ISSN：0037－3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

Vol. 32 (No. 1), 1993

平成 5 年 10 月

神経化学

第36回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 36th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　大阪

10月25日(月), 10月26日(火), 10月27日(水)

Vol. 32 (No. 1), 1993

日本神経化学会

編集委員（ABC順）

馬場明道	（大阪大・薬・薬理）
福井裕行	（大阪大・医・薬理２）
播口史朗	（大阪大・医・精神）
畠中寛	（大阪大・蛋白研）
早川徹	（大阪大・医・脳外）
樋口宗史	（大阪大・医・薬理１）
松田敏夫	（大阪大・薬・薬理）
西村健	（大阪大・医・精神）
大西博	（大阪大・医・神経）
祖父江憲治	（大阪大・医・バイオメディカル）
種子田護	（大阪大・医・脳外）
山上栄	（大阪大・医・神経）
大和谷厚	（大阪大・医・分子生理化学）
三木直正（代表）	（大阪大・医・薬理１）

目　　次

1．神経成長因子反応エレメント結合蛋白質の性質と組織分布…… 30
樋口宗史、金　哲熙、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

2．NGFとEGFのras活性化シグナル伝達機構の解析…… 32
橋本裕子、服部成介、中村　俊
（国立精神神経セ・神経研・診断研究）

3．前脳基底野コリン作動性ニューロンのNGFとBDNF応答性には空間的相違がある…… 34
野々村健、小島正己、西尾チカ、畠中　寛
（大阪大・蛋白質研・生合成）

4．中枢GABAニューロン様細胞株の細胞死 …… 36
久永欣哉[1]、呉　繁夫[2]、池田康夫[1]、高坂新一[1]
（国立精神神経セ・神経研・代謝[1]、東北大・医・病態代謝[2]）

5．培養グリア細胞と神経細胞からのサイトカイン受容体の発現…… 38
伊藤康宏[1]、澤田　誠[1]、錫村明生[2]、丸野内棣[1]
（藤田保衛大・医・総医研・応用細胞[1]、神経内科[2]）

6．Neuron-glia interactionと成長抑制因子（GIF）…… 40
内田洋子[1]、大塚成人[2]、井原康夫[3]
（都老人研・神経病理[1]、東京大・医・病理[2]、脳研・病理[3]）

7．c-MYCタンパク質によるイノシトールリン脂質情報伝達系の制御の可能性…… 42
堀越哲郎[1]、高橋　恵[2]、豊島　聰[3]、吉岡　亨[4]
（東海大・開発工・生物工[1]、横浜市大・医・精神[2]、JT基礎研[3]、早稲田大・人間科学[4]）

8．マウス脳核画分における神経分化特異的蛋白質necdinの性質 …… 44
丸山悦子、吉川和明
（都神経研・分子神経生物）

9．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 …… 46
山田真久[1・3]、中尾純治[2]、鹿川哲史[3]、御子柴克彦[4]、池中一裕[3]
（大阪大・蛋白質研[1]、慶應大・医[2]、岡崎生理研[3]、東京大・医科研[4]）

10. グリア分化因子としてのミエリンプロテオリピド蛋白質の機能解析
－トランスジェニックマウスの系を用いて－…… 48
鹿川哲史[1]、池中一裕[1]、井上芳郎[2]、御子柴克彦[3]
（岡崎生理研[1]、北海道大・医・第一解剖[2]、東京大・医科研[3]）

11. バフィロマイシンA_1によるPC12細胞の突起伸展機構の解析 …… 50
割谷孝貴、能登政彦、木下邦則、大熊勝治
（金沢大・薬・生化）

12. ラット胎仔における脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの局在とその機能…… 52
仙波りつ子[1]、渡辺英治[1]、前田信明[2]、大平敦彦[1]
（愛知県コロニー・研[1]、基礎生物学研[2]）

13. 橋由来拡散性物質による大脳皮質軸索での側枝形成の誘導…… 54
佐藤　真[1]、Dennis D.M, O'Leary [2]
（大阪大・医・第二解剖[1]、The Salk Institute、USA[2]）

14. 培養交感神経細胞の神経伝達物質選択に対するレチノイン酸の作用…… 56
小林三和子、松岡一郎、栗原堅三
（北海道大・薬・薬剤）

15. ヒト赤芽球細胞におけるIsoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase cDNAの配列決定…… 58
武田良平[1]、溝渕睦彦[1]、村尾孝児[2]、佐藤　誠[2]、柿本泰男[1]
（愛媛大・医・神経精神[1]、香川医大・第一内科[2]）

16. TRE配列に対する親和力の異なる脳内転写制御因子AP１の検出…… 60
米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

17. 脳内転写制御因子Myc結合活性の調節 …… 62
荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

18. マウス小脳に存在するモルヒネ感受性１本鎖CRE結合蛋白質（ssCRE-BP）の性質と精製…… 64
大杉　武、青木義矢、池本光志、田中秀和、王　小兵、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

19. E１マウス脳におけるFosと異常可塑性の関連性について …… 66
勝元栄一、横谷　昇、撫井弘二、大西　博、山上　榮
（大阪市大・医・神経精神）

20. ALDH 2のgenotypeの簡便な決定とアルコール依存症の特徴について…… 68
中村和彦[1]、岩橋和彦[1]、松尾義則[2]、洲脇　寛[1]、市川佳幸[2]、
細川　清[3]、市川正浩[4]、三船和史[5]
（香川医大・精神神経[1]、生化学[2]、附属病院[3]、三光病院[4]、三船病院[5]）

21. ドーパミントランスポーター遺伝子多型と精神神経疾患…… 70
佐野　輝[1]、近藤啓次[1]、柿本泰男[1]、近藤郁子[2]、服部優子[3]、水野美邦[3]
（愛媛大・医・神経精神[1]、衛生[2]、順天堂大・医・神経内科[3]）

22. パーキンソン病態モデルラット線条体シナプス膜におけるドパミンアゴニストのG蛋白質活性化の増強作用とドパミン受容体遺伝子発現…… 72
井上敦子[1,2]、仲田義啓[2]、植田弘師[1]、三須良実[1]
（横浜市大・医・薬理[1]、広島大・医・総合薬学科・薬効解析科学[2]）

23. 運動ニューロン疾患におけるモーター蛋白質の変動…… 74
豊島　至、小松眞史、正宗　研
（秋田大・医・第一内科）

24. ヒトリンパ球におけるドーパミンD_3、D_5受容体の発現と新しいD_3異型体の転写 …… 76
永井義隆、佐伯良修、上野　聡
（大阪大・医・神経内科）

25. 短時間脳虚血によるCa^{2+}／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの減少 …… 78
山本秀幸[1,2]、福永浩司[1]、Kevin Lee[3]、宮本英七[1]、Thomas R.Soderling[2]
（熊本大・医・第一薬理[1]、オレゴン医大[2]、ヴァージニア大[3]）

26. ラット中大脳動脈閉塞モデルにおけるbFGF mRNAと蛋白発現の経時的変化の検討…… 80
大槻秀夫[1]、山田和雄[1]、藤田真幸[2]、甲村英二[1]、湯口貴導[1]、種子田護[1]、早川　徹[1]
（大阪大・医・脳神経外科[1]、病理病態[2]）

27. 砂ネズミ脳虚血におけるRyanodine受容体の変化に関する研究 …… 82
野崎博之[1]、田中耕太郎[1]、五味愼太郎[2]、美原　盤[3]、白井俊孝[1]、野川　茂[1]、
永田栄一郎[1]、福内靖男[1]、桑島吾郎[4]、御子柴克彦[5]
（慶應大・医・神経内科[1]、大田原赤十字病院・神経内科[2]、
脳血管研・美原記念病院[3]、シオノギ研[4]、東京大・医科研・化学[5]）

28. 分化ヒトニューロブラストーマにおけるcolchicine誘発神経細胞死…… 84
八木－中川勇三
（雪印・生物化学研・神経化学）

29. ラット海馬神経細胞培養系におけるカイニン酸神経細胞毒性…… 86
山口時男、大野和茂、小原厚行
（山之内製薬㈱・第一創薬研）

30. グルタミン酸誘発神経細胞死とphospholipase C-delta免疫活性の増大 …… 88
下濱　俊[1]、田村　豊[2]、赤池昭紀[2]、松島秀行[1]、竹縄忠臣[3]、本間　好[4]、木村　淳[1]
（京都大・医・神経内科[1]、福山大・薬・神経薬理[2]、
東京大・医科研・癌生物[3]、都老人研・生体情報[4]）

31. 酸化的ストレスと神経細胞死－C6グリオーマ細胞におけるグルタミン酸毒性を中心として－… 90
馬渡一浩[1]、安井裕子[2]、石田外樹[2]、加藤　聖[2]
（金沢大・医療短大・衛生技術[1]、金沢大・医・神経情報研伝達[2]）

32. 脳NOシンターゼにおける〔3H〕N^G-Nitro-L-Arginine結合の性質 …… 92
来山義則、北村佳久、桐山賀充、野村靖幸
（北海道大・薬・薬効）

33. ラット脳グリア細胞におけるNOシンターゼ誘導機構 …… 94
北村佳久[1]、来山義則[1]、桐山賀充[1]、江角浩安[2]、野村靖幸[1]
（北海道大・薬・薬効[1]、国立がんセ[2]）

34. 生後ラット中枢コリン作動性ニューロンのプログラム細胞死…… 96
中村桃子、西尾チカ、野々村健、畠中　寛
（大阪大・蛋白質研・生合成）

35. Caイオノフォアによる中枢神経細胞のアポトーシス …… 98
武井延之、遠藤泰久
（京都工繊大・応用生物）

36. 抗Fas抗体による培養グリオーマ細胞のapoptosis誘導 …… 100
白石哲也、中川摂子、木原俊壱、田渕和雄
（佐賀医大・脳神経外科）

37. アルツハイマー病脳におけるクラスリンの分布異常…… 102
中村　祐[1・2]、武田雅俊[1]、吉見健二[3]、服部英幸[4]、関　浅男[2]、
大嶋正人[2]、播口之朗[1]、橋本重夫[5]、北嶋省吾[2]、西村　健[1]
（大阪大・医・精神[1]、日生病院[2]、三共㈱[3]、美原病院[4]、近畿大・医・第二病理[5]）

38. シナプスにおけるアミロイド前駆体蛋白の局在に関する検討…… 104
下川雅丈[1]、柳澤勝彦[1]、西江　弘[2]、宮武　正[1]
（東京医科歯科大・医・神経内科[1]、順天堂大・医・第二生理[2]）

39. アミロイド前駆体蛋白の蓄積に関連する蛋白の検索
－イボテン酸によるラット海馬破壊部位において－…… 106
新川久義[1,2]、武田雅俊[1]、中村　祐[1,3]、迫田慎一郎[1]、播口之朗[1]、北嶋省吾[3]、西村　健[1]
（大阪大・医・精神[1]、狭山病院[2]、日生病院[3]）

40. βアミロイドペプチドの二次構造とミトコンドリア機能低下活性との関係…… 108
亀之園正弘[1]、桜庭祐子[1]、山田紀子[1]、堤　信也[2]、木下　武[2]、金子　勲[1]
（三共㈱バイオサイエンス研[1]、分析代謝研[2]）

41. PHF-tauおよび胎児型tauの*in vitro*微小管重合促進能 …… 110
吉田裕孝、井原康夫
（東京大・医・脳研病理）

42. タウは生体内でproline-directed protein kinase（PDPK）の基質である …… 112
渡辺　淳[1,2]、長谷川成人[1]、鈴木政美[3]、瀧尾攩士[4]、森島真帆[1]、
千谷晃一[3]、新井孝夫[2]、井原康夫[1]
（東京大・医・脳研病理[1]、東京理科大・応用生物[2]、藤田保衛大・総医研[3]、
理化学研・生体分子解析[4]）

43. 微小管結合タンパク質タウの最C末端領域の多様性　－mRNAレベルでの検討－ …… 114
沢　　明[1,2]、小山文隆[1]、松下正明[2]、千谷晃一[3]、井原康夫[1]
（東京大・医・脳研病理[1]、精神[2]、藤田保衛大・総医研[3]）

44. ラット神経成長抑制因子(GIF)の抗体作製と実験的頭部外傷ラットにおける発現動態について… 116
保住　功[1]、犬塚　貴[1]、平岩雅男[2]、内田洋子[3]、姉崎利治[1]、
石黒英明[1]、小林　央[4]、宇田　裕[2]、宮武　正[4]、辻　省次[1]
（新潟大・脳研・神経内科[1]、新潟薬大・衛生化学[2]、
都老人研・神経病理[3]、東京医科歯科大・医・神経内科[4]）

45. 線維芽細胞増殖因子による学習記憶の促進効果と老化による脳の記憶力低下の防止…… 118
大村　裕[1]、今井秀樹[1]、佐々木和男[2]、李　愛軍[3]、木村　宏[4]、遠山育夫[4]、
花井一光[4]、矢内原昇[5]、北村佳久[6]、野村靖幸[6]
（日本臓器製薬・生物活性科学研[1]、富山大・工[2]、九州大・医[3]、
滋賀医大[4]、静岡大・薬[5]、北海道大・薬[6]）

46. 断頭後の脳CaMキナーゼⅡαサブユニットのトランスロケーション（Ⅱ）…… 120
鈴木龍雄、野路久仁子、田中　亮
（名古屋市大・医・第一生化）

47. 開口放出のツーステップ・モデルにおけるミオシン軽鎖キナーゼの役割…… 122
笹木君仁[1]、今泉美佳[1]、櫻井　隆[2]、松田　譲[3]、野々村禎昭[2]、熊倉鴻之助[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[3]）

48. ラット大脳の発達過程におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの基質タンパク質の動態 …… 124
杉浦弘子[1]、山内　卓[2]
（都神経研[1]、徳島大・薬[2]）

49. ラット脳内ヒスタミン神経系に共存するGABAの遊離 …… 126
山本由美子[1]、望月貴年[2]、望月　薫[2]、堀井　新[3]、東　　均[4]、大和谷厚[1]
（大阪大・医・分子生理化学[1]、第二薬理[2]、耳鼻科[3]、精神科[4]）

50. 脳シナプス前末端に存在するrab3A、SNAP-25、VAMP-2およびsyntaxins複合体 …… 128
堀川　洋、西須英雄、石塚　徹、関根陽子、阿部輝雄
（新潟大・脳研）

51. 中枢神経系における神経伝達物質の遊離とP－タイプカルシウムチャンネルの連関…… 130
木村真奈美、花田敬久、加賀谷孝樹、山西嘉晴、寺本哲之、
澤田光平、片山幸一、西沢幸夫
（エーザイ㈱筑波研）

52. グリオスタチンの神経栄養因子活性とアストロサイト分化誘導因子活性…… 132
植木孝俊、中西圭子、大河内由香、浅井清文、加藤泰治
（名古屋市大・医・分子医学研・生体制御）

53. PC12h-R細胞は上皮増殖因子（EGF）に応答して神経細胞様に分化する…… 134
山田雅司、池内俊彦、畠中　寛
（大阪大・蛋白質研・生合成）

54. ニューロン細胞膜上のプラスミノーゲン結合蛋白の同定…… 136
中嶋一行[1]、浜之上誠[1]、竹本なぎさ[1]、加藤兼房[2]、高坂新一[1]
（国立精神神経セ・神経研・代謝[1]、愛知県コロニー・発障研・生化[2]）

55. 加齢によるラット組織内HCNPとその類似体の変動 …… 138
小鹿幸生、松川則之、大塚康史、三竹重久、片田栄一
（名古屋市大・医・第二内科）

56. HCNP Processing Enzymeの物理的、化学的性質 …… 140
大塚康史、小鹿幸生、三竹重久、片田栄一、松川則之
（名古屋市大・医・第二内科）

57. 神経突起伸展因子受容体の構造と性質について…… 142
平　英一、高羽夏樹、郭　哲輝、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

58. β－アミロイドペプチド（25－35）によるアポトーシス様の神経細胞死とIGF－Ⅱまたは血清添加による抑制 …… 144
高寺恒雄、毛利哲郎
（北陸大・薬・創薬研）

59. 培養神経細胞におけるβ－アミロイド蛋白による神経細胞死…… 146
上田恵一、福井義弘、蔭山宏康
（塩野義製薬研）

60. βアミロイドペプチドによるミトコンドリア機能（MTT還元能）の特異的低下作用について … 148
金子　勲、亀之園正弘、桜庭祐子、山田紀子
（三共㈱バイオサイエンス研）

61. 神経細胞株におけるアミロイドβ蛋白の生成について　－APP遺伝子導入による検討－ …… 150
荒木　亘、国下龍英、池田幸弥、高橋慶吉、田平　武
（国立精神神経セ・神経研・疾病）

62. アミロイド蛋白脳室内投与によるアルツハイマー型老年期痴呆症モデル動物の作製
－学習記憶およびコリン作動性神経に対する影響－…… 152
新田淳美、伊東亜紀雄、鍋島俊隆
（名古屋大・医・医療薬学・薬剤）

63. マウス神経系発生過程における核蛋白質NECDIN mRNAの発現 …… 154
高城啓一、吉川和明
（都神経研・分子神経生物）

64. 小脳の形成過程で発現調節されるタンパク質nuclein（Ｖ－２）の組織内局在と発現様式 …… 156
松岡邦枝[1]、篠田友孝[1]、田岡万悟[2]、山国　徹[2]、宋　時栄[2]、礒辺俊明[1]
（都立大・理・化学[1]、三菱化成・生命研[2]）

65. 神経分化に関与する新規因子TA20のcDNAクローニングおよびその機能の検討…… 158
東田千尋、東田道久、野村靖幸
（北海道大学・薬・薬効）

66. 大脳新皮質マージナルゾーンに対するモノクローン抗体を用いた皮質発生の解析…… 160
石井加代子、植村慶一
（慶應義塾大・医・生理）

67. 神経細胞の分化と軸索走行を制御するEGFモチーフを持つ新しい分泌性因子・*strawberry*遺伝子産物…… 162
岡野栄之、沢本和延、吉川真悟、御子柴克彦
（東京大・医科研・化学）

68. ニューロカルシン（Neurocalcin）－神経系に特異的分布を示すカルシウム結合蛋白質－…… 164
岡崎勝男[1]、井上繁雄[1]、飯野　哲[2]、小林　繁[2]、日高弘義[1]
（名古屋大・医・薬理[1]、第一解剖[2]）

69. 成熟ラット脳における主要ガングリオシドの免疫組織化学的局在…… 166
小谷政晴[1]、川島育夫[1]、小沢秀樹[1]、小倉　潔[1]、寺島俊雄[2]、田井　直[1]
（都臨床研・腫瘍免疫[1]、解剖[2]）

70. ラット神経系の抗HCNP抗体による免疫組織化学（第二報）…… 168
三竹重久[1]、片田栄一[1]、松川則之[1]、大塚康史[1]、小鹿幸生[1]、藤森　修[2]
（名古屋市大・医・第二内科[1]、第二解剖[2]）

71. 抗HCNP抗体による11日齢Wistar系ラット一般臓器の免疫組織化学的検討…… 170
片田栄一[1]、三竹重久[1]、松川則之[1]、大塚康史[1]、小鹿幸生[1]、藤森　修[2]
（名古屋市大・医・第二内科[1]、第二解剖[2]）

72. IL－4によるミクログリアの増殖、活性化とMHC抗原誘導の抑制…… 172
錫村明生[1]、澤田　誠[2]、丸野内棣[2]、山本纊子[1]
（藤田保衛大・神経内科[1]、総医研・応用細胞[2]）

73. 脳内でのCD14の役割とミクログリアの休止化にともなう発現の変動…… 174
澤田　誠[1]、錫村明生[2]、丸野内棣[1]
（藤田保衛大・総医研・応用細胞[1]、神経内科[2]）

74. Guillain-Barré症候群を惹起する細菌のリポ多糖はGM1ガングリオシド様構造を有する…… 176
結城伸泰[1]、宮武　正[1]、瀧　孝雄[2]、飯田静夫[2]、笠間健嗣[3]、高橋正樹[4]、
斉藤香彦[4]、稲垣冬彦[5]
（東京医科歯科大・医・神経内科[1]、分子医化学[2]、機器分析[3]、
都立衛生研・微生物[4]、東京都臨床医学総合研[5]）

75. ヒト末梢神経ガングリオシドと抗ガングリオシド抗体の反応性…… 178
太田雪子[1]、後藤希代子[1]、黒谷篤之[1]、阿部敏明[1]、長嶋和郎[2]
（帝京大・医・小児[1]、北海道大・医・病理[2]）

76. γ線照射によるマウス小脳原基のアポトーシスと組織トランスグルタミナーゼの変動…… 180
田丸政男[1]、井上　稔[2]、新井正一[3]、安藤正人[4]、永田　豊[4]
（鈴鹿医療科学技術大・医用情報[1]、放射線技術[3]、名古屋大・環研[2]、藤田保衛大・医・生理[4]）

77. 神経成長因子（NGF）によるetoposide誘発PC12細胞死の抑制…… 182
中島光業[1]、柏木久美子[1]、古川昭栄[2]、林　恭三[2]、川島拓司[1]、林要喜知[1]
（森永乳業・生科研[1]、岐阜薬大・分子生物[2]）

78. 小脳granule細胞死を抑える脱分極シグナルによるチロシンリン酸化…… 184
小池達郎、田中秀逸
（佐賀医大・化学）

79. 高酸素負荷による培養中枢ニューロン死の生化学的および形態学的性質について…… 186
榎戸　靖[1]、久保武一[1]、市川真澄[2]、畠中　寛[1]
（大阪大・蛋白質研・生合成[1]、都神経研・解剖発生[2]）

80. 遅発性神経細胞壊死の病態生理にApoptosisが関与 …… 188
－砂ネズミ一過性前脳虚血後の海馬でのDNA fragmentationの観察－
松本昌泰[1・2]、岡本昌也[1]、田口明彦[1]、大槻俊輔[1]、北川一夫[1]、小川　智[1]、
上田周一[2]、御子柴克彦[3]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
（大阪大・医・第一内科[1]、神経内科[2]、東京大・医科研[3]）

81. 脳虚血によるスナネズミ脳内転写制御因子の変動 …… 190
米田幸雄[1]、荻田喜代一[1]、三谷　章[2]、片岡喜由[2]
（摂南大・薬・薬理[1]、愛媛大・医・第一生理[2]）

82. Pertussis toxin処理による、PC 12細胞からのドパミン放出過程に於けるCa^{2+}感受性の亢進… 192
小泉修一、井上和秀
（国立衛生試験所・薬理）

83. ジギトニンで透過性にした副腎クロマフィン細胞からの開口分泌におけるカルモデュリンの関与 … 194
松田守弘、岡部登志男、杉本　央
（大阪大・微生物病研・抗酸菌生理）

84. シンタキシンのアイソフォームの性質 …… 196
根本康夫[1]、伊藤朋子[1]、笠井陽子[1]、西木禎一[2]、小崎俊司[2]、高橋正身[1]
（三菱化成生命研[1]、大阪府大・農[2]）

85. 神経系特異的カルモジュリン結合蛋白質NAP－22のシナプス前部への局在 …… 198
前川昌平[1・2]、中村　俊[2]
（東京大・理・生化[1]、国立精神神経セ・神経・診断[2]）

86. リチウムのラット脳内リン代謝産物に及ぼす影響－高分解能^{31}P-NMRスペクトロスコピーを用いた研究－…… 200
今福　淳[1]、Pettegrew J.W.[2]
（聖マリアンナ医大・神経精神[1]、ピッツバーグ大・精神[2]）

87. ヒト死後脳における内在性遊離型D－アスパラギン酸とD－セリンの発達及び加齢に伴う変化… 202
橋本篤司[1・2]、西川　徹[2]、熊代　新[2]、岡　高恵[2]、水戸　敬[2]、高嶋幸男[2]、高橋清久[2]
（新技術事業団[1]、国立精神神経セ[2]）

88. 培養アストロサイトにおけるグルタミン酸受容体刺激によるCaMキナーゼⅡの活性化反応と中間径フィラメントのリン酸化反応…… 204
矢野茂敏[1・2]、福永浩司[1]、生塩之敬[2]、宮本英七[1]
（熊本大・医・第一薬理[1]、脳神経外科[2]）

89. NMDA受容体の分子的多様性と機能 …… 206
崎村建司[1]、森　寿[1]、目黒裕之[1]、轡田達也[1]、柏渕信子[1]、池田和隆[1]、永沢道明[1]、荒木一明[1]、櫛谷悦子[1]、山倉智宏[1]、柾木　永[1]、渡辺雅彦[2]、三品昌美[1]
（新潟大・脳研・神経薬理[1]、北海道大・医・第一解剖[2]）

90. $GABA_B$受容体に特異的なモノクローナル抗体のアンタゴニスト作用について…… 208
中安博司[1]、木村　宏[2]、栗山欣弥[1]
（京都府立医大・薬理[1]、滋賀医大・分子神経セ[2]）

91. ラット培養海馬細胞におけるATP受容体を介するシナプス伝達の存在 …… 210
井上和秀、中沢憲一、小泉修一、綿野智一
（国立衛生試験所・薬理）

92. ATPによるラット線条体dopamine放出機序…… 212
張　玉祥、山下拓史、中村重信
（広島大・医・第三内科）

93. 脳室脈絡膜及び眼球毛様突起に特異的に発現するラット脳エクト型ホスホジエステラーゼⅠのcDNAクローニング …… 214
成田正明、佐野公彦、中村　肇
（神戸大・医・小児）

94. ATP感受性K^+チャネルオープナー、ニコランジールの線条体ドパミン放出に及ぼす影響…… 216
田中隆彦、吉田真美、横尾秀康、溝口克弘、江本浩幸、石井秀夫、古賀千尋、田中正敏
（久留米大・医・薬理）

95. 側坐核Dopamine遊離に及ぼすBenzodiazepine受容体AgonistおよびInverse-agonistの効果… 218
富山勝則[1]、村井為敦[2]、越川憲明[1]、小林雅文[1]
（日本大・歯・薬理[1]、歯科麻酔[2]）

96. amantadineによるdopamine放出機序…… 220
高橋哲也、山下拓史、張　玉祥、北村　健、鳥居　剛、中村重信
（広島大・医・第三内科）

97. NBQX投与がラット線条体の細胞外ドパミンにおよぼす影響 …… 222
坂井研一[1]、土田和生[2]、氏家　寛[2]、柏原健一[1]、秋山一文[2]、黒田重利[2]
（岡山大・医・神経内科[1]、精神神経[2]）

98. nicotineのdopamine uptakeに対する影響…… 224
山下拓史[1]、高橋哲也[1]、張　玉祥[1]、北山滋雄[2]、土肥敏博[2]、川上秀史[1]、中村重信[1]
（広島大・医・第三内科[1]、歯・薬理[2]）

99. 多重標識オートラジオグラフィー法によるヒスタミンH_3受容体とドパミンD_1、D_2受容体の局在分布解析…… 226
柳　鍾薫[1]、谷内一彦[1]、岩田　錬[2]、井戸達雄[2]、渡邊建彦[1]
（東北大・医・第一薬理[1]、サイクロトロンRIセ[2]）

100. 再構成系におけるラットアストロサイト由来細胞骨格間相互作用－マイクロフィラメントによるグリアフィラメントの重合促進－…… 228
伊藤仁一、増田真理、田中　亮
（名古屋市大・医・第一生化）

101. ニューロフィラメントH鎖キナーゼは脳のcdc 2関連キナーゼcdk 5か？…… 230
久永真市[1]、石黒幸一[2]、内田庸子[2]、岸本健雄[1]
（東工大・生命理工[1]、三菱化成生命研[2]）

102. 培養神経細胞における突起形成と微小管安定化…… 232
関本澄人、田代朋子、小宮義璋
（群馬大・医・分子病態）

103. 神経成長円錐のCa^{2+}感受性アクチン結合蛋白質 －カルデスモンとゲルゾリン－…… 234
田中潤也、吉良正浩、祖父江憲治
（大阪大・医・バイオメディカル教育研究セ・神経生化）

104. ラットドレブリンのアクチン結合部位の解析…… 236
白尾智明[1]、石川良樹[2]、林　謙介[1]、小林　聡[1]
（群馬大・医・行動分析[1]、薬理[2]）

105. 脳におけるアネキシンVI結合蛋白質…… 238
乾　　誠、渡辺達夫、伊賀正英、祖父江憲治
（大阪大・医・バイオメディカル教育研究セ・神経生化）

106. 中枢神経回路網障害の構造・機能修復を*in vitro*で解析する系の開発…… 240
黒田洋一郎[1]、藤井　聡[2]、川原正博[1]、小林和夫[1]、村本和世[1]
（都神経研・神経生化[1]、杏林大・医・生化[2]）

107. 海馬長期増強に伴うCaMキナーゼIIの活性化反応…… 242
福永浩司[1]、L.Stoppini[2]、D.Muller[2]、宮本英七[1]
（熊本大・医・第一薬理[1]、ジュネーブ大・医・薬理[2]）

108. 神経ペプチドプロセシング酵素の軸索内輸送と生理機能…… 244
加藤　武
（横浜市大大学院・総合理学・分子認識）

109. 培養アストログリアNa^{+}-Ca^{2+}交換系－その存在とK^{+}よる調節－…… 246
田熊一浩、松田敏夫、橋本　均、浅野省一、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

110. ストレスとHSP28／27の重合型と解離型：グリオーマ細胞およびラット組織での解析 …… 248
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）

111. 低分子量ストレス蛋白質複合体の燐酸化による解離…… 250
加藤兼房、長谷川かおり、後藤幸代、稲熊　裕
（愛知県コロニー・発障研・生化）

112. シナプトタグミンを欠失したPC12細胞へのコリンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の導入とアセチルコリンの放出 …… 252
笠井陽子[1]、吉田　明[2]、三澤日出巳[3]、高橋正身[1]
（三菱化成生命科学研[1]、早稲田大・人総研[2]、都神経研[3]）

113. Achatin－Ⅰの神経修飾作用…… 254
劉　国君、Santos, Divina E.、Emaduddin, Muhammad.、
荒木陽子、竹内　宏
（岐阜大・医・第一生理）

114. ラットκオピオイド受容体cDNAのクローニング…… 256
南　雅文[1]、佐藤公道[2]
（京都大・薬・薬理[1]、分子作用制御[2]）

115. 脳内カテコールアミンとインドールアミン代謝の相互作用…… 258
丸山和佳子[1]、太田深雪[2]、高橋　勤[3]、直井　信[4]
（名古屋大・医・神経内科[1]、岐阜県立多治見病院・精神科[2]、江南女子短大[3]、名古屋工大[4]）

116. NADPサイクリングを用いる一酸化窒素合成酵素（NOS）の微量測定法 …… 260
王　瑋[1]、井上順雄[1]、中山　孝[1]、加藤尚彦[1]、石井當男[2]
（横浜市大・医・第一生化[1]、第二内科[2]）

117. ノルエピネフリン刺激による白鼠上頸部交感神経節内一酸化窒素依存性cyclic GMP生成系とその細胞局在性…… 262
安藤正人、立岔延族、永田　豊
（藤田保衛大・医・生理）

118. ラット線条体プロテインキナーゼCのメタンフェタミン投与に伴う変化 …… 264
田口淳一、井端泰彦
（京都府立医大・第二解剖）

119. 小脳顆粒細胞転写制御系におけるグルタミン酸応答性とその調節系の解析…… 266
津田正明
（岡山大・薬・微生物）

120. 自己チオリン酸化によるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの自己活性化について… 268
石田敦彦、木谷隆子、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化）

121. プロテインキナーゼC各アイソザイムの機能的役割分担について
— RBL－2H3細胞を用いた検討 —…… 270
小澤光一郎[1]、Michael A.Beaven[2]
（広島大・医・総合薬・薬品分析化学[1]、Lab. Chem. Pharmacol.•NHLBI•NIH[2]）

122. ヒスタミンH_1受容体脱感作機構のリン酸化酵素阻害剤による検討 …… 272
堀尾嘉幸[1]、劉　業奇[1]、伊藤誠二[2]、福井裕行[1]
（大阪大・医・第二薬理[1]、大阪バイオサイエンス研[2]）

123. プロスタグランジンD合成酵素の脳軟膜・脈絡叢における発現及び脳脊髄液への分泌…… 274
裏出良博[1]、北浜邦夫[2]、大石　仁[3]、金子武嗣[3]、水野　昇[3]、
鈴木登志子[4]、渡部紀久子[4]、早石　修[4]
（日本チバガイギー国際研[1]、INSERN[2]、京大・医・脳形態[3]、大阪バイオサイエンス研[4]）

124. ESR-CTシステムによるラット脳の2-(14-carboxypropyl)-2-ethyl-4、4-dimethyl-3-oxazolidinyloxyの画像について …… 276
平松　緑[1]、小松真紀子[1]、及川和夫[2]、劉　健康[3]、鎌田　仁[1]
（山形県テクノポリス財団・生物ラジカル研[1]、山形県工業技術セ[2]、
岡山大・医・分子細胞医学・神経情報[3]）

125. 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体 －Ⅲ新生仔期6－OHDA投与ラットのドーパミンD_1受容体の変動：[3H]SCH-23390を用いたレセプターオートラジオグラフィー－… 278
岡村　均[1]、横山ちひろ[2]、井端泰彦[1]
（京都府立医大・第二解剖[1]、精神[2]）

126. 抗てんかん薬の代謝と神経系への副作用…… 280
岩崎和彦[1]、中村和彦[1]、高城健司[1]、久郷敏明[1]、松尾義則[2]、
早原敏之[4]、細川　清[3]、洲脇　寛[1]
（香川医大・精神[1]、生化[2]、附属病院[3]、国立療養所南岡山病院・臨床[4]）

127. E 1マウス発達過程における脳内SOD活性の変化に及ぼすアロプリノールの効果と抗けいれん作用発現機序…… 282
村島善也[1]、多田博史[2]、笠茂公弘[3]、篠崎たき子[1]、中本百合江[1]、諸岡啓一[4]、鈴木二郎[5]
（東京都精神研[1]、国立療養所・千石荘病院[2]、日大・医・精神神経[3]、東邦大・医・第一小児科[4]、精神神経[5]）

128. セルレチドのてんかん準備性獲得におよぼす抑制効果…… 284
板野俊文[1]、宮本 修[2]、岡田泰士[3]、根木哲朗[2]、村上哲英[3]、畠瀬 修[1]
（香川医大・生理[1]、基礎スポーツ医学[2]、生物[3]）

129. パーキンソン病態モデルラットの線条体アセチルコリン作動性神経におけるドーパミンD_1およびD_2受容体のアップレギュレーション …… 286
佐藤和夫[1,2]、奥村福一郎[2]、植田弘師[1]、三須良実[1]
（横浜市大・医・薬理[1]、麻酔科[2]）

130. メタンフェタミン慢性投与後におけるマウス線条体3MT代謝の変化とセロトニン神経系の関与…… 288
盛政忠臣、金行孝雄、上村尚人、庄盛敏廉
（岡山大・医・神経内科）

131. 新しい抗精神病薬OPC14597のドーパミン遊離に対する影響…… 290
仙波純一[1]、渡辺明子[2]、鬼頭昭三[1]、融 道男[2]
（放送大・教養[1]、東京医科歯科大・医・神経精神[2]）

132. 脳虚血急性期における血管作動性物質の経時的変動とその臨床応用…… 292
水島秀勝[1]、佐々木健[1]、荒井好範[1]、嶋津基彦[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]）

133. 脳虚血による低分子ストレス蛋白(HSP27およびαBクリスタリン)の誘導と虚血耐性との相関… 294
加藤宏之[1]、劉 勇[1]、糸山泰人[1]、小暮久也[2]、加藤兼房[3]
（東北大・医・神経内科[1]、神経病理研[2]、愛知県コロニー生化[3]）

134. 脳虚血による海馬コリン神経機能低下に対するペントバルビタールの効果－組織学的および機能的評価における相違－…… 296
石丸裕久、高橋 章、五十嵐康、丸山悠司
（群馬大・医・神経精神薬理（ツムラ））

135. 一過性前脳虚血時におけるLeukotriene C 4の動態と神経細胞障害との関係 …… 298
松本昌泰[1]、大槻俊輔[1]、鎌田武信[1]、林 陽子[2]、山本尚三[2]
（大阪大・医・第一内科[1]、徳島大・医・生化[2]）

136. 慢性脳血流低下モデル動物の行動・脳内モノアミン代謝からみた脳代謝賦活薬の効果…… 300
車谷隆宏、武田雅俊、工藤　喬、谷向　知、新川久義、
服部英幸、播口之朗、西村　健
（大阪大・医・精神）

137. カイニン酸による培養アストロサイトのタウリン遊離作用…… 302
田中康一、小山　豊、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

138. 虚血性細胞障害、記憶障害における細胞内情報伝達系酵素活性の関与と治療法について…… 304
石川敏三[1]、脊戸山景子[1]、仲西　修[2]、前川剛志[3]、坂部武史[1]
（山口大・医・麻酔蘇生[1]、九州歯大・歯科麻酔[2]、山口大・医・付属病院総合診療[3]）

139. ベラトリジンによるNa^+チャンネルを介した神経栄養因子除去後のラット上頸神経節細胞の細胞死の抑制…… 306
田中秀逸、小池達郎
（佐賀医大・化学）

140. 高用量のmethamphetamine投与によるdopamineおよびserotonin神経系への神経毒性効果とグルタミン酸放出との関係について…… 308
安部川智浩、大森哲郎、小山　司
（北海道大・医・精神）

141. E１マウスの脳内グルタメイトレセプター結合能…… 310
荻田喜代一[1]、榎本理世[2]、加太英明[3]、森　昭胤[3]、米田幸雄[1]
（摂南大・薬・薬理[1]、現・神戸学院大・薬・薬理[2]、岡山大・医・分子細胞医学研[3]）

142. 自然発症高血圧ラット脳内細胞骨格蛋白mRNAの一過性脳虚血後の代償性変化 …… 312
浅沼幹人[1]、西林佐紀子[1]、近藤洋一[1・2]、平田　洋[1・2]、小川紀雄[1]、森　昭胤[1]
（岡山大・医・分子細胞医学研・神経情報学[1]、第三内科[2]）

143. 局所脳虚血におけるNOS活性の組織化学的観察 …… 314
荒井好範[1]、水島秀勝[1]、嶋津基彦[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]）

144. ラット一過性脳虚血モデル慢性期の脳内鉄沈着について…… 316
近藤洋一[1・2]、西林佐紀子[1]、田中健一[1]、浅沼幹人[1]、平田　洋[1・2]、
小川紀雄[1]、森　昭胤[1]
（岡山大・医・分子細胞医学研・神経情報[1]、第三内科[2]）

145. 低酸素低グルコース処理による培養海馬アストロサイトからの興奮性アミノ酸放出のメカニズム…… 318
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・第一生理[1]・整形外科[2]）

146. 脳虚血の蛋白チロシンリン酸化に対するの影響1　－pp42のチロシン残基リン酸化亢進－ …… 320
大槻俊輔[1]、松本昌泰[1・2]、松下幸司[1]、萬代研二[1]、北川一夫[1]、
小川　智[1]、上田周一[2]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
（大阪大・医・第一内科[1]、神経内科[2]）

147. 脳虚血の蛋白チロシンリン酸化に対するの影響2　－遅発性神経細胞壊死との関わり－ …… 322
大槻俊輔[1]、松本昌泰[1・2]、松下幸司[1]、萬代研二[1]、北川一夫[1]、小川　智[1]、
上田周一[2]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
（大阪大・医・第一内科[1]、神経内科[2]）

148. 脳虚血の蛋白チロシンリン酸化への影響3　－pp60^{c-src}のチロシンキナーゼ活性の遅発性神経細胞壊死への関与－…… 324
大槻俊輔[1]、松本昌泰[1・2]、松下幸司[1]、萬代研二[1]、北川一夫[1]、小川　智[1]、
上田周一[2]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
（大阪大・医・第一内科[1]、神経内科[2]）

149. 弁別学習の遂行に伴うラット中隔ドーパミン代謝の亢進…… 326
堀　耕治[1]、山室　裕[1]、田中淳一[2]、野村正彦[1]
（埼玉医大・第一生理[1]、鳴門教育大・人間形成基礎[2]）

150. 大脳皮質体性感覚野におけるLTPに伴うCaM Kinase Ⅱの消長 …… 328
山口知子[1]、川上順子[2]、宮田麻理子[2]
（東女医大・生化[1]、第二生理[2]）

151. トリのインプリンティング行動の神経化学的研究…… 330
金松知幸、高原ひろみ、塚田裕三
（創価大・生命科学研）

152. E1マウス発作とPTZ注射による痙攣発作の脳蛋白質合成に及ぼす影響…… 332
黒田陽子、撫井弘二、中西亜紀、古塚大介、大西　博、山上　榮
（大阪市大・医・神経精神）

153. Glutamate受容体を介する中枢神経内Norepinephrine Release調節機序と高血圧における意義について　－高血圧自然発症ラットを用いた検討－…… 334
津田和志[1]、増山善明[2]、Menek Goldstein[3]
（和歌山医大・循環器内科[1]、東京労災病院[2]、New York Univ. Medical Center[3]）

154. フェンサイクリジンのラット前頭前野ドーパミン遊離に及ぼす影響…… 336
本藤久雄[1]、中原辰雄[2]、中村　薫[1]、堤　哲之[1]、米澤裕次[1]、
橋本喜次郎[1]、松本　孝[1]、平野　誠[1]、内村英幸[1]
（国立肥前療養所・情動行動障害セ・臨床研・生化学[1]、九州大・理・化学[2]）

155. Ｅ１マウス脳のペプチド画分の解析…… 338
小出誠司、大西　博、片山雅文、甲斐利弘、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神）

156. 遺伝的運動障害ラットの小脳内神経伝達物質代謝の変調…… 340
國井修一[1]、田丸政男[2]、大野京子[3]、安藤正人[4]、藤田公和[4]、永田　豊[4]
（椙山女学園大短期大学部[1]、鈴鹿医療科学技術大[2]、名古屋大・環研[3]、藤田保衛大・医・生理[4]）

157. ラット前部帯状回皮質における興奮性アミノ酸遊離に対するフェンサイクリジンの影響－脳内微小透析法による検討－…… 342
米沢裕次[1]、本藤久雄[1]、中村　薫[1]、堤　哲之[1]、橋本喜次郎[1]、松本　孝[1]、
平野　誠[1]、内村英幸[1]、黒木俊秀[2]、田代信維[2]
（情動行動障害セ・国立肥前療養所[1]、九州大・医・神経精神[2]）

158. フェノバルビタール禁断症候における脳内抑制性および興奮性アミノ酸神経の関与
－マイクロダイアリシスと結合実験を用いた検討－…… 344
田中佐知子[1]、土田晃敬[1]、木内祐二[3]、山元俊憲[2]、小口勝司[3]、吉田武美[1]、
黒岩幸雄[2]
（昭和大・薬・毒物[1]、臨床薬[2]、医・第一薬理[3]）

159. ニューロフィラメント欠損ウズラ（Quiver）の脳における神経伝達物質動態の変化…… 346
長谷川宏之[1]、村山俊彦[1]、北村佳久[1]、高橋明美[2]、板倉智敏[2]、野村靖幸[1]
（北海道大・薬・薬効[1]、獣医・比較病理[2]）

160. *dw*イヌマウス脳におけるカルシウム結合蛋白質 －ヒポカルシンの免疫組織化学的研究－…… 348
杉崎哲朗、山田　孝、高松　研、野口鉄也
（東邦大・医・第二生理）

161. p-Chloroamphetamine投与による脳内monoamineの経時的変化
－ラット側坐核における脳内透析法による検討－…… 350
杉田倫太郎[2]、関谷　紫[3]、寺田恭子[1]、澤　　温[4]、伊藤哲一彦[1]、
笠原　嘉[1]、野村総一郎[5]
（藤田保衛大・医・精神[1]、トヨタ記念病院[2]、桶狭間病院[3]、さわ病院[4]、立川病院[5]）

162. 高血圧自然発症ラットの脳内より見出したイサチン（内因性MAO活性阻害物質）…… 352
浜上尚也、遠藤　泰、南　　勝
（東日本学園大・薬・薬理）

163. 培養アストロサイトF－アクチン再構成に対するエンドセリンの作用…… 354
小山　豊、藤田茂樹、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

164. ヒト脳リカバリン様蛋白質（BDRP 1）のcDNAクローニング …… 356
小林正明、高松　研、藤城正敏、斎藤茂治、野口鉄也
（東邦大・医・第二生理）

165. 非神経細胞に発現したドレブリン蛋白が細胞接着に及ぼす影響…… 358
池田圭朗[2]、白尾智明[3]、戸谷重雄[2]、植村慶一[1]
（慶應大・医・生理[1]、脳外[2]、群馬大・医・行動分析[3]）

166. IDPN中毒神経における細胞骨格再編成とニューロフィラメント蛋白リン酸化との関連…… 360
田代朋子、今井礼子、小宮義璋
（群馬大・医・分子病態）

167. スフィンゴシンによるマウス神経芽腫細胞の神経突起伸展の抑制…… 362
上村敬一、武富　保
（信州大・医・心脈管病・脂質生化）

168. 成長円錐を退縮させる活性因子の作用機序：G蛋白共役系の関与…… 364
五十嵐道弘[2]、S.M.Strittmatter[1]、T.Vartanian[1]、M.C.Fishman[1]
（マサチューセッツ総合病院[1]、現・群馬大・医・分子病態[2]）

169. ベンゾジアゼピンアンタゴニスト結合部位のラット脳内分布及び生後発達…… 366
兼子幸一、車地暁生、融　道男
（東京医科歯科大・医・神経精神）

170. 培養ラットニューロンのシナプス形成におけるアストロサイトの役割…… 368
中西圭子[1]、大河内由香[1]、植木孝俊[1]、浅井清文[1]、加藤泰治[1]、黒田洋一郎[2]
（名古屋市大・医・分子医学研・生体制御[1]、都立神経研・生化[2]）

171. ラット胎児脳シナプトソーム画分に存在する50kDaタンパク質の精製と一次構造解析 …… 370
萩原民雄、北原功雄、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大・医・第一生化）

172. 植物由来リグナン関連化合物の神経細胞分化促進、マウス潜在学習能力増強の効果…… 372
毛利哲郎、山崎眞津美、千葉賢三
（北陸大・薬・創薬研）

173. ネオスチグミン脳室内投与による血糖上昇とノルアドレナリン、ドーパミン神経活動の亢進… 374
高橋　章、石丸裕久、五十嵐康、丸山悠司
（群馬大・医・神経精神薬理（ツムラ））

174. ラット肝ミトコンドリア外膜からのキヌレニン3－モノオキシゲナーゼの精製…… 376
植村富彦、平井久美子
（都精神医学総合研・神経化学）

175. 脳シナプス膜脂質の代謝回転とその加齢変化…… 378
田中康一、近　一夫、脇　初枝、安藤　進
（都老人総合研・生体膜）

176. Nicotineはdexamethasoneの持つkainate神経毒性の増強作用を抑制する …… 380
鬼頭昭三[1]、仙波純一[1]、三好理絵[2]、古津みを[1]
（放送大学[1]、東京女子医大・薬理[2]）

177. ニューロンのグルタミン酸刺激後の脳型Naポンプ活性増大はターンオーバー数の増大による… 382
松井英男[1]、誉田晴夫[1]、井上順雄[2]
（杏林大・医・第一生化[1]、横浜市大・医・第一生化[2]）

178. rasトランスフォームした細胞で変調するブラジキニン反応 －膜過分極により活性化するCa^{2+}オシレーションおよびCa^{2+}流入－ …… 384
橋井美奈子[1,2]、三辺義雄[2]、村崎欣子[2]、野澤義則[3]、東田陽博[1]
（金沢大・医・神経情報研・神経物性[1]、国立精神神経セ[2]、岐阜大・医・生化[3]）

179. 神経終末モデルとしての血小板へのセロトニン取り込みに対する有機水銀性SH阻害剤チメロサールの抑制作用機構…… 386
西尾廣昭、根笹賢一、平野　潤、仲田義啓
（広島大・医・総合薬学・薬効解析）

180. ニューロンのNaポンプアイソフォーム活性のK^{+}依存性…… 388
井上順雄[1]、松井英夫[2]、加藤尚彦[1]
（横浜市大・医・第一生化[1]、杏林大・医・第一生化[2]）

181. カルシウムおよびグアニンヌクレオチドによる開口分泌はオール・オア・ナンの反応である
－肥満細胞をモデルとして－…… 390
秀　和泉[1]、仲田義啓[1]、P.E.R.Tatham[2]、B.D.Gomperts[2]
（広島大・医・総合薬学・薬効解析[1]、University College London[2]）

182. スタウロスポリンによる神経突起の誘導…… 392
佐野　護、岩永　操
（愛知県コロニー研・形態）

183. 神経成長因子による摘出白鼠交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性の抑制効果とGM１糖脂質による修飾作用…… 394
安藤正人、立岔廷族、永田　豊
（藤田保衛大・医・生理）

184. Cytokineにより活性化されるastrocyteのneurotrophic activity
－脳幹コリン作動性ニューロンに対する作用－…… 396
左合正周、吉田一成、若本寛起、上口裕之、大谷光弘、戸谷重雄
（慶應大・医・脳神経外科）

185. 大腸菌による脳由来神経栄養因子の発現…… 398
藤森　清、半澤宏子、福薗真一、高橋健一、清水範夫
（㈱日立製作所・基礎研）

186. NGIF、A Neuroblastoma Growth Inhibitory Factor from Human Astrocytoma with Neurotrophic Properties …… 400
Eksioglu, Yaman Z.[1]、飯田淳子[2]、山形一雄[2]、浅井清文[1]、加藤泰治[1]
（名古屋市大・医・分子医学研[1]、住友金属工業[2]）

187. 正常ラットならびに小脳障害マウスにおける脳NO合成酵素活性　－HPLCによる検討－…… 402
池田正行[1・2]、森田育男[1]、室田誠逸[1]、湯浅龍彦[2]、宮武　正[2]
（東京医科歯科大・大学院・細胞機能制御[1]、医・神経内科[2]）

188. 培養成熟マウス・シュワン細胞に対する各種増殖因子の作用…… 404
渡部和彦[1]、田中順一[1]、豊原敬三[2]、酒井　紀[2]
（慈恵会医大・神経病理[1]、第二内科[2]）

189. 神経突起伸長作用を示すCon A結合塩基性タンパク質…… 406
石岡憲昭[1]、佐藤淳子[1]、中村純太[1・2]、大久保辰雄[1・3]、栗岡　晋[1]
（慈恵医大・医科研・生化[1]、第二外科[2]、第一外科[3]）

190. 損傷周囲脳における細胞応答反応と塩基性線維芽細胞成長因子によるその修飾
－c-fos mRNAでの検討－ …… 408
湯口貴導[1]、甲村英二[1]、山田和雄[1]、山下俊英[1]、大槻秀夫[1]、岸口稔睦[1]、
榊　孝之[1]、和中明生[2]、遠山正彌[2]、早川　徹[1]
（大阪大・医・脳神経外科[1]、第二解剖[2]）

191. 神経栄養因子活性を持つペプチドについて…… 410
石黒麻利子[1]、村山美由紀[1]、大森　彬[2]、浜登希子[1]
（三菱化成生命研・脳神経科[1]、構造解析[2]）

192. サイトカイン、glucocorticoidによるアストロサイトのNGF、NCAM発現調節…… 412
吉田一成、左合正周、矢崎貴仁、若本寛起、上口裕之、稲葉　真、
大谷光弘、戸谷重雄
（慶應大・医・脳神経外科）

193. C 6グリオーマ細胞による神経突起伸長の抑制作用…… 414
渡辺英治[1]、細川　浩[2]、小林裕明[3]、大平敦彦[1]、村上富士夫[3]
（愛知県コロニー・発達障害研[1]、京大大学院大学・人間環境学研究科・行動調節機構[2]、
大阪大・基礎工学・生物工学[3]）

194. ラット舌下神経損傷後の神経再生過程におけるERKs mRNAの発現…… 416
桐生寿美子、前野浩巳、木山博資
（大阪大・医・バイオ研神経機能解剖）

195. 神経細胞特異的タンパク質（PNP14）の脳内分布、およびmRNA発現部位の解析…… 418
中条茂男[1]、塩田清二[2]、中井康光[2]、中谷一泰[1]
（昭和大・薬・生物化学[1]、医・第一解剖[2]）

196. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの遅い軸索輸送に対するシロスタゾールの作用…… 420
山本恵史[1]、保田好信[1]、小宮義璋[2]
（大塚製薬㈱徳島研[1]、群馬大・医・分子病態[2]）

197. NG108-15細胞におけるカルシウムキレート剤導入後のブラジキニン反応の解析 …… 422
木村康宏、東田陽博
（金沢大・医・神経物性）

198. Ca^{2+}／Calmodulin-dependant Protein Kinase V from Rat Cerebrum
－精製と組織分布－…… 424
杉田竜太郎、望月秀雄、伊藤直史、日高弘義
（名古屋大・医・薬理）

199. Nitric oxide合成酵素基質（L-Arginine）および阻害剤（LNAME、LNMMA）の脳内局所灌流による脳内アミノ酸レベルの変化…… 426
太田晃一、福内靖男、島津邦男、小松本悟、一條真琴、荒木信夫、柴田　護
（慶應大・医・神経内科）

200. Dopamine（DA）遊離を制御するDA自己受容体機能に及ぼすN-ethylmaleimideとforskolinの影響 …… 428
山田茂人[1]、横尾秀康[2]、高木俊博[3]、西彰五郎[1]
（久留米大・医・脳疾患研[1]、薬理[2]、精神神経[3]）

201. cAMP依存性プロテインキナーゼのGangliosideによる活性化反応 …… 430
荒金　太[1,2]、福永浩司[1]、宮崎康二[2]、岡村　均[2]、宮本英七[1]
（熊本大・医・第一薬理[1]、産婦人科[2]）

202. 淡蒼球内GABA作働性神経におけるGABA放出調節機構 －マイクロダイアリーシス法による解析－ …… 432
橋本恒一、栗山欣彌
（京都府立医大・薬理）

203. バルプロ酸によるモノアミン合成の調節 …… 434
本橋伸高、斉藤　浩、岡本泰昌、林　輝男、山脇成人
（広島大・医・神経精神）

204. ニューロキニンAに対する高感度酵素免疫測定法の開発 －ラット感覚神経系におけるニューロキニンA様免疫活性の性質－ …… 436
猪股裕二、加藤　武
（横浜市立大・大学院・総合理学・分子認識）

205. ムスカリン受容体のリン酸化部位欠損変異種の性質 …… 438
亀山仁彦[1]、中田博子[1]、芳賀和子[1]、芳賀達也[1]、茂呂　修[2]、Wolfgang, Sadée[2]
（東京大・医・脳研生化[1]、カリフォルニア大・サンフランシスコ校[2]）

206. 選択的セロトニン取り込み阻害薬フルボキサミン（SME3110）の神経化学的検討 …… 440
木下徳久[1]、神庭重信[1]、新谷　太[1]、丹生谷正史[1]、鈴木映二[1]、八木剛平[1]、浅井昌弘[1]、中木敏夫[2]、加藤隆一[2]
（慶應大・医・精神神経[1]、薬理[2]）

207. 株化した内分泌細胞におけるSNAP受容体の発現 …… 442
於保　力、伊藤朋子、高橋正身
（三菱化成生命科学研）

208. 神経系に特異的なG蛋白質γサブユニットについて …… 444
森下理香、加藤兼房、浅野富子
（愛知県コロニー・研・生化）

209. インターロイキン－1βによるサブスタンスP受容体の発現制御 …… 446
小河宏城、三木新也、西尾廣昭、仲田義啓
（広島大・医・総合薬・薬効解析）

210. アミノ酸置換によるマストパランの活性部位の検討 －溶血活性とカテコールアミン放出活性の分離－ …… 448
笠井久隆[1]、伊藤三恵[2]、高橋俊一[2]、柳生大祐[2]、栗田　孝[3]、熊倉鴻之助[4]、伊藤　尚[2]
（都立医療技術短大[1]、青山学院大・理・化学[2]、ヘキストジャパン・医総研[3]、上智大・生命研[4]）

211. 細胞外神経伝達物質濃度におよぼすNMDAの作用 …… 450
菅原　恵、芝軒信次、小暮美樹、九穂泰三、松本　明、石川紘一
（日本大・医・薬理）

212. E１マウスの痛覚鈍麻－発作の影響とオピオイド系の関与－ …… 452
片山雅文、大西　博、小出誠司、甲斐利弘、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神）

213. カプトプリル脳室内投与が正中視索前核領域モノアミン代謝におよぼす影響…… 454
田中淳一[1]、堀　耕治[2]、山室　裕[2]、野村正彦[2]
（鳴門教育大・人間形成基礎[1]、埼玉医大・第一生理[2]）

214. フェレット腸管からのセロトニン脱顆粒と腹部求心性迷走神経活動におよぼす制癌剤の影響… 456
遠藤　泰、南　勝、浜上尚也
（東日本学園大・薬・薬理）

215. Triprolidineのachatin-Ｉ拮抗作用 …… 458
Divina E. Santos、劉　国君、張　唯、荒木陽子、竹内　宏
（岐阜大・医・第一生理）

216. エタノールのリン脂質－カルシウム細胞内情報伝達系への作用…… 460
斎藤　浩[1・2]、西田　朗[1]、福田裕恭[1・2]、清水雅美[1]、内富庸介[2]、本橋伸高[2]、山脇成人[2]
（国立呉病院・臨床研[1]、広島大・医・神経精神[2]）

217. 三環系抗うつ薬のラット脳ホスホリパーゼC活性化作用…… 462
福田裕恭[1・2]、西田　朗[1]、清水雅美[1]、岡本泰昌[2]、山脇成人[2]
（国立呉病院・臨床研[1]、広島大・医・神経精神[2]）

218. ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する情報伝達系に対するリチウムの効果…… 464
深間内文彦[1]、D.M.Chuang[2]
（東京医科歯科大・難治疾患研・プロジェクト[1]、NIH[2]）

219. ラット大脳に豊富に存在するCaM結合蛋白質（CaMBP64）について …… 466
亀下　勇、石田敦彦、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化）

220. 胎盤培養細胞からの成長ホルモン分泌促進因子（GRH）の分泌 －ダイアシルグリセロールのPKCを介さないGRH放出機序の存在？－ …… 468
溝渕睦彦[1]、L.A. Frohman[2]
（愛媛大・医・精神神経[1]、イリノイ大・医・内科[2]）

221. Cキナーゼの基質蛋白質MARCKSの生理機能 …… 470
谷口寿章、古橋　潔、千谷晃一
（藤田保衛大・総医研・医高分子）

222. バキュロウイルス発現系によるG蛋白質（GL_1、GL_2、Gq）の発現と機能 …… 472
中村史雄[1]、加藤真理子[1]、亀山仁彦[1]、額田敏秀[2]、芳賀達也[1]
（東京大・医・脳研生化[1]、都精神研・神経化学[2]）

223. ラット脳のフォスファチジルセリン特異的結合タンパク質 …… 474
中岡隆志、小島直也、浜本敏郎、辻　崇一
（理研　国際フロンティア・糖遺伝情報）

224. 単一C 6細胞におけるセロトニン刺激性細胞内カルシウム動員
－画像解析装置を用いた検討－ …… 476
加賀谷有行[1]、山路隆之[1]、林　輝男[1]、岡本泰昌[1]、西田　朗[2]、
清水雅美[2]、本橋伸高[1]、山脇成人[1]
（広島大・医・神経精神[1]、国立呉病院・臨床研・精神神経[2]）

225. ラット大脳皮質および線条体におけるチューブリン－Gs連関によるアデニル酸シクラーゼ活性の調節 …… 478
八田愼一[1]、雨宮紀人[1]、芦沢　健[2]、齋藤利和[2]、大鹿英世[1]
（札幌医大・医・薬理[1]、神経精神[2]）

226. BromocriptineはD_2 Receptor agonistか？　－Microdialysis法による検討－ …… 480
井上幸紀、切池信夫、奥野正景、伊藤英樹、藤嵜泰利、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神）

227. ラット緊縛ストレスに伴う脳内アミン変動に及ぼすフィトンチッドの影響 …… 482
富田晃代、山岡貞夫、鯉淵典之
（獨協医大・第一生理）

228. 5-HT_{1A}作動薬(Ipsapirone、SM3997)の種々の摂餌条件下におけるラット摂餌行動への影響 … 484
伊藤英樹[1・2]、切池信夫[1]、井上幸紀[1]、奥野正景[1]、藤嵜泰利[1]、山上　栄[1]
(大阪市大・医・神経精神[1]、宝塚三田病院[2])

229. Methamphetamineによる行動感作に対する競合的及び非競合的NMDA受容体拮抗薬の影響 … 486
大森哲郎、安倍川智浩、小山　司
(北海道大・医・精神)

230. 電撃ストレスによる脳内セロトニンおよびドーパミン代謝の亢進
－2つの電撃強度における効果の比較－ …… 488
井上　猛、小山　司、土屋　潔
(北海道大・医・精神)

231. β／A4タンパク質の細胞外への分泌におけるシグナル配列の役割について …… 490
宇佐美美穂子[1]、佐原成彦[1]、丸山　敬[2]、吉川和明[3]、吉岡　昇[1]、森　　啓[1]
(都精神研・分子生物[1]、都臨床研・遺伝情報[2]、都神経研・分子生物[3])

232. Identification of a Novel Amyloid Component (NAC) in Alzheimer's Disease …… 492
上田健治
(Univ. of California San Diego Sch. of Medicine Dept. of Neurosciences)

233. 老化ラット髄液中キヌレニン濃度の特異的増加 …… 494
和田博夫[1]、井藤英喜[2]、折茂　肇[1]、佐藤昭夫[3]
(東京大・医・老年病[1]、都老人医療セ[2]、都老人総合研[3])

234. アルツハイマー病及びダウン症線維芽細胞におけるカルシウム動態の異常 …… 496
楯林義孝、武田雅俊、柏木雄次郎、大河内正康、播口之朗、西村　健
(大阪大・医・精神)

235. アミロイド前駆体蛋白の糖鎖結合に関する検討 …… 498
斉藤史明[1]、柳澤勝彦[1]、谷　昭義[2]、宮武　正[1]
(東京医科歯科大学・医・神経内科[1]、武田薬品㈱開拓第一研[2])

236. アルツハイマー病・病態モデル －レセルピン投与ラット海馬におけるプロテインキナーゼCの細胞内局在の変化について(第2報)－ …… 500
小町裕志[1]、柳澤勝彦[1]、白崎康文[2]、宮武　正[1]
(東京医科歯科大・医・神経内科[1]、第一製薬探索二研[2])

237. アルツハイマー病における脳組織および脳脊髄液中の異常リン酸化タウの量について …… 502
工藤　喬[1]、Inge Grundke-Iqbal[2]、Khalid Iqbal[2]、武田雅俊[1]、
以倉康充[1]、播口之朗[1]、西村　健[1]
(大阪大・医・精神[1]、New York State Institute for Basic Research[2])

238. アルツハイマー病における脳脊髄液および脳組織中のユビキチン量の相関について…… 504
工藤　喬[1]、Inge Grundke-Iqbal[2]、Khalid Iqbal[2]、武田雅俊[1]、
播口之朗[1]、西村　健[1]
（大阪大・医・精神[1]、New York State Institute for Basic Research[2]）

239. フォスファターゼ2B阻害剤による脳内細胞骨格蛋白の変化
－サイクロスポリンA投与ラット脳内のニューロフィラメントの変化－…… 506
田中稔久、武田雅俊、新川久義、金山　巌、工藤　喬、西村　健
（大阪大・医・精神）

240. 若年および老齢ラット脳のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性の相違について…… 508
油布文枝、江頭　亨、山中康光
（大分医大・薬理）

241. ケイ酸アルミニウムのリポフスチンへの蓄積 …… 510
徳武　哲
（都精神研・分子生物）

242. マウスおよびラット加齢過程における脳内G蛋白質の遺伝子発現…… 512
宮本　篤、木村永一、大鹿英世
（札幌医大・医・薬理）

243. ダウン症脳におけるアミロイドβ／A4前駆体タンパクおよびそれに由来する成分の解析Ⅱ… 514
亀谷富由樹、田中喜久子、徳田隆彦
（都精神医学総合研・分子生物）

244. アルツハイマー型老年期痴呆におけるGTP結合蛋白質の量・機能について …… 516
橋本恵理[1]、小澤寛樹[1]、齋藤利和[1]、八田愼一[2]、Peter Riederer[3]、
大鹿英世[2]、高畑直彦[1]
（札幌医科大・医・神経精神[1]、薬理[2]、Wuerzburg大・精神[3]）

245. アミロイド前駆体蛋白mRNA発現に対するCiliary Neurotrophic Factorおよび血清除去の影響…… 518
須藤慎治[1]、川上秀史[1]、三森康世[1]、太田光熙[2]、中村重信[1]
（広島大・医・第三内科[1]、国立療養所宇多野病院・臨床研[2]）

246. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の脊髄および血清中トランスグルタミナーゼ（TG）活性… 520
藤田公和[1]、安藤正人[1]、青木則久[2]、安達一真[2]、永田　豊[1]、本多虔夫[3]
（藤田保衛大・医・生理[1]、脳神経外科[2]、横浜市民病院・神経内科[3]）

247. イミプラミンの脱分極依存性Ca^{2+}流入抑制効果の作用機序に関する検討 …… 522
清水雅美[1]、西田　朗[1]、岡本泰昌[2]、山脇成人[2]
（国立呉病院・臨床[1]、広島大・医・神経精神[2]）

248. メタンフェタミン逆耐性ラット側坐核ドパミン遊離に及ぼすオピオイド受容体調節の変化
－脳内透析法による検討－ …… 524
横尾秀康[1]、山田茂人[2]、吉田眞美[1]、田中隆彦[1]、溝口克弘[1]、
江本浩幸[1]、古賀千尋[1]、石井秀夫[1]、石川経子[1]、田中正敏[1]
（久留米大・医・薬理[1]、脳研[2]）

249. PCRを用いての単純ヘルペス脳炎ウィルスの検出 …… 526
土居孝至[1]、溝渕睦彦[2]、村尾孝児[3]、武田良平[2]、柿本泰男[2]
（松山記念病院[1]、愛媛大・医・神経精神[2]、香川医大・第一内科[3]）

250. 筋緊張性ジストロフィー症患者リンパ球中のmyotonin protein kinase mRNAの分析…… 528
溝渕睦彦[1]、武田良平[1]、土居孝至[2]、印南敏彦[1]、柿本泰男[1]
（愛媛大・医・神経精神[1]、松山記念病院[2]）

251. パーキンソン病患者における尿量の排泄異常…… 530
溝渕睦彦、柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神）

252. 新規セロトニン１A受容体作用薬MKC－242の性質 …… 532
吉川　崇[1]、松田敏夫[1]、田熊一浩[1]、鈴木　眞[1]、江川三生[2]、戸部昭広[3]、馬場明道[1]
（大阪大・薬・薬理[1]、三菱化成・医薬第一研[2]、臨床開発セ[3]）

253. ヒト脳腫瘍の近赤外励起フーリエ変換ラマン分光スペクトル…… 534
水野有武[1]、北島具秀[2]、尾崎幸洋[3]
（慈恵医大・医化学[1]、脳外科[2]、関西学院・理学・化学[3]）

254. 抗うつ薬長期投与および電気けいれん処置のラット脳チューブリン重合に対する作用…… 536
宮本聖也、朝倉幹雄、中西純一、塚本　徹、今福　淳、佐藤厚子、西崎　純、
松井宏晃、伊野美幸、長田賢一、足立　淳、長谷川浩、長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

255. 運動ニューロン病の基底核病変 －組織化学的検討－ …… 538
長谷川一子
（北里大東病院・神経内科）

256. 生体外から投与したニトロキシドラジカルの代謝に与えるイデベノンの影響について
－L-バンドESR（電子スピン共鳴）法による研究－ …… 540
松本清治[1]、横山秀克[2]、石田信一[2]、森　則夫[2]、土橋宣昭[3]
（針生ケ丘病院[1]、福島県立医大・神経精神[2]、RI研究室[3]）

257. ウィスター系ラット臓器の血小板活性化因子（PAF）の局在
－蛍光抗体法によるPAF染色の開発－ …… 542
加藤僚子[1]、平島　豊[1]、遠藤俊郎[1]、唐沢　健[2]、野島庄七[2]、高久　晃[1]
（富山医薬大・医・脳神経外科[1]、帝京大・薬・薬品物理化学[2]）

258. ウシ脳ピリドキサルキナーゼの性質とウサギ脳内分布…… 544
大川　清[1]、平河多恵[1]、城　謙輔[2]、朝倉　正[1]、松田　誠[1]
（慈恵医大・医化学[1]、病理[2]）

259. 抗fucosyl GM 1モノクローナル抗体による脊髄・末梢神経の免疫組織化学的検討 …… 546
楠　　進[1]、千葉厚郎[1]、清水輝夫[2]、金澤一郎[1]
（東京大・医・神経内科[1]、帝京大・医・神経内科[2]）

260. 嗅覚系神経細胞に発現するSpot - 35/calbindin - D28k
－ラット発達過程における局在の変化－ …… 548
藤原　満[1]、中村英生[1]、中野雄一[1]、山国　徹[2]、高橋康夫[2]、桑野良三[3]
（新潟大・医・耳鼻[1]、脳研[2]、遺伝子実験[3]）

261. ヒト中脳腹側被蓋野に存在するL - DOPA免疫陽性細胞は辺縁系ドーパミン投射路にどのような役割を成しているか？　－高力価抗体を用いた免疫組織化学的検討－ …… 550
小森　薫[1,2]、中村　真[1]、山岡久也[1]、國見由佳理[1]、山岡功一[1,4]、
藤田潔史[1,3]、内藤　宏[1]、伊藤哲彦[1]、笠原　嘉[1]、永津郁子[2]
（藤田保衛大・医・精神[1]、第二解剖[2]、メイヨークリニック[3]、神経科浜松病院[4]）

262. TRHによる下垂体初代培養細胞TSHβsubunit遺伝子発現の変化 …… 552
鯉淵典之、大竹英樹、山岡貞夫
（獨協医大・第一生理）

263. 脳におけるリアノジンレセプター／Ca^{2+}放出チャンネルサブタイプの遺伝子発現分布 …… 554
古玉大介[1,2]、古市貞一[1]、袴田康弘[3]、中井淳一[3]、竹島　浩[4]、御子柴克彦[1]
（東京大・医科研・化学[1]、大阪医大・第一内科[2]、京都大・医化学[3]、
国際高等研・沼記念プロジェクト[4]）

264. 脳内endozepine（diazepam binding inhibitor）mRNA発現に及ぼすnicotineの影響について…… 556
桂　昌司[1]、大熊誠太郎[1]、辻村　敦[2]、栗山欣彌[1,2]
（京都府立医大・薬理[1]、脳・血管老化セ[2]）

265. ミエリンプロテオリピッド蛋白質遺伝子ファミリーの存在
－軟骨魚類Chondrichthyes脳からの3種類のDM－20関連蛋白質の分子クローニング－… 558
北川一夫[1]、松本昌泰[1]、鎌田武信[1]、David R.Colman[2]
（大阪大・医・第一内科[1]、米国マウントサイナイ医大[2]）

266. 細胞接着分子L1の組織依存的な選択的スプライシングの同定…… 560
武田泰生、阿相皓晃、三浦正幸、小林正明、植村慶一
（慶應大・医・生理）

267. マウス2'、3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase遺伝子のプロモーター領域の解析… 562
服部和枝、遠山陽子、栗原　正
（創価大・生命研・神経化学）

268. ラットPO cDNAを導入したtransgenicメダカと行動異常…… 564
坪川達也[1]、宮崎勝己[2]、松本二郎[2]、植村慶一[1]
（慶應大・医・生理[1]、生物[2]）

1 神経成長因子反応エレメント結合蛋白質の性質と組織分布

樋口宗史、金 哲熙、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕
ラットNeuropeptide Y (NPY)遺伝子プロモーター部-80/-33 の 48bp にはPC12細胞でのNGF 刺激に反応して転写活性を増加するエレメント(NGFRE) が存在する。このNGFRE に対するDNA 結合蛋白質をゲルシフト、UVクロスリンキング、Southwestern法で調べた。２本鎖オリゴヌクレオチド-80/-51(NGFUds) と-62/-33(NGFDds) にはそれぞれAP1-like、Sp1-like site に結合する蛋白質が認められた。NGF 刺激はNGFUds結合蛋白質の結合活性を２倍増加させたが、NGFDdsのそれは増加させなかった。加えて、PC12細胞にはNGFUdsの相補鎖側１本鎖オリゴヌクレオチドに強い親和性を持つ110kDaと35kDa の蛋白質の結合が豊富に存在した。 35kDa蛋白質には塩基配列特異性が認められ、NGF 処理によりDNA 結合活性の誘導が見られた。NGFUds結合蛋白質と35kDa 一本鎖結合蛋白質は脳、肺に多く存在し、神経系由来のcell line にも豊富に発現していた。

［目的］
NGF 高親和性受容体(trk) のチロシンキナーゼ活性化による燐酸化カスケードを介しての、蛋白合成に依存しない転写制御因子群immediate early genes の発現誘導の機構は、最近、PC12細胞で明らかになりつつある(1-3) 。しかし、それに続いて起きる蛋白合成を介するlate genesとしての神経特異遺伝子群の転写誘導機構はまだ不明であり、これらの機構の解明はNGF による交感神経の分化・生存維持を知る上で重要であること考えられる。交感神経に発現するNeuropeptide Y(NPY) 遺伝子はlate gene であり、NGF により蛋白合成を介して転写活性化を受ける(4) 。昨年度、私達はNPY 遺伝子のプロモーター上に48bpのNGF-response element(NGFRE) を同定し、報告した(5,6) 。興味深いことに、NGFRE の上流18bp(-80/-63) は、系統的に良く保存された28bpのパリンドロームの一部を形成していたので、二次構造をとる可能性が考えられる(7) 。今回、NGFRE を介する転写活性化機構を明らかにする目的で、NGFRE の二本鎖、一本鎖塩基配列に対するDNA 結合蛋白質の性質について検討を加えた。

［方法］
核抽出液の調整： 種々の培養細胞及び、Iversen らの方法で分画した脳各部位から粗核分画を作成した後、Dignamらの方法(8) で核抽出液を得た。
ゲルシフトアッセイ： ラットNPY 遺伝子プロモーター部位に同定したNGF-Response Element 48 bp を構成する種々のオリゴヌクレオチドを合成した。5'末端ラベルした２本鎖及び１本鎖オリゴヌクレオチドと核蛋白質の結合は12mM Hepes-KOH(pH7.9) 、60 mM KCl、12% glycerol 存在下に、既報に従って行なった(6) 。
UVクロスリンキング： ゲルシフト反応液中で254nm UVを０℃、1-1.5 時間照射し、DNA-蛋白質複合体をSDS-PAGEにて解析した。
Southwestern実験： 核蛋白質を10%SDS-PAGE で分画後、ニトロセルロース膜に転写し、ラベルされたNGFRE オリゴヌクレオチドをプローブとしてDNA 結合蛋白質を検出した。

［結果および考察］
（１）PC12細胞には、ゲルシフト法によって、NGFRE 48bpの上流２本鎖30 bp(NGFUds: -80/-51)に、NGF 処理で結合活性の増加する核蛋白質が存在した（図１）。下流２本鎖30 bp(NGFDds:-62/-33)には結合する核蛋白質が存在したが、NGF での結合誘導は見られなかった。

（２）上流30bp２本鎖オリゴ(NGFUds)結合蛋白質は脳、肺に発現し、脳内では大脳、小脳に多く、また神経細胞由来のcell linesに存在した（図２）。
（３）一方、上流30b の相補鎖側１本鎖オリゴヌクレオチド(UAss)に結合活性が100 倍も強い核蛋白質がゲルシフト法でPC12細胞に認められた。このUAss結合蛋白質は、UVクロスリンキング、Southwestern法で分子量35KDa と110KDaの少なくとも２つが存在し、35kDa蛋白のDNA 結合活性はやはりNGF 処理により増加した（図１）。
（４）110kDa蛋白質は塩基配列特異性が認められなかったが、35kDa 蛋白質は30b のUAssに結合特異性を持っていた。
（５）35kDa のUAss蛋白質は、脳、肺に発現し、脳内では大脳、小脳、延髄に多く存在していた。また、神経細胞由来のcell line に多く発現していた。

既に、Somatostatin遺伝子プロモーター部-1471/-1458 のHSTFコンセンサスに似た１本鎖塩基配列に、NGF によって結合蛋白質の結合誘導が起きることが知られている(9) 。しかし、このエレメントはNGFRE とは塩基配列も蛋白誘導パターンも違っているので、別の核蛋白質と思われる。

以上のように、NGF 刺激は、PC12細胞に於て、蛋白合成を介して上記の核蛋白質因子を誘導し、神経特異的なNPY 遺伝子の転写を活性化する可能性が考えられた。

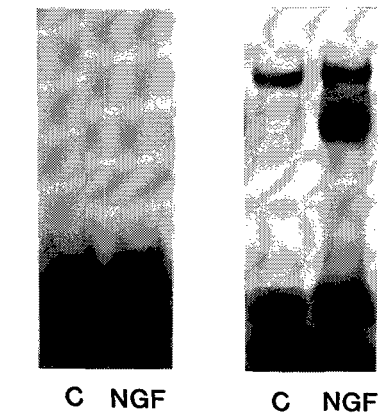


図１　NGF による二本鎖(NGFUds;A)及び一本鎖(UAss;B)結合蛋白質の誘導
PC12細胞をNGF ２４時間処理後、ゲルシフトを行なった。

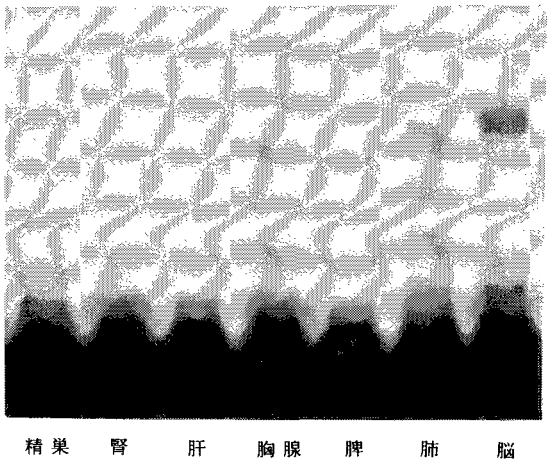


図２　二本鎖NGFUds結合蛋白質の組織分布
各組織より粗核分画を作成後、核抽出液を得た。ゲルシフトで組織分布を調べた。

文献
(1) Jing, S. et al. (1992) Neuron 9, 1067-1079.
(2) Thomas, S.M. et al. (1992) Cell 68, 1031-1040.
(3) Qui, M.-S. and Green, S.H. (1992) Neuron 9, 705-717.
(4) Sabol, S.L. and Higuchi, H. (1990) Mol. Endocrinol. 4, 384-392.
(5) 樋口宗史、中野浩一、三木直正(1992) 神経化学、31巻、71-72 頁
(6) Higuchi,H. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 1553-1560.
(7) McMurray, C.T. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 666-670.
(8) Dignam, J.D. et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489.
(9) Gilchrist, C.A. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 1395-1400.

2　NGFとEGFの*ras*活性化シグナル伝達機構の解析

橋本裕子、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］　チロシンキナーゼからRasに至るシグナル伝達においてSH2/SH3領域を有する一連のアダプタータンパク質が、重要な役割を担うことが明らかにされつつある。そこで今回我々は、PC12細胞においてNGF、EGF刺激後に活性化されるRasへのシグナル伝達経路を明らかにする目的で、各々の受容体とSH2/SH3含有タンパク質Ash/Grb2、及びShcとの複合体形成能を調べた。さらに同複合体中のGEF（グアニンヌクレオチド交換促進因子）活性の変化を検討し以下の知見を得た。NGF又はEGF添加後、どちらの場合も速やかにShcタンパク質がチロシン燐酸化され、Ash/Grb2及び各々の受容体との複合体形成が観察された。しかしながら、GEFと複合体を形成すると考えられているAsh/Grb2はEGF受容体とは複合体を形成するのに対し、NGF受容体（gp140^{trk}）とは、直接複合体を形成しないことが示された。また、EGF刺激後のEGF受容体を含む分画には因子依存性にGEF活性の上昇が観察されたが、NGF刺激後のgp140^{trk}を含む分画には、同活性はわずかにしか検出されなかった。NGF、EGFとも細胞膜上に位置する受容体チロシンキナーゼの活性を介してRasを活性化するが両因子のシグナル伝達に関与すると考えられているアダプタータンパク質は、各々に特異的な作用機序で働く可能性が示唆された。

［目的］　我々はこれまでに、ラット褐色細胞腫由来PC12細胞において神経成長因子（NGF）及び上皮成長因子（EGF）が*ras*遺伝子産物p21を活性化すること（1）、チロシンキナーゼ阻害剤がNGFによるRasの活性化及び細胞の分化を完全に抑制すること（2）を見いだし、NGFシグナル伝達にチロシンキナーゼ及びRasの活性化が必須であることを示した。しかしながら、細胞膜に位置する受容体チロシンキナーゼから同じく細胞膜上のRasに至るシグナルの伝達経路はこれまで明らかにされていなかった。最近、Srcと相同性を有するSH2/SH3領域から主に構成されているAsh/Grb2と呼ばれるタンパク質が、SH2領域でチロシン燐酸化タンパク質と結合しSH3領域でGEFと結合することによって、細胞質中のGEF分子を細胞膜の近傍に移動させ、その結果Rasを活性化することを示唆する報告がなされた。そこで今回、PC12細胞におけるNGF、EGFのRas活性化シグナル伝達経路におけるアダプタータンパク質の関与を検討した。

［方法］　細胞培養：PC12細胞は10%ウシ胎児血清及び5%ウマ血清を含むDMEM中で、5%CO_2、37°Cの条件下で培養した。試料の調製：PC12細胞を、50 ng/ml NGFまたはEGFで2分間刺激後、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。種々の抗体による免疫沈降又は、小麦胚芽アグルチニン（WGA）アガロースに吸着させて得た画分を数回洗浄後試料とした。ウェスタンブロティング：SDS電気泳動によって試料を展開し、一次抗体、HRPラベルの二次抗体と反応後ECL法で発色させた。また、一次抗体の代わりにGST融合タンパク質を用いる場合は抗GSTモノクローナル抗体と反応後、二次抗体を使用した。GEFアッセイ：20 mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4）、1 mM $MgCl_2$、50 μg/ml BSA、50 ng Ras、1 mM DTT、［α-^{32}P］GTPを試料に加え、32°C、20分間インキュベート後、ニトロセルロースフィルターにRasを吸着させ、その放射活性を計測した。抗体：抗Trk抗体及び抗Ash抗体はそれぞれC末11個のペプチド及びGST-Ash融合タンパク質をウサギに免疫後、抗血清をアフィニティー精製して使用した。抗Shc抗体は、U.B.I.社から抗ホスホチロシン抗体はICN社から購入した。

［結果・考察］　PC12細胞においてNGF、EGF刺激後のチロシン燐酸化タンパク質の挙動を調べると、各々の受容体と共に100, 52, 46, 44及び42kDaのタンパク質のチロシン燐酸化が観察された（図1A、lysate）。44及び42kDaの2本のバンドは、*ras*シグナル伝達系において下流に位置するMAPキナーゼと考えられた。52及び46kDaのチロシン燐酸化タンパク質は、可溶性タンパク質であるにもかかわらず、NGF又は、EGF刺激後に各々の受容体と共にWGAアガロース画分に回収された（図1A、WGA）。さらに52及び46kDaチロシン燐酸化タンパク質は、NGF刺激後抗Trk抗体免疫沈降物にも回収されること（図1A、αTrk）よりNGF受容体（gp140^{trk}）と複合体を形成していると考えられた。さらに抗Shc抗体による免疫沈降後、チロシン燐酸化タンパク質を検出すると因子に応答してチロシン燐酸化した52及び46kDaのShc分子とgp140^{trk}又はEGF受容体が検出された（図1B）。

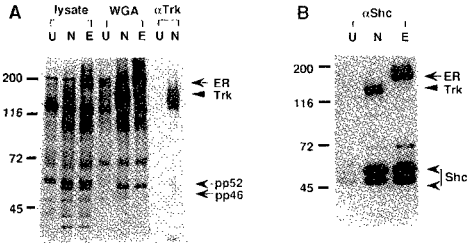


図1．NGF、EGF添加後のチロシンリン酸化タンパクとレセプターとSHCとの複合体形成パターン

PC12細胞をNGF、EGFで刺激し、(A) 全タンパク抽出物（lysate）、WGA吸着分画（WGA）抗Trk抗体免疫沈降物（αTrk）、(B) 抗Shc抗体免疫沈降物（αShc）を回収し電気泳動後、抗ホスホチロシン抗体でウェスタンブロッティングを行なった。

次にShcとAsh/Grb2との相互作用を調べるために抗Ash/Grb2抗体による免疫沈降物を抗Shc抗体でウェスタンブロッティングを行なうとNGF、EGF添加後に分子量52kDaのShcがこの沈降物中に存在することが明かとなった（図２A）。報告によるとEGF刺激後Ash/Grb2はチロシン燐酸化したEGF受容体、及びShcと複合体を形成する。そこで、抗Ash/Grb2抗体による免疫沈降物中のチロシン燐酸化タンパク質を調べるとこの沈降物中のShcがチロシン燐酸化していることが確認された。（図２B）。これらのことは、NGF、EGF添加後Shc分子は速やかにチロシン燐酸化されAsh/Grb2及びチロシン燐酸化された各々の受容体と複合体を形成することを示している。これに対して、Ash/Grb2と受容体の複合体形成については、抗Ash/Grb2抗体免疫沈降物中にはチロシン燐酸化したEGF受容体は回収されるもののgp140^{nt}はわずかしか回収されず（図２B）、EGF受容体とAsh/Grb2は複合体を形成するがgp140^{nt}とAsh/Grb2は複合体を形成できないか、もしくは極めて親和性が低いことが示された。

gp140^{nt}、EGF受容体に対してAsh/Grb2が異なる挙動を示すことをさらに以下のように調べた。NGF、EGF添加前後のWGAアガロース吸着画分を試料として電気泳動後、GSTと融合させたAsh/Grb2をプローブとしてウェスタンブロッティングを行なうと、Ash/Grb2はチロシン燐酸化されたShc及びEGF受容体とは明らかに結合するが、gp140^{nt}とはチロシン燐酸化にもかかわらず結合しなかった（図２C）。さらにこの画分中のRasに対するGEF活性について調べたところ、GEF活性はEGF依存性に増加したがNGF添加後ではわずかな増加しか観察されなかった（図３）。これらの結果は、EGFのシグナル伝達においては、EGFの刺激によって自己燐酸化したEGF受容体にGEFと複合体を形成したAsh/Grb2が結合しRasを活性化するというモデルに一致する。しかしながら、NGFの場合は、gp140^{nt}はShcとは結合できるが、GEFと複合体を形成したAsh/Grb2とは直接複合体を形成できず、gp140^{nt}を含む画分にはGEF活性がほとんど検出されない。GEFによるRasの活性化は、NGF刺激の場合別の機構で引き起こされている可能性がある。NGF又はEGF刺激後、チロシン燐酸化したShcが膜画分に移行することを我々は観察しているが受容体以外の膜タンパク質をアンカーとするシグナル伝達経路が存在する可能性も考えられる。

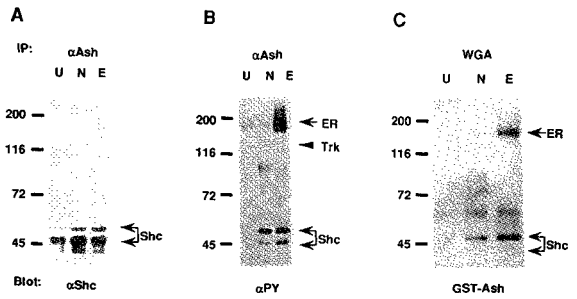


図２．AshとShc及びレセプターとの複合体形成パターン
PC12細胞をNGF、EGFで刺激後、タンパク質を抗Ash抗体免疫沈降（A, B）及びWGAアガロース吸着画分（C）を得た。試料を電気泳動後、抗Shc抗体（A）抗ホスホチロシン抗体又はGST-Ash（C）によってウェスタンブロッティングした。

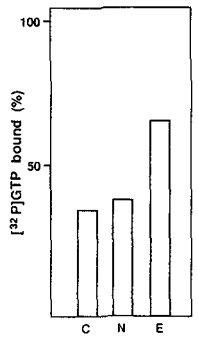


図３．WGAアガロース画分でのGEF活性
PC12をNGF、EGFで刺激後、タンパク質をWGAアガロースで吸着し、*ras*を基質にGEF活性を測定した。

（この研究は松岡耕二博士（都老人研・生体情報）、竹縄忠臣博士（東大医科研・癌生物）との共同研究として行なわれました。）

［文献］

1. K. Muroya, S. Hattori & S. Nakamura. (1992) *Oncogene* 7, 277-281.
2. Muroya K, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S. (1992) *Biochim Biophys Acta*, 1135: 353-6.

3　前脳基底野コリン作動性ニューロンのＮＧＦとＢＤＮＦ応答性には空間的相違がある

野々村健、小島正己、西尾チカ、畠中寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕

ＮＧＦとＢＤＮＦが生存維持的に作用する発生段階の中枢コリン作動性ニューロンについて、それらの作用スペクトルを検討した。シナプス形成終了期に当たる生後２週齢期のラットの前脳基底野コリン作動性ニューロンは初代培養下で、ＮＧＦだけでなくＢＤＮＦ添加によってもＡＣｈＥ陽性細胞数の増加が観察された。しかし、ＮＴ－３は効果がみられなかった。ＮＧＦとＢＤＮＦの最大作用量を同時添加したところ、コリン作動性ニューロン数は相加的な増加を示した。この結果は前脳基底野コリン作動性ニューロンは、少なくともＮＧＦ依存型とＢＤＮＦ依存型の２種類の細胞群に再分類されることを示唆している。

脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、ニューロトロフィン－３（ＮＴ－３）は神経成長因子（ＮＧＦ）と高い相同性を保った神経栄養因子である。それらが作用を及ぼすニューロン群が、末梢神経系と中枢神経系において明らかとなってきている。それらニューロトロフィンは、一部の重複は認められるが、それぞれ異なるニューロン群に作用することが明らかとなってきた（１）。中枢神経系の前脳基底野コリン作動性ニューロンはＮＧＦとＢＤＮＦの両方に応答するニューロン群である。著者らはそれらの作用がともに、コリン作動性ニューロンのシナプス形成の前後で、分化促進から生存維持へとシフトすることを既に報告している（２）（３）。このように複数のニューロトロフィンが同様に作用するコリン作動性ニューロンにおいて、ＮＧＦとＢＤＮＦとの役割の相違について解析した。

〔実験方法〕

生後２週齢ラット前脳基底野ニューロンの初代培養ならびにアセチルコリンエステラーゼ（ＡＣｈＥ）活性染色は既報に従って行った（３）。パパインで分散した細胞を、ラット胎仔の皮質より調製しシート状に培養したアストロサイト上にまいた。翌日無血清ＴＩＰ／ＤＦ培地に交換し、この時各ニューロトロフィンを加えた。培地は３日おきに交換し、７日間培養した。ＮＧＦは雄マウス顎下腺からの精製標品、もしくはジェネンティック社のヒト組換え型を使用した。マウスＮＧＦとヒト組換え型ＮＧＦとでは結果に差はなかった。ＢＤＮＦはリジェネロン社、ＮＴ－３は武田薬品（株）よりいただいた、共にヒト組換え型を使用した。

〔結果と考察〕

生後１６日齢ラットの前脳基底野初代培養系においてＡＣｈＥ陽性ニューロン数の、ＮＧＦとＢＤＮＦに対する用量依存曲線を描いた（図１）。ＢＤＮＦは約５０ng/mlで最大値の生存維持作用を示し、ＮＧＦはその約１０分の１の濃度で最大作用を示した。しかし、最大に生存維持を高める作用はＢＤＮＦの方がＮＧＦに比べ高かった。一方、ＮＴ－３はコリン作動性ニューロンに対して全く効果がなかった。そこで、ＮＧＦとＢＤＮＦを組み合わせた同時添加を行った（表１）。共に最大作用を示す５０ng/mlの濃度のＮＧＦとＢＤＮＦの組み合わせによって、相加的なＡＣｈＥ陽性ニューロンの増加が観察できた。これらの結果から、前脳基底野コリン作動性ニューロンには少なくともＮＧＦ応答性とＢＤＮＦ応答性の２種類が存在し、ＮＴ－３に応答するコリン作動性ニューロン群は存在しないこ

とが示唆された。最近、末梢の後根神経節はＮＧＦ、ＢＤＮＦ、ＮＴ－３に応答する少なくとも３つのニューロン群に細分類されることを示唆する報告がなされた（４）（５）。複数のニューロトロフィンに対し応答する前脳基底野コリン作動性ニューロンについても同様に、ニューロトロフィンに対する応答性でニューロン群が細分化される可能性が考えられる。

〔参考文献〕

（１） 野々村健、畠中寛 (1992) 生体の科学 **43** 616-625
（２） Hatanaka, H., Tsukui, H. and Nihonmatsu, I. (1988) *Dev. Brain Res.* **39**, 85-95
（３） Nonomura, T. and Hatanaka, H. (1992) *Neurosci. Res.* **14** 226-233
（４） Carroll, S.L., Silos-Santiago, I., Frese, S.E., Ruit, K.G., Milbrandt, J. and Snider, W.D. (1992) *Neuron* **9** 779-788
（５） Hory-Lee, F., Russell, M., Lindsay, R.M. and Frank, E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 2613-2617

図１

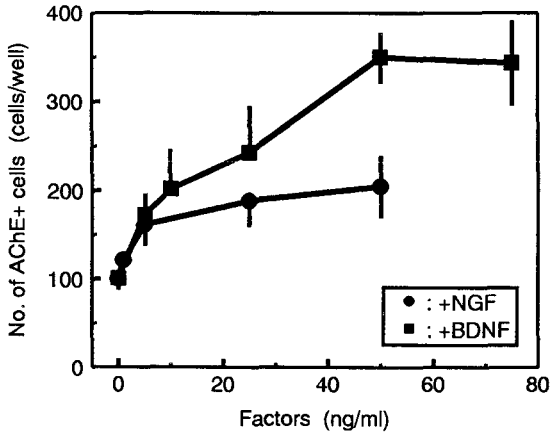


表１

Factors (ng/ml)	AChE+ cells (cells/well)	% Control
Control	101 ± 10.4	100
NGF 50	205 ± 29.6	203
BDNF 25	243 ± 42.2	240
NGF 50 + BDNF 25	457 ± 34.0	453
BDNF 50	350 ± 23.9	347
NGF 50 + BDNF 50	483 ± 41.9	478

図１ 生後１６日齢ラットの前脳基底野初代培養系におけるＡＣｈＥ陽性ニューロン数の、ＮＧＦとＢＤＮＦに対する用量依存性

表１ 初代培養ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンの生存数に対するＮＧＦとＢＤＮＦの相加的効果

4 中枢 GABA ニューロン様細胞株の細胞死

久永欣哉*、呉　繁夫**、池田康夫*、高坂新一*
(国立精神・神経センター神経研究所、代謝研究部*,
東北大学医学部病態代謝学**)

〔要約〕 ラット胎仔海馬由来の初代培養細胞に温度感受性の SV40 large T 遺伝子を導入することにより GABA ニューロン様の細胞株を得た。得られた細胞は 33°C では倍加時間 36 時間で分裂増殖し、核は SV40 large T 抗原に対する免疫染色性を示す。38.5°C の環境下に移すと細胞分裂は速やかに抑制され、しだいに突起を持つ神経細胞様の形態になる。この変化は dibutyryl-cyclic AMP 添加によって増強された。この細胞は GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase の免疫染色性を示す。神経細胞様の形態変化と並行して DNA の断片化を伴う細胞死が認められた。培地より血清を除くと、この神経細胞様の形態変化と細胞死は加速され、この株細胞の分化や生存が何らかの液性因子により調節されていることが示唆された。またこの神経細胞様の形態変化と細胞死は培地に蛋白合成阻害剤である cycloheximide (100 ng/ml) をあらかじめ加えると部分的に抑制され、新たに合成された蛋白質の関与が示唆された。この細胞株は中枢神経細胞の分化やプログラム細胞死、栄養因子要求性の研究に有用であると考えられる。

〔緒言〕 中枢神経の発生の過程では一部の神経細胞が死滅することが知られており、いわゆるプログラム細胞死と考えられている。その細胞死のメカニズムにはリンパ球などでみられるいわゆるアポトーシスとの共通性も指摘され、老化や神経疾患における神経細胞死との関連も含めて興味を集めている。近年、神経細胞の分化や細胞死の研究には初代培養が多用されているが、細胞が分裂増殖せず、またその不均一性などにより、取り扱いが困難な場合も多い。我々は温度感受性腫瘍遺伝子を導入することによりラット胎仔海馬由来の初代培養より GABA ニューロン様細胞株を得た。この細胞株では培養温度の調整や培養液からの血清除去などにより細胞死を誘導することが可能であり、その細胞死の性質等につき検討した。

〔方法〕 胎齢 17 日のラット海馬由来の初代培養細胞にレトロウイルスベクターを用いて温度感受性腫瘍遺伝子 (SV40 large T 抗原 tsA58 mutant) (1) および neomycin phosphotransferase 遺伝子を導入し、neomycin の同族体 G418 に対し抵抗性を示すコロニーを単離することにより細胞株を樹立した。得られた細胞株の温度による形態及び分裂能の変化、いくつかの蛋白の免疫染色性、神経分化に影響があるとされる薬剤、成長因子等に対する反応性等を調べるとともに、この株細胞に細胞死を誘導するような培養条件の検索、さらにアポトーシスの一つの指標とされる DNA の断片化の有無をゲノム DNA の電気泳動 (2) により調べた。

〔結果〕 得られた細胞は 33°C では上皮細胞様の形態を示し(図1)、10% 牛胎仔血清を含む DME 培地で倍加時間約 36 時間で分裂増殖する。また核は SV40 large T 抗原に対する免疫染色性を示した。38.5°C の環境下に移すと細胞分裂は速やかに抑制され、しだいに短い突起を持つやや細長い形態を取るようになる。また、dibutyryl-cyclic AMP に反応して長い突起を持つ神経細胞様の形態になる。これらの細胞は neurofilament protein, neuron-specific enolase, a-tubulin、GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD, 図2) の免疫染色性を示す。一方、dopamine などの合成酵素である tyrosine hydroxylase, アストロサイトの指標である glial fibrillary acidic protein の免疫染色性は示さない。

この形態の変化と伴に細胞死も誘導され、38.5°C に移して60時間後には 10% 血清存在下では最初の6割程度の細胞数となった(図3)。DNA の断片化は38.5°C に移して 8 時間後より軽度に認められ、16時間後には顕著となる(図4)。培地中の血清濃度を下げると、濃度に準じてこの神経細胞様の形態変化と細胞死は加速され、無血清では大半の細胞は速やかに神経細胞様の形態を示すが 24 時間以内に死に至り、この

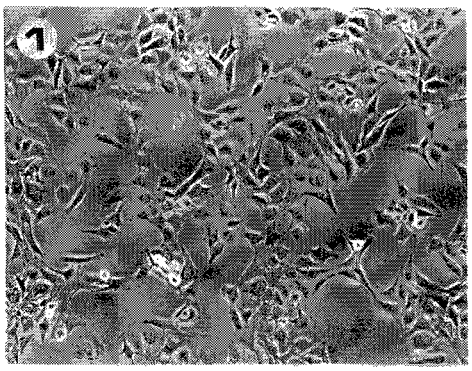
株細胞の分化および生存が何らかの液性因子により調節されていることが示唆される。nerve growth factor (100 ng/ml), basic fibroblast growth factor (5 ng/ml)、epidermal growth factor (20 ng/ml) はいずれも神経細胞への分化促進作用や細胞生存維持作用は示さなかった。またこの神経細胞様の形態変化と細胞死は培地に蛋白合成阻害剤である cycloheximide (100 ng/ml) をあらかじめ加えると部分的に抑制され、新たに合成された蛋白質の関与が示唆された。

[考察] 得られた細胞株は海馬の初代培養由来であり、GAD陽性であることから、海馬のGABAニューロンの性質を備えた細胞株である可能性がある。この株細胞は温度の調節により随時に神経細胞様の分化さらにDNAの断片化に伴う細胞死を誘導することができ、中枢神経細胞の分化やその過程にみられるプログラム細胞死の研究に有用であると考えられる。

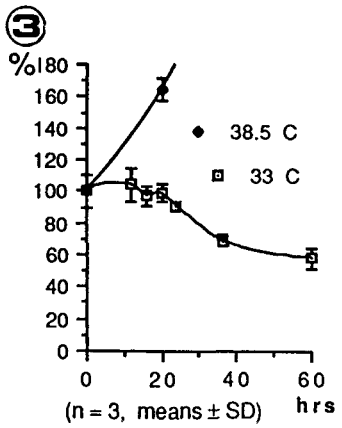
[文献]

(1) Frederiksen K., et al. (1988) Neuron 1: 439-448

(2) Kure S., et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179: 39-45







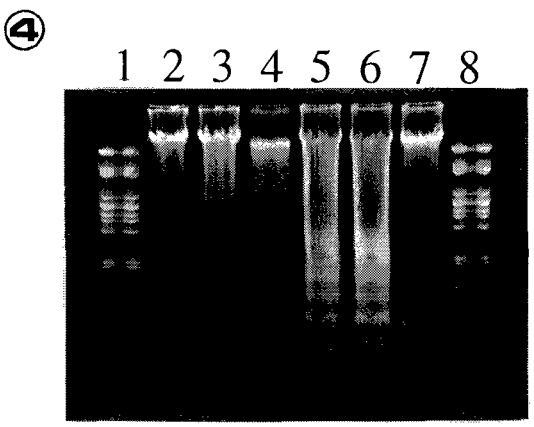


図1　33°Cにおける細胞の形態(位相差)。

図2　38.5°Cにて dibutyryl-cyclic AMP 処理後の細胞 (GAD 免疫染色)。

図3　38.5°Cに移した直後にみられる細胞数の減少。

図4　38.5°Cに移した直後にみられるDNAの断片化。(1,8) DNA マーカー λ/HindIII digest、(2) 33°C から 38.5°C に移す直前、(3) 38.5°C に移して8時間後、(4) 12時間後、(5) 16時間後、(6) 20時間後、(7) 38.5°C に移さず、そのまま33°Cで20時間培養したもの。

5　培養グリア細胞と神経細胞からのサイトカイン受容体の発現

伊藤康宏, 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*)

〔要約〕

マウス中枢神経系のミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびグリア系前駆細胞OS-3と神経株化細胞N18およびN1E115細胞からのサイトカイン受容体の発現を測定した。ミクログリアはIL-3R、-4R、-6R、7R、M-CSFR、GM-CSFRのmRNAを発現した。アストロサイトはIL-6R、-7R、M-CSFR、GM-CSFRのmRNAを発現した。オリゴデンドロサイトからはIL-3R、GM-CSF、M-CSFのmRNAを検出した。OS-3からはIL-2R、-3R、-4R、-6R、GM-CSFRを検出した。神経系株化細胞N18とN1E115はGM-CSFRを発現した。N18は低レベルながらIL-6Rも発現した。中枢神経系でのこれらのサイトカインの機能はまだ充分に解明されていないが、サイトカインネットワークを形成し神経系の細胞間あるいは神経系と免疫系の細胞間の情報伝達に関与していると考えられる。

中枢神経系は免疫学的特権部位と呼ばれ、免疫系の監視を受けない特殊な部位と考えられていた。しかし、近年神経系に於いても免疫系と同様のサイトカインが産生されることが明らかにされている。これらのサイトカインは免疫系とは異なった特有の作用を持ち、種々の細胞の機能を様々に調節している。中枢神経系ではサイトカインは主にグリア細胞により産生され、あるものは発達段階における神経系細胞の増殖や分化に関与していると考えられる。また、あるものは炎症などの病態において産生され、HAMやMSなど病態の形成あるいはグリオージスなど組織の修復機構に関与していると考えられる。本研究では２種類の神経細胞株N18およびN1E115と一次培養より精製したアストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびミクログリアとグリア系株化細胞OS-3からIL-3、-4、-5、-6、-7、GM-CSFおよびM-CSFの各々の受容体mRNAを調べ、サイトカイン受容体の中枢神経系での細胞内局在を明らかにし、中枢神経系におけるサイトカインネットワークを考察した。

［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C3H/HeN新生マウスの脳一次混合培養から精製した。ミクログリアとアストロサイトの純粋度は抗Mac I抗体あるいは抗GFAP抗体による間接蛍光抗体法により測定し、それぞれ98～100%および90～95%であった。グリア細胞はFalcon plastic dishを使用し、Eagle's MEM培地に10% FCS、0.5 μ g/mlインスリンおよび0.2%グルコースを添加して培養した。神経系株化細胞N18およびN1E115はDulbecco's Modified Eagle培地に10% FCSおよび1mMのdbcAMPを添加して培養した。OS-3細胞の分化誘導はEagle's MEM培地に0.5 μ g/mlインスリンおよび0.2%グルコースを添加しこれに2% FCSを添加したものおよび添加しないもので行った。それぞれ約1×106個の細胞からChomczynskiとSacchiの方法によりtotal cellular RNAを採取し、RT-PCR法（6）にてmRNAの半定量を行った。

［結果］

ミクログリアはIL-3R、-4R、-6R、7R、M-CSFR、GM-CSFRのmRNAを発現した。アストロサイトはIL-6R、-7R、M-CSFR、GM-CSFRのmRNAを発現した。また、アストロサイトはTPA刺激によりIL-3R、-4Rを発現した。オリゴデンドロサイトからはIL-3R、GM-CSF、M-CSFのmRNAを検出した。OS-3からはIL-2R、-3R、-4R、-6R、GM-CSFRを検出した。神経系株化細胞N18とN1E115はGM-CSFRを発現した。また、N18は低レベルながらIL-6Rも発現した。しかし、今回使用した細胞からはIL-5Rは検出されなかった。

［考察］

IL-3、GM-CSF、M-CSFはミクログリアを含む単球系細胞の成長因子である。これらのサイトカインはミクログリアを増殖させ、活性化し、形態変化を起こさせる（5）。オリゴデンドロサイトからIL-3R、GM-CSFR、M-CSFRのmRNAを検出したが、オリゴデンドロサイトにおけるこれらのサイトカインの生物学的機能は不明である。また、OS-3細胞は無血清培地での分化にともないIL-2R mRNAを発現した。IL-2は従来よりオリゴデンドロサイトを増殖させることが示唆されており（1）、前駆細胞であるプロリゴデンドロサイトではIL-2Rは低発現しているが、オリゴデンドロサイトに分化するとIL-2Rを高発現する。IL-4はミクログリアの成長と機能を制御している。IL-5はミクログリアとアストロサイトから産生され、アストロサイトによるNGFの産生を誘導する（3）。しかし、IL-5R mRNAはこの実験で使用した神経系のいずれの細胞からも検出できなかった。我々のマウスの系ではIL-6Rはミクログリアとアストロサイトに高発現しており、cAMPで誘導したN18神経系株化細胞では低レベルながら観察された。IL-6はミクログリアとアストロサイトにより産生され、ミクログリアの機能を調節する。一方、神経細胞に対してはIL-6がその

生存と分化を調節し（2）、アストロサイトから産生されるGM-CSFはニューライトの神経突起伸展を促進することが示されている（4）。IL-7の中枢神経系での機能は不明だが、グリア系の3種の細胞からIL-7Rが検出された。

本研究では数種のサイトカイン受容体mRNAを新たに検出したが、これらは中枢神経系サイトカインネットワークに含まれると考えられる。即ちCNS系で産生されるサイトカインはCNS細胞自身の受容体と相互作用してオートクラインおよびパラクラインに細胞の活性、増殖、分化を調節し、CNS系で産生されないサイトカインの受容体は神経系と免疫系との間の情報伝達に関与していると考えられる。

[参考文献]
1：Benvenisite,E.N. et al.(1986)Nature,321.610-613
2：Hama,T.,et al.(1989)Neurosci.Lett.,104,340-344
3：Hayashi,K. et al.(1992)Seikagaku,64,289-307
4：Kamegai,M.,et al.(1990)Brain Res.,532,323-325
5：Sawada,M. et al.(1990)Brain Res.,509.119-124
6：Sawada,M. et al.(1992)Brain Res.,583.296-299

	IL-3R	IL-4R	IL-5R	IL-6R	IL-7R	GM-CSFR	M-CSFR
microglia	+++	++	-	+++	+++	+++	++
astrocyte	-	-	-	+	+	++	++
oligodendrocyte	++	++	-	-	+	+	+++
N18	-	-	-	+	-	+	-
N1E115	-	-	-	-	-	+	-

Relative levels of expression were determined by the TIAS 2000 Image Analyzer and indicated as follows:

+++, high (more than each control β-actin level)

++, moderate (comparable to each control β-actin level)

+, low (1/3 to 1/10 of each control β-actin level)

-, not detected (less than 1/10 of each control β-actin level)

6 Neuron-glia interactionと成長抑制因子(GIF)

内田洋子[1]、大塚成人[2]、井原康夫[3]
（都老人研神経病理[1]、東大医学部病理[2]、東大脳研病理[3]）

〔要約〕
成長抑制因子（GIF）は広く中枢神経系に存在し、細胞レベルではアストロサイトに分布している。そして、GIFは正常アストロサイトだけでなく、脳梗塞周囲の反応性アストロサイトにも出現していた。アルツハイマー病を含む変性疾患では、ニューロンの脱落が高度な部位にあるアストロサイトでGIFは消失するが、ニューロンの脱落が軽度な部位にあるアストロサイトでは、GIFは消失しなかった。また、培養アストロサイトでは、ニューロンとのinteractionがなくなるとGIFが消失し、ニューロンとcocultureするとGIFが出現するようになった。これらのことから、アストロサイトでのGIF発現は、ニューロンからのシグナルによって維持されていると考えた。

成長抑制因子（GIF）は中枢神経系（アストロサイト）に特異的に分布するメタロチオネイン様の蛋白である。正常老人大脳でのGIFの分布は、第２－６層にあるアストロサイトの細胞体と突起、白質のアストロサイトの細胞体や、小血管周囲にあるアストロサイトの血管足に限局している。アルツハイマー病では灰白質第２－６層でGIFが減少し、GIF消失部位ではGFAP陽性の反応性アストロサイトが出現している（１）。そこで、今回は、すべての反応性アストロサイトでGIFが消失しているのか、アストロサイトにGIFを発現させる条件はなにかについて検討した。

〔方法〕
GIF抗体の調製：GIF3-13およびGIF53-54に相当するペプチドを合成し、ウサギに投与して抗血清を得、各々の合成ペプチドでアフィニティ精製した。GIF3-13抗体は、精製GIFを認識するが、メタロチオネインを認識しない。また、ヒト脳抽出液だけではなく、ラットやマウスの脳抽出液中のGIFのバンドも認識する。GIF53-54はヒトGIFのみを認識する。
免疫組織化学：正常老人８例、アルツハイマー病８例、筋萎縮性側索硬化症２０例、ピック病５例、陳旧性脳梗塞５例、パーキンソン病３例、進行性核上性麻痺３例、ハンチントン舞踏病１例の脳または脊髄の剖検組織を１０％ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成した。二重染色はGIF53-54抗体とGFAP抗体（Dako社）を用い、Ohgami (2)らの方法に従い、ABC法にて行なった。
アストロサイトの培養：２日令のラット大脳を取りだし、Yong (3)らの方法に従って、トリプシン処理、30%Percol密度勾配遠心によりアストロサイト分画を得た。細胞を25cm^{2}の培養フラスコにまき、10%牛胎児血清、2mg/mlグルコース、5μg/mlインシュリン、20μg/mlゲンタマイシンを含むMEMで２日間培養し、浮遊細胞を除いた。細胞をさらに５日間培養後、150rpmで２時間振とうして浮遊細胞を除いた。

〔結果と考察〕
（１）アルツハイマー病脳のアストロサイトでのGIFとGFAPの動向
アルツハイマー病の大脳皮質（第２－６層）でのGIF染色性の減少は、症例によってその程度は異なり、GIF染色性が層状に消失する症例、patch状に消失する症例、GIF染色性が細胞体ではあまり減少せず突起遠位部で消失してGIF陽性のmeshworkが見られなくなる症例があった。そして、GIF抗体とGFAP抗体による二重染色の結果、GIF消失部位ではGFAP陽性の反応性アストロサイトが出現し

ていた。しかし、GIF染色性が残っている部位では、アストロサイトの多くがGIFとGFAPの両方に陽性になっていた。共焦点レザー顕微鏡によって、同一視野内に、３種類のアストロサイト（GIFのみ陽性のアストロサイト、GIFとGFAPの両方に陽性のアストロサイト、GFAPのみ陽性のアストロサイト）が観察された。これらのことから、アルツハイマー病の大脳皮質第２－６層でGIFが減少しGFAPが増加するのは、GIF陽性のアストロサイトが、GIFとGFAPに陽性のアストロサイトへと性質を変え、やがて、GFAP陽性のアストロサイトへと変わっていくためと考えた。

（２）アルツハイマー病以外の変性疾患でのGIFの動向

ピック病、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、ハンチントン舞踏病、筋萎縮性側索硬化症、陳旧性脳梗塞について、病変部位でのGIFの変化を免疫組織化学的に調べた。その結果、脳梗塞周囲の反応性アストロサイトには、正常アストロサイトに比べてかなり強いGIF染色性が認められた。また、ニューロンの脱落を伴う変性疾患では、GIF染色性に疾患特異性はなく、同一疾患でも症例によって染色性の程度が様々であった。そして、症例によるGIF染色性の差は、高度にニューロンが脱落している部位ではGIF染色性が消失し、ニューロンの脱落が軽度な部位ではGIF染色性が残るためであった。これらの結果から、アストロサイトでのGIFの発現にニューロンの存在が必須であると考えた。

（３）培養アストロサイトでのGIFの動向

培養アストロサイトを用い、GIF発現にニューロンの存在が必要かどうかを調べた。GIFは出生時のラット大脳ですでに検出されたが、生後2-3週目に急激に増加し、やがてプラトーに達した。GFAPも同様に生後2-3週目に急激に増加しプラトーになった（図１）。培養アストロサイトでも生後2-3週目に相当する時期に、GIFは増加したが、その後GIFは消失した。それに対し、GFAPは培養アストロサイトで生後2-3週目に相当する時期から増加し、GIFが消失したアストロサイトでもGFAPは減少しなかった（図２左）。GIFが消失したアストロサイトを、胎生18日令ラットの大脳ニューロンと10日間coculturetしたところ、アストロサイトにGIFが検出されるようになった（図２右）。これらの結果から、アストロサイトがGIF発現を維持していくには、ニューロンとのinteractionが必要であると考えた。

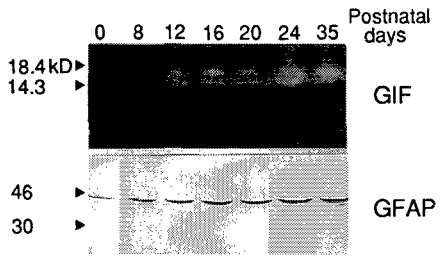


図１．ラット大脳GIFとGFAPのimmunoblot

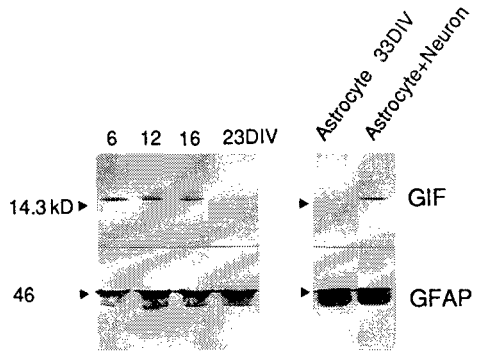


図２．培養アストロサイトでのGIFとGFAPのimmunoblot

〔文献〕

(1) Uchida Y et al: Neuron, 7: 337-347 (1991)

(2) Ohgami T et al: Acta Neuropathol, 81: 242-247(1991)

(3) Yong VW et al: J Neurosci Res, 19: 187-194 (1988)

7　c－MYCタンパク質によるイノシトールリン脂質情報伝達系の制御の可能性

堀越哲郎[1]、高橋恵[2]、豊島聰[3]、吉岡亨[4]
（[1]東海大・開発工・生物工、[2]横浜市大・医・精神、[3]ＪＴ基礎研、
[4]早稲田大・人間科学）

［要約］
ラット小脳発生中のＰＩＰ$_2$量の変化の原因を調べる目的で、immediate early genes（ＩＥＧ）のひとつである*ｍｙｃ*遺伝子に注目し、そのmRNA及びタンパク質の発現量の変化を小脳の発生段階を追って測定した。他のＩＥＧである*ｃ－ｆｏｓ*，*ｃ－ｊｕｎ*，*ｊｕｎ*－Ｂの発現パターンが抗ＰＩＰ$_2$抗体による染色性の変化とは異なるパターンを示したのに対して、*ｃ－ｍｙｃ* mRNAの発現は抗ＰＩＰ$_2$抗体による染色性が低下するよりも先に上昇し始め、小脳発生が終了し染色性が回復する時期には低い値に戻っていた。更にｃ－MYCタンパク質の発現パターンを調べると、細胞質画分の量的変化は抗ＰＩＰ$_2$抗体による染色性の変化と負の相関を示していた。これらの結果はｃ－MYCタンパク質によりＰＩＰ$_2$の存在量または局在が制御されている可能性を示している。

イノシトールリン脂質情報伝達系は、イノシトール三リン酸（ＩＰ$_3$）を介して細胞内カルシウム動員を行い、ジアシルグリセロールを介してＣキナーゼ（ＰＫＣ）を活性化するなど、重要な細胞内情報伝達系である。我々は神経系の発生におけるフォスファチジルイノシトールニリン酸（ＰＩＰ$_2$）及びＰＫＣの動態を調べるために、生後発達することが知られているラット小脳を用い抗ＰＩＰ$_2$抗体及び抗ＰＫＣ抗体、抗フォスファチジルセリン（ＰＳ）抗体による免疫組織化学的染色を行ない、発生段階による変化を調べてきた。その結果、抗ＰＩＰ$_2$抗体による染色部位が、神経突起の伸展、シナプス形成に対応するように変化しており、しかも染色部位とグルタミン酸アゴニストによるカルシウム動員部位とが対応していることが示された（１）。また抗ＰＫＣ抗体によるプルキンエ細胞の染色は発生段階を通してほぼ一定だったのに対し、抗ＰＳ抗体による染色性は変化しており、小脳発生中のプルキンエ細胞内のＰＫＣは量的な変化よりも活性化の度合によって制御されていることが示唆された（２）。このようにＰＩＰ$_2$の存在量または局在の変化が神経発生において重要だと考えられるのだが、それが何によって制御されているのかは明らかでない。そこで本研究ではimmediate early genes（ＩＥＧ）のひとつである*ｍｙｃ*遺伝子に注目しＰＩＰ$_2$の存在量の制御の可能性を検討した。*ｍｙｃ*遺伝子は神経発生中に発現量が変化するために神経の増殖・分化に関与するであろうこと、またＰＩ代謝回転やＰＫＣとの相互作用などが示唆されているが、その機能については不明な点が多い。

［方法］

１）ｃ－*ｍｙｃ* mRNAの発現

Northernブロット：各日齢のラット小脳約５０ｍｇよりＡＧＰＣ法にて全ＲＮＡを抽出した。４０μｇの全ＲＮＡをホルムアルデヒドアガロースゲルにて分離し、ニトロセルロース膜に転写、ランダムプライム法により^{32}Ｐラベルしたｃ－*ｍｙｃ*プローブ(Takara)をハイブリダイズさせた。洗浄後Ｘ線フィルムに感光し、それをイメージアナライザーで定量化してmRNA発現量を半定量化した。比較のために、他のＩＥＧである*ｃ－ｆｏｓ*，*ｃ－ｊｕｎ*，*ｊｕｎ*－Ｂについても同様に測定した。**in situ hybridization（ＩＳＨ）**：各日齢ラットをペントバルビタール麻酔後、４％パラホルムアルデヒド、0.5％グルタールアルデヒド、0.1Mリン酸緩衝液で灌流固定し、小脳をマイクロスライサーにて厚さ５０μｍの切片にした。これをproteinase Kで処理した後ｃ－*ｍｙｃ*用プローブをハイブリダイズさせた。プローブはｃ－*ｍｙｃ*特異的領域をＰＣＲ法で増幅し、これをテンプレートにantisense ＲＮＡを合成し（方法は文献３参照）使用した。ＲＮＡ合成時に digoxigenin-UTP (Boehringer) によりラベルし、組織上でハイブリダイズしたプローブを抗digoxigenin抗体にて検出した。

２）ｃ－MYCタンパク質の発現

Westernブロット：各日齢のラット小脳約１０ｍｇをホモジナイズ後細胞成分を回収し、Schreiberら（４）の方法により細胞質画分と核画分に分離した。各画分のタンパク質を可溶化後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、セミドライブロッターでＰＶＤＦ膜に転写し、抗ｃ－MYC抗体（ＣＲＢ）を用いて検出し、イメージアナライザーで半定量化した。**免疫組織化学**：ＩＳＨと同様に各日齢のラット小脳切片を作成後、抗ｃ－MYC抗体 (Oncogene Science) と反応させVectastain ＡＢＣキット(Vector Lab.)にて検出した。

［結果］

1）c－*myc* mRNAの発現

c－*myc* mRNAの発現量をNorthernブロットで見ると、生後７日に一過性の増加を示した後、１２日から14日にかけて急激に減少しその後は緩やかに減少するというパターンを示した。比較のためにc－*fos*，c－*jun*，*jun*－Bの各mRNAについて同様に調べたところ、これらは生後２１日または３５日に向かって増加を続け、c－*myc*のパターンとは異なっていた。ＩＳＨではc－*myc* mRNAの発現は生後３日目からプルキンエ細胞に見られるようになり、それが生後７－１４日にかけて多く発現していた。その後は次第に発現量は減少するが、２１日及び成体でも完全には消失しなかった。一方顆粒細胞は、細胞が外顆粒層から内顆粒層に移動する前後にc－*myc* mRNAが多く発現しており、移動前の増殖時や移動後のシナプス結合完成時以後ではあまり発現していないように思われた。

2）c－MYCタンパク質の発現

Westernブロットの結果では、c－MYCタンパク質の発現は細胞質画分では生後１０日から１２日にかけて高値を示した後、急激に減少し生後２１日ではほぼ成体同様の低いレベルになった。これに対し、核画分のc－MYC量は生後７日から１４日にかけて増加し、生後２１日まで高値を維持し、その後緩やかな減少に転じた。細胞全体のc－MYC量の変化は細胞質画分と同様であった。免疫染色の結果は次のようであった。生後７日でプルキンエ細胞の核と細胞質に強い染色が見られるようになるが、生後１４日になると核の染色性は強くなるが細胞質の染色性が低下した。核の染色性は生後２１－３０日でも強いが、その後成体になるにつれ低下した。顆粒細胞は、生後７日より２１日まで内顆粒層に移動した細胞の核に強い染色が見られたが、生後３０日以後成体になるにつれ低下した。

［考察］

既に報告したように、ラット小脳発生中のプルキンエ細胞の抗PIP_2抗体による染色性は生後１５日頃に最低になり、同時にグルタミン酸アゴニストであるキスカル酸によるカルシウム動員能が最低となる（1）。キスカル酸によるカルシウム動員はフォスフォリパーゼC（PLC）によるPIP_2の加水分解によって生ずるIP_3によって引き起こされることが知られているので（5）、PIP_2量が調節されたために応答性が変化すると考えられる。PIP_2量の変化がIEGによって制御されているとすると、IEG発現量の変化はPIP_2量の変化に先だって起こるはずである。今回調べた範囲内ではIEGのうちc－*fos*，c－*jun*，*jun*－Bの発現パターンは抗PIP_2抗体による染色性の変化とは異なるパターンを示しており、これらが直接PIP_2の存在量を制御している可能性は低い。一方、c－*myc* mRNAの発現は抗PIP_2抗体による染色性が低下するよりも先に上昇し始め、生後２１日以後の染色性の回復時には低い値に戻っている。更にc－MYCタンパク質の発現パターンを調べたところ、特に細胞質画分の量的変化は抗PIP_2抗体による染色性の変化と負の相関を示していた。これらの結果はc－*myc* 遺伝子によりPIP_2の存在量が制御されている可能性を示している。それではそれはどのような機構によるのだろうか。c－MYCタンパク質が核に局在し転写調節因子として作用している可能性も考えられるが、我々は細胞質画分のc－MYCタンパク質が一過性に高くなりそれがPIP_2量変化と対応していることに注目している。c－MYCタンパク質は構造上の類似性からフォスファターゼインヒビターではないかという仮説が出されている（6）。PLCはリン酸化されているととPIP_2の加水分解が阻害されるので（7）、その結果カルシウム動員能の低下とPI代謝回転の抑制が起こると考えられる。PLCのリン酸化の程度がフォスファターゼインヒビターとしてのc－MYCタンパク質により制御されていると考えるとこれらの現象が説明可能である。

［文献］

1. 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.
2. Miyazawa, A., Inoue, H., Yoshioka, T., Horikoshi, T., Yanagisawa, K., Umeda, M. and Inoue, K. (1992) J. Neurochem., 59, 1547-1554.
3. Horikoshi, T., Danenberg, K.D., Stadlbauer, H.W., Volkenandt, M., Shea, L.C.C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frosing, R., Ray, M., Gibson, N.W., Spears, C.P. and Danenberg, P.V. (1992) Cancer Res., 52, 108-116.
4. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Nucleic Acid Res., 17, 6419-6420.
5. Berridge, M. (1993) Nature, 361, 315-325.
6. Rechsteiner, M. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 143, 194-198.
7. Ryu, S.H., Kim, U.H., Wahl, M.I., Brown, A.B., Carpenter, G., Haung, K.P. and Rhee, S.G. (1990) J. Biol. Chem., 265, 17941-17945.

8 マウス脳核画分における神経分化特異的蛋白質 necdin の性質

丸山悦子、吉川和明
（都神経研、分子神経生物）

〔要約〕 Necdin の脳における機能を明らかにするためにC末端の推定アミノ酸に対する合成ペプチド抗体を用いて、necdin の生化学的性質を westernblotting によって調べた。その結果、SDS-PAGE で 49 kDa と51 kDa が染色され、それは脳の核画分で比活性が最も高かった。Sephacryl S-300 によるゲル濾過法で核画分の necdin は分子量 700 kDa だった。グルタルアルデヒドによる架橋反応で necdin のバンドは濃度に依存して減少した。非還元下では検出されなかった。液体等電点電気泳動 (ロトフォア) では pI 6.2 の画分にこれらの２本のバンドがみられた。0.5 M NaCl と1% NP-40を含むトリス緩衝液で核画分より抽出され、DNA-アフィニティクロマトカラムに強く吸着した necdin は 0.6 M NaCl で洗浄後 2.0 M NaCl で溶出された。その銀染色像の 50 kDa のバンドは抗体染色された necdin のバンドと一致した。Necdin は等電点ゲル電気泳動で pI 9.5 の強塩基性蛋白として挙動した。ロトフォアで得られた necdin は他蛋白と結合している可能性もある。これらの知見は necdin の核内での機能を示唆する。

目的： 既に胚性癌細胞 (P19) においてレチノイン酸誘導による subtraction library から神経分化に伴って現れる cDNAをクローニングし(1)、その推定アミノ酸に対する合成ペプチド抗体を用いてその産物 (necdin) が免疫組織化学的に神経細胞の核に局在することを報告した(2)。今回は necdin が脳でどのような役割を果しているのかを知るためにその性質をC末抗体を用いて生化学的に究明した。

方法： C末端の 15 推定アミノ酸に対する合成ペプチド抗体を作製し、この抗体をペプチドアフィニティクロマトグラフィーで精製後使用した。Westernblotting はルミゲンPPDを基質としてケミルミネッセンスにより検出した。核標品は Brobel と Potter の方法 (3) に従って得た。架橋反応は Baler らの方法 (4) を用い、低調緩衝液処理の核上清を用いた。DNA (native)-セルロースカラムには核より 0.5 M NaCl と1% NP-40 を含むトリス緩衝液で抽出、次に0.1% NP-40, 2 mM $MgCl_2$ を含むトリス緩衝液に透析した標品 200 μg を 1 g の担体に使用した。ロトフォアでは P1 画分より上述と同じく抽出、透析後、1.5% ByoRyte を添加し、1 時間の前泳動後、15 Wの定出力で 15 mg の蛋白を分離した。5 時間 の泳動後 2 ml ずつ 20 本のチューブに分取した。各溶出画分の蛋白は 15 % の TCA で濃縮し洗浄後、SDS-PAGE に供した。電気泳動は 8 %もしくは 4-20 %のグラジエントゲルおよび pH 勾配 3-10 の IEF ゲルを用い、ブロッティングは PVDF 膜を使用し、蛋白像は銀染色法によって検出した。

結果： Necdin は脳の核分画で最も比活性が高く、それは 0.3 M NaCl 共存 Sephacryl S-300 によるゲル濾過法では分子量 700 kDa だった。Westernblotting では 51 kDa を主バンドとした 49 kDa と51 kDa の２種類よりなることがわかった。グルタルアルデヒドによる架橋反応の結果、両バンドとも濃度依存的にバンドの消失が見られた（Fig. 1）。分子量の変化あるいは抗原決定部の異常が生じたことになる。種々の精製法は抗原性の低下あるいは構造の変化のためか極めて検出が微弱となった。ロトフォアによる等電点分離により pI 6.2 の画分に49 kDa と51 kDaのバンドが常に見られた（Fig. 2）。DNA-アフィニティカラムに強く結合した necdin は 0.6 M NaCl を含むトリス緩衝液で洗浄後 2.0 M NaCl で溶出され 50 kDa が免疫染色された。その 50 kDa のバンドは銀染色で蛋白染色された（Fig. 3）。このクロマトグラフィーにより necdin は特異的に精製されることがわかったが、同時に 70 kDa と 56 kDa のバンドが認められた。この溶出標品をゲル等電点で分離し、銀染色したところ pI 9.5と pI 4.3-5.5 に数本のバンドが認められた（Fig. 4）。種々の精製標品の蛋白像の比較から necdin のバンドは pI 9.5 のバンドと推察され、necdin は強塩基性の核蛋白と考えられた。

考察： Necdin はマウス脳で神経の分化に伴い発現することが免疫組織化学的 (2) に、また最近 in situ hybridization (高城, 吉川、未発表) により明らかにされた。しかし、その分子レベルの機能に関しては推察の域をでない。本研究により necdin は核に存在して多量体で存在するらしいこと、ＤＮＡ結合能があること、また pI 9.5 の強塩基性蛋白であることがわかった。cDNA 配列より得られた推定アミノ酸による necdin の pI は 8.7 と算定される。ロトフォアにおいて pI 6.2 に分離された necdin は他蛋白に結合してみかけの等電点を示した可能性がある。さらに分析を進め、神経分化の制御機構に本蛋白あるいは複合体がどのようにかかわり得るのか検討したい。

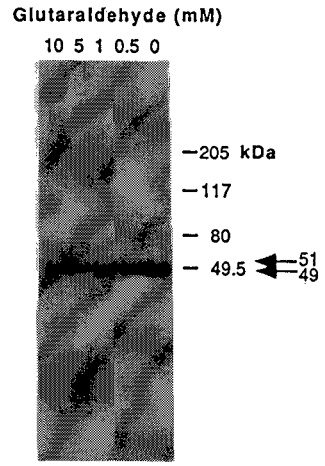


Fig. 1.
Westernblot analysis of necdin cross-linked with glutaraldehyde at different concentrations. 3 µg of nuclear protein treated with glutaraldehyde was electorophoresed on a 4-20 % gradient gel.

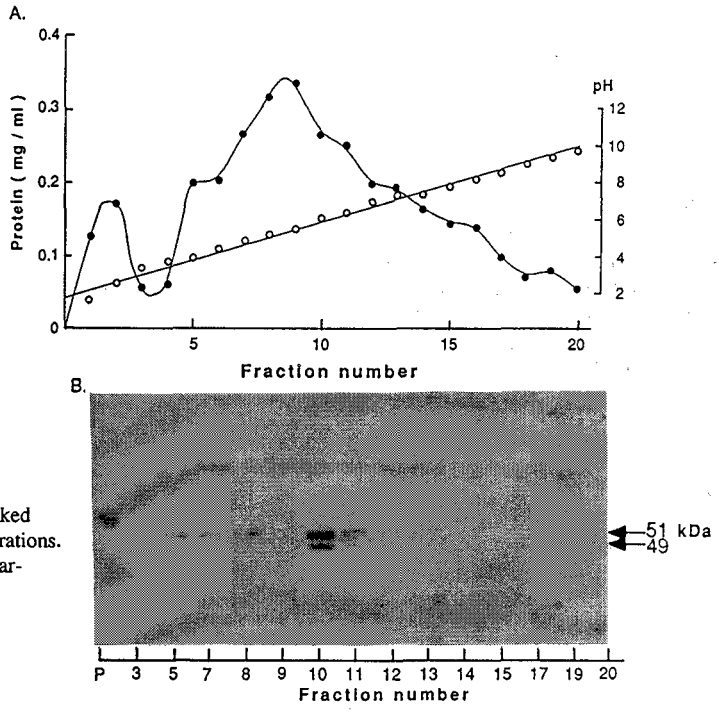


Fig. 2.
Analysis of Rotofor fractions by pH, protein assay, and necdin immuno reactivity.
15 mg of brain extract containing 1.5% BioRyte, 15% glycerol and 0.1% NP-40 was fractionated. A) pH gradient (○—○) and protein (●—●). B) Westernblot. P, sample prior to fractionation on Rotofor.

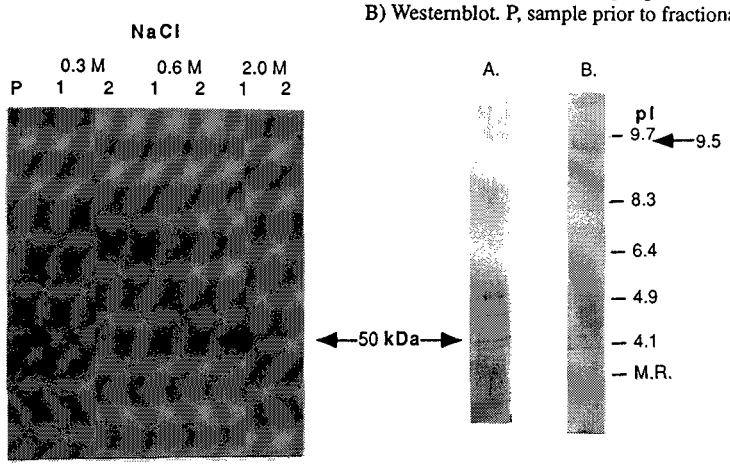


Fig. 3.
DNA binding activity of necdin.
Eluates from a DNA(native)-cellulose column were concentrated with 15% TCA followed by washing with ether-ethanol (1:1), and analyzed by western-blotting. P, sample pior to separation on the column.

Fig. 4.
Analysis of necdin purified by a DNA-cellulose column chromatography.
A) Silver-stained SDS-PAG of eluates from a DNA-affinity column with 2 M NaCl. B) Silver-stained IEF-PAG of eluates from a DNA-affinity column with 2 M NaCl. M.R., methyl red.

References

1) K. Maruyama et al., Biochem.Biophys. Res. Commun., 178, 291-296 (1991).
2) T. Aizawa et al., Develop. Brain Res., 68, 265-274 (1992).
3) G. Brobel and Van R. Potter, Science, 154, 1662-1665 (1966).
4) R. Baler et al., Mol. Cell Biol., 13, 2486-2496 (1993).

9　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

山田真久[1,3]、中尾純治[2]、鹿川哲史[3]、御子柴克彦[4]、池中一裕[3]
（[1]阪大・蛋白研、[2]慶応大・医学部、[3]生理研、[4]東大・医科研）

〔要約〕
我々は、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シング産物ＤＭ－２０がオリゴデンドロサイトの分化時期に相当する胎仔期に産生が増大することを明らかにしてきた。今回、この胎仔期におけるＤＭ－２０の機能を明らかにするためにＰＬＰ及びＤＭ－２０ｃＤＮＡをＮＩＨ－３Ｔ３細胞に導入した形質転換細胞を作製した。この形質転換細胞の培養上清は胎仔マウス脳初代培養系のオリゴデンドロサイトの分化を促進する作用を示した。このことから、ＰＬＰ遺伝子産物またはそれらの修飾産物が、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示唆された。

（序論）
ミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）及びＰＬＰ遺伝子のオルタナティブスプライス産物であるＤＭ－２０は、中枢神経系のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的に発現し、ミエリンの膜構造の安定化に関与していると考えられていた（１）。しかし、ＰＬＰ遺伝子に突然変異を持つジンピーマウスでは、ミエリン形成期以前にオリゴデンドロサイトが幼弱なまま分化異常を起こし変性脱落してしまうことが知られている。さらにこのジンピーオリゴデンドロサイトは、正常のアストロサイトの培養上清に含まれる液性因子により延命する事が報告された（２）。近年、我々は、ＰＣＲ法を用いグリア細胞の分化時期に相当する胎仔期においても、ＤＭ－２０ｍＲＮＡが一過性に産生されることを見いだし報告した（３）。これらのことより、グリアの細胞分化時にＰＬＰ遺伝子がアストロサイトなどオリゴデンドロサイト以外の細胞にも発現し、オリゴデンロサイトの生存維持又は分化促進に機能していることが示唆された。我々は、神経系由来の非常に多種の培養細胞にＤＭ－２０－ｍＲＮＡが産生されていること報告してきた。そのうち、特に多くのＤＭ－２０を産生しているマウスオリゴデンドログリオーマＧ２６、マウスメラノーマＢ１６、ラットニューロブラストーマＢ１０４細胞の培養上清にオリゴデンドロサイトの分化を促進する液性因子が放出されていることを明らかにし、昨年の本学会でも発表した（４）。今回、我々は、この因子がＰＬＰ遺伝子発現に直接関連したものであるか検討するため、新たにレトロウイルス強制発現ベクターを開発し、これを用いてＰＬＰ及びＤＭ－２０ｃＤＮＡをＮＩＨ－３Ｔ３細胞に強制発現させた。これらＰＬＰまたはＤＭ－２０ｃＤＮＡを導入したＮＩＨ－３Ｔ３形質転換細胞の培養上清には、オリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する効果が出現した。

（実験方法）
１）レトロウイルスベクターの構築　ＰＬＰ又はＤＭ－２０はＬＴＲから転写され、マーカーとしてｎｅｏ耐性遺伝子を発現するよう作製した。又、感染効率を上げるためψ^+の領域を挿入した。（図１）
２）レトロウイルスベクターを用いた形質転換細胞の作製　マウス小脳のｃＤＮＡのライブラリーから得たＰＬＰとＤＭ－２０クローンの蛋白質翻訳領域を我々の研究室で作製したｐＤＬ$^+$レトロウイルスベクターに挿入し、リン酸カルシウム法によりそれぞれウイルスパッケージ細胞ψ２へ導入した。得られたｐＤＬ$^+$ＰＬＰウイルスとｐＤＬ$^+$ＤＭ－２０ウイルスをそれぞれＮＩＨ－３Ｔ３細胞に感染させ形質転換細胞を作製した。
３）培養上清の調製　ＰＬＰまたはＤＭ－２０ｃＤＮＡを発現している形質転換細胞を、Ｎ４合成培地（５）で１又は、２日間培養した上清を回収し、その上清をアミコン（ＹＭ－１０）濃縮機で１０分の１容量に限外濾過した後、５ｍＭ燐酸緩衝液、５０ｍＭ　ＮａＣｌ，１μｇ／ｍｌ　ＰＭＳＦにて透析し濃縮試料とした。
４）胎仔マウス脳初代培養　胎生１７日のＩＣＲマウス大脳皮質をトリプシン処理により細胞を分散させ、ポリエチレンイミン処理したカバーグラスの上に３×１０^{5}の細胞密度で培養した。１０％牛胎児血清を含むＤＭＥＭ：Ｈａｍ’ｓＦ１２＝１：１で３日間培養した後、１）で調製した試料を含むＮ４：Ｏ３＝１：２で混合した無血清培地（５）で更に４日間培養した。
５）免疫染色　オリゴデンドロサイトの染色には、一次抗体としてマウス抗ガラクトセレブロシド（ＧａｌＣ）モノクローナル抗体（Ｏ１抗体）を用いた。パラホルムアルデヒドで固定した後、二次抗体にはＦＩＴＣ－抗マウス抗体を用い蛍光顕微鏡下で陽性細胞数を数えた。

（結果と考察）
Ｇ２６細胞やＢ１０４などＤＭ－２０を産生している細胞からは、オリゴデンドロサイトの分化を促進している液性因子が放出されている。この活性は，ＮＩＨ－３Ｔ３細胞のようなＤＭ－２０を産生していない細胞の上清には通常見られない（４）。この因子とＰＬＰ遺伝子発現の因果関係をより明確にするために、ＰＬＰ又はＤＭ－２０ｃＤＮＡをＮＩＨ－３Ｔ３細胞に強制発現させ、オリゴデンドロサイトの分化促進作用を検討した。レトロウイルスベクターは、①遺伝子導入時に細胞の損傷が少ない、②１細胞に１コピーのみ取り込まれる特徴を持っていることから安定な実験結果が期待された。そこで新たに強制発現ベクターを開発し、このベクターにＰＬＰ又は、ＤＭ－２０ｃＤＮＡを挿入した。このベクターをψ２細胞に導入した後、産生されるレトロウイルスによって、ＮＩＨ－３Ｔ３細胞にＰＬＰ又はＤＭ－２０を強制発現させることに成功した（図２）。細胞の培養上清を濃縮・透析した試料をオリゴデンドロサイトの前駆細胞が多く

存在する胎生１７日マウス大脳皮質の初代培養系に添加したところ、オリゴデンドロサイトのマーカーであるＧａｌＣ陽性数の増加を示した。しかし、ＰＬＰまたはＤＭ－２０ｃＤＮＡを導入していないＮＩＨ－３Ｔ３細胞の培養上清はＧａｌＣ陽性数に変化を示さなかった（図３）。以上のことから、ＰＬＰ遺伝子産物もしくはその修飾産物がオリゴデンドロサイトの分化を促進する液性因子の産生に機能していることが示された。

この液性因子がどのような分子であるか、現在検討中である。我々は、ＧａｌＣ陽性細胞数をオリゴデンドロサイトの数としているので，Ｏ－２Ａ前駆細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を促進する作用と同様に、オリゴデンドロサイトのアポトーシスを減少させる作用や、幼弱オリゴデンドロサイトの分裂を盛んにしていることも考えられる。この因子の作用機序に関しても現在検討しているのであわせて報告する。

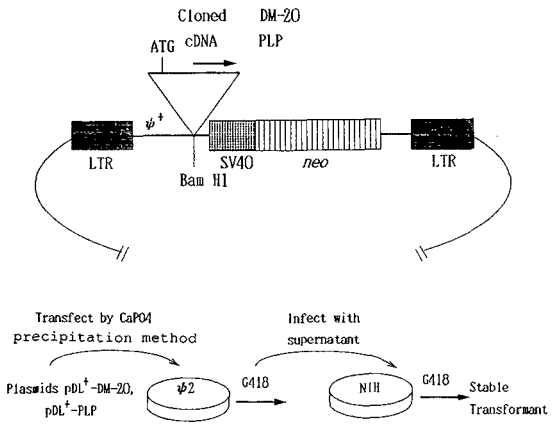
（まとめ）

中枢神経系のミエリンの膜構造の安定化に関与していると考えられていたＤＭ－２０が、他の蛋白質との相互作用を介して、或いはそれ自身の修飾産物が細胞外に放出され、オリゴデンドロサイトの分化生存に機能していることが示された。

（文献）

1. Campagnoni, A.T. and Macklin, W.B. (1988) Mol. Neurobiol. 2, 41-89.
2. Bartlett, W.P. et al. (1988) Glia 1, 253-259.
3. Ikenaka, K., Kagawa, T. and Mikoshiba, K. (1992) J. Neurochem. 58, 2248-2252.
4. 中尾純治、池中一裕、鹿川哲史、Seung, U. Kim、御子柴克彦 (1992) 第３５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　レトロウイルス強制発現ベクターの構築と Stable Transformant の作製



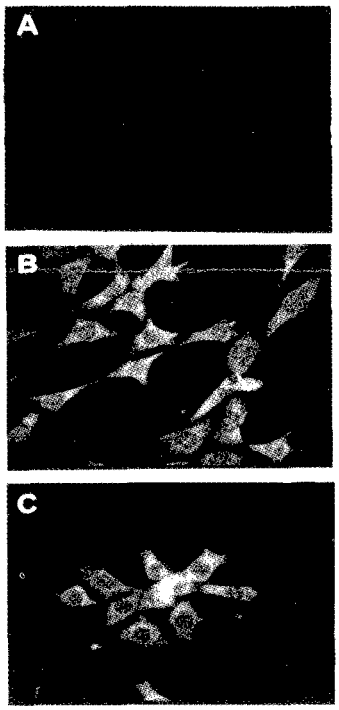
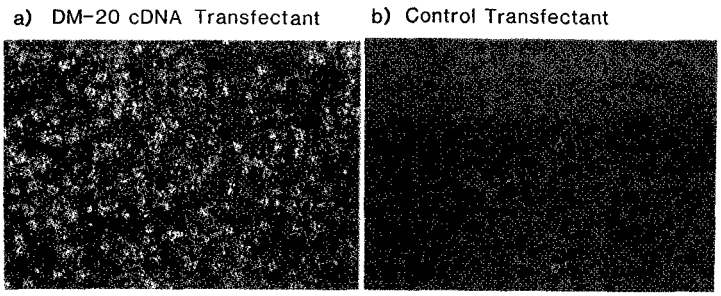


図２　形質転換細胞におけるPLP遺伝子産物の産生
A:NIH-3T3細胞，B:PLP強制発現細胞，C:DM-20強制発現細胞を抗PLP抗体(D2)で免疫組織化学染色した。

図３　形質転換細胞の培養上清に含まれるオリゴデンドロサイトの分化促進効果



10　グリア分化因子としてのミエリンプロテオリピド蛋白質の機能解析 ～トランスジェニックマウスの系を用いて～

鹿川哲史[1]、池中一裕[1]、井上芳郎[2]、御子柴克彦[3]
（1岡崎生理研、2北大・第一解剖、3東大医科研）

〔要約〕我々はミエリンプロテオリピド蛋白質（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、ＰＬＰ遺伝子産物の機能の推定を試みた。共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて詳細に解析した結果、ＰＬＰ遺伝子産物は抗ガラクトセレブロシド抗体陽性のオリゴデンドロサイトの数を増加させるが、同時に、オリゴデンドロサイトの分化異常やミエリン形成不全も引き起こすことが明らかとなった。即ち、ＰＬＰ遺伝子産物は、幼弱なオリゴデンドロサイトの分裂を促進するが、逆にその成熟過程には阻害的に作用するという、オリゴデンドロサイトの分化や生存維持を制御する重要な分子であることが示唆された。

【序論】

ミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）は、中枢ミエリンに局在し、ミエリン膜の層構造の維持に機能すると考えられている分子量約３０Ｋの蛋白質である(1)。ＰＬＰ遺伝子に突然変異を有する動物は全てミエリン形成不全を特徴とするが、ミエリンの層構造にのみ異常が生じるラムシェーカーマウスタイプと、ミエリン形成不全に先行してミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの分化異常が観察されるジンピーマウスタイプの２種類に分類することができる(2)。これはＰＬＰ遺伝子産物にミエリン構造蛋白質としての機能と、細胞の分化に関係した別の、第二の機能があることを示唆している。我々はグリア細胞の分化時期にＰＬＰ遺伝子のオルタナティブスプライス産物ＤＭ－２０が産生されていること、このＤＭ－２０はオリゴデンドロサイト以外の細胞にも産生されていることを報告し(3)、ＤＭ－２０がミエリン構造蛋白質として機能する以前に分化に関係して機能し得ることを示唆した。

我々は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、ＰＬＰ遺伝子産物の機能の推定を試みた(4, 図1)。ＰＬＰ－トランスジェニックホモ接合体マウス（外来性遺伝子４コピー）は正常なＰＬＰ遺伝子を過剰に発現するだけで、ＰＬＰ遺伝子ミュータントと酷似した振戦などの表現型を示した。免疫組織化学的解析により、ホモ接合体マウスは中枢神経系のミエリン形成不全を、ヘテロ接合体（同２コピー）も成熟後脱髄を示すことを明らかにした。今回、我々はトランスジェニックマウスを共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて詳細に解析し、ＰＬＰトランスジェニックマウス脳内ではオリゴデンドロサイトの数が増加していること、ホモ接合体のミエリン形成不全にはオリゴデンドロサイトの分化異常が伴うことを見いだした。

【実験方法】

1）抗ガラクトセレブロシド（ＧａｌＣ）抗体を用いた免疫組織化学

トランスジェニックマウス及びその同腹マウスの脳を３００μｍの厚切り切片とし、アール平衡塩培地で培養しながら抗ＧａｌＣ抗体（Ｏ１抗体）を反応させた。２次抗体としてＦＩＴＣラベル抗マウスＩｇＭを用いた後、４％パラホルムアルデヒドで固定し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2）電子顕微鏡観察

様々な時期のトランスジェニックマウス及び同腹マウスを固定し、中枢及び末梢神経組織を電子顕微鏡により観察した。

3）小脳における変性細胞の同定

エポン樹脂に包埋した小脳を１μｍ切片とし、トルイジンブルー染色して光学顕微鏡で観察した。電子顕微鏡観察の結果を加味し、細胞質に異常な液胞の存在する細胞を変性細胞とした。

【結果と考察】

ＰＬＰ遺伝子にはオリゴデンドロサイトの分化を誘導する作用がある。

生後２０日目のトランスジェニックマウスの脳の厚切りスライスを、Ｏ１抗体（抗ＧａｌＣ抗体）を用い、蛍光抗体法で染色した（図２）。共焦点レーザー顕微鏡で観察した所、トランスジェニックヘテロ接合体マウスの小脳、延髄、脳梁などの白質部分に野生型マウスに比べＯ１陽性細胞数の有意な増加が観察された。ヘテロ接合体では胎生期のグリア細胞分裂の盛んな時期に正常の約３倍程度のＰＬＰ遺伝子の発現があるがこれがオリゴデンドロサイトの数に影響していることが考えられた。一方、胎生期に正常の約５倍程度のＰＬＰ遺伝子発現がみられるホモ接合体マウスでは、オリゴデンドロサイトの変性脱落が観察され、Ｏ１陽性細胞数はむしろ減少していた（後述）。ジンピーマウスの解析などからＰＬＰ遺伝子産物がオリゴデンドロサイトの分化生存に関与していることは示唆されていたが、ＰＬＰ－トランスジェニックマウスの解析により初めて直接的に証明された。

ＰＬＰ－トランジェニックマウスのオリゴデンドロサイトも変性脱落する。

ＰＬＰ－トランスジェニックマウスはそのＰＬＰ遺伝子の発現量に依存して、ミエリン形成不全（外来性遺伝子４コピー）、脱髄（同２コピー）を示した。ＰＬＰ遺伝子ミュータントでは多くの場合、ミエリン形成不全に先行したオリゴデンドロサイトの分化異常が報告されている。そこでＰＬＰ－トランスジェニックマウスを生後１４日目、２０日目、３２日目、６カ月、及び８カ月に固定し、小脳の白質を中心に電子顕微鏡下で観察した。ホモ接合体は生後１カ月あまりで幼弱死するが、生後１４日目にはオリゴデンドロサイトの細胞体にゴルジ装置が変性したと考えられる異常な液胞が多数観察された（図３）。既に、この時期においてミエリン形成は障害されており、ジンピーマウスタイプの様にオリゴデ

ンドロサイトの変性の結果ミエリン形成が障害されたのかどうか結論するには更に早い時期における検討が必要である。

ＰＬＰ遺伝子産物の作用機序

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することが報告された(5)。実際に我々はアストロサイトなどにもＤＭ２０が発現していることを見いだしている。ＰＬＰ／ＤＭ２０は他の蛋白質との相互作用を経て、細胞外からオリゴデンドロサイト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。

Ｇａｌ Ｃ陽性オリゴデンドロサイトの数が増加しているヘテロ接合体マウスにおいても、ミエリンは正常より低形成であった。ＰＬＰ遺伝子産物はオリゴデンドロサイトの分裂を促進するが、逆にその成熟には阻害的に作用することが考えられた。この様な作用を持つ分化因子にＰＤＧＦなどが知られている。ＰＬＰ遺伝子発現がＰＤＧＦやＰＤＧＦレセプターなどの産生に影響を及ぼしているとすれば、ＰＬＰ／ＤＭ２０はミエリンの構造蛋白質として単にオリゴデンドロサイトの最終分化段階に産生されるのではなく、反対に分化段階を制御していることになり、大変興味深い。

【結論】

トランスジェニックマウスの系を用いて、ＰＬＰ遺伝子を過剰に発現させるとオリゴデンドロサイト数は増加するがその一方では分化異常やミエリンの低形成が観察された。即ち、ＰＬＰ遺伝子産物はオリゴデンドロサイトの分化及び生存維持を厳密に制御する重要な分子であることが示唆された。

【参考文献】

1. Campagnoni, A.T. and Macklin, W.B. (1988) Mol. Neurobiol. 2, 41-89.
2. Schneider, A. et al. (1992) Nature 358, 758-761.
3. Ikenaka, K., Kagawa. T. and Mikoshiba, K. (1992) J. Neurochem. 58, 2248-2252.
4. 鹿川哲史、他、(1992) 神経化学 31, 244-245.
5. Bartlett, W.P. et al. (1988) Glia 1, 253-259.

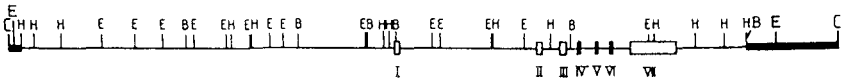


図１　ＰＬＰトランスジェニックマウス作製に用いたＰＬＰ遺伝子

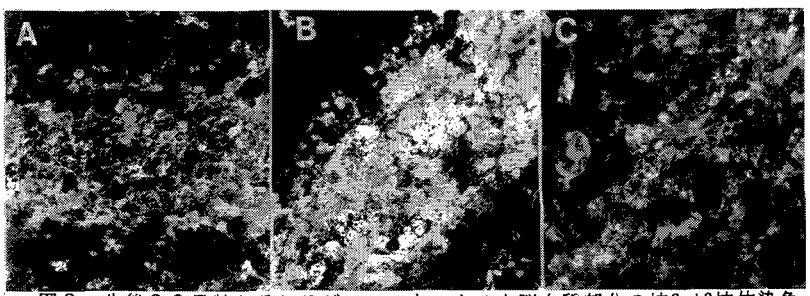


図２　生後２０日齢トランスジェニックマウス小脳白質部分の抗GalC抗体染色
Ａ：野生型マウス　Ｂ：ヘテロ接合体マウス　Ｃ：ホモ接合体マウス

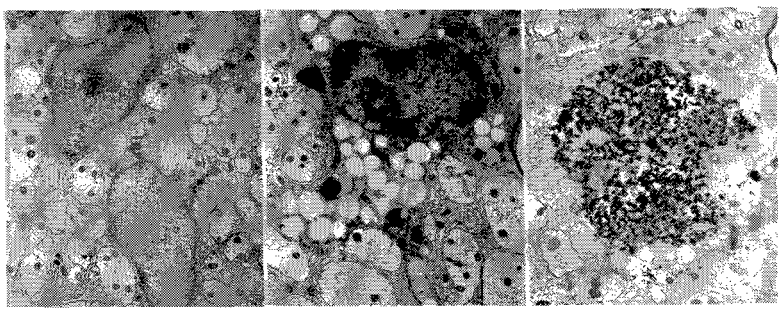


図３　ホモ接合体マウス小脳におけるオリゴデンドロサイトの変性とミエリン形成不全
左：生後１４日、オリゴデンドロサイトは正常であるがミエリンは形成されていない。
中：生後２０日、細胞体に異常な液胞が出現したオリゴデンドロサイト。
右：核が破壊したオリゴデンドロサイト。

11 バフィロマイシンA_1によるＰＣ１２細胞の突起伸展機構の解析

割谷孝貴、能登政彦、木下邦則、大熊勝治
（金沢大・薬，生化学）

〔要約〕

放線菌由来のマクロライド系抗生物質である、バフィロマイシンA_1（Ｂａｆ）は、空砲系プロトンポンプを選択的にかつ低濃度で阻害することが報告されている。我々はこのＢａｆがＰＣ１２細胞に作用して、神経様突起を伸展させることを明らかにした。また、この突起伸展（ＮＯＧ）は、時間依存的・濃度依存的に起こり、蛋白合成・ＲＮＡ合成を必要とする形態的な変化であることを報告した[1]。さらにこの突起伸展機構を明らかにするために、プロテインキナーゼ・プロテインホスファターゼの観点から検討した。ＢａｆによるＮＯＧに対する各種キナーゼの阻害剤が与える影響を調べたところ、プロテインキナーゼＡ，Ｃを介しておらず、チロシンキナーゼ、ＭＡＰ（微小管結合タンパク質）キナーゼを介していることが示唆された。またセリン／スレオニンホスファターゼが突起伸展に関与していることも示唆された。このことからＭＡＰのリン酸化・脱リン酸化のサイクルが必要である可能性が示唆された。さらにＢａｆにより活性化されたＭＡＰキナーゼはチロシンキナーゼの阻害剤で抑制されたことから、ＭＡＰキナーゼの上流にチロシンキナーゼがあることが示唆された。

〔目的〕

現在、細胞内酸性顆粒が各種生物現象に関与していると報告されている。しかし細胞の分化におけるその役割についてはまだほとんど明らかになっていない。そこで細胞内酸性顆粒のｐＨを上昇させるＢａｆを用いて、神経細胞様に分化誘導される、ＰＣ１２細胞の分化に対する影響を検討したところ、我々の予想に反して、Ｂａｆが単独でＮＯＧを誘導することを見いだし報告した。今回、その突起伸展機構についてプロテインキナーゼの関与をＮＧＦ等のinducerと比較検討した結果を報告する。

〔方法〕

細胞培養：ＰＣ１２細胞は１０％ＦＢＳ，５％ＨＳ，ＤＭＥＭで培養した。

神経突起伸展の測定：poly-D-lysinでコートした２４穴プレートにＰＣ１２細胞を2.5×10^4cells/wellの濃度にまき、Ｂａｆまたはキナーゼの阻害剤を添加し３７℃で２４～４８時間培養した後、細胞体の直径の１．５倍以上の突起を有する細胞の出現を分化の指標とし、その割合を種々の条件下で求めた。

ＭＡＰキナーゼ活性測定：牛脳より調製した微小管結合タンパク質を基質とし、薬剤処理後のＰＣ１２細胞のlysateと^{32}Ｐ－ＡＴＰをin vitroで３０℃、２ｍｉｎ反応させ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、ＭＡＰのバンドを切りだし、その放射活性を測定した。

〔結果と考察〕

ＢａｆによるＮＯＧはＮＧＦと同様、Ａ-，Ｃ-，チロシンキナーゼの阻害剤である、スタウロスポリンで阻害されたので（図１）、これらのキナーゼが関与している可能性が示唆された。そこでさらに選択的阻害剤を用いて検討した。するとＣ－キナーゼ及びＴＲＫチロシンキナーゼの阻害剤である、Ｋ－２５２ａではＮＯＧは阻害されず、Ａ-キナーゼの阻害剤である、Ｈ－８９では高濃度で若干阻害されたが、Ｂａｆによる細胞内ｃＡＭＰの量的変化はみられなかった。しかしチロシンキナーゼの阻害剤である、ＳＴ－６３８では強く阻害された（図２）。このことからＢａｆによるＮＯＧ

は、ＮＧＦとは異なりＴＲＫチロシンキナーゼを介しておらず、Ｋ－２５２ａ非感受性のチロシンキナーゼが関与している可能性が示唆された。またＮＧＦによるＮＯＧにはＭＡＰキナーゼが関与しているという報告があるので、ＭＡＰキナーゼの阻害剤である、ＬｉＣｌで検討してみると、ＮＯＧが阻害された（図３）。次にＢａｆによりＭＡＰキナーゼ活性の変化を検討したところ一過性の上昇がみられた。さらにＭＡＰキナーゼを活性化する、オカダ酸（セリン／スレオニンホスファターゼの阻害剤）によりＮＯＧが阻害された（図３）ことから、ＢａｆによるＮＯＧにはＭＡＰキナーゼの活性化・不活性化のサイクルが必要であることが示唆された。またＭＡＰキナーゼの活性化はＳＴ－６３８により抑制されたことから、ＭＡＰキナーゼの上流にチロシンキナーゼがあることが示唆された。これまでの結果からＢａｆによるＮＯＧは、まずＢａｆによりチロシンキナーゼが活性化し、その後そのシグナルがＭＡＰキナーゼを活性化することにより起こることが示唆された（図４）。今後、Ｂａｆが作用する蛋白質やキナーゼカスケードを構成しているキナーゼの同定、ＢａｆによってＮＯＧが誘導されないＰＣ１２Ｄ細胞とのシグナル伝達の比較を通じて、ＢａｆのＮＯＧ機構を明らかにしていきたい。

(1)Tamura, H., Ohkuma, S. FEBS Lett. 294, 51 (1991)

図１

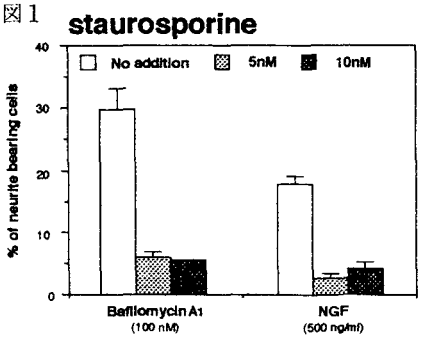


図２

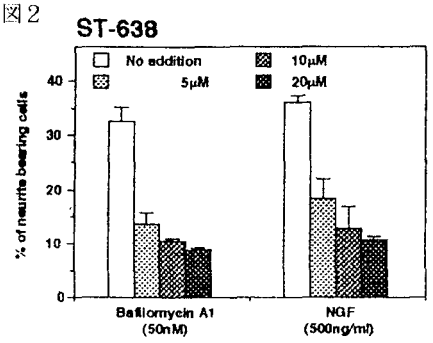


図３

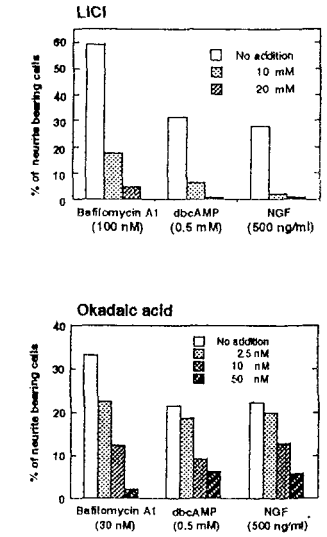
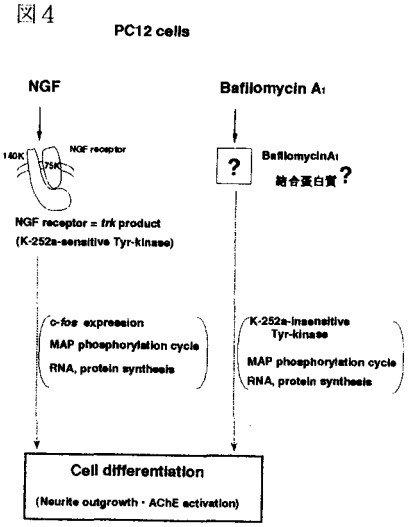


図４



12 ラット胎仔における脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの局在とその機能

仙波りつ子、渡辺英治、前田信明＊、大平敦彦
（愛知県コロニー・研究所、＊基礎生物学研究所）

〔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細胞の増殖および突起形成を阻害することを明らかにしている。これらの阻害が、生体内でも起きるか否かについて、2種類のCSPGのモノクローン抗体を用いて、ラット胎仔の免疫組織化学を行うことによって検討した。1）220Kおよび150Kのコアプロテインを持つCSPG（ニューロカン）を認識するモノクローン抗体1G2では、胎生12.5および13.5日齢のラットの神経管周囲（おそらくboundary cap）が染色された。後根神経節から神経管にはいる線維は12.5から13.5日齢の間に形成されるが、この線維と神経管の接する部位は1G2抗体で染色されなかった。ラミニンは後根神経節と神経管の間の細胞に強く染色された。2）250Kのコアプロテインを持つCSPGを認識する6B4抗体は、三叉神経節、顔面神経節、前庭神経節、交感神経節等のいくつかの神経節を染色したが、神経管の周囲にはその染色がみられなかった。また、6B4抗体は、CSPGによるPC12D細胞の増殖阻害を消失させた。以上の結果は、生体では、1G2抗体の認識するプロテオグリカンが後根神経節の神経突起伸長を阻害することにより、その方向性の決定に関与していることを示唆している。また、6B4抗体の認識するプロテオグリカンは細胞増殖と関わりのある可能性が考えられた。

脳可溶性画分には、少なくともコアタンパクの分子サイズの異なる5種類のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）が存在している[1]。私達は、これらのCSPGの生理作用を明らかにしようと試みてきた。これまでに、いずれのCSPGも、培養系でPC12D細胞の増殖および突起形成を阻害することを明らかにした[1-5]。また、ラミニン（LN）やフィブロネクチンのような細胞間物質とCSPGが共存した場合には、濃度依存性にCSPGの阻害作用が消失することも報告した[6]。プロテオグリカンには、神経細胞の突起形成を阻害する作用と促進する作用のあることが報告されている[2-3]。いずれにしても、PC12D細胞に観察されるCSPGの阻害が、生体でも起きうる環境下にあるか否かが問題である。そこで、これらのCSPGのいくつかを認識する2種類のモノクローン抗体を用いて、ラット胎仔の免疫染色を行なったので報告する。

〔実験方法〕 2種類のモノクローン抗体（1G2および6B4）は、既報にしたがって調製した[7-8]。LN抗体は、当研究所、加藤兼房生化学部長より供与された。ラット胎仔は、胎生12.5および13.5日齢で、ブアンあるいはパラフォルムアルデヒド溶液で固定した。ブアン固定した胎仔はパラフィンで包埋後、厚さ10μmの切片として使用した。一方、パラフォルムアルデヒド固定した胎仔は、ビブラトームで100μmの切片として用いた。PC12D細胞は5%牛胎仔血清および5μg/mlインシュリンを含むダルベッコ改変培地で培養した。6B4抗体の認識するCSPG部位の作用を調べるためには、ポリリジン、250kのコアプロテインを持つCSPG、6B4抗体の順で処理した培養皿にPC12D細胞をまき、全細胞数および突起を持つ細胞数の変化を測定した。

〔結果および考察〕 生体には、神経線維伸長の方向性を決定するglial barrierが存在し、ここにはプロテオグリカンが発現するといわれている。PC12D細胞の突起形成は、ラット脳可溶性画分より精製されたいくつかのCSPGによって阻害される。そこで、これらのCSPGのうち、いずれのCSPGに生体内で神経突起形成を阻害する作用があるかを検討するため、2種類のモノクローン抗体による組織染色を行なった。モノクローン抗体1G2は、220Kおよび150Kのコアプロテインを染色し、ニューロカン[9]と称されるプロテオグリカンを認識する。一方、6B4抗体は250Kのコアプロテインを持つCSPGを認識する（6B4-PG）[8]。PC12細胞は知覚および交感神経節の神経細胞のモデル細胞である。そこで、まず、後根神経節の神経細胞が軸索を伸長する時期である胎生13.5日齢のラットを用いて、1G2および6B4抗体で免疫染色し、それらの認識するプロテオグリカンの局在を調べた。1G2抗体では、神経管の周囲（おそらくboundary capと称される神経堤由来のグリア細胞）およびglial barrierの一つであるroof plateが染色された。一方、6B4抗体では、三叉神経節、顔面神経節、前庭神経節、交感神経節等のいくつかの神経節の細胞が染色されたが、後根神経節からの線維伸長にかかわる部位は染色されなかった。これらの結果から、後根神経節の線維伸長に関与するのはニュー

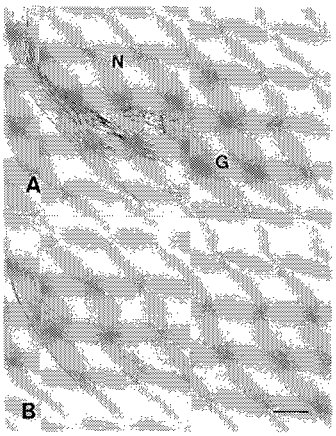


Fig. 1 Immunostaining of rats on embryonic-day 13.5 with MAb 1G2 (A) and anti-laminin antibody (B). N, neural tube; G, dorsal ganglion. bar, 100 μm.

Reversion by MAb 6B4 of the inhibitory action of 6B4-PG on proliferation of PC12D cells.

Substrata	Cell number (cells/well) none	6B4-PG
Antiserum		
cul. sup.	9081 ± 961	5558 ± 1187
1G2	9976 ± 2233	6114 ± 1074
6B4	9128 ± 1479	8308 ± 1926*
2H6#	8737 ± 2680	6382 ± 2030
IgG (10 μg/ml)	8996 ± 2440	5175 ± 622
IgM (10 μg/ml)	9300 ± 1750	5407 ± 680

Averages ± S.D. #, MAb against chondroitin sulfate. *, $P<0.01$ statistical significance between MAb-treated and non-treated dishes.

ロカンであろうと考えられた。

次に、神経管周囲に観察されるニューロカンが、後根神経節から神経管に向かって伸びる線維にどのような影響を与えるのかについて検討した。胎生12.5日齢のラットでは、後根神経節から末梢組織へ伸びる線維は観察されたが、後根神経節から神経管にはいる線維はまだ形成されていなかった。胎生13.5日齢では、後根神経節からの線維が神経管（脊髄）に接していた。１Ｇ２抗体による染色は、胎生12.5日齢では、神経管を取り囲む部分にほぼ一様に観察されたが、胎生13.5日齢では、後根神経節からの線維が神経管に接する部分できわめて弱く、その周囲が強かった（図１Ａ）。PC12D細胞を用いた実験では、CSPGとLNの濃度比が神経突起形成に影響をおよぼすことを明らかにしている[6]。LN抗体による染色も神経管の周囲に局在したが、１Ｇ２抗体による染色より広範囲に観察された。LN抗体は、boundary cap自身よりもむしろboundary capと後根神経節の間隙をより強く染色し、胎生13.5日齢になると染色性が弱くなる傾向にあった（図１Ｂ）。これらのことから、ニューロカンは、後根神経節の線維形成を阻害することにより、その方向性の決定に関与していることが示唆された。

6B4-PGの生体における機能は組織染色からでは分からなかった。このプロテオグリカンは、PC12D細胞の増殖も阻害する。そこで、PC12D細胞を用いて、まず、6B4-PGの細胞増殖阻害に対する６Ｂ４抗体の影響を調べた。６Ｂ４抗体は、6B4-PGによるPC12D細胞の増殖阻害を消失させた（表）。6B4-PGは、生体で、細胞増殖をしつつあるいくつかの神経節に一過性に発現されるようなので、細胞増殖と6B4-PGとの関係を現在検討中である。

［謝辞］ 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。組織切片作製にご協力くださいました当研究所の松田素子博士に感謝致します。

［文献］ 1. Oohira, A., Matsui, F. and Katoh-Semba, R. (1991) J. Neurosci., 11, 822-827. 2. 仙波りつ子 (1990) 神経研究の進歩、34巻、612-618. 3. 仙波りつ子、大平敦彦 (1990) 細胞、22巻、340-345. 4. Katoh-Semba, R. and Oohira, A. (1992) Neurotrophic Factors, 185-196. 5. Katoh-Semba, R. and Oohira, A. (1993) J. Cell. Physiol., in press. 6. 仙波りつ子、大平敦彦 (1992) 神経化学、31、356-357. 7. 大平敦彦、松井ふみ子、前田信明 (1992) 神経化学、31, 556-557. 8. Maeda, N., Matsui, F. and Oohira, A. (1992) Dev. Biol., 151, 564-574. 9. Rauch, U., Karthikeyar, L., Maurel, D., Margolis, R.U. and Margolis, R.K. (1992) J. Biol. Chem., 267, 19536-19547.

13 橋由来拡散性物質による大脳皮質軸索での側枝形成の誘導

佐藤　真、Dennis D. M. O'Leary
（大阪大学・第二解剖、The Salk Institute）

〔要約〕

皮質橋路は軸索からの側枝により形成されることが明かとされている。この側枝による回路形成という現象は従来知られていなかったもので、その形成機構はいまだ解明されていない。今回の実験では大脳皮質と橋とを3次元コラーゲンゲル中にて共培養し、橋の大脳皮質軸索への影響をビデオ間欠撮影装置を用い、時間を追って観察した。その結果橋の存在下大脳皮質軸索の成長円錐近位部に側枝様突起が、特に橋の方向に、形成される様子が観察された。この側枝様突起は平均約2分間存在し、その形成頻度は大脳皮質のみ培養したときに較べ、橋の存在下約5倍増加した。橋方向に形成される頻度は反対方向に形成されるものに較べ約3倍多かった。また橋より300μm以上離れている軸索では側枝形成頻度の低下が見られ、この現象には距離依存性があることが明かとなった。これらの事実は橋より側枝を誘導する因子が分泌されており、コラーゲンゲル中での濃度差により側枝の形成方向が定められていることを示唆する。

（目的）

大脳皮質より小脳への情報伝達を担う重要な経路である皮質橋路は、脊髄に伸びる錐体路の分枝により形成される。この投射は発生学的には、従来他の系で考えられていた一次軸索（この場合は錐体路）の成長円錐の分岐により形成されるのではなく、軸索が伸展した後側枝が形成され、この側枝が橋に伸びることで達成されることが近年明かとされた(1)。この投射の形成にあたり橋より大脳皮質軸索の成長円錐を自らに導く何等かの因子が放出されていることはin vitroの実験により明かとされているが(2)、実際に側枝形成がどのような機構でなされるのかは明かとされていなかった。ラットで実際の側枝形成の様子を観察すると、側枝は錐体路のほぼ決まったところより発生していた。そこで考えれる機構としては、（1）錐体路にある標識があり、その情報に基づき側枝が形成される。（2）側枝は自発的に形成され、そのうち橋に到達したものだけが安定化され、他は消退する。（3）標的（橋）よりなんらかの因子がでており、その因子が側枝を誘導する。これらの可能性を検証するため、コラーゲンゲル中で大脳皮質と橋との3次元共培養を行い、ビデオ間欠撮影により側枝形成の様子を観察した。

（実験方法）

動物はWistar ratで、回路が実際に形成される時期に当たる生直後（生後24時間以内）から生後2日のものを用いた。ラットは氷を用い低体温とし、これを麻酔とした。大脳皮質、橋および対照組織として、乳頭体、嗅脳および小脳を使用した。これらの組織を切り出した後、ラットの尾より抽出したコラーゲンよりなるゲル中にて3次元培養を行った。DMEM/F-12にFCSを10%加えたものを培養液として用いた。位相差顕微鏡下でImage-1プログラムを用い、1分に1フレームの割で映像をとりOMDRにてビデオに再現し、検討した。

（成績および考察）

側枝様構造物の例を図１に示した。側枝様構造物は成長円錐より近位部に見られ、平均出現時間は約２分であった。図２にその出現頻度を示した。橋と共培養を行うと、その頻度は約５倍に増加しており、また橋の方向に向かうものが反対方向に向かうものに較べ約３倍多く観察された。以上の事実は橋よりなんらかの因子が分泌され、大脳皮質軸索に作用し側枝の形成を促進していることを示唆している。橋方向に有意に側枝が形成されたことは、軸索近傍の微小環境の変化（濃度変化）を検出する機構が存在すると思われる。さらに、この側枝誘導の作用には距離依存性が観察された。橋組織より０－３００μｍにある大脳皮質軸索と３００－６００μｍとに存在する軸索とを比較すると、０－３００μｍにある軸索では３００－６００μｍにあるものに較べ、約１、８倍側枝形成の頻度が高かった。この事実はコラーゲンゲル中で分泌物質が濃度の勾配を保って存在していることを意味すると考えられる。

（１）O'Leary,D.D.M. and Terashima,T.(1988) Cortical axons branch to multiple subcortical targets by interstitial axon budding: implications for target recognition and "waiting periods". Neuron 1, 901-910.

（２）Heffner,C.D., Lumsden,A.G.S. and O'Leary,D.D.M. (1990) Target control of collateral extension and directional axon growth in the mammalian brain. Science 247, 217-220.

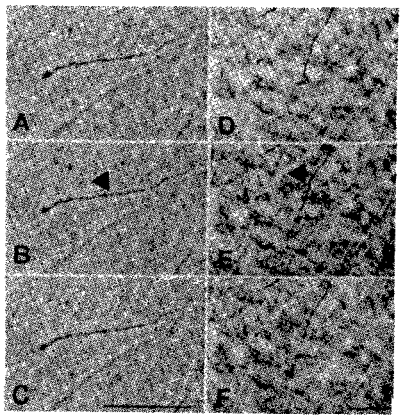


図 1

橋・大脳皮質共培養下での大脳皮質軸索のビデオ間欠撮影像。
側枝様構造物（アローヘッド）を示す。Ａ－Ｃ、Ｄ－Ｆはそれぞれ連続した像である。撮影は培養開始後約２４時間で開始し、１分間隔で行った。なお橋は画面下に存在する。
スケール＝５０μｍ。

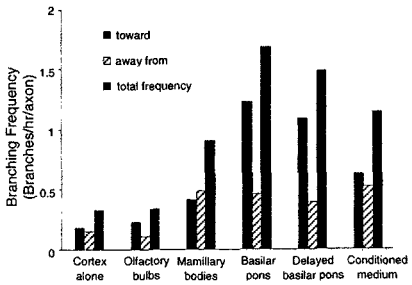


図 2

共培養実験における大脳皮質軸索での側枝様構造物の出現頻度。
培養開始２４－３６時間後に側枝様構造物の出現頻度を観察した。横軸には、それぞれ大脳皮質と共培養した組織を示す。

14 培養交感神経細胞の神経伝達物質選択に対するレチノイン酸の作用

小林 三和子，松岡 一郎，栗原 堅三
（北大・薬・薬剤学）

〔要約〕 すでに、我々は、レチノイン酸が神経系株化細胞に対して伝達物質合成酵素の活性を変化させ、コリン作動性分化を誘導させることを報告してきた。今回、より in vivoに近い系として、培養ラット交感神経細胞に対するレチノイン酸(RA)の効果を検討した。この結果、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)のmRNAが減少するとともにコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)のmRNAの発現が誘導され、株化細胞と同様にレチノイン酸によるコリン作動性分化が起こることを見いだした。交感神経細胞においては株化細胞におけるよりも低濃度のレチノイン酸でコリン作動性分化が誘導された。交感神経細胞のChAT mRNAの増加に作用するレチノイン酸濃度は、TH mRNAの減少に作用するよりも低濃度であった。さらにChAT mRNAの分子種をRT-PCR法により解析したところ、ChAT遺伝子のコーディング領域の上流部に存在するRタイプ、Mタイプエクソンより転写されるmRNAがレチノイン酸により誘導されることが明かとなった。

【はじめに】 神経分化の過程における伝達物質の選択は、標的組織由来の神経栄養因子等の環境因子の影響を受けることが知られている[6]。これまで我々は、形態形成に関与し、EC細胞の分化を誘導するレチノイン酸の伝達物質選択に対する作用を調べてきた。その結果、レチノイン酸はPC12細胞に対し、THの活性を減少させるとともにChATの活性を増加させコリン作動性分化誘導能を有することを見いだした[4]。今回、レチノイン酸によるコリン作動性分化誘導がin vivoでのレチノイン酸の作用を反映しているかどうかを明かにするために、従来より神経栄養因子等の蛋白性因子により神経伝達物質変換の起こる系として用いられている培養ラット交感神経細胞を用いて検討した。

【実験方法】 細胞培養：新生2日目のラットより上頸部神経節を摘出し、コラゲナーゼ/トリプシン処理により細胞を分散し、ポリリジン/ラミニンでコートしたディッシュにまいた。N2 Supplementおよび40 ng/mlNGFを含むF12培地中、95% air/5% CO_2環境下で培養した。培養2日目より10 μM Ara-Cで72時間処理し、90%以上純粋なニューロンの培養を得た。ノーザンブロット法によるTH mRNAの定量：酸性グアニジウムーフェノールークロロホルム法[1]に従って細胞より全RNAを抽出した。グリオキザール変性下アガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写し、^{32}Pでラベルした TH-cRNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。RT-PCR法によるChAT mRNAの定量：全RNAをDNaseIで処理後、ランダムヘキサマーをプライマーとし、AMV逆転写酵素によりcDNAを合成した。ChAT cDNAおよび、内部標準としてβ-Actin cDNAに特異的なプライマーペアを用い、[α-^{32}P] dCTPを含む反応液中でPCRを行った。プライマーはそれぞれ、cDNA内部の異なるエクソンに位置するものを用い、ChAT mRNAは5'-CA3、3'-CA8プライマーの組み合わせにより330 bp(cDNA、1150-1479[2])のバンドとして、β-Actin mRNAは5'-BA5、3'-BA3プライマーの組み合わせにより219 bp(cDNA、261-479[5])のバンドとして増幅した。PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、増幅されたChATおよびβ-ActinのcDNA断片の放射活性をバイオイメージアナライザーにより測定した。ChAT mRNAの分子種の解析：Kengakuらの報告[3]を参考に、ラットChAT遺伝子のコーディング領域の上流に存在するR、N、Mタイプのノンコーディングエクソンにそれぞれ特異的な5'プライマーとコーディング領域に位置する共通な3'プライマーを用いたRT-PCRを行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色により検出した。

【結果と考察】 レチノイン酸によるChATおよびTH mRNAの発現変化：アドレナリン作動性の交感神経細胞は、高いレベルのTH mRNAを発現している。しかし、培養2日目よりレチノイン酸を6日間作用させた交感神経細胞のTH mRNA発現量は、レチノイン酸の濃度依存的に減少し、10^{-7} Mレチノイン酸によりコントロールレベルの約30 %まで減少した(図1-C)。10^{-6} M以上のレチノイン酸は、細胞の生存に影響を及ぼし、β-Actin mRNAの発現の減少がみられた(図1-D)。しかし、レチノイン酸によるTH mRNAの減少に比べてβ-Actin mRNAの減少率は低く、レチノイン酸によるTH mRNAの発現減少の大部分は、特異的な作用であると考えられる。一方、ChAT mRNAの発現レベルはTH mRNAに比べてかなり低く、より高感度なRT-PCR法を用いて解析した。ChAT mRNAは、図1-Aに示すように10^{-11} Mの低濃度のレチノイン酸でコントロールの約6倍に増加した。サンプル間の増幅効率の差を補正する目的で、ChAT mRNAの放射活性をβ-Actin mRNAの放射活性で割った値を相対的なChAT mRNA量とした場合にも同様な結果となった(図1-B)。胎生19日目のより幼若な交感神経細胞で同様の実験を行ったところ、TH mRNAは10^{-10} Mレチノイン酸によりコントロールレベルの約50 %まで減少した。ChAT mRNAについては、新生2日目の交感神経細胞に比べ、コントロールでの発現レベルが高く、顕著なレチノイン酸によるChAT mRNAの発現増加作用はみられなかった。新生2日目の交感神経細胞を培養一週間目よりレチノイン酸で処理した場合、10^{-6} Mのレチノイン酸でもTH mRNAの発現減少はほとんどみられなかったが、ChAT mRNAはレチノイン酸による発現増加が見られた。以上の結果より、本来アドレナリン作動性の交感神経細胞においてもレチノイン酸は、TH mRNAを減少させるとともに、ChAT mRNAの発現を増加させ、神経伝達物質選択に対し相互排他的な作用を示した。しかし、TH mRNAの減少とChAT mRNAの増加に作用するレチノイン酸の濃度領域は異なっており、また、発生段階に応じたChATおよびTH mRNAの発現に対するレチノイン酸感受性の変化も異なっていた。ChATおよびTH遺伝子発現変化に作用し得るレチノイン酸濃度の違いについては、両遺伝子をコントロー

ルするレチノイン酸受容体が複数種存在する、あるいは、レチノイン酸受容体と二量体を形成する受容体が異なることを示唆する。また、発生段階に応じたレチノイン酸感受性の変化は、レチノイン酸受容体の発現変化によることも考えられる。

培養交感神経細胞に発現するChAT mRNA分子種の解析：ラットChAT遺伝子のコーディング領域の上流部には、図2に示すように、３つのノンコーディングエクソンが存在し、ラット脊髄においては、異なるプロモーター領域からの転写と、異なるスプライシングにより、５つのChAT mRNAの分子種が生成することが最近報告された[3]。そこで、交感神経細胞において発現するChAT mRNAの分子種を調べる目的で、R、M、Nタイプエクソンの塩基配列のそれぞれに特異的なプライマーを用いたRT-PCRを行った。図3に示すように、コントロールの交感神経細胞においては、N2タイプのChAT mRNAの発現がみられた。10^{-8} Mレチノイン酸を作用させた交感神経細胞ではN2タイプに加えてR2タイプ、Mタイプのm RNAが発現していた。このことより、レチノイン酸によりR2タイプ、MタイプのChAT mRNAの発現が誘導され、ChAT遺伝子のR、Mタイプエクソンの5'上流部にレチノイン酸による転写促進に関与する配列が存在することが示唆された。

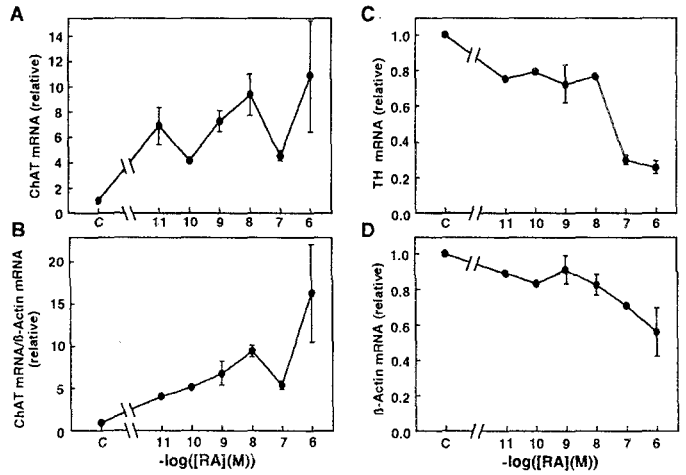


図1. 交感神経細胞に対するレチノイン酸作用の濃度依存性
A; ChAT mRNA発現量(RNAあたり)
B; ChAT mRNA発現量
(β-Actin mRNA発現量で補正)
C; TH mRNA発現量(RNAあたり)
D; β-Actin mRNA発現量
(RNAあたり)

A, B, DはRT-PCRにより定量
Cはノーザンブロットにより定量

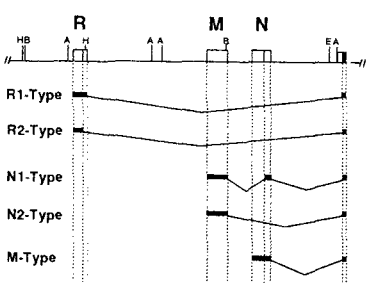


図2. ラットChAT遺伝子の5'領域および対応するChAT mRNAの構造

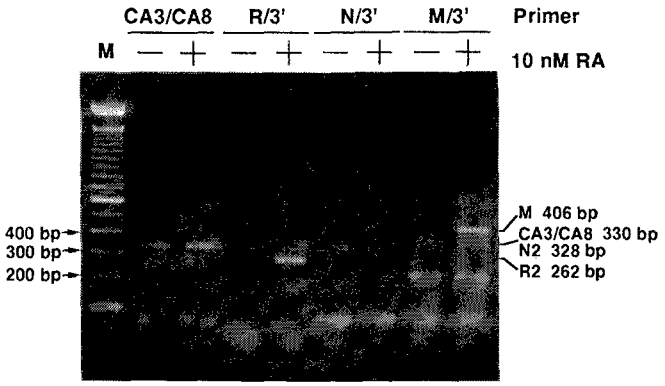


図3. 交感神経細胞において発現するChAT mRNAのタイプ

【謝辞】TH cDNAを御供与下さいました旭川医科大学第一生化学教室の奥野幸子先生ならびに藤澤仁先生に感謝いたします。

【文献】

1) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159
2) Ishii, K., Oda, Y., Ichikawa, T. and Deguchi, T. (1990) Mol. Brain Res., 7, 151-159
3) Kengaku, M., Misawa, H. snd Deguchi, T. (1993) Mol. Brain Res., 18, 71-76
4) Matsuoka, I., Mizuno, N. and Kurihara, K. (1989) Brain. Res., 502, 53-60
5) Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z. and Yaffe, D., (1983) Nucl. Acids Res. 11, 1759-1771
6) Patterson, P. H. and Nawa, H., (1993) Cell, 72/Neuron, 10 (Suppl.), 123-137

15 ヒト 赤芽球細胞におけるIsoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase cDNAの配列決定

武田良平、溝渕睦彦、村尾孝児＊、佐藤誠＊、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 (PIMT)cDNA 配列をもとに、PCR を用いDNAプローブを作成した。8 種類のヒト血球由来の培養細胞からRNAを抽出し、ノーザンブロットを行なった。長さの異なる 2 種類のRNA (1.1、1.6 kb) が検出された。mRNAを抽出し1.6 kbに相当するcDNAをNested RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法で配列決定した。スプライシングの違いにより、1600と1553bpの 2 種類のcDNAが同定された。この 2 種類のcDNA から推定される蛋白は、C末端の一部が異なることが明らかになった。さらに本遺伝子の発現量は、phorbol myristate acetate(PMA)で抑制された。

[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[4]とヒト赤血球[5]から単離精製され、アミノ酸配列が決定れた。我々は、ラットの睾丸のcDNAの配列を決定し、脳のN末端３１個のアミノ酸を欠いていることを報告した[9]。今回われわれは、8 種類のヒト血球由来の培養細胞からRNAを抽出し,ノーザンブロットを行なうとともに、ヒト 赤芽球細胞での転写産物である1.6 kbに相当するcDNAの構造を新たに決定した。

[方法]

8 種類のヒト血球由来の培養細胞からtotal RNAをChomczynskiらの方法[2]で抽出した。さらに 赤芽球細胞のtotalRNAから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[10]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[5]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[7]を用いた。ヒト脳で報告されている配列をもとに未知の5', 3'末端の増幅は、Nested RACE 法[3,8]にしたがった（図２）。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。さらに10^{-6}MのPMAを添加２日間培養し、本遺伝子の発現量を比較した。

[結果と考察]

既報のcDNA配列[10]をもとに、ラット脳のcDNA からPCRで124 bp DNA断片を増幅し、124 bp断片が単一に得られた。このDNAをプローブに用いて、8 種類のヒト血球由来の培養細胞をノーザンブロットした結果が図１である。すべての血球由来培養細胞から1.1と1.6 kbの2種類のmRNAが検出された。ヒト 赤芽球細胞から増幅した146 bp断片が、報告されている配列[6]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、ヒト 赤芽球細胞の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。その後の増幅は、3'末端で用いた方法と同じである（図２）。1.6 kbに相当するcDNAは、1600と1553 bpの２種類から構成され、それぞれのcDNAの全塩基配列を決定した。この２種類のcDNAは、スプライシングの違いによるもので、推定される蛋白は、図３の様にC末端の一部が異なることが明らかになった。さらに10^{-6}MのPMAを２日間添加すると本遺伝子の発現量は約半分に抑制された（図４）。

[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. Frohman, M. A. and Martin, G. R. (1989) Technique 1, 165-170
4. Henzel, W. J., Stults, J. T. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15905-15911
5. Ingrosso, D., Fowler, A. V. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 20131-20139
6. MacLaren, D. C., Kagan, R. M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 185, 277-283
7. Mizobuchi, M. and Frohman, L. A. (1992) BioTechniques 12, 350-353
8. Mizobuchi, M., Frohman, M. A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5, 476-484
9. Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R. et al. J. Neurochem.(in press)
10. Sato, M., Yoshida, T. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 342-347

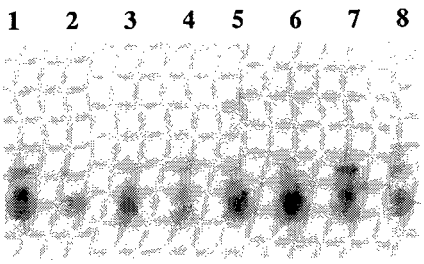
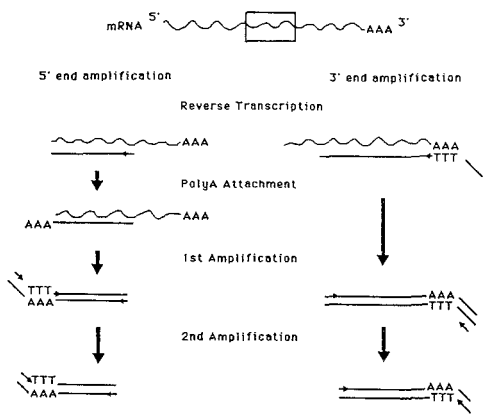


図1
8種類のヒト血球由来の培養細胞のノーザンブロット分析
すべての培養細胞で1.1と1.6 kbのmRNAが検出された。
1; acute lymphoblastic leukemia 2; acute monocytic leukemia
3; T cell lymphoma 4; acute lymphoblastic lymphoma
5; erythroid leukemia 6; chronic myelogenous leukemia
7; acute myeloblastic leukemia 8; Burkitt lymphoma

図2、Nested RACE法の説明図



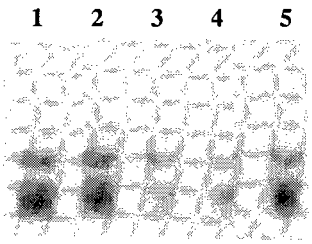
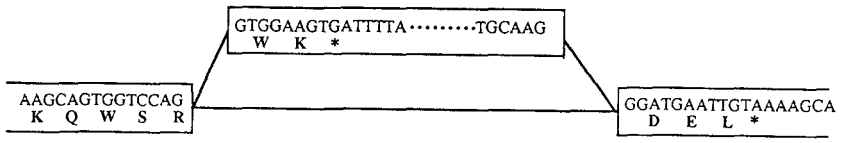


図4、PMA処理によるPIMTmRNA量の減少
10^{-6}MのPMAを2日間添加した後の
ノーザンブロット分析
1; control 2; 0.5% FCS 3; 2% DMSO
4; 10^{-6}M PMA in 0.05% DMSO
5; 0.05% DMSO

図3、1.6 kb に相当する2種類のcDNAの相違部分
47 bのスプライスアウトにより、PIMT蛋白C末端の一部のアミノ酸配列が変っている。



16 TRE配列に対する親和力の異なる脳内転写制御因子AP1の検出

米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
マウス脳核抽出液中の転写制御因子Activator protein-1(AP1)のDNA結合能を、Phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsive element(TRE)を含む放射性プローブを用いたゲル移動度シフトアッセイにより測定したところ、本結合はゲル内移動度の異なる複数の成分から構成されることが判明した。移動度の遅い成分($AP1_A$)のプローブ結合能は、移動度の速い成分($AP1_B$)に比べて極めて強力であった。非放射性AP1プローブ添加は、遅い成分への結合を濃度依存的に阻害したが、速い成分への結合は逆に著明に増強した。また、非放射性cAMP responsive element(CRE)の添加は、遅い成分への結合を濃度依存的に阻害したが、速い成分への結合に対しては著変を与えなかった。遅い成分のプローブ結合能は大脳皮質、海馬および小脳が他の脳内部位に比べて著しく高かったが、速い成分のプローブ結合能はほぼ均一な脳内分布を示した。以上の結果は、マウス脳内においてTREに対する親和力の異なるAP1が存在する可能性を支持するものである。

転写制御因子AP1は、最初SV40やメタロチオネインⅡA遺伝子のエンハンサーエレメントに結合する蛋白質として同定された(4)。その後、AP1はPhorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate(TPA)によって活性化を受ける遺伝子群の上流域に存在する共通のDNA配列TGACTCAに結合することが明らかとなり、このDNA配列はTREと命名された(1)。AP1はプロトオンコジーンc-jun遺伝子の産物であるc-Jun蛋白質のホモダイマーや、あるいはc-fos遺伝子産物のc-Fos蛋白質とc-Jun蛋白質とのヘテロダイマーであるが、c-Jun蛋白質やc-Fos蛋白質以外のJunファミリー蛋白質やFosファミリー蛋白質も、それぞれ複合体を形成してTRE配列に結合することが知られている(2)。さらに、CRE結合蛋白質(CREB)/ATFファミリーもJunやFosとヘテロダイマーを形成して、TRE配列に親和力を持つことが明らかにされている(3)。このような分子生物学的研究成績から、生体内において複数のAP1が存在すると推察される。したがって本研究では、マウス脳内AP1のDNA結合能をゲル移動度シフトアッセイにより解析した。

〔実験方法〕

核抽出液の調製：Std-ddY雄性マウス全脳あるいは脳内各部位から、Nonidet P-40を用いた方法(5)に準じて核抽出液を調製した。得られた核抽出液は使用時まで-80℃に凍結保存した。DNAプローブ：AP1の放射性プローブは、TRE配列を含む2本鎖オリゴヌクレオチド(5'-GATCCGGCTGACTCATCACTAG-3')を、dATP[α-^{32}P](111 TBq/mmol, NEN/DuPont社)とDNAポリメラーゼIのKlenow fragmentを用いたエンドラベリング法により調製した。CREBプローブおよびMycプローブは、それぞれのコンセンサス配列以外のDNA配列がAP1プローブの場合と同一のものを作成した。ゲル移動度シフトアッセイ：核抽出液(3-5 μg蛋白質)、1 μg poly(dI-dC)、放射性プローブ(20 fmol、1-12×10^4 cpm)、10 mM $MgCl_2$、100 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、10%グリセロールおよび各種蛋白質分解酵素阻害剤を含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)の全量20 μlを室温で30分間反応させたのち、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電気泳動法(80 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(6)。

〔実験結果〕

ゲル上ではAP1/プローブ複合体は移動度の異なる2種類のバンドとして検出されたが、非放射性AP1プローブを添加しない場合は、移動度の遅い成分の方が移動度の速い成分よりもはるかにプローブ結合能が強力であった。100倍量(2 pmol)の非放射性AP1プローブの添加は、遅い成分を完全に消失させたのに対して速い成分の結合能を著しく増加させた(図1)。遅い成分への結合は、添加した非放射性AP1プローブ濃度の上昇に伴って阻害され、20倍量の非放射性プローブ添加でほぼ完全に消失した。一方、速い成分への結合は20-200倍量の非放射性プローブの添加で著明に増強されたが、500倍量以上の非放射性プローブ添加で速い成分への結合は減少した(図2)。また、非放射性CREの添加は、AP1/プローブ複合体の遅い成分を濃度依存的に阻害したが、速い成分に対しては著変を与えなかった。非放射性CREの遅い成分の対する阻害作用は、非放射性AP1プローブの場合に比べて弱いことが判明した。さらに、非放射性Mycプローブは遅い成

分および遅い成分への結合に対して、いずれも少なくとも20倍量までは著変を与えなかった(図3)。非放射性プローブの無添加条件下でAP1結合の脳内分布を検討した結果、遅い成分の結合は他の脳内部位に比べて大脳皮質、海馬および小脳で顕著に高いことが判明した。また、非放射性AP1プローブ添加による速い成分の増強効果は、海馬および小脳のいずれの核抽出液を用いた場合にも同様に認められた。

図1. デンシトグラム

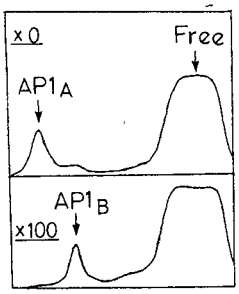


図2. AP1プローブによる競合実験

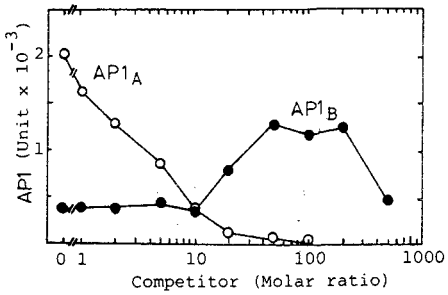
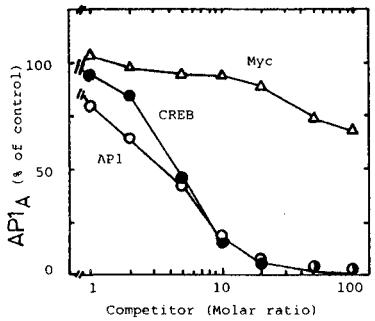


図3. 各種プローブによる競合実験



〔考察〕

本研究において用いられた測定条件では、マウス脳内に存在するTRE親和力の異なる複数のAP1を容易に検出することが可能となった。非放射性AP1プローブによる競合実験結果から類推して、移動度の速い成分はTREに対する親和力は移動度の遅い成分よりも低いものと考えられる。さらに、各コンセンサス配列のみ異なるCREやMycプローブでは競合されなかったので、速い成分はコンセンサス配列以外の塩基配列を認識するのではなく、逆に遅い成分よりもTREに特異性の高い蛋白質である可能性が示唆される。一方、移動度の遅い成分はTREに対する高い親和力を持つが、非放射性CREによりその結合が阻害される事実は、本成分がTREのみならずCREに対しても親和力を持つことを支持するものである。事実、ATFファミリー蛋白質はJunやFosファミリー蛋白質ともヘテロダイマーを形成して、TREおよびCREの両シスエレメントに同等度に結合することが示されている(4)。したがって、本研究において見出されたゲル内移動度とTRE親和力の異なるAP1を構成する各蛋白質の早急な同定が望まれる。

〔謝辞〕

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(05671855)の援助の下に行われた。

〔文献〕

1. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987) Cell 49, 729-739.
2. Curran, T. and Franza, Jr., B.R. (1988) Cell 55, 395-397.
3. Hai, T. and Curran, T. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 3720-3724.
4. Lee, W., Haslinger, A., Karin M. and Tijian, R. (1987) Nature 325, 368-372.
5. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Nucleic Acid Res. 17, 6419.
6. Yoneda, Y., Ogita, K., Kabuto, H. and Mori, A. (1993) Neurosci. Lett. in press.

17 脳内転写制御因子Ｍｙｃ結合活性の調節

荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕核内転写制御因子MycのDNA結合能の性質を、マウス脳核抽出液を用いたゲル移動度シフトアッセイにより検討した。本結合は、KClおよび$MgCl_2$の両カチオンの非添加条件下ではほとんど検出されなかったが、KClの添加により著明に結合が増強された。$MgCl_2$あるいは$CaCl_2$の添加は、いずれもKCl添加条件下のMyc結合を濃度依存的に阻害した。KCl単独添加条件下およびKCl/$MgCl_2$共存下のMyc結合はともに、非放射性2本鎖Mycプローブ添加により濃度依存的に阻害されたが、非放射性1本鎖Mycプローブの添加では全く影響されなかった。さらに、Activator protein-1(AP1)やcAMP responsive element結合蛋白質(CREB)の非放射性2本鎖プローブの添加は、イオン添加条件にかかわらずMyc結合には影響を与えなかった。ピロリン酸の添加(>1 mM)は、KCl単独添加条件下のMyc結合を著明に阻害したのに対して、KCl/$MgCl_2$共存下の結合はピロリン酸添加により著しく増強された。しかしながら、他のプロテインホスファターゼ阻害薬は、いずれの条件下のMyc結合にも著変を与えなかった。以上の結果より、脳内Myc蛋白質のDNA結合活性はカチオン類やピロリン酸など種々の内因性因子により調節を受ける可能性が示唆される。

プロトオンコジーンc-mycの翻訳産物であるMyc蛋白質は、核内に存在する転写制御因子の一つであると考えられている。Myc蛋白質は、そのC末端側に塩基性アミノ酸に富む領域、ヘリックス・ループ・ヘリックス、およびロイシンジッパーと続く構造(bHLH-Zip)を有している(3)。MycはこのbhLH-Zip構造を介して核内蛋白質Maxとヘテロダイマーを形成して、2本鎖DNA上の特定の塩基配列[CAC(G/A)TG]に選択的かつ高親和性に結合し、その標的遺伝子に対する転写調節機能を発揮する(2)。このMaxは同じbHLH-Zip蛋白質であるMadともヘテロダイマーを形成後、Myc/Max複合体と同一のシスエレメントに結合して、Myc/Max複合体の場合と相反する転写調節機能を発現することが示されている(1)。このように、DNA配列CAC(G/A)TGには数種類の異なる蛋白質複合体が結合するが、その結合活性の調節メカニズムについてはほとんど解明されていないのが現状である。したがって本研究では、DNA配列CAC(G/A)TGへの結合蛋白質をマウス脳核抽出液を用いたゲル移動度シフトアッセイにより検出するとともに、このMyc結合活性の内因性調節因子を検索した。

〔実験方法〕

核抽出液の調製：Std-ddY雄性マウス全脳から、Nonidet P-40を用いた方法(4)に準じて核抽出液を調製した。得られた核抽出液は、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTTおよび各種蛋白質分解酵素阻害剤を含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で透析後、使用時まで-80℃で凍結保存した。DNAプローブ：放射性2本鎖Mycプローブ(5'-CTAGTGACACGTGGCCGGATCA-3')は、dATP[α-^{32}P](111 TBq/mmol, NEN/DuPont社)と、DNAポリメラーゼⅠのKlenow fragmentを用いたエンドラベリング法により調製した。CREBプローブおよびAP1プローブは、それぞれのコンセンサス配列以外のDNA配列がMycプローブの場合と同一のものを作成して実験に供した。ゲル移動度シフトアッセイ：核抽出液(3-5 μg蛋白質)、1 μg poly(dI-dC)、放射性プローブ(20 fmol、1-12×10^4 cpm)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、10%グリセロールおよび各種蛋白質分解酵素阻害剤を含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)の全量20 μlを室温で30分間反応させたのち、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電気泳動法(80 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(5)。

〔実験結果〕

放射性Mycプローブへの結合は、KClおよび$MgCl_2$の両カチオンの無添加条件下では検出されなかったが、100 mM KClを添加すると、顕著な結合活性の上昇が認められた。100 mM KCl添加条件下にさらに$MgCl_2$を添加すると、結合は5 mM以上の$MgCl_2$で濃度依存的に阻害された。$CaCl_2$も$MgCl_2$の場合と同様なMyc結合阻害作用を発揮した(図1)。KCl単独添加条件下およびKCl/$MgCl_2$共存下において、各種非放射性オリゴヌクレオチドによる競合実験を行ったところ、2本鎖Mycプローブの添加は両条件下の結合を濃度依存的に阻害したが、その阻害強度はKCl/$MgCl_2$共存下の場合に比べてKCl単独添加条件下の方が強力であった。しかしながら、いずれのイオン添加条件下でも1本鎖Mycプローブは50倍量添加してもMyc結合には著変を与えなかった。また、AP1プローブおよびCREBプローブはいずれの反応条件下の結合にも影響を与えなかった(図2)。KCl単独添加条件下およびKCl/$MgCl_2$共存下において結合反応を行ったのちに、S. aureus V8プロテア

ーゼ処理による限定分解を行った結果、放射性バンドのシフトパターンがイオン添加条件により異なることが明らかとなった。次に、両反応条件下でピロリン酸の添加効果を検討した結果、ピロリン酸はKCl単独添加条件下の結合を1 mM以上の濃度で濃度依存的に阻害するのに対して、KCl/$MgCl_2$共存下の結合はピロリン酸添加により著しく増強されることが判明した(図3)。しかしながら、他のプロテインホスファターゼ阻害薬(オルトバナジン酸、オカダ酸、カリクリンAおよびマイクロシスチン-LR)はいずれも、KCl/$MgCl_2$共存下のMyc結合に著変を与えなかった。

図1. 2価カチオンの影響

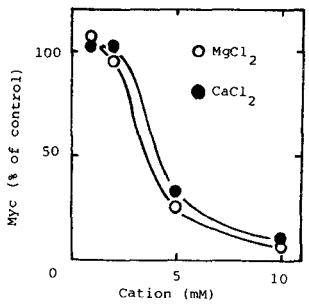


図3. ピロリン酸の影響

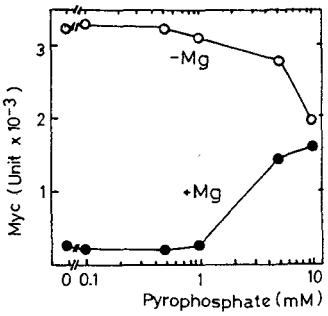
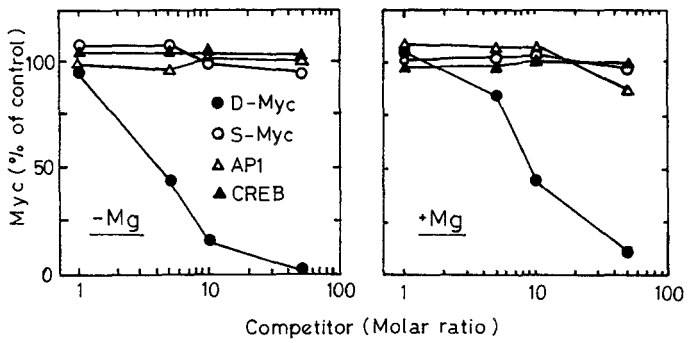


図2. 競合実験



〔考察〕

本Myc結合活性はMg^{2+}の添加により著明に影響されたが、Mg^{2+}添加にかかわらずMyc結合は1本鎖MycプローブやAP1プローブあるいはCREBプローブでは阻害されないことから、本結合蛋白質が2本鎖のCACGTG配列を認識することは明確である。また、S. aureus V8プロテアーゼを用いたバンドシフトアッセイによる結果は、$MgCl_2$存在下と非存在下に検出される蛋白質が互いに異なるものである可能性を支持する。さらに、Myc結合活性はピロリン酸により影響を受けるが、他のプロテインホスファターゼ阻害薬ではこのような効果が認められなかったことから、ピロリン酸の効果はプロテインホスファターゼの阻害作用に起因するものではなく、ピロリン酸自身の作用に由来する可能性が考えられる。しかしながら、その有効濃度が極めて高いため、生理的機能との関連性や作用特異性などに関する最終結論は今後の研究を待たなければならない。

〔謝辞〕

本研究の一部は平成5年度厚生省精神・神経疾患研究委託費の援助の下に行われた。

〔文献〕

1. Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N. (1993) Cell 72, 211-222.
2. Blackwood, E.M. and Eisenman, R.N. (1991) Science 251, 1211-1217.
3. Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N. and Weintraub, H. (1990) Science 250, 1149-1151.
4. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Nucleic Acid Res. 17, 6419.
5. Yoneda, Y., Ogita, K., Kabuto, H. and Mori, A. (1993) Neurosci. Lett. in press.

18 マウス小脳に存在するモルヒネ感受性1本鎖CRE結合蛋白質(ssCRE-BP)の性質と精製

大杉　武、青木義矢、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、モルヒネに対して耐性や依存が生じることが知られている。我々は、これまでに、モルヒネ慢性投与により変化する核蛋白質をマウス小脳に見いだしている。この核蛋白質は1本鎖のcAMP reponse element (CRE)を特異的に認識して結合することがわかった。今回、この1本鎖DNA結合蛋白質の精製及び性質を検討した。マウス小脳より核分画を調製し、0.5 M NaCl抽出画分をDNAアフィニティカラムとMonoQカラムを用いて精製した。このDNA結合蛋白質はSDS-PAGE上で35-40 kDaの2本のポリペプチドバンドとして検出された。精製の指標として、DNA結合活性を用いたが、精製するにともない、この蛋白質の結合活性が減少した。しかし、DNAアフィニティカラムのflow through分画を加えることにより結合活性は回復した。また、カゼイン存在下でも結合活性が保持されることがわかった。しかし、BSAやヒストンは効果がなかった。

以上のことから、1本鎖CRE結合蛋白質は他の因子によって、結合活性が調節されることが示唆された。

[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、マウス小脳の核抽出液中にモルヒネの長期投与により変化するDNA結合蛋白質が存在することを報告した（1）。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、マウス小脳より、この1本鎖CRE結合蛋白質(ssCRE-BP)の精製及び性質を検討した。

[実験方法]

核抽出液: マウスを断頭屠殺し、小脳を摘出後、0.25 M Sucrose、10 mM KCl、1.5 mM $MgCl_2$、0.5 mM DTT、10 mM Hepes (pH 7.9)溶液中でホモゲナイズした。低速遠心(500 x g、10 min)後、粗核分画を調製し、Dignamらの方法（2）に従って、核蛋白質抽出液を得た。

ゲルシフト法: ^{32}P-ATPで末端標識したソマトスタチン遺伝子のCREを含むオリゴDNAを用いて、既報（3）に準じて行った。

ssCRE-BPの精製:　核抽出画分を超遠心(100,000 xg、1 h)後、上清をアミコン限外ろ過装置(YM 100)を用いて濃縮した。そして、1本鎖CREのDNAアフィニティカラムとMonoQカラムを用いて精製した。

UV-クロスリンク法: ^{32}P-dGTPで標識したオリゴDNAと核抽出液をゲルシフト法に準じて反応後、紫外線(254 nm)を1時間照射して、蛋白質とDNAを共有結合させた。そして、ヌクレアーゼ処理によりDNAを分解した後、SDS-PAGEにより分子サイズを測定した。

[結果及び考察]

ssCRE-BPはDNAアフィニティカラムから、1 MのKClによって溶出されるが、DNA結合活性が著しく減少する。しかし、DNAアフィニティカラムのflow through分画を添加することにより、ssCRE-BPの結合活性は回復した。ssCRE-BPの結合活性はflow through分画に含まれる他の因子を必要とすると思われる。ssCRE-BPの結合活性促進作用はBSAやヒストンには見られなかったが、カゼインはflow through分画と同様にssCRE-BPのDNA結合活性を回復させた。従って、カゼイン存在下にゲルシフト法を行ない、ssCRE-BPのDNA結合

活性を測定し、精製を行なった（図１）。MonoQカラムからの約0.4 M KCl溶出分画にssCRE-BPの結合活性が存在し、SDS-PAGE上では、分子サイズが35-40 kDaの二本のポリペプチドバンドを検出した。UV-クロスリンク法から分子サイズを調べると、約45 kDa以下であると考えられた（図２）。ssCRE-BPはゲルろ過によって約110-150 KDa の分画に溶出され、多量体や他の因子と複合体を形成していると思われる。ssCRE-BPはラットの43 kDa-CREBやCRE-BP1に対する抗体とは反応せず、１本鎖DNAに特異的に結合することから、これまでに報告されたCRE結合蛋白質とは異なると考えられる。

この蛋白質の機能はまだ不明であるが、モルヒネ長期投与により、DNA 結合活性が変化することから、モルヒネの耐性依存現象に深く関与していると考えられる。

［文献］

1) Osugi, T. et al., (1993) Mol. Brain Res. in press.
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.

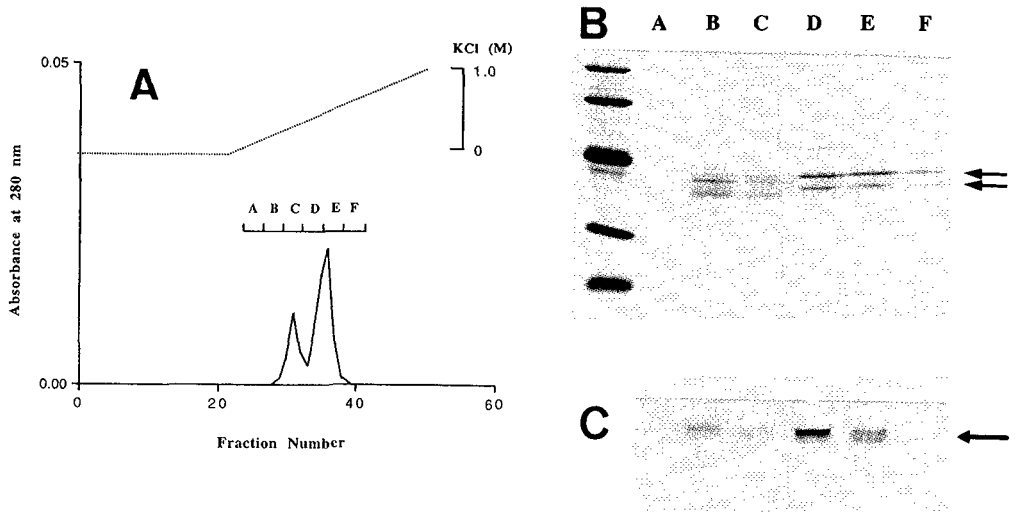


図１．マウス小脳核抽出液のDNAアフィニティカラム溶出分画のMonoQカラムクロマトグラフィー(A)とそのSDS-PAGE (B)及びゲルシフトアッセイ(C)

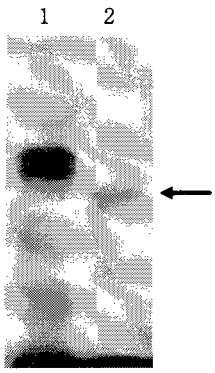


図２．マウス小脳核抽出液とssCREのUV-クロスリンク
（１）ヌクレアーゼ未処理、（２）ヌクレアーゼ処理後

19　El マウス脳における Fos と異常可塑性の関連性について

勝元　栄一、横谷　昇、撫井　弘二、大西　博、山上　榮
（ 大阪市大・神経精神 ）

〔要約〕

我々は既に El マウスの放り上げ刺激による固有の発作後において、c-*fos* mRNA 発現の誘導が、 El[s]、El[ns]、ddY に対してペメグリドを腹腔内に注射して発作を起こした時に較べて延長していることを報告[2]した。今回は発作後の Fos 蛋白質の発現について検討を加えた。El[s] では放り上げ刺激による発作とペメグリド注射による発作ともに Fos の発現は発作 2 時間後でピークとなり、48 時間後まで延長していた。これに対して El[ns]、ddY において注射によって発作を起こしたときは、それぞれ 4 時間後、2 時間後で発作間歇期のレベルに戻っていた。したがって El[s] の Fos 発現は El[ns]、ddY に較べて明らかに延長していることが示され、このことは El[s] が週一回の放り上げ刺激により発作を反復することによって、てんかん感受性が高まっていくことを示唆している。また Fos の発現延長によって他の遺伝子の発現が誘導され、異常可塑性が獲得されていくのではないかと推測される。

(目的) c-*fos* の発現産物である Fos 蛋白質は同じ核内癌遺伝子の産物である Jun 蛋白質と AP-1 complex を形成し、AP-1 site を上流に持つ遺伝子を活性化していると考えられる[3,5]。今回、我々は複雑部分発作のモデルと考えられている El マウスを用いてけいれん発作後の Fos の発現を検討し、El マウスにおける abnormal neural plasticity と Fos による遺伝子制御の可能性について考察を加えた。

(方法) 生後 150 日で週一度のけいれん履歴を持つ El[s] マウスを放り上げ刺激によりけいれん発作を誘発した。また、El[s]、放り上げ履歴を持たない El[ns] および発作非感受性の ddY マウスに対してペメグリドをそれぞれ 16 mg/kg 体重腹腔内投与し、発作を誘発した。発作後経時的に断頭して Chauveau ら[1]の方法を一部改変して、脳より核分画を抽出した。得られた核分画を DNase 処理し、SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルは electroblot により PVDF membrane に転移した。その後、Fos のポリクローナル抗体と [^{125}I]-protein A を用いて、Fos の発現をオートラジオグラフィーを行った。

(結果) Fig. 1 にオートラジオグラフィーの結果を示した。(a) が El[s] に放り上げ刺激によってけいれんを起こさせた場合で、(b)、(c)、(d) は El[s]、El[ns] と ddY にペメグリドの 16 mg/kg 体重を腹腔内投与してけいれんを起こさせた場合である。レーンは各々、発作前 (1)、発作後 30 分 (2)、60 分 (3)、90 分 (4)、2 時間 (5)、4 時間 (6)、6 時間 (7)、24 時間 (8)、48 時間 (9)、72 時間 (10)、96 時間 (11) で示した。まず、El[s] に放り上げにより発作を起こさせた場合では、発作 30 分後より Fos の増加が見られ、2 時間後でピークとなった。48 時間後まで Fos の発現は持続していた。次に、ペメグリドによる発作の誘発では、El[s] では発作 60 分後より Fos の誘導が見られ、放り上げの場合と同様に 2 時間後にピークとなり、次第に減少してゆき 48 時間後では極く僅かの誘導にとどまった。一方、El[ns] 、ddY においては、それぞれ 30 分後より発現が認められたが、El[ns] では 4 時間後、ddY では 2 時間後にそれぞれ発作間歇期のレベルに回復した。

(考察) 反復電撃刺激による発作後のラット海馬において c-*fos* と c-*jun* の発現に遅れて AP-1 site を上流に持つプロエンケファリン遺伝子の活性化が報告されている[6]。また、メトラゾールけいれん誘発後の海馬でも c-*fos*、c-*jun*、*jun*-B、*erg*-1 が一過性に活性化され、遅れてプロエンケファリンの活性化されるという[4]。今回の結果では El[s] の固有の刺激による発作において Fos の発現は、ペメグリドによる痙攣を誘発した時の El[s] の場合よりやや延長していた。また El[ns]、ddY に較べるとより明らかな延長が見られた。。このことは El マウスにおいて放り上げ刺激により発作を起こさせ、Fos が繰り返し発現することにより、転写因子である AP-1 がプロエンケファリンやその他の標的遺伝子を活性化するのかも知れない。それによって脳における異常可塑性が生じ、発作感受性が亢進していくのではないかと推測される。

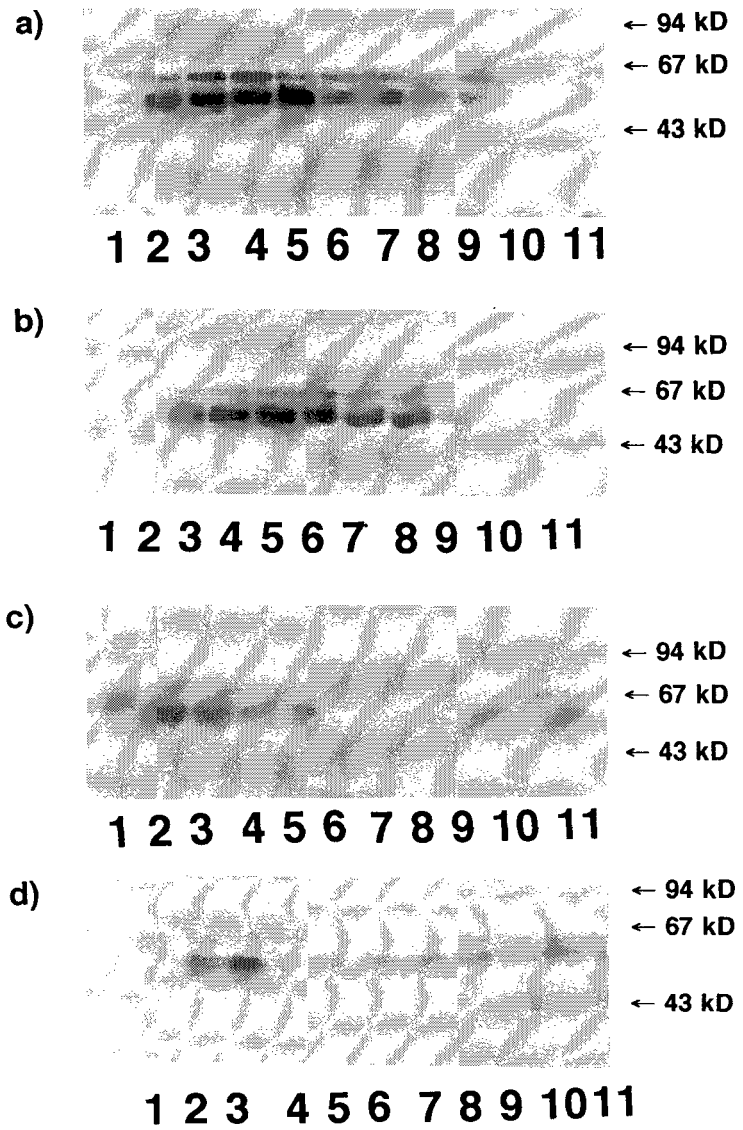


Fig. 1 Autoradiogram of Fos expression after seizures were shown in (a) : El[s] by tossed-up stimulation, and (b) : El[s], (c) : El[ns] and (d) : ddY by bemegride injection. Lane 1 : interictal period, 2 : 30 min, 3 : 60 min, 4 : 90 min, 5 : 2 h, 6 : 4 h, 7 : 6 h, 8 : 24 h, 9 : 48 h, 10 : 72 h and 11 : 96 h after seizures.

(文献)

1) Chauveau J et al., Exp. Cell Res., 1956, 11:317-321.

2) Katsumoto E et al., Neurosciences 1992, 18 suppl. 2: 21-25.

3) Sassone-Corsi P et al., Cell, 1988, 54: 553-560.

4) Sonnenberg JL et al., Science, 1989, 246:1622-1625.

5) Verma IM and Sasson-Corsi P, Cell, 1987, 51:513-514.

6) White JD and Christine MG, 1987, Mol. Brain Res., 3:21-29.

20 ALDH2のgenotypeの簡便な決定とアルコール依存症の特徴について

中村和彦，岩橋和彦，松尾義則[1]，洲脇寛，市川佳幸[1]，細川清[2]，市川正浩[3]，三船和史[4]（香川医大・精神神経科，生化学[1]，附属病院[2]，三光病院[3]，三船病院[4]）

〔要約〕

ALDH2のgenotypeをの決めるための簡便なPCRを用いた方法を考案した．第一の方法はプライマーを一塩基変えることによって，ALDH2¹とALDH2²を区別できるMboIIの制限酵素の認識部位を作ることによる．第二の方法は各々の遺伝子に特異的なプライマーを使い二回PCRをすることによる．どちらの方法もアイソトープを使わず簡単にgenotypeを決めることができた．これらの方法でDSM-Ⅲ-Rで，アルコール依存症と診断された57人の患者のgenotypeを決めたところ，ALDH2¹/ALDH2¹のホモが51人で，ALDH2¹/ALDH2²のヘテロが6人であった．ヘテロの人の臨床特徴は二つに分けられた．一つは人格障害を伴い，反社会的な行為がみられ，治療も断酒会などが効果がなく治療困難例として取り上げられていたもの．もう一方は特に臨床的に特徴のないものであった．

〔目的〕

ALDHはアルコールの代謝に重要な役割を果たしている．その一つであるALDH2はアルコールの酸化に関係している．ALDH2の活性は西洋人と東洋人では異なる．東洋人の約50%がALDH2の活性が欠損している(1,2)．ALDH2にはALDH2¹とALDH2²がある．西洋人のほぼ100%がALDH2¹である(3)．特異的なALDH2²はヌクレオチドが一塩基G→Aに置き変わっている(4,5)．日本人におけるALDH2¹の頻度は0.65でALDH2²の頻度は0.35である(6)．日本人のアルコール依存症はALDH2¹が多い(7,8,9,10)．台湾のアルコール依存症の人の88%がALDH2¹/ALDH2²であった(11)．ここで興味深いのは西洋人にはALDH2¹/ALDH2²のヘテロのアルコール依存症の人はいないが，東洋人にはヘテロのアルコール依存症がいることである．そこでわれわれは，ALDH2のgenotypeを決める簡単な方法を考案して，アルコール依存症の人を調べ臨床的特徴をみた．

〔方法〕

本人，家族にアルコール依存の既往のない医療関係者112人，DSM-Ⅲ-Rでアルコール依存症と診断された，57人の血液を同意を得て採血した．患者については，家族歴，既往歴，症候，身体症状，身体障害，社会障害，自己意識，多剤併用について本人に面接を行った．

各々のDNAを白血球から取り出す(12)．プライマーはALDH2のエクソン12の遺伝子の配列から考案した(13)．PCRは最終の量が50μl(primary PCR)または25μl(secondary PCR)で100から200ngの人のDNA，50mM KCl，10 mM Tris HCl(pH 9.0)，1.25mM $MgCl_2$，200μM dNTP，1 unitのTaq polymerase(Promega)，5 pmolの各々のプライマー（ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1:5'-CAAATTACAGGGTCAACT-3'，ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2:5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTT-3'，ﾌﾟﾗｲﾏｰ 3:5'-CCACACTCACAGTTT 3'，ﾌﾟﾗｲﾏｰ 4:5'-CACAGTTTTCACTTC-3'，ﾌﾟﾗｲﾏｰ 5:5' CACAGTTTTCACTTT-3'）で行った．Primary PCR(ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 2，ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 3)は94℃1分，51℃2分，72℃2分で5秒のextentionで30サイクルを行った．Secondary PCR(ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 4，ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 5)は94℃1分，51℃2分，72℃2分で30サイクル行った．両方ともPerkin-Elmer Cetus Thermal Cyclerを使った．

方法1：ALDH2¹に特異的な制限酵素の認識部位を作った．ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2はT/Aのミスマッチがある．このようにしてALDH2²はAAAGAの配列，ALDH2¹はMboIIの制限酵素認識部位を持つGAAGAの配列になるようにした．ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 2で30サイクルのprimary PCRをしたあと1/10を取りALDH2¹を調べるためMboIIで37℃6時間で切る．その後10-20%のポリアクリルアミドゲルで流し，エチジウムブロマイドで染めてポラロイド667フィルムで写真を取った．

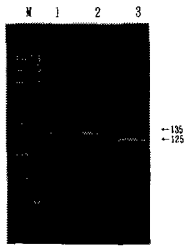
方法2：ﾌﾟﾗｲﾏｰ 4とﾌﾟﾗｲﾏｰ 5は各々の配列に特異的なプライマーである．ﾌﾟﾗｲﾏｰ 4はG→Aの変異のないALDH2¹のみに特異的である．一方ﾌﾟﾗｲﾏｰ 5はこの変異のあるALDH2²のみに特異的である．Secondary PCRはALDH2¹を調べるためにﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 4を使い，ALDH2²を調べるためにﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 5を使う．primary PCR(ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1とﾌﾟﾗｲﾏｰ 3)の後，1/500をsecondary PCRする．その後2%アガロースゲルに流し，染色して写真を取った．

〔結果と考察〕

方法1：Fig.1はMboIIで切断されたALDH2¹の遺伝子を示す．Lane1(one band; 135bp)はhomozygoteのALDH2² allele(ALDH2²/ALDH2²)を示す，Lane 2(two band

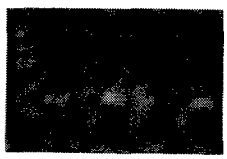
;125bp, 135bp)は heterozygote(ALDH2^1/ALDH2^2), Lane 3(one band;125bp)は homozygoteの ALDH2^1 allele(ALDH2^1/ALDH2^1).
方法 2:PCR の条件はﾌﾟﾗｲﾏｰと各遺伝子が完全にマッチする. Fig.2 は結果を示す. homozygoteのALDH2^1 (ALDH2^1/ALDH2^1)はﾌﾟﾗｲﾏｰ 4のみによって増幅された. heterozygote(ALDH2^1/ALDH2^2)はﾌﾟﾗｲﾏｰ 4とﾌﾟﾗｲﾏｰ 5によって増幅された. mutant homozygote(ALDH2^2/ALDH2^2)はﾌﾟﾗｲﾏｰ 5のみによって増幅された.
コントロール112人とアルコール依存症57人について方法1と2を使い ALDH2の genotypeを決めた(Table.1). 方法1と方法2の結果は全く同じであった. 112人のコントロールは66人が homozygoteの ALDH2^{1}で36人が heterozygoteの ALDH2^1/ALDH2^{2}で10人がhomozygoteの ALDH2^{2}であった. アルコール依存症57人の内6人が heterozygoteの ALDH2^1/ALDH2^{2}であった. ヘテロの臨床的特徴をみる. 6人中5人が幻覚妄想が現れ, 被害関係念慮などが現れている. 6人中2人は2合から4合で暴力行為, 尿失禁, 行動以上など病的酩酊まで至っている. 6人中2人に人格障害(反社会性人格障害, 衝動性人格障害), 6人中3人は飲酒運転などの逮捕歴があった. タイプを二つに分けた. 人格障害などがあり社会適応が悪く断酒会などの治療効果がないタイプと臨床的に特に特徴のないタイプに分けた. 前者のタイプについては, ALDH2活性が低いにも関わらずアルコール症とみられる理由は, 人格障害などが背景にあり, 問題行動としてアルコールが取り上げられている. つまりアルコールを飲んで興奮して暴力を振るうなどの行為が問題となっている. 後者についても断酒会などの治療がうまく行かない. 後者については, 問題飲酒は著明でないが, 飲酒により幻覚妄想をきたしやすい. このようにALDH2のタイプ分けは, 臨床的特徴, 従来言われている亜型をよりはっきりさせ治療的アプローチを正確にできるので, 何らかの意味があるように思われる. 後者のタイプについては, 他の酵素などとの関係を調べ, 臨床面も含めてさらなる研究が必要であると思われる.

Fig.1. PCR products separated in a 10-20% polyacrylamide



M:molecular mass markers(Funakoshi)
Lane 1:homozygous for ALDH2^2 allele(ALDH2^2/ALDH2^2)
Lane 2:heterozygous(ALDH2^1/ALDH2^2)
Lane 3:homozygous for ALDH2^1 allele(ALDH2^1/ALDH2^1)

Fig.2. PCR products separated by 2% agarose gel
Genotype ALDH2^1/2^1 ALDH2^1/2^2 ALDH2^2/2^2



M:molecular mass markers(Funakoshi)
Lanel.2:homozygous for ALDH2^1 allele(ALDH2^1/ALDH2^1)
Lane3.4:heterozygous(ALDH2^1/ALDH2^2)
Lane5.6:homozygous for ALDH2^2 allele(ALDH2^2/ALDH2^2)

Table.1. Genotype of the ALDH2 Locus in Japanese nonalcoholics(n=112)and alcoholics(n=57)

	Genotype			Gene Frequency	
	ALDH2^1/ALDH2^1	ALDH2^1/ALDH2^2	ALDH2^2/ALDH2^2	ALDH2^1	ALDH2^2
Nonalcoholics	66	36	10	0.75	0.25
calculated*	63	42	7		
Alcoholics	51	6	0	0.95	0.05
calculated*	51	5	0		

* Based on the assumption of random mating population

〔文献〕

(1)Goedde, H.W., Harada, S., & Agarwal, D.P.(1979)Hum.Genet.51, 331-334
(3)Goedde, H.W., Agarwal, D.P., Fritze, G., et al.(1992)Hum.Genet.88, 344-346
(7)Harada, S., Agarwal, D.P., Goedde, H.W, Tagaki, S., &Ishikawa, B.,(1982) Lancet 2:827
(8)Harada, S., Agarwal, D.P., Goedde, H.W., &Ishikawa, B.,(1983)Pharmacol Biochem Behav 18[Suppl 1]:151-153
(9)Harada, S., Agarwal, D.P., &Goedde, H.W.,(1985)Alcohol 2:391-392
(5)Hsu, L.C., Tani, K.Fujiyoshi, T., Kurachi, K., & Yoshida, A.,(1985)Proc.Natl. Acad.Sci.USA 82, 3771-3775
(13)Hsu, L.C., Bendel, R.E. and Yoshida, A.(1988)Genomics.2, 57-65
(12)Maniatis, T., Fitsch, E.F., & Sambrook, J.(1989)Molecula cloning. A laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory 9, 16-19
(6)Shibuya, A. and Yoshida, A.(1988a)Am.J.Hum.Genet 43, 741-743.
(2)Teng, Y.S.(1981)Biochem.Genet.19, 107-113
(11)Thomasson, H.R., Edenberg, H.J., Crabb, D.W. et al.(1991) Am.J.Hum.Genet.48:677-681
(4)Yoshida, A., Huang, I.Y., & Ikawa, M.,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 258-261
(10)Yoshihara, H., Sato, N., Kamada, T., &Abe, H.,(1983)Pharmacol Biochem Behav 18[Suppl 1]:425-428

21 ドーパミントランスポーター遺伝子多型と精神神経疾患

佐野輝[1]、近藤啓次[1]、柿本泰男[1]、近藤郁子[2]、
服部優子[3]、水野美邦[3]
（愛媛大・医・神経精神[1]、衛生[2]、順天堂大・医・神経内科[3]）

〔要約〕

最近ヒトードパミントランスポーターのcDNAがクローニングされ、3'-非翻訳領域に40ヌクレオチドの繰り返し配列が存在することが明らかにされた。すでに我々はこの繰り返し配列の回数が多型を示すことを証明し、日本人での多型パターンを報告した。今回我々は、この多型とParkinson病、精神分裂病との相関ならびに家族性Parkinson病での解析を行った。これら疾患との有意な相関および家族性Parkinson病での特異な型の検出は得られなっかたが、日本人の中で沖縄住民に繰り返し配列の少ない傾向を見い出した。

[緒言] ドーパミントランスポーター（Dopamine Transporter; DAT）は、ドーパミン（Dopamine; DA）ニューロンの神経終末部の細胞膜に特異的に発現するDA再取り込みポンプである。ヒトDAT cDNA 3'-非翻訳領域には40ヌクレオチドの繰り返し配列が存在するが[1]、ラットDATcDNAの同部位にやはりCA-ジヌクレオチドの繰り返し配列が認められる[2]。最近、我々はヒトDAT遺伝子での40ヌクレオチド繰り返し配列の回数が日本人集団で多型を示すことを明らかにした[3]。mRNAにおける3'-非翻訳領域の機能意義については未だ明らかではないが、筋緊張性ジストロフィーで、3'-非翻訳領域のtandem (triplet)repeatの増加がmRNAおよび蛋白質への翻訳の減少と相関していることが証明されている[4]。今回我々は、DAニューロンの変性疾患であるParkinson病、DAニューロン系の異常が考えられる精神分裂病の患者集団のDAT多型を正常対照集団と比較検討し、また家族性Parkinson病での解析を行った。

[実験方法]

99人の健常日本人および47人の健常琉球系沖縄在住日本人のボランティアから研究趣意を説明し同意を得た後採血を行った。また日本人Parkinson病、精神分裂病患者および琉球系日本人Parkinson病、精神分裂病患者からインフォームドコンセントを得られた者から10 mlの採血を行った。血液からリンパ球を分離し、PHA存在下に7日間培養後genomic DNAを抽出した。得られたgenomic DNAを鋳型とし、既報の方法[3]を用いてPCRにてヒトDAT遺伝子中40-ヌクレオチド繰り返し配列部分を含む3'-非翻訳部分の増幅を行った。PCR産物を1.7%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、繰り返し配列の繰り返し回数を解析した。

[結果と考察]

表1に示すように健常日本人集団ではgenotypeとして、10回繰り返しのホモの割合が99人中87人（88%）を占め、10回繰り返しの対立遺伝子頻度は93.5%（表2）と高い。これはVandengergh らの報告したアメリカ人（白人+黒人）での対立遺伝子頻度[5]と比べると、日本人ではより均一な対立遺伝子構成を示している（図1）。これに対し健常琉球系日本人集団での頻度は、9回繰り返し等の頻度が若干多く、統計的には日本人対照集団との有意差はないもののアメリカ人集団により近い傾向を示した。Horai らはミトコンドリアDNAの分析を用い人種の差異を遺伝子レベルから解析し、琉球系日本

表1 DAT-VNTR Genotypes

VNTR#	日本			琉球		
Genotype	対照	Parkinson	分裂病	対照	Parkinson	分裂病
11/10	3	0	2	2	0	1
10/10	87	29	16	39	41	31
10/9	5	3	1	4	5	8
9/9	1	0	0	1	1	0
10/8	1	0	0	0	0	0
10/7	2	2	2	1	2	0
合計	99	34	21	47	49	40

表2　DAT-VNTR Allelic Frequencies

VNTR#	日本			琉球		
Genotype	対照 (%)	Parkinson (%)	分裂病 (%)	対照 (%)	Parkinson (%)	分裂病 (%)
11	3 (1.5)	0 (0)	2 (4.8)	2 (2.1)	0 (2.1)	1 (1.2)
10	185 (93.5)	63 (92.6)	37 (88.8)	85 (90.4)	89 (90.4)	71 (88.8)
9	7 (3.5)	3 (4.4	1 (2.4)	6 (6.4)	7 (6.4)	8 (10.0)
8	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7	2 (1.0)	2 (2.9)	2 (4.8)	1 (1.1)	2 (1.1)	0 (0)
合計	198 (100)	68 (100)	42 (100)	94 (100)	98 (100)	80 (100)

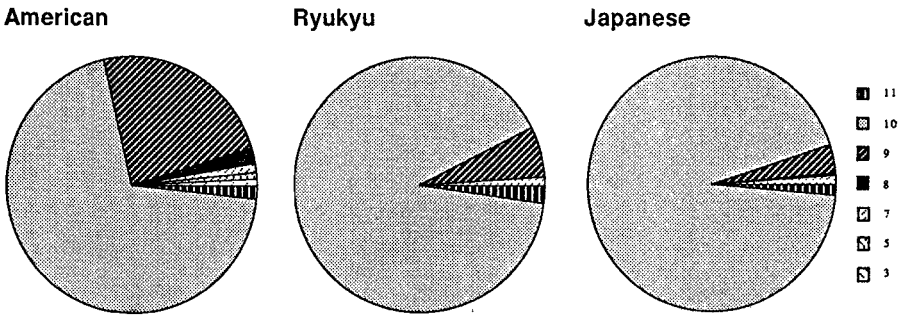


図1　アメリカ人（白人十黒人）[5]、琉球系日本人、日本人における DAT-VNTR 対立遺伝子頻度

人が本土の日本人と遺伝的に差を持つことを報告しているが[6]、DAT 多型についても9回繰り返しや11回繰り返しの対立遺伝子の割合が若干多くより不均一な傾向が認められた（図1）。

次に疾患との相関を日本人および琉球系日本人の集団で検討した結果、Parkinson 病および精神分裂病のいずれの患者集団も、対照集団と統計学的有意差を示さなかった（表2）。また家族性 Parkinson 病の解析では、繰り返し回数の異常に多いもしくは少ない例の存在を期待したが、そのような例は認めなかった。

Parkinson 病における DA ニューロンの特異的変性脱落を考えるには、DA ニューロンの何らかの特異性を考えねばならない。Parkinson 病モデルで有名な MPTP は DA ニューロン特異的神経毒であるが、この特異性は DA ニューロンへの特異的取り込みすなわち DAT による特異的認識によっ決定され、DAT に Parkinson 病の病因としての役割も考えられる[7]。今回の結果から、DAT 遺伝子 3'-非翻訳部分の繰り返し配列多型には Parkinson 病との相関は認められなかったが、機能と相関する遺伝子多型との相関は否定されるものではない。また DAT の発現実験でアンフェタミンやコカインが DAT に効率よく結合してその活性を阻害することが明らかとなり、DAT と薬物依存の関係も注目されているため、アルコール依存症患者集団でのDAT 遺伝子多型を現在解析中である。

[文献]

1) Vandenberg DJ, Persico AM, Uhl GR (1992) Mol. Brain Res. 15, 161-166

2) Shimada S, Kitayama S, Lin C-L, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G (1991) Science 254, 576-578

3) Sano A, Kondoh K, Kakimoto Y, Kondo I (1993) Hum. Genet. in press

4) Fu Y-H, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG Jr, Caskey CT (1993) Science 260, 235-238

5) Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR (1992) Genomics 14, 1104-1106

6) Horai S, Gojobori T, Matsunaga E (1987) in *Human Genetics, Proceedings of the 7th International Congress* pp. 177-181, Springer-Verlag, Heidelberg

7) Uhl GR (1992) TINS 15, 265-268

22 パーキンソン病態モデルラット線条体シナプス膜におけるドパミンアゴニストのG蛋白質活性化の増強作用とドパミン受容体遺伝子発現

井上敦子*・**、仲田義啓**、植田弘師*、三須良実*
(*横浜市大、医、薬理 **広島大、医、総合薬、薬解)

〔要約〕

一側性の内側前脳束に6-hydroxydopamine(6-OHDA)を注入することにより一側性黒質線条体神経路を破壊したラットを作製し、この線条体シナプス膜標品におけるドパミン受容体G蛋白質連関機能亢進作用を解析した。GTPase活性を測定することによりドパミン受容体機能を調べたところ、検討したドパミン作働薬のうち、quinpiroleは破壊側線条体膜において対照側線条体膜の約2倍のGTPase活性化を示したが、その他のドパミン作働薬によっては破壊側と対照側との間で有意な変化は観察されなかった。そこで黒質線条体ドパミン神経破壊による線条体ドパミン（D1、D2、D3）受容体の質的及び量的変化をRNAaseプロテクションアッセイにより検討した。その結果、破壊側と対照側線条体との間に質的変化、量的増加は観察されなかった。D3受容体mRNA量は検討した線条体RNA量では検出限界以下であった。従って、quinpiroleによるG蛋白質活性化増強のメカニズムはD1、D2受容体の量的変化によるのではなく、別のドパミン受容体タイプの関与、あるいは受容体以降の情報伝達系の変化による可能性が示唆された。

［目的］

6-hydroxydopamine(6-OHDA)により一側性黒質線条体ドパミン神経路を破壊したラットにおいてはamphetamine投与による反対側方向の回転運動が観察され、除神経による線条体ドパミン受容体系の機能亢進が知られている。ドパミンはG蛋白質連関受容体を介して作用を発現していることが知られている。そこで、われわれは6-OHDAにより一側性黒質線条体ドパミン神経路を破壊したラット脳線条体におけるドパミン受容体機能変化の解析を試みた。本研究においては、受容体を介するG蛋白質活性化の変化を知る目的でGTPase活性測定を行い、また、ドパミン受容体の質的及び量的変化をみる目的でRNAaseプロテクションアッセイを行った。

［方法］

1. 6-OHDA投与ラット　SD系雄性ラット(8週令)をペントバルビタール麻酔下、一側性内側前脳束に6-OHDA(4 μl、2μg/μl in 0.2mg/ml ascorbic acid)を注入した。6-OHDA投与後10日にamphetamine（5mg/kg、sc)による回転数を検定し、毎分8回以上、反対側方向に回転するラットを6-OHDA投与後3週間で以後の実験に用いた。6-OHDA投与ラット脳の破壊側線条体のドパミン含量は、投与後1週間においてすでに対照側の1%以下に減少していた。

2. GTPase活性　Uedaらの方法(1)に従って行った。すなわち、線条体膜標品を25mM Tris-HCl(pH7.4)、0.1mM EDTA、2.5mM DTT、100mM NaCl、6mM $MgCl_2$、1mM ATP、0.5mM App(NH)p、10mM Phosphocreatine、5u/100μl Creatine phosphokinase、1mM Ouabain、0.1μMあるいは50μM GTPという組成の反応液中で、7x10⁴cpm/tubeの［γ-^{32}P］GTP（20Ci/mmol)と37℃15分間インキュベートし、5% charcoalを加え氷冷することにより反応を停止し、遠心した後、上清中の遊離した^{32}Piの放射活性を測定した。低濃度GTP(0.1μM)存在下での遊離量から高濃度GTP(50μM)存在下での遊離量を差し引いて高親和性GTPase活性とした。

3. RNAaseプロテクションアッセイ　ラット脳線条体よりChomczynskiらの方法(2)に従ってtotal RNAを抽出した。ラット脳ドパミン受容体cDNA配列をもとに、図1に示すようなDNA primerを作製して、線条体total RNAより逆転写酵素によりcDNAを作成し、その後PCRで増幅するという、いわゆるRT-PCR法でD1、D2、D3受容体cDNA断片を作製した。各々のDNAはTaq dye primer sequencing system(373A DNA Sequencer ;Applied Biosystem)によりそれぞれの核酸配列を決定し、確認した。RNAaseプロテクションアッセイはUedaら(投稿中）の方法に従った。簡単に述べると、各cDNAを鋳

型にしてIn vitro transcriptionにより^{32}P-UTPを含むアンチセンスcRNAプローブを作製し、ラット脳線条体total RNAと45℃で12時間ハイブリダイゼーションした。続いてRNAase処理し、PAGE電気泳動後、オートラジオグラフィー、あるいはバイオイメージングアナライザーBAS2000(FJIX)により解析した。

［結果］

1. GTPase活性　　検討したドパミン作働薬は、すべてラット脳線条体膜標品においてGTPase活性を増加させた。活性を逆数プロット法により解析し、その結果を表1に示した。Quinpiroleは、0.1μMからGTPase活性化をおこし、対照側線条体では最大7.4%活性化させた。破壊側線条体では最大15%活性化し、対照側に比し、みかけ上のKm値を変化させることなく最大反応を約2倍増加した。このquinpiroleの作用は1μM sulpirideで完全に抑制された。BromocriptineとpergolideはGTPaseを大きく活性化させたが、対照側と破壊側との間でみかけ上の親和性と最大反応に有意な変化は観察されなかった。D1アゴニストであるSKF38393は破壊側では最大反応を増加させる傾向はあったが、有意ではなかった。

2. RNAaseプロテクションアッセイ　　ラット線条体total RNA 10μgをD1、D2、D3受容体プローブとハイブリダイゼーションした。プロテクションアッセイの結果、D1受容体については1つのbandが検出され、D2受容体についてはlong formとshort formのbandが検出された。D3受容体mRNAはこの系では検出されなかった。D1受容体とD2受容体mRNAのPAGE電気泳動パターンは対照側線条体と破壊側線条体との間に変化がなく、すなわち、質的及び量的変化は観察されなかった。

［考察］

6-OHDA投与ラット脳破壊側線条体では対照側に比し、D2アゴニスト活性をもつquinpiroleによりGTPase活性化の増加が認められたことから、D2受容体-G蛋白質連関系機能亢進がおこったことが示唆された。しかし、同じくD2アゴニスト活性をもつbromocriptineとpergolideではこのGTPase活性増加は観察されなかった。また、RNAaseプロテクションアッセイにおいても破壊側線条体におけるD2受容体mRNAの質的及び量的変化は観察されなかったことから、quinpiroleの作用点はD2受容体以外にある可能性が考えられた。

［参考論文］

1. Ueda, H. et al (1990) J.Neurochem. 54, 841-848
2. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159

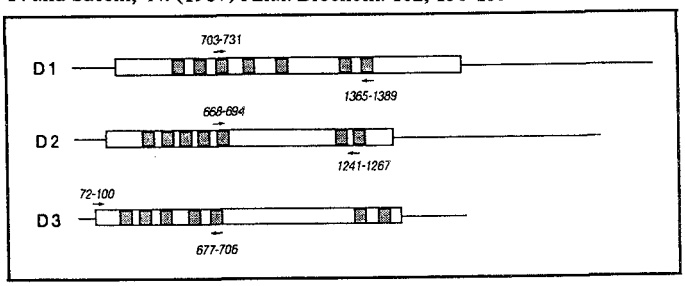


図1　D1、D2、D3受容体cDNA作製のためのプライマー

表1　6-OHDA投与ラット脳線条体膜におけるGTPase活性に対するドパミン作働薬の影響

	Contralateral striatum		Ipsilateral striatum	
	Apparent Km (μM)	Vmax (%Increase)	Apparent Km (μM)	Vmax (%Increase)
Quinpirole	0.41 ± 0.13	7.4 ± 1.7	0.33 ± 0.05	15.3 ± 1.2**
Bromocriptine	0.02 ± 0.00	22.9 ± 1.9	0.02 ± 0.00	23.1 ± 2.9
Pergolide	0.13 ± 0.02	33.0 ± 2.3	0.11 ± 0.01	32.0 ± 2.2
SKF38393	0.12 ± 0.03	5.6 ± 1.6	0.13 ± 0.02	7.3 ± 1.0

Results represent Mean±S.E.M. of 4-8 separate experiments. **:$p<0.05$ vs contralateral.

23　運動ニューロン疾患におけるモーター蛋白質の変動

豊島　至、小松眞史、正宗　研

秋田大学医学部第一内科

〔要約〕

速い軸索内輸送をになうモーター蛋白質であるキネシンと細胞質ダイニンの、ＭＮＤ脊髄内における量的変動を検討した。凍結乾燥切片をつくり、目的部分を切りとってウシとヒトの精製蛋白質とイムノブロットで比較定量した。標準蛋白質の精製はイムノアフィニティーによった。その結果、対照脊髄のキネシン濃度は0.223±0.042 μM、細胞質ダイニンは0.169±0.026 μＭであった。ＭＮＤと対照の脊髄全体の比較では、キネシンと細胞質ダイニンが重量比でも体積比でも有意に低下していた。脊髄各部の比較でも、後索を含めキネシンと細胞質ダイニンの有意な低下がみられた。形態学的に変化のない後索でもキネシンと細胞質ダイニンの有意の低下が見られることは、ＭＮＤにおける一次的な減少を示唆している。

[はじめに]

運動ニューロン疾患（ＭＮＤ）脊髄においては、これまでニューロフィラメントの異常が注目され、近位軸索、細胞体に高燐酸ニューロフィラメント蛋白質が蓄積することが報告されてきた。私達はこれに加え、微小管関連蛋白質、キネシンが軸索腫大に蓄積することを報告した（１、２）。ニューロフィラメント蛋白質や微小管関連蛋白質の蓄積は局所的な遅い軸索輸送障害の結果と考えられるが、ＭＮＤにおける速い軸索内輸送についての報告は少なく、微分干渉顕微鏡-ビデオ増強法による検討があるだけである（３）。今回は、速い軸索内輸送をになうキネシンと細胞質ダイニンの２つのモーター蛋白質のＭＮＤ脊髄内における量的変動を検討した。

[方法]

ＭＮＤ症例９例と対照非神経筋疾患５例の脊髄を剖検によって得、液体窒素あるいはドライアイス・ヘキサンで急速凍結し保存した。目的部分を切りとって、ウシとヒトの精製蛋白質の希釈系列とイムノブロットで比較定量した。

ウシとヒトのキネシンと細胞質ダイニンの精製は、イムノアフィニテイーカラムによった。キネシン精製は抗ウニ卵キネシン重鎖（ＫＨＣ）頭部モノクロナル抗体であるSUK-4（４）を、細胞質ダイニンには抗鶏胚脳ダイニン中間鎖（ＤＩＣ）モノクロナル抗体である70.1（５）を用いた。ウシ脊髄の超遠心上清から４０％純度のキネシンと細胞質ダイニンをえ、希釈系列をつくりイムノブロットから標準曲線をもとめた。イムノブロットは、抗ＫＨＣ抗体としてSUK-4は感度が低いので抗鶏胚脳モノクロナル抗体であるＣＫＨＣ９（６）を、抗ＤＩＣ抗体としては70.1をもちいた。二次抗体はアルカリフォスファターゼ標識抗マウス抗体を用いた。感度の限界はそれぞれ５と１０ fmol/laneであった。ヒトＫＨＣとＤＩＣに対するＣＫＨＣ９と70.1の反応性をウシの希釈系列との比較から求めたが、いずれもウシの1.4倍であった。希釈系列の標準曲線は、３次多項式の回帰曲線でえた。ＭＮＤ症例と対照の脊髄から厚さ４５μｍの凍結乾燥切片をつくり、全体あるいは各部分に分け、重量と面積の測定から密度を算定した。ＳＤＳ電気泳動後イムノブロットを行い、標準曲線と比較してＫＨＣとＤＩＣの濃度を求めた。

[結果]

正常対照の脊髄のキネシンと細胞質ダイニンの濃度は、0.223±0.042 μMと 0.169±0.026 μMであった。MNDでの脊髄凍結乾燥切片の密度、単位重量あたりと単位体積あたりのキネシンと細胞質ダイニンの濃度を表1に示す。MNDでキネシンと細胞質ダイニンの濃度が単位重量あたりと単位体積あたりの両者で、低値を示した。密度は、MNDで低い傾向を示したが有意差はなかった。

脊髄各部における運動蛋白質濃度は、単位体積あたりでキネシンが灰白質で高値を示すが、細胞質ダイニンは部位による差をしめさなかった。MNDでは、病変を示す前角、前側索のほか、病理組織学的に異常を示さない後索でも、キネシンと細胞質ダイニンの濃度が単位重量あたりと単位体積あたりの両者で低値を示した（図1）。

[考察]

ヒトの神経系のモーター蛋白質濃度はこれまで測定されたことがない。鶏胚脳ではキネシンが 1.3 μMとされている（7）。今回は凍結乾燥切片法を用いたが、既に凍結されている試料内の濃度を測定するのに適した方法と考えられる。キネシンと細胞質ダイニンの同時測定により両者が近似したモル濃度で神経系に存在することが明らかになった。MND脊髄全体の比較でキネシンは対照の４０％、細胞質ダイニンは７０％に減少し、脊髄各部でも減少を示した。形態学的に変化のない後索でもキネシンと細胞質ダイニンの有意の低下が見られることは、MNDにおける一次的な減少を示唆している。

[文献]

1) Toyoshima I et al, J Neurol Sci 89:269-77, 1989. 2) 豊島至他、神経化学31:562-3, 1992.
3) Breuer AC et al, Neurolgy 37:738-48, 1987. 4) Ingold AL et al, J Cell Biol 107:2657-67, 1988.
5) Steuer ER et al, Nature 345:266-8, 1990. 6) Toyoshima I et al, J Cell Biol 118:1121-31, 1992
7) Hollenbeck PJ, J Cell Biol 108:2335-42, 1989

表1　脊髄のモーター蛋白質濃度

	対照	MND	p (t test)
密度(mg/μl)	0.306±0.034	0.286±0.042	>0.1
キネシン濃度 (pmole/mg)	0.724±0.099	0.315±0.11	<0.001
(μM)	0.223±0.042	0.091±0.038	<0.001
細胞質ダイニン濃度 (pmole/mg)	0.539±0.056	0.422±0.074	<0.01
(μM)	0.169±0.026	0.121±0.027	<0.01

MND：運動ニューロン疾患

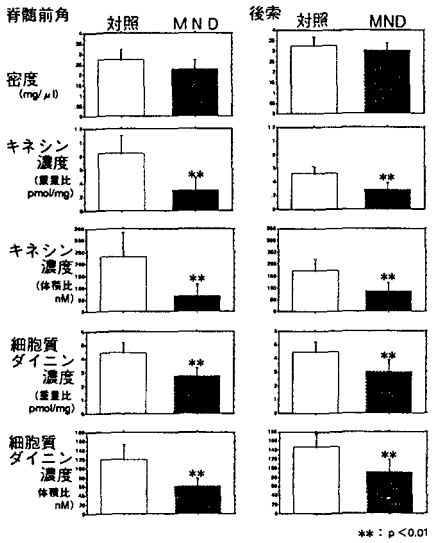


図1　脊髄前角と後索のモーター蛋白質濃度

24 ヒトリンパ球におけるドーパミンD3，D5受容体の発現と新しいD3異型体の転写

永井 義隆、佐伯 良修、上野 聡
（大阪大・神経内科）

〔要約〕

RT-PCR 法を用いてヒト末梢血リンパ球におけるドーパミンD3およびD5受容体遺伝子の転写と、受容体特異的なリガンドを用いた結合実験にて両受容体タンパク質の発現を示した。また、ヒトリンパ球および脳において選択的スプライシングによって新しいD3受容体異型体が転写されていることを示した。このD3異型体では第4膜貫通領域のアミノ酸をコードする 143 塩基対が欠失しており、D3受容体の最初の3つの膜貫通領域のみを持つ 138 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている。さらに、2種類のD5受容体偽遺伝子もヒトリンパ球において転写されていることを明らかにした。

［目的］

ドーパミン伝達系は運動、情動、認識の中心的な役割を担っており、その障害はパーキンソン病、精神分裂病など様々な神経精神疾患を引き起こす。ドーパミン受容体は現在までにD1からD5までの5つの亜型が報告されているが、ヒトについては検体入手の制限から未だ十分検索されているとは言えず、また脳以外の臓器での検討もなされていない。今回我々は、ヒト末梢血リンパ球を用いてドーパミン受容体の発現について検討した。

［方法］

1．Total RNA の抽出

健常成人のヘパリン加静脈血から Ficoll-Paque 液を使って 400g、30 分間遠心分離してリンパ球を得、さらに混入している赤血球は低張溶解させた。ヒトリンパ球および全脳から AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) 法を用いて Total RNA を抽出し DNase で処理した。

2．RT-PCR (Reverse transcription and Polymerase chain reaction)

リンパ球および全脳から得た 150 ng の Total RNA を random hexanucleotide primer と M-MLV 逆転写酵素を用いて cDNA に逆転写し、次にD3およびD5受容体遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 法により増幅した。プライマーの配列は、D3-F; 5'-TTCAGCCGAATTCGCTGTGATGTT-3'(292→315)、D3-R; 5'-GGGTTGGAGATGGATCCGACAGT-3'(557→535)、D5-F; 5'-CAATGAGCTCATCTCCTACAAC-3'(1170→1191)、D5-R; 5'-TAATGGGATCCATTCGGGGTGAA-3'(1433→1411)である。RT-PCR 産物を 1.5% アガロースゲルにて電気泳動した。また、Dideoxy Termination 法によって塩基配列を決定した。

3．ドーパミン受容体結合実験

ヒトリンパ球を Hanks' 平衡塩に懸濁し、$1x10^6$個のリンパ球をD3およびD5受容体に特異的なリガンド、[^{3}H]7-OH-DPAT、[^{3}H]SCH-23390 とともに全量 100μl にて室温で 60 分間保温した。その後セルハーベスターにてリンパ球をフィルターに吸着させ、その放射活性を測定した。

［結果及び考察］

ヒト末梢血リンパ球および全脳からのD3、D5受容体遺伝子の RT-PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果、D3では予想された 266 塩基対のバンドに加え 123 塩基対のバンド、D5では予想された 264 塩基対のバンドが検出された。266、264 塩基対のバンドの塩基配列を決定した結果、それぞれD3、D5受容体遺伝子に一致した（1,2）（図1）。

ドーパミン受容体結合実験ではヒトリンパ球に対し [^{3}H]7-OH-DPAT、[^{3}H]SCH-23390 は共に高親和性の結合を示し、他のドーパミン結合性リガンドによって置換された。解離定数 (Kd) はそれぞれ 12.2 nM、1.4 nM と算出され、これらの値はラットの神経細胞膜やD3、D5受容体遺伝子を導入発現させた細胞膜のそれに近似する（図2）。

また、D3での 123 塩基対のバンドの配列を決定した結果、D3受容体遺伝子から選択的スプライシングにより転写される新しい異型体であることが判った。この異型体では第4膜貫通領域のアミノ酸をコードする 143 塩基対が欠失しており、その結果生じるフレームシフトによって新たに終止コドンが出現し、138 アミノ酸のみを

コードする。D３(TM4-del)と名付けられたこのタンパク質は本来のD３受容体の最初の３つの膜貫通領域のみを持つ（図３）。この異型体はリンパ球のみならず脳においても検出された。これ以外に既に２種の異型体、D３(TM3-del)（ヒト、ラット）、D３(02-del)（ラット）(3)、そして最近マウスにおいてD３L、D３Sの亜型(4)がやはり選択的スプライシングによって転写されることが報告されている。D３L、D３Sは共にドーパミン結合能を持つが、我々が見いだしたD３(TM4-del)を含め、D３(TM3-del)、D３(02-del)の３種の異型体はいずれもドーパミン結合能を示さない。これらの異型体は全く無作為に転写されているのかあるいはD３受容体遺伝子転写を調節しているのかなど、その生理的役割については明らかでない。

さらに、D５の264塩基対のバンドの配列決定によって、D５受容体遺伝子に加えて、２つのD５受容体偽遺伝子、D５Ψ1、D５Ψ2 (5)がリンパ球においても転写されていることが明らかになった。

本研究においてヒトリンパ球におけるドーパミンD３およびD５受容体の発現、ヒトリンパ球および脳における新しいD３異型体、D３(TM4-del)の転写、２つのD５偽遺伝子、D５Ψ1、D５Ψ2のヒトリンパ球における転写を明らかにした(6,7)。リンパ球でのドーパミン受容体の発現は多様でありドーパミンの標的臓器としてのリンパ球の重要性を示唆している。ヒトの神経精神疾患における脳とリンパ球での受容体発現の関連については今後の課題である。

[文献]

1. Giros,B., Martres,M.P., Sokoloff,P., & Schwartz,J.C. (1990) C. R. Acad. Sci. (Paris) III 311,501-508.
2. Sunahara,R.K., Guan,H.C., O'Doed,B.F., Seeman,P., Laurier,L.G., Ng,G., George,S.R., Torchia,J., Van Tol,H.H.M., & Niznik,H.B. (1991) Nature 350,614-619.
3. Giros,B., Martres,M.P., Pilon,C., Sokoloff,P., & Schwartz,J.C. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176,1584-1592.
4. Fishburn,C.S., Belleli,D., David,C., Carmon,S., & Fuchs,S. (1993) J. Biol. Chem. 268,5872-5878.
5. Nguyen,T., Bard,J., Jin,H., Taruscio,D., Ward,D.C., Kennedy,J.L., Weinshank,R., Seeman,P., & O'Dowd,B.F. (1991) Gene 109,211-218.
6. Nagai,Y., Ueno,S., Saeki,Y., Soga,F., & Yanagihara,T. Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press)
7. Takahashi,N., Nagai,Y., Ueno,S., Saeki,Y., & Yanagihara,T. (1992) FEBS Lett. 314,23-25.

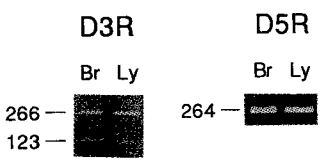


図１．D３R、D５RのRT－PCR

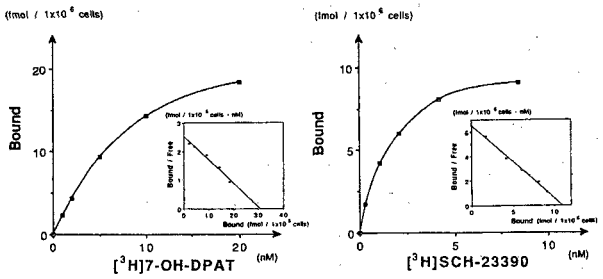


図２．ドーパミン受容体結合実験

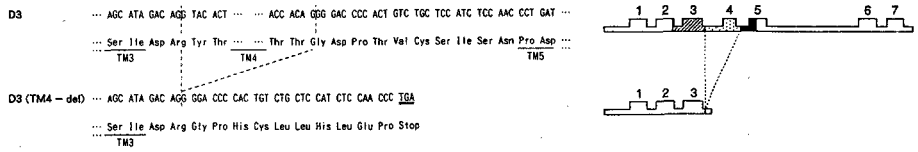


図３．D３R、D３(TM4-del)の塩基配列

25 短時間脳虚血による Ca^{2+}／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの減少

山本秀幸[1),2)]、福永浩司[1)]、Lee, K.[3)]、宮本英七[1)]、Soderling, T.R.[2)]

([1)]熊本大・医・第一薬理、[2)]オレゴン医科大、[3)]ヴァージニア大)

〔要約〕

一過性脳虚血後の遅発性神経細胞壊死の原因として、虚血に伴う神経細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が重要視されている。今回、一過性脳虚血後の 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）の変化について検討した(1)。ジャービルラットの総頸動脈結紮により前脳虚血を作成した。大脳皮質と海馬では、細胞質内の CaM キナーゼII活性は5分間の虚血により完全に消失した。酵素活性の減少は10分間の虚血に伴う再開通後2時間まで持続した。プロテインキナーゼC、cAMP 依存性プロテインキナーゼの急激な減少は認められなかった。虚血を生じない小脳においては、CaM キナーゼII活性の減少は認められなかった。細胞質分画の CaM キナーゼIIの消失は3種類の抗体を用いたイムノブロット法によっても確認された。これらの結果より、脳虚血により、細胞質内の CaM キナーゼIIが非常に速く消失することが示された。本酵素の消失により、神経細胞機能が障害され、神経細胞壊死が惹起される可能性が示唆される。

〔目的〕

一過性脳虚血により神経細胞内の Ca^{2+} 濃度が急激に増加することが知られている。増加した Ca^{2+} によりカルパインが活性化され、細胞内主要蛋白質を分解することが予想される。CaM キナーゼIIは神経細胞内に豊富に存在し、種々の細胞機能に重要な役割を演じている。本酵素は試験管内ではカルパインの良好な基質であることが知られている。今回、脳虚血にともなう遅発性神経細胞壊死の原因を解明する目的で、一過性脳虚血後の CaM キナーゼIIの変化について検討した。

〔方法〕

ジャービルラットの両側総頸動脈結紮により前脳虚血を作成した(2)。脳内各部位を分離した後、液体窒素で凍結し、-70℃に保存した。CaM キナーゼIIの触媒領域と調節領域内の合成ペプチドを作製した。ヘモシアニンと結合したペプチドを兎に免疫し、抗血清を作成した。抗血清より、硫安分画と抗原カラムにより特異抗体を精製した。酵素活性測定(3)、免疫ブロット(4)、免疫沈殿法(4)は既報の方法に従った。

〔結果及び考察〕

CaMキナーゼII活性の変化；脳の各部位を 0.1％トリトン X-100 存在下でホモジナイズ後、400,000 g で15分間遠心し、細胞上清分画と膜分画に分離した。大脳皮質と海馬の細胞上清分画では10分間の脳虚血により急激な CaM キナーゼII活性の減少が認められた（図1）。酵素活性の減少は再開通後30分まで持続し、2時間でわずかに回復した。膜分画では、再開通後30分で大脳皮質で対照例の 25 %、海馬で 54 % まで減少した。小脳では虚血直後での酵素活性の減少は認められなかった（図1）。脱燐酸化酵素阻害剤存在下でホモジナイズを行なった場合、対照脳では全活性の 16～22 % の Ca^{2+}／カルモデュリン非依存性活性が認められた（図1）。脱燐酸化酵素阻害剤の非添加により、非依存性活性は 2 % 以下に減少した。虚血直後脳では非依存性活性は認められなかった（図1）。海馬細胞上清分画でのプロテインキナーゼCと cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性は虚血直後に変化を示さなかった。再開通後2時間でプロテインキナーゼC活性のみ対照例の 65 % に減少した。CaM キナーゼII活性は2分間虚血で対照例の 23 % に減少し、5分間で約 10 % に減少した。10分間の虚血直後に残存する酵素活性が CaM キナーゼIIによるものかを以下の実験にて検討した。1) 酵素活性は CaM キナーゼIIに対する抗体で免疫沈殿をうけなかった。2) 脱燐酸化酵素阻害剤非存在下でホモジナイズ後、細胞上清分画を得た。細胞上清分画を ATPγS を用いて自己燐酸化反応を行なった後、Ca^{2+}／カルモデュリン非依存性活性を測定した。対照例では全活性の 60 % の非依存性活性が認められた（図2A）。本活性は CaM キナーゼIIの自己阻害ペプチドで精製酵素と同様に阻害された（図2B）。虚血例では非依存性活性の出現は認められなかった。3) 虚血後の酵素活性はプロテインキナーゼCの自己阻害ペプチドで強く抑制された。これらの結果から CaM キナーゼII活性が細胞上清分画から消失していることが確認された。

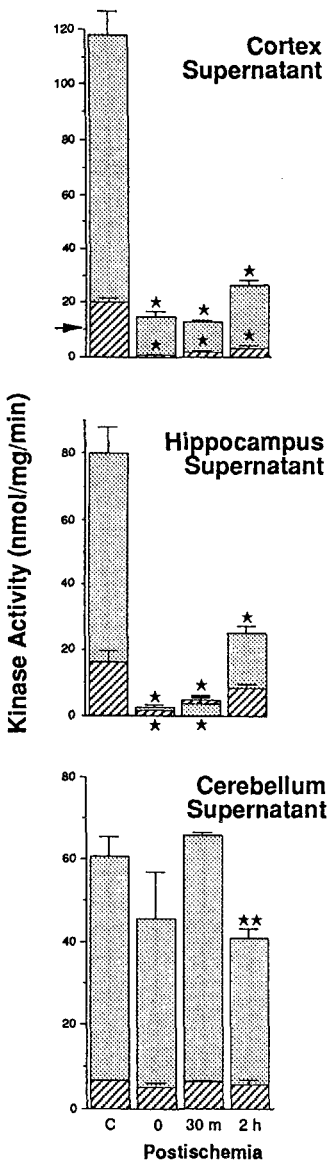


図1 虚血後の CaM キナーゼII活性の変化
10 分間虚血後の細胞上清分画での酵素活性を示す。酵素活性は、EGTA 存在下 (▨) あるいは Ca^{2+} とカルモデュリン存在下 (▩) で測定した。矢印はプロテインキナーゼCの全活性を示す。海馬ではプロテインキナーゼCの全活性を除いた値を示す。
*p<0.005、**p<0.02。

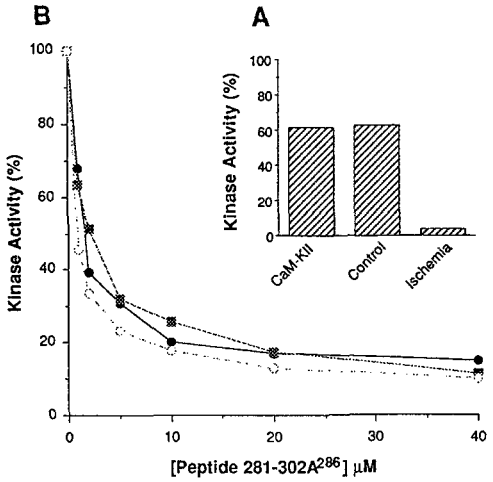


図2 Ca^{2+}／カルモデュリン非依存性活性の出現と自己阻害ペプチドによる阻害作用
A. 精製酵素 (CaM-KII)、対照 (Control) および虚血後 (Ischemia) 海馬細胞上清分画を ATPγS 存在下に室温で 3 分間処理した後，酵素活性を測定した。
B. 精製酵素 (■)、対照海馬細胞上清分画 (●)、両者を加えた場合 (○) の非依存性活性の自己阻害ペプチドによる阻害反応。

CaM キナーゼII サブユニットの変化；酵素サブユニットの変化を免疫ブロット法により検討した。海馬細胞上清分画を調節部位に対する抗体を用いて免疫ブロットを行なった。10分間の虚血直後では酵素のαとβサブユニットはほとんど認められなかった。再開通後 2 時間でαサブユニットの軽度の出現が認められた。同様の結果は CaM キナーゼIIに対する抗体を用いても認められた。触媒領域に対する抗体を用いて、短時間での両サブユニットの減少を検討した。2 分間の虚血後に、酵素の両サブユニットは減少した。カルパインによる低分子量の分解産物の出現は認められなかった。膜分画での両サブユニットの変化はほとんど認められなかった。これらの結果より、脳虚血による細胞質内 CaM キナーゼIIの急速な減少が示された。本酵素のカルパインによる急速な分解が、神経細胞機能を障害し、神経細胞壊死を招く可能性が示唆された。今後、海馬スライス系での虚血後の酵素活性の変化とカルパイン阻害剤の影響を検討する予定である。

〔文 献〕

1) Yamamoto, H., Fukunaga, K., Lee, K. and Soderling, T.R. *J. Neurochem.* **58**, 1110-1117 (1992)
2) Lee, K.S., Tetzlaff, W. and Kreutzberg, G.W. *Brain Res.* **380**, 155-158 (1986)
3) Hashimoto, Y. and Soderling, T.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 418-425 (1987)
4) McGlade-McCulloh, E., Yamamoto, H., Tan, S.E., Brickey, D.A. and Soderling, T.R. *Nature* **362**, 640-642 (1993)

26　ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける bFGF mRNA と蛋白発現の経時的変化の検討

○大槻秀夫、山田和雄、＊藤田真幸、甲村英二、湯口貴導、種子田護、早川徹
（大阪大学医学部脳神経外科、＊病理病態）

〔要約〕

ラット中大脳動脈閉塞による脳虚血モデルにて、閉塞1、6時間後、1、3、7日後の大脳における bFGF mRNA と蛋白の発現を Northern blotting および免疫染色にて経時的に検討した。左半球を虚血側、右半球をコントロールとして解析すると、bFGF mRNA の発現は2峰性で虚血6時間後、および3-7日後に虚血側で発現が増加していた。bFGF 蛋白の免疫活性は虚血3日目以後にみられ、mRNA に遅れ蛋白が発現していた。脳虚血により合成が阻害された蛋白を早期投与する意義を示唆している。

〔目的〕

実験的脳虚血において虚血損傷部位でのエネルギー代謝、mRNA合成能が早期に回復し、アミノ酸が蓄積する (5) にもかかわらず、蛋白合成障害が続くと報告されている (2)。一方、私共はラットにて中大脳動脈閉塞後早期に髄腔内投与した basic fibroblast growth factor (bFGF) が、視床ニューロンの変性、脱落を防止することを示してきた (4)。これは、脳虚血後早期に脳内に不足している蛋白を投与することにより、虚血によるニューロンの変性、脱落を防止できる可能性を示唆している。そこで、中大脳動脈閉塞によるラット脳虚血モデルにおいて、まず虚血による代謝変動が Northern blotting での internal control である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β-actin mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。この結果を用いて、虚血による bFGF mRNA の発現を定量化した。また、中大脳動脈閉塞後の大脳半球での bFGF 蛋白発現を免疫染色し、これらの結果を時間的経過より検討したので報告する。

〔方法〕

200～250 g Wistar rat を用い、抱水クロラール麻酔後経眼窩法にて左中大脳動脈を閉塞、3、6時間、1、3、7日後に大脳を摘出、acid guanidinium phenol chloroform 法により両側皮質の total RNA を抽出した（各６匹）。GAPDH, β-actin, bFGF cDNA を用い 20 μg total RNA にて Northern blotting をおこなった。右側皮質をコントロールとし、それぞれの mRNA, rRNA 量を densitometric analysis にて検討した。次に、虚血時においても安定した発現がみられる GAPDH mRNA を internal control として、bFGF mRNA の発現を経時的に検討した。bFGF 蛋白の発現は同じく左中大脳動脈閉塞ラットを用い、閉塞 1、3、7 日後に大脳を摘出、組織切片の免疫染色により経時的に検討した。

〔結果〕

GAPDH mRNA は 1.4 kb、β-actin mRNA は 2.1 kb にみられた。densitometric analysis の結果、GAPDH mRNA の発現が最も安定していた（図１）。GAPDH mRNA を internal control として虚血時における bFGF mRNA の発現を検討した。その結果、bFGF mRNA の発現は2峰性であり、中大脳動脈閉塞6時間後と、３, 7日後に対側と比べて 2.0, 2.6 kb bFGF mRNA の発現が増加していた（図２）。免疫染色の結果、bFGF 蛋白の発現は閉塞１日後にはほとんどみられず、３、７日目にみられた。このことは、脳虚血における bFGF mRNA と蛋白の発現時期にずれがみられることを示す。

〔考察、結論〕

脳虚血実験において、虚血そのものが Northern blotting の internal control に影響をおよぼしており、

結果の解析に注意しなければならない。ラット中大脳動脈閉塞後の bFGF mRNA 発現は2峰性であり、3日目以降のbFGF mRNA は虚血による反応性グリア由来と考えられる (1)。実験的脳虚血における複数の組織反応が示唆された。また、bFGF mRNA より遅れて蛋白が発現していた。外傷モデルでは bFGF 蛋白の発現は1日目より観察されており (1)、脳虚血における蛋白合成障害を示している。また、虚血耐性実験では耐性が獲得されると、蛋白合成は早期に回復している (3)。これらの結果は、合成が阻害されている bFGF のような細胞修復、維持に必要な蛋白を脳虚血早期に投与する意義を示唆している。今後、他の蛋白についても検討し、治療応用への可能性を追及していきたい。

〔文献〕

(1) Logan A, Frautschy SA, Gonzalez AM, et al., J Neurosci 12, 3828-3837, 1992
(2) Mies G, Ishimaru S, Xie Y et al., J Cereb Blood Flow Metab 11, 753-761, 1991
(3) Nakagomi T, Kirino T, Kanemitu H, et al., J Cereb Blood Flow Metab 13 (Suppl.1) S581, 1983
(4) Yamada K, Kinoshita A, Kohmura E et al., J Cereb Blood Flow Metab 11, 472-478, 1991
(5) Yoshimine T, Hayakawa T, Kato A et al., J Cereb Blood Flow Metab 7, 387-393, 1987

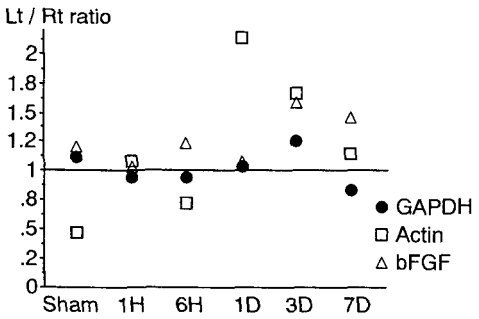


図1　左中大脳動脈閉塞によるGAPDH, Actin, bFGF mRNA 発現。Northern blotting をdensitometer で定量化、左（閉塞側）大脳皮質と右（コントロール）大脳皮質との発現量の比を示す。GAPDH mRNA の発現が最も安定している。

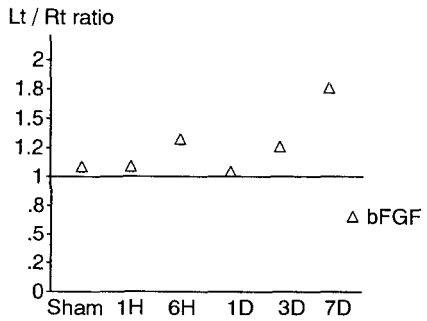


図2　左中大脳動脈閉塞後のbFGF mRNA 発現の経時的変化。Northern blottingをdensitometerで定量化、internal control であるGAPDH mRNA 量に対するbFGF mRNA 量の比を用い、閉塞側と健常側とで比較した。bFGF mRNA 発現は閉塞6時間、3日、7日後に増加しており、2峰性を示した。

27　砂ネズミ脳虚血におけるRyanodine受容体の変化に関する研究

○野崎博之，田中耕太郎，五味憲太郎*，美原　盤**，白井俊孝，野川　茂，永田栄一郎，福内靖男
桑島吾郎***，御子柴克彦****
慶應義塾大学神経内科，*大田原赤十字病院神経内科，**脳血管研究所美原記念病院
*** シオノギ研究所，****東京大学医科学研究所化学研究部

〔要約〕
砂ネズミ一側総頸動脈結紮モデル（６時間虚血）において局所脳血流量および脳組織Ryanodine受容体結合能を測定し，さらに抗Ryanodine受容体抗体を用いて免疫組織学的検討を加えCa^{2+}誘発性Ca^{2+}放出チャンネル（ＣＩＣＲ）について検討した．ハロセン麻酔下に右総頸動脈を結紮，１時間後にStroke indexを判定，６点以上の動物を結紮群として以下の実験に使用し，結紮６時間後覚醒状態で，［^{14}Ｃ］Iodoantipyrine法により局所脳血流量（ＬＣＢＦ）を測定した．摘出した脳を急速凍結し，クリオスタットで連続脳切片を作製した．［^{3}Ｈ］-Ryanodineでラベルしてオートラジオグラムを作製し，Ryanodine特異的結合量を各脳局所で測定した．また一部は抗Ryanodine受容体抗体を用いて免疫組織学的染色を行った．Ryanodine受容体結合能は，虚血側海馬ＣＡ１・ＣＡ３においてのみ有意な低下を示した．一方免疫組織学的検討では明かな左右差を認めなかった．このような変化が虚血に対し選択的脆弱性を示す海馬でのみ認められたことは，ＣＩＣＲの機能的異常が虚血性細胞障害に密接に関係している可能性が示唆された．

【目的】
近年脳虚血における細胞障害に細胞内遊離Ca^{2+}濃度の上昇が重要な役割を果たすことが明らかになってきた．我々は既に昨年の本学会で報告した如く，脳内second-messenger系のひとつであるInositol trisphosphate（IP_3）受容体について検討し，脳虚血時に海馬ＣＡ１領域において特異的にIP_3結合能が低下することを明らかにした（２）．一方細胞内Ca^{2+}放出機構として植物アルカロイドのひとつであるRyanodineと特異的に結合するCa^{2+}誘発性Ca^{2+}放出チャンネル（Ca induced Ca release:ＣＩＣＲ）の存在が中枢神経系で注目されつつある．しかし脳虚血時のＣＩＣＲ動態については未だ明らかにされていない．そこで今回砂ネズミ一側総頸動脈結紮モデル（６時間虚血）を用い，脳虚血時のＣＩＣＲ動態をRyanodineを用いたオートラジオグラフ法により各脳局所で検討したので報告する．

【方法】
Ryanodine受容体結合能の測定には体重60～90gの砂ネズミを29匹用いた．結紮群では，ハロセン麻酔下に頸部正中切開し右総頸動脈を結紮し，結紮後１時間の時点でstroke index（１）を判定した．有意な一側脳虚血モデルとなったstroke index６点以上の動物８匹（結紮群）を以後の実験に使用した（４）．一方sham手術群（以下sham群）では右総頸動脈を露出するのみの手術をおこなった（５匹）．sodium pentobarbital（25mg/kg）腹腔内投与による麻酔下に一側大腿動・静脈にポリエチレンチューブ（PE10）を挿入し，結紮後ないしsham手術後６時間の時点で覚醒状態下に［^{14}Ｃ］Iodoantipyrine法により局所脳血流量（ＬＣＢＦ）を測定した（６）．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℃に冷却したクリオスタットにて厚さ20μmの連続脳切片を作製し，ゼラチンでコートしたスライドガラスに固定した．脳切片はＬＣＢＦ測定用，Ryanodine binding用，免疫組織化学用，病理組織標本用に分けた．

脳血流測定用脳切片スライドは，そのまま［^{14}Ｃ］標準線源（Amersham）とともにフィルム（ＳＢ-５，Kodak）に１週間感光し，オートラジオグラムを作製した．

［^{3}Ｈ］-Ryanodine binding用脳切片標本は，室温のbuffer Ａ（20mM PIPES-KOH(pH 8.0)，1.0M KCl，550μM ATP，100μM $CaCl_2$，1.0mM PMSF）中で15分間２回preincubationを行った．次にbuffer Ａに15nMの［^{3}Ｈ］-Ryanodine（specific activity=77.3～87.0 Ci/mmol；NEN Reseach Products/Du Pont）を加えた組成の溶液中において，25℃で15分間incubateした．また非特異的結合量の測定のため，buffer Ａに15nMの［^{3}Ｈ］-Ryanodineならびに未標識の15μMのRyanodineを加えた溶液中でincubateした．その後，４℃のbuffer Ａ中で５分間の洗浄を２回繰り返し，最後に４℃の精製水で洗浄し，直ちに冷風にて乾燥した．これらの標本は，［^{3}Ｈ］標準線源とともにUltrofilmに５週間感光し，オートラジオグラムを作成した（５）．［^{3}Ｈ］-Ryanodine総結合量から非特異的結合量を減じて特異的結合量とし，ＬＣＢＦのデータと共に定量的検討を行った．

免疫組織化学用脳切片スライドは４％パラホルムアルデヒドで固定し，200倍に希釈した抗Ryanodine受容体抗体を一次抗体として用いてＡＢＣ法を施行した（３）．病理組織標本用のスライドは，Ｈ＆Ｅ染色を施行した．

【結果】
（１）生理学的パラメーター
動脈血液ガス分析（Pao_2，$Paco_2$，ｐＨ）及び平均動脈血圧（ＭＡＢＰ）については両群間で有意差を認めなかった（表１）．

表１：生理学的パラメーター

	pH	PaO_2(mmHg)	$PaCO_2$(mmHg)	MABP(mmHg)
結紮群	7.24±0.18	111.4±29.5	32.6±15.5	89.1±14.7
sham群	7.30±0.11	90.8±25.4	39.0±15.9	91.2±18.4

（２）局所脳血流量（ＬＣＢＦ）

結紮群ではsham群と比較して小脳を除くすべての領域で，結紮側（右）で著明なＬＣＢＦの減少を認め，非結紮側（左）でも中等度の低下を認めた（表２）．

（３）Ryanodine特異的結合量

Ryanodine特異的結合量は，結紮群ではsham群と比較して結紮側（右）の海馬ＣＡ１領域（$p<0.01$），ＣＡ３領域（$p<0.05$）で有意な低下を認めたが，その他の部位では有意差を認めなかった（表３）．

表２：脳内各領域におけるＬＣＢＦ（ml/100g/min）

部位／ＬＣＢＦ		結紮群	sham群
大脳皮質	右	20.1±27.3**	139.4±19.4
（運動領野）	左	57.1±21.0**	137.4±20.0
大脳皮質	右	12.0±18.7**	142.0±33.4
（感覚領野）	左	67.4±21.3**	143.8±20.7
海馬ＣＡ１	右	10.4± 9.5**	114.8±23.5
	左	56.3±19.2**	106.6±19.4
海馬ＣＡ３	右	5.3± 6.9**	99.8± 8.1
	左	61.6±22.9**	106.0±14.2
海馬歯状回	右	16.9±14.1**	117.4±17.2
	左	66.7±20.8**	118.2±22.0
線条体	右	6.6±11.2**	133.0±35.8
	左	67.3±24.0**	135.6±31.9
小脳半球	右	114.1±18.8	135.4±13.9
	左	115.0±20.6	133.8±15.3

（数値はmean±ＳＤ，**$p<0.01$ sham群との比較）

表３：脳内各領域におけるRyanodine結合量（fmol/mg）

部位／特異的結合量		結紮群	sham群
大脳皮質	右	12.9± 6.3	16.4± 5.4
（運動領野）	左	15.5± 6.8	17.0± 4.7
大脳皮質	右	11.3± 4.5	15.4± 4.2
（感覚領野）	左	13.8± 5.5	15.4± 4.0
海馬ＣＡ１	右	8.6± 2.8**	15.1± 3.8
	左	13.1± 3.6	16.6± 4.3
海馬ＣＡ３	右	15.0± 2.9*	23.2± 7.4
	左	18.9+ 4.8	24.5± 5.9
海馬歯状回	右	12.3± 4.3	18.6± 6.3
	左	14.4± 4.6	19.3± 6.6
線条体	右	4.9± 2.5	7.6± 3.2
	左	8.9± 3.0	7.1± 3.4
小脳半球	右	6.2± 1.1	6.7± 1.6
	左	6.2± 1.9	6.0± 1.2

（数値はmean±ＳＤ，*$p<0.05$,**$p<0.01$ sham群との比較）

（４）免疫組織学的検討

抗Ryanodine受容体抗体を用いた免疫組織学的検討では，結紮群・sham群ともに染色性には明かな左右差を認めず，結紮群虚血側の海馬においても各細胞の染色性は保たれていた．

【考察】

今回我々は砂ネズミ一側頸動脈結紮モデルにおけるRyanodine受容体結合能の変化につき検討した．Ryanodine受容体結合能は，虚血側海馬ＣＡ１・ＣＡ３においてのみ有意に低下を示し，同部位のＣＩＣＲ動態に大きな擾乱が生じている可能性が示唆された．一方免疫組織学的検討では明かな左右差を認めなかったことから，この変化は単なるRyanodine受容体の形態的破壊によるものとは考え難かった．以上の変化が虚血に対し選択的脆弱性を示す海馬でのみ認められたことは，ＣＩＣＲ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)McGraw, C.P.(1977) Arch. Neurol.,34:334-336.
(2)永田栄一郎，他(1992) 神経化学,31:226-227.
(3)Nakanishi S., et al.(1992) Neurosci. Res. 15:130-142.
(4)野崎博之，他(1993) 第18回脳卒中学会抄録集:107.
(5)Padua R.A., et al.(1991) Brain Res. 542:135-140.
(6)高嶋修太郎，他(1990) 自律神経,27:38-45.

28 分化ヒトニューロブラストーマにおける colchicine誘発神経細胞死

八木一中川勇三
（ 雪印・生物科学研究所・神経化学 ）

〔要約〕
レチノイン酸で分化させたヒトニューロブラストーマSH－SY5Y細胞を用いて、細胞死に対する colchicine の効果を調べた。 colchicine は時間依存性および濃度依存性の細胞死を引き起こした。 colchicine による細胞死は、タンパク合成阻害剤である cycloheximide 前処理で抑制された。さらに、 colchicine は apoptosis の生化学的マーカーである ladder パターンのDNAフラグメンテーションを引き起こし、cycloheximide 前処理によりそのDNAフラグメンテーションが抑制された。 以上の結果より、colchicine による神経細胞死誘発作用の少なくとも一部は apoptosis のメカニズムを介している可能性が示唆された。

〔はじめに〕
海馬CA1野や歯状回の神経細胞が層状に脱落する組織変化が colchicine 海馬内投与ラットに認められることが既に報告されており、脳組織の萎縮を伴う神経変性疾患モデルの観点から注目されている（4，5，12，16）。しかし、その神経細胞死のメカニズムについては不明な点が多い。一方、ニューロンのモデル細胞としてニューロブラストーマが神経突起成長制御やシグナル伝達メカニズムの解析に有用であることが報告されているので（6，10，11，13，14，15）、今回レチノイン酸で分化させたヒトニューロブラストーマSH－SY5Yを用いて、colchicine で誘発される神経細胞死のメカニズム解析を行った。

〔実験方法〕
SH－SY5Y細胞の培養：Dr. June Bielder により樹立された細胞株ヒトニューロブラストーマSH－SY5Y細胞は、伊野美幸博士（聖マリアンア医大）の御好意により提供された。SH－SY5Y細胞は、既報（15）の条件に準じ、10%牛胎仔血清，抗生物質を含むDMEM液中，5%CO_2 存在下，37° Cの条件で培養した。レチノイン酸10 μMを5日間処理したものを分化ニューロブラストーマとして実験に供した。生化学的測定：LDH（lactate dehydrogenase)活性は、ロブレスキー・ラ・デュー法により測定した。MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasolium bromide) アッセイは、MTTを37° C，4時間反応後、細胞内で生成されたホルマザンを比色定量した。DNAフラグメンテーションの検出：細胞を lysisバッファー(50 mM Tris-HCl;pH8, 10 mM EDTA, 0.3 % Triton X-100) で30分間処理後、27,000 x g，20分間の遠心を行い、得られた上清に proteinase K (0.5mg/ml) 50° C, 1時間および RNase A (0.4mg/ml) 50° C, 1時間の処理を行った。処理後、フェノール／クロロホルム(1:1) で抽出し、得られたDNAフラグメントを 1.5 %のアガロース電気泳動にかけ、エチディウムブロマイド染色を行った。

〔実験結果〕
図1に、レチノイン酸誘発分化ニューロブラストーマSH－SY5Y細胞にcolchicine添加後4日間培養した時の用量依存性曲線を示す。colchicineは濃度依存性に培養液LDH遊離の増大を引き起こし、そのEC50は約25 nM を示した。一方、光不活性型アナログである lumicolchicine は 10 μMまで無影響であった。また、MTTアッセイによる細胞の生存曲線から colchicine の効果を調べたところ、LDH遊離増大率での曲線とミラーイメージを示した（図1）。次に、タイムコースを調べた。図2に示すように、colchicine (1 μM) で誘発される培養液LDH遊離増大効果は1日後に認められず、2日以後に認められた。タンパク合成阻害剤である cycloheximideが apoptosisを抑制することが他の細胞系で報告されているので（18）、colchicine－誘発細胞死に対する影響を調べた。図3に示すように、cycloheximide 15 時間前処理によりcolchicine－誘発培養液LDH増大作用が用量依存的に抑制された。さらに、colchicine－誘発神経細胞死が apoptosisのメカニズムかどうかを証明するために、 180-200塩基対からなる ladder パターンのDNAフラグメンテーションの有無について調べた。図4に示すように、colchicine (1 μM) 処理により明確なladderパターンのDNAフラグメンテーションが、LHD遊離増大作用でのタイムコースと一致して認められた。また、cycloheximide 15 時間前処理によりcolchicine（4日間培養)-誘発DNAフラグメンテーションが抑制された（図5）。

〔考察〕

神経系において apoptosis の関与を示唆する報告はいくつか存在するが（1，2，3，6，7，8）、それらの研究では脳組織や初代培養細胞が用いられているため、変化の由来がニューロンか非ニューロンかまたは両方にあるのか明確でない。さらにそれらの実験的証拠の大部分は、NGFまたは血清の除去で誘発したものである。今回、血清を除去することなしに ladder パターンDNAフラグメンテーションが colchicine で誘発されることを発見した。この発見は、神経細胞死における apoptosis の役割を示唆する重要な証拠である。アミロイド前駆体タンパクの蓄積が colchicine ラット脳室内投与により誘発されること（17）やベーターアミロイド 25-35フラグメントがラット海馬培養細胞にDNAフラグメンテーションを引き起こすこと（3）が近年報告されているので、colchicine－誘発神経細胞死現象はアミロイドを介しているのかもしれない。海馬CA1野での錐体細胞脱落やそれに伴ったAMPA(α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate)結合部位の減少等の生化学的変化が認められるのに数日必要であることが既に報告されている（5，9，11，12，16）。この海馬での組織・生化学的変化の遅延性タイムコースと今回のレチノイン酸分化SH－SY5Y細胞で認められたものと類似していることは、非常に興味深い。しかし、海馬ニューロンでも同様な apoptosis メカニズムを介した神経細胞死が起こっているかどうかについては、現在のところ不明である。さらに詳細な検討が必要であろう。

〔文献〕
1) Dipasquale,B., Marini,A.M. and Youle,R.J.(1991) Biochem.Biophys.Res.Commun.181,1442-1448.
2) Forloni,G., Angretti,N., chiesa,R., Monzani,E., Salmona,M., et al.(1993) Nature 362,543-546.
3) Forloni,G., Chiesa,R., Smiroldo,S., Verga,L., Salmona,M., et al.(1993) NeuroReport 4,523-526.
4) Goldschmidt,R.B. and Steward,O.(1982) Neuroscience 7,695-714.
5) Hortnagl,H. and Hanin,I.(1992) in Handbook of Experimental Pharmacology "Selective Neurotoxicity" (eds Herken,H.and Hucho,F.) 102,293-332.(Springer-Verlag).
6) Jensen,L.M., Zang,Y. and Shooter,E.M.(1992) J.Biol.Chem.267,19325-19333.
7) Kure,S.,Tominaga,T.,Yoshimoto,T.,Tada,K.and Narisawa,K.(1991) Biochem.Biophys.Res.Commun.179,39-45.
8) Masters,J., Finch,C.E. and Sapolsky,R.M.(1989) Endocrinology 124,3083-3088.
9) Nakagawa,Y. and Baudry,M.(1989) Neuroscience 32,363-369.
10) Nakagawa,Y., Higashida,H. and Miki,N.(1984) J.Neurosci.4,1653-1661.
11) Nakagawa,Y. and Ishihara,T.(1988) Brain Res.439,11-18.
12) Nakagawa,Y., Nakamura,S., Kase,Y., Noguchi,T. and Ishihara,T.(1987) Brain Res.408,57-64.
13) Nakagawa-Yagi,Y., Saito,Y., Kitoh,N., Ogane,N., Fujisawa,E. and Nakamura,H.(1993) Biochem. Biophys.Res Commun.191,727-736.
14) Nakagawa-Yagi,Y., Saito,Y., Takada,Y. and Nakamura,H.(1992) Biochem.Biophys.Res. Commun.182,45-54.
15) Nakagawa-Yagi,Y., Saito,Y., Takada,Y. and Takayama,M.(1991) Biochem.Biophys.Res. Commun.178,116-123.
16) Seubert,P., Nakagawa,Y., Ivy,G., Vanderklish,P., Baudry,M. and Lynch,G.(1989) Neuroscience 31,195-202.
17) Shigematsu,K. and McGeer,P.L.(1992) Am.J.Pathol.140,787-794.
18) Wyllie,A.H.(1993) Br.J.Cancer 67,205-208.

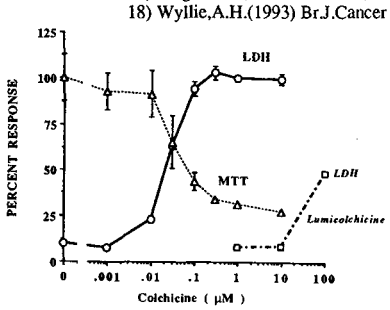


図1．colchcicine 誘発細胞死の用量依存性曲線

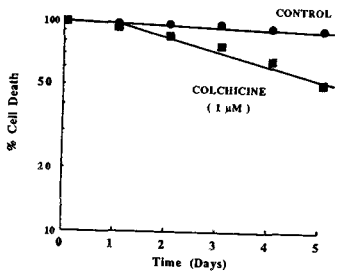


図2．colchicine 誘発細胞死のタイムコース

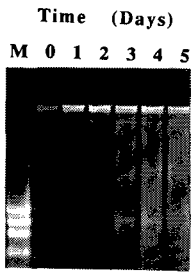


図4．colchicine誘発DNA
フラグメンテーションのタイムコース
M: øX174 RF DNA/Hae III fragments

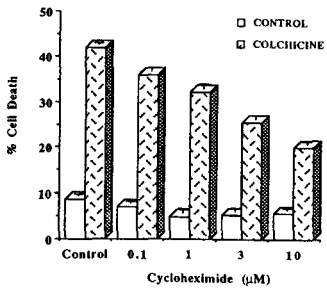


図3．colchicine 誘発細胞死に対する cycloheximideの効果



図5．colchicine誘発DNAフラグメンテーション
に対する cycloheximideの効果
1）コントロール：H_2O
2）コントロール：colchicine (1 μM)
3）cycloheximide(10μM) 処理：H_2O
4）cycloheximide(10μM) 処理：colchicine(1μM)

29 ラット海馬神経細胞培養系におけるカイニン酸神経細胞毒性

山口　時男、大野　和茂、小原　厚行
（山之内製薬・第一創薬研究所）

〔要約〕

ラット海馬神経細胞初代無血清培養系を用いて、non-NMDA受容体アゴニストであるカイニン酸の神経細胞毒性を解析した。non-NMDA受容体拮抗薬であるNBQXは完全にカイニン酸による神経細胞死を抑制した。NMDA受容体拮抗薬であるMK801は部分的に阻害作用を示した。細胞死の時間経過について検討したところ、グルタミン酸による神経細胞死と比較し、細胞死は2時間程度遅れて観察された。Non-NMDA受容体アゴニストであるAMPAもカイニン酸による神経細胞死阻害作用を示した。以上の結果よりカイニン酸による神経細胞死は、non-NMDA受容体を介し直接死に至る経路と、non-NMDA受容体を介し内在性のグルタミン酸の放出によるNMDA受容体を介し死に至る経路の２種類あると考えられる。AMPAの神経細胞死阻害作用については、電気生理学的にAMPAはカイニン酸の作用を抑制する作用が知られており、この現象を反映しているものと考えられる。

現在 in vivo 脳虚血モデルにおいて non-NMDA受容体アンタゴニストであるNBQXの有効性が認められており(1)、脳虚血による神経細胞死とnon-NMDA受容体の関連が注目されている。培養系を用いたnon-NMDA受容体を介する神経細胞死について幾つか報告はあるが(2, 3)、海馬の培養系での例は非常に少なく(4)、詳細は不明である。そこで我々は海馬神経細胞初代培養系を用い non-NMDA受容体アゴニストであるカイニン酸に着目し、この薬物によるin vitro神経細胞死について解析を行った。

【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18～20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パパインとDNase Iを用い、レンズフィルターにて細胞塊を除き、血清を含むMEMにて細胞浮遊液を作成した。分離した神経細胞を poly-l-lysine coating 48 well plate 上に4 x 10^5 / cm^2の密度で播種し、24時間後、無血清培地（ MEM, 20mM HEPES, 6g/l glucose, 1mM sodium pyruvate, 1mg/ml BSA, 2mM L-glutamine, 25μg/ml transferrin, 25μg/ml insulin, 25ng/ml selenium, 100μM putrescine, 1nM T3, 20nM progesterone, 20ng/ml corticosterone, 1μM tocopherol acetate, 1μg/ml arachidonic acid, 0.5μg/ml docosahexaenoic acid) に交換した。無血清培地の組成は、Brewerらの報告を参考とした(5)。グルタミンは用事調製とした。培地交換は2回／週で行った。

②グルタミン酸受容体アゴニスト神経細胞毒性

上記の培養細胞を用いてカイニン酸曝露実験を行なった。検討項目は、1)培養過程における神経細胞毒性の発現時期、2)濃度依存性、3)グルタミン酸受容体関連化合物の阻害効果、4)神経細胞死の時間経過である。薬物曝露時には項目1)を除き６日目以降の培養細胞を用い、各種薬物を含む無血清培地に交換し（volume: 0.3 ml）、24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。全LDH量は0.05% Triton-X100で処理したものとした。LDH活性は日立736型自動分析装置にて測定した。

【結果及び考察】

カイニン酸による神経細胞死は、培養３日目以降の細胞より認められ、その後培養６、９、１３日目と神経細胞の感受性が上昇した。EC50は、100～300μMであった。Non-NMDA受容体拮抗薬である

NBQXは完全にカイニン酸による神経細胞死を抑制した。 NMDA受容体拮抗薬であるMK801は完全ではないが、阻害作用を示した(Fig.1)。 細胞死の時間経過について検討したところ、グルタミン酸による神経細胞死と比較し、細胞死の開始が2時間程度遅れたが、12時間目以降同様な経過を示した(Fig.2)。Non-NMDA受容体アゴニストであるAMPAもカイニン酸による神経細胞死阻害作用を示した。カイニン酸神経細胞毒性のNMDA受容体の関与については、海馬のスライスの実験系でカイニン酸刺激でグルタミン酸の放出されるという報告があり(6)、 今回の我々の培養系においても同様な現象が起きている可能性が考えられる。以上の結果より、海馬培養系におけるカイニン酸による神経細胞死は、non-NMDA受容体を介し直接死に至る経路と、 non-NMDA受容体を介し内在性のグルタミン酸の放出による NMDA受容体を介し死に至る経路の２種類あると考えられる。AMPAの神経細胞死阻害作用については、既に報告されているが(3,4)、電気生理学的にAMPAはカイニン酸の作用を抑制することが知られており(7)、これを反映していると考えられる。

【参考文献】

(1)Sheardown, M.J., et al., (1990) Science, 247 571-574.
(2)Koh, J., et al., (1990) J. Neurosci., 10 693-705.
(3)Kato, T., et al., (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., 225 399-406
(4)May, P.C. and Robison, P.M., (1993) J. Neurochem., 60 1171-1174
(5)Brewer, G.J. and Cotman, C.W., (1989) Brain Res., 494 65-74.
(6)Ferkany, J.W. and Coyle, J.T., (1983) J. Pharmacol. Exp. Ther., 256 402-411
(7)Patneau, D.K. and Mayer, M.L., (1991) Neuron, 6 785-798

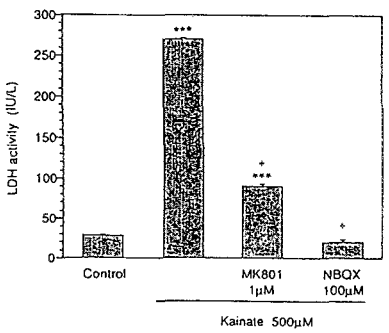


Fig. 1 Antagonism against kainate neurotoxicity
+ P<0.001 as compared with 500μM kainate by Student's two-tailed t test.
*** P<0.001 as compared with control.

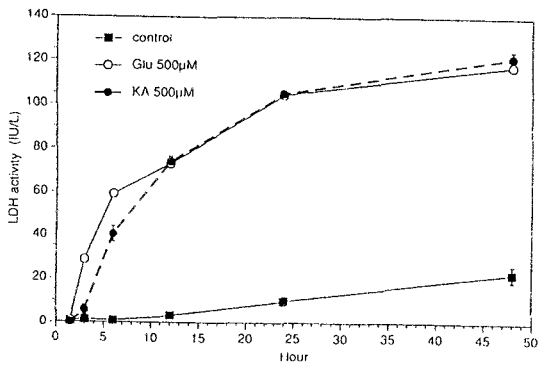


Fig. 2 Time course of kainate neuroloxicity

30 グルタミン酸誘発神経細胞死と phospholipase C-delta 免疫活性の増大

下濱 俊、田村 豊*、赤池昭紀*、松島 秀行、竹縄忠臣**、本間 好***、木村 淳
（京都大·医·神経内科、福山大·薬·神経薬理*、東京大·医科研·癌生物**、
東京都老人研·生体情報***）

〔要約〕

ラット培養大脳皮質ニューロンを用いて、グルタミン酸誘発の神経細胞死と ホスホリパーゼ C (PLC) のアイソザイムである PLC-delta 免疫活性の変動の関係について検討した。低濃度 (25 μM - 200 μM) のグルタミン酸を短時間投与し、その後グルタミン酸不含液で 24 時間インキュベートすることにより、50 μM 以上のグルタミン酸により濃度依存的にラット培養大脳皮質ニューロンの細胞死が誘発された。グルタミン酸の同様な投与により、25 μM の低濃度から濃度依存的に、PLC-delta の免疫活性の増大が認められた。細胞外カルシウムイオンの除去あるいは NMDA レセプターアンタゴニストの MK-801 の投与により、グルタミン酸による PLC-delta の免疫活性増大の有意な減少が認められ、細胞死も著減した。これらの結果より、グルタミン酸投与によるカルシウムイオンの流入によりニューロン内の PLC-delta の免疫活性が増大し、細胞死と関連することが示唆された。さらに、nitric oxide (NO) 合成阻害剤である N-Arg の同時投与によりグルタミン酸投与による PLC-delta 免疫活性の増大および細胞死も有意な減少を示したことより、カルシウム流入後のシグナルトランスダクションに NO の生成が関与していることが推測された。

[目的]

ニューロンの細胞膜にはイノシトールリン脂質が構成成分として含まれている。これを分解してジアシルグリロール（DG）とイノシトールリン酸を生成する酵素がイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC（PLC）である。PLC によって生じた DG は、プロテインキナーゼCの活性化因子として作用する。一方、イノシトールリン酸のうちのイノシトール３リン酸は小胞体から細胞質へのCa^{2+}の流入を促進する作用があることから、PLC はイノシトールリン脂質の分解を伴う数々の細胞応答に関与していると思われる。すなわち、神経伝達物質、神経栄養因子、ホルモンなどの外界情報物質が受容体を経て、その信号を細胞内へ伝える系の途中に PLC は位置し、上述した２つのセカンドメッセンジャーを生み出すことによって情報を細胞膜から細胞内へと伝える役割を担っていると考えられる (1,2)。私たちは、アルツハイマー病 (AD) 脳を用いて PLC について検討し、ホスファチジルイノシトール特異的 PLC 活性には変化が認められなかったが、そのアイソザイムである PLC-delta が、AD 脳において異常に蓄積していること、また、その特異抗体により、アルツハイマー病神経原線維変化 (NFT)、老人斑の変性した神経突起さらに neuropil の curly fiber といった AD に特徴的な病理像が濃染されることを明らかにし、AD の病態生理に PLC-delta 異常が密接に絡んでいる可能性を指摘した (6,7)。しかし、この AD 脳における PLC-delta の異常蓄積の分子機構の解明は今後に残された研究課題であった。一方、AD における神経変性の成因としてグルタミン酸によるニューロン障害説がある。本研究では、ラット培養大脳皮質ニューロンを用いて、グルタミン酸によるニューロンの細胞死と PLC-delta の免疫活性の変化の関係について検討した。

[実験方法]

1) 細胞培養

ラット胎生19日目の胎仔脳より大脳皮質を切り出し、細胞を単離した後、10% の胎仔牛血清、glutamine (2mM), glucose (11 mM), sodium bicarbonate (24 mM) を含む Eagle の MEM 培地に懸濁し、一枚あたり 3-4.5 x 10^6個になるように培養プレートに撒いた。培養は、5% CO2 環境下 37° Cで行った。播種後、8日目に cytosine arabinoside を加えて、ニューロン以外の細胞成分の生育を阻止した。

2) 神経毒性の解析

培養12日目に、培地に低濃度 (25 μM - 200 μM) グルタミン酸を 10 分間投与し、その後グルタミン酸不含液で 24 時間インキュベートすることにより、ラット培養大脳皮質ニューロンの細胞死を誘発した。培養細胞を 1.5 %トリパンブルーで染色し、その後ホルムアルデヒドで固定した後、生食でリンスした。トリパンブルーで染色される細胞を死細胞と判断した。対照群には、薬物を加えない培養液を用いた。また、グルタミン酸 (100 μM) と同時に MK-801 (10 μM) または N-Arg (300 μM) を添加して10分間処置後、グルタミン酸不含液で 24 時間インキュベートした系でもニューロンの生存度を調べた。グルタミン酸処置時に細胞外カルシウムを含まない Krebs 液を使用した系でのニューロンの細胞死も検討した。

3) 免疫化学

PLC-delta の検出に用いた抗体は、大腸菌で発現させた PLC-delta を抗原としたウサギポリクローナル抗体であり、ラットおよびヒト脳組織で 85 kDa のタンパクとして PLC-delta を特異的に認識することが確認されている (3,4,6)。

[結果]

1) グルタミン酸による神経毒性

低濃度 (25 μM - 200 μM) グルタミン酸を短時間投与し、その後グルタミン酸不含液で 24 時間インキュベートすることにより、50 μM 以上のグルタミン酸によりラット培養大脳皮質ニューロンの細胞死が誘発された。細胞外カルシウムイオンの除去あるいは NMDA レセプターアンタゴニストの MK-801 および nitric oxide (NO) 合成阻害剤であるN-Arg の投与により、細胞死は有意に減少した (表 1)。

2) グルタミン酸による PLC-delta 免疫活性

低濃度 (25 μM - 200 μM) グルタミン酸を短時間投与し、その後グルタミン酸不含液で 24 時間インキュベートすることにより、濃度依存的に、PLC-delta の免疫活性の増大が認められた。細胞外カルシウムイオンの除去あるいは NMDA レセプターアンタゴニストの MK-801 および NO の合成阻害剤である N-Arg の投与により、グルタミン酸誘発の PLC-delta の免疫活性の有意な減少が認められた (表 2)。

表 1　グルタミン酸処置によるニューロンの生存率

処置	生存率 (%)
Control (無処置群)	90.0 ± 0.3
Glutamate (25 μM)	88.5 ± 0.7
Glutamate (50 μM)	82.5 ± 1.5[a]
Glutamate (100 μM)	55.4 ± 1.0[b]
Glutamate (200 μM)	29.1 ± 2.4[b]
Glutamate (100 μM)	44.9 ± 0.7
Glutamate (100 μM) in Ca^{2+} free medium	88.6 ± 0.4[c]
Glutamate (100 μM) +MK-801 (10 μM)	86.2 ± 0.5[c]
Glutamate (100 μM) +N-Arg (300 μM)	75.7 ± 1.6[c]

数値は平均 + SEM (n=5)。
a; p<0.05, b; p<0.01 vs control,
c; p<0.01 vs glutamate (100 μM) alone
統計処理は、Dunnett's two-tailed test を用いた。

表 2　グルタミン酸処置による PLC-delta 免疫活性

処置	相対的免疫活性
Control (無処置群)	10.0 ± 2.8
Glutamate (25 μM)	22.6 ± 3.9[a]
Glutamate (50 μM)	37.8 ± 7.9[a]
Glutamate (100 μM)	43.4 ± 9.2[a]
Glutamate (200 μM)	48.0 ± 9.6[a]
Glutamate (100 μM)	38.2 ± 7.6
Glutamate (100 μM) in Ca^{2+} free medium	12.2 ± 2.9[b]
Glutamate (100 μM) +MK-801 (10 μM)	15.8 ± 3.2[b]
Glutamate (100 μM) +N-Arg (300 μM)	25.6 ± 5.0[b]

数値は平均 + SEM (n=5)。
a; p<0.01 vs control
b; p<0.01 vs glutamate (100 μM) alone

[考察]

ラット培養大脳皮質ニューロンを用いて、グルタミン酸誘発のニューロン死と ホスホリパーゼ C (PLC) のアイソザイムである PLC-delta 免疫活性の変動の関係について検討した。グルタミン酸投与により、50 μM 以上で濃度依存的にラット培養大脳皮質ニューロンの細胞死が誘発された。グルタミン酸の同様な投与により、濃度依存的に、PLC-delta の免疫活性の増大が認められたが、25 μM という低濃度のグルタミン酸でも有意に免疫活性が増大した。細胞外カルシウムイオンの除去あるいは NMDA レセプターアンタゴニストの MK-801 の投与により、グルタミン酸誘発の PLC-delta の免疫活性増大の有意な減少が認められ、また、細胞死も著減したことより、グルタミン酸によるカルシウムイオンの流入によりニューロン内の PLC-delta の免疫活性が増大し、細胞死と関連することが示唆された。さらに、NO 合成阻害剤である N-Arg の同時投与によりグルタミン酸投与による PLC-delta 免疫活性の増大および細胞死も有意な減少を示したことより、カルシウム流入後のシグナルトランスダクションに NO の生成が関与していることが推測された。

私たちは、原因不明の神経変性疾患で特定のニューロンの細胞死を呈する AD 脳において PLC-delta が異常に増大していること、また、その特異抗体により、NFT、老人斑の変性した神経突起さらに neuropil の curly fiber といった AD に特徴的な病理像に PLC-delta が異常に沈着していることをすでに明らかにしている (6,7)。しかし、この AD 脳における PLC-delta の異常蓄積の分子機構の解明は今後に残された研究課題であった。本研究でのラット培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸による PLC-delta 免疫活性増大および細胞死の誘発は AD における変性機序を考える上で興味深い。今後、この PLC-delta の増大が合成レベルによるか否かなどさらにその分子機構の解明が必要である。最近、PLC-delta がイノシトール 3 リン酸の結合タンパクであるという報告もあり (5)、PLC-delta の増大がニューロンの細胞死において果たす病態的意義については、イノシトールリン脂質代謝異常の観点よりさらに検討を要する課題であると考えられる。

文献

1. Berridge MJ. and Irvine RF. (1984) Nature 312, 315-320
2. Hawthorne JN. (1982) Nature 295,281-282
3. Homma Y., Imaki J., Nakanishi O. and Takenawa T. (1988) J Biol Chem 263, 6592-6598
4. Homma Y., Emori Y., Shibasaki F., Suzuki K. and Takenawa T. (1990) Biochem J 269, 13-18
5. Kanematsu T., Takeya H., Watanabe Y., Ozaki S., Yoshida M., Koga T., Iwanaga S. and Hirata M. (1992) J Biol Chem 267, 6518-6525
6. Shimohama S., Homma Y., Suenaga T., Fujimoto S., Taniguchi T., Araki W., Yamaoka Y., Takenawa T. and Kameyama M. (1991) Am J Pathol 139, 737-742
7. Shimohama S., Fujimoto S., Taniguchi T. and Kameyama M. (1992) Brain Res 579, 347-349

31 酸化的ストレスと神経細胞死 －C6グリオーマ細胞におけるグルタミン酸毒性を中心として－

馬渡一浩[1]，安井裕子[2]，石田外樹[2]，加藤 聖[2]
([1]金沢大・医療短大・衛生技術，
[2]金沢大・医・神経情報研伝達)

〔要約〕
我々は，既にC6グリオーマ細胞にグルタミン酸（mMオーダー）を添加すると遅延型の細胞死が招来され，この細胞死はアミノ酸輸送系の一つであるシスチン／グルタミン酸交換輸送系（x_c^-系）を介したシスチン取り込みの阻害による細胞内グルタチオン（GSH）の枯渇にもとづくことを報告している。GSHは主要な生体内SH還元物質であることより，GSH減少により細胞が酸化的ストレスに暴露されることを想定し，以下の実験を行った。第一としてグルタミン酸添加によりC6細胞の膜および核に対する障害度をそれぞれ，膜の脂質過酸化および核内DNAの断片化を指標に判定した。第二としてグルタミン酸毒性に対する活性酸素（過酸化水素やスーパーオキサイド等）の関与を調べるためカタラーゼやSODの添加効果を観察した。その結果，グルタミン酸による細胞死と一致して，脂質過酸化が約2倍増加し，また細胞死に先立ち核内DNAのラダー状断片化が認められた。他方カタラーゼの添加により，有意にこのグルタミン酸細胞死は抑えられた。またビタミンEの添加によっても完全に細胞死は防御された。以上の事実から，このC6グリオーマ細胞におけるグルタミン酸毒性は酸化的ストレスによる神経細胞死の格好のモデル系と考えられる。

［ 序 ］ 最近，生体内の主要な還元物質であるGSH細胞内レベル維持機構として，C6グリオーマ細胞や網膜グリア細胞では，アミノ酸交換輸送系（x_c^-系）の発現が重要な役割を果たしていることが判明した[2)3)4)]。さらに我々は，細胞外に過剰のグルタミン酸が存在すると，このx_c^-系を介してシスチンの取り込みの阻害－GSHの枯渇により遅延型細胞死が招来されることを報告した（図1）[4)]。そこで今回，細胞内GSHの枯渇－酸化的ストレス防御機構破綻－細胞死の一連の過程を探るため本実験を企画した。

［方 法］ C6グリオーマ細胞は DMEM 培地（5%胎児血清含有）で培養した。膜の脂質過酸化は，八木法[6)]にて定量化した。また核内DNAの断片化については，高田らの方法[5)]にてDNAを抽出し，2%アガロースゲル電気泳動後，エチジウムブロマイド染色を施し写真撮影を行った。さらに，活性酸素の関与を調べる目的でカタラーゼ（シグマ，牛肝由来）とSOD（シグマ，牛赤血球由来）を添加した。細胞死の判定は，メディウム中のLDH活性の測定またはトリパンブルー排泄試験にて行った[3)]。

［結 果］ C6グリオーマ細胞にL-グルタミン酸を添加すると，14～16時間後から徐々に細胞の変性がおこり，24時間後には大部分の細胞は死滅した[1)]。このとき産生される膜の過酸化脂質は，添加14時間後頃から増加傾向が認められ，24時間後では対照に比して約2倍に上昇した（図2）。また，グルタミン酸添加10～12時間後に抽出された核内DNAはアガロースゲル上でヌクレオゾーム長のラダー状断片化が観察された（図3）。さらに，グルタミン酸添加後にカタラーゼやSODを添加し培養したところ，カタラーゼ添加群では有意にグルタミン酸細胞死は抑制された。またビタミンEを添加した場合，完全に細胞死は防御された。

［考　察］　C６グリオーマ細胞におけるグルタミン酸添加後の遅延型細胞死において 1) 膜の過酸化脂質の上昇，2) 核内ＤＮＡのラダー状断片化が認められた。以上のことから，グルタミン酸添加により，x_c^-系を介したシスチン取り込みの阻害による細胞内ＧＳＨ減少の結果，細胞が酸化的ストレスに暴露され，細胞の膜および核に不可逆的な変化が生じたと考えられる。さらに，カタラーゼ添加により有意に細胞死が抑制されたことから，過酸化水素の関与が示唆された。

図１．Ｃ６細胞におけるグルタミン酸毒性の細胞内機序

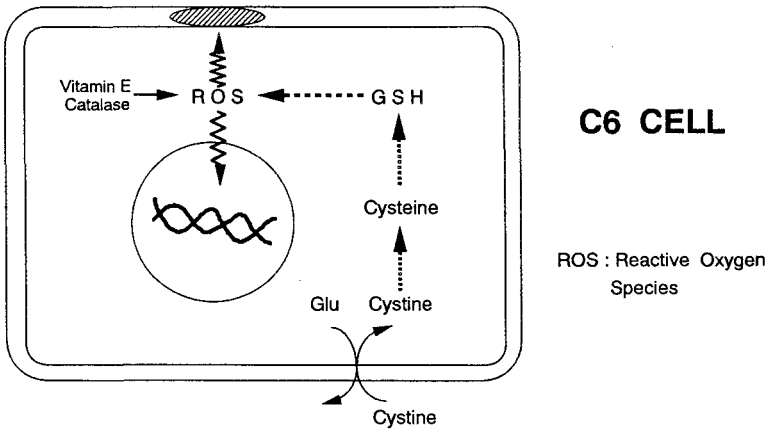


図２．膜の過酸化脂質の増加

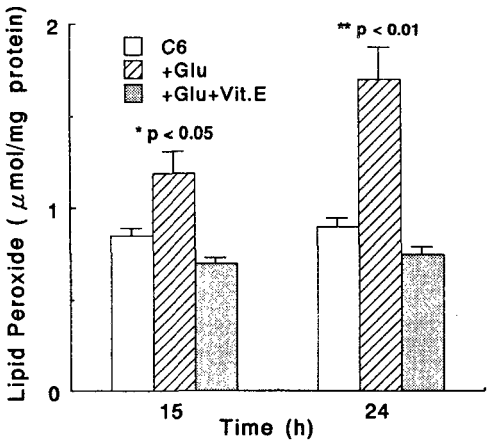
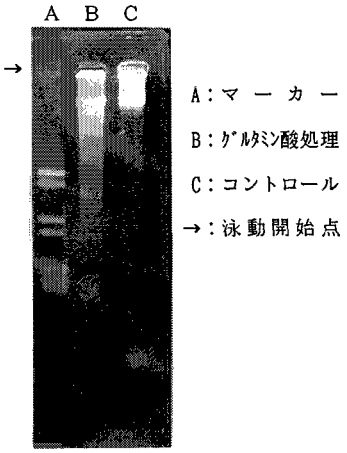


図３．ＤＮＡの電気泳動



［文　献］

1. Kato, S., Higashida, H., Higuchi, Y., Hatakenaka, S. and Negishi, K. (1984) Brain Research 303, 365-373.
2. Kato, S., Ishita, S., Sugawara, K. and Mawatari, K. (1993) Neuroscience in press.
3. Kato, S., Negishi, K., Mawatari, K. and Kuo, C.-H. (1992) Neuroscience 48, 903-914.
4. 加藤　聖,安井裕子,高寺恒雄 (1993) 実験医学 in press.
5. 高田俊範,木南　凌 (1991) 実験医学別冊　遺伝子工学ハンドブック 41-45.
6. Yagi, K. (1976) Biochem. Med. 15, 212-216.

32 脳ＮＯシンターゼにおける[^{3}H]N^G-Nitro-*L*-Arginine結合の性質

来山義則、北村佳久、桐山賀充、野村靖幸
（北海道大・薬・薬効）

〔要約〕
一酸化窒素（ＮＯ）は、生体内で*L*-arginine（*L*-Arg）からＮＯシンターゼ（ＮＯＳ）によって産生され、神経系や免疫系におけるシグナルメッセンジャーとして注目されている。ＮＯＳの活性化機構を明らかにする目的で、*L*-Argの誘導体でＮＯＳ阻害薬であるN^G-nitro-*L*-Arg（ＮＮＡ）のトリチウム体（[^{3}H]ＮＮＡ）を用いて、本酵素への結合の性質を検討した。ラット脳可溶性画分における[^{3}H]ＮＮＡ結合活性は小脳が最も高く、次いで海馬、大脳皮質、嗅球、線条体、視床下部、中脳で、延髄では弱い結合活性しか認められなかった。この[^{3}H]ＮＮＡ結合活性は、*L*-[^{14}Ｃ]Argからの*L*-[^{14}Ｃ]citrulline産生および脳切片におけるＮＡＤＰＨジアホラーゼ染色と高い相関性を示した。さらに、[^{3}H]ＮＮＡ結合はＦＡＤ、ＦＭＮ非依存性であるが、Ca^{2+}/カルモジュリン（ＣａＭ）および ＮＡＤＰＨ/BH_4によって結合親和性が増加することが示された。

【緒言】
一酸化窒素（ＮＯ）は、血管系、免疫系における内皮由来弛緩因子、マクロファージ由来細胞障害因子、血小板凝集阻害因子、グアニル酸シクラーゼ活性化因子として知られていた。近年、脳においてＮＯは、シナプス可塑性、神経細胞死に関与することが報告されている。このＮＯは、ＮＯシンターゼ（ＮＯＳ）によって*L*-arginine（*L*-Arg)を基質として *L*-citrullineと共に産生される。ＮＯＳは、主にCa^{2+}/カルモジュリン（ＣａＭ）依存性のconstitutive NOS（ｃＮＯＳ）とエンドトキシンやサイトカインにより誘導されるCa^{2+}非依存性のinducible NOS （ｉＮＯＳ）の２種類に分類されている。また、N^G-nitro-*L*-Arg（ＮＮＡ）は*L*-ArgのN^G位がNO_2に置換されたもので、ＮＯＳの阻害薬として知られている。そこで、脳ｃＮＯＳの性質を明らかにする目的で、脳[^{3}H]ＮＮＡ結合の諸性質を検討した。

【実験方法】
ラット脳８部位にそれぞれ４倍量のhomogenate buffer (50 mM Tris·HCl buffer(pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 100 U/ml aprotinin, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)でホモジナイズし、超音波粉砕した後、18,000 x g、10分間4℃で遠心分離し、その上清を可溶性画分とした。また、小脳可溶性画分から2',5'-ADPアガロース、ＣａＭアガロースのカラムクロマトグラフィーによりｃＮＯＳを精製した。[^{3}H] ＮＮＡ（10～40 nM）結合実験において、10μM ＮＮＡ存在下での結合を非特異的結合とした。また、*L*-[^{14}Ｃ] Arg（3μM）から産生される*L*-[^{14}Ｃ]citrullineを陽イオン交換カラム（Dowex 50WX8, Na^+form）クロマトグラフィーにより分離、定量した。

【実験結果および考察】
L-[^{14}Ｃ]ArgはＮＯＳ標品（ラット小脳可溶性画分）により約５０％が*L*-[^{14}Ｃ]citrullineに変換されるが、[^{3}H]ＮＮＡはＮＯＳ標品の存在、非存在に関わらず、*L*-[^{14}Ｃ]citrullineと同じ分離パターンを示した（図１）。このことから、[^{3}H]ＮＮＡはＮＯＳによって分解されないと推定された。

ラット脳を８部位に分割しその可溶性画分について[^{3}H]ＮＮＡ結合活性を調べたところ、小脳が最も高く、次いで海馬、大脳皮質、嗅球、線条体、視床下部、中脳で、延髄では低い活性しか認められなかった（図２）。この[^{3}H]ＮＮＡ結合活性は、*L*-[^{14}Ｃ]Argからの[^{14}Ｃ]citrulline産生および脳切片におけるＮＡＤＰＨジアホラーゼ染色と高い相関性を示した（図３）。このことから、[^{3}H]ＮＮＡ結合は可溶性ｃＮＯＳのマーカーとして有用であることが示された。

またラット小脳可溶性画分における[^{3}H]ＮＮＡ結合活性は、N^G-monomethyl-*L*-Arg > diphenyleneiodonium（ＤＰＩ，フラボ蛋白質阻害薬）> *L*-Arg = *L*-kyotorphin > W-7（ＣａＭ阻害薬）の順に抑制された。しかしながら*L*-citrulline、*D*-Arg、*D*-kyotorphinでは抑制されなかった（表１）。また、[^{3}H]ＮＮＡ結合活性は、ＦＡＤ、ＦＭＮ、Ca^{2+}、ＣａＭによってあまり影響を受けなかったが、ＮＡＤＰＨおよびテトラヒドロビオプテリン（BH_4）存在下によって約３倍に増加した。Scatchard 解析したところ、この増加は結合数の変化ではなく、結合親和性の増加によることが示唆された。一方、*L*-[^{14}Ｃ]Argを基質とした*L*-[^{14}Ｃ]citrulline産生にはCa^{2+}/ＣａＭが必須で、ＮＡＤＰＨ、BH_4も必要であった。精製ｃＮＯＳも同様の結果が得られた。以上のことから、１）ｃＮＯＳは小脳、海馬、嗅球の可溶性画分に豊富であること、２）ｃＮＯＳへのＮＮＡ（あるいは*L*-Arg）結合活性は、Ca^{2+}/ＣａＭ非依存性であること、３）ＮＡＤＰＨ/BH_4によって結合親和性が増加すること、しかしながら ４）ｃＮＯＳの活性化にはCa^{2+}/ＣａＭは必須であることが示唆された。このこ

とより、cNOSはNADPH/BH_4よって基質に対する結合親和性が増大するが、酵素の活性化（NO産生）にはCa^{2+}/CaMが必須であることが推定された。

【参考文献】
1) D.S. Bredt & S.H. Snyder (1992) *Neuron* 8, 3-11.
2) Y. Nomura & Y. Kitamura (1993) *Neurosci. Res.* in press.

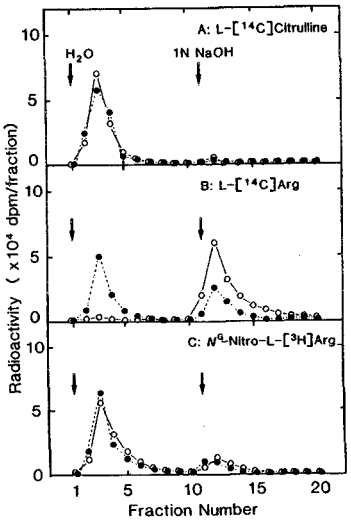


図1：陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーにおけるL-citrulline、L-ArgおよびNNAの溶出パターン
L-[^{14}C]citrulline（A）、*L*-[^{14}C]Arg（B）および[^{3}H]NNA（C）をラット小脳可溶性画分存在下（●）および非存在下（○）で、Ca^{2+}、NADPH、BH_4と共に37 ℃、10分間インキュベート後、Dowex 50WX8 (Na^+ form)カラムに添加した。フラクション1～10は蒸留水（0.5 ml）で、またフラクション11～20は1 N NaOH（1 ml）で溶出した。

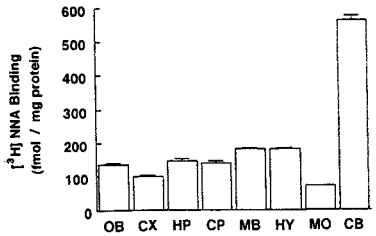


図2：ラット脳8部位の可溶性画分における[^{3}H]NNA結合活性
OB（嗅球），CX（大脳皮質），HP（海馬），CP（線条体），MB（中脳），HY（視床下部），MO（延髄），CB（小脳）

表1：[^{3}H]NNA結合に及ぼす各種薬物

Drug	IC_{50} (nM)	nH
NNA	103±39	0.81±0.09
NMMA	699±188	0.79±0.12
L-Arg	10,300±1,400	1.03±0.13
L-KTP	12,600±867	1.16±0.13
DPI	2,620±1,280	0.66±0.03
W-7	40,200±10,600	1.19±0.18
Citrulline	>100,000	—
D-Arg	>100,000	—
D-KTP	>100,000	—

KTP: kyotorphin, *L*-KTP: *L*-Tyr-*L*-Arg, *D*-KTP: *L*-Tyr-*D*-Arg

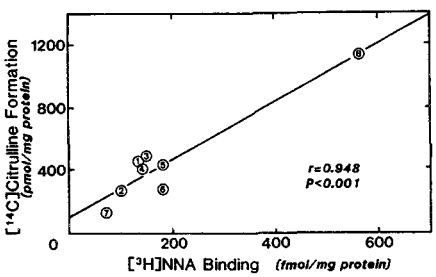


図3：ラット脳8部位の可溶性画分における[^{3}H]NNA結合活性と*L*-[^{14}C]citrulline産生活性の相関性
①嗅球，②大脳皮質，③海馬，④線条体，⑤中脳，⑥視床下部，⑦延髄，⑧小脳

33 ラット脳グリア細胞におけるＮＯシンターゼ誘導機構

北村佳久、来山義則、桐山賀充、江角浩安*、野村靖幸
（北海道大・薬・薬効；*国立がんセンター）

〔要約〕
ＮＯシンターゼ（ＮＯＳ）は、constitutive NOS（ｃＮＯＳ）とinducible NOS（ｉＮＯＳ）の２種類に分類されている。脳においてある種の神経細胞にｃＮＯＳの存在が知られているが、グリア細胞にはｃＮＯＳはほとんど認められない。今回、グリア細胞におけるｉＮＯＳの誘導機構およびその性質について検討した。その結果、１）ＬＰＳ刺激によるＮＯＳ誘導は主にミクログリアで、一部のアストロサイトでも引き起こされること、２）ＬＰＳはＰＩアンカータンパク質（おそらくＣＤ１４様蛋白質）に作用し、チロシンキナーゼが活性化されること、３）この誘導はグルココルチコイドで抑制されること、４）グリア細胞で誘導されるｉＮＯＳは分子量１３万と１１万であることが示唆された。

【緒言】
一酸化窒素（ＮＯ）は、血管系、免疫系における内皮由来弛緩因子、マクロファージ由来細胞障害因子、血小板凝集阻害因子、グアニル酸シクラーゼ活性化因子として知られていた。近年、中枢神経系においてＮＯは、シナプス可塑性、神経細胞死に深く関与していることが知られている[1]。このＮＯは、ＮＯシンターゼ（ＮＯＳ）によって*L*-arginine（*L*-Arg）を基質として*L*-citrullineと共に産生される。ＮＯＳは、主にCa^{2+}／カルモジュリン（CaM）依存性の constitutive NOS（ｃＮＯＳ）とエンドトキシンやサイトカインにより誘導されるCa^{2+}非依存性のinducible NOS（ｉＮＯＳ）の２種類に分類されている。神経細胞にはｃＮＯＳの存在が報告されているが、グリア細胞にはほとんど認められない。アルツハイマー病、パーキンソン病およびＨＩＶ脳症の神経脱落部位周辺には多数のアストロサイトおよびミクログリアが集積することが知られている。また、グリア細胞を大腸菌由来リポポリサッカライド（ＬＰＳ）処置によりＮＯＳが誘導され、培養上清にNO_2^-が蓄積されることが報告されている[2,3]。今回、グリア細胞におけるｉＮＯＳの誘導機構およびその性質について検討した。

【実験方法】
新生ラット脳より混合グリア細胞を調製し、培養した。アストロサイトおよびミクログリアの同定にはそれぞれ抗グリア線維酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）抗体および抗マクロファージ抗体（ＥＤ-１）を用いた。また、ＮＯＳはＮＡＤＰＨジアホラーゼ染色により同定した。ＮＯＳ活性は*L*-[^{14}C]Argを基質として産生される*L*-[^{14}C]citrulline量、[^{3}H]N^{G}-nitro-*L*-Arg（ＮＮＡ）結合活性およびNO_2^-蓄積量を定量することにより行った。
L-[^{35}S]methionineおよび*L*-[^{35}S]cysteineを取り込ませたグリア細胞をＬＰＳ刺激し、新たに合成されるタンパク質を同定した。さらに、抗リン酸化チロシン抗体、抗肝細胞ｉＮＯＳ抗体[4]によるimmunoblottingも検討した。

【結果および考察】
培養した混合グリア細胞は、抗ＧＦＡＰ抗体陽性細胞（アストロサイト）は９０％以上で、抗マクロファージ抗体陽性細胞（ミクログリア）は約７％であった。混合グリア細胞のＬＰＳおよびその活性本体であるリピッドＡ処置によって培養上清中のNO_2^-蓄積、細胞ホモジネートにおける[^{14}C]citrulline産生活性および[^{3}H]ＮＮＡ結合活性の著しい増加が認められた（図１）。ＬＰＳによるＮＯＳ誘導は、ｍＲＮＡ合成阻害薬アクチノマイシンＤ、蛋白質合成阻害薬シクロヘキシミド、グルココルチコイド（デキサメサゾン）によって完全に抑制された。
Ｃキナーゼ阻害薬スタウロスポリン、Ａキナーゼ阻害薬ＫＴ-５７２０、ＣａＭ阻害薬Ｗ-７では阻害されなかったが、チロシンキナーゼ阻害薬ハービマイシンＡによって濃度依存的に阻害された（図２）。また、ＬＰＳ刺激後（１５秒～１時間）、分子量１１万のタンパク質がチロシンリン酸化された。一方、刺激後１２～２４時間で分子量１８万，１３万，８万，７万，６万タンパク質の新規合成が認められた。
抗肝細胞ｉＮＯＳ抗体を用いてimmunoblottingを行ったところ、ＬＰＳ刺激により分子量１３万および１１万タンパク質が同定された。この抗体は、ラット小脳から精製したｃＮＯＳ（分子量１６万）には反応しなかった。このことから、グリア細胞ｉＮＯＳの多様性が示唆された。
ＬＰＳによるＮＯＳ誘導は、ミクログリア損傷を引き起こす*L*-leucine methylester（ＬＭＥ）によって９０％、ＰＩアンカータンパク質を切断するＰＩ-ＰＬＣによって５０％抑制された。振盪操作によって９５％以上に精製したミクログリアの

ＬＰＳ処置によっても混合グリアと同様にＮＯＳ誘導が認められた。無処置グリア細胞はＮＡＤＰＨジアホラーゼ染色されないが、ＬＰＳ処置するとミクログリアが強く染色され、また一部のアストロサイトも染色された。

以上のことから、１）ＬＰＳ刺激によるＮＯＳ誘導は主にミクログリアで、また一部のアストロサイトでも引き起こされること、２）ＬＰＳはＰＩアンカータンパク質(おそらくＣＤ１４様蛋白質)に作用し、チロシンキナーゼが活性化されること、３）この誘導はグルココルチコイドで抑制されること、４）グリア細胞で誘導されｉＮＯＳは分子量１３万と１１万であることが示唆された。

【参考文献】

1) D.S. Bredt & S.H. Snyder (1992) *Neuron* 8, 3-11.
2) Y. Nomura & Y. Kitamura (1993) *Neurosci. Res.* in press.
3) M.L. Simmons & S. Murphy (1992) J. Neurochem. 59, 897-905.
4) Oguchi et al. (1992) *FEBS Lett.* 308, 22-25.

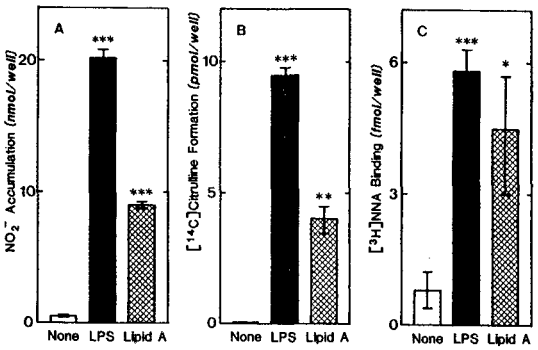


図１：混合グリア細胞におけるＬＰＳおよびリッピドＡ刺激２４時間後のＮＯＳ活性
Ａ．培養上清に蓄積されたNO_2^-量；
Ｂ．*L*-[^{14}Ｃ]Argを基質として産生される*L*-[^{14}Ｃ]citrulline量；
Ｃ．[^{3}Ｈ]ＮＮＡ結合活性。

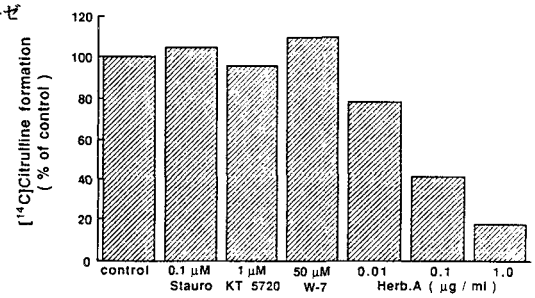


図２：ＬＰＳによるＮＯＳ活性誘導に及ぼす各種キナーゼ阻害薬の作用
スタウロスポリン（0.1μＭ）、ＫＴ-５７２０（1μＭ）、Ｗ-７（50μＭ）、ハービマイシンＡ（0.01～1μＭ）前処置後、ＬＰＳ（10μg/ml）刺激をした。

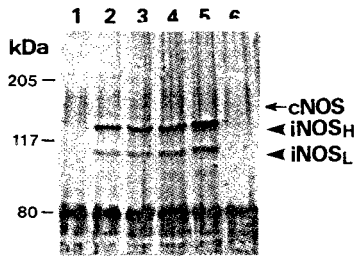


図３：混合グリア細胞の抗肝細胞ｉＮＯＳ抗体のimmunoblotting
ＬＰＳ刺激、０時間（*lane* １）、６時間（*lane* ２）、１２時間（*lane* ３）、２４時間（*lane* ４）、４８時間（*lane* ５）；ラット小脳から精製したｃＮＯＳ（*lane* ６）。

34　生後ラット中枢コリン作動性ニューロンのプログラム細胞死

中村 桃子、西尾 チカ、野々村 健、畠中 寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕
シナプス形成の終了期である生後 2 週齢のラットから培養した前脳基底野コリン作動性ニューロンは、神経成長因子 (NGF) 存在下にその生存が維持されている。我々は培地を高カリウムに変え脱分極刺激を与えると、コリン作動性ニューロンの生存維持が NGF 無添加でも観察されること、また、同様に c-AMP 誘導体の添加でも見られることを確認した。この現象は、末梢神経系での NGF 除去による神経節ニューロンのプログラム細胞死が同様の脱分極刺激で抑制されることと似ている。一方、成熟ラット (8 週齢前後) からの培養コリン作動性ニューロンは、NGF に対する応答性を殆ど失っており、同様に高カリウムによる生存維持効果も著しく低下した。以上の結果は、シナプス形成終了期では前脳基底野コリン作動性ニューロンがプログラム細胞死の形をとることを示している。

中枢神経系におけるシナプス形成とそれに伴うプログラム細胞死の研究は、末梢神経系の場合と比べ、その系の持つ複雑さから解析が遅れている。前脳基底野コリン作動性ニューロンは海馬・新皮質に投射しており、このコリン作動性投射回路は記憶・学習に重要な系として知られており、またこの破壊はアルツハイマー型痴呆症と深い関わりが指摘されている。神経成長因子 (NGF) は、また最近では脳由来神経栄養因子もそうであるが、このニューロンに作用し栄養因子作用をしていることが知られている。既に、我々は培養ラット 2 週齢のこのニューロンは NGF 依存性の生存維持が見られることを明らかにしている (1)(2)。この報告で、我々は培地を高カリウムに変えることにより引き起こされる脱分極刺激による影響を、NGF の効果と比較検討したので報告する。また、cAMP 誘導体の添加効果も調べた。さらに、シナプス形成終了期から数週間過ぎた成熟期のラット (8 週齢前後) からの培養コリン作動性ニューロンに対する効果とも比較した。

〔方法〕
生後ラットからの中枢神経系ニューロンは既報に従って培養した (2)(3)。前脳基底野は、中隔野とブローカ対角帯核垂直部を含んでいる。ラットは Wistar 系 ST (♂、♀) を用い、出生日を第 1 日目として数えた。細断した組織をパパイン消化の後、得られた生細胞を 1 cm^2 に 0.8～4×10^5 cells の割合で、予めアストログリア細胞を生育させてた 48-well プレート(培養面積 0.65 cm^2) にまいた。まず、血清を含む培地で培養の翌日、培地を交換し種々の添加物を加え 5 日間培養した。高 K^+ 培地は $NaHCO_3$ を $KHCO_3$ に置き換えることで 26 mM まで調製し、最大 50 mM までにした時は KCl を補った。cAMP 誘導体として、8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP を用いた。培養の後、アセチルコリン合成酵素 (ChAT) 活性の測定、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性染色、また抗 ChAT 抗体および抗 MAP2 抗体での免疫染色を行った。

〔結果と考察〕
図 1 は、生後 2 週齢ラット前脳基底野ニューロンへの高 K^+ 培地および cAMP 誘導体の効果を NGF 添加効果と比較して調べたものである。高 K^+ および cAMP 誘導体によって ChAT 活性また生存 ChAT 陽性ニューロン数は NGF と同様に上昇することが示されている。この図では示していないが高 K^+ 培地および cAMP 誘導体の添加によって、MAP2 陽性細胞数も高い値を示した。また、cAMP 誘導体によって

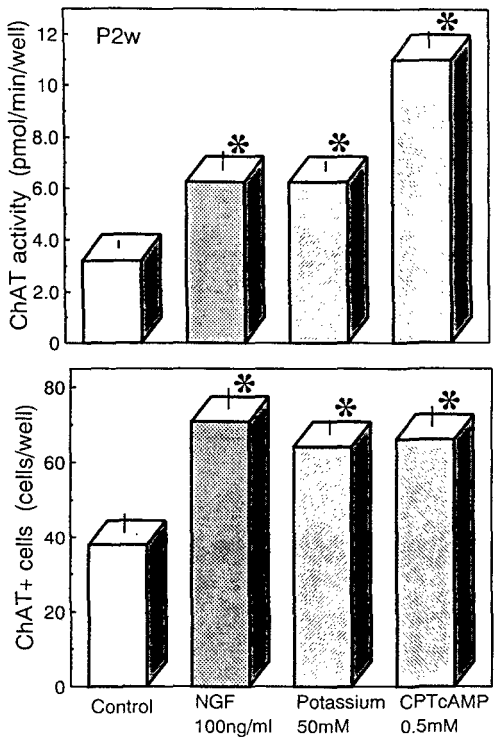


図 1. 生後 2 週齢ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンの生存維持に対する高 K^+ 培地および cAMP 誘導体の効果と NGF 添加効果の比較。 *印は $p<0.01$ で有意であることを示す。

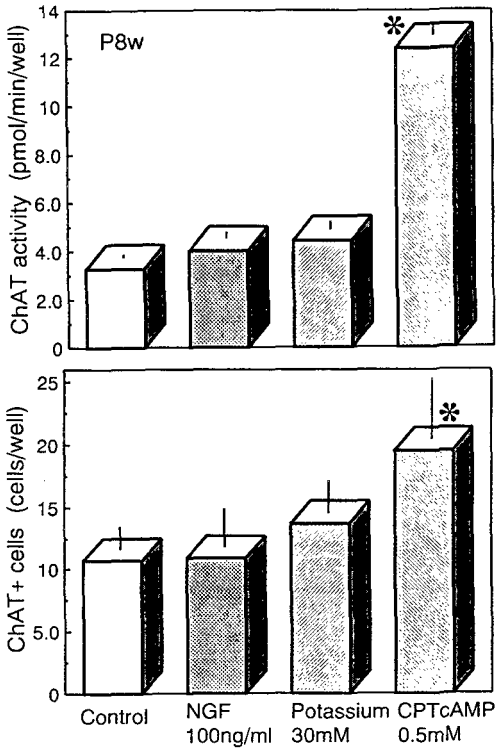


図 2. 生後 8 週齢ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンの生存維持に対する高 K^+ 培地および cAMP 誘導体の効果と NGF 添加効果の比較。 *印は $p<0.01$ で有意であることを示す。

ChAT 活性は、生存 ChAT 陽性細胞に比べ著しく高い値を与えた。また、AChE 陽性細胞数の比較も行っているが、同様の結果を得ていることを確認した。

図 2 に、生後 8 週齢ラットよりの培養ニューロンへの効果を見た。30 mM の高 K^+ の効果は、2 週齢期のニューロンに比べ著しく低下した。NGF の効果は殆ど見られなかった。cAMP 誘導体によっては ChAT 活性および生存 ChAT 陽性細胞数いずれも著しく高い値を示した。

以上の結果は、ラット前脳基底野-海馬のシナプス形成終了期である生後 2 週齢のコリン作動性ニューロンの培養下での NGF 除去に伴う死は、プログラム細胞死の形態をとっていることを示している。

〔文献〕

(1) Kushima,Y. and Hatanaka,H. (1992) Culture of neuronal cells from postnatal rat brain: Application to the study of neurotrophic factors. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat., 5,* 617-633.

(2) Kushima,Y., Nishio,C., Nonomura,T. and Hatanaka,H. (1992) Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor on survival of cultured septal cholinergic neurons from adult rats. *Brain Res., 598,* 264-270.

(3) Hatanaka,H., Tsukui,H. and Nihonmatsu,I. (1988). Developmental change in the nerve growth factor action from induction of choline acetyltransferase to promotion of cell survival in cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Dev. Brain Res., 39,* 85-95.

35　Caイオノフォアによる中枢神経細胞のアポトーシス

武井延之、　遠藤泰久
（京都工繊大　応用生物）

[要約]
Caイオノフォアであるイオノマイシンの初代培養大脳皮質神経細胞に対する細胞毒性について検討した。イオノマイシンによる神経細胞死はRNA合成阻害薬及び蛋白合成阻害薬によって阻害される積極的な細胞死であり、c-fosの発現を伴うような現象であることが明かとなった。　神経細胞の微細構造の変化としては、核の濃縮、クロマチンの凝集、空胞の出現あるいは増加などが顕著であった。　またDNAの断片化も観察された。　以上のことからイオノマイシンによる神経細胞死はアポトーシスであると考えられた。

アポトーシスとはおもに形態学的に分類された細胞死のパターンである。細胞壊死（ネクローシス）が外部からのストレスによって強制された受動的な死であるのに対して、アポトーシスはいわば細胞の自殺ともいえる積極的な死とされている。形態的な特徴としては、細胞の縮小、クロマチンの凝縮、核の濃縮などが認められ、生化学的変化としてはDNAのヌクレオソーム単位での断片化が起こることが知られている（1）。
神経細胞においては発生の過程でおこるプログラム細胞死がこのタイプの死にかたであるとされているが、神経細胞のアポトーシスは他の場合にもおこってる可能性がある。　またアポトーシスのメカニズムに関してはほとんどわかっておらず、その解明のためにも神経細胞のアポトーシスの系の確立が必要である。アポトーシスでは細胞内Caの上昇がしばしば引き金になっているとの報告があるので　本研究ではCaイオノフォアであるイオノマイシンによって引き起こされる神経細胞死がアポトーシスであるかということについてラット胚中枢神経細胞の初代培養系を用いて検討した。

[方法]
ラット１７日胚より大脳皮質を摘出し、酵素で分散後、神経細胞を播種し、１０％牛胎児血清を含むMinimum essential medium (MEM)で４日間培養し（2）、イオノマイシン及び各種薬物を添加した。細胞毒性の検定は神経細胞を経時的にを固定し、位相差顕微鏡写真をとり計数した。　免疫染色はABC法により行なった。電子顕微鏡試料の作製は通常の方法で固定、脱水、包埋し、細胞表面の微細構造は走査型電子顕微鏡で、細胞内、特に核内の微細構造は透過型電子顕微鏡で観察した（3）。　DNAは常法に従って抽出し、アガロースゲル電気泳動を行なった。

[結果と考察]
イオノマイシン(1 μM)を培地に添加して経時的に生細胞数を計数すると、２時間後ではほとんどの神経細胞が生き残っているものの、８時間後には約６０％、１６時間後には４０％以下の神経細胞しか生存していない（図1）。　またイオノマイシンによる神経細胞死は全ての神経細胞で同時に起こるのではなく、細胞によって時間的なズレがあることがわかった。　つぎにRNA合成阻害薬アクチノマイシンD (20 μg/ml)と蛋白合成阻害薬サイクロヘキサミド(2 μg/ml)をイオノマイシンと同時に培地に添加し、１６時間後に生存細胞数を計数した。アクチノマイシンD、サイクロヘキサミド共にイオノマイシンの神経細胞に対する毒性を抑制した（図2）。さらにイオノマイシン添加２時間後に細胞を固定し、c-FOSに対する抗体を用いて免疫染色を行なうと、c-FOS陽性細胞の増加及び染色性の増強がみられた。これらことはイオノマイシンによる細胞死が新たな転写や翻訳を必要とする積極的なメカニズムによるものであることを示唆している。この様な細胞死はアポトーシスである可能性が考えられるので、神経細胞の微細形態の変化について電子顕微鏡観察を行なった。　図3はイオノマイシン添加後２時間の神経細胞の像の一例であるが、核の濃縮、クロマチンの凝集、細胞質内での空胞の形成などアポトーシスでの特徴的な変化が観察された。この時点ではほとんどの神

経細胞が生存している（図1）が、すでに細胞死のトリガーは引かれているということを示唆している。さらに時間が経過すると細胞表面にはアポトーシス小体様のものが観察されるようになる。　またDNAの断片化も認められたが、その程度は少なかった。このことは神経細胞の死に時間的なズレがあることと関係しているのかもしれない。

以上のことから、Caイオノフォアであるイオノマイシンによる神経細胞死はアポトーシス様のものであると考えられた。　今後はその細胞内メカニズムに関して検討する予定である。

［謝辞］

本研究の初期の段階は国立精神神経センター神経研究所代謝研究部で行なわれた。　大澤圭子研究員の協力と高坂新一部長の支援に深く感謝致します。

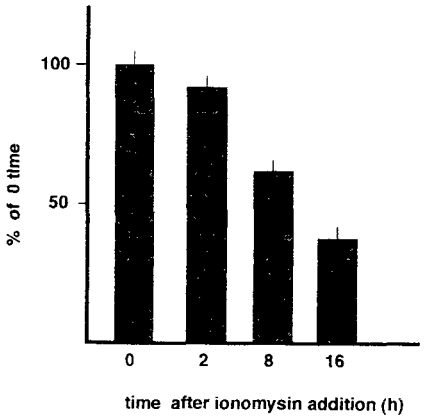


図1：イオノマイシン添加後の時間経過にともなう生存神経細胞の割合。

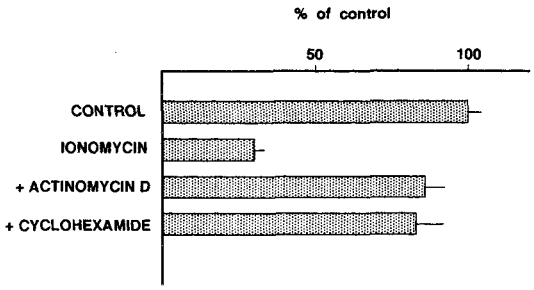


図2：アクチノマイシンD及びサイクロヘキサミドによるイオノマイシン細胞毒性の抑制。



図3：イオノマイシン添加2時間後の神経細胞の透過型電子顕微鏡像。

［文献］

(1) Williams,C.T. et al. (1992) Trends Cell Biol. 2 263-267

(2) Takei, N. et al. (1991) J. Neurochem. 57 1178-1184

(3) Endo, Y. et al. (1991) Biomed. Res. 12 211-214

36 抗Fas抗体による培養グリオーマ細胞のapoptosis誘導

白石哲也、中川摂子、木原俊壱、田渕和雄
（佐賀医大・脳神経外科）

〔要約〕 Apoptosisによる細胞死は炎症反応を惹起し難いため抗腫瘍療法に有利である。抗Fas抗体はFas抗原を発現している細胞に対してapoptosisを誘導する事が知られている。4種の培養グリオーマ細胞におけるFas抗原の発現と抗Fas抗体によるapoptosisの誘導を検討した。免疫組織化学およびflow cytometryによりすべての細胞株にてFas抗原の発現が認められたが、抗Fas抗体による細胞死が誘導できたのは2株のみで、apoptosisに典型的なDNA fragmentationが認められたのはT98Gのみであった。グリオーマでもapoptosisが誘導できたことは今後の脳腫瘍治療開発に新たな視点を提示するものであると思われる。しかしFas抗原が陽性であっても抗Fas抗体でapoptosisが誘導できないものもあり、これらの細胞株ではFas抗原の異常やapoptosis抑制機構の存在等が推定される。

[目的] 細胞死は形態学的に壊死(necrosis)とアポトーシス(apoptosis)とに2大別される。従来の放射線・化学療法は腫瘍細胞の壊死を起こし炎症を惹起しやすい。しかしapoptosisによる細胞死は細胞溶解が起きずに近隣の細胞に貪食されるため炎症反応を惹起しない(1)。このことは頭蓋内圧亢進をきたしやすい脳腫瘍の治療に非常に有利である。1988年、米原らによって開発されたIgM型モノクロナール抗体（抗Fas抗体）はFas抗原を発現している細胞にapoptosisを誘導する働きがあり注目されている(2,3)。本実験は培養グリオーマ細胞におけるFas抗原の発現と抗Fas抗体によるapoptosisの誘導を検討することを目的とした。

[方法] 4種類のグリオーマ細胞株(T98G, U251, KG-1-C, A172)を使用した。抗Fasモノクロナール抗体（MBL社）を一次抗体とした免疫組織化学およびflow cytometryにてFas抗原の発現を観察した。さらに同抗体（50ng/ml）を培養液中に加え、細胞増殖曲線を作製した。細胞死を来たした細胞株からDNAを抽出し、2%アガロースゲルによる電気泳動を行ない、DNA fragmentationの有無を確認した。また抗体処理前後の細胞核の形態変化を光顕および電顕にて確認した。なおnegative controlとしてnon-specific IgM (Sigma)を使用した。

[結果] 免疫組織染色では全4株で細胞質にびまん性に陽性所見が認められた。Flow cytometryではほぼ90%以上の細胞でFas抗原の発現が見られた（図1）。しかし抗体処理では2株（T98G, U251）のみしか細胞死が誘導されなかった（図2）。光顕では細胞死を起こして浮遊した細胞はapoptosisに特徴的な細胞サイズの縮小とクロマチンの凝集およびアポトーシス小体(apoptotic body)が認められた（図3）。電顕でもapoptosisに特徴的な形態を示していた（図4）。細胞死を来たした2株のうちDNA電気泳動で典型的なDNA fragmentationが認められたものはT98Gのみであった（図5）。

[考察] Fas抗原は自己抗原に反応するT細胞(4)やウイルス感染細胞(5)に発現し、それらの除去に関与していることが発見され注目されている。今回我々はグリオーマ細胞でもFas抗原が強く発現されていることを示した。さらに実際に抗Fas抗体処理でapoptosisを誘導できることが確認された。このことは脳腫瘍においてもapoptosisによる細胞死を誘導できる可能性を示したものである。またlpr変異マウスではマウスFas抗原遺伝子の異常により末梢T細胞の除去ができないことが知られている(6)。今回検討したグリオーマ4株ともFas抗原を強く発現していたが、実際に抗Fas抗体でapoptosisを誘導できたのは1株のみであった。この原因として(a) Fas抗原の変異によりapoptosisを誘導する活性がない (b) シグナル伝達系に異常がある (c) bcl-2蛋白などapoptosisを抑制する機構が優位となっているなどが考えられる。

[文献]

(1)Kerr J.F.R., et al. (1972) Br J Cancer 26, 239; (2)Yonehara S., et al. (1989) J Exp Med 169, 1747-56; (3)Itoh N., et al. (1991) Cell 66, 233-43; (4)Owen-Schaub L.B., et al. (1992) Cell Immunol 140, 197-205; (5)Kobayashi N., et al. (1990) Proc Natl Acad Sci U S A 87, 9620-4; (6)Watanabe-Fukunaga R., et al. (1992) Nature 356, 314-7

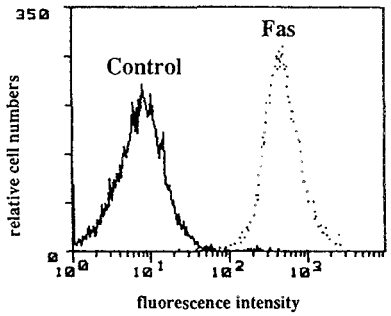


Fig. 1 Flowcytometric analysis of Fas antigen expression in T98G

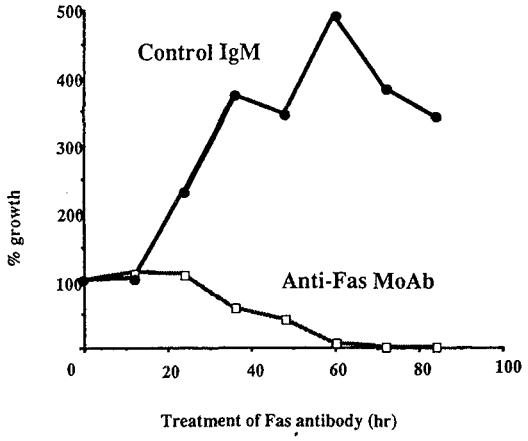


Fig. 2 Cytocidal effect of Fas MoAb in T98G

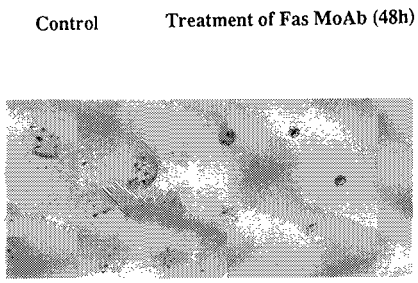


Fig. 3 Morphology of nucleus in T98G

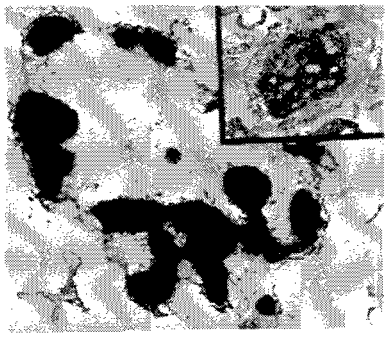


Fig. 4 Electron microscopic analysis of T98G

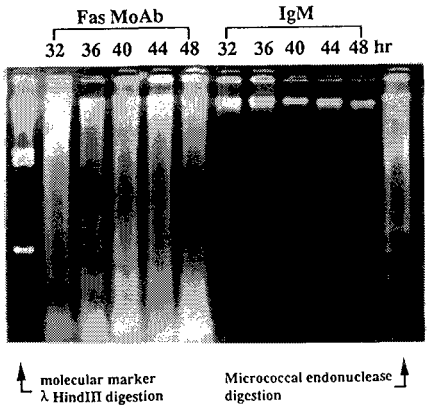


Fig. 5 Analysis of DNA fragmentation in T98G

37 アルツハイマー病脳における クラスリンの分布異常

中村　祐[1,2]、武田雅俊[1]、吉見健二[3]、服部英幸[4]、関　浅男[2]、大嶋正人[2]、
播口之朗[1]、橋本重夫[5]、北嶋省吾[2]、西村　健[1]
（大阪大学医精神[1]、日生病院[2]、三共（株）[3]、美原病院[4]、近畿大第二病理[5]）

〔要約〕Coated vesicleを形成するクラスリンは神経細胞機能に重要な役割を果している。アルツハイマー病脳においてクラスリンの病態への関与を調べるために、4種類の抗クラスリン軽鎖抗体を用いて免疫組織化学的にクラスリンの分布を検討した。対照脳では神経細胞クラスリン軽鎖のみと反応するLCB2抗体にて、海馬錐体細胞周囲は顆粒状に染色されるが、アルツハイマー病海馬ではpatchyに染色が抜けるなど免疫反応性が低下していた。また、対照脳ではLCB2抗体にて神経細胞体は弱く染色されるが、アルツハイマー病脳においては一部の神経細胞体が強く染色された。特にearly-onset typeにて一部の神経原線維変化及び一部の老人斑のcrownがLCB2抗体にて染色された。一方、late-onset typeでは大部分の老人斑は抗クラスリン抗体では染色されなかった。western blotでは対照脳とアルツハイマー病脳をLCB2及びX-16抗体を用いて比較すると、分子量、蛋白量、分解産物において明瞭な差異は認められなかった。以上のことからアルツハイマー病においてクラスリンの輸送に障害があり、そのために神経原線維変化や老人斑を形成することが示唆され、クラスリンの動態を解明することはアルツハイマー病の病態を解明する上で有用であると思われる。

我々はこれまでにアルツハイマー病の病態にカテプシンDなどのライソゾーム蛋白分解酵素が関与していることを示してきた[4]。今回、ライソゾーム酵素などの糖蛋白などのsortingに関与し、また、アミロイド前駆体蛋白の代謝にも関与していると考えられているクラスリンについてアルツハイマー病脳において免疫組織化学的に検討した。

［方法］

アルツハイマー病脳（early-onset type 2例、late-onset type 4例）、対照脳5例の海馬パラフィン切片（4μm厚）を以下の表に示す抗体にてVectastain kitを用いて染色した。また、アルツハイマー病海馬及び対照脳海馬を 8 M urea/ 10 mM Bis-Tris/ pH6.5にてホモジェネイトし、western blotを行った。

［結果］

1：対照脳では、神経細胞のクラスリン軽鎖のみと反応するLCB2抗体にて、海馬錐体細胞周囲は顆粒状に染色されるが、アルツハイマー病海馬ではpatchyに染色が抜けるなど免疫反応性が低下していた（**図1**）[7]。尚、X-16抗体は対照脳及びアルツハイマー病脳においてLCB2抗体で見られる顆粒状の構造を染色しない。これは神経終末にはfreeなクラスリンの存在量がごく少ないためであると考えられる。LCB1での染色patternは、LCB2によるものとほぼ同様であった。また、CON1での染色patternはX-16によるものとほぼ同様であった。

2：対照脳では。LCB2及びX-16抗体にて神経細胞体は弱く染色されるが、アルツハイマー病脳においては一部の神経細胞体が強く染色された（**図1**）。また、特にearly-onset typeにて一部の神経原線維変化がLCB2にて強く染色された（**図2**）。

3：アルツハイマー病脳にて特にearly-onset typeにて一部の老人斑のcrownが、LCB2抗体にて染色された（**図3**）。late-onset typeでは大部分の老人斑は抗クラスリン抗体では染色されなかった。

4：western blottでは対照脳とアルツハイマー病脳をLCB2及びX-16抗体を用いて比較すると、分子量、蛋白量分解産物において明瞭な差異は認められなかった（**図4**）。

［考察］

クラスリンはreceptor-meidate endocytosisやprotein sortingに関与している。神経細胞においては、シナプス終末にその含量が多く、軸索流（ＳＣｂ）にて輸送されている[1]。アミロイド前駆体蛋白のＣ末にクラスリン関与のendocytosisを起こす配列があり[3]、またＡＰＰとGoが結合することからクラスリンがＡＰＰのsortingに関与している可能性が示唆される[5]。我々は牛脳より精製したcoated vesicle分画に少量のＡＰＰが含まれていることを確認しており脳組織においてＡＰＰの代謝にクラスリンが関与すると考えられる。

今回、アルツハイマー病脳６例にて抗クラスリン軽鎖抗体を用いて、クラスリンのその病態への関与を検討した。まず、海馬錐体細胞層に投射している神経終末に存在するクラスリン量は減少し、一部では欠落していることが見られた。また、逆に一部の神経細胞体はクラスリン抗体に強く反応し、細胞体内のクラスリン含量の増加が示唆された。また、western blotでは対照脳とアルツハイマー病脳をLCB2及びX-16抗体を用いて比較すると、分子量、蛋白量、分解産物において明瞭な差異は認められないことからから、アルツハイマー病では軸索流の障害によりクラスリンの分布に変化が生じたと考えられる。また、虚血ジャービル海馬においてクラスリンの分布の変化を見いだしており[8]、これらクラスリンの分布の異常は神経細胞の障害と関連のあるものと考えられる。

また、特にeraly-onset typeのアルツハイマー病において一部の神経原線維変化や老人斑ががLCB2抗体にて染色されたことは、神経原線維変化の形成や老人斑の形成ににクラスリンが関与していることを示唆している。late-onset typeではこの様な所見は多くみられず、病期の進行と共に神経原線維変化や老人斑に存在するクラスリンの免疫反応性が失われていくと考えられる。

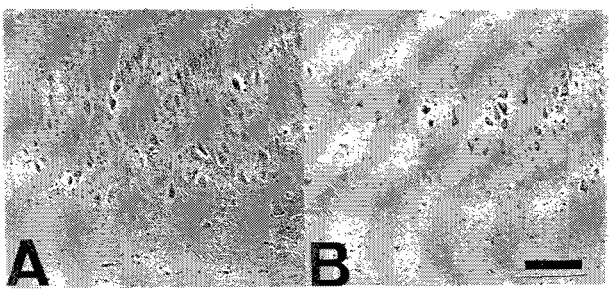
以上のことからアルツハイマー病においては軸索流に障害があり、クラスリンなどの蛋白の分布障害が発生し、そのために神経原線維変化や老人斑を形成することが示唆され、クラスリンの動態を解明することはアルツハイマー病の病態を解明する上で有用であると思われる。

使用抗体

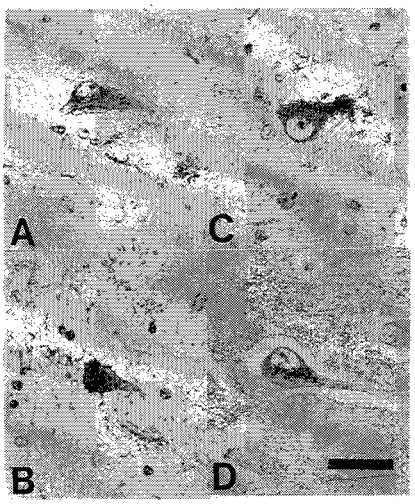
LCB2：clathrin light chain b,neuron-specific insert(assembled form)に反応[2,7]
X-16：clathrin light chain aのfree formに反応[2,7]
LCB1：clathrin light chain bのN末端に反応[2]
CON1：clathrin light chain a及びbの共通配列に反応[6]
何れもmonoclonal抗体、Brodsky FM博士より提供

[参考文献]

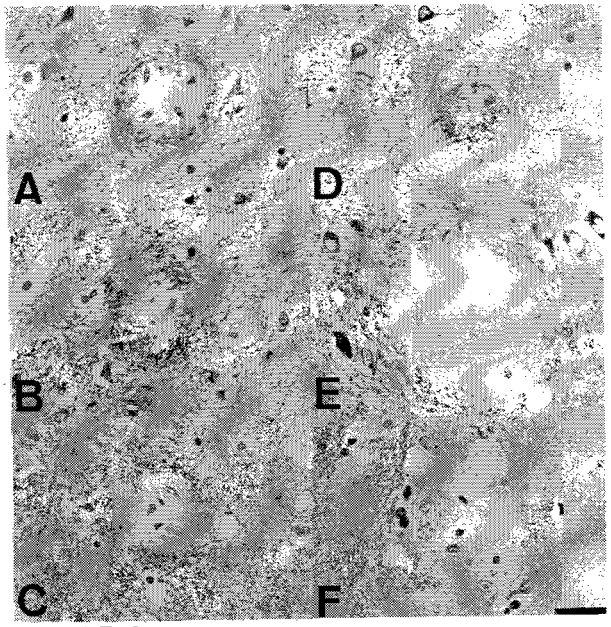
[1]Black MM, et al., J Neurosci 11(1991)1163-1172. [2]Brodsky FM, et al., Nature 326(1987)203-205.
[3]Chen WJ, et al., JBC 265(1990)3116-3123. [4]Nakamura Y, et al., Neurosci Lett 130(1991)195-198.
[5]Nishimoto I, et al., Nature 362(1993)75-79. [6]Nathke IS, et al., Cell 66(1992)899-910.
[7]Wong DH, et al., J Neurosci 10(1990)3025-3031. [8]Yoshimi K, et al., Brain Res 560(1991)149-158.



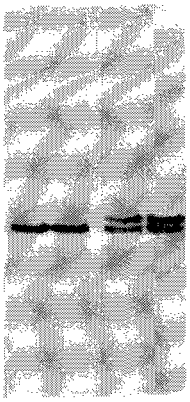
[図1]
LCB2抗体による海馬ＣＡ２領域の免疫組織化学染色
A：対照脳　**B**：アルツハイマー病脳(early-onset type)
Bar: 200μm



[図2]
LCB2抗体により染色される神経原線維変化
A、**B**：early-onset type, ＣＡ１
C：early-onset type, 海馬脚
D：late-onset type, ＣＡ１
Bar: 50μm



[図3]
LCB2抗体により染色される老人斑
A：early-onset type, ＣＡ１
B：late-onset type, ＣＡ１
C：early-onset type, ＣＡ２
D：early-onset type, 前頭葉皮質
E：early-onset type, 前頭葉皮質
F：late-onset type, ＣＡ１
Bar: 50μm



[図4]
対照脳及びアルツハイマー病脳海馬ホモジェネイトの
LCB2抗体（**1**、**2**）及びX-16抗体（**3**、**4**）によるwestern blot
1、**3**：対照脳海馬
2、**4**：アルツハイマー病脳(early-onset type)

38 シナプスにおけるアミロイド前駆体蛋白の局在に関する検討

下川雅丈，柳澤勝彦，西江　弘*、宮武　正
（東京医科歯科大学医学部神経内科、*順天堂大学医学部第二生理）

〔要約〕　ラット大脳ホモジネートからMatusらの方法に従いショ糖密度勾配遠心によってsynaptic plasma membraneを分離した．また，ラット大脳皮質ホモジネートから西江らの方法によりシナプス小胞を精製した．synaptic plasma membraneおよびシナプス小胞をアミロイド前駆体蛋白(APP)に対するポリクローナル抗体およびsynaptophysinに対するモノクローナル抗体を用いてECL Western blot法で検討した．synaptophysinの免疫反応性はsynaptic plasma membraneとシナプス小胞の両者に認められた．一方，APP の免疫反応性は大脳皮質ホモジネートに比してsynaptic plasma membraneにおいて強く認められたが，シナプス小胞においては明らかでなかった．この事実は，APPはシナプスの膜に局在していることを示す．APPは種を越えて保存されている重要な蛋白であり，シナプスの膜において何らかの生理機能を担っていると推察される．

目的：アミロイド前駆体蛋白（ APP ）の生理的機能は不明である．今回，我々はシナプスにおける APP の局在を明らかにすることを目的に，synaptic plasma membraneおよびシナプス小胞を分離し，免疫生化学的に検討した．

方法：Sprague-Dawley ラット雄６匹より大脳を摘出し，Teflon-glass homogenizerにてホモジネートを作製した．これを Matus ら(1)の方法に従い分画し，粗ミトコンドリア画分を分離し，ショ糖密度勾配遠心によりsynaptic plasma membrane 画分を分離した．

また，Sprague-Dawley ラット大脳皮質から西江らの方法（ Nishiye et al. in preparation)によりシナプス小胞を精製した．

synaptic plasma membrane画分，シナプス小胞およびこれらの精製途中画分をSDS-PAGEにて分離し，抗 synaptophysinモノクローナル抗体（ DAKOPATTS社製）および APP のC末側， N末側に対するポリクローナル抗体（東京大学　井原康夫教授提供）を用い，ECL Western blot を行った．

結果：1. synaptic plasma membrane画分およびシナプス小胞中に分子量38kdのsynaptophysinの強い免疫反応性を認めた(図1，2)．
2. synaptic plasma membrane 画分に分子量約105kdの強いAPP免疫反応性を認めた．これはAPPのN末側に対する抗体の吸収試験で消失した(図1)．
3. シナプス小胞には APP免疫反応性は認められなかった(図2)．

考察：APPは種を越えてよく保存されている蛋白であり，生体内で重要な役割を担っていると推測されている．しかし，その生理機能は解明されていない．APPは神経細胞でも合成されており，その一部は軸索輸送によりシナプスに運ばれている(2)．結果2よりAPPはsynaptic plasma membrane画分に存在すると考えられた．この画分にはシナプスの膜，シナプス小胞，少量のミトコンドリアなどが含まれているが(1)，結果3からシナプス小胞にはAPPは存在しない．したがってAPPは主にシナプスの膜に存在し，シナプスにおける何らかの生理機能を担っていると推察される．アルツハイマー病では前頭葉や側頭葉を中心にシナプスの減少が報告されている(3)．また，老人斑にはアミロイドβ/A4蛋白とともにsynaptophysinも存在している(4)．シナプス膜のAPPの異常な分解がシナプス減少や老人斑の形成に関与している可能性がある．

結論：APPはシナプスの膜に存在し，何らかの生理機能を担っていると推察された．

参考文献：
(1). Jones, D.H. & Matus, A.I. (1974) Biochimi. Biophys. Acta, 356, 276-287
(2). Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fisher, P., Masters, C.L. & Price, D.L. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 1561-1565
(3). Sceff, S.W. & Price, D.A. (1993) Ann. Neurol., 33, 190-199
(4). Brion, J-P. (1991) Brain Res., 539, 143-150
(5). Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dircksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L. & Beyreuther, K. (1991) Brain Res., 563, 184-194
(6). Shigematsu, K., McGeer, P.L. & McGeer, E.G. (1992) Brain Res., 592, 353-357

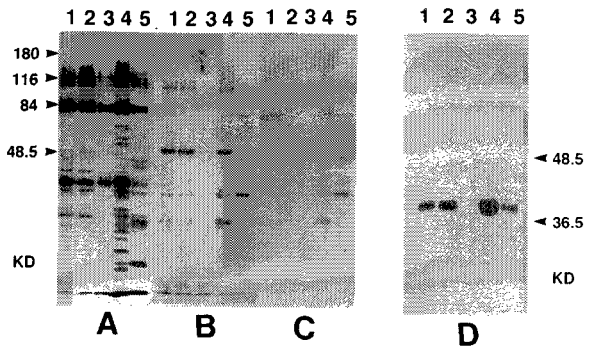


図1 synaptic plasma membraneのwestern blot analysis
lane 1:大脳ホモジネート, lane 2:粗ミトコンドリア画分, lane3:ミエリン画分,
lane 4:synaptic plasma membrane画分, lane 5:ミトコンドリア画分
A:APPのC末に対する抗体 B:APPのN末に対する抗体 C:APPのN末に対する抗体の吸収試験
D:synaptophysinに対する抗体

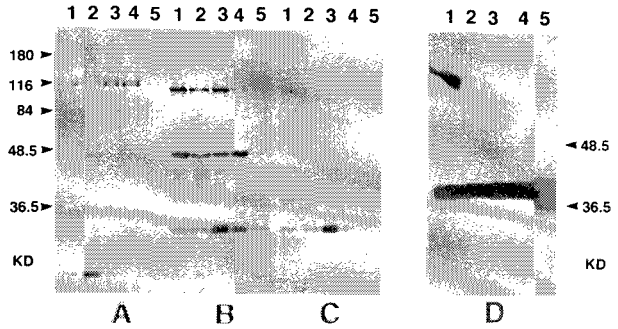


図2 シナプス小胞のwestern blot analysis
lane 1:大脳皮質ホモジネート, lane 5:シナプス小胞 (lane 2～4は精製途中の画分)
A:APPのC末に対する抗体 B:APPのN末に対する抗体 C:APPのN末に対する抗体の吸収試験
D:synaptophysinに対する抗体

39 アミロイド前駆体蛋白の蓄積に関連する蛋白の検索 -イボテン酸によるラット海馬破壊部位において-

新川久義[1,2]、武田雅俊[1]、中村　祐[1,3]、迫田慎一郎[1]、播口之朗[1]、北嶋省吾[3]、西村　健[1]
(大阪大学医精神[1]・狭山病院[2]・日生病院[3])

〔要約〕イボテン酸をラット片側海馬に大量に注入すると100日後に破壊部にβ-アミロイド前駆体蛋白（ＡＰＰ）の大量の蓄積が見られる。ＡＰＰの蓄積のメカニズムを探るために種々の抗体を用いて、ＡＰＰの蓄積と関連のある蛋白を免疫組織化学的に検討した。破壊部位に顆粒状に蓄積しているＡＰＰとその分布が、検索した蛋白の中で最も一致するのはカテプシンＤであった。一部が一致していると考えられるのは、MAP1B、クラスリン軽鎖、ミクログリアのマーカーのひとつであるＩａ、ユビキチンにであった。GFAPはほぼ萎縮海馬全域に見られ、また、シナプトフィジン、ニューロフィラメント、MAP2は全体に高度の減少が見られた。これらの結果からＡＰＰの蓄積にカテプシンＤなどのライソゾーム酵素が関与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。また、最近アルツハイマー病脳においてglutamine synthetaseの活性が上昇していることが報告され、glutamateの代謝系の異常が示唆されている[1]。我々は、グルタミン酸受容体のアゴニストであるイボテン酸を大量に海馬実質内に注入することにより破壊部位にＡＰＰが蓄積することを報告してきた[2]。今回、ＡＰＰの蓄積がどの様な蛋白と関連しているのかを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部位に注入した。その後100日間飼育し、10%formalin/PBSにて灌流した[2,4,5]。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/0.1% Triton X-100にてVectastain kitを用い染色しDABにて発色させた。

[抗体及び希釈]

抗原（名称）	種類	希釈	source
APP(60-100, 22C11)	mono	2.5μg/ml	(Boehringer Mannheim)[4-6]
cathepsin D	poly	300×	[2]
synaptophysin(SY38)	mono	1.0μg/ml	(Boehringer Mannheim)
MAP1B	mono	1.0μg/ml	(Amersham)
MAP2	mono	1.0μg/ml	(Amersham)
NF-H	mono	1.0μg/ml	(Amersham)
tau(tau-1)	mono	1.0μg/ml	(Boehringer Mannheim)
Alz-50	mono	10×	(gift of Davies P)
ubiquitin	mono	1.0μg/ml	(Chemicon)
clathrin LCb(LCB2)	mono	1.0μg/ml	(gift of Brodsky FM)
GHAP-head(aGH)	poly	0.1μg/ml	[3]
RAT-Ia(OX-6)	mono	1000×	(Biosys. S.A.)

[結果・考察]

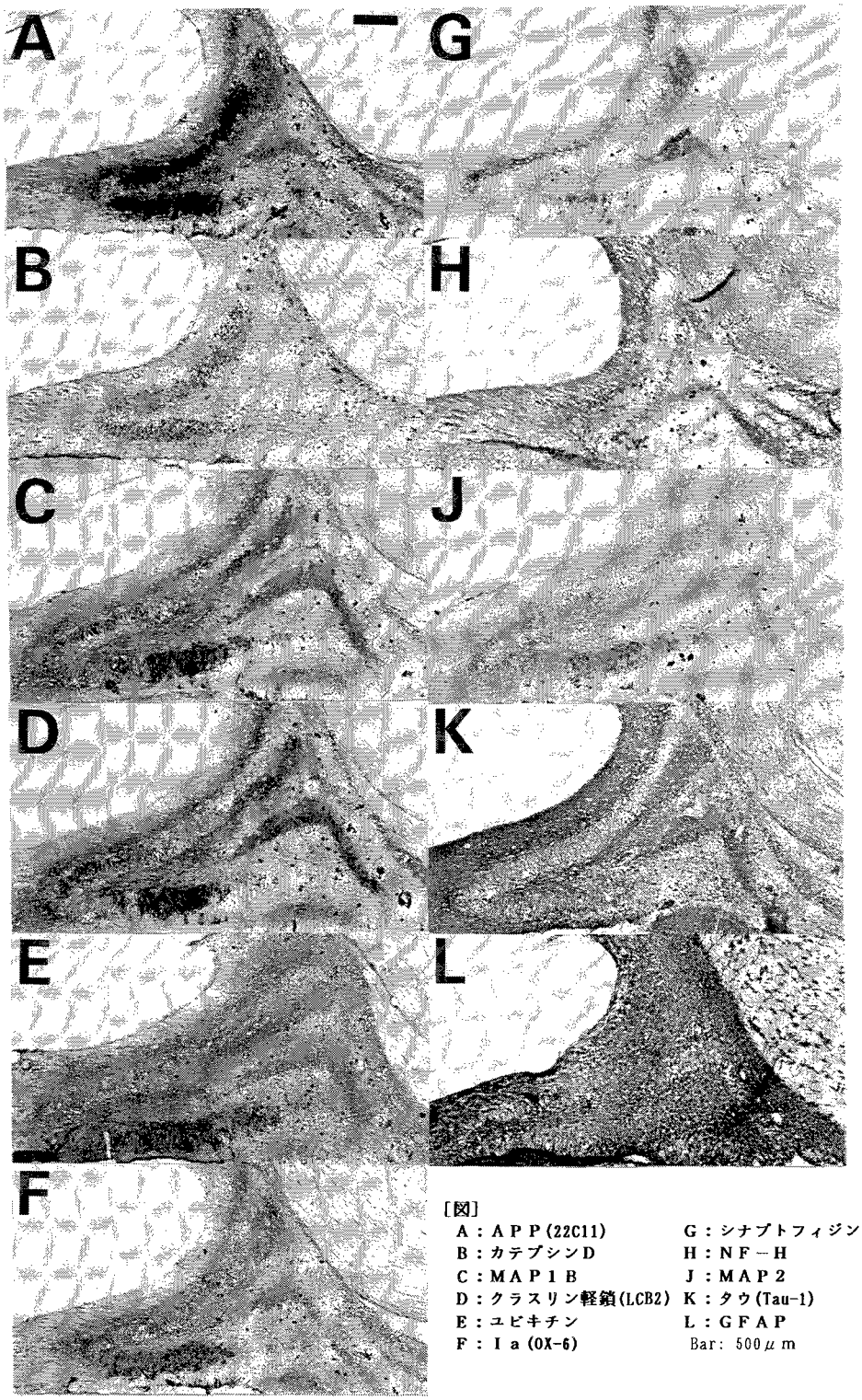
イボテン酸を3ヵ所に注入した例では破壊側は高度に萎縮を呈し、注入部位の確認は困難であった。22C11抗体では破壊部に顆粒状のＡＰＰの大量の蓄積がみられるが、蓄積しているＡＰＰとその分布が、検索した蛋白の中で免疫組織化学上最も一致するのはカテプシンＤであった。一部が一致していると考えられるのは、MAP1B、クラスリン軽鎖、ミクログリアのマーカーのひとつであるＩａ（OX-6）、ユビキチンにであった。GFAPはほぼ萎縮海馬全域に見られ、また、シナプトフィジン、ニューロフィラメント、MAP2は全体に高度の減少が見られた。

これらの結果からＡＰＰの蓄積にカテプシンＤなどのライソゾーム酵素が関与していることが示唆された。細胞骨格蛋白では、障害に脆弱であるMAP2が高度に減少しているに対してMAP1Bは残存し、一部ＡＰＰと免疫染色上一致しており、ＡＰＰの蓄積の過程に関与すると考えられる。また、tauはＡＰＰの蓄積と一致する部分があまり見られず、残存した神経突起・軸索に含まれていると思われる。尚、Alz-50での染色では全く陽性の構造物は見られなかった(Data not shown)。また、蛋白の代謝や輸送に関係あるユビキチンやクラスリン軽鎖の分布はほぼ一致し、coated vesicle内の代謝にユビキチンが関与しているという報告があることから、coated vesicleを介する代謝系の活性化が考えられる。これらの分布が一部蓄積したＡＰＰと一致し、また、顆粒状でないＡＰＰの染色部位と一致することから、ＡＰＰの代謝にクラスリンが関与することが示唆される。

microgliaのmarkerであるIa（OX-6）では顆粒状に蓄積したＡＰＰの周囲が染色され、RCA-1による染色も同様であり(Data not shown)、ＡＰＰの蓄積の生じている部分にmicrogliaの活性化が生じていると考えられる。またシナプトフィジンは高度に減少しており、破壊側での神経細胞機能の低下を反映しているものと考えられる。以上のことから、ＡＰＰの蓄積のメカニズムを解明する上で本実験系は有用であると思われる。

[参考文献]

1]Gunnersen D, Haley B (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89, 11949-11953. 2]Nakamura Y, Takeda M, Suzuki H, et al.(1991) Neurosci Lett 130, 195-198. 3]Nakamura Y, Takeda M, Niigawa H, et al. (1992) Neurosci Lett 136, 95-98. 4]中村　祐、他.(1992) 神経化学 31,100-101. 5]新川久義、他. (1992) 神経化学 31, 98-99. 5]Wiedermann A, Konig G, Bunke D, et al.(1989) Cell 57, 115-126.



[図]

A：ＡＰＰ(22C11)	G：シナプトフィジン(SY38)
B：カテプシンＤ	H：ＮＦ－Ｈ
C：ＭＡＰ１Ｂ	J：ＭＡＰ２
D：クラスリン軽鎖(LCB2)	K：タウ(Tau-1)
E：ユビキチン	L：ＧＦＡＰ
F：Ｉａ(OX-6)	Bar: 500μm

40 βアミロイドペプチドの二次構造とミトコンドリア機能低下活性との関係

亀之園正弘[1]，桜庭祐子[1]，山田紀子[1]，堤　信也[2]，木下　武[2]，金子　勲[1]
（三共(株)，[1]バイオサイエンス研，[2]分析代謝研）

〔要約〕βアミロイドペプチド(β25-35)を通常のFmoc法で合成すると，一部脱水体〔dehydro-Ser^{26}〕β25-35が生じることが分かり，それにH_2Oが付加し一部ラセミ体が生成する可能性が考えられた。そこで，D-アミノ酸を含む各種β25-35置換体を合成し，βアミロイドの作用点の一つと考えられるミトコンドリア電子伝達系活性(MTT還元能)低下作用を比較した結果，〔D-Ser^{26}〕β25-35はβ25-35と同様に強いMTT還元能低下活性を示した。これら二つのペプチドの活性は溶解法によって大きく変化し，培地(MEM or PBS)中に直接溶解(A法)すると強い活性を示すが，酸性条件で溶解後培地に添加(B法)すると，活性は大幅に低下した。CDスペクトル解析の結果から，β25-35及び〔D-Ser^{26}〕β25-35はともにpH 2ではランダム構造を，pH 7～8ではβ構造をとり，また活性が発現されるA法ではβ構造を，活性が発現されないB法ではランダム構造のままであった。従って，β25-35及びそのD-Ser^{26}置換体はβ構造の時に活性を発揮するものと推定した。

〔序文〕　βアミロイドペプチドβ1-40及びそのフラグメントβ25-35 (^{25}GSNKGAIIGLM^{35})が海馬神経細胞を変性・壊死させると報告されて以来(1)，多くの追試が行われているが必ずしも一定の結果が得られていない(2)。我々はその原因として，海馬神経細胞培養法及びその生死判定法の難しさとともに，合成βアミロイドペプチドの純度及びその溶液中での高次構造の変化に問題があるのではないかと考えた。我々はβアミロイドの作用点を追求した結果，βアミロイドペプチドがPC12細胞，HeLa細胞のミトコンドリアの電子伝達系活性を反映するMTT還元能(succinate dehydrogenaseによる)を特異的に低下させることを見出した。そこで，βアミロイドのミトコンドリア機能(MTT還元能)低下活性を指標として，合成βアミロイドペプチドの高次構造と活性との関係及び合成ペプチド中に含まれる副生成物について検討した。

〔方法〕

1)ペプチド合成：βアミロイドペプチド及びその関連ペプチドはABI社の430 A Peptide Synthesizerを用いてFmoc法(HDBT/NMP Cycle)で合成した。得られたペプチドは0.1％TFA-アセトニトリル(CH_3CN)中でC18或いはC4逆相HPLCで単離・精製し，無菌的に凍結乾燥後，-20℃で保存した。

2)ペプチド分析：得られたペプチドはアミノ酸組成分析，N末端アミノ酸配列分析，D/L-アミノ酸分析(FLEC法)及びFABMS(TMS-SX/SX102Aタンデム型質量分析装置)によって確認した。すなわち，アミノ酸組成分析はペプチドを加水分解後，日立Amino acid analyzer L-8500で行い，N末端アミノ酸配列分析はABI社の475A Protein Sequencerで行った。D/L-アミノ酸分析はペプチドを常法に従って加水分解後，FLEC〔(+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate〕試薬と反応させた後，逆相HPLCで分析した(3)。また，ペプチドの二次構造は円二色性(CD)スペクトルによって解析した。

3)細胞培養及びMTT還元能測定：HeLa細胞は10%FBS/MEM中，PC12細胞は10%GIT/DMEM中で96穴plateで培養した。MTT還元能測定は常法に従った(4)。各種βアミロイドペプチド類は特に記載しないかぎり，凍結乾燥したペプチドに培地を添加し，超音波処理で溶解後，培地で希釈し細胞に添加した。

〔結果と考察〕

1)βアミロイド合成ペプチドの問題点

β25-35 (^{25}GSNKGAIIGLM^{35})を通常のFmoc法で合成し，その生成物をC18HPLCで分離・精製し，FABMSで分子量及び構造を解析した結果，目的のβ25-35の他に26番目のSerの水酸基が脱水したデヒドロ体〔dehydro-Ser^{26}〕β25-35が副産物(20%程度)として生成されることが分かった。このデヒドロ体はC18HPLCではβ25-35のすぐ後に溶出され，通常の加水分解ではβ25-35と同じアミノ酸組成値を示し，またN末アミノ酸配列分析においてもβ25-35と同じ配列結果を示した。さらに，デヒドロ体は0.7% NH_3水中で室温で1 h放置すると一部H_2Oが付加しβ25-35に戻った。D/L-アミノ酸分析の結果，戻ったβ25-35のSer^{26}の大部分はL型であったが，保存或いは合成中の条件によっては一部D型Serのものが混在してくる可能性は否定できない。脱水

体の生成はβ25-35 の配列に依存しており，他の配列中のSer では脱水体は生じない。また，Fmoc-Asnの代わりにトリチル(Trt) 基で保護したFmoc-Asn(Trt) を用いるとデヒドロ体は殆ど生成しない。現在，殆どの研究室でFmoc法によりペプチドを合成しており，このペプチドを合成する際には共通の問題が生じている可能性がある。

2) D -アミノ酸置換β25-35 の活性

以上のこと及びアルツハイマー病患者のβアミロイドペプチドの中には 2 ～5%ものD-Asp，D-Serが存在することが報告(5) されていることを考慮して，β25-35 のL-Ser^{26} をD-Ser^{26} に置換した〔D-Ser^{26}〕β25-35 などを合成し，L 型のβ25-35 とのミトコンドリアMTT 還元能低下活性を比較した。その結果，〔D-Ser^{26}〕β25-35 はβ25-35 とほぼ同程度の強い活性を発揮した。一方，Asn^{27} をAsp^{27} に置換すると活性は約1/1000に低下し，また〔D-Ser^{26},D-Asp^{27}〕β25-35 には全く活性がなかった（図1）。このことはMTT 還元能低下活性はβアミロイドのアミノ酸配列と同時にその高次構造に強く依存することを示唆する。

3) βアミロイドペプチドの二次構造と活性発現

凍結乾燥したβ25-35 或いは〔D-Ser^{26}〕β25-35 に培地(MEM或いはPBS)を直接添加し，超音波処理により溶解後，培地で希釈した場合と，Yankner らの方法に準じて0.1% TFA-20%CH_3CN, 0.1%TFA, 0.03N HCl などで溶解後，培地で希釈し(pH を補正)，細胞に添加した場合とで，MTT 還元能低下活性を比較した。その結果，酸性溶液やCH_3CN で前処理した場合(B法とする) は，MEM 或いはPBS で処理した場合(A法とする) に比べると，MTT 還元能低下活性が約1/50～1/500 に低下することが分かった（図2）。βアミロイドペプチドの二次構造をCDスペクトルによって解析したところ，β25-35 及び〔D-Ser^{26}〕β25-35 はいずれもpH 2ではランダム構造をpH 7～8ではβ構造をとることが明らかになった（図3）。また，どちらのペプチドも活性が発現されるA 法ではβ構造をとるが，活性が発現されないB 法ではランダム構造をとることが判明した。以上の結果から，β25-35 及び〔D-Ser^{26}〕β25-35 はβ構造をとる時にMTT 還元能低下活性を発現するものと推定した。

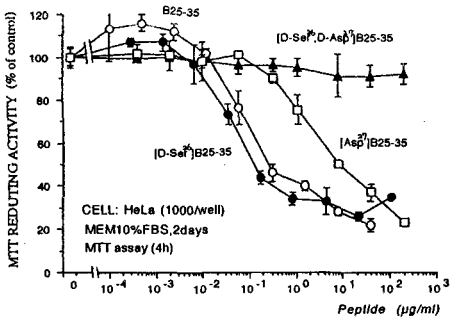


図1．HeLa細胞に対するアミロイドβ蛋白関連ペプチドの作用

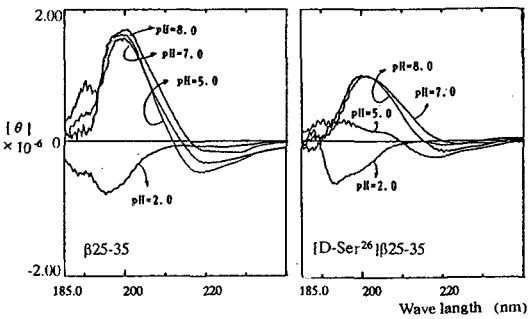


図3．CDスペクトルpH依存性

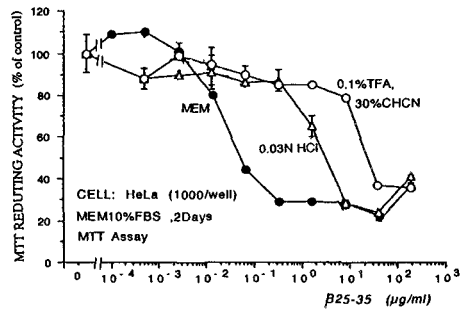


図2．β25-35の活性発現に影響を及ぼす添加条件

文献

1) Yankner,B.A. et al (1990) Science, 250,279-282
2) Kowall, N.W. et al (1992) Neurobiology of Aging 13,536-625
3) Einarsson, S. et al (1991) Anal.Chem. 59,1191-1195
4) Mosmann, T et al(1983) J. Immun. Methods,65, 55
5) Shapira. R. et al (1988) J. Neurochem. 50,69-74

41 PHF-tauおよび胎児型tauのin vitro微小管重合促進能

吉田裕孝、井原康夫
（東京大学医学部脳研究施設）

〔要約〕

リン酸化依存性PHF抗体の反応性から、PHF-tauと胎児型tauのリン酸化状態は類似していることが示された。そこで両者は機能的にも同様であるかを検討するため、in vitroにおける微小管重合促進能を測定した。その結果、PHF-tauではほとんど重合促進能はみられなかたのに対し、胎児型tauではその活性は低いものの重合能はみられた。また、微小管に対する結合能を調べた結果、PHF-tauでは微小管に対する親和性は非常に低かったのに対し、胎児型tauではその過剰リン酸化種においても結合能は保持されていた。脱リン酸化後PHF-tauの機能は正常tauとほぼ同程度まで回復した。①PHF-tauおよび胎児型tauにはリン酸化以外の修飾は見つかっていない；②免疫化学的・タンパク化学的解析からPHF-tauは胎児型tauよりもリン酸化を受けていることが示唆されている、ので上記の著しい差はリン酸化の量的な差によるものと考えられた。

［目的］

paired helical filaments (PHF)は神経原線維変化の単位であり、アルツハイマー病脳の特定の神経細胞内に蓄積する。これまでの研究からPHFは異常リン酸化をうけたtauが主な構成成分であることが示されている(1)。また胎児型tauは成人型のtauに比べ、多くのリン酸化を受けていることが知られている。さらに、サルコシル不溶性PHFを抗原として得られた抗体（リン酸化依存性）は胎児型tauと反応することから、胎児型tauはPHF-tauと類似したリン酸化状態を有することが示唆されている(2,3)。本研究ではPHF-tauと胎児型tauとに機能的な差を調べるため、in vitroにおける微小管重合促進能を測定した。

［方法］

PHF-tauはアルツハイマー病脳サルコシル不溶性画分から、胎児型tauは1日齢ラット脳より精製した(2,4)。tauの脱リン酸化はalkaline phosphatase (E. coli Type III)を用い、プロテアーゼ・インヒビターを含む50mM Tris-HCl(pH8.3)緩衝液中で、67℃、2時間処理した(5)。

tauによる微小管重合促進能は濁度上昇を測定することにより求めた。0.1mg/ml tauを含む重合緩衝液（0.1M MES pH 6.5、1mM EGTA、0.5mM $MgCl_2$、1mM GTPおよび1mM DTT）に種々の濃度のＰＣチューブリンを加え、37℃にてインキュベートし、45分後の濁度を重合能を示す値とした。tauの微小管結合能はタキソール微小管を用いて調べた。20μMタキソールを含む重合緩衝液に最終濃度0.5mg/mlとなるようにチューブリンを加え、37℃にて15分間インキュベートした。これに0.05mg/mlとなるようtauを加え、さらに37℃にて15分間インキュベート後、遠心分離し、上清と沈渣内のtauを抗tau抗体（anti-human tauおよびC5)を用いて検出した。

［結果］

tauのリン酸化状態を調べるために3種類のモノクローナル抗体を用いてイムノブロットを行った。非リン酸化tauを認識するtau 1によりPHF-tauは認識されないが、胎児型tauはそのブロードなバンドの低分子量部分が弱く認識された。次にリン酸化依存性PHF抗体M4およびC5に対する反応を調べた。M4に対してPHF-tauおよび胎児型tauは共に強く反応した。しかしC5は胎児型tauのバンドの高分子量領域のみを弱く認識した。したがって、以上の結果からPHF-と胎児型tauとは類似したリン酸化状態をもつものの、その程度に違いのあることが予想された。

つぎにPHF-tauと胎児型tauのin vitroにおける微小管重合促進能を測定した。PHF-tauにはほとんど微小管重合促進能はみられなかったが、胎児型tauでは成人型tauに比べ低いな

がらも重合促進能は存在した。脱リン酸化後、両者の微小管重合促進能は成人型tauとほぼ同程度まで回復した。さらに、この結果が微小管に対する親和性によるものかをタキソール微小管をもちいて検討した。PHF-tauではそのほとんどが微小管非結合画分に回収されたのに対して、胎児型tauでは過剰リン酸化種（C5-positiveおよびtau 1-negative）も結合画分に回収され、微小管結合能にも差のあることが示された。PHF-tauの微小管結合能は脱リン酸化後回復することも確認された。

［考察］

脳内のtauのイソフォームの多様性は発達段階によって変化することが知られており、成人型tauおよびPHF-tauでは微小管結合量域のリピートが3つのものと4つのものとからなるのに対して、胎児型tauでは3リピート型のみからなっている。またN末端の挿入配列は胎児型tauには存在しない。Goedertらの報告によると、3リピート型tauにくらべ4リピート型tauはより重合促進能が高く、N末端の挿入はこれに影響を与えない(6)。以上のことを考慮すると、PHF-tauの微小管重合促進能の低さはそのイソフォームの組成によるものでないと考えられる。

3種のモノクローナル抗体を用いた免疫化学的な結果から、PHF-tauは胎児型のtauよりも、リン酸化されている程度の高いことが示唆されているが、これはタンパク化学的な解析によっても支持されている(7)。また、脱リン酸化後ではその機能が回復すること、現在までのところPHF-tauおよび胎児型tauにはリン酸化以外の修飾が見つかっていないことを考え合わせると、本研究で得られた結果はPHF-tauと胎児型tauにおけるリン酸化の量的な差によると考えられた。

［参考文献］

1. Lee V.M.-Y et al. (1991) Science 251, 675-678.
2. Kanemaru K et al. (1992) J.Neurochem. 58, 1667-1675.
3. Hasegawa M et al. (1993) J.Neurochem. 60, 2068-2077.
4. Hasegawa M et al. (1992) J.Biol. Chem. 267, 17047-17054.
5. Goedert M et al. (1991) Neuron 8, 159-168.
6. Goedert M and Jakes R (1990) EMBO J. 8, 4225-4230.
7. Watanabe A et al. unpublished data.

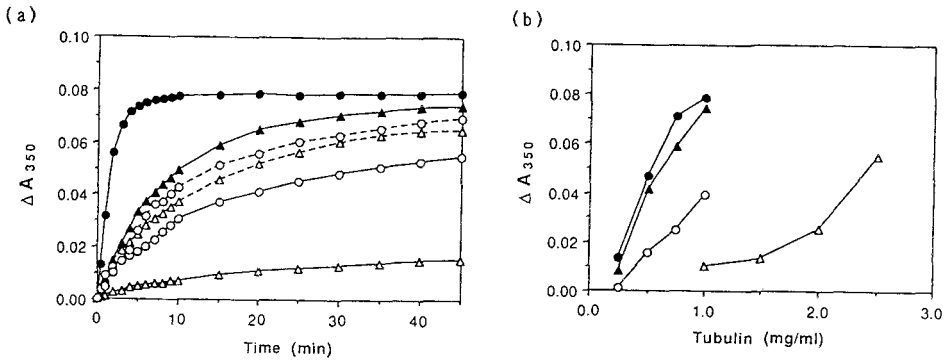


図1　種々のtauの存在下における微小管重合能。(a)濁度上昇の時間変化。PHF-tau(-△-)、脱リン酸化PHF-tau(-△-)、正常成人tau(-▲-)、成熟ラットtau(-●-)、胎児ラットtau(-○-)、および脱リン酸化胎児型tau(-○-)の存在下にて、PCチューブリン(1.0mg/ml)を重合させた。各tau濃度は0.1mg/ml。(b)PHF-tau(△)、正常成人tau(▲)、成熟ラットtau(●)および胎児型tau(○)存在下におけるチューブリンのcritical concentration（臨界濃度）。

42 タウは生体内でproline-directed protein kinase(PDPK)の基質である

渡辺 淳[1・2], 長谷川成人[1], 鈴木政美[3], 瀧尾擴士[4], 森島真帆[1], 千谷晃一[3], 新井孝夫[2], 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], 藤田保健衛生大学総医研[3], 理化学研究所生体分子解析[4])

〔要約〕
リン酸化依存性抗PHF抗体は、PHFタウ及び胎児型タウと反応することから、これら二つの分子には共通のリン酸化部位が存在することが示唆されている。そこで、その相違を明らかにするために、アミノ酸配列分析及び質量分析によって、胎児型タウのリン酸化部位の同定を試みた。その結果、胎児型ラットのタウでは、ラットタウの最も長いイソフォームを基準とすると、Ser-189, -190, -193, -226, -387, -395及びThr-172, -222, また、おそらくSer-391, Thr-208の10箇所がリン酸化されていることが分かった。一方、成熟型のタウでは、Ser-190, -193, -395及びThr-172, -222がリン酸化されていたが、その割合は胎児型タウに較べてかなり低かった。これらのリン酸化部位は、Ser-189, -391を除いてすべてSer/Thr-Proの配列を持つ部位であることから、タウはproline-directed protein kinase(PDPK)の生体内での基質であり、そのリン酸化は発達段階において制御されていることが判明した。

［目的］
アルツハイマー病患者脳の神経細胞内に蓄積するpaired helical filaments (以下PHF) は、異常にリン酸化されたタウを基本骨格としていることが分かっている(1,2)。タウの異常リン酸化の意味については、現在不明であるが、胎児型のリン酸化との類似性が指摘され、注目されている(3,4)。本研究では、PHFタウにおける異常リン酸化と胎児型のリン酸化との比較、及びタウに働くキナーゼの検索をするために、胎児型タウのリン酸化部位の同定を試みた。

［方法］
タウの調製及び臭化シアン (CNBr) 分解；胎児型タウ及び成熟型タウはそれぞれ生後1日齢及び10週齢のラット脳から、硫安分画 (33 - 50%) 、熱処理、ホスホセルロースカラム、TSK - G3000SWXLによるゲルろ過、さらには、逆相HPLC (RP - 300, ABI) を用いて精製した。精製したタウは、CNBrで分解して、逆相HPLC (Select B, Merck) で展開した。
CNBrフラグメントのプロテアーゼ消化；分子量の大きいCNBrフラグメントについては、さらに次にあげたプロテアーゼで消化した。Achromobacter lyticus protease I (API) は、2M尿素を含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH9.0) 中、酵素／基質 (重量比) 1/50で、Pseudomonas fragi endoproteinase Asp-Nは、2M尿素を含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中、酵素／基質 (重量比) 1/10で、トリプシンは、10mM塩化カルシウム、2M尿素を含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中、酵素／基質 (重量比) 1/10で、サーモリシンは、10mM塩化カルシウムを含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中、酵素／基質 (重量比) 1/10の条件で、37℃で一晩中反応させた。そして、これらの消化物は、逆相HPLC (Select B, Merck) で展開し、ペプチドを分離した。
アルカリホスファターゼ処理；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) に懸濁し、アルカリホスファターゼ (E.coli, typeIII R, Sigma) を10u/ml加え、67℃で2時間処理した。
アミノ酸配列及び質量分析；CNBr分解及びプロテアーゼ消化によって得られた各々のペプチドはApplied Biosystem 477A及び473A プロテインシークエンサーを用いて、N末端アミノ酸配列を決定すると共に、ion-spray mass spectrometry (API III, PE-SCIEX) を用いて質量分析を行った(5)。
リン酸化部位の決定；リン酸化ペプチドは、アルカリ条件下でエタンチオール処理した後に、N末端アミノ酸配列分析をし、リン酸化部位の同定を行った(6)。

［結果および考察］
生後一日齢ラットのタウをCNBr分解し逆相HPLCで展開したところ、9つの画分 (CN1-9) が得られた。これらの中でCN4とCN6はアルカリホスファターゼによる脱リン酸化処理によって、逆相HPLCの溶出位置が変化することが示され、リン酸化されていることが示唆された。そこで、CN4とCN6をさらにプロテアーゼで消化し、リン酸化部位の検索を試みた。CN4はAPIさらにはトリプシンを用いて消化し、逆相HPLCで展開した。得られたペプチドをアミノ酸配列及び質量分析を行ったところ、TPPGSGEPPK(172-181)が1箇所リン酸化されたもの、SGYSSPGSPGTPGSR

(186-200)が1箇所、2箇所、及び3箇所リン酸化されたもの、TPSLPTPPTR(203-212)が1箇所リン酸化されたもの、VAVVRTPPK(217-225)が1箇所リン酸化されたもの、VAVVRTPPKSPSASK(217-231)が2箇所リン酸化されたものが存在することが分かった。

一方、CN6はAsp-Nを用いて消化し、アルカリホスファターゼ処理によって変化するペプチドはさらにサーモリシンで消化し、逆相HPLCで展開し、アミノ酸配列及び質量分析を行った。この結果、IVYKSPVVSG(383-392)が1箇所及び2箇所リン酸化されたもの、DTSPRH(393-398)が1箇所リン酸化されたものが存在することが分かった。

これらの中で、VAVVRTPPK(217-225)が1箇所リン酸化されたものについては、そのリン酸化部位はThr-222であることが判明したが、その他のリン酸化ペプチドについては、アルカリ条件下でエタンチオール処理した後にアミノ酸配列分析を行い、リン酸化部位を同定した。この処理をするとリン酸化セリンはS-エチルシステインとして同定される。これにより、Ser-189, -190, -193, -226, -387, -395が同定された。また、TPPGSGEPPK(172-181)が1箇所リン酸化されたペプチドについては、非リン酸化ペプチドと較べて、最初のサイクルのPTH-Thrの回収率が低かったこと、また、S-エチルシステインが読み取れなかったことから、Thr-172がリン酸化されているものと思われた。TPSLPTPPTR(203-212)が1箇所リン酸化されたものについても同様に、6番目のサイクルでPTH-Thrの回収率が低かったこと、また、S-エチルシステインが読み取れなかったことから、Thr-208のリン酸化が示唆された。IVYKSPVVSG(383-392)が2箇所リン酸化されたものについては、S-エチルシステインのシグナルが読み取れたことから、1箇所はSer-387と同定されたが、もう1箇所はシグナルが弱くはっきり同定できなかった。しかし、PTH-Tyrの回収率は悪くなかったこと、また、ホスホチロシンに対するモノクローナル抗体で反応しなかったことなどを考えるとSer-391のリン酸化が示唆された。

以上と全く同様に、10週齢ラットのタウを用いてリン酸化部位を同定したところ、Ser-190, -193, -395, 及びThr-172, -222がリン酸化されていること分かった。また、胎児型タウと成熟型タウのペプチドマップの比較を見ると、その割合も胎児型タウに較べてかなり低かった。

以上のことから、タウのリン酸化部位は、Ser-189, -391を除いてすべてSer/Thr-Proの配列を持つ部位で、タウはPDPKの生体内での基質であることが判明した。PDPKには、cdc2関連キナーゼ、MAPキナーゼ、タウプロテインキナーゼⅠ, Ⅱ及びグリコーゲンシンターゼキナーゼ3がこれまで知られており、これらのキナーゼがタウのリン酸化に関わっているのかも知れない。

PHFタウについては、まだすべてのリン酸化部位の同定はなされていないが、本研究で同定した胎児型タウのリン酸化部位及びタウのペプチドマップは、PHFタウの未同定のリン酸化部位の検索に役立つと思われ、また、タウに働くキナーゼの同定の手がかりを与えるもの思われる。

［文献］

(1)Ihara, Y. et al. (1986) J. Biochem. 99, 1807-1810.
(2)Lee, V. M.-Y. et al. (1991) Science 251, 675-678.
(3)Kanemaru, k. et al. (1992) J. Neurochem. 58, 1667-1675.
(4)Hasegawa, M. et al. (1993) J. Neurochem. 60, 2068-2077.
(5)Hasegawa, M. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 17047-17054.
(6)Meyer, H. E. et al. (1991) Methods Enzymol. 201, 169-185.
(7)Kosik, K. S. et al. (1989) Neuron 2, 1389-1397.

```
                  20                  40                  60                  80
MAEPRQEFDTMEDQAGDYTMLQDQEGDMDHGLK[ESPPQPPADDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVEERAPDKQATA
                 100                 120                 140                 160
QSHTEIPEGTT]AEEAGIGDTPNMEDQAAGHVTQARVAGVSKDRTGNDEKKAKGADGKTGAKIATPRGAATPGQKGTSNAT
            *    180        **  *    200        o         220 *   *           240
RIPAKTTPSPKTPPGSGEPPKSGERSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSASKSRLQTAPVP
                 260                 280                 300                 320
MPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGK[VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS]VQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIH
                 340                 360                 380      *   o   *  400
HKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLS
                 420
NVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL
```

図　ラッ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イソフォーム）(7)
［ ］成熟型挿入配列　＊リン酸化部位　○リン酸化が示唆される部位

43 微小管結合タンパク質タウの最C末端領域の多様性－mRNAレベルでの検討－

沢 明[1,2]，小山文隆[1]，松下正明[2]，千谷晃一[3]，井原康夫[1]
（東大医学部脳研病理[1]，東大医学部精神医学教室[2]，藤田保健衛生大学総医研[3]）

〔要約〕
微小管結合タンパク質タウには，多様なアイソフォームの存在が知られている．それらは共通のmRNA前駆体よりalternative splicingによって産生される．タウの最もC末端の部分の多様性については，ヒト，ラットでは未知でマウスだけに同定されたアイソフォームの存在が知られている．そこで，今回はこのヒト，ラットで未知のアイソフォームの存在の可能性について検討した．その結果，ヒト，ラットでこのアイソフォームに相当するクローンを同定した．

Andreadisらにより報告されたヒトタウのgenomicクローンの配列に照らしあわせると，この領域のアイソフォームは2種に大別されることがわかった．すなわち，我々が得た新しいアイソフォームはspliced out型（A型と名付ける）であり，ヒト，ラットで既知のものはretained intron型（B型）に相当する．さらにマウスのA型は1種類のみであったが，これとは対照的に，ヒト，ラットのA型は，exon同志の結合に自由度があるためと考えられる分子多様性をもっていた．C末端領域のalternative splicingの制御をnuclease S1 protection法で検索したところ，多くの脳では既知のB型の発現割合が優位であった．A型は少量ではあるが発現しており，そのうちマウス類似のクローンは胎児期，若年期にその発現割合が上昇していた．

目的

タウのアイソフォームについては，ヒトにおいて，N末端側をコードする部分で3種[1]，微小管結合部位で2種[2]（3リピートと4リピート）が知られている．これらの産生は，共通のmRNA前駆体のalternative splicingにおけるcassette exonの挿入の有無によって制御される．したがって，ヒトでは少なくとも6種のアイソフォームが存在すると考えられている．

一方，タウの最C末端の部分では，マウスにおいて2種のアイソフォーム[3]が知られており（Fig. 1参照），それぞれ短いオープンリーディングフレーム（ORF），長いORFをもつ．しかし，ヒト，ラットでは，そのうちの短いORFをもつものが知られるのみである．

そこで，我々は，この最C末端をコードする領域に注目し，ヒト，ラットにおいて，マウスのみに見出されている長いORFを持つアイソフォームに相当するものがあるかどうかをmRNAレベルから検討した．

方法

マウス，ラット，ヒト脳より，total RNAをAGPC法で調製した．マウスの配列（プライマー4の領域）を用いてcDNAを作成し（Fig. 1参照），それを鋳型としてPCRで増幅した．PCRのセンスプライマーとしては，それぞれの種でプライマー1に相当する配列，アンチセンスプライマーとして，マウスのプライマー4の配列を用いた．増幅されたDNAをゲルで分離後，内部プライマー（それぞれの種のプライマー2とマウスのプライマー3）で再増幅を行った．再増幅されたcDNAをpUC118もしくはpUC119にサブクローニングし，塩基配列をジデオキシ法で解析した．

上記の方法で得たヒトcDNAクローンをプローブとしてヒト脳由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした．

それぞれのmRNA発現は，nuclease S1 protection法で定量した．

結果及び考察

PCR増幅により得られたcDNAクローンを解析した結果，ヒト，ラットでは，マウスにのみ知られていたクローンに相似するもの，対応するものを含めて，数種のクローンが得られた．

最近，Andreadisらによりヒトでタウのgenomicクローンの配列が報告された[4]．その配列に照らしあわせた結果，ヒトの新しいクローンは既知のexon13のあとに続く数百baseのintronがsplice outされて，直接exon14に続くものと考えられた．また，ヒトcDNAライブラリーのスクリーニングの結果，今までに知られていたアイソフォームの下流は，genomicクローンに一致して，intronの除去なしにexon14の配列に続くことをcDNAレベルで確認した．ここで，我々が新たに同定したクローンをA型（spliced out型），既知のクローンをB型（retained intron型）と呼ぶことにする（Fig. 2参照）．

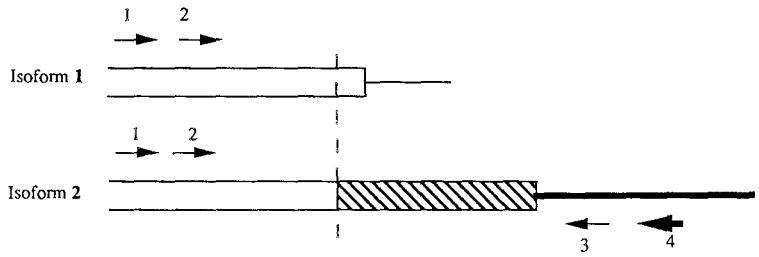
ラットで今回新しく同定したクローン，今までにマウスのみで知られていたアイソフォームは，ヒトより類推すると共にA型であると予想される．

A型クローンは，マウスでは，既知の1種以外には新たなものは見出されなかったが，ヒト，ラットでは数種のクローンが得られている．ヒト，ラットにおいてはexon13には複数の5' splice donor siteが，exon14には複数の3'splice acceptor siteがあり，その組み合せで複数種のクローンが得られると考えられた．すなわち，exon13，14間のsplicingにおいて，ヒト，ラットではそれぞれのsplice siteの選択に自由度があることで，A型クローンの多様性が生まれると考えられる．

この領域のalternative splicingの制御をnuculease S1 protection法で検索したところ，多くの脳では既知のB型の発現割合が優位であった．A型は少ないながらも，全例で発現しており，胎児期，若年期にはそのうちマウス類似のクローンの発現割合が上昇していた．

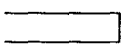
文献
1) Goedert, M. et al. (1989) Neuron 3, 519-526
2) Goedert, M. et al. (1989) EMBO J. 8, 393-399
3) Lee,G. et al. (1989) Science 239, 285-288
4) Andreadis, A. et al. (1992) Biochemistry 31, 10626-10633

Fig. 1 Schematic representation of two types of mouse tau cDNA clones around the C-terminal coding region



Isoform **1** ; common among human, rat, and mouse

Isoform **2** ; known only in mouse until now

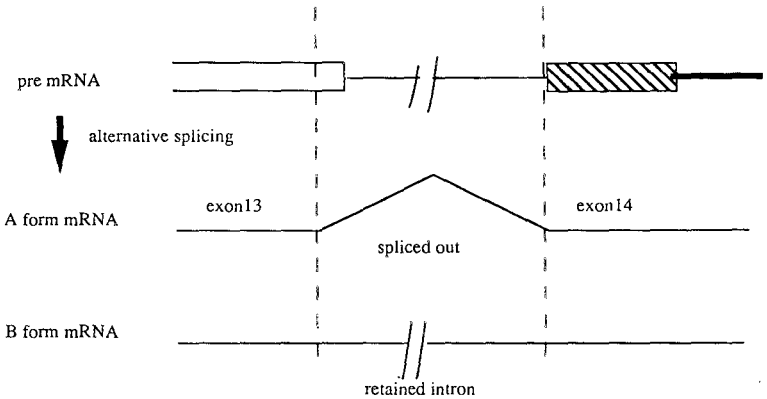

open leading frame of isoform **1**


open leading frame of isoform **2**

primers used for PCR


primers used for reverse transcription and 1st PCR

Fig. 2 Schematic illustration of alternatively spliced products from exon13 and newly identified exon 14



44 ラット神経成長抑制因子（GIF）の抗体作製と実験的頭部外傷ラットにおける発現動態について

保住　功[1]，犬塚　貴[1]，平岩雅男[2]，内田洋子[3]，
姉崎利治[1]，石黒英明[1]，小林　央[4]，宇山　裕[2]，
宮武　正[4]，辻　省次[1]
新潟大学脳研究所神経内科[1]，新潟薬科大学衛生化学[2]，都老人総合研究所神経病理[3]，東京医科歯科大学神経内科[4]

〔要約〕

アルツハイマー病の脳では神経成長抑制因子（growth inhibitory factor：GIF）が減少していることが明らかにされたが[1,2]、GIFの生物学的機能についてはいまだ充分解明されていない。今回我々はラットGIFの抗体を作製し、頭部外傷モデルラットにおいてGIFとGIFmRNAの変動について検討した。作製した抗体はmetallothionein、ヒトGIFと反応せず、ラットおよびマウスGIFと特異的に反応した。頭部外傷モデルで検索した結果ではGIF，GIFmRNAは術後14～21日目にかけて上昇を示しており、GFAP，GFAPmRNAが術後5～7日目でピークを示していたのとは異なった発現動態を呈した。GIFは今後神経組織修復におけるアストロサイトの機能を考える上で機能的に重要な分子と思われた。

【目的】

アルツハイマー病の脳では神経成長抑制因子（growth inhibitory factor：GIF）が減少していることが明らかにされたが[1,2]、GIFの生物学的機能についてはいまだ充分解明されていない。一方、アルツハイマー型痴呆発病の危険因子として疫学的に頭部外傷の既往が注目されている。そこでラットGIFに特異的な抗体を作製し、stab woundラットを用いてGIFの蛋白、mRNAレベルでの発現動態について検討した。

【方法】

① 合成ペプチドによるラットGIFに特異的な抗体の作製
ラットGIFに特異的なアミノ酸配列であるCKGEEGAKAEKを合成し、BSAとconjugateさせ（ペプチド研究所）兎に免疫して抗体を作成した。合成ペプチドをFMP-活性化セルロファインに結合させ、抗体を精製した。

② recombinantラットGIFの作製
当施設ですでにクローン化してある全長のrat GIF cDNA[3]をpMALc vectorに組み込み、大腸菌（TB1）に導入した。0.3mM IPTG存在下にrecombinant GIF-maltose binding protein fusion protein（rGIF-MBP）を産生させた。

③ 抗体の検定
rGIF-MBP、recombinant maltose-binding protein（rMBP）、metallothionein I&II（MT）とWisterラット、Sprague-Dawleyラット、ヒト、マウス大脳25%水homogenate熱処理後の遠心上清を抗原として免疫ブロットを行った。精製抗体は150倍希釈し3時間反応させた。また、合成ペプチド50μg/mlで吸収試験を行った。

④ stab woundラットにおけるGIF，GIFmRNAの経時的変化の観察
200g，雌Sprague-Dawleyラットの両側大脳にFig.1のようなstab woundを作製した。経時的に術後0，1，3，7，14，21，27日目に右大脳半球をWestern blotting、左大脳半球をNorthern blottingに供した。このモデルはすでにGFAP[4]、GFAPmRNA[5]の変動について報告したモデルと同様である。

【結果】

① 精製抗体はrGIF-MBPを発現させた大腸菌菌体成分液（蛋白量として3μg）では分子量49KD付近に1本のバンドが、ラット脳homogenate遠心上清（蛋白量として20μg）、マウス脳homogenate遠心上清（蛋白量として20μg）では分子量8.5kDと14.4kDの間にバンドが認識できた。一方rMBPのみを発現させた大腸菌菌体成分液（蛋白量として3μg）、MT 0.5μg、ヒト脳homogenate遠心上清（蛋白量として20μg）とは反応しなかった（Fig.2）。反応は合成ペプチドで吸収された。

② 外傷モデルラットではGIF, GIFmRNAとも術後14～21日にかけて上昇が認められた。

【考察】

今回我々はMT, rMBP, ヒトGIFと反応せず、ラットおよびマウスGIFとのみ特異的に反応する抗体を作製できた。頭部外傷モデルにおけるGIF, GIFmRNAの変動は術後14～21日目にかけて上昇が認められた。これは既に報告したGFAP, GFAPmRNAが術後5～7日目にpeakを示す変動[4,5]とは異なっていた。GIFとGFAPはアストロサイトに発現することが認められており[1]、外傷周辺部のreactive astrocteにおけるGFAPとGIFの発現動態は神経組織修復機序を考える上.で重要と思われた。今後免疫組織化学、in situ hybridization法によってGFAPと対比させながらGIF, GIFmRNAの発現の局在を検討して行く予定である。今回我々は外傷後28日までの短期的なGIFの変動について検索したが、今後長期的なGIFの変動また各種疾患モデルにおけるGIFの発現を検討し、GIFの機能およびアルツハイマー病の発病との関連性についても検討して行きたいと考えている。

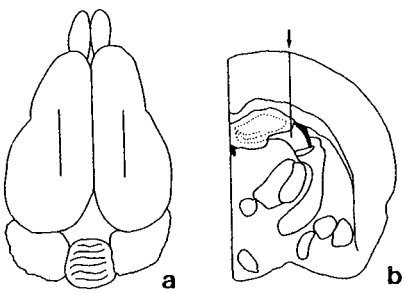


Fig.1 Schematic illustration of the stab wounds.
a:dorsal view
b:coronal view

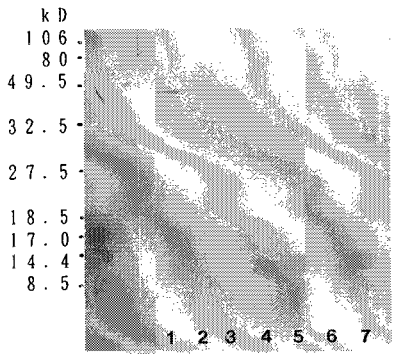


Fig.2 1:rGIF-MBP, 2:rMBP
3:MT, 4:Wister rat,
5:Spraque-Dawley rat,
6:HumanGIF, 7:mouse
(4～7:25%brain homogenate)

【文献】

1. Y.Uchida et al.(1991) Neuron 7,337-347
2. S.Tsuji et al.(1992) The EMBO J 11,4843-4850
3. H.Kobayashi et al.Mol Brain Res in press
4. I.Hozumi et al.(1990) Brain Res 524,64-71
5. I.Hozumi et al.(1990) Brain Res 534,291-294

45 線維芽細胞増殖因子による学習記憶の促進効果と老化による脳の記憶力低下の防止

大村裕[1], 今井秀樹[1], 佐々木和男[2], 李愛軍[3], 木村宏[4], 遠山育夫[4], 花井一光[4], 矢内原昇[5], 北村佳久[6], 野村靖幸[6]
(日本臓器製薬·生物活性科学研[1], 富山大·工[2], 九大·医[3], 滋賀医大[4], 静岡大薬[5], 北大·薬[6])

〔要約〕

酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)は脳室壁の上衣細胞が産生している。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、中隔などのニューロンが取り込んでいる。aFGFと記憶との関係をみると、Gluc投与後、受動回避学習とモリス水迷路学習テストで、投与2時間後だけが有意に学習記憶を促進した。これらの促進は、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は量一反応的にシナプス電位の長期増強の促進を起こすが、神経化学的に海馬内の転写因子zif/268のRNAおよびmRNAは変化しなかった。

さて、老化促進モデルマウス(SAM) P-8は早期に学習記憶能力が障害される。しかし、生後10ヵ月間aFGFを1週1回s.c.投与により有意に学習·記憶を正常に維持できた。一番大きな原因は内側中隔コリン作動性ニューロンのCAT含有量低下をaFGFが正常化していたことである。これらの結果はaFGFが学習·記憶促進とSAMの脳老化防御に有効であることを示している。

1. aFGFの消長

aFGFは脳室壁の上衣細胞が産生している。摂食あるいはGLuc腹腔内投与により、CSF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CSF中濃度は、0.7pmolから摂食やGluc投与(300 mg/kg)2時間で0.7nmol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)。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、生理的範囲内であり(Hanaiら, 1989)、抗aFGF抗体は摂食を促進させる(Oomuraら, 1992)から、aFGFは満腹物質である。

2. シナプス可塑性および記憶促進作用

受動回避学習: ラットの摂食あるいはGluc投与2時間後に海馬、中隔などのニューロンがaFGFを取り込んでいる。したがってaFGFと学習·記憶との関係を検討した。Glucを腹腔内に投与後、受動的回避学習をマウスで行うと、2時間目だけ有効で(Oomuraら, 1992)、24時間後にも有意にその効果が持続した。

Morrisの水迷路学習: 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分ごとに入れて、水中に置いた足場発見までの時間(4回)を測定すると、Gluc投与後2時間目の群は有意に速く足場を見いだした。両学習ともGluc投与30分前に抗aFGF抗体を両側脳室に投与すると、阻害された(Oomuraら, 1992)。さらにaFGFをラットに持続的にicv投与すると、受動回避学習による記憶促進は日とともに増大した。

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(Coleら, 1989)。実際にzif/268が海馬内で増加したかどうか測定した。Gluc腹腔内投与後1, 2および3時間目にzif/268 RNAおよびGluc投与30分後のmRNAは変化しなかった。

長期増強(LTP): 海馬を含むラット脳切片を用いSchaffer側枝に電気刺激を加えてCA1でのシナプス電位のLTPは、aFGF灌流により量一反応的に促進した。

4. SAM(老化促進モデルマウス)とaFGF: 生後3週間後からSAM P-8に週1回 7μg/kg aFGF s.c.投与で、生後10ヵ月間、対照食塩水投与に比し有意に学習·記憶を正常(R-8)に維持できた。図1および2がその例である。Acetylcholine transferase (CAT)活性検索で、海馬に投射する内側中隔コリン作動性ニューロン数は、図3に示すように対照では約15%減少したが、aFGF群では減少しなかった。図4に示すように、個々のニューロンのCAT含有量は対照群で著明に減少しているが、aFGF群は正常マウス(R-8)に近づいた。MAO-B活性は対照脳での増加に比し、有意に低下した。ムスカリンおよびNMDA受容器密度は大脳皮質で、aFGF投与群は有意に高い状態を維持した。s.c.投与のaFGFがCSFで増減するかを検討した。少なくとも

aFGF1-15は投与10時間後10倍に増加した。
摂食により上昇したGlucに反応して、上衣細胞が放出したaFGFは2時間後に海馬ニューロンに取り込まれて、学習･記憶を促進している。つまり摂食により、脳は学習の効率化の準備状態を形成している。またSAM脳の老化による記憶障害をaFGFが阻止することは、aFGFの脳での重要性を示している。

[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., 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 Nutr 55: 278S-282S

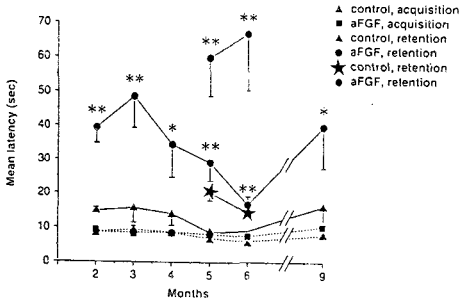


図1: SAM P-8の受動回避学習テストーaFGFの効果
aFGF, 生後3週目から週1回aFGFを皮下注射。リンガー液投与群(n＝10)と比較。縦軸, 暗箱に入るまでの時間(保持)。1群(n＝10)は5ヵ月と6ヵ月目で一時記憶保持が低下し、9ヵ月目で上昇しているが、もう1群は5ヵ月目と6ヵ月目で低下はない。

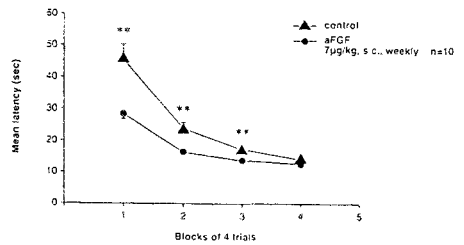


図2: SAM P-8のモリス水迷路学習ーaFGFの効果
aFGF, 生後3週目から週1回aFGFを皮下注射。リンガー液投与群と比較。生後9ヵ月末にテスト。aFGF群(n＝10)は対照群(n＝10)に比し有意に早く足場を見つける。

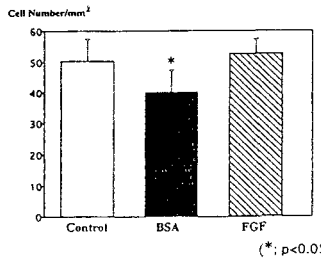


図3: SAM P-8及び対照のR-8中隔のコリントランスフェラーゼ(CAT)含有神経細胞
FGF, P-8にaFGFを生後3週間目から週1回皮下注射。9ヵ月間。BSA, リンガー液皮下注射。Control, R-8: 無処置。

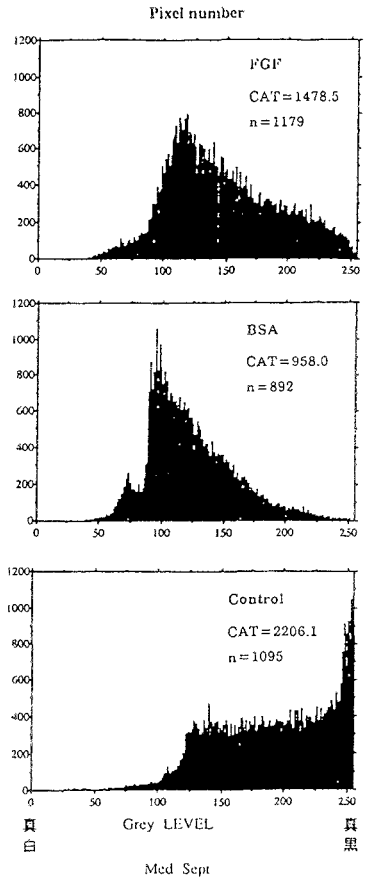


図4: SAM P-8及び対照のR-8中隔のコリントランスフェラーゼ(CAT)含有神経細胞
横軸: CAT含有量(相対値) 縦軸: 神経細胞数 FGF, P-8にaFGFを生後3週目から週1回皮下注射。9ヵ月間。BSA, リンガー液皮下注射。Control, R-8: 無処置。

46 断頭後の脳CaMキナーゼIIαサブユニットのトランスロケーション (II)

鈴木龍雄，野路久仁子，田中 亮

（名市大・第一生化学）

〔要約〕

我々は、昨年の本学会において、断頭後におこるラット脳のCaMキナーゼIIαサブユニット(CaMKIIα)の細胞質から顆粒画分へのトランスロケーションと、それと同一条件でおきるシナプス後肥厚部(postsynaptic density, PSD)画分へのCaMKIIα (mPSDp)の蓄積について報告した。その後、断頭後、種々の条件下に脳を置いた時に、各種細胞下分画のCaMKII含量と、活性にどのような変化が現われるか観察し、CaMKIIα トランスロケーションのメカニズムについて考察を与えた。その結果、1. CaMKIIα の細胞質画分からの損失と顆粒画分での増大の経時変化は類似していた。2. その損失量と増加量(脳1個あたり)は、ほぼ同量であった。3. 顆粒画分へトランスロケートしたCaMKIIα はすべてTritonX-100 不溶性となり、部分的な活性低下を伴った。4. 断頭後の脳を0℃下に放置する(昨年報告)かわりに37℃で5分間処理した場合には i)細胞質画分の95%以上のCaMKIIα が顆粒画分へトランスロケートした。ii)顆粒画分のCaMKII比活性の著しい低下を観察した。iii) PSD画分でのmPSDp含量の新たな増大と、CaMKII比活性の低下を観察した。

以上のことから、断頭後にみられたCaMKIIα のトランスロケーションは、CaMKIIの変性過程の一側面である可能性が考えられた.

[序論]

CaMKIIα (mPSDp)は、大脳皮質から調製したPSD画分の主要成分で、可溶性画分から精製したCaMKIIに比べ、キナーゼ活性(比活性)は低いが、その他の性質(自己リン酸化, 自己リン酸化に伴うCa^{2+}非依存性活性の出現[1], 脳部位による存在量の分布など)はよく似ている。一方、PSD結合型CaMKIIα (mPSDp)は、アミノ酸の部分配列が異なる可能性も示唆されている[2]。しかし、PSD画分中になぜそれ程多量存在するのか、また、mPSDpは、PSDの主要細胞骨格成分としても機能しているのか？といった謎は解明されていない。我々は、昨年 PSD画分中へmPSDpが主に死後に蓄積する可能性を指摘したが、本発表では、その現象についてさらに詳しく調べた結果について報告する。

[方法]

細胞質画分と顆粒画分及び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、氷上または37℃に一定時間静置した後、液体窒素にて急速凍結し、-80℃に保存した。前脳を解凍後、プロテアーゼ及びプロテインホスファターゼ阻害剤を含むTris緩衝液でホモジナイズした後、100,000g x 60分間の遠心で細胞質画分と顆粒画分を分離した。顆粒画分に0.1%Triton-X100を加え、氷上に1時間静置後、再び100,000g x 60分間の遠心により、TritonX-100可溶性画分と不溶性画分を得た。PSD画分の調製はWuらの方法に従った[3]。

キナーゼ活性の測定： 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA, 5 μMないし50 μM [γ-^{32}P]ATPを含む50 mM HEPES buffer (pH7.4)中で、Ca^{2+}-calmodulinの存在下、非存在下で、Syntide-2を基質としてリン酸化反応を行なった。顆粒画分については、0.1%TritonX-100を加えて0℃, 30分間静置してから活性測定を行なった。

CaMKIIα サブユニット含量の測定： affinity purifyしたウサギ抗CaMKII抗体を用いたWestern blottingの方法で、細胞質画分と顆粒画分中のCaMKIIα サブユニット含量を測定した。定量のために、精製 CaMKIIを同時にblottingして測定毎に検量線を作成した。

[結果]

前脳1個あたりについて、細胞質画分および顆粒画分中のCaMKIIα量は、それぞれ128 μg, 960 μgと計算された。前脳を0 ℃, 1時間放置した場合、細胞質画分中のCaMKIIα含量は68%に減少し、顆粒画分では107%に増加したので、それぞれの画分での減少量と増加量は47 μg, 67 μgと計算された。次に、顆粒画分をTritonX-100可溶性画分と不溶性画分とに分けてCaMKIIα量の変化をみた(図1)。TritonX-100可溶性画分での含量に変動はみられなかったが、不溶性画分中の含量の増大がみられた(約30%)。CaMKII活性もTritonX-100不溶性画分で増大していた。断頭後直ちに凍結した場合と比べ、0 ℃の処理の場合、CaMKIIα 1 mgあたりのキナーゼ活性は、細胞質画分, 顆粒画分, PSD画分とも大きな変動はみられなかった。

次いで、断頭後前脳を37 ℃に5分間放置した場合のCaMKII分布と活性の変化を調べた。この場合、細胞質画分からはWestern blottingでCaMKIIαが検出されなくなった(図2)。顆粒画分中には約27 %の増加がみられた。両画分ともにCaMKIIαの分解産物は観察されなかった。また、顆粒画分中のCaMKII比活性は有意に減少した。PSD画分ではmPSDp含量が高度に増加し、比活性は明らかに低下した。

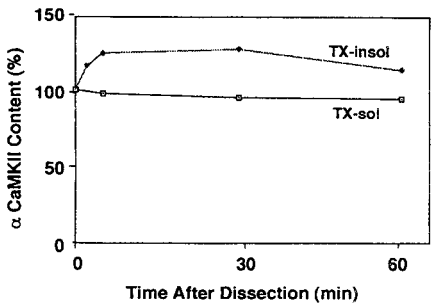


図1.
ラット前脳を一定時間0℃に置いた後，顆粒画分を得，さらにTX-100処理をしてTX-100可溶性画分とTX-100不溶性画分を得，CaMKIIα含量を測定した。

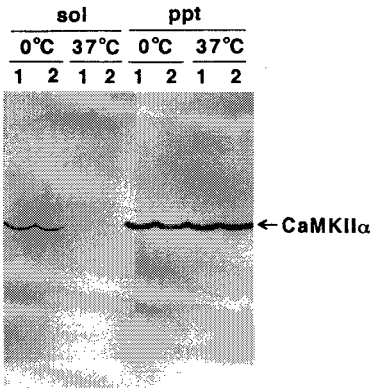


図2.
ラット前脳を37℃, 5分間処理した後，顆粒画分と細胞質画分を得，抗CaMKII抗体を用いてWestern blotting を行なった．それぞれ2例を示す．

[結論]

37 ℃での変化のプロセスが、0 ℃での変化のプロセスと本質的に全く同じものであるとは完全には断言できないが、主要プロセスはほぼ同じであると考えてよいようである。何故なら、どちらの処理によっても、細胞質CaMKIIαの顆粒画分へのトランスロケーションと、CaMKII活性の低下を、程度の差はあるが、観察したからである。また、37 ℃, 5分間の処理で、プロテアーゼ活性が大きく亢進したとも考えられなかったからでもある。CaMKIIαのトランスロケーションと活性の部分低下は、断頭後CaMKIIタンパク質が、非生理的に修飾されたことを示唆している。PSD画分中においても、37 ℃処理後にmPSDp含量の新たな増大と著しい活性低下がみられたことから、PSD画分中へのmPSDp蓄積も、上記と同じプロセスによるものである可能性が考えられた。

[文献]

1. Suzuki, T., Fujii, T., and Tanaka, R. (1987) J. Neurochem., 48, 1716-1724.

2. Wu, K., Huang, Y., Adler, J., and Black, I. B. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3015-3019.

3. Wu, K., Carlin, R., and Siekevitz, P. (1986) J. Neurochem., 46, 831-841.

47 開口放出のツーステップ・モデルにおけるミオシン軽鎖キナーゼの役割

笹木君仁、今泉美佳、櫻井　隆*、松田　譲**、野々村禎昭*、熊倉鴻之助

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〕

Ca^{2+}依存性開口放出機構におけるミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の役割をツーステップ・モデルの上で明確にする目的で、ジギトニン処理により膜の透過性を高めた牛副腎髄質クロマフィン細胞を用いてMLCKの特異的阻害剤、Wortmannin 及び活性阻害ペプチド、SM-1 がそれぞれATP依存性とATP非依存性のカテコールアミン(CA)放出に及ぼす影響を検討した。細胞のジギトニン処理中にATPを添加しておくと、プライミング効果によりその後に添加したCa^{2+} 100μMで引き起こされるATP非依存性CA放出が増大するが、ジギトニン処理前にあらかじめ Wortmannin 10μM で前処理しておくと、このATPプライミング効果は打ち消された。このときATPによるプライミングを受けない細胞からのATP非依存性放出は、Wortmannin処理によってほとんど影響を受けなかった。またSM-1を370μMの濃度でジギトニンbufferに加え処理すると、Ca^{2+} 10μM によるATP依存性の放出は顕著な阻害を受けるが、ATP非依存性の放出は全く影響を受けなかった。これらの結果からMLCKは、ツーステップ・モデルにおけるATP依存性プライミング機構に関与することが示唆された。

最近Holzらによって、クロマフィン細胞のCa^{2+}依存性開口放出機構に対してCa^{2+}感受性とMgATP要求性が異なる２段階の反応系からなるツーステップ・モデルが提示された(1)。第１ステップはCa^{2+}で促進されるMgATP依存性のプライミング・ステップであり、第２ステップはMgATP非依存的でCa^{2+}により直ちに引き起こされる開口過程である。このモデルによれば顆粒の状態には、すでに第１ステップによって放出部位にプライミングされ終えた顆粒のプール（プールＢまたはプライムド・プール）と、まだプライミングを受けていないプール（プールＡ）が存在すると考えられている。Ca^{2+}濃度を急激に上昇させた時の高透過性細胞（leaky細胞）からのCA放出のタイム・コースでは、まずプールＢからのCa^{2+}依存性・ATP非依存性開口反応による速い放出が起こり、次いで第１ステップによりプールＡからプールＢにプライムまたは移行された顆粒からの放出が持続する(Fig.1)。この２相の放出の前者は、Ca^{2+} 100μMで引き起こされ2分以内に終了するATP非依存性の放出として、また後者は Ca^{2+} 10μMでATP存在下6分以上持続する放出として測定できる。またMgATPのみで細胞を前処理することによって、第１ステップであるATPのプライミング作用が進み、その効果はCa^{2+} 100μMによるATP非依存性放出の増大として測定されることが、Holzら(2)によって既に報告されている。これまで我々はクロマフィン細胞からの開口放出に至るCa^{2+}依存性機構にMLCKが重要な一過程として関与することを示してきたが(4)、本研究ではさらにこのMLCKの役割をツーステップ・モデルにおいて明確にするため、上に述べたATP依存性・非依存性のCA放出及びATPのプライミング作用に及ぼすWortmanninならびにSM-1の影響を検討した。

[実験方法]　クロマフィン細胞は、牛副腎髄質から既報(3)のように調製し、10%牛胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium中で単層培養した。実験には培養4～10日の細胞を用いた。leaky細胞の調製及びleaky細胞からのCA放出の測定には、まず培養細胞をCa^{2+}－free Locke's液で洗浄後、ジギトニンbuffer(10or20μM digitonin, 140mM Na-glutamate, 20mM PIPES, 5mM glucose, 5mM EGTA, pH 6.8)に置き換え、37℃、10分(10μM digitonin)又は4分間(20μM digitonin)incubationしてleaky細胞を調製した。次にCa-EGTA buffer (140mM Na-glutamate, 20mM PIPES, 5mM glucose, 5mM $MgSO_4$,5mM ATP, 5mM EGTA 及び各濃度の$CaCl_2$, pH 6.8)に置き換え、1.5または6分間放出刺激を行った(但し、ATP非依存性放出はCa^{2+} 100μM/-ATPで1.5分、ATP依存性放出はCa^{2+} 10μM/+ATPで6分の放出を測定)。なおATPのプライミング効果は、ジギトニンbufferに5mM $MgSO_4$/±ATPを予め添加し、その後のCa^{2+} 100μMによる1分及び2分間のATP非依存性CA放出により測定した。10μM 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0.4M過塩素酸で抽出し、HPLC法により定量を行った。

[結果および考察] Leaky細胞をMgATPで前処理すると、その後の細胞からのCa^{2+} 100μMによるATP非依存性CA放出は、ATP非処理細胞に対し3～4倍に増大した。ところがWortmanninで前処理することにより、このATPのプライミング効果は打ち消された。一方、プライミングを受けない細胞からのATP非依存性放出にWortmanninはほとんど影響を与えていない(Fig.2)。そこでATP依存性CA放出機構におけるMLCKの関与をさらに明確にするために、ATP非依存性及び依存性放出に対するSM-1の影響を調べると、Ca^{2+}添加に先立ち370μM SM-1をジギトニンbuffer中で4分間処理した細胞からのATP依存性CA放出に対し顕著な抑制が観察された。このときATP非依存性CA放出に、SM-1は全く影響を及ぼさなかった(SM-1と比べて阻害作用の弱いMKIPは、ATP依存性CA放出においてわずかな抑制がみられたにすぎない。Fig.3)。また、MgATP存在下Ca^{2+} 10μMで引き起こされるATP依存性CA放出のタイム・コースをとると、最初の2分間ではWortmannin処理した細胞からのCA放出と無処理細胞からの放出にそれほど相違はみられないが、以後の経過において無処理細胞は直線的に放出が増大するのに対し、Wortmannin処理細胞の方はMgATPの存在にもかかわらず強い阻害作用がみられ、ATP依存性機構に裏打ちされた持続的なCA放出にはMLCKの存在が必須であることが推察された。これらの結果からMLCKは、副腎髄質クロマフィン細胞の開口放出ツーステップ・モデルにおけるATP依存性プライミング機構に関与することが示唆された。

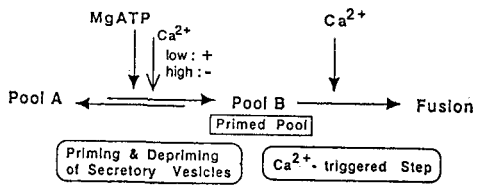


Fig.1 Ca^{2+}依存性開口放出機構におけるツーステップ・モデル
(文献1から改変)

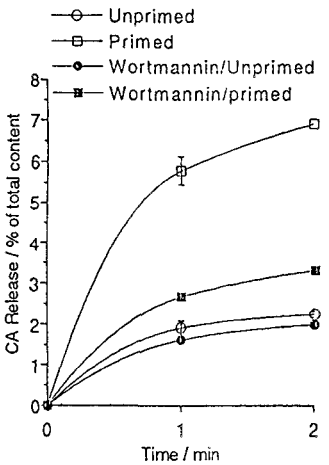


Fig.2 ATPのプライミング効果に対するWortmanninの阻害作用

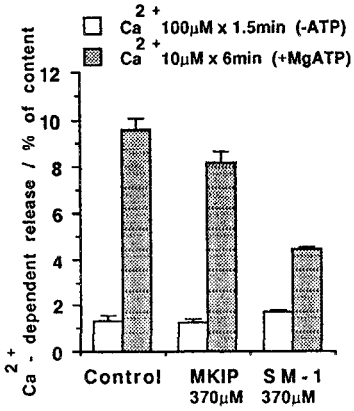


Fig.3 ATP非依存性および依存性CA放出に対するMKIPとSM-1の影響

[文献]

1. Bittner,M.A. & Holz,R.W. (1992) J. Biol. Chem. 267, 16219-16225.
2. Holz,R.W., Bittner,M.A., Peppers,S.C., Senter,R.A., & Everhard,D.A. (1989) J. Biol. Chem. 264, 5412-5419.
3. Ohara-Imaizumi, M., Kameyama, K., Kawae, N., Takeda, K., Muramatu, S., & Kumakura, K. (1992) J. Neurochem. 58, 2275-2284.
4. Ohara-Imaizumi, M., Sakurai, T., Nakamura, S., Nakanishi, S., Matsuda, Y. Muramatsu, S., Nonomura, Y., & Kumakura, K. (1992) Biochem. Biopys. Res. Commun. 185, 1016-1021.

48 ラット大脳の発達過程におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの基質タンパク質の動態

杉浦 弘子、山内 卓*
(東京都神経科学総合研究所、*徳島大学薬学部)

〔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)の発現が発達過程において調節されている。基質もキナーゼIIと同様に発達過程において発現調節を受けるかどうかを明かにするために、生後1日から90日のラット大脳の可溶性画分と顆粒画分について、キナーゼIIによりリン酸化されるタンパク質をSDS電気泳動および2次元電気泳動によって調べた。その結果、可溶性画分では大部分の基質が出生直後から存在し、リン酸化量の経時的変化は少なかったが、顆粒画分では、いくつかの基質がキナーゼIIと同様に発達過程で増加することが明らかとなり、キナーゼIIによる神経機能の調節に基質の発現も重要であると考えられる。

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)は脳神経系に多量に存在し、シナプス伝達や可塑性などに重要な役割を果たすと考えられている[1)]。私達はキナーゼIIの活性、および、αまたはβ分子に対する特異抗体を用いて酵素タンパク量を測定にすることにより、キナーゼIIの発現が発達過程において調節を受け、生後10日頃からに急速に増大し、およそ30日で最大に達することを明かにした[2)]。また、キナーゼIIのcDNAを神経芽細胞に導入し酵素を過剰発現させることにより、神経突起形成が促進され、グロースコーンの運動性が高まること[3)]、およびキナーゼIIの基質タンパク質が大脳と小脳では異なることを見出しており[4)]、キナーゼIIの基質タンパク質の分布や発達過程での動態を明かにすることが必要であると考えられる。そこで、今回、生後1日から90日のラット大脳の可溶性画分と顆粒画分について、キナーゼIIによってリン酸化されるタンパク質を2次元電気泳動により解析した。

「実験方法」

ラット大脳をホモゲナイズし、可溶性画分と顆粒画分に分離した。可溶性画分を0.1 M Acetate buffer, pH 5.0でインキュベートし、ついで15%エタノール処理することにより、また、顆粒画分を3M尿素処理することにより、内在性のキナーゼIIを特異的に失活させ基質として使用した。[γ-^{33}P]ATPを用いて可溶性画分および顆粒画分の基質をキナーゼIIでリン酸化したのち、電気泳動を行い、オートラジオグラフィーで解析した。またラジオアクティブスポットを切出し放射活性を測定することにより基質のリン酸化量を定量した。

「実験結果と考察」

大脳の可溶性画分と顆粒画分の内在性キナーゼII活性と基質のリン酸化量に変化があるかどうか調べるために、まず、生後5日と60日について比較した。可溶性画分および顆粒画分ともに、内在性のリン酸化が観察され、さらにキナーゼIIを加えることにより5日目ではリン酸化量が増加したのに対して、60日ではほとんど増加しなかった。このことは、5日目では基質の発現量に比べて相対的にキナーゼIIの活性が低いことを示している。しかし、顆粒画分では、5日ではキナーゼIIを加えても、60日のリン酸化レベルまで達しなかったことから、基質量も少ないことが明らかとなった。

キナーゼIIによってリン酸化される基質を調べるために、内在性のキナーゼIIを失活させた後に、キナーゼIIを加えてリン酸化を行った。この条件で、発達過程におけるリン酸化レベルは10－20日にか

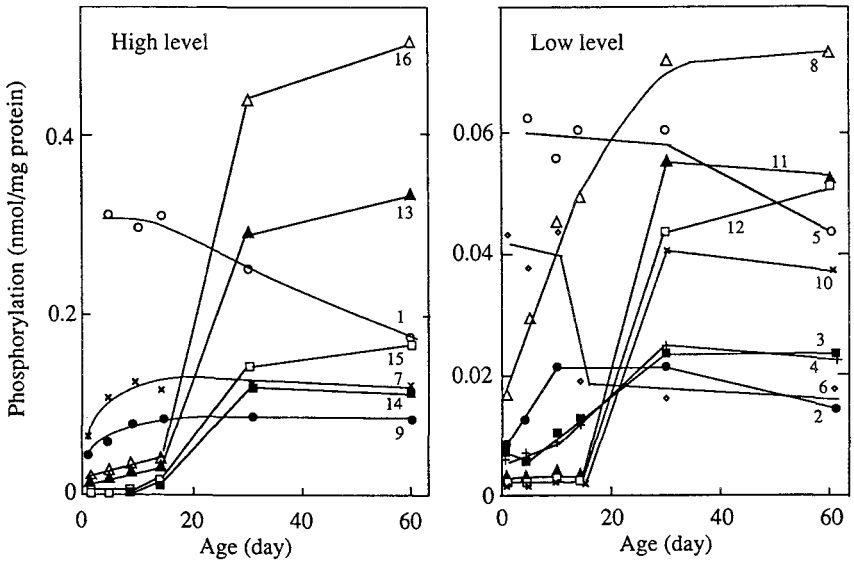


図1　キナーゼIIの16種の基質のリン酸化量の発達過程による変化（顆粒画分）

High level , Low level はリン酸化レベルの違う2グループを示す。

けて増加し、キナーゼIIの基質の発現も発達過程で調節される可能性が考えられた。

次にどのような基質が発達過程で増加するか調べるために、SDS電気泳動および2次元電気泳動によって検討した。従来使用されていた[γ-^{32}P]ATPでは、オートラジオグラフィーによるリン酸化のスポットが広がり不明瞭であるので、それを改善するために[γ-^{33}P]ATPを用いた。可溶性画分では30種以上の基質がキナーゼIIによってリン酸化された。これらの基質のほとんどは出生直後から存在しており、2－3のタンパク質のリン酸化が増加または減少するが、経時的な変化は少なかった。一方、顆粒画分でも、30種以上のタンパク質がリン酸化され、リン酸化パターンは可溶性画分のものと異なっていた。発達過程において10種以上のタンパク質のリン酸化が増加し、約3種が減少した。発達過程において2次元電気泳動でリン酸化レベルが変化した16のタンパク質のリン酸化量の変化を図1に示す。

キナーゼIIによりリン酸化される基質はA－キナーゼによるものと異なったパターンを示し、キナーゼIIに特異的であった。

キナーゼIIの基質の発達過程における変化を調べたところ、いくつかの基質が発達過程において変化することが明らかとなった。この方法では脳の分画以前に内在性にリン酸化されている基質量は決定できないが、キナーゼIIが作用できる基質量を求めることは可能である。この研究では基質の大部分が同定されていないが脳の発達につれてキナーゼIIの基質が増減することは極めて興味深いものがあり、どの基質が神経の分化とシナプスの発達に重要であるか明らかにしたいと考えている。また最近使用できるようになった[γ-^{33}P]ATPを用いることにより高いカウント量を使用してもスポットが明瞭であり、個々のタンパクについて電気泳動で分離した後、リン酸化量が定量でき基質の解析が容易である。

「文献」

1. Hanson, P. I., Shulman, H. (1992) Annu. Rev. Biochem. 61, 559-601
2. Sugiura, H., Yamauchi, T. (1992) Brain Res. 593, 97-104
3. Goshima, Y., Ohsako, S., Yamauchi, T. (1993) J. Neurosci. 13, 559-567
4. Yamauchi, T., Sekihara, S., Ohsako, S. (1991) Brain Res. 541, 198-205

49 ラット脳内ヒスタミン神経系に共存するＧＡＢＡの遊離

山本由美子、望月貴年[1]、望月薫[1]、堀井新[2]、東均[3]、大和谷厚
（大阪大、医、分子生化、第二薬理[1]、耳鼻科[2]、精神科[3]）

〔要約〕

ヒスタミン神経系に共存するＧＡＢＡの遊離動態を検討するため、*in vivo* マイクロダイアリシス法とＨＰＬＣ蛍光検出法を用いて、ウレタン麻酔下のラット視床下部前部よりのＧＡＢＡ遊離を測定した。ヒスタミン神経終末の豊富なこの部位において、２０分間に平均0.32pmolのＧＡＢＡ遊離が観察された。次にヒスタミン神経の起始核である結節乳頭核を電気刺激すると、細胞外カルシウム依存性にＧＡＢＡ遊離の増加が見られた。さらにヒスタミンH_3受容体遮断薬であるチオペラミドの投与によりＧＡＢＡ遊離の著しい増加が見られた。これらの結果より、視床下部で遊離されるＧＡＢＡについて、1)少なくとも一部はヒスタミン神経終末に由来し、2)ヒスタミンH_3受容体により調節されていることが示された。

ヒスタミンは哺乳類の中枢神経系において神経伝達物質または修飾物質として存在し、神経内分泌、自律機能、睡眠-覚醒等の調節に関与している[8)9)]。ヒスタミン神経系の起始核は結節乳頭核に局在し脳内の広範な部位にその線維を投射しており[8)9)]、ＧＡＢＡ、アデノシン、ガラニン等が共存することが免疫組織化学的に示されているが[1)]、これらの共存物質が実際にヒスタミン神経終末より遊離されているかどうかは明らかではない。私達はこれまでに*in vivo* マイクロダイアリシス法により、ヒスタミン神経終末の密に存在するラット視床下部前部におけるヒスタミン遊離動態とその制御機構について検討してきた[4)5)]。そこで、本研究ではヒスタミン神経終末における共存するＧＡＢＡの遊離をマイクロダイアリシス法により検討した。

（実験方法）

Wistar系雄性ラットをウレタン麻酔下に脳定位固定装置に固定し、透析プローブを視床下部前部に刺入し、灌流液を流速1μl/minで流し、２０分毎にサンプルを採取した。チオペラミドは灌流液中に加え透析プローブを通じて投与した。α-フルオロメチルヒスチジンは実験開始の17.5および3.5時間前の２回、100 mg/kgを腹腔内投与した。結節乳頭核の電気刺激は双極電極により、複相50 Hz、200μA、パルス幅1msecの矩形波で行った。透析サンプル中のＧＡＢＡは、KehrとUngerstedtのＨＰＬＣ-ＥＣＤ法[3)]を改良し、*t*-ブチルメルカプタン存在下に*o*-フタルアルデヒドと反応させ蛍光誘導体に変換した後、逆相系カラムに注入し50％(v/v)アセトニトリルを含む0.15Ｍの酢酸緩衝液を用いて展開し、カラムからの溶出液の蛍光強度を連続測定するＨＰＬＣ-蛍光法で定量した。本法によるＧＡＢＡの定量限界は0.1pmol/20mlであった。

（結果と考察）

マイクロダイアリシス法で回収された視床下部前部におけるＧＡＢＡ遊離は平均0.32pmol/20μlであり、５時間にわたり安定であった。視床下部には内在性のＧＡＢＡ神経が多く存在しており、さらに、ＧＡＢＡの遊離は神経終末以外にグリア細胞からも起こっている[2)]。そこでヒスタミン神経に共存するＧ

ＡＢＡの遊離をより特異的に見るため結節乳頭核に対する電気刺激を行ったところ、１３０％のＧＡＢＡの遊離増加が見られた。また、灌流液よりCa^{2+}を除去しMg^{2+}とＥＧＴＡを添加すると、基礎遊離は有意に減少しなかったのに対し電気刺激に対する遊離増加は減弱した（図１）。またα-フルオロメチルヒスチジン前投与により神経性ヒスタミンを涸渇させた状態で同様の電気刺激を行ってもＧＡＢＡ遊離が増加したことより、電気刺激によって遊離したヒスタミンが二次的にＧＡＢＡ遊離を引き起こしたとは考えられない。以上の結果より、結節乳頭核の電気刺激により視床下部前部でヒスタミン神経終末から共存するＧＡＢＡが遊離されることが示唆された。

ヒスタミンH_3受容体はヒスタミン神経のシナプス前に存在し、ヒスタミン遊離に抑制的に働くことが知られている。このH_3受容体遮断薬であるチオペラミドの投与により用量依存的にＧＡＢＡ遊離が増加した（図２）。このことよりヒスタミンがH_3受容体を介してＧＡＢＡの遊離を緊張性に調節していることが明らかになった。しかし、先の電気刺激により見られた遊離増加よりはるかに大きな遊離の増加が見られたこと、またセロトニン、ノルアドレナリン神経終末でもH_3受容体がシナプス前ヘテロ受容体として遊離調節を行うことが知られていることから[6][7]、視床下部内在性のＧＡＢＡ神経終末にもH_3受容体が存在し機能している可能性も考えられた。

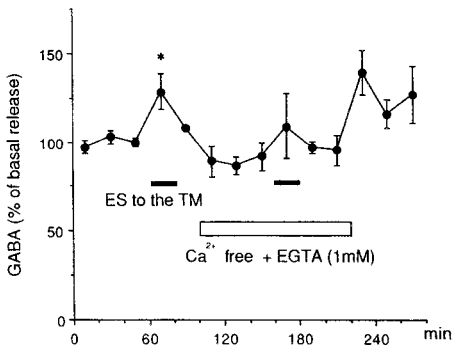


図１　結節乳頭核への電気刺激（50Hz, 1msec, 200μA）によるＧＡＢＡの遊離増加とそれに対する細胞外カルシウム除去の影響。
* P < 0.05 vs basal release

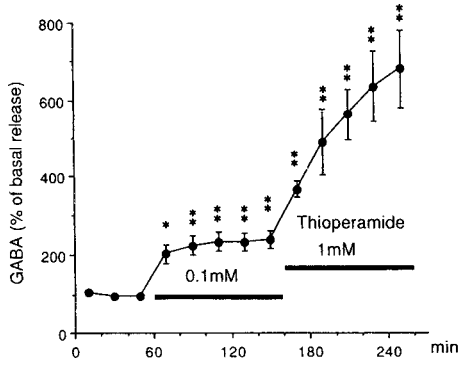


図２　前部視床下部のＧＡＢＡ遊離に対するチオペラミド（0.1、1mM）の影響。
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs basal release

（文献）

1) Airaksinen M. S. et al. (1992) *J. Comp. Neurol.* **323**, 103-116. 2) Bernath S. (1992) *Prog. Neurobiol.* **38**, 57-91. 3) Kehr J. and Ungerstedt U. (1988) *J. Neurochem.* **51**, 1308-1310. 4)Mochizuki T. et al. (1991) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **343**, 190-195. 5) Okakura K. et al. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* **213**, 189-192. 6) Schlicker E. et al. (1988) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **337**, 588-590. 7) Schlicker E. et al. (1989) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **340**, 633-638. 8) Wada H. et al. (1991) *Trends Neurosci.* **14**. 415-418. 9) Yamatodani A. et al. (1991) in *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 97.* (Uvnäs B., ed), pp. 243-283. Springer Verlag, Berlin.

50 脳シナプス前末端に存在するrab3A、SNAP-25 VAMP-2およびsyntaxins複合体

堀川　洋、西須英雄、石塚　徹、関根陽子、阿部輝雄
（新潟大学・脳研究所）

〔要約〕

N型Caチャネルを沈降させる2種の単クローン抗体(SPM-1とSPM-2)はそれぞれ、36、28 kDaの蛋白質を認識する。ウシ脳膜分画のジギトニン抽出物をSPM-1-Sepharose、SPM-2-Sepharoseにかけると、いずれの場合も、36、28および19 kDaの蛋白質が特異的に結合する。36 kDaの蛋白質 (synaptocanalins)がsyntaxin A、Bを含むことをすでに報告した。今回、28 kDaおよび19 kDaバンドが尿素存在下でのSDS電気泳動によって、それぞれ2種の異なった蛋白質にわかれることを見出した。蛋白分解酵素およびCNBrによる処理によって得られたペプチドの一次構造と抗体との反応に基づき、これらの蛋白質をシナプス前末端に局在するrab3A/smg25A、SNAP-25およびVAMP/synaptobrevin-2と同定した。SPM-1、SPM-2はそれぞれ、36、28 kDaの蛋白質のみを認識するので、これらの結果はrab3A/smg25A、SNAP-25、VAMP/synaptobrevin-2およびsyntaxinsがシナプス前末端において複合体を形成していることを意味する。

脳N型Caチャネルを免疫沈降させる2種の単クローン抗体SPM-1とSPM-2はそれぞれ36、28 kDa蛋白質を認識する(1)。脳膜分画のSPM-1-SepharoseおよびSPM-2-Sepharoseによるimmunoaffinity chromatographyではいずれの場合も36、28、19 kDaの3種の蛋白質が特異的に結合した。このうち、36、28 kDa蛋白質はそれぞれSPM-1、SPM-2の抗原である。36 kDa蛋白質(synaptocanalins)はいくつかのisoformからなり、主要な成分はsyntaxin A (HPC-1)、syntaxin B(synaptocanalin I)である(2)。今回、28、19 kDa蛋白質の実体を追究した。両者はいずれも2種の異なる蛋白質を含むことが明らかになった。28 kDa蛋白質の2成分は低分子量GTP結合蛋白質rab3A/smg25Aおよびシナプス前部の蛋白質SNAP-25であり、19 kDa蛋白質の一つはシナプス小胞に存在するVAMP/synaptobrevin-2である。

［実験方法］

ウシ脳膜分画のジギトニン抽出物をSPM-1-SepharoseあるいはSPM-2-Sepharoseにかけ、結合物をSDSで溶出した(1)。溶出物は尿素存在下でのSDS電気泳動(2)で分画し、各成分を蛋白分解酵素あるいはCNBrで処理した。得られた断片をSDS電気泳動あるいはHPLCで分画した。主要な断片の部分アミノ酸配列をプロテイン・シークエンサーによって決定した。また、各蛋白質に対する抗体は、部分アミノ酸配列のペプチドを合成して作製した。

［結果と考察］

SPM-1-SepharoseおよびSPM-2-SepharoseからのSDS溶出物を尿素存在下でSDS電気泳動で分画すると、36 kDaおよび19 kDaバンドはいずれも2本のバンドを与えた。また、28 kDaバンドはSPM-2-Sepharoseからの溶出物のみ2本に分かれた(28a、28b)(図1a)。しかし、biotinyl anti-mouse IgG、avidin-alkaline phosphataseを用いた、より高感度のイムノブロットでは、SPM-1-Sepharoseからの溶出物中にも28bが検出された(図1b)。すでに報告したように(2)、36 kDaの2成分(36a、36b)はそれぞれsynaptocanalin I (syntaxin B)(2,3)、syntaxin A(HPC-1)(3,4)である(2)。28a、28bともSPM-2と反応する(図1)。19a、19bはSPM-1、SPM-2のいずれとも反応しなかった。

蛋白分解酵素(V8プロテアーゼあるいはパパイン)による消化(28a、28b)あるいはCNBr分解(28a、19b)によって得られた断片の部分アミノ酸配列をデータベースで検索した結果、28aの配列はSNAP-25(5)、28bの配列はrab3A/smg25A(6,7)、19bの配列はVAMP/synaptobrevin-2(8,9)の部分アミノ酸配列にそれぞれ完全に一致した(図2)。また、28a、28b、19bはそれぞれ対応する蛋白質に対する抗体と特異的に反応した(図2)。以上の結果から、28a、28b、19bはそれぞれSNAP-25、rab3A/smg25A、VAMP/synaptobrevin-2であると結論した。SPM-1、SPM-2はそれぞれsyntaxins、28 kDaバンドとのみ反応するので(1)、rab3A/smg25A SNAP-25、VAMP/synaptobrevin-2およびsyntaxinsが複合体を形成していることが示された。syntaxins、SNAP-25は前シナプス膜あるいは細胞質に、VAMP/synaptobrevin-2はシナプス小胞に、また、rab3A/smg25Aはシナプス小胞と細胞質に存在する。したがって、ここに示した結果は脳シナプス前部において、前シナプス膜成分とシナプス小胞成分との間に密接な連絡があることを示唆する。

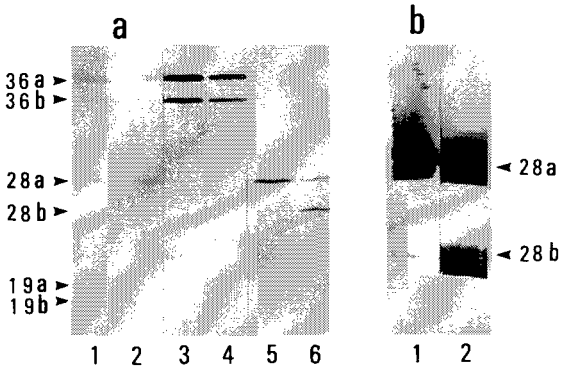


図1 抗体カラム結合物のイムノブロット
(a)SPM-1-Sepharose (lane 1,3,5)、SPM-2-Sepharose(lane 2,4,6)結合物のイムノブロット。lane 1,2 はAmidoblackよる染色、他はSPM-1(lane 3,5)あるいはSPM-2(lane 4,6)による反応。
(b)SPM-1-Sepharose(lane 1)、SPM-2-Sepharose (lane 2)結合物のSPM-2によるブロット。avidin-biotin系を使用。

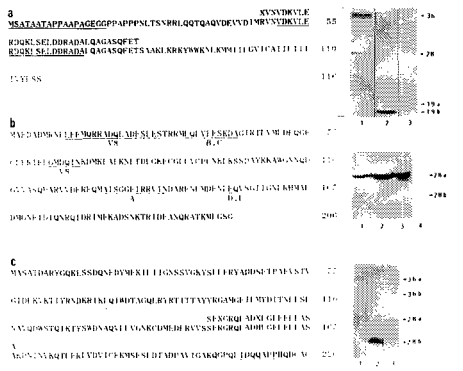


図2 各バンドの同定
(a)19bの部分配列をVAMP-2の配列と表示。ブロットはamidoblack染色(lane 1)と2種の抗体(抗原は配列の下線部)による反応(lane 2,3)。 (b)28aの部分配列(下線部)とSNAP-25の配列。ブロット(抗原：二重下線)は(a)と同様。lane 4は非免疫血清。
(c)28bの部分配列とrab3A/smg25Aの配列。ブロットのlane 2は抗体との反応(抗原：下線)。lane 3は非免疫血清。

[文献]

(1) H. Saisu et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 59-66 (1991). (2) T. Morita et al. (1992) Biomed. Res. 13, 357-364. (3) M. K. Bennett, N. Calakos and R. H. Scheller (1992) Science 257, 255-259. (4) A. Inoue, K. Obata and K. Akagawa (1992) J. Biol. Chem. 267, 10613-10619. (5) G. A. Oyler et al. (1989) J. Cell Biol. 109, 3039-3052. (6) Y. Matsui et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 11071-11074. (7) A. Zahraoui et al. (1988) Nucl. Acid Res. 16, 1204. (8) T. C. Sudhof et al. (1989) Neuron 2, 1475-1481. (9) L. A. Elferink et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 11061-11064.

51 中枢神経系における神経伝達物質の遊離とP-タイプカルシウムチャンネルの連関

木村真奈美、花田敬久、加賀谷孝樹、山西嘉晴、寺本哲之、
澤田光平、片山幸一、西沢幸夫（エーザイ株式会社・筑波研究所）

〔要約〕

ラット胎仔の大脳皮質培養神経細胞、ラット海馬および線条体のスライスを用いて、高濃度KCl刺激により遊離される神経伝達物質量を測定し、これらの伝達物質の遊離に対するカルシウムチャンネルの各サブタイプに特異的な阻害剤ω-Agatoxin IVA（P-タイプ）、Nifedipine（L-タイプ）、およびω-Conotoxin（N-タイプ）の作用を検討した。グルタミン酸、アスパラギン酸およびセロトニンの遊離は、ほぼ選択的にP-タイプのカルシウムチャンネルと連関しているのに対し、L-タイプ、N-タイプチャンネルの関与は、極くわずかであった。また、ノルエピネフリン、ドーパミンの遊離にもP-タイプカルシウムチャンネルが部分的に介在していることが明らかとなり、中枢神経系においてはP-タイプカルシウムチャンネルが、神経伝達に重要な機能を果たしていることが示唆された。

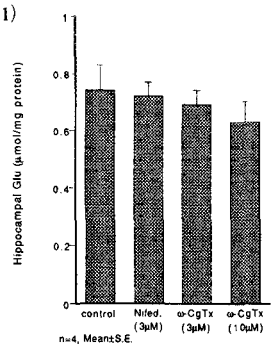
（目的）　神経伝達物質のシナプスからの遊離は、電位依存性カルシウムチャンネルによる細胞外からのカルシウムイオンの流入が引き金となっていると考えられているが、遊離する神経伝達物質の種類とカルシウムチャンネルのサブタイプとの関連については不明な点が多い。神経系には少なくともL-、N-、P-、T-タイプの4種のサブタイプの電位依存性カルシウムチャンネルの存在が知られている(1)。このうちN-タイプは神経細胞の軸索終末部位に多く存在し、種々の神経伝達物質、特にアセチルコリン、ドーパミン、ノルエピネフリン、セロトニンなどの遊離に関与していることが報告されている(2-4)。一方、グルタミン酸、アスパラギン酸など興奮性アミノ酸の遊離には、N-タイプのカルシウムチャンネル阻害剤ω-Conotoxin (ω-CgTX) がほとんど作用を示さないことが知られていたが(5), 最近P-タイプカルシウムチャンネル阻害剤としてω-Agatoxin IVA (ω-AgaIVA) が発見され、グルタミン酸のシナプトソーム、および海馬スライスからの遊離を抑制することが報告された(6-8)。我々は、カルシウムチャンネルのサブタイプと伝達物質の遊離機構との連関を知る目的で、各サブタイプに特異的な阻害剤を用いて培養神経細胞および脳スライスからの各種神経伝達物質の遊離に対するこれらの阻害剤の作用を検討した。

（方法）　大脳皮質培養神経細胞は、ラット胎仔(E17)より調製し15～16日間培養したものを用い、海馬および線条体スライスはWistarラット（雄性、8週令～10週令）から調製した。伝達物質の遊離は、高濃度KCl (40～100 mM) の刺激により誘発した。カルシウムチャンネル阻害剤は、反応前5～10分から反応中にかけて添加し、またMAO阻害剤 (pargyline 10 μM), および取り込み阻害剤 (Imipramine 1 μM, Nomifensine 1 μM) を溶液に加えてインキュベーションを行なった。グルタミン酸、アスパラギン酸の定量は、OPA法により誘導体化し蛍光検出器を用いてHPLCで定量した。モノアミンの定量はHPLCを用い電気化学検出器にて測定した。蛋白定量は、Micro BCA assayによった。

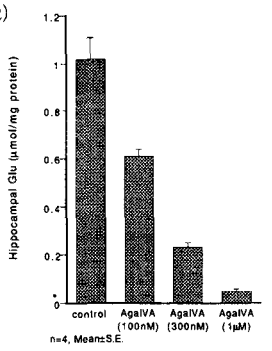
（結果）　培養したラット大脳皮質神経細胞から、電位固定法によりカルシウム電流を検出し、阻害剤に対する感受性を調べると、この細胞には、Nifedipine、ω-CgTX、およびω-AgaIVAで抑制されるチャンネル成分が含まれていた。この神経細胞を高濃度KClで刺激すると、グルタミン酸、アスパラギン酸の著明な遊離が見られた。カルシウムチャンネル阻害剤の作用を検討したところ、Nifedipine 3 μMでは全く阻害が認められず、ω-CgTX 3 μMでわずかに抑制傾向が見られた。一方、P-タイプカルシウムチャンネル阻害剤ω-AgaIVA 100 nMによって遊離は有意に抑制され、1 μMまで用量依存的な抑制効果が観察された。次いで、ラット海馬および線条体のスライスを用い、伝達物質の遊離に対する阻害剤の作用を検討した。グルタミン酸（図1）、アスパラギン酸、ノルエピネフリン、ドーパミン、およびセロトニンの遊離のいずれもNifedipine 3 μMでは全く抑制されず、ω-CgTXでは3 μM、10 μMでわずかに抑制傾向が見られた。

一方、ω-AgaIVA は 100 nM から用量依存的にグルタミン酸（図2）、アスパラギン酸の遊離を抑制したが、海馬のほうが線条体に比べてω-AgaIVA に対する感受性が高かった。また、ω-AgaIVA は海馬スライスからのセロトニンの遊離を 100 nM から濃度依存的に抑制した（図3）。線条体スライスからのセロトニンおよびドーパミンの遊離に対しては、ω-AgaIVA 300 nM ではほとんど影響が見られず、1 μM で約 70 % 抑制された。セロトニンの遊離抑制作用においてもグルタミン酸と同様に、海馬の方がω-AgaIVA に対して感受性が高かった。また海馬スライスからのノルエピネフリンの遊離に対するω-AgaIVA の抑制作用は比較的弱く、1 μM で 60 % 遊離を抑制しただけであった。

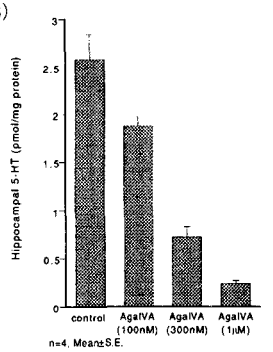
（図1）



（図2）



（図3）



（図1）海馬スライスを用いた50mM KCl刺激によるグルタミン酸の遊離に対するNifedipine,ω-CgTxの影響
（図2）海馬スライスを用いた50mM KCl刺激によるグルタミン酸の遊離に対するω-IVAの影響
（図3）海馬スライスを用いた50mM KCl刺激によるセロトニンの遊離に対するω-IVAの影響

（考察）　培養したラット大脳皮質神経細胞には、L-、N-、およびP-タイプのカルシウムチャンネルが存在することが、電位固定法により確認された。しかし、高濃度KCl刺激によるグルタミン酸、アスパラギン酸の遊離はNifedipine、ω-CgTX ではほとんど抑制されず、ω-AgaIVA によりほぼ選択的に抑制されることから、遊離される神経伝達物質と関与するカルシウムチャンネルのサブタイプ間には、密接な連関が存在することが推定される。海馬、線条体スライスを用いた実験においても同様に、グルタミン酸、アスパラギン酸の遊離とP-タイプカルシウムチャンネルとの選択的な連関の存在が明らかとなった。一方、グルタミン酸、アスパラギン酸遊離のω-AgaIVA に対する感受性は、組織により異なり、海馬の方がより低濃度から抑制を受けることから、チャンネルと遊離機構との連関メカニズムの違い、あるいは、介在する複数のP-タイプチャンネルの存在が示唆される。セロトニンの遊離についても同様に海馬、線条体ともにP-タイプチャンネルのほぼ選択的な関与と、組織による感受性の差異が認められた。海馬からのノルエピネフリンおよび線条体からのドーパミンの遊離についても、Nifedipine、ω-CgTX ではほとんど抑制されず、L-、N-タイプチャンネルの介在はほとんど認められなかった。これらモノアミンの遊離にも、P-タイプチャンネルが部分的に関与していることは明らかであるが、これのみでは説明されず、P-、L-、N-タイプ以外のカルシウムチャンネルサブタイプの介在が推定される。中枢神経系においては神経伝達物質の遊離にP-タイプのカルシウムチャンネルが、重要な役割を担っていることが明かとなったが、今後その生理的機能のみならず、病態への関わりの解明が重要と考えられる。

（参考文献）(1) Miller, R.J. (1987) Science 235, 46-52 (2) Dooley, D.J., Amelie Lupp, A.,and Hertting,G. (1987) Naun-Schmied. Arch Pharmacol. 336, 467-470 (3) Maggi,C.A., Tramontana, M., Cecconi, R., and Santicoli, S. (1990) Neurosci. Lett. 114, 203-206 (4) Feuerstein, T.J., Dooley, D.J., and Seeger, W. (1990) J. Pharmacol. Exp. Ther. 252 , 778-785 (5)Turner,T.J. and Goldin, S.M. (1989) Biochemistry 28, 586-593 (6) Pocock, J.M., and Nicholls, D.G. (1992) Eur. J. Pharmacol.-Mol. Pharmacol. 226 , 343-350 (7) Burke, S.P., Taylor, C.P., and Adams, M.E. (1992) Society for Neuroscience, Abstract p9 (8) Turner, T.J., Adams, M.E., and Dunlap, K.(1992) Science 258, 310-313

52 グリオスタチンの神経栄養因子活性とアストロサイト分化誘導因子活性

植木孝俊、中西圭子、大河内由香、浅井清文、加藤泰治
（名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門）

〔要約〕 グリア及びグリオーマの増殖抑制因子であるグリオスタチン(gliostatin)を精製し、ラット胎仔(E16)大脳皮質より分離されたニューロン・グリア共培養系を調製することにより、ニューロンとグリアに及ぼす影響を検討した。グリオスタチンを添加した共培養系では、神経線維の伸展と神経細胞体の集塊形成が顕著に促進され、また成熟したシナプスの形成が電子顕微鏡により観察された。一方、グリオスタチンの非存在下では、共培養10日目までに多くのニューロンが死滅した。さらに、グリオスタチンのもとでは特異的に線維性アストロサイトが分化したが、グリオスタチン無添加の系においては原形質性アストロサイトのみが出現した。これらと同様の結果が、アストロサイト単培養系にグリオスタチンを短時間添加することにより得られた条件培養液のもとでも確認された。この結果は、グリオスタチンの神経栄養因子活性がアストロサイトを介してもたらされることを示すと考えられる。

（目的）

グリオスタチン(gliostatin)は、はじめ神経線維腫より精製されたグリア及びグリオーマの増殖を抑制する約100kDのタンパク性因子である[1,2]。ここでは、グリオスタチンの神経栄養因子活性、さらにグリアに及ぼす影響を検討することを目的とした。

（方法）

ラット胎仔(E16)大脳皮質よりアストロサイトを分離し、10%FCSを含む低グルコースDMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培地中で7日間一次培養した後、スライドグラス上に播種した。このアストロサイト上に、ラット胎仔(E16)大脳皮質より分離されたニューロンを、$1X10^4 cells/cm^2$の密度で播種しニューロン・グリア共培養系を調製し、10%FCSを含む高グルコースDMEM培地中で14日間培養した。共培養系には、培養2日目より1日おきに既報に従いヒト胎盤より精製したグリオスタチン(5nM)を添加した。14日間培養後、抗ニューロフィラメント抗体及び抗GFAP(glial fibrillary acidic protein)抗体を用いて免疫組織化学染色を施した。さらに、透過型電子顕微鏡法により観察した。また、ラット胎仔(E16)大脳皮質より分離されたアストロサイトをスライドグラス上に播種し、アストロサイト単培養系を調製し10%FCSを含む低グルコースDMEM培地中で7日間培養した。この系にグリオスタチン(5nM)を投与し、1時間後に培地を交換し、さらに2日間培養することにより条件付け培地を得た。そしてあらかじめ調製したニューロン・グリア共培養系を、この条件付け培地のもとで14日間培養した。その後、抗ニューロフィラメント抗体及び抗GFAP抗体による免疫組織化学染色を行なった。

（結果）

14日間培養後、グリオスタチンを添加した系では神経線維の伸長と神経細胞体の集塊形成が顕著に促進された(写真1A)。しかし、グリオスタチン無添加の系では神経線維は微小であり、神経細胞体は均一に散在していた(写真1B)。また、共培養10日目において播種されたニューロンの約80%が生存していたが、グリオスタチン非存在下では約30% が生存するのみであった。14日間培養後、グリオスタチンを添加した系では特異的に線維性アストロサイトが分化したが、非存在下では原形質性アストロサイトのみがみられた(写真2)。一方、条件付け培地のもとで14日間培養した共培養系でも、同様の神経栄養因子活性と生存維持活性がみられた[3]。

（考察）

条件付け培地中にも神経栄養因子活性が見出されたことから、グリオスタチンは共培養系のアストロサイト層に作用し、アストロサイトからの神経栄養因子の産生を誘導していることが示唆された。一方、神経細胞体の集塊形成の機序は明らかでないが、グリオスタチンがアストロサイトにおける細胞間基質の蓄積を生じ、

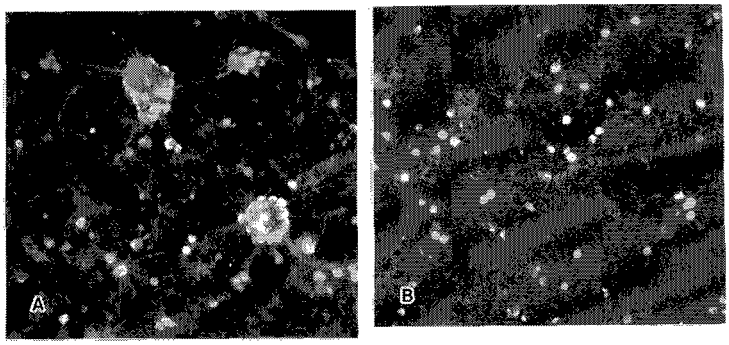
二次的にもたらされたとも考えられる。このような、グリオスタチンによる神経細胞体の集塊形成は、グリオスタチンがシナプス形成において重要な役割を果たしていることを示す。また、グリオスタチンの存在下での線維性アストロサイトの分化は、神経系の発生におけるグリオスタチンの関与を示唆し、今後in situ hibridization等により神経系の発生過程におけるグリオスタチンの発現を検討したい。

（結論）

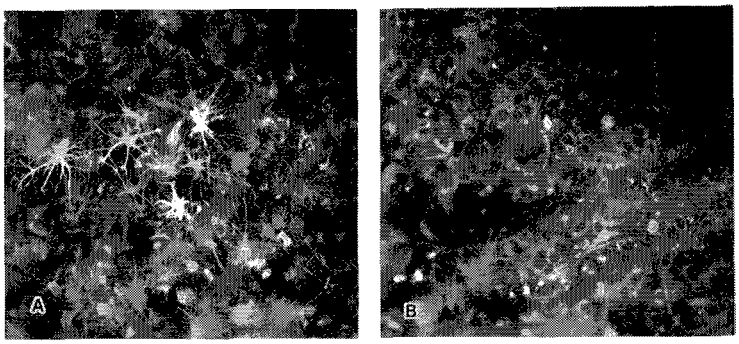
グリオスタチンが神経細胞生存維持活性を伴う神経栄養因子であり、さらに線維性アストロサイトの分化を誘導することが示された。これらはグリオスタチンが、神経系の発生分化に重要な役割を果たすことを示唆している。

（参考文献）

1. Asai K., Nakanishi K., Isobe I., Eksioglu Y.Z., Hirano A., Hama K., Miyamoto T., and Kato T. (1992) J.Biol.Chem. 267, 20311-20316
2. Asai K., Hirano T., Kaneko S., Moriyama A., Nakanishi K., Isobe I., Eksioglu Y.Z., and Kato T. (1992) J.Neurochem. 59, 307-317
3. Ueki T., Nakanishi K., Asai K., Okouchi Y., Isobe I., Eksioglu Y. Z., Kato T., and Kohno K. (1993) Brain Res. (in press)



(写真1) グリオスタチンの神経栄養因子活性
A グリオスタチンを添加した共培養系でみられる神経線維の伸展と細胞体集塊の形成、
B グリオスタチン非存在下で散在する神経細胞体



(写真2) グリオスタチンのアストロサイト分化誘導因子活性
A グリオスタチンのもとでの線維性アストロサイトの特異的な分化、
B グリオスタチン非存在下でみられる原形質性アストロサイト

53 PC12h-R 細胞は上皮増殖因子 (EGF) に応答して神経細胞様に分化する

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〕

上皮増殖因子 (EGF) は、PC12 系細胞に対して増殖を促進することが知られている。今回、我々は EGF により神経細胞様に分化する PC12h-R 細胞の存在を見いだしたので報告する。EGF を PC12h-R 細胞に作用させると、NGF を作用させた時とほぼ同様に神経突起の伸展および細胞分裂抑制の作用を観察した。EGF は $p140^{trkA}$ をチロシンリン酸化しないことから、EGF の作用は、NGF レセプターを介するものではない。NGF による $p140^{trkA}$ のチロシンリン酸化は、PC12h-R 細胞においても顕著に見られた。PC12h-R 細胞で見られる EGF の神経細胞様への分化誘導作用は、PC12 細胞系における NGF と EGF の作用機構を解析する上での有用な系を与えるものであると考えられる。

上皮増殖因子 (EGF) は、増殖細胞系に働く細胞成長因子として最初に見いだされたものであり、上皮系細胞の増殖と分化を制御するタンパク質として詳しい研究がなされている。副腎髄質クロム親和性細胞腫由来の PC12 細胞に対しても細胞増殖促進の作用を示す。我々が従来用いてきた PC12h 細胞 (1) においても、EGF は細胞増殖促進に働く。今回、PC12h 細胞の長期培養後に単離した、神経突起伸展の早い応答を示す PC12h-R 細胞 (2,3) が EGF に応答して神経細胞様に分化することを発見した。PC12h-R 細胞は、EGF により神経細胞様に分化することが初めて示された株細胞である。一方、初代培養系においては、EGF が大脳皮質のニューロンに対して神経栄養因子として作用することが報告されている (4)。PC12h-R 細胞における EGF の作用機構の研究は、分化と増殖の仕組み、さらには神経栄養因子の作用機序の解明につながると考えられる。

〔実験方法〕

PC12h-R 細胞の培養は既報通り行った (5)。細胞はコラーゲンコートしたディッシュにまき、EGF あるいは NGF 存在、非存在下で 数日間培養をし、神経繊維の伸長を見た。細胞数の測定は、細胞をトリプシンではがし、ヘモサイトメーターで測定した。$p140^{trkA}$ のチロシンリン酸化検出は、EGF あるいは NGF 処理、未処理の PC12h-R 細胞を 1% Triton X-100 を含む lysis buffer で可溶化し、次に抗 $p140^{trkA}$ 抗体により免疫沈降した後、抗ホスホチロシン抗体 (4G10) を用いたウエスタンブロッティングにかけることにより行った。

〔結果と考察〕

図1に示すように、PC12h-R 細胞に EGF を作用させると神経突起の伸展や細胞体の肥大等が、NGF添加の時と同様に観察された。また、図2に示すように EGF は PC12h-R 細胞に対し NGF と同様、細胞分裂を抑えるように働くことがわかった。これらの結果は、PC12h-R 細胞 が EGF により神経細胞様に分化することを示している。また、PC12h-R 細胞で見られる EGF の分化誘導作用は、NGF よりむしろ強いと思われる。次に、EGF が $p140^{trkA}$ を直接あるいは間接的に活性化したことが、PC12h-R 細胞でみられる EGF 作用の原因ではないことをみるために、PC12h-R 細胞での EGF による $p140^{trkA}$ のチロシンリン酸化を調べた。その結果、図3に示すように EGF による $p140^{trkA}$ のチロシンリン酸化は、少なくとも4時間後まで検

出できなかった。一方、NGF による $p140^{trkA}$ のチロシンリン酸化は 4 時間後まで顕著に観察することができた。これらの結果から、PC12h-R 細胞における EGF の分化誘導作用は、EGF レセプターを直接介して行われている可能性が高いと考えられる。

PC12 細胞に対し、NGF は神経細胞様への分化誘導を、EGF は細胞増殖促進の作用を示すことがよく知られている。しかしながら、両者のシグナル伝達系における違いは見いだされていなかった。最近、NGFによるシグナルの活性化は EGF と比べ持続的であることが報告された (6,7)。また、SNT と呼ばれる、NGF ではチロシンリン酸化されるが EGF ではされないといったタンパク質も報告されている (8)。今回報告する PC12h-R細胞を用いて、EGF のシグナル伝達系を解析することは、PC12 細胞における分化と増殖の機構を解明する手がかりを与えてくれるものと思われる。

図 1.

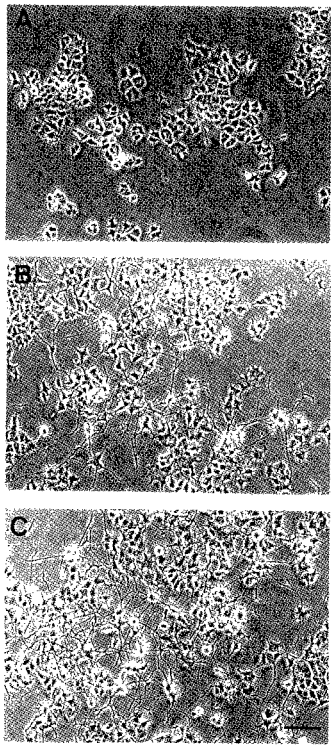


図 2.

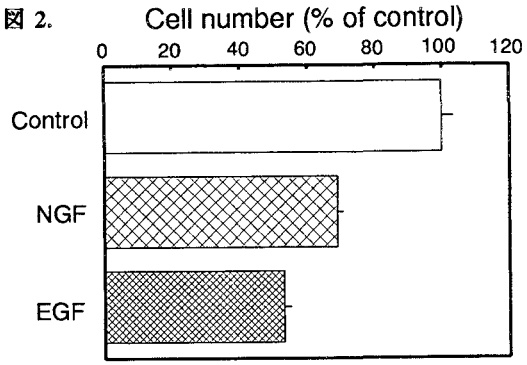


図 3.

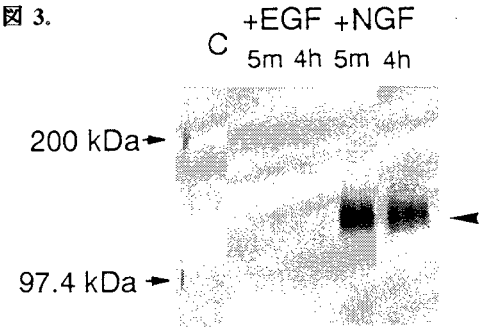


図 1. EGF と NGF による PC12h-R 細胞における突起伸展。PC12h-R 細胞を因子非存在 (A) 、100 ng/ml EGF (B) および 100 ng/ml NGF (C) 存在下で 4 日間培養した。スケール：100 μm

図 2. EGF と NGF による PC12h-R 細胞の細胞増殖抑制。PC12h-R 細胞を因子非存在 (Control) 、50 ng/ml EGF (EGF) および 50 ng/ml NGF (NGF) 存在下で 6 日間培養した後、細胞数を測定した。

図 3. PC12h-R 細胞における EGF と NGF による $p140^{trkA}$ のチロシンリン酸化。無添加 (C) および 100ng/ml EGF (+EGF)、100 ng/ml NGF (+NGF) の添加後 5 分 (5 m) と 4 時間 (4 h) での PC12h-R 細胞 における $p140^{trkA}$ チロシンリン酸化の検出結果を示す。

〔文献〕

(1) Hatanaka,H. *Brain Res.* ***222,*** (1981) 225-233. (2) Hatanaka,H. and Tsukui-Tamagawa,H. *3rd Int.Cong.Biol.,* (1984) Tokyo. (3) Ikenaka,K., Nakahira,K., Takayama,C., Wada,K., Hatanaka,H. and Mikoshiba,K. *J.Biol.Chem.* ***265,*** (1990) 19782-19785. (4) Morrison, R. in *Neurotrophic Factor,* Academic Press, (1993) 339-357. (5) 畠中寛　神経生化学マニュアル, 羊土社, (1990) 106-110 (6) Qiu,M.-S., and Green,S.H. *Neuron* ***9,*** (1992) 705-717. (7) Traverse,S., Gomez,N., Paterson,H., Marshall,C. and Cohen,P. *Biochem.J.* ***288,*** (1992) 351-355. (8) Rabin,S.J., Cleghon,V. and Kaplan,D.R. *Mol.Cell.Biol.* ***13,*** (1993) 2203-2213.

54 ニューロン細胞膜上のプラスミノーゲン結合蛋白の同定

中嶋一行，浜之上誠，竹本なぎさ，加藤兼房*，高坂新一
（国立精神・神経センター，神経研，代謝，*愛知県コロニー，発障研，生化）

〔要約〕
ラットの培養皮質および中脳ニューロンに対し神経栄養効果を示すプラスミノーゲンはニューロン膜上に存在する分子量約45kDa蛋白に特異的に結合することが示されたため、プラスミノーゲンレセプター様蛋白の候補として、その蛋白の分離、精製を試みた。胎生16-17日ラット脳よりパーコール遠心法を用い細胞膜を調製し、これを出発材料とした。膜抽出液をクロマトフォーカシング、ヒドロキシアパタイトおよびセファデックスG-150カラムクロマトグラフィーにかけ、リガンドブロット法により追跡、精製した。得られた45kDa蛋白はBrCNまたはスタフィロコッカスV8プロテアーゼにより断片化し、その部分アミノ酸配列を調べた。その結果、4つの断片はα-エノラーゼの配列と同一であった。実際ニューロン膜のプラスミノーゲン結合蛋白はラットのαエノラーゼ抗体により認識され、逆にラットαエノラーゼはプラスミノーゲン結合能を有していた。また45kDa蛋白へのプラスミノーゲン結合はα-エノラーゼ抗体により阻害された。以上の結果はニューロン表面膜上に存在するプラスミノーゲン結合蛋白がαエノラーゼであることを示している。

〔目的〕
既に報告したようにミクログリア分泌性プロテアーゼのひとつとして同定したプラスミノーゲン[3,4]は培養皮質ニューロンに対しては突起伸展を[2]、中脳ニューロンに対してはドーパミンの取り込みを[1]促進する活性を示した。一方、^{125}Iでラベルしたプラスミノーゲンは両ニューロンに特異的に結合する性質を有していた[1,2]。これらの結果は、プラスミノーゲンの神経栄養活性はニューロン上のレセプター様蛋白を介している可能性を強く推定させるものであった。昨年度報告したように培養ニューロンのホモジネートをプラスミノーゲンのリガンドブロットで検索すると、数種のプラスミノーゲン結合蛋白が検出された[5]。しかしプラスミノーゲンレセプターを想定すると、それは細胞膜上に存在する必要がある。そこで今回、ニューロンの細胞膜に存在するプラスミノーゲン結合蛋白に注目し、その分離、精製を試みたのでその結果を報告する。

〔方法〕
大脳皮質ニューロンは胎生16日のラット脳より分離し、10%FCSを含むMEM培地を用いて高密度（10^6 cells/cm^2）に培養した。細胞は3日後にラバーポリスマンでかきとり、遠心により集め、培養ニューロンとして回収した。また大脳は胎生16-17日のラットより摘出し用いた。培養ニューロンまたは胎仔脳は5倍量の0.32Mショ糖を含む緩衝液でホモジナイズし、1000 x g，10分遠心の上清を更に35,000 x g，30分遠心することにより沈澱（粗ミトコンドリア細胞膜画分）を得た。次にこれを20%パーコールに重層し、30,000 x g，15分の遠心を行い、細胞膜とミトコンドリアを分離した。細胞膜部分を遠心により集め材料とした。プラスミノーゲン結合蛋白の検出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。45 kDa蛋白のV8プロテアーゼによる限定分解は2M尿素存在下50 mM重炭酸アンモニウム（pH 7.8）中で行った。BrCN分解は0.5%BrCN（70%ギ酸中）で行った。蛋白断片はSDS-PAGE後イモビロンに転写した。生じた各バンドを切り出しアミノ酸シークエンサー（ABI477A）によりその配列を決めた。

〔結果および考察〕
培養ニューロンおよび胎生16日脳のホモジネートには数種のプラスミノーゲン結合蛋白が存在することがリガンドブロットにより明らかとなった（図1A）。ニューロン膜上に想定されるレセプター様蛋白に的を絞るため、胎生16日脳より細胞膜を調製しプラスミノーゲン結合蛋白を調べると分子量約45kDa蛋白が一種類検出された（図1B）。そこで胎生期脳より細胞膜を多量に調製し、この45kDa蛋白精製のための出発材料とした。膜抽出液をp

H7.4-pH4.0のクロマトフォーカシングにかけるとpH6.0付近に45kDaのプラスミノーゲン結合蛋白が溶出した。この画分を集め更にヒドロキシアパタイトおよびセファデックスG-150を用いて精製した。精製標品は均一なバンドを示しプラスミノーゲン結合能を保持していた（図１Ｃ）。次にこの蛋白をBrCNおよびＶ８プロテアーゼにより限定分解し、生じた４つの断片のアミノ酸配列を調べたところ、それらはラットαエノラーゼの配列に一致していた。そこでニューロン細胞膜に存在するプラスミノーゲン結合蛋白とαエノラーゼの同一性を検討するためにαエノラーゼ抗体による認識性を調べた。細胞膜とαエノラーゼを用いて（図２Ａ）、プラスミノーゲン結合性を見ると、細胞膜の分子量45kDa蛋白とエノラーゼは同位置でプラスミノーゲンを結合すること（図２Ｂ）、しかもそれらはαエノラーゼ抗体により認識されることが明らかになった（図２Ｃ）。またイモビロンに転写した細胞膜蛋白をαエノラーゼ抗体で処理し、プラスミノーゲン結合性を検討してみると、コントロール（図３，レーン２）に対しαエノラーゼ抗体処理したものはプラスミノーゲンの結合が著しく減少した（レーン３）。しかし同量の正常ウサギIgGで処理した場合（レーン４）は殆ど影響を受けなかった。従ってαエノラーゼ抗体処理によるプラスミノーゲン結合の抑制は特異的であることが示された。以上の結果はニューロン細胞膜に存在する45kDaプラスミノーゲン結合蛋白はαエノラーゼ様蛋白であることを示している。ニューロン膜上に検出されるαエノラーゼが細胞内シグナル伝達系にどのように関与しているのか興味深い問題である。

［文献］

1. Nagata K, Nakajima K and Kohsaka S. Dev. Brain Res. in press
2. Nagata K, Nakajima K, Takemoto N, Saito H and Kohsaka S. Int. J. Dev. Neurosci. 11, 227-237 (1993)
3. Nakajima K, Takemoto and Kohsaka S. FEBS Lett. 314, 167-170 (1992)
4. Nakajima K, Tsuzaki N, Nagata K, Takemoto N and Kohsaka S. FEBS Lett. 308, 179-182 (1992)
5. 中嶋一行，永田晃一，浜之上誠，竹本なぎさ，高坂新一．神経化学．31，158-159（1992）

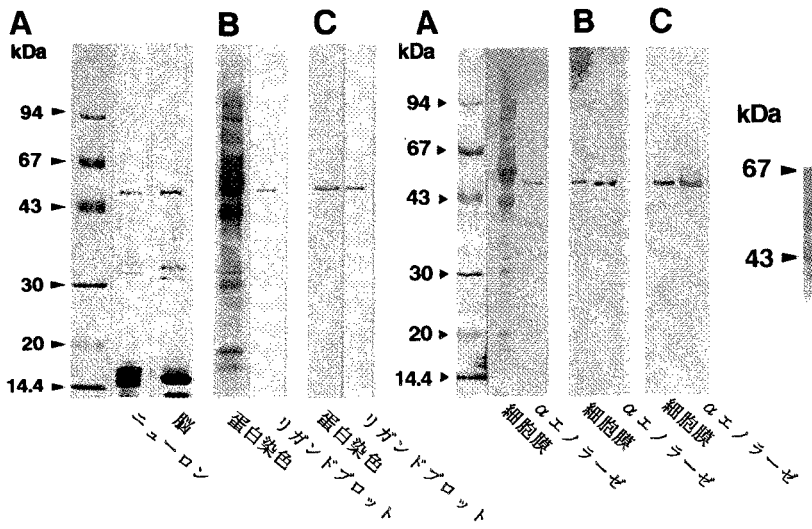


図１ リガンドブロットによるプラスミノーゲン結合蛋白の同定
A：ホモジネートへのプラスミノーゲンの結合性
B：細胞膜へのプラスミノーゲン結合性
C：精製プラスミノーゲン結合蛋白

図２ プラスミノーゲン結合蛋白とαエノラーゼの免疫学的同一性
A：蛋白染色
B：ビオチン化プラスミノーゲンの結合
C：α-エノラーゼ抗体の反応性

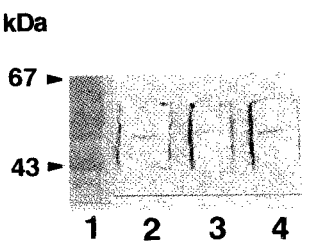


図３ αエノラーゼ抗体処理によるプラスミノーゲン結合の抑制
1 細胞膜蛋白染色
2 コントロール
3 αエノラーゼ抗体処理
4 ウサギIgG処理

55 加齢によるラット組織内HCNPとその類似体の変動

小鹿幸生、松川則之、大塚康史、三竹重久、片田栄一
名市大・医・第二内科

〔要約〕 現在 HCNP 類似物には、HCNP とそのアセチル基を除いた free-HCNP, それらの前駆体蛋白とが知られている。これらの組織内総量や各々の成分の加齢による変動について RIA法やHPLC法を用いて検討した。総HCNP類似体量は、頭頂後頭葉、海馬、中隔核および腎臓では加齢と共に増加し、生後 7-13日目に peak を示し、以後漸減をした。また、脳幹、小脳、脊髄では日齢により二峰性を示した。各神経系組織を HPLCによりfree-HCNP, HCNP, その前駆体に分離し測定すると、HCNP量は各組織で少なく、生後13日～30日目以後に少量検出された。一方free-HCNPは生後2日目から認められ、free-HCNP量とその前駆体量の比は新生仔期に高く、加齢と共に減少を示したことから、その発育、分化に於ける役割が示唆された。

［緒言］

HCNP はラット培養中隔核の Choline acetyltransferase 産生を誘導して acetylcholine産生を促進する新規ペプチドである(1)(2)。HCNPのN末端アセチル基を除いた合成 free-HCNPは培養系でより高い生物学的活性を示す(1)。また、HCNP をコードするcDNAクローンの検討結果、HCNPは21KDaの前駆体蛋白のN末端に位置していることも判明した(3)。本研究はこれらの HCNP類似体が各組織でどのような割合で存在し、加齢と共にどの様に変動するかを明らかにすることを目的とする。

［実験方法］

(1)組織抽出液作製：生後2日、7日、13日、30日、120日の Wistar rat 頭頂後頭葉、海馬、中核、脳幹、小脳、脊髄、肝臓、腎臓を摘出、直ちに冷凍保存し必要時解凍して用いた。各組織に5－6倍容積量の0.1%TFA を加え、超音波破壊し、15000xg, 40分の遠沈後、上清を凍結乾燥した。凍結乾燥した資料に 1 mM EDTA を含む50mM Tris-HCl pH7.8(RIA buffer)に再溶解し、再度遠沈にて得た上清を組織抽出液として用いた。蛋白量は BSAを標準蛋白とし Bradford 法(4)で測定した。

(2)HPLC法：ラット脳から精製された21KDa HCNP前駆体蛋白、合成HCNP, free-HCNP, 更に各種組織抽出液を 0.09%TFA に溶解、逆相系C4 Column を用いた HPLC で分画した。Buffer A;0.09% TFA, Buffer B;95%MeCN + 0.07%TFA を用い、1 ml/min の流速で Buffer B 濃度20%から60%までの liner gradient を実施した。

(3)抗HCNP抗体の作製と特異性の検討：free-HCNPをKLHに結合、Freund's complete adjuvantに懸濁し家兎を免疫、抗 free-HCNP 抗血清を得た。抗体の特異性は各種HCNP断片を抗原に用いたEIA法(5)により抗血清の抗原認識部位を検討した。更に２週齢ラット海馬、頭頂後頭葉、脳幹、小脳の組織抽出液を12% polyacrylamide gelを用いたSDS-PAGEで分離後、Immobilon-P^{SQ}に転写し抗free-HCNP抗体とABC法による免疫染色を実施して検討した。

(4)RIA法；HPLCの各画分は凍結乾燥後 0.25mlのRIA bufferに再溶解しsample 溶液として用いた。種々の濃度の標準free-HCNP溶液、各種組織抽出液、HPLCの各画分sample 溶液各々0.1mlと[^{3}H]HCNP (5000 DPM/0.1ml/assay)および１/200 希釈抗free-HCNP抗血清50μlを４℃, one or two overnight incubationした。結合と非結合の分離には Amerlex-M(Amersham)を用い、遠沈上清の放射活性を測定し、検量線からsample中のHCNP およびその類似体量を算定した。

［結果および考察］

今回用いた抗free-HCNP抗血清はEIAによる抗原認識部位の検討から、HCNPとは反応を示したが、各種HCNP断片との反応性は乏しかった。また、Western blot による検討から、本抗体は神経組織中の 23, 25KDaの成分と反応を示し、他の成分との交叉反応性は乏しかった(図１)。この23, 25KDa成分は、ラット脳から精製、単離されたHCNP前駆体蛋白の Western blotでも23KDaから25KDaに一本または二本のバンドとして検出されることからHCNP 前駆体蛋白と考えられた。

表１に加齢によるラット各組織中の総HCNP類似物量を示す。HCNP類似物は各日齢を通じ中隔核と腎臓に多い傾向が、肝臓で最も少ない傾向が認められた。頭頂後頭葉、海馬、中隔核および腎臓で

は加齢と共に増加し、生後7~13日でpeakに達して以後漸減する傾向が認められた。一方、脳幹、小脳、脊髄では日齢により二峰性を示す傾向が窺われた。組織抽出液には HCNP, free-HCNP, HCNP前駆体やその他の未知HCNP類似体が含まれていると考えられる。既知free-HCNP, HCNP およびHCNP前駆体をHPLC法で分離するとそれぞれRT 12.42, 15.15, 25.21分に溶出され、HPLC開始8分後から28分まで2分毎に分画すると、それぞれfraction(F)3, F4, F9 に含まれることが判明した。各神経組織抽出液をHPLCで分離し、F1からF10までの各画分をRIAによりHCNP類似体量を測定すると、各画分に於けるその量は各組織およびラットの日齢により異なっていた。図2にF3, F4, F9のそれぞれfree HCNP, HCNP, HCNP前駆体と考えられる成分の頭頂後頭葉、海馬、中隔核、脳幹に於ける日齢変化を示す。HCNPは脳幹を除く新生仔期の他組織ではほとんど検出されず、13日または30日以後に認められる様になった。一方、free-HCNP およびその前駆体蛋白は新生仔期より各組織に認められた。また、free-HCNP量とその前駆体量の比を計算すると、何れの組織に於ても生後2日目が最大で、それ以後漸減を示した。しかし、海馬組織では生後13日目まで比較的高い値を維持する傾向が認められた。これらの結果は、ラット神経系の発育・分化にfree-HCNPが重要な役割を演じている可能性を示唆するものと考えられ興味深い。HCNPはラットの発育に伴いアセチル化酵素が豊富となった時期にfree-HCNPから合成される可能性が考えられた。

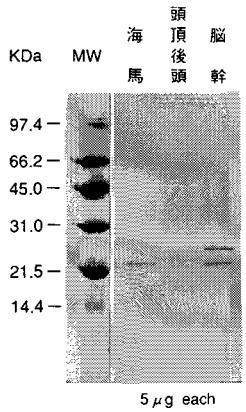


図1 Western blot

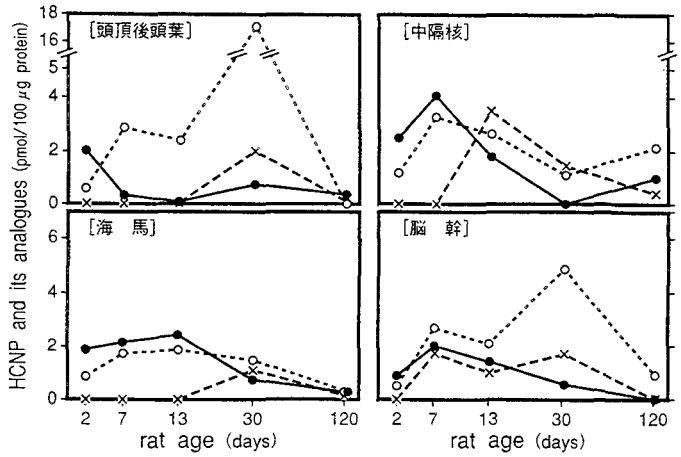
図2 ラット頭頂後頭葉、海馬、中隔核、脳幹組織抽出液にふくまれる、free-HCNP,HCNP,HCNP前駆体の加齢による変動

(表1) 加齢によるラット各組織中の総 HCNP 類似物量

(age)	2日	7日	13日	30日	120日
頭頂後頭葉	12.5	19.5	21.0	12.5	11.0
海馬	11.0	11.0	21.0	12.5	10.0
中隔核	23.0	30.0	20.0	13.5	18.0
脳幹	17.5	21.0	27.5	15.0	23.0
小脳	21.0	18.0	24.0	14.5	18.0
脊髄	19.0	19.0	11.0	18.0	16.0
肝臓	11.0	5.0	2.0	2.0	1.0
腎臓	20.0	26.0	18.0	15.0	8.0

(Pmol/100μg 蛋白)

Mean of two independent experiments



本研究の一部は文部省科学研究費；課題番号 NO 04268103 の援助を得て行われた。

[文献]
(1)Ojika, K. et al, Brain Research, 572:164-171, 1992. (2)小鹿幸生 他、神経化学、30:92-93, 1991. (3)東藤直樹 他、神経化学、31:258-259, 1992. (4)Bradford, M., Anal.Biochem., 72:248-254, 1976, (5)小鹿幸生 他、神経化学、31:260-261, 1992.

56 HCNP PROCESSING ENZYME の物理的、化学的性質

大塚康史、小鹿幸生、三竹重久、片田栄一、松川則之

名市大（医）第2内科

〔要約〕
Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) を前駆体蛋白からprocessingする酵素が存在することが10-11日齢ラット海馬組織抽出液を用いて判明した。基質には前駆体蛋白のN末端より26個のアミノ酸からなる合成ペプチドを用いた。反応産物は、アミノ酸シークエンサーおよびMass spectrumにてfree-HCNPと確認された。本酵素の物理的あるいは化学的性質についての検討を行った結果、分子量58,000-100,000、至適pH5-6、EDTAは活性を促進し、Chymostatin,E-64は活性を抑制すること等が判明した。また、DTTも活性を促進することが判明した。以上より、本酵素はシスティンプロテアーゼである可能性が示唆された。

［はじめに］
HCNPはラット培養中隔核のChATase産生を誘導して、Acho産生を促進するN末端がアセチル化された11個のアミノ酸からなる新規ペプチドであり[1)]、約21kDaの前駆体蛋白のN末端に位置し細胞内でprocessingされ遊離されるものと考えられる[2)]。今回我々は、このprocessing enzymeがラット海馬組織内に存在することを示し、その物理的、化学的性質について検討したので報告する。

［対象および方法］
1)10-11日齢Wistar ratの海馬組織片を摘出後、150mM NaCl、3mM KCl、1mM EDTAを含む 50mM HEPES-NaOH pH6.5溶液中で超音波破壊し、遠沈上清をGV filterにて濾過した物を粗抽出液とした。
2)HCNP前駆体蛋白のうちN末端より26個のアミノ酸からなる合成ペプチド (1-26 pro-protein：4mg/ml) を基質とし、海馬粗抽出液と37℃で反応後、0.1%TFAにて反応を停止させた。C18逆相系カラムとA液：0.1%TFA溶液およびB液：90%アセトニトリル+0.7%TFAの緩衝系を用いたHPLCにて、アセチル基を除いた合成free-HCNPと同じ溶出時間に出現するpeakを反応産物として採取し、そのアミノ酸配列および分子量をアミノ酸シークエンサーおよびMass spectrumにて検討した。
3)Processing enzymeの性質を以下について検討した。1-26 pro-protein(4mg/ml)10μl+酵素を含む抽出液25μl+緩衝液65μl　計100μlを37℃で反応後、0.1%TFAにて反応を停止させ、前記のHPLC法にて反応産物を検出した。いずれの実験においてもHPLCにおけるpeakの高さを酵素活性の指標とした。
(1)Molecular sieving column(Protein Pack 300、Waters社製、2連結)と150mM NaCl、3mM KCl、1mM EDTAを含む50mM HEPES-NaOH緩衝液pH6.5を用い分画した後、各画分を37℃、7時間反応させ分子量を検討した。酵素活性を有する画分を酵素液として用い、以下の実験を行った。
(2)Ion exchange column(Protein Pack DEAE 5PW、Waters社製)とA液：3mM KCl、1mM EDTAを含む10mM Tricine-NaOH緩衝液pH7.6およびB液：800mM NaCl、3mM KCl、1mM EDTAを含む10mM Tricine-NaOH緩衝液pH7.6を用い分画した後、各画分を37℃、7時間反応させion exchange columnへの吸着の有無を検討した。
(3)37℃での反応時間（1、2、3、5、7時間）と反応産物量の関係を検討した。
(4)150mM NaCl、3mM KCl、1mM EDTAを含む50mM MES-NaOHあるいはTAPS-NaOHを用い、pH4から9の範囲の緩衝液を作製し、これを用い37℃、7時間反応させ、至適pHを検討した。
(5)酵素液を56℃で前処理（0、5、10、30、60分間）を行った後、37℃、7時間反応させ熱に対する耐性を検討した。
(6)各種protease inhibitors (Antipain,APMSF,Aprotinin,Bestatin,Chymostatin,E-64,EDTA,Leupeptin,Pepstatin, Phosphoramidon、Boehringer Mannheim Biochemica社製) を加え37℃、7時間反応させ、各々の効果を検討した。

［結果］
粗抽出液では他の蛋白分解酵素の作用のためHPLCによるpeakの同定が困難であった。そのためMolecular sieving column後の溶液を酵素液として用いた。反応産物のアミノ酸配列とMass spectrumによる分子量の検討から、反応産物にはfree-HCNPが含まれ、1-26 pro-proteinからfree-HCNPをprocessingするproteaseが存在することが判明した。
以下、今回検討した本酵素の諸性質について述べる。Molecular sieving columnでは、分子量58,000-100,000 の画分に酵素活性を認め、以下の実験ではこの画分を酵素液として用いた。Ion exchange columnでは、Na^+360-424mMの画分に酵素活性を認めた。反応温度37℃では7時間までは反応時間とともにpeakの高さは漸増したことから、以下の実験では反応時間を7時間に統一した。pHの検討ではpH5から6でfree-HCNPと考えられる反応産物量は最高を示し、pH4あるいは

pH6.5以上で反応産物量は減少しており、至適pHは5から6と考えられ（図1）、以下の実験では反応系のpHを6とした。酵素液の56℃前処理では無処理（0分）に比べ、5分ですでに活性は62%に減少し、以後活性は漸減し 60分では16%にまで減少したことから、熱に対して不安定であると考えられた。各種protease inhibitorsの検討では、EDTAは活性を促進した。Chymostatinは相対活性43%、E-64は相対活性50%と抑制効果を認めた（表1）。この結果より、本proteaseはcathepsin Bに似た性質を持つシスティンプロテアーゼである可能性が示唆され、反応系に1mM DTTを加えたところ、加えない系に比べ68%の反応産物量の増加を認めた。

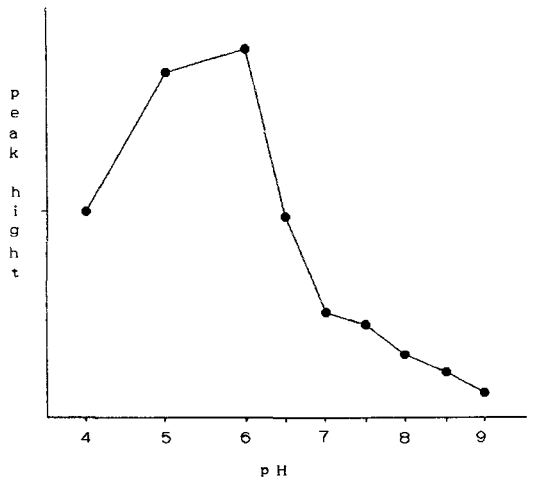


図1　pH4から9の範囲での酵素活性

表1　各種protease inhibitors の効果

protease inhibitor	濃度(μg/ml)	相対活性 (%)
無添加		100
Antipain	50	83
APMSF	20	71
Aprotinin	1	126
Bestatin	40	92
Chymostatin	50	43
E-64	5	50
EDTA	0.5	292
Leupeptin	2.5	75
Pepstatin	2.5	106
Phosphoramidon	15	90

[考察]

HCNPをその前駆体蛋白よりprocessingするproteaseがラット海馬組織内に存在することが判明した。その物理的あるいは化学的性質の検討、特に各種protease inhibitorsの検討よりシスティンプロテアーゼである可能性が示唆された。しかし、今回は精製されたproteaseでの検討でないため、他のproteaseをはじめとする各種蛋白等の影響も否定できないと考えられる。現在、本proteaseを精製中であり、今後さらにHCNPの代謝等についての解明が期待される。

[文献]

1)Ojika,K., et al. (1992) Brain research. 572,164-171
2)東藤直樹　他. (1992) 神経化学. 31(1),258-259

57　神経突起伸展因子受容体の構造と性質について

平　英一、高羽夏樹、郭　哲揮、三木直正

大阪大学医学部第一薬理

〔要約〕

神経突起伸展因子受容体は分子量約９０kDa　の糖タンパク質であり、ニワトリの砂嚢平滑筋に存在している。私たちはその性質を明らかにするために、その cDNA クローニングを行った。その結果、このタンパク質はイムノグロブリンジーンスーパーファミリーに属する新たなタンパク質であることが明らかになっている。今回そのサブタイプが存在していることがわかったのでその構造を明らかにした。またこれらの cDNA を哺乳類細胞に発現させ、その性質について検討した。

目的

私達は培養系においてニワトリ胚毛様体神経節ニューロンの突起伸展を引き起こす因子としてNOF (neurite outgrowt factor) を単離精製している。NOF は分子量約700kDaの細胞外マトリクスに存在する酸性糖タンパク質であり、神経系のほかに砂嚢平滑筋、骨格筋、心筋などにも存在している（１）。NOF 受容体はNOF に結合する細胞膜蛋白質としてやはり砂嚢平滑筋より精製しており、発生初期の神経系や網膜にも発現している（２）。神経系における発現時期は神経細胞が突起を伸展させる時期に一致している。このことは、神経の突起伸展に NOF 受容体が深く関与していることを示唆している（３、４）。この NOF 受容体はその推定アミノ酸配列からイムノグロブリンジーンスーパーファミリーに属するタンパク質であることが明らかになった。細胞外領域には Ig 様ループ構造を５個持ち、 SC1, MAG, L1, NCAM 等と類似した構造をしている。このような NOF 受容体の cDNA クローニングを行った際に、3’ 端は２種類存在することが明らかになったので、その構造を明らかにする。また、単離した NOF 受容体 cDNA を L929 マウス線維芽細胞に発現させ、その性質について検討する。

方法

NOF 受容体の cDNA をプローブとしてニワトリ砂嚢の λgt11 発現ライブラリーのスクリーニングを行い、陽性クローンを単離した。単離したクローンはプラスミドにサブクローン化し、ジデオキシ法により、その塩基配列を決定した。また、3’ 端の異なる mRNA が実際に存在する事を示すために、砂嚢 RNA の RT-PCR を行い、その産物の検討を行った。

単離した cDNA は発現ベクター pcDNA1 に挿入し、L929 マウス線維芽細胞にリポフェクチンを用いて導入した。発現細胞については免疫組織化学を行い、その局在を検討した。また、発現細胞よりタンパク質を抽出し、抗 NOF 受容体抗血清によるイッムノブロットを行った。

結果

NOF 受容体 cDNA の3’ 側をプローブとしたスクリーニングにおいて、複数のクローンを単離し、制限酵素によるマッピング及び、その塩基配列を決定したところ、２種類のクローンが存在した。NOF 受容体 cDNA に3’ 側の異なるサブタイプが存在するかを明らかにするためにニワトリ砂嚢平滑筋より、 AGPC 法により total RNA を抽出し、reverse transcriptase により cDNA を合成後、それぞれのクローンに特徴的なプライマーによる PCR (polymerase chain reaction) を行った。RT-PCR の結果、及び塩基配列の解析より、２種類のクローンのうち、片方のクローンは他方のクローンの一部に挿入配列を含んだものであることが明らかになった（図１）。すでに単離している短い C 末を持つクローンの細胞内ドメインは２１アミノ残基より構成されているが、今回新たに得られたクローンは3’ 側の細胞内ドメインコード領域に１１８塩基対の挿入配列を持つために、フレームシフトを含めて、細胞内ドメインは６０アミノ残基より構成されていることが明らかになった。

単離した cDNA をリポフェクチンを用いて L929 マウス線維芽細胞に一過性に発現させると、免疫組織化学において細胞膜が染色された（図２）。この事実と、推定アミノ酸配列に膜貫通領域と思われる疎水性部位が存在することから、NOF 受容体は細胞膜上に存在すると思われる。またこの細胞を用いてウエスタンブロットを行うと砂嚢に見られる約 90kDa のダブレットバンドの片方（大分子量）に一致したバンドが認められた。

考察

NOF 受容体には細胞内ドメインの異なる２種類のサブタイプが存在することが明らかになった。ノーザンブロットにおいても同一組織内で複数のバンドが認められることや、組織によってもバンドの高さが異なることから alternative splicing による複数の mRNA が存在していると思われる。今回得られたサブタイプは３' のみが異なるものであった。単離した cDNA をマウス線維芽細胞に導入、発現させてウエスタンブロットを行うと、砂嚢に見られるようなダブレットバンドは見られず、ダブレットバンドの大分子量のバンドに一致したシングルバンドが認められたが、これは糖鎖付加の違いによるものと考えられる。

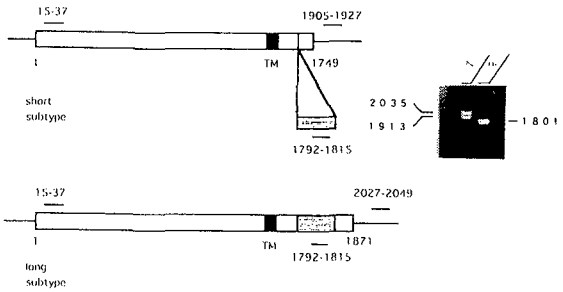


図１　NOFR のサブタイプ

lane 1: PCR product, primer 15-37 and 1905-1927
lane 2: PCR product, primer 15-37 and 1792-1815

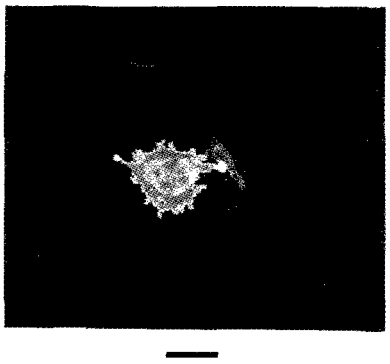


図２　NOFR の免疫細胞化学

(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., Taniura H., Taira E. and Miki N. (1992) Neurosci. Lett. 140 78

58 β-アミロイドペプチド（25-35）によるアポトーシス様の神経細胞死とIGF-IIまたは血清添加による抑制

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）由来の海馬初代培養細胞を用いてβ-アミロイドペプチド（25-35)（β25-35）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3-5日間培養した細胞にβ25-35を20μg/ml添加すると3-4日後に著しい細胞毒性が見られ、IGF-IIまたは血清の添加によって抑制された。この細胞毒性は核およびDNAの断片化を伴っており、aurintricarboxylic acidよっても抑制された。無血清条件下のβ25-35はアポトーシスを誘導する可能性があり、またこの毒性は細胞内情報伝達系の障害を介していることが示唆された。

現在、β-アミロイド蛋白の神経毒性が大きな焦点であるが、必ずしも一致した結果が得られていない。我々は、β22-35及びβ25-35（アミノ酸配列がそれぞれβアミロイド蛋白の22-35及び25-35位のペプチド）が無血清の条件下で著しい細胞毒性を引き起こし、インスリンなどによってその細胞毒性を抑制されることを報告した[1]。今回は、β25-35を用いてこの細胞毒性がアポトーシスかどうか、さらにInsulin-like growth factor (IGF-I 及びIGF-II)による抑制の有無を調べた。

[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3-5日間培養した後、細胞にβ25-35単独、あるいは透析済血清、Aurintricarboxylic acid（ATA）、IGF-I, IIと同時に添加する。3-4日間培養したのち、細胞壊死を位相差顕微鏡像、トリパンブルー染色あるいは細胞外遊離LDH活性を測定することによって確認した。核の染色は細胞を10%ホルマリン中性緩衝液（pH7.4）で固定したのち、H33258（8 μg/ml）で 5 分間行なった。

[結果] 培養6日目に血清を除き3-4日間DMEMのみで培養した細胞に、β25-35を20 μg/ml　となるように添加すると、3-4日後に著しい細胞毒性が顕微鏡像やトリパンブルー染色によって観察され、核およびDNAの断片化（図1）を伴っていた。1%の血清添加群ではβ25-35による細胞毒性は見られなかった。このβ25-35の細胞毒性はエンドヌクレアーゼ阻害剤として知られるATA　あるいはIGF-IIでも有意に抑制された（図2、3）。

[考察]　細胞を無血清の条件にしてやると、β25-35の著しい細胞毒性が観察できた。この毒性は1%の血清存在下では全く見られない。最近、Pikeら[2]も合成培地で培養した海馬細胞（培養12日目）に対するβ25-35の細胞毒性を報告した。IGF-IIはβ25-35による細胞毒性を抑制しており、この細胞毒性が細胞内情報伝達系（細胞内カルシウム濃度変化などを介した）と関わっている可能性がある。また、β25-35はアポトーシスを促進する可能性が強い[3]。

β25-35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。

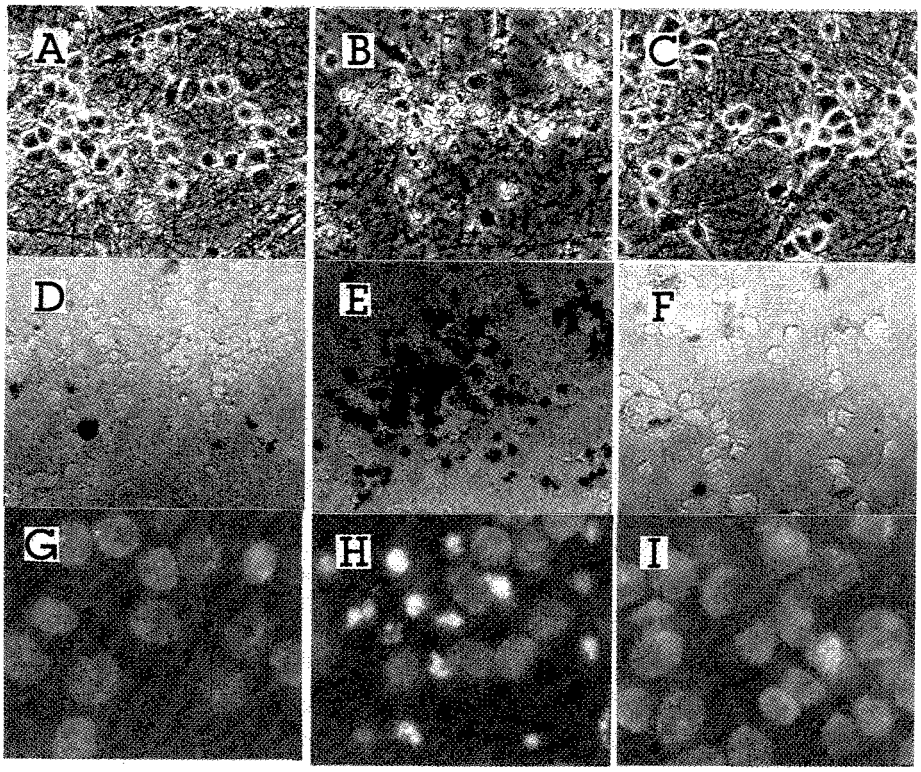


図 1 β25-35による細胞毒性
A-C: 位相差像　D-F: トリパンブルー染色　G-I: H33258染色
A,D,G: Control　B,E,H: β25-35　C,F,I: β25-35+Serum

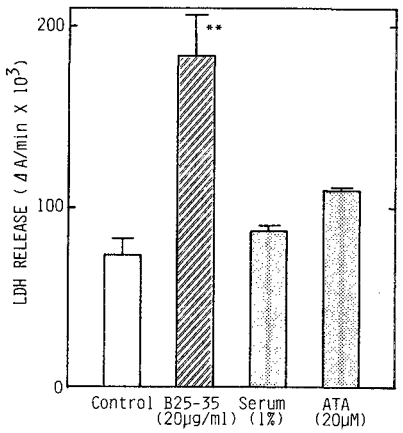


図 2 β25-35による細胞毒性に対するserum, ATAの保護作用

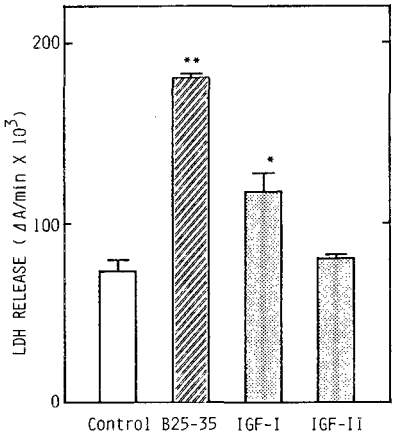


図 3 β25-35による細胞毒性に対するIGF-I, IIの保護作用

[文献]
1. Takadera, T., Sakura, N., Mohri, T. and Hashimoto, T. (1993) Neurosci. Lett. (in press)
2. Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. (1993) J. Neurosci. 13, 1676-1687
3. Forloni, G., Chiesa, R., Smiroldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F. and Angeretti, N.(1993) Neuroreport 4, 523-526

59 培養神経細胞におけるβ-アミロイド蛋白による神経細胞死

上田恵一、福井義弘、藍山宏康

(塩野義製薬・研究所)

β アミロイド蛋白(β-AP)の神経細胞に対する影響をラット胎仔初代培養神経細胞を用いて検討した。蒸留水に溶解した直後のnewβ(1-40)は無血清条件下で7 日間培養した海馬神経細胞に対して5 μM以上で用量依存的に細胞毒性を示した。水溶液中で7 日間放置したagedβ(1-40)はnewβ(1-40)の約10倍強い細胞毒性を示した。β(1-28)には細胞毒性はみられなかったが、β(25-35)はagedβ(1-40)と同程度の細胞毒性が認められた。agedβ(1-40)を細胞に3 時間暴露した後、ペプチドを含まない培地で培養を続けても2 日後には細胞毒性が認められた。agedβ(1-40)による細胞毒性は海馬、大脳皮質神経細胞で強く認められたが、小脳の顆粒細胞に対しては弱く、アストロサイトでは殆どみられなかった。以上よりβ-APは神経細胞に対して強い細胞毒性を示すが、脳の部位によって影響の受け方が異なるこが示唆された。

β-アミロイド蛋白(β-AP)は40前後のアミノ酸からなるペプチドで、アルツハイマー病(AD)患者にみられる老人斑等のアミロイド沈着物の主要構成成分として知られている。AD患者において老人斑周辺で神経細胞死が多くみられることから、β-APに神経細胞毒性があるのではないかと考えられ、β-APの*in vitro*および*in vivo*での作用が調べられている(1,2)。最近、β(1-42)は水溶液中でaggregateし、これに伴いラット胎児の海馬初代培養神経細胞に対する細胞毒性がみられることが報告された(3,4)。今回solubleおよびaggregatedβ-APを用いてラット胎仔脳の初代培養神経細胞に対する影響を調べた。

[実験方法]

海馬および大脳皮質細胞はSD系ラットの19 日齢胎仔から調製し、Brewer's B18 componentsを含むDulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM)に懸濁した(3)。小脳顆粒細胞は生後7 日齢のSD系ラットより調製し、25mM KCl、Brewer's B18 componentsを含むDMEMに懸濁した。アストロサイトは培養6日目の大脳皮質の初代培養から調製した。大脳皮質細胞を10%ウシ胎児血清、5%馬血清を含むDMEMで培養し、培養6 日目にトリプシン存在下で分散した。細胞は全てpoly L lysineコートした24-well dish上で培養した。β(1-40)はApplied Biosystems 430Aペプチド合成機で合成したものを使用し、一部のβ(1-40)およびそのフラグメントはBachem Inc.より購入した。各ペプチドは蒸留水に溶解し、溶解直後のβペプチドをnewβ、溶解後7 日間37 ℃で保存したものをagedβとした。β-APの細胞毒性の評価はMTT法により行なった(5)。

[結果と考察]

海馬培養神経細胞の培養1 日目(DIV1)および培養7 日目(DIV7)に5.8 μMのnewおよびagedβ(1-40)を添加し3 日後の細胞の生存率を測定したところ、DIV1の細胞に対してnewβ(1-40)は細胞毒性を示さなかったが、agedβ(1-40)では有意な細胞毒性が認められた。一方、DIV7の細胞に対してはnew,agedいずれも細胞毒性を示した(図1)。agedβ(1-40)による細胞毒性はnewβ(1-40)の約10倍強くみられた。このような細胞毒性に対して、サブスタンスPの前処理は保護作用を示さなかった。β(1-40)のフラグメントによる細胞毒性を検討したところ、β(25-35)にはβ(1-40)とほぼ同程度の細胞毒性がみられたが、β(1-28)には毒性は認められなかった(図2)。agedβ(1-40)による細胞死の経時的変化について検討を行なったところ、細胞死は4 時間で僅かにみられるだけで顕著にみられたのは24 時間以降であった。agedβ(1-40)を細胞に一定時間処理し、ペプチドを含まない培地に交換して2 日後の神経細胞の生存率を調べたところ1 時間の処理では細胞死は全く認められず、3 時間処理

によって毒性作用が認められた(図3)。

DIV7の海馬神経細胞、大脳皮質神経細胞、小脳顆粒細胞およびアストロサイトに対する細胞毒性を比較した。海馬、大脳皮質細胞に対して強い細胞毒性がみられたが、小脳顆粒細胞に対する細胞毒性は弱く、アストロサイトではみられなかった(図4)。

海馬培養神経細胞に対して、new β(1-40)の細胞毒性は神経細胞の成熟度により異なるが、aged β(1-40)の効果は神経細胞の成熟度には影響されず、しかもnew β(1-40)に比べて増強された。また、aged β(1-40)によって細胞毒性が発現するには、比較的長時間細胞を処理する必要のあることが明かとなった。aged β(1-40)による細胞毒性は神経細胞に特異的であり、また、脳の部位の違いによってβ-APに対する感受性が異なる可能性が示唆された。

[文献]

1.Yankner, B. A., Duffy, L. K. and Kirschner, D. A. (1990) Science, 250, 279-282.

2.Kowall, N. W., Beal, F. M., Busciglio, J., Duffy, L. K. and Yankner, B. A. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88, 7247-7251.

3.Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. (1991) Brain Res., 563, 279-282.

4.Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. (1991) Eur. J. Pharmacol., 207, 367-368.

5.Manthorpe, M., Fagnani, R., Skaper, S. D. and Varon, S. (1986) Dev. Brain. Res., 25, 191-198

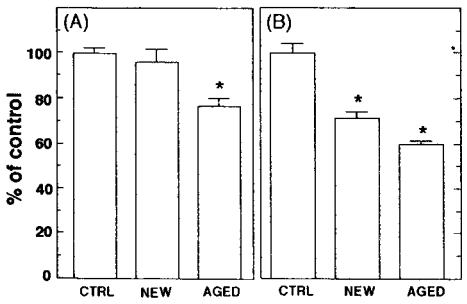


Fig.1. The neurotoxic effect of β(1-40)s on hippocampal neurons. New and aged β(1-40) (5.8 μM) were added to 1(A) or 7 day old cultures(B), and toxic response were determined 3 day later. (n=4) *P <0.01 vs. control.

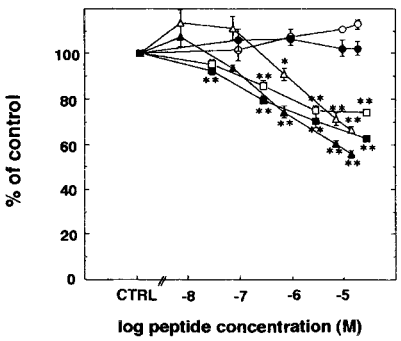


Fig.2. The neurotoxic effect of aged β(1-40) and related peptides. △, new β(1-40); ▲, aged β(1-40); □, new β(25-35); ■, aged β(25-35); O, new β(1-28); ●, aged β(1-28). (n=3) *P <0.05, **P <0.01 vs. control.

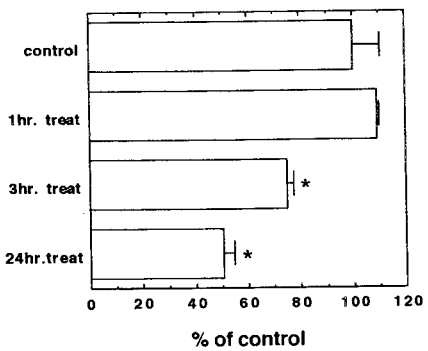


Fig.3. The neurotoxitic effect of aged β(1-40) depended upon the duration of exposure. (n=4) *P <0.01 vs. control.

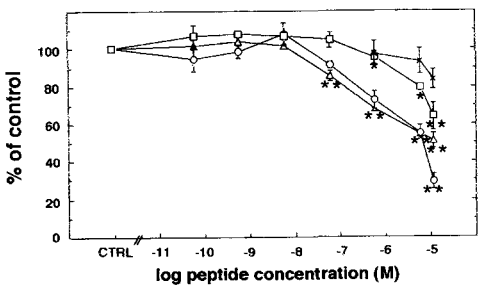


Fig.4. Aged β(1-40) toxity in several cultured neuronal cells. △, hippocampal neurons; O, cerebral cortical neurons; □, cerebellar granule cells; ×, astrocytes. (n=3) *P <0.05, **P <0.01 vs. control

60 βアミロイドペプチドによるミトコンドリア機能(MTT還元能)の特異的低下作用について

金子　熱，亀之園正弘，桜庭祐子，山田紀子
（三共(株)，バイオサイエンス研）

〔要約〕βアミロイドペプチド(β25-35)はPC12神経系細胞及びHeLa細胞のミトコンドリアMTT 還元能(電子伝達系を反映)を低濃度で特異的に低下させたが(IC50 = 10～100nM)，色素排除試験,CV 染色,^{3}H-thymidine 取り込み活性で判定する細胞毒性作用は全く発揮しなかった。一方，β25-35 はラット胎児海馬神経細胞に対しては細胞毒性を発揮し，生存神経細胞数(MAP2 免疫染色)を減少させた。このことはβアミロイドの作用点の一つは細胞表面の受容体を介したミトコンドリア電子伝達系活性の低下であり，従って殆どのエネルギーを解糖系(glucose→lactate)に依存するHeLa，PC12細胞株には毒性を発揮できないが，ミトコンドリアの電子伝達系のエネルギーに大きく依存する海馬神経細胞には毒性を発揮することを示唆する。〔D-Ser^{26}〕β25-35 はβ25-35 と同程度の強いMTT 還元能低下活性を保持するが，β25-35 と異なりBrain extract proteinaseにより分解されなかった。老化等により蓄積するD-アミノ酸変換βアミロイドとアルツハイマー病発症との関係に興味が持たれる。

〔序文〕　アルツハイマー病(AD)の病因解明のためのアプローチとして，老人斑に沈着するβアミロイドペプチドの蓄積機構とβアミロイドペプチドによる脳神経細胞変性の機序に多くの関心が集まっている。Yankner らはβアミロイドペプチド(β1-40)及びその断片β25-35 がin vitro及びin vivo で海馬由来の神経細胞を変性・壊死させ，さらにSubstance P がその作用を打ち消すと報告した(1,2)。しかし，その後，他の研究室では必ずしも再現性が得られず，多くの論争を引き起こしている(3)。また，βアミロイドが原因の一つとしても，海馬神経細胞の選択的な障害及び老齢でのADの発症を充分には説明できない。我々はβ25-35 (^{25}GSNKGAIIGLM^{35})，β1-40，及びそれらのD-アミノ酸を含む関連ペプチドを合成し，PC12神経系細胞をはじめとした各種培養細胞に添加し，それらの細胞内代謝に及ぼす影響について検討した。その結果，βアミロイドペプチドは細胞のミトコンドリア電子伝達系活性を反映するMTT 還元能を特異的に低下させることを見出したので報告する。

〔方法〕1)ペプチド：βアミロイドペプチド及びその関連ペプチドはABI 社の430 A Peptide Synthesizer を用いてFmoc法(HOBT/NMP Cycle)で合成した。合成ペプチドは0.1 % TFA-CH_3CN 中でC18 逆相HPLCで単離・精製し，無菌的に凍結乾燥後，- 20℃で保存した。得られたペプチド配列はアミノ酸組成分析，N 末端アミノ酸配列分析，D/L- アミノ酸分析(FLEC 法) 及びFABMS(TMS-SX/SX102A タンデム型質量分析装置) によって確認した。

2)細胞培養：PC12細胞は非働化10% 馬血清・5% FBSを含むDMEM中で継代培養し，アッセイ時に10% GIT/DMEM培地で96穴plate で培養した。HeLa細胞は10% 非働化FBS を含むMEM 中で培養した。ラット胎児海馬神経細胞はYankner らの方法に準じた(1)。ペプチドは培地を直接加え超音波処理で可溶化後，細胞に添加した。

3)細胞生存度評価法：MTT 還元能測定は常法に従い(4)，MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)を培養細胞(96 well plate) に添加し，37℃，4 h インキュベート後，塩酸/2- プロパノールでホルマザンを抽出し，特異的吸光度(Δ570nm - 660nm)をmicroplate reader で測定した。トリパンブルー染色法，Crystal violet(CV)法および^{3}H-thymidine，^{3}H-uridine，^{3}H-leucine取り込み法は常法に従った。ラット胎児海馬神経細胞の場合はYankner らの方法に準じ，MAP2免疫染色を行い海馬神経細胞数を計測した。

〔結果と考察〕

1)βアミロイドペプチドによるミトコンドリアMTT 還元能低下作用

β25-35 (^{25}GSNKGAIIGLM^{35}) 及びその関連ペプチドを各種培養細胞系に添加し，その細胞代謝活性に及ぼす影響について調べた。その結果，β25-35 はHeLa細胞のミトコンドリアによるMTT 還元能(電子伝達系活性を反映，succinate dehydrogenase による) を非常に低濃度で特異的に低下させたが(IC50 =10 ～100 nM)，いわゆる細胞毒性作用を全く発揮しなかった(図 1)。すなわち，トリパンブルー色素排除試験による生細胞数，Crystal Violet(CV)法による付着細胞数及び，^{3}H-thymidine，^{3}H-uridine，^{3}H-leucine の取り込み活性は100 μM以上でも殆ど影響を受けなかった。PC12 細胞もNGF 存在・非存在に関わらずβ25-35 によりMTT 還元能が特異的に低下(IC50 = 20～ 100ng/ml)したが(図 2)，培地中にglucose とNGF が充分に存在するときにはトリパンブル

一色素排除試験及び^{3}H-thymidine取り込み活性を指標とした細胞毒性作用はやはり発揮されなかった。 一方，Yankner らの方法に準じ，ラット胎児海馬神経細胞培養系にβ25-35 を添加・培養後，MAP2免疫染色により海馬神経細胞数を計測したところ，実験により差はあるものの，β25-35 は濃度依存的に生存海馬神経細胞数を減少させることが分かった(IC50 = 50～1000 ng/ml) 。 このことは殆どのエネルギー(ATP) を解糖系(glucose→lactate)に依存する長期継代培養可能な細胞(HeLa, PC12 等) に対しては，βアミロイドは電子伝達系活性を低下させても細胞毒性は発揮しないが，ミトコンドリアの電子伝達系のエネルギーに大きく依存する脳神経細胞とくに海馬神経細胞は細胞毒性を発揮することを示唆する。βアミロイドのMTT 還元能低下作用はアミノ酸一次構造及び高次構造に大きく依存した。すなわち，β25-35 配列を含むβ1-40もMTT 還元能を特異的に低下させる(IC50 = 240 nM, HeLa) が，β25-35 のAsn^{27} をAsp^{27} に置換すると，活性は1/50～1/100 に低下した。 また，一部アミノ酸配列が類似なSubstance P, Spantide は高濃度(100 μM 以上) でMTT 還元能を低下させた(agonist) 。

一方，D-Ser^{26} に置換したもの〔D-Ser^{26}〕β25-35 はHeLa細胞及びPC12細胞の何れにおいてもβ25-35 と同等もしくはそれ以上に強いMTT 還元能低下活性を示した(図 3) 。β25-35 の作用(MTT還元能低下) には細胞種特異性があり，HeLa，PC12株には作用するが，HeLaS3, L929, K562, CEM, EL4, CMK, IMR32株には殆ど作用しない。このことは，細胞表面の何らかの受容体を通してMTT 還元能低下作用が発揮されることを類推させる。

2)脳ホモジネート上清 (brain extract)によるβ25-35 の分解

β25-35 をウシ或いはラットのbrain extract を添加し，37℃でインキュベートすると，β25-35 は急速に分解され，HPLC上でのピークが消失し，それとともにMTT 還元能低下活性も減弱した。一方，〔D-Ser^{26}〕β25-35 はbrain extract による分解は殆ど見られなかった(図 4)。Brain extract 中のβ25-35 分解活性は熱処理及びEDTA処理で失活するが，DFP，leupeptin処理では抑制されにくかった。以上の結果は老化や何らかの原因で生じる可能性のあるD-Ser 変換βアミロイドが脳内の分解活性に抵抗し，アルツハイマー病変に関与する可能性を示唆する。

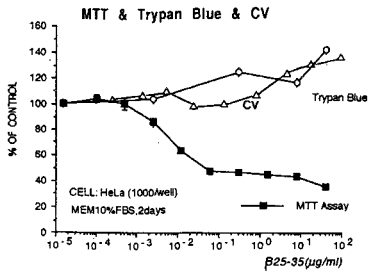


図1. β25-35 によるHeLa細胞でのMTT 還元能の特異的低下作用.

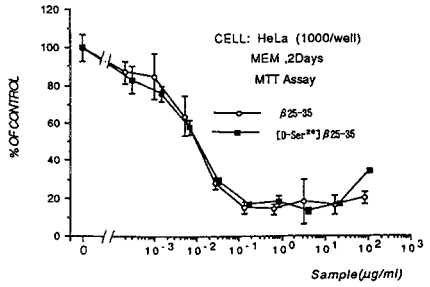


図3．[D-Ser^{26}]β25-35によるHeLa細胞でのMTT還元能の特異的低下作用

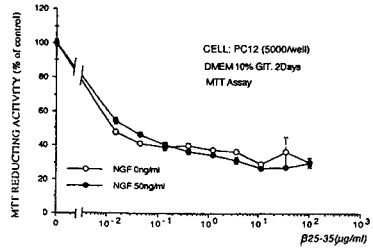


図 2. β25-35 のPC12細胞でのMTT 還元能低下活性.

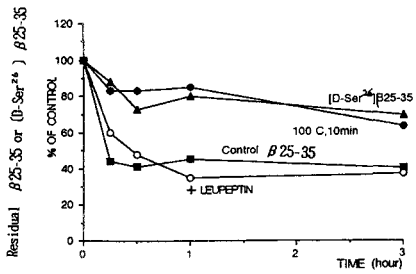


図4．β25-35 と〔D-Ser^{26}〕β25-35 のウシ脳ホモジネート上清(brain extract) による分解活性に対する感受性の相違.

文献

1) Yankner,B.A. et al(1990) Science, 250, 279

2) Yankner,B.A. et al(1990) Pro.Natl.Acad.Sci.87,9020

3) Kowall,N.W.et al(1992) Neurobiology of Aging 13,536

4) Mosmann,T et al(1983) J. Immun. Methods, 65, 55

61　神経細胞株におけるアミロイドβ蛋白の生成について－ＡＰＰ遺伝子導入による検討－

荒木　亘、国下龍英、池田幸弥、高橋慶吉、田平　武
（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第６部）

〔要約〕
βアミロイド前駆体蛋白（APP）を過剰発現する神経細胞株を作成し、その細胞株を用いてβ蛋白の分泌について検討した。マウスcholinergic hybridoma cell line（SN49）に、マウスAPP695 cDNA を導入し、トランスフェクタントを得た。この細胞株では　APP mRNA 発現は対照の３倍以上に増加していた。抗β蛋白抗体を用いる免疫沈降法により培養上清中の4kDa 蛋白の増加が認められた。更に、アミノ酸分析の結果、この4 kDa蛋白がβ蛋白であることが同定された。従ってこのAPP遺伝子導入神経細胞株はβ蛋白の生成に至る代謝過程の解析のための有用なシステムになると思われる。

〔緒言〕
アルツハイマー病は老人斑の脳内への出現を特徴とする痴呆疾患で、その病因には老人斑の主成分であるβアミロイド蛋白の蓄積が深く関与することが示唆されている。β蛋白は膜蛋白構造を持つβアミロイド前駆体蛋白（APP）に由来する42～43個のアミノ酸からなるペプチドである。APP の分解についてはβ蛋白配列の内部で切断されるsecretory pathway が報告されているが、β蛋白の生成する機序は現在不明である。最近 amyloidogenic C 末断片がライソゾーム、エンドゾーム系で生成すること（4, 5）やβ蛋白自体が細胞から分泌されること（6, 9）が報告され、secretory pathway 以外の代謝経路の存在が示唆されている。
今回我々は、このβ蛋白の生成機序を明らかにする目的で、遺伝子導入により APPを過剰発現する神経細胞株の分離を試みるとともに、β蛋白の分泌について検討を行った。

〔方法〕
1. トランスフェクション
宿主細胞はマウス生後中隔野ニューロン由来の hybrid cell line（SN49）（8）を用い、DMEM/10% FCSで培養した。マウス APP695 cDNAをネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼプロモーターを含む発現ベクター（pXT2）に挿入し、リン酸カルシウム法で細胞に導入した。G418（500 μg/ml）による選別後、トランスフェクタント３クローン（SN49-A#1～3）を分離した。また、対照としてベクターのみを導入したトランスフェクタント２クローン（SN49-P#1, 2）を得た。
2. トランスフェクタントにおけるAPP 発現の検討
APP mRNA量は細胞より抽出したtotal RNA を用い、マウス　APP cDNA をプローブとして、ノーザンブロット法で解析した。細胞抽出液中の APPの蛋白量は抗APP　C末抗体（3）を用いるウエスタンブロットで分析した。
3. 培養上清中のβ蛋白の分析
細胞を[^{35}S]メチオニンで標識し、上清に抗β蛋白抗体（7）、protein A-agaroseを添加し、得られた免疫沈降物をTris/Tricine SDS-PAGEで分離した後、フルオログラフィーで検出した。アミノ酸配列は抗β蛋白抗体による免疫沈降物を電気泳動後、アミノ酸シークエンサーで解析した。

〔結果〕
SN49、SN49-P　２クローン、SN49-A　３クローンの APP発現をmRNAレベルで検討した。各細胞株で約3.5 kbの位置にAPP mRNAのバンドが認められ、SN49-Aでは対照に比較して、発現の増加が観察された（Fig. 1）。βアクチン量で補正すると、SN49-Aでは APP発現が３倍以上に増加していることが判明した。更に、ウエスタンブロットにより蛋白レベルでも全長型 APPの増加が確認された。また興味深いことに、SN49-Aの増殖速度は対照に比較して約60％に低下しており、SN49-A#2, 3 では細胞内に空胞が多数出現していた。

次に、培養上清中のβ蛋白の存在を検討した。SN49-P、SN49-Aともに抗β蛋白抗体で認識される 4 kDaの蛋白が認められ、その量はSN49-Aで著明に増加していた（Fig. 2）。この 4 kDa蛋白の移動度は合成ペプチドβ1-42と一致した。更に、N末端アミノ酸配列の分析の結果、 4 kDa蛋白のN末端はマウスのβ蛋白領域のN末端と一致した。

［考察］

遺伝子導入により全長型の APPを過剰発現する神経細胞株を作成することができた。この細胞株の一部で、細胞内空胞の出現が観察されたことより、過剰の APPが神経細胞の生存度に影響を与えることが示唆される。現在、この点について詳細に検討中である。また、遺伝子導入細胞ではβ蛋白の生成が増加していることが示され、最近の報告（6, 9）とも一致した。従って、マウス神経細胞でもヒト細胞と共通のβ蛋白生成に至る APP代謝経路が存在することが示唆された。この可溶性β蛋白の増加がアルツハイマー病の病因になりうることを示唆する報告(1, 2)もあり、脳に沈着するβ蛋白は細胞外に分泌されたβ蛋白に由来する可能性がある。今後はこの実験系を用いてβ蛋白の生成、分泌に関わる因子を検索し、β蛋白蓄積の機序を追究していく予定である。

［謝辞］

本研究の一部はヒューマンサイエンス振興財団の受託研究費、厚生科学研究補助金（長寿科学研究）、笹川医学医療研究財団の研究助成金の援助のもとに行われた。

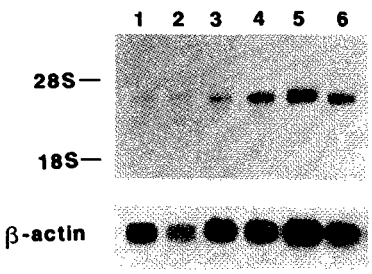


Fig. 1 Northern blot of APP cDNA transfected SN49 cells. 1: SN49, 2: SN49-P#1, 3: SN49-P#2, 4: SN49-A#1, 5: SN49-A#2, 6: SN49-A#3

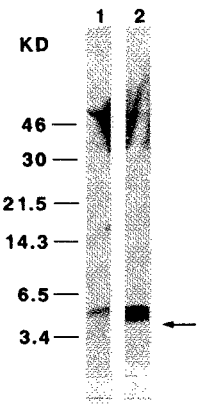


Fig. 2 Immunoprecipitation of cell-conditioned medium.
1: SN49-P#1, 2: SN49-A#2

［文献］

1. Cai, X. D. et. al. (1993) Science 259, 514-516. 2. Citron, M. et. al. (1992) Nature 360, 672-674. 3. Estus, S. et. al. (1992) Science 255, 726-728. 4. Golde, T.E. et. al. (1992) Science 255, 728-730. 5. Haass, C. et. al. (1992) Nature 357, 500-502. 6. Haass, C. et. al. (1992) Nature 359, 322-325. 7. Koike, F. et. al. (1988) J. Neurol. Sci. 85, 9-15. 8. Lee, H.J. et. al. (1990) Dev. Brain Res. 52, 219-228. 9. Shoji, M. et. al. (1992) Science, 258, 126-129.

62 アミロイド蛋白脳室内投与によるアルツハイマー型老年期痴呆症モデル動物の作製 ー学習記憶およびコリン作動性神経に対する影響ー

新田淳美、伊東亜紀雄、鍋島俊隆
名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部

〔要約〕
アルツハイマー型老年期痴呆症患者脳には、アミロイド蛋白の沈着が観察されている。しかし、*in vivo*でのアミロイド蛋白の作用についてはほとんど研究されていない。本研究では、合成アミロイド蛋白を成熟ラットの脳室内に持続的に注入を行ない、学習記憶能力およびコリンアセチルトランスフェラーゼ活性に及ぼす影響について検討した。アミロイド蛋白を1週間持続注入後、水迷路学習および受動的回避反応試験法において学習記憶能力の低下が観察された。また、皮質および海馬のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が有意に減少した。本実験では、アミロイド蛋白の成熟した脳での*in vivo*での影響を明らかにした。さらに、これらの実験結果は、アルツハイマー型老年期痴呆症モデル動物の開発に結びつくと考えられる。

高齢化社会において老年期痴呆症の急増は社会的に深刻な問題になりつつある。特に、アルツハイマー型老年期痴呆症は、現在、発症の機序が不明で有効な治療法もなく、原因解明や治療法の確立は緊急を要する重要課題の1つとなっている。しかし、現在、同症の治療薬の開発に用いられているモデル動物は、化学的および物理的に脳の一部に損傷を与えることによって作製している。このようなモデル動物は、同症の特徴である脳内の老人斑やアミロイド蛋白の沈着を伴なっていない。近年、培養条件下での研究によって、アミロイド蛋白が種々の細胞に対し毒性を有することが報告されている（1、2）。そのため、アミロイド蛋白の沈着がアルツハイマー型老年期痴呆症患者の脳内神経細胞の脱落や記憶障害の原因となっている可能性が考えれる。しかし、それらのことを直接証明した研究は、ほとんど行なわれていない。本研究では、成熟したラットに合成アミロイド蛋白を持続注入し、学習記憶能力およびコリン作動性神経に及ぼす影響について検討した。

【実験方法】実験には、7週齢の雄性ラットを用いた。1群の動物は、7匹とした。アミロイド蛋白を35%アセトニトリルおよび0.1%トリフルオロ酢酸に溶解し、1日あたりの注入量が3, 30および300p moleになるようにミニ浸透圧ポンプ(11.52±0.48μl/day)を用いてラット脳室内に持続注入した（3）。ポンプ埋め込み手術時は、ペントバルビタール麻酔下で行なった。なお、溶媒が浸透圧ポンプに影響を与えないことをAlzaidのテストキットを用いて事前に確認した。注入8日目に自発運動量をアニメックスにより10分間測定した。注入9日目から13日目まで水迷路学習を1日2試行行ない、各試行ごとに入水からプラットフォームにたどり着くまでの遊泳時間を測定した。注入14および15日目に受動的回避反応学習試験を行なった。受動的回避反応学習試験法では、明暗2つの部屋からなるstep-through 型の装置を用いた。ラットを明室に置き、暗室に移動後速やかに床グリットから電気ショックを負荷した。装置から一旦取り出し、24時間後に再びラットを明室に置き、暗室に移動するまでの時間（滞在時間）を測定した。その後断頭し、脳分割後、HPLC-ECD法によってコリンアセチルトランスフェラーゼ活性を測定した。

【実験結果】自発運動量を10分間測定したところ、偽手術群のラットでは、時間の推移に伴って測定装置の環境に馴れ除々に運動量が減少してくるが、アミロイド注入群では減少の程度が少なかった（Fig. 1）。水迷路学習法では、各ラットのプール投入後からプール中央のプラットフォームに辿り着くまでの遊泳時間を測定した。第1試行では、いずれの動物も最大観察時間の90秒間遊泳していた。偽手術群のラットは試行を重ねるに従って急激に遊泳時間が短縮した。アミロイド蛋白300p mole/day注入群では、第6試行以降偽手術群に比べて有意に遊泳時間が延長した（Fig. 2）。受動的回避反応学習試験法の保持試行では、偽手術群のラットでは1日目の電気ショックを記憶しているため7匹中6匹が最大観察時間の300秒間明室に留まっていたが、300pmole/day注入群では、

2匹のみであった。コリンアセチルトランスフェーラーゼ活性は、偽手術群では、前頭葉皮質、頭頂葉皮質、海馬および線条体でそれぞれ1169.4±24.4, 718.9±45.3, 899.7±56.9および4041.7±691.6 nmole/min/g であった。前頭葉皮質でアミロイド蛋白(3および30 pmole/day) 注入群のコリンアセチルトランスフェーラゼ活性がそれぞれ85.5±5.4および81.3±7.1%と有意に減少した。海馬では、アミロイド蛋白(300 pmole/day) 注入群のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が82.1±5.1%と有意に減少した（Fig. 3）。

【考察】これまでアミロイド蛋白の神経細胞に対する影響についての報告は培養条件下での研究が中心的になされてきた。アミロイド蛋白がアルツハイマー型老年期痴呆症の記憶障害や細胞脱落の原因であることを証明するためには、成熟ラットの神経機能に対する影響を検討することが不可欠である。本実験の結果から、アミロイド蛋白を持続的に脳室内へ注入することにより、2つの試験法において学習記憶障害が観察され、さらに、アルツハイマー型老年期痴呆症患者脳で著しく変性・脱落しているコリン作動性神経系に障害を与えることが示めされた。これらの結果は、アミロイド蛋白の沈着がアルツハイマー型老年期痴呆症の記憶障害の原因の1つであることを証明するとともに、より病態に近いモデル動物の開発に結びつくものと考えられる。

【謝辞】アミロイド蛋白を供与されました塩野義製薬株式会社に深謝致します。

【参考文献】

(1) Yankner, B. A., Duffy, L. K., and Kirshner, D. A. (1990) *Science* 250, 279-282

(2) Roher, A. E., Ball, M. J., Bhave, S. V., and Wakade, A. R. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 572-579

(3) Nabeshima, T., Ogawa, S., Ishimaru, H., Kameyama, T., Fukuta, T., Takeuchi, T., and Hayashi, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 215-219

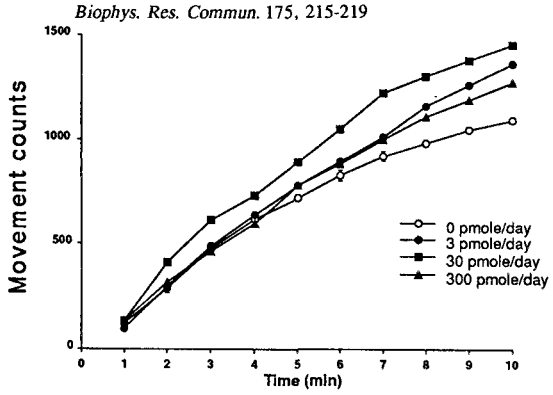


Fig. 1 Effects of β-amyloid protein on the spontaneous locomotor activty.

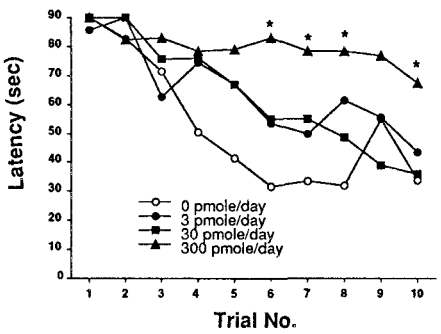


Fig. 2 Effects of β-amyloid protein on the performance of the water maze task in rats. Each value for latency shows mean. *p<0.05 (Tukey's test)

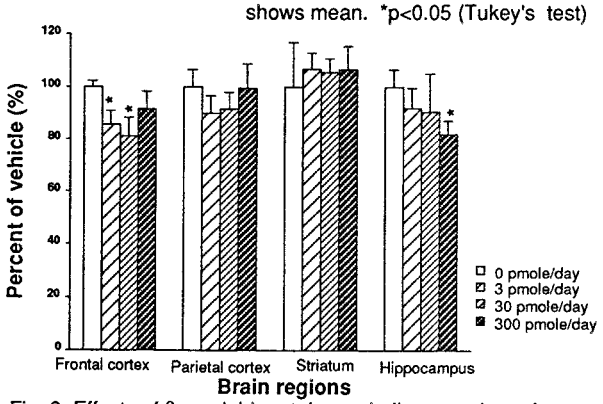


Fig. 3 Effects of β-amyloid protein on choline acetyltransferase activity in the various brain regions Bar heights are means ±SEM. *p<0.05 (Mann-Whitney's U test)

63 マウス神経系発生過程における核蛋白質 NECDIN mRNA の発現

高城 啓一，吉川 和明
（東京都神経科学総合研究所分子神経生物部門）

〔要約〕
神経特異核蛋白質 necdin の mRNA の発現パターンを，非放射標識プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により，マウス神経系の発生過程を追って解析した．ニューロンを示すコントロールとして，ニューロンのマーカーとして一般的である 68 kD-neurofilament protein (NFL) mRNA の発現パターンも調べた．その結果，necdin mRNA は中枢神経系の発生過程において，最終分裂を終えて脳胞（神経管）の外套層に達したニューロンで強く発現されており，感覚神経や交感神経などの末梢神経を含むほとんどすべてのニューロンで発現されることがわかった．一方，NFL mRNA は，中枢神経系の発生過程においては，すべてのニューロンで発現されるというよりは，かなり限局された領域で強く発現されることがわかった．以上の結果より，necdin は細胞分裂，および，増殖層からの移動を終了したニューロンで強く発現され，ほとんどのニューロンで神経系の発生初期から発現される蛋白質であり，成体の神経系だけでなく，特に神経系発生初期における神経分化のマーカーとして有用であると考えられる．

【序論】

胚性ガン細胞株 P19 はレチノイン酸処理によってニューロン，アストロサイトなどの神経系細胞に分化させることができる．この細胞株について，神経系細胞に分化した細胞と，未分化の細胞間で，サブトラクションクローニングを行い，神経系細胞の分化に特異的な cDNA として necdin がクローニングされた(1)．さらに，necdin の推定アミノ酸配列から作製したペプチド抗体により，necdin は主としてニューロンで発現し，核内に局在することが示された(1,2)．また，necdin はマウスの神経系発生のきわめて初期からニューロンにおいて発現されていた(2)．

今回，我々はアイソトープ標識よりも高い解像度が得られるジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い，マウス胚における necdin mRNA の時間－空間的発現パターンを調べた．また，その際のコントロールとして，ニューロンのマーカーとして一般に用いられている NFL についても，同様に発現パターンを調べた．

【方法】

成体マウスの脳，および，胎児を 4 % paraformaldehyde/PBS で固定後 10-20 μm の凍結切片を作製し，*in situ* ハイブリダイゼーションを行った．プローブには，full length necdin cDNA を Bluescript II に挿入し，T3 RNA polymerase を用いて DIG 標識-UTP でラベルしたアンチセンス RNA（～ 1.5 kb）をアルカリ処理により平均 150 ベースに切断したものを用いた．ハイブリダイゼーションシグナルの検出には，Nucleic Acid Detection Kit (Boheringer Mannheim)を用いた．

【結果と考察】

Necdin mRNA は，胎齢 10.5 日 (E10.5) ですでに発現しており，端脳，間脳，中脳，後脳の腹側で強い発現がみられた（図 1）．脊髄腹側，脊髄後根神経節にも強い発現が見られた．Necdin mRNA を発現しているのは，どの胎齢においても脳胞（神経管）の外套層に存在する細胞に限られ，神経上皮細胞層（マトリックス細胞層）では，ハイブリダイゼーションシグナルは検出されなかった（図 2）．このことは，necdin が増殖中の神経幹細胞や，移動中の神経芽細胞では発現されず，最終分裂を終えて分裂終了細胞になったニューロンで強く発現されることを示している．発生が進行し，ニューロンの数が増えていくに連れて nedin mRNA 陽性細胞も増加した（図 1, 3a, 4a）．最終的にはほとんどすべてのニューロンで necdin mRNA の発現がみられた．また，中枢神経系に限らず，末梢神経系に属する脊髄背根神経節，交感神経節などほとんどの神経細胞で，発生の進行にともなった necdin mRNA の発現がみられた．脳内におけるハイブリダイゼーションシグナルの強さは，大脳旧皮質，視床下部，橋，延髄など，個体発生上早く出現する脳領域ほど強く，また，系統発生上古い脳領域ほど強いという傾向があった．

一方，NFL mRNA は，神経系の発生の初期においては成体の場合と異なり，すべてのニューロンに発現されていると言うわけではなく，その発現に領域特異性がみられた．E10.5, E11.5 においては，中脳より後方の中枢神経系では強い発現がみられ，発現する細胞の分布は necdin mRNA とほぼ同じであったが，発現している細胞は necdin と比較すると少なかった．端脳，間脳では，necdin mRNA が脳胞基底部で強く発現しているのに対して，NFL mRNA は，端脳，間脳では，どの部位においてもほとんど発現していなかった（図 3a, 3b）．E14.5 においても，necdin mRNA は端脳や間脳の基底部で強い発現がみられるが，NFL mRNA は，間脳より前方の領域ではほとんど発現はみられず，中脳より後方の中枢神経系では，赤核，下オリーブ核など，限定された細胞集団（神経核）において強く発現していた（図 4a, 4b）．このように

NFL mRNA 発現は領域特異的であり，また，網膜神経節細胞層，耳胞，腸神経叢細胞での強い発現もみられた．このことは，おそらくこれらの時期での神経突起形成の領域差を反映しているものと考えられる．

以上の結果より，necdin は細胞分裂，および，増殖層からの移動を終了したニューロンで強く発現され，ほとんどのニューロンで神経系の発生初期から発現される蛋白質であり，成体の神経系だけでなく，特に神経系発生初期における神経分化のマーカーとして有用であると考えられる．

【参考文献】

1. Maruyama, K., Usami, M., Aizawa, T., and Yoshikawa, K., Biochem. Biophys. Res. Commun. 178: 291- 296 (1991)
2. Aizawa, T., Maruyama, K., Kondo, H., and Yoshikawa, K., Dev. Brain Res. 68: 265- 274 (1992)

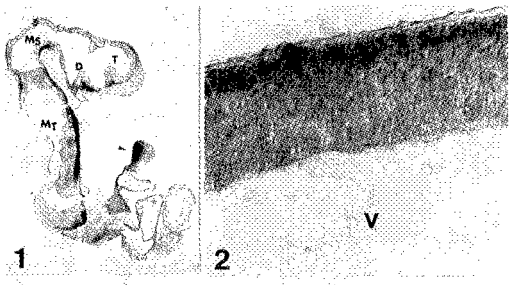


図1．E10.5 マウス胚での necdin mRNA の発現(矢状断)．Necdin mRNA は端脳，間脳，中脳，後脳 の腹側で強く発現している．また，脳胞だけでなく，第一鰓弓の上部 (arrow head) でも強く発現している．T：端脳，D: 間脳，MS：中脳，MT：後脳

図2．E11.5 中脳蓋．Necdin mRNA は脳胞の最外側でのみ発現しており，マトリックス細胞や移動中の神経芽細胞では発現していない．V：脳室

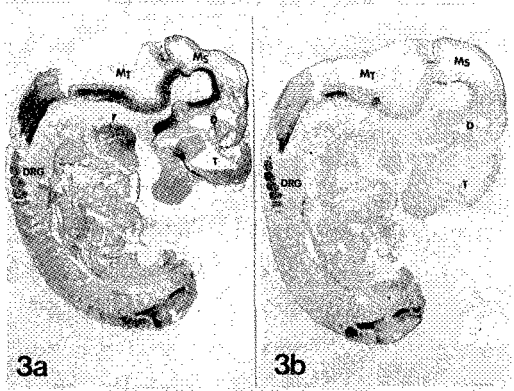


図3．E11.5 マウス胚での necdin (a), および，NFL (b) mRNA の発現（矢状断）．Necdin mRNA は脳胞の全域，および，脊髄後根神経節で強く発現しており，脳胞腹側で多くの細胞が necdin mRNA を発現している．第一鰓弓の上部(arrow head)にも発現がみられる．一方，NFL mRNA は，端脳，間脳ではほとんど発現していない．また，後脳においても，限られた細胞しか NFL mRNA を発現していない．T：端脳，D: 間脳，MS：中脳，MT：後脳，DRG：脊髄後根神経節

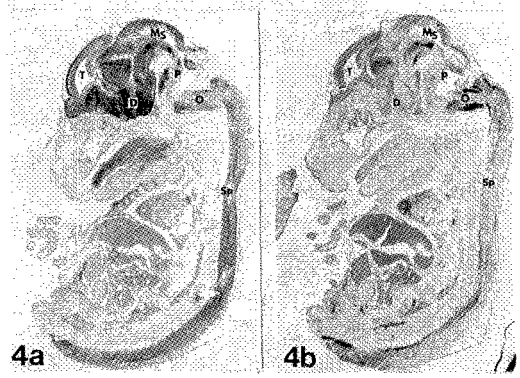


図4．E14.5 マウス胚での necdin (a), および，NFL (b) mRNA の発現（矢状断）．Necdin mRNA は中枢神経系の全域全域で強く発現している．舌を構成する筋肉(arrow head) においても necdin mRNA は発現されている．NFL mRNA は，端脳，間脳ではほとんど発現していない．また，中脳，橋，延髄では，特定の領域に限局して強い発現がみられる．T：端脳，D: 間脳，MS：中脳，P：橋，O：延髄，SP：脊髄

64　小脳の形成過程で発現調節されるタンパク質nuclein(V-2)の組織内局在と発現様式

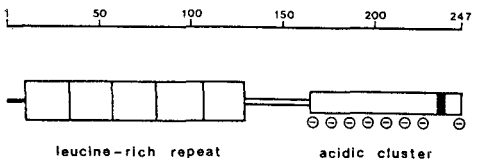
松岡邦枝、篠田友孝、田岡万悟*、山国徹*、宋時栄*、礒辺俊明
（都立大・理・化、三菱化成生命研*）

〔要約〕
V-2は小脳の成熟過程で発現が調節されているタンパク質の一つで、cDNAクローニングによる構造解析の結果から、いわゆるLeucine-rich Repeat ファミリーの一員であることが明らかになっている。本研究では免疫組織化学、及び *in situ*ハイブリダイゼーション法によって、 V-2の組織内分布、小脳の成熟過程におけるV-2 mRNAの発現様式を検討した。 V-2は小脳においてプルキンエ細胞や顆粒細胞などの神経細胞の核に局在していた。V-2 mRNAは小脳成熟の初期過程で、分化増殖が活発に起こっている “neurogenic region” である外顆粒細胞層で強く発現し、成熟後もプルキンエ細胞と顆粒細胞で発現していた。核内因子としての特徴と、一次構造の一部が核小体に存在する nucleolinと似ていることを考慮して V-2をnuclein と命名した。

【はじめに】
nuclein(V-2)は小脳の成熟過程で発現量が一時的に増加する強酸性タンパク質である。精製タンパク質ならびにcDNAの解析から、 nucleinはアミノ酸 247残基から成るポリペプチドで、N末端側 1/2にはショウジョウバエの背腹軸形成に関与する *Toll*遺伝子産物(1) や酵母のアデニル酸シクラーゼ(3) などと共通の Leucine-rich Repeat構造の23残基のモチーフが５回繰り返す構造を持ち、C末端側 1/3には非ヒストンタンパク質HMG1や核小体に局在するnucleolin などに存在する酸性アミノ酸のクラスター構造(2) を持つ特徴的な分子構造が明らかになっている。また、酸性クラスター内部には核移行シグナルに類似の配列が認められる(4)（図１）。 nuclein mRNAの発現は生体内の各種臓器で認められ、特に脳、肺、腎臓、脾臓で強く発現が認められた。脳内での発現は広範囲にわたり、とりわけ小脳で強い発現が認められた。本研究では、免疫組織化学及び *in situ*ハイブリダイゼーション法によって、 nucleinの小脳組織内分布と小脳の成熟過程におけるmRNAの発現様式を解析した。

【方法】
nuclein抗体はウシ脳より精製したタンパク質をウサギに免疫して得た抗血清を、プロテインＡをリガンドとするアフィニティーHPLCに導入し、 IgG画分として精製・濃縮して使用した。組織内分布は、生後７週齢のラット小脳凍結切片を用い、 nuclein抗体によって免疫組織化学染色を行って解析した。ラット小脳の生後発達に伴うmRNAの発現の変化は、生後 3,14,28日齢のラット小脳を用い、ランダム・プライミング法で^{35}Ｓラベルしたnuclein cDNAの翻訳領域の EcoRI-HaeⅢフラグメント(341 bp) をプローブとして、 *in situ*ハイブリダイゼーション法(5) により検討した。

【結果と考察】
免疫組織化学的解析の結果の一部を図２に示した。 nucleinに対する免疫活性はプルキンエ細胞や顆粒細胞などの神経細胞の核に認められた。この結果は、 nuclein分子中に核移行シグナル様の構造が存在すること、また酸性クラスターを持つ多くのタンパク質が核に局在していることに対応している。nuclein mRNAの発現は、生後３日のラット小脳の内・外顆粒細胞層ならびにプルキンエ細胞層で発現が認められ、特に外顆粒細胞層で強かった（図３）。プルキンエ細胞層での発現は生後14日で著しく増強した。生後28日の小脳でもプルキンエ細胞層と顆粒細胞層で明瞭に発現していた。 nucleinは核に局在し、小脳の成熟過程で細胞の分化増殖の盛んな外顆粒細胞層で強く発現し、さらに成熟後もプルキンエ細胞層と顆粒細胞層で発現が持続していることは、このタンパク質が核内因子として神経系の形成や神経活動の維持に関わっていることを示唆している。



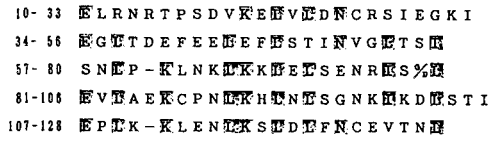


図１　nucleinの分子構造
■は核移行シグナルを示す

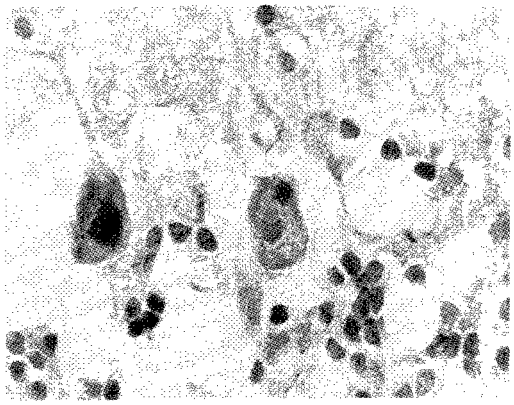
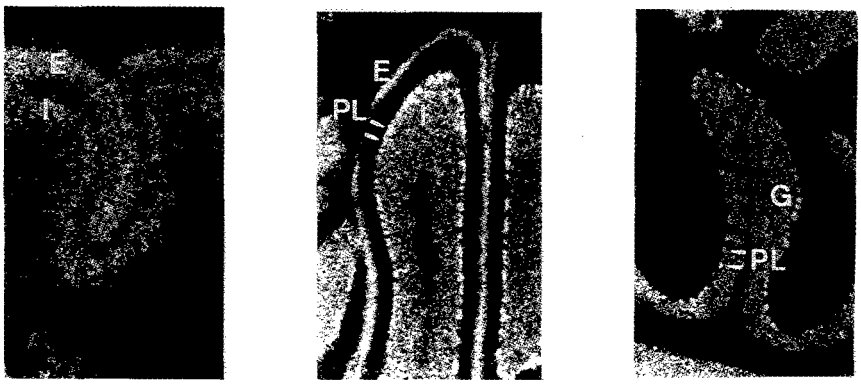


図２　ラット小脳のnuclein抗体による
免疫組織化学染色



生後３日　　生後14日　　生後28日

図３　ラット小脳nuclein mRNAのin situハイブリダイゼーション
Ｉ：内顆粒層　　Ｅ：外顆粒層　　ＰＬ：プルキンエ細胞層　　Ｇ：顆粒層

【文献】
1. Hashimoto, C. et al (1988) Cell, 52, 269-279
2. Earnshaw, W. C. et al (1987) J. Cell Biol., 105, 1479-1482
3. Kataoka, T. et al (1985) Cell, 43, 493-505
4. 松岡邦枝ら　(1992) 神経化学 31, 126-127
5. Song, S.-Y. et al (1991) Neurosci. Res. Suppl.16 : S76

65 神経分化に関与する新規因子ＴＡ２０のｃＤＮＡクローニングおよびその機能の検討

東田千尋、東田道久、野村靖幸
（北大・薬学部・薬効学）

【要約】
NG108-15 細胞において diBu-cAMP 単独 72 時間処理よりも、これに TPA を添加した方がより分化が促進されることから、両処理間で発現量の異なる神経分化因子が存在すると推定し、プラスマイナス法により cDNA クローニングを行った。単離されたクローンＴＡ２０は未知配列の５’側とチトクロームｂ（cyt.b）と相同性の高い３’側よりなるが、nuclear DNA であることが示されたことより cyt.b とは全く異なる約 20 kDa の蛋白質として機能することが示唆された。

【緒言】
ニューロンモデル NG108-15 細胞において、細胞内 cAMP 上昇によるＡキナーゼ活性化が突起伸展、増殖抑制、カルシウム流入、アセチルコリン放出などを引き起こすことが知られている（１）。我々はこれまでに、Ｃキナーゼ活性化薬 TPA をＡキナーゼ活性化薬 diBu-cAMP と同時に長時間処理させることにより各薬物単独処理と比較して著しい突起伸展、伸展した突起の維持、細胞増殖抑制が認められること（２）、TPA + diBu-cAMP 長時間処理は growth-associated protein-43 (GAP-43) の発現量を促進すること（３、４）を報告し、両薬物処理が特異的に神経分化に及ぼす効果を遺伝子発現のレベルから解析する必要性を示唆してきた。そこで今回、TPA + diBu-cAMP 同時 72 時間処理細胞でのみ強く発現している因子の探索をプラスマイナス cDNA クローニング法により行い、クローンＴＡ２０を単離したので報告する。

【実験方法】
細胞培養：NG108-15 細胞は 2% 牛胎児血清含有 DMEM-HAT 培地で培養した。cDNA クローニング:1 mM diBu-cAMP あるいは 100 nM TPA + 1 mM diBu-cAMP で72 時間処理した NG108-15 細胞より mRNA を抽出し、各 mRNA を鋳型として single strand cDNA プローブを合成した。TPA + diBu-cAMP 処理 mRNA から λZAPII にて cDNA ライブラリーを作製し、上記２種のプローブでスクリーニングし、TPA + diBu-cAMP 処理 mRNA よりのプローブでのみハイブルダイズしたプラークを単離、解析した。ＴＡ２０ DNA の局在：NG108-15 細胞より nuclear DNA および mitochondrial DNA を抽出し制限酵素反応後、ＴＡ２０ ５’側 657 bp 断片をプローブとして Southern blot 解析を行った。RT/PCR 法による mRNA の検出：NG108-15 細胞 total RNA を鋳型とし、sense primer 335 bp - 351 bp、antisense primer 764 bp - 780 bp を用いて RT/PCR を行い、産物に対しＴＡ２０ ５’側 657 bp 断片をプローブとして Southern blot 解析を行った。ＴＡ２０ mRNA の定量：100 mm dish 中で各薬物存在下で培養した細胞の total RNA をグアニジウム/CsCl 法により抽出し、ＴＡ２０ ５’側 657 bp 断片をプローブとして Northern blot 解析を行った。in vitro translation：pBluescript KS(-) に挿入したＴＡ２０を鋳型として T7 RNA polymerase により sense RNA を合成した。[^{35}S]methionine 存在下で reticulocyte lysate を用いて sense RNA から蛋白を合成させ SDS-PAGE 後オートラジオグラフィーを行った。

【結果および考察】
プラスマイナススクリーニング法により、NG108-15 細胞を 1 mM diBu-cAMP 72 時間処理した場合には発現せず 100 nM TPA + 1 mM diBu-cAMP 72 時間処理時に発現しているクローンを 33 個単離した。各クローンの DNA を diBu-cAMP 72 時間処理あるいは TPA + diBu-cAMP 72 時間処理細胞 mRNA より合成した single strand cDNA プローブを用いて Southern blot を行い、artifact クローンではないＴＡ２０を単離した。Dideoxy 法により全長 1823 bp をシークエンシングしたところ、３’側約 1100 bp は mouse チトクロームｂ（cyt.b）gene と高い相同性を有し、５’側約 700 bp には既知配列との相同性は認められなかった。cyt.b gene は mitochondrial DNA であるためＴＡ２０ gene の局在を検討することが必要と考え、NG108-15 細胞より nuclear DNA および mitochondrial DNA を抽出し Southern blot を行った。5’側 657 bp 断片をプローブとすると nuclear DNA にのみシグナルが認められた（Fig. 1）。また、このＴＡ２０ gene がクローニング操作中の組み換えなどにより生じた artifact ではないことを証明するために RT/PCR を行った。すなわち、TPA + diBu-cAMP 72 時間処理した NG108-15 細胞から抽出した mRNA を鋳型とし、５’側未知配列部分と３’側 cyt.b 相同部分を overlap する領域を増幅させる sense primer と antisense primer を用いて反応させ、産物に対し、５’側 657 bp 断片をプローブとして Southern blot を行ったところ、予想される増幅断片 446 bp の位置にシグナルが検出された（データ未提示）。これらの結果より、ＴＡ２０の２つの領域が細胞中で確かに連

なって存在していること、ＴＡ２０が nuclear DNA として転写される新規因子であることが示唆された。ＴＡ２０が NG108-15 細胞において TPA + diBu-cAMP 処理依存的に発現していることを検討するために、5' 側 657 bp 断片をプローブとして Northern blot を行ったところ、約 1.7 kb のＴＡ２０ mRNA 発現量は TPA + diBu-cAMP 72 時間処理により増加したが、各薬物単独処理による増加効果は認められなかった（Figs. 2、3）。72 時間という長時間の薬物処理からＴＡ２０の発現増加にいたる機序については現在検討中である。ＴＡ２０の蛋白質としての分子量はその一次構造より 22 kDa であることが予想された。そこで T7 RNA polymerase による sense RNA 合成および reticulocyte lysate による蛋白質合成の系によりＴＡ２０の分子量を検討したところ、SDS-PAGE 上で約 20 kDa のバンドとして検出された（Fig. 4）。また、ＴＡ２０ cDNA 移入細胞を用いてその神経分化過程における機能の解明を行い、ＴＡ２０が細胞増殖抑制に関与する結果を得ているが（データ未提示）詳細については現在検討中である。

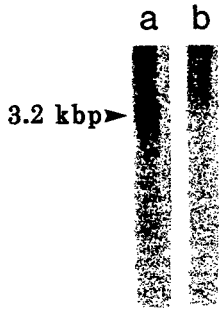


Fig. 1　ＴＡ２０ gene の nuclear DNA および mitochondrial DNA における局在

NG108-15 細胞より抽出した nuclear（a）および mitochondrial（b） DNA を Hind III で消化しＴＡ２０のプローブを用いた Southern blot を行った。

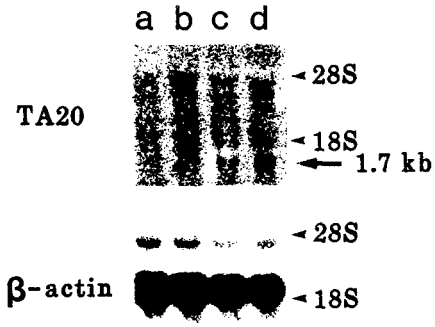


Fig. 2　ＴＡ２０ mRNA 発現量の薬物処理による変化

NG108-15 細胞を 100 nM TPA（b）、1 mM diBu-cAMP（c）、100 nM TPA + 1 mM diBu-cAMP（d）存在下、あるいは非存在下で（a） 72 時間培養した後 total RNA を抽出し、ＴＡ２０プローブを用いて Northern blot を行った。positive control として同一フィルター上の β-actin を検出した。

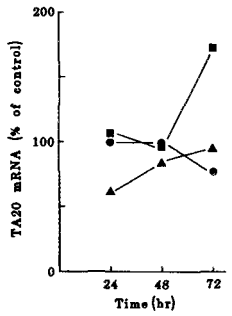


Fig. 3　ＴＡ２０ mRNA 発現量と薬物処理時間の関係

NG108-15 細胞を 100 nM TPA（●）、1 mM diBu-cAMP（▲）、100 nM TPA + 1 mM diBu-cAMP（■） 存在下で培養し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に total RNA を抽出し、ＴＡ２０プローブを用いた Northern blot を行い得られたオートラジオグラム上のＴＡ２０のシグナルをデンシトメーターにより定量した。

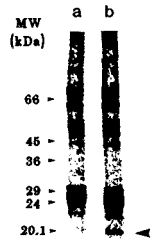


Fig. 4　ＴＡ２０の分子量の in vitro translation による検討

[^{35}S]methionine 存在下、reticulocyte lysate に T7 RNA polymarase により合成したＴＡ２０ sense RNA を添加（b）あるいは無添加で（a）翻訳反応を行った。SDS-PAGE 後のオートラジオグラムを示した。

【参考文献】

1）Nirenberg, M., Wilson, S.P., Higashida, H., Rotter, A., Kreuger, K., Busis, N., Ray, R., Kenimer, J., Adler, M. and Fukui, H. (1983) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48, 707-715.
2）Tohda, M., Kumagai, C. and Nomura, Y. (1991) Neurochem. Int. 19, 255-260.
3）Kumagai, C., Tohda, M., Isobe, M. and Nomura, Y. (1992) J. Neurochem. 59, 41-47.
4）Kumagai-Tohda, C., Tohda, M. and Nomura Y. (1993) J. Neurochem. in press

66 大脳新皮質マージナルゾーンに対するモノクローン抗体を用いた皮質発生の解析

石井　加代子、植村　慶一

（　慶應義塾大学　医学部　生理学教室　）

〔要約〕大脳新皮質の発生の機構を調べるため　発達性失読症患者と共通な大脳新皮質の局所的な層構造異常を示すNew Zealand Black mouseに注目し、それらの形態形成の物質的背景を解明すべくモノクローン抗体の作製を試みた。その結果　皮質発生の早期にサブプレート、後期にマージナルゾーンに免疫組織化学的反応性が局在する抗体が得られ、胎仔期に特異的に発現する280及び270 kDaの蛋白質を認識した。この抗体を用いてNew Zealand Black mouseの皮質に於る層構造形成異常の発生機構を検討した。

ヒト大脳新皮質の機能構築を調べるため　遺伝性発達障害の中で新皮質の発生を調べる手がかりになると予想され　モデルマウスの存在するものを検索した。発達性失読症は、他の知能水準は正常又は優秀であるにも関わらず読み·書きの習得のみに困難を来す障害である。患者の大脳新皮質には局所的な層構造と線維走行の異常が存在し、これが左側言語野に集中する[1]。更に、New Zealand Black mouse (NZB) は大脳新皮質に同様な形態異常を発現し[2]、学習能力が低いこと等から発達性失読症患者の皮質発達障害のモデルとなる可能性が示された。近年　言語能力の獲得を可能にする神経機構の多くの部分が遺伝的に制御されているという知見が得られており、大脳皮質言語野の特殊化に関して発生初期の物質的解析が可能であると予想される。発達性失読症患者とNZBに共通な形態異常の最も顕著なものは　マージナルゾーン(MZ)に於ける異所性神経細胞の集積とその下部皮質層での異常な線維走行である。これらは皮質の神経細胞の中でも最初期に分化し後続する神経細胞に対して誘導的役割を果たすとされているサブプレート(SP)とMZの細胞の機能の障害によるものと推測し、これを実験的に証明しようと計画した。

このような機能に関与する物質として　以下のような条件を満たす物について　モノクローン抗体を作ることにより探索することを試みた。即ち；　1)　マウスからヒト迄保存されており、2)　MZ又はSPの神経細胞の表面に存在し、3)　神経細胞間相互作用に携わることによって皮質形成に関与する。このような物質は　4)　量的には極く僅かである可能性が大きいが　皮質形成の時期には比較的豊富に発現すると予測される。

［方法］

モノクローン抗体の作製；　種の間で保存され　量的に極く微量である様な物質は抗原性に乏しく抗体ができ難いことが予想されるが　NZB自体が自己免疫疾患モデルマウスであり抗体産生能の高いことが知られている。そこで　ラット胎仔大脳新皮質の膜画分をNZBに免疫し、その脾臓細胞を骨髄腫細胞株x63-Ag8 653と融合した。雑種細胞の培養上清を胎生19日目のラット脳切片でのMZとSPに対する免疫組織化学的反応性によって選別した。

［結果と考察］

雑種細胞1111コロニーについて選別を行ない、胎生19日のラット大脳切片に対し反応を示した41コロニーから、最終的に5個の細胞株を樹立した。モノクローン抗体K1はMZに局在し

た反応性を示し、K2 は SP の領域に反応が認められた。K3 は　移動を終了した神経細胞の多くが反応したが　特に MZ と SP のものが強く反応していた。そのうち　最も反応の局在している K1 に関して更に解析を行なった。

K1 の抗原性を調べるため　胎生 19 日ラット大脳皮質標本の Western blotting による解析を行なった結果、主に 280 と 270 kDa のバンドが認められた。これらを個体発生的に調べると、膜画分・可溶性画分とも　280 と 270 kDa のバンドが胎生 16 日から認められ　胎生後期に比較的豊富に存在し　生直後は急速に消失した（図 1）。一方　生直後には膜画分で 140 kDa、可溶性画分では 200 及び 170 kDa のバンドが顕著に認められた。成熟及び老齢ラット脳では何れも陰性であった。大脳皮質標本をトリプシン処理すると　これらのバンドは濃度依存的に減弱した。一方　糖鎖を切断するグリコペプチダーゼ A 処理によっては変化が認められなかった。これらのことからモノクローン抗体 K1 は胎仔・新生児期に特異的に発現する蛋白質を認識していると考えられる。

次に　個体発生過程を免疫組織化学的に調べると　皮質の層構築に応じて SP から MZ へ反応が移行した。即ち　皮質上層部に SP と MZ のみが存在する皮質発生の第一期から両者の間に皮質層細胞の侵入する第二期へと移行する時期である胎生 16 日には SP 領域の上部にのみ強い顆粒状の陽性所見が認められ　MZ には認められなかった。このとき SP の神経細胞の細胞体内部ではなくは細胞と細胞の接触点が染まっており、細胞膜或は神経線維に抗原性が存在すると考えられる。胎生 19 日では細胞体の少ない MZ 全域に顆粒状の染色が認められ、SP の反応は消失している（図 2）。皮質層の成熟に伴って SP と MZ 神経細胞分布が希薄になっていく第三期に相当する生後 7 日では MZ 全域に渡る反応性の局在は無くなり、MZ の上端のみに比較的強い染色像が得られた。

マウスでの反応性を免疫組織化学的に調べると、胎生後期の時期ではやはり MZ に局在していた。一部の NZB マウスの大脳皮質で脳回・脳溝構造の様な奇形が観察されたが、このような部位で K1 の反応性は皮質層内部にも認められた。このように K1 は SP と MZ の関与した皮質発生機構に役割を果たす物質を認識している可能性が示唆された。

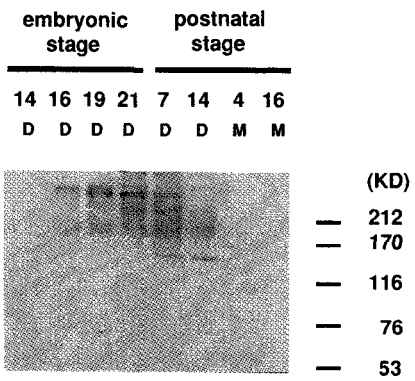


図 1　ラット大脳新皮質膜画分での K1 抗原性の個体発生；Western blotting による解析

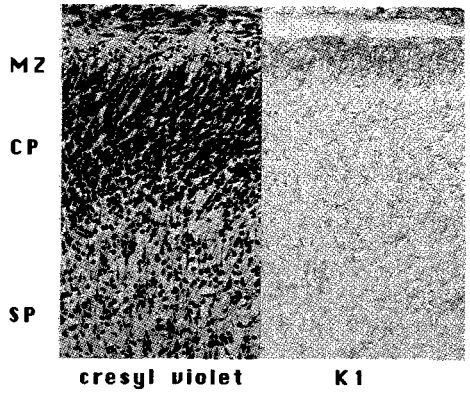


図 2　胎生 19 日ラット大脳における K1 免疫反応性の分布　200 μm

［文献］

1. Galaburda AM *et al*, 'Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies.' Annals of Neurology 18 (1985) 222-233
2. Sherman GF *et al*, 'Abnormal architecture and connections disclosed by neurofilament staining in the cerebral cortex of autoimmune mice.', Brain Research 529 (1990) 202-207

67 神経細胞の分化と軸索走行を制御するEGFモチーフを持つ新しい分泌性因子・*strawberry*遺伝子産物

岡野栄之，沢本和延，吉川真悟，御子柴克彦
(東大医科研・化学)

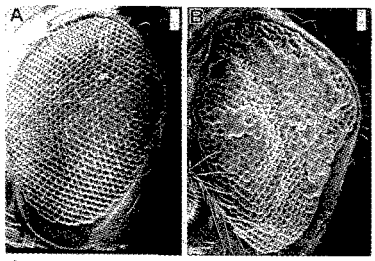
〔要約〕 我々は,神経系の発生・分化を制御する新しい遺伝子を単離する目的で、P-因子挿入法によりショウジョウバエの視覚系の変異体の分離を試み、*strawberry* (*sty*)遺伝子座(第3染色体・73A1-2)を同定した。P-因子挿入部位を指標にした*sty*遺伝子とcDNAの単離と構造決定の結果,*sty*遺伝子は分子量50kDのEGFモチーフを有する分泌性の蛋白質をコードしていることが判明した。これらの結果と発現パターンの解析により,*sty*遺伝子産物は側方抑制による神経細胞の数と位置の調節を行い,更に軸索走行を規定することにより神経系の分化過程・形態形成を制御する液性因子であると考えられた。トランスジェニック・ｆｌｙを用いた*sty*遺伝子産物の異所性の強制発現の結果、複眼における神経細胞（光受容細胞）が減少することが観察され、このモデルが正しいことが示された。

[緒言] 神経系特に視覚系において重要な機能を有する新しい分子を分離・同定するという目的のもとに、ショウジョウバエのトランスポゾンであるP-エレメントのランダムな挿入による変異法を用いて、電気生理学的および形態学的なスクリーニングを行った。染色体上に単一のP-エレメントの挿入変異法6500系統をスクリーニングし、１７系統の視覚異常を伴う変異体を分離した（Okano, H., Blendy, J. and Montell, C., unpublished results）。この内、複眼の形態形成異常を伴う*strawberry* (*sty*)遺伝子座に関する解析結果を報告する。*sty*遺伝子は分子量50kDのEGFモチーフを有する分泌性の蛋白質をコードしており、この因子の機能について個体レベルでの解析をおこなった。

[実験方法] 1. 組織学；眼・触覚原基における神経細胞の分化のパターンは、神経細胞特異的な抗原を認識するモノクローン抗体22C10 (1)を用いて行った。又、網膜から視葉への神経軸索の投射パターンを光受容細胞特異的な抗原を認識するモノクローン抗体24B10 (1)を用いて行った。免疫組織化学染色および電子顕微鏡的観察は、常法(2,3)に従って行った。2. *strawberry* 遺伝子座のクローニングとDNA sequencing；P-エレメントの挿入部位近傍の遺伝子断片のクローニングは、プラスミド・rescue法(4)に従って行い、それをプローブとしてショウジョウバエ遺伝子DNAライブラリーをスクリーニングし、*strawberry* (*sty*)遺伝子座全領域をクローニングした。Northern blot法により、*strawberry* (*sty*)遺伝子座における転写単位を同定し、cDNAのクローニングを行った。DNAのsequencingは、dideoxy法(5)に従って行った。3. トランスジェニック・ｆｌｙの作成と*sty*遺伝子産物の異所性の強制発現；*strawberry* cDNAをpCaSpeR-hsベクターのheat shockプロモーターの下流に挿入し、germ line transformationをSpradling & Rubin(6)の方法により行った。トランスジーンに関してホモ接合体の蛹に対して、heat pulseを与えることにより、*sty*遺伝子産物の熱誘導性の異所性強制発現を行い、複眼をはじめとする成虫の表現型を解析した。

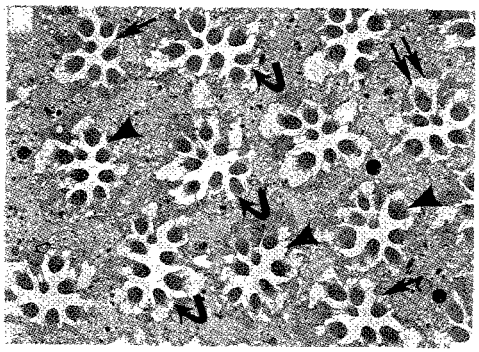
[結果と考察] P-因子挿入法によりショウジョウバエの視覚系の変異体の分離を試み、*strawberry* (*sty*)遺伝子座(第3染色体・73A1-2)を同定した。得られた二つのallele (sty^{P1}, sty^{P2})は,この領域周辺のdeficiency stockとの交配により,loss-of-function typeの表現型を示すと考えられた。ホモ接合体成虫は,複眼表面のmechanosensory bristleの重複やレンズの融合及び個眼の不整な配列等を伴うrough eye（図１）、各々の個眼内における光受容細胞の数の増加と位置の異常（図２）、視葉外層の層形成の異常,著しい生存率の低下,labial pulpやwingの変形などの多様な症状を呈し,これらはexcision実験の結果、P-因子の挿入によることが示された。更に、胎生期では胚帯短縮、頭部陥入の異常やantenno-maxiliary complexにおける感覚子の増加,第3齢幼虫期では、眼・触覚原基のommatidial preclusterにおける神経細胞の増加やの光受容細胞の軸索の走行異常（図３）等が観察された。又、P-因子挿入部位を指標にした*sty*遺伝子とcDNAの単離と構造決定の結果、*sty*遺伝子は分子量50kDのEGFモチーフを有する蛋白質をコードし（図４）、P-因子はこのcoding領域を分断していることが判明した。Hydropathy plotの結果*sty*遺伝子産物は、分泌性蛋白質であると予想された。以上のloss-of-function typeの表現型の解析結果とエンハンサー・トラップ法によるβ-galactosidaseの局在を指標とした発現パターンの解析や遺伝子産物の一次構造から、*sty*遺伝子産物は、神経母細胞が隣接した未分化細胞が神経細胞になるのを抑制する作用（側方抑制）による神経細胞の数と位置の調節を行い、更に恐らくは別の機構により軸索走行を規定し、神経系の分化過程・形態形成を制御する液性因子として働くと考えられた。トランスジェニック・ｆｌｙの作成とheat shockプロモーターを利用した*sty*遺伝子産物の異所性発現の結果、heat pulseによって、少なくとも複眼において神経細胞の数の減少が誘導されたことより、*sty*遺伝子産物が、神経細胞を含む*sty*産性細胞の周囲に存在する未分化細胞が、神経細胞への分化するのを抑制していることが考えられた。

［謝辞］以上の研究は、林茂生、広瀬進（遺伝研）、谷村禎一（九大）、岩崎雅行（福岡大）、Craig Montell（Johns Hopkins大学）博士らとの共同にて行われた。



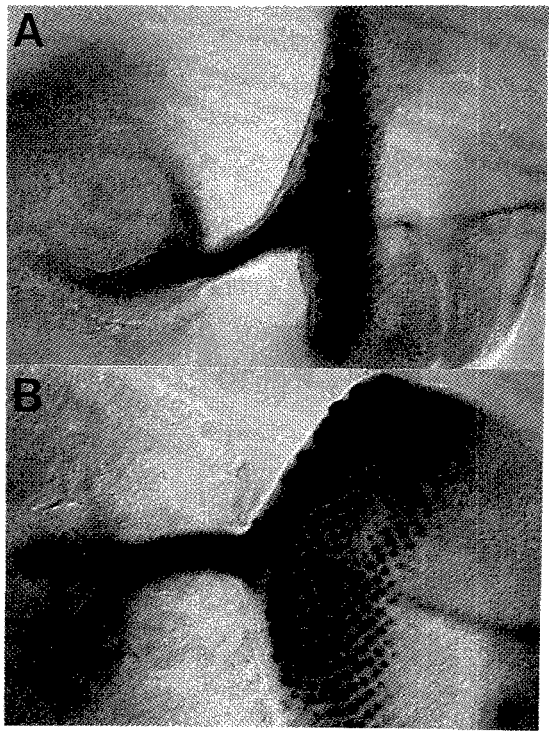
図－１；走査型電顕による*strawberry*ミュータントにおけるrough eye phenotype

A; 野生型, B; *sty*ミュータント(*sty*^{p2e1}/*Df(3L) st4*)



図－２；透過型電顕による*strawberry*ミュータントにおける複眼の表現型

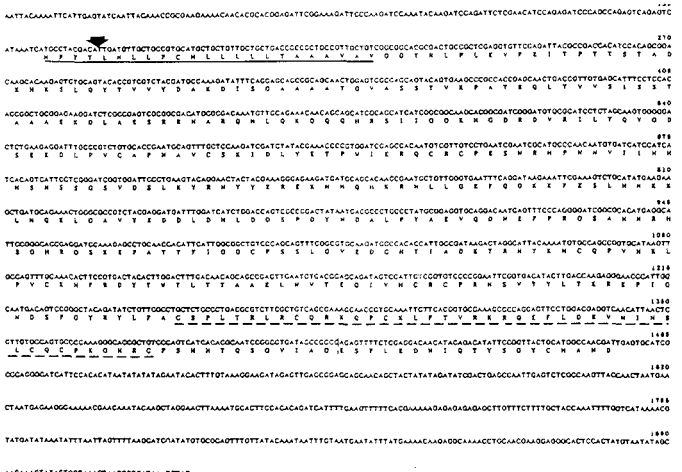
多くの個眼において光受容細胞の数が増加しているのが観察される（arrowhead(8個), curved arrow (9個)；この断面の場合、野生型では、個眼あたり7個の光受容細胞が観察される）。軸が９０度回転している個眼も観察される（double aarow）。



図－３；24B10抗体による*strawberry*ミュータントにおける網膜一視葉投射パターンの異常の解析.A; 野生型, B; *sty*ミュータント

図－４；*sty*遺伝子cDNAの塩基配列。

444アミノ酸のORFを示す。下線部は予想されるシグナルペプチド、波線部はEGFモチーフを示す部位、矢印は*sty*^{p2}におけるP-エレメント挿入部位を示す。



[文献] 1. Fujita S, Ziprusky SL, Benzer S, Ferrys A, Shotwell SL (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7929-7933.
2. Cagan RL, Ready DF (1989) Dev. Biol. 136: 346-362.
3. Freeman M, Klambt C, Goodman C, Rubin G (1992) Cell 69: 963-975.
4. Mlodzik M, Hiromi Y, Weber U, Goodman CS, Rubin GM (1990) Cell 60: 211-224.
5. Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
6. Spradling AC, Rubin GM (1982) Science 218: 341-347.

68 ニューロカルシン(Neurocalcin); 神経系に特異的分布を示すカルシウム結合蛋白質

名古屋大学医学部薬理学講座、第一解剖講座*
岡崎勝男、井上繁雄、飯野　哲*、小林　繁*、日高弘義

〔要約〕

ニューロカルシン抗体を用いて、ラットの各臓器における免疫組織化学的検討をおこなった。中枢神経系では、既に報告した大脳、小脳、網膜の他、耳部の神経節、嗅粘膜、嗅球及び下垂体に、ニューロカルシンが存在した。中枢神経以外では、既に報告した副腎髄質及び皮質球状層以外に、脊髄神経節、筋紡錘等に発現されていた。これらの結果よりニューロカルシンは神経系、特に知覚系に特異的発現を示すと考えられた。

ニューロカルシンは当教室で発見、精製された、新しいカルシウム結合蛋白質である(1992, J.B.C)。当教室で合成した新しいカルモデュリン阻害剤の一つで、ベンゼンスルフォナマイド誘導体であるW-77を用いたアフィニティクロマトグラフィを使って、ウシ大脳粗蛋白画分より得られた(1992, J.B.C.)。少なくとも合計６つのアイソザイムが脳内に存在しており、同じく３つのEF-hand構造をもつカルシウム結合蛋白である、リカバリン(46.5%)とビシニン(51.5%)に強い相同性があることがわかっている(1992, B.B.R.C.)。前回、ウシの大脳、小脳及び網膜での存在を報告したが(1992, B.B.R.C.)、今回、免疫組織学的検討をさらに行い、新しい知見が得られたので報告する。

「方法」ウシ脳より精製したニューロカルシンをウサギに免疫し、血清を硫安分画にて分離してポリクローナル抗体を得た。ラットの各臓器は４％パラホルムアルデヒドにて固定し、凍結切片を作成した。免疫染色はＡＢＣキットを用い、ジアミノベンジジンにて発色させた。

「結果」大脳では新皮質及び海馬に強く染まる細胞体があった。小脳では、顆粒層の顆粒細胞及び分子層の神経線維が強く染まったが、プルキンエ細胞は染まらなかった。網膜では視細胞よりも、アマクリン細胞及びガングリオン細胞及びその神経線維に発現されていた(Fig. A)。また嗅細胞(Fig. B)や嗅球のtuffed cellとその神経繊維が染まった。内耳ではらせん神経節(Fig. C)及び前庭神経節の細胞に発現されていたが、有毛細胞には発現されていなかった。脊髄では後角及び側角の細胞に強く見られた。副腎では髄質、髄質内の神経終末と皮質球状層が強く染まり、束状層や網状層は染まらなかった(1993, J. Endocrinol)。また、下垂体後葉や脊髄神経節細胞、筋紡錘にも見られた。

「考察」　今回の検討で、ニューロカルシンは中枢神経系において、小脳、網膜、内耳、嗅部などの感覚器領域に特異的な分布を示す傾向があることが明らかになった。また末梢神経系では知覚神経系に特異的な発現が見られた。このことより、ニューロカルシンは知覚系を中心とした細胞内Ca^{2+}情報伝達に関与している可能性が示唆された。



ニューロカルシン抗体(x 5000)をもちいた免疫組織学的検討

図A
網膜ではニューロカルシンはガングリオン細胞アマクリン細胞及び間の神経線維に一致してみられた。 (x 350)

図B
嗅部では嗅細胞に一致してニューロカルシンの発現がみられた。
(x 200)

図C
内耳ではラセン神経節及び前庭神経節の細胞、神経線維及び有毛細胞に接する神経線維終末部にニューロカルシン抗体陽性がみられた。
(x 200)

「参考文献」

1. Hiroyoshi Hidaka and Katsuo Okazaki. (1993) Neurosci. Res., 16, 73-77.
2. Terasawa, M., Nakano, A., Kobayashi, R., and Hidaka, H.(1992) J. Biol. Chem., 267, 19596-19599.
3. Okazaki, K., Watanabe, M., Ando, Y., Hagiwara, M., Terasawa, M., and Hidaka, H.(1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., 185, 147-153.
4. Dizhoor, A.M., Ray, S., Kumar, S., Niemi, G., Spencer, M., Brolley, D., Walsh, K.A., Philipov, P.P., Hurley, J.B., and Stryer, L. (1991) Science, 251, 915-918.
5. Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C.H., Kondo, H., and Miki, N. (1990) Neuron, 2, 469-476.
6. Nakano, A., Terasawa, M., Watanabe, M., Usuda, N., Morita, T., and Hidaka, H. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., 186,1207-1211
7. Nakano, A., Terasawa, M., Watanabe, Kato, M., Nirura, Y., Usuda, N., Morita, T., and Hidaka, H. (1993) J. Endocrinology in press.

69 成熟ラット脳における主要ガングリオシドの免疫組織化学的局在

小谷政晴、川島育夫、小沢秀樹、小倉　潔、寺島俊雄*、田井　直
（都臨床研・腫瘍免疫、都神経研・解剖*）

〔要約〕
成体ラット脳（小脳皮質、大脳皮質、海馬および脊髄）における主要ガングリオシド（GM1、GD1a、GD1b、GT1bおよびGQ1b）の局在分布は、各々のガングリオシドに特異的なモノクローナル抗体（MAb）を用いた免疫蛍光染色法により、それぞれの組織領域において特徴的であった。①小脳皮質において、GM1はバーグマングリアおよびアストロサイト系に、GD1aは分子層に、GD1bは顆粒細胞層に、GT1bはプルキンエ細胞層以外の各層に、GQ1bは小脳糸球に発現分布していた。②大脳皮質では、GM1はグリア系に、GD1aはⅠ、Ⅱ／Ⅲ、ⅤaおよびⅥの上部の各層に、GQ1bはⅣ、ⅤbおよびⅥの下部の各層に、GD1bはⅢ層以下の各層に、GT1bはⅠ～Ⅵ層に、それぞれ分布していた。③海馬では、GM1は網状・分子層、上昇層および海馬白板に、GD1aは上昇層と放射層に、GD1bは錐体細胞層、網状・分子層および海馬白板に、GT1bは錐体細胞層を除くほぼ全層に、GQ1bはCA1領域、上昇層および海馬白板に、それぞれ分布していた。④脊髄では、GM1はグリア系に、GD1aはラミナⅠ、Ⅱ（Rexed分類）に、GD1b、GT1bおよびGQ1bは灰白質に、それぞれ分布していた。

【目的】
ガングリオシド（シアル酸含有スフィンゴ糖脂質）は、脊椎動物において中枢神経系組織に多量に存在している。成体ラット脳における主要ガングリオシドは、生化学的解析によってGM1、GD1a、GD1b、GT1bおよびGQ1bであることが既に判明している。近年、生理活性物質としてのガングリオシド、すなわち神経細胞に対する神経突起伸長作用等をはじめとして、抗ＨＮＫ－１抗体反応性の糖鎖が神経組織構築および回路形成に関与している可能性、さらに神経細胞間および神経細胞－細胞外マトリックス間認識においてシアル酸が重要な機能を担っている可能性等、糖鎖の機能的役割を示す興味ある知見が報告されている。しかし、これまでガングリオシドの神経組織における局在分布は、有用な免疫学的プローブがなかったために依然として不明であった。最近、我々は精製ガングリオシドを免疫原とする効率のよいマウスMAbの作製法の開発に成功した[1)2)]。そこで、ガングリオシドの脳における機能的役割を解析していく１つのアプローチとして、ガングリオシドのラット脳組織における局在分布を抗ガングリオシドMAbを用いた免疫蛍光染色により検討した。

【材料および方法】
MAbs：GM1、GD1a、GD1b、GT1bおよびGQ1bに特異的なMAbsは、各精製抗原をC3H/HeNマウスに免疫して得た（表１、図１）。免疫蛍光染色：用いた脳組織は、Wistarラット（１０～１４週齢；雌）より採取した。作製した凍結切片は冷アセトンで固定した[3)]。各切片に１次抗体として上記MAbを添加し４℃１晩反応させた。洗浄後、２次抗体（FITC-conjugated goat anti-mouse IgM $F(ab')_2$および anti-mouse IgG $F(ab')_2$）を４℃で１時間反応させた後、観察した[4)]。

【結果および考察】
ラット小脳および大脳よりガングリオシドを抽出・精製後、TLCで展開してみると上記５種類のガングリオシドが検出されたが、脊髄においてはGD1aの含量が少なかった（図１）。各MAbは、各ガングリオシドと特異的に反応したが、コレラトキシンはGM1以外にGD1bやその他の未知のガングリオシドとも反応することが観察された。続いて、組織構築が明瞭な成体ラット小脳皮質、大脳皮質、海馬および脊髄における主要ガングリオシドの組織内分布を免疫蛍光染色により観察したところ、各組織において主要ガングリオシドは細胞および層に特異的な発現分布をしていることが明かとなった。その中で、最も明瞭な局在分布が観察されたのは小脳皮質であった。すなわち、GM1はバーグマングリアを含むグリア系細胞および白質に発現分布していた。GD1aは分子層に主に発現していたことより、その分布は平行線維であろうと推察された。GD1bは、顆粒細胞層に発現しており、その染色性から主として神経細胞体に発現していると思われた。GT1bはプルキンエ細胞層以外の各層に分布していた。GQ1bは、小脳糸球と考えられる部位にのみ発現していた。これらのことから、GM1はグリア系細胞に、GD1bは神経細胞体に、GD1a、GT1bおよびGQ1bはシナプシス形成領域に、それぞれ局在分布している可能性が示

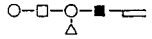
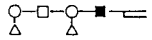
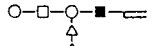
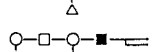
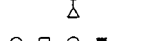
唆された。さらに、FITC標識コレラトキシンにより染色したところ、抗GM1と抗GD1b MAb によって各々染色された領域を重ねた染色像が認められた。このことから、免疫組織染色においてもコレラトキシンは主としてGM1とGD1b に反応性を有し、さらに他の未知のガングリオシドとの反応性が確認された。本実験に用いた各MAb は組織上のガングリオシドに対して特異的に反応していることを以下の実験により確認した。すなわち、組織のクロロホルムーメタノール（2：1、v／v）処理、トリプシン処理およびシアリダーゼ処理を行った。その結果、クロロホルムーメタノール処理によりMAb の染色性は完全に失われ、トリプシン処理ではその染色性および分布領域に変化はなかった。さらに、シアリダーゼ（C.perfringens）処理によってGD1a、GD1b、GT1bおよびGQ1bはGM1へと分解された。

脳組織において各ガングリオシドが細胞および層に特異的な局在分布を示した事実は、その発現領域において何らかの機能的役割を担っているものと推察される。尚、ガングリオシドは細胞表層に発現されているので、中枢神経系組織における神経細胞、各層および領域に対する特異的な分子マーカーとして極めて有用な分子になる可能性が考えられる。今後、ガングリオシドの脳、特に小脳組織の形態形成および神経回路形成の過程における機能的役割に着目して解析を進めて行く予定である。

【文献】

1) Kotani, M., Ozawa, I., Kawashima, I., Ando, S., and Tai, T. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1117, 97-103.
2) Ozawa, H., Kotani, M., Kawashima, I., and Tai, T. (1992) ibid. 1123, 184-190.
3) Graus, F., Cordon-Cardo, C., Houghton, A. N., Melamed, M. R., and Old, L. J. (1984) Brain Res. 114, 117-122.
4) Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Terashima, T., and Tai, T. (1993) Glycobiology 3, 137-146.

表1　ラット脳における主要ガングリオシドの構造とそれらに対する特異的MAb

Ganglioside	Structure	MAb	Ig isotype
GM1		GMB16	IgM (κ)
GD1a		GMR17	IgM (κ)
GD1b		GGR12	IgG2b (κ)
GT1b		GMR5	IgM (κ)
GQ1b		GMR13	IgM (κ)

■, Glc; ○, Gal; □, GalNAc; △, NeuAc; ⊢⊏, Cer.

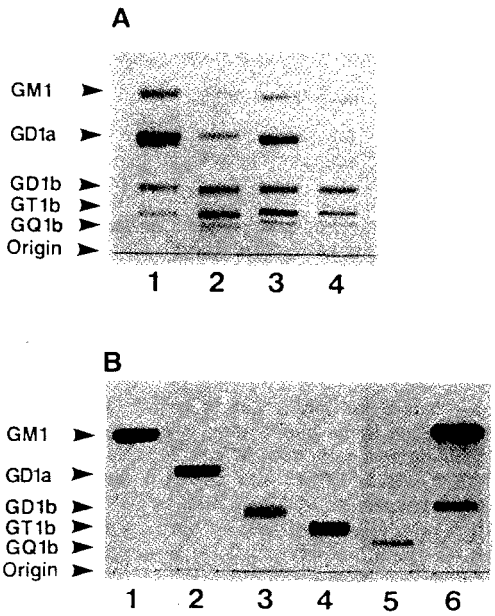


図1　MAbsによるラット脳ガングリオシドのTLC-immunostaining　（A）小脳(lane 2)、大脳(lane 3)、および脊髄(lane 4)から抽出されたガングリオシド画分のTLC。Lane 1は標準試料（牛脳ガングリオシド）である。試料は10 nmolシアル酸／レーン。発色はレゾルシノール塩酸により行った。（B）小脳ガングリオシド画分のMAbによるTLC-immunostaining。　Lane 1, anti-GM1; Lane 2, anti-GD1a; Lane 3, anti-GD1b; Lane 4 anti-GT1b; Lane 5, anti-GQ1b; Lane 6, peroxidase-conjugated cholera toxin.

70 ラット神経系の抗HCNP抗体による免疫組織化学（第二報）

三竹眞久＊　片田栄一＊　松川則之＊
大塚康史＊　小鹿幸生＊　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由来 Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP) を合成した。このHCNPをKLHに結合させ家兎を免疫し、抗HCNP抗体を作製しaffinity精製した。11日齢Wistarラットに抗 HCNP抗体を使用し免疫組織化学的に検討した結果 、抗 HCNP抗体は、以下の３陽性産物を各部位に認めた。１）神経細胞：大脳皮質および海馬の錐体細胞、線条体、交感神経節、後根神経節等。２）神経終末：視床の一亜核、視床下部、迷走神経背側核、脊髄後角および側柱等。３）グリア細胞：大脳、脳幹脊髄の白質。以上の結果から、HCNPおよびHCNP前駆体蛋白は、ラット神経系において種々の生理機能に介在する蛋白と考えられた。

［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、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り、この前駆体蛋白は、牛脳由来のphosphatidylethanolamine binding protein[3]と高い相同性を示した[4]。また、合成HCNPをBSAに結合させ家兎を免疫し作製した抗体（以下抗体１）は免疫組織化学的に2週齢 Wistar 系ラットで脳白質グリア細胞[5]を、高齢者ヒト剖検脳で平野小体、一部のアルツハイマー神経原線維変化[6]を認識する事を報告した。また、この抗体１は、各種断片のペプチドの検討より主として種を越え保存されるHCNPのＣ末端近傍を認識する事を示した[7]。今回更にこの合成HCNPをKLHに結合させ家兎を免疫し作製した抗体（以下抗体２）を使用し11日齢Wistarラットの神経系に免疫組織化学的検討を加えので報告する。

［対象および方法］

1)抗体の作製：合成 HCNP をKLH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体２をCNBr-Activated Sephalose 4B (Pharmacia) によりaffinity精製した。

2)ウエスタンーブロット（WB）法:11日齢Wistarラット大脳皮質（頭頂後頭葉）、脳幹および海馬の抽出液を前回報告した方法[6]に準じ施行した。

3)免疫組織化学：11日齢Wistarラット（６ひきオス）の脳および脊髄をブアン固定液に室温で浸漬した。脳は24時間、脊髄は約一週間固定後、パラフィンで包埋し厚さ4μmの切片を作製した。２ひきのラット脳および脊髄を冠状断および矢状断で、連続切片を作製した。免疫染色は、Streptavidin-Biotin(SAB)法(ニチレイ）で行った。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。脳の各部位は、Paxinosらのアトラス[8]に準じて決めた。

［結果］

1)WB法：大脳皮質および海馬で23KDa、脳幹で23,25KDaに抗HCNP抗体陽性バンドを認めた（図１）。

2)免疫組織所見：抗体２による免疫反応陽性部位を以下に記載する。大脳皮質；深層における一部錐体細胞（図２ａ）。海馬；CA3,PoDGを中心とした一部錐体細胞（図２ｂ）、一部顆粒細胞。嗅脳；AO,Tuの神経細胞および神経終末。扁桃体；一部神経細胞。；大脳基底核；CPu,Acb,MSの一部神経細胞、BST,PS。間脳；PV,RT,ZI,SubI,PeFの神経終末。視床下部；AVPO,MPA,MPO,MPOC,SCh,Pa,DMD,DMC,Arc の神経終末、Arcの一部神経細胞（図２ｃ）。脳幹；Me5の神経細胞内の顆粒、Sol,sp5の一部神経細胞、Me5,LC,IO,Sol,sp5の神経終末。脊髄；後角の神経

終末および一部神経細胞。側柱の神経終末。大脳から脊髄の白質のグリアおよび線維。交感神経節の一部神経細胞および節後線維（図２ｄ）。後根神経節の神経細胞内顆粒。末梢神経；無髄神経線維およびその神経終末。中腔性消化管；筋間および粘膜下神経節の神経細胞。いずれの陽性産物も対照試験では陰性であった。（注：略語は、Paxinosらのアトラス[8]に準じた。）

［考察］

今回の抗体２はラット神経系の広範囲の部位を認識した。その認識部位は、機能的に１）感覚系（後根神経節の神経細胞、後角の神経終末）２）交感神経系（交感神経節、視床下部、迷走神経背側核、側柱）３）錐体外路系（線条体の神経細胞）４）グリア細胞系等に及んだ。現在のところHCNPおよびHCNP前駆体蛋白の生理機能の詳細は不明と言わざるをえないが、幼若ラット神経系において種々の機能に介在する蛋白と考えられた。

問題点として、本実験に使用された抗体２はラット神経系において、抗体１に比較し、白質のグリア細胞を含めより広範囲な部位を認識した。これは、抗体の認識するエピトープの差と考えられた。抗体１は、先に示した如くHCNPのC末端近傍領域を主として認識する[7]ものと考えられた。抗体２は、小鹿らが本学会で報告する予定であるが、HCNPの各種断片のペプチドの検討よりＮ末端側を含め認識するものと考えられる。この両者の差が免疫陽性産物の分布に影響したものと考えた。

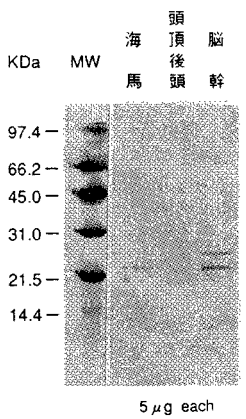


図１、ウエスターンブロット法（11日齢ラット脳）の所見

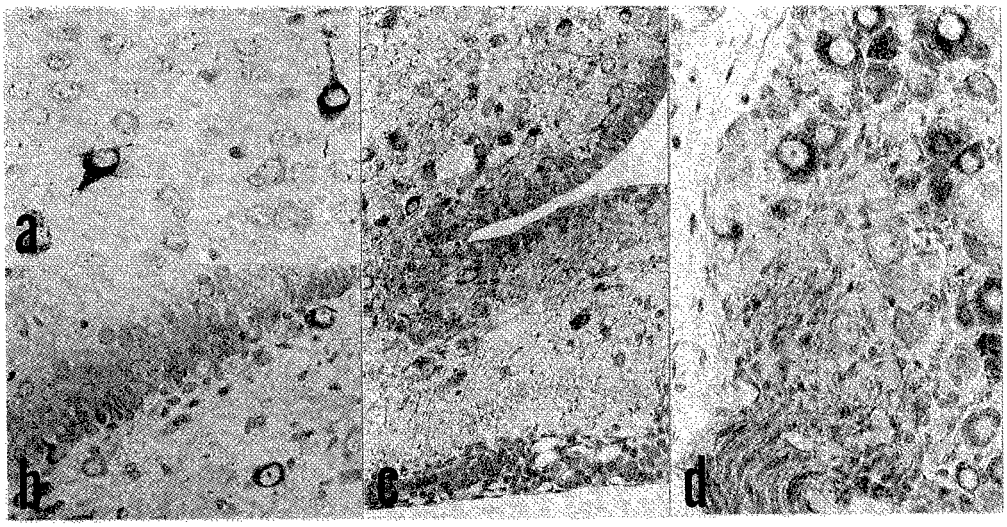


図２、抗HCNP抗体による免疫染色像（強拡大）

a、大脳皮質　b、海馬　c、視床下部弓状核　d、交感神経節

［文献］

1)Ojika,K.,et al.(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.81,2567-2571.2)Ojika,K.,et al.(1992) Brain research. 572,164-171.3)Schoentgen,F.,et al.(1987)Eur.J.Biochem.166,333-338.4)東藤貞樹 他.(1992) 神経化学. 31(1),258-259.5)林謙一郎 他.(1991)神経化学. 30(1),328-329.6)三竹恒久 他.(1992)神経化学. 31(1),88-89. 7)小鹿幸生 他.(1992)神経化学. 31(1),260-261.8)Paxinos,G.,and Watson,C.(1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates,2nd Ed.,Academic Press.

71　抗HCNP抗体による11日齢Wistar系ラット一般臓器の免疫組織化学的検討

片田栄一＊　三竹重久＊　松川則之＊　大塚康史＊　小鹿幸生＊　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peptide［Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide(HCNP)］を合成し、ＫＬＨに結合、家兎を免疫して得た抗ＨＣＮＰ抗体をaffinity精製した。１１日齢Ｗｉｓｔａｒ系ラットの一般臓器について抗ＨＣＮＰ抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。その結果、腎臓の近位尿細管、精巣の精細管上皮細胞及びライディヒ細胞、精管上皮、鼻腺、肺の細気管支上皮、唾液腺の導管、小腸及び大腸の基底顆粒細胞、膵臓のラ氏島内の一部の細胞、脾臓内のマクロファージ及び胸腺の髄質内の細網細胞と思われる細胞、ラセン器の内有毛細胞及び外有毛細胞、ハーラー脂腺に抗ＨＣＮＰ抗体の陽性産物を認めた。

［はじめに］
我々は先に海馬－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構造を有す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]。合成ＨＣＮＰをＢＳＡに結合させ家兎を免疫し作製した抗体（以下抗体１）は免疫組織化学的に２週齢Ｗｉｓｔａｒ系ラットで脳白質グリア細胞[3]を、高齢者ヒト剖検脳で平野小体、一部のアルツハイマー神経原線維変化[4]を認識することを報告した。今回、この合成ＨＣＮＰをＫＬＨに結合させ家兎を免疫し作製した抗体（以下抗体２）を使用し、１１日齢Ｗｉｓｔａｒ系ラットの全身臓器におけるＨＣＮＰ及びＨＣＮＰ前駆体蛋白の発現を（神経系に関しては三竹らが本学会で報告する予定）免疫組織化学的に検討したので報告する。

［対象および方法］
１）１１日齢Ｗｉｓｔａｒ系ラット雄５匹を対象とした。ネンブタールにて麻酔処理後、１匹は全身臓器をまた４匹は各臓器を系統的に摘出し室温下でブアン固定液に浸漬させ、常法に従ってパラフィン包埋し４μｍの切片を作製した。なお、全身固定したラット１匹は頭部から尾部にかけ中軸断で５００μｍ毎に切片を作製した。
２）抗体２の作製：合成ＨＣＮＰをＫＬＨ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）光顕的免疫組織化学：免疫染色は抗体２を用いて４℃下で３昼夜反応させ、Streptavidin-Biotin(SAB)法（ニチレイ）で行った。対照試験としてＨＣＮＰによる吸収試験及び二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。

［結果］
一般臓器における抗ＨＣＮＰ抗体による陽性産物の分布を表１に示すが、特に腎臓、精巣、精管、鼻腺、肺、唾液腺、小腸、大腸、膵臓、脾臓、胸腺、ラセン器、ハーラー脂腺で陽性産物の出現が強かった。陽性産物を認めた各臓器の組織構造は下記の通りであつた。

腎臓；主として近位尿細管を構成する細胞（図１ａ）。精巣；精細管上皮細胞及び間質のライデ゛ィッヒ細胞（図１ｂ）。精管；上皮（図１ｃ）。鼻腺；腺細胞。肺；細気管支上皮。唾液腺；導管。小腸及び大腸；腸陰窩の基底顆粒細胞（図１ｄ）。膵臓；ラ氏島内の一部の細胞。脾臓；マクロファージと思われる細胞。胸腺；髄質内の細網細胞と思われる細胞。ラセン器：内有毛細胞及び外有毛細胞。ハーラー脂腺；腺細胞。

以上の陽性産物は対照試験で、いずれも陰性であった。

［考案］

今回使用した抗ＨＣＮＰ抗体（抗体２）による１１日齢Ｗｉｓｔａｒ系ラットにおける陽性産物の分布は組織構造レベルでは腺と呼ばれる構造を構成している分泌細胞、分泌物が運ばれる導管を構成する細胞を中心に各臓器に広がっていた。ＨＣＮＰ及びＨＣＮＰの前駆体蛋白の生理機能に関する詳細は現在のところ不明である。今後、ＨＣＮＰのＣ末端近傍領域を主として認識するエピトープを有する抗体１による一般臓器における免疫染色の比較検討、また抗ＨＣＮＰ抗体（抗体２）陽性部位に電顕レベルでの免疫組織化学的アプローチによる細胞内小器官での発現分布の検討もその生理機能の解明への一助となるものと考えられた。

表１．一般臓器における抗ＨＣＮＰ抗体陽性産物の分布

検索部位	腎盂	腎杯	腎臓	尿管	精巣	精管	精巣上体	前立腺	鼻腔	咽頭	喉頭	気管	肺	心臓	血管	骨格筋	平滑筋	下垂体前葉	副腎	舌	唾液腺	食道	胃	小腸	大腸	肝臓	膵臓	リンパ節	脾臓	胸腺	骨髄	皮膚	平衡器	ラセン器	眼球	ハーダー腺	脂腺
免疫反応性	＋	－	－	＋	＋	－	＋	－	－	－	＋	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋	－	－	＋

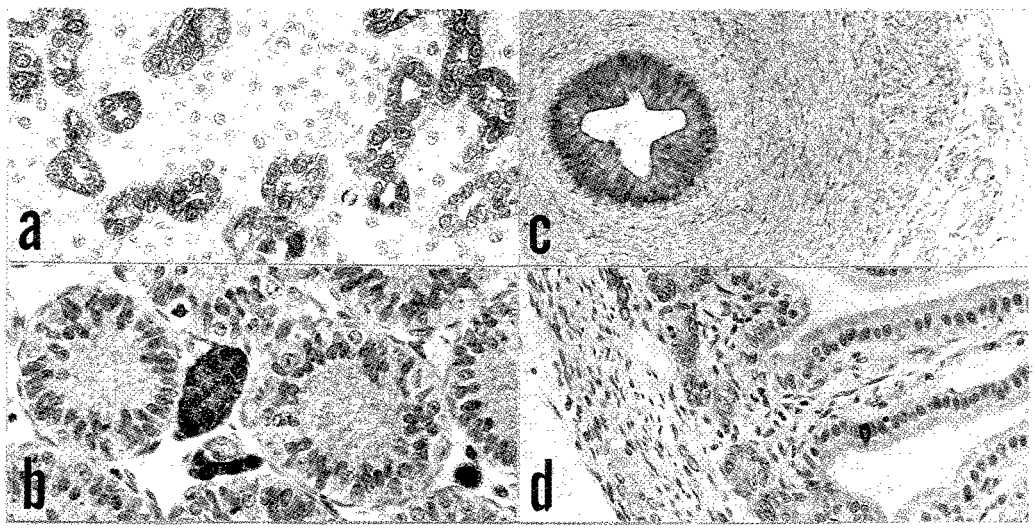


図１．　抗ＨＣＮＰ抗体による陽性産物の分布

［文献］　ａ．腎　ｂ．精巣　ｃ．精管　ｄ．小腸

１）Ojika,K.,et al.(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.81,2567-2571
２）Ojika,K.,et al.(1992)Brain research.572,164-171
３）林謙一郎　他.(1991)神経化学.30(1),328-329
４）三竹重久　他.(1992)神経化学.31(1),88-89

72 IL-4によるミクログリアの増殖，活性化とMHC抗原誘導の抑制

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〕

ミクログリア，アストロサイトのinterleukin-4(IL-4)産生及びIL-4 receptor (IL-4R)の表現を検索した．両者ともIL-4の産生は活性，mRNAの表現ともに認められなかったが，ミクログリアはIL-4R mRNAを表現していた．Recombinant IL-4は容量依存性にミクログリアの増殖を促進し，この効果は従来ミクログリアの増殖因子として知られていた M-CSFやGM-CSFと協調性に働いた．またIL-4はミクログリアの酸フォスファターゼ活性や活性酸素の産生も促進させたが，γ-interferon (IFNγ)によるclass II MHC (Ia)抗原の誘導には抑制的に働いた．T細胞由来のIL-4はミクログリアの増殖因子として，また種々の活性の調節因子として中枢神経系の病態発症に重要な役割を持つ可能性が示唆された．

中枢神経系のグリア細胞は種々のサイトカインを産生し独自のサイトカインネットワークを形成している．このサイトカインネットワークの詳細を更に検討する目的で，今回は脳内での産生も機能も不明であるIL-4について，その脳内での産生及び機能，特にミクログリアの種々の機能に対する影響について検討した．IL-4はB細胞の増殖因子として同定されたT細胞由来のサイトカインであるが，マクロファージ系の細胞に対しては，多岐にわたる機能を持つことが明らかにされている．ミクログリアはマクロファージ系の細胞であり，最近我々はIL-4受容体のmRNAを表現していることを確認していることから，IL-4がミクログリアの機能に何らかの作用を持つことが推測される．

［対象と方法］

既報[1,2]のごとくC3H/HeNマウス新生仔脳の一次混合培養よりミクログリアとアストロサイトを分離した．これらを無刺激，LPS，IFNγ存在下で培養し，2日後に上清を集めてそのIL-4活性をbioassayで測定した．残った細胞を洗浄後，total RNAを抽出し，RT-PCR法[3]にてIL-4及びIL-4 rceptor(R)のmRNAを検索した．さらにIL-4のミクログリアに対する効果を検討する目的で，ミクログリアを recombinant IL-4 (0.1-200 U/ml)で刺激し，72時間後に増殖能の変化をMTT assay，^{3}H-thymidine uptake，BrdU uptake[4] で検討し，更に酸フォスファターゼ活性，活性酸素産生の変化を既報[4]のごとく検索した．また，IFNγによるclass II MHC 抗原の誘導に対する影響を検討するためにミクログリアを100 U/ml IFNγと種々の濃度のIL-4 で24時間刺激し，class II MHC 抗原の表現を間接免疫抗体法で調べるとともに，同様に刺激したミクログリアよりtotal RNAを抽出しclass II MHC mRNAを検索した．

［結果と考察］

ミクログリア，アストロサイトともにIL-4を産生しなかったが，ミクログリアにはIL-4Rの mRNAが認められた．IL-4は容量依存性にミクログリアの増殖を誘導し，これは抗IL-4R 抗体で特異的に抑制された（図1）ことよりIL-4受容体を介した特異的作用であると考えられた．ミクログリアがアストロサイト由来のM-CSFやGM-CSFで増殖することは以前報告したが[4,5]，IL-4はこれらのコロニー刺激因子と協調的に働き，ミクログリアの増殖を更に強めた（図2）．IL-4はミクログリアの酸フォスファターゼ活性，活性酵素産生も容量依存性に増加させた．これに反し，IFNγによるclass II MHC 抗原の誘導に対してはIL-4は抑制的に働きclass II MHC 抗原のmRNAと表面抗原量をともに減少させた．これらの成績はIL-4がミクログリアの増殖因子として働くこと，その際にミクログリアの炎症細胞としての機能は亢進させるが免疫調節細胞としての機能は抑制することを示唆している．種々の免疫性，炎症性疾患でのミクログリアの増加が認められ，病態発症に重要な役割を果すと

考えられているが，この増殖にはGM-CSFや M-CSFなどのアストロサイト由来のコロニー刺激因子のほかにT細胞由来のIL-4が関与していることが推測された．最近，ウイルス性脳炎や多発性硬化症の急性期における髄液中IL-4の上昇や，それらの組織中にIL-4 mRNAが検出されることが報告[6,7]されており，上記の仮説を支持している．我々は昨年度の本学会で transforming growth factorβ（TGFβ）がミクログリアの増殖，活性化，class II MHC抗原の誘導すべてを抑制し中枢神経系のサイトカインネットワークにおける負の調節因子であることを報告したが[8]，IL-4 も病態下において，TGFβと異なるもう一つの負の調節因子として働きうると考えられる．

[文 献]

1) Suzumura, A. et al., J. Neuroimmunol. 15:263, 1987.
2) Suzumura, A. et al., J. Immunol. 140:2068, 1988.
3) Sawada, M. et al., Brain Res. 583:296, 1992.
4) Suzumura, A. et al., J. Neuroimmunol. 30:111, 1990.
5) Suzumura, A. et al., Brain Res. 545:301, 1991.
6) Moskophidis, D. et al., J. Virol. 65:1364, 1991.
7) Wucherphennig, K. W., J. Exp. Med. 175:993, 1992.
8) Suzumura, A. et al., J. Immunol. in press

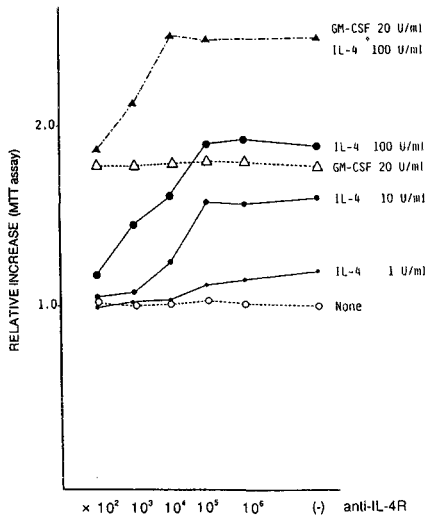


Fig. 1

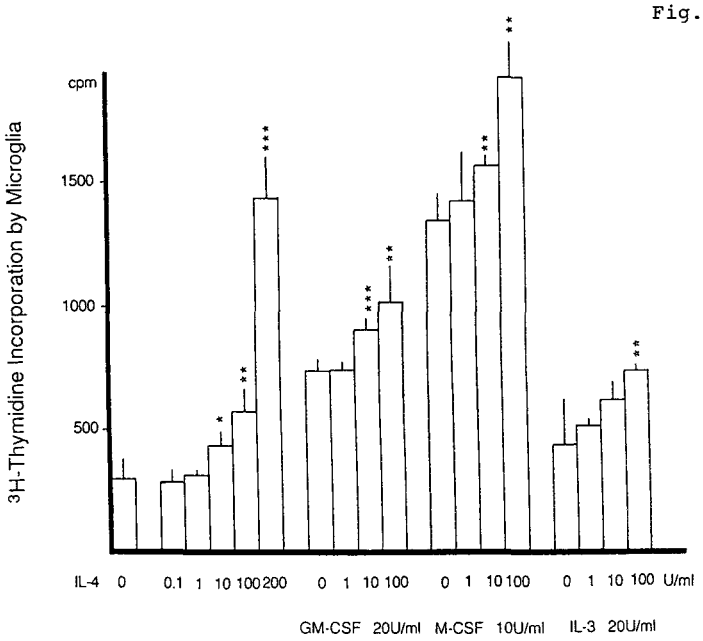


Fig. 2

73 脳内でのCD14の役割とミクログリアの休止化にともなう発現の変動

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)

〔要約〕

アストロサイトやミクログリアは免疫細胞を活性化するリポポリ多糖(LPS)で活性化されサイトカインを産生したりO_2^-の産生を増大したりすることが知られている。マクロファージなどの免疫細胞ではLPSはLPS結合タンパクに結合した複合体として細胞表面にあるCD14に結合して作用を表わすため、グリア細胞でもCD14を介した活性化のメカニズムが想定されていた。今回我々は培養系でアストロサイトやミクログリアがCD14の mRNAを発現していることを発見した。抗マウスCD14抗体を用いた阻害実験からCD14はLPSにより活性化されるいくつかのサイトカインのうちIL-1α産生の増大を調節していることがわかった。さらにミクログリアのCD14はアストロサイトが産生するミクログリア脱活性化因子によってramifiedに誘導すると発現が低下することがわかった。したがって脳のCD14はLPSの作用の一部を仲介しており、ミクログリアの活性化状態の調節に関わっていると考えられる。

中枢神経系は免疫系細胞の支配から免れている特異な組織と考えられてきたが、近年脳内の細胞が種々のサイトカインやリポポリ多糖(LPS)などの免疫細胞の活性化物質によってその機能や増殖分化などを調節されることが明らかになった。この事実は中枢神経系といえども免疫系に影響されることを意味するが、脳内には免疫系細胞がほとんど見られないため、それらの作用を仲介または代替する細胞が存在しなくてはならない。この役割を担う脳内の免疫担当細胞とでも言うべき細胞がミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞であることを我々をはじめ多くのグループが示している。我々はミクログリアやアストロサイトが多くのサイトカインレセプターや免疫細胞に特異的な細胞表面分子を発現していることを報告してきたが(1-3)、モノサイトやマクロファージに特異的に見られ、LPSの作用点となるLPS結合タンパクのレセプター(CD14)(4)がミクログリアやアストロサイトに発現し、LPSの作用を仲介していることを発見した。今回我々はCD14の脳内での役割を調べ、その意義について検討した。

[方法]

ミクログリアおよびアスト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(5)で分離した。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ない、培養上清のサイトカインをバイオアッセイで定量した。CD14抗体による阻害実験は抗マウスCD14ポリクローナル抗体をLPS処理の30分前に培地に添加して行った。IL-1αについてはさらにELISA法により定量した。同様に処理したミクログリアおよびアストロサイト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およびアストロサイトより酸性グアニジンーフェノール法によりRNAを抽出してRT-PCRによりサイトカインやCD14のmRNA発現を調べた。

[結果]

ミクログリアは通常の培養条件下でIL-1αを発現しているが、LPSで刺激するとIL-1α, β, IL-6, TNFαの発現が促進され、このときのmRNA発現や活性の分泌はLPSが存在する限り持続的であった。同様にアストロ

サイトでも通常の培養条件下でIL-1αを発現しており、LPSで刺激するとIL-1α, β, IL-6, TNFαに加え、GM-CSFやM-CSFを発現した。しかしLPSによる発現の増大はミクログリアとは異なり、LPSが存在していても一過性であった。ミクログリアおよびアストロサイトの酸性ホスファターゼ活性とNBT還元能もLPSにより活性化された。ミクログリアおよびアストロサイトはCD14を強く発現しているので、LPSの作用はCD14を介した活性化である可能性が考えられたが、抗マウスCD14抗体の前処理ではIL-1αの増大のみが抑制され、他のIL-1β, IL6, TNFα産生の増大は阻害されなかった。CD14の発現はLPS刺激の有無にかかわらず強く発現していたが、ミクログリアを休止状態に誘導すると発現が抑制された。

[結論]

CD14はモノサイトやマクロファージの細胞表面に発現している53-55kDaの糖タンパクで、血清中に存在するLPS結合タンパクとLPSとの複合体を受容するレセプターの一つとしてとしてLPSの作用を仲介している(4)。培養条件下ではミクログリアおよびアストロサイトはLPSにより活性化されることから、これらの細胞にCD14が存在することが予測されていた。今回の結果から培養条件下ではミクログリアおよびアストロサイトがCD14を発現していることが明らかになった。両細胞においてCD14はIL-1αの発現を制御しているが、他のサイトカインの産生の増大には関与していないと考えられた。したがって脳内でのCD14はLPSの作用の一部を仲介しており、他の作用についてはさらに別のLPSを受容するタンパクが存在すると思われる。また両細胞でのLPSに対する応答性にはちがいがあることから、脳内でのLPSによるシグナルを受容するメカニズムは非常に複雑であると考えられる。

しかし一方で抗CD14抗体による検索では脳内でCD14を発現している細胞はほとんどなく、特に休止状態にあると考えられているramified ミクログリアはCD14陰性であると報告されていた(6)。我々は既にアストロサイトが産生する因子により培養ミクログリアが休止状態と考えられているramifiedと呼ばれる形態に変換することを報告している(7)が、この因子を処理してミクログリアを休止状態に誘導するとCD14発現が低下することを発見した。このことはCD14 が休止状態から活性化状態に移行するミクログリアのサイトカイン産生や生化学的機能の増大や調節に関与していることを意味する。現在アストロサイトの産生する因子やCD14の内在性のリガンドの実態について検討中であるが、両者の相互作用により脳組織中のミクログリアの状態が調節されているかもしれない。

[引用文献]

1. Sawada, M. et al. (1993) Neurosci. Lett. in press.
2. Suzumura, A. et al. (1987) J Neuroimmunol. 15, 263-278.
3. Sawada, M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun.189, 869-876.
4. Ziegler-Heitbrock, H.W.L. et al.(1993) Immunol. Today 14, 121-125.
5. Sawada, M. et al. (1990) Brain Res. 509, 119-124.
6. Ferrero, E. et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2380-2384.
7. Suzumura, A. et al. (1991) Brain Res. 545, 301-306.

74 Guillain-Barré症候群を惹起する細菌のﾘﾎﾟ多糖はGM1ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ様構造を有する

東京医科歯科大学神経内科　結城伸泰、宮武　正
同　分子医化学　瀧　孝雄、飯田静夫
同　機器分析　笠間健嗣
都立衛生研究所　微生物部　高橋正樹、斉藤香彦
東京都臨床医学総合研究所　稲垣冬彦

Guillain-Barré症候群(GBS)の発症機序として、神経成分と交叉反応する抗原を有する病原体が感染し、抗神経抗体が産生されて神経が障害されるという交叉抗原説が考えられている。本研究では，Penner 19型の*Campylobacter jejuni*のﾘﾎﾟ多糖がｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞGM1と共通する構造を含むことを明らかにし、GBSを惹起する細菌と神経成分の交叉抗原の存在を初めて証明した。

GBSは、上気道症状・胃腸症状など前駆症状の後に筋力低下が急性に発症・進行する末梢神経障害である。血漿交換の有効性から自己抗体の関与が強く示唆されている。GBSの発症機序のひとつとして、先行感染の病原体が神経構成成分と共通する抗原を有し、病原体の交叉抗原に対する抗体が自己抗体として神経に障害を与えるという仮説(交叉抗原説)が以前から提出されていたが、証明されてはいなかった。

われわれはこれまで，下痢症の起因菌でｸﾞﾗﾑ陰性の*C.jejuni*に感染した後に発症したGBS患者の急性期の血清中に抗GM1抗体価が上昇することを見いだした．また、*C.jejuni*感染後のGBS患者の便中からPenner 19(PEN 19)型の*C.jejuni*が分離される頻度が高いことを明らかにした。一方、Pennerの血清型はﾘﾎﾟ多糖の糖鎖構造の相異を反映すると考えられている。そこで，抗GM1抗体の産生機序を明らかにするために*C.jejuni*(PEN 19型)ﾘﾎﾟ多糖中にGM1構造が存在するかを検討した。

方法と結果

対象：下痢を前駆症状としたGBS患者から分離した*C.jejuni*(PEN 19型)を用いた．

ﾘﾎﾟ多糖の精製：温水・ﾌｪﾉｰﾙ法を用いて菌体から粗ﾘﾎﾟ多糖を抽出した。水層を透析した後、1容量の水に対して、2容量のﾒﾀﾉｰﾙと1容量のｸﾛﾛﾎﾙﾑを加え、さらにｸﾛﾛﾎﾙﾑと水をそれぞれ1容量加えた。ｸﾛﾛﾎﾙﾑ層を乾燥後、25%ｱﾝﾓﾆｱ水で溶解し、56℃で48時間処理した．水に対して透析，凍結・乾燥後、n-ﾌﾟﾛﾊﾟﾉｰﾙ-水-25%ｱﾝﾓﾆｱ水(75:15:10)に溶解し，予め同溶媒で平衡化したｼﾘｶﾋﾞｰｽﾞｶﾗﾑにのせ，n-ﾌﾟﾛﾊﾟﾉｰﾙ-水-25%ｱﾝﾓﾆｱ水(75:15:10-6:4:1)で勾配をかけて溶出した．各試験管の一部を薄層ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾑに展開し，ﾆﾝﾋﾄﾞﾘﾝ、ﾚｿﾞﾙｼﾉｰﾙ、ｵﾙｼﾉｰﾙ、Dittmer試薬での呈色反応とｳｻｷﾞ抗GM1抗体、ｺﾚﾗ毒素を用いた免疫染色でﾓﾆﾀｰした。ｺﾚﾗ毒素が反応した画分はｹﾄ糖、ｱﾐﾉ基を含む均一なﾘﾎﾟ多糖のﾊﾞﾝﾄﾞとして得られた。この画分を回収・乾燥し、生理的食塩水に溶解し，逆相ｶﾗﾑにかけた．ﾒﾀﾉｰﾙで溶出した画分を乾燥し、精製ﾘﾎﾟ多糖とした。

ｶﾞｽｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰ・ﾏｽｽﾍﾟｸﾄﾛｸﾞﾗﾌｨｰ(GC-MS)：精製ﾘﾎﾟ多糖をﾒﾀﾉﾘｼｽし，n-ﾍｷｻﾝで脂肪酸ﾒﾁﾙｴｽﾃﾙ(上層)を抽出した．糖を含む下層はｱｾﾁﾙ化後，ﾄﾘﾒﾁﾙｼﾘﾙ化した．GC-MSで分析したところ，ﾘﾎﾟ多糖にはｶﾞﾗｸﾄｰｽ，ｸﾞﾙｺｰｽ，N-ｱｾﾁﾙｶﾞﾗｸﾄｻﾐﾝ，ｼｱﾙ酸、N-ｱｾﾁﾙｸﾞﾙｺｻﾐﾝ，3-ﾃﾞｵｷｼ-2-ｵｸﾂﾛﾝ酸，ﾍﾌﾟﾄｰｽと3-ﾋﾄﾞﾛｷｼﾐﾘｽﾁﾝ酸，ﾊﾟﾙﾐﾁﾝ酸が含まれていた．

NMR：NMRの解析を図 に示した。Galβ(a,b), GalNAcβ(c), Hep(d)およびNeuAcに由来するｼｸﾞﾅﾙが検出された（図 (1) (2)）。図 (3) からはGalβ(b)の3位がGalβ(a)に比べて低磁場へｼﾌﾄしているので3位にNeuAcが結合していることが示された。NOESYｽﾍﾟｸﾄﾙからGalβ(a)はGalNAcβ(c)の3位に、GalNAcβ(c)はGalβ(b)の4位に結合していること、またこのGalβ(b)はHepα(d)の2位に結合していることが明らかになった（図 (4)）。以上のことから、このﾘﾎﾟ多糖がGalβ(a)1-3GalNAcβ(c)1-4(NeuAcα2-3)Galβ(b)1-2Hepα(d)構造を有することが確認された。

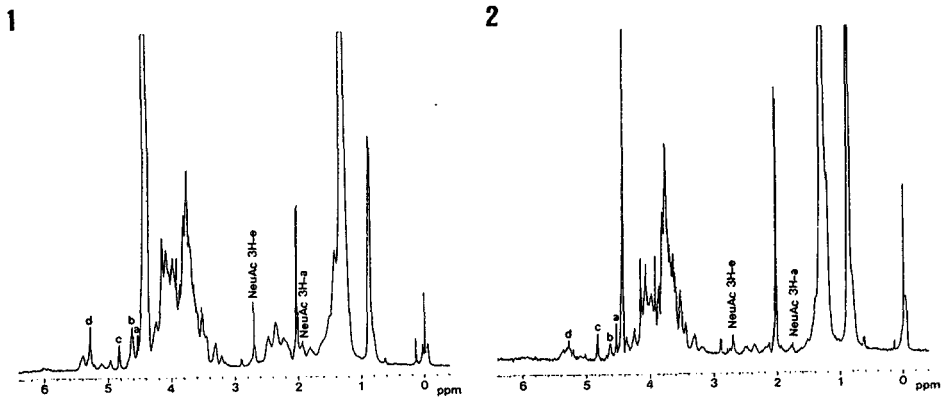
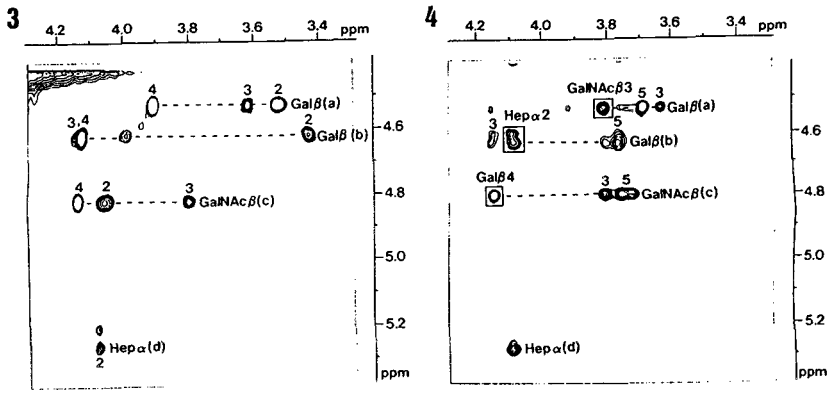


図　ﾘﾎﾟ多糖のNMRｽﾍﾟｸﾄﾗﾑ (1)正常ｽﾍﾟｸﾄﾗﾑ (2)CPMGｽﾍﾟｸﾄﾗﾑ



(3)TOCSYｽﾍﾟｸﾄﾗﾑ　　(4)NOESYｽﾍﾟｸﾄﾗﾑ

考察

C.jejuni(PEN 19型)ﾘﾎﾟ多糖がｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞGM1と共通する構造(Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-)を含むことが明らかにされた。本研究により，GBSを惹起する細菌と神経成分の分子相同性の存在が初めて証明された．

75 ヒト末梢神経ガングリオシドと抗ガングリオシド抗体の反応性

太田雪子[1]、後藤希代子[1]、黒谷篤之[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〕
我々のこれまでのヒト末梢神経のガングリオシドの解析から、運動神経と感覚神経のガングリオシドのセラミド組成は大脳ガングリオシドのそれと比べ複雑で、互いに異なることが明かとなっている。今回、ヒト運動神経と感覚神経から精製したGM1を用いて末梢神経疾患患者血清中の抗GM1抗体との反応性をELISA法、TLC一免疫染色法を用いて検討した結果　大脳GM1に比べ末梢神経由来のGM1は高い反応性を示す事が分かった。更に末梢神経ガングリオシドには飽和型長鎖塩基が多いため還元型GM1を作成し、その反応性を検討した。飽和型長鎖塩基を含む還元型GM1は大脳GM1に比べ高い反応性を示した。このようにガングリオシドのセラミド組成の違いが抗GM1抗体との反応性に影響を与えることが示された。

近年、様々な末梢神経障害において、神経系の細胞表面に存在する糖脂質、ガングリオシド等の複合糖質に対する自己抗体が病態に深く関与している事が報告され注目されている。我々はこれまでヒト末梢神経のガングリオシドの解析を行なってきた(1-3)。構成脂肪酸の約90%がステアリン酸からなる大脳ガングリオシドと比べ、末梢神経のガングリオシドの脂肪酸組成は複雑で炭素数14から26まで含まれており不飽和脂肪酸の含量も高い。更に、感覚神経由来のガングリオシドには長鎖脂肪酸が多く、運動神経には少ないという両神経の特徴的差異も明かとなった。長鎖塩基組成に関しても、両神経のガングリオシドでは異なり、感覚神経のガングリオシドには飽和型長鎖塩基が多かった。脂肪酸及び長鎖塩基の組成は糖鎖の配向に影響を与える為、抗ガングリオシド抗体との反応性に影響を及ぼすと考えられる。本研究ではヒト運動神経と感覚神経から精製したGM1および大脳GM1を用いて末梢神経疾患患者血清中の抗GM1抗体との反応性をELISA法、ＴＬＣ一免疫染色法を用いて検討した。更に、末梢神経ガングリオシドに多く存在する飽和型長鎖塩基(d18:0等)の影響を検討するため、還元型GM1を作成して抗体との反応性を検討した。

［方法］

1．ガングリオシドの精製と分析

ガングリオシド抗原は既法に基づきヒト末梢神経のうち運動神経と感覚神経から精製したGM1を用いた(1)。精製GM1は、^{1}H-NMR分析(400MHz)により構造解析をおこなった。長鎖塩基組成はGaver & Sweeleyの方法に従いGLCにより分析した(4)。

2．GM1の還元

牛大脳GM1(4mg)をメタノールに溶解し、$Pd(OH)_2$を触媒として水素ガスを用いて室温で3日間反応させた．脂肪酸および長鎖塩基の二重結合が還元されたことを^{1}H-NMR分析により確認した。

3．抗ガングリオシド抗体との反応性

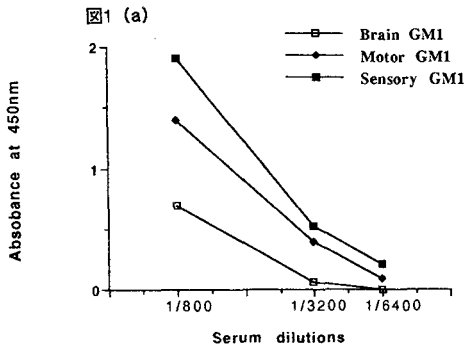
(a)精製したガングリオシドの抗GM1抗体との反応性はELISA法により測定した。抗原として100pmolのGM1を用いて、抗GM1抗体と4℃で一晩反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を作用させ発色し、450nmの吸光度を測定した。抗GM1抗体はギランバレー症候群患者血清（GBS）をもちいた。

(b)ＴＬＣ一免疫染色法は既法にもとずきおこなった(3)。ペルオキシダーゼの酵素活性は、4一クロロー1ナフトールー過酸化水素液で検出した。TLCの展開溶媒はC/M/0.2％$CaCl_2.2H_2O$(55/45/10, by volume)を使用した。

［結果］

1．GM1の構造分析

両神経由来のGM1のNMRスペクトルには、大脳のGM1のそれと同一の化学シフトを示すアノマープロトン(β-グルコース、β-ガラクトース、β−N-アセチルガラクトサミン)が同定され、これらのガングリオシドの糖鎖構造はGM1と同一である事を



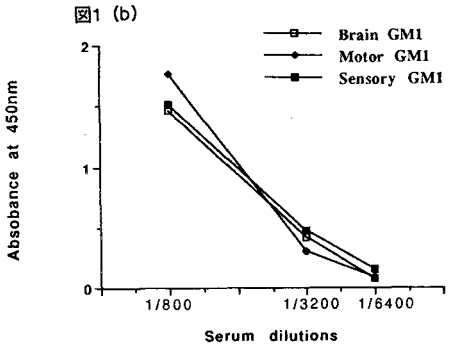


図1 末梢神経GM1と抗GM1抗体との反応性
(a) GBS患者血清中抗GM1IgG抗体価
(b) GBS患者血清中抗GM1IgM抗体価

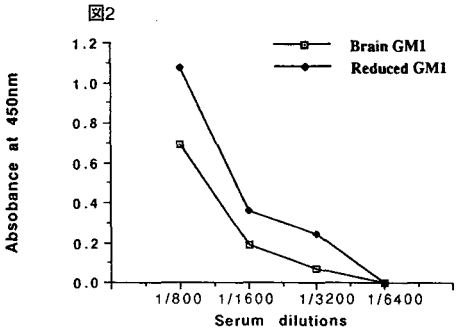


図2 還元型GM1と抗GM1抗体との反応性
(GBS患者血清中抗GM1IgG抗体価)

確認した。TLC上では感覚神経GM1は運動神経GM1よりRf値が僅かに大きく、セラミド組成の差によるものと考えられた。

2．末梢神経GM1と抗ガングリオシド抗体との反応性

抗GM1 IgG抗体陽性のGBS患者血清中の抗体と末梢神経由来のGM1との反応性をELISA法で測定した結果を図1aに示した。大脳GM1にくらべ末梢神経由来のGM1は高い反応性を示した。感覚神経GM1と運動神経GM1を比較すると 感覚神経GM1でより高い反応性がみられた．同一患者血清中の抗GM1IgM抗体は3種のGM1に対し差はみられなかった(図1b)。また他のGBS患者血清中IgGについても末梢神経由来のGM1は高い反応性を示す傾向がみられた。

3．還元型GM1と抗ガングリオシド抗体との反応性

飽和型長鎖塩基をもつ還元型GM1と抗GM1抗体陽性患者血清との反応性をELISA法で測定した結果を図2に示した。不飽和型長鎖塩基を含む大脳GM1にくらべ還元型GM1は高い反応性を示した。 同様の傾向はＴＬＣ－免疫染色法でも認められた。

[考察]

これまでガングリオシドに対するモノクローナル抗体について、抗原との結合性にその脂肪酸組成が影響する事を示した報告がある(5,6)。本研究ではヒト血清中の抗GM1抗体に関しても抗原への結合性がセラミド組成により変化する可能性を示した。又、不飽和型長鎖塩基の還元により得た飽和型長鎖塩基をもつ還元型GM1では反応性が高くなる場合もあり、長鎖塩基組成によっても抗体との結合が変化することが分かった。今後、末梢神経障害との関連について更に検討を進める予定である。

[謝辞]ギランバレー症候群患者血清を御供与頂きました近畿大学医学部八木祐史先生並びに東京医科歯科大学医学部結城伸泰先生に深謝いたします。NMR測定に御協力いただいた帝京大学医学部石塚稲夫先生と還元GM1作成に御指導いただいた理化学研究所伊藤幸成先生並びに小川智也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. 59: 1844-1849.(1992) (3)Ogawa-Goto, K., *et al* J.Neurochem. in press (4)Gaver, R. C., and Sweeley,C.C. (1965).J.Am.Oil Chem.Soc. 42: 294-298 (5)Itonori,S et al., Glycoconjugate J., 6:551-560(1989) (6)Karlsson,G., et al. B.B.A., 1043: 267-272 (1990)

76 γ線照射によるマウス小脳原基のアポトーシスと組織トランスグルタミナーゼの変動

田丸　政男，井上　稔[x]，新井　正一[xx]，安藤　正人[xxx]，永田　豊[xxx]
（鈴鹿医療科学技術大・医用情報，[xx]同・放射線技術，[x]名大・環研，[xxx]藤田保健衛生大・医・生理）

〔要約〕 1.0 Gyのγ線を生直後のマウス新生仔に照射すると，照射3時間後より小脳外顆粒層の細胞死（核濃縮）の頻度が上昇し，6時間後にピークに達し，以後回復傾向を示した．照射1時間後における蛋白合成阻害剤のサイクロヘキシミド（ＣＣＨ:3㎎/kg）の投与は，細胞死の頻度の上昇を一時的に抑制したが，ＣＣＨが代謝したと思われる時期に再開し，12時間後にピークに達した．このことからγ線照射による小脳外顆粒層の細胞死は，RNAおよび蛋白合成を伴ういわゆるアポトーシスであることが示された．細胞内のＣａ$^{2+}$依存性のトランスグルタミナーゼ（ＴＧ）は，アポトーシスに関与するとされるが，照射5時間後より15時間後までにおいて酵素誘導および活性化が見られ，その後回復傾向を示し組織学的な細胞死の経時的変化とほぼ一致した．照射1時間後のＣＣＨ投与は，ＴＧの誘導ばかりでなく活性化も完全に阻害し，検索した24時間後まで持続した．しかし，ＣＣＨの単独投与では，何れの時期でも細胞死およびＴＧの誘導は示されなかったが，比活性のみが対照の約5倍以上の高値を示した．以上のことから，小脳未分化神経細胞のγ線照射によるアポトーシスは，蛋白合成阻害により一時的に抑制されても，アポトーシスの「シグナル」は数時間保存されることが示唆された．また，ＣＣＨ単独投与がＴＧの活性化を起こし，照射後のＣＣＨ投与では見られないことから，ＴＧの活性化の機構はγ線照射により修飾された可能性が示唆された．

〔はじめに〕 小脳外顆粒層の分裂増殖中の未分化神経細胞は放射線感受性が高く，低線量の放射線によっても細胞死に至ることが知られている[1]．この放射線による細胞死は電子顕微鏡的観察によって，apoptotic death（プログラム死）であることが報告されている[2]．アポトーシスは，形態形成や変態などの生理的な細胞死の過程，ホルモン依存性の組織再構成などの過程，更に放射線・温熱・化学療法剤などによる細胞死においても見られ，遺伝子発現過程としてのRNAおよびタンパク合成を伴う，能動的な細胞死であると定義されている[3,4]．アポトーシスの組織学的な経過は，先ず核濃縮pyknosisが起こり，細胞容積の減少や細胞質の蛋白の濃縮により，細胞が縮小化および断片化する[5]．この過程で出現するapoptotic bodyは，高度に架橋（cross-link)した蛋白の骨格構造物であることが知られている[6]．細胞質内のトランスグルタミナーゼtransglutaminase(ＴＧ；EC 2.3.2.13)は,この蛋白の架橋に機能していると考えられており，実際に肝細胞を用いたアポトーシスの実験で，誘導されることが報告されている[6]．本実験では，γ線を新生仔マウスに照射し,小脳外顆粒細胞の細胞死を発現させた場合のＴＧの変動と細胞死との関係について検討した．

〔実験方法〕 実験にはSlc:ICRマウスを用い，交配の翌日，膣栓の認められた雌を妊娠0日とした．妊娠マウスは自然分娩させ，出生日を生後0日と起算し生後0日の新生仔にγ線を照射した．実験群は，γ線照射群，γ線照射＋ＣＣＨ（サイクロヘキシミド）投与群，ＣＣＨ単独投与群および無処置群の４群に分けた．γ線照射は，新生仔をプラスチックケージに入れ，コバルト60のγ線に線量率0.04Gy/minで1.0 Gy，１回全身被曝させた．ＣＣＨ(3㎎/kg)はγ線照射1時間後に一回皮下投与した．γ線照射後，マウスはエーテル麻酔下で経時的に断頭屠殺し，摘出小脳を組織学的および生化学的検索に供した．小脳は，0.25M庶糖を含む10mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)中で，ガラスホモゲナイザーを用いて磨細した懸濁液を，酵素活性測定用試料とした．ＴＧ活性の測定は［^{3}H]putrescine(1,100 GBq/㎜ol)が，N,N'-dimethyl-caseinタンパクに取り込まれる放射活性からもとめるLorandら[7]の方法に従って実施した．また，摘出小脳は2%ホルムアルデヒド，2.5%グルタールアルデヒド液で固定後，矢状断組織切片(2μm)を作成し，ヘマトキシリン・エオジン染色した．小脳原基のculmenの外顆粒層を600倍の顕微鏡下に観察し，核濃縮を示す細胞の頻度を検索した[8]．

〔結果〕 1．小脳外顆粒層の核濃縮を示す細胞の頻度： 1.0 Gyの照射群では，照射3時間後から小脳外顆粒層の未分化神経細胞の核濃縮像が増加し始め，6時間後にピークに達し（図１），それらの細胞は近隣の細胞に貪食され徐々に消失した．γ線照射１時間後のＣＣＨ投与群では，照射6時間後まで核濃縮の増加は抑制されたが，その後，細胞死が再開し12時間後にピークに達した．ＣＣＨ単独投与群では細胞死の明らかな増加は見られなかった（図１）．

2．ＴＧ活性および酵素誘導の変動： 小脳のＴＧ活性は，照射5時間後より上昇し始め，6時間～15時間目では約3.5倍の著しい比活性の増大が持続し，その後徐々に減少し回復傾向を示した(図2)．また，図3は酵素反応液へのカゼイン非添加条件における内因性酵素活性値と，γ線照射前の対照値との比を検討したもので，これはＴＧそのものの酵素蛋白量，即ち酵素の誘導の指標となり，この比の上昇もＴＧ活性の上昇とほぼ同様の経時的変動を示した(図3)．一方，照射1時間後のＣＣＨ投与は，ＴＧの誘導ばかでなく活性化までも，検索した24時間後まで完全に抑制した(図2,3)．しかし，ＣＣＨ単独投与群では，投与2時間後（照射群の3時間後に相当）より急激にＴＧの活性化が発現し，投与18時間後まで無処置の約5倍以上の高い活性

値を示し，その後無処置群のレベルまで回復したが，酵素の誘導は何れの時期でも見られなかった(図2,3)．

[考察] γ線照射による小脳外顆粒層の細胞死は，ＣＣＨ投与で抑制されることから，蛋白合成を必要とするアポトーシスであることが示され，既に報告[8]した0.25Gyの低線量照射の場合とほぼ同様の経過であった．ＣＣＨによる照射後の細胞死の抑制は，この薬物が代謝されたと思われる時点で再開することから，アポトーシスの「シグナル」は蛋白合成が阻害されても数時間は保持されることが示唆された．一方，照射後のＣＣＨ投与では，小脳のＴＧは誘導ばかりでなく活性化も阻害され，細胞死が再開し核濃縮の頻度が，ピークに達する時点においても完全に抑制されたままであり，組織学的所見と異なった．このことは，照射後の蛋白合成阻害によってＴＧの酵素誘導の「シグナル」が消滅したか，あるいはＣＣＨがまだ完全に代謝されなかったなどの可能性が考えられるが明らかでない．また，非照射群へのＣＣＨ単独投与が，ＴＧの著しい活性化を起こし，照射群でのＣＣＨ投与では見られなかったことから，ＴＧの活性化の機構は，γ線照射によりなんらかの修飾を受けた可能性が示唆された．

ＴＧはＣａ$^{2+}$依存性であり，細胞質に存在するＴＧの生理的な役割は，細胞骨格タンパクの架橋[9]，更に肝細胞を用いた実験では，アポトーシスに関与することが報告されている[6]．Fesusら[6]は，ＴＧのアポトーシスにおける役割は，細胞死の過程で形成されたapoptotic bodyをＴＧが架橋することで安定化し，細胞内物質の細胞外への漏出を防いでいる可能性を報告している．本実験のγ線照射による未分化神経細胞の細胞死の経過が，ＴＧの経時的変動とほぼ併行することから，ＴＧのアポトーシスへの関与が示唆される．また，アポトーシスにおける核の断片化には，Ca^{2+}，Mg^{2+}依存性エンドヌクレアーゼの関与が報告[5]されており，Ｃａ$^{2+}$のキレート剤がapaptosisを阻害することが知られている．このことから，細胞死の発現にはＣａ$^{2+}$の細胞内流入が重要な因子の一つであると考えられている．本実験でのγ線照射後のＴＧの活性化および誘導の要因の一つとしても，Ｃａ$^{2+}$の細胞内への流入が示唆される．

[文 献]

1)Inouye, M. and Kameyama (1983) J. Radiat. Res. 24: 259-269. 2)Harmon, B.V. and Allan, D.J. (1988) Scanning Microsc. 2: 561-568. 3)山田 武 (1989) 細胞 21: 122-124. 4)Yamada, T. and Ohyama,H. (1988)Int. J. Radiat. Biol. 53: 65-75. 5)Arends, M.J. and Wyllie, A.H.(1991) Int. rev. Exp. Pathol. 32: 223-254. 6)Fesus, L. et al. (1991)Eur. J. Cell Biol. 56: 170-177. 7)Lorand, L. et al.(1972) Anal. Biochem. 50: 623-631. 8)Inouye, M. et al.(1992): Int. J. Radiat. Biol. 61: 669-674. 9)Folk, J.E.(1980) Annu. Rev. Biochem. 49: 517-531.

図１　小脳外顆粒層の核濃縮を示す細胞の頻度

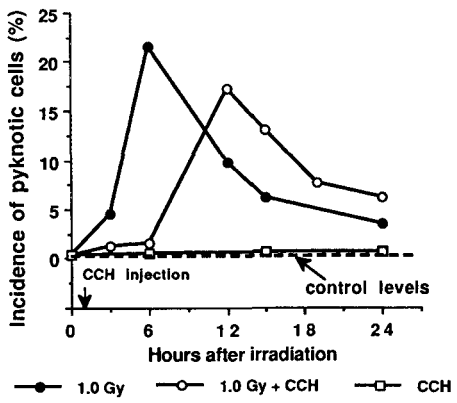


図２　トランスグルタミナーゼ活性の経時的変化

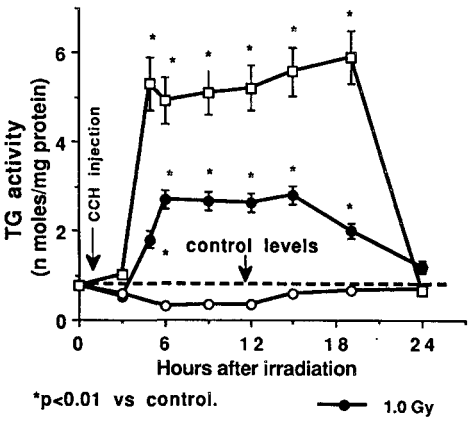
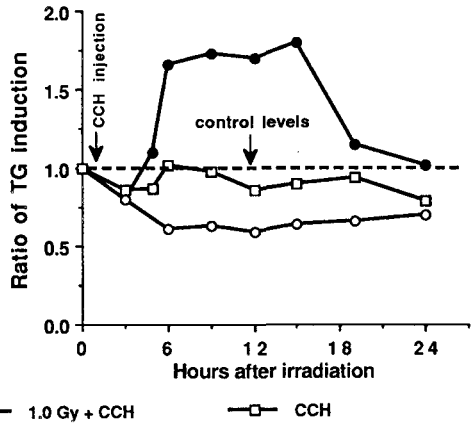


図３　トランスグルタミナーゼの酵素誘導の経時的変化



77　神経成長因子（ＮＧＦ）によるｅｔｏｐｏｓｉｄｅ誘発ＰＣ１２細胞死の抑制

中島光業、柏木久美子、*古川昭栄、*林　恭三、川島拓司、林要喜知
（森永乳業．生科研、*岐阜薬科大学．分子生物）

〔要約〕

抗がん剤であるｅｔｏｐｏｓｉｄｅは、いろいろな細胞に対しプログラム細胞死を引き起こすことが知られている。今回、ラット褐色腫細胞（ＰＣ１２細胞）に対するｅｔｏｐｏｓｉｄｅの細胞死誘発効果を検討した。ｅｔｏｐｏｓｉｄｅは1μg／ｍｌ以上の濃度でＰＣ１２細胞の死滅を引き起こし、その細胞死はタンパク質合成阻害剤（シクロヘキシミド）及びＲＮＡ合成阻害剤（アクチノマイシンＤ）で阻止された。さらに、この細胞死は神経成長因子（ＮＧＦ）によっても阻止された。また、ＮＧＦによって誘導されるＰＣ１２細胞の形態変化（突起伸展、接着性の強化）に対し、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅは何ら影響を及ぼさなかった。以上の結果より、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅはＰＣ１２細胞に対してプログラム細胞死を誘発し、その細胞死にはタンパク質性分子の発現が必要とされることが示唆された。また、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅの細胞死誘発経路は、ＮＧＦのシグナル伝達によって遮断されることが明かになった。

［緒言］脊椎動物では、神経系の発生過程で生じた神経細胞のうち約半数が成熟するまでに死滅する(4,11)。この細胞死（プログラム細胞死；programmed cell death）の分子機構は明かではないが、自身を死滅させる機構（自殺プログラム）が活性化されることによって死滅するものと考えられている(15,17)。また、ほとんどの動物細胞はこの自殺プログラムを有しており、このプログラムが、他の細胞からのシグナルによって制御を受けている、とする報告が近年蓄積しつつある(13,15,18)。

プログラム神経細胞死のin vitroのモデル系としては、発生過程の特定の時期の交感神経細胞、知覚神経細胞あるいはＰＣ１２細胞などの培養系が知られている。交感神経細胞のすべてと知覚神経細胞の約半数はその生存にＮＧＦを必要とする。一方、ＰＣ１２細胞は、通常生存にＮＧＦを必要としないが、長期間（２週間程度）ＮＧＦを処理し交感神経細胞様に分化させるとＮＧＦ依存性になる(8)。今回私たちは、抗がん剤であるｅｔｏｐｏｓｉｄｅがＰＣ１２細胞のプログラム細胞死を誘発し、それをＮＧＦが阻止することを見いだした。

［方法］ＰＣ１２細胞の継代は、コラーゲンコートデッシュを用い、馬血清（５％）、牛胎児血清（10％）、ペニシリンＧ（50 U/ml）、および硫酸ストレプトマイシン（100μg/ml）を含むダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）で行った。細胞死誘発実験は、コラーゲンコート４８well plateにＰＣ１２細胞をまき（10^5個／cm^2）、２日後、無血清培地（ヒトトランスフェリン（５μg/ml）、ウシインシュリン（５μg/ml）、プロゲステロン（20nM）、ウシ血清アルブミン（0.5％）、セレン酸（30nM）、および上記抗生物質を含むＤＭＥＭ）で細胞を１度すすぎ、ＮＧＦを含む無血清培地に交換して、３０－６０分後にｅｔｏｐｏｓｉｄｅを添加した。細胞死の判定は、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ添加後２４時間目に培養上清を回収し、培地中に漏出したＬＤＨ（lactate dehydrogenase）活性を測定することで行った(7)。なお、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅはＤＭＳＯに溶解して実験に用いた。ＤＭＳＯ最終濃度は０．０１－０．１％の範囲となるようにし、対照にはそれぞれ等量のＤＭＳＯを添加した。

［結果と考察］ＰＣ１２細胞にｅｔｏｐｏｓｉｄｅ（10μg/ml）を処理すると、１２時間目には細胞死が認められ、２４時間までに約半数の細胞が死滅した。細胞内酵素（ＬＤＨ）活性の培地中への漏出量を指標に細胞死誘発効果を定量化してみると、1μg／ｍｌのｅｔｏｐｏｓｉｄｅでＬＤＨ活性の増加が認められ、１０μg／ｍｌで最大放出量になった（図１）。

ｅｔｏｐｏｓｉｄｅは、いろいろな細胞に対しプログラム細胞死を引き起こすことが知られており(2,5)、またそのうちのいくつかはタンパク質合成阻害剤によって阻止されることが知られている(10)。そこで私たちは、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ誘発ＰＣ１２細胞死に対するタンパク質合成阻害の効果を検討した。シクロヘキシミド（タンパク質合成阻害剤）とアクチノマイシンＤ（ＲＮＡ合成阻害剤）は、いずれもｅｔｏｐｏｓｉｄｅ誘発細胞死を顕著に抑制した（図２）。この結果より、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅによるＰＣ１２細胞死は、タンパク質性分子の発現を必要とするプログラム細胞死であることが示唆された。

胎生後期の交感神経細胞は、ＮＧＦ存在下１週間培養した後ＮＧＦを除くと２４－４８時間でプログラム細胞死を起こす(9)。また、ＰＣ１２細胞は、なんの添加物（supplement）も加えない無血清培地で培養するとプログラム細胞死を起こすが、ＮＧＦの添加でそれは阻止される(1,6)。いずれもＮＧＦがプログラム細胞死を阻止していることから、今回のｅｔｏｐｏｓｉｄｅ誘発ＰＣ１２細胞死に対してもＮＧＦの効果を検討した（図３）。その結果、ＮＧＦは１

－１０ｎｇ／ｍｌの濃度範囲で用量依存的に細胞死を阻止した。また、ＮＧＦはＰＣ１２細胞に対して突起伸展、接着性の強化などの形態変化を誘導することが知られているが、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅはこれらの変化に対して何ら影響を与えなかった。この結果は、ＮＧＦのシグナル伝達経路の下流にｅｔｏｐｏｓｉｄｅの作用経路が存在することを示唆している。

ｅｔｏｐｏｓｉｄｅは抗がん剤として用いられているが、その作用機序は明かにされていない(3)。しかし、ｅｔｏｐｏｓｉｄｅはさまざまな細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られており(2,16)、また、核タンパク質であるＤＮＡトポイソメラーゼＩＩの阻害剤として知られている。この酵素はＤＮＡの２本鎖を切断、再結合しＤＮＡのトポロジーを調節して、ＤＮＡ複製に重要な役割を果たしている(12)が、分裂能を失った神経細胞の核でもこの酵素活性の存在が知られている(14)。ｅｔｏｐｏｓｉｄｅによるトポイソメラーゼＩＩの活性阻害と今回のＰＣ１２細胞死がどのように関与しているかは、今後の課題である。何れにせよ、本実験系は、プログラム神経細胞死の分子機構を研究するための１つの有用なモデルになるものと考えられる。

［文献］

(1) Batistatou, A. and Greene, L. A. (1991) J. Cell Biol. 115, 461-471. (2) Bertrand, R. et al. (1991) Cancer Res. 51, 6280-6285. (3) Clarke, A. R. et al. (1993) Nature 362, 849-852. (4) Franklin, J. L. and Johnson, E. M. (1992) TINS 15, 501-508. (5) Fry, A. M. et al. (1991) Cancer Res. 51, 6592-6595. (6) Greene, L. A. (1978) J. Cell Biol. 78, 747-755. (7) Koh, J. Y. and Choi, D. W. (1987) J. Neurosci. Methods 20, 83-90. (8) Koike, T. (1992) Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol-Psychiat. 16, 95-106. (9) Martin, D. P. et al. (1988) J. Cell Biol. 106, 829-844. (10) Onishi, Y. et al. (1993) Biochim. Biophys. Acta 1175, 147-154. (11) Oppenheim, R. W. (1991) Annu. Rev. Neurosci. 14, 453-501. (12) Osheroff, N. (1989) Pharmacol. Ther. 41, 223-241. (13) Tomei, L. D. and Cope, F. O. (eds) Apoptosis: the Molecular Basis of Cell Death (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1991) (14) Tsutsui, K. et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 1116-1122. (15) Raff M. C. (1992) Nature 356, 397-400. (16) Roy, C. et al. (1992) Expl. Cell Res. 200, 416-424. (17) Wyllie, A. H. et al. (1980) Int. Rev. Cytol. 68, 251-305. (18) Yonish-Rouach, E. et al. (1991) Nature 352, 345-347.

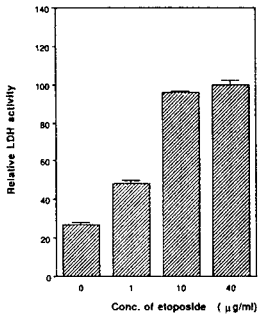


図１．ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ誘発ＰＣ１２細胞死の用量依存性

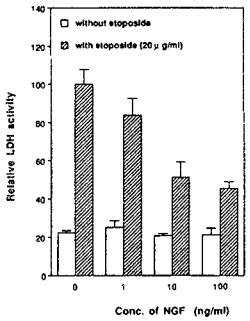


図３．ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ誘発ＰＣ１２細胞死に対するＮＧＦの効果

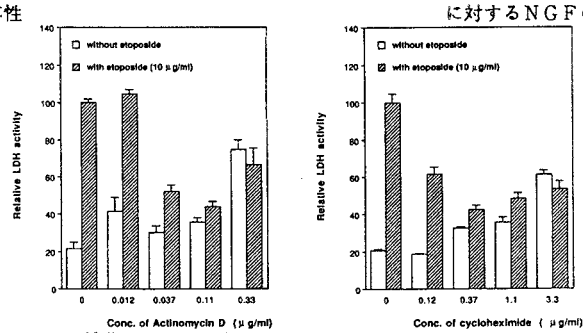


図２．ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ誘発ＰＣ１２細胞死に対するアクチノマイシンＤ、シクロヘキシミドの効果

78 小脳granule細胞死を抑える脱分極シグナルによるチロシンリン酸化

小池達郎，田中秀逸
（佐賀医大・化学）

〔要約〕

小脳granule細胞のin vitroの細胞死を阻止する脱分極効果を調べる為に、脱分極による細胞内Ca^{2+}濃度と生存との関係及び脱分極シグナルによるチロシンリン酸化とK^+濃度との関係を調べた。小脳granule細胞を種々の細胞外液のK^+で処理後、fura-2を用いて細胞内Ca^{2+}濃度を測定した結果及び種々の細胞外液のK^+下での細胞の生存との関係をあわせると、交感神経節細胞の場合と同様に細胞内Ca^{2+}濃度と生存との相関を得た。しかし、この場合50%の生存を与える細胞内Ca^{2+}は90nMと交感神経節細胞の場合(175nM)に比較して低く、神経細胞の種類によってセットポイントが異なる為と考えられる。細胞死へコミットする時間の測定から脱分極シグナルはシクロヘキシミド感受性部位より下流で作用することにより細胞死を阻止することが判った。この下流の標的を同定するために、抗ホスホチロシン抗体を用いて抗体ブロットを行うと、K^+濃度依存的にチロシンリン酸化が起こり、それはK^+濃度による細胞死阻止効果にほぼ対応していた。Herbimycinはこのリン酸化を用量依存的に阻害した。これらの事から細胞内Ca^{2+}濃度の上昇による神経細胞死の阻止はその下流の標的としてチロシンリン酸化の促進を含むことが示された。

神経栄養因子の欠如による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。末梢神経系における研究から,この細胞死は①積極的な過程からなり[5]，且つ②脱分極により阻止される[2]。中枢神経系におけるin vitroの細胞死のモデル系としては小脳granule細胞死があげられる。生後7-8日目の小脳から分離したgranule細胞は通常の培養条件下では DIV 5-6 で大量の細胞死が起こる[1,8]が、これは脱分極により阻止することができる[1,4]。この脱分極効果はLタイプCa^{2+}チャンネルからの細胞外Ca^{2+}の流入による為[1]であり、交感神経節細胞の場合[2]と同じである。更に、この細胞死はcycloheximide(0.1-1uM)又は，cordycepin(1-3uM)により阻止される事から、蛋白合成を必要とする[4]。小脳granule細胞は生後7日目では増殖・移動しており、その後postmitoticになりsynaptogenesisを行うと考えられ,この細胞死はその生存を維持する栄養因子が供給されない為に起こる過程をmimicしていると推定される。この細胞の神経栄養因子依存性は確定していないが、in vitroではBDNFが生存を促進するという報告がある[6]。高K^+効果による神経細胞の生存はCa^{2+}セットポイント説[2,3]によれば、幼若な神経細胞はその細胞内Ca^{2+}は低く、生存に神経栄養因子の存在を必要とするが、細胞内Ca^{2+}濃度が示適濃度に上昇した為神経栄養因子の助けなしに自律的に生存することになる。そこで、この実験の目的として、小脳granule細胞死を阻止する細胞内Ca^{2+}濃度と生存との関係を調べ、又、脱分極シグナルによるシグナル伝達機構としてチロシンリン酸化に注目してチロシンリン酸化とK^+濃度との関係を調べた。

［実験方法］

小脳granule細胞の培養：Balazらの方法[8]を修正した方法によった。生後7日目のラット小脳をジスパーゼ処理し,ポリリジンコートした24 wellディッシュ（細胞数、薬物効果用）又は60mmディッシュ（抗体沈降用）にまき、FUDR処理によりほぼ均一なgranule細胞を得た。培地は10%非働化牛胎児血清を含むMEM培地を使用した。種々のK^+濃度の調製は既報[2]の通りに行った。

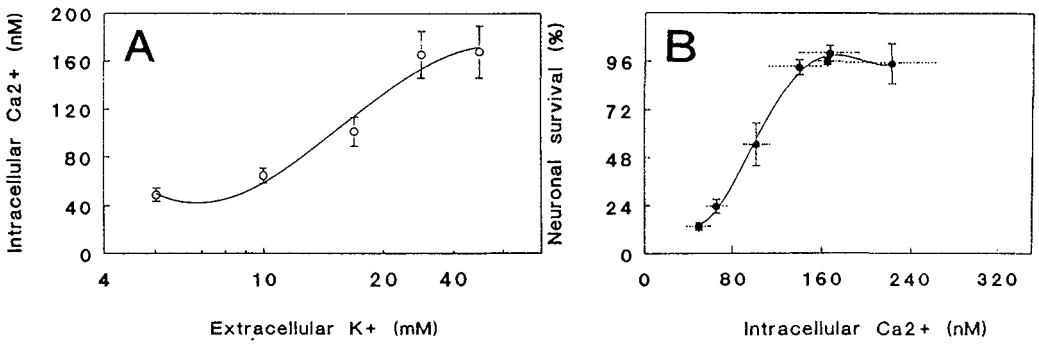


図1 (A)小脳granule細胞を種々の細胞外K^+濃度で処理した時の細胞内Ca^{2+}レベルと細胞外K^+濃度との関係（実験条件の詳細は文献(3)に記載）。(B)小脳granule細胞における細胞の生存と細胞内Ca^{2+}レベルとの相関

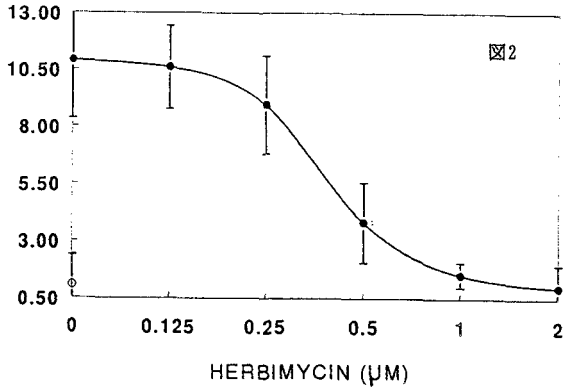


図2

図3

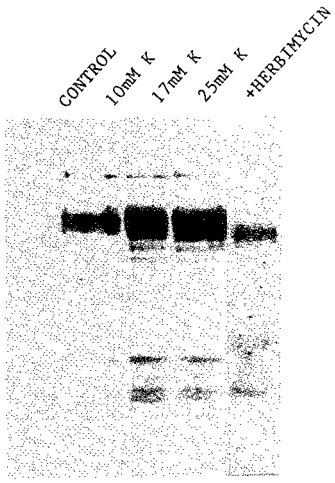


図2　高K⁺培地による小脳granule細胞の生存に与えるHerbimycinの阻害効果。小脳granule細胞を培養後、4日目に高K⁺培地(0 at 0)及び種々の濃度のHerbimycin (0.125-2uM) を加え、7日目に生細胞数を数えた。縦軸は細胞数 (10^4／mm^2) を表す。左下の測定値(0 at 0)は5mMK⁺の細胞数をあらわす。　mean+SD

図3　高K⁺培地によるチロシンリン酸化の促進とHerbimycinによる阻害。左側レーンは5mMK⁺(CONTROL)、次いで10mM、17mM、25mMそして右側レーンは25mMK⁺にherbimycin(0.5μM)処理をした時の抗チロシンリン酸抗体によるimmunoblottingの結果。

細胞死のアッセイ法[7]：トリパンブルー染色又は蛍光色素染色によって生細胞数を数えた。
細胞内Ca^{2+}濃度の測定[3]：小脳granule細胞をfura-2でラベルした後、細胞内Ca^{2+}濃度をアルガス100画像解析装置により測定した。他の条件は既報[3]の通りに行った。
抗体ブロット法：細胞を氷冷PBS(-)で1回洗浄後RIPA緩衝液で抽出、遠心した。Bradford法による蛋白定量後、一定量を10%SDS-PAGEで分離し、ゲルをPVDF膜にブロッティングした。膜を抗ホスホチロシン抗体 (1:1000 ; Zymed)で処理後、^{125}I-プロテインAで検出した。定量にはFujiBAS2000を用いた。
［結果及び考察］小脳granule細胞を種々の細胞外液のK⁺で処理後、fura-2を用いて細胞内Ca^{2+}濃度を測定した結果、basalな(5mMK⁺の時)細胞内Ca^{2+}濃度は40 nMと低いが、K⁺の上昇と共に上昇した。例えば25mM K⁺ではsustained level (詳細は文献(3)参照) は160nMとなった (図1A) 。この結果及び種々の細胞外液のK⁺下でのgranule細胞の生存との関係をあわせると図1Bが得られた。これは小脳granule細胞の細胞内Ca^{2+}と細胞生存との関係を表しており、交感神経節[3]と同様の相関を得た。小脳granule細胞の場合、50%の生存を与える細胞内Ca^{2+}は90nMと交感神経節細胞の場合(175nM)に比較して低く、神経細胞の種類によってセットポイントが異なる為と考えられる。脱分極シグナルがどういう過程で神経細胞死を抑えるのかを調べる為に、細胞死へコミットする時間を測定した (この定義及び測定は文献(7)に詳述) ところ、交感神経節細胞の場合もこのgranule細胞の場合も高K⁺処理による細胞内Ca^{2+}濃度の上昇はシクロヘキシミド感受性部位より下流で作用することにより細胞死を阻止することが判った。即ち、高K⁺効果は翻訳後修飾によって細胞死を阻止する (文献(7)参照) 。この下流の標的を同定するために、小脳granule細胞を種々の阻害剤の存在下で高K⁺処理したところ、Herbimycinで有効に阻害された (図2 : IC_{50}=0.3uM)。抗ホスホチロシン抗体を用いて抗体ブロットを行うと、granule細胞の場合、p120等いくつかのバンドのチロシンリン酸化が細胞外液のK⁺濃度依存的に起こった (図3) 。p120のバンドの定量からK⁺濃度によるチロシンリン酸化はK⁺濃度による細胞死阻止効果にほぼ対応していた。このリン酸化は細胞外Ca^{2+}に依存し、EGTA処理で消失した。更に、Herbimycin処理によりp120及びp60のバンドが激減又は消失した (図3) 。これらのバンドの同定を進めているが、p60はc-src又は類似、p120はその標的と考えられる。これらの事から細胞内Ca^{2+}濃度の上昇による神経細胞死の阻止はその下流の標的としてチロシンリン酸化の促進を含むことが示された。

［参考文献］
1. Gallo, V. et al., J. Neurosci. 7:2203-2213(1987)
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. Soc. Neurosci. Abstr. 17:442(1991)
5. Martin,D, et al.J. Cell Biol. 106:829-844(1988)
6. Segal, R.A.et al., Neuron 9:1041-1952(1992)
7. Tanaka, S. and Koike, T., Biochim. Biophys. Acta 1175:114-122(1992)
8. Thangnipton, T. et al., Dev. Brain Res. 10: 177-189(1984)

79 高酸素負荷による培養中枢ニューロン死の生化学的および形態学的性質について

榎戸 靖、久保 武一、市川 真澄*、畠中 寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成、*東京都神経科学総合研究所・解剖発生）

〔要約〕ラット海馬ニューロンを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。この死は、蛋白質やRNA合成阻害剤あるいは高K^+刺激により阻止されるなど、アポトーシスの特長を持つことを報告している[1]。今回、高酸素負荷による神経細胞死のより詳細な生化学的および形態学的性質について解析をおこなった。核内 DNA の断片化は高酸素負荷後、約 12 時間でみられ、cycloheximide の添加によって抑えられた。高 K^+ 刺激による生存維持効果は Nifedipine などの添加により阻止された。細胞死にともなう形態的特徴として、高酸素負荷10 時間後あたりから核が不規則な形態をとる様子が観察され、その後クロマチンの凝集や細胞膜および細胞内小器官の変性が観察された。一方、免疫系の細胞でみられるような典型的な核の濃縮はほとんど起こらなかった。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は細胞内自殺メカニズムを介して誘導されているが、核の変性に関しては免疫系の細胞とは異なるものであることを示していた。

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。酸素ストレスへの防御機構の解明は、ニューロン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治療を考える上でも特に重要な問題であると考えられる。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について、(1) NGF や bFGF などの神経栄養因子によって阻止される[3,4]、(2) ニューロン死の誘導には dc novo の蛋白質および RNA 合成を必要とする[5]ことを明らかにしてきた。本研究では、酸素によって誘導される中枢ニューロン死について、核内DNA の断片化や高 K^+ による生存維持効果への Ca^{2+} チャンネル拮抗薬の作用および電顕観察による形態変化について検討した。

【実験方法】

胎仔 20 日目 (E20) のラット海馬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 5 μM の Ara C を含む TIP/DF 培地にかえ、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 日間培養をおこなった。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。細胞死にともなう核内 DNA の断片化は、細胞を遠心して集めた後、RNase および Proteinase K 処理したものを phenol / chloroform 処理し、EtOH沈殿により抽出した DNAを 1.5% アガロースゲルで電気泳動した。さらに、細胞を paraformaldehyde と glutaraldehyde を用いて包埋固定し、電顕観察用の切片を作成した。

【結果と考察】

E20 海馬ニューロンを 50% 気相酸素で培養すると、培養 1 日目あたりからしだいに細胞が死んでいく様子が観察され、3 日後にはそのほとんどが死滅した。一方、培地中の K^+ 濃度を 40 mM に上げることにより、酸素負荷後 48 時間で培養開始時の約 70% のニューロンの生存が維持された。この時、1 μM Nifedipine あるいは Nicardipine を添加すると、高 K^+ による生存維持効果は抑制された(図 1)。さらに、細胞死にともなう核内 DNA の断片化を観察したところ、高酸素負荷を加えてから12 時間後には約 180 塩基対ごとの DNA 断片 (DNA ladder) が観察され、これらは 1 μM の cycloheximide を加えることで抑えられた。以上のことは、以前我々が報告した高酸素負荷によるニューロン死が de novo の蛋白質合成を必要とするという結果と合わせ、それらがapoptosis による細胞死に極めて類似の性質を持つことを示している。

次に、高酸素負荷によるニューロン死の形態学的性質について電顕観察による解析を行った(図2)。その結果、高酸素負荷10時間後あたりから核の変性がみられ、核内のクロマチンの凝集が観察された。その後、20〜24時間後にかけて細胞膜および細胞内小器官の変性が観察された。この時期の細胞の形態を比較したところ、核の濃縮を生じているものはあまり見られず、免疫系の細胞でみられる典型的なapoptosis の形態とは異なっていた。一方、神経系の細胞での最も典型的なアポトーシスといわれるNGF 除去後にみられる上頸神経節細胞の死でも免疫系の細胞とは異なる形態を取ることが報告されている[6]。このことは、神経系の細胞と免疫系の細胞では異なる経路を経て細胞死が誘導されている可能性を示唆している。この点も踏まえ、これまで我々が研究を進めてきた細胞死に関しては、中枢神経細胞死の形態的な特徴を知る上でもさらに解析をしていく必要がある。

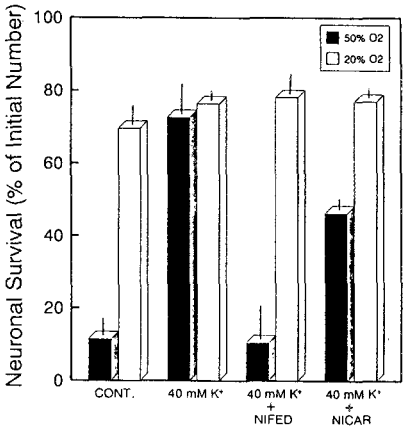


図 1. 高 K^+ による培養海馬ニューロンへの生存維持作用に対する Nifedipine および Nicardipine の効果
E20 ラット海馬ニューロンをそれぞれの条件で48 時間培養した後の、培養開始時のニューロン数に対する生存ニューロン数の割合。加えた Nifedipine (NIFED) および Nicardipine (NICAR) はそれぞれ 1 μM。

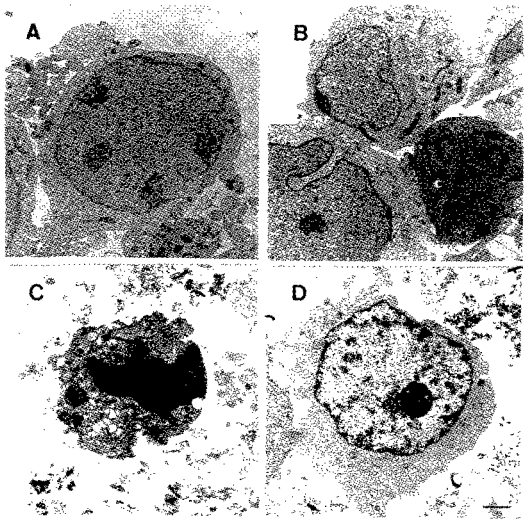


図 2. 50% 気相酸素下で培養したラット海馬ニューロンの形態変化。それぞれ 50% 気相酸素下で、A) 0 時間、B) 10 時間、C), D) 24 時間培養した後、paraform-aldehyde と glutaraldehyde を用いて包埋固定し、電顕観察を行なった。スケールは 1 μm。

【文献】

(1)榎戸 靖、茜谷行雄、畠中 寛、(1992) 神経化学 **31** 220-221. (2)Hatanaka, H. and Tsukui, H., (1986) *Dev. Brain Res.*, **30** 47-56. (3)Enokido, Y. and Hatanaka, H., (1990) *Brain Res.*, **536** 23-29. (4)Enokido, Y., Akaneya, Y., Niinobe, M., et al., (1992) *Brain Res.*, **599** 261-271. (5)Enokido, Y. and Hatanaka, H., submitted. (6)Martin, D.P., Schmidt, R.E., Distefano, P.S., et al., (1988) *J. Cell Biol.*, **106** 829-844.

80 遅発性神経細胞壊死の病態生理にApoptosisが関与 ～砂ネズミ一過性前脳虚血後の海馬でのDNA fragmentationの観察～

松本 昌泰[1,2]，岡本 昌也[1]，田口明彦[1]，大槻 俊輔[1]，北川 一夫[1]，
小川 智[1]，上田 周一[2]，御子柴克彦[3]，柳原 武彦[2]，鎌田 武信[1]
（大阪大学医学部第一内科[1]、神経内科[2]、東京大学医化研[3]）

〔要約〕

砂ネズミ一過性前脳虚血モデルにおいて、5分間の脳虚血負荷により海馬CA1領域の錐体細胞に遅発性神経細胞壊死が生じるが、この機序はまだ十分に解明されていない。早期の虚血病変を鋭敏に検出し得る 抗microtubule-associated protein 2(MAP2)抗体を用いた免疫組織化学によると、形態的には虚血66時間後から海馬CA1領域の神経細胞の脱落の開始が観察されたが、これに先行して虚血54時間後にapoptosisの特異的な生化学的指標であるDNA fragmentation(1)を検出し得た。脳虚血後の遅発性神経細胞壊死のメカニズムにDNA fragmentationを介したapoptosisが関わる可能性が示唆された。

【目的】砂ネズミ一過性前脳虚血モデルにおいて、5分間の脳虚血は海馬CA1領域の錐体細胞に選択的かつ遅発的に壊死を起こす(2)。この事象は遅発性神経細胞壊死としてよく知られているが、機序は十分に解明されていない近年この現象はapoptosisの機序を経ていることが示唆されているが明かな証拠は得られていない(4)。本研究では同モデルを用いてapoptosisの特異的な生化学的指標であるDNA fragmentation(1)の検出を試みた。同時に形態的に神経細胞壊死の経時的変化を観察するため、早期の虚血病変を鋭敏に検出し得る抗microtubule-associated protein 2 (MAP2)抗体を用いた免疫組織化学(4)を施行した。

【方法】成熟砂ネズミ48匹を対象とした。軽エテール麻酔下に頸部正中切開、両側総頸動脈を剥離、麻酔覚醒後クリップにて5分間血流遮断し虚血を作成した。虚血中は体温を37℃に維持した。再灌流後24，48，54，66，72，96時間後に断頭、脳を摘出した。(a)海馬、視床、線条体を摘出し、順にSDS，proteinase K，RNaseA，phenol処理し、DNAを精製回収した。 DNAを2%アガロースゲル電気泳動に供し、ethidium bromideで可視化した(各時間n=4)。(b)95%エタノール5%酢酸浸漬固定後、パラフィン包埋し、背側海馬を含む切片を作成、MAP2に対する免疫組織化学(4)に供した(各時間n=4)。

【結果】海馬では虚血後54時間後から96時間まで190塩基対の整数倍のoligonucleosomeバンド(DNA fragmentation)が鮮明に観察され、虚血後96時間ではほとんどが190塩基対の断片に切断された（図1A）。一方視床と線条体では同様のDNA fragmentationは検出されなかった(図1B,C)。組織学的には海馬CA1領域の錐体細胞は虚血後54時間後まではMAP2の免疫反応性を維持したが、66から72時間後にかけてMAP2反応性生存細胞数が著減し、萎縮した核を伴った壊死神経細胞群が観察された（図２）。しかし視床及び線条体では著明なMAP陰性の壊死神経細胞は観察されなかった。

【結論】以上、遅発性神経細胞壊死に連なると考えられるMAP2の免疫反応性の低下に先行して、虚血早期からのDNA fragmentationの存在が初めて明かとなり、遅発性神経細胞壊死のメカニズムにDNA fragmentationを介したapoptosisが深く関わる可能性が示された。

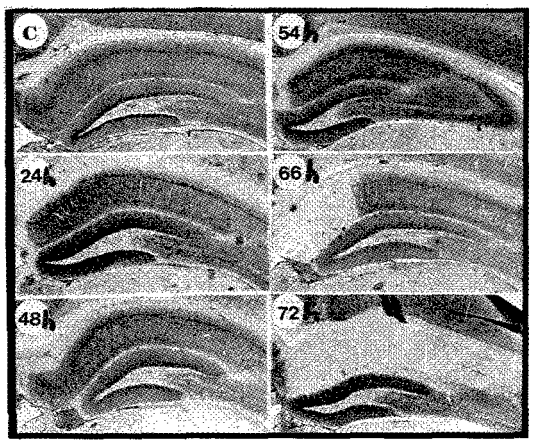
【文献】

(1) Kerr J.F.R., et al. Br. J. Cancer 26;1972: 239-257

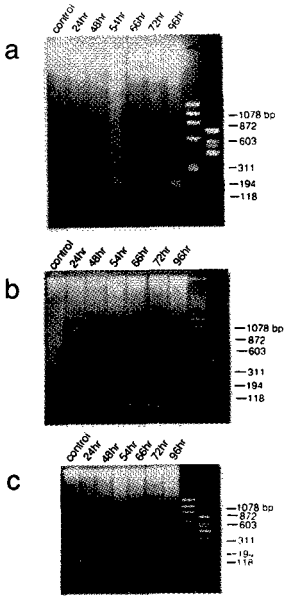
(2) Kirino T. Brain Res. 239;1982:57-69

(3) Kitagawa K., et al. Neuroscience 31;1989: 401-411

(4) Shigeno T., et al. J. Neurosci. 11;1991:2914 -2919



【図１】一過性前脳虚血後の海馬のMAP2免疫組織化学
虚血後66時間後より海馬CA1領域の錐体細胞のMAP2染色性が消失、形態学的に神経細胞死を認めた。



【図２】脳虚血後のchromosomal DNA電気泳動
海馬において虚血後54時間目から約180kbのDNA断片の階段状のﾊﾟﾀｰﾝが観察された(A)。(B)線条体、(C)視床ではDNA fragamentationは観察されなかった。

81 脳虚血によるスナネズミ脳内転写制御因子の変動

米田幸雄、荻田喜代一、三谷章*、片岡喜由*、
（摂南大・薬・薬理、*愛媛大・医・第一生理）

〔要約〕スナネズミ脳内特定部位における各種転写制御因子の分布を、各因子のDNAプローブ結合能を指標に検索した。Activator protein-1(AP1)は嗅球に最も活性が高く、以下海馬歯状回、前脳、尾状核および小脳皮質の順に低くなったが、海馬CA1野およびCA3野、視床、視床下部あるいは橋などにはAP1結合能は殆ど検出されなかった。一方、cyclic AMP responsive element(CRE) binding protein(CREB)も嗅球に最も活性が高かったが、AP1とは異なり小脳皮質がその次に活性が高く、以下歯状回、前脳、尾状核、CA3野、視床下部、CA1野、視床および橋の順に低くなった。これに対して、Myc結合は小脳に比較的活性が高いが、その他の脳内部位には殆ど検出されないことが明かとなった。両側総頸動脈の5分間結紮による一過性脳虚血を負荷すると、血流再開通後4時間目にはCA1野においてAP1結合活性の約10倍の上昇が誘発されることが判明した。次いで、CA3野にも約8倍のAP1結合能上昇が観察されたのに対して、歯状回のAP1結合能上昇はCA1野とCA3野に比べて約5倍と軽度であった。また、一過性脳虚血は歯状回、CA1野およびCA3野にほぼ同等度のCREB結合能上昇を誘発したが、Myc結合能はいずれの脳内部位においても虚血に伴う変化を受けなかった。以上の結果より、ロイシンジッパー構造を持つ3種類の転写制御因子群の中で、AP1が比較的選択的に脳虚血負荷に伴う部位特異的変化を受ける可能性が示唆される。

細胞核内転写制御因子は、二本鎖DNA上のエンハンサー領域やプロモーター領域に見出される特定の塩基配列を認識して高親和性に結合し、標的遺伝子の転写活性を調節する蛋白質である。その結果、細胞には長期的あるいは永続的な機能変動が招来されることになる。代表的なグループとして、ヘリックス・ループ・ヘリックスや、亜鉛フィンガー、およびロイシンジッパー等の特殊な蛋白構造を持つものがよく知られている。中でも、ロイシンジッパー構造を持つAP1は、c-Fosファミリー蛋白質やc-Junファミリー蛋白質のホモダイマーあるいはヘテロダイマーであるが、エンハンサー領域の12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA) responsive element(TRE)に高親和性に結合して、その標的遺伝子の転写を促進する活性を有する。同様に、CREBもロイシンジッパー構造を持つ転写制御因子であるが、cyclic AMPシグナルによるプロテインキナーゼAの細胞核内移行の結果、このCREB結合能の著明な上昇が誘発されることが示されている(2)。さらに、ロイシンジッパー型転写制御因子であるMycは細胞分化や細胞増殖に関与するだけでなく、細胞のプログラム死である「アポトーシス」を誘発する作用を持つことも最近明らかにされている(1)。本研究では、一過性脳虚血負荷後に観察される特徴的な「ネクローシス」の出現メカニズムを解明する一端として、虚血負荷スナネズミ脳内のこれら3種類の転写制御因子のDNA結合能を測定した。

〔実験方法〕

脳虚血負荷：一過性脳虚血負荷(4)後4時間目に脳内各部位を分画採取し(3)、直ちに各部位を液体窒素により凍結させた。核抽出液の調製：凍結脳内各部位から、Nonidet P-40を用いた方法(5)に準じて核抽出液を調製した。得られた核抽出液は使用時まで-80℃に凍結保存した。DNAプローブ：放射性TREプローブは、2本鎖オリゴヌクレオチド(5'-GATCCGGCTGACTCATCACTAG-3')を、dATP[α-^{32}P](111 TBq/mmol, NEN/DuPont社)とDNAポリメラーゼIのKlenow fragmentを用いたエンドラベリング法により調製した。CREプローブおよびMycプローブは、それぞれのコンセンサス配列以外のDNA配列がCREプローブの場合と同一のものを作成した。ゲル移動度シフトアッセイ：核抽出液(3-5 μg蛋白質)、1 μg poly(dI-dC)、放射性プローブ(20 fmol、1-12×10^4 cpm)、10 mM $MgCl_2$、100 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、10%グリセロールおよび各種蛋白質分解酵素阻害剤を含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)の全量20 μlを室温で30分間反応させたのち、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電気泳動法により分離した。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(6)。

〔実験結果〕

本実験条件下では、測定した3種類の転写制御因子はいずれも、ゲル内移動度の異なる2種類のバンドとして検出された。移動度の遅いAP1結合は嗅球に最も高く、以下海馬歯状回、前脳、尾状核および小脳皮質の順に低くなったが、海馬CA1野やCA3野、視床、視床下部および橋などにはほとんど検出されなかった。同様に、移動度の遅いCREB結合も嗅球

に最も高い活性が観察されたが、AP1の場合とは異なり小脳皮質がその次に活性が高く、以下歯状回、前脳、尾状核、CA3野、視床下部、CA1野、視床および橋の順であった。また、遅い移動度のMyc結合は小脳皮質に比較的高い活性が見出されたが、その他の脳内部位にはほとんど著明なMyc結合は認められなかった。これに対して、移動度の速い結合はいずれの転写制御因子の場合にも、ほぼ均一な脳内分布が見られた。一過性脳虚血負荷後4時間目では、移動度の遅いAP1結合が海馬内特定部位において増強された(図1,2,3)。この増強の程度はCA1野が最も高く、次いでCA3野にも著しい増強が見られたが、歯状回の増強は前2部位に比べて軽度であった(表1)。これに対して、移動度の遅いCREB結合はいずれの海馬内部位においてもほぼ同等度に増強されたが、Myc結合の場合は虚血に伴う著明な変動は認められなかった。

図1. 脳虚血負荷に伴うCA1野のAP1結合の変化

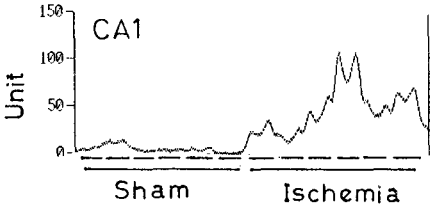


図2. 脳虚血負荷に伴うCA3野のAP1結合の変化

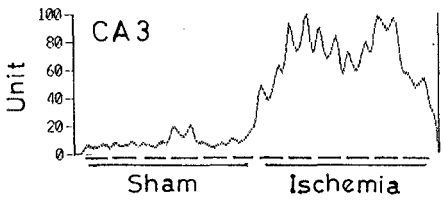


図3. 脳虚血負荷に伴う歯状回のAP1結合の変化

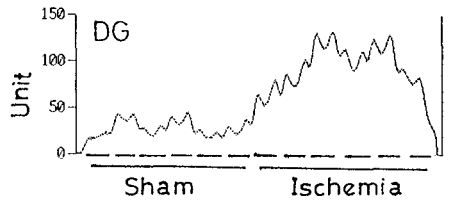


表1. 脳虚血負荷に伴うAP1結合の変化

Region	Unit Sham	Ischemia
CA1	93±10	928±249 **
CA3	229±48	1790±236 **
Dentate	482±95	2285±276 **

**P<0.01, significantly different from the value obtained in control animals.

〔考察〕

本研究により、測定した3種類のロイシンジッパー型転写制御因子の中では、AP1が最も鋭敏に脳虚血の影響を受けることが明らかとなった。さらに、虚血抵抗性を示す歯状回が虚血脆弱性の高いCA1野よりも、AP1結合の増強程度が低い事実は、AP1により転写調節される遺伝子群の中に神経細胞を破壊する能力を持つ蛋白質をコードするものが存在する可能性を示唆するものである。しかしながら、虚血耐性現象の出現に関与するストレス蛋白質群の誘導については、逆の誘導パターンが報告されていることを考え合わせると本研究成績は興味深い。また、Myc結合が脳虚血に伴う著明な変動を受けなかったことは、虚血後の遅発性神経細胞死における「アポトーシス」の関与の可能性を支持する結果とは考えにくいものと推察される。

〔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研究助成金(93-2-810)の援助の下に行われた。

〔文献〕

1. Bissonnette, R.P., Echeverri, F., Mahoboubi, A. and Green, D.R. (1992) Nature 359, 552-556.
2. Karin, M. (1992) FASEB J. 6, 2581-2590.
3. Kataoka, K., Mitani, A., Andou, Y., Enomoto, R., Ogita, K. and Yoneda, Y. (1993) Neurochem. Int. 22, 37-43.
4. Mitani, A., Andou, Y., Masuda, S. and Kataoka, K. (1991) Neurosci. Lett. 131, 171-174.
5. Schreiber, E., Mathias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Nucleic Acid Res. 17, 6419.
6. Yoneda, Y., Ogita, K., Kabuto, H. and Mori, A. (1993) Neurosci. Lett. in press.

82 Pertussis toxin処理による、PC12細胞からのドパミン放出過程に於けるCa^{2+}感受性の亢進

小泉 修一、井上 和秀
〈国立衛生試験所・薬理〉

〔要約〕 細胞外Ca^{2+}を除去した条件下（100 nM Ca^{2+}、EGTA 1 mMを含む）で、bradykinin（BK）刺激により惹起されるラットpheochromocytoma PC12細胞からのドパミン（DA）放出と、細胞内Ca^{2+}濃度（[Ca^{2+}]$_{in}$）の変動を観察し、それらに対するpertussis toxin(PTX)処理の影響を検討した。BK刺激（1 nM～1 μM）によりPC12細胞からのDA放出及び[Ca^{2+}]$_{in}$の一過性の上昇が濃度依存的に観察された。これらの応答はBK刺激により産生されたIP$_3$による細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からのCa^{2+}遊離により惹起されたものと考えられる。PTX処理を施すと、BK刺激による[Ca^{2+}]$_{in}$変動は通常のPC12細胞でのそれと全く変化が認められないにもかかわらず、DAの放出量が有意に増大した。これはPTX処理により、DA放出におけるCa^{2+}感受性が亢進したものと推測される。次にBK受容体拮抗薬の影響を観察した。B2受容体拮抗薬処理により、BKによるDA放出及び[Ca^{2+}]$_{in}$は抑制された。しかしB1受容体拮抗薬は両者に全く影響を与えなかった。ところが、B1受容体拮抗薬は、PTX処理により惹起されたDA放出の亢進を、ほぼコントロールレベルにまで抑制した。以上の結果より①BK刺激によるPC12細胞からのDA放出及び[Ca^{2+}]$_{in}$の上昇は通常B2受容体を介して惹起され、B1受容体は関与していない、②PTX処理により惹起されるDA放出の増大は、B1受容体を介する経路で引き起こされる、③PTX処理により惹起されるDA放出の増大は[Ca^{2+}]$_{in}$のさらなる増大を伴わないことが明らかとなった。以上の結果は、PTX処理によりDA放出過程に於けるCa^{2+}感受性が増大すること、それはB1受容体を介するpathwayで引き起こされることを示唆する結果である。

〔目的〕 学習・記憶のモデルとして頻用されている長期増強（long-term potentiation; LTP）は高頻度刺激などの後にシナプスの伝達効率が増大する現象であるが、この現象がプレシナプスの神経伝達物質放出亢進により引き起こされている可能性が報告されている（1-3）。Malgaroli & Tsien(1992)はLTP成立後の神経伝達物質放出量の亢進は、[Ca^{2+}]$_{in}$上昇ではなく、神経伝達物質放出過程におけるCa^{2+}感受性が増大した結果であることを示している。この様に神経伝達物放出過程におけるCa^{2+}感受性の増大を示す報告がなされている。

Pertussis toxin(PTX)処理により様々な細胞で神経伝達物質およびホルモンの放出が増大することが知られている（10-11）。そこでまず本実験では、PC12細胞を用いてBK刺激により惹起されるDA放出量を観察し、PTX処理による影響を調べた。さらに、[Ca^{2+}]$_{in}$変動をも測定し、DA放出量と[Ca^{2+}]$_{in}$の関係を詳細に検討することにより、PTX処理がDA放出過程におけるCa^{2+}感受性に与える影響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, 9）及び[Ca^{2+}]$_{in}$測定法（8, 9）は既報に従った。B1 antagonistとしてDes-Arg^9-[Leu^8]-bradykinin（ペプチド研）、B2 antagonistとしてD-Arg-[Hyp^{3,8}, D-Phe^7]-bradykinin（ペプチド研）を用いた。PTXは、Dr. J.G.Kenimer（FDA, USA)から提供して頂いた。PTX処理も既報（7）に従った。

〔結果〕 Fig.1は、外液Ca^{2+}非存在下において、BK刺激（1 nM～1μM）により惹起されたPC12細胞からのDA放出の濃度依存曲線を示している（○; control、●; PTX処理）。基礎遊離量は通常のPC12細胞及びPTX処理を施した細胞の間で有意な差は認められなかった。BK刺激により惹起された最大遊離量は2.20±0.35（300 nM; control）及び3.25±0.29（300 nM; PTX処理、$P<0.05$ vs control）であった。PTX処理により、BKにより惹起されるDA放出量は有意に増大した。Fig.2は、

BKにより惹起された$[Ca^{2+}]_{in}$変動の最大値の濃度依存曲線を示している（○；control、●；PTX処理）。BKにより惹起される$[Ca^{2+}]_{in}$の最大値は478.2±58.4（control）及び429.1±38.9（PTX処理）であった。PTX処理によりBKにより惹起される、$[Ca^{2+}]_{in}$上昇は全く影響を受けなかった。

すなわちPTX処理を施したPC12細胞では、BKにより惹起されるDA放出の、$[Ca^{2+}]_{in}$非依存的な亢進が認められた。またBKによる応答は通常、B2受容体を介しており、B1受容体拮抗薬はこれらの応答に全く影響を与えなかった。しかしB1受容体拮抗薬は、PTXにより惹起されたBKによるDA放出の亢進を$[Ca^{2+}]_{in}$に影響を与えること無しに、通常のDA放出レベルにまで抑制した。

［考察］ PTX処理による伝達物質放出増大は、G蛋白によるCa channel抑制が消失しCa influxが増大することに帰因するという報告もなされている。しかし本実験結果は、PTX処理を施したPC-12細胞において、BKが$[Ca^{2+}]_{in}$の変動に影響を与えることなしにDA放出を促進させたことを示すものである。ジギトニン処理を施したクロム親和細胞でもPTX処理によりCa^{2+}依存性のカテコーラミン放出の亢進が認められている（11)。さらに本実験結果は、通常BK応答に関与していないB1受容体を介する経路が、PTX処理によるDA放出亢進過程に不可欠であることを示唆しており、その生理的な意味を考える上で非常に興味深い。

［文献］ [1]Bekkers J.M. & Stevens C.F. Nature 346, 24-729, 1992. [2]Malinow R. & Tsien R.W. Nature 346, 177-180, 1990. [3]Larkman A. et al., Nature 360, 70-73, 1992. [4]Malgaroli A. & Tsien R.W. Nature 357, 134-139, 1992. [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]O-Imaizumi M. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 259, 484-489, 1992. [10]Knight D.E. & Baker P.F. FEBS Lett. 189, 345-349, 1985. [11]O-Imaizumi et al., J. Neurochem. 58, 2275-2283, 1992.

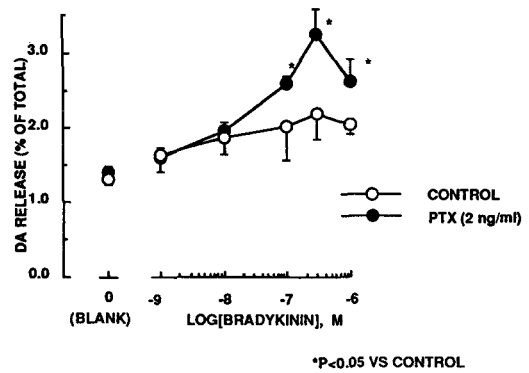


Fig. 1
Concentration-dependent curves of BK-evoked dopamine release from PC12 cells under Ca^{2+}-free condition.
(○; control, ●; PTX-treated PC12 cells)
*P<0.05 vs control

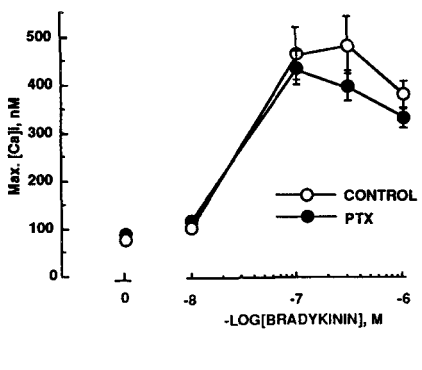


Fig. 2
The concentration-dependent curves of BK-evoked the maximal $[Ca^{2+}]_{in}$ increase in PC12 cells.
(○; control, ●; PTX-treated PC12 cells)

83 ジギトニンで透過性にした副腎クロマフィン細胞からの開口分泌におけるカルモデュリンの関与

松田 守弘、岡部 登志男、杉本 央
(大阪大学微生物病研究所・抗酸菌生理)

〔要約〕 開口分泌におけるカルモデュリン(CaM)の重要な役割は、CaMにたいする合成拮抗阻害剤や抗CaM抗体の効果から間接的に推定されている。実際、カルモデュリンの合成拮抗阻害剤と考えられているW-7およびCa^{2+}-CaM依存性蛋白キナーゼであるミオシン軽鎖キナーゼの合成阻害剤ML-9は、ジギトニンで透過性にした副腎クロマフィン細胞からの[^{3}H]ノルエピネフリン(NE)の遊離を阻害した。このことはCaMがミオシン軽鎖キナーゼを介してNEの「開口分泌」に関与していることを示唆する。さらに透過性クロマフィン細胞内に精製CaMを直接導入して、その効果を調べたところCaMはCa^{2+}依存性のNEの遊離を用量依存的に増加させた。一方、カルデスモン、アクチンやウシ血清アルブミンを細胞内導入してもこのような効果は全くなかった。したがってCaMのNE遊離に対する効果は特異的であると考えられる。またCaMによって増加を示す透過性クロマフィン細胞からのNE遊離は、開口分泌を特異的に阻害することが知られている破傷風毒素によって殆ど完全に阻害された。以上の結果、CaMの開口分泌における関与を直接示すことができた。

[目的]

開口分泌がCa^{2+}の細胞内濃度の上昇によって惹き起こされることは知られているが、それに続いておこる分泌顆粒内容物の細胞外放出に至る一連の開口分泌過程の分子機構は明らかではない。そこでこの過程に関与することが示唆されている細胞内物質のうち、細胞にひろく分布するCa^{2+}受容蛋白質の一つであるカルモデュリン(CaM)の役割について調べた。精製CaMをジギトニン処理によって透過性した副腎クロマフィン細胞内に直接導入するとクロマフィン細胞からのノルエピネフリン(NE)の遊離が増加すること、またCaMによって増加したNEの遊離が破傷風毒素によって阻害されることから開口分泌におけるCaMの関与を直接示すことができたので報告する。

[方法]

クロマフィン細胞はウシ副腎からKilpatrickらの方法に従いコラゲナーゼ処理によって分離し、10% FCSを含むDMEMで培養した。細胞数well当たり1×10^6個(4×10^5 cells/cm^{2}の密度)で3~7日間培養し、あらかじめ[^{3}H] NEで37℃、3時間ラベルした細胞をLocke液中で 種々の濃度の阻害薬剤により37℃、10分間処理した後、Ca^{2+}-free Locke液で洗浄し、2 mM MgATP を含む139 mM K-glutamate buffer(KG液)中で37℃、10分間 20 μMジギトニン処理した。CaMその他の被検蛋白質、前処理と同濃度の阻害薬剤、または破傷風毒素はジギトニンと同時に添加した。次に、0または2.5×10^{-6} M Ca^{2+}を含むKG液に10分間インキュベートしてNEの放出実験を行った。CaMその他の被検蛋白質、阻害薬剤はNE放出実験中も相当濃度を添加した。上清および1% Triton X-100処理した細胞残渣をACS-IIに溶かし液体シンチレーションカウンターによって放射活性を測定し、NE放出量を[上清]/[上清+残渣]×100(%)によって表示した。CaMはウシ大脳皮質よりTCA処理、DE-52を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。破傷風毒素(TNTX)は、Clostridium tetani Harvard A47微研亜株の培養濾液を出発材料とし、硫安分画、超遠沈分画、UltrogelAcA34によるゲル濾過、G3000SWカラムによるHPLCにより精製した。

[結果および考察]

1. ジギトニン処理細胞からの[^{3}H]NE放出のカルモデュリン作用の阻害薬剤による抑制

CaMの阻害剤と考えられているW-7は、ジギトニン処理クロマフィン細胞からのCa^{2+}-依存性[^{3}H]NE放出を濃度依存性に抑制し、W-7 100 μMで50%、W-7 200 μMで83%の抑制をした(Fig.1)。さらにCa^{2+}-CaM依存性蛋白キナーゼであるミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤と考えられているML-9も、[^{3}H]NE放出を濃度依存性

に抑制し、ML-9 100 μMではCa^{2+}依存性NE放出を40%抑制した。以上の結果は、CaMがミオシン軽鎖キナーゼを介して開口分泌に関与していることを示唆している。しかしながら、これらの合成された阻害剤は疎水性に富み形質膜にも容易に結合することから非特異的効果が関与している可能性も考えられた。実際W-7 200 μM(Fig.1)やML-9 200 μMでは、Ca^{2+}の非存在下でも[^{3}H]NEの遊離が増加した。したがってこれらの結果から、W-7やML-9による見かけ上の[^{3}H]遊離抑制が、実際にCaMの作用の特異的抑制やCaM依存性の蛋白リン酸化の抑制によるのか明確に結論づけることは難しいと考えられた。

2. CaMの細胞内直接導入によるジギトニン処理クロマフィン細胞からのNE放出の増加

CaMをジギトニン処理により透過性にした細胞に直接添加すると濃度依存性にCa^{2+}-依存性NEの放出が増加し、5 μMで最大効果の半分、約30 μMで最大効果(50~60%)を示した(Fig.2)。この濃度はCaMの細胞内生理的濃度に相当する。CaMを細胞のジギトニン処理およびそれに続くCa^{2+}刺激時にも加えておいた方がNE放出増加が顕著になった。このことはNEの放出に対してCaMの一定濃度以上が持続的に必要であることを示している。CaM(0.64 mg/ml, 40 μM)と異なりウシ血清アルブミン(0.64 mg/ml)アクチン(0.46 mg/ml)やカルデスモン(0.5 mg/ml)はNE放出を増加しなかった。したがってCa^{2+}-依存性放出に対するCaMの増強効果は特異的であると考えられる。CaMによるNEの放出増加は遊離Ca^{2+}濃度約10^{-6}M以上でおこった。このことはCaMが生理的条件下で作用していることを支持している。CaM(40 μM)の存在下でのNE放出は、調べたすべてのMg^{2+}濃度(0~10 mM)でCaM非存在下に比べて大きく、3 mM $MgCl_2$でプラトーに達した。W-7 100 μMおよびML-9 100 μMによるNE放出の抑制はCaMを加えることによって相当回復させることができた。W-7 100 μM存在下で、Ca^{2+}依存性NE放出は40 μM CaMを添加することにより2倍になった(Fig.2)。 CaM(40 μM)を加えると100 μM ML-9によるNEの放出抑制も50%回復した。

3. CaMによって増加するNEの放出に対する破傷風毒素の効果

破傷風毒素はジギトニン処理細胞からの開口分泌を阻害することが知られている。そこでCaMによって増加されるNEの放出が開口分泌の増加によるもので、クロマフィン顆粒からの不明の機構による漏出によるのではないことを明らかにするために破傷風毒素を開口分泌の特異的な阻害物質として用いた。破傷風毒素はCaMのよって増加されるCa^{2+}-依存性のNE放出を殆ど完全に阻害した(Fig.3)。

これまでCaMの阻害薬剤や抗CaM抗体を用いた研究から開口分泌におけるCaM依存性経路が間接的に示唆されていた。私たちの今回の実験結果は開口分泌におけるCaMの関与を直接示すものであり、CaMが開口分泌において重要な役割を果たしていることを示している。現在、CaMが分泌過程において分泌顆粒の転移や、分泌顆粒と形質膜との融合などのどの段階で作用しているのかを明らかにする研究を進めている。

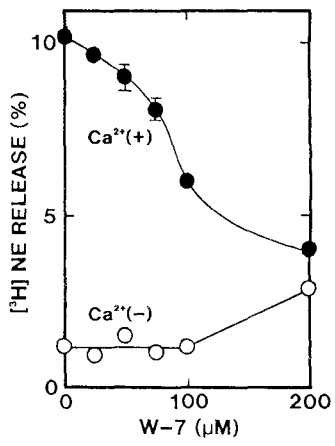


Fig.1

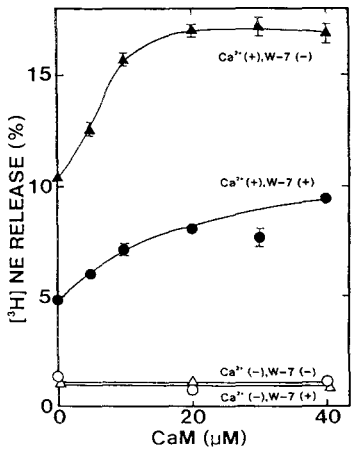


Fig.2 CaM: Calmodulin

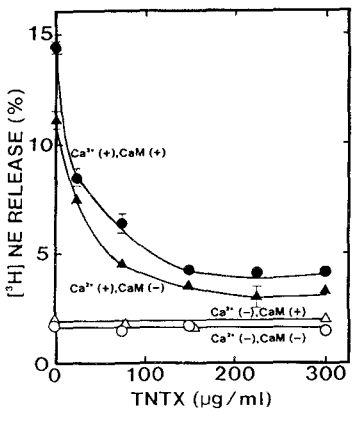


Fig.3 TNTX: Tetanus Toxin

84　シンタキシンのアイソフォームの性質

根本康夫、伊藤朋子、笠井陽子、西木禎一*、
小崎俊司*、高橋正身
（三菱化成生命研、大阪府大農学部*）

〔要約〕

シンタキシンのアイソフォームの発現と性質を、特異性の異なる抗体群を用いて検討した。尿素存在下のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離したアイソフォームのＮ末端アミノ酸配列の分析とモノクローナル抗体との反応性の違いから、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で移動度の大きい分子種がシンタキシンA、小さい分子種がBである結論した。イムノブロット法で中枢神経系でのアイソフォームの発現を比較した結果、シンタキシンBは中枢神経系ほぼ全域に渡って発現しているのに対し、Aの発現は吻側で高く尾側で低い勾配をなしていた。シンタキシンA，Bに対して異なる特異性を持つ抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、ラット脳の海馬でA、Bが異なる分布をとっていることが明かとなった。AとBのどちらにも反応性を持つモノクローナル抗体と、Aに特異的なモノクローナル抗体でωコノトキシン受容体の免疫沈降を行うと、最大免疫沈降量に 4倍以上違いが見られた。以上の結果はシンタキシンの二種のアイソフォームは神経系で異なって分布しており,なんらかの機能分担をしている可能性を示唆している。

［序文］

シンタキシン（ＨＰＣ－１，シナプトカナリン）[1-4]は神経および内分泌細胞に特異的に発現している分子量約３５ｋＤａの膜タンパク質である。シンタキシンはシナプス部位に特に多く発現しており、脳での神経伝達物質の遊離を制御しているＮ型Ｃａチャンネル（ωコノトキシン受容体）やシナプス小胞蛋白であるシナプトタグミンと結合する性質を持っている。小胞体やゴルジでの膜輸送にはＮＳＦやＳＮＡＰと呼ばれるタンパク質が関与しているが、最近これらのタンパク質の脳での受容体の一つがシンタキシンであることが示された[5]。この様な結果からシンタキシンがシナプス前部ではＣａに依存した神経伝達物質の遊離機構に関わっている可能性が考えられている。またシンタキシンは上皮細胞の形態形成の制御に関わっているタンパク質のエピモルフィンと、６３％同一なアミノ酸配列を持っていることも明かとなっている[6]。ラット脳では異なる遺伝子によってコードされる二種類のシンタキシンのアイソフォームが発現している[1-4]。今回シンタキシンの構造と機能の関連を調べる目的で特異性の異なる抗体群を用い、アイソフォームの性質や脳内発現の違いを比較検討した。

［方法］

モノクローナル抗体６Ｈ１，６Ｄ２、１０Ｈ５は既に報告した方法で[2]、ＢＲ１３は部分精製したシナプトタグミン分画で免疫したマウスを用いてそれぞれ調製した。ポリクローナル抗体は１０Ｈ５抗体カラムとＳＤＳ－ＰＡＧＥを併用して精製したシンタキシンをウサギに免疫し、得られた抗血清からＩｇＧをアフィニティー精製して得た。Ｎ末端アミノ酸配列は尿素存在下でＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った後シリコナイズしたグラスフィルター上にブロットし、気相シークエンサーで決定した。シンタキシンAのｃＤＮＡは既に報告した方法で[2]、Bのｃ ＤＮＡはラット脳ｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲ法で単離した。ＣＯＳ細胞でのシンタキシン遺伝子の発現は真核細胞での発現プラスミドを構築しＤＥＡＥデキストラン法を用いて一過性に発現させた。免疫組織化学は４％パラフォルムアルデヒドで固定したラット脳の凍結切片を用い間接蛍光抗体法で行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥでのシンタキシンA、Bの分離はMoritaらの方法[3]に従って行った。

［結果および考察］

既に報告されているように5M尿素存在下でSDS－PAGEを行うとシンタキシンは2つのバンドに分離される[3]。ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体6D2、10H5はそのどちらのバンドにも結合するのに対し6H1は移動度の小さいバンドのみを選択的に認識した（図1）。一方モノクローナル抗体BR13は移動度の大きいバンドをより強く認識した。分離された2本のバンドがシンタキシンのどのアイソフォームに相当するかについては相反する報告がなされていたため[3,5]それぞれのN末端のアミノ酸の部分配列を調べた結果、移動度の大きなバンドがシンタキシンA、小さいバンドがBの配列とそれぞれ一致していた。シンタキシンA及びBの遺伝子をCOS細胞に一過的に発現させ、6H1抗体で免疫染色するとシンタキシンBを発現させた細胞のみが染色されることからもこの結果は確認された。イムノブロット法でシンタキシンAおよびBの発現の脳内部域差を比較したところ、Bは中枢神経系ほぼ全体に渡って発現しているのに対しAの発現は吻側で高く尾側で低い勾配をなしていた。A及びBの脳内分布をさらに詳しく調べるためBに特異的な6H1とAにより強い反応性を持つBR13を用いラット脳の海馬の免疫組織化学を行ったところCA3の苔状繊維の終末部や歯状回でBがより強く発現していた（図2）。シンタキシンはN型Caチャンネル（ωコノトキシン受容体）と結合するが、6H1抗体と10H5抗体で免疫沈降を行うと6H1による最大沈降量は10H5の約4分の1であった。以上の結果はシンタキシンの2種のアイソフォームは神経系で異なって分布しており,なんらかの機能分担をしている可能性を示唆している。

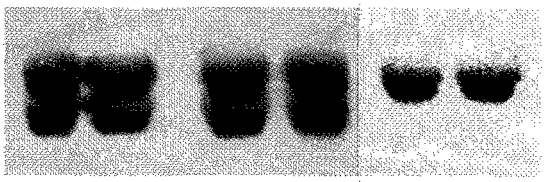


図1．ラット脳のP2分画のタンパク質を5M尿素入りのSDS－PAGEで分離した後、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体10H5および6H1でイムノブロットした。6H1は移動度の小さいシンタキシンBのみと特異的に反応する。

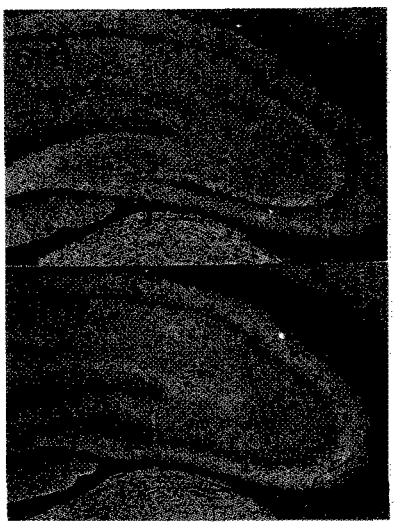


図2．特異性の異なる抗シンタキシン抗体によるラット脳海馬の蛍光抗体染色。シンタキシンBに特異的な6H1抗体によってはCA3領域の苔状繊維の神経終末部が強く染色されているが、シンタキシンAにより特異性の強いBR13では異なった染色パターンを示している。

［文献］

(1)Inoue, Obata & Akagawa (1992) J. Biol. Chem. 267: 10613-10619.

(2)Yoshida, Oho, Omori, Kuwahara, Ito & Takahashi (1992) J. Biol. Chem. 267: 24925-24928.

(3)Morita, Mori, Sakimura, Mishina, Sekine, Tugita, Odani, Horikawa, Saisu & Abe (1992) Biomed. Res. 13: 357-364.

(4)Bennett, Calakos & Sheller (1992) Science 257: 255-259.

(5)Sollner, Whiteheart, Brunner, Erdjument-Bromage, Geromanos, Tempst & Rothman (1993) Nature 362: 318-324.

(6)Hirai, Takebe, Takashina, Kobayashi & Takeichi (1992) Cell 69: 471-481.

85 神経系特異的カルモジュリン結合蛋白質 NAP-22 のシナプス前部への局在

前川昌平[1,2]、中村俊[2]
([1]東京大・理・生物化学、[2]国立精神・神経センター神経研診断部)

〔要約〕 神経成長円錐は様々な情報を神経突起の伸長・退縮やシナプス形成へと変換する興味深い部位である。この部位の蛋白質を解析する過程でその不溶性画分に未知の酸性蛋白質を同定し、続いてラット全脳よりこの蛋白質を単離・精製した。その物理化学的性質は細胞内のC-キナーゼの基質である MARCKS(p80, p87) や GAP-43(neuromodulin) とよく似ていたが cDNA クローニングの結果よりこの蛋白質が未登録のものであることがわかった。そこでこの蛋白質をその神経系での発現、酸性等電点、及び推定分子量 22 kDa より NAP-22 と命名した。脳組織の細胞分画の結果、Triton X-100 によって NAP-22 の一部は可溶化されるが発生に伴いその割合は減少すること、比較的低比重の膜画分に局在すること等が明らかになった。免疫組織化学的解析の結果はこの蛋白質がシナプス前部、特にシナプス小胞やシナプス前膜に存在することを示した。

「目的」 神経成長円錐は神経細胞ネットワークの形成及びその改変に重要な役割を果たすと考えられる。これらの過程に関与する重要な因子を明らかにする目的でまずこの部位の構成分子を解析していくことを行ってきた(1)。今回は以前にその存在に言及した見かけの分子量 50 kDa の蛋白質(1)について精製と構造解析を行いあわせて細胞内局在を明かにすることを試みた。

「方法」 成長円錐の単離は Pfenninger らの方法に従った(1,2)。NAP-22 はラット新生児全脳の低イオン濃度、高イオン濃度、及びTriton 抽出の残査をアルカリ条件で可溶化後種々のカラムを用い精製した。精製蛋白質のトリプシン断片のアミノ酸配列より推定したオリゴヌクレオチドをプローブとし、ラット新生児脳のライブラリーを用いて cDNA クローニングを行った。モノクローン抗体は部分精製標品を抗原としマウスより作成した。シナプス小胞はラット前脳より Huttner らの方法に従い調製した(3)。免疫組織化学はラット脳をアルデヒド固定後、凍結切片を作成し ABC 法により行った。

「結果と考察」 NAP-22 の疎水性カラムでの挙動及び精製パターンを図1に示す。NAP-22 の疎水性は弱く 2M-1.5M NaCl 条件下で溶出が見られる。10% アクリルアミドゲルをもちいた SDS-PAGE では 見かけの分子量 50kDa を示すが(図1)この値は用いたゲル濃度により変動する。また NAP-22 は熱処理や 2.5% 過塩素酸処理に耐性であること、カルシウム依存性にカルモジュリンと結合すること(図2)がわかった。これらの性質は NAP-22 が MARCKS や GAP-43 とよく似た物理化学的性質を持つことを示している。しかしながら cDNA クローニングの結果は NAP-22 がこれらとは異なる蛋白質であることを示した(4)。細胞分画と免疫ブロットの結果

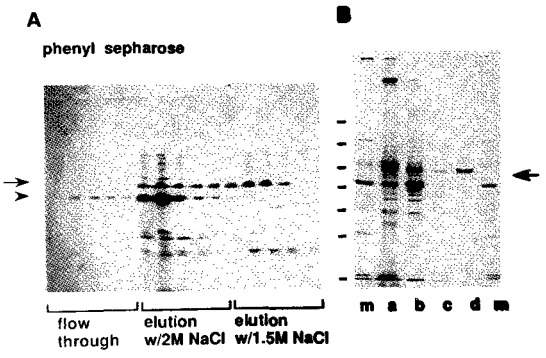


図1 A フェニルカラムによる蛋白質の溶出。矢印は NAP-22、矢頭は GAP-43 のバンドを示す。B NAP-22 の精製パターン。アルカリ抽出液(a)、DE52(b)、フェニル(c)、2度目のDE52(d)カラム後の標品を分子量マーカー(m)と共に泳動した。

NAP-22 が神経組織に特異的に発現していること（図３A）、その一部は Triton X-100により可溶化されるが発生が進むに伴いこの割合は減少すること（図３B）、軽い比重の画分に局在すること等が明かになった。免疫組織化学の結果は NAP-22 が前シナプス部、特にシナプス小胞やシナプス前膜に存在することを示した。この結果と一致して単離したシナプス小胞画分にも存在が示された（図４）。これらの結果は NAP-22 がシナプスでの情報伝達に関与していることを示唆していると考えている。

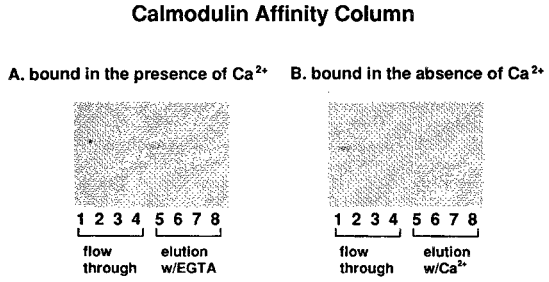


図２ NAP-22 のカルモジュリンとの結合．
精製 NAP-22 を Ca^{2+}イオンの有(A)無(B)でカルモジュリンカラムに添加しCa^{2+}濃度を変えて溶出させた。

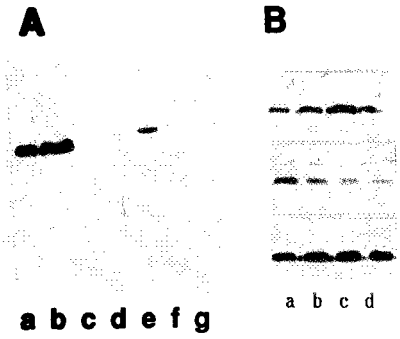


図３ A. NAP-22 の組織分布。脳(b)、腎(c)、肺(d)、肝(e)、心(f)、及び骨格筋(g)の SDS 抽出液を精製 NAP-22 標品(a)と泳動後免疫ブロットを行った。
B. NAP-22 の存在様式の発生に伴う変化。生後 0.3(a),2(b),5.5(c),30(d)週令のラット脳(A)をTriton可溶化画分(B)及び不溶化画分(C)にわけ各々免疫ブロットした。

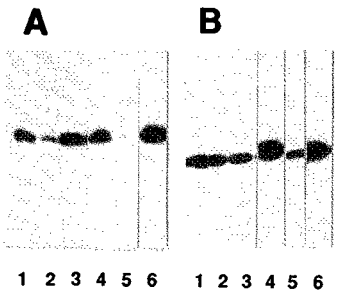


図４ NAP-22 の シナプス小胞画分中の存在。
核画分（１）、２万g上清（２）、２万g沈澱（粗シナプトソーム画分）（３）、３の低張処理後の１０万g沈澱（シナプス小胞画分）（４）；同上清（５）、４を更にショ糖密度勾配遠心で分画した標品（６）を抗 NAP-22 抗体(A) 及び抗 synaptophysin 抗体(B)でブロットした。

この研究は飯野哲博士・小林繁博士（名古屋大・医）との共同研究であることを付記します。

「文献」

1. 森田光洋、前川昌平 (1990) 神経化学 29 332-333
2. Pfenninger,K.H., Ellis,L., Johnson,M.P., Friedman,L.b., Somlo, S., (1983) Cell 35 573-584
3. Huttner,W.B., Schiebler,W., Greengard,P., De Camilli,P., (1983) J. Cell Biol. 96 1374-1386
4. Maekawa,S., Maekawa,M., Hattori,S., Nakamura,S. (1993) J. Biol.Chem. 268 13703-13709

86 リチウムのラット脳内リン代謝産物に及ぼす影響
－高分解能^{31}P－NMRスペクトロスコピーを用いた研究－

今福　淳、J.W.Pettegrew*
（聖マリアンナ医大神経精神科学教室、＊ピッツバーグ大学精神科学教室）

〔要約〕
Fischer344雄性ラットを用い、リチウム投与後の脳内リン代謝産物の変化を高分解能^{31}P－NMRスペクトロスコピーを用いて調べた。リチウム3mmol/kg/day、1週間投与により、イノシトール一リン酸の増加とホスホコリンの減少を認めた。リチウム急性投与では、高用量(10mmol/kg) および低用量(3mmol/kg)を用い、イノシトール一リン酸は用量依存性に増加し、ホスホエタノールアミンおよびホスホコリンはそれぞれ用量依存性に減少した。またリチウム急性投与ではエネルギー関連物質であるホスホクレアチンが有意に増加し、それにともない無機リンの減少を認めた。これらの結果から、リチウムはホスファチジルイノシトールのみならず、細胞膜の重要な構成成分であるホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンなどのリン脂質の代謝にも影響を与えることが示唆された。

＜目的＞
リチウムは臨床上躁うつ病の治療、特に再発予防に効果があり広く使用されているが、その作用機序は明らかになっていない。今回我々は、高分解能^{31}P－NMRスペクトロスコピーを用い、リチウム投与後のラット脳perchoric acid(PCA) 抽出試料を測定し、生体膜の主要な構成物質であるホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンの代謝産物、およびホスホクレアチン、無機リン、ATP、ADPなどのエネルギー関連物質の代謝に及ぼすリチウムの効果を調べた。

＜方法＞
動物はFischer344雄性ラット(3か月令) を用いた。リチウム投与方法は、急性投与群では高用量 (10mmol/kg) および低用量 (3mmol/kg) を注射器により皮下投与し24時間後に屠殺した。1週間投与群では3mmol/kg/dayをAlzet Model 2ML2浸透圧ミニポンプを用い皮下投与した。対照群は生理食塩水を用いた。薬物投与期間終了後、ラットは5% chloral hydrate(8ml/kg)で麻酔し、液体窒素に頭部を浸し、脳を凍結した状態で取り出し、PCA抽出を行った。凍結した脳サンプルは、液体窒素で低温にしたステンレス鋼製のすり鉢と乳棒で粉末にし、この脳粉末に60% perchoric acid(0.25v/w) を加えよく混ぜた。この混合粉末を液体窒素で低温にしたポリプロピレン製の遠心チューブに移し、43,600g で15分間遠心した(-4 ℃) 。抽出液はpH10付近に調整し、凍結乾燥後、重水に溶解しNMR測定の試料とした。NMRスペクトロメーターはBruker AM500を用いた。磁場強度は11.7テスラ、^{31}P共鳴周波数にして202.49MHz である。試料はそれぞれ12.000から20.000回のスキャンを行った。データは New Methods Research 社製 Lab One NMR1 を用いて解析した。リン代謝産物はそれぞれのピークの面積からモルパーセントで算出した。二群間の有意差はF-test の後、pooled variance t-test により求めた。

＜結果＞
図1はラット脳のPCA抽出で得られた試料の^{31}P－NMRのスペクトルである。主なピークは(4) 、ホスホエタノールアミン（PE）、ホスホコリン（PC）、無機リン（Pi）、グリセロ－3－ホスホエタノールアミン（GPE）、グリセロ－3－ホスホコリン（GPC）、ホスホクレアチン（PCr）、ATP、ADPなどである。リチウム投与により、4.03ppm 付近に対照群スペクトルに認められないピークを認めた。このピークは化学シフトおよびpH滴定曲線がイノシトール一リン酸（IP）に一致した。リチウム1週間投与では、IPの有意な増加と、PCの約 28%の有意な減少を認めた。リチウム急性投与では、IPは用量依存性に有意な増加を認めた。PEは10mmol/kg 投与群で約23% 、3mmol/kg投与群で約17% 有意に減少した。PCも用量依存性に，それぞれ約59% 、約27% と有意な減少を認めた。GPEは10mmol/kg 投与群でのみ約23% の有意な減少を認めた。エネルギー関連物質はリチウム急性投与のみで変化し、PCrはリチウム低用量、高用量いずれでも約30% 有意に増加し、Piは逆に約50% の有意な減少を認めた。ATPおよびADPはリチウム1週間および急性投与により変化はなかった。

＜考察＞
リチウム投与によりラット脳内IPの増加が起こり(1) 、ホスファチジルイノシトール代謝に影響することは

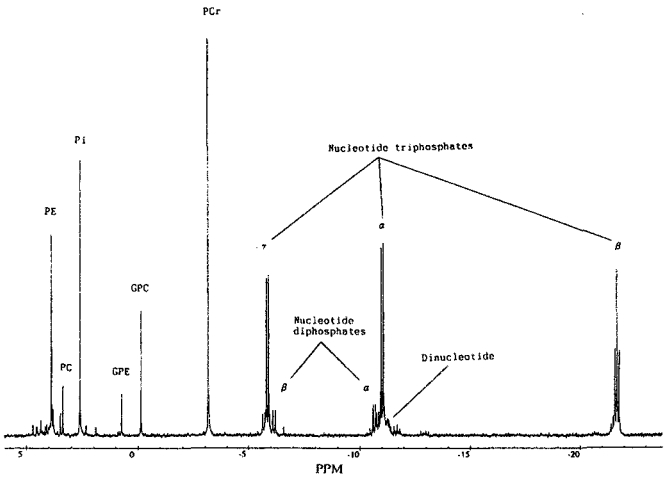


図1。High-resolution ^{31}P NMR spectrum of a perchloric acid extract of freeze-clamped brain from a three-month-old Fischer 344 rat.

The easily identifiable resonances and their chemical shifts(ppm) include phosphoethanolamine (PE, 3.84ppm), phosphocholine(PC, 3.33ppm), inorganic orthophosphate(Pi, 2.63ppm), glycerol 3-phosphoethanolamine(GPE, 0.81ppm), glycerol 3-phosphocholine(GPC, -0.13ppm), the nucleotide triphosphates(especially ATP; γ -5.80ppm, α -10.92ppm, β -21.45ppm) and the nucleotide diphosphates(especially ADP ; β -6.11ppm, α -10.61ppm).

よく知られている。今回このＩＰの変化がＮＭＲスペクトロスコピーで検出された。一般にＰＥ、ＰＣは細胞膜リン脂質の前駆物質、ＧＰＥ、ＧＰＣは分解代謝産物とされている(2)。リチウム投与により、特にＰＥおよびＰＣに変化があったことはリチウムはホスファチジルイノシトールのみならず生体膜の主要な構成成分であるホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンの代謝にも影響していることが示唆された。ＰＥおよびＰＣ減少の機序として考えられる可能性は、１）エタノールアミンキナーゼあるいはコリンキナーゼ活性の低下、２）ホスホリパーゼＣ（ＰＬ－Ｃ）活性の低下、３）グリセロホスホジエステラーゼ活性の低下、４）ＣＤＰコリンホスホトランスフェラーゼ活性の上昇、５）ホスホモノエステルホスファターゼ活性の上昇、６）ホスホリパーゼＤ（ＰＬ－Ｄ）活性の上昇などがあげられる。またリチウム投与によりラット脳内アセチルコリン生成が増加するという報告があり(3)、脳内コリンがリチウム投与によりアセチルコリン生成に多く使われるためＰＣ生成が減少している可能性も考えられる。またリチウム急性投与によってエネルギー関連物質に影響を与えるという興味ある結果を得た。ＰＣｒとＰｉ間の変換機構に何らかの影響を与えていると思われるが、その作用機序、生理的意義は明らかになっていない。ＮＭＲは生体に非侵襲的に使用できるため、今後臨床用ＮＭＲでの躁うつ病研究が盛んに行われると思われるが、今回の結果はその際の基礎データになることが期待される。

＜謝辞＞

この研究の一部は財団法人笹川医学医療研究財団の援助により行われた。

＜文献＞

(1)Allison, J.H., Blisner, M.E., Holland, W.H., Hipps, P.P. and Sherman, W.R. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 664-670.

(2)Dawson, R.M.C. (1985). In Eichberg, J. (Editor). Phospholipids in Nervous Tissues. 45-78. Wiley, New York

(3)Jope, R.S. (1979). J. Neurochem. 33, 487-495.

(4)Pettegrew, J.W., Panchalingam, K., Withers, G., Mckeag, D. and Strychor, S. (1990). J. Neuropathol. Exp. Neurol. 49, 237-249.

87 ヒト死後脳における内在性遊離型D-アスパラギン酸とD-セリンの発達及び加齢に伴う変化

橋本篤司[1,2]、西川徹[2]、熊代新[2]、岡高恵[2]、水戸敬[2]、高鳩幸男[2]、高橋清久[2]
（新技術事業団[1]、国立精神・神経センター[2]）

〔要約〕
これまでに我々は、ＧＣ-ＭＳ法及びＨＰＬＣ法を用いてラットやマウス脳内に多量の遊離型D-セリンが存在し、このD-セリンの脳内分布がN-メチル-D-アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）型興奮性アミノ酸受容体の分布と正の相関を示すことを報告してきた(2-4)。今回我々は、ＧＣ-ＭＳ法によってD-アスパラギン酸の同定を行なうと共に、胎生１４週～１０１歳までのヒト死後脳における遊離型D-アスパラギン酸とD-セリンの発達及び加齢に伴う変化を検討した。その結果、胎生１４週のヒト前頭前野においてすでに多量のD-セリンやD-アスパラギン酸が存在していた。D-アスパラギン酸はその後急速に減少したが、D-セリンは、一生を通して比較的一定して存在していた。D-アスパラギン酸及びD-セリンはそれぞれＮＭＤＡ受容体のグルタミン酸結合部位及びストリキニン非感受性グリシン結合部位の選択的なアゴニストであることがすでに知られていることから(5,7)、これらのD-アミノ酸は大脳皮質の発達やＮＭＤＡ受容体を介した種々の機能と関連している可能性が示唆された。

これまで哺乳類のアミノ酸はL-体から構成されていると考えられてきた。しかし、D-アスパラギン酸オキシダーゼやD-アミノ酸オキシダーゼが系統発生学的に哺乳類脳に保存されていること(6,8)、ラットやマウス脳内に多量のD-アスパラギン酸やD-セリンが存在すること(1-4)、D-アスパラギン酸やD-セリンはＮＭＤＡ受容体の選択的なアゴニストであること(5,7)などの所見は、これらD-体のアミノ酸が哺乳類の中枢神経系においても機能している可能性を示唆している。今回我々は各発達段階のヒト死後脳においてD-アスパラギン酸の同定及びD-アミノ酸の測定を行なったので報告する。

［実験方法］
D-アスパラギン酸の同定は、ヒト胎児脳ＴＣＡ抽出液のＰＦＰ-イソプロピル誘導体をChirasil-L-Val キャピラリーカラムを用いてＧＣ-ＭＳで分析した。アミノ酸の分析は、精神神経疾患に罹患していない胎生１４週～１０１歳の死後脳（前頭葉前端部）ＴＣＡ抽出液をo-phthaldialdehydeおよびBoc-L-cysteineで誘導化した後、蛍光検出器付きＨＰＬＣを用いて行なった。
なお、この研究は国立精神神経センター倫理委員会の承認を得て行なった。
［結果］
ヒト胎児脳抽出液のガスクロマトグラム上に標準D-アスパラギン酸誘導体と一致するピークが検出された。さらに、このピークのＥＩマススペクトルは、標準D-アスパラギン酸誘導体のマススペクトルと一致した(data not shown)。
胎生１４週の前頭前野には、多量のD-セリンばかりでなくD-アスパラギン酸も見いだされた(Fig.1)。驚くべきことに、このときのD-アスパラギン酸含量(0.36 μmol/g, n=2)はL-体(0.21 μmol/g, n=2)より高濃度であった。D-アスパラギン酸含量は発達に伴って急激に減少し、胎生４１週には痕跡程度になり、出生以降(0.008±0.004 μmol/g, n=11)はほとんど検出できなくなった(Fig.2)。一方、D-セリン含量は胎生期及び出生以降もそれぞれ比較的一定していたが、胎生期のD-セリン含量(0.28±0.02 μmol/g, n=17)は出生以降(0.13±0.01 μmol/g, n=11)の約２倍であった。他のD-アミノ酸は各発達段階において検出限界以下であった。
［考察］
今回の研究でヒト胎児脳中に存在した物質がD-アスパラギン酸であることがＧＣ-ＭＳ法によって証明された。さらにこのD-アスパラギン酸は、ヒト脳においては胎性期にのみ高濃度で存在し、生後には痕跡程度になることが明かとなった。この発達に伴う変化は、ラット脳のD-アスパラギン酸含量が生後急速に減少するというDunlopらが行なった観察結果とよく類似している(1)。一方、D-セリンは胎生期から１０１歳に至るまで比較的一定して存在したが、この結果も我々がラット脳で得た結果と同様であった(4)。

さらにD-アスパラギン酸及びD-セリンがそれぞれＮＭＤＡ受容体のグルタミン酸結合部位及びアロステリック部位の選択的なアゴニストであること及びラット脳内透析法における細胞外D-セリン濃度がアロステリック部位におけるD-セリンのＫｄ値より高いこと(unpublished data)を考え合わせると、これらのD-アミノ酸は大脳皮質の発達やＮＭＤＡ受容体を介した種々の機能と関連している可能性があると思われる。今後はＮＭＤＡ受容体の機能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検討していく予定である。

［謝辞］

今回の実験でヒト死後脳を提供していただいた土井永史（都立府中病院）、水谷喜彦、山崎達二、金子嗣郎（都立松沢病院）、大友英二（浴風会病院）の各先生方に感謝致します。

［文献］

1) Dunlop, D.S. et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 27-32
2) Hashimoto, A. et al. (1992) FEBS Lett. 296, 33-36
3) Hashimoto, A. et al. (1993) Neurosci. Lett. 152, 33-36
4) Hashimoto, A. et al. (1993) J. Neurochem. 60, 783-786
5) Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1998) Science 241, 835-837
6) Neims, A.H. et al. (1966) J. Neurochem. 13,163-168
7) Ransom, R.W., and Stec, N.L. (1988) J. Neurochem. 51, 830-836
8) Yusko, S.C., and Neims, A.H. (1973) J. Neurochem. 21,1037-1039

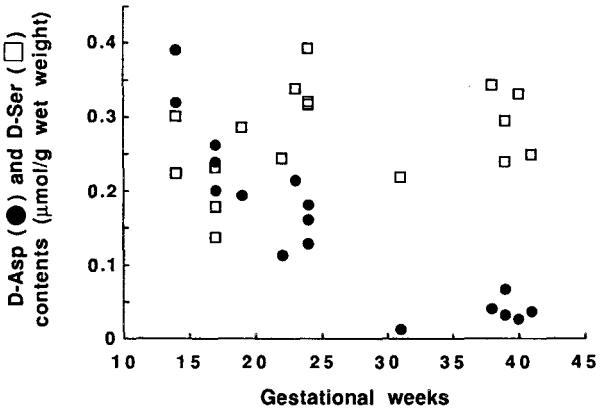


Fig. 1. Embryonic changes in the contents of free D-aspartate and D-serine in human prefrontal cortex. Each value is the content of D-aspartate (●) or D-serine (□) in the individual frontal tip.

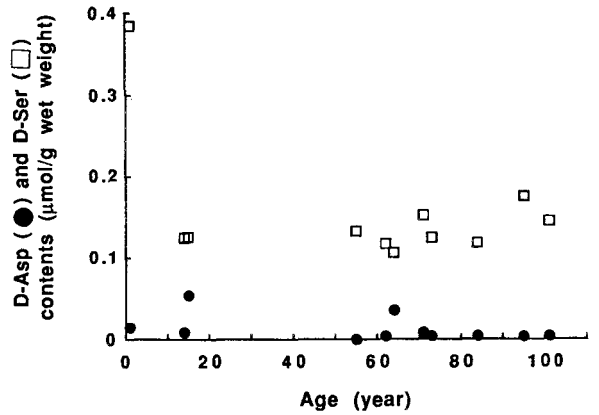


Fig. 2. Postnatal changes in the contents of free D-aspartate and D-serine in human prefrontal cortex. Each value is the content of D-aspartate (●) or D-serine (□) in the individual frontal tip.

88 培養アストロサイトにおけるグルタミン酸受容体刺激による CaM キナーゼ II の活性化反応と中間径フィラメントのリン酸化反応

矢野茂敏*,**、福永浩司*、生塩之敬**、宮本英七*
(熊本大・医・*第一薬理、**脳神経外科)

〔要約〕

培養アストロサイトにおいて、グルタミン酸受容体刺激による 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) の活性化反応と、中間径フィラメントのリン酸化反応について調べた。1) グルタミン酸受容体刺激により、CaM キナーゼIIの Ca^{2+} 非依存性活性の上昇が起こり、この反応は、代謝型および non-NMDA 受容体阻害薬で抑制され、NMDA 受容体阻害薬では抑制されなかった。2) 無機リン酸でラベルしたアストロサイトにおいてグルタミン酸の刺激により、ビメンチンと glial fibrillary acidic protein (GFAP) のリン酸化が増加し、non-NMDA 受容体阻害薬で抑制された。またビメンチンと GFAP は精製した CaM キナーゼIIと *in vitro* で反応させても同様にリン酸化された。以上の結果から，培養アストロサイトにおいて、CaM キナーゼIIは代謝型および non-NMDA 受容体を介してグルタミン酸により活性化され、ビメンチンと GFAP をリン酸化し、中間径フィラメントの機能を調節していることが示唆された。

〔目的〕

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として、神経細胞死、シナプス伝達長期増強などに重要な役割をはたしている (1, 2)。最近、アストロサイトにもニューロンと同様にグルタミン酸受容体が存在し、刺激により細胞内カルシウムの上昇が起こることが報告され (3)、ニューロンからグリア細胞への情報伝達の存在が考えられるようになった。しかしグルタミン酸による細胞内カルシウムの上昇が、アストロサイト内で機能的にどのように作用しているのかは不明な点が多い。今回、我々はラット大脳皮質培養アストロサイトを用いて、グルタミン酸受容体刺激による CaM キナーゼIIの活性化反応と中間径フィラメントであるビメンチン、GFAP のリン酸化反応の関連を検討した。

〔実験方法〕

大脳皮質アストロサイトの培養は、生後1日目ラットより McCarthy と de Vellis の方法 (4) により行なった。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後、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の活性は Fukunaga らの方法 (5) により測定した。*in situ* での CaM キナーゼIIの自己リン酸化反応、ビメンチンおよび GFAP のリン酸化反応について検討した。細胞を ^{32}P-リン酸でラベルし、刺激後、0.5 % トリトン-X を含む緩衝液でホモジナイズし、不溶性分画と可溶性分画に分けた。不溶性分画は SDS-PAGE 後、ウエスタンブロット法にて同定されたビメンチンと GFAP のバンドに対して、リン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。可溶性分画は、CaM キナーゼ II の特異抗体にて免疫沈降し、同様の方法にてリン酸化の程度を測定した。

〔結果と考察〕

培養アストロサイトにおいて、Krebs-Ringer HEPES (KRH) 溶液中 (コントロール) では CaM キナーゼ II の全活性の 4～5 % が Ca^{2+} 非依存性活性であった。500 μM グルタミン酸で刺激すると、Ca^{2+}非依存性活性は 1 分で 約 1.5 倍に上昇し、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 (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。non-NMDA 受容体のアゴニストであるカイニン酸、α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) (100 μM) および代謝型グルタミン酸受容体のアゴニストである 1-Aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylate (ACPD) (500 μM) によって有意な Ca^{2+} 非依存性活性の上昇が見られたが、NMDA は効果がなかった。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。500 μM グルタミン酸の効果は non-NMDA 受容体の拮抗薬である 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) および代謝型受容体の拮抗薬である 2-Amino-3-phosphonopropionate (AP3) で阻害されたが、NMDA 受容体の拮抗薬である MK801 では阻害されなかった (図2)。以上の結果は、培養アストロサイトにおいてグルタミン酸は non-NMDA 受容体および代謝型受容体を介して CaM キナーゼ II を活性化し、Ca^{2+} 非依存性活性を発現することを示している。

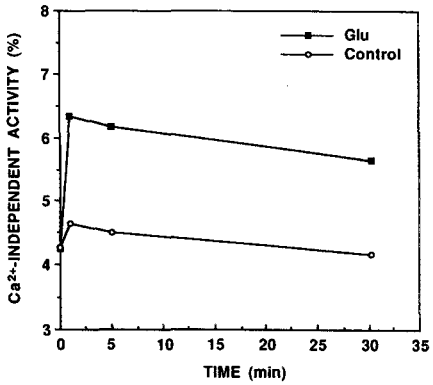


図1 CaM キナーゼIIの Ca^{2+} 非依存性活性に対するグルタミン酸の刺激効果
実験は各点につき4回行ない、再現性を確認した。図は代表的な一例を示す。

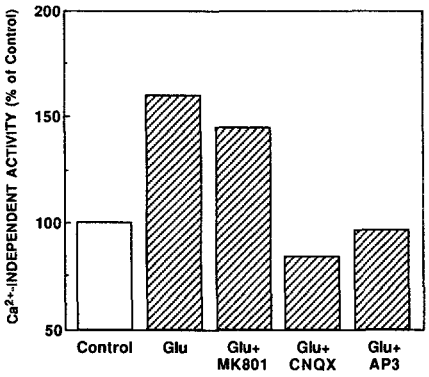


図2 グルタミン酸刺激に対するグルタミン酸受容体阻害薬の抑制効果
実験は4回行ない、再現性を確認した。図は代表的な一例を示す。

次に *in situ* での CaM キナーゼ II の自己リン酸化反応と標的蛋白質であるビメンチンと GFAP のリン酸化反応について調べた。培養アストロサイトの CaM キナーゼ II は 50 kDa のサブユニットが主であり、グルタミン酸刺激により、酵素の自己リン酸化は刺激前に比べ 1.6 ± 0.1 倍に増加し、CNQX で有意に抑制された。ウエスタンブロットで同定したビメンチン (58 kDa) と GFAP (51 kDa) のリン酸化反応は、グルタミン酸刺激にてそれぞれ 1.5 ± 0.2 倍、2.0 ± 0.2 倍に増加し、CNQX で有意に抑制された (図3)。*in situ* における CaM キナーゼ II の自己リン酸化反応の上昇と、ビメンチン、GFAP のリン酸化反応の上昇はよく相関した。また両蛋白質は精製した CaM キナーゼ II により *in vitro* で強くリン酸化された。

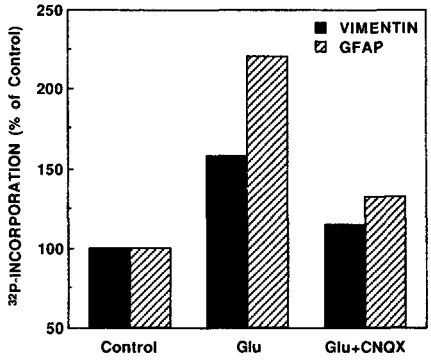


図3 ビメンチン、GFAP の *in situ* でのリン酸化に対するグルタミン酸の刺激効果
実験は6回行ない、再現性を確認した。図は代表的な一例を示す。

以上の結果より、培養アストロサイトにおいてグルタミン酸刺激により CaM キナーゼ II が活性化を受け、ビメンチンと GFAP をリン酸化することが示唆された。*in vitro* でビメンチン、GFAP はリン酸化により脱重合すること (6)、また、グルタミン酸刺激によりアストロサイトの細胞容積が不可逆的に増加すること (7) を考え合わせると、アストロサイトにおける中間径フィラメントの機能の調節に CaM キナーゼ II の活性化が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

〔文 献〕

1) Arvin, B., Neville, L.F., Pan, J., and Roberts, P.J. (1989) *Br. J. Pharmacol.* **98**, 225-235
2) Simon, R.P., Griffiths, T., Swan, J.H., and Meldrum, B.S. (1984) *Science* **226**, 850-852
3) Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990) *Science* **247**, 470-473
4) McCarthy, K.D., Prime, J., Harmon, T., and Pollenz, R. (1985) *J. Neurochem.* **44**, 723-730
5) Fukunaga, K., Soderling, T.R., and Miyamoto, E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22527-22533
6) Inagaki, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., Ando, S., Tanabe, K., Kikuchi, K., Tsuiki, S., and Nishi, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4722-4729
7) Koyama, Y., Sugimoto, T., Shigenaga, Y., Baba, A., and Iwata, H. (1991) *Neurosci. Lett.* **124**, 235-238

89 NMDA受容体の分子的多様性と機能

嵜村建司[1] 森 寿[1] 目黒裕之[1] 轡田達也[1] 柏渕信子[1] 池田和隆[1] 永沢道明[1] 荒木一明[1] 櫛谷悦子[1]
山倉智宏[1] 柾木永[1] 渡辺雅彦[2] 三品昌美[1]
(1、新潟大・脳研・神経薬理 2、北海道大・医・第一解剖)

〔要約〕
グルタミン酸受容体チャネルを形成する分子のcDNAをマウスより単離しその構造解析と発現実験をおこなった。その結果マウスのグルタミン酸受容体チャネルサブユニットには、複数の分子種が存在することを見いだし、一次構造の類似性よりα、β、γ、δ、ε、ζサブファミリーの6つに分類した。このうちεおよびζサブファミリーがNMDA型の受容体チャネルを形成することを見いだした。またεサブファミリーの分子的多様性が、NMDA受容体チャネルの機能的多様性すなわちアゴニストに対する親和性、アンタゴニストやMg^{2+}に対する感受性、さらにプロテインキナーゼCの活性化剤であるホルボールエステル(TPA)による活性調節などの基盤となっていることが明らかになった。また、in situ hybridization によりε1、ε2、ε3、ε4サブユニットmRNAが、それぞれ全脳、前脳、小脳、脳幹に特徴的な分布をしていることを見いだした。

はじめに

中枢神経系における主要な興奮性シナプス伝達を担っているグルタミン酸受容体チャネルは、アゴニストに対する特異性により、AMPA型、カイニン酸型、NMDA型に分類されてきたが、このうち高いCa^{2+}の透過性と入力依存的にMg^{2+}によりチャネルの閉塞を調節されるNMDA受容体チャネルは、脳の高次機能と密接な関係を有することが明らかになっている。またNMDA受容体チャネルは、脳の発達期におけるシナプス結合成立に関与し神経系のネットワーク形成の鍵を握ると考えられている。さらに、NMDA受容体チャネルの異常な活性化によるCa^{2+}の流入が、様々な病態でおこる神経細胞壊死に深く関わっていると考えられている。

我々は、グルタミン酸受容体チャネル分子が脳の高次機能や形成、さらに病態においてはたす生理的機能を解明するためには、分子と個体を結び付けるトランスジェニック動物の手法を用いた解析が必須であると考え、マウスグルタミン酸受容体チャネルcDNAを単離しその構造と機能の解析をおこなってきた。

方法

グルタミン酸受容体チャネルサブユニットのcDNAは、先にクローン化したAMPA型グルタミン酸受容体チャネルのサブユニットcDNAをプローブとして用いて(1)、クロスハイブリダイゼーション法によりマウスcDNAライブラリーをスクリーニングして得た(2-8)。クローン化したサブユニットcDNAよりmRNAを合成し、アフリカツメガエル卵母細胞で翻訳させ、発現したグルタミン酸受容体チャネルの電気生理学的性質を解析した(1)。in situ hybridization は、各サブユニットmRNAに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを合成しおこなった(9)。

結果と考察

分子的多様性

cDNAの単離により、マウスのグルタミン酸受容体チャネルサブユニットには十数種類以上の分子種が存在することを見いだし、一次構造の類似性より6つのサブファミリー α、β、γ、δ、ε、ζに分類した。これらのサブユニットはいずれも4つの疎水性推定膜貫通領域(M1-M4)を有しており、その基本構造においてアセチルコリン受容体チャネルなどの神経伝達物質依存性イオンチャネルと類似していることが明らかになった。各サブユニットの機能的性質を解析した結果、αサブファミリーがAMPA型受容体チャネルを(1)、βおよびγサブファミリーがカイニン酸型受容体チャネルをそれぞれ形成することを見いだした(2,3)。一方ζサブユニットは、グリシンの存在下でNMDA受容体チャネルの基本的な性質を示したがその電流応答は非常に小さいものでしかなかった(4)。ところが単独では電流応答を示すチャネルを形成しないεサブユニット(ε1-ε4)いずれかをζ1サブユニットと組み合わせて発現させることにより高いチャネル活性をもつ NMDA型の受容体チャネルが形成されることを見いだした(6-8)(図1)。

NMDA受容体チャネルの機能的多様性

各εサブユニットとζ1サブユニットを組み合わせて形成されるNMDA受容体チャネル機能を解析した結果、アゴニストに対する親和性やアンタゴニストに対する感受性がεサブユニットの種類によって異なることを見いだした(6-8)(図2)。さらに生理的に重要な特性である電位依存的なMg^{2+}による抑制もεサブユニットの種類によって異なることが明らかになった(7,8)。また、ε1/ζ1チャネルおよびε2/ζ1チャネルならびにζ1チャネルの活性はプロテインキナーゼの活性化剤であるTPA処理により、2-4倍増強されることを見いだした(図3)。この活性化はプロテインキナーゼの阻害剤であるスタウロスポリン存在下では認められないことから、NMDA受容体チャネルの活性がプロテインキナーゼにより制御されているものと考えられる(7,11)。このプロテインキナーゼによるNMDA受容体チャネルの調節は、シナプス可塑性の閾値を抑制していると考えられる。

NMDA受容体チャネルの脳内分布

マウス脳において4種類のεサブユニットmRNAが特徴的な分布をしていることを in situ hybridization により見い

だした(6,7,9)。ε1サブユニットmRNAは脳内に広く分布するが、ε2サブユニットmRNAの発現は前脳に限定されていた。これに対し、ε3サブユニットmRNAは、主に小脳顆粒細胞層で強い発現が認められた。ε4サブユニットmRNAは弱いながらも間脳、脳幹部に発現が認められた。一方ζ1サブユニットmRNAは、脳全体に広く分布していた。

ε1およびε2サブユニットmRNAはシナプス可塑性が観察される海馬や大脳皮質に発現が認められ、またε1／ζ1およびε2／ζ1チャネルはMg^{2+}に感受性が高いこと、さらにプロテインキナーゼにより調節を受けることからε1およびε2サブユニットはシナプス可塑性を担う分子であると推定している。一方ε3サブユニットmRNAは、主に小脳顆粒細胞層に発現しており、またε3／ζ1チャネルはMg^{2+}に感受性が低いことから、ε3サブユニットはシナプス伝達に関与している分子と推定している。今後は、ジーンターゲティングなどの発生工学的手法を用いて生命個体の中でのこれら分子のはたす役割が解明されることが期待される。

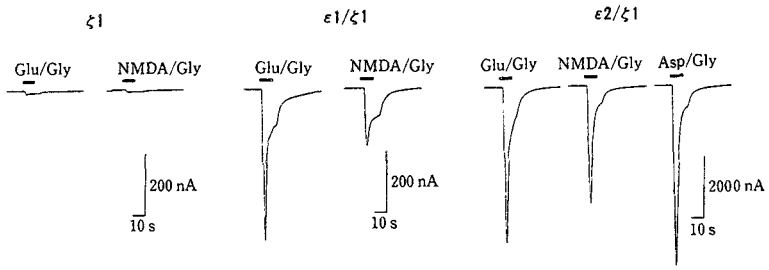


図1 εサブユニットとζサブユニットによるNMDA受容体チャネルの形成。Glu／Gly：10μMグルタミン酸＋10μMグリシン、NMDA／Gly：100μMNMDA＋10μMグリシン、Asp／Gly：100μMアスパラギン酸＋10μMグリシン。

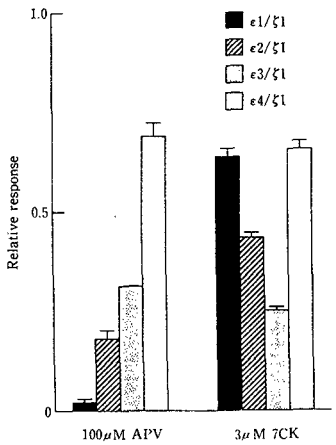


図2 εサブユニットによるNMDA受容体チャネルの薬理学的性質の差異

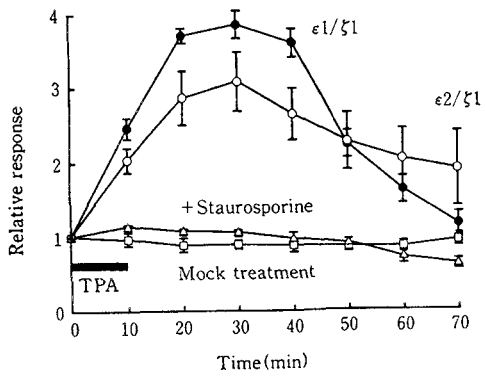


図3 TPAによるNMDA受容体チャネルの活性化

文献

(1) K. Sakimura, H. Bujo, E. Kushiya, K. Araki, M. Yamazaki, M. Yamazaki, H. Meguro, A. Warashina, S. Numa and M. Mishina: FEBS Lett. 272: 73-80, 1990. (2) T. Morita, K. Sakimura, E. Kushiya, M. Yamazaki, H. Meguro, K. Araki, T. Abe, K.J. Mori and M. Mishina: Mol. Brain Res. 14:143-146, 1992. (3) K. Sakimura, T. Morita, E. Kushiya and M. Mishina: Neuron 8:267-274, 1992. (4) M. Yamazaki, H. Mori, K. Araki, K.J. Mori and M. Mishina: FEBS Lett. 300:39-45, 1992. (5) M. Yamazaki, K. Araki, A. Shibata and M. Mishina: Biochem. Biophys. Res. Commun. 183:886-892, 1992. (6) H. Meguro, H. Mori, K. Araki, E. Kushiya, T. Kutsuwada, M. Yamazaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, K. Sakimura and M. Mishina: Nature 357:70-74, 1992. (7) T. Kutsuwada, N. Kashiwabuchi, H. Mori, K. Sakimura, E. Kushiya, K. Araki, H. Meguro, H. Masaki, T. Kumanishi, M. Arakawa and M. Mishina: Nature 358:36-41, 1992. (8) K. Ikeda, M. Nagasawa, H. Mori, K. Araki, K. Sakimura, M. Watanabe, Y. Inoue and M. Mishina: FEBS Lett. 313:34-38, 1992. (9) M. Watanabe, Y. Inoue, K. Sakimura and M. Mishina: NeuroReport 3:1138-1140, 1992. (10) H. Mori, H. Masaki, T. Yamakura and M. Mishina: Nature 358:673-675, 1992. (11) H. Mori, T. Yamakura, H. Masaki and M. Mishina: NeuroReport 4:519-522, 1993. (12) T. Yamakura, H. Mori, H. Masaki, K. Shimoji and M. Mishina: NeuroReport, in press.

90 GABAB 受容体に特異的なモノクローナル抗体のアンタゴニスト作用について

中安博司、木村宏*、栗山欣弥
（京都府立医科大学・薬理、　滋賀医科大学・分子神経センター*）

〔要約〕

我々は既に GABAB 受容体に特異的なモノクローナル抗体を得ている。 この抗体は、GABAB 受容体に結合するだけでなく、結合後受容体の GABA binding 活性を阻害することがわかった。 また、抗体による阻害のしくみを検討したところ、この抗体は GABAB 受容体に対してアンタゴニストとして働くことがわかった。 このことにより、高分子アンタゴニストとしての抗体分子の応用の道が開かれることになった。

「方法」

GABAB受容体に特異的なモノクローナル抗体（腹水）は、約１／２量の抗体分子（１０mg／ml）を含むが、大部分の阻害実験にはこれをそのまま使用した[1]。 なお抗体結合アガロースビーズは文献[2]の方法にしたがって調製した。

「結果と考察」

ウシ大脳皮質より調整したシナプス膜標品とモノクローナル抗体（IgM)をインキュベートすると、シナプス膜表面のGABAB受容体と抗体が反応して［^{3}H］-GABA結合反応が阻害された。 この際、加える抗体の量を増やしてゆくと受容体の GABAB 結合活性が次第に強く阻害された。 ここから、みかけのKi値を概算すると、約8 x 10^{-12} 程度となり、GABAのそれよりも10、000倍も affinity が高いことがわかる。 それにもかかわらず、十分な阻害のためにはシナプス膜上の受容体の量に比べて過剰量の抗体（約２０－３０倍）の添加が必要であった。

Fig.1. Monoclonal antibody inhibited GABA binding activity

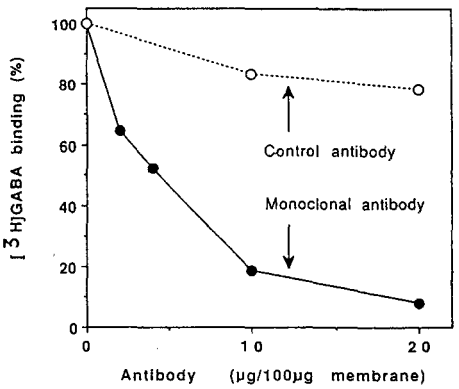
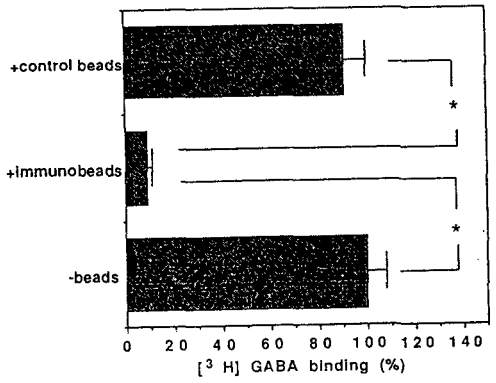


Fig.2. GABAb receptor adsorbed on immunobeads was inactive.



この理由は明確ではないが、シナプス膜という巨大な構造物と分子量１００万近いIgM抗体の両者が反応して完全な平衡に達するのに長時間かかることがその大きな理由であろうと考えられる。

十分な反応時間のあと１：１の分子比の複合体が形成された時、これが結合活性を持っているかどうかを調べるために、抗体をアガロースビーズに共有結合させたものを調製し、これに可溶化した受容体を吸着させたところ、モノクローナル抗体ビーズに結合した受容体ではGABA結合能は全くみられなかった（図２）。このことは、１：1の抗原抗体結合物は基本的に結合活性を持たないことを意味している。

シナプス膜の系では、阻害作用が現われてくるまで非常に長い時間が必要となる。４時間のインキュベーションでも阻害率は約１／２程度であり、その後徐々に減少して行く（図３）。このことは、結合部位がシナプス膜の裏側にあるなどの理由による遅延ではないと考えられる。事実、Triton X-100などでシナプス膜をpermeableな状態にした場合にも結合阻害が高まる様なことはみられなかった。すなわち、Triton X-100の濃度を0、0.001、0.04、0.2%としても同量のシナプス膜と同量の抗体を使用した場合には阻害の割合は変化を示さなかった。　また、この抗体による阻害はGABA$_B$受容体に特異的なもので、GABA$_A$受容体のGABA結合能には影響を与えなかった。また、このように抗体の結合によりGABA結合活性は変化を示したが、これとは逆に、抗体との結合にGABAの有無はまったく影響を与えず、大過剰量のGABAの存在下においても、抗体結合ビーズは受容体蛋白質を結合した。

Fig.3. Inhibition by monoclonal antibody needs long preincubation time.

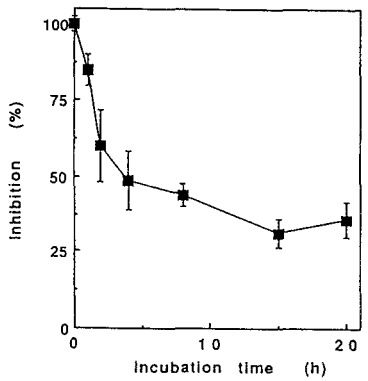
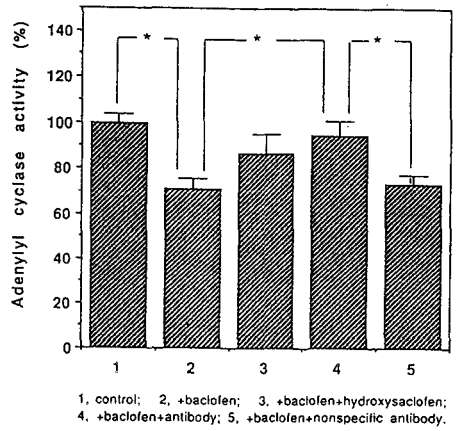


Fig.4. Monoclonal antibody acts as antagonist.



1, control; 2, +baclofen; 3, +baclofen+hydroxysaclofen; 4, +baclofen+antibody; 5, +baclofen+nonspecific antibody.

結合した抗体は受容体に対してどのような作用を示すであろうか？　このために、シナプス膜上のアデニル酸シクラーゼ（AC）活性に対する抗体の効果を調べてみた。GABA$_B$受容体の活性化は通常$G_{i,o}$蛋白質を介してAC活性を抑制するが、アゴニスト存在下で起きるこの抑制に抗体は拮抗を示した（図４）。この意味では、この抗体はアンタゴニストとしての作用を持つといえる。

なお、この場合、抗体によるＡＣ活性抑制の阻害は、GABAと抗体の添加順序とは無関係に出現した。このモノクローナル抗体の示すGABA$_B$受容体へのアンタゴニスト作用は極めて強力であり、GABA$_B$受容体の機能を微量の抗体で断ち切ることができると考えられ、これを利用して脳内GABA$_B$受容体の機能解析に有効な手段となるものと思われる。

『文献』

(１) Nakayasu,H., Mizutani,H., Hanai,K., Kimura,H., and Kuriyama,K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182, 722-726.

(２) Nakayasu,H., Nishikawa,M., Mizutani,H., Kimura,H., and Kuriyama,K. (1993) *J.Biol.Chem.*, 268, 8658-8664.

91 ラット培養海馬細胞におけるATP受容体を介するシナプス伝達の存在

井上和秀、中沢憲一、小泉修一、綿野智一
（国立衛生試験所・薬理部）

〔要約〕ﾗｯﾄ培養海馬細胞においてｼﾅﾌﾟｽ電流(-10から-380pA at-60mV)を観察した。ｼﾅﾌﾟｽ電流は種々の大きさの急速に不活化する電流(fast)と比較的緩やかに不活化する電流(slow)で構成されており、前者がnon-NMDA･Glu受容体ﾌﾞﾛｯｶｰにより、後者がP2受容体ﾌﾞﾛｯｶｰにより抑制されたことから、これらはそれぞれの受容体を介する電流であると考えられた。一部の細胞ではslow電流のみが得られ、これらはP2受容体ﾌﾞﾛｯｶｰで完全に抑制された。またATP(100μM)はATP受容体を介し細胞内Ca濃度([Ca]i)上昇を起こすことが明かとなった。以上、ﾗｯﾄ培養海馬系ではATP受容体を介するｼﾅﾌﾟｽ伝達が存在し、放出されたATPはｼﾅﾌﾟｽ後細胞の細胞内Ca濃度([Ca]i)上昇を通じて生理作用を示す可能性が示された。

[目的]海馬での主な興奮性神経伝達物質はｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸(Glu)であり，Gluによる[Ca]i上昇はLTPの発現，あるいは神経細胞死に深い関係があるとされている．しかし、海馬での速いｼﾅﾌﾟｽ伝達をGluだけでは説明できない場合もある。最近、海馬からはATPが放出されることが分かった。我々はすでにPC12において外液ATPがP2受容体を刺激し，非選択性ｶﾁｵﾝﾁｬﾈﾙを活性化し、そこからのCa流入を促して[Ca]i上昇とｶﾃｺｰﾙｱﾐﾝ放出を引き起こすことを明らかにした(1-6)。ついで，ﾗｯﾄ培養海馬細胞ではATPが内向き電流を惹起しかつ脱分極を生じ，その結果Gluの放出を促す可能性を示した(7)．このように培養海馬細胞においてATPは、Gluに加え，あらたな興奮性神経伝達物質としてｼﾅﾌﾟｽ伝達を担う可能性が非常に高くなってきた．今回，われわれはﾗｯﾄ培養海馬細胞においてATP受容体を介するｼﾅﾌﾟｽ伝達を確認したので報告する．

[方法]17日令のﾗｯﾄ胎児から海馬を得、培養開始後7-10日に実験に供した。Patch clampによるwhole cell recording、細胞内Ca測定は既報(7,8)どおりに行った．

[結果および考察]ﾗｯﾄ海馬培養系で127神経細胞中25細胞に自発的に繰返す内向き電流(-10から-380pA at-60mV)を観察した(図1、図2)。この電流はTTX(3μM)によって可逆的に抑制された（図1Ab）が、-15pA以下の miniature currents (mini.cs)は残存した。外液Caﾌﾘｰ条件下ではこの電流は図1Bb、b'のように完全に消滅した。上記25細胞中15例では、このmini.csは図1Ab'のように急速に不活化する電流(fast、半減期:0.72±0.03 ms, mean±SEM, n=42)と比較的緩やかに不活化する電流(slow、半減期:8.61±0.50 ms, mean±SEM, n=28)の2種類に分類できた。ｼﾅﾌﾟｽ電流はこのminiaturesとそれらの重層した成分とで構成されていることが分かる(図1Aa')。このｼﾅﾌﾟｽ電流をATP受容体ﾌﾞﾛｯｶｰ･ｽﾗﾐﾝ(100μM)は、fast miniatures 以外、大部分可逆的に抑制し(図1Cb)、non-NMDA･Glu受容体ﾌﾞﾛｯｶｰ･CNQX （30μM)は、slow miniatures以外、大部分可逆的に抑制した(図1Db')。従って、slow成分はATP受容体、fast成分はnon- NMDA･Glu受容体によるものと考えられた。なお、NMDA受容体ﾌﾞﾛｯｶｰAPV(100μM)はまったく影響を及ぼさなかった。

上記25例中残る10例では、slow成分のみが認められ(図2Aa')、これはｽﾗﾐﾝ(100μM)により完全かつ可逆的に抑制された(図2B)。このｼﾅﾌﾟｽ電流は、別のP2受容体ﾌﾞﾛｯｶｰ･Reactive Blue2(100μM)およびP2受容体の脱感作薬α，β-methylene ATP(100μM)によっても抑制されたことから、ほぼ純粋なATP受容体によるｼﾅﾌﾟｽ電流と考えられる。図2CはTTX存在下のATP(30μM)による[Ca]iに対する影響を検討したものである。ATP(30μM)により[Ca]iは上昇し、この上昇はｽﾗﾐﾝ(100μM)により強く抑制されたことから、ATP受容体を介するものであることが分かった。

以上、ﾗｯﾄ培養海馬細胞では、ATP受容体を介するｼﾅﾌﾟｽ伝達が存在することが明らかとなった。また、放出されたATPはｼﾅﾌﾟｽ後細胞の[Ca]i上昇を引き起こすことも推察された。Glu受容体とATP受容体とは[Ca]i上昇を通じて互いに海馬系の機能を維持している可能性が考えられる。 ［文献］1. Inoue et al. Neurosci. Let. 106, 294, 1989. 2. Nakazawa et al. J. Physiol. 428, 257, 1990. 3. Nakazawa et al. Br. J. Pharmacol. 101, 224, 1990. 4. Nakazawa et al. J. Physiol. 434, 647, 1991. 5. Inoue et al. Br. J. Pharmacol. 102, 581, 1991. 6. Inoue et al. Br. J. Pharmacol. 102, 851, 1991. 7. Inoue et al. Neurosci. Lett. 134, 215, 1992. 8. Grynkiewicz et al. J. Biol. Chem. 260, 3440, 1985.

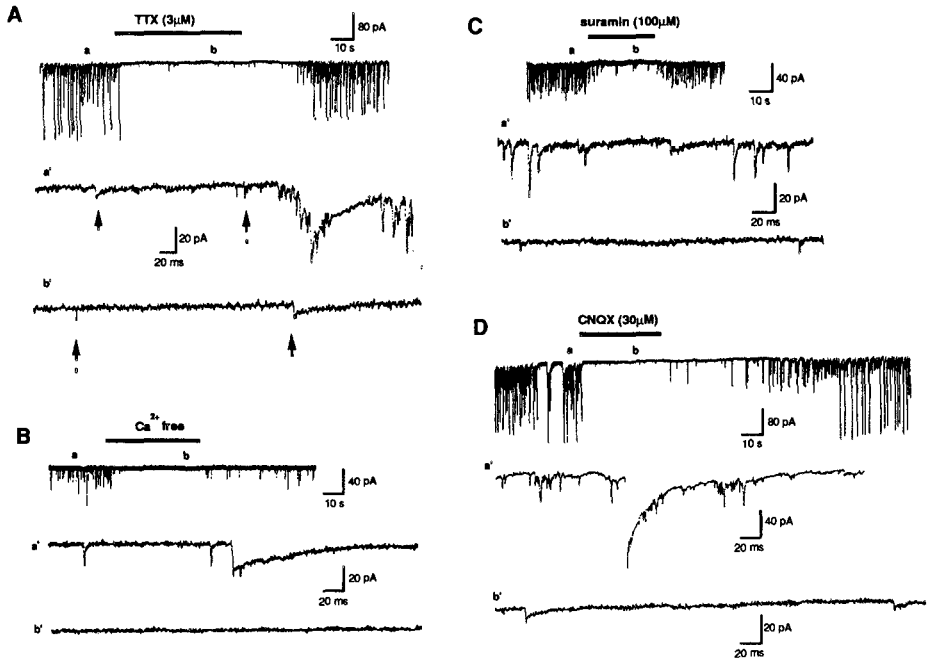


Fig.1(upper). Characterization of spontaneous excitatory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons held at -60 mV. Every a' and b' is expanded trace of a and b. Effects of tetrodotoxin (TTX, 3 μM, A), removal of extra-cellular Ca^{2+} (Ca^{2+} free, B), suramin (100μM,C), a P_2-purinoceptor antagonist and 6-cyano-7-nitro-quinoxalline-2,3-dione (CNQX, 30 μM, D), an antagonist to non-NMDA glutamate receptors.

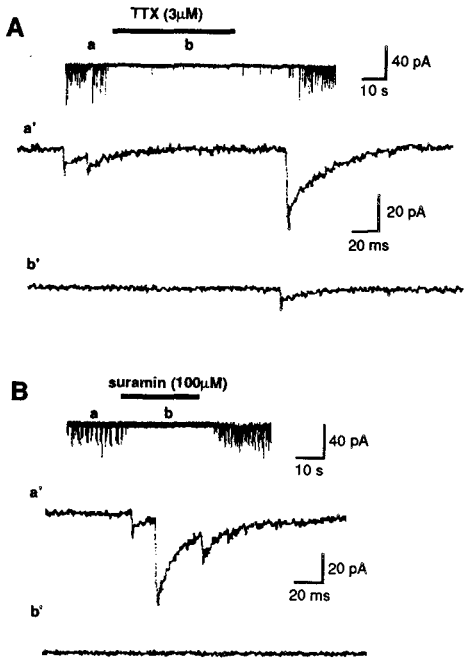
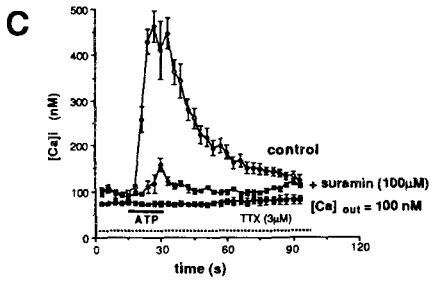


Fig.2(lower). Characterization of slow spontaneous excitatory postsynaptic currents in cultured rat hippocampus neurons. Effects of TTX(3μM, A) and suramin (100μM, B). C.Increase of internal Ca^{2+} by ATP (30 μM) in the presence of 3μM TTX (open circle). Reduction of extracellular Ca^{2+} ([Ca]out) from 1.8 mM to 100 nM abolished the ATP-evoked response (closed square). Suramin (100 μM, closed circle) inhibited the increase of the Ca^{2+}. Each symbol represents mean from 12-15 cells tested. Bars are S.E.M.



92 ATPによるラット線条体dopamine放出機序

張玉祥, 山下拓史, 中村重信
(広島大・医・第三内科)

〔要約〕ラット線条体におけるATPによるdopamine (DA) の放出と代謝について, in vivo microdialysis法を用いて検討した. ATPの脳内投与により線条体細胞外液のDAを濃度依存性に上昇した. ATPによるDAの放出はtetrodotoxin(TTX)感受性で, Ca^{2+} 依存性であったが, N-type voltage sensitive Ca^{2+} channelとの関係は認められなかった. ATPによるDA放出はreactive blue 2およびpertussis toxinによって有意に抑制された. ATPによるDA放出の作用の強度はATP=ADP>AMP>delenosineの順であった. ATPによるDA放出はG蛋白とcoupleしている P_{2y}-purinoceptorを介して起こると考えられた. また, ATP投与によりdihydroxyphenylacetic acid濃度は有意に低下し, ATPによるDA放出は α-methyl-p- tyrosineの前処置によって抑制されたことから, ATPにより放出されたDAは新しく合成されたものと考えられた.UTPはATPとほぼ程度の作用を示した. GTP, CTPとATPの誘導体のAMP-PNPはATPよりも強いDA放出作用があった. 線条体の P_{2y} purinoceptorに作用してDA放出を起こすには塩基とphosphate bondの二つの部分が必要であることが示唆された.

〔はじめに〕

ATPはacetylcholine(ACh), norepinephrine(NE)などとともに放出され, 後シナプスのP2-purinergic receptorに作用し, 様々な生理作用を持つ. ATPは脳内ではfast transmissionに関与し, ATPの刺激によってDAあるいはNE放出がみられる(1, 2). ATPはAChによるdopamine(DA)放出を抑制する(3). $MPTP^{+}$の投与により(4), 脳内のATP濃度は低下する. 今回われわれはin vivo microdialysisを用いてATPの線条体DAの放出, 代謝及びその機序を検討した.

〔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, NARISHIGE)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, EICOM)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2 μl/minの速度で灌流した. 線条体透析液中のDA, dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA)は逆相カラム(MA-ODS, EICOM)で分離し, 電気化学検出器で検出, 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-octane sulfonate, 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4時間Ringer液を灌流し, 各ピークが安定した後に行なった. 薬物はRinger液に溶解し, pHを生理的条件になるように調整し, これを20分間灌流することによる脳内投与を行った. pertussis toxin (PTX) (2 μg/2 μl, 0.5 μl)は手術で埋め込んだguide cannulaを通してマイクロシリンジで脳内に投与した. PTX投与7日後に実験に使った. 結果における統計学的有意差の検定は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. ATP(10^{-5}-10^{-3} M)は濃度依存性にDA濃度を上昇させた.
2. ATP(10^{-3} M)投与により線条体細胞外液のDA濃度は投与40分後に62%上昇した. ADP(10^{-3} M)投与によりDA濃度は投与40分後に48%上昇した. AMP (10^{-3} M)の投与により軽度のDA放出がみられた. adenosine (10^{-3} M)の投与によりDA濃度は低下した(図1).
3. tetrodotoxin (TTX) (2 μM)の60min前投与により, ATPによるDA放出は抑制された. (図2).
4. Ca^{2+} free Ringer液の灌流でATPのDA放出が抑制された. また, DA放出は ω-CgTXによって抑制されなかった(図3).
5. P_{2y} purinoceptorのnon-competitive antagonist のreactive blue 2 (RB2)の投与により, ATPの作用が抑制された(図4).
6. PTXの前処置後のATP(10^{-3}M)投与によってもDAの放出がみられた(118%)が, control (162%)に比べて, 有意に抑制されていた(図5).

7. reserpineの前処置によって, ATP のDA放出は抑制されなかった. しかし, α-methyl-p- tyrosine (α-MPT)の投与によって, ATPの作用が抑制された.
8. GTP, CTP, UTPおよび水解されないATPの誘導体gamma-imidoadenosine 5'-phosphate (AMP-PNP)投与によりDA放出がみられた. 作用はAMP-PNP=GTP=CTP>ATP=UTPの順で強力であった(図6). inorganic pyrophosphate (PPI)投与ではDA放出はみられなかった.

〔考察〕

ATPによるDA放出の強度順序はATP= ADP>AMP>adenosineであり, PC12 cell における結果と一致していた. ATP投与によるDA放出はTTXにより抑制されたことから, voltage-dependent Na^+ channel (VDNC)の関与が示唆された. また, ω-CgTXによって抑制されなかったことからN- type Ca^{2+} channelは介さないことが示唆された. ATPによるDA放出はRB2によって抑制されたことから, ATPがP_{2Y}-purinoceptorを介してDA放出を引き起こしたと考えられた. PTXの前処置によってDA放出が抑制されたので, P_{2Y}-purinoceptorがG蛋白にcoupleしている可能性がある. ATPによるDA放出は完全にCa^{2+}依存性であることから, G蛋白共役系のIP3と無関係であると考えられた. P_{2Y}-purinoceptorはG蛋白共役系を介して, cAMPなどのsecond messengerを介するのか, あるいは直接にion channelに作用する2通りの可能性が考えられた. reserpineによってATPによるDA放出は抑制されなかったが, α-MPTで抑制されたことから, ATPはvesicular stores のDAよりも新しく合成されたDAを放出させると考えられた(5). 水解されないATPの誘導体AMP-PNPも強いDA放出作用がみられ, PPIではDA放出作用がみられなかったことから, ATPがP_{2Y}-purinoceptorに作用して, DA放出を起こすには, nucleotide base とphosphate bondの二つの部分が必要であることが示唆された. 以上の結果からATPは線条体DA系を調節する作用を持っていることが示唆された.

文献

1. Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K., and Takanaka, A. (1989) Neurosci. Lett. 106, 294-299.
2. Sera, D., Efrat, R., and Daphene, A. (1991) J. Biol. Chem. 266, 17990-17994.
3. Chern, Y. J., Herrera, M., Kao, L. S., and Westhead, E. W. (1987) J. Neurochem. 48, 1573-1576.
4. Chan, P., and Delanney, L. E. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 648, 306-308.
5. Philippu, A., and Heyd, W. (1970) Life Sci. 9, 361-373.

図1

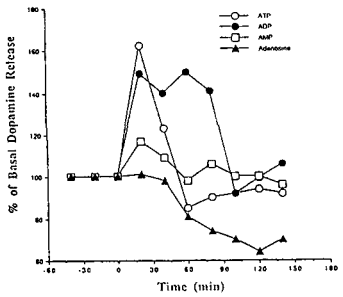


図2

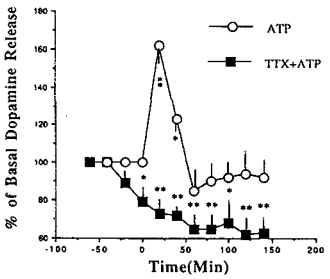


図3

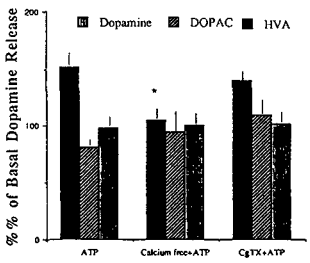


図4

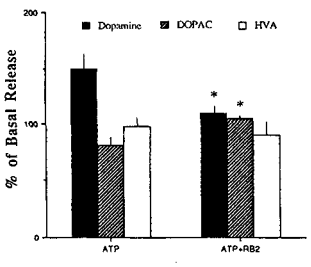


図5

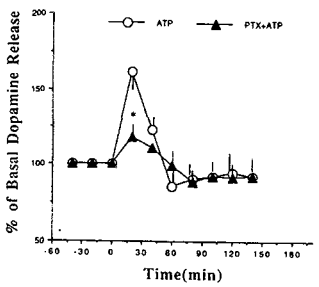
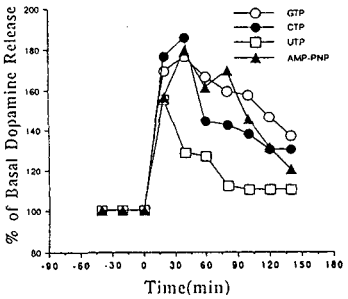


図6



93 脳室脈絡膜及び眼球毛様突起に特異的に発現するラット脳エクト型ホスホジエステラーゼⅠのｃＤＮＡクローニング

成田正明、佐野公彦、中村肇
（神戸大学小児科）

〔要約〕

ラット脳エクト型ホスホジエステラーゼⅠ（EC3.1.4.1）（以下ＰＤ－Ⅰα）のｃＤＮＡをクローニングした。報告されている牛腸ホスホジエステラーゼⅠ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全脳ＲＮＡを用いてＲＴ－ＰＣＲを行った。得られたｃＤＮＡ断片をプローブとしてラット脳ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングし、ＰＤ－Ⅰαの全塩基配列を決定した。また、得られたｃＤＮＡをプローブとしてラット各組織の Northern blotting を行ったところ大脳及び小脳に多量の発現を認めた。さらに得られたｃＤＮＡよりジゴキシゲニン標識ｃＲＮＡプローブを作成し、ラット全脳切片で in situ hybridization を行ったところ脳室脈絡膜上皮細胞及び眼球毛様突起に発現を認めた。

脳においてホスホジエステラーゼⅠ活性を持つ蛋白質の単離の報告はなく、ＰＤ－Ⅰαはその局在から髄液産生、房水産生機構に関与していると考えられる。

（緒言）

細胞膜に存在するエクト型ホスホジエステラーゼⅠ（EC3.1.4.1）は細胞外のＡＴＰを加水分解して5'-AMPに変換し、アデノシン前駆体を生成する。現在のところ、本酵素については牛腸に存在するホスホジエステラーゼⅠの活性部位の部分アミノ酸配列のみ明らかにされているがその全一次構造は明らかでない。また、脳における本酵素は精製されておらずその構造は全く不明である。アデノシンは神経伝達物質として神経細胞に作用するだけでなく、他の多くの組織においても特異的レセプターを介してその機能を調節している。従って脳におけるホスホジエステラーゼⅠの一次構造を決定しその存在及び作用様式を解析することは重要な課題である。また他のアデノシン作働組織においても本酵素ファミリーの存在が示唆される。今回私共はラット脳型ホスホジエステラーゼⅠ（ＰＤ－Ⅰα）のｃＤＮＡクローニングを行い脈絡膜上皮細胞及び眼球毛様突起に特異的に存在することを明らかにし本酵素の生体における機能を考察したので報告する。

（実験方法）

動物実験に際してはペントバルビタル麻酔下で実験を行った。

１）ｃＤＮＡクローニング；既知の牛腸型ホスホジエステラーゼⅠの活性部位の部分アミノ酸配列から対応する塩基配列を混合プライマーとして作成し、ラット全脳ＲＮＡを用いて逆転写酵素－ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）を行って、175bpのクローンを得た。このｃＤＮＡ断片をプローブとしてラット脳ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。長いインサートを含むクローンをベクターにサブクローニングしdideoxy 法で塩基配列を決定した。

２）Northern blotting ；2か月齢雄SD系ラットの各組織、生後5日，20日の大脳、及び培養アストロサイトからグアニジウム塩化セシウム法によりＲＮＡを抽出し１）で得られたｃＤＮＡ(1200bp)をプローブとして，Northern blottingを行った。

３）in situ hybridization ；ｃＤＮＡ(1200bp)をpGEM7Zf(+) にサブクローニングしＴ７及びＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼでセンス及びアンチセンスのジゴキシゲニン標識ｃＲＮＡプローブを作成し、ラット脳及び眼球切片でin situ hybridization を行った。

（結果）

ＰＤ－ⅠαｃＤＮＡをクローニングした。ｃＤＮＡは全長約3500bpで約2200bpの翻訳領域からなる。牛腸型ホスホジエステラーゼⅠの活性部位のアミノ酸配列と77%の相同性を認めた。また、塩基配列上、形質細胞膜に存在する糖蛋白質（ＰＣ－１）と相同性を認めた。ＰＣ－１にはホスホジエステラーゼⅠの活性部位アミノ酸配列を有することが最近報告されている。

Northern blotting ではＰＤ－Ⅰαは大脳と小脳に特異的な約3500ntの転写産物として発現し、小腸、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓では殆ど発現を認めなかった（図１）。発達過程におけるＰＤ－Ⅰα　ｍＲＮＡの大脳での発現をみると日齢とともに増加傾向にあった。また培養アストロサイトには発現を認めなかった。

in situ hybridization では脳室内脈絡膜上皮細胞に特異的に発現を認め、また脳実質血管内皮細胞にも発現を認め

た。しかし、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、及び特定の神経核には発現は認めなかった。眼球では毛様突起及び網膜色素上皮層に発現を認めた（図２）。

（考察）

ホスホジエステラーゼＩ活性部位アミノ酸配列と高い相同性を認めるＰＤ－Ｉαは、in situ hybridization で、脈絡膜上皮細胞に特異的に存在した。脈絡膜上皮細胞は脳脊髄液関門を形成し髄液産生機能、イオンなどの物質交換機能を担うとされているがその詳細な機能は未だ解明されていない。また眼球において毛様突起は房水産生機能を担う。脈絡膜上皮細胞、眼球毛様突起に特異的な発現を認めたことは、本蛋白がホスホジエステラーゼＩ活性を介して髄液房水産生機構に深く関与していることを強く示唆する。

中枢神経系においてアデノシンは前シナプスから放出されたＡＴＰが、シナプス間隙においてアデノシンに変換されると考えられていたが、今回の解析ではＰＤ－Ｉαはアデノシン作働性神経核には発現が見られなかった。この事実はシナプス間隙においては、別のＡＴＰ分解酵素があるのか、あるいは微量のＰＤ－Ｉαが存在するのかは今後の研究課題である。

生体内には細胞外のＡＴＰを基質として産生されたアデノシンが作働する組織は数多くあるがＡＴＰを分解するエクト型ホスホジエステラーゼＩの一次構造は不明であった。今回私共がクローニングしたＰＤ－Ｉαの局在から考えて他の上皮細胞にも特異的なエクト型ホスホジエステラーゼＩが存在すると考えられる。実際に私共はラット腸ｃＤＮＡライブラリーから同様の方法でラット腸特異的ホスホジエステラーゼＩ（ＰＤ－Ｉβ）のｃＤＮＡクローニングに成功している。今後本蛋白が分泌あるいは選択的透過機構にどのように関わっているか検討を行う予定である。

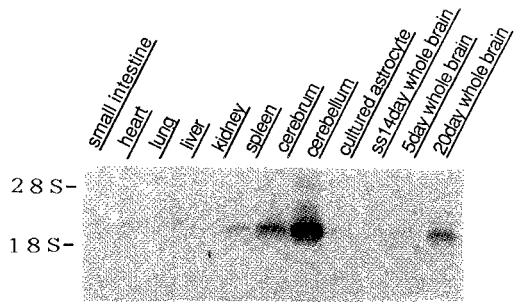
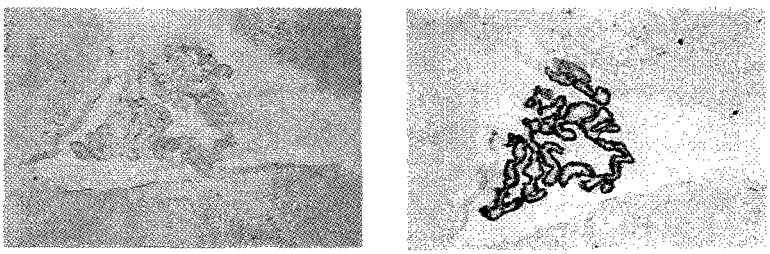


図１．Northern blotting によるＰＤ－Ｉαの組織発現



Ａ；センスプローブ　　Ｂ；アンチセンスプローブ

図２．側脳室脈絡膜上皮細胞におけるＰＤ－ＩαｍＲＮＡの発現

94 ＡＴＰ感受性Ｋ⁺チャネルオープナー、ニコランジールの線条体ドパミン放出に及ぼす影響

田中隆彦・吉田真美・横尾秀康・溝口克弘・江本浩幸・石井秀夫・古賀千尋・田中正敏
（久留米大・医・薬理）

〔要約〕
脳内透析法を用いてラット線条体でのdopamine (DA) autoreceptorを介するDA放出調節機構におけるATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) の役割を検討した。K_{ATP} blockerのquinine(QIN,10^{-3}M)またはDA D2 receptor antagonist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、両薬物ともに線条体のDA放出を有意に増加させた。K_{ATP} opener のnicorandil(NIC,10^{-5},10^{-4},10^{-3}M) を同様にして線条体に局所投与すると、線条体DA放出は用量依存的に減少した。NIC (10^{-3}M) を線条体に投与しながら、QIN(10^{-3}M)または SLP (10^{-5}M)を同部位に投与すると、QIN とSLP によるDA放出の増加はそれぞれ有意に抑制された。これらの結果は線条体においてK_{ATP}の抑制がDA放出を増加させ、逆にK_{ATP}の活性化がDA放出を抑制することを示している。さらにNIC がSLP によるDA放出を抑制したことから、線条体のDA autoreceptor によるDA放出の抑制は、K_{ATP}の活性化を介して生じることが示唆された。

（緒言） 黒質のdopamine (DA) autoreceptorはK^+ channelを活性化し、DAの発火頻度を抑制している(2) 。線条体DA神経終末に存在するDA autoreceptor によるDA放出調整にもK^+ channelが関与しているという報告があるが(5)、そのK^+ channelの種類はまだ明白にされていない。ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) は虚血や低酸素などで細胞内 ATP が減少すると開口するK^+ channelであるが、今回K_{ATP} opener のnicorandil (NIC)とK_{ATP} blocker のquinine (QIN) 、DA D2 receptor antagonist のsulpiride (SLP) を透析膜を介して線条体に投与し、K_{ATP}の線条体DA autoreceptor を介するDA放出調節に対する役割について、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)の線条体 (A:+0.5 mm, L:2.5 from bregma, V:-5.5 from dura) にU字型 probeを植え込み、手術２日後にRinger液(140 mM NaCl, 1.26 mM $CaCl_2$, 3.35 mM KCl, 1.15 mM $MgCl_2$, pH 7.2) を 2.5 μl/ minで灌流し、20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。薬物はすべてRinger液中に溶解し、線条体に局所投与した。SLP(10^{-5}M)、QIN(10^{-3}M) は透析液中のDAレベルが安定してから線条体に１時間それぞれ灌流した。NIC は10^{-5}M 、10^{-4}M 、10^{-3}Mと低濃度から高濃度に各１時間、連続して線条体に投与した。別の実験で、NIC(10^{-3}M)を１時間投与後にNIC 灌流下にSLP(10^{-5}M)またはQIN (10^{-3}M) をさらに１時間投与した。統計学的検定は各薬物のDA放出の経時的変化に及ぼす影響についてはone-way ANOVA とNewman-Keuls test を用い、NIC のSLP またはQIN によるDA放出増加への抑制効果についてはStudent's t-testを用いた。

（結果） NIC (10^{-5}-10^{-3}M)を線条体に局所投与すると、線条体からのDA放出はいずれの濃度においても有意に減少し、用量依存性を認めた。NIC によるDA放出の最小値は10^{-3}M で出現し、基礎値の52% であった（図１）。QIN (10^{-3}M) を線条体に局所投与すると線条体からのDA放出は有意に増加し、最大放出はQIN 投与第１サンプルで出現し、基礎値の310%であった（図２）。SLP(10^{-5}M)の線条体投与によりDA放出は時間とともに有意に増加し、最大放出はSLP 投与最終サンプルで認め、基礎値の205%であった（図３）。NIC(10^{-3}M)存在下にQIN(10^{-3}M)またはSLP (10^{-5}M) を投与すると、QIN によるDA放出の最大値は188%に減少し、SLP ではDA放出増加は全く認めず、QIN とSLP によるDA放出増加はNIC により有意に抑制された（図２，３）。

（考察） K_{ATP} は心筋 (4)と膵臓のβ細胞 (1)で発見されたK^+ channelであるが、脳内では海馬、視床下部、黒質

淡蒼球、大脳皮質に存在する（3）。しかし、線条体におけるK_{ATP}の存在やDA神経機能との関係はまだ不明である。著者らは、K_{ATP} blockerのQINを線条体に投与すると同部位よりのDA放出が用量依存性に増加することを報告したが（5）、今回の実験ではK_{ATP} openerのNICを線条体に局所投与すると、同部位でのDA放出は用量依存性に減少することを示した。さらに、QINによるDA放出の増加は、NICにより有意に抑制された。このことは、線条体においてK_{ATP}の抑制がDA放出を増加させ、逆にK_{ATP}の活性化がDA放出を阻止すること、QINによるDA放出の増加は、線条体のK_{ATP}の抑制を介して生じていること、さらに線条体にもK_{ATP}が存在する可能性を示唆している。DA D2 antagonistのSLPの線条体局所投与により同部位からのDA放出が増加したのは、SLPが線条体神経終末にあるDA autoreceptorの機能を阻止したためと考えられる（6）。NICはこのSLPによるDA放出増加を完全に抑制した。このことは、SLPによるDA autoreceptorの機能抑制は、NICによりK_{ATP}が活性化されることで完全に阻止されることを示している。以上のことから、ラット線条体において、DA autoreceptorによるtonicなDA放出抑制はK_{ATP}の活性化を介して生じることが示唆された。

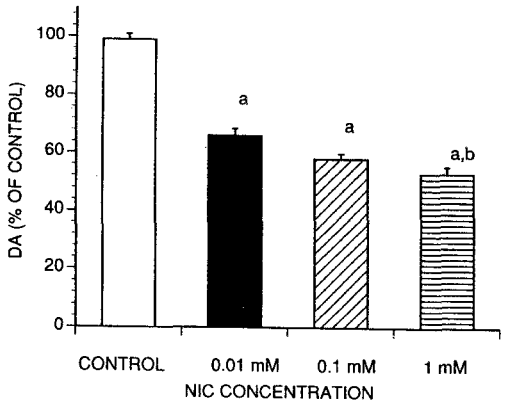


Fig.1 Effects of various doses of nicorandil (NIC) on DA release in the rat striatum. Only the maximum decrease of DA was given. (n=4) a:p<0.01 vs CONTROL, b:p<0.05 vs 0.01 mM NIC

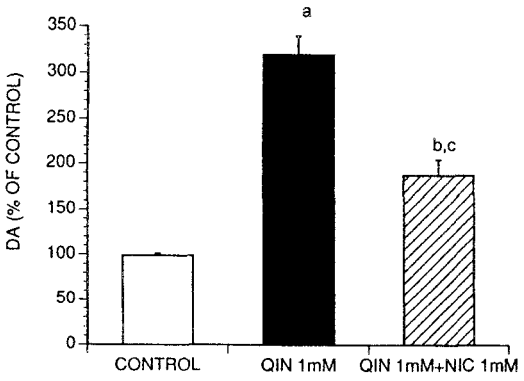


Fig.2 Effects of nicorandil(NIC) on quinine (QIN)-induced increases in DA release in the rat striatum. Only the maximum increase of DA was given. (n=4) a:p<0.01 vs CONTROL, b<0.05 vs CONTROL, c:p<0.01 vs QIN

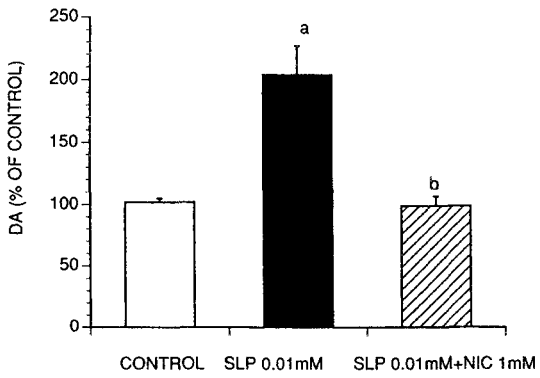


Fig.3 Effects of nicorandil (NIC) on sulpiride (SLP)-induced increases in DA release in the rat striatum. Only the maximum increase of DA was given. (n=4) a:p<0.01 vs CONTROL, b<0.01 vs SLP

(文献)

(1) Aschcroft,F.M. et al. (1988) Ann.Rev. Neurosci. 11,97-118. (2) Lacey,M.G. et al. (1987) J.Physiol. 392, 397-416. (3)Mourre,C. et al.(1989) Brain Res. 486, 159-164. (4) Noma,A. (1983) Nature 305,147-150. (5) Tanaka,T. et al.(1992) J.Neurochem. 59, 1640-1645. (6) Westerink,B.H.C. and De Vreis J.B. Neurosci.Lett. 99,197-202.

95 側坐核Dopamine遊離に及ぼすBenzodiazepine受容体Agonistおよびinverse-agonistの効果

富山勝則，村井為敦*，越川意明，小林雅文
（日本大・歯・薬理，歯科麻酔*）

〔要約〕

脳微小透析法を用いてラットにbenzodiazepine(BZ)受容体agonistのmidazolamおよびinverse agonistのβ-carboline-3-carboxylate ethyl ester（β-CCE）を投与した際の側坐核細胞外液中dopamine（DA）動態について検討した。側坐核のDA遊離はmidazolam（0.075, 0.15 mg/kg i.v.）の投与により用量依存的にして減少したが，β-CCE（3, 10 mg/kg i.p.）の投与では逆に用量依存的に増加した。BZ受容体antagonistのflumazenil（6μg/kg i.v.）はそれ自身側坐核のDA遊離に対して効果を示さなかったが，midazolamおよびβ-CCEの効果を完全に抑制した。BZはadenosineの再取り込みを阻害する作用が知られているので，midazolamの効果におけるadenosine系の関与について検討した。その結果midazolamの効果はA_1受容体antagonistの 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine（CPDX）によって抑制されなかった。またβ-CCEがA_2受容体のantagonistでもあることから，A_2 antagonistの 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine（DMPX）を用いて実験を行ったが，DMPXにはβ-CCEのようなDA遊離増加作用は認められなかった。以上の結果，midazolamとβ-CCEによる側坐核DA遊離の調節はGABA／BZ受容体複合体を介したものであることが示唆された。

演者らは既にBZ系薬物のmidazolamやflunitrazepamが線条体においてDA遊離を用量依存的に抑制することを報告した(4)。しかしBZ系薬物によるDA遊離の抑制は線条体よりもむしろ側坐核において著明に認められることが報告されている。そこで今回は側坐核のDA遊離調節機構におけるBZ受容体の役割についてそのagonistの midazoalmとinverse agonistのβ-CCEを用いて実験を行った。また，BZの作用にadenosine系が関与する可能性が指摘されている(2)ので，adenosineA_1およびA_2受容体のantagonistを用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（50 mg/kg i.p.）麻酔下で，Paxinos & Watson (1) のアトラスに従いガイドカニューレを片側の側坐核（A:10.6 mm, L:1.5 mm, V:4.0 mm from interaural line)および線条体（A:9.2mm, L:3.0 mm, V:7.0 mm）に挿入固定した。手術7日後に直管型プローブ（エイコム社製；透析膜長2 mm(側坐核用)，3 mm（線条体用），カットオフ分子量 50,000）をガイドカニューレに装着固定した。Ringer液（NaCl 147.0 mM, KCl 4.0 mM, $CaCl_2$ 1.2 mM, $MgCl_2$ 1.1 mM, pH 6.0）を2μl／min の流速で3時間以上灌流し，回収されるDAの量が安定した後，灌流液の交換または薬物の投与を行った。薬物の投与はあらかじめ片側の総頸静脈に留置しておいたカテーテルより行った。また薬液が懸濁液である場合には腹腔より投与した。回収した灌流液は25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を定量した。Ringer液で灌流し安定した時点の3回分の平均値を100%として各時点の値を表した。有意差の検定にはpaired t-testを用い，薬物投与直前の値に対して検定を行った。また群間の比較にはtwo-way ANOVA を用いた。

〔結果および考察〕

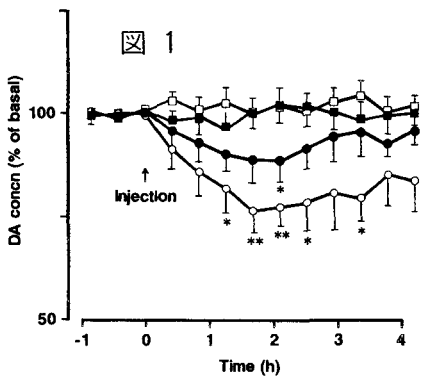
図1に示すようにmidazolamの投与によって側坐核DA遊離は用量依存的に減少した。Midazolamの投与量は静脈鎮静法に使用される0.075 mg/kgと全身麻酔導入量の0.15 mg/kgとした。DA遊離減少の程度は演者らが既に報告した線条体での減少とほぼ同じであった。またこの効果はantagonistであるflumazenil（6μg/kg i.v.）の併用によって完全に抑制されるが，flumazenilの単独投与では側坐核DA遊離に変化は認められなかった。一方，inverse agonistであるβ-CCE（3, 10 mg/kg i.p.）の投与は図2に示すように側坐核のDA遊離を用量依存的に増加させた。また，この効果もfluma-

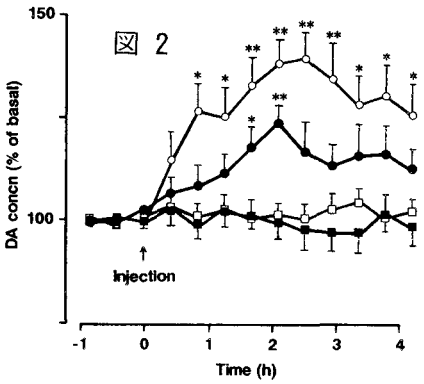
zenilの併用によって完全に抑制された。しかし，線条体においてはβ-CCEによるDA遊離の増加は認められなかった。

以上のように BZ受容体の agonistと inverse agonistが側坐核DA遊離に関してお互いに逆の効果を示し，それらの効果が共にantagonistによって抑制されるという本実験の結果は，一般的に理解されているBZ受容体の性質，すなわちBZ agonistはCl^-コンダクタンスを増加し，inverse agonistは逆にそれを減少し，antagonistはそれ自身は無効であるがagonistとinverse agonist の効果を抑制することと一致するものである。したがって側坐核のDA遊離におけるこれらの薬物の効果は$GABA_A$／BZ受容体を介したものであると考えられる。近年，BZ系薬物の複雑な作用様式にはadenosine系への効果が関係しているのではないかとの考え方が提唱されている(2)。すなわちBZは adenosineの再取り込みを阻害し，その結果増加したadenosineがadenosine A_1受容体を介して一定の効果を示すというものである(5)。そこでmidazolamによる側坐核DA遊離の減少がadenosine A_1受容体 antagonistの併用により抑制されるか否かを検討した。その結果図３に示すとおり，A_1 antagonist の CPDXの併用により midazolamの効果は影響を受けなかった。さらにβ-CCEはA_2 antagonistとしての作用も報告されているので(3)，A_2 antagonistの DMPX がβ-CCE と同様のDA遊離の増加を起こすか否かについても検討した。しかし図３に示すとおり DMPX にそのような作用は認められなかった。以上の結果より，midazolamとβ-CCEによる側坐核DA遊離の調節は$GABA_A$／BZ受容体複合体を介したものであり，このことは側坐核のDA遊離がin vivo におけるBZ受容体機能の研究に利用できる可能性を示唆するものである。

〔文献〕

(1) Paxinos, G. & Watson, C. (1986) The Rat Brain in StereotaxicCoordinates, Academic Press. (2) Phillis, J.W. & O'regan, M.H. (1988) Trends in Pharmacol. Sci., 9, 153-154. (3) Seale, T.W.,et al., (1988) Life Sci., 43, 1671-1684. (4) Takada, K., et al. (1992) Brit. J. Anaes., 70, 181-185. (5) Wood, P.L., et al., (1989) Neuropharmacology 28, 21-25.





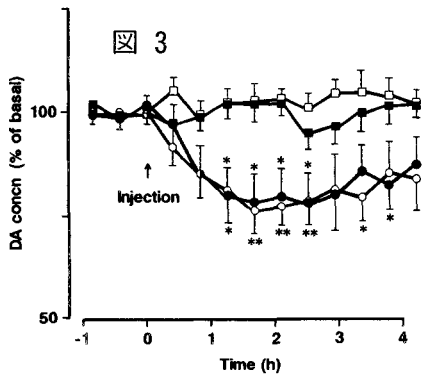


図1 Effects of midazolam and flumazenil on the DA release from the nucleus accumbens. ● = midazolam 0.075 mg/kg; ○ = midazolam 0.15 mg/kg; □ = flumazenil 6 μg/kg; ■ = midazolam 0.15 mg/kg + flumazenil 6 μg/kg. *P < 0.05; **P < 0.01 (paired t test, n = 6).

図2 Effects of β-CCE and flumazenil on the DA release from the nucleus accumbens. ● = β-CCE 3 mg/kg; ○ = β-CCE 10 mg/kg; □ = flumazenil 6 μg/kg; ■ = β-CCE 10 mg/kg + flumazenil 6 μg/kg. *P < 0.05; **P < 0.01 (paired t test, n = 6).

図3 Effects of midazolam, CPDX and DMPX on the DA release from the nucleus accumbens. ○ = midazolam 0.15 mg/kg; □ = CPDX 25 mg/kg; ● = midazolam 0.15 mg/kg + CPDX 25 mg/kg; ■ = DMPX 1 mg/kg. *P < 0.05; **P < 0.01 (paired t test, n = 6).

96 amantadineによるdopamine放出機序

高橋哲也, 山下拓史, 張玉祥, 北村健, 鳥居剛, 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は, 細胞外液Caの存在下において, 濃度依存的に線条体細胞外液のdopamine(DA)濃度を上昇させた. また同時に, amantadineは濃度依存的に線条体細胞外液のglutamate(Glu)濃度も増加させた. そしてDAの放出はω-conotoxin GVIAにより抑制されなかったが, NMDA receptorのchannel blockerであるMK-801によって抑制された. このことからamantadineによるDAの放出はN-type voltage-sensitive Ca channelは介さず, NMDA receptorを介すると考えられた. 線条体においてGluはDA神経終末でDAの放出を促進し, また, D_1およびD_2 receptor刺激はGluを増加させることが知られている. amantadineによるDAの放出はこのcascadeによって間接的にNMDA receptorを介して行われ, またこのcascadeによってDAの放出が増強されている可能性が示唆された.

〔はじめに〕
昨年, われわれは本学会においてN-methyl-D-aspartate (NMDA) receptorのchannel blockerである(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a, d] cyclohepten-5, 10-imine maleate (MK-801)がamantadineによるdopamine (DA)放出を抑制することを報告した. 線条体には, 前頭葉皮質からのglutamate (Glu) neuronと黒質からのdopamine neuronの投射を受け(1), 両者の神経終末は相互に調節作用を持つ. 今回われわれはamantadineがラット線条体のDA系およびGlu系に与える影響をin vivo microdialysis法を用いて検討した.

〔方法〕
1) Microdialysis
実験にはWistar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, NARISHIGE)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, EICOM)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2 μl/minの速度で灌流した.
2) 線条体灌流液中のDAの測定
DA, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA)を逆相カラム(MA-ODS, EICOM)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. 線条体灌流液をautoinjector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.
3) 線条体灌流液中Gluの測定
Gluの測定はプレラベル誘導体化法により行った. o-phthalaldehide (OPA) 54mgをethanol 1mlで溶解し, 炭酸buffer(0.1M Na_2CO_3-HCl, pH 9.5)で10mlとし, この溶液2.5mlに対し2-mercaptoethanol 10 μlを加え, 炭酸bufferで10倍希釈して4 mM OPA誘導体化試薬を作製した. 灌流液30 μlに4 mM OPA誘導体化試薬10 μlを加えて混和して2.5分間反応させた後, HPLC-ECDに注入した. 移動相は30% methanol-0.1M リン酸buffer (0.1M NaH_2PO_4 : 0.1M Na_2HPO_4 = 6.25 : 1, pH 6.0), カラムは逆相カラム(MA-ODS)を用い, 流速は1.0 ml/min, 温度は30℃に設定した.
4) 薬物投与
薬物投与はprobeを挿入後, 約4時間Ringer液を灌流し, 各濃度が安定したことを確認した後に行った. 薬物はRinger液に溶解しpHを生理的条件に調整し, これを灌流することによる脳内投与を行った. 薬物投与は以下の方法で行った.
(1) 10^{-7}～10^{-3} Mのamantadineを20分間灌流した.
(2) MK-801 (75 μM)を20分間灌流した後, amantadine (1mM)を20分間灌流した.
(3) ω-conotoxin GVIA (ω-CgTX) (100nM)を60分間灌流した後, amantadine(1mM)を20分間灌流した.
(4) *Ca free Ringer*液にて*amantadine* (1mM)を20分間灌流した.
結果における統計学的有意差の検定は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の投与により，線条体細胞外液のDA濃度は濃度依存的に有意に上昇した．(図1)

3) amantadineの投与により，線条体細胞外液のGlu濃度は濃度依存的に有意に上昇した．(図2)

2) amantadineによるDA濃度上昇はCa存在下でみられ，ω-CgTXの投与によって抑制されなかったが，MK-801の投与によって抑制された．(図3)

〔考察〕

amantadineは抗パーキンソン病薬として広く用いられ，その薬理作用は神経終末のcatecholamine放出作用(2)，tyrosine hydroxylase活性促進作用(3)，dopamine β-hydroxylase活性抑制作用(4)，DA再取り込み阻害作用(5)が報告されている．今回われわれの実験では，amantadineは細胞外液Caの存在下において，濃度依存的に線条体細胞外液のDA濃度を上昇させた．また同時に，amantadineは濃度依存的に線条体細胞外液のGlu濃度を増加させた．そしてamantadineによるDA放出はMK-801の投与によって抑制された．MK-801は選択的にNMDA receptorをblockする(6, 7)ことから，amantadineによるDAの放出はNMDA receptorを介すると考えられた．また，amantadineによるDA放出は，ω-CgTXにより抑制されなかったことから，N-type voltage-sensitive Ca channelを介さないことが示唆された．

線条体においてGluはDA神経終末でDAの放出を促進し，GluのDA神経終末への直接作用，多シナプスを介しての作用が想定されている(8, 9)．また，線条体においてD1およびD2 receptor刺激によりGluが増加することが知られており(10, 11)．このことから，線条体においてDAはGluの放出を，GluはDAの放出を相互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の放出はこのcascadeによって間接的にNMDA receptorを介して行われ，cascadeによってDAの放出が増強されている可能性が考えられた．

図1

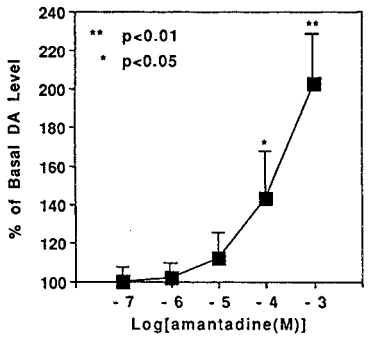


図2

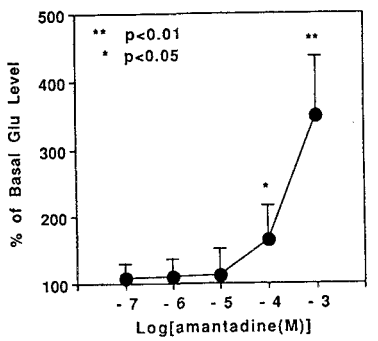
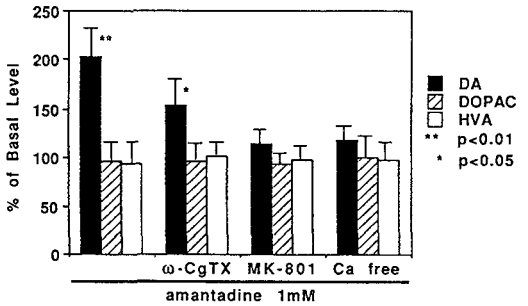


図3



文献

1. Freund, T., Powell, J. and Smith, A. (1984) Neuroscience.13, 1189-1215
2. Thornburg, J. E. and Moore, K. E. (1973) Res. Comm. Chem. Path. Pharm. 5, 81-85
3. Stromberg, U., Svensson, T. H. and Waldeck, B. (1970) J. Pharm. Pharmaol. 22, 959-961
4. Scatton, B., Cheramy, A., Besson, M. J. and Glowinski, J. (1970) Europ. J. Pharmacol. 13, 131-135
5. Stromberg, U. and Svensson, T. H. (1971) Acta. Pharmacol. (1971) 30, 161-165
6. Vignon, J., Pinet, V., Cerruti, C., Kamenka, J. M. and Chicheportiche, R. (1988) Eur. J. Pharmacol. 148, 427-436
7. 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
8. Roberts, P. J. and Anderson, S. D. (1979) Neurochem. 32, 1539-1545
9. Chesselet, M. F. (1984) Neuroscience. 12, 347-375
10. Reid, M. S., Herrera, M. M., Kehr, J. and Ungerstedt, U. (1990) Acta. Physiol. Scand. 140, 527-537
11. Deris, J., Dwoskin, L. and Zahniser, N. (1988) Synapse. 2, 450-456

97　ＮＢＱＸ投与がラット線条体の細胞外ドパミンにおよぼす影響

坂井研一＊、土田和生＊＊、氏家寛＊＊、柏原健一＊、秋山一文＊＊
黒田重利＊＊（＊岡山大・医・神経内科、＊＊精神科・神経科）

〔要約〕
線条体ドパミン代謝に非ＮＭＤＡ受容体が及ぼす影響を調べるために、マイクロダイアリーシス法を用い、ＡＭＰＡ受容体の選択的拮抗薬である2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline (NBQX)をラットに腹腔内投与して線条体の細胞外 dopamine (DA)とその代謝産物である 3,4-dihy-droxyphenylacetic acid (DOPAC)濃度を経時的に測定した。　ＮＢＱＸを腹腔内投与したところＤＡレベルは緩徐に低下し、溶媒投与に比べて有意に減少した。ＮＢＱＸ２０ｍｇ／ｋｇ群とＮＢＱＸ４０ｍｇ／ｋｇ群の比較では後者の方が有意により低下しており用量依存性があった。ＤＯＰＡＣレベルには変動は見られなかった。以上のことからＡＭＰＡ受容体が線条体ドパミン代謝の調節を行っている可能性が示された。

〔緒言〕
従来よりグルタミン酸の投与によって脳組織からのドパミン放出が促されることが報告されており、ドパミン代謝に中枢グルタミン酸ニューロンが関与する可能性が推定されている。近年グルタミン酸受容体の１つであるＮＭＤＡ受容体が注目され、この受容体を介する調節作用が検討されてきたが、ＮＭＤＡ受容体遮断下ではコカインやアンフェタミン反復投与動物でのドパミン系過感受性形成が抑制されるとする報告[2]も見られる。しかし一方では、抑制作用は競合性及び非競合性ＮＭＤＡ拮抗薬のどちらにおいても全く見られないという報告[4]もあり一定していない。ドパミン代謝への影響についてわれわれは、非競合性NMDA受容体拮抗薬であるMK-801投与により脳内ＤＡ放出が減少することを報告した[3]が、逆に増加を示す報告もある。またＮＭＤＡ投与により必ずしもＤＡ放出が促されないことからグルタミン酸ニューロンによるドパミンニューロン調節作用にはＮＭＤＡ受容体以外のサブタイプがより関与している可能性を指摘するものもある[1,5]。2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline (NBQX)は、選択的なＡＭＰＡ受容体拮抗薬として開発され、その抗虚血・抗痙攣作用が報告されている。そこで今回はＮＢＱＸを用いてＡＭＰＡ受容体のドパミン系への影響を検討した。

（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 Pellegrinoらのアトラスに従いＵ字型透析プローブを左側線状体（A : 2.4mm ,L : 3.0mm from bregma , V : 5.9mm from dura ）に挿入固定した。透析用プローブは、エチレンビニルアルコール製の血漿交換用透析膜を（molecular weight cut off 75,000)使用した。予備実験ではＮＢＱＸ２０ｍｇ／ｋｇ腹腔内投与にて移所行動の抑制を、ＮＢＱＸ４０ｍｇ／ｋｇでは著明な移所行動の抑制を認めており今回の実験での投与量とした。ラットを無作意に３群に分け（ Vehicle群 N=4,NBQX20mg/kg群 N=4,NBQX40mg/kg群 N=5 ）手術翌日に、Vehicle、ＮＢＱＸ２０ｍｇ／ｋｇ、ＮＢＱＸ４０ｍｇ／ｋｇを腹腔内投与した。プローブを人工脳脊髄液（ Na^+ 140mM, K^+ 3.35mM, Ca^{2+} 1.26mM, Mg^+ 1.15mM, Cl^- 151mM, PH 6.5）を潅流液として２μｌ／ｍｉｎで潅流し、潅流液は２０分毎に採取した。採取された潅流液から、電気化学検出器を組み合せた高速液体クロマトグラフィーにより線条体の細胞外ＤＡとその代謝産物であるＤＯＰＡＣを測定した。投与前の３本の潅流液の濃度の平均を基礎値として、投与後３時間の濃度変化を基礎値に対する％で示した。各時間における群間の比較には２元配置分散分析を用いた。

（結果および考察）

Fig.1.に示すようにＮＢＱＸを腹腔内投与したところＤＡレベルは緩徐な低下を示した。このＤＡレベルの低下は投与後１６０分に最大となりＮＢＱＸ２０ｍｇ／ｋｇ及び４０ｍｇ／ｋｇ投与群ではそれぞれ-23.4%、-36.6%でありこれらは溶媒群より有意に低かった。（ＮＢＱＸ２０ｍｇ／ｋｇ：$F(1,53)=6.48$ $P<0.05$，ＮＢＱＸ４０ｍｇ／ｋｇ：$F(1,59)=30.55$ $P<0.001$）ＮＢＱＸ２０ｍｇ／ｋｇ群とＮＢＱＸ４０ｍｇ／ｋｇ群の比較では後者の方がより有意に（$F(1,60)=11.446$ $P<0.005$）低下しており用量依存性が見られた。ＤＯＰＡＣレベルには有意な変動は見られなかった。細胞外ＤＡ放出に興奮性アミノ酸が関与していることは知られているが、線条体のＤＡ神経終末にはＡＭＰＡ受容体は存在するがＮＭＤＡ受容体は存在しないという報告もあり、ＤＡ放出調整においてＡＭＰＡ受容体の果たす役割はＮＭＤＡ受容体よりも重要である可能性がある。今回の実験でもＡＭＰＡ受容体の特異的な拮抗薬であるＮＢＱＸを腹腔内投与することで線条体のＤＡレベルが明かに低下を示したことからＡＭＰＡ受容体を介してＤＡ放出が調整されている可能性が考えられた。

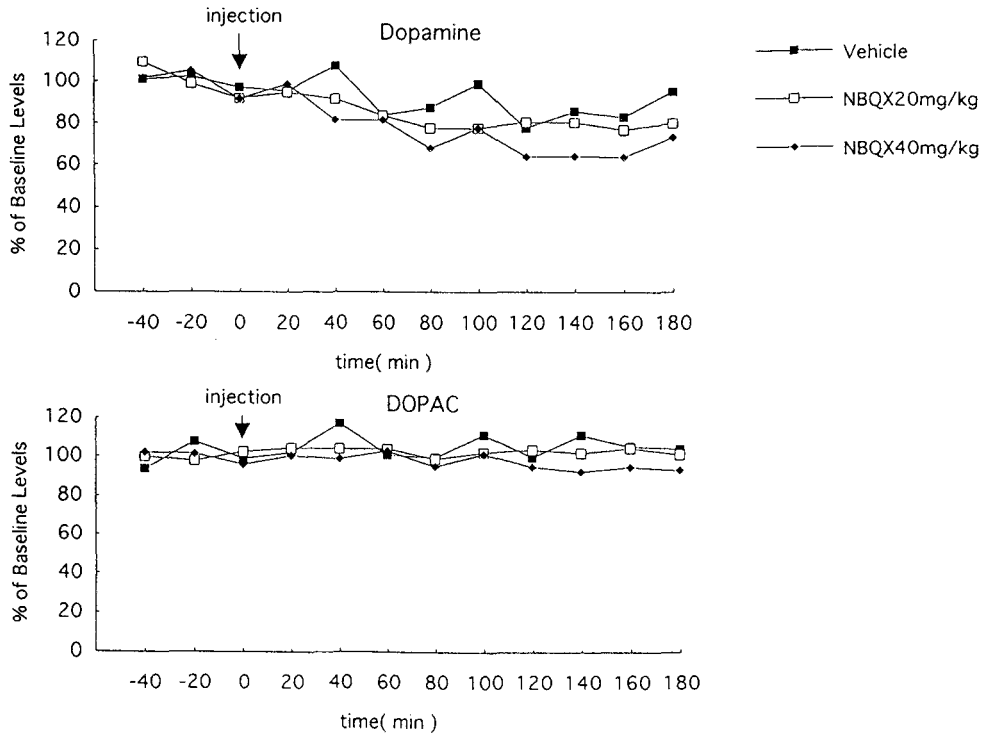


Fig.1. Time course and dose-response of stiatal extracellular levels of DA and DOPAC following systemic treatment with vehicle (i.p.) or NBQX (20,40mg/kg,i.p.).

〔文献〕

1) Imperato,A. et al (1990) Brain Reserch,530,223-228.
2) Karler,R. et al. (1989) Life Sci.,45,599-606.
3) Kashihara,K. et al. (1990) Brain Reserch,528,80-82.
4) Ujike,H.et al. (1992) Life Sci.,50,1673-1681.
5) Westerink,B.H.C. et al. (1992) Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol ,345,523-529.

98 nicotineのdopamine uptakeに対する影響

山下拓史[1], 高橋哲也[1], 張玉祥[1], 北山滋雄[2], 土肥敏博[2], 川上秀史[1], 中村重信[1]
(広島大・医・第三内科[1], 歯・薬理[2])

〔要約〕
nicotineがdopamine uptakeに与える影響をPC12細胞およびdopamine transporterを発現させたCOS細胞を用いて検討した. dopamine transporterを発現させたCOS細胞ではnicotineはdopamine uptakeに対して影響を与えなかった. PC12細胞ではnicotineの投与によりdopamine uptakeは抑制された. βNGF処理により分化したPC12細胞では, より低濃度(10^{-7}～10^{-3} M)のnicotineで顕著にdopamine uptakeが抑制された. またnicotinic acethylcholine receptorのinhibitorであるhexamethonium(500 μM)の前投与によりnicotineのdopamine uptake抑制作用は完全に拮抗された. このことから, nicotineはnAChRを介してdopamine uptakeを抑制すると考えられた.

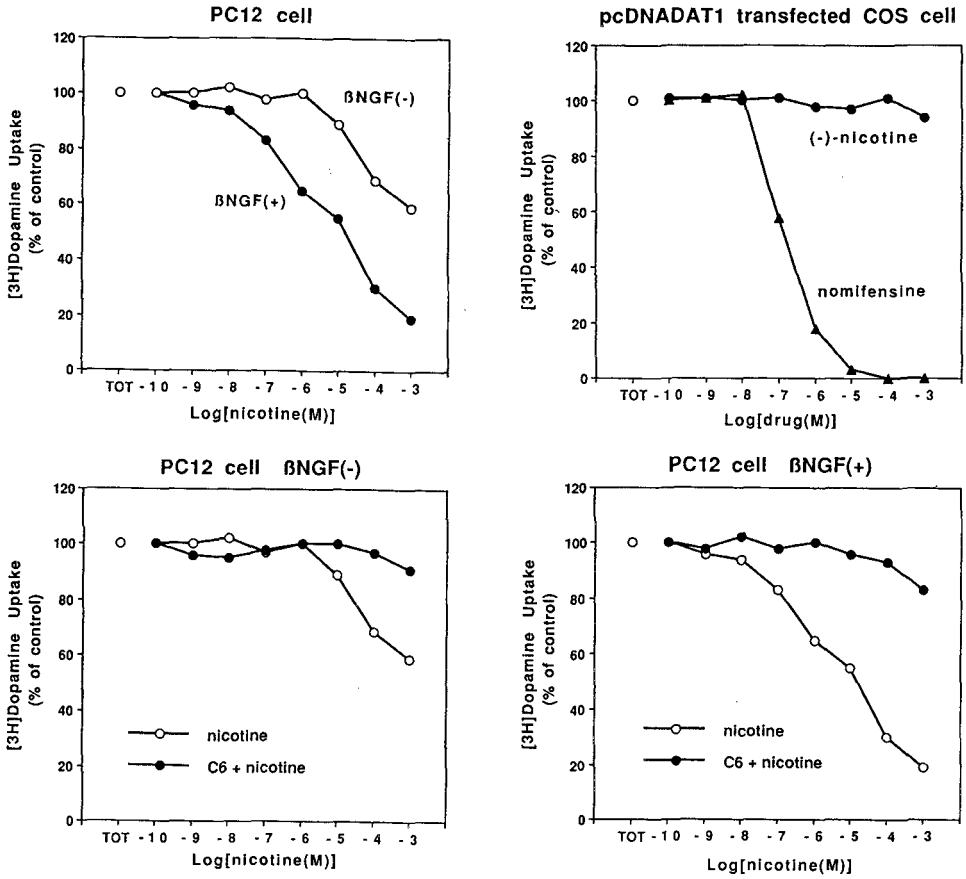
〔はじめに〕
nicotineは習慣性のある物質で広く用いられているが, nicotineの作用は完全にはわかっていない. nicotineはラット線条体のスライス(1, 2, 3), シナプトソーム(4, 5)およびin vivo microdialysis(6)の実験によりdopamine(DA)放出を促進することが知られている. しかし, DA再取り込みについてはラット線条体スライスを用いた実験からreceptorを介した再取り込み阻害作用が推測されているが, 明らかではない(7). そこで今回われわれはdopamine transporter(DAT)を発現させたCOS細胞とPC12細胞を用いてnicotineがDA取り込みに与える影響について検討した.

〔方法〕
1) 細胞培養
実験にはCOS-7細胞とPC12細胞を用いた. PC12細胞は, 5%牛胎児血清と10%馬血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)中で, 37℃, 10%CO_2存在下に培養した. 1x10^7のPC12細胞を24wellプラスチックプレートに播き, 翌日実験に供した. PC12細胞を分化させる時にはβNGF(50ng/ml)を加えた培地で培養し, 2日毎に培地交換を行い, 7日間培養した後, 実験に供した. COS-7細胞は10%牛胎児血清を含むDMEM中で, 37℃, 5%CO_2存在下に培養した.
2) 遺伝子導入
北山らの方法(8)に従い, 1x10^7のCOS-7細胞を800 μlのHEBSに分散させ, rat DAT cDNAを組み込んだexpressin vectorであるpcDNADAT1(6.7 pmol)を加え, 遺伝子導入装置(FTC-64, SHIMAZU)を用いてelectroporation(200V, 1600 μF)を行った. 室温で10分間静置した後, 10%牛胎児血清を含むDMEMに分散させ, 24wellのプラスチックプレートに播き, 3日間培養した後, 実験に供した.
3) [^{3}H]DA uptake
pcDNADAT1をtransfectしたCOS細胞とPC12細胞とも各wellから培養液を取り除き, Krebs-Ringer HEPES (KRH) buffer (5.6 mM glucose, 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM potasium phosphate, 1.3 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 1 mM sodium ascorbate, 25 mM HEPES, pH 7.3)で3回洗浄した後, 各wellにKRH buffer 1mlを入れた. (-)-nicotine(10^{-10}～10^{-3} M)と15 nMの[^{3}H]DAを加え, 37℃で10分間incubateした. 氷冷したKRH bufferを加えることにより反応を中止させ, KRH bufferで3回洗浄した. 細胞に取り込まれた[^{3}H]DAは1N NaCl 250 μlと1N HCl 250 μlにて溶解し液体シンチレーション測定器で放射活性を測定した. 非特異的なDA取り込みを除外するため, Naをcholine Clに替えたNa free KRH bufferを用いて同様の実験を行ない, 両者の差を実際の取り込みとした. なお, PC12細胞は実験の12時間前にreserpine(10 μM)を加えて培養し, nicotine投与(10^{-4}M)によるDA放出が起こらないことをHPLC-ECDを用いて確認した.

〔結果〕
1) pcDNADAT1 transfected COS細胞では(-)-nicotine 10^{-10}～10^{-3} MでDA uptake阻害作用はみられなかった.
2) 未分化なPC12細胞では10^{-5}～10^{-3} Mで軽度のDA uptake阻害作用を認めた. βNGFで分化させたPC12細胞では10^{-7}～10^{-3} Mでdopamine uptake阻害作用を認めた.
3) 未分化なPC12細胞でhexamethonium(500 μM)を加えたところ, DA uptake阻害作用作用は抑制された.
4) β-NGFで分化させたPC12細胞でhexamethonium(500 μM)を加えたところ, dopamine uptake阻害作用作用は抑制された.

〔考察〕

nicotineはDATを発現させたCOS細胞ではDA uptakeに対して影響を与えなかった. このことから, nicotineはDATに直接作用しないことが明らかとなった. 一方, 未分化なPC12細胞では高濃度のnicotine投与によりDA uptakeは軽度抑制された. βNGFにより分化したPC12細胞では, より低濃度でdopamine uptakeが抑制された. またnicotinic acetycholine receptor(nAChR)の阻害薬であるhexamethoniumの前投与によりnicotineの阻害作用は完全に抑制された. このことから, nicotineはnAChRを介してDA uptakeを抑制すると考えられた. この機序としては2通りが考えられた. DAはDA神経終末において細胞内外のNa濃度差に依存して取り込まれる(9, 10). nicotine刺激によりNaの細胞内への流入が増大し, 細胞内外のNa濃度差が低下した結果, 取り込みが抑制された可能性が考えられた. また, nAChR刺激により細胞内に流入したCaによって細胞内のリン酸化が促進し, transporterがリン酸化されたためにuptakeが抑制された可能性が考えられた(11). βNGF処理はこうしたnicotineの間接的なtransporter抑制作用を修飾したものと考えられた.



文献

1. Westfall T. C. (1974) Neuropharmacology 13, 693-700.
2. Giorgueff M. F., Le Floc'h M. L., Glowinski J., and Besson M. J. (1977) J. Pharmacol. Exp. Ther. 200, 535-544.
3. Arqueros L., Naquira D., and Zunino E. (1978) Biochem. Pharmacol. 27, 2667-2674.
4. Sakurai Y., Takano Y., Kohjimoto Y., Honda K., and Kamiya H. (1982) Brain Res. 242, 99-106.
5. Rapier C., Lunt G. G., and Wonnacott S. (1988) J. Neurochem. 50, 1123-1130.
6. Damsma G., Westerink B. H. C., de Vries J. B., and Horn A. S. (1988) Neurosci. Lett. 89, 349-354.
7. Izenwasser S., Jacocks H. M., Rosenberger J. G., and Cox B. M. (1991) J. Neurochem. 56, 603-610.
8. Kitayama S., Shimada S., and Uhl G. R. (1992) Ann. Neurol. 32, 109-111.
9. Iversen L. L. (1971) Br. J. Pharmacol. 41, 571-591.
10. Horn A. S. (1990) Prog. Neurobiol. 34, 387-400.
11. Kitayama S., Uhl G. R., and Dohi T. (1993) Japan. J. Pharmacol. 61(suppl I), 111p.

99 多重標識オートラジオグラフィー法によるヒスタミンH_3受容体とドパミンD_1, D_2受容体の局在分布解析

柳鐘薫[1)]，谷内一彦[1)]，岩田錬[2)]，井戸達雄[2)]，渡邊建彦[1)]
（東北大．医．第一薬理[1)]．東北大．サイクロトロンRIセンター[2)]）

〔要約〕

ヒスタミンH_3受容体は大脳皮質，線条体，側座核，黒質に多く分布している。またドパミン受容体も線条体，黒質に分布しているので，二つの受容体のinteractionが予想される。今回我々はNMDA 受容体のagonist であるQuinolinic acidの投与による障害モデルラットを用いて，ヒスタミン H_3受容体とドパミン 受容体との分布の相関関係を^3H, ^{11}C 標識リガンド による多重標識受容体オートラジオグラフィーにより検討した。ヒスタミンH_3 受容体はドパミンD_1 受容体と共に線条体，黒質にて同一程度に減少した。またドパミンD_2受容体はQuinolinic Acidによって破壊されず，H_3受容体とは異なる部位に存在することが明確となった。以上の結果からヒスタミンH_3受容体とドパミンD_1受容体は線条体ー黒質ニューロン上に共存，もしくはごく近傍に分布していることが示唆された。またこのような多重標識オートラジオグラフィーと神経障害モデルを用いて受容体の局在を明確にすることができると考えられる。

＜はじめに＞

線条体には多種の神経系が存在し，運動，記憶などに関連している。またヒスタミンH_3 受容体がヒスタミンだけではなく，いろんな神経伝達物質の遊離に関与しているという報告があり，特にヒスタミンH_3受容体が線条体にてGABAニューロンと共存している可能性があるという報告もある（1）。しかし線条体ー黒質系においてヒスタミン神経系の役割はほとんどわかっていない。今回我々は Axon にはあまり影響を与えないで細胞体，遠心性神経を破壊するQuinolinic acidを用いてドパミン受容体とヒスタミンH_3受容体との分布を，既に去年の本学会において報告した多重標識in vitro 受容体オートラジオグラフィー法（4）を用いて検討をしたので報告する。

＜実験方法＞

1。実験動物作製

雄 Wistar ラット(270-320g)をネンブタール(50 mg/kg)麻酔下で脳定位固定装置を用いて，片側の線条体（AP: 0.7 mm ; ML: 3 mm; DV:5 mm)に1 μ lのQuinolinic Acid (120mM) を局所注入した。投与7日後断頭しすぐ脳を取り出し凍結し，microtomeを用いて，切片を作製した。

2。多重標識受容体オートラジオグラフィー

1 nM [^3H](R)-α-methylhistamineと 2-4 nM [^{11}C]SCH23390の両方同時入れたTris-HCl Bufferに切片をincubationし，半減期の差を利用して^{11}Cと^3Hの２つ核種による多重標識受容体オートラジオグラフィーを行なった。 はじめに切片を２時間UR-IPに曝露させ^{11}Cで標識されたD_1受容体の画像を得，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^3Hで標識されたH_3受容体の画像を得た。H_3とD_2受容体の多重標識オートラジオグラフィは [^{11}C]SCH23390の代わりに 0.5-1 nM [^{11}C]YM09151-2を溶解し上記方法と同じく実験を行なった。本実験に使用した[^{11}C]標識リガンドは我々の開発した on-line 合成システムを使用して，$^{11}CO_2$より実験ごとに作成した。

3。画像解析

各々のUR-IPとTR-IPは富士写真フィルムのBAS3000を用いて解析した。

＜結果＞

ヒスタミンH_3受容体に選択性が高いと言われている[^3H](R)-α-methylhistamineで標識されたヒスタミンH_3受容体は大脳皮質，線条体，黒質などに多く分布し，[^{11}C]SCH23390で標識されたドパミンD_1受容体は線条体，黒質に最も多く分布していた。Quinolinic acidの障害によって ヒスタミンH_3とドパミンD_1受容体が線条体，黒質において大きく減少した（図1）。それぞれ部位においての受容体の減少比率はほぼ同じで平行しているが，線条体と黒質で Y切片が異なり，違うコンパートメントに存在する受容体群もわずかだが存在する（図3）。一方，[^{11}C]YM-09151-2で標識された ドパミンD_2受容体は線条体に多く分布し，側座核，olfactory tubercleなどにも分布していた（図2）。しかしドパミンD_2受容体はQuinolinic acid投与によってもヒスタミンH_3あるいはドパミンD_1 受容体と比べてあまり変化しなかった（図2，3）。

＜考察＞

中枢神経においてヒスタミンH_3 受容体の存在が報告された以来，さまざまな面でおいて注目を集めているが，はっきりしたその役割，Synapse 前後においての存在位置などに関してはまだよく分かっていない（2）。さらに線条体にはさまざまな神経，すなわちコリン介在ニューロン，Glutaminergic神経の終末，遠心性GABAニューロン，ほかにもneuro peptide神経が存在していることが知られている。今回の我々の実験結果から少なくとも線条体，黒質においてヒスタミンH_3受容体とドパミンD_1受容体は線条体から黒質への同一神経細胞上に，即ちに遠心性GABAニューロン上に存在しており，ドパミンD_2受容体とは分布の局在が違っている可能性が考えられる（3）。しかしコリン介在ニューロン上にも存在する可能性も考えられ，現在この点について多重標識オートラジオグラフィー法を用いて検討を進めている。このような多重標識オートラジオグラフィー法は受容体の相互関係を定量的に明らかにするのに大いに役立つと思われる。

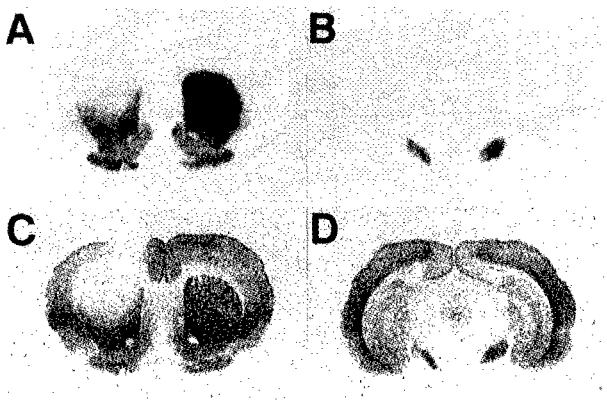


図1　片側線条体への Quinolinic acid 投与によるヒスタミンH_3とドパミンD_1受容体の線条体と黒質においての分布の変化。AとCが同一切片で，BとDが同一切片である。ヒスタミンH_3とドパミンD_1受容体が線条体と黒質において大きく減少している。

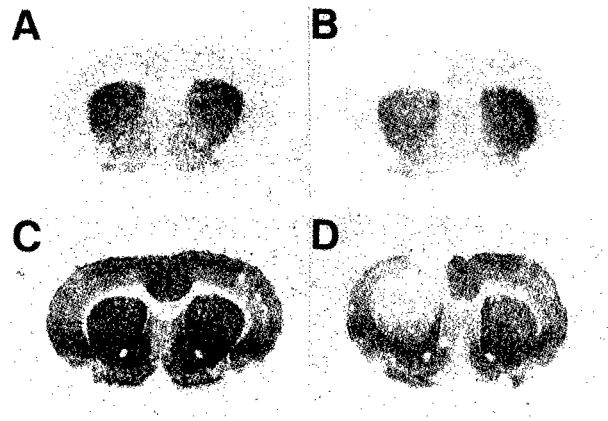


図2　[^{11}C]YM-09151-2 と [^{3}H](R)-α-methylhistamineの多重標識受容体オートラジオグラフィー：AとCがコントロールラット脳の同一切片で，BとDがQuinolinic acid投与ラット脳の同一切片である。正常ラットの場合ヒスタミンH_3とドパミンD_2受容体が線条体において多く分布している。Quinolinic acid 投与によってヒスタミンH_3受容体は大きく減少するがドパミンD_2受容体はあまり変化していない。

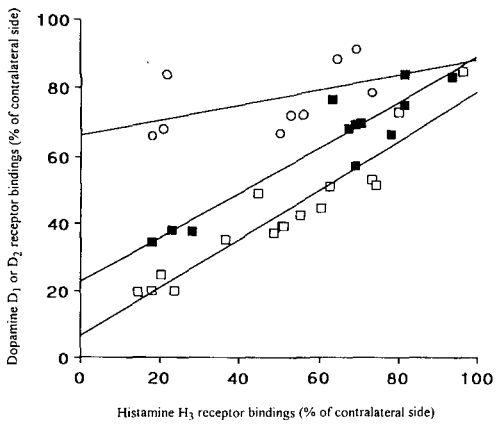


図3　Quinolinic acid 投与によるヒスタミンH_3とドパミンD_1受容体の線条体と黒質においての変化比率及びヒスタミンH_3とドパミンD_2受容体の線条体における変化比率。□，線条体でのヒスタミンH_3とドパミンD_1受容体分布の変化率（$y = 6.13 + 0.72x$: $r=0.95$, $p < 0.001$）；■，黒質でのヒスタミンH_3とドパミンD_1 受容体分布の変化率（$y = 22.27 + 0.66x$: $r=0.94$, $p < 0.001$）；O，線条体でのヒスタミンH_3とドパミンD_2受容体分布の変化率（$y = 65.89 + 0.22x$: $r=0.5$）。

＜文献＞
1. Cumming P, Shaw C and Vincent SR. Synapse 8:144-151 (1991)
2. Pollard H, Moreau J, Arrang JM and Schwartz JC. Neuroscience 52:169-189 (1993)
3. Ryu JH, Yanai K, Iwata R, Ido T and Watanabe T. Submitted.
4. Yanai K, Ryu JH, Watanabe T, Iwata R and Ido T. NeuroReport 3:961-964 (1992)

100 再構成系におけるラットアストロサイト由来細胞骨格間相互作用 －マイクロフィラメントによるグリアフィラメントの重合促進－

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の粗細胞骨格画分よりマイクロフィラメントとグリアフィラメントを特異的に脱重合抽出し、再構成系でのフィラメント形成時におけるこれらの相互作用を検討した。合成糖脂質であるα-シアロシルコレステロール（α-SC, 15 μM）および 100 mM NaCl と 10 mM $MgCl_2$ の存在下において、マイクロフィラメント画分（MF）はグリアフィラメント画分（GF）のタンパク質重合を促進するが、あらかじめ重合されたMFはGF重合促進活性が約1／3に減少した。このことからマイクロフィラメントはその構成タンパク質が非重合型において強いグリアフィラメントの重合促進作用を有することが示唆された。MFのGF重合促進作用は温度依存性で、37℃より反応温度の低下に従ってMF活性は減少し、4℃ではGF重合促進作用は観察されなかった。
MFはα-SC存在下でウシ水晶体由来のビメンチンの重合を促進し、またウサギ骨格筋アクチンはα-SC存在下においてGFの重合を促進した。これらの知見よりMFのGFの重合促進作用はそれぞれのフィラメントの主要構成タンパク質であるアクチンとビメンチンとの相互作用を介したものであることが示唆された。

私たちはラットアストロサイトの細胞分化における細胞骨格の構造と機能を研究する過程[1]で、アストロサイトよりマイクロフィラメントとグリアフィラメントとを特異的に脱重合抽出する方法を開発した。またアストロサイトの形態分化誘導作用のあるα-SCが再構成系において脱重合抽出されたマイクロフィラメント画分（MF）およびグリアフィラメント画分（GF）の重合を濃度依存的に抑制することを示し、α-SCがセカンドメッセンジャーを介さず直接細胞骨格に作用し細胞骨格の構造を変えることを示唆した[2,3]。さらにMFが再構成系においてα-SC存在下でGFの重合を促進することを見いだした[4]。今回はさらにMFとGFとの相互作用について検討を加えたので報告する。

（実験方法）

1. ラットアストロサイトの培養: 髄膜を除去し胎性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。さらに細胞を0.1% トリプシンで採取し、10% FCS / DMEM で1週間の二次培養を経てアストロサイトとして実験に供した。
2. マイクロフィラメントの脱重合抽出と再構成: アストロサイトをラバーポリースマンで採取し、これを Tris-HCl/saline, pH 7.5, で洗浄後、0.15 % Triton X-100/PHEM バッファーで2分間処理し 16,000 x g, 20 min の遠心で得られた沈澱画分を粗細胞骨格画分とした。これよりアクチン抽出バッファーでマイクロフィラメントを脱重合抽出した。得られた画分（MF）を 150 mM KCl と 10 mM $MgCl_2$ の添加で重合させ、10万 x g、1時間の超遠心により得た沈澱画分を再構成マイクロフィラメントとし、電気泳動分析に供した[3]。
3. グリアフィラメントの脱重合抽出と再構成: 粗細胞骨格画分よりファロイジンを含むGF抽出バッファーでグリアフィラメントを脱重合抽出した。得られた画分をGFとし、100 mM NaCl と 10 mM $MgCl_2$ により重合し、超遠心沈澱画分を得た[3]。

（実験結果および考察）

α-SC存在下でGF はMF（非重合型）あるいは、あらかじめ 150 mM KCl と 10 mM $MgCl_2$ で重合されたMF（重合型MF, 再構成マイクロフィラメ

ント様フィラメント）により濃度依存的に重合が促進された。1 μg protein/200 μlの非重合型ＭＦは 15 μＭ α-ＳＣ存在下でＧＦ(7.5 μg protein/200 μl)におけるビメンチンの重合を約２倍促進したのに対し、重合ＭＦはビメンチン重合を促進しなかった。また 5 μg protein/200 μl の重合型ＭＦはビメンチン重合を２倍促進したにとどまり、促進活性は非重合型のＭＦに比べ約１／３であった（図１）。このことはマイクロフィラメントのグリアフィラメント重合促進活性は非重合型に比べ低いことを意味した。ＭＦが重合してマイクロフィラメントを形成することにより、ＭＦにおけるＧＦ重合促進因子の遊離分子数が減少し活性が低下するのかもしれない。ＭＦのＧＦ重合促進活性は温度依存性で、３７℃、２５℃、４℃と反応温度の減少に伴い活性は低下し、４℃ではＧＦ重合促進作用は認められなかった（図２）。

マイクロフィラメントとグリアフィラメントの相互作用に関わるタンパク質を検索したところ、7.5 - 15 μＭ α-ＳＣ存在下でウサギ骨格筋アクチンがＧＦ重合を促進し、またＭＦはウシ水晶体より精製したビメンチンの重合を強く促進した。これらの知見より、マイクロフィラメントとグリアフィラメントの相互作用は、それぞれの主要構成タンパク質であるアクチンとビメンチンの結合を介したものであることが示唆され、またフィラメント形成をしていない細胞内遊離型アクチンがグリアフィラメント構造形成に関与しうる可能性を示した。ビメンチンとアクチンをもつアストロサイト以外の細胞におけるマイクロフィラメントと中間径フィラメント.との相互作用の存在も示唆された。

（文献）
1）J. Ito et al., Neurochem. Int., 16, 133-140, 1990
2）J. Ito et al., J. Neurochem., in press.
3）J. Ito et al., J. Neurochem., in press.
4）伊藤ら: 神経化学, 31, 196-197, 1992

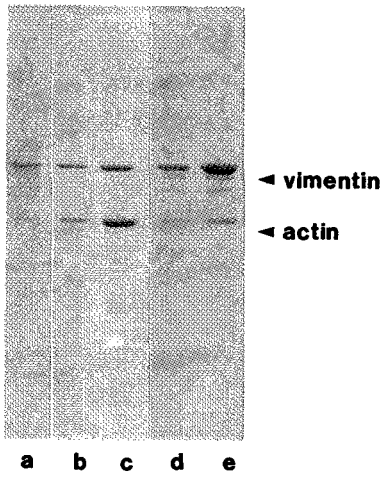


図１　重合型および非重合型ＭＦによるＧＦ重合促進

a. ＭＦ非添加におけるＧＦ(7.5 μg/200 μl)重合
b, c. 重合型ＭＦ(1, 5 μg)添加
d, e. 非重合型ＭＦ(1, 5 μg)添加

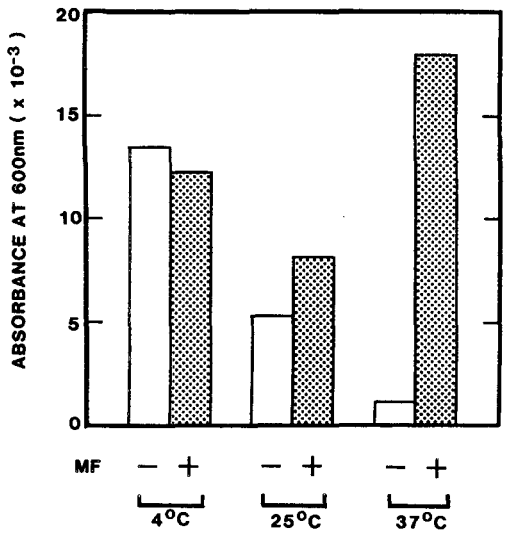


図２　ＭＦのＧＦ重合促進作用に対する重合温度の効果

101 ニューロフィラメントH鎖キナーゼは脳のｃｄｃ２関連キナーゼｃｄｋ５か？

久永真市、石黒幸一＊、内田庸子＊、岸本健雄
（東工大・生命理工、三菱生命研＊）

〔要約〕
ブタ脳よりニューロフィラメントH鎖（ＮＦ－Ｈ）のＣ末尾部をリン酸化し、ＮＦ－Ｈの電気泳動上の移動度を減少させるキナーゼ（ＮＦ－Ｈキナーゼ）を精製し、その性質について調べた。脳粗抽出液中に検出されるＮＦ－Ｈキナーゼの大部分は、微小管を重合させ、遠心分離したとき、微小管とともに沈澱に回収された。ＮＦ－Ｈキナーゼは微小管沈澱の高塩抽出液から各種カラムを用いて部分精製した。精製ＮＦ－Ｈキナーゼは３２ｋＤａと２６ｋＤａの２種のポリペプチドから主に成っていた。ＮＦ－ＨキナーゼはＮＦ－Ｈに加えＮＦ－Ｍもリン酸化し、電気泳動上の移動度を減少させた。リン酸化部位を認識する抗体とのブロッティングにより全てのリン酸化部位がリン酸化されているわけではないことが示唆された。ＮＦ－Ｈキナーゼの酵素的性質はｃｄｃ２キナーゼと非常によく似ていたが、抗原性やｓｕｃ１蛋白との結合性は異なっていた。ＮＦ－Ｈキナーゼはｃｄｋ５のＣ末ペプチドに対する抗体によって認識され、脳に存在するｃｄｃ２関連キナーゼ（ｃｄｋ５）と考えられた。

〔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繊維であり、特に軸索には大部分の細胞骨格要素を占めるほど大量に存在している(1)。ＮＦはＳＤＳ－ＰＡＧＥ上の見かけの分子量が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－ＨとＮＦ－ＭのＣ末尾部はコアの繊維から外へ伸びだしており(2)、そこには数多くのリン酸化部位が存在する(3)。ＮＦ－Ｈ，ＮＦ－ＭのＣ末尾部はＮＦが他の細胞内オルガネラや細胞骨格と相互作用する部位で、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(4)。このようにＮＦ蛋白のＣ末尾部のリン酸化はＮＦの機能を考慮する上で非常に重要である。昨年の本大会ではｃｄｃ２キナーゼとタウプロティンキナーゼＩＩ（ＴＰＫＩＩ）がＮＦ－ＨのＣ末尾部をリン酸化することを報告した(5,6)。しかし、ＴＰＫＩＩが神経細胞内に存在する唯一で、しかも機能的なキナーゼであるかどうかは未解決である。本大会では、脱リン酸化したＮＦ蛋白を基質として、ＮＦ－Ｈを特異的にリン酸化するキナーゼをブタ脳から精製し、その性質について調べたので報告する。

〔方法〕
ＮＦＨキナーゼは脱リン酸化したＮＦ蛋白を基質として、ブタ脳より精製した。微小管はブタ脳粗抽出液を３７°Ｃに加温することにより重合させ、遠心により沈澱として回収した。粗微小管分画の高塩抽出液からＤＥＡＥ－セルロース、ハイドロキシアパタイト、ゲルろ過、ＭｏｎｏＱ、ＳＰの各カラムを用いて部分精製した。
脱リン酸化ＮＦ蛋白はウシ脊髄から単離したＮＦをアルカリフォスファターゼで脱リン酸化して、調製した(3)。

〔結果〕
ブタ脳粗抽出液、粗微小管沈澱分画、その上清についてＮＦ－Ｈキナーゼ活性を測定したところ、粗抽出液中に存在するほとんどのＮＦ－Ｈキナーセ活性は粗微小管沈澱分画に回収された（図１）。粗微小管分画から上述の方法により部分精製したＮＦ－Ｈキナーゼ分画は３２ｋＤａと２６ｋＤａの主に二つのポリペプチドより成っていた（図２）。この蛋白組成は脳のｃｄｃ２様キナーゼとして報告されているものとほとんど同じであった。精製ＮＦ－Ｈキナーゼで脱リン酸化型ＮＦをリン酸化するとＮＦ－Ｈのみならず、ＮＦ－Ｍもリン酸化に伴うＳＤＳ－ＰＡＧＥ上の移動度の変化を示した。このリン酸化によりＮＦ蛋白のリン酸化部位を認識する抗体（ＳＭＩ３１，３４、３６、ＪＪ２９，５１）との反応性も回復するようになった。但し、全てのin vivoのリン酸化部位がリン酸化されているわけではなく、ＮＦ－Ｈキナーゼではリン酸化されないリン酸化部位も存在するようであった。
ＮＦ－Ｈキナーゼとｃｄｃ２キナーゼの比較を行った。ＮＦ－Ｈキナーゼはｃｄｃ２キナーゼの特異的阻害剤であるButyrolactone Ⅰによって、ｃｄｃ２キナーゼとほぼ同じ濃度で阻害された(7)。しかし、ＮＦ－Ｈキナーゼはｃｄｃ２キナーゼに対する抗体によって認識されず、ｃｄｋ５のＣ末ペプチドに対する抗体とは反応した。

ｓｕｃ１蛋白に対する結合性も異なり、ｃｄｃ２キナーゼはｓｕｃ１カラムから0.5M NaClと50% ethyleneglycolを含む溶液によってのみ溶出されるのに対して、ＮＦ－Ｈキナーゼは塩濃度を少し上げるだけで溶出してしまった。

〔考察〕

ＮＦ－Ｈキナーゼの精製過程において脱リン酸化型のＮＦ蛋白を特異的にリン酸化する酵素が他にみつからなかったことは、本研究で精製したキナーゼがＮＦ－Ｈキナーゼとして機能している主なものであると考えられる。但し、このキナーゼがＮＦ－ＨのＣ末尾部の全てのリン酸化部位をリン酸化しているわけではなく、他のキナーゼの関与も示唆されている。また、ＮＦ－ＨキナーゼはＮＦ－Ｍもリン酸化し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上の移動度を減少させたが、ＮＦ－Ｍに対する親和性はＮＦ－Ｈより低く、ＮＦ－Ｍに特異的なキナーゼの存在も推測される。ＮＦ－Ｈキナーゼは脳に多く発現しているｃｄｃ２関連キナーゼ（ｃｄｋ５）であると考えられる[8]。ｃｄｃ２キナーゼの細胞周期における重要性から、ｃｄｋ５も神経細胞内で重要な働きをしているに違いない。ｃｄｋ５のＮＦ－Ｈキナーゼとしての意義、また、それ以外にどのような機能を果たしているかなどは今後の興味ある課題である。

〔参考文献〕

(1)Liem, R. K. H. (1993) Current Opinion Cell Biol. 5, 12-16.

(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)Hisanaga, S., and Hirokawa, N. (1990) J. Biol. Chem. 265, 21852-21858.

(5)Hisanaga, S., Kusubata, M., Okumura, E., and Kishimoto, T. (1991) J. Biol. Chem. 266, 21798-21803

(6)Hisanaga, S., Ishiguro, K., Uchida, T., Okumura, E., Okano, T., and Kishimoto, T. (1993) J. Biol. Chem. 268, in press.

(7)Kitagawa, M., Okabe, T., Ogino, H., Matsumoto, H., Suzuki-Takahashi, I., Kokubo, T., Higashi, H., Saitoh, S., Taya, Y., Yasuda, H., Ohba, Y., Nishimura, S., Tanaka, N., and Okuyama, A. (1993) Oncogene, in press.

(8)Hellmich, M. R., Pant, H. C., Wada, E., and Battey, J. F. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10867-10871.

図1

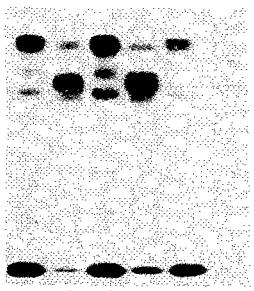


図2

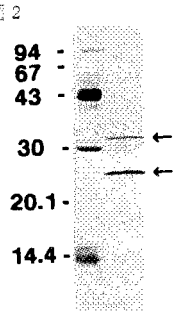


図3

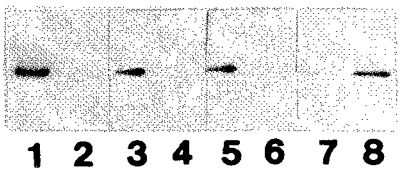


図1　ブタ脳粗抽出液中のＮＦ－Ｈキナーゼ活性検出と微小管との共沈。リン酸化型ＮＦ蛋白（１、３、５）と脱リン酸化型ＮＦ蛋白（２、４、６）を基質として粗抽出液（１、２）、粗微小管分画（３、４）とその上清（５、６）のキナーゼ活性を測定したときのオートラジオグラフ。

図2　精製ＮＦ－Ｈキナーゼのｓｄｓ－ＰＡＧＥ．１、マーカー蛋白；２、ＮＦ－Ｈキナーゼ。矢印が３２ｋＤａと２６ｋＤａのポリペプチド。

図3　ＮＦ－Ｈキナーゼのｃｄｃ２キナーゼとｃｄｋ５に対する抗体によるブロッティング。レーン１、３、５、７がｃｄｃ２キナーゼ、レーン２、４、６、８がＮＦ－Ｈキナーゼ。抗ＰＳＴＡＩＲ抗体（１、２）、ｃｄｃ２Ｃ末ペプチドに対する抗体（３、４と５、６）、ｃｄｋ５Ｃ末ペプチドに対する抗体（７、８）によるブロッティング。

102 培養神経細胞における突起形成と微小管安定化

関本澄人、田代朋子、小宮義璋
（群大・医・分子病態）

〔要約〕

ラット後根神経節細胞初代培養系を用い、神経突起形成過程に伴うチューブリンの安定性の変化について検討した。チューブリンは低温及びCa^{2+}処理により可溶性されるチューブリン（SolT）と可溶化されないチューブリン（InsT）に分別して定量した。更にSolT、InsT各々の代謝回転速度についても検討することにより神経細胞に固有な微小管安定化機構の解析を試みた。その結果、以下のことが明かとなった。

1）ラット後根神経節細胞初代培養系ではin vivoの系と同様に全チューブリン中InsTがその多くを占め、その割合は神経突起が形成されるに伴って増大した。

2）新たに合成されるチューブリンについてはどの時点においてもSolT：InsTの比はおよそ4:1と常に同程度の値を示し、SolTの方がInsTを上回っていた。

3）これに対し、pulse-chase実験の結果では標識後の時間経過とともにInsTの比率が増大した。

4）以上より神経細胞の細胞骨格においてInsTは主要な成分であり、成長神経突起が神経回路網を形成するのに伴う突起構造の安定化に関与している可能性が示唆される。

近年、微小管については生化学及び細胞生物学的な手法により様々な研究が進めれているが、その多くはCa^{++}及び低温条件下で脱重合する微小管についてであり、それ以外の微小管については殆ど知られてない。我々はこれまでに坐骨神経軸索中には従来の微小管（ダイナミック型）以外に低温条件下でも脱重合しない安定重合型微小管が相当量存在し、発生、再生、老化等の各過程でその量的な変動が見られることをin vivoの系を用いて示してきた[1,2,3]。今回、ラット後根神経節細胞初代培養系を用いて、神経突起再生過程における低温Ca^{2+}可溶性チューブリン（SolT）と不溶性チューブリン（InsT）間の量比変動を定量し、更に^{35}S-Metによる放射標識により各時点の新生チューブリン中における両者の比率やpulse-chase法による合成後の標識SolT:InsTの変化を測定した。

（方法）SolT、InsTの培養過程での経時変化：生後14日ラット後根神経節細胞を無血清培地中で初代培養し[4]、培養後1-16日の各時点で培養皿ごと-80度保存した。細胞が凍結した状態のまま1%Triton-1mMCa^{++}を含む抽出液によって培養皿より回収、ホモジェナイズしSolT、InsTを各々含む可溶性分画と不溶性分画に分別した。両分画を二次元電気泳動後、抗チューブリン抗体によるイムノブロットを行いデンシトメーターにて定量した。

^{35}S-Met標識による新生チューブリン中SolT：InsTの量比測定：培養期間中の各時点において^{35}S-Metを30 uCi/ml培養液の濃度で24時間培養液に加え新生蛋白を標識した後、上述の方法でSolT及びInsTを分離した。各スポットの放射活性量をFUJIX BAS 2000により定量し量比の変動を測定した。

pulse-chase法によるSolTとInsTの代謝安定性の比較：培養後6日に30uCi/ml培養液で24時間pulse標識した後7、10、13、16日までchaseし上述の方法によってSolT、InsT間の量比の変動を測定した。

（結果と考察）培養開始直後、ほとんどのチューブリンはSolTであるが（95.2%）培養後1-5日にかけてInsTの比率が急激に増大し6日以後55-75%という高値で安定化する（図1）。この変動パターンは形態的に

観察される神経突起の成長期（1-5日）と神経回路網の形成期(6日以後）に一致しており、このことよりInsTの神経突起との関連が予想される。培養開始後SolTとInsTのこうした急激な量比変化があるにも関わらず各時点で合成されてくる新生チューブリン中のSolT:InsTの量比は1-13日間でおよそ4:1とほぼ一定の値を示した（図2）。よって図1のような二群間の量比変動は新生蛋白の合成比率の変化によるものではなく合成後の代謝安定性の差による可能性が考えられる。実際、SolT:InsT比が一定になった時期(6日）に新生チューブリンを標識しその後の両者間の比率をchaseしたところInsT／SolT+InsTは培養後16日（chase後9日）で4.5倍にまで上昇し（図3）培養6日以降の時期では代謝安定性は見かけ上InsTの方が大きい。この現象が両者の代謝回転速度の差のみを反映するのか、それとも何らかの修飾によってSolTからInsTへの変換が生じている結果なのかについて現在検討中である。

（文献）(1)Tashiro, T. & Komiya, Y. (1989) J.Neurosci., 9, 760 (2)Tashiro, T. & Komiya, Y. (1991) J. Neurochem., 56, 1557 (3)Tashiro, T. & Komiya, Y. (1991) J. Neurosci. Res. 30, 192 (4)Horie, H. et al. (1991) Neuroreport 2, 521

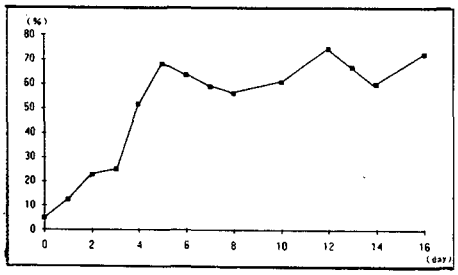


図1　培養開始後のInsT／全チューブリンの変動

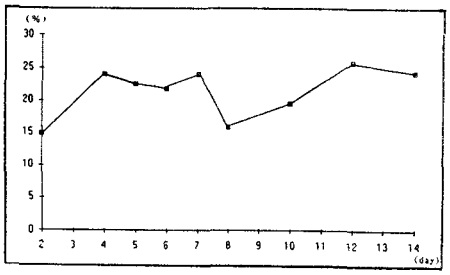


図2　培養開始後の新生InsT／新生チューブリンの変動
新生チューブリンは^{35}S-Metで24時間標識されたものを示す

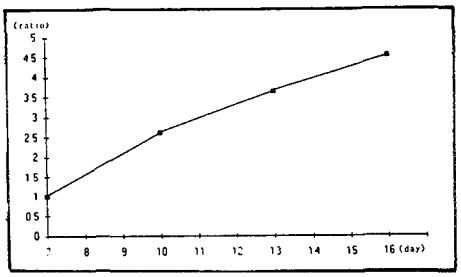


図3　放射標識チューブリン（培養7日目）のpulse-chase実験
7日目に合成されたチューブリン中の標識InsT／標識SolT+InsTを1とし
それに対する各時点での標識InsT／標識SolT+InsTの比率を表示した

103 神経成長円錐のCa²⁺感受性アクチン結合蛋白質 --カルデスモンとゲルゾリン

田中潤也・吉良正浩・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〕
Ca^{2+}・カルモデュリン結合蛋白質であるカルデスモンと、Ca^{2+}依存性にアクチンフィラメントを切断するゲルゾリンが培養ラット大脳皮質ニューロンの神経成長円錐に局在していることを免疫組織化学的に明らかにした。更にカルデスモンが、細胞下分画法によりミオシン・トロポミオシンとともにラット前脳の成長円錐分画に局在していることを示した。これらの結果は、成長円錐のCa^{2+}依存性運動制御機構に、カルデスモンとゲルゾリンが関わっていることを示唆している。

緒言

神経成長円錐は神経突起の先端にあり、基質と接着して神経突起伸長のためのアンカーとなるとともに、シナプス形成のための活発な探索運動を行っている。成長円錐の運動は神経伝達物質や細胞接着因子等の影響を受け、細胞内Ca^{2+}濃度に依存していることが示されている[1]。一方、成長円錐に豊富に存在するアクチンフィラメントが、この構造のもつ活発な運動性の主たる物質的基盤であることは明らかである[2]。従って、成長円錐に局在する種々のCa^{2+}感受性アクチン結合蛋白質がCa^{2+}依存性の成長円錐の運動制御機構に関わっていると考えられる。このようなCa^{2+}感受性アクチン結合蛋白質として、現在までにミオシンI[3]・actin depolymerizing factor (ADF)[4]・Ca^{2+}感受性α-アクチニン[5]などが報告されている。今回我々は、Ca^{2+}依存性にアクチンフィラメントを切断するゲルゾリンとCa^{2+}・カルモデュリン依存性アクトミオシン制御蛋白質であるカルデスモンが、ラット神経細胞の成長円錐に局在することを新たに見い出した。

方法

1．抗体

抗ゲルゾリン抗体は、ヒト血液よりDE-52とブルーセファロースカラムを用いて精製したプラズマゲルゾリンを抗原とし、これをウサギに免疫して抗血清を作成した。この抗血清から、ゲルゾリンのCa^{2+}感受性ドメインであるC末フラグメントを結合したアフィニティカラムによって、C末フラグメント特異的な抗体を分離精製した。抗カルデスモン抗体は、鶏砂のうから精製した平滑筋カルデスモンを抗原としてウサギ抗血清を作成し、アフィニティクロマトグラフィーによって特異抗体を作成した。MAP2とGAP43に対する抗体は市販のものを利用した。

2．細胞培養と細胞染色

胎生15日齢のラットから大脳皮質ニューロンを初代培養した。培養液として、Fischerの完全無血清培地[6]75%に血清(10%)存在下で培養したアストロサイトの条件培地を25%の割合で混合したものを用いた。ゲルゾリンとカルデスモンの細胞内局在を決定するために、パラフォルムアルデヒドで固定後間接蛍光抗体法により免疫染色した。F-アクチンは、ローダミン標識ファロイジンにより検出した。

3．ラット前脳成長円錐分画の調製

Pfenningerらのショ糖密度勾配法による成長円錐分画調製法[7]をもとにGAP43の局在を指標に若干の改変を加え、妊娠18日齢のラット前脳から成長円錐分画の調製を行った。調製した分画はSDS-PAGEにより分離後、Immunoblottingによりカルデスモンの局在を検討した。

結果

妊娠18日齢のラット大脳より調製した成長円錐分画に対するimmunoblottingの結果を図1に示した。GAP43の集積する0.32M/1.0Mショ糖の界面にカルデスモンが存在する。また、この分画にはトロポミオシンとミオシン・アクチンも検出された。培養大脳皮質ニューロンにおけるカルデスモンの局在を図2Aに示した。図2BにはMAP2の局在を示している。カルデスモンは軸索先端と樹状突起先端の両方の成長円錐に局在しているが、トロポミオシン・ミオシンではこの点が若干異なっている可能性がある。カルデスモンとゲルゾリンの抗体で免疫染色された、軸索先端の成長円錐の拡大像を図3に示した。カルデスモンとゲルゾリンの免疫反応性はともに成長円錐のフィロポディアを中心に観察された。

考察

アクチン・ミオシンの成長円錐における局在は従来よりよく知られている。また、アクチンフィラメント結合蛋白質であるトロポミオシンも成長円錐に局在することが明らかになっている。今回我々は、カルデスモンの成長円錐における局在を、形態学的・生化学的に明らかにし、成長円錐のCa^{2+}依存性運動制御機構にカルデスモンが関与していることを示唆した。今後は、

アクトミオシン系の活性化が成長円錐にどのような運動を引き起こすのかを検討する必要がある。ところで、軸索先端と樹状突起先端の成長円錐では、カルデスモン・トロポミオシン・ミオシンの分布が異なっている可能性があり現在追究中である。また、妊娠18日齢と生後4日齢の成長円錐分画を比較すると、トロポミオシンのアイソフォームの発現が変化しておりこの点も検討中である。ゲルゾリンは神経系では主にミエリン形成細胞に存在しているが、神経細胞にもわずかに存在し特に成長円錐のフィロポディアにおける局在が特徴的である。ゲルゾリンは、アクチンの重合・脱重合のサイクルを調節することによって直接細胞運動に関与している可能性が示唆されており、成長円錐の活発な運動性に対しきわめて大きな役割をはたしているものと推測される。

参考文献

[1]Letourneau and Cypher (1991) Cell Motil.Cytoskel. 20; 267-271 [2]Smith (1988) Science 242; 708-715 [3]Miller et al. (1992) Neuron 8; 25-44 [4]Bamburg and Bray (1987) J.Cell Biol. 105; 2817-2825 [5]Sobue and Kanda (1989) Neuron 3; 311-319 [6]Fischer (1982) Neurosci.Lett. 28; 325-329 [7]Pfenninger (1983) Cell 35; 573-584

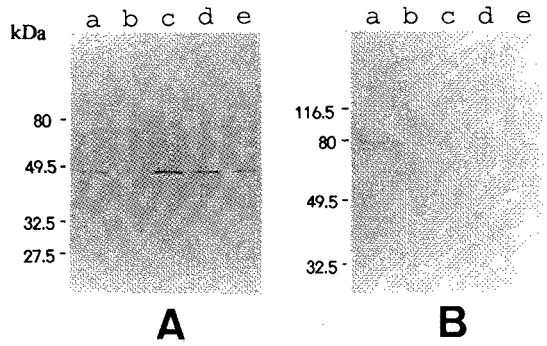


図１　妊娠18日齢ラット前脳より不連続ショ糖密度勾配法による細胞下分画を行い、成長円錐分画を調製しカルデスモンの局在を検討した。AはGAP43、Bはカルデスモンの局在をimmunoblottingにより示したもの。レーンa; 脳ホモジネートの低速遠心上清。b; aに示した分画を不連続ショ糖密度勾配下で超遠心して得た上清(可溶性分画)。c; 0.32M/1.0Mショ糖界面。d; 1.0M/.25Mショ糖界面。e; 沈澱分画。GAP43は主に0.32M/1.0Mショ糖界面に分布しており、成長円錐がこの分画に回収されていることを示している。カルデスモンはこの成長円錐分画にも局在している。各レーンには等量の蛋白質(5μg)を泳動してある。

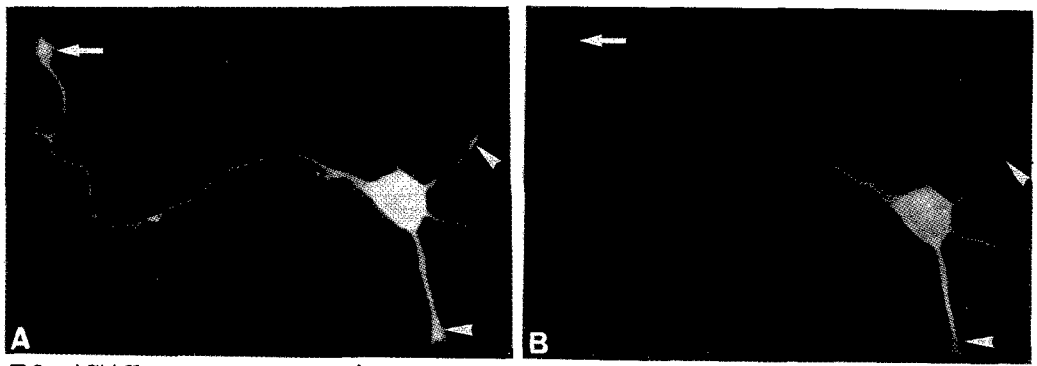


図２　大脳皮質ニューロンにおけるカルデスモン(A)とMAP2(B)の局在を二重染色法で示した。MAP2が検出されない軸索先端（矢印）とMAP2が検出される樹状突起先端（矢尻）の両方の成長円錐にカルデスモンが検出される。

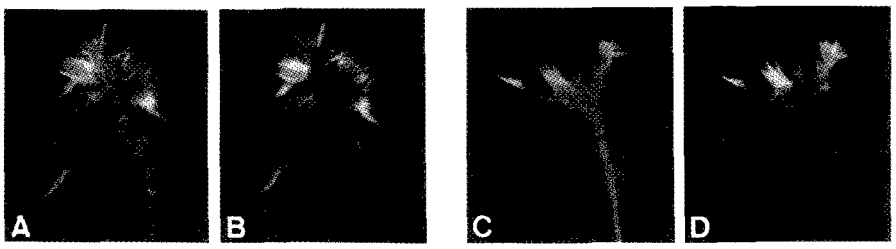


図３　大脳皮質ニューロン軸索先端の成長円錐をカルデスモン(A)とゲルゾリン(C)に対する抗体によって免疫染色したもの。AB、CDはそれぞれローダミン-ファロイジンとの二重染色像を示している。

104 ラットドレブリンのアクチン結合部位の解析

白尾智明、石川良樹*、林謙介、小林聡
（群馬大学・医・行動分析，薬理*）

〔要約〕
ドレブリンとアクチンの結合を解析する目的で胎生１８日および生後１日のラット脳よりドレブリンを精製した。次にドレブリンとアクチンの結合実験を in vitro で行ない、ドレブリンが F-アクチンに結合することを示した。さらに、この結合部位を決定するため、ドレブリンをα−キモトリプシンで限定分解し、得られたフラグメントとアクチンとの結合実験を行なった。その結果、分子量２万～３万前後の三本のフラグメントにアクチン結合能があることが解った。次にこれらのフラグメントがドレブリン分子の何処から由来したのかを解析した。我々は既にドレブリン分子の中央付近のエピトープに結合するモノクローナル抗体M2F6を作製していたので、α−キモトリプシンによる限定分解産物とアクチンとの結合実験の結果をこの抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析したところ、このアクチン結合フラグメントはドレブリン分子の中央付近由来ではないことが示唆された。

ドレブリンは最初ニワトリ胚脳より発生過程に一過性に出現してくる蛋白として精製された蛋白であり遺伝子導入法により樹状突起形成に関与していることが示唆されている。また免疫組織化学的解析により生体内ではアクチンに結合していることが予想されている(1,2,3)。実際、前川らが幼若ラット脳の抽出液を加温したときに作られるアクチンゲル化産物中の蛋白として精製した１１０K蛋白は免疫学的交叉性および分子量よりドレブリンと同一であると考えられている(4)。今回我々はラットドレブリンを胎生１８日あるいは生後１日の幼若ラット脳より精製し、in vitroでのアクチン結合能を解析し、同時にアクチン結合部位の同定を試みた。

（実験方法）

1　ドレブリンの精製：石川らの方法（投稿準備中）に準じて行なった。すなわち胎生１８日あるいは生後１日のラットより全脳を取りだし、湿重量測定後 5 倍量の ホモジナイジングバッファー （20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mg/ml Leupeptin ）でホモジナイズ後、超遠心（10万×G、1時間、4℃）により可溶性画分を作製した。この画分を１００℃で3分間熱処理し、再び超遠心後上清を回収した。次にこの画分を 30 %飽和硫安とし、遠心後沈澱を回収した。この画分をDEAE-Toyoperlイオン交換クロマトグラフィーにかけ、ドレブリン画分を回収し、その画分をゲル濾過クロマトグラフィーにかけ精製ドレブリンを得た。アクチン結合の実験にはイオン交換クロマトグラフィー後のドレブリン画分を用いた。

2　アクチンの精製：小濱の方法（５）に準じて行なった。

3　アクチン結合能の解析：アクチン（最終濃度0.5 mg/ml)とドレブリンを100 mM NaCl 存在下で室温で１時間インキュベート後14万×G、30分超遠心後上清および沈澱をSDS-PAGEにより解析した。

4　アクチン結合部位の解析：精製ドレブリンを0.1 μg/ml の α−キモトリプシン中で37℃、20分インキュベイト後 PMSF を加えて反応を停止し、その後で上記の方法でアクチン結合能の解析を行なった。

〔実験結果と考察〕

精製した蛋白（図1）の同定はウェスタンブロッティングおよび部分アミノ酸配列の決定により行なった。図2に示すように部分精製ドレブリン画分とアクチンの結合実験の結果ドレブリンはアクチン線維と結合することが解った。この結合はストイキオメトリ1:5, 解離定数10^{-7} Mであった。

次にドレブリンのアクチンとの結合部位を明かにするために精製ドレブリンをα–キモトリプシンにより限定分解し、その各フラグメントとアクチンの結合能を調べたところ分子量2万から3万の3本のバンドをアクチン結合画分に検出した（図3）。モノクローナル抗体M2F6はドレブリン分子の中央付近を認識していることが解っているが、この抗体を用いて、限定分解ドレブリンのアクチン結合画分および非結合画分のSDS-PAGEのウェスタンブロッティングを行なったところ、図4に示すようにアクチン結合画分には分子量の比較的大きなバンドしか検出できなかった。このことから、分子量2－3万のアクチン結合フラグメントはドレブリンの中央付近由来ではなく、末端部位の近くから由来していると考えられた。

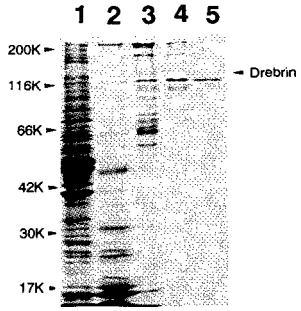


図1　胎生18日ラット脳からのドレブリンの精製
lane 1,可溶性画分；lane 2,熱処理後画分；lane 3,30%硫安画分；lane 4,イオン交換カラム溶出画分；lane 5,ゲル濾過後画分

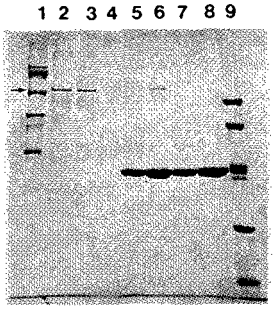


図2　ドレブリンとアクチンとの結合　lane 1,分子量マーカー（上から212K,170K,116K,76K,53K）；lane 2,部分精製ドレブリン；lane 3,5,7,上清；lane 4,6,8,沈澱；lane 9,分子量マーカー（上から94K,67K,43K,30K,20K）；
lane 3,4,ドレブリンのみ；lane5,6,ドレブリンとアクチン；
lane 7,8,アクチンのみ。矢印はドレブリン

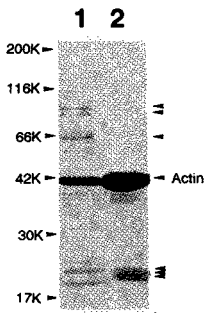


図3　ドレブリン限定分解物とアクチンとの結合
lane1, 超遠心上清；lane2,超遠心沈澱；CBB染色

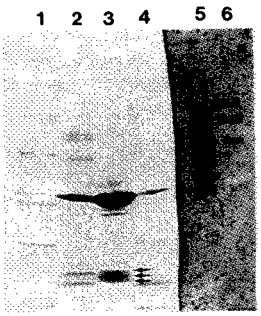


図4　ウェスタンブロッティング　lane 1-4, アミドブラック染色；lane 5-6,抗体染色；lane1,分子量マーカー（上から94K,67K,43K,30K,14.4K）；lane 2と3,図3のlane 1,2と同じ；lane 4,分子量マーカー（上から67K,43K,30K,20K,14.4K）；lane 5と6, lane 2と3の抗体染色

（文献）(1)Shirao T. and Obata K. (1985) *J.Neurochem.* 44:1210-1216. (2)Shirao T., Kojima N. and Obata K. (1992) *NeuroReport* 3:109-112. (3)浅田秀穂　他 (1992) 神経化学31,146-147. (4)Maekawa S. and Sakai H. (1988) *Exp. Cell Res.* 178:127-142. (5)Kohama K. (1981) *J.Biochem.* 90:497-501.

105　脳におけるアネキシンＶＩ結合蛋白質

乾　誠，渡辺達夫，伊賀正英，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〕
ラット脳におけるアネキシンVI結合蛋白質の検索をＳＤＳ電気泳動後転写したニトロセルロース膜上にて行った。その結果、アネキシンVIはCa^{2+}／ホスファチジルセリン（ＰＳ）あるいはホスファチジン酸（ＰＡ）依存性に約１４種類の蛋白質と結合した。このうち分子量８０Kおよび２４０Kの蛋白質は、それぞれシナプシンＩおよびカルスペクチンであった。アネキシンVIの両蛋白質への結合は、非変性条件下でも認められ、ＰＳ存在下でのCa^{2+}感受性は約１０μMであった。アネキシンVIのシナプシンＩへの結合は、シナプシンＩの頭部に結合し、この結合は、ｃＡＭＰキナーゼおよびＣａＭキナーゼIIのシナプシンＩ燐酸化により阻害された。アネキシンVIのカルスペクチンへの結合では、アネキシンVIはカルスペクチンのβサブユットＮ末端部に結合した。アネキシンVIは、Ca^{2+}、ＰＳ存在下にカルスペクチンとＦ－アクチンとの結合を阻害し、カルスペクチンのＦ－アクチン架橋作用を抑制した。すなわち、アネキシンVIがCa^{2+}による細胞膜骨格制御に関与している可能性を示唆する。

緒言

アネキシンは、Ca^{2+}および燐脂質を結合する一群の蛋白質で、７０－８０アミノ酸からなる各アネキシンに共通の繰り返し構造を有している。アネキシンVIは、この繰り返し構造を８個有し、脳に比較的豊富に存在し、細胞膜直下に局在することが知られているにもかかわらず（３）、その生理機能は未だ不明である。本研究では、神経細胞におけるアネキシンVIの機能を明らかにすることを目的としてアネキシンVI結合蛋白質の検索を行い、その同定を試みると共に結合の性質の解析を行った。

方法

１．アネキシンＶＩ結合の解析法：ラット脳のホモジネート、細胞下分画或いは精製蛋白質をＳＤＳ電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、Ｔｗｅｅｎ２０とＢＳＡ或いはホスファチジルコリン（ＰＣ）でブロックした。このニトロセルロース膜をCa^{2+}、燐脂質存在下で^{125}Ｉ標識アネキシンVIとインキューベートし、洗浄した後、オートラジオグラフィーで解析した。また、非変性条件下でのアネキシンVI結合量の測定では、精製蛋白質を直接ニトロセルロース膜に固定し、種々の条件下で^{125}Ｉ標識アネキシンVIとインキューベートし、洗浄後、結合量を放射活性から定量した。

２．Ｆ－アクチン－カルスペクチン相互作用の解析法：Ｆ－アクチンとカルスペクチンの相互作用は、落下球法によるＦ－アクチンの粘度測定および遠心法による両者の結合の解析から調べた。遠心法では、^{125}Ｉ標識カルスペクチンを用いて、Ｆ－アクチンと共沈したカルスペクチン量を定量した。

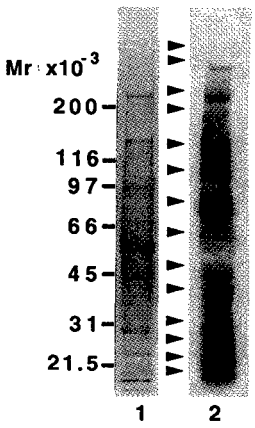


図１　ラット脳のアネキシンVI結合蛋白質（矢印）。１：脳ホモジネートの蛋白染色。２：転写ニトロセルロース膜のオートラジオグラフィー。

成績

１．ラット脳のアネキシンＶＩ結合蛋白質

ラット脳のホモジネートをＳＤＳ電気泳動、ニトロセルロース膜に転写した後^{125}Ｉ標識アネキシンVIの結合を調べた（図１）。その結果、アネキシンVIは、４５０K、３５０K、２４０K、１８０K、１２０－１４０K、１０５K、８０K、６３K、４８K、４０K、３２K、２７K、２３K、１６Kの蛋白質に結合した。これらの蛋白質への結合は、Ca^{2+}／ＰＳ或いはＰＡ依存性で、ＰＣ、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールでは認められなかった。これらの蛋白

質のうち８０Ｋは、Ｐ2分画さらにシナプス小胞分画に、２４０ＫはＰ2分画さらにＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で処理した細胞骨格分画に豊富に存在し、抽出条件および精製蛋白質との比較からそれぞれシナプシンＩとカルスペクチンであることを同定した。

２．アネキシンＶＩとシナプシンＶＩとの結合

アネキシンVIは、シナプシンＩａ，ｂの両者に結合し、ＮＴＣＢフラグメントへの結合実験からシナプシンＩのＮ末端頭部に結合することが判明した。アネキシンVIのシナプシンＩへの結合を非変性条件下で調べた結果、ＰＳ存在下でのＣａ$^{2+}$感受性は１２．６μＭで、Ｋｄは２７０ｎＭであった。アネキシンVIのシナプシンＩへの結合は、シナプシンＩのｃＡＭＰキナーゼ或いはＣａＭキナーゼIIによる燐酸化により著明に阻害された。

３．アネキシンＶＩとカルスペクチンとの結合

アネキシンVIは、カルスペクチンのβサブユニットに結合し、αサブユニットには結合しなかった。非変性条件下での結合の性質は、シナプシンＩへの結合と同様であった。次にＦ－アクチン－カルスペクチン相互作用へのアネキシンVIの効果を落下球法による粘度測定により解析した。カルスペクチンはＦ－アクチンを架橋するすることにより粘度を増加させるが、アネキシンVIは、Ｃａ$^{2+}$、ＰＳ共存下においてこの粘度上昇を阻害した。また、遠心法によるＦ－アクチンとカルスペクチンの結合解析では、アネキシンVIはＣａ$^{2+}$、ＰＳ共存下にカルスペクチンをＦ－アクチンから解離させた（図２）。さらに、アネキシンVIのカルスペクチンへの結合部位をトリプシン・フラグメントを用いて調べてみると、アネキシンVIはβサブユニットのＮ末端部に結合した。この部分は、アクチン結合部位の近傍であり、ジストロフィンやα－アクチニンのＮ末端部と高い相同性を示す部分であった。

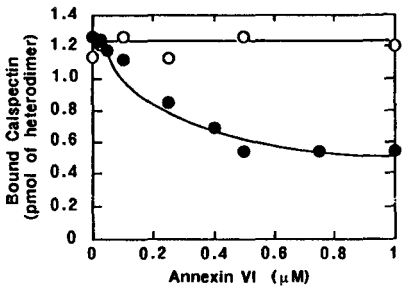


図2　アネキシンVIのカルスペクチンとＦ－アクチンとの結合に対する効果（遠心法）。●：Ｃａ$^{2+}$存在下、○：Ｃａ$^{2+}$非存在下。

考察

ラット脳におけるアネキシンVI結合蛋白質を検索した結果、アネキシンVIは、Ｃａ$^{2+}$、燐脂質依存性に約１４種類の蛋白質と結合した。アネキシンVIのこれらの蛋白質への結合は、以下の理由から直接の蛋白質－蛋白質相互作用であると考えられる。１）アネキシンVIの結合は、ＰＳ或いはＰＡを含む溶液で十分洗っても減少しない。２）アネキシンVIの燐脂質への結合は、０．５ＭのＮａＣｌで阻害されないのに対し、これらの蛋白質への結合は著明に阻害される。３）アネキシンVIとこれらの蛋白質の結合は、グルタルアルデヒドにより架橋される。

シナプシンＩは、シナプス前部におけるシナプス小胞のアクチンネットワークへの貯留に重要な役割を果たすと考えられている（１）。アネキシンVIのシナプシンＩへの結合の生理機能は、現時点では不明である。そのＣａ$^{2+}$感受性から考えてシナプス小胞の貯留に関与しているとは考え難い。むしろシナプス前膜直下で細胞膜とシナプス小胞の相互作用に関与している可能性が考えられる。

カルスペクチンは、アクチンと共に細胞膜骨格の主要構成員として種々の細胞機能に関与すると考えられている（２）。実際、白血球の分化や副腎髄質細胞のホルモン分泌に際しては、カルスペクチンを中心とする細胞膜骨格の再構築が起こることが知られている。今回の結果は、アネキシンVIがカルスペクチンに結合することによりカルスペクチンをＦ－アクチンから解離させ、カルスペクチンとＦ－アクチンとの架橋構造を消失させ得ることを示しており、アネキシンVIがこのような細胞機能に対応したＣａ$^{2+}$による細胞膜骨格制御に関与している可能性が考えられる。

参考文献

1. Hirokawa, N., Sobue, K., Kanda, K., Harada, A., and Yorifugi, H. (1988) *J. Cell Biol.* 108, 111-126
2. Sobue, K. (1990) *Neurosci. Res.* 13, S80-S91
3. Woolgar, J.A., Boustead, C.M., and Walker, J.H. (1990) *J. Neurochem.* 54, 62-71

106 中枢神経回路網障害の構造・機能修復をin vitroで解析する系の開発

○黒田洋一郎、藤井聡*、川原正博、小林和夫、村本和世
東京都神経科学総合研究所・神経生化学、*杏林大学医学部・生化学

1．中枢神経回路網障害の構造・機能修復をin vitroで解析するために、ラット大脳皮質培養ニューロンを用いた系を開発した。
2．メスまたはN_2レーザーを用いて、培養下でつくられた神経回路網を実験的に切断し、その構造・機能の回復を経時的に観察した。
3．切断２分された部分は、生き残ったニューロンからの突起の伸展、ニューロンの移動等によって形態的に再結合する状態が観察された。この現象はテトロドトキシンを存在させると、著しく抑制され、修復分子過程にニューロンの興奮を伴った活動依存性の部分と非依存性の部分があることが示唆された。
4．切断２分された二つの培養下の神経回路網で、Ca^{2+}の細胞内変動のoscillationとして観察される、全く異なったパターンの同期発火がみられ、機能修復の指標となることが示された。
5．既知の濃度の種々の阻害剤、抗体、薬物等の添加などにより、中枢神経回路網修復にかかわる細胞・分子メカニズムの経時的な解析が可能になった。

脳の老化及びそれに伴う疾患（アルツハイマー病など）、脳虚血、外傷、神経毒などによる傷害等で起る脳内神経回路網の破壊は、シナプス、樹状突起、軸索ニューロンの変性や脱落をひきおこし、神経機能の傷害として現れ、大きな社会問題となっている。一度死んだニューロンの再生は起らないが、生き残ったニューロンから突起が伸展し、さらに最も重要なシナプス結合が再び“正しく”起きてくれば、神経回路網は機能上代償され、神経機能は回復する。リハビリテーションはこの機能回復を目指して行なわれているが、実際に脳内で起っている細胞・分子レベルの過程については未知のことが多い。また回復を早めるための、リハビリによる繰り返し刺激が修復速度にどの様に役立っているかの問題もある。

演者らはラット大脳皮質ニューロン初代培養系で多数のシナプスを形成させることに成功し[1]細胞内Ca^{2+}の同時多点観察法[2]により、シナプス形成を簡便にアッセイする系をつくった[3]。電顕により同定されたシナプス密度は培養日数に従って増加し[4]、神経回路内のニューロンは自発的に同期発火を繰り返すようになり、その結果としてニューロン間で細胞内Ca^{2+}のoscillationがみられることが詳細な電気生理実験により確かめられた[5]。

本研究は、修復の分子メカニズムを探る手はじめとして、突起伸展など構造上の再生を観察しやすく、かつシナプスの再結合すなわち神経回路網機能の再生も観察できる、この大脳皮質ニューロン培養系を用い、まずレーザー、メスなどで物理的に回路網を破壊することを試みた。

[実験方法]

ラット胎児（胎齢18日）より大脳皮質を摘出し、パパイン酵素処理によりdissociateした後、polyethylenimineコートしたカバーガラス上にて、培養液として、Dulbecco's MEMに5% horse serum、5% new born calf serumを添加したものを用いて、培養を行った[1]。

培養１週間後、培養細胞を顕微鏡観察下、N_2レーザー（波長:337nm,Laser Science,Inc.）またはガラスピペットを用いたメスにより、切断を行った。切断は、培養皿（8mmx10mm）の短辺を一直線に部分的に約８０％まで切断した場合と、完全に切断した場合とを行い、切断後、位相差顕微鏡により、形態変化を時間を追って観察した。神経回路機能の指標として培養細胞に、fura-2/AMを投与し、細胞内Ca^{2+}の時間変化を高感度ビデオカメラによる同時多点計測システム[2]を用い、自発的なoscillationの発現を観察した。

[結果と考察]

メスによって巾数百μmの切断帯をつくり切断後の位相差顕微鏡像を時間を追って観察した。切断６時間後には切断帯には両側の生き残ったニューロンなどから突起が伸びだし、突起連絡が形成されている。またニューロンなどの移動も見られた（図１、ａ）。一方、切断後テトロドトキシン（TTX:20μM）を加えた条件では、突起の伸展、ニューロンなど細胞の移動が抑制されていた（図1、ｂ）。切断１２時間後ではＴＴＸ存在下でもかなり突起の伸展、細胞の移動は起っていた。Preliminaryな結果ではあるが、このような簡単な実験でも、構造修復の分子メカニズムに

、ＴＴＸで抑制されるニューロン活動依存性のものと、抑制されない非依存性のものがあることが示唆された。各種機能回復を目指すリハビリテーションは前者を促進するものと考えられる。

培養皿中のニューロンは、視野のほぼ全ての領域で同期した細胞内Ca^{2+}のoscillationを示す[3]。レーザーによる部分切断の場合は、約２０％ほど未切断部位がある場合は，分割されたどちら側の領域のニューロンからも同期したoscillationがみられた。切断後は、分割された各々の領域内では，oscillationは同期しているものの、切り離された領域間では、位相、振動数ともに異なる，２種類のoscillationの発現が、観察された（図２）。この状態からの，同期したoscillationの回復は、シナプス結合の再生・神経回路網の機能修復の指標となる。

既知の濃度の種々の阻害剤、抗体、薬物を添加し、免疫組織化学を組み合わせた形態と機能の観察により、修復の細胞・分子メカニズムが次々に明らかにできると期待される。

謝辞：実験の一部を行なって下さった㈱イオスの方々に感謝いたします。

【文献】

1)Muramoto,K.et al.,Proceedings of Japan Academy,64.SerB,319-322(1988).
2)Ogura A. et al.,Neuroscience Letters, 78,69-74(1987).
3)Kuroda,Y.et al.,Neuroscience Letters,135,255-258(1992).
4)Ichikawa M.et al.,Neuroscience Research,16,95-103(1993).
5)Robinson H. et al.,J.of Neurophysiol. (in press).

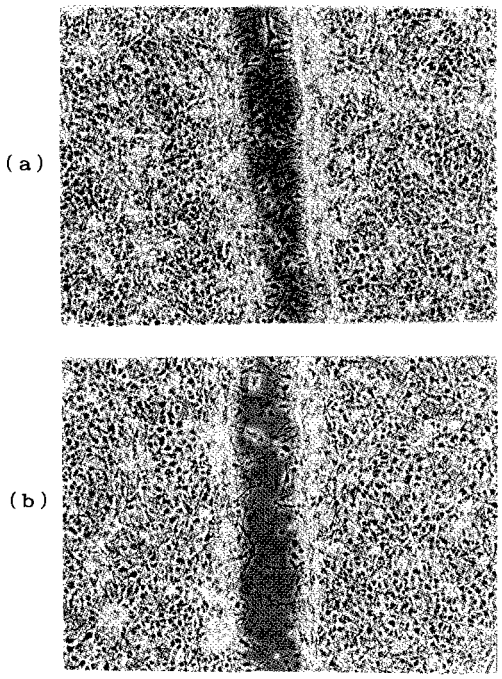


図１：切断６時間後の位相差顕微鏡像
（ａ）コントロール、（ｂ）ＴＴＸ添加

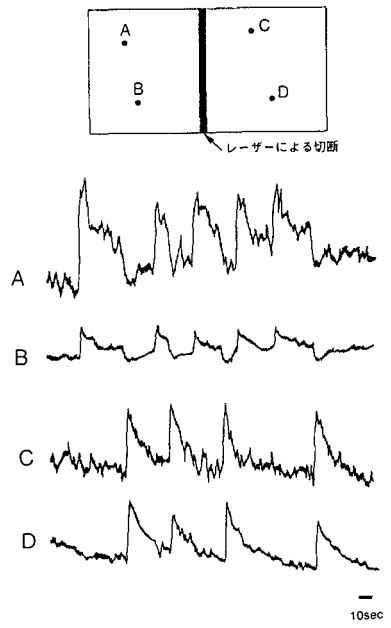


図２：レーザーによる切断１時間後の細胞内Ca^{2+}のoscillation
Ａ，ＢまたＣ，Ｄは完全に切断され分割された各々の領域内の代表的なニューロンの活動を著す。

107 海馬長期増強に伴うCaMキナーゼIIの活性化反応

福永浩司[1)]、L. Stoppini[2)]、D. Muller[2)]、宮本英七[1)]
([1)]熊本大・医・第一薬理、[2)]ジュネーブ大・医・薬理)

〔要約〕
海馬切片標本を用いて，長期増強 (LTP) 誘発に伴う 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) の Ca^{2+} 非依存性活性の発現について検討した。CA1 錐体細胞への興奮性入力線維 (シャファー側枝，交連線維) を短時間，高頻度刺激するとLTPが発現する。これに伴って刺激後5分で Ca^{2+} 非依存性活性は有意に上昇し，この上昇は少なくとも1時間持続した。さらに，LTP 誘発後1時間において詳細に調べた結果，Ca^{2+} 非依存性活性に加えて，Ca^{2+}／CaM 依存性活性 (全活性) の有意な上昇が見られた。酵素の自己燐酸化反応の指標である Ca^{2+} 非依存性活性の全活性に対する割合も有意に上昇し，自己燐酸化反応の亢進が確認された。D-2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5) によりLTP発現を阻害すると，Ca^{2+} 非依存性及び全活性の上昇はともに完全に抑制された。以上の結果より，CA1 のLTPにおいてはNMDA受容体活性化に続いて，CaMキナーゼIIが活性化され，少なくとも1時間という時間経過では，本酵素による機能蛋白質の燐酸化反応が亢進していると考えられる。

〔目的〕
CaMキナーゼIIは神経細胞に豊富に発現し，神経伝達物質の生合成，放出および受容体，イオンチャネル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。私達はこれまで，ラット小脳顆粒細胞，海馬神経細胞の初代培養系を用いて，グルタミン酸受容体刺激に伴って Ca^{2+} 非依存性活性が上昇することを報告した (1～3)。CaMキナーゼIIの種々の阻害剤を用いた研究によって，本酵素のLTPの誘導，維持機構への関与が示唆されているが，LTP 誘発に伴って本酵素が活性化されるという証拠は得られていない。本研究ではLTP誘発に伴うCaMキナーゼIIの *in situ* での活性変化について検討した (4)。

〔実験方法〕
海馬切片標本の作成とLTP誘発の刺激条件は Dunwiddie と Lynch の方法 (5) に従った。両側性に高頻度刺激後，CA1 錐体細胞層をパンチアウトし，液体窒素にて凍結した。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+} 非依存性活性 (EGTA 存在下) および全活性 (Ca^{2+}／CaM 存在下) を syntide 2，synapsin I を基質として測定した。結果は低頻度で刺激した CA1 錐体細胞での活性を 100 % として割合 (%) で表した。同様の実験を生後5日目のラットから約10日間器官培養した海馬切片を用いて行なった。器官培養は Stoppini らの方法 (6) に従った。

〔結果と考察〕
最初に，本研究で用いた syntide 2 を基質としたCaMキナーゼIIの活性測定法の特異性について検討した。syntide 2 はCaMキナーゼIIとプロテインキナーゼC (PKC) によって燐酸化される。海馬の細胞抽出液を用いた本実験の条件では Ca^{2+} 非依存性活性，全活性のそれぞれ 90 %，100 % がCaMキナーゼIIの阻害ペプチドである $CaMK_{281\text{-}309}$ (20 μM) で抑制された。精製したPKCを完全に阻害する 2 μM の $PKC_{19\text{-}36}$ 阻害ペプチドではまったく抑制は見られなかった。これらの結果から，Ca^{2+} 非依存性活性，全活性ともにCaMキナーゼIIの活性を反映していると考えられる。

高頻度刺激後，5分，30分，1時間で CA1 錐体細胞をパンチアウトし，CaMキナーゼIIの Ca^{2+} 非依存性活性，全活性を syntide 2 を基質として測定した。Ca^{2+} 非依存性活性は刺激後5分でコントロールに比べて有意に上昇し，この上昇は少なくとも1時間持続した。興味あることに，Ca^{2+} 非依存性活性に加えて全活性も有意に上昇した。私達は酵素の活性化すなわち自己燐酸化反応の指標として Ca^{2+} 非依存性活性の全活性に対する比 (%) を用いている。この比においても5，30，60分で有意な上昇が見られ，自己燐酸化反応が亢進していることが確認された (図1)。さらに，特異的な基質である synapsin I を用いて，刺激後1時間で解析した。syntide 2 と同様に，Ca^{2+} 非依存性活性，全活性および両者の比が有意に上昇した (図2)。LTPにおけるCaMキナーゼIIの活性化が異なる基質を用いて確認された。

生後5日目のラット脳から器官培養した海馬切片では，培養後 10日目ぐらいから LTP の現象が観察される (6)。そこで，培養後10日目以降に CA3 からの CA1 への入力線維を高頻度刺激し，LTP誘発後，1時間で同様に活性を測

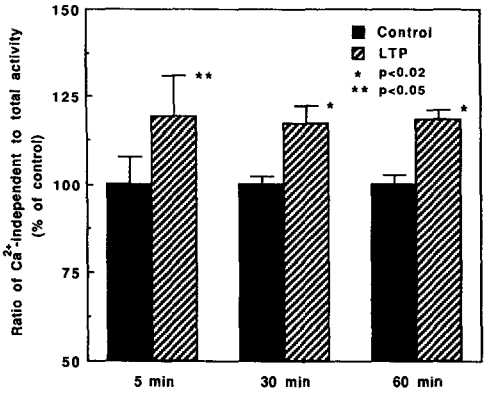


図1 海馬 CA1 野の LTP 誘発に伴う Ca^{2+} 比依存性活性の上昇。CaM キナーゼIIの活性は syntide 2 を基質として測定した。

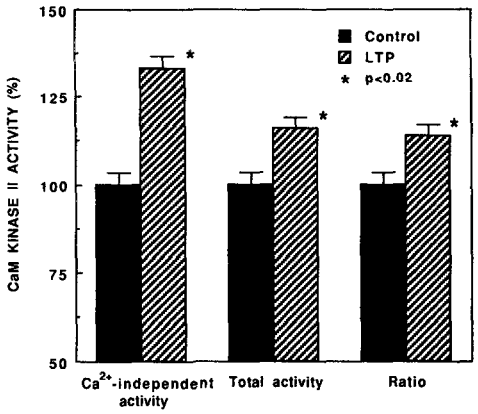


図2 LTP 誘発に伴う CaM キナーゼIIの活性化反応。基質として synapsin I を用いて測定した。

定した。器官培養した切片においても Ca^{2+} 非依存性活性，全活性および両者の比の有意な上昇が見られた（図3）。海馬切片の器官培養は LTP の発現するまでの神経回路網の発達過程を研究する上で良いモデルとなる。つぎに，NMDA 受容体の拮抗的阻害剤である AP5 により LTP の発現を阻害すると，Ca^{2+} 非依存性活性，全活性の上昇がともに完全に抑制された（図3）。

最後に，プロテインホスファターゼ 1，2A の阻害剤である calyculin A の LTP の発現，CaM キナーゼIIの活性に対する効果について検討した。1 μM の calyculin A の前処理によって CaM キナーゼIIの Ca^{2+} 非依存性活性は約 76 % 上昇した。この条件においても高頻度刺激によって LTP が誘発され，Ca^{2+} 非依存性活性と全活性の上昇はなお観察された（図3）。

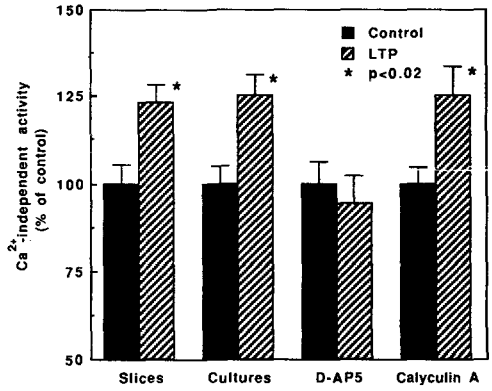


図3 LTP 誘発に伴う CaM キナーゼIIの活性化反応に対する AP5，calyculin A の効果

以上の結果は，CaM キナーゼIIが LTP の誘導に関与するというこれまでの説をさらに支持するものである。一方，阻害剤を用いた実験により LTP の維持過程には本酵素の活性化を必要としないと考えられているが，CaM キナーゼIIの活性上昇は持続しており，少なくとも 1 時間という時間経過では本酵素による機能蛋白質の燐酸化反応が亢進していると考えられる。さらに，CaM キナーゼIIの全活性の上昇が LTP で観察された。この理由として，酵素のトランスロケーション，潜在的な酵素の活性化，ホスファターゼ活性の変化，酵素蛋白質の誘導などが考えられる。最近 Mackler らは CA1 の LTP 誘導に伴って CaM キナーゼIIの mRNA が有意に増加していると報告した（7）。全活性の上昇がこの結果を反映しているのか検討する必要がある。さらに CaM キナーゼIIの標的蛋白質を検索し，LTP 発現における本酵素の役割を明らかにする。

〔文 献〕

1) Fukunaga, K., Rich, D.P. & Soderling, T.R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21830-21836
2) Fukunaga, K. & Soderling, T.R. (1990) *Mol. and Cell. Neurosci.* **1**, 133-138
3) Fukunaga, K., Soderling, T.R. & Miyamoto, E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22527-22533
4) Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E. & Muller, D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7863-7867
5) Dunwiddie, T. & Lynch, G. (1978) *J. Physiol.* **276**, 353-367
6) Stoppini, L., Buchs, P.-A. & Muller, D. (1991) *J. Neurosci. Methods* **37**, 173-182
7) Mackler, S.A., Brooks, B.P. & Eberwine, J.H. (1992) *Neuron* **9**, 539-548

108 神経ペプチドプロセシング酵素の軸索内輸送と生理機能

加藤 武
(横浜市大大学院・総合理学・分子認識)

〔要約〕 神経ペプチド前駆体のプロセシング酵素の候補は多く報告されている。その生理機能を明らかにする目的で私達は、ラット坐骨神経内軸索輸送を用いて研究してきた。今回、 Carboxypeptidase-B 様酵素 (CPH) の軸索内輸送を測定するため、酵素の基質 Dns-Gly-Lys を合成し、高感度な測定方法を用いて研究した。その結果、以前の研究で明かにしたC－末端アミド化酵素と同様に、CPH が顆粒中に存在し、速い軸索流によって輸送されていることが明かとなった。しかし、Boc-Gly-Arg-Arg-MCA を用いた塩基性アミノ酸対プロセシング酵素活性では軸索内輸送が見られていない。これらの結果から、この方法は適当な基質を用いれば生理機能を有する神経特異的プロセシング酵素を明らかにできることを示唆している。

神経ペプチドは脳、腸管などに存在し、その生理機能も多様である。これらの機能発現には、神経ペプチドの生合成が深く関わっている。最近神経ペプチドの生合成酵素の候補が多く発見された。塩基性アミノ酸対プロセシング酵素 (PBAPE) として PC2, PC3 など[1]、C－末端塩基性アミノ酸 carboxypeptidase-B 様酵素として carboxypeptidase-H (CPH) など[2]、そしてC－末端アミド化酵素として peptidylglycine- α-amidating monooxygenase (PAM) [3]が、神経ペプチドのプロセシングに関与していると考えられている。しかし、これらの酵素が神経内で生理機能を発現しているかどうか不明な点が多い。私達はラット坐骨神経を用いて神経ペプチドを調節する酵素の軸索内輸送を研究してきた。そして PAM が順行性に輸送されていることを最近報告した[4]。今回の実験ではラット坐骨神経を用いて CPH が軸索内輸送されているか否かを明らかにすることが目的である。そのために先ず高感度な CPH 活性の測定法を開発して研究を行った。

実験方法：Wistar 系雄性ラットはペントバルビタール麻酔下両側の坐骨神経を 2 ケ所で結紮し、12, 24, 48, 72 時間後に断頭し、坐骨神経を氷上に取り出した。坐骨神経はそれぞれ 3 mm に分け (P1 - P4, M1 - M3, D1 - D3) (Fig. 1A) 両側をプールした。各切片は酢酸緩衝液中でホモジネートとし、遠心後あるいはそのまま酵素標品とした。CPH 活性は合成した dansyl-glycyl-lysine (Dns-Gly-Lys) を基質として用い、酵素反応液を HPLC- 蛍光分光法 (矢嶋ら[5]) により測定した。また PAM 活性は Dns-D-Tyr-Val-Gly, PBAPE 活性は Boc-Gly-Arg-Arg-MCA をそれぞれ基質として用い、HPLC-蛍光分光法などにより測定した。

結果と考察：

1. PBAPE 様活性：Boc-Gly-Arg-Arg-MCA は PBAPE 活性測定の合成基質として Mizuno ら[6]によって開発されたが、図１Ｂに示すように結紮 48 時間後に P1 と D1 の両側に活性が高いことなどから、今回用いた合成基質は lysosome 酵素などの基質としても働いていると思われ、神経ペプチドプロセシング酵素としての PBAPE 活性は測定できていないと考えている。

2. PAM 活性：今回測定したラット坐骨神経内の PAM 活性の結果は以前私達が報告した結果と同じであった[4]。PAM は二種類の酵素(PHM, PAL) からなっている。最近私達はラット坐骨神経内の PAM が軸索輸送中に低分子量の酵素にプロセスされることを見いだしており (Takasugi et al., in preparation)、P1 中には色々な分子サイズの PAM が存在するものと思われる。

3. CPH 様活性：Fig. 1D に示すように P1 の CPH 様活性は D1 に比べて 2 倍以上高く、M1, M3 の活性は低かった。P1 に存在する酵素の至適 pH は 5.5 であり、Dns-Gly-Lys を用いて測定している酵素は CPH であると考えられる。坐骨神経のホモジネートを可溶性画分と膜結合性画分に分けて酵素活性を測定したところ (Fig. 2)、両方の画分に同程度活性が存在することが明かとなった。これらの結果から坐骨神経内に CPH が存在し、可溶及び膜結合の両型で、主に順行性に輸送されていることが明かとなった。更に、ラット坐骨神経内の CPH はこれまで調べられているカテコラミン合成酵素や PAM と同様に、速い軸索流によって運ばれていることが Fig. 3. から明らかである。

結語：神経ペプチドプロセシング酵素であるか否かを明らかにする方法として、坐骨神経内軸索輸送を用いる方法は大変有用であることが明かとなった。しかし PBAPE 活性の測定で見られたように、基質によっては測定方法に限界があり、今後更

Fig. 1A Schematic illustration of the ligation in rat sciatic nerve

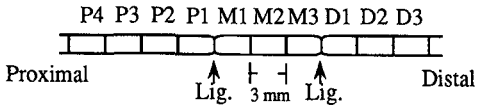


Fig. 1B

Paired basic amino acid residue processing enzyme activity in rat sciatic nerves 48 hours after ligation

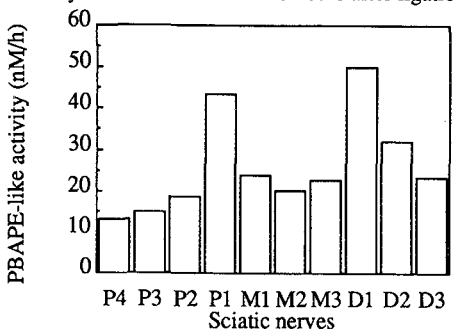


Fig. 1C

Peptidylglycine α-amidating monooxygenase activity in rat sciatic nerves 48 hours after ligation

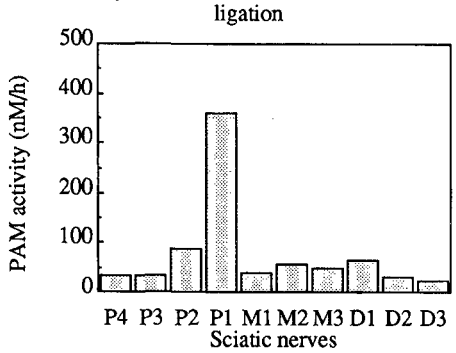


Fig. 1D

Carboxypeptidase H-like activity in rat sciatic nerves 48 hours after ligation

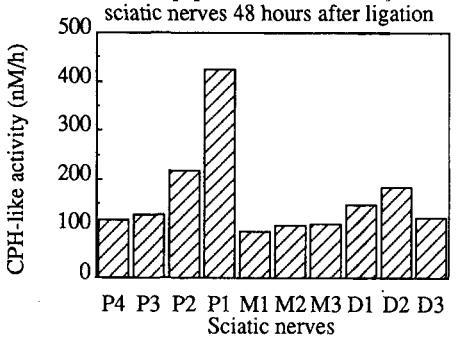


Fig. 2

CPH-like activity in the soluble and membrane-associated fractions of rat sciatic nerves 48 hours after ligation

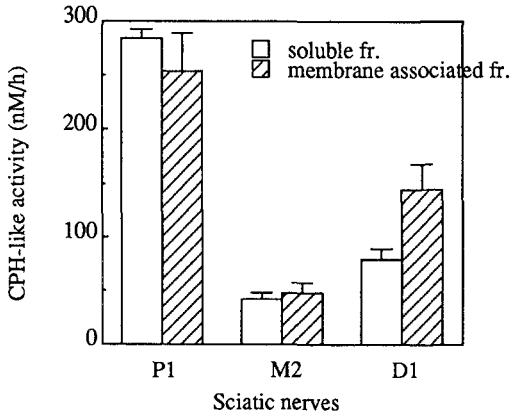
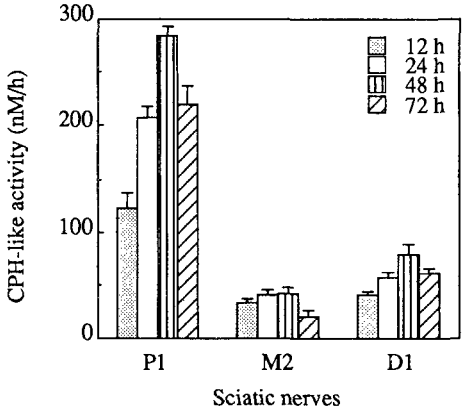


Fig. 3

Carboxypeptidase H-like activity in the soluble fraction of rat sciatic nerves 12, 24, 48, and 72 hours after ligation



に工夫を要する。

この研究は矢嶋隆一氏（ダイナボット総合研究所）との共同研究である。

References

1) Benjannet S. et al., Proc.NAS 88, 3564 (1991)

2) Lynch D.R. et al., J.Neurosc. 10, 1592 (1990)

3) Glembotski C.C. et al., JBC 259, 6385 (1984)

4) Tozawa K. et al., J.Neurochem. 55, 745 (1990)

5) 矢嶋ら　日本生化学大会 (1993)

6) Mizuno K. et al., BBRC 144, 807 (1987)

109 培養アストログリアNa^+–Ca^{2+}交換系: その存在とK^+による調節

田熊一浩，松田敏夫，橋本　均，浅野省一，馬場明道
（大阪大学・薬学部・薬理）

〔要約〕

培養ラットアストロサイトにおいてNa^+-Ca^{2+}交換系の存在を活性(Na^+依存性のCa^{2+}取り込み促進と細胞内Ca^{2+}($[Ca^{2+}]i$)の増加)、蛋白、mRNAのレベルで検討した。細胞内Na^+を増加させるウアバイン、モネンシンにより、Ca^{2+}チャンネル阻害薬非感受性、Na^+依存性の$^{45}Ca^{2+}$取り込み促進、及び$[Ca^{2+}]i$増加が見られた。心臓Na^+-Ca^{2+}交換系の抗体を用いたウエスタンブロットにより交換系蛋白の存在が示された。ノザンブロット解析によりNa^+-Ca^{2+}交換系mRNAの発現を認めた。アストロサイトNa^+依存性$^{45}Ca^{2+}$取り込みは外液K^+により活性化された。この活性化は細胞膜の脱分極やK^+チャンネルの活性化に起因していなかった。

【目的】

細胞内外のNa+濃度勾配によりCa^{2+}を輸送するNa^+-Ca^{2+}交換系は$[Ca^{2+}]i$濃度調節に関与する重要な膜蛋白で、心筋、視細胞をはじめ様々な細胞の存在していることが報告されている。中枢神経系においては、神経膜標品、シナプトゾーム、脳切片の系で詳細に検討され、脳障害や脳虚血の際の$[Ca^{2+}]i$増加への関与が示唆され、またK^+による活性調節等が報告されている。一方、グリア細胞においてはCa^{2+}代謝に関して不明な点が多く、Na^+-Ca^{2+}交換系の存在は未だ不明である(1)。本研究は、培養ラットアストロサイトにおけるNa^+-Ca^{2+}交換系の存在を明らかにする目的で行った。

【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(2)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10-20日培養後二次培養をし、細胞内Ca^{2+}測定の実験には1-2日目の細胞を、またその他の実験には10-20日のコンフルエントな細胞を用いた。Na^+-Ca^{2+}交換活性は細胞内Na^+濃度を増加させる条件でのNa^+依存性の$^{45}Ca^{2+}$取り込み(逆モード)で測定した。$^{45}Ca^{2+}$取り込みは、Hanks balanced salt solution (HBSS)中で37℃で行った。$[Ca^{2+}]i$濃度測定はfura-2を用いた二波長顕微分光測定法により行った(3)。ウエスタンブロット解析は、心臓Na^+-Ca^{2+}交換系抗体(SWant)を用いて行った。ノザンブロット解析はアストロサイトよりpoly(A)$^+$ RNAを調製し、Na^+-Ca^{2+}交換系cDNA翻訳領域の3'側約1kb(Prof. Philipsonより)をプローブとして用いて行った。3,4-Dichlorobenzamilは Kaczorowski博士(Merck Sharp & Dohme Res. Lab.)より頂いた。

【結果】

Fig. 1に$[Ca^{2+}]i$測定の結果を示す。Na^+イオノフォアであるモネンシン、Na^+,K^+-ATPase阻害薬ウアバインは、それぞれ単独では短時間において$[Ca^{2+}]i$に影響を及ぼさなかったが、両者の併用により$[Ca^{2+}]i$の著明な増加が認められた。この$[Ca^{2+}]i$の増加作用は灌流液中のCa^{2+}、Na^+の存在に依存していた。また、灌流液からK^+を除くとCa^{2+}レスポンスの減弱が認められた。一方、$[Ca^{2+}]i$の増加はCa^{2+}チャンネル阻害薬の影響を受けなかった。モネンシンとウアバンの併用は$^{45}Ca^{2+}$の取り込みを促進した。モネンシンとウアバインにより促進される$^{45}Ca^{2+}$取り込みは、Ca^{2+}チャンネル阻害薬により影響を受けなかったが、Na^+-Ca^{2+}交換系の阻害薬であるアミロライド、3,4-dichlorobenzamil(DCB)により抑制された(Fig. 3)。モネンシン、ウアバインによるCa^{2+}取り込みは、外液K^+により促進された(Fig. 2)。この促進作用は、脱分極を阻害するcarbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazoneの存在下、及びtetraethylammonium、CsCl、2,3-diaminopyridine等のK^+チャンネル阻害薬の存在下でも見られた。外液K^+濃度のウエスタンブロット解析により160、120、36kDaのバンドが検出された。ノザンブロットにより心臓の場合と同様に7kbのバンドが認められ、その発現量は心臓より少なかったが脳のそれより著しく多かった。

【考察】

近年、培養グリア細胞においてNa^+-Ca^{2+}交換系の存在(1)、あるいはそのCa^{2+}パラドックス障害への関与(5)を示唆

する報告なされているが、本細胞におけるNa^+-Ca^{2+}交換系の存在は明らかにされていない。本研究は、培養アストロサイトにNa^+-Ca^{2+}交換系が存在していることを、活性(逆モード)、蛋白、mRNAレベルで示した。本研究で用いた培養細胞には他の細胞も混入しており(90%以上がGFAP陽性であるが)、検出されたNa^+-Ca^{2+}交換系がアストロサイト以外の細胞に由来している可能性も考えられるが、この点は単一アストロサイトでの$[Ca^{2+}]i$レスポンスの成績から否定される。mRNAの発現で見ると、アストロサイトにおける発現量は脳のそれよりかなり多いことが示された。また、活性調節に関しては、K^+による活性化が見られ、この調節様式は近年報告されている神経膜標品でのもの(4)と類似していた。これらの成績は、グリア細胞Na^+-Ca^{2+}交換系が神経膜のものと同様で視細胞のもの(活性が完全にK^+に依存している)と異なるタイプである可能性、あるいは従来より神経標本で報告されているNa^+-Ca^{2+}交換系がグリア細胞に由来している可能性を示唆する。

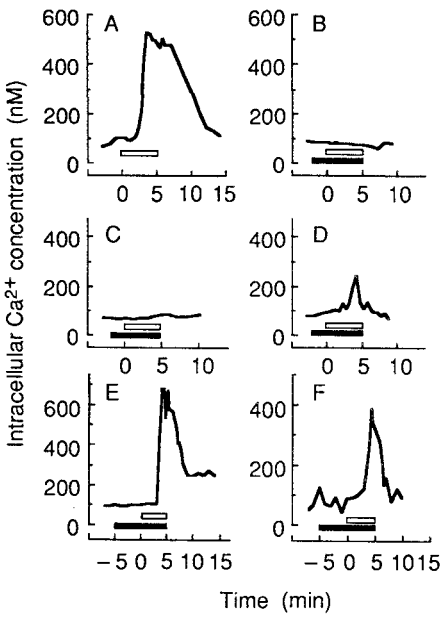


Fig. 1. Effects of external cations on the Ca^{2+} increases induced by ouabain plus monensin. Fura-2-loaded astrocytes were stimulated with 1 mM ouabain plus 100 μM monensin in normal (*A*), Ca^{2+}-free (*B*), Na^+-free (*C*), K^+-free (*D*) HBSS, in normal HBSS containing 20 μM Cd^{2+} (*E*), and 100 μM Ni^+ (*F*). Horizontal bars indicated perfusion with each HBSS (*solid bars*) and ouabain plus monensin (*open bars*).

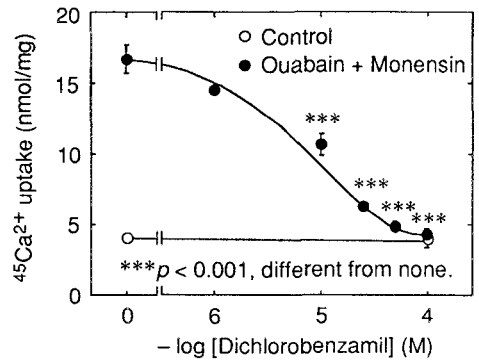


Fig. 2. Effect of 3,4-dichlorobenzamil (DCB) on $^{45}Ca^{2+}$ uptake stimulated by ouabain plus monensin.

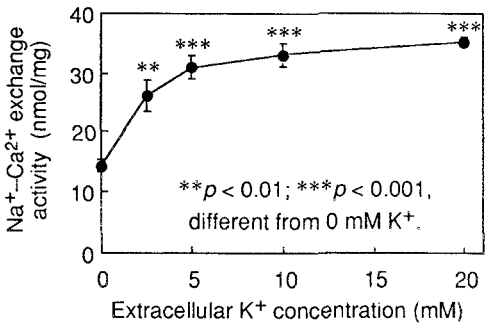


Fig. 3. Effect of extracellular K^+ on Na^+–Ca^{2+} exchange activity in cultured rat astrocytes.

【文献】

(1)Blaustein, M.P., Goldman, W.F., Fontana, G., Krueger, B.K., Santiago, E.M., Steele, T.D., Weiss, D.N. and Yarowsky, P.J. (1991) Ann. N.Y. Acad. Sci., 639, 254-274.

(2)Frangakis, M.J. and Kimelberg, H.J. (1984) Neurochem. Res. 9, 1689-1698.

(3)Tsien, R.Y., Rink, T.J. and Ponue, M. (1985) Cell Calcium 6, 145-157.

(4)Dahan, D., Spanier, R. and Rahamimoff, H. (1991) J. Biol. Chem. 266, 2067-2075.

(5)Kim-Lee, M.L., Stokes, B.T. and Yates, A.J. (1992) Glia 5, 56

110 ストレスとHSP28/27の重合型と解離型

：グリオーマ細胞およびラット組織での解析

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〕 低分子量ストレス蛋白質、HSP27/28は筋組織などではαBクリスタリンと複合体を形成している。一方、HSP28/27は燐酸化され、その程度によって等電点の異なる4-5種類のisomerが存在する。我々は、庶糖濃度勾配遠心によってヒトグリオーマ細胞およびラット組織中のHSP28/27が分子サイズの大きい(500-300 kDa)分画（以下 L-form)と、小さい(<70 kDa)分画(S-form)に分離されることを見つけ、これらがストレスに対してどのように応答するか検討し、以下に示す結果を得た。

1) ヒトグリオーマ細胞株，U251 MG，U118 MG，A172などの細胞抽出液を庶糖濃度勾配(10-40%)上に乗せ、遠心するとHSP28がL-formとS-formに分離された。ラット各組織の抽出液中のHSP27も同様に2分画に分離した。しかし、αBクリスタリンも高濃度共存する細胞(U373 MG)およびラットヒラメ筋では大部分のHSP28/27はL-formで存在した。

2) グリオーマ細胞に45℃/15分間の熱ストレスを負荷するとL-form，S-formともに減少し、とくにL-formが激減した。その後37℃で培養を続けると、徐々に回復し、４時間後には対照のレベルに戻り、８時間後にはL-formは対照細胞の２倍以上に達した。

3) グリオーマ細胞を亜砒酸ナトリウムに暴露すると、速やかにL-formが減少し、それに伴って S-form が増加した。暴露(１時間/37℃)後数時間で L-form は元のレベルにもどった。その後合成促進による増量で、十数時間後には L-form は対照細胞の2倍以上のレベルに達した。

4) ラットを42℃/20分間温浴させて、0、8、16時間後の心筋、大腿直筋、小脳、副腎などの L-，S-form のHSP27もグリオーマ細胞と同様に熱ストレスに応答した。しかし、上記組織中のαBクリスタリンは殆どが500 kDaの位置に沈降し、熱ストレスに対しては、L-form 量が増減するだけで、αBの S-form の顕著なピークは出現しなかった。

以上の結果より低分子量ストレス蛋白質、HSP28/27は細胞内では重合型のL-formと解離型のS-formが存在し、L-form/S-formの濃度比はストレス負荷後に著しく減り、その後の合成促進に伴ってL-formの量が回復・増加することが明かとなった。

低分子量ストレス蛋白質、HSP28/27は、αBクリスタリンと同様に、重合(self-assembly)する性質があり、細胞内では高分子量のaggregatesとして存在すると報告されている(1)。また、ヒトHSP28あるいはラットHSP27が筋組織、神経組織でαBクリスタリンと複合体を形成していることが示唆されている(2)。一方、HSP28/27は燐酸化を受け、等電点の異なる4-5種類のisomerが存在することも知られている(3)。しかし、これらの存在様式および修飾の生物学的意義については全く不明である。我々はヒトグリオーマ細胞の抽出液を庶糖濃度勾配遠心法で分画したところ、HSP28が L-form と S-form の二つの成分に分離することを見つけた。細胞中のこれら二成分が熱および化学ストレスを負荷した時にどのように変化するかを解析したのでその結果を報告する。

【方法と材料】

細胞培養と抽出液の調製 ヒトグリオーマ細胞株、U251，U118，A172 および U373 MG は37℃、95% air/5% CO_2 下で 10% FCS 添加培地で培養した。大部分の実験は60-mm皿で培養し、confluent状態に達した細胞を用いた。熱ストレスは、培養皿を45℃に維持したウオーターバスに15分間浸して負荷した。化学ストレスの負荷には、培養皿に各種物質溶液を添加し、37℃で1時間後に正常培地に置換した。細胞はPBSで３回洗浄し、皿ごと-20℃で凍結保存した。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、45000 rpm/40 minの遠心上清を分析に用いた。

庶糖濃度勾配遠心(SDG) 上記の上清0.2 mlを50 mM Tris-HCl，10 mM EDTA (pH7)中で作製した10-40%庶糖濃度勾配(3.5 ml)溶液上に乗せ、4℃で36000 rpm/16h 遠心した。各サンプルはチューブ底より取り出し15分画した。

HSP28/27およびαBクリスタリンの測定 既に報告してるEIA法(2,4,5)にて測定した。

【結果】

ヒトグリオーマ細胞のHSP28およびラット組織のHSP27の沈降パターン U251 MG，U118 MG，U373 MG，A172 グリオーマ細胞株の抽出液をSDGで分画し、それぞれのフラクション中のHSP28を測定した結果の一部を図１に示した。HSP28は二つの分画に分かれ、L-formは大腸菌のβ-Gal(540 kDa)と同じか少し小さいサイズであるのに対し、S-formは、BSA (67 kDa)より小さい。U373 MG細胞では、大部分が L-formであり、U118 MG 細胞では大半はS-formであった。ラット心筋、大腿直筋、小脳の抽出液中のHSP27も2型に分離した。

熱ストレスおよび化学ストレス負荷後の沈降パターンの経時的変動 U118 MG細胞を45℃/15分間加熱すると、HSP28は核分画へ移行し、L-form は検出できなくなり、S-formも激減した（図2）。しかし、18時間後には新しく合成されたHSP28も加わって、増量

し、とくにL-formの増加が顕著であった。同じ細胞を200 μMの亜砒酸ナトリウムに一時間暴露すると、L-formが熱ストレスの時と同じように消失した。しかし、この減少分がS-formの増量となって現れた。18時間後にはL-form、S-formともに増量していた(図2)。一方、この細胞株には僅かしか存在しないαBクリスタリンは熱および亜砒酸ナトリウム処理で誘導されるが、すべてがL-formとして存在した。ストレスに伴うHSP28の沈降パターンの変化は、U251 MG, A172 など他の細胞株でも類似の変化が認められた。図3にU251 MG細胞を亜砒酸ナトリウム(200 μM)に暴露した時のL-formとS-formの比率の経時的変化を示した。

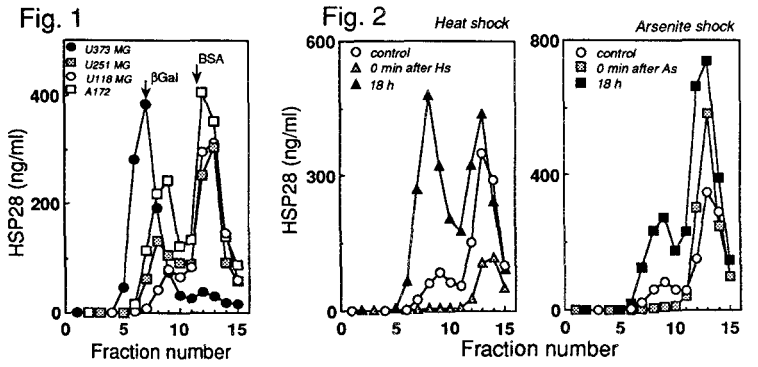
熱ストレスを負荷したラット組織のHSP27の変動　絶食した雄ラット（体重250g）を42℃/20分間温浴させ、0, 8, 16時間後に採取した組織の可溶性分画を同じようにSDG分画して解析した。図4に大腿直筋、小脳、心筋のHSP27の沈降パターンを示した。細胞株の熱ストレスの際に見られた変化と本質的に同じことが観察された。

【考察】

HSP27/28分子の細胞内存在様式については、熱ストレス時に凝集して核あるいはゴルジ小体に移行するなどの報告がある。αBクリスタリンとともに凝集し易い性質を持ち、この特性が、これらのストレス蛋白質が共存すると、他の蛋白質の熱変性による凝集、沈澱を阻止する効果(6,7)に寄与していると思われる。今回われわれが明らかにした事実は、HSP27/28が細胞内では重合体と解離体の二つの状態で存在し、その濃度比がストレス負荷により大きく変化することである。すなわちストレス負荷直後には重合体が激減し、解離体が増加（化学ストレスの場合）する。しかし、数時間後には、新たに誘導合成されるHSPとともにL-formの蓄積が始まることである。次の演題で報告するように、亜砒酸やカドミウムなどのHSPの誘導物質以外に、フォルボールエステルやサイトカインによっても重合体の解離が燐酸化を伴って促進されることから、HSP28/27分子の存在状態とその機能の間に密接な関連があることが示唆される。

【文献】

(1) J. Biol. Chem. 262, 15359-15369, 1987.　(2) J. Biol. Chem. 267, 7718-7725, 1992.　(3) J. Biol. Chem. 260, 3058-3062, 1985.　(4) Biochim. Biophys. Acta 1074, 201-208, 1991.　(5) J. Biochem. in press.　(6) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 10449-10453, 1992.　(7) J. Biol. Chem. 268, 1517-1520, 1993.



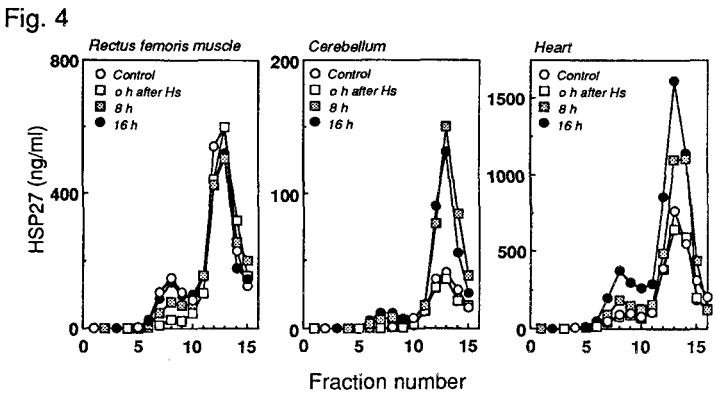


図1．ヒトグリオーマ細胞株上清中のHSP28の沈降パターン

図2．U118 MG細胞に熱(45℃/15分)またはAs (200 μM/1 h)ストレス負荷後のHSP28の沈降パターンの変化

図3．U252 MG細胞にAs (200 μM)暴露中に起こる2型のHSP28の変化

図4．熱ストレス負荷ラット組織のHSP27の沈降パターン

111 低分子量ストレス蛋白質複合体の燐酸化による解離

加藤兼房、長谷川かおり、後藤幸代、稲熊 裕
（愛知県コロニー・発障研・生化）

〔要約〕 ヒトグリオーマ細胞株U373 MGでは、低分子量ストレス蛋白質であるαBクリスタリンとHSP28を多量発現し、低分子サイズ(<70 kDa)の HSP28 (S-form)が僅かに認められるが、両蛋白質の大部分は約500 kDaの複合体 (L-form) を形成している。このU373MG細胞に各種のストレスあるいはフォルボールエステル(TPA)やサイトカインを作用させ短時間に起こる両蛋白質の分子サイズの変化を庶糖濃度勾配遠心法で解析し以下の結果を得た。

1) U373 MG細胞中のHSP28は、TPA (100 nM), interleukin-1α (IL-1α, 40 ng/ml), tumor necrosis factor α (TNF-α, 200 ng/ml)、あるいはオカダ酸(OA, 100 nM)を60分間作用させると、500 kDaのL-formが減少し、<70 kDaのS-formが増加した。しかし、HSP28とαBクリスタリンの誘導は認められなかった。一方、解離したαBクリスタリンは検出されなかった。

2) HSP28の誘導を引き起こす亜砒酸ナトリウム(As, 200 μM)、塩化カドミウム(200 μM)、および硫酸亜鉛 (200 μM)を60分間作用させた場合もHSP28の解離が観察された。しかし、熱ストレスの場合は、不溶性（核）分画への移動のため、沈降パターンからはHSP28の解離促進の有無は分からなかった。αBクリスタリンの解離は化学ストレス負荷の場合も認められなかった。

3) 上記の薬物あるいは誘導物質によるHSP28の解離は、αBクリスタリン重合体の沈降速度の有意の低下をもたらした。

4) [^{32}P]無機燐酸を取り込んだ HSP28は S-form 分画のみならず L-form 分画にも検出されたが、αB中には検出されなかった。また、HSP28に取り込まれた放射能活性は上記の薬物、誘導物質、さらに熱ストレスによっても著しく促進されていた。

以上より、U373 MG 細胞では、HSP28の燐酸化の促進によって、L-formは解離すること。しかし、αBクリスタリンは燐酸化も受けないし、解離しないこと。また、HSP28の燐酸化・解離促進はHSP28の合成促進機構に直接連関していないことが推測された。

哺乳動物の低分子量ストレス蛋白質、HSP28/27がストレス負荷後の早期に燐酸化を受けること、また誘導作用のない TPA, IL-1α、TNF-αさらにphosphoserine/phosphothreonine protein phosphataseの阻害剤であるOAを細胞に作用させると燐酸化が促進されることが報告されている(1-3)。しかし、これらの燐酸化の生物学的意義については不明である。われわれはヒトグリオーマ細胞やラット組織の抽出液を庶糖濃度勾配遠心するとHSP28が二つの成分に分かれ、その濃度比がストレス負荷のよって変わることを前演題で示した。ここでは、TPA, OA, IL, TNFなどの燐酸化促進薬物によって短時間に L-form のHSP28が S-form のHSP28に変換することを示す。また、その一次構造が HSP28と類似性が高く、しかもストレス蛋白質の一員として認知されたαBクリスタリンを HSP28と同じように多量に発現しているU373 MG細胞を用いて、各種ストレスおよび上記の燐酸化促進物質に対してαBクリスタリンがどのように分子サイズを変化させるのかを解析したので報告する。

【方法と材料】

細胞培養と抽出液の調製 ATCCより入手したヒトグリオーマ細胞株、U373 MG は37℃、95% air/5% CO2 下で 10% FCS 添加イーグルMEM培地で培養した。[^{32}P]標識実験には Pi-free 培地を用いた。大部分の実験は60-mm皿を用い、confluent状態に達した細胞で行った。各種薬物および化学物質を添加し、37℃で1時間作用させた後、PBSで３回洗浄し、皿ごと-20℃で凍結保存した。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，45000 rpm/40 minの遠心上清を分析に用いた。

庶糖濃度勾配遠心(SDG) 上記の上清0.2 mlを50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA中で作製した10-40%庶糖濃度勾配(3.5 ml)溶液上に乗せ、4℃で36000 rpm/16 h遠心した。各サンプルはチューブ底より取り出し15分画した。

HSP28およびαBクリスタリンの測定 既に報告してるEIA法(4,5)にて測定した。

[^{32}P]標識蛋白質の分離とautoradiography carrier free [^{32}P]燐酸 800 μCi/2 ml培地（無燐、無血清）で1時間preincubate後、薬剤を1時間作用させた。SDG分画の一部に抗HSP28あるいは抗αBクリスタリン抗体を加え、形成された免疫複合体はプロテインA-セファロースで回収し、SDS-PAGE後、泳動ゲルを乾燥し、フィルムに重ねた。

【結果】

U373 MG 細胞にTPA、IL-1α、TNF-αあるいは OA を1時間作用させ、細胞抽出液をSDG分画して各フラクションのHSP28を測定した結果を図１に示した。HSP28は約500 kDaのL-formの減少に伴い、S-formが増量している。OAによる解離促進作用は濃度および作用時間に依存した（図２）。一方、αBはHSP28のように解離しなかったが、その沈降速度が僅かに遅くなる傾向が認められた。恐らくHSP28-αB複合体中のHSP28部分の減少に伴って複合体サイズが低下したものと思われる。

細胞をAsなどの化学ストレスに暴露したときの両蛋白質の沈降パターンを図３に示した。図１と同じように、HSP28はL-formか

らS-form へ移行し、その変化は濃度および作用時間依存的であった（図2）。しかし、Hs負荷の際にはこのような変化は認められなかった。αBの解離は、化学ストレス暴露の場合も認められず、僅かに沈降速度が遅くなるだけであった（図3）。

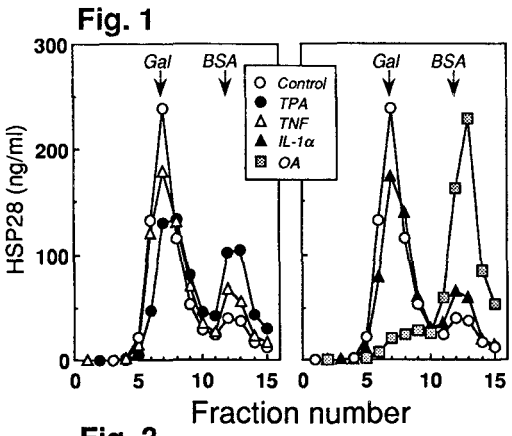
[^{32}P]を取り込ませた細胞を同じように上記薬物、およびストレスに暴露し、SDG後に分画した各サンプル中のHSP28およびαBを抗体およびプロテインAセファロースを使って分離し、autoradiographyを行うと、[^{32}P]でラベルされたHSP28はS-formのみならずL-formにも検出された。しかし、αBへの[^{32}P]の取り込みはなかった。

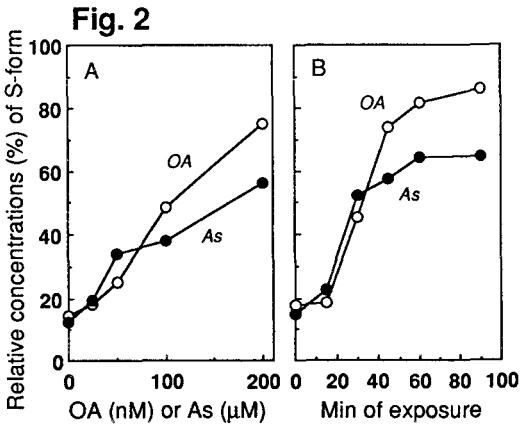
【考察】

HSP28/27が熱および化学ストレス負荷後、あるいはフォルボールエステルやサイトカイン、OAで燐酸化が促進され、等電点の異なる4-5種類の燐酸化HSPが出現することが二次元電気泳動法で確認されている。また、ヒトHSP28の燐酸化部位は，N末端より78および82番目のセリンであり(6)、新しいprotein kinase (7)の関与も示唆されている。我々はSDGによって分離できるHSP28のL-formからS-formへの変換に燐酸化が深く関与していることを見つけた。一方、HSP28と相同性の高いαBの燐酸化についてはレンズとアレキサンダー病脳のαB以外は報告がない。αBが HSP28と同じレベルで存在するU373 MG細胞で、HSP28 の燐酸化・解離が生じる条件下でもαBの燐酸化および解離は認められず、この二つのストレス蛋白質が細胞内では異なる役割をもつことを示唆している。αBが殆ど存在しないU251 MG細胞では、[^{32}P]HSP28はおもに S-form 分画に検出され、燐酸化と解離が同調している。一方、U373 MG 細胞中のHSP28は平常時には大部分がαBと複合体を形成している(8)。燐酸化された HSP28 すべてが直ちにαB-HSP複合体から解離せず、一部が複合体中に留まっているためと思われる。L-form と S-form の HSP28 の生理的意義については不明であるが、inducerではないTPA やサイトカインでも促進される燐酸化・解離現象は、HSP28 の合成促進とは直接の連関はないと思われる。

【文献】

(1) J. Biol. Chem. 260, 3058-3062, 1985. (2) J. Biol. Chem. 267, 1846-1852, 1992. (3) J. Biol. Chem. 268, 35-43, 1993. (4) Biochim. Biophys. Acta 1074, 201-208, 1991. (5) J. Biol. Chem. 267, 7718-7725, 1992. (6) J. Biol. Chem 267, 794-803, 1992. (7) J. Biol. Chem. 268, 4236-4243, 1993. (8) Biochim. Biophys. Acta 1175, 257-262, 1993.





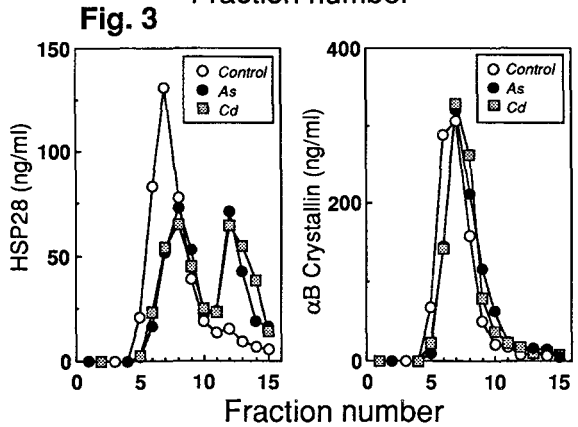


図1．TPA, TNF α, IL-1α, および OA による U373 MG 細胞の HSP28 L-form の解離．
各薬物は 37 ℃で 1 時間作用させた．

図2．オカダ酸(OA)および亜砒酸(As)による S-form への解離．　(A)各濃度で 1 時間作用させた．
(B)OA (200 nM)、または As (200 μM) を加え、37℃で各時間インキュベートした．

図3．亜砒酸(As, 200 μM/1 h) またはカドミウム (Cd, 200 μM/1 h) 暴露後の HSP28 およびαBクリスタリンの沈降パターン．

112 シナプトタグミンを欠失したＰＣ１２細胞へのコリンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の導入とアセチルコリンの放出

笠井陽子、＊吉田　明、＊＊三澤日出巳、高橋正身
（三菱化成生命研、＊早大　人総研、＊＊都神研）

〔要約〕シナプトタグミンは中枢および末梢神経細胞のシナプス小胞膜と前シナプス膜に局在する糖タンパク質で、シナプス前部で重要な役割を担っていると考えられている。これまでに、私共はラット副腎褐色細胞腫由来PC12細胞からこの蛋白が欠失している変異株を単離し、有芯顆粒に貯蔵されるカテコールアミンはシナプトタグミン欠失細胞からもCa^{2+}依存的に放出されることを示した(1)。今回カテコールアミンとは異なる分泌顆粒に貯蔵されているアセチルコリンの放出を調べるために、シナプトタグミン欠失細胞にコリンアセチルトランスフェラーゼの遺伝子を導入しアセチルコリン含量の多い株を得た。この細胞は脱分極刺激によってCa^{2+} 依存的にアセチルコリンを放出することから、シナプトタグミンはシナプス小胞様の顆粒からのアセチルコリンの分泌にも必須ではなく、むしろ分泌機能の調節機構にかかわっていると思われる。

［序論］

神経伝達物質の放出機構の特徴のひとつは分泌顆粒による開口放出である。分泌顆粒構成タンパク質としてこれまでにシナプシン、シナプトフィジン、シナプトタグミンを始め様々な分子が同定されている。シナプトタグミンは一回の膜貫通ドメインを持ち、細胞質側にはプロテインキナーゼＣのC2ドメインと相同な繰り返し構造を持っている(2)。このC2ドメインがプロテインキナーゼ活性のCa^{2+}依存性とリン脂質依存性を担っていることから、シナプトタグミンは分泌応答の際のCa^{2+}受容体である可能性が示されており(3)、シナプトタグミンが神経伝達物質の放出やその調節に重要な働きをしていると考えられている。既に報告しているように(1)、私共は神経伝達物質の放出機構を研究する上でよいモデル系であるPC12細胞を用いてシナプトタグミンの役割を明らかにするため、シナプトタグミンを欠失した細胞株を分離した。この欠失細胞は有芯顆粒に貯蔵されているカテコールアミンをCa^{2+}依存的に放出した。一方、アセチルコリンはカテコールアミンとは異なる分泌顆粒に貯蔵されていると考えられており、アセチルコリンとカテコールアミンでは放出機構が異なる可能性がある。しかし、私共の得たシナプトタグミン欠失細胞はアセチルコリンの含量が少なく、アセチルコリンの放出を調べることができなかった。そこで、この欠失細胞にマウスのコリンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を導入し、アセチルコリン含量の高いシナプトタグミン欠失株を樹立、その放出活性を検討した。

［方法］

コリンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現ベクターpEFmChAT(4)を、pEF-neo とともにPC12細胞に燐酸カルシウム法を用いて導入した。シナプトタグミン発現株と欠失株の各々から６株のネオマイシン耐性クローンを得て、その中からアセチルコリン含量の多い安定なクローンを選別した。アセチルコリン含量は細胞を過塩素酸処理後、その上清を固定化酵素カラムを接続した電気化学検出器付きの高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ－ＥＣＤシステム、ＢＡＳ社）で測定した。細胞からの放出実験では細胞外液のKCl濃度を60 mMに高めて脱分極刺激し、１分毎に外液を回収、液中のアセ

チルコリン量を直接ＨＰＬＣ－ＥＣＤで測定した。カテコールアミンの放出実験では、細胞にあらかじめ［^{3}H］ノルエピネフィリンを取り込ませて脱分極刺激後、外液中に放出される［^{3}H］のカウントを測定した。放出量はその時細胞に残っているアセチルコリンやノルエピネフィリンの量に対する割合（％Release）で表した。

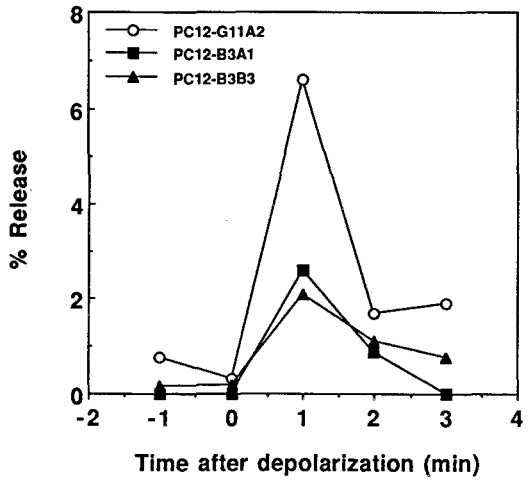
［結果と考察］

シナプトタグミン発現株(PC12-G11)と欠損株(PC12-B3)からコリンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の導入細胞を各々１株(PC12-G11A2)と２株(PC12-B3A1、PC12-B3B3）分離確立した。PC12-B3A1のアセチルコリン含量は他のPC12亜株で内在的にアセチルコリンを持つ系統に比べてほぼ同程度であったが、PC12-G11A2、PC12-B3B3 は5-10倍も多かった。アセチルコリンの多くは細胞質に含まれ、分泌顆粒に取り込まれて貯蔵されるのは細胞全体の含量の一部であるが、高Ｋによる脱分極刺激によってこれらの三つの導入細胞では刺激後１分間に、全ての株で細胞含量の２－７％のアセチルコリンの放出が見られた（図１）。外液のCa^{2+}が無い場合はアセチルコリンの放出は殆ど見られず、Ca2+ 依存性の開口放出が起こっていると推定された。この結果からシナプトタグミンは有芯顆粒からのカテコールアミンの放出だけでなく、神経終末のシナプス顆粒に似た小型の分泌顆粒からのアセチルコリンの放出にも必須では無いことが示唆された。一方、これらの導入細胞での脱分極刺激によるカテコールアミンの放出は導入以前の細胞株に比べて著しい変化は見られなかった。

［謝辞］

アセチルコリンの測定にご協力頂きました斉藤喜人氏、遺伝子導入細胞の選別にご協力頂きました桑原玲子氏に深く感謝致します。

図１ 脱分極刺激によるPC12細胞からのアセチルコリンの放出



［参考文献］

(1)Shoji-Kasai, Y. et al. (1992) Science 256, 1820-1823

(2)Sudhof, T. C., and Jahn, R.(1991) Neuron 6, 665-677

(3)Brose, N. et al. (1992) Science 256, 1021-1025

(4)Misawa, H. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 20392-20399

113 Achatin－Iの神経修飾作用

劉 国君，ディビナ・E・サントス，ムハンマド・エマドゥディン，荒木陽子，竹内 宏
（岐阜大・医・第1生理）

〔要約〕アフリカマイマイ (Achatina fulica Férussac) の神経節より分離された tetrapeptide の achatin-Iは，この動物の神経細胞に，神経伝達物質として働いているばかりでなく，神経修飾物質としても働いている．すなわちこのペプチドは，それ自体直接作用を示さぬ薄い濃度 (3×10^{-6} M) で，5-hydroxytryptamine による興奮のあるものを顕著に増強し，他のあるものを抑制した．またこのペプチドは，acetylcholine による抑制のあるものを減少させた．神経作用性ペプチドに対しては，achatin-I は oxytocin の興奮作用ならびに APGW-amide の抑制作用を減少させ，APGW-amideの抑制作用を増強させた．

［はじめに］D-phenylalanine residue を含む tetrapeptide である achatin-I (Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp)は，先にアフリカマイマイ (Achatina fulica Férussac) の神経節より分離・同定され（2），この動物の興奮性神経伝達物質と考えられた（3，4）．本研究では Achatina 巨大神経細胞を用いて，小分子神経伝達物質ならびに神経作用性ペプチドに対する achatin-Iの神経修飾作用が検討された．使用された神経作用性ペプチドのうち，APGW-amide はナガニシ (Fusinus ferrugineus) と Achatinaの神経節より（5，6），FMRFamide はアサリ (Macrocallista nimbosa)の神経節より（8），[Ser^2]-Mytilus inhibitory peptide (Ser^2-MIP)はイガイ (Mytilus edulis) の神経節より（1），おのおの分離・同定されたものである．

［実験方法］Achatina神経節中に同定される巨大神経細胞のうち，TAN (tonically autoactive neurone), PON (periodically oscillating neurone), v-RCDN (ventral-right cerebral distinct neurone), RAPN (right anterior pallial nerve neurone) の4種（9）が，実験に用いられた．これらの神経細胞にガラス微小電極が2本刺入され，膜電位固定が行われた（7）．検定された神経伝達物質候補は，ガラス毛細管微小ピペットに充填され，圧により神経細胞に局所投与された．その修飾作用を観察するために，3 x 10-6 M achatin-Iを，実験標本の周囲に灌流した．この濃度の achatin-Iは，ほとんど直接作用を示さなかった．

［結果と考察］Table 1 にその結果を要約する．まず achatin-Iの直接作用については，本研究に使用された4種の神経細胞のうち，TAN, PON, v-RCDNの3種は，achatin-I により脱分極性の興奮を示したが，RAPNは achatin-Iに感受性を持たなかった．5-hydroxytryptamine (5-HT)は，TAN, PONに対して興奮作用を示した．この興奮には，早い反応と遅い反応の2種があった．achatin-I の灌流は，これら2つの神経細胞における 5-HT に対する早い興奮性反応を，著しく増強させた．一方 v-RCDN においては，5-HTの興奮作用は，achatin-I により逆に抑制された．RAPNでは，5-HTの興奮作用は，achatin-I により影響されなかった．また achatin-Iは，acetylcholine (ACh)による TANの抑制を有意に減少させた．神経作用性ペプチドについては，achatin-I は PONにおける oxytocin の興奮作用ならびにv-RCDNにおける APGW-amide の抑制作用を減少させた．さらに achatin-Iは，v-RCDNにおける FMRFamideの抑制作用を有意に増強させたが，その増強作用はそれほど強力ではなかった．

Fig. 1, A には，TAN における 5-HT の興奮作用（その早い成分）に対する，achatin-I の増強作用の時間経過を示す．Achatin-I の増強作用は，achatin-I 灌流後ただちに見られたが，これは achatin-I灌流下においても次第に減少し，40－50分後には，もはや有意差が見られなくなった．Fig. 1, B は，同細胞における同興奮の用量（圧持続時間）・作用曲線である．この曲線より，ED_{50} (95 %信頼限界) は 5-HT 単独投与（対照）では 59.3 msec (13.9 - 95.3 msec)，achatin-I 灌流下では 36.5 msec (19.5 - 52.6 msec)，E_{max}（平均値±標準誤差）は対照では 1.06 ± 0.11 nA，achatin-I 灌流下では 1.74 ± 0.26 nAと計算された．すなわち2つの曲線の間で，ED_{50}には大きな差は見られなかったが，E_{max}は achatin-I灌流下で，かなり顕著に増大した．なお Hill coefficienntは，対照では 2.4624 ($r = 0.9531$)，achatin-I 灌流下では 1.7440 ($r = 0.9899$)であった．

以上の実験結果が示すように，achatin-I は，神経作用性ペプチドを含めてかなり広範な神経伝達物質候補の作用に対して，修飾作用を呈する．その修飾作用は，時間経過とともに減少する．このペプチドの修飾機構は，この報告に示した用量（圧持続時間）・作用曲線から推定する限り，5-HTの受容体に対する結合の問題ではないように思われるが，これにはさらに検討を加える必要がある．

Table 1. Direct effects of putative neurotransmitters, ejected by pneumatic pressure, on Achatina giant neurones and the modulation of these effects by perfusion with 3 x 10^{-6} M achatin-I.

No.	Neurone	A-I	5-HT	ACh	GABA	BHGA	DA	Oxyt	APGW	FMRF	MIP
1.	TAN	E	E^{en}	I^{su}	I^{nm}	(-)	(-)	(-)	I	I	I
2.	PON	E	E^{en}	E	(-)	Var	I^{nm}	E^{su}	(-)	(-)	(-)
3.	v-RCDN	E	E^{su}	E^{nm}	E	I^{nm}	I^{nm}	(-)	I^{su}	I^{en}	I^{nm}
4.	RAPN	(-)	E^{nm}	Var	I	E	(-)	(-)	I	SI	I

E, excitation. I, inhibition. SI, slight inhibition. Var, varied response. (-), no response. ^{en}, enhanced by achatin-I. ^{su}, suppressed by achatin-I. ^{nm}, not modulated. A-I, achatin-I; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; ACh, acetylcholine; BHGA, threo-β-hydroxy-L-glutamic acid; DA, dopamine; Oxyt, oxytocin; APGW, APGW-amide; FMRF, FMRF-amide; and MIP, [Ser^2]-Mytilus inhibitory peptide.

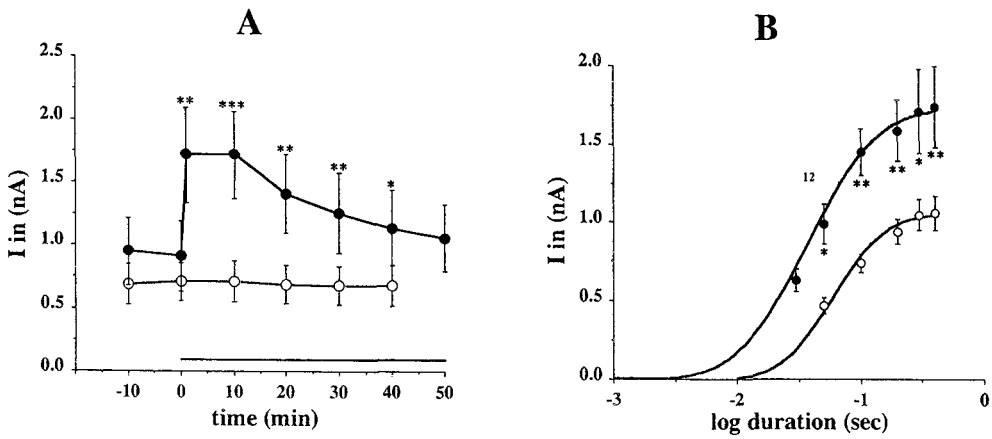


Fig. 1. Enhancement by achatin-I of the inward current (I_{in}) induced by 5-hydroxytryptamine (5-HT) in TAN (tonically autoactive neurone). A, time course of the effects of achatin-I (applied by bath at 3 x 10^{-6} M) on the fast response to 5-HT (ejected by pressure, 2 Kg/cm^2, 400 msec, 10^{-2} M). (○), 5-HT alone (control) (n = 6). (●), 5-HT under achatin-I (n = 7). Abscissa, time course (min); horizontal bar, achatin-I perfusion. Ordinate, I_{in} (nA) (vertical small bar: S.E.M.). Student's t-test for paired data of I_{in} under achatin-I perfusion was performed against those before the perfusion (*, P < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001). B, dose (duration)-response curves for 5-HT (by pressure, 1 Kg/cm^2, 3 x 10^{-3} M). Abscissa, pressure duration in logarithmic scale (sec). Ordinate, 5-HT fast response (I_{in}) (nA) (vertical small bar: S.E.M.). (○), 5-HT alone (control). (●), 5-HT under achatin-I perfusion at 3 x 10^{-6} M. One set of the curves in absence and presence of achatin-I was obtained from one TAN (n = 8). Student's t-test of the 5-HT responses under achatin-I was performed against those of control. The curves were drawn by fitting to the ideal sigmoidal curves (r = 0.9749 for control; 0.9832 under achatin-I). Abscissa, time course (min). Ordinate, I_{in} (nA). In A and B, V_h was maintained at -55 mV.

References

(1) Hirata, T. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., 152, 1376-1382.
(2) Kamatani, Y. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 160, 1015-1020.
(3) Kim, K.H. et al. (1991) European J. Pharmacol., 194, 99-106.
(4) Kim, K.H. et al. (1991) Life Sci., Pharmacol. Lett., 48, 91-96.
(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) Okamoto, H. et al. (1976) J. Physiol. (Lond.), 254, 607-638.
(8) Price, D.A. & Greengard, M.J. (1977) Science (N.Y.), 197, 670-671.
(9) 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.

114 ラットκオピオイド受容体ｃＤＮＡのクローニング

南　雅文、佐藤公道*
（京都大学・薬学部・薬理、分子作用制御*）

〔要約〕

ラット視床ｃＤＮＡライブラリーより、ラットκオピオイド受容体ｃＤＮＡを単離した。推定されるアミノ酸配列は 380残基よりなり、７回膜貫通型のＧタンパク連関型受容体に共通する特徴を有していた。マウスδオピオイド受容体とは、 58.6%のホモロジーを有していた。このｃＤＮＡを発現ベクターに組み込み、ＣＯＳ７細胞にトランスフェクトしたところ、この細胞の膜画分には、［^{3}Ｈ］ ブレマゾシンとの特異的結合が観察されるようになった。この特異的結合はκアゴニストであるダイノルフィンA(1-17)やU50488Hにより用量依存的に阻害されるが、μアゴニストである DAMGOやδアゴニストである DPDPEでは阻害されなかった。ノーザンブロットの結果、κオピオイド受容体ｍＲＮＡは線条体、視床下部に強く、視床、中脳、橋・延髄で中等度に、大脳皮質、海馬、小脳で微弱に発現していた。

［目的］ モルヒネをはじめとする麻薬性鎮痛薬や内在性のオピオイドペプチドは、特定の受容体を介してその薬理的あるいは生理的作用を発現していると考えられており、その受容体はμ、δ、κの３種類に大別されている。最近、マウス由来δオピオイド受容体のｃＤＮＡがクローニングされ、７回膜貫通型のＧタンパク連関型受容体であることが示された（１）。麻薬性鎮痛薬あるいはオピオイドペプチドの作用機序を分子レベルで理解するためには、さらに、μおよびκオピオイド受容体のクローニングが必須であると考えられる。そこで、本研究では、マウスδオピオイド受容体とのホモロジーを利用して、ラットのオピオイド受容体をクローニングすることを試みた。

［方法］ マウスδオピオイド受容体の塩基配列を参考にしてＰＣＲプライマーを合成し、ＲＴ－ＰＣＲを行った。鋳型となるＲＮＡにはラット後根神経節より抽出したtotal RNAを用いた。ＲＴ－ＰＣＲの結果マウスδ受容体に、対応する領域で 70.8%のホモロジーを有するクローンpR11を得た。*in situ* ハイブリダイゼーションによる予備的な実験よりpR11にハイブリダイズするｍＲＮＡが脳内では視床に多いことがわかったので、ラット視床ｃＤＮＡライブラリーを作製し、^{32}Ｐ標識したpR11のインサートを用いてスクリーニングを行った。

［結果及び考察］ スクリーニングの結果、７つのポジティブクローンを得た。これらのクローンは塩基配列の解析から、対応する領域でpR11とほとんど同じである５つのクローンとpR11と 68.5%のホモロジーを有する２つのクローンに分類された。*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた予備的な実験の結果（一部を Fig.1に示す）から、以後、前者をpMOPR1-5、後者をpKOPR1,2と呼ぶことにした。これら７つのクローンのうちコーディング領域の全長を含んでいると考えられたクローンはpKOPR2だけであったので、pKOPR2の塩基配列をさらに詳しく解析した。pKOPR2は、 380アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードしており、その配列の特徴から、７回膜貫通型のＧタンパク連関型受容体であると考えられた。相同性検索の結果、このタンパクはマウスδオピオイド受容体に最もホモロジーが高く、全体で58.6%、 膜貫通部位および細胞内領域で、各々、68.2%および68.3%のホモ

Fig.1

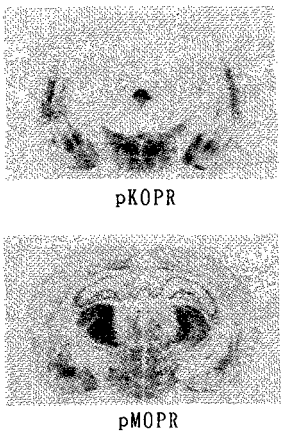


Fig.2

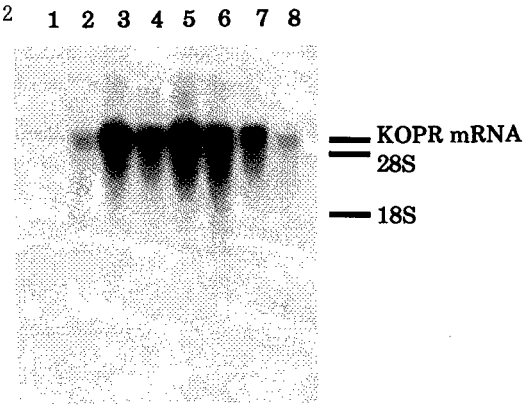


Fig.1 ***In situ*** **hybridization histochemistry with pKOPR (upper) or pMOPR (lower) as a probe.**

Fig.2 Northern blot analysis of poly A(+) RNA samples (4 μg in each lane) isolated from various regions of rat brain. Lane 1, cerebral cortex; lane 2, hippocampus; lane 3, striatum; lane 4, thalamus; lane 5, hypothalamus; lane 6, midbrain; lane 7 pons-medulla; lane 8, cerebellum.

ロジーが見られた。しかしながら、細胞外領域では、 36.4%のホモロジーであった。

pKOPR2のインサートを発現ベクターに組み込んだものをトランスフェクトしたＣＯＳ７細胞より調製した膜画分に対し、［^{3}Ｈ］ブレマゾシンは特異的に結合し、そのＫｄ値は、0.37nMであった。5nMの［^{3}Ｈ］ブレマゾシンとオピオイド受容体の各サブタイプに選択的なリガンドを用いて受容体のサブタイプを検討したところ、κ受容体に選択的なダイノルフィン A (1-17)および U50488Hは 300nM の濃度で、各々、ブレマゾシンの特異的結合を15% および 67%にまで抑制した。μおよびδ受容体選択的なリガンドである DAMGOおよびDPDPEは、同じ濃度でブレマゾシンの結合を抑制しなかった。

以上の結果より、本研究により得られたｃＤＮＡはκオピオイド受容体をコードしているものと考えられた。次に、得られたｃＤＮＡより^{32}Ｐ標識ＲＮＡプローブを合成し、脳の諸部位におけるκオピオイド受容体のｍＲＮＡの発現をノーザンブロット法により検討した。κオピオイド受容体ｍＲＮＡは線条体、視床下部に強く、視床、中脳、橋・延髄で中等度に、大脳皮質、海馬、小脳で微弱に発現していた(Fig.2)。

［謝辞］ 本研究は、京都大学薬学部薬理学教室、戸谷充志、前川京子、小野木達弘および分子作用制御学教室、片尾謙利、細井陽介らとともに行ったものである。

［文献］

(1) Evans,C.J., Keith Jr.,D.E., Morrison,H., Magendzo,K., and Edwards,R.H. (1992) Science 258, 1952-1955

115　脳内カテコールアミンとインドールアミン代謝の相互作用

丸山和佳子[1)]、太田深雪[2)]、高橋勤[3)]、直井信[4)]
[1)]名古屋大神経内科、[2)]岐阜県立多治見病院精神科、[3)]江南女子短大、[4)]名古屋工業大

[要約]
In vivo microdialysis法を用いラット脳内におけるチロシン(Tyr)および、トリプトファン(Trp)水酸化反応の反応速度を同時測定する方法を考案した。この方法を用いカテコールアミン(CA)前駆体がTrpの水酸化反応、インドールアミン(IA)前駆体がTyrの水酸化反応を相互に阻害することを明らかとした。さらにin vitroの実験によりドパミン(DA)と、その前駆アミノ酸、代謝物がトリプトファン水酸化酵素(TPH)活性を阻害することを見いだした。阻害の型は基質に対して拮抗的、補酵素に対して非拮抗的であった。さらにセロトニン(5-HT)前駆体およびモノアミン由来のsalsolinol類がin vitroのチロシン水酸化酵素(TH)活性のビオプテリン(BH4)によるアロステリック調節に影響を与えることが証明された。

[はじめに]
重要な脳内神経伝達物質であるモノアミンのなかでも、CAとIAの代謝系には共通するところが多い。CA生成の律速酵素はTH、IA生成の律速酵素はTPHであり、ともにBH4を補酵素とする。さらにTH、TPHによって生成されたL-DOPAと5-HTPは共通の芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素(ADDC)によって脱炭酸をうけdopamine (DA)と5-HTが生成される。DA、5-HTは共にモノアミン酸化酵素(MAO)により分解される。今回生合成の段階でのモノアミンの代謝の相互作用をin vitroとin vivoで検討を行なった。

[実験方法]
雄性Wistar系ラット線条体でin vivo microdialysisをおこない(1)、AADC阻害剤であるNSD-1015を含んだKrebs-Ringer液で潅流した。潅流液中に回収されたL-DOPAと5-HTP濃度が一定時間後に平衡に達したことを確認し、この値をin vivoにおけるTyr、Trpの水酸化反応活性とした(2)。末梢性AADC阻害剤であるbenserazideを腹腔内に投与した後にL-DOPA、5-HTPを腹腔内投与し、脳内L-DOPA、5-HTP濃度への影響を検討した。DA、5-HTおよびその代謝物の定量はHPLC-ECDによった。in vitroTH活性の測定はラット線条体homogenateを酵素標品として用い、HPLC-ECDにより測定した(3)。in vitro TPH活性は肥満細胞腫P-815の可溶化標品を用いHPLC-蛍光検出法により測定した(4)。

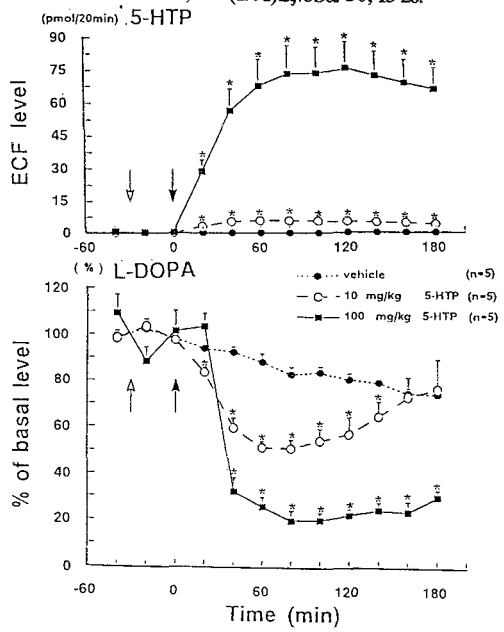
[結果]
腹腔内5-HTP投与によりラット線条体潅流液中の5-HTP濃度は投与量に依存して増加した。それとは逆にL-DOPA濃度は5-HTP濃度に反比例して低下した(図1)。腹腔内L-DOPA投与も同様潅流液中のL-DOPA濃度を増加させ、5-HTP濃度を低下させたが、5-HTPによるL-DOPAの低下作用の方が強かった(図2)。
in vitroにおいてL-DOPA、L-Tyr、DAはTPH活性を阻害し、基質に対しては拮抗的、補酵素に対しては非拮抗的であった。(表1)に阻害定数(Ki)、阻害の型をまとめた。一方D-Tyr、D-DOPAは阻害作用を持たなかった。
TH活性は補酵素BH4によりアロステリック調節をうけているが、5-HTの代謝前駆体、代謝産物salsolinol類の一部はin vitroの実験においてこのアロステリック調節を消失させることが明かとなった。

[考察]
TyrおよびTrpの水酸化反応はCA、IA生成の律速段階であり、5-HTP、L-DOPAによる阻害は脳内DA、5-HTレベルの低下を惹起するであろう。事実L-DOPAの投与によりパーキンソン患者脳脊髄液中の5-HT代謝産物5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)が低下することが知られており、この低下と患者における精神症状発現とは関連があるといわれている。
L-DOPAや5-HTPは血液から脳へ、あるいはモノアミン細胞内への前駆アミノ酸の取り込みを競合的に阻害する可能性が考えられる(5)。特にTPHに対して脳内のL-Trp濃度は飽和しておらず、前駆アミノ酸の取り込みの阻害は重要な役割を果たす可能性がある。一方、神経細胞内に取り込まれたL-DOPAや5-HTPがTPH、

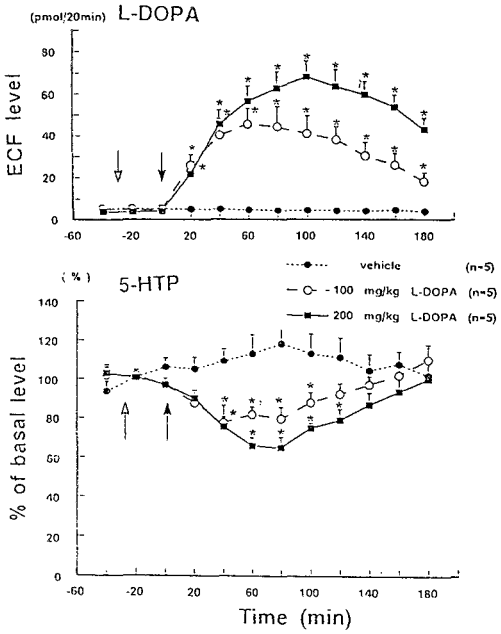
THを直接阻害することがin vitroの実験により証明され阻害の機序も明らかになった。L-DOPAのTPHに対するKi値は基質に対しての方が補酵素に対するものよりも低く、主としてL-Trpに競合して酵素活性を阻害すると考えられた。脳内においてはTHの基質L-Tyrは飽和しており、TH活性は不飽和である補酵素ビオプテリンに依存している。THにはBH4によるアロステリック調節が認められるが(6)、5-HTPなどはこのpositive cooperativityを増加することにより生体内のようなBH4低濃度条件下でTH酵素活性を低下させ、脳内CA生成を阻害すると考えられる。

[文献]

1.Maruyama W., et al. (1992) *J. Neurochem.*, **59**, 395-400. 2.Hashiguchi H., et al. (1993) *J. Neural Transm.*, in press. 3.Naoi M., et al. (1988) *J. Chromatogr.* **427**, 229-238. 4.Ota M., et al. (1992) *Neuropharmacology* **31**, 337-341. 5.Maruyama W., et al. (1992) *J. Neural Transm. [Gen Sect]* **90**, 183-197. 6.Minami M., et al. (1991) *Life Sci.* **50**, 15-20.



[図1] 5-HTP腹腔投与によるラット線条体潅流液中の5-HTP、L-DOPA量の変化



[図2] L-DOPA腹腔投与によるラット線条体潅流液中のL-DOPA、5-HTP量の変化

Kinetics						
Interms of	(6R) BH 4				L-Tryptophan	
	*Km*1 (μM)	*V* max1 (pmol / min / mg protein)	*Km*2 (μM)	*V* max2 (pmol / min / mg protein)	*Km* (μM)	*V* max (pmol / min / mg protein)
Control	796.1± 380.0	222.8 ± 77.0	3.44 ± 0.99	31.7 ± 4.1	2.65 ± 0.83	67.8 ± 3.85
Inhibitor constant, Ki, (μM)						
L-Tyrosine	16.2 ± 11.8		305.9 ± 76.8		19.8 ± 4.13	
D-Tyrosine	No inhibition		No inhibition		233.4 ± 468.3	
L-DOPA	80.3± 45.3		88.7 ± 30.3		36.5 ± 6.1	
D-DOPA	No inhibition		No inhibition		No inhibition	
Dopamine	7.01± 0.01		39.3 ± 6.2		94.3 ± 13.8	

Each value reprsents mean and SD of duplicate measurements of two experments.

[表1] D, L-チロシン、D,L-DOPAによるin vitro TPH活性の阻害。
L-チロシン、L-DOPAによりTPH阻害が認められる

116 NADPサイクリングを用いる一酸化窒素合成酵素（NOS）の微量測定法

王 瑋，井上順雄，中山 孝，加藤尚彦，石井富男＊
（横浜市立大医第一生化；第二内科＊）

〔要約〕 Nitric Oxide Synthase (NOS)により生成される $NADP^+$ を，NADP Cycling を用いて特異的に増幅して蛍光測定する微量測定法を開発した．Arginine と NADPH 存在下で粗酵素試料（組織の homogenate とその上清）中の NOS により生成される $NADP^+$ は，試料中の nucloetidase により直ちに分解される．この分解を過剰濃度の NAD^+ を NOS反応液に加えて防ぎ，HCl を加えて反応を停止させた後，反応液を Cycling 反応液に加えた．Cycling 反応酵素の glucose 6-phsophate dehydrogenase の特異性を利用して，共存する NAD^+ に邪魔されずに生成された$NADP^+$ のみを増幅測定出来る．この方法により，0.5 μg 湿重量の小脳 homogenate の NOS 活性が測定できた．

Nitric oxide (NO) は血管拡張作用・細胞毒性作用(1)と共に，中枢神経系では neuromodulator として長期増強や細胞死に関与する因子として注目されている(2)．NO の生成酵素である NOS は cytosol (3)と顆粒分画(4)に存在し，次の反応を触媒する（arginine + NADPH + O_2 → citrulline + H_2O + NO; 5,6）．Isozymes として構成型や誘導型，水溶型・膜結合型 (7,8) が知られているが，活性測定法としては 1) [^{3}H]-arginine を基質として生成 [^{3}H]-citrulline を放射測定 (3)；2) 生成される NO を sensor(9)または chemiluminescence により測定(10) の２法が用いられている．また粗酵素試料としては上清分画が用いられ，homogenate 全体の活性測定法は工夫されていない．そこで NOS 反応生成物の一つである $NADP^+$ を測定し，homogenate・上清またニューロン一個の活性測定を可能にする微量測定法の開発を試みた．

実験方法 ［粗酵素試料］ラット（オス，6 週齢，Sprague-Dawley 系）小脳の 10 % homognte を 50mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 1 mM Dithiothreitol; 0.2 mM PMSF; 10μg/mlの各Antipain, Pepstatin, Leupeptin を用いて調製した．その 100,000 g-60 分遠心上清分画と，さらに Dowex AG50WX-8(Na^+ 型) column を通して Arginine を除去した上清を調製した．

［NOS 微量測定法］反応液（100 mM HEPES-NaOH, pH 7.4; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1.25 mM $CaCl_2$; 1μg/ml Calmodulin; 100 μM Arginine (Arg); 500 μM N^G-Nitroarginine (NArg, NOSの特異的阻害剤）; 15 μM NADPH; 0.2 mM PMSF; 10 μg/mlの各 Antipain, Pepstatin, Leupeptin; 3～6 mM NAD^+; 大気圧下で約 260 μM O_2 を含む）20 μlを 500μl の Eppendorf 遠心管の底にとり，粗酵素試料 1.25μl 以下を加えて 25℃で 30 分加温反応させる．1 μlの 5 M HClを加えて反応を止め，100℃で 5 分加熱して試料中の諸酵素を変性させると共に未反応の NADPH を破壊する．1.0μlの aliquotをとり，40μl の NADP Cycling反応液 (11) に加え，NOS反応により生成された $NADP^+$を～5,000 倍に増幅して蛍光測定する．Arg と NArg 存在下の活性を非特異的 $NADP^+$生成 (NspNADP)活性，Arg のみを含む反応液で得られる活性から前者の活性を差し引いた値を NArg で阻害される NOS 活性 とした．

結果及び考察 ［粗酵素試料の特徴］小脳 homogenate は nucleotidase 活性を含み，NOS 反応により生成される $NADP^+$は直ちに破壊されて測定出来ない．上清には nucleotidase 活性は含まれていなかった．この顆粒分画による $NADP^+$ の破壊を防ぐために，nucleotidase の活性中心を $NADP^+$ と競合する諸物質を反応液に加えたが（図１），NAD^+ が最も有効であった．NAD^+ は 12 mM の濃度まで加えても，上清試料の NOS 活性には影響が無く，また Cycling 反応速度は 20 % 阻害した．

［NOS 反応の特性］2.0 μlの上清試料（蛋白量 5.5 μg）を NAD^+ を含まぬ反応液 100 μl に加えて，反応の条件を検討した．この時は 5 μlの 5 M HCl を加えて反応を止め，更に 1.0 ml の 6.6 M NaOH を加え～0.6 nmol の生成 $NADP^+$ を蛍光物質に転換して測定出来た（strong alkali treatment, 文献 11）．PIPES 緩衝液中では pH7.0

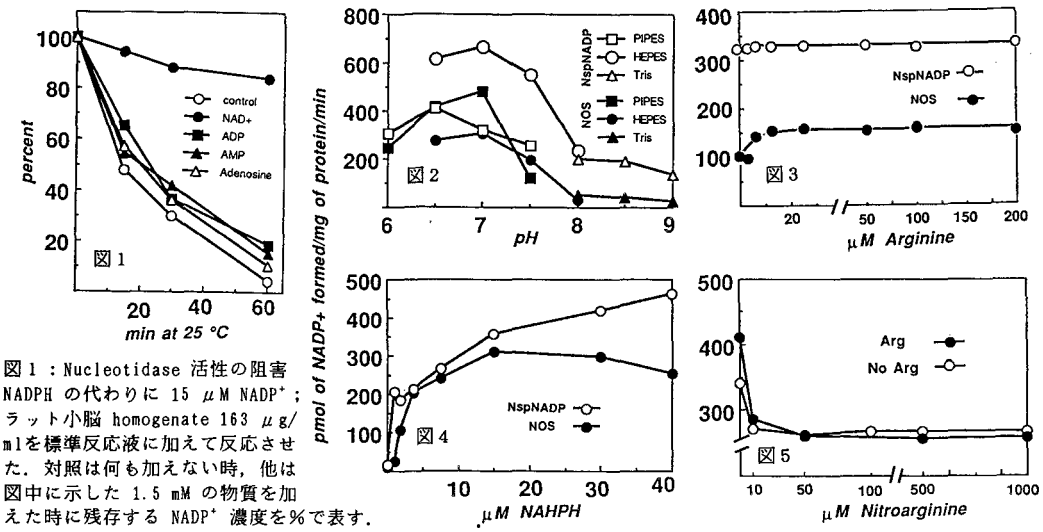


図1：Nucleotidase 活性の阻害 NADPH の代わりに 15 μM $NADP^+$；ラット小脳 homogenate 163 μg/ml を標準反応液に加えて反応させた．対照は何も加えない時，他は図中に示した 1.5 mM の物質を加えた時に残存する $NADP^+$ 濃度を%で表す．

図2～5：ラット小脳上清 55.0 μg蛋白質/ml を用い，pH と図の下に示す基質の標準反応液中の濃度を，横軸示す様に変化させて反応を行った．NspNADP は [Arg + NArg]反応によって得られる，非特異的 $NADP^+$生成活性を表す．

で HEPES に比較してより高い活性を示したが，反応停止時に HCl を加えると PIPES は沈澱を生じるので HEPES を用い，従来の報告との比較の為に，一般的に用いられて来た pH 7.4 を採用した（図2）．上清及び homogenate 試料共に Arg を加えなくても活性が見られ，内在性の Arg が含まれる事を示していた（図3）．従って[^{3}H]-Arg を基質として用いる測定法は粗酵素試料の活性測定には用いる事が出来ないので，従来は column 処理により内在性 Arg を取り除いていた（3）．内在性の NADPH は測定反応では無視できる程低濃度であり（図4），また NArg はその濃度を増やしても阻害は増えない非競合型を示した（図5）．NOS は非常に不安定であり，column 処理や 30℃以上の温度では容易に失活し，反応液中に蛋白質分解酵素阻害剤を加える必要があり，至適反応温度は 25℃であった．上述の結果より測定に用いる標準条件を設定した．この条件下で FAD 及び tetrahydrobiopterin は，homogenate と上清試料の NOS 活性を阻害した．また内在性 Argをcolumn処理により除いた上清の蛋白当りの NOS 比活性は増加し，+ に帯電した蛋白質が除かれた為と考えられた．反応は45 分迄直線的に進み，0.5～2.5 mg湿重量homogenate/ml の範囲で濃度と比例した．本方法で得られたラット小脳homogenate と上清試料の NOS比活性は，それぞれ 0.104 ± 0.017（試料数，10）と 0.189 ± 0.042（13）nmol 生成 $NADP^+$/mg蛋白質/分 ± SD であった．

従来の放射測定法や chemiluminscence 法では，内在性 Arg や混入物の為粗酵素試料の活性測定は不可能であり，測定感度も低い．また NO を直接測定するには高価な sensor が必要である．本測定値は非特異的 $NADP^+$ 活性（内在基質による種々の脱水素酵素活性や謂わゆる Diaphoraseを含むとおもわれる）によるゲタを含むが，NADP Cycling による増幅が可能であるため，現在まで 0.5 μg 湿重量の homogenate 試料の活性測定が可能となっており，さらに 10 nl の反応液を用い 5,000,000 倍以上の増幅を行えば，単一ニューロンの測定も可能となる(12)．

文　献

1) Moncada S, Plamer RMJ and Higgs EA. (1989) Biochem Pharmacol 38: 1709-1715. 2) Garthwaite J (1990) TINS 14: 60-67. 3) Bredt DS and Snyder SH. (1989) Proc Ntal Acad Sci USA 86: 9030-9033. 4) Hiki K, Hattori R, Kawai C and Yui Y. (1992) J Biochem 111: 556-558. 5) Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR and Snyder SH. (1991) Nature (London) 351: 714-718. 6) Mayer B, John M, Heinzel B, Werner ER, Wachter H, Schultz G and Bohme E. (1991) FEBS Lett 288: 187-191. 7) Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempest P and Michel T. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89: 6348-6352. 8) Nathan C. (1992) FASEB J 6: 3051-3064. 9) Malinski T and Taha Z. (1992) Nature 358: 676-678. 10) Palmer MRJ, Ferrige AG and Moncada S.(1987) Nature (London) 327: 524-526. 11) Lowry OH and Passonneau JV. (1972) A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York, pp. 8-16 and pp.129-136. 12) Akabayashi A and Kato T. (1993) J Neurochem 60: 931-935.

117 ノルエピネフリン刺激による白鼠上頸部交感神経節内一酸化窒素依存性 cyclic GMP 生成系とその細胞局在性

安藤正人・立泰廷族・永田 豊 (藤田保健衛生大・医・生理)

[要約]節前神経線維末端と節後交感性ニューロンとがシナプス結合し、その周囲をグリア細胞が取り囲む交感神経節(SCG)を白鼠上頸部より摘出して、生理溶液中で好気的条件下でインキュベーションを行い、L-arginine (L-Arg)を前駆物質として NO synthase (NOS)の触媒反応により発生する一酸化窒素(NO) 依存性に変動するcyclic GMP(cGMP)生成系を検索した。①cGMPの分解を抑制するIBMXを溶液中に添加した条件で、L-Argの濃度を種々変化(1～1,000 μM)させて作用すると、濃度依存性にSCG内cGMP生成量の増大が見られ、L-Arg濃度100μMでcGMP量が56.9 pmoles/mg protein (4.5倍)に達す最大値が示された。この摘出SCG内cGMP生成の最大効果は、L-Arg添加後1分から15分迄の短時間以内に認められた。次に、NOSを特異的に阻害するN^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA, 50 μM)をL-Argと共に溶液中に添加(10分間)すると、L-ArgによるSCG内cGMP生成の増大効果は約1/2以下に抑制された。このことは、SCG内で、明かにL-Argを前駆物質として発生したNOが、guanylyl cyclase を活性化する結果、cGMP生成の増大が引き起こされたものと理解された。②Norepinephrine(NE, 50μM)を溶液中に添加すると、SCGでのcGMP生成量は4.4倍に上昇し、これはL-Arg依存性の増強効果と同程度であった。このNE刺激で増大するcGMP生成量も、L-NMMAをさらに添加すると有意に抑制された。従って、NE刺激に依存する神経節でのcGMP生成の促進効果は、やはりNOを介した代謝的現象であることが推測された。NE刺激によるcGMP生成の増大効果は、prazosin (1μM)添加によって約18%に低下したことから、SCG細胞膜上の主に α_1受容体を介して発現している可能性が推定された。③非手術神経節標本で認められるNE刺激依存性の cGMP生成促進効果は、予め節前神経切断後1週間経過したSCG標本でも完全に保持されていた。しかし、節後軸索の切断手術を施して(1週間経過)ニューロンの変性・脱落とグリア細胞の増殖を来たした神経節標本では、 NE刺激によるcGMPレベルの促進効果は9倍以上に達した。これらの実験成績から、NE伝達刺激が膜の受容体と結合した後、SCGで NOの発生を介してcGMPレベルを上昇させる一連の反応カスケードは、節前末端や節後交感神経細胞よりはむしろ、主に非ニューロン性のグリア細胞に限局している可能性が推測された。

[序]最近、神経伝達物質のnorepinephrine(NE) でアストロサイトを豊富に含む初代培養系脳細胞を刺激すると、L-arginine(L-Arg)を前駆物質として NO synthase(NOS)の触媒反応で生成する一酸化窒素(NO)が、細胞内可溶性画分のguanylyl cyclase (G-cyclase)を活性化して組織内 cyclic GMP(cGMP)生成が促進される知見(1)が報告されて、神経細胞体のみならずグリア細胞でのNO依存性cGMP生成系の存在様式に興味が持たれている。今回は、節前神経線維と節後交感性ニューロンとがシナプス結合し、その周囲をグリア細胞が豊富に取り囲んでいる交感神経節(SCG)を白鼠上頸部より摘出して、L-Argあるいは NEを含む生理溶液中で好気的条件下でインキュベーションを行い、NO依存性cGMP生成系を検索した。さらに、SCG標本の節前神経線維の切断手術(denervation)を行い節前神経末端のワーラー変性を生じさせた標本、あるいは節後神経線維の切断手術(axotomy)により逆行性にSCG内ニューロンの変性・脱落とグリア細胞の反応性増殖を来たした標本を用いて実験を行い、 NE刺激による NO依存性cGMP生成系が神経節内の節前神経末端、節後交感性神経細胞体あるいは周辺グリア細胞の何れの細胞成分で発現しているのかその局在を検証した。

[実験方法]①Wistar系成熟白鼠を用いpentobarbital麻酔下に、既報(2)に従い一側のSCG の節前線維をdenervationし、反対側神経節の節後線維を頭蓋内に入る直前でaxotomyした。 術後1週間経過した白鼠よりurethane麻酔下に両側のSCGを摘出し、以下のインキュベーション実験に供した。 ②生理溶液中に薬剤を添加した条件下でインキュベーションしたSCG標本内cGMP生成量は、RIA法により定量した(2)。

[実験成績と考察]①L-arginine刺激によるSCG内cGMP生成系: 摘出直後のSCG内cGMP含量は極めて低値(2.1pmoles/mg protein)であった。cGMPの分解酵素を抑制する3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX、1.5mM)を含む生理溶液中にL-Argの濃度を種々変化(1～1,000μM)させて添加し、好気的条件下(37° C)でインキュベーションを行うと、10μMから濃度依存性にSCG内cGMP生成量の増大が見られ、100μM濃度で56.9 pmoles/mg protein(4.5 倍)の最大値に達した。さらに、L-Arg濃度を500～1,000μM に上昇させると、節内cGMP 生成量は逆に減少した(図1)。 また、L-Arg(100μM)刺激によるcGMP生成の最大効果は添加後1分で既に認められ、 この効果は15分迄持続して見られた。従って、種々の薬剤添加条件での摘出SCGのインキュベーション時間は10分間とした。次に、NOSを特異的に阻害するN^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 50 μM)をL-Arg と共にSCGインキュベーション溶液中に添加すると、L-Arg添加で生じたcGMP生成の増大効果は、約1/2以下に抑制された。また、L-Arg添加で見られたSCGのcGMP生成レベルの上昇効果は、細胞内可溶性画分に回収されるG-cyclase活性をmethylene blue (500μM)を作用させて抑制すると、ほぼ消失した(表1)。このことから、SCG内には明かにL-Argを前駆物質としてNOSの触媒反応で発生したNOが、特異的にG-cyclaseを活性化して cGMP生成の増大を引き起こす一連の反応過程が存在していると考えられた。②NO依存性cGMP生成系におよぼすNEの添加効果: SCGにおけるシナプス伝達は、節前神経末端より遊離される伝達物質のacetylcholine(ACh)が節後ニューロン膜上のムスカリン性受容体と結合する結果、slow-EPSPの脱分極性電位変化が誘発される過程が証明されている(4)。 既に我々は、ACh(0.1mM)でSCGを刺激すると、節内cGMP生成量が著明に増大(約7.5倍)することを認め、この促進効果はmuscarinic antagonistのatropineで拮抗されることを見い出している(2)。今回は、交感性神経伝達物質のNE刺激に依存するSCG内cGMP生成系について

ンキュベーションすると、非刺激SCGに比べて組織内cGMP生成量は 4.4倍に上昇するのが見られ、これはL-Arg依存性の増強効果と同程度であった。また、このNE刺激で増大するcGMP生成過程は、L-NMMAをさらに添加すると有意に抑制された(図2)。このことから、NE刺激に依存する節内cGMP生成の促進効果も、やはり NOを介した現象であることが充分推測された。次に、NE刺激で上昇するSCG内NO依存性cGMP生成系におよぼす各種adrenergic blockerの影響を検討した。α_1遮断剤のprazosin (1 μM)をNEと共に溶液中に添加すると、節内cGMPの生成量は約18%に低下した。しかし、yohimbine(10 μM)の同時添加でα_2受容体を遮断しても、NE刺激で見られた SCG内cGMP生成量の上昇効果に対しては、有意な影響をおよぼさなかった。さらに、β blockerのpropranolol(10μM)添加条件では、prazosinの効果ほどではないが、NE依存性のcGMP生成量は有意に減少(-37%)した(図2)。 従って、NE伝達刺激は主にSCG細胞膜上にあるα_1受容体（一部はβ受容体）を介して、NO依存性のcGMP生成系を促進している可能性が推定された。③NE刺激で増大する節内cGMP生成系の細胞局在性:図2に示すように、NE刺激によるcGMP生成促進の効果は、予めdenervationして1週間経過した SCG標本でも、非手術神経節標本で認められた効果と同様に完全に保持されていた。さらに、L-NMMAあるいは各種antagonistの同時添加によるNE刺激依存性cGMP生成系に対する拮抗調節作用も、非手術標本で認められた効果とほぼ同程度であった。一方、axotomy(1週間経過)を施してニューロンの脱落とグリア細胞の増殖を来たした神経節標本をNEで刺激すると、cGMP レベルは9倍以上に促進された。さらに、この標本では、NOSやNE受容体に対する薬剤の影響も非手術および denervated SCG標本で見られた変動を何れも上回る傾向であった。このような成績から、 NE伝達刺激がその受容体と結合した後、 NOの発生を介してcGMPレベルを上昇させる一連の反応カスケードが、神経節の節前末端や節後交感神経細胞よりはむしろ主として、非ニューロン性のグリア細胞に限局して存在する可能性が推測された。 Aokiらは、抗-arginine抗体を用いて組織化学的に小脳組織内のL-Arg分布を細胞レベルで検索している。 その結果、抗体に対する反応性はアストロサイトおよびバーグマン細胞で顕著に発現していることを報告している。 また、G-cyclase活性とbasal cGMPレベルが、共に小脳プルキンエ細胞内で高値を示していることから、グリア性細胞に局在するNOS による反応系で発生する NOが、ニューロン性のプルキンエ細胞に作用して cGMP生成を引き起こすと解釈している(3)。今回の我々の実験成績から、NEは明かにグリア細胞を刺激して同一細胞内で機能的にNO-cGMP生成の一連の反応過程を調節している可能性が強く示唆された。この点をさらに解明すべく、コリン作動性シナプス伝達に共役した節後ニューロン内でのcGMP生成系との相互関連性についても、細胞レベルで追求する必要があろう。

【文献】(1) Agullo and Garcia (1991) *Eur. J. Pharmacol.* 206, 343-356 (2) Ando et al. (1983) *Brain Res.* 267, 313-321 (3) Aoki et al. (1991) *Brain Res.* 547, 190-192 (4) Quenzer et al. (1980) *J. Neurochem.* 34, 1782-1784.

図1. 摘出SCG内cGMP生成におよぼすL-Arg添加濃度の変化

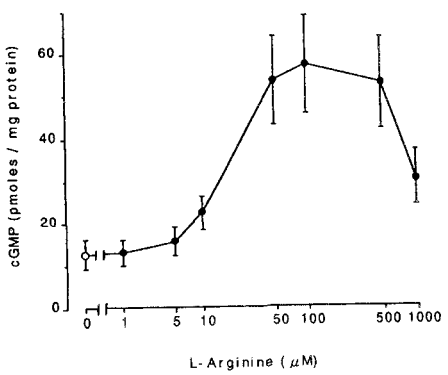
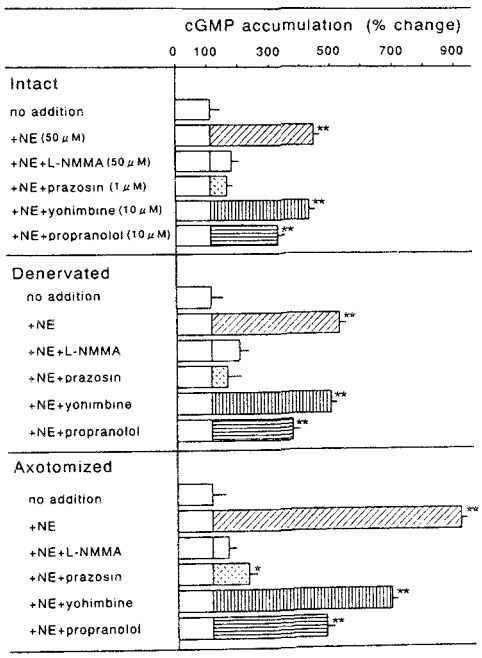


表1. L-Arg刺激で増大するSCG内cGMP生成におよぼす各種薬剤の効果

	cGMP accumulation (pmoles/mg protein)	% change
no addition	12.6 ± 3.4(6)	100
+ L-Arg (100μM)	56.9 ± 11.7(6)[a]	452
+ L-NMMA (50μM)	14.5 ± 2.7(5)	115
+ Arg + L-NMMA	26.1 ± 5.5(6)[b]	207
+ methylene blue (500μM)	15.4 ± 2.2(5)	122
+ Arg + MB	17.0 ± 2.8(5)	135

[a] $p<0.001$, [b] $p<0.05$

図2. NE刺激で増大するSCG内cGMP生成におよぼすdenervationあるいはaxotomyの影響



NE, norepinephrine; L-NMMA, N^G-monomethyl-L-arginine
*p<0.05; **p<0.001 vs each no addition

118　ラット線条体プロテインキナーゼCのメタンフェタミン投与に伴う変化

田口　淳一　，井端　泰彦
（京都府立医大・第二解剖）

〔要約〕
線条体プロテインキナーゼC（PKC）に対するメタンフェタミン（MAP）投与の影響を検討するために，各種PKCアイソザイム抗体（α，β，γ）を用いた免疫組織化学的検索及びイムノブロッティングによる検索を行った。MAP（4mg／kg）投与ラット線条体を用いた免疫組織化学的検索では，いずれの抗体の場合も免疫陽性な突起を伴った細胞体様形態が外側部で経時的に明確になると共に，線条体全域で認められる染色性も増大する傾向にあった。またイムノブロッティングによる検索では，どの抗体を用いた場合も分子量80KDaの免疫陽性バンドの染色性が経時的に膜分画で増大及び可溶性分画で減少していた。以上の結果は，神経細胞内に於ける各種PKCアイソザイムの可溶性分画から膜分画へのトランスローケーションがMAP投与により促進されたことを示唆していると考えられる。

【目 的】
メタンフェタミン（MAP）を動物に反復投与することによって出現する行動感作に代表される逆耐性現象の形成機序としては，線条体チロシン水酸化酵素活性やドパミン含量の低下及び常同行動の出現などが観察されることから，線条体ドパミン神経系の機能的変化が重要な要因の一つとして考えられている。一方，プロテインキナーゼ C（PKC）を活性化するホルボールエステル類によって線条体内ドパミン放出が促進されるという報告（1）に加え，PKCと機能的に連関するN－メチル－D－アスパラギン酸受容体に対する拮抗薬がMAP投与による線条体内ドパミン神経系の機能的変化を抑制することも明らかにされ（2），MAP投与が線条体PKCに変化を及ぼす可能性が考えられる。本研究では，線条体PKCに対するMAP投与の影響について各種PKCアイソザイム抗体を用いた免疫組織化学的検索及びイムノブロッティングによる検索を行った。

【方 法】
Wistar系雄性ラット（200－250g）にMAP（4mg／kg）を腹腔内投与し以下の実験を行った。①免疫組織化学：MAP投与後0，10，40，70分でネンブタール麻酔を施行し，左心室より脳の灌流固定（2%パラホルムアルデヒド及び0．1%グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液）を行った。ビブラトームで作製した脳の前額断切片（厚さ40μm）について各種PKC抗体（生化学工業：α，β，γ）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行い光顕下で3，3’-ジアミノベンチジン－ニッケル（DAB－Ni）による発色を観察した。②イムノブロッティング：MAP投与0，10，40，70分で断頭後直ちに頭部を液体窒素で凍結し－80℃で保存した。解凍後氷冷下で摘出した線条体を諸種のプロテアーゼ阻害剤及び蔗糖を含むHEPES緩衝液中でホモジナイズした。このホモジネートの1，000×g，10分間の遠心分離で得られた上清について100，000×g，60分間の遠心分離を行い，その上清と沈渣を各々可溶性分画及び膜分画とした。一定蛋白量の可溶性分画あるいは膜分画標品についてSDS－PAGE及びウェスターンブロッティングを行い，各種PKCモノクロナール抗体と反応させてABC法による免疫染色を行いDAB－Niによる発色を観察した。

【結 果】
免疫組織化学：各種PKCモノクロナール抗体を用いた免疫組織化学的特異性を小脳で検討したところ，PKC－γ抗体ではプルキンエ細胞の細胞体，樹状突起及び軸索に，PKC－β抗体では分子層に於けるプルキンエ細胞の樹状突起以外の部分及び顆粒層に，PKC－α抗体ではプルキンエ細胞の細胞体及び分子層に於ける諸種の神経細胞体に免疫陽性反応が観察され，これまで報告されている結果（3，4）とほぼ一致した分布特異性が認められた。一方，線条体に於いては小脳に比較して染色度は弱いが神経線維束以外の全領域に稠密な陽性反応が認められると

共に，線条体に存在すると考えられている神経細胞のうち大型及び小型の細胞体様形態がα，β，γ抗体全ての場合に観察された。この様な免疫染色性を示す線条体に於いてＭＡＰ単回投与の影響を検討したところ，全ての抗体で突起を伴った細胞体様形態が外側部で経時的に明確になると共に，線条体全域に認められる神経線維束以外の染色性も増大する傾向にあった（Ｆｉｇ．１）。イムノブロッティング：線条体ホモジネートより得られた膜分画と可溶性分画について各種モノクロナール抗体によるイムノブロッティングを行ったところ，いずれの分画でも全ての抗体で分子量８０ＫＤａに主な単一バンドが認められると共に，膜分画では高分子側に，可溶性分画では低分子側に数本の薄いバンドが認められた。また，この分子量８０ＫＤａの免疫陽性バンドの染色性は電気泳動蛋白量の５－１５μｇに於いて漸増した。この様なイムノブロッティングの条件下で，ＭＡＰ単回投与ラット線条体からの膜分画と可溶性分画に於ける各種ＰＫＣアイソザイムの量を検討したところ，全ての抗体に於いて経時的に膜分画では増大し可溶性分画では減少していた（Ｆｉｇ．２）。

【考 察】

免疫組織化学的検索に於いてＭＡＰ投与により免疫反応性が経時的に増大していたが，この変化はＭＡＰ単回投与によって観察される常同行動の出現パターンとほぼ一致していたことから，ＭＡＰによる常同行動の出現に線条体ＰＫＣが何らかの役割を果たす可能性が示唆される。現に，ＭＡＰ投与によって誘発されるドパミン放出の促進にＰＫＣによるリン酸化が重要である事が報告されている（５）。また，イムノブロッティングで観察されたＭＡＰ投与に伴う膜分画に於ける免疫陽性バンドの経時的増大及び可溶性分画に於ける経時的減少は神経細胞内での各種ＰＫＣアイソザイムの可溶性分画から膜分画へのトランスローケーションが促進している事を示しており，この事が免疫組織化学的検索で認められた免疫陽性反応の増大に関与している可能性が考えられる。

【文 献】

(1)Zurgil, N. and Zisapel, N. (1985) FEBS Lett. 185, 257-261. (2)Sonsalla,P. K. et al. (1989) Science 243, 398-400. (3)Hidaka, H. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 4523-4526. (4)Saito, N. et al. (1988) J. Neurosci. 8, 369-382. (5)Giambalvo, C. T. (1992) Neuropharmacol. 31, 1201-1210.

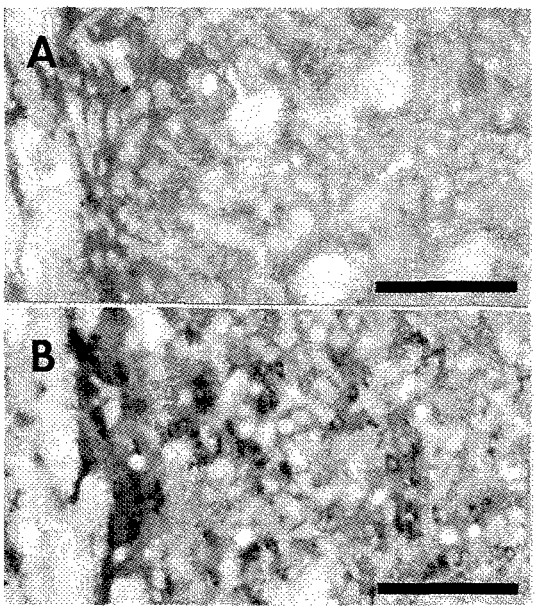


Fig.1 Immunohistochemistry in striatum at 0 min(A) and 70 min(B) after MAP administration.
Bars indicate 100 μm.

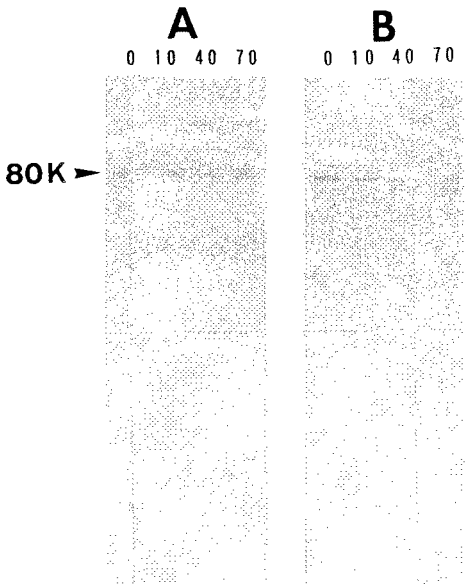


Fig.2 Immunoblotting of membrane (A) and cytosol(B) fractions from MAP-treated rat.
Each number on the lane indicates time after MAP administration.

119 小脳顆粒細胞転写制御系における グルタミン酸応答性とその調節系の解析

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於いて、NMDA(N-metyl-D-aspartate)あるいはカイニン酸投与でAP-1活性の誘導の起こることを報告している（1）。このAP-1活性の誘導は、c-*fos* mRNAの発現誘導に大きく起因している。また、この誘導は細胞内へのCa^{2+}流入ともよい対応を示した。カイニン酸によるAP-1活性の上昇は、電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)のアンタゴニストであるニカルジピンによって抑制された。実際、Ca^{2+}の細胞内取り込みも抑えられた。また、VDCCアゴニストであるBAYK8644投与によってもCa^{2+}取り込み上昇とともにAP-1の活性上昇が認められた。従って、カイニン酸によるAP-1活性上昇はVDCCからのCa^{2+}流入を介して引き起こされているものと考えられる。一方、NMDAによるAP-1活性上昇はニカルジピン投与では影響を受けなかった。また、NMDAおよびカイニン酸によってc-*fos*と*zif*/268の発現誘導が同様に認められた。このAP-1活性上昇は、一酸化窒素(NO)生成薬剤SNP(sodium nitroprusside)によって抑えられるが、これはフェロシアナイドイオンによるものではなかった。また、その抑制効果はNMDA、カイニン酸レセプターでは異なっていた。

【目的】 シナプス可塑性のモデル系として知られる長期増強や薬剤投与による痙攣誘発によって、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)。これら事実は、シナプス伝達によって核内転写制御系にも影響が及んでいることを示している。IEGは転写制御因子をコードしているので、その発現誘導は何らかの遺伝子の発現調節に関わっている可能性が考えられる。この場合、発現調節を受ける遺伝子群を明らかにすることは、神経細胞のシナプス応答性を明らかにする上で重要である。また、核内転写制御系への情報伝達系およびその伝達をコントロールする制御系の解析(4)も同様に重要な課題となる。このような観点から本研究では特に、異なったサブタイプのグルタミン酸レセプターを介したシナプス入力と核内転写制御系の応答性の関係、及びそれら応答性を制御するものとしてのNOの可能性を検討した。

【方法】 出生後一週目のマウス(ICR)小脳より、小脳顆粒細胞の初代培養系を調製した。培地には、25 mMKClおよび10 μMシトシンアラビノシドを加えた。培養開始後5-7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100μMで加えた。1-2時間後に細胞を回収し、核抽出液の調製を行なった(1, 5)。ゲルシフトアッセイは、TRE(TPA-responsive element: 5'-GATTCGTGACTCAGCACAGG-3')をプローブとして用いて行なった(1)。細胞内へのCa^{2+}取り込みは、10μCi$^{45}Ca^{2+}$をLocke's溶液に加え、アゴニスト投与後10分間の取り込み値で示した。ノザンハイブリダイゼーションは、アゴニスト投与後1時間で細胞を集めRNAを抽出した。SNPは、アゴニスト投与3分前に加えた。

【結果】

すでにNMDAあるいはカイニン酸投与で引き起こされるAP-1活性の上昇には、細胞内へのCa^{2+}流入が引き金になっていることを報告した。しかし、カイニン酸投与の場合、流入するCa^{2+}が果たしてカイニン酸レセプターチャンネルを介したものかVDCCを介したものかは明らかではなかった。そこで、カイニン酸投与とともに1μMニカルジピンを加えた所、Ca^{2+}の取り込みが抑えられるとともに、AP-1活性の上昇も抑えられた。25mMKCl存在下で1μM BAYK8644を加えてVDCCを活性化した所、Ca^{2+}流入とともにAP-1活性の上昇も認められ、それはニカルジピンによって抑制された。一方、NMDAによるCa^{2+}流入とAP-1活性上昇はニカルジピンによって抑えられなかった。

ノザンハイブリダイゼーションによってc-*fos*と*zif*/268 mRNAの発現を調べた所、NMDAおよびカイニン酸によって同程度の発現誘導が認められた。一方、キスカル酸を加えても、AP-1活性の上昇およびc-*fos*, *zif*/268の発現誘導はほとんど認められなかった。

SNP投与によってカイニン酸によるAP-1活性上昇の抑制が認められるが、SNPは解離してNOとフェロシアナイドイオン$[Fe(CN)_5]^{2-}$を生成する。従って、$[Fe(CN)_5]^{2-}$による抑制効果も考えられた。そこで、同じフェロシアナイドイオンを生成するフェロシアン化カリウム$K_4Fe(CN)_6$を加えた所、AP-1活性の上昇は抑えられなかった。また、Ca^{2+}流入も抑えられなかった。従って、SNPから生成したNOがなんらかの形でAP-1活性の上昇に抑制効果を与えたことが考えられる。一方、NMDA投与に対しては、SNP, $K_4Fe(CN)_6$ともにCa^{2+}流入を抑え、且つ、AP-1活性上昇も抑えた。これは、主にフェロシアナイドイオンによるNMDAレセプター不活性化によるものと考えられる(6)。このように、SNPのNMDA, カイニン酸レセプターに与える作用効果は異なっていた。なお、フェリシアン化カリウム$K_3Fe(CN)_6$は、NMDA, カイニン酸によるCa^{2+}流入およびAP-1活性上昇に対して全く影響を与えなかった。

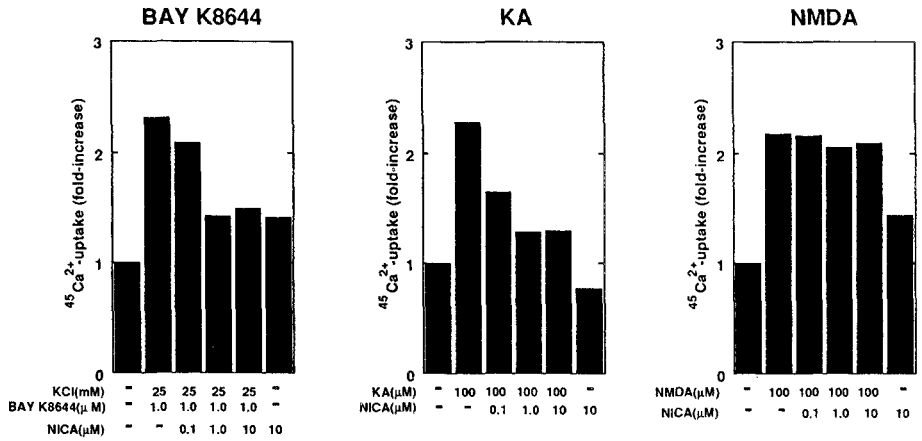


図1. Ca^{2+}取り込みに対するニカルジピンの効果　10 μCi $^{45}Ca^{2+}$投与後即座にNMDA, カイニン酸, BAYK8644を加え、10分間の$^{45}Ca^{2+}$の取り込みを測定した。カイニン酸、BAYK8644の場合、ニカルジピンが効いている。

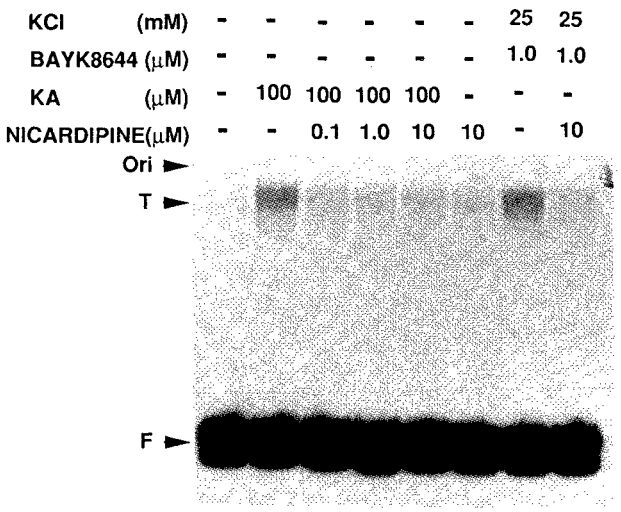


図2. AP-1活性化に対するニカルジピンの効果　カイニン酸、BAYK8644によるAP-1活性の上昇をニカルジピンは抑える。

【考察】　NMDAレセプター活性化の場合はレセプターチャンネルを介して、カイニン酸レセプター活性化の場合はVDCCを介して細胞内へCa^{2+}が流入し、それがAP-1活性の上昇を引き起こしているらしい。従って、Ca^{2+}流入口の違いに拘わらずAP-1の活性上昇は起こり得る。更に、*c-fos*, *zif*268の誘導性にも違いは認められなかった。このことは、少なくともIEGの発現に対してNMDA, カイニン酸は同じような効果を及ぼしているものと考えられる。現在、メタボトロピック型グルタミン酸レセプター活性化におけるIEGの発現誘導を検討中であるが、IEG誘導はイオンチャンネル型レセプター活性化に伴った応答性の一つかもしれない。また、NOはAP-1活性上昇を抑えるが、これには細胞の酸化還元状態が大きく効いている可能性が考えられる。現在、細胞レベルでの検討とともに、AP-1活性の酸化還元による制御を*in vitro*系においても検討中である。

【文献】

1. Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1992) J. Neurochem. 59, 2067-2075.
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. Katayama, N., Iwata, E., Sakurai, H., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1993) J. Neurochem. 60, 902-907.
5. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 6419.
6. Kiedrowski, L., Costa, E. and Wroblewski, J. T. (1992) Mol. Pharmacol. 41, 779-784.

120 自己チオリン酸化によるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの自己活性化について

石田敦彦、木谷隆子、藤澤仁
（旭川医大・第一生化学）

〔要約〕

ラット大脳より精製したカルモデュリン依存性プロテインキナーゼII（ＣａＭキナーゼII）を用い、Ca^{2+}/CaM存在下、2 μM ＡＴＰγＳと 200 μM syntide-2を基質として５℃で酵素反応をおこなわせると、syntide-2のチオリン酸化が僅かなタイムラグの後、直線的に進行した。この間、酵素の自己チオリン酸化は殆ど無視できる程度であった。この時、予め自己チオリン酸化しておいた酵素を用いると、全活性の顕著な活性化が観察された。この全活性の活性化は自己チオリン酸化の程度や、Ca^{2+}/CaM非依存性活性の出現の程度によく相関していた。更にE．ｃｏｌｉを用いて発現させたＣａＭキナーゼIIβサブユニットを用いて同様の解析をおこなったところ、野生型の酵素では脳酵素と同様、自己チオリン酸化に伴う全活性の活性化が観察されたのに対し、Ｔｈｒ^{287}をＡｌａに変えた変異酵素では活性化は全く観察されなかった。以上の結果から、Ｔｈｒ$^{286/287}$の自己（チオ）リン酸化はCa^{2+}/CaM非依存性活性の出現のみならず、全活性のfull activationにおいても重要な役割を果していることが強く示唆された。

〔目的〕 ＣａＭキナーゼIIのＴｈｒ$^{286/287}$の自己リン酸化がCa^{2+}/CaM非依存性活性の出現のみならず、全活性（Ca^{2+}/CaM存在下の活性）の活性化にも関与している可能性（３、６）を明かにするため、高濃度のsyntide-2と低濃度のＡＴＰγＳを用い５℃で酵素反応をおこなわせることにより、アッセイ中の自己チオリン酸化を抑えた条件で本酵素の活性を測定して、自己チオリン酸化と全活性の活性化の関係を検討した。

〔方法〕 ＣａＭキナーゼIIはラット大脳より調製したもの（１）、あるいは既報の方法（２）に準じて ＣａＭキナーゼIIβサブユニットｃＤＮＡ、または Ｔｈｒ^{287}をＡｌａに変換したｃＤＮＡを発現させたE．ｃｏｌｉより調製したものを用いた。これらの酵素を200 μM syntide-2, 2 μM ［γ-^{35}Ｓ］ＡＴＰ-γＳ, 5mM 酢酸マグネシウム, 40mM Hepes-NaOH (pH 8.0), 0.01% Tween 20, 0.2mM $CaCl_2$, 0.1mM EGTA, 1 μM カルモデュリンを含む反応液中、５℃でインキュベートし、一定量の反応液を経時的に取り出してsyntide-2への［γ-^{35}Ｓ］チオリン酸の取り込みを常法（３）に従って測定した。ＣａＭキナーゼIIの自己チオリン酸化は既報の方法（４）に準じておこない、［γ-^{35}Ｓ］チオリン酸の取り込みはホスホセルロースペーパーを用いる方法（５）にておこなった。

〔結果と考察〕 50 μM ［γ-^{35}Ｓ］ＡＴＰγＳ存在下ではＣａＭキナーゼIIによるsyntide-2のチオリン酸化の経時変化には顕著なラグが観察されたが、［γ-^{35}Ｓ］ＡＴＰγＳ濃度を2 μMに下げるとチオリン酸化は僅かなタイムラグの後、直線的に進行した（図１、白丸）。50 μM ［γ-^{35}Ｓ］ＡＴＰγＳ存在下ではこの間、かなりの自己チオリン酸化が観察されたのに対し、2 μM ［γ-^{35}Ｓ］ＡＴＰγＳ存在下では酵素の自己チオリン酸化はごく低いレベルに抑えられていた（data not shown）。 従って、2 μM ［γ-^{35}Ｓ］ＡＴＰγＳ存在下でアッセイした場合にはアッセイ中の酵素の自己チオリン酸化の影響は殆ど無視できるものと考えられる。予め自己チオリン酸化しておいた酵素を用いて同様の条件下で活性を測定したところ、いずれの場合もsyntide-2のチオリン酸化におけるタイムラグは完全に消失したが、 特に2 μM ［γ-^{35}Ｓ］ＡＴＰγＳ存在下の場合には全活性の顕著な活性化（自己活性化）が観察された（図１、黒丸）。次に、このアッセイ系を用いて自己チオリン酸化と自己活性化の関係を検討した。種々の時間、自己チオリン酸化させた酵素の活性を測定したところ、図２に示すように自己チオリン酸化と全活性の活性化、Ca^{2+}/CaM非依存性活性の出現の三者の経時変化はよい一致を示した。この条件下では酵素の自己チオリン酸化はＴｈｒ$^{286/287}$に特異的に起こることが示されている（４）ので、全活性の活性化にはＴｈｒ$^{286/287}$の自己チオリン酸化が関わっていることが示唆された。 このことを更に確認するために、 Ｔｈｒ^{287}をＡｌａに変換した変異型ＣａＭキナーゼIIβサブユニットをE．ｃｏｌｉに発現させたものを調製し、野生型酵素とともに自己チオリン酸化にともなう自己活性化の有無を調べた。図３に示すように、野生型酵素を自己チオリン酸化条件でインキュベートすると、脳酵素と同様にCa^{2+}/CaM非依存性活性の出現とともに顕著な自己活性化が観察されたのに対し、変異型酵素では非依存性活性の出現も自己活性化も全く観察されなかった。以上の結果からＴｈｒ$^{286/287}$の自己（チオ）リン酸化はCa^{2+}/CaM非依存性活性の出現のみならず、 全活性のfull activationにも必須の役割を果たしているという可能性（３、６）が強く示唆された。

〔文献〕

１）石田敦彦、木谷隆子、藤澤仁 (1991) 実験医学、 9, 1479-1484
２）Hagiwara, T., Ohsako, S., and Yamauchi, T. (1991) J. Biol. Chem. 266, 16401-16408
３）Katoh, T., and Fujisawa, H. (1991) J. Biol. Chem. 266, 3039-3044
４）Ikeda, A., Okuno, S., and Fujisawa, H. (1991) J. Biol. Chem. 266, 11582-11588
５）Colbran, R. J. (1993) J. Biol. Chem. 268, 7163-7170
６）Kwiatkowski, A. P., Shell, D. J., and King, M. M. (1988) J. Biol.Chem. 263, 6484-6486

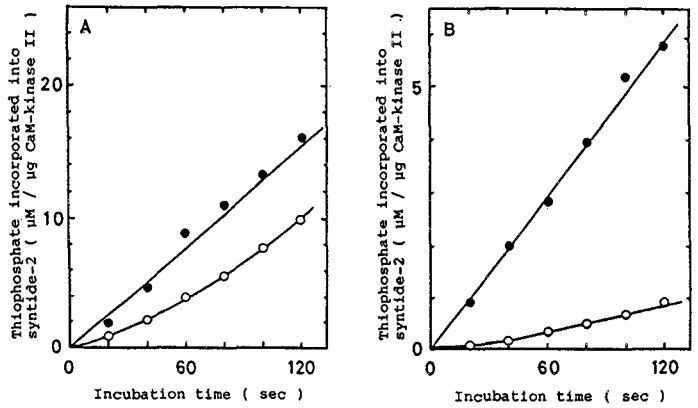


図1　ＣａＭキナーゼⅡ（ラット大脳）によるsyntide-2のチオリン酸化の経時変化
200μM　syntide-2をCa^{2+}/CaM存在下に50μM　[γ-^{35}S]ＡＴＰγＳ（Ａ）または2μM　[γ-^{35}S]ＡＴＰγＳ（Ｂ）を用いて５℃でチオリン酸化した。白丸は未処理のＣａＭキナーゼⅡを用いた場合、黒丸は50μＭＡＴＰγＳ存在下に５℃で１０分間自己チオリン酸化したＣａＭキナーゼⅡを用いた場合を表す。

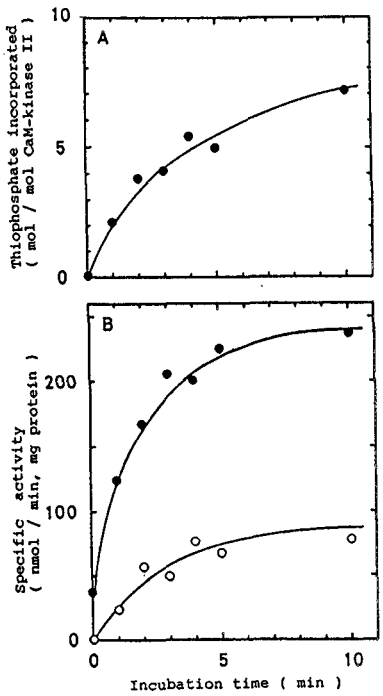


図2　ＣａＭキナーゼⅡの自己チオリン酸化（Ａ）とそれに伴う全活性の活性化及びCa^{2+}/CaM非依存性活性の出現（Ｂ）
（Ａ）ラット大脳ＣａＭキナーゼⅡを50μＭ[γ-^{35}S]ＡＴＰγＳ存在下５℃で自己チオリン酸化し、[γ-^{35}S]チオリン酸の取り込みを測定した。（Ｂ）Ａと同一条件でＣａＭキナーゼⅡを自己チオリン酸化し、経時的に取り出して2μＭ[γ-^{35}S]ＡＴＰγＳを用いて全活性（黒丸）並びにCa^{2+}/CaM 非依存性活性（白丸）を測定した。

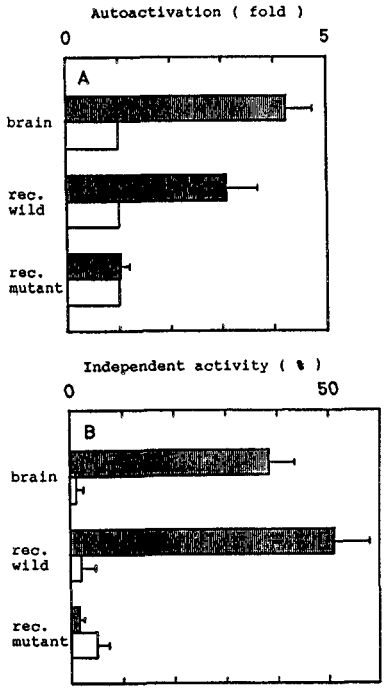


図3　ラット大脳ＣａＭキナーゼⅡおよび組み換え型ＣａＭキナーゼⅡβサブユニットの自己チオリン酸化による全活性の活性化（Ａ）ならびにCa^{2+}/CaM非依存性活性の出現（Ｂ）
ラット大脳ＣａＭキナーゼⅡ（brain）、組み換え野生型ＣａＭキナーゼⅡβサブユニット（rec. wild）、Thr^{287}／Ａｌａ組み換え変異型ＣａＭキナーゼⅡβサブユニット（rec. mutant）をそれぞれ自己チオリン酸化条件でインキュベートした後、　全活性（Ａ）とCa^{2+}/CaM非依存性活性（Ｂ）をそれぞれ測定した。全活性の活性化は未処理の酵素の全活性を１として表示した。また、Ca^{2+}/CaM非依存性活性はそれぞれの状態の酵素の全活性に対する%にて表示した。　Ａ,Ｂともhatched barは自己チオリン酸化酵素、open barは未処理の酵素を示す。

121 プロテインキナーゼC各アイソザイムの機能的役割分担について ――RBL-2H3 細胞を用いた検討――

小澤光一郎、Michael A. Beaven*
（広島大・医・総合薬・薬品分析化学、*Lab. Chem. Pharmacol・NHLBI・NIH）

〔要約〕
各種プロテインキナーゼC（PKC）アイソザイムの機能的役割分担を解明する目的で、ラット肥満細胞系である Rat basophilic leukemia (RBL-2H3) 細胞を用いて検討し、次の結果を得た。1）抗原抗体刺激による RBL-2H3細胞の開口放出現象は、PKCの活性化と細胞内Ca^{2+}濃度の上昇に依存していた。2）ウエスタンブロット解析の結果、RBL-2H3 細胞には2種類のCa^{2+}依存性PKC（αとβ）と3種類のCa^{2+}非依存性PKC（δ、ε、およびζ）が存在し、α、β、δ、およびεが抗原抗体刺激により活性化された。3）細胞膜透過性を上昇させPKCを枯渇させた細胞を用い、各精製PKCアイソザイムとの再構成実験を行ったところ、PKC－βとδは抗原抗体刺激による開口放出を回復させた。4）同様の再構成実験の結果、PKC－αとεがホスホリパーゼCのダウンレギュレーションに、PKC－αとδがホスホリパーゼA_2の活性調節に、それぞれ関与していることが明らかになった。以上の結果より、RBL-2H3 細胞において、各PKCアイソザイムは機能的に役割分担をしていることが示唆された。

【緒言】
発見当初、プロテインキナーゼC（PKC）[3]は単一の分子と考えられていたが、その後の研究により、PKCは複数の分子種からなるファミリーであることが明らかになり、現在、α、βI、βII、γ、δ、ε、ζ、η、θ、およびλの少なくとも10種類のアイソザイムの存在が知られている[1]。PKCの各アイソザイムは、組織分布の違いやその蛋白質としての構造の違いの他にも、Ca^{2+}に対する感受性、リン脂質への依存性、活性化物質の選択性、基質とする蛋白質への選択性、などもそれぞれで異なっており、その機能的役割分担に興味が持たれてきた。一方、Rat basophilic leukemia (RBL-2H3) 細胞は抗原抗体刺激によりヒスタミン等のケミカルメディエーターを開口放出するなど、多くの性質が肥満細胞に類似していることから、そのモデル細胞として広く利用されている。また、RBL-2H3 細胞でPKCが開口放出の際に中心的役割を担っていること、ホルボールエステル処理によりホスホリパーゼC（PLC）の活性抑制が引き起こされること、等が知られており、細胞内情報伝達機構解明のためのモデル細胞としても利用されている。そこで今回、RBL-2H3 細胞を用い、各種PKCアイソザイムの機能的役割分担について検討した。

【実験方法】
①RBL-2H3 細胞の培養：RBL-2H3 細胞は15%牛胎仔血清、2 mM グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 U/ml ストレプトマイシンを含む Eagle's Mimimum Essential Medium を用いて培養した。実験の前日に、トリプシン処理により細胞をフラスコより剥離させ、0.5×10^6 cells/ml となるように希釈し、これに DNP-BSA 特異的 IgE (0.5μg/ml)を加え感作させ実験に使用した。膜の透過性を上昇させるための streptolysin O 処理は、Cunha-Melo らの方法[2]に準じて行った。
②ウエスタンブロット解析：各種抗PKCアイソザイム抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った[4]。蛋白量20 μg（PKC－α）あるいは 40 μg（PKC－α以外）を用い、デンシトメータにより定量した。
③開口放出とPLC活性の測定：RBL-2H3 細胞の刺激は、DNP-BSA (20 ng/ml)を添加することにより開始し、37℃で15分間インキュベート後反応を停止した。開口放出の測定[4]はhexosaminidaseの遊離量を測定することにより行った。PLC活性の測定[5]は、実験の前日に [^{3}H]inositol を培養液中に添加し、一晩インキュベートし細胞に取り込ませ、刺激後の [^{3}H]inositol phosphates 量を測定することにより行った。

【結果および考察】
①RBL-2H3 細胞に存在するPKCアイソザイムの検討：各PKCアイソザイムに特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果、RBL-2H3 細胞には2種類のCa^{2+}依存性PKC（αとβ）と3種類のCa^{2+}非依存性PKC（δ、ε、およびζ）の少なくとも5種類のアイソザイムが存在した。抗原抗体刺激により、これらアイソザイムの内、α、β、δ、およびεの細胞質より細胞膜への移行を伴う活性化が認められた。

②開口放出に関与するＰＫＣアイソザイムの検討：抗原抗体刺激による RBL-2H3細胞の開口放出は、特異的ＰＫＣ阻害剤であるRo31-7549あるいはcalphostin Cにより抑制され、また、細胞内Ca^{2+}濃度の上昇に依存していた。RBL-2H3細胞をstreptolysin Oで処理し膜透過性を上昇させ、その後２度細胞を洗浄した結果、細胞内よりすべてのＰＫＣアイソザイムが消失し、このとき、抗原抗体刺激による開口放出も完全に抑制された。この様に細胞内よりＰＫＣを消失させた RBL-2H3 細胞を用い、各種精製ＰＫＣアイソザイムとの再構成実験を行った結果、ＰＫＣ－βとδは抗原抗体刺激による開口放出を濃度依存的に回復させたが、ＰＫＣ－αあるいはεは高濃度においてのみ回復させた（図１Ａ）。このＰＫＣ－βとδの作用は、抗原抗体非刺激時には認められず（図１Ｂ）、また、細胞内Ca^{2+}濃度に依存していた（図１Ｃ）。これらの結果は、RBL-2H3 細胞における抗原抗体刺激による開口放出にＰＫＣ－βとδが関与していることを示唆している。また、Ca^{2+}非依存性ＰＫＣであるＰＫＣ－δによる開口放出の回復も細胞内Ca^{2+}濃度に依存していたことから、RBL-2H3 細胞における開口放出の過程には、ＰＫＣの活性化と共に細胞内Ca^{2+}濃度の上昇も必須であることが示唆された。

③ＰＬＣ活性の調節に関与するＰＫＣアイソザイムの検討：抗原抗体刺激によるＰＬＣ活性の上昇は、細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 20 nM)で前処理することにより、抑制された。Streptolysin O処理により細胞内ＰＫＣを枯渇させた RBL-2H3細胞を用い、精製ＰＫＣアイソザイムとの再構成実験を行った結果、ＰＫＣ－αとεが抗原抗体刺激によるＰＬＣの活性化を抑制した（図２）。興味深いことに、開口放出（ＰＫＣ－βとδ）とＰＬＣ活性の抑制（ＰＫＣ－αとε）には、各々Ca^{2+}依存性アイソザイム１種とCa^{2+}非依存性アイソザイム１種が関与していた。

④細胞内ＰＫＣアイソザイム濃度との比較：開口放出におけるＰＫＣアイソザイムのEC_{50}値およびＰＬＣ活性抑制のIC_{50}値を細胞内ＰＫＣアイソザイム濃度と比較した結果、表１に示すように、いずれも細胞内濃度と相関していた。

⑤その他の生理反応に関与するＰＫＣアイソザイムの検討：各種ＰＫＣアイソザイムの内、ＰＫＣ－δはホスホリパーゼA_2の活性化に、そしてＰＫＣ－αは抑制に関与していることが明らかになった。

以上の結果から、RBL-2H3 細胞を用い、ＰＫＣ－βとδが開口放出に、ＰＫＣ－αとεがＰＬＣ活性の抑制に、そしてＰＫＣ－αとδがホスホリパーゼA_2活性の調節に関与していることが明らかになった。さらに、この様に各ＰＫＣアイソザイムは機能的に役割分担をし、細胞機能を維持していることが示唆された。

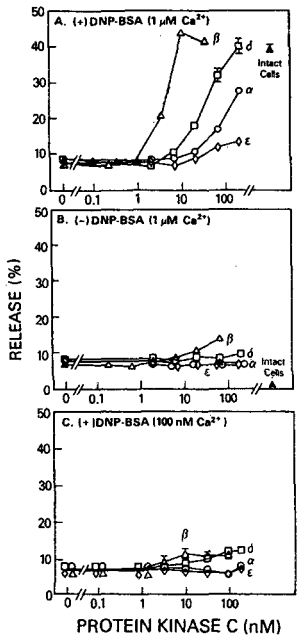


図１　精製ＰＫＣアイソザイムによる開口放出現象の回復

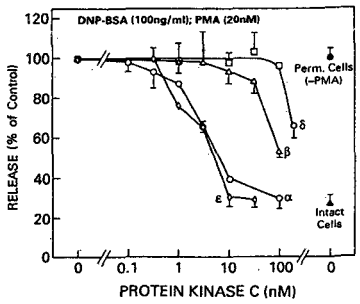


図２　精製ＰＫＣアイソザイムによるＰＬＣ活性抑制の回復

表１　RBL-2H3 細胞における、精製ＰＫＣアイソザイムの作用濃度と細胞内濃度との比較

Isozyme	Intracellular concentration*		Activity		
	Total	Particulate	EC_{50}	IC_{50} −PMA	IC_{50} +PMA
			nM		
Stimulatory					
β	35	~10	5	>200	~75
δ	60	~35	45	>200	~200
Inhibitory					
α	85	~20	175	0.75	3
ϵ	12.5	~7.5	>250	1.5	3

*Estimated concentration in whole cells extracts and particulate fraction 1 min after stimulation with 10 ng/ml DNP-BSA.

【参考文献】

(1) Asaoka, Y. et al. (1992) TIBS 17, 414-417. (2) Cunha-Melo, J. R. et al. (1989) J. Immunol. 143, 2617-2625. (3) Nishizuka, Y. (1989) Cancer 63, 1892-1903. (4) Ozawa, K. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 1749-1756. (5) Ozawa, K. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 2280-2283.

122 ヒスタミンH$_1$受容体脱感作機構のリン酸化酵素阻害剤による検討

堀尾嘉幸、劉　業奇、伊藤誠二*、福井裕行

（阪大・医・二薬理、　*大阪バイオサイエンス研）

〔要約〕

HeLa 細胞ヒスタミンH$_1$受容体の脱感作機構を各種キナーゼ阻害薬を用いて検討した。HeLa細胞をPMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) で２０時間処理するとヒスタミンH$_1$受容体量は約２倍になる。この増加はキナーゼ阻害薬のstarurosporine, K_{252a}, H7, sphingosine, phloretin のいずれでも阻害された。一方、ヒスタミンによる細胞内イノシトールリン酸(IPs) の蓄積はPMAによって抑制される。PMAを２０時間細胞に作用させた場合 staurosporine, H7を添加することによって抑制が除かれIPs の蓄積の促進が起こるがK_{252a}, sphingosine, phloretin では効果がなかった。一方PMAを１５分間作用させた場合には staurosporine, K_{252a}、高濃度のH7によってIPs の蓄積がおこったがsphingosine, phloretinでは効果がなかった。H$_1$受容体を介する情報伝達の脱感作の機構は複数のキナーゼが関与している可能性が考えられた。

〔目的〕

ヒスタミンH$_1$受容体は分子内に７個の膜貫通領域を有する７回膜貫通型受容体（１）であり、その情報伝達機構はホスホリパーゼCの活性化とそれに続くイノシトール 1,4,5一三リン酸（IP_3)の蓄積、細胞内Ca^{2+}の増加である。H$_1$受容体には脱感作が知られており、ヒスタミンによって起こるhomologous desensitization とホルボールエステルであるPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)などによって起こるheterologous desensitization の２種類があると考えられている。クローン化したH$_1$受容体の一次構造上にCキナーゼによってリン酸化されうる配列が3ヶ所（２）存在しており脱感作にH$_1$受容体自身のリン酸化が関与することが強く示唆されるが、多種類あるCキナーゼのどのアイソザイムが脱感作を行うのかまた、ヒスタミンによるhomologous脱感作機構にはどのようなキナーゼが関与しているのかは不明である。そこで我々は各種のキナーゼ阻害剤を使ってH$_1$受容体の脱感作がどのように修飾されるかをHeLa細胞を用いて検討した。

〔方法〕

HeLa細胞を［^{3}H］イノシトールで２４時間ラベルした後１００μMヒスタミンで刺激し、生成された［^{3}H］イノシトールリン酸を AG1-X8 樹脂カラムを用いて精製して測定した。キナーゼ阻害薬はPMA刺激の１５分前に添加した。PMAはヒスタミン添加の１５分または２０時間前に加えた。H$_1$受容体はHeLa細胞膜

分画と［^{3}H］メピラミンを用いたバインディングアッセイで測定した。Cキナーゼ活性は［γ－^{32}P］ＡＴＰを用いてmyelin basic proteinに取り込まれた放射性カウントによって測定した。細胞内 Ca^{2+} はfura-2AMでHeLa細胞をラベルした後カルシウム顕微鏡を用いて測定した。

〔結果と考察〕

HeLa細胞をＰＭＡで処理すると２０時間後にH$_1$受容体量は約２倍に増加する。［^{3}H］メピラミンに対するKd値はコントロールに比べ有意に低下した。これらの変化はキナーゼ阻害剤である staurosporineをＰＭＡ添加時に加えておくと抑制された。H$_1$受容体量の増加はキナーゼ阻害薬であるK_{252a}、H7、sphingosine, phloretin のいずれでも、濃度依存性に阻害された。一方、ヒスタミンによる細胞内イノシトールリン酸(IPs) の蓄積については、ＰＭＡがその蓄積を阻害した。HeLa細胞を２０時間ＰＭＡで刺激した後ヒスタミンによるIPs の蓄積を測定したところstaurosporine とH7を各々ＰＭＡ添加の１５分前に加えたもののみにIPsの蓄積の促進が起こり、K_{252a}, sphingosine, phloretinではそれが見られなかった。HeLa細胞を１５分間のみＰＭＡで刺激しヒスタミンによるIPs の蓄積を観察したところstaurosporine, K_{252a} をＰＭＡ添加１５分前に加えておいたもののみにIPs の蓄積が起こった。またH7は高濃度を用いたときにのみ IPsの蓄積が観測され、sphingosine や phloretinにはIPs 蓄積作用がなかった。以上により、H$_1$受容体量の増加に関与するキナーゼとＰＭＡ１５分間作用時に活性化してH$_1$受容体情報伝達を阻害するキナーゼおよびＰＭＡ２０時間作用時に活性化してH$_1$受容体情報伝達を阻害するキナーゼが別種のものである可能性が示唆された。現在カルシウム顕微鏡を用いてHeLa細胞のヒスタミンによる細胞内Ca^{2+}の増加を測定し、Ca^{2+}の動態に対するヒスタミン、ＰＭＡおよびキナーゼ阻害薬の作用を調べるとともにCキナーゼ活性に対するキナーゼ阻害薬の作用を検討している。

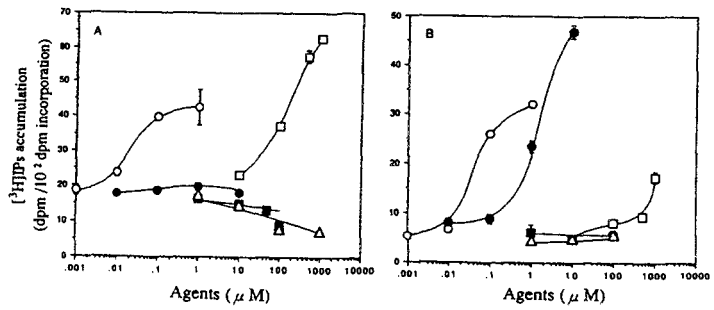


Figure 1. EFFECTS OF PKC INHIBITORS ON [^{3}H] IPs ACCUMULATION IN THE PMA TREATED HeLa CELLS. HeLa cells were treated with PMA for 20 h (A) or 15 min (B) and then histamine (100 μM) was added. Staurosporine (○), K252a (●), H7 (□), Sphingosine (■), and phloretin (△) were used.

(1) 堀尾嘉幸、福井裕行、和田博 (1992)化学と生物, 30, 102-111

(2) Horio, Y., Mori, Y., Higuchi, I., Ito, S. & Fukui, H. (1993) J. Biochem. 114, (in press)

123 プロスタグランジンD合成酵素の脳軟膜・脈絡叢における発現及び脳脊髄液への分泌

○裏出良博[1]、北垣邦夫[2]、大石仁[3]、金子武嗣[3]、水野昇[3]、鈴木登志子[4]、渡部紀久子[4]、早石修[4]
日本チバガイギー国際研[1]、INSERM[2]、京大・医・脳研総[3]、大阪バイオサイエンス研[4]

〔要約〕 ラット脳プロスタグランジン(PG)D合成酵素に対するantisense RNAを用いたin situ hibridizationの結果、本酵素mRNAは成熟ラット中枢神経系において脳・脊髄を取り巻く脳軟膜に最も多量に検出され、次いで脈絡叢と脳実質のオリゴデンドログリア細胞にその発現が認められた。その細胞局在は免疫組織化学の結果とよく一致した。又、大脳表面より剥離した脳軟膜や脳室より単離した脈絡叢に検出される本酵素活性は脳全体の活性に比べ数倍高く、さらにWestern blot及び酵素活性測定の結果、本酵素が脳脊髄液中にも検出された。以上の結果は、本酵素が主に脳軟膜や脈絡叢で合成され、少なくともその一部は脳脊髄液中に分泌される事を示している。最近、ヒト脳脊髄液中の主要構成蛋白質であるβ-traceのN-末端アミノ酸配列がヒト脳PGD合成酵素の配列と一致する事が報告された。従って、β-traceはPGD合成酵素と同一の蛋白質であり脳脊髄液中における輸送蛋白質として機能している可能性が高い。

PGD_2はラット及びヒト脳における主要PGであり、その脳内投与により睡眠誘発や痛覚応答の修飾、体温低下などの多彩な中枢作用を示す(3)。中枢神経系に於けるPGD_2の生合成はグルタチオン非依存性PGD合成酵素により触媒される(18, 19)。本酵素に対する抗体を用いた免疫組織化学の結果、ラット脳内での本酵素の主な細胞局在が生後1～2週齢の幼若動物の神経細胞から成熟動物のオリゴデンドログリア細胞へ移行する事から、本酵素は動物の発育の各段階に於いて異なった機能に司り、中枢神経系の分化と機能維持の両面で重要な役割を担っていると考えられる(20)。ラット及びヒト脳本酵素のcDNA (10, 22)及びgenomic DNA (5, 23)のクローニングに基くアミノ酸配列及び遺伝子構造の比較から、本酵素は疎水性リガンドの輸送を司る各種分泌蛋白質で構成されるリポカリン遺伝子ファミリー(14)に属する唯一の酵素蛋白質である事が判明した(17)。さらに、本酵素の阻害剤として見い出されたセレニウム(7)の脳室内微量注入により非拘束ラットの睡眠の特異的阻害と生理的覚醒の誘発が起こる事が発見され(9)、本酵素が睡眠を司るKey enzymeである可能性が示された。今回、本酵素mRNAの発現部位を明らかにするために以下の実験を行なった。

［方法］「In situ hibridization」：ラット脳PGD合成酵素cDNA (22)を鋳型として本酵素に対するantisense RNAを[^{35}S]CTP存在下T7 RNA polymeraseを用いて作成した。SD系雄ラット(体重200～300 g)をエーテル麻酔下に断頭し、脳・脊髄を取り出し速やかに凍結した。その凍結切片(10 μm)を作成し、スライドグラスに張り付け、ホルマリン固定後アセチル化を行い脱水・乾燥後－80度にて保存した。In situ hibridizationは上記^{35}S標識riboprobeを用い重本らの方法(16)に準じて行なった。「免疫組織化学及びWestern blot」：本酵素に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用い、酵素抗体法により行なった(20)。「酵素活性測定」：ペントバルビタール麻酔下ラットの左心室よりリンゲル液を用いて全身の還流放血を行なった後、脳を摘出し実体顕微鏡下に脳軟膜及び脈絡叢を採取した。各組織は10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)中でホモゲナイズ後その10万x g上清を回収し酵素標品とした。ラット脳脊髄液は麻酔下に大槽より採取した。PGD合成酵素活性は40 μM [1-^{14}C]PGH_2を基質として用い、1 mM ジチオスレイトール存在下に100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)中25度 1分間反応させ測定した(19)。

［結果］In situ hibridizationの結果、本酵素 mRNA は成熟ラット中枢神経系において脳・脊髄を取り巻く脳軟膜に最も多量に検出され、次いで脈絡叢と脳実質のオリゴデンドログリア細胞にその発現が認められた(Fig. 1) (21)。本酵素に対する抗体を用いた免疫組織化学の結果、陽性染色は脳軟膜、脈絡叢及びオリゴデンドログリア細胞に観察されin situ hibridizationの結果とよく一致した。一方、単離した脳軟膜や脈絡叢のPGD合成酵素活性(14.2 及び7.0 nmol/min/mg蛋白質)は脳全体の酵素活性(2.0 nmol/min/mg蛋白質)と比べ数倍高く、又、脳軟膜剥離後の大脳皮質の酵素活性(0.6 nmol/min/mg蛋白質)は脳軟膜剥離前の大脳皮質の酵素活性の50%以下に減少し、白質の酵素活性(0.8 nmol/min/mg蛋白質)よりも低かった。更に、脳脊髄液中に脳軟膜と同程度の酵素活性が検出され、SDS電気泳動後のWestern blotの結果、精製酵素と同じ分子量26,000の移動度を示す脳脊髄液中の主要蛋白質がPGD合成酵素抗体に対する免疫交差性を示した。

［考察］以上の結果は、PGD合成酵素が主に脳軟膜や脈絡叢に存在し、その一部が脳脊髄液中へ分泌される事を示している。最近、ヒト脳脊髄液中の主要構成蛋白質であるβ-traceのN-末端アミノ酸配列がヒト脳PGD合成酵素の配列と一致する事が見い出された(4, 8, 24)。我々の結果と考え合わせると、その機能が不明とされていたβ-traceはPGD合成酵素と同一の蛋白質である可能性が高い。又、カエル脈絡叢の主要分泌蛋白質がラット及びヒト脳PGD合成酵素と高い相同性を示す事も報告された(1)。本酵素は疎水性リガンドの輸送を司る各種分泌蛋白質で構成されるリポカリン遺伝子ファミリーに属する唯一の酵素蛋白質であるが、脳脊髄液中では本酵素の基質及び活性発現に必要な還元剤の供給が予想しがたい事から、分泌されたPGD合成酵素は脳脊髄液において他のリポカリンと同様にレチノールやPG類などの低分子量疎水性リガンドの輸送蛋白質として機能しているのかも知れない。一方、従来、脳軟膜や脈絡叢は脳脊髄液の生成を行ない中枢神経系の化学的・物理的保護に携わる組織とされてきた。しかし、近年、これらの組織はより積極的に脳脊髄液を介した中枢神経系の調節に関与していると考えられて

いる(11). 例えば睡眠に関しても、脈絡叢での酸素消費が徐波睡眠時に亢進する事(2)が報告され、脳脊髄液中から各種睡眠誘発物質が見い出されている(6. 12. 15).. 又、昏睡状態の睡眠病患者の脳脊髄液中における選択的なPGD_2濃度上昇も観察されている(13). 従ってPGD_2は従来の神経伝達物質とは異なり、脳脊髄液を介した液性調節因子として機能すると考えられる。

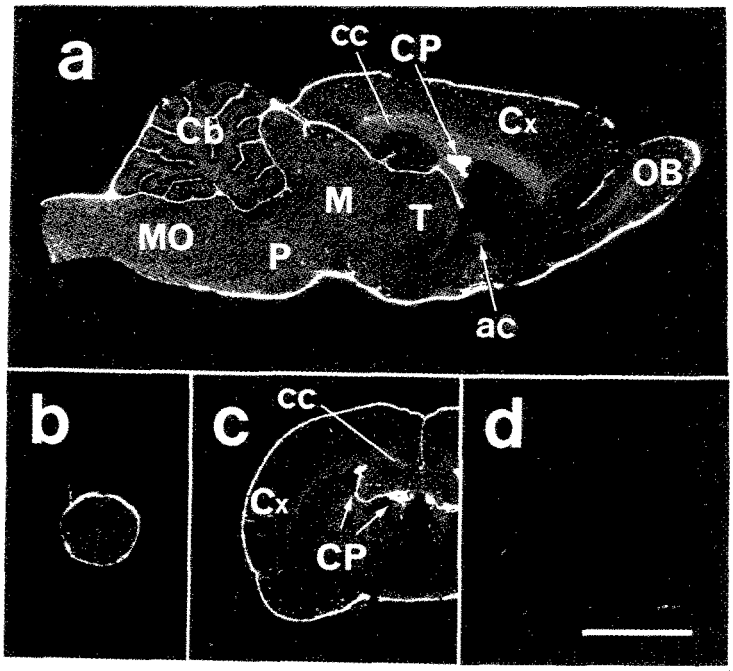


Fig. 1. Distribution of mRNA for PGD synthase in the adult rat brain and spinal cord (21). Negative film images of *in situ* hybridization of a parasagittal section (a) and coronal sections of the spinal cord (b) and the brain (c. d) are shown. Sections were hybridized with an antisense riboprobe for the enzyme in the presence (d) or the absence (a-c) of 100-fold excess of unlabeled probe. ac, anterior commissure; Cb, cerebellum; cc, corpus callosum; CP choroid plexus; Cx cerebral cortex; M, midbrain; MO, medulla oblongata; OB. olfactory bulb; P, pons; T. thalamus. Bar = 500 μm.

[文献] 1. Achen, M. G., Harms, P. J., Thomas, T., Richardson, S. J., Wettenhall, R. E. H., and Schreiber, G. (1992) J. Biol. Chem. 267, 23170-23174.
2. Bobillier, P., Suguin, S., Petitjean, F., Buda, C., Salvert, D., Janin, M., Chouvet, G., Jouvet, M., and Des Rosiers, M. H. (1982) Brain Res. 240, 359-363.
3. Hayaishi, O. (1991) FASEB J. 5, 2575-2581.
4. Hoffmann. A., Wurster, U., Nimtz, M., and Conradt, H. S. (1992) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 372, 958.
5. Igarashi, M., Nagata, A., Toh, H., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89. 5376-5380.
6. Inoue, S. (1989) Biology of Sleep Substances (CRC Press. Boca Raton, Florida, U.S.A.), pp. 12-14.
7 Islum, F., Watanabe, Y., Morii, H., and Hayaishi, O. (1991) Arch. Biochem. Biophys. 289, 161-166.
8. Kuruvilla, A. P., Hochwald, G. M., Ghiso, J., Castaño, E. M., Pizzolato, M, and Frangione, B. (1991) Brain Res. 565, 337-340.
9. Matsumura, H., Takahata, R., and Hayaishi, O. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9046-9050.
10. Nagata, A., Suzuki, Y., Igarashi, M., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4020-4024.
11 Nilsson, C., Lindvall-Axelsson, M., and Owman, C. (1992) Brain Res. Reviews 17, 109-138.
12 Pappenheimer, J. R., Miller, T. B., and Goodrich, C. A. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 513-517.
13. Pentreath, V. W., Rees, K., Owolabi, O. A., Philip, K. A. & Doua, F. (1990) Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 795-799.
14. Pervaiz, S., and Brew, K. (1987) FASEB J. 1, 209-214.
15. Pieron, H. (1973) Le Probléme Physiologigue du Sommeil (Masson, Paris), p. 520.
16. Shigemoto, R., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1992) J. Comp. Neurol. 322, 121-135.
17 Toh, H., Urade, Y., and Tanabe T. (1992) Mediators of Inflammation 1, 223-233.
18 Ujihara, M., Urade, Y., Eguchi, N., Hayashi, H., Ikai, K., and Hayaishi, O. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 260, 521-531.
19. Urade, Y., Fujimoto, N., and Hayaishi, O. (1985) J. Biol. Chem. 260, 12410-12415.
20 Urade, Y., Fujimoto, N., Kaneko, T., Konishi, A., Mizuno, N., and Hayaishi, O. (1987) J. Biol. Chem. 262, 15132-15136.
21 Urade, Y., Kitahama, K., Ohishi, H., Kaneko. T., Mizuno, N. and Hayaishi, O. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, in press.
22 Urade. Y., Nagata, A., Suzuki, Y., Fujii, Y., and Hayaishi, O. (1989) J. Biol. Chem. 264, 1041-1045.
23. White, D. M., Mikol, D. D., Espinosa, R., Weimer, B., Le Beau, M. M., and Stefansson, K. (1993) J. Biol. Chem. 267, 23202-23208.
24. Zahn, M., Mäder, M., Schmidt, B., Bollensen, E., and Felgenhauer, K. (1993) Neurosci. Lett. 154, 93-95.

124 ESR-CTシステムによるラット脳の2-(14-carboxypropyl)-2-ethyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxyの 画像について

平松　緑、小松真紀子、及川和夫＊、劉　健康＊＊、鎌田　仁
（山形県テクノポリス財団、生物ラジカル研究所、＊山形県工業技術センター
＊＊岡山大学医学部分子細胞医学研究施設、神経情報学部門）

〔要約〕

ラットの左頚動脈より2-(14-carboxypropyl)-2-ethyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxy(16DS) を注入し、生きたままでラット脳部位の16DSの分布を electron spin resonance(ESR)-CTシステムにより画像として捕らえることができた。また、16DSを注入後大脳皮質、海馬、線条体、中脳、橋延髄及び小脳に16DSの取り込みをESRスペクトロメーターで確認した。さらに大脳半球の核、ミトコンドリア、ニューロン膜及びミクロソーム分画にも16DSが取り込まれていることを認めた。

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つつある。L-バンドESR-CTシステムの開発により、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頭部で捕らえられている（1、2）。しかし、carbamoyl-PROXYLは脳関門を通過しにくいので、脳実質内の画像が捕らえられていない。今回は、16DSを用い、高速ESR-CTシステムを使用して検索した結果、in situでラット脳部位の画像が捕らえられた。また、16DSは脳各部位及び各膜分画に取り込まれていることが認め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. 画像試薬　：　16DSをジメチルホルムアミドに溶解した。
3. ESR-CT画像方法　：　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、0.1mlの200mM16DSを左頚動脈より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の条件は、次のとおりである：field, 39± 6 mT; response, rapid; magnetic fields modulation, 0.2 mT; sweep time, 2.4 sec; magnetic gradient, 1 mT/cm; angle, 0～ 160° intervals。
4. 16DS の測定　：　100mM16DSを0.08ml左頚動脈よりゆっくりと注入したのち、心臓より生理食塩水で灌流し、ただちに脳を摘出した。ついで大脳皮質、海馬、線条体、中脳、橋延髄及び小脳に分離した。組織に20倍量の生理食塩水を加えてホモジェナイズし、ホモジェネート液を偏平セルに移して16DSの分析をX-バンドESRを用いて行った。また、ホモジェナイズしたラット大脳半球を遠心法により核、ミトコンドリア、シナプトソーム及びミクロソーム分画に分け、これらの分画の16DSを分析した。
X-バンドESRの測定条件は、fieldは 335±5 mT, modulationは 0.1 mT, responseは 0.3 , sweep timeは 1 minとした。
5. 蛋白質の測定　：　測定は、PIERCE製の蛋白質測定試薬を用いて行った。

［実験結果］

脳の画像位置を確認するために、ラットより脳を取り出し、carbamoyl-PROXYL溶液に浸した脳を再びラットの頭にもどしたESR-CT像を灰色で示した。ラット脳の冠状断及び矢状断のいずれにおいても脳の位置に一致して16DSの取り込みの分布が認められた（図１）。

次に16DSを左頚動脈より注入し、灌流したのち、脳部位を取り出しホモジェネート中の16DSを分析した結果、大脳皮質、海馬、線条体、中脳、橋延髄及び小脳に16DSの取り込みが認められた。また、大脳半球の核、ミトコンドリア、シナプトソーム及びミクロソーム分画中に16DSの取り込みが認められた（表１）。

［考察］

ヒトの頭部病巣部位をESR-CTシステムにより捕えることを目的とし、ESR-CTシステムの開発を行っている（３）。今までは、carbamoyl-PROXYLの頭部の画像をラットで捕えているが、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。今回我々は、16DSを用いて初めてラット脳実質内の画像を捕えることができた。又、16DSは脳全域及び核、シナプトソーム、ミトコンドリア及ミクロソーム分画に取り込まれていることを確認したことから、今回のラット頭部の16DSのESR-CT画像はラット脳実質内のものであることが明らかとなった。

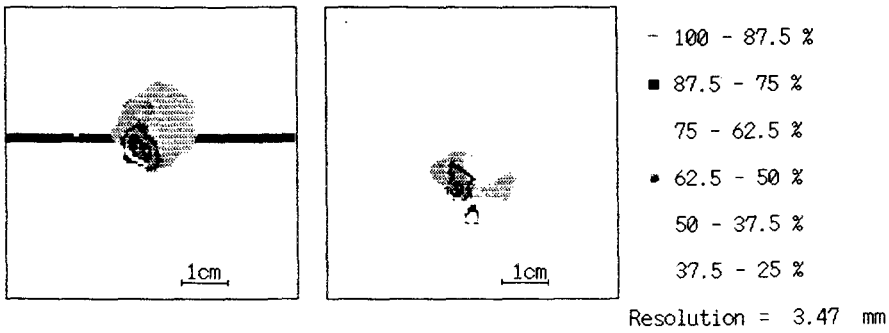


Fig.1 ESR-CT imaging of 16DS in the rat head after injection of 16DS into the carotid artery. ESR-CT imaging of carbamoyl-PROXYL on the rat brain was exhibited as gray color. Two dimentional ESR-CT imaging and three dimentional ESR-CT imaging at 2mm width of black line in the two dimentional ESR-CT imaging were indicated in left and right figures.

Table 1 16DS level in rat brain

Brain Area ($\times 10^{16}$spins/ml)		Fraction ($\times 10^{14}$spins/mg protein)	
Left Cortex	9.69	Nuclei	1.43
Hippocampus	6.85	Mitochondoria	0.71
Striatum	7.12	Synaptosomes	0.97
Midbrain	10.0	Microsome	0.82
Pons-Medulla oblongata	8.29		
Cerebellum	9.03		

Each value represents the mean of 2 animals.

［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）及川和夫、佐藤敏行、野田博行、平松緑、鎌田仁、Neurosciences,19:197-200,1993.

125 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体

III 新生仔期6-OHDA投与ラットのドーパミンD1受容体の変動：[^{3}H]SCH-23390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D1受容体密度を[^{3}H]SCH-23390をリガンドとする定量的in vitroレセプター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D1受容体密度の有意な変動は認められなかった。しかるに線条体黒質路の神経終末のある黒質網様部の[^{3}H]SCH-23390の結合密度はSMB群においては、非SMB群や対照群に比し有意に上昇した。この所見は、L-DOPAやD1作動薬投与時のSMB出現に、黒質網様部のD1受容体が重要な役割を果たしている事を示唆する。

［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(stereotyped behavior)を示す。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SCH-23390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。しかるに、D1受容体拮抗薬である[^{3}H]SCH-23390をリガンドとしたレセプターアッセイ法にて線条体におけるD1受容体密度の測定が行なわれているが、新生仔期6-OHDA投与による変動はなく[1]、行動薬理学的現象の神経化学的裏付けは、未だなされていない。この行動薬理学的現象が、in vitroで実証されない理由として、現在までのところ、線条体を均一な部位として捉えそのなかの部位差についての検索がなされていないこと、また線条体以外の部位についての変化が追求されていないことなどがあげられる。そこで今回我々は選択的D1受容体拮抗薬である[^{3}H]SCH-23390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おける、SMBに伴うD1受容体の変化について検索した。

［方法］Wistar系ラット生後一日齢及び三日齢にdesipramine(20mg/kg)前処置後、実験群には6-OHDA(100μg/5μl)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週で、末梢性ドーパ脱炭酸酵素阻害剤であるRo-4-4602(50mg/kg i.p.)を負荷し、行動評価を行い、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週で[^{3}H]SCH-23390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[^{3}H]SCH-23390 bindingの種々の生化学的検討を行い、飽和実験をScatchard解析し、Kd = 3.0 nM、Bmax =127.5 fmol/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[2]。0.1Mリン酸緩衝駅(PBS)で潅流脱血後、大脳基底核を含む連続16um厚の凍結切片を作成し、120mM NaCl、5mM KCl、2mM CaCl2、1mM MgCl2を含む50mM Tris-HCl bufferにて22℃、5分のpreincubation後、2nM [^{3}H]SCH-23390溶液中に22℃、2時間反応させた。nonspecific bindingは10uM (+)-butaclamol存在下で決定した。反応後、洗浄は5分、2回氷冷buffer中で行い、冷風下で乾燥後、[^{3}H]acrylic standard bars(Amersham)とともに、[^{3}H]Hyperfilmに4℃、2週間露出した。得られた画像は、MCID(Imagung 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．対照群ラット大脳基底核における[^{3}H]SCH-23390結合の分布

大脳基底核のうち、前脳に存在する線条体、側坐核、嗅結節、および中脳に存在する黒質網様部はいずれも非常に高い密度で[^{3}H]SCH-23390の結合が観察された。画像解析による定量化の結果、嗅結節および黒質網様部における結合密度の平均値は、線条体および側坐核よりも高かった。また線条体における[^{3}H]SCH-23390の結合密度はほぼ均一であったが、腹外側部(CPVL)で比較的高い傾向を示した。ドーパミンニューロンの細胞体が存在する黒質緻密部(A9)、腹側被蓋野(A10)、赤核後部(A8)では非常に低い結合密度しか示さなかった。

２．新生仔期6-OHDA投与による[^{3}H]SCH-23390結合密度の変動

大脳基底核各領域における[^{3}H]SCH-23390の結合密度を、対照群、非SMB群、SMB群の三群間で比較した。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 +0.7、嗅結節　B +1.7、黒質　B -5.6）。線条体各領域、側坐核、嗅結節においては結合密度は三群間でほとんど変動しなかった(Table 1)。線条体黒質路の終末が存在する黒質網様部では、非SMB群は対照群との間に有意な変化はなかったが、SMB群は対照群、および非SMB群に比して有意な結合密度の増加が認められた。その増加の程度は、黒質網様部外側で特に著しかった。

［考察］新生仔期6-OHDA大槽内投与ラットでは、大脳基底核（線条体、側坐核、嗅結節、黒質）のドーパミン含量が減少する。これは非SMB群、SMB群ともに認められるが、SMB群で特に著しい。しかしドーパミン神経終末の存在する前脳の線条体、側坐核、嗅結節で、D1受容体の分布密度は、対照群、非SMB群、SMB群の三群間に変化がないことが、今回の実験により明らかになった。このことは、新生仔期6-OHDA投与後も線条体におけるD1結合能は変動しないというレセプターアッセイの手法による従来の実験結果とよく一致している。これまでに我々は、新生仔期6-OHDA投与の非SMB群、SMB群ともに前脳の各基底核におけるD2受容体密度に有意な変動がないことを確認している[3)]。これらの結果は、ラット成熟期におけるドーパミンニューロンの脱落後には出現する前脳基底核のD1及びD2受容体のup-regulationが、発達段階におけるドーパミンニューロンの傷害の場合には起こらないことを示している。

一方、中脳黒質のD1受容体は新生仔期ドーパミンニューロンの傷害に対し、前脳基底核のD1受容体とは異なった反応をする。すなわち、黒質網様部において、[^{3}H]SCH-23390の結合密度がSMB群で対照群、非SMB群に比して有意な増加を示したのである。SMBは、L-DOPAやD1作動薬投与時に発現し、また発現したSMBはD1拮抗薬で抑制される。今回、SMBを発現する群に特異的にみられた黒質におけるD1受容体のup-regulationの所見は、黒質網様部が、これらの薬物の作用部位として重要な役割を果たし、SMB発現に深く関わっていることを示唆している。ところで黒質網様部のD1受容体は、線条体に存在するGABA作動性ニューロンが黒質に投射する線条体黒質路の神経終末上に存在し、中脳ドーパミンニューロンの樹状突起より放出されるドーパミン(dendritic release)によりGABAの放出を調節する働きがあるとされている。SMBにおけるGABAニューロン系の関与については今後の検討課題である。

［文献］

1) Breese et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 167-176 (1987)
2) Kuhar and Unnerstall. In Method in Neurotransmitter Receptor Analysis (Ed. H. Yamamura et al.), Raven Press, New York, 1990, pp177-218
3) 岡村　均、横山ちひろ　ら、神経化学　31, 112-113 (1992)

Table 1　対照群、非SMB群、SMB群における[3H]SCH-23390の結合密度の大脳基底核における変動

	Control	SMB(-)	SMB(+)
CPDL	363.7 ± 15.2	308.0 ± 28.8	348.6 ± 13.3
CPM	361.6 ± 17.2	294.5 ± 33.3	365.3 ± 15.8
CPVL	406.6 ± 20.4	373.9 ± 22.6	402.1 ± 31.3
CPPV	406.3 ± 11.8	324.6 ± 28.2	344.6 ± 15.6
Acb	375.1 ± 13.4	350.5 ± 22.1	398.7 ± 12.0
TuO	361.8 ± 25.2	345.6 ± 18.4	349.0 ± 4.7
SNR	251.9 ± 11.0	287.2 ± 20.4	382.2 ± 23.7* **
VTA	17.2 ± 1.9	14.4 ± 0.9	12.5 ± 1.0

数値は各群５個体の平均±標準誤差（fmol/mg tissue）で表す。
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。Acb、側坐核。TuO、嗅結節。SNR、黒質網様部。
VTA、腹側被蓋野。
* $p < 0.05$は対照群と比較したもの。** $p < 0.05$は非SMB群と比較したもの。

126 抗てんかん薬の代謝と神経系への副作用

岩橋和彦，中村和彦，高城健司，久郷敏明，*松尾義則，**早原敏之，#細川清，洲脇寛

（香川医科大学精神科，*同生化学，#同附属病院，**国立療養所南岡山病院臨床研究部）

［要約］
抗てんかん薬（フェニトイン(PHT)およびバルプロ酸(VPA)）の代謝や副作用について調べた．特にPHTの小脳症状の出現頻度や重症度に個人差がある事と　抗精神病薬や三環系抗うつ薬を代謝する薬物代謝酵素Ｐ－４５０の酵素活性の個体差との相関関係についてＤＡラットを用いて調べた．　その結果　肝ミクロソームＰ－４５０のアイソザイムのひとつであるＰ－４５０ｄｂ１活性が低い雌のＤＡラットは同活性が高い雄のＤＡラットに比べて　PHTの腹空内注射による小脳失調症状が出現し易い事が判明した．一方VPAは雌雄どちらの　ＤＡラットにおいても小脳失調症状は出にくかった．この事からPHTの代謝及びその副作用に対するsensitivityはＰ－４５０ｄｂ１の活性の強さに関係している可能性のあることが判明した．

［方法］
動物：雌雄ＤＡ(Dark　Agouti）及び　Ｗｉｓｔａｒラット（２カ月，約１５０－２００ｇ）を用いた(1)．
処置：PHT,VPAを２カ月間腹腔内注射した(50mg/kg/day)後　行動観察により physical findings, behavior, motion, postureなどをチエックした．さらに脳を取り出しHematoxylin-eosin staining し，光顕にてPurkinje cellの脱落変性を調べた．
酵素（P-450系のアイソザイム）活性測定：無処置の雌雄ＤＡラットの肝臓を取り出してmicrosome分画を精製しＰ－４５０系薬物代謝酵素の活性を測定した．　その際　PHTやVPAをさまざまな濃度で加え 酵素活性の阻害も調べた．
［1］Debrisoquine-4-monooxygenase活性
反応液(final volume 1ml, microsomal protain 1mg/ml)に基質として0.5mMのdebrisoquineを加え，　NADPH-generatingsystem(5mM G6P, 2.5U G6PDH, 4mM $MgCl_2$, 1.6mM NADPH)を加えて反応をスタートさせた．１時間，３７°Ｃにて反応させた後，100μｌの$HClO_4$を加えて反応をストップさせた．反応生成物のdebrisoquine-4-OHをHPLC(Waters 510)を使って定量した(1)．
［2］さらに debrisoquine-4-monooxygenase(P-450dbl)以外にもいくつかの代表的なP-450のアイソザイムの活性を Nashらの方法で測定した(2)

［結果］
雌ＤＡラットでは　PHTの投与によるunfanning of the digits in hind-leg,　sluggishness, tottering on walking といった小脳症状と思われる（非可逆性の）physical abnormal sign の出現頻度が　雄ＤＡやＷｉｓｔａｒ系ラットに比べて高かった．また Table １に示したように光顕レベルの検索においても雌ＤＡラットの小脳プルキンエ細胞の変性脱落の頻度が高かった．なおVPAによる雌雄ＤＡラットの小脳失調症状はほとんど見られなかった．
一方，肝ミクロソームの主なＰ－４５０アイソザイムのうち，Ｐ－４５０ｄｂ１（debrisoquine-4-hydroxylase）活性は　雌ＤＡラットの同活性(1.1±0.3 nmoles/h/mg protain)は　雄ＤＡ，Ｗｉｓｔａｒ系ラットのそれ(5.0±1.1, 4.0±0.8)よりかなり低かった（Table ２）．　また　PHTはＰ－４５０の主なアイソザイムのうちＰ－４５０ｄｂ１活性を阻害すること，およびPHTによる酵素活性阻害の形式は競合阻害であることが Double-reciprocal plotから判明した（Figure １）．
なお VPAはＰ－４５０ｄｂ１活性をほとんど阻害しなかった．

［考察］
本研究で我々は　向精神薬による副作用の出現頻度や症状の程度に個人差があることについて　その原因解明の一助として　実際ヒトにおいてその活性の強さに個人差のある薬物代謝酵素（Ｐ－４５０）に着目し　そのモデルにＤＡラットを用いた．その結果Ｐ－４５０ｄｂ１活性が同系の雄や他の系のラットに比べてかなり低いＤＡラットの雌はＰＨＴによる小脳症状をおこし易いことがわかった．さらに酵素化学的解析からＰＨＴは　Ｐ－４５０ｄｂ１活性を競合阻害することが判明し　少なくともＰＨＴはＰ－４５０ｄｂ１の基質結合部位に結合し

代謝されるかあるいは酵素活性に影響を与える可能性が示唆された.
以上の結果より PHT代謝は肝ミクロソーム酵素P－４５０ｄｂｌに関係し 本酵素活性の個体差によってその副作用の出方も影響を受ける可能性のあることが示唆された.

〔文献〕
(1)Matsuo Y., Iwahashi K., and Ichikawa Y. Biochem. Pharmacol.(1992)43:1911-1919.
(2)Nash T. Biochem. J. (1953) 55:416-421.

Table 1. The proportions of the rats whose Purkinje cells were decreased in each group.

Groups of rats		Proportion (%)
Female DA	Phenytoin(+)	80
	Phenytoin(-)	0
Male DA	Phenytoin(+)	20
	Phenytoin(-)	0
Female Wistar	Phenytoin(+)	20
	Phenytoin(-)	0
Male Wistar	Phenytoin(+)	0
	Phenytoin(-)	0

More than 3 diffffferent sections(30 μm thick) of the cerebellum/a rat were obserbed with the light microscopic in each group.
Each group consists of more than 5 rats.

Figure 1. Effect of phenytoin on the activity of P-450dbl.

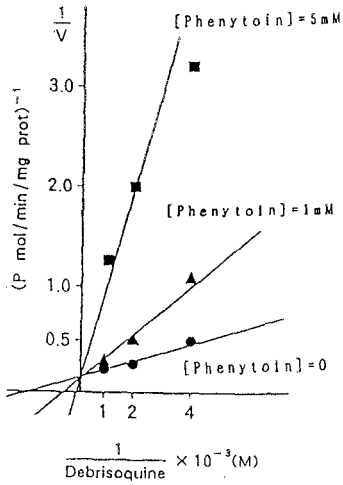


Table 2. Drug metabolizing activities of cytochrome P-450 isozymes in liver microsomes of DA and Wistar rats.

	Debrisoquine-4 -hydroxylase (P-450dbl)	p-Nitroanisole o-demethylase (mainly P-450h)	Benzo[a]pyren hydroxylase (mainly P-450c)	Aminopyrine hydroxylase (mainly P-450b, p)
male DA rats	5.0±1.1	5.8±0.5	25.1±2.1	3.5±0.3
female DA rats	1.1±0.3	2.6±0.8	22.4±3.5	3.0±0.7
male Wistar rats	4.0±0.8	6.4±2.1	18.3±3.1	2.7±0.5
female Wistar rats	3.5±0.7	5.8±1.5	15.1±2.5	2.1±0.7

Each value is expressed in nmoles/h/mg protain as a mean of 5 (rats) trials of the assay.
There are little differences in these 4 activities between male and female Wistar rats.

127 El マウス発達過程における脳内SOD活性の変化に及ぼすアロプリノールの効果と抗けいれん作用発現機序

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**，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^-産生を伴うｷｻﾝﾁﾝｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ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ﾃﾞﾙであるElﾏｳｽの発達に伴う脳内SOD活性の変化とこれに及ぼすアロプリノールの効果を見て、その作用機序について検討した。
Elﾏｳｽの発達過程における脳内ＳＯＤ酵素活性はPCxでは発達に連れて上昇し、20-30週齢で一定ﾚﾍﾞﾙとなるが、Hippでは20-30週齢で逆に低下してくる。この海馬での異常なＳＯＤ活性低下は生後8週齢よりアロプリノールを投与し続けると起こらず、かつ発作も誘発されないことがわかった。またこのアロプリノール慢性投与で血中尿酸値は変化しなかった。従ってアロプリノールの抗てんかん作用はｷｻﾝﾁﾝｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ阻害作用に由来する全身作用ではなく、海馬に特異的に起こるＳＯＤ酵素活性誘導によることが示唆された。

[目的]
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ﾀﾞｰｾﾞ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Elﾏｳｽは優れた遺伝性てんかんﾓﾃﾞﾙであり、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Elマウスを用いて、発達過程におけるＳＯＤ活性の変化を明かにし、さらにこの変化に及ぼすアロプリノールの効果を検討し、その抗けいれん作用機序について明らかにしようとした。

[方法]
脳内領野試料の作製：発達過程におけるElﾏｳｽ脳内ＳＯＤ活性の変化を明らかにするために、5,10,20,30,40 週齢のEl[s]各3匹計15匹を用いた。頸椎脱臼後断頭し、ｺｰﾙﾄﾞﾙｰﾑ中にて氷上で脳をとりだした。ｽﾃﾝﾚｽ製の剃刀の刃で２ｍｍ間隔で嗅脳側から尾側へと前頭断切片を得、これより頭頂皮質（ＰＣｘ）、海馬（Ｈｉｐｐ）、の２部位について、8-20 mgの試料を得、8-12％のﾎﾓｼﾞｪﾈｰﾄとした。また、発達過程におけるElﾏｳｽ脳内ＳＯＤ活性の変化に及ぼすアロプリノールの効果を明らかにするために、生後８週齢より２日に一回、体重20-30gのEl[s]に pH 10 のNaOH 溶液に過飽和させ 100mg/mlとしたアロプリノール液30-40μlを投与した(150mgアロプリノール/kg体重)。このアロプリノール投与群は生後、10,20,30週齢に各３匹ずつ計９匹を10,20,30週齢に達し、アロプリノール最終投与後３日目に、頸椎脱臼後断頭し、上記と同様にﾎﾓｼﾞｪﾈｰﾄを得た。また断頭の際、頸動脈より採血を行った。対照としてはアロプリノール液を溶かした溶液を同量経口投与したものを各３匹計９匹を用いた。尚El[s]とは生後５週齢より週一回の放りあげ刺激を与え、発作いき値が発達に伴い、低下してきて十分発作を起こし易くなるように飼育されたものをいう。
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ﾀﾞｰｾﾞを働かせると1:1でO_2^-を生じる。このﾌﾘｰﾗｼﾞ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(1U)と定義している。今回のﾃﾞｰﾀでは１μgﾀﾝﾊﾟｸあたりのＳＯＤ活性を１ Unit /μg protein として表示している
血清尿酸の定量法:ｶﾀﾗｰｾﾞ-ｳﾘｶｰｾﾞ法により410nmの吸光度を測定しｻﾝﾌﾟﾙﾌﾞﾗﾝｸとの差を標準曲線から読み取り定量した。

[結果]
発達過程におけるElﾏｳｽ脳内ＳＯＤ活性の変化：PCxに於てはＳＯＤ活性は発達に伴ってはわずかずつ上昇していくが20週齢を越えると有意の差はなくなり、2-3U/μg protein の一定ﾚﾍﾞﾙに達する。これに対しHippに於ては、5-10週齢ではP

Cx 同様発達に応じて上昇して行くが20週齢よりＳＯＤ活性は低下し始め30週齢で最低ﾚﾍﾞﾙとなっている（図1a. b.）。

発達過程におけるEl ﾏｳｽ脳内ＳＯＤ活性の変化に及ぼすアロプリノールの効果：PCxではアロプリノール非投与群の値は図２の値と有意差は認められず、アロプリノール投与群では非投与群に比べて若干高いものの統計的に有意ではなかった。Hippに於いては、アロプリノール非投与群の値はPCx同様図２の値と同じ傾向を示した。これに対して投与群では10週齢では投与群との間に差は認められなかったが、非投与群では急激なアロプリノール活性の低下を示し始める20週齢でも1.5U/μg protein と高い値を保ち続けた（図２a.b.）。さらに臨床症状としては非投与群では8週齢頃より発作を起こし始め20-30週齢で安定した発作を起こすにいたるが、投与群では全経過を通じて全く発作は誘発されなかった。

アロプリノール投与群と非投与群で発達過程におけるEl ﾏｳｽ血清尿酸値の変化：アロプリノール投与群ではも非投与群に比べて若干高値を示したが、統計的有意差はなかった（表１）。

［考察］

血中尿酸値がアロプリノール投与群と非投与群で差がなかったことはアロプリノールの抗てんかん作用がｷｻﾝﾁﾝｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ阻害による全身作用によるものではないことを示唆している。El マウスの発作発射について、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[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海馬でのＳＯＤ活性の特異的誘導が本剤の抗てんかん作用機序の中心になるものと思われる。

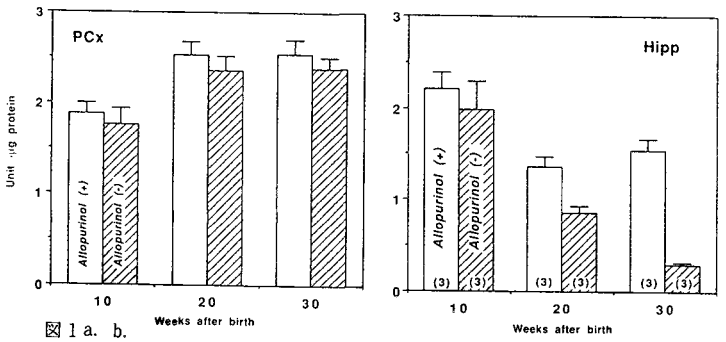


図１a. b.

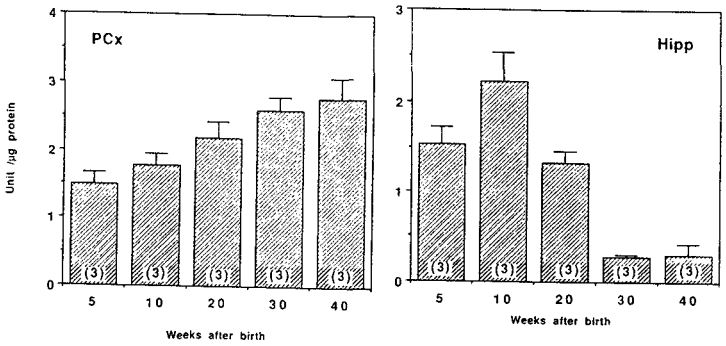


図２a. b.

Age / Weeks	Allopurinol (-)	Allopurinol (+)
10	503 ± 48(3)	451 ±42(3)
20	262 ± 23(3)	304 ± 28(3)
30	278 ± 28(3)	241 ± 26(3)

表１
serum uric acid μg/ml

［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., Kasamo. K. and Suzuki, J. (1987) Jpn. J. Neurol. Psychiat. 41, 498-9.
5. Suzuki, J. (1989) Art and Science of Epilepsy. (Suzuki, J. ed.) 27-33.
6. Hass, M. A. et al. (1989) J. Clin. Invest. 83(4), 1241-6.

128 セルレチドのてんかん準備性獲得におよぼす抑制効果

板野俊文，宮本　修*，岡田泰士**，根木哲朗*，村上哲英**，島瀬　修，（香川医科大学，生理，基礎スポーツ医学*，生物**）

〔要約〕
CCK アナログであるセルレチド（CLT）を用いて，てんかんモデルであるキンドリングのけいれん準備性獲得に及ぼす効果を検索した。CLT 20－80μg/kgの腹腔内投与によってけいれん準備性獲得は著しく抑制され，けいれんのステージの進行を遅らせた。またけいれん準備性（ステージC5）を獲得後の投与によってもより高濃度（160μg/kg）ではけいれん発作を抑制するが，その効果は持続性はなかった。二重盲検によってその副作用はほとんどないことよりけいれん準備性獲得抑制薬として用いられる可能性を示した。

（緒言）

セルレチド（CLT）はオーストラリア産アマガエルの皮膚から抽出されたアミノ酸10個からなるセルレインの一般名である。その構造はコレシストキニンとよくにており，CCK-8 のN-末端に 2個のアミノ酸残基を持った CCK10である。その生理作用はCCK8とほぼ同等か，より強力といわれており，代謝を受けにくく作用が持続する[1]。

一方脳内においてCCK はドパミン系と共存することが報告されており，従来よりドパミンの作用との関連において研究が進められてきた。たとえば実験的にはCCK は hypolocomotion をおこし，アンフェタミンによって誘導される hyperlocomotionを抑制する[2]。また，involuntary movementに関係する疾患が検討され，tardive dyskinesiaおよび舞踏病，パーキンソン病における tremor には有効であった[3]。一方学習や記憶と関連するという報告があり，また，脳虚血に伴う遅延性神経細胞死を有意に抑制すると報告されている[4]。これらの報告はCLT が単にドパミン系のみならず，海馬のグルタミン酸系の活動をも修飾することを示唆している。

我々は従来よりキンドリングモデルを用いて，てんかん準備性獲得の機序について研究を行い，海馬におけるグルタミン酸が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた[5]。本研究はCLT がけいれん準備性獲得に及ぼす影響について報告する。

（方法）

Male Sprague-Dawley ラット（250－300g）を用いた。各グループは n≧ 5匹で実験を行った。動物は通常の明暗サイクルでエサと水を与えて飼育した。ジエチルエーテルとペントバルビタールで麻酔し，定位脳固定装置に固定し，双極性の刺激電極を左側扁桃体（A -0.2，L 4.5，V 8.2mm from bregma）に刺入した。手術 1週間の回復を待って，刺激を開始した[5),6)]。刺激は100-200μAで60Hz 1秒の双極性矩型波を用い，1日 2回，午前 9時と午後 3時に行った。キンドリングのステージ判定はRacineの方法を用いて行った[7)]。ステージC1：mouth and facial movement，ステージC2：plus head nodding，ステージC3：plus forelimb clonus，ステージC4：plus rearing，ステージC5：plus bilateral clonic seizures with rearing and falling over。CLT は腹腔内投与で 1日 1回午前 8時30分に行った。

全データーは Mean±SD で表示し，有意差判定は Student's t-test を用いた。

（結果）

キンドリングモデルにおけるけいれん準備性獲得に及ぼすCLT の効果をFig. 1に示した。これは実験群の中の典型的なものを表している。CLT 無投与群ではステージは刺激回数に応じて上昇していき，C5に到達する刺激回数は 10.83±2.32であった。これに対しCLT 投与群では完全ではないが用量依存性にC5に到達する回数が増え，20μg/kg 投与群では 15.5±1.87，40μg/kg 投与群では19.17±2.04 で，80μg/kg 以上の投与群では30回以上刺激してもC5には到達しなかった。これらの差異は全て統計学的に有意であった。

次に一度C5に到達し，10回以上刺激し，完全にけいれん準備性を得た動物におけるCLT の効果を調べた結果を Fig. 2 に示す。80μg/kg 以下の投与群ではステージ判定では全て無効で，80μg/kg 投与では投与直後C4またはC5であった。160μg/kg 投与群ではC1からC4のステージを変動したが，明らかに抑制傾向を示した。

けいれん準備性獲得と脳波の関連を検討したところ，C1－C2のステージで海馬直上の皮質より誘導した脳波に spike and wave が観察され，後に前頭葉に spike and wave が広がるが，CLT 投与群ではこの全般化が抑制される。

（考察）

CLT がけいれん準備性獲得を著しく抑制し，準備性獲得後でも高濃度の CLT投与でけいれんを抑制することを明らかにした。CCKとてんかんに関する研究は少なく中国のグループより報告されているものだけで，これも CCKが全く別のてんかんモデルでけいれん発作を抑制すると報告されている[8)]（光誘発けいれん発作遺伝的素因が強い）。

キンドリングにおけるけいれん準備性獲得の機序として，我々は扁桃体が誘発刺激の generatorで，海馬が enhanser，大脳皮質が expander であると考えている。本実験では海馬から大脳皮質への拡散をCLT が抑制することが示唆された。この抑制は現在のところ何によるものかは不明である。可能

性としては，1.促通性の神経伝達物質であるグルタミン酸の放出の抑制，2.抑制性の神経伝達物質であるGABAの放出の促進，3.ドパミンの放出の修飾である。

腹腔内に投与されたCLTがどのように効果を発揮するかは未だ充分には解明されていない。我々は6-OHDAで黒質を破壊したラットを用いて，回転運動に及ぼすCLTの抑制効果を明らかにしたが，この場合はおそらく，脳に直接働き，CCK-A受容体を介して効果を表すものと考えている[9]。一方，Hamamuraらは迷走神経切断モデルを用いて実験を行い，CLTの効果が減少したことより迷走神経を介する作用機序を考えている[10]。また，Kiharaらは迷走神経切断の効果は脳の部位によって異なると報告している。つまりアンフェタミン誘導による locomotive effects に対するCLTの効果は迷走神経切断によって消失するが，stereotypyにおいては無効であった。いずれにしてもCLTの作用点は中枢に直接有効なものと，迷走神経を介するものがあると考えられる[11]。最近てんかんのけいれん発作に迷走神経の電気刺激療法が報告されているので[12]，CLTのけいれんの抑制機序は迷走神経を介して起こる可能性も充分ある。

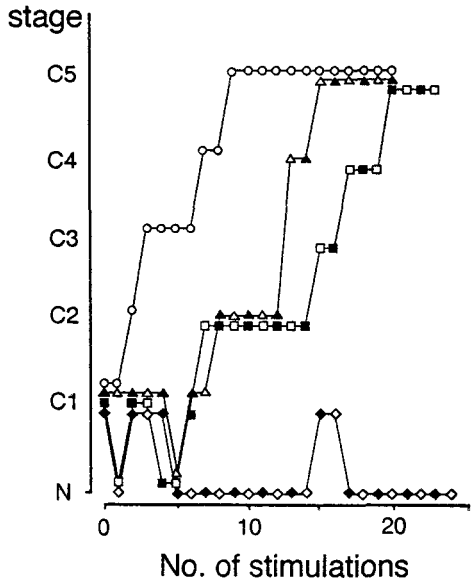


Fig. 1 けいれん準備性獲得に及ぼすCLTの効果
-○-無処理，-△-20μg/kg処理群
-□-40μg/kg処理群，-◇-80μg/kg処理群
各 closed symbol は投与を示す。

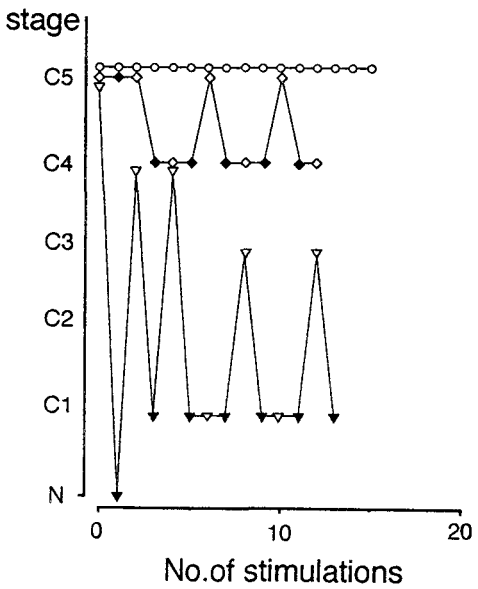


Fig. 2 けいれん準備性に及ぼすCLTの効果
-○-無処理，-◇-80μg/kg処理群
-▽-160μg/kg処理群
各 closed symbol は投与を示す。

〈文献〉

1) 松下　享(1991)神経ペプチド'91，祖父江ら編，メディカルレビュー社，227-234
2) O'Neill, N.F., Dourish, C.T. and Iversen, S.D.(1991) Eur. J. Pharmacol., 193, 203-207
3) Kojima, T., Yamauchi, T., Miyasaka, M., Koshino, Y., Nakane, Y., Takahashi, R., Shimazono, Y. and Yagi, G.(1992) Psychiatry Res., 43, 129-136
4) Eigyo, M., Katsuura, G., Shintaku, H., Shinohara, S., Katoh, A., Shiomi, T. and Matsushita, A.(1992) Eur. J. Pharmacol., 214, 149-158
5) Minamoto., Y., Itano, T., Tokuda, M., Matsui, H., Janjua, N.A., Hosokawa, K., Okada, Y., Murakami, T.H., Negi, T. and Hatase, O.(1992) Brain Res., 573, 345-348
6) Miyamoto, O., Itano, T., Yamamoto, Y., Tokuda, M., Matsui, H., Janjua, N.A., Suwaki, H., Okada, Y., Murakami, T.H., Negi, T., Nakahara, S. and Hatase, O.(1993) Brain Res., 603, 143-147
7) Racine, R.J.(1972) Electroencephalogy Clin. Neurophysiol., 32, 281-294
8) Li-Xin, Z., Min, W. and Ji-Sheng, H.(1992) NeuroReport, 3, 700-702
9) Fujisawa M., Miyamoto, O., Itano, T., Tokuda, M., Matsui, H., Nagao, S., Negi, T. and Hatase, O.(1993) Eur. J. Pharmacol., in press
10) Hamamura, T., Kazahaya, Y. and Ohtsuki, S.(1989) Brain Res., 483, 78-83
11) Kihara, T., Ikeda, M., Matsubara, K. and Matsushita, A.(1993) Eur. J. Pharmacol., 230, 271-277
12) Michael, J.E.(1992) J. Neurosci. Nurs., 24, 19-23

129 パーキンソン病態モデルラットの線条体アセチルコリン作動性神経におけるドーパミンD_1およびD_2受容体のアップレギュレーション

佐藤和夫*†、奥村福一郎*、植田弘師†、三須良実†
(横浜市立大学医学部薬理学教室†、麻酔学教室*)

〔要約〕

6-hydroxydopamine (6-OHDA) によるパーキンソン病態 (PD) モデルラットの線条体におけるアセチルコリン (ACh) 遊離に対するドーパミン (DA) D_2 および D_1アゴニスの影響を調べた。ACh 遊離測定は微小透析法 (microdialysis) とHPLC－ECD 法を組み合わせて行った。疑似手術をうけたラットにおける D_2 アゴニストであるquinpirole は 1 μM の濃度で ACh の遊離を基底遊離量の１１％抑制したが、PDモデルラットではその３倍抑制した。また、6-OHDA 処置後１週目ですでに線条体のDA含量は最大減少を示したにもかかわらず２週目において最大抑制がみられた。一方、D_1である SKF 38393 は1 μMの濃度で疑似手術をうけたラットの ACh の基底遊離量の19 %増加させたが PDモデルラットではその２.５倍増加させた。これらの結果からPDモデルラットでのD_1, D_2 受容体のアップレギュレーションの存在が示された。

（目的）

パーキンソン病態(PD)では線条体におけるドーパミン(DA)ーアセチルコリン(ACh)系のバランスがくずれており、その治療の１つとして線条体のACh遊離を抑制することが従来より指摘されている[4]。治療薬としてはDA前駆物質であるL-DOPAがよく用いられるが、そのほか種々の抗コリン剤やD_2アゴニストも用いられる[3,4]。一方、D_1アゴニストの効果に関しては不明な点が多い。今までにPDモデル線条体において全身的に投与された D_1 (CY 208-243), D_2 (quinpirole) アゴニストが正常なラットよりその作用が増強されたという報告がある[6]。全身的に投与された場合は線条体以外の部位からの作用も考慮せねばならない。今回、われわれは D_2 アゴニストであるquinpirole,ならびにD_1アゴニストであるSKF38393を局所的に投与して、6-hydroxydopamine (6-OHDA) によるPDモデルラットの線条体のACh遊離に対する影響を in vivo微小透析法を用いて調べた。

（方法）

実験には 250-350 g のオスのSD系ラットを用いて調べた。ペントバルビタール麻酔下でラットを脳定位固定装置に固定し右内側前脳束(medial forebrain bundle) (interaural line の中心より前方 4 mm,右側方 1.3 mm, 深さ -2 mm) の位置に6-OHDAを8 μg (4 μl) を８分かけて作用させ,４日後にアポモルヒネ 1 mg / kg 皮下注射 による反時計方向の回転運動の発現により判定した。３０分間の観察において毎分最大８回以上の回転を呈し、かつ毎分平均６回以上回転したものを実験に用いた（図１）。疑似手術としては6-OHDAの代りに4 μl の生理食塩水を作用させた。6-OHDA 投与後１－３週目に微小透析法を行った。微小透析法の実験の２日前にペントバルビタール麻酔下で脳定位固定装置に固定し、右線条体 (Bregmaから前方1 mm, 右側方 3 mm、深さ 4 mm) に透析用プローブ (BDI-8-03、EICOM) を挿入するための ガイドカニューレを埋め込んだ。透析用プローブは内径 0.22 mm, cut-off 分子量 50,000であり、回収率は実験終了時の測定において 12.5 ± 1.43 % であった。ガイドカニューレ先端から3 mm 突出した状態で挿入した。無麻酔、無拘束の状態でプローブに抗コリンエステラーゼである１０μM エゼリンを含むリンゲル液をマイクロシリンジポンプにより ２ μl／minの流速で流した。 ACh の基底遊離が安定したあと（微小透析開始１５０分後）より２０分毎に透析液を回収し、透析液中の ACh を測定した。薬物投与は直接リンゲル液に加えて１２０分間作用させた。回収した透析液中のAChは分離カラムで分離し、次に固定化酵素カラムで過酸化水素を生成し白金電極上で酸化し測定した。また 6-OHDA 処置後1、２、３週目のラットにおいて 6-OHDA 処置側と非処置側の線条体における DA 含量を HPLC-ECD 法により測定し 6-OHDA 処置側の DA 含量を非処置側の含量に対する%であらわした。なお、ACh 遊離は、各分画中の１分間あたりの ACh の量をプローブの回収率で除した値をプローブの回収率を考慮した量としてあらわし、ならびに薬物の効果は最初の４分画の基底遊離の平均を１００%とし基底遊離量に対する%であらわした。

（結果）

1. PDモデルラットにおいて6-OHDA処置後、１週目においてすでに線条体におけるDA含量は処置側では、非処置側

の含量の1 %以下であり、その後6-OHDA処置後4週目までの測定においても1 %以下であった。

2. プローブの回収率を考慮した基底 ACh 遊離量は疑似手術をうけたラットにおいては4.8 ± 0.3 pmol / min でありPDモデルラットにおいては6-OHDA処置後1、2、3週目においてはそれぞれ 7.0 ± 0.9 pmol / min, 6.4 ± 0.6 pmol / min, 6.1 ± 0.6 pmol / min でありすでに1週目より疑似手術をうけたラットと比較して有意に上昇していた。

3. 0.1, 1, 10 μM quinpirole は6-OHDA処置後2週目のPDモデルラットにおいて線条体の ACh 遊離を用量依存性に抑制し、それぞれ基底遊離量の 5.4 %, 34.6 %, 35.6 % 抑制した。

4. 1μM quinpirole は線条体 ACh 遊に対し疑似手術をうけたラットにおいて基底遊離量の11.0 % 抑制したが6-OHDA処置後1、2、3週目のラットにおいてそれぞれ 21.2 %, 34.6 %, 32.1 % 抑制した（図2、図3 A）。

5. D_2 アンタゴニストである1μM sulpiride は単独では ACh 遊離を6-OHDA処置後2週目のPDモデルラットにおいて ACh 遊離を基底遊離の 8 % 増加させた。また1 μM sulpiride は 1 μM quinpirole の抑制作用を完全に拮抗した。

6. 0.01, 0.1, 1 μM SKF 38393 は6-OHDA処置後2週目のPDモデルラットにおいて線条体 ACh 遊離を用量依存性に増加させそれぞれ ACh 基底遊離に対して, 20.8 %, 42.2 %, 54.0 % 増加させた。

7. 1 μM SKF 38393 は線条体 ACh 遊離を疑似手術をうけたラットにおいて基底遊離の 19 %, 6-OHDA 処置後2週目のPDモデルラットにおいては 54 % 増加させた（図3 B）。

（考察）

過去の報告によると線条体においてコリン作動性ニューロンにおいてはD_2受容体が多くあり[7]ACh放出に対し抑制的に働くことが示されている[2]。今回の結果から、D2アゴニストである quinpirole は疑似手術をうけたラットおよびPDモデルラットの線条体のACh遊離に対し抑制的に作用したがPDモデルラットにおいて顕著にあらわれた。また、6-OHDA処置後1週目のPDモデルラットの線条体においてすでにDA含量は最大に減少しており、また、線条体ACh 遊離量の上昇が DA 減少による脱抑制による可能性を示唆したが, 1、2、3週目においてはquinpiroleの抑制作用は2週目において最大にみられた。このことはPDモデルラットにおいて線条体 ACh 遊離において経時的なD_2受容体のアップレギュレーションを示唆した。一方、D_1アゴニストである SKF 38393 は疑似手術をうけたラットおよび同じ6-OHDA処置後2週目PDモデルラットにおいて線条体のACh遊離を増加させたがPDモデルラットにおいて顕著にあらわれた。薬物投与は 直接透析液を介してであり線条体におけるコリン作働性神経に作用したと考えられる。

以上の結果からPDモデルラットにおいて線条体D_2, D_1 受容体におけるアップレギュレーションが存在すると思われる。

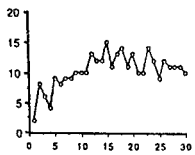


図1 アポモルヒネによる回転運動の発現 横軸は時間（分）、縦軸は毎分の回転数

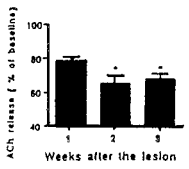


図2 1 μM quinpiroleの6-OHDA処置後1、2、3週目の線条体アセチルコリン遊離への影響

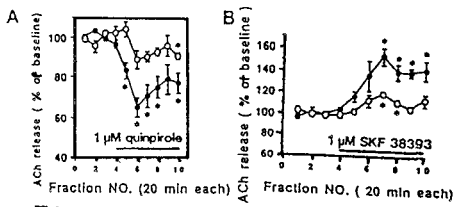


図3 1 μM quinpirole(A)、1 μM SKF38393(B)の線条体アセチルコリン遊離に対する影響
白丸は疑似手術をうけたラット

（参考文献）

1) Ajima A. et al. (1990) Brain Res 518, 193-198.

2) Bertorelli R. et al. (1990) J.Neurochem. 54, 2145-2148.

3) Close S. P. et al. (1990) Psychopharmacolgy 102, 295-300.

4) John w. k. (1993) Neurochem.Res. 18, 101-104.

5) Moine C. L. et al. (1990) Neurosci Lett. 117, 248-252.

6)Robertson G. S. et al. (1992) Eur. J. Pharmocol. 219, 323-325.

7)Stoof J. C. et al.(1992) Neuroscience 47, 755-770.

130 メタンフェタミン慢性投与後におけるマウス線条体３ＭＴ代謝の変化とセロトニン神経系の関与

盛政忠臣、金行孝雄、上村尚人、庄盛敏廉

（岡山大学・医・神経内科）

〔要約〕

マウスにメタンフェタミン（4mg/kg）を１０日間繰り返し投与して、断薬１週間後にメタンフェタミン（2mg/kg）を再投与した。その結果、線条体において、３ＭＴ（3-methoxytyramine）濃度の増加が示された。さらに、セロトニン受容体（5HT1Aと 5HT3）に対する選択的薬剤を併用投与した。その結果、5HT1A のアゴニストとアンタゴニストは、共に、３ＭＴ濃度の増加を、さらに増強させた。5HT3のアゴニストとアンタゴニストは、共に、３ＭＴ濃度の増加を抑制した。本研究は、メタンフェタミン逆耐性の神経可塑性機序について検討を行ったものである。その結果（３ＭＴ濃度の変化）から、ドパミン神経系の関与があらためて明らかにされた。さらに、この機序には、セロトニン神経系が関与している（5HT1A 受容体機構は逆耐性を増強し、5HT3受容体機構は逆耐性を抑制する）ことが示された。これらのアゴニストとアンタゴニストが、各々、同様な結果を示したことは、今後の課題として残される。

【緒論】メタンフェタミン（覚醒剤）乱用後に、慢性・再発性の精神症状を発現（逆耐性）することが知られている。このような病態が、精神分裂病の病態モデルとしての研究対象であった歴史は長い。臨床薬理学的な知見と、逆耐性の病態モデル研究から、ドパミン神経機構の可塑的な病的機序が示唆（ドパミン仮説）されてきた。しかし、その機序は、いまだに明確でないままである。本研究は、このような病的機序に対して、３ＭＴ代謝を指標としたドパミン神経系と、神経モジュレーターとされるセロトニン神経系の関与について検討を加えた。

【実験方法】実験動物に C57BL系雄性成熟マウスを用いた。１０週齢に開始して、メタンフェタミン（4mg/kg, sc）を１０日間連日投与した。１週間の断薬後に、メタンフェタミン（2mg/kg, sc）と、セロトニン受容体選択的薬剤である、5HT1A 受容体のアゴニスト(Bus;buspirone,10または2mg/kg)とアンタゴニスト(NAN;NAN190,3または1mg/kg)および、5HT3受容体のアゴニスト(2ME;2-Me-5HT,10または2mg/kg)とアンタゴニスト(MDL;MDL72222,5または1mg/kg）を併用投与（sc）した。それらの薬剤投与３５分後に、頭部をマイクロウエーブ処理した後、全脳を急速冷凍し後日、冷凍状態のまま微小脳部位（嗅球、前頭葉皮質、前帯状回、側頭葉皮質、後頭葉内側こう状回、海馬背側部、背外側線条体）を得た。これらの脳部位をホモジナイズして得られた上清を用いて、ＨＰＬＣ－ＥＣＤによりモノアミン伝達物質とその代謝産物濃度を測定した。

統計学的な比較は、分散分析（Fischer PLSD）によった。

【結果】 メタンフェタミン慢性投与により、線条体において、３ＭＴ（3-methoxytyramine）濃度の有意な増加が示された。さらに、セロトニン受容体（5HT1Aと 5HT3）に対する選択的薬剤を併用投与した。その結果、5HT1Aのアゴニストとアンタゴニストは、共に、３ＭＴ濃度の増加を、さらに増強させた。5HT3のアゴニストとアンタゴ

ニストは、共に、３ＭＴ濃度の増加を抑制した（表１．）。

表１．線条体内３ＭＴ濃度（pmol/mg protein（mean±sem））

a	b	3MT conc.
M	M' MDL 5mg/kg	1.8 ± 0.2 *
M	M' MDL 1mg/kg	2.1 ± 0.6 *
M	M' 2ME10mg/kg	1.8 ± 0.2 *
M	M' 2ME 2mg/kg	5.6 ± 1.4 *
M	M' NAN 3mg/kg	20.1 ± 5.0 * *
M	M' NAN 1mg/kg	9.4 ± 2.0
M	M' BUS10mg/kg	29.2 ± 1.8 * *
M	M' BUS 2mg/kg	32.1 ± 4.9 * *
M	M' v	14.7 ± 7.0 *
v	M' v	5.8 ± 0.3
v	v v	5.1 ± 0.3

a; M は、メタンフェタミンの１０日間連続投与（mg/kg）
　v は、vehicle（生食水）投与
b; M'は、断薬１週間目のメタンフェタミン投与(2mg/kg)
　v は、生食水投与
　セロトニン受容体選択的薬剤は、M' と併用投与

＊は、１０日間 v 投与後の、M'群に対する有意な変化；
＊＊は、１０日間メタンフェタミン(4mg/kg) 投与(M)した後、断薬１週間後にメタンフェタミン(2mg/kg)再投与(M')した群に対する有意な変化；
$p < 0.05$ (ANOVA)

【考察】

本研究は、ドパミン神経活動の結果の指標として、代謝産物である３ＭＴ濃度の変化に注目した。３ＭＴ濃度は、線条体におけるドパミン神経活動の指標とされて[1]いる。アンフェタミン類薬剤の急性投与によって、３ＭＴ濃度の増加[2,3]が知られている。また、急性投与実験によって、ドパミン受容体遮断剤[4]や、セロトニン受容体選択的薬剤の関与も報告[5]されている。しかしながら、メタンフェタミン慢性投与に関する報告はほとんど見ない。本研究の結果（３ＭＴ濃度の変化）から、ドパミン神経系の関与があらためて明らかにされた。さらに、この機序には、セロトニン神経系が関与している（5HT1A 受容体機構は逆耐性を増強し、5HT3受容体機構は逆耐性を抑制する）ことが示された。

【文献】 1) Brown,EB et al.(1991) J. Neurochem. 57(2),701-707
2) Elverfors,A. et al (1992) Neuropharmacol. 31(7),661-670
3) HEAL,DJ et al (1992) Psychopharmacol. 107, 303-309
4) Karoum F et al (1992) Br.J.Pharmacol. 105, 703-707
5) Nissbrandt H, et al (1992) N-S's A.Pharmacol. 346, 12-19

131　新しい抗精神病薬ＯＰＣ１４５９７のドーパミン遊離に対する影響

仙波純一・*渡辺明子・鬼頭昭三・*融道男
（放送大学　教養学部、*東京医科歯科大学　神経精神医学教室）

〔要約〕

新しい抗精神病薬として開発中のOPC-14597のラット脳内ドーパミン系に及ぼす影響を in vivo microdialysis 法を用いて検討した。OPCの腹腔内投与により、線条体と前頭葉皮質のドーパミンは 10, 40 mg/kg で 20－30% 減少した。DOPAC, HVAは低用量(2.5, 20 mg/kg)で増加、高用量(40 mg/kg)では対照のレベルまで減少と、二相性の変化を示した。このことから、OPC はドーパミンの自己受容体に強く働いて、ドーパミンの合成や遊離を抑制していると考えられた。行動実験や受容体結合実験では OPC は後シナプスＤ2受容体を遮断することが知られているので、OPC は前シナプスのドーパミン自己受容体には agonist として、また後シナプスのドーパミン受容体に対しては antagonist として働くことが推測された。

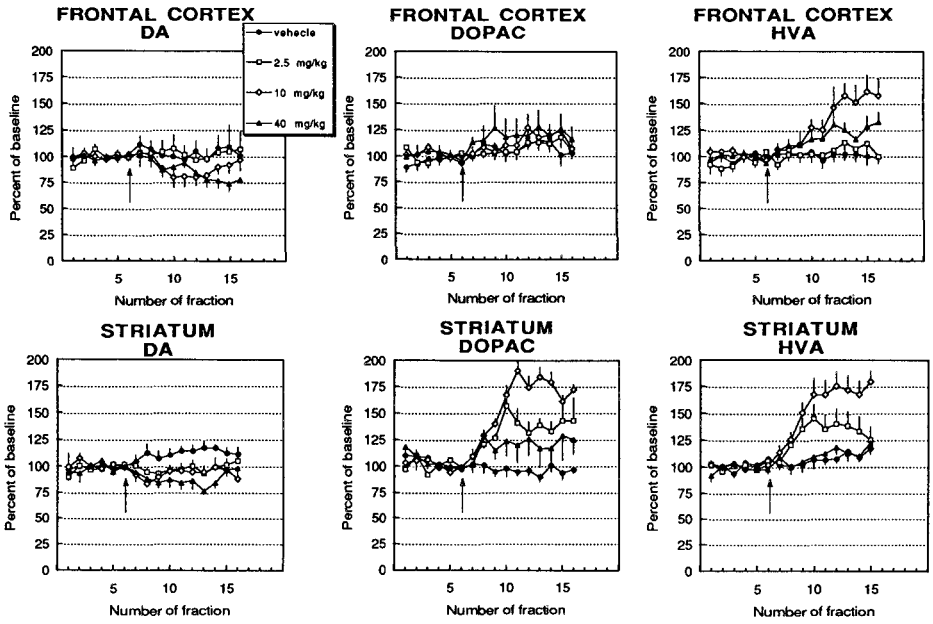
【はじめに】

OPC-14597 (OPC) は、現在臨床治験が進められている新しい抗精神病薬である。OPCは従来の抗精神病薬と異なる特異な薬理作用を持っている。すなわち、OPC は in vivo でチロジン水酸化酵素活性を抑制する一方で、^{3}H-spiroperidolを用いた受容体結合法ではＤ2受容体に対する高い親和性を持っている。また行動学的にみると、カタレプシー惹起作用は弱いが、アポモルフィンによる常同行動を抑制する。さらにヒトではプロラクチン上昇作用がみられない。このように OPC はドーパミンニューロンに対して前シナプスでは作動薬として、一方後シナプスに対しては拮抗薬として働くと考えられている。

脳内透析法は、脳の細胞外液中の物質の経時的な変化を知るための有力な方法であり、近年その応用が広がっている(1)。今回我々は OPC をラットの腹腔内に投与し、線条体と前頭葉でのドーパミンとその代謝物を脳内透析法を用いて経時的に測定し、OPCの特徴的な薬理作用を検討したのでここに報告する。

【方法】

動物はＳＤ系の雄ラット（体重250-300g）を用いた。透析プローブは直管型のもので、Hutson らの方法(2)にならって作製した。薬物投与の前日に麻酔下にラット線条体あるいは前頭葉にプローブを植え込んだ。植え込み手術の翌日に、OPC 投与の 3 時間前から灌流を開始し、薬物投与後 3 時間まで無麻酔無拘束の状態で 20 分ごとに灌流液を採取した。プローブの透析膜の長さはどちらも4 mmで、in vitro の回収率は室温で、ドーパミン(DA) 23.5%、DOPAC 20.9 %、HVA 15.9%であった。灌流液中のDAとその代謝物である DOPAC, HVA は高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器で測定した。それぞれの物質の経時的な変化は、薬物投与前３フラクションの平均を100%として示した。遊離量の変化は既報の方法(3)でAUCを求め、ANOVAにより溶媒投与を対照として統計処理した。



【結果】

OPC の投与量を 0.5, 2.5, 10, 40 mg/kg, i.p. で展開した。線条体の DA のAUCは 10 mg/kg以上で対照群と比べて約 20-30% の減少を示した。一方OPACとHVA は10 mg/kgまで増加し、40 mg/kgでは逆に対照群のレベルまで減少していた。前頭葉も線条体とほぼ同様の傾向を示したが、投与量による変化は線条体よりも小さかった。

【考察】

予備的な実験で、OPC はアポモルフィンによるラットの常同行動を 0.5 mg/kg 以上で抑制していることから、本実験の投与量では後シナプスのD2受容体は十分に遮断されていると思われる。しかし、OPCはハロペリドールなどと異なり negative feedback によるDAの遊離増加を引き起こさず、むしろ減少させた。これは、前シナプスに存在するドーパミン自己受容体をOPCが刺激することにより、ドーパミンの合成・遊離が強く抑制されたためと考えた。DA代謝物の二相性の変化の解釈はむずかしいが、低用量ほど自己受容体の抑制作用が弱いために negative feedback の作用に拮抗できないためではないかと推測される。以上の in vivo microdialysis の実験から、OPCはドーパミンシナプスにおいて自己受容体に対しては作動薬として、一方後シナプス受容体に対しては拮抗薬として働くと推測される。

現在まで開発されてきた抗精神病薬（ハロペリドールなど）は、後シナプスの遮断作用のみを有している。このような点で、OPCは他の抗精神病薬とは異なるユニークな薬理学的特性を持つことが脳内透析法から確認された。 (OPC-14597は大塚製薬から提供された)

【文献】

(1) Semba et al. (1992) Br. J. Pharmacol 105, 59-62. (2) Hutson et al. J. Neurochem (1985) 44, 1266-1274. (3) 仙波純一 (1992) 脳と精神の医学 3: 247-250.

132 脳虚血急性期における血管作動性物質の経時的変動とその臨床応用

水島秀勝、佐々木　健、荒井好範、嶋津基彦、松本　清、
塩田清二＊、中井康光＊、竹田　稔＊＊
昭和大学脳神経外科、第一解剖＊、第一生化学＊＊

〔要約〕

我々は、実験的脳虚血ラットの脳内における血管作動性物質の経時的変動を免疫組織化学的に観察し、さらに画像解析装置を用いて半定量化し、合わせて血中濃度も測定し、脳虚血のパラメータとして血管作動性物質が有効であることを昨年の本学会で報告した。今回、脳虚血急性期症例を臨床応用し、outcome scale と比較検討した。各作動性物質の経時的血中濃度の変化は、脳虚血ラットとほぼ同様な変化を示した。特に脳虚血急性期の治療開始時期のパラメータとしてＣＧＲＰ、ＳＰが有効と思われた。

〔目的〕

昨年の本学会において、実験的脳虚血ラットにおける血管作動性物質 [tyrosine hydroxylase (TH), neuropeptide Y (NPY), substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP)] の経時的変化を免疫組織化学的に観察した後、画像解析装置にて半定量化し、同時に血中濃度の変化を調べ報告した(1)。その結果、これらの物質がヒトの脳梗塞急性期の診断や予後判定に利用できる可能性が示唆された。今回、急性期脳梗塞症例において、これらの物質の血中濃度を経時的に測定し、入院時の意識レベル（Glasgow outcome scale ：GCS scale ）と退院時の意識レベル（Activity of Daily Living scale：：ADL scale ）とを比較検討し、実験的脳虚血ラットの結果を含め考察を加えた。

〔方法〕

発症後２４時間以内に当院および関連病院に搬送された急性期脳梗塞症例（ｎ＝１５）を対象とした。平均年齢７４才（男１２女３）。受診時のレベルはＧＣＳ scaleで判定し、発症後３，６，１２，２４時間後に経時的に採血し、ただちに血清分離し、－３０℃にて凍結保存し、adrenaline(A), noradrenaline(NA), SP, CGRP, (VIP) の濃度測定はＲＩＡ法にて可能な限り一度に行った。治療方法は、sodium ozagrel（カタクロット^{R}、４ｖ～８ｖ／ｄａｙ、２週間）を２４時間以内に可能な限り早急に点滴治療し、一部の症例では高圧酸素療法（１気圧、１時間、５日間）を併用した。また効果判定はＡＤＬ scaleにて行った。

〔結果〕

各血管作動性物質の脳内の経時的変化を調べると、Ａは１２～２４時間（１２時間）、ＮＡは６時間（１２時間）にreleasing peak time を示し、ＣＧＲＰは６時間（１２時間）にreleasing peak time を示し、以後漸時減少を示した（Ｆｉｇ．１）。一方、ＳＰは３時間（６時間）にreleasing peak time を示し、以後漸時減少傾向を示した（Ｆｉｇ．１）。各物質の血中濃度の増減パターンは、実験的脳虚血ラットとほぼ同様の傾向を示した。また（　）内に示した値は各物質の実験的脳梗塞ラットでのreleasing peak time を示しているが、ほぼ同様の値を示していると考えられる。一方、ＡＤＬ scaleとの関係では、予後良好例ほど各パラメータの変化が実験的脳虚血ラットの結果と類似していた。特にNA, CGRP, SPは典型的な経時的変化を示した。

〔考察〕

近年、脳虚血性疾患の急性期の治療が盛んに行われるようになってきたが、その診断および予後判定は主に

MRI, CT, SPECT, PETなどの装置を用いて行われているのが現状である。一方、実験的脳虚血ラットの虚血時における血管作動性物質の変動の形態学的(1, 3)ならびに生理学的観察(1, 2)が報告されている。その結果、脳虚血後のアミン性物質とペプチド性物質ではそれぞれ特有な経時的変化が見られ、特にカテコールアミン類の血中濃度の変化は虚血12時間でピークに達するのに対し、ペプチド性物質の変化は一様でないことが分かった(1, 3)。今回の結果から、SP, CGRP, NAは脳梗塞の診断と予後判定に充分応用可能であることが分った。また我々は、主にラットの扁桃体において形態学的観察を行った(1, 2)が、今回の結果から虚血による血管作動性物質の組織内の変化が扁桃体以外の脳の他の領域でも起きている可能性が示唆された。また脳梗塞と紛らわしい脳出血の症例に関しても同様に検索したが、血管作動性物質の経時的変化は、脳梗塞のそれとはまったく異なっていた。今回、症例数が少なく統計的有意差を検定するに至っていないが、今後さらに症例数を増やし脳虚血急性期における血管作動性物質の経時的変化を調べ、さらに臨床応用できる可能性を追求していきたいと考えている。

[参考文献]

1. 水島秀勝, ほか (1992) 神経化学 31 (1) : 320-321
2. Sasaki K. et al. (1993) Showa Univ. J. Med. Sci. 5 (1) (in press)
3. 板倉 徹, ほか (1988) 薬理と治療 16 (8) : 45-53

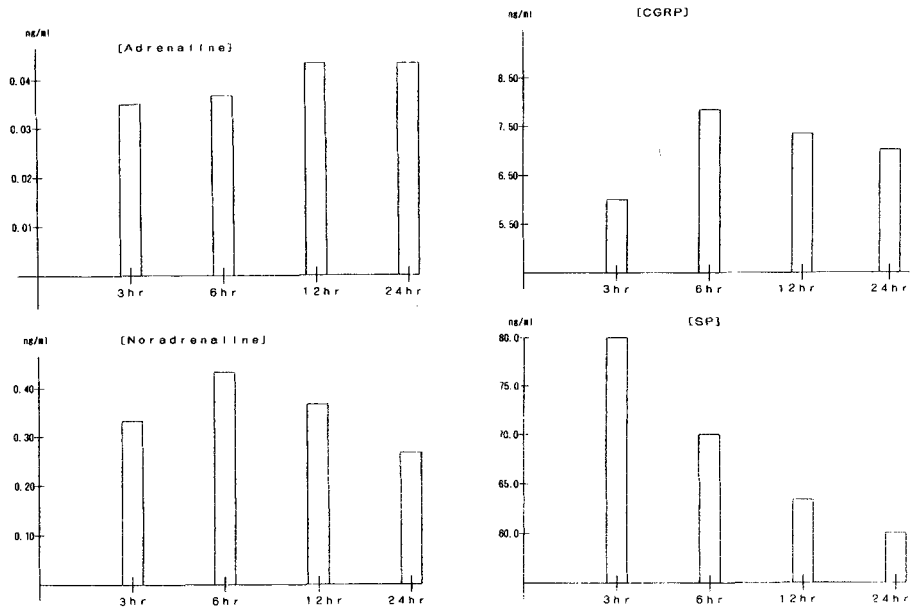


Fig 1. Time course of blood concentration of adrenaline, noradrenaline, CGRP and SP in cerebral infarcted humans.

133 脳虚血による低分子ストレス蛋白（ＨＳＰ２７およびαＢクリスタリン）の誘導と虚血耐性との相関

加藤宏之、劉勇、糸山泰人、小暮久也*、加藤兼房**
（東北大学医学部神経内科、*神経病理研究所、**愛知県コロニー生化学）

〔要約〕

非致死的脳虚血の前処置によるラットの虚血耐性獲得モデルにおける低分子ストレス蛋白、HSP27 およびαB crystallinの誘導をenzyme immunoassay法および免疫組織化学染色を用いて検討した。３分間の前脳虚血（非致死的）の前処置の３日後に、６分間の脳虚血（海馬ＣＡ１神経細胞に対して致死的）を負荷した。このモデルでは虚血前処置によって海馬ＣＡ１神経細胞は障害を免れる。前処置群では３分虚血の３日後に海馬のHSP27含量は2.4倍に増加し、６分間虚血の２時間後にはHSP27含量は低下したが、１、３日後には虚血前値（正常の約２倍）に戻った。非前処置群ではHSP27含量は１、３日後に著明に増加した。免疫染色では、３分間虚血前処置の３日後に海馬全域にHSP27陽性グリア細胞が観察された。虚血前処置、非前処置群とも、６分間虚血１日後には、両群で海馬ＣＡ１神経細胞が強く染色された。３、７日後には、前処置群では虚血前に復したが、非前処置群ではＣＡ１神経細胞脱落に伴う反応性グリアが著明に染色された。αB crystallin含量は両群でいずれの時間経過でも変化しなかった。以上の結果は、脳虚血がHSP27の合成を誘導するが、αB crystallinは誘導しないことを示している。HSP27は虚血耐性の獲得と平行して主にグリア細胞に誘導され、虚血耐性に関与することが示唆されたが、これまで報告されているHSP70とは異なった役割を担っていると考えられた。

【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ことを我々は報告している(1,2)。この、虚血耐性の機構を解明すること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。そこで今回われわれは、虚血耐性発現における、低分子ストレス蛋白、すなわち、27-kDa heat shock protein (HSP27)およびαB crystallinの役割を検討するために以下の実験を行った。

【方法】

雄Wistar ratを用い４血管閉塞法で前脳虚血モデルを以下のように作製した(2)。ラットを２群に分け、ハロセン麻酔下に一群は３分間虚血の前処置を行ない、他群は偽手術のみ行った。その３日後に６分間虚血を負荷し、以下の検索を行った。実験１：虚血前および虚血後２時間、１日、３日後に断頭し、海馬、大脳皮質を摘出してホモジナイズし、遠心後の上清を用いて、既に報告されているEIA法を用いて、HSP27およびαB crystallin含量を測定した(n=3ないし6)(3)。実験２：虚血前および虚血後２時間、１日、３日、７日に脳を灌流固定し、スクロース溶液に浸潤後、凍結切片を作製し、常法通り免疫組織化学的にHSP27を染色した(n=5)。

【結果】

実験１（図１）：３分間虚血前処置の３日後に海馬のHSP27量は正常の2.4倍に増加した。虚血前処置群では、６分間虚血の２時間後にHSP27量は低下したが、１、３日後には虚血前値に戻った。非前処置群では、HSP27量は６分間虚血１日後に2.2倍、３日後に5.9倍に増加した。大脳皮質ではHSP27量の有意な変動は見られなかった。αB crystallin量は、海馬、大脳皮質とも変化しなかった。

実験２（図２）：HSP27は正常脳ではほとんど染色されなかった。３分間虚血前処置の３日後に海馬全体にグリア細胞が散在性に染色された。前処置群、非前処置群とも、６分間虚血２時間後には有意な変化は見られず、１日後には海馬ＣＡ１神経細胞が強く染色され、また、ＣＡ３、ＣＡ４神経細胞や一部のグリア細胞も染色された。３、７日後には、前処置群では虚血前の染色性に戻ったが、非前処置群ではＣＡ１神経細胞脱落とともに反応性グリア細胞が強く染色された。

【考察】

本実験により、脳虚血が低分子ストレス蛋白のHSP27の合成を海馬において誘導することが示されたが、αB crystallinは誘導されなかった。この２種の低分子ストレス蛋白の誘導の解離は、ラットの熱ショック後の反応でも認められている(4)。HSP27の合成誘導はin vitroで温熱耐性の獲得に強く関与していることが報告されている(5)。今回の実験で、虚血耐性を獲得させる非致死的脳虚血処置にてHSP27が誘導される結果が得られ、HSP27が虚血耐性に関与している可能性が示唆された。興味あることに、このHSP27と同様に虚血耐性獲得に関与していると考えられているHSP70の誘導がＣＡ１神経細胞を中心におこる(2,6)のに較べ、HSP27は神経細胞よりも、むしろグリア細胞を中心に誘導されていた。したがって、虚血耐性の機構において、HSP27はHSP70と異なった（あるいは相補的な）役割を果たしていると推定される。

【文献】

(1) Kato H. et al. (1991) Brain Res. 553:238-245. (2) Liu Y. et al. (1992) Brain Res. 586:121-124. (3) Inaguma Y. et al. J. Biochem. in press. (4) 稲熊裕、他 (1992) 神経化学 31:120-121. (5) Landry J. (1989) J. Cell. Biol. 109:7-15. (6) 加藤宏之、他 (1992) 神経化学 31:232-233.

図１　ラット海馬および大脳皮質におけるHSP27とαB crystallin含量(ng/mg protein)の変化

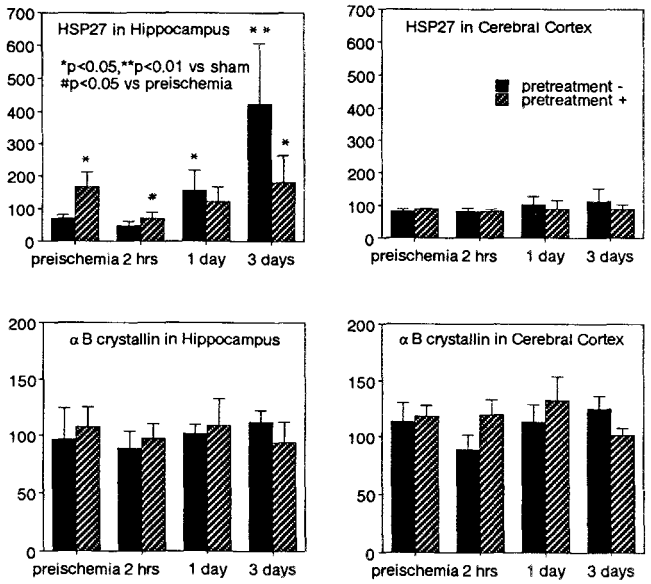
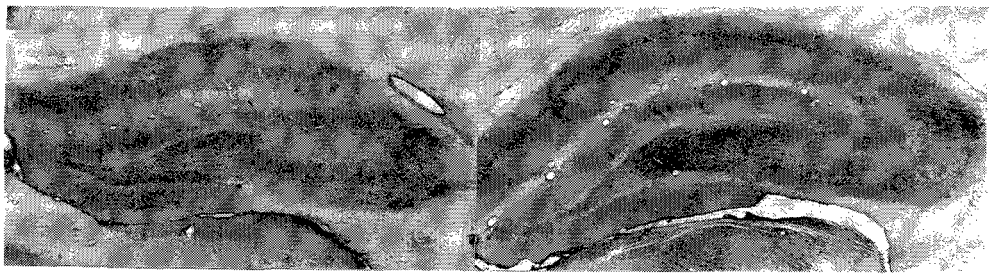


図２　ラット海馬におけるHSP27の免疫染色。左：３分虚血３日後。右：６分虚血１日後（非前処置群）。



134 脳虚血による海馬コリン神経機能低下に対するペントバルビタールの効果：組織学的および機能的評価における相違

石丸裕久，高橋　章，五十嵐康，丸山悠司
（群馬大学・医学部・神経精神薬理　ツムラ）

〔要約〕

脳虚血による砂ネズミ海馬コリン神経機能低下に対するペントバルビタールの効果を観察した．KClおよびアトロピンによるアセチルコリン(ACh) releaseは5分虚血の7日および14日後にcontrol群と比べ有意に低下した．虚血30分前に投与したペントバルビタールは虚血による海馬CA1錐体細胞壊死に対しては著明な保護効果を示したが，これらのACh releaseの低下に対しては改善効果を示さなかった．今回の結果は組織学的および機能的評価におけるペントバルビタールの改善効果の相違を示しており，今後これらの分野における機能的評価の重要性が示された．

〔緒言〕

ペントバルビタールは虚血による海馬CA1領域の遅発性神経細胞壊死に対して強い保護効果をもつ薬物であることはよく知られている(1)．最近，われわれは海馬コリン神経機能が虚血により経時的に低下してくることをマイクロダイアリシス法を用いて明らかにしたので(2)，今回，ペントバルビタールが虚血によるコリン神経機能の低下に対しても改善効果を示すか否かを検討した．

〔方法〕

実験には体重50-70 gの砂ネズミを使用した．

虚血　ハロタン麻酔下で両側総頸動脈を露出し，5分間の一過性虚血を施した．ペントバルビタール(50 mg/kg)および生理食塩液(vehicle)は虚血の30分前に腹腔内投与した．

マイクロダイアリシス　虚血2日前に，定位的脳固定装置にてbregmaより後方2.6 mm，側方2.0 mm，脳表より2.5 mmの海馬内にプローブの先端が挿入されるようにガイドカニューレを装着した．虚血7日および14日後にプローブを挿入し，HPLC-ECDにてアセチルコリン(ACh)を測定し，エゼリン(100 μM)灌流時およびKCl(100 mM)，アトロピン(3 μM)添加時のAChの濃度(nM)を算出した．

組織学的評価　虚血7日および14日後に凍結切片を作製し，ヘマトキシリンで染色後，画像解析装置にて海馬CA1錐体細胞の面積を計測した．

〔結果〕

表に示すとおり，KClによるACh releaseは虚血7日および14日後にcontrol群の45 % 以下に低下した．ペントバルビタールはこれに対して改善傾向を示したが有意ではなかった．アトロピンによるACh releaseは虚血7日および14日後にcontrol群のそれぞれ58.3および38.5 % に低下した．またbasal releaseも虚血14日後に有意な低下を示した．ペントバルビタールはこれらのACh releaseの低下に対して全く改善効果を示さなかった．一方，海馬CA1錐体細胞面積は虚血7日および14日後にcontrol群の46.3および33.3 % とそれぞれ有意に減少し，細胞壊死が認められた．ペントバルビタール投与群の細胞面積は虚血7日および14日後においてもcontrol群と同程度であり，形態変化は特に認められなかった．

Effects of pentobarbital on the cholinergic dysfunction and CA1 cell damage in the hippocampus

		Time after ischemia			
		7 days		14 days	
	Control	Vehicle	Pentobarbital	Vehicle	Pentobarbital
			(nM)		
Basal release	117.7±7.9	124.6±44.0	136.7±55.4	32.4±8.7**	44.7±4.5**
KCl-induced release	239.3±16.3	104.2±30.0*	159.7±36.4	105.3±19.2**	170.6±25.8
Atropine-induced release	426.7±40.9	248.8±24.1*	218.9±55.8**	164.4±28.8**	159.7±32.8**
			(%)		
Cell area	100±1.5	46.3±11.2**	93.5±12.0††	33.3±13.3**	107.1±9.7††

Data are means ± S.E. from 5-7 animals. *P<0.05, **P<0.01 vs control, ††P<0.01 vs vehicle (the Bonferroni test).

〔考察〕

虚血により海馬コリン神経終末の膜機能およびムスカリン様アセチルコリンレセプター(mACh-R)を介したACh releaseの調節機構に障害が生じることが示唆された．またvehicle群のbasal releaseは虚血7日後ではcontrol群と比較して差はないが14日後では有意に低下していることから，虚血後のコリン神経機能低下は7日後に比べ14日後ではさらに進行するものと思われる．ペントバルビタールは膜機能障害に対しては若干の改善効果をもつと考えられるが，mACh-Rを介した調節機構の障害に対しては全く改善効果がないものと思われる．一方，海馬CA1錐体細胞壊死に対しては従来の報告(1)と同様に，著明な保護効果を示した．このような機能的評価と組織学的評価におけるペントバルビタールの効果の相違がなぜ起こるのかは現段階では不明であるが，虚血後の細胞壊死のメカニズムに興奮性アミノ酸が関与していることから(3)，虚血によるコリン神経機能低下のメカニズムには何か別の因子も関与している可能性が考えられる．今回の結果から，虚血後の機能面での評価は脳血管性痴呆症の病因解明および抗痴呆薬の研究などにおいて非常に重要であると考えられる．

〔文献〕

1 Hallmayer, J., Hossmann, K. A. and Mies, G. (1985) Acta Neuropathol., 68, 27-31

2 Ishimaru, H., Takahashi, A., Ikarashi, Y. and Maruyama, Y. (1993) Jpn. J. Pharmacol., 61 Suppl., 113p

3 Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N. H. (1984) J. Neurochem., 43, 1369-1374

135 —過性前脳虚血時におけるLeukotriene C4の動態と神経細胞障害との関係

松本 昌泰[1]、大槻 俊輔[1]、鎌田 武信[1]、林 陽子[2]、山本 尚三[2]

（大阪大学医学部第一内科[1]、徳島大学医学部生化学[2]）

〔要約〕

砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて、虚血後の脳部位別のLeukotriene C_4(LTC)値を測定した。虚血再灌流後早期に脳各部位で普遍的にLTC上昇が観察されたが、神経細胞にとって非致死的な虚血よりも、致死的な虚血負荷後LTC増加が著明であった。更に短時間の虚血に対して比較的抵抗性のある大脳皮質,視床,線条体よりも、最も脆弱である海馬において、LTC増加が著明であった。虚血後のLTC増加の多寡が遅発性神経細胞壊死および選択的脆弱性の病態生理に関与する可能性を示唆させた。

【目的】種々の刺激に応じて細胞膜から切り出される種々のアラキドン酸代謝産物のうち、ロイコトリエンは血管収縮、透過性亢進、白血球遊走などの強力な生理活性を持ち、また情報伝達物質として生体内において重要な役割を果たしている(3,4)。今回、砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて、虚血後の脳部位別のLeukotriene C_4(LTC)値を測定し、5分間の脳虚血後の海馬に選択的な遅発性神経細胞壊死(5,6,7)や delayed blood-brainbarrier opening(8)の病態生理に関わるか否か検討した。

【方法】成熟砂ネズミを対象とした。軽エーテル麻酔下に両側総頸動脈を剥離し、麻酔覚醒後クリップで閉塞させることにより虚血を作成した。虚血中の体温は37℃に維持した。偽手術は両側総頸動脈を剥離のみ施行した(6,7)。**(A)** 偽手術または5分虚血後、0,15,60分,6時間, 1,2,4,7日にmicrowave照射(5kw, 1.25sec)で屠殺し(9)、海馬を摘出した。**(B)** 5分虚血後15分に、海馬,線条体,視床,大脳皮質を分別し摘出した(2)。**(C)** 偽手術、2, 5分虚血後15分に海馬を摘出した。**(D)** 2分虚血を2回1日間隔で予め負荷し2日後に5分虚血を加え、再灌流15分に海馬を摘出した(6)。この条件では虚血耐性現象が発現し本来致死的である5分虚血後でも海馬の神経細胞は壊死を免れる(虚血耐性現象;ischemic tolerance phenomenon)(6,7)。**(E)** 以上の検体(各群各時点N=4～5)は既報のごとく抗LTC抗体を用いたRadioimmunoassay(RIA)にて測定した(1)。

【結果】**(A)** 偽手術後LTC値は変化を示さなかった。5分虚血直後は変化なく、再灌流15分にpeak値(9.2pg/mg)を示し、再灌流1日以降ｺﾝﾄﾛｰﾙ値(1.0)に復した。虚血後2日目の再上昇は認めなかった。偽手術だけではこの上昇は認めなかった（図１）。**(B)** 5分虚血再灌流15分値は、線条体3.6, 視床3.7, 大脳皮質2.0pg/mgとすべて上昇したが,海馬(9.2)に比し低値を示した（図２）。**(C)** 2分,5分虚血後LTC値は各々4.8, 9.2pg/mgで偽手術時(1.0)に比し高値を示した（図３）。**(D)** 虚血耐性群ではLTCは3.6と、単独5分虚血群(9.2)よりもLTC上昇が軽減化した（図４）。

【考察】虚血再灌流後早期に脳各部位で普遍的にLTC上昇が観察されたが、非致死的な2分虚血および虚血耐性獲得後の5分虚血よりも、神経細胞にとって致死的な5分虚血負荷後LTC増加が著明であった。更に虚血に対して比較的抵抗性のある皮質,視床,線条体よりも、最も脆弱である海馬においてLTC増加が著明であった。以上、

虚血後のLTC増加が遅発性神経細胞壊死および選択的脆弱性の病態生理に関与する可能性を示唆するものである。一方、虚血の遅発性の血管透過性亢進 (delayed blood-brain barrier opening)にはLTCが直接関与していないことが判明、本現象には他因子の関与が示唆された。

【文献】

(1) Ban M et al. Stroke 20;1989:248-252

(2) Glowinski J. et al. J Neurochem 13;1966: 655-669

(3) Samuelsson B. Science 220;1983:568-575

(4) Shimizu et al. J Neurochem 55;1990:1-15

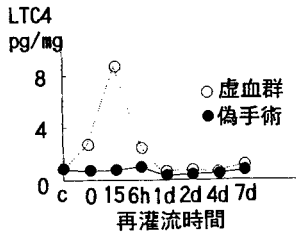
(5) Kirino T. Brain Res 239;1982:57-69

(6) Kitagawa K. et al. Brain Res 528;1990:21-24

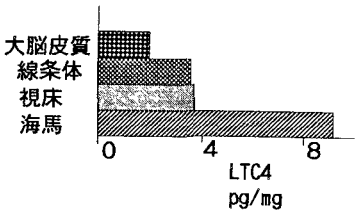
(7) Kitagawa K. et al. Brain Res 561;1991: 203-211

(8) Kitagawa K. et al. Acta Neuropathol 84;1992: 378-386

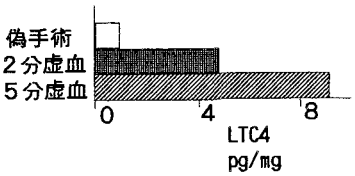
(9) Matsumoto M. et al. J Neurochem 42;1984:647



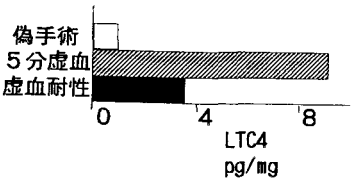
【図１】5分虚血後海馬Leukotriene C_4量の経時的変化



【図２】5分虚血再灌流15分後の部位別 Leukotriene C_4量



【図３】海馬Leukotriene C_4量に対する虚血時間の影響



【図４】虚血耐性獲得時の虚血後海馬Leukotriene C_4に対するの影響

136 慢性脳血流低下モデル動物の行動・脳内モノアミン代謝からみた脳代謝賦活薬の効果

車谷隆宏、武田雅俊、工藤　喬、谷向　知、新川久義、服部英幸、播口之朗、西村　健

（大阪大学・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障害されていた。次にこのモデル動物の各脳内モノアミン定量の結果、ドパミンが前部大脳皮質、後部大脳皮質で約５０％の低下を示し、一方その代謝産物には有意な変動は見られなかった。また、ノルエピネフリンが後部大脳皮質で約１２０％の有意な増加を示した。セロトニンおよびその代謝物は有意な変動を示さなかった。

学習能と脳内モノアミン代謝との関係を検討する目的で、３種の脳代謝賦活薬、アセチルコリンエステレース阻害薬ＳＤＺ－ＥＮＡ－７１３、セロトニン再取り込み阻害薬ＺＤ－２１１、ドパミン系賦活作用が知られるＴＲＨ－ＳＲの投与による影響を検討した。いずれの薬剤も障害された本モデル動物の学習能を改善した。また、ＺＤ－２１１の投与により皮質におけるセロトニンとドパミンが増加傾向を示し、ＴＲＨ－ＳＲの投与により皮質におけるドパミンが増加傾向を示した。

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。我々はこの問題の解明を目的として、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検討を加えてきた。水素クリアランス法により、このモデル動物の大脳皮質における局所脳血流量は正常対照群と比較して約７５％に低下していた[1]。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[3]。

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、学習能と脳内モノアミン代謝の変化、およびこれに対する脳代謝賦活薬の影響について検討した。

実験方法）

外科処置

ペントバルビタール麻酔下に成熟モンゴル砂ネズミ（雌、６０－８０ｇ）の左側総頸動脈を露出し、コイル状クリップ（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に加工）を装着した。１週間後に右側総頸動脈に同様の処置を施し、８週間飼育したものを慢性脳血流低下モデル動物とした。

学習能計測

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を動物に課し、その学習能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日目に獲得試験、次に１日を空け第４日目に電撃ショックを解除して保持試験として、合計３セッションを行なった。

モノアミン定量

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、前部大脳皮質、後部大脳皮質、海馬、視床の各部を速やかに切り出し、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、８０００xg、２５分の遠心により分離して得た上清をＨＰＬＣの試料とした。モノアミン分析用カラムＭＡ－５０ＤＳを用い各試料中の、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）を定量した。

薬剤投与

ＳＤＺ－ＥＮＡ－７１３は０．１ｍｇ／ｋｇの投与量で６日間連続投与し、投与期間中の３、４、６日目に学習能の計測を行った。ＺＤ－２１１は０．３ｍｇ／ｋｇの投与量で単回投与し、その３０分後に学習能の計測を行った。ＴＲＨ－ＳＲは３ｍｇ／ｋｇの投与量で単回投与し、その１週間後に学習能の計測を行った。

結果）

１．学習実験

非電撃ショック領域滞留時間の割合（％ＮＳＴ）を学習能の指標として検討したところ、慢性脳血流量低下モデル動物では、正常対照と比較して、非電撃ショック領域滞留時間の増加が悪く、更に第２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

慢性脳血流低下モデル動物では、前部大脳皮質と後部大脳皮質におけるＤＡ量は正常対照の約５０％に有意に低下し、一方その代謝物であるＤＯＰＡＣ、ＨＶＡについては有意な変化を示さなかった。後部大脳皮質におけるＮＥは正常対照の約１２０％に有意に増加していた。５ＨＴおよびその代謝物である５ＨＩＡＡは有意な変化を示さなかった。

３．脳代謝賦活薬の影響

このモデル動物における学習能と脳内モノアミン代謝との関係を検討する目的で、３種の脳代謝賦活薬、アセチルコリンエステレース阻害薬ＳＤＺ－ＥＮＡ－７１３、セロトニン再取り込み阻害薬ＺＤ－２１１、ドパミン系賦活作用が知られるＴＲＨ－ＳＲの投与を行った。

図１は正常対照、薬剤投与、生食投与各群についての獲得試験と保持試験の結果である。左からＳＤＺ－ＥＮＡ－７１３、ＺＤ－２１１、ＴＲＨ－ＳＲについての結果で、ＺＤ－２１１については１セッションのみの試行のため保持試験の結果はない。各薬剤投与によりこのモデル動物の障害された％ＮＳＴの増加傾向が認められた。

図２は前部大脳皮質におけるモノアミン代謝に対する、ＺＤ－２１１およびＴＲＨ－ＳＲの影響を示す。ＺＤ－２１１投与により、ドパミンとセロトニンの増加傾向が認められた。後部大脳皮質、海馬、視床においても同様の効果が認められた。一方ＴＲＨ－ＳＲ投与によりドパミンの増加傾向とその代謝物ＤＯＰＡＣの有意な増加が認められた。

考察）

慢性脳血流低下状態の病態を検討する目的で作成された本モデルでは、受動的回避反応における学習能が障害され、またＨＰＬＣによる脳内モノアミン代謝の検討により、大脳皮質におけるドパミンの有意な低下が認められた。

今回の実験では、学習能と脳内モノアミンとの関係について更に検討する目的で、開発中の脳代謝賦活薬であるアセチルコリンエステレース阻害薬ＳＤＺ－ＥＮＡ－７１３、セロトニン再取り込み阻害薬ＺＤ－２１１およびドパミン系賦活作用が知られるＴＲＨ－ＳＲをこのモデル動物に投与し、その学習能及び脳内モノアミン代謝の変化について検討した。その結果、受動的回避反応学習についてはいずれの脳代謝賦活薬の投与によっても学習能の改善傾向が認められた。また、ＨＰＬＣによるモノアミン定量では、ＺＤ－２１１投与によりその標的物質であるセロトニンおよびドパミンの増加傾向が、またＴＲＨ－ＳＲ投与により賦活作用の期待されるドパミンの増加傾向を認めた。

以上のことより、本モデル動物は痴呆薬の開発・研究においても有用であるものと考えられる。

文献）

1) T. KUDO et al., Stroke 1990;21:1205-9
2) T. KUDO et al., Stroke 1993;24:259-65
3) H. HATTORI et al., Acta Neuropathol Berl 1992;84(4):432-42

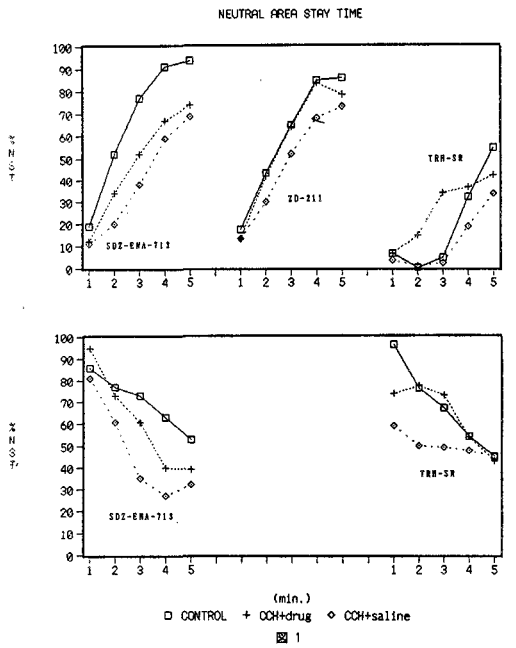


図１

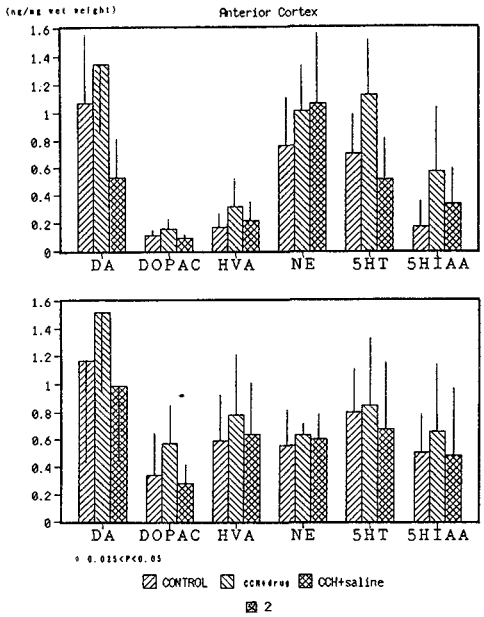


図２

図１：脳代謝賦活薬の慢性脳血流低下モデル動物の学習能に対する影響。上：獲得試験、下：保持試験。
図２：ＺＤ－２１１、ＴＲＨ－ＳＲ投与による脳内モノアミン代謝の変動。上：ＺＤ－２１１、下：ＴＲＨ－ＳＲ。

137 カイニン酸による培養アストロサイトのタウリン遊離作用

田中康一，小山　豊，馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕

培養ラットアストロサイトにおいてL-グルタミン酸（L-Glu）、及び、カイニン酸（KA）は、[^{3}H]タウリン（Tau）の遊離を増加させた。ED_{50}値はそれぞれ23μMと224μMであった。L-Gluによる遊離は、ゆっくりとした時間経過を示し、Na^+非存在下ではその作用が見られなかった。グルタミン酸輸送阻害薬のDL-*threo*-β-hydroxy-aspartate（TBHA）でもL-Gluと同様の作用が見られた。KAによる遊離は早い時間経過を示し、Na^+非存在下ではL-Gluの場合と同様の時間経過を示した。また、グルタミン酸受容体アンタゴニストのキヌレイン酸（KYN）はL-Gluの作用を抑制しなかったが、KAの作用は完全に抑制した。一方、L-Glu、TBHAはアストロサイトの膨化を引き起こしたが、KAにはその作用は見られなかった。以上の結果から、L-GluによるTauの遊離は、グルタミン酸輸送系を介した膨化によること、また、KAによる作用はKA受容体を介した脱分極効果以外に、Na^+非存在下でも作用を示すことからGluとは異なった作用機構をもつものと考えられる。

〔目的〕

グルタミン酸は中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質であり、記憶、学習などの脳の高次機能や中枢神経疾患、脳虚血による神経細胞死などへの関与が示唆されている。グリア細胞の一つのアストロサイトは、細胞外液イオン濃度の調節、神経伝達物質の除去などにより神経細胞の活動を支えているが、近年、グルタミン酸受容体がアストロサイトにも存在することが示唆され、グルタミン酸情報伝達系にアストロサイトも関与していることが考えられる。一方、てんかん発作や一過性虚血時において、含硫アミノ酸のタウリンが脳内で細胞外に多量に遊離されてくることが知られているが（6,2）、その機構については未だ明確な結論には至っていない。培養アストロサイトを用いた系では、低張刺激による細胞の膨化（3）やβアゴニストなどの神経伝達物質による受容体刺激（7）によって、タウリンが遊離してくることが報告されてきた。我々はL-GluによるアストロサイトのBV化機構とそれに伴うTauの遊離について検討した（4,5）。その過程においてKAが膨化を引き起こさずにTauの遊離を誘発することを見い出した。そこで今回、このKAによるTauの遊離機構をGluの作用と比較検討した。

〔方法〕

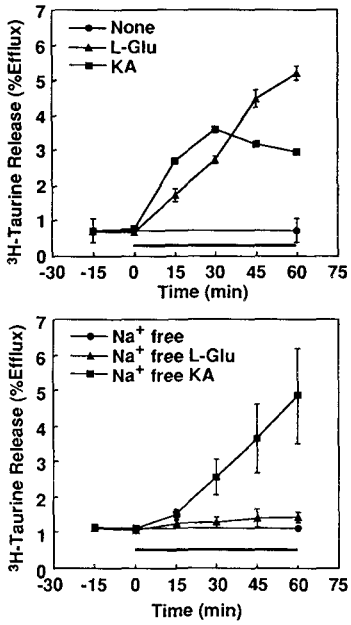
培養ラットアストロサイトは、生後1-2日齢のS.D.系ラット大脳皮質よりFrangakisとKimelberg(1)の方法に従って調製し、10%の牛胎児血清を含むイーグルMEM中で10-20日間培養後、二次培養を7-14日間行いコンフルエントになった細胞を実験に用いた。本培養条件で得られた細胞は90%以上がGFAP陽性であった。Tauの遊離は[^{3}H]Tauを取り込ませ、HEPES-緩衝液（HEPES-buffered medium, HBM）で洗浄後、メディウムを交換することによって遊離量を測定し、全取り込み量に対する遊離量を%Effluxとして表した。Na^+非存在下での実験では塩化ナトリウムを塩化コリンに置換することによって行った。

〔結果〕

ラット培養アストロサイトにおいて、L-Glu及びKAは、用量依存的に[^{3}H]Tauの遊離を増加させた。しかし、その経時変化は異なり、L-Gluでは比較的ゆっくりとした増加、KAでは早い増加を示した。Na^+非存在下では、L-Gluによる作用は見られず、KAによる作用はNa^+存在下とは異なりゆっくりとした増加を示した（図1）。また、KAによる作用は

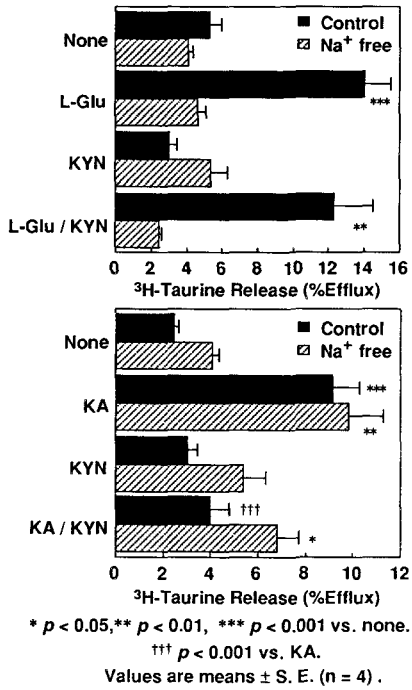
Na^+存在下、非存在下ともにED_{50}値は約224μMであった。L-Gluと同様の作用がグルタミン酸輸送阻害薬TBHAでも観察された。グルタミン酸受容体アンタゴニストのKYNはL-Gluの作用をほとんど抑制しなかったが、KAの作用に対しては、完全に抑制した。Na^+非存在下ではKYNによりKAの作用は部分的に抑制された（図２）。一方、L-Glu、TBHAはアストロサイトの膨化を引き起こしたが、KAはその作用を示さなかった。

図１．[^{3}H]Tauの遊離の経時変化



Values are means ± S. E. (n = 3).

図２．KYNによる阻害作用



* $p < 0.05$,** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. none.
††† $p < 0.001$ vs. KA.
Values are means ± S. E. (n = 4).

〔考察〕

培養アストロサイトからのL-GluによるTauの遊離は細胞外液のNa^+に依存したグルタミン酸輸送系を介した膨化によるものであり、一方、KAによる遊離はイオンチャンネル型のKA受容体を介した脱分極によるNa^+依存性のもの以外に、Na^+非依存性のものもあることが示唆された。L-Gluの競合的取り込み阻害薬であるTBHAでL-Gluと同様の膨化、Tau遊離が起こることは、アストロサイトにおいてNa^+依存性のL-Gluトランスポーターがそれらの現象に関わっていることを示している。一方、KAはL-Gluとは異なりKA受容体を介する作用及び現時点では不明であるがこれらの機構とは別の機構によりTau遊離を引き起こすと考えられる。

〔文献〕

1) Frangakis, M. V. & Kimerberg, H. K., Neurochem. Res. 9, 1689-1698 (1984). **2)** Hagberg, H., Lehmann, A., Sandberg, M., Nystrom, B., Jacobson, I. & Hamberger, A., J. Cereb. Blood Flow Metab. 5, 413-419 (1985). **3)** Kimelberg, H. K., Goderie, S. K., Higman, S., Pang, S. & Waniewski, R. A., J.Neurosci. 10, 1583-1591 (1990). **4)** Koyama, Y., Baba, A. & Iwata, H., Neurosci. Lett. 122, 210-212 (1991). **5)** Koyama, Y., Ishibashi, T. & Baba, A., Adv. Exp. Med. Biol. 315, 375-380 (1992). **6)** Lehmann, A., Hagberg, H., Jacobson, I. & Hamberger, A., Brain Res. 359, 147-151 (1985). **7)** Martin, D. L. & Shan, W. G., Cell. Mol. Neurobiol. 4, 191-196 (1986).

138 虚血性細胞傷害、記憶障害における細胞内情報伝達系酵素活性の関与と治療法について

石川敏三**　脊戸山景子　仲西　修*
前川剛志**　坂部武史
山口大学医学部麻酔・蘇生学教室
*九州歯科大学歯科麻酔学教室
**山口大学医学部付属病院総合診療部

〔要約〕
脳虚血後の細胞傷害、機能障害におけるCキナーゼ（PKC)活性の関与および治療法について検討した。ラットに両側頸動脈閉塞と低血圧(50mmHg)による10分間（一部で20分間）の前脳虚血を行なった。虚血後早期（1時間）に ^{3}H-PN200-110 結合(Ca channel)の減少（線条体、海馬）を伴う ^{3}H-PDBu結合(PKC活性）の増加（海馬）が見られた。また、PKC 阻害剤（staurosporine:STR ）が虚血時（20分間）の線条体細胞外液DA(ecf DA)濃度の増加を抑制し、虚血後7日における海馬CA1 の神経細胞傷害（HE染色）および空間認知学習（水迷路）の障害（逃避潜時の延長）を軽減した。また、Pentobarbital および軽度脳低温（34℃）は、 ^{3}H-PDBu結合の増加とecf DA濃度増加を抑制し、細胞傷害、学習障害を軽減した。以上のことから、細胞内PKC 活性は虚血性神経伝達物質放出、細胞傷害、機能障害に密接に関与することが判明し、Pentobarbital および軽度脳低温の保護作用にPKC 活性の抑制を介する機序が示唆される。

【はじめに】
一過性脳虚血後の遅発性細胞傷害は緩徐に進展することから治療の可能性がある。最近、この細胞死への過程における細胞内情報伝達系の酵素活性の関与とそれに基ずく治療法が注目される[1)]。すなわち、脳細胞は虚血に陥ると膜の脱分極が引き金となって細胞内Ca増加や興奮性アミノ酸を始め神経伝達物質過剰放出が起きる。さらに、これらが細胞内のリン脂質代謝を刺激すると、連鎖する2次メッセンジャーの合成や情報伝達系酵素の活性変化をもたらし、細胞膜や原形質内の画分のみならず、核内遺伝子発現の機構をも修飾し、細胞を機能的、構造的に破壊する可能性がある[4)]。したがって、虚血で活性化される情報伝達機構の細胞傷害への関与を解明することは、治療を考える上で重要となる。そこで、本研究では一過性前脳虚血後の選択的脆弱部位（海馬、線条体）の細胞傷害と学習・記憶障害におけるCキナーゼ（PKC)の関与を明らかにし、治療法についても合せ検討した。

【実験方法】
ウイスター系雄ラット(250-350g)を、N2O(70%)+O2 麻酔／人工呼吸下、両側頸動脈閉塞と脱血性低血圧(50 mmHg）による前脳虚血を10分間（一部では20分間）行ない、再灌流した。治療ではPKC 阻害剤（staurosporine: STR, 10ng, 脳室内、虚血前30分）、pentobarbital(PB, 30mg/kg, iv 、再還流5分）および軽度脳低温（TEMP、34±1℃）とした。

1．化学的シナプス伝達の検討：虚血後1時間で断頭し、脳組織切片を作成後、in vitro autoradiographyでG蛋白質（ ^{3}H-GTP:400nM)、PKC(^{3}H-PDBu:2.5nM）、L型Ca channel（ ^{3}H-PN200-110:0.1nM)の結合実験を行った[1)]。画像解析装置を用い、フィルム上（線条体および海馬CA1)の黒化度を標準線源（ ^{3}H-microscale）で較正し、各濃度に換算した（各群 4例）。また、ラットの線条体に透析用プローベを挿入留置し、Ringer液を灌流(2μl/min)して安定状態を得た後、10分間虚血あるいは20分間虚血および再灌流60分間連続で透析液を採取し、透析液はHPLC-ECDに注入しDA濃度を定量分析した（各群4~7 例）。
2．病理学的所見の検討：虚血後7日に、生理食塩水および中性ホルマリンで灌流固定したのち、脳組織標本はHE染色を行い、神経細胞の虚血性傷害を光顕的に観察評価した（傷害スコア：正常 0、虚血性傷害10%>; 1 、<50%;2、50%<;3）（各群5~7 例）。
3．学習・記憶能の検討：空間認知の学習獲得過程について評価した（水迷路法）。ラットに、墨汁で不透明にした水面下(2cm）のプラットホームを認識させるため、プール内4か所より放出しゴールするまでの時間（逃避潜時）を虚血後4日(2試行／日）から7日まで測定した（各群 6例）。

【結果】
1．化学的シナプス伝達：再灌流1時間で ^{3}H-GTP 結合は変化しなかったが、 ^{3}H-PDBu結合が増加（海馬；24%）し、PBおよびTEMPがそれを抑制した。 ^{3}H-PN200-110 結合が減少（線条体;15%、海馬;21%）し、PBは抑制したが、TEMPでは海馬(14%）で抑制できなかった。一方、線条体Ecf DA濃度は10分間虚血時，前値の22倍に増

加し、この増加はω-CgTX（2μM, N型 Ca blocker)の局所注入により抑制され、再灌流後のPB投与でDAの減少（15分で 8倍）が促進された(3倍）。20分間虚血ではEcf DA濃度は120 倍に増加し、この増加をSTR （20倍）およびTEMP（ 8倍）は抑制した。

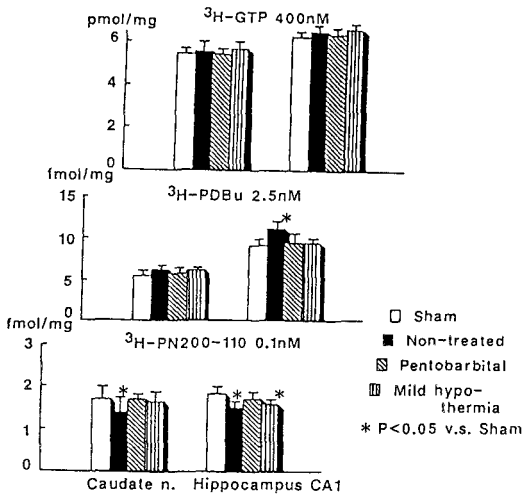
2．神経細胞傷害：虚血後７日の海馬CA1 の神経細胞傷害（平均スコア2.8 ）は、STR(1.3)、PB(0.3) 、TEMP (0.5) で軽減された。

3．学習・記憶障害：対照では試行開始３日目に逃避潜時がほぼ一定となり（平均 3秒）獲得が確認された。非治療群では７日目で著しく延長したが(48 秒) 、STR (22 秒) 、PB(12 秒) 、TEMP(6秒) は障害を軽減した。また、同一ラットにおける空間認知障害(4段階スコア）と海馬CA1 錐体細胞傷害(4段階スコア）に良い相関が認められた（Spearman ρ=0.7）。

【考察】

PKC は、脳内に豊富に存在するCaおよびリン脂質依存性酵素であるが、その過剰な活性化は蛋白のリン酸化反応を促進させ、細胞構造を破壊する可能性がある。本研究は、虚血および再灌流早期におけるPKC 活性およびPKC 阻害剤の神経伝達物質放出、海馬CA1 細胞傷害および学習障害に及ぼす影響について検討し、PKC の活性化が細胞傷害を進展させる要因として関与することが明らかとなった。本研究結果から、脆弱部位の線条体で著明な虚血性DA放出が認められ、ωコノトキシンあるいはPKC 阻害剤(staurosporine) が抑制したことから、シナプス前のＮ型Ca channel開口による細胞内Ca増加およびPKC の活性化によるものと考えられる。そこで、PKC 活性の変化（再灌流早期の海馬CA1)を検討したところ、Ｇ蛋白質の変化は明らかでないが、 ^{3}H-PDBu結合（PKC 活性）が増加し、細胞膜機能の指標とされるＬ型Ca channel （ ^{3}H-PN200-110)の減少を伴うことが分かった。これらのことは、虚血あるいは再灌流早期の細胞内Ca増加やDGの産生増加に起因し、膜およびその周囲の蛋白質に局在するPKC が膜へのtranslocation により活性化され、その結果DAの過剰放出およびPKC を介する情報伝達系の異常（細胞膜機能異常を含む）を起こすものと考えられる。さらに、PKC 阻害剤が虚血後の海馬CA1 細胞傷害および記憶障害を部分的に軽減することが分かり（STR は選択的にPKC 酵素阻害作用を有する：IC50がほかのcAMPやcGMP依存性蛋白酵素の1/10) 、脳虚血中、再灌流早期にPKC の活性化を介した過程がその後の細胞傷害、機能障害を引き起こす可能性が強く示唆される。

最近の虚血性脳障害の治療において、Pentobarbital(GABA作動薬）あるいは軽度脳低温療法はもっとも期待され、注目されている。これらは、代謝を抑制し、虚血性の興奮性アミノ酸（興奮性と抑制性神経活動の不均衡）による毒性やCaイオンホメオスターシスの異常を軽減する作用を介する可能性が示唆されている[2]。さらに本研究から、PBの虚血後の低用量投与あるいは約３℃の脳温低下で、虚血後の ^{3}H-PDBu結合の増加とecf DA濃度増加を抑制し、その後の細胞傷害、学習障害を軽減することが明らかとなった。したがって、ここでも細胞内PKC 活性は虚血性神経伝達物質放出、細胞傷害、機能障害に密接に関与することが判明し、これらの保護作用にPKC の活性亢進の抑制を介する可能性が示唆される。とくに軽度脳低温では、約３℃の脳温低下では脳酸素消費量はわずか10%低下するのみであるが、その虚血性細胞傷害に及ぼす影響は同程度の代謝抑制作用を有するbarbitalや麻酔薬isofluraneを超えること[3]、さらに本研究でも明らかなように細胞内情報伝達系の機能維持を行なうことが示唆される。



【文献】

1） Hara H, et al.; J Cereb Blood Flow Metab 10:646-653, 1990

2） Ishikawa T, et al.; J Cereb Blood Flow Metab 13:S676, 1993

3） Sano T, et al.; Anesthesiology 76:221-228, 1992

4） 遠谷重郎ほか; 脳神経 43: 307-318, 1991

139 ベラトリジンによるNa^+チャンネルを介した神経栄養因子除去後のラット上頚神経節細胞の細胞死の抑制

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ベラトリジンの作用機構について調べた。低濃度(0.75 μM)のベラトリジンは、培養したラット上頚神経節 (SCG) 細胞の神経成長因子 (NGF) 除去に伴う細胞死を遅らせ、その一方で神経突起の変性も引き起こした。これらのベラトリジンの効果は *tetrodotoxin* 及び flunarizine により完全に阻止され、細胞外 Na^+ に依存していた。突起の変性は、細胞死を防ぐ CPT-cAMP では阻止できないが高 K^+ 培地中では起こらないことから、脱分極に伴う K^+ の流出によって起こる RVD (Regulatory Volume Decrease) と思われる。ベラトリジンを処理した際の細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) の変化を蛍光プローブ SBFI を用いて調べたところ、低濃度のベラトリジンでも $[Na^+]_i$ の上昇が見られ、この上昇は flunarizine で完全に抑えられた。さらに、低濃度のベラトリジンは、単離直後の未発達の SCG 細胞には toxicity もないが trophic 効果も無く、ウワバインやモネンシンも NGF 除去後の培養 SCG 細胞の細胞死を遅らせた。これらの結果は、SCG 細胞の発達に伴い Na^+ チャンネルの発現が up-regulation されること、分化した SCG 細胞の生存が Na^+ を介した機構でも調節されている可能性があることを示唆している。

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プログラムされた細胞死であることが示唆され、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。ラットの上頚神経節から得られた神経細胞はその生存のために NGF を必要とし、培養液から NGF を除くと細胞は 2～3 日で死ぬ。これに伴い放出される細胞内酵素の量で細胞死が定量化できる。この NGF 除去による細胞死は、Cycloheximide や Actinomycin D の培地への添加により抑えられることが判っている[1]。さらにメチルキサンチン類や cAMP のアナログ等により細胞の cAMP レベルを高めること[2-4]や、高 K^+ 培地により細胞内 Ca^{2+} 濃度を高めること[5]でもこの細胞死は阻止されることが判っている。今回 Na^+ チャンネルを介して細胞を脱分極させることで知られるベラトリジンについて NGF 除去後の細胞死に与える影響を調べた。

[実験方法]

上頚神経節 (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 (トリパンブルー染色，AK 放出のアッセイ用，0.3 神経節／well)または φ25 mm カバースリップ(蛍光測定用，0.1神経節／well) にまいた。10% 牛胎児血清、50 ng/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：NGF は培地中に 0.5% のマウス NGF に対する抗体 (guinea-pig) を加えることで除去した。細胞の生死の判別は、0.2%トリパンブルーで染色される細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、顕微鏡下で直接観察することにより行った。また、NGF 除去後培地中及び細胞内の細胞質性酵素アデニレートキナーゼ (AK) 活性をそれぞれ測定し、NGF 除去に伴い放出される AK の割合を求めることで細胞死を定量的に評価した。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% (NGF 除去後36時間) 放出される。

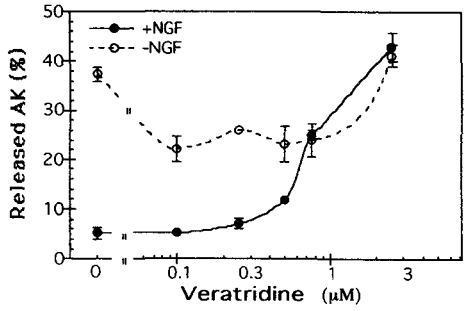


図 1 NGF 除去後の SCG 細胞の細胞死を抑制するベラトリジンの効果．細胞を各濃度のベラトリジンで処理し36時間培養したとき培地中に放出される AK の割合を示した。Mean±SEM (n=3)

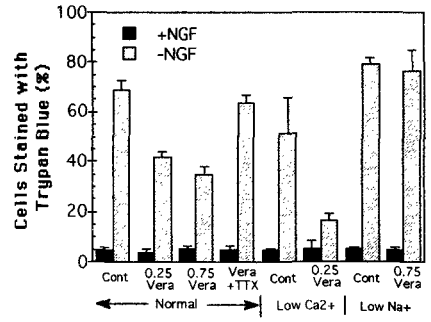


図 2 ベラトリジンの細胞死抑制効果の調節．処理開始後 30 hr で細胞を染色，固定した。Ca^{2+} は EGTA を加えることで 1/18 (100 μM) に，Na^+ は N-Methyl-D-Glucamine に置換することで 1/4 (38 mM)に減らした。ベラトリジンの濃度単位は μM，TTXは 1 μM. Mean±SEM (n=3).

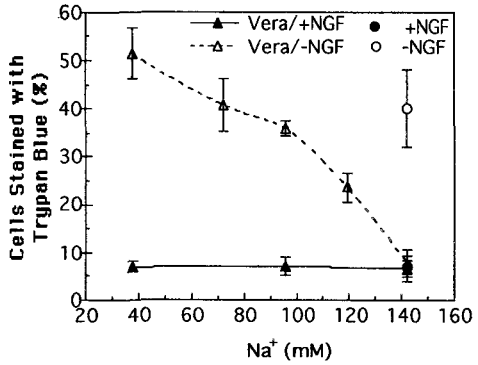


図3 ベラトリジンの効果の細胞外 Na^+ への依存性. 横軸は培地中の Na^+ 濃度を表す。通常の培養液中の Na^+ 濃度は 142 mM、各々 Na^+ の減少分は N-Methyl-D-Glucamine で置換した。Vera: 0.75 μM veratridine. Mean±SEM (n = 3).

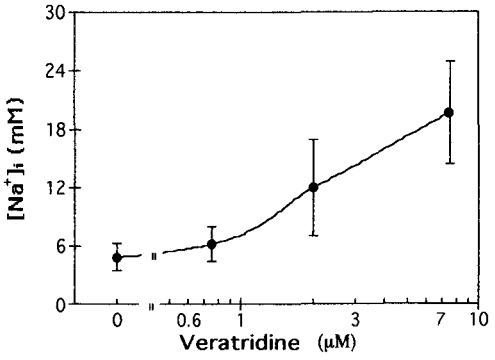


図4 ベラトリジンによる細胞内 Na^+ の上昇. 同一の細胞 (n =12) を各濃度のベラトリジンで処理し30分以上経過後の SBFI による蛍光強度を測定した。値は別に作製した検量線より濃度に変換した。Mean±SD.

細胞内 Ca^{2+}, Na^+ 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$ 及び $[Na^+]_i$) の測定：$[Ca^{2+}]_i$ は fura-2 を、$[Na^+]_i$ は SBFI を蛍光プローブとしてアルガス 100 (浜松) を用いて測定した。

[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時間までに 7～8 割が細胞死を起こす。NGF 除去に伴う SCG 細胞の細胞死は、高 K^+ 培地 (35～40 mM) による脱分極刺激で阻止できることが知られている[5]。これに対し膜電位依存性 Na^+ チャンネルの賦活剤として知られているベラトリジンは、1 μM 以上の濃度では細胞に toxic に働くが、低濃度 (0.1～0.75 μM) で用いると NGF 除去に伴っておこる細胞死を遅らせ、AK 放出を半分に抑えた（図1）。しかし、0.75 μM のベラトリジンは、NGF の有る無しにかかわらず神経突起の変性も引き起こした。図2，3にはベラトリジンの効果をトリパンブルーにより染色される細胞の割合の減少で示した。細胞へのベラトリジンの2つの効果（突起変性促進・細胞死遅延）は、tetrodotoxin (1 μM) 及び flunarizine (1 μM) により完全に消失し、細胞外 Na^+ に依存していた（図2、3）。ベラトリジンによる突起の変性は、細胞死を防ぐ CPT-cAMP (200 μM) では阻止できないが高 K^+ (40 mM) 培地中では起こらないことから、Na^+ 流入の際細胞内から K^+ が流出することによって起こる RVD (Regulatory Volume Decrease) と思われる。容積が細胞体に比べて小さい突起において RVD が観察されたと考えられる。ベラトリジンは細胞外 Ca^{2+} に依存した機構でも細胞に種々の効果をもたらすことが報告されている[6,7]。そこでベラトリジンを処理した際の細胞内 Ca^{2+} 及び Na^+ 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$ 及び $[Na^+]_i$) の変化を調べた。fura-2 による $[Ca^{2+}]_i$ の測定では、0.75 μM ベラトリジン投与では $[Ca^{2+}]_i$ に変化はなかった。SBFI を用いた $[Na^+]_i$ の測定では、低濃度のベラトリジンでも $[Na^+]_i$ の上昇が見られ（図4）、ベラトリジン (～7.5 μM) による $[Na^+]_i$ 上昇は flunarizine で完全に抑えられた。0.75 μM ベラトリジンでの長時間 (7 hr) の処理では4.90 ± 1.46 mM (Mean ± SD, n = 23) から 7.15 ± 2.25 (n = 33) への $[Na^+]_i$ の有意な (student's *t* test, $p < 0.005$) 上昇が確認された。この他、低濃度のベラトリジンは、単離直後 (E18～P1) の未発達の SCG 細胞には toxicity もないが trophic 効果もないこと、ベラトリジンと同じく $[Na^+]_i$ を上げる効果を持つ Na^+ / K^+ ポンプの不活性化剤ウワバイン (0.5～1 mM) や Na^+ のイオノフォア モネンシン (30 nM) も NGF 除去後の培養 SCG 細胞の細胞死を遅らせることが判っている。これらの結果は、NGF により SCG 細胞の発達に伴い Na^+ チャンネルの発現が up-regulation されること、分化した SCG 細胞の生存が presynaptic な入力による Na^+ を介した機構でも調節されている可能性があることを示唆している。

文献

1). Martin,D.P. et al. J.Cell Biol.**106**, 829-844 (1988).
2). Tanaka,S. & Koike,T. Biochim.Biophys.Acta.**1175**, 114-122 (1992).
3). Rydel,R.E. & Greene,L.A. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,1257-1261 (1988).
4). Edwards,S.N.,Buckmaster,A.E. & Tolkovsky,A.M. J.Neurochem. 57, 2140-2143 (1991)
5). Koike,T. & Tanaka,S. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88, 3892-3896 (1991).
6). Pauwels,P.J., Leysen,J.E. & Jansen,A.J. Life Sci.48, 1881-1193 (1991).
7). Horwitz,J. & Perlman,R.L. J.Neurochem.42, 384-389 (1984).

140 高用量のmethamphetamine投与によるdopamineおよびserotonin神経系への神経毒性効果とグルタミン酸放出との関係について

安部川　智浩、大森　哲郎、小山　司
北海道大学医学部精神医学教室

〔要約〕
高用量のmethamphetamine（MA）投与（5mg／kg，皮下注、2時間毎に計4回）による、DA、5－HTの組織内含有量の低下を指標とした神経毒性効果に対し、DA系およびグルタミン酸系神経伝達が与える影響について，線条体、側坐核の2部位で、脳内透析法による検討を行った。透析実験終了5日目に断頭し、組織内モノアミン含有量を測定した。MA投与によるDA放出の著明な亢進は、線条体のみならず、側坐核においても認められた。DAおよび、その代謝産物の組織内含有量は、線条体でのみ有意に減少した。このことから、高用量のMA投与によるDA神経終末への神経毒性効果は、DA放出の亢進のみでは、説明できないことが示唆された。MA投与によるグルタミン酸放出の亢進は線条体に限定されていた。以上より、DA放出の亢進とグルタミン酸放出の亢進の両者の存在により、DA神経終末への神経毒性効果が発現される可能性を推定した。　（はじめに）我々は既に、高用量のMA投与によるDA神経終末への神経毒性効果は、線条体のみで発現し、5－HT神経終末への神経毒性効果は、線条体のみならず、種々の脳部位で発現することを報告し、さらに、これらの神経毒性効果が、NMDA受容体拮抗薬により、用量依存性に阻止されることを明かにした（1）。O'Dellら（2）は、高用量のMA投与により誘発されるDA放出の著明な亢進と、DA神経終末への神経毒性効果との関連についての指摘を行った。また、Nashら（3）は、高用量のMA投与により、線条体でのグルタミン酸放出が亢進し、DAの組織内含有量が減少したことから、MAによるDA神経終末への神経毒性効果とグルタミン酸放出亢進との関連を推定した。今回、我々は、MA投与により発現される神経毒性効果に対してDA系およびグルタミン酸系神経伝達が与える影響について、線条体、側坐核の2部位において、脳内透析法を用いて検討した。　（対象と方法）Wistar系雄性ラットの線条体および側坐核に、ペントバルビタール（30mg／kg）麻酔下でガイドカニューラを挿入した後、透析プローブを装着した。翌日、リンゲル液を2μl／minの速度で灌流し始め、1．5時間の空流しの後、さらに2時間の間、30分毎に透析液を採取し、これらの平均値を基礎値とした。その後、2時間毎に計4回、MA（5mg／kg）あるいは生理食塩水を皮下注射し、この間も30分毎に透析液を採取した。透析液中のDA、DOPAC、HVA，5－HIAA、および、グルタミン酸，グルタミン，ホモセリン，グリシン，タウリン，アラニンの量をHPLC－ECDを用いて測定した。アミノ酸の測定には、O－フタルアルデヒドによるプレカラム誘導体化法を用いた。透析実験終了5日目に断頭し、線条体、側坐核での組織内モノアミン含有量を測定した。透析実験のデータ解析にはtwo－way repeated　ANOVAを用い、組織内モノアミン含有量の検討には、Studentのt－testを用いた。（結果）DA放出は、高用量のMA投与により、線条体、側坐核の両部位で有意に亢進した（P<0.001）（Fig 1,2）。DOPAC，HVA，5－HIAAはMA投与により、線条体、側坐核で有意に減少した（P<0.001）。グルタミン酸放出は、MA投与により、線条体でのみ有意に亢進した（P<0.05）（Fig 3,4）。その他のアミノ酸系物質の放出には、MA投与による有意な変化を認めなかった。DA、DOPAC、HVAの組織内含有量（Fig 5A,B）は、線条体でのみ有意に減少したが（P<0.01）、側坐核では有意な変化を認めなかった。5－HT，5－HIAAの組織内含有量は線条体、側坐核の両部位で有意に減少した（P<0.01）。
（考察）高用量のMA投与により誘発されるDA放出の著明な亢進は、線条体のみならず、側坐核においても認められた。このことから、線条体に限定される高用量のMA投与によるDA神経終末への神経毒性効果は、DA放出の亢進のみでは説明できないことが示唆された。グルタミン酸の放出亢進は線条体のみに限定されていたことから、線条体でのDA神経終末への神経毒性効果とグルタミン酸放出の亢進とが関連している可能性が示唆さ

れた。以上より、ＤＡ放出の亢進とグルタミン酸放出の亢進の両者の存在により、ＤＡ系への神経毒性効果が発現される可能性を推定した。ＭＡのＤＡ系への神経毒性効果の部位差のメカニズムについては、さらに検討が必要と思われた。５－ＨＴ系への神経毒性効果には、グルタミン酸系神経伝達が何らかの関与をしていると推定される（１）。しかし、今回の結果では、グルタミン酸放出の亢進を認めない側坐核でも、５－ＨＴ含有量の低下が出現したことから、５－ＨＴ系への神経毒性効果に、グルタミン酸放出の亢進は、直接的には関与していない可能性が示唆された。

（文献）

1) Ohmori T et al J Neural Transm (in press)

2) O'Dell SJ et al (1991) Brain Res 564:256-260

3) Nash JF et al (1992) Brain Res 581:237-243

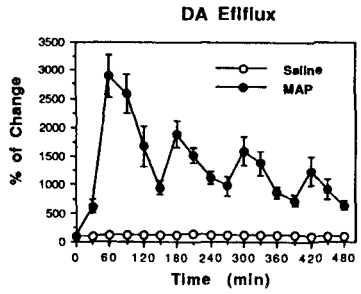


Fig 1. Effects of MA or vehicle on DA efflux in ST.

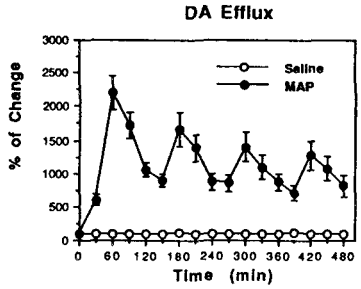


Fig 2. Effects of MA or vehicle on DA efflux in NA.

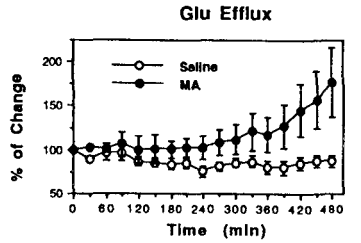


Fig 3. Effects of MA or vehicle on Glu efflux in ST.

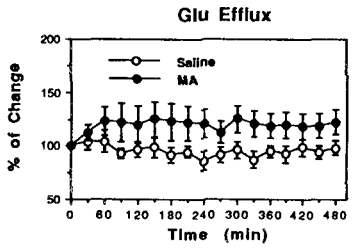


Fig 4. Effects of MA or vehicle on Glu efflux in NA.

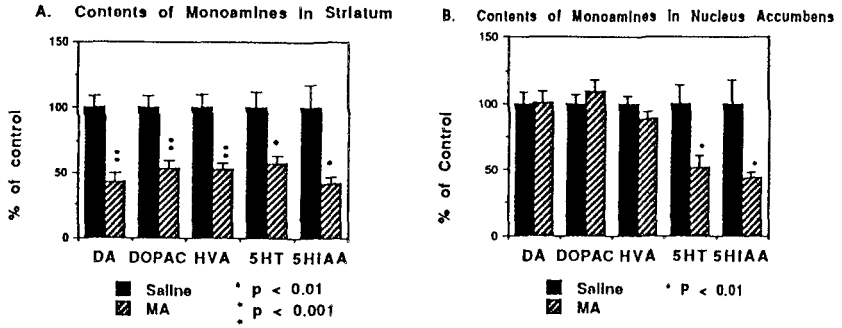


Fig 5. Effects of MA or vehicle on contents of monoamines.

141　E1マウスの脳内グルタメイトレセプター結合能

荻田喜代一、榎本理世*、加太英明**、森昭胤**、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理、*現 神戸学院大・薬・薬理、
**岡山大・医・分子細胞医学研）

〔要約〕自然発症性てんかんマウス(E1マウス)を用いて、脳内各部位のグルタメイト(Glu)レセプター結合能をddY系マウスと比較検討した。N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプター複合体上のイオンチャネルドメインへの[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合は、ddY系マウスでは海馬が最も高く、以下大脳皮質、線条体、中脳、視床下部、橋・延髄および小脳の順に結合は低下した。E1系マウスでは、小脳の[^{3}H]-MK-801結合がddYマウスの場合に比べて有意な低下を示したが、他のいずれの脳内部位においても両系統マウスの間で[^{3}H]MK-801結合に有意な変化は認められなかった。E1マウス小脳における[^{3}H]MK-801結合の低下は、反応速度解析の結果結合初速度の低下に起因することが明らかとなった。一方、NMDAドメインへの[^{3}H]Glu結合およびグリシン(Gly)ドメインへの[^{3}H]Gly結合はともに、いずれの脳内部位においても両系統マウス間で有意な変化は見られなかった。non-NMDAレセプターへの[^{3}H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate(AMPA)結合は、E1マウス小脳においてのみddYマウスに比べて有意な低下が観察された。これに対して、[^{3}H]カイニン酸(KA)結合はいずれの脳内部位においても両系統マウス間で有意な変化は認められなかった。以上の結果より、E1マウスにおける痙攣等の異常発現に小脳のGluレセプターの機能変化が少なくとも一部は関与する可能性が示唆される。

イオノトロピック型Gluレセプターは、NMDAレセプターとnon-NMDAレセプターに分類される(3)。これらの中で、NMDAレセプターは、中枢神経系の可塑性形成などの長期的神経機能変動や、脳虚血などによる遅発性神経細胞壊死ばかりでなく、てんかん、パーキンソン病あるいはアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症メカニズムにも深く関連する可能性が示されている。NMDAレセプターは、NMDA認識ドメイン、Gly認識ドメイン、ポリアミン認識ドメインおよびイオンチャネルドメインがレセプターイオノフォア複合体を形成して機能すると理解される。前3者のドメインの活性化は、イオンチャネルを開放してCa^{2+}の細胞内流入を惹起する。この細胞内に流入したCa^{2+}が細胞内リン酸化カスケード反応や他のCa^{2+}依存性プロセスの活性化を通じて、最終的な細胞機能変化を招来すると推察されている(4)。一方、E1マウスは遺伝的に痙攣準備状態が規定された動物系統で、ヒトのてんかん症のモデル動物と推定されている(1)。本研究では、てんかんの発症メカニズムにおけるGluレセプターの病態生理学的意義を解明する目的で、本モデル動物の脳内Gluレセプター結合能を一斉測定した。

〔実験方法〕

膜標品の調製：てんかん自然発症型E1マウスおよびddYマウスの各脳内部位を、40倍量の0.01% bacitracin、0.1 mM PMSFおよび1 mM EDTAを含む5 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)でホモジナイズしたのち、50,000 g、30分間の遠心分離を行った。得られた沈渣を50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)で懸濁・遠心操作により3回洗浄したのち、0.32 M蔗糖水溶液に懸濁状態で-80℃に凍結保存した。実験当日には、膜標品を0.08%トリトンX-100で2℃、30分間前処理した。この前処理を上記遠心分離操作により停止したのち、得られた沈渣を上記操作でさらに1回洗浄した(2)。リガンド結合能の測定：上記トリトン処理膜標品を、50 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)中で、5 nM [^{3}H]MK-801と10μM Glu、10μM Glyおよび1 mM スペルミジン(SPD)の共存下に30℃で20分間あるいは5時間反応させた。NMDA感受性[^{3}H]Glu結合およびD-セリン感受性[^{3}H]Gly結合はともに、10 nMの各放射性リガンドと膜標品を2℃で10分間反応させて測定した。[^{3}H]AMPA結合は、10 nM [^{3}H]AMPAと100 mM KSCNの存在下あるいは非存在下で、また[^{3}H]KA結合は10 nM [^{3}H]KAと、それぞれ上記膜標品を2℃で30分間反応させて測定した。

〔実験結果〕

ddYマウス脳内各部位の[^{3}H]MK-801結合を平衡状態(5時間反応)あるいは未平衡状態(20分間反応)条件下で測定したところ、本結合はいずれの場合も海馬に最も高く、次いで大脳皮質、線条体、中脳、視床下部、橋・延髄および小脳の順に低下することが判明した。E1マウスの場合も、[^{3}H]MK-801結合の脳内分布はddYマウスの場合と同様であったが、小脳においてはddYマウスに比べてE1マウスが有意に低いことが明らかとなった。他の脳内部位の[^{3}H]MK-801結合はいずれも、両系統マウスの間で有意な変化は認められなかった(表1)。E1マウス小脳における[^{3}H]MK-801結合の低下は、結

合の初速度の低下に起因することが反応速度論的解析により明らかとなった[$K_{0.5}$: El, 4.23±0.57; ddY, 6.85±0.77 ($min^{-1}\times10^{-3}$)]。NMDA感受性[^{3}H]Glu結合およびD-セリン感受性[^{3}H]Gly結合はともに、[^{3}H]MK-801結合と同様の脳内分布を示したが、いずれの脳内部位においても両系統マウス間で有意な差異は見られなかった。また、Elマウス脳内の[^{3}H]AMPA結合は、KSCN非添加時において海馬で最も高く、以下大脳皮質、線条体、視床下部、中脳、小脳および橋・延髄の順に結合は低くなった。この[^{3}H]AMPA結合はKSCN添加により約4倍に増強されたが、KSCN添加はその脳内分布には著変を与えなかった。さらに、Elマウス脳内各部位の[^{3}H]AMPA結合をddYマウスと比較すると、小脳においてのみElマウスがddYマウスに比べて有意に低いことが判明した(表1)。[^{3}H]KA結合は、両系統マウスともに線条体が最も高く、以下大脳皮質、海馬、視床下部、小脳、中脳および橋・延髄の順に結合は小さくなった。しかしながら、いずれの脳内部位においても両系統マウス間で[^{3}H]KA結合の有意な変化は認められなかった。

表1. Elマウスおよびddyマウス脳内における[^{3}H]MK-801結合および[^{3}H]AMPA結合の分布

		[^{3}H]MK-801 binding (fmol/mg protein)		[^{3}H]AMPA binding (fmol/mg protein)	
		20 min	5 h	None	100 mM KSCN
Cerebellum	ddY	16.6± 1.2	52.7± 1.7	41.9±3.2	134.7± 5.0
	El	13.1± 0.6 *	41.3± 1.7 **	26.4±0.8 **	117.5± 4.2 *
Medulla-Pons	ddY	31.5± 0.9	76.4± 2.0	11.7±2.0	47.0± 3.0
	El	26.1± 3.0	74.7± 3.1	9.7±1.3	38.5± 2.5
Hypothalamus	ddY	207.4± 9.7	245.4±15.2	35.8±3.9	194.4±16.2
	El	196.3± 6.6	235.6±12.1	37.9±6.0	171.2±18.9
Midbrain	ddY	196.9±12.5	273.6±14.9	22.9±2.9	115.3± 5.1
	El	244.7±21.4	316.2±20.8	26.1±4.5	109.6± 8.2
Striatum	ddY	617.3±23.8	654.5±36.4	95.9±3.9	266.1±11.8
	El	546.3±29.5	591.5±26.3	65.1±4.3	228.7±20.1
Cerebral cortex	ddY	1074.7±75.3	1083.1±56.5	57.9±5.9	333.8±20.6
	El	982.7±72.6	997.9±56.3	78.8±8.2	336.9±23.6
Hippocampus	ddY	1215.7±52.0	1402.4±79.1	111.9±7.5	406.1±20.5
	El	1261.9±35.6	1385.2±46.3	78.9±5.4	450.7±30.0

Values were from 5 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the value obtained in ddY mice.

〔考察〕

本研究において、Elマウス小脳ではNMDAレセプターおよびAMPAレセプターの機能がddYマウスに比べて低下している可能性が示された。Elマウスの小脳において、NMDAレセプター複合体の各アゴニスト結合ドメインが変化することなく[^{3}H]MK-801の結合速度のみが有意に低下した事実は、NMDAチャネル自身の性質変化によりその開放速度が低下している可能性を示唆するものである。NMDAレセプターは、小脳においては顆粒細胞に高密度に存在するが、小脳唯一の出力系である抑制性ニューロンのプルキンエ線維の活性は、入力系興奮性ニューロンである苔状繊維により顆粒細胞を仲介して調節を受ける。したがって、小脳のNMDAチャネル開放速度低下はプルキンエ線維を介する小脳からの抑制性出力を減少させ、その結果海馬や扁桃核などの痙攣発作焦点部位の興奮性が増幅される可能性も考えられる。

〔謝辞〕

本研究の一部は、学校法人大阪工大摂南大学中央研究所一般助成金(93-2-809)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Imaizumi, K., Ito, S., Kututake, G., Takizawa, T., Fujiwara, K. and Tutikawa, K. (1959) Jikken Dobutsu 8, 6-10.
2. Ogita, K., Enomoto, R., Yoneda, Y., Kabuto, H. and Mori, A. (1992) Neuroscience 18(Sup. 2), 83-92.
3. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) Neurosci. Res. 10, 1-33.
4. 米田幸雄、荻田喜代一 (1991) 薬学雑誌 111, 329-344.

142 自然発症高血圧ラット脳内細胞骨格蛋白mRNAの一過性脳虚血後の代償性変化

浅沼幹人[1)*], 西林佐紀子[1)], 近藤洋一[1,2)], 平田 洋[1,2)], 小川紀雄[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〕

自然発症高血圧ラットの3時間両側総頸動脈結紮一過性脳虚血モデルを用いて、虚血後慢性期の細胞骨格蛋白α-tubulin, β-actin mRNAの変化について、*in situ* hybridization, Northern blot analysisにより検討した。虚血再灌流2週後に、α-tubulin mRNAは梗塞巣に一致して前頭皮質で低下したが、その他の部位では変化しなかった。一方、β-actin mRNAは虚血2週後に、帯状回、頭頂皮質、島皮質、中隔野を含む前脳基底核、線条体において偽手術群に比して有意に増加し、前頭・側頭皮質、側坐核、扁桃核、腹側視床核においても増加傾向が認められた。さらに、海馬全体のβ-actin mRNAは再灌流2週後に偽手術群に比して有意に増加したが、8週後には逆に有意に減少し、また前頭皮質においても海馬と同様の経時的変化が認められた。虚血2週後にβ-actin mRNAの増加あるいは増加傾向が認められた脳部位は、海馬への入力線維の起始核あるいは各皮質間の交連線維の起始核であり、actinは神経細胞のシナプス終末に多く存在し、神経突起の伸長、シナプス形成に関与している細胞骨格蛋白であることから、脳虚血によるシナプス結合の障害に対し代償性の修復機転が虚血2週後という比較的早期に働いていると考えられた。また、海馬、前頭皮質でも組織的変化が固定していない虚血後比較的早期にはこの代償性変化が認められるが、その後の虚血巣の拡大に伴い修復機構も障害されることが示唆された。

[目的] スナネズミの5分間両側総頸動脈結紮一過性脳虚血モデルの海馬CA1領域では、虚血再灌流後数日から出現し始める錐体細胞の遅発性神経細胞死が認められるが(1)、このモデルでは再灌流30分後の早期に前脳の大部分において蛋白合成障害が認められ、海馬CA1領域以外の部位ではその後蛋白合成能は回復するのに対して、CA1領域では遅発性神経細胞死が認められる時期まで遷延性の蛋白合成障害がみられる(2)。また我々は、このスナネズミ一過性脳虚血モデルを用いて、再灌流14日後の細胞骨格蛋白のα-tubulin, β-actin mRNAの変化について検討し、海馬CA1領域ではα-tubulin, β-actin mRNA共に減少したが、海馬CA1領域への入力線維の起始核ではβ-actin mRNAが増加し、海馬CA1錐体細胞の遅発性神経細胞死によるシナプス結合の障害に対し代償性の修復機転が働いていることを既に報告した(3)。これは細胞骨格蛋白特にactin mRNAの変化が一過性脳虚血後のシナプス連絡の障害の指標となることを示唆している。一方、自然発症高血圧ラット(SHR)の一過性脳虚血モデルでは、海馬CA1のみならずその他の海馬領域、大脳皮質、線条体などにおいても遅発性神経細胞死が認められる。そこで今回、一過性脳虚血後の細胞骨格蛋白mRNAの代償性変化についてさらに普遍的に明らかにする目的で、SHR3時間両側総頸動脈結紮モデルを用いて、虚血後慢性期の細胞骨格蛋白α-tubulin, β-actin mRNAの変化について、*in situ* hybridization(ISHH), Northern blot analysisにより検討した。

[方法] 雄性SHR(BW 400-450g)を用い、ketamine(100 mg/kg i.p.)麻酔下で両側総頸動脈に絹糸を掛け、翌日ether麻酔下で外科用クリップにて両側総頸動脈を閉塞し、3時間後に再開通させた。偽手術群には血流遮断を行わずそれ以外は虚血群と同様の処置を行った。再開通2週後に、4% paraformaldehydeの左心室からの灌流固定を行い、クリオスタットにて線条体あるいは海馬を含む2種の冠状断凍結脳切片を作製し、[^{35}S]dATPαSで3'末端標識したα-tubulin, β-actin mRNAに対するoligonucleotide probeによるISHHを行い(3)、macro autoradiographyの後各脳部位のsignalのoptical density(O.D.)を画像解析装置にて定量した。さらに、再灌流2、4、8週後に断頭屠殺し、海馬、前頭皮質からtotal RNAをAGPC法(4)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、[^{32}P]ddATPで3'末端標識したβ-actin mRNA oligonucleotide probeによるNorthern hybridization(3)を行い、autoradiogram上のsignalのO.D.値を定量した。

[結果および考察] ISHHでは、再潅流2週後にα-tubulin mRNAは梗塞巣に一致して前頭皮質で低下していたが、その他の部位では変化しなかった(Fig. 1左)。一方、β-actin mRNAは虚血2週後に、帯状回、頭頂皮質、島皮質、中隔野を含む前脳基底核、線条体において偽手術群に比して有意に増加し、前頭・側頭皮質、側坐核、扁桃核、腹側視床核においても増加傾向が認められた(Fig. 1右)。さらに、Northern blot analysisによる海馬、前頭皮質全体のβ-actin mRNAの経時的変化についての検討では、海馬のβ-actin mRNAは再潅流2週後では偽手術群に比して有意に増加していたが、8週後には逆に有意に減少した(Fig. 2)。また前頭皮質β-actin mRNAについても海馬と同様の経時的変化が認められた。

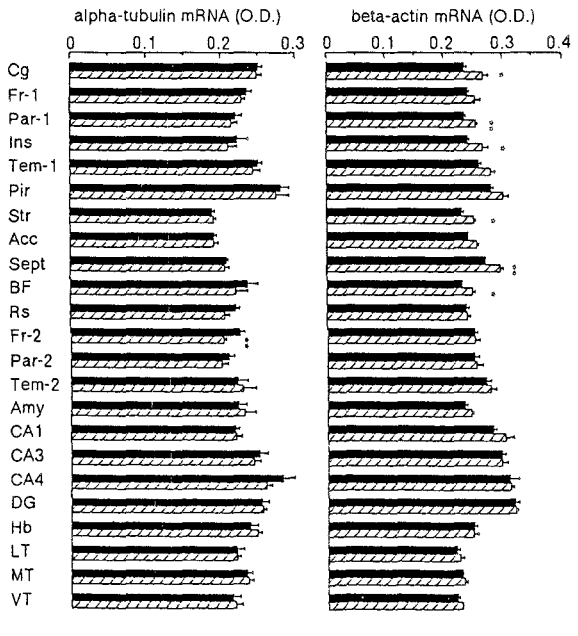


Fig. 1. *in situ* hybridizationによる一過性脳虚血2週後の脳内各部位でのα-tubulin, β-actin mRNAの変化。左: α-tubulin mRNA, 右: β-actin mRNA. (mean± SEM, n=4) *p<0.05, **p<0.01 偽手術群との有意差. Cg,Fr,Par,Ins,Tem,Pir,帯状回,前頭,頭頂,島,側頭,梨状皮質; Str,線条体; Acc,側坐核; Sept,中隔野; BF,前脳基底核; Amy,扁桃核; CA1,3,4,海馬; DG,歯状回; Hb,手綱核; LT,MT,VT,外側,内側,腹側視床核

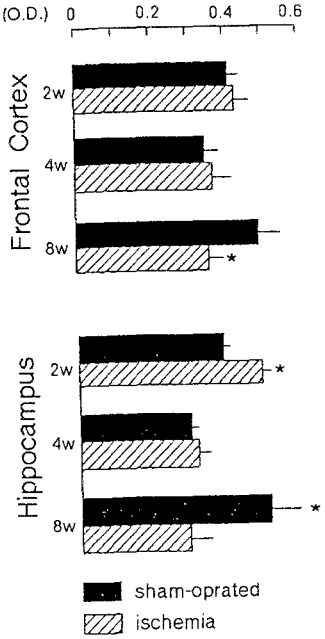


Fig. 2. Northern blot analysisによる一過性脳虚血2, 4, 8週後の前頭皮質、海馬β-actin mRNAの変化。mean SEM, n=4.

SHRの3時間両側総頸動脈結紮一過性脳虚血モデルにおいては、再潅流2週後に海馬CA1領域、前頭皮質の一部で軽度の神経細胞死が認められ、その後経時的に虚血巣は拡大し、8週後には海馬CA1-4領域、大脳皮質広範囲にまで及ぶようになる。ISHHにより虚血2週後にβ-actin mRNAの増加あるいは増加傾向が認められた脳部位は、海馬への入力線維の起始核あるいは各皮質間の交連線維の起始核であり、actinは神経細胞のシナプス終末に多く存在し、神経突起の伸長、シナプス形成に関与している細胞骨格蛋白であることから(5,6,7)、このSHR一過性脳虚血モデルにおいても一過性脳虚血によるシナプス結合の障害に対し代償性の修復機転が虚血2週後という比較的早期に働いていると考えられた。また、海馬全体、前脳皮質においても虚血2週後にβ-actin mRNAは増加するが、8週後には減少することから、組織的変化が固定していない虚血後比較的早期にはこの代償性の可塑性変化が認められるが、その後の虚血巣の拡大に伴い次第に修復機構も障害されていくことが示唆された。

[文献] 1. Asanuma, M. et al. (1993) Brain Res., 600, 243-8.
2. Chomczynski,P. and Sacchi, N. (1987) Anal.Biochem., 162, 156-9.
3. Kirino, T. (1982) Brain Res., 239, 57-69.
4. Letourneau, P.C. (1981) Dev. Biol., 58, 113-22.
5. Matus, A. et al. (1982) PNAS USA, 79, 7590-4
6. Thilmann, R. et al. (1986) Acta Neuropathol., 71, 88-93.
7. Toh, B.H. et al. (1976) Nature, 264, 648-50.

143 局所脳虚血におけるＮＯＳ活性の組織化学的観察

荒井好範[1]，水島秀勝[1]，嶋津基彦[1]，松本　清[1]，
塩田清二[2]，中井康光[2]，竹田　稔[3]
（昭和大学脳神経外科[1]，第一解剖[2]，第一生化[3]）

〔要約〕

ラット中大脳動脈閉塞モデルを作成し、閉塞5、10、20、30、60分後の大脳皮質におけるnitric oxide synthase (NOS)の変化をNADPH－diaphoraseを用いて光顕にて組織化学的に観察した。さらに、画像解析装置にて定量的に解析した。NOS活性は、5分虚血の超急性期において頭頂皮質全層の毛細血管内皮細胞に認められ、時間経過とともに漸次減少した。同部位の大小の動脈の血管内皮細胞には出現しなかった。画像解析装置の結果でも、5分：9.996、60分：1.385 (pick cell /μm²)を示した。毛細血管内皮細胞のNOS活性の増加は、脳虚血時における脳循環の調節及び神経伝達に重要な役割を演じていることが示唆された。

【目的】

Nitric oxide (NO，一酸化窒素)は神経伝達物質として、脳循環調節に関係していて、虚血脳においてはneurotoxicな作用があると言われているが[3]、その機構はまだ十分に解明されていない。虚血ラットを用いた実験でNOSのinhibitorを投与すると、梗塞範囲が有意に減少するという報告もある[2]。我々はラットの局所脳虚血モデルを作成し、NADPH－diaphoraseを組織化学的に検索し、虚血脳におけるNOS活性の出現を形態学的に観察した。

【方法】

Wistar系成熟雄ラット (250－300g)を用いた。 pentobarbital (20mg /kg)を腹腔内投与した後、気管内挿管を行い、halothane (0.3%－1.0%)，N_2O 70%，O_2 30%による全身麻酔下にて開頭した。右中大脳動脈を凝固閉塞し、局所脳虚血モデルを作成した。虚血5、10、20、30、60分後に4%paraformaldehydeと0.4%glutaraldehyde混合溶液で灌流固定した。又、NOSのinhibitorであるN－nitro－L－arginine methylester (L－NAME，3mg/kg)を虚血前30分、5分の2回腹腔内投与し、虚血10分後に灌流固定した。又、開頭のみを行ったsham群も作成した。凍結切片を作成し、0.1M Tris－HCl (pH8.0)，β－NADPH (1mg/ml)，nitro blue tetazolium (0.25mg/ml)を用い、37℃にて30分間反応させ、NADPH－diaphoraseを組織化学的に検出した。各アルコール系列にて脱水後、光学顕微鏡にて観察し、各群の比較検討を行った。又、これらの標本を画像解析装置(SP－500，Olympus)を用いて、その染色強度を定量的に評価した。

【結果】

虚血5分では、虚血側の頭頂皮質全層にNADPH－diaphorase陽性の毛細血管内皮細胞が認められた(Fig. 1)。健常側では反応陰性であった。虚血時間の経過と共に毛細血管内皮細胞の染色性は低下した。同部位の大小の動脈の内皮細胞には陽性反応は認められなかった。又、L－NAME投与群では染色性は著しく低下していた。sham群では反応陰性であった。画像解析装置による測定結果では、5分：9.996，10分：6.053，20分：3.437，30分：1.916，60分：1.385 (NOS活性，pick cell /μm²)であった(Fig. 2)。

【考察】

血管内皮細胞は血流やshear stressの変化に反応して、その機能や形態を変え、さらに細胞内のCa^{2+}の濃度変化を引き起こすと言われている[1]。又、神経細胞では虚血侵襲でL－glutamate、NMDA receptorを介し、Ca^{2+}濃度が

増加する。NOSはCa^{2+}の増加により急激に活性化されるので、今回我々の観察した虚血による血管内皮細胞のNOS活性の増加は、血流やshear stressの変化によるものか、あるいは内皮細胞自体の虚血によるものか、又、虚血に陥った神経細胞や神経膠細胞などからのシグナル伝達の影響によるものであろう。いずれにせよ5分という超早期の虚血で毛細血管内皮細胞のNOS活性は急激に増加し、60分後には減少する。このように平滑筋の存在しない毛細血管血管内皮細胞で産生されたNOが、脳虚血時における脳循環調節もしくは神経伝達等に直接関与している可能性が示唆された。

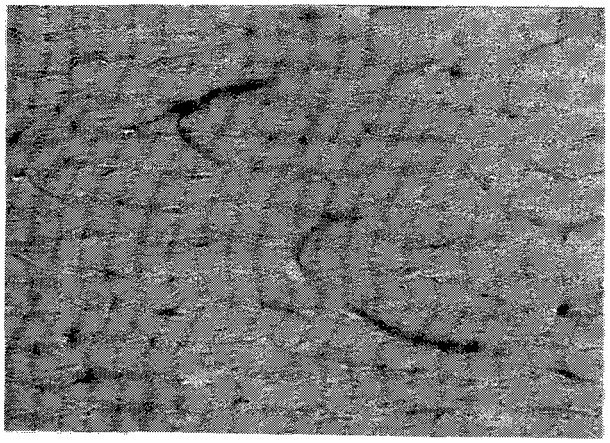


Fig 1
毛細血管内皮細胞における
NOS (NADPH−diaphorase)活性
(虚血5分)

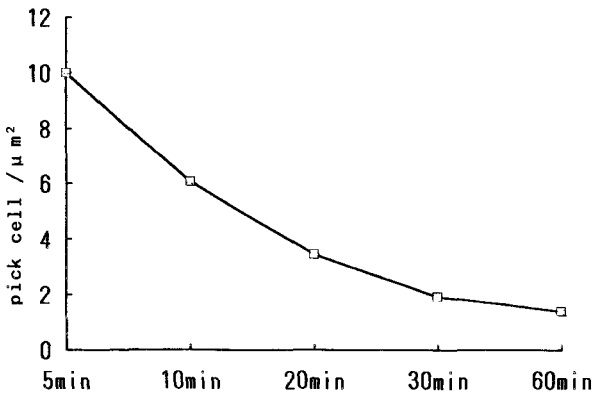


Fig 2
毛細血管内皮細胞の
虚血時間によるNOS活性の変化

【文献】

(1) 安藤譲二, ほか (1993) Molecular Medicine , 30(3), 334−340

(2) J. P. Nowicki, et al. (1991) Eur. J. Pharmacology , 204, 339−340

(3) Ted M. Dawson, et al. (1992) Annals of Neurology, 32(3), 297−311

144 ラット一過性脳虚血モデル慢性期の脳内鉄沈着について

○近藤洋一*・**，西林佐紀子*，田中健一*，浅沼幹人*，平田　洋*・**，小川紀雄*，森　昭胤*．（岡山大医・*分子細胞医学研・神経情報学，**第三内科）

〔要約〕ラットの一過性脳虚血モデルの脳虚血後慢性期における鉄の沈着とferritin，transferrin(Tf)，transferrin receptor (Tf-R) およびグリア細胞 (astrocyte，microglia) の変化を鉄染色または免疫組織化学法により検討した．ラット一過性脳虚血モデルでは虚血に対し脆弱な部位に遅発性神経細胞壊死がおこることが知られているが，虚血再灌流1週以後に神経細胞壊死に陥った海馬CA1領域に著明な鉄沈着が認められた．同部位にはastrocyteとmicrogliaが虚血後1週から出現しており microgliaはferritin陽性のものが存在した．海馬CA1領域では，神経細胞壊死に陥った部位にグリオーシスが進行するのと同時に，神経細胞壊死の結果生じた鉄が処理されていると考えられた．一方，大脳皮質では神経細胞変性はみられないが，虚血後8週以降より第V層の錐体細胞内に鉄の沈着が認められた．さらに虚血後8週には第IIIからV層にかけてferritin陽性のmicrogliaが強く発現していた．大脳皮質錐体細胞における鉄沈着は，グリオーシスと関連して鉄沈着がみられる海馬とはその発生機序を異にし，鉄の利用が障害された結果として錐体細胞に過剰の鉄が蓄積する可能性が考えられた．また，この過剰の鉄が虚血後の慢性的な神経細胞障害に関与することも示唆される．

〔目的〕ラット一過性脳虚血モデルでは虚血に対し脆弱な部位に遅発性神経細胞壊死が認められる[2]．一方，鉄は脳内のフリーラジカル発生を介し細胞傷害的に働くと考えられている[3,6]．一過性脳虚血後慢性期の大脳皮質神経細胞に組織学的変化がみられない時期から細胞内に鉄沈着が認められることを報告したが，今回さらに脳内ferritin，transferrin (Tf)，transferrin receptor (Tf-R) およびグリア細胞 (astrocyte，microglia) の一過性脳虚血後慢性期の変化について検討した．

〔方法〕9週齢の雄性Wistar系ラットを用いて，Pulsinelli and Brierleyの方法[4]に従い4動脈閉塞モデルを作成し30分間の脳虚血負荷後，血流を再開した．脳虚血再灌流後1，2，4，8，24週にNembutal麻酔下で左心室より4% paraformaldehydeを灌流して固定した脳を取り出し (n=4～5)，同液中でさらに後固定．cryostatにて20μmの脳凍結切片を作成した．

鉄染色．切片を脱イオン蒸留水にて十分に洗浄，1% potassium ferrocyanide－1% HCl溶液中で30分間反応させた後 (Perls' 反応)，0.5% 3，3'-diaminobenzidine (DAB) ／0.1M PB (pH7.4) にfinal 0.005% H_2O_2を加えた溶液とincubateしPerls' 反応を増感した[1]．

免疫組織化学．抗ferritin抗体，抗Tf抗体，抗Tf-R抗体，astrocyteのglial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する抗GFAP抗体，microgliaのC3bi receptorを認識する抗体MRC OX-42[5]を用い，Avidin Biotin peroxidase Complex (ABC) 法による免疫組織化学染色を行った．抗原の可視化にはDABまたはnickel-DABを用いた．

〔成績〕虚血再灌流4週以後に神経細胞壊死に陥った海馬CA1領域に著明な鉄沈着が認められ (Fig. 1A)，虚血後24週では鉄は比較的大きな塊状で散在していた (Fig. 1C)．また，同部位にはastrocyteとOX-42陽性microgliaが虚血後1週で出現していた．OX-42陽性microgliaは海馬CA1以外にも海馬CA3，大脳皮質に広範に観察されたが，その発現は1週以降徐々に減弱していった．大脳皮質第V層の錐体細胞内には，虚血後8週以降よりドット状の鉄の沈着が認められた (Fig. 2)．虚血後8週には第IIIからV層にかけてferritin陽性のastrocyteと異なる細胞が強く発現していた (Fig. 3)．Tfは脈絡叢に，Tf-Rは脈絡叢と血管内皮に，虚血群，sham ope群とも同様に分布しており，時間的変化もみられなかった．

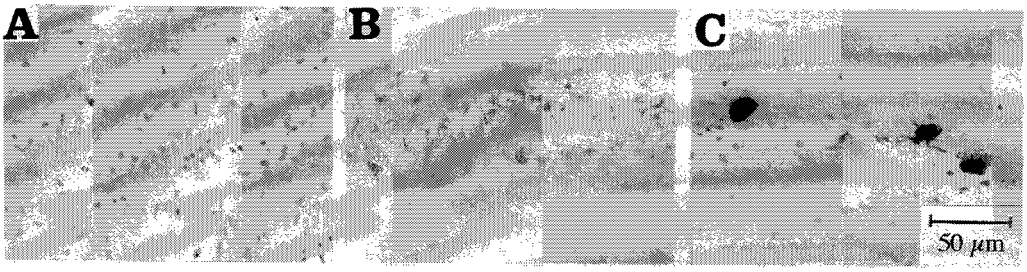


Fig. 1. 海馬 CA1 の鉄染色. 虚血後 2 週 (A), 8 週 (B), 24 週 (C).

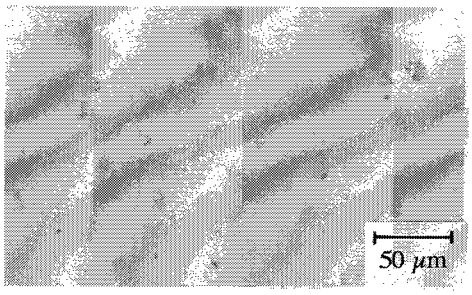


Fig. 2. 鉄染色による大脳皮質第 V 層錐体細胞, 虚血後 24 週.

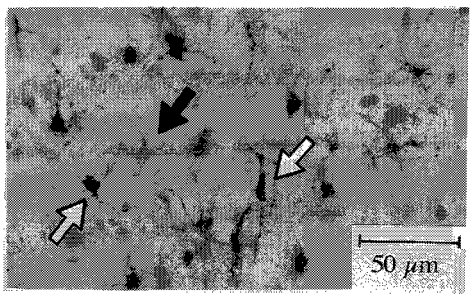


Fig. 3. GFAP positive astrocyte (arrows) および ferritin positive cells (open arrows) の二重染色像. 虚血後 8 週の大脳皮質.

[考察] ラットの一過性脳虚血による遅発性神経細胞壊死は海馬 CA1 領域に顕著であり, 同部位では虚血後早期から活性化された astrocyte と OX-42 陽性 microglia が出現していた. さらに鉄が海馬 CA1 に沈着していた虚血後 4 週以降には astrocyte は強く活性化されており, microglia には ferritin 陽性のものも存在していたが, これは, 神経細胞壊死に陥った部位にグリオーシスが進行するのと同時に, 神経細胞壊死の結果生じた老廃物としての鉄が処理されていると考えられた. 大脳皮質の錐体細胞も虚血に対して脆弱な部位として知られるが[2], 今回の実験では大脳皮質錐体細胞に形態的な変化はみられなかった. しかし, 機能的に障害されているとすれば, 鉄が利用されなくなり, 結果として錐体細胞に過剰の鉄が沈着する可能性がある. 虚血後 8 週に大脳皮質第 III から V 層にかけてみられた ferritin 陽性細胞の強い発現は, 大脳皮質で鉄が過剰な状態にあることを示唆すると考えられた. また, この時期に astrocyte の増加を伴っていないことからも, 大脳皮質における鉄の発生機序は, グリオーシスと関連して鉄沈着がみられる海馬のそれとは異なっていると思われる. そして, 鉄がフリーラジカルを介した神経細胞障害に関与することを考えると[3, 6], この過剰の鉄は観察期間以降のさらに慢性期の神経細胞障害を起こし得るであろう. Tf および Tf-R は脈絡叢や血管内皮に分布していたが, 特異的な変化は示さなかったことから, 少なくとも脳虚血慢性期の鉄沈着には末梢循環からの鉄の吸収は関与しないものと考えられた.

[文献]

(1) Hill, H. A. and Switzer, R. C. (1984) Neuroscience, 11: 595–603.
(2) Kirino, T., Tamura, A. and Sano, K. (1984) Acta. Neuropathol(Berl), 64: 139–147.
(3) Krause, G. S., White, B. C. Aust, S. D., et al. (1988) Crit. Care. Med., 16: 714–720.
(4) Pulsinelli, W. A. and Brierley, J. B. (1979) Stroke, 10: 267–272.
(5) Robinson, A. P., White, T. M. and Masson, D. W. (1986) Immunology, 57: 239–247.
(6) Siesjö, B. K., Bendek, G., Koide, T., et al. (1985) J. Cereb. Blood. Flow. Metab., 5: 253–258.

145 低酸素低グルコース処理による培養海馬アストロサイトからの興奮性アミノ酸放出のメカニズム

尾形 直則*# 中村 洋一* 辻 浩司*# 片岡 喜由*
（愛媛大学医学部 第一生理* 整形外科#）

〔要約〕低酸素低グルコース処理により引き起こされる培養海馬アストロサイトからの興奮性アミノ酸放出のメカニズムを明らかにするために、アストロサイトに様々な条件を負荷した時の興奮性アミノ酸の放出パタンを比較検討した。低酸素低グルコース処理による興奮性アミノ酸の放出ではアスパラギン酸とグルタミン酸がほぼ同じ程度放出されるのに対し、高カリウム (100 mM) や NaCN (5 mM) による放出ではグルタミン酸がアスパラギン酸の 5-6 倍であった。一方解糖系を抑制する iodoacetate (5 mM) を添加するとアスパラギン酸の著明な放出が観察された。低酸素低グルコース処理においては解糖系が抑制され、細胞内のアスパラギン酸含有量が増加し、さらにATP量の減少や細胞膜の脱分極による興奮性アミノ酸の取り込み阻害により、細胞内のアミノ酸漏出が放出として観察されるものと考えられる。

虚血性神経細胞死のメカニズムは未だ完全には解明されていないが、近年の研究により細胞外液中のグルタミン酸、アスパラギン酸などの興奮性アミノ酸濃度の急速な上昇とそれに引き続く神経細胞内カルシウム濃度の上昇が重要な役割を演じていると考えられている。この興奮性アミノ酸は主に神経終末部より放出されると考えられてきたが、我々は培養海馬アストロサイトに in vitro の虚血として低酸素低グルコース条件を負荷することによっても興奮性アミノ酸の放出が起こることを見い出した (1)。さらに注目すべきことにアストロサイトではグルタミン酸の細胞内含有量がアスパラギン酸のそれに比べ約5倍であるにも関わらず、虚血により放出されたアスパラギン酸の量はグルタミン酸の量に匹敵した。今回の研究ではこの現象を説明するために培養海馬アストロサイトに低酸素低グルコース処理以外の様々な刺激を加え、その時のアミノ酸放出パタンを比較検討した。

[実験方法]

細胞培養：妊娠19日ラット胎児海馬をトリプシン処理により解離し、5% FCS / 10% horse serum / DMEM 中で培養し、2回の継代により神経細胞を除去した後、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。この方法によって得られた細胞の約80%が抗 GFAP 抗体に陽性であった。

細胞灌流：カバースリップ上に培養した細胞を normal medium (5.5 mM グルコースを含む Hepes-buffered Krebs Ringer solution (HKR)) で 37℃,1時間 preincubate した後、Fig.1 に示すような perfusion chamber にセットした。37℃に保温されたperfusion medium がinlet tube より送り込まれ、outlet tube より出てきた medium は sample として採取された。perfusion rate はhigh-K treatment（70 μl/min）を除き 200 μl/min とした。各種処理は perfusion medium を normal より各々の treatment medium に切り替えることでなされた。

アミノ酸測定：採取された sample は遠心により細胞断片などを取り除かれた後2分間同量のOPA液（37 mM o-phthalaldehyde, 72 mM 2-mercaptoethanol, 0.36 M K-borate(pH 10.4)）と反応後、CMA-200 autosampler (BMA,Sweden) を用いてHPLC system に inject した。逆相カラム(Cosmosil $5C_{18}$-AR, 4.6 x 150 mm; Nakarai Tesque, Kyoto) のクロマトグラフィーはLKB-2249 gradient pump (Sweden) を用いて1 ml/min, 30℃で20分間に methanol / 50 mM Na-phosphate(pH 6.0), 1% tetrahydrofuran の量比を 25/75 から 70/30 まで変化させて行った。蛍光は 12 μl flow cell を用い、360 nm (excitation) ,450 nm (emission) をF-2000蛍光光度計 (Hitachi) でモニターした。測定感度はグルタミン酸、アスパラギン酸で、約 50 fmol であった。結果は細胞蛋白量 (Bradford の方法により測定) あたりのアミノ酸放出量として示した。

[結果及び考察]

低酸素低グルコース処理 (perfusion medium を 95% N_2/5% CO_2 でバブリングした glucose-free HKR に変える)では速やかにアスパラギン酸、グルタミン酸の放出が見られ、アスパラギン酸は放出の pre-treatment level 及び細胞内の endogenous な含有量(1)がグルタミン酸に比べそれぞれ 1/3, 1/6 と低いにもかかわらず、ピーク時の放出量はグルタミン酸と同じレベルまで上がった。さらにこの放出は可逆性であり、perfusion medium を normal medium に戻すと処理前のレベルまで下がった(Fig. 2)。一方、高カリウム処理 (perfusion medium を 100 mM の NaCl を 100 mM の KCl で置き換えた HKR に変える) で放出される興奮性アミノ酸のパタンはピーク時にアスパラギン酸もグルタミン酸もそれぞれの pre-treatment level の 5-6 倍まで上がるというものであった(Fig. 3)。生理的条件下ではアストロサイトはNaのグラジエントを利用したトランスポーターを使って興奮性アミノ酸を取り込んでいる。この機構はグルタミン酸とアスパラギン酸を区別しないので、もしこの取り込み機構が阻害されると細胞から漏出した興奮性アミノ酸が取り込まれずに放出として観察されることになり、この場合放出量は細胞内の含有量あるいは処理前の自然漏出量を反映すると考えられる。高カリウム処理では細胞膜が脱分極することにより、この取り込み機構が阻害された結果興奮性アミノ酸が放出されたと考えられる。これに対して低酸素低グルコースによる興奮性アミノ酸放出のパタンは明らかに違う。我々は更に低酸素のみあるいは低グルコースのみの影響について検討した。低酸素処理 (perfusion medium を 95% N_2/5% CO_2 でバブリングした HKR に変える) のみでは興奮性アミノ酸の放出は観察されなかったので化学的低酸素処理として perfusion medium に 5mM

の NaCN を加えるとFig. 4 の如く高カリウムの場合に似たパターンの興奮性アミノ酸放出が見られた。ここではNaCNによるATPの低下が細胞内からのNa の汲み出し能力を低下させ、その結果としてNa 依存性の興奮性アミノ酸取り込み能力が低下したものと考えられた。続いて低グルコース処理(perfusion medium を glucose-free HKR に変える)も試みたが有意な興奮性アミノ酸の放出は見られなかった。グリア細胞は細胞内に多量のグリコーゲンを持っており、糖新生によってグルコースを作り出すことができる。そこで化学的低グルコース処理として解糖系を阻害する iodoacetate を 5 mM の濃度で投与してみた。すると比較的遅い反応ではあるが、グルタミン酸を遥かに凌駕する量のアスパラギン酸の放出が観察された(Fig. 5)。この現象は細胞内での metabolic な変化で説明し得る。すなわち、解糖系が高度に抑制された時、TCAcycle への acetyl-CoA の供給が減少し、それは、α-ketoglutarate の減少と、一方では oxaloacetate の増加を引き起こし、ATP 産生ができなくなる。そこで細胞内に多量にあるグルタミン酸と増加した oxaloacetate より aspartate aminotransferase によって α-ketoglutarate とアスパラギン酸ができる。このようにしてグルタミン酸を利用して α-ketoglutarate を供給すれば TCAcycle の一部を利用してATPの産生を行うことが可能となる。しかしその結果としてアスパラギン酸が多量に産生されてしまうのである。

以上のことを考え併せると、虚血条件負荷によりアストロサイト内のアスパラギン酸濃度が上昇，一方平行して細胞内エネルギー供給の低下と細胞膜の脱分極が起こり、それが興奮性アミノ酸の取り込み阻害を引き起こすことによって細胞内アミノ酸の漏出が放出として観察されるという機序が考えられる。

（注1）グラフの各点は全て平均値±標準偏差 (n=4)を示す。
（注2）それぞれの実験の pre-treatment level に対する各点の有意差の検定は one-way ANOVA ,Scheffe multiple comparison procedure で行った。(*P < 0.05, **P < 0.01)

[参考文献]

(1) Ogata T., Nakamura Y., Shibata T., and Kataoka K. (1992) J. Neurochem. **58**, 1957-1959.

Fig. 1 Perfusion chamber

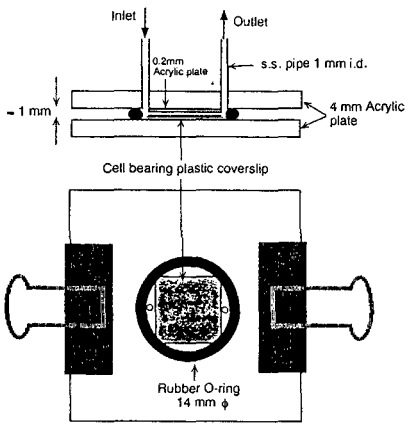


Fig. 2 低酸素低グルコース処理

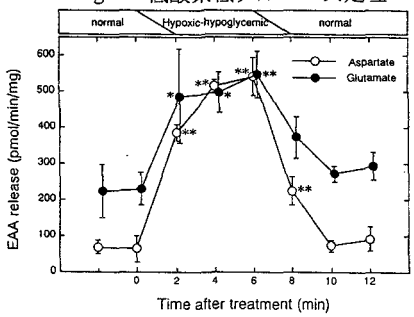


Fig. 3 高カリウム処理

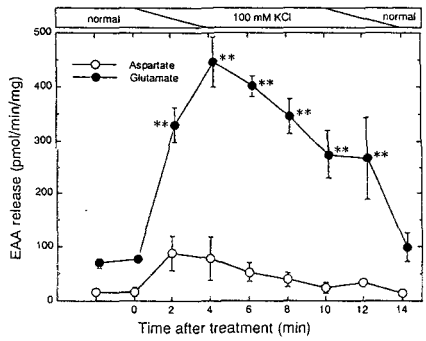


Fig. 4 NaCN 添加

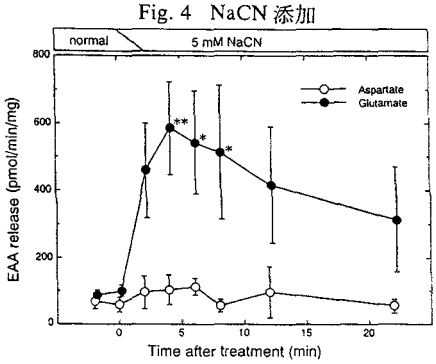
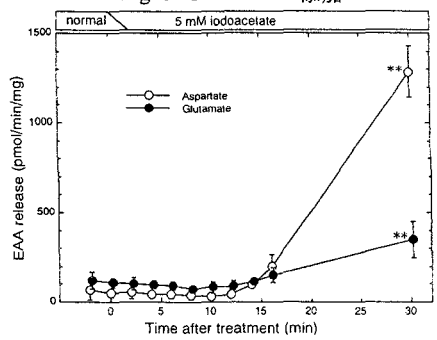


Fig. 5 Iodoacetate 添加



146 脳虚血の蛋白チロシンリン酸化に対する影響

1．pp42のチロシン残基リン酸化亢進

大槻俊輔[1]，松本昌泰[1,2]，松下幸司[1]，萬代研二[1]，北川一夫[1]。
小川 智[1]，上田周一[2]，柳原武彦[2]，鎌田武信[1]
（大阪大学医学部第一内科[1]、神経内科[2]）

〔要約〕
砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて、虚血再灌流超早期の分子量42kDaの蛋白のチロシン残基リン酸化状態(Tyr-P)を検討した。一過性前脳虚血後3分後を頂点とし、海馬及び大脳皮質に一貫して分子量42kDaの蛋白(pp42)のチロシン残基リン酸化の亢進が観察された。このpp42はmicrotubule-associated protein kinase(MAP Kinase)とcomigrateすることが観察され、脳虚血に対する神経細胞の細胞応答現象にsecond messengerとしてチロシン残基リン酸化MAP kinaseが関わる可能性が示唆された。

【目的】神経細胞は虚血負荷に対し、c-fosやhsp72のmessenger RNA誘導等の細胞応答を発現する(7,9)。しかし、脳虚血負荷が如何なるシグナルで核内へ情報伝達を行なっているかは全く不明である。今回、砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて(3)、虚血再灌流早期の分子量42kDaの蛋白のチロシン残基リン酸化状態(Tyr-P)を検討した

【方法】成熟砂ネズミを対象とした。虚血は、軽エーテル麻酔下に頸部正中切開後、両側総頸動脈を剥離、麻酔覚醒後杉田型クリップで閉塞して作成した。偽手術は両側総頸動脈を剥離のみ行なった(4)。(A)5分虚血負荷後、再灌流0,3,15,60分に断頭屠殺し、海馬を摘出した(各N=4)。(B)偽手術，2，5，10分虚血負荷-再灌流3分時に，海馬と大脳皮質を摘出した(各N=4)。(A),(B)の検体は2%SDS含有Laemmli bufferでhomogenazeし、電気泳動後(6)、gel銀染色、および 抗phosphotyrosine(P-Tyr)抗体を用いたimmunoblottingに供し、Tyr-P蛋白を検出した。(C)偽手術，もしくは5分虚血再灌流3分の海馬蛋白を1%NP-40で可溶化し、過剰量の抗P-Tyr抗体または抗microtubule-associated protein kinase (MAPK)抗体を反応させProtein A-Sepharoseを用い免疫沈降した(2)。各々の蛋白を電気泳動で分離し、転写後抗MAPK抗体でMAPKを検出した。

【結果】(A) 5分虚血後、3分をpeakとして分子量42kDaの蛋白(pp42)のみTyr-Pが亢進し(densitometer上、コントロールに比し3.4±0.7倍)、虚血15分以降ではコントロール値に復していた。銀染色上このpp42の蛋白量は増減を認めなかった（図1）。(B) 偽手術群に比し、2,5,10分虚血後、海馬,大脳皮質とも一貫してpp42のTyr-Pが亢進した（図2、3）。(C)分子量42kDaのMAPK蛋白量は虚血前後で変化を示さなかった。一方、抗P-Tyr抗体で免疫沈降された蛋白のうち、Tyr-Pが増加したpp42はMAPK抗体で交差検出され、MAPKのTyr-Pが亢進したと考えられた（図4）。

【結論】一過性前脳虚血後早期に、一貫して分子量42kDaの蛋白(MAP kinase)のチロシン残基リン酸化の亢進が観察された。MAP Kinaseは自己チロシン残基リン酸化により活性化され、細胞内の多様な基質をリン酸化しその活性を調節することにより、さまざまな生命現象における細胞内情報伝達経路に大きな役割を果たしているが(1,5,8)、脳虚血に対する神経細胞の細胞応答現象にsecond messengerとしてチロシン 残基リン酸化MAP kinaseが関わる可能性が示唆された。

【文献】

(1) Banding H. et al. Science 253;1991:913

(2) Baraban JM et al. J Neurochem 60;1993:330-336

(3) Kirino T. Brain Res 239;1982:57-69

(4) Kitagawa K. et al. Neuroscience 31;1989:401-411

(5) Kosako H. et al. EMBO J 12;1993:787-794

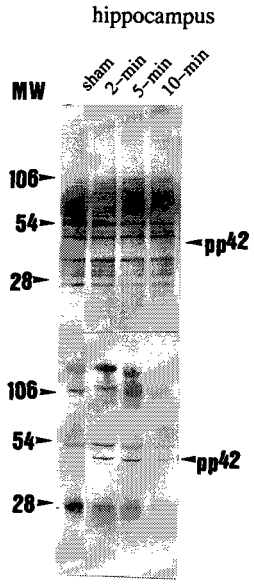
(6) Laemmli UK. Nature 227;1970:680-685

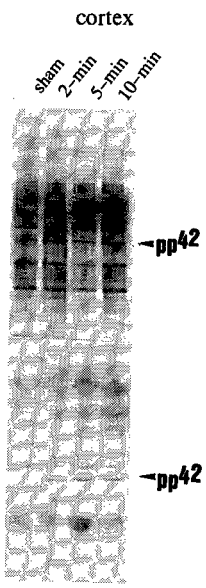
(7) Nowak TS Jr. J Cerebr Blood Flow Metab 11;1991:432-439

(8) Thomas G. Cell 68;1992:3-6

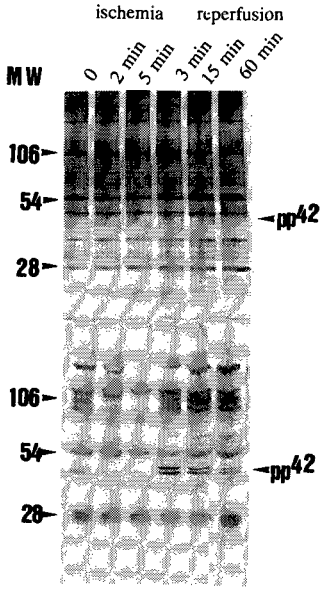
(9) Welsh FA. et al. J Cerebr Blood Flow Metab 12;1992:204-212

【図２】虚血後3分の海馬pp42のチロシンリン酸化の動態（下）と蛋白銀染色（上）



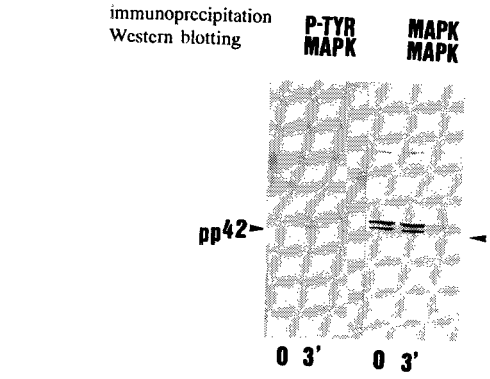


【図３】虚血後3分の大脳皮質pp42のチロシンリン酸化の動態（下）と蛋白銀染色（上）



【図１】5分虚血後の海馬pp42のチロシンリン酸化の動態（下）と蛋白銀染色（上）

【図４】虚血後海馬の免疫沈降蛋白のMAP kinaseのimmunoblotting



147 脳虚血の蛋白チロシンリン酸化に対する影響

2.遅発性神経細胞壊死との関わり

大槻俊輔[1]，松本昌泰[1・2]，松下幸司[1]，萬代研二[1]，北川一夫[1]，
小川 智[1]，上田周一[2]，柳原武彦[2]，鎌田武信[1]
（大阪大学医学部第一内科[1]、神経内科[2]）

〔要約〕 砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用い、遅発性神経細胞壊死の病態生理に蛋白チロシンリン酸化(P-Tyr)が関与するか否か検討した。海馬において遅発性神経細胞壊死を生ずるのに十分な5分以上の虚血が負荷された時、海馬神経細胞内の特定の蛋白のP-Tyr増加とTyrosine kinase活性亢進が観察された。虚血負荷後、海馬において遅発性に神経細胞が死に経るプロセスに特定蛋白のチロシンリン酸化による細胞内情報伝達機序が強く関わる事が示唆された。

【目的】蛋白のチロシン残基リン酸化はさまざまの外界からの刺激をsecond messengerとして細胞内へ情報伝達し、細胞の癌化、増殖、分化に重要な役割を果たしている(1,2,3,4)。今回、砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用い、5分以上の虚血後に海馬に限局して生じる遅発性神経細胞壊死(5)に蛋白チロシンリン酸化(P-Tyr)が関与するか否か、またその調整因子であるTyrosine kinaseとProtein tyrosine phosphatase活性の虚血後の変化を検討した。【方法】成熟砂ネズミを対象とした。軽エーテル麻酔下両側総頸動脈を剥離、麻酔覚醒後clippingする事により一過性前脳虚血を作成した(7)。偽手術は両側総頸動脈を剥離のみ行なった。**(A)** 5分虚血後，3，6，8，12時間，1，2，4，7日に断頭、海馬を摘出した。**(B)**偽手術，2，5，10分虚血8時間後、海馬と大脳皮質を摘出した。また予め2分，または5分虚血を負荷し4日後に5分虚血を負荷し、8時間後に海馬を摘出した(6,7)。(A),(B)の検体はLaemmli bufferで可溶化，電気泳動に供し(8)、抗phosphotyrosine抗体を用いたimmunoblottingを行い，P-Tyr蛋白を検出した。**(C)**偽手術または5分虚血再灌流8時間時、ザンボニ液で灌流固定、薄切後抗 P-Tyr抗体を用いた免疫組織化学を施行した。**(D)**偽手術または5分虚血8時間後、海馬及び大脳皮質をRIPA bufferでhomogenateし、poly(GluNa,Tyr)のチロシンリン酸化よりTyrosine kinase(TK)活性(10)を，phosphotyrosineの脱リン酸化力よりTyrosine phosphatase(PTP)活性(9)を測定した。

【結果】**(A)** 5分虚血後8時間を頂点とし3～24時間にかけて分子量160，115，102，92，85kDaの蛋白のP-Tyrが増加した（図１）。**(B)** この増加は、5分,10分虚血後の海馬においてのみ観察され（図２）、皮質では認めなかった（図３）。また予め2分虚血で虚血耐性を獲得した海馬(6,7)および5分虚血で海馬CA1錐体細胞を予め壊死を起すと(7)、本来虚血後観察されるべきのP-Tyr亢進は観察されなかった（図２）。**(C)**虚血後海馬錐体細胞の細胞体とpresynaptic terminalのP-Tyr染色性が増加した。偽手術群では染色性の変化は無かった（図３）。**(D)** 虚血後TK活性は海馬では非虚血群に比し1.7倍に増加したが、皮質では変化しなっかた。PTP活性は海馬,大脳皮質とも虚血により変動しなかった。

【結論】海馬において遅発性神経細胞壊死を生ずるのに十分な虚血が負荷された時、神経細胞の特定の蛋白のP-Tyr増加とTK活性亢進が観察された。虚血負荷後、遅発性に神経細胞が死に至るプロセスに蛋白チロシン

リン酸化による細胞内情報伝達機序が強く関わる事が示唆された。

【文献】

(1) Bishop JM. Cell 64;1991:235-248

(2) Cantley LC. et al. Cell 64;1991:281-302

(3) Hunter T. Cell 50;1987:823-829

(4) Hunter T. Ann Rev Biochem 54;1985:897-930

(5) Kirino T. Brain Res 239;1982:57-69

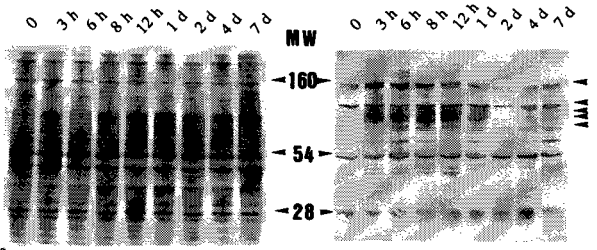
(6) Kirino T. et al. J Cerebr Blood Flow Metab 11;1991:299-307

(7) Kitagawa K. et al. Brain Res 561;1991: 203-211

(8) Laemmli UK. Nature 227;1970:680-685

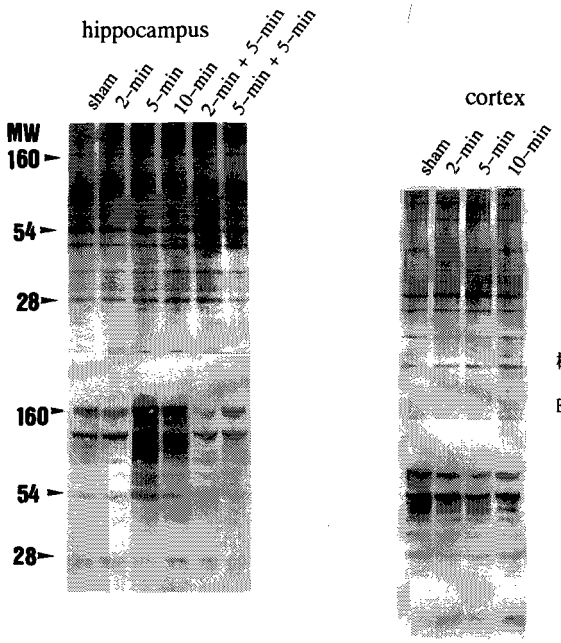
(9) Maher PA. J Cell Biol 112;1991:955-963

(10) Rijksen G. et al. Anal Biochem 182;1989:98-102

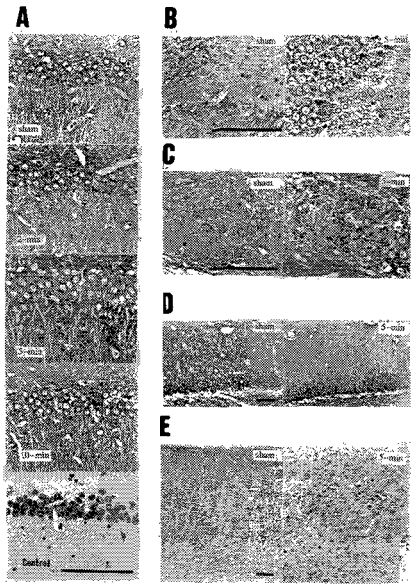


【図１】B:5分虚血後の海馬蛋白チロシンリン酸化(P-Tyr)の経時的変化　3～24時間にかけて分子量160，115，102，92，85kDaの蛋白のP-Tyrが増加した。A: 電気泳動後ゲルの銀染色、蛋白量の変化は認めない。

【図２】虚血後8時間の海馬蛋白チロシンリン酸化(P-Tyr)の亢進の虚血時間による影響



【図３】虚血後8時間の大脳皮質蛋白チロシンリン酸化(P-Tyr)の亢進の虚血時間による影響



【図４】免疫組織化学によるチロシンリン酸化蛋白の検出A;海馬CA1，B;海馬CA3，C;海馬CA4，D;海馬歯状回、E;大脳皮質

148 脳虚血の蛋白チロシンリン酸化への影響

3．pp60^{c-src}のチロシンキナーゼ活性の遅発性神経細胞壊死への関与

大槻俊輔[1]，松本昌泰[1,2]，松下幸司[1]，萬代研二[1]，北川一夫[1]。
小川 智[1]，上田周一[2]，柳原武彦[2]，鎌田武信[1]
（大阪大学医学部第一内科[1]、神経内科[2]）

〔要約〕

Protooncogene pp60^{c-src} (Src)のチロシンキナーゼ (TK)は一過性前脳虚血後活性化され、特定脳内蛋白のチロシン残基リン酸化の亢進を誘導した。さらにSrcのTK活性の特異的阻害剤であるradicicolは、脳虚血後の遅発性神経細胞壊死に対して著明な保護効果を認めた。虚血後の神経細胞死の病態生理にSrc-TK活性化および脳内蛋白の関与する事が示唆された。

【目的】protooncogene pp60^{c-src}(Src)は脳に豊富に存在し(1,2)、チロシンキナーゼ(TK)活性を有し、シナプス機能や細胞内情報伝達機能に深く関わっていると言われている(3,4)。今回、SrcのTKの特異的阻害剤であるradicicolを用い(5,6)、砂ネズミ一過性前脳虚血モデルにおける遅発性神経細胞壊死(7)の病態生理に Src-TK活性化および蛋白チロシン残基リン酸化の亢進が関与するか否か検討した。

【方法】成熟雄性砂ネズミ（体重60-80g）を対象とした。虚血は両側総頸動脈を軽エーテル麻酔下で剥離、麻酔覚醒後クリップで5分間閉塞することにより負荷した(8)。体温は直腸温を測定し、虚血中は37.0℃に維持、再灌流後2時間まではモニターした。偽手術は両側総頸動脈を剥離のみ行った(N=4)。虚血3分後に radicicol 0, 2, 5, 10mg/kg体重を腹腔内投与した(各N=4)。**(A)**虚血後7日後に断頭、摘出脳を95%エタノール+5%酢酸固定(4℃ 4時間)、パラフィン包埋した。薄切後cresyl-violet染色に供し，海馬CA1領域1mm当りの生存錐体細胞数(neuronal density)を測定した(8)。**(B)**虚血8時間後に海馬を摘出し、2%SDS含有Laemmli bufferで可溶化、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、抗リン酸化チロシン抗体を用いたimmunoblottingを施行し、蛋白チロシンリン酸化状態(P-Tyr)を検出した(9)。**(C)**虚血8時間後の海馬を1%Triton含有RIPA bufferでhomogenate後、十分量の抗pp60^{c-src}抗体で免疫沈降し、基質としてのenolaseのチロシンリン酸化力よりTKを測定した(10)。

【結果】**(A)**偽手術群は神経細胞壊死を認めなかった(neuronal density; 228±5/mm, mean±SD)。radicicol 0, 2, 5, 10mg/kg投与により、neuronal densityは各々8±4, 12±7, 25±25, 143±20/mmと量依存性に虚血に対する神経細胞の保護効果の増強が観察された($p<0.01$, ANOVA & Scheffe型多群比較)。なお体温は虚血後各群増加したが、投与量による差は認めなかった（図１）。**(B)**虚血後分子量160, 115, 102, 92, 85kDaの蛋白のP-Tyrが亢進したが、radicicol投与量依存性に分子量102, 85kDaの蛋白のP-Tyrが軽減した（図２）。**(C)**また、5分虚血後SrcのTK活性が増加したが、radicicol投与により量依存性の抑制が観察された（図３）。

【考察】radicicolは虚血後のSrcのTK活性化を抑制し、蛋白P-Tyrの増加を阻害した。また5分虚血後の海馬CA1領域の神経細胞壊死に対して、radicicolが著明な保護効果を示した。脳虚血後のradicicol投与が有用性から、遅発性の虚血性神経細胞障害プロセスにSrcのTK活性化および特定蛋白のP-Tyrが深く関わることが示唆された。

【文献】

(1) Nature 316(1985)554

(2) Proc Natl Acad Sci USA 85(1998)3348

(3) Ann Rev Biochem 54(1985)897

(4) Science 253(1991)912

(5) Nature 171(1953)344

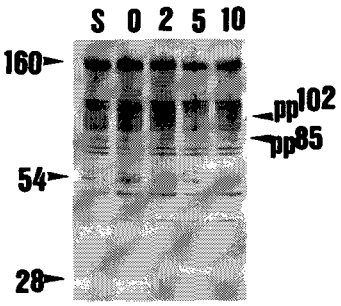
(6) Cancer Res 52(1992)6926

(7) Brain Res 239(1982)57

(8) Brain Res 599(1992)246

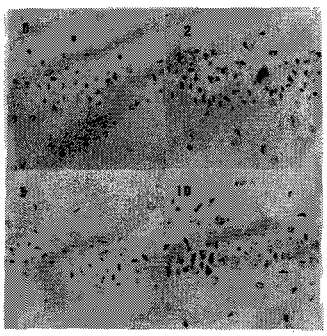
(9) Mol Cell Biol 84(1989)3035

(10) Proc Natl Acad Sci USA 84(1988)3035



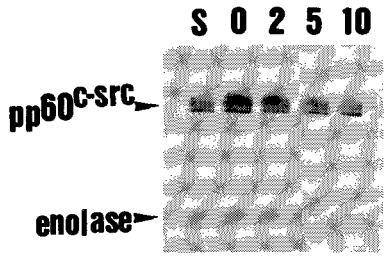
【図２】Radicicolの海馬蛋白チロシン残基リン酸化に対する効果

虚血後pp102, pp85のチロシンリン酸化が亢進しているが(lane 0)、radicicol投与によりリン酸化が減少している(lane 2,5,10;各数値 mg/kg投与量に相当)。



【図１】Radicicolの海馬CA1領域の遅発性神経細胞壊死に対する効果

Radicicol 0 mg/kg i.p.投与ではほとんどの神経細胞が壊死をきたしたが、2, 5, 10mg/kg投与により量依存性に神経細胞の保護効果が認められた。



【図３】Radicicolの海馬pp60c-src活性に対する効果

虚血後pp60c-srcによるenolaseのチロシン残基リン酸化力(tyrosine kinase)が亢進したが(lane 0), radicicol投与により量依存性に抑制された(lane 2, 5, 10)。

149 弁別学習の遂行に伴うラット中隔ドーパミン代謝の亢進

堀 耕治，山室 裕，田中淳一*，野村正彦
（埼玉医科大学・第一生理，鳴門教育大学・人間形成基礎講座*）

〔要約〕
中隔は，記憶・学習に密接な関係を持つ海馬にコリン作動性神経を投射する一方，脳幹その他からモノアミン作動性神経の投射を受けている（1,4）．電気生理学的所見などから，これら中隔へのモノアミン作動性入力は中隔—海馬コリン作動系の調節に与っていることが示唆されている（3,5）．今回われわれは弁別学習課題遂行中のラットの中隔において，in vivo dialysis法によりドーパミン（DA）とその代謝物を測定した．その結果，課題遂行時に，DAの代謝物である3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)とhomovanillic acid (HVA)の細胞外レベルが基底値から有意に上昇し，中隔におけるDA代謝が課題遂行により亢進することが示された．このことから，弁別課題の遂行に中隔へのDA入力が関与することが示唆された．

中隔に入力するDA系の学習行動への関与を調べる目的で，学習課題遂行時のラット中隔におけるDA代謝を検討した．DAおよびその代謝物の定量には脳内微小透析（in vivo microdialysis）法を適用した．

［方法］

10個体のFischer344系雄ラットを用いた（訓練開始時12週齢）．実験期間中の体重は自由摂食時の85％に統制した．

訓練には前面パネルの反応レバー直上に3個のランプ（24V DC）を配置したオペラント箱（30×25×31cm）を用い，45mg餌ペレットを強化子（報酬）とした．

レバー押し反応を形成した後，ランプの点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おこなった（2）．ランプ点灯（S+）下の反応はVI 15-sスケジュールで間欠的に餌強化し，ランプ消灯（S-）下の反応は無強化とした．1日の訓練は40試行（1試行は20 s）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．

30セッション（30日間）の訓練後，内側中隔領域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12時間以上灌流後，ラットをオペラント箱に入れた状態で透析をおこなった（流速2 μl/min）．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試料は学習訓練下で採取し，前後各3試料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採取した．透析液中のDA，DOPAC，HVAは，電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフによりただちに定量した．なお透析プローブの刺入部位は，実験終了後ホルマリン灌流をおこない脳を摘出し組織標本を作成して確認した．これにより標的部位への刺入が確認された7個体についてデータを分析した．

［結果と考察］

訓練過程における反応数の推移をFig. 1に示す．訓練の進行につれてR+（S+下の反応）とR-（S-下の反応）は明瞭に分化した．訓練終了時点における正反応率（総反応数に占めるS+下の反応数の百分率）は74.6±4.0％であった．Fig. 2にはDA，DOPAC，HVAの経時変化を，課題遂行前3試料の平均を基底値としてこれに対する百分率の形で示した．DAには有意な変化がなかったが［$F(8,48)=1.8, p>.05$］，DOPACとHVAには訓練セッションの開始によって含量が増加し，セッション終了後徐々に減少するという変化が見られた［DOPAC：$F(8,48)=22.6, p<.0001$；HVA：$F(8,48)=28.953, p<.0001$］．以上の結果から，今回の弁別課題の遂行によって中隔のDA代謝が亢進することが示され，中隔におけるDA作動系入力の弁別学習への関与が推察された．

［文献］

1) Amaral, D.G. & Kurtz, J. (1985) J. Comp. Neurol., 240, 37-59.
2) Hori, K., Tanaka, J. & Nomura, M. (in press) Brain Res.

3) Kramis, R. & Vanderwolf, C.H. (1980) Brain Res., 192, 383-398.
4) Lindvall, O. & Stenevi, U. (1978) Cell Tissue Res., 190, 383-405.
5) Robinson, T.E. & Vanderwolf, C.H. (1978) Exp. Neurol., 61, 485-515.

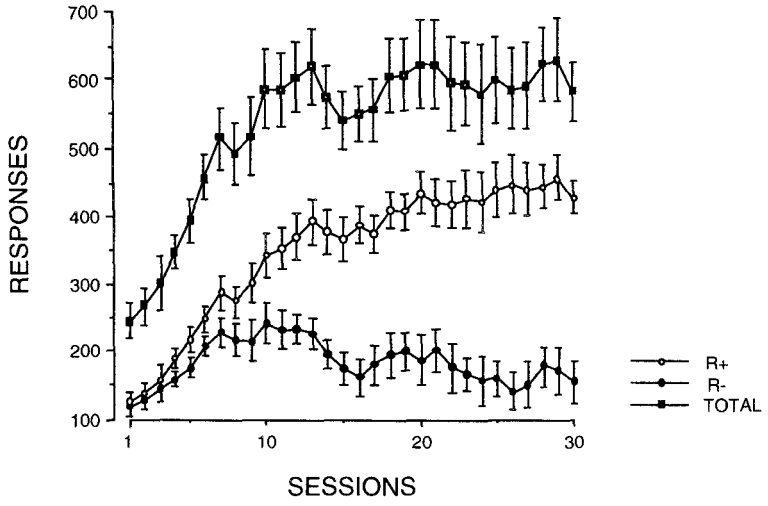


Fig. 1. Responses plotted against sessions. Each point represents the mean ± SEM.

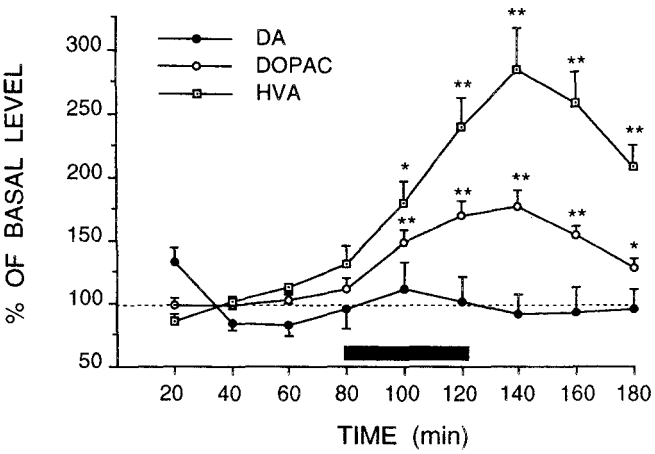


Fig. 2. Concentrations of DA, DOPAC and HVA. Dashed line represents basal level. Horizontal bar indicates samples obtained during learning session. * $p<.05$, ** $p<.01$ vs basal level.

150 大脳皮質体性感覚野におけるLTPに伴うCam Kinase IIの消長

山口知子[1]・川上順子[2]・宮田麻理子[2]
（東女医大・生化[1]、第二生理[2]）

〔要約〕

ネコの視床後外側腹側核(VPL)にテタヌス刺激を与えて大脳二次体性感覚野(SII)のField potential(FP)で刺激側にLTP（110－170%の増大で90分－5時間持続）を記録した。一次感覚野(SI)はLTP誘導率がSIIに比較して低かった（SII：16例中16例、SI：6例中2例）（3）。これら大脳皮質体性感覚野の組織をLTP10分後と60分後に摘出し、直ちに液体窒素で凍結した組織についてCaMキナーゼII(CaMK II)の活性をSyntide 2を基質に測定した。LTP10分後、SIIにおけるCaMK IIの活性は3例中2例の刺激側で上昇が認められた。内在基質のリン酸化をオートラジオグラムで調べたところ、膜画分の80 kDaおよび可溶画分および膜画分の60kDa および50kDaのリン酸化は対側の2－3倍に上昇していた。LTPによって刺激側のCaMK IIの活性の上昇が内在基質のリン酸化ではFPの上昇に比例した変化が観察された。

［目的］ 海馬におけるLTP誘導に関与するキナーゼとして、PKCと共にCaMキナーゼII(CaMK II) が注目されてきている(1－2、4－7）。LTPを担う分子はカルシウムの動員に始まる複雑な系の関与が想定されている。川上ら（3）はネコの体性感覚系路の視床後外側腹側核（VPL）にテタヌス刺激を与えて、第二次大脳皮質体性感覚野（S II: Secondary Somatosensory Cortex)のField PotentialでLTPを記録した。S II領域の損傷によって、触覚（材質や形態認知）の異常が起こることが知られている。VPLにテタヌス刺激を与えてS IIで記録されたLTPに伴うCaMK IIを刺激側と対照側、ならびに両側のSI、およびVPLへの低周波刺激による両側での消長を合成基質と内在基質で検討した。

［方法］

LTP刺激および記録：ネコにケタミン筋中麻酔後、大腿静脈にケタミンとドロペリドールの点滴麻酔下にて開頭し、視床後外側腹側核（VPL）にテスト刺激として0.1Hzの電気刺激を与えSecondary somatosensory cortex(SII)よりField potential(FP)を記録した。VPLに200Hz,20 pulseを10秒間隔でテタヌス刺激を与えるとFPは刺激前の110-130%に増大した。このFPの増大は90分から5時間維持された（3）。

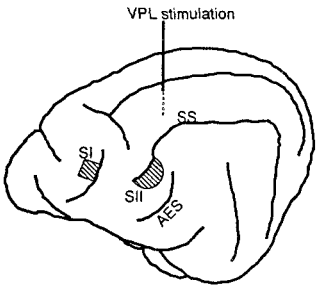
キナーゼ活性測定法：テタヌス刺激側及び対側のSI及びSIIの大脳皮質（約50mg）を10分後および60分後に切除し、液体窒素で凍結したのち－80 °Cで保存した凍結組織を2mM EGTA,10μM ロイペプチン,10nM オカダ酸,1mM PMSF,20 mM Tris-HC(pH7.2)溶液中で15%(w/v)ホモジネートをポリトロンホモジナイザーおよび超音波処理し、105,000 g 60分遠心上清を細胞質画分とし、沈渣を50mM Tris-HCl(pH7.2), 2mM EDTA,2mM EGTA,ロイペプチン(10 μl/ml),0.1% Triton X-100中でホモジナイズおよび超音波処理し、4 °Cで60分放置後再び105,000 g 60分遠心した上清を膜画分とした。Cam kinase(Cam K) IIの活性は10μM Syntide 2を基質とし、10μM PKC_{19-38} 10μM PKA_{6-22}存在下で10μM カルモジュリンおよび 1.5mM $CaCl_2$ 0.5mM EGTA, 0.5mM EDTA, 5mM $MgCl_2$, 200 μM $^{32}P(\gamma)$-ATP中で30 °C,3分インキュベートし、ホスホセルロース濾紙上（ワットマンP81)に一部をスポットし、ミリポア濾過器で75mM リン酸で充分洗浄した濾紙に吸着された放射能をカウントした。内在基質のリン酸化はSDS-PAGE(10-20% ゲル）で分離した試料のオートラジオグラムをスポットデンシトメトリーでカウントした。LTP電極挿入部位とPrimary somatosensory cortex(S I)およびSecondary somatosensory cortex(S II)を図－1に示した。

［結果］

Syntide 2のリン酸化：Cam KIIのSyntide 2のリン酸化による活性をLTP側と対側で比較した結果が図－2に示されている。LTP10分後（パネルA: Case 1-3）および60分後（パネルB:Case 4-6）のSIIにおける活性を3例で比較すると、10分後ではLTP側で3例中2例では亢進（1例は不変）していたが、60分後では少なくとも不変あるいは減少傾向が認められた。又、対照実験としてlow frequency stimulation(0.1Hz)によるSIIでの電極側と対照側での活性の変化が認められていない。

内在基質のリン酸化：SDS-PAGEによる内在基質のCam KIIによるSIIにおけるリン酸化のオートラジオグラムの例が図－3に示されている。Cam KIIによるAutophosphorylationの基質として、泳動原点にはMap 2と思われるリン酸化を始めとし、Cam KIIのαユニット（50kDa)およびβユニット（60kDa)、さらに膜画分でのシナプシン1 (80kDa)と思われるバンドのリン酸化をLTPの10

分後および６０分後で検討した。膜画分での80kDaのリン酸化はLTP側で約２倍、さらに50kDaと60kDaのリン酸化は可溶画分および膜画分でLTP１０分後には対照側の約２－３倍亢進していた。しかし、６０分後では何れのリン酸化も対照側との差は認められなかった。一方、ＳＩ においては、可溶画分および膜画分での50kDaのリン酸化がLTP１０分後で僅か電極側での亢進が認められたに過ぎなかった。



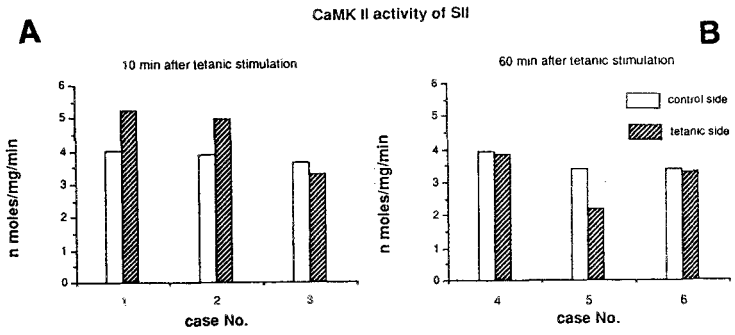
SS : suprasylvian sulcus

AES : anterior ectosylvian sulcus

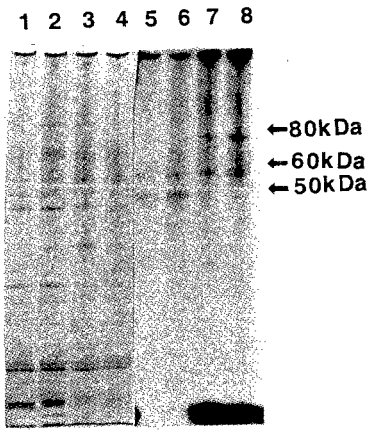
図－１：ネコLTP刺激部位ならびに大脳皮質体性感覚野

S I : Primary somatosensory cortex

S II: Secondary somatosensory cortex



図－２：大脳皮質体性感覚野(SII)におけるLTP刺激10分後（パネルA:Case 1,2,3）および60分後（パネルB:Case 4,5,6）におけるCam kinase II の消長。



図－３：大脳皮質体性感覚野(SII)におけるLTP 10分後のSDS-PAGE：タンパクパターン(1-4)およびオートラジオグラム(5-8)。対照（1,5）LTP(2,6)可溶画分,対照（3,7）LTP(4,8)膜画分。タンパク８μg/ lane。

［考察］

ネコ大脳皮質体性感覚野ＳＩＩはVPLから直接投射あるいは同側のＳＩから投射を受けており、VPLのテタヌス刺激によってＳＩＩでは100%の割合でLTPを生ずるがＳＩではLTPは起きにくい（３）。この生理現象をCam KIIで比較するとFPの差に応じた活性化の相異が観察された。LTPの観察されたＳＩＩでは１０分後に膜画分では80kDaのリン酸化の亢進、さらに可溶画分および膜画分の60kDaと50kDaのバンドのリン酸化の亢進が認められた。これらのバンドは未同定ではあるがそれぞれシナプシン１、Cam KIIのβおよびαサブユニットの自己リン酸化を観察していると思われる。Syntide 2を基質としたCam KIIの活性の両側での相異は必ずしも内在基質のリン酸化を直接反映してはおらず、高濃度の合成基質の存在する系での内在基質のリン酸化の変化はSDS-PAGE,オートラジオグラムさらにバンドは抗体を用いたウエスターンブロットによる同定が望まれる。しかし、大脳体性感覚野でのLTPの観察とCam KIIの活性化との分子相関はPKCと共にLTPとシナップスの可塑性に関する知見を提供するものと思われる。

［文献］

1. Fukunaga,K.,Soderling,T.R. and Miyamoto,E.(1992) J.Biol.Chem. 267(31),22527-22533.
2. Fukunaga,K.,Stoppini L.,Miyamoto,E. and Mulley D.(1993) J.Biol.Chem. 268(11),7863-7867.
3. Kawakami,Y. and Ashida H.(1993) Brain Res. 605,147-154.
4. Malinow R.,Schulman,H. and Tsien,R.W.(1989) Science 245,862-866.
5. Malenka,R.C.,Kauer,J.A.,Perkel,D.J.et al(1989) Nature 340,554-556.
6. Silvia,A.J.,Stevens,C.F.,Tonegawa,S. and Wang,Y.(1992) Science 257,201-206.
7. Silvia,A.J.,Payer.R.,Wehner,J.M. and Tonegawa,S.(1992) Science 257,206-211.

151　トリのインプリンティング行動の神経化学的研究

金松知幸・高原ひろみ・塚田裕三
（創価大学・生命科学研究所）

〔要約〕

トリのインプリンティング行動 (Imp. B.) 形成に関与する神経伝達物質の検索をマイクロダアイヤリシス法を用いて行った。今回、我々は Imp. B. 形成の評価がより定量的に行え、かつマイクロダアイヤリシスの実験に適した学習装置及びその方法を開発し、Imp. B.に伴う脳内 medial hyperstriatum ventrale (MHV) 部位でのアセチルコリン (Ach) 放出量の変化を検討した。Imp. B. 評価装置として回転カゴを用い、Imp. 刺激には赤色回転灯を用いた。トリの Imp. B. の評価として回転カゴの回転回数を積算計で記録した。これらの装置を用い、Imp. B. 形成率を算出し、Imp. B. 形成群と非形成群を選別した。また、*in vivo* マイクロダアイヤリシスにより、両群の脳 MHV 部位での Ach の放出量の定量を行なった。Imp. B. 形成群では Imp. 刺激提示に伴い Ach 量が増加するのが認められたが、非形成群では変化が認められなかった。このことから、トリの Imp. B. には MHV 部位で Ach 作動性シナプスが関与していることが明かとなった。

[はじめに]

アヒル、ニワトリ等の早成性鳥類のヒナに見られる Imp. B. は、孵化後の短期間内に始めて受容した刺激に対して、その後かなり恒常的に、接近、追随行動を示す現象であり、学習、記憶の原型と見なされる。Imp. B. 発現のためには、脳の medial hyperstriatum ventrale (MHV) 部位が必須であることが ^{14}C−デオキシグルコース法[1]やその他の研究[2]により確かめられており、また、MHV部位に種々の神経伝達物質の拮抗剤を投与する研究から、Imp. B. 発現にはムスカリン性コリン作動性神経やグルタミン酸作動性神経が関与している可能性が示唆されている[3]。そこで我々は、Imp. B.に伴い放出される神経伝達物質を直接定量する目的でマイクロダアイヤリシス法を用いて検索した。同時に、Imp. B. を定量的に評価すると共に、マイクロダアイヤリシスの実験が可能な学習装置を開発した。今回は、Imp. B. の評価成績と MHV 部位での Ach の動態について報告する。

[方法]

Imp. B. 形成の評価装置として、直径 40cmの回転カゴを用い、カゴがヒナドリによって 1/32回転 (約 4cmの移動) した場合に 1カウントを数えるように積算計に接続した。一方向を正のカウントとし、その反対方向を負のカウントとした。Imp. 刺激としては、直径 17cm, 高さ 14cmの赤色回転灯を回転カゴの中心より 1mの所の左右に置き、回転灯の作動状態をサイクルタイマーでコントロールした（Fig. 1）。ニワトリ（White Leghorn, line-M; SPF）卵を暗室内で孵化させ、6時間以内に室温 34℃、湿度 80%の暗室内で一方向のみの回転灯にスポットライトを当てる（25ルックス）と共に回転灯を 20分間作動させ（25〜95ルックス）、初期刺激を行った。その後の飼育は暗室内で行った。2日目、再度暗室下で 回転カゴ内に入れ 10分後に一方向の回転灯にスポットライトを当てると共に回転灯を 5分間作動させ、その後、反対方向の回転灯にスポットライトを当てると共にその回転灯を 5分間作動させた。実験終了後に 30分間、30ルックス下で水を与えた。3日目より Imp. B. の評価を行った。即ち、回転カゴの部分にスポットライトを当て（30ルックス。この時、回転灯の部分は 1〜2ルックス）、ヒナドリをそのカゴの中に10分間放置し、その後、2日目同様に回転灯とスポットライトの左右を順に作動させた。その後、30分間、30ルックス下で水と餌を与えた。同様のことを 4〜7日目まで続けた。その間、トリの成長にあわせ室温を 30℃、湿度を 75% まで下げた。評価の方法は次の式に従った。形成率(%)＝回転灯作動時（10分間）にその方向に移動したカゴの回転数／｛回転灯作動時（10分間）にその方向に移動したカゴの回転数＋回転灯非作動時（10分間）のカゴの回転数｝X 100。この値が 3日間連続して75%以上を示すものを Imp. B. 形成群とし、50%以下を非形成群とした。マイクロダアイヤリシス装置、及び Achの定量法はエイコムのシステムに従った。即ち、7日目に両群のヒナドリをエ

ーテル麻酔下で脳固定器に固定し、マイクロダアイヤリシス用のガイドカニューレ（頭蓋骨からの深さ2mm、直径0.99mm）を左側MHV部位に埋め込み、翌日学習評価を行った後にプローブ（膜長1.5mm、直径0.22mm）を挿入した。4時間後にトリを回転カゴの中（30ルックス下）に入れ マイクロダアイヤリシス装置と接続し、リンガー液を1分間に2μlの流速で灌流し、オートサンプラー中に15分間溜めた後（30μl）、カラムへインジェクションし、酵素カラムを通した後、ECDでAchの定量を行った。その間に、回転灯を作動させ、追随行動に伴うAch量の変動を調べた。実験終了後にプローブの位置を組織学的に確認した。

[結果および考察]

今回、開発した学習装置は、以下の点が特徴的である。1) 回転カゴを用いているため、総行動量が記録できる。2) 両方向性の追随行動が記録できるため、Imp. B. がより明確になる。3) 刺激用回転灯が回転カゴの左右にあり、尚且つ両者が交互に作動するため、Imp. による追随行動か否かの評価がより確実になる。4) 回転カゴの側面、軸の1cm上部に5mm径の穴があり、そこから マイクロダアイヤリシス用チューブが挿入でき、Imp. B. 評価時と同一条件で、in vivo マイクロダアイヤリシスのデーターが取れる。これらの装置を用い、ヒヨコ（116匹）のImp. B. 形成率を求めたところ、孵化後 6日目で形成率 50%以下が全ヒヨコの41%、51% ～74%の範囲内が30%、75%以上が29%であった。3日間連続して形成率が75%以上を示すものをImp. B. 形成群、50%以下を非形成群とし実験に使用した。形成率51%以上74%以下は形成不確定群として実験には用いなかった。このように、本装置によってImp. B. が、正確に評価出来るようになった。

トリを回転カゴに入れ、マイクロダイヤリシス装置と接続した後、15分間隔で回収されてきたAch量を測定し、その値が安定した後、刺激用回転灯を15分間作動させた。その結果をTable 1.に示した。Imp. B. 形成群では回転灯作動時にAch放出量が約2倍に増加するのが認められた。この時、回転カゴの回転を止めても同様の増加が認められた。このことから、Achの増加はトリの運動に伴う結果ではなく刺激に反応したためと思われた。一方、choline量には有意の変化は認められなかった。また、Imp. B. 非形成群では、刺激としての回転灯が作動している間でもAch, choline量に変動は認められなかった。以上の結果から、Imp. B. 発現には、Ach作動性シナプスが深く関与していることが明かとなった。

Fig. 1.

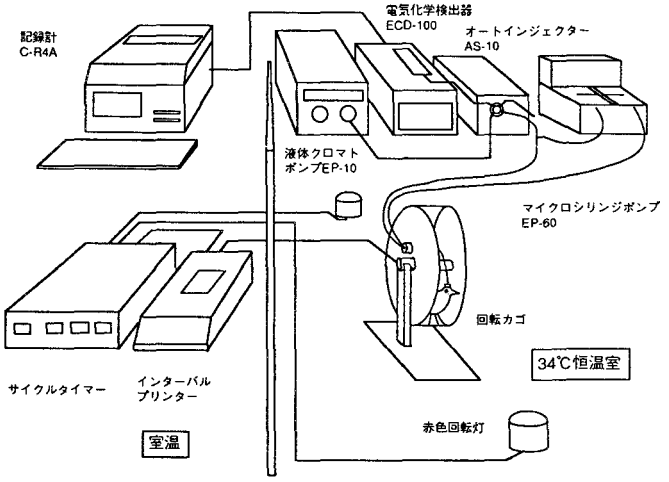


Table 1. Ach Release from MHV of Imprinted or Non-Imprinted Chick Brain

	No. of chick	Ach		Choline	
		Non-Stimulation	Stimulation	Non-Stimulation	Stimulation
Imprinted	1	1.01	2.12	13.00	12.03
	2	0.79	1.98	14.87	14.00
	3*	1.35	2.55	12.51	12.65
Non-Imprinted	1	0.89	1.01	15.12	15.02
	2	1.32	1.25	12.15	12.83
	3*	1.10	1.25	13.50	12.87

*: Running wheel was fixed. Probe was implanted in left side of MHV.
Values were indicated as pmoles/30μl.

[文献] 1) Kohsaka et. al. (1979) Brain Res., 172, 539-544. 2) McCabe et. al. (1981) Brain Res., 205, 29-37.
3) Takamatsu et. al. (1985) Neurochem. Res., 10, 1371-1391

152 EIマウス発作とPTZ注射による痙攣発作の脳蛋白質合成に及ぼす影響

黒田陽子、撫井弘二、中西亜紀、古塚大介、大西博、山上榮
（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕
痙攣履歴を持つEI[s]マウスの放り上げ刺激による発作とPTZ注射により誘発される痙攣発作の脳蛋白質合成に及ぼす影響について、in vitroの系で比較した。また、痙攣履歴を持たないEI[ns]マウスと発作非感受性のddYマウスについても、PTZ注射により誘発される発作の影響を検討した。ddYマウスでは、発作直後に蛋白質合成阻害が最大となったが、EI群では15分後に最大となり、3群とも発作120分後でほぼ痙攣前のレベルに回復した。さらに、EI[s]の放り上げ刺激による痙攣発作の前後で蔗糖密度勾配により、ribosomal profile を分析したところ、発作15分後に発作前に比べpolysomesが減少しmonosomesの増加がみられ、polysomes/ monosomesの比が１０８から78へと減少していた。これらのことから発作によって引き起こされる脳蛋白質合成の低下は、マウスによる遺伝的発作感受性と相関があると考えられる。また発作によってmonosomesが増加したことから、蛋白質の合成の低下はinitiation の段階で阻害されていることが示唆された。

［目的］
既に我々は，遺伝性てんかんモデルのEIマウス脳ではmRNAの transcription や poly(A)添加、poly(A)鎖合成に障害があり、その翻訳活性が発作非感受性のddYマウスより有意に低いことを報告した。[1) 2) 3)] 本研究では、EIマウス固有の痙攣およびPTZの腹腔内注射で誘発された痙攣がpolysomal RNAの脳蛋白質合成に及ぼす影響を検討した。さらに蔗糖密度勾配によるribosomal profileを分析した。

[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日ごろより強直痙攣を起こした生後100日目の痙攣履歴のあるEI[s]マウスと、生後放り上げ刺激を与えなかった痙攣履歴の無いEI[ns]、発作非感受性のddYマウスを用いた。痙攣履歴を持つEI［s］マウスについては、放り上げ刺激と50mg/kg（体重）のＰＴＺの腹腔内注射により発作を誘発した。痙攣履歴のないEI［ns］と発作非感受性のddYマウスは、ＰＴＺ注射により発作を誘発し、発作間歇期、発作直後、発作5、10、15、30、60、120分後の全脳よりpolysomal RNAを調製し、RNAからrabbit reticulocyte lysate に［^{35}S］-methionineを加えた系で蛋白質を合成し、［^{35}S］-methionine の蛋白質への取り込みからmRNAの翻訳産物を比較した。さらに、発作間歇期と発作15分後でのpolysomesを10%-40%蔗糖の直線的密度勾配を用いて分析した。

[結果]
polysomal RNAのin vitroの系における蛋白質への［^{35}S］-methioninの取り込みをFig.1に示す。3群ともpolysomal RNAの濃度の上昇とともに75-100 μ/ml までは直線的に増加したが、それ以降は平坦化した。ＥＩ［s］マウスでは放り上げ刺激による発作の場合とＰＴＺ注射により発作を誘発した場合もin vitroの系での蛋白質への［^{35}S］-methionineの取り込みは、Fig.2に示すように発作15分後で57%と63%にそれぞれ低下した。また、3群間のマウスの［^{35}S］-methionineの取り込みは、ddYでは発作直後に45%まで減少したが(Fig.3)、EI［ns］とEI［s］とでは発作15分後に取り込みが最低となり、それぞれ77%と63%となった。3群とも発作120分後で、ほぼ痙攣前のレベルに回復した(Fig.3)。さらにEI［s］のpolysomesの蔗糖密度勾配では発作15分後で、発作前に比べてpolysomesが減少し、monosomesの増加がみられ、その結果polysomes/monosomes比が108から78へと減少した(Fig.4)。

[考察]
痙攣発作とその蛋白質合成に及ぼす影響について遺伝性てんかんモデルを用いて検討した。ＥＩマウスでは、発作の型式によらず発作によってひきおこされる蛋白質合成の阻害は、発作後15分で最大であり、ddYマウスでは発作直後に見られた。従って、マウスの種により蛋白質合成阻害のパターンに違いがあったことになる。このことから発作によってひきおこされる蛋白質合成の低下はマウスによる遺伝的発作感受性と相関があると考えられる。発作によってmonosomesが増加したことから蛋白質合成の低下はtranslationの過程でも特に、initiation の段階で阻害されることが示唆された。[4) 5)]

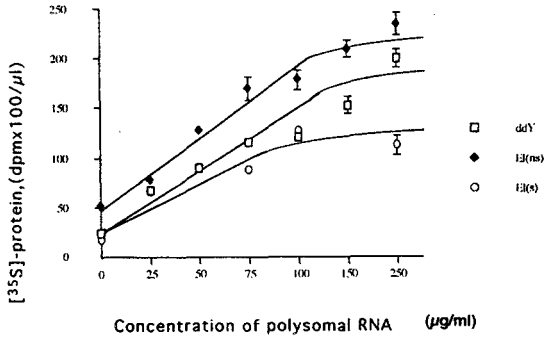


Fig.1 Response curves for polysomal RNA concentration of EI [s] ,EI[ns],and ddY mouse brains.Translation in rabbit reticulocyte lysate containing [^{35}S]-methionine was incubated for 1 h. at 30 ℃ in the presence of polysomal RNA(final concentration of 60 μg/ml). Each value exhibited as mean ± S.D. for 3 different experiments.

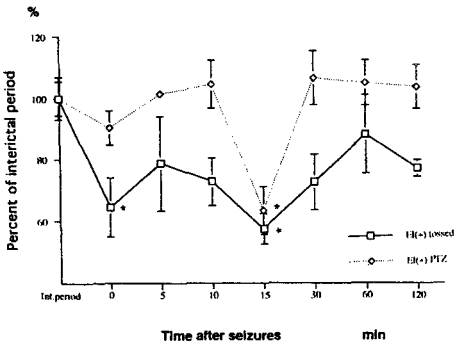


Fig.2 Translation activity of polysomal RNA after 2 different types of seizures in EI [S] mice . Polysomal RNA after tossed-up-induced seizures (□－□) or that after PTZ-induced seizures (◇－◇) were added to a final concentration of 60 μg/ml.

* ,p<0.05,when compared with their interictal period.(One-Way Analysis of Variance with Pairwise Comparison by Bonferroni method)

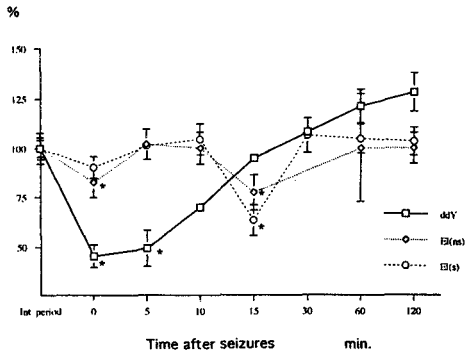
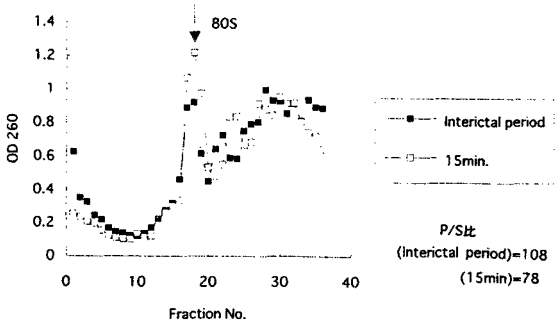


Fig.3 Translation activity of polysomal RNA after PTZ-induced seizures in ddY (□－□), EI[ns](◇－◇) ,EI [s](○－○) .

Fig.4 Disaggregation of brain polysomes after tossed-up-induced seizures of EI[s] mice. Brain polysomes of interictal and 15min after seizures were fractionated on a liner10-40% sucrose gradients.



[文献]

1) Yamagami S.,et al, (1987) Exp. Neurol.,95,167-177.

2) Yamagami S.,et al, (1989) Acta. Neurol. Scand.,80,327-332.

3) Mui K.,et al, (1992) J.Neurochem.,18(suppl) 2.

4) Dwyer.B.E.,et al.,(1986) Adv. Neurol.,44,903-918.

5)Hershey J.W.B.,(1991) Ann. Rev.Biochem., 60,717-755.

153 Glutamate受容体を介する中枢神経内Norepinephrine Release調節機序と高血圧における意義について －高血圧自然発症ラットを用いた検討－

津田　和志，増山　善明*，Menek Goldstein**
和歌山県立医科大学循環器内科，東京労災病院*
New York University Medical Center**

〔要約〕

Glutamate受容体による中枢交感神経活性調節機序を検討するためラット延髄からのnorepinephrine (NE) releaseに及ぼすL-glutamate (L-Glu) やglutamate受容体作動薬の影響を検討した。L-GluはMg^{2+} freeの条件下でNE release量を増加させ、その変化はN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のmodulatorであるglycineによって増強、逆にNMDA受容体antagonist MK-801によって有意に抑制された。高血圧自然発症ラット(SHR)においてL-GluによるNE release増加作用は対照Wistar-Kyotoラット(WKY)に比し有意に大であり、またglycineによる増強効果もSHRで亢進していた。以上よりglutamate受容体は中枢神経内NE release調節因子として作用し、さらに高血圧の交感神経活性調節にNMDA受容体が一部関与する可能性が示唆された。

〔目的〕

最近、L-Gluをはじめとする興奮性アミノ酸の中枢神経内における役割が注目され、これらが神経伝達物質あるいは神経調節因子として作用することが明らかとなった(1,4)。Glutamate受容体サブクラスの中でも特にNMDA受容体を介する反応は生理的な神経活動調節のみならず各種の病態にも関与する可能性が示唆されているが、興奮性アミノ酸の交感神経活性に及ぼす影響や高血圧における意義については不明な点が多い。本研究では中枢神経内NE releaseに及ぼすL-Gluの作用を観察し、さらにNMDA受容体のmodulatorやその antagonistとの相互作用を検討した。またSHRを用いて高血圧の交感神経活性調節におけるglutamate受容体の意義について考察した。

〔対象と方法〕

体重250～350 gの雄Sprague-Dawley (SD) ラット、および9～10週齢SHR、WKYを断頭後速やかに延髄を摘出し、厚さ0.3 mmのbrain sliceを作成した。Slice (5～7 mg) は0.1 μM [^{3}H] NEで37℃で20分間 incubationした後、容積200 μlの温浴槽内 (37℃) に入れ、Krebs-Ringer bicarbonate bufferにて表面灌流を行った(7)。灌流を開始してから61分後と110分後に各々7分間ずつ灌流液を採取し、その中に含まれる[^{3}H] NE量をliquid scintillation spectrometry を用いて測定した。そしてtotal tissue radioactivityのpercent fractional release (SAおよびSB) として表示した。L-Gluをはじめglutamate受容体作動薬の効果はこれらをSBの7分前に灌流液中に投与し、ratio of fractional release (SB/SA ratio) として算出した。数値はmean±SEMで表し、統計学的検討は分散分析法ならびにMann-Whitney U-testによった。

〔成績〕

(1) L-GluはMg^{2+} freeの条件下で延髄からのNE release量を増加させた (SB/SA ratio：control 0.826±0.010, n=6, L-Glu 10^{-3}M 1.221±0.013, n=6, P<0.05)。(2) NMDA受容体modulatorのglycineはL-GluによるNE releaseを有意に増強した (SB/SA ratio：glycine 10^{-5}M+L-Glu 10^{-3}M 1.308±0.007, n=6, P<0.05 vs L-Glu 10^{-3}M alone)。(3) Fig. 1 はNMDA受容体antagonist MK-801の影響を示している。L-GluによるNE release増加はMK-801によって有意に抑制された。(4) SHRの延髄においてL-GluによるNE release増加作用は対照WKYに比し有意に大であり (SB/SA ratio：L-Glu 10^{-3}M, SHR 1.748±0.051, n=6, WKY 1.210±0.011, n=6, P<0.05) (Fig. 2)、またglycineによるNE release増強効果もSHRで亢進していた (SB/SA ratio：glycine 10^{-4}M, SHR 1.203±0.014, n=6, WKY 1.013±0.010, n=6, P<0.05)。

〔考案と結論〕

近年、興奮性アミノ酸の中枢作用が注目され、脳各部位にglutamate結合部位が高濃度存在することが明らかとなっ

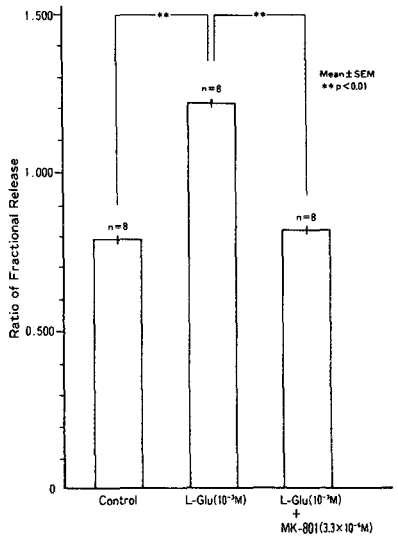


Fig.1 Effects of MK-801 on L-glutamate (L-Glu)-Induced [^{3}H]NE Release in Medulla Oblongata of Sprague-Dawley Rats

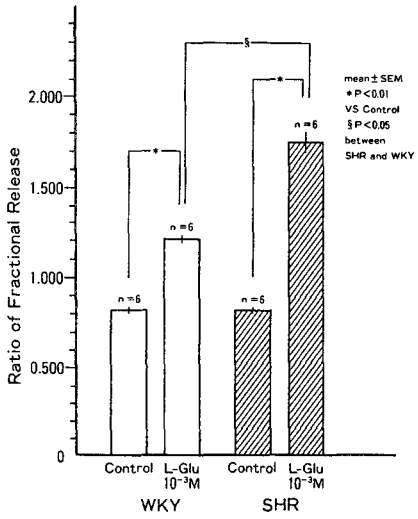


Fig.2 Effects of L-Glu on NE Release in Medulla Oblongata of Spontaneously Hypertensive Rats(SHR) and Wistar-Kyoto Rats(WKY)

た[3]。In vivoの研究においてL-Gluをラット延髄の孤束核に投与すると有意な血圧降下と徐脈が認められることから[6]、L-Gluの中枢性血圧調節における意義が注目されているが、その作用機序については不明な点が多い。本研究においてL-Gluはラット延髄からのNE releaseを著明に増加させた。一般に孤束核をはじめ延髄内のNE量増加は降圧の方向に作用することが知られており、今回の成績も先述のin vivoの成績[6]と一致するものと考えられる。Glutamate受容体は現在ionotropic typeとmetabotropic typeに分けられ、前者はさらにNMDA-, kainate-およびα-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)- 受容体に分類されている[1,4]。今回の成績でラット延髄におけるL-GluによるNE release増加はglycineによって増強され、逆にMK-801によって拮抗された。Glycineは NMDA受容体の positive modulator として知られ[2]、また MK-801は non-competitive NMDA 受容体 antagonist であることから、L-GluによるNE release増加作用は主にNMDA受容体を介しているものと考えられる。一方、SHRを用いた実験ではL-Gluによる延髄からのNE release増加作用は対照WKYに比し有意に大であった。このことはSHRにおいてL-Gluに対する感受性が亢進していることを示唆するものと考えられる。さらにglycineによるNE release増加作用もSHRで大であることから、高血圧における延髄内NE releaseはNMDA受容体に強く依存している可能性が示唆される。 Smith and Barron はL-GluをSHR延髄内に投与した際WKYに比し強い降圧効果が得られることを報告し[5]、我々の結果を支持する成績と考えられる。興奮性アミノ酸の中枢性循環調節機構における意義についての詳細は尚不明であるが、SHRでL-Gluやglycineによる NE release調節異常が見られることは、これらアミノ酸が高血圧の中枢内交感神経活性調節を介し血圧調節に深く関与することを示唆するものと考えられた。

〔文献〕

1) Cotman, C.W. and Iversen, L.L. (1987) Trends in Neurosci., 10:263-265.
2) Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987) Nature., 325:529-531.
3) Monaghan, D.T. and Cotman, C.W. (1986) Pro. Natl. Acad. Sci. USA., 83:7532-7536.
4) Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 29:365-402.
5) Smith, K.J. and Barron, K.W. (1990) Brain. Res., 506:1-8.
6) Talman, W.T., Perrone, M.H. and Reis, D.J. (1980) Science., 209:813-814.
7) Tsuda, K., Tsuda, S., Masuyama, Y. and Goldstein, M. (1990) Hypertension., 3:555-559,

154 フェンサイクリジンのラット前頭前野ドーパミン遊離に及ぼす影響

本藤久雄，中原辰雄*，中村薫，堤哲之，米澤裕次，
橋本喜次郎，松本孝，平野誠，内村英幸

国立肥前療養所・情動行動障害センター・臨床研究部・生化学研究室
九州大学・理・化学教室*

〔要約〕

フェンサイクリジン(PCP)のラット前頭前野におけるドーパミン(DA)遊離に及ぼす影響について脳内微小透析法により調べた。PCP 7.5mg/kg腹腔内投与によりラット前頭前野では細胞外DA及びその代謝産物であるDOPACは有意に増加した。一方，PCP(100μM及び500μM)の透析プローベを介する60分間局所投与により前頭前野における細胞外DAは用量依存的に増加したがDOPACには有意な変化はみられなかった。NMDA型興奮性アミノ酸受容体の非競合的阻害剤であるMK-801(50μM,100μM及び500μM)の局所投与によっても同様に前頭前野における細胞外DAは用量依存的に増加したがDOPACには変化はみられなかった。以上からPCPは中脳－皮質DAニューロン系の神経終末部に作用してDA遊離を亢進させ，その作用の少なくとも一部はPCPのNMDA受容体阻害作用によるものと思われた。

〔目的〕

精神分裂病の病態モデルとして，最近フェンサイクリジン(PCP)モデルが注目されている(2)。我々はこれまでPCPの脳内DAニューロン系に及ぼす影響に注目し，急性投与により中脳－皮質・辺縁系DAニューロンに選択的な代謝亢進を引き起こすことなどを報告してきた(3)。今回，我々はPCPの脳内DAニューロンに及ぼす影響をより明らかにすることを目的として，脳内微小透析法を用いてラット前頭前野におけるDA遊離を指標としてPCPの影響について検討した。PCPは多様な薬理作用を有することが知られているが，特にNMDA型興奮性アミノ酸受容体阻害作用について精神分裂病のグルタミン酸仮説に関連して注目されている。そこでPCPによる前頭前野DA遊離作用へのNMDA受容体阻害作用の関与について検討する為，より選択的な同作用を有するMK-801のDA遊離に及ぼす影響についても併せて調べ，PCPと比較した。

〔方法〕

Wistar系雄性ラットを用い，抱水クロラール(400mg/kg)麻酔下に脳定位的に前頭前野へ透析プローベを装着した。手術翌日，自由行動下に人工脳脊髄液を灌流し，試料を30分毎に採取し電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)法にてDA及びその代謝産物であるDOPACを測定した。基礎遊離量を測定後，PCP7.5mg/kgを腹腔内投与し，対照の生食投与群と比較した。またPCP(100μM,500μM)及びMK-801(50μM,100μM及び500μM)を透析プローベを通して60分間投与し，投与後の遊離量を基礎遊離量と比較検討した。

〔結果〕

PCP7.5mg/kg腹腔内投与により灌流液中のDA及びDOPACは対照群に比し各々投与後30-180分，60-150分に最高328±66%，180±27%の有意な増加を示した(Fig.1)。

PCP(100μM，500μM)の60分間局所投与では灌流液中のDAは最高587±120%，1505±506%の有意な増加を示したが，DOPACには有意な変化はみられなかった(Fig.2)。MK-801(50μM,100μM及び500μM)の局所投与でも同様にDAは最高308±15%,360±27%及び539±51%の増加を示したが，DOPACには有意な変化はみられなかった(Fig.3)。

〔考察〕

PCP7.5mg/kgの腹腔内投与によりラット前頭前野ではDA遊離が増加した。Taniiら(5)は脳内微小透析法を用いてPCP10mg/kgの腹腔内投与による前頭前野細胞外DOPAC及びhomovanillic acidの増加を報告しており我々の結果を支持する所見と思われる。一方我々は以前，今回と同様7.5mg/kgのPCPを腹腔内投与して線条体におけるDA遊離を検討したが，有意な変化は見いだせなかった(4)。今回，線条体では変化を及ぼさない用量のPCPによって前頭前野におけるDA遊離が増加したことは，同部位におけるDAニューロンが精神分裂病の病態に深く関与しているとされることからも興味ある所見と思われる。

MK-801の前頭前野への局所投与によって細胞外DAの増加をみたことは，NMDA受容体が同部位におけるDAニューロン活動に関与していることを示唆している。Hataら(1)も前頭前野でNMDA受容体がDAニューロンをtonicに抑制する可能性を示唆する所見を報告している。従ってPCPは中脳－皮質DAニューロン系の神経終末部に作用してDA遊離を増加させ，その作用の少なくとも一部はNMDA受容体阻害作用を介するものと思われる。しかし，MK-801はPCPに比しより選択的かつ強力なNMDA受容体阻害作用を有する(in vitroでPCPの約10倍)にもかかわらず(6)，そのDA遊離亢進作用はPCPに及ばなかった。PCPはNMDA受容体阻害作用の他DA取り込み阻害作用等も有することが知られており，PCPによるDA遊離の増加の機序としては今後更にこれらについても検討する必要があろう。

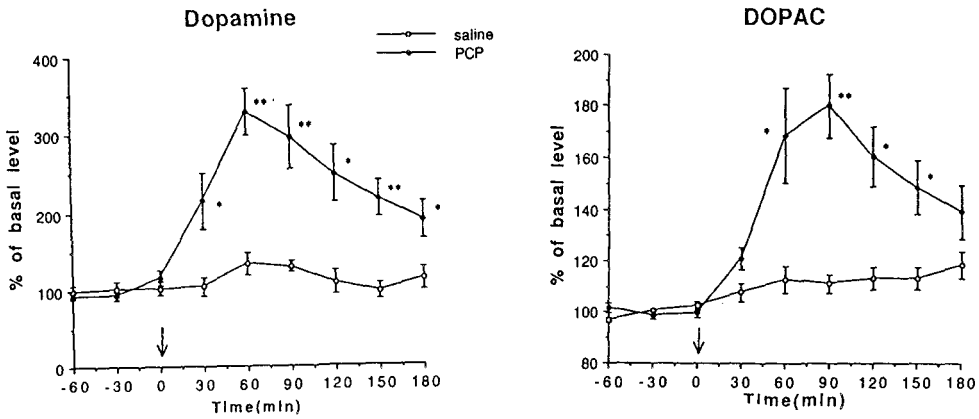


Fig.1. The effect of PCP (7.5mg/kg i.p. filled circles) on the extracellular levels of dopamine and DOPAC in the rat prefrontal cortex. The arrow indicates the time of PCP injection. The average of the values for the three samples before injection was taken as the basal values (100%). **P<0.01, *P<0.05 as compared to the respective saline controls (open circles) by Scheffe's test. n=4-5.

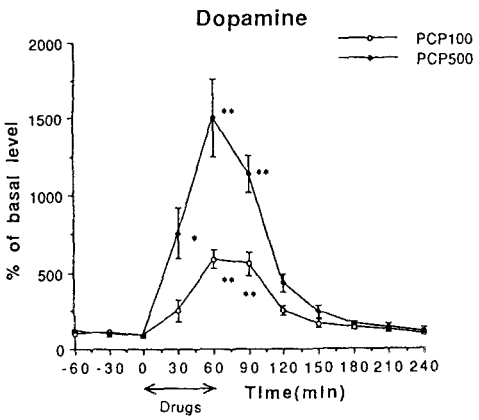


Fig.2. The time course for the extracellular levels of dopamine after perfusion of PCP 100 μM (open circles) and 500 μM (filled circles) into the rat prefrontal cortex. The arrow indicates the time of PCP perfusion. The average values for the three samples before perfusion was taken as the basal values (100%). **P<0.01, *P<0.05 as compared to the basal values by Scheffe's test. n=4.

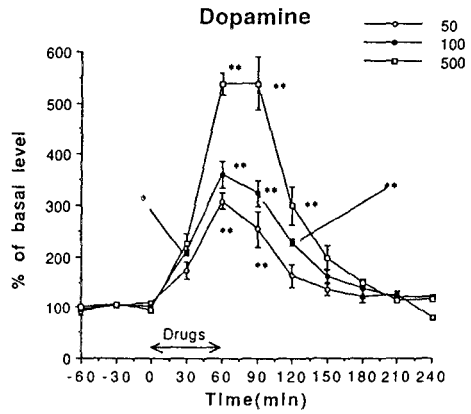


Fig.3. The time course for the extracellular levels of dopamine after perfusion of MK-801 50μM (open circles), 100μM (filled circles) and 500 μM (open squares) into the rat prefrontal cortex. The arrow indicates the time of MK-801 perfusion. The average values for the three samples before perfusion was taken as the basal values (100%). **P<0.01, *P<0.05 as compared to basal values by Scheffe's test., n=4.

〔文献〕
(1) Hata, N., Nishikawa, T., Umino, A. and Takahashi, K. (1990) Neurosci. Lett., 120, 101-104. (2) Javitt, D. C. and Zukin, S. R. (1991) Am. J. Psychiatry, 148, 1301-1308. (3)松本 孝他 (1990) 神経化学, 29, 220-221. (4)西山浩二 (1992) 久留米医学雑誌, 55, 41-51. (5)Tanii, Y., Nishikawa, T., Umino, A. and Takahashi, K. (1990) Neurosci. Lett., 112, 318-323. (6)Wong, E. H. F., Knight, A. R. and Woodruff, G. N. (1988) J. Neurochem., 50, 274-281.

155 EIマウス脳 のペプチド画分の解析

小出誠司、 大西 博、 片山雅文、 甲斐利弘、 山上 栄
（大阪市大、 神経精神）

〔要約〕

EIマウス は、自然発症の遺伝てんかんモデルである。遺伝形式は常染色体優性遺伝で多遺伝子性であろうと考えられており、遺伝子異常に起因するタンパク質やペプチドの異常が想定される。今回我々は、脳のペプチド画分（低分子量タンパク質画分）に着目し、分離様式の異なるイオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーの２種類の高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた、２次元高速液体クロマトグラフィー（2D-HPLC）システムによって EIマウス脳 のペプチド画分を解析した。脳内ペプチド画分は、 130-140 種類のピークに分離溶出され、再現性も良くほとんどのペプチドピークがペプチドマップ上の対応する位置に検出された。このペプチドマップを放り上げ刺激を受け痙攣履歴のある EI[s]マウス と母系の ddYマウス脳 で比較した結果、ペプチドピークの大部分は対応していたが、一部のピークに違いがみられた。これらのピークは、未だ同定できていないが、脳内ペプチドの違いを意味し、 EIマウス の痙攣発作や遺伝子異常や異常可塑性との関連が想定される。

［目的］ これまで我々は、 EIマウス における分子生物学的な研究に関して、痙攣履歴のある EIマウス脳 の RNA 合成が、ddYマウス や痙攣履歴のない EIマウス より亢進していること(1)、DNA-RNA hybridization 法を用いて、 EIマウス脳 の Poly-$(A)^+$-mRNA 画分の塩基配列の複雑性が ddYマウス よりも低いこと(2)、 complementary DNA-RNA hybridization 法を用いて、 mRNA の塩基配列の複雑性が３群間で異なること(3)、 EIマウス の固有の痙攣と bemegride 誘発痙攣による脳の RNA 合成が異なること(4) などを報告し、 EIマウス に特異な遺伝情報の発現機構を示唆した。田岡ら(5, 6) は、ラットの発育に伴う小脳の１２１種類のタンパク質の変動を２次元高速液体クロマトグラフィーシステムで定量的に解析し、特徴的な２種類のタンパク質を検出し、分離同定を行った。今回我々は、 EIマウス の特異な遺伝情報の発現機構、異常可塑性および痙攣履歴に関連した生化学的マーカーの検索を目的として、低分子量タンパク質画分（ペプチド画分）に着目して、 2D-HPLC システムを用いて解析を行った。

［方法］ 実験には、成熟期において、放り上げ刺激を受け痙攣履歴のある EI[s]、EIマウス の母系で痙攣非感受性の ddYマウス を使用した。 EI[s]マウス については、痙攣発作後７日目の放り上げ刺激前に断頭した。脳内ペプチド画分の抽出は、断頭後、全脳から嗅脳、橋-延髄、小脳を除いた大脳を、４倍容の１M酢酸-２０mM塩酸中で９０℃、５分間加熱し、氷冷後ホモジナイズして 12,000 xg で３０分間遠心した。この上清を６６％のアセトン沈澱して得られた上清を粗ペプチド画分（低分子量タンパク質画分）とした。

2D-HPLC システムの各パラメターについては次ページに記載した。１次元目は、イオン交換クロマトグラフィーの TSK-GEL SP-5PW を用い、硫酸ナトリウムによる０M－０．２５Mまでの５段階の *step gradient* を行い、得られた５画分に対してそれぞれ２次元目の逆相クロマトグラフィーで、アセトニトリル濃度２０－５０％の linear gradient を行った。

［結果と考察］ この粗ペプチド画分を 2D-HPLC に導入するにあたって、ハイドロオキシアパタイトカラムや他のイオン交換クロマトグラフィーのカラムについても検討を加えたが、強カチオンのイオン交換クロマトグラフィーの TSK-GEL SP-5PW が最もカラムへの吸着が多く、素通り画分が少ない結果が得られた。Fig. 1 が ddY、 Fig. 2 が EI[s]マウス の 2D-HPLC システムにより得られたペプチドマップである。脳内ペプチド画分は、 130-140 種類の異なるピークに分離溶出された。また再現性も良くほとんどのペプチドピークが地図上の対応する位置に検出された。一部のピークを分取し SDS-PAGE（１５％均一ゲル）電気泳動にかけたところ 20 kDa 以下の単一バンドであった。

このペプチドマップを ddY、 EI[s]マウス 脳で比較した結果、ほとんどのペプチドピークは保持時間と大きさが対応していたが、対応のみられないピーク（矢印）が認められた。これらのピークは、未だ同定できていないが、脳内ペプチドの量的あるいは質的違いを意味し、 EIマウス の痙攣履歴や遺伝子異常や発作感受性との関連が想定される。今後、これらのピークを分取しペプチドシーケンサー（ABI）でアミノ酸配列を決定して行くと同時に、３次元クロマトシステム（DAD system）を用いて、さらに脳ペプチド画分を解析していくつもりである。また、放り上げ刺激を受けず痙攣履歴のない EI[ns]マウス についても検討を加えたい。

FIRST DIMENSION

COLUMN: TSK-GEL SP-5PW (7.5mmID × 7.5cm)

ELUANT: Initial 20mM Acetic acid (pH 3.5) / Acetonitrile = 60/40

Final 20mM Acetic acid (pH 3.5) / Acetonitrile = 60/40 + 0.25M Na_2SO_4

FLOW RATE: 1.0ml/min TIME: 40min COLUMN TEMP.: ROOM TEMP.

SECOND DIMENSION

COLUMN: Chemcosorb 7-ODS-H (4.6mmID × 25cm)

ELUANT: Initial 0.05% TFA / 0.04% TFA - 100%Acetonitrile = 80/20

Final 0.05% TFA / 0.04% TFA - 100%Acetonitrile = 50/50

FLOW RATE: 1.0ml/min TIME: 40min COLUMN TEMP.: ROOM TEMP.

DETECTION: A214 nm 0.32 aufs

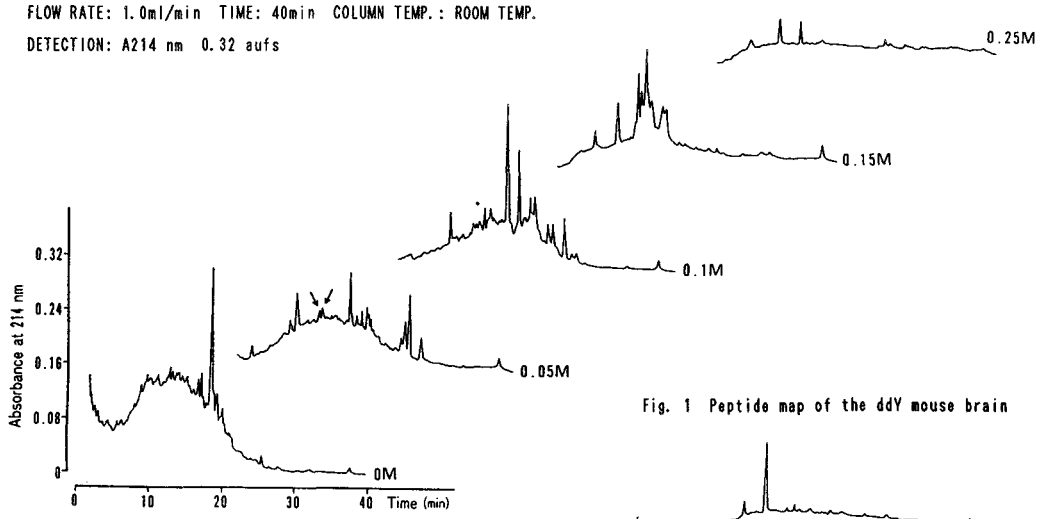


Fig. 1 Peptide map of the ddY mouse brain

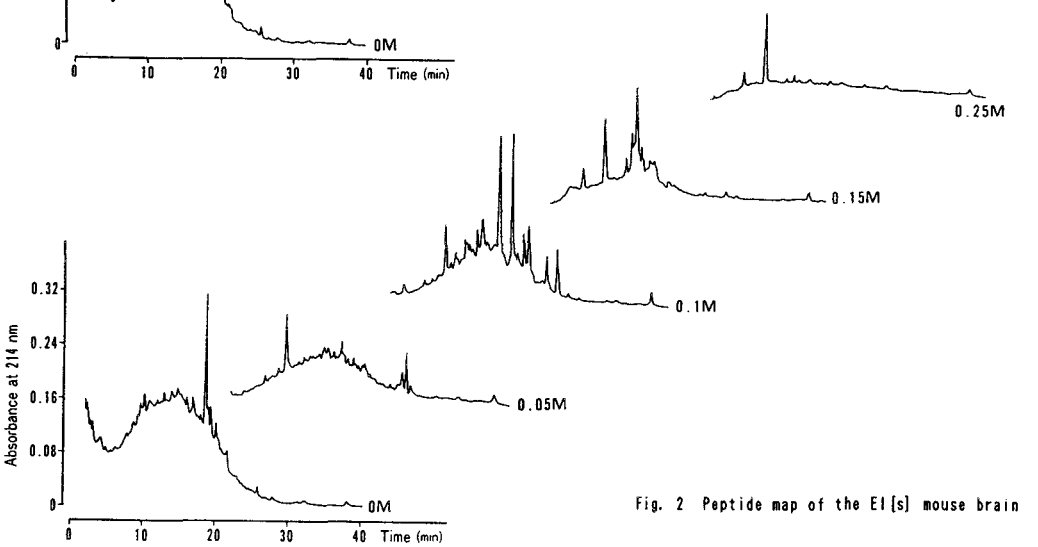


Fig. 2 Peptide map of the El[s] mouse brain

[文献] 1) 山上 栄、大野京介、辻 正記、森 浩一、川北幸男 (1981) 神経化学 24, 120-123. 2) Hirayama, E., Yamagami, S., Onishi, H., Chikami, T., Mori, K., and Kawakita, Y. (1986) Jpn. J. Psychiat. Neurol. 40, 361-365. 3) Mui, K., Yamagami, S., Kioka, T., Onishi, H., and Kawakita, Y. (1991) Epilepsy Res. 10, 134-141. 4) 山上 栄、千頭孝史、森 浩一、大西 博、川北幸男 (1982) 神経化学 25, 303-305. 5) 田岡万悟、磯部俊明、真鍋 敬、奥山典生、山田 徹 (1988) 神経化学 27, 256-257. 6) 田岡万悟、磯部俊明、奥山典生、渡辺雅彦、近藤尚武、桑野良三、森井 研、宗時栄、山田 徹 (1991) 神経化学 30, 510-511.

156 遺伝的運動障害ラットの小脳内神経伝達物質代謝の変調

國井修一[1]（椙山女学園大学短期大学部）・田丸政男（鈴鹿医療科学技術大学）
大野京子（名古屋大学環医研）・安藤正人・藤田公和・永田　豊（[1]藤田保健衛生大・医・生理）

[要約] 遺伝的後弓反張様運動障害を示すDop ﾗｯﾄ[3]の、運動調節機能障害の原因を探るために、中枢神経系内の神経伝達物質の濃度およびその代謝系を調べ、それらを対照ﾗｯﾄの値と比較検討した。ｺﾘﾝ作動性神経系の指標酵素であるｺﾘﾝ・ｱｾﾁﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ(ChAT)活性は、脊髄（頸髄・胸髄・腰髄）、および脳髄（大脳皮質・小脳・海馬・間脳および線条体）の各測定部位で、Dopﾗｯﾄと対照ﾗｯﾄとの間に有意な相異は認められなかった。分離各組織内の遊離ｱﾐﾉ酸含量（ｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸(Glu)、ｱｽﾊﾟﾗｷﾞﾝ酸(Asp)、ｸﾞﾙﾀﾐﾝ(Glu)、ﾀｳﾘﾝ(Tau)、ｸﾞﾘｼﾝ(Gly)、およびｱ-ｱﾐﾉ酪酸(GABA)）含量も、Dopﾗｯﾄと対照ﾗｯﾄの間で有意な差はほとんど認められなかった。しかし、小脳組織内遊離ｱﾐﾉ酸の内、興奮性神経伝達候補物質であるAspおよびGluが、Dop ﾗｯﾄで対照ﾗｯﾄより有意に低値を示したが、他のｱﾐﾉ酸には両者の間で差異はなかった。抑制性神経伝達物質であるGABA量にはDopﾗｯﾄと対照ﾗｯﾄとの間に大きな差は見られなかったが、GABA合成酵素であるL-ｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸脱炭酸酵素(GAD)活性は、Dopﾗｯﾄ群で対照より高値が示された。しかしGABA分解系酵素の１つであるGABAｱﾐﾉ転移酵素（GABA-T）活性には両者間で有意差は見られなかった。これらの実験成績より、協調的運動調節機能を統御している小脳組織内の興奮性ならびに抑制性ｱﾐﾉ酸作動性神経伝達候補物質代謝の変調が、Dop ﾗｯﾄの運動失調の発現にある程度関与している可能性が考えられた。

[序] 近年、新たに分離された後弓反張様運動障害をもつﾗｯﾄ（dilute-opisthotonus rat；Dopﾗｯﾄ[3]）は、生後12日齢頃より体の平衡をくずして横転を繰り返すようになり、３週齢には歩行時の四肢の突っ張り、頸背部の後弓反張および、尾の跳ね上がり現象が顕著に出現することから正常ﾗｯﾄと区別できるようになり、離乳時になると自ら哺乳することができずに死亡するに至る。系統調査と交配実験の結果、Dopﾗｯﾄの遺伝形質は常染色体の単一劣性遺伝子により支配されていることが明かにされているが、中枢神経系の異常についての生化学的知見は全く得られていない。今回我々は、Dopﾗｯﾄの中枢神経系組織内の神経伝達候補物質の内、ｺﾘﾝ作動性神経系の指標であるｱｾﾁﾙｺﾘﾝ合成酵素（ChAT）活性を測定した。また、各組織標本の遊離ｱﾐﾉ酸含量について測定し、非運動障害ﾗｯﾄの値と比較した。これらの測定結果から、特に運動調節機能に関与している小脳内ｱﾐﾉ酸作動性神経伝達候補物質の代謝系について検討し、運動失調をひきおこす神経機構の解明を企図した。

[実験方法] DopﾗｯﾄのF17世代目に得られた仔9匹（同腹）の内、Dopﾗｯﾄに特徴的運動障害が明らかに認められた4匹をDopﾗｯﾄ群、他の5匹を対照群とした。これら仔動物は生後16日目に断頭屠殺後、脳と脊髄を速やかに摘出した。摘出新鮮脳は氷冷したｶﾞﾗｽ板上で延髄・小脳・海馬・線条体・大脳皮質および中脳間脳の６部位に分割し、脊髄は、頸髄・胸髄および延髄の３部位に分割してから以下実施する生化学的測定まで-80℃の冷凍庫内に凍結保存した。ChAT活性は、酵素基質の[^{14}C]acetyl CoAとcholineから生成される[^{14}C]acetylcholinをborate塩とした後ethylbutylketone層中に回収して、その放射能活性を測定するRossierらの方法[4]によって行った。試料中の遊離ｱﾐﾉ酸含量は、それぞれの分割神経組織片を70%ethanol中で磨細した後、その遠沈上清を小さいｶﾞﾗｽｶｯﾌﾟにいれ、温風を持続的に吹き付け乾燥して回収し、ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰ用bufferで撹拌・溶解した。これに水飽和ｸﾛﾛﾎﾙﾑを加えて撹拌・遠沈したのちに得られる水性上清をｱﾐﾉ酸自動分析器（日立L8500）にかけて遊離ｱﾐﾉ酸を分離・定量した。GAD活性は、基質のC^{14}-glutamateから酵素作用により発生する$^{14}CO_2$をｱﾙｶﾘ性濾紙に吸着させて、その放射能活性を計数した[6]。GABA-T活性は、組織を微小ｶﾞﾗｽﾎﾓｼﾞﾅｲｻﾞｰを用いてﾘﾝ酸緩衝液(pH8.0)で磨細して、遠心分離後、上清をNADPを含む反応液に加えｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝを行い、試料の吸光度の経時変化から生成されたNADP値を求め酵素活性を計算した[5]。

[実験成績と考察] ①脳および脊髄組織内ChAT活性：図１に示した如く、それぞれの脊髄中のChAT活性値は、頸髄＜胸髄＜腰髄の順で下位脊髄部位ほど高くなる傾向が見られた。しかし、Dopﾗｯﾄ群と対照ﾗｯﾄ群とので統計的な差異は認められなかった。分割脳の各組織内のChAT活性は、線条体で最も高く、以下延髄・海馬・中脳間脳・皮質・小脳の順であったが、Dopﾗｯﾄと対照群で有意な差異は認められなかった。ｺﾘﾝ作動性神経系に異常をもつことで知られているElﾏｳｽは、急激な加速運動刺激を負荷することにより二次性の四肢の部分発作性痙攣を起こすてんかんﾓﾃﾞﾙ動物である[2]。この動物が痙攣をおこしていない状態では、その脳内のｱｾﾁﾙｺﾘﾝ含量は対照ﾏｳｽの値より約50%高値を示した[2]。また全脳でChAT活性を比較した場合、非痙攣ﾏｳｽより約50%Elﾏｳｽが高値を示すこと[1]から、中枢神経組織中のｺﾘﾝ作動性神経系のACh代謝異常が、動物の痙攣発作を発現させる因子の一つとして考えられている。しかしながら、Dopﾗｯﾄの ChAT活性は対照群の値と有意差が認められないことからDopﾗｯﾄで見られる運動障害は中枢神経系のｺﾘﾝ作動性神経の障害とは異なる他の運動神経系機能の変調に原因が存在するものであると推測される。②小脳組織内遊離ｱﾐﾉ酸含量：遊離ｱﾐﾉ酸含量は小脳以外の各分割組織内でDopﾗｯﾄと対照ﾗｯﾄとで有意な差異は見られなかった。図２に示される如く、小脳組織内遊離ｱﾐﾉ酸の内で、興奮性神経伝達候補物質であるAspおよびGluが対照動物群よりもDopﾗｯﾄ群で有意に低値を示した。また、ｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸の前駆物質であるGlnおよび抑制性神経伝達物質であるGABAにもDopﾗｯﾄ群でやや低下傾向が見られた。③小脳内GABA分解・合成酵素活性：表１に見られるように、Dopﾗｯﾄ群のGAD活性値は対照群の値と比較すると有意に高値であった。しかし、GABA-T活性値はDop

ﾗｯﾄと対照ﾗｯﾄ小脳で両者の間に差異は認められなかった（表２）。これらの測定結果から、Dopﾗｯﾄにみられる運動障害は、運動機能の統合的調節機能を統御する小脳組織内において、興奮性および抑制性ｱﾐﾉ酸神経伝達物質であるGABAとGlu内相互の代謝系に何らかの変調が認められ、このことが痙攣発作を始めとする失調性歩行障害の発生過程に何らか関与している可能性が推察される。しかしながら、中枢神経組織内におけるGlu-GABA代謝系は複雑に錯綜しているので、GADとGABA-T以外の小脳内ｱﾐﾉ酸代謝系についても、さらに詳細に検討する必要があろう。

④小脳の形態的観察：Hematoxylin-Eosin(H-E)染色およびKluver-Barrera(K-B)染色で染めたDopﾗｯﾄの小脳では、対照ﾗｯﾄの小脳標本よりもﾌﾟﾙｷﾝｴ細胞の一部脱落が認められた。このような形態変化もまた、Dopﾗｯﾄが示す運動失調の背景の１つとも考えられよう。

[文献]

(1)Kurokawa, M. et al. (1961) Biochem. Biophysys. Acta 50. 385-386. (2)Kurokawa, M. et al. (1963) J. Neurochem. 10. 341-348. (3)大野京子ら(1991)名古屋大学環研年報、226-228. (4)Rosseir, J., et al. (1973) FEBS Lett. 32: 231-234. (5)Scott, E. M. and Jaloby, W. B. (1959) J. Biol. Chem. 234. 932-936. (6)Storm-Mathisen, J. (1972) Brain Res. 40. 215-235.

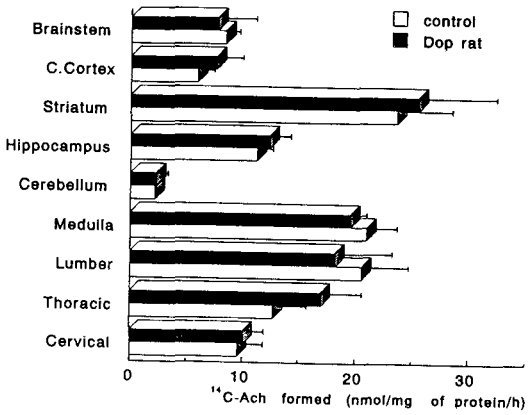


Fig.1. ChAT activity in spinal cord and brain of rat. All assays were done in duplicate. Dop rat:dilute-opisthotonus rat.

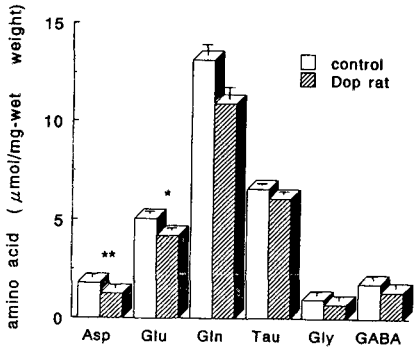


Fig.2. Comparison of amino acid concentration in cerbellum. Dop rat: dilute-opisthotonus rat. *:p<0.05, **:p<0.01.

Table 1. Difference of GAD activity between control and Dop rat in cerebellum.

	GAD activity(nmol/mg of protein/h)	
	Control	Dop
M	3.86	6.10*
S.D.	0.57	1.56
	(5)	(3)

*:p<0.05. Dop:dilute-opisthotonus rat. Number in parenthesis indicates number of experiments. GAD activity was expressed as the amount of $^{14}CO_2$ formed from nmol-^{14}C-Glu・per mg protein/hour during incubation at 37℃/20min.

Table 2. Difference of GABA-T activity between control and Dop rat in cerebellum.

	GABA-T activity (μmol NADPH formed/min/g-protein)		
	Control	Dop	diff.
M	3.41	3.66	NS
S.D.	0.62	0.48	
	(4)	(4)	

Dop:dilute-opisthotonus rat. Number in parenthesis indicates number of experiments. GABA-T activity was expressed as the amount of μmol NADPH formed/g-protein/min from NADP with metabolic coupling to fluorometric reaction between GABA and Glu.

157 ラット前部帯状回皮質における興奮性アミノ酸遊離に対するフェンサイクリジンの影響ー脳内微小透析法による検討ー

米沢裕次、本藤久雄、中村薫、堤哲之、橋本喜次郎、松本孝、平野誠、内村英幸、黒木俊秀*、田代信維*
(情動行動障害センター・国立肥前療養所、九州大学ー医ー神経精神科*)

〔要約〕

ラット前部帯状回皮質における興奮性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）遊離に及ぼすフェンサイクリジン（PCP）の影響について脳内微小透析法を用いて検討した。PCP (7.5mg/kg,ip) は興奮性アミノ酸の基礎遊離量には有意な影響を与えなかったが、高カリウム刺激 (100mM) による興奮性アミノ酸放出反応に対しては有意な抑制効果を示した。以上の結果から、PCP は ラット前部帯状回皮質における興奮性アミノ酸遊離を、NMDA受容体を介した機構により抑制する可能性が示唆された。

〔目的〕

PCP は、その乱用により分裂病に類似した症状を呈することが知られており(4)、その多彩な薬理作用のうち特に NMDA 型興奮性アミノ酸受容体阻害作用について分裂病のグルタミン酸仮説との関連から注目されている(2)。これまでに、PCP の脳内ドーパミンニューロンへの影響をみた報告は多数あるが、興奮性アミノ酸ニューロンへの影響をみた報告は数少ない。最近、NMDA 受容体を介した興奮性アミノ酸の遊離調節機構を示唆する報告がいくつかされている(1)(5)。一方、前部帯状回皮質は大脳辺縁系の一部と考えられており、しかも PCP によって引き起こされる情動及び思考障害の責任部位としての可能性が示唆されている(7)。そこで今回我々は、PCP の NMDA 受容体阻害作用に着目し、脳内微小透析法を用いてラット前部帯状回皮質における興奮性アミノ酸遊離に対する PCP の影響について検討した。

〔方法〕

実験には Wistar 系雄性ラット(300-400g)を用いた。抱水クロラール(400mg/kg,ip)麻酔下で Paxinos and Watson のアトラスに従い脳定位的に前部帯状回皮質(A +1.2mm, L 0.7mm from bregma, 3.5mm below dura surface) に透析用プローブ (膜長2mm,外径220μm)を装着した。手術翌日、自由行動下に流速 2.0μl/min で人工脳脊髄液 (140mM NaCl, 3.35mM KCl, 1.15mM $MgCl_2$, 1.26mM $CaCl_2$, 1.2mM Na_2HPO_4, 0.3mM NaH_2PO_4, pH7.3)の灌流を開始した。約２時間後から１５分毎に透析液の回収を行い、透析液中のアスパラギン酸(Asp)及びグルタミン酸(Glu) の基礎遊離量を蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー法で測定した。その後、PCP(7.5mg/kg) を腹腔内投与して、透析液中の興奮性アミノ酸の濃度を基礎遊離量と比較検討した。また、透析用プローブを通しての高カリウム刺激 (100mM,60min) による興奮性アミノ酸放出反応に対する PCP の影響についても同様に検討した。なお統計学的有意差の検定には、Scheffe's test を用いた。

〔結果及び考察〕

PCP は前部帯状回皮質における興奮性アミノ酸基礎遊離量(Asp:72.5±4.2,Glu:163.8±12.9nM) には有意な影響を与えなかった。しかし、高カリウム刺激による興奮性アミノ酸放出反応(Asp:202±10%,Glu:234±18%)に対しては、PCP は有意な抑制効果を示した(Asp:65%,Glu:85%;Fig. 1)。Asp や Glu の様なアミノ酸の場合、細胞外液中のアミノ酸についてはそのほとんどが metabolic pool から由来するものと考えられているのに対して、高カリウム刺激誘発性の興奮性アミノ酸については、in vivo においてカルシウム依存性が示されている(3)(6)。したがって、今回示した高カリウム刺激による興奮性アミノ酸放出反応に対する PCP の効果については、neuronal pool 由来の興奮性アミノ酸遊離の変化を反映していると考えられる。

Connick らは、海馬のスライスを用いて、NMDA antagonist である 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) や dizocilpine (MK-801) が興奮性アミノ酸の基礎遊離量には影響を与えず、高カリウム刺激による興奮性アミノ酸放出反応には抑制的に働くことを報告している(1)。PCP の NMDA 受容体阻害作用に着目すれば、今回の我々の結果はこれらの所見によって支持されるものであり、しかも in vivo の条件下で PCP が興奮性アミノ酸の遊離調節機構に影響を及ぼすことを示した初めての報告である。PCP は多彩な薬理作用を持っているので、NMDA 受容体を介した機構を明確にするために、今後より選択的な NMDA antagonist (MK-801など) を用いての詳細な検討が必要と思われる。

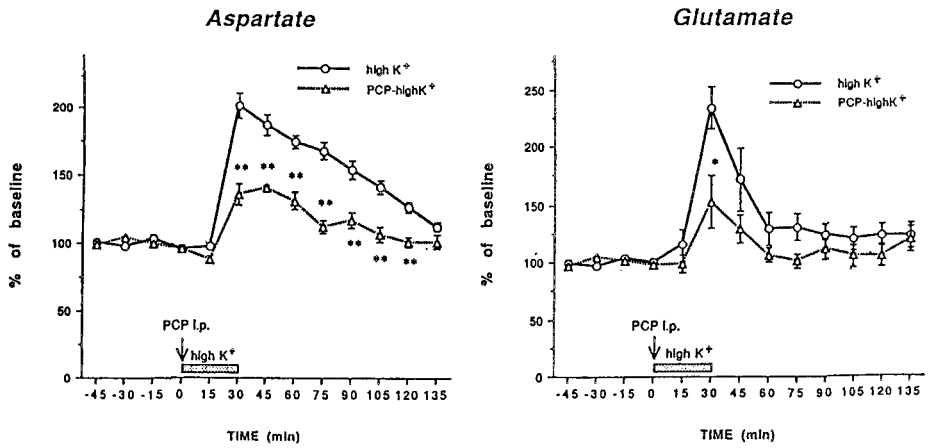


Fig. 1. Effect of phencyclidine (7.5 mg/kg) on the K^+-evoked aspartate (left) and glutamate (right) release in the anterior cingulate cortex of awake rats. Phencyclidine was injected intraperitoneally after collecting 4 consecutive samples (denoted by the arrow). The dotted bar indicates the period of high K^+ (100 mM) perfusion. Each point represents the mean ± SEM of 5 or 6 rats in each group. $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ vs high K^+ group.

〔文献〕
1)Connick, J.H. and Stone, T.W. (1988) Br. J. Pharmacol., 93, 863-867.
2)Deutsch, S.I. et al. (1989) Clin. Neuropharmacol., 12, 1-13.
3)Gozalo, et al. (1992) Brain Res., 585, 105-115.
4)Javitt, D.C. and Zukin, S.R. (1991) Am. J. Psychiatry, 148, 1301-1308.
5)Martin, D et al. (1991) J. Neurochem., 56, 1647-1655.
6)Paulsen, R.E. and Fonnum, F (1989) J. Neurochem., 52, 1823-1829.
7)Weissman, A.D. et al. (1987) Brain Res., 435, 29-40.

158 フェノバルビタール禁断症候における脳内抑制性および興奮性アミノ酸神経の関与

ーマイクロダイアリシスと結合実験を用いた検討ー

田中佐知子，土田晃敬，木内祐二**，山元俊憲*，小口勝司**，吉田武美，黒岩幸雄*
（昭和大・薬・毒物学，*臨床薬学，**医・第一薬理学）

〔要約〕

フェノバルビタール（PB）退薬症候時の痙攣発現機序を検討する目的で in vivo 脳内微小透析法を用いたシナプス前部からのアミノ酸伝達物質の放出変化と結合実験による脳内アミノ酸受容体の変化を観察した。海馬および前頭皮質内微小透析により、個体差はあるにせよ禁断処置２０時間前後より興奮性アミノ酸（グルタミン酸（Glu）およびアスパラギン酸（Asp））の遊離増加が認められた。またこの頃より痙攣や振戦などの退薬症状が観察された。しかしながら、脳シナプトソームの Glu 受容体の特異的結合には変化は認められなかった。抑制性アミノ酸であるγーアミノ酪酸（GABA）の遊離には変化は認められなかったが、依存性形成時より認められる $GABA_A$ 受容体の特異的結合の低下が退薬時に増強することが明らかになった。これらの結果から興奮性アミノ酸神経系のシナプス前部からの遊離増加と $GABA_A$ 受容体を介した抑制系の機能低下により、痙攣等の退薬症状が生じている可能性が示唆された。

［目的］ 抗てんかん薬の PB は長期投与により依存性を形成し、休薬により、痙攣等の退薬症候を発現するが、その退薬症候の発現機序については解明されていない。近年、脳内微小透析法の開発により in vivoで細胞外に遊離してくる伝達物質を測定することが可能になった。そこで、依存性形成後から退薬時にかけて、経時的に細胞外液に遊離してくるアミノ酸（Glu、Asp、グリシン(Gly)、タウリン（Tau）および GABA）濃度の変化と痙攣等の退薬症候の発現を観察することにより、伝達物質の遊離量と禁断症候発現の関連性について検討した。また依存性および禁断時の脳内 $GABA_A$ 受容体および Glu 受容体の質的および量的変化についても検討を行なった。

［方法］ PB 依存性形成ラットは薬物混入飼料法により、PB を 5 週間にわたって粉末飼料中に段階的に増量しつつ混入し、摂取させることによって作成した(1)。また、通常の粉末飼料と置換することによって禁断処置とした。対照および依存性形成ラットをペントバルビタール麻酔下に頭蓋骨を固定し、歯科用ドリルで頭蓋骨に穴を開けた。海馬の場合は Bregma より A 5.8, L 5, V 5 mm の位置に、また前頭皮質の場合はA -3.5, L 2.1, V 2 mm at 14° angle にガイドカニューレを挿入し、歯科用セメントにて固定した。手術後 3 日目に透析用プローブ（膜長：海馬 2 mm、前頭皮質 3 mm）を挿入し、翌日リンゲル液を用いた灌流実験（灌流速度 2μl/min）を行った。灌流実験はラットを無拘束下に禁断処置後 30 時間まで行った。また、灌流開始と同時に禁断処置とし、ビデオによる行動観察も併せて行った。30 分ごとの透析回収液中のアミノ酸の定量は HPLC-Fluorometry (Glu, Asp, Gly および Tau) と HPLC-ECD (GABA) により測定した。一方、依存性形成時および禁断処置後経時的にラットを断頭し、脳シナプトソーム画分を調製し、$GABA_A$ 受容体のリガンドには [^{3}H] - muscimol (2) を用い、また Glu 受容体のリガンドには [^{3}H] -glutamate (3) を用いて結合実験を行った。

［結果］ 脳内微小透析法を用いた実験では海馬において興奮性アミノ酸である Gluおよび Asp は禁断処置 20 時間頃より持続的な細胞外液濃度上昇を認めた。 Glu およびAsp 濃度の上昇開始時間には個体差が認められた。Glu 濃度の上昇と痙攣発現が一致する場合も認められたが、一致しない場合でも痙攣発現前より Glu 濃度の上昇とその持続が認められた。GABA, Gly および Tau の細胞外液濃度に変化は認められなかった。前頭皮質においても海馬と同様に Glu 濃度上昇とそれに伴った痙攣発現が生じた。

一方、依存性形成時には $GABA_A$ 受容体の特異的結合の低下が認められ、また禁断処置 16 時間後（早いラットでは痙攣発現を生じ始める時間）にはさらに特異的結合低下の増強が認められた。Glu 受容体の特異的結合は対照群と比較して依存性群および禁断後 24 および 48 時間群においても変化は認められなかった。

［考察］ PB 依存性形成後の休薬による痙攣等の退薬症候の発現機序について脳内微小透析法を用いて検討を行ったところ、海馬および前頭皮質において細胞外液中の興奮性アミノ酸濃度（Glu および Asp）の上昇を認めたが、これはシナプス前部からの遊離量の増加を反映しているものと思われる。興奮性アミノ酸の遊離増加とその持続は退薬症候の痙攣や興奮状態の発現と経時的によく一致していることから、退薬症候発現の要因になっていると考えられる。しかしながら、興奮性アミノ酸のシナプス前部からの遊離増加は認められたものの、Glu 受容体での結合変化は認められなかった。一方、PB の作用部位と推測される抑制性の $GABA_A$受容体の特異的結合は依存性形成時に低下し、さらに禁断時の低下が増強していることから、$GABA_A$ 受容体の機能低下が生じているものと考えられる。この様に PB 退薬症候発現時にシナプス前部からの興奮性アミノ酸の遊離増加が生じ、シナプス後部では抑制性アミノ酸受容体の $GABA_A$ 受容体の機能低下が生じて、痙攣等の退薬症状を生じているものと考えられる。

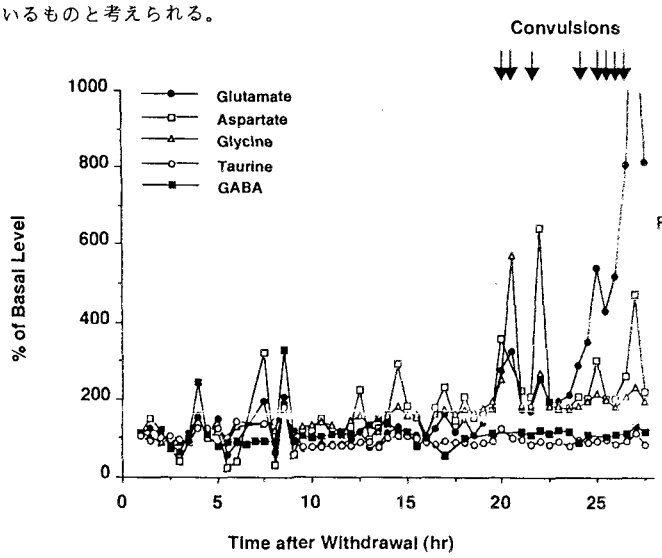


Fig. 1 1例のラットにおける禁断処置後の海馬透析回収液中各種アミノ酸濃度の経時的変化と痙攣発現

Table I. フェノバルビタール依存性および禁断ラット脳のシナプトソーム画分における ^{3}H-muscimol 結合

Treatment	n	Specific ^{3}H-muscimol binding (pmol/mg protein) 100 nM	2 nM
Control	9	1.431 ± 0.056	0.311 ± 0.016
Dependence	10	0.352 ± 0.060	0.270 ± 0.008**
Withdrawal 16hrs	6	1.035 ± 0.059**.##	0.235 ± 0.010**.#
48hrs	6	1.292 ± 0.035	0.263 ± 0.008**
10days	6	1.274 ± 0.075	0.237 ± 0.009**

**p<0.01 compared with the control group.
#p<0.05 and ##p<0.01 compared with the dependent group.

［文献］

(1) Yanaura, S., Tagashira, E. and Suzuki, S. (1975) Jpn. J. Pharmacol. 25, 453-463

(2) Tanaka, S., Aoki, K., Satoh, T., Yoshida, T. and Kuroiwa, Y. (1991) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 73, 269-279

(3) Yoneda, Y., Ogita, K., Ohgaki, T., Uchida, S. and Meguri, H. (1989) Biochem. Biophys. Acta., 1012, 74-80

159 ニューロフィラメント欠損ウズラ（Quiver）の脳における神経伝達物質動態の変化

長谷川宏之、村山俊彦、北村佳久、高橋明美*、板倉智敏*、野村靖幸
（北海道大学・薬・薬効、北海道大学・獣医・比較病理**）

（要約）
全身性振戦を発現するウズラ "Quiver"は神経細胞に特異的な中間径フィラメントであるニューロフィラメント（NFs）が欠損している。正常ウズラとQuiverの脳のモノアミン含量、神経活性アミノ酸含量を比較したところ、1）Quiverでは新線条体においてノルエピネフリンとセロトニン含量が、旧線条体と視床においてセロトニン含量が、正常ウズラに比べ有意に増加していた、2）1週齢ウズラ前脳スライス標品で脱分極刺激やグルタミン酸刺激は[^{3}H]ノルエピネフリン分泌を増加させたが、両者の反応性に差はなかった、3）Quiverでは一般皮質と脊髄においてGABA含量が正常ウズラに比し有意に増加していた。NFsが欠損しているQuiverでみられた脳内モノアミン、神経活性アミノ酸含量の異常が全身性振戦の一因と考えられる。

（目的）
水谷、板倉らはふ化直後より全身性振戦を発現するウズラ "Quiver" をWE系ウズラを用いて確立した。遺伝形式は常染色体劣性遺伝で寿命は野生型と大差はない（1）。中枢、末梢神経の電顕観察によって、このウズラは神経細胞に不可欠な中間径フィラメントの一種であるニューロフィラメント（NFs）が欠損していることが分かった（2、3）。さらに、3つのサブユニット（NF-L,NF-M,NF-H）のうちNFs重合に必要と言われている低分子量サブユニットNF-Lの遺伝子の点突然変異によってmRNAが正常に転写できないことが報告されている（4）。
最近、神経系において微小管やアクチンフィラメントといった細胞骨格とシナプス機能に密接な相互関係があることが示されつつある。しかし、ニューロフィラメントとの関係の詳細は、微小管やアクチンフィラメントのように特異的作用薬がないこともあり、不明な点が多い。今回ニューロフィラメントのシナプス機能における役割を明らかにする目的で、正常ウズラとQuiverの脳内モノアミンおよび神経活性アミノ酸含量を測定し比較した。

（実験方法）
Quiver（日本生物学研究所より）、正常対照系ウズラ（豊橋市・加藤養ウズラ場より）の有精卵を39℃で16日間ふ卵し両系よりヒナを得た。脳を一般皮質（GC: general cortex）新線条体（NS: neostriatum）旧線条体（PP/PA: paleostriatum）視床（TH: thalamus）中脳（OL: optic lobe）小脳（CB: cerebellum）延髄（ME: medulla）の7部位に分けた。モノアミン、アミノ酸含量は、Eicom HPLC-ECD systemを用い脳7部位について測定した。測定結果を平均値標準誤差で示し、student's t-testにより有意差の検定を行った。危険率は＊: $p < 0.05$;＊＊: $p < 0.01$のように表示した。ノルエピネフリン（NE）取り込みは、1週齢の前脳（GC,PP/PA,NS,Th）を300μmナイロンメッシュで通した画分をスライス標品として用いた。[^{3}H]ノルエピネフリン50 nMを37℃、30分間インキュベートし洗浄後、放射活性を測定し取り込み量とした。洗浄後の標品を各種薬物下で10分間インキュベートし遠心後上清にある放射活性を分泌量とした。

（結果・考察）
鳥類の脳は、哺乳類の脳と大きく異なっており、ハト脳の分画法に準じ脳の部位分けを行った。いわゆる大脳半球はほとんど線条体であり、大脳皮質、海馬はわずかしかない。大脳皮質、海馬に値する部位を一般皮質とし、線条体は、淡蒼球、被殻、尾状核に値する部位を旧線条体、それ以外を新線条体とした。3週齢脳において、ノルエピネフリンは視床と延髄に、ドパミンは旧線条体と視床に多く、セロトニンは小脳以外どの部位にも多く存在していた。また、小脳はどのモノアミンもほとんど存在していなかった。ウズラ脳における3者モノアミンの局在性および含量はこれまで報告されているラットなどの哺乳類のそれとほぼ類似していた。正常ウズラとQuiverとを比較した場合、Quiverのノルエピネフリン含量は新線条体と視床で有意に高かった。ドパミン含量は両系において有意な差はみられなかった。セロトニン含量は、Quiverの新線条体、旧線条体、視床において有意に高かった（表1）。
次にモノアミンの取り込み、分泌機構に両系で差があるか否かを1週齢の前脳スライス標品を用いて検討した（図1）。各種刺激による[^{3}H]ノルエピネフリン分泌を測定したところ、Ca^{2+}イオノフォアA23187により分泌が促進された。また、脱分極刺激においても著しい分泌促進がみられた。これらの分泌は細胞外Ca^{2+}を無くすると消失

しており、ウズラ脳においても脱分極刺激による電位依存性Caチャネルを介した分泌機構が機能していると考えられる。また、100μMグルタミン酸刺激によっても[³H]ノルエピネフリン分泌が促進された。現在グルタミン酸受容体のサブタイプについて検討中である。[³H]ノルエピネフリン取り込みおよび刺激に応答した分泌に関して両系で有意な差はみられなかった。

次に脳内アミノ酸含量を測定した（図2）。ウズラの脳では一般皮質、小脳においてグルタミン酸、グルタミンが高いのに対して、脊髄ではグリシンが高い値を示した。また、ラットなどの哺乳類の脳に比べてタウリン含量が著しく低かった。正常ウズラとQuiverとを比較すると、一般皮質においてはグルタミン、タウリン含量がQuiverで有意に低く、逆にGABA含量は有意に高かった。脊髄においてもGABA含量がQuiverで増加していた。これらの知見はQuiverにおいて脳内モノアミンや神経活性アミノ酸含量が正常ウズラとは異なっていることを示しており、NFs欠損による振戦の原因の一つとして脳内神経伝達物質の異常が考えられる。

1週齢の前脳を用いたスライス標品において[³H]ノルエピネフリン分泌に関しては正常ウズラ、Quiver両系で差が認められなかったが、現在5週齢を用いた場合や脳各部位を個別に用いた場合について検討中である。またウズラ神経細胞の初代培養系についても併せて報告する。

表1　正常ウズラとQuiverの脳各部位におけるモノアミン含量の比較

A: Norepinephrine　　n = 8

Site	Normal	Quiver
	(ng/mg wet weight)	
GC	0.389 ± 0.015	0.376 ± 0.027
NS	0.357 ± 0.020	0.447 ± 0.024*
PP/PA	0.482 ± 0.020	0.488 ± 0.036
TH	1.879 ± 0.052	2.089 ± 0.071*
OL	0.754 ± 0.026	0.710 ± 0.051
CB	« 0.1	« 0.1
ME	1.724 ± 0.189	1.682 ± 0.224

B: 5-Hydroxytryptamine

Site	Normal	Quiver
	(ng/mg wet weight)	
GC	1.715 ± 0.119	1.910 ± 0.054
NS	1.232 ± 0.052	1.477 ± 0.035**
PP/PA	1.785 ± 0.207	2.399 ± 0.090*
TH	1.302 ± 0.062	1.638 ± 0.081**
OL	1.123 ± 0.051	1.068 ± 0.063
CB	« 0.1	« 0.1
ME	1.481 ± 0.140	1.955 ± 0.269

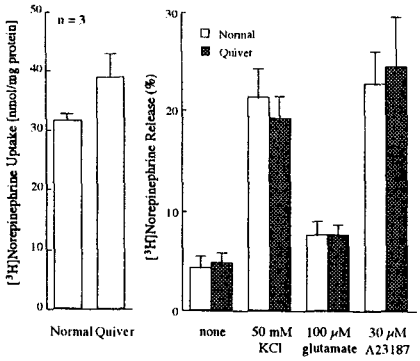


図1　正常ウズラとQuiverの前脳スライス標品におけるノルエピネフリン取り込みと放出量の比較

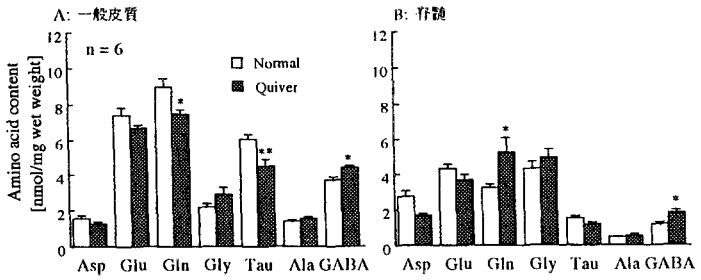


図2　正常ウズラとQuiverの脳各部位におけるアミノ酸含量の比較

（参考文献）

(1) H.Yamasaki,C.Itakura,and M.Mizutani (1991) *Acta Neuropathol.* 82,427-434
(2) M.Mizutani,T.Nunoya,H.Yamasaki,and C.Itakura (1992) *J.Hered.* 83(3) 234-235
(3) H.Yamasaki,G.S.Bennett,C.Itakura,and M.Mizutani (1992) *Lab. Invest.* 66(6) 734-743
(4) O.Ohara,Y.Gahara,T.Miyake,H.Teraoka,T.Kitamura (1993) *J.Cell Biol.* 121 387-395

160 *dw* マウス脳におけるカルシウム結合蛋白質：ヒポカルシンの免疫組織化学的研究

杉崎哲朗、山田　孝、高松　研、野口鉄也
(東邦大学・医学部・第二生理)

〔要約〕
dw マウス脳内におけるカルシウム結合蛋白質：ヒポカルシンの分布を免疫組織化学的に検討した。その結果、（1）海馬の錐体細胞の細胞体とその樹状突起は良く染めだされたが、正常マウスと比較すると*dw* マウスで全体的にその染まりが弱かった。（2）小脳のプルキンエ細胞の細胞体のヒポカルシンの染まりは正常マウスと差はなかった。しかし、両者ともにその染まり方は一様ではなく、濃淡が見られた。また、*dw* マウスでは樹状突起の末端が染めだされ、その発育が未熟であることが示唆された。（3）正常マウス大脳でのヒポカルシンの染まりは極めて弱かったが、*dw* マウスでは第二層から六層にかけて非常によく染めだされた。*dw* マウスには脳、とくに、大脳に発達障害があり、脳の機能も低下していることが明かにされていることから、今回の実験結果は、ヒポカルシンが、神経系の情報伝達機能および細胞連関形成機構に強く関与していることが示唆された。

〔目的〕
カルシウム結合蛋白質：ヒポカルシンは、3つのカルシウム結合部位 (EF - hand 構造) をもつカルモジュリン・スーパーファミリーに属する蛋白である (1, 2, 3)。すでに、斎藤ら (4) の *in situ* ハイブリダイゼーションならびに免疫組織化学的検索の結果、成熟ラット脳では海馬の錐体細胞に著しく多量に発現し、大脳皮質錐体細胞、小脳のプルキンエ細胞にもわずかではあるが発現することが報告されている。しかし、機能に関してはいまだ不明で、視細胞の明暗順応を調節するリカバリンやS - モジュリンと構造的に類似することから、神経細胞における刺激受容の細胞内情報伝達を調節している可能性が考えられている。今回、我々はヒポカルシン蛋白の機能を探る目的で、先天的に成長ホルモンと甲状腺ホルモンを欠損し、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(5) Snell 下垂体性小人症マウス(*dw* マウス)を用いて、ヒポカルシン蛋白の脳内での発現の局在を免疫組織化学的に検索し、正常マウスと比較検討した。

〔実験方法〕
40日齢の正常マウス(+/?)と*dw* マウス(*dw*/*dw*) を先ず生理的食塩水 (PBS)で、さらに Bouin 液で灌流固定後、脳を摘出、再び Bouin 液で3 日間4 ℃で固定後、パラフィン包埋を行ない、6 μm の切片を作成した。抗ヒポカルシン抗体は既報のもの (4) を PBS で 500 倍に希釈して用いた。免疫組織化学的手技は既報の方法 (6)によった。

〔結果および考察〕
40日齢の正常マウス脳を抗ヒポカルシン抗体で染めると、海馬の錐体細胞の細胞体とその樹状突起が非常に良く染めだされた(Fig. 1 A)。小脳のプルキンエ細胞の細胞体とその樹状突起も非常に強く染めだされた (Fig. 1 C)。しかし、大脳皮質での染まり方は、海馬および小脳と比較すると極めて弱く、第三層の錐体細胞がわずかに染まっただけであった(Fig. 1 E)。他方、*dw* マウスでも海馬の錐体細胞の細胞体とその樹状突起が染めだされたが、正常マウスと比較してその染まり方は全体に弱かった(Fig. 1B)。海馬の錐体細胞は刺激の受容に伴う可塑性に極めて富んでいることが知られており、海馬神経細胞間の刺激受容機構をヒポカルシンが調節している可能性が示唆されている。従って、海馬におけるヒポカルシンの関与すると考えられている情報伝達機能が、*dw* マウスでは正常マウスと比較して低下していることが示唆された。小脳のプルキンエ細胞の細胞体の染まりは正常マウスと差はなかったが、*dw* マウスでは樹状突起の末端が染め出されるという特徴が見られ、発育が未熟であることが示唆された(8)(Fig. 1 D)。しかし、正常マウス、*dw* マウスともに全てのプルキンエ細胞の細胞体が一様に染まっているのではなく、濃染するものと淡染するものが混在するが、とくに、小脳虫部の小舌 (I)、中心小葉 (II+III)、山頂 (IV+V)、ならびに、小節 (X) におけるプルキンエ細胞の細胞体の染まり方が、他の小葉と比較して全体に弱かった。ヒポカルシンの染まり方と小脳虫部小葉の系統発生学的な因果関係について興味の持たれるところであり、今後、詳細に検討しようと考えている。さらに、第1裂と後外側裂の間の小葉 (VI, VII A, VII B, VIII, IX) の分子層で、星状神経細胞と思われる細胞も染まることが認められ、*dw* マウスで比較的よく見られた。大脳皮質での染まり方は、正常マウスと著しく異なり、第二層、三層の錐体細胞の細胞体およびその先端突起が非常に強く染めだされた。第四、五、六層の細胞体も弱いながら染めだされた(Fig. 1 F)。すでに我々は、鍍銀染色ならびに抗ニューロンスペシフィックエノラーゼ抗体を用いた免疫組織学的検索で、*dw* マウス大脳の運動領野では、各層の錐体細胞は細

胞体が小さく、樹状突起も短く分枝に乏しく、突起上の棘の密度も低くなっていることを報告し、合わせて、生下日から20日間成長ホルモンと甲状腺ホルモンの併用投与することにより完全に回復することを明かにしてきた(6,7)。斎藤らのラット脳を用いた発達段階各時期のヒポカルシン発現の検索結果によれば(8)、大脳では出生前後から認められ、10日齢にかけて急激に増加し、その後減少し、生後2週齢以後一定値を示すことが知られている。この時期は、生後の大脳におけるグリア細胞の分裂・増殖の最も活発な時期であり、*dw*マウスではこのグリア細胞の分裂・増殖が著しく抑制されている(9)。従って、ヒポカルシン蛋白は大脳の細胞連関形成機構に強く関与していることが示唆された。

［文献］
(1) Takamatsu, K. and Uyemura, K. (1992) Brain Res. 571, 350-353
(2) Takamatsu, K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., 183, 245-251
(3) Kobayashi, M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., 189, 511-517
(4) Saitoh, S. et al. (1993) Neurosci. Letters, in press
(5) Noguchi, T. et al. (1982) J. Neurochem., 38, 257-263
(6) Noguchi, T. et al. (1984) Neurochem. Pathol., 12, 123-137
(7) Noguchi, T. et al. (1983) Dev. Brain Res., 10, 125-138
(8) 斎藤茂治、他 (1993) 第70回日本生理学会大会予稿集、220
(9) Noguchi, T. et al. (1982) J. Neurochem. 39, 1693-1699

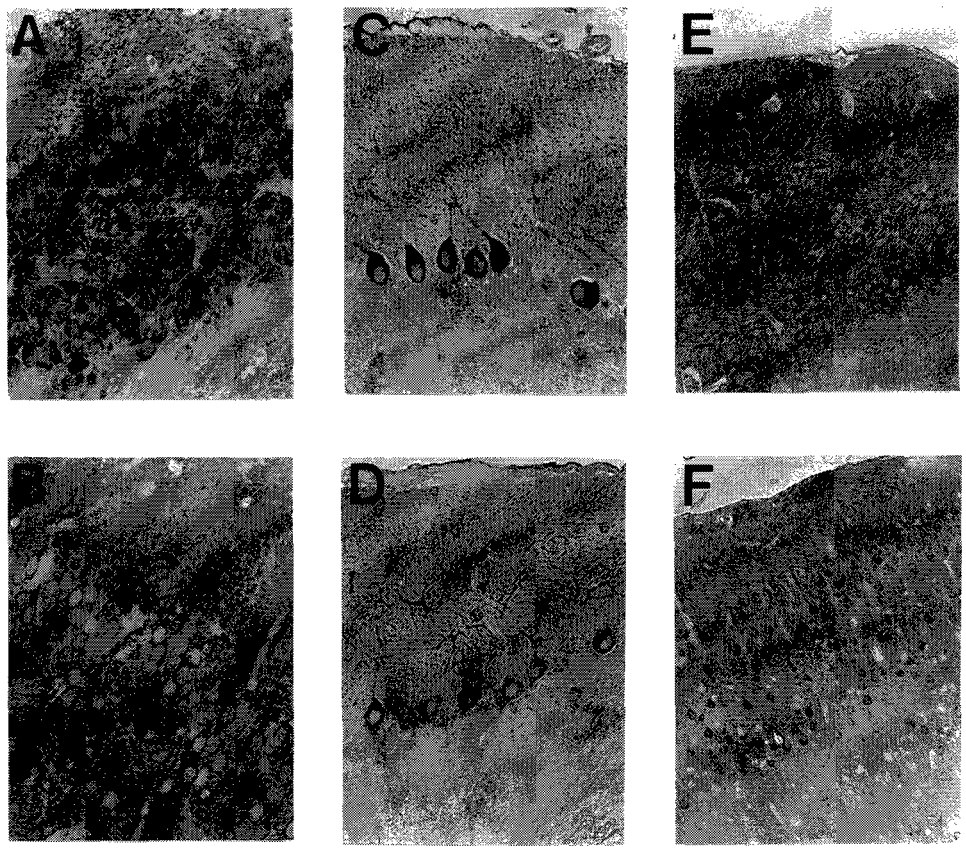


Fig. 1 Immunohistochemical localization of hippocalcin in the hippocampus (A, B), cerebellum (C, D), and cerebral cortex (E, F). +/?; A, C, E. *dw/dw*: B, D, F. Magnification; 100 x (A, B, C, D), 50 x (E, F).

161 p-Chloroamphetamine投与による脳内monoamineの経時的変化
—ラット側坐核における脳内透析法による検討—

杉田倫太郎*，関谷紫**，寺田恭子，澤　温***，伊藤哲一彦，笠原嘉，野村総一郎****
(藤田保健衛生・医・精神，トヨタ記念病院*，桶狭間病院**，さわ病院***，立川病院****)

〔要約〕
p-Chloroamphetamine(PCA)投与後のラット側坐核におけるmonoamine代謝変化とlocomotor activity(LA)の関連を調べる目的で、脳内透析法を用いてPCA投与後のdopamine(DA)とその代謝物である3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)、homovanillic acid(HVA)、及びserotonin(5-HT)とその代謝物である5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)とlocomotor activity(LA)の変化を、自由行動下において経時的に測定した。その結果LAは、PCA(2mg/kg, i.p.)投与後1時間目と2時間目において有意に増加し、同時に透析液中のDAは1時間目と2時間目に有意に増加した。これに対して5-HTは有意な変化を認めなかった。DOPAC、HVA、5-HIAAは各々1時間目から6時間目において有意に減少した。このことから、PCA投与により惹起されたLAの増加は、側坐核におけるDA放出による行動異常である可能性が示唆された。

〔緒言〕PCAは5-HT neuron に対してreleaserとして作用することや、動物に投与することによりDA行動異常及び5-HT行動異常を惹起することが報告されており、内因性精神病の精神症状の生物学的研究において極めて興味深い薬物である。しかしPCAによる動物の行動異常と脳内monoamine代謝の関連については、従来の行動研究及び断頭脳を使用した生化学研究からは、その正確な機序が解明されていない。一方側坐核は中脳辺縁系DA神経の終末核の一つであり、自発運動の発現及び情動、意欲の維持に深く関与していると考えられている。以上の視点からPCA投与後のmonoamine代謝変化とLAの関連を調べる目的で、PCA投与後のLAとラット側坐核のmonoamine及びmonoamine代謝産物の変化を脳内透析法を用いて経時的に測定し検討した。

〔方法〕手術は7週齢時のWistar系雄性ラットをpentobarbital麻酔下において脳定位固定装置に固定した後、透析プローブ装着時には側坐核の中心に透析部分が固定されるようにガイドカニューレをKönig & Klippelのアトラス(4)に基づきA=9.2mm,H=+2.0mm,L=1.3mmの位置に留置した。透析実験は、手術1週間後の8週齢時にHutson et al(3)の方法に従って作製された脳内透析プローブを用い、Sugita et al(5)の方法に準拠して行った(Fig.1)。30分毎連続3回の透析液を採取し、これを前値とした後、PCA投与群には2mg/kgを、対照群には生理食塩水を腹腔内投与した。その後1時間毎6時間まで透析液を採取した。同時にAnimex(Columbus Instrumental)を用いてLAを測定した。採取した透析液は、0.1%cystein 10μl(前値は5μl)と混和後、測定まで-75℃にて保存した。透析液中のDA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAAの測定は電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。投与前値を算術平均し、その値に対する投与後6時間までの各時間の値の変化率を算出して、分散分析後Student's unpaired t-testを用いて検定した。

〔結果〕投与前値の平均は、LA 106±27count/hour、DA 6.6±1.3pmol/ml、DOPAC 634.4±98.1pmol/ml、HVA 402.7±68.4pmol/ml、5-HT 2.1±0.8pmol/ml、5-HIAA 170.3±0.8pmol/ml(mean±SEM)であった。LAは、PCA投与後1、2時間目においてP<0.01(両側検定)にて有意に増加した(Fig.2,A)。透析液中のDAは、PCA投与後2、4時間目においてP<0.05(両側検定)にて有意に増加した(Fig.2,B)。DOPACは、PCA投与後1時間目においてP<0.05(両側検定)、2時間目から6時間目においてP<0.01(両側検定)にて有意に減少した。HVAは、PCA投与後1時間目から6時間目においてP<0.01(両側検定)にて有意に減少した。5-HTは、対照群との間に統計学的な有意差を認めなかった(Fig.2,C)。5-HIAAは、PCA投与後1時間目から6時間目においてP<0.01(両側検定)にて有意に減少した。

〔考察〕Amphetamine類似物質であるPCAは、従来から5-HTのreleaserとして広く動物実験に使用されている薬物であり、投与時に5-HT症候群が出現することが知られている。しかしDA behaviorとの関連も報告されており、現在のところmonoamine neuronに対する作用の詳細に関しては明かではない。

今回我々は脳内透析法を用いて自由行動下においてPCA投与後の中脳辺縁系DA神経の終末核である側坐核におけるmono-

amine代謝の変化をLAと同時に経時的に測定した。その結果、LAは、PCA投与後LAは1、2時間において極めて激しい有意なLAの増加を認め、その後は速やかにbasal levelに戻った。透析液中のDAの変化率の経時的変動は、ほぼLAの増加と一致して1、2時間目に有意な増加を示した。このことから、側坐核におけるDA放出とLAの推移の間には有意な時間的相関関係が確認されたと考えられる。一方5-HTの変化率の経時的変動については1時間目と2時間目に増加する傾向が認められたが、統計学的に有意差が認められず、側坐核における5-HT放出とLAの推移の間には時間的相関関係は確認されなかった。Hutson & Curzon(2)は前脳皮質においてPCA投与後のmonoamine代謝とLAを脳内透析により測定し、5-HTよりむしろDAの放出がLAと相関していると報告しているが、今回我々は、側坐核においてもPCA投与後のLAの増加がDA放出により引き起こされた可能性があることを示唆し、このHutson & Curzon(2)の報告を強く支持している。

一方、DAの代謝産物であるDOPAC、HVAと5-HTの代謝産物である5-HIAAは、DAの有意な増加や5-HTの増加傾向に対して、いずれも全ての時間において有意に減少した。Fuller(1)は、PCAの薬理学的研究よりPCAがmonoamine oxidase阻害作用を有することを明かにしており、今回の我々の結果はこのFuller(1)の知見によって解釈できると考えられる。

現在のところLAと最も関係が深い部位であるといわれている側坐核においてPCA投与後のmonoamine代謝を自由行動下において測定した報告は我々の知る限りはない。今回の我々の結果は、PCA投与により惹起されるLAの増加と側坐核におけるDA放出が関係していることを示唆するものであり、今後のPCAの行動薬理学的研究に意義あるものと考えるものである。

〔文献〕

1) Fuller, R.W. (1966) Life Sci., 5, 2247-2252.

2) Hutson, P.H. and Curzon, G. (1989) Br. J. Pharmacol., 96, 801-806.

3) Hutson, P.H., Sarna, G.S., Kantamaneni, B.D. and Curzon, G. (1985) J. Neurochem., 44, 1266-1273.

4) König, J.F. and Klippel, R.A. (1963) The Rat Brain. Williams and Wilkins, Baltimore.

5) Sugita, R., Sawa, Y., Nomura, S., Zorn, S.H. and Yamauchi, T. (1989) Neurochem. Res., 14, 267-270.

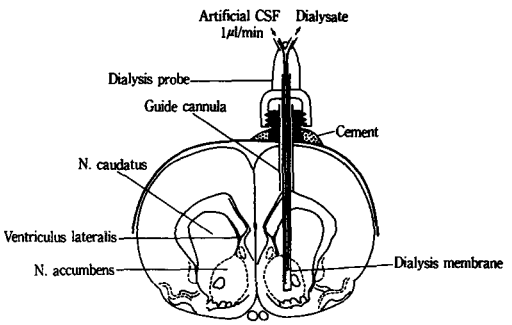


Fig.1 Schematic drawing of a dialysis probe inserted into the nucleus accumbens. (Sugita et al, 1989)

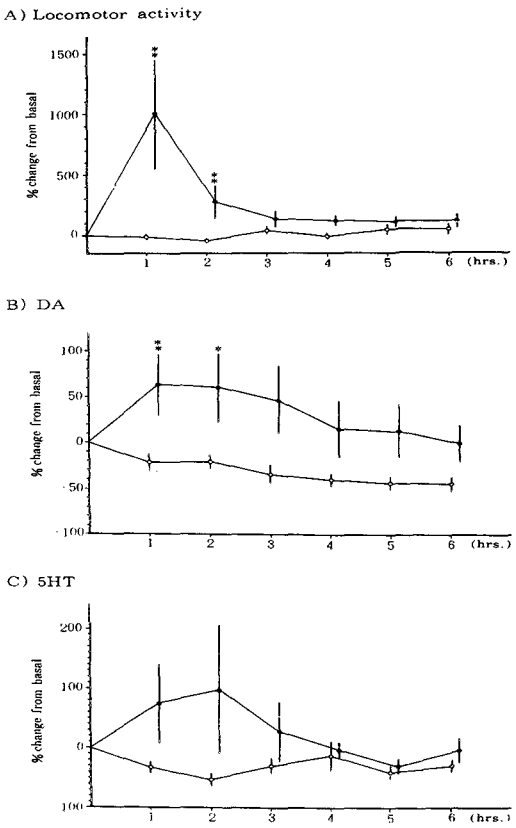


Fig.2. The time course after administration of PCA(2mg/kg, i.p.). Each value is expessed as a percentage(mean±S.E.M.) from basal level. (n=6)
● PCA, ○ control, **p<0.01, *p<0.05

162 高血圧自然発症ラットの脳内より見出したイサチン（内因性MAO活性阻害物質）

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)の血漿ノルエピネフリン(NE)濃度が正常血圧のウィスター系京都ラット(WKY)に比較して有意に上昇し、同時に測定した腎モノアミンオキシダーゼ(MAO)活性が有意に低値をとることを報告してきた[1]。脳卒中例ではSHRSPの血圧と腎MAO活性は有意な負の相関関係を示した。種々のストレスがMAO活性の低下を引き起こす。内因性MAO活性阻害物質はトリプリンと命名された。この内因性MAO活性阻害物質とトリプリンとの関係を明らかにすべく研究を進めた。SHRSPの尿中よりトリプリンの一つをガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(GC-MS)によりイサチンであることを同定した[2]。今回は、さらにSHRSPの脳内にも内因性MAO活性阻害物質が存在するか否かを検討した。イサチンはラット肝MAO活性を競合的かつ用量に依存して抑制した。外因的に投与したイサチンは、ラット脳内NE濃度、セロトニン(5-HT)濃度を上昇させた。イサチン一回投与ではWKYおよびSHRSPの血圧を上昇させなかった。しかしながら、イサチンを慢性経口投与すると血圧は有意に上昇した。以上よりイサチンは生体内にあってNEの運命を延長させSHRSPの高血圧発症に深く関与していることが示唆された。

〔目的〕 我々はSHRSPにおいて高血圧進展や脳卒中発症時に合成系の酵素が低下しているのでNEや5-HT濃度上昇には代謝系の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。種々のストレスがMAO活性を低下させる。内因性MAO活性阻害物質は、ヒト尿中で最初に見出された化学構造が不明のままにトリプリンと命名された。寒冷拘束ストレスによりトリプリンがラットの心臓や腎臓で増加することが報告された[3]。Gloverらは、ヒト尿中トリプリンの一つがイサチンであることを報告した。我々も、GC-MSによりWKYならびにSHRSPの尿中内因性MAO活性阻害物質の一つがヒト尿中より得られたものと同じイサチンであることを同定した[2]。本実験ではSHRSPの脳内にも内因性MAO活性阻害物質が存在している可能性を検討した。さらにイサチンの薬理活性を、血圧やモノアミン濃度の変動について測定することにより検討した。

〔方法〕 SHRSPの脳内内因性MAO活性阻害物質の抽出はElsworthらの方法[5]に基づいて行い、その抽出液をHPLC-UVを用いてトリプリンの含む分画を採取しこの溶液から再抽出した。MAO活性阻害物質の同定はGloverらの方法[5]により前述の抽出物を誘導化しGC-MSを用いて行った。外因的にWKYおよびSHRSPにイサチン(50, 200 mg/kg)を一回腹腔内投与し脳および腎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。アミン濃度はHPLC-ECDにより測定し、Lowry法[6]で得たタンパク量により補正した。また、イサチン(50, 200mg/kg/day)を飼料に混合し、WKYに4週間経口投与し血圧や尿中モノアミン排泄量の変化についても検討した。

〔結果〕 1）SHRSP脳内のMAO活性阻害物質はGC-MS測定の結果、ヒトならびにSHRSP尿中より見出された物質と同様にインドール化合物の一つイサチンであることが判明した。2）イサチンをラット腹腔内に投与し2時間後の脳内NE濃度はWKYの大脳皮質、海馬、小脳においてイサチンの用量に依存して上昇し、特に大脳皮質では無投薬群の2.18±0.31 ng/mg proteinに比較しイサチン(200mg/kg)投与群では11.52±2.39 ng/mg proteinと著明であった。SHRSPは脳のいずれの部位においてもイサチン投与によりNE濃度は上昇傾向を示した(図参照)。3）脳内5-HT濃度はイサチン(200 mg/kg)投与によ

り有意に上昇した。一方、5-HTの代謝回転(5-HIAA/5-HT)は有意に低下していた。4）同時に測定したWKYの腎NE濃度は有意に上昇した。一方、SHRSPでは200mg/kg群でNE濃度は有意に低下した。5-HT濃度はWKY、SHRSPいずれにおいてもイサチンの投与によって有意な変化は見られなかった。5）イサチンの慢性経口投与によりWKYの血圧は投与4週間後では無投薬群の114.3±5.28 mmHgに比較して200mg/kg投与群では124.4±5.45mmHgと有意に上昇した。6）尿中ドパミン(DA)排泄量は投与4週間後、200mg/kg投与群で無投薬群に比較して有意に上昇した。

〔考察〕 MAOは組織あるいは血漿中のモノアミン濃度を制御している重要な酵素である。我々もこれまでにSHRSPの尿中にもヒトと同様にイサチンが存在することを報告してきた。SHRSPの脳内からもGC-MSの結果イサチンが存在することを確認した。イサチンはラット肝ミトコンドリアのMAO活性を用量依存的かつ競合的に拮抗する。SHRSPから抽出したトリプリンは同週令のWKYの抽出物と比較して有意にMAO活性を低下させた。外因的にイサチンを投与した際の脳、腎のアミン濃度を測定するとWKYではその用量に依存して上昇したがSHRSPにおいてはその増加の割合が小であった。詳細は不明であるがダウンレギュレーションの理由でイサチンに対し感受性が低下していることが考えられる。また、イサチン(50, 200mg/kg)一回投与は腹腔内でも静脈内投与によっても血圧、心拍数に影響しなかった。すなわち一回投与は脳内モノアミン濃度を上昇させるが、そのまま行動や循環動態に影響を及ぼさないものと考えられた。そこで正常血圧のWKYにイサチンを慢性経口投与すると3週目より血圧は有意に上昇した。タイムラグがあって生理活性を発揮する理由は不詳である。生体内イサチン量と血圧、MAO活性は同調し中枢においても末梢においてもモノアミン濃度を変動させ血圧上昇に関わっていることが示唆された。

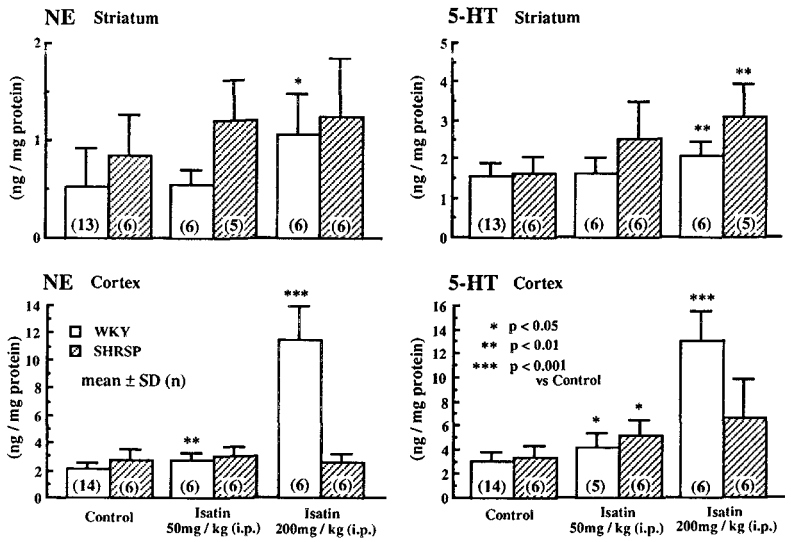


Fig. Norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) concentrations in cortex and striatum after isatin administration in SHRSP and WKY.

〔文献〕 (1) Minami, M., Senjo, M., Togashi, H. et al. (1988) Biogenic Amines 5, 517-526. (2) Hamaue, N., Minami, M., Kanamaru, Y. et al. (1992) Biogenic Amines 8, 401-412. (3) Glover,V., Bhattacharya, S.K. and Sandler, M. Nature (1981) 292, 247-250. (4) Glover,V., Halket,J.M., Watkins,P.J. et al. (1988) J. Neurochem., 51, 656-659. (5) Elsworth,J.D., Dewar,D., Glover,V. et al. (1986) J. Neural. Transm., 67, 45-56. (6) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.

163 培養アストロサイトF-アクチン再構成に対するエンドセリンの作用

小山　豊、藤田茂樹、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕
培養アストロサイトの細胞骨格アクチン構成に対するエンドセリン(ET)の作用を検討した。無血清培地中でのdi-butyryl cAMP (DBcAMP)およびサイトカラシンB(CB)での短時間処置は、ラット大脳培養アストロサイトを stellate shapeへ形態変化させると共に細胞骨格アクチン量を減少させた。ET-3 (1 nM)は、それ自体で培養アストロサイトの形態、および細胞骨格アクチン量を変化させなかったが、DBcAMPおよびCBによる形態変化、アクチンの減少を完全に抑制した。更に、DBcAMPおよびCB処置でstellate shapeとなった培養アストロサイトに対し、ET-3はその形態をprotoplasmic shapeにすると共に、減少した細胞骨格アクチン量を非処置の細胞のレベルに回復させた。DBcAMPおよびCB処置は、培養アストロサイトのstress fiberを消失させたが、ET-3による形態の回復に伴い、stress fiberの形成が認められた。以上の結果は、ETがアストロサイトの細胞骨格アクチン再構成を制御する細胞外シグナルであることを示す。

エンドセリン(ET)は、脳内に多く存在し、その神経伝達物質あるいは修飾物質としての役割が示唆されている。ET産生細胞であるアストロサイトは、ET受容体を有するがその役割は不明である。Protoplasmic shape培養アストロサイト(Type 1アストロサイト)は、無血清培地中で短時間のDBcAMP処置で、細胞質の退行を伴ったグリア突起形態(stellation) を起こす(5)。このstellationの発生機構については、DBcAMPによる処置が、アストロサイトの細胞骨格アクチン量を減少させること(2)、アクチン重合阻害薬であるサイトカラシンB(CB)が、DBcAMP類似の形態変化を起こすこと(1)、からアクチン再構成の関与が示唆されている。我々は、既に、ETがDBcAMPによる培養アストロサイトのstellation抑制することを認めており(4)、今回、その機構を明らかにする目的で、培養アストロサイトの細胞骨格アクチン再構成に対するETの作用を検討した。

【実験方法】

1．培養アストロサイトの調製：アストロサイトは1-2日令のWister系ラット大脳より、既報の方法で調整した(3)。10 %牛胎児血清を含んだEagle最小培地で18~28日間培養したprotoplasmic shape (Type 1)アストロサイトを実験に用いた。

2．細胞形態の観察：薬物は20 mM HEPES緩衝液を含んだ無血清培地中で処置された。薬物処置後、位相差顕微鏡下で各条件400個以上の細胞を観察し、細胞体の2倍以上の長さの突起を複数持つ細胞を"stellate cell"とスコアした。結果は、観察した全細胞に対するstellate cellの割合で示した。培養アストロサイトのF-アクチン構成の変化は、薬物処置後、細胞を3%パラホルムアルデヒドで固定し、ローダミン-ファロイジン染色し蛍光顕微鏡下で観察した。

3．細胞骨格アクチン量の測定：培養アストロサイトは薬物処置後、0.5% Triton X-100で5分間処置された。Lysateを遠心分離し、得られたTriton X-100不溶性分画（細胞骨格分画）をSDS-PAGEで分離した。GelをCoomassie bule染色し、560nm吸収をデンシトメーターで測定した。

【結果】

DBcAMP(1 mM)およびCB(5 μM)による処置は、protoplasmic shape培養アストロサイトに細胞質の退行を伴う突起形成(stellation)を起こし、120分の処置でstellate cellは全細胞の90%以上になった。ET-3は用量依存的にDBcAMPおよびCBによるstellationを抑制し、そのIC_{50}値は約50 pM、最大効果は、0.1 nMで得られた。ET-1およびsarafotoxin S6bもET-3と同様のpotencyでCBによるアストロサイトのstellationを抑制した。DBcAMPおよびCB処置によりstellate shapeとなったアストロサイトに対し1 nM ET-3の添加は、細胞質の拡張を起こし、ET-3添加30分後、stellate cellの割合は約15%にまで減少した(表1)。コルヒチン(10 μM)の同時添加は、DBcAMPおよびCBによるstellationを抑えたが、形態変化後に加えた場合は作用がなかった。培養アストロサイトの細胞骨格アクチンは、DBcAMPおよびCBによる処置で減少した(表2)が、中間系フィラメント(GFAP、ビメンチン)の量は変化しなかった。DBcAMPおよびCBによる細胞骨格アクチンの減少は、ET-3(1 nM)の同時添加により認められなくなった。DBcAMPおよびCBによる処置後、ET-3を加えた場合、減少した細胞骨格アクチンは、120分の処置で非処置のレベルまで回復した(表2)。ローダミン-ファロイジン染色により培養アストロサイトのF-アクチン構成を観察した結果、protoplasmic shapeの細胞には、stress fiberが主な構造として認められた(図1A)。120分のDBcAMP処置は、これを消失させたが、続くET-3の処置によりstress fiberの

形成が認められた(図1C)。

【考察】

DBcAMPによる培養アストロサイトのstellationは、細胞骨格F-アクチンの脱重合に伴い生じることが示唆されている(2)。我々は既に、ETが、DBcAMPによるstellationを抑制することを認めているが(4)、今回、F-アクチンに直接作用し、脱重合を起こすCBの作用も、ETにより抑制されることが示された。更に、DBcAMPおよびCBによる細胞骨格アクチン量の減少は、ETによるアストロサイトの細胞質の拡張と共に回復した(表1,2)。以上の結果より、ETは培養アストロサイトの細胞骨格アクチンの安定化あるいは重合を促進し、DBcAMPなどによる形態変化を抑制すると考えられる。また、アクチン構造の観察より、ETの作用は、stress fiberの形成を促すことが示された(図1)。アクチンの再構成は細胞の形態維持の他、増殖、運動性、cytosisに関わる。脳傷害の際には、アストロサイトの肥大、増殖促進などの機能変化(reactive astrocyte)、およびETの産生の促進が生じる。従って、ETによるアストロサイトのアクチン構成の制御は、reactive astrocyteの発生への関与を示唆すると考えられる。

表1．DBcAMPおよびCB惹起stellate cellに対するET-3の作用

		Stellate cells (%)			
		0 min	15	30	60
1 mM DBcAMP					
ET-3	(4)	95.9 ± 0.1	18.5 ± 7.2	14.9 ± 3.8	15.2 ± 5.8
colchicine	(3)	-----	-----	-----	85.8 ± 1.2
5 μM CB					
ET-3	(7)	91.5 ± 1.0	32.7 ± 3.2	18.5 ± 1.1	14.2 ± 2.8
colchicine	(5)	-----	-----	-----	86.1 ± 2.2

1 mM DBcAMPおよび5 μM CBにより形態変化したアストロサイトを、示した時間、1 nM ET-3あるいは10 μMコルヒチンで処置し、stellate cellの割合を測定した。結果は、平均±SEM。括弧内は実験数を示す。

表2．細胞骨格アクチン量に対するET-3の作用

	Actin/IF (Relative to control)
Control	1
DBcAMP 2hrs	0.64 ± 0.03
DBcAMP followed by ET-3 2hrs	1.02 ± 0.08
CB 1hr	0.72 ± 0.09
CB followed by ET-3 2hrs	0.97 ± 0.05
ET-3 2hrs	0.98 ± 0.12

培養アストロサイトを、示した条件で処置した後、細胞骨格分画のアクチン量を測定した。結果は、中間系フィラメント(IF；GFAPおよびvimentin)の量に対するアクチン量の割合で示す。6例の平均±SEM。

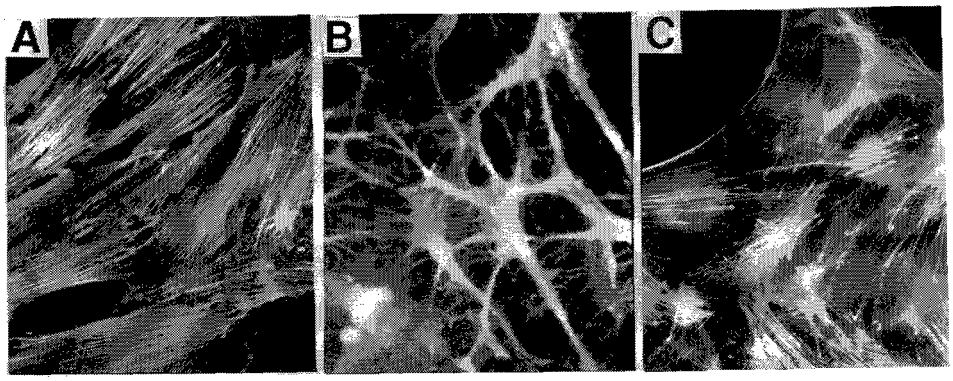


図1．培養アストロサイトF-アクチン構造の変化：(A)非処置、(B)1 mM DBcAMP処置2時間、(C)DBcAMP処置後1 nM ET-3添加2時間

【引用文献】

1)Ciesielski-Treska J., Guerold B. and Aunis D. (1982) Neuroscience, **2**, 509-522.

2)Goldman J.E. and Abramson B. (1990) Brain Res., **528**, 189-196.

3)Koyama Y., Baba A. and Iwata H. (1991) Neurosci.Lett., **122**, 210-212.0

4)Koyama Y., Ishibashi T., Hayata K. and Baba A. (1993) Brain Res., **600**, 81-88.

5)Shapiro D.L. (1973) Nature, **241**, 203-204.

164 ヒト脳リカバリン様蛋白質（BDRP1）のcDNAクローニング

小林正明、 高松 研、 藤城正敏、 斎藤茂治、 野口鉄也
（東邦大学・医学部・第二生理）

〔要約〕

ヒト脳cDNAライブラリーより6種類のリカバリン様蛋白質（BDRP1～6）のcDNAクローンを得，これらのうちBDRP1について全塩基配列を決定した。ヒトBDRP1 cDNAは582 bpの蛋白質翻訳領域を持ち、193残基のアミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。アミノ酸配列の解析から、ヒトBDRP1は3個のEF-hand構造とアミノ末端のミリスチン酸付加の共通配列を持ち、visinin, recoverin, S-modulin, neurocalcin, neural visinin-like protein, hippocalcinと高い相同性を示した。また、ヒト-ハムスター体細胞雑種ゲノムDNAを用いた解析より、ヒトBDRP1遺伝子は、第2染色体上に存在することが明らかとなった。ヒトrecoverin遺伝子は第17染色体上に存在することが報告されており、これらはマルチ遺伝子ファミリーであることが示唆された。

［緒言］

最近、新しい細胞内カルシウム結合蛋白質が、網膜（visinin[1], recoverin[2], S-modulin[3]）および脳（p23k[4], neurocalcin[5], neural visinin-like protein[6], hippocalcin[7]）より相ついで同定された。これらの蛋白質はいずれも3個のEF-hand構造を持ち、一次構造上極めて高い相同性を示すことから、神経系において蛋白質ファミリー（ここでは便宜上、リカバリン・ファミリーと呼ぶ）を形成しているものと考えられる。またこれらの蛋白質は、発現する部位および細胞が異なっている[8,9]。網膜視細胞に存在するvisinin, recoverinおよびS-modulinはカルシウム依存性にcyclic GMP phosphodiesterase (PDE)を活性化し、光応答の延長をもたらすことにより明暗順応を調節していると考えられている[3,10]。このカルシウム依存性のPDE活性化は、ロドプシンのリン酸化阻害を介していることが報告されている[11]。受容体のリン酸化は、情報伝達調節に見られる共通の機構である。脳に存在するp23k, neurocalcin, neural visinin-like proteinおよびhippocalcinの生理的機能については明らかにされていないが、各々が異なった部位の神経細胞においてカルシウム依存性に刺激受容に伴う細胞内情報伝達を調節している可能性が示唆される。今回、我々はリカバリン・ファミリーに属する蛋白質と精神神経疾患との関連を追求する目的で、ヒト脳cDNAライブラリーからのクローニングを試みた。

［実験方法］

1）cDNAクローニング：ヒト脳cDNAライブラリー（Clontech Labs.USA）を、ラットhippocalcin cDNAをプローブとしてlow stringency conditionでスクリーニングを行った。

2）ヒトBDRP1の染色体の同定：ヒト-ハムスター体細胞雑種ゲノムDNA（BIOS.USA）を用いsouthern blottingを行った。プローブとしてヒトBDRP1 cDNAの5'端非翻訳領域（約150 bp）を用いた。

［結果と考察］

ヒト脳cDNAライブラリーをラットhippocalcin cDNAをプローブとしてlow stringency conditionでスクリーニングし、8個の独立したクローンを得た。これらのクローンは、制限酵素部位のパターンから6種類のcDNAに対応すると考えられ、BDRP1～6と命名した。これらのうち、BDRP1について全塩基配列を決定した。BDRP1 cDNAは全長968 bpで、全蛋白質翻訳領域を含んでいた。翻訳領域は582塩基対からなり、193残基のアミノ酸からなる推定分子量22,282 dalton, および等電点5.22のポリペプチドをコードしていた（図-1）。ヒトBDRP1の予想アミノ酸配列は他のリカバリン・ファミリー蛋白質と高い相同性を示し、3個のEF-hand構造とアミノ末端のミリスチン酸付加の共通配列が認められた。これらの構造上の特徴はリカバリン・ファミリーの蛋白質に共通している。Hippocalcinでは3個のEF-hand構造ともカルシウム結合活性を持ち、アミノ末端にミリスチン酸化を受けることが示されている[12]。また、ヒト-ハムスター体細胞雑種ゲノムDNAを用いた解析より、ヒトBDRP1遺伝子は、第2染色体上に存在することが明らかとなった（図-2）。ヒトrecoverin遺伝子は第17染色体上に存在することが報告されており[13]、リカバリン・ファミリーはマルチ遺伝子ファミリーであることが示唆された。

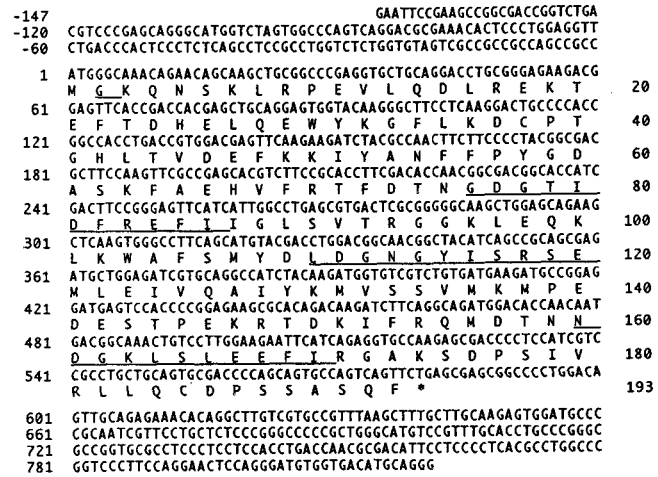


Fig. 1. The nucleotide sequence of cDNA for BDRP1 and the deduced amino acid sequence. The nucleotide and deduced amino acid sequences are numbered beginning with the first nucleotide of the translational initiation codon (left side) and the initiator methionine (right side), respectively. Three putative calcium-binding domains of the EF-hand structure are underlined. * indicates termination codon.

Cell		Human Chromosome																						
Line	BDRP1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
937	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
854	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
507	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
983	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1079	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1006	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
756	-	-	-	-	-	D	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
904	-	-	-	-	-	D	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
909	-	-	-	-	-	D	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
967	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
862	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
860	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
1049	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
683	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
867	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
750	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
212	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
734	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Fig. 2. Chromosomal mappiong of the human BDRP1 Gene. For each hybrid cell line, the presence (+) or absence (-) of each of the human chromosomes in the hybrid is indicated in the columns under chromosome. D=Deletion at p15.1-15.2. In the column labeled BDRP1, the presence (+) or absence (-) of human BDRP1-hybridizing band(s) in each cell line is indicated.

[文献]

1) Yamagata K. et al. (1990) Neuron 2, 469-476
2) Dizhoor A.M. et al. (1991) Science 251, 915-918
3) Kawamura S. and Murakami M. (1991) Nature 349, 420-423
4) Takamatsu K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 245-251
5) Okazaki K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 185, 147-153
6) Kuno T. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 1219-1225
7) Kobayashi M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 511-517
8) Takamatsu K. and Uyemura K. (1992) Brain Res. 571, 350-353
9) Saitoh, S. et al. (1993) Neurosci. Lett. (in press)
10) Gray-Keller M. et al. (1993) Neuron 10, 523-531
11) Kawamura S. (1993) Nature 362, 855-857
12) Kobayashi M. et al. (1993) J. Biol. Chem. (in press)
13) Murakami A. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 234-244

165 非神経細胞に発現したドレブリン蛋白が細胞接着に及ぼす影響

池田圭朗[2)]、白尾智明[3)]、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)]、群馬大学・医・行動分析[3)]

〔要約〕 ドレブリン A cDNAをもつ発現ベクターをL細胞に導入して得られた形質転換線維芽細胞 MiwD-6 と L細胞に tubulin の脱重合剤であるcolcemid と actin の脱重合剤である cytochalasin D を加えたところ、L細胞のほとんどが球形化したのに対し、MiwD-6 の細胞突起は比較的よく維持された。一定濃度の colcemid 存在下において、この形態変化と cytochalasin D 濃度との間には正の相関を認めた。また、 MiwD-6 と L細胞の cell spreading 及び cell adhesion には有意差を認めなかったが、cytochalasin D 存在下では両方とも有意差を認めた。各脱重合剤添加時の tubulin および F-actin の免疫染色では、微小管、ストレスファイバーの形状変化は両者同様であったが、抗ビンキュリン抗体を用いて cytochalasin D添加時の接着斑を解析すると、MiwD-6 のほうが L細胞よりも接着斑がよく維持されていた。以上のことから、ドレブリンは actin の重合状態を変化させることによって接着斑を安定化し、細胞基質間接着を安定化していると考えられた。

［緒言］ ドレブリンは神経組織の発生過程で特異的に発現するアクチン結合蛋白であり、ヒト及びラットではドレブリンE（幼若型）からドレブリンA（成熟型）へアイソフォームが変化する。そして、ドレブリンAはある程度以上成熟した中枢神経にのみ存在する[2,3)]。一方、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞ではドレブリンが接着斑部に強く発現していることが明かになっており、細胞接着との関係が示唆されている。我々は既にドレブリン A cDNAと β-actin promoterをもつ発現ベクターを作製してL細胞に導入し、形質転換線維芽細胞 MiwD-6 を確立した[1)]が、今回、この MiwD-6 を用いて、ドレブリンAが細胞基質間接着に及ぼす影響について解析した。

［実験方法］ MiwD-6 と L細胞を、poly-L-lysineを塗布したカバースリップ上でDMEM,10%FCSにて細胞密度10^5個／mlで24時間培養した。そして、それぞれに種々の濃度のcolcemid (0 μg/ml, 0.05 μg/ml, 0.5 μg/ml, 5.0 μg/ml, 50 μg/ml)とcytochalasin D (0 μg/ml, 0.005 μg/ml, 0.05 μg/ml, 0.5 μg/ml, 5.0 μg/ml)を添加してさらに1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視野においてrounded cell数を計測し、全細胞数に対する比率を算出した。2：3.5%ホルムアルデヒド、0.9%NaCl、200mMリン酸緩衝液(pH7.4)で30分間固定後、TritonX-100処理し、抗β-チュブリンモノクローナル抗体あるいは抗ビンキュリンモノクローナル抗体とその二次抗体FITC標識抗マウスIgG、および細胞骨格蛋白F-actinに結合するNBD-Phallacidinを用いた染色を行って微小管、ストレスファイバー、接着斑の変化を観察した。細胞基質間接着については次のように行った。cell spreading: MiwD-6 と L細胞をプラスチック組織培養ディッシュ上でDMEM,10%FCSにて細胞密度10^5個／mlで24時間培養した後、トリプシン処理し、得られた細胞浮遊液を800rpm,5分間遠心する。上清を取り除き、DMEM,10%FCSまたは cytochalasin D (0.5 μ M)添加DMEM,10%FCSを加えて十分にピペッティングを行った後、DMEM,10%FCSで10分間前処置したプラスチック組織培養ディッシュ上に注ぐ。10分、20分、40分、60分、90分後に倒立顕微鏡下、最低10視野において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。cell adhesion: MiwD-6 と L細胞を上記と同様にプラスチック組織培養ディッシュ上に散布して、5分、10分、20分、40分、60分、90分後にディッシュを振とう器に固定。150rpm, 10秒間振とうさせた後、浮遊細胞を含む培溶液を別のディッシュ上に移す。倒立顕微鏡下、最低10視野において両ディッシュ上の細胞数を計測して接着細胞の割合を算出した。

［結果］ colcemid (5 μ g/ml) と cytochalasin D (0.5 μ g/ml) を加えたところ、L細胞のほとんどは球形化し、rounded cell は90.4%に達したのと対照的に、MiwD-6 の形態はよく維持され rounded cell は 22.7% であった (Fig.1)。colcemid の濃度を5 μ g/mlに固定すると、cytochalasin D 濃度0.5 μ g/ml以下ではL細胞はcytochalasin D 濃度の上昇に伴ってrounded cellの割合が著しく増加したのに対し、MiwD-6 は軽度の増加に留まった (Fig.2)。colcemid (5 μ g/ml) または cytochalasin D (0.5 μ g/ml) 添加時の tubulin および F-actin の免疫染色では、L細胞、MiwD-6とも微小管の消失とストレスファイバーからcytoplasmic poolへの変化が観察され、その形状変化に大きな違いは見られなかったが、抗ビンキュリン抗体を用いて cytochalasin D添加時の接着斑を解析すると、MiwD-6 のほうが L細胞よりも接着斑がよく維持されていた(Fig.3)。また、cytochalasin D 非存在下では MiwD-6 と L細胞の cell spreading 及び cell adhesion に有意差を認めなかったが、cytochalasin D 存在下では培養60分の時点で、cell spreadingは 71.0% と 51.5%、cell adhesion は 78.6% と 60.4%であり、両方とも有意差を認めた(Fig.4., 5.)。

［考察］ MiwD-6 と L細胞に colcemid と cytochalasin D を加えたときの形態変化の差、即ち、L細胞のほとんどが球形化したのに対し、MiwD-6 細胞が細胞突起をよく維持したという現象は、一定濃度 colcemid 存在下においてcytochalasin D 濃度の増加に伴って著しくなるため、actin の重合状態の違いが影響していると思われる。また、各脱重合剤添加時のtubulinおよび F-actin の染色では、微小管とストレスファイバーの形状変化は両者同様であったが、抗ビンキュリン抗体を用いて cytochalasin D添加時の接着斑を解析すると、MiwD-6 のほうが L細胞よりもよく維持されており、cytochalasin D はビンキュリンに影響を与えないことから、ドレブリンは特に接着斑部の actin 重合を安定化している可能性がある。次に、 MiwD-6 と L細胞の cell spreading 及び cell adhesion がcytochalasin D 非存在下では有意差を認めず、cytochalasin D 存在下で有意差を認めたことから、ドレブリンによる接着斑部 actin 重合の安定化が細胞基質間接着の強化に寄与していると考えられる。以上のことから、ドレブリンは actin の重合状態

を変化させることによって接着斑を安定化し、細胞基質間接着を安定化していると考えられた。

今後はドレブリンとストレスファイバーの関係について検討すると共に、ヒト神経芽細胞腫等ドレブリン発現細胞の発現抑制により、ドレブリンと細胞骨格、細胞接着の関係について更に解析を進めていきたい。

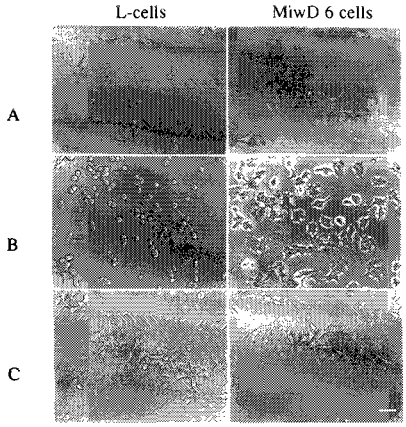


Fig.1. Morphological changes in L-cells and MiwD-6 cells after treatment with colcemid and cytochalasin D Bar:40 μ m
A:untreated, B:colcemid[5 μ g/ml] +cytochalasin D[5 μ g/ml],
C:24 hours after removal of colcemid and cytochalasin D

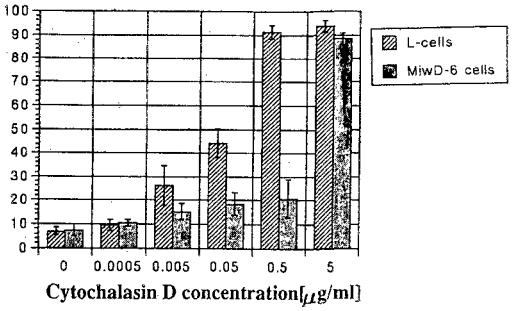


Fig.2 Morphological changes caused by cytochalasin D (colcemid concentration is fixed at 5 μ g/ml)

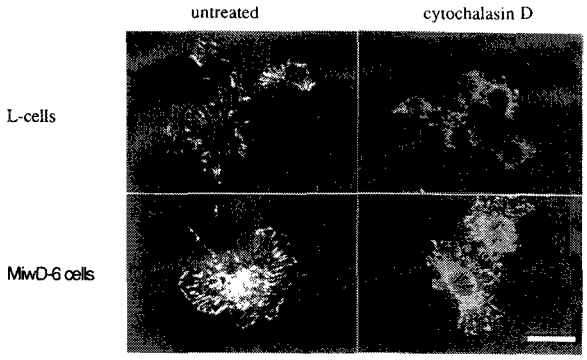


Fig.3. Immunostaining of L-cells and MiwD-6 cells with anti-vinculin antibody Bar: 20 μ m

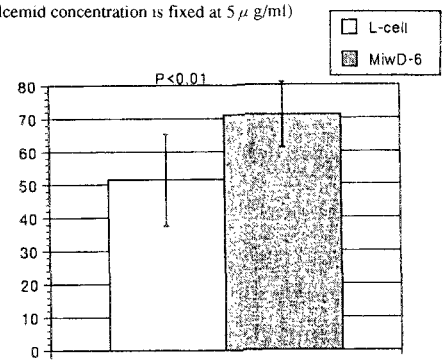


Fig.4. Cell spreading of L-cells and Miw D-6 cells after treatment with cytochalasin D [0.5 μ g/ml] for 1 hour

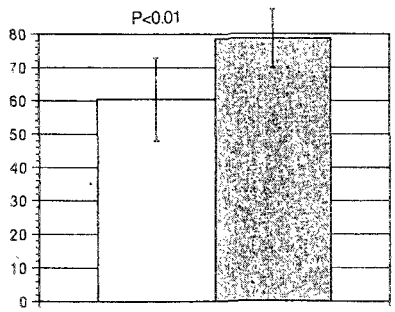


Fig.5. Cell-substrate adhesion of L-cells and Miw D-6 cells after treatment with cytochalasin D[0.5 μ g/ml] for 1 hour

〔文献〕
1) 池田圭朗、白尾智明、浅田英穂、Peter Kaub、戸谷重雄、植村慶 (1992)神経化学, 31 : 564-565
2) Shirao,T. and Obata,K.(1985) J.Neurochem. 44 : 1210-1216
3) Shirao,T.,Kojima,N.,Nabeta,Y. and Obata,K.(1989) Proc. Japan Acad. 65 Ser.B : 169-172

166 IDPN中毒神経における細胞骨格再編成とニューロフィラメント蛋白リン酸化との関連

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) は、ニューロフィラメント(NF)の軸索内輸送を阻害し、軸索細胞骨格の再編成をひき起こす神経毒である。我々は、ラット坐骨神経運動繊維の系を用いて、IDPN投与によるNF蛋白のリン酸化状態の経時変化と、軸索微小管の安定性との対応を調べ、細胞骨格の構築におけるリン酸化の調節機能を検討した。また、輸送停止とNF蛋白の分解との関連についても調べた。

1. 200k NFサブユニット(NF-H)のCOOH側リン酸化状態を識別する抗体を用いて、正常神経では前根部で進行するリン酸化が、IDPN投与後12時間～１日で一過性に抑制されることがわかった。
2. 正常神経では軸索チューブリンの約50% が低温不溶性の安定重合型であるが、IDPN投与１日後からその比率が減少しはじめ、３日後に最低値の 30%に達した後、徐々に回復する。この経過はIDPNによるNFと微小管の解離とその回復過程に一致しており、NFとの相互作用が軸索微小管の安定化に寄与することを示すとともに、NF-Hリン酸化がこれを調節する可能性を示唆する。
3. 輸送停止により貯留したNF蛋白の輸送は３週間後も回復せず、その分解が加速される。

IDPN は、NF蛋白の軸索内輸送を阻害し、軸索近位部にNFの貯留を起こすことが知られており(1,3)、Motor Neuron Diseaseなどの疾患モデルとしても注目される神経毒である。我々は、IDPNによる輸送停止は近位部に留まらず、軸索の全長にわたって投与後２日以内に起こること、これまで報告されている長期経過(2,10)と異り、初期にNF蛋白のリン酸化状態が変化することを示す結果を得た(9)。NF の高分子量サブユニットNF-HとNF-MはCOOH末端側に KSP配列から成るリン酸化部位を多数含み、多重リン酸化をうけることが知られているが、その生理的意義は不明である(5)。 今回更に、IDPN投与後のNF蛋白リン酸化の変化を定量的に調べるとともに、NF－微小管の相互作用に対するリン酸化の影響について検討した。また、IDPNによる輸送停止がNF蛋白の分解過程にも影響を与えることを見出したのであわせて報告する。

＜方法＞ 軸索内輸送による細胞骨格蛋白の標識：７週齢ラットの脊髄前角L_3-L_5に L-[^{35}S]メチオニン 50uCi(0.2ulx2)を注入し、直後または一定期間後にIDPN 1.5g/kg体重を腹腔内投与した。標識３週間後（10週齢）に坐骨神経と前根を摘出して 8mmの連続切片にした。各切片を凍結破砕後、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とNF蛋白の各バンドに含まれる放射活性を測定した。

NF-Hリン酸化状態の検索：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、４コの 6mm切片に切断した。各切片に含まれるNF-HおよびNF-Lを以下の３種のモノクローナル抗体を用いたイムノブロットで検出し、レーザーデンシトメーターで定量した。 (1)高度にリン酸化されたNF-Hに対する抗体(SMI-31; Sternberger Monoclonals)、 (2)脱リン酸化NF-Hに対する抗体(SMI-32)、 (3)リン酸化に左右されないNF-Lに対する抗体(NR-4; Boeringer Mannheim)。（抗体の特異性については文献４を参照）

＜結果と考察＞ SMI-31/NR-4 の免疫染色比および SMI-32/NR-4の免疫染色比を各々リン酸化および脱リン酸化の指標とすると、正常状態では、細胞体に最も近い切片１でリン酸化程度が低く、切片２、３でリ

ン酸化が進行することが示される（図.1:control)。 IDPN投与により、1日後をピークとする SMI-32 反応性の一過性上昇がみられる（図.1)。この時、SMI-31反応性は低下しており、リン酸化が一時的に抑制されると考えられる。SMI-31反応性は、2,3 日後に上昇した後、1週間後にはほぼ正常レベルに戻る。

軸索チューブリンには、低温下、1% Triton に不溶性の安定重合型がほぼ50% 存在するが(7)、 その安定化機構は明らかではない。軸索内を移動中の標識チューブリンについて、IDPN投与後の溶解性と輸送パターンの変化を調べた結果、1日後から安定重合型の比率が低下しはじめ、3日後に30% と最低値に達した後、数週間で徐々に正常レベルに戻ることを見出した（図.2)。 このような経過は、軸索全長にわたって観察されるNFと微小管の解離現象およびその回復過程とよく一致し(6)、 NFとの相互作用が軸索微小管の安定化に寄与することを示すとともに、これがNF-Hのリン酸化によって調節される可能性を示唆する。

IDPNによりチューブリンの一部も輸送が阻害され、NF蛋白とともに貯留するが、大部分は数日以内に輸送が回復する。一方、貯留したNF蛋白の輸送回復は3週間後にもほとんど見られず、NF-Lについてはその分解が進むことが明らかとなった（図.3)。 軸索細胞骨格蛋白は代謝的に安定で、主として神経終末部に達した後、分解されると考えられてきたが、輸送停止によって分解促進が起こることは、輸送と分解のバランスが制御されていることを示している。加齢に伴ってNF蛋白の輸送が極度に遅くなった場合にも、分解が促進されることから(8)、分解過程の破綻が病的状態の発生につながる可能性が示唆される。

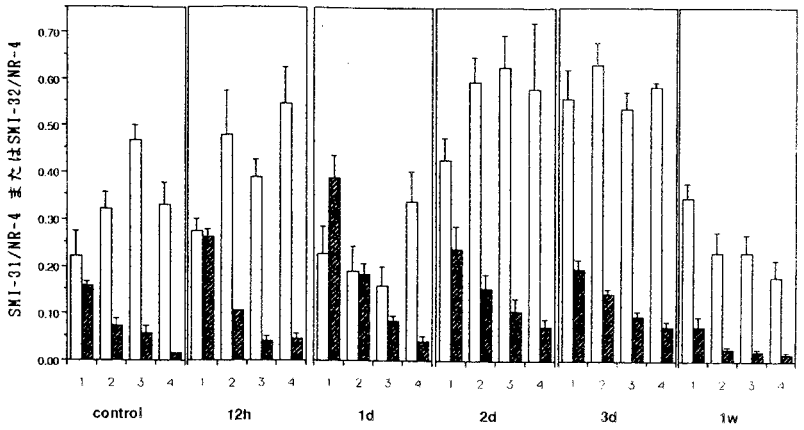


図.1: IDPN投与後のNF-H リン酸化状態の変化。 L4前根を近位部より1～4の 6mm切片に分け、高リン酸化NF-Hを認識するSMI-31、脱リン酸化NF-Hを認識するSMI-32、及びNF-Lに対するNR-4の3種の抗体を用いたWestern blotを行い、定量した。 □: SMI-31/NR-4 ▨: SMI-32/NR-4 平均値±SEM

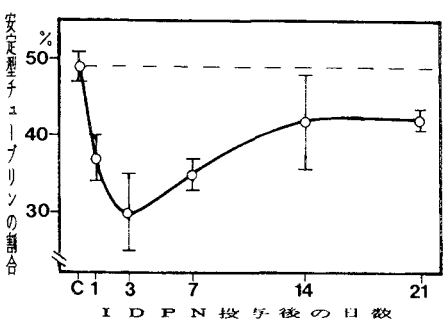


図.2: IDPN投与後の安定重合型チューブリンの割合の変化。

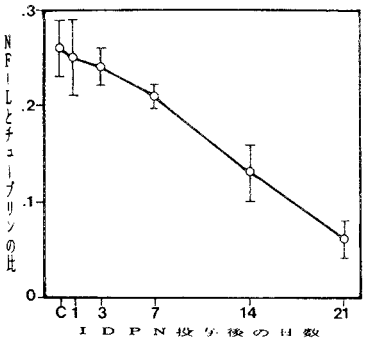


図.3: IDPN投与後のNF-Lの分解促進。

(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)Nixon,R.A. & Sihag,R. K. (1991) TINS, 14, 501 (6)Papasozomenos,S.C. et al. (1981) J.Cell Biol., 91, 866 (7)Tashiro,T. & Komiya,Y.(1989)J.Neurosci. 9, 760 (8)Tashiro,T. & Komiya,Y.(1991)J.Neurosci. Res., 30, 192 (9)田代,今井,小宮(1992)神経化学,31,198 (10)Watson,D.F. et al. (1989) J.Neurochem., 53, 1818

167 スフィンゴシンによるマウス神経芽腫細胞の神経突起伸展の抑制

上村敬一，武富　保
（信州大・医・心脈管病研・脂質生化）

〔要約〕

マウス神経芽腫細胞 NS-20Y を血清を除いた培地中で培養したときにみられる神経突起の伸展は、スフィンゴシンを培地に添加すると濃度依存的に抑制された。この抑制効果は可逆的であり、培地からスフィンゴシンをのぞくと神経突起の伸展が起こり、また神経突起をあらかじめ伸展させた後にスフィンゴシンを加えると、神経突起の退縮を引き起こした。一方、プロテインキナーゼ阻害剤 H-7 は NS-20Y細胞の神経突起伸展をまったく抑制せず、神経突起を退縮させる作用も示さなかったこと、PMA で前処理した細胞においても神経突起の伸展とスフィンゴシンによるその抑制がみられたことから、スフィンゴシンの効果はプロテインキナーゼCに依存しない経路によることが示唆された。

マウス神経芽腫細胞の神経突起伸展が、外来性 sphingosylphosphocholine (SPC) により促進されること、SPC は細胞に取り込まれた後、スフィンゴシン、セラミドを経てスフィンゴミエリンへと代謝されることをすでに報告した(1)。また、神経突起の伸展は糖脂質合成酵素の阻害剤を添加することにより強く抑制され(2)、スフィンゴ脂質代謝は神経突起の伸展に重要な役割を果していると考えられる。スフィンゴシンはプロテインキナーゼCの阻害作用により細胞の機能にさまざまな影響を及ぼすことが知られている一方、プロテインキナーゼCに依存しない効果を示す例も多く報告されている。今回、神経突起伸展に及ぼすスフィンゴシンの効果について検討したので報告する。

［方法］

マウス神経芽腫細胞 NS-20Y (2×10^4 個)を Petri dish (9 cm^2) に播き24時間培養した後、培地を 10% fetal calf serum (FCS) 含有 Dulbecco's MEM (DMEM) より serum-free medium (2 ml) に交換、さらに24時間培養してから神経突起の伸展を測定した(2)。スフィンゴシン（ブタ脊髄 galactosylceramide より調製、ウシ血清アルブミンと等モルの complexとした）と H-7 は培地交換時に添加した。神経突起の退縮をみる場合は、serum-free medium に交換して24時間培養し、神経突起の伸展を起こさせた後に添加してさらに24時間培養した。Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理は、細胞播種時に 1 μM を添加して24時間行った。

［結果と考察］

NS-20Y細胞は、10% FCS を含む培地中ではほとんど神経突起を持たないが、培地から血清を除くと著しい神経突起の伸展を起こし、24時間後に神経突起を持つ細胞は50～60%に達した (Fig. 1A)。スフィンゴシンはこの神経突起の伸展を濃度に依存して抑制し、1～2 μM で最大の抑制効果を示した (Fig. 1B and 2A)。この抑制は可逆的であり、スフィンゴシン (2 μM, 24 h) 添加後、培地からスフィンゴシンを除くと対照と同程度の神経突起伸展がみられた。また、細胞数、生存率、[^{3}H]thymidine の取り込みにはスフィンゴシン添加群と対照との間に差を認めなかった。あらかじめ伸展させた神経突起に対して、スフィンゴシンの添加は、その退縮を引き起こした (Fig. 1C and 2A)。スフィンゴシン誘導体のうち、N,N-dimethylsphingosine はスフィンゴシンの約10倍強い抑制効果を示したが、N-acetylsphingosine およびセラミドの効果は弱かった。

プロテインキナーゼ阻害剤 H-7 は、血清を除いた培地中での神経突起伸展をまったく抑制せず、神経突起の退縮も起こさなかった (Fig. 2B)。一方、10% FCS を含む培地中では H-7 の添加により神経突起の神経突起の伸展がみられたが (Fig. 2B)、スフィンゴシンにはその作用は無く (Fig. 2A) また H-7 による神経突起伸展をスフィンゴシンは抑制しなかった (Table 1)。PMA で前処理した細胞においても、血清を除いた条件下での神経突起の伸展とスフィンゴシン

によるその抑制がみられた (Table 2) 。これらの結果から、NS-20Y 細胞でみられる serum-free medium 中での神経突起の伸展、およびスフィンゴシンの神経突起伸展に対する抑制効果は、プロテインキナーゼCに依存しない経路によるものと考えられる。

[文献] (1) Sugiyama, E., Uemura, K., Hara, A. & Taketomi, T. (1993) J. Biochem. 113, 467-472
(2) Uemura, K., Sugiyama, E. & Taketomi, T. (1991) J. Biochem. 110, 96-102

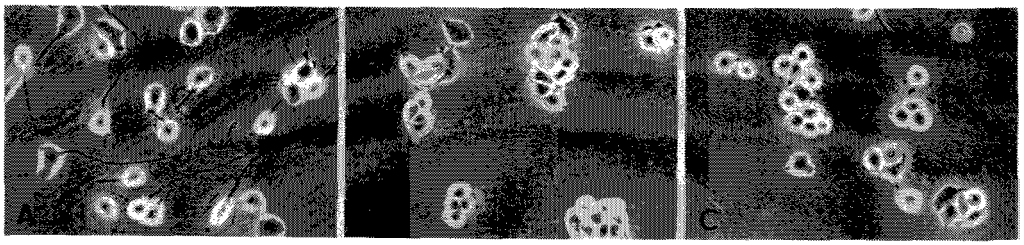


Fig. 1 Effect of sphingosine on neurite outgrowth of NS-20Y cells in serum-free medium.

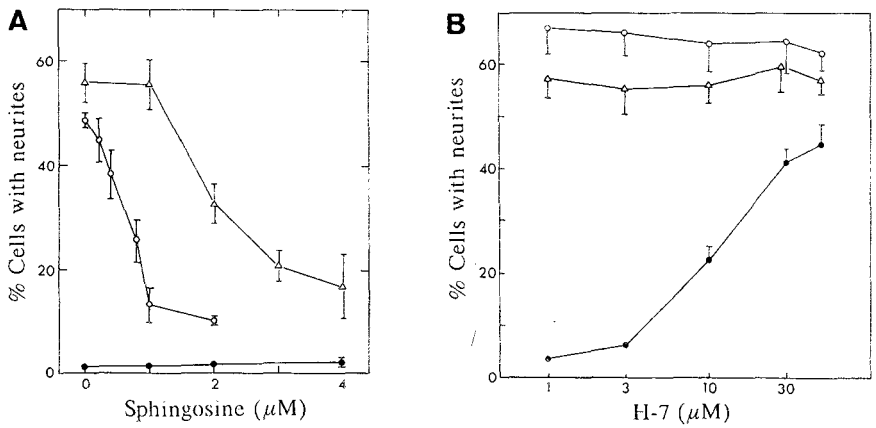


Fig. 2 Effect of sphingosine and H-7 on neurite outgrowth.
○, serum-free DMEM; ●, DMEM + 10% FCS; △, serum-free DMEM alone (24 h), then treatment for 24 h.

Table 1 Effect of sphingosine and H-7 on neurite outgrowth.

Addition	μM	Cells with neurites (%)	
		-FCS	+10% FCS
None		62.8±3.9	2.9±0.8
Sphingosine	2	18.4±1.5	2.0±0.6
H-7	30	67.0±4.8	34.4±4.7
Sphingosine + H-7	2 + 30	34.0±1.4	34.8±3.7

Table 2 Effect of prolonged phorbol ester treatment on neurite outgrowth.

Addition	Cells with neurites (%)	
	Untreated	PMA pretreatment
None	53.5±4.2	53.2±2.9
Sphingosine (2 μM)	19.0±1.6	21.5±1.6

168 成長円錐を退縮させる活性因子の作用機序：G蛋白共役系の関与

五十嵐道弘＊, S.M. Strittmatter, T. Vartanian, M.C. Fishman
マサチューセッツ総合病院、＊現・群馬大・医・分子病態学

〔要約〕神経成長の抑制因子は、培養系では成長円錐の退縮(growth cone collapse)を引き起こすことが知られている。鶏胚後根神経節をG蛋白(Go/Gi)阻害剤である百日咳毒素(PTX)で前処理すると、神経成長の抑制因子を含む、①鶏胚脳由来の膜可溶化画分、②成熟脳ミエリン（またはその抑制活性分子NI-35蛋白）による成長円錐の退縮活性は著しく阻害された。網膜神経節細胞でもPTXによる退縮の阻害がみられた。一方、G蛋白(GO/Gi)の活性化剤マストパランは成長円錐を退縮させた。以上の結果は、ある種の膜結合性の神経成長抑制因子が、成長円錐に内在するG蛋白(Go/Gi)に共役する経路を活性化して、成長円錐の退縮をひき起こすことを示している。

成長円錐は、神経細胞の成長時及び限局的に生ずる突起の再生時にのみ突起先端に形成される特殊構造で、神経成長を制御する情報を全て受容する機能を持つ[1]。近年、神経成長を促進する因子のみならず成長を抑制する因子（負の制御因子）が神経発生の場において重要な役割を果たしていることが明らかとなった[2),3)]。このような因子は、中枢神経系の突起再生の困難さや、アルツハイマー病などの病態に関与していると考えられる[2),4)]。現在これらの成長抑制因子の作用機序は殆ど未解明である。G蛋白(Go/Gi)は成長円錐膜の主要蛋白[5),6)]で、成長円錐に存在する各種受容体に共役して、情報交換に重要な役割を果たすと考えられる。演者らは膜結合性の成長抑制因子を含む画分の活性がG蛋白を介していると考えられる知見を得たので報告する[7)]。

［方法］①成長円錐の退縮活性を含む画分の調製

鶏胚脳の膜可溶化画分(BME)は文献8)により調製した。ラット成熟脳ミエリンはoctylglucosideにより可溶化し透析した[9)]。ミエリン由来の成長抑制蛋白である35K蛋白(NI-35)は文献10)に従い、電気泳動後バンドの切り出しゲルからの溶出、リポソームへの再構成によって調製した。

②退縮活性のアッセイ

成長の抑制因子は培養系では成長円錐の退縮を起こすので、文献8)に従って退縮活性を定量的に評価した。鶏胚後根神経節(DRG)を24時間培養後、(a)BME, (b)Go/Giの活性化剤マストパラン(MP)を加えて30分間培養した。この際に生ずる成長円錐の退縮を観察し、固定後、（退縮成長円錐数）／（全成長円錐数）の百分率で定量化した。いくつかの実験では、Go/Gi阻害剤の百日咳毒素(PTX)を予め培養液に加えて2-4時間インキュベートした後、上記の実験を行なった。同様の実験を鶏胚網膜神経節細胞についても行なった。さらに(c)成熟ラット脳ミエリンの可溶化画分、(d)NI-35を培養DRGに加えて退縮活性を検討した。予めPTXを加えた系について同様のアッセイを行なった。

［結果］①MPによってもBMEと同様のDRG成長円錐の退縮が生じた。この退縮は濃度依存的に生じ、共にPTX前処理によって顕著に阻害された。（図1）

②網膜神経節細胞においてもBMEの効果が認められ、その効果はPTXによって阻害された。BMEの効果、PTXにとる阻害の程度は共にDRGに比べると弱かった（図2）。

③脳ミエリンの神経成長抑制活性はDRGの成長円錐を退縮させ、その効果はPTX前処理により強く阻害された。この画分の活性蛋白NI-35をリポソームに再構成して培養DRGに加えると同様の退縮活性が観察され、PTX前処理により消失した（図3）。

［考察］BME、及びミエリン由来の画分はいずれも膜結合性の神経成長抑制能を有する蛋白を含むことが知られている[8),9)]。これら2種の蛋白は別個の分子であり[9)]、受容体も異なる可能性が強い。セカンド・メッセンジャーも両者は異にしているが[11),12)]、共に成長円錐退縮活性を持ち、その活性はG蛋白(Go/Gi)の活性化を介することが今回の結果で明らかになった。この系はDRG及び網膜神経節細胞に存在することから、G蛋白を介する成長円錐の退縮は、中枢・末梢神経系のどちらにも存在すると考えられる。

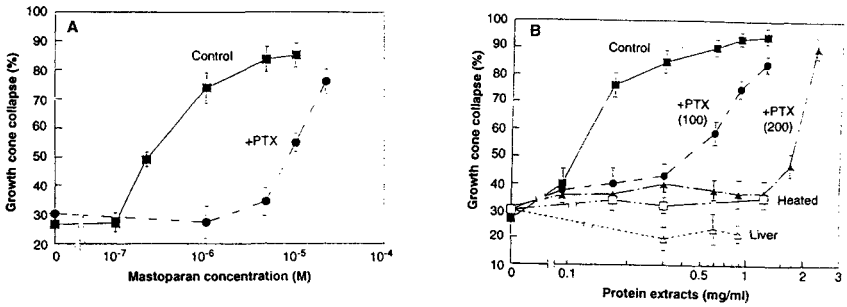
成長円錐膜上にG蛋白を介する受容体が濃縮されていることは演者らが既に報告しているが[13)]、成長円錐には多種の受容体が存在し、多様な情報が成長円錐の挙動を規定していると考えられる。しかし成長円錐の限られた表面積上に多種の受容体が共存するため、各受容体の密度は極めて小さいはずで情報伝達には著しい

増幅が必要と考えられる。従って、G蛋白がこの系に関与しているのは合理的と考えられる。

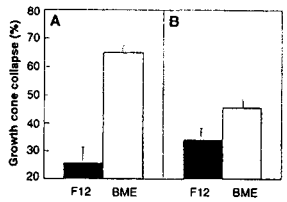
最近、受容体構造を持つアルツハイマー病のアミロイド前駆体蛋白(APP)が、Goを活性化することが報告された[14]。この病態の本体が「過剰な神経成長の抑制因子」の欠如によるとの考えがあり、神経成長抑制因子とG蛋白共役系の関連性が今後更に深く検討されることが、神経発生のみならず、種々の病態の研究にも重要であると考えられる[15]。

(文献)

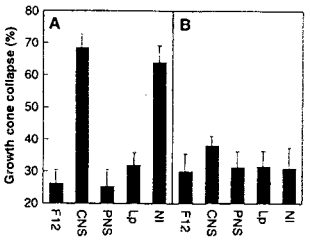
1) Bixby JL, Harris WA ('91) Annu Rev Cell Biol 7, 117-59. 2) Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE ('93) Annu Rev Neurosci 16, 565-95. 3) Fawcett JW ('93) Trends Neurosci 16, 165-7. 4) Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M Neuron 5) Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC ('90) Nature 344, 836-41. 6) Edmonds T, Moomaw CR, Hsu JT, Slaughter C, Ellis L ('90) Dev Brain Res 56,.131-6. 7) Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC ('93) Scinece 259, 77-9. 8) Raper JA, Kapfhammer JP ('90) Neuron 4, 21-9. 9) Aveldaño MI, Díaz RS, Regueiro P, Monreal J ('91) J Neurochem 57, 250-7. 10) Caroni P, Schwab ME ('88) J Cell Biol 106, 1281-8. 11) Bandtlow CE, Schmidt MF, Hassinger TD, Kater SB, Schwab ME ('93) Science 259, 80-3. 12) Ivins J,Raper JA, Pittman R ('91) J Neurosci 11, 1597-608. 13) Saito S, Komiya Y, Igarashi M ('91) Neuroscience 45, 735-45. 14) Nishimoto I et al. ('93) Nature 362, 75-9. 15) Hanley MR, Selkoe DJ ('93) Nature 362, 14-5.



(図1) MP(A)及びBME(B)によるDRG成長円錐の退縮とPTXによる阻害



(図2) BMEによる網膜成長円錐の退縮(A)とPTXによる阻害(B)



(図3) CNSミエリン成分によるDRG成長円錐の退縮(A)とPTXによる阻害(B)

F12: F12 medium のみ; CNS: 可溶化 CNSミエリン画分; PNS: 可溶化 PNSミエリン画分; Lp: lipid vesicleのみ; NI: リポソームに再構成したNI-35

169 ベンゾジアゼピンアンタゴニスト結合部位のラット脳内分布及び生後発達

兼子幸一、車地暁生、融　道男
（東京医科歯科大学・神経精神医学教室）

〔要約〕 $GABA_A$受容体／Cl-チャネル複合体の機能をアロステリックに調節するベンゾジアゼピン結合部位のラットでの脳内分布及び生後発達を、〔125I〕Iomazenil（Ro 16-0154)をリガンドとする定量的オートラジオグラフィー法によるin vitro レセプター結合実験で検討した。成熟ラットでは、前頭皮質をはじめとする大脳皮質、小脳皮質浅層、黒質、下丘で比較的高い結合密度を示し、次いで海馬、扁桃核、視床下部等が続き、線条体、中隔が最も低いという脳内分布を示した。生後発達においては、測定した21部位で生下時から特異的結合が認められたが、1）一過性の増減を示す部位、2）漸減を示す部位、3)ほぼ一定の値を示す部位、の3群に分類される変化を示し、〔125I〕Iomazenil結合部位は生後発達において、脳内で均一な変化を示すのではなく、各脳部位で異なる変化を示すことが示唆された。

〔目的〕 ベンゾジアゼピン系薬物は、抗不安、抗痙攣、催眠、筋弛緩作用などの薬理作用を持ち広く臨床で使用されている。これらの薬理作用は、$GABA_A$受容体／Cl-チャネル複合体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合し、GABAによるCl-チャネルの開口頻度を増加させるというアロステリックな調節を行なうことで生じることが知られている。脳の発達過程における受容体の発現は、各脳部位及び発達段階に応じた特異的な調節を受けており、中枢神経系機能の成熟と密接に結びついている。今回我々は、従来知られているFlumazenil (Ro 15-1788）に比して、約10倍高い親和性をベンゾジアゼピン結合部位に対して示すアンタゴニストIomazenil（Ro 16-0154）[1]による定量的オートラジオグラフィー法を用いたin vitro レセプター結合実験で、ラット脳におけるベンゾジアゼピン結合部位の脳内分布及び生後発達を検討した。

〔方法〕 1)実験動物及びレセプター結合実験の試料：生後0, 3, 7, 11, 16, 22, 35, 65日齢のウィスター系ラットを断頭した後に脳を取り出し、ただちにイソペンタン(約-43℃)で凍結後、クライオスタット(-23℃)で厚さ20μmの冠状断または水平断の凍結脳切片を作成し、ゼラチンコートしたスライドガラスにマウントし、以下の結合実験に用いた。

2)in vitro レセプター結合実験：アッセイ用バッファーとしては150mM NaClを含有した25mM $K\text{-}HPO_4$(pH 7.40) バッファーを使用し、〔125I〕Iomazenil（約2,200Ci/mmole、日本メジフィジックス)の濃度は10pMとした。この反応溶液を脳スライスに適当量滴下し、室温で60分間インキュベートし、NaClを含まない 25mM $K\text{-}HPO_4$バッファー(pH 7.40)で3回、蒸留水で1回洗浄した後に室温で風乾させた。特異的結合を算出するためのディスプレーサーとしては1μM clonazepamを用いた。

3)オートラジオグラフィー像の作成：脳切片を Autoradiographic〔125I〕microscale (Amersham)とともに ^{3}H-Hyperfilm(Amersham)に72時間露光後、現像を行った。

4)〔125I〕Iomazenil 特異結合の定量：画像解析装置(MCID, Image Research)を用いて、大脳皮質、皮質下諸核、小脳皮質の合計 21部位の関心領域について特異的結合 (fmoles/mg tissue)をAutoradiographic 〔125I〕microscaleを参照して求めた。なお、各脳部位の全結合または非特異的結合は、近接した 3枚の脳切片から得られた画像を用いて測定した。

〔結果〕 1)〔125I〕Iomazenil 特異的結合の生後65日齢ラットにおける脳内分布：65日齢ラットにおいては、大脳皮質、小脳皮質浅層、黒質、下丘が比較的高い結合密度を示し、一方錐体外路系の線条体と中隔及び小脳皮質深層では低いという脳内分布を呈した(図2)。大脳皮質を部位別にみると、前頭皮質が最も高く、次いで後頭皮質、後帯状皮質、内嗅皮質、前帯状皮質、頭頂皮質の順であった(図1)。

2)〔125I〕Iomazenil 特異的結合の生後発達：部位別に生後発達における結合密度の変化を検討すると、変化のパターンから以下の3群に分類することができた。

a）一過性の増加あるいは減少を示す部位：このパターンを示す領域が最も多く、前頭皮質、前帯状皮質、後頭皮質、内嗅皮質(図3)といった大脳皮質、小脳皮質、黒質、海馬（CA1)、視床が含まれる。結合密度が最大または最小を示す時期は内嗅皮質では生後7日、黒質では22日などと部位によって異なるが、その他の多くの脳部位でも生後22日に変化を示した。

b）漸減を示す部位：上丘、中隔、手綱核が含まれる。手綱核では65日齢ラットの結合密度は0日齢の約50％に低下していた(図3)。

c）ほぼ一定の結合密度を示す部位：線条体(図3)、側坐核、淡蒼球、扁桃核、視床下部といった皮質下核や、一部の大脳皮質はほぼ一定の密度を示した。

〔考察〕 成熟ラットでは、〔125I〕 Iomazenil 特異的結合は、大脳皮質、小脳皮質浅層、黒質で高く、扁桃核、海馬、視床下部等の皮質下核が続き、線条体、視床、手綱核で低いという脳内分布を示した。また、生後発達においては、測定を行ったすべての部位で生下時から特異的結合が認められたが、a)一過性の増加あるいは減少を示す部位、b)漸減を示す部位、c)ほぼ一定の結合密度を示す部位の3群に分類され、〔125I〕 Iomazenil 結合部位の脳内生後発達は脳部位ごとに異なっており複雑に調節されている可能性が考えられる。

本実験の〔125I〕 Iomazenil 結合の結果とGABAアゴニストの〔3H〕 muscimol 結合に関するこれまでの報告[2]と比較すると、脳内分布及び生後発達の何れにおいても概ね一致していた。しかし、脳内分布において、〔3H〕 muscimol 結合では、小脳皮質深層が浅層に比して著しく高く、〔125I〕 Iomazenil 結合の浅層で高く、深層で低いという分布とは明らかな相違を示した。また、視床でも〔125I〕 Iomazenil 結合が〔3H〕 muscimol 結合よりも低値を示す傾向が認められた。一方、生後発達においても〔125I〕 Iomazenil 結合では〔3H〕 muscimol 結合で報告されているような生後21日の大脳皮質における著明な増加は認められなかった。成熟ラットの脳内分布及び生後発達における相違には、$GABA_A$受容体分子の多様性[3]が関与している可能性が考えられる。

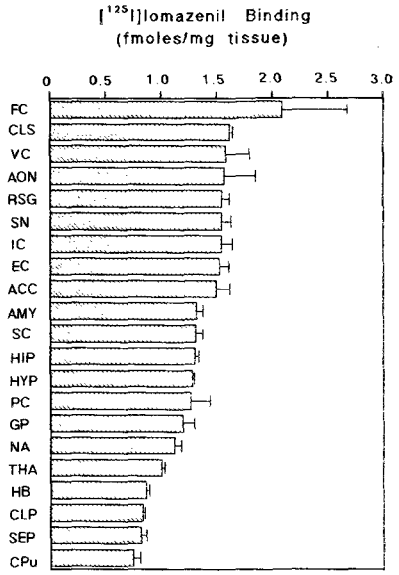


図1．65日齢ラットにおける〔125I〕 Ro 16-0154結合の分布(n=3)

FC	：前頭皮質	CLS	：小脳皮質浅層
VC	：後頭皮質	AON	：前嗅核
RSG	：後帯状皮質	SN	：黒質
IC	：下丘	EC	：内嗅皮質
ACC	：前帯状皮質	AMY	：扁桃核
SC	：上丘	HIP	：海馬(CA1)
HYP	：視床下部	PC	：頭頂皮質
GP	：淡蒼球	NA	：側坐核
THA	：視床(後内側腹側核)	HB	：手綱核
CLP	：小脳皮質深層	SEP	：中隔
CPu	：線条体		

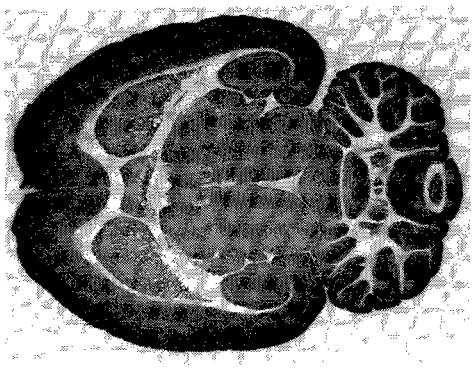


図2.65日齢ラットの〔125I〕 Ro 16-0154全結合のオートラジオグラム(水平断)

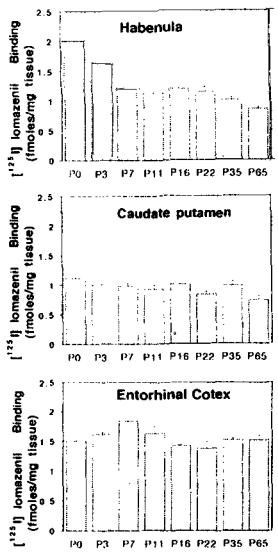


図3．〔125I〕 Ro 16-0154結合の生後発達変化(n=3)
上から順に、手綱核、線条体、内嗅皮質における変化を示す。
横軸の数字は生後の日齢を表わす。

[文献]
1) Johnson, E. W. et al, Life Sciences 47, 1535-1546(1990)
2) Xia, Y. and Haddad, G. G., Neuroscience 49, 973-989(1992)
3) Burt, D. R. and Kamatchi, G. L., FASEB J., 5, 2916-2923(1991)

170 培養ラットニューロンのシナプス形成における アストロサイトの役割

中西圭子、大河内由香、植木孝俊、浅井清文、加藤泰治、黒田洋一郎*
(名古屋市大・医・分子医研・生体制御、*都立神経研・生化学)

〔要約〕
ラット胎仔大脳皮質ニューロンとアストロサイトの共培養系において、細胞内カルシウムイオンの変動をモニターすることにより、シナプス形成に対するアストロサイトの影響について検討した。ニューロンの単培養および他の機能細胞との共培養の時と比較して、アストロサイトとの共培養系ではシナプスはよく形成され、またアストロサイトの加齢により、シナプス形成は抑制された。しかし、条件培養液を用いた実験の結果から、この抑制は液性因子を介しているものではないことが示唆された。また種々の神経伝達物質および神経栄養因子等で刺激したアストロサイトとの共培養系では、グリオスタチン前処理でシナプス形成は抑制され、ジブチルcAMPの前処理でやや促進された。さらに、大脳皮質以外のニューロンおよび大脳皮質アストロサイトを用いた各種の組み合わせの共培養系で、海馬ニューロンは共培養後7－10日目に70-100%の細胞で細胞内カルシウムイオンの同期した振動が認められた。また、線条体や中隔野ニューロンでも50-100%の細胞に、細胞内カルシウムイオンの同期した振動が観察された。他の部位のアストロサイトとの共培養においても細胞内カルシウムイオンの同期した振動はみられたが、一般的には同部位より培養したニューロンとアストロサイトとの共培養系で、最もよく同期した振動がみられる傾向があった。以上の結果より、共培養系に用いるアストロサイトの培養日齢および由来部位により、シナプス形成が大きく変化することがわかった。

［目的］ 哺乳動物の神経系において、グリア細胞は従来より、ニューロンの支持細胞として考えられてきたが、最近の神経科学の進歩により、種々の神経栄養因子や膜蛋白が同定され、そのいくつかがグリア細胞で分泌あるいは合成されていることがわかり、神経系の発生や分化に深く関与していることが明らかとなってきている。一方培養ラットニューロンにおいては、fura-2などの蛍光指示薬を用いた実験などから、培養日齢が進むにつれてニューロンの細胞内カルシウムイオン濃度が自身の興奮により自発的に変動するようになり、この変動が隣接したニューロン間で同期してくることが報告されている[1-3]。この同期が細胞間の電気的な連絡を反映していると考えられ、実際にこの同期する変動の振動数が電子顕微鏡で定量したシナプスの数と相関することから、シナプス形成の定量化が試みられている[4-6]。そこで我々は、ニューロンとアストロサイトの共培養系において、このカルシウムモニタリングシステムを用いることにより、ニューロンのシナプス形成におけるアストロサイトの関与について検討した。

［方法］ウィスター系ラット胎仔脳よりアストロサイトを初代培養し、アストロサイトの単層培養上およびポリリジンコート上に、ラット大脳皮質ニューロンを共培養あるいは、単培養し、その後5－19日目に蛍光指示薬（fura-2AM）を用いて細胞内カルシウムイオン濃度の変動を細胞内カルシウムイオン解析装置にて測定することにより、ニューロンのシナプス形成に対するアストロサイトの影響を比較した。シナプス形成能は、既に報告されているような同期する振動数に加えて、ビデオ画面より実際に同期しているニューロン数を求める方法でも比較検討した。単層培養するアストロサイトのかわりに、ウシ大動脈血管内皮細胞や髄膜線維芽細胞の単層培養上に大脳皮質ニューロンを共培養し、アストロサイトの場合と比較した。また単層培養するアストロサイトの培養日齢を5日目のアストロサイト（C5アストロサイト）と35日目のアストロサイト（C35アストロサイト）の二種類のアストロサイトで行い、加齢による影響を比較した。またこれらのアストロサイトの条件培養液を添加して、あるいはアストロサイトに分化・増殖を誘導するといわれる物質や神経栄養因子および神経伝達物質の前処理をすることにより、アストロサイトの変化がニューロンのシナプス形成へ及ぼす影響を検討した。さらに大脳皮質以外の海馬、中隔野、線条体などの脳組織からもアストロサイトおよびニューロンを初代培養し、この各々のアストロサイトの単層培養上での大脳皮質ニューロンの細胞内カルシウムイオン濃度の同期する変動を、また大脳皮質および自身のアストロサイトの単層培養上でのおのおののニューロンの細胞内カルシウムイオン濃度の同期する変動を比較した。

［結果］ニューロンのみの単培養に比較して、アストロサイトの単層培養上ではニューロンは安定して成育し、シナプスもよく形成されることがわかった（図1）。また、ウシ大動脈血管内皮細胞および髄膜線維芽細胞上ではニューロンは集塊を形成し、これらの細胞とは接着性を持たないことが示された。一方アストロサイトの培養日齢を変えた実験

では、C5アストロサイトや対照と比較して、C35アストロサイトの単層培養上ではシナプスの形成は抑制されていた（図2）。条件培養液を加えた実験では明らかな差は認められなかったことから、この抑制は液性因子を介したものではないことが示唆された。また種々の神経伝達物質や神経栄養因子などで刺激したアストロサイトとの共培養系では、グリオスタチン前投与では抑制的に、ジブチルcAMP前投与ではやや促進的にシナプスは形成された。一方海馬、中隔野、線条体から培養したアストロサイトの単層培養上でも大脳皮質ニューロンはシナプスを形成したが、やはり大脳皮質自身のアストロサイトでもっともよく形成が認められる傾向にあった。この傾向は他のニューロンにおいても同様に認められた（図3）。

［考察］アストロサイトとニューロンの共培養系および細胞内カルシウムイオンモニタリングシステムを用いることにより、培養ニューロンのシナプス形成にアストロサイトの存在が必須であることが示唆され、さらにアストロサイトの培養日齢および由来部位により、シナプス形成が大きく変化することがわかった。このシステムをさらに改良し分析方法を詳細に検討すれば、神経系の発生過程および病的状態、さらには損傷修復過程などにおけるアストロサイトの役割がより明らかになると思われた。

［文献］
1. Kudo, Y. and Ogura, A. Br. J. Pharmac. 89 (1986)191-198.
2. Kudo, Y., Ozaki, K., Amano, T. and Ogura, A. Jpn. J. Pharmacol. 41(1986)345-341
3. Ogura, A., Iijima, T., Amano, T. and Kudo, Y. Neurosci. Lett. 78(1987)69-74.
4. Muramoto, K., Kobayashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y. and Kuroda, Y. Proc. Japn. Acad. 64(1988)319-322.
5. Kuroda, Y., Ichikawa,, M., Muramoto, K., Matsuda, Y., Ogura, A. and Kudo, Y. Neurosci. Lett. 135(1992)255-258.
6. Ichikawa, M., Muramoto, K., Kobayashi, K. and Kuroda, Y. (1991) In 'Role of adenosine and adenine nucleotides in the biological system' pp397-425, (Elsevier)

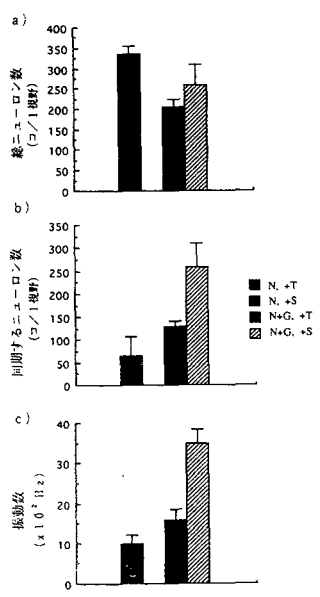


図1　大脳皮質アストロサイト上での皮質ニューロンのシナプス形成

播種した皮質ニューロン数：2x10³個／ウェル、N：ニューロンの単培養系、N+G：共培養系、+S：10%FCS含有DMEM培養液、+T：無血清N培養液。共培養後10日目に測定。

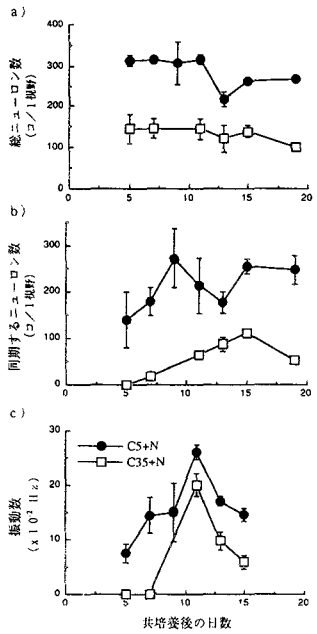


図2　大脳皮質アストロサイトの加齢によるシナプス形成の変化

播種した皮質ニューロン数：5x10⁵個／ウェル。C5：初代培養後5日目のアストロサイト、C35：初代培養後35日目のアストロサイト。

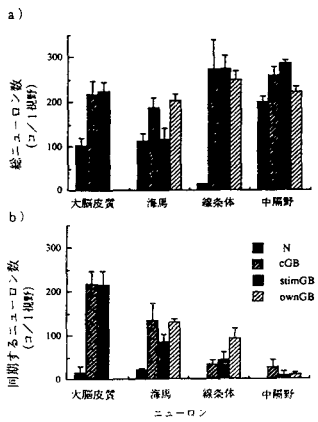


図3　非大脳皮質ニューロンのシナプス形成能および神経伝達物質刺激したアストロサイト上でのシナプス形成

N：大脳皮質、海馬、中隔野および線条体ニューロンのみの単培養系、cGB：大脳皮質アストロサイトとの共培養系、stimGB：神経伝達物質刺激した大脳皮質（グルタミン酸）、海馬（グルタミン酸）、中隔野（カルバコール）および線条体（ドーパミン）アストロサイトとの共培養系。ownGB：同部位の共培養系。

171 ラット胎児脳シナプトソーム画分に存在する５０ｋＤａタンパク質の精製と一次構造解析

萩原民雄、北原功雄、竹田二美代、竹田稔
（昭和大・医・第一生化学）

〔要約〕

加齢に伴う中枢神経系の機能変化は神経伝達物質の生合成やアミロイド等の沈着物質などの生理的変化と病的変化の両面から研究されてきた。我々は各齢に特異的に発現するタンパク質を同定し、中枢神経系の発生分化や老化に伴う様々な障害との関連性について解明することを目的としている。今回、ラット胎児脳に特異的に存在し、老齢ラットでは認められない分子量５０ｋＤａのタンパク質に着目してその精製を試みると共に、一次構造解析を行なった。このタンパク質は胎児脳シナプトソーム画分に多量に存在し、DEAE-Sepharose, Sephacryl S-200 および HPLC column TSK DEAE-5PW, TSK SP-5PW によりＳＤＳ－ＰＡＧＥ上単一バンドまで精製された。このタンパク質は抗体との反応性からα,β-tubulin等の脳に比較的多量に存在する分子量近似のタンパク質とは異なり、また、トリプシン消化フラグメントから得られた部分一次構造に他のタンパク質との相同性が見いだせないことから一次構造未知の新しいタンパク質と考えられる。

中枢神経系の発生分化そして生存維持と続く神経細胞の一生に伴って起こる様々な機能変化を探る目的で、我々はタンパク質の量的質的変化に着目して解析を行なっている。胎児期から老齢に至るまでの脳シナプトソーム画分に含まれるタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析すると加齢に伴って種々のタンパク質に変化が見られるが、この中の一つで胎児脳に特異的に存在する分子量５０ｋＤａのタンパク質について本学会でも報告してきた。我々はこれまでその容易さからこの５０ｋＤａタンパク質を調製用電気泳動により単離してきたが、このタンパク質の生化学的性質や生理機能を探る上で未変性の精製標品を得る必要があるので、精製を試みた。また、得られた標品を用いてこのタンパク質の情報の一つとして一次構造を解析した。

［実験方法］

妊娠２０日目のＷｉｓｔｅｒ系ラットをエーテル麻酔した後、十分脱血して速やかに胎児を取り出し、脳を摘出した。１０倍容のHomogenization Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.32 M sucrose, 0.5 mM PMSF, およびpepstatin A, leupeptin, antipain 各20μg/ml]中でホモジナイズ後、1,000 x g, 10 minの遠心上清を更に15,000 x g, 20 min遠心してP_2画分を得た。この画分を50 mM Tris-HCl (pH 7.5)中で超音波処理後、105,000 x g, 90 min遠心した上清をシナプトソーム可溶性画分として用いた。これを出発材料としてDEAE-Sepharose, Sephacryl S-200 および HPLC column TSK DEAE-5PW, TSK SP-5PW にて精製を行なった。精製した胎児脳５０ｋＤａタンパク質をTPCK-trypsinにより限定分解後、生じたペプチドフラグメントをHPLC column TSK ODS-120Tにより分離した。アミノ酸配列はMilligen/Biosearch ProSequencer model 6625 により解析した。

［結果と考察］

胎児およびその親のラット（７週齢）の脳より調製したシナプトソーム可溶性画分のタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析すると、親ラットと比較して胎児では８０、５０、４０、３４および３２ｋＤａのタンパク質が特徴的であり、５０ｋＤａタンパク質が最も多量に存在する（Ｆｉｇ．１）。しかしながら、この中には分子量の近似したいくつかのタンパク質が含まれており、DEAE-Sepharoseにより異なる画分に分離された。脳に比較的多量に存在する５０ｋＤａ前後のタンパク質としてα,β-tubulin, actin, tau-protein 等が考えられるが、

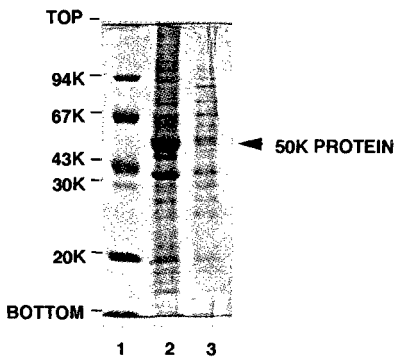
0.15 M NaCl容出画分の５０ｋＤａタンパク質は抗体との反応性からこれらのタンパク質とは異なるものと考えられたので、これに注目して更に精製を進めた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で５０ｋＤａを示すこのタンパク質はSephacryl S-200 columnによるゲルろ過では１５０ｋＤａの位置に溶出した。この画分を更にHPLC column TSK DEAE-5PWおよびTSK SP-5PW を用いて精製を進めることにより、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上単一バンドまで精製された（Ｆｉｇ．２）。精製標品を再度ゲルろ過したところ分子量５９ｋＤａの位置に容出した。このことはこの５０ｋＤａタンパク質がｃｒｕｄｅな状態では他のタンパク質と結合していることを示唆している。また、精製標品をTPCK-trypsinにより限定分解することによりいくつかのフラグメントを得たが、その内の一部についてアミノ酸配列を調べたところ、Ｆｉｇ．３に示すような配列であったが一次構造既知のタンパク質との相同性は見られなかった。現在更に一次構造解析を進めており、この情報を基にｃＤＮＡのクローニングも計画中である。また、詳細な発現時期や細胞内分布等を調べるため抗体の作成を試みている。

［引用文献］

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

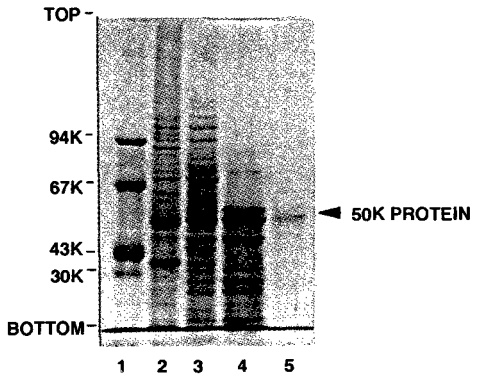
Glenner, G. G. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885-892.

Fig.1



Lane 1 : MW Standards
Lane 2 : Fetal synaptosomal fraction
Lane 3 : Adult synaptosomal fraction

Fig.2



Lane 1 : MW Standards
Lane 2 : Fetal synaptosomal fraction
Lane 3 : DEAE-Sepharose, 0.15 M NaCl fraction
Lane 4 : Sephacryl S-200 fraction
Lane 5 : SP-5PW fraction

Fig.3

Fragment #1 : **Ala-Val-Phe-Val-Asp-Glu-Glu-Pro-Gln---**

Fragment #2 : **Phe-Ile-Leu-Val-Phe-Leu-Glu-Pro-Phe-Asn-Met-Asp-Phe---**

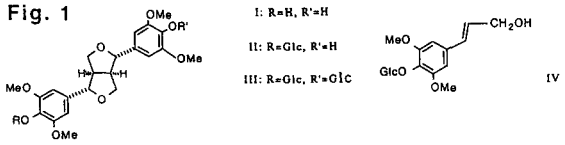
172 植物由来リグナン関連化合物の神経細胞分化促進、マウス潜在学習能力増強の効果

毛利哲郎、山崎眞津美、千葉賢三
(北陸大・薬・創薬研)

〔要約〕
ﾊﾟﾗﾆｭｰﾛﾝである PC12h細胞を無血清 DF培地で培養し、その神経突起伸長と高 KCl誘導脱分極およびｶﾙﾊﾞｺｰﾙ誘導細胞内 Ca^{2+}濃度上昇に対する植物由来ﾘｸﾞﾅﾝ関連化合物 4種 (0.1～10 μg/ml) 添加 (4日間) の効果を検討したところ、この濃度範囲内で有意な促進が見られた。また、これら化合物のうち syringinをﾏｳｽに投与 (2 mg/Kg、7日間) して潜在学習能力を試験したところ、その増強を示唆する結果を得た。

ｴｿﾞｳｺｷﾞ、ｺｶﾞﾈﾊﾞﾅなどから分離される(+)syringaresinol(I)、(+)syringaresinol-O-β-D-glucoside(II)、(+)syringaresinol-di-O-β-D-glucoside(III)および syringin(IV) (Fig. 1)などﾘｸﾞﾅﾝ関連化合物は、動物実験で運動能力増強作用が報告されているが、これらの化合物についてﾗｯﾄ副腎褐色細胞腫由来の PC12h細胞の神経突起伸長、高 KClおよびｶﾙﾊﾞｺｰﾙ誘導による細胞内 Ca^{2+}濃度上昇の促進作用とﾏｳｽの潜在学習能力増強効果の関連を検討した。

Fig. 1

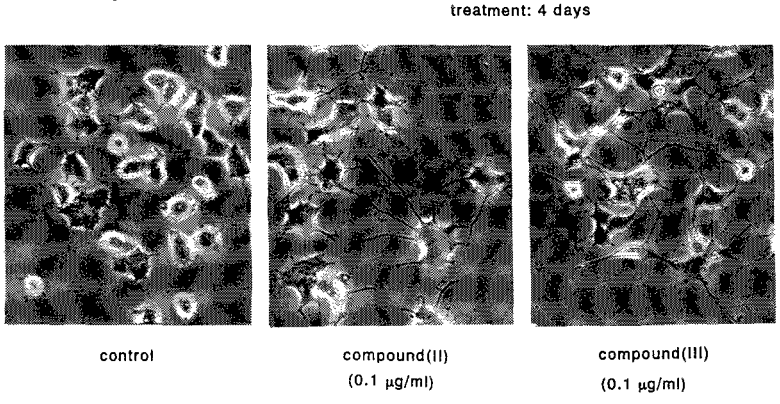


〔方法〕 PC12h細胞はｺﾗｰｹﾞﾝｺｰﾄした 35 mmﾃﾞｨｯｼｭ上で、5 % 準胎仔牛血清および 5 % 熱非働化馬血清を含む DMEM培地を用い、1.5×10^4 cells/ml、37 ℃、10 % CO_2存在下で培養した。翌日、薬物を含む無血清 DF培地に交換し、3～4日間処理後実験に用いた。個々の細胞内 Ca^{2+}濃度変化は Ca^{2+}感受性蛍光色素(Indo-1)を用い、ACAS 570(ﾒﾘﾃﾞｨｱﾝ社)により測定した。また、潜在学習能力ﾃｽﾄは鍋島らの方法[1]によりﾏｳｽ(Std:ddY、♂)を用いて行った。

〔結果および考察〕 <u>形態的変化</u> syringaresinol類は無血清培養下の PC12h細胞に対して神経様突起の誘導活性を有し、特に化合物(II)および(III)で強い活性が観察された (Fig. 2)。

<u>画像解析による突起伸長の定量化</u> これら化合物中で(II)および(III)は0.1～10 μg/mlの濃度範囲内で突起伸長活性が見られ、処理 2～3日目での画像解析による細胞当りの突起面積は約 150～250 μm^2と未処理群に比較し、有意に増強された(Fig. 3)。また、化合物(IV)でも比較的強い突起誘導活性が見られたが、(I)は、突起伸長活性を有するものの、濃度の増加とともに細胞障害が観察され、糖鎖部分がその保護作用を有すると考えられた。

Fig. 2 Morphological chage of PC12h cells



細胞内 Ca^{2+}動態 化合物(III)による突起伸長が神経様細胞への分化を反映しているかどうかについて、0.5 μg/mlで 4日間培養し、突起誘導後の PC12h細胞における高 KCl(40 mM)およびｶﾙﾊﾞｺｰﾙ(100 μM)刺激に伴う細胞内 Ca^{2+}濃度変化について未処理群と比較した(Fig. 4)。高 KCl刺激に伴う細胞内Ca^{2+}応答は、未処理群で 57 %、処理群では 95 %の細胞で観察され、それぞれ 72から 88 nM、および 76から 130 nMの細胞内 Ca^{2+}濃度上昇が見られた。ｶﾙﾊﾞｺｰﾙ刺激においても、未処理群で 60 %に対し、処理群では 89 %の細胞で応答が見られ、それぞれ82から 109 nMおよび 72から 147 nMの細胞内 Ca^{2+}濃度上昇が見られ、いずれの刺激においても処理群で有意な細胞内 Ca^{2+}応答の増強が観察された。以上のことから、これら化合物が分化誘導活性を有することが示唆され、現在ｶﾙｼｳﾑﾁｬﾝﾈﾙおよびﾚｾﾌﾟﾀｰﾚﾍﾞﾙでの質的変化について検討を行っている。

潜在学習能力ﾃｽﾄ 突起伸長活性を有する syringinについて、頭部打撲後の潜在学習能力ﾃｽﾄ(Water findingおよび drinking latency)を行った。ｺﾝﾄﾛｰﾙ群に比較し、2 mg/Kg、7日間(p.o.)の syringin投与群では、Finding latencyおよびDrinking latencyで 25 %の減少が見られ、潜在学習能力増強作用を有することが示唆された。現在さらに他の syringaresinol類を用いて検討中である。

Fig. 3 Neurite outgrowth of PC12h cells induced by syringaresinol glucosides

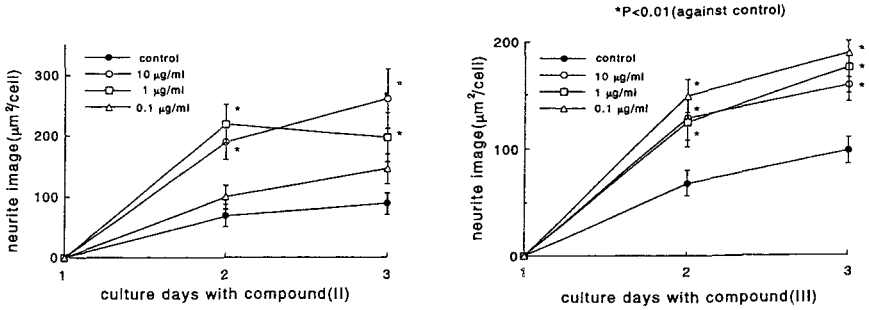
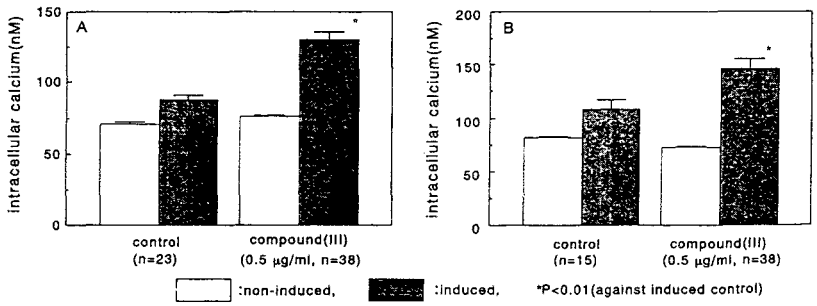


Fig. 4 Enhancement of the high K^+-induced(A) and carbachol-induced(B) increase of intracellular calcium concentration of PC12h cells following 4 days of treatment with compound(III)



[引用文献] 1) 鍋島俊隆、市原賢一、木下博 (1992) 生物薬科学実験講座 14巻、広川書店

173 ネオスチグミン脳室内投与による血糖上昇とノルアドレナリン、ドーパミン神経活動の亢進

高橋 章、石丸裕久、五十嵐康、丸山悠司
[群馬大・医・神経精神薬理（ツムラ）]

〔要約〕
ラットの第三脳室内にネオスチグミンを投与すると血糖の著しい増加が起こる。この高血糖が招来する条件下において、視床下部の神経伝達物質含量を測るとともに in vivo microdialysisの手法にて細胞外液中の伝達物質由来代謝物の変動を調べた。ネオスチグミンの投与はアセチルコリン(ACh) 含量の増加をもたらすのみならずノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)含量を低下させた。視床下部内側では細胞外液中のDOPAC、HVA濃度が約２倍に上昇しており、高血糖の出現時に NA、DA の放出は増加していたものと思われる。これらの結果は、ネオスチグミン投与で惹起される高血糖にコリン神経系ばかりでなくNA、DA神経系も関与している可能性を示している。また、化学的神経刺激を用いての中枢作用の解明に際しては、他の神経系への影響も十分考慮する必要性のあることが明らかにされた。

中枢神経系が司る様々な生理調節機能に特定の神経系がどのように関与するのかを解析するために、神経伝達物質あるいは関連薬物を微量注入する化学的神経刺激の方法が一般に用いられている。しかしながら、これらの実験では中枢神経活動の動態を検討した例は少なく、実際どのような神経伝達の変動が中枢性の生理作用に対応したものか必ずしも明らかではない。中枢性の糖代謝調節については、視床下部 NA 神経系の重要性が明らかにされ(1,2)、一方、コリン神経系の影響も報告されている(3)。そこで我々は、視床下部の各神経伝達物質と血糖値の関係並びに化学的神経刺激の特異性を調べるために、ACh esterase阻害剤であるネオスチグミンを脳室内に投与し、以下の検討を行った。

[方法]

雌 Wister ラットを用い、ネンブタール麻酔下に外径 0.2mmのカニューレを第三脳室に挿入し、３時間後、ネオスチグミンを 1μl/分で５分間(5×10^{-8}mol)注入した。神経伝達物質の含量は、投与40分後にマイクロ波を頭部に照射(9.0kw、1.0-1.1 秒) して、視床下部を切り出し、内部標準として1 nmolのdeoxyepinephrineと5 nmolのethylhomocholineを含む1 mlの50 mM $HClO_4$ にて抽出し、２系統すなわち、カテコールアミン、セロトニン用および AChのHPLC-ECDシステムにより測定した。また、in vivo microdialysis 法を用いて、視床下部内側部での細胞外液中の伝達物質代謝物を測定した。Dialysis probeは、Carnegie Medicine CAM 10 (外径0.5 mm; 1 mm membrane)を使用し、ネオスチグミン投与の３時間前に内側部に挿入(AP 0.0; L 1.0; D 9.5 mm, Pellegrino and Cushman)し、Ringer液を2 μl/分で灌流して平衡化後、灌流液中の代謝物を調べた。ラットの採血はあらかじめ心臓右心耳に留置したカテーテルより経時的に行い、血中のグルコースを測定した。

[結果並びに考察]

ネオスチグミンを第三脳室内投与すると血糖値の著しい上昇が起こる(Table 1)。あらかじめ副腎髄質を摘除したラットでは著しい上昇は認められず、この作用は交感神経－副腎髄質系を介したものと考えることができる。この高血糖が起こる条件下、視床下部の伝達物質含量と交感神経系と深い関連のある内側部での細胞外液中代謝物の変動を調べた。含量ではFig.1,2 に示すように AChの増加とNA,DA の減少が認められた。また、micro-

dialysis灌流液中の DOPAC、HVA 濃度が増加した (Fig.3)。しかし、セロトニン含量と5-HIAAの濃度は特に変化しなかった。

ネオスチグミン投与によるこれらの結果は、血糖の上昇時に視床下部内側部での NA、DA放出も増加し、コリン神経系ばかりでなく NA、DA神経系の活動も亢進することを示している。糖代謝の中枢性調節ではNA神経系の関与が明らかにされており(1,2)、このACh esterase阻害剤の脳内投与による血糖増加にもNA神経系の関与が考えられる。以上の成績は、中枢神経系が司る様々な生理的作用における特定ニューロンの役割を検討するうえで、従来の化学的刺激では十分な根拠となり得ないことを明らかにするとともに、実際に組織含量や細胞外液中の濃度の変動を測定することの必要性とその重要さを示している。

Table 1 Plasma glucose concentration after microinjections of neostigmine

	Blood glucose level (mg / 100 ml)		
	preinjection	20 min	40 min
Saline	122 ± 3	122 ± 2	116 ± 3
Neostigmine	121 ± 3	150 ± 8*	212 ± 12*

Values are means ± SE for 5 rats.

Fig. 1

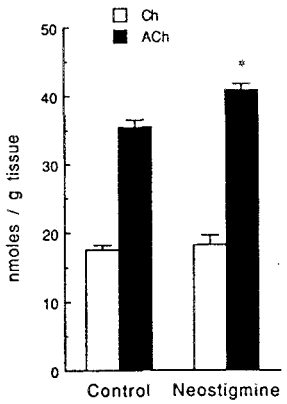


Fig. 2

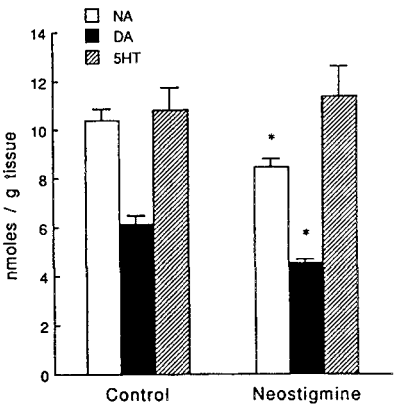
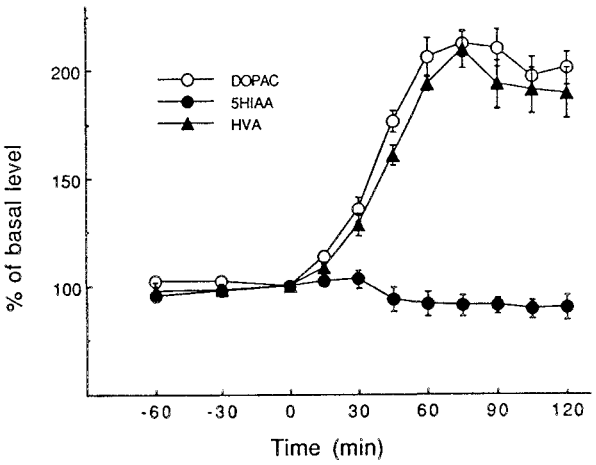


Fig. 3



[文献]

1. Smythe, G.A. et al (1984) Nature 308, 65-67.

2. Shimazu, T. In S.L. Lightman and B.J. Everitt (Eds.), Neuroendocrinology, Oxford, UK. Blackwell, 1986, pp. 304-330.

3. Iguchi, A. et al (1986) Am. J. Physiol., 251, E431-E437.

174 ラット肝ミトコンドリア外膜からのキヌレニン3ーモノオキシゲナーゼの精製

植村富彦　平井久美子
（東京都精神医学総合研究所 神経化学）

〔要約〕ラット肝臓ミトコンドリア外膜を、プロタミン硫酸塩存在下に、両性界面活性剤（Chaps）で処理することにより、Chaps不溶性膜分画を得た。この膜分画を、非イオン性界面活性剤（β－オクチルグルコシド；OGS）にて処理することにより、キヌレニン3ーモノオキシゲナーゼ（FpK）は、可溶化された。この可溶化分画を、0.5% OGSで平衡化したヘパリンセファローズCL-6Bカラムにかけ、結合したFpKをNaCl濃度勾配（0.01-0.8 M）で溶出した。FpKは、塩濃度約0.7-0.8 M附近に溶出され、その比活性は、約120 nmoles of NADPH oxidized/min/mg proteinであり、外膜と比較して約14倍精製されていた。この酵素標品を、更にWGA-AgaroseまたはChelating Sepharoseにかけた後、その分光学的性質を調べたところ、可視部スペクトルでは、まだ外膜シトクロムb由来のヘムを含んでおり、典型的なフラビン酵素の示す可視部スペクトルは得られなかった。目下、ヘムの除去を検討中である。

（緒言）エイズも含め脳の免疫反応や虚血後には、マクロファージの侵襲により、脳内トリプトファン代謝が著明に変化することが知られている(3,13)。脳内トリプトファン代謝中、キヌレニン経路に関しては、肝臓ほど詳細には調べられていないが、脳ではキヌレニン3ーモノオキシゲナーゼが、キヌレニン経路の律速酵素であることが示唆されている(1)。我々は、ラット脳ミトコンドリアのFpK活性を測定し、肝臓と比較して約1/4,000の比活性しか示さぬこと、およびこの低い活性がEDTA-Fe Complex存在下、メナジオンの添加により著しく増大し、活性化に水酸ラジカルの関与する可能性を報告した(4,5,14)。この活性化機序も含め、脳の炎症や虚血時におこる酵素活性の増大機序を知る為には、精製酵素が是非必要である。今回、FpKの精製を試み、従来の報告値と同等か、むしろ高い比活性をもつ酵素標品を得たので報告する。

（方法）ラット肝臓ミトコンドリアより外膜を低張処理法にて調製した(12)。外膜を緩衝液A（0.1 M Tris-Acetate, pH 8.0, 10%Glycerol, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 5μM FAD)に懸濁し（蛋白濃度10mg/ml）、10% Chapsを終濃度0.5%になる様に滴下して加え4°C, 30 min撹拌後、1.5% Protamine sulfateを終濃度0.07%になる様に加え更に20 min 撹拌後、170,000xg, 60 min 遠沈し、Chap不溶性膜分画を得た。この分画の懸濁液（10mg/ml)に20% OGSを終濃度2%になる様に加え、30 min 撹拌後上記の如く遠沈し、可溶性分画を得た。これを一晩放置後、遠沈し上清を得た。この上清を0.5%OGSを含むFAD無添加緩衝液Aで平衡化したヘパリンセファローズCL6Bカラムにかけ、結合したFpKをNaCl濃度勾配で溶出した。活性ピークを集めCentriprep-30（アミコン）で濃縮した。FpK活性は、(2)により測定された。ミリモル分子吸光係数$\varepsilon^{NADPH}_{340}$ = 6.22 $mM^{-1}cm^{-1}$を用いた。蛋白定量は、(7)に従った。

（結果）表1は、FpK精製の各ステップにおける比活性、収量、精製度を表している。OGSによる可溶化の段階で、外膜より約5倍高い比活性を示す可溶化標品が得られた。これは、以前報告したOGS可溶化法より約2倍高い比活性であり、用いた緩衝液中のGlycerol濃度を前回の30%より10%に下げることにより、遠沈にて不純蛋白がよりよく除けたと考えられる。この可溶性分画を一晩放置し、遠沈して得られた上清を、直接ヘパリンアフィニテイーカラムにかけた。図1は、カラムからの溶出パターンを示している。NaCl濃度約0.7-0.8M附近で活性ピークが出現している。この活性分画を集め濃縮後、WGA-Agarose Affinityまたは、Metal Chelating Sepharose (Zn)カラムにかけた所、前者では、FpKの大部分は素通りしカラムに吸着しなかったが、後者では、大部分の蛋白は吸着し、pH勾配（pH 8-5）による溶出で活性ピーク（チャージ前の約25%）が出現した。いずれの場合も活性分画を濃縮後分光学的性質を調べた。図2は、酵素標品の紫外部および可視部スペクトルを示す。可視部では、外膜シトクロムbに由来すると思われるヘムのSoret bandが、酸化型で418nmに、還元型で4nm長波長にシフトして422nmに見られた。またフラビンの吸収に由来すると思われる445ー450nmの谷が、酸化還元差スペクトル（図2, inset）をとることにより明らかに出現した。

（考察）FpKは、ミトコンドリア外膜に存在するフラビン酵素で、既に数グループによる精製が試みられている(6,8-11)が、数種の分子量が報告されており確定していない。以前我々は、Chaps/Sodium Cholate/Lubrol PXによる可溶化後の部分精製を報告した(15)が、再現性の点で問題がありLubrol PX溶液は、その保存状況によりFpK活性を抑制することが判明した。今回報告したOGSを用いる可溶化法は、収量、再現性の点で、Lubrol PX法より優れていると思われる。ヘパリンアフィニテー後、更にNADPHアフィニテーカラム、Chelating Sepharose, WGA-Agaroseを試みた所、比活性は更に約1.5倍上がるが、最終標品のSDS-PAGEでは、低分子量領域（<60,000以下）に数種のバンドが見られ、まだかなり不純蛋白質の混入がありFpKのモノマーの分子量をきめるまでには至らなかった。ヘムの除去と共に今後の問題である。

Table 1

Purification of L-kynurenine 3-monooxygenase from rat liver mitochondrial outer membrane

	Total Volume (ml)	Total Protein (mg)	* S.A.	Purification Factor	Yield (%)
Outer Membrane	42.5	848	8.8	1.0	100
Chaps, n-Octyl-β-D-glucoside Solubilization	62.0	138	45.4	5.2	84
Supernatant	61.0	92.6	58.8	6.7	73
Heparin-Sepharose CL-6B	5.2	34.2	120	13.6	55

* Specific Activity: nmoles of NADPH oxidized/min/mg protein

Fig.1

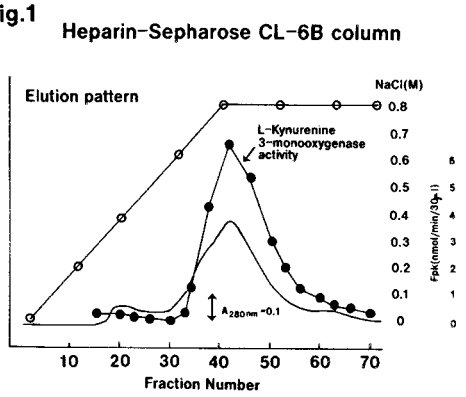
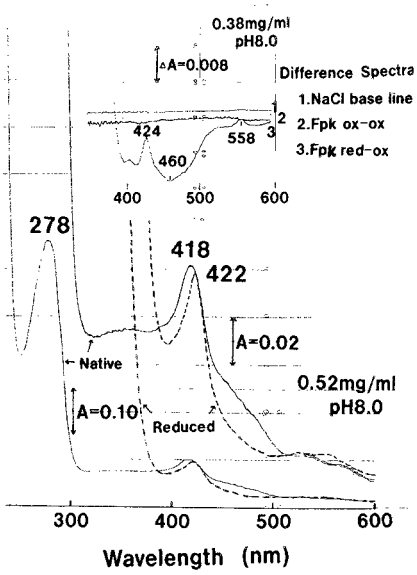


Fig.2



（文献）(1)Bender, D. A., and McCreanor, G. M. (1985) Biochem. Soc. Trans. 13, 441-443 (2)Hayaishi, O. (1962) Methods Enzymol. V. (Colowick, S. P., and Kaplan, N. O., eds.) 807-809, Academic Press (3)Heyes, M. P., Brew, B. J., Martin, A., Praice, R. W., Salazar, A. M., Sidtis, J. J., Yergey, J. A., Mouradian, M. M., Sadler, A. E., Keilp, Jj., Rubinow, D., and Maarkey, S. P. (1991) Ann. Neurol. 29, 202-209 (4)平井　久美子、植村　富彦　第14回日本トリプトファン研究会抄録集 (1990) A-12, p. 20 (5)平井　久美子、植村　富彦 (1990) 第63回日本生化学会大会発表抄録集 2069, p. 760 (6)Horn, U., Ullrich, V., and Staudinger, Hj. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 837-842 (7)Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 (8)Nishimoto, Y., Takeuchi, F. and Shibata, Y. (1975) J. Biochem. 78, 573-581 (9)Nishimoto, Y., Takeuchi, F. and Shibata, Y. (1977) J. Biochem. 81, 1413-1425 (10)Nishimoto, Y., Takeuchi, F. and Shibata, Y. (1979) J. Chromatogr. 169, 357-364 (11)Okamoto, H., and Hayaishi, O. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 603-608 (12)Parsons, D. F., Williams, G. R., and Chance, B. (1966) Ann. N. Y. Acad. Sci. 137, 643-666 (13)Saito, K., Nowak, T. S. Jr., Markey, S. P., and Heyes, M. P. (1993) J. Neurochem. 60, 180-192 (14)Uemura, T., and Hirai, K. (1991) in Kynurenine and Serotonin Pathways (R. Schwarcz et al. eds.) pp. 531-534. Plenum Press, New York (15)Uemura, T., and Hirai, K. (1992) in Advances in Tryptophan Research (Ishiguro, I. et al. eds.) pp. 439-442. Fujita Health University Press, Toyoake

175 脳シナプス膜脂質の代謝回転とその加齢変化

田中康一、近　一夫、脇　初枝、安藤　進
（東京都老人総合研究所、生体膜部門）

〔要約〕

重水素ラベル法と質量分析法を用いてマウス脳シナプス膜脂質の代謝回転を測定した。重水の経口投与により*in vivo*で標識されたシナプス膜のホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノラミン(PE)およびコレステロールを質量分析計で定量し、その重水素化分子の減衰曲線から各脂質の代謝回転速度を求めた。その結果、シナプス膜構成脂質はそれぞれ異なる速度で代謝回転しており、その速度はPE＞PC＞コレステロールの順であった。老齢マウスシナプスでは、PEの代謝回転速度が若齢に比べ遅くなっていたが、PCでは若齢より代謝速度が速くなる傾向が認められた。

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かにしようとしている。既に、シナプス膜脂質組成が加齢に伴って変化し、このことがシナプス膜酵素活性やシナプス膜電位に影響を与えている可能性を指摘した（1）。実際、シナプスからの高カリウム刺激によるアセチルコリン放出が老齢マウスで低下していることを明かにしている（2）。これらのことから、シナプス膜の加齢変化が神経終末の機能変化に関与していると考えられる。

分裂、増殖をしないニューロンにおいて、その機能を保持するためには代謝回転による膜構成成分の入れ換えが不可欠であり、代謝回転の障害は老齢期におけるシナプス膜構成の変化と、ひいてはシナプス機能低下の一因とも推測される。そこで、シナプス膜脂質の動態を明かにするため、重水素トレーサーと質量分析法を用いる方法（3）によって、シナプス膜構成脂質の代謝回転速度を測定し、その加齢変化について検討した。

（実験方法）

重水投与：2か月齢と28か月齢のC57BL/6マウスに40%重水を10日間に渡り自由に摂取させた。11日目より軽水に戻し飼育を継続した。実験期間中、エサは通常の固形飼料を与えた。

シナプス膜の調製：軽水に切り換えた後3日目を0日とし、1、2、4、7、14、20、30日目に断頭により脳を摘出し、Booth & Clarkのフィコール密度勾配遠心法（4）によってシナプトソームを調製した。シナプトソームを1mMのリン酸緩衝液で低張処理した後、蔗糖の密度勾配遠心法によってシナプス膜を得た（1）。

脂質の抽出と単離：シナプス膜からクロロホルムーメタノール（2：1）で膜総脂質を抽出した後、DEAEトヨパールカラムにて総脂質を中性脂質と酸性脂質に分画した。中性脂質画分より、薄層クロマトグラフィーのかきとりによってPC、PEおよびコレステロールを単離した。

SIM（selected ion monitoring)の測定：PCとPEから5%塩酸ーメタノールで100℃で2時間メタノリシスをおこない脂肪酸メチルエステルを得た。コレステロールはトリフルオロアセチル（TFA）誘導体とした。

これらの誘導体をガスクロマトグラフ質量分析計に導入し、分子イオンと重水素を取り込んだ同位体イオンピークをSIM (selected ion monitoring) によって測定し重水素標識脂質を定量した。

（結果と考察）

図1はPCとPEの重水素化パルミチン酸の減衰曲線を示す。PEはPCより速い速度で減衰しているのが認められる。これらの曲線からそれぞれの脂質の半減期を計算で求めると、PEが5.8日であり、PCは9.8日であった。PEはPCの1.7倍速い速度で代謝回転していることが示された。一方、膜脂質のもう一つの主要構成脂質であるコレステロールの代謝速度はPCやPEよりはるかに遅く、その半減期はおよそ59日であることが減

衰曲線より求められた。このように一つの膜を構成する各々の脂質成分が異なる代謝速度で入れ替わっていることが明かとなった。

図2に2か月齢と28か月齢のシナプス膜より得たPEの減衰曲線を示す。老齢シナプス膜のPEの代謝速度(半減期、6.3日）が若齢に比べやや遅くなっている。しかしながら、PCの代謝回転は、逆に老齢マウスで速い傾向が認められた（図3）。このように、脂質種によって代謝速度の加齢変化の受け方が異なる結果、個々の成分に特徴的な代謝速度が失われ均一化する傾向が現れてくるように思われた。

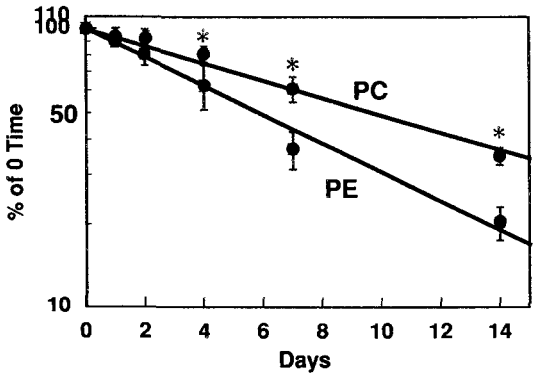


図1　若齢脳シナプス膜のPCとPEの減衰曲線
*, p<0.05, PC vs PE (Student t-test, n=6)

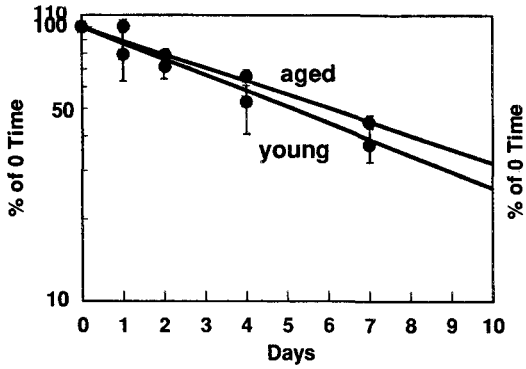


図2　若齢および老齢マウスシナプス膜PEの減衰曲線（両グループ共n=6)

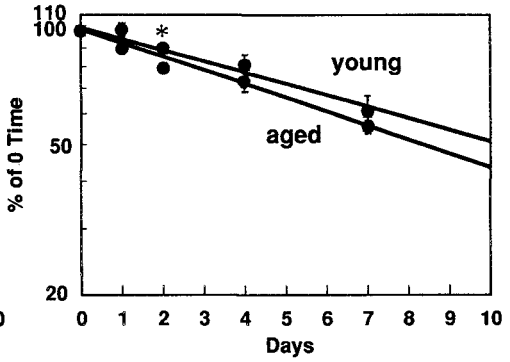


図3　若齢および老齢マウスシナプス膜PCの減衰曲線 * p<0.05 young vs aged (Student t-test, n=6)

（参考文献）
(1) Tanaka, Y. & Ando, S. (1990) Brain Res., 506, 46-52
(2) 田中康一、安藤進(1991)　神経化学　31, 192-193
(3) Tanaka, Y. & Ando, S. (1981) Biomed. Res. 2, 404-412
(4) Booth R.F.G. & Clark, J.B.(1978) Biochem. J., 176, 365-370

176 Nicotineはdexamethasoneの持つkainate神経毒性の増強作用を抑制する

○鬼頭昭三、仙波純一、三好理絵＊、古津みを

（放送大学・東京女子医科大学薬理学教室＊）

〔要約〕

海馬神経細胞に強い毒性を示すkainateを用いて、dexamethasone がラット海馬培養神経細胞に与える影響を調べた結果、dexamethasone は、10^{-9}～10^{-4}Mで、用量依存的に kainate の毒性を増強した。この系に更に nicotine を添加したところ、dexamethasone の毒性増強作用は nicotine 10^{-10} ～ 10^{-7} Mの間で用量依存的に減弱された。次に、このメカニズムを解明する研究の一環として in vivo microdialysis 実験を行なった。本実験では、nicotine の皮下投与直後から、海馬における glutamate の遊離が減少した。

〔目的〕

海馬は内分泌系の最高中枢として視床下部の更に上位に位置し、機能すると考えられている。この部位には、脳内で最も多くの副腎皮質ホルモン受容体が存在する。副腎皮質ホルモンは加齢と共に血中濃度が上昇し、また、臨床的にも広く投与されていることから、海馬の神経機構に対する作用は注目に値する。当研究室では、海馬における dexamethasone の毒性増強作用とnicotine の影響について検討を続けてきた。今回はこれら化学伝達物質の脳内の挙動から、神経生理機構を解明することを目的として実験を行った。

〔方法〕

1． in vitro の実験では、ラット胎肝由来の海馬神経細胞を10% FBS を含むDMEM 培地で７日間培養し、実験に用いた。神経細胞に各種濃度の nicotine を添加し、一晩培養した。次に10^{-4} M の dexamethasone を添加してさらに培養した。最後に10^{-5} M の kainate を添加して一晩培養した。上記の手法で得た細胞を洗浄し、Triton X-100 で処理し、3000rpm, 20分間遠心した。上清の LDH 活性は、Sigma Diagnostic Kit 500を用いて測定し細胞生存率（percent servival)を算出した。

2． 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、ステレオタキシーにより Pellegrino & Cushman のアトラスに準じて bregma から A P 2.2mm, L 2.5mm, 硬膜から深さ 3.5mm の海馬内にガイドカニューラを埋め込み、１日後に、透析プローブを挿入し無麻酔下でリンゲル液を 2μl/min の速度で灌流した。４時間の basal release を取った後、灌流サンプルは１５分毎に分取し、nicotine を0.8mg/kg の割合で皮下投与した。分取サンプルは、HPLCにて注入し、ACh, アミノ酸及びカテコールアミンを定量した。

〔結果〕

1）kainate 10^{-5} M ラット海馬培養神経細胞の細胞生存率は、kainate 刺激後のdexamethasone の追加により、用量依存的に低下することを認めた（図１）。

2）ラット海馬10^{-5} 培養神経細胞にdexamethasone 10^{-4} M 及び kainate 10^{-5} M を添加して発現した毒性は、nicotine の添加により抑制され、その作用は、10^{-10}～ 10^{-7} M の間で用量依存的であった（図２）。

3）ラットにnicotine を0.8mg/kg の割合で皮下投与したところ、海馬での glutamate の放出が有意に減少した（投与３時間後約１０%。、図３）。

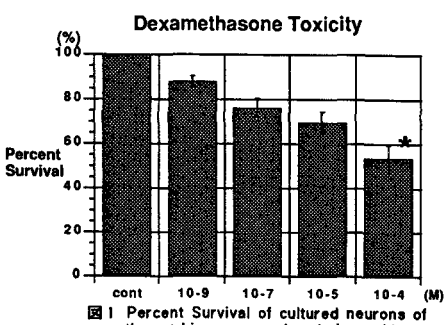
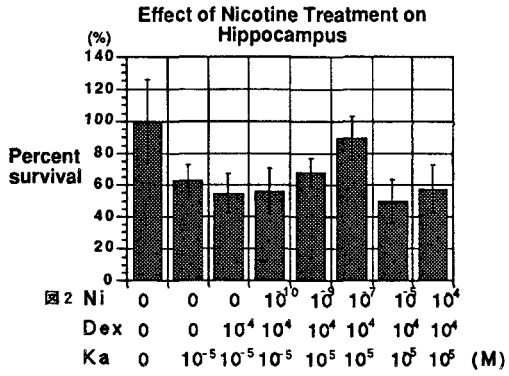


図1 Percent Survival of cultured neurons of the rat hippocampus in relation with dexamethasone. Cont means kainate alone of which % survival is 85% of medium alone.



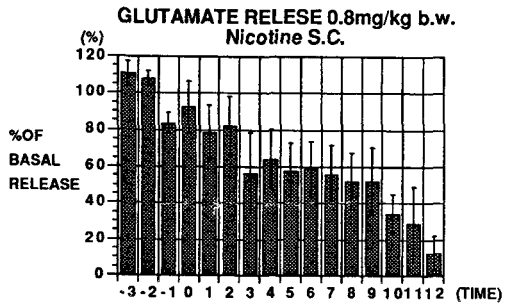


図3 Effect of Nicotine S.C. on levels of glutamate in hippocampal perfusates. Values are given as percentages of basal values (N=5).

［考察］

海馬は、glucocorticoid receptor が脳内で最も豊富に存在する場所であるにもかかわらず、その存在意義、あるいは機能に関しての報告は少ない。著者らは、今回の実験で、glucocorticoid が、海馬神経細胞に対する興奮性アミノ酸の毒性を増強することを確認した。このことは、glucocorticoid が血液脳関門を自由に通過することと合わせ、注目に値する。一方nicotineが、記憶、学習に対してよい影響を与えるという一部の臨床的な結果がある。これに対し今回の実験で、nicotine が dexamethasone の海馬神経細胞に対する毒性を軽減したということは意義深い。また、in vivo microdialysis実験では、nicotine が glutamate の 遊離を抑制した。従って海馬での glucocorticoid とnicotine の役割については、今後更に検討を進める必要があると考える。

［文献］ 1. Robert M. Sapolsky, Hideo Uno, Charles S. Robert, and Caleb E. Finch, (1990), J. Neurosci., 10, 2897-2902.

2. Paul B. S. Clarke, Pochele D. Shwartz et al., (1985) J. Neurosci., 5, 1307-1315

177 ニューロンのグルタミン酸刺激後の脳型Naポンプ活性増大はターンオーバー数の増大による

松井英男，菅田晴夫，井上順雄*
（杏林大・医・第一生化，*横浜市大・医・第一生化）

〔要約〕
ラット大脳の初代培養ニューロンをグルタミン酸で刺激すると、Naポンプアイソフォーム（脳型、普遍型）の活性が調節を受け、特にウアバイン高感受性の脳型Naポンプ活性は3倍に増大する。このポンプ活性増大のメカニズムがポンプ数の増加、ターンオーバー数（TN）の増大、或いはその両者の協同のいづれによるかを判定するため、培養ニューロン *in situ* での^{3}Hウアバイン結合を測定した。脳型Naポンプは、高親和性ウアバイン結合として求められ（Kd＝0.5μM）、その結合量（20p mol／mg protein）は脳型Na^+,K^+-ATPase 活性に見合う値を示した。$^{42}K^+$取込みによるNaポンプ活性と^{3}Hウアバイン結合を、二重標識実験により同時に測定してポンプのTNをもとめた。グルタミン酸刺激により、ウアバイン結合量は変化しなかったがポンプ活性は約3倍に増大した。したがってTNも3.5／秒から8.6／秒と約3倍に増大した。至適条件下における膜断片のNa^+,K^+-ATPaseのTNが約140／秒であるので、*in situ* のNaポンプの活性は無刺激時で最大活性の2.5%、グルタミン酸刺激時でも6．2%と低く、ポンプ活性の調節には充分ゆとりがあることがわかった。

神経細胞においては、Naポンプによって形成されるNa^+，K^+の細胞内外の濃度勾配が神経機能発現のために必須である。我々は、ラット大脳の初代培養ニューロンを用いた研究から、ニューロンには、すべての組織細胞に存在するウアバイン低感受性の普遍型Naポンプ（α1型）の他に、脳などの限られた組織にだけ存在するウアバイン高感受性の脳型Naポンプ（α2型とα3型）がニューロンの成熟・分化に応じて発現することを明らかにした（1）。この成熟ニューロンを興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸で刺激興奮させると、脳型Naポンプ活性が数倍に上昇し、一方普遍型Naポンプ活性は低下することを見出し、脳型Naポンプが神経興奮後のイオン環境の修復に重要であることを示した（2，3）。今回、我々は、この活性調節機構における最終アウトプットとしての脳型ポンプ活性の増大が、ポンプ数の増加によるのか、ターンオーバー数（TN）の増大によるのか、或いは両者の協同によるのかを、ウアバイン結合を測定して検討した。

〔実験方法〕
Wistar系ラットの17日胚大脳から分離したニューロンを24穴マルチウエル中で14～16日培養した（1－3）。ウアバイン結合の測定は、Naポンプの^{42}K取込み活性測定と同じ標準反応液〔130mM NaCl，2mM KCl，0.8mM $MgCl_2$，1.8mM $CaCl_2$，5mM グルコース，25mM Hepes-Imidazol 緩衝液（pH7.3）〕に1μM ^{3}Hウアバインを加えた反応液でウエル中の細胞をインキュベートし、細胞を2回洗浄して得られた^{3}Hウアバイン結合量から、比放射活性を500倍に希釈した0.5mM ^{3}Hウアバインと細胞をインキュベートした時の結合を非特異的結合量として差引き、脳型Naポンプへの特異的結合量を求めた。^{3}Hウアバイン結合量と^{42}K取込みポンプ活性の、二重標識実験による同時測定は、0μM、1μM及び0.5mM ^{3}Hウアバイン含む反応液とニューロンを37℃で30分プレインキュベーションした後、100μMグルタミン酸を含む反応液（含ウアバイン）と交換して細胞を12分間刺激し、次いで、^{42}Kで標識した反応液（含ウアバイン）と交換して12分間インキュベーションし、細胞内に取込まれた^{42}K及び結合した^{3}Hウアバインを測定する。Naポンプの全活性は0.5mMウアバインで阻害されるK^+取込み量より求め、1μMウアバインで阻害される脳型と残余の普遍型アイソフォーム活性とに分別した。尚、ウアバイン低感受性の普遍型Naポンプへのウアバイン結合は、非特異的結合量を求めることが困難なため，測定が行えなかった。

［実験結果と考察］

ウアバイン結合測定の実験条件を定めるため、予備実験としてウアバイン濃度および反応時間の影響を検討した。脳型Ｎａポンプへのウアバイン結合は 1μM ウアバインで充分飽和し、 0.1μM でも８０％以上の結合を示した。脳型Na^+, K^+-ATPase活性のウアバインに対する K_iは 6×10^{-7}M、脳型Ｎａポンプ活性のウアバインに対する K_iは 10^{-7}Mであるのに比べて、結合測定における $K_{0.5}$ は $\sim 5 \times 10^{-8}$M と低いことがわかった。これ等の違いは、当然のことながら、各々の K_i は測定条件の違いから実際のK_dを間接的にしか反映していないためである。一方、結合反応の時間経過曲線では、ウアバイン濃度が 0.1μM と 1μM とで同様のパターンを示し、結合飽和に達するのに４０分を要した。濃度を１０倍に上げても結合の立ち上がりが早くならないのは、結合が浮遊細胞にたいするものでなく、器壁面に接着したコンフルエントな状態の細胞に対するものであるためと考えられる。

グルタミン酸刺激によるＮａポンプ活性変化の測定において、^{42}Kと^{3}Hウアバインを用いた二重標識実験を行い、K^+取り込みとウアバイン結合を同時に測定した結果を図１に示す。脳型Ｎａポンプ活性はグルタミン酸刺激により、既報の結果と同様、約３倍に増大したが、普遍型Ｎａポンプ活性では逆に２５％減少した。一方、脳型Ｎａポンプへのウアバイン結合はグルタミン酸刺激によって、誤差範囲内の変動しか認められなかった。Ｎａポンプ活性とウアバイン結合の同時測定結果より、ターンオーバー数を計算した。表１に見られる如く、至適条件下における膜断片のNa^+, K^+-ATPaseターンオーバー数が約１４０／ｓｅｃ（4、5）であるのに対して、ニューロン *in situ* のＮａポンプは無刺激時で３.５／ｓｅｃ（２.５％）、グルタミン酸刺激時で８.６／ｓｅｃ（６.２％）と低く、Ｎａポンプ活性には充分なゆとりがあるものと見られた。これらの結果から、グルタミン酸刺激による脳型ＮａポンプのK^+取り込み量の増大は、ポンプ数の増加によるものではなく、ターンオーバー数の増大に基づくポンプ活性そのものの増大によることが明らかになった。

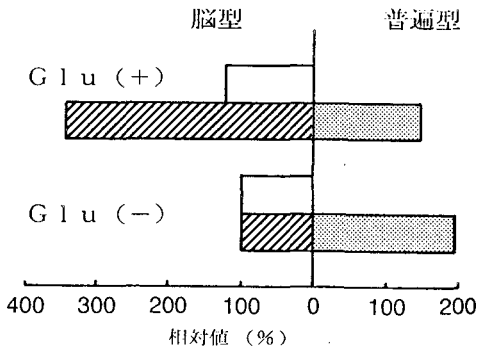


図１．グルタミン酸刺激による培養ニューロンの K^+取り込み及びウアバイン結合

□ 脳型Ｎａポンプへのウアバイン結合量

▨ 脳型ＮａポンプによるK^+取り込み量

▩ 普遍型ＮａポンプによるK^+取り込み量

表Ｉ．Ｎａポンプのターンオーバー数の比較

	-Glu	+Glu
K^+取り込み (nmol/min/mg)	5.8	16.9
ウアバイン結合 (pmol/mg)	13.8	16.4
ポンプturnover数 (sec^{-1})	3.5	8.6
ATPase turnover数 (sec^{-1})	139	

［文献］

1. Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H.(1988) J. Biochem. 104, 349-354.

2. Inoue, N. and Matsui, H. (1990) Brain Res. 534, 309-312

3. Inoue, N. and Matsui, H. (1991) The Sodium Pump : Recent Developments. 597-600, The Rockefeller Universety Press, New York

4. Matsui, H. and Homareda, H. (1982) J. Biochem. 92, 193-217

5. Nagamatsu, S., Inoue, N. and Matsui, H. (1986) Acta Endoclinol. 111, 69-74

178 ｒａｓトランスフォームした細胞で変調するブラジキニン反応：膜過分極により活性化するＣａ$^{2+}$オシレーションおよびＣａ$^{2+}$流入

橋井美奈子[1)2)]、三辺義雄[2)]、村崎欣子[2)]、野澤義則[3)]、東田陽博[1)]
（金沢大・医・神経情報研・神経物性[1)]、国立精神神経センター[2)]、
岐阜大・医・生化[3)]）

〔要約〕

fura－２による細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度測定とホールセルパッチクランプによる膜電位固定とを組み合せることにより、ｒａｓ遺伝子を導入しトランスフォームしたＮＩＨ／３Ｔ３線維芽細胞（ＤＴ細胞）における、ブラジキニン（ＢＫ）によって活性化される細胞外からのＣａ$^{2+}$流入のメカニズムを検討した。ＢＫをＤＴ細胞に投与すると、細胞外にＣａ$^{2+}$が存在するときのみ周期的細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度上昇（Ｃａ$^{2+}$オシレーション）がみとめられ、細胞外液のＣａ$^{2+}$を除くと消失した。同様の現象は細胞膜電位を過分極側から脱分極側へもっていく操作で再現できた。膜電位が－４０ｍＶにある間はＣａ$^{2+}$オシレーションがみられたが、０ｍＶに保持すると消失した。ＮＩＨ／３Ｔ３細胞では、いずれの膜電位でもＣａ$^{2+}$オシレーションはおこらなかった。ＤＴ細胞、ＮＩＨ／３Ｔ３細胞共、膜過分極側で細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度が増加する性質がみられ、細胞外液Ｃａ$^{2+}$をフリーにするとこの現象は消失することから、この現象は過分極性Ｃａ$^{2+}$流入によると考えられた。ＤＴ細胞では、ＢＫ投与により過分極性Ｃａ$^{2+}$流入が著名であったが、ＮＩＨ／３Ｔ３細胞ではＢＫによる増強効果はみられなかった。以上の結果より、ＤＴ細胞におけるＣａ$^{2+}$オシレーションは、ｒａｓおよびＢＫによって活性化される持続的な過分極性Ｃａ$^{2+}$流入によって維持されることが示唆された。

＜目的＞

神経伝達調節物質であるブラジキニン（ＢＫ）は、リン脂質代謝を活性化し、細胞内Ｃａ$^{2+}$動員を生じることが知られている。一方、周期的な細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度上昇（Ｃａ$^{2+}$オシレーション）は多くの非興奮性細胞でみられ、ホルモン分泌・受精・ＤＮＡ合成・細胞増殖などに重要な働きをする。この機序として、まず、リン脂質代謝産物による細胞内Ｃａ$^{2+}$動員が重要な役割をはたしているが、さらに、細胞外から何らかの経路を通ってのＣａ$^{2+}$流入も必須であるとされている。そのＣａ$^{2+}$流入のキーメッセンジャーとして、イノシトール３リン酸、４リン酸等が注目されている（１）。しかしながらこの流入経路の詳細はほとんど解明されていない。そこで今回我々は、ｒａｓ導入線維芽細胞にパッチ膜電位固定法を適応した上で、ＢＫ受容体刺激後ひきおこされるＣａ$^{2+}$流入を解析したので報告する。

＜方法＞

理化学研究所の杉本博士より入手したＤＴ細胞は、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭで既報通り培養した（３）。細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度測定は、fura－２ＡＭ添加、３４０ｎｍ／３８０ｎｍの蛍光強度比を調べることによった。膜電位固定は８－１６ＭΩのパッチ電極によるホールセル膜電位固定法で行なった。細胞は２ｍＭ$CaCl_2$、１００ｍＭＴＥＡ、５ｍＭＣｓＣｌ、１ｍＭ$MgCl_2$、２５ｍＭ glucose、２５ｍＭ Hepesを含むDocherty液（２）で潅流した。Ｃａ$^{2+}$フリー溶液は、この溶液から$CaCl_2$を除きさらに0.1ｍＭＥＧＴＡを添加した。パッチ電極は、１５０ｍＭＣｓＣｌ、１ｍＭ$MgCl_2$、１ｍＭNa_2ATP、0.1ｍＭ fura－２、１０ｍＭ Hepesを含む液で満たした。

＜結果と考察＞

ＢＫ（２００ｎＭ）をＤＴ細胞に添加すると、液温３５℃の条件では７５％の細胞でＣａ$^{2+}$オシレーションが出現した。細胞外にＣａ$^{2+}$が存在しない場合には、ＢＫ刺激によるＣａ$^{2+}$オシレーションはおこらなかった。そこで細胞外Ｃａ$^{2+}$を２ｍＭからフリーにし、再び２ｍＭに戻すと、０ｍＭに保った間だけオシレーションは消失した。これと同じ現象は、細胞外２ｍＭＣａ$^{2+}$存在下で、膜電位を－４０ｍＶから０ｍＶへ変えることでも観察された（図１）。膜電位を－４０ｍＶから０ｍＶへ脱分極させ、再び－４０ｍＶへ過分極させると、０ｍＶに保った間だけＣａ$^{2+}$オシレーショ

ンは消失した。より詳しく膜電位を変えていくと、Ca^{2+}オシレーションは－11.7±6.9mV（n＝10）で止まることがわかった。またオシレーション頻度やオシレーション間の細胞内Ca^{2+}濃度についても膜過分極側で増加する傾向がみられた。次に細胞内Ca^{2+}濃度と膜電位の関係を、外液温を26－28℃にさげCa^{2+}オシレーションを止める操作を行ない、更に詳しく検討した（図2）。BKを投与したDT細胞では、膜電位過分極化と共に細胞内Ca^{2+}濃度は顕著に増加した（図2A）。これに比しBKを投与しないDT細胞では、膜電位過分極化に伴う細胞内Ca^{2+}濃度増加はわずかであった（図2B）。さらに細胞外液のCa^{2+}を除いたDT細胞では、細胞内Ca^{2+}濃度は－90mVから＋40mVの間でほとんど変化がみられなかった。他方NIH／3T3細胞でも、外液2mMCa^{2+}存在下で膜電位過分極化に伴うわずかな細胞内Ca^{2+}濃度増加がみられたが、BK刺激による増強効果はなかった。したがって、NIH／3T3細胞にも、微量ではあるが、もともと過分極側で増強するCa^{2+}流入経路があり、rasタンパク質が関与するかrasによるトランスフォーメーションによって、BK刺激による過分極性Ca^{2+}流入が増強すると考えられた。このCa^{2+}流入がCa^{2+}オシレーションの発現と維持に重要な働きをすることが想定される。現在、その機構に関与するイノシトール(1,3,4,5)4リン酸を中心とするセカンドメッセンジャーの役割について、検討中である（4）。

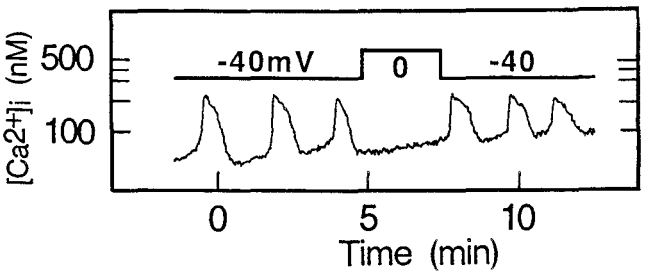
<文献>

1） Berridge, M. J. (1993) Nature 361, 315-325.

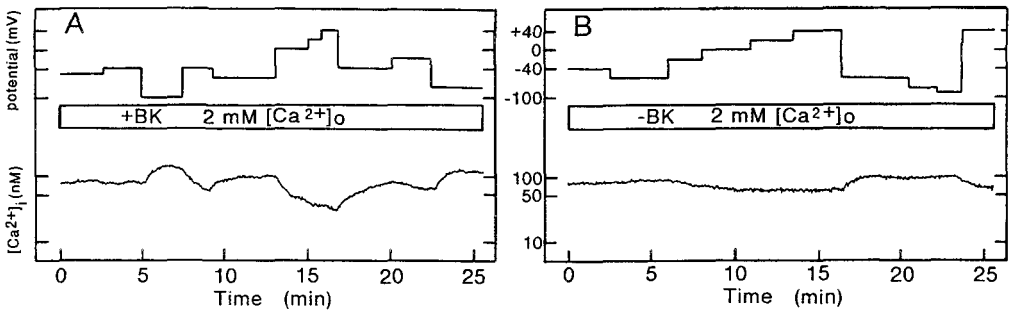
2） Docherty, R. J. (1988) J. Physiol. 398, 33-47.

3） Fu, T., Sugimoto, Y., Oki, T., Murakami, S., Okano. Y. & Nozawa, Y. (1991) FEBS Lett. 281, 263-266.

4） Hashii, M., Nozawa Y. & Higashida, H. (1993) J. Biol. Chem. in press.



〔図1〕 DT細胞における、Ca^{2+}オシレーションと膜電位との関係。Ca^{2+}オシレーションは膜電位を0mVに脱分極させると消失、再度－40mVに戻すと再出現した。



〔図2〕 DT細胞における、細胞内Ca^{2+}濃度と膜電位との関係。A，B共、膜電位の時間的変化を上段に、同時に測定したCa^{2+}濃度を下段に示す。A：BK（200nM）を投与したDT細胞では、膜電位脱分極側のCa^{2+}濃度に対して、過分極側での濃度増加が顕著である。B：BKを投与しないDT細胞でも膜電位変化に伴う細胞内Ca^{2+}濃度変化がみられるが、Aに比しわずかである。

179 神経終末モデルとしての血小板へのセロトニン取り込みに対する有機水銀性SH阻害剤チメロサールの抑制作用機構

西尾 廣昭、根笹 賢一、平野 潤、仲田 義啓
（広島大・医・総合薬学・薬効解析科学）

〔要約〕 神経終末モデルとしての血小板へのセロトニン(5-HT)取り込み活性、細胞内 Ca^{2+}濃度([Ca^{2+}]i)およびc-AMP濃度に対する thimerosalの影響について検討した。 Thimerosalは細胞内 Ca^{2+}貯蔵部位からCa^{2+}を遊離させ[Ca^{2+}]i上昇を引き起こし、その結果 5-HT取り込み抑制作用をあらわすことが示唆された。これらの thimerosalの作用はDb-c-AMPあるいはforskolinによって阻害されたが、theophyllineによっては阻害されなかった。Thimerosalは、従来より示唆されている Ca^{2+}-ATPase阻害に基づく Ca^{2+}動員作用とともに、それ自体 c-AMP産生を抑制し、^{3}H-5-HT取り込み活性に影響を与える可能性が明かとなった。

血小板には各種化学伝達物質の受容体、細胞内情報伝達系としての cyclic nucleotide代謝系、Ca^{2+}動員系、また化学伝達物質の取り込み、あるいは貯蔵といった数多くの神経細胞様機能的側面が見いだされており、血小板を神経終末モデルとして用いる研究は、益々盛んになっている。我々は、血小板への5-HT取り込み調節機構の解明をめざし一連の検討を行っている。そして、concanavalin A (Con A)による5-HT取り込み抑制作用に、[Ca^{2+}]iの上昇および C-kinase系の活性化が関与している可能性について報告している(3),(4)。一方、有機水銀性 SH阻害剤である thimerosalは、肝細胞において $InsP_3$感受性Ca^{2+}チャネルを活性化し(5)、骨格筋小胞体および小脳ミクロソームにおいてCa^{2+}-ATPaseを阻害することによりCa^{2+}取り込みを抑制すること(1)が報告されている。また、血小板においても thimerosalによる細胞内Ca^{2+}動員作用が報告されているが(2)、その作用におけるCa^{2+}-ATPase活性および$InsP_3$感受性Ca^{2+}チャネルとの関係はあきらかとなっていない。さらに、ハムスター卵細胞での実験結果より、thimerosalがCa^{2+}誘発性Ca^{2+}遊離機構(CICR)についての有用な研究手段となるうるとされている(7)。今回、我々はウサギ血小板への 5-HT取り込みに対する thimerosalの抑制作用機構について検討を行った。

「実験方法」①血小板 5-HT取り込み活性の測定：ウサギ頚動脈血より調整した希釈 platelet rich plasma (dil-PRP)を用いて、^{3}H-5-HTの取り込み活性を我々がすでに報告した方法(4)に従って測定した。②血小板内遊離Ca^{2+}濃度の測定：Fura-2 ロードしたウサギ血小板を用い、我々が確立した顕微鏡画像解析法(6)により測定した。③血小板内 c-AMP濃度の測定：ウサギの dil-PRPを各種処理後、急速遠心し得られた血小板をTCA処理後、c-AMP assay system (Amersham) により c-AMP量を測定した。

「実験結果」①血小板5-HT取り込み活性に対する thimerosalの影響： 血小板5-HT取り込みに対し、10 μM thimerosalはその3分間前投与では無影響であったが、30分間前投与は著明な抑制作用をあらわした（図1）。あらかじめ血小板に取り込ませた^{3}H-5-HTレベルに対しては、これらの thimerosal投与は無影響であった。また、このthimerosalによる5-HT取り込み抑制作用に対して、SH-基還元試薬である dithiothreitol(DTT) は濃度依存的に拮抗作用を示した。さらに、thimerosalによる5-HT取り込み抑制作用は、Db-c-AMPおよび forskolinによってそれぞれ 1 mM, 10 μMの濃度によって有意に阻害された。しかし、theophyllineは 1 mMの濃度においても阻害作用を示さなかった（図2）。

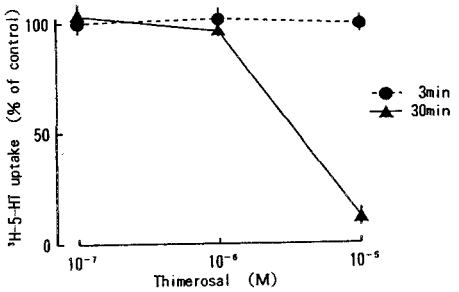


図1 EFFECT OF THIMEROSAL ON ^{3}H-5-HT UPTAKE

②血小板内Ca^{2+}濃度に対する thimerosalの影響：

静止時の血小板[Ca^{2+}]iは 69 ± 8 nM (n=6)であった。10 μM thimerosal添加により、その直後より急激に上昇し 2,555 ± 125 nM (n=6)の最大値を示した。この

thimerosal作用は、外液中の Ca^{2+} に依存しなかった。さらに、外液中に Ca^{2+} 非存在下において、thimerosalの Ca^{2+} 動員作用は1 mM Db-c-AMPあるいは 10 μM forskolinの前投与により有意に抑制されたが、1 mM theophyllineの前投与は無影響であった。

③血小板 c-AMP濃度に対するthimerosalの影響：

Thimerosal 10 μMは無処置血小板の c-AMP濃度をやや低下させたが、有意な変化ではなかった。Theophylline 1 mM はややc-AMP濃度を上昇させ、forskolin 10 μMは有意な c-AMP濃度上昇作用を示した。これらの薬物存在下においては、10 μM thimerosalは有意に c-AMP濃度を低下させた（図3）。

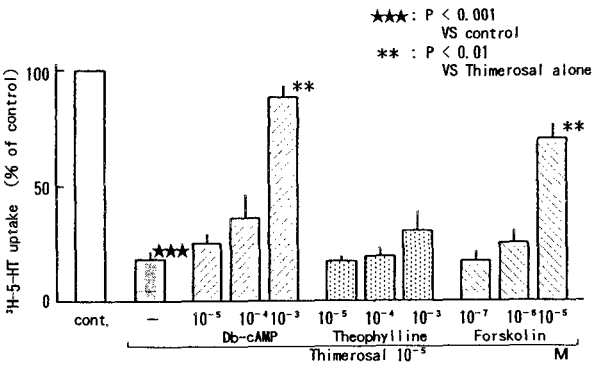


図2 EFFECT OF A-KINASE ACTIVATORS ON ³H-5-HT UPTAKE INHIBITION BY THIMEROSAL

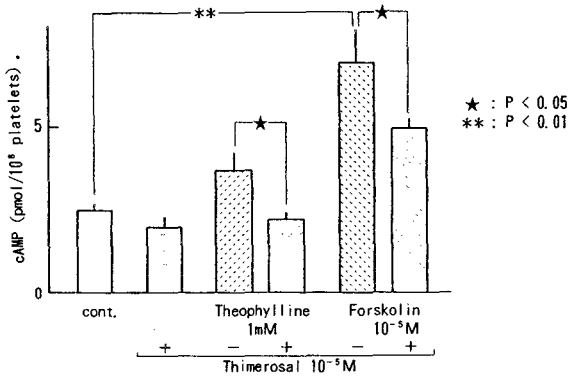


図3 EFFECT OF THIMEROSAL ON PLATELET cAMP LEVELS

「考察」 Ca^{2+}-ATPase阻害活性を有するとされる有機水銀性 SH-基阻害剤 thimerosalは、血小板内 5-HT遊離作用をあらわさない濃度において、処置時間に依存した 5-HT取り込み活性抑制作用を示した。この抑制作用が DTTによって拮抗されたことは、SH-基阻害作用を介する作用であることを示唆している。この時、Thimerosalは、外液中の Ca^{2+} に依存しない $[Ca^{2+}]i$ 上昇作用を示し、thimerosalの $[Ca^{2+}]i$ 上昇作用が Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員によるものである事が示唆された。さらに、これらの thimerosal作用はいずれも、Db-c-AMPおよび forskolinによって抑制された。これらの結果は、我々が Con Aによる 5-HT取り込み作用機構について報告した結果(3)と同様に、thimerosalの作用は [$[Ca^{2+}]i$ 上昇作用→C-キナーゼ系活性化→5-HT取り込み阻害] と考えられ、この過程にA-キナーゼ系が抑制的に働くことを示唆するものである。しかし、thimerosalによる $[Ca^{2+}]i$ 上昇作用ならびに5-HT取り込み抑制作用に theophyllineが無影響であったという結果は、thimerosalが c-AMP産生系に抑制的に影響することを示唆するものであり、この点については血小板内c-AMP定量実験結果から確認されたものと思われる。Thimerosalによる血小板 $[Ca^{2+}]i$ 上昇作用については、細胞内貯蔵部位への Ca^{2+} の取り込みポンプである Ca^{2+}-ATPase阻害作用の関与が示唆されているが、今後さらに検討する必要があると思われる。

「参考文献」

(1) Brown, G.R., Michell, R.H. & Michelangeli, F.(1993) Biochem. J. 289, 883-887.
(2) Hecker, M., Brüne, B., Decker, K. & Ullrich, V.(1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 159, 961-968.
(3) Ikegami, Y., Nishio, H., Fukuda, T., Nakata, Y. & Segawa, T.(1991) Japan. J. Pharmacol. 57, 233-241.
(4) Jikoh, Y., Nishio, H., Okugawa, K. & Segawa, T.(1990) Japan. J. Pharmacol. 53, 403-410.
(5) Missiaen, L., Taylor C.W. & Berridge, M.J.(1991) Nature 352, 241-244.
(6) Nishio, H., Ikegami, Y. & Segawa, T.(1991) Cell Calcium 12, 177-184.
(7) Swann, K.(1991) FEBS Lett. 278, 175-178.

180 ニューロンのNaポンプアイソフォーム活性のK⁺依存性

井上 順雄，松井 英男*，加藤 尚彦
（横浜市大・医・第一生化，杏林大・医・第一生化*）

〔要約〕

ラット大脳の初代培養ニューロンのNaポンプアイソフォーム活性に対する細胞外K^+濃度の影響を検討した．脳型Naポンプの活性は0.5 mM KClでピークとなり1 mM以上では顕著に阻害された．普遍型Naポンプの活性はS字型の飽和曲線を示した．しかし，細胞膜分画のNa,K-ATPase活性のK^+濃度依存性では，高濃度K^+による脳型活性の阻害はなく，また普遍型活性の飽和曲線もS字型ではなかった．一方，グルタミン酸であらかじめ刺激した細胞のNaポンプ活性では，脳型活性は2 mMで最大になり，無刺激時に見られた高濃度K^+による阻害が消失した．活性値も無刺激時より増大した．普遍型活性の飽和曲線は無刺激時と同様にS字型であったが，活性は無刺激時より低下した．これらのグルタミン酸刺激後の脳型活性の上昇，普遍型活性の低下は既報と同様であるが，今回の結果から，脳型活性が上昇する機構の一つとして，高濃度K^+よる活性阻害の消失が関与する可能性が示された．

ニューロンにおいて，Naポンプ（Na,K-ATPase）が維持するNa^+とK^+の濃度勾配は，細胞が正常に機能するために必須である．これまで我々はラット大脳の初代培養ニューロンを用いて，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，脳などの限られた組織に特徴的な脳型Naポンプ（α2型とα3型）が存在することを示した（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（4，5），および細胞内エネルギーレベルが低下した時のイオン環境の維持（6）に重要であることも明らかにした．これらの結果は，アイソフォーム間の活性調節および機能の相違を示すものである．今回，我々は，Naポンプアイソフォームの活性調節機構を明らかにする目的で，Naポンプ活性に対する細胞外K^+濃度の影響をみた．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12～15日間培養し成熟したもの（1－5）を用いた．Naポンプ活性は既報に準じて測定した（2-4）．細胞を反応液［130mM NaCl，0.1～4 mM 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）］中で，37℃で30分間preincubationした後，^{42}KClを添加し，12分間に細胞内に流入する^{42}Kを測った．Naポンプ活性は，1 mMウアバイン添加で阻害されるK^+流入量から求めた．グルタミン酸刺激の影響を見るためには，preincubationの最後の12分間100μMグルタミン酸を添加した．さらに，Naポンプアイソフォームの活性を，コンピューター解析により，ジギタリス阻害に対する感受性の相違によって，脳型（ジギタリス高感受性型）と普遍型（低感受性型）の活性に分けた．培養細胞の膜分画のNa,K-ATPaseは，既報に準じて，100 mM NaCl，0～15 mM KCl，4 mM $MgCl_2$，1mM EDTA，2

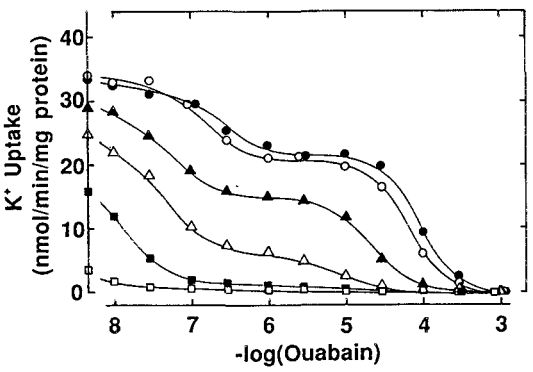


図1．培養ニューロンのNaポンプ活性のウアバイン阻害曲線
□，0.1 mM KCl；■，0.25 mM KCl；△，0.5 mM KCl；
▲，1.0 mM KCl；○，2.0 mM KCl；●，4.0 mM KCl

mM ATP, 0～10 mM strophanthidin, 50 mM imidazole-HCl緩衝液(pH 7.5)中で測定した（２）.

【実験結果と考察】

ニューロンのNaポンプ活性のウアバイン阻害曲線が，2 mM KCl条件下で二相性になることは既に報告（３－４）した．ここでは，種々のK^+濃度でも同様に，阻害曲線が二相性になることを示す（図１）．これらの阻害曲線から，脳型と普遍型それぞれのNaポンプの，活性およびウアバインによる阻害定数を求めた．図２に活性のKCl濃度依存性を示すが，全体のNaポンプ活性は2 mM KClでほぼ飽和して一定の最大活性値となった．脳型活性は0.5 mM KClでピークとなり1 mM以上では顕著な阻害を受けた．普遍型活性はＳ字型の飽和曲線を示した．最大活性の1/2を与えるKCl濃度（以下，$K_{m.app}$）は，脳型活性は0.2 mM，普遍型活性は0.8 mMであった．一方；結果は示さないが，ニューロンから分離した膜分画のNa,K-ATPase活性では，脳型活性と普遍型活性の$K_{m.app}$はそれぞれ1 mM，2 mMであった．しかし，Naポンプ活性と異なり，脳型活性は高濃度K^+でも阻害されず，普遍型活性の飽和曲線もＳ字型ではなかった．この結果は，細胞レベルにおいてNaポンプ活性がなんらかの機構で調節されていることを示すと考えられる．Na,K-ATPaseの一般的性質としてよく知られているが，図１の様に，ウアバインに対する親和性はK^+濃度に依存して低下した．

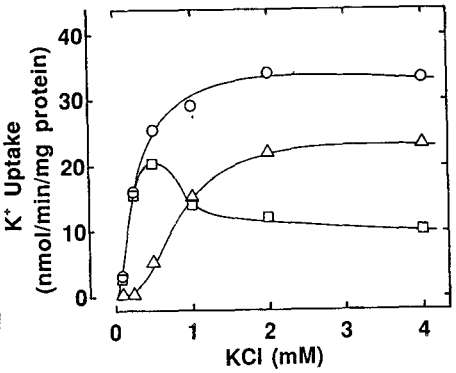


図２．培養ニューロンのNaポンプ活性のKCl濃度依存性
○，全活性；□，脳型活性；△，普遍型活性

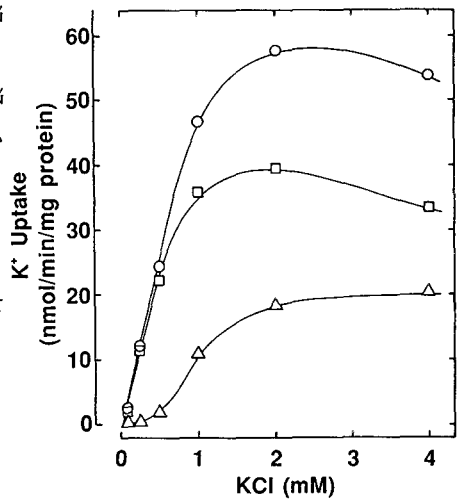


図３．グルタミン酸刺激後の培養ニューロンのNaポンプ活性のKCl濃度依存性
○，全活性；□，脳型活性；△，普遍型活性

グルタミン酸で細胞をあらかじめ刺激した場合は，脳型活性は2 mMで最大になり，無刺激時に1 mM以上の濃度で起こったK^+による顕著な阻害がほとんど消失した（図３）．また，活性値も無刺激に比較して高かった（図２，図３）．この結果は，これまで報告した2 mM KCl条件下で起こるグルタミン酸刺激後の脳型Naポンプの活性化（２－４）と一致するものである．そして，この結果から活性化の機構の一つとして，K^+による活性阻害の消失が関与する可能性が考えられる．一方，普遍型活性の飽和曲線は，無刺激時と同様にＳ字型であり，グルタミン酸刺激によって既報と同様に活性が低下した（図２，図３）．K^+に対する$K_{m.app}$は，脳型活性は0.4 mM，普遍型活性は1 mMであり，グルタミン酸刺激によりわずかに増加した．結果には示さないが，ウアバインによる阻害定数は脳型活性，普遍型活性ともグルタミン酸刺激により変化しなかった．

【文献】

1. 井上順雄，原諭吉，中尾真，津久井弘子，畠中寛，松井英男（1987）神経化学，26，229-231.
2. Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H. (1988) J. Biochem. 104, 349-354.
3. Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H. (1988) Prog. Clin. Biol. Res. 268B, 91-96.
4. Inoue, N. and Matsui, H. (1990) Brain Res. 534, 309-312.
5. 井上順雄（1991）生化学，63，356-359.
6. 井上順雄，阿部田聡，松井英男（1992）神経化学，31，240-241，1992.

181 カルシウムおよびグアニンヌクレオチドによる開口分泌はオール-オア-ナンの反応である -肥満細胞をモデルとして-

秀 和泉[1)]、仲田 義啓[1)]、P.E.R.Tatham[2)]、B.D.Gomperts[2)]
(広島大・医・総合薬・薬効解析[1)]、University College London[2)])

〔要約〕

開口分泌は神経伝達物質の遊離やホルモンの分泌を担う重要な細胞機能であるが、その調節機構の詳細は明かではない。今回我々は肥満細胞の脱顆粒をモデルとして、Ca^{2+}とグアニンヌクレオチドによる開口分泌を個々の細胞レベルで検討した。Sub-optimalな濃度のCa^{2+}とGTP-γSで刺激した膜透過性細胞およびCa^{2+}イオノフォアで刺激した無傷細胞では、いずれも完全に脱顆粒を起こした細胞と反応していない細胞の二つの細胞集団が認められた。つまり、Ca^{2+}およびグアニンヌクレオチドによって引き起こされる開口分泌は個々の細胞レベルではオールオアナンであり、これらの細胞内エフェクターに対する閾値は顆粒レベルではなく細胞レベルで決定されていることが示された。それに対し、ホスホリパーゼCを活性化し細胞内Ca^{2+}を動員するコンパウンド48/80は、濃度依存的に個々の細胞から部分的脱顆粒を引き起こした。従って、本来細胞単位でオールオアナンの反応をとるCa^{2+}結合蛋白質およびGTP結合蛋白質の活性化による開口分泌は、細胞表面の受容体刺激によるCa^{2+}動態とさらに何らかの情報伝達を介して顆粒レベルの調節を受ける可能性が示唆された。

〔目的〕

肥満細胞はサブスタンスP等の神経ペプチドによる刺激やIgE受容体の架橋により活性化され、顆粒内に貯えられたヒスタミンなどのケミカルメディエーターを開口分泌により放出する。この細胞は、1)膜透過処置により分泌機能が損なわれない、2)単一細胞からの開口分泌を膜容量の変化やボルタメトリーにより測定することが可能である、3)脱顆粒による細胞形態を光学顕微鏡レベルで観察できる、4)適当な刺激により顆粒内に貯えている物質をほぼ100%放出することができる、といった特質を備え、開口分泌の優れたモデルシステムとして広く研究に用いられている。神経伝達物質の遊離は神経終末へのCa^{2+}流入が引き金となるが、このCa^{2+}はカルモデュリンやシナプトタグミンなど複数のCa^{2+}結合蛋白質に結合することにより開口分泌を引き起こすことが解明されつつある。一方、smg p25A/rab 3AなどのGTP結合蛋白質も重要な役割を果たしていることが明らかにされている。肥満細胞の開口分泌にもCa^{2+}結合蛋白質(C_E)とGTP結合蛋白質(G_E)が関与し、この二つの蛋白質の活性化が、100%の分泌を起こすために必要にして十分であることが示されている[(1)]。

細胞が細胞内エフェクターの濃度に依存して分泌をおこすとき、個々の細胞はどのように反応していくのだろうか。例えば、sub-maximalな分泌反応が生じた時、すべての細胞が部分的に顆粒を放出しているのか、それとも一部の細胞が完全に脱顆粒をおこし、残りの細胞は静止状態に留まっているのだろうか。肥満細胞にレーザー光線を照射すると細胞内の顆粒によりあらゆる方向へ散乱するが、脱顆粒によりこの散乱光は著しく減少する。この性質を利用して今回分泌反応と脱顆粒の関係を個々の細胞レベルで検討した。

〔方法〕

SD系雄性ラットより腹腔肥満細胞を調製し、以下の3通りの方法で刺激した[(2)]。1)ストレプトリジン-Oで膜透過処置を行いGTP-γSとCa^{2+}-EGTA 緩衝液を細胞内に導入する、2)Ca^{2+}イオノフォアであるイオノマイシンでCa^{2+}を細胞内に取り込ませる、3)コンパウンド48/80によりホスホリパーゼCの活性化を引き起こしIP_3を介して細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からCa^{2+}を動員する。分泌反応はN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ(β-ヘキソサミニダーゼ、HEX)の遊離量を測定し、%で表した。フローサイトメーター(Coulter Epics Elite)を用いて90° 散乱光を測定し、脱顆粒の指標とした[(3)]。また、走査型電子顕微鏡で細胞の形態を観察した。

〔結果および考察〕

膜透過性肥満細胞をGTP-γS(20μM)存在下に異なる濃度のCa^{2+}で刺激した（図1A）。分泌の生じない低Ca^{2+}濃度(pCa8, 10nM)では、細胞は強い90° 散乱光を示した。高Ca^{2+}(pCa5, 10μM)では95%のHEX遊離が認められ、90° 散乱光は著明に減少した。47%のHEXを遊離したCa^{2+}濃度(pCa6.25, 0.56μM)では、それぞれpCa8とpCa5で認められた90° 散乱光の強さを示す二つの細胞のピークが存在し、その中間は認められなかった。この時、電子顕微鏡観察で、脱顆粒を起こした細胞と静

止状態の細胞の存在が確認された。高Ca^{2+}(pCa5.25)存在下でGTP-γSの濃度を変化させた時も同じ結果が得られた。従って、個々の細胞のCa^{2+}およびグアニンヌクレオチドによる開口分泌はオールオアナンの反応であり、これらの細胞内エフェクターに対する感受性の閾値を決定しているのは顆粒レベルではなく細胞レベルであることが示された。

無傷細胞にイオノマイシンを作用させ47%のHEX遊離を引き起こした細胞集団にも、全く反応していない細胞と完全に脱顆粒を起こした細胞の二つのピークのみ認められた（図1B)。ところが、コンパウンド48/80で無傷細胞を刺激すると、細胞集団は濃度依存的に90° 散乱光を減弱させる一つのピークとしての挙動を示した（図1C）。つまり、個々の細胞が顆粒を部分的に放出することが示された。

以上の結果から、個々の肥満細胞はCa^{2+}に対する固有の閾値を持っており、細胞内Ca^{2+}が持続的にしかも均一に上昇しCa^{2+}要求の閾値を満たすと、細胞は一気に全顆粒を放出することが明かとなった。それに対し、細胞表面の受容体刺激では個々の細胞が部分的な脱顆粒を引き起こす。この場合、細胞内Ca^{2+}の上昇は一過性で局在し、また、Cキナーゼ系の活性化などさまざまな調節機構が働き得る。従って、本来Ca^{2+}結合蛋白質およびGTP結合蛋白質の活性化によりオールオアナンの反応をおこす開口分泌は、細胞表面の受容体刺激によるCa^{2+}動態およびさらに何らかの情報伝達を介する機序によって顆粒レベルの調節を受ける可能性が示唆された。開口分泌系においては、細胞内エフェクターに対して一定の閾値が存在し、さらに顆粒レベルで部分的に脱顆粒をおこすような調節機構が働いているのかもしれない。

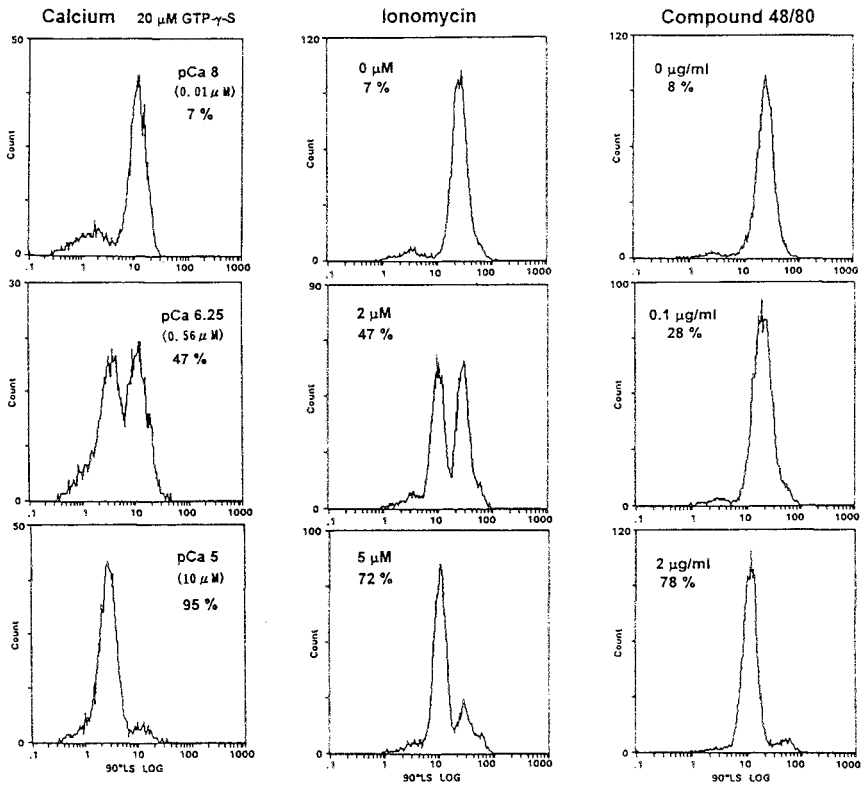


図1．個々の肥満細胞の90° 散乱光を示すヒストグラム。%値はHEX遊離量を表す。A)膜透過処置後GTP-γS存在下にCa^{2+}、B)イオノマイシン、C)コンパウンド48/80で刺激を行った。

〔文献〕

1. Gomperts, B.D. (1990) Ann. Rev. Physiol., 52, 591-606

2. Gomperts, B.D., Tatham, P.E.R. (1992) Methods in Enzymology, 219, 178-189

3. Hide, I., Bennet, J.P., Pizzy, A., Boonen, G., Bar-Sagi, D., Gomperts, B.D. and Tatham, P.E.R. (1993) J. Cell Biol. in press

182　スタウロスポリンによる神経突起の誘導

佐野　護、岩永　操
（愛知県コロニー研、形態学部）

〔要約〕

強力な蛋白燐酸化酵素阻害剤であるスタウロスポリン(SSP) は、培養幼鶏脊椎後根神経節(DRG) より、わずか4～20nMの添加で神経突起を誘導する。 それは神経成長因子(NGF) によって誘導される神経突起と、位相差顕微鏡、電子顕微鏡、アクチン、チュブリンの免疫染色法などにおいて、全く区別出来なかった。 しかし、40-100nMの SSP存在下で DRGを培養すると、細い神経突起の伸張が見られ、神経節からの細胞移動は見られない為、異なった様相を呈した。 またPC12D 細胞を用いて、 SSPおよび NGFによって誘導される敏速な形態変化と続いて起こる神経突起形成を比較検討した。 SSP または NGFを添加４分後、細胞周囲にラッフルの形成が観察され、10分後、そのラッフルが複数の突出を形成し、24時間後には神経突起へと成長する事が確認された。 SSPと NGFによって誘導されたPC12D 細胞の神経突起は、位相差顕微鏡、アクチン、チュブリンの染色において、差が認められなかった。 PC12D 細胞のラッフルと神経突起の形成には、10nMの SSPを要し、高濃度(100-200nM) では、長い神経突起に加えて、cytochalasin 感受性、colchicine非感受性のフィロポディア様の突起の形成が認められた。

NGF による神経突起誘導に細胞骨格蛋白質の燐酸化が関わる可能性が示唆され、我々もMAP キナーゼの介在を主張してきた(3,4,5)。 最近では、 PC12D細胞が、 NGF、dbcAMP添加数分後に生じるラッフル形成も、蛋白燐酸化酵素を介する可能性を示唆した(6)。 スタウロスポリン(SSP) は、 NGF作用の特異的阻害剤K-252a と類似の強力なキナーゼ阻害剤で、最初はC-キナーゼ(PKC) の阻害剤とされたが、最近では多くの既知のキナーゼに強い阻害効果が知られる。 高濃度 SSPが、 NGFの作用を阻害する実験結果が複数報告され、 PKCの関与が示唆されている。しかし、一方では、SSPがPC12, human neuroblstoma で短い神経突起を誘導する事、それは PKCと無関係とする報告もある(1,2)。 DRG やPC12D細胞は、NGF 添加後、新たな遺伝子発現を必要とせず、直ちに神経突起が誘導される。これらの培養に SSPを添加したところ、極低濃度で NGFと区別出来ない強力な神経突起誘導能を観察した。

［実験方法］① DRGの培養　10日鶏胚 DRGは、poly-Lysine の上にlaminin をcoat したdishで行なった。② PC12D細胞培養　poly-Lysine coat したcoverslip 上に培養した。 ③蛍光染色 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］ 4-40 nM の SSPを添加し、 DRGを培養すると24時間後には長い神経突起の伸張が観察される。これは NGFによって誘導される突起と区別出来ない（図１）。 40-100 nM の SSPでは、神経節からの細胞の遊走が見られず、神経突起は細く、見かけ上異なっていた。 NGF によって生じた突起と比較すべく、アクチン、チュブリン抗体で蛍光染色したが、差は認められなかった。 両者を電子顕微鏡で観察したが、共に、微小管、ニューロフィラメントの存在状態にも差は認められなかった。

PC12D 細胞は、10-200 nM SSP 或いは NGF処理すると、4 分後、細胞周囲にruffleが形成され、10分後にはそれが、数個所の点に凝集する。 この変化はアクチン染色によって良く観察出来る。そして、数時間から24時間で長い神経突起に成長する(図２)。高濃度の SSP(100 nM)を投与した時には、太い突起に加えて、アクチン陽性の細い突起が観察された。 ruffleの形成はcytochalasin B, cholchicine によって、影響されなかった。 細い突起は、cytochalasin Bにより、阻害されるが、cholchicine によっては影響されなかった。その形状から、フィロポディア様の突起と解釈される。低い濃度の SSPによる神経突起誘導は、NGF によるものと、判別出来なかった。 SSPによる神経突起誘導は、DRGと PC12D細胞のいずれの場合も、高濃度では、副作用があるが、低い濃度では、NGFの作用と酷似していた。 DRG ,PC12細胞に類似した作用を示す物質は、成長因子、cAMP上昇薬以外には類が無い。 SSPのこの作用はキナーゼ阻害活性によるのか、それ以外の作用があるのか不明である。 このアルカロイドの神経細胞に対する作用の解明は、 NGFによって誘導される神経細胞の分化機構解明の手がかりとなるだろう。

図１、鶏胚 DRGの培養、Staurosporine の効果
(A)無添加 (B)50ng/ml NGF (C)10 nM staurosporine の添加、24時間後の位相差顕微鏡写真

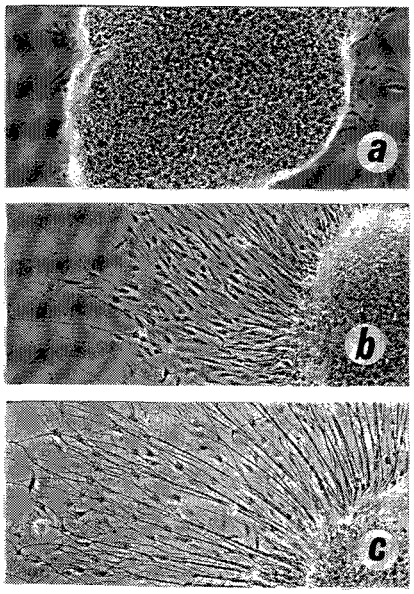
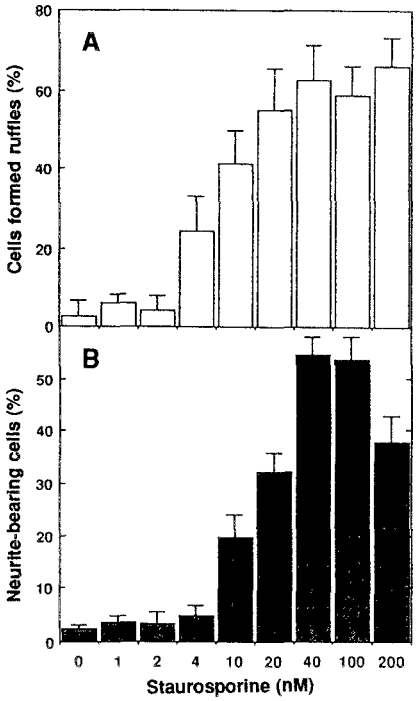


図２、StaurosporineによるPC12D 細胞の形態変化
1-200nM のstaurosporine を添加、(A) 4 分後のruffle 形成、(B) 24 時間後の神経突起形成



[文献] (1) Hashimoto,S., Hagino,A. (1989) Expt! Cell Res.,184. 351-359
(2) Rasouly,D. et al. (1992) Mol. Pharmacol.,42. 35-43
(3) Sano,M.et al. (1990) J. Neurochem., 55, 427-435
(4) Sano,M., Kitajima,S. (1992) J. Neurochem., 58, 837-844
(5) Sano,M.(1992) J. Neurochem.,59, 1263-1272
(6) Sano,M., Iwanaga,M.(1992) Cell Str. Func.,9. 341-350

183 神経成長因子による摘出白鼠交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性の抑制効果とGM1糖脂質による修飾作用

安藤正人・立岑廷族・永田　豊　(藤田保健衛生大・医・生理)

[要約] 摘出白鼠上頸交感神経節(SCG)を含む生理溶液中に神経成長因子(NGF)を添加してインキュベーションを行い、細胞内Ca^{2+}依存性トランスグルタミナーゼ(TG)活性におよぼす影響を検討した。また、NGF刺激で変動するSCG内TG活性におよぼすGM1糖脂質(GM1)の添加効果を追求した。さらに、細胞内Ca^{2+}-依存性タンパク・リン酸化酵素(PKC)活性におよぼすNGFとGM1刺激の影響を測定して、SCG内TG活性発現に与るNGFとGM1の細胞内PKC-情報伝達系への関与を考察した。①SCG内TG活性値は、NGFの添加濃度0.10μg/mlから濃度依存的に低下し、その抑制効果は0.25μg/mlで最大(-43%)であった。この低下効果は、NGFに対する特異抗体の同時添加(0.75μg/ml)で完全に回復した。即ち、NGFのTG酵素に対する抑制効果は、NGF受容体を介した作用と確認された。②NGFによるSCG内TG活性抑制効果は、TGの著明な活性増大を引き起こす GM1(5nM)の同時添加で消失し、逆に有意な活性上昇(43%)が引き起こされた。つまり、GM1はNGFの作用を拮抗的に調節する可能性が推測された。③SCG内TG酵素はPKC活性化剤のフォルボールエステル(TPA, 1μM) 刺激で有意に抑制されるが、この時標本内可溶性分画に回収されるPKC酵素には活性化(30%)が見られたが、顆粒(膜)結合型PKC への影響は示されなかった。また、TPAによるSCG内可溶性型PKCの活性化効果は、NGF刺激と同程度(33%)に認められた。 一方、GM1刺激は節細胞可溶性局在のPKC活性値を低下(-27%)させ、膜型PKC の活性上昇(+40%)を引き起こした。つまり、GM1は可溶型PKC酵素を膜型へ移行(translocation)させるのを促進する作用が推定された。 ④NGFとGM1をSCGに同時添加すると、PKC活性の細胞内でのtranslocationは殆ど消失した。従って、GM1によるPKC活性の細胞質から膜への移行促進効果は、NGFで阻止される可能性が強く示唆された。 以上の実験成績から、NGF は退行性物質代謝変動を促進するTG活性を抑制し、交感性ニューロンの成長・分化を維持する過程に極めて合目的に作用していることが再確認された。 また、NGFは細胞内Ca^{2+}-PKC情報伝達系でPKC活性を抑制してTG酵素の活性化を引き起こすGM1の作用に拮抗して、成熟動物でも交感性神経細胞の生存維持に与る代謝調節系に積極的に関与していることが明確となった。

[序] 白鼠上頸交感神経節(SCG)は、その標的器官(瞳孔と唾液腺) から逆行性に速い軸索輸送(約10mm/h)で供給される神経成長因子(NGF)の作用により、節内交感性ニューロンの生存と機能維持がなされている(3)。我々は既に、SCGの節後神経切断後2～4時間以内で、節内NGF含量は非手術神経節の約1/3 レベルに迄低下することを報告した(5)。この時、SCG細胞質内の至適なCa^{2+}濃度に依存して可溶性タンパクの非流動化(退行性物質代謝変化)を促進するトランスグルタミナーゼ(TG)活性は有意に上昇(1.5倍)することを認めた(2)。これは、神経切断後に生ずるSCG内NGF含量の低下とTG活性の増大が、密接に関連している生化学的変動と推定された。 今回は、摘出SCG標本を含む生理溶液中にNGFを添加してインキュベートした後、節内TG活性を測定してNGFの酵素活性におよぼす調節作用を追求した。一方、神経組織の分化を誘発する天然のGM1糖脂質(GM1)は、細胞内情報伝達機能に与かるCa^{2+}依存性タンパク・リン酸化酵素(PKC)の活性調節系を介して、SCG内TG活性を著明に増大することが知られている(1)。そこで、NGF刺激で変動するTG活性に対するGM1の修飾作用、ならびに節内PKC活性におよぼすNGFとGM1の影響をSCGを用いて検討して、TG活性発現に与るNGFとGM1の細胞内PKC-情報伝達系への関与の様式を考察した。

[実験方法] 成熟白鼠上頸部より麻酔下に摘出したSCG標本を、生理溶液中で好気的条件下に37° Cでインキュベートした。インキュベーション終了後、神経節組織を磨細して、その可溶性分画を酵素標品とした。TG酵素活性は、[^{3}H]putrescineが添加したcaseinタンパク内へ架橋されて取り込まれる放射活性値から算定した(1,2)。 同様にSCGをインキュベートした後磨細し、105,000 x G (1 h)で遠心分離して得た可溶性および顆粒(膜)分画に回収されるPKC活性を、[γ-^{32}P]ATPを利用した特異的なリン酸化反応系で測定した(4)。

[実験成績と考察] ①NGFによるSCG内TG活性の抑制効果: 摘出SCGおよび非交感性の迷走神経節(NG)を、NGF濃度を種々変化させた生理溶液中で30分間インキュベーションした後、これら組織内のTG活性を測定した。図1 に見られるように、SCG内TG活性値はNGF添加濃度0.10μg/mlから濃度依存的に低下するのが認められ、0.25μg/mlで最大抑制効果(-43%)が見られた。しかし、NGではそのTG活性値に対してNGFの有意な影響は示されなかった。SCGで認められたNGFによる酵素活性の低下は、NGFに対する特異抗体の添加(0.75μg/ml)によって対照値に迄完全に回復した。従って、NGFによるSCG内TG酵素の抑制効果は、交感性ニューロンの NGF受容体を介して引き起こされた現象として確認された。このことから、 NGFは発育期のみならず成熟期の交感性神経細胞に作用して、退行性の物質代謝を促進するTG酵素活性を抑制して神経節の機能維持に役立っている可能性が考えられた。 ②GM1によるNGF依存性TG活性抑制効果の修飾: GM1(5nM) 添加によって摘出SCGを刺激すると、節内TG活性は著明に増大(約5.4倍)した(1,2)。 そこで、NGFによって低下した神経節内TG活性値に対してGM1あるいは合成シアル酸コレステロール(SC、20μM)の添加効果を検討した。 GM1あるいはSCの何れの添加によって、NGFで引き起こされた節内TG活性の低下効果は完全に消失したばかりか、僅かながら活性上昇作用が示された(図2)。この成績は、GM1のみならずSCなどシアル酸化合物は、NGFの生理作用を拮抗的に修飾し得ることを示唆している。 ③NGFあるいはGM1によるSCG内PKC活性の調節: 既に我々は、細胞内情報伝達系や細胞増殖過程に与るPKC に作用して、その酵素活性を直接抑制するtrifluoperazine(10μg/ml)を添加すると、SCG内TGは活性化される。一方、PKC活性化剤の12-O-

tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, 1μM) 添加によって、神経節内TG活性は逆に低下することを報告した(1)。また、白鼠前脳部へ分布する動脈枝を閉塞して脳虚血を引き起こすと、線条体組織の顆粒(膜)結合型PKCは著明に活性化することが示されている(6)。このことは、虚血など組織の損傷の情報は、受容体に近接する細胞膜結合型のPKC活性の増大を引き起こすため、組織内可溶性の部分に分布するPKC酵素が膜へ移行(translocation)するのが促進されると推定されている(6)。そこで、前述と同様にインキュベーション後のSCG内可溶性および顆粒(膜)分画に回収されるPKC活性に対して、NGFあるいはシアル酸化合物がどのような影響をおよぼすのか検討した。図3に見られるように、溶液中にNGFを添加すると、SCGの可溶性分画に分布するPKC活性は明かに上昇(33%)するのがみられたが、顆粒(膜)結合型PKC活性は逆に低下傾向を示した。SCGの可溶性PKCの活性増大効果は、またTPA刺激によっても同様に見られた。一方、GM1あるいはSC化合物を添加すると、SCG可溶性PKC活性は低下(-27～-40%)し、顆粒性(膜)型PKCは有意な活性上昇効果(+40～+60%)を認めた。このように、シアル酸化合物刺激では、SCGのPKC活性は可溶性分画から膜分画への移行が促進されることが判明した。次に、NGFとGM1あるいはSCと同時に添加すると、SCGのPKC活性はシアル酸化合物によるPKC活性の膜分画への移行現象が完全に消失した。つまり、SCG内でNGFはシアル酸刺激で引き起こされるPKCの可溶性分画から膜分画への移行を阻止するように作用していると考えられた。従って、GM1などシアル酸化合物は、細胞内Ca^{2+}-PKC情報伝達系で、PKC活性とその細胞内分布状態の調節に積極的に関与して、細胞内Ca^{2+}濃度に依存したTGを活性化する可能性が示唆された。そして、NGFはこの過程を拮抗的に作用する結果、神経節内TG酵素の抑制的な活性調節を引き起こしていることが推定された。以上の成績から、NGFは成熟動物においても交感性神経節細胞内Ca^{2+}濃度の変動を介して、その退行性物質代謝を抑制的に修飾している可能性が強く示唆された。

[文献] (1) Ando et al. (1991) *J. Neurochem.* 57: 1884-1854 (2) Ando et al. (1993) *Neurosci Res.* (in press) (3) Gilad et al. (1985) *J. Neurochem.* 44: 1385-1390 (4) Louis et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 19282-19285 (5) Nagata et al. (1987) *J. Neurochem.* 49: 296-302 (6) Wieloch et al. (1991) *J. Neurochem.* 56: 1227-1235.

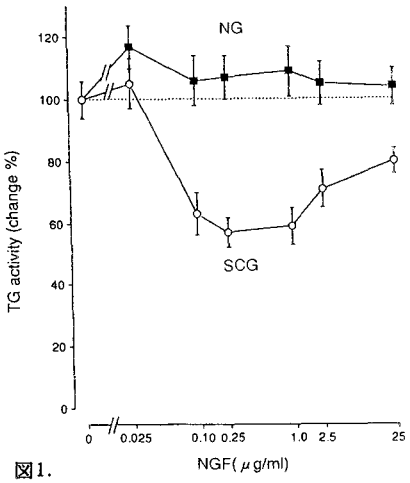


図1.

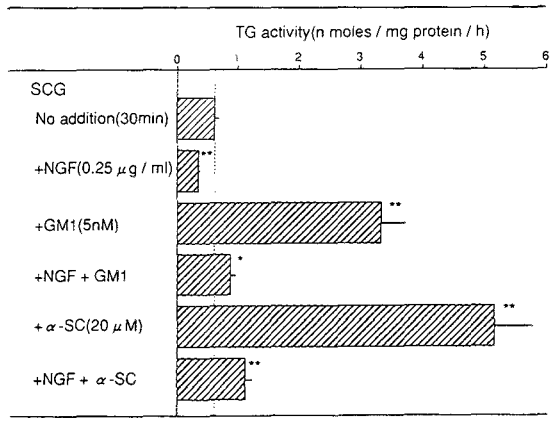
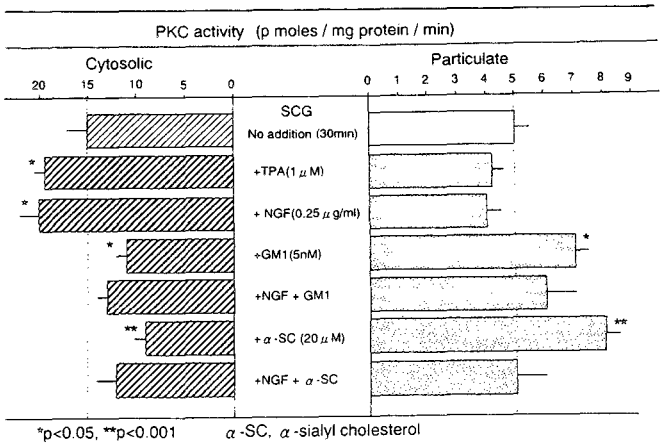


図2. *p<0.05, **p<0.001 α-SC, α-sialyl cholesterol

図1.摘出SCGおよびNG標本内TG活性におよぼすNGF添加濃度変化の影響

図2.NGF刺激で低下する摘出SCG内TG活性におよぼすシアル酸化合物の効果

図3.摘出SCG 組織の可溶性および顆粒性PKC活性におよぼすNGFあるいはシアル酸化合物の効果



*p<0.05, **p<0.001 α-SC, α-sialyl cholesterol

図3, TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate

184 Cytokineにより活性化されるastrocyteのneurotrophic activity -脳幹コリン作動性ニューロンに対する作用-

左合正周、吉田一成、若本寛起、上口裕之、大谷光弘、戸谷重雄
慶應義塾大学医学部脳神経外科

〔要約〕

アストロサイトには種々の神経栄養効果があることが知られている。我々はこれまでにアストロサイトがnerve growth factor（ＮＧＦ）を産生し、これがacidicおよびbasic fibroblast growth factor（ＦＧＦ）、interleukin-１β（ＩＬ-１β）、tumor necrosis factorα（ＴＮＦα）、transforming growth factor-β１（ＴＧＦ-β１）などのサイトカインにより協調的に増強されること、また、これらのサイトカインにより刺激されたアストロサイトが産生するＮＧＦは生理学的活性を持ち、前脳基底野コリン作動性ニューロンのcholine acetyltransferase（ＣＡＴ）活性を上昇させることを明かにした。今回は、ＩＬ-１βとＴＮＦαにより刺激されたアストロサイトが脳幹コリン作動性ニューロンに対するneurotrophic activityを持つことを明かにした。これはＮＧＦにはない作用であり、また、抗ＮＧＦ中和抗体にても抑制されないことから、アストロサイトによるnon-ＮＧＦ typeのneurotrophic factorの産生がＩＬ-１βとＴＮＦαにより増強されたものと考えられた。

＜目的＞

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、ＮＧＦによりcholine acetyltransferase（ＣＡＴ）活性が上昇する。一方、我々はこれまでにアストロサイトによるＮＧＦの産生がＦＧＦなどのサイトカインにより協調的に増強されること、また、これらのサイトカインにより刺激されたアストロサイトが産生するＮＧＦは生理学的活性を持ち、前脳基底野コリン作動性ニューロンのＣＡＴ活性を上昇させることを明かにしてきた。今回はサイトカインにより活性化されたアストロサイトが脳幹コリン作動性ニューロン、中脳黒質ドパミン作動性ニューロンに対しtrophic activityを有するか否かについて検討を行った。

＜方法＞

Ａ-１）ニューロン選択培養系に於ける検討：ラット新生仔海馬由来アストロサイトをpoly-L-lysine処理したdish内で10％ＦＣＳ添加ＤＭＥ/Ｆ-１２にて培養し、無添加、およびＩＬ-１β＋ＴＮＦαを添加した１％ＢＳＡ添加Ｎ２にて４時間処理した後、ＰＢＳにて洗浄し、さらに１％ＢＳＡ添加Ｎ２にて20時間培養してastrocyte conditioned medium（ＡＣＭ）を得た（それぞれcontrol ＡＣＭ、stimulated ＡＣＭとする）。胎生16日ラット脳幹由来神経細胞をpoly-L-ornithine、laminin処理した24-well culture plateで１％ＢＳＡ添加Ｎ２にて培養を開始し、cytosine arabinoside（Ａｒａ-Ｃ）（１０$^{-5}$Ｍ）存在下に、ＡＣＭ、stimulated ＡＣＭ＋抗ＮＧＦ中和抗体、また、acidic ＦＧＦ、ＮＧＦ、ＩＬ-１β＋ＴＮＦαを添加し（ＡＣＭは*medium*の半量となるように加えた）、４日間培養後ＣＡＴ活性を測定した。

Ａ-２）アストロサイトとニューロンのco-culture系に於ける検討：ラット新生仔海馬由来アストロサイトをpoly-L-lysine処理した24-well culture plateにて10％ＦＣＳ添加ＤＭＥ/Ｆ-１２にて培養し、confluentに達した後に１％ＢＳＡ添加Ｎ２にて胎生16日ラット脳幹由来神経細胞をco-cultureし、ＮＧＦ、ＩＬ-１β＋ＴＮＦαの作用を、４日間培養後ＣＡＴ活性を測定することにより検討した。

Ｂ）胎生16日ラット腹側中脳由来神経細胞をpoly-L-ornithine、laminin処理したcoverslip上で１％ＢＳＡ添加Ｎ２にて培養し、Ａｒａ-Ｃ存在下に、半量のＡＣＭを添加し、４日間培養後tyrosine hydroxylase（ＴＨ）に対する免疫組織化学染色を行い、ＴＨ陽性細胞数を顕微鏡下に算定した。

＜結果＞

Ａ-１）stimulated ＡＣＭではcontrol ＡＣＭに対し脳幹コリン作動性ニューロンのＣＡＴ活性を有意に上昇させたが、この作用は抗ＮＧＦ中和抗体にて抑制されなかった。また、acidic ＦＧＦ、ＮＧＦ、ＩＬ-１β＋ＴＮＦαを添加した場合との比較では、acidic ＦＧＦはＣＡＴ活性を上昇させたが、ＮＧＦ、ＩＬ-１β＋ＴＮＦαはＣＡＴ活性に影響を及ぼさなかった。（Ｆｉｇ．１）

Ａ-２）ＩＬ-１β＋ＴＮＦαを添加したものはcontrolに対しＣＡＴ活性は上昇した。（Ｆｉｇ．２）

Ｂ）ＴＨ陽性細胞数の変化は認められなかった。（Ｆｉｇ．３）

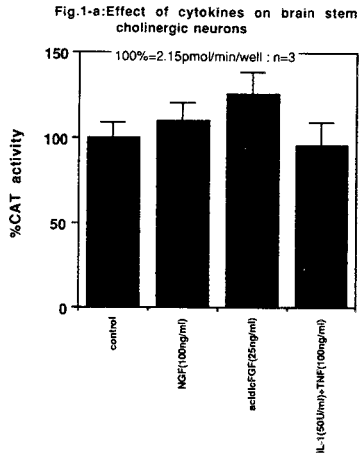
＜考察＞

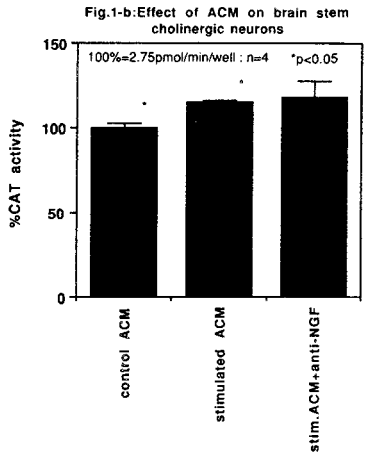
種々のサイトカインにより活性化されたアストロサイトが産生するＮＧＦは、脳損傷時の神経細胞の再生を促

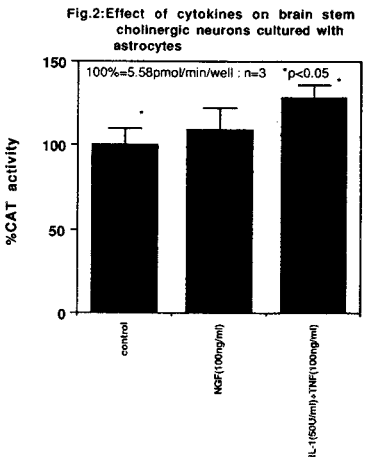
進する役割を担っていると考えられる。しかし、中枢神経系では前脳基底野コリン作動性ニューロンなど一部がＮＧＦ感受性であり、多くはＮＧＦ非感受性ニューロンである。今回はＮＧＦ非感受性脳幹コリン作動性ニューロンと中脳黒質ドパミン作動性ニューロンに対するアストロサイトの神経栄養効果について、サイトカインによりアストロサイトを刺激することにより検討した。stimulated ＡＣＭではcontrol ＡＣＭに対し脳幹コリン作動性ニューロンのＣＡＴ活性を有意に上昇させ、これは抗ＮＧＦ中和抗体にて抑制されなかったことより、ＮＧＦ以外のneurotrophic factorが関与していると考えられた。また、ニューロンの選択培養系においてacidic ＦＧＦはＣＡＴ活性を上昇させ、ニューロンの生存を促進すると考えられたが、ＩＬ-１β＋ＴＮＦαにはＣＡＴ活性増強効果は認められなかった。アストロサイトとニューロンのco-culture系における検討ではＩＬ-１β＋ＴＮＦαにＣＡＴ活性増強効果が認められたが、これはアストロサイトを介しニューロンに作用した結果と考えられた。

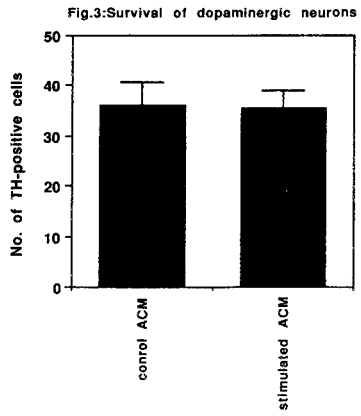
＜結論＞

アストロサイトの中脳黒質ドパミン作動性ニューロンに対する作用については結論を出すのに十分な結果は得られなかったが、ＩＬ-１βなどのサイトカインはアストロサイトの脳幹コリン作動性ニューロンに対するtrophic activityを増強することが明かとなった。ＮＧＦには同様の作用は認められず、抗ＮＧＦ中和抗体にて抑制されなかったことから、サイトカインにより活性化されたアストロサイトはＮＧＦのみではなく、ＮＧＦ以外のNeurotrophic factorを産生する可能性が示唆された。









＜文献＞Yoshida K, Gage FH: Brain Res 538:118-126, 1991
Yoshida K, Gage FH: Brain Res 569:14-25, 1992
Yoshida K, et al.: J Neurochem 59: 919-931, 1992

185　大腸菌による脳由来神経栄養因子の発現

藤森　清，半澤宏子，福園真一，
高橋健一，清水範夫
（㈱日立製作所　基礎研究所）

〔要約〕

脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）の大腸菌による発現を検討した。ＢＤＮＦ遺伝子は、ラットＢＤＮＦｃＤＮＡが挿入されたプラスミドから調製し、β－ラクタマーゼのシグナルペプチド遺伝子に連結して、トリプトファンプロモータの下流に配置し、発現ベクター－ｐＴＲＳＢＤＮＦとした。この発現ベクターを大腸菌ＨＢ１０１株に導入して発現させた結果、菌体内に成熟型ＢＤＮＦが生産されていることを抗血清を用いて確認し、かつイオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過により精製したＢＤＮＦにニワトリ８日胚後根神経節に対する神経線維の伸長活性を認めた。

［目的］

神経栄養因子は神経細胞の分化と生存維持に関係する蛋白質として知られており、特に、神経成長因子（ＮＧＦ）は約４０年前に発見されてから、その機能について研究されてきた。最近、このＮＧＦのファミリーの一つとして１１９個のアミノ酸からなるＢＤＮＦが見出された（４）。ＢＤＮＦは、ＮＧＦと同様に知覚神経細胞、前脳基底核コリン作動性神経細胞（３）に作用するが、ＮＧＦが作用を示さない前脳基底核ＧＡＢＡ作動性神経細胞や中脳ドーパミン作動性神経細胞に対しても生存維持活性を示す（３）という特徴を有する。このような作用スペクトルやｍＲＮＡの分布状態（２）から、ＢＤＮＦは中枢神経系において重要な役割を果たしているものと考えられている。このＢＤＮＦの神経細胞に対する機能について検討するためには、大量に得る必要がある。我々は、既に大腸菌により生物活性のあるヒトＮＧＦの大量生産に成功した（１）。そこで、ＢＤＮＦはＮＧＦとアミノ酸レベルで約５０％の相同性があり、高次構造も類似していると考えられることから、ＮＧＦの生産系を適用して、生物活性のあるＢＤＮＦの大腸菌による発現について検討した。

［方法と結果］

ラットＢＤＮＦｃＤＮＡを含むプラスミドｐｃＢＤＮＦ／ＣＤＭ８を鋳型としてＰＣＲを行い、ＢＤＮＦ遺伝子を調製した。ＢＤＮＦｃＤＮＡ上には２４７個のアミノ酸からなるＢＤＮＦ前駆体蛋白質をコードする遺伝子が存在しており、後半の１１９個のアミノ酸の部分がＢＤＮＦ成熟蛋白質に対応する。この領域をコードする３５７塩基対に、終始コドンを含む１０塩基対が付加した、合計３６７塩基対のＤＮＡをＰＣＲにより合成した。ヒトＮＧＦの発現ベクター－ｐＴＲＳＮＧＦを制限酵素ＳａｃＩ及びＢａｍＨＩで切断し、ｈＮＧＦを除去した後、両末端を平滑化した。これにＰＣＲで調製したＢＤＮＦ遺伝子を結合することにより、発現ベクター－ｐＴＲＳＢＤＮＦを作製した（図１）。

発現ベクター－ｐＴＲＳＢＤＮＦを用いて大腸菌ＨＢ１０１を形質転換し、得られた組換え菌ＨＢ１０１［ｐＴＲＳＢＤＮＦ］を、カザミノ酸2.5g/l、グルコース5g/l、酵母エキス1.5g/l、L-プロリン0.1g/l、塩酸チアミン0.1g/l、L-トリプトファン40mg/l及びアンピシリン50mg/lを含むM9培地中、37℃で前培養した。次に、L-トリプトファンと酵母エキスを除いた培地50mlにOD_{660}が0.5~1になるように接種し、500mlの坂口フラスコにて、37℃で振盪培養し、24時間後にはOD_{660}が3.5に達した。この菌体を回収し、超音波で破砕した後、ＢＤＮＦの検出を行った。菌体破砕液をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）で分析した結果を図２に示す。抗マウスＮＧＦウサギ抗血清（コラボレイティブ社）を10%ブロックエース（大日本製薬）と0.13MNaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）7ml及び大腸菌HB101株の菌体破砕液3mlよりなる溶液に加えて500倍に稀釈し、イムノブロットを行ったところ、ＢＤＮＦの分子量に相当する位置に濃い発色が認められた　また、菌体破砕液からイオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過により精製したＢＤＮＦのＮ末端側のアミノ酸配列を調べたところ、Ｎ末端から１０個のアミノ酸配列がＢＤＮＦの配列と一致した。これから、ＢＤＮＦに付加されているシグナルペプチドは設計された位置で切断されていることが分かった。

次に、イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過により精製したＢＤＮＦ（純度約50%）の生物活性を、ニワトリ８日胚の後根神経節（ＤＲＧ）に対する神経線維の伸長活性を観察することにより調べた。ＢＤＮＦ量に換算して100ng/ml添加した培養２６時間目の結果を図３に示す。組換え大腸菌ＨＢ１０１［ｐＴＲＳＢＤＮＦ］の培養により得られたＢＤＮＦには明らかに神経線維の伸長活性が認められた。

以上の結果から、組換え大腸菌は成熟型のＢＤＮＦを発現していること、発現されたＢＤＮＦは生物活性を有することが明らかとなった。

［謝辞］

ＢＤＮＦｃＤＮＡを含むプラスミドを分譲していただいたコールドスプリングハーバー研究所 那波弘之博士に深く感謝いたします。

［文献］

(1)Fujimori, K. et al.(1992) Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1985-1990.

(2)Hofer, M. et al.(1990) EMBO J., 9, 2459-2464.

(3)Knüsel, B. et al.(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 961-965.

(4)Leibrock, J. et al.(1989) Nature, 341, 149-152.

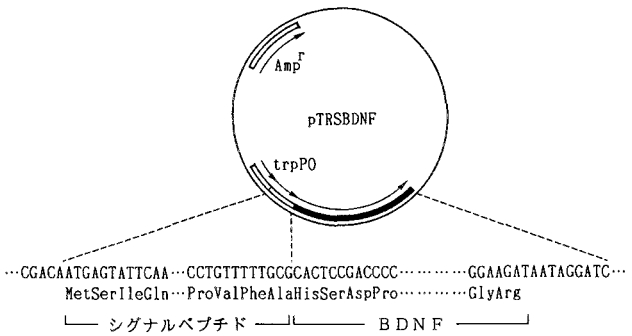


図１　発現ベクターｐＴＲＳＢＤＮＦの構造

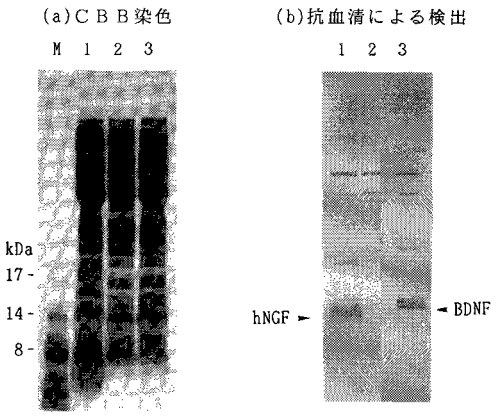


図２　菌体破砕液のＳＤＳ－ＰＡＧＥ

レーン１　HB101[pTRSNGF]　培養24時間の菌体破砕液

２　HB101[pTRSBDNF]　培養0時間の菌体破砕液

３　HB101[pTRSBDNF]　培養24時間の菌体破砕液

Ｍ　分子量マーカー

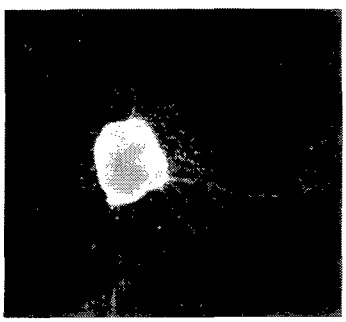


図３　ＢＤＮＦの生物活性

186 NGIF, A NEUROBLASTOMA GROWTH INHIBITORY FACTOR FROM HUMAN ASTROCYTOMA WITH NEUROTROPHIC PROPERTIES

Yaman Z. Eksioglu, Junko Iida*, Kazuo Yamagata*, Kiyofumi Asai, and Taiji Kato
Department of Bioregulation Research, Nagoya City University School of Medicine, and * Sumitomo Metal Industries Bio-Medical Division

ABSTRACT Investigations on the general characteristics of NAC-1 human astrocytoma cell line revealed the presence of a neuroblastoma growth inhibitory activity in the conditioned medium. Neuroblastoma growth inhibitory factor (NGIF), was partially purified by column chromatography successively on Econo Q, Econo CM and Superose 12. This protein is weakly basic with an estimated M_r of 60,000, having a possible dimeric structure. NGIF inhibits the growth of human neuroblastoma cell lines but has no effect on their morphology, nor does it produce any change in the growth of human *glioblastoma* cells. Interestingly, NGIF also promotes the survival and neurite outgrowth of embryonal rat cortical neurons. Its neurotrophic properties without inhibition of glial cells suggest a role for NGIF in the development of the nervous system.

INTRODUCTION Natural neuronal death which takes place in the developing nervous system is thought to be the result of competition among neurons for limiting amounts of target-derived neurotrophic factors, like NGF. Although essential for the development of peripheral sensory and sympathetic neurons as well as central cholinergic neurons of the basal forebrain, NGF cannot alone explain the survival and differentiation of all neuronal populations[1]. This, in turn has led to the identification of brain derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), acidic and basic FGF, and new neurotrophins (NT-3, NT-4, NT-5). In addition to direct neurotrophic action on neurons there is evidence for the astroglial production of NGF, CNTF, Glia maturation factor (GMF), acidic and basic FGF, glia derived neurotrophic factor (GDNF) besides many yet unidentified factors, suggesting key roles for neurotrophic neuron glia interactions. In this study, we investigated regulatory factors produced by NAC-1 astrocytoma cells. Here, we describe one of them, human neuroblastoma growth inhibitory factor (NGIF), with neurotrophic action on embryonal rat cortical neurons in culture.

METHODS Concentrated serum-free conditioned medium, prepared from NAC-1 human astrocytoma cells, was applied onto an Econo Q cartridge (5ml bed volume) in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4. NGIF activity appeared in the flow through fractions. The pool of active fractions, after having been acidified to pH 6.0 was applied onto an Econo CM cartridge (5 ml bed volume) in 0.02 M MES buffer, pH 6.0 and developed with a linear gradient of 0 to 1 M NaCl in the same buffer. Bioactive fractions were pooled and half of it was used for further characterization, while the second half was applied on a Superose 12 column (1 x 22 cm) in 0.02 M Tris HCl buffer, pH 7.4. A bioassay system employing [^{3}H]dThd incorporation into TGW human neuroblastoma cells was used for the evaluation of NGIF activity[2, 3]. Cortical neurons were prepared from rat embryonal cortex (E16), and plated on a poly-L-lysine coated 48-well dish at a density of $5x10^4$ cells/well in 250 µl N2 medium[2, 3].

RESULTS AND DISCUSSION NGIF purified successively on Econo Q and Econo CM (Fig. 1 and 2) was found out to be a protein, susceptible to protease digestion and heat treatment.

Active factions from Econo CM separation eluted in two peaks corresponding to 60 kDa and 120 kDa on a Superose 12 column, and raised the possibility that NGIF could exist in dimeric form. Mouse NGIF partially characterized by this group was also a protein with an M_r of 70 kDa[4]. Proliferation of human neuroblastoma cell lines TGW, NAGAI, YT-nu, and SKN-DZ were inhibited by partially purified NGIF (Fig. 3). Neither human glioblastoma cells GB-1, T98G, A-172, nor human osteosarcoma cell line OST responded to NGIF (Fig. 4). However, NGIF stimulated the proliferation of MKN-45, a human gastric carcinoma cell line (Fig. 4). To evaluate the role of NGIF in development of the nervous system, cortical neurons from E16 rat embryos were stimulated daily with the factor. NGIF not only promoted their survival but also neurite extension after 7 days in culture. Taken together, these data suggest that NGIF, with its distinct biological properties as an astroglia-derived neurotrophic factor, may play an important role in the developing nervous system. We have previously identified Gliostatin, a glial growth inhibitory factor with neurotrophic and angiogenic effects, from human neurofibroma[2, 3]. There is also a recent report on GDNF, a glia-derived neurotrophic factor[5]. These results and ours, altogether, draw attention to the significant regulatory potential of glial cells in developmental processes.

Fig. 1 Human NGIF On ECONO Q

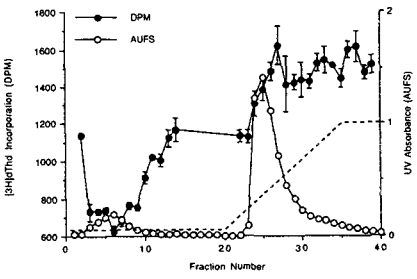


Fig. 2 Human NGIF On Econo CM

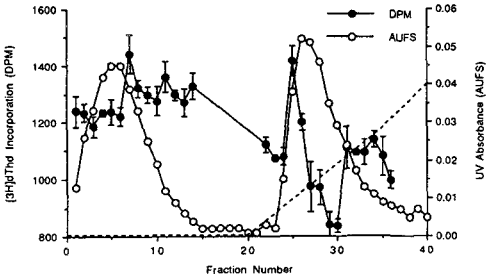


Fig. 3 Human NGIF On Various Cell Lines I

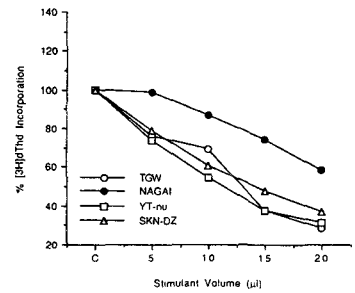
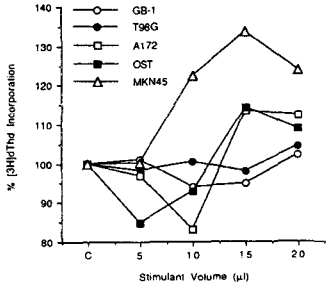


Fig. 4 Human NGIF On Various Cell Lines II



REFERENCES

1. Barde Y.-A. (1989) *Neuron* **2**, 1525-1534.

2. Asai K., Hirano T., Kaneko S., Moriyama A., Nakanishi K., Isobe I., Eksioglu Y. Z., and Kato T. (1992) *J. Neurochem.* **59**, 307-317.

3. Asai K., Nakanishi K., Isobe I., Eksioglu Y. Z., Hirano A., Hama K., Miyamoto T., and Kato T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 28, 20311-20316.

4. Sakazaki Y., Kato T., Kato H., Ito J., Tanaka R., Naganawa N., Kato T., Masaoka A., and Tsunooka H. (1983) *Brain Res.* **262**, 125-135.

5. Lin L.-F. H., Doherty D. H., Lile J. D., Bektesh S., Collins F., (1993) *Science* **260**, 1130-1132.

187 正常ラットならびに小脳障害マウスにおける脳ＮＯ合成酵素活性—ＨＰＬＣによる検討—

池田正行1)2)，森田育男1)，室田誠逸1)，湯浅龍彦2)，宮武　正2)

東京医科歯科大学　大学院細胞機能制御学1)　医学部神経内科2)

〔要約〕
脳における一酸化窒素(ＮＯ)の神経伝達物質としての役割と意義を明らかにするために，１）正常ﾗｯﾄ脳各部位ならびに，２）３種類の小脳障害マウス（NERVOUS;NR, PURKINJE CELL DEGENERATION; PCDの２種のミュータントと3-acetylpyridine(3-AP)投与マウス）におけるＮＯ合成酵素（ＮＯＳ）活性をHPLC法により測定した．その結果，１）正常ラットの脳ではＮＯＳ活性はCa依存性であり，小脳で活性が最も高く，次いで嗅球＞線条体＞大脳皮質＞海馬＞視床下部＞中脳＞橋の順だった。２）小脳障害マウスにおいては，3-AP投与群では変化がなかったが，NR,PCDでは小脳あたりのＮＯＳ活性ともに対照の約半分に低下していた．このことより，従来はＮＯＳ陰性とされていたプルキンエ細胞が新たな型のＮＯＳを持っているか，あるいはなんらかの形で他の細胞のＮＯＳ活性の発現に関与していることが示唆された．

ＮＯは，中枢神経でも重要な機能を果していると推測される［２，４］．我々はopen columnを用いたＮＯＳ活性測定法を報告したが［３］，今回はより分離能の良いHPLC法により，正常ラット脳各部位でＮＯＳ活性を測定し，さらに活性が最も高い小脳に着目し，小脳障害マウスを用いて，ＮＯＳの局在を検討したので報告する．

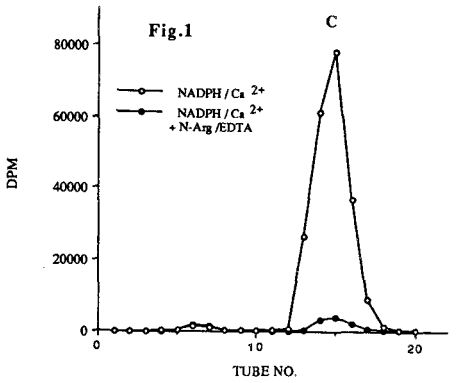
材料：１）正常ラットは成熟Wister系雄ラットを用いた．２）小脳障害マウス：プルキンエ細胞欠損ミュータントとして8-10週齢のNERVOUS（NR），PURKINJE CELL DEGENERATION（PCD）の２種のマウス，並びに選択的に登上線維を破壊（3-acetylpyridine（3-AP）250 mg/kg腹腔内１回投与）した5週齢ddYマウスを用いた．NR，PCDの対照としては無症状のlittermatesを用い，3-AP投与群の対照にはvehicleを投与した．ラット，NR，PCDとその対照群は未処置のまま断頭，3-AP投与マウスとその対照群は注射後４８時間後に断頭し，直ちに脳を取り出し，ラットは大脳皮質，嗅球，線条体，海馬，視床下部，中脳，小脳，橋の各部位，マウスは小脳を切出し，ＮＯＳ活性測定に供した．

ＮＯＳ活性測定：50mM HEPES buffer (pH 7.4)とともに材料をホモジナイズしたのち20000xg，10分間遠心した．上清を^{3}H-L-arginineとともに1mM NADPHと0.45 mM Ca^{2+}の存在下で３７℃１０分間反応させた後，反応液を20000xg，５分間遠心した．得られた上清に含まれる^{3}H-citrullineをHPLCにより分離，溶出した．カラムは東ソー社製TSKgel Aminopakカラム(4.6x120 mm)を，移動相は8%エタノールと0.01%n-カプリル酸を含んだ0.067Mクエン酸バッファーを用いた．^{3}H-citrullineの放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した．Ca2+非存在下(EDTA添加)と，ＮＯＳの特異的な阻害剤であるL-nitro-arginine (50μM)の存在下でも同様の実験を行ない，反応のCa依存性と特異性も検討した．

結果：Fig.1に正常ラット小脳ホモジネートを用いた場合のHPLCパターンを示す．^{3}H-citrullineの分離は非常に良好で，単一で鋭いピークを示し，標準^{14}C-citrullineのピークと完全に一致した．このピークはEDTAあるいはL-nitro-arginineの存在下で完全に抑制された．Fig.2は正常ラット各脳部位別のＮＯＳ活性を示す．成熟ラットの脳においてはいずれの部位にてもＮＯＳ活性が認められたが，活性の強さは部位により大きく異なり，小脳で最も高く，次いで嗅球＞線条体＞海馬＞大脳＞視床下部＞中脳＞橋の順だった．Fig.3に各小脳障害マウスの小脳あたりのＮＯＳ活性を示す．NR，PCDでは小脳あたりのＮＯＳ活性は対照の半分以下に低下していたが，3-AP投与群ではＮＯＳ活性は対照群と比較し，有意な変化はなかった．

考案：今回の我々の検討でHPLCにより溶出、分離されたcitrullineの生成はCa依存性であり，L-nitro-arginineで抑制されたことから，ＮＯＳにより特異的に生成されたものと考えられる．これま

での免疫組織学的検討［１］や，我々の神経細胞培養系でのＮＯＳ活性の結果［３］を考慮すると，脳ホモジネートを用いた今回の結果は，神経細胞由来でCa依存性のconstitutiveなＮＯＳ活性を測定していると考えられる．
今回の検討では脳の各部位の中ではＮＯＳ活性は小脳で最も高く，ＮＯが同部位で重要な機能を果していることが示唆されるが，長期抑圧の成立にとっても重要な小脳分子層でのＮＯの発生源［４］については不明な点が多い．この点を検討すべく我々は小脳障害マウスでＮＯＳ活性を測定した．まず下オリーブ核－登上線維系を選択的に破壊する3-AP投与ではＮＯＳ活性に変化はなかったことから，ＮＯの発生源として登上線維は否定的である．一方プルキンエ細胞を欠くNR，PCDでは小脳あたりのＮＯＳ活性が著減していた．以上より，１）従来の報告ではＮＯＳ陰性とされているプルキンエ細胞自体が，新たな別の型のＮＯＳ［２］を持っているかあるいは，２）プルキンエ細胞の欠損がなんらかの機序で他の細胞でのＮＯＳ活性低下を引き起こす，の２つの可能性が考えられる．



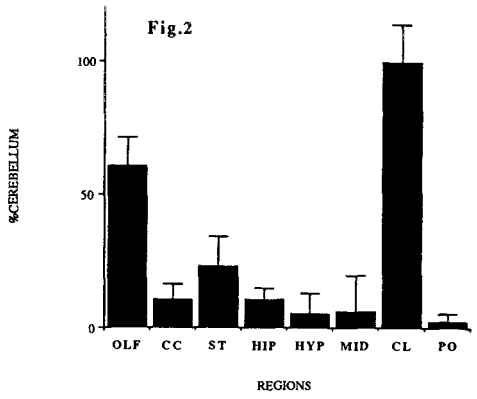


Fig.1. Representative chromatogram of NOS activity. The peak labelled C is that for citrulline.

Fig. 2. NOS activity in various brain regions. Values are expressed as % of cerebellar NOS activity ± S.E.M. (n=3). OLF, olfactory bulb; CC, cerebral cortex; ST, striatum; HIP, hippocampus; HYP, hypothalamus; MID, midbrain; CL, cerebellum; PO, pons.

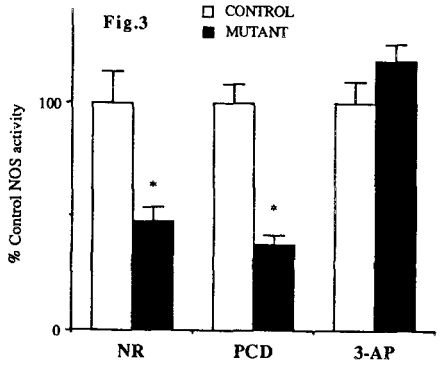


Fig. 3. Cerebellar NOS activity of nervous (NR) (n=7), Purkinje cell degeneration (PCD) (n=10), 3-acetylpyridine (3-AP) treated (n=6) and control mice (n=8, 10, 6 for NR, PCD and 3-AP respectively). Values are expressed as % of control value ± S.E.M.. * P<0.01 in unpaired two-tailed Student's t-test.

1. Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotuhi, M., Dawson, T.M. & Snyder, S.H. (1991) Neuron 7, 615-624.
2. Dawson, T.M., Dawson, V.L. & Snyder, S.H. (1992) Ann Neurol 32, 297-311.
3. Ma, L.J., Ishizaki, Y., Morita, I. & Murota, S. (1991) Neurosci Lett 132, 23-25.
4. Shibuki, K. & Okada, D. (1991) Nature 349, 326-328.

188 培養成熟マウス・シュワン細胞に対する各種増殖因子の作用

渡部和彦、田中順一、豊原敬三*、酒井 紀*
（東京慈恵会医科大学・神経病理、第２内科*）

〔要約〕培養成熟マウス・シュワン細胞に対するplatelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor-β (TGF-β) の増殖作用およびforskolin (FSK) の効果について、S100/bromodeoxyuridine(BrdU) 蛍光二重免疫染色により検討した。その結果、牛胎児血清(FBS)存在下では、PDGF-BB, basic FGF, TGF-β1, β2 がそれぞれ濃度依存性に増殖促進効果を有していたが、FSKの共存によりその効果は抑制された。他方、無血清培地下では、PDGF-BB, basic FGFは増殖促進に働いたが、TGF-β1, β2 は無効であった。FBSをheparin-Sepharoseで分画したところ、0.6M NaCl 溶出分画が TGF-β1, β2 の増殖効果発現に必要であることが示された。

〔目的〕末梢神経の細胞分化・髄鞘形成および再生において、シュワン細胞に対する各種増殖因子の働きが重要視されている。培養新生児ラット・シュワン細胞は、10%牛胎児血清(FBS)存在下では増殖能に乏しく、platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), acidic & basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF), transforming growth factor-β (TGF-β), glial growth factor (GGF) などがmitogenとして働き、このうち特にPDGF-BB, a&b FGF に関してはadenyl cyclase activatorであるforskolin (FSK)の共存が必要であることが知られている(1-3,6,8)。一方、培養ヒト胎児シュワン細胞ではPDGFおよびGGF、新生児マウス・シュワン細胞ではFGFがmitogenとして働くことが報告されている(5,10)が、詳細はなお不明である。本研究では培養成熟マウス・シュワン細胞に対するPDGF, FGF, TGF-βおよびFSK の増殖効果について検討した。

〔方法〕生後4-6週のICRマウスより頚ー腰部後根神経節および連続する末梢神経を採取し(9)、collagenase, dispaseにて処理後、分散培養とした。抗Thy1.2および補体の反復処理にて混在する線維芽細胞を除去したのち，培養３週間以内(short-term)あるいは３カ月以上(long-term)の細胞をpoly-L-lysine処理したcoverslipに植えた。培地はKimら(4)の無血清培地に0.03%牛血清アルブミンを加えたものを用いた(chemically-defined media; CDM)。シュワン細胞に対するproliferation assay として、培地にFBSあるいは各種因子(PDGF-AA, PDGF-BB, aFGF, bFGF, TGF-β1, TGF-β2, FSK)を添加し24時間培養、さらに10μM bromodeoxyuridine (BrdU) を加え24時間培養したのち、S100/BrdUの蛍光二重免疫染色を施行し、各coverslipでのS100陽性（シュワン）細胞数（250-300個）のうちのBrdU陽性細胞数の割合を％で３回算出(% labeling index; %LI)し比較検討した。また、FBS中のシュワン細胞に対する増殖活性をheparin-Sepharoseで分画し、上記assayで検討した。

〔結果〕Short-, long-term cultureともに成熟マウス・シュワン細胞は、新生児ラット同細胞と異なり、1, 5, 10, 20%FBS存在下で濃度依存性に増殖反応を示した(Fig.1)。本研究ではFBSと各種因子の相互作用をみるために以降FBSを1%濃度で使用した。1%FBS存在下では、PDGF-BB (20ng/ml), aFGF (10ng/ml), bFGF (5ng/ml), TGF-β1 (2ng/ml), TGF-β2 (2ng/ml) が増殖促進効果を有していたが、PDGF-AA (50ng/ml)は無効であった。そこで、PDGF-BB, bFGF, TGF-β1, TGF-β2の効果およびforskolin 共存の影響につき、さらに検討した。Short-, long-term cultureともに、1%FBS存在下、非存在下で、PDGF-BB (2, 20ng/ml), bFGF (0.5, 5ng/ml) は濃度依存性に増殖効果を認めたが、新生児ラットの場合と異なりFSK (2μM) の共存によりその増殖効果は抑制された (Fig.2,3)。一方、Short-, long-term cultureともに、1% FBS存在下では、TGF-β1 (2, 10ng/ml), TGF-β2 (2, 10ng/ml) は濃度依存性に増殖効果を認めたが、FSK (2μM)の共存によりその増殖効果は抑制され、またFBS非存在下では、TGF-β1, β2 そのものに増殖効果を認めなかった (Fig.4,5)。他方、FBS非存在下で、PDGF-BB, bFGF, TGF-β1, β2 のうち２者の組み合わせでは、新生児ラット(7)と同様、 bFGF + TGF-β1 あるいは bFGF +TGF-β2 において増殖協調効果を認めた (Table)。そこで、FBS の中に、TGF-β1, β2と協調効果を示すbFGF類似のheparin結合蛋白が存在することを想定し、培地にFBS, TGF-β1, β2 とともに1μg/ml heparin を添加したところ、 FBS およびTGF-β1, β2 の増殖効果は著しく抑制された。さらに、FBSを透析後、heparin-Sepharose column に添加し、0.6M, 1M, 2M NaCl 溶出分画を得、各分画の活性をみたところ、0.6M NaCl 分画に増殖活性および TGF-β1, β2との協調効果を認めた (Fig.6)。この活性は bFGF に対する抗体では吸収されなかった (Fig.7)。

〔結論〕成熟マウス・シュワン細胞に対して、PDGF-BB, bFGF, TGF-β1, β2が増殖促進効果を有し、forskolin の共存はこれら増殖効果を抑制した。一方、TGF-β1, β2の増殖効果発現には、bFGF、あるいはbFGFとは異なる血清中のheparin結合蛋白の共存が必要と考えられた。これらのことから、シュワン細胞の増殖・分化・再生は，種あるいは年齢によって異なる複数の制御因子のバランスのもとに行われていることが示唆された。

〔文献〕(1) Davis JB, Stroobant P. (1990) J Cell Biol 110,1353-1360. (2) Eccleston PA, Jessen KR, Mirsky R. (1989) J Neurosci Res 24,524-530. (3) Eccleston PA. (1992) Exp Cell Res 199,1-9. (4) Kim SU, Stern J, Kim MW, Pleasure DE. (1983) Brain Res 274,79-86. (5) Krikorian D, Manthorpe M, Varon S. (1982) Dev Neurosci 5,77-91. (6) Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H. (1989) J Cell Biol 109,3419-3424. (7) Schubert D. (1992) J Neurobiol 23,143-148. (8) Stewart HJS, Eccleston PA, Jessen KR, Mirsky R. (1991) J Neurosci Res 30,346-352. (9) Watabe K, Yamada M, Kawamura T, Kim SU. (1990) J Neuropathol Exp Neurol 49,455-467. (10) Yong VW, Kim SU, Kim MW, Shin DH. (1988) Glia 1,113-123.

Fig.1

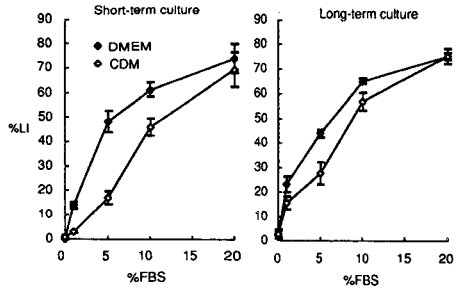


Fig.2

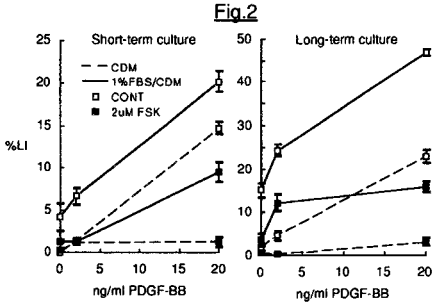


Fig.3

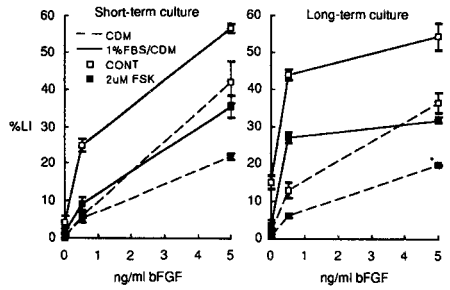


Fig.4

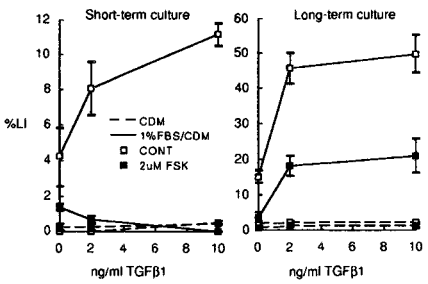


Fig.5

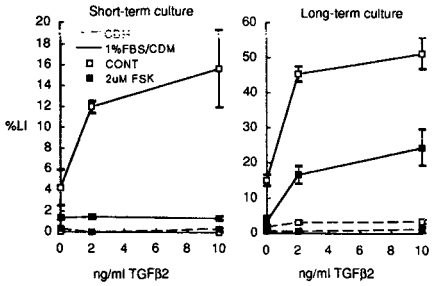


Table Long-term culture

Control : 9.1 ± 3.9	PDGF-BB	bFGF	TGFβ1	TGFβ2
20ng/ml PDGF-BB	43.4 ± 3.8			
5ng/ml bFGF	45.3 ± 3.1	39.9 ± 4.9		
2ng/ml TGFβ1	46.4 ± 3.3	68.3 ± 4.0	8.1 ± 1.7	
2ng/ml TGFβ2	45.2 ± 1.1	67.3 ± 4.8	10.9 ±3.5	9.6 ± 3.5

Fig.6

Heparin-Sepharose, 1ml/bed vol, 1ml fractions / Long-term culture

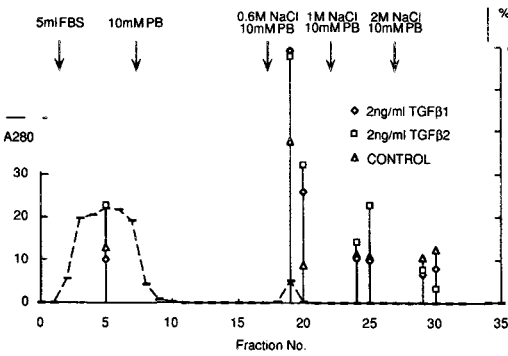
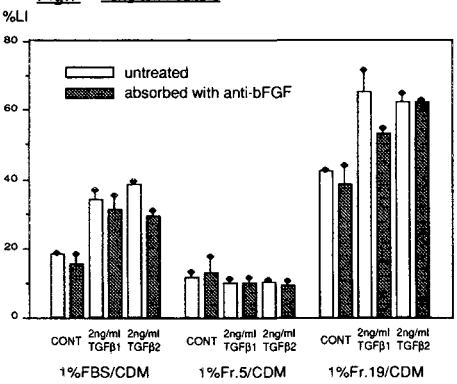


Fig.7 Long-term culture



189　神経突起伸長作用を示すCon A結合塩基性タンパク質

石岡憲昭*、佐藤淳子*、中村純太*,**、大久保辰雄*,***、栗岡　晋*
(慈恵医大医科研生化学*、第二外科**、第一外科***)

〔要約〕
ウシ脳抽出液中に存在するコンカナバリンA（Con A）結合性タンパク質を二次元電気泳動（2DE）法により分析し、特にCon Aに対して強い結合性を示す強塩基性タンパク質を見いだした。この特徴的タンパク質（sGP74と命名）は、イオン交換、逆相系カラムを用いたHPLCにより分離された。SGP74は、二次元電気泳動分析で等電点（pI）8.2～9.3、分子量（MW）74kDaの範囲に連続的な5個のスポットとして検出された。N末端アミノ酸配列分析の結果は、膜結合型の免疫グロビン（Igs）スーパーファミリィ系タンパク質の一つであるNg-CAM、L1タンパク質と一次構造上高い相同性を認めた。神経芽細胞腫由来の培養細胞（NB41A3）に対する影響等について検討した結果、ラミニン同様に神経突起を伸長させる性質を有し、48時間で10μm～50μmの突起伸長を促進した。

《はじめに》中枢神経系において、膜結合型のIgsスーパーファミリィ系糖タンパク質の存在がN-CAMなど多く報告されているが[1]、可溶型Igsスーパーファミリィ系糖タンパク質の存在については、可溶型Thy-1[2]やF3[3]以外あまり報告がない。そこで、脳抽出液中のタンパク質をCon Aに対する結合性を指標に、細胞接着や神経突起伸長作用を持つ可溶型Igsスーパーファミリィタンパク質の検索を行った。

《実験方法》1）sGP74の分離：ウシ脳Con A結合性タンパク質画分のイオン交換（Sセファロース）及び逆相系カラム（Develosil 300 ODS-7）を用いたHPLCによりsGP74を分離精製した。**2）sGP74の化学構造分析**：二次元電気泳動分析は、既報[4,5]の方法に従った。N末端アミノ酸配列は、ＡＢＩ社のモデル471Aプロティンシーケンサーにより決定した。**3）神経突起伸長の同定**：培養細胞としてマウスの神経芽細胞腫由来であるNB41A3を用い、既報の方法に従って突起伸長の同定を行った。

《結果》（1）sGP74の分離分析：イオン交換カラムHPLCにより分離したsGP74は、逆相系カラムHPLCにより最終的に分離精製した（図1A）。精製sGP74の2DE像を図1Bに示した。sGP74はpI 8.2～9.3、MW 74kDaの範囲に連続した5個のスポットとして検出された。（2）**sGP74のN末端アミノ酸配列の比較**：N末端分析の結果は、Ile-Glu-Ile-Pro-Met-Asp-Pro-(　)-Ile-Gln-Asn-Glu-Leu-(　)-Gln-Pro-Pro-であつた（図2）。sGP74のN末端アミノ酸配列と神経突起伸長を促進する細胞接着分子であるニワトリ脳膜タンパク質Ng-CAM[6]及びマウス脳膜タンパク質L1[7]のN末端アミノ酸配列18残基について比較した結果、L1と18残基中6残基同一（33%）で、さらに遺伝子コドンの一塩基突然変異による置換が可能なアミノ酸残基を含むと11残基（61%）の高い相同性を示した。Ng-CAMに対しても同様で39%～56%の相同姓を示した。**（3）sGP74の神経系培養細胞に対する影響**：図3Bに示したように、NB41A3に対してsGP74は、明らかに突起伸長性を有しており48時間後では突起の長さが10μm～50μmまで伸長していた。この変化は、ラミニンの場合とほぼ同じ結果を与えた（図3C）。

《考察》Igsスーパーファミリィタンパク質のほとんどが糖タンパク質であることに注目し、Con Aに対する結合性を一つの指標として中枢神経系タンパク質の分析をおこなった。その結果、脳の可溶性タンパク質画分に細胞接着分子L1あるいはNg-CAMと類似のN末端アミノ酸配列を有するタンパク質sGP74の存在を明らかにした。可溶型Igsスーパーファミリィタンパク質の本来の機能については、不明の点も多いが、接着分子F3の可溶型が神経細胞の突起伸長作用を示す[3]ことや細胞接着機能を持つ膜結合型Thy-1によって成熟したアストロサイト上で選択的に突起伸長を阻害される神経細胞が、可溶型Thy-1により伸長

作用が回復する[2]など、可溶型Igsスーパーファミリィタンパク質が神経機能発現の調節に関与するものと考えられた。

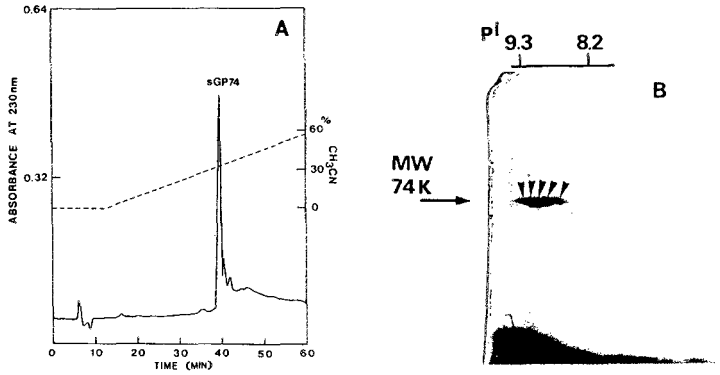


Fig.1. Purification of sGP74 by a reversed-phase column HPLC and 2DE profileof the purified sGP74.
The fraction containing sGP74 from the ion exchange step was applied to areversed-phase column of RP304 (4.6mm I.D. x 25cm) and eluted at a flow rate of 0.7ml/min. The peak containing biologically active sGP74 was eluted at 25% acetonitrile (termed sGP74 in A).The purified sGP74 was indicated on 2DE gel stained by Coomassie BrilliantBlue R-250 (B). The sGP74 showed five spots separated horizontally, ranging in pI from 8.2 to 9.3 (arrowheads in B), and microheterogeneity of MW in eachspot exhibited a shift of about 0.5-1.0 kDa.

	1	5	10	15
sGP74	: Ile-Glu-Ile-Pro-Met-Asp-Pro-( ) -Ile -Gln-Asn-Glu -Leu -( ) -Gln-Pro-Pro-( ) -			
L1	: [illegible]-Gln-[illegible]-Asp-[illegible]-Lys-Gly-His-His -Val -Leu-------Glu-Pro-Pro-Val-			
Ng-CAM	: [illegible]-Thr-Ile-Pro- Pro-[illegible]-Gly-Ala-His-Asp -Phe -Leu-------Gln-Pro-Pro-Glu-			

Fig.2. Comparison of the N-terminal amino acid sequences of sGP74, L1, andNg-CAM.
The N-terminal amino acid sequence of the purified sGP74 was analyzed on agas phase sequencer and compared with those of L1 and of Ng-CAM obtainedfrom published data (see articles in refs. 6, 7). Identical amino acid residues were densely shaded (■), and light shaded amino acid residues ( ) showed thepossibility of a conservative mutation in the codon.

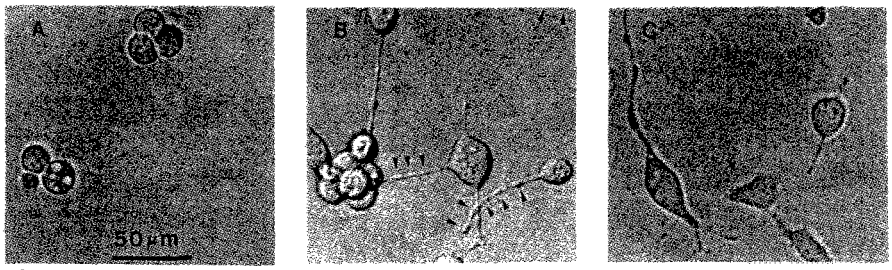


Fig. 3. Effect of different protein-coated surfaces on neurite outgrowth of NB41A3 neuroblasts.
(A) Bovine serum albumin: Cells are round-shaped without neurite outgrowth. (B) sGP74: Cells show beaded varicosities (arrowheads in C) along the entire length of a neurite with a few ramifications. (C) Laminin: laminin shows a neurite outgrowth activity, although two different shapes of cells are exhibited. Scale bar: 50 μ m.

《文献》(1)Hemperly,J.J.,Murphy,B.A.,Edelman,A.M.andCunningham,B.A.(1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 83, 3037-3041. (2)Tiveron,M-C., Barboni, E., Rivero, F.B.P., Gormley, A.M., Seeley, P.J., Grosveld, F., and Morris, R. (1992) Nature, 355:745-747. (3)Durbec, P., Gennarini, G., Goridis, C., and Rougon, G. (1992) J.Cell Biol.,117:877-887. (4)Ishioka,N., Oda,T., Natake,Y., and Kurioka,S. (1990) Neurochemical Research, 15:475-481. (5)Ishioka,N., and Kurioka,S. (1992) Neurochemical Research(6)Rathjen,F.G., Wolff,J.M., Frank,R., Bonhoeffer,F., and Rutishauser,U. with the technical assistance of Schoeffski,A. (1987) J.Cell.Biol.,104:343-353. (7)Miura,M., Kobayashi,M., Asou,H., and Uyemura,K. (1991) FEBS Letters, 289(1):91-95.

190 損傷周囲脳における細胞応答反応と塩基性線維芽細胞成長因子によるその修飾
－c-fos mRNAでの検討－

湯口貴導　甲村英二　山田和雄　山下　俊英　大槻秀夫　岸口稔睦　榊　孝之
*和中明生　*遠山正彌　早川　徹　　（大阪大.医.脳外.*第二解剖）

〔要約〕ラット体性感覚領野切除モデルを用いて神経損傷に引き続いて生じる周囲脳組織の細胞応答反応をc-fos mRNAの発現に注目して解析した。またこのc-fos mRNAの発現が、bFGFにより修飾されるか否かを検討した。損傷後すでに２時間目で損傷側皮質神経細胞層にc-fos mRNAの発現を認めた。しかしこの発現は一過性であり、６時間後にはほぼ消退していた。一方、bFGF局所投与群では損傷後６時間目においても皮質神経細胞層のc-fos mRNAの発現は持続していた。さらに１日後ではその発現は損傷側皮質神経細胞層のみならず皮質下層の非神経細胞にも認められた。以上よりbFGFの局所投与により損傷周囲組織での細胞応答が修飾されうる事が明らかとなった。

目的：これまでラットの体性感覚領野切除モデルにおける同側視床の逆行性変性萎縮が、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)を損傷部に局所投与することにより、ある程度防止され得ることを報告してきた(3)。そこでこのモデルを用いて、局所脳損傷後の周辺脳組織における早期細胞応答をc-fos mRNAの発現に注目して検索し、神経栄養因子の一つであるbFGFによるこの早期遺伝子発現の修飾効果を検討した。

方法：包水クロラール麻酔下(300mg/kg)に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(n=24)とした。溶解液のみを吸収させたスポンゼルを投与した群をcontrol群(n=24)とした。また、開頭術のみを加えたラットをsham operation群(n=4)とした。術後2、6、12、24、48、72時間後に深麻酔下に脳を摘出し、6μm厚の冠状断凍結切片を作成した。^{35}S -dATPを用いて3'-end labelingしたoligo nucleotide probeを用いたin situ hybridization法にてc-fos mRNAの発現を調べた。

結果：sham operation群でのc-fos mRNA in situ hybridizationを示す（図１）。海馬神経細胞に最も強いc-fos mRNAのシグナルを認めた。皮質切除のみのcontrol群では、c-fos mRNAの発現はすでに術後２時間で認められ、その発現範囲は損傷側皮質の神経細胞層に広範に広がっていた（図１）。損傷後６時間目にはc-fos mRNAの発現はほぼ消退し発現が一過性であることを示した（図２）。FGF群でも損傷２時間後のc-fos mRNAの発現はcontrol群と同程度であった。しかしcontrol群と異なり、その発現は損傷後６時間後にもなお持続する傾向を認めた。さらに損傷後２４時間、４８時間後には損傷側皮質並びに皮質下白質に広範なc-fos mRNAの発現を認めた（図３）。両群ともに視床神経細胞には損傷後７２時間までc-fos mRNAの発現誘導は認められなかった。

考察：c-fosはimmedate early geneとして知られている。これまで、神経損傷直後に損傷側皮質でc-fos mRNAの発現が認められその機序としてspreading depressionが考えられている（１）。　またin vitroの系でbFGFが神経細胞でのc-fosの発現を促進するという報告もある（２）。今回の実験で損傷局所にbFGFを投与することによりc-fos mRNAの発現が持続したことは、上記のin vitroのデータを支持するものである。また損傷側の皮質と白質の細胞にc-fos mRNAの発現が誘導されることからbFGFによるc-fos mRNAの発現には異なる機序の関与が示唆された。損傷側視床の細胞にはc-fos mRNAの発現誘導は認められなかった。このことから局所投与したbFGFが損傷側皮質の細胞を活性化し周辺環境を変化させることにより視床神経細胞に対する

保護作用を発現している可能性が考えられた。中枢神経系での再生能の欠如は神経細胞の問題とともに周囲環境の問題と考えられることから、損傷後の細胞応答を解析し神経栄養因子などを用いて修飾することは神経再生に向けての有力な手段となろう。

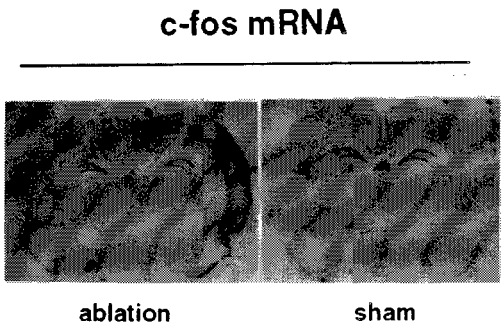


図1．Expression of c-fos mRNA in the cortical ablation (left) and sham operation (right) animals.

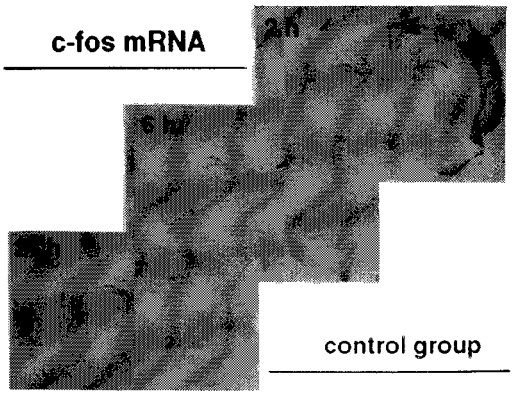


図2．Time course of c-fos mRNA expression in the control group.

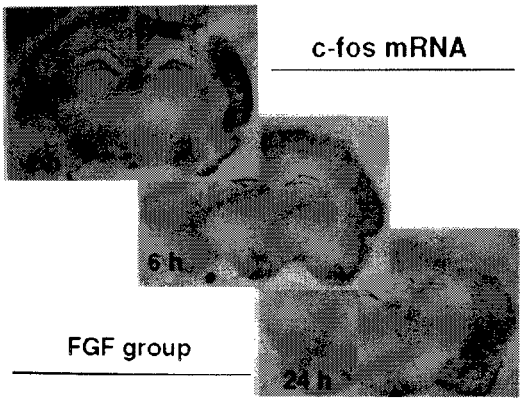


図3．Time course of c-fos mRNA expression in the FGF group.

参考文献

(1)Dragunow, M., Goulding, M., (1990) Experimental Neurology 107:236-248

(2)Hisanaga, K., Sagar, SM., (1992) J. Neurochem. 58:1836-1844

(3)Kohmura, E., Yuguchi,T., Yamada, K., Hayakawa,T. (1990) Advances in Neurotrauma Res. 2:58-63

191 神経栄養因子活性を持つペプチドについて

石黒 麻利子、村山 美由紀、大森 彬*、浜 登希子

三菱化成生命科学研究所、脳神経科学、*構造解析

〔要約〕ニューロンの生存維持、損傷修復に関与する因子、及びその作用機構を調べる目的で、脳の損傷部位からの抽出液より神経栄養因子の精製を行い[1]その構造解析を進める過程で得られたペプチドについて、神経栄養因子活性を調べた．生後2週間前後のラット中隔野、及び中脳下部を用いた初代培養でそれぞれコリナージックニューロンの指標としてcholineacetyltransferase(ChAT)活性、ドーパミナージックニューロンの指標としてドーパミン量を測定したところ、生存維持作用がみられた。

神経系の分化、成熟に関与する細胞間調節因子の一つとして、神経栄養因子と総称される液性因子がある。また、これらの神経栄養因子は、成熟した神経系においてもニューロンの生存、機能維持さらにある程度の損傷からの修復に働くと考えられている．これらの神経栄養因子についてはNGF(nerve growth factor)ファミリーやCNTF(Ciliary neurotrophic factor), LIF(leukemia inhibitory factor,cholinergic differentiation factor)、またグリア細胞由来因子等が明らかになってきている．このような調節因子は、まだ多く存在していると予想される。私達のグループでは成熟したニューロンへの生存維持を指標として新しい因子の検索を行ってきた。その構造解析の過程で得られたペプチドの一部で、中隔コリナージックニューロン及び中脳ドーパミナージックニューロンへの生存維持作用があった。

[実験方法]

神経栄養因子の精製は、すでに報告した方法[1]で行い、得られた蛋白をトリプシン分解して得られたペプチドをプロテインシークエンサーによりそのアミノ酸配列を解析した。そのアミノ酸配列をもとにして１３個のアミノ酸からなるペプチド(Glu-Ala-Leu-Glu-Leu-Ala-Arg-Gly-Ala-Ile-Phe-Gln-Ala)を固相法によるペプチド合成法により合成した。

初代培養は前報に従って行った[2]。無血清での培養は翌日にTIP/DF培地に交換して行った。ペプチドの添加は、翌日に行い、３日毎に培地を交換し７日間培養した．コリナージックニューロンの生存の指標としてＣｈＡＴ活性の測定及びacetylcholine esterase(AChE)活性染色による組織化学的方法により行った。ＣｈＡＴ活性は、Fonnum法を改良して行った．AChE活性染色はHefti等の方法[3]に従って行った。またドーパミナージックニューロンの生存維持の指標として、ドーパミン含量を測定した。ドーパミン量は、細胞を０．１ＭＰＣＡで破壊し、除蛋白後その上清をＨＰＬＣ－ＥＣＤ法により測定した。

[結果と考察]

生後１２日ラット中隔野からの細胞を種々の濃度のペプチド存在下で６日間培養し、ＣｈＡＴ活性を測定した．図ペプチドは濃度依存的に中隔コリナージックニューロンの生存維持作用があり、最大効果量は、１ｎｇ／ｍｌでコントロール群の約２倍のChAT活性を示した。また、同様の培養を無血清培地中で行ったところ、図１に示すように同様の効果がみられた。さらに、ＡＣｈＥ活性染色により形態及びコリナージックニューロン数について調べた

ところ、ペプチド存在下で培養されたニューロンは、よく突起を伸長しており、ニューロン数もＣｈＡＴ活性で得られたと同様の結果を示した。（図２）このペプチドの神経栄養因子様作用について他の神経伝達物質ニューロンの一つであるドーパミナージックニューロンへの作用を調べた。ドーパミナージックニューロンの指標としてドーパミン含量をＨＰＬＣ－ＥＣＤにより測定した。その結果、中脳ドーパミナージックニューロンへも生存維持作用があることが示された。

以上のようにアミノ酸１３個からなるペプチドで生後２週間前後のラット中隔野コリナージック、中脳ドーパミナージックニューロンへの生存維持作用がみられた。この効果は，無血清培地でもみられることから、ペプチド自身の作用であると考えられる。このペプチドの作用はニューロンへ直接作用しているかどうか、また作用機構、蛋白との関係等今後さらに研究を進めて行きたい。

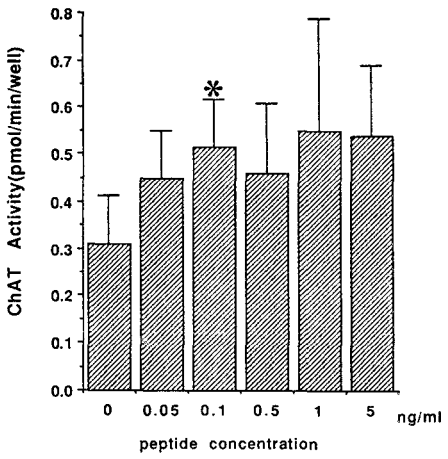


図１

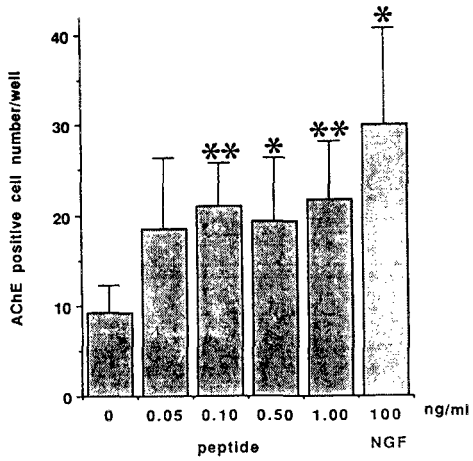


図２

図１．無血清培地中でのペプチドの中隔コリナージックニューロンへの作用

生後１２日ラット中隔より得られた細胞をマルチウェルプレートにまき翌日無血清培地に交換しそれぞれの濃度のペプチドを加え６日間培養し、ChAT活性を測定した。　＊ $p<0.05$

図２。ペプチドのAChE陽性ニューロンへの作用

生後１４日ラット中隔を用いた初代培養にそれぞれの濃度のペプチドを加え、６日間培養後，４％パラホルムアルデヒドで固定しAChE染色をおこなった。　＊ $p<0.05$　＊＊ $p<0.01$

[文献]

（１）浜　登希子、他　生化学、62，596 (1990)

（２）Hama,T., et al Neuroscience 40, 445-452 (1991)

（３）Hefti,F. et al . Neuroscience 14, 55-68 (1985)

[謝辞]

この研究を行うにあたり、ペプチドを合成していただいた佐藤　一紀博士（三菱化成生命科学研究所、ペプチド研究室）に深く感謝いたします。

192 サイトカイン、glucocorticoidによるアストロサイトのＮＧＦ、ＮＣＡＭ発現調節

吉田一成、左合正周、矢崎貴仁、若本寛起、上口裕之、稲葉真、大谷光弘、戸谷重雄

（慶應義塾大学　脳神経外科）

〔要約〕

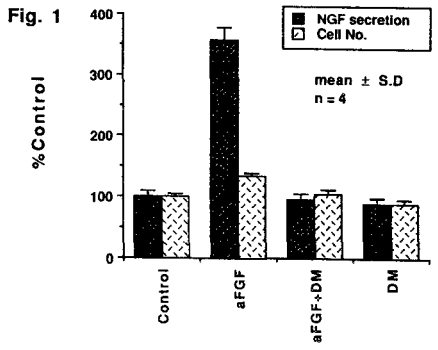
aFGF、IL-1β＋TNF-αはアストロサイトによるNGF産生を著明に増強するが、glucocorticoidはその作用を著明に抑制した。IL-1β＋TNF-αによるアストロサイトのNCAM発現増強作用もglucocorticoidにより抑制された。アストロサイトと中核野ニューロンのcoculture系において、IL-1β＋TNF-αはコリン作動性ニューロンのCAT活性を増強するが、この作用もglucocorticoidにより抑制された。GlucocorticoidにはNGF自体のCAT活性増強効果は抑制しないことから、サイトカインにより活性化されるアストロサイトのNGF typeのcholinergic neurotrophic activityを抑制するものと考えられた。アストロサイトは、脳に障害が起きた際に、NGFなどのneurotrophic factor、NCAMなどの神経突起伸展因子を産生することにより、傷害された神経回路網の修復を促すものと考えられるが、今回の結果から、特に脳神経外科領域において手術後に用いられるglucocorticoidの作用を、神経再生の側面から再考する必要性があることが示唆された。

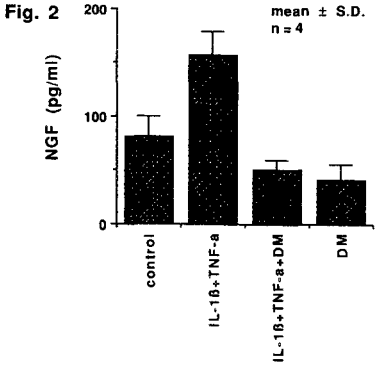
我々はこれまでに、acidic and basic fibroblast growth factor (aFGF & bFGF)、interleukin-1β (IL-β)、tumor necrosis factor-α (TNF-α)、transforming growth factor-β1 (TGF-β1)などのサイトカインが、アストロサイトによるnerve growth factor (NGF) の産生を協調的に増強すること、およびアストロサイトのcholinergic neurotrophic effectを特異的に増強することを見いだした[2-5]。我々はサイトカインにより活性化されたアストロサイトは、脳に損傷が起きた際に傷害された神経回路網の修復を行なう役割を担っているものと推測している。最近、glucocorticoidがアストロサイトのNGF産生を抑制することが報告された[1]。そこで今回は、脳神経外科領域において術後、脳浮腫を軽減する目的で用いられるglucocorticoidがアストロサイトのNGF産生、cholinergic neurotrophic effectおよびアストロサイトの膜表面にあるneural cell adhesion molecule (NCAM)の発現に及ぼす影響について検討した。

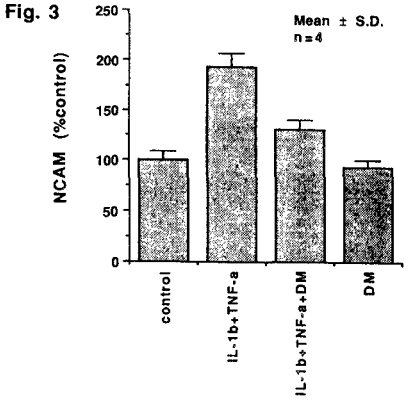
【方法】1) 新生仔ラット海馬由来培養アストロサイトを、24 well culture plateにて10% FCS-MEMを用いて培養し、aFGF、interleukin-1β (IL-1β)＋tumor necrosis factor-α (TNF-α)、dexamethasone (DM)を組み合せて作用させ、24時間後に培地中のNGFを2-site ELISA法にて定量、最終の細胞数をCoulter counterにて算定した。2) 同様の培養条件下において、海馬由来のアストロサイトを6-well culture plateにて培養し、IL-1β＋TNF-α、DMを48時間作用させ、N-CAMの発現量をELISAにて定量した。3) アストロサイトとラット胎生１７日中隔野由来コリン作動性ニューロンのcoculture系においてbovine serum albumin (BSA)添加N2培地を用い、培養開始翌日よりIL-1β＋TNF-α、DMを作用させ、４日後にcholineacetyltransferase (CAT)活性を測定した。4) BSA-N2にcytosine arabinosideを添加した、中隔野ニューロンの選択培養系において、NGF、DMを培養開始翌日より４日間作用させた後、CAT活性を測定した。

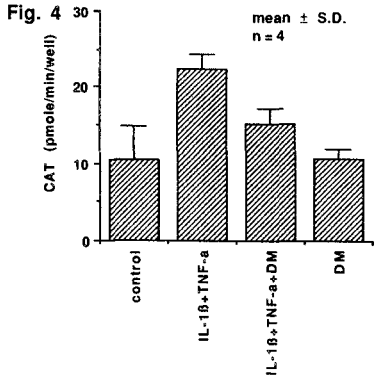
【結果】1) aFGFにはアストロサイトに対し、増殖促進効果、NGF産生増強効果があるが、DMによりこれらの作用は著明に抑制された(Fig. 1)。2) IL-1β、TNF-αを同時に添加することによりアストロサイトのNGF産生は著明に増強されるが、この作用もDMにより抑制された（Fig. 2）。3) IL-1β＋TNF-αにはアストロサイトのNCAMの発現量を増加させる作用もあるが、DMはNCAM発現増強効果も抑制した(Fig. 3)。4) アストロサイトと中隔野ニューロンの coculture 系において、IL-1β、TNF-αのCAT活性増強作用はDMにより約50%抑制された（Fig. 4）。５）中隔野ニューロンの初代培養系において、DMはNGFのCAT活性増強効果には全く影響を及ぼさなかった（not shown）。

【考察】アストロサイトは中隔野コリン作動性ニューロンに対し、CAT活性を増強する効果があり、その一部はNGFを介する作用である。今回の研究結果より、aFGF、IL-1β+TNF-αによるアストロサイトのNGF産生増強効果は、glucocorticoidにより著明に抑制されることが判明した。アストロサイトと中核野ニューロンのcoculture系において、IL-1β+TNF-αは中核野ニューロンのCAT活性を増強するが、glucocorticoidはその作用を著明に減弱させたが、NGF自体の中隔野コリン作動ニューロンに対するCAT活性増強効果を減弱させる作用はなく、glucocorticoidはアストロサイトのNGF産生を抑制することにより、IL-1β+TNF-αの作用を抑制することが判明した。アストロサイトの膜表面には細胞接着因子であるNCAMが発現しており、その発現量がIL-1β+TNF-αの添加により増加するが、glucocorticoidはサイトカインによるNCAM発現増強効果をも抑制した。我々は、脳に損傷が起きた際に、種々のサイトカインにより活性化されたアストロサイトは、NGFなどの神経栄養因子、NCAMなどの神経突起伸展因子を産生することにより、障害を受けた神経回路網の修復を促す役割を果たすものと考えているが、glucocorticoidがそれらの因子の発現を抑制することは、脳神経外科術後に脳浮腫予防目的で用いられるglucocorticoidの作用を、障害された神経回路網の修復という観点から見直す必要があることが示唆された。









【文献】 1. Lindholm D, et al.: Eur J Neurosci 4: 404-410, 1992.
2. Yoshida K, Gage FH: Brain Res 538: 118-126, 1991.
3. Yoshida K, Gage FH: Brain Res 569: 14-25, 1992.
4. Yoshida K, et al.: J Neurochem 59: 919-931, 1992.
5. Yoshida K, et al.: Recent Advances in Neurotraumatology: 279-282, 1993.

193　C６グリオーマ細胞による神経突起伸長の抑制作用

渡辺英治(1)、細川浩(2)、小林裕明(3)、大平敦彦(1)、村上富士夫(3)
(1愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所，2京都大学大学院大学人間環境学研究科行動調節機構，3大阪大学・基礎工学部・生物工学科)

〔要約〕

中枢神経の軸索が再生できない理由の一つとして、オリゴデンドロサイトによる軸索再成長の阻害効果が注目を集めている(1)。本研究ではその分子機構解明のために、C６グリオーマ細胞を使ったモデル系の確立を試みた。実験に使用したC６細胞は、高密度で培養するとオリゴデンドロサイトのマーカーであるＰＬＰmＲＮＡを発現することが報告されている(2)。そこで高密度C６細胞上でニワトリ胚脊髄後根節の培養を行ったところ、ＮＧＦ存在下にも関わらず突起伸展がほとんど観察されなかった。一方、低密度C６細胞上では盛んな突起伸展が見られ、また低密度C６細胞の一部にパッチ状に高密度C６細胞を配置させた培養系では、神経突起は高密度C６細胞の領域を避けるようにして成長した。また、高密度C６細胞のＣＨＡＰＳ可溶性膜分画は神経突起伸展を阻害する効果を示した。これらの結果は、C６細胞が低密度状態から高密度状態に移行するときに神経突起伸長に対して抑制的な因子を発現することを示唆しており、抑制性グリアの良いモデル系になると考えられる。

＜緒言＞ 成熟した高等動物の脳は一度損傷を受けると、再生するのは非常に困難である(3)。この再生の起こりにくい原因の一つとして、軸索の再伸長を阻害する中枢白質の環境、特にオリゴデンドロサイトの存在があげられる(1)。例えば、凍結組織切片を培養基質として利用した実験によって、中枢神経系白質は神経突起の伸長を阻害する環境であることが(4)、また培養系で神経突起先端の成長円錐はオリゴデンドロサイトを避けるように振る舞うことが示されている(5)。そこで今回我々はその分子機構解明の手段を得るために、阻害効果を発現する株細胞の研究を行った。グリアの株細胞の一つ、C６細胞はアストログリアとオリゴデンドロサイトのいずれのマーカー分子をも発現する能力を有するが、無血清高密度で培養して細胞分裂を抑制しておくとオリゴデンドロサイトのマーカー遺伝子であるPLPmRNAが発現することが知られている(2)。そこで今回の実験では高密度培養状態のC６細胞について神経突起伸長の抑制活性の有無についての検討を行った。

＜実験方法＞1) 培養：C６細胞（御子柴克彦博士の提供による）をポリリジンでコートした35mm dish一枚あたり３００万と５万個の割合でまき、それぞれＦＣＳ非存在下と５％ＦＣＳ存在下のDME/F12培地で培養した。２４時間後に全量培地交換をし、その２４時間後にニワトリ胚（Ｅ９）の脊髄後根神経節を置き、50ng/mlＮＧＦ（2.5S,Chemicon)と５％ＦＣＳを含むDME/F12培地で２４時間の培養を行った。神経突起はホルマリンによる固定後、ニワトリ神経節はニワトリ組織に特異的なモノクロナル抗体96D2（藤田忍博士の提供による）の間接蛍光抗体法によって可視化した。

2)ＣＨＡＰＳ可溶性成分の抽出：上記の要領で培養した高密度状態および低密度状態のC６細胞をはがし取り、ホモジナイズ後超遠心をし、そのペレットを２％ＣＨＡＰＳでホモジナイズし、さらに超遠心を行い、上澄みを過剰量のDME/F12培地に透析をした。SchaffnerとWeissmann(6)の方法によって蛋白定量をした後、ＣＨＡＰＳ可溶性膜分画は９６穴プレートに加え、さらにＮＧＦを含んだ培地と共にニワトリ胚脊髄後根神経節を加えて培養を行った。２４時間後、ホルマリン固定とＣＢＢ染色を経て、画像処理装置を用いて神経突起が占める面積を測定し、これを神経節本体の周囲長で割って、「Length of neurites」という値を定義し、神経突起伸長阻害作用の指標とした。

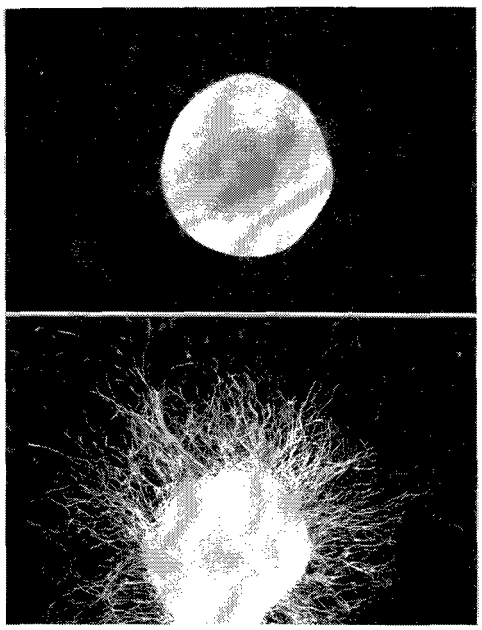
＜結果と考察＞ 増殖期（低密度状態）のC６細胞は偏平形しているが、単層状態になって高密度化すると細胞増殖が抑制され、細胞の形は細く短い突起を持った球状になる。低密度状態と高密度状態のC６細胞上に孵卵後９日目のニワトリ胚脊髄後根神経節を置いて培養したところ、神経節細胞は低密度状態のC６細胞上では盛んに突起を

伸展させたが、高密度状態のＣ６細胞上ではほとんど突起伸長が認められなかった（図１）。また、高密度Ｃ６細胞と低密度Ｃ６細胞とを混在させた細胞基質の上では、神経突起は低密度Ｃ６細胞上を選択的に走行し、高密度Ｃ６細胞の領域には侵入しなかった。これらの結果は、高密度Ｃ６細胞は神経突起伸長に好ましい基質ではないことを示している。また高密度Ｃ６細胞の条件培養液には神経突起伸長を阻害する効果が認められなかった。したがって高密度Ｃ６細胞上で突起伸展が見られないのは、水溶性の神経突起伸長阻害因子、あるいは神経細胞の生存や代謝活性自身に影響を与える毒性因子、もしくは培養液中のＮＧＦを分解するような酵素の働きによるものではないことが示唆された。

神経突起の伸長を制御する因子が、高密度Ｃ６細胞の細胞膜に発現されているかどうかを検討するために、界面活性剤（ＣＨＡＰＳ）で膜を可溶化し、それを後根神経節の培養液に加えたところ、蛋白濃度に依存して神経突起の伸長抑制効果が見られた（図２）。また、低密度Ｃ６細胞のＣＨＡＰＳ分画には弱い抑制効果しか認められなかった。また高密度Ｃ６細胞のＣＨＡＰＳ分画をトリプシン処理、あるいは熱処理すると、阻害効果はほぼ低密度Ｃ６細胞のものと同程度に低下したことから、高密度Ｃ６細胞の神経突起伸長抑制作用の原因の一つは膜蛋白質性因子の発現であることが示唆された。

以上の結果からＣ６細胞は低密度の状態から、高密度の状態に移行する過程で、その細胞膜上に神経突起の伸長を阻害する因子を発現するものと思われる。我々はさらに、抑制効果の組織特異性、発生期による違い、またモノクロナル抗体を使った抑制因子の検索を行っており併せて報告する。

＜文献＞ 1) Schwab,M.E. et al. (1993) Annu.Rev.Neurosci. 16, 565-595
2) Nave,K.A. and Lemke,G. (1991) J.Neurosci. 11(10), 3060-3069
3) Cajal,S.R.Y. (1928) Degeneration and regenaration of nervous system. London, Oxford University Press
4) Watanabe,E. and Murakami,F. (1990) Neurosci. Res. 8, 83-99
5) Bandlow,C. et al. (1990) J.Neurosci. 10(12), 3837-3848
6) Schaffner,W. and Weissmann,C. (1973) Anal. Biochem. 56, 502-514



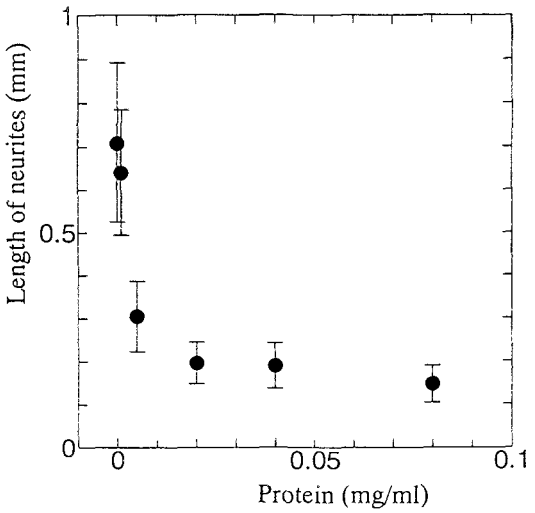


図１（左図）：高密度状態（上）および低密度状態（下）のＣ６細胞上でのニワトリ胚脊髄後根節の神経突起伸長。ＮＧＦ、ＦＣＳ存在下で２４時間培養し、固定後、ニワトリ組織に特異的な抗体９６Ｄ２によって可視化した。高密度Ｃ６細胞上では神経突起の伸長がほとんど見られない。

図２（右図）：ＣＨＡＰＳ可溶化膜分画の神経突起抑制作用。脊髄後根節の培養液にＣＨＡＰＳ分画、ＮＧＦ、ＦＣＳを加えて２４時間培養し、神経突起長を測定した。濃度に依存して神経突起の伸長が阻害されている。

194 ラット舌下神経損傷後の神経再生過程における ERKs mRNAの発現

桐生寿美子、前野浩巳、木山博資
（大阪大学・医・バイオ研・神経解剖）

〔要約〕

ラット舌下神経に損傷（crush、resection）を与えることで引き起こされるERK（extracellular-signal regulated kinase/ MAP kinase）1、2、3のmRNAの経時変化を、合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたin situハイブリダイゼーション法により検索した。その結果、ERK1はcrush、resectionどちらの損傷によっても術後3日目よりmRNAの強い発現が検出された。また、crush時には術後30日前後でmRNAレベルが元に戻ったのに対し、resection時にはそれ以上長期間にわたりmRNAの強い陽性反応が見られた。一方、ERK2、ERK3に関しては、ERK1で認められるような変化は起こらないことが明らかになった。ERK1の結果は、同様の実験にて報告されたGAP-43の経時変化と非常によく一致していた。従って、損傷を受けた神経の再生過程において、成長因子受容体を介して引き起こされる細胞内シグナル伝達経路のうちERK1を通る経路が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

〔はじめに〕

様々な成長因子によりチロシン/スレオニン残基のリン酸化で活性化されるERK(MAP kinase）は細胞の増殖、分化に必須の役割を果たすと考えられており、現在多くの注目を集めるところである(1)。末梢神経損傷後に起こる再生過程において、ある種の成長・栄養因子が関与すると考えられており、それらの多くは、細胞内にチロシンキナーゼドメインを有する受容体を介して、シグナルが細胞内に伝えられる。ERKは受容体型チロシンキナーゼより核へ至る細胞内情報伝達系の中にあり、神経の再生に関与する可能性が考えられる。そこで、ラット舌下神経に損傷を与えることで引き起こされるERK mRNAの経時変化について、合成オリゴヌクレオチドを用いたin situハイブリダイゼーション法により検討した。

〔材料と方法〕

Wistar系ラットをペントバルビタール麻酔にて、片側舌下神経に損傷（resectionまたはcrush）を与えた。手術後、経時変化を見るため一定期間ごとに、ラットをジエチルエーテル麻酔後断頭し速やかに脳を取り出し、ドライアイスにて凍結、厚さ20μmの新鮮凍結切片を作成した。切片は、4%パラホルムアルデヒド液にて10分間固定し、アセチル化を行った後、アルコールにて脱水を行った。probeはラットERK1、2、3のcDNAに対してそれぞれ相補的な42merのオリゴヌクレオチドを合成して用いた。これらprobeは、DNASISによるhomology search（Gene Bank）の結果、ERKs間ならびに、現在Gene Bankに登録されている遺伝子との相同性の低い部位よりデザインしたものである。^{35}S-dATPにより3'端標識したオリゴヌクレオチドプローブを用い、42度にて一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、アルコールにて脱水し、乳剤オートラジオグラフィーを行った。

舌下神経核に見られるハイブリダイゼーションシグナルはイメージアナライザーにて、定量化を行った。

〔結果〕

ERK1については、crush、resectionのどちらも手術後3日目以降で術側舌下神経核において、mRNAの強い陽性反応が認められたが、健側ではそのような反応は検出されなかった。これは、免疫組織化学によっても確認された。crushの場合、術後30日前後に健側と同程度のレベルにmRNAシグナルが下がった。resectionの場合、それより長期間にわたって健側に比べ有意にmRNAの陽性反応が認められた。

なお、ERK2、ERK3については、神経障害により舌下神経核のmRNAレベルは変化しなかった。

〔考察〕

ERKファミリーの中でERK1が、障害神経再生時に、極めて強い転写促進が見られることにより、ERK1は神経の再生に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。転写促進の時間経過はGAP-43の場合と極めて類似しており、ERKは神経の突起伸展に関与すると考えられる(2)。また、受容体型チロシンキナーゼよりの別の伝達経路に存在するフォスファチジルイノシトール3キナーゼ（PI-3K）や、フォスフォリパーゼCγ（PLCγ）は、神経再生時にその転写レベルに変化が見られなかったことより(3)、ERKを介した経路が神経再生には最も重要であると考えられる。今後さらにERK周辺のシグナル伝達分子の解析をすすめて行くことにより、神経再生時における細胞内変化についてmRNAレベルでの詳細な検討を加えることができると考えている。

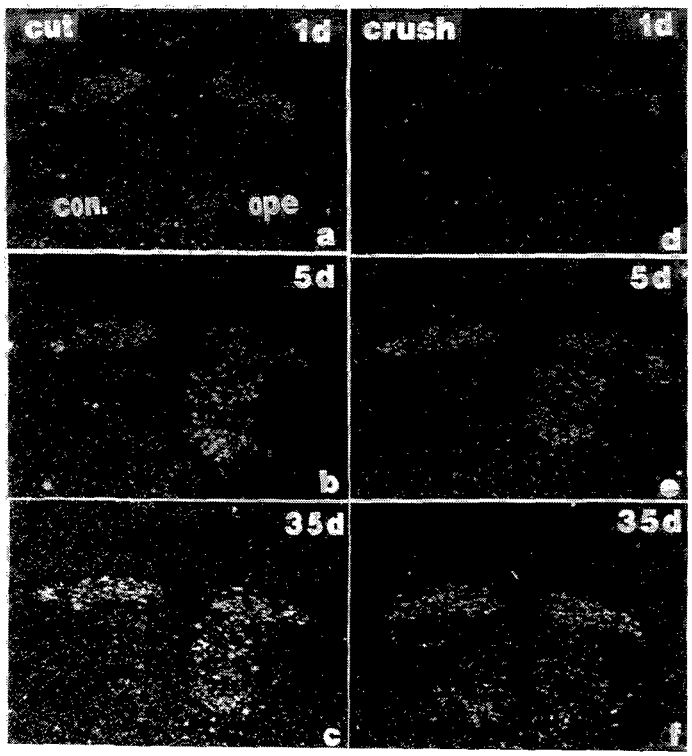


図１．　舌下神経損傷後の舌下神経核におけるERK1 mRNA

〔文献〕

(1) Teri G. Boulton, Steven H. Nye, David J. Robbins, Nancy Y. Ip, Elizabeth Radziejewska, Sharon D. Morgenbesser, Ronald A. DePinho, Nikos Panayotos, Melanie H. Cobb, and George D. Yanocopoulos (1991) Cell 65, 663-675

(2) Kobayashi N., Kiyama H., and Tohyama M. (1993) Mol.Brain Res. (in press)

(3) Saika T., Kiyama H., and Tohyama M. (1992) Neurosci. Res. Suppl. 17, S185

195 神経細胞特異的タンパク質（PNP 14）の脳内分布、およびmRNA発現部位の解析

中条茂男[1)]、塩田清二[2)]、中井康光[2)]、中谷一泰[1)]
（昭和大学・薬学部・生物化学[1)]、医学部・第一解剖[2)]）

〔要約〕

リン酸化タンパク質である神経細胞特異的タンパク質Phosphoneuroprotein 14 (PNP 14)のラット大脳、および小脳における分布とそのmRNAの発現について解析した。大脳では海馬、線条体、および皮質が免疫陽性であった。小脳は特に分子層で強い免疫陽性を示したが、顆粒層にも陽性反応が認められた。PNP 14 mRNAの発現は大脳では海馬、梨上皮質に、小脳では顆粒層に強く認められた。また、NGF刺激したPC12細胞を用いてPNP 14の細胞内分布を調べたところ、刺激後5日目に細胞質から核周辺部へ移行し、7-8日目に核内に濃縮された後、突起への移行が観察された。以上の結果から、PNP 14は特定の細胞体で合成された後、軸索輸送により神経終末へ移行し、機能していることが示唆された。

PNP 14 (1)はEGF受容体、$p60^{v\text{-}src}$によりチロシン残基が、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIによりセリン残基がリン酸化されること、および$p60^{c\text{-}src}$やPI3-kinaseと複合体を形成することから情報伝達系において重要な役割を果たしているものと考えられる(2)。また、PNP 14が有する生理機能はそれらタンパク質リン酸化酵素により制御されている可能性が考えられる。本実験では、PNP 14の生合成部位、およびPNP 14の脳内分布についてin situハイブリダイゼーション法、および免疫組織化学的手法を用いて詳細に検討することを目的とした。

【実験方法】

抗体は抗ウシPNP 14ウサギ血清をアフィニティ精製して実験に用いた。免疫染色は7週令雄性Wistar系ラット脳を用いて行った。PNP 14の検出は光顕はABC法により、電顕はロイクリル樹脂切片上で金コロイド法を用いて行った。in situハイブリダイゼーションは[α-^{35}S]dCTPを用いて、ラットPNP 14 cDNA (3)をランダムプライム標識法により標識したものをプローブとして用いて行った。PC12細胞はコラーゲン処理した培養皿上、10%ウシ胎児血清、5%ウマ血清を含むRPMI 1640培地中、37℃、5% CO_2下で培養した。PC12細胞は50 ng/mlのNGFで10日間処理した。PNP 14の細胞内分布は共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。

【実験結果・考察】

免疫陽性線維は小脳では分子層と顆粒層に見られたが、プルキンエ細胞層と髄質にはほとんど認められなかった（図1、A, B）。大脳皮質では免疫陽性終末が分布し、特に第V層の錐体細胞に直接接している陽性終末像が認められた（図1、C, D）。海馬では特にCA3領域に（図1、E）、また線条体にも多数の免疫陽性線維と終末が分布している像が認められた（図1、F）。小脳の顆粒層と分子層について免疫電顕により観察した結果、PNP 14は軸索終末内にランダムに分布していることが明らかになった（図2）。大脳におけるPNP 14 mRNAの発現はCA1-CA4、および歯状回を含む海馬（図3、A）と梨状皮質に、小脳では顆粒層に強い発現を示す細胞が認められた（図3、B）。以上の結果から、PNP 14は特定の細胞体で生合成された後、軸索輸送により神経終末へ移行し機能するものと考えられる。また、PC12細胞をNGFで刺激し、PNP 14の細胞内分布を蛍光抗体法により調べたところ、刺激後5日目に細胞質から核周辺部への移行が認められ、7-8日目に核内に濃縮された後、突起への移行が観察された。この結果もPNP 14が細胞内移行を示すタンパク質であることを支持する。細胞内移行する時期にPNP 14の合成量が上昇することをイムノブロットで確認した。

【文献】

(1) Nakajo, S., Omata, K., Aiuchi, T., Shibayama, T., Okahashi, I., Ochiai, H., Nakai, Y., Nakaya, K. and Nakamura, Y. (1990) J. Neurochem. 55, 2031-2038.
(2) 中条茂男、塚田和彦、中谷一泰 (1992) 神経化学、31, 518-519.
(3) Tobe, T., Nakajo, S., Tanaka, A., Mitoya, A., Omata, K., Nakaya, K., Tomita, M. and Nakamura, Y. (1992) J. Neurochem. 59, 1624-1629.

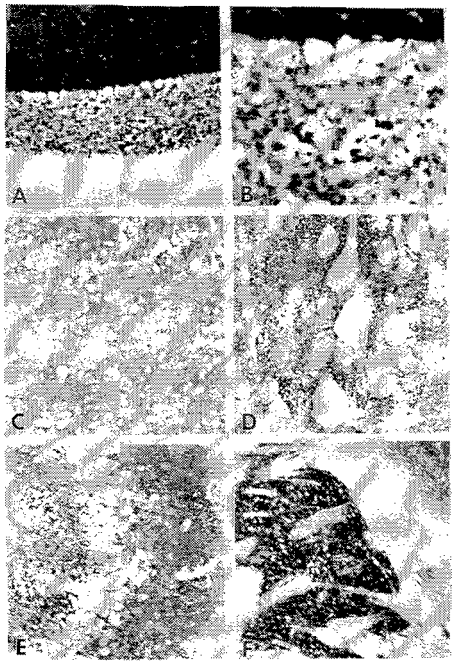


図１．　PNP 14免疫陽性線維の光顕像
A，B：小脳（BはAの拡大図）
C，D：大脳皮質（DはCの拡大図）
E：海馬CA3領域
F：線条体

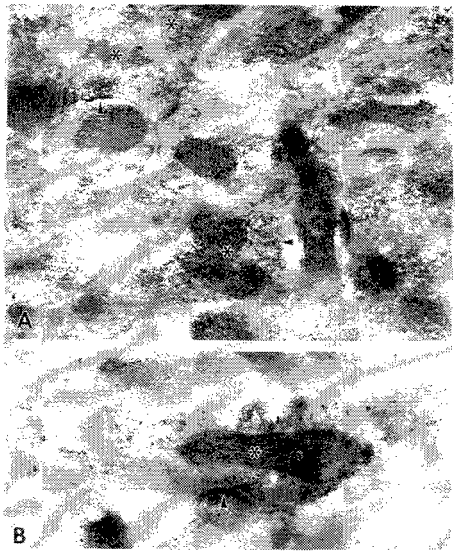


図２．　小脳PNP 14の免疫陽性終末の電顕像
A：顆粒層
B：分子層
＊は免疫陽性終末を、矢尻はシナプス形成部位を示す。

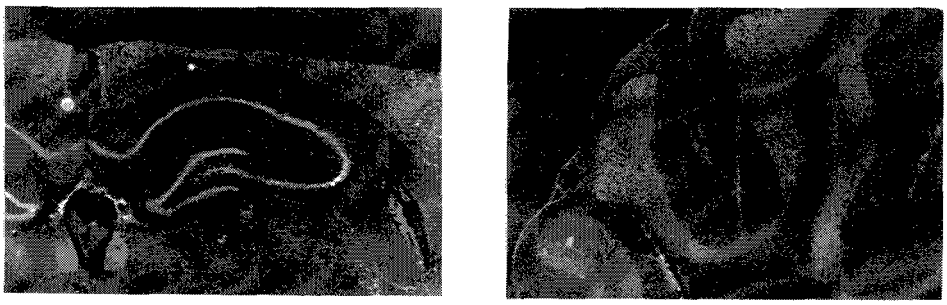


図３．　PNP 14 mRNAのin situハイブリダイゼーション
A：海馬
B：小脳
（エマルジョンオートラジオグラフィー、暗視野）

196 ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの遅い軸索輸送に対するシロスタゾールの作用

山本　恵史、保田　好信、小宮　義璋*
(大塚製薬(株)徳島研究所、群馬大学医学部分子病態学*)

〔要約〕
ストレプトゾトシン（STZ）により誘発した糖尿病ラットを用い、細胞骨格蛋白質の坐骨神経運動繊維内輸送に対するシロスタゾールの作用を検討した。細胞骨格蛋白質は脊髄前角部に ^{35}S-メチオニンを注入した後、坐骨神経内に含まれる標識蛋白質をSDSゲル電気泳動で分離しフルオログラムで検出した。その結果、糖尿病コントロール群ではSTZ投与4週で ニューロフィラメント（NF-M およびNF-L）の輸送に障害が認められた。また チューブリン（Tub）および アクチン（Act）に関しても STZ投与 5週で輸送障害が認められた。これに対しシロスタゾール投与群では各細胞骨格蛋白質の軸索内輸送の障害は認められず、シロスタゾールは糖尿病で障害された軸索内輸送を改善した。

〔目的〕
実験的糖尿病動物の末梢神経において細胞骨格蛋白質の輸送障害が報告されており[1,2]、軸索内輸送が糖尿病性末梢神経障害に深く関与しているものと考えられている。本試験では糖尿病性末梢神経障害の指標としてラットの坐骨神経運動繊維内を輸送される細胞骨格蛋白質の輸送速度を測定し、シロスタゾールの軸索内輸送に対する作用を検討した。

〔実験方法〕
1．糖尿病の誘発：6週令のウイスター系雄性ラット（ＳＬＣ）に 0.01Mクエン酸緩衝液（pH 4.5）に溶解したストレプトゾトシンを50mg/kgの用量で尾静脈より投与した。正常群には0.01Mクエン酸緩衝液（pH 4.5）を投与した。
2．群分けおよび投薬：糖尿病ラットはストレプトゾトシン投与 3日後に血糖値を測定し、糖尿病コントロール群およびシロスタゾール投与群に群分けした。正常群と糖尿病コントロール群 にはコントロール飼料を、またシロスタゾール投与群には0.03%シロスタゾール含有飼料を与え以後自由摂食させた。
3．坐骨運動神経細胞体への標識アミノ酸の注入：　ストレプトゾトシン投与14日後、ラットをエーテル麻酔下で背部を切開し、^{35}S-メチオニン約150 μCiを脊髄前角部へ注入した。
4．標識神経の摘出とフルオログラムの作成：標識アミノ酸を注入した 1、2 あるいは 3週間後に採血し、坐骨神経を上方は脊髄前角までたどり、下方は総腓骨神経、脛骨神経、腓腹神経の三本に分岐して踵に至るまで摘出した。摘出した神経は凍結後 6mmの連続片に切断し SDS緩衝液でホモジェナイズした。各切片の標識蛋白質は、SDS 電気泳動(10%ポリアクリルアミドゲル) で分離しフルオログラムを作成した。各標識蛋白質に含まれる放射活性は、イメージングアナライザー（フジフィルム）により解析した。
5．各標識蛋白質のピーク位置：ニューロフィラメント（NF-MおよびNF-L）、チューブリン（Tub）およびアクチン（Act）の各蛋白質の全放射活性をそれぞれ100%として、脊髄からの距離と放射活性の分布を表した。Slow Component a (SCa)のピーク位置は、放射活性の高いポイントを中心に 3ポイントをとり、それぞれを結ぶ 2直線の傾きから比例配分し算出した。

〔実験結果〕
血糖値および体重の変化：血糖値は、STZ投与 3日後で 正常群が 166.3±4.6mg/dl、糖尿病コントロール群およびシロスタゾール投与群がそれぞれ608.1±26.5mg/dlおよび559.3±11.2mg/dl (mean±S.E.) を示した。試験最終時（STZ投与 5週後）の血糖値は、正常群が 165.0±3.2mg/dl、糖尿病コントロール 群およびシロスタゾール投与群がそれぞれ 718.0±31.8mg/dlおよび646.7±54.9mg/dl（mean±S.E.）であった。体重は、正常群が試験開始時 141.0±3.1gから試験最終時 269.7±2.6gに増加したのに対し、糖尿病コントロール 群は 135.6±2.9gから 170.3±16.3g 、シロスタゾール投与群が 140.0±3.4gから 176.7±12.8g(mean±S.E.) であり、両群ともに正常群に比較して体重増加の低下が認められた。
細胞骨格蛋白質の軸索内輸送：細胞骨格蛋白質のうち NF-M および NF-L は、正常群と比較して糖尿病コントロール群で STZ投与3週から軸索内輸送の障害が認められた（図１）。STZ 投与 5週時における 糖尿病コントロール群の NF-M および NF-L輸送内輸送は、正常群に比べそれぞれ 32.3%および 41.3%抑制されていた。これに対してシロスタゾール投与群では軸索内輸送の障害は認められず、輸送速度は正常群とほぼ同じであった。また Tubと Actに関しても、糖尿病コントロール群で STZ投与 5週時に輸送の障害が認められた（図１）。この時の抑制率は Tubと Actでそれぞれ 39.1%および 37.0%であった。シロスタゾールは Tubと Actに対しても 糖尿病コントロール群で認められた軸索内輸送の障害を抑制した。

〔考察〕

ＳＴＺ誘発糖尿病ラットの坐骨神経運動繊維において、NF、Tub 、Act などの細胞骨格蛋白質の輸送に障害が認められた。なかでもNFはTubとActに比較して早い時期から輸送障害が認められたことから、NFはTubおよびActとは異なった機構で輸送されることによるものと考えられる。しかしMaciocoらによるとＳＴＺ誘発糖尿病ラットの坐骨神経では、感覚神経線維において細胞骨格蛋白質の輸送障害、特にNFの障害が大きいことが認められているが、運動神経繊維では認められていないことが報告されている[2]。これらの不一致は、実験条件の違いによる糖尿病状態の程度の差異によるのかもしれない。

糖尿病性神経障害の成因に代謝異常説や血管障害説が提唱されているが未だ結論は出ていない。シロスタゾールはcAMP dependent phosphodiesteraseを阻害し細胞内cAMPを上昇させることにより、抗血小板作用、抗血栓作用および血管拡張作用などを有する薬剤であり[3-5]、末梢での血流増加作用、神経hypoxiaの改善などを介して糖尿病性神経障害を改善することが期待される。本試験でシロスタゾールは糖尿病ラットで認められた NF 、Tub 、Act などの軸索内輸送障害を抑制し、輸送速度を正常レベルまで改善した。シロスタゾールの効果が循環改善作用によるとすれば、糖尿病ラットにおける軸索内輸送障害は血管障害説に基づく循環障害によると考えられる。しかしシロスタゾールは神経に対する直接作用を有する可能性も考えられ、詳細な作用機序の解明は今後の課題であると思われる。

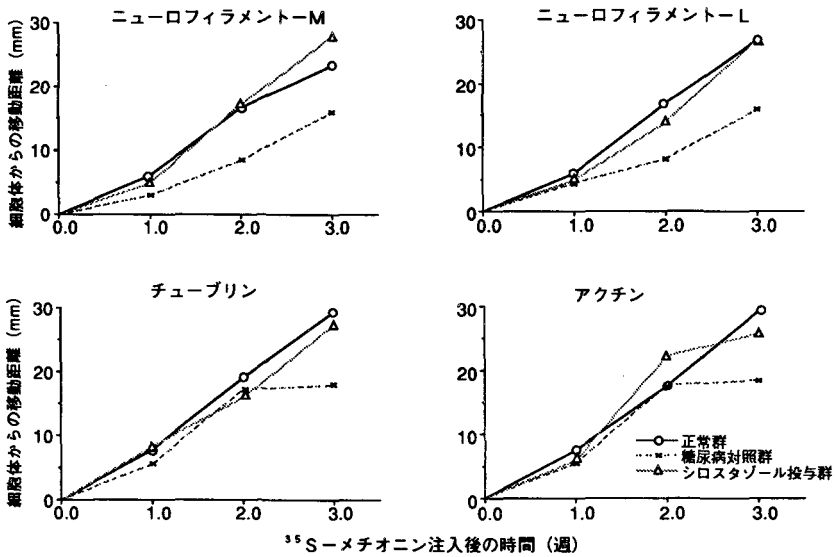


図. 2 ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット坐骨運動神経における細胞骨格蛋白質の軸索輸送に対するシロスタゾールの作用： ストレプトゾトシン投与３日後よりシロスタゾールを投与し２週間後に^{35}Ｓーメチオニンを注入した。

〔文献〕

1）Larsen,J.R., and Sidenius,P. (1989) J.Neurochem. 52,(2), 390-401
2）Macioce,P., Fillatreau,G., Figliomeni,B., Hassig,R., Thiery,J., and Di,Giamberardino,L. (1989) J.Neurochem. 53 , (4), 1261-1267
3）Nishi,T., Tabusa,F., Tanaka,T., Shimizu,T., Kanbe,T., Kimura,Y., and Nakagawa, K. (1983) Chem. Pharm. Bull. 31, 1151- 1157
4）Kimura,Y.,Tani,T.,Kanbe,T., and Watanabe,K. (1985) Arzeim.-Forsch./Drug Res.35, 1144-1149
5）Kawamura,K.,Watanabe,K., and Kimura,Y. (1985) Arzeim.-Forsch./Drug Res. 35, 1149-1154

197 NG108-15細胞におけるカルシウムキレート剤導入後のブラジキニン反応の解析

木村康宏、東田陽博
（金沢大、医、神経物性）

要旨

NG108-15細胞を、アセトキシメチル化したカルシウム(Ca^{2+})キレート剤1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid(BAPTA)で処理し、BAPTAの細胞内導入を行った後、ブラジキニン(BK)にてBK受容体を刺激し、そのシグナル伝達を調べた．BAPTA処理NG108-15細胞とコントロール細胞においてBKはイノシトール-1,4,5,-三リン酸(IP_3)を同程度産生させた．しかし、BKによる細胞内Ca^{2+}濃度上昇はBAPTA処理細胞で抑制された．また、NG108-15細胞と筋細胞を同時培養しBAPTAを導入後、微小終盤電位(MEPPs)を測定することによりアセチルコリン(Ach)の分泌をみた．BAPTA処理細胞では初期Achの分泌は抑制されたが、後期の分泌は観察された．これらの結果は、NG108-15細胞におけるBKの刺激は主にIP_3依存的Ca^{2+}感受性反応と非感受性反応を生ずることを示す．

目的

NG108-15細胞のBK受容体は、刺激後ホスホリパーゼC(PLC)とカップルし、そのエフェクター酵素はホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸(PIP_2)よりIP_3とジアシルグリセロール(DG)を産生する．IP_3は細胞内のCa^{2+}濃度を上昇させCa^{2+}依存性K^+チャンネルを開き、DGはプロテインキナーゼCを活性化しL型チャンネルを閉じる(1)．また、NG108-15細胞はAchを分泌し、それはリン脂質代謝産物セカンドメッセンジャーによって促進される(2)．今回、細胞内Ca^{2+}キレート剤(BAPTA)(3)を細胞内に取り込ませることでBK受容体からのIP_3依存的Ca^{2+}をセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達経路を再検討してみた．

方法

1．NG108-15細胞は既報のとうり培養した(2)．

2．BAPTAのNG108-15細胞への導入は10μM BAPTA-acetoxy methyl ester(BAPTA-AM)を37℃で60分間置くことで行った(3)．

3．IP_3測定は[^{3}H]IP_3アッセイキッドによった(4)．

4．細胞内Ca^{2+}濃度はfura-2の蛍光強度より測定した(5)．

5．Achの分泌はNG108-15細胞と培養ラット筋細胞を同時培養し、筋細胞ニコチン性Ach受容体刺激の結果生ずる脱分極性シナプス電位(MEPPs)を測定することにより推測した．

結果

BK受容体刺激によるIP_3産生は、コントロール細胞とBAPTA処理細胞において同程度で、刺激後約１０秒でピークに達し３０－６０秒で刺激前に戻った(Fig 1)．

刺激前の細胞内Ca^{2+}濃度は、コントロール細胞で84±11nM(n=6)、BAPTA処理細胞において73±5 nM(n=6)であった．刺激後、ピークの濃度はコントロールの細胞で194±29 nM(n=6)、BAPTA処理細胞で88±7 nM(n=6)と減少した(Fig 2)．

Achの分泌に関してFig 3で示すように、MEPPs頻度はコントロールの細胞において刺激後２０秒程度（初期）でピークに達するが、BAPTA処理後の細胞ではその期間ピークを認めず、むしろ刺激後４０－５０秒（後期）でピークに達

する結果を得た．Fig 4はその平均を示す．

考察

これらの結果は、Ca^{2+}キレート剤を細胞内に導入することによりBK受容体以降のシグナル伝達をCa^{2+}感受性経路と非感受性経路に分離できたことを示す．またPIP_2を分解するをPLCは、細胞外のCa^{2+}に影響されないこと(6)と考えあわせて、NG108-15細胞のPLCはCa^{2+}非依存性と推定できる．

現在、BAPTA処理時のCa^{2+}依存性K^+チャンネルとMチャンネルへの影響について検討中である．

文献

1. Higashida, H. and Brown, D.A. (1986) Nature 323, 333-335

2. Higasnida, H. (1988) J. Physiol. 397, 209-222

3. Tsien, R.Y. (1980) Biochem. 19, 2396-2404

4. Fu, T. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 157, 1429-1435

5. Ogura, A. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 3577-3584

6. Yano, K. et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10201-10207

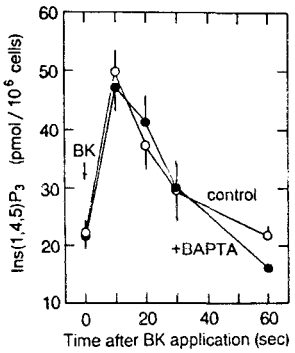


Fig. 1. Time course of BK-induced formation of $Ins(1,4,5)P_3$ in control or BAPTA-AM-treated NG108-15 cells.

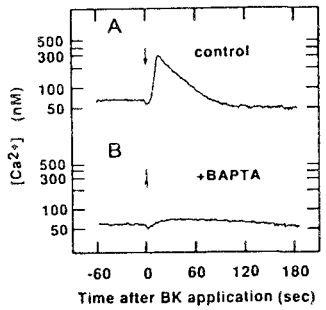


Fig. 2. Microfluorometrical recording from two fura-2-AM-loaded NG108-15 cells to examine effects of BAPTA on the BK-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$.

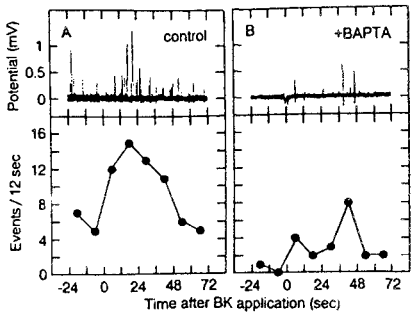


Fig. 3. Typical time course of ACh release evoked by BK in two control and BAPTA-AM-treated NG108-15-myotube cell pairs.

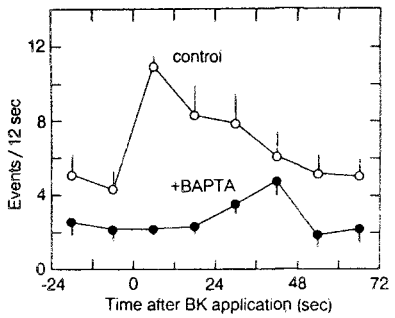


Fig. 4. Frequency plots of mean synaptic responses of hybrid-myotube pairs challenged by BK in 9 control (○) and 7 BAPTA-AM-treated (●) cultures. Values are mean ± SEM.

198 Ca^{2+}/Calmodulin- dependant Protein Kinase V from Rat Cerebrum : 精製と組織分布

杉田竜太郎、望月秀雄、伊藤直史、日高弘義 （名大・医・薬理）

〔要約〕

我々は、ラット大脳から新しいカルシウム／カルモデュリン依存性プロテインキナ-ゼVを精製し、その酵素学的性質及び組織分布について検討した。この酵素は、分子量41kDaのモノマー蛋白質であり、その活性はカルシウム／カルモデュリンに依存している。部分アミノ酸シークエンスを決定した結果、既知の蛋白質に同じアミノ酸配列はなく、新しい酵素であることが判明した。また、大脳の可溶性画分にある多種の蛋白質をリン酸化することから、大脳において多くの機能に関与している可能性が示唆された。組織分布については、モルモットを用いて作成した抗ペプチド抗体により、ラットの種々の臓器での酵素の存在を調べたところ、多くの臓器にこの酵素が存在していることが判明した。

（方法）

精製

ラット大脳の可溶性画分から得た40%硫酸アンモニウム分画をもちいて、これをSepharose CL-4B、DEAE-Sepharose、Calmodulin-Sepharose、Hydroxylapatiteの各カラムにかけたのち、TSK gel G3000SWをもちいたHPLCシステムにより酵素を精製した。酵素活性は、合成ペプチドであるsyntide-2のリン酸化反応により測定した。

アミノ酸シークエンス

Hydroxylapatite カラムで得られた酵素画分をSDS-PAGEで分離し41kDaのバンドを切り出した。ゲルから酵素を抽出し、エンドペプチダーゼにて処理し、C18 reverse-phase columnを用いたHPLCシステムによりペプチドを分離した。アミノ酸配列はBiosystems 473A Protein Sequencerにより測定した。

組織分布

決定された部分アミノ酸シークエンスより、アミノ酸14残基のペプチドを合成し、これをモルモットに免疫し、その抗血清を精製してポリクローナル抗体を作成した。ラット各臓器の可溶性画分を用いて、immunoblotting法にて各臓器における酵素の分布を調べた。

（結果及び考察）

精製結果は、Table 1 のごとくである。得られた酵素標品を用いてSDS-PAGEをおこなったところ41kDaのsingle band をしめした(Fig 1)。そのストークス半径及び沈降定数より算出した分子量は 37kDaであり、この酵素はモノマー蛋白質であることが判明した。酵素活性には、カルシウム／カルモジュリンを必要とした。ラット大脳の可溶性画分を熱処理し、この酵素とともに incubationし、蛋白質のリン酸化をAutoradiogramにて調べてみたところ(Fig 2)、多くの蛋白質がリン酸化された。従って、この酵素がCaM Kinase IIと同様な多機能性蛋白質リン酸化酵素であることが示唆された。また、得られた部分アミノ酸シークエンス（Table 2）をNBRF-PDB, SWISS-PROT data baseにより検索したが、同じ配列をもつ蛋白質は無く、CaM Kinase V が新しい酵素であることが 判明した。
組織分布については、ラットの種々の臓器の可溶性画分を用いて、immunoblotを行なった結果、この酵素は、大脳だけではなく、小脳、脳幹、下垂体、肺、副腎、肝臓、卵巣、胃、大腸、心臓、脾臓等においても確認され、しかも、すべての臓器において分子量は同じであった。

(文献)
1. Mochizuki. H Ito. T Hidaka. H (1993) J. Biol. Chem. 268, 9143-9147

Table 1

Summary of Purification of CaM Kinase V from 24 rat cerebrum

Purification step	Protein	Total activity	Specific activity	Purification	Yield
	mg	nmol/min	nmol/min/mg	-fold	%
Sepharose CL-4B	85.9	2310	26.9	1	100
DEAE-Sepharose	37.9	1080	28.5	1.06	46.8
CaM-Sepharose	0.984	697	708	26.3	30.2
Hydroxylapatite	0.280	639	2280	84.8	27.7
TSK gel G3000SW	0.0228	278	12200	454	12.0

Table 2

Partial amino acid sequence of CaM kinase V

Peptide	Sequence
L1	AEYEFDVXY
L2	IMISXFGLSK
L3	NIHQSVSEQIK
L4	QAEDIRDIYDFRDVLGTGAFSEVILT

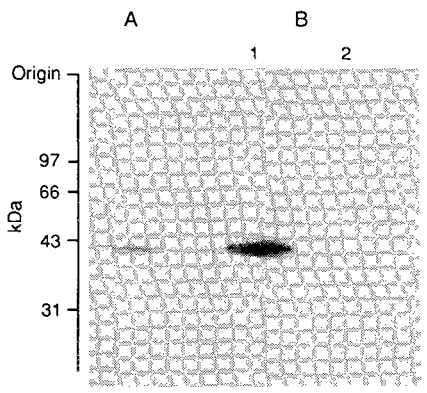


Fig.1 精製したCaM kinase VのSDS-PAGE
A.銀染 B. [γ-P^{32}]ATPをもちいてCa^{2+}存在下(lane 1)、非存在下(lane 2)にautophosphorylationさせ、SDS-PAGE後autoradiogramを行った。

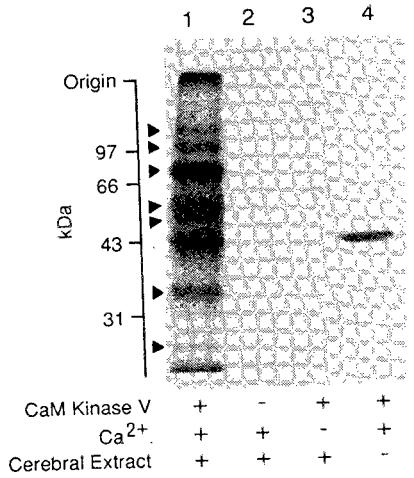


Fig.2 CaM kinase V によるラット大脳蛋白質のリン酸化
heat-treated rat cerebral extracts を、種々の条件下にて[γ-P^{32}]ATPとともにincubationしSDS-PAGE後autoradiogramを行った。

199 Nitric oxide合成酵素基質(L-Arginine)および阻害剤(LNAME, LNMMA)の脳内局所潅流による脳内アミノ酸レベルの変化

太田晃一、福内靖男、島津邦男、小松本 悟、一條真琴、荒木信夫、柴田 護
(慶應義塾大学医学部 神経内科)

〔要約〕 Nitric oxide合成酵素(NOS)の基質であるL-ArginineとNOS阻害剤であるLNAME·LNMMAを、in vivo microdialysis法によりラット線条体内に局所投与することにより、これらの薬剤が脳内アミノ酸動態にどのような変化をもたらすかを検討した。L-Arginine 4~320 μMの潅流によっても線条体のCitrulline放出に有意な変化を認めず、L-Arginineがin vivoでNOSに対して飽和状態にある可能性が示された。LNAME (1 mM)により線条体のCitrulline産生の減少とArginineの増加が観察され、神経組織のArginineとCitrullineのレベルがNOS活性により影響されることが明かとなった。これに対してLNMMA (1mM)ではCitrullineが上昇し、LNMMAをCitrullineに代謝する酵素活性が線条体組織に存在することが示唆された。また、これらのNOS阻害剤によりGlutamateの低下傾向、GABAの増加が観察され、脳内アミノ酸動態に及ぼす多様な作用が注目された。

【目的】Nitric oxide (NO)は中枢神経系でもその産生が証明され、内皮細胞由来血管弛緩因子としての脳血流調節機能の他に、神経伝達物質としての役割も注目されている。Nitric oxide合成酵素(NOS)活性は神経細胞やグリア細胞にも存在することが明かとなり、培養神経細胞のNOS活性を、基質であるL-Arginineのuptakeと、NOのco-productであるL-Citrullineの放出で評価する試みがin vitroでなされている[3]。本研究ではこれをmicrodialysisによりin vivoに応用し、L-Arginine並びにNOS阻害剤であるLNMMAとLNAMEの脳内局所潅流により、これらの薬剤が脳内アミノ酸動態にどのような変化をもたらすかを検討した。

【実験方法】(1)Sprague-Dawley ラットを対象とし、pentobarbital 40 mg/kgの腹腔内投与により全身麻酔した。体温は37.5℃に維持した。(2)ラット頭部を脳定位固定装置に固定し、前頭部の小開頭孔から直管型microdialysisプローブ(BDP-I-8-3、エイコム)をマイクロマニピュレータを用いて刺入して線条体に設置した。プローブをRinger液で潅流し(2μl/分)、プローブ刺入後2時間から、20分毎に潅流液をポリエチレンチューブに回収した。(3)対象を次の3群に分け、各々、プローブの潅流液をRinger液から次のように変更して線条体をin vivoで局所潅流した。

a) L-Arginine 4, 8, 16, 32, 320 μMを含むRinger液、各々20分間 (n=8)。
b) N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester (LNAME) 1 mMを含むRinger液、60分間 (n=8)。
c) N^{G}-monomethyl-L-arginine (LNMMA) 1 mMを含むRinger液、60分間 (n=6)。

(4)回収した潅流液のアミノ酸をOPA誘導体化法によりHPLC/ECD(ECD-100、エイコム)で定量した。(5)各薬剤刺激による細胞外アミノ酸レベルの変化の統計学的に処理には、ANOVAおよびFisher PLSDを用いた。潅流液中のアミノ酸値はmean±SEMで表した。

【結果】(1)L-Arginineの潅流中および後に、線条体におけるCitrulline放出に有意な変化を認めなかった(図1)。(2)LNAME潅流開始直後から線条体のArginineレベルは有意な増加を示し、前値の22.5±2.2 pmol/fractionから、0~20分で既に32.8±3.5 pmol/fractionに達した($p<0.05$)(図2)。LNAME中止後にはArginineは速やかに減少し、100~120分には前値よりも低値となった(14.7±3.0 pmol/fraction、$p<0.05$)。Citrullineは6.4±0.7 pmol/fractionからLNAME潅流開始により漸減し、LNAME中止後も有意な低下を示した(3.9±0.6 pmol/fraction、100~120分、$p<0.05$)。一方、LNAME潅流によりGABAは1.2±0.5 pmol/fractionから3.3±1.4 pmol/fraction (40~60分) に増加傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。(3)LNMMA潅流開始直後から線条体のArginineレベルは増加傾向を示し、前値の25.0±2.0 pmol/fractionから、40~60分では38.1±6.5 pmol/fractionに達したが、統計学的には有意な増加ではなかった(図3)。LNMMA中止後にもArginineは同様のレベルを維持した。Citrullineは7.3±0.7 pmol/fractionであったのがLNMMA潅流開始により漸増し、潅流中止後にも有意な上昇を示した(18.6±5.3 pmol/fraction、100~120分、$p<0.05$)。一方、Glutamateは14.0±7.1 pmol/fractionから、LNMMA潅流開始40~60分には5.4±2.3 pmol/fractionへと低下傾向を示した。GABAは0.7±0.4 pmol/fractionからLNMMA潅流開始40~60分には2.6±0.8 pmol/fractionへと有意な増加を示したが($p<0.05$)、LNMMA中止後には前値に復した。

【考察】L-Arginineを線条体細胞外液中に投与してもCitrullineの上昇が明かでなかったことは、神経組織におけるL-Arginineがin vivoでNOSに対して飽和状態にある可能性があると考えられた。これは新鮮な血管内皮細胞内のL-Arginineレベルは充分高く、L-Arginineの細胞内取込みがNO合成に関して

rate limitingではないとするin vitroの報告に対応するものと考えられる[1]。

NOS阻害剤であるLNAME投与によりCitrulline放出の減少とArginineの増加が観察され、神経組織のArginineとCitrullineのレベルがNOS活性により影響されることが明かとなった。これに対して、LNMMAによりCitrullineが上昇したことは、腎臓[4]や大動脈内皮[2]で報告されているようなLNMMAをCitrullineに代謝する酵素活性が線条体組織にも存在することを示唆すると考えられた。これらのNOS阻害剤がArginineやCitrullineの脳内レベルに対して異なった効果をもたらすことが判ったが、一方でGlutamateやGABAのような興奮性および抑制性アミノ酸伝達物質の放出にも影響を与え得ることが示唆された。LNMMA、LNAMEを用いた様々な生理学的・薬理学的研究が報告されているが、その成績には相反するものも多く、本研究で示されたような脳内アミノ酸動態に及ぼす多様な作用にも注目する必要があると考えられた。

【文献】(1) Gold, M.E., Bush, P.A., and Ignarro, L.J. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 714-721 (2) Hecker, M., Mitchell J.A., Harris, H.J., Katsura, M., Thiemermann, C., and Vane, J.R. (1990) *Biochem. Biophys. Res.Commun.* 167, 1037-1043 (3) Kiedrowski, L., Costa, E., and Wroblewski, J.T. (1992) *J. Neurochem.* 58, 335-341 (4) Ogawa, T., Kimoto, M., and Sasaoka, K. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10205-10209

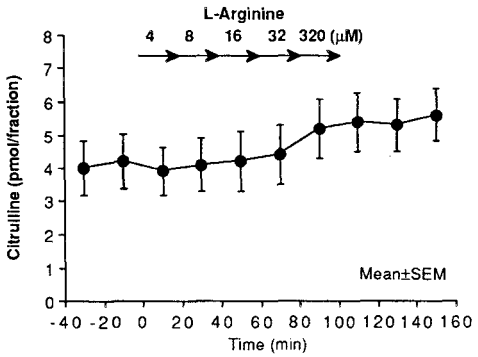


図1. L-Arginine（4~320 μM）灌流による線条体Citrullineレベルの変化

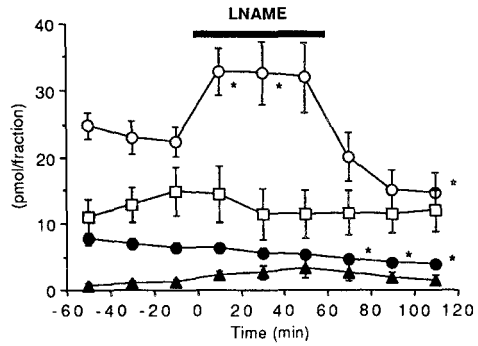


図2. LNAME（1 mM）灌流による線条体アミノ酸レベルの変化

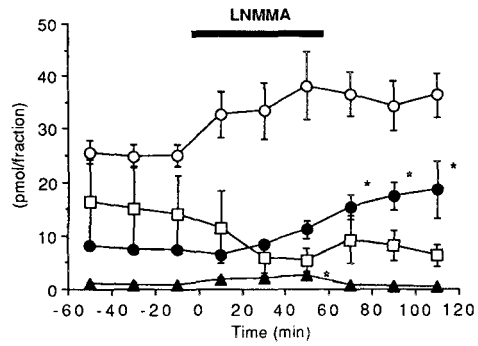


図3. LNMMA（1 mM）灌流による線条体アミノ酸レベルの変化

200 Dopamine(DA)遊離を制御するDA自己受容体機能に及ぼすN-ethylmaleimideとforskolinの影響

山田茂人，横尾秀康，高木俊博，西　彰五郎
久留米大学医学部脳疾患研究所，薬理学講座

〔要約〕ラット線条体スライスからのdopamine(DA)遊離に対するN-ethylmaleimide(NEM)及びforskolinの影響について検討した．NEMは3 μMより濃度依存性に自発遊離及び刺激誘発性DA遊離を増強した．NEMによる自発DA遊離の増加はtetrodotoxin(TTX)により影響を受けないが，刺激誘発性DA遊離の増強はTTXにより消失した．またDA agonist (B-HT920)の潅流で認められる刺激誘発性DA遊離の抑制はNEMの存在下で減弱し，DA antagonist (sulpiride)の潅流で認められる刺激誘発性DA遊離の増強もNEM存在下に消失した．一方forskolinは1 μMより自発DA遊離を，3 μMより刺激誘発性DA遊離を増強するが，刺激誘発性DA遊離に対するB-HT920の抑制作用やforskolinの増強作用に対して影響を及ぼさなかった．すなわちDA遊離作用の制御に関与するDA自己受容体はNEM感受性であり，forskolin非感受性であった．これらの結果はalpha-2受容体と同じくDA自己受容体に抑制性GTP蛋白が共役しておりNEMにより不活化された事を示唆している．

Dopamine (DA)-D2受容体の活性化によりadenylate cyclase活性の抑制やDA神経終末からの刺激誘発性DA遊離の抑制が認められる．D2受容体活性化によるadenylate cyclaseの抑制は抑制性G蛋白が関与していると考えられているが，D2自己受容体に共役している抑制性G蛋白がDA遊離の制御に関与しているか否かについては明らかになっていない．Sulphydyl alkylating agentであるN-ethylmaleimide (NEM)はalpha-2adrenoceptorに共役している抑制性G蛋白を不活化しalpha-2 agonistであるclonidineによるnoradrenaline遊離抑制作用を減弱すると報告されている(Allgaier et al,1986)．そこでD2自己受容体を介するDA遊離の制御にGi蛋白が関与するか否かについて検討するために，ラット線条体スライスからの刺激誘発性DA遊離に対するDA agonist及びDA antagonistの効果がNEMでどう変化するかについて検討した．

［方法］Wistar系雄性ラット(200-250g)を用いた．ラットは断頭後速やかに脳をとりだし氷冷クレブス液中に前額断スライス〔厚さ0.3mm)を作成しその線条体部分を直径4mmの円形に切りだし潅流槽に封入して酸素飽和したクレブス液で持続潅流した．潅流開始50分目と８０分目に潅流槽に設置した電極より20 mA、1 Hz, 2 msecの電気刺激を２分間行い，それぞれの刺激前後７分間の流出液を分取しHPLCにてDAの測定を行った．一回目の刺激の７分後より種々の濃度の薬物を含むクレブス液を潅流した．刺激直前のDA量を基礎遊離量とし，刺激後のDA量から差し引いた値を刺激誘発性DA遊離量とした．
それぞれの薬物の影響は２回目の刺激誘発性DA遊離量から一回目のそれで割った値S2/S1比で表示した．
有意差の検定にはANOVA及びScheffe testを用いた．

［結果］１．DA遊離に及ぼすNEM, forskolinの影響：表１に示すように３μM以上のNEMの潅流によりDA遊離は基礎遊離，刺激誘発性遊離共に濃度依存性の増加が認められた．NEMによる基礎遊離の増加はTTX存在下でも認められたが，刺激誘発性DA遊離はTTXにより完全に消失した．またforskolinは1 μMより自発遊離を，２μMより刺激誘発性遊離を増強した．
２．B-HT920のDA遊離抑制作用とsulprideのDA遊離増強作用に対するNEMの影響：図１に示すように１μMのB-HT920は刺激誘発性DA遊離を50%抑制するが，10 μMのNEM存在下ではこの抑制が13%に留まりB-HT920のDA遊離抑制作用がNEMにより減弱する結果であった．一方sulpiride (1 μM)は刺激誘発性DA遊離を87%増強するがNEM(10 μM)存在下ではこの増加が１５%に留まり，sulprideによるDA遊離増強作用がNEMにより減弱する結果となった．
３．B-HT920, sulprideによる刺激誘発性DA遊離の変化に対するforskolinの影響：図２に示すようにB-HT920のDA遊離抑制作用はforskolin (2 μM, 5 μM)により変化を受けず，またsulprideのDA遊離増強作用もforskolinの影響を受けなかった．

表１　DA 遊離に及ぼすNEM, forskolinの影響

Drugs	conc.(uM)	n	spont. DA release (%)	evoked DA release (%)
NEM	0	12	100	100
	1	6	105±4	110±4
	3	14	133±6*	121±5*
	10	14	215±8**	145±6**
forskolin	1	8	136±7*	112±4
	2	8	164±5**	124±4*
	4	8	210±11**	145±5**

mean % ± SEM, * P<0.05,**P<0.01

［考察］中枢のDA神経終末からのDA遊離は終末部におけるDA自己受容体，opioid受容体，ACh受容体等によって制御されている.特にDA自己受容体の機能については刺激誘発性 DA遊離を指標としてDA agonist やDA antagonist の影響が検討され，DA自己受容体の活性化は刺激誘発性 DA遊離を強く抑制することが知られている(Yamada et al ,1991)．今回の実験においても刺激誘発性DA遊離をDA agonistであるB-HT920が抑制し，DA antagonistである sulprideが増強しており，本実験系が DA自己受容体の機能を良く反映することを示唆している．DA自己受容体の活性化によるDA 遊離の抑制作用は抑制性GTP結合蛋白の活性化に引き続くK+ channel conductanceの増加による細胞膜の過分極が原因と考えられるが(Lacy et al,1988),その機序に関する生化学的な証明はすくない．抑制性G蛋白の不活化には通常百日咳毒素が用いられるが，作用発現までに数時間かかることから急性の灌流実験には使用が難い。NEMはalpha-2adrenoceptor に共役する抑制性GTP 蛋白を急性に不活化し noradrenaline (NA) agonistであるclonidineによるNA遊離の抑制作用を減弱すると報告されている，今回の結果でNEMがTTX感受性の刺激誘発性DA遊離を増強し，DA遊離に対するB-HT 920抑制作用やsulprideの増強作用を抑制したことは，NEMがalpha-2受容体ばかりでなく，DA 自己受容体に共役する抑制性GTP蛋白も不活化することを示唆している．またNEM がκ受容体 agonistであるdynorphinによるDA 遊離の抑制作用も減弱する事から(未発表data),NEMによるG蛋白不活化は伝達物質の種類に関しては非特異的であるように思われる. NEMにはDA transporter に対する特異的結合が報告されており，NEM によるDA自発遊離増強作用はNEMによる DA uptake 阻害による可能性がある.一方，B-HT920や sulprideの刺激誘発性DA遊離に対する抑制及び増強作用に forskolin は影響を与えないことから，DA自己受容体を介するDA遊離の制御にはadenylate cyclase系の関与は少ないと考えられる.

Allgaier C. et al, Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 333, 104-109, 1986
Lacy M.G. et al, Pharmacology and functional regulation of dopaminergic neuron (ed. by P.M.Beart et al.) Macmillan Press, London PP152-160, 1988
Yamada et al, Eur.J.Pharmacol. 205,43-47, 1991

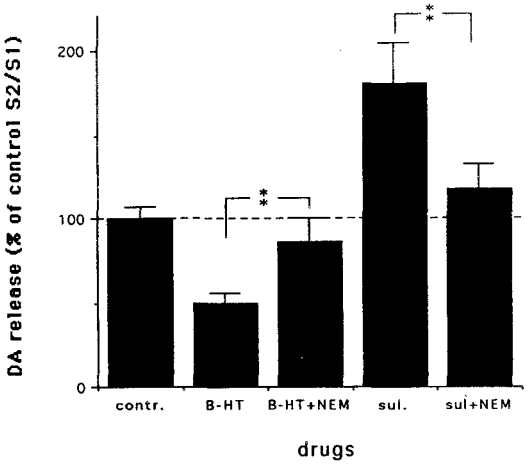


図1

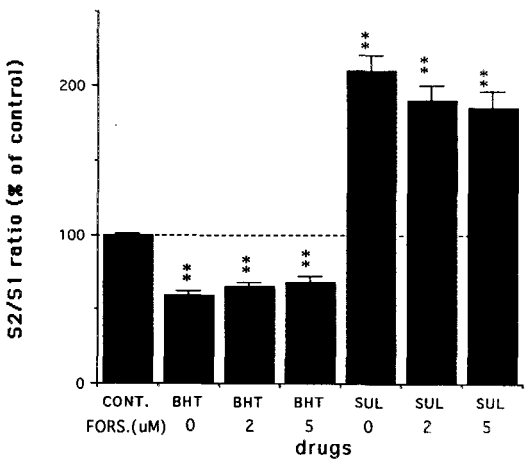


図2

201 cAMP 依存性プロテインキナーゼの Ganglioside による活性化反応

荒金　太[1)2)]、福永浩司[1)]、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）

〔要約〕

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、ガングリオシドの効果を調べた。1) cAMP 依存性プロテインキナーゼ（A-キナーゼ）のタイプⅡ活性に一致してガングリオシドによる活性化が認められた。2) この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解離させてキナーゼ活性を調べると、ガングリオシド依存性の活性は消失した。3) ガングリオシドは、A-キナーゼの触媒サブユニットの活性を阻害した。4) 今回用いた全てのガングリオシドの中で、シアル酸を多く持つガングリオシドに比べ、シアル酸が1個のみの GM1 が最も強い効果を持っていた。5) ガングリオシドによる活性化は、cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKItide) により阻害された。6) ガングリオシド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が見られた。7) GM1 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、ガングリオシドが、A-キナーゼのホロ酵素に対して cAMP とは異なる部位に結合し、特異的に活性化することが示唆された。

〔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。また、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、最近は、膜において細胞の分化や増殖に重要な役割を担っていることが注目されており、A-キナーゼの触媒サブユニット (1) やカルシウムカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ (2) をはじめとする多くのキナーゼの活性を調節していることが報告されている。今回、我々は、ガングリオシドのA-キナーゼのホロ酵素に対する活性化について検討した。

〔実験方法〕

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-セルロースカラムに展開させ、NaCl 濃度勾配（50 mM から 400 mM）で溶出した。各分画のA-キナーゼの活性を測定し、その活性分画を 50 % 飽和の硫安分画で沈降させた。この沈殿を小量の緩衝液で溶解し、セファクリル S-300 カラムにてゲルろ過した。この活性分画を透析、濃縮したものを、部分精製したA-キナーゼとして用いた。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 濃度勾配で溶出した。各分画のA-キナーゼの活性を測定すると、0.24 M NaCl 濃度付近に cAMP 依存性にA-キナーゼ タイプⅡの活性ピークに一致して、ガングリオシド依存性活性ピークを認めた。A-キナーゼのホロ酵素は、cAMP 非存在下において調節サブユニットの2量体に、2つの触媒サブユニットが結合しており、不活性な状態になって

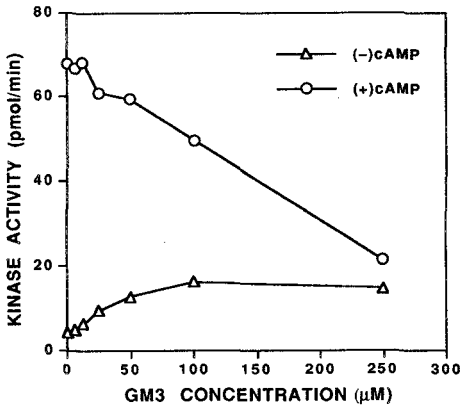


図1　GM3 濃度依存性と cAMP の効果

いる。しかし、cAMP がこれに結合すると、サブユニットの解離が起こり活性化される。そこで、可溶化上清分画をあらかじめ cAMP とインキュベイトし、A-キナーゼを解離させた後、cAMP で飽和したカラムに展開し、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、ガングリオシド依存性活性のピークも 0.24 M NaCl 付近から完全に消失した。また、触媒サブユニットの活性は、ガングリオシドにより阻害された。これらのことからガングリオシドは、cAMP の非存在下において、ホロ酵素のA-キナーゼを活性化すること、解離した触媒サブユニットの活性を阻害することが示唆された。

ガングリオシドは、オリゴ糖を含む脂質分子で、多くの細胞に分布し、特に、神経細胞に多く含まれている。その分子中には、シアル酸を含み、負の電化を持っている。調べた全てのガングリオシドがA-キナーゼを活性化し、特に、複数のシアル酸をその分子内に持つ GT1b や GD1b に比して、シアル酸が、1 個のみ持つ GM1 が最も強い効果を持って活性化した。ガングリオシドを酵素的に処理し、オリゴ糖とセラミドに分解すると、それぞれは、A-キナーゼを活性化しなかった。さらに、単純な糖脂質であるグルコセレブロシッドもA-キナーゼを活性化しなかった。このことから、A-キナーゼの活性化において、オリゴ糖とセラミドの結合したガングリオシドの構造が重要であると示唆された。

このガングリオシドによるA-キナーゼの活性化には、濃度依存性が見られた。また、ガングリオシドは、cAMP により活性化されたA-キナーゼの活性を阻害した（図1）。

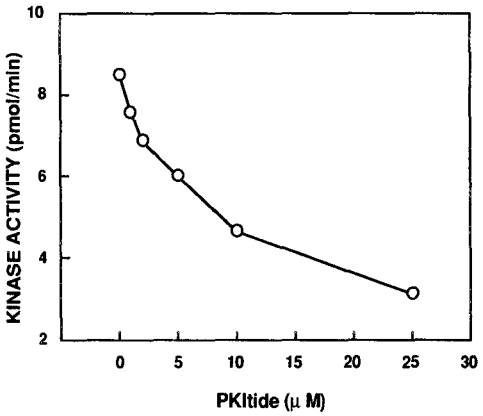


図2　GM1 依存性活性に対する PKItide の効果

	Concentration (μM)	Binding activity (cpm)
none		5057.1 ±262.7
cAMP	1	520.9 ± 68.9
	10	341.4 ± 45.1
GM1	5	4104.2 ±132.3
	100	4325.0 ±446.4

図3　cAMP のA-キナーゼの結合に対する GM1 の効果

ガングリオシド依存性のA-キナーゼ活性は、A-キナーゼの特異的阻害剤である PKItide により阻害された（図2）。これにより、ガングリオシドがA-キナーゼを特異的に活性化していると考えられた。ガングリオシド依存性のA-キナーゼ活性の基質特異性を調べると、MAP2、シナプシンⅠ、ミエリン塩基性蛋白質は、リン酸化された。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、A-キナーゼでよくリン酸化されるにも関わらず、ガングリオシドによるA-キナーゼ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、cAMP とガングリオシドを用いたときの基質特異性に差がみられた。

ガングリオシドの活性化反応を解明するため、[^{3}H]cAMP を用いて実験を行った（図3）。cAMP は、調節サブユニットに結合することにより、触媒サブユニットとの解離を起こし、A-キナーゼを活性化する。しかし、ガングリオシドは、調節サブユニットと cAMP の結合を阻害しなかった。

これらの結果から、ガングリオシドが、A-キナーゼのホロ酵素を特異的に活性化することが明らかになった。ガングリオシドによるA-キナーゼの活性化において基質特異性に違いが見られた。また、cAMP 結合実験の結果から、ガングリオシドが 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) Yates A. J., Walter D. J., Wood L. C., and Johnson D. J. (1989) *J. Neurochem.* **53**, 162-167.
2) Fukunaga K., Miyamoto E., and Soderling T. R. (1990) *J. Neurochem.* **54**, 1229-1234.

202 淡蒼球内GABA作働性神経におけるGABA放出調節機構：マイクロダイアリーシス法による解析

橋本恒一、栗山欣彌
（京都府立医大・薬理）

〔要約〕ラット淡蒼球内γ－アミノ酪酸(GABA)作働性神経からのGABA放出調節機構について、in vivoマイクロダイアリーシス法によるKCl誘発性のGABA放出を指標として検討を加えた。淡蒼球よりのGABA放出は、ニューロンへのGABA取り込み阻害剤とされるニペコチン酸(0.5mM)の添加により上昇した。さらに適応したKClの用量に依存してGABA放出が高まり、50mM KClで基礎放出量の195% 100mM KClで500%に達した。$GABA_A$受容体作働薬のムシモールは、100mM KCl 誘発性のGABA放出を有意に抑制した。このムシモールによるGABA放出の抑制作用は、$GABA_A$受容体拮抗薬のビククリンの同時添加により有意に拮抗された。しかしながら、$GABA_B$受容体作働薬のバクロフェンおよびムスカリン受容体作働薬カルバコールは、100mM KCl 誘発性の GABA の放出に影響を及ぼさなかった。 さらに他の $GABA_B$ 受容体作働薬である3-aminopropylphosphonous acid (APPA) の添加によっても、KCl (50mM,100mM) 誘発性のGABA放出は変化しなかった。また、$GABA_B$ 受容体拮抗薬 CGP 54626Aの添加によっても、50mM KCl誘発性のGABA放出は変化を受けなかった。以上の結果より、淡蒼球内GABA作働性神経からのGABA放出は、$GABA_A$受容体により抑制的な調節を受けていると考えられる。

［目的］GABAは中枢神経系において主要な抑制性神経伝達物質として作用している。一方、神経終末からの神経伝達物質の放出は、神経終末に存在するオートレセプターとヘテロレセプターにより調節を受けていると考えられている。本研究においては、淡蒼球内GABA作働性神経からのGABA放出の調節機構を明らかにする目的で、in vivo マイクロダイアリーシス法を用いてKCl刺激に伴なう内因性GABAの放出を測定する事により、2種類のGABA受容体のうちいづれの受容体が淡蒼球におけるGABA放出機構に関与しているかを検討した。

［方法］Wistar系雄性ラット（体重：300-350g）を用い、ハロセン／笑気ガス麻酔下に脳固定装置を用いて固定した後、脳図譜に従って淡蒼球の位置にマイクロダイアリーシス用プルーベ（BAS社製CMA10）を挿入した。2μl／minの速度でリンゲル液を還流し、還流開始2時間目からサンプリングを開始し、20分間隔でリンゲル液を回収した。回収したリンゲル液を蛍光検出器を装着したHPLCに直接注入し、還流液中のGABA含量を定量した。薬物の影響の検討は、サンプリング開始１時間目から20分間高KClを含むリンゲル液を流し、さらに薬物を含むリンゲル液を1時間流した後に2度目のKCl刺激を行ない、2度目の刺激で誘発されたGABAの量(S2)／1度目の刺激で誘発されたGABAの量(S1)の比を算出する事により行なった。

［結果］還流液中に回収されるGABAの量は、GABA取り込み阻害剤であるニペコチン酸(0.5mM)の添加により上昇した。また還流液中のKClの濃度を増加させていくと、KClの濃度に依存してGABA放出が高まり、基礎放出量に比較して50mM KCl で195%, 100mM KCl で500%の上昇が認められた(Fig 1)。$GABA_A$受容体作働薬であるムシモールの添加は、100mM KCl 誘発性の GABA放出を有意に抑制したが、$GABA_B$受容体作働薬バクロフェンおよびムスカリン受容体作働薬のカルバコールは、100mM KCl 誘発性の GABA 放出に影響を及ぼさなかった(Fig 2)。ムシモールによる淡蒼球よりの GABA 放出抑制は、$GABA_A$ 受容体拮抗薬のビククリンの同時添加により有意な回復を示した (Fig 3)。50mM および 100mM KCl 刺激に伴なう GABA 放出に対して、他の $GABA_B$ 受容体作働薬である APPA の添加も著明な変化を与えなかった(Fig 4)。さらに$GABA_B$受容体拮抗薬であるCGP 54626Aの添加によっても50mM KCl誘発性の淡蒼球よりのGABA放出は変化を受けなかった。

［考察］淡蒼球におけるGABA作働性神経からのGABA放出調節機構について、in vivo マイクロダイアリーシス法を用いてKCl誘発性の内因性GABA放出を指標として検討を行なった。淡蒼球よりのGABA放出は、還流液中にGABA取り込み阻害剤であるニペコチン酸を添加すると基礎放出量の約2.2倍に上昇し、ニペコチン酸の還流を停止すると基礎値へ回復した。KClによる刺激反応性放出について検討したところ、添加し

たKClの濃度に依存してGABA放出の増加が認められた。このようにin vivo マイクロダイアリーシス法を用いてもKCl刺激に伴なうGABAの細胞外への放出が認められたことより、この実験系を用いてGABA受容体作働薬の影響を検討した。GABA$_A$受容体作働薬のムシモールは、100mM KCl 刺激に伴なうGABA放出を有意に抑制し、このムシモールによる抑制作用はGABA$_A$受容体拮抗薬のビククリンの同時添加により有意な回復を示した。GABA作働性神経からのGABAの放出に関しては、線条体切片におけるGABA$_A$受容体作働薬のムシモールによる抑制(1)やδ－アミノレブリン酸による抑制(2)が報告されている。一方、GABA作働性神経におけるGABA$_B$受容体を介したGABA放出の抑制に関しては、大脳皮質シナプトソーム(3)、尾状核のスライス(4)、正中隆起シナプトソーム(5)においてバクロフェンが[^{3}H]GABAの放出を抑制することが報告されているが、この抑制は 15mM KCl などの低い刺激下において検出されている。 本研究においては、100mM KCl 誘発性 GABA放出に対して、バクロフェンの影響をみたが、有意な放出抑制がみられなかったことから、還流液中のKClの濃度を低下させ低刺激条件下におけるGABA放出に及ぼすAPPAの影響について検討したが、著明な影響は認められなかった。さらに放出された内因性のGABAによる影響を考えてGABA$_B$受容体拮抗薬CGP 54626A を用いて検討を行なったが、GABA放出に変化は認められなかった。以上の結果より、淡蒼球内GABA作働性神経からのGABA放出調節には、オートレセプターとしてGABA$_A$受容体が関与している可能性が考えられる。

［文献］

1. Kuriyama, K. et al. (1984) J. Neurochem. 42, 943-950.
2. Brennan, M. J. W. and Cantrill, R. C. (1979) Nature 280, 514-545.
3. Pittaluga, A. et al. (1987) Eur. J. Pharmacol. 144, 45-52.
4. Limberberg, N. et al. (1986) J. Neurochem. 46, 1109-1117.
5. Anderson, R. A. (1985) Eur. J. Pharmacol. 118, 355-358.

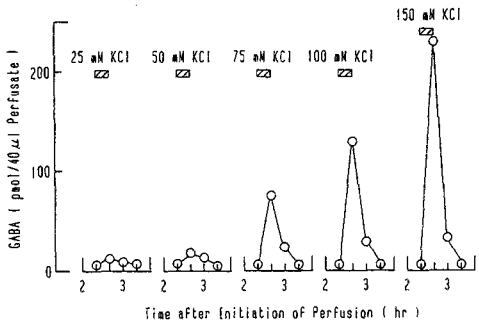


Fig.1 KCl-evoked GABA release from globus pallidus.

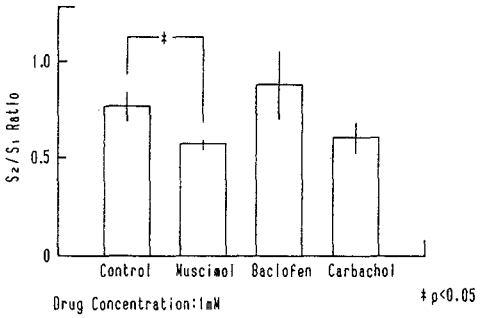


Fig.2 Effect of muscimol, baclofen and carbachol on KCl (100mM)-evoked GABA release from globus pallidus.

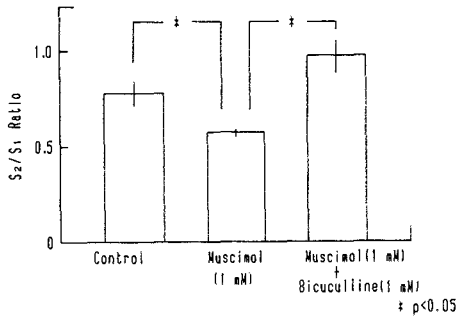


Fig.3 Effect of bicuculline on muscimol-induced supression of KCl (100mM)-evoked GABA release.

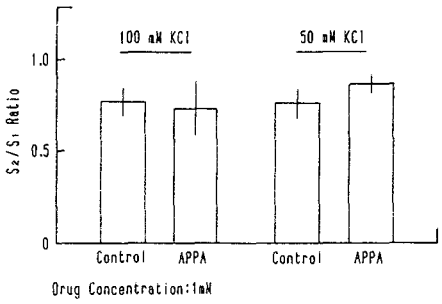


Fig.4 Effect of APPA on KCl-evoked GABA release from globus pallidus.

203 バルプロ酸によるモノアミン合成の調節

本橋伸高、斉藤浩、岡本泰昌、林輝男、山脇成人
広島大学医学部神経精神科

〔要約〕

sodium valproate（VPA）のマウス脳内モノアミン合成に与える影響を検討した。モノアミン合成は芳香族アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬NSD-1015投与後30分間のL-DOPAと5-HTPの蓄積量を電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーで測定した。VPAの急性投与により大脳皮質のL-DOPA蓄積量が減少した。同様の変化はmuscimol投与でも認められたが、baclofen投与では変化がなかった。またVPAによるL-DOPAの変化はbicucullineの併用投与により消失した。VPA投与により5-HTP蓄積量は変化を示さなかった。さらにVPAの慢性投与によりL-DOPAと5-HTP蓄積量は変化を示さなかった。以上の結果より、VPAは急性投与によりGABA$_A$受容体を介してマウス大脳皮質のカテコールアミンの合成を抑制する可能性が示された。

γ-アミノ酪酸（GABA）は哺乳類の中枢神経で最も重要な抑制性神経伝達物質の一つである。GABAは多くの神経伝達物質との相互作用が知られており、特にセロトニン（5-HT）系やノルアドレナリン（NA）系に対する効果が示されている（2,7）。

sodium valproate（VPA）はGABAの分解酵素を阻害することによりGABA作動薬として作用することが知られている。VPAは抗けいれん薬として広く用いられているが、近年感情障害に対する治療予防効果注目されており、気分安定薬として分類されている（5,6）。感情障害の成因としてはモノアミン仮説が有力であるので、VPAの急性および慢性投与のモノアミン合成に与える影響およびGABAとモノアミン合成との関連を検討した。

〔方法〕

1.実験動物：ICR系雄性マウス（20～30 g）を用いた。

2.薬物投与：急性投与実験ではsodium valproate（200または400 mg/kg）、muscimol hydrochloride（MUS、2 mg/kg）、baclofen（BAC、20 mg/kg）、(+)bicuculline（BIC、2 mg/kg）投与30分後にNSD-1015（100 mg/kg）を投与しその30分後に断頭し、脳を取り出し分割した後－80℃で保存した。対照群には生食を投与した。慢性投与実験ではVPAを0.25または0.5%含む水で4週間飼育し、NSD-1015投与30分後に断頭した。VPAの消費量はそれぞれ466および794 mg/kg/dayであった。

3.モノアミン合成能の測定：脳組織を0.1 mM EDTAを含む0.2 M PCAでホモゲナイズし、冷却放置後遠心分離し上清を取った。1 M酢酸NaでpHを約3に調整し、0.2μmのフィルターで濾過後電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーでL-DOPAと5-HTP濃度を測定した。カラムはエイコム社製EicompakMA-0DS4.6φ×150mm、移動相は15%メタノール、オクタンスルホン酸Na（230 mg/l）、EDTA（5 mg/l）を含む0.1Mクエン酸－酢酸Naバッファー（pH 2.5）、加電圧0.7 mV、流量1 ml/minとした。

4.統計学的検定：一元配置の分散分析に引続きDuncan多重比較検定を用いた。

〔結果〕

1.急性投与

VPAは大脳皮質のL-DOPA蓄積量を容量依存的に減少させた。MUS投与でもL-DOPAは減少したが、BAC投与では変化を示さなかった（Fig.1）。BIC単独投与はL-DOPA蓄積量に影響を与えなかったが、併用するとVPA（400 mg/kg）投与によるL-DOPA減少を元に戻した（Fig.2）。5-HTP蓄積量はいずれの薬物投与によっても影響を受けなかった（データ省略）。

2.慢性投与

VPA慢性投与によりL-DOPA、5-HTP蓄積量のいずれも有意の変化を示さなかった（Fig.3）。

〔考察〕

VPAは急性投与によりマウス大脳皮質のL-DOPA蓄積量を減少させた。NSD-1015は芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の阻害薬であることから、この結果はチロシン水酸化酵素（TH）の活性が低下したことを示している。$GABA_A$受容体に強く作用するMUS投与でも同様の結果が得られたが、$GABA_B$受容体の選択的作動薬BACでは変化がなかったこと、さらにはVPAと$GABA_A$受容体拮抗薬BICとの併用では変化が見られないことから、この変化は$GABA_A$受容体を介したものと考えられる。この結果はGABAによる中脳辺縁系ドーパミン神経系の抑制（3）と関係しているかもしれない。最近、線条体のスライスで$GABA_B$受容体を介するTH活性の抑制が報告されており、脳の部位差を考慮した検討がさらに必要と思われる（1）。

トリプトファン水酸化酵素活性を示すと考えられる5-HTP蓄積量はいずれの薬物投与によっても変化が見られなかった。GABAが5-HTを抑制するとの報告でも部位差を認めており、線条体や海馬と異なり前頭葉皮質では変化を示していない（7）。今回の実験でも同様の結果を示しており、他の部位での検討が必要と思われる。

VPAの慢性投与によってはL-DOPAおよび5-HTP蓄積量に有意の変化はなかった。VPAの慢性投与により$GABA_A$受容体に変化はないが$GABA_B$受容体の変化は報告されており（4,5）、急性投与で見られた変化がなくなったことと関連しているかもしれない。

結論として、VPAの急性投与により大脳皮質のカテコールアミンの合成は抑制され、この変化は$GABA_A$受容体を介している可能性が示唆された。

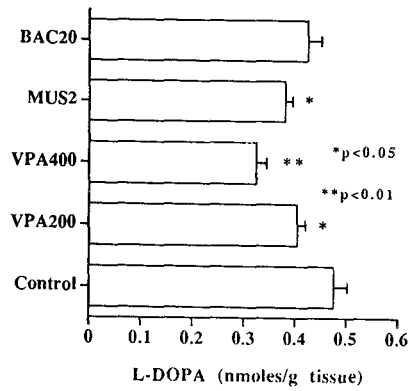


Fig.1 Changes in L-DOPA accumulation after acute treatment GABAergic drugs

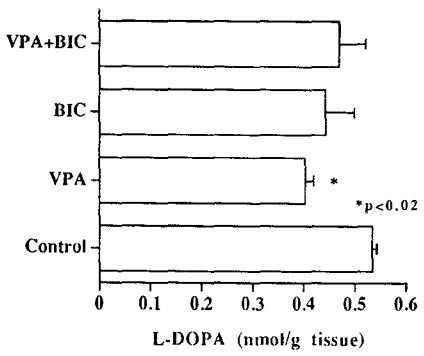


Fig. 2 Changes in L-DOPA after acute treatment with sodium valproate (VPA, 400 mg/kg) and bicuculline (BIC, 2 mg/kg)

〔文献〕

1.Arias-Montano, J.A., Martinez-Fong, D. and Aceves, J. (1991) Neuropharmacology 30: 1047-1051.

2.Dennis, T. et al. (1985) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 331: 225-234.

3.Fuxe, K. et al. (1975) Med. Biol. 53: 177-183.

4.Motohashi, N. (1992) Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 16: 571-579.

5.Motohashi, N., Shioe, K. and Kariya, T. (1992) Lithium 3: 7-14.

6.本橋伸高ほか (1993) 精神医学 35: 87-89.

7.Nishikawa, T. and Scatton, B. (1985) Brain Res. 331: 91-103.

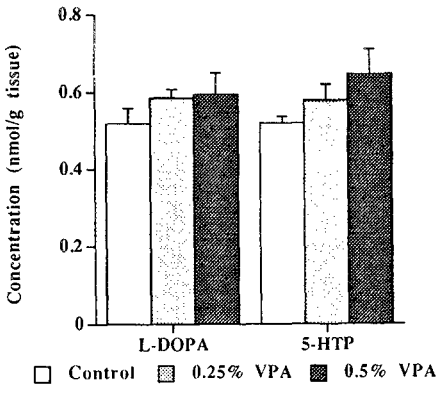


Fig 3. Changes in the synthesis of monoamines after chronic treeatment with sodium valproate (VPA)

204　ニューロキニンAに対する高感度酵素免疫測定法の開発：ラット感覚神経系におけるニューロキニンA様免疫活性の性質

猪股裕二、加藤武
（横浜市大大学院　総合理学　分子認識）

〔要約〕

ニューロキニンA特異的抗血清を作製し、簡便な高感度酵素免疫測定法（EIA)を開発した。この方法の最大感度は1pgでありラジオイムノアッセイ法に匹敵する。ラットの脊髄後根神経節と坐骨神経の抽出物をそれぞれ逆相カラムHPLCにより分離した後、ニューロキニンA様免疫活性(NKALI)をEIA法により定量したところ、どちらの部位でも前駆体は少なく、最終的な生理活性をもつニューロキニンAに変換された物質が主要な存在であることが明らかとなった。

これらの結果は、翻訳後の前駆体蛋白質のプロセシングが細胞体内あるいはそれに非常に近いオルガネラにおいて行われている可能性を示唆するものである。

ニューロキニンAはサブスタンスPと同じpreprotachykinin (PPT) I gene由来の神経ペプチドで、組織特異的なalternativeスプライシングによって合成されたβ−およびγ-PPTmRNAから生合成される。β-およびγ-PPTmRNAはニューロキニンAそのものの配列をC末端にもつニューロペプチドKとニューロペプチドγもそれぞれ特異的に発現している(5,6)。ニューロペプチドKからニューロキニンAへの変換が起こるという報告もあるが(1)、これらの生合成を調節していると思われるmRNAの翻訳後のPPT前駆体蛋白質のプロセシング機構は不明な点が多い。そこでこのプロセシング機構を解明する目的で、EIAを開発し、ラットの後根神経節と坐骨神経内のNKALIの性質を検討した。

【方法】　ニューロキニンA特異的抗血清はニューロキニンAにBSAを結合させた抗原を用いてウサギより作製し、EIAは以前私たちが開発したサブスタンスP様免疫活性測定法に従って行った(5)。ラットの後根神経節は腰部（L1～L5）から８個を取り出し、坐骨神経は圧搾破壊後二日目に細胞体側と末梢側に分けて切り出し、それぞれを２M酢酸で抽出した。抽出物は遠心分離後の上清のみを凍結乾燥して試料とした。逆相カラムHPLC分離は０.１％トリフルオロ酢酸存在下１５％から８０％アセトニトリルのリニアグラジエントにより溶出した。

【結果及び考察】　図１に示すようにこの方法の最大感度は1pgであった。これは従来のラジオイムノアッセイ法に匹敵する。他のタキキニン類との交叉性はニューロペプチドKと６０.７％、ニューロペプチドγと８９.９％、ニューロキニンBと１００％、サブスタンスPと０.３％であった。この方法を用いてラットの後根神経節と坐骨神経内のNKALIを逆相カラムHPLC分離後に測定したところ、図２、３、４に示すように化学合成されたニューロキニンAと同じ溶出位置に最も大きな活性が見られた。これらの活性の大きさはそれぞれのNKALI全体の約８０％に相当した。これらの結果は、翻訳後のPPT前駆体蛋白質のプロセシングが細胞体内あるいはそれに非常に近いオルガネラにおいて行われている可能性を示唆するものである。しかし私たちは神経ペプチド前駆体蛋白質のプロセシングに関与していると考えられているpeptidylglycine α−monooxygenase (PAM) とcarboxypeptidase H(CPH)が軸索内輸送されていることも明らかにしており(3,4)、このような矛盾した結果をもたらす原因については今後の検討課題にしていきたい。

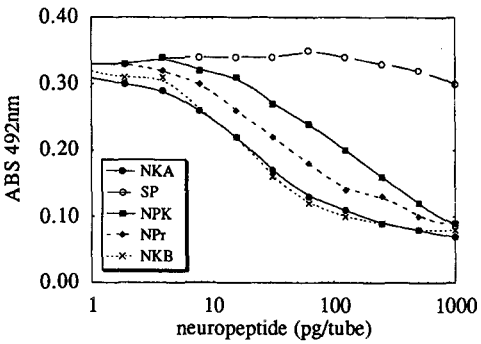


Fig.1 Cross-reactivity of anti-neurokinin A serum for neuropeptide tachykinin

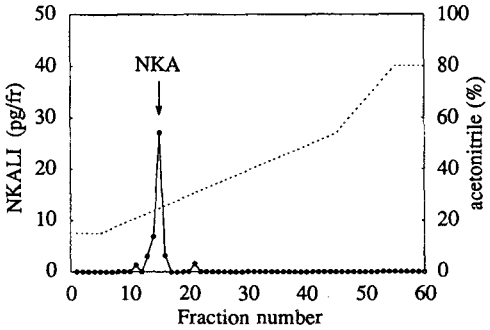


Fig.3 Combined HPLC/EIA analysis of NKALI in the distal segments of rat sciatic nerves

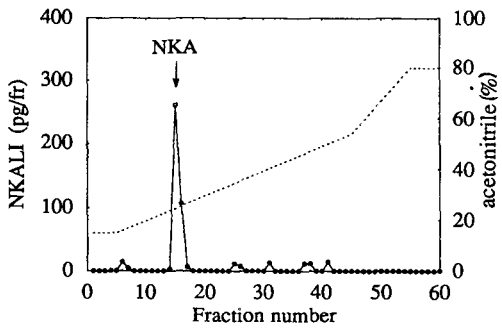


Fig.2 Combined HPLC/EIA analysis of NKALI in the proximal segments of rat sciatic nerves

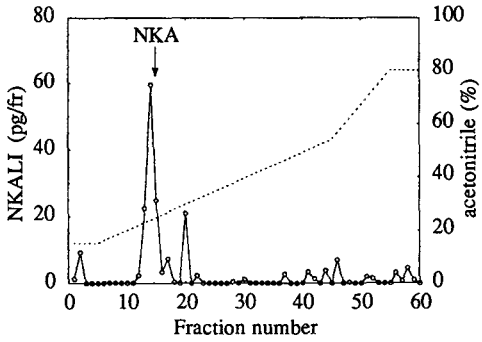


Fig.4 Combined HPLC/EIA analysis of NKALI in rat dorsal root ganglia

【文献】
(1) C.F. Deacon. et al. (1987) J. Neurochem. 48, 141-146.
(2) C.J. Dalsgaard. et al. (1985) Histochemistry. 83, 37-39.
(3) T.Kato. et al. (1987) Neurosci. Res. 4, 241-248.
(4) 加藤武. 日本神経化学会大会 (1993)
(5) 加藤ら. 日本神経化学会大会 (1992)
(6) J.E. Krause. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 15176-15183.
(7) J.E. Krause. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15578-15592.

205 ムスカリン受容体のリン酸化部位欠損変異種の性質

亀山仁彦[1]、中田博子[1]、芳賀和子[1]、芳賀達也[1]、茂呂 修[2]、 W. Sadée[2]

（東京大学医学部脳研生化学[1] カリフォルニア大サンフランシスコ校[2]）

[要約]
ムスカリン性アセチルコリン受容体（m2サブタイプ）の第3細胞内ループの大部分を欠損させた変異種をバキュロウイルス系を用いてSf9細胞に発現させた。精製した変異型受容体はβアドレナリン受容体キナーゼ（βARK）によってリン酸化されなかった。一方、第3細胞内ループ部分ペプチドとグルタチオンSートランスフェラーゼ（GST）との融合蛋白質はβARKによりリン酸化された。この結果および野性型受容体のリン酸化部位の蛋白化学的分析の結果は、ムスカリン受容体のアゴニスト依存性リン酸化部位が第3細胞内ループに限局していることを示している。精製受容体とG蛋白質(Go、Gi2）を人工脂質膜に再構成させると、変異型受容体も野性型受容体と同様のG蛋白質活性化能（GTPγS結合促進）を示した。一方、グアニンヌクレオチド依存性高親和性アゴニスト結合の実験から、変異型受容体はG蛋白質に対する親和性が低下している可能性が示唆された。

[目的] ムスカリン受容体m2サブタイプは、ブタ大脳から精製したムスカリン受容体キナーゼあるいは培養細胞に発現させたβARKによりアゴニスト依存性にリン酸化される。そのリン酸化はG蛋白質βγサブユニットにより促進される[1][2]。リン酸化部位は細胞内第3ループにあることが蛋白化学的方法によって推定された[4]。本研究ではこの推定リン酸化部位の欠損した変異種を発現させ、その部位がリン酸化部位であることを確認するとともにその部位のG蛋白質活性化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

[方法] ヒトムスカリン受容体m2サブタイプの234-381番目のアミノ酸を欠損させたcDNA（図1）[3]をバキュロウイルスへの転移ベクターに組み込み、野性型ウイルスDNAとSf9細胞に共感染させその培養液中から組み換え型ウイルスをプラーク法により単離した。変異型(m2LD)または野性型(m2WT)受容体[5]を組み込んだウイルスをSf9細胞に感染させて受容体を発現した。受容体を発現した細胞（培養液2L）を1500g、10minで遠心し細胞を回収した。この細胞を20mM HEPES(pH8)、1mM EDTA、2mM $MgCl_2$、200mLに懸濁しホモゲナイズしたのち1500g、10minにて遠心し、その上清を100000g、30minにて遠心し、沈査を膜画分とした。膜画分を1% digitonin、0.1% sodium cholate、20mM potassium phosphate(pH7)、100mM NaCl、400mLにて可溶化しABT（アミノベンズトロピン）アフィニティーゲルにて精製した。同様にウシβARK cDNAをバキュロウイルス転移ベクターに組み込み、変異ウイルスを単離してSf9細胞に感染させて発現させた。その細胞質画分をゲル濾過カラム、陽イオン交換カラムを用いて精製しリン酸化に用いた。G蛋白質Goはブタ脳より、Gi2はウシ肺より精製した。精製受容体および精製G蛋白質を人工脂質膜中に組み込み、アゴニスト依存性の受容体リン酸化、アゴニストによる[^{35}S]GTPγS結合促進、グアニンヌクレオチド感受性高親和性アゴニスト結合を既報にしたがい検討した[2][6]。GST融合蛋白質はブタm2受容体cDNAより227-324番目のアミノ酸に相当する部位をGST融合蛋白質発現ベクターに組み込みグルタチオンセファロースカラムを用いて精製した。

[結果] 図2Aに精製受容体のSDS-PAGEの銀染色を示す。野性型受容体が59kDaを示すのに対して、変異型受容体は、35kDaを示した。欠損部位に比して分子量がみかけ上小さくなることについての原因は不明である。図2Bに[^{3}H]PrBCM（プロピルベンジルコリンマスタード）による受容体のアフィニティーラベルを示す。各精製受容体に対応するバンドがラベルされ、アトロピンにより阻害された。図2CにβARKによる受容体のリン酸化を示す。野性型m2受容体はアゴニスト依存性にリン酸化されるが、変異型受容体はリン酸化されなかった。図3に欠損部位に相当するm2受容体第3細胞内ループとGSTとの融合蛋白質のリン酸化を示す。GST融合蛋白質はムスカリン受容体キナーゼによりリン酸化され、そのリン酸化はヘパリンにより阻害された。βARKを用いた場合も同様にGST融合蛋白質はリン酸化された。これは欠損した部分がβARKによるリン酸化部位であることを示しており、リン酸化部位の蛋白化学的同定の結果と合致する。図4Aにm2受容体刺激によるGoの[^{35}S]GTPγS結合の促進を示す。野性型、変異型受容体は同様にアゴニスト依存性にGTPγSの結合を促進した。図4Bに受容体とGo再構成膜におけるグアニンヌクレオチド感受性高親和性アゴニスト結合を示す。野性型に比較して変異型の方がアゴニストに対する親和性が低いことが観察された。Gi2を用いた場合にも同様な結果であった。

[考察] ロドプシンキナーゼによるロドプシンの光依存性リン酸化部位、βARKによるβアドレナリン受容体のアゴニスト依存性リン酸化部位はC末端にあることが知られている。一方今回の実験から、ム

スカリン受容体m2サブタイプのβARKによるリン酸化部位は第３細胞内ループにあることが確認された。G蛋白質の活性化実験の結果は、このリン酸化部位がG蛋白質の活性化に必須でないことを示している。しかし、変異受容体ではG蛋白質に対する親和性が低下していることが示唆されており、その生理的意義は今後の検討課題である。この部位のリン酸化によって受容体の細胞内移行が誘起される可能性が考えられる。培養細胞への発現実験により、それを示唆する結果が得られている[3]。

［文献］

(1) Haga K. and Haga T.: *J. Biol. Chem.* 267 2222-2227 (1992)
(2) Kameyama K. et al: *J. Biol. Chem.* 268 7753-7758 (1993)
(3) Moro O. et al: *J. Biol. Chem.* 268 6862-6865 (1993)
(4) Nakata H. et al: 論文投稿中
(5) Parker E. et al: *J. Biol. Chem.* 266 519-526 (1991)
(6) Shiozaki K. and Haga T.: *Biocemistry* 31 10634-10642 (1992)

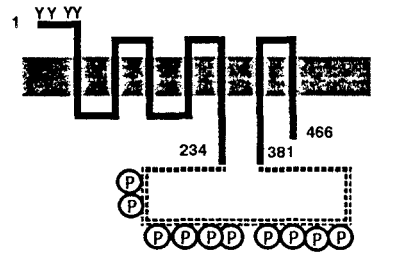


図１　変異型受容体の模式図

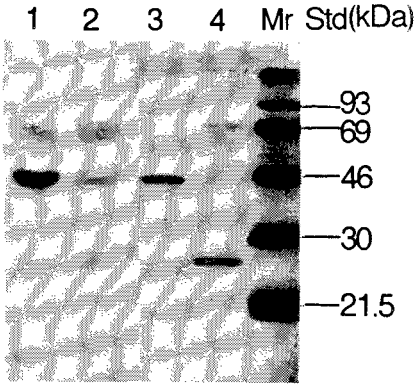


図３　GST融合蛋白質のリン酸化
１　ムスカリン受容体キナーゼによるリン酸化
２　10nM　ヘパリンによる阻害
３　GST融合蛋白質のCBB染色
４　GST蛋白質のCBB染色

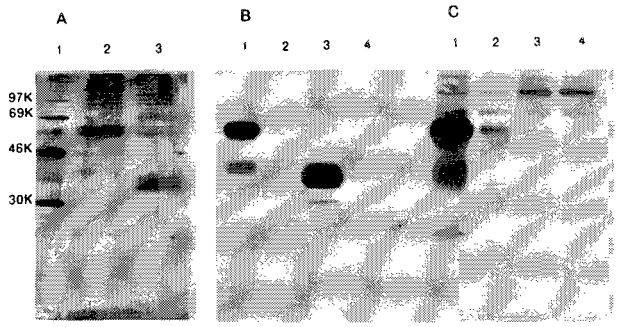


図２
A　精製受容体のＳＤＳ－ＰＡＧＥの銀染色
１　分子量マーカー　２　野性型ｍ２受容体　３　変異型受容体
B　精製受容体の［³H］PrBCM　ラベル
１　野性型受容体−アトロピン　２　野性型受容体＋100μMアトロピン
３　変異型受容体−アトロピン　４　変異型受容体＋100μMアトロピン
C　精製受容体のβARKによるリン酸化
１　野性型受容体＋1mMカルバミルコリン　２　野性型受容体＋10μMアトロピン
３　変異型受容体＋1mMカルバミルコリン　４　変異型受容体＋10μMアトロピン

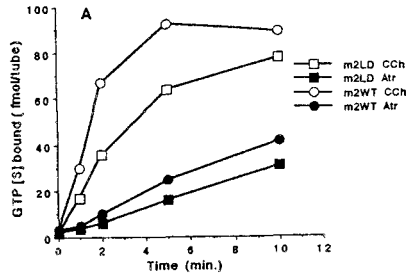
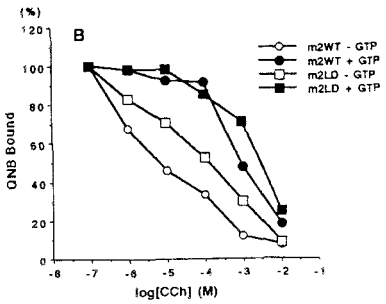


図４
A　アゴニストによる［³⁵S］GTPγS結合の促進
野性型（ｍ２ＷＴ）　変異型（ｍ２ＬＤ）
カルバミルコリン（CCh）1mM
アトロピン（Atr）10μM
B　ＧＴＰ依存性高親和性アゴニスト結合
［³H］QNB（キヌクリジニルベンジレート）結合
のカルバミルコリンによる阻害
ＧＴＰ１００μＭ　存在下
もしくは　ＧＴＰ非存在下



206 選択的セロトニン取り込み阻害薬 フルボキサミン(SME3110)の神経化学的検討

木下徳久、神庭重信、新谷太、丹生谷正史、鈴木映二、八木剛平、浅井昌弘、中木敏夫*、加藤隆一*
慶應義塾大学医学部精神神経科学教室、*慶應義塾大学医学部薬理学教室

〔要約〕

選択的セロトニン（5-HT）取り込み阻害薬(SSRI)は、新しい抗うつ薬のカテゴリーとして、その有用性が確かめられている。そのひとつであるフルボキサミン（SME3110）は強い5-HT選択性と強い取り込み阻害能を有し、他の受容体と親和性を持たないなどの薬理学的特徴が従来の抗うつ薬と異なるため、抗うつ効果の奏効機転を考える上で注目される薬物である。今回我々はin vivo microdialysisの手法を用いて、ラット海馬におけるフルボキサミンの単回投与および慢性投与によるモノアミン動態の変動を検討した。結果、単回投与において細胞外の5-HTを速やかに選択的にかつ持続性に増加させることがin vivoで観察され、5-HTの代謝産物である5-HIAAを有意に減少させた。フルボキサミン慢性投与群の最終投与時の5-HT、5-HIAAの変化は同様の投与手技を行なった対照群と有意差はなく、慢性投与後も、単回投与時と同様の作用が持続することが考えられた。

＜方法＞

測定方法　SD系雄性ラット（250-350g）のネンブタール麻酔下に海馬（bregmaの6mm後方、5mm左側方、脳表より深さ4mm）に測定前日に直管型プローブを挿入し、Hanks' buffer（流速2 μl/min）透析潅流した。回収産物量の安定後、フルボキサミンを経口投与し、一定時間毎にサンプルを回収した。

モノアミンおよびの代謝産物の定量にはHPLC-ECDを用い、5-HT、5-HIAA、ノルエピネフリン（NE）、MHPG、DOPAC、HVAを測定した。

単回投与実験　フルボキサミンを経口投与し、投与前後のサンプルを測定した。投与量は15, 30, 60 mg/kgとした。

慢性投与実験　30 mg/kgのフルボキサミンを１日２回、１４日間連続経口投与し、投与終了前日に、プローブを挿入、最終投与時に単回投与実験と同様にサンプルを回収、測定した。対照群は投与手技による影響を除くため、同様の方法で蒸留水を連続経口投与後、フルボキサミンを単回投与し測定した。

結果はフルボキサミン投与前の各物質量を最低３回測定し、その平均を基礎値とし、投与後の変化率に対し、ANOVAを用いて検定した。

＜結果＞

単回投与実験　フルボキサミン単回投与によりラット海馬における5-HTは投与後速やかに有意に増加し、その増加は持続性のあるものとして観察された。投与量を増やしていくと用量依存的に5-HTは増加した（Fig.1）。5-HIAAは減少し、投与量を増やしていくと、用量依存的に5-HIAAは減少した（Fig.2）。またフルボキサミン30 mg/kg単回投与時のNEは、明らかな変化を認めなかった。代謝産物であるMHPG、DOPAC、HVAにも明らかな変化は認められなかった。比較として、NE、5-HTの両方の取り込み阻害作用を持つ、イミプラミン30 mg/kg単回投与では、フルボキサミンとは逆に5-HIAAは変化せず、MHPGは有意に減少した。

慢性投与実験　最終投与時の5-HTは、フルボキサミン慢性投与群、同様の投与手技を行なった対照群のいずれも5-HTは速やかに基礎値に対して有意に増加するが、しかし両群間で変化に有意差は認められなかった（Fig.3）。最終投与時の5-HIAAは、慢性投与群と対照群いずれも有意に減少するが、その減少の程度は両群でほぼ同等となった（Fig.4）。MHPGは、慢性投与群と対照群いずれも有意な変化は認められなかった。

＜考察＞

以上の結果、フルボキサミンは5-HTの取り込み阻害作用によって、ラット海馬においては細胞外の5-HTを速やかに選択的にかつ持続性に増加させることがin vivoで観察された。同時にNE、MHPGに変化がなく、海馬においては5-HT選択性であることが示された。また5-HTの代謝産物である5-HIAAを有意に減少させた。またドーパミン系代謝産物であるDOPAC、HVAには変化が認められなかった。これらの結果は、同じSSRI

であるフルオキセチンのin vivo dialysisによる報告（３）とほぼ同様の結果となった。

フルボキサミン慢性投与群の最終投与時の5-HTの変化は対照群に比して有意差はなく、5-HIAAの変化は対照群とほぼ同等となった。以上の結果から、フルボキサミンは慢性投与後も、NE系に影響を与えずに選択的に5-HTを増加、5-HIAAを減少させ、単回投与と同様の作用が持続することが考えられた。フルボキサミン慢性投与後の受容体のダウンレギュレーションがみられない点（２）なども考慮すると、今回の結果は、より短い時間的サイクルの5-HT動態の変動の連続による、5-HTニューロンの伝達促進を考えたSSRIの作用機序仮説（１）を支持する結果と思われる。このような薬理学的特徴は従来の抗うつ薬にはみられないもので、抗うつ効果発現の機序の解明にフルボキサミンのようなSSRIに関する研究が今後さらに望まれる。

＜文献＞

1.Hrdina, P.D.(1991) J Psychiatry Neurosci. 16, (Suppl.1),10-18.

2.Nelson,D.R.,Thomas,D,R. and Johnson,A.M. (1989) Acta Psychiatr Scand 80, (Suppl.350),21-3.

3.Perry ,K.W., Fuller, R.W.(1992) Life Sci. 50, 1683-90.

Fig.1 Changes of 5-HT Levels in the Rat Hippocampus by Fluvoxamine

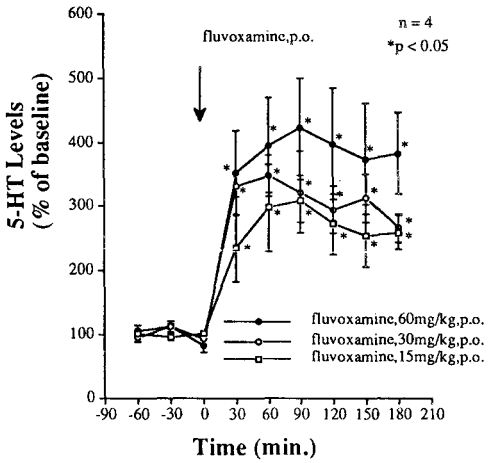


Fig.2 Changes of 5-HIAA Levels in the Rat Hippocampus by Fluvoxamine

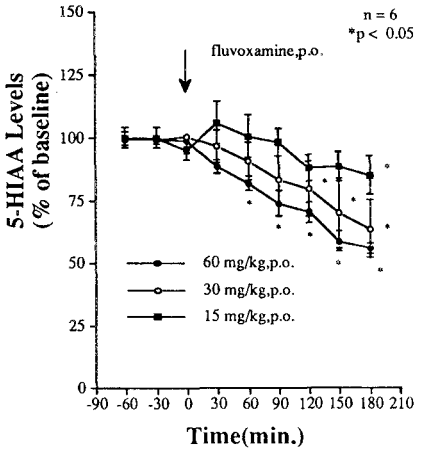


Fig.3 Chronic Effects of Fluvoxamine Treatment

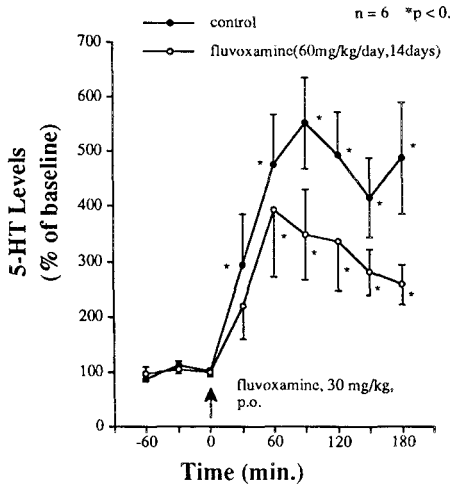
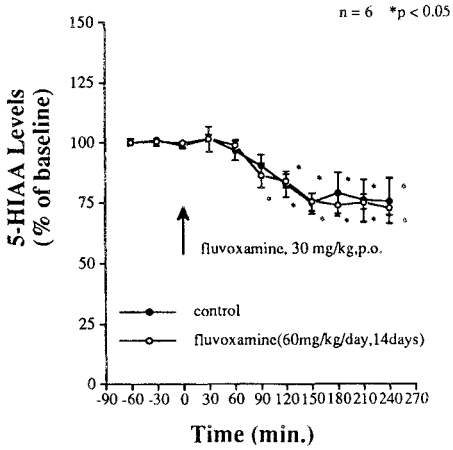


Fig.4 Chronic Effects of Fluvoxamine Treatment



207 株化した内分泌細胞におけるＳＮＡＰ受容体の発現

於保　力、伊藤朋子、高橋正身
（三菱化成生命科学研究所）

〔要約〕

開口放出機構には、NSF（NEM-sensitive fusion protein）やSNAP(soluble NSF-attachment protein)と呼ばれる細胞質に存在する蛋白質因子と、膜成分としてのSNAP結合蛋白質が必要であることが分かってきた。SNAP結合蛋白質の候補として、脳においてはシンタキシン（Stx）、シナプトブレビン（Sbr)、SNAP-25がある。また、シンタキシンはシナプトタグミン（Stg）と結合していることが分かっている。そこで、開口放出機構の解明を目的として、株化した神経系細胞（PC12、GH3）および内分泌系（インスリン分泌）細胞（RINr、RINm5F、βTC）のSNAP結合蛋白質（Stx、Sbr、SNAP-25）およびStgの発現を調べた。その結果、神経系細胞とともに内分泌系細胞にも、それらの発現が観察され、これらの蛋白質が、分泌機構に関与する可能性が示唆された。

神経細胞や内分泌細胞からの神経伝達物質やホルモン分泌は、Ｃａイオンに依存した開口放出機構によって行われる。その仕組みを分子レベルで明らかにすることは、神経系においてはシナプスでの情報伝達の機構を理解する上で、また、インスリン分泌細胞などの内分泌系においては糖尿病等のホルモン分泌異常の病因を明らかにする上で極めて重要である。最近、これらの開口放出機構が、小胞体－ゴルジ間あるいはゴルジ－ゴルジ間での小胞輸送の機構と共通性があることが明らかになってきた。ゴルジで小胞輸送が起こるためには、NSF（NEM-sensitive fusion protein）やSNAP（soluble NSF-attachment protein）と呼ばれる細胞質蛋白質が膜に存在する SNAP結合蛋白と複合体を作ることが必須である(1)。牛脳ではシナプス前部に特異的に発現しているシナプトブレビン（Sbr、VAMP）、シンタキシン（Stx、HPC-1、シナプトカナリン）、SNAP-25等の膜蛋白質に SNAP が結合することが明らかにされ、相同なSNAP結合蛋白質が、酵母から哺乳類にわたる多様な有核細胞の膜に存在することが示唆された(2)。この結果は、シナプス小胞の開口放出にも SNAPや NSFが関っており、基本的には、ゴルジ間の小胞輸送と同じ機構で営まれていることを示唆している。

開口放出機構の研究には、分泌機能を持った株化細胞やその変異細胞を用いることは有用な手段である(3)。今回、特異的抗体を用いて、神経系（PC12、GH3）および内分泌系細胞由来の株化細胞(RINr、RIN5mF、βTC)で、SNAP結合蛋白質(Sbr、Stx、SNAP-25)、およびシンタキシンと相互作用をもつ蛋白質シナプトタグミンの発現と性質を調べた。

（方法）

抗シンタキシン抗体は、モノクローナル抗体、6H1、10H5を用いた(4)。抗シナプトブレビン、抗SNAP-25抗体としては、ラットのシナプトブレビン２のＮ末端、SNAP-25のＣ末端に相当するペプチドを合成し、KLHに結合させたものをウサギに免疫し、得られた抗血清から IgGをプロティンＡセファロースで精製した。抗シナプトタグミン抗体はモノクローナル抗体(1D12)及び抗ペプチド抗体(3)を用いた。

分泌機能を持った株化細胞としては、単層培養したラット副腎髄質腫瘍細胞（PC12）、ラット脳下垂体由来細胞（GH3）、ラットインスリン分泌細胞（RINr、RINm5F）、マウスインスリン分泌細胞（βTC）を20 mM HEPES (pH7.5)中で超音波破砕した後、超遠心で沈澱させた膜画分を、またラット前脳膜画分 P2 を調製し、SDS-PAGEを行い、ウエスタンブロット法で解析した。検出はHRP-標識した2次抗体とECL検出キットを用いた。

（結果と考察）

図１Ａに示すように、シンタキシンはその発現量に違いがみられるが、全ての細胞で検出された。SDS-PAGEで求めた分子量はラット脳とほぼ同じ35kDaを示したが、RINm5F のみ若干小さい分子量値を示した。シンタキシンは、上皮細胞の形態形成を制御しているエピモルフィンと１次構造上、63%相同であるが、全ての細胞においてエピモルフィンの様な150kDaの分子型をとるものは無かった。また、図１Ｂに示す様に、全ての細胞でシナプトブレビンの発現が認められた。発現量はPC12細胞で最も多く、GH3細胞では低かった。それに対しSNAP-25の発現はRINr、RINm5Fでは高かったが、PC12、GH3では低くβTCではほとんど認められなかった（図１Ｃ）。

我々は、脳においてシンタキシンがシナプトタグミンと結合している事を明らかにしている（4）。モノクローナル抗体（1D12）を用いてシナプトタグミンの発現を調べると、PC12に特に多く、GH3では少なく、インスリン分泌細胞では、極薄いバンドが見いだされた。

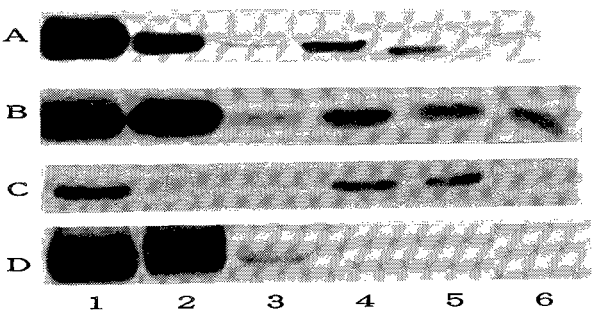
ラット前脳P2と比較した場合、P2はシンタキシン（Stx）、シナプトブレビン（Sbr）、シナプトタグミン（Stg）は、充分な発現がみられるのに対して、SNAP-25の発現量は少ない。発現量に差はあるが、PC12及びGH3も神経系細胞であり、Stx、Sbr、Stg、SNAP-25の発現パターンは、P2の場合に良く似ている。一方、インスリン分泌系細胞では、Stx、Sbr、SNAP-25の有為な発現は観察されるのに比べ、Stgの発現は少ない。

免疫組織化学を用いては、シナプトブレビンやシナプトタグミンが副腎髄質、脳下垂体、膵臓の内分泌細胞に発現していることが示されているが、今回、分泌機能を保持した株化細胞でも脳のSNAP結合蛋白であるシンタキシン、シナプトブレビン、SNAP-25が発現していることが明かとなった。これらの結果は、SNAP結合蛋白質が内分泌細胞の分泌機構にも関与している可能性を示している。

分泌機構の分子生物学的解析は酵母を使って盛んに進められているが、Ｃａイオンなどによって制御される調節性分泌機構の研究には動物細胞を用いることが必要である。株化細胞を用いれば突然変異株を単離したり分子生物学的手法を用いることも可能であり、今後これらの細胞はホルモン分泌における SNAP結合タンパク質の役割を調べる上で有力な実験系となると期待される。

図１　イムノブロットによるSNAP-結合蛋白およびシナプトタグミンの検出

A　抗シンタキシン抗体
B　抗シナプトブレビン抗体
C　抗ＳＮＡＰ－２５抗体
D　抗シナプトタグミン抗体
1　ラット脳Ｐ２画分　５ｕｇ
2　ＰＣ１２　２０ｕｇ
3　ＧＨ３　２０ｕｇ
4　ＲＩＮｒ　２０ｕｇ
5　ＲＩＮｍ５Ｆ　２０ｕｇ
6　βＴＣ　２０ｕｇ



（文献）

(1)Wilson, D.W. et al (1992) J.Cell.Biol. 117, 531-538
(2)Sollner, T. et al (1993) Nature 362, 318-323
(3)Shoji-Kasai, Y. et al (1992) Science 256, 1820-1823
(4)Yoshida, A. et al (1992) J.Biol.Chem. 267, 24925-24928

208　神経系に特異的なG蛋白質γサブユニットについて

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サブユニットは少なくとも7種類存在するが、そのうちγ_3は神経系に特異的なγと考えられている。γ_3のN末端のアミノ酸配列に一致するペプチドをヘモシアニンに結合させ、これでウサギを免疫して抗体を得た。精製抗体はγ_3と特異的に反応し、他のγとは交差しなかった。また、ウシ、ラット、ヒトのいずれのγ_3とも反応した。イムノブロットによりγ_3の分布を調べると、神経系以外の組織には検出できず、神経系特異的であることを確認した。しかし、神経芽細胞腫の組織から精製したβγ複合体中には存在した。ラットにおける脳内分布を調べると、大脳皮質、小脳で高く、海馬、線条体、視床下部、中脳で中程度、嗅球、脳幹、脊髄で低かった。免疫組織化学的にγ_3の局在を検討すると、G_oαやβと同様ほとんどの部位のneuropil が染色された。しかし、嗅神経や鋤鼻神経などの感覚神経は染色されなかった。ラットの発育に伴う脳内濃度変化をイムノブロットで調べると、γ_3はβよりやや遅れて上昇することが明らかになった。

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おり、βとγは生理的条件下では常に結合して存在していると考えられている。各サブユニットとも一次構造の異なる複数の分子種が知られている。G蛋白質の機能はαが担っていると考えられてきたが、最近βγの役割を示唆する多くの報告もなされている(1-3)。細胞内でのβγ複合体はβとγの各分子種の組合せで多種類が存在しうるが、分子種の差による機能の差はβよりもγによって決定されていると考えられている(4,5)。γは少なくとも7種類存在するとされているが、このうち、γ_1は網膜に、γ_3は神経系に特異的に発現していると報告されている(6,7)。今回、γ_3の神経系における機能を知る目的で、γ_3に対する抗体を作製し、これを用いてγ_3の脳内分布、免疫組織化学的局在、ラットの発育に伴う脳内濃度変化などについて検討した。

[方法]

抗体作製：ウシγ_3のN末端アミノ酸配列に一致したペプチドのC末端側にシステインを付加したペプチド（MKGETPVNSTMSIGC）を合成し、N-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylateを用いてヘモシアニンに結合させた。これでウサギを免疫し抗血清を得た。抗血清をγ_3ペプチド結合セファロースカラムで精製した。イムノブロット：ラット（Wistar）の脳の各部位を1％コール酸ナトリウムを含む緩衝液でホモジナイズし、100,000 x g、1時間遠心後の上清をコール酸抽出液とし、SDS-PAGEで分離した。一方、抗体の特異性を調べる場合は、精製βγをTricine/SDS-PAGE で分離した。蛋白質をそれぞれのゲルからニトロセルロース膜へ転写したのち、抗γ_3または抗β抗体と反応させ、2次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgGを用い、ECL(Amersham) またはジアミノベンチジンで発色した。免疫組織化学：抗γ_3または抗β抗体を用いて、酵素抗体間接法で行った。

[結果]

精製抗γ_3抗体の特異性を図1に示した。精製βγとして、ウシ網膜$\beta\gamma_1$、ウシ脳$\beta\gamma_2$、$\beta\gamma_3$、$\beta\gamma_7$を、さらにウシ脾臓から精製した3量体G_{i2}（γ_2、γ_5、γ_7、γ_{s1}を含んでいる）を用いてイムノブロットを行うと抗体はγ_3とのみ反応し、他のγとはまったく反応しなかった。ウシ以外の種のγ_3もこの抗体と反応するかどうかを調べると、ラットおよびヒトの脳から精製したβγ中のγ_3も同様に反応した。そこで、ラットの各組織のコール酸抽出液をイムノブロットすると、神経組織中にのみγ_3に一致するバンドがみられたが、他の組織中には検出できず、神経系に特異的であることを確認した。しかし、ヒト神経芽細胞腫の組織から精製したβγの中にはγ_3がみいだされた。つぎに、ラットにおける脳内分布を検討すると、大脳皮質、小脳に最も高く、海馬、線条体、視床下部、中脳で中程度、嗅球、脳幹、脊髄で低かった。βの分布を同一のサンプルで抗β抗体を用いて調べると、γ_3とほぼ比例していたが、嗅球においてはβの濃度が非常に高いのにγ_3が低いという特徴的な分布がみられた。免疫組織化学的にγ_3の局在を検討すると、G_oαやβの場合と同様、ほとんどの neuropil が染色された。しかし、抗β抗体で強く染まる嗅神経や鋤鼻神経は抗γ_3で染色されなかった。ラットの発育に伴う大脳皮質中のγ_3の濃度変化をイムノブロットで調べると、生後急激に上昇するが、これはβの上昇よりやや遅れる傾向がみられた。

[考察]

抗γ_3抗体は既報(6)のようにN末端ペプチドのN末端側にヘモシアニンを結合させて作製したものに比べ、今回のようにC末端側にヘモシアニンを結合させたもので作製した抗体の方が反応性が強かった。また脳の抽出液を用いたイムノブロットで調べると非特異的反応も見られないことから免疫組織化学にも利用することができた。図1でγ_3のバンドが2本あるが両者とも抗体と反応することから高分子のバンドは不純物ではなくγ_3と考えられる。2本バンドの理由は不明であるが、蛋白質の修飾の違いによる差、電気泳動上の問題などが考えられる。γはβと1：1の複合体を形成しており、脳にはγ_3以外にγ_2とγ_7が存在している。したがって、抗βで検出できるβ量はほぼ全γ量を反映していると考えられる。βが高濃度存在するのにγ_3が少ない部位、例えば嗅神経と鋤鼻神経には、γ_3以外のγが高濃度存在することを示している。これらの感覚神経には中枢神経系には見られない$G_{o1}\alpha$あるいは少量しか存在しない$G_{i2}\alpha$が高濃度限局して存在することが知られているので(8)、γの分布も中枢神経系とは異なるものと考えられる。発達に伴う脳内のγ_3の上昇は、βよりやや遅れる傾向にあり、これは他のγよりγ_3が遅く発現することを意味し、神経機能への関与を解明する上で重要な手がかりになると考えられる。

本研究は長浜眞人博士との共同研究で行われた。

[文献]

1) Neer, E.J. and Clapham, D.E. (1988) Nature 333, 129-134. 2) Birnbaumer, L. (1992) Cell 71, 1069-1072. 3) Logothetis, D.E., et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5814-5818. 4) Iniguez-Lluhi, J.A., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 23409-23417. 5) Asano, T., et al. (1993) J. Biol. Chem. in press. 6) Gautam, N., et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7973-7977. 7) Morishita, R., et al. (1992) Eur. J. Biochem. 210, 1061-1069. 8) Shinohara, H., et al. (1992) J. Neurosci. 12, 1275-1279.

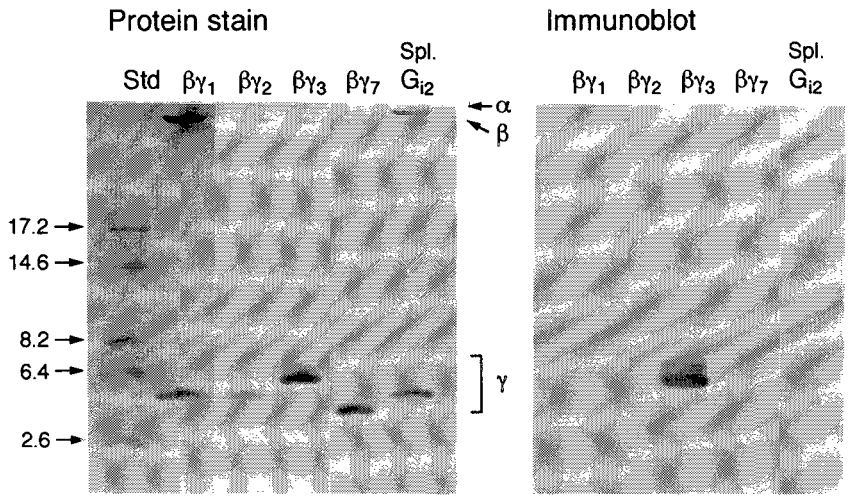


図1．精製抗γ_3抗体の特異性

精製ウシ網膜$\beta\gamma_1$、ウシ脳$\beta\gamma_2$、$\beta\gamma_3$、$\beta\gamma_7$、およびウシ脾臓3量体G_{i2}をTricine/SDS-PAGE したのち蛋白染色（左）または抗γ_3抗体でイムノブロットした（右）。蛋白染色は左2レーンはクマシーブルー、他のレーンは銀染色で行った。

209 インターロイキン－1βによるサブスタンスP受容体の発現制御

小河宏城、三木新也、西尾廣昭、仲田義啓
（広島大・医・総合薬学科・薬効解析）

〔要約〕

インターロイキン－1β（IL-1β）をU-87 MG細胞に添加（1 ng/ml）し培養すると、細胞の増殖には影響することなくサブスタンスP(SP)結合量の減少が経時的に認められ、36時間後では約50%に減少した。Scatchard 解析の結果、IL-1βのSP受容体に対する作用は最大結合数(Bmax)の低下であり、親和性には変化がないことが認められた。IL-1βは、SP受容体mRNA量を低下させるが、SP生合成系のα、β、γ-preprotachykininのmRNAには影響を及ぼさないことを確認した。IL-1βのSP受容体結合減少作用は、細胞に予め10^{-5}Mのindomethacinを添加すると部分的に拮抗されることより、SP受容体生合成系に対する直接作用ではなくcyclooxygenase阻害によるprostaglandin(s)の関与が示唆された。さらに、IL-1βをラットの側脳室に投与した後、大脳皮質膜画分を調製しSP結合を行うと、U-87MG細胞の場合と同様にSP結合量の減少がみられ、indomethacinにより拮抗された。しかし、正常ラット脳膜画分を直接IL-1βとインキュベートしてもSP結合量は変化しなかった。

以上の結果、生体内でのIL-1βのSP受容体への作用は一部prostaglandin(s)系を介している可能性が示唆された。

IL-1βは生体防御機構に関与するサイトカインのひとつであり、中枢神経系の機能にも重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方、神経ペプチドのSPも炎症に関わっていることが知られている。IL-1βのSP受容体発現調節に対する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IL-1βで処理した後、SP受容体結合量およびSP受容体mRNA量の変化を測定した。更にラットを用いたex vivoの系で同様な実験を行った。

[実験方法]

U-87MG細胞はRiken Cell Bankより入手し、10% FCS含有RPMI1640 培養液にて培養した。ラットは雄性Wistar系(200～250g)を使用した。

1. ^{3}H-SP結合実験

Nakataらの方法(1)に従って行った。Intact細胞の^{3}H-SP結合実験の場合、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 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.4)]で洗浄後、結合実験に用いた。

2. Protecetion assay

Hershey and Krauseの方法(2)に従い、細胞およびラット脳組織よりRNAを^{32}Pでラベルした696bpのSP受容体mRNAのantisense cRNAとhybridizationさせた。その後、S_1 nuclease処理によりprotectされた588bpのmRNA量をオートラジオグラフィーにて検出した（図2）。

[実験結果および考察]

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1 ng/mlのIL-1βを添加したのち、一定時間後の細胞SP結合量を^{3}H-SPを用いて測定した（図1）。IL-1βによりSP受容体結合量が経時的に減少し、その減少はScatchard解析の結果、最大結合数の低下による

ことが明らかになった。一方、IL-1βをラット大脳皮質膜画分とin vitroでインキュベートを行ってもSP結合量には影響を与えなかった。しかし、IL-1βをラットの側脳室内に投与し、得られた大脳皮質膜画分でのSP結合量は、U-87MG細胞の場合と同様に有意に低下していた。従って、IL-1βのSP受容体に対する結合量減少作用は、SP受容体への直接作用ではないことが示唆された。IL-1β処置した場合のSP受容体をコードするmRNA量の変化について検討した結果、SP受容体mRNAの低下が認められた（図2）。IL-1βは、SP受容体mRNA量を低下させるが、SP生合成系のα、β、γ-preprotachykininのmRNAには影響を及ぼさないことをprotection assay法により確認した。以上の結果より、IL-1βによりSP受容体発現調節機構が中枢神経組織に存在している可能性が示唆された。

IL-1βの作用機序を検討するため、細胞に予め10^{-5}M indomethahcinで処理するとIL-1βのSP受容体抑制作用が部分的に有意に拮抗された（図3）。

以上の結果、生体内でのIL-1βのSP受容体への作用は一部prostaglandin(s)系を介している可能性が示唆され、prostaglandinが脳－免疫系のかかわるサイトカインと神経ペプチドの相互作用に関与することが考えられた。

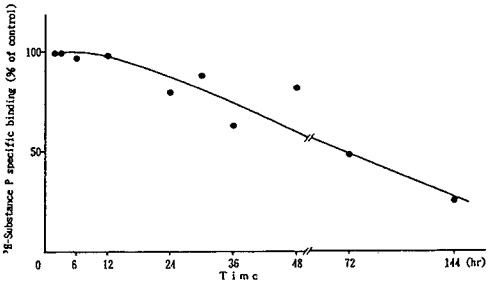


図 1. U-87MG細胞におけるIL-1βのSP結合量に対する効果

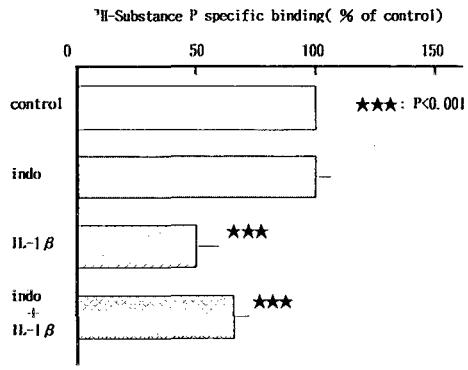


図 3. IL-1βによるSP結合量減少作用に対するindomethacinの効果

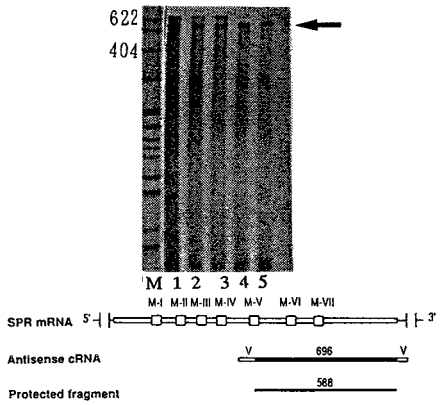


図 2. SP受容体mRNAのprotection assay
M: マーカー、 1:ラット脳(total RNA)
2,3: IL-1β (0.5 ng/ml, 3 days)
4,5: Control (U-87 MG cell)

[謝辞] 実験に協力頂きました放射線影響研究所 秋山實利部長、平井裕子副主任研究員に感謝いたします。SP受容体probe等を分与していただいたDr. Krauseに感謝致します。

[文献]

1) Nakata, Y. et al, (1988) J. Neurochem. 50, 522-527
2) Hershey, A. D. and Krause, J. E., (1990) Science 247, 958-962

210 アミノ酸置換によるマストパランの活性部位の検討
-溶血活性とカテコールアミン放出活性の分離

笠井久隆[1] 伊藤三恵[2] 高橋俊一[2] 柳生大祐[2] 栗田孝[3] 熊倉鴻之助[4] 伊藤尚[2] (都立医療技術短大[1]、青山学院大学・理・化学[2]、ヘキストジャパン・医総研[3]、上智大学・生命研[4])

〔要約〕

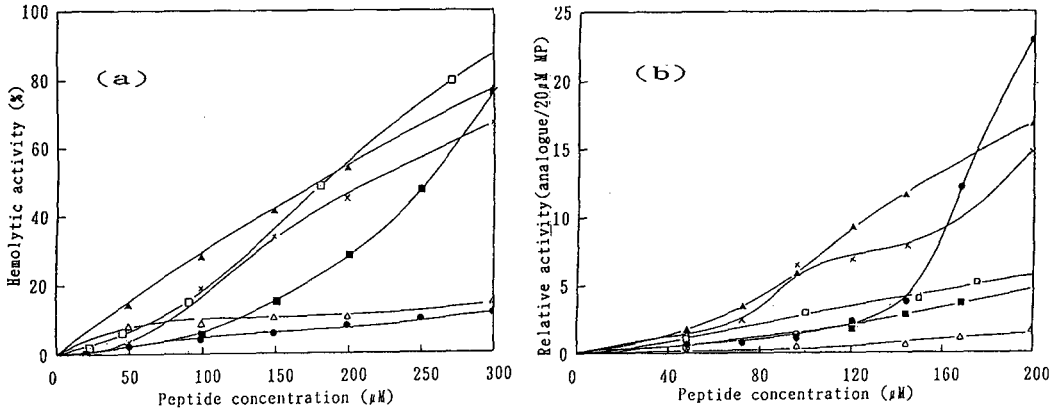
スズメバチから単離された天然のマストパラン(MP)類10種とMPのLys残基をOrn残基に置換したもの5種、C末端領域を置換したもの4種を合成し、牛赤血球を用いた溶血活性と牛副腎髄質クロム親和細胞からのカテコールアミン(CA)放出活性を測定した。天然MP類の両活性を比較した場合、Polistes-MP, HR2は両活性とも高いが、その他の8種では、両活性との間に規則的な相関性は見られなかった。天然MP類のアミノ酸配列では、14位のLeu残基のみが共通しており、Polistes-MP, HR2を除いては4、11、12位のLys残基が保存されている。これらのLys残基(4、11、12位)をOrn残基に置換したアナローグの中で、[Orn^{4,11,12}]MPは、溶血活性が抑えられ、CA放出活性は高濃度ではじめて上昇した。しかし、[Orn^{11,12}]MPではCA放出活性が抑えられ、溶血活性は高濃度ではじめて上昇した。C末端側に関しての置換では、Des-Ile^{13}, Leu^{14}-MP, Des-Leu^{14}-MP, [Val^{14}]MP, [$_D$Leu^{14}]MPのいずれも溶血活性、CA放出活性共に殆ど見られなかった。

マストパラン(MP)はスズメバチ毒腺中より単離された、アミノ酸14残基からなるペプチド[3]である。赤血球溶血作用[1]、肥満細胞からのヒスタミン放出[3]、クロム親和細胞からのカテコールアミン(CA)放出[6]、G-タンパク質の活性化[2]など、様々な生理作用が報告されており、神経伝達物質放出機構を探るプローブとしても注目されている。そこで、本研究では、天然MP類のまとまったデータが得られていないことから、天然MP類10種を合成し、それらの溶血活性、CA放出活性を測定した。また、4、11、12位のLys残基とC末端領域の影響を調べるために、4、11、12位のLys残基をひとつ、ふたつ、全てをOrn残基に置換したものを5種、14位のLeu残基をVal残基、$_D$Leu残基に置換したものと欠落させたもの、13、14位を欠落させたものを合成し、溶血活性とCA放出活性を測定し、その構造と活性の相関を検討することを目的とした。

[実験方法]ペプチドはペプチドシンセサイザー(MilliGen biosearch社)により、合成した。精製は、逆相HPLCにより行った。ここでは、ODSカラム(資生堂)を用い、移動相0.1%TFAを含む、水-アセトニトリル系直線濃度勾配法で溶出した。溶血活性は牛赤血球を用いた従来のバッチ法[2]とHPLCによる測定法[7]で測定した。牛副腎髄質クロム親和細胞からのCA放出活性は、Cell Bed Perfusion-ECD SystemによるReal-Time Monitoring[5]を用いて測定した。

[結果及び考察]合成した分子種22種(天然MP類、MPアナローグ)の溶血活性、CA放出活性を共にTable 1に示した。天然MP類の両活性を比較すると、互いに平行関係にはない。しかし、それらのアミノ酸配列には14位のLeu残基のみが共通しており、Polistes-MPとHR2を除いて4、11、12位のLys残基が保存されている。それらのアミノ酸配列と、溶血活性、CA放出活性には相関性は見いだされなかった。また、MPアナローグに関しては、溶血活性、CA放出活性のDose-Response-CurveをFig. 1に示す。溶血活性は、300μMまでは、[Orn^{4}]MP, [Orn^{11}]MP, [Orn^{12}]MPは、ほぼ同程度で、MPより高い活性を示した。CA放出活性においては、[Orn^{11}]MP, [Orn^{12}]MPは200μMまでは、同程度の活性を示したが、[Orn^{4}]MPは、これらより低い活性を示した。[Orn^{4,11,12}]MP, [Orn^{11,12}]MPの両活性は、140μM以上では[Orn^{4,11,12}]MPは強いCA放出活性を示して、溶血活性は殆ど認められなかった。一方、[Orn^{11,12}]MPは、CA放出活性は殆どなく、溶血活性は増大した。C末端領域の置換に関しては、[$_D$Leu^{14}]MP, [Val^{14}]MP, Des-Ile^{13}, Leu^{14}-MP, Des-Leu^{14}-MPのいずれも、溶血活性、CA放出活性共に殆ど見られなかった。これより、13位のIle残基、14位のLeu残基は必須であり、14位のLeu残基はL体でなければならないことが示唆された。

Fig. 1 The effect of Orn-Replacement on Hemolytic Activity(a) and on CA-Releasing Activity(b)



[Orn⁴]MP (−●−) [Orn¹¹]MP (−▲−) [Orn¹²]MP (−×−)
[Orn¹¹,¹²]MP (−■−) [Orn⁴,¹¹,¹²]MP (−□−) [Arg⁴,¹¹,¹²]MP (−△−)

Table 1 Synthesized Mastoparan Derivatives and their Hemolytic and CA-Releasing Activities

	4 1112 14	Relative Activity Hemolysis[1]	CA Release[1]
MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	1.0	1.0
MP-B	L-K-L-K-S-I-V-S-W-A-K-K-V-L-NH_2	0.1	0.1
MP-M	I-N-L-K-A-I-A-A-L-A-K-K-L-L-NH_2	0.1	0.6
MP-T	I-N-L-K-A-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	0.1	0.6
MP-H	I-N-L-K-A-I-A-A-L-V-K-K-V-L-NH_2	0.4	5.8
MP-A	I-K-W-K-A-I-L-D-A-V-K-K-V-L-NH_2	1.8	0.5
MP-C	L-N-L-K-A-L-L-A-V-A-K-K-I-L-NH_2	5.0	0.8
MP-X	I-N-W-K-G-I-A-A-M-A-K-K-L-L-NH_2	1.2	0.2
Polistes MP	V-D-W-K-K-I-G-Q-H-I-L-S-V-L-NH_2	13.1	4.5
HR2	F-L-P-L-I-L-G-K-L-V-K-G-L-L-NH_2	2.6	7.4
Des-Ile¹³,Leu¹⁴-MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-NH_2	0.4	0.0
Des-Leu¹⁴-MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-NH_2	1.1	0.0
[Val¹⁴]MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-V-NH_2	0.3	0.1
[$_D$Leu¹⁴]MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-$_D$L-NH_2	0.1	0.1

	4 1112 14	Hemolysis[2]	CA Release[2]
[Orn⁴]MP	I-N-L-K'-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	7.4	5.0
[Orn¹¹]MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K'-K-I-L-NH_2	7.4	16.8
[Orn¹²]MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K'-I-L-NH_2	6.2	14.7
[Orn¹¹,¹²]MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K'-K'-I-L-NH_2	3.7	2.1
[Orn⁴,¹¹,¹²]MP	I-N-L-K'-A-L-A-A-L-A-K'-K'-I-L-NH_2	1.0	22.9
[Arg⁴,¹¹,¹²]MP	I-N-L-R-A-L-A-A-L-A-R-R-I-L-NH_2	2.0	1.3
D-MP	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	3.5	2.3
D(LLL-MP)	L-L-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	-	-

(1) measured at 20μM (2) measured at 200μM
K':Ornithine residue D-MP:enantiomer MP D(LLL-MP):enantiomer LLL-MP

REFERENCES
(1)Argiolas, A. et. al (1983) J. Biol. Chem. 258, 13697-13702
(2)Higasijima, T. et. al (1988) J. Bio. Chem. 263, 6491-6494
(3)Hirai, Y. et. al (1979) Chem. Pharm. Bull. 27, 1942-1944
(4)Kasai, H. et. al (1991) J. Neurochem. 57, S75
(5)Kumakura. K et. al (1986) J. Neurochem. 46, 1851-1858
(6)Kuroda, Y. et. al (1980) Proc. Jpn. Acad. Ser. B 56, 660-664
(7)Takahashi, S. et. al (1992) Seikagaku 64, 744

211 細胞外神経伝達物質濃度におよぼすNMDAの作用

菅原 恵・芝軒 信次・小暮 美樹・九穂 泰三・松本 明・石川 紘一
（日本大学医学部薬理学教室）

[要約]
脳内神経伝達物質の細胞外液中濃度におよぼす外因性興奮性アミノ酸の影響を脳内微小透析法により調べた。NMDAの全身投与(10 mg/kg, i.p.)は、海馬CA1領域および線条体における細胞外タウリン濃度を有意に上昇（投与前の3-5倍）した。線条体におけるその増加作用は、海馬における増加作用に比し、持続的であった。一方、グルタミン酸あるいはアスパラギン酸などの他のアミノ酸濃度には著明な影響を与えなっかた。NMDA (300 μM)の両部位へのプローブを介した局所投与により、全身投与と同様な作用が観察された。高張溶液（150 mM庶糖を含むリンゲル液）灌流下において、両部位のタウリン濃度は有意に低下したが、NMDA全身投与によるタウリン増加作用には変化は認められなかった。上記のNMDAによる両部位における細胞外タウリン濃度増加作用は、NMDA受容体の非競合型拮抗薬であるMK-801 (1 mg/kg, i.p.)前処置により、強く抑制された。また、競合型拮抗薬であるAP-5 (1 mM)存在下において、両部位におけるNMDAの作用は完全に消失した。一方、線条体における細胞外ドーパミン濃度は低用量のNMDA (300 μM)局所投与により、軽度の増加を示し、高用量のNMDA (3 mM)では、DAの著明な上昇（投与前の約10倍）と代謝産物のDOPACおよびHVAの減少が認められた。このNMDAの作用は、AP-5 (1 mM)の存在下で強く抑制された。NMDA (3 mM)の線条体への局所投与により、細胞外アセチルコリン濃度は著しい変動を示さなかった。以上の結果は、脳内神経伝達物質の遊離調節にNMDA受容体が関与していることを示唆する。

近年、興奮性アミノ酸受容体の生理的役割に興味が持たれている。グルタミン酸受容体のサブタイプの一つである、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の神経伝達物質（ドーパミン、ノルアドレナリン、アミノ酸など）の神経終末からの遊離調節機構ににおける役割が明らかにされつつある(1-5)。本研究ではin vivoでの脳内神経伝達物質の遊離調節機構における興奮性アミノ酸受容体の役割を明らかにする目的で、無麻酔・無拘束下におけるアミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸、タウリンなど）、ドーパミン関連物質およびアセチルコリン(ACh)のラット脳内細胞外濃度におよぼす興奮性アミノ酸受容体興奮薬（NMDAなど）の脳内局所投与あるいは全身投与の影響を脳内微小透析法により調べた。

[実験方法]
実験にはWistar系雄性ラット（体重約350 g）を用いた。ペントバルビタール麻酔下、Paxinos & Watson (6)の脳図譜に従って、透析プローブ用ガイドカニューレ(Eicom)を海馬CA1領域（bregmaより後方5.0 mm、左側方3.5 mm、深さ2.7 mm）および線条体（bregmaより前方0.1 mm、右側方3.2 mm、深さ4.0 mm）に植え込んだ。術後48時間以上経過後、透析用プローブ(Eicom、外径0.22 mm)を、その先端が海馬においては1 mm、線条体においては3 mm出るように挿入、装着した。無麻酔・無拘束下、リンゲル液(147 mM NaCl, 4.0 mM KCl & 2.4 mM $CaCl_2$)により、両プローブを2 μl/minの速度で灌流した。

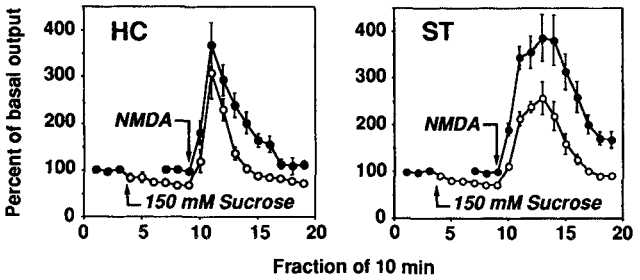


図1. 等張溶液（●）および高張溶液（150 mM庶糖含有, ○）灌流下における海馬CA1領域(HC)および線条体(ST)細胞外タウリン濃度におよぼすNMDA全身投与(10 mg/kg, i.p.)の影響
結果は無処置タウリンレベルの3例の平均値に対する百分率で表わし、各点は平均値±標準誤差(N=5)で示してある。

アミノ酸濃度の測定：両部位のプローブから得られた灌流液を10分毎に採取し、o-フタルアルデヒドと縮合反応させた後、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)により測定した。
ドーパミン関連物質濃度の測定：線条体のプローブから得られる灌流液をオートインジェクターのサンプルループ内に直接採取し、20分毎にHPLC-ECDによりドーパミン関連物質(DA, DOPACおよびHVA)を測定した。

アセチルコリン濃度の測定：ドーパミン関連物質の測定の場合と同様に線条体のプローブから得られる灌流液をオートインジェクターのサンプルループ内に直接採取し、15分毎に固定化酵素（コリンエステラーゼおよびコリンオキシダーゼ）カラムを装着したHPLC-ECDにより測定した。

[結果および考察]

NMDA (10 mg/kg) の腹腔内投与により、海馬CA1領域および線条体における細胞外タウリン濃度が有意に上昇（投与前の3-5倍）した（図1）。海馬におけるその増加作用が比較的一過性であったのに比し、線条体における増加作用は持続的であった。グルタミン酸などの他のアミノ酸濃度は、NMDA投与により影響されなかった。このことは、両部位におけるタウリンの増加作用は内因性グルタミン酸の遊離増加を介したものではなく、直接タウリン遊離調節に関与するNMDA受容体に作用して生じたと考えられる。NMDA (300 μM) の局所投与により、両部位において全身投与と同様の作用が観察された。灌流液を正常リンゲル液から高張リンゲル液（150 mM 庶糖を含む）に変えると、両部位におけるタウリン濃度は有意に低下したが、NMDAによるタウリン増加作用は遮断されなかった。このことは、タウリンがその生理作用として浸透圧調節機構に強く関与しているが(7)、全身投与されたNMDAの作用はそのような浸透圧変化を介したものではないことを示している。NMDA受容体の非競合型遮断薬のMK-801 (1 mg/kg, i.p.) の前処置あるいは競合型遮断薬のAP-5 (1 mM) の存在下において、NMDAの作用は強くあるいは完全に抑制された（図2）。この結果は、両部位におけるNMDAによるタウリン増加が、NMDA受容体が活性化された結果引き起こされることを示唆する。低濃度 (300 μM) のNMDA局所投与では、軽度のDA濃度の増加作用を示し、高濃度 (3 mM) のNMDA局所投与により、著明なDA濃度の上昇（投与前の約10倍）とDOPACおよびHVAの減少が認められた。このNMDAによるDA増加作用は、AP-5 (1 mM) の存在下では強く抑制された。これらの結果は、NMDAのDAに対する作用がNMDA受容体の活性化を介していることを示している。しかしながら、タウリンに対するそれと比し、高濃度を必要とすると思われる。NMDA (3 mM) の線条体への局所投与により、ACh濃度には著しい変動は認められなかった。しかしながら、AChの遊離は、内因性DAによっても調節を受けることから、NMDA受容体のAChの遊離調節における直接的な関与を明らかにするには、さらに詳細な研究が必要であると考えられる。さらに、高濃度NMDA (3 mM) の細胞外液中アミノ酸濃度におよぼす作用についても現在検討中である。

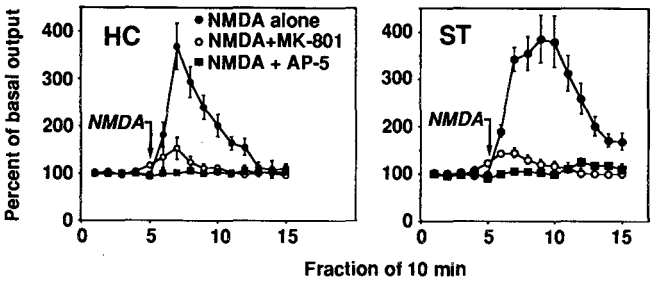


図2．海馬CA1領域 (HC) および線条体 (ST) におけるNMDA全身投与 (10 mg/kg, i.p.) によるタウリン増加作用におよぼすMK-801およびAP-5の影響
MK-801はNMDA投与20分前に投与 (1 mg/kg, i.p.) し、AP-5 (1 mM) はNMDA投与60分前より灌流液中に加えた。

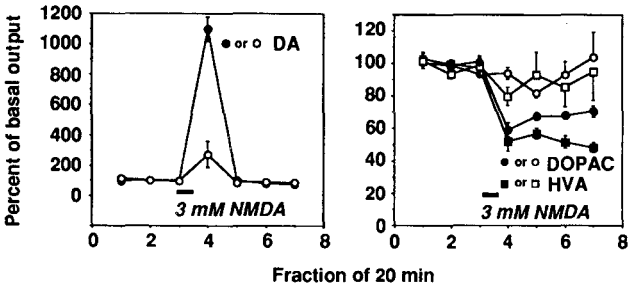


図3．AP-5非存在下 (● or ■) および存在下 (○ or □) における線条体細胞外ドーパミンおよび代謝産物濃度におよぼすNMDA局所投与の影響
NMDA (3 mM) は4番目のフラクションの前半10分間プローブを介して投与した。AP-5 (1 mM) は灌流液中に加えた。

［文献］

1. Krebs, M.O., Trovero, F., Desban, M., Gauchy, C., Glowinski, J. and Kemel, M.L. (1991) J. Neurosci. 11, 1256-12622.
2. Carter, C. J., L'Heurex, R. and Scatton, B. (1988) J. Neurochem. 51, 462-4683.
3. Fink, K., Bonish, H. and Gothert, M. (1990) Eur. J. Pharmacol. 185, 115-1174.
4. Menendez, N., Solis, J.M., Herreras, O., Herranz, A.S. and Martin del Rio, R. (1990) J. Neurochem. 55, 714-7175.
5. Young, A. M. J. and Bradford H. F. (1991) J. Neurochem. 56, 1667-16836.
6. Paxinos, G. and Watson, C. (1982) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York
7. Huxtable, R. J. (1992) Physiol. Rev. 72, 101-163

212 El マウスの痛覚鈍麻－発作の影響とオピオイド系の関与－

片山雅文, 大西 博, 小出誠司, 甲斐利弘, 山上 栄
（ 大阪市大 ・ 医 ・ 神経精神 ）

〔要約〕

El マウスの痛覚を tail-pinch 法を用いて測定した。El[s] は El[ns] より、また El[ns] はElの母系の ddY マウスよりも痛覚が鈍麻しており、 El には遺伝的な系統の差による痛覚鈍麻と、反復強直間代痙攣により生じた痛覚鈍麻のあることが示唆された。この神経機構を調べるためオピオイド拮抗薬を投与し痛覚の変化を観察した。 naloxone (NX) や選択的 δ 受容体拮抗薬の naltrindole (NTI) の皮下注射により El[s] や El[ns] の痛覚はddYレベルまで過敏化された。またほぼ同量の NX や NTI を El[s] の大槽内に注射したが痛覚は変化せず、その10倍量の NX や β-endorphin (β-EP) 特異的 ε 受容体拮抗薬の β-EP-(1-27) の大槽内注射により痛覚過敏化反応が認められた。 El[ns] は β-EP-(1-27) の大槽内注射によって痛覚鈍麻傾向を示した。 El[s] マウス脳の β-EP 系は機能的に活性化されており、これは反復痙攣発作によるものであり、 痙攣履歴による痛覚鈍麻の主な原因になっていると考えられた。

電撃痙攣後に一過性の無痛覚状態を生じることなどから、痙攣と痛覚との密接な関係が推測されている。てんかんは痙攣ばかりでなく付随する精神神経症状を含む症候群であり、同様のことはてんかんにおいても認められる可能性がある。今回我々は、遺伝性てんかんモデルの El マウスで痛覚を測定し、オピオイド系との関係について検討した。

〔方法〕 El マウスは、生後28日から放り上げ刺激を加え75日以後強直間代痙攣を示す El[s] 、刺激を加えず痙攣履歴のない El[ns] に分けた。対照は El の母系の ddY マウスと、 ddY に放り上げ刺激を加えた ddY[s] である。実験には生後120日、体重30g前後で、 El[s] は痙攣3日後の発作間歇期のものを用いた。痛覚測定は、 Takagi ら[9]の方法に準じ tail-pinch による痛覚試験法を用いた。5本の止血鉗子の挟み強度を 100、 200、 300、 500、 800g の5段階に調節し、マウスの尾の付け根を挟み、一定時間内に（仮性）疼痛反応である鉗子への咬みつきが認められた場合に、痛覚試験陽性とした。痛覚試験陽性のマウス数を総 tail- pinch 施行数で除し百分率で表したもの（累積反応率 rate of cumulative responses ）を痛覚レベルの指標とした。実験 1 では、 El[s]、 El[ns]、 ddY[s]、 ddY の4群で 100g から 800g の各鉗子についてそれぞれマウス18匹を用い、1匹のマウスに対し15分間隔で5回連続の tail-pinch を行い、2秒以内の咬み付き反応を記録、鉗子ごとの累積反応率を求めた。挟み強度と累積反応率の用量反応関係から各マウス群の50%反応挟み強度（ED_{50}）を算出し、それぞれの比較を行った。実験 2 では、 El[s] および El[ns] の2群でオピオイド拮抗薬をマウスの皮下（ NX 1, 5 mg/kg 体重, NTI 0.5, 2 mg/kg 体重）または大槽内（ NX 50, 100 μg, 1 mg/mouse, NTI 100 μg/mouse, β-EP-(1-27) 10, 20 μg/mouse ）に注射し、その5分後から15分間隔で110分後まで、挟み強度が 300g の鉗子で tail-pinch を行い、2および6秒以内の咬み付き反応を記録した。1薬物濃度につき50匹（皮下）または25匹（大槽内）のマウスを用い、累積反応率を算出、痛覚レベルの変化を観察した。対照には生理食塩水を注射した。

〔結果〕 実験 1 : 5回連続の tail-pinch でマウスの痛覚に明らかな耐性化や過敏化は認められなかった。用量反応関係はS字状となり（Fig. 1）、 ED_{50} (95% confidence limits) は El[s] 550 (477-635) g、 El[ns] 245 (209-288) g、 ddY 157 (129-191) g、 ddY[s] 195 (164-234) g であり、これらは El[s] と El[ns]、 El[s] と ddY、 El[ns] と ddY の間で有意な差を認めた。 ddY と ddY[s] の差は有意でなかった。実験 2 : El[s] では NX と NTI の皮下注射により、2秒以内の累積反応率は有意に上昇し（Fig. 2a）、痛覚が過敏化された。薬物比 NX/NTI=2~2.5 で同程度の力価であった。皮下注射の際と近似的な用量（50-100 μg/mouse）の NX や NTI の大槽内注射では El[s] の痛覚は変化せず、高用量（1 mg/kg）の NX や比較的低用量（10-20 μg/mouse）の β-EP-(1-27) の大槽内注射によって過敏化された（Fig. 2b）。 El[ns] の痛覚は、 NX や NTI の皮下注射により過敏化されたが、 β-EP-(1-27) の大槽内注射により鈍麻傾向を示した（Fig. 2c）。6秒以内の累積反応率もほぼ同様の傾向を示した（当日発表）。

〔考察〕 痙攣履歴のない El[ns] は El[s] に比べてより素因を反映していると考えられるので、実験 1 における El[ns] と ddY の痛覚レベルの差は遺伝的要因に由来するものと思われた。 ddY と放り上げ刺激を加えた ddY[s] の痛覚に差がなかったことより、 El[s] と El[ns] の痛覚の差は主に痙攣履歴によるものと考えられた。 El には遺伝性の痛覚鈍麻があり、さら

に痙攣履歴により痛覚鈍麻を生じることが示唆された。実験2で El[s] に認められた薬物投与による痛覚過敏化反応は、NX の半量の NTI の皮下注射で起こり、これら薬物近似量の大槽内注射では認められなかったので、脊髄レベルの δ 受容体を遮断して誘導されたものと考えられた。β-EP-(1-27) はそれ自体弱い鎮痛作用を持つと同時に β-EP 特異的 ε 部位の競合的拮抗薬と考えられているので[1]、El[s] の過敏化反応は比較的少量の β-EP-(1-27) や大量の NX による脳内 ε 受容体の遮断によっても起きたと推察された。El[ns] でも脊髄の δ 受容体遮断によると考えられる痛覚過敏化が認められたが、β-EP-(1-27) の大槽内注射では鎮痛傾向であり、β-EP-(1-27) に対する正常な反応と思われる。従って El[s] では反復痙攣履歴に基づく β-EP 系の異常のあることが推測される。脳内に投与された β-EP は脊髄の δ 受容体および脳の ε 受容体を介して鎮痛作用を発現する[4,5]ことを考慮すると、El[s] の β-EP 系は慢性的な機能亢進状態にあり、痙攣履歴による痛覚鈍麻の主因になっていると考えられた。我々はこれまで、El マウスの脳内 β-EP は ddY より増加していることを報告し[2]、また痙攣後の β-EP 様免疫活性の変化から El[s] は El[ns] マウスに比して脳内 β-EP 系が機能的に亢進している可能性を示唆した[3]。前者は実験1で認められた遺伝性の痛覚鈍麻に関与するのかもしれないし、後者は実験2における見地を生化学的に支持する所見と思われる。

El マウスにおいて「痙攣履歴により脳内 β-EP 系が機能亢進し痛覚鈍麻を惹き起こす」という病態生理が存在すると考えられる。

［文献］ 1) Hammonds, R. G. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1389-1390 2) 片山雅文ら (1991) 神経化学 30, 454-455 3) 片山雅文ら (1992) 神経化学 31, 392-383 4) Suh, H. H. et al. (1988) Neuropharmacol. 27, 957-963 5) Suh H. H. et al. (1990) J. Pharmacol. Exp. Ther. 90, 981-986 6) Takagi, H. (1966) Jpn. J. Pharmacol. 16, 287-294

Fig. 1 (right) Relationship between pain response of El[s] (●), El[ns] (○), ddY[s] (■) and ddY (□) mice, and pinching intensity of artery clip. Plots are shown in log-standard scale (lower) and log-probability scale (upper). Straight lines were drawn for calculations of ED_{50} values by the method of Litchfield and Wilcoxon.

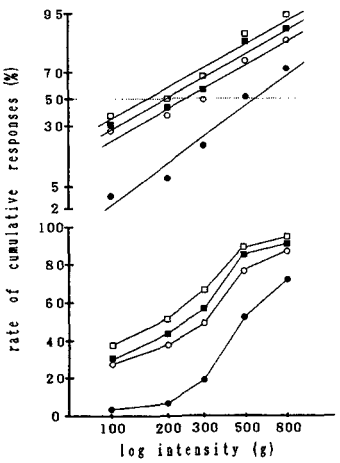
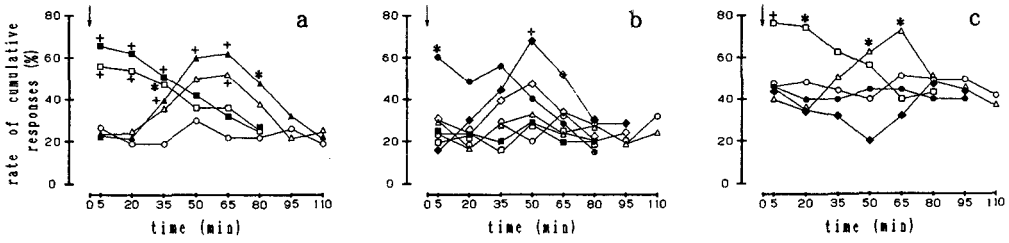


Fig. 2 (below) a: Effects of s.c. injection of naloxone 1 (□) and 5 (■) mg/kg b.w., naltrindole 0.5 (△) and 2 (▲) mg/kg b.w. and saline (○) on pain response of El[s] mice. b: Effects of i.cist. injection of naloxone 50 μg (□), 100 μg (■) and 1 mg (●)/mouse, naltrindole 100 μg (△)/mouse, β-EP-(1-27) 10 μg (◇) and 20 μg (◆)/mouse and saline (○) on pain response of El[s] mice. c: Effects of s.c. injection of naloxone 1 mg (□)/kg b.w., naltrindole 0.5 mg (△)/kg b.w. and saline (○), and of i.cist. injection of β-EP-(1-27) 20 μg (◆)/mouse and saline (●) on pain response of El[ns] mice. Each compound dissolved in saline was injected s.c. 1 ml/kg b.w. (N=50) or i.cist. 10 μl/mouse (N=25) as shown by arrow. Pinching intensity of artery clip was 300 g. Significance of difference was determined by Fisher's exact test. *P<0.05, *P<0.01 compared to saline. s.c., subcutaneous; b.w., body weight; i.cist., intracisternal.



213 カプトプリル脳室内投与が正中視索前核領域モノアミン代謝におよぼす影響

田中淳一，堀耕治＊，山室裕＊，野村正彦＊
（鳴門教育大学・人間形成基礎，埼玉医大・第一生理＊）

〔要約〕
高血圧自然発症ラット（SHR)および対照のWistar Kyotoラット(WKY)の第三脳室内にアンギオテンシン(ANG)変換酵素阻害剤であるカプトプリル(CP)あるいは生理食塩水を投与し、正中視索前核(MnPO)領域のモノアミン代謝の変化をマイクロダイアリシス法を用いて検討した。CP投与により、WKYのMnPO領域のノルアドレナリン(NA)，ドーパミン(DA)およびその代謝産物の細胞外量は有意な減少を示した。一方、SHRではCP投与によるNAの有意な低下は観察されず、またDAとその代謝産物であるhomovanillic acid (HVA)は減少したが、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)は有意な変化を示さなかった。これらの結果より、脳内ANG系がMnPO領域のNAとDA代謝調節に係わっており、この代謝調節機構はSHRとWKYでは異なることが推察された。

ANG IIの脳室内投与は飲水行動や昇圧反応を引き起こすが、この作用にアミン作動性ニューロンが関与していることが考えられている。第三脳室前腹部に位置しているMnPOは、血圧調節、飲水行動の誘起やバゾプレッシン分泌調節に関与している（1，2)。このMnPO領域はモノアミン作動性(3)およびANG作動性(4，5)ニューロンの神経支配を受けている。 我々は、MnPOにおけるANG系とモノアミン系ニューロンとの係わりを明らかにする目的で、CPの脳室内投与がMnPO領域のモノアミン代謝に及ぼす影響をマイクロダイアリシス法を用いてSHRとWKYで検討した。

［方法］
ネンブタール麻酔下のSHRおよびWKY（18-22週齢）の第三脳室にステンレス製カニューレを、MnPOへステンレス製ガイドカニューレを入れ、デンタルセメントで固定した。手術後３日目に直管型で透析膜長１mmのプローブをMnPOへ刺入し、リンゲル液で６時間以上灌流した。ベースラインが安定したことを確認した後、第三脳室へ生理食塩水に溶解したCP（300 μg/kg，34-48 μl)または生理食塩水（36-44 μl)を注入した。透析は流速1μl/minで行ない、1時間の透析液を1試料とした。透析液中のNA、DA、DOPAC、HVAおよび5-HIAAは電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフにより定量した。カニューレと透析プローブの刺入部位は、実験終了後脳組織標本を作成し確認した。

［結果と考察］
投与直前のMnPO領域のNA、HVA、5-HIAA量には両群間に差は認められなかったが、DAおよびDOPAC量はWKYに比べSHRの方は高い値を示した。CPあるいは生理食塩水の第三脳室内投与に対するWKYのMnPO領域のモノアミン量変化をFig. 1に、SHR群における変化をFig. 2に示す。WKY群では、CP投与によりNA、DA、DOPACおよびHVAは有意に減少したが、5-HIAAは有意な変動を示さなかった。一方、SHR群ではDAにCP投与による減少傾向、そしてHVAに有意な減少を認めたが、WKY群と異なりNAとDOPACにはCP投与の効果が観察されなかった。以上の結果により、脳内ANG系がMnPO領域におけるNAおよびDA代謝に対して促進的な役割を持つことが示唆された。また、WKYとSHRではこの調節機構に差があることが考えられた。

［文献］
1) Lind,R.W. & Johnson,A.K. (1982) J. Neurosci., 2, 1043-1051.
2) Mangiapane,M.L. et al. (1983) Neuroendocrinology, 37, 73-77.
3) Saper,C.B. et al. (1983) Neurosci. Lett., 42, 285-291.
4) Lind,R.W. et al. (1984) Brain Res., 321, 209-215.
5) Tanaka, J. et al. (1987) Exp. Brain Res., 68, 579-585.

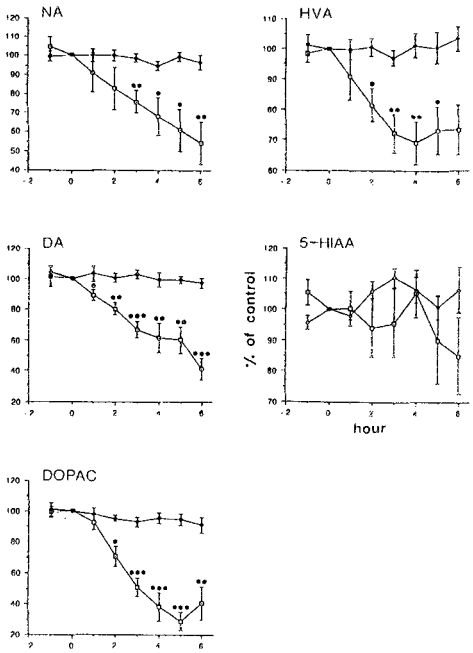


Fig. 1. Changes in extracellular NA, DA, DOPAC, HVA and 5-HIAA in the MnPO area of WKY in response to injections of CP (open square) or saline (closed diamond) into the third ventricle. Mean ± S.E.M. ***P<.001, **P<.01, *P<.05 vs. 0hr.

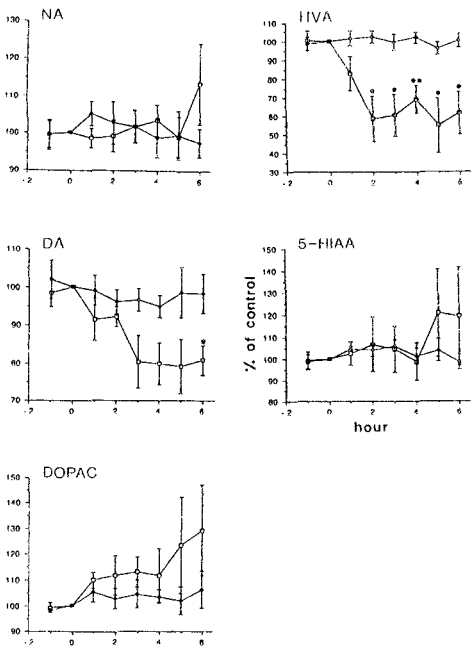


Fig. 2. Changes in extracellular NA, DA, DOPAC, HVA and 5-HIAA in the MnPO area of SHR in response to injections of CP (open square) or saline (closed diamond) into the third ventricle. Mean ± S.E.M. **P<.01, *P<.05 vs. 0hr.

214 フェレット腸管からのセロトニン脱顆粒と腹部求心性迷走神経活動におよぼす制癌剤の影響

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〕
嘔吐のモデル動物フェレットを用いた実験において制癌剤誘起性嘔吐の際に腸管ならびに延髄最後野のセロトニン(5-HT)濃度の上昇を伴うことを報告した。消化管の5-HTはenterochromaffin (EC) 細胞に広く分布している。制癌剤はEC細胞からの5-HT脱顆粒を促し、迷走神経終末の5-HT_3受容体を刺激する。制癌剤誘起性嘔吐の詳細な発現機序を明らかにするために腸管EC細胞からの5-HT脱顆粒ならびに末梢から情報を嘔吐中枢へ伝達する腹部迷走神経活動におよぼす制癌剤の影響を検討した。Cisplatin投与群の腸管からの5-HT遊離量は対照群に比し有意に上昇した。腹部求心性迷走神経活動はcisplatin投与群においては投与90分後、cyclophosphamide投与群では投与20分後より有意に増加した。フェレットが嘔吐を惹起する時間に一致して神経活動の増加が観察された。制癌剤は回腸からの5-HT遊離を促し、遊離した5-HTが直接腹部求心性迷走神経終末の5-HT_3受容体を刺激することにより迷走神経活動が上昇し、嘔吐を発現させる。以上の結果より制癌剤は主に消化管から嘔吐中枢の存在する延髄最後野へ腹部迷走神経を介して嘔吐を引き起こすことを明らかにした。

〔緒言〕

我々はフェレットを用いて制癌剤による嘔吐に回腸ならびに嘔吐中枢の存在する延髄最後野の5-HT含量上昇が関与していることを報告してきた[1,2]。全身の90%以上の5-HTは腸管のEC細胞に存在する。EC細胞より脱顆粒した5-HTが消化管に広く分布する迷走神経終末に存在する5-HT_3受容体に結合し求心性迷走神経を介して嘔吐中枢を刺激し嘔吐が発現するものと考えられている[3]。一方腹部迷走神経を切離することによりcisplatinによる嘔吐が3分の1から5分の1に有意に抑制された[2]。Cisplatinによる嘔吐のほとんどは腹部求心性迷走神経を介して延髄最後野にある嘔吐中枢に刺激が伝達されると考えられる。本研究は詳細な嘔吐発現機序を探るべくEC細胞からの5-HTの脱顆粒に関してフェレット摘出腸管を用い5-HT遊離量の測定を行い、さらに腹部求心性迷走神経活動を電気生理学的に検討した。

〔方法〕

1．5-HT遊離量の測定：Cisplatin投与60分後フェレットから回腸を素早く摘出した。Milanoらの方法[4]に準じてあらかじめ混合ガス(95%O_2+ 5%CO_2)で飽和したModified Krebs液中に2～3cmの回腸片を懸垂した。栄養液槽は温度を37℃に保ち混合ガスを通気した。20分ごと6時間まで栄養液中に遊離した5-HTをHPLC-ECDにて測定した。

2．求心性迷走神経活動の測定：ウレタン(500mg/kg)ならびにα-クロラロース(50mg/kg)の腹腔内麻酔後、人工呼吸器で呼吸を管理した。Yoshiokaらの方法[5]に準じフェレットを腹臥位に固定し胸腔背面部から腹部迷走神経後枝を剥離切断しその中枢断端を白金イリジウム双極電極上にのせ、求心性の迷走神経活動を測定した。得られたパルスをバイオアンプにて増幅しパルスカウンターにより10秒ごとに積算した。リアルデータおよび積算データは同時にサーマルアレイレコーダーに記録し、投与前の放電カウントを100%とし薬物投与後の値をパーセント補正して表わした。薬物はcisplatin(10mg/kg, i.p.)、cyclophosphamide (200mg/kg, i.p.)ならびに硫酸銅(40mg/kg, p.o.)を用いた。

〔結果〕

Cisplatin投与60分後から20分ごとの回腸からの5-HT遊離量をヒストグラムで表わした(Fig. 1)。対照群に比較してcisplatin投

与群の5-HT遊離量は投与120分後には2倍以上と有意に上昇し、6時間後まで有意に上昇し続けた。

求心性迷走神経自発放電は行動観察時における嘔吐の作用モードと比較するとcisplatinの嘔吐発現時間に一致して投与後約90分すぎから増加が観察され投与110分からは有意に増加した(Fig. 2)。この神経活動は投与前値と比較すると最大350%に達し、180分過ぎまで有意な活動の増加が観察された。Cyclophosphamideにおいてもcisplatin同様嘔吐発現時間に一致して投与後20分すぎから求心性迷走神経活動は対照群に比較して増加が観察された。Cyclophosphamideによる神経の自発放電も180分過ぎまで持続し最大カウントは400%に達した。硫酸銅投与群においても嘔吐発現時間に一致して投与直後に求心性迷走神経活動が有意に増加し最大約300%に達した。

〔考案〕

フェレット摘出腸管を用いたEC細胞からの5-HT脱顆粒に関しての遊離実験において、cisplatin投与群の20分ごとの5-HT遊離量は対照群に比較すると投与120分後には著明に増加していた。全身の5-HTの90%が腸管のEC細胞に分布する。EC細胞より放出された5-HTは腸管周辺に分布する迷走神経求心性線維終末の5-HT_3受容体を刺激する。さらに嘔吐惹起物質の嘔吐発現のT_{max}に一致して求心性腹部迷走神経活動の増加が観察された。延髄最後野の嘔吐中枢に入力する情報はCTZを経るものと直接到達するものとがある[6]。制癌剤誘起性嘔吐は迷走神経の切離によりその2/3～4/5は抑制できることをすでに報告した[2]。本実験で使用した腹部迷走神経の求心性線維は嘔吐中枢に直接達し、嘔吐中枢に至る経路のうちでも最も大きな役割を占めている。制癌剤の種類が異なってもまた機序の異なる硫酸銅による嘔吐に対しても同様な結果が得られたことは嘔吐中枢への求心路の意義がさらに深まったと考えられる。以上より制癌剤は主に腹部迷走神経を介して消化管からの情報を嘔吐中枢へ伝達し嘔吐を発現させることを明らかにした。

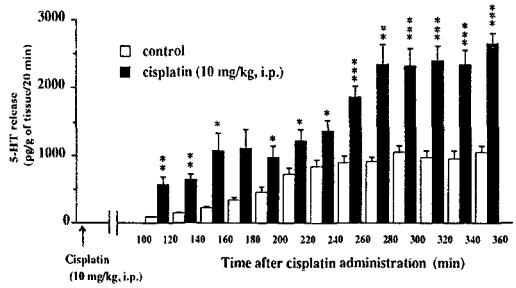


Fig. 1 Effects of cisplatin on release of endogenous 5-HT during 20 min from ferret ileum. mean±SE, n=6.
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control.

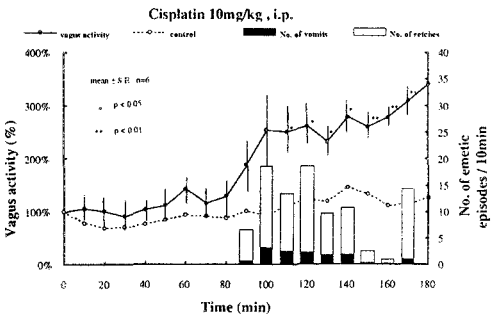


Fig. 2 Effects of cisplatin on abdominal afferent vagal nerve activity and mode of emetic action induced by cisplatin.

〔文献〕

1) Endo,T., Minami,M., Monma,Y. et al. (1990) Biogenic Amines 7, 525-533.

2) Endo,T., Minami,M., Monma,Y. et al. (1992) Biogenic Amines 9, 163-175.

3) Higgins,G.A., Kilpatric,G.J., Bunce,K.T. et al. (1989) Br. J. Pharmac. 97, 247-255.

4) Milano,S., Simon,C. and Grelot,L. (1991) Clin. Autonomic Res. 1, 275-280.

5) Yoshioka,M., Ikeda,T., Abe,M., et al. (1992) Br. J. Pharmacol. 106, 544-549.

6) Wang,S.C. and Borison,H.L. (1952) Gastroenterology 22, 1-12.

215 Triprolidineのachatin-I拮抗作用

ディビナ・E・サントス，劉　国君，張　　唯，荒木陽子，竹内　宏
（岐阜大・医・第1生理）

〔要約〕アフリカマイマイ（Achatina fulica Férussac）の神経節より分離された神経興奮性ペプチド，achatin-Iの拮抗物質として，histamine blocker（H1-blocker）である triprolidine を見いだした．この物質の achatin-I拮抗作用の ED_{50}（95 % 信頼限界）は，2.007 x 10^{-4} M（0.961 - 8.102 x 10^{-4} M）と計算された．他の H1-blocker，diphenhydramine, tripelenamine, pyrilamine, d-chlorphenylamineなどは，achatin-I の興奮作用に対して，まったく影響を与えなかった．

［はじめに］Achatin-I（Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp）（3，4）の拮抗物質を見いだすことを，本研究の目的とした．Hiatamine blocker（H1-blocker）のなかで，triprolidine（2-[1-(4-methyphenyl)-3-(1-pyrrolidimyl)-1-propenyl] pyridine）が有効であることを見いだしたので，この物質を中心に研究が進められた．

［実験方法］Achatina fulica は，フィリピンのマニラ市およびセブ市より空輸された．本研究全般を通じて，Achatina神経節中に同定される巨大神経細胞，PON（periodically oscillating neurone）（8）が使用された．その細胞体に2本のガラス微小電極が刺入され，膜電位固定が行われた（6）．Achatin-I（3 x 10^{-4} M）がガラス毛細管微小ピペットに充填され，圧（2 Kg/cm^2, 400 msec）により神経細胞に局所投与された．拮抗作用を検定すべき物質は，スクリーニング・テストとしては 10^{-4} M に生理溶液（7）により溶かされ，実験標本に灌流で与えられた．拮抗物質の作用の時間経過については，achatin-I により発生する内向き流（I_{in}）値を，繰り返し測定のための analysis of variance（ANOVA）ならびに Bonferroni's t-test（2）により，拮抗物質投与前と投与後とで有意差があるかどうか検定した（*, $P < 0.05$）．拮抗物質の用量・反応曲線は，probit法（5）により解析された．

［結果と考察］10分間隔で achatin-Iの圧投与を6回行い，これによる I_{in}の安定性を検討した．Fig. 1, A に見られるように，これについたは充分に満足すべき結果が得られた．

Achatin-I の圧投与により得られる I_{in}に対する，histamine（H1）拮抗物質の作用を検定した．Triprolidineは H1-blockerの1つである（1）が，10^{-4} Mの濃度で，この I_{in}値を有意に減少させた．この場合 triprolidine 灌流後10分では I_{in}はやや減少の傾向を見せたが，有意差を示すには至らず，20分後には I_{in}は有意差を示すまで減少した．その後生理溶液で標本を洗ったが，ごの後 20 分までは triprolidine による I_{in}値の減少が持続された（Fig. 1, B）．なお 3 x 10^{-5} M triprolidineの灌流により，achatin-I による I_{in}値は減少の傾向を示したが，有意差を得るには至らなかった．

3 x 10^{-4} M triprolidine の灌流により，10分後にはすでに achatin-Iによる I_{in}値が有意に減少した．生理溶液で標本を洗った後，30分後には，I_{in} 値には回復の傾向が見られた（Fig. 1, C）．10^{-3} M triprolidine 灌流により，I_{in} 値はさらに大きく減少した．このように，triprolidineは用量依存性に，achatin-I による I_{in}値を減少させた．

Fig. 1, D には，achatin-I による I_{in}抑制のための，triprolidineの用量・作用曲線を示す．横軸には triprolidineの濃度（対数表示），縦軸には I_{in}の比較値（triprolidine投与後 20 分の値）を示す．この曲線より，ED50（95 %信頼限界）= 2.007 x 10^{-4} M（0.961 - 8.102 x 10^{-4} M），Hill coefficient = 0.938203（r = 0.982164）と計算された．

他の H1-blocker，diphenhydramine, tripelenamine, pyrilamine, d-chlorphenylamine などを，10^{-4}の濃度で灌流したが，これらは achatin-Iの興奮作用に対して，まったく影響を与えなかった．

Achatin-I は私どもにより分離・同定され，比較的近年（1989年）に報告されたもの（3，4）なので，その拮抗物質については，本研究以前にはまったくその手がかりがなかった．しかしながら本研究により，triprolidine が achatin-Iに対して拮抗性を示すことが見いだされた．しかしながらその拮抗性の機構については，まだこれからの仕事である．すくなくとも現在いえるのは，triprolidineの achatin-Iに対する拮抗性は，その抗 histamine作用とは直接関係がないことであろう．何故なら本研究で試験された他の H1-blocker がまったく achatin-Iに対して作用を示さなかったからである．Triprolidineの achatin-Iに対する拮抗作用の機構解析は，achatin-I 自身の興奮作用，あるいはその神経修飾作用の解析と平衡して，なされねばならぬ研究テーマであろう．

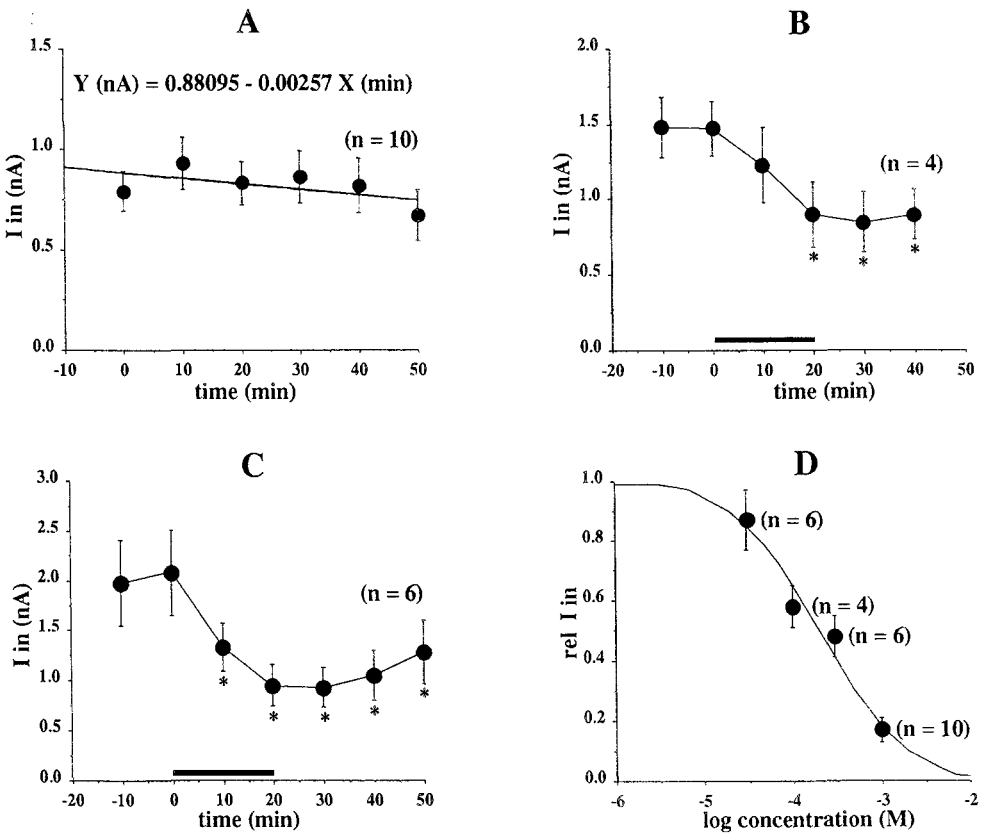


Fig. 1. Antagonistic effects of triprolidine applied by bath perfusion on the excitation produced by pressure ejection (2 Kg/cm^2, 400 msec, 3 x 10^{-4} M) of achatin-I in PON (periodically oscillating neurone). A, stability of the inward current (I_{in}) produced by achatin-I alone. Straight line was drawn by the linear regression. B, influence of triprolidine perfusion at 10^{-4} M on achatin-I-produced I_{in}. C, influence of triprolidine at 3 x 10^{-4} M. In A, B and C, Abscissa, time course (min); ordinate, I_{in} produced by achatin-I (nA); and small vertical bars, S.E.M. In B and C, horizontal line shows the achatin-I perfusion; Bonferroni's t-test was performed following ANOVA for repeated measurements (*, $P < 0.05$). D, dose-response curve of triprolidine for antagonistic effects to achatin-I excitation. Abscissa, logarithmic scale of triprolidine concentration (M); ordinate, relative value of I_{in} produced by achatin-I 20 min after the triprolidine perfusion. The curve was drawn by fitting the ideal sigmoidal curve ($r = 0.98307$). Throughout these experiments, the holding voltage (V_h) was maintained at -55 mV.

References

(1) Casy, A.F. et al. (1992) J. Pharm. Pharmacol., 44, 791-795.
(2) Glantz, S.A. (1987) Primer of biostatistics: the program. McGraw-Hill Book Co., P.P. 1-379.
(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) Litchfield, J.T.jr. & Wilcoxon, F. (1949) J. Pharmacol. Exp. Ther., 96, 99-113.
(6) Okamoto, H. et al. (1976) J. Physiol. (Lond.), 254, 607-638.
(7) Takeuchi, H. et al. (1973) C. R. Soc. Biol. (Paris), 167, 598-602.
(8) 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.

216 エタノールのリン脂質-カルシウム細胞内情報伝達系への作用

斎藤 浩[1) 2)]、西田 朗[1)]、福田裕恭[1) 2)]、清水雅美[1)]
内富庸介[2)]、本橋伸高[2)]、山脇成人[2)]
([1)] 国立呉病院臨床研究部、[2)] 広島大神経精神)

〔要約〕

ラット脳膜画分のホスホリパーゼC(PLC)、ホスホリパーゼD(PLD)、イノシトール3リン酸(IP_3)受容体およびラット前大脳皮質初代培養細胞の細胞内カルシウム濃度へのエタノールの作用を検討した。高濃度(100mM以上)のエタノールは、PLC及びPLD活性を直接阻害したが、1MまでのエタノールはIP_3受容体結合能には直接作用しなかった。また、高濃度(100mM以上)のエタノールは細胞内カルシウム濃度を上昇させた。一方、エタノール慢性投与ラットでは、エタノールに対するPLCの感受性低下が認められたがPLDでは認められなかった。以上より、エタノールは細胞内情報伝達系に種々の作用をもつこと、また、エタノール慢性処置は、エタノールに対する感受性をPLC選択的に低下させることが判った。

［目的］

中枢神経系におけるエタノールの作用のをめぐり多くの議論があるが未解決な部分が多い。エタノールの作用の機序として細胞内情報伝達系、なかでもG蛋白質－アデニレートサイクラーゼ系に関しては、多くの研究がなされている。一方、サイクラーゼ系と並んでもうひとつの重要な細胞内情報伝達系であるリン脂質代謝系へのエタノールの作用の有無が最近注目されてきている(1)。そこで、本研究ではリン脂質情報伝達系のなかでPLC、PLD、IP_3受容体（ラット脳）および、細胞内カルシウム（ラット前大脳皮質初代培養細胞）へのエタノールの作用を検討した。

［方法］

膜標品の作成

前大脳皮質は、10倍量のhomogenizing buffer (0.5 mM EDTA/1 mM dithiothreitol/0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride/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。小脳は、10倍量のhomogenizing buffer (1 mM EDTA/50 mM Tris-HCl, pH 8.3)でhomogenizeした後、35,000gで10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。

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)。

PLD活性測定

PLD活性測定は、既報に従い行なった(4)。

エタノール慢性投与実験

Wistar系雄性ラット(体重約200g)を使用した。対照群はオリエンタル酵母社製の液体飼料のコントロール食、エタノール群は同社のエタノール液体飼料食を与え3週間pair feedingした。

培養神経細胞内Ca^{2+}濃度変化測定

培養神経細胞の作成は、既報どうりに行なった(5)。エタノールはすべて還流液に溶解して暴露し、340nm/360nmの二波長励起蛍光変化をコンピューター画像処理により解析した。

IP_3受容体結合実験

IP_3受容体結合実験は、既報を一部改変して行なった(6)。

培養神経細胞内Ca^{2+}濃度変化測定

エタノールはすべて寒流液に溶解して暴露し、fura-2を用いた。340nm/360nmの二波長励起蛍光変化をコンピューター画像処理により解析した。

［成績］

1)エタノールのPLC活性への作用

ラット前大脳皮質膜分画のPLC活性へのエタノールの作用を検討したところ、100 mM以上の高濃度で、エタノールは用量依存性にPLC活性を抑制した(Fig.1)。生理的濃度である10 mMのエタノールとエタノールの代謝産物であるアセトアルデヒド(AA、10μM)のPLC活性への作用を検討したが、AA単独、AAと10mMのエタノール併用ともにPLC活性にはなんら作用しなかった(n=4, $p>0.05$)。

2)エタノール慢性投与のPLC活性への影響

アルコール慢性投与のPLC活性への影響を検討した。対照群と慢性投与群でPLCの基礎活性には差がなかった(Fig.2)。しかし、500 mMのエタノール存在下での活性は対照群では有意なPLC活性低下を引き起こしたが(n=8, $p<0.05$)、慢性投与群では有意な低下が見られなかった(n=8, $p>0.05$)(Fig.2)。

3)エタノールのPLD活性への作用

ラット前大脳皮質膜分画のPLD活性へのエタノールの作用を検討したところ、100 mM以上の濃度で、エタノール

は用量依存性にPLD活性を抑制した(Fig.1)。生理的濃度である10 μMのアセトアルデヒドや10 mMのエタノールは単独ではラット脳のPLD活性に有意な変化を示さなかったが、AAとエタノールとの併用はPLD活性を有意に抑制した(n=4, $p<0.05$)。

4)エタノール慢性投与のPLD活性への影響

アルコール慢性投与のPLD活性への影響を検討した。慢性投与群でのPLDの基礎活性は対照群と差がなかった(n=8, $p>0.05$)。

5)エタノールのIP_3受容体への作用

ラット小脳膜分画のIP_3受容体へのエタノールの作用を検討したが、1 Mまで影響をしなかった。

6) 細胞内カルシウム濃度へのエタノールの作用

ラット前大脳皮質初代培養細胞において細胞内カルシウム濃度に対するエタノールの作用を検討したところ、100 mM以上の濃度でエタノールは用量依存性に細胞内カルシウム濃度を上昇させた。

[考察]

急性のin vitro実験でエタノールがPLC活性を抑制するという結果は、脳や神経系の培養細胞で、高濃度のエタノールが程度は弱いながらPLC活性を抑制するという報告(1)に一致した。PLDはエタノール存在下で、ホスファチジルエタノール(PEt)を産生するが、高濃度(400mM以上)のエタノールでは、PEt産生が抑制されるというラット脳での報告があり(2)、今回の結果と一致した。エタノールの作用は高濃度でしか観察されなかったが、アセトアルデヒドとエタノールとの併用はPLD活性を有意に抑制したことから、通常の飲酒状態でPLD活性の選択的な抑制が起こっている可能性を示唆した。

一方、エタノール慢性投与実験では、500mMのエタノールによるPLC活性の抑制は対照群では有意な低下を引き起こしたが、慢性投与群では有意な低下が見られなかったことから、慢性投与群でのエタノール感受性の低下が示唆された。これは、アルコール依存形成に関連しているかも知れない。今後はこの感受性低下のメカニズム解明のため受容体やG蛋白質を介したPLC活性化やPLCの各サブタイプへのエタノールの作用を検討していく必要がある。

初代培養細胞で、エタノールは細胞内カルシウム濃度を上昇させた。また、エタノールはPLC活性を抑制したが、IP_3受容体に対しては影響を与えなかった。これらのことより、この細胞内カルシウム濃度上昇はエタノールがPLC以外の細胞内カルシウム動員系に作用した可能性が示唆された。

[文献]

1) Hock J.B.et al (1992), FASEB J. 6.2386-2396. 2) Kobayashi M. et al (1987), J. Neurochem. 48.1597-1603. 3) Nishida A. et al (1988), Neurosci. Lett. 90. 354-357. 4) Nishida A. et al (1992), Brain Res. 595.12-16. 5) Shimizu M. et al (1992), Neurosci. Lett.146. 101-104. 6) Paul F. et al (1987), J. Biol. Chem.262.12132-12136.

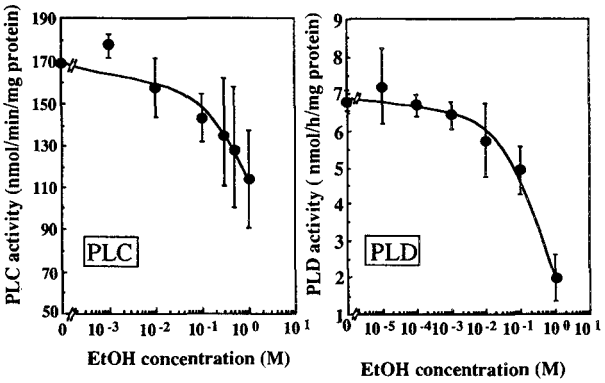


Fig.1 Effect of EtOH on PLC and PLD activities in rat brain.
These results represent the mean ± S.D. of three independent experiments

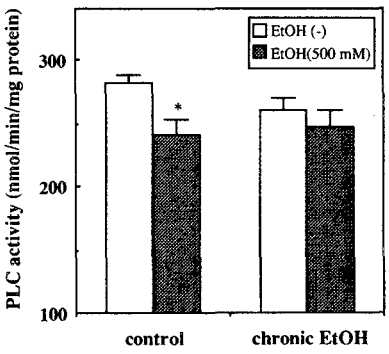


Fig.2 Effect of EtOH on PLC activity in rat brain.
Frontal cortex membranes were obtained from rats (n=8) fed by control feed (□) or by 5% etanol feed (▨) for 3 weeks. These results represent the mean ± S.D. of 8 rat. *P<0.05.

217　三環系抗うつ薬のラット脳ホスホリパーゼC活性化作用

福田裕恭[1),2)]・西田　朗[1)]・清水雅美[1)]
岡本泰昌[2)]・山脇成人[2)]
([1)]国立呉病院臨床研究部・[2)]広島大・神経精神)

〔要約〕

ラット脳膜画分および細胞質画分でのホスホリパーゼC(PLC)活性への三環系抗うつ薬の作用を検討した。その結果、in vitroな系において三環系抗うつ薬は用量依存性(10^{-4}M以上)に膜画分および細胞質画分のＰＬＣを活性化した。

［目的］

近年、細胞外の情報が受容体に伝わり、さらに細胞内に伝わる機構として細胞内情報伝達系の存在が明かにされ、その機能も次々に解明されてきている。これに伴い、抗うつ薬の作用機序として以前から考えられているシナプス前部のモノアミン再取り込み阻害や受容体機能への作用以外に、細胞内情報伝達系に対する直接作用の可能性が注目されてきている(1)。細胞内情報伝達系のなかでもホスファチジルイノシトールーCa^{2+}動員系に対して抗うつ薬が作用する可能性が示唆されている(1)。我々も、ラット前大脳皮質初代培養細胞で抗うつ薬によるイノシトール1,4,5-三リン酸の増加と細胞内Ca^{2+}濃度の上昇を報告しているが(2)、その作用機序に関しては未解決である。そこで今回我々は、ラット大脳皮質でのホスホリパーゼC(PLC)活性へのイミプラミンの作用を検討した。その結果、イミプラミンは、in vitroな系において用量依存性(10^{-4}M以上)にPLCを活性化し、しかもその活性化はPLCへの直接作用による可能性が示唆されたので報告する。

［方法］

1)酵素標品の作成

Wistar系雄性ラット(体重約250g)または初代培養細胞を使用した。断頭後直ちに前大脳皮質を取り出し、10倍量のhomogenizing buffer (0.5 mM EDTA/1 mM dithiothreitol/0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride/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、その上清を細胞質画分、沈渣をhomogenizing bufferで再懸濁したものを膜画分とした。

2)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]phosphatidylinositol-4,5-二リン酸と膜標品(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。

3)ラット前大脳皮質初代培養細胞作成

初代培養細胞作成は、既報どうりに行なった(2)。胎生第18日のラット胎仔より前大脳皮質を取り出し、0.25%トリプシン、0.02%DNase I で37℃，20分間処理した。得られた細胞懸濁液を予め単層培養したアストログリア細胞上にまき、7－12日間培養した。

［成績］

イミプラミンの膜画分PLC活性への影響を検討したところ、イミプラミンは、in vitroな系において、用量依存性(10^{-4}M以上)にPLCを活性化した。また、他の三環系抗うつ薬(desipramine, amitriptyline)もPLCを活性化したが四環系抗うつ薬(maprotiline, mianserin)やLi^+、pargylineにはPLC活性化作用はなかった。PLCと連関した３種(mACh, 5-HT_2, α_1)の受容体の阻害剤(atropine, spiperone, prazosin)を共存(1 M)させてもイミプラミンのPLC活性化に何ら影響しなかった。ラット前大脳皮質の初代培養細胞で百日咳毒素(100 ng/ml, 24h)処置と無処置の膜画分のイミプラミンによるPLC活性化を比較したが、百日咳毒素処置はイミプラミンのPLC活性化に何ら影響しなかった。イミプラミンは細胞質画分のPLCも膜画分と同程度活性化した。イミプラミンによるPLC活性化のCa^{2+}依存性を検討したところ、Ca^{2+}非存在下ではPLC活性化は認められなかったが、Ca^{2+}存在下ではイミプラミンは、Ca^{2+}のPLC活性化効果に相加的にPLCを活性化した。リン脂質のひとつであるphosphatidylethanolamineもPLCを活性化するがイミプラミンの活性化作用はphosphatidylethanolamineによるPLC活性化に非依存的であった。

［考察］

イミプラミンや他の三環系抗うつ薬は、10^{-4} M以上の濃度でPLCを活性化したが、臨床薬用量での抗うつ薬の脳内濃度は$10^{-6}-10^{-5}$Mといわれている。また、四環系抗うつ薬はPLCを活性化しなかった。これらの結果から抗うつ薬のPLC活性化と抗うつ作用との関連は否定的である。抗うつ薬のPLC活性化のメカニズムについて検討した。PLCと連関した３種(mACh, 5-HT_2, α_1)の受容体の阻害剤がイミプラミンのPLC活性化に何ら作用しなかったことから、少なくともこれらの受容体を介した作用ではなかった。この３種の受容体を含む種々の受容体が百日咳毒素感受性または非感受性Ｇ蛋白質を介してPLCと連関していることと、百日咳毒素が受容体とＧ蛋白質の共役を阻害することが知られている。初代培養細胞に百日咳毒素処置をしたが、イミプラミンのPLC活性化に何ら差がなかったことから、イミプラミンの作用はこれらの百日咳毒素感受性Ｇ蛋白質に共役した受容体を介したPLC活性化でもないことが示唆された。また、イミプラミンは細胞質画分のPLCも膜画分と同程度活性化した。これらの結果からイミプラミンは直接PLCに作用する可能性が示唆された。Ca^{2+}非存在下では活性化は認められず、イミプラミンのPLC活性化はCa^{2+}依存性であったが、Ca^{2+}存在下ではイミプラミンはCa^{2+}のPLC活性化効果に相加的にPLCを活性化し、PLCのCa^{2+}感受性には変化を与えなかった。イミプラミンはPLCのCa^{2+}感受性部位以外に作用してPLCを活性化することが示唆された。イミプラミンの活性化作用がphosphatidylethanolamineによるPLC活性化に非依存的であったことから、イミプラミンはphosphatidylethanolamineと異なるPLC活性化機構に作用していることが示唆された。我々の報告したラット前大脳皮質初代培養細胞で抗うつ薬によるイノシトール1,4,5-三リン酸の増加と細胞内Ca^{2+}濃度の上昇という結果は(2)、今回の無細胞系での結果と濃度の点でもよく一致していた。また、我々はイミプラミンがホスホリパーゼＤを抑制することを報告しており、イミプラミンのホスホリパーゼに対する相反した結果は情報伝達機構研究の上で抗うつ薬利用の可能性を示唆する。

［文献］

1) 大金ら(1992) 神経化学 35、528-529
2) Shimizu, M. et al (1993) J.Neurochem.60. 595-601.
3) Nishida, A. et al (1988), Neurosci. Lett. 90. 354-357

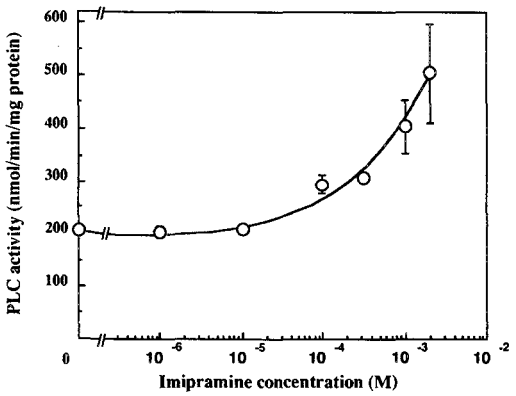


Fig. 1 Effect of imipramine concentration on PLC activity.

Experimental conditions are described in methods except for the indicated concentration of imipramine. Data represent the mean ± S.D. of four independent experiments.

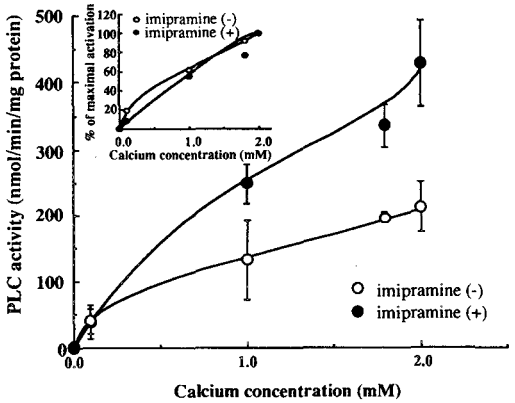


Fig. 2 Effect of calcium concentration on imipramine-induced PLC activation.

Experimental conditions are described in methods except for the indicated concentrations of calcium with 1 mM imipramine (●) or without imipramine (○). Inset, data were redrawn as a percentage of the maximal response with 2 mM calcium. Data represent the mean ± S.D. of four independent experiments.

218 ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する情報伝達系に対するリチウムの効果

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、リチウムによるムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)の制御機構について検討した。低濃度(<2mM)と高濃度(>5mM)のリチウムをそれぞれ7日間作用させた場合、低濃度のリチウムは小脳顆粒細胞に対して形態的および機能的に神経栄養因子作用を示した。すなわち、低濃度ではリチウムは神経突起の伸長を促進し、カルバコールによるイノシトールリン脂質の代謝回転、N-methyl-scopolamine (NMS) 結合部位、さらにm3-mAChR mRNAを増加させc-fos mRNAを誘導した。一方、高濃度のリチウムは明らかな細胞毒性を示した。

[目的]

ラット小脳顆粒細胞はグルタミン酸を主たる神経伝達物質とする興奮性神経細胞で*in vitro*においてホスホリパーゼCにカップルするさまざまな受容体を発現している。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、それぞれに共役するエフェクターシステムも異なっているが、ラット小脳顆粒細胞ではこのうちm2-およびm3-mAChRを発現しており、m3-mAChRはホスホリパーゼCを介してイノシトールリン脂質代謝を亢進させる。一方、リチウムは、細胞内のイノシトールを減少させ、さらにホスホリパーゼCの基質であるホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸を減少させることにより細胞内イノシトールリン脂質代謝系を抑制するといわれており(1)、臨床上、リチウムの躁病治療効果の理論的根拠の一つになっている。しかしリチウムの作用は必ずしも単純ではない。今回われわれは*in vivo*においてリチウムの作用部位の一つであるmAChRの細胞内情報伝達系を調べるために幼若ラットの小脳顆粒細胞の初代培養系をモデルとして用い、mAChRを介するイノシトールリン脂質代謝、受容体結合とmRNAの発現について検討した。

[方法]

細胞培養: 生後8日目のSprague-Dawley ラットの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, 50 μg/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 (10 μM)を加え、培養8日目に反応を停止した。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。イノシトールリン脂質代謝: [^{3}H]*myo*-inositol (2.5 μCi/ml)で細胞を16-18時間ラベルしたのちPhysiological Saline Solution (PSS)で細胞を洗い、5mMのLiClを含むPSS 1mlで37℃、20分間インキュベートした。カルバコール(100 μM)を加え、さらに37℃、45分間インキュベートした。反応液を吸引し、冷メタノールを加え細胞を集めBio-Rad AG-1x8 カラムを用い0.2M ammonium formate/0.1N formic acidにより溶出し放射活性を測定した。受容体結合実験: 培養細胞をPSSで洗浄後、[^{3}H]NMS (2nM)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。非特異的結合はアトロピン(1 μM)存在下で測定した。

[結果および考察]

低濃度(<2mM)および高濃度(>5mM)のリチウムを培養2日目より7日間作用させ、その形態の変化を観察すると低濃度では個々のニューロン、神経繊維の増大伸展が著明にみられたのに対し、高濃度では神経細胞の剝離、神経突起の減少がみられニューロン間の連携に統合性を欠いていることが窺えた。

培養２日目に各々の濃度のリチウムを加え、培養7日目に細胞を[^{3}H]*myo*-inositolでラベルし、8日目にmAChRのアゴニストであるカルバコールによるイノシトールリン脂質代謝を測定したところ濃度依存性にリチウム2mMまで有意に増加した。10mMのリチウムではイノシトールリン脂質代謝回転は有意に減少した。[^{3}H]NMS結合実験においてはリチウム2mMで約20%結合部位が増加し、高濃度では著明に減少した(Fig.1)。つぎにm2-およびm3-mAChR mRNAの発現に対するリチウムの経時的変化をみると1.5mMのリチ

ウムを5日間作用させるとm3-mAChR mRNAが約80%増加し以後徐々に減少した。5mMのリチウムではm3-mAChR mRNAは連続的に減少し、m2-mAChR mRNAはどちらの濃度においても対照群より増加することはなかった(Fig.2)。リチウムを7日間作用させ、m3-mAChR mRNAおよびc-fos mRNAを測定したところ、1.5mMにピークをもつ2相性の変化を示し、カルバコールを介するイノシトールリン脂質代謝や[^{3}H]NMS結合実験の結果とほぼ一致した(Fig.3)。β-actin mRNAはリチウム3mMまで変化はみられないが、それ以上の濃度では減少しており、形態上の変化と照らし合わせると、高濃度のリチウムによるイノシトールリン脂質代謝回転やムスカリン性アセチルコリン受容体数およびそのmRNAの減少は、非特異的な細胞毒性を反映しているものと考えられる。また、m2-mAChR mRNAはリチウム10mMまで連続的に減少していることから、リチウムの効果は低濃度であっても、細胞内転写機構の全般的な上昇をきたすのではなく受容体サブタイプに選択的に作用していることを示唆している。

[文献]

1) Berridge,M.J.(1989)J.Am.Med.Ass.262,1834-1841.

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

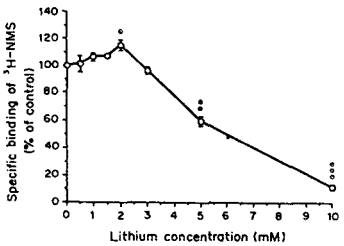


Fig.1. Lithium-induced changes in [^{3}H]NMS binding to intact cerebellar granule cells. Cells were pretreated with the indicated concentration of LiCl for 7 days. At day 8, cells were washed with PSS and the specific binding of [^{3}H]NMS to intact cells was measured. The data are the mean ± SEM of a quadruplicate experiment.*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$ when compared with the untreated control group (Student's t-test).

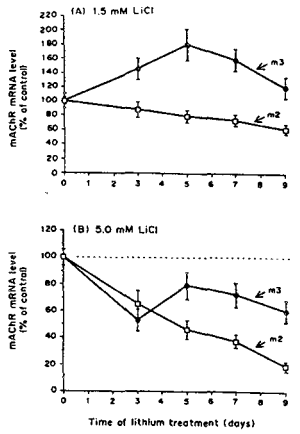


Fig. 2. Time-course of LiCl-induced changes in m_2- and m_3-mAChR mRNAs. Cells were treated with (A) 1.5 mM or (B) 5 mM LiCl for the indicated time. The time-course was arranged so that all reactions were terminated simultaneously.

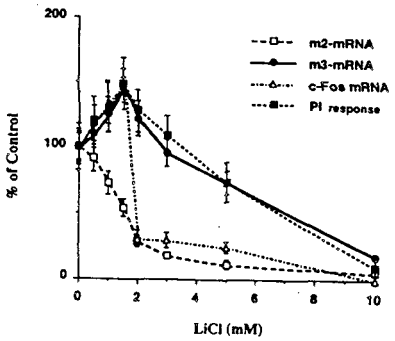


Fig.3. Lithium-induced changes of mRNA levels for m_2-mAChR, m_3-mAChR, c-fos, and β-actin and the activity of carbachol-stimulated PI turnover:dose-effect relationship. Cells were pretreated with the indicated concentrations of LiCl for 7 days. Levels of mRNA were measured by Northern blot hybridization. The data represent the means ± SEM of percentages from a triplicate experiment performed three times with similar results.

219 ラット大脳に豊富に存在するＣａＭ結合蛋白質（ＣａＭＢＰ６４）について

亀下　勇、石田　敦彦、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化学）

〔要約〕
ラット大脳ＣａＭ－キナーゼⅣ調製の際に、酵素と共に精製されてくる蛋白質（ＣａＭＢＰ６４）を単離し、その性質を調べた。ＣａＭＢＰ６４は特に大脳に豊富に存在するＣａＭ結合蛋白質で、その分子量はＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で６４ｋＤａを示した。ＣａＭＢＰ６４の部分アミノ酸配列は既知の蛋白質とは異なっており、新しいタイプのＣａＭ結合蛋白質であると考えられた。またこの蛋白質はＣａＭ－キナーゼⅡならびにＡ－キナーゼの有効な基質になることが明らかになった。

脳に豊富に存在するＣａＭ結合蛋白質として、ＣａＭ－キナーゼⅡ、Ⅳ、カルシニューリン、ＭＡＲＣＫＳ、ニューロモジュリンなどが知られている。ラット大脳に豊富に含まれるＣａＭＢＰ６４は、これまでに報告されていないＣａＭ結合蛋白質であり、その生理機能は全く不明である。我々はＣａＭＢＰ６４の中枢神経系における機能を明らかにする目的で、まず本蛋白質の分子的な性質を調べることにした。本研究ではＣａＭＢＰ６４がＣａＭ－キナーゼⅡとＡ－キナーゼの非常によい基質となることが明らかになったので以下に報告する。

［実験方法］
ＣａＭ－キナーゼⅣ（１）ならびにＣａＭ－キナーゼⅡ（２）はラット大脳皮質より、またＡ－キナーゼ触媒サブユニット（３）は牛心筋より精製した。ＣａＭ非依存性活性を示すＣａＭ－キナーゼⅡの３０ｋＤａフラグメントは、酵素をキモトリプシン処理した後、ＤＥＡＥ－５ＰＷにより精製したものを用いた。また、ＣａＭ－キナーゼⅣとＣａＭＢＰ６４はＤＥＡＥ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）ＨＰＬＣカラムにかけ、０－０．５ＭＮａＣｌグラジエントにより溶出し分離した。ＣａＭ－キナーゼ活性は従来の方法（２）ならびに活性ゲル法（４）により検出した。

［実験結果］
ラット大脳からＤＥＡＥ－トヨパール、ＣａＭアフィニティーカラム、ゲル濾過カラムにより精製したＣａＭ－キナーゼⅣはＳＤＳ－ＰＡＧＥでは単一バンドとして観察されるが、この標品をＤＥＡＥ－ＮＰＲ　ＨＰＬＣカラムにかけると図１のように２つの蛋白ピークが検出された（ピーク１と２）。ピーク２にｐｅｐｔｉｄｅ－γ（５）をリン酸化するプロテインキナーゼ活性が検出されることから、ピーク２がＣａＭ－キナーゼⅣであると考えられた。ピーク１の蛋白質はＣａＭカラムへの結合やゲル濾過カラムからの溶出パターン、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上での移動度などＣａＭ－キナーゼⅣとよく似た挙動を示したが、ＣａＭキナーゼⅣに対する抗体とは全く反応せず、また活性ゲル法でもプロテインキナーゼ活性は検出されなかった（図２）。この蛋白質はＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で６４ｋＤａを示し、ＣａＭ結合蛋白質であることから、ここではＣａＭＢＰ６４と呼ぶことにした。ＣａＭＢＰ６４はＣａＭカラムに結合するのにもかかわらず、ブロッティングしたメンブレン上ではＣａＭとの結合性が見られないことから（図２）ＣａＭとの結合には蛋白質のネイティブなコンフォメーションが重要な意味を持つものと考えられた。ＣａＭＢＰ６４を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）で分析したところ、Ｎ末端のアミノ酸が検出されなかったので、プロテアーゼ（リシルエンドペプチダーゼ）分解で得られたペプチドのアミノ酸配列分析を行なってみた。アミノ酸配列を決定した３つのペプチドはこれまで報告されている既知の蛋白質中に見られない配列を持つペプチドであることから、ＣａＭＢＰ６４は新しいＣａＭ結合蛋白質であると考えられた。また、ＣａＭＢＰ６４は大脳には豊富に含まれるのに対し、小脳にはわずかしか含まれていないことも明らかになった。次にＣａＭＢＰ６４がプロテインキナーゼの基質になるかどうか調べてみた。ＣａＭ－キナーゼⅡβサブユニットの自己リン酸化バンドはＣａＭＢＰ６４とほぼ同じ位置に検出され、区別がつきにくいので、ＣａＭ－キナーゼⅡの代わりにＣａＭ非依存性活性を有する３０ｋＤａフラグメントを用いることにした。結果は図３に示したようにＣａＭＢＰ６４がＣａＭ－キナーゼⅡ３０ｋＤａフラグメントの非常によい基質になることがわかった。また、ＣａＭＢＰ６４はＡ－キナーゼによっても同様リン酸化をうけたが、Ｃ－キナーゼによるリン酸化は受けないことが明らかになった。

［考察］
ＣａＭＢＰ６４は特に大脳に豊富に存在しており、ＣａＭ－キナーゼⅡ、Ⅳ、カルシニューリンなどにも劣らぬ高い含量を示す新しいタイプのＣａＭ結合蛋白質であることがわかった。本蛋白質がＣａＭ－キナーゼⅡやＡ－キナーゼの非常によい基質となることが明らかになり（図３）、中枢神経系におけるＣａＭＢＰ６４の生理機能ならびにそのリン酸化の持つ意義に興味が持たれる。

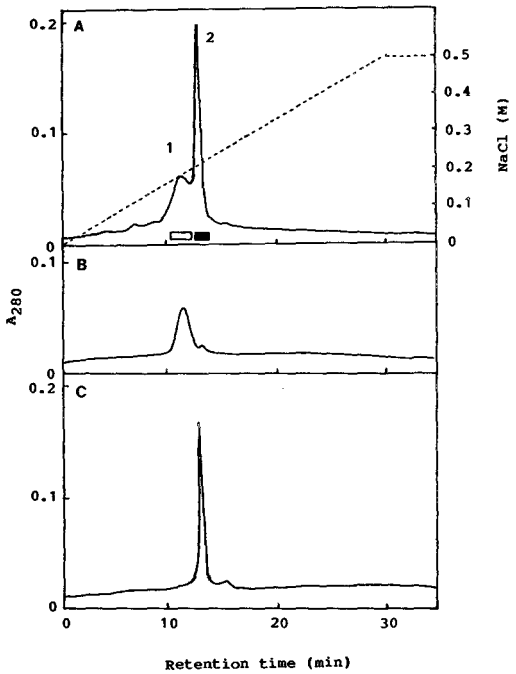


図1．DEAE－NPRカラムによるCaMBP64とCaM－キナーゼIVの分離。

A．ピーク1（CaMBP64）とピーク2（CaM－キナーゼIV）の溶出パターン
B．ピーク1の再クロマトグラフィー
C．ピーク2の再クロマトグラフィー

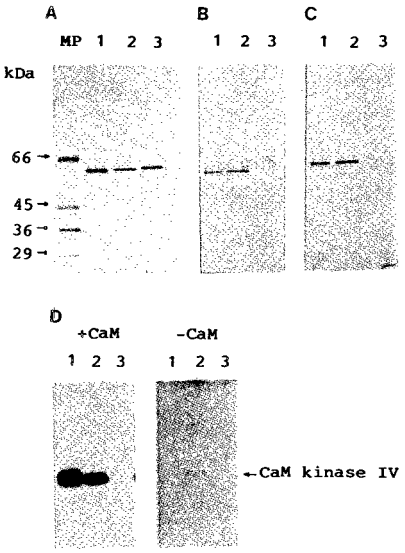


図2．SDS－PAGE（8%ゲル）によるピーク1とピーク2の分析。

レーン1：DEAE－NPRにアプライしたサンプル
レーン2：DEAE－NPR・ピーク2
レーン3：DEAE－NPR・ピーク1
A．蛋白染色（銀染色）
B．抗CaM－キナーゼIV抗体による免疫染色
C．ブロッティングした蛋白へのCaMの結合
D．活性ゲル法（4）によるプロテインキナーゼ活性の検出。基質としてMAP2を含むゲルを用い、リン酸化反応はCaM存在下（+）と非存在下（－）で行なった。

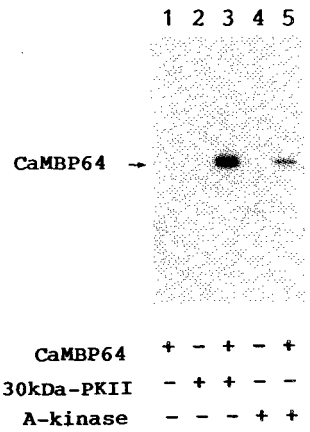


図3．CaMBP64のCaM－キナーゼII（30kDaフラグメント）ならびにA－キナーゼによるリン酸化。下に示した条件下に^{32}P－ATPでリン酸化した後、SDS－PAGE、オートラジオグラフィーを行なった。

[文献]
(1) Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1993) J. Biochem. 113, 583-590
(2) 石田敦彦、木谷隆子、藤澤仁 (1991) 実験医学 9、1479-1484
(3) Okuno, S., and Fujisawa, H. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1038, 204-208
(4) Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1989) Anal. Biochem. 183, 139-143
(5) Miyano, O. Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1992) J. Biol. Chem. 267, 1198-1203

220 胎盤培養細胞からの成長ホルモン分泌促進因子(GRH)の分泌 ダイアシルグリセロールのPKCを介さないGRH放出機序の存在？

溝渕睦彦、 Frohman, L.A.*
(愛媛大学医学部精神神経医学教室、*イリノイ大学内科学)

〔要約〕
成長ホルモン分泌促進因子(GRH)は、ラットとマウスでは視床下部以外に胎盤に多量に存在する。視床下部のGRH分泌細胞は、少量でしかも局在しているため、培養することが困難である。従ってわれわれは、マウス胎盤の初代培養細胞を用いてGRHの分泌機序を調べた。Cキナーゼ系に関連していると考えられる、ホルボールエステル(PMA; phorbol 12-myristate 13-acetate, PDA; phorbol 12,13-diacetate)とダイアシルグリセロール(OAG; 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol, diC8; 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol)を添加した。OAG処理では、10^{-4}Mで最大約2.6倍、10^{-3}Mで2.1倍の細胞外への放出があり、diC8でも効果は少ないが同様に1.5-1.6倍認められた。一方、ホルボールエステルのPMAとPDAでは、10^{-7}, 10^{-6}Mでは、ほとんど対照と差はなく、10^{-5}Mでは逆に放出抑制傾向が認められた。従って、ダイアシルグリセロールによる放出機序は、ホルボールエステルで放出されないため、PKC(protein kinase C)を介さない可能性が考えられる。

[はじめに]
GRHは、視床下部に限局して局在し、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(3)。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は胎盤に多量に含まれている(1,5)。われわれは、ラットの視床下部(4)やラットとマウスの胎盤のcDNA(6)やgenomic DNA(7)の構造解析や遺伝子発現に関し、多くの研究を行なってきた。視床下部のGRH分泌細胞群は少量で、培養することが困難であるとともに、GRH分泌cell lineも無いため、GRH分泌機序を詳細に検討するための培養細胞系での研究は無い。今回われわれは、視床下部以外でGRHを豊富に含有するマウス胎盤の初代培養細胞を用いて、GRHの分泌機序を調べた。

[方法]
マウスの胎盤は、妊娠12-16日のものを用い、胎盤組織はハサミで細かく切った後、0.3％のトリプシンで1.5時間処理した。トリプシンインヒビターとDNaseを添加し、12穴プレイトで、1穴当たり10^6細胞入れた。約17時間、10%ウシ血清と25mg/ml濃度のゲンタマイシンの入ったMEM中で培養し、細胞をプレイトに固着させる。実験開始前に、0.2%BSA入りのMEMで一度洗った後に、添加物質を加え培養液中のGRHを経時的(30, 60, 120, 240分)に採取し測定した(2)。PMA, PDAとOAGはDMSOに、diC8はエタノールに溶解した。DMSOとエタノールは、いずれも培養液の0.1%以下の濃度にした。なお、対照としては、無添加とDMSO, エタノールのみを加えたものを用いた。

[結果と考察]
表1は、ホルボールエステル(PMA, PDA)とダイアシルグリセロール(OAG, diC8)を3種類の濃度で添加し、放出されたGRH量を基礎放出量を100として示した。OAGを10^{-4}M加えると2時間後には、2.6倍に増加している。10^{-3}Mでは、増加は10^{-4}Mに比して少ない。diC8は、OAGほど効果はないが1.5倍程度増加している。ホルボールエステルは、低濃度では基礎放出量と差はないが、高濃度になるにしたがい放出は抑制される。10^{-4}M OAG, 10^{-6}M PMAとDMSOのみ(basal)処理し、培養液中に放出される全GRH量(図1)と時間当たりのGRH量(図2)を表した。OAG処理では、30分後にはほとんど変化が認められないが、1から2時間後に放出量が増加する。なお、放出されたGRHはHPLCで分離しGRHであることを確かめた。さらに、この系で対照(cytosol fr. 64%, membrane fr. 36%)に対しPMA処理(cytosol fr. 23%, membrane fr. 77%)によりPKCが活性化されていることは、PKCのmembraneへのtranslocationを指標に確認した。また、OAGのこの効果が、胎盤培養細胞に対する物理的な作用の可能性を考慮し^{35}S-methionineでprelabelし5%TCAの沈殿と上清をOAG処理群と非処理群で比較したが差はなかった。生理的作用であるかは詳細な検討を要するが、

このダイアシルグリセロールの放出作用は、ホルボールエステルで放出されないため、PKCを介さない可能性がある。

[文献]

1. Baird, A., Wehrenberg, W. B., et al. (1985) Endocrinology 117: 1598-1601.
2. Frohman, L. A. and Downs, T. R. (1986) Methods in enzymology, vol. 124 pp 371-389.
3. Frohman, L. A. and Jansson, J-O. (1986) Endocr. Rev. 7: 223-253.
4. Frohman, M. A. Downs, T. R. et al. (1989) Mol. Endocrinol. 3: 1529-1536.
5. Meigan, G., Sasaki, A. et al. (1988) Endocrinology 123: 1098-1102.
6. Mizobuchi, M., Frohman, M. A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5: 476-484.
7. Mizobuchi, M. and Frohman, L. A. BioTechniques (in press)

表1、各濃度のPMA, PDA, OAG, diC8処理により、放出されたGRH量を基礎放出量をもとにパーセント表示したもの。

	Cumulative mGRH secretion (min)			
Substances	30	60	120	240
PMA 10^{-7}		100±27(6)	115±14(6)	99±12(9)
10^{-6}		106± 9(10)	101± 7(9)	97± 4(12)
10^{-5}				51±20(3)
PDA 10^{-7}		75±15(3)	105± 6(3)	103± 7(3)
10^{-6}		69±24(3)	93± 6(3)	108± 0(3)
10^{-5}		40± 8(3)	75± 7(3)	108±14(3)
OAG 10^{-5}				95± 2(3)
10^{-4}	112±12(6)	226±19(19)	266±23(16)	150± 4(19)
10^{-3}		184±10(3)	210±20(3)	141±27(6)
diC8 10^{-5}		107±19(3)	77± 7(3)	99± 7(3)
10^{-4}		115±19(6)	125±25(6)	147±19(6)
10^{-3}		167±30(3)	106± 7(3)	167±19(3)

OAG, diC8は10^{-4}, 10^{-5}Mで最大の放出を示す。低濃度のPMA, PDAは基礎放出量と差は無く、高濃度になるにしたがい、むしろ放出は抑制される。
カッコ内の数字は、サンプル数を表す。平均±S.E.M.

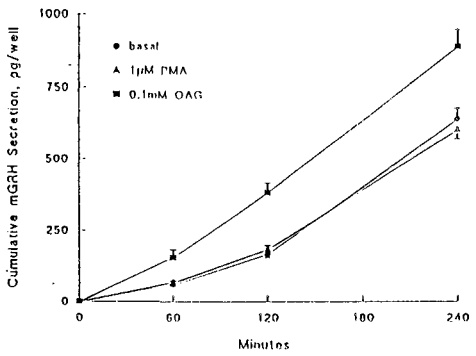


図1、10^{-4}M OAG, 10^{-6}M PMAとDMSOのみ(basal)処理し、培養液中に放出された全GRH量の時間経過
PMAでは基礎放出量と差はないが、OAGでは1.5-2倍増加している。barはS.E.M.を表す。

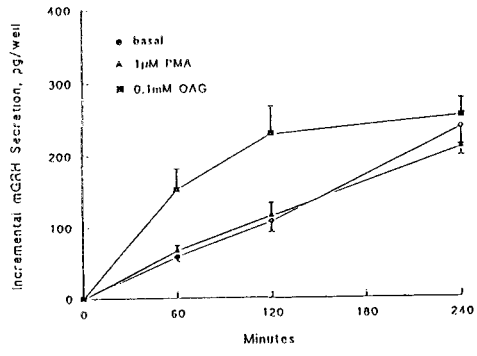


図2、10^{-4}M OAG, 10^{-6}M PMAとDMSOのみ(basal)処理し、培養液中に放出された、時間当たりのGRH量
OAG処理による放出量増加は、はじめの2時間で生じる。barはS.E.M.を表す。

221　Cキナーゼの基質蛋白質MARCKSの生理機能

谷口寿章、古橋潔、千谷晃一
（藤田保衛大・総医研・医高分子）

〔要約〕

Cキナーゼはシナプスにおける神経伝達物質放出の制御に重要な役割を果たしている事が知られているが、その作用機構、直接の基質蛋白質は今だ不明である。本研究では、脳におけるCキナーゼの主要基質蛋白質として知られているMARCKS(myristoylated alanine-rich C-kinase substrate)の生理機能を調べることにより、脳におけるCキナーゼの作用機構の解明を行なった。MARCKSはアクチンを架橋することが知られているが、我々は、MARCKSとアクチンの結合に酸性リン脂質が必須であることを見いだした。脂質非存在下ではMARCKSはアクチンとは殆ど結合しないが、ホスファチジルグリセロールなどの酸性リン脂質存在下では強固な結合を示す。CキナーゼによるMARCKSのリン酸化は酸性リン脂質の存在下では阻害されたが、逆にCキナーゼによりリン酸化されたMARCKSは酸性リン脂質とは結合しなかった。MARCKSはまた単離したシナプス小胞と結合するが、この結合はCキナーゼによるリン酸化で阻害された。これらの結果は、MARCKSがシナプス小胞と細胞骨格との相互作用、そのCキナーゼによる調節に直接関与している事を示唆する。

〔方法〕

MARCKS、及びCキナーゼは、ウシ脳から既報（1）により精製した。アクチンはウサギの骨格筋より精製したものを用いた。脂質は市販のもの（Avanti Polar Lipids）を緩衝液に懸濁し、アルゴン下で超音波処理してリポソームとした。シナプス小胞はウシ脳よりKishらの方法（2）で単離した。MARCKSとFアクチンとの結合はFアクチンとの共沈を測定することで調べた。MARCKSとリポソームとの結合はスクロース密度勾配法により、シナプス小胞との結合は超遠心による共沈で調べた（3）。CキナーゼによるMARCKSのリン酸化は常法（4）により行なった。

〔結果〕

1．MARCKSとシナプス小胞との結合

精製したMARCKSとシナプス小胞を30°Cで15分間インキュベートし、超遠心機でシナプス小胞を沈降すると、MARCKSは沈降画分に見いだされた。同条件でMARCKSは単独では沈降しないので、精製したMARCKSはシナプス小胞膜に結合する能力を持っていると考えられる。MARCKSをシナプス小胞とインキュベートし、さらに精製したCキナーゼとATPを加えてインキュベートすると、MARCKSはかなりの部分が上清画分に移行した。したがってMARCKSはCキナーゼによるリン酸化に依存してシナプス小胞膜と可逆的に結合すると考えられる。

2．MARCKSとリン脂質人工膜との結合

次に、MARCKSとシナプス小胞の結合の機構を明らかにするために、種々のリン脂質より成る人工膜（リポソーム）を調製し、精製したMARCKSとの相互作用を調べた。中性リン脂質であるホスファチジルコリンより成るリポソームにMARCKSは結合したが、Cキナーゼによるリン酸化は、その結合に影響を及ぼさなかった。しかし、酸性リン脂質を含むリポソームを使用すると、MARCKSはより強固な結合を示し、しかもその結合はCキナーゼによるリン酸化により阻害された。これらの結果は、MARCKS自身に、脂質膜と結合する能力のあること、Cキナーゼによるリン酸化がその結合を阻害することを示唆する。このリン酸化に依存したMARCKSの脂質膜との結合の機構を明らかにするために、我々はさらにCキナーゼによるMARCKSのリン酸化部位に相当するペプチドを合成し、合成ペプチドと脂質膜との結合を調べた。リン酸化部位に相当するペ

ブチドはMARCKSと同様にリン酸化に応じ脂質膜との可逆的な結合を示した。これらの結果は、Cキナーゼによるリン酸化部位が、直接MARCKSの脂質膜との可逆的結合に関与している事を示している。

3.脂質によるMARCKSのリン酸化の阻害

脂質がCキナーゼによるリン酸化部位に直接結合する事を確かめるために、次にMARCKSのリン酸化に及ぼすリン脂質の影響を調べた。Cキナーゼ自身が脂質依存性を示すために、脂質に依存しないで活性を示すキナーゼドメイン（PKM）を用い、種々のリン脂質存在下でMARCKSのリン酸化を調べた。中性リン脂質であるホスファチジルコリンはリン酸化に影響を与えなかったが、酸性リン脂質は濃度に依存して、MARCKSのリン酸化を阻害した。また、同じ酸性リン脂質でも種類によって阻害の程度に違いが見られ、阻害の程度の強い順にホスファチジルグリセロール＞ホスファチジルイノシトール＞ホスファチジルセリン＞ホスファチジン酸であった。従ってMARCKSのリン酸化部位の脂質との相互作用は、単に荷電だけではなく脂質の特異的な立体構造が必要と考えられる。

4.MARCKSとアクチンとの相互作用

次にMARCKSとアクチンとの相互作用に対するリン脂質の影響を調べた。脂質非存在下でMARCKSは殆どアクチンと共沈しなかったが、ホスファチジルグリセロール存在下では脂質の濃度に依存して、共沈が見られた（図1）。このことから、MARCKSとアクチンの結合には酸性リン脂質の存在が不可欠であることが結論された。

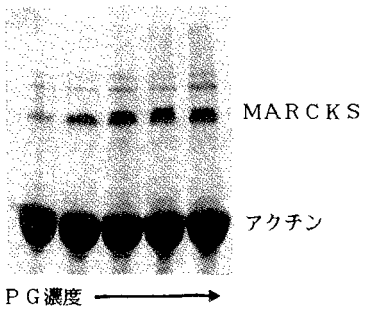


図1

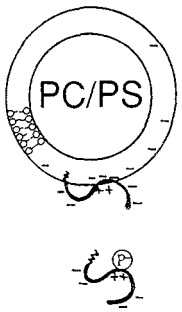


図2

［考察］

以上の結果からMARCKSは、N末端のミリスチル化部位と一次構造上で分子の中央付近に存在するCキナーゼによるリン酸化部位の2ヶ所でシナプス小胞膜と結合し、後者のCキナーゼによるリン酸化により、この部分が、膜との結合性を失い、更にリン酸基が導入されることによって分子全体の負の荷電が増し、酸性リン脂質の負の荷電との反発力で膜から解離するという機構が考えられる（図2）。また、アクチンとの結合に酸性リン脂質が必須であることから、アクチン、MARCKS、脂質膜の三者複合体が形成され、Cキナーゼによるリン酸化は、MARCKSと脂質膜との解離を引き起こし、MARCKSもまた、アクチンとの結合性を失うという機構が考えられる。これらの結果は、MARCKSがシナプス小胞と細胞骨格、特にアクチン繊維との相互作用にリンカーとしての役割を果たしていて、Cキナーゼによるリン酸化が、その調節に重要な役割を果たしていることを示唆する。

［文献］

1.Manenti,S., Sorokine,O., Van Dorsselaer,A., & Taniguchi,H. (1992) J.Biol.Chem. 267, 22310.

2.Kish,P.E., & Ueda,T. (1989) Methods Enzymol. 174, 10.

3.Taniguchi,H. & Manenti,S. (1993) J.Biol.Chem. 268, 9960.

4.Manenti,S., Sorokine,O., Van Dorsselaer,A., & Taniguchi,H. (1993) J.Biol.Chem. 268, 6878.

222 バキュロウイルス発現系によるG蛋白質(GL1, GL2, Gq)の発現と機能

中村 史雄、加藤 真理子、亀山 仁彦、額田 敏秀*、芳賀 達也
(東京大学医学部脳研生化学、*東京都精神研・神経化学)

〔要約〕
Gqファミリーに属するG蛋白質αサブユニット、GL1α(α14)、GL2α(α11)、αqの機能を明らかにするために、バキュロウイルス発現系を用いて、Sf9細胞に目的とするG蛋白質を発現させ、精製してそのホスホリパーゼCβ活性化能を調べた。
この結果、(1) GL1α、GL2α、αqは単独で発現させた場合はいずれも主要成分として発現されるがほとんど可溶化されない、(2) αサブユニットをβγサブユニットと共発現させると部分的に可溶化される、(3) 精製したGL1、GL2、GqいずれもホスホリパーゼCβを活性化する、(4) これらの活性化は脳から精製されたβγサブユニットにより濃度依存性に抑制される、ことが明らかになった。

〔目的〕
我々は一昨年新しいG蛋白質αサブユニット、GL1α、GL2αを同定した(3)。これらはSimonらによって独立に報告されたα14とα11 (4) に対応し、Gqファミリーに属することがその後明らかになった。GqとG11の混合物は肝臓や脳から精製され、ムスカリン受容体 m1 によって活性化され、ホスホリパーゼC(PLC)βを活性化することが示されている(1)。一方G L1αの機能についての直接的な証拠は得られていない。今回、我々はGL1α、GL2α、αq をバキュロウイルス発現系を用いて発現させ、それらを精製してその機能を直接明らかにすることを試みた。
〔方法〕
GL1α、GL2α、αq それぞれを発現する組換えウイルスを従来の方法(8)で得た。またG蛋白質β 1とγ2サブユニットを同時に発現する組換えウイルスを作成した。3×10^8個のSf9 細胞にαの組換えウイルスを単独、あるいはβγの組換えウイルスと共に感染させ、65～72時間培養して目的蛋白質を発現させた。
G蛋白質の精製は既報(6)に従った。細胞の顆粒性画分を20 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1％コール酸ナトリウムで可溶化した。可溶化抽出物をDEAE Sephacelカラムに吸着させ、0～500 mM のNaCl直線濃度勾配で溶出させた。G蛋白質を含む分画をNa・Hepes pH 7.0, 1 mM EGTA, 1mM DTTで5倍に希釈し、Heptylamine Sepharoseカラムに吸着させた。カラムを0.2％コール酸ナトリウム・150 mM NaCl ～1.5%コール酸ナトリウム・50mM NaClの濃度勾配で溶出させた。Gq はさらにUltroGelAcA34によるゲル濾過を行った。GL1α、GL2α、αq の濃度は既知量のGoαとSDS-PAGEを行い、Coomassie Blue染色されたバンドの濃度を比較して推定した。
ホスホリパーゼの活性は以下の方法で測定した。1 tubeあたり、10nCi [^{3}H] Phosphatidylinositol 4,5 - bisphosphate (PIP2), 2μg PIP2, 20μg Phospatidylethanolamine の混合物を超音波処理により50mM Na·Hepes pH 7.0, 100mM NaClに懸濁させたもの(10μl)を基質として用いた。またG蛋白質の活性化には AlF^{4-} (20μM AlCl3, 6mM NaF)を用いた。0～1.2pmol のG蛋白質を加え、最終的に50μlの反応液(13mM Hepes pH 7.0, 2mM EGTA, 1mM DTT, 20mM NaCl, 30mM KCl, 5μM GDP, 2mM MgCl2, 0.06% コール酸ナトリウム, 遊離 Ca^{2+}200nM)になるように調製し、ウシ脳より精製されたPLCβ1.5ngを加えて反応を開始した。37℃で10分間反応させ、生成する[^{3}H]イノシトール燐酸量を測定した。さらに脳から精製したβγサブユニットを終濃度0～2μMになるように再構成系に加え、PLCβ活性化への影響を検討した。
〔結果〕
GL1α、GL2α、αq それぞれを単独に発現させた場合、いずれも膜画分及び核画分に大量に発現していたが、1％コール酸ではほとんど可溶化されなかった。しかしβγサブユニットと共にこれらのαサブユニットを発現させた場合、膜画分から可溶化されるαサブユニットは、単独発現に比べて約10倍増加した。
αとβγを共発現させた細胞の顆粒性画分を1％コール酸で可溶化し、部分精製した標品のSDS-PAGEを図1に示す。AはCoomassie Blue染色したもの、Bは抗βサブユニット抗体で免疫ブロットしたもの、Cは抗GL2αC末端ペプチドに対する抗血清を用いて免疫ブロットしたものである。GL1α、GL2α、αqの分子量はそれぞれ43K、42K、42Kと計算された。
AlF^{4-}はGTPのγ位の燐酸基を模倣しGDP結合型のG蛋白質を活性化する。部分精製したG L1、GL2を AlF^{4-}存在下に活性化したものは濃度依存性にPLCβを活性化した（図2）。またGqについても AlF^{4-}による活性化が認められた。
さらに、GL1、GL2、GqによるPLCβの活性化は脳から精製されたβγサブユニットにより濃度依存性に抑制された（図3）。5～25nMのαサブユニットによるPLCβ活性化をβγサブユニットは約20nMで半分に抑制し、2μMで完全に抑制した。

［考察］

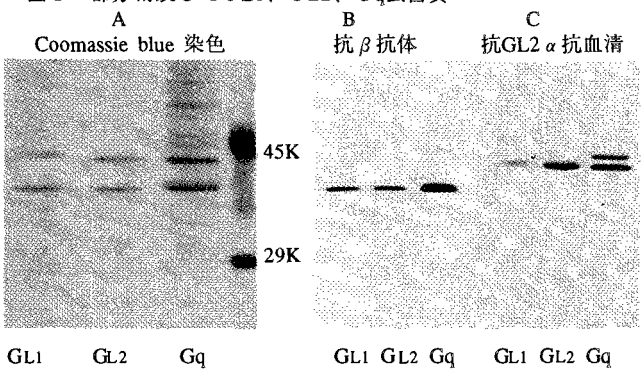
Gqファミリーに属するαサブユニットは現在4種類、αq、GL2α(α 11)、GL1α(α14)、α15(α16)が知られている(4)。Leeらはαサブユニットを発現させたCOS-7細胞の膜を用いてGqファミリーのαサブユニットはいずれもPLCβを活性化することを示している(2)。一方G qとG11は肝臓や脳から混合物として精製され、そのPLC活性化能が再構成実験から直接示されている(5,9)。今回の実験ではG L1、GL2、Gq 3種が別々に精製され、いずれのαサブユニットも脳から精製されたPLCβを活性化することが明らかになった。

PLCβはG蛋白質βγサブユニットによっても活性制御されることが最近明らかにされた(7)。PLCβのサブタイプにより効果が異なるが、同一サブタイプ（PLCβ1、脳のPLCβの主成分）についても実験条件により活性化と抑制、両方の効果が観察され、作用機構について統一的結論は得られていない。今回の実験では3種のαサブユニットによるPLCβの活性化がβγサブユニット添加で抑制されること、その阻害は3種のαサブユニットで変わらないことが示された。またαサブユニットがない時にはβγにより脳のPLCβは僅か活性化される。これらの作用機構については現在検討中である。今後は精製したG蛋白質とムスカリン受容体と再構成実験を行い、受容体サブタイプ特異性の有無などについても明らかにしたい。

［文献］

1. Berstein, G. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8081-8088
2. Lee, C.H. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16044-16047
3. Nakamura, F. et al. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12676-12681
4. Simon, M.I. et al. (1991) *Science* **252**, 802-808
5. Smrcka, A.V. et al. (1991) *Science* **251**, 804-807
6. Sternweis, P.C. and Robishaw, J.D. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13806-13813
7. Sternweis, P.C. and Smrcka, A.V. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 502-506
8. Summers, M.D. and Smith, G.E. (1987) *Texas Agric. Exp. Stn. Bull.* **1555**, 1-56
9. Taylor, S.J. et al. (1991) *Nature* **350**, 516-518

図1　部分精製したGL1、GL2、Gq蛋白質



流したサンプル量 (pmol/lane)

	GL1α	GL2α	αq
A：	2.5	6	12
B,C：	1.2	3	6

図2　GL1、GL2によるPLCβの活性化

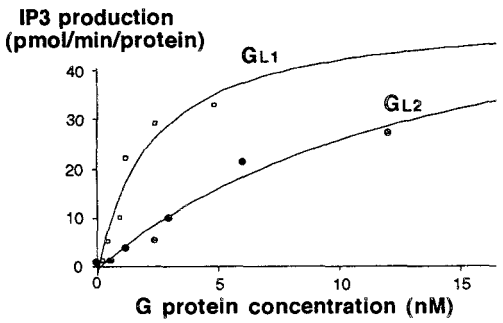
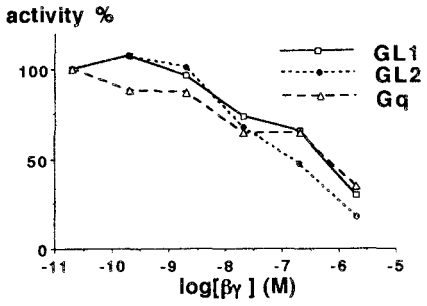


図3　GL1、GL2、GqのPLCβ活性化能に対するβγサブユニットの影響



223 ラット脳のフォスファチジルセリン特異的結合タンパク質

○中岡隆志、小島直也、浜本敏郎、辻　崇一
（理研　国際フロンテイア・糖遺伝情報）

〔要約〕

リポソームブロッティング法を用いてフォスファチジルセリン（ＰＳ）特異的に結合するタンパク質（70 kDa）がラット脳に存在することを明かにした。70 kDaは、膜画分に多く存在し、ＰＳを含む [3H]-標識リポソームとの結合はCa^{2+}に依存しなかった。これらの結果から70 kDaはＰＳにCa^{2+}非依存的に結合し、これにより膜に局在するという可能性が強く示唆された。これまで報告されたリン脂質結合タンパク質の多くはリン脂質にCa^{2+}依存的に結合するのに対し、70 kDaの細胞膜への局在はカルシウムの動員を必要としないことから、大きく異なっていると考えられる。

細胞質膜直下に存在する裏打ちタンパク質が細胞内情報伝達において重要な役割を担っていることが最近になって注目を集めてきている(1)。裏打ちタンパク質のなかで、Calpactin(2)、Syntagmin(3)等は、リン脂質にCa^{2+}依存的に結合し、エンドサイトーシスあるいはシナプスでの神経伝達物質放出に重要な作用をしていることが既に明かにされている。我々は、細胞内情報伝達に重要な役を担っていると考えられる裏打ちタンパク質について検討を行なってきた。細胞膜の構成成分であるリン脂質のなかでＰＳは特に二重膜の内側に局在することが知られている(4)。今回、裏打ちタンパク質のなかで、ＰＳにCa^{2+}非依存的に結合するタンパク質の存在を明かにしたのでここに報告する。

実験方法

[1,2-^{3}H(N)]-コレステロール標識したリポソームの調製　：リン脂質/コレステロール (1:1 mol/mol)リポソームの調製のために(5)、20 μg のリン脂質と12 μg のコレステロールをクロロホルム/メタノールに溶解し、窒素ガス下乾燥した。多重脂質膜を1 ml の 緩衝液A（20 mM トリス塩酸塩、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5）に懸濁し、超音波処理、0.45 μmのフィルターを通したものを一層の（unilamellar）リポソームと考えて用いた。

リポソームブロッティング　：ラット脳のタンパク質を膜画分（Ｐ２、Ｐ３画分）(6)と細胞質画分に分画した。両画分をSDS-PAGE電気泳動後、ナイロン膜に転写した。ナイロン膜を2.5% BSAを含む緩衝液Aでブロッキングした後、[^{3}H]-標識したリポソームを含む緩衝液B（20 mM トリス塩酸塩、1 mM EGTA、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5、0.2% BSA）中で１６時間インキュベートした。ナイロン膜を洗浄、乾燥後、フルオログラフィーを行なった。

結果及び考察

ＰＳを含む [^{3}H]-標識リポソームでブロッティングすると、幾つかのバンドが再現性よくリポソームと結合した。このなかで110 kDaタンパクを含む数本のバンドは、標識していないフォスファチジルコリン（ＰＣ）-、フォスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）-、フォスファチジルイノシトール（ＰＩ）-リポソーム存在

化で縮退したことから、ＰＳ-リポソームとの結合はＰＳ特異的なものではないと考えられる。70 kDaのバンドはこれらの標識していないリポソームを緩衝液B中に加えても消失しなかった事から、このタンパク質は特異的にＰＳに結合すると考えられる（Fig. A）。ＰＳ-リポソームは、緩衝液B中に 1 mM EGTAの代わりに、1 mM 塩化カルシウムを加えても 70 kDaに対して同様に結合したことから、 ＰＳと 70 kDaとの結合はカルシウムに依存しないと考えられた。70 kDaは、膜画分と細胞質画分を比較すると膜画分に多く存在した。これらの結果から70 kDaはＰＳにCa^{2+}非依存的に特異的に結合し、それにより膜に局在する可能性が強く示唆された。これまで報告されたリン脂質結合タンパク質の多くはリン脂質にCa^{2+}依存的に結合する。言い換えると、細胞内でのカルシウムの動員が、タンパク質の局在を左右すると考えられる。ところが、70 kDaの細胞膜への局在はカルシウムの動員を必要とせず、他のこれまで報告されたリン脂質結合タンパク質と大きく異なっている。今後、細胞内情法伝達過程で、このタンパク質が持つ役割を解明すると共に、細胞質膜直下に存在する他の裏打ちタンパク質についても、同様の可能性を検討することが必要であると考えられる。

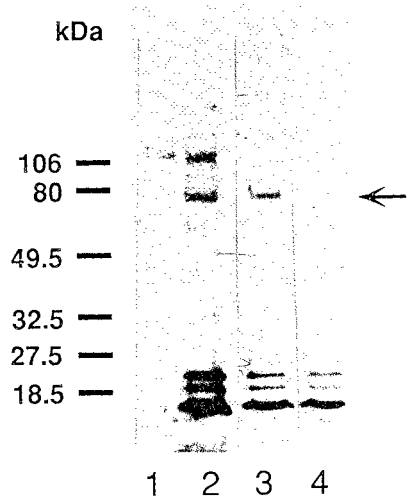


Fig. A リポソームブロッティング
細胞質画分 (lane 1)と膜画分 (lanes 2-4) をＰＳを含む[^{3}H]-標識したリポソームでブロッティングした。[^{3}H]-標識したリポソームを含む緩衝液B中に１０倍量の標識していない PC-, PE- , PI-リポソーム (lane 3)、 PC-, PE-, PI- , PS-リポソーム (lane 4)を加えた。70 kDaのバンドを矢印で示した。

文献

1. Klee, C. B. (1988) Biochemistry 27,6645-6653
2. Glenny, J. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7247-7252
3. Brose, N., Petrenko, A. G., Suhof, T. C., and Jahn R. (1992) Science 256, 1921-1925
4. Rothman, J. E., and Lenard, J. (1977) Science 195,743-753
5. Kojima, N., and Hakomori, S. (1991) J. Biol. Chem. 266, 17552-17558
6. Gray, E.G., and Whittaker, V.P. (1962) J. Anat. (Lond) 96, 79-88

224 単一C6細胞におけるセロトニン刺激性細胞内カルシウム動員
-画像解析装置を用いた検討-

加賀谷有行[1]、山路隆之[1]、林輝男[1]、岡本泰昌[1]、西田朗[2]、清水雅美[2]、本橋伸高[1]、山脇成人[1]
1.広島大学医学部神経精神医学教室
2.国立呉病院臨床研究部精神神経科学研究室

〔要約〕
ラット・グリオーマ由来培養細胞C6BU-1における5-HT-2受容体を介した細胞内カルシウム濃度変化について画像解析装置を用いて検討した。5-HT刺激により40%の細胞において細胞内カルシウム濃度が急速に上昇し、その後緩徐に低下していった。そのうち35%の細胞にはoscillationが観察された。5-HT刺激性細胞内カルシウム濃度上昇に対するnilvadipineの影響を検討したところ、有意な変化がなかったことからnilvadipineの5-HT-2受容体に対する直接作用の可能性は低いことが示唆された。細胞膜透過性の高いことが知られているカルモジュリン阻害薬W-7の影響を検討したところ、5-HT刺激性細胞内カルシウム濃度上昇後の減衰を抑制した。5-HT-2受容体の急性脱感作に対する細胞内情報伝達系の役割を検討する上で興味深い結果であると考えられた。

ラット・グリオーマ由来C6BU-1細胞にはセロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)により細胞内イノシトールリン脂質加水分解亢進[1]やカルシウム動員[2]を誘導する経路が存在し、これらの反応は5-HT-2受容体を介している[3]ことが知られている。C6BU-1細胞における5-HT-2受容体を介した細胞内情報伝達系は種々の調節を受けており、たとえばglucocorticoid typeII受容体の慢性刺激による5-HT刺激性細胞内カルシウム濃度上昇反応の亢進[3]、カルモジュリン依存性経路を介した5-HT-2受容体の長期脱感作[4]が知られている。これまでの報告では、C6細胞を集団として捉え細胞内イノシトールリン脂質加水分解亢進やカルシウム動員についての観察がされていたので、今回われわれは、画像解析装置Argus50を用いて単一細胞レベルでのC6細胞における5-HT刺激性細胞内カルシウム濃度変化について検討したので報告する。

[方法]C6BU-1細胞をガラスに接着させたflexiperm内に蒔き、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)に10%牛胎児血清を加えて90% air, 10% CO_2の条件下、37℃で培養した。牛胎児血清を除いたDMEMで一晩静置した後、Krebs-Ringer Hepes緩衝液 (NaCl:145mM, KCl:5mM, Na_2HPO_4:0.5mM, $MgSO_4$:1mM, $CaCl_2$:1mM, Hepes:10mM, Dextrose:10mM, pH7.4) 中に3μM fura-2/AMを加えて37℃、30分間インキュベートした。その後、細胞を蛍光顕微鏡に設置し、Krebs-Ringer Hepes緩衝液を37℃、1.5ml/minの流速で潅流しながら、励起波長340,380nmにより10秒毎に得られた蛍光強度を、連動させた画像解析装置で解析し、それぞれの細胞における細胞内カルシウム濃度を測定した。

[結果および考察]静止時細胞内カルシウム濃度は125nMであった。10μM 5-HTにより約40%の細胞が反応した。反応した細胞では、刺激開始後15秒～1分で細胞内カルシウム濃度は約480nM に上昇した。5-HT刺激により上昇した細胞内カルシウム濃度は潅流液中に5-HTが存在していても次第に減少して行くことが明らかになった(fig.A)。10μM 5-HTを潅流する間、反応した細胞の約35%に細胞内カルシウム濃度上昇と減少を規則性に反復するoscillationが観察された(fig.B)。このoscillationの周期は約55秒であった。Oscillationの後半に1μM ketanserinを加えたところ、細胞内カルシウム濃度は静止時レベルに低下した(fig.C)ことから、5-HT刺激性oscillationは5-HT-2受容体を介した反応であることが示唆された。10μM 5-HTと同時にL型カルシウムチャネル阻害薬であるnilvadipine 10μMも潅流して5-HTによる反応を検討したところ、細胞内カルシウム濃度上昇、oscillationとも抑制されなかったので、5-HT刺激性oscillationにおけるL型カルシウムチャネルの関与の可能性は低いことが推測された。また、nilvadipineの5-HT-2受容体に対する直接作用の可能性も低いと考えられた。

次に5-HT刺激性細胞内カルシウム濃度変化に対する細胞内情報伝達機構の影響を検討するため、naphthalenesulphonamideの一つであるW-7 30μMを10μM 5-HTと同時に潅流した。W-7により5-HT刺激性細胞内カルシウム濃度が上昇した細胞の割合、その最大カルシウム濃度、oscillationが観察された細胞の割合、その周期に有意な変化はみられなかった。しかし、表に示すように、最大反応を呈した後の減衰に関して検討したところ、W-7処置群では82%と未処置群の62%に比較して有意に減衰が抑制されていた。W-7は細胞膜透過性が高く、細胞質内に分布することが知られているので[5]、細胞内でカルモジュリン依存性経路を阻害している可能性が示唆された。5-HT-2受容体は脱感作を引き起こしやすい受容体であることが知られている[4]が、それに対して細胞内情報伝達機構が果たす役割についてはまだ不明な点が多い。今回の結果は、5-HT-2受容体の脱感作における細胞内情報伝達機構の役割を検討するうえでの興味深い結果であると考えられる。

[参考文献]

1)Ananth,U.S., Leli,U., Hauser,G.: J.Neurochem. 48:253-261(1987)

2)Sugino,H., Ogura,A., Kudo,Y., Amano,T.: Brain Res. 322:127-130(1984)

3)Muraoka,S., Mikuni,M., Kagaya,A., Saitoh,K., Takahashi,K.: Neuroendocrinol. 57:322-329(1993)

4)Kagaya,A., Mikuni,M., Muraoka,S., Saitoh,K., Ogawa,T., Shinno,H., Yamawaki,S., Takahashi,K.: J.Neurochem. (in press)

5)Hidaka,H., Sasaki,Y., Nakata,T., Endo,T., Ohno,S., Fujii,Y. and Nagata,T. Proc.Natl. Acad.Sci.USA.78:4354-4357 (1981)

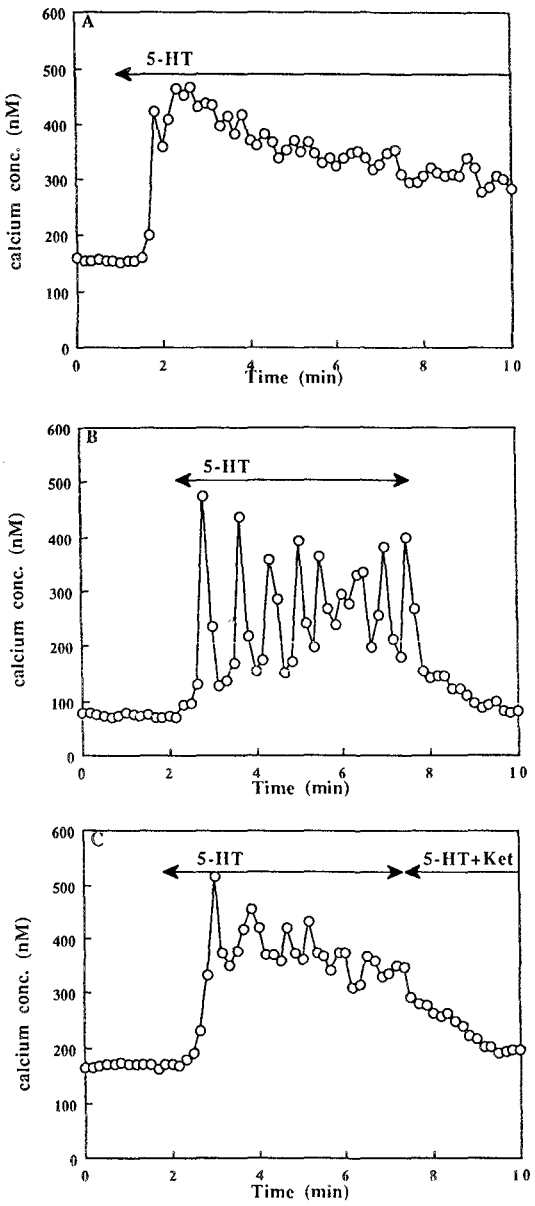
表: 5-HT刺激性細胞内カルシウム濃度上昇に及ぼすW-7の影響

	control	W-7
Ratio(%)	61.6±4.3	82.2±4.6**

5-HT刺激後0～2分における最大増加と3～5分における最大増加との比率を%で表示した。

**p<0.01 by Student t test.

Fig. Time course of intracellular calcium concentration in C6BU-1 cells.



225 ラット大脳皮質および線条体におけるチューブリン－Gs連関によるアデニル酸シクラーゼ活性の調節

八田愼一、雨宮紀人、芦沢　健*、齋藤利和*、大鹿英世
（札幌医科大学医学部薬理学講座・*神経精神医学講座）

〔要約〕　チューブリン(Tu)とGsとの連関によるアデニル酸シクラーゼ(AC)活性の促進性調節について、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 Tu (Tu-[^{32}P]AAGTP)をラットの脳より調製し、ACの活性化に適している条件下(5 mM $MgCl_2$ / 30 ℃)で膜標品とインキュベーションした結果、Tuに結合していたグアニンヌクレオチド([^{32}P]AAGTP)(GN)は膜標品中のGs αへ転移された。さらに、膜標品にGppNHp結合型Tu (Tu-GppNHp)を作用させた結果、TuからのGNの転移によるGs機能の活性化を反映して、大脳皮質および線条体ACの活性化とβアドレナリン感受性(大脳皮質)、D_1ドパミン感受性(線条体)AC活性の促進が観られた。これらの結果は、AC促進性条件下で、TuはGsとの連関によるGNの転移反応を介してAC活性の促進性調節に関与していることを示唆している。

【目的】　先に我々は、細胞骨格微小管構成成分蛋白質であるチューブリン(Tu)が、Giと連関し、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)活性の抑制性調節ならびにGiとの共役が知られているD_2受容体の親和性調節に関与していることを報告した(2)。しかしながら、上述の実験で用いた条件下[1 mM $MgCl_2$/23 ℃(AC抑制性条件)]では　TuからGsへのGNの転移反応は観察されなかった。これまでの報告では、精製Gs αあるいはラットC6　glioma細胞を用いた研究でTuとGsとの会合が示されており、さらにS49　lymphoma細胞でTu-Gs連関によるAC活性の促進が示唆されている(5, 8, 9)。しかしながら中枢神経系AC活性の促進性調節に関するTuの関与についてはまだ明らかとなっていない。今回我々は、ラット脳からTuと大脳皮質および線条体膜標品を調製し、ACの活性化に適している実験条件[5 mM $MgCl_2$ / 30 ℃(AC促進性条件)]を用いて、Tu-Gs連関を介したACの促進性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、線条体粗膜分画の調製およびAC活性の測定はHatta et al. (3)の方法によって行った。Tuの調製はRasenick and Wang (6)の方法に従って行い、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)Tuを得た。Tu-[^{32}P]AAGTPを用いたPhotoaffinity Labelingは Hatta et al. (3)の方法によって行った。

【結果】　ラット脳より調製したTu-[^{32}P]AAGTPと大脳皮質膜標品をAC促進性条件下(5 mM $MgCl_2$ / 30 ℃)でインキュベーションした後、大脳皮質膜G蛋白質への[^{32}P]AAGTPの結合を検討した結果、主要な放射活性はGi αで認められたが、先に報告したAC抑制性条件での場合とは対照的に、Gs αでも[^{32}P]AAGTPの結合を示す放射活性が観察された(Fig.1)。同様に、Tu-[^{32}P]AAGTPと線条体膜標品を用いた際にもGs αおよびGi αへの[^{32}P]AAGTPの結合が認められた(Fig.1)。次に、Tu-GppNHpを用いてTuによるAC活性の促進性調節について検討した。大脳皮質膜標品に10^{-8}～10^{-5} MのGppNHpをAC促進性条件下で作用させると、ACはBasalの約200%まで活性化された(Fig.2)。Tu-GppNHpを用いて同様の実験を行うと、ACの活性化の程度はやや低かった(Basalの約150%)が、GppNHpを用いた場合と同じく、Tu-GppNHpによってAC活性は促進された(Fig.2)。次に、βアドレナリン感受性AC活性に対する影響を検討した結果、GppNHpおよびTu-GppNHpによってイソプロテレノール(ISP)刺激性AC活性の促進が観られた(Fig.　4)。さらに、結果には示していないが　Tuによるβ アドレナリン受容体親和性の調節について検討したところ、[^{3}H]CGP12177特異的結合のISPによる置換曲線はTu-GppNHp(10^{-6} M)によって右方移動し、この右方移動の程度はGppNHp　(10^{-6} M)を単独で加えた場合とほぼ同程度であった。線条体膜標品でのAC活性に関しても大脳皮質膜の場合とほぼ同様の結果が得られ、GppNHp単独での場合と比較するとその効力はやや弱かったが、Tu-GppNHpによるAC活性の促進とD_1ドパミン(R(+)SKF 38393)感受性AC活性の促進が認められた(Figs. 3, 5)。

【考察】　先に報告したAC抑制性条件での場合とは対照的に、AC促進性条件下での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、Tuに結合していた[^{32}P]AAGTPは膜標品中のGs αへ結合し、TuからGsへのGNの転移が示された(Fig. 1)。Tu-GppNHpによってACの活性化とISP刺激性AC活性の促進が観られ(Fig. 2)、さらに[^{3}H]CGP12177特異的結合のISPによる置換曲線は右方移動した(結果未提示)。これらのことは、Tu-Gsとの連関を介したGNのGs αへの転移によってGsが活性化されることを支持している。線条体膜標品を用いた場合も大脳皮質膜での場合とほぼ同様の結果が得られ、Tuから線条体膜Gs αへのGNの転移、ならびに、ACの活性化、D_1ドパミン感受性AC活性の促進が示された(Figs. 1, 3, 5)。これらの結果から、Gsとの連関によるGNの転移を介して、Tuが中枢神経系AC活性の促進性調節やGsと共役している受容体の親和性調節に関与していることが示唆された。TuとG蛋白質との連関は、①TuとG蛋白質との蛋白質間の会合、②TuからG蛋白質へのGNの転移反応、③G蛋白質の"acceptor"としてのGN結合能力などによって影響される(7)。AC抑制性および促進性条件で観られたTu-Gs連関の違いには、これらの要因の変化が影響しているものと思われた。TuがAC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不明な点も多い。しかしながら、細胞骨格系機能の変化が示されている老化やアルツハイマー型老年痴

呆におけるAC系応答の変化と、Tu-G蛋白質連関の変化との関連が示唆されている(1, 4)。今後、他の疾病状態での変化との関連も含めてさらに詳細な検討を加えたい。

【文献】

(1) Cowburn R.F., Oneill C., Ravid R., Alafuzoff I., Winblad B., and Fowler C.J. (1992) J. Neurochem. 58, 1409-1419.

(2) 八田愼一、小澤寛樹、芦沢健、齋藤利和、大鹿英世 (1992) 神経化学 31, 506-507.

(3) Hatta S., Marcus M.M., and Rasenick M.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5439-5443.

(4) Hatta S., Ozawa H., and Ohshika H. Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. (in press)

(5) Leiber D., Jasper J.R., Alousi A.A., Martin J., Bernstein D., and Insel P.A. (1993) J. Biol. Chem. 268, 3833-3837.

(6) Rasenick M.M. and Wang N. (1988) J. Neurochem. 51, 300-311.

(7) Roychowdhury S., Wang N., and Rasenick M.M. (1993) Biochemstry 32, 4955-4961.

(8) Wang N., Yan K., and Rasenick M.M. (1990) J. Biol. Chem. 265, 1239-1242.

(9) Yan K. and Rasenick M.M. (1990) Biology of Cellular Transducing Signals (Vandernoek J.Y., ed.) , pp 163-172, Plenum Publishing Corp., New York.

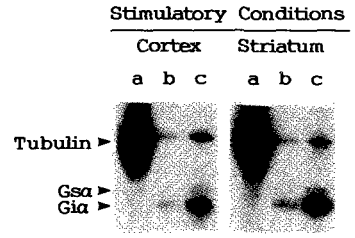


Fig. 1 Transfer of nucleotide from tubulin (Tu) to G proteins. Rat cerebral cortical membranes and striatal membranes were incubated with 2 μg (lane b) or 10 μg (lane c) of Tu-[^{32}P]AAGTP for 5 min at 30°C and those membranes were washed and resuspended for photoaffinity labeling. After UV irradiation, quenching and washing, 30 μg of membranes were subjected to SDS/PAGE and autoradiography. Ten μg of Tu-[^{32}P]AAGTP without incubating with membranes was UV irradiated and subjected to SDS/PAGE in lane a.

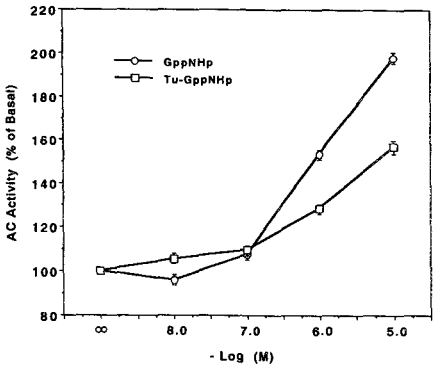


Fig. 2 Effects of GppNHp and Tu-GppNHp on AC activity in cerebral cortical membranes. The values are mean ± SEM of eight experiments.

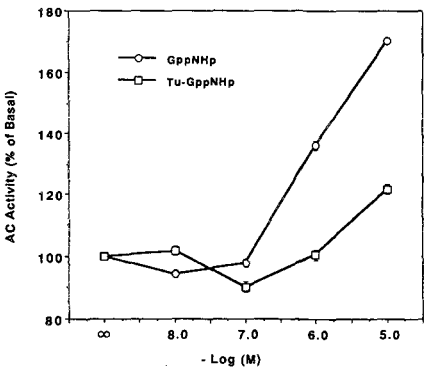


Fig. 3 Effects of GppNHp and Tu-GppNHp on AC activity in striatal membranes. The values are mean ± SEM of eight experiments.

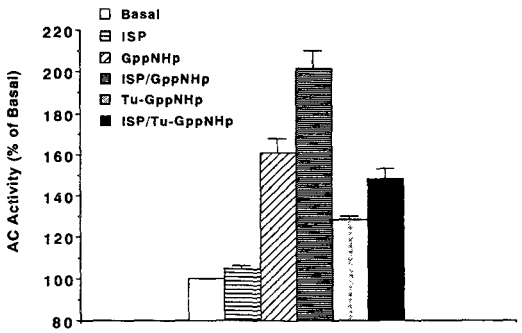


Fig. 4 Effects of GppNHp and Tu-GppNHp on the isoproterenol (ISP)-stimulated AC activity in cerebral cortical membranes. The concentrations of agents used were as follows; isoproterenol, 10^{-5} M; GppNHp, 10^{-6} M; Tu-GppNHp, 10^{-6} M. The values are mean ± SEM of eight experiments.

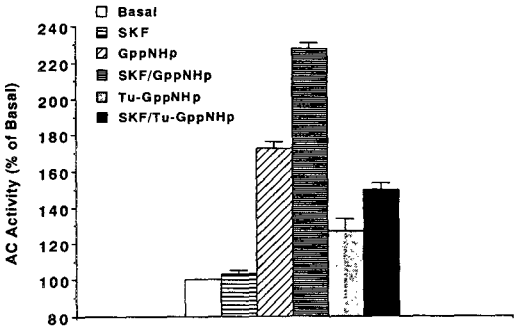


Fig. 5 Effects of GppNHp and Tu-GppNHp on the R(+)SKF 38393 (SKF)-stimulated AC activity in striatal membranes. The concentrations of agents used; R(+)SKF 38393, 10^{-5} M; GppNHp, 10^{-5} M; Tu-GppNHp, 10^{-5}M. The values are mean ± SEM of six experiments.

226 Bromocriptine は D2 Receptor agonist か？ —Microdialysis 法による検討—

井上幸紀、切池信夫、奥野正景、伊藤英樹、藤嵜泰利、山上 栄

（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

D2 receptor agonist として作用機序の既に明らかにされている quinpirole と bromocriptine をラット線条体に拡散投与し、摂餌行動と細胞外液中ドパミンおよびその代謝産物の濃度変化を比較し検討を加えた。Quinpirole を線条体に拡散投与した場合、細胞外液中の DA, DOPAC, および HVA 濃度は有意に減少し、高濃度含有液の灌流で摂餌量は増加した。しかし bromocriptine は、その拡散投与により用量依存性に摂餌量が増加したにもかかわらず、DA およびその代謝産物の濃度に影響を与えなかった。これらのことから、bromocriptine は D2 receptor agonist として作用していないと考えられ、bromocriptine を脳内に直接投与した時に惹起される行動上の変化には、ドパミン系は関与しておらず、他の作用機序による可能性が示唆された。

＜はじめに＞ 我々は本学会において、ラットの摂餌行動における線条体ドパミン代謝の役割について報告してきた[1]。そしてその中で D2 receptor agonist として bromocriptine、D2 receptor antagonist としてsulpiride、D1 receptor agonist として CY208-243, そして D1 receptor antagonist としてSCH 23390 を使用し、線条体 D2 receptor が摂餌行動に関与していることを示してきた。しかしこの際、bromocriptine を線条体へ拡散投与しても同部位における細胞外液中ドパミンおよびその代謝産物の濃度は、予想に反し有意な変化を示さないことを観察した。Bromocriptine は麦角化合物で、これまでドパミンの D2 receptor agonist として数々の報告がなされている[3)6)]。しかしその作用機序については未だ不明な点が多く[2)7)]、また、その脳内への直接投与によるドパミン代謝に及ぼす影響については未だ検討されていない。そこで今回、D2 receptor agonist として作用機序の既に明らかにされている quinpirole[4)] と bromocriptine を用い、両薬物をラット線条体に拡散投与したときの摂餌行動と細胞外液中ドパミンおよびその代謝産物の濃度変化を比較し検討を加えた。

＜方法＞ 実験動物、マイクロダイアリシス法における外科的処置は前報と同様である[1)]。すなわち、Wistar 系雄性ラット (180-210 g) に chloral hydrate 麻酔下でPaxinos and Watson の図譜[5)] に従い guide cannula を線条体（背外側）(AP +0.5 mm, L +3.0 mm, V -3.5 mm from bregma and dura surface) に挿入し、固定した。ラットを 8 時から20時を暗期とする明暗恒温条件下で飼育し、術後10日間以上の回復期の後、実験開始日の13時に飼料を取り除き（摂水は自由）、21時に長さ 3 mm の I 字型透析プローブを挿入した。自由行動下でリンゲル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$) を 0.25 μl/min の流速で10時間灌流し、その後（実験 2 日目の 7 時から）1 μl/min の流速で灌流し、9 時から11時までの dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenilacetic acid (DOPAC), および homovanillic acid (HVA) 濃度をそれぞれの基礎値として測定した。ラットを 22 時間絶食させた後、実験 2 日目の 11 時から 17 時まで、bromocriptine を 25×10^{-4} μg/μl/min, 0.25 μg/μl/min, 25 μg/μl/min または quinpirole を 2.56×10^{-2} pg/μl/min, 2.56×10^{-1} pg/μl/min 各濃度で、線条体にプローブより拡散投与しながら 6 時間自由摂餌させ、その間の摂餌・摂水量を測定した。実験終了後、ラットの大脳切片を作成し、顕微鏡下で正しくプローブが線条体内に挿入されていることを確認した。

統計的解析は、DA, DOPAC, および HVA 濃度変化についてはラット間における基礎値のばらつきが大きいため、測定値を各基礎値 6 点の平均値の百分比として表し、各測定値と同時期の対照群との間で Welch Test を用いて行った。各濃度における累積の摂餌・摂水量については対照群と各実験群の間で Welch Test を用いて行った。

＜結果および考察＞ Bromocriptine を25×10^{-4} μg/μl, 0.25 μg/μl, 25 μg/μl 各濃度で含むリンゲル液、または quinpirole を 2.56×10^{-2} pg/μl, 2.56×10^{-1} pg/μl 各濃度で含むリンゲル液を線条体に灌流したときの線条体細胞外液中の DA, DOPAC, および HVA 濃度変化を Fig. 1 および Fig.2 に示した。Bromocriptine を含むリンゲル液を線条体に灌流したとき、各濃度で細胞外液中の DA, DOPAC, および HVA 濃度は対照群に比し有意な変化を示さなかった。しかし、quinpirole を含む液を線条体に灌流したときには、2.56×10^{-2} pg/μl 濃度では対照群に比し有意にDA, DOPAC, および HVA 濃度は減少し、それらは基礎値の各々 55%, 35%, および 50% に達した。また、2.56×10^{-1} pg/μl 濃度の時にも DA, DOPAC, および HVA 濃度は有意に減少し、各々 60%, 50%, および 65% 達した。

Bromocriptine および quinpirole 投与後の自由摂餌 6 時間における累積の摂餌・摂水量についてみると、bromocriptine の投与により摂餌量は、用量依存性に有意ではないが増加した。また、摂水量はすべての濃度において、対照群との間に有意な変化を示さなかった。一方 quinpirole の投与による摂餌量の変化は、低濃度では減少傾向を、高濃度では増加傾向を示した。摂水量は両濃度において低下する傾向を認めた。

D2 receptor agonist として作用機序の既に明らかにされている quinpirole を脳内へ直接拡散投与した場合、細胞外液中の DA, DOPAC, HVA 濃度は有意に減少し、低濃度で摂餌量は減少傾向を、高濃度では増加傾向を示した。これは、D2 receptor antagonist である sulpiride をラット脳内に拡散投与すると低濃度では摂餌量は増加傾向を示し、高濃度では低下傾向を示したという結果[1]の逆であり、D2 receptor の刺激により摂餌行動が強化されることを示していると考えられた。しかし bromocriptine は、その脳内への直接投与により用量依存性に摂餌量が増加したにもかかわらず DA およびその代謝産物の濃度に有意な変化を与えなかった。これらのことから、bromocriptine を脳内に直接投与した場合には D2 receptor agonist として作用しておらず、他の作用機序が存在する可能性が示唆された。

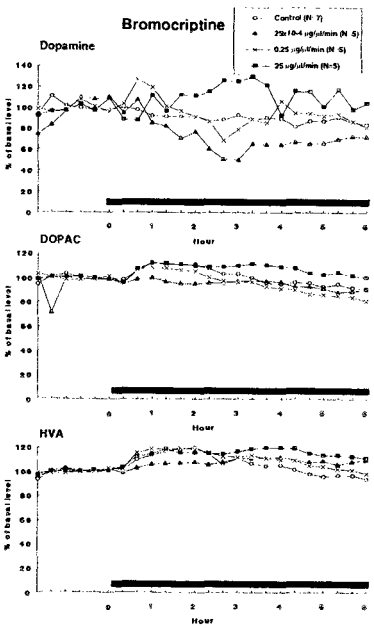


Fig.1 Changes of striatal extracellular DA, DOPAC, and HVA concentrations during bromocriptine perfusion (expressed as closed bars ▬) into the ventrolateral striatum for 6 hours. Values are expressed as mean.

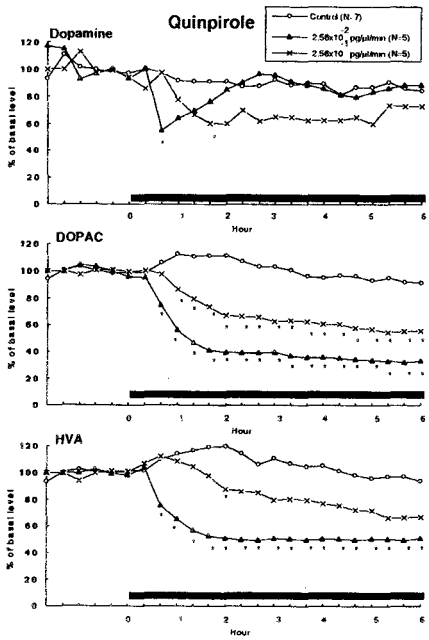


Fig.2 Changes of striatal extracellular DA, DOPAC, and HVA concentrations during quinpirole perfusion (expressed as closed bars: ▬) into the ventrolateral striatum for 6 hours.
Values are expressed as mean. * p<0.05: Compared with the control.

＜参考文献＞ 1) Inoue K.ら (1992) 神経化学 31(1), 494-495. 2) Johnson AM. et al. (1976) Br. J. Pharmac. 56, 59-68. 3) Kebabian JW.et al.(1978) Nature 277(11) 93-96. 4)Nagahama S. et al. (1986) J. Pharmacol. Exp. Therap. 236,735. 5)Paxinos G and Watson C (1986) The Rat Brain, Academic Press. 6) Trugman JM. et al. (1988) Neurology 38(Suppl.1) 122. 7)Zarrindast MR. et al.(1991) Gen. Pharmac 22(6) 1011-1016.

227 ラット緊縛ストレスに伴う脳内アミン変動に及ぼすフィトンチッドの影響

富田 晃代，山岡 貞夫，鯉淵 典之
（獨協医大・第一生理学）

〔要約〕 ラットに緊縛ストレスを与えた時の脳内アミン変動に対して、森林浴の際に嗅覚系を介して作用すると思われるフィトンチッド特にαピネン,ヒノキオールなどの精油成分を匂いとして動物に提示した場合の影響について in vivo microdialysis の方法によって検索した。また同時に慢性的に静脈に留置したカテーテルより採血した血漿サンプルよりＡＣＴＨをＲＩＡ法により測定した。本実験より緊縛ストレスは視床下部前部などのカテコールアミン代謝産物の顕著な増加が認められるが、緊縛ストレス前の30分間αピネン,ヒノキオールなどの精油成分の匂いに暴露するとこの増加がほぼ完全に抑制されストレス前,中,後の変化が認められなくなった。また同時に測定したACTHも緊縛ストレスで顕著に増加するがストレス前30分間のフィトンチッド暴露で完全にACTH増加が抑制された。以上の事実よりフィトンチッドの嗅覚系を介する入力は中枢のカテコールアミン作動性ニューロンの抑制を介して視床下部ー下垂体ー副腎系に抑制的に作用することが推測された。

〔緒言〕我々は森林浴の生理機能に及ぼす影響として、ラットを用いて睡眠,概日リズム,性行動の変化を報告し、森林揮散物質αピネンは睡眠量の増加,リズム振幅の増大,性行動の動機付け機構の亢進などを示すことを明かにしてきた[1]。一方、森林浴はストレスの緩和に役立つことが考えられている。そこでストレスとして緊縛ストレスを用い ACTH 放出，脳内のカテコールアミン放出に森林揮散物質がどのように作用するか検討してみた。

〔方法〕Sprague Dawley 系雄ラット（3～5ヵ月齢, 体重300～450）を用いた。ネンブタール麻酔(35mg/kg)下に脳定位固定装置により視床下部、扁桃核等に Microdialysis 用 Probe を挿入するためのガイドカニューレを慢性的に埋めこみ、支持のステンレスネジと共にアクリルレジンで頭蓋に固定した。手術後２週間以上の回復期間を置いて実験に供した。 Probeはステンレスパイプ,フューズドシリカチューブ,セルローズ透析チューブより作製した自家製の物を利用した。透析膜露出部は1.5～2mmとした。動物は手術前は２～３匹づつ木屑（オートクレーブで処理し数日以上経過し木の香りの残っていない物）を敷いたプラスチックケージを用いて、１４時間明,１０時間暗（5.00-19.00:明）の照明条件,24±0.5°C の室温にて飼育し、手術後は同一条件であるが１匹づつ個別に飼育した。実験は前日に観察ケージに移し、Probe を装着し、無麻酔無拘束の状態でリンガー液を持続潅流し、翌日9～10時より開始した。実験終了迄20分間隔で自動的に潅流液をHPLCシステムに送り込み電気化学検出器により分析記録した。緊縛ストレスは分析を継続しながら14時から20分間固定板に金網で固定した。ACTH 測定（三菱油化のキットによる）には実験数日前に頚静脈よりカテーテルを右心房迄挿入後頚部に断端を固定、実験時 Microdialysis と同時に採血、血漿分離後凍結保存した。1週以上経過後同一動物について同じ実験を行なった、ただしこの際は緊縛ストレス前 13.30から14.00 迄の30分間α-pinen,又はHinokiol(日本デオドール株式会社の提供による）の匂いに暴露した。

〔結果〕1. In vivo microdialysis :今回は視床下部前部のアミン変動について分析を行なった。緊縛ストレスにより視床下部前部のアミンのうちノルアドレナリンの代謝産物(MHPG:3-ﾒﾄｷｼｰ4-ﾋﾄﾞﾛｷｼﾌｪﾆﾙｸﾞﾘｺｰﾙ) ドーパミンの代謝産物(DOPAC:3,4-ｼﾞﾋﾄﾞﾛｷｼﾌｪﾆﾙ酢酸)の顕著な変動が認められた。MHPG はストレス負荷最中より顕著に増加し、DOPAC はストレスより解放後１時間頃より増加し、高い値を２時間程度持続した。しかし同一の実験をストレス負荷前の30分間、Hinokiol(ヒノキ油:ヒノキ葉に含まれる精油)に暴露するとストレス負荷による視床下部のアミン変動はほぼ完全に抑制された（図，１）。

2. 慢性的に頚静脈に留置したカテーテルより２０分間隔で採血した血液より血漿を分離しRIA法によりACTH

を測定した。ストレス負荷により、顕著な増加が観察されたが、ストレス負荷前３０分間のHINOKIOL暴露はストレス負荷によるACTH増加をほぼ完全に抑制し、ストレス負荷前後のACTH分泌に差が認められなくなった（図，２）。

〔考察〕種々のストレスが脳内のアミン変動を来すことはよく知られている[2]。また、種々の中枢作用薬や神経ペプチド，ホルモン等が脳内アミン変動を修飾することの多くの報告[3]も認められる。今回の結果より、αピネンやヒノキオール等の森林揮散物質は嗅覚系を介して視床下部下垂体系に作用して、視床下部のアミン変動及び下垂体よりのACTH分泌にも影響し、ストレスによる視床下部下垂体系の反応を抑制することが推察された。今後この現象について更に検討を加え、視床下部他部位や辺縁系のアミン変動を検索すると共に脳内アミン修飾系との関連，免疫系への影響についても検討する。

〔文献〕1.山岡貞夫、aromatopia 1(1):16-21,1992
2.Nakagawa,R. et al. Pharmacol. Biochem. Behav., 14:729-732,1981
3.Delbende,C. et al. European J. Pharmacol. 202:391-396,1991

図１．

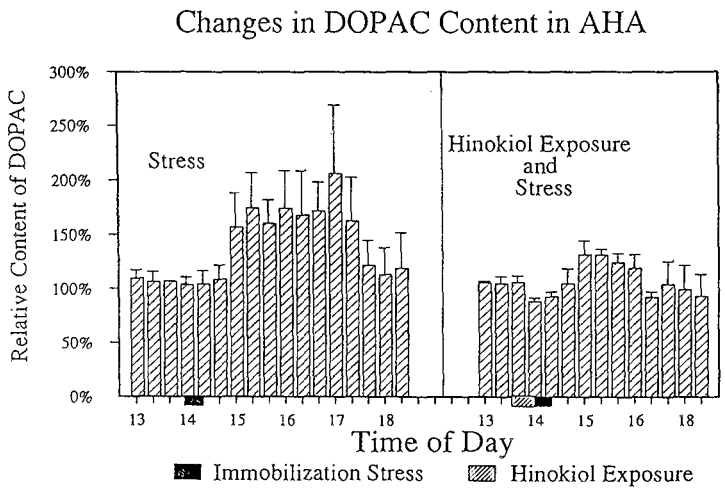
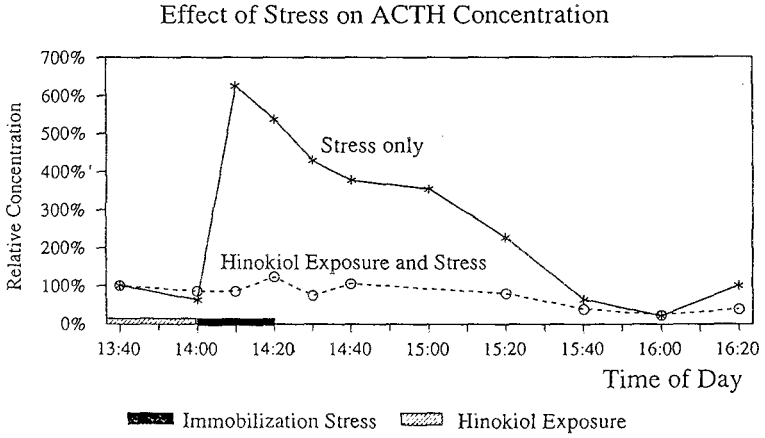


図２．



228 5-HT_{1A} 作動薬 (Ipsapirone, SM 3997) の種々の摂餌条件下におけるラット摂餌行動への影響

伊藤英樹*・**、切池信夫*、井上幸紀*、奥野正景*、藤嵜泰利*、山上栄*
＊大阪市大（医）・神経精神医学教室　＊＊宝塚三田病院

〔要約〕 5-HT_{1A} agonist であるpyrimidinyl-piperazine 誘導体の SM 3997 と Ipsapirone の摂餌行動に対する効果について検討を加えた。自由摂餌条件下では Ipsapirone、SM 3997 はともに用量依存的に摂餌量を増加させた。そしてそれぞれ 8 mg/Kg, 20 mg/Kg 濃度において対照群の 200%, 197% の増加を示した。また、一昼夜絶食後の空腹状態下では SM 3997 は用量依存的に摂餌量の減少をきたし、20 mg/Kg 濃度では対照群の 48% に減少した。しかし Ipsapirone については有意な変化を認めなかった。22 時間絶食後の 2 時間摂餌後の満腹状態では、Ipsapirone, SM 3997 とも摂餌量に有意な変化を示さなかった。一方、2 時間後、3 時間後の摂餌量については、両薬剤とも、いずれの摂餌条件下においても対照群との間に有意差を認めなかった。以上の結果より、5-HT_{1A} agonist は自由摂餌条件下において摂餌量を増加させるが、一昼夜絶食後の空腹状態では摂餌量を抑制した。この mechanism に若干の考察を加えた。

＜はじめに＞ 我々はこれまで摂食障害の生物学的基盤を解明するために、ラット摂餌行動と脳内セロトニン代謝の関係について検討を加え、種々の摂餌条件下で脳内セロトニン（5-HT）代謝が変化することを報告してきた[6)7)]。したがって摂餌条件が変われば、摂餌行動に影響を及ぼす薬物の効果も異なるものと予想される[2)]。5-HT_{1A} agonist は自由摂餌下におけるラットの摂餌量を増加させることが知られている[4)5)]が、空腹時および満腹時における 5-HT_{1A} agonist の摂餌行動への影響については検討されていない。そこで本研究では、自由、空腹時、および満腹時ということなる条件下における Ipsapirone[3)]と SM 3997 の摂餌におよぼす影響について検討を加え、興味ある結果を得たので、若干の考察を加えて報告する。

＜方法＞ 8-20 時を暗期、20-8 時を明期とする明暗恒温条件下で、個別の飼育用プラスチックゲージ (215x320x130 mm) で飼育したWistar 系雌性ラット (12 週齢、 200-250 g) を実験に供した。飼料としては、日本クレア社製 CE-2 (水分 8.7%, 粗蛋白質 25.2%, 粗脂肪 4.6%, 粗繊維 4.3%, 粗灰分 7.2%, 可溶性無窒素物 50%, 345.2 Cal/100g) を用いた。1 週間のならし期間の後、ラットを 3 群に分け、（1）自由摂餌群 (Free feeding group)（2）24 時間絶食群 (Fasted group)（3）22 時間絶食後 2 時間自由摂餌させた群 (Satiated group) とした。各群のラットに Ipsapirone (2-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl]-1,2-benzisothiazoline-3-one-1,1-dioxide hydrochloride) （ドイツ、トロポン社製）を濃度 0.1 mg/Kg, 1 mg/Kg, 4 mg/Kg, 8 mg/Kg, およびコントロールとして生理食塩水 1 ml を腹腔内投与した。投与後自由摂餌とし、1 時間後、2 時間後、および 3 時間後の摂餌量、摂水量、および体重を測定した。一方、SM 3997 [3aα,4β,7β,7aα-hexahydro-2-{4-[4(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl}-4,7-methano-1H-isoindole-1,3(2H)-dione dihydrogen citrate] （住友製薬）についても濃度 2.5 mg/Kg, 5 mg/Kg, 10 mg/Kg, 20 mg/Kg, およびコントロールとして生理食塩水 1 ml を各群ラットに腹腔内投与し、Ipsapiron と同様、摂餌量、摂水量、および体重を測定した。統計学的解析には一元配置分散分析法および Welch Test を用いた。

＜結果および考察＞ Ipsapirone および SM 3997 の腹腔内投与 1 時間後の各群ラットの摂餌量への効果について、Fig 1, 2 に示した。自由摂餌条件下では、Ipsapirone, SM 3997 は共に摂餌量を用量依存性に増加させ、それぞれ 8 mg/Kg, 20 mg/Kg 濃度において対照群に比し約 200%,約 197% の有意な増加を示した。また、絶食条件下の空腹状態における摂餌量については、SM 3997 は用量依存性に減少させ、20 mg/Kg 濃度において対照群の約 48% と有意に減少した。しかし、Ipsapirone については対照群との間に有意な差を認めなかった。また、22 時間絶食後 2 時間摂餌させた満腹状態では、Ipsapirone, SM 3997 はともに摂餌量について対照群との間に有意な差を認めなかった。一方、2 時間後、3 時間後の摂餌量

については、両薬剤はいずれの摂餌条件下においても対照群との間に有意な差を認めなかった。以上の結果より、自由摂餌条件下における Ipsapirone, SM 3997 の摂餌量の用量依存的な増加は、5-HT_{1A} agonist が pre-synapse の autoreceptor に働き、5-HT 放出が抑制され、その結果摂餌量が増加したものと考えられた。一方、絶食条件下では脳内の 5-HT の代謝亢進が報告されており[1]、この条件下では 5-HT_{1A} agonist は post-synapse に働き、より5-HT の作用が増強された結果、摂餌量が減少したものと考えられた。しかし、同じ 5-HT_{1A} agonist である Ipsapirone において同じ結果が見られなかった理由は不明であるが、投与量や作用機序の違いが関係している可能性も考えられた。

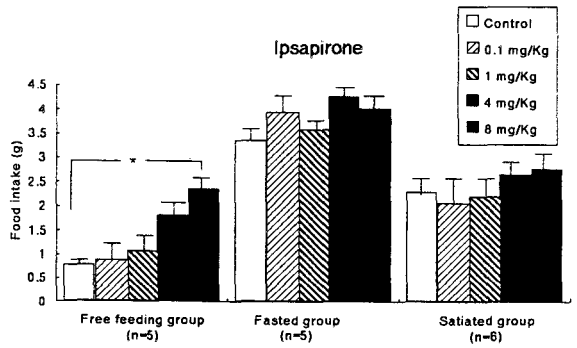


Fig.1 Food intakes after ipsapirone injections at various doses to the rats under different feeding conditions for one hour.
Values are expressed as mean ± S.E.M. * $p < 0.05$

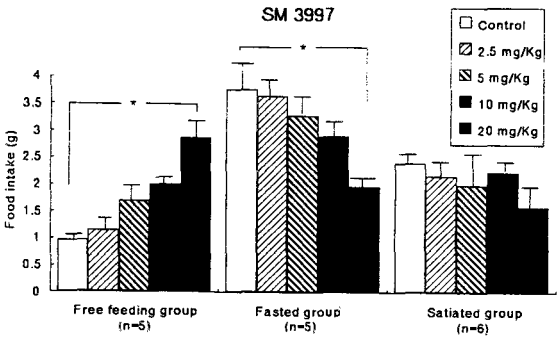


Fig.2 Food intakes after SM3997 injections at various doses to the rats under different feeding conditions for one hour
Values are expressed as mean ± S.E.M. * $p < 0.05$

＜参考文献＞ 1) Blundell J.E. (1984) Neuropharmacology 23. 1537-1551. 2) Gen Komaki 他 (1989) 医学の歩み 150, 12. 3) Gilbert F. and Dourish C.P. (1983) Psychopharmacology 93. 349-352. 4) Kennett G.A. and Curzon G. (1988) Psychopharmacology 96. 93-100. 5) Muscat R. et al. (1989) Psychopharmacology 99. 402-408. 6) 奥野正景 他 (1991) 神経化学 30, 440-441. 7) 奥野正景 他 (1992) 神経化学 31, 442-443.

229 Methamphetamineによる行動感作に対する競合的及び非競合的NMDA受容体拮抗薬の影響

大森哲郎、安倍川智浩、小山　司
北海道大学医学部精神医学教室

〔要約〕Wistar-King系雄性ラットにMAPを投与量を2.5, 5, 7.5, 10 mg/kgと増量しながら1,3,5,7日目に1日2回皮下投与した。生食群には生食1ml/kgを皮下投与した。それぞれの半数には、NMDA受容体の非競合的拮抗薬MK-801(0.5mg/kg) あるいは競合的拮抗薬D-CPP-ene (20mg/kg)を前投与した。14,15日目にMAPを1mg/kg皮下投与し、赤外線センサーを利用した運動量測定装置を用いて行動を測定した。17,18日目には、MK-801 (0.25mg/kg) あるいはD-CPP-ene (10mg/kg)を腹腔内投与し、同様に行動を測定した。その結果、MK-801 およびD-CPP-eneは、MAP反復処置によって形成される行動過敏性を阻止することが判明した。この所見は行動過敏性の形成にNMDA受容体の活動が重要な役割を有することを示唆している。またMK-801あるいはD-CPP-eneの反復投与によって行動効果に耐性が生ずることも示された。

【はじめに】

記憶や学習あるいはキンドリング過程などと同様に、Amphetamineの反復投与後に形成される行動過敏性も、なんらかの脳内の可塑的変化を背景に持つものと思われる。最近 Karler（1）、Wolf（2）、Stewart（3） らは、Amphetamineによる行動過敏性の獲得を非競合的NMDA受容体拮抗薬MK-801が阻止すると報告した。NMDA受容体を介するグルタミン酸神経伝達は、中枢の可塑的変化に重要な役割を有すると推定されているだけに、この報告は興味深い。そこで我々は今回、MK-801に加え、競合的NMDA受容体拮抗薬D-CPP-eneについても同様の検討を行った。同時にMK-801やD-CPP-ene反復投与が、行動効果に過敏性ないし耐性を生ずるか否かをも検討した。

【方法】

実験1）Wistar-King系雄性ラット(200-250g)を用い、MAP反復処置群、MK-801反復処置群、MAPとMK-801併用処置群および生食群を次のように作成した(n=15-18)。すなわち、MAPは、投与量を2.5, 5, 7.5, 10 mg/kgと増量しながら1,3,5,7日目に1日2回皮下投与した。生食群には生食1ml/kgを皮下投与した。MAP処置群および生食群の半数には、MK-801(0.5mg/kg)を、MAPあるいは生食投与の30分前に腹腔内投与した。処置後7－8日間の休薬期間をおき、14,15日目に上記4群に対しMAPを1mg/kg皮下投与し、赤外線センサーを利用した運動量測定装置を用いて行動を測定した。ついで17,18日目に、MK-801 0.25mg/kgを腹腔内投与し,同様に行動を測定した。

実験2）実験1と同様にMAPあるいは生食を投与した。MAP処置群および生食群の半数には、D-CPP-ene (20mg/kg)を、MAPあるいは生食投与の30分前に腹腔内投与し, MAP反復処置群、D-CPP-ene反復処置群、MAPとD-CPP-ene併用処置群および生食群を作成した(n=9)。14,15日目に4群に対しMAPを1mg/kg皮下投与し、ついで17,18日目にD-CPP-ene 10mg/kgを腹腔内投与し行動を測定した。統計にはANOVAとpost-hoc Dunkan new multiple range testを用い、危険率5％を有意水準とした。

【結果】

実験1）MAP反復処置群では生食投与群に比べ、MAPによる運動量増強が有意に増加していた。すなわち行動過敏性が確認された。この行動過敏性の形成をMK-801は完全に抑制した。MK-801単独処置群は、生食群と差がなかった(Fig.1)。MK-801単独処置群およびMAPとMK-801併用処置群では、生食群とくらべ、MK-801 challenge による運動量増強の程度が有意に低下していた。すなわち、MK-801の行動上の効果には耐性が生じていた。MAP反復処置群は、生食群と差がなく交差過敏性は認められなかった(Fig.2)。

実験2）MAP反復処置群では行動過敏性が確認された。この行動過敏性の形成をD-CPP-eneは完全に抑制した。D-CPP-ene単独処置群は、生食群と差がなかった(Fig.3)。 D-CPP-ene単独処置群およびMAPとD-CPP-ene併用処置群

において、D-CPP-ene challenge による運動量が低下し、D-CPP-eneの行動上の効果に耐性が生ずることが示唆された(Fig.4)。図の棒グラフは140分から230分までの累積運動量を示している。MAP反復処置群は、生食群と差がなく交差過敏性は認められなかった(Fig.4)。

【考察】

MAP反復処置によって形成される行動過敏性を非競合的NMDA受容体拮抗薬 MK-801 は完全に抑制していた。これは、Karler（1），Wolf（2），Stewart（3）らの報告と一致するものである。本研究ではさらに競合的NMDA受容体拮抗薬 D-CPP-ene もMAP反復処置によって形成される行動過敏性を阻止することを示した。これらの結果は、行動過敏性の形成にNMDA受容体活動が重要な役割を有することを示唆している。動物モデルからの類推は慎重でなければならないが、覚醒剤精神病の症状形成や精神分裂病の易再燃化や難治化においてもNMDA受容体の活動が関与するのかもしれない。

MK-801あるいはD-CPP-eneの反復処置は、行動効果に耐性を生じさせた。Dall'Olioら（4）はMK-801の慢性投与後の行動について我々の結果と一致する報告をしている。MAPとMK-801あるいはMAPとD-CPP-eneとの間には交差過敏性や交差耐性は見られず、MAP過敏性と、MK-801あるいはD-CPP-eneの行動耐性は、独立のメカニズムによるものと思われる。

【文献】

1) Karler et al (1990) Brain Res. 537:76　2) Wolf et al(1991) Brain Res.562:164

3) Stewart et al (1993) Psychopharmacol. 110: 125　4)Dall'Olio et al (1992) Psychopharmacology 107:591

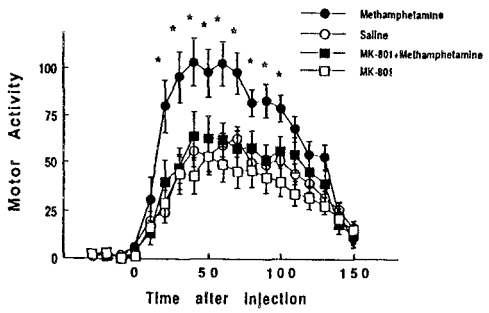


Figure 1. Methamphetamine challenge (1mg/kg,sc). n=15-18. *< 0.05.

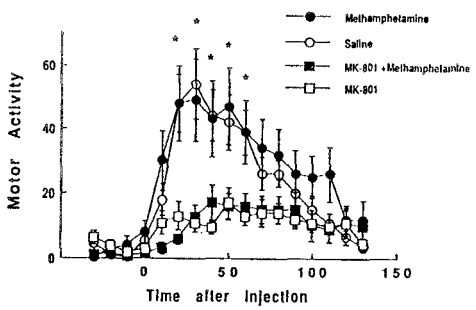


Figure 2. MK-801 challenge (0.25 mg/kg,ip) . n=15-18. *< 0.05.

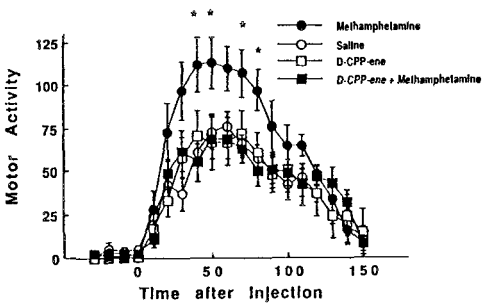


Figure 3. Methamphetamine challenge (1mg/kg,sc). n=9. *< 0.05.

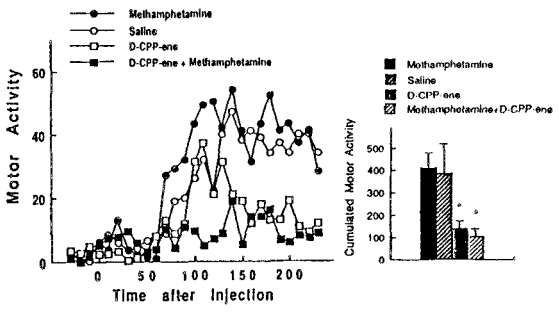


Figure 4. D-CPP-ene challenge (10mg/kg,sc). n=9. Histogram represents the cumulated motor activity of each group from 140 to 230 min. *< 0.05.

230 電撃ストレスによる脳内セロトニンおよびドーパミン代謝の亢進
---２つの電撃強度における効果の比較---

井上　猛、小山　司、土屋　潔
(北海道大学医学部精神医学教室)

〔要約〕
電撃ストレスによって惹起されるラット脳内ドーパミン(DA)およびセロトニン(5-HT)代謝の亢進について２種類の電撃強度で検討した。ラットに1.5mAか2.5mAの電撃強度のfootshockを30分間負荷した。その際の8脳部位におけるDOPAC、HVA、5-HIAA含量の変化を電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)によって測定した。1.5mAの電撃ストレスでは、DA代謝は内側前頭前野でのみ亢進した。一方、2.5mAの電撃ストレスは内側前頭前野のみならず、海馬を除くほとんどの脳部位でDA代謝の亢進をもたらした。内側前頭前野でのDOPAC含量の増加の程度は1.5mA群よりも2.5mA群で有意に大きかった。5-HT代謝に関しては、1.5mAの電撃ストレスでは扁桃体でのみ代謝の亢進がみられ、2.5mAの電撃ストレスでは扁桃体のほか、内側前頭前野、側坐核、外側視床下部でも代謝の亢進が認められた。電撃ストレスがラットに及ぼす行動上の影響を検討するために、電撃ストレスの24時間後にラットを再びショック箱におき、電撃を加えずに30分間行動を観察した（恐怖条件付け）。恐怖条件付けストレスによってすくみ行動が顕著に出現したが、その程度は1.5mA群よりも2.5mA群で有意に大きかった。電撃ストレスによって惹起されるDA、5-HT代謝の亢進は、電撃強度が強いほどより広範な脳部位で、しかもより増強してみられた。しかも、この神経化学的変化は電撃ストレスがラットに及ぼす行動上の影響（恐怖反応の増強）と機能的に関連していることが示唆された。

ストレスが脳内DA、5-HT代謝に及ぼす影響を検討した報告はこれまで多くなされているが、ストレスによって代謝の亢進がみられる脳部位は報告によって異なり、用いたストレスの強さ、期間の違いが結果の違いに影響していることが、特にDA系で指摘されている(1)。これまでの報告をまとめると、弱い強度のストレスでは選択的に内側前頭前野のDA代謝が亢進するのに対し、強いストレスでは内側前頭前野のみならず、側坐核、線条体でもDA代謝の亢進がみられることが多い(1)。しかし、ストレスの強さを変えてDAおよび5-HT代謝に対するストレスの影響を系統的に検討した報告はこれまでない。そこで、本研究では２種類の電撃強度を用いて、電撃ストレスの脳内DA、5-HT代謝に及ぼす影響を検討した。さらに、電撃ストレスがラットの行動に及ぼす影響を、２つの電撃強度で比較検討することによって、脳内の神経化学的変化と機能との関連についても考察した。

【方法】
Sprague-Dawley系雄性ラットを用いた。ラットに1.5mAか2.5mAの電撃強度のfootshockを30分間負荷し、直後に断頭により脳を採取した。対照群は同じ箱に電撃を加えずに30分間静置した。Palkovitsらの方法(5)により、内側前頭前野、側坐核、内側線条体、外側線条体、室旁核、外側視床下部、扁桃体、海馬の８部位を、-70℃で保存した脳からpunch outした。その組織片をl-cysteine(20μg/ml)を含有する0.2N perchloric acid中でhomogenizeし、14,000×g、１分で遠心分離後、上清に含まれるDA、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA)、5-HT、5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)をHPLC-ECDにより測定した(3)。ペレット中の蛋白量をFolin-Lowry法(4)により測定し、各代謝物の含量は蛋白量あたりの濃度とした。電撃ストレスがラットの行動に及ぼす影響を検討する実験では、ラットに1.5mAか2.5mAの電撃強度のfootshockを30分間負荷した後、ラットをいったんhome cageにもどし、24時間後に再びショック箱に置き、恐怖条件付けによって惹起されるすくみ行動を15分間観察した。すくみ行動はtime-sampling procedure(2)により、10秒毎に行動を評価した。15分間を5分ずつ3ブロックにわけて、各ブロック毎にfreezing behavior がみられる期間を百分率に計算しスコアとして表した。

【結果】
1.5mAの電撃ストレスでは、DOPAC含量は内側前頭前野でのみ増加した(Fig.1)。一方、2.5mAの電撃ストレスは内側前頭前野のみならず、海馬を除く検討したほとんどの脳部位でDOPAC含量の増加をもたらした。内側前頭前野でのDOPAC含量の増加の程度は1.5mA群よりも2.5mA群で有意に大きかった。HVA含量は1.5mA群では変化せず、2.5mA群では内側前頭前野、側坐核、線条体で増加がみられた。5-HT代謝に関しては、1.5mAの電撃ストレスでは扁桃体でのみ5-HIAA含量の増加がみられた。2.5mAの電撃ストレスでは扁桃体で5-HIAA含量が増加したほか、5-HIAA/5-HTの比は内側前頭前野、側坐核、外側視床下部でも有意な増加が認められた。電撃ストレスがラットに及ぼす行動上の影

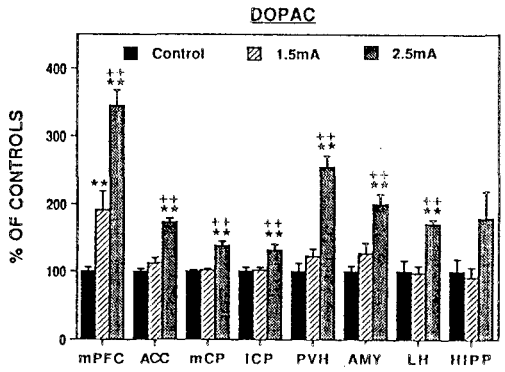
響が電撃強度の違いによって異なるかどうかを確かめるために、電撃ストレス負荷後の恐怖条件付けによる行動の変化を検討した。恐怖条件付けストレスによってすくみ行動は顕著に出現したが、その程度は1.5mA群よりも2.5mA群で有意に大きかった(Fig.2)。

【考察】

本研究の結果からDeutchら(1)がその可能性を指摘したように、身体的ストレスの強度によってDA代謝の亢進する部位が異なることが確認された。強度の弱い電撃ストレスでは選択的に内側前頭前野でDA代謝が亢進するのに対し、強度を強くしたときは、電撃ストレスは内側前頭前野だけでなく、検討したほとんどの脳部位でDA代謝の亢進をもたらした。ストレスのDA代謝に及ぼす影響を電撃強度を変えて系統的に検討した報告はこれまで少なく、Specialeらの報告(6)があるのみである。彼らが検討した部位は内側前頭前野、側坐核、線条体の3部位と少なく、その結果も線条体については我々の結果と一致しているが、側坐核については弱い強度でDA代謝の亢進がみられるのに対し、より強い強度のストレスではDA代謝の亢進がみられないなど、従来の報告(1)と一致しない点がみられた。一方、5-HT系に関してはこれまで、ストレス強度を変えて検討した報告はなく、本報告がはじめてのものと思われる。弱い電撃強度の電撃ストレスでは扁桃体でのみ5-HT代謝の亢進がみられたのに対し、強い強度のストレスでは扁桃体だけでなく、内側前頭前野ほか3部位で5-HT代謝の亢進がみられた。このようにDA系、5-HT系ともに弱い強度のストレスでは限局した部位で変化がみられたのに対し、強い強度のストレスではより広範な脳部位でも変化がみられた。このDA、5-HT代謝の亢進はそれぞれの神経系の活動の亢進を反映していると思われるが、その機能的な意義はこれまで明らかではなかった。本研究では恐怖条件付け(2)を用いて、電撃ストレスのラットに及ぼす行動上の変化を検討した結果、強度の強い電撃ストレスは弱い強度の電撃ストレスに比べ、より強い恐怖反応をラットにもたらすことが認められた。この行動上の変化と広範な脳部位でDA系、5-HT系の活動亢進がみられたことは何らかの機能的な関連をもっていると思われる。

【文献】

(1)Deutch,A.Y. et al. (1990) Prog. Brain Res.,85,367-403. (2)Fanselow,M.S. (1980)Pavlov.J.Biol.Sci.,15,177-182. (3)Inoue,T. et al. (1993) Phramacol. Biochem. Behva., 44,371-374. (4)Lowry,O.H. et al. (1951) J. Biol. Chem., 193,265-275. (5)Palkovits,M. et al. (1988) Maps and guide to microdissection of the rat brain, Elsevier, New York. (6)Speciale,S.G. et al. (1986) Brain Res. Bull., 16,33-38.



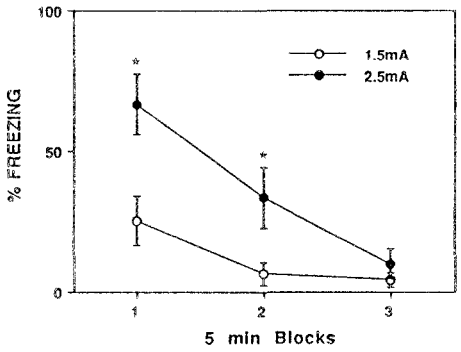


Fig. 2. Mean percent±SEM of freezing scored for each 5 min block of testing in groups of rats receiving 1.5mA or 2.5mA shock. (* P<0.05).

Fig. 1. Effects of two levels of electric footshock stress (1.5mA or 2.5mA) for 30 min on DOPAC levels of different brain regions. Results are means with SEM of data obtained on 7-8 rats and are expressed as percentage of respective control values. Significantly different from controls (** p<0.01) or from 1.5mA shock group (++ p<0.01). mPFC, medial prefrontal cortex; ACC, nucleus accumbens; mCP, medial striatum; lCP, lateral striatum; PVH, paraventricular nucleus of the hypothalamus; AMY, amygdala; LH, lateral hypothalamus; HIPP, hippocampus.

231 β/A4タンパク質の細胞外への分泌におけるシグナル配列の役割について

宇佐美美穂子、佐原成彦、丸山　敬[1]、吉川和明[2]、吉岡　昇、森　啓
都精神研・分子生物、都臨床研・遺伝情報[1]、都神経研・分子生物[2]

〔要約〕

アルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク (APP) のC末端から100ケのアミノ酸をコードするcDNA(C−100)及びそのN末端にシグナル配列を付加したcDNA(SC−100)をCOS細胞に導入し、シグナル配列の有無によるこれらのタンパクの代謝への影響について検討した。1、C−100及びSC−100ともそのタンパク質としての発現がC末端抗体によって確認された。これらのタンパク質は発現後N末端側が切断され、やや分子量の小さい断片に変化するが、その切断の時期は両者で異なり、C−100では導入後5日で生じるがSC−100ではより早く2日目であった。2、SC−100では細胞内でβ抗体に反応するペプチドがみられたが、その分子量はAPPのC末端部分を含むと考えられる分子種 (14 kD) が主要成分でありβ/A4に相当するペプチドは微量であった。C−100を導入した細胞内ではβ/A4抗体に反応するタンパクは見られなかった。3、SC−100cDNAを導入したCOS細胞には培養液中にβ/A4タンパクが分泌されたが、C−100cDNAでは検出されなかった。

β/A4タンパクの産生と分泌には、シグナル配列の認識による小胞体腔への移行に始まる一連の修飾及び輸送過程が必要であると考えられる。

アルツハイマー病 (AD) においては脳組織に多くの老人斑がみとめられる (3)。最近その主成分であるβ/A4タンパク質が正常人や培養細胞でも検出され (1,4,5)、通常の代謝過程においてもβ/A4タンパクが形成されることが示唆された。最近では、ADの病因解明のためにアミロイドの沈着機構が注目されている。

私達は以前、APPのβ/A4タンパクからC末端まで (C−100) をコードするcDNAをCOS細胞で発現させ、細胞内にβ/A4タンパクに対する抗体で染色される繊維状構造が生じていることを報告した (2)。今回はそのN末端に小胞体移行シグナル配列を持ったC−100 cDNAの発現及びその代謝をC−100 cDNAのそれと比較しながらCOS細胞にて検討した。

[方法]

1、C−100及びSC−100のcDNAの構成は図1に示してある。

2、COS細胞におけるcDNAの発現はDEAE−dextran法で行った。発現されたタンパクの検出は15/22.3 %連続勾配ポリアクリルアミドゲルを用いたウエスタンブロットで実施した。用いた抗体は合成ペプチドを抗原としたウサギポリクロナール抗体であるC40 (APPのC末端40ケのアミノ酸、APP656−695)、及びβ1−42 (β/A4タンパク1−42) を用いた。

[実験結果]

1、C−100及びSC−100のcDNAをそれぞれCOS細胞に遺伝子導入し,C40抗体を用いてその発現を経時的に観察した。図2に見られるように、C−100は導入後2日目で分子量、14kDのタンパクの発現みられ、5日目より小さい分子量のフラグメントが出現した。一方、SC−100では比較的早い時点（3日目）でフラグメントが検出された。

2、β1−42抗体を用いるとC−100では反応するタンパクは見られないのに対し、SC−100では2日目より分子量14kDのバンドが3日目からはより小さいペプチドが検出された。（図3）

3、β/A4タンパクの細胞外への分泌を調べるために、培養液を集めβ1−42抗体を用いて免疫沈降を行った後、SDS−PAGEにて調べたところ、C−100では全く反応しなかったが、SC−100ではβ抗体に反応して分子量約4000のペプチドが検出された。（図4）

[考察]

C−100はシグナルを持たないためタンパクとして生合成されても小胞体に入らずそのまま細胞質中に排出されると考えられる。C−100分子内の膜貫通領域にある疎水性アミノ酸のために、細胞質内では可溶性タンパクとして存在するよりも自己凝集して線維状構造をとり易くなったと考えられる。この線維状構造は免疫組織学的にAPPのC末端抗体(C40)で強く染色される。このうちβ/A4に対する抗体に陽性な細胞は約30分の1であり、C−100のN末端部分の分解が速いことが考えられる。イムノブロットにおいてβ抗体で検出されないのは、細胞内にこのような構造の存在はごく少ないためか、あるいはSDS-PAGE分析では検出されないような特殊な二次構造をとっているものと考えられる。一方、シグナル配列を持つSC−100は小胞体内腔に取り込まれて後、輸送、修飾過程を経て未同定のプロセシングを受け、一部はC末端が切断され可溶性β/A4タンパクとして細胞外へ分泌され、大部分はC末端部分を含んだ膜貫通タンパクとして細胞内オルガネラや細胞膜に存在するものと考えられる。

C−100、SC−100とも生合成後により小さい分子量のペプチドが出現するが、このペプチドはC末端抗体で検出されるため、N末端側が少し切断された断片であると考えられるが、C−100、SC−100とも同一位置で切断されるのか否かは不明である。しかし、切断に時間的なズレがあること、SC−100からは可溶性のβ/A4タンパクが分泌されること、これら2つのタンパク質の生合成経路及び存在様式が異なっていると考えられることなどから、両者の代謝分解過程に作用する分子機構が違うものであることが示唆される。

[参考文献]

1. Haass, C. et. al. (1992) Nature 356, 322−325
2. Maruyama, K. et. al. (1990) Nature 347, 566−569
3. Selkoe, D. J. (1991) Neuron 6, 487−498
4. Seubert, P. et. al. (1992) Nature 356, 325−327
5. Shoji, M. et. al. (1992) Science 258, 126−129

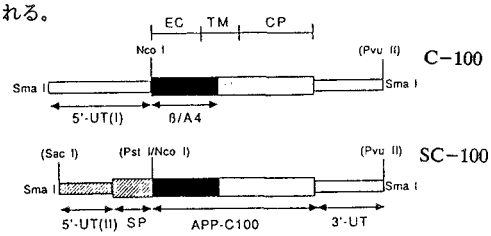


Fig. 1 Constructs of C-100 and SC-100.

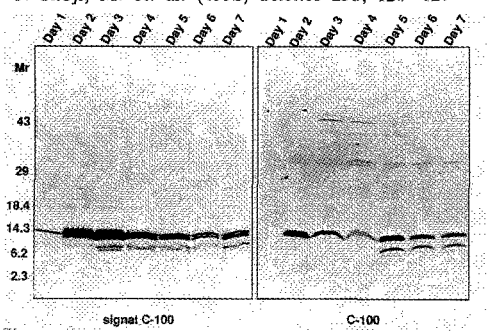


Fig. 2 Time-dependent change in polypeptides with immunoreactivity against C40 antibody.

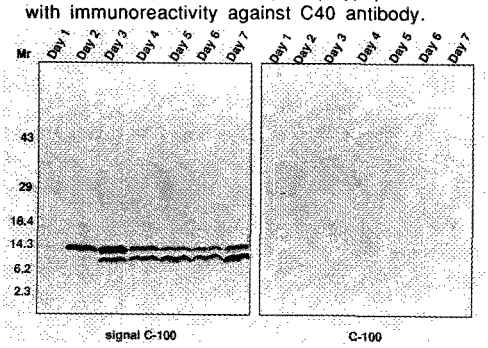


Fig. 3 Time-dependent change in polypeptides with immunoreactivity against ß antibody.

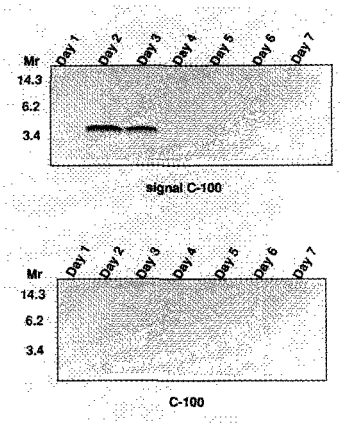


Fig. 4 Immunoprecipitation of 4-kD protein released from COS-1 cells transfected with C-100 or SC-100 cDNA.

232 Identification Of A Novel Amyloid Component (NAC) In Alzheimer's Disease

KENJI UÉDA
Dept.of Neurosciences, Sch. of Medicine,
Univ.of California, San Diego, La Jolla, CA92093-0624, USA.

〔要約〕Recently, we have discovered a novel amyloid component (NAC) from Alzheimer's disease (AD) brain, and cloned the corresponding cDNA. NAC is found to be part of the precursor protein (NACP) composed of 140 amino acids. Hydropathy analysis of NACP showed NAC to be most hydrophobic, possibly a membrane-associated domain of the protein. Secondary structure predictions show that the NAC peptide has a strong tendency to form β-structures, like amyloid β/A4 protein (Aβ). Quantitative immunohistochemical analyses showed that 30% of the diffused plaques and 55% of the immature/mature plaques are strongly stained in AD, while the plaques of the normal aged cases are not. This could imply that a subpopulation of the plaques in AD represents the products of normal aging that are not stained with the anti-NAC antibody, whereas the plaques with extensive neuritic changes and amyloid condensation represent AD specific plaques that are positive with anti-NAC antibody. We conclude that NAC might be a critical component in the pathogenesis of the AD plaque.

INTRODUCTION A neuropathological hallmark of AD is a widespread amyloid deposition. We analyzed the entire amino-acid sequences in an amyloid preparation and found, besides Aβ fragment, two unknown peptides. Antibodies against these peptides immunostained amyloid fibrils with electron microscopy. We named this 35-amino-acid peptide NAC (Novel Amyloid Component) and its precursor NACP. Many other components reported to be associated with plaque core were only with immunological probes. Thus, NAC is the second component after Aβ identified both chemically and immunohistochemically.

MATERIALS AND METHODS

Amyloid preparation: Amyloid was purified as described[1] in the presence of SDS, solubilized in formic acid, digested with CNBr, then with endopeptidase and analyzed by HPLC. Analysis of all the major peaks revealed two unknown peptides named as X and Y. **Immunohistochemistry:** Antibody production against the peptides and the immunohistochemical analyses were performed as described[1]. Specificity of the staining was demonstrated by absorption with the corresponding peptide. **PCR and Screening of cDNA Library:** Sense (X1) and antisense (X2) oligonucleotides were designed based on the N- and C-terminal halves of the X peptide sequence. One set of oligonucleotides that flanks the *Eco*RI cloning site of λgt11 was made as Z (sense), and αZ (antisense)[1]. PCR was performed using these oligonucleotides as primers, with combinations of X1 (or X2) and Z (or αZ), and a human fetal brain λgt11 cDNA library as a template. A PCR product of ~280 bp from the combination of X2 and αZ was sequenced, confirming its identity as a piece of NACP cDNA. This PCR product was used as a probe for the screening of a brain cDNA library. **Bacterial Expression of NACP Protein.** NACP protein was expressed in *E. coli* using pSE380 expression vector (Invitrogen, San Diego, CA) and NACP cDNA.

RESULTS AND DISCUSSION

Immunohistochemistry of NAC: AD brain sections were analyzed with two antibodies raised against subsequences of X and Y peptides. Analyses revealed immunostaining of amyloid in diffuse and immature/mature plaques (Fig. 1A & B) as well as vascular amyloid. The staining was localized on amyloid fibrils with immunoelectron microscopy (Fig. 1D), indicating that these peptides are integral part of, or very tightly associated with amyloid fibrils.

cDNA cloning: Clone HBS6-1 contained the entire coding sequence of NACP. Sequence analysis of the clone revealed a 420-bp open-reading frame encoding 140-amino-acid residues with a calculated M_r of 14.5K, and that X- and Y-peptide sequences are localized in tandem in the middle of the precursor (Fig. 2A). Secondary structure predictions indicate that the NAC peptide sequence has a strong tendency to form β-structures like Aβ, consistent with its association with amyloid. The hydropathy profile (Fig. 2B) shows this region to be most hydrophobic, possibly a membrane-associated domain of the protein.

Northern blot analysis: NACP mRNA was expressed principally in brain but was also expressed in low concentrations in all the tissue examined except liver, suggesting its ubiquitous and brain-specific functions.

Immunohistochemical staining patterns in AD and normal brain: Quantitative analyses revealed that anti-NAC antibodies immunostained 30% of the diffuse type, and 55% of the immature/mature type of plaques in AD brain, but did not stain plaques in normal aged cases. Therefore, NAC-positive plaques might be specific to AD, while NAC-negative plaques might be the products of normal aging. The availability of NACP cDNA should help elucidate the mechanisms of amyloidogenesis in AD.

Acknowledgment The author thanks to Drs. H. Fukushima, E. Masliah, A. Iwai, M. Yoshimoto, J. Kondo, Y. Ihara, and T. Saitoh for their collaboration.

Reference (1) Uéda, K *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (in press).

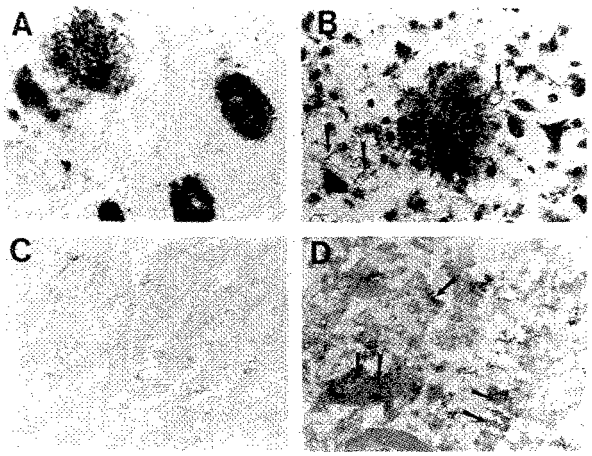


Fig. 1. Immunodetection of NAC in AD brain sections. **A.** AD hippocampal sections were stained with anti-NAC antibodies, anti-X1 (**A**) and anti-Y (**B**). Both antibodies stained neuritic plaque amyloid that was thioflavin S positive. Occasional staining of neuropil threads (arrows in **B**) was detected with anti-Y antibody. Absorption with the corresponding peptide eliminated the staining. The section in panel **C** was stained with preabsorbed anti-X1. The electron micrograph (**D**) shows the anti-X1 staining of amyloid fibrils (arrows in **D**). Amyloid fibrils were also stained with anti-Y antibody.

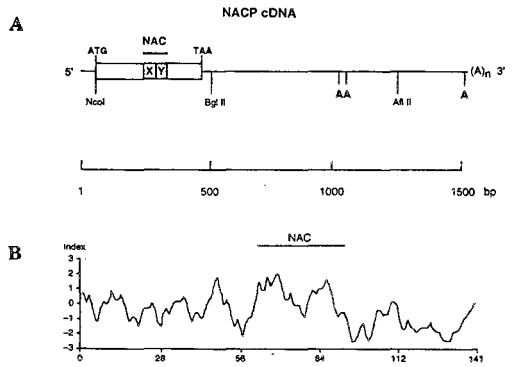


Fig.2. **A.** Schematic representation of NACP cDNA clone HBS6-1. The sequence encodes a 140-residue open-reading frame resulting in a calculated M_r of 14,459.46. Sequences for X and Y peptides obtained from amyloid fractions are shaded. **B.** Hydropathy plot of NACP. The main hydrophobic domain of the deduced amino-acid sequence (amino acids 62 through 90) is within the NAC sequence (amino acids 61 through 95).

233 老化ラット髄液中キヌレニン濃度の特異的増加

和田博夫, 井藤英喜[1], 折茂肇, 佐藤昭夫[2]

(東京大・老年病, 都老人医療センター[1], 都老人総合研究所[2])

〔要約〕老化ウィスター系雄性ラット(月齢28－32箇月, n＝6)および成熟ウィスター系雄性ラット(月齢4－6箇月, n＝6)の髄液中のカテコラミン系(MHPG, DOPAC, HVA)とインドールアミン系(TRP, KYN, 5－HIAA)の神経化学物質濃度を多種目神経化学物質測定装置(「ニューロケム」, ESA社)で測定した。測定物質の中で老化ラット群(A)と成熟ラット群(M)の間で統計的に有意な差を認めたものはKYN濃度のみであった(A:94.1±8.9, M:53.7±8.5 ng/ml)。他の物質は両群間で有意な差は認めなかった。またKYN／TRP比も両群間で有意な差を認めた。以上の結果を中枢神経系の老化との関連で検討した。

〔目的〕中枢神経系の加齢変化は髄液中の各種神経化学物質濃度に反映されると考えられ、その濃度測定は脳内神経機能の加齢変化を探る上で意義がある。髄液中のモノアミン類の濃度の加齢変化を知るためには、血圧・体温・呼吸状態など測定濃度に影響を与える各種の生理的状態を一定にして行う必要がある(1,2)。今回これらの状態を一定にして、老化ラットおよび成熟ラットの髄液中のモノアミン類6種(MHPG, DOPAC, HVA, TRP, KYN, 5－HIAA)の濃度を「ニューロケム」で測定し、結果を検討したので報告する。

〔方法〕月齢28－32箇月のウィスター系雄性ラット6匹(老化ラット群:A:平均360g)および月齢4－6箇月のウィスター系雄性ラット6匹(成熟ラット群:M:平均380g)をハロセン麻酔下で気管切開し人工呼吸器を装着した。ハロセン濃度は手術中は1.5 %とし、その後は1.0 %に保持した。直腸温は37℃前後に維持した。右大腿動脈から全身血圧をモニターした。ラット後頭下の皮膚・筋肉を剥離して脊髄硬膜を露出し、26Gの注射針を大槽に刺入した。針吸引によって髄液(100-150 μl)を迅速に採取し、0.2Mの酢酸で処理した後、－80℃に凍結保存した。

髄液50μl を逆相クロマトカラム(C_{18})に注入し、「ニューロケム」を用いて髄液中の各種アミン類(MHPG, DOPAC, HVA, TRP, KYN, 5－HIAA(図1参照))濃度を測定した。測定結果は平均値±標準誤差で表示し統計的有意性の判定にはt－検定を用いた。

〔結果〕(1)各種アミン類のA群およびM群の濃度(ng/ml)は以下の表に示される(図2参照)。

	MHPG	DOPAC	HVA	TRP	KYN	5－HIAA
A群	22.4±2.3	8.7±1.8	23.0±3.3	345 ±62	94.1±8.9	154±41
M群	21.7±2.9	13.3±2.4	30.6±4.2	383 ±83	53.7±8.5	126±20

(2)両群間で有意な差を認めたのはKYNのみであった($p<0.001$)。

(3)KYN／TRP比も両群間で有意な差を認めた(A: 0.305±0.045 ; M: 0.156±0.021, $p<0.05$)(図3参照)。

〔考察〕老化ラット髄液中のＫＹＮ濃度は成熟ラットに比べて有意な上昇を示した。他の物質は有意な差を認めなかった。ＴＲＰなどは標準誤差が比較的大きかったが、食餌量の個体差や血液脳関門の透過性の影響であろう。老化ラット髄液におけるＫＹＮ濃度の特異的増加は中枢神経系の老化の反映と考えられる。ＫＹＮ／ＴＲＰ比の増加からはＴＲＰからＫＹＮへの変換酵素であるＩＤＯ（indoleamine-2,3-dioxygenase)活性が老化ラットで上昇していることが示唆される。またＫＹＮからＫＹＮＡ（キヌレニン酸）やＱＵＩＮ（キノリニン酸）への変換酵素の活性が老化ラットにおいて低下している可能性もある。（ＫＹＮ／ＴＲＰ比はヒトでは知的機能を反映した痴呆の診断マーカー群を構成する可能性を以前に報告した(3)。）またＩＤＯ活性はインターフェロンγ処理したマクロファージによってその活性が亢進することも報告されており、ＫＹＮ／ＴＲＰ比の老化に関連した意義に関しては今後も検討が必要である（4,5)。

〔略号の説明〕

TYR	: tyrosine
L-DOPA	: L-dihydroxyphenylalanine
DA	: dopamine
3-MT	: 3-methoxytyramine
DOPAC	: dihydroxyphenyl acetic acid
HVA	: homovanillic acid
NE	: norepinephrine
MHPG	: 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol
TRP	: tryptophan
5-HTP	: 5-hydroxytryptophan
5-HT	: serotonin
5-HIAA	: 5-hydroxyindole-3-acetic acid
IDO	: indoleamine-2,3-dioxygenase
KYN	: kynurenine
KYNA	: kynurenic acid
QUIN	: quinolinic acid

〔文献〕

(1) Higley, J.D. et al. (1991)Psychopharmacology, 103, 551-556.

(2) Seyfert, W.E. et al. (1985)Develop. Brain Res. 17, 225-232.

(3) Wada, H. et al. (1993)Jpn. J. Geriat. 30, 46-53.

(4) Heyes, M.P. et al. (1992)Brain, 115, 1249-1273.

(5) Heyes, M.P. et al. (1992)Biochem. J. 283, 633-635.

図１：カテコラミン系とインドールアミン系物質の代謝経路

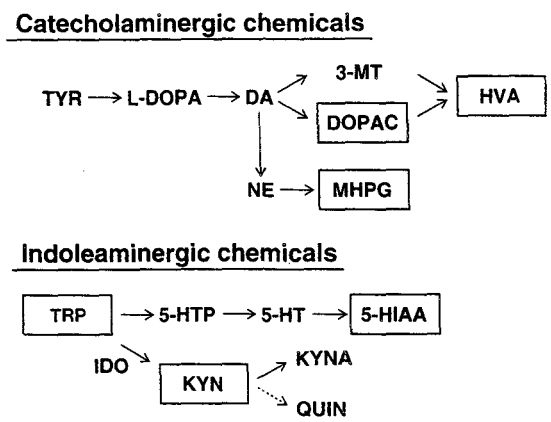


図２：測定物質濃度結果（□：M群, ▨：A群）　###：p<0.001

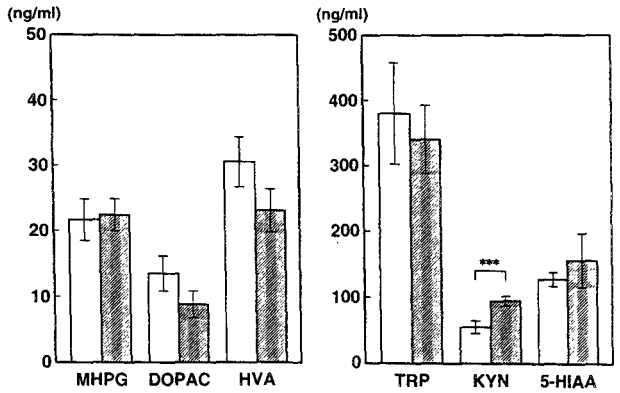
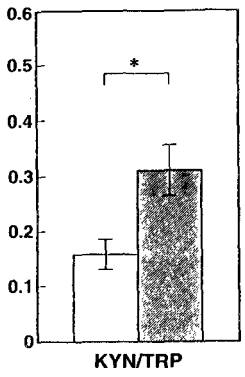


図３：ＫＹＮ／ＴＲＰ（□：M群, ▨：A群）*：p<0.05



234 アルツハイマー病及びダウン症線維芽細胞におけるカルシウム動態の異常

楯林義孝、武田雅俊、柏木雄次郎、大河内正康
播口史朗、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、ダウン症、及び健常線維芽細胞のＣａ代謝をメリディアン社のACAS470を用い検討した。測定外液をCa^{2+}-freeの状態にしてブラジキニン100nM、バソプレッシン100nMで刺激すると２家系の家族性アルツハイマー病（内１家系はHardy typeの点突然変異を有する）及びダウン症線維芽細胞において小胞体よりのＣａ放出ピークの低下が認められた。ピーク低下は細胞周期と関連しており細胞をＳ期に同調させることで再現性が得られた。ところが、G_0～G_1期に同調させたり、測定外液にＣａを加えてやるとピークの低下は消失した。一方、家族性の１家系と孤発性アルツハイマー病線維芽細胞は健常細胞と同様の反応を示し遺伝的多様性の存在が示唆された。測定前に細胞を低濃度のＣａイオノフォアでインキュベイトしておきCa^{2+}-freeの状態で刺激してやると、濃度・時間依存性にＣａ放出ピークの低下が認められた。以上の結果より、一部の家族性アルツハイマー病及びダウン症線維芽細胞は細胞周期に応じてＣａ代謝に異常が存在し、それが細胞膜のＣａ保持能の低下によって生じている可能性が示唆された。

〔はじめに〕　以前よりアルツハイマー病の病理過程にＣａ動態の異常が関与していると考えられてきた。特に病態の中心と考えられる神経細胞の変性過程にＣａの関与が予想されており，具体的には細胞骨格蛋白質の異常リン酸化などへの関与が考えられている。最近ではアミロイド前駆体蛋白質（以下ＡＰＰ）とＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）の細胞内での共役が証明され，Ｇ蛋白質を通じてＡＰＰの代謝とＣａ代謝が関連している可能性もでてきた。我々はかねてよりアルツハイマー病患者より採取し培養した線維芽細胞を用いて細胞骨格蛋白質とＣａ代謝について研究を行い，今までにフォドリン代謝の異常とそれに関連して家族性アルツハイマー病特異的にＣａ代謝の異常が存在する事を報告してきた。今回は対象をダウン症に広げさらに詳しく検討したところ興味深い結果が得られたので報告したい。

〔方法〕　家族性アルツハイマー病６例（３家系２例ずつ，内１家系はHardy typeの点突然変異を有する），孤発性アルツハイマー病３例，ダウン症２例，健常対照者３例より本実験の目的と意義を十分に説明し同意を得た上で皮膚を採取し線維芽細胞を得た。細胞はＣａ測定用ディッシュに約3000個の割合でまきDMEM+10%FCSにて培養した。Ｃａの測定にはメリディアン社のACAS470を用いた。測定前に1μMのindo-1-AMを30～60分間負荷させた後，Hanks-HEPES EGTA bufferにて十分に洗浄し，外液を測定用のHanks-HEPES buffer(Ca^{2+}+ or Ca^{2+}-)に交換後，細胞内Ｃａ濃度を測定した。細胞の刺激はブラジキニン100nM、バソプレッシン100nM、及び各種濃度のＣａイオノフォア（4 Bromo-calcium ionophore A23187）を用いた。細胞周期は無血清法によってG_0～G_1期に、過剰チミジン（50mM）およびヒドロキシウレア（20mM）によってG_1～Ｓ期に同調した。

〔結果〕　細胞をディッシュにまいてから測定するまでの時間を16～72時間と変化させ、Ca^{2+}-freeの状態でブラジキニン100nMで刺激するとFig.1の様なＣａピークの変動が家族性アルツハイマー病の２家系（１家系はHardy typeの点突然変異を有する）とダウン症線維芽細胞に認められた。図の様にダウン症線維芽細胞は32時間の典型的な周期性が認められ細胞周期が関与していると考えられた。また、測定時間によっては健常細胞と同程度の反応が認められピークの低下が培養手技によるものではない事が示唆された。次に同調培養によって細胞の周期をG_1～Ｓ期に同調させて同様の刺激を行うと、Fig.2の様に先ほどの２家系とダウン症線維芽細胞のみ小胞体よりのＣａピークの低下が認められた。ところが、外液にＣａを加え同じくブラジキニン100nMで刺激するとピークの差は消失した（図は省略）。また、バソプレッシン100nMでも同様の変化が認められた。一方、細胞周期をG_0～G_1に同調するとピークの差は認められなくなった。

低濃度のＣａイオノフォア（1pM～1μM）をG_1～Ｓ期に同調した細胞に加え、３時間インキュベイトした後、Ca^{2+}-freeの状態でブラジキニン100nMで刺激すると、Fig.3の様に濃度依存性にＣａの放出ピークが低下するのが認められた。1μMの場合、細胞がディッシュよりはがれてしまい測定できなかった。この結果から、細胞膜のＣａ保持能を低下させて微量のＣａの持続的な流入を生じさせた場合、細胞内のＣａ濃度（特に小胞体内のＣａ濃度）は上昇せず逆に低下するという事が判明した。また、1nMのＣａイオノフォアでインキュベイトし同様の刺激を経時的に行うとFig.4の様に時間依存性にＣａピークの低下が認められた。

〔考察〕　線維芽細胞をブラジキニンで刺激すると、①GTPに依存したアデニル酸シクラーゼの抑制、②AA放出の促進、③PIリスポンスの促進による小胞体からのＣａの放出、④CaチャネルからのCa^{2+}の流入、⑤Na,K-ATP

aseの活性化といった反応が惹起される。Caに関しては、外液をCa^{2+}-freeの状態で刺激すると③の反応が選択的に、またCa^{2+}を加えた状態で刺激すると③と④の合わさった反応が観察できると考えられる。今回、Ca^{2+}-freeの状態でのみ差が認められたことはPIリスポンスのどこかの異常、あるいは小胞体のCa含有量の低下のいずれかが存在する事を示唆している。そして、その原因としてIP$_3$レセプターチャネルのリン酸化レベルの異常や、細胞膜のCa保持能の低下（Caチャネルの異常、Caイオノフォア様の物質の存在等）等が考えられる。実際、今回の実験で示されたように、Caイオノフォアで膜のCa保持能を微妙に低下させてやると、小胞体膜のCa保持能も同時に低下するためCaの持続的な流出が生じ小胞体のCa含有量が低下するのに対し、細胞質のCa濃度はCaポンプの代償的作用により通常かあるいはそれ以下の濃度に保たれるようである。最近、β／A4タンパク質にCaイオノフォア様の作用があるとの報告や、分泌型のAPPが細胞内Ca濃度を低下させるといった報告が相次いでおり、今回の結果は、一部の家族性アルツハイマー病及びダウン症線維芽細胞においてAPPの代謝異常が細胞周期に応じて微妙に生じている可能性を示唆している。また、同様の変化が中枢系にも生じていると考えられ、この作用機序を解明することがアルツハイマー病の病理過程の解明に大いに役立つものと思われる。

〔文献〕

1) M.Takeda, Y.Tatebayashi and T.Nishimura(1991)Acta Neurol Scand 84, 416-420.

2) M.Takeda, Y.Tatebayashi and T.Nishimura(1992)Prog Neuro Psycho & Biol Psychiat 16(3), 317-328.

3) 楯林義孝, 武田雅俊他(1991)神経化学 30, 106-107.

4) T.tanaka, M.takeda, H.Niigawa, S.Hariguchi and T.Nishimura(1993)Meth Find Exp Clin Pharmacol 15(2), 77-87.

5) I.Nishimoto, T.Okamoto, Y.Matuura, S.Takahasi, T.Okamoto, Y.Murayama & E.Ogata(1993)Nature 362, 75-79

6) Nelson Arispe, Eduardo Rojas and Harvey B.Pollard(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90, 567-571.

7) M.P.Mattson, B.Cheng, A.R.Culwell, F.S.Esch, I.Lieberburg and R.E.Rydel(1993)Neuron 10, 243-254.

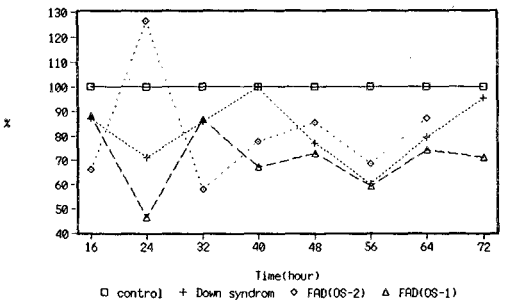


Fig.1 ブラジキニン刺激時のピークの変動，縦軸はベースに対するピークの割合をコントロールを100%として補正して表示，横軸は細胞をディッシュにまいてからの時間で表示，FAD=familial Alzheimer's disease

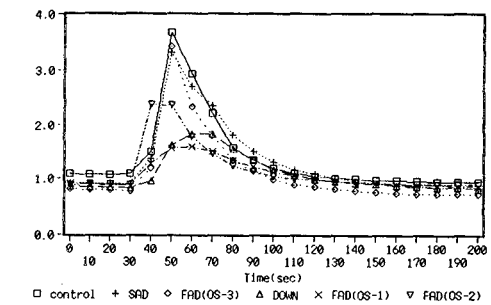


Fig.2 S期同調培養時におけるCatピーク，縦軸は480nmの蛍光量を405nmの蛍光量で割った比として表示，横軸は時間(秒)，ブラジキニンは30-40秒の間に投与している　SAD=sporadic Alzheimer's disease

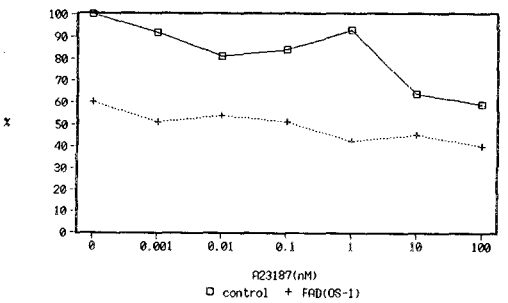


Fig.3 各種濃度のCaイオノフォアで3時間インキュベイトした後のCaピークの変動，縦軸はベースに対するピークの割合をコントロールを100%として表示，S期に同調しているためOS-1のピークは最初から低い

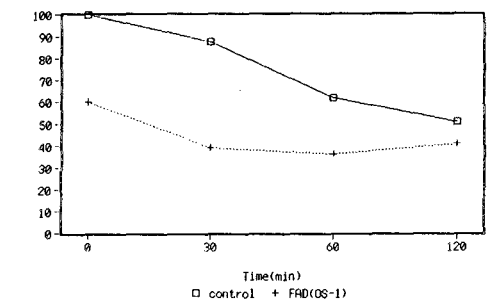


Fig.4 1nMのCaイオノフォアで各種時間インキュベイトした後のCatピークの変動，縦軸はFig.3と同じ

235 アミロイド前駆体蛋白の糖鎖結合に関する検討

斉藤史明、柳澤勝彦、谷 昭義*、宮武 正

(東京医科歯科大学神経内科、武田薬品（株）開拓第1研究所*)

〔要約〕

アミロイド前駆体蛋白（APP）の糖鎖結合様式を明らかにすることを目的にして、ヒト脳脊髄液（CSF）中の可溶性APP(sAPP)をglycanase処理して抗APP抗体を用いたWestern blot にて解析した。またN-結合型糖鎖のAPPプロセッシングにおける役割を明らかにするために、APP遺伝子をtransfectしたC6培養細胞をTunicamicineにて処理し培養上清中のsAPPの検討を行った。neuraminidase、N-及びO-glycanaseにて処理したCSFをAPPのN末端に対する抗体を用いWestern blotにて検討したところ酵素処理前103kDであったCSF中のAPPの分子量は、N-glycanase処理にて3 kD減少しneuraminidase及びO-glycanase処理にて7kD減少した。この結果からCSF中のAPPはN-及びO-結合型糖鎖の付加を受けていることが示された。一方、C6細胞培養上清にTunicamicineを添加したのち培養上清をWestern blotにて検討したところ、128kDであった分子量は12kD減少し、同時に免疫反応性の低下が認められた。この結果からAPPの糖鎖構造はAPPの分泌に影響を及ぼしうるものと推測された。

【目的】

アルツハイマー病脳に出現する老人斑の主要な構成成分は、糖蛋白であるアミロイド前駆体タンパク（APP）より切り出しを受けて生じるβ/A4タンパク（βAP)である。APPのプロセッシングにはβAP ドメイン内で切断を受け細胞外へ分泌されるsecretory pathwayと、一度細胞表面に発現されたAPPが細胞内にとりこまれlysosomeへと運ばれるendosomal-lysosomal pathwayとが知られている[2,3]。一方、糖蛋白のプロセッシングにおいてその糖鎖構造が重要な役割を担っているとの知見が集積されつつある[1]。そこで今回我々はAPPの糖鎖構造のAPPプロセッシングに及ぼす影響を明らかにすることを目的として、CSF中のsAPPの糖鎖結合様式の検討を行い、さらに培養細胞を用い薬剤により糖鎖構造を修飾することでAPPのプロセッシングに変化が生じるか否かを検討した。

【方法】

腰椎穿刺にて健常人のCSFを採取し、NAP-5カラム(Pharmacia)にて脱塩後、凍結乾燥した。0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS)内で沸騰、変性させた後protease inhibitorを含む20mM sodium phosphate中でN-glycanase(Peptide-N-Glycosidase F, Oxford Glycosystems)、neuraminidase(Sigma)、およびO-glycanase (endo-a-N-acetylgalactosaminidase、Genzyme)による処理を行なった。この結果生じた分子量の変化をAPPのN末端に対する抗体(東京大学脳研病理、井原康夫教授提供)を用いてWestern blotにて検討した。

一方、APP751遺伝子をtransfectしたC6培養上清にTunicamicine(Sigma)およびCastanospermin(Sigma)を加え2日間培養した後、培養上清中のsAPPを上記抗体を用いてWestern blotにて検討した。

【結果】

酵素処理前のCSF中には103kDのmajor bandと125kDのminor bandが認められた。N-glycanase処理により両bandともに分子量が3kD減少した。neuraminidase処理ではmajorおよびminor bandの分子量はそれぞれ5kDおよび10kD減少した。neuraminidaseに引き続くO-glycanase処理ではmajor bandの分子量は7kD減少したが、minor bandは認識できなかった。N-glycanase、neuraminidase、O-glycanaseの順に処理を行なうとmajor bandの分子量は13kD減少したが、minor bandは認識できなかった。一方、C6培養上清中には薬剤処理前128kDにbandが認められたが、Tunicamicine処理によりこの分子量は12kD減少、しさらにbandの免疫反応性は低下した。Castanospermin処理では明らかな変化は認められなかった。

【考察】

CSF中のsAPPは1分子中にN-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖両者の付加を受けていることが示された。PC-12培養上清中のsAPPはO-結合型糖鎖のみの付加を受けていることが報告されているが[5]、この差異は細胞、組織の違いによる糖鎖付加の多様性を示すも

のと考えられる。また、CSF中のAPP分解産物のmajor bandはKPIを含む挿入ドメインを有するもの、minor bandは有さないものと考えられているが[4]、neuraminidase処理によりminor bandのほうがmajor bandに比べてより大きな分子量の低下を示したことから、挿入ドメインを有するAPPは有さないAPPに比べてより多くの糖鎖付加を受けている可能性が示された。また、TunicamicineによりN-結合型糖鎖の結合を阻害するとC6培養上清中のsAPPの免疫反応性は低下することから、APPの糖鎖はその細胞外への分泌に影響を与える可能性があることが示唆された。

【文献】

1. Dube, S., Fisher, J. W. & Powell, J. S., Glycosylation at specific site of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function, J. Biol. Chem., 263 (1988) 17516-17521.

2. Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J. & Younkin, S. G., Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives, Science, 255 (1992) 728-730.

3. Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y. & Selkoe, D. J., Targeting of cell-surface β-amyloid precursor protein to lysosomes : alternative processing into amyloid-bearing fragments, Nature, 357 (1992) 500-503.

4. Palmert, M. R., Podlisny, M. B., Witker, D. S., Oltersdorf, T., Younkin, L. H., Selkoe, D. J. & Younkin, S. G., The β-amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives in human brain and cerebrospinal fluid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (1989) 6338-6342.

5. Refolo, L. M., Salton, S. R. J., Anderson, J. P., Mehta, P. & Robakis, N. K., Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer amyloid precursor from PC 12 cell cultures, Biochem. Biophys. Res. Commun., 164 (1989) 664-670.

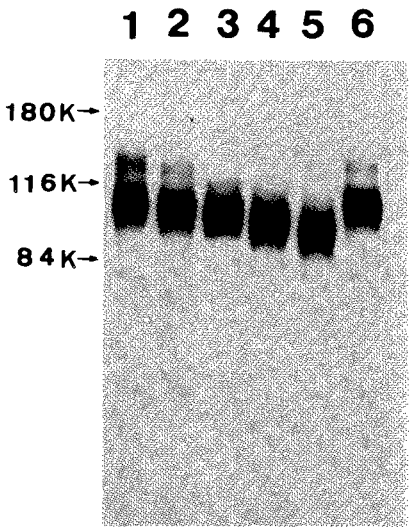


Fig. 1: Enzymatic deglycosylation of APP in the CSF from a normal subject.
Lane 1 : incubated without enzymes.
Lane 2 : with N-glycanase.
Lane 3 : with neuraminidase.
Lane 4 : neuraminidase and O-glycanase.
Lane 5 : N-glycanase, neuraminidase and O-glycanase.
Lane 6 : preincubation.

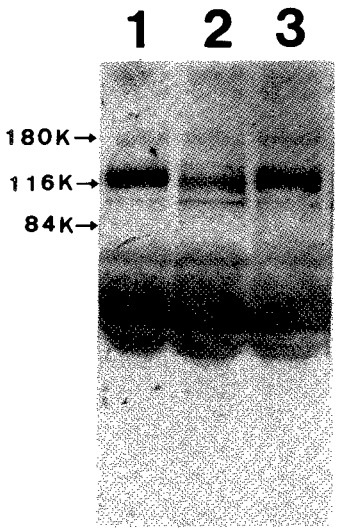


Fig. 2: Modification of N-glycosylation of APP in the C6 conditioned medium.
Lane 1 : incubated without drugs.
Lane 2 : with Tunicamicine.
Lane 3 : with Castanospermin.

236 アルツハイマー病・病態モデル：レセルピン投与ラット海馬におけるプロテインキナーゼCの細胞内局在の変化について［第2報］

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，第一製薬探索二研*）

〔要約〕 プロテインキナーゼCは脳に高濃度に存在し，記憶形成との関連で注目される．一方，アルツハイマー病脳の海馬顆粒画分においてPKC(β)の免疫反応性の低下が報告されている．我々はレセルピン投与ラット脳海馬でのPKC(β)の減少を報告した．今回，さらに，レセルピン投与ラット脳の線条体と海馬において，PKC(α)と(β)について比較検討した．レセルピン投与により，PKC(α)の免疫反応性は，線条体および海馬の顆粒画分で有意な減少を示したが，PKC(β)の免疫反応性は，海馬の顆粒画分においてのみ，有意な減少を認めた．PKC(β)の変動がアミロイド沈着の好発部位である海馬においてのみ認められたことはPKCとAPPプロセッシングとの関係において興味深い．

目的：プロテインキナーゼC（PKC）は脳に高濃度に存在し[1,2]，その生理的役割は不明であるが，神経細胞機能の調節に重要な役割を果たすと考えられる[3,4]．PKCの細胞内局在の変化は脳における学習や記憶のモデルと考えられるlong-term potentiation (LTP) の成立に重要な役割を果たしていると報告されている[5,6,7]．一方，primary neuronal culture において，adrenergic receptorを介するPKCの細胞内局在の変化が報告されている[8]．これらの結果から，adrenergic receptor を介するPKCの細胞内局在の変化は，記憶形成との関連で注目される．すでに，我々はレセルピン投与ラット脳を用いた in vivo の実験系でPKC(β)の細胞内局在の変化を示した[9]．今回，PKC(α)およびPKC(β)の変動をレセルピン投与ラットの線条体と海馬について，enhanced chemiluminescence (ECL) を用いて検討した．

方法：体重約200gWistar雄ラットを用いた．レセルピン単回投与群は，5mg/kgを腹腔内投与し，6時間後にハロセン麻酔下に断頭，線条体と海馬を摘出した．また，レセルピン連続投与群は，初日5mg/kg，その後3日間2mg/kg/日，それぞれ腹腔内に連続投与した．対照群には，vehicleを腹腔内投与した．最終投与の6時間後に，両側の線条体と海馬を摘出した．それぞれの摘出試料の一側約20mgを0.32M sucrose 500μlでホモジナイズし，100,000g，18分間遠心し，細胞質画分と沈査とを得た．沈査は，0.32M sucrose 400μlで懸濁し，同条件で再度，遠心分離して，細胞質画分の混入を除去し，顆粒画分とした．それぞれの画分について，Westernblotを行い，抗PKC(α)および抗PKC(β)モノクローナル抗体（生化学工業）を用いて，免疫染色を施行し，デンシトメータにて定量を行った．次に，それぞれの試料の他の一側をTris-saline緩衝液(PH7.6) 500μlでホモジナイズし，100,000g，30分間遠心して得られた可溶性画分についてWestern blotを行い，Amyloid protein precursor (APP)のN末端およびC末端に対する抗体（東京大学脳研井原康夫教授提供）を用いて免疫染色を施行，比較検討した．

結果：PKC(α)とPKC(β)は，80KDの単一なバンドとして，線条体および海馬の細胞質画分および顆粒画分に認められた(図1)．定量的解析結果では，レセルピン単回投与で，PKC(β)の免疫反応性は，海馬の細胞質画分での有意な増加と顆粒画分での有意な減少を認めた(図2)．レセルピン連続投与では，PKC(α)の免疫反応性は，線条体および海馬の顆粒画分で有意な減少を示したが，一方，PKC(β)の免疫反応性は，海馬の顆粒画分においてのみ有意な減少を認め，線条体では，細胞質画分，顆粒画分ともに変化を認めなかった（図3）．なお，可溶性APPについては，レセルピン投与によって，明らかな変動を示さなかった．

考察：Masliahらはアルツハイマー病脳の海馬顆粒画分において，PKC(α)とPKC(β)の免疫反応性の低下を報告した[10]．アルツハイマー病脳においては，青斑核の神経細胞の脱落が知られている[11,12]．今回の実験結果と考え合わせると，アルツハイマー病脳においてPKC細胞内局在の変化は上行性モノアミンの障害に起因する可能性が考えられる．Baxbaumらは，アミロイド前駆体蛋白(APP)の代謝がPKCの活性化により影響を受けることを示した[13]．PKC(β)の変動がアミロイド沈着の好発部位である海馬においてのみ認められたことはPKCとAPPプロセッシングとの関係において重要であると考えられる．今回，可溶性APPに限って検討を行ったが，明らかな変動は認められなかった．膜結合APPの変動についても詳細な検討を行う必要があると考えられる．

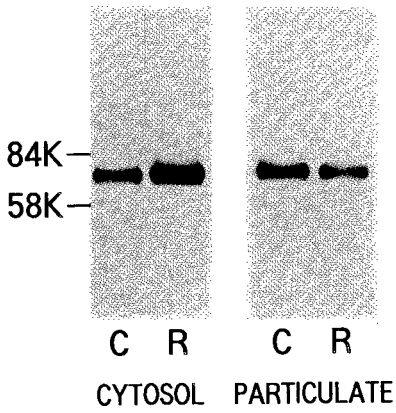


図1 ラット海馬のPKC(β) Western blot
C:対照ラット, R:レセルピン単回投与ラット

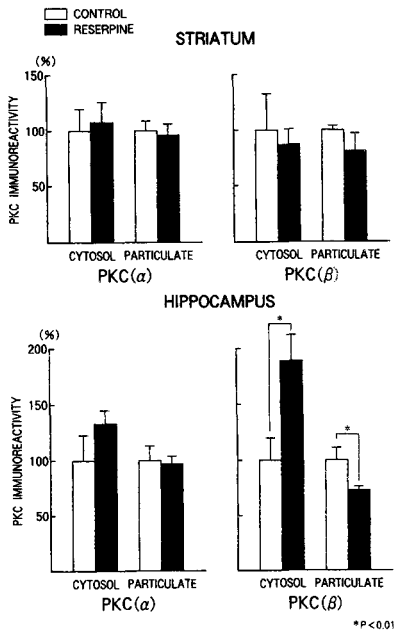


図2 レセルピン単回投与群のWesten blot定量的解析

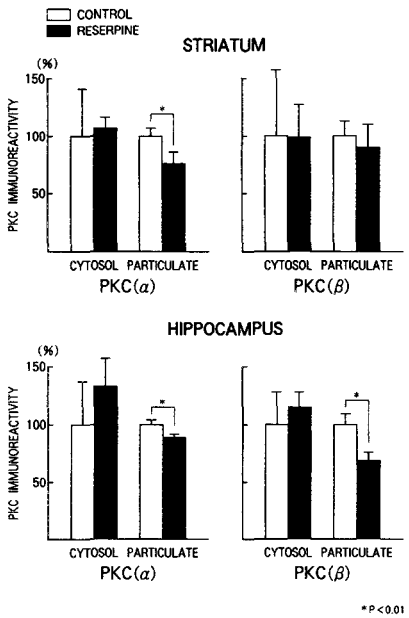


図3 レセルピン連続投与群のWesten blot定量的解析

REFERENCES

1. Saito, N. et al. (1988) J.Neurosci. 8, 369-382.
2. Yoshida, Y. et al. (1988) J. Biolog. Chem. 263, 9868-9873.
3. Baraban, J.M. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2538-2542.
4. Caporaso, G.L. et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 3005-3059.
5. Akers, R.F. et al.(1986) Science. 231, 587-589.
6. Hu, G.Y. et al. (1987) Nature 328, 426-429.
7. Olds, J.L. et al. (1989) Science. 245, 866-869.
8. Kalberg, C.J. and Sumners, C. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 166, 22-28.
9. Komachi, K. et al. (1993) Neurosci. Lett. 149, 6-8.
10. Masliah,E. et al. (1990) J.Neurosci. 10, 2113-2124.
11. German, D.C. et al. (1992) Ann. Neurol. 32, 667-676.
12. Mann, D.,M. et al. (1984) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 47, 201-203.
13. Buxbaum, J.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 6003-6006.

237 アルツハイマー病における脳組織および脳脊髄液中の異常リン酸化タウの量について

工藤 喬、Inge Grundke-Iqbal*、Khalid Iqbal*、武田雅俊、
以倉康充、播口之朗、西村 健
（大阪大・医・精神医学、
*New York State Institute for Basic Research）

〔要約〕 異常リン酸化タウは、paired helical filaments（PHF）を構成する代表的な蛋白である。そこで、この蛋白がアルツハイマー病（AD）のbiomarkerとなりうるかどうかの評価を試みた。異常リン酸化タウに特異的なmonoclonal抗体であるPHF-1を用い、capture ELISAを開発し、脳組織中及びCSF中のPHF-1 site（serine 396）がリン酸化されている異常リン酸化タウ（PHF-1 tau）量について検討した。AD患者群のbrain homogenate中のPHF-1 tau量は、control群に対して有意に高く、ほとんどのcontrolは測定感度以下を示した。一方、antemortem lumbar CSFに対する検討では、AD患者群、control群ともに、PHF-1 tau量は感度以下であった。従って、異常リン酸化タウは、もう一つのADのbiomarkerの候補であるユビキチンとは異なり、CSF中にはほとんど存在せず、CSF中のbiomarkerとして利用するのは現在のところ困難であることが示唆された。

［目 的］
アルツハイマー病（AD）の診断及び治療法の開発に、この疾患のbiomarkerの確立は重要な課題である。ADを代表する神経病理学的変化には、paired helical filament（PHF）より構成された神経原線維変化及びamyloidをコアに持つ老人斑がある。従って、PHFあるいはamyloidに関連した蛋白がADのbiomarkerとなる可能性が十分考えられる。これまでのところ、PHFを構成する蛋白として、異常リン酸化タウとユビキチンが確認されている。この報告では、（i）異常リン酸化タウに特異的なmonoclonal抗体PHF-1（1）を用いたcapture ELISAを開発し、AD患者群、neurological control（AD以外の神経疾患）群、non-neurological control（神経疾患を持たない症例）群のbrain homogenate中のPHF-1 siteがリン酸化されている異常リン酸化タウ（PHF-1 tau）量を測定し、（ii）また、同測定法を用いて、AD患者群とcontrol群のantemortem lumbar CSF及びpostmortem ventricular CSF中のPHF-1 tau量を測定した。

［方 法］
測定に使用したmonoclonal抗体PHF-1は、human tauのserine 396がリン酸化されていれば反応する抗体である（1、2）。brain homogenateは、homogenate buffer（10 mM Tris-HCl、pH 7.2、0.2 mM PMSF、1 mM EDTA、1 mM EGTA）を用いて、20 %(w/v)になるように、AD患者群及びcontrol群の側頭葉皮質から作成した。CSFは、AD患者群とcontrol群のantemortem lumbar CSFとpostmortem ventricular CSFの2種類を用いた。IgGに精製したPHF-1をTBS（10 mM Tris-HCl、pH 7.6、0.85 % NaCl、0.1 % NaN_3）で0.5 μg/100 μlに希釈し、microtitier plate（MaxiSorp、Nunc社）の各wellに加え、37℃で1時間、更に4℃で18時間incubateし、wellをcoatingした。200 μl/wellのblocking buffer（10 % normal goat serum、0.2 % Tween-20、10 μM leupeptin、2 μg/ml aprotinine、1 μg/ml pepstatin A、TBS）を加え、37℃で30分間incubateし、wellをblockingした。plateを5分間ずつ3回、200 μl/wellのwashing buffer（100 mM Tris-HCl、pH 7.6、0.05 % Tween-20）で洗浄した。標準曲線の作成のため、AD患者脳から水溶性異常リン酸化タウ（ADP-tau）を精製（3）、また正常脳から正常タウを精製し、dilution buffer（1 % normal goat serum、0.2 % Tween-20、10 μM leupeptin、2 μg/ml aprotinine、1 μg/ml pepstatin A）にて様々な濃度に調整した後、100 μlずつ各wellに加えた。brain homogenateの測定には、dilution bufferにより蛋白量を調整し、1.5 μgずつ100 μlの容量で各wellに加えた。CSFの測定には、各wellに100 μlずつCSFを加えた。各々のサンプルは、37 ℃で2時間incubateした。washing bufferで上記の様に洗浄の後、dilution bufferで1.5 μg/wellとなるように調整したpolyclonal抗タウ抗体R111eを、100 μlずつ加え、22℃で18時間incubateした。同様に洗浄の後、1:3,000に希釈したalkaline phosphatase標識の抗ウサギIgG抗体（Jackson Immunoresearch Laboratories社）100 μlずつ加え、22 ℃で2時間incubateした。十分な洗浄の後、1 mg/mlのPNPP（Sigma社）（10 % diethanolamine、pH 9.8）を100 μl/well加え、30 分間incubationの後、405 nmで吸光度を測定した。抗原なしサンプルをbackgroundとして測定した。脳組織及びCSFは、Natherlands Brain Bankより供与をうけた。

［結 果］
(1)PHF-1によるcapture ELISAの標準曲線（Figure 1）：標準曲線によると、この測定法では、6 pg/100 μlの感度まで、PHF-1 tauが測定できることが示された。一方、この測定法は、正常タウとはほとんど反応しないことが示された。
(2)brain homogenate中の異常リン酸化タウ量（Table 1）：PHF-1 tau量は、AD患者群では、27±21 pg/μgであった。ほとんどのneurological control群では、PHF-1 tau量は、感度以下（< 4 pg/μg）であったが、多発梗塞性痴呆の2症例とPick病の1症例では、PHF-1 異常リン酸化タウが認められた。non-neurological controlではすべての症例が、感度以下を示した。
(3)CSF中異常リン酸化タウ量（Table 2）：AD患者群及びnon-neurological control群のantemortem lumbar CSF中のPHF-1 tau量を検討してみたところ、両群とも測定感度以下（< 6 pg/100 μl）であった。一方、postmortem ventricular CSFでは、AD患者、neurological control、non-neurological control群3群にわたり、数症例でPHF-1 tauが認められた。

［考　察］

PHF-1を用いたcapture ELISAは、測定感度が6 pg/100 μlと非常にsensitiveなものであった。しかも、正常タウとはほとんど反応せず、測定値はほぼPHF-1 tauのものと考えることができる。この測定法を用いて側頭葉homogenate中のPHF-1 tau量を測定したところ、non-neurological control群の全てとneurological control群の多くの場合では測定感度以下を示し、AD患者群homogenateの特異的な指標なりうる可能性がある。しかし、neurological control群の中には、極少数で異常リン酸化タウがpositiveになる例がある。これらの症例については、ADとのborderlineである可能性をも含めて更に検討していきたい。一方、antemortem lumbar CSF中には、AD患者群及びnon-neurological control群両群とも、今回の測定法では、異常リン酸化タウは感度以下であり、biomarkerとしては現在のところ使用困難である。postmortem ventricular CSFにおいては、non-neurological control群の中でさえもpositiveなものがあり興味深いが、原因については不明である。本学会の他の報告で我々は、ユビキチンのAD biomarkerとしての可能性について検討しているが、共にPHFの構成蛋白である異常リン酸化タウとユビキチンのうち、ユビキチンの方が使いやすいbiomarkerであると現在のところ結論づけられる。以前に、我々は、他の抗タウmonoclonal抗体であるTau-1を用いたradioimmuno-slot-blot assayにて、AD前頭葉には6 ng/μgの異常リン酸化タウが存在することを確認した（4）。今回の測定法を用いると、AD側頭葉の異常リン酸化タウ含量は27 pg/μgであり、Tau-1を用いた場合のほぼ1/200という測定値となった。部位差もさることながら、これは、全ての異常リン酸化タウでTau-1 site 及びPHF-1 site両方が必ずしもリン酸化されているわけではない可能性を示唆している。

［文　献］

(1)SG. Greenberg et al. : J. Biol. Chem., 267, 564-569 (1992)
(2)E. Lang et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 187, 783-790 (1992)
(3)E. Kopke et al. : Neurobiol. Aging, 13(suppl. 1), 55 (1992)
(4)S. Khatoon et al. : J. Neurochem., 59, 750-753 (1992)

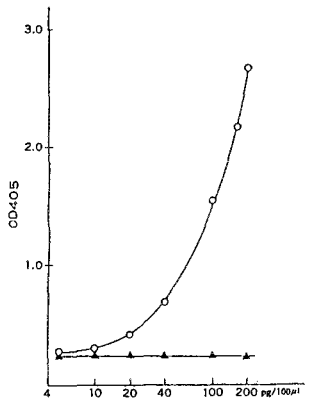


Figure 1

Standard curve of the capture assay with PHF-1
○ : AD-tau、▲ : normal tau.

Level of abnormally phosphorylated tau in AD and control CSF

Group	N	Age	Postmortem interval (h)	Abunormally phosphorylated tau (pg/100μg)
Antemortem lumbar puncture CSF				
Alzheimer disease	10			ND
Non-neurological control	13			ND
Postmortem ventricular CSF				
Alzheimer disease	17	77±14	4±1	
	(7)			ND
	(10)			26±18
Neurological control	13	79±15	4±1	
	(7)			ND
	(6)			50±42
Non-neurological control	14	74±14	6±2	
	(3)			ND
	(11)			54±42

ND; not detectable, <6pg/100μg.

Table 2

Level of abnormally phosphorylated tau in AD and control temporal cortex homogenates

Age/Sex	Postmortem interval (h)	Diagnosis	Abnormally phosphorylated tau (pg/μg of protein)
84/F	5	AD	16
64/F	3	AD	44
68/F	6	AD	32
59/F	5	AD	86
40/M	3	AD	34
98/F	3	AD	12
68/M	4	AD	24
95/F	3	AD	18
77/M	3	AD	14
77/F	3	AD	8
87/M	3	AD	20
93/F	3	AD	18
76±16	4±1		27±21
101/F	4	P	ND
70/F	5	P	ND
83/F	4	P	ND
90/F	3	P	ND
83/F	3	Pick	ND
62/F	4	Pick	10
88/F	3	MID	10
88/M	4	MID	14
91/M	3	MID	ND
77/F	4	MID	ND
81/M	3	LBD	ND
84±10	4±1		
69/M	7	C	ND
80/F	8	C	ND
76/M	6	C	ND
70/F	7	C	ND
84/F	4	C	ND
73/M	4	C	ND
85/M	6	C	ND
85/M	7	C	ND
83/M	6	C	ND
61/M	5	C	ND
88/M	11	C	ND
78±8	6±2		

AD; Alzheimer disease, C; non-neurological control, P; Parkinson disease, Pick; Pick disease, MID; Multiple infarct denmentia, LBD; Lewy Body Disease. ND; not detectable (<4pg/μg).

Table 1

238 アルツハイマー病における脳脊髄液および脳組織中のユビキチン量の相関について

工藤 喬、Inge Grundke-Iqbal*、Khalid Iqbal*、武田雅俊、
播口之朗、西村 健
(大阪大・医・精神医学、
*New York State Institute for Basic Research)

〔要約〕ユビキチン (Ub) がアルツハイマー病 (AD) のbiomarkerとなりうるかどうかを評価する目的で、(i) Competitive enzyme-linked immunoflow assay法 (CELIFA) を用いて、AD患者群とcontrol群の脳脊髄液 (CSF) 中のUb量を定量し、(ii) ELISAを用いて、AD患者群とcontrol群の脳組織中のUb量を定量し、(iii) 同一症例にて両Ub量の相関について検討したところ次の結果を得た。①AD患者群及びneurologicalcontrol群のCSF中Ub量は、non-neurological control群のそれに対して有意に高いことが示された。②brain homogenate中のAD患者群のUb量は、neurological control群及びnon-neurological control群のそれらに対し、有意に高いことが示された。③brain homogenate及びcytosol fractionのUb量の比較検討から、AD患者群ではparticulate fractionのUb量が高いことが示された。④CSF中とbrain homogenate中のUb量の相関関係は、AD患者群、neurological control群及びnon-neurological control群をまとめると、側頭葉白質において、正でかつ有意であることが示された。以上のことから、AD患者のCSF中のUbの増加は、ADのbiomarkerとして利用できることが示唆された。

〔目 的〕

アルツハイマー病 (AD) の確定診断は、剖検脳の神経病理学的検討によってのみ得ることができるというのが現状である。従って、ADのbiomarkerの確立は、重要な課題である。paired helical filament (PHF) より構成された神経原線維変化及びamyloidをコアに持つ老人斑は、ADの代表的な病理学的変化である。よって、amyloidあるいはPHFに関連したタンパク質がbiomarkerとなる可能性が十分考えられる。これまでのところ、PHFを構成するタンパク質として、異常リン酸化タウとユビキチン (Ub) が確認されている。この報告では、(i) 新たに開発したCompetitive enzyme-linked immunoflow assay法 (CELIFA) を用いて、AD患者群とcontrol群の死後脳脊髄液 (CSF) 中のUb量を定量し、(ii) ELISAを用いて、AD患者群とcontrol群の脳組織中のUb量を定量し、(iii) さらに同一症例にて、両Ub量の相関について検討し,UbのADに関するbiomarkerとしての可能性について検討してみた。

〔方 法〕

(1)CSF中のUb量の測定：17例のADのCSF、17例のAD以外の神経疾患 (neurological control) のCSF、12例の神経疾患を持たない症例 (non-neurological control) のpostmortem ventricular CSFを使用した。すべての症例は、病理組織学的に確定診断が与えられている。CSFはcell debrisを除くため、12,000 xgで10分間遠沈し、その上清を用いた。300 μlのCSFの上清に60 μlの1:133,000に3 % BSA/TBS (3 % bovine serum albumin、10 mM Tris-HCl、pH7.2、0.85 % NaCl) で希釈したmonoclonal抗Ub抗体mAb 5-25を加え、2時間室温でpre-incubateした。同量の3 % BSA/TBSを加えて、the Easy-Titer ELIFA System (Pierce社) を用いたCELIFA(1)にて検討した。この方法を用いると、すべての溶液がsuctionによってnitrocellulose膜を通過するので、通常のELISAが抱えるlimiting diffusionの問題がなく、大幅にassay 時間を短縮できる。pre-incubation mixtureのapplyに先立ち、200 μl/wellの0.01 mg/ml の精製Ub (Sigma社) (0.1 % glutaraldchyde、0.02 % NaN_3、0.1 M Na_2CO_3、pH 9.0) で、nitrocellulose膜をcoatingし、TBSで洗浄の後、5 % BSA/TBSにてblockingをした。200 μlのpre-incubation mixtureを各wellに加えてsuctionし、次に1:1,000にBSA/TBSで希釈したalkaline phosphatase標識の抗mouse IgG抗体 (Pierce社) 200 μl/wellを加えて、suctionした。十分な洗浄の後、200 μl/wellの0.5 mg/ml p-nitrophenylphosphate (PNPP) (Sigma社) (0.1 % diethanolamine、 pH 9.5) を加え、室温で1時間incubateした。suctionにより発色した溶液をELISA用のplateに集め、405 nmで吸光度を測定した。negative control (no inhibition) として、CSFの替わりに0.2 mg/ml BSA/TBSを、また標準曲線を描くために様々な濃度のUbを、mAb 5-25とincubateし、CELIFAにて測定した。

(2)脳組織中のUb量の測定：9例のAD、9例のneurological control、8例のnon-neurological controlの側頭葉を用いた。脳組織を灰白質と白質に分けた後、homogenate buffer (10 mM Tris-HCl、pH 7.2、0.2 mM PMSF、1 mM EDTA 、1 mM EGTA) を用いて20 % (w/v) homogenateを作製した。更に、そのhomogenateを100,000 xg で30分間遠沈し、cytosolとparticulate fractionに分離した。1:1,000,000にsolution A (10 mM Tris-HCl、2 % BSA、20 μg/ml leupeptin、20 μg/ml aprotinin、4 μg/ml pepstatin A) で希釈した90 μlのmAb 5-25と同量の検体を室温で3時間pre-incubateした。ELISA用microtiter plateは、10 μg/mlのUb (0.001 % SDS、35 mM $NaHCO_3$、pH 9.6) 50 μl/wellを加え、4℃で18時間かけてcoatingした。wellのblockingは、10 % normal goat serumを加えることにより行った。wellを洗浄の後、50 μlのpre-incubation mixtureを各wellに加え、室温で2時間incubateした。再び洗浄の後、1:1,000に希釈したalkaline phosphatase標識抗mouse IgG抗体 (Tago社) を50 μl/well加え、4℃で18時間incubateした。十分な洗浄うえ、1 mg/ml PNPPを50 μl/wellを加え、30分間室温でincubateした後、405 nmで吸光度を測定した。negative control (no inhibition) として、検体の替わりに3 % BSA/TBSを、また標準曲線を描くために様々な濃度のUbを、mAb 5-25とincubateし、同様に吸光度を測定した。また、各検体でmAb 5-25を加えないものをbackgroundとして求め、それぞれの測定値から差し引いた。

使用したmAb 5-25は、UbのC末端を認識する。UbはC末端のグリシンを介して他の蛋白と結合するので、この抗体が認識した多数のUbは結合型であると考えられる。標準曲線は非結合型のUbが用いられているので、今回の結果は全てUb量の絶対値の替わりに、%inhibitionを用いた。

(3)CSF中のUb量と脳組織中のUb量の相関の検討：同一症例のCSF中Ub量及び脳組織中のUb量について、Pearson product-moment correlation coefficientを用いて相関関係を検討した。

脳組織及びCSFは、Netherlands Brain Bankより供与を受けた。

〔結 果〕

(1)CSF中のUb量 (Figure 1) ：AD患者群のpercent inhibition (MEAN±SD; 34±20 %) は、non-neurological control群のそれ (16±15 %) に対して有意に高いことが示された ($p<0.02$) 。また、neurological control群のpercent inhibition (28±17 %) もnon-neurological control群のそれに対して有意に高いことが示された ($p<0.05$ %) 。しかし、neurological control群とnon-neurological control群のpercent inhibitionの間には有意な差を認めなかった。

(2)脳組織中Ub量 (Table 1) ：側頭葉灰白質、白質いずれにおいても、AD患者群のhomogenate中のpercent inhibitionは、neurological及びnon-neurological control群のそれらに対し、有意に高いことが示された。一方、neurological control群とnon-neurological control群のhomogenateの間には、灰白質、白質いずれにおいても、有意なpercent inhibitionの差を認めなかった。cytosol fractionにおいては、3群の間で有意な差を認めなかった。

(3)CSF中Ub量と脳組織中のUb量の相関関係：AD患者、neurological control、non-neurological control群をまとめると、側頭葉

白質とCSF中のUb量の間に有意な正の相関が認められた（r=0.4145、N=26、p<0.035）（Figure 2）。各々の群で、側頭葉白質とCSF中のUb量の相関関係を検討したところ、AD患者群とnon-neurological control群においては同様な正の相関関係が認められたが、一方、neurological control群においては、負の相関関係が認められた。従って、AD患者及びnon-neurological control合同群において、この相関関係は正の有意なものであることが認められた（r=0.5853、N=17、p<0.014）。側頭葉灰白質とCSF中のUb量の相関に関しては、3群をまとめて検討したが、正の相関関係をを傾向を認めたが、有意ではなかった。また各々の群においても、相関関係を検討したが、有意なものはなかった。

[考　察]

今回、postmortem ventricular CSF中のUb量を検討した結果、AD患者群のそれはnon-neurological control群のそれより有意に高いことが示されたが、neurological control群においても有意な高値が見られた。以前のantemortem lumbar CSF中のUb量の検討では、AD患者群のUb量はneurological control群及びnon-neurological control群双方に対し有意に高いことが示されている(2)。今回と前回のneurological control群の内訳を比較してみると、疾患の種類のばらつきにかなりの差があることが認められ、これによりUb量に差が生じたと考えられる。脳組織中のUb量については、側頭葉灰白質、白質ともに、AD患者群のhomogenateにおいて、他の2群に比し有意に高いことが示された。一方、cytosol fractionにおいては、3群の間に有意な差がないことから、AD患者群のhomogenateにみられるUb量の高値は、particulate fractionにおけるUb量の上昇によるものと考えられる。ADの灰白質におけるUb量の上昇は、PHFに帰すると考えられるが、PHFが少ないとされている白質においてもUb量は上昇しており、これには何らかの違った機序が関与していると考えられる。今回の検討から、側頭葉白質とCSFのUb量の間には有意な正の相関関係が存在することが示された。これは、CSF中のUb量が脳組織中のUb量の何らかの反映であること示すものである。各々の群での検討では、AD患者とnon-neurological control群では同様の傾向がみられたが、唯一neurological control群のみ負の傾向がみられた。neurological control群は多くの疾患の集合であり、一元的に論じることはやや困難である。以上の結果より、UbはADのbiomarkerとなりうる可能性が示され、CSF中のUb量はAD診断の指標となる可能性が示された。CELIFAは全行程が約4時間とたいへん簡便であり、CSF中のUb定量は臨床応用が期待できると思われる。

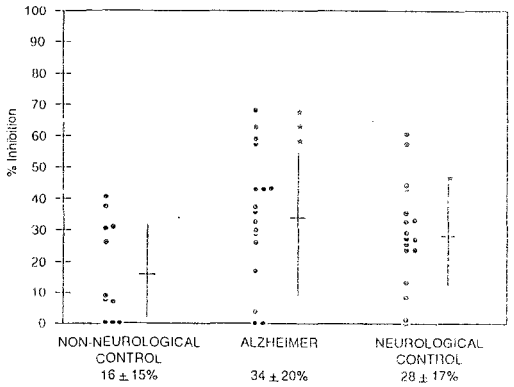


Figure 1

Ubiquitin immunoreactivity of CSF measured by CELIFA
Each value is the mean of percent inhibition±SD.
***:p<0.02, *:p<0.05.

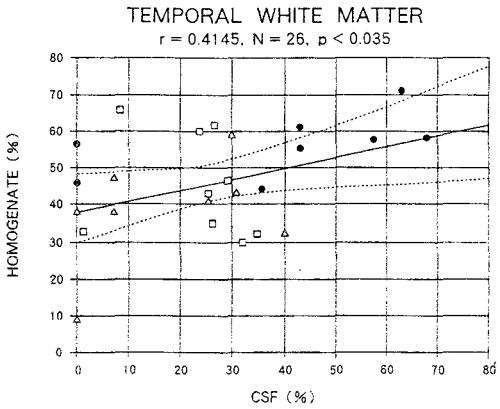


Figure 2

Correlation between ubiquitin levels of temporal white matter and CSF in AD(●), neurological control(□), and non-neurological control cases(△)

UBIQUITIN LEVEL OF BRAIN TISSUE
(% inhibition, Mean±SD)

	Temporal gray matter		Temporal white matter	
	Homogenate	Cytosol	Homogenate	Cytosol
AD (9)	49±22	61±13	55±9	65±9
Neurol. cont. (9)	34±8	61±11	45±13	56±12
Non-neurol. cont. (8)	27±11	57±13	39±13	58±10

Each value is the mean of percent inhibition±SD.
Difference in gray matter homogenates : between Alzheimer disease and neurological control groups, $p<0.025$; between Alzheimer disease and non-neurological control groups, $p<0.025$.
Difference in white matter homogenates : between Alzheimer disease and neurological control groups, $p<0.05$; between Alzheimer disease and non-neurological control groups, $p<0.01$.

Table 1

[文　献]
(1)T. Kudo et al. : Neurobiol. Aging, 13(suppl. 1), 29 (1992)
(2)GP. Wang et al. : Acta Neuropathol. (Berl.), 82, 6 (1991)

239 フォスファターゼ2B阻害剤による脳内細胞骨格蛋白の変化－サイクロスポリンA投与ラット脳内のニューロフィラメントの変化－

田中稔久、武田雅俊、新川　久義、金山　巌、
工藤　喬、西村健（大阪大学精神医学教室）

〔要約〕
カルシニューリン(calcineurin)阻害剤であるサイクロスポリンA(cyclosporin A)をラット海馬内に投与し、1週後に脳内神経細胞および細胞骨格蛋白の変化を検討した。cyclosporin A投与群の脳homogenateでは、calcineurin活性は対照群と比較して62-84%に低下しており、脳内においてcyclosporin Aはcyclophilinと結合後calcineurinを阻害することが示唆された。cyclosporin A投与群ではHE染色において海馬、大脳皮質、線条体、小脳皮質に好塩基性細胞質を有する神経細胞が認められた。またこれらの細胞体はリン酸化されたneurofilamentに対する抗体で陽性染色され、その陽性細胞数は投与されたcyclosporin A濃度依存性に増加していた。脱リン酸化neurofilamentに特異的な抗体SMI-32による染色では対照群で脳幹神経核の神経細胞が陽性に染色されるのに対して、cyclosporin A投与ラットでは同部位のその抗体による陽性染色が認められなかった。抗PHF(paired helical filament)抗体および抗tau抗体では、これらの好塩基細胞は染色されなかった。以上の結果からcalcineurin阻害により神経細胞体内にリン酸化されたneurofilamentの集積が惹起され、神経細胞内のリン酸化状態はkinase活性だけでなくphosphatase活性によっても調節されていることが示唆された。

〔はじめに〕
アルツハイマー病脳では細胞骨格蛋白であるtauやneurofilamentの異常リン酸化が知られている(1)。細胞内蛋白のリン酸化状態はkinaseによるリン酸化とphosphataseによる脱リン酸化とにより調節されていると考えられる。アルツハイマー病における病的リン酸化状態がkinase活性の上昇(2,3)によるものかphosphatase活性の低下によるものかは明らかにされていない。calcineurin(4)は脳内に大量に存在し細胞内情報伝達系に関与する脱リン酸化酵素であり、そこでアルツハイマー病脳のリン酸化の異常を検討するためにこの阻害剤であるcyclosporin Aをラット脳内に注入し脳内神経細胞および細胞骨格蛋白の変化を検討した。

〔方法〕
cyclosporin A投与
雄ウィスター系ラット（体重350g）頭蓋骨に、ケタミン麻酔下にブレグマより5.1mm後方、正中線より5.2mm左側に歯科用ドリルにて穴をあけ、海馬内にcyclosporin A溶液を注入した(Fig.1)。cyclosporin A溶液は25%DMSOに溶解し、0.02、0.2、2.0、20、200μg/mlの濃度に調整し、各溶液5μlをゆっくりと各群5匹のラット海馬内に注入した。対照として25%DMSO溶液のみを注入した。cyclosporin A注入7日後に動物を屠殺し、その脳homogenateにあるいは固定脳標本について検討した。
calcineurin活性の測定
^{32}P標識histone蛋白を外因性基質としてphosphatase活性を測定した。10μlのラット脳組織homogenateと20μlの標識histone蛋白溶液(1mg/ml)を100μlの反応溶液(20mM Tris-HCl(pH7.4)/ 0.5mM DTT/ 100mM KCl)に加え、incubateした後、上清中にreleaseされた^{32}Pを定量し、Caとカルモジュリン（CaM）とを添加した時の上清中の^{32}P量から加えない時の^{32}P量を差し引いたものをcalcineurin活性とした。
免疫組織化学的検討
10% paraformaldehydeにて固定した脳組織について、HE染色と細胞骨格をふくむ関連蛋白（リン酸化200kDa neurofilament、脱リン酸化neurofilament、tau、Paired Helical Filament(PHF)、およびcalcineurin）に対する抗体を用いてABC法による免疫組織染色を行ない、その変化を観察した。

〔結果〕
10^{-7}－10^{-3}mgのcyclosporin Aを注入したラット（N＝25）はすべて生存し行動上の異常を認めなかった。
cyclosporin A(1μg)注入1週後に脳組織homogenate中のCa/CaM依存性phosphatase活性を測定したところ、対照群のDMSO注入ラット脳組織と比較して62-84%に低下していた（Fig.2）。
cyclosporin A注入1週間後のHE染色では細胞体が膨らんだ好塩基性の神経細胞が、大脳皮質、海馬、脳幹神経核、小脳に認められた。またこのような神経細胞数は注入したcyclosporin A濃度の上昇とともに増加していた。抗neurofilment抗体による免疫組織化学的検討では、好塩基性細胞体はリン酸化neurofilament 200K抗体により陽性に染色され、海馬の抗neurofilament抗体陽性細胞は海馬のCA1-4、歯状回を含む全領域に認められた。視床、線条体の神経細胞も抗neurofilament抗体にて陽性に染色され、神経細胞の細胞体だけでなく多くのneuriteも陽性に染色されることが示された。cyclosporin A注入量に対して、抗neurofilament抗体陽性細胞の数をプロットしたところ、cyclosporin A濃度依存性に陽性細胞数が増加していた（Fig.3）。次に脱リン酸化neurofilament200Kに特異的とされている抗体SMI-32を用いて細胞体内に集積したneurofilament蛋白のリン酸化のレベルについて検討したところ、対照群では脳幹神経核の神経細胞がSMI-32による染色で陽性に染色されるのに対して、cyclosporin A注入ラットにおいては、同部位の染色性が認められなかった。抗tau抗体による免疫組織染色では、実験群と対象群との間に明確な差異を認めなかったが、抗tau抗体によるWestern blotにおいて、リン酸化tauに対する抗体(anti-p-tau)では、cyclosporin A注入群と対照群との間に差異を認めなかった。

[考察]

calcineurinは脳内に最も大量に存在し全脳蛋白の1%にも達する(1)。この酵素は特に大脳皮質、線条体、海馬に多く、脳幹、脊髄には少ないといわれる(5)。calcineurinの基質として、neurofilament、tau、MAP2、A kinaseの調節subunit、synapsin I、histone H1、casein、myelin塩基性蛋白などが知られているが(6)、いまだcalcineurinの機能については不明なところが多い。免疫抑制剤として開発されたcyclosporin Aは、cyclophilinと複合体を形成し、この複合体はcalcineurinを阻害するという薬理作用が明らかにされた(7)。cyclosporin A投与は脳内脱リン酸化酵素の役割を明らかにするのに有用であろうとの考えのもとに、cyclosporin Aの脳内注入実験を行った。今回の実験結果から、ラットは比較的大量（1mg）のcyclosporin Aの投与をうけても十分に耐えうることが示された。また、cyclosporin A注入ラット脳では実際にcalcineurin活性が低下していることが示された。このような脱リン酸化が阻害された条件下における神経細胞や細胞骨格蛋白の変化について検討したところ、神経細胞体内にリン酸化されたneurofilament蛋白が集積することが示された。未だ初歩的な実験結果ではあるが、われわれはcalcineurin阻害作用を有する薬剤であるFK506投与によっても、同様のneurofilament集積が生じることを観察しており、このようなneurofilamentの反応は、calcineurin阻害作用と対応しているものと考えられる。神経細胞内neurofilamentはリン酸化状態の変化に対応してその状態が変化することが示唆され、このようなリン酸化亢進状態が神経細胞の変性脱落を惹起するものかどうかを検討することが次の重要課題であると考える。Alzheimer病脳においてはtauやneurofilamentの異常リン酸化が知られており、cyclosporin A注入ラットは神経組織内の蛋白リン酸化脱リン酸化の過程を検討するために有用であり、Alzheimer病の病態研究に有用な手段となる可能性が示唆される。

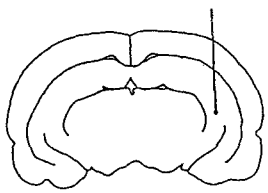


Fig.1
ブレグマより5.1mm後方、正中線より5.2mm左側、頭蓋骨に穴をあけ、cyclosporin Aを海馬に注入

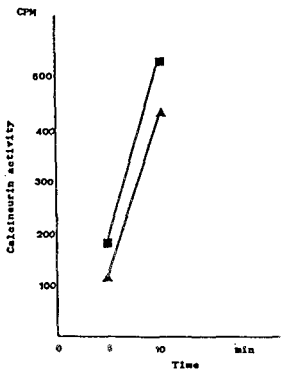


Fig.2
カルシニューリン活性
■はCa/CaM存在下、▲はCa/CaMなしの条件下での上清中^{32}Pを示す

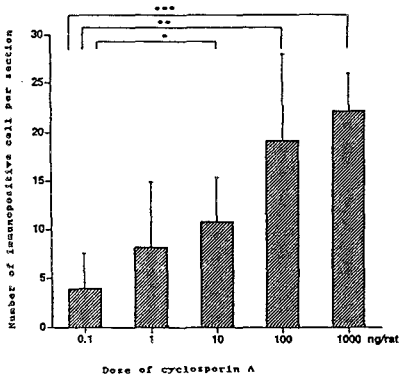


Fig.3
cyclosporin A注入(0.1-1,000ng)ラット海馬切片を抗リン酸化neurofilament抗体で染色し、その染色陽性細胞を数えた。

[文献]
(1)Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., et al. (1992) Neuron, 8, 159-168
(2)Florez, J.C., Nelson, R.B., Routtenberg, A., et al. (1991) Exp. Neurol., 112, 264-272
(3)Masliah, E., Iimoto, D.S., Mallory, M., et al. (1992) Amer. J. Pathol., 140, 263-268
(4)Clipson, N.A., Crabtree, G.R. (1992) Nature, 357, 695-697
(5)Goto, S., Matsukado, Y., Miyamoto, E., et al. (1987) Neuroscience, 22, 189-201
(6)Eyer, J., Leterrier, J.F. (1988) Biochem. J., 252, 655-660
(7)Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., et al. (1991) Cell, 66, 807-815

240 若年および老齢ラット脳のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性の相違について

油布　文枝、江頭　亨、山中　康光

（大分医科大学　薬理学教室）

〔要約〕

老齢及び若年ラット脳のcholine acetyltransferase(CAT)活性を脳８部位、すなわち小脳、延髄、視床下部、線条体、中脳、海馬、大脳皮質、前頭皮質において比較検討した。老齢ラット脳では若年ラットのそれと比較して、線条体・大脳皮質で著明な活性の低下が認められた。その他の部位では両者間に活性の相違は認められなかった。一方、老齢ラットの小脳、延髄、中脳では、CAT活性は高値を示した。老齢および若年ラット脳のCAT活性に対するNa^+、K^+、Li^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}およびAl^{3+}の各陽イオンの影響について検討した。Na^+は老齢ラット線条体と若年ラット線条体、大脳皮質および前頭皮質の活性を50%以上増加させた。K^+は若年及び老齢ラットに対して活性を増加させた。Li^+は若年ラット線条体および前頭皮質で20%増加させたが他は変化しなかった。一方、Mg^{2+}、Ca^{2+}およびAl^{3+}はいずれもCAT活性を抑制した。特に、Al^{3+}の低濃度で著明であった。老齢ラット脳でのCAT活性低下は量的にも質的にも一律ではないと思われる。

〔目的〕

今日、老年期痴呆症状において、生化学的には種々の神経伝達物質や神経ペプチドに変化が起こることが明らかにされてきた。老年期の記憶障害の成因を脳内コリン作動性神経系の活性低下に求める考え方が注目されている[2]。前回、我々は老齢ラットを用い、中枢コリン作動性神経機構の生化学的マーカーである muscarinic recepter(mAChR)、choline acetyltransferase(CAT)活性、acetylcholinesterase(AChE)活性 および choline uptake能を若年ラットと比較し、老齢ラットでは mAChRの数の減少、CAT及び AChE活性の低下、さらにcholine uptake能の低下が認められることを報告した[5]。今回はこれらの生化学的マーカーのうち、老齢ラット脳のcholine acetyltransferase(CAT)の性質を検討する一環として、老齢ラット脳部位における活性や陽イオンの影響を、若年ラットのそれらと比較検討した。

〔実験方法〕

実験動物としてSprague-Dawley系雄性若年（３か月齢）および老齢（２８か月齢）ラットを用いた。ラット脳を小脳、延髄、視床下部、線条体、中脳、海馬、大脳皮質（前頭部を除く）、前頭皮質の８部位に分割した。前頭皮質は、視交叉より前方で線条体を除いた部分とし、残りの皮質部分を大脳皮質とした。CAT活性は、Fonnumの方法[6]に準じて測定した。Incubation mixtureとして、300mM NaCl、8mM choline bromide、20mM EDTA、0.1 mM physostigmine、0.2mM [^{3}H]acetyl coenzyme Aおよび50mM phosphate buffer(pH7.4)を用いた。各陽イオンについては、NaClに代えて incubation mixtureを調整し、同様に CAT活性を測定した。酵素材料の蛋白量はLowryらの方法[7]で測定した。

〔結果〕

老齢ラット脳のCAT活性は、specific activityでは視床下部、線条体、大脳皮質、前頭皮質で、若年ラット脳のそれと比較しておのおの14%、13%、25%、31%低下していた（Table 1）。しかし、total activityでは線条体及び大脳皮質で著明な低下（59%、48%）をみとめた。前頭皮質においてはやや低下（10%）していた。一方、老齢ラットの小脳、延髄、中脳ではCAT活性は高値を示した。

それぞれの陽イオン存在下で CAT活性を測定し、300mM NaClを含むincubation mixture時の活性を100%として示した（Table 2）。250mM Na^+存在下では、若年ラットは線条体、大脳皮質、前頭皮質ともに50%以上の活性増加をみとめたが、老齢ラットでは線条体のみ増加した。250mM K^+存在下では、線条体26%、大脳皮質は若年9%、老齢14%の増加であったが、前頭皮質では若年59%、老齢39%と他の部位より大きな増加がみられた。100

mM Li^+は、若年ラットで線条体、前頭皮質共20%増加させたほかは変化をもたらさなかった。Mg^{2+}、Ca^{2+}はいずれも活性を抑制し、その程度は、大脳皮質に対するマグネシウムイオンの場合を除いては、ほぼ同じであった。100μM Al^{3+}は、いずれも50%以上の阻害を示した。この活性抑制の程度には、若年および老齢ラット脳での相違は認められなかった。

〔考察〕

前回、Cortical regions (CR部) とSubcortical structures (SS部) に分けた場合、老齢ラット脳のCAT活性は若年と比していずれも、約30%の低下を示すことを報告した[5]。大脳皮質・前頭皮質での低下はCR部の低下と一致する。SS部の低下の本態は視床下部と線条体での低下と考えられ、線条体内の細胞群の加齢による減少のためCAT活性が低下し、これから投射をうける皮質部分でも活性低下が起こっているものと思われる。一方、痴呆症状の特徴である記憶認知障害は海馬の機能低下と考えられている[4]が、生理的老化では海馬のCAT活性は低下していないものと思われる。

老化や老人性痴呆症状でコリン作動性神経機構の低下が報告され、とくにacetylcholineの合成酵素であるCAT活性の動態が注目される。CAT活性が、Na^+、K^+で活性化され、又、細胞障害を惹起させるCa^{2+}、Mg^{2+}で阻害される事から、生体内ではこれらイオンにより活性が調節されているのかもしれない。躁鬱病の治療薬であるlithium carbonate投与により甲状腺機能が低下し、痴呆症状が出現することがあるが、Li^+によりCAT活性は低下しなかった。一方、アルツハイマー病患者脳にアルミニウムが蓄積し、特に老人斑やneurofibrillary tangles(NFT)を持つニューロンに局在するという報告[3]や透析患者[1]やアルミニウム加工場従業員に痴呆症状が出現したという報告[8]がある。低濃度Al^{3+}でCAT活性が、老齢及び若年ラットで同程度に抑制された事は、アルミニウムが神経細胞の形態的変化だけでなく、機能的変化をもたらすことを示唆すると考える。

Table 1 The distribution of choline acetyltransferase activity in young(3 mo) and aged(28 mo) rats.

	young rat(3 mo)		aged rat(28 mo)	
Region	Specific activity[a]	Total activity[b]	Specific activity	Total activity
Cerebellum	0.0414	0.6140	0.0873	1.4317
Medulla oblongata	0.7169	6.4091	0.8202	9.9244
Hypothalamus	0.6068	3.1978	0.5286	1.7180
Striatum	1.1899	10.3521	1.0309	4.2267
Midbrain	0.5055	6.1469	0.6047	10.0985
Hippocampus	0.4133	2.1409	0.3925	1.9625
Cortex[c]	0.3904	11.5558	0.2913	6.0299
Frontal cortex	0.3914	7.6519	0.2696	6.9287

a.synthesized ACh nmoles/min/mg protein
b.synthesized ACh nmoles/min/region
c.cerebral cortex except for frontal cortex

Table 2 The effects of ions on choline acetyltransferase activity.
control substrate was containing with 300mM NaCl.

		CAT activity (% of control)					
		Striatum		Cortex		Frontal cortex	
Ion		young	aged	young	aged	young	aged
Na^+	250mM	157	149	153	103	170	113
K^+	250mM	126	126	109	114	159	135
Li^+	100mM	119	99	102	93	121	108
Ca^{2+}	10mM	68	78	50	47	71	65
Mg^{2+}	10mM	42	50	57	38	39	45
Al^{3+}	100μM	41	39	49	37	45	47

〔参考文献〕
1)Alfrey, A. C. et al(1976)New Eng. J. Med. 294:184 2)Bartus, R. T. et al(1982)Science 217:408 3)Candy, J. M. (1986)Lancet 1(8477):354 4)Dunbar, G. L. et al(1993)Brain Res. 604:266 5)江頭 亨, 他(1991)神経化学 30:188 6)Fonnum, F. (1975)J. Neurochem. 24:407 7)Lowry, O. H. et al(1951)J. Biol. Chem. 193:265 8)McLaughlin, A. et al (1962)Br. J. Ind. Med. 19:253

241 ケイ酸アルミニウムのリポフスチンへの蓄積

徳武　哲
（都精神研・分子生物）

〔要約〕 アルツハイマー病や老人痴呆症の脳に見られる老人斑や神経原線維変化にアルミニウムが蓄積し生成に関与しているかどうかについては議論が分かれているが、アルミニウムの脳細胞への侵入と蓄積の機序を考えると、アルミニウムは老人斑や神経原線維変化に蓄積するというよりもリポフスチンに蓄積している可能性が考えられたので、部分精製したリポフスチンの元素分析を走査型電顕とX線分析装置を用いて行い、一部のリポフスチンにはアルミニウムが蓄積していることを確認した。また、リポフスチンの組織内分布より、老人斑や原線維変化で検出されたアルミニウムは、それらに蓄積したリポフスチンによるものと考えるほうが適当と思われた。

［はじめに］

アルツハイマー病をはじめとする老年痴呆症の脳に神経病理学的特徴として見いだされる老人斑(SP)や神経原線維変化(NFT) に、アルミニウム(Al)が含まれ生成に関与しているのではないかという結果が報告されていたが(2,8)、最近は否定的な報告も多い。Landsberg やChafi らは、nuclear microscopeやion microprobe等の新しい方法をを用いて、SPやNFT にはAlが検出されなかったと報告している (3,7)。しかし、彼らは、Alの小さな粒子が組織中に見いだされたがそれは試薬や操作の過程で混入したものであろうと述べている。しかし、Alの脳細胞への侵入および蓄積の機序を考えると、可能性のある器官としてリポフスチン(lipofuscin: lipf)が考えられること (6)、および細胞分画においてlipfやアミロイド小体(corpora amylacea: corp)は比重が重く無機塩の蓄積が予測されたことから(11)、その可能性につい調べて見た。

［実験法］

1．Lipf画分の調製．　Lipfは、臨床診断および神経病理検査よりアルツハイマー病と診断された患者の剖検脳より調製した。調製法は本学会で既に報告したPick小体の調製において、lipfやcorpが一緒に濃縮されてきたので、ほぼ同じ方法で調製した (12,13)。主な操作は、homogenize、stainless meshによる濾過、1.5M蔗糖溶液を用いた分画遠心および8M尿素処理等である。

2．Lipfの確認と元素分析．　Lipfを含んだ画分の懸濁液の一滴を合成樹脂でできたcover slipの上にとり乾燥した。それを蛍光顕微鏡を用い、可視光および蛍光で観察し、特異的自己蛍光によりlipfの位置を確認した (Fig.1a,b)。これをカーボン蒸着してから走査型電顕(JSM-6100)で観察し、次にエネルギー分散型X線分析装置(JED-2001)で含有元素のスペクトルを調べ、さらにmapping 法を用いて元素の分布を調べた。

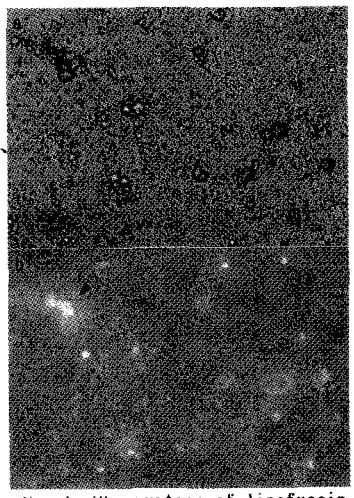


Fig.1. Observation of lipofuscin preparation by visible light (a) and fluorescence light (b). Arrows in (a) are corpora amylacea.　Arrowhead in (b) is a cluster of lipofuscin granules.

［結　果］

1．Lipfの元素分析．　Fig.2aは、lipfの集合体の走査型電顕による観察像である。個々のlipfは直径が1 μm 以下の顆粒で分析が困難なので、細胞内で大きな集合体を作ったものを観察し分析した。これに含まれる元素のスペクトルを示したのがFig. dである。AlとSi（ケイ素）の際立ったピークが見られる。Minor な元素としては、Na, S, Cl, Ca等が見いだされた。しかし、すべてのlipfにAlとSiが高濃度に含まれていたわけではなく、含量の低いものもあった。Fig.2b, cはmapping 法によりAlとSiの分布を調べたもので、AlとSiはlipfに由来していることが分かる。また、その組成比はAl_2O_3 $3SiO_3$ と考えられ、lipf中の含量は約10%と推定された。

2．脳組織中のlipf分布．　本実験に用いた剖検脳組織中のlipfの分布を、Bodian染色した標本を蛍光顕微鏡で観察して調べた。老人斑や原線維変化にはlipfを含んでいるものがかなり多かったが、それ以外の細胞にもlipfは分布していた (Fig.3)。



Fig. 2. Elemental anlysis of lipofuscin.
(a) Scanning electron micrograph of a cluster of lipofuscin granules.
(b) Mapping of Al.
(c) Mapping of Si.
(d) Spectrum of elements in lipofuscin.

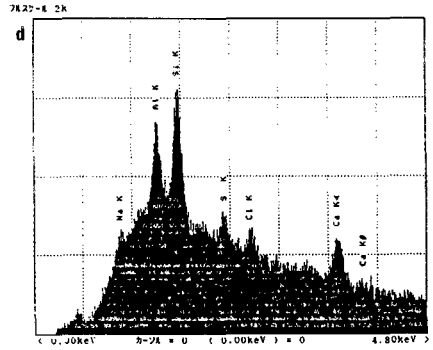
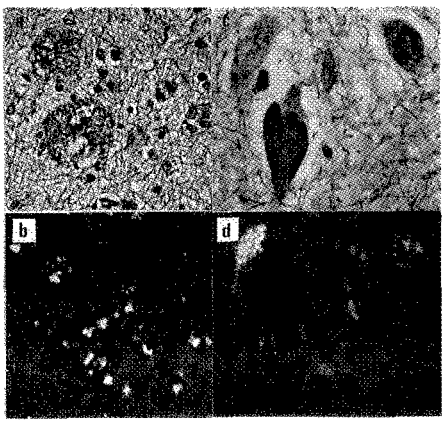


Fig. 3. Distribution of lipofuscin in the brain of Alzheimer's disease. Bodian stained paraffin section was observed by visible light (a, c) and fluorescent light (b, d) in the regions containing SP (a, b) and NFT (c, d).



[考　察]

Al化合物を投与した動物の脳に神経原線維様の変化が見られること (5)、およびAl化合物を含んだ透析液を用いた腎不全の患者に透析によるものと思われる痴呆が生じることから (1)、SPやNFT の発生にAlが関与しているのでないかと考えられ、SPやNFT 中のAlの存在分布が調べられた。しかし、その結果は研究者により異なっている (2, 3, 7, 8)。本研究の結果から考えると、このような結果の不一致は、SPやNFT の中にlipfを含んでいたかどうかにより説明できると思われる。

しかし、すべてのlipfにAlとSiが高い濃度で含まれているわけではないし、また、lipfがSPやNFT に特異的に分布しているわけではないので、AlやSiがSPやNFT の生成の直接的な要因とは考えにくいが、lipfはlysozomeがその機能を失った後に残ったものと考えられており (9)、ケイ酸アルミニウム等の蓄積がlysozomeの機能破壊の原因となる可能性が考えられることから、AlやSiが神経細胞の老化や細胞死の一つの要因である可能性は考えられる。また、lysozomeに含まれるリン酸化酵素やタンパク質分解酵素がSPアミロイドやNFT の生成に関与している可能性が高いことなどを考えると(4, 10)、SPやNFT 生成の初期段階において関与している可能性も否定できないと思われる。

本実験につい御助言頂いた当研究所の小柳新策先生、および走査型電顕とX線分析の御指導をして頂いた都立大学工学部の森崎重喜先生と長瀬裕和氏に感謝致します。

[文　献]

(1)Alfrey, A.C., LeGendre, G.R. & Kaehny, W.D., N. Eng. J. Med., 294, 184-188 (1976)
(2)Candy, J.M., Klinowski, J., Perry, R.H., et al., Lancet, I, 354-357 (1986)
(3)Chafi, A.H., Huaw, J-J., Rancrel, G. et al., Neuroscience Letters, 123, 61-64 (1991)
(4)Clauberg, M. & Joshi, J.G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1009-1012 (1993)
(5)Crapper, D.R., Krishnan, S.S. & Ouittkat, S., Brain, 99, 67-80 (1976)
(6)Galle, P., Berry, J-P. & Duckett, S., Acta Neuropathol., 49, 245-257 (1980)
(7)Landsberg, J.P., McDonald, B. & Watt, F., Nature, 360, 65-68 (1992)
(8)Perl, D.P. & Broady, A.R. Science, 208, 297-299 (1980)
(9)Sohal, R.S. & Wolfe, L.S., Progress in Brain Research, 70, 171-183 (1986)
(10)Takahashi, H., Utsuyama, M., Kurashima, C. et al., Acta Neuropathol., 85, 159-166 (1993)
(11)徳武哲, 山本明広, 神経化学, 29, 424-425 (1990)
(12)徳武哲, 神経化学, 30, 112-113 (1991)
(13)徳部哲, 神経化学, 31, 98-99 (1992)

242 マウスおよびラット加齢過程における脳内G蛋白質の遺伝子発現

宮本 篤、木村永一、大鹿英世
（札幌医大・医・薬理）

【要 約】
マウスおよびラット脳におけるGTP結合蛋白質（G蛋白質）の加齢に伴う遺伝子発現の変化を検討した。本研究では、3，12および24か月齢の雄性ddy系マウスおよび3，6および24か月齢の雄性Wistar系ラットを使用した。マウスおよびラット大脳皮質において、加齢に伴う総RNA量/組織重量に有意な変化は認められなかった。マウスおよびラット大脳皮質では、Gsαおよびβ-actin mRNAが検出された。マウス大脳皮質の加齢に伴うGsα mRNAおよびβ-actin mRNAの変化を検討したところ、両mRNA量の発現レベルは加齢とともに増大していた。しかし、ラット大脳皮質のGsα mRNAおよびβ-actin mRNA量の発現レベルに加齢変化は認められなかった。このことから、加齢に伴う脳内G蛋白質の遺伝子発現は実験動物の種差により異った挙動を示すことが明らかとなった。

【緒 言】
G蛋白質は、GDP/GTP結合活性とGTPをGDPに加水分解する活性(GTPase活性)を有する一群の蛋白質である。神経組織は細胞間の情報伝達がその主な機能であるので、種々の情報伝達系がもっとも発達した組織であり、G蛋白質がもっとも高濃度に存在する組織である。神経組織にその存在が報告されているG蛋白質には、Gs, Gi1, Gi2, Go1, Go2, Gq familyなどがある(1)。神経組織又は神経性細胞においてG蛋白質を介して引き起こされる細胞応答は、アデニリルシクラーゼの活性化や抑制、ホスホリパーゼCの活性化や抑制、K^+チャネルの活性化、Ca^{2+}チャネルの抑制などが知られている(2)。なかでも一部のG蛋白質が神経成長やシナプス形成と関連すること、さらに記憶という脳高次機能への関与の可能性が示唆されている(3)。先に我々は、ラット大脳皮質のGiα, Goα, GqαおよびGβ蛋白質量は生理的老化で変化しないことを報告した(4)。そこで今回は、脳内G蛋白質mRNA発現の加齢に伴う変化をマウスおよびラットで比較検討した。

【実験方法】
実験には、正常飼育飼料を自由に与えた3，12および24か月齢の雄性ddy系マウス（平均寿命：23.1か月）と3，6および24か月齢の雄性Wistar系ラット（平均寿命：23.5か月）を使用した。動物を断頭屠殺後すみやかに脳を摘出し、大脳皮質を氷上で分割した。直ちに既報の方法(5)に従って大脳皮質の総RNAを抽出した。総RNA(15μg/lane)は、臭化エチジウムを添加した6.5%ホルムアルデヒド/1.2%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロン膜に転写した。転写された総RNAの等量性と非分解度は、リボゾーマルRNA(rRNA)の蛍光によって確認した。ハイブリダイゼーションは、Gsα(39mer, 5'-TCC AGA GGT CAG GAC ACG GCA GCG AAG CAG GTC CTG GTC-3')およびβ-actin(40mer, 5'-GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT CAT C-3')のオリゴヌクレオチドを3'エンドラベリング法で放射標識([α-^{32}P]dATP, specific activity of 6,000 Ci/mmol)したものをプローブとして既報(6)のマイナーモディフィケーション下で行なった。オートラジオグラムは、Soft Laser Scanning Densitometerで解析した。

【実験結果と考察】
マウスおよびラット大脳皮質より得られた組織重量当たりの総RNA量の加齢変化を表に示す。総RNA/組織重量は、両加齢動物の大脳皮質においてほぼ同等に維持されていた。上図は、マウス大脳皮質におけるGsα mRNAおよびβ-actin mRNA発現の加齢変化を示す。Gsα mRNA発現量はマウスの加齢に伴い増加していること、また、β-actin mRNA発現量も同様の挙動を示すことが明らかになった。下図は、ラット大脳皮質におけるGsα mRNAおよびβ-actin mRNA発現の加齢変化を示す。Gsα mRNAおよびβ-actin mRNA発現量は、ラット大脳皮質において加齢で変化しないことが明らかになった。これらの成績から、生理的加齢に伴う脳内Gsα蛋白質の遺伝子発現は、動物の種差により著しく異なった挙動を示していることが明らかとなった。蛋白質発現との関係を含め、脳内に特異的にかつ高濃度存在

するGoα発現と加齢との関連は今後の課題である。

Table. Comparison of the total cerebral cortex RNA per tissue weight during aging in ddy mice and Wistar rats

	Total RNA/tissue (μg/mg tissue weight)
Mice (month)	
3	1.388 ± 0.09
12	1.218 ± 0.10
24	1.403 ± 0.09
Rats (month)	
3	1.230 ± 0.08
6	1.196 ± 0.08
24	1.156 ± 0.09

Values are expressed as the mean±S.E. of 5 different experiments.

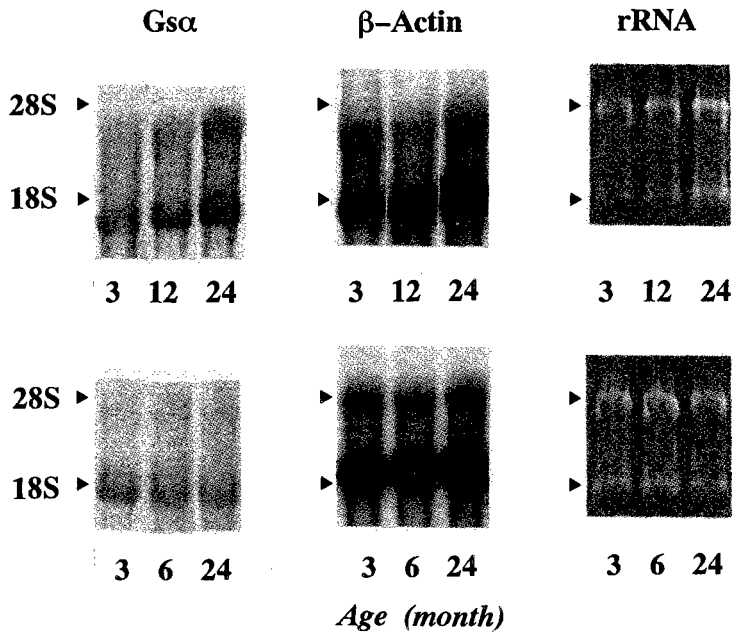


Fig. Representative Northern blots of total RNA isolated from cerebral cortex of 3-, 12- and 24-month-old ddy mice (upper) and of 3-, 6- and 24-month-old Wistar rats (lower). 15μg of total RNA was loaded per lane. The Northern blots were hybridized with the oligonucleotide probes encoding the Gsα (left) and β-actin (center). Migration of the 18S and 28S ribosomal RNA (rRNA) before hybridization with the oligonucleotide probe is shown at right. Northern blots were analyzed by scanning densitometry of bands.

【参考文献】

1. Simon, M.I., Strathmann, M.P. and Gautam, N. (1991) Science 252, 802-808
2. Summers, R.J. and McMartin, L.R. (1993) J. Neurochem. 60, 10-23
3. Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Kennedy, T.E., Neer, E.J. and Fishman, M.C. (1990) Nature 344, 836-841
4. Miyamoto, A. and Ohshika, H. (1991) J. Neurochem. 57, S115
5. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159
6. Miyamoto, A., Kimura, H., Kawana, S. and Ohshika, H. (1993) Excerpta Medica (Elsevier, Amsterdam), pp.237-240

243 ダウン症脳におけるアミロイドβ／A4前駆体タンパクおよびそれに由来する成分の解析 II

亀谷富由樹、田中喜久子、徳田隆彦 （東京都精神医学総合研究所、分子生物）

〔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）、およびアミロイド粗画分に分画した。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12-16KDaのC端断片および110-140KDaの膜結合型APPが得られた。分泌型APPおよびC端断片を解析した結果から、APPの一部（APP695）では通常のプロセシング以外の部位で切断が起き、アミロイド原性のあるC端断片が生じていることが示唆された。

＜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）から生じるが、その生成機序は不明のままである。この生成機序解明のために、我々は、昨年度より、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してきた。本年度は、膜結合型APPおよびC端断片の解析をしたので報告する。

＜方法＞

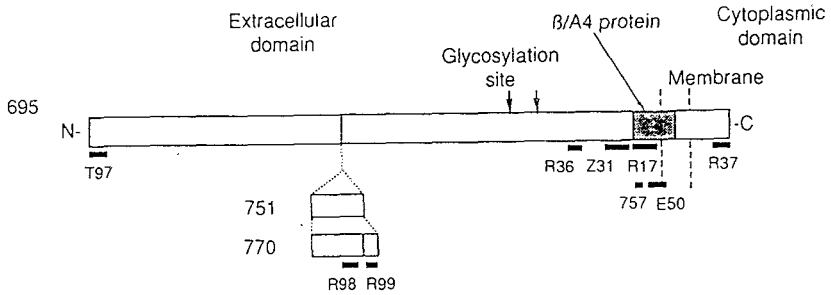
55歳のダウン症脳（病理学的検索では、大脳皮質、海馬、皮質下白質等広範な部位に老人斑および脳血管アミロイドを認める）皮質を9倍量の10mMリン酸/0.2M NaCl/緩衝液でホモゲナイズし、47,000 xgの遠心をして得たPB画分、沈殿を10mMリン酸/0.2M NaCl/0.5% Triton X-100緩衝液でホモゲナイズし、47,000 xgの遠心をして得たPB/T画分、その後の沈殿をSDS/DTT溶液でホモゲナイズし、47,000 xgの遠心後の沈澱画分をギ酸で処理し、得られた可溶画分に分画した。それぞれの画分から、Affigel-heparin、イオン交換クロマトグラフィー等によるAPPおよびそれに由来する成分の精製を行った。精製した成分は、図1に示したAPPの各部分に対する抗体(1)、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、N末端アミノ酸配列分析等の解析を行った。

＜結果と考察＞

PBのヘパリン結合画分からイオン交換クロマトグラフィーによって93-123KDaの分泌型APPを精製した。PB/Tのヘパリン結合画分からイオン交換クロマトグラフィーによって110-140KDaの膜結合型APPを、ヘパリン非結合画分から逆相クロマトグラフィーにより12-16KDaのC端断片を精製した。またアミロイド粗画分から、分子量4KDaのβ/A4を得た。これらの免疫化学的解析の結果は表1にまとめた。分泌型APPおよびC端断片の結果を検討してみると、APPの一部分子（APP695）では、通常のプロセシングとは異なり、β/A4すべてを含むアミロイド原性C端断片が生じるプロセシングが起きていることが判明した。これと同様の結果は正常脳、AD脳でも得られ(2-4)、β/A4はこのアミロイド原性C端断片より生じるものと考えられる。

＜文献＞

1. Ishii T., Kametani F., Haga S. and Sato M. (1989) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 15, 135-147.
2. Kennedy H., Kametani F. and Allsop D. (1992) Neurodegeration 1, 59-64
3. Allsop D., Kennedy H.E. and Kametani F. (1993) Alzheimer's disease: Advances in clinical and basic research, pp.421-429
4. Kametani F., Tanaka K., Ishii T., Ikeda S., Kennedy H.E. and Allsop D. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 392-398



APPの模式図。各合成ペプチドの位置を示した。

Table 1. Summary of antiserum reactivies to purified APP and its derivatives

Antiserum Domain		T97 N	R98 KPI	R99 OX2	R36	Z31	757 β1-10	E50 β17-31	R37 C
Secretory form									
123 KDa		+	+	weaker	+	+	+	-	-
105-112 KDa	top	+	+	weaker	+	+	+	-	-
	middle	+	+	faint	+	+	weaker	-	-
	bottom	+	-*	-	+	-*	-	-	-
93-97 KDa	top	+	-	-	+	-	-	-	-
	bottom	+	-	-	+	-	-	-	-
Membrane bound form									
130-145 KDa	top	+	+	weaker	+	weaker	weaker	-	+
	bottom	+	+	weaker	+	weaker	weaKer	-	+
115-125 KDa	top	+	-	-	+	+	-	-	+
	middle	+	+	-	+	+	-	-	+
	bottom	+	-	-	+	+	-	-	+
110 KDa		+	-	-	+	weaker	+	-	+
C-terminal fragment									
16 KDa		-	-	-	-	-	+	-	+
15.5 KDa		-	-	-	-	-	+	-	+
12-15 KDa	top	-	-	-	-	-	-	-	+
	middle	-	-	-	-	-	-	-	+
	bottom	-	-	-	-	-	-	-	+
β/A4 amyloid									
4 KDa		-	-	-	-	-	weaker	+	-

* Sometimes very weakly positive. + Strongly positive; - negative.

244 アルツハイマー型老年期痴呆におけるＧＴＰ結合蛋白質の量・機能について

橋本恵理[1)]、小澤寛樹[1)]、齋藤利和[1)]、八田慎一[2)]、Peter Riederer[3)].
大鹿英世[2)]、高畑直彦[1)]
[1)] 札幌医科大学医学部神経精神医学講座・[2)] 薬理学講座，
[3)] Wuerzburg大学精神医学講座

〔要約〕

アルツハイマー型老年期痴呆(SDAT)の死後脳におけるＧＴＰ結合（Ｇ）蛋白質の量及び機能をimmunoblotting ならびに光親和型ＧＴＰアナログ(AAGTP)を用いて検討した。

immunoblottingではＧ蛋白質の各subunitに対する免疫反応性の変化は認められなかった。機能面からの評価のために行なったAAGTP結合実験では、SDAT群の頭頂葉及び側頭葉領域においてGsαのAAGTP結合量は有意に減少し、GsαとGi/oαの AAGTP 結合量の比も低下を示した。これらの結果より、SDATではＧ蛋白質の機能面での変化を介し、細胞内情報伝達系の機能的バランスの乱れが生じていることが示唆される。

［目的］

Ｇ蛋白質は細胞膜受容体と細胞内で新たな情報伝達物質を産成する効果器との間で情報の変換と増幅の役割をもつ、 signal transduction における key element と考えられている。これまで我々は、ヒト死後脳を用いて 生理的加齢やアルコール依存症者におけるＧ蛋白質の変化について報告しているが(2,3)、今回アルツハイマー型老年期痴呆(SDAT)群及び対照群においてＧ蛋白質の量ならびに機能について検討した。

［方法］

ヒト死後脳大脳皮質膜標本(頭頂葉，側頭葉，後頭葉)を用いて、１７名のアルツハイマー型老年期痴呆(SDAT)群と年齢，死後凍結時間をマッチさせた対照群におけるＧ蛋白質の量及び機能の検討を行なった。

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, tubulin の各subunit に対しそれぞれ RM/1, AS/7, GC/2, QL, SW/1, policlonal antitubulin)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(4) 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。

［結果及び考察］

immunoblotting ではいずれの領域においても、またいずれのＧ蛋白質subunitにおいても、SDAT群と対照群間に有意な差は認められなかった(Fig.1)。Ｇ蛋白質の機能面を反映すると考えられるAAGTP 結合実験では、SDAT群で頭頂葉、側頭葉領域においてGsαの AAGTP 結合量が有意に減少し(Fig.2)、 GsαとGi/oα の AAGTP 結合量の比も低下を示した(Fig.３)。Gi/oα の AAGTP 結合量はSDAT群で増加傾向を示したが有意な変化ではなかった(Fig.2)。以上より、SDAT群においては、Ｇ蛋白質の量的変化は認められないものの、Ｇ蛋白質の機能の変化を介した細胞内情報伝達系の機能的バランスの乱れが生じている可能性が示唆された。

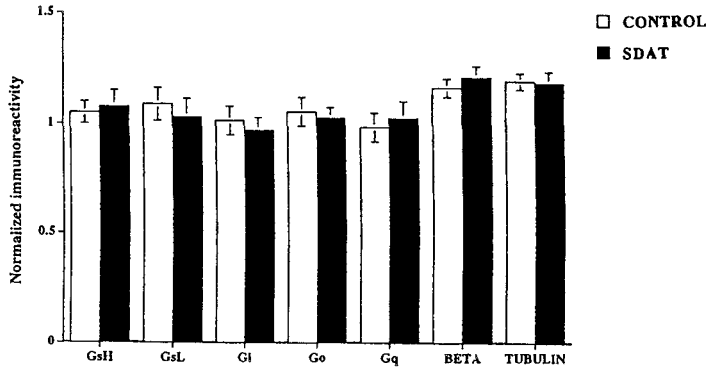


Fig. 1. The amounts of G protein subunits in temporal cortex membrane.

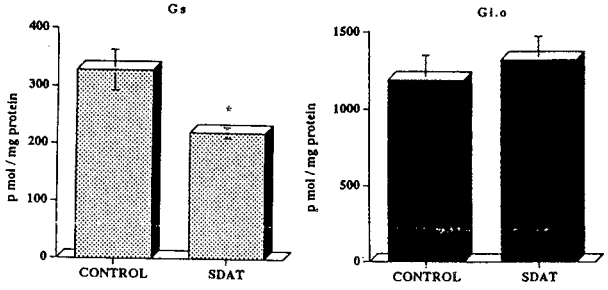


Fig. 2. AAGTP binding to Gsα and Gi/oα in temporal cortex membrane.
* Significantly different from control ($p < 0.05$)

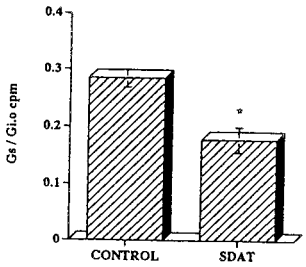


Fig. 3. The ratio of Gsα to Gi/oα AAGTP binding in temporal cortex membrane.
* Significantly different from control ($p < 0.05$)

[文献]
1. Gordon, J. H. and Rasenick, M. M. (1988) FEBS Lett. 235, 201-206
2. 橋本ら (1992) 神経化学 31, 508-509
3. 片村ら (1992) 神経化学 31, 504-505
4. Pfeuffer, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7224-7234

245 アミロイド前駆体蛋白ｍＲＮＡ発現に対する Ciliary Neurotrophic Factor および血清除去の影響

須藤慎治、川上秀史、三森康世、太田光熙*、中村重信
（広島大学医学部第三内科、国立療養所宇多野病院臨床研究部*）

〔要約〕
アミロイド前駆体蛋白 (APP) mRNA の発現の調節因子を明らかにする目的で、神経栄養因子の一つである Ciliary neurotrophic factor (CNTF)の添加 および血清除去における発現の変化をラットＣ６グリオーマ細胞およびヒト SH-SY5Y ニューロブラストーマ細胞を用いて検討した。Ｃ６グリオーマ細胞における APPmRNA の発現はＣＮＴＦ添加１時間後より経時的な増加を示した。また、培養液中の血清を除去することによっても、APPmRNA の発現はＣ６グリオーマ細胞において増加した。一方、SH-SY5Y ニューロブラストーマ細胞では、CNTF の添加や血清除去により APPmRNA の発現に明らかな変化は見出せなかった。以上の結果より、グリア系細胞において APP 遺伝子は神経栄養因子や血清中の因子により発現の調節を受けながら生理的あるいは病的な条件下で発現していることが推定された。

〔目的〕

アルツハイマー病における特徴的な病理学的沈着物質である老人斑の主要な成分であるβ蛋白の前駆体蛋白 (Amyloid Precursor Protein : APP) は全身のほとんどの細胞で発現し、生体にとって欠くことのできない重要な働きをしていると推定されており、生理的あるいは病的な条件下においてその発現は種々の因子により調節を受けているものと考えられるが、その詳細に関しては不明である。そこで、ＡＰＰ遺伝子発現の調節因子を明らかにする目的で神経栄養因子の一つである Ciliary neurotrophic factor (CNTF) および培養液中の血清除去による APPmRNA の発現への影響に関して培養細胞を用いた検討を行った。

〔方法〕

1）細胞培養：培養細胞には human SH-SY5Y neuroblastoma cell （神戸大小児科佐野公彦博士の御好意により供与）および rat C6 glioma cell を用い、10%牛胎仔血清、抗生物質を含むＤＭＥＭ液中で、３７℃、５％CO_2存在下に細胞を播き、２４時間培養して実験に供した。

2）ＣＮＴＦの添加または血清除去：上記の細胞を100mm dish に８Ｘ１０^5/dish の細胞密度で播種してから24時間培養後に、recombinant rat ciliary neurotrophic factor (3ng/ml) をDME medium に溶解して添加、または無血清培地に交換すなわち血清除去を行った。

3）Nothern blot 解析：ＣＮＴＦ添加または血清除去後に一定時間培養した後、細胞を回収し acid guanidinium-phenol-chloroform 法により total RNA を抽出し、total RNA 10μｇを 1.2％アガロースゲル上で電気泳動し、ナイロン膜に転写後、^{32}P でラベルした 2.2kb APPcDNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。なお、total RNA の定量は 260nm での吸光度を測定して行い、定量のaccuracy はアガロースゲルのethidium bromide 染色による28Sおよび18S ribosomal RNA のintensityの比較および解糖系酵素glyceraldehydephosphate dehydrogenase(GAPDH) mRNAレベルの比較により確かめた。洗浄後にオートラジオグラフィーを行い、さらに発現量の定量化は各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 BAS2000 で測定して求めた。

〔結果〕

1）ＣＮＴＦ添加による APPmRNA発現の変化

ＣＮＴＦ（３ng/ml）の添加によりＣ６グリオーマ細胞における APPmRNA の発現は添加後１時間目より経時的に増加し24時間後に最大の発現を示し、24時間における対照の APPmRNA の発現量と比較して2.7 倍の発現の増加を示した（Fig.1）。一方、SH-SY5Y ニューロブラストーマ細胞におけるＣＮＴＦ添加による APPmRNA の発現は対照と比べて明らかな変化は認められなかった。

2）血清除去による APPmRNA の変化

血清除去によりＣ６グリオーマ細胞における APPmRNA の発現は24時間以降増加し、48時間後には10%血清含有培地での対照と比較して約３倍の発現の増加を認めた（Fig.2）。また、血清除去によりＣ６グリオーマ細胞は突起を伸展させるなどの形態的変化が認められた。一方、SH-SY5Y ニューロブラストーマ細胞では血清除去によっても APPmRNA の発現は対照との間で明らかな変化は認めなかった。

〔考察〕

ＣＮＴＦは元来、毛様体神経節細胞 (Ciliary ganglion neuron) の生存を維持する因子として発見されたが、最近では広く神経系の細胞に生存あるいは分化因子として作用することが知られてきており、グリア系においては未分化なグリア系の細胞である oligodendrocyte-type 2 astrocyte (O-2A) progenitor cell を type 2 astrocyte へ分化誘導する作用を有していることが報告されている[1]。一方、ＡＰＰは培養細胞に対して生存維持活性を有しており[2]、今回の検討で観察されたＣＮＴＦによるＣ６グリオーマ細胞における APPmRNA の発現の増加はＣＮＴＦのグリア系細胞に生存あるいは分化作用の一つである可能性が示唆される。しかし、SH-SY5Y ニューロブラストーマ細胞ではＣＮＴＦのレセプターを有しているにもかかわらず[3]、APPmRNA の発現の変化は認めなかった。このことはＣＮＴＦの作用が二つの細胞間で異なることを意味するのであろう。

次に、培養液中の血清除去により、APPmRNA の発現の増加が認められたが、血清除去によりＣ６グリオーマ細胞は突起が伸展するなど形態的変化が観察され、Ｐ19細胞をレチノイン酸で処理した際に認められる APPmRNA の発現の増加[4]と同様に細胞の分化に伴って生じた可能性が考えられるが、転写レベルでどのような変化が起こっているのかどうかに関して今後の検討が必要である。

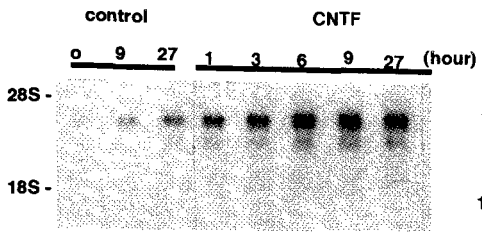


Fig. 1a APP mRNA expression after CNTF treatment in C6 glioma cells.10 μg of total RNA was loaded in each lane.

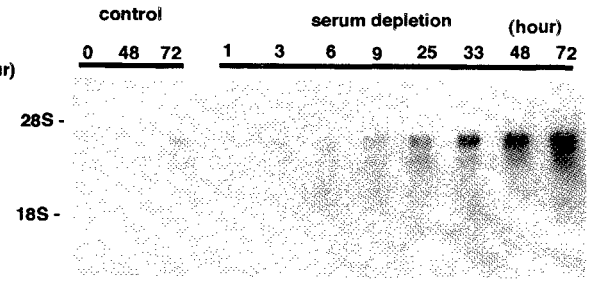


Fig. 2a APP mRNA expression after serum depletion in C6 glioma cells.10 μg of total RNA was loaded in each lane.

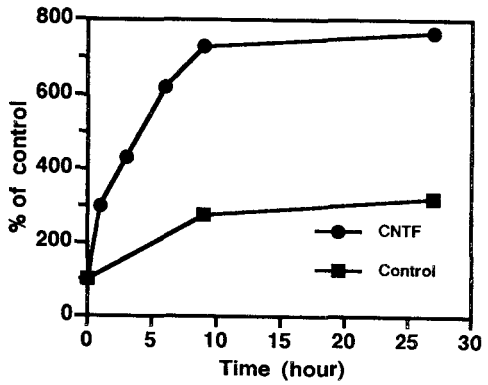


Fig. 1b Time course of APP mRNA induction after CNTF treatment in rat C6 glioma cells.

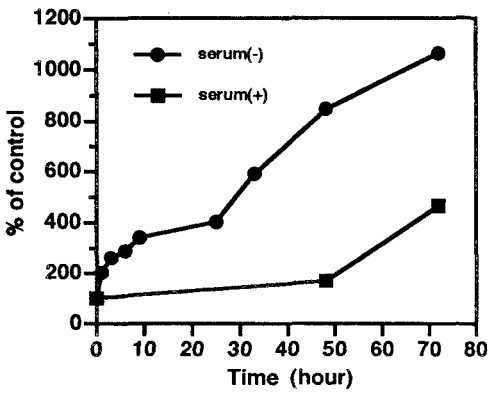


Fig.2b Time course of APP mRNA induction after serum depletion in rat C6 glioma cells

[参考文献]

1) Hughes, S.M. et al., (1988) Nature. **335**, 70-73.

2) Araki, W. et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. **181**, 265-271.

3) Davis, S. et al., (1991) Sience. **253**, 59-63.

4) Yoshikawa, K. et al .,(1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. **171**, 294-309.

246 筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）患者の脊髄および血清中トランスグルタミナーゼ（ＴＧ）活性

藤田公和・安藤正人・青木則久[1)]・安達一真[1)]・永田　豊・本多虔夫[2)]
（藤田保健衛生大学・医学部・生理、脳神経外科[1)]、横浜市民病院・神経内科[2)]）

［要約］ 筋萎縮性側索硬化症（ALS）で死亡した患者からなるべく早期に摘出した脊髄標本、および臨床的にALSと診断された患者から得た血清中のトランスグルタミナーゼ（ＴＧ）活性を測定し、非神経病患者（対照）から得た脊髄および血清中の酵素活性値と比較検討した。ALS患者の胸髄と腰髄組織内ＴＧ活性値は、脊髄横断面のすべての分画で著明な低下が認められたが、これは前角と側索のみ特異的にニューロンと軸索の変性が見られる形態的変化とは対応しなかった。ＴＧは組織変性の標識酵素の１つで、変性初期に急激な活性増大を来たした後、末期にはその活性が逆に低下することが知られている。したがって、ALSで死亡した患者では、組織変性の終末期に相当するため、対照脊髄と比べて患者組織のＴＧ活性の減少が認められたものと考えられる。一方、死亡前のALS患者から採取された血清内ＴＧ活性値は、病気の経過と対応させて観察した結果では、病気の初期段階よりもさらに進行した中期段階で、活性値の減少傾向が観察された。この点については、今後さらに例数を増やして、詳細に検討していく必要があると考えられる。

［目的］ 神経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。したがって、組織内のＴＧ活性の変動は、神経細胞の退行・変性過程を生化学的に検知する上で有用な指標となりうることが考えられる(1,6)。我々はすでに、ALS患者脊髄中の遊離アミノ酸含量を測定し、ALS患者脊髄内の一次運動神経の変性・脱落を生化学的に証明した(4)。また、我々はＴＧ活性値の変化が、脊髄組織内のアミノ酸作動性神経の変性・脱落の早期指標となりうることを昨年の本学会で報告した(5)。今回の実験では、ALS患者の死後に摘出した脊髄組織のＴＧ活性を測定し、神経変性とこの酵素活性の変動との関連性について検討した。さらに臨床的に、ALSと診断された患者血清中のＴＧ活性を測定して、臨床症状とこの酵素活性との関連性についても調べ、神経変性疾患の早期診断のための生化学的指標となり得るかどうかについて調べた。

［実験材料および方法］ ALS患者（3例）およびALS患者とほぼ同年令の非ALS患者（6例）の脊髄組織は、遺族の承諾を得て死後3～16.5時間経過して摘出し、生化学的分析まで-80℃で凍結保存した。また、血清はALSと診断された患者（5例）およびALS患者と同年令で神経疾患のない正常男女（12例）から採取した。胸髄および腰髄は厚さ約3mmに横断し、横断面をさらに前角（前索を含む）、側索、後角および後索の４部分に細分割した。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および血清を用いて、N,N'-dimethylcaseinタンパク分画に取り込まれた〔^{3}H〕putrescine(1110GBq/mmol)の放射活性から算出するLorandの方法(8)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（組織磨細物）を添加して37℃、30分間インキュベーションし、単位蛋白量当たりに取り込まれた反応基質(^{3}H-putrescine)の放射活性量を放射活性より計算して表わした。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(2)で行なった。

［結果および考察］ ALS患者の胸髄および腰髄のＴＧ活性値は、さらに細分割した前角、側索、後角および後索のいずれの部位でも、非神経病患者脊髄の分割各部と比較して、脊髄各部位で多少の変動はみられるものの、いずれも対照値の22%～56%の範囲まで著明に減少しているのが観察された（図１）。しかし、ALS患者脊髄の病変が局在している前角および側索の変性部位に対応して、特にＴＧ活性値が対照脊髄の値と比べて低値というわけではなく、いずれの部位でも著明な酵素活性の減少が示されたので、組織学的変化と生化学的変化とは対応しなかった。Kawashimaら(1989)はアルツハイマー病患者の大脳から死後摘出した大脳組織中のＴＧ活性値は、正常死後脳の値と比べて明らかに(-75%)低下していることを報告している(7)。したがって神経変性の進行に伴って、終末期には組織内ＴＧ活性が次第に減少していくことが示唆された。しかし、我々が既に報告した如く、ラット脊髄に虚血性変性を引き起こした後１日以内の短時間で、組織内ＴＧ活性値が３倍以上に著明に増加し、この活性の増加は次第に減少する傾向にある

ものの、1ヶ月間も持続することが示されている(5)。したがって、ALS患者脊髄でも発病初期では、運動ニューロンなどの組織変性に伴ってＴＧ活性値が増大し、その後、病気の進行と共に次第に変化は少なくなり、死亡に至る終末期では破壊された組織内のＴＧ活性値はかえって対照よりも減少した状態になることが推察される。病気途中のALS患者から種々の時期に採血した血清中のＴＧ活性値(20.0±7.8pmol/100μl/h)は、対照患者の値(27.9±10.2pmol/100μl/h)と比較してやや低い傾向が認められたものの、統計的有意差は認められなかった。しかし、採血時期をこの疾患の初期と中期段階に分けて分類すると、ＴＧ活性値は初期では30.4±5.3pmol、中期では15.2±4.4pmolであった。D'Argenioraら(1989)は小腸の炎症性疾患患者の血清中のＴＧ活性が正常者の値と比べて有意に低値を示したことから、ＴＧ活性値の変動は腸管の炎症による機能形態学的変化と関連していて、病状の生化学的指標となりうることを述べている(3)。元来、ＴＧは血液凝固の第13因子として存在していることが知られている。しかし、ALS脊髄で組織変性が進行する過程で、その一部が組織から血液中にまで漏出してくる可能性も考えられ、進行した変性組織からの血中への酵素の逸脱は、終末病期にはかえって減少することも推定される。いずれにしても、ALSの病気の進行に対応した血清中のＴＧ活性値の変動の関連性が見出せれば、疾患の進行を予測しうる生化学的因子の一つとして利用できるかも知れないので、今後症例数を増やして、精力的にこれらの関連性を追求していく必要があろう。

[文献] (1)Ando et al.(1991)J.Neurochem.57.1848-1854.(2)Bradford.M.M.(1976)Anal.Biochem.72.248-252.(3)D'Argenio et al(1989)Gut.30.950-954.(4)藤田ら(1991)神経化学.30.488-489.(5)藤田ら(1992)神経化学.31.542-543.(6)Gilad et al.(1985)J.Neurochem.44.1385-1390.(7)Kawashima et al(1989)Biomed.Res.10.17-23.(8)Lorand et al(1972)Anal.Biochem.50.623-631.

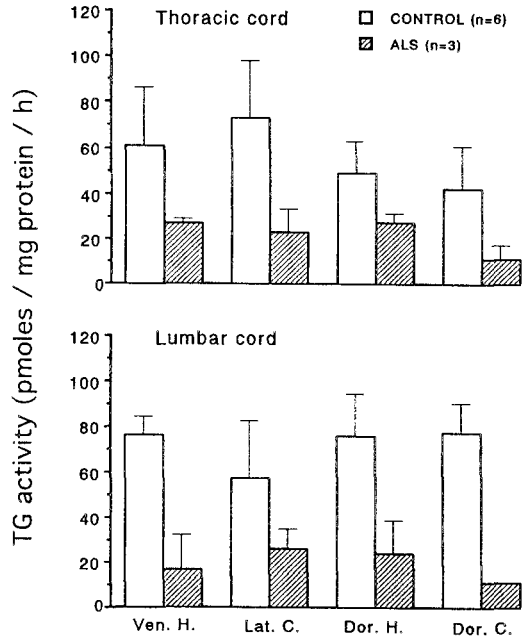


図１．ALS患者（3例）および対照患者（6例）
脊髄組織中のＴＧ活性値
上段；胸髄
下段；腰髄

表１　血清中のＴＧ活性値（pmol/100μl）

ALS(n=5)		CONTROL(n=12)	
initial stage		① 43.6	
①31.0	30.4	② 11.4	
②23.4	±5.3	③ 25.9	
		④ 37.7	27.9
middle stage		⑤ 29.5	±10.2
③10.7		⑥ 15.9	
④19.4	15.2	⑦ 21.4	
⑤15.4	±4.4	⑧ 32.4	
		⑨ 32.6	
		⑩ 17.5	
total	20.0	⑪ 41.1	
(n=5)	±7.8	⑫ 25.2	

247 イミプラミンの脱分極依存性Ca^{2+}流入抑制効果の作用機序に関する検討

清水雅美[1)]、西田 朗[1)]、岡本泰昌[2)]，山脇成人[2)]
([1)] 国立呉病院臨床研究部、[2)] 広島大・神経精神)

〔要約〕
ラット大脳皮質培養神経細胞において、高K^+液による細胞内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]i$)上昇をイミプラミン(IMP)が用量依存性に抑制した(IC_{50}=32 μM)。この抑制効果は、非選択的Ca^{2+}チャンネル阻害剤であるLa^{3+}(0.3 μM)またはNi^{2+}(300 μM)共存下に増強され、IC_{50}値はそれぞれ16、3.2 μMに減少した。一方、nicardipine(10 μM)、verapamil(10 μM)およびω-conotoxin GVIA(ω-CTX、1 μM)の共存下ではIC_{50}値はそれぞれ44、29、24 μMと変化せず、IMPの抑制効果は影響されなかった。

［目的］

我々は先に、イミプラミン(IMP)をはじめとする三環系抗うつ薬がラット前大脳皮質の培養神経細胞において観察される$[Ca^{2+}]i$の自発変動を減弱することから、抗うつ薬が電位依存性のCa^{2+}チャンネルを抑制する可能性を示唆した[1)]。また近年、IMPが神経系腫瘍細胞におけるCa^{2+}電流を抑制すること[2)]、ラット脳シナプトソームにおける電位依存性のCa^{2+}流入を抑制することが明らかにされ[3)4)]、抗うつ薬の電位依存性Ca^{2+}チャンネルに対する作用が注目され、抗うつ効果との関連性が議論されるようになってきた。神経系の電位依存性Ca^{2+}チャンネルは、薬理学的性質の違いから少なくとも次の4群に分類されている。1)ジヒドロピリジン誘導体(DHP誘導体)で阻害される高閾値Ca^{2+}チャンネル群、2)ω-CTXにより不可逆的に阻害される高閾値Ca^{2+}チャンネル群、3)そのいずれでも阻害されない群、4)活性化の閾値の小さい低閾値Ca^{2+}チャンネル群である。今回我々は、これらの各種電位依存性Ca^{2+}チャンネルに対する抗うつ薬の作用の違いを明らかにする目的で、高K^+液投与により引き起こされる脱分極性の$[Ca^{2+}]i$上昇に対する抗うつ薬の効果を培養神経細胞を用い観察した。

［方法］

胎生18日齢ラットの大脳皮質を酵素処理後、7～12日間培養し実験に用いた。5 μM fura-2/AMを負荷した標本を倒立蛍光顕微鏡のステージ上に置き、超高感度カメラでとらえた標本の蛍光像を画像解析装置(ARGUS-100)により継時的に解析した。標本は高K^+(25mM)で刺激した後、抗うつ薬またはCa^{2+}チャンネル阻害薬を4分間前処置し薬物存在下で再度高K^+で刺激した。1回目の$[Ca^{2+}]i$変化に対する2回目の$[Ca^{2+}]i$変化の比を求め抗うつ薬の抑制効果を判定した。百日咳毒素(PTX、100ng/ml)は培養液に添加し20時間処置した。

［成績］

1) 25mM K^+により$[Ca^{2+}]i$は静止時88±8 nMから357±29 nM(n=45)まで上昇した。この$[Ca^{2+}]i$上昇はIMP(10、30 μM)の存在下に可逆的に抑制された(Fig.1)。阻害効果のIC_{50}値は32 μMを示した。

2) 各種電位依存性Ca^{2+}チャンネル阻害薬の共存下でIMPの抑制効果を観察した。まず、非選択的にCa^{2+}チャンネルを阻害する無機イオン存在下でIMPの抑制曲線を求めたところ、La^{3+}(0.3 μM)またはNi^{2+}(300 μM)共存下においてIMPの阻害曲線は左にシフトし、IC_{50}値はそれぞれ16、3.2 μMに減少した(Fig.2)。一方、nicardipine(10 μM)およびverapamil(10 μM)の共存下にはIMPの抑制効果は影響されず、IC_{50}値もそれぞれ44、29 μMと変化しなかった。同様に、ω-CTX(1 μM)共存下でもIMPの抑制効果は変化しなかった(IC_{50}=24 μM)。

3) K^+(15mM)刺激性の$[Ca^{2+}]i$上昇は、DHP誘導体agonistのBay K 8644(100nM)により増強されたが、IMP(30 μM)はBay K 8644の存在の有無に関わらず同程度抑制した(Fig.3)。

4) IMPの$[Ca^{2+}]i$上昇抑制作用果はNMDA受容体阻害薬のAP-5(50 μM)存在下およびtetrodotoxin(1 μM)の存在下に変化しなかった。

5) PTX処置(100ng/ml、20h)によりIMPの$[Ca^{2+}]i$上昇抑制効果は変化しなかった。

［考察］

25mM K^+による$[Ca^{2+}]i$上昇は、nicardipineまたはω-CTXの最大効果濃度(それぞれ10 μM、1 μM)で部分的にしか抑制されなかったことから、ラット大脳皮質の神経細胞にはDHP感受性またはω-CTX感受性の高閾値Ca^{2+}チャンネルに加えてDHPとω-CTXに非感受性の高閾値Ca^{2+}チャンネルが存在すると考えられた。25mM K^+による脱分極依存性Ca^{2+}流入をIMPは用量依存的かつ可逆的に抑制した。IMPの抑制効果はLa^{3+}あるいはNi^{2+}共存下に増強されたが、

nicardipine、verapamilまたはω-CTX共存下では変化しなかった。これらの結果から、IMPは少なくともnicardipine、verapamilおよびω-CTXとは作用部位を共有しないと考えられた。さらに、Bay K 8644による$[Ca^{2+}]i$上昇の増強に対しIMPはまったく影響しなかったことからも、IMPがDHP誘導体の作用部位に直接影響しないことが確認された。このことは、ラット大脳皮質膜またはラット脊髄シナプトソームにおける[^{3}H]-nitrendipine結合に対しIMPは10^{-4}Mまでまったく影響しないという報告とも一致する[5]。一方、IMPの抑制効果は無機阻害剤の共存下に増強された。無機阻害剤はCa^{2+}と競合することによりチャンネルを通過するCa^{2+}量を減少させるが、IMPのCa^{2+}流入抑制作用にこれと類似した作用があるのかあるいはIMPの作用を無機イオン阻害剤が直接修飾するのか否か、作用機序の詳細は現在のところ不明である。あるいは、IMPがDHP誘導体非感受性およびω-CTX非感受性のCa^{2+}チャンネルに選択的に作用する可能性も考えられた。

また、IMPは電位依存性のNa^+、K^+電流やNMDA受容体刺激によるCa^{2+}流入を抑制することが報告されている[2)6)]。IMPが有するこれらの作用が$[Ca^{2+}]i$上昇抑制効果に間接的に関わっている可能性が考えられたが、電位依存性Na^+チャンネル阻害薬やNMDA受容体阻害薬はIMPの抑制効果にはまったく影響しなかった。一方興味深いことに、IMPによるCa^{2+}電流の抑制がPTXの前処置により減弱すること、つまりIMPがG蛋白質への作用を介してCa^{2+}電流を抑制することが後根神経節培養細胞において報告されている[4)]。しかしながら、本実験系ではPTXの前処置でIMPの抑制効果は変化せず、IMPは何か別の機序を介して作用すると考えられた。

［文献］

1) Shimizu, M. et al. (1992) Neurosci. Lett. 146, 101-104 2) Ogata, N. (1989) Brain Res. 479, 140-144 3) Beauchamp, M. et al. (1992) Neuropharmacol. 31, 229-234 4) Choi, J. et al. (1992) J. Pharmacol. Exp. Ther. 263, 49-53 5) Rehavi, M. et al. (1988) Eur. J. Pharmacol. 155, 1-9 6) Reynolds, I. J. and Miller, R. J. (1988) Br. J. Pharmacol. 95, 95-102

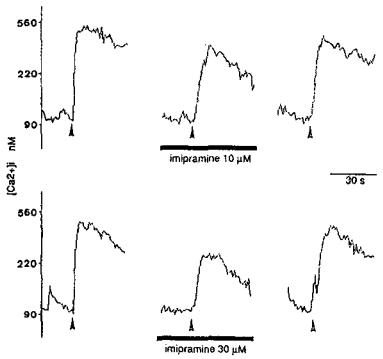


Fig.1 Effect of IMP on 25mM K^+-induced $[Ca^{2+}]i$ increases. IMP application before and during high K^+ stimulation reduced the $[Ca^{2+}]i$ increases. Suppression by IMP is reversed by washout of IMP and restimulation with high K^+. High K^+ additions are indicated by the arrow. The figure represents a typical experiment that was repeated five times with similar results.

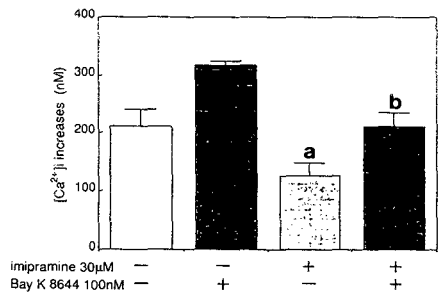


Fig.3 Effect of IMP on Bay K 8644 potentiation of 15mM K^+-induced $[Ca^{2+}]i$ increases. Bay K 8644 addition 3 min before 15mM K^+-induced depolarization enhanced the effect of K^+ on $[Ca^{2+}]i$ levels. Bay K 8644 also enhanced 15mM K^+-induced $[Ca^{2+}]i$ increases in the presence of IMP. The results represent mean ± SEM values obtained by testing 21～35 cells. *$p<0.05$ versus (-)IMP(-)Bay K 8644; †$p<0.05$ versus (-)IMP(+)Bay K 8644.

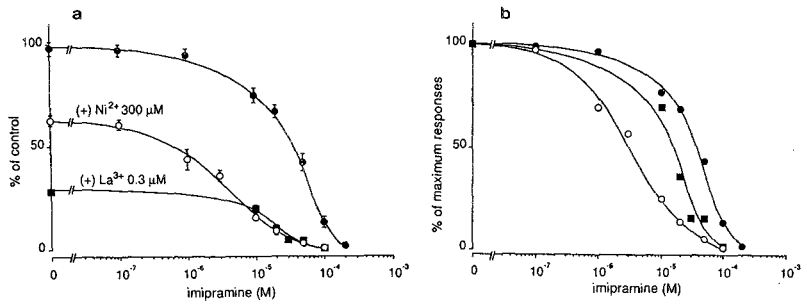


Fig.2 Effects of Ni^{2+} or La^{3+} on IMP inhibition of 25mM K^+-induced $[Ca^{2+}]i$ increases. Ni^{2+} (300 μ M) or La^{3+} (0.3 μ M) were added before and during 25mM K^+ stimulation with IMP (10^{-7}～10^{-4}) or without IMP (a). In b, each curve was redrawn as a percentage of the responses obtained with 25mM K^+ alone. The results represent mean ± SEM values obtained by testing 20～42 cells.

248 メタンフェタミン逆耐性ラット側坐核ドパミン遊離に及ぼすオピオイド受容体調節の変化ー脳内透析法による検討ー

横尾秀康、山田茂人*、吉田眞美、田中隆彦、溝口克弘、江本浩幸、古賀千尋、
石井秀夫、石川経子、田中正敏　　（久留米大学・医・薬理、脳研*）

〔要約〕
脳内透析法を用い側坐核でのdopamine（DA）の細胞外濃度を指標にMAP逆耐性形成ラットにおけるopioid受容体によるDA遊離調節作用の影響について検討した。DAの基礎遊離量は、MAP投与群は、生食投与群に比べ有意な減少を認めた。dynorphinの潅流により、両群共にDA遊離は有意に抑制されたが、MAP投与群でDA遊離抑制の有意な減弱を認めた。DAGOの潅流は、両群共にDA遊離は有意に増加したが、MAP投与群でDA遊離増加の有意な上昇を認めた。これらの結果からκ及びμ opioid受容体によるラット側坐核からのDA遊離調節機構において、MAP逆耐性形成ラットではκ opioid受容体による側坐核からのDA遊離抑制機能の低下、及びμ opioid受容体によるDA遊離亢進機能の増加が認められることが確認された。

Methamphetamine（MAP）逆耐性形成ラット線条体及び、側坐核切片を用いた潅流実験から、dopamine（DA）神経終末からのDA遊離調節機構においてDA自己受容体調節の機能低下が認められること（12）、またκopioid受容体による抑制性のDA遊離調節機構の減弱が認められること（13）をこれまでに報告してきた。中枢 opioid 神経系が catecholamine 神経機能に影響を及ぼしているが、実際、opioid receptor subtype の catecholamine 遊離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、また、中枢enkephalin 神経系は、DA 神経系に対して興奮性の調節を行なっている（8）。逆に、中枢 DA 神経系がopioid 神経系の機能に影響を及ぼすことも報告されている（4, 7, 9）。今回、脳内透析法を用い側坐核でのDAの細胞外濃度を指標にMAP逆耐性形成ラットにおけるκ及びμ opioid受容体によるDA遊離調節作用の影響について検討した。

対象と方法

Wistar系雄性ラットを用いMAP(6 mg/kg/day, i.p.)を９日間投与し９日間の休薬後以下の実験を行なった。対照には、生食（1 ml/kg/day）の投与を行なった。側坐核に透析チューブの植え込み手術後２４時間後から潅流実験を開始した。潅流液は２０分毎に採取し、その全量（４０μl／２０min）を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用い潅流液中のDAの定量を行なった。潅流開始２時間後から実験を開始した。１時間のDAの基礎値が得られたところでμ opioid受容体の agonist である[D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin（DAGO、１０μM, ４０分間）または、κ opioid 受容体の agonist であるdynorphin（１０μM、４０分間）を透析チューブを介して側坐核に投与した。この両opioid peptideの効果を生食投与群およびMAP投与群との間で比較検討した。統計学的検定は２要因分散分析のあとFisher's Protected Least Significant Differencesを用いておこなった。

結果

DAの基礎遊離量は、MAP投与群（18.6 ± 4.41 pg/20 min, n=33）では、生食投与群(30.8 ± 7.92 pg/20 min, n=36）に比べ、有意に減少していた。Dynorphinの潅流は両群共にDA遊離は有意に抑制されたが、MAP投与群ではDA遊離抑制が有意に減弱した（図１）。DAGOの潅流により、両群共遊離はDAの有意に増加したが、MAP投与群ではDA遊離増加が有意に増強された（図２）。

考察

側坐核からのDAの基礎遊離は、生食投与群に比べMAP投与群で有意に減少した。この所見は、nomifennsine 非存在下における線条体切片からのDAの基礎遊離が、生食投与群に比べMAP投与群で有意に減少するという我々の報告（12）と一致した結果である。しかし、nomifensine 存在下においては線条体、側坐核切片からの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（11, 13）。さらに、MAP逆耐性形成ラット線条体においてDA再取り込み機構の亢進が認められている（12）。以上

図1

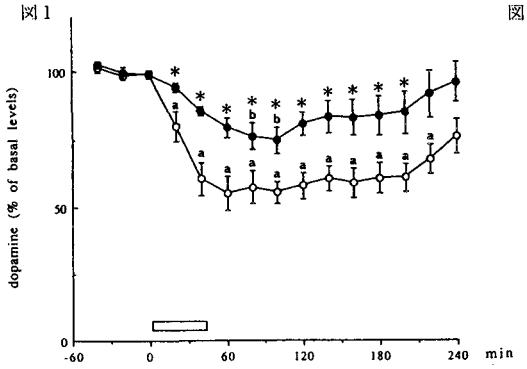


図2

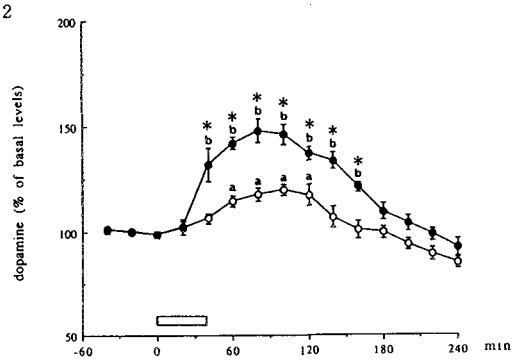


図1. The effect of dynorphin on the extracellular DA levels in nucleus accumbens of the rats pretreated with saline (n=5, ○) or methamphetamine (n=5, ●). Each value represents the mean ± S.E.M. A two way ANOVA on the effect of dynorphin for each group indicated a significant difference as followed, a comparison of each fraction ($F=12.857$; $df=14$; $P<0.001$), of pretreatment with saline and methamphetamine ($F=97.703$; $df=1$; $P<0.001$) and of the interaction between each fraction and the both pretreatment ($F=1.779$; $df=14$; $P<0.05$). * $P < 0.05$ methamphetamine vs saline, [a] $P < 0.01$ vs basal levels in saline treated group, [b] $P < 0.05$ vs basal levels in methamphetamine treated group.

図2. The effect of DAGO on the extracellular DA levels in nucleus accumbens of the rats pretreated with saline (n=6, ○) or methamphetamine (n=7, ●). Each value represents the mean ± S.E.M. A two way ANOVA on the effect of DAGO for each group indicated a significant difference as followed, a comparison of each fraction ($F=34.237$; $df=14$; $P<0.001$), of pretreatment with saline and methamphetamine ($F=118.0$; $df=1$; $P<0.0001$) and of the interaction between each fraction and the both pretreatment ($F=5.084$; $df=14$; $P<0.001$). * $P < 0.05$ methamphetamine vs saline, [a] $P < 0.05$ vs basal levels in saline treated group, [b] $P < 0.01$ vs basal levels in methamphetamine treated group.

のことから、MAPによる逆耐性形成ラット側坐核からのDA基礎遊離の低下は再取り込みの亢進によって生じた結果であることが考えられる。dynorphinの潅流により、側坐核からのDA遊離の抑制が両群共に抑制が認められ、逆にDAGOの潅流でのDA遊離は、両群共に亢進した。Dynorphinは、中枢opioid受容体の中でκ受容体agonist (1) として, DAGOは、μ受容体agonist (5) として作用する。また、側坐核には、dynorphin及びenkephalin含有神経が局在し、κ及びμ受容体の存在が認められている (6, 10)。opioid peptidesの中枢DA遊離調節に関する報告 (8) では、κ受容体は、その遊離に対して抑制的に作用し、μ受容体は促進的に作用するといわれている。今回の結果も、これまでの報告と一致するものであった。κ及びμ受容体は中枢神経系において、いずれも抑制性の神経調節を行なっている (3) ことから、dynorphinはDA神経終末に局在するκ受容体を介してDA遊離の抑制作用を示すものと考えられる。一方、DAGOのDA遊離増加作用はkainate破壊線条体においてその効果が減少すること (2) からもDAGOが作用するμ受容体はDA神経終末には局在していないことが考えられ、このDA遊離促進効果には介在神経の関与が考えられる。MAP逆耐性形成ラット側坐核からのDA放出に関して、dynorphinによる抑制作用の減弱と、DAGOによる促進作用の亢進が認められた。MAP又はapomorphineの連続投与でラット黒質及び線条体でdynorphinのimmunoreactivityが増加する (7, 9) ことが報告されている。また、DA神経の破壊及びDA受容体遮断が、proenkephalin mRNAの増加を引き起こす報告 (4) がある。これらの所見は、DA agonistsが、dynorphinの放出を促進させ、enkephalinの放出を抑制することを示唆している。このように、MAP連続投与は中枢opioid神経系に影響しDA放出調節に関与するκ受容体の感受性の低下及び、μ受容体の感受性の増加を引き起こすことが示唆される。

文献 1) Chavkin C. (1982) Sci. 215, 413-415. 2) Dourmap N. et al. (1992) J. Neurochem. 58,709-713. 3) Duggan A.W. and North R.A. (1984) Phaemacol. Rev. 35, 219-281. 4) Gerfen C.R. et al. (1990) Sci. 250, 1429-1432. 5) Goldstein A. and Naidu A. (1989) Mol. Pharmacol. 36, 265-272. 6) Graybiel A.M. et al. (1981) Neurosci. 6, 377-397. 7) Hanson G.R. et al. (1987) Eur. J. Pharmacol. 144, 245-246. 8) Illes P. and Jackish R. (1991) Neurobiolgy of opioids (O.F.X. Almeida and T.S. Sippenberg, eds) 213-225. 9) Li S.J. et al. (1988) J. Pharmacol. Exp. Ther. 246, 403-408. 10) Mansour A. et al. (1991) Neurobiolgy of opioids (O.F.X. Almeida and T.S. Sippenberg, eds) 169-183. 11) Yamada S. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 205, 43-47. 12) Yamada S. et al. (1988) Biol. Psychiat. 24, 399-408. 13) Yokoo H. et al. (1992) Eur. J. Pharmacol. 222, 43-47.

249 PCRを用いての単純ヘルペス脳炎ウイルスの検出

土居孝至、溝渕睦彦＊、村尾孝児＊＊、武田良平＊、柿本泰男＊
(松山記念病院、＊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〕
PCRを用い髄液中のウイルスDNAを高感度に検出できる二回増幅法(nested amplification法)と、さらに定量的な直接増幅法(direct amplification法)を確立した。nested amplification法はエチジウムブロマイド染色にて約10^{-16}gまで検出可能であった。一方direct amplification法はnested amplification法に比べ約10倍感度が低いが、定量性が保たれた。この二つの方法を用いて、患者6例から単純ヘルペスウイルスDNAを検出、経過中のウイルスDNA量を分析した。抗ウイルス薬の治療の有無に関係なく、発症後少なくとも4週間はウイルスDNAが検出できることが明らかになった。

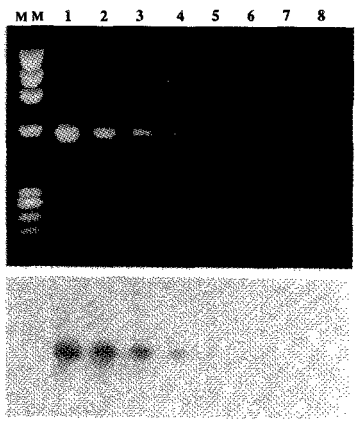
[はじめに]
単純ヘルペス脳炎は、単純ヘルペスI型ウイルス(HSV-I)が中枢神経系に感染し、重篤な精神神経症状を呈し、致死率も高い中枢神経感染症である。従来、本疾患の早期診断や経過および治療効果の指標には、髄液のウイルス抗体価が一般的に用いられてきた。しかし、経時的な変動で判定をする必要がある点、また結果を得るまでに長時間を要する点などにおいて必ずしも有用ではなかった。近年polymerase chain reaction (PCR) の開発に伴い、ウイルスDNAを微量の検体から増幅検出することが可能となった。しかし、PCRを用いての分析は検出感度や定量性に問題があり、同じ検体でも陽性率が施設間で異なる等完全には確立されていない[1,3,6]。今回われわれは、患者髄液からウイルスDNAを高感度にPCR増幅する方法を確立し、単純ヘルペス脳炎の経過とウイルスDNA量の分析を行った。

[方法]
標準とするHSV DNA 株は北海道大学歯学部坂岡博先生より頂いた。ヘルペス脳炎患者6名から16検体を採取分析した。髄液は 使用するまで -80C で保存した。nested amplification法では、髄液100μlをプロテアーゼKで処理した後、フェノール／クロロホルムで除蛋白し、ウイルスDNAをプラスミドDNAと共沈殿させた。PCR溶液や増幅条件は既報の方法[4]に従った。一回目のPCR増幅は外部プライマーで行い、増幅したPCR産物をTE (10mM Tris-HCl, pH7.5 ; 1mM EDTA) で20倍希釈し、その1μlを内部プライマーで増幅した。一回目、二回目とも35サイクル増幅した。用いたプライマーの塩基配列は、外部センスプライマー; 5'-CCACCGAGCGGCAGGTGATC-3', アンチセンス; 5'-GCCGACCGCCTGCTCGTGCT-3', 内部センスプライマー; 5'-GCACATCACAGTCGCGGCAG-3', アンチセンス; 5'-CGCGGCAATGATCACAACTC-3'である[2]。一方、前処理しない髄液5μlを直接PCR溶液(50μl)に加え増幅する方法がdirect amplification法である。PCR産物をゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色し、さらにサザンブロット分析を行った。プローブ作成とラベル方法は、溝渕らの方法[5]を用いた。

[結果と考察]
二つの方法の検出感度の結果が図1である。標準HSV-1 DNAをPCR溶液中に10^{-12}gから10^{-18}gまで連続10倍希釈し加え、PCR増幅した。図1-a) に示すように、一回目の増幅では10^{-15} gまでエチジウムブロマイド染色で検出可能であった。サザンブロット法では10^{-16} gまで検出された[図1-b)]。さらに内部プライマーで二回目の増幅を行い、エチジウムブロマイド染色した。図1-c) のように10^{-16} gまで検出されたが、定量性に欠ける。患者髄液8検体を前処理した後、外部プライマーで増幅した結果が図2である。共沈させたプラスミドDNAは不均一である。以上の結果からdirect amplification法をまず施行し、エチジウムブロマイド染色で検出されない検体のみ nested amplification法を施行した。6例のヘルペス脳炎患者の経過とPCR分析の結果をまとめたものが表1である。全ての患者からウイルスDNAが検出され、抗ウイルス薬の治療の有無に関係なく、発症後少なくとも4週間はウイルスDNAが検出できることが明らかになった。

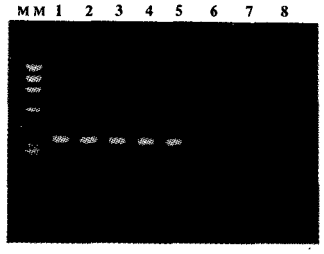
[文献]
1. Aurelius, E., B. Johansson, B. et al. (1991) Lancet 337: 189-1991.
2. Dowbenko, D.J. and Lasky. L.A.(1984) J. Virol. 52: 154-163.
3. Klapper, P.E., Cleator, G.M. et al. (1993) Lancet 341: 691.
4. Mizobuchi, M., Frohman, M.A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5: 476-484.
5. Mizobuchi, M. and L.A. Frohman. (1992) BioTechniques 12: 350-353.
6. Stockl, E.P., Kraupp, T.P. et al. (1990) J. Med. Virol. 32: 77-82.

図１、連続希釈した標準DNAをPCR増幅し、検出感度と定量性を比較した結果



標準HSV-1 DNAをPCR溶液中に10^{-12}gから10^{-18}gまで連続10倍希釈し加え(lane 1-6)、一回目の増幅を行いエチジウムブロマイド染色(a)とサザンブロット法(b)を行った。さらに内部プライマーで二回目の増幅を行い、エチジウムブロマイド染色した(c)。健常者髄液(lane 7)とDNA非添加サンプル(lane 8)を増幅したものである。MM; Molecular Marker (φx 174 / HaeIII)

図２、患者髄液を前処理後、外部プライマーで増幅した結果
患者8検体(lane 1-8)、健常者(lane 9)とDNA非添加サンプル(lane 10)



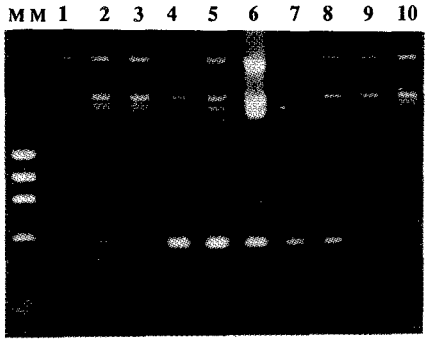


表１、6例のヘルペス脳炎患者の経過とPCR分析の結果
増幅されたPCR産物の量は ＋、＋＋、＋＋＋に大別した。抗ウイルス薬を投与した期間を ◀―▶ で示した。

Case	1	2	3	4	5	6
weeks after onset	2~4	6	1 1.5 2 3 4	5 6 8 11	2 4	0.5 3 4
PCR amplification	＋	＋＋	＋＋＋ ＋＋＋ ＋ ＋	＋＋＋ ＋ —	＋＋ ＋＋	＋＋ ＋＋ ＋
antiviral agent	(—)	(—)	◀――▶	◀――▶	◀――▶	◀――▶

250 筋緊張性ジストロフィー症患者リンパ球中のmyotonin protein kinase mRNAの分析

溝渕睦彦、武田良平、土居孝至＊、印南敏彦、柿本泰男
（愛媛大学医学部神経精神医学教室、＊松山記念病院）

〔要約〕

近年、筋緊張性ジストロフィー症の責任遺伝子が単離同定され、cDNAから本遺伝子産物は蛋白リン酸化酵素であることが明らかとなった。しかも、非翻訳領域の3'-末端部分にCTGの繰り返し配列が存在し、本疾患患者では健常者より長い繰り返し配列を有し、その長さと発症時期や症状の重篤度が相関していると推定されている。われわれは、リンパ球RNAに転写された繰り返し配列を、RT-PCR (Reverse Transcribed-Polymerase Chain Reaction) 法で分析した。患者では、リンパ球RNA上に長い繰り返し配列が存在し、しかもこの異常RNA量が病状の進行あるいは重篤度と関係している可能性が示唆された。

[はじめに]

筋緊張性ジストロフィー症は、筋緊張症、筋力低下、筋萎縮などの筋肉症状以外に、白内障、内分泌異常や中枢神経障害を伴う遺伝性多組織性疾患である。1992年に、本疾患の責任遺伝子の構造が解明され[1, 7]、cDNAの3'-末端にCTGの繰り返し配列を持つ蛋白リン酸化酵素の一種である事が明らかになった[1, 4]。このような三塩基の繰り返し配列をもつ疾患遺伝子は、Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA; Kennedy disease)やFragile X syndromeで既に報告されている[2]。この三塩基の繰り返し配列は、SBMAはRNAから蛋白に翻訳される部分、Fragile X syndromeでは5'-末端部分に存在し、患者ではこの繰り返し配列が健常者より増加している。筋緊張性ジストロフィー症では、3'-末端のGCT繰り返し(健常者; 5-40回) が40から数百回にまで増加し、しかも発症年令や症状の重篤度に関連している[1, 6, 10]。われわれは、本疾患が多組織性疾患である事に着目し、患者血液中のリンパ球のRNAをPCRを用いて分析した。

[方法]

リンパ球は、血液2mlからFicoll-Paqueを用い採取した。リンパ球と筋肉のtotal RNAはChomczynski等の方法で抽出した[3]。既報の方法[8]を用い2μgのtotalRNAから$(dT)_{17}$プライマーと逆転写酵素でcDNAを作製し、50μlのTE (10 mM Tris-HCL, pH 7.5; 1 mM EDTA)に希釈した。希釈したcDNA 1 μl とプライマー1, 2 (25 p mol; primer 1;, 5'-AGTTCACAACCGCTCCGAGC-3', pimer 2; 5'-GAACACGGACGGCCCGGCTT-3'; 図1-a)を50 μl PCR 溶液に加え30 回増幅した。PCR産物は、ゲル電気泳動後サザンブロットを行なった。プローブは、図1-a) に示したように、CTG繰り返し配列の上流(primer 3-4; 105 bp)と下流部(primer 5-6; 74 bp)でヒト筋肉cDNAからPCR増幅し作成した。プローブのラベル方法は溝渕らの方法を用いた[9]。腰椎症患者の筋肉と血液および筋緊張性ジストロフィー症患者の家族5名、健常者4名からの血液は本人の同意のもとに採取した。

[結果と考察]

腰椎症患者の筋肉と血中リンパ球のRT-PCRの結果を図1-b)に示した。筋肉と血中リンパ球ともに同じ長さの正常範囲(255-360 bp; CTG repeat plus 240 bp)のPCR産物が増幅された。図には示していないが、本産物は上記の両プローブとハイブリダイズした。従って、本遺伝子は筋肉のみならず血中リンパ球にも発現し、リンパ球中のmRNAを分析することは有用である。Fu等もlymphoblastiod cell lineで分析しているが[5]、われわれの方法はより直接的に患者リンパ球中のmRNAを測定できる。

4名の健常者と筋緊張性ジストロフィー症患者の家族5名(発症者3名, 非発症者2名)の分析をした。図2-a)には、採取時年齢と発症年齢を示している。健常者(2, 4, 6と8)と非発症者(3と9)は、正常範囲の長さのPCR産物が検出された。発症者3名では、正常範囲の長さのPCR産物とともに、約540 bp (5; 100回 repeats), 約1000 bp (1; 250回) と1100-1300 bp (7; 290-350回) 産物が検出された(図2-bとc)。従って、患者

のリンパ球では、長い繰り返し配列を持つmRNAが実際に発現している。患者1と7を比較すると、発症年齢が同じであるにもかかわらず、病状は全く異なる。患者1は、重症のミオトニア、顔面四肢の筋萎縮、腸や膀胱症状、斜視、傾眠傾向などの精神症状も出現しているが、患者7は手のミオトニアのみである。サザンブロットの結果から、患者1は長い繰り返し配列の発現量が患者7に比し多い。したがって、この異常RNAの量が、病状の重症度や進行に関係している可能性がある。

[文献]

1. Brook, J. D., McCurrach, M. E. et al. (1992) Cell 68: 799-808.
2. Caskey, C. T., Pizzuti, A. et al. (1992) Science 256: 784-789.
3. Chomzynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162: 156-159.
4. Fu, Y.-H., Pizzuti, A. et al. (1992) Science 255: 1256-1258.
5. Fu, Y.-H., Friedman, D. L. et al. (1993) Science 260: 235-238.
6. Harley, H. G., Rundle, S. A. et al. (1992) Lancet 339: 1125-1128.
7. Mahadevan, M., Tsilfidis, C. et al. (1992) Science 255: 1253-1255.
8. Mizobuchi, M., Frohman, M.A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5: 476-484.
9. Mizobuchi, M. and L.A. Frohman. (1992) BioTechniques 12: 350-353.
10. Tsilfidis, C., MacKenzie, A. E. et al. (1992) Nature Genet. 1: 192-195.

図1、プライマー、プローブの位置(a)とヒト筋肉と血中リンパ球のRT-PCR(b)

a)斜線部がプローブに用いた部分
b)筋肉(lane 1 &2)と血中リンパ球(lane 3 &4)のRT-PCR産物。RNA分画にDNAが含まれていないことを確認するために、逆転写酵素を加えないサンプルもPCR増幅した(lane 1 & 3)。lane 5はDNAを加えていないサンプル。

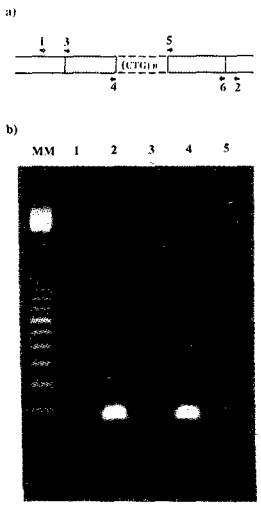
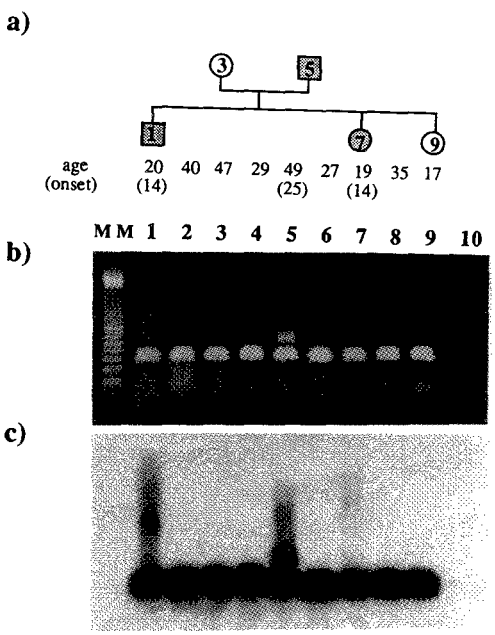


図2、筋緊張性ジストロフィー症患者の家系図(a)、血中リンパ球のRT-PCR(b)とそのサザンブロット分析(c)

血液採取時年齢と発症年齢をa)に示した。エチジウムブロマイド染色(b)とサザンブロット(c)。lane 10はDNAを加えていないサンプル。



251 パーキンソン病患者における尿量の排泄異常

溝渕睦彦、 柿本泰男
(愛媛大学医学部神経精神医学教室)

〔要約〕

成人健常者の尿量の日内リズムは、早朝時に最大で深夜に最小である。今回われわれは、パーキンソン病患者の尿量の排泄異常を検討した。対象は15人の対照健常者と16例のパーキンソン病患者で、尿は日中 (9.00-21.00)と夜間 (21.00-9.00) に分けて採取した。対照健常者では、一日量の60%が日中、40%が夜間に排泄されていた。一方、パーキンソン病患者では、43%が日中、57%が夜間に排泄される。この尿量排泄の逆転は、MPTP投与パーキンソン病モデルイヌに見られた現象と類似であり、尿量を調節している脳のドーパミンあるいは非ドーパミン神経細胞の変性と関係している可能性がある。

[はじめに]

パーキンソン病の臨床症状は、神経症状、精神症状とも詳しく研究されている。しかし、日内変動に関しては、頭痛、ジストニア、アキネジアなどの数種の神経症状でのみ報告されている(1, 4, 5)。われわれは、最近イヌにMPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) を投与し、パーキンソン病モデルイヌを作成、尿量や血中バゾプレッシンの日内リズム異常(2)や血中のホルモン異常を報告した(6)。今回われわれは、パーキンソン病患者の尿量の排泄異常を健常者と比較し、詳細に検討した。

[対象と方法]

本研究は、15人の対照健常者と16例のパーキンソン病患者を用い、全て同意を得て行なった。15人の対照健常者は、表1に示したように平均年齢67才で神経症状を呈した既往もなく、薬物服用もない。特発性パーキンソン病患者16例は、平均年齢65才で症例1, 2, 3, 6以外は外来通院患者である。症例2, 6の休薬治療期間以外では、全ての患者は何らかの抗パーキンソン病薬を服用していた(表2)。パーキンソン病の重症度は、HoehnとYahrの分類(3)を用いて評価した。尿は、日中(9.00-21.00; Daytime, D)と夜間(21.00-9.00; Nighttime, N)に分け採取し、9.00と21.00に強制排尿させ、9.00と21.00の尿はそれぞれ日中尿と夜間尿とした。その他の時間帯では、自然排尿とした。タバコ、コーヒー、紅茶とアルコールは禁止したが、水は自由に飲んだ。対象者は、朝7.00頃起き夜21.00頃寝、8.00, 12.00, 18.00頃に食事をした。それぞれの対象者の平均の比(D/D+N or N/D+N)は、Wilcoxon-Mann-Whitney's u testを用いて統計処理した。

[結果と考察]

表1に示したように、すべての対照健常者で日中の平均尿量が夜間より多かった。逆に、パーキンソン病患者では、4例 (3, 8, 11, 16)を除いて夜間尿量が多い。しかし、日中と夜間尿量は、健常者とパーキンソン病患者では統計的には有意な差は無かった。また、一日全尿量は、パーキンソン病患者で174ml健常者より少ないが、有意な差ではない。しかし、両群間をD/D+NとN/D+Nで比較すると、有意な差が認められる($P<0.01$)。それぞれの被検者での一日のD/D+NとN/D+Nを表したものが、図1である。パーキンソン病患者は、明らかに健常者と逆転している。

この現象を考察するには、抗パーキンソン病薬と運動量の影響を考慮する必要がある。抗パーキンソン病薬に関しては、2症例(2, 6)で休薬期間中に尿量を測定した。症例2は、D/D+NとN/D+Nは投与中{0.26±0.04, 0.74±0.04(n=12)}と休薬中[0.28±0.03, 0.72±0.03(n=12)]であり。症例6でも、投与中[0.47±0.02, 0.53±0.02(n=7)]と休薬中[0.46±0.03, 0.54±0.03(n=9)]であり、休薬による変化は無かった。次に、運動障害のある他の神経疾患、筋萎縮性側索硬化症、Charcot-Marie-Tooth病と脊髄小脳変性症では、D/D+NとN/D+Nはそれぞれ[0.74±0.02, 0.26±0.02 (n=5)], [0.82±0.03, 0.18±0.03 (n=5)], [0.75±0.05, 0.25±0.05 (n=5)]であった。したがって、抗パーキンソン病薬と運動量の影響は少ないと考えられる。

以上より、尿量排泄の逆転は、MPTP投与パーキンソン病モデルイヌに見られた現象(2)と類似であり、尿量を調節している脳のドーパミンあるいは非ドーパミン神経細胞の変性と関係している可能性がある。

[文献]

1. Bertelsmann, F.W. and Smit, L.M.E., Clin. Neurol. Neurosurg. (1985) 87: 123-126.
2. Hineno, T., Mizobuchi, M.et al. Brain Res. (1992) 580: 92-99.
3. Hoehn, M.M. and Yahr, M.D. Neurology (1967) 17: 427-442.
4. Indo, T. and Takahashi, A. et al. Headache (1987) 27: 151-154.
5. Lees, A. Eur. Neurol. (suppl 1) (1987) 27: 126-134.
6. Mizobuchi, M. Hineno, T., et al. Brain Res. (1993) 612: 319-321.

表1、パーキンソン病患者と対照健常者の年齢、性と尿量
D; 日中の尿量 (ml) N; 夜間の尿量 (ml), 平均±S.E.M.

Case	Age	Sex	Number of samples	D	N	D/D+N	N/D+N
Parkinson's patients							
1	66	F	(11)	523 ± 50	599 ± 72	0.48 ± 0.04	0.52 ± 0.04
2	59	M	(24)	348 ± 36	957 ± 51	0.27 ± 0.02	0.73 ± 0.02
3	53	F	(5)	1136 ± 60	734 ± 51	0.61 ± 0.0	0.39 ± 0.03
4	52	F	(5)	890 ± 106	932 ± 103	0.49 ± 0.05	0.51 ± 0.05
5	61	F	(5)	584 ± 64	676 ± 56	0.47 ± 0.02	0.53 ± 0.02
6	70	M	(16)	469 ± 28	536 ± 29	0.46 ± 0.02	0.54 ± 0.02
7	69	M	(2)	232 ± 5	648 ± 96	0.27 ± 0.04	0.73 ± 0.04
8	78	F	(4)	502 ± 39	299 ± 40	0.63 ± 0.05	0.37 ± 0.05
9	82	M	(3)	226 ± 31	295 ± 4	0.43 ± 0.03	0.57 ± 0.03
10	78	M	(3)	277 ± 23	322 ± 12	0.46 ± 0.02	0.54 ± 0.02
11	59	F	(5)	880 ± 57	569 ± 53	0.61 ± 0.02	0.39 ± 0.02
12	59	M	(5)	504 ± 85	820 ± 124	0.38 ± 0.04	0.62 ± 0.04
13	68	F	(5)	790 ± 95	970 ± 107	0.45 ± 0.04	0.55 ± 0.04
14	57	M	(5)	760 ± 49	816 ± 64	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.02
15	60	F	(5)	830 ± 73	1279 ± 95	0.40 ± 0.03	0.61 ± 0.03
16	67	M	(5)	680 ± 65	636 ± 70	0.52 ± 0.01	0.48 ± 0.01
Total mean 65±2			(108)	563 ± 26	737 ± 29	0.43 ± 0.01	0.57 ± 0.01
Control subjects							
1	43	M	(3)	657 ± 28	313 ± 1	0.68 ± 0.01	0.32 ± 0.01
2	56	F	(5)	933 ± 129	670 ± 54	0.58 ± 0.02	0.42 ± 0.02
3	67	M	(3)	558 ± 36	541 ± 49	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.04
4	53	M	(1)	900	320	0.74	0.26
5	53	F	(5)	1028 ± 199	960 ± 101	0.50 ± 0.05	0.50 ± 0.05
6	67	M	(1)	770	180	0.81	0.19
7	83	F	(4)	846 ± 36	470 ± 35	0.64 ± 0.02	0.36 ± 0.02
8	84	F	(3)	859 ± 84	532 ± 35	0.62 ± 0.03	0.38 ± 0.03
9	71	F	(3)	987 ± 161	660 ± 31	0.59 ± 0	0.41 ± 0.03
10	68	M	(5)	850 ± 97	569 ± 58	0.60 ± 0.0	0.40 ± 0.01
11	83	F	(4)	1006 ± 90	693 ± 32	0.59 ± 0.01	0.41 ± 0.01
12	78	F	(4)	851 ± 30	518 ± 37	0.63 ± 0.01	0.38 ± 0.01
13	67	M	(4)	944 ± 31	563 ± 93	0.63 ± 0.04	0.37 ± 0.04
14	73	M	(4)	907 ± 83	531 ± 40	0.63 ± 0.02	0.37 ± 0.02
15	65	M	(4)	819 ± 58	693 ± 83	0.55 ± 0.02	0.46 ± 0.02
Total mean 67±3			(53)	876 ± 32	598 ± 27	0.60 ± 0.01	0.40 ± 0.01

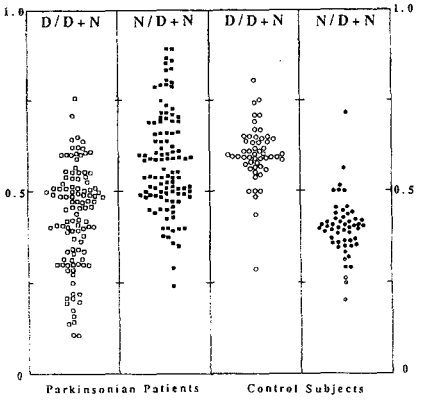


図1、パーキンソン病患者と対照健常者のそれぞれのD/D+NとN/D+Nを一日毎に点で表した

表2、パーキンソン病の重症度と罹病期間および使用した抗パーキンソン病薬

100 mg L-DOPA と 10 mg carbidopaは500 mg L-DOPA と換算した。平均±S.E.M.

Case	Hoehn & Yahr grade	Duration of disease (year)	Drug Therapy (mg) L-dopa	Amantadine	Trihexyphenidyl	Bromocriptine	Others
1	4	11	3000	200	6	0	0
2	4	7	500	0	0	0	0
3	4	16	2000	200	6	7.5	0
4	2	7	2000	0	6	0	0
5	2	5	1500	100	12	0	0
6	4	6	0	200	0	0	0
7	4	2	1500	100	0	0	400 Droxidopa
8	2	2	0	100	6	0	0
9	4	3	1500	0	0	0	0
10	4	11	0	150	0	0	0
11	4	4	3000	200	0	7.5	0
12	4	11	2100	150	12	0	6 Biperiden
13	2	12	1500	100	8	0	0
14	3	7	1500	0	6	0	0
15	4	7	1500	200	4	10	6 Biperiden
16	3	12	1500	200	12	10	0
Average	3.3±0.3	7.7±1.0	1440±230	120±20	4.9±1.1		

252 新規セロトニン1A受容体作用薬MKC-242の性質

吉川 崇，松田敏夫，田熊一浩，鈴木 眞
江川三生[*1]，戸部昭広[*2]，馬場明道
(大阪大学・薬学部・薬理，三菱化成・医薬第1研[*1]，臨床開発センター[*2])

〔要約〕

新規化合物5-[3-{(2S)-(1,4-Benzodioxan-2-ylmethyl)amino}propoxy]-1,3-benzodioxol hydrochloride(MKC-242)のセロトニン(5-HT)神経系に対する作用をマウス、ラットで検討した。ラット膜標品を用いたin vitro 受容体結合実験においてMKC-242は5-HT_{1A}受容体に対して選択的に高い親和性を示した(8-OH-DPAT結合:Ki=0.12nM)。MKC-242は、代表的5-HT_{1A}受容体アゴニスト8-OH-DPATと同様に海馬膜標品フォルスコリン感受性アデニル酸シクラーゼ(AC)活性を抑制した。MKC-242の投与により、ラット、マウスにおいて体温下降作用、血清コルチコステロン量増加作用が認められた。MKC-242は、ラット脳各部位の5-hydroxy-indoleacetic acid(5-HIAA)量を有意に減少させた。In vivo マイクロダイアリシスにおいて、MKC-242皮下投与による5-HT遊離抑制作用が認められた。これらの結果は、MKC-242が選択的に5-HT_{1A}受容体に結合し5-HT_{1A}受容体アゴニストとして作用する事を示している。

【目的】

薬理学的、分子生物学的手法により多くの5-HT受容体サブタイプの存在が明らかにされている。その中の5-HT_{1A}受容体は、その作用薬のいくつかが抗うつ作用、抗不安作用を有することで注目されている(1)。5-HT_{1A}受容体の選択的アゴニストとして知られる8-OH-DPATは、in vivoにおいて体温下降作用、視床下部-下垂体-副腎系活性化作用を有しており、また5-HT代謝回転の低下を引き起こし5-HT神経系に対して負のフィードバックをかけること、アデニル酸シクラーゼと負にカップリングしていること等が報告されている(1)。我々は、5-HT_{1A}受容体の精神機能への関与を追求する目的で新しい5-HT_{1A}受容体作用薬の開発を行っており、またそれらの薬理作用発現における性ホルモンの関与を報告している(2-6)。今回は、5-HT_{1A}受容体に対して高い親和性を持つ新規化合物MKC-242を見いだしたので、その神経薬理学的性質について報告する。

【方法】

実験にはウイスター系雄性ラット（200-350g）、ddY系雄性マウス（20-40g）を用いた。各種受容体結合実験、AC活性測定、脳内アミン及びその代謝産物量の測定、血清コルチコステロン量の測定、直腸体温の測定は既報の方法に従っておこなった(2)。In vivo マイクロダイアリシスは、ラットにペントバルビタール(50mg/kg,i.p.)麻酔下でガイドカニューラを埋め込み、3日後に透析プローブを線条体にセットして無拘束下で行った。5-HT再取り込み阻害薬であるシタロプラム 1μM を含むリンゲル液で灌流し、灌流液中の5-HT遊離の測定はECD-HPLC法を用いて行った。

【結果】

(1) In vitro における各種リガンドの受容体結合に対するMKC-242の作用を表1に示す。本薬物は、ラット脳膜標品5-HT_{1A}受容体に対して高い親和性を示しており、その親和性は5-$HT_{1-non-A}$, 5-HT_2, 5-HTトランスポーター, ベンゾジアゼピン, ドーパミンD_2, α_2アドレナリン認識部位よりもはるかに高いものであった。なお、MKC-242には立体異性体が存在し、R体の5-HT_{1A}受容体に対する親和性はS体(MKC-242)に比べて有意に低かった(IC_{50}, S: 0.390 ± 0.089 nM, R: 6.30 ± 1.38 nM)。**(2)** MKC-242はフォルスコリン(10μM)で刺激した海馬膜標品アデニル酸シクラーゼ活性を、濃度依存的に抑制した(10^{-9}～10^{-8}M)。**(3)** MKC-242(0.5mg/kg)皮下投与1時間はラット脳各部位での5-HT代謝回転の低下を引き起こした(図1)。この作用は投与後30分から認められ240分では認められないものであり、また濃度依存的でもあった。同様な作用はマウスにおいても認められた。**(4)** MKC-242皮下投与によりラット体温下降及び、血清コルチコステロン量の増加が認められた。同様な作用はマウスにおいても認められた。**(5)** MKC-242の皮下投与により、ラット線条体における5-HT遊離の抑制が認められた。

【考察】

In vitro受容体結合実験においてMKC-242は、5-HT_{1A}受容体に対して高い親和性と選択性を示した。 また、本化合物はフォルスコリン感受性AC活性を抑制した。これらのことは、本化合物が5-HT_{1A}受容体にアゴニストとして働くことを示している。5-HT_{1A}受容体はシナプス前、後に存在しており前者の活性化は5-HT神経における5-HTの生合成およびその神経終末からの遊離を抑制していると考えられている。MKC-242の皮下投与によって脳における5-HT代謝回転の抑制及び細胞外5-HT遊離の抑制が示されたことは in vivo において本化合物がシナプス前5-HT_{1A}受容体にアゴニストとして働いていることを示唆する。一方、MKC-242はシナプス後5-HT_{1A}受容体活性化の指標として考えられている体温下降作用を有しており、in vivo においてシナプス後5-HT_{1A}受容体にもアゴニストとして作用していると考えられる。5-HT_{1A}作用薬の抗うつ作用、抗不安作用の発現機構に関しては、シナプス後5-HT_{1A}受容体の重要性を示唆する報告がみられるが、未だその詳細は不明である。我々は、MKC-242が動物実験において抗うつ作用、抗不安作用を有していることを認めており（未発表）、本化合物は中枢5-HT_{1A}受容体の機能的役割を追求するのに有用であると考えられる。

Table 1 .Affinity of MKC-242 for central neurotransmitter recognition sites.

Binding sites	membrane preparation	Ligand dose (nM)	Ligand	IC_{50}
5-HT_{1A}	Hippocampus	0.2	[^{3}H]8-OH-DPAT	0.390 ± 0.089 [nM]
5-$HT_{1\text{-non-A}}$	Hippocampus	2	[^{3}H]5-HT	> 1 μM
5-HT_2	Cortex	0.25	[^{3}H]spiperone	299.4 ± 17.0 [nM]
5-HT transporter	Cortex	0.05	[^{3}H]paroxetine	430.3 ± 23.7 [nM]
α_2	Whole brain	0.4	[^{3}H]clonidine	995 ± 64 [nM]
D_2	Striatum	0.25	[^{3}H]spiperone	1090 ± 147 [nM]
Benzodiazepin	Cortex	2	[^{3}H]diazepam	> 1 μM

Results are means of four to six experiments.

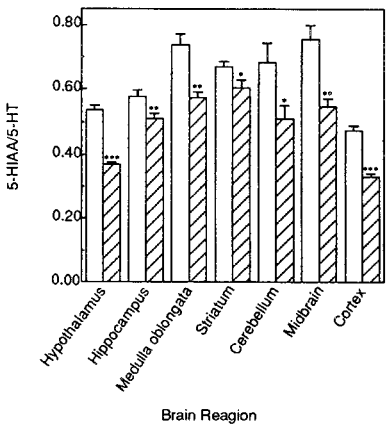


Figure 1. Effect of MKC-242 on brain 5-HT turnover.
Results are means of five to nineteen experiments.

□ 0.5%CMC ☑ BP-860(S) (0.5mg/kg,S.C.)

• p<0.05 , •• p<0.01 , ••• p<0.001 vs. 0.5%CMC.

【文献】

(1) Azmitia, P. M. W. and Peroutka, A. J.(Edit), Ann. N. Y. Sci. 600(1990).

(2) Matsuda, T., Seong, Y. H., Aono, H., Kanda, T., Baba, A.,Saito, K., Tobe, A. and Iwata, H., Eur. J. Pharmacol. 170, 75-82(1989).

(3) Matsuda, T., Kanda, T., Seong, Y. H., Baba, A. and Iwata, H., Eur. J. Pharmacol. 181, 295-297(1990).

(4) Matsuda, T., Nakano, Y., Kanda, T., Iwata, H.and Baba, A., Eur. J. Pharmacol. 200, 299-304(1991).

(5) Matsuda, T., Nakano, Y., Kanda, T., Iwata, H.and Baba, A., Life Sci. 48, 1627-1632(1991).

(6) Nakano, Y., Matsuda, T., Takuma, K., Yoshikawa, T. and Baba, A., Eur. J. Pharmacol. 219, 339-341 (1992).

253 ヒト脳腫瘍の近赤外励起フーリエ変換ラマン分光スペクトル

水野有武、北島具秀*、尾崎幸洋**
(慈恵医大・医化学、脳外科*、関西学院・理学・化学**)

「要約」
外科的に摘出したヒトの脳腫瘍組織を組織のまま非破壊的に近赤外励起フーリエ変換 (NIR-FT)ラマン分光法を用いてラマンスペクトルを測定した。用いた組織は浮腫をともなった正常の大脳皮質と白質、glioma grade II と grade III、二つの neurinoma 、そして neurocytoma である。ヒトの正常皮質と白質のスペクトルは以前に報告したラットのスペクトルに似ていた。(1) glioma と neurinoma は本質的には皮質のスペクトルに似ていた。glioma grade III のスペクトルでは PAS 染色陽性の細胞外多糖類によると思われる特異的なバンドが 856 cm^{-1} に認められた。neurinoma の一つだけに carotinoid のバンドが 1157 と 1524 cm^{-1} に認められた。neurocytoma では 960 cm^{-1} に石灰化を示す強いバンドを認めた。

「目的」
従来からの分散型のラマン分光器による脳のような生体組織からのラマンスペクトル測定は、生体、とくに加齢や病的組織に多い蛍光、弱いラマン散乱、励起光による組織の破壊などで非常に困難であった。それらの不利の点は NIR-FT ラマン分光法を用いることで、ほぼ解決したことは以前報告した。[1)] NIR-FT ラマン分光は Nd-YAG レーザー光を励起光とすることで生体に多い蛍光の妨害を少なくし、さらにフーリエ変換することによりスペクトルの精度を上げている。この FTラマン分光法をヒトの正常脳組織と脳腫瘍のような異常組織に応用した。そしてスペクトルを解析して、正常での部位別の組織の違いや異常組織の違いを区別でき、その特性を捉えることが出来れば、非破壊的に腫瘍の範囲や属性を知ることができ、将来の臨床応用へも繋げられることになる。

「方法」
外科的に摘出した脳、または腫瘍組織は上面すれすれにメヂウムの入ったガラスセルにいれレーザー光を真上から照射し 180° のラマン散乱光を楕円ミラーで分光器に導く。用いた脳組織は、脳腫瘍周囲の浮腫をともなった正常脳組織としての頭頂葉の皮質と白質、glioma grade II とgrade III 、二つの neurinoma そして脈絡膜叢の neurocytoma である。用いたラNラマン分光器は JEOL JRS-FT 6500N である。レーザーは CW Nd-YAG レーザー発振器で 1064 nm の光を用いた。 試料表面でのレーザー光は 200-300 mw であった。検出器として InGaAs 検出器を用いた。

「結果と考案」
浮腫をともなった正常の皮質と白質のスペクトルは共通にバンドが多く見られた。ラットの実験的脳浮腫のラマンスペクトル測定で 400-2940 cm^{-1} の範囲では正常とに大きな差はなかった。1439 と 1659 cm^{-1} のバンドの比は蛋白と脂質の比を表しており、皮質と白質を区別するマーカーとなる。アミド I と III の位置から蛋白質の多くはアルファヘリックス構造であることが分かる。さらに脂肪酸鎖の長さと trans-gauche 構成比に両者余り差がない。図 1 にglioma grade III のスペクトルを示す。glioma grade II のスペクトルは基本的には皮質のそれに近く、組織的にも定型的な glioma であった。 glioma grade III は非定型的で PAS 染色で良く染まる多糖類と思われる細胞外物質を多く含んでいた。それによるバンドは 856 cm^{-1} に比較的大きなバンドとして現われた。そのほか、アミド I の 1659 cm^{-1}, アミド III の 1245 cm^{-1} にあることから蛋白質の多くはアルファヘリックスからランダムコイルに変化しており、脂質の脂肪酸鎖は 1130 と 1068 cm^{-1} のバンドの相対比から trans 型が多くなり、脂肪の流動性はかなり落ちていると推察された。

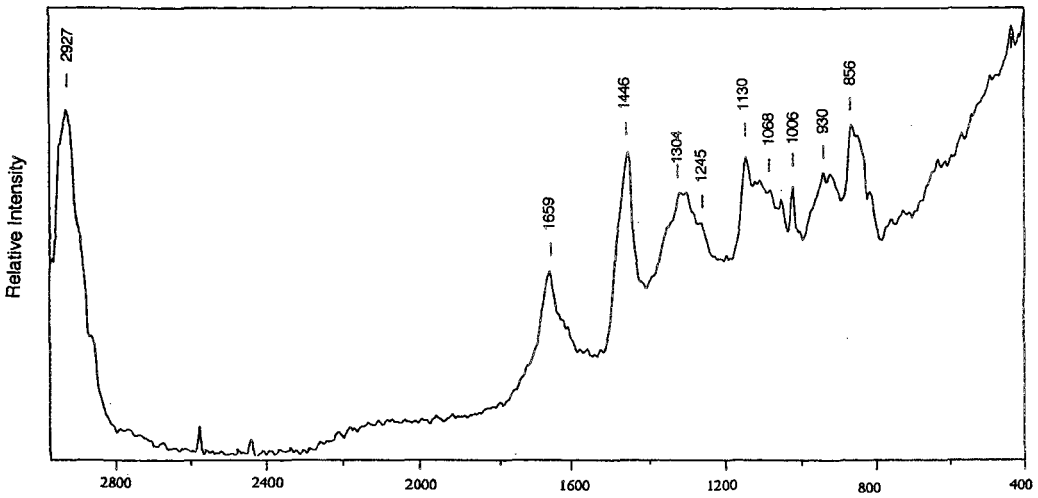


図1．glioma grade III のNIR-FTラマンスペクトル、患者は43才女性

neurinoma の二つは組織学的に Schwannoma と診断された。その一つにだけ carotinoids のバンド 1524, 1157, 1006 と956 cm^{-1} が観察された。carotenoids は共鳴ラマン効果で大きなバンドとなるが、近赤外光の励起では共鳴効果は少ない。組織学的におなじでも、一方だけにかなりの含量の carotinoids が蓄積される原因の究明は興味あることである。

neurocytoma は石灰化しやすく 960 cm^{-1} のシャープなバンドが観察された。これはハイドロオキシアパタイトのバンドと一致する。

このようにNIR-FTラマン分光法によりクリアーなスペクトルを脳組織、脳腫瘍組織から測定できた。そして脳腫瘍の種類によりスペクトルは基本的には皮質に似たり、白質に似ていることが推定できる。そして同じ種類の腫瘍でもグレードが違ったりすると特異的なバンドを捉えることができた。さらに neurinoma のように組織学的に同じでも carotinoids のような特異的なバンドで特性を区別ができる。また石灰化などは強いバンドを出すので容易にモニターでき、将来の臨床応用するとき、その範囲などを、たとえば手術中に知ることができるマーカーとなりうる。さらに非破壊的に測定しているので、組織の構造を分子レベルで解析できることを示した。

文献

(1) A. Mizuno, T. Hayashi, K. Tashibu, S. Muraishi, K. Kawauchi, and Y. Ozaki: Near-infrared FT-Raman spectra of the rat brain tissues, Neurosci. Lett. 141, 47-52 (1992)

著者　北島具秀　水野有武　尾崎幸洋

254 抗うつ薬長期投与および電気けいれん処置のラット脳チューブリン重合に対する作用

宮本聖也，朝倉幹雄，中西純一，塚本 徹，今福 淳，佐藤厚子，西崎 純，松井宏晃，伊野美幸，長田賢一，足立 淳，長谷川 浩，長谷川和夫　（聖マリアンナ医科大学・神経精神科学教室）

〔要約〕

抗うつ薬と電気けいれん処置（ＥＣＴ）に共通の作用機序は未だ明らかではない．最近，我々は三環系および四環系抗うつ薬長期投与とＥＣＴ反復処置後のラット大脳皮質可溶性画分で，αβチューブリンモノクローナル抗体の免疫反応性が増加することを見い出した．これより抗うつ薬長期投与とＥＣＴ処置後チューブリンの重合が抑制される可能性が示唆された．そこで各種抗うつ薬とＥＣＴの単回および長期処置後のラット大脳皮質可溶性画分の350 nmにおける吸光度よりチューブリンの重合を経時的に測定した．その結果イミプラミン(IMI)急性投与後チューブリンの重合の初速度は増加したが最大重合は変化しなかった．一方，IMI，シタロプラム 7～14日間投与後はいずれもチューブリン重合の初速度を減少したが最大重合は変化しなかった．しかしミアンセリンでは初速度と最大重合ともに減少した．ＥＣＴ単回処置は初速度は減少したが最大重合に影響されなかった．ＥＣＴ反復処置7日間後は初速度と最大重合ともに抑制された．In vitroで 20～500μM IMIはチューブリンの重合初速度に影響しないが高濃度で非特異的凝集反応を促進した．サイクリックAMP (cAMP)(10μM)はチューブリンの重合の初速度と最大重合を著明に抑制した．cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)阻害薬IP_{20}-amideは初速度と最大重合を著明に増加した．以上より抗うつ薬長期投与とＥＣＴ処置に共通して見られるチューブリンの重合抑制は抗うつ効果と関連する可能性が示唆された．

〔緒言〕

抗うつ薬長期投与後や反復電気けいれん処置（ＥＣＴ）後のラット脳におけるβアドレナリン受容体の減少，ノルアドレナリン (NE)によるアデニル酸シクラーゼ活性低下，セロトニン (5-HT)によるイノシトールリン脂質代謝回転の低下などが報告されているが一部の非定型抗うつ薬では認められない．また5-HT_2受容体は抗うつ薬投与により減少しＥＣＴで増加すると報告されている．現在，非定型抗うつ薬を含むすべての抗うつ薬とＥＣＴに共通した作用機序は明らかでない．さらに受容体情報伝達系の二次メッセンジャー以後の蛋白質リン酸化反応に関する報告は極めて少ない．我々はうつ病の発症機構や抗うつ薬およびＥＣＴの作用機序を『脳の可塑性』として捉え，蛋白質リン酸化反応の生理学的役割に焦点を当てた．Perezら[2]はデシプラミン長期投与後，微小管関連蛋白質Ⅱ(MAP2)のリン酸化の増加を報告しているがその機能的役割には明らかにしていない．微小管関連蛋白質であるMAP2やτ因子はチューブリンを重合して微小管を形成するが，サイクリックAMP (cAMP)依存性プロテインキナーゼ(PKA)，Ca^{2+}・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ，Ca^{2+}・リン脂質依存性キナーゼの基質となってリン酸化されるとチューブリンの重合を抑制する．最近，大脳皮質と海馬の可溶性画分と沈渣画分でαチューブリンモノクローナル抗体の免疫反応性を対照群と比較したところIMI急性投与後沈渣画分で増加し，IMI，MIA 7～21日間投与後は可溶性画分のチューブリンの免疫反応性が増加し，この変化はcAMP依存性リン酸化反応で増強することを報告した[1]．またＥＣＴ反復処置後も可溶性画分のαチューブリンの免疫反応性が有意に増加した．そこで，抗うつ薬投与やＥＣＴ処置後，ラット大脳皮質のチューブリンの重合は抑制され，その機序としてMAP2やτ因子のリン酸化が関与する可能性が示唆された．そこで本研究では抗うつ薬とＥＣＴ処置後のMAP2の機能を知るために，チューブリン重合に対する両処置の作用を比較検討しその機序を考察した．

〔方法〕

1．実験動物と薬物処置およびＥＣＴ処置

動物はウィスター系雄性ラットを使用した。イミプラミン(IMI) 20 mg/kg/日，ミアンセリン (MIA)とシタロプラム (CTR)は 30 mg/kg/日を，3～21日間皮下注射し最終投与の24時間後，あるいは背部皮下より浸透圧ポンプを用いて持続投与し断頭した．急性投与は IMI 20 mg/kg腹腔内注射後 1～2時間後に屠殺した．ＥＣＴ処置は無麻酔下で両耳電極より100 mA，1秒間，1日1回3～21日間反復処置し最終処置24時間後あるいは単回処置1時間後に断頭し大脳皮質と海馬を摘出した．

2．大脳皮質チューブリン重合実験

大脳皮質は同容量の100 mM PIPES-NaOH buffer pH 6.9，4°C(1 mM EGTA，1 mM EDTA，1 mM β-mercaptoethanolを含む）中でホモジナイズ後，氷中に1時間静置後，100,000×g，4°C，1時間遠心分離し可溶性画分を得た．蛋白量14～18 mg/mlの試料は終濃度1 mMの$MgSO_4$を加えた後，37°Cでインキュベートし分光光度計による350 nmにおける吸光度から濁度を測定しチューブリン重合の経時的変化を調べた．

〔結果〕

IMI急性投与後チューブリン重合の初速度を増加したが最大重合に影響しなかった (Fig. 1a)．一方，IMI 7日間投与後は初速度は減少し最大重合は変わらなかった．CTR 7日間投与後わずかに初速度を減少したが最大重合は変わらなかった(Fig. 2b)．MIAは重合の初速度と最大重合をともに減少した (Fig. 2a)．ＥＣＴ単回処置はチューブリン重合の初速度を軽度減少した(Fig. 3a)．ＥＣＴ 7日間反復処置後は初速度と最大重合は著明に抑制された (Fig. 3b)．In vitroで10μM cAMPは重合の初速度と最大重合を著明に抑制し，PKA阻害薬IP_{20}-amide 200 nM は初速度と最大重合を著しく増加した．In vitroにおける IMI (20，100，500μM)の重合に対する直接作用を調べた所，重合初速度には影響せず非特異的凝集を増加した（結果は示していない）．

〔考 察〕

抗うつ薬の長期投与とＥＣＴ単回および反復処置がラット脳の微小管重合を抑制した．IMIは急性投与と長期投与でチューブリン重合速度に背反する作用を示した．急性IMI投与後初速度が増加した理由は明らかではないが内在性GTPの量的変化も考えられる．抗うつ薬長期投与の重合初速度抑制の機序については今後の課題であるが，in vitroにおけるcAMPとIP_{20}-amideの作用からPKAの活性化あるいはMAP2のリン酸化が増加していた可能性もある．長期投与後の初速度の抑制作用はMIA，IMIは強いがCTRは弱いのでNEが関与する可能性もあろう．ＥＣＴ単回処置が反復処置同様重合を抑制することはＥＣＴの臨床的抗うつ効果の速効性を示すものかもしれない．抗うつ薬長期投与およびＥＣＴ処置後に共通して見られるチューブリンの重合抑制作用が抗うつ効果と関連する可能性が示唆された．

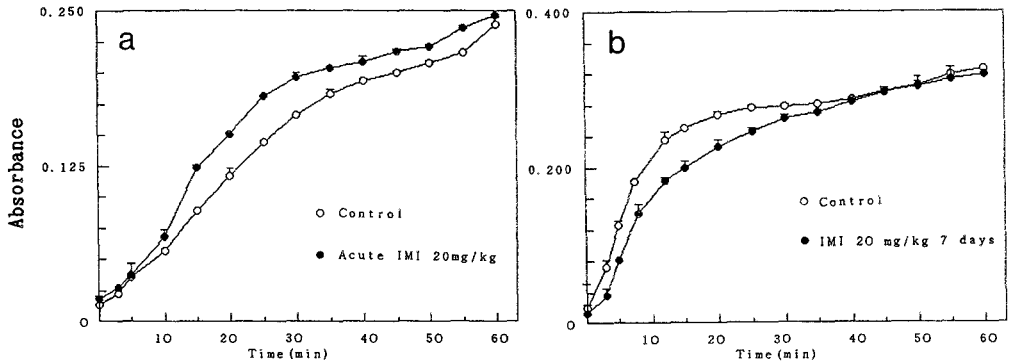


Fig. 1. イミプラミン(IMI)の急性投与(a)と長期投与(b)のチューブリン重合に対する作用

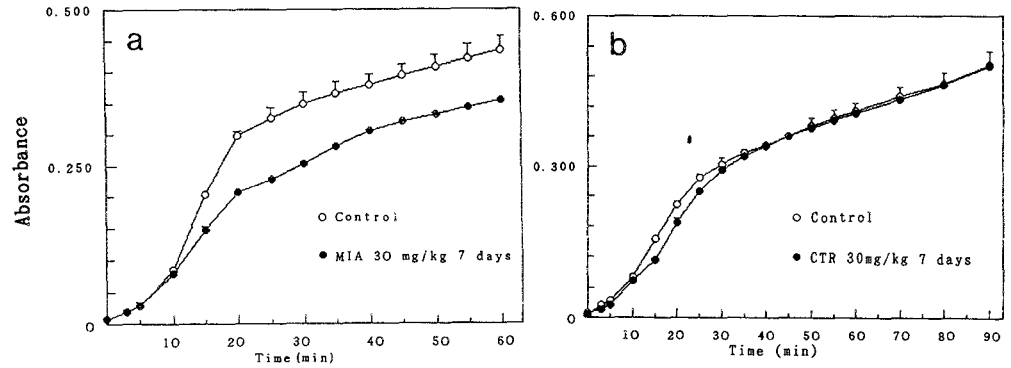


Fig. 2 ミアンセリン(MIA)およびシタロプラム(CTR)長期投与のチューブリン重合に対する作用

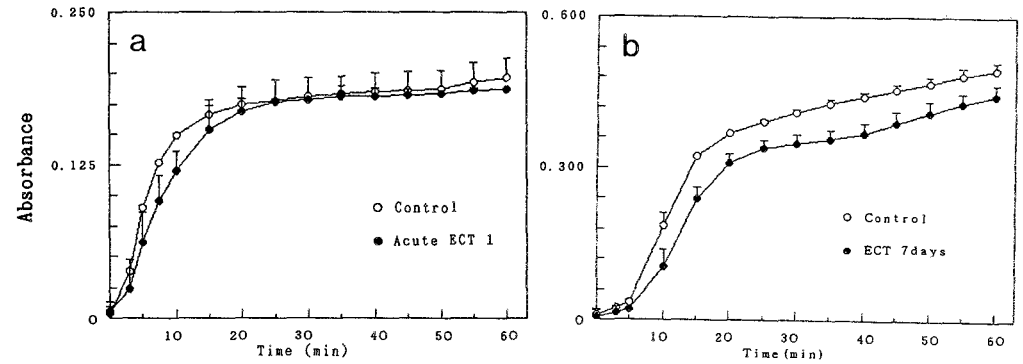


Fig. 3 ＥＣＴ単回処置(a)とＥＣＴ反復処置(b)のチューブリン重合に対する作用

〔文 献〕

1. 宮本聖也，朝倉幹雄，中西純一，他 (1993)，平成４年度厚生省神経疾患委託研究費報告書
2. Perez, J., Tinelli, D., Brunello, N. et al. (1989), Eur. J. Pharmacol. Molec. Pharmacol. Sec. 172:305-316.

255 運動ニューロン病の基底核病変 ―組織化学的検討

長谷川一子
北里大学東病院神経内科

〔要約〕

神経病理学的に基底核病変を認めるMND症例9症例について，免疫組織学的検討を行なった．通常の神経病理学的検討により黒質のみに病変を認める群6例，黒質-淡蒼球-ルイ体病変を認める群3例は，抗GFAP抗体染色によれば連続性の病変である可能性が示唆された．また，基底核系病変を伴う群について，抗メト・エンケファリン抗体，抗サブスタンスP抗体で免疫染色してみると，これらの神経伝達物質には明かな減少はなかった．この事実は，これらの群が神経病理学的所見を有するに関わらず，臨床的に錐体外路症候を示さない事に関連している可能性が示唆された．

＜緒言＞

基底核病変を伴う非典型的運動ニューロン病（MND）の存在に注目し報告してきている[1)2)]．基底核病変を有するMND群では黒質のみならず淡蒼球，ルイ体も障害されるが，錐体外路症候を呈さない．この点に注目し，同部位に免疫組織学的検討を加え，神経伝達物質からみたMNDにおける基底核病変について検討した．

＜対象および方法＞

対象：対象は臨床的および電気生理学的にMNDと診断した16剖検例（男性10例，女性6例）で，病型は狭義の筋萎縮性側索硬化症14例，進行性脊髄性筋萎縮症2例．なお，今回対象としたMND症例には錐体外路症状や痴呆を伴う非典型的な臨床像を呈した症例は含まれず，死因の多くは呼吸不全，感染症であった。

対照は神経学的所見を認めなかったベーチエット病症例，肝癌症例，高齢老人症例の剖検脳とした。

方法：神経病理学的なMNDの診断は脊髄前角細胞，および舌下神経核神経細胞の脱落と錐体路変性の存在によった．黒質，淡蒼球，ルイ体病変の有無は同部の神経細胞の変性脱落，グリオーシスの有無により判定した．これらの病変の有無により，黒質病変群，黒質-淡蒼球-ルイ体病変群，異常なし群の3群に分類した．

免疫組織学的検討はパラフィン包埋切片について，1次抗体を抗メト・エンケファリン抗体：M（和光純薬），抗サブスタンスP抗体：P（アマシャム），抗GFAP抗体：G（ニチレイ）として行った．ブロッキング剤はブロックエースTM（雪印乳業），染色はヒストファインSAB-PO（R）キット（ニチレイ）を用い，ABC法により染色した．免疫染色後，1次抗体に陽性に染色される黒質，淡蒼球，ルイ体の神経細胞および神経線維について染色性を検討した．

＜結果＞

1．MNDにおける基底核病変の頻度

神経病理学的検討から自験MND16症例は基底核病変あり群9症例（56.3%），基底核病変なし群7症例（43.7%）に分類できた．基底核病変あり群はさらに黒質病変群6症例（37.5%），黒質-淡蒼球-ルイ体病変群3症例（18.8%）に分けられた．

2．基底核の免疫染色結果

1）正常対照群

免疫組織学染色では淡蒼球外節がMで濃染し，一方淡蒼球内節はPで濃染し[3)]．また，黒質では両者により黒質緻密部，網様部双方が染色された．

2）黒質-淡蒼球-ルイ体病変群

Pによる染色では全例とも正常対照群に比較して淡蒼球内節および黒質ともに濃染した．一方，Mでは染色性は様々で一定の傾向は得られなかった．黒質では3症例全例と

もPでは濃染したが，Mでは染色されなかった．また，淡蒼球，黒質はGでよく染色され，グリオーシスの存在が明かであった．ルイ体ではM，P両者共に染色される神経線維密度が高かった．また，同部位のグリオーシスの存在も確認できた（図1-a-d）．

3）黒質病変群

M，Pによる染色は対照群と同様の症例が2症例，黒質-淡蒼球-ルイ体病変群と同様の症例が2症例，Pの染色度は対照群と同様であるものの，Mで染色されない例が2症例と様々であった．Gで染色すると淡蒼球と黒質は双方ともに全例で染色され，通常の染色では明かではないものの，線維性グリオーシスが生じていることが示された。

4）基底核病変なし群

免疫染色での染色結果は対照群と同様であった。

＜考案＞

MNDの基底核病変，特に黒質病変を伴うMNDは56．3％と頻度が高かった．免疫組織化学的検討結果からはGでの染色結果からみて，通常の病理組織上では黒質病変のみを認める群は黒質-淡蒼球-ルイ体病変を有するMNDと連続性のある病変である可能性が推定出来た．一方，通常の病理学的検討で基底核系に異常を認めない群では，G染色を試みても，正常対照群と差異はなかった．よって，基底核系を障害する群と，基底核系が障害を免れる群とはMNDにおけるサブグループを成している可能性が示唆された。

今回検討した神経伝達物質はPとMのみであったが，基底核を障害するMND群で明かなP，M含有神経線維の減少は証明出来なかった．この事実は基底核病変を有するMND群で明かな錐体外路症状を認めない点の傍証ともいえる．しかし，基底核病変を認めるMND群では，同部位のグリオーシスを伴い，グリオーシスの存在はすなわち神経細胞の脱落の間接的証拠である．この障害されている神経系がどのような系統の神経系であるかを究明することを今後の課題としたい．

参考文献1）K.Hasegawa,H.Kowa,S.Yagishita:Extrapyramidal involvement in Motor Nueron Disease. J Neurol Sci 108:137,1992.

2）古和久幸，長谷川一子ら；運動ニューロン病の基底核病変について．厚生省神経変性疾患平成3年度報告書．1992.

3）RL.Albin,A.Reiner et al: Preferential loss of Striato External Pallidal Projection Neurons in Presymptomatic Huntington's Disease. Ann Neueol 31:425,1992.

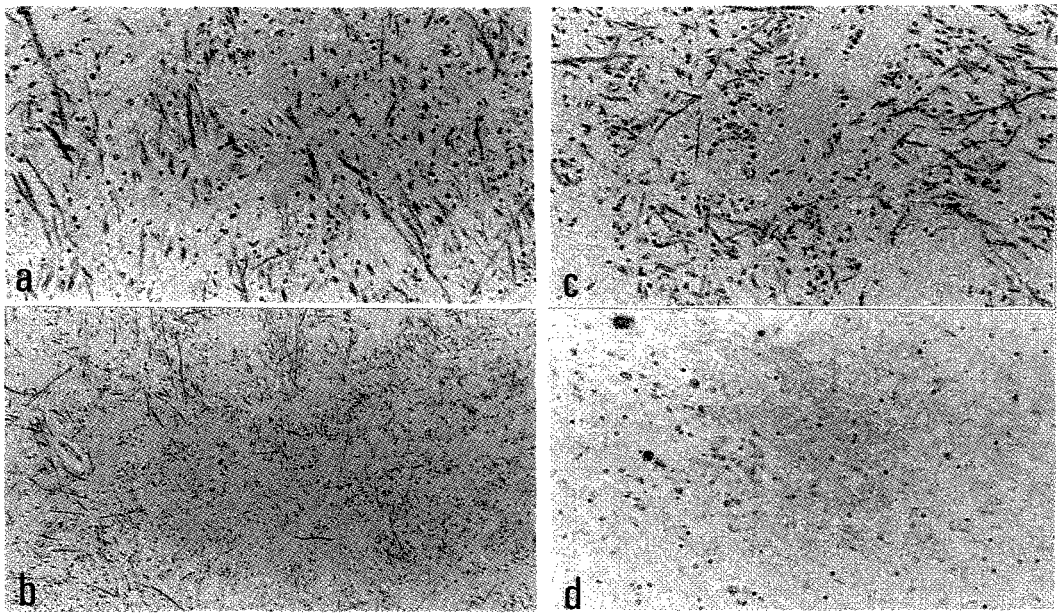


図1　サブスタンスPによる免疫染色結果．a：MND淡蒼球外節，b：正常対照淡蒼球外節，c：MND黒質，d：正常対照黒質（X50）

256 生体外から投与したニトロキシドラジカルの代謝に与えるイデベノンの影響について；L-バンド ＥＳＲ（電子スピン共鳴）法による研究

松本清治、横山秀克*、石田信一*、森則夫*、土橋宣昭**
針生ヶ丘病院、福島県立医科大学神経精神医学教室*、ＲＩ研究室**

〔要約〕
我々は、L-バンドESR(電子スピン共鳴)装置を開発し、これを小動物に適用してきた。そこでは、小動物にニトロキシドラジカルを投与し、その生体内における動態を観察した。そしてニトロキシドラジカルの半減期は小動物のラジカル消去能を評価するよい指標であることが確認された。さて、イデベノン（アバン®）は脳梗塞後遺症、脳出血後遺症、脳動脈硬化症の治療薬として広く臨床に用いられている。本研究では、イデベノン含有食で飼育したラットにニトロキシドラジカルを繰り返し投与した時、その半減期はどのように変化していくのかを調べた。ニトロキシドラジカルにはTEMPOLを用い、対照群のラットは標準食で飼育した。TEMPOLの初回投与時には、イデベノンで飼育したラットも対照群のラットもほぼ同じ半減期を示した。しかし、TEMPOLを反復投与すると対照群での半減期は徐々に延長していった。イデベノンを摂取させたラットではこのような半減期の延長は認められなかった。このことから、イデベノンは生体のラジカル消去能を強化することが示唆される。

我々はin vivo計測が可能なL-バンドESR(electron spin resonance;電子スピン共鳴)装置を開発し、ラットやマウスなどの小動物に適用してきた(1,2,3)。そして、3-carbamoyl-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-1-oxyl(CTPO)や4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl(TEMPOL)などのニトロキシドラジカルをラットに投与してESR信号を経時的に観測し、その減衰速度を半減期として表現すると、この半減期はニトロキシドラジカルの代謝を評価するうえでよい指標になることを明らかにした(1)。一方、イデベノンは脳梗塞後遺症、脳出血後遺症、脳動脈硬化症の治療に広く用いられているキノン系の薬物である。イデベノンはラジカル消去作用を有し、この作用が臨床効果の一部に関与していると考えられている(4)。本研究では、ラットにイデベノン含有食を与え、この動物にTEMPOLを反復投与してESR計測を行った。その結果に基づいて各投与毎のTEMPOLの半減期を求め、TEMPOLの代謝に与えるイデベノンの影響を調べた。

実験方法

実験動物にはウィスター系雄性ラットを用いた。これを対照群(C)(n=5)とイデベノン群(I)(n=12)の2群に分けた。I群をさらにI-2W群(n=6)とI-4W群(n=6)との2群に分けた。C群には13週齢になるまで標準食（日本クレア製のCE-2）を自由摂食させた。I-2W群の動物は11週齢まで標準食で飼育し、その後の2週間をイデベノン含有食で飼育した。I-4W群の動物は9週齢まで標準食で飼育し、その後の4週間をイデベノン含有食で飼育した。イデベノン含有食は標準食にイデベノンを添加して、飼料1kgあたり1.5gのイデベノンを含むように調整した。13週齢の時点で、全てのラットを以下に述べるESR計測に供した。

ESR計測には、内径41mm、軸長10mmのループギャップ共振器を取り付けたL-バンドESR装置を使用した。共振周波数は約700MHzであった。ペントバルビタール麻酔下(50mg/kg,i.p.)で、ラットの頭部を共振器内に固定した。生理食塩水に溶解した0.05MのTEMPOLを、66.7μmol/kg(1.33ml/kg)の用量でラットの尾静脈から投与した。図1に示すように、投与直後からTEMPOL由来の3本線のESR信号が観察された。図1には、2分間で低磁場側から磁場掃引した時のものが示されている。この間にもM=+1,M=0,M=-1のピークが順次減衰していく様子がわかる。そこで、本研究では、低磁場側（M=+1）の信号をノイズレベルになるまで繰り返しスキャンした。続いて、同量のTEMPOLを5分間隔で5回反復投与し、そのつど同様の計測を行った。

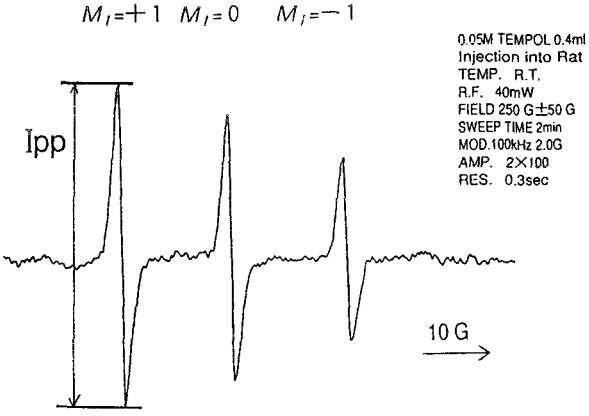


図1 ラット頭部で観測されたESR信号。2分間のスキャンの間にも信号強度は次第に減衰していく。

結果

TEMPOLの信号強度は時間の経過とともに減少し、投与後約3分でノイズレベルに達した。信号強度の対数を時間に対して片対数プロットすると直線関係が得られた(図2)。すなわち、TEMPOLの減衰は一次反応速度式にしたがっていることが示され、ここから半減期を求めた。TEMPOL初回投与時の半減期はC群、I-2W群、I-4W群のいずれでも約50秒であり、これらの群の間に有意差はなかった。しかし、図3に示すように、C群では投与回数の増加にともない半減期は徐々に延長していった。これに対し、I-2W群、I-4W群のいずれでも、TEMPOLの反復投与による明瞭な半減期の延長は認められなかった。このため、I-2W群やI-4W群における2回目以降のTEMPOLの半減期はC群のものより有意の低値を示した。

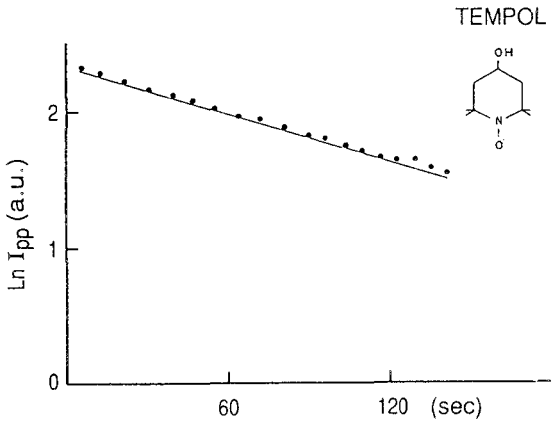


図2 横軸に経過時間、縦軸に信号強度の自然対数をプロットした。直線性を示している。

考察

本研究はTEMPOLの半減期を指標に、イデベノンで飼育されたラットのラジカル消去能を検討した。TEMPOLを初回に投与した時には、イデベノンで飼育されたラットでの半減期は標準食で飼育されたラットのそれと同様の値を示した。すなわち、TEMPOLの単回投与では、イデベノンの効果はTEMPOLの半減期には反映されなかった。一方、TEMPOLを反復投与すると、標準食で飼育されたラットでは、その半減期が延長していった。これに対し、イデベノンで飼育したラットでは、TEMPOLを反復投与しても半減期の延長は認められなかった。TEMPOLは生体内でヒドロキシルアミンに還元され、また腎臓からすみやかに排泄されることが知られている(5)。すなわち、TEMPOLの半減期に反映されている主な要素はTEMPOLの還元と排泄であると考えられ、従って、イデベノンは還元能力や排泄能力に影響を与えて生体のラジカル消去能力を強化することが示唆される。また、本研究の結果は、生体のラジカル消去能をその減衰速度から評価する場合、ラジカルの繰り返し投与が重要であることを示唆している。このことは、翻って、ラジカルを反復計測できるin vivo ESR装置の有用性を示している。

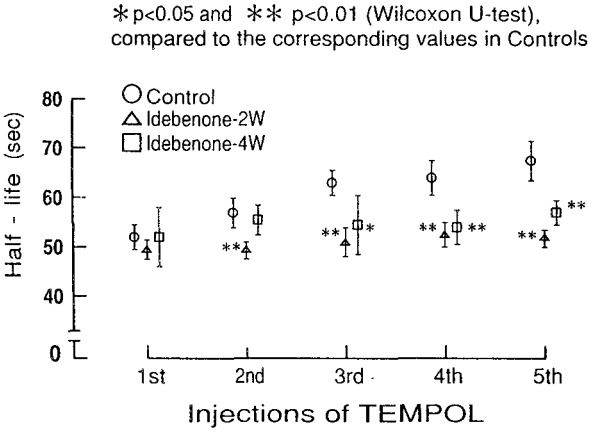


図3 横軸にTEMPOLの投与回数、縦軸に半減期をプロットした。対照群では投与回数の増加に伴い半減期が延長していった。イデベノン群(Idebenone-2W、Idebenone-4W)では半減期の延長は認められなかった。

謝辞

本研究は山形大学工学部尾形健明助教授を中心とするL-バンドESR装置開発チームとの共同研究によるものです。ここに記して謝意を表します。

文献

1.Ishida,S., et.al. (1989) Phys.Med.Biol.34,1317-1323

2.Ishida,S., et.al. (1990) Jpn.J.Magn.Reson.Med.10,21-27

3.Ishida,S., et.al. (1992) Magn.Reson.Imag.10,109-114

4.Suno,M. and Nagaoka,A. (1985) J.Takeda Res.Lab.44 No.1/2,30-33

5.William R.Couet,et.al. (1984) Pharm.Res.1,203-209

257 ウィスター系ラット臓器の血小板活性化因子（ＰＡＦ）の局在

－蛍光抗体法によるＰＡＦ染色の開発－

加藤僚子，平島　豊，遠藤俊郎，唐沢　健*，野島庄七*，高久　晃
（富山医薬大・医・脳神経外科，帝京大・薬・薬品物理化学*）

〔要約〕
血小板活性化因子（ＰＡＦ）を染色する蛍光抗体法を開発したので報告する。本法はポリクローナル兎抗ＰＡＦ抗体を用いて行った。ウィスター系ラットの脳、心、肺、肝および腎を染色したが、心、肺、腎でよく染色され、脳、肝では染色されなかった。また同時に各臓器のＰＡＦ量を測定した。

［目的］
ＰＡＦは虚血（７）、外傷後（２）またクモ膜下出血後の脳血管攣縮時（４）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。ＰＡＦの測定法に関してはこれまで生物学的（３）、放射免疫分析法（６）、およびＧＣ－ＭＳを用いた分析法（１）が報告されているが、免疫組織化学的な手法は知られていない。今回唐沢等（５）の方法によって得たポリクローナル抗ＰＡＦ抗体を用いて組織のＰＡＦ蛍光抗体法の開発を行った。

［方法］
雄ウィスターＬＷＨラット（250g）をケタミン（100mg/kg，i.m）で麻酔後、約100mmHgの圧で200mlの生食ついで300mlの４％パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。ＰＡＦ量測定は生食のみで灌流した臓器を用い、ただちにBligh and Dyer法で脂質を抽出した。ＰＡＦ染色は包埋後クライオスタットで5μmの切片を作成し、一次抗体として抗ＰＡＦＩｇＧを反応させ、洗浄後二次抗体としてＦＩＴＣ標識山羊抗ウサギＩｇＧ抗体を反応させた。洗浄後ＦＩＴＣ用フィルターを用いた蛍光顕微鏡で蛍光の局在を観察した。対照として一次抗体の代わりに正常ウサギのＩｇＧを用いた。また吸収試験は過剰なＰＡＦと反応させた後の抗ＰＡＦＩｇＧを用いて同様な染色を行った。またlecithin、lyso-lecithin、methoxyＰＡＦおよびＰＡＦを反応後にＰＡＦ染色を行い各々の染色を比較した。ＰＡＦは生物学的分析法（３）で定量した。

［結果］
対照、吸収試験では通常のＰＡＦ染色と較べ全く染色が得られなかった。吸収試験に関してはＰＡＦの溶媒として0.01%ゼラチン溶液を用いるとより効果的であった。脳、肝ではＰＡＦは染色されなかったが、心筋線維を囲む結合組織、肺胞間質および腎髄質の血管壁にＰＡＦが強く染色された（図１）。肺組織にＰＡＦを処置した後の染色ではＰＡＦの染色は付加的に増加したが、lecithin、lyso-lecithinおよびmethoxyＰＡＦでは変化は無かった。各臓器のＰＡＦ量の測定では腎臓が最も高い値を示した（表１）。

［考察］
ＰＡＦは多くの生物学的活性を有するchemical mediatorであるが、生理的な状態にあっても心、肺、腎等に局在することが今回の蛍光抗体法を用いた染色により明らかにされた。腎髄質降圧脂質（anti-hypertensive polar renomedullary lipid）として腎に存在する極性脂質がＰＡＦと同一物質である事が知られているが、今回のＰＡＦ染色、またＰＡＦの定量でも腎髄質にＰＡＦの存在が示された。また肺には他臓器に較べＰＡＦリセプターの分布が高い事も示唆された。

中枢神経系の種々病態にもＰＡＦの関与が知られており、今後今回の蛍光抗体法は生理状態、病態におけるＰＡＦの組織化学的研究に寄与するものと思われる。

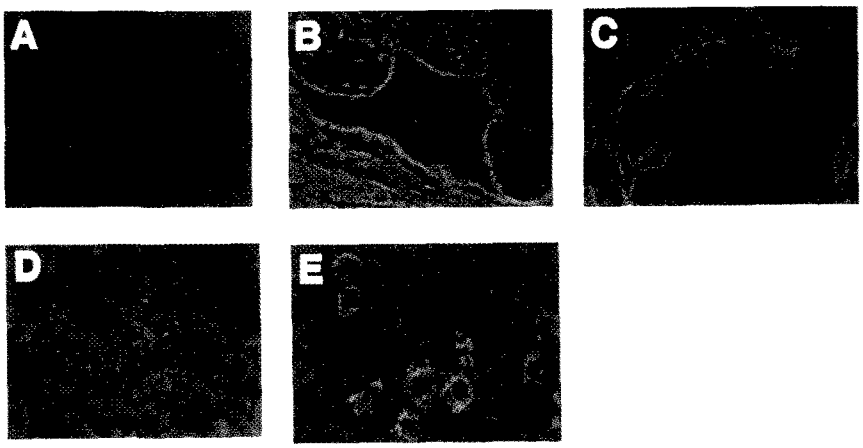
［文献］
1. Oda, M., Satouchi, K., Yasunaga, K., et al. (1985) J. Immunol. 134, 1090-1093.
2. Frerichs, K. U., Lindsberg, P. J., Hallenbeck, J. W., et al. (1990) J. Neurosurg. 73, 223-233.
3. Hanahan, D. J., Weintraub, S. T. (1985) In: Methods of Biochemical Analysis. (Glick, D., ed.), New York, Wiley and Sons, pp.195-219.
4. Hirashima, Y., Endo, S., Otsuji, T., et al.(1993) J. Neurosurg. 78, 592-597.
5. Karasawa, K., Satoh, N., Masuda, M., et al. (1991 a) J.Biochem. 110, 683-687.
6. Karasawa, K., Satoh, N., Hongo, T., et al. (1991 b) Lipids 26, 1126-1129.
7. Panetta, T., Marcheselli, V.L., Braquet, P., et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 580-587.

Table 1
Platelet-activating Factor Content of Different Rat Organs

Brain	10.8± 3.64	(n=6)
Heart	18.8± 3.23	(n=5)
Lung	16.0± 6.13	(n=6)
Liver	13.0± 4.45	(n=6)
Kidney	36.8± 11.2	(n=5)

The amount of PAF was determined as described in methods. values represent the mean in pmol/gram(wet weight) + S.E.M.. n= number of samples tested.

Fig.1 Immunofluorescent labeling of PAF in different rat organs.



A; brain, B; heart, C; lung, D; liver, E; kidney
(×200)

258 ウシ脳ピリドキサルキナーゼの性質とウサギ脳内分布

大川　清、平河多恵、城　謙輔*、朝倉　正、松田　誠
（慈恵医大・医化学、*病理）

〔要約〕

ウシ脳よりピリドキサルキナーゼ(EC 2.7.1.35)を各種クロマトグラフィーを用い27,000倍(2,105 nmol/min･mg)の均一標品に精製した。分子量は80,000(サブユニット39,500の二量体)であった。本標品を用いて作製した抗血清はウサギ、ウシ、イヌ、ニワトリ、ヒト各脳抽出液と交叉反応した。ウサギ脳での酵素分布を免疫組織学的に検討すると、ピリドキサルキナーゼは神経細胞の細胞質、線維、そしてグリア細胞の細胞質に様々の染色強度で分布しており、特別の局在は認めなかった。

［目的］

ピリドキサル燐酸は中枢神経系でのセロトニン、カテコールアミン、GABA産生におけるL-amino acid decarboxylaseの補酵素としてこれら伝達物質産生に深く関与する可能性がある。ピリドキサル燐酸の産生をつかさどるピリドキサルキナーゼのこれら代謝系に関わる役割を知るため、ピリドキサルキナーゼを精製し（1）、その酵素の性質と脳内分布を検討した。

［方法］

〔精製〕ウシ脳の40～60%飽和硫安分画のDEAEセルロース、ハイドロキシアパタイト、セファデックスG-150ゲル濾過、ブルーアガロース、フェニールスーパーローズ各クロマトグラフィーを用いた。純度検定はSDS-PAGEによった。

〔活性測定〕フェニールヒドラジンを用いた410nmでの比色法（2）によった。

〔抗体作製〕得られた精製標品をマウスに常法で免疫し、抗血清を得た。特異性はウシ脳抽出液酵素活性の中和反応、ウェスタンブロットによる反応性で検討した。

〔SDS-PAGEとウェスタンブロット法〕

SDS-PAGEは高塩濃度緩衝液条件下ではWeber and Osborn法（3）、通常はLaemmli法（4）で行った。電気泳動後分画蛋白はニトロセルロース膜に常法で転写し、抗ピリドキサルキナーゼ抗血清(a-PLK)、ついでペルオキシダーゼ標識抗マウスインムノグロブリンで処理後発色した。

〔免疫組織化学検索〕ペントバルビタール深麻酔下で得たウサギ脳を用い、緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋切片上でのＡＢＣ法により検討した。ウシ脳でも同様の検討を行っている。

［結果］

ウシ脳（5kg）から各クロマトグラフィーで最終的に1.2mg、比活性2,105 nmol/min･mgの精製標品を得た（表Ⅰ）。本標品はSDS-PAGEで分子量39,500に単一バンドを示し（図1）、ゲル濾過から得られた分子量80,000より二量体と考えられた。本標品の各ビタミンB_6に対するKm値はピリドキシン＜ピリドキサル＜ピリドキサミンの順で増加し（表Ⅱ）、これらの親和性の程度はブタ脳（5）、ヒツジ脳（6）と同程度であったがブタ肝（7）での値とは異なっていた。

得られた抗血清はウェスタンブロットでウシ、イヌ、ウサギ、ニワトリ、ヒトの脳抽出液中の一本のバンドを認識し、ラット、ハムスター等齧歯類脳抽出液とは反応しなかった。またウシ肝臓抽出液とも交叉反応を認めなかった（図2）。この事実は詳しい検索を未だ行っていないので明確ではないが酵素の臓器特異性の存在の可能性が示唆された。

a-PLKを用いてピリドキサルキナーゼの免疫組織学的分布を検討した結果、大脳ではいずれの部位においても神経細胞の細胞質、神経突起、並びにグリア細胞の細胞質に様々の程度の染色性で局在を認めた。特に脳幹部のカテコールアミンや

セロトニン系ニューロンを多く含む神経核構成細胞の一部に極めて強い染色性を示した（図３）。小脳は分子層、顆粒層を構成する神経細胞、そしてグリア細胞細胞質に種々の程度で局在しているが、プルキンエ細胞にはほとんど染色されなかった（図４）。検討の余地はあるが、このことからプルキンエ細胞には本抗体の検出感度以下のピリドキサルキナーゼ量しか存在しない可能性が考えられた。

Table Ⅰ Purification of pyridoxal kinase from bovine brain

Treatment	Volume	Total protein	Protein	Total activity	Activity	Specific activity
	ml	mg	mg/ml	nmol/min	nmol/min/ml	nmol/min/mg
Homogenate[1]	10000	369800	36.98	28700	2.87	0.078
40 to 60% $(NH_4)_2SO_4$ fraction	930	15186	16.3	23668	25.5	1.56
DEAE fraction	1037	1787	1.7	17889	17.25	10.0
Hydroxyapatite fraction	100	327	3.3	13000	130.4	39.9
Sephadex G-150 fraction	71	82	1.2	9102	128.2	111.0
Blue Sepharose CL-6B fraction	75	36	0.48	9054	120.7	253.6
Phenyl-Superose fraction	30	1.2	0.039	2457	81.9	2105

Table Ⅱ Kinetic data[1] of pyridoxal kinase from bovine brain

Compounds	K_m (μM)	V_{max} (μ moles/ min·mg)	K_i (μM)
Pyridoxal	91	4.2	
Pyridoxine	67	3.7	
Pyridoxamine	2100	21.4	
ATP	210	4.5	
4-Deoxypyridoxine			39

[1] Samples (360 ng) of pyridoxal kinase (1.78 μmol/min·mg protein) in 70 mM potassium phosphate (pH 6.0) containing 1 mM ATP and 0.05 mM $ZnCl_2$ were incubated with various concentrations of substrates or inhibitor for 20 min at 37° C.

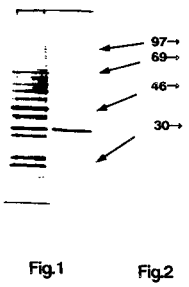


Fig.1

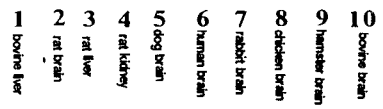


Fig.2

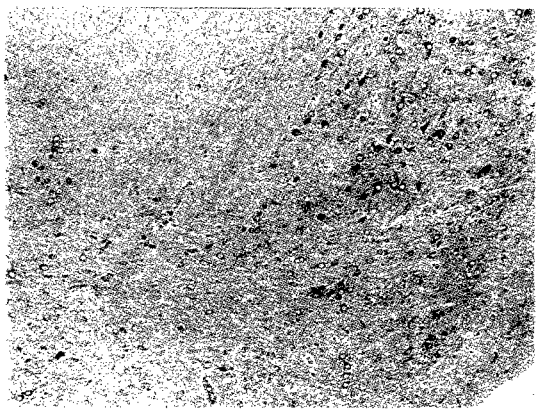


Fig.3

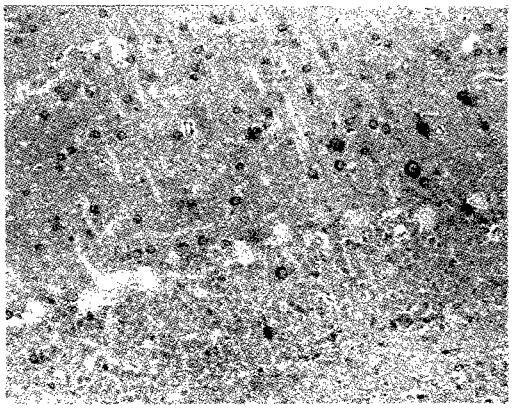


Fig.4

(1) Hirakawa-Sakurai, T., Ohkawa, K., and Matsuda, M. (1993) Mol. Cell. Biochem. 119, 203-207
(2) Wada, H., and Snell, E. E. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2089-2095
(3) Weber, K., and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
(4) Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
(5) Kwok, F., and Churchich, J. E. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6489-6495
(6) Kerry, J. A., Rohde, M., and Kwok, F. (1986) Eur. J. Biochem. 158, 581-585
(7) Tagaya, M., Yamano, K., and Fukui, T. (1989) Biochemistry 28, 4670-4675

259 抗fucosyl GM1モノクローナル抗体による脊髄・末梢神経の免疫組織化学的検討

楠　進，千葉厚郎，清水輝夫*，金澤一郎
（東京大学・神経内科，帝京大・神経内科*）

〔要約〕

われわれは抗fucosyl GM1ウサギ抗血清をもちいて、ガングリオシドfucosyl GM1がヒトおよびウサギの一次知覚ニューロンの一部に表現され、ウサギでは発生学的に変化することを報告してきた。今回はfucosyl GM1の発現をさらに詳細に検討するため、ウサギ後根神経節を免疫原として用いてマウスモノクローナル抗体を作成した。得られた抗体はfucosyl GM1に特異的でありGM1やfucosyl GA1とは全く反応しなかった。同抗体を用いた従来の条件による免疫組織染色では既報告の結果が再確認された。さらに凍結切片をアセトン固定して免疫染色することにより、ウサギ後根の無髄および小径有髄線維の染色があきらかとなり、陽性の小径有髄線維をとりまくミエリンにも強い染色が認められた。また同じ処理によりウサギ脊髄前角の神経細胞も染色され、陽性細胞の周囲の組織も同時に染色された。これらの所見からfucosyl GM1は隣接する細胞および組織に同時に表現され、それらの接着や相互作用に関与することにより、神経系の発生・分化に重要な役割を果している可能性が考えられた。

われわれは抗fucosyl GM1抗血清をもちいて、ヒトおよびウサギ後根神経節を免疫染色し、その局在を検索してきた。ヒト成人では一部の小型神経細胞とそれをとりまくsatellite cellsが染色され[1]、それらは同じくフコース含有糖鎖抗原を認識するUEA-1レクチンの結合する細胞と同じsubsetの細胞であり、無髄線維を突起としてもつ細胞と考えられた[2]。ウサギでも一部の後根神経節細胞とそれをとりまくsatellite cellsや間質にfucosyl GM1が表現されており、出生前後の後根神経節では全ての細胞が陽性となりやがて大型細胞が陰性となっていくことがわかった[3]。また後根神経節の脂質分画にはfucosyl GM1が存在し、抗体の認識する抗原物質はfucosyl GM1自身であると考えられた[3]。
Fucosyl GM1は、神経細胞の重要な表面抗原としてその発現をさらに検索する必要があるが、ウサギについての検討にはウサギ抗血清よりマウスモノクローナル抗体がより適切なプローブと考えられた。そこで今回抗fucosyl GM1マウスモノクローナル抗体の作成を試み、得られた抗体を用いてヒトおよびウサギの脊髄と末梢神経におけるfucosyl GM1抗原の分布を再検討した。

［方法］

生後1ヶ月のウサギ後根神経節にはfucosyl GM1が多量に発現しているため、その時期のウサギ後根神経節ホモジェネートをbalb-cマウスに免疫した。得られたモノクローナル抗体(CRD73-6)の特異性を検討するため、17種類の糖脂質(GM1, fucosyl GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b, galactocerebroside, GA1, fucosyl GA1, SSEA-1, Forssman antigen, globoside, paragloboside, sulfatide)を抗原としてenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を行なった。CRD73-6を用いて剖検ヒト後根神経節、脊髄、脊髄前根、交感神経節、および生後1ヶ月と6ヶ月のウサギ後根神経節と脊髄の凍結切片を免疫染色した。従来4% formalin in phosphate-buffered saline (PBS)により固定していたが、今回はアセトン固定した切片についても検討した。抗体は培養上清を30倍希釈して用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体(Cappel)を用い、diaminobenzidineを基質として発色させた。二次抗体とのみ反応させた切片を対照とした。

［結果］

抗fucosyl GM1 モノクローナル抗体(CRD73-6)が得られた。CRD73-6はIgMκ型でありfucosyl GM1に特異的に反応し、構造の類似したGM1やfucosyl GA1を含めて他の抗原とは全く反応しなかった。GM1と

fucosyl GA1に反応しないことから、フコース残基とシアル酸残基のどちらも抗体の反応に必要であると考えられた。

CRD73-6を用いた免疫組織染色により、4% formalin in PBSで固定した切片では従来のウサギ抗血清を用いた結果が再確認された[1,2,3]。一方アセトン固定によりいくつかの新たな所見が得られた。ヒトでは後根の無髄神経線維の染色があきらかとなった。また脊髄後角のsubstantia gelatinosaの染色も認められた。脊髄前角、前根や交感神経節の染色はアセトン処理後もみられなかった。ウサギでも後根の神経線維の染色が著明となったが、無髄線維だけではなく小径有髄線維がミエリンも含めて強く染色された（図1）。しかし後根神経節細胞体の染色陰性率と比較して後根での染色陰性の有髄線維（主として大径線維）の割合は高く、細胞体にはfucosyl GM1が表現されるが線維には表現されていないニューロンがあると考えられた。またアセトン固定により脊髄前角細胞の染色もあきらかとなり、染色された前角細胞の周囲の組織も同時に染色された（図2）。

[考察]

抗fucosyl GM1マウスモノクローナル抗体(CRD73-6)を用いた検索により、fucosyl GM1の局在についてウサギ抗血清を用いて得られた従来の結果[1,2,3]が再確認された。さらにアセトン固定することにより、いくつかのあらたな知見が得られた。まずヒト後根でfucosyl GM1が無髄線維に表現されており、fucosyl GM1陽性細胞が無髄線維を突起として持つ小型細胞であることが確認された。またウサギでは後根の一部の小径有髄線維の軸索とミエリン、および脊髄前角細胞とその周囲にもfucosyl GM1が発現していることがあらたにあきらかとなった。今回の結果とfucosyl GM1の発生過程における発現の変化を考え合わせると、fucosyl GM1が神経細胞の分化や神経組織構築、ミエリン形成やシナプス形成などに表面抗原として重要な役割を担っている可能性があり、今後さらに検討を続けていく必要がある。

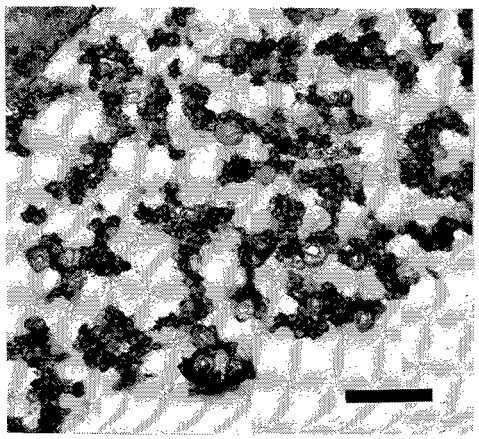


図1　生後1ヶ月のウサギの後根をアセトン固定後CRD73-6で免疫染色した。小径有髄線維がミエリンを含めて強く染色され、一部大径線維のミエリンも淡く染色されている。
(Bar=0.05mm)

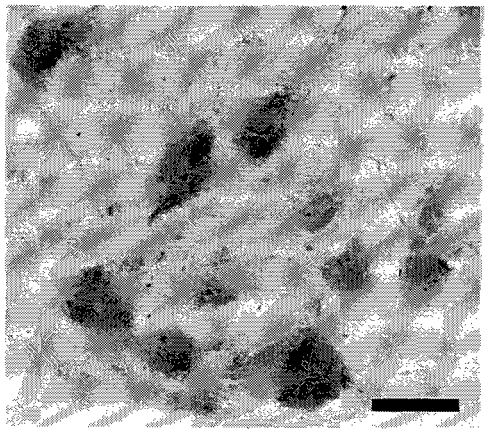


図2　生後6ヶ月ウサギ脊髄前角のアセトン固定後CRD73-6による免疫染色。前角細胞とそれをとりまく組織が染色されている。(Bar=0.1mm)

[参考文献]

1) Kusunoki, S. et al., (1989) Brain Res., 494, 391-395

2) Kusunoki, S. et al., (1991) Neurosci. Lett., 126, 159-162

3) Kusunoki, S. et al., (1992) Neurosci. Res., 15, 74-80

260 嗅覚系神経細胞に発現するSpot-35/calbindin-D28k —ラット発達過程における局在の変化—

藤原　満,中村英生,中野雄一,*山国　徹,*高橋康夫,**桑野良三
新潟大・医・耳鼻,*脳研究所,**遺伝子実験施設

〔要約〕

Ca結合蛋白Spot-35/calbindin-D28k（calbindin）の嗅覚系神経細胞における局在の変化をラットの胎生期より成熟期まで免疫組織化学染色法にて検索した。嗅上皮においては嗅細胞の一部にcalbindinの分布が認められたが発達ステージにより局在が異っていた。幼若期では主として鼻腔背内側の嗅裂部にcalbindin陽性の嗅細胞が分布していたが、成熟期には鼻腔腹外側の鼻甲介部、鼻中隔下部にのみ観察された。嗅脳においては傍糸球体細胞、僧帽細胞、顆粒細胞など多くの神経細胞に分布しており、嗅脳の発達、成熟にともない増加がみられ、この蛋白の嗅覚受容、嗅覚伝達への関連が推測された。また嗅上皮でのcalbindin陽性嗅細胞の局在の変化からは嗅覚の成立、嗅神経の再生機構との関連も示唆された。

〔目的〕

Spot-35/calbindin-D28k(calbindin)は主として中枢神経、腸管、腎に発現しているCa結合蛋白であり、多くの感覚神経系の細胞にもその分布が認められている[1,2]。嗅覚系においても成熟ラット、マウスおよびモルモットの嗅粘膜、嗅脳におけるこの蛋白の分布が認められ、成熟ラット、マウス嗅粘膜においては鼻腔周辺部あるいは腹外側の嗅粘膜に限局していることが報告されている[3,4]。

嗅細胞においてもcAMP、イノシトール３リン酸を介する嗅覚受容経路の存在をはじめ、多くの細胞機能にカルシウムが関与していること、またcalbindin、calretinin、calmodulin、GAP43などのCa結合蛋白が嗅細胞に発現していることより、嗅細胞のカルシウム調節機構の解析は重要と考えられる。そこで、今回われわれはcalbindinの嗅覚系神経細胞における発生、発達過程におけるこの蛋白の局在の変化を免疫組織化学染色法にて検索した。

〔対象および方法〕

胎生１３日、１９日、生後４日、８日、２２日、４５日、１８３日のWistar系ラットを麻酔下に４％パラホルムアルデヒドにて灌流固定あるいは断頭後浸漬固定し、嗅上皮あるいは嗅脳の凍結切片（１０～１５μm厚）を作製した。必要に応じＥＤＴＡ液にて頭部前半を脱灰した。その後、自家製ウサギ抗ウシcalbindin抗体を用いてＳＡＢＣ法（イムノマークキット、ICN Biomedicals Inc.,USA）により免疫組織化学染色を行った[5,6]。

〔結果〕

１）嗅脳（図１）

出生前よりcalbindin陽性細胞が出現し、その後嗅脳の層構造の発達と平行して傍糸球体細胞、僧帽細胞、顆粒細胞でcalbindin陽性細胞の増加が認められた。特に傍糸球体細胞においてはその多くがcalbindin陽性であり、糸球体においてはcalbindin陽性の樹状突起によるネットワークの形成が著明であった。

２）鼻腔（図２、３）

胎生１９日からcalbindin陽性細胞が出現し、生後８日には鼻腔背内側の嗅裂部にて多くの陽性細胞がみられた。生後２２日、生後４５日にはその分布が鼻腔腹外側に移り、さらに生後１８３日の成熟動物では鼻腔腹外側の鼻甲介部の嗅上皮に限局するようになった。成熟期には嗅細胞の密度の高い嗅裂深部には陽性細胞が認められなかった。

嗅上皮の陽性細胞は上皮表面に突出する樹状突起と深層へむかう軸索をもち、その形態からは嗅覚受容細胞である嗅細胞と考えられた。calbindin陽性の嗅細胞の頻度は分布の多い部位で嗅細胞総数の1/2から2/3程度であった。

鋤鼻器の神経細胞および鼻中隔粘膜下層の鋤鼻神経と思われる神経線維束にもcalbindinの分布が認められた。いずれの時期においても呼吸上皮にはcalbindinはみられなかった。

〔考察〕

嗅脳でのcalbindinの増加は嗅脳の構造的、機能的成熟と時期が一致しており、この蛋白の嗅覚受容、嗅覚伝達へ

の関連が推測された。

嗅上皮でのcalbindinの局在の変化は他の既知の物質にはみられない特異なものであり、calbindin陽性嗅細胞の出現する範囲は幼若期では嗅裂部を中心にかなり広いが、成熟期では薄い嗅上皮の部分に限局されている。これらの部位は比較的嗅細胞の細胞周期が速いと推測され、また各々の陽性細胞では比較的表層に近いものほど染色性が強い傾向が認められていることから、この蛋白が嗅細胞の移動、再生に関与することが示唆される。また最近、ある種の嗅覚受容体遺伝子の発現が鼻腔腹外側に局在しているとの報告もあり、calbindin陽性細胞の分布との類似が見られ興味深い[7]。さらに今後はin situ hybridization、RT-PCR等も用いた解析も必要と思われる。

〔文献〕

1. Iwanaga, T., Takahashi, Y. & Fujita, T. Arch Histol Cytol (1989).
2. Rogers, J. in Novel Calcium Binding Proteins(ed. Heizmann C.W.) 251-276 (Springer-Verlag, Berlin, 1991).
3. 藤原他. 日本鼻科学会会誌 31, 235 (1992).
4. Kishimoto, J., Keverne, B. & Emson, P. Brain Res 610, 325-329 (1993).
5. Yoshida, Y. & Takahashi, Y. Neurochem. Res. 5, 81-96 (1980).
6. Yamakuni, T., et al. Neurosci. Lett. 45, 235-40 (1984).
7. Ressler, K.J., Sullivan, S.L. & Buck, L.B. Cell 73, 597-609 (1993).

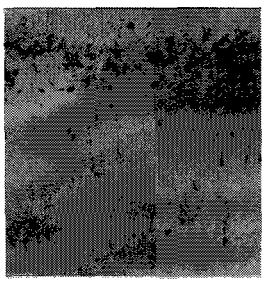


図1　生後4日
嗅脳

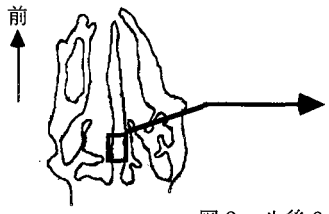
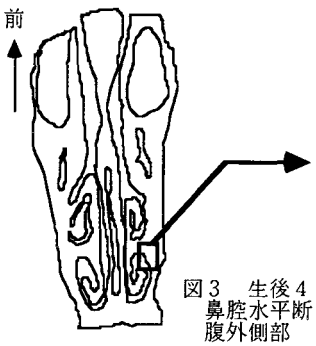




図2　生後8日
鼻腔水平断
嗅裂部



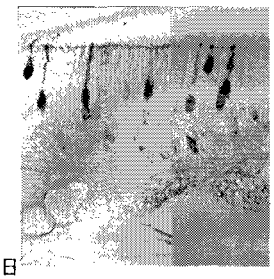


図3　生後45日
鼻腔水平断
腹外側部

261 ヒト中脳腹側被蓋野に存在するL－DOPA免疫陽性細胞は辺縁系ドーパミン投射路にどのような役割を成しているか？ －高力価抗体を用いた免疫組織化学的検討－

小森 薫[1),2)]、中村 真[1)]、山岡久也[1)]、國見由佳理[1)]、山岡功一[1),4)]、藤田潔史[1),3)]、内藤 宏[1)]、伊藤哲彦[1)]、笠原 嘉[1)]、 永津郁子[2)]

[1)]藤田保健衛生大・医・精神医学教室、[2)]藤田保健衛生大・医・第二解剖学教室

[3)]メイヨークリニック、[4)]神経科浜松病院

〔要約〕

ヒト中脳領域ドーパミン(DA)ニューロン群について、従来のチロシン水酸化酵素(TH)、DAに対する抗血清を用いた二重標識法によるカテコールアミン(CA)ニューロン群の同定法と、新しい抗体作製の手法であるグルタルアルデヒド縮合反応を用いて作製した高力価の抗L-DOPA抗体を用いた検索を行い、連続切片標本における免疫反応の一致点と相違点について考察を加えた。この結果、黒質部位では三者の免疫反応陽性細胞の分布は殆ど一致したが、腹側被蓋野では免疫反応の一致した細胞以外にも、TH、L-DOPAには陽性の免疫反応を示すが、DAに対しては明らかに陽性反応を欠いていると思われるニューロンの一群を見出した。この結果から、我々はL-DOPAを含有するニューロングループには少なくとも、2つの性質の異なるグループが存在するのではないかと考えた。1つは従来より考えられている脱炭酸作用によってDAに変換される前段階としてのDAの中間代謝産物としての場合と、もう1つの可能性はL-DOPAそのもの自身が最終生成物質として細胞体内に含有され、それ自身が内因性神経伝達物質あるいは神経修飾物質として中枢神経系内で作用している場合である。

［目的］組織化学者の年余にわたる詳細な免疫組織化学的検討が進むにつれTHの免疫陽性細胞とアミン蛍光法の異染性(discrepancy) が指摘され、疑問視されるに至った。特に中枢神経内の各所のニューロンにおいてCA系生合成系の律速酵素であるTHのみを有し、それ以外の生合成酵素、及び生成されるべきアミンを有さない“TH単独免疫陽性細胞”が見出されている。我々は、このような“TH単独免疫陽性細胞”が、その最終生成物質としてL-DOPAを合成し、未知の脳内神経伝達の一翼を担っている可能性があるのではないかと考え、このようなニューロンを“L-DOPAニューロン”として取り扱うことを提唱してきた。しかし、脳内のL-DOPA含有濃度は著しく低値で、かつturn over が早いため、従来の免疫組織化学化学的手法では、その感度面よりみてL-DOPAニューロンの存在の有無を確認することが困難であった。ごく最近、新たな抗体精製法によって得られた特異的抗血清を利用して、高感度に微量な物質を同定することが可能となった。我々はこの手法を利用して新しく高力価の抗L-DOPA抗体を作製し、上記のような染色性のdiscrepancy を示すニューロン群での含有酵素と生成産物の間の不一致についての新たな可能性について検討を加えることにした。

［方法］

(1) 抗体作製とその検定；近年グルタルアルデヒド縮合反応を用いることにより分子量の小さいアミンにも抗原性を付与することが可能となり、このようにして得られた特異性の高い抗血清を利用して高感度に微量な物質を同定することが可能となった。今回、我々は同様の手法を用いて、高力価の抗L-DOPA抗体を作製し、従来より作製してきたCA系生合成酵素およびモノアミン自身に対する抗体による反応と併せて検索を行った。新たに作製した抗体の特異性については ELISA法を用い、DA及び、その他の関連性物質 (tyrosine, tyramine, octopamine, noradrenaline, adrenaline)との間の交叉反応性について十分な検索を行い、結果としていずれの物質との間にも交叉反応性を見出すことはなかった。それゆえ、我々は今回の検索でL-DOPAの組織細胞内での免疫反応性をその他の免疫反応性と明確に区別しうることが可能であった。

(2) 実験材料；今回我々は当大学病理学教室より提供された剖検時に得られたヒト脳組織をもちいて免疫組織化学的反応による検討を試みた。提供を受けたヒト脳は、8 ケ月女児のもので、死因としては神経疾患が除外され得たものである。なお、提供を受けた際、家人に対しては本研究の性質と目的について十分に説明し、同意を得ることに努めた。剖検に際して取り出された脳は、但ちに 5mm薄のブロックにカットされ、1～3時間の間、5% glutaraldehyde溶液（1% sodium metabisulfite 含有）中で固定された。組織内の酵素活性の低下を防ぐために死亡から組織固定までの時間は10時間以内とした。固定後、同組織をmicroslicer (DTK-3000, DSK)によって30μmの連続薄切切片とし、非特異反応抑制の為の前処置後、抗TH抗体、抗L-DOPA抗体、抗DA抗体を第1次抗体として用い、 PAP法の免疫反応の手技に従って免疫染色を行った。前述した抗L-DOPA抗体以外の抗体の作製過程、信頼性については当教室の既報の論文に詳しい。

(3) L-DOPAニューロンの検出法；既知のDAニューロンとは異なる、いわゆるL-DOPAニューロンが存在するか否かの検討のため、我々は2種類の手法を利用して検索をすすめ、いずれの手法においても確認し得たものをL-DOPAニューロンと同定した。ひとつは従来の抗TH、抗DA抗血清を利用した二重標識法でTH陽性／DA陽性は既知のDAニューロン、TH陽性／DA陰性の免疫反応を示すニューロンをL-DOPAニューロンの可能性を有するニューロンとした。又、もう一つの方法は高力価の抗L-DOPA抗血清による反応を用いたもので、この2種類の方法によって比較検討が行われた。

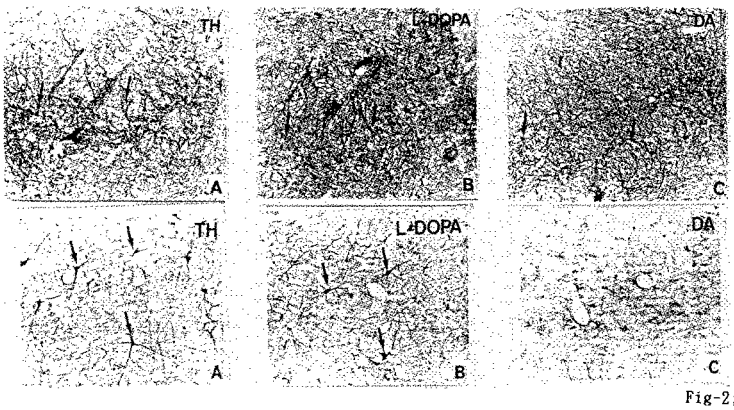


Fig-1;中脳黒質の免疫反応像

Fig-2;中脳腹側被蓋野の免疫反応像

［成績］Fig-1 に黒質の連続切片像におけるTH、L-DOPA、DAのそれぞれの免疫反応性の比較像を示す。この図で明確に示されるように、L-DOPAの免疫反応陽性細胞は黒質内全体に比較的均一に分布し、その分布様式は概略TH及びDA免疫陽性細胞の分布のそれと一致していた。よって、黒質においては二重標識法とL-DOPA免疫陽性反応の一致の結果が指し示すように、L-DOPA陽性細胞は同一細胞内にTH、DAを共有し、その多くが既知のDA作動性ニューロンであろうと考えられた。一方、中脳腹側被蓋野における検索において、我々は黒質と同様に多くのTH陽性／L-DOPA陽性／DA陽性の免疫反応陽性細胞を見出した。しかし、その他にも Fig-2に示されるように我々はTH陽性／L-DOPA陽性／DA陰性の免疫反応を示すニューロンを認めることができた。この細胞は最終生成物質としてL-DOPAを合成、貯蔵し、内因性神経伝達物質として利用する、いわゆるL-DOPAニューロンではないかと考えた。

［考察］従来の抗TH、抗DA抗血清を利用した二重標識法、及び抗L-DOPA抗体を用いた免疫組織化学的手法で可視化されたL-DOPAニューロンと考えられる神経細胞を初めてヒト脳内に認め報告した。近年、薬理学的検索によって中枢神経内においてL-DOPAは、それ自身が薬理学的作用を有し、神経伝達物質あるいは神経修飾物質であるという可能性が示唆されている。では、このL-DOPAが中枢神経内においてどのような作用をはたしているのであろうか？L-DOPA自身がpre-synapticに他のニューロンに作用する可能性があるのか、又、神経末端より放出されたL-DOPAが近傍の毛細血管に到達し、血管壁に存在する芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素によってDAに変換されて作用する可能性もあるのかもしれない。脳内DAニューロンは局在がはっきりしており、このうち中脳上行性DA路には大きく２種の系統があることが既に知られている、一つは黒質線条体DA系で主として黒質を起源とする。錐体外路系を司り外界からの感覚情報に対して生体の運動プログラムを任意に変換することができる。もう１つは中脳辺縁系DA系で主として中脳腹側被蓋野を起源とする。抗精神病薬の登場により精神分裂病の生物学的成因の１つとしてDA仮説が提唱されるに至った（もちろん、精神分裂病の病態をDAニューロンの機能異常のみでは全てを説明できないにしても）。薬剤の抗精神病作用には中脳辺縁系、中脳皮質系への作用が想定され、日常臨床上、最も問題となる副作用である錐体外路症状は黒質線条体系への作用によるとされている。この点から、逆説的に考えれば情動に関与する辺縁系に線維投射を行っている腹側被蓋野に存在するL-DOPAニューロンの部位特異的な局在性は情動系とL-DOPAとの関係を考えるうえで、興味深いといわざるを得ない。もし、L-DOPA自身が神経活性物質であり、脳内の情動系に関与し、何等かの精神症状とも関係しているのならば、錐体外路症状を副作用として生じさせる確率を減じ、精神症状に特異的に作用する抗精神病薬開発の一助となり得るかもしれない。我々が今回、腹側被蓋野で見出したL-DOPAニューロンと考えられる細胞のシナプス後細胞の反応性、L-DOPAを認識する受容体はいまだに不明である。L-DOPAニューロンの新たな役割が明らかとなり、反応する受容体の性質も明らかになれば、L-DOPA自身をめぐる神経機能の解明がさらに進み、神経疾患の治療に新たな可能性を開くことが期待されるであろう。

［文献］

1. Komori, K., Fujii, T. and Nagatsu, I. Do some tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the human ventrolateral arcuate nucleus and globus pallidus produce only L-DOPA? Neurosci Lett 133: 203-206, 1991
2. Komori, K., Sakai, M., Karasawa, N., Yamada, K. and Nagatsu, I. Evidence for transient expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the mouse striatum and the effect of colchicine. Acta Histochem Cytochem 24. 223-231. 1991.
3. Komori, K., Kunimi, Y., Yamaoka, K., Ito, T., Kasahara, Y. and Nagatsu, I. Semiquantitative analysis of immunoreactives of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase in locus coeruleus of desipramine-treated mice. Neurosci Lett 147. 197-200. 1992.

262 TRHによる下垂体初代培養細胞TSHβsubunit遺伝子発現の変化

鯉淵典之、大竹英樹、山岡貞夫
（獨協医大　第一生理）

〔要約〕甲状腺刺激ホルモン (TSH) 遺伝子発現の生理的調節機構を調べるため、ラット下垂体細胞を無血清培地で初代培養し、TSH β subunit 遺伝子発現に及ぼす甲状腺ホルモン、TSH-放出刺激ホルモン (TRH) の効果を *in situ* hybridization 法により細胞単位で解析した。甲状腺ホルモンは TSH β 遺伝子の発現を著明に抑制した。TRH は TSH β subunit 遺伝子の発現を促進したが、この効果は培養開始から 6 日目で消失した。以上の事から、本実験系は下垂体細胞における遺伝子発現の生理的調節機構の研究のために有用な系となる事が考えられる。

[緒言]　甲状腺刺激ホルモン (thyrotopin、TSH) は下垂体前葉から分泌され、甲状腺ホルモン (T_3 及び T_4) の分泌及び合成を促進する事が知られている。この糖蛋白ホルモンは α subunit と β subunit から構成され、α subunit はこれ以外の糖蛋白ホルモンである卵胞刺激ホルモン及び黄体形成ホルモンと相同の構造を持ち、ホルモンとしての特異性は β subunit による。α subunit も β subunit も甲状腺ホルモン並びに視床下部ホルモンである TSH 放出刺激ホルモン (thyrotropin-releasing hormone、TRH) によって発現が調節されている事が知られている[1]。しかし、これらの遺伝子発現調節機構の研究は、もっぱらクローン化した株細胞を用いて行われてきた[2,3]。その理由として、TSH 細胞は下垂体細胞のうち約 5 % 程度しか存在せず Northern blotting 法により遺伝子発現調節機構を調べる事が難しいこと、無血清培地を用いて細胞を培養すると細胞の反応性が著明に低下してしまう事などがあげられる。そこで我々はラット下垂体細胞を無血清培地で初代培養し、培養開始後初期の遺伝子発現の変化を *in situ* hybridization (ISH) 法を用いて細胞単位で解析した。

[方法]　動物は成熟雄性ラットをもちいた。ネンブタール麻酔下 (50 mg/kg) にて 0.25 % トリプシンを左心室から灌流し、下垂体を摘出し、ピペッティングによって細胞を分散させた後スライドグラスへまいた。そして、無血清培地 (DMEM:F12 = 1:1) を用い、以下の実験をおこなった。**1)** 1 nM の T_3 を加えた群 (n=9) と加えない群 (n=9) に分けて培養し、培養開始 24、48、72 時間後に各 6 チェンバー (T_3 を加えた群と加えない群各 3 チェンバー) ずつホルマリンにて固定した。**2)** 48 時間 T_3 存在下 (n=12) または非存在下 (n=12) に培養し、固定した。固定の 6、12、24 時間前に培地内に TRH を 1 μM を加えた (T_3 を加えた群と加えない群各 3 チェンバーずつ各群計 6 チェンバー; TRH (-) の対照群も同様に 6 チェンバー)。**3)** 72 時間 T_3 存在下、又は非存在下で培養した後に固定した。固定の 6、12、24 時間前に培地内に TRH 1 μM を加えた (チェンバー数は実験 **2)** と同じ)。**4)** 72 時間培養後に培地を交換し、さらに 72 時間培養後に固定した。固定の 24 時間前に実験 **2)3)** と同様の条件で TRH を加えた (TRH (+) 群も (-) 群も T_3 を加えたものと加えないものを各 3 チェンバーずつ各群計 6 チェンバー)。そして TSH β subunit mRNA に対する ^{35}S 標識 antisense RNA を Koibuchi らの方法[4]により作成した。これを probe として ISH を施行した。エマルジョンオートラジオグラフィーを施行し、細胞単位でのオートラジオグラフィーグレイン数を計測した。

[結果]　図 1 に ISH 像の一例を示した。培養細胞中にオートラジオグラフィーグレインが集積した標識細胞がみとめられた。これら標識細胞のグレイン数を計測したところ、図 2 に示した様に培養開始から 24 時間後では TSH β subunit mRNA 量に及ぼす T_3 の効果は認められなかった。しかし、培養開始 48 時間及び 72 時間後では、T_3 は TSH β subunit mRNA 量を有意に減少させた。培養開始 48 時間で固定した群と 72 時間で固定した群とを比較すると、培養開始 72 時間の群では TSH β subunit mRNA 量は低下傾向にあった。図 3 で示したように、培養開始から 48 時間後に固定した細胞では、TRH は投与から 12 時間後の時点で TSH β subunit mRNA 量を有意に増加させた。一方、図 4 で示したように、培養開始から 72 時間後に固定した細胞では TRH は TSH β subunit mRNA 量をほぼ time-dependent に増加させた。しかし、図 5 で示したように、培養開始から 6 日間経過した細胞では T_3 の効果は明らかに見られるものの、TRH による発現促進は認められなかった。

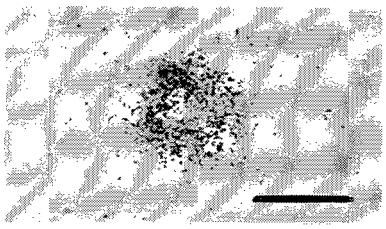
[考察]　一般に、TSH β subunit 遺伝子の発現は甲状腺ホルモンによって用量依存的に抑制されること、また、TRH によって時間依存的、用量依存的に促進されるといわれている。しかしこれらはクローニングした

遺伝子の上流域の解析や、マウス下垂体由来の thyrotropic tumor より作成した株細胞をもちいて得られた結果にもとづいている。TRH の遺伝子発現にたいする効果についても遺伝子の上流域の解析、及び GH_3 細胞(ラット somatotropic tumor 由来の株細胞) 等を用いた研究が主であった。生理的な調節機構を研究するためには、初代培養細胞を用いるほうが理想的である。しかし、下垂体全体に占める TSH 細胞の割合は 5 % 以下であるためる、Northern blotting 等により遺伝子の発現変化を知ることは困難であると思われる。実際、初代培養細胞を用いて行われた研究は少ない。本研究では ISH 法により、細胞単位で mRNA 量の変化を調べれば、初代培養細胞を用いても遺伝子発現調節機構の検索が可能であることを証明した。今後、本実験系を用いて、下垂体遺伝子発現の調節における甲状腺ホルモンの役割について研究を進める予定である。

[文献]

1. Morley, J. E. 1981 *Endocrine Rev.* 2:396-436.
2. Chin, W. W. *et al.* 1985 *Endocrinology* 116:873-878.
3. Jones, K. E. *et al.* 1991 *Endocrinology* 128:1763-1768.
4. Koibuchi *et al.* 1993. *Neuorosci. Lett.* (in press).

図 1



ラット下垂体初代培養細胞における TSH β subunit mRNA の *in situ* hybridization 像。
Scale bar length = 20 μm

図 2

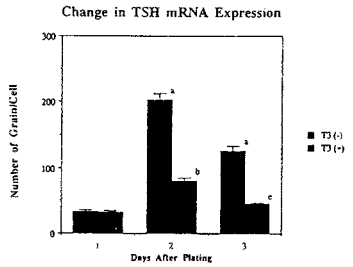


図 3

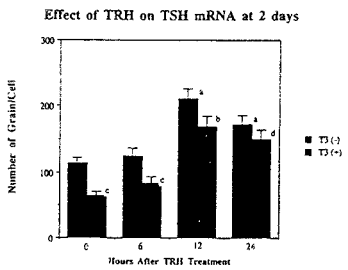


図 4

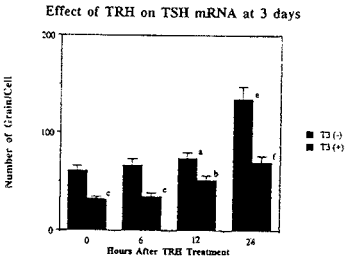
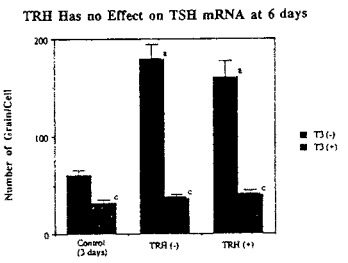


図 5



a; $p < 0.05$ vs T_3 (-) at day 1 (図 2) or T_3 (-) at TRH (-) (図 3-5).
b; $p < 0.05$ vs T_3 (+) at day 1 (図 2) or T_3 (-) at TRH (-) (図 3-5), and vs T_3 (-) at the same treatment.
c; $p < 0.05$ vs T_3 (-) at the same treatment. d; $p < 0.05$ vs T_3 (+) at TRH (-).
e; $p < 0.05$ vs T_3 (-) at TRH (-), and vs T_3 (-) at 12 h.
f; $p < 0.05$ vs T_3 (+) at TRH (-), and vs T_3 (-) at 24 h.

263 脳におけるリアノジンレセプター／ Ca^{2+}放出チャンネルサブタイプの遺伝子発現分布

古玉 大介[1,2]、古市 貞一[1]、袴田 康弘[3]、中井 淳一[3]、竹島 浩[4]、御子柴 克彦[1]
([1]東京大学医科学研究所 化学研究部 、[2]大阪医科大学 第一内科 、
[3]京都大学 医化学 、[4]国際高等研究所沼記念プロジェクト)

〔要約〕

リアノジンレセプター(RyR)の３種類のサブタイプ（骨格筋型(sRyR)／心筋型(cRyR)／脳型(bRyR)）のウサギ脳内での分布をin situ hybridization法を用いて検討した。sRyR mRNAは小脳プルキンエ細胞に強く発現していた。cRyR mRNAの発現は脳全体にわたっており、特に嗅球の嗅神経細胞層、大脳皮質第VI層、歯状回、小脳の顆粒細胞、三叉神経運動核、顔面神経核などに強く認められた。bRyR mRNAも広く発現していたが、海馬CA1領域の錐体細胞、線状体、背側視床に特に強く発現していた。これらの発現パターンの違いは、各RyRサブタイプが多様な脳機能発現に関与している可能性を示唆している。

【はじめに】

細胞内のCa^{2+}濃度([Ca^{2+}]i)の一過性の変化は様々な生理機能に関与することが知られている。RyRは、イノシトール三リン酸レセプター(IP_3R)と細胞内Ca^{2+}プールからCa^{2+}を動員するチャンネルで、これまで、sRyR[1]、cRyR[2]、bRyR[3,4]の３種のRyRサブタイプcDNAがクローニングされており、いずれも脳において発現している事が知られている。これまで免疫組織学的にsRyRやcRyRの脳内分布が報告されているが、bRyRを含めたRyRサブタイプの分布の全体的な比較は報告がない。また、これまでの抗体を用いた研究では各サブタイプ間のcross-reactivityのため、特定のニューロンにどのサブタイプが存在するのかは一部を除き不明確な点が多い。今回、我々はサブタイプ特異的なプローブを用いたin situ hybridization法で３種のRyRの脳内分布を明らかにした。

【方法】

13週齢のウサギ(std: JW/CSK)脳の凍結切片(12μm)を作製し使用した。プローブとして、各サブタイプに特異的なcDNAクローン（sRyRは塩基番号1, 443-4, 431、cRyRは11, 527-13, 353、bRyRは7, 986-8, 569を含む）からin vitro transcription法にて［α-^{35}S］UTPラベルしたAnti-senseおよびsense RNAを作製した。In situ hybridizationはFuruichi[5]らの方法に従った。シグナルの可視化にはNTB-2乳剤によるオートラジオグラフィー法を用い、cRyRプローブでは５日間、他は18日間の露光(4℃)を行った。

【結果】

（図１）脳全体に渡ってcRyR mRNAの高い発現が認められた。特に嗅球、大脳皮質（特に第VI層）、歯状回、小脳、顔面神経核、三叉神経運動核に強いシグナルを認めた。sRyR mRNAは、小脳と海馬に中程度の発現を認めた。bRyR mRNAは、海馬、尾状核・被殻、背側視床に特に強く発現していた。いずれのsense RNAプローブではシグナルを認めなかった。

海馬、歯状回では各サブタイプとも発現を認めたが、cRyRが主であった。sRyRのmRNA発現はCA1,2,3,歯状回ともほぼ一様であるのに対し、cRyR mRNAは歯状回に一番強く、bRyR mRNAはCA1で最も強く発現していた。

小脳では（図２）、sRyR mRNAはプルキンエ細胞で強く発現していたが他では殆ど認められなかった。cRyR mRNAはプルキンエ細胞の他に顆粒細胞や分子層のinterneuronにも発現していた。bRyR mRNAは小脳皮質にはあまり認められなかった。小脳核には３種類とも発現が認められた。

【考案】

cRyRは、最も広く脳に発現し、他のCa^{2+}チャンネル（電位依存性Ca^{2+}チャンネル(VDCC)やリガンド型Ca^{2+}チャンネル、IP_3R）と同一の細胞に共存することが示された。cRyRは心筋細胞においてはCa^{2+}誘導性Ca^{2+}放出機構(CICR)により細胞内Ca^{2+}プールからCa^{2+}を動員することが知られている。脳においても同様に他のチャンネルを介した[Ca^{2+}]iの上昇でcRyRのCICR機構が働き、Ca2+シグナルがさらに増幅される

と思われる。

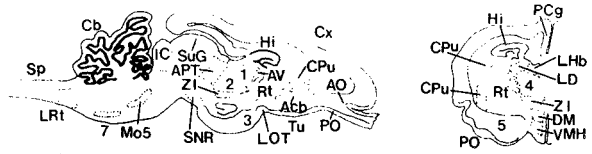
骨格筋細胞でのsRyRは、膜の脱分極を感知すると考えられているL型VDCCと機能的に連関してチャンネルを開くとされている。しかし、プルキンエ細胞を含め脳には骨格筋L型VDCCのα1サブユニットは認められないので、そのほかのタイプのVDCCと連絡して細胞内プールからCa^{2+}が動員される可能性がある。

bRyRは、他のタイプと異なりカフェインに非感受性であることが報告されている。また、mink肺上皮細胞で、TGF-βによりbRyRの発現が誘導されることが知られている[4]。bRyRはTGF-βあるいはその関連サイトカインにより、特に発達過程において、up-regulationを受けている可能性があるだろう。

以上のように本研究から、cRyRは、主要な脳内RyR/Ca^{2+}放出チャンネルで、一方、sRyRとcRyRは特定のニューロンや領域に強く発現するタイプであることがわかった。また、機能の異なるRyRサブタイプの特徴的な分布様式は、各々の発現部位で多様な脳機能に関わっていることを示唆している。

【文献】

(1) Takeshima, H.et al. Nature 339: 439-445, 1989 (2) Nakai, J. et al. FEBS Lett. 271: 167-177, 1990
(3) Hakamata, Y. et al. FEBS Lett. 312: 229-235, 1992 (4) Giannini, G. et al. Science 257: 91-94, 1992
(5) Furuichi, T.et al. Receptors and Channels 1: 11-24, 1993



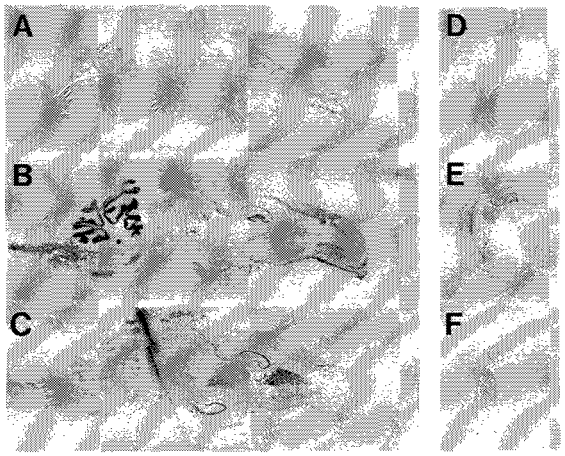


図１：ウサギ脳におけるRyRサブタイプmRNAの発現
左：矢状断、右：冠状断
AおよびD: sRyR, BおよびE: cRyR, CおよびF: bRyR

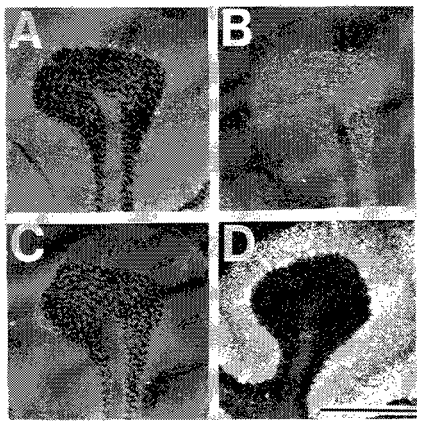


図２：ウサギ小脳におけるRyRサブタイプmRNAの発現
A: sRyR, B: cRyR, C: bRyR, D: IP_3R1

264 脳内 endozepine (diazepam binding inhibitor) mRNA 発現に及ぼす nicotineの影響について

桂 昌司[1)]、大熊誠太郎[1)]、辻村 敦[2)]、栗山欣彌[1) 2)]
(京都府立医大・薬理[1)]、脳・血管老化センター[2)])

〔要約〕

脳内benzodiazepine (BZD)様物質として知られているendozepine (diazepam binding inhibitor, DBI) の、脳内における生成とその調節機構に及ぼすnicotine の影響を、マウス大脳皮質初代培養神経細胞（培養細胞）ならびにマウス大脳皮質を用いて、mRNA発現とnicotine受容体結合実験などの観点より検討した。PCRによるマウスDBI cDNAのクローニングを行ったところ、約300 bpのDNA断片が増幅された。本プローブを用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、マウス脳および培養細胞のいづれにおいても、明らかなDBI mRNAの発現が認められた。Nicotine (10^{-9}-10^{-7} M)を培養細胞に24時間曝露した場合、DBI mRNAの発現量はnicotineの添加濃度および曝露時間に依存して増加したが、対照として用いた β-*actin* mRNAの発現量には何ら変化も認められなかった。なお、nicotine曝露に伴うDBI mRNAの発現量の増加は、hexamethoniumの存在下により完全に消失した。また、nicotineを投与したマウス大脳皮質におけるDBI mRNAの発現量も同様に増加傾向が認められた。培養細胞およびマウス大脳皮質より得られたnicotine無処置顆粒画分に対してnicotineを添加した場合、[^{3}H]flnitrazepam ([^{3}H]FLN)および[^{3}H]muscimol ([^{3}H]MUS) 結合は、10^{-5} M以上の濃度のnicotineの添加でのみ有意に阻害されたが、[^{3}H]methylcarbamylcholine ([^{3}H]MCC) 結合に対してはFLNおよびMUSの添加は何ら影響を示さなかった。一方、nicotineの長期曝露後により得られた培養細胞顆粒画分においては、[^{3}H]FLN結合の有意な低下と[^{3}H]MUS結合の増大が認められた。以上の成績より、培養細胞ならびにマウス大脳皮質のいずれにおいてもDBI mRNAの発現が強く認められ、また、nicotineはDBI mRNA の発現の増加を介しての脳内DBI含量の生成増加を生じ、併せてGABA$_A$/BZD受容体複合体機能にも影響を及ぼしている可能性が示唆される。

[目的]

抗不安薬として臨床で繁用されているBZD系薬物と類似の薬理作用を有する内因性生理活性物質(DBI)の存在がラット脳において見い出されて以来[4)]、その中枢神経機能における役割が注目されている。近年、DBIの単離[3)]に続いてそのcDNA塩基配列が明らかとなり[5)]、脳内における分布[7)]が詳細に検討されている。また、各種ストレス[1)]や薬物依存状態[2)]におけるDBIの変化についても検討が進み、脳内における生理的役割が解明されつつある。本研究では、まずPCRによるマウスDBIのcDNAのクローニングを行ない、さらにDBI mRNAの培養細胞ならびにマウス脳内における発現を指標として、nicotineのDBI mRNA発現に及ぼす影響について検討した。

[方法]

1. Nicotineの投与: ddY系雄性マウス(体重30 g)を用い、nicotine (1 mg/kg)の皮下投与2時間後には形成され、8時間後には消失する急性耐性、ならびにnicotine (3x1 mg/kg, 7 days または 0.5 mg/kg, 30 days)の連続皮下投与後に形成される慢性耐性について検討した。また、培養細胞[6)]では、種々の濃度のnicotineを曝露時間を変えて曝露し、培養14日目に実験に用いた。

2. 受容体結合実験: 1.より得られたマウス大脳皮質もしくは培養細胞を用い、常法に従い顆粒画分を調製し、BZD、GABA$_A$ならびにnicotine受容体に対する結合実験を、[^{3}H]FLN、[^{3}H]]MUSおよび[^{3}H]MCCをリガンドとして用いて行った。

3. PCRによるマウスDBI c DNAのクローニング: マウス全脳よりFastTrack mRNA Isolation kit (Invitrogen)を用いてpoly(A)+RNAを精製し、First strand cDNA合成キット(Pharmacia)を用い、Oligo(dT)をプライマーとして一本鎖のcDNAを合成した。このcDNAをテンプレートとして、PCR法によりマウスDBIのcDNAを増幅した。マウスDBIに特異的な一対のプライマーMDBIF (5'-CTTGATTGCTCCTGCTTCT-G-3')、MDBIR (5'-CTCGTCTACCTTTTCCACAT-3')は、DNA合成装置(Pharmacia)により合成し、5'末端をT4 kinaseでリン酸化したものを用いた。95℃、55℃、72℃にて各1分を30回繰り返すことにより増幅反応を行った。得られたPCR産物をフェノール処理およびエタノール沈殿により精製し、EcoRIアダプターを連結させ、さらに末端をリン酸化してpUC18のEcoRIサイトに挿入した。得られたDNAを大腸菌に導入して培養し、プラスミドDNAを超遠心で精製し、EcoRIで切断後アガロース電気泳動によりcDNAを精製した。

4. ノーザンブロットによるDBI mRNAの測定: 1.より得られたマウス大脳皮質もしくは培養細胞を用い、Fast Track mRNA Isolation kit (Invitrogen)を用いてpoly(A)+RNAを精製し、3.で得たDBI cDNA断片をランダムプライマーとして[^{32}P]dCTPによりラベルしたものをプローブとしてノーザンブロットを行い、DBI mRNAをBAS/2000 によるimage analizerにより解析した。

[結果]

1. PCRによるマウスDBI cDNAのクローニングとマウス脳ならびに培養細胞におけるDBI mRNA発現の検討: PCRにより約300 bpのDNA断片が増幅され、プラスミドにクローニングを行ったのちに塩基配列の確認を行ったところ、DBI cDNAの塩基配列を有していた。また、本プローブを用いてノーザンブロットを行ったところ、マウス脳および培養細胞のいずれにおいても、明らかなDBI mRNAの発現が認められた。

2. NicotineのDBI mRNA発現に及ぼす影響: Nicotine (10^{-9}-10^{-7} M)を培養細胞に24時間曝露した場合のDBI mRNAの発現量は、

nicotine の濃度に依存した増加が認められたが、対照に用いたβ-actin mRNAの発現量には何ら変化も認められなかった(図1)。また、nicotine曝露に伴うDBI mRNAの発現量の増加は、hexamethonium (10^{-4} M)の存在下により完全に消失した(図2)。一方、nicotineを投与したマウス大脳皮質より得られたDBI mRNAの発現量についても、同様の増加傾向が認められた。

3. Nicotineの受容体結合に及ぼす影響: 培養細胞およびマウス大脳皮質より得られたnicotine無処置顆粒画分に対し、nicotineをin vitro条件下で添加した場合の[^{3}H]FLNおよび[^{3}H]MUS結合は、10^{-5} M以上のnicotineの添加により有意に阻害された。なお、[^{3}H]MCC結合に対してFLNおよびMUSは何ら影響を示さなかった。一方、nicotineの長期曝露後に培養細胞およびマウス大脳皮質より得られた顆粒画分について同様の検討を行ったところ、[^{3}H]FLN結合で有意な抑制および[^{3}H]MUS結合で増強傾向が認められた。

[考察]

BZD誘導体は代表的な抗不安薬であるが、脳内にこの誘導体に対する特異的受容体の存在が明らかになり、抗不安作用の発現機序としてこのBZD受容体を介した作用が重要であると考えられている。一方、$GABA_A$受容体はBZD受容体と構造的のみならず機能的にも共役していることが知られており、一般にBZD誘導体が投与されるとまずBZD受容体が活性され、続いて$GABA_A$受容体の活性化を介して脳内の抑制性GABAニューロンの機能を増強することにより、抗不安作用が出現すると考えられている。ところで、DBIはBZD系薬物と類似の薬理作用を有する脳内内因性生理活性物質として存在していることが確認され、その中枢神経機能における役割が注目されている。そこで、本研究ではDBIの脳内における生理的役割を検討する目的で、中枢神経系に作用し、少量では軽度の興奮あるいは発揚、大量では中毒症状を示し、しかも連用することにより精神的依存を生じるとされるnicotineに注目し、マウス脳ならびに培養細胞を用いてnicotineがDBI mRNA発現および$GABA_A$/BZD受容体機能にいかなる変化を与えるのかについて検討した。

まず、PCRによるマウスDBI cDNAのクローニングを行ったところ、約300 bpのDNA断片が増幅された。本プローブを用いてノーザンブロットを行ったところ、マウス脳および培養細胞のいずれにも明らかなDBI mRNAの発現が認められた。また、本研究で使用した培養細胞は$GABA_A$/BZD受容体ならびにnicotine受容体を有していたことから、本実験を行うにあたり有用な材料であると考えられる。

次に、nicotineのDBI mRNAの発現に及ぼす影響ついて検討したところ、培養細胞におけるDBI mRNAの発現量はnicotineの添加濃度ならびに曝露時間に依存して増加を示した。また、培養細胞におけるnicotine曝露に伴うDBI mRNAの発現量の増加は、hexamethoniumの存在下により完全に消失した。一方、nicotine投与マウス脳についても同様に、DBI mRNAの発現量の増加傾向が認められた。従って、nicotineの投与によりDBI mRNAの発現量に相関して脳内DBI量も増加している可能性が示唆され、nicotineの脳内における薬理作用の一部にこのDBIの変化が関与している可能性が考えられる。

さらに、nicotineによる脳内$GABA_A$/BZD受容体複合体に対する結合能の変化についても検討したところ、Nicotine無処置顆粒画分における[^{3}H]FLNおよび[^{3}H]MUS結合は、高濃度のnicotine添加によってのみ有意に阻害された。一方、nicotineの長期曝露後に得られた顆粒画分においては、[^{3}H]FLN結合の有意な抑制と[^{3}H]MUS結合の増強傾向が認められた。以上の成績より、nicotineはDBI mRNAの発現量の増加に相関した脳内DBI含量の生成増加を介して、$GABA_A$/BZD受容体複合体の機能に影響を及ぼす可能性が示唆される。

[参考文献]

1)Ferrarese, C. *et al.* (1991) Neuropharmacology 30, 1445-1452. 2)Guidotti, A. (1991) Neuropharmacology 30, 1425-1433. 3)Guidotti, A. *et al.* (1983) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 80, 3531-3535. 4)Guidotti, A. *et al.* (1978) Nature 257, 553-555. 5)Mocchetti, I. *et al.* (1986) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7221-7225. 6)Ohkuma, S. *et al.* (1986) Int. J. Devl. Neuroscience 4, 383-395. 7)Tong, T. *et al.* (1991) Neuropeptides 20, 33-40.

Fig. 1 Changes in Levels of mRNA for Diazepam Binding Inhibitor (DBI) and β-Actin Following Exposure (24 hours) to Nicotine in Primary Cultured Cerebral Cortical Neurons.

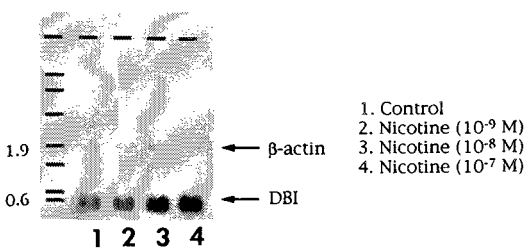
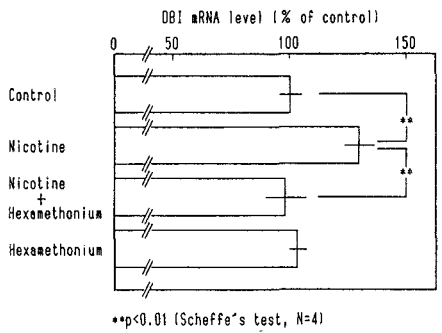


Fig. 2 Effect of Hexamethonium on Nicotine (10^{-7}M)-Stimulated Expression of mRNA for Diazepam Binding Inhibitor (DBI) in Primary Cultured Cerebral Cortical Neurons.



**p<0.01 (Scheffe's test, N=4)

265 ミエリンプロテオリピッド蛋白質遺伝子ファミリーの存在

ー軟骨魚類Chondrichthyes脳からの3種類のDM-20関連蛋白質の分子クローニングー

北川一夫、松本昌泰、鎌田武信、David R. Colman*
（大阪大学医学部第一内科、＊米国マウントサイナイ医科大学）

〔要約〕

ミエリンプロテオリピッド蛋白質（PLPs=PLP and DM-20）は哺乳類中枢ミエリンの主要疎水性蛋白質で、ミエリン鞘形成に際しては、"adhesive struts"として働くものと考えられている。今日までPLPsは、シーラカンス、肺魚の進化した魚類（Sarcopterygii）と四肢動物でのみ存在するものと信じられてきた。今回、我々はPCR法を用い、ミエリンを形成する最も進化的に古い動物である軟骨魚類Chondrichthyes(Squalus acanthias, Torpedo californica)の脳から3種類のDM-20に関連した物質(DMs=DMα, DMβ and DMγ)を見いだした。cDNA cloningより得られた全翻訳領域は哺乳類DM-20と44-63%のアミノ酸配列の一致を認めた。特に膜貫通部分と考えられる疎水性領域とその周辺で強い相同性を認め、親水性領域のアミノ酸置換及びgenomic サザンブロットの結果から、これら3種類のDMsが異なった遺伝子よりの産物で遺伝子ファミリーを形成する事が明らかとなった。3種類の内2種類のDMs(DMα and DMγ)は、脊髄の白質に限局した発現を認めミエリンタンパク質と考えられた。さらにDMγの部分アミノ酸配列が同じTorpedo californicaのニコチン性アセチルコリンレセプターの膜通過部分のアミノ酸配列と27%の相同性を示し、DM遺伝子ファミリーがイオンチャンネルと発生学的に同じ起源を有する事が示唆された。

（はじめに）PLPとDM-20は四肢動物中枢ミエリンの40%以上を占める疎水性タンパク質で唯一の遺伝子からのalternative splicing により生ずる産物である。これらPLPsは種を越えて高度に保存されており、膜貫通領域でみられる数種の点変異がミエリン形成不全を含む重度の神経障害を引き起こす事が知られている(1)。一方、進化的に古い脊椎動物である大部分の魚類（Chondrichthyes, Actinopterygii）の中枢及び末梢ミエリンではPLPsとは生物学的に全く無関係のPo蛋白質がミエリン鞘の接着に役割を果たしている。Po蛋白質は非グリア細胞にトランスフェクトした実験から細胞接着を顕著に促進する事が示されており、四肢動物末梢ミエリンの主要蛋白質であるが、中枢ミエリンには存在せずそこではPLPsがPoに置き変わっている(2)。従ってこれらPLPsは進化的に新しく付け加えられたものと考えられてきており、今日までPLPsにPoと同様な細胞接着作用を示す実験結果が得られていないのを考え合わせると、PLPsの高等動物である四肢動物での突然の出現やその意義はきわめて謎に包まれている。さらにミエリン形成不全動物にみられる所見や神経発生過程におけるPLP/DM-20遺伝子の発現はこれら蛋白質のオリゴデンドロサイトの分化、生存といったミエリン構成要素として以外の役割を強く示唆している(3,4)。我々は、魚類のなかでは最も両生類に近いと考えられている"living fossil"であるシーラカンスや肺魚におけるPLPに免疫化学的に交叉する蛋白質(2)に注目し、今日まで免疫化学的な検索では検出し得なかったPLPあるいはPLPに関連した物質が今からおよそ4億年前に現われたミエリンを形成する最古の脊椎動物である軟骨魚類（サメ、エイ）にも存在するのではないかと考えた。そこで哺乳類PLPの膜貫通領域のアミノ酸配列に対応した変性プライマーを作成し、PCR法による増幅を試みたところ2種類の軟骨魚類、Squalus acanthiasとTorpedo californica、から各々対応した3種類のDM-20に関連した新しい物質(DMs;DMα, DMβ and DMγ)のクローニングに成功した。

（方法及び結果）

1)PCR; PCRに用いる変性プライマーはラットPLPの第一膜貫通領域に対応した5'プライマー(PLP1)と第三および第四膜貫通領域に対応した3'プライマー(PLP3,PLP4)を作成した。Squalus acanthias 及びTorpedo californicaの脳からのRNAの精製はAGPC法により行った。PCR反応の陽性コントロールとしてラット脳からのRNAを用いた。逆転写酵素反応により生成したfirst strand cDNAをPCR反応の鋳型DNAとして用いた。40サイクルのPCR反応後、ラット脳RNAからのPCR産物はPLPおよびDM-20に一致したサイズのDNAバンドが認められた。一方軟骨魚類脳RNAからのPCR産物にはDM-20に一致したサイズのもののみが得られた。しかしHinfI,HaeIII,HphIの制限酵素によるPCR産物消化のパターンから少なくとも2種類以上のDNAが軟骨魚類脳からのPCR産物に含まれているものと推測された。これらのバンドをアガロースゲルにて分離後、プラスミッドpGEM1にサブクローニングしDNA塩基配列を決定した(Applied Biosystems社)。個々のcDNAクローンの推定アミノ酸配列から3種類のDM-20に類似した物質(DMs; DMα, DMβ, DMγ)の存在が明らかとなった。

2)cDNA cloning; PCRから得られたnovel DMsの全長の核酸配列およびアミノ酸配列を決定するため、Squalus ac

anthias脳からpoly(A)RNAを精製し既報の方法に従いcDNA libraryを作成した。さきにPCRから得られた個々のクローンのインサートをプローブとして^{32}P-dATPにてrandom labeling後、1X10^{5}のフェージプラークをスクリーニングし、各々のDMのmessageに対応したサイズのcDNAクローン2個以上を分離した。DNA塩基配列の結果からDMαは244個のアミノ酸からなりrat DM-20と62.7%のアミノ酸配列の一致を認めた。DMβ及びDMγは各々277個、245個のアミノ酸からなりDM-20とは43.6%,56.4%の一致を認めた。rat DM-20を含むこれら新しいDM familyはいずれも類似した疎水性プロットと4個の疎水性領域を示し、アミノ酸配列上の相同性はこれら疎水性領域及びその周辺に強くみられた。軟骨魚類で見いだされたDMsはいずれも第三と第四疎水性領域の間の親水性領域にN-glycosylationを受け得るArg残基を有した。さらに興味深いことにミエリン形成不全を引き起こす事が知られているミュータント動物(jimpy^{msd} mouse, md rat, shaking pupなど)やPerizaeus-Merzbacher病に見られるPLP/DM-20のアミノ酸置換はこれら新しく見いだされたDM-20関連蛋白質にも決して存在しなかった。

3)Northern and Southern blots; Squalus acanthias, Torpedo californica各々の脳から精製した1 μgのpoly(A)RNAをグリオキサールにて処理後1%アガロースゲルにて分離しナイロン膜に転写した。プローブはPCRから得られた個々のクローンのインサートを^{32}P-dATPにてラベルし用いた。DMαから作られたプローブはSqualus, Torpedo脳RNAに1.6kbの1本のバンドを示し、DMβは4.0kbのバンドを、DMγは4.0kbと2.6kbの2本のバンドを示し、各々のDMに対応したmRNAの存在が示された。Genomic southern blotにはTorpedo californicaの肝臓から既報の方法により精製したgenomic DNA 10μgを制限酵素EcoRIあるいはHindIIIにて消化して用いた。0.7%アガロースゲルにて電気泳動後、アルカリ処理しニトロセルロース膜に転写した。プローブはTorpedoから得られた3種類のDMを用いた。EcoRIで消化したDNAにはDMαで1.6kb,DMβで5.3kb,DMγで6.0kb,4.5kbのバンドを、またHindIIIで消化したDNAではDMαで9.4kb,DMβ,DMγで約20kbのバンドを示し、これら3種類のDMが各々異なった遺伝子からの産物である事が示された。

4)In situ hybridization; 体長13cmの幼若Squalus acanthiasをパラフォルムアルデヒド液にて固定後パラフィンに包埋し作成した薄切切片を、in situ hybridizationに供した。プローブは得られたcDNA cloneの蛋白翻訳領域をpGEM1に組み込み、SP6及びT7 RNA polymeraseを用いて、^{35}S-UTP でラベルされたsence及びantisence RNAプローブを作成し実験に供した。その結果、DMαおよびDMγのantisenceプローブで脊髄腹側の白質に強い陽性シグナルを認めた。その領域は抗Poタンパク質抗体で示されるPoタンパク質の分布とよく一致しており、DMα及びDMγがミエリンタンパク質である事が強く示唆された。

5) イオンチャンネルタンパク質とのホモロジー;今回見いだされた3種類のDMsをGCG社のFasta, Wordsearchで検索したところ、哺乳類、鳥類、両生類に存在するPLP以外には有意なシークエンスの類似性を有するタンパク質は検出されなかった。そこでDMsと同じ4個の膜貫通領域を持つ蛋白質のみに限って検索したところ、Torpedo DMγの第2から第3膜貫通領域の約90個のアミノ酸配列がTorpedoのニコチン性アセチルコリンレセプターのαサブユニットの膜貫通領域と27%の相同性を有する事が明らかとなった。

(まとめ) 本研究からPLPがこれまで考えられていたよりも発生学的に古い起源を有し、少なくともミエリンを形成する最古の脊椎動物である軟骨魚類にも存在することが示された。これら軟骨魚類でPLPは遺伝子ファミリーを形成し、しかもPoがミエリンの主要疎水性蛋白質として存在するこれら魚類におけるPLPの役割はミエリン構成要素とは考え難くPLPsの多機能的な作用の存在を強く示唆する。DMγにみられるイオンチャンネル蛋白質とのアミノ酸配列上の類似性はPLPsがイオンチャンネル蛋白質と発生学的に同じ起源を有する事と共に、PLPの多機能的な役割の一つが膜に選択的なporeを形成する事により果たされる可能性を示している。

(文献)

1. Hudson, L. (1990) Molecular genetics of X-linked mutants. Ann.New York Acad. Sci. 605: 155-165
2. Waehneldt, T.V. (1990) Phylogeny of myelin proteins. Ann. New York Acad. Sci. 605, 15-28
3. Ikenaka, K. et al. (1992) Selective expression of DM-20, an alternatively spliced myelin proteolipid protein gene product, in developing nervous system and in nonglial cells. J.Neurochem. 58, 2248-2253.
4. Timsit, S.G. et al. (1992) DM-20 mRNA is expressed during the embryonic development of the nervous system of the mouse. J.Neurochem. 58, 1172-1175.

266 細胞接着分子 L1 の組織依存的な選択的スプライシングの同定

武田泰生、阿相皓晃、三浦正幸、小林正明、植村慶一
（慶應義塾大学医学部・生理学教室）

〔要約〕細胞接着分子である L1 は、N 末側（細胞外部分）に 6 個のイムノグロブリン C2 様ドメインと 5 個のフィブロネクチン 3 型ドメインを持ち、一箇所の膜貫通部位と、C 末側に比較的短い細胞内部分を持つ、分子量約 200 KDa の高分子蛋白質である。選択的スプライシングの違いにより、L1 の細胞内領域の 4 つのアミノ酸（RSLE）が欠損しているアイソフォームが存在することは既に報告した。今回、逆転写および PCR 法を用いて、細胞外領域においても 5 つのアミノ酸（KGHHV）が欠損しているアイソフォームが存在することを明らかにした。さらに両アイソフォームの組織選択的な発現特異性を検討した結果、ラット、マウスの脳および神経芽細胞 NG108-15 株に発現する L1 は、両領域においてアミノ酸の欠損が認められない完全型であり、一方、ラット、マウスの坐骨神経系、ラット由来の不死化したシュワン細胞およびシュワノーマ（RN22）細胞に発現する L1 は、両領域共にアミノ酸が欠損したアイソフォームであることが示された。以上の結果、細胞接着分子 L1 遺伝子は、組織に依存した選択的スプライシングによって組織特異的にアイソフォームが発現されることが示唆された。現在、これらの機能的差異に関する検討を進めている。

［目的］

哺乳類の神経系は多種多様な細胞が、個体発生の過程において遺伝的にプログラムされた情報に従い、分裂増殖、移動および分化を繰り返しながら、目的の標的細胞と特定の機能的シナプスを形成することにより構築される。これらの細胞間で行なわれる動的な接着および解離は各細胞の膜表面に存在する細胞接着分子ならびに細胞外基質との相互認識作用により営まれている。当教室では、神経系におけるイムノグロブリンスーパーファミリー細胞接着分子：P0 および L1 に焦点をあて、分子生物学的ならびに細胞生物学的手法により、これら蛋白質の構造と機能の解析を行なってきた。L1 cDNA のクローニングの過程において選択的スプライシングの違いにより、ラットおよびヒト L1 の細胞内領域に 4 つのアミノ酸（RSLE）を欠損したアイソフォームが発現する可能性を示唆した[1,2]。今回我々は、ラット、マウスおよびヒト L1 の N 末端に近い細胞外領域においても選択的スプライシングの違いが生じることを認めた。さらに、L1 の細胞内部分および細胞外部分に見られる選択的スプライシングが組織特異的であることに関して検討を加えたので報告する。

［方法］

1. 各組織および細胞からの総 RNA の抽出

生後 18 日のラットおよびマウスを用いて脳および坐骨神経からチオシアン酸グアニジン－フェノール・クロロホルム法を用いて総 RNA の抽出を行った。神経芽細胞である NG108-15、N18TG、PC12 株ならびにラット E 20 日の坐骨神経から単離後コレラトキシンを用いて分裂増殖を繰り返し、不死化したシュワン細胞およびシュワノーマ（RN22）細胞からの総 RNA の抽出は、T-75 型フラスコ 1 ～ 5 枚を用いて、SDS－フェノール（簡便）法により行った。

2. PCR 法による L1 アイソフォームの検出

各組織切片ならびに培養細胞から抽出した総 RNA の各々 5.0 μg を逆転写反応後、2 つに分け、一方を細胞外領域の、他方を細胞内領域の選択的スプライシングの差異を検出する為の PCR に供した。不死化シュワン細胞および RN22 RNA 中には L1 mRNA が極微量しか存在しないことが予想されたので初回 PCR 反応後、internal primers を用いてさらに PCR を行い検出可能な量に増幅した。ラット L1 cDNA（翻訳開始部位ヌクレオチド "A" を 1 とする）塩基配列の -90 → -71 (RLP1)、541 ← 561 (RLP2)、3119 → 3139 (RLP3)、3751 ← 3768 (RLP4)、1 → 23 (RLP5)、169 ← 189 (RLP6)、3436 → 3454 (RLP7) および 3591→ 3609 (RLP8) に相当する oligonucleotides を合成し、primers として PCR に使用した。RNA から合成した逆転写産物の半量を RLP1 および RLP2 primers を用いて、残量を RLP3 および RLP4 primers を用いて初回 PCR を行った。反応生成物を 1.2 % agarose gel にて分離し、目的の cDNA フラグメントを単離精製後、これらを templates に用い、internal primers として各々 RLP5 および RLP6、RLP7 および RLP8 を用いて 2 回目の PCR を行った。

［結果］

初回 PCR の後、反応生成物の約 10 % を 1.2 % agarose gel にて分離した結果、脳、坐骨神経系、NG108-15、N18TG および PC12 の RNA では、両領域における PCR で約 650 bp の cDNA フラグメントが強く増幅された。一方、不死化シュワン細胞および RN22 の RNA においては、両領域共にこのバンドは検出できなかった。次に、gel にて分離した cDNA をナイロンセルロース膜へ転写した後、全長ラット cDNA を鋳型として作製したプローブを用いハイブリダイゼーションを行った結果、シグナルに強弱はあるものの、不死化シュワン細胞および RN22 を含めた、実験に供した全サンプル中で、約 650 bp 領域に単一のバンドが認められた。各サンプルから増幅された 650 bp cDNA フラグメントを単離精製後、これらを templates として 2 回目の PCR を行った。反応生成物の約 10 % を低分子ヌクレオチド分析用 meta-phore agarose の 3 % gel にて分離した（図 1）。L1 蛋白質の細胞外領域、特に N 末端に近い部分（図 1A）、および細胞内領域（図 1B）において組織特異的な選択的スプライシン

グが起こることが認められた。図 1A および 1B を比較した結果、ラットあるいはマウスに関わらず、坐骨神経系に発現する L1 は脳神経系に発現する L1 に対して細胞内外の両被検部位で各々 15 bp および 12 bp 短いことが認められた。NG108-15 株に発現する L1 は両被検部位で各々 +15 bp、+12 bp を持ついわゆる完全型 L1 であり、不死化シュワン細胞および RN22 株に発現する L1 は両被検部位で各々 -15 bp、-12 bp のいわゆる欠失型の L1 であることがわかった。N18TG 株および PC12 株では、両被検部位で脳および坐骨神経系で認められた両方の L1 型を併せて発現していることが明らかとなった。これらのバンドを各々サブクローニングした後、塩基配列を調べた結果を図 2 に示した。

[考察]

我々は今回 L1 蛋白質の細胞外領域の一部分を欠損したアイソフォームの存在を明らかにした。興味あることに、細胞外領域で 15 bp の欠損が認められる組織あるいは細胞では、細胞内領域においても 12 bp の欠損が認められ、この両者は組織特異的な選択的スプライシングの過程で共に並行して欠損する可能性が示唆された。細胞内領域に見られる 12 bp の欠損部分は、アミノ酸 4 つ（RSLE）をコードする短いエクソン部分であり、その -12 bp 型の L1 はマウスの myoblast やヒトのメラノーマ細胞などの非神経細胞で発現していることが報告されている[3]。一方、本実験結果でも認められたが、マウス、ラットおよびヒトの脳に発現する L1 は 12 bp エクソンを含んだ +12 bp 型であることが認められている。今回の実験において認められたラットおよびマウス L1 の N 末端側における 15 bp 欠損部分は Schachner らのグループによって報告されたマウス L1 遺伝子のエクソン 2 部分[4]と完全に一致しており、我々の結果は 12 bp エクソンと共に N 末側でも短い 15 bp エクソンが組織に依存して選択的にスプライスされていることを示唆した。即ち、神経細胞では 15 bp および 12 bp 両エクソンを含んだ完全型 L1 が発現し、シュワン細胞などの非神経細胞ではこれら両エクソンを欠損した欠失型 L1 が発現することを明らかにした。細胞内領域の 12 bp エクソンは RSLE というアミノ酸配列を認識しており、これは特に、Casein Kinase I および II によるリン酸化が可能な配列である[5]。従って組織に依存してこの 12 bp エクソンが選択的にスプライスされることは神経細胞あるいは非神経細胞の機能的役割に大きな影響を与えている可能性が示唆される。L1 同様にイムノグロブリンスーパーファミリーに属する N-CAM は、これまでに数多くのアイソフォームが認められており、これらも組織特異的にスプライスされることが知られている。さらに興味あることに細胞内ドメインに見られる 30 bp エクソン（VASE）部分は N-CAM の機能を大きく変化させることが報告されている[6]。L1 の N 末側 15 bp エクソン部分ならびに細胞内 12 bp エクソン部分が持つ重要性に関して、今後、組織選択的なスプライシングの機構ならびに機能的役割の両面から検討を深めていきたい。

図 1

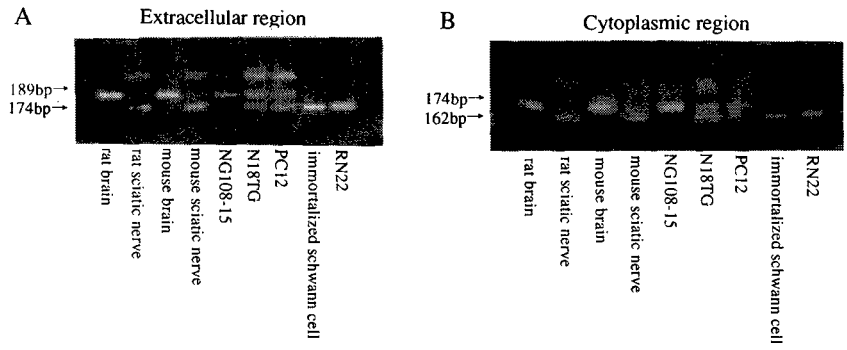
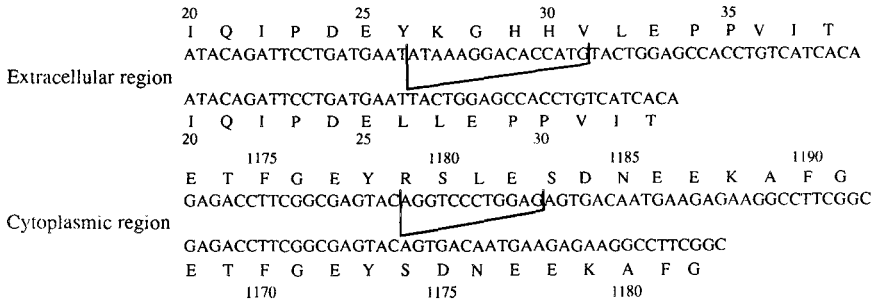


図 2



[文献]

1. Miura et al., FEBS Lett., 289: 91-95, 1991. 2. Kobayashi et al., BBA, 1090: 238-240, 1991. 3. Reid & Hemperly, J. Mol. Neurosci., 3: 127-135, 1992. 4. Kohl et al., J. Neurosci. Res., 32: 167-177, 1992. 5. 三浦 & 植村, 神経研究の進歩 36: 797-812, 1992. 6. Doherty et al., Nature, 356: 791-793, 1992.

267 マウス 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase 遺伝子のプロモーター領域の解析

服部和枝，遠山陽子，栗原　正
（創価大・生命研・神経化学）

〔要約〕

マウス2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) 遺伝子は２つのプロモーターを使うこととalternative splicingにより２種のmRNAが生じることが明らかとなっている．それぞれのmRNAの転写調節機構を詳細に調べるために下流から転写されるmRNAのプロモーター領域の活性のみを培養細胞へのトランスフェクション実験により解析した．プロモーターの部分欠失による転写活性の変化からプロモーター内に少なくとも２ヵ所の転写活性に影響するシスエレメントが存在することが示唆された．

［目的］

非常に高活性の2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase（CNP）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．CNP mRNAの発現は時期的にもミエリン形成時にピークに達し，CNPがミエリン形成に重要な役割を果たしていることが示唆される．しかしながら，CNPの機能は依然不明である．CNPは細胞の裏側に濃度が高いこと，アクチンと相互作用があること，またC末端がイソプレニル化することから，細胞の裏打ち構造において特殊な機能を担っている可能性がある．CNPタンパクはSDS-PAGEゲル上で近接した２本のバンド（CNPのダブレット）から成り，最近我々が見いだした２つのプロモーターの使用とそれに伴うalternative splicingはSDS-PAGEの成績をよく説明する（1, 2）．我々は２つのプロモーター領域の転写活性を別々に測定できるようなCATプラスミドを構築した．今回は特に下流プロモーター領域の解析を報告する．

［方法］

マウスCNP遺伝子のプロモーター領域中の細胞特異的発現に必要な領域の解析を行うためにマウスCNP遺伝子のプロモーターの下流クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）を接続した発現ベクターを構築し，培養細胞にトランスフェクションを行った．

１）CATプラスミドの構築：マウスCNP遺伝子の上流に存在するSma I部位からエクソン１内Hind III部位までの1.3 kbpの断片（エクソン０を含む）をCAT遺伝子の上流に方向が正になるように挿入しF5CATを作成した．F5CAT内のCNPプロモーターの5'末端からエキソヌクレアーゼIIIによって3'方向に種々の部分欠失を導入した．

２）トランスフェクション：細胞は５％ CO_2 存在下10％FCS添加DMEMを用いて培養した．CATプラスミド15 μgと内部標準としてのβ-GAL発現ベクター5 μgを 5×10^5 個のラットグリオーマ細胞株であるC6細胞にリン酸カルシウム共沈法によりトランスフェクトした．４８時間後に細胞を集め，凍結融解により得られた細胞抽出液のβ-galactosidase活性を測定した．

３）CAT assay：β-GAl活性により標準化した抽出液量を用いてCAT assayを行い，TLCにて生成物を展開したのちFujix Bio-imaging Analyzer (Fuji Film)を用いて解析を行った．

［結果および考察］

CNP遺伝子はalternative splicingにより生じる5'末端の異なる２種のmRNA (mRNA IとmRNA II) が存在する（図１）．それぞれのmRNAの転写開始点は約900 bp離れて存在し，それぞれの転写調節領域が一部重なりあった構造をとっている．これら２種のmRNAが独立して転写調節を受けているかあるいは関連しあって調節を受けているのか調べるため，まずエクソン０の下流側のみの転写活性を測定した．

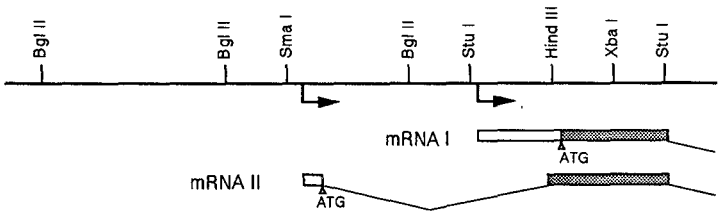


図1　マウスCNP遺伝子上流域の構造．　転写開始点を矢印で示す．2種のmRNAとそのalternative splicingの起こり方を表わす．　黒いボックスはタンパクのコード領域

CNP遺伝子のエクソン0より下流をCATに接続したプラスミド，CNPが発現しているC6細胞に導入しCATの一時的発現の強さで比較した．図2に見られるように下流側のプロモーターを5'側からmRNA Iの転写開始点より−760 bpまでを欠失すると転写活性が非常に強くなった．しかし，さらに欠失させた場合再び活性は低くなり，その後調節領域が短くなるにしたがって活性が徐々に増加した．転写開始点より−345 bpまでを欠失したところで活性はピークとなり，さらに短くなると活性は減少した．これらの結果からmRNA Iの転写には転写開始点の上流約400 bpが必要であること，−400 bp領域および-800 bp領域には転写活性に影響を及ぼすシスエレメントの存在が示唆された．また今回プロモーター活性測定に用いたエクソン0とエクソン1の間の領域はマウスとヒトの間でも塩基配列が非常によく保存されており，CNP遺伝子の転写調節にこの領域が特に重要であると考えられる．

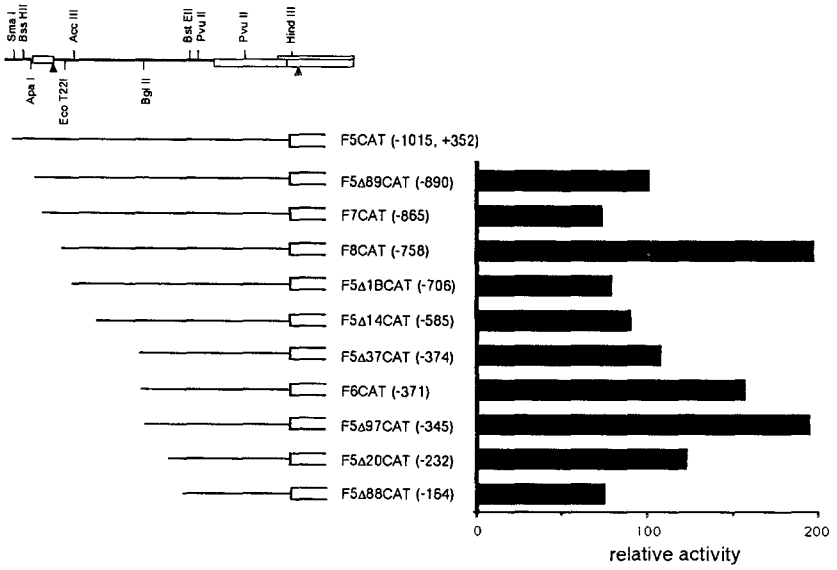


図2　F5Δ89CATを100としたときのプロモーター長によるプロモーター活性の比較

[参考文献]

1. T. Kurihara *et al.* (1990) Biochem. Biophys Res. Commun. *170*, 1074-1081.
2. T. Kurihara *et al.* (1992) Neurosci. Lett. *138*, 49-52.

268 ラットＰ０ｃＤＮＡを導入したtransgenicメダカと行動異常

坪川達也、宮崎勝己*、松本二郎*、植村慶一

（慶應大・医・生理、生物*）

〔要約〕

ミエリンＰ０蛋白が神経突起伸展促進作用を示すこと、及び哺乳類の末梢神経系、魚類の中枢及び末梢神経系など再生能の高い神経組織で発現が見られることにより、神経再生との関連が推測されている。そこでＰ０の生理学的機能解析の一環としてラットＰ０ｃＤＮＡを導入したtransgenicメダカの作製を試みた。得られたtransgenicメダカは、振動などの物理的な刺激に対して背腹の反転を伴う回転運動を示し、明らかな行動異常が認められた。transgenicメダカではラットＰ０ｃＤＮＡのｍＲＮＡの発現が見られ、免疫組織化学的検索では、有髄神経線維に沿ってＰ０蛋白の発現が認められた。電子顕微鏡的検索では、延髄有髄神経線維のミエリン構造に断裂が高い頻度で認められ、対照の正常個対のそれとは異なる像が観察された。これらの結果より、Ｐ０transgenicメダカに見られる行動異常にミエリン蛋白質Ｐ０の発現異常が関与している可能性が強く示唆された。

【緒言】

哺乳類のミエリンの主要膜蛋白質は、末梢神経系ではＰ０蛋白であり、中枢神経系ではＰＬＰ蛋白であるが、魚類等の下等脊椎動物においては、末梢神経系のみならず、中枢神経系でもＰ０様蛋白が存在する[1)]。最近、Ｐ０は神経突起の伸展を促進することが示され、神経系の再生能と関与することが示唆されている[2)]。下等脊椎動物では中枢神経系でも高い再生能を示すが、それはミエリンのＰ０様蛋白が関与している可能性がある。このように下等脊椎動物では、Ｐ０が末梢神経系、中枢神経系の両方の神経系で大きな役割を果たしているので、Ｐ０ｃＤＮＡを導入した下等脊椎動物の作製はこの蛋白の機能解析に有効であると考えられた。Ｐ０ｃＤＮＡを導入する動物として、1）遺伝的な純系が存在し、更に雌性発生や性転換ができるので遺伝的解析が行い易い点、2）生殖様式は体外受精で、卵が大きく（直径約1ｍｍ）操作が容易である点、3）世代時間が短く（孵化まで約10日、性成熟まで約90日、寿命約2年）、交配が一年中可能で、飼育が簡単に出来る点などからメダカを選んだ。本研究ではラットＰ０ｃＤＮＡをメダカ卵に導入し、成熟したメダカについて遺伝子工学的、免疫組織化学的及び行動学的解析を行った。

【実験方法】

純系ヒメダカ(*Oryzias latipes*)（名古屋大学、メダカ系統保存施設より供与）より受精卵を採取し、卵割開始前に卵膜に小孔を開けた後、矩形波発生装置を用いて、β－ａｃｔｉｎプロモーターを結合したラットＰ０ｃＤＮＡ発現ベクター（ｐβＡｃｔＰ０）[2)]を濃度1μｇ/μｌでＴＥバッファーに懸濁し、400V/cmの電圧で150μsec、3回処理するエレクトロポーレーション法により遺伝子導入を行った[3)]（fig.1）。　遺伝子導入した卵は室温で孵化、後は水槽で飼育した。得られたtransgenic founder間で交配を行って、第二世代Ｆ1を得た。対照としてＰ０ｃＤＮＡを発現ベクターに逆向きに組み込んだｐβＡｃｔＰ０'を上述の方法で受精卵に導入した。全ての解析はこれらのＦ1に対して行った。メダカの行動はビデオカメラで撮影し、各動作をビデオプリンターで解析した。

transgenicメダカにおけるラットＰ０ｃＤＮＡの組み込みと発現の確認のために、まずメダカの脳の全ＲＮＡを分離し、ｃＤＮＡを合成し、ＰＣＲのテンプレートとした。また、ラットＰ０ｃＤＮＡ塩基配列（翻訳開始部位ヌクレオチド を１とする）の 183 → 199 及び 692 ← 708 に相当するoligonucleotidesを合成し、これらを各々プライマー として用い、ＰＣＲを行った。更にこの産物を泳動、転写し、^{32}Ｐラベルしたラットｐ０ｃＤＮＡとハイブリダイズすることで確認した。Ｐ０蛋白の発現の検索のため、transgenicメダカの脳膜分画を調整し、ポリクローナル抗Ｐ０抗体によりウェスタンブロットを行った。

免疫組織化学的検索は、メダカを4%パラフォルムアミドで固定した後、クライオスタットにより8～14μｍの凍結切片を作成し、モノクローナル抗Ｐ０抗体を反応させ、ＦＩＴＣラベルまたはペルオキシダーゼを用いたＡＢＣ法により行った。ミエリン構造の電子顕微鏡による観察は、メダカを2.5%グルタルアルデヒド、1%酸化オスミウム-0.1Mカコジル酸緩衝液により固定した後、氷冷後、頭部を切断し、エポン812で包埋し、酢酸ウラン、クエン酸鉛による二重染色をした切片について電子顕微鏡ＪＥＯＬ100Ｓにより行った。

【結果と考察】

〈Ｆ1の作製〉　純系ヒメダカより得た受精卵、100個にラットＰ０ｃＤＮＡ発現ベクター（ｐβＡｃｔＰ０）を上述の方法で導入し、8匹の 成魚を得た。更にこれらを交配することで約150匹のＦ1を得た。対照はｐβＡｃｔＰ０'を72個の受精卵に導入し、12匹の成魚を得た。

〈発現の確認〉 ウェスタンブロット及びＲＴ-ＰＣＲにおいて、メダカの神経系には内在性のＰ０様分子が認められたが、今回用いたstringencyの高い条件においてはメダカ内在性Ｐ０様蛋白ｍＲＮＡはラットＰ０ｃＤＮＡとハイブリダイズしなかった。そこで、この実験条件においてtransgenicメダカと無処理の正常ヒメダカについてラットＰ０ｃＤＮＡの発現を調べると、transgenicメダカにのみラットＰ０の発現は認められた（fig.2）。〈行動の観察〉 transgenicメダカは、振動などの物理的な刺激や人影などに対して背腹の反転を伴う回転運動で反応し、行動異常を示した。対照のヒメダカはこれらの刺激に対して直線的な逃避運動を行うだけであり、特に背腹の反転は見られなかった。刺激無い普通の状態においては、transgenicメダカは対照であるヒメダカと変らぬ行動を示しており、急激な行動を示す時のみ、このような運動障害を示すので、なんらかの形で神経系に異常が起きていると考えられる。これらの異常行動は得られた一系統だけでなく、全てのＦ１に見られ、founderから継承したと考えられる。
〈組織分布〉 免疫組織化学的にラットＰ０の発現を調べたところ、ヒメダカに比べて特に有髄神経線維に沿って強いシグナルが見られた。今回用いたベクターはβ－ａｃｔｉｎプロモーターを用いているので、遺伝子導入されたラットＰ０は全身的に発現している可能性があるが、ミエリンでは細胞膜の重層が起きているので、膜蛋白であるＰ０もここに濃縮されていると考えられる。
〈ミエリンの電子顕微鏡による観察〉 延髄有髄神経線維の電子顕微鏡像は、ミエリンの巻き方には特に変化を示さなかったが、高い頻度で断裂が見られた。これがラットＰ０の発現による直接の影響かどうかは現在まだ検討中であるが、これは発現したラットＰ０が内在性Ｐ０様蛋白間の結合を弱めるなどの相互作用を示すことで、Ｐ０transgenicメダカのミエリンに異常をもたらしている可能性が考えられる。

今後はＰ０transgenicメダカの行動異常とＰ０の発現の関連を更に調べるため、解剖学的な異常の検索を進めると共に、内在性のＰ０分子を分離し、これとラットＰ０との相互作用を調べて、ミエリンの構造の異常と行動異常の関連の検討を行う計画である。さらには、発現部位の限定できるＰ０自身のプロモーターを用いた別のtransgenicメダカ及びＰ０の発現のないknock downメダカを作製、解析することにより、下等脊椎動物神経系におけるＰ０の役割を調べ、Ｐ０と神経の再生能と関連を明らかにしたい。

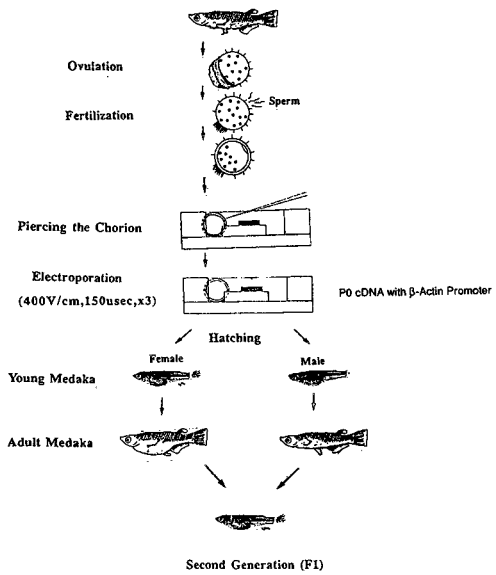


Fig.1 Generaton of rat P0 transgenic medaka fish

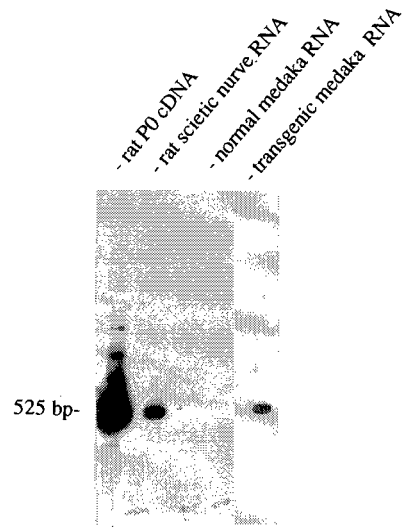


Fig.2 Expression of rat P0 cDNA

【文献】
1) Uyemura, K., et al, (1992), MYELIN:BIOLOGY AND CHEMISTRY, CRC press,481 - 508
2) Yazaki, .T, et al, (1991), Biomed.Res., 12, 223 - 230
3) Matsumoto, J., et al, (1992), Pigment Cell Res., 5, 322 - 327

人名索引 (ABC順，番号は演題番号を表します)

(A)

阿部輝雄……50
阿部敏明……75
安部川智浩……140・229
足立淳……254
安達一真……246
赤池昭紀……30
秋山一文……97
雨宮紀人……225
安藤正人76・117・156・183・246
安藤進……175
姉崎利治……44
青木則久……246
青木義矢……18
新井正一……76
新井孝夫……42
荒井好範……132・143
荒金太……201
荒木一明……89
荒木信夫……199
荒木亘……61
荒木陽子……113・215
浅井清文……52・170・186
浅井昌弘……206
朝倉幹雄……254
朝倉正……258
浅野省一……109
浅野富子……208
浅沼幹人……142・144
芦沢健……225
阿相皓晃……266
東均……49

(B)

馬場明道 109・137・163・252
Beaven, M.A. ……121

(C)

千葉厚郎……259
千葉賢三……172
千谷晃一……42・43・221
Chuang, D.M. ……218
Colman, D.R. ……265

(D)

土肥敏博……98
土居孝至……249・250

(E)

江頭亨……240
江川三生……252
Eksioglu, Y.Z. ……186
Emaduddin, M. ……113
江本浩幸……94・248
遠藤俊郎……257
遠藤泰……162・214
遠藤泰久……35
榎戸靖……79
榎本理世……141
江角浩安……33
Fishman, M.C. ……168
Frohman, L.A. ……220
藤井聡……106
藤森清……185
藤森修……70・71
藤嵜泰利……226・228
藤澤仁……120・219
藤城正敏……164
藤田公和……156・246
藤田潔史……261
藤田真幸……26
藤田茂樹……163
藤原満……260
深間内文彦……218
福田裕恭……216・217
福井裕行……122
福井義弘……59
福永浩司…25・88・107・201
福内靖男……27・199
福薗真一……185
古橋潔……221
古市貞一……263
古川昭栄……77
古玉大介……263
古津みを……176
古塚大介……152

(G)

Goldstein, M. ……153
五味愼太郎……27
Gomperts, B.D. ……181
後藤希代子……75
後藤幸代……110・111
Grundke-Iqbal, I. …237・238

(H)

芳賀和子……205
芳賀達也……205・222
萩原民雄……171
袴田康弘……263
浜登希子……191
浜本敏郎……223
浜之上誠……54
浜上尚也……162・214
花田敬久……51
花井一光……45
半澤宏子……185
播口之朗 37・39・136・234・237・238
長谷川浩……254
長谷川宏之……159
長谷川かおり……110・111
長谷川一子……255
長谷川和夫……254
長谷川成人……42
橋井美奈子……178
橋本篤司……87
橋本恵理……244
橋本均……109
橋本喜次郎……154・157
橋本重夫……37

橋本恒一…… 202
橋本裕子…… 2
畠中寛……3・34・53・79
畠瀬修…… 128
八田愼一…… 225・244
服部英幸……37・136
服部和枝…… 267
服部成介…… 2
服部優子……21
早原敏之…… 126
早石修…… 123
早川徹……26・190
林謙介…… 104
林恭三……77
林輝男…… 203・224
林要喜知……77
林陽子…… 135
日高弘義……68・198
秀和泉…… 181
東田陽博…… 178・197
樋口宗史…… 1
平井久美子…… 174
平岩雅男……44
平河多恵…… 258
平松緑…… 124
平野潤…… 179
平野誠…… 154・157
平島豊…… 257
平田洋…… 142・144
久永欣哉…… 4
久永真市…… 101
誉田晴夫…… 177
本藤久雄…… 154・157
本間好……30
本多虔夫…… 246
堀耕治…… 149・213
堀井新……49
堀川洋……50
堀越哲郎…… 7
堀尾嘉幸…… 122
細川浩…… 193
細川清……20・126
保住功……44

（I）

井端泰彦…… 118・125
一條真琴…… 199
市川正浩……20
市川真澄……79
市川佳幸……20
井戸達雄……99
伊賀正英…… 105
五十嵐道弘…… 168
五十嵐康…… 134・173
井原康夫……6・41・42・43
飯田淳子…… 186
飯田静夫……74
飯野哲……68
池田和隆……89
池田圭朗…… 165
池田正行…… 187
池田幸弥……61
池田康夫…… 4
池本光志……18
池中一裕……9・10
池内俊彦……53
以倉康充…… 237
今福淳……86・254
今井秀樹……45
今井礼子…… 166
今泉美佳……47
印南敏彦…… 250
稲葉真…… 192
稲垣冬彦……74
稲熊裕…… 110・111
伊野美幸…… 254
猪股裕二…… 204
井上敦子……22
井上和秀…… 82・91
井上幸紀…… 226・228
井上稔……76
井上順雄…… 116・180
井上繁雄……68
井上猛…… 230
井上順雄…… 177
井上芳郎……10
乾誠…… 105
犬塚貴……44
Iqbal, K. …… 237・238
石田敦彦…… 120・219
石田信一…… 256
石黒英明……44
石黒幸一…… 101
石黒麻利子…… 191
石井秀夫……94・248
石井加代子……66
石井當男…… 116
石川紘一…… 211
石川経子…… 248
石川良樹…… 104
石川敏三…… 138
石丸裕久…… 134・173
石岡憲昭…… 189
石田外樹……31
石塚徹……50
礒辺俊明……64
板倉智敏…… 159
板野俊文…… 128
伊東亜紀雄……62
伊藤英樹…… 226・228
井藤英喜…… 233
伊藤尚…… 210
伊藤仁一…… 100
伊藤三恵…… 210
伊藤直史…… 198
伊藤誠二…… 122
伊藤哲彦…… 261
伊藤哲一彦…… 161
伊藤朋子……84・207
伊藤康宏…… 5
糸山泰人…… 133
岩橋和彦……20
岩永操…… 182
岩崎和彦…… 126

岩田　錬……99
（J）
城　謙輔……258
（K）
加太英明……141
加賀谷有行……224
鹿川哲史……9・10
加賀谷孝樹……51
蔭山宏康……59
甲斐利弘……155・212
柿本泰男 15・21・249・250・251
郭　哲輝……57
鎌田　仁……124
鎌田武信 80・135・146・147・148・265
亀之園正弘……40・60
亀下　勇……219
亀谷富由樹……243
亀山仁彦……205・222
上口裕之……184・192
金山　巌……239
金澤一郎……259
神庭重信……206
金子　勲……40・60
兼子幸一……169
金子武嗣……123
金松知幸……151
金行孝雄……130
唐沢　健……257
笠原　嘉……161・261
笠井久隆……210
笠井陽子……84・112
笠間健嗣……74
笠茂公弘……127
柏原健一……97
柏渕信子……89
柏木久美子……77
柏木雄次郎……234
片田栄一……55・56・70・71
片岡喜由……81・145
片山幸一……51
片山雅文……155・212
加藤宏之……133
加藤兼房 54・110・111・133・208
加藤真理子……222
加藤僚子……257
加藤隆一……206
加藤　聖……31
加藤泰治……52・170・186
加藤尚彦……116・180
加藤　武……108・204
勝元栄一……19
桂　昌司……264
川原正博……106
川上秀史……98・245
川上順子……150
川島育夫……69
川島拓司……77
木原俊壱……36
金　哲熙……1
木村　宏……45・90
木村永一……242
木村　淳……30
木村真奈美……51
木村康弘……197
木下邦則……11
木下徳久……206
木下　武……40
吉良正浩……103
切池信夫……226・228
桐山賀充……32・33
桐生寿美子……194
岸本健雄……101
岸口稔睦……190
北川一夫 80・146・147・148・265
北浜邦夫……123
北原功雄……171
北島具秀……253
北嶋省吾……37・39
北村　健……96
北村佳久……32・33・45・159
木谷隆子……120
北山滋雄……98
来山義則……32・33
鬼頭昭三……131・176
木内祐二……158
木山博資……194
小林裕明……193
小林　央……44
小林　薫……261
小林和夫……106
小林正明……164・266
小林雅文……95
小林三和子……14
小林　聡……104
小林　繁……68
古賀千尋……94・248
小暮久也……133
小暮美樹……211
小原厚行……29
高坂新一……4・54
鯉淵典之……227・262
小出誠司……155・212
小池達郎……78・139
小泉修一……82・91
小島正己……3
小島直也……223
小町裕志……236
小松真紀子……124
小松眞史……23
小松本悟……199
小宮義璋……102・166・196
近　一夫……175
近藤洋一……142・144
近藤郁子……21
近藤啓次……21
小崎俊司……84
越川憲明……95
小谷政晴……69
甲村英二……26・190
小山　司……140・229・230
小山　豊……137・163
九穂泰三……211
久保武一……79

工藤　喬 136•237•238•239
久郷敏明…… 126
熊倉鴻之助……47•210
熊代　新……87
國井修一…… 156
國見由佳里…… 261
国下龍英……61
呉　繁夫…… 4
栗原堅三……14
栗原　正…… 267
栗岡　晋…… 189
栗田　孝…… 210
栗山欣彌……90•202•264
黒田重利……97
黒田洋一郎…… 106•170
黒田陽子…… 152
黒岩幸雄…… 158
黒木俊秀…… 157
黒谷篤之……75
車地暁生…… 169
車谷隆宏…… 136
櫛谷悦子……89
楠　進…… 259
轡田達也……89
桑野良三…… 260
桑島吾郎……27

（L）

Lee, K. ……25
李　愛軍……45
劉　健康…… 124
劉　国君…… 113•215
劉　勇…… 133

（M）

前田信明……12
前川昌平……85
前川剛志…… 138
前野浩巳…… 194
萬代研二…… 146•147•148
丸野内棣…… 5•72•73
丸山悦子…… 8
丸山　敬…… 231
丸山和佳子…… 115
丸山悠司…… 134•173
柾木　永……89
正宗　研……23
増田真理…… 100
増山善明…… 153
松田　誠…… 258
松田守弘……83
松田敏夫…… 109•252
松田　譲……47
松井英男…… 177•180
松井宏晃…… 254
松川則之…… 55•56•70•71
松本　明…… 211
松本　清…… 132•143
松本昌泰 80•135•146•147•148•265
松本清治…… 256
松本　孝…… 154•157
松尾義則……20•126
松岡一郎……14
松岡邦枝……64
松島秀行……30
松下幸司…… 146•147•148
松下正明……43
松本二郎…… 268
馬渡一浩……31
目黒裕之……89
美原　盤……27
三船和史……20
三木直正…… 1•18•57
三木新也…… 209
御子柴克彦 9•10•27•67•80•263
三辺義雄…… 178
南　雅文…… 114
南　勝…… 162•214
三澤日出巳…… 112
三品昌美……89
三須良実……22•129
三竹重久…… 55•56•70•71
三谷　章……81
水戸　敬……87
三森康世…… 245
三浦正幸…… 266
宮本　篤…… 242
宮本英七… 25•88•107•201
宮本　修…… 128
宮本聖也…… 254
宮田麻理子…… 150
宮武　正 38•44•74•187•235•236
宮崎勝己…… 268
宮崎康二…… 201
三好理絵…… 176
溝渕睦彦15•220•249•250•251
溝口克弘…… 4•248
水野有武…… 253
水野　昇…… 123
水野美邦……21
水島秀勝…… 132•143
望月秀雄…… 198
望月　薫……49
望月貴年……49
森　昭胤…… 141•142•144
森　啓…… 231
森　寿……89
森　則夫…… 256
盛政忠臣…… 130
森島真帆……42
森下理香…… 208
森田育男…… 187
茂呂　修…… 205
諸岡啓一…… 127
本橋伸高…… 203•216•224
毛利哲郎……58•172
撫井弘二……19•152
Muller, D. …… 107
村井為敦……95
村上富士夫…… 193
村上哲英…… 128
村本和世…… 106
村尾孝児……15•249
村崎欣子…… 178
村島善也…… 127

村山美由紀…… 191
村山俊彦…… 159
室田誠逸…… 187

（N）

鍋島俊隆……62
永井義隆……24
永沢道明……89
長嶋和郎……75
永田栄一郎……27
永田豊 76・117・156・183・246
永津郁子…… 261
内藤宏…… 261
中川摂子……36
中原辰雄…… 154
中井淳一…… 263
中井康光…… 132・143・195
中嶋一行……54
中島光業……77
中条茂男…… 195
中木敏夫…… 206
中本百合江…… 127
中村史雄…… 222
中村肇……93
中村英生…… 260
中村純太…… 189
中村薫…… 154・157
中村和彦……20・126
中村真…… 261
中村桃子……34
中村重信……92・96・98・245
中村俊……2・85
中村祐…… 37・39
中村洋一…… 145
中西亜紀…… 152
中西純一…… 254
中西圭子……52・170
仲西修…… 138
中野雄一…… 260
中尾純治…… 9
中岡隆志…… 223
中田博子…… 205
仲田義啓…22・179・181・209
中谷一泰…… 195
中山孝…… 116
中安博司……90
中沢憲一……91
直井信…… 115
成田正明……93
根木哲朗…… 128
根本康夫……84
根笹賢一…… 179
丹生谷正史…… 206
西彰五郎…… 200
西林佐紀子…… 142・144
西田朗 216・217・224・247
西江弘……38
西川徹……87
西木禎一……84
西村健 37・39・136・234・237・238・239
西尾チカ……3・34
西尾廣昭…… 179・209
西崎純…… 254
西沢幸夫……51
新田淳美……62
野川茂……27
野口鉄也…… 160・164
野路久仁子……46
野島庄七…… 257
野村正彦…… 149・213
野村総一郎…… 161
野村靖幸 32・33・45・65・159
野々村健……3・34
野々村禎昭……47
能登政彦……11
野崎博之……27
野澤義則…… 178
額田敏秀…… 222

（O）

O'Leary, D.D.M. ……13
尾形直則…… 145
小川紀雄…… 142・144
小川智…80・146・147・148
荻田喜代一……16・17・81・141
小河宏城…… 209
小口勝司…… 158
小倉潔……69
大石仁…… 123
大川清…… 258
大河内正康…… 234
大河内由香……52・170
大久保辰雄…… 189
大熊誠太郎…… 264
大熊勝治……12
大森彬…… 191
大森哲郎…… 140・229
大村裕……45
大西博…19・152・155・212
大野和茂……29
大野京子…… 156
於保力…… 207
大鹿英世…… 225・242・244
大嶋正人……37
大杉武……18
太田晃一…… 199
太田光熙…… 245
太田深雪…… 115
太田雪子……75
大竹英樹…… 262
大谷光弘…… 184・192
大塚成人…… 6
大塚康史…… 55・56・70・71
大槻秀夫……26・190
大槻俊輔 80・135・146・147・148
及川和夫…… 124
小鹿幸生…… 55・56・70・71
岡高恵……87
岡部登志男……83
岡田泰士…… 128
岡本昌也……80
岡本泰昌 203・217・224・247
岡村均…… 125・201
岡野栄之……67
岡崎勝男……68

奥村福一郎…… 129
奥野正景…… 226•228
大平敦彦……12•193
折茂肇…… 233
長田賢一…… 254
小山文隆……43
尾崎幸洋…… 253
小沢秀樹……69
小澤寛樹…… 244
小澤光一郎…… 121
（P）
Pettegrew, J.W. ……86
（R）
Riederer, P. …… 244
劉業奇…… 122
柳鍾薫……99
（S）
佐伯良修……24
杉崎哲朗…… 160
左合正周…… 184•192
佐原成彦…… 231
西須英雄……50
斉藤史明…… 235
斎藤浩…… 203•216
斉藤香彦……74
斎藤茂治…… 164
齋藤利和…… 225•244
坂部武史…… 138
坂井研一……97
酒井紀…… 188
榊孝之…… 190
崎村建司……89
迫田慎一郎……39
桜庭祐子…… 40•60
櫻井隆……47
佐野輝……21
佐野公彦……93
佐野護…… 182
Santos, D.E. …… 113•215
佐々木和男……45
佐々木健…… 132
笹木君仁……47
佐藤昭夫…… 233
佐藤厚子…… 254
佐藤淳子…… 189
佐藤和夫…… 129
佐藤誠……15
佐藤真……13
佐藤公道…… 114
沢明……43
澤温…… 161
澤田光平……51
澤田誠…… 5•72•73
沢本和延……67
関浅男……37
関本澄人…… 102
関根陽子……50
関谷紫…… 161
仙波純一…… 131•176
仙波りつ子……12
脊戸山景子…… 138
芝軒信次…… 211
柴田護…… 199
島津邦男…… 199
嶋津基彦…… 132•143
清水雅美 216•217•224•247
清水輝夫…… 259
下濱俊……30
下川雅丈……38
新川久義……39•136•239
篠田友孝……64
篠崎たき子…… 127
塩田清二…… 132•143•195
白井俊孝……27
白石哲也……36
白尾智明…… 104•165
白崎康文…… 236
庄盛敏廉…… 130
清水範夫…… 185
新谷太…… 206
祖父江憲治…… 103•105
Soderling, T.R. ……25
宋時栄……64
Stoppini, L. …… 107
Strittmatter, S.M. …… 168
須藤慎治…… 245
菅原恵…… 211
杉本央……83
杉田倫太郎…… 161
杉田竜太郎…… 198
杉浦弘子……48
洲脇寛……20•126
鈴木映二…… 206
鈴木二郎…… 127
鈴木眞…… 252
鈴木政美……42
鈴木龍雄……46
鈴木登志子…… 123
錫村明生…… 5•72•73
（T）
田平武……61
田渕和雄……36
多田博史…… 127
田口明彦……80
田口淳一…… 118
田井直……69
平英一……57
高寺恒雄……58
高城啓一……63
高木俊博…… 200
高羽夏樹……57
高原ひろみ…… 151
高橋明美…… 159
高橋章…… 134•173
高橋慶吉……61
高橋健一…… 185
高橋清久……87
高橋正樹……74
高橋正身……84•112•207
高橋恵…… 7
高橋俊一…… 210
高橋哲也…… 96•98
高橋勤…… 115

高橋康夫…… 260
高畑直彦…… 244
高久晃…… 257
高松研…… 160•164
高嶋幸男……87
竹田二美代…… 171
武田雅俊 37•39•136•234•237•238•239
竹田稔…… 132•143•171
武田良平……15•249•250
武田泰生…… 266
武井延之……35
竹本なぎさ……54
竹縄忠臣……30
竹島浩…… 263
武富保…… 167
竹内宏…… 113•215
高城健司…… 126
瀧孝雄……74
瀧尾擴士……42
田熊一浩…… 109•252
田丸政男……76•156
田村豊……30
田中秀和……18
田中淳一…… 149•213
田中順一…… 188
田中潤也…… 103
田中健一…… 144
田中喜久子…… 243
田中康一…… 137•175
田中耕太郎……27
田中正敏……94•248
田中亮……46•100
田中佐知子…… 158
田中秀逸……78•139
田中隆彦……94•248
田中稔久…… 239
種子田護……26
谷昭義…… 235
谷口寿章…… 221
谷向知…… 136
田岡万悟……64
田代信維…… 157
田代朋子…… 102•166
楯林義孝…… 234
立岔延族…… 117•183
Tatham, P.E.R. …… 181
寺田恭子…… 161
寺本哲之……51
寺島俊雄……69
戸部昭広…… 252
東田千尋……65
東田道久……65
隔道男…… 131•169
遠山育夫……45
遠山陽子…… 267
徳田隆彦…… 243
徳武哲…… 241
富田晃代…… 227
富山勝則……95
遠山正彌…… 190
鳥居剛……96
戸谷重雄…… 165•184•192
豊原敬三…… 188
豊島至……23
豊島聰…… 7
坪川達也…… 268
土田晃敬…… 158
土田和生……97
土橋宣昭…… 256
土屋潔…… 230
津田和志…… 153
津田正明…… 119
辻浩司…… 145
辻省次……44
辻崇一…… 223
辻村敦…… 264
塚田裕三…… 151
塚本徹…… 254
堤信也……40
堤哲之…… 154•157

(U)

内田庸子…… 101
内田洋子……6•44
内村英幸…… 154•157
内富庸介…… 216
宇田裕……44
上田周一…80•146•147•148
植田弘師……22•129
上田恵一……59
上田健治…… 232
植木孝俊……52•170
上村敬一…… 167
植村慶一…66•165•266•268
上村尚人…… 130
植村富彦…… 174
上野聡……24
氏家寛……97
裏出良博…… 123
宇佐美美穂子…… 231
生塩之敬……88

(V)

Vartanian, T. …… 168

(W)

和田博夫…… 233
若本寛起…… 184•192
脇初枝…… 175
和中明生…… 190
王瑋…… 116
王小兵……18
割谷孝貴……11
渡部和彦…… 188
渡辺明子…… 131
渡辺淳……42
渡辺英治……12•193
渡部紀久子…… 123
渡辺雅彦……89
渡邉建彦……99
渡辺達夫…… 105
綿野智一……91
Wolfgang, S. …… 205

(Y)

八木－中川勇三……28
八木剛平…… 206

柳生大祐…… 210
山田和雄……26•190
山田真久…… 9
山田雅司……53
山田紀子…… 40•60
山田茂人…… 200•248
山田孝…… 160
山上榮 19•152•155•212•226•228
山形一雄…… 186
山口時男……29
山口知子…… 150
山路隆之…… 224
山国徹……64•260
山倉智宏……89
山本秀幸……25
山本纊子……72
山本尚三…… 135
山元俊憲…… 158
山本恵史…… 196
山本由美子……49
山室裕…… 149•213
山中康光…… 240
山西嘉晴……51
山岡久也…… 261
山岡功一…… 261
山岡貞夫…… 227•262
山下拓史……92•96•98
山下俊英…… 190
大和谷厚……49
山内卓……48
山脇成人 203•216•217•224•247
山崎眞津美…… 172
柳原武彦…80•146•147•148
柳澤勝彦……38•235•236
矢内原昇……45
谷内一彦……99
矢野茂敏……88
保田好信…… 196
安井裕子……31
矢崎貴仁…… 192
横尾秀康……94•200•248
横谷昇……19
横山ちひろ…… 125
横山秀克…… 256
米田幸雄……16•17•81•141
米澤裕次…… 154•157
吉田明…… 112
吉田裕孝……41
吉田一成…… 184•192
吉田眞美……94•248
吉田武美…… 158
吉川和明……8•63•231
吉川真悟……67
吉川崇…… 252
吉見健二……37
吉岡昇…… 231
吉岡亨…… 7
湯浅龍彦…… 187
油布文枝…… 240
湯口貴導……26•190
結城伸泰……74
張唯…… 215
張玉祥……92•96•98

神経化学　32巻　第1号

平成5年10月12日発行
編集兼発行者　日本神経化学会
代表者　植村　慶一
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　㈱六甲商会