ISSN：0037－3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

Vol. 33 (No. 1), 1994

平成 6 年 10 月

神経化学

第37回 日本神経化学会大会論文集

PROCEEDING OF THE 37th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 松本

10月6日(木), 10月7日(金), 10月8日(土)

Vol. 33 (No. 1), 1994

日本神経化学会

編　集　委　員

（ＡＢＣ順）

藤　井　敏　弘	（信大・繊維）
林　　恭　三	（岐阜薬大）
日　高　弘　義	（名大・医・薬理）
亀　山　　勉	（名城大・薬）
假　屋　哲　彦	（山梨医科大・精神）
加　藤　兼　房	（愛知県コロニー）
加　藤　泰　治	（名市大・医・分子医研）
鍋　島　俊　隆	（名大・医・薬剤）
直　井　　信	（名工大・保健体育）
永　田　　豊	（藤田保健衛生大・医・生理）
永　津　俊　治	（藤田保健衛生大・総医研）
西　野　仁　雄	（名市大・医・生理Ⅱ）
小　幡　邦　彦	（岡崎共同研究機構・生理研）
大　平　敦　彦	（愛知県コロニー）
武　富　　保（代表）	（信大・医・加齢適研）
田　中　　亮	（名市大・医・生化）
上　村　敬　一	（信大・医・加齢適研）

目　　次

1．Syntaxin 3 の isoform の同定 …… 36
茨木京子、堀川　洋、森田貴雄[1]、森　　寿[1]、崎村建司[1]、三品昌美[1]、阿部輝雄
（新潟大学脳研究所・神経化学、[1]神経薬理学）

2．α_2-Adrenoceptor による側坐核 dopamine 遊離調節機構；$GABA_A$／benzodiazepine receptor 関与の可能性 …… 38
富山勝則、村井為敦[1]、越川憲明、小林雅文
（日本大学歯学部・薬理、[1]日本大学歯学部・麻酔）

3．シンタキシンのN型 Ca チャンネルとの結合部位の構造 …… 40
高橋正身、根本康夫、関口真理子
（三菱化成生命科学研究所）

4．ドパミンニューロンの除神経に伴うヒスタミン H_3 受容体の増加 …… 42
柳　鐘薫、谷内一彦、渡邊建彦
（東北大・医・第一薬理）

5．新規抗精神病薬 OPC-14597 のラット脳線条体ドパミン受容体に及ぼす影響 …… 44
三木新也、井上敦子、菊地哲朗[1]、森田誠治[1]、植田弘師[2]、三須良実[2]、仲田義啓
（広島大・医・総合薬・薬解、[1]大塚製薬・徳島新薬三研、[2]横浜市大・医・薬理）

6．PC 12 細胞における NMDA 依存性 Cl 電流 …… 46
吉田　明、高木　博、吉岡　亨、工藤佳久[1]
（早稲田大学・分子神経生物学、[1]三菱化成生命研）

7．NMDA シグナルによる海馬 Activator protein 1 の誘導 …… 48
東　泰孝、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

8．NMDA レセプターポリアミンドメインの新規アンタゴニスト …… 50
荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

9．PC 12 細胞における、亜鉛イオンによる ATP 応答の増強作用 …… 52
小泉修一、池田　真、井上和秀
（国立衛生試験所・薬理部）

10. チロシンキナーゼ阻害剤による中枢神経細胞のアポトーシスにおける AP-1 の関与 …… 54
武井延之、村上　章[1]、遠藤泰久
（京都工繊大・応用生物、[1]高分子）

11. NMDA 神経毒性に対する Diphenyliodonium の効果 …… 56
辻　浩司[1,2]、中村洋一[1]、片岡喜由[1]
（愛媛大学医学部・[1]第一生理学、[2]整形外科）

12. 低酸素耐性モデルの開発と耐性獲得における bFGF の役割 …… 58
榊　孝之、山田和雄、大槻秀夫、湯口貴導、今泉和則[1]、津田　学[1]、
高木　勉[1]、和中明生[2]、遠山正彌[2]、早川　徹
（大阪大学脳神経外科、[1]分子脳機構、[2]第2解剖）

13. 一過性脳虚血に伴う神経細胞死と迷走神経刺激および遮断の効果 …… 60
板野俊文、政田哲也[1]、松井秀樹、徳田雅明、岡田泰士[2]、根木哲朗[3]
村上哲英[2]、長尾省吾[1]、畠瀬　修
（香川医科大学・生理学、[1]脳神経科学、[2]生物学、[3]基礎スポーツ医学）

14. BDNF は小脳顆粒細胞のアポトーシスによるニューロン死を抑制する …… 62
久保武一、野々村健、小島正己、岡　哲志、榎戸　靖、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

15. NO のニューロン死惹起機構：NAD の Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase との反応促進の関与の可能性 …… 64
中澤美奈子、上原　孝、野村靖幸
（北海道大学薬学部・薬効学講座）

16. ヒトニューロブラストーマ SH-SY5Y 細胞における Bcl－2蛋白質の発現調節機構 …… 66
板野泰弘、野村靖幸
（北大・薬・薬効）

17. 培養神経細胞の細胞死機構における $pp60^{c\text{-}src}$ の役割 …… 68
小田　毅、小池達郎
（北大大学院理学研究科行動知能学）

18. 砂ネズミ海馬における遅発性神経細胞死の DNA 断片化とプロペントフィリンの保護作用 …… 70
戸田啓介、木原俊壱、白石哲也、鞠　硯、中川摂子、田渕和雄
（佐賀医科大学・脳神経外科）

19. 神経分化と NMDA 受容体チャネルサブユニットの発現変化 …… 72
渡辺雅彦、井上芳郎
（北海道大学医学部・解剖）

20. 5′-プロモーター領域／*lac* Z融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いた IP_3受容体 type 1 遺伝子発現の解析 …… 74
古玉大介[1,2]、下田耕治[3]、吉川真悟[1]、宮脇敦史[1]、古市貞一[1]、御子柴克彦[1]
（[1]東京大学医科研化学研究部、[2]大阪医大第一内科、[3]慶應義塾大学医学部実験動物センター）

21. GFAP 遺伝子導入によるアストロサイトーマC 6 細胞の増殖抑制 …… 76
戸田正博[1,2]、三浦正幸[1]、阿相皓晃[1]、戸谷重雄[2]、植村慶一[1]
（慶應大・医・[1]生理、[2]脳神経外科）

22. 海馬 NF-AT like DNA-Binding Protein および AP-1 発現への免疫抑制剤 Cyclosporin A投与の影響 …… 78
近藤洋一、浅沼幹人、西林佐紀子、岩田恵美、小川紀雄、森　昭胤
（岡山大医・分子細胞医学研・神経情報学部門）

23. 神経分化特異的蛋白質ネクジンの遺伝子構造と発現調節 …… 80
植月太一、杉浦弘子、河野朋子、吉川和明[1]
（都神経科学研・分子神経生物部門、[1]現大阪大学蛋白研・蛋白質機能制御部門）

24. 神経細胞の核特異的タンパク質 5E5 の cDNA クローニングとそのタンパク質機能解析 …… 82
鈴木恵理香、小幡邦彦[1]、赤川公朗[2]
（総合研究大学院大学・生命科学科、[1]生理学研究所・神経化学、
[2]杏林大学・医学部・第二生理）

25. ニワトリ gicerin cDNA を導入した zebrafish の神経特異発現 …… 84
金　哲熙、平　英一、郭　哲輝、岡本　仁[1]、中平健祐[2]、池中一祐[2]、樋口宗史、三木直正
（大阪大・医・第一薬理、[1]慶應大・医・生理、[2]生理研・神経情報）

26. PC12D細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストによる MAPK の活性化について；PKC、カルシウムと Raf-1 の関連 …… 86
隈原英子、海老原達彦、三枝理博、David Saffen
（東京大学・医学部・脳研・生化学部門）

27. 初代培養前脳基底野ニューロンにおける NGF レセプター mRNA の発現に対する神経栄養因子の効果 …… 88
小島正己、池内俊彦、畠中　寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

28. Leucine Rich Repeats（LRRs）構造を有するマウス脳由来遺伝子のクローニング …… 90
谷口弘樹、高木　勉、遠山正弥[1]、和中明生[1]
（大阪大学・医学部・分子脳機構（田辺）寄付講座、[1]解剖学第2講座）

29. 不死化細胞株を用いた多能性神経幹細胞の増殖と分化の分子機構の解析 …… 92
中福雅人[1,2]、中川康史[1,3]、貝渕弘三[2]、中村　俊[1]
([1]国立精神神経センター・神経研、[2]奈良先端大・バイオ、[3]東大医科研)

30. NG 108-15 細胞および関連細胞における新規因子 TA 20 の神経分化機能 …… 94
東田千尋、長井忍布、野村靖幸
(北海道大学・薬学部・薬効学)

31. 細胞接着因子 gicerin のサブタイプの構造と機能 …… 96
平　英一、薙野智子、高羽夏樹、三木直正
(大阪大学医学部・第一薬理)

32. レチノイン酸による神経細胞分化の分子機構 …… 98
桃井　隆、東真木子、小高亜矢子、武笠　毅、中村　俊[1]
(国立精神神経セ神経研究所疾病5部、[1]診断研究部)

33. ロイシンリッチリピート蛋白ファミリーの同定と発生過程神経系における発現 …… 100
田口明彦、和中明生、森　徹自、松本和政、今井祐二[1]、高木　勉[1]、遠山正彌
(大阪大学・医学部・第二解剖、[1]分子脳機構(田辺)寄付講座)

34. LIM／homeodomain 蛋白ファミリーに属する新規遺伝子のクローニングとその神経系における遺伝子発現 …… 102
松本和政、和中明生、森　徹自、田口明彦、遠山正彌
(大阪大学医学部・第二解剖)

35. eph サブファミリーに属する新規リセプターチロシンキナーゼの遺伝子クローニングと神経系における発現 …… 104
森　徹自、和中明生、田口明彦、松本和政、遠山正彌
(大阪大学医学部・第二解剖)

36. ミクログリアのサブタイプの同定とその性質 …… 106
澤田　誠、錫村明生、田中正彦、丸野内棣
(藤田保健衛生大学・総医研・応用細胞、医学部・神経内科)

37. ラット脳の MAP 1 キナーゼ活性について …… 108
藤井敏弘、渡辺正知、中村　晶、近藤慶之
(信州大学・機能高分子)

38. タウのリン酸化・脱リン酸化と脳 cdc 2 様キナーゼ／cdk 5 …… 110
久永真市、岸本健雄
(東工大・生命理工)

39. プロリン指向性蛋白質燐酸化酵素による MARCKS 燐酸化反応 …… 112
山本秀幸、荒金　太、久永真市[1]、福永浩司、岸本健雄[1]、宮本英七
（熊本大学医学部・第一薬理、[1]東京工業大学・生命理工）

40. 海馬長期増強における Ca^{2+}／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの内在性基質 …… 114
福永浩司、D. Muller[1]、宮本英七
（熊本大・医学部・第一薬理、[1]ジュネーブ大・医学部・薬理）

41. Ca^{2+}／calmodulin-dependent protein kinase V における燐酸化反応とその活性調節機構 …… 116
太田英正、杉田竜太郎、伊藤直史、望月秀雄、日高弘義
（名古屋大学・医・薬理）

42. 神経特異蛋白質 NAP-22 の解析 …… 118
前川昌平[1,2,3]、中村　俊[3]
（[1]東大・院・理・生化、[2]京都工繊大・応用生物（現）、[3]国立精セ・神経研診断）

43. アルコール依存症におけるアセトアルデヒド代謝酵素の遺伝子型の影響 …… 120
岩橋和彦、宮武良輔、洲脇　寛、中村和彦、市川佳幸[1]、松尾義則[1]、早原敏之[2]、
細川　清[3]
（香川医科大学精神神経科、[1]生化学、[3]同・付属病院、[2]国立療養所・南岡山病院臨床研究部）

44. PCR 法による Ramsay Hunt 症候群患者からの水痘、帯状疱疹ウイルス DNA の検出 …… 122
村上信五、中城有喜[1]、溝淵睦彦[1]、羽藤直人、柳原尚明
（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室、[1]愛媛大学医学部神経精神医学教室）

45. Fisher 症候群患者から分離された *Campylobacter jejuni* のリポ多糖と GQ1b ガングリオシドの分子相同性 …… 124
瀧　孝雄、結城伸泰、飯田静夫、田井　直[1]
（東京医歯大・分子医化、[1]都臨床研・腫瘍免疫）

46. ニーマンピック病神経型と非神経型における遺伝子変異の検討 …… 126
井田博幸、衛藤義勝
（東京慈恵会医科大学小児科）

47. ゴーシェ病の中枢神経障害の病因に関する研究：CBE を用いての実験的ゴーシェ病 …… 128
衛藤義勝、山本敏晴、川目　裕、上原恵子、大橋十也、井田博幸
（東京慈恵会医科大学小児科）

48. Adrenoleukodystrophy の分子遺伝学的研究 …… 130
小林卓郎、安武多恵子、新納信江、山田　猛、古谷博和
（九州大学医学部脳研神経内科）

49. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）における CAG 繰り返し配列の somatic mosaicism について …… 132
上野修一、小牟禮修[1]、久野貞子[1]、小谷泰教、近藤哲次、佐野　輝
（愛媛大・医・神経精神医学、[1]国立宇多野病院・神経内科）

50. ミエリン形成期前段階におけるシュワン細胞の細胞死 …… 134
中尾純治、村上善紀、植村慶一
（慶應義塾大学医学部・生理学教室）

51. 低分子量ストレス蛋白質に高いホモロジーをもつ 20-kDa 蛋白質（p20）：ラット後肢筋における発達、座骨神経切除、腱切断に伴う変化について …… 136
稲熊　裕、長谷川かおり、伊東秀記、加藤兼房
（愛知県コロニー発達障害研究所・生化学）

52. 培養セロトニン産生細胞におけるトリプトファン水酸化酵素レベルの決定要因としての酵素タンパク分解について …… 138
長谷川宏幸、大黒一哉
（西東京科大・バイオサイエンス）

53. ホルボールエステルによるヒスタミンH_1受容体遺伝子転写活性増加と受容体アップレギュレーション …… 140
福井裕行
（大阪大学医学部・第二薬理学）

54. ヒスタミンH_1受容体のリガンド認識機構について …… 142
大田和美、林　秀行、鏡山博行、福井裕行[1]
（大阪医大・医化学、[1]大阪大学医学部・第二薬理）

55. ATP 誘発内向き電流およびドパミン放出に対するアデノシンの両方向性制御 …… 144
井上和秀、小泉修一
（国立衛生試験所・薬理部）

56. 一酸化窒素（NO）誘発性 acetylcholine 放出における peroxynitrite の役割 …… 146
大熊誠太郎、陳　大志、桂　昌司、長谷川武史[1]、栗山欣弥
（京都府立医科大学・薬理、[1]同・放射性同位元素研究室）

57. セロトニンによるラット前頭葉アセチルコリン分泌の制御機構（I）：セロトニン分泌促進剤 Fenfluramine の効果 …… 148
平野　均、山田通夫、H. C. Fibiger[1]
（山口大学医学部神経精神科、[1]ブリティシュ・コロンビア大学医学部精神科）

58. 開口放出の Priming Step に対する Mastoparan の抑制作用 …… 150
御園生裕明、今泉美佳、池田　顕、熊倉鴻之助
（上智大学・生命研・神経化学）

59. 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体
Ⅳ　ドーパミンD１、D２受容体作動薬および拮抗薬の脳内微量注入による自傷行為の誘発および抑制 …… 152
岡村　均、村上　剛[1]、中村　亨[2]、井端泰彦
（京都府立医科大学・第二解剖、[1]麻酔、[2]歯科）

60. シナプス活動、グルココルチコイドによって調節される脳の誘導型プロスタグランジン合成酵素 …… 154
山形要人
（大阪大学医学部第一薬理）

61. マウス胎生期の脳における 2′, 3′-Cyclic-Nucleotide 3′-Phosphodiesterase 遺伝子の発現 …… 156
笠間弘美、栗原　正
（創価大・生命研・神経化学）

62. ミエリンプロテオリピッド蛋白質遺伝子ファミリー
—ミエリン形成脊椎動物での普遍的存在— …… 158
北川一夫[1]、松本昌泰[1,2]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]、David R. Colman[3]
（[1]大阪大学医学部第一内科、[2]神経内科、[3]米国マウントサイナイ医科大学）

63. ミエリン塩基性蛋白質 3′ 非翻訳部位 RNA の遺伝子発現における影響について …… 160
上野修一、近藤哲次、小谷泰教、佐野　輝、柿本泰男、A. T. カンパニオーニ[1]
（愛媛大学・医・神経精神医学、[1]UCLA Medical School Psychiatry）

64. １本鎖 CRE 結合蛋白質（ssCRE-BP）の遺伝子発現と性質 …… 162
大杉　武、青木義矢、谷口直子、中野浩一、田中秀和、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

65. ラットＣ６グリオーマ細胞における細胞質型ホスホリパーゼ A_2 の IL-1β による誘導とその遺伝子上流解析 …… 164
森井博史[1,3]、尾崎美和子[3]、Rajes Qvist[3]、渡辺恭良[2,3]
（[1]新技術事業団さきがけ研究21細胞と情報、[2]バイオ認識プロジェクト、
[3]大阪バイオサイエンス研究所）

66. リポ多糖によってラット脳内に誘導型 NO 合成酵素が発現する …… 166
鈴木映二[1,2]、新谷　太[1,2]、永田　清[1]、山添　康[1]、中木敏夫[1]、神庭重信[2]、加藤隆一[1]、浅井昌弘[2]
（慶應義塾大学医学部・[2]精神神経科学教室、[1]同薬理学教室）

67. 中枢神経系における IL-10 の産生とその作用について …… 168
水野哲也、錫村明生[1]、澤田　誠[2]、丸野内棣[2]
（名古屋大学神経内科、藤田保健衛生大学・[1]神経内科、[2]応用細胞）

68. ラット視床下部における拘束ストレスによるモノアミン代謝の亢進ならびに血漿 ACTH の増加におけるインターロイキン－1の関与 …… 170
新谷　太[1,2]、中木敏夫[2]、佐藤耕一[1]、神庭重信[1]、加藤隆一[2]、浅井昌弘[1]
（慶應義塾大学医学部・[1]精神神経科学教室、[2]薬理学教室）

69. HNK－1関連抗原に対する抗体とサイトメガロウイルス感染 …… 172
窪田和興、黒谷篤之、後藤希代子、阿部敏明
（帝京大学医学部小児科）

70. 抗 HCNP 抗体によるラット末梢神経系の免疫組織化学的検討 …… 174
片田栄一、三竹重久、松川則之、岩瀬　環、大塚泰史、継　泰城、小鹿幸生、藤森　修[1]
（名市大・医・第二内科、[1]名市大・医・第二解剖）

71. 脳内の NF-AT like DNA-binding protein …… 176
浅沼幹人、西林佐紀子、近藤洋一、岩田恵美、小川紀雄、森　昭胤
（岡山大医・分子細胞医学研・神経情報学部門）

72. 酸性線維芽細胞成長因子の内分泌系および交感神経系に対する作用 …… 178
大村　裕、松本逸郎、佐々木和男、新島　旭
（日本臓器・生物活性研、長崎大学・医学部、富山大学・工学部、新潟大学・医学部）

73. 肝細胞成長因子（HGF）の神経栄養活性 …… 180
浜之上誠、竹本なぎさ、松本邦夫[1]、中村敏一[1]、中嶋一行、高坂新一
（国立精神・神経センター神経研究所・代謝研究部、[1]大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍生化学研究部）

74. 神経成長因子で誘導される転写因子 NDF 1 の cDNA クローニング …… 182
樋口宗史、李　炳生、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

75. 成長抑制因子（GIF）による β-amyloid toxicity の減弱 …… 184
内田洋子、増水章季[1]、井原康夫[2]
（都老人研神経病理、[1]日本電子 ESR 応用研究室、[2]東大脳研病理）

76. マウス胎児期におけるニューロトロフィン－3遺伝子の発現 …… 186
東條英明、高見健治[1]、改正善彦、中田　貢、阿部敏男[2]、志甫　理[3]、五十嵐貢一
（武田薬品開拓第二研究所、[1]薬剤安全性研究所、[2]実験動物管理室、[3]ROR 研究部）

77. プロサポシンの海馬錐体細胞保護作用 …… 188
佐野　輝、松田正司[1]、温　同春[1]、小谷泰教、近藤啓次、上野修一、柿本泰男、吉村裕之[2]、阪中雅広[1]
（愛媛大・医・神経精神、[1]第2解剖、[2]実験実習機器センター）

78. プロサポシンの坐骨神経再生促進作用 …… 190
小谷泰教、佐野　輝、松田正司[1]、近藤啓次、上野修一、柿本泰男、阪中雅広[1]
（愛媛大・医・神経精神、[1]第2解剖）

79. 生後ラット脳から培養した種々のコリン作動性ニューロンとその生存維持 …… 192
阿比留康弘、野々村健、西尾チカ、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

80. アストロサイトによる赤血球分化増殖因子エリスロポエチンの生合成 …… 194
増田誠司、永尾雅哉、佐々木隆造
（京都大学農学部食品工学科）

81. ラット組織におけるニューロトロフィン－3の濃度 …… 196
仙波りつ子、新谷麻江[1]、加藤兼房
（愛知県コロニー・研究所、[1]武田薬品㈱・開拓第二研究所）

82. マウス脳内 NT－3 量の加齢による変化 …… 198
改正善彦、新谷麻江、西田真由美、福元宏明[1]、五十嵐貢一
（武田薬品工業㈱・開拓第2研究所、[1]創薬第1研究所）

83. 神経系細胞上のエリスロポエチン受容体 …… 200
永尾雅哉、増田誠司、安田佳子[1]、佐々木隆造
（京都大学農学部食品工学、[1]近畿大学医学部第1解剖）

84. プロテオグリカン型チロシンホスファターゼの同定と性質 …… 202
前田信明、浜中裕喜、野田昌晴
（岡崎国立共同研究機構・基生研）

85. ビデオマイクロスコープを用いた細胞動態リアルタイム解析
－RBL-2H3細胞における開口放出とプロテインキナーゼCの動態解析を中心に－ …… 204
小澤光一郎、升島　努
（広島大・医・総合薬・薬品分析化学）

86. CaM-キナーゼⅣのカルシウム／カルモデュリンによる不活性化とマグネシウムイオンによる再活性化 …… 206
木谷隆子、奥野幸子、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化学）

87. C 6細胞における hsp27 および αBクリスタリンのストレス応答のアラキドン酸カスケード阻害剤による修飾 …… 208
伊東秀記、稲熊　裕、長谷川かおり、小澤　修、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

88. GAPⅢ、新しい GTPase-activating protein ファミリーメンバー …… 210
馬場広子、Babbet Fuss, Joseph B. Watson, and Wendy B. Macklin
（Mental Retardation Reseach Center, UCLA, U.S.A.）

89. コレシストキニン-B受容体を介する細胞内シグナル伝達とその細胞生物学的意義についての検討 …… 212
松井利充、谷口泰造、伊藤光宏、村山　徹、岩田暢子、千原和夫
（神戸大学医学部・第3内科）

90. 神経幹細胞に対する APP の作用 …… 214
林要喜知、柏木久美子、中島光業、太田　淳、川島拓司、吉川和明[1]
（森永乳業・生科研、[1]大阪大学・蛋白研）

91. トランスグルタミナーゼにより架橋されたアルツハイマー β／A4 アミロイドペプチドの神経細胞毒性 …… 216
佐々木隆造、増田誠司、品川理佳、伊倉宏司[1]、高畑京也[2]
（京都大学農学部、[1]京都工芸繊維大学物質工学科、[2]岡山大学農学部）

92. アルツハイマー病脳変性神経細胞におけるニューロフィラメントの異常 …… 218
中村　祐[1,2]、武田雅俊[1]、新川久義[3]、服部英幸[4]、播口之朗[1]、西村　健[1]
（[1]大阪大・医・神経、[2]小坂病院、[3]狭山病院、[4]美原病院）

93. 軽微な頭部衝撃の繰り返しにより惹起される細胞骨格蛋白の変化 …… 220
金山　巌、武田雅俊、新川久義、西村　健
（大阪大学医学部精神医学教室）

94. アルツハイマー病脳に特徴的な遺伝子の同定：カルボキシメチルトランスフェラーゼ …… 222
山本明広、北村大介[1]、渡辺　武[1]、白沢卓二[2]、近藤威史、森　　啓
（都精神研・分子、[1]九大・生医研・感染防御、[2]都老人研・分子病理）

95. 老人脳における apolipoprotein E の genotype とアルツハイマー病病変ならびに関連遺伝子発現制御 …… 224
小山文隆、井原康夫
（東京大学医学部脳研脳病理）

96. βアミロイド過剰発現下における神経細胞代謝の変化 …… 226
国下龍英、池田幸弥、荒木　亘、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）

97. Alzheimer 病および Down 症脳分画におけるAβ免疫反応性の生化学的検討 …… 228
柳澤勝彦、新海泰久、井原康夫、尾高麻乃[1]、鈴木伸宏[1]、嶋田裕之[2]
（東京大学・医・脳研・脳病理、[1]武田薬品・開拓一研、[2]東京医大・病理）

98. 頭蓋内外血管可溶性画分におけるβアミロイド蛋白の定量 …… 230
新海泰久、柳澤勝彦、井原康夫、尾高麻乃[1]、鈴木伸宏[1]、吉村正博[2]
（東京大・医・脳研・脳病理、[1]武田薬品工業・開拓一研、[2]東京都監察医務院・病理）

99. アミロイドβタンパクのC末端特異的酵素免疫測定法 …… 232
尾高麻乃、石橋祥弘、菊池　崇、北田千恵子、鈴木伸宏
（武田薬品工業㈱・開拓第一研究所）

100. 特異抗体による髄液中 HCNP の測定法の検討とその応用 …… 234
継　泰城、小鹿幸生、松川則之、岩瀬　環、大塚泰史、三竹重久、片田栄一
（名古屋市立大学第二内科）

101. D-Ser 含有 β-amyloid によるコハク酸脱水素酵素の特異的低下作用および海馬神経細胞変性作用について …… 236
山田紀子、桜庭祐子、熊谷善弘、金子　勲
（三共株式会社・神経科学研究所、第一生物研究所）

102. βアミロイドA4ペプチドのイムノアッセイ系と髄液および脳抽出液中で検出される免疫活性について …… 238
加藤兼房、長谷川かおり、伊東秀記、稲熊　裕、大野紘宇[1]、山本良平[2]
（愛知県コロニー・研・生化、[1]㈱カイノス、[2]クラボウ技研）

103. PHF タウの異常リン酸化部位の同定 …… 240
長谷川成人、森島真帆、瀧尾擴士[1]、鈴木政美[2]、吉田裕孝、千谷晃一[2]、井原康夫
（東京大学脳研病理、[1]理化学研究所生体分子解析、[2]藤田保健衛生大学総医研）

104. アルツハイマー病脳の異常リン酸化タウのリン酸化部位について …… 242
以倉康充、工藤　喬、Inge Grundke-Iqbal[1]、Khalid Iqbal[1]、武田雅俊、西村　健
（大阪大・医・精神医学、[1]New York Institute for Basic Research）

105. タウプロテインキナーゼⅡ（TPKⅡ）の活性調節サブユニット（p23） …… 244
内田庸子、石黒幸一、大沼　純、米倉小百合、高松昌子、今掘和友
（三菱化成生命科学研究所）

106. タウプロテインキナーゼⅠのラット胎仔神経系における分布 …… 246
藤田　忍、高橋美帆、長谷川準子、今掘和友
（三菱化成生命科学研究所・プロジェクト2）

107. グルタミン酸応答における c-*fos*, *zif*／268誘導に対する細胞外カルシウム流入の優性的効果 248
津田正明
（岡山大学・薬学部・微生物）

108. グルタミン酸の神経系株化培養細胞、(PC12) 毒性に対する抗酸化性薬剤 probucol の効果… 250
内藤通孝、梅垣宏行、井口昭久
（名古屋大学医学部老年科学）

109. アミノ酸交換輸送系を介するグルタミン酸神経細胞死の成因と防御 …… 252
馬渡一浩、杉谷加代、安井裕子[1]、加藤　聖[1]
（金沢大・医療短大・衛生技術、[1]金沢大・医・神経情報研伝達）

110. ラット海馬神経細胞初代培養系における non-NMDA 受容体を介する神経細胞死に対する YM 90 K の作用 …… 254
大野和茂、岡田正路、小原厚行、山口時男
（山之内製薬株式会社・第一創薬研究所）

111. 砂ネズミ脳虚血における脳内 Ca^{2+}誘発性Ca^{2+}放出チャンネルの変化に関する研究 …… 256
野崎博之、福内靖男、田中耕太郎、五味愼太郎[1]、美原　盤[2]、野川　茂、永田栄一郎、近藤太郎
（慶應義塾大学神経内科、[1]大田原赤十字病院神経内科、[2]脳血管研究所美原記念病院）

112. 大脳皮質障害に伴い発現上昇する遺伝子の検索
－Ser／Thr protein kinase 遺伝子 sgk の傷害脳における発現－ …… 258
今泉和則[1,3]、津田　学[1,3]、和中明生[2]、遠山正彌[2]、高木　勉[1]
（大阪大学医学部・[1]分子脳機構（田辺）寄付講座、[2]解剖学第二講座、[3]田辺製薬生化研）

113. ラット局所脳虚血中及び血流再開後の脳内 NO 産生増大とその由来 －NO 電極装置を用いた in vivo 直接定量－ …… 260
長藤寿昭、杉山昌一、松居　徹[1]
（中外製薬㈱・創薬第四研究所、[1]埼玉医大総合医療センター脳外）

114. 一過性脳虚血後の ATP・ユビキチン依存性蛋白質分解系の変化 …… 262
上久保毅[1,2]、林　　敬[1]、野賀正史[1,3]、大川　清[1]
（東京慈恵会医科大学・[1]医化学、[2]脳神経外科、[3]精神神経科）

115. 培養神経細胞を用いた in vitro 脳虚血モデルに於けるグルタミン酸の遊離と細胞傷害に対するグルタミン酸受容体拮抗剤及びカルシウムチャンネル阻害剤の作用 …… 264
木村真奈美、宮川武彦、片山幸一、西沢幸夫
（エーザイ株式会社・筑波研究所）

116. Fas 抗体によるグリオーマ細胞のアポトーシス誘導とスフィンゴミエリン情報伝達系 …… 266
白石哲也、中川摂子、戸田啓介、木原俊壱、鞠　　硯、田渕和雄
（佐賀医科大学・脳神経外科）

117. 脳内在性 Catechol-isoquinolines によるパーキンソン病ラットモデルの作成 …… 268
丸山和佳子、直井　信[1]
（名古屋大・医・神経内科、[1]名工大）

118. ラット大脳皮質微小管重合に対する慢性ストレスの影響 …… 270
貴家康男、朝倉幹雄、宮本聖也、長田賢一、今福　淳
（聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室）

119. 脱髄疾患モデル、ミエリンプロテオリピド蛋白質（PLP）トランスジェニックマウスの解析 …… 272
鹿川哲史、井上芳郎[1]、御子柴克彦[2]、池中一裕
（国立生理研・神経情報、[1]北大・医・第一解剖、[2]東大・医科研・化学）

120. 顔面神経麻痺モデルマウスにおける単純ヘルペスウイルス DNA 検出 …… 274
村上信五、土居孝至[1]、溝渕睦彦[1]、羽藤直人、柳原尚明
（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室、[1]愛媛大学医学部神経精神医学教室）

121. ラットの眼組織および網膜内におけるＳ－抗原分布の定量的解析 …… 276
加藤尚彦、木島正哉[1]
（横浜市立大医・第一生化、[1]眼科）

122. インターフェロン投与による脳内セロトニンの減少 …… 278
横谷　昇[1,2]、勝元栄一[1]、尾崎宜洋[1]、高　治義[1]、切池信夫[1]、山上　榮[1]
（[1]大阪市大・神経精神、[2]刀根山結核研究所）

123. EL マウスにおけるアロプリノール急性投与後の脳内 SOD アイソザイム活性の変化とその抗痙攣作用発現機序 …… 280
村島善也、多田博史[1]、篠崎たき子、諸岡啓一[2]、鈴木二郎[3]
（東京都精神研、[1]国立療養所千石荘病院、[2]東邦大・医・第一小児、[3]精神神経）

124. 上頚神経節細胞の脱分極による生存と神経成長因子によるＬタイプ Ca^{2+} チャンネル発現量の増加との相関 …… 282
田中秀逸、小池達郎[1]
（佐賀医大・化学、[1]北大・院理学研究科・行動知能）

125. Estrogen が扁桃核培養神経細胞の生存率に与える効果 …… 284
鬼頭昭三、仙波純一、三好理絵[1]、金澤美穂
（放送大学、[1]Royal Free Hospital School of Medicine, London）

126. 新規神経細胞保護物質 carquinostatin Ａの海馬神経細胞および樹立神経系細胞株におけるグルタミン酸毒性抑制効果 …… 286
新家一男
（東京大学・分生研）

127. グルタミン酸により引き起こされる培養神経細胞死における ATP 量変化の時間経過 …… 288
中村洋一[1]、辻　浩司[1,2]、片岡喜由[1]
（愛媛大学医学部・[1]生理学、[2]整形外科）

128. MK-801 の虚血ニューロン死保護作用：脳温自動制御システムによる検討 …… 290
柳瀬尚人、章　龍、三谷　章、片岡喜由
（愛媛大学医学部・第一生理）

129. 中枢ニューロンのアポトーシスに関与する遺伝子探索の試み …… 292
米増知子、岡　哲志、西尾チカ、榎戸　靖、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

130. 高酸素負荷による培養中枢ニューロン死へのリン酸化酵素阻害剤の生存維持効果 …… 294
榎戸　靖、久保武一、岡　哲志、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

131. エトポシド（etoposide）により誘発される培養大脳皮質神経細胞死 …… 296
中島光業、村瀬真一[1]、古川昭栄[2]、柏木久美子、太田　淳、川島拓司、林要喜知
（森永乳業・生科研、[1]慶應大学・医・解剖、[2]岐阜薬科大学・分子生物）

132. グルタミン酸神経細胞毒性における血小板活性化因子の関与の検討 …… 298
野上予人、平島　豊、高久　晃
（富山医科薬科大学・医・脳神経外科）

133. シグマ受容体に作用する脳内内在性物質 …… 300
富樫俊二、小林　徹、細木俊宏、伊藤　陽
（新潟大学医学部精神医学教室）

134. ボツリヌスB型神経毒素受容体としてのシナプトタグミン・ガングリオシド複合体 …… 302
西木禎一、根本康夫[1]、吉田　明[2]、高橋正身、小崎俊司[3]
（三菱化成生命研、[1]大阪大学・医、[2]早大・人総研、[3]大阪府大・農）

135. ヒトグルタミン酸トランスポーターのクローニング、発現およびその染色体部位の決定 …… 304
川上秀史、田中光一[1]、中山隆安、井上　健、高井節夫[2]、山田清美[2]、中村重信
（広島大学医学部第3内科、[1]国立精神神経センター神経研究所疾病研究4部、
[2]国立国際医療センター研究所遺伝研究室）

136. PC12細胞における高 KCl, ATP による［^{3}H］ノルアドレナリン放出とG蛋白質（Go） …… 306
小田温子、村山俊彦、野村靖幸
（北大薬学部・薬効学）

137. グルタミン酸受容体刺激による培養海馬神経細胞の MAP キナーゼ活性化機構 …… 308
栗野雅仁[1,2]、福永浩司[1]、生塩之敬[2]、宮本英七[1]
([1]熊本大・医・第一薬理、[2]熊本大・医・脳神経外科)

138. [^{3}H]-YM-09151-2 は強力な σ2 受容体リガンドである …… 310
氏家　寛、石原武士、坂井研一[1]、秋山一文、黒田重利
(岡山大学医学部神経精神医学教室、[1]神経内科教室)

139. スルピリドによる線条体ドパミン放出に対する ATP 感受性 K^+ チャネルオープナーの影響 … 312
田中隆彦、吉田真美、横尾秀康、溝口克弘、田中正敏
(久留米大・医・薬理)

140. ラット大脳皮質 NMDA 受容体イオンチャンネル複合体への [^{3}H] TCP と [^{125}I] MK 801 結合の比較 …… 314
山本敏文[1,2]、山本秀子[1]、諸治隆嗣[1]
([1]東京都精神医学総合研究所・精神薬理、[2]横浜市大大学院総合理学研究科・分子認識)

141. 一酸化炭素の合成阻害薬 ZnPP はシナプトニューロソームからのグルタミン酸の放出を抑制する …… 316
篠村徹太郎、中尾慎一、村川雅洋、森健次郎
(京都大学附属病院麻酔科)

142. 老人斑アミロイド生成機序に関する研究 …… 318
池田幸弥、国下龍英、荒木　亘、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)

143. 髄液中 tau 測定によるアルツハイマー病診断の試み …… 320
降矢芳子、平井俊策[1]、細田健治[2]、佐原成彦、宇佐美美穂子、森　啓
(東京都精神医学総合研究所・分子生物、[1]群馬大学神経内科、[2]帝人株式会社診断医療研究所)

144. β-アミロイド蛋白脳室内持続投与によるアルツハイマー型痴呆モデル動物の作製
－加齢および神経成長因子との関係－ …… 322
新田淳美、鍋島俊隆
(名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部)

145. アルツハイマー病アミロイドの Aβ 蛋白以外の構成成分 NAC の前駆体蛋白質の組織依存的 alternative splicing …… 324
上田健治、森　啓
(東京都精神医学総合研究所・分子生物学研究部門)

146. 大脳白質に存在するアミロイドβ蛋白前駆体およびそのC端断片の解析 …… 326
徳田隆彦、亀谷富由樹、田中喜久子、池田修一[1]
（東京都精神医学総合研究所・分子生物、[1]信州大学・第三内科）

147. 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アミロイド前駆体蛋白代謝 …… 328
小町裕志、柳澤勝彦[1]、白崎康文[2]、宮武　正[3]
（東京医科歯科大学・医・神経内科、[1]東京大学・医・脳研・脳病理、
[2]第一製薬探索二研、[3]都臨床研）

148. アミロイド前駆体蛋白の糖鎖構造に関する検討 …… 330
斉藤史明、柳澤勝彦[1]、谷　昭義[2]、宮武　正[3]
（東京医科歯科大学・医・神経内科、[1]東京大学・医・脳研・脳病理、
[2]武田薬品開拓第1研究所、[3]東京都臨床研）

149. ヒト眼組織における蛋白カルボキシメチル化酵素の遺伝子発現 …… 332
児玉俊夫、鳥飼治彦[1]、武田良平[2]、溝渕睦彦[2]、四宮博人[3]、大橋裕一
（愛媛大学眼科学、[1]愛媛労災病院眼科、[2]愛媛大学精神神経医学、[3]愛媛大学細菌学）

150. メタンフェタミン慢性投与ラットにおけるチロシン水酸化酵素 mRNA レベルの検討 …… 334
石丸昌彦、橋本隆紀[1]、小幡邦彦[2]、深間内文彦
（東京医科歯科大学難治疾患研・プロジェクト研究室、[1]清瀬病院、
[2]生理学研究所・神経化学）

151. ラット脳における Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase の遺伝子発現 “in situ ハイブリダイゼーション法を用いて” …… 336
武田良平、溝渕睦彦、柿本泰男
（愛媛大学医学部精神神経医学教室）

152. A-172細胞におけるアルドース還元酵素の発現調節 …… 338
西村千尋、桂　仝
（国立小児病院・小児医療研究センター・小児薬理）

153. Artifact を利用した Competitive PCR “脳下垂体の蛋白メチル化酵素 mRNA の定量化” 340
佐藤　誠、溝渕睦彦[1]、武田良平[1]、村尾孝児、高原二郎
（香川医科大学第一内科、[1]愛媛大学神経精神医学）

154. トランスジェニックマウスにおける CCK 遺伝子の発現解析 …… 342
伊藤康宏[1,2]、石橋　晃[1]、花岡和則[3]、桑野良三[2]
（[1]新潟大・農・畜産、[2]同・遺伝子実験施設、[3]北里大・理・生物）

155. 蛋白リン酸化酵素阻害薬の培養神経細胞移動に及ぼす影響 …… 344
小林 聡[1,2]、林 謙介[1]、伊佐かおる[1]、井上 洋[2]、大江千廣[2]、白尾智明[1]
([1]群馬大学医学部行動分析学、[2]同脳神経外科学)

156. ジーントラップ法により同定された遺伝子 GT1のマウス脳における発現 …… 346
今井裕二[1]、鈴木 豊[1,3]、松井崇裕[3]、和中明生[2]、遠山正彌[2]、高木 勉[1]
(大阪大学医学部・[1]分子脳機構(田辺)寄付講座、[2]第二解剖、[3]田辺製薬生化研)

157. ラット胎仔の神経系におけるニューロカンの分布と発達に伴う変化 …… 348
仙波りつ子、渡辺英治、大平敦彦
(愛知県コロニー・研究所)

158. 筋由来神経突起伸長促進因子の同定 …… 350
西宗裕史、田口隆久[1]
(大阪大学・基礎工学・生物工学、[1]通産省大阪工業技術研究所・生体分子工学)

159. 小脳プルキンエ細胞におけるスフィンゴ脂質の存在意義
－セラミド合成阻害剤 Fumonisin B1による解析－ …… 352
古屋茂樹、小野謙一[1]、平林義雄
(理化学研究所国際フロンティア研究システム糖細胞情報研究チーム、
[1]ヘキスト医薬総合研究所)

160. エイ脳のガングリオシド：新しいハイブリッド型ポリシアロガングリオシドの同定 …… 354
中村和生、小嶋久子、玉井洋一
(北里大学・医学部・生化学)

161. PC 12 細胞の神経突起形成に関与するシアル酸転移酵素とその阻害剤 KI-8110 の影響 …… 356
小嶋久子、中村和生、玉井洋一
(北里大学・医学部・生化学)

162. Neuro 2 a 細胞への GD 3 合成酵素遺伝子の導入と細胞分化 …… 358
小島直也、黒澤信幸、西 達也[1]、花井陳雄[1]、辻 崇一
(理研・国際フロンティア・糖遺伝情報、[1]協和発酵㈱・東京研究所)

163. α-ヒドロキシ脂肪酸含有スルファチドに親和性の高いモノクローナル抗体の作成と神経化学への応用 …… 360
崔 永喜、岩森正男
(東京大学医学部・生化学)

164. シナプシン I は生体内で SP キナーゼの基質である …… 362
谷口寿章、楠畑 雅、鈴木政美、千谷晃一
(藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・医高分子部門)

165. ストレス蛋白質 hsp 27 の細胞内存在様式の変動とその生理的意義 …… 364
長谷川かおり、稲熊　裕、伊東秀記、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

166. Cキナーゼの主要基質タンパク質 MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) の MAP キナーゼによるリン酸化 …… 366
楠畑　雅、古橋　潔、鈴木政美、千谷晃一、谷口寿章
（藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・医高分子部門）

167. PNP 14 ファミリータンパク質の精製と一次構造の解析 …… 368
中条茂男、中谷一泰
（昭和大・薬・生物化学）

168. PC 12 細胞での Ca^{2+}／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの強制発現による神経突起伸展の抑制 …… 370
田島和周、山本秀幸、小野常彦、Sodering, T. R.[1]、宮本英七
（熊本大・医・第一薬理、[1]オレゴン医科大）

169. ラット大脳 CaM キナーゼⅣの酵素化学的性質 …… 372
亀下　勇、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化学）

170. 遺伝的運動障害ラットの小脳形成不全とグルタミン酸代謝調節系 …… 374
國井修一[1,4]、田丸政男[2]、Dekker-Ohno 京子[3]、藤田公和[4]、安藤正人[4]、永田　豊[4]
（[1]椙山女学園大学、[2]鈴鹿医科技大学、[3]名古屋大学環医研、[4]藤田保衛大・医・生理）

171. 発作感受性 El マウス脳における発作後の AP-1 DNA 結合能について …… 376
勝元栄一、尾崎宜洋、横谷　昇[1]、山上　榮
（大阪市立大学医学部神経精神医学教室、[1]大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所）

172. El マウス脳におけるポリ（A）結合蛋白質について …… 378
木岡哲郎、山上　榮
（大阪市立大学医学部神経精神科）

173. El マウス脳 mRNA の翻訳活性におよぼす poly（A）鎖の影響 …… 380
中西亜紀、撫井弘二、木岡哲郎、黒田陽子、山上　榮
（大阪市大・医・神経精神）

174. ラット脳内モノアミン濃度およびアセチルコリン濃度におよぼすイサチン（内因性モノアミンオキシダーゼ活性阻害物質）の影響 …… 382
浜上尚也、遠藤　泰、平藤雅彦、南　勝
（北海道医療大学薬学部薬理学教室）

175. ラット脳における神経特異的ビジニン類似カルシウム結合タンパク質（NVP）mRNA の発現に対するフェンサイクリジンの急性および遅延性の効果 …… 384
梶本康雄、白井　豊、村上直也、楊　常青、北村　登、白川　治、西野直樹
（神戸大学医学部精神神経科）

176. Methamphetamine の急性および亜慢性投与による AP-1 結合タンパク質の変化 …… 386
石原武士、柏原健一[1]、氏家　寛、清水義雄、秋山一文
（岡山大学医学部神経精神医学教室、[1]神経内科学教室）

177. ハロセン麻酔による低体温ラットの髄液中神経化学物質濃度の検討 …… 388
和田博夫、井藤英喜[1]、折茂　肇、佐藤昭夫[2]
（東京大・老年病、[1]都老人医療センター、[2]都老人総合研究所）

178. 脳内 diazepam binding inhibitor（DBI）mRNA 発現に及ぼす ethanol の影響について … 390
桂　昌司、大熊誠太郎、辻村　敦[1]、栗山欣弥
（京都府立医大・薬理、[1]脳・血管老化センター）

179. ミュータントマウス小脳における NO／cGMP 系の検討 …… 392
池田正行、松井京子[2]、石原好弘[3]、湯浅龍彦[1]、室田誠逸
（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]国立精神神経センター神経研4部、[3]都神経研神経病理）

180. 脳血管性痴呆モデルとしての脳血流慢性低潅流ラットの基礎的検討 …… 394
田中健一、小川紀雄、堀　耕治[1]、野村正彦[1]、近藤洋一、浅沼幹人、森　昭胤
（岡山大学医学部神経情報学、[1]埼玉医科大学第一生理）

181. 学習課題遂行ラットにおける中隔-海馬コリン作動性神経の調節：in vivo microdialysis 法による検討 …… 396
山室　裕、堀　耕治、岩野　仁[1]、田中淳一[2]、野村正彦
（埼玉医科大学第一生理・[1]精神医学、[2]鳴門教育大学人間形成基礎講座）

182. 摂取不飽和脂肪酸とラットの明暗弁別学習能
－行動、シナプス形態、膜表面構造変化及びシアル酸分布との関連－ …… 398
吉田　敏、宮崎真理[1]、竹下正純[1]、奥山治美[2]
（大分医科大学・実験実習機器センター、[1]生化学、[2]名古屋市立大学薬学部）

183. 老年痴呆症治療薬としての新規 Prolyl endopeptidase 阻害剤、JTP-4819 の生化学的性質及び薬理活性 …… 400
砥出勝雄、岩本陽子、藤原教子
（日本たばこ産業㈱医薬総合研究所）

184. 大脳皮質体性感覚野における LTP に伴うシナプトフィジンおよびシナプシンの消長 …… 402
山口知子、川上順子[1]
（東女医大・生化、[1]第二生理）

185. 脳発育障害ラットにおける脳内物質変化と八方向放射状迷路学習機能 …… 404
田丸政男、清水　遵[1]、平田ゆかり[2]、松谷天星丸[2]、永田　豊[2]
（鈴鹿医療大・医用工学、[1]愛知淑徳大、[2]藤田保健衛生大・医）

186. ラットの時間制限給餌による rebound hyperphagia に閉所条件を加えた時の摂餌行動と前頭葉ドパミン代謝 …… 406
藤嵜泰利[1]、切池信夫[1]、井上幸紀[1]、奥野正景[1,2]、伊藤英樹[1,3]、栗岡政典[1]、
吉村敬一[1,4]、山上　榮[1]
（[1]大阪市立大・医・神経精神医学教室、[2]三国ケ丘病院、[3]宝塚三田病院、[4]浅香山病院）

187. アンギオテンシン作動性入力による正中視索前核領域のモノアミン代謝の促進 …… 408
田中淳一、牛込彰彦、山室　裕[1]、仮屋勝秀[1]、堀　耕治[1]、野村正彦[1]
（鳴門教育大・人間形成基礎、[1]埼玉医大・第一生理）

188. 老齢ラットに対するアマンタジンの行動薬理作用 …… 410
溝渕睦彦、堀口　淳、柿本泰男
（愛媛大学医学部神経精神医学教室）

189. ラットの時間制限給餌による rebound hyperphagia に対する飼料内容と fluvoxamine の効果 …… 412
井上幸紀[1]、切池信夫[1]、藤嵜泰利[1]、栗岡政典[1]、伊藤英樹[1,2]、奥野正景[1,3]、
吉村敬一[1,4]、山上　榮[1]
（[1]大阪市立大学・医・神経精神医学教室、[2]宝塚三田病院、[3]三国ケ丘病院、[4]浅香山病院）

190. コカイン反復投与による痙攣感受性の経時変化と NMDA 受容体および脳内ポリアミンとの関係 …… 414
霜里和朗
（川崎医科大学・薬理）

191. ラット脳トランスグルタミナーゼ …… 416
大橋　博、竹内　裕
（萬有製薬つくば研・生物工学）

192. 脳内のピリドキサルリン酸の変動に伴うピリドキサルキナーゼ（PLK）活性の変化について … 418
朝倉　正、平河多恵、大川　清、日比　望[1]
（慈恵医大・医化学、[1]SRL. 研）

193. ヒト血漿中および尿中のモノアミンおよびその代謝物質の多項目同時測定 …… 420
藤田　興、坂本秀生、川井　薫[1]、石田松雄[2]、伊藤哲彦[2]、葛谷博磁
（藤田保健衛生大学・総医研、[1]短期大学・生化、[2]桶狭間病院・精神科、[3]医学部・精神科）

194. ［1-^{13}C］D-glucose を用いた*in vitro* ^{13}C-MRS による脳内アミノ酸代謝コンパートメントの研究 …… 422
金松知幸、高原ひろみ、塚田裕三
（創価大学生命科学研究所）

195. 高等動物の脳におけるリゾ型イノシトールリン脂質を介した新規の PI 代謝について …… 424
小林哲幸、奥山治美
（名古屋市立大学・薬学部）

196. ラットにおける iminodipropionitrile 誘発ジスキネジアに対する免疫抑制剤 cyclosporin A の影響 …… 426
岩田恵美、浅沼幹人、西林佐紀子、近藤洋一、小川紀雄、森　昭胤
（岡山大医・分子細胞研・神経情報学部門）

197. 末梢神経障害と小脳失調を呈する症例にみられた Gal（β1-3）GalNAc 基を認識する IgM M蛋白 …… 428
楠　　進、等　誠司、千葉厚郎、田井　直[1]、金澤一郎
（東京大学医学部・神経内科、[1]都臨床研・腫瘍免疫）

198. ラット小脳皮質の発達過程におけるガングリオシドの局在分布 …… 430
小谷政晴、寺島俊雄[1]、田井　直
（都臨床研・腫瘍免疫、[1]都神経研・解剖）

199. ガングリオシド投与によるタイラー脳脊髄炎ウイルス（TMEV）による脱髄疾患の抑制 …… 432
井上　敦、高　昌星、武富　保[1]
（信州大学第3内科、[1]信州大学脂質生化学）

200. サル末梢神経ミエリンP 2蛋白の一次構造解析について …… 434
坂本　安、北村邦男、東山智子、野村恭一[1]、植村慶一[2]、野村正彦
（埼玉医科大学・第1生理、[1]神経内科、[2]慶應大学・医学部・生理）

201. 末梢神経系における PASII／PMP-22 および connexin 32 の分布 …… 436
宮崎唯雄、武田泰生、川野　仁[1]、嶋津　孝[2]、戸谷重雄[3]、植村慶一
（慶應義塾大学医学部生理学、[1]解剖学、[3]脳神経外科、[2]愛媛大学医学部医化学第一）

202. 末梢神経ミエリン PAS-II／PMP-22 蛋白質糖鎖の構造と HNK-1 抗原性 …… 438
北村邦男、田中早苗、澤辺真紀、坂本　安、西島樹重[1]、渋谷匡子、吉村和法、寺田庄一、野村正彦
（埼玉医大・第一生理、[1]第三内科）

203. ラット脳のグリア細胞における1型グルコーストランスポーター（GLUT1）の発現…… 440
Yu Shun、遠山育夫、Ding Wei Guang[1]、木村　宏
（滋賀医科大学・分子神経研、[1]第二生理）

204. マウス発育に伴う脳内ドーパミン局在性の変化
－免疫組織染色によるヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼの局在性との比較－ …… 442
深谷健司、池田和正[1]、佐藤嘉兵[1]、中川滋木[2]
（日本大学農獣医学部・獣医第二病理、[1]応用生物科学、[2]医学部・生化学）

205. 上皮増殖因子（EGF）の PC12h-R 細胞および大脳皮質ニューロンに対する栄養因子作用 … 444
山田雅司、榎戸　靖、池内俊彦、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

206. ラット胎仔脳ニューロン前駆細胞のソーティングの検討 …… 446
山之端万里、塚田裕三
（創価大学・生命科学研究所）

207. リン酸化ペプチドによる NGF シグナル伝達経路の解析 …… 448
下家浩二、山田雅司、池内俊彦、相本三郎[1]、田中真人[2]、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成、[1]蛋白質工学基礎研究センター、[2]三菱化成生命研）

208. PC12D 細胞における MAP キナーゼ（ERK1＆2）の活性化および細胞内移動 …… 450
佐野　護、岩永　操
（愛知県コロニー研究所、形態学部）

209. PC12 細胞における Interleukin-6 の細胞死抑制作用 …… 452
梅垣宏行、山田清文[1]、内藤通孝、亀山　勉[2]、井口昭久、鍋島俊隆[1]
（名古屋大学・医・老年科、[1]名古屋大学・医・医療薬学・病院薬剤部、
[2]名城大学・薬・薬品作用）

210. Dibutyryl cyclic AMP により分化誘導されたアストロサイトの NGF 産生と神経栄養効果 454
左合正周、吉田一成、上口裕之、稲葉　真、大谷光弘、戸谷重雄
（慶應義塾大学医学部脳神経外科）

211. 培養脳軟膜細胞は IGF-Ⅱ／IGFBP-2 と β-trace protein を産生する …… 456
石川巧一、大江良秀、壁谷建志、篠田元扶[1]、立元一彦
（群馬大学・内分泌研究所・生理学、[1]医学部・動物実験施設）

212. ウシ脳細胞外マトリックス糖タンパク質と移動型免疫グロブリンスーパーファミリィ分子 sGP 74 …… 458
石岡憲昭、佐藤淳子
（東京慈恵会医科大学医科研・生化学）

213. グルタチオンで誘起されるヒドラの触手球形成応答を利用した生理活性物質の検出 …… 460
花井一光
（滋賀医科大学分子神経生物学研究センター・神経化学）

214. HCNP pro-protein のシナプス内局在 …… 462
三竹重久[1]、鈴木龍雄、野路久仁子、片田栄一[1]、藤森　修[2]、小鹿幸生[1]
（名市大・第一生化学、[1]第2内科、[2]第二解剖）

215. 肝性脳症モデルラットの脳内 5-HT_2 受容体に関する研究 …… 464
兼子幸一、車地暁生、山田佐登留[1]、藤代　博、渡辺明子、融　道男
（東京医科歯科大学神経精神医学教室、[1]東京都立梅ケ丘病院）

216. 新規セロトニン1A受容体作用薬、MKC-242のマウス強制水泳に対する作用 …… 466
プラニー・ソンブンタム、松田敏夫、鈴木　眞、浅野省一、田熊一敞、馬場明道
（大阪大学・薬学部・薬理）

217. 拘束ストレスに対する情動的適応能の加齢変化と大脳辺縁系内モノアミン動態との関連 …… 468
李　踐偉、武田弘志、高田　香、馬場　剛、松宮輝彦[1]、渋谷　健
（東京医科大学薬理学教室、[1]東海大学医学部薬理学教室）

218. 活動性ストレスが誘発する脳内生理活性アミン動態変化の神経化学的意義 …… 470
武田弘志、泉澤　恵、高田　香、李　踐偉、馬場　剛、松宮輝彦[1]、渋谷　健
（東京医科大学薬理学教室、[1]東海大学医学部薬理学教室）

219. 運動ニューロン疾患脊髄における細胞質ダイニンの変動 …… 472
豊島　至、小松眞史、長谷川一子[1]、正宗　研
（秋田大学医学部第一内科、[1]北里大学東病院神経内科）

220. フェンサイクリジン（PCP）のラット線条体 GABA ニューロン活動に及ぼす影響 …… 474
本藤久雄、中村　薫、中原辰雄[1]、米澤裕次、堤　哲之、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、
[1]九州大学・理・化学教室）

221. 単純ヘルペス1型および2型ウイルス DNA の PCR を利用しての同時型別診断と Competitive PCR を用いてのウイルス DNA の定量化 …… 476
土居孝至、溝渕睦彦、中城有喜、武田良平、柿本泰男
（愛媛大学医学部神経精神医学教室）

222. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脊髄および血清トランスグルタミナーゼ（TG）活性と臨床症状との関連性 …… 478
藤田公和、安藤正人、青木則久、楠戸正子[1]、山口幸子、入谷克己、永田　豊、本多虔夫[2]
（藤田保健衛生大学・医学部・生理、[1]リハビリテーション医学、[2]横浜市民病院・神経内科）

223. 運動ニューロン病の基底核病変（２）－組織化学的検討 …… 480
長谷川一子
（北里大学東病院神経内科）

224. グルココルチコイドはアンフェタミンにより惹起される初代培養神経細胞の［^{3}H］TCP INTACT CELL BINDING の変化を増強する …… 482
山本秀子、山本敏文[1]、鷺　直樹、楊　献紅、諸治隆嗣
（東京都精神研・精神薬理、[1]横浜市大・総合理・分子認識）

225. ラットアストロサイトのグリアフィラメントによるマイクロフィラメント重合促進 …… 484
伊藤仁一、磯部真理
（名市大・医・生化Ⅰ）

226. エンドセリンによる培養アストロサイト Stress Fiber 形成に対するＣ３酵素の阻害 …… 486
小山　豊、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

227. ラット大脳シナプス後部におけるドレブリン－アクチン複合体 …… 488
林　謙介、石川良樹[1]、何　暁玲、白尾智明
（群馬大学医学部・行動分析、[1]薬理）

228. シナプシンⅠとカルスペクチンとの結合解析 …… 490
伊賀正英、乾　　誠、祖父江憲治
（大阪大学医学部・神経生化学）

229. ラット胎児ドレブリンの精製と解析 …… 492
石川良樹、佐々木洋、林　謙介[1]、白尾智明[1]、小浜一弘
（群馬大学医学部・薬理、[1]同・行動分析）

230. 軸索に存在する微小管結合蛋白タウの特性 …… 494
田代朋子、孫　小燕[1]、小宮義璋
（群馬大学医学部・分子病態、[1]リハビリテーション医学研究施設）

231. T98 ヒトグリオーマ細胞のタウリンの uptake に及ぼすプロテインキナーゼCと cyclic AMP の関与 …… 496
中村博彦、黄　縄好[1]、高倉公朋[1]
（都立駒込病院脳神経外科、[1]東京女子医大脳神経センター脳神経外科）

232. 培養小脳顆粒細胞の Na ポンプアイソフォーム …… 498
井上順雄、曽我智子、中山　孝、加藤尚彦
（横浜市立大学・医学部・第一生化学）

233. ヒトグルタミン酸トランスポーターに対する 2-(carboxycyclopropyl) glycine の作用 …… 500
山下拓史、張　玉祥、川上秀史、中村重信
（広島大学医学部第三内科）

234. ラット海馬における γ-アミノ酪酸によるグルタミン酸放出調節機構 …… 502
土田晃敬、田中佐知子、木内裕二[1]、小口勝司[1]、吉田武美
（昭和大・薬・毒物学、[1]医・第一薬理学）

235. NMDA 誘発細胞外タウリンとドーパミン濃度増加機構の相違 …… 504
菅原　恵、芝軒信次、石川紘一
（日本大学・医学部・薬理）

236. ラット海馬における NMDA 投与後の NO 濃度の上昇
－NO マイクロセンサー法を用いて－ …… 506
横山秀克、平松　緑、土橋宣昭[1]、森　則夫[1]
（山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所、[1]福島県立医科大学）

237. 培養ウシ副腎クロム親和細胞からの一酸化窒素刺激によるカテコールアミン遊離 …… 508
李　　憲、竹内　宏
（岐阜大・医・第一生理）

238. 一酸化窒素による神経伝達物質遊離における Na^+-Ca^{2+} 交換系の関与 …… 510
浅野省一、松田敏夫、田熊一敞、馬場明道
（大阪大学・薬学部・薬理）

239. 白鼠上頸部交感神経節内一酸化窒素依存性環状 GMP 生成系におよぼすカルバコール伝達刺激の影響とその細胞局在 …… 512
安藤正人、立杢廷族、楠戸正子、永田　豊
（藤田保健衛生大・医・生理）

240. ラットシナプス画分の MAP キナーゼカスケード …… 514
鈴木龍雄、野路久仁子
（名市大・第一生化学）

241. ラット脳一酸化窒素合成酵素に対するアルカインの阻害作用 …… 516
加太英明、横井　功、浅原弘嗣[1]、森　昭胤
（岡山大学・医・分子・神経情報、[1]整形外科）

242. 老齢ラット大脳皮質におけるα_1-アドレナリン受容体刺激性イノシトール三リン酸産生の変化 518
宮本　篤、木村永一、大鹿英世
（札幌医大・医・薬理）

243. コリン作動性神経終末におけるアセチルコリン放出の加齢変化 …… 520
田中康一、安藤　進
（東京都老人総合研究所・生体膜部門）

244. 老齢ラット脳における一酸化窒素合成酵素含有神経細胞の減少 …… 522
山田清文、野田幸裕、鍋島俊隆
（名古屋大学・医・医療薬学・薬剤部）

245. β-アミロイドによる神経細胞死におけるアミロイド前駆体蛋白質（APP）の役割 …… 524
高島明彦[1]、山口晴保[1]、石黒幸一、佐藤一紀、星野歳三、野口かおり、今堀和友
（三菱化成生命研、[1]群馬大学医療短大）

246. β-アミロイド蛋白脳室内持続投与ラットにおけるコリン作動性およびドパミン作動性神経系の機能障害－in vivo microdialysis による検討－ …… 526
伊東亜紀雄、新田淳美、西村京子、鍋島俊隆
（名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部）

247. アミロイド前駆体蛋白の発現および選択的スプライシングの変化に対する血清除去の影響 … 528
須藤慎治、川上秀史、中村重信
（広島大学医学部・第三内科）

248. 実験的頭部外傷ラットにおける神経成長抑制因子（GIF）の発現動態について
－共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学的検討－ …… 530
保住　功、犬塚　貴、平岩雅男[1]、石黒英明、宇多　裕[1]、辻　省次
（新潟大学脳研究所神経内科、[1]新潟薬科大学衛生化学）

249. アミロイド小体（Corpora Amylacea）の生理学的あるいは病理学的機能について…… 532
徳武　哲
（都精神研・分子生物）

250. Post Synaptic Density（PSD）におけるアミロイド前駆体蛋白（APP）の局在に関する検討 534
下川雅丈[1,2]、鈴木龍雄[3]、柳澤勝彦[4]、石浦章一[2]、宮武　正[5]
（[1]東京医科歯科大神経内科、[2]東大・分子細胞生物学研、[3]名古屋市大・医・生化、
[4]東大・脳研・病理、[5]都臨床研）

251. 脳卒中自然発症高血圧ラットにおける脳内エンドセリンの関与 …… 536
山下康子、山下樹三裕、丹羽正美、片岡泰文、谷山紘太郎
（長崎大学・医学部・第2薬理）

252. アストログリアからの低酸素暴露による Oxygen Regulated Proteins（ORPs）と再酸素化による HSP 72 の誘導とそのメカニズム …… 538
桑原敬介[1]、松本昌泰[1,2]、前田裕輔[1]、堀　修[1]、上田周一[2]、小川　智[1]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
（[1]大阪大学医学部・第一内科、[2]同・神経内科）

253. 低酸素暴露によるアストログリアの Glucose Regulated Proteins（GRPs）の発現とその虚血下における役割 …… 540
小川　智[1]、松本昌泰[1,2]、前田裕輔[1]、堀　修[1]、上田周一[2]、桑原敬介[1]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
（[1]大阪大学医学部・第一内科、[2]同・神経内科）

254. ラット局所脳虚血モデルにおける HSP 27 の誘導と HSP 70 との相違 …… 542
加藤宏之、劉　暁宏、糸山泰人、小暮久也[1]、加藤兼房[2]
（東北大学医学部神経内科、[1]神経病理研究所、[2]愛知県コロニー生化学）

255. 一過性脳虚血後海馬 CA 1 野に発生するグルタミン酸受容の変化 …… 544
三谷　章、柳瀬尚人、片岡喜由
（愛媛大学医学部・第一生理）

256. ラット大脳皮質可溶性分画中に認められる一酸化窒素合成酵素活性に対する各種阻害剤の作用比較 …… 546
杉山昌一、長藤寿昭、内藤成孝
（中外製薬㈱創薬第四研究所）

257. MARCKS のホスファチジルセリン結合部位
－大腸菌発現系での解析－ …… 548
中岡隆志、小島直也[1]、辻　崇一[1]
（東大医学部第4内科、[1]理研・国際フロンティア・糖遺伝情報）

258. エタノール慢性投与はイノシトール三リン酸受容体数をラット小脳で減少させる …… 550
斉藤　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）

259. エタノールによるホスホリパーゼC活性の抑制 …… 552
西田　朗[1]、斉藤　浩[1,2]、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）

260. チューブリン－Gs関連によるアデニル酸シクラーゼ活性の調節：ラット線条体での老化に伴った変化 …… 554
八田愼一、齋藤利和[1]、大鹿英世
（札幌医科大学医学部薬理学講座、[1]神経精神医学講座）

261. ヒト・ヒポカルシン遺伝子のクローニング …… 556
小林正明、高松　研、藤城正敏、斉藤茂治、野口鉄也
（東邦大学・医学部・第二生理）

262. ムスカリン受容体のGタンパク質共役受容体キナーゼによるリン酸化：m1，m2サブタイプ特異性 …… 558
芳賀和子、亀山仁彦、芳賀達也
（東京大学医学部脳研究施設生化学部門）

263. セロトニン受容体を介するアデニル酸シクラーゼ活性におよぼす抗うつ薬慢性処置の効果 … 560
清水雅美[1]、西田　朗[1]、福田裕恭[1,2]、斎藤　浩[1,2]、山脇成人[2]
（[1]国立呉病院臨床研究部、[2]広島大神経精神）

264. 神経系に特異的分布を示すカルシウム結合蛋白質、ニューロカルシン（Neurocalcin）標的蛋白質について …… 562
岡崎勝男、井上繁雄、日高弘義
（名古屋大学医学部薬理学講座）

265. カルバコール刺激依存性の白鼠上頸部交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性化におよぼす一酸化窒素合成酵素阻害剤の抑制効果 …… 564
安藤正人、立杢廷族、楠戸正子、永田　豊
（藤田保健衛生大・医・生理）

266. ラット脈絡叢、脳室上衣における src, H-ras 細胞性癌遺伝子産物の発現について …… 566
菅谷慶三、塩田清二[1]、竹田二美代[2]、中井康光[1]、竹田　稔[2]
（都立神経病院・神経内科、昭和大・[1]第一解剖、[2]第一生化）

267. 脳腫瘍における VEGF（Vascular endothelial growth factor）の免疫組織化学的検討 …… 568
下川尚子、白石哲也、戸田啓介、鞠　　硯、田渕和雄
（佐賀医科大学・脳神経外科）

268. 熱ショック蛋白質 HSP 65 を発現するラット・シュワン細胞株 …… 570
遠藤真澄、由村健夫[1]
（国立多摩研究所・生体防御部、九州大学医学部脳研、[1]神経内科）

269. ウシ脳の神経・アストログリア細胞に局在する新しい Serpin に関する研究 …… 572
西堀正洋、近井高志、川端昌弘、佐伯清美
（岡山大学医学部薬理）

270. コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの遅発性神経細胞死防止機能 …… 574
岡本　基、森　秀治
（岡山大学・医療短大・衛生技術）

271. シナプス後神経細胞脱落後残存シナプス前神経終末の機能的意義：虚血性グルタミン酸放出 … 576
三谷　章、松田正司[1]、阪中雅広[1]、片岡喜由
（愛媛大学医学部・第一生理、[1]第二解剖）

272. 脳虚血後のラット脳のアセチルコリンの変化 …… 578
金光秀晃、中込忠好、久保田勝、岩崎克典[1]、藤原道弘[1]、田村　晃
（帝京大学・医・脳神経外科、[1]福岡大学・薬学部・応用薬理）

273. ラット大脳皮質修復過程における神経ペプチド発現の動態 …… 580
重吉康史、岡村　均[1]、阿部廣巳、井端泰彦[1]、千原和夫
（神戸大学第三内科、[1]京都府立医大第二解剖）

274. ラット大脳皮質における局所脳虚血再潅流後の蛋白質の質的量的変化 …… 582
北原功雄、萩原民雄[1]、水島秀勝、松本　清、竹田　稔[1]
（昭和大学・脳神経外科、[1]第一生化学）

275. 慢性脳血流低下モデル動物に特徴的な白質障害の形成機序について …… 584
車谷隆宏、武田雅俊、工藤　喬、播口之朗、西村　健
（大阪大学・精神医学教室）

276. PC 12 細胞死における蛋白質リン酸化－プロテインフォスファターゼの検討 …… 586
小野寺宏、岩本竜明、武田　篤、望月るり子、糸山泰人、小林孝安[1]、田村真理[1]
（東北大学医学部神経内科、[1]東北大学加齢研遺伝子情報）

277. 小脳形成期に特有なタンパク質の検索と同定 …… 588
内田和久[1,2]、中山　洋[1]、篠田友孝[1]、磯辺俊明[1]
（[1]東京都立大学・理学部、[2]協和発行・東京研究所）

278. 胎児期の脳に特異的に発現するタンパク質の解析 …… 590
萩原民雄、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大・医・第一生化学）

279. 抗 MAG 抗体を用いたミエリン特異的タンパク質遺伝子の発現制御機構の解析 …… 592
松田義宏、小糸寿美、山元　弘
（国立精神・神経センター神経研究所・免疫研究部）

280. 発達分化するラット小脳各層の一酸化窒素合成酵素（NOS）活性 …… 594
王　瑋、井上順雄、中山　孝、加藤尚彦、石井當男[1]
（横浜市立大・医・第一生化、[1]第二内科）

281. マウス神経芽腫細胞の神経突起伸展に対するプロテインキナーゼ、カルモジュリン阻害剤の効果 …… 596
上村敬一、武富　保
（信州大・医・脂質生化）

282. 胚性腫瘍細胞の神経系分化におけるプロテインホスファターゼの発現変動 …… 598
笠原洋二、小林孝安、田村眞理
（東北大学・加齢研・遺伝子情報）

283. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける坐骨知覚神経の再生に対するシロスタゾールの作用 …… 600
山本恵史、保田好信
（大塚製薬株式会社徳島研究所）

284. 微小管関連蛋白質 MAP1B の細胞外ドメインのリン酸化と培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成への関与 …… 602
村本和世[1,2]、谷口寿章[3]、川原正博[1]、小林和夫[1]、諏訪牧子[4]、美宅成樹[4]、黒田洋一郎[1]
（[1]東京都神経研・神経生化、[2]東京大・医・薬理、[3]藤田保健衛生大・総医研・医高分子、[4]東京農工大・工）

285. 成長円錐におけるシナプス前終末関連蛋白の局在 …… 604
五十嵐道弘、小宮義璋
（群馬大・医・分子病態学）

286. サイトカインによる培養グリア細胞の分化調節 …… 606
伊藤康宏、澤田　誠、錫村明生[1]、丸野内棣
（藤田保健衛生大学総医研応用細胞、[1]神経内科）

287. CMT，HNPP 患者線維芽細胞における PMP-22 遺伝子の発現 …… 608
由村健夫、佐田正一郎、後藤幾生
（九州大学医学部脳研神経内科）

288. cAMP specific phosphodiesterase 阻害剤投与による脳内転写制御因子 CREB の DNA 結合活性の変化 …… 610
西林佐紀子、浅沼幹人、近藤洋一、岩田恵美、小川紀雄、森　昭胤
（岡山大医・分子細胞研・神経情報学部門）

289. マウス小脳顆粒細胞初代培養系における核内 CRE および AP-1 結合活性に対する γ-ヒドロキシ酪酸の効果 …… 612
石毛久美子、伊藤芳久、福田英臣
（日本大・薬・薬理）

290. 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 C／EBP β のリン酸化反応と発現調節 …… 614
矢野茂敏[1,2]、福永浩司[1]、滝口正樹[3]、生塩之敬[2]、森　正敬[3]、宮本英七[1]
（熊本大・医・[1]第一薬理、[2]脳神経外科、[3]分子遺伝）

291. ラット海馬の長期増強（LTP）に関連して発現する遺伝子の検索の試み ……616
丸山　敬、葛目博子、川村勇樹、淺田英穂、関野祐子[1]、小幡邦彦
（国立生理学研究所・神経化学、[1]新技術さきがけ）

292. ヒトグリオーマ細胞株 KG-1-C 細胞における β_1 および β_2 アドレナリン受容体の発現調節：副腎皮質ホルモン、甲状腺ホルモン、およびレチノイン酸の効果 …… 618
佐藤厚子、西崎　純[1]、伊野美幸、足立　淳、長谷川浩、朝倉幹雄、松井宏晃
（聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室、[1]誠心会・神奈川第二病院）

293. 脊髄の分化過程におけるグリシン受容体 α 1 ・ α 2 サブユニット mRNA の分布の変化 …… 620
渡辺えり[1,2]、赤木宏行[1]
（[1]群馬大学医学部薬理学教室、[2]麻酔・蘇生学教室）

294. A Simple Protocol for Amplification of cDNA Ends (SPACE) 法 “ヒト脳の蛋白カルボキシメチル化酵素の cDNA 配列決定” …… 622
溝渕睦彦、四宮博人[1]、佐藤　誠[2]、武田良平
（愛媛大学神経精神医学教室、[1]細菌学教室、[2]香川医科大学第一内科）

295. Haloperidol, (-)-Sulpiride および SCH 23390 腹腔内投与によるマウス脳の *c-fos* と *c-jun* mRNA発現 …… 624
尾崎宜洋、勝元栄一、横谷　昇[1]、山上　榮
（大阪市立大学医学部神経精神医学教室、[1]大阪市立大学医学部付属刀根山結核研究所）

296. アルツハイマー病脳における神経原線維変化に関与するタウ因子の燐酸化と脱燐酸化反応 … 626
小野常彦[1,2]、山本秀幸[1]、田島和周[1]、久永真市[3]、岸本健雄[3]、宮川太平[2]、宮本英七[1]
（熊本大・医・[1]第一薬理、[2]神経精神医学、[3]東工大生命理工）

297. アルツハイマー病脳におけるイオンチャンネルの変化 …… 628
池田正行、Deborah Dewar[1], James McCulloch[1]
（東京医科歯科大学・大学院細胞機能制御学、[1]Wellcome Surgical Institute, University of Glasgow）

298. 加齢に伴う学習障害とイノシトールリン酸受容応答の変化 …… 630
齋藤巨志、中村静雄、大野知親
（サントリー生物医学研究所・薬効薬理研究室）

299. チロシン残基脱リン酸作用を有する酸性ホスファターゼの Alzheimer 病脳における変動 …… 632
下濱　俊、藤本貞毅[1]、谷口隆之[2]、木村　淳
（京都大学医学部神経内科、[1]京都薬科大学生化学、[2]生物）

300. アミロイドβ蛋白のミクログリア走化性刺激の機序に関する検討 …… 634
中井真通、中岡大樹、山口　徹、波多腰正隆、柿木達也、保田　稔、前田　潔、田中千賀子
（兵庫県立高齢者脳機能研究センター）

301. アルツハイマーβアミロイド蛋白の aggregation と神経毒性：アルミニウムによる促進 … 636
川原正博、加藤みどり、村本和世、小林和夫、森　　啓[1]、黒田洋一郎
（東京都神経科学総合研究所・神経生化学、[1]東京都精神医学総合研究所・分子生物）

302. バキュロウイルス発現系を用いたタウ蛋白の合成 …… 638
宇佐美美穂子、降矢芳子、佐原成彦、森　　啓
（東京都精神研・分子生物）

303. シナプトタグミンのカルモデュリン結合能 …… 640
乾　　誠、祖父江憲治
（大阪大学医学部・神経生化学）

304. セロトニンによるラット前頭葉アセチルコリン分泌の制御機構（Ⅱ）：Fenfluramine による
アセチルコリン分泌増加作用は 5-HT_2受容体を介する …… 642
平野　均、山田通夫、H. C. Fibiger[1]
（山口大学医学部神経精神科、[1]ブリティシュ・コロンビア大学医学部精神科）

305. G蛋白質の各種γサブユニットの性質と脳内分布 …… 644
浅野富子、森下理香、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

306. 脳腫瘍における Bcl-2 および Bcl-x の免疫組織化学的発現 …… 646
白石哲也、中川摂子、戸田啓介、田渕和雄
（佐賀医科大学・脳神経外科）

307. 神経ペプチドによる achatin-Ⅰ興奮作用の修飾 …… 648
劉　国君、翁　述民、竹内　宏
（岐阜大・医・第1生理）

308. *Achatina fulica* 巨大神経細胞に対する L－グルタミン酸関連物質の作用 …… 650
張　唯、荒木陽子、ツキジデス・L・サルンガ、竹内　宏
（岐阜大・医・第1生理）

309. *Achatina fulica* 巨大神経細胞に対するカテコールアミンの作用 …… 652
ムハンマド・エマドゥディン、劉　国君、韓　暁燕、竹内　宏
（岐阜大・医・第1生理）

310. 5HT3受容体作用薬のドパミン代謝に対する影響は遺伝学的な選択によって変異する－モデル動物による検討－ …… 654
盛政忠臣、金行孝雄[1]、庄盛敏廉
（岡山大学医学部・神経内科、[1]岡山県立大学）

311. Signal Transduction of BDNF／trkB in PC12 cells …… 656
Zhang Jian, Hattori Seisuke, Nakamura Shun
（Div. of Biochem. and Cell. Biol., Natl Inst. of Neurosci., NCNP）

312. 低酸素・再酸素化によるアストグリアよりの神経栄養因子・IL-6の誘導：そのメカニズムと虚血脳における発現 …… 658
前田裕輔[1]、松本昌泰[1,2]、桑原敬介[1]、大槻俊輔[1]、小川　智[1]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
（[1]大阪大学医学部第一内科、[2]同神経内科）

313. インターロイキン2により発現誘導されるミクログリア特異的遺伝子の解析 …… 660
井幡　巌[1,2]、今井嘉紀[1]、矢部　裕[2]、高坂新一[1]
（[1]国立精神・神経センター神経研・代謝、[2]慶應義塾大学・医・整形外科）

314. 培養アストロサイトにおける bFGF の産生調節とその生物活性について …… 662
上口裕之、吉田一成、若本寛起、左合正周、稲葉　真、佐々木光、大谷光弘、戸谷重雄
（慶應義塾大学脳神経外科）

315. 自発的な不死化による成熟マウス・シュワン細胞株の樹立 …… 664
渡部和彦、田中順一、豊原敬三[1]、酒井　紀[1]
（東京慈恵会医科大学・神経病理、[1]第2内科）

316. 抗 BINP（brain injury-derived neurotrophic peptide）抗体による神経栄養因子の解析 …… 666
浜登希子、石黒麻利子[1]、小倉明彦[2]、村山美由紀
（三菱化成生命科学研究所、[1]現国立精神神経センター、[2]現大阪大学理学部）

317. NGF／*trkA* カスケードを介する神経細胞の分化誘導に与える *N-myc* 遺伝子の影響 …… 668
岡藤隆夫、前川喜平、衛藤義勝、松島　宏
（東京慈恵会医科大学小児科）

318. ラット脳における NT－3様免疫交差活性の分布 …… 670
古川昭栄、杉原祐志、古川美子
（岐阜薬科大学・分子生物）

319. 脊髄損傷に伴う BDNF および NT－3様免疫交差活性の脊髄内動態 …… 672
後藤昭彦、富田泰次、中村信之、池上亮介、替地恭介、室田景久、古川昭栄[1]
（東京慈恵会医科大学・整形外科、[1]岐阜薬科大学・分子生物）

320. レチノイン酸による培養交感神経細胞のニューロトロフィン依存性変化：trkB の発現誘導と BDNF による生存 …… 674
小林三和子、松岡一郎、栗原堅三
（北海道大学・薬・薬剤学）

321. ニューロトロフィンの中枢ニューロンにおける初期応答と生存維持作用は必ずしも一致しない …… 676
野々村健、久保武一、畠中　寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

322. 砂ネズミ一過性前脳虚血後の神経細胞における Mitogen-inducible Cyclooxygenase（Cox 2）の誘導 …… 678
大槻俊輔、松本昌泰、北川一夫、馬渕卓真、萬代研二、松下幸司、小川　智、上田周一、山形要人、三木直正、柳原武彦、鎌田武信
（大阪大学第一内科、神経内科、第一薬理）

1 syntaxin 3のisoformの同定

茨木京子[1]、堀川　洋[1]、森田貴雄[2]、森　寿[2]、崎村建司[2]、三品昌美[2]、阿部輝雄[1]
（新潟大学脳研究所　神経化学[1]、神経薬理学[2]）

〔要約〕

syntaxinは細胞内の膜輸送に関与する一群の蛋白質である。これまでに1A、1B、2-5の6種が知られている。syntaxin 1BのcDNAをプローブとして用いて、マウス脳cDNA libraryから、4種のsyntaxin 3のisoformをクローニングし、syntaxin 3A、3B、3C、3Dと命名した。3Aは既に報告されているラットのsyntaxin 3とアミノ酸一残基のみが異なっていた。3Bは3AとN末端から226残基が同一であるが、膜貫通部位を含むC末端部位がかなり異なる。3CではN末端付近の34残基に代わり、新たな16残基の配列が存在し、他は3Bの配列と同じである。3Dでは86アミノ酸で終了する。これらのisoformのmRNAは脳を含めて多くの組織に存在するが、特に腎臓に多い。

syntaxinは小胞体、ゴルジ装置、シナプス小胞等の膜輸送に関与する一群の蛋白質であり、これまでに1A、1B、2-5の6種類が知られている(1)。われわれはすでに脳N型Caチャネル分子を免疫沈降させる単クローン抗体を用いて、神経終末のsyntaxin 1AおよびBがSNAP-25、VAMP/synaptobrevin-2およびrab3Aと複合体を形成していることを報告した(2)。syntaxinの種類と量比は組織によって異なり、各組織の膜輸送の状況を反映するものと思われる。syntaxin 1Aと1Bは神経系およびパラニューロンに特異的であるが(3)、他のsyntaxinは多くの組織に存在する(1)。今回、われわれは脳におけるsyntaxin 3のisoformを同定したので報告する。

［実験方法］

syntaxin 1Bをコードするウシ脳のcDNAクローン(plasmid pCR42のEcoRI断片)(4)をプローブとして用い、マウス脳のλgt10 cDNA libraryをlow stringency条件下にスクリーニングした。得られた多数のcDNAクローンのうちの一つ(M-14)をプローブとして、high stringency条件下にスクリーニングして、更に3個のクローンを得た。これらのcDNAクローンのヌクレオチド配列をSangerらの方法(5)によって決定した。また、Northern blotは各組織のpolyA$^+$ RNAをブロットしたナイロン膜を^{32}Pで標識した各cDNA(全体あるいは一部)とインキュベートすることにより行った。

［結果と考察］

pCR42のcDNA insertをプローブとして、マウス脳cDNA libraryをスクリーニングした結果多くのクローンが得られたが、その大部分はsyntaxin 1A、1Bに対するものであった。しかし一つのクローン(M-14)は1A、1Bとは明らかに異なり、3によく似た蛋白質をコードしていた。

N末端から226残基はsyntaxin 3のアミノ酸配列と完全に一致したが、膜貫通部位を含むC末端部位ではアミノ酸配列の一致が46%であった。syntaxin 3はsyntaxin 3Aとしてデータ・ベースに登録されているので、この新しい蛋白質をsyntaxin 3Bと命名した。

次にM-14をプローブとして、3個のcDNAクローン(15A1、26B1、32)が得られた。15A1はラット脳syntaxin 3Aと1残基のみが異なっていた。この違いはマウスとラットの種属差によるものと考えられるので、15A1がコードする蛋白質をsyntaxin 3Aと結論した。26Biのコードする蛋白質(syntaxin 3Cと命名)は3Bと似た一次構造を持つが、3A、3BのN末端に近い34残基が新たな16残基によって置換されている。クローン32ではN末端から72残基はsyntaxin 3A、3Bと同じであるが、それに続いて14残基の新たな配列があり、87番目のアミノ酸残基にストップ・コドンが存在した。クローン32と全く同一のコーディング部分を含む、別のクローンも得られたので、この短縮型に対するmRNAは実際に脳に存在するものと思われる。クローン32のコードする蛋白質(syntaxin 3D)は膜貫通部位を欠き、全体として疎水度が低いので、それ自身では可溶性と予想される。図1にsyntaxin 3A-3Dの一次構造を模式的に示す。異なったアミノ酸配列が生じる位置が共通であり、アミノ酸配列が同じ部分はヌクレオチド配列も完全に一致する。したがって、syntaxin 3のこれらのisoformはsyntaxin 3遺伝子のmRNA前駆体での選択的スプライシングによって生じたものと思われる。これらのsyntaxin isoformの組織分布を調べるため、上記のcDNAクローンの全体あるいは一部を用いてNorthern blotを行った。syntaxin 3B、3C、3DをコードするmRNAは腎臓に特に高濃度に存在するが、脳や肺など他の組織にも検出された。syntaxin 3AのmRNAは肺にも腎臓に匹敵する濃度が見いだされた。

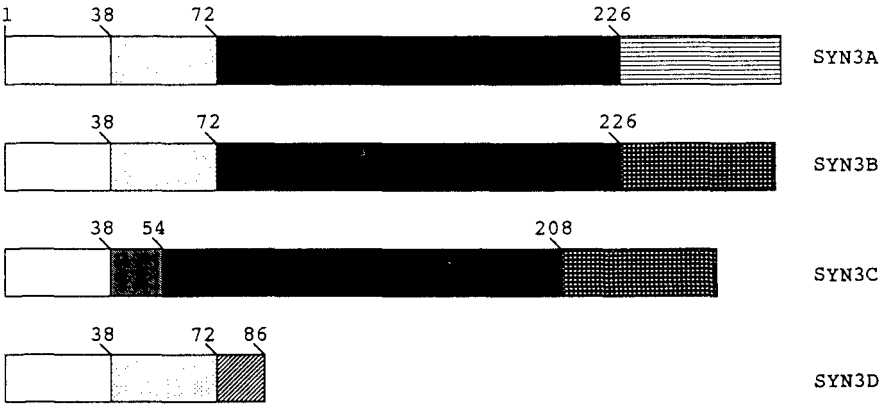


図1 syntaxin 3 isoformの構造

横棒の上の数字はアミノ酸残基の番号を示す。

[文献]

(1) M. K. Bennett et al. (1993) Cell 74, 863-873. (2) H. P. M. Horikawa et al. (1993) FEBS Lett. 330, 236-240. (3) H. Saisu et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 59-66. (4) T. Morita et al. (1992) Biomed. Res. 13, 357-364. (5) F. Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

2 α_2-Adrenoceptorによる側坐核dopamine遊離調節機構；$GABA_A$/benzodiazepine receptor 関与の可能性

富山　勝則，村井 為敦*，越川　憲明，小林 雅文
（日本大学歯学部・薬理，*日本大学歯学部・麻酔）

〔要約〕
脳微小透析法を用いて側坐核dopamine (DA)遊離におけるα_2-adrenoceptor, $GABA_A$/benzodiazepine (BZ) receptor complexの役割について検討した。α_2-adrenoceptor agonistのclonidine（1, 5 μg/kg i.v.）の投与により側坐核DA遊離は減少したが，その効果はantgonistのidazoxan (10 μg/kg i.v.)によって抑制された。また，clonidineによる側坐核DA遊離抑制効果はBZ receptor agonistのmidazolam (0.075 mg/kg i.v.)により促進され，inverse agonistのβ-CCEによって逆に抑制されたが，antagonistのflumazenilによっては影響を受けなかった。以上の結果はα_2-adrenoceptorによる側坐核DA遊離調節機構に$GABA_A$/BZ receptorが関与することを示唆するものである。

α_2-Adrenoceptor agonistのclonidineは海馬において3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)を減少させることが報告され，中枢DA遊離機構に対するα_2-adrenoceptorの関与が示唆されている。そこで本研究では，まず，中脳辺縁系DA神経系の主要な終末部位である側坐核のDA遊離に及ぼすclonidineの効果について検討した。演者らはすでに側坐核のDA遊離はBZ receptor agonistのmidazolamによって抑制されるが，inverse agonistのβ-CCEでは逆に促進され，さらにそれらの効果は共にantagonistのflumazenilによって打ち消されることを報告している(1)。そこで，α_2-adrenoceptorを介した側坐核のDA遊離調節機構における$GABA_A$/benzodiazepine receptorの関与についてさらにmidazolam, β-CCE, flumazenilをそれぞれclonidineと併用投与して検討した。

〔方法〕　SD系雄性ラット(約300g)を用い，ペントバルビタール(50 mg/kg i.p.)麻酔下で，Paxinos & Watson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)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,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 147.0mM,KCl 4.0 mM,$CaCl_2$ 1.2 mM,$MgCl_2$ 1.1 mM,pH 6.0)を2.0 μ/minの流速で4時間以上灌流し，回収されるDAの量が安定した後，薬物を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投与した。またβ-CCEは懸濁液であるため腹腔より投与した。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，ECD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示した。有意差の検定はMatthewsら(2)のsummary measure法に従い，薬物投与後250分間の変化の総和についてNewmann-Keuls検定を用いて行った。

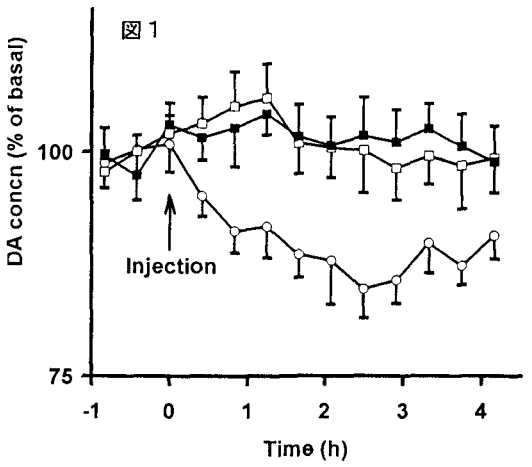
〔結果および考察〕　図1に示すようにclonidine (5 μg/kg i.v.)の投与によって側坐核DA遊離の減少が認められた($P<0.01$)。この効果はα_2-adrenoceptor antagonistであるidazoxan (10μg/kg i.v.)の併用によって完全に抑制($P<0.01$)されるが，idazoxan単独では側坐核DA遊離に変化は認められなかった。

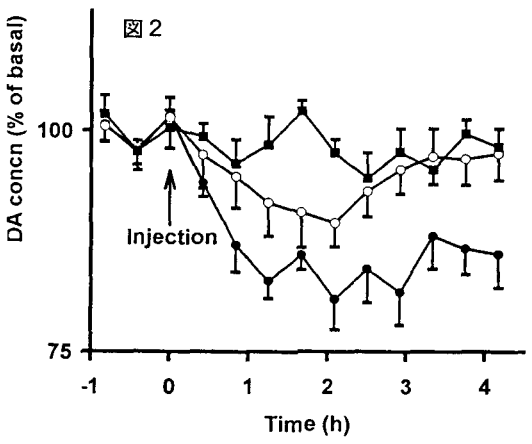
Midazolamとclonidineの併用投与の実験には，DA遊離に大きな変化を与えないclonidineの1 μg/kgとmidazolamの0.075 mg/kg(1)を用いた。その結果，側坐核DA遊離は両薬物の併用により相乗的に減

少($P<0.05$)することが示された(図 1)。

Clonidineが如何なる機構で側坐核のDA遊離を抑制するのかについては,今日までの知見から,clonidineによってまずGABAが遊離され,それによってDA遊離が抑制された可能性が推察される。事実,脳内のGABA機構はα_2-adrenoceptorによって制御されることが線条体や海馬のシナプトゾームを用いた実験から明らかにされており(3),また脳内DA遊離は脳内のGABAによって抑制的に調節されていることが知られている(4)。そうだとすれば,clonidineのDA遊離抑制効果はBZ receptor agonistのmidazolamでGABAの作用を高めることによって促進され,逆にinverse agonistのβ-CCEによって抑制されるはずである。本実験の結果は,clonidineの側坐核DA遊離抑制効果がmidazolamによって促進され(図 2),β-CCEの併用により抑制($P<0.01$)されることを示している(図 3)。従って，clonidineの側坐核DA遊離抑制作用は，clonidineがまずGABA遊離を亢進し,その結果二次的に発現したものであることが示唆された。さらに，この効果はflumazeilによって影響されないので(図 3),少なくともclonidineはBZ receptorに直接働いてDA遊離を抑制するのではないことが示された。

〔文献〕 (1) 富山勝則 他(1993) 神経化学,32,218-219. (2)Matthews,J.N.S.,et al.(1990) Br.Med.J.,300,230-235. (3) Maura,G.,et al.(1988) Eur.J.Pharmacol.,157,23-29. (4) Reid,M.S.et al.(1988) Eur.J.Pharmacol.147,411-420.





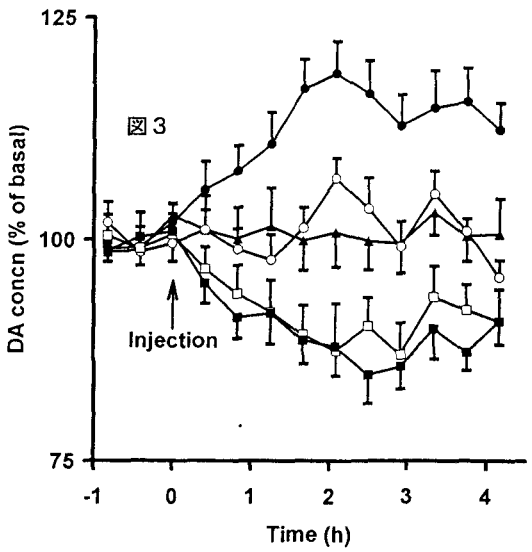


図 1 Effects of clonidine and idazoxan on the DA release from nucleus accumbens.○=clonidine 5 μg/kg;□=idazoxan 10 μg/kg; ■=clonidine 5 μg/kg+idazoxan 10 μg/kg.

図 2 Effects of midazolam and clonidine on the DA release from nucleus accumbens. ○=midazolam 0.075 mg/kg;■=clonidine 1 μg/kg;●=midazolam 0.075 mg/kg+clonidine 1 μg/kg.

図3 Effects of β-CCE,flumazenil and clonidine on the DA release from nucleus accumbens. ●=β-CCE 3 mg/kg; ■=clonidine 5 μg/kg;○=β-CCE 3 mg/kg+clonidine 5 μg/kg;▲=flumazenil 6 μg/kg;□=flumazenil 6 μg/kg+clonidine 5 μg/kg.

3　シンタキシンのN型Caチャンネルとの結合部位の構造

〔著者〕　高橋正身，根本康夫，関口真理子
〔所属〕　（三菱化成生命科学研究所）

〔要約〕

シンタキシンは神経伝達物質の遊離を制御しているN型Caチャンネルと複合体を形成する．シンタキシンの異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体を用い，この複合体形成にシンタキシン分子のどの部域が関与しているかを調べた．脳に特異的に発現するシンタキシンのアイソフォームとしてシンタキシン1Aおよび1Bが知られているが，両者のアミノ酸配列は84％相同である．10H5抗体はシンタキシン1Aと1Bの両者を認識するのに対し，9H1抗体および6H1抗体は，それぞれシンタキシン1Aおよび1Bとのみ特異的に反応した．これら3種の抗体はいずれもシンタキシン分子を免疫沈降するが10H5抗体は可溶化したラット脳のN型Caチャンネルを約7割以上免疫沈降するのに対し，9H1および6H1抗体では1割以下が免疫沈降されるのみであった．以上の結果はシンタキシン1Aと1B間で構造が異なる部域がCaチャンネルとの複合体形成に関与していることを示唆している．この部位を特定するため大腸菌で発現したシンタキシン1Aおよび1Bをプローテアーゼで部分分解し，6H1および9H1抗体と反応するペプチドのアミノ酸配列の決定を行った．

シンタキシンはシナプス前膜にに多く発現している分子量約35，000の蛋白質である（*1－4*）．シンタキシンは神経伝達物質の遊離を抑制するC型ボツリヌス毒素で特異的に切断されること（*5*），細胞内膜輸送に必須な細胞質因子であるNSF／SNAPの脳での受容体であること（*6*）抗シンタキシン抗体によって神経伝達物質の遊離が抑えられること（*7*）などから，開口放出による神経伝達物質の遊離に重要な役割を果たしていると考えられている．シンタキシンは神経伝達物質の遊離を制御しているN型Caチャンネルや，シナプス小胞膜蛋白質であるシナプトタグミンと結合し複合体を形成することから，アクティブゾーンへのシナプス小胞のドッキングにも関与している可能性が示唆されている．もしもこの可能性が正しければCaチャンネルとシンタキシン／シナプトタグミンとの結合様式を変化させることによってシナプス伝達の効率を大きく変化させることが出来ると考えられ，それらの相互作用の性質を明らかにすることはシナプスの可塑性の分子機構を知る上で重要であると考えられる．今回異なるエピトープを認識する抗モノクローナル抗体を用い，Caチャンネルとの複合体形成に関わるシンタキシン分子の構造を調べた．

（方法）

モノクローナル抗体10H5および6H1抗体は先に報告した方法を用いて調製した（*1*）．9H1抗体は10H5抗体カラムを用いて精製したラット脳のシンタキシンで免疫したマウスの脾臓細胞を用いて作成した．N型Caチャンネル（ω－コノトキシンGVIA受容体）はラット脳のP2膜からCHAPSで可溶化し免疫沈降に用いた（*1*）．リコンビナントのシンタキシン1Aおよび1BはpET－3aベクターを用いて大腸菌で発現させ，10H5抗体カラムを用いて精製した．

（結果および考察）

すでに１０Ｈ５抗体はシンタキシン１Ａおよび１Ｂを，６Ｈ１抗体は１Ｂと反応することを報告している（*8*）．今回新たに作成したモノクローナル抗体をリコンビナントのシンタキシン１Ａおよび１Ｂ用いたイムノブロット法でスクリーニングを行い，シンタキシン１Ａと特異的に反応する９Ｈ１抗体を得た．これら３種類の抗体はＣＨＡＰＳで可溶化したシンタキシン１Ａあるいは１Ｂをほぼ同じ効率で免疫沈降した．しかしながら図１に示すように，シンタキシン１Ａ，１Ｂの両者と反応性を持つ１０Ｈ５抗体は可溶化したＮ型Ｃａチャンネル（ω－コノトキシンＧＶＩＡ受容体）を８割以上免疫沈降するのに対し，アイソフォームに特異的な６Ｈ１，９Ｈ１抗体は１割以下を免疫沈降するに過ぎなかった．シンタキシン１Ａと１Ｂのアミノ酸配列は８４％が同一であるが，膜貫通部分とアミノ末端に近い部位では１次構造が大きく異なっている．このアミノ末端位に近い部位は蛋白質／蛋白質間の結合に関与するモチーフであるheptad repeat構造を含んでいる．今回得られた結果はこの部域がＣａチャンネルとの複合体形成に関与しており，シンタキシンがＣａチャンネルと結合すると９Ｈ１や６Ｈ１抗体のエピトープが隠され，抗体が結合できなくなることを強く示唆している．この部域を特定するためリコンビナントのシンタキシン１Ａおよび１Ｂのトリプシンや Ｖ８プロテアーゼによる部分分解を行い，抗体と反応性を持つペプチドの単離とアミノ酸配列の決定を行っている．

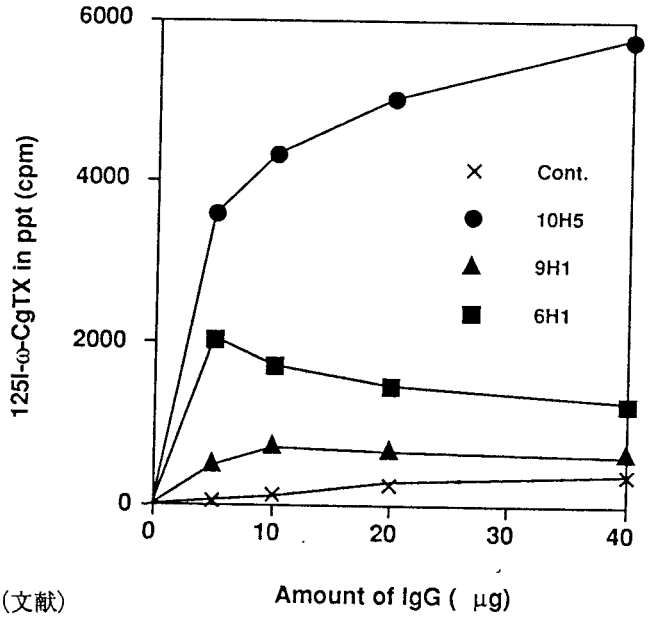


図１．抗シンタキシン抗体によるＮ型Ｃａチャンネルの免疫沈降．ラット脳のＮ型ＣａチャンネルをωコノトキシンｇＶＩＡで標識しＣＨＡＰＳで可溶化した後，さまざまな量の抗シンタキシン抗体と反応させ免疫沈降させた．６Ｈ１抗体はシンタキシン１Ｂと９Ｈ１抗体はシンタキシン１Ａとのみ反応する．１０Ｈ５抗体は両者を共に認識する．

（文献）

1. Bennett et al. (1992) Science **257**, 255-259.
2. Yoshida et al. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 24925-24928.
3. Morita et al. (1992) Biomed. Res. **13**, 357-364.
4. Inoue et al. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 10613-10619.
5. Blasi et al. (1993) EMBO J. **12**, 4821-4828.
6. Sollner et al. (1993) Nature **362**, 318-324.
7. Bennett et al. (1993) Cell **74**, 863-873.
8. 根本，伊藤，笠井，西木，小崎，高橋 (1993) 神経化学 **32**, 196-197.

4　ドパミンニューロンの除神経に伴うヒスタミンH_3受容体の増加

〔著者〕

〔所属〕　柳鐘薫，谷内一彦，渡邊建彦
（東北大・医・第一薬理）

〔要約〕
ヒスタミンH_3受容体は大脳皮質，線条体，側座核，黒質など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，二つの受容体の相互作用が予想される。前回我々はNMDA受容体のアゴニストであるキノリン酸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，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して分布していることを明らかにした（２）。今回我々は黒質ー線条体系のドパミン神経を６ーヒドロキシドパミンを用いて破壊した後３週目にヒスタミンH_3受容体をオートラジオグラフィーを用いて調べた結果，線条体と黒質においてそれぞれ約20%と70%増加したことを確認した。以上の結果から線条体・黒質ニューロン上のヒスタミンH_3受容体はドパミン神経に対して後シナプス性に存在し，またドパミン神経より強く影響を受けることが明らかになった。

＜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ヘテロレセプターという報告がある。 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。今回我々は黒質ー線条体系のドパミン神経をドパミン神経の特異的な神経毒である６ーヒドロキシドパミン（６ーＯＨＤＡ）を用いてドパミン神経を破壊した後３週目にヒスタミンH_3受容体の結合変化をイメージングプレート（富士写真フィルム BAS 3000）を用いたオートラジオグラフィー法で調べたので報告する。

＜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，片側の黒質（AP: -5.3 mm; ML: 2.5 mm; DV: 7.8 mm)に６ーＯＨＤＡ（８μｇ／４μｌ）を局所注入した。投与後２週目にドパミン作動薬投与による回転運動を調べ，７回転／１０分以上のラットを以下の実験に用いた。投与後３週目に断頭後脳を取り出し凍結し，切片（20 μm）を作製した。
２。オートラジオグラフィー法を用いた結合実験
数段階の濃度の異なる[^{3}H](R)-α-methylhistamine（[^{3}H]αMeHA）を含む 50 mM Na-K リン酸緩衝液に切片をインキュベートし，オートラジオグラフィーを行なった。 室温で60分間インキュベートした後，5分間緩衝液にて洗い，氷冷した蒸留水で数秒間洗い乾燥させた。切片をイメージングプレート（TR-IP）と7日接触させて^{3}Hで標識されたH_3受容体の画像を得た。非特異結合は 10μMの Thioperamide存在下の結合量とした。
３。画像解析
TR-IPを用いた受容体オートラジオグラムはバイオイメージングアナライザーBAS3000（富士写真フィルム）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[^{3}H]αMeHA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ていた。ドパミン神経の特異的な神経毒である６ーＯ

ＨＤＡを用いてドパミン神経を破壊したラットでは，破壊後３週目にヒスタミンH_3受容体の顕著な増加がドパミン神経が多く分布している線条体と黒質においてのみ認められた（図１）。飽和実験の結果，各々の部位においてヒスタミンH_3受容体の結合は約20％と70％増加していた。この増加は最大結合量（Ｂmax）の増加で，結合解離定数（Ｋd）は変化しないことを確認した（表１）。

＜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て以来さまざまな面において注目を集めているが，その役割，シナプスにおける存在位置などに関してはまだよく分かっていない（１）。前回我々はキノリン酸の投与による障害モデルラットを用いて，多重標識受容体オートラジオグラフィー法によりヒスタミン H_3受容体とドパミン 受容体との分布の相関関係を検討した結果，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して分布していることを明らかにした（２）。今回我々は黒質ー線条体系のドパミン神経を６－ＯＨＤＡを用いて破壊した後３週目にヒスタミンH_3受容体の結合をオートラジオグラフィーを用いて調べた結果，線条体と黒質においてそれぞれ約20％と70％増加したことを認めた。以上の結果からヒスタミンH_3受容体はドパミン神経に対して後シナプスに存在し，ドパミン神経より強く影響を受けることが考えられる。現在この病態モデルを用いてヒスタミンH_3 受容体のUp-regulationのメカニズムをドパミンD_1作動薬並びにドパミンD_2作動薬，ヒスタミン合成酵素阻害剤を用いて検討を進めている。

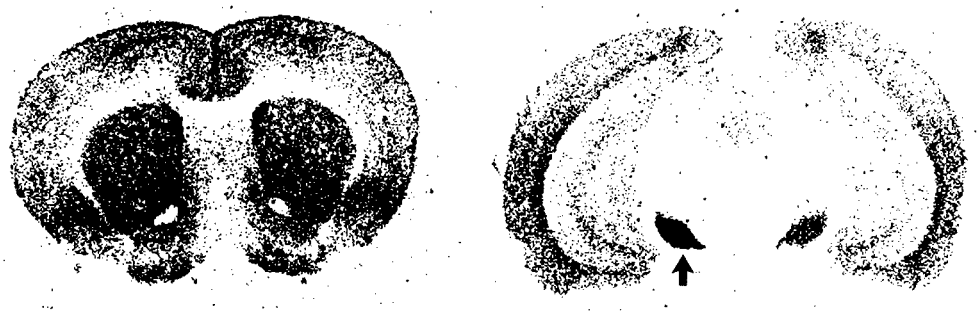


図１ 片側黒質への６-ＯＨＤＡ投与によるヒスタミンH_3受容体オートラジオグラフィー。[^{3}H]α MeHAで標識されるヒスタミンH_3受容体が同側の線条体と黒質において大きく増加している。矢印は6-ＯＨＤＡを投与した側を示している。

表１。黒質への６－ＯＨＤＡ投与によるヒスタミンH_3受容体結合能分析：飽和実験。

Region	Contralateral		Ipsilateral	
	Bmax (fmol/mg)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg)	Kd (nM)
Striatum (DM)	17.91±1.45	1.60±0.18	22.49±1.79*	1.79±0.27
Striatum (DL)	17.62±1.43	1.60±0.27	20.21±1.68*	1.87±0.39
Substantia nigra	19.55±3.68	1.49±0.22	33.19±5.49**	1.75±0.67

(DM = dorsomedial, DL = dorsolateral, *p<0.05; **p<0.01 compared with the contralateral side by the Mann-Whitney test)

＜文献＞

1. Pollard H, Moreau J, Arrang JM and Schwartz JC. Neuroscience 52: 169-189 (1993)
2. Ryu JH, Yanai K, Iwata R, Ido T and Watanabe T. NeuroReport 5:621-624(1994).

5 新規抗精神病薬OPC-14597のラット脳線条体ドパミン受容体に及ぼす影響

三木新也*・井上敦子*・菊地哲朗**・森田誠治**・植田弘師***・三須良実***・仲田義啓*
(*広島大・医・総合薬・薬解、**大塚製薬・徳島新薬三研、***横浜市大・医・薬理)

〔要約〕
新規抗精神病薬OPC-14597（OPC）は、ラット脳線条体膜において、リガンド結合実験よりD1様受容体よりD2様受容体に100倍の親和性を有しており、またD2アゴニストであるquinpirole誘発高親和性GTPase活性を抑制した。Haloperidol（HAL 1mg/kg）およびOPC（12mg/kg、100mg/kg）慢性投与ラットにおいては^{3}H-spiperone最大結合数の増加が観察されたが、OPC 12mg/kg投与ラットにおける増加は有意なものではなかった。OPC100mg/kg投与ラットにおいてはquinpirole誘発GTPase活性の増加も観察された。D2受容体mRNA量変化をRNaseプロテクションアッセイにて検討した結果、D2L型受容体mRNA量には薬物投与による有意な変化は観察されなかった。これらの結果より、慢性投与後、OPCはHAL同様D2様受容体機能増強作用を有するが、その程度は小さく、その増強はD2L型受容体の転写促進によるものではないことが示唆された。

[序]
OPC-14597（OPC）は錐体外路系副作用の少ない抗精神病薬として開発が進められている。OPC（12mg/kg）あるいはhaloperidol（HAL1mg/kg）3週間慢性経口投与後、両薬物ともに投与終了後3日にapomorphineによる常同行動の増強作用を示したが、OPCの効果はHALに比し、弱くかつ持続時間も短かった。この効果の神経化学的作用機序を解明する目的でOPCあるいはHAL慢性投与ラットを用いてD2受容体結合活性、高親和性GTPase活性を測定し、またD2受容体mRNAの定量を行った。

[方法]
1. 薬物慢性投与
OPC（12mg/kg、100mg/kg）とHAL（1mg/kg）は0.5%アラビアゴム生理食塩水に懸濁させ、5ml/kgになるように調製した。薬物は、Wistar系雄性ラット(6週令)に1日1回（10：00-12：00AM）3週間、経口投与した。OPC12mg/kgとHAL1mg/kgはapomorphineによる常同行動の抑制のED50値の2倍量である。また、OPC100mg/kgは投与ラットの75%にカタレプシーを惹起させた高用量である。

2. D2様受容体結合実験
ラット線条体膜標本を120mM NaCl、5mM KCl、2mM CaCl2、1mM MgCl2を含む50mM Tris-HCl (pH7.4) buffer中、^{3}H-spiperone（19Ci/mmol、NEN)と37℃15分インキュベートした後、BF分離し、GF/Bフィルターにトラップされた放射能活性を結合量とした。特異的結合量は2μM (+)-butaclamolにより決定した。

3. GTPase活性
線条体膜標本を25mMTris-HCl (pH7.4)、0.1mM EDTA、2.5mM DTT、100mM NaCl、6mM MgCl2、1mM ATP、0.5mM App(NH)p、10mM Phosphocreatine、5u/100μl Creatine phosphokinase、1mM Ouabain、0.1μMあるいは50μM GTPを含む反応液中で、7x10^{4}cpm/tubeの[γ-^{32}P]GTP(20Ci/mmol, NEN)と37℃15分間インキュベートし、遊離した^{32}Piの放射能活性を測定した。低濃度GTP(0.1μM)存在下での遊離^{32}Pi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。

4. D2受容体mRNAのRNase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[1]に従ってtotal RNAを抽出した。ラット脳線条体 total RNAより逆転写PCR法によりラットD2受容体とβ-actinのcDNA fragmentを作成した。これらを鋳型にしてin vitro transcriptionにより^{32}P-UTPを含むアンチセンスcRNAプローブを作成し、ラット脳線条体total RNAと45℃で12時間ハイブリダイズさせた。続いてRNase処理し、PAGE電気泳動後、バイオイメージングアナライザーBAS2000(FJIX)により解析した。

[結果および考察]

ラット線条体において、OPCは^{3}H-spiperone結合に対し、5.6x10^{-8}M、^{3}H-SCH23390結合に対し5.1x10^{-6}MのKi値を有し(図1)、quinpirole誘発GTPase活性を抑制した(図2)。従って、OPCはD2様受容体に高い親和性を有することが示された。Haloperidol (HAL 1mg/kg)およびOPC (12mg/kg、100mg/kg)慢性投与ラットにおいては^{3}H-spiperone最大結合数の増加が観察されたが、OPC 12mg/kg投与ラットにおける増加は有意なものではなかった(表1)。OPC100mg/kg投与ラットにおいてはquinpirole誘発GTPase活性の増加も観察された。D2受容体mRNA量変化をRNaseプロテクションアッセイにて検討した結果、D2L型受容体mRNA量には薬物投与による有意な変化は観察されなかった。これらの結果より、慢性投与後、OPCは、HAL同様D2様受容体機能増強作用を有するが、同程度にD2受容体を抑制する用量で比較すると、OPCのD2様受容体増強作用は小さいことが示された。この増強作用は最大結合数すなわち受容体数の増加によるが、D2L型受容体の転写促進によるものではないことが示唆された。

[文献]

1) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal.Biochem. 162, 156-159

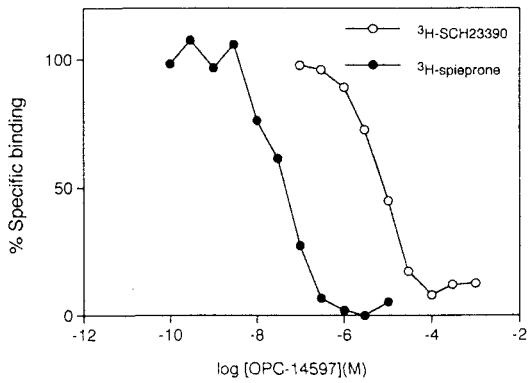
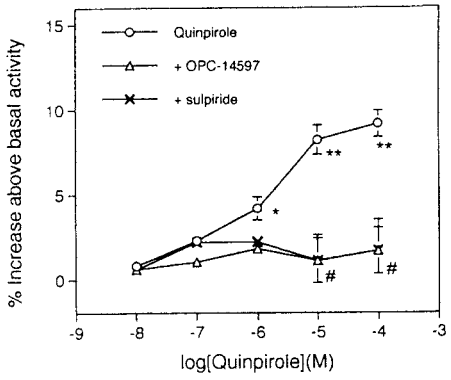


図1 ^{3}H-SCH23390および^{3}H-spiperone結合に対するOPC-14597の置換曲線



*p<0.05,**p<0.01 vs control
#p<0.05 vs quinpirole alone

図2 Quinpirole誘発性GTPase活性に対するOPC-14597の効果

表1 薬物慢性投与ラット線条体における^{3}H-spiperone結合定数

		Kd value (nM)	Bmax value (fmol/mg protein)
Control		0.39±0.06	335.8±34.5
Haloperidol	1mg/kg,p.o.	0.35±0.06	480.7±28.2**
OPC-14597			
	12mg/kg,p.o.	0.35±0.06	372.7±28.6+
	100mg/kg,p.o.	0.34±0.03	429.0±36.1*

** p<0.01 vs Control , * p<0.05 vs Control ,+ p<0.05 vs Haloperidol

6 PC12細胞におけるNMDA依存性Cl電流

吉田　明、高木　博、吉岡　亨、工藤佳久*
（早稲田大学・分子神経生物学、*三菱化成生命研）

〔要約〕

ホールセルクランプしたPC12細胞をNMDAにより刺激すると、比較的ゆっくりとした内向き電流が観察された。この応答はグルタミン酸受容体のアンタゴニストであるAPV及びAP7により遮断された。しかしながらこの内向き電流は外液のCa^{2+}濃度を2mMから1mMに下げた場合の方が顕著に観察され、また、細胞内外の$[Cl^-]$の差に応じた大きさの電流が観察された。以上の結果は、すでに数多く報告されている型のNMDA受容体を介する応答とは異なる、Cl^-を流すようなNMDA応答が存在することを示している。

グルタミン酸受容体チャンネルのうちNMDA型はCa^{2+}に対する透過性が高く、シナプス可塑性や種々の神経細胞死に関与していると考えられている。この型のグルタミン酸受容体はクローニングもされ、その構造と機能については詳細に検討されている。これに対し、通常とは異なる応答を示すグルタミン酸受容体について昨年報告があった（1）。この報告によると、プレシナプスに存在する蛋白質であるシンタキシン1BのcRNAをXenopus oocyteに注入した後、NMDA依存性の内向き電流が観察された。この結果から彼らはシンタキシンがプレシナプスでのグルタミン酸受容体チャンネルではないかと主張している。本研究ではこの結果の妥当性を検討するため、シンタキシン1Bが細胞膜に発現しているPC12細胞を用いてNMDA依存性電流について検討を行なった。

［実験方法］

1）細胞培養　電気生理及び細胞内Ca測定に用いたPC12細胞は、測定の2日前にpoly-Lysine coatしたcoverslip上に培養した。2）電気生理　ホールセルパッチクランプ法によりイオン電流を測定した。細胞外液は、130mM NaCl, 5.4mM KCl, 5.5mM D-glucose, 10mM HEPES-NaOH (pH7.3), 1mM $CaCl_2$, 10μM glycine、細胞内液は、122.5mM K-gluconate, 17.5mM KCl, 10mM HEPES-KOH (pH7.3), 9mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 0.2mM EGTA。細胞の膜電位を-60mVに保持し膜電流を記録した。時折細胞の膜抵抗をはかるために-80mVから+20mVまで変化するランプパルスを与えた。NMDAやその阻害剤は、細胞外より潅流投与法により細胞に与えた。

［結果］

標準細胞外液中で、whole-cell voltage-clamp法により100μM NMDAに対する電流応答を記録すると、NMDA投与中（1分間）から内向き電流が観察され、その後数分間にわたり内向き電流が増大した（図1）。この電流の反転電位は約-40mVで

あった。NMDA 10μM 以上の濃度でこの内向き電流は観察されたが、3μM では測定されなかった。100μM NMDA刺激により見られる応答は、100μM APVあるいは100μM AP7により完全に抑制された。

通常のNMDA受容体チャンネルを介する応答では、細胞内Ｃａ濃度の上昇が観察される。しかしながら、Fura-2を用いた細胞内Ca測定の結果、100μM NMDA存在下でPC12細胞内Ca濃度の変動は観察されなかった。反転電位が-40mV付近であることから、このとき流れるイオンの候補としてCl^-を考え、電極内液の[Cl^-]を変化させNMDA依存性電流の反転電位を検討した。その結果、電極内の[Cl^-]を増加させるに従い反転電位が脱分極側に移動した。この移動の程度は、NMDA依存性に流れるイオンがCl^-であるとしたときに計算される大きさとよく一致した（図２）。したがって今回PC12細胞で見いだされたNMDA依存性電流がCl^-電流である可能性が高いことが分かった。

［考察］

PC12細胞でNMDA依存性に内向き電流が流れることを見いだし、それがCa電流ではなくCl^-電流であることが示された。それ故このCl^-電流が今まで報告されているCaを通すNMDA受容体チャンネルを通るとは考えにくい。今回見いだされたNMDA依存性電流の性質は、昨年報告のあった、Xenopus oocyteにシンタキシンを発現させた場合に見られたNMDA依存性電流によく似ている。しかしながら、その場合に観察された電流は細胞外の[Cl^-]には依存せず今回の結果とは異なる。今回PC12細胞で見いだされたNMDA依存性電流にシンタキシンが関与しているのかどうかについては未だ不明であり、現在シンタキシン欠損株等を用いての解析を検討している。

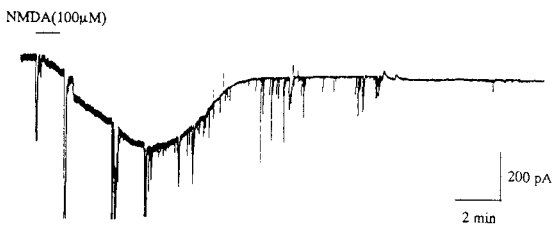


図１　PC12細胞のNMDA依存性内向き電流。PC12細胞を-60mVに膜電位固定しNMDA(100mM)を１分間投与したときの電気的応答。

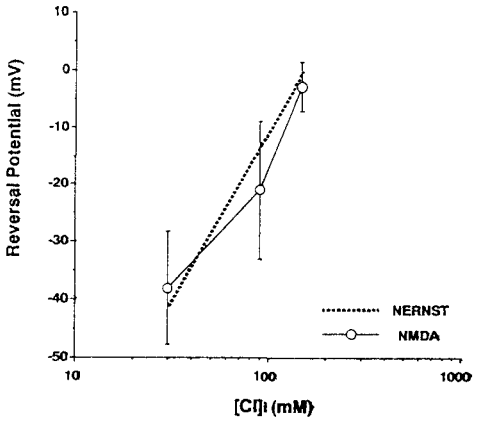


図２　NMDA依存性電流の逆転電位。実線は、細胞内[Cl^-]を変化させたときの実測値、破線は、Nernstの式による計算値。

［文献］

1. Smirnova, T., Stinnakre, J. and Mallet, J. (1993) Science 262 430-433

7 NMDAシグナルによる海馬 Activator protein 1 の誘導

東　泰孝、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
N－メチル－D－アスパラギン酸 (NMDA) シグナルを介した脳内転写制御因子の特異的変化を解明する目的で、NMDAあるいはPentylenetetrazole (PTZ) 投与による脳内転写制御因子のDNA結合能の変動を解析した。NMDA投与2時間後のActivator protein 1 (AP1) 結合能は、小脳および中脳を除くすべての脳内部位で有意な増強が見られたが、中でも海馬が最も顕著であった。NMDAによる海馬のAP1結合能の増強は投与8時間後で完全に消失したが、12–16時間後に再び増強が認められた。一方、PTZ投与2時間後のAP1結合能は大脳皮質、海馬、線条体、視床下部および中脳で有意な増強が認められた。しかしながら、PTZ投与の場合にはNMDA投与の場合とは異なり大脳皮質での増強が最大であった。さらに、PTZ投与の場合には遅発性 (12–16時間) のAP1結合能の増強も認められなかった。以上の結果より、NMDA投与によるAP1結合能の増強はけいれん発作による場合とは明らかに異なることが示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDAレセプターは、学習や記憶などの中枢神経系の可塑性形成プロセスなどの長期的神経機能変動や、脳虚血や低酸素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与する可能性が示されている(2)。NMDAレセプター活性化により細胞内流入したCa^{2+}は、細胞内リン酸化カスケード反応の活性化を介して各種核内転写制御因子を誘導する可能性が示される(1)。しかしながら、このような転写制御因子の誘導はPTZなどのけいれん薬の投与や電撃けいれんなどによっても惹起されることから、NMDAシグナルを介した転写制御因子の特異的誘導現象が存在するか否かについては不明である。したがって、本研究では、NMDAシグナルによる脳内転写制御因子の特異的変化を解明する目的で、NMDA投与動物とPTZ投与動物における脳内転写制御因子のDNA結合能を比較検討した。

〔実験方法〕

薬物投与：Std-ddY系雄性マウス (25–35 g) にNMDA (100–150 mg/kg) あるいはPTZ (75 mg/kg) を腹腔内投与した。また、対照動物には生理食塩水を腹腔内投与した。DNAプローブ：AP1の放射性プローブは、TPA response element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) 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。ゲル移動度シフトアッセイ：マウス脳内各部位から調製した核抽出液 (5 μg 蛋白質)、1 μg poly (dI–dC)、放射性プローブ (20 fmol、1–2×10^5 cpm)、200 mM KCl、10 mM $MgCl_2$、1mM EDTA、1mM 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 (80mV定電圧、2°C、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(3)。

〔実験結果〕

NMDA投与2時間後における脳内各部位のAP1を測定したところ、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部および橋・延髄において対照群と比べて有意に増加していた。中でも海馬での増強が約6倍と最も高いことが判明した(表1)。一方、中脳および小脳では著変は見られなかった。また、cAMP-response element結合蛋白質 (CREB)

のDNA結合能は、海馬においてのみ有意な増強が観察された。一方、Myc結合能はいずれの脳内部位においても著変は認められなかった。NMDA投与による海馬のAP1結合能の増強は投与2時間後で最大となり、8時間後で完全に消失した。しかしながら、NMDA投与12-16時間後に再びAP1結合能の増強が観察された。PTZ投与2時間後では、大脳皮質、海馬、線条体、中脳および視床下部において有意なAP1結合能の増大が見られたが、NMDAの場合とは異なり大脳皮質で約4倍と最も高い増強が観察された (表1)。一方、CREB結合能はいずれの脳内部位においてもPTZ投与に伴う変動を示さなかった。また、PTZ投与14時間後では海馬でのAP1結合能の増強は観察されなかった。

表1　NMDA投与およびPTZ投与による脳内AP1結合能の変化

	AP1 binding (% of control)			
	Saline	NMDA	Saline	PTZ
Cerebral cortex	100.0± 5.8	146.7±10.9**	100.0± 7.1	427.7±142.8**
Hippocampus	100.0± 7.9	606.1±44.8**	100.0± 4.2	271.8± 30.6**
Striatum	100.0±21.8	191.0±19.9*	100.0±17.6	269.2± 55.8**
Hypothalamus	100.0± 8.8	177.2±10.5**	100.0±13.2	238.9± 37.1**
Midbrain	100.0± 7.6	88.1±13.7	100.0±15.3	235.1± 40.8**
Cerebellum	100.0±20.0	108.1± 4.1	100.0±11.4	107.0± 15.2
Medulla-Pons	100.0± 8.9	154.5±14.7**	100.0±11.3	128.9± 20.0

NMDA (150 mg/kg, i/p., 2 hr), PTZ (75 mg/kg, i/p., 2 hr), *P<0.05, **P<0.01, significantly different from control value obtained in animals injected with saline.

〔考察〕

NMDA投与により海馬のAP1結合能が選択的に誘導されることが判明した。一方、けいれん薬であるPTZの投与によるAP1結合能の増強は、NMDA投与の場合とは異なり大脳皮質で最も顕著であった。これらの事実は、NMDAシグナルによる海馬でのAP1結合能の増強がNMDA投与によるけいれんに起因するのではないことを示唆するものである。また、NMDA投与により観察された遅発性のAP1結合能の増強はPTZ投与の場合には見られないことも両薬物によるAP1結合能の変化が明らかに異なることを意味するものである。今後、NMDAシグナルに特異的な遅発性のAP1結合能の増強について詳細なる解析を進めていきたい。

〔謝辞〕

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(06672215)の援助の下に行われた。

〔文献〕

1. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1994) *J. Neurochem.* in press.
2. 米田幸雄、荻田喜代一 (1991) 薬学雑誌 111, 329-344
3. Yoneda, Y., Ogita, K., Kabuto, H. and Mori, A. (1993) *Neurosci. Lett.* 161, 161-164

8 NMDAレセプターポリアミンドメインの新規アンタゴニスト

荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターの選択的ポリアミン (PA) アンタゴニストの開発を目的として、NMDAレセプター複合体上の各ドメイン結合に対する各種合成PAの効果を検討した。[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801) 結合に対する各種PAの影響をスペルミジン (SPD) 添加時および非添加時で検討したところ、用いたPAの中でbis(3-aminopropyl)nonanediamine (TE393)のみがSPD非添加時の結合を阻害することなく、SPD添加時の結合を著明に阻害することが判明した。TE393は[^{3}H]MK-801結合に対するSPDの増強を競合的に抑制するばかりでなく、グルタミン酸(Glu)の結合増強作用を有意に増大させた。またTE393は、NMDAドメインへの[^{3}H]D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoic acid (CGP 39653) 結合を著明に増強させ、グリシン(Gly) ドメインへの[^{3}H]5,7-dichlorokynurenic acid (DCKA) 結合を有意に阻害した。以上の結果より、TE393はNMDAレセプター複合体上のPAドメインの新規アンタゴニストである可能性が示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDAレセプターは、イオンチャネルドメイン、NMDAドメイン、GlyドメインおよびPAドメインから構成されるレセプターイオノフォア複合体である(7)。近年、NMDAドメインおよびGlyドメインのアンタゴニストが活発に開発され、多くの選択的アンタゴニストが見出されている (3)。一方、PAアンタゴニストとしてはifenprodil (1) およびdiethylenetriamine (DET)(6) およびarcaine (5) などが見出されているが、それらの化合物はその特異性などに問題があると考えられる (2)。したがって本研究では、選択的PAアンタゴニストの開発を目的として、各種合成PAのNMDAレセプター結合に対する効果を検討した。

〔実験方法〕
ラット全脳より調製したシナプス膜標品を、遠心分離操作により1回洗浄した膜標品を非洗浄膜標品とした。また3回洗浄したのち、0.32 M蔗糖水溶液に懸濁状態で-80℃で凍結保存した膜標品を結合実験当日に0.08% Triton X-100と2℃で30分間前処理した膜標品をトリトン処理膜標品とした。[^{3}H]MK-801結合はいずれかの膜標品を50 mM トリス酢酸緩衝液 (pH 7.4) 中で、5 nM [^{3}H]MK-801と30℃で30分間反応させて測定した。他のリガンド結合実験は、トリトン膜標品とそれぞれの放射性リガンドを2℃で反応させて行った。反応停止は、すべてWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた急速吸引濾過法により行った。

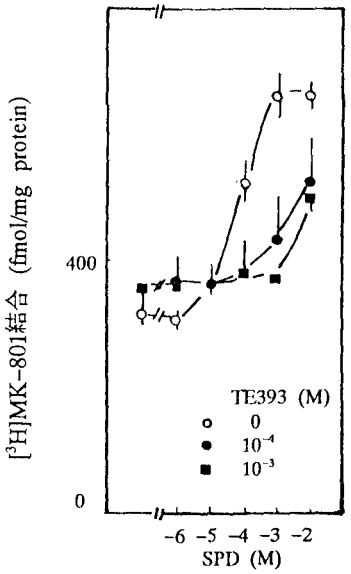
〔実験結果〕
非洗浄膜標品への[^{3}H]MK-801結合はGluおよびGly添加による影響を受けなかったが、SPD添加は同標品への結合を約2倍に増大させた。SPD添加および非添加条件下で、[^{3}H]MK-801結合に対する種々のPA化合物 (10^{-3} M)の添加効果を検討したところ、1,10-diaminodecane (DA10)、DET、N-(3-aminopropyl)octanediamine (TE38)、agmatineおよびarcaineなどがSPD非添加および添加の両条件下で著明な結合阻害作用を発揮することが明らかとなった (表1)。一方TE393は、SPD非添加時の結合を阻害することなく、SPD添加時の結合のみを阻害した (表1)。次にトリトン処理膜への[^{3}H]MK-801結合に対するPA化合物の効果を解析したところ、DA10およびarcaineはGlu/Gly/SPD共存下の結合ばかりでなく、Glu単独存在下およびGlu/Gly共存下の結合も完全に阻害することが判明した。一方TE393は、Glu/Gly/SPD共存下の結合を濃度依存的に阻害したが、Glu単独存在下

およびGlu/Gly共存下の結合に対しては有意な増強作用を示した。さらに、TE393はGluの増強作用を有意に増大させるが、Glu/Gly共存下におけるSPDの増強作用に対しては競合的な阻害作用を発揮することが判明した(図1)。TE393は[^{3}H]CGP 39653結合を10^{-5} M以上の濃度で著明に増強したが、[^{3}H]Glu結合に対しては10^{-3} Mの濃度でのみ有意な阻害作用を発揮した。またTE393は、[^{3}H]DCKA結合を10^{-4} M以上の濃度で有意に阻害したが、[^{3}H]Gly結合には著変を与えなかった。一方、[^{3}H]カイニン酸結合および[^{3}H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid結合に対してTE393は著変を与えなかった。

表1. [^{3}H]MK-801結合に対する各種PAの効果

PA (10^{-3} M)	[^{3}H]MK-801 (% of control) None	10^{-3} M SPD
None	100±3	211±7
TE393	127±4	126±7
TE38	88±4	114±7
DA10	0	81±5
DET	65±1	152±5
Arcaine	17±3	54±1
Agmatine	43±2	120±5

図1. SPDの結合増強作用に対するTE393の効果



〔考察〕

TE393がPA非添加時の[^{3}H]MK-801結合を阻害することなく、[^{3}H]MK-801結合のSPDの増強作用に対して拮抗するという本研究成績は、本化合物が従来報告されているPAアンタゴニストとは異なる選択的PAアンタゴニストである可能性を示すものである。しかしながら、TE393はSPD非添加時の[^{3}H]MK-801結合を有意に増強することから本化合物がアゴニスト作用を有する部分アンタゴニストである可能性も示唆される。さらに、TE393のNMDAアンタゴニスト結合に対する増強作用およびGlyアンタゴニスト結合に対する阻害作用は、いずれもSPDなどのPAアゴニストの効果 (4,8) と類似している。これらの事実は、本化合物が従来のPAアンタゴニストとは異なった新しいタイプのアンタゴニストであること支持するものである。

〔謝辞〕

貴重なPA化合物を供与して頂いた城西大学薬学部薬品分析化学教室・鮫島啓二郎博士および白幡晶博士に深く感謝の意を表します。また、実験遂行上の協力を頂いた榎本理世、小島紀香および首藤誠の三氏に感謝します。本研究の一部は、ヒューマンサイエンス振興財団平成6年度基礎研究事業の援助のもとに行った。

〔文献〕

(1) Carter, C., Rivy, J.-P. and Scatton, B. (1989) *Eur. J. Pharmacol.* 164, 611-612. (2) Ogita, K., Ohkawara, A., Suzuki, T., Ohgaki, T., Uchida, S., Meguri, H. and Yoneda, Y. (1992) *Neurochem. Int.* 21, 135-147. (3) 荻田喜代一、米田幸雄 (1991) 神経精神薬理 13, 817-828. (4) Reynolds, I.J. (1994) *J. Neurochem.* 62, 54-62. (5) Sacaan, A.I. and Johnson, K.M. (1990) *Mol. Pharmacol.* 38, 705-710. (6) Williams, K., Dawson, V.L., Romano, C., Dichter, M.A. and Molinoff, P.B. (1990) *Neuron* 5, 199-208. (7) Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) *Neurosci. Res.* 10, 1-33. (8) Yoneda, Y., Suzuki, T. and Ogita, K. (1994) *J. Neurochem.* 62, 102-112.

9　PC12細胞における、亜鉛イオンによるATP応答の増強作用

小泉修一、池田　真、井上　和秀

（国立衛生試験所・薬理部）

〔要約〕　PC12細胞における様々なATP応答に対する亜鉛イオン（Zn^{2+}）の影響を検討したZn^{2+}（３～300μM）は、ATP（30μM）刺激により惹起される内向き電流、細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_{in}$）上昇及びドパミン（DA）放出を濃度依存的に増大させた。Zn^{2+}によるATP誘発性内向き電流増大作用の電位依存性は認められなかった。またZn^{2+}の作用は、ATPの最大反応には影響を与えず、低濃度ATPの作用を増大した。高濃度KCl（40 mM）により惹起されるDA放出はZn^{2+}（１～300μM）による影響を受けなかった。ATP応答は、Zn^{2+}の有無に関わらず、外液Ca^{2+}除去または競合的拮抗薬suraminの添加により完全に消失した。以上の結果より、Zn^{2+}はPC12細胞においてATP受容体/チャネルを活性化し、Ca^{2+}の細胞内流入を増大させ、DA放出を増強することが明らかとなった。このZn^{2+}によるATP応答の増強作用は、様々な神経細胞におけるATP応答の生理的意味を考察する上で非常に興味深い知見である。

［目的］　亜鉛は必須希少元素として生体内に存在しているが、そのほとんどは亜鉛結合タンパク質と強固な結合をしており、様々な酵素反応において重要な役割を担っている。しかし近年神経終末のシナプス小胞に亜鉛を含む、いわゆる亜鉛含有神経の存在が確認され、神経の興奮により、Zn^{2+}としてシナプス間隙に放出されていることが明らかとなった。Zn^{2+}は電位依存性カルシウム、ナトリウム、カリウムチャネル及びN-methyl-D-aspartate受容体／チャネルさらにNa/CaATPaseを抑制する(1)。しかし最近、上頸及び腹腔神経節細胞を用いた電気生理的実験により、Zn^{2+}がATP誘発電流を増強させることが報告された(2,3)。また亜鉛は海馬や扁桃体に高濃度に存在しており、我々はATPが海馬で神経伝達を担っていることを報告している(3)。そこでまず、今までATP応答を様々な角度から検討してきたPC12細胞を用い(5,6)、ATP応答に対するZn^{2+}の影響について詳細に検討した。特にチャネルレベルでの変化が、DA放出といった細胞の機能的応答にまで影響を与え得るのか否かについて調べることを目的とした。

［実験方法］　PC12細胞の培養法（7）、パッチクランプ法による内向き電流の測定（8）、DA放出量の定量（9）及び$[Ca^{2+}]_{in}$測定（10）は既報に従った。

［結果］Zn^{2+}(10μM) はATP（30μM）により惹起される内向き電流を約２倍に増強した。しかしATP（300μM）の電流に対しては約30 %増強させただけであった。Zn^{2+}のこの増強作用には電位依存性は認められなかった。Zn^{2+}（３～300μM）はATPにより惹起されるDA放出を用量依存的に増強した（Fig. 1）。またZn^{2+}はATP-DA放出用量依存曲線を最大反応に影響を与えること無しに、左方へシフトさせた。外液Ca^{2+}除去によりATP（30μM）による応答はZn^{2+}の有無に関わらず消失した。Suramin(10μM)はATP(30μM)応答をZn^{2+}の有無に関わらず消失させたが、さらに高濃度のATP（100μM）応答に対しする抑制は部分的であったZn^{2+}(１～30μM) はATPにより惹起される$[Ca^{2+}]_{in}$上昇を増大させた(Fig. 2)。高濃度KCl(40 mM)により惹起される応答はZn^{2+}の影響を受けなかった。さらに、高濃度のMg^{2+}(6 mM)存在条件下でもZn^{2+}によるATP応答の増大作用は認められた。

［考察］ Zn^{2+}はATP受容体／チャネルの活性化、Ca^{2+}流入を促進させ、ATPによるDA放出の増大を引き起こすことが明らかとなった。Zn^{2+}のこの増強作用は、①最大反応に影響を与えないこと、②低濃度のP2受容体競合的拮抗薬suraminによっても完全に消失することから、機能的なP2受容体数の増加によるものではなく、ATP受容体／チャネル活性化の効率のが増大したことによると考えられる。またZn^{2+}はATP分子のMg^{2+}結合部位にMg^{2+}と競合的に結合する。Zn^{2+}のターゲットがATP分子である可能性も否定できないが、過剰のMg^{2+}存在下でもZn^{2+}はATP応答を増大させることから、Zn^{2+}はATP受容体／チャネルに作用して、上述の増大作用を呈すものと考えられる。Zn^{2+}の増強作用がATP応答に特異的であること並びにZn^{2+}含有神経の脳内局在性を考えると、本実験結果は非常に興味深い知見である。

［文献］ [1]Frederickson C.J., International Rev.Pharmacol., 31, 145-238, 1989. [2]Cloues et al., Pflugers Arch., 424, 152-158, 1993. [3]Li et al., Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A., 90, 8264-8267, 1993. [4]Inoue et al., Neurosci. Lett., 134, 215-218, 1992. [5]Inoue K. and Nakazawa K.,News in Physiol.Sci.,7,56-59,1992. [6]Nakazawa.K and Inoue K.,J.Neurophysiol.,68,2026-2032, 1992. [7]Inoue K. and Kenimer J. G., J. Biol.Chem. 263,8157-8161,1988. [8]Nakazawa et al., J.Physiol(Lond.),428, 257-272, 1990. [9]Ohara-Imaizumi M.,et al., J.Pharmacol.Exp.Ther., 259,484-489, 1992. [10]Grynkiewicz G.,et al.,J.Biol.Chem. 260,3440-3450, 1985.

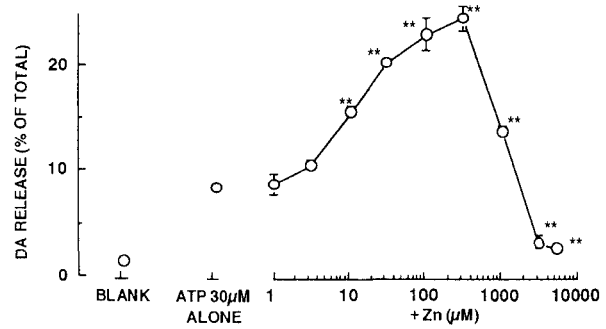


Fig. 1
Effect of zinc (Zn) on the release of dopamine (DA) evoked by 30 μM ATP in PC12 cells. The amount of released dopamine was expressed as percentage of total cellular content. Data are mean±S.E.M. of at least two separate experiments (n=6-9). Asterisks show significant difference from the response evoked by 30 μM ATP alone (*p<0.05, **p<0.01).

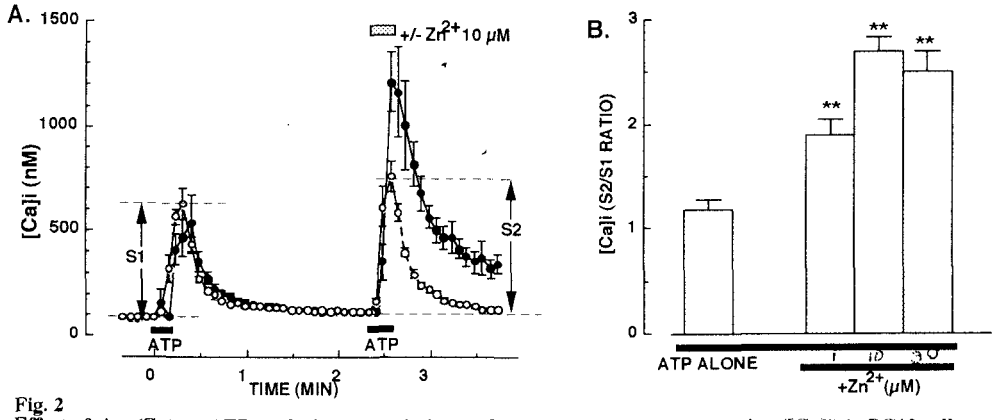


Fig. 2
Effect of zinc (Zn) on ATP-evoked increase in intracellular calcium ion concentration ([Ca]i) in PC12 cells.
A. The time-course of ATP (30 μM)-evoked [Ca]i rise in the cells. The cells were stimulated twice with ATP for 15 s in a 2 min interval, and the second stimulation was made in the absence (open circles) or presence of 10 μM Zn. The responses evoked by the first and the second stimulation were represented as S1 and S2, respectively.
B. Concentration-dependency of changes by Zn of ATP-evoked increase in [Ca]i in the cells. The value show the ratio of S2/S1 as shown in A. Data are mean±S.E.M. of 15-30 cells tested. Asterisks show significant difference from the ratio obtained with ATP alone (p<0.01)**

10　チロシンキナーゼ阻害剤による中枢神経細胞のアポトーシスにおけるAP-1の関与。

〔著者〕　武井延之、　村上章*　遠藤泰久
〔所属〕　（京都工繊大　応用生物、*高分子）

〔要約〕
チロシンキナーゼ阻害剤であるgenistain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。genistain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、微細構造の変化やDNAの断片化も観察された。　以上のことからgenistainによる神経細胞死はアポトーシスであると考えられた。またこの神経細胞死に先立ち、転写因子であるAP-1が増加していることが明らかとなった。　さらにc-fos, c-junのアンチセンスによりこの神経細胞死は抑制された。　以上のことからこの神経細胞死はAP-1を介した転写調節を必要としている可能性が強く示唆された。

神経細胞のアポトーシスの実験系としては、末梢上頚神経節神経細胞のNGF除去による死が良く知られている。　このように神経細胞の生存維持には神経栄養因子が重要な（あるいは必須の）役割を果たしている。　中枢の神経細胞ではCaイオノフォア(1)、βアミロイド(2)、高酸素環境(3)などによるアポトーシスが報告されているが、神経栄養因子除去といったいわゆる”生理的”な実験系はない。中枢神経細胞は多様性に富むため、その生存維持に必要な神経栄養因子もまた多様で（しかも未知のものも含まれており）抗体を用いることは難しいからである。　ところで多くの成長因子の受容体はチロシンキナーゼであり、Ras / MAPキナーゼカスケードなどの活性化を介して成長因子の機能を核内に伝達していると考えられている。そこでこれらの情報伝達系をチロシンキナーゼ阻害剤で抑制したときに細胞死が起こるか否か、またその細胞死はアポトーシス様の積極的なものかを検討した。
さらにこの神経細胞死における新たな転写調節の可能性についてまずAP-1に注目し、ゲルシフト法およびアンチセンスを用いて検討した。

［方法］
初代培養神経細胞はラット１７日胚大脳皮質より既報(1, 4)に従って調製した。細胞毒性の検定は位相差顕微鏡写真をとり生存神経細胞数を計数した。　電子顕微鏡観察、　DNAの電気泳動も既報(1)に従った。核抽出液はSchreiberらの方法(5)に従って調製し、AP-1 consensus oligo (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3' 3'-GCG AAC TAC TC A GTC GGC CTT-5')をプローブとしてゲルシフトアッセイをおこなった。　アンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホチオエート型のものをDNA合成機(ABI)で合成した。各シークエンスはc-fos sense; 5'-TTC TCG GGT TTC AAC GCG-3', c-fos antisense; 5'-CGC GTT GAA ACC CGA GAA-3', c-jun sense; 5'-ACT GCA AAG ATG GAA ACG-3', c-jun antisense; 5'-CGT TTC CAT CTT TGC AGT-3' を用いた。

［結果と考察］
genestein を培地に添加して生細胞数を計数すると、30μMの濃度で顕著な細胞毒性が観察された（Fig. 1）。また時間経過にともなう生存率の変化を調べると８時間から１６時間の間で急激な神経細胞死がおっこっていることがわかった（Fig. 2）。　またこの神経細胞死はRNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDおよび蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサミドによって抑制されることから新たな転写や翻訳を必要とする積極的な細胞死であると考えられた。　さらに微細構造の電子顕微鏡観察の結果、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が認められた。さらにDNAの断片化なども観察され、genisteinによる神経細胞死はアポトーシスであると考えられた。

このような積極的な細胞死における転写調節を調べる目的で、代表的な転写因子であるAP-1の関与について、ゲルシフトアッセイとアンチセンスオリゴを用いた実験をおこなった。 genistein (30 μM) を添加して2時間後に核抽出液を調製し、AP-1 consensus oligo をプローブとしてゲルシフトアッセイを行なうと、顕著なAP-1 bindinngの増加がみられた。 さらにc-fos およびc-jun アンチセンスオリゴヌクレオチド(1 μM)はgenistein による神経細胞死を部分的に抑制したが、センスオリゴヌクレオチドは作用がなっかた(Fig. 3)。 以上の結果から、genistein による神経細胞死はAP-1 を介した転写調節を必要とする、遺伝的にプログラムされたものであることが強く示唆された。

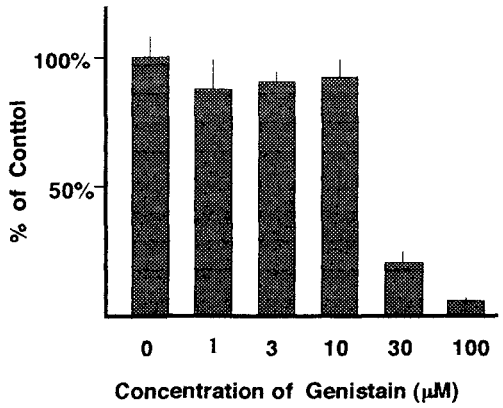


Fig. 1：genistein の神経細胞毒性の濃度による変化。

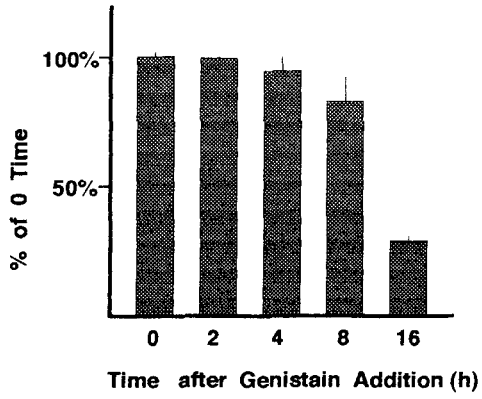


Fig. 2：genistein添加後の時間経過にともなう生存神経細胞の割合。

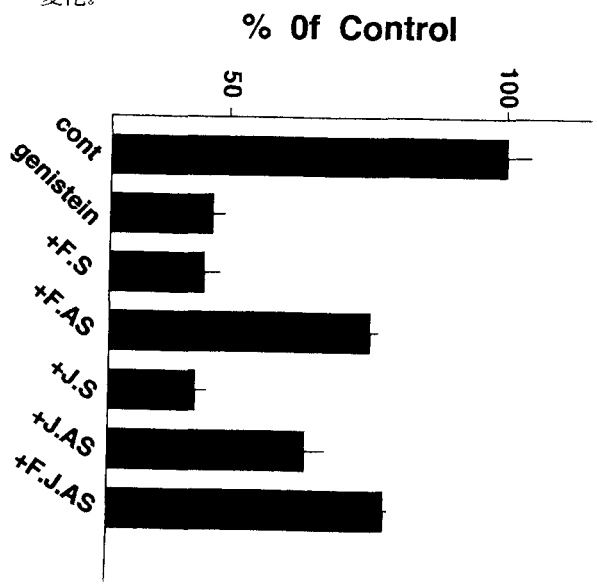


Fig. 3：アンチセンスオリゴの作用。 F.S; c-fos sense, F.AS; c-fos antisense, J.S; c-jun sense J.AS; c-jun antisense, F.J.AS; c-fos & c-jun antisense mixture 濃度は 1 μM。

[文献]

[1] Takei, N. and Endo, Y. (1994) Brain Res. in press

[2] Loo, D. T. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 7951-7955

[3] Enokido, Y. and Hatanaka, H. (1993) Neuroscience 57 965-972

[4] Takei, N. et al. (1991) J. Neurochem. 57 1178-1184

[5] Schreiber, E. et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17 6419

11 NMDA神経毒性に対するDiphenyliodonium の効果

辻 浩司[1,2], 中村 洋一[1], 片岡 喜由[1]
（愛媛大学医学部・[1]第一生理学, [2]整形外科）

〔要約〕
NMDAによる培養脊髄神経細胞の細胞死の機構を明らかにするために，NO合成酵素(NOS)阻害剤とされるdiphenyliodonium (DI) [4]およびcalmodulin 阻害剤であるW7の，神経細胞死抑制作用と細胞質内へのCa^{2+}流入に対する効果を検討した。DIとW7はともにNMDAによる神経細胞死をほぼ完全に抑制した。Ca^{2+}流入はW7によって阻害されないことから流入Ca^{2+}の標的機構がcalmodulinであることが示唆される。しかしながらNOS阻害剤であるとされるDIはCa^{2+}流入を阻害した。これらの結果はSnyder等が提唱する，Ca^{2+}流入→ Ca/calmodulin→NOS→NO→細胞障害，という活性化経路[1]が少なくとも我々の培養脊髄神経細胞ではあてはまらず，流入したCa^{2+}の標的はcalmodulinであるにしても，その次には →NOS→NO→ 以外の主要経路があることを示唆する。

［目的］
フラビン酵素阻害剤とされるDiphenyleniodonium (DIP)が，大脳皮質の培養神経細胞におけるNMDA神経毒性を抑制するという報告[1]があり，DIP はNOSを抑制することにより，毒性抑制効果が発現すると考えられている。そこで，我々は脊髄神経細胞を用いて，DIPの類似物質で同様のNOS抑制効果があるといわれているdiphenyliodonium (DI)[4]およびcalmodulin 阻害剤であるW7を用いて，NMDA神経毒性に対する抑制効果を検討した。また，NMDAによる細胞質内Ca^{2+}濃度の上昇に対するDIおよびW7の作用を調べた。

［方法］
（神経毒性の評価）妊娠14日目ラット胎児の脊髄より単離した神経細胞をポリエチレンイミン(PEI)でコートしたプラスチックカバースリップ上で無血清培地にて12日間培養し用いた。[2]神経細胞をHepes-buffered Krebs Ringer solution (HKR)で30分間前処理した後，15分間300 μMNMDAに暴露し，その後無血清培地に換え24時間後に変性した神経細胞より遊離した乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定することにより，神経毒性の程度を評価した。DIはNMDA暴露時のみ添加し，W7は前処理およびNMDA暴露時に添加した。

（細胞内Ca^{2+}測定）同様に脊髄より単離した神経細胞をPEIでコートしたガラスカバースリップ上で無血清培地にて10日間培養し用いた。細胞内Ca^{2+}濃度変化は，Fura-2を用いた顕微蛍光画像解析法により測定した[3]。

［結果］
NMDA (300 μM)暴露により障害された神経細胞からのLDH放出の程度は10 μMDI を暴露中に添加しておくことによりほぼ完全に抑えられた。また，calmodulin の阻害剤であるW7も30分間の前処理中およびNMDA 暴露中に添加しておくことによりNMDA神経毒性に対して抑制効果を認めた。またDIおよびW7は，それ自体には神経毒性を認めなかった（図１）。

NMDA (100 μM)による細胞内Ca^{2+}の上昇は，10 μMDI と同時に添加した場合ほぼ完全に抑制された。W7は，NMDAの添加数分前から加えても，抑制効果は見られなかった（図２）。

［考察］

Snyderらは，NMDAによる神経細胞死がNOSを介して生じると提唱している。その一つの根拠として，NOSのフラビン結合部位での阻害剤であるDPIによる防御効果を挙げている。我々の培養脊髄神経細胞においても確かに，NMDAによる神経細胞死は，DPIと同様の作用を持つDIによりほぼ完全に抑制された。しかしながら，我々の脊髄神経細胞では，nirtoprusside を添加して発生するNOに暴露しても神経細胞死は誘発されないし，NMDAによる神経細胞死に対してNOS阻害剤であるnitroarginineは抑制効果がなかった（データ略）。我々はDIがNMDAによる細胞質内Ca^{2+}濃度の上昇を抑制することをみいだした。この細胞質内Ca^{2+}濃度上昇抑制作用がどのような機構で起こるのかは明らかでないが，NMDAによる神経細胞死に対するDIの防御効果は，DIがNOS活性のみを抑制しているのではなくて，DIがNMDA受容体に直接作用して細胞質内へのCa^{2+}流入を抑え神経細胞死を防いでいる可能性がある。

一方，calmodulin阻害剤であるW7もNMDAによる神経細胞死をほぼ完全に抑制した。興味深いことにW7の場合はDIと異なりNMDAによる細胞内Ca^{2+}濃度の上昇をほとんど抑制しなかった。このことはW7が細胞内へのCa^{2+}流入以降のステップを阻害して細胞死を抑制していることを示し，calmodulinが重要な次の標的機構であることを示唆している。Snyder等はDPIがNOS阻害剤であるとみなし，またNOSがCa/calmodulinにより活性化されることから，NMDAチャネル→Ca^{2+}流入→Ca/calmodulin→NOS→NO→細胞障害，という活性化経路を提唱している。しかしながら，少なくとも我々の培養脊髄神経細胞では，流入したCa^{2+}の標的はcalmodulinであるにしても，その次の活性化経路として→NOS→NO→以外の主要経路があることが示唆される。

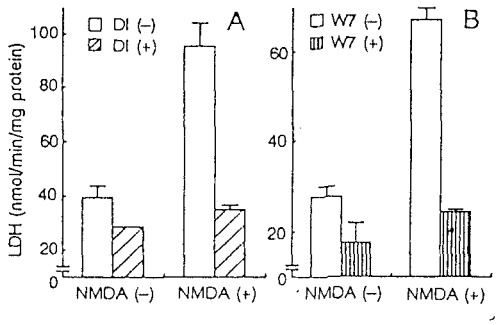


図1: NMDA神経毒性に対するDI (A)およびW7 (B)の保護作用。NMDA (300 μM)を15分間暴露した時に遊離されるLDH活性を測定した。DI (10 μM)は暴露中のみ、W7 (10 μM)は30分間の前処理中および暴露中に添加した。

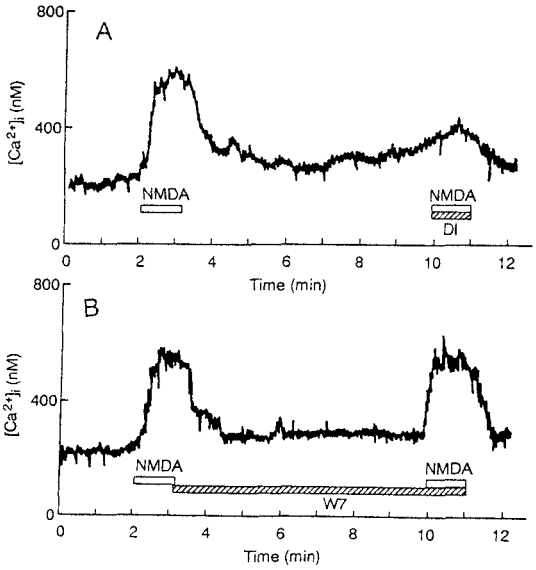


図2: NMDA暴露による細胞内Ca2+濃度上昇に対するDI (A)およびW7 (B)の効果。図に示した如く，100 μM NMDA, 10 μM DI, 10 μM W7を用いた。

［文献］[1]Dawson, V.L., Dawson, T.M, Bartley, D.A., Uhl, G.R. and Snyder, S.H. (1993) *J. Neurosci.* 13, 2651-2661. [2]Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T. and Kataoka, K. (1993) *Neuroscience* 55, 445-449. [3]Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T., Kataoka, K. and Schubert, P. (1994) *Neurosci. Lett.* 170, 5-8. [4]Stahr, D.J., Faschean, O.A., Kwon, N.S., Gross, S.S., Gonzalez, J.A., Levi, R. and Nathan, C.F. (1991) FASEB J. 5, 98-103.

12 低酸素耐性モデルの開発と耐性獲得におけるbFGFの役割

榊 孝之、山田 和雄、大槻 秀夫、湯口 貴導、今泉 和則*、津田 学*、高木 勉*、
和中 明生**、遠山 正彌**、早川 徹（大阪大学脳神経外科、*分子脳機構、**第２解剖）

〔要約〕
低酸素耐性現象をラット神経細胞培養系において検討し、耐性獲得の機構および耐性関連因子について検討した。培養神経細胞にあらかじめ細胞傷害のない短時間低酸素負荷を加えると、その後の長時間低酸素負荷に対する耐性を獲得することがわかり、さらに特定の遺伝子の発現や円滑な蛋白への転写が耐性に密接に関与していることが示された。この耐性関連因子の１つとして塩基性線維芽成長因子(bFGF)が重要であることが示唆された。

[目的]
あらかじめ致死的でない脳虚血負荷を与えると、その後の致死的な脳虚血負荷に対して耐性を獲得することが、虚血耐性現象として報告された(1,2)。この耐性獲得には、特定の遺伝子、蛋白の発現が不可欠と考えられ、その１つの候補としてheat shock protein が挙げられている(1,2)。 この耐性獲得機構の解明、および耐性関連遺伝子の検索のため、神経細胞初代培養系を用い、低酸素性神経細胞傷害に対する耐性獲得モデルを作成した。本研究では耐性獲得へのbFGFの関与に注目し、bFGFmRNAおよび蛋白の発現を耐性獲得との関連において経時的に解析した。

[方法]
18日齢のWistar ラット胎仔を用い、大脳皮質細胞の高密度初代培養を行った(3)。10％血清培地で24時間培養し、その後24-72時間無血清培地で培養した後、低酸素負荷を加えた(4)。低酸素負荷は培地中の酸素分圧が対照群の1/ 4以下になるように密閉されたチャンバーを95％NO_2、5％CO_2に置換しておこなった。実験群を1)対照群2)短時間(４時間)低酸素負荷群3)短時間低酸素+長時間(24時間)低酸素負荷群4)長時間低酸素負荷群の４群に分けた。細胞傷害は培地中に傷害細胞より遊離されるLDHを定量し、判定した。また耐性獲得機構について、低酸素負荷前後におけるbFGFmRNAおよび蛋白の発現を Northern blot と Western blotで経時的に検討し、解析した。なお本培養系ではbFGFを培地に添加すると低酸素性細胞死が有意に減少することを確認している。

[成績]
細胞傷害をLDHの定量により経時的に検討したところ、短時間の低酸素負荷では対照群と比較して有意な細胞傷害を認めなかった。一方、長時間の低酸素負荷を加えると神経細胞の膨化、神経突起の消失を認め、有意に細胞傷害を認めた。しかし、あらかじめ短時間の低酸素負荷を加えておくと、その後の長時間低酸素に対する細胞傷害が有意に軽減し、低酸素に対する耐性が獲得された(図1)。
ついで、低酸素負荷前後におけるbFGF発現の経時的変化を検討したところ、短時間の低酸素負荷を加えることにより、24時間後よりbFGFmRNAの発現を認め、また、24時間後には蛋白の発現も認めた。一方長時間低酸素負荷では、bFGFmRNAは48時間後まで遅延して発現し、蛋白の合成も3日後まで抑制された。これに対し、短時間の低酸素を負荷して、48時間後に長時間の低酸素負荷をかけると、最初の短時間低酸素負荷後より bFGF 蛋白が持続的に発現しており、

細胞傷害も軽減された(図2,3)。

[考察]

ラット胎仔大脳皮質初代培養系においてあらかじめ軽度の低酸素負荷を加えることにより、低酸素性神経細胞傷害に対する耐性を獲得することが明らかとなった。本実験系においては、培地に添加したbFGFが低酸素性傷害に対する保護作用を示すこと、また私どもが報告したように脳虚血後には、bFGFmRNA,蛋白とも発現が認められることから(5)、bFGFが耐性関連遺伝子の1つである可能性が示唆された。そこで耐性獲得の機構として、遺伝子、蛋白の発現について経時的に検討したところ、あらかじめ軽度の低酸素を負荷することにより、その後の低酸素負荷でも蛋白の合成が抑制されず、あらかじめbFGF蛋白が誘導されることにより神経細胞が低酸素に対して耐性を獲得したものと判断された。これ以外にも未知の耐性関連因子の存在が強く示唆され、今後培養系において低酸素耐性関連遺伝子の検索が必要である。

[文献]

1) Kitagawa,K et al. (1990) Brain Res 528,21-24
2) Kirino, T et al. (1991) Cereb Blood Flow Metab 11,299-307
3) Otsuki, H et al. (1994) Cereb Blood Flow Metab 14,150-155
4) Kinoshita, A et al. (1989) Exp Cell Biol 57,310-314
5) Otsuki,H et al. (1993) 神経化学 32,(1) 80-81

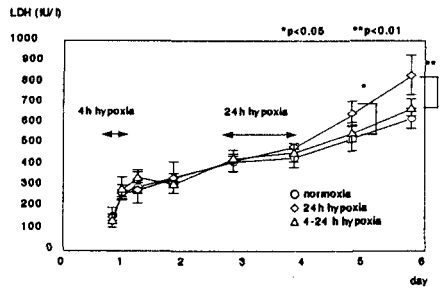
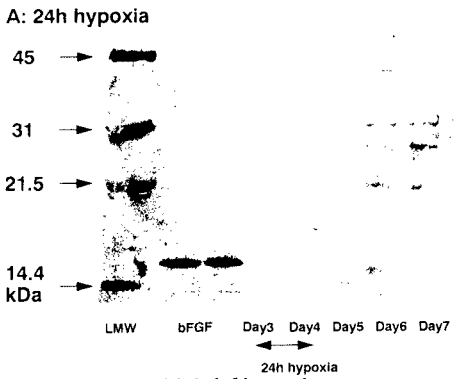


図1：LDH定量による細胞傷害の経時的変化。長時間(24h)低酸素負荷後、対照群と比較して有意に細胞傷害が認められるが、あらかじめ短時間(4h)低酸素負荷を加えると耐性を獲得した。



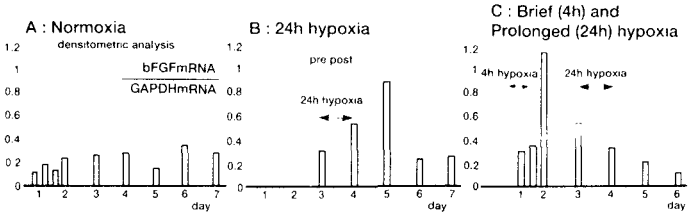


図2：Northern blot, bFGF mRNA densitometric analysis
短時間低酸素では負荷開始より24h、長時間低酸素では負荷開始より48h と遅延している。

図3：Western blot
短時間では蛋白発現は負荷開始より24h後より認めるが、長時間負荷後では、3日間発現が抑制されている。

13　一過性脳虚血伴う神経細胞死と迷走神経刺激および遮断の効果

板野俊文、政田哲也[1]、松井秀樹、徳田雅明、岡田泰士[2]、根木哲朗[3]、村上哲英[2]、長尾省吾[1]、
畠瀬　修、
香川医科大学、生理学、脳神経科学[1]、生物学[2]、基礎スポーツ医学[3]

〔要約〕

一過性脳虚血に伴う遅延性神経細胞死とコリン作動性神経である迷走神経の関係について明らかにした。迷走神経の電気的直接刺激は神経細胞死を明らかに抑制した。一方アトロピンによる迷走神経の遮断は用量依存性に神経細胞死を増悪させた。この現象を説明することが可能な作用機序について考察した。

（目的）

一過性の脳虚血に伴いおこる神経細胞死は虚血・血流再開より４８－７２時間遅れて起こり、海馬ＣＡ１領域に特異的に起こる遅延性錘体神経細胞死（Delayed Neuronal Death：DND）としてよく知られた現象である（３）。この現象は臨床的には順行性の健忘を伴う。その死に至る過程は不明であるが、種々の神経伝達物質（グルタミン酸等）の関与や、細胞内情報伝達系（Protein Kinase Cやカルモデュリン依存性キナーゼII）の関与が報告されている（１）。一方この反応を修飾する系としてコリン作動性ニューロンの可能性が報告されているが（２）、詳細な機序は明かではない。この解析を行う目的で、今回は迷走神経に焦点を当て、DNDとの関連を明らかにする。迷走神経の刺激系としては直接電気刺激を、抑制系としてはアトロピンを用いて実験を行った。

（方法）

常法に従い８０ｇの砂ネズミの両側性の頸動脈を剥離し、クリッピングを３－５分行う（３）。このとき同時に頸動脈に平行して走っている迷走神経も剥離する。刺激は虚血と平行して行う。刺激装置は日本電気三栄の電気刺激装置（ＳＥＮ－３００１）を用い、強刺激としては０．２ｍＡ，１ｍｓｅｃ，２５ｍｓｅｃのインターバルで３分間刺激を行った。弱刺激０．１ｍＡの強度で他は強刺激と同様であった。アトロピンは０．０２mg/kgから２０mg/kgまで各量を虚血前に腹腔内投与した。１週間後にペントバルビタルで深麻酔後、脳を摘出しフォルマリン固定した。ビブラトームで３０μmの切片を作成し、クレジル　バイオレットで染色した。ＣＡ１領域の神経細胞を顕微鏡写真で撮影し、単位面積あたりの生存細胞数をカウントした。統計解析はStudent-t Testを用いた。

（結果）

１．迷走神経電気刺激の効果

図１に示すように虚血時における迷走神経の強刺激はほぼ完全に海馬ＣＡ１領域のDNDを抑制した。一方弱刺激は虚血のみの群と同様で、刺激効果は認められなかった。同様の細胞死の解析を大脳皮質の錘体細胞で行ったところシャム群と比較して全ての群で３０－４０％の細胞死を認めたが、迷走神経刺激群と非刺激群では統計的に差がなかった。以上より迷走神経刺激は条件により海馬では有効であったが、大脳皮質では無効であった。この刺激効果は虚血前・後の処理では無効であった。

２．アトロピンのDND増悪効果

図２に示すようにアトロピンの虚血前投与は明らかにDNDを用量依存性（０．０２－２０ｍｇ／ｋｇ）に増悪させた。また０．０２ｍｇを前投与し、虚血後２０ｍｇを投与した場合は０．０２ｍｇ単独よりもより増悪したが、２０ｍｇ前投与ほどの効果は認められなかった。

（考察）

迷走神経とDNDが密接に関係する事を２種の実験系を用いて示した。今回の実験より迷走神経系の賦

活はDNDを抑制し、遮断はDNDを増悪する。

迷走神経の電気刺激法は薬物耐性の多焦点性のてんかん患者のけいれん発作を抑制するため開発され、欧米ではすでに臨床応用が始まっている（４）。迷走神経は弧束核を介して中枢神経系と連絡しており、この核より中枢神経系の各部位に投射している。ただし大脳皮質への直接の投射がない事より、今回の大脳皮質での効果が少なく、海馬では顕著な効果が認められたことは説明できる。また海馬ＣＡ１でのDNDと大脳皮質でのDNDはその誘導機序が異なる可能性もあり、刺激の有効性に差があることは矛盾しない。

アトロピンは脳外科領域においては汎用される迷走神経遮断薬である。今回明かな毒性を示した２０ｍｇ／ｋｇは通常投与量からすれば明らかに大多量であるが、用量依存性があることを考慮すれば、手術前投与は充分に注意をされるべきであろう。

次に迷走神経がDNDに及ぼす作用機序であるが、次の２つの可能性が考えられる。

１．虚血にともなう大量のグルタミン酸の遊離が神経毒性を発揮すると考えられているが、コリン作動ニューロンはこの遊離を抑制する。

２．コリン作動性神経に共存するVIPが脳血管系に拡張に働き、虚血に拮抗する。

というものである。現在のところいずれの機序であるかは不明であるが、今回の研究でコリン作動性神経系の活性化とDNDの抑制は密接に関係していることが明かとなった。

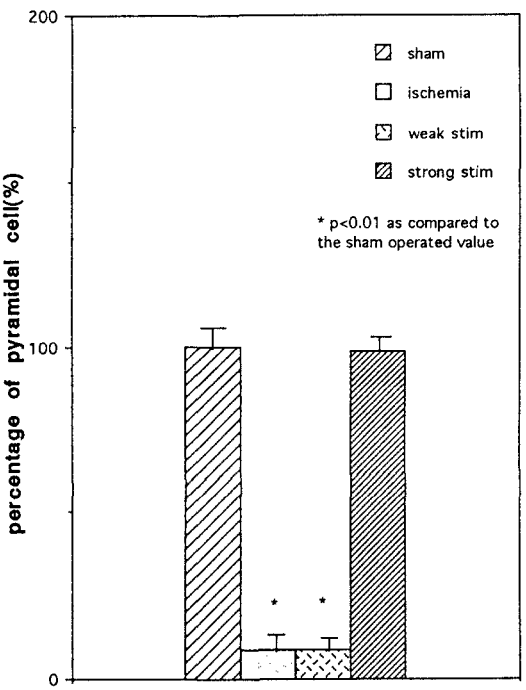


図１．迷走神経電気刺激がDNDに及ぼす効果

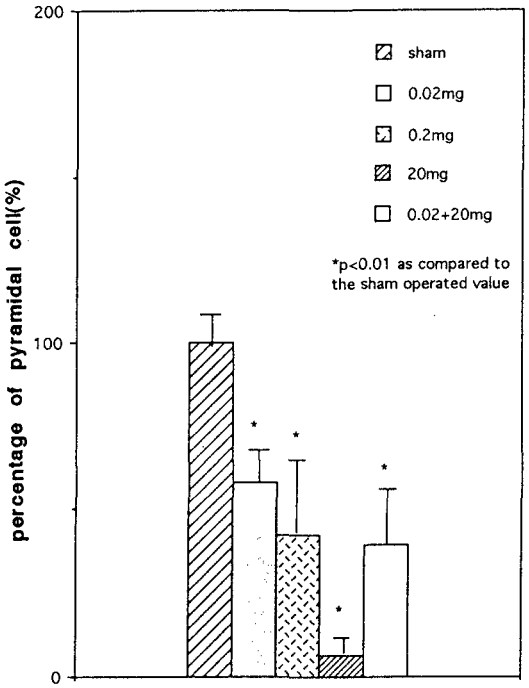


図２．アトロピン投与がDNDに及ぼす効果

文献
(1)Domanska-Janik K., Zalewska T.(1992) J. Neurochem. 58, 1432-1439
(2)Kawasaki Y., Araki H., Otomo S.(1992) Physiol. Behavior. 52, 141-147
(3)Kirino T.(1982) Brain Res. 239,57-69
(4)Landy H.J., Ransay R.E. et al.(1993) J. Neurosurg. 78,26-31

14　BDNFは小脳顆粒細胞のアポトーシスによるニューロン死を抑制する

〔著者〕　久保 武一、野々村 健、小島 正己、岡 哲志、板戸 靖、畠中 寛
〔所属〕　（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕
生後 7～9 日齢のラット小脳顆粒細胞は、*in vitro* において高カリウム培地 (26 mM) で 4～5 日培養後、細胞外液を通常のカリウム濃度 (5 mM) に変えると大量の細胞死が起こることが知られており、最近この細胞死はアポトーシスの形態を示すことが報告された (1)。しかし、この系に働く神経栄養因子についてはあまりよく分かっていない。そこで我々は、この小脳顆粒細胞で見られるアポトーシスに対する種々の neurotrophins の細胞死抑制効果を検討した。その結果、脳由来神経栄養因子 (BDNF, 50 ng/ml) を添加することにより細胞の生存率が上昇し、顕著な細胞死抑制効果を観察した。ニューロトロフィン-4/5 (NT-4/5) でも同様の効果が観察された。NGF (100 ng/ml) には細胞死抑制効果は見られなかった。NT-3 は僅かであるが有意な作用を示し、既報と一致した (1)。さらに抗 Fos 抗体を用いた細胞免疫染色法により neurotrophins の添加にともなう Fos の誘導を調べたところ、BDNF の添加により顆粒細胞が染色された。以上の結果から BDNF は小脳の顆粒細胞に直接作用して細胞死抑制効果を示すものと考えられる。

近年アポトーシスと呼ばれる細胞死の形態が注目されており、神経系においても神経栄養因子の除去にともなう交感神経節ニューロンの細胞死 (2) などいくつかのアポトーシスの系が知られている。なかでも小脳顆粒細胞で見られる細胞死は、その細胞の均一性、量の豊富さなどから中枢神経系におけるアポトーシスを解析するのに優れたモデル系として注目されている。生後 8 日齢のラットから分離した小脳顆粒細胞は、高カリウム培地中で 6～7 日培養後、通常のカリウム濃度 (5 mM) の培地に変えるとアポトーシスを起こす (1)。この細胞死は高カリウムによる脱分極刺激で抑えられ、また actinomycin D、cycloheximide などで阻止されることから新しい RNA 及び蛋白質の合成を必要とする。さらに細胞死にともない DNA の断片化も観察されている。したがってこの細胞死の系はアポトーシスを誘導する機構及びそれを抑制し生存を維持する機構を解析するのに適しているものと考えられる。現在までにこの細胞死に対してインシュリン様成長因子-Ⅰが抑制効果を示すことが報告されているが、neurotrophins の顕著な効果は報告されていない。また未成熟な小脳顆粒細胞においては BDNF が生存維持を促進することが報告されているが (3)、より成熟した小脳顆粒細胞に対する neurotrophins の効果は明らかでない。そこで今回このより成熟した小脳顆粒細胞で見られる細胞死における neurotrophins の効果を検討することにした。

実験方法

生後 8～9 日齢ラットからの小脳顆粒細胞は既報に従って培養したが、一部改良した (4)(5)。細断した組織を papain で消化し、得られた生細胞を 5 X 10^5 cells/cm^2 の密度で、polyethyleneimine コートした 48-well プレート（培養面積 0.65 cm^2）にまいた。翌日 5 % 非働化馬血清及び 1 μM の 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine を含む高カリウム培地 (26 mM) に交換し、4～5 日間培養した。その後、無血清培地 (MEM) に交換し、種々の添加物を加え培養を続けた。高カリウム培地は MEM の $NaHCO_3$ を $KHCO_3$ に置き換えて カリウム濃度が 26 mM になるように調製した。生細胞は MTT アッセイ法で測定した (6)。NGF は雄マウス顎下腺から精製した。BDNF、NT-4/5 は Regeneron 社、NT-3 は武田薬品㈱より頂いたヒト組換え型のものを使用した。抗 FOS 抗体は Oncogene Science 社より購入した。

結果と考察

高カリウム培地で 4〜5 日間培養を行った後、細胞外液を通常のカリウム濃度 (5 mM) に置換すると、時間経過にともなう細胞死が観察された（図 1）。低カリウム培地への交換と同時に BDNF (50 ng/ml) を添加しておくとこの細胞死はかなり抑制された。NGF (100 ng/ml) は無効であったが、さらに種々の neurotrophins の効果を図 2 で調べた。低カリウム培地で 2 日間培養した結果を示す。低カリウム培地 (5 mM) で 2 日間培養すると、高カリウム培地 (26 mM) で培養したコントロール群に対して、約 30 % の細胞の生存しか観察されないが、この培地に BDNF 及び NT-3 （いずれも 50 ng/ml）を添加しておくとそれぞれ 62%、46% の細胞の生存が観察され、細胞死抑制効果が見られた。一方 NGF (100 ng/ml) は 33% の生存率しか示さず、この値は無添加の場合とほぼ同程度であった。この系においても cycloheximide (300 nM) によって細胞死抑制効果がみられることを確認した。この細胞死には新たな蛋白質の合成が必要である。細胞死を抑制した BDNF の効果が直接ニューロンに作用したのかどうかを明らかにする目的で、さらに抗 Fos 抗体を用いた細胞免疫染色を行なった。その結果、BDNF の添加により顆粒細胞が染色されたが、無添加及び NGF の添加では染色される細胞はほとんど見られなかった。以上の結果、BDNF は小脳顆粒細胞に直接作用し、細胞死抑制効果を発現するものと思われる。今回得られた結果は成熟した小脳顆粒細胞の neurotrophin 依存性に一つの示唆を与えるものと考えられる。

文献

1) D'Mello, S. R. et al.(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90,** 10989-10993
2) Martin, D. P. et al.(1988) *J. Cell Biol.* **106,** 829-844
3) Segal, R. A. et al.(1992) *Neuron* **9,** 1041-1052
4) Hatanaka, H. et al.(1988) *Dev. Brain Res.* **39,** 85-95
5) Lasher, R. S. et al.(1972) *Brain Res.* **41,** 482-488
6) Hansen, M. B. et al.(1989) *J. Immunol. Methods* **119,** 203-210

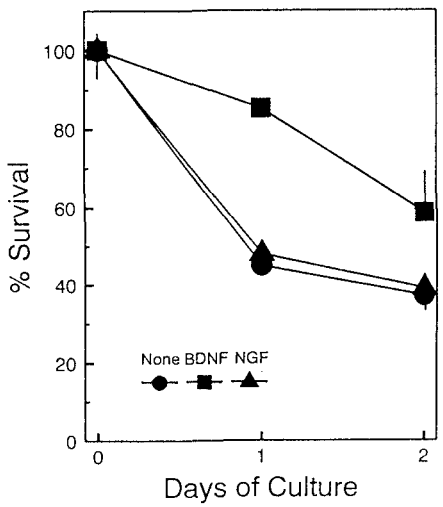


図 1　低カリウム培地 (5 mM) 中での小脳顆粒細胞死の経時変化。縦軸は、高カリウム培地で培養したコントロール群に対する割合で示してある。

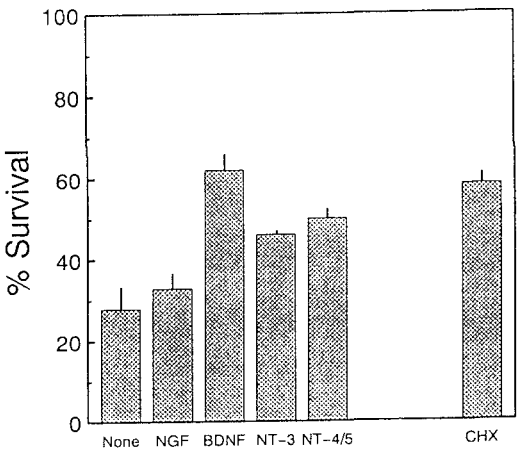


図 2　各種 neurotrophins の小脳顆粒細胞死抑制効果。低カリウム培地で 2 日間培養した結果を示す。縦軸は図 1 と同様である。

15 NOのニューロン死惹起機構：NADのGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase との 反応促進の関与の可能性

中澤 美奈子、上原 孝、野村 靖幸
（北海道大学薬学部薬効学講座）

[要約]

ラット大脳皮質、海馬、小脳のシナプス膜および可溶性画分において、NO donor であるSNPは、37 kDaの蛋白質に対する[^{32}P]NADの反応性を増大させた。また、PC12細胞において、SNPはlactate dehydrogenase(LDH)漏出を引き起こしたが、これはNO_2^-産生量と並行していた。次に、SNP, SNAP, NO_2^- は、精製ウサギ筋 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 標品の [^{32}P]NAD との反応を促進するとともに、その酵素活性を抑制した。一方、GAPDHに対し、コレラ毒素(CTX)、百日咳毒素(DTX)、ボツリヌス毒素(BTX-C_3)、ジフテリア毒素(DTX)は、ADPリボシル化を引き起こさず、活性にも影響を及ぼさなかった。以上より、NOは、何らかのニューロン内基質（GAPDHもその１つ）とNADとの反応を促進させることが、NOのニューロン死惹起作用に関与すると示唆された。

[緒言]

脳組織において、Ca^{2+}/カルモジュリン依存的に活性化されるニューロン内の構成型NO合成酵素(cNOS)ならびにLPSやサイトカインによって誘導されるグリア由来誘導型(iNOS)の存在が知られ、またNOSにより生成されるNOの神経生理学的、病態生理学的役割が示唆されている[1)]。今回NOのニューロン死惹起機序を明らかにするためラット脳組織、およびPC12細胞を使用し、NOによりNADとの反応(ADPリボシル化など)が促進される蛋白質のニューロン死への関与の可能性を検討した。解糖経路で最初の酸化還元反応（ATP産生反応）を司る酵素であるglyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase(GAPDH) に対し、NO donor であるSNP, SNAP を用いてNADとの反応（ADPリボシル化など）や活性への影響を検討し、以下に示す新知見を得た。

[方法]

PC12細胞におけるLDH Leakage : 0.1% polyethylenimine でコーティングした24 ウェルプレートにコンフルエントになるまで培養し、SNP, SNAP をmedium中に添加して24時間培養した。その後、細胞上清および0.1%Triton-X100処置細胞についてそれぞれのLDH活性を、NADHからNADへの変化（OD_{340}の変化）を測定した。LDH漏出を(LDH Leakage)= (上清のOD_{340}の変化)/(上清のOD_{340}の変化十可溶化した細胞のOD_{340}の変化) x 100 として評価した。

ADP- ribosylation : SNP, SNAP(1mM), CTX, BTX, PTX, DTX(10 μg/ml)をそれぞれ、10 μCi [^{32}P]NAD(800 Ci/mmol), 精製ウサギ筋GAPDH (25 μg) と37 ℃,1 hr インキュベートしたのち、SDS-PAGE (9~12 % Acrylamide gel)を行い、６～２４時間X線フィルムに露出させた。

GAPDH活性測定 : あらかじめ薬物とGAPDH を37 ℃, 1 hr インキュベートした反応液に反応開始 buffer (45 mM ピロリン酸ナトリウム、0.5 mM NAD, 0.5 mM glycelaldehyde-3-phosphate, 10 mM ヒ酸二ナトリウム）を加えてOD_{340}における吸光度の変化を測定した[2)]。

[結果及び考察]

ラット大脳皮質、海馬、小脳より膜及び可溶性画分を調製し、SNP(1mM)、[^{32}P]NADとともに1hr, 37° Cでインキュベートすると、37 kDa の蛋白質において[^{32}P]NADとの反応が増大した。この蛋白質は未知蛋白質の可能性もあるがGAPDHである可能性が高い。また、PC12細胞においてSNPを24 hr作用させたところ、放出されるNOの量に依存してLDHの leakageが起こった(Fig. 1)。このことより、NOはなんら

かの作用により細胞障害を起こすことが示唆された。NOはGAPDHのNADとの反応を促進することから、GAPDHの選択的阻害薬である koningic acid [3] (10 μM)を作用させたところLDH leakage が見られた。NOのGAPDHへの作用を調べるために、精製ウサギ筋 GAPDH を用いて、SNP, SNAP を作用させたところ、用量依存的にNADとの反応が検出された(Fig. 2) 。一方、ADPリボシル化を起こすbacteria toxin (CTX, PTX, BTX-C3, DTX 各10 μg / ml) を同条件でGAPDHに作用させたところ、NADとの反応（ADPリボシル化反応）を示さなかった。さらに、GAPDHの活性に対する作用を検討したところ、SNP, SNAP では用量依存的にGAPDH の活性を抑制した(Fig. 3)が、bacterial toxinでは抑制はみられなかった。この結果より、SNPから放出されたNOは、GAPDHを化学修飾し、その活性を抑制することが示唆された。現在、NOによるGAPDH活性抑制の、細胞死との関連をさらに検討中である。

[参考文献]
1) Nomura, Y. and Kitamura, Y. (1993) *Neurosci. Lett.*, **18**, 103-107
2) Suzuki, K. and Imahori, K. (1973) *J. Biochem.*, **73**, 97-102
3) Sakai, K. , Hasumi, K. and Endo, A. (1988) *Biochem. Biophys. Acta*, **952**, 297-303

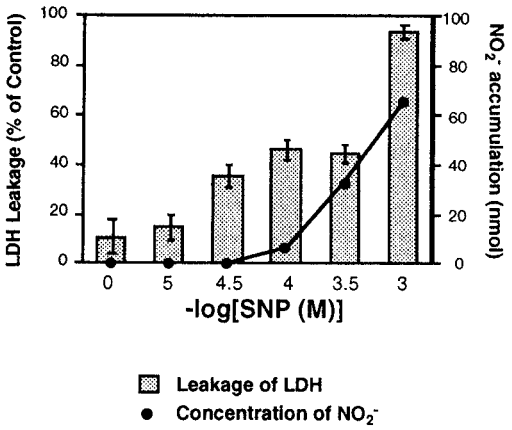


Fig.1　PC12 細胞における SNPのLDH leakage とNO$_2^-$ 蓄積作用

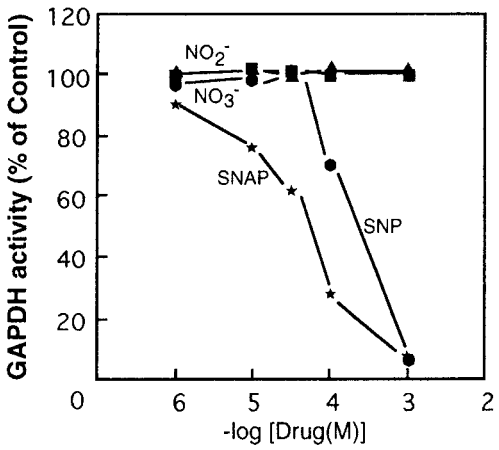


Fig.3　精製ウサギ筋GAPDH活性に対するSNP,SNAP,NO$_2^-$,NO$_3^-$の作用

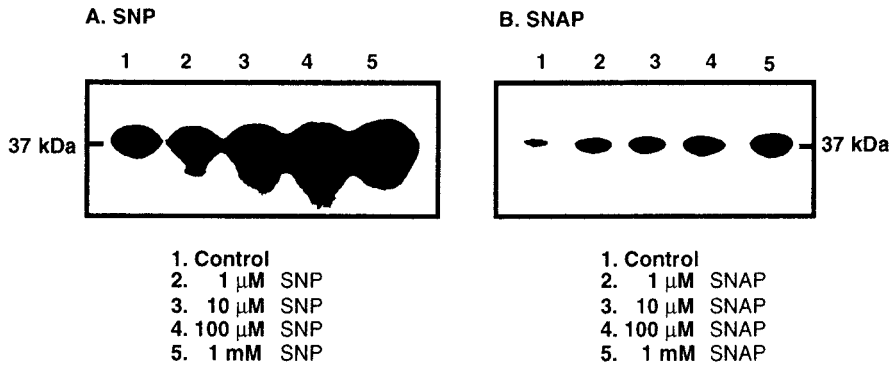


Fig. 2　SNP, SANPによる精製ウサギ筋GAPDHの[^{32}P]NADとの反応促進

16 ヒトニューロブラストーマSH－SY5Y細胞におけるBcl－2蛋白質の発現調節機構

板野泰弘　野村靖幸
（北大、薬、薬効）

【要約】
Bcl-2蛋白質はアポトーシスを抑制する活性を有することで注目を集めている。Bcl-2蛋白質を内在的に発現しているヒトニューロブラストーマSH-SY5Y細胞をＴＰＡおよびcarbachol（ＣＣｈ）で処置したとき、Bcl-2の発現量はコントロールに比べて増加した。また、この作用はstaurosporineによって抑制された。一方、dibutyryl cAMP（diBu-cAMP）で処置した場合にはBcl-2の発現量はコントロール以下に減少し、この作用はＡキナーゼ（ＰＫＡ）阻害薬であるH-89で抑制された。以上の結果より、SH-SY5Y細胞においてBcl-2蛋白質の発現をＣキナーゼ（ＰＫＣ）は正に、ＰＫＡは負に調節していることが示唆された。

【緒言】
Bcl-2は分子量26 kDaの膜蛋白質（核、小胞体およびミトコンドリア）であり、細胞死の一形態であるアポトーシスを抑制することで知られる[1, 2]。アポトーシスは生体内で広く認められる現象であり、とくに神経系と免疫系の組織においてその恒常性の維持に関与していると考えられている。しかしながら、アポトーシスの抑制という機能面での知見に比較して、その発現の調節機構に関する知見は殆ど得られていない。本研究では、Bcl-2蛋白質を内在的に発現しているヒトニューロブラストーマSH-SY5Y細胞を用いてBcl-2蛋白質の発現調節機構について検討した。

【実験方法】
細胞培養
SH-SY5Y細胞はDMEM培地、10%ＦＣＳ存在下で培養した。
薬物処置
SH-SY5Y細胞（5 ～ 10 x 10^5 cells/35 mm dish）に薬物を加え、培養条件下で０～７日間培養した。
ウエスタンブロット
薬物処置後の細胞を回収し超音波破砕した後、10,000 x gで15分間遠心して得られた膜画分をサンプルとして用い、15 % SDS－ポリアクリルアミドに電気泳動し（5 μg protein/lane）、抗ヒトBcl-2モノクローナル抗体（DAKO社）を用いウエスタンブロットを行った。

【結果および考察】
SH-SY5Y細胞をＴＰＡ（1 ～ 100 nM）で１週間処置したとき、Bcl-2の発現量はコントロールに比べて増加した（図１）。一方、diBu-cAMP（1 mM）で処置した場合にはその発現量は逆に減少した（図１）。
SH-SY5Y細胞はＴＰＡ処置によって分化（増殖停止、突起伸展など）する性質を有するが、プロテインキナーゼ阻害薬であるstaurosporineによってもＴＰＡと同様の分化が引き起こされることが示されている[3]。そこで、staurosporine（10 nM）の効果を検討したが、３日間処置でBcl-2の発現量はコントロール以下に減少した（図２）。そのうえ、ＴＰＡによる発現量の増加もstaurosporine前処置によって抑制された（図２）。以上の結果から、ＰＫＣの活性化がBcl-2の発現量の増加を引き起こすことが示唆された。
そこで受容体を介してＰＫＣを活性化する薬物の効果を検討した。ムスカリン受容体（M_3）はSH-SY5Y細胞においてIP$_3$産生と一過性の細胞内Ca^{2+}濃度の上昇を引き起こすことが知られている唯一の受容体であるが[4]、carbachol（ＣＣｈ，1 mM）で３日間処置した場合にもBcl-2の発現量が増加した。また、ＴＰＡと同様にＣＣｈの効果もstaurosporine前処置によって抑制された。
diBu-cAMPと同様にＰＫＡを活性化（細胞内cAMP濃度を上昇させる）forskolin（10 μM）およびコレラ毒素（1 μg/ml）で処置した場合、diBu-cAMPと比較すると弱いながらも発現量の減少が認められた。次に、Bcl-2発現に対するＰＫＡ阻害薬であるH-89の効果を検討した。H-89（20 μM）で３日間処置したときBcl-2の発現量はコントロールよりも増加した（図３）。また、diBu-cAMPによる発現量の減少はH-89前処置によって抑制された（図３）。

本研究により、SH-SY5Y細胞においてBcl-2の発現はＰＫＣの活性化により増加し、逆にＰＫＡの活性化により減少すること、すなわちBcl-2の発現に対してＰＫＣは正の、ＰＫＡは負のモデュレーターであることが示唆された。現在、アポトーシス、DNA断片化[5]およびBcl-2発現の相関性についてさらに検討中である。

【参考文献】

1) Hockenbery, D. et al. (1990) Nature 348, 334-336
2) Garcia, I. et al. (1992) Science 258, 302-304
3) Jalava, A. et al. (1992) FEBS Lett. 300, 114-118
4) Ogino, Y. and Costa, T. (1992) J. Neurochem. 58, 46-56
5) 板野泰弘、野村靖幸 (1994) 細胞工学　印刷中

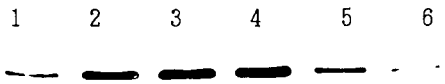


図１　Bcl-2発現に対するＴＰＡおよびdiBu-cAMPの効果（１週間処置）
lane 1. Control (0.1% DMSO)
2. TPA (1 nM)
3. TPA (10 nM)
4. TPA (100 nM)
5. Control (no addition)
6. diBu-cAMP (1 mM)

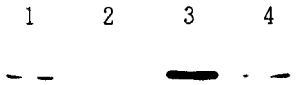


図２　Bcl-2発現に対するstaurosporineの効果（３日間処置）
staurosporineはＴＰＡを加える３時間前に添加した。
lane 1. Control
2. staurosporine (10 nM)
3. TPA (10 nM)
4. TPA (10 nM) + staurosporine (10 nM)

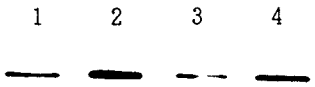


図３　Bcl-2発現に対するH-89の効果（３日間処置）
H-89はdiBu-cAMPを加える３時間前に添加した。
lane 1. Control
2. H-89 (20 μM)
3. diBu-cAMP (1 mM)
4. diBu-cAMP (1 mM) + H-89 (20 μM)

17　培養神経細胞の細胞死機構におけるpp60$^{c\text{-}src}$の役割

〔著者〕　小田毅，小池達郎 (北大大学院理学研究科行動知能学)
〔所属〕

〔要約〕
脱分極作用は幼若な神経細胞の生存を促進し，細胞死を阻止するが，その主要な機構は翻訳後修飾によると考えられる。その標的候補として，Ca^{2+}-カルモジュリン系の関与をふくむ選択的チロシンリン酸化特にpp60$^{c\text{-}src}$の役割が重要であると結論された。この役割を神経細胞死過程と結び付ける為にその時間経過が厳密に制御できる上頸神経節細胞を用い他の系と比較した。その結果，細胞死へのコミットメント時間にほぼ平行してpp60$^{c\text{-}src}$の消失が起こることが示唆された。

高 K^+培地処理による脱分極作用は細胞内Ca^{2+}レベルの上昇によって幼若な神経細胞生存を促進し，細胞死を阻止する[3]。中枢cortical neuronでは脱分極はCa^{2+}依存的にBDNFの発現を促進することによって生存を促進する為とされる[2]が，ラット上頸神経節細胞などではその証拠はない。脱分極作用はcycloheximide感受性部位より下流で神経細胞死を阻止できることからその効果は翻訳後修飾によるものと考えた[7]。発生過程で起こる神経細胞死の末梢神経(分化させたPC12細胞)及び中枢神経(小脳顆粒細胞)in vitroモデル系共に，標的候補として，Ca^{2+}-カルモジュリン系の関与をふくむ選択的チロシンリン酸化(特にpp60$^{c\text{-}src}$)の役割が重要であると結論された[4,5]。一方，この役割を神経細胞死過程と結び付けるには細胞死の時間経過がより詳細に記載されている上頸神経節細胞系[2,7]で調べる必要があり，他の系と比較を行なった。

[実験方法]

神経細胞培養法：ラット上頸神経節細胞の培養は既報[3,8]により、細胞はコラーゲン塗布した35mm dish又は 48well plateにまき、10%牛胎児血清(非働化)、50 ng / ml NGF を含む MEM 培地で1-7日培養して実験に供した。小脳顆粒細胞は 7 日目のラット小脳から disparse 処理により解離してポリリシン塗布したプレートにまき、10%牛胎児血清を含むMEM培地で培養して実験に供した[4,5]。共にnon-neuronal Cells の除去のため FUdR 処理をした。

細胞死のアッセイ法：上頸交感神経節細胞の場合は培地中にマウス 2.5S NGF に対する抗体を加え、NGFを中和することにより細胞死実験を開始した。抗体添加後 経時的に培地中及び細胞内のAK (Adenylate Kinase) 活性を測定するか[7]、又は(特に小脳顆粒細胞の場合は)トリパンブルー染色によって生細胞数を数えた。

アンチセンスオリゴ：ラットpp60$^{c\text{-}src}$のヌクレオチド配列[6](又は他の配列)から翻訳開始Metをふくむ配列に対応するSセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチド(15-mer)を合成し，図2に示されている濃度及び処理日数でassayした。

抗体ブロット法：細胞をRIPA緩衝液で可溶化し、遠心後上清を回収した。Bradford法による蛋白定量後一定量をC-SRCに対する抗体(1:100)を加え，少なくとも2時間反応後，結合物をProtein A-agaroseにより回収した。熱処理によって遊離させた後，10%SDS-PAGE で分離し，ゲルをPVDF膜にブロットした。ブロット膜を抗ホスホチロシン抗体で処理後，HRP標識Protein AによりECL(Amasham)法で検出した。

[結果]

発生過程で起こる神経細胞死を阻止する機構として脱分極作用の分子機構を特にチロシンリン酸化との関係で調べた，即ち，高K^+培地による上頸神経節細胞の生存促進はチロシンキナーゼの阻害剤であるハービマイシンAによって阻害された(IC_{50}<0.3uM)。これはPC12 細胞や小脳顆粒細胞における高K^+ 培地効果に対するハービマイシンA阻害と同程度であった[4,5]。すでにPC12 細胞や小脳顆粒細胞ではチロシンリン酸化と高K^+ 培地による神経細胞の生存とは良い相関が得られている[4,5]。更に図 1に示すようにアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたassay (src, yes, fyn, fes, fgr, elkについて調べた)から，これら

のリン酸化では$pp60^{c\text{-}src}$が関与していることが示唆された。この結果は$pp60^{c\text{-}src}$によるチロシンリン酸化が脱分極作用による細胞死阻止に重要な役割を果たしている事を支持する。又、アンチセンスオリゴの効果はNGF存在下ではみられないことから, NGFは$pp60^{c\text{-}src}$の活性低下を阻止するか又はby-pathにより神経細胞の生存を維持していると考えられる。$pp60^{c\text{-}src}$の活性低下とNGF欠乏による上頚神経節細胞死との関係を調べるために, 細胞死の時間経過をとって抗体ブロットを行なった。細胞死にコミットメントする時間は15-18時間とされている[2,8]。高K培地による細胞死阻止のコミットメント時間は20時間である[8]。図2に示すように, $pp60^{c\text{-}src}$のバンドは18時間で減少し、24時間では激減する。死細胞数は24時間で15%(±5%), 36時間で35%(±4%)となり, 48時間後には85%(±5%)に達する。この結果は上頚神経節細胞死に先行し, 細胞死へのコミットメント時間にほぼ平行して, $pp60^{c\text{-}src}$の活性低下が起こることが示唆している。現在更にこの点を確認するために他の蛋白質との関連及び定量的解析を行なっている。

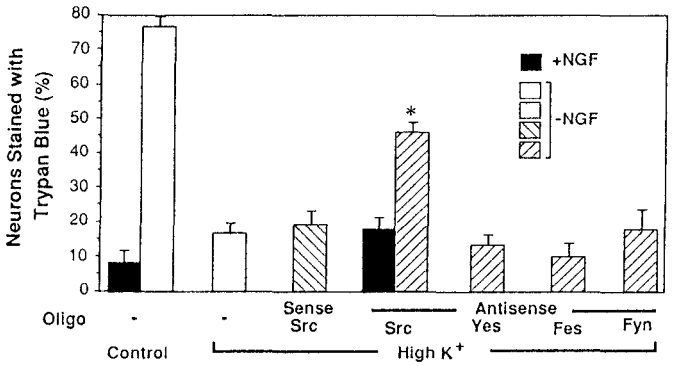


図1 S-センス及びアンチセンスオリゴ(15mer)による脱分極による生存促進に対する効果(各々10uMで4日間処理した後生存細胞数を測定(3視野を各々200以上測定), 左側は+,-NGF 処理のみの対照値:mean ±SE)

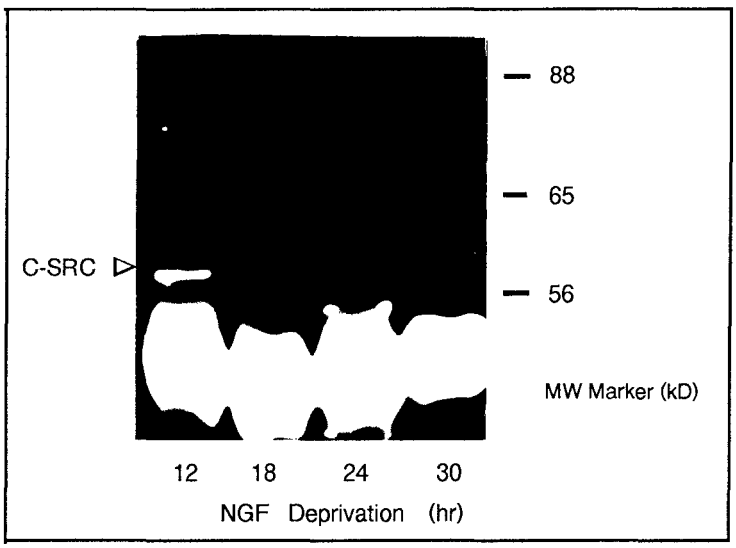


図2 神経細胞死と$pp60^{c\text{-}src}$との関係
上頚神経節細胞の培地中にNGFに対する抗体を加え、細胞死実験を開始した。抗体添加後経時的に生細胞数測定と抗体ブロットを行なった。

参考文献

1. Ghosh,A., Carnahan,J., and Greenberg,M.E. Science 263: 1618-1623 (1994)
2. Deckworth,T.L. and Johnson,Jr.,E.M. J. Cell Biol. 123: 1207-1222 (1993)
3. Koike,T. and Tanaka,S. Proc Natl Acad Sci USA 88: 3892-3896 (1991)
4. 小池達郎, 田中秀逸 神経化学 32 (1) : 184－185 (1993)
5. Koike,T. and Tanaka,S. Soc. Neurosci. Abstr. 19: 1504 (1993)
6. Martinez,R. et al. Science 237: 411-415 (1987)
7. Tanaka,S. and Koike,T. Biochim Biophys Acta 1175: 114-122 (1992)
8. Tanaka,S and Koike,T. Neuropeptide 26: 103-111 (1994)

18 砂ネズミ海馬における遅発性神経細胞死のDNA断片化とプロペントフィリンの保護作用

戸田啓介、木原俊壱、白石哲也、鞠　硯、中川摂子、田渕和雄
（佐賀医科大学　脳神経外科）

〔要約〕

砂ネズミの一過性前脳虚血負荷にて海馬CA1領域は遅発性神経細胞死を生じるが、その機序はまだ明らかではない。我々は*in situ* DNA strand breaks staining法を用い、遅発性神経細胞死をきたしている細胞核にapoptosisに特徴的なDNA断片化を組織上で証明した。これにより遅発性神経細胞死にはapoptosisが関与している可能性が示唆された。また虚血解除後の再灌流時にプロペントフィリンを腹腔内投与したところ、DNA断片化の抑制が認められた。プロペントフィリンの脳神経細胞保護作用によるapoptosisの抑制は、脳虚血急性期の治療の一助となるものと考えられる。

【目的】砂ネズミの5分間前脳虚血モデルにおいて、海馬CA1領域の錐体細胞が選択的かつほとんど同一の経過で遅発的に死んでいく現象は遅発性神経細胞死としてよく知られている1)が、その機序は十分には解明されていない。その緩徐で炎症を伴わない細胞死はapoptosisの概念2)に類似しているが未だ確証は得られていない。我々はGavrieliら3)のTUNEL法を改良した*in situ* DNA strand breaks staining法を用いて、砂ネズミ一過性前脳虚血後の海馬神経細胞のDNA断片化を組織上で証明し、形態学的変化との関係を経時的に観察した。さらにキサンチン誘導体であるプロペントフィリンの腹腔内投与により、海馬神経細胞のDNA断片化がどのような影響を受けるかも併せて検討した。

【方法】10週齢、雄、70 g以上の砂ネズミを用いた。ハロセン麻酔下に両側総頚動脈を露出し、脳動脈瘤用クリップにて5分間血流遮断し前脳虚血モデルを作製した。この間体温は37℃に維持した。再灌流後3、5、7日目にホルマリンにて灌流固定し脳を摘出した。一方両側総頚動脈再灌流時に20 mg/kgのプロペントフィリン（ヘキストジャパン株式会社より供与）を腹腔内投与し、5日目に脳を摘出した。生理食塩水を腹腔内投与したものを対照群とした。6 μmのパラフィン切片を作成し、proteinase Kにて前処理後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を添加し、DNAの3'-OH断端をジゴキシゲニン化dUTPで標識した。さらにペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を反応させ、diaminobenzidineで発色させた。高倍率下で観察できる海馬CA1領域において、陽性染色核の全核数に対する割合（apoptotic index）を算出した。

【結果】虚血3日後では海馬CA1領域に限局して少数の濃縮した核が染色された（Fig. 1, apoptotic index；2.0）。虚血5、7日目では陽性染色核が増加し、apoptotic indexはそれぞれ58.1, 62.3を示した (Fig. 2, 3)。陽性核の大部分は濃縮し紡錐形を呈していた。またプロペ

ントフィリン投与群では対照群と比べてapoptotic indexは低値(8.9)を示した。

【考察】遅発性神経細胞死とapoptosisとの関連性については議論の分かれるところであり、形態学的変化はapoptosisに類似していないとする報告がある4)。一方、海馬よりDNAを抽出し、電気泳動上DNA ladder patternを認めたとする報告も散見される5)。今回我々の結果より一過性前脳虚血後の海馬CA1領域の遅発性神経細胞死を来している神経細胞核に、apoptosisに特徴的なDNA断片化を認めたことにより、遅発性神経細胞死にapoptosisが関与している可能性が強く示唆された。またプロペントフィリンは遅発性神経細胞死に対して保護作用が認められている6)。我々の実験ではプロペントフィリンによって海馬CA1領域のDNA断片化が抑制されたが、その機序は未だ不明であり今後の検討が必要と考えている。

【文献】(1)Kirino T., et al. (1982) Brain Res. 239, 57-69. (2)Wyllie A.H., et al. (1980) Int. Rev. Cytol. 68, 251-306. (3)Gavrieli Y., et al. (1992) J. Cell. Biol. 119, 493-501. (4)Deshpande J., et al. (1992) Exp. Brain Res. (Germany) 88, 91-105. (5)Okamoto M., et al. (1993) BBRC 196, 1356-1362. (6)DeLeo J., et al. (1988) Stroke 19, 1535-1539



Fig. 1 Three days after ischemia, positively stained nuclei are occasionally observed in CA1.



Fig. 2 Five days after ischemia, positive staining is marked and highly restricted to CA1.



Fig. 3 After 7 days, a widespread regressive change developed in CA1. Cell debris of the pyramidal neuron had been removed by phagocytotic cells.

19 神経分化とNMDA受容体チャネルサブユニットの発現変化

渡辺雅彦、井上芳郎
（北海道大学医学部・解剖）

〔要約〕
4種のεサブユニット遺伝子発現の空間的配置からみると、成熟マウス神経系におけるNMDA受容体チャネルサブユニットの発現様式は、1）ε1とε2サブユニットの特異的発現を特徴とする海馬・大脳皮質型、2）ε1とε3サブユニットの特異的発現を特徴とする小脳顆粒細胞型、3）ε1サブユニット発現が支配的な脳幹・脊髄型、4）εサブユニットの多様な組み合わせ発現を特徴とする視床型、5）εサブユニットの発現が観察されないプルキンエ細胞・末梢神経型に大別される。また、痛覚、視覚、平衡覚、聴覚などの感覚性一次中継核では、ε2もしくはε3サブユニットによる特異的な発現も認められる。このεサブユニット遺伝子発現の空間的異質性は、生後2週間に終始するダイナミックな時間的発現変動を経て形成される。この事実は、神経系の分化と特殊化に伴い、NMDA受容体チャネルのサブユニット構成に再編成が起こり、その結果、この受容体に空間的異質性と機能的多様性が生じることを強く示唆する。

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体チャネルは、興奮性神経伝達に中心的役割を果たしているグルタミン酸受容体の主要なサブタイプのひとつである。このチャネルは、記憶や学習の基盤である活動依存性のシナプス可塑性に重要な役割を果たしており、一方、発達期の脳では、神経細胞の移動やシナプス形成・経験依存性のシナプス可塑性を通して、脳の形態的および機能的発達にも深く関与している。NMDA受容体チャネルの薬理学的・電気生理学的特性は、神経領域や細胞種により異なり、同一神経細胞でも発達過程に応じて変化することから、従来よりこのチャネルの機能的多様性が指摘されてきた。本研究では、多様な生理的役割と機能特性をしめすNMDA受容体チャネルの分子解剖学的な検討を行う目的で、このチャネルを構成する5種のサブユニット遺伝子の時間的・空間的発現を検索した。

材料と方法；材料は、胎生13日より生後56日に至るまでのC57BLマウス脳、脊髄、網膜、知覚神経節、副腎を用いた。^{35}S標識の45塩基長アンチセンスオリゴヌクレオチドプローブを用いて、in situハイブリダイゼーション法により、ε1-ε4およびζ1サブユニットmRNAの特異的検出を行った。

結果；成熟マウス神経系における4種のεサブユニットmRNAの空間的配置は、その分子種により大きく異なる。ε1サブユニットmRNAは中枢神経系に広く発現し、特に海馬・大脳皮質等の終脳領域と小脳顆粒細胞層で顕著な発現が認められる。ε2サブユニットmRNAの発現は、前脳領域（終脳、視床、網膜）に限局して観察されるが、一部、脳幹・脊髄の感覚性中継核（蝸牛神経背側核、三叉神経尾側亜核、脊髄後角）にも特異的な発現が認められる。ε3サブユニットmRNAの強い発現シグナルは、小脳顆粒細胞層に観察される。これに加え、嗅球、視交叉上核、蝸牛神経核、前庭神経内側核にも限局した発現が認められる。ε4サブユニットmRNAは、嗅球糸球体層、視床、脳幹に分布しているが、その発現レベルは極めて低い。一方、ζ1サブユニットmRNAは、検索した中枢および末梢神経系の灰白質領域において、広範な発現を示す。このεサブユニット遺伝子の異なる空間的発現パターンから、神経系の各領域がそれぞれ特徴的な発現様式を有していることがわかる（表1）。

胎児期における発現様式を検索すると、中枢神経系の諸領域は、外套層の形成時期に一致してε2, ε4およびζ1サブユニットの遺伝子発現を開始するが、この時期、発現するサブユニット分子種の空間的配置に関する領域差は乏しい。末梢神経系では、早期よりζ1サブユニット遺伝子の発現が認められるが、εサブユニット遺伝子の発現は検出されない。

生後、εサブユニット遺伝子の発現様式は中枢神経系の諸領域で大きく変動する。ε1サブユニットmRNAは、海馬CA1領域に発現を開始し、やがてその分布は中枢神経系全体に拡大する。これとは対照的に、胎児期に広範な発現を示していたε2サブユニットmRNAは、視床下部・脳幹・脊髄の大部分で発現を停止する。ε3サブユニットmRNAは、小脳の生後発達とともに顆粒細胞に発現する。ε4サブユニットmRNAは、胎生期に見られた強い発現レベルを著しく低下させる。このεサブユニット遺伝子群の劇的な発現変動を経て、生後14日までにNMDA受容体チャネルサブユニットの発現パターンは前述の成熟型へと移行する。この間、ζ1サブユニット遺伝子発現の空間的配置は不変で、その発現レベルの増強を認めるのみである。

考察；以上の所見は、εサブユニットの分子配置が神経分化の時間軸の中で変容する結果として、NMDA受容体チャネルのサブユニットの空間的配置に異質性が生ずることを示している。この発現変動が起こる生後２週間に、NMDA受容体チャネルの薬理学的特性や電気生理学的特性が変化することを示す報告は数多い（表２）。しかも、特定の機能特性の変化や差異が、そこに発現変化するサブユニットの分子特性と強い相関性を示している事実は興味深い。

結論；神経分化に伴い、NMDA受容体チャネル複合体のサブユニット構成に再編成が起こり，この過程を経て、このチャネルの機能的多様性が作り出されていることが推察される。

表１

Levels and Basic Combinations of the NMDA Receptor Channel Subunit mRNAs

REGIONS	ε1	ε2	ε3	ε4	ζ1	Basic Combin.	
CNS							
Telencephalon	+++	+++	-	-	+++	ε1, ε2	ζ1
Thalamus	+	++	+	±	++	various ε	ζ1
Hypothalamus	±	-	R	±	++	low levels	ζ1
Brainstem	+	R	R	±	++	ε1	ζ1
Spinal cord	+	R	-	±	++	ε1	ζ1
Cerebellum	++	-	+++	±	+++	ε1, ε3	ζ1
PNS							
Sensory ganglia	-	-	-	-	+	no ε	ζ1
Adrenal medulla	-	-	-	-	+	no ε	ζ1

R; expression in restricted regions

表２

Developmental Changes in Functional Properties and Expressions of the NMDA Receptor Channel

REGION	FUNCTIONAL CHANGE	ε SUBUNIT at birth	ε SUBUNIT P14
Hippocampus	appearance of LTP affinity for glycine sensitivity to Mg^{2+} block	ε2	ε1, ε2
Forebrain	affinity for ifenprodil	ε2	ε1, ε2
Sup. colliculus	shortening of channel opening	ε2, ε4	ε1
Purkinje cell	loss of NMDA responsiveness	ε2	-
Spinal ventral	loss of L-Glu binding	ε1, ε2, ε4	ε1

文献；Watanabe et al., NeuroReport 3: 1138-1140 (1992); J. Comp. Neurol., 338:333-390 (1993); J. Comp. Neurol., 343:513-519 (1994); J. Comp. Neurol., 343:520-531 (1994); J. Comp. Neurol., 345:314-320 (1994); Brain Res., 634:328-332 (1994); Neurosci. Lett., 165:183-186 (1994).

20 5'-プロモーター領域／*lac Z*融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いたIP3受容体type 1遺伝子発現の解析

古玉 大介[1,2] 下田 耕治[3] 吉川 真悟[1] 宮脇 敦史[1] 古市 貞一[1] 御子柴 克彦[1]
1)東京大学医科研 化学研究部, 2)大阪医大 第一内科, 3)慶應義塾大学医学部 実験動物センター

〔要約〕

イノシトール３リン酸受容体 type 1 (IP_3R1)の組織特異的発現の調節機構、および時間的／空間的発現分布を解析するためにマウスIP_3R1の5'-プロモーター領域／*lac Z*融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。IP_3R1転写開始部位を含む-528～+169または-4187～+169までの領域の下流にレポーター遺伝子*lac Z*をつないだDNA断片を導入し、各7系統、4系統の独立したトランスジェニックマウスを得た。それぞれ１系統(-528～+169 : 1NM13系統, -4187～+169 : 4NM2系統)のトランスジェニックマウス成獣脳および末梢組織におけるβ-ガラクトシターゼの発現パターンは、ともにこれまで免疫組織化学または*in situ* hybridization法にて報告された野生型マウス成獣におけるIP_3R1の分布にほぼ一致した。今回の結果は-528～+169の領域がIP_3R1発現の組織特異性に関与していることを示唆している。

緒言

イノシトール３リン酸受容体(IP_3R)は、神経伝達物質・ホルモン・成長因子などの刺激で産生される細胞内セカンドメッセンジャーであるIP_3の結合により、細胞内Ca^{2+}ストア(小胞体など)からCa^{2+}を放出し、一過性のCa^{2+}シグナルを産み出すイオンチャンネル型受容体である[3]。IP_3R type1(IP_3R1)は小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する蛋白質としてそのcDNAがクローニングされたが、その後の免疫組織化学法[5]および*in situ* hybridization法[2]による解析の結果、小脳以外の各細胞における分布も明らかになり、また、小脳発生および発達過程においてその発現パターンが変化してゆくことも知られている。今回、我々は、発生過程や各種刺激による発現パターンの変化を時間的／空間的に解析することを目的に、レポーター遺伝子として*lac Z*(大腸菌β-ガラクトシダーゼ)をIP_3R1の5'-プロモーター領域につなぎ、トランスジェニックマウスを作製した。β-ガラクトシダーゼ活性をX-gal染色により組織化学的に観察することで、IP_3R1遺伝子発現のダイナミクスを視覚的に解析した。

方法

(1) トランスジェニックマウスの作製

マウスIP_3R1の転写開始部位を含む-528～+169または-4187～+169までの領域（吉川ら、未発表）をグルココルチコイド受容体由来の核移行シグナルを含む*lac Z*発現ベクター[6]に挿入し、インサート部分を精製して導入遺伝子とした。

C3H/He×C57BL/6JのF1マウス同士を交配した雌マウスより受精卵を集め、受精卵の雄前核へ約5～10×10^2コピーの遺伝子を注入し、トランスジェニックマウスを作製した[4]。以後の解析はfounderマウスとC3H/He×C57BL/6JのF1マウスを交配して生まれたhemizygoteマウスで行った。導入遺伝子の有無は*lac Z*領域をプローブとしたSouthern blot法、または同領域にプライマーを設定したPCR法により確認した。

(2) 導入遺伝子発現の検出

マウス成獣組織の凍結切片を1% glutaraldehyde/PBSで10分間固定後、0.5μg/mlの 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside (X-gal, Takara)を含むPBS (pH 7.4)中で30分、または一晩染色した[1]。

結果

IP_3R1の-528～+169または-4187～+169までの領域を含む遺伝子導入により、それぞれ7系統、4系統の独立したトランスジェニックマウスを得た。各系統の組織切片をX-galにより染色し、導入遺伝子の発現を

解析したところ、それぞれ1系統(-528～+169 : 1NM13系統, -4187～+169 : 4NM2系統)で、これまで免疫組織化学法および*in situ* hybridization法を用いて報告されている野生型マウスにおける発現パターンとほぼ同じ発現分布が見られた(Fig.1)。すなわち、脳においては小脳プルキンエ細胞にもっとも強い発現が見られ、ついで海馬での発現が強かった。短時間(30分)のインキュベーション（染色）ではこれらの細胞のみが染色されたが(Fig. 2)、一晩染色すると大脳皮質、線条体など広く発現が見られた。嗅球での発現は弱かった。脳以外の組織では、輸精管で最も強い発現が観察され、そのほか、卵細胞、子宮、腎などにも発現が見られた。

考察

IP_3R1の5'- プロモーター領域-528～+169または-4187～+169と*lac* Zを含む遺伝子導入により、*lac* Zの発現パターンがIP_3R1遺伝子と同じ組織特異性をもつトランスジェニックマウスを作製した。用いた5'- プロモーター領域のいずれでもほぼ同様な結果を得た。この結果は、IP_3R1の組織特異的発現には少なくとも-528～+169の領域が関与していることを示唆する。これらのマウスを使うことにより、これまで技術的な理由、あるいは抗体の特異性などの問題で解析が難しかった、発生段階や各種刺激に対するIP3R1の発現の変化を比較的容易に解析できるものと期待される。

文献

1) Allen ND et al. : Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. Nature 333: 852-855, 1988
2) Furuichi et al. : Widespread Expression of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 Gene (Insp3r1) in the Mouse Central Nervous system. Receptor and Channels 1: 11-24, 1993
3) Furuichi et al. : Intracellular channels. Current Opinion in Neurobiology 4: 294-303, 1994
4) Hogan B et al. : Manupulating the Mouse embryo, Cold Spring habor Laboratory Press, New York, 1986
5) Nakanishi S et al. : Immunohistochemical Localization of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, P400, in Neural Tissue: Studies in Developing and Adult Mouse brain. J Neuroscience11: 2075-2086, 1991
6) Picard D and Yamamoto KR : Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. EMBO J 6: 3333-3340, 1987



Fig. 1　トランスジェニックマウス 1NM13系統の脳における大腸菌β-ガラクトシダーゼの発現分布（矢状断　×１、一晩染色）



Fig.2　トランスジェニックマウス 1NM13系統の小脳皮質における大腸菌β-ガラクトシダーゼの発現分布
（矢状断　×100、染色時間 30分）

21 GFAP遺伝子導入によるアストロサイトーマC6細胞の増殖抑制

戸田正博[1,2]，三浦正幸[1]、阿相皓晃[1]，戸谷重雄[2]，植村慶一[1]
（慶應大・医・[1]生理、[2]脳神経外科）

〔要約〕

アストロサイトに特異的な中間系フィラメントであるGFAPと細胞増殖との関係を明らかにする目的で、マウスGFAP cDNAをラットアストロサイトーマC6細胞にtransfectionした。GFAP導入細胞(GFC6-5, GFC6-6)では、コントロールであるvectorのみ導入した細胞(NeoC6)およびC6と比較して、形態および細胞増殖に著明な変化が見られた。GFC6-5, GFC6-6は、共にGFAP陽性の細胞突起を形成し、培地中での細胞増殖およびBrdU取込みに著明な抑制効果が認められた。Western blot解析上、GFC6-5, GFC6-6では、NeoC6およびnative C6と比較してGFAP発現量に著明な増加が見られたが、一方、vimentin発現量には変化を認めなかった。以上の結果より、細胞骨格蛋白質であるGFAPの発現による、アストロサイトーマの増殖抑制が示唆された。

［はじめに］

腫瘍細胞は正常細胞と著しく異なった特性をもち、増殖能の亢進、転移、浸潤性の増大、基質接着性の減少など、腫瘍細胞を特徴づけるこれらの性質と、細胞骨格蛋白質との関連性が指摘されている(1,2)。GFAPはアストロサイトに特異的な中間系フィラメントであり(3)、その高い細胞特異性から、細胞の分化との関連が示唆されている。一方アストロサイトーマの悪性化に伴って、GFAPの発現量が減少することが報告されており(4)、今回我々は細胞骨格蛋白質であるGFAPと細胞増殖との関係を明らかにする目的で、アストロサイトーマC6細胞にGFAP cDNAをtransfectionし、解析を行った。

〔方法〕

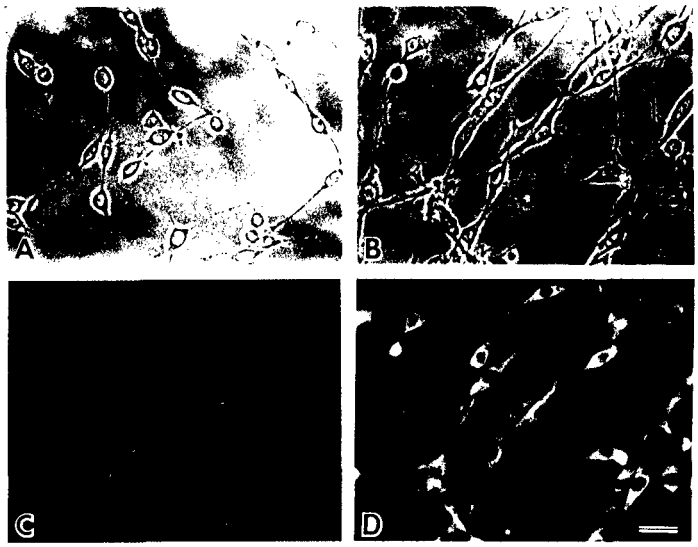
導入する細胞は、GFAP発現量の少ないC6 cell lineを選択した。マウスGFAP cDNA全長をヒト-MTプロモーターによりdriveされるexpression vectorに組み込み、C6 cellに燐酸カルシウム法によりtransfectionした。遺伝子導入後3日目よりG418(600 μg/ml)にてselectionを行い、生存した細胞をクローニングした。得られた細胞は抗GFAP抗体を用いたWestern blot解析および免疫染色により、GFAPの発現を確認した。BrdUの取込みの測定により、細胞の分裂合成能に及ぼす影響を検討し、また24時間毎に生細胞数を計測し、液体培地中での細胞増殖を評価した。

〔結果および考察〕

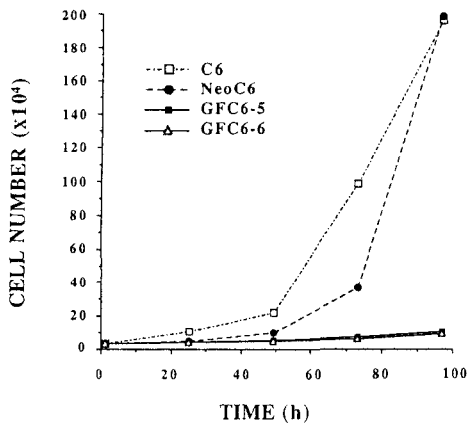
2度transfectionを行い、それぞれ別個に、stable transfectant(GFC6-5, GFC6-6)を得た。GFC6-5, GFC6-6は、Western blot解析上GFAP発現量は同程度に著明に増加しており、共にGFAP陽性の細胞突起を形成していた(FIG. 1)。コントロールとしてvectorのみを導入した細胞(NeoC6)では、C6 cellと比較して、その円い細胞の形態およびGFAP発現量に変化は認められなかった。細胞増殖に関して細胞数の測定を行った結果、FIG.2に示した様にGFC6-5, GFC6-6では、ともに著明な増殖抑制効果が認められた。さらにBrdUの取込みの測定においても、コントロールと比較して、GFC6-5, GFC6-6では同程度の減少が見られた(FIG. 3)。

vimentinはGFAPと非常に似た構造をもつ中間系フィラメントであり、アストロサイトでは未分化な時に豊富に発現しているが、分化にともなって減少することが知られている(5)。今回の実験では、Western blot解析上、GFAP導入によるvimentin発現量に変化は認められなかった(data not shown)。GFAPとvimentinは一次構造を比較して、central rod domainが高いhomologyを示しているのに対して、head regionに違いが認められる。今回の結果から一つの可能性として、specificityの高いhead regionが細胞増殖に関係しているのではないかと推察されるが、さらに詳細な検討が必要とされる。

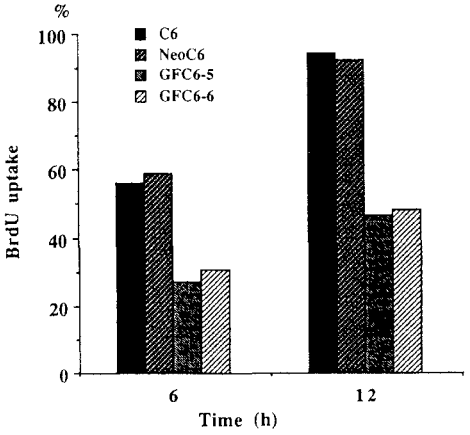
GFAP導入細胞では著明な腫瘍増殖抑制効果が認められ、細胞骨格蛋白質であるGFAPが、tumor suppressorと成り得る可能性が示された。



(FIG. 1) Morphology of control C6 cells transfected only with the neomycin gene (NeoC6) (A and C) or C6 cells transfected with GFAP cDNA (GFC6-6) (B and D), which were visualized with a polyclonal antibody against GFAP. Calibration bar = 28.7 μm.



(FIG. 2) Cell growth of native C6, control NeoC6, GFC6-5, and GFC6-6 cells. Trypan blue exclusion was used to assess viable cells, which were counted at 24 h intervals over a period of 4 days.



(FIG. 3) Comparison of BrdU uptake of C6, NeoC6, GFC6-5, and GFC6-6 cells. Cultured cells reacted with BrdU in 6 or 12 h and visualized with a monoclonal antibody against BrdU. All samples were in duplicate, and SEM was within 15% of mean value.

〔 文献 〕

1. Chan D., Goate A., and Puck T. T. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2747-2751.
2. Cooper H. L., Bhattacharya B., Bassin R. H., and Salomon D. S. (1987) Cancer Res. 47, 4493-4500.
3. Reeves S. A., Helman, L. J., Allison, A, and Israel, M. A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5178-5182.
4. Duffy, P.E., Huang, Y.Y., and Rapport, M.M. (1982) Exp. Cell Res. 139, 145-157.
5. Yung, W.K.A., Luna, M., and Borit, A. (1985) J. Neurooncol. 3, 35-38.

22 海馬NF-AT like DNA-Binding ProteinおよびAP-1発現への免疫抑制剤Cyclosporin A投与の影響

近藤洋一，浅沼幹人，西林佐紀子，岩田恵美，小川紀雄，森 昭胤
（岡山大医・分子細胞医学研・神経情報学部門）

〔要約〕 Pentylenetetrazol (PTZ)で刺激したラットの海馬において，interleukin-2遺伝子のpromoter領域に結合する転写制御因子NF-ATおよびAP-1の結合活性の変化と，それに与える免疫抑制剤cyclosporin A(CsA)の影響をelectrophoretic mobility shift assayにて検討した。PTZ刺激により，海馬NF-AT like DNA結合活性およびTRE結合活性の増加が認められ，これらはCsAの前投与によって抑制された。また，CsA前投与はPTZで誘発されるけいれん発作の重症度を軽減した。脳内でIL-2の発現に関連した転写制御因子活性の調節が存在すること，さらにこれがけいれん発作の重症化に関与していることが示唆された。

[目的] 近年，神経変性疾患，脳移植，てんかん等，種々の中枢神経系の疾患において免疫反応の関与が注目されている。われわれは，免疫抑制剤であるcyclosporin A (CsA)の投与が一過性脳虚血後の海馬に起こるムスカリン性アセチルコリンレセプターの減少を阻止することを見いだしている(1)。CsAは末梢のT cellに作用して，T cellのinterleukin-2 (IL-2)産生を抑制することでその免疫抑制機能を発揮する(2)。T cell内では抗原刺激を受けて活性化されたcalcineurinにより転写制御因子NF-ATは脱リン酸化され，核内に移行，IL-2遺伝子上流域の結合element (NF-AT site)に結合し，mRNAへの転写が惹起されIL-2が産生される。一方，CsAはレセプター蛋白cyclophilin (CyP)に結合しcomplexを形成し，これがcalcineurinに結合し脱リン酸化活性が阻害されNF-ATが核内に移行できなくなりIL-2産生が抑制される。今回，CsAの中枢神経系での作用機序を明らかにするために，pentylenetetrazol (PTZ)刺激後の海馬での転写制御因子NF-ATのDNA結合活性の変化と，それに与えるCsAの影響をelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)にて検討し，さらにIL-2遺伝子上流域のTRE結合蛋白であるAP-1についても同様の検討を行った。

[方法] Animal experiment：7週齢雄性SDラットを用い，CsA (5 mg/kg)またはvehicleの皮下投与2時間後にPTZ (75 mg/kg)または生理的食塩水を腹腔内投与し，誘発されたけいれん発作の重症度を10分, 50分後に評価した。

核抽出液の調製：ネンブタール麻酔下で脳血管内の血球成分を除くために左心室より冷却生理的食塩水で潅流し，断頭後脳から海馬を取り出した。Schreiberらの方法(3)に従い海馬組織より核抽出液を調整した。得られた核抽出液は蛋白定量後，使用時まで-80℃で凍結保存した。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)：murine IL-2 のpromoter 領域のNF-AT site (-290～-276)を含む合成ヌクレオチド鎖, あるいはコンセンサスなTREを含む合成ヌクレオチド鎖(5'-GATTCGTGACTCAGCACAGG-3')をannealさせ2本鎖DNAプローブとした。5'末端を突出させたプローブは3'末端を[α-^{32}P]dCTPとDNA polymerase Iを用いてラベルした。核抽出液(4 μg), 20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 2 mM Tris-HCl, 1mM DTT, 0.4 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 80 mM NaCl, 2 μg Poly (dI-dC), 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, DNAプローブ(200 pg)のmixtureを23℃で15分間インキュベート後，ポリアクリルアミドゲルで電気泳動(11V/cm, 4℃, 2.5時間)した。泳動後ゲルを乾燥し，オートラジオグラフィーを行った。

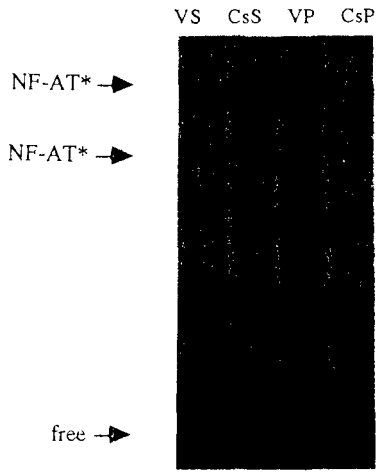


Fig.1. PTZ刺激後の海馬NF-AT site結合蛋白の変化とCsA前投与の影響
標識NF-AT site プローブ (NF-AT*)によるEMSA
VS, vehicle + 生食; CsS, CsA+ 生食; VP, vehicle + PTZ;
CsP, CsA+ PTZ

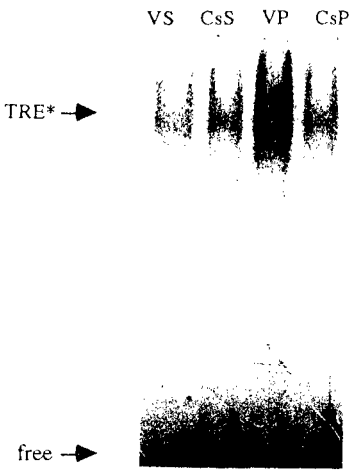


Fig.2. PTZ刺激後の海馬TRE 結合蛋白の変化とCsA前投与の影響
標識TRE プローブ (TRE*)によるEMSA
VS, vehicle + 生食; CsS, CsA+ 生食; VP, vehicle + PTZ;
CsP, CsA+ PTZ

[結果] CsAの前投与はPTZ投与により誘発されたけいれん発作の重症度を明らかに軽減した。murine IL-2のNF-ATに対するプローブを用いたEMSAでは，海馬核抽出液から2つのbandが得られ，脾臓の核抽出液でみられる2つのbandと同様の移動度であり，さらに100倍量の非標識プローブの添加により消去された。このDNA結合NF-AT like proteinはPTZの刺激によって発現が増加したが，CsAの前投与により抑制された(**Fig.1**)。TRE結合活性もPTZ投与により著明に増加したが，CsAの前投与によってほぼ完全に抑制された(**Fig.2**)。

[考察] PTZ刺激によって海馬でNF-AT like proteinおよびAP-1のDNA結合活性が誘導されたことは，脳内でIL-2の発現に関連した転写制御因子活性の調節が行われていることを示唆している。CsA前投与によるPTZ誘発TRE結合活性の発現に対する抑制効果は，CsA前投与がc-*fos* mRNAの発現には影響しないことから，AP-1自身への作用によると考えられる。一方，NF-AT like proteinの結合活性がCsA前投与によって抑制されたことは，CsAの既知の作用機序であるcyclophilin-CsA-calcineurin complexの形成を介した，NF-AT like proteinの脱リン酸化阻害によると考えられる。JainらはT cellからの核抽出液を用い，TRE結合蛋白であるAP-1がIL-2遺伝子上流域のNF-AT siteに結合するnuclear NF-ATの構成成分であることを報告しており(4)，本実験でのNF-AT site結合蛋白のupper bandは同様のものである可能性がある。CsAのNF-AT site結合活性の抑制効果は，一部にはAP-1のTRE結合活性への作用による二次的なものである可能性もあるが，pre-existing NF-ATと考えられるlower bandもCsAにより抑制されていたことから，CsA投与はNF-AT，AP-1それぞれ別々に作用していると考えられる。以上のことから，CsAの前投与によるPTZ誘発けいれん発作の軽減は，CsAのNF-ATへの作用を介したいわゆる免疫反応の抑制のみならず，TRE結合活性の抑制のように他の転写制御因子への作用も関与している可能性も示唆された。

[文献] 1. Ogawa, N et al. Neurosci Lett 152: 173-6 (1993)
2. Emmel, EA et al. Science 246: 1617-20 (1989)
3. Schreiber, E et al. Nucleic Acid Res 17: 6419 (1989)
4. Jain, J et al. Nature 356: 801-4 (1992)

23 神経分化特異的蛋白質ネクジンの遺伝子構造と発現調節

植月太一、杉浦弘子、河野朋子、吉川和明*

都神経科学研·分子神経生物部門、*現大阪大学蛋白研·蛋白質機能制御部門）

〔要約〕

ネクジンは胚性ガン細胞（P19細胞）をレチノイン酸によって神経分化させた際に特異的に誘導される遺伝子産物として見いだされた。その発現調節を解析する目的でマウスネクジン染色体遺伝子を単離した。得られた遺伝子はイントロンを持たなかった。単離されたクローンは構造遺伝子の他5'上流域を約1kb、3'領域を6kb含んでいた。プロモーター領域（5'上流域）の下流にレポーターとしてβガラクトシダーゼ遺伝子を結合したプラスミドを作製し、P19細胞に導入した。P19細胞をレチノイン酸により分化させたところ、ニューロンに分化した細胞においてβガラクトシダーゼによる発色が見られた。従って得られたネクジン遺伝子のプロモーター領域には神経分化を制御するcisエレメントが含まれる可能性が示唆された。

（序文）

細胞の分化に関する研究は、種々の細胞を用いて行われてきたが、ニューロンの分化に関する分子生物学的な研究は、現在結論を見るまでには至っていない。我々はニューロン分化機構を解析する目的で胚性ガン細胞P19を培養系で神経分化を再現する系として着目してきた。この細胞系から生ずるニューロンは分裂終止細胞であり、生体内でのニューロンと極めて似た性質と発生様式を示す。P19細胞が神経分化する際に特異的に発現するmRNAを解析し、我々は既知の遺伝子との相同性を示さないcDNAを単離してネクジンと名付けた(1)。ネクジンは*in vivo*においても分化したニューロンに存在する核蛋白質であった(2)。*in situ*ハイブリダイゼーション法によって発現の特異性を検討した結果、ネクジンはニューロン特異的に発現されること、また、分化を終了して細胞分裂を停止した細胞において強い発現がみられることが明らかになった(3)。これらの知見からネクジンはニューロンの分化のマーカーとして極めて優れていることが示された。ニューロン分化の分子生物学的解析を行うにはまずその手がかりが重要であるがネクジンはその目的に合致している。従ってその遺伝子発現の調節機構を研究することはニューロンの発生分化の分子機構を知る上で重要な知見を与えてくれるものと期待される。そこで今回、我々はネクジンのプロモーターの構造と機能の解析を試みた。

（方法）

最初にマウス細胞より作製されたラムダファージを用いた染色体遺伝子ライブラリーをネクジンcDNAをプローブとして検索した。単離された遺伝子はプラスミドにリクローニングした後に塩基配列を決定し、ネクジン遺伝子の全構造を解析した。

得られた遺伝子のプロモーター領域（約1キロベースの5'上流域）の下流にレポーター遺伝子（βガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等）を結合したプラスミドを作製した。次にネクジンのプロモーター活性を解析する目的でこのプラスミドをP19細胞への導入を試みた。P19細胞を3～4日間0.5μMのレチノイン酸を含むメディウム中で培養した後、カチオン性脂質（リポフェクタミン）を用いてP19細胞に遺伝子導入した。さらに3日間培養しニューロンに分化させた後、レポーター遺伝子の活性を測定してプロモーターの機能を解析した。

（結果と考察）

マウス細胞より作製した染色体遺伝子ライブラリーをネクジンcDNAをプローブとして検索してネクジン染色体遺伝子を単離し、その構造を明らかにした。単離されたクローンは構造遺伝子の他5'上流域を約1kb、3'領域を6kb含んでおり、得られた遺伝子はイントロンを持たなかった。コード領域の全塩基配列を決定したところ1アミノ酸の置換をもたらす1bpの変異を除いてcDNAと一致した。サザンハイブリダイゼーションによってネクジン遺伝子はハプロイド当たり1個と考えられること、このクローンはポリAを3'末端に持たないことなどからプロセスされた偽遺伝子ではないと考えられる。次にプロモーター領域（5'上流域）の下流にβガラクトシダーゼ遺伝子を結合したプラスミドを作製し、レチノイン酸処理後のP19細胞に導入した。この際、組織特異性を持たないヒトペプチド鎖延長因子（EF1α）のプロモーターにβガラクトシダーゼを結合したレポーター遺伝子もコントロールとして導入した。導入3日後、βガラクトシダーゼの活性を発色により検討した結果、主としてニューロンに分化した細胞において発色が見られた（図1）。一方、EF1αのプロモーターを持つレポーター遺伝子を導入したものではニューロンの他グリア様細胞、線維芽様細胞も強く発色した（図2）。この結果、得られたプロモーターが転写活性を持っており、ニューロンに特異性が高いことが示された。さらにβガラクトシダーゼの替わりにルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして神経分化特異的発現を調節するcisエレメントを同定する試みを行っている。

（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)
3.高城啓一、吉川和明 神経化学. 32(1):154-155(1993)



図1 ネクジンプロモーターによるβガラクトシダーゼの発現
レチノイン酸処理によってニューロンに分化したP19細胞にβガラクトシダーゼによる発色が見られる。

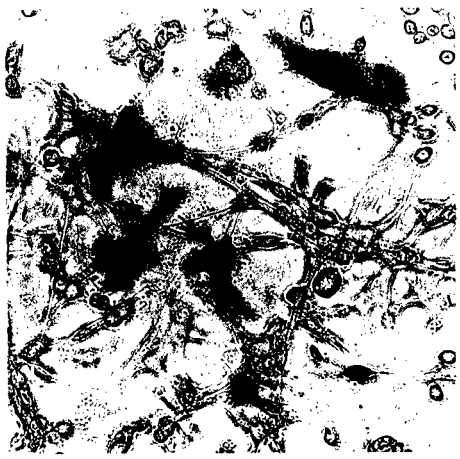


図2 EF1αプロモーターによるβガラクトシダーゼの発現
レチノイン酸処理によってニューロンに分化したP19細胞の他、グリア様や線維芽様のP19細胞にもβガラクトシダーゼによる発色が見られる。

24 神経細胞の核特異的タンパク質　5E5のcDNAクローニングとそのタンパク質機能解析

鈴木恵理香[1]、小幡邦彦[2]、赤川公朗[3]
（総合研究大学院大学　生命科学科[1]、　生理学研究所　神経化学[2]、
杏林大学　医学部　第二生理[3]）

〔要約〕神経系は多種の細胞からなりそれぞれ独特な形態や性質を持っている。この神経系の特殊性は神経細胞の核内の特異的な調節因子によって調節されていると考えられている。そこで我々は神経細胞の特殊な核内調節因子を探索するため神経細胞の核を認識するモノクローナル抗体を作成し、神経細胞の核特異的抗体を得ている。今回我々はそのcDNAの塩基配列を決定した。その結果、核タンパク5E5は塩基性アミノ酸であるアルギニンに富み、C末端側にプロリンに富む構造を持ち、トランスロケーションシグナルを持った分子量約90KDaのタンパク質であると推定した。このクローニングしたcDNAを発現させたタンパク質に対するモノクローナル抗体はラットの脳の切片で神経細胞の核を認識した。ラットの脳の核分画を調整し、DNA-セルロースカラムにかけ、DNA結合タンパク質分画を　Western blotting　したところ、DNA結合タンパク質分画 の約100KDaのタンパク質がこの抗体により認識された。また、全翻訳領域を含む約3.6KbのcDNAを真核細胞の発現ベクターに組み込み、COS-1細胞にトランスフェクションしその細胞内局在性を調べたところ、核に局在していることがわかった。以上の結果より5E5は新しいDNA結合タンパク質であることがわかった。

＜実験方法＞

ギニアピッグの脳から既述の方法により核分画を調整した。この核分画をEDTAバッファーでホモジナイズし、遠心後のペレットを0.35M NaClバッファーに懸濁し、遠心しペレットを得た。このペレットを尿素バッファーに懸濁 して遠心した後の上清を非ヒストンタンパク質分画とした。この非ヒストンタンパク質分画を抗原としてモノクローナル抗体5E5を作成した（1）。ラット海馬の λ gt11 cDNAライブラリーより　β-ガラクトシダーゼ／5E5 の融合タンパク質をmAb 5E5で認識させることにより約1.7KbのcDNA を単離した。さらにラット脳の　λ gt10 cDNA ライブラリーより約1.7KbのcDNAのN末端側180bpをプローブとしてこの1.7Kb全てを含む3.6KbのcDNAを単離し、塩基配列を決定した。また1.7KbのcDNAをpMAL発現ベクターに組み込みこの1.7Kbの発現タンパク質についてモノクローナル抗体を作成した。ラットの脳よりDignam法により脳の核抽出物分画を調整し、DNA-セルロースカラムにかけて、カラムバッファーに2M KCl を添加することにより溶出してきた分画をDNA 結合タンパク質分画とした。約3.6Kbの全翻訳領域を含むcDNAを真核細胞の発現ベクターであるpRc/RSVに組み込み、DEAE－デキストラン法にてCOS-1細胞にトランスフェクションした。

＜結果及び考察＞

得られたラット脳の5E5 cDNAは、3.6Kbで825アミノ酸からなる分子量約90KDaのタンパク質をコードしていると考えらた。この5E5はDNA結合タンパク質によく見られるように塩基性アミノ酸であるアルギニンに富んでいた。C末端側に酸性アミノ酸であるプロリンとグリシンが多く含まれていた。5E5はN末端側から430アミノ酸付近にタンパク質の核内への移行を示唆するトランスロケーションシグナルを持っていた。この5E5には一般的にDNA結合ドメインのモチーフとされているZnフィンガー構造、ヘリックス-ターン-ヘリックス構造やロイシンジッパー構造は見られなか

った。mAb5E5でラットの脳の切片を間接蛍光抗体法で染色すると神経細胞の核が斑点状に染まることも考え合わせると、5E5は細胞質で翻訳された後、核内にとりこまれDNAに結合するものと考えられた。SWISS PROTデータベースで検索したところ5E5は全く未知のタンパク質であることがわかった。

5E5のタンパク質機能を調べるため、1.7Kb cDNAを発現させたタンパク質に対してモノクローナル抗体を作成した。このモノクローナル抗体はラットの脳の切片で神経細胞の核を認識した。またDignam法により調整したラットの脳の核抽出物分画で約100KDaのタンパク質を認識した。更に、このラットの脳の核抽出物分画をDNA-セルロースカラムにかけたところ、DNA結合タンパク質分画である2M KClを含んだカラムバッファーによる溶出分画の100KDaのタンパク質がこの抗体で認識された(図1)。この結果から5E5は直接的又は間接的なDNA結合タンパク質であると考えられた。5E5の全翻訳領域を含む3.6Kb cDNAを真核細胞の発現ベクターに組み込み、COS-1細胞にトランスフェクションした。これを間接蛍光抗体法で調べるとCOS-1の細胞核に5E5が発現していることがわかった(図2)。これはトランスロケーションシグナルが機能しており、細胞質でつくられたタンパク質がトランスロケーションシグナルにしたがって核内に移行するものが示唆された。

以上の結果より5E5は細胞質で合成された後、核内に移行し、なんらかの修飾を受けてDNAに結合している新しい核タンパク質であると考えられた。

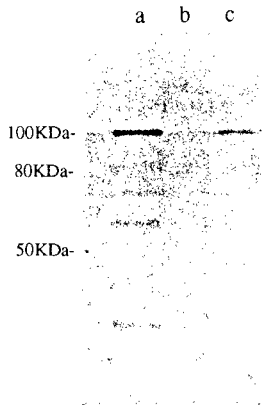


Fig.1 DNA結合タンパク質中にみられる抗体陽性バンド

DNA-セルロースカラムに核分画をかけて得られたDNA結合タンパク質分画の100KDaのタンパク質が抗体で認識された。
a: DNA結合タンパク質分画
b: DNA-セルロースカラム非吸着分画
c: ラット脳の核抽出物分画

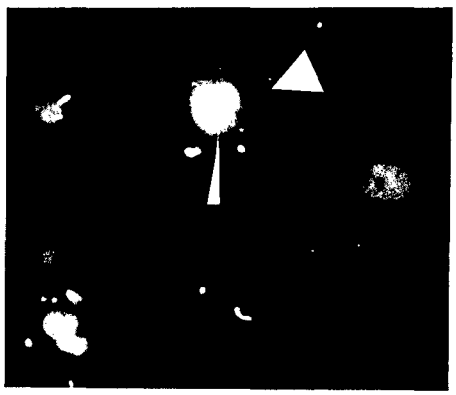


Fig.2 5E5発現タンパク質のCOS-1細胞での細胞内局在

小三角は核、大三角は細胞質を示す。COS-1の核に発現させた5E5の強いシグナルがみられた。

文献

(1) Yoshimura.K. et al. (1990) Brain Res. 509: 161-164

25 ニワトリ gicerin cDNA を導入した zebrafish の神経特異発現

金哲熙、平英一、郭哲輝、岡本仁*、中平健祐**、池中一裕**、樋口宗史、三木直正
(大阪大・医・第一薬理、*慶応大・医・生理、**生理研・神経情報)

〔要約〕
神経突起伸展因子(NOF)の受容体として見い出されたニワトリgicerinは、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する新しい細胞接着因子であり、発生初期の神経系形成において重要な役割を果たしていると推測されている。Zebrafishは、脊椎動物の中でも単純な構造の神経系を持つので、神経系形成過程を研究するために適した材料である。そこで、ニワトリgicerinの神経系形成における機能解析の一環として、zebrafish卵へ遺伝子導入を試みた。マウスneurofilamentプロモーターを結合したニワトリgicerin cDNA発現ベクター(pNFP-gicerin)を、zebrafish受精卵に導入、 transient transgenic zebrafishを作製し、gicerinの発現と共に、zebrafish神経系形成への影響を調べた。導入gicerin cDNAの発現はほぼ神経細胞に限られ、神経特異発現が認められた。Zebrafish神経特異発現系を利用して、gicerinの生理機能の解析が可能であることが示唆される。

私達は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 outgrowth factor)を単離精製している(1)。GicerinはこのNOFの受容体として見い出された新しい細胞接着因子であり、発生初期の神経系や網膜に発現し、シナプス形成や細胞移動に深く関与していると考えられる(2)。Zebrafishは毎朝数百の受精卵が採取可能であり、胚発生が透明で２４時間で神経系が形成され、脊椎動物の初期神経系形成機構を研究するために適した実験材料である(3)。そこで私達はニワトリgicerinの初期神経系形成においての役割を明らかにするためにzebrafishへの遺伝子導入を試みた。

［方法］
１）Zebrafish (*Brachydanio rerio*、基礎生物学研究所より供与)より受精卵を採取、マニプレーターを使って細胞質へのDNA導入を行った。導入DNAは濃度25μg/mlになるように0.05% phenol red、0.05M KCl溶液にて調整した。
２）発現ベクターは基本的にヒトcytomegalovirus(CMV)プロモーターを持つpcDNA1ベクターを使い、β-galactosidase(LacZ)、マウスneurofilamentプロモーター(NFP)、ニワトリgicerin cDNAを発現ベクターに組み込んだ。
３）ホールマウント染色は、zebrafish胚をpronase処理で卵殻膜を除去、パラフォルムアミド固定、X-gal染色を行った。免疫組織化学の場合はさらに、acetone処理の後、抗ニワトリgicerin抗体、β-galactosidase抗体、HNK-1抗体などを用いてABC法より行った。HNK-1抗体はzebrafish初期胚の神経系の中でも神経突起をもつ神経細胞と反応することが知られている。

［結果と考察］
１）Zebrsfishを用いたニワトリgicerinの初期神経系形成における機能解析のためには、神経特異的な発現系が必要である。pCMV-LacZ発現ベクターを導入したzebrafish胚をX-gal染色で調べると、発現がモザイクであるが、数十匹のzebrafish胚を合わせて検討したところ、その発現が全身的であることが認められた。これに対し、pNFP-LacZベクターを導入したzebrafish胚の場合は、ホールマウントX-gal染色、抗β-galactosidase抗体、又はX-galとHNK-1抗体の二重染色した結果、その発現は限局され、部分的に神経特異的であることが認められた。マウスneurofilamentプロモーターはin vitro系において神経特異

性がないと報告されているが(4)、transgenic mouseの場合は神経特異発現が認められている(5)。特に、今回、zebrafishを用いたpNFP-LacZのプロモーター活性は部分的に神経特異性が認められ、今後マウスとzebrafish間のneurofilament遺伝子プロモーター領域の保存性についても検討が必要である。

２）Zebrafishより得た受精卵、約１５０個にNFPを用いたgicerin発現ベクター(pNFP-gicerin)を導入し、２８時間目のzebrafish胚約１３０匹が得られた。これらのzebrafish胚に抗gicerin抗体を用いたホールマウント染色を行い、約８０匹がニワトリgicerin cDNAを発現するtransient transgenic zebrafishであると認められた。このtransient transgenic zebrafishはモザイク様の発現に加えて神経特異発現が認められ、zebrafish胚当り一つから数十個のgicerin発現細胞が見られた。その中、７７匹のzebrafish胚においてgicerinを発現する細胞のほとんどが神経軸索を持つ神経細胞であることが認められた。他に、ごく一部の筋肉細胞などが発現しているのが見られた。このように、pNFP-gicerinベクターはほぼ神経細胞に限られ発現していたが、中でも１次感覚神経細胞である三叉神経節、体表の触覚を脊髄に伝えるRohon-Beard神経細胞などが高頻度にgicerinを発現することが観察された。現在、この７７匹のpNFP-gicerin導入transient transgenic zebrafishに対し、gicerinを発現する神経細胞の種類や神経形成への影響などについて具体的に検討中である。ニワトリgicerin cDNAを発現させたtransient transgenic zebrafish胚をFig. 1に示した。

今後は、ニワトリgicerin cDNAを導入したstable transgenic zebrafishを作製し、zebrafish神経系形成への影響及び行動異常などの検索を進めると共に、zebrafishのgicerin様分子を同定し、初期神経系形成におけるgicerinの役割を明らかにしたい。

［文献］

(1) Hayashi Y. and Miki N. (1985) J.Biol.Chem., 260, 14269-14278.
(2) Taira E., Takaha N., Taniura H., Kim C-H., and Miki N. (1994) Neuron, 12, 861-872.
(3) 岡本　仁 (1992) 細胞工学, 11(8), 600-604.
(4) Nakahira K., Ikenaka K., Wada K., Tamura T., Furuichi T., and Mikoshiba K. (1990) J.Biol.Chem., 265, 19786-19791.
(5) Begemann M., Tan S-S., Cunningham B.A., and Edelman G.M. (1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 87, 9042-9046.



Fig. 1. A representative of transient transgenic zebrafish embryo introduced with pNFP-gicerin. Anti-gicerin antibody stained several trigeminal ganglion cells and Rohon-Beard neurons (arrows) including axons and growth cones. C, cerebellum; E, eye; Y, yolk. Scale bar, 200μm.

26 PC12D細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストによるMAPKの活性化について；PKC、カルシウムとRaf-1 の関連

隈原英子、海老原達彦、三枝理博、David Saffen
(東京大学・医学部・脳研・生化学部門)

〔要約〕

PC12D細胞を、ムスカリン性アセチルコリンレセプター(mAChR) のアゴニストであるカルバコール(Carb)、またはオキソトレモリン(Oxo)で刺激すると、MAP Kinase (MAPK) が活性化されることが見いだされた。また、細胞をホルボールエステル (PDA)で一日前処理するとmAChRアゴニストの刺激によるMAPKの活性化が抑制されたが、NGF刺激によるMAPKの活性化は抑制されなかった。以上よりmAChRからMAPKへの経路はPKCを介するが、NGFの場合はPKCを介さないことが示唆された。さらに、MAPKの活性化はSDS-PAGE におけるバンドの移動度の変化と相関性があるが、EGTA存在下でMAPKの活性化が抑制されたがNGFの場合は影響を受けないので、mAChRアゴニスト刺激によるMAPKの活性化にはCa^{2+}が必要であることが示された。また、NGF刺激, Carb刺激どちらに対してもMAPKの移動度の変化はRaf-1の移動度の変化に先行したので、PC12D細胞では、Raf-1はMAPKの上流で機能していない可能性が示唆された。

「緒言」

PC12D細胞はPC12細胞の亜株で、NGF刺激後数時間以内に神経突起を伸長させる[1]。PC12D細胞をNGFで刺激するとMAPKの活性化が起こることが報告されており[2]、それが細胞のNGFによる分化に必須であると考えられている。我々は以前、PC12D細胞がmAChR のm1とm4のサブタイプを発現していることや、PC12D細胞をmAChRアゴニストで刺激するとPI turn overが起こることを報告した[3]。PI turn overが起こるとPKCが活性化し、細胞内Ca^{2+}の濃度が上昇すると考えられる。他の細胞株では、PKCの活性化や細胞内Ca^{2+}の上昇によりMAPKが活性化することが知られているので、PC12D細胞において、mAChRの刺激によるMAPKの活性化へのPKCとCa^{2+}の関与について検討した。また他の細胞株では、成長因子の刺激後、MAPKの上流にRaf-1がMAPKKKとして機能していると報告されているので、NGFまたはCarbの刺激によるMAPKの活性化とRaf-1の関連を調べた。

「方法」

PC12D細胞は、5% FCS / 5% Horse Serumを含むDMEM培地で、37℃、5% CO_2下で培養し、80 - 90% confluentになったものを用いた。MAPKのin vitro kinase 法は、 Myelin Basic Proteinを基質として既報(4)に従って行った。in gel 法は、既報(5)に従った。また、SDS-PAGE上の移動度の変化は、抗MAPK及び抗Raf-1抗体を用いてイムノブロッティングを行い検出した。抗MAPK及び抗Raf-1抗体は、 Santa Cruz Biotechnology, Inc(USA)のものを使用した。

「結果と考察」

PC12D細胞をNGFまたはCarbで刺激し、MAPKが1分以内に活性化することをin gel 法やin vitro kinase 法により 確認した。MAPKの活性化のPKCに対する依存性を検討するために、細胞をPDAで一日処理してNGF, Carb, Oxoで刺激し、MAPKの活性化を

調べた(図1)。NGFの刺激によるMAPKの活性化はPDAの影響を殆ど受けなかったのに対し、CarbとOxoによるMAPKの活性化はPDA前処理により抑制された。次に、細胞内Ca^{2+}濃度を上昇させるthapsigargin(0.1 μM)を加えところ、MAPKの移動度の変化が見られた。細胞をEGTAで前処理するとMAPKのCarb刺激による移動度の変化は抑制されたが、NGF刺激によるMAPKの移動度の変化は抑制されなかった。以上のことから、mAChR刺激によるMAPKの活性化には、PKCとCa^{2+}が関与していることが示唆された。最後に、Raf-1 とMAPKの移動度の変化のタイムコースを調べたところ、NGF刺激, Carb刺激共にRaf-1 の移動度の変化はMAPKの移動度の変化よりも遅れることがわかった(図2)。

以上の結果より、

(1) PC12D細胞をmAChRアゴニストで刺激するとMAPKが速やかに活性化される、

(2) その活性化は、PKCとCa^{2+}に依存する経路を介して起こる、

(3) PC12D細胞では、Raf-1はMAPKの上流で機能していない、

ことが、示唆された。

「文献」

1) Katoh-Semba R., Kitajima S., Yamazaki Y., and Sano M. (1987) J. Neurosci. Res. 17, 36-44.

2) Sano, M. (1992) J. Neurochem. 59, 1263-1272.

3) 海老原達彦、伊藤和光、Saffen D. (1993) 生化学 65 (8), 1000.

4) Clark-Lewis I., Sanghera J. S., and Pelech S. L. (1991) J. Biol. Chem. 266, 15180-15184.

5) 伊藤文詔、後藤由季子、西田栄介 (1992) 実験医学 11(3), 392-396.

図 1

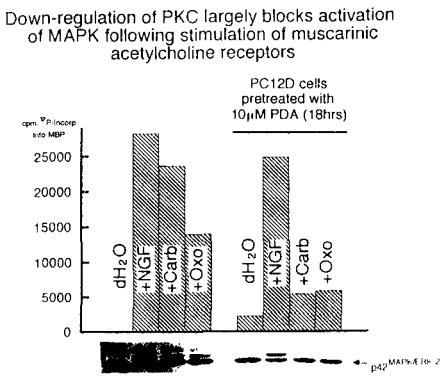
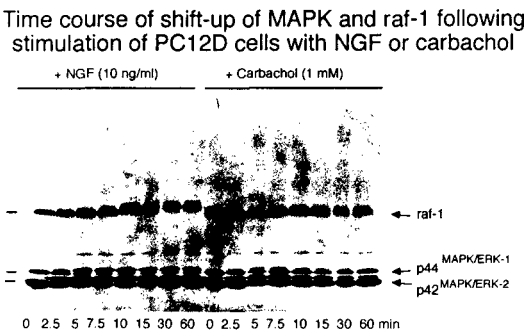


図 2



27 初代培養前脳基底野ニューロンにおけるＮＧＦレセプターmRNAの発現に対する神経栄養因子の効果

小島正己、池内俊彦、畠中寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕
神経成長因子（NGF）の生理作用発現に不可欠な高親和性 NGF レセプター *trk*A 遺伝子の発現調節の研究を胎生 17 日齢ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンの培養系を用いて進めた。この時期のコリン作動性ニューロンに対して分化促進作用を行う NGF が *trk*A mRNA の発現を強く誘導することは既に報告した。今回は、NGF 以外の神経栄養因子を同様に添加する実験を行った。脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）は、NGF と同様にアセチルコリン合成酵素（ChAT）活性を上昇させたが、*trk*A mRNA の発現を誘導しなかった。高 K^+ 培地による脱分極刺激及び、毛様体神経栄養因子（CNTF）は、ChAT 活性の上昇も *trk*A の発現誘導も起こさなかった。しかし、K252b 存在下で NT-3 を添加した時（この条件下で NT-3 は *Trk*A レセプターを NGF と同様に活性化することが知られている）、ChAT 活性の上昇と *trk*A mRNA の発現の誘導が NGF を添加した時と同様に観察された。以上の結果から、培養下の前脳基底野コリン作動性ニューロンの *trk*A mRNA の発現は、NGF という特異的リガンドによって調節されており、コリン作動性ニューロンに対する神経栄養因子作用は直接的には関係がないことが示唆された。

NGF の作用起点である NGF レセプターは、チロシンキナーゼを持つ高親和性レセプター *Trk*A とその機能発現を補う低親和性レセプター p75 から構成されることが最近明らかになった（1）。我々は、NGF レセプターの遺伝子の発現調節の研究を NGF の作用が知られる中枢前脳基底野コリン作動性ニューロンの培養系を用いて進めており、NGF の添加によって p75 と *trk*A の発現が up-regulation されることを既に報告した（2, 3）。この研究は、ニューロンがいつ、どのような状況で NGF に応答するのかという問題に答えるための重要な研究と考えている。

【実験方法】
胎生 17 日齢ラット前脳基底野ニューロンの培養は既報に従った（4）。細胞は polyethyleneimine コートしたプレートにまき、14 時間後に各神経栄養因子を添加した。*trk*A mRNA の定量は、インターナルコントロールを用いた RT (Reverse Transcription)-PCR 法により行った。PCR プライマーは、*trk*A mRNA からの PCR 産物が 441 bp になるように設定した。インターナルコントロールには、この 441 bp のシークエンスの途中の約 100 bp を欠失した trkA cDNA を含むプラスミドからの *in vitro* 転写産物を用いた。*trk*A の定量は、培養細胞から抽出したトータル RNA とインターナルコントロールを混合した後 RT-PCR 反応を行い、各反応産物の量比をとることによって行った。ChAT 活性の測定も既報に従った（4）。

【結果と考察】
胎生17日齢ラット前脳基底野ニューロンの培養系において、コリン作動性ニューロンに対して分化促進作用を行う NGF が *trk*A mRNA の発現を強く誘導した（図 1）（3）。この結果は、培養前脳基底野コリン作動性ニューロンの *trk*A mRNA の発現には NGF の分化促進作用が関与していること

を示唆する。前脳基底野組織における *trk*A mRNA の発現上昇のタイミングは、コリン作動性ニューロンが海馬に投射を開始する時期と投射先の海馬において NGF の生合成が始まる時期にほぼ一致している（4）。この意味からも、*in vivo* では *trk*A の発現に NGF が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。表 1 は、 ChAT 活性及び *trk*A mRNA の発現に対する代表的な神経栄養因子の効果を添加 36 時間後について調べたものである。BDNF、NT-3、bFGF は、NGF と同様に ChAT 活性を上昇させたが、*trk*A mRNA の発現には強い効果を持たなかった。高 K^+ 培地による脱分極刺激及び、CNTF については、ChAT 活性の上昇にも *trk*A mRNA の発現にも効果はなかった。ところが、プロテインカイネースインヒビターである K252b 存在下で NT-3 を添加した時 、ChAT 活性の上昇に加えて *trk*A mRNA の発現誘導が NGF を添加した時と同様に観察された（図 2）。K252b 存在下での NT-3 は *Trk*A レセプターを NGF と同様に活性化することが知られている（5）。以上の結果から、培養下のコリン作動性ニューロンの *trk*A 遺伝子の発現は、神経栄養因子による分化促進作用ではなく、*Trk*A レセプターを活性化する特異的リガンド NGF によってより直接的に調節されている可能性が示唆された。

【文献】

(1) 小島正己、池内俊彦、畠中寛 （1992） 実験医学 **10,** 1487-1493.
(2) Kojima, M., et al. (1992) *Mol. Brain Res.,* **16,** 267-273.
(3) Kojima, M., et al. (1994) *Neurosci. Lett.,* **169,** 47-50.
(4) Hatanaka, H., et al. (1988) *Dev. Brain Res.,* **39,** 85-95.
(5) Knusel, B., et al. (1992) *J. Neurochem.,* **59,** 715-722.

図 1

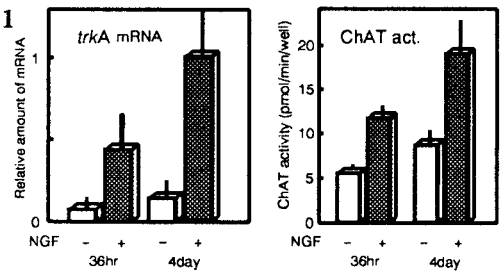


図 2

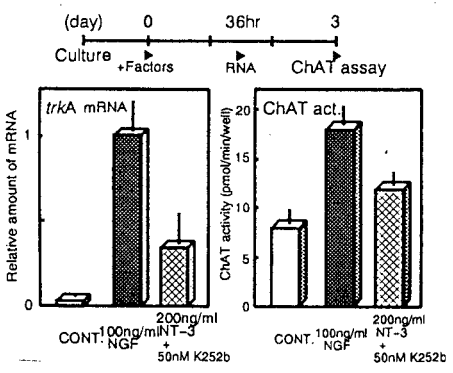


表 1

	ChAT activity (pmol/min/well)	Relative amount of trkA mRNA
Control	4.49 ± 0.08	1.00 ± 0.20
100 ng/ml NGF	9.89 ± 0.26	5.10 ± 1.88
50 ng/ml NT-3	8.65 ± 0.95	0.80 ± 0.22
50 ng/ml BDNF	6.75 ± 0.60	1.45 *
Control	2.20 ± 0.09	1.00 ± 0.46
100 ng/ml NGF	4.21 ± 0.01	3.30 ± 1.42
50 ng/ml bFGF	2.93 ± 0.09	1.60 *
5 ng/ml CNTF	2.29 ± 0.29	0.80 ± 0.22
40 mM KCl	2.00 ± 0.14	0.76 *

* n=1

図 1 初代培養ラット前脳基底野ニューロンにおける *trk*A mRNA の発現に対する NGF の効果
胎生 17 日齢ラットの初代培養前脳基底野ニューロンに 100 ng/ml の NGF を添加し、36 時間後と 4 日後について、*trk*A の発現及び ChAT 活性を調べた。

図 2 初代培養ラット前脳基底野ニューロンにおける *trk*A mRNA の発現に対する K252b 存在下における NT-3 の効果 培養ニューロンに対する K252b 処理の方法は既報に従った（5）。

表 1 *trk*A mRNA の発現に対する各神経栄養因子と NGF の効果の比較

28 Leucine Rich Repeats (LRRs) 構造を有するマウス脳由来遺伝子のクローニング

谷口 弘樹、高木 勉、遠山 正弥*、和中 明生*
（大阪大学 医学部 分子脳機構（田辺）寄付講座、解剖学第２講座*）

〔要約〕
Ｌｅｕｃｉｎｅ Ｒｉｃｈ Ｒｅｐｅａｔｓ（ＬＲＲｓ）構造はタンパク質ータンパク質間の相互作用を担う構造として考えられており、この構造を有するタンパク質は１つのファミリーを形成している。Ｍａｒｋ Ｄ．Ａｄａｍｓらによって得られたＨｕｍａｎ脳ｃＤＮＡライブラリー由来のＬＲＲｓを有するフラグメント（１）をプローブとしてマウス脳ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングし、全アミノ酸配列のコード領域と思われる部分を含むｃＤＮＡを単離し、その塩基配列を決定した。塩基配列から予想されるアミノ酸配列から、このタンパク質はＮ末端にシグナルペプチドを有し、疎水性アミノ酸からなる膜貫通領域を持つ膜貫通型タンパクであることが予想された。また、細胞外領域と思われる部分にはＬＲＲｓが９回存在し、さらにＬＲＲｓファミリー間で保存されたアミノ酸配列がＮ末端側、Ｃ末端側にそれぞれ存在する事がわかった。また、得られたｃＤＮＡをプローブとしてＮｏｒｔｈｅｒｎ ｂｌｏｔを行ったところ約４．２ｋｂのバンドが発生期から成体に至るまで一様に認められた。また、組織ごとの解析では、脳に特に強く発現していることがわかった。

神経系の構築には、ニューロン・グリアの分化、神経軸索の伸長、シナプス形成、細胞死といったような様々な局面が存在し、各段階において未知の分子を含め、種々の分子がその機能を担っている。ＬＲＲｓ構造を持つタンパク質は、βシート構造を形成し、タンパク質ータンパク質間の相互作用に関わる分子として考えられており、１つのファミリーを形成している。神経系においては、主にＤｒｏｓｏｐｈｉｌａから、ｓｌｉｔ、ｃｏｎｎｅｃｔｉｎ（２）、ｔｏｌｌなど、神経発生に関与していると考えられる分子が単離されており、マウスなど哺乳類においても同様な分子が存在する可能性がある。そこで、我々は、マウスの脳においてＬＲＲｓ構造を持ち、細胞間、細胞ー細胞外マトリックス間で働いているような分子を同定することを目的とし、ｈｕｍａｎ脳ｃＤＮＡライブラリーから得られたＬＲＲｓ構造を有するフラグメントをプローブとして生直マウス脳ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングし、全アミノ酸配列を決定した。その結果、ＬＲＲｓ構造を有する新しい分子であることがわかったので、現在進行中のｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションの結果と共に報告する予定である。

［方法］
（１）ｃＤＮＡクローニング
Ｐ１マウス脳ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。プローブは、ｈｕｍａｎ脳ｃＤＮＡライブラリーから得られたＬＲＲｓ構造を有するフラグメントを用いた。
（２）Ｎｏｒｔｈｅｒｎ ｂｌｏｔ
常法に従った。１レーンにつき２０μｇのｔｏｔａｌＲＮＡをアプライした。
（３）ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション
Ａｄｕｌｔマウス脳組織の凍結切片を作製し、ｃＤＮＡを鋳型としたｃＲＮＡをプローブとして、ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを行った。

［結果と考察］
ＬＲＲｓ構造を有するｈｕｍａｎ脳ｃＤＮＡフラグメントをプローブとして生直マウス脳ｃＤＮＡ

ライブラリーをスクリーニングしたところ、数個の陽性プラークが得られた。そのうち、最も長いクローン（約３．４Ｋｂ）の塩基配列の全てを決定した。このクローンは全長３３６８ｂｐで、１つのオープンリーディングフレームを持ち、3’末端にｐｏｌｙ（Ａ）を持っていた。塩基配列から予想されるアミノ酸配列から、７０７個のアミノ酸をコードしていることがわかった。このタンパク質は、Ｎ末端にシグナルペプチドを有し、疎水性アミノ酸からなる膜貫通領域を持つ膜貫通型タンパク質であることが予想された。細胞外領域と思われる部分には、ＬＲＲｓが９回存在し、また、ＬＲＲｓファミリー間で保存されているＮ末端側とＣ末端側のアミノ酸配列も存在した。ホモロジー検索の結果、この分子は、既知の分子とは核酸レベル、アミノ酸レベルでいずれも高い相同性は示さなかった。

発生過程を追った脳のＮｏｒｔｈｅｒｎ　ｂｌｏｔ解析では、胎生期から成体までほぼ一様に約４．２ｋｂのシグナルが検出された。また、成体の組織ごとの解析では、脳に特に強い発現を認め、そのほかの組織では、肺に発現が認められた。

以上の結果から、このタンパク質は、ＬＲＲｓ構造を有する哺乳類の新規タンパク質であり、また、発生過程を通じて発現がみられることから、神経系の形態、及び機能の維持に関与している可能性が考えられる。しかしながら、発生初期のこの分子の発現は検討していないので、さらなる検討が必要である。

今後、免疫組織化学により脳組織におけるこのタンパク質の局在を調べ、さらには、接着性の有無を調べるためにａｄｈｅｓｉｏｎ　ａｓｓａｙを行い、機能面での検討を試みていく予定である。

［文献］
（１）Ｍａｒｋ　Ｄ．Ａｄａｍｓ．ｅｔ　ａｌ．（１９９３）ｎａｔｕｒｅ　ｇｅｎｅｔｉｃｓ．４，３７３－３８０
（２）Ｎｏｓｅ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ．７０，５５３－５６７

LRRs構造

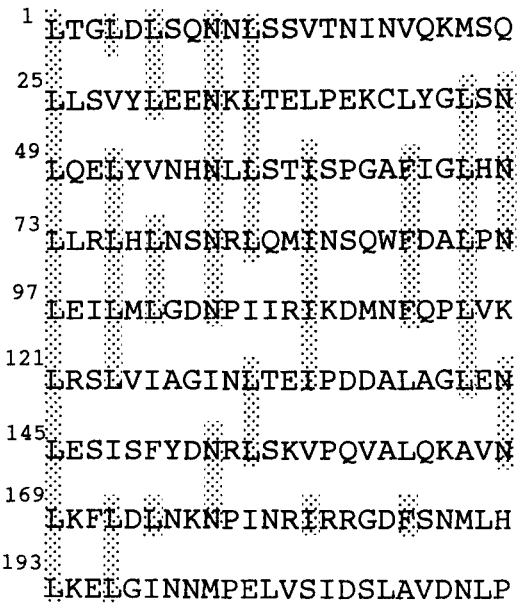


図.
本分子におけるＬＲＲｓ構造

29 不死化細胞株を用いた多能性神経幹細胞の増殖と分化の分子機構の解析

中福雅人*#、中川康史*$、貝淵弘三#、中村俊*
(*国立精神神経センター神経研、#奈良先端大バイオ、$東大医科研)

[要約]
ラット胎児脳の神経上皮組織より多能性神経幹細胞由来と考えられる培養細胞株を樹立し、その増殖および分化の機構について解析した。ラットE12神経上皮細胞の初代培養にヒトc-*myc*とエストロゲン受容体との融合タンパク質遺伝子(*mycer*)を導入し、多数の細胞株を得た。これらの細胞株では、培地にエストロゲンを添加することによって条件的に細胞内のc-*myc*活性を上昇させることが可能である。解析の結果、哺乳動物の中枢神経系を構成する3種類の主要な細胞系列、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのいずれにも分化しうる細胞株が複数種得られた。その中の一つMNS-57細胞は、ネスチン、ビメンチン、RC1等の抗原マーカーを発現しており、またbFGF, EGFによってその増殖が促進されるなど、神経上皮細胞の性質をよく反映した表現型をもっていた。さらに、*mycer*の活性化を引き起こすエストロゲンとbFGFを同時に培地に添加すると、MNS-57細胞の増殖が協調的に促進されるとともに、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの発生が誘導された。このことは、神経幹細胞の増殖あるいは分化の誘導に増殖因子からのシグナルとともに、細胞内でのc-*myc*の活性化が重要な役割を果たしていることを示唆している。

[目的] 哺乳動物の中枢神経系を構成する3種類の主要な細胞系列、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトはいずれも、胎児脳の神経上皮に存在する多分化能を有した「神経幹細胞」より発生すると考えられている[1,2]。この神経幹細胞についてはこれまで形態学的には詳細な解析が行われてきたが[1]、細胞レベルあるいは遺伝子レベルでの解析は未だほとんど進んでいないのが現状である。そこで我々は中枢神経系の発生と分化の分子基盤を明らかにしていく手がかりとして、ラット胎児神経上皮より不死化細胞株MNS-57細胞を樹立し、その性質の解析を行った。

[方法] MNS-57細胞は、ラット胎児(E12)終脳および中脳部分の神経上皮組織の初代培養にヒトc-*myc*とエストロゲン受容体との融合タンパク質遺伝子(*mycer*)[3]をレトロウイルスベクターを用いて導入することによって得られた。導入遺伝子のゲノムへの挿入位置のサザンブロット解析により、この細胞株が単一細胞由来であることを確認した。MNS-57細胞の表現型および*in vitro*で分化した細胞の同定は、細胞種特異的な抗原を認識する種々の抗体を用いた蛍光免疫染色法によって行った。

[結果と考察] 単層培養下のMNS-57細胞は胎児神経上皮細胞の抗原マーカーとして知られているネスチン[4]、ビメンチン、RC1[5]等を発現しており、未分化の神経幹細胞として継代可能であった。*mycer*の活性化を引き起こすエストロゲン、および塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF), 上皮細胞増殖因子(EGF)などの増殖因子は、それぞれ単独でMNS-57細胞の増殖を促進するが、エストロゲンと増殖因子の両者で同時に細胞を刺激すると、さらに協調的な強い増殖促進効果が認められた(図1A)。このエストロゲンによる効果が*mycer*の活性化によるものであり内在性のエストロゲン受容体を介するものでないことは、抗エストロゲン作用を有する合成化合物ICI 163, 384を用いて確認した(図1B)。次にMNS-57細胞の*in vitro*における分化能を、浮遊培養下での凝集塊形成法を用いて検討した。
MNS-57細胞をエストロゲンとbFGFの存在下に非接着性の培養器中で浮遊培養すると、細胞の増殖が著しく促進されるとともに、多数の細胞よりなる凝集塊が形成された。この細胞凝集塊を接着性の培養器上で再培養すると、MAP2$^+$/NSE$^+$ニューロン、GFAP$^+$アストロサイト、O4$^+$/GalC$^+$オリゴデンドロサイトの発生が誘導されることが明かとなった(図2)。さらに、これらの細胞の分化の効率的な誘導

には、エストロゲンによる c-*myc* の活性化と bFGF からの刺激が同時に存在することが必要であった（表1）。このことは、神経幹細胞の増殖あるいは分化の誘導に増殖因子からのシグナルとともに、細胞内での c-*myc* の活性化が重要な役割を果たしていることを示唆しているものと考えられる。現在、この多能性神経幹細胞株 MNS-57 細胞の増殖と分化の分子メカニズムについて、*in vitro* での解析をさらに進めるとともに、生体ラット脳組織への細胞株の移植•再導入の手法を用いた個体(*in vivo*)レベルでの幹細胞の分化の解析への応用を計画している。

[結語] 多能性神経幹細胞由来の培養細胞株を用いて、哺乳動物の中枢神経系を構成する3種類の主要な細胞系列、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが発生する過程を *in vitro* で再構成する系を確立した。

[参考文献]

1) Fujita, S. (1964) *J. Comp. Neurol.* **120**, 37-42.

2) McKay, R. D. G. (1989) *Cell* **58**, 815-821.

3) Eilers, M. et al. (1989) *Nature* **340**, 66-68.

4) Lendahl, U et al. (1990) *Cell* **60**, 585-595.

5) Edward, M. A. et al. (1990) *Neurosci.* **36**, 121-144.

Figure 1. Mitogenic effects of oestrogen and growth factors on MNS-57 cells

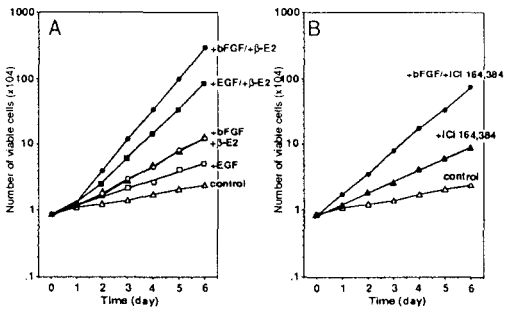
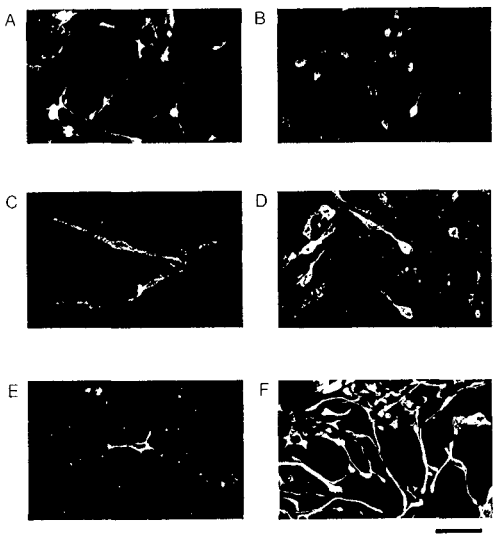


Table 1. Oestrogen- and bFGF-dependent differentiation of MNS-57 cells

culture condition		MAP2⁺ cells/total number of cells counted			
β-E_2	bFGF	exp.1	exp. 2	exp. 3	ratio (%)
suspension culture					
-	-	2/1856	1/1976	2/1358	0.1
+	-	2/1258	10/1522	10/1927	0.5
-	+	4/1631	10/2905	4/1602	0.3
+	+	132/1542	187/1379	179/1244	12.0
monolayer culture					
-	-	4/1056	2/1328		0.3
+	-	5/1251	2/986		0.3
-	+	7/1408	5/1123		0.5
+	+	45/1007	27/990		3.7

Figure 2. Generation of neurons, oligodendrocytes, and astrocytes from MNS-57 cells

Immunostaining with; A, anti-MAP2; B, anti-NSE; C, anti-GalC; D, A2B5; E, O4; F, anti-GFAP. Scale bar=50 μm.



30 NG108-15 細胞および関連細胞における新規因子 TA20 の神経分化機能

東田千尋、長井忍布、野村靖幸
(北海道大学、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 を添加した方が神経分化が促進されることから、両処理間で発現量の異なる因子が存在すると推定し、 differential screening 法による cDNA クローニングを行った。単離された新規因子 TA20 cDNA のNG108-15 細胞および親細胞であるニューロブラストーマ N18TG-2 細胞へのトランスフェクションにより、著しい神経突起の伸展と細胞増殖停止が認められたことより、 TA20 が神経分化に関与する因子であることが示唆された。

緒言

我々は、ニューロンモデル NG108-15 細胞において、 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、強い突起伸展、伸展した突起の維持、細胞増殖抑制などが認められることを報告してきた (1、2)。この長時間の薬物処理を要する現象には、 TPA と diBu-cAMP の同時処理に特異的な遺伝子レベルでの変化が関与すると考え、 differential screening 法により新規因子 TA20 を単離した (3)。各種細胞へのトランスフェクションの結果より、 TA20 がニューロンにおいて分化作用を有する因子であることが示唆されたので報告する。

実験方法

細胞培養：NG108-15 細胞は2% ウシ胎児血清含有 DMEM-HAT で培養した。 神経突起伸展および細胞数の計測：2 mm グリッド付 60mm 径dish 中、細胞を培養した。培養前に1つの dish あたり任意の4ヵ所に印をつけたグリッド中の細胞について、その数と有する突起の長さを計測した。 cDNA クローニング：1 mM diBu-cAMP あるいは 100 nM TPA と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 よりのプローブで強くハイブリダイズしたクローンを単離した。 TA20 mRNA の定量：100 mm dish 中で培養した細胞の total RNA をグアニジウム／ CsCl 法により抽出し、 TA20 の 5' 側 657 bp 断片をプローブとして Northern blotting を行った。 TA20 cDNA のトランスフェクション：TA20 cDNA 全長を、発現ベクター pREP9 あるいは誘導型発現ベクター pMAM-neo に挿入しリン酸カルシウム法により細胞へトランスフェクションした。 G418 による選別を2～3週間行い各トランスフェクタントを得た。

実験結果および考察

NG108-15 細胞を TPA とdiBu-cAMP 処理した場合、各薬物単独処理と異なり、神経突起の強い伸展が認められ、また処理後 72時間以降、特に長い突起伸展の割合が高まった (Fig.1) 。そこで differential screening 法により NG108-15 細胞において1mM diBu-cAMP の72時間処理よりも 100 nM TPA／1 mM diBu-cAMP の72時間処

理により強く発現している因子、 TA20 を単離した。 TA20 はその 1 次構造より未知の蛋白質へ翻訳されることが予想され、また数ヵ所の被リン酸化部位の存在以外は、何らかの機能を予測させるような既知のドメインとの相同性は見られなかった。そこで、 TA20 cDNA を NG108-15 細胞へトランスフェクションし、持続した発現を示すトランスフェクタントを複数得、それらの TA20 mRNA 発現量を Northern blotting により検討した (Fig.2) 。トランスフェクタントの薬物非存在下での形態を観察したところ、 TA20-S1 において突起伸展 (Fig.3) と増殖抑制効果 (Fig.4) が認められた。また dexamethasone 処理による誘導型の発現ベクターを用いて TA20 cDNA を NG108-15 細胞にトランスフェクションしたところ、 dexamethasone 処理に依存して著しい突起の伸展が認められた (データ未提示)。また、ニューロブラストーマ N18TG-2 細胞へのトランスフェクションにより、 NG108-15 細胞の場合と同様に分化が引き起こされたが、グリオーマ C6Bu-1 細胞へのトランスフェクションによっては何の形態変化も見られなかった (データ未提示)。以上の結果より、 TPA と diBu-cAMP 処理により特異的に増加する因子として見い出された TA20 は、神経細胞において分化因子として機能することが示唆された。

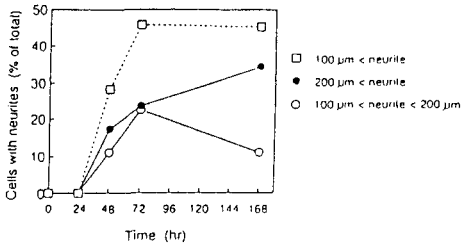


Fig.1 TPA+diBu-cAMP 処理の各時間における突起伸展効果

NG108-15 細胞においての、 100 nM TPA+1 mM diBu-cAMP 処理時間に対する突起伸展の割合を突起の長さ別に示す。

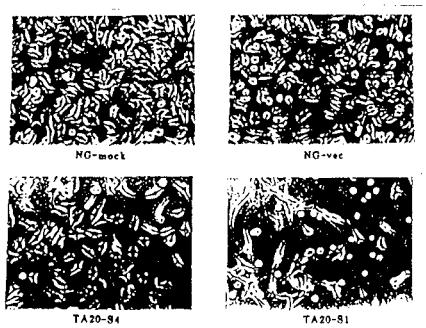


Fig.3 NG108-15 細胞への TA20 cDNA トランスフェクションによる神経突起伸展作用

NG-mock 、NG-vec 、TA20-S1 、TA20-S4 細胞を薬物非存在下で 72 時間培養した場合の形態を示す。

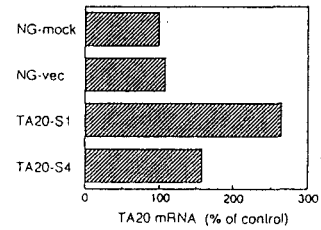


Fig.2 TA20 cDNA トランスフェクタントにおける TA20 mRNA 発現

NG108-15 細胞への TA20 cDNA トランスフェクションにより得たトランスフェクタントのうち、TA20-S1 と TA20-S4 および、トランスフェクションの操作のみを施した NG-mock 、ベクターのみをトランスフェクションした NG-vec の、TA20 mRNA 発現量を示す。

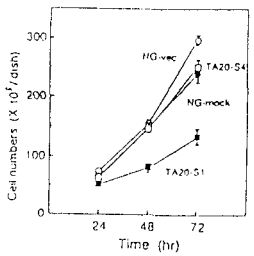


Fig.4 NG108-15 細胞への TA20 cDNA トランスフェクションによる細胞増殖抑制作用

NG-mock 、NG-vec 、TA20-S1 、TA20-S4 細胞をそれぞれ同程度の密度で培養した場合の、薬物非存在下での細胞数を示す。

参考文献

1) Tohda, M., Kumagai, C. and Nomura, Y. (1991) Neurochem. Int. 19, 255-260.
2) Kumagai-Tohda, C., Tohda, M. and Nomura, Y. (1993) J. Neurochem. 61, 526-532.
3) Tohda, C., Tohda, M. and Nomura, Y. 投稿中。

31 細胞接着因子 gicerin のサブタイプの構造と機能

平　英一、薙野智子、高羽夏樹、三木直正

大阪大学医学部第一薬理

〔要約〕

細胞接着因子 gicerin はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する新たな膜タンパク質である。そのサブタイプが mRNA レベルで存在していることが示されており、今回、実際に蛋白質として発現していることをサブタイプに特異的な抗体を作成することにより確認した。gicerin は従来 82kDa と90kDa のダブレットバンドとして存在しているが（1）、新しいサブタイプ (l-gicerin) は 90kDa のバンドに相当する分子であることが明らかになった。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］

gicerin はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する新しい膜タンパク質である（2、3）。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持っている。このような gicerin の cDNA クローニングを行った際に 2 種類のmRNA が存在することが明らかになった。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。すでに単離していた短い C 末を持つクローンは細胞内ドメインが２１アミノ残基より構成されているが、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。今回、この 2 種類のタンパク質 (s-gicerin, l-gicerin) が実際に存在することを確かめるとともに、その性質を検討する。

［方法］

1　新たに見い出されたサブタイプ (l-gicerin) に特異的なアミノ酸配列に相当する合成アミノ酸を作成した。さらに MAP （多抗原性ペプチド）法によりこのペプチドに特異的な抗体を作成した。
2　抗 gicerin 抗体及び抗 l-gicerin 特異抗体を用いてウエスタンブロットを行った。
3　これらの抗体による免疫沈降を行い、さらに抗ホスホチロシン抗体によるウエスタンブロットを行った。
4　マウス線維芽細胞 L929 の s-gicerin 及び l-gicerin 恒常発現細胞株を作成した。
5　これらの発現細胞の細胞凝集能を検討した。

［結果］

l-gicerin に特異的細胞内領域のアミノ酸配列のうち 2 ヵ所を特異的抗体作成のための抗原とした。MAP （多抗原性ペプチド）法によりこの 2 種類のペプチドを抗原としてウサギ抗体を作成した。この l-gicerin 特異抗体を用いてニワトリ砂嚢平滑筋のウエスタンブロットを行うと、gicerin の 82kDa, 90kDa のダブレットバンドのうち 90kDa のバンドのみが反応した（図 1）。さらにこの 90kDa のバンドが gicerin であることを確認するために、抗 gicerin 抗体及び抗 l-gicerin 抗体を用いた免疫沈降物を双方の抗

体によりウエスタンブロットを行った。その結果、l-gicerin 特異抗体が認識するのは 90kDa の gicerin であることが確認できた。さらに、l-gicerin 特異抗体により免疫沈降されるのは 90kDa の分子だけであることから、筋肉においては S-S 結合などの強固な結合によるダイマーは形成していないと思われる。また塩基配列から推定される l-gicerin は細胞内領域にチロシン残基を持つが、免疫沈降された gicerin は抗ホスホチロシン抗体と反応することから、このチロシン残基はリン酸化されていると思われる。l-gicerin, s-gicerin 発現細胞を用いて細胞凝集能について検討したところ、1時間内では有為な差は認められなかった（図2）。

［考察］

gicerin には細胞内ドメインの異なる2種類のサブタイプが蛋白質レベルで存在することが明らかになった。さらにこの2種類の gicerin (l-gicerin, s-gicerin) はそれぞれ 90kDa, 82kDa の分子量に相当するものであることが明らかになった。この2種類のサブタイプは細胞外領域は同一であり、細胞凝集能には有為な差は認められなかった。同じイムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白質でグリア細胞に発現している MAG (myelin assosiated glycoprotein) は gicerin と同様に細胞内領域の異なる2種類のサブタイプが存在している。l-MAG はリン酸化チロシンを持ち、最近非受容体型チロシンキナーゼと関係することが示されている。gicerin は神経細胞で発現しており、特に l-gicerin は細胞内情報伝達機構に深く関与していることが推察される。

Fig.1

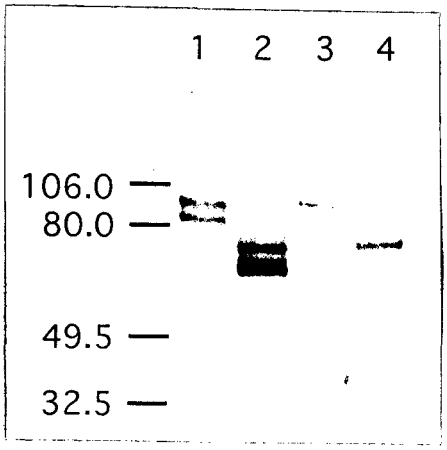


Fig.2

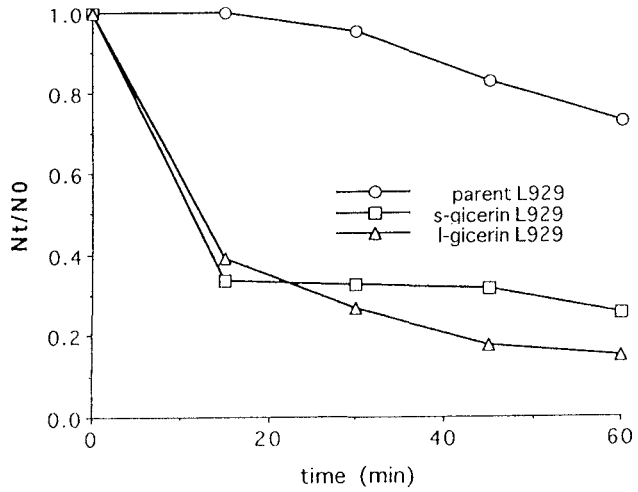


Fig.1 Western blot of gizzard extracts. lane 1, 3;gizzard extracts, lane 2,4; gizzard extracts digested by N-glycosidase F, lane1,2; anti-gicerin antibody, lane 3,4; anti-l-gicerin antibody.
Fig.2 Aggregation pattern of l-gicerin and s-gicerin expressing cells. N0; total particle number at time 0, Nt; total particle number at time t.

Reference
(1) Taniura H., Kuo C-H., Hayashi Y. and Miki N., (1991) J. Cell Biol., 112, 313
(2) Taira E., Takaha N. and Miki N., (1993) Neurosci. Res., 17, 1
(3) Taira E., Takaha N. Taniura H. Kim C-H and Miki N.,(1994) Neuron, 12, 861

32 レチノイン酸による神経細胞分化の分子機構

桃井　隆，東　真木子，小高　亜矢子，武笠　毅，中村　俊*
（国立精神神経セ神経研究所疾病５部，*診断研究部）

〔要約〕Ｐ１９細胞の神経細胞分化の過程をレチノイン酸処理と細胞凝集の二つの過程にわけ，それぞれの分子機構の解析をおこなった．レチノイン酸処理により神経特異的ｂＨＬＨ遺伝子であるＭＡＳＨ，ＮＳＣＬなどの遺伝子が発現するが，レチノイン酸単独では神経上皮細胞マーカーであるネスチン陽性であるが，ニューロフィラメントやＭＡＰ－２陽性の成熟神経細胞には分化しない．細胞凝集による細胞間接触の過程によりレチノイン酸処理したＰ１９細胞はニューロフィラメントおよびＭＡＰ－２陽性の成熟神経細胞へと分化するが，活性化ｒａｓを発現させると細胞凝集の過程なしにレチノイン酸処理したＰ１９細胞を成熟神経細胞へと分化させることが可能であった．一方，ｃ－ｊｕｎの発現はネスチン陽性の神経上皮細胞への分化に必要であるが，ｃ－ｊｕｎの過剰発現はＭＡＳＨ，ＮＳＣＬの発現を抑制し，細胞凝集や活性化ｒａｓの導入でも神経細胞へと分化することはなかった．

[目的]
我々はレチノイン酸受容体（ＲＡＲ），細胞内レチノイン酸結合タンパク（ＣＲＡＢＰ）がマウス9.5-10.5日胚の神経系にすでに発現しており，神経系形成に伴い著明な発現と分布の変化を示すこと，またステージ９のツメガエル胚外胚葉ではＣＲＡＢＰ，ＲＡＲが発現していることから，レチノイン酸（ＲＡ）が神経系形成に深く関与していることを明らかにしてきた．Ｐ１９細胞はレチノイン酸存在下に凝集状態で培養することにより神経細胞へと分化することから，レチノイン酸による神経細胞分化の機構を研究する上ですぐれたモデル系である．しかし，非凝集状態ではレチノイン酸単独では神経細胞へと分化しないことから，神経細胞分化における凝集過程が重要であるにもかかわらず，その解析が十分でないことが，神経細胞分化の分子機構の解析を困難にしている．われわれはＰ１９神経細胞分化の過程をレチノイン酸処理と凝集過程の二つの過程分離することにより，それぞれの過程における分子機構を解析することを可能にした．本研究ではレチノイン酸処理により特異的に発現するｂＨＬＨ遺伝子産物，ホメオボックス遺伝子産物，Ｊｕｎと神経細胞分化および細胞凝集によるｒａｓ活性化と神経細胞分化との関連について解析をおこなった．
[方法]
Ｐ１９神経細胞分化
0.5uMレチノイン酸でＰ１９細胞を２日間処理した後，レチノイン酸非存在下での凝集状態で２日間培養し，神経細胞へと分化させた．神経細胞への分化はネスチン，ニューロフィラメント（２００ｋＤａ），ＭＡＰ－２の抗体を用いて免疫染色法にて調べた．無処理のＰ１９細胞，レチノイン酸処理２日の細胞，神経細胞へと分化させた細胞を４％パラホルムアルデヒドで固定した後，各種抗体を用いて免疫染色した．反応の検出はアビジン・ビオチン法を用いておこない，パーオキシダーゼの活性をＤＡＢを基質として検出した．
ノーザンブロット解析
未分化，レチノイン酸処理したＰ１９細胞，神経細胞へと分化した細胞より，グアニジンチオシアネート法を用いてＲＮＡを抽出したのち，２０ｕｇＲＮＡをホルマリンアガロースゲルにて電気泳動後，ニトロセルロースフィルターに転写後，３２Ｐラベルした各種プローブをもちいて，ハイブリダイズし，シグナルを検出した．
[成績]
Ｐ１９細胞をレチノイン酸（0.5uM)と培養すると時間経過とともに神経細胞分化の転写調節に必要とされるＭＡＳＨ，ＮＳＣＬ，ＭＥＢなどのＢ－ＨＬＨ遺伝子が発現した（図１）。

組織非特異的Ｂ－ＨＬＨ遺伝子であるＭＥＢはＲＡ未処理でも発現していたが、マウス初期神経系に発現するＭＡＳＨは1nMレチノイン酸、６時間以内に発現が見られ、ＮＳＣＬは0.1uMレチノイン酸、４８時間で発現が観察された．しかし，レチノイン酸処理４８時間では，成熟神経細胞のマーカーであるニューロフィラメント、ＭＡＰ－２は発現しておらず、むしろ神経前駆体細胞（神経上皮細胞）のマーカーであるネスチンが発現していた。このレチノイン酸処理した細胞を凝集により，細胞間接触を促進させると４８時間以内に成熟神経細胞へと分化し、ニューロフィラメント、ＭＡＰ－２，などの神経細胞マーカーが発現した（図２）。一方，ｊｕｎ遺伝子をＰ１９細胞に発現させたＣ２Ｃ５細胞は形態はＰ１９細胞と著しく異なっており，すでにネスチン陽性の細胞へと分化していた．しかし，Ｐ１９細胞と異なり，神経細胞分化を誘導する条件下でもニューロフィラメント，ＭＡＰ－２陽性の成熟神経細胞へと分化することはなかった．Ｃ２Ｃ５細胞ではレチノイン酸処理によりＭＡＳＨやＮＳＣＬの発現は誘導されなかった．

次に，細胞凝集の分子機構について解析をおこなった．細胞凝集させるとｒａｓの活性化がおこることから，神経細胞分化におけるｒａｓと細胞凝集との関係について検討した．レチノイン酸処理したＰ１９細胞に活性化ｒａｓを発現させるか，ｒａｓを発現するＰ１９細胞をレチノイン酸処理すると，凝集させた場合と同様，ニューロフィラメントおよびＭＡＰ－２陽性の成熟神経細胞へと分化することが明かとなった．しかし，Ｃ２Ｃ５細胞にｒａｓを発現させても成熟神経細胞へと分化することはなかった．

[考察]

Ｐ１９細胞は凝集状態でレチノイン酸とともに培養すると神経細胞へと分化するが，レチノイン酸単独，および凝集だけでは神経細胞へは分化しない．本研究ではレチノイン酸処理により神経特異的ｂＨＬＨの発現が誘導され，ネスチン陽性の細胞に分化するが，レチノイン酸単独ではニューロフィラメントやＭＡＰ－２陽性の成熟神経細胞へは分化せず，成熟神経細胞への分化にはレチノイン酸処理の他，細胞間接触からの情報が必須であることが明かとなった．また，活性化ｒａｓは細胞凝集の過程を経ずしてレチノイン酸処理したＰ１９細胞を神経細胞へと分化させることが可能であることから，凝集による細胞間接触はｒａｓの活性化あるいはｒａｓの下流を活性化することにより，レチノイン酸処理したＰ１９細胞を神経細胞へと分化させることが明かとなった．また，ｃ－ｊｕｎを過剰発現するＣ２Ｃ５細胞はネスチン陽性であることから，ｃ－ｊｕｎの発現はネスチン陽性の神経上皮細胞への分化に必要なものの，その過剰発現はＭＡＳＨ，ＮＳＣＬなど神経特異的ｂＨＬＨ遺伝子の発現を抑制することにより，成熟神経細胞への発現が抑制されている可能性が示唆された．

図１　Ｐ１９およびＣ２Ｃ５細胞に発現するＢ－ＨＬＨ遺伝子

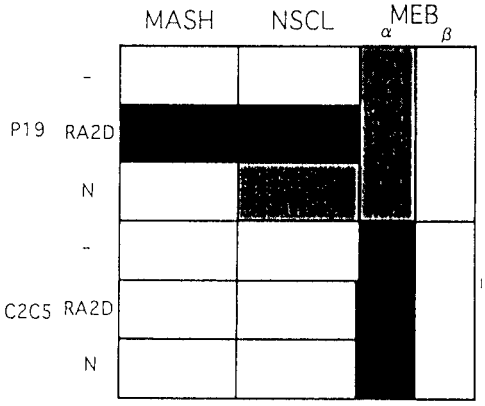
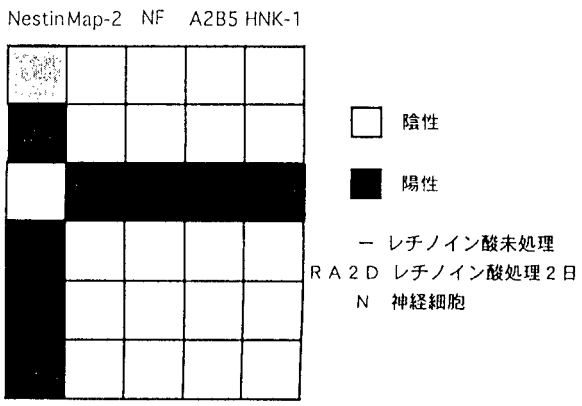


図２レチノイン酸によるＰ１９細胞の神経細胞への分化とマーカーの発現



33 ロイシンリッチリピート蛋白ファミリーの同定と発生過程神経系における発現

田口明彦、和中明生、森徹自、松本和政、今井祐二*、高木勉*、遠山正彌
(大阪大学　医学部　第二解剖、分子脳機構（田辺）寄付講座*)

〔要約〕

ショウジョウバエでは神経系形成時に接着因子の一つであるロイシンリッチリピート蛋白（LRR）スーパーファミリーが重要な働きをしていることが知られているが、哺乳類など高等動物においてはLRRスーパーファミリーが神経発生の過程で発現しているかどうかは不明であった。我々は今回ヒトLRR部分cDNAをプローブとしマウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、このファミリーに属する二つの新規なクローンを得、またそれらの発現パターンを検討するために in situ hybridization、Northern blottingを行い、その分布を検討した。このうち一種類は胎生期の神経系、軟骨組織などに強発現しその後徐々に発現が低下する傾向であったが、他方はほぼ神経系に発現が限局していた。以上の結果よりマウスの神経系の発生過程においてもLRR蛋白スーパーファミリーに属する蛋白群が発現し機能していることが示唆された。

神経回路網形成時の細胞認識に関しては細胞接着因子が重要な役割を持っている。胎生期における神経回路網形成は、おもにショウジョウバエやバッタで研究がなされているが、ロイシンリッチリピート蛋白（LRR蛋白）スーパーファミリーに属する接着因子 (connectin,slit.chaoptin等）のmutationの検討によりそれらの細胞接着因子が胎生期における形態形成において必須であることが示されている。LRR蛋白スーパーファミリーとはアミノ酸配列上ロイシンがある一定の周期をもって出現する蛋白であるが、酵母からヒトにいたるまで多く生物種で主に細胞外に存在しており、主に細胞－細胞相互作用に関係していると考えられている。本研究では神経回路網形成における基本的な機構は、種を越えて保存されていると考え、マウスにおけるLRR蛋白ファミリーの同定及びその発現に関して検討した。

方法

クローニングの方法として胎生１５日のマウスbrain cDNA libraryをスクリーニングした。プローブとしては、アメリカNIHのヒトbrain cDNA library sequencing project (1)で 報告された、LRR蛋白スーパーファミリーに属するSLITと、50%のホモロジーを持つクローン(EST06184)をプローブとし緩徐な条件下でプラークハイブリゼイションにて一次及び二次スクリーニングを行った。

得られた部分cDNAを鋳型としcRNAプローブを合成、胎生13,15,17,19日のマウス胎児およびadult brainにてmRNAの分布をRI in situ hybridizationで検討した。

また、成熟マウスの脳、心臓、肺、肝臓、小腸よりmRNAを抽出し、定法に従いNorthern blottingを行った。

結果

プラークハイブリゼイションの結果２つの独立したクローンA,Bが得られ塩基配列を決定したところそれぞれLRR構造を持つことが確認された。既知のものとのホモロジーがA,B共に核酸レベルで40%程度であった。クローンAはLRRスーパーファミリーに特徴的なcarboxy flanking regionとamino flanking regionを持つことが確認された。また、in situ hybridizationによる発現の検討では２つのクローンとも主に胎生期の神経系（脳、脊髄、dorsal root ganglion）および軟骨組織などに特異的に発現しており 、クローンAは胎生13日に最も強く発現し、その発現量および発現部位は徐々に縮小しadult brainでは海馬を中心に発現が見られるのみである。また、クローンBにおいては胎生13,15,17,19日で脳、脊髄にその発現が同じ程度見られ、adult brainでは海馬を中心に発現が見られた。

クローンAをプローブとしたadult臓器別のNorthern blottingでは約4Kbの位置に単一のバンドが認められ、脳に強く発現しその他の臓器では肺と腎臓に弱いシグナルを認めるのみであった。

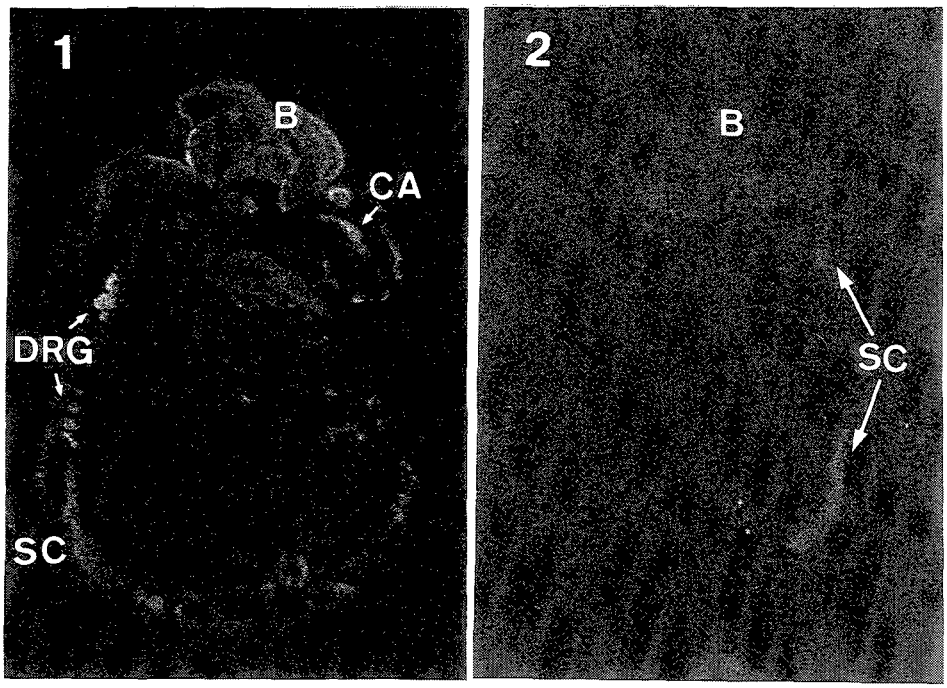
考察

本研究ではLRR構造を有する二種の新規のcDNAを得たが、それぞれ現在までに報告されているものとはホモロジーが低く、また、これらはたがいにホモロジーが高いことより、これらのLRRを持つ蛋白がファミリーを形成しているものと考えられる。我々はこの２種とは別にEST06238クローンをプローブとしてもう一種類の別のLRR蛋白も同定しており（本学会、谷口ら参照）このクローンも含めるとこのファミリーが多数のメンバーを持つことが考えられる。また、これらのLRR蛋白スーパーファミリーに属する蛋白がマウスの神経発生過程に発現することが確認されたことにより、哺乳類の神経系形成過程においてもショウジョウバエと同じくLRR蛋白が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

機能に関してはadhesion assay等を行っていないため不明であるが、今までに報告されている、LRRを持つ蛋白がほとんど細胞接着作用に関係していること、しかもin situ hybridizationにて胎生期神経系に強く発現していること等により、神経系の発生に何らかの関与をしていることが期待される。現在クローンAに関しては全長cDNAを取得しその全塩基配列を解析中であり今後細胞接着機能を含めこのファミリーの機能解析をおこなっていく予定である。

文献

(1)Adams.M.D. et al, (1993) Nature Genetics 4:373-380
(2)Adams.M.D. et al, (1993) Nature Genetics 4:256-267
(3)Allan L.et al (1988) Science 242:700-708
(4)Dhang B. et al (1993) Developmental Biology 160:315-322
(5)Hasimoto C. et al (1988) Cell 52:269-279
(6)Hickey M.J. et al (1989) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86:6773-6777
(7)Nose A. et al, (1992) Cell 70 :553-567
(8)Rothberg M.J. et al (1990) Genes and Development 4:2169-2187



マウス胎生15日におけるRI in situ hybridization
B:脳　CA:軟骨　DRG:後根神経節　SC:脊髄

図１　クローンA
脳、後根神経節、脊髄、軟骨などにmRNAの発現が見られる。

図2　クローンB
脳、脊髄などほぼ神経特異的にmRNAの発現が見られる。

34 LIM/homeodomain蛋白ファミリーに属する新規遺伝子のクローニングとその神経系における遺伝子発現

松本和政、和中明生、森徹自、田口明彦、遠山正彌
(大阪大学 医学部 第二解剖)

〔要約〕 我々はLIM/homeodomain蛋白ファミリーに属する新規遺伝子であるL3をRT-PCR法を用いて単離した。L3 mRNAは胎生中期においてはmedial ganglionic eminence と第一鰓弓由来の上顎および下顎に限局して発現が見られ、これらの領域の分化ならびに細胞系譜の規定に深く関与することが示唆された。胎生期神経系、特に前脳においては既知のファミリーメンバーとの間に相補的な発現が観察され、しかもそれぞれの発現部位が近年提唱されている前脳の分節構造と一致することから、このファミリーが各々の分節構造の分化に深く関わるものと考えられる。

＜緒言＞

LIM/homeodomain 蛋白（以下LH蛋白）ファミリーは、転写活性能を有するホメオドメインと、自身の転写活性能を調節する機能ドメインである２つのLIMモチーフから成る転写調節因子群である。ホメオドメインとは別に機能ドメインを有する転写調節因子ファミリーには、Pax遺伝子群、POU遺伝子群が挙げられるが、これらの遺伝子群の機能ドメインは自身の転写活性能をポジティブに調節するのに対し、LIMモチーフはネガティブに調節することが示唆されており、他のファミリーとは異なるユニークな転写調節メカニズムを有する。また、このファミリーは、線虫やショウジョウバエにおいて部位特異的な発現がみられ、細胞系譜の規定に関与することが報告されており、しかもメンバーの多くは神経系に発現していることから、神経系領域特異的な分化及び細胞系譜の規定に関与していることが予想される。現在までにクローニングされたこのファミリーに属する遺伝子は９種で、動物種も線虫からマウスに至るまで多岐に渡っており、Pax, POUファミリーのようにその遺伝子発現部位がお互いに相補的なのか、あるいはoverlapがあるのかも明らかではない。我々はマウスにおいてRT-PCR法を用いてLH 蛋白のファミリーメンバーの単離を試みたところ、新規遺伝子を含む数種のファミリーメンバーの単離に成功したので、in situ hybridization 法による胎生期神経系における遺伝子発現部位の結果とあわせてこれを報告する。

＜方法＞

新たなファミリーメンバーの単離方法としては、RT-PCR法を用いた。既知のファミリーメンバーで相同性の高い２番目のLIMモチーフ及びホメオドメインの塩基配列を基に変性プライマーを作製し、胎生14日齢マウス脳cDNAをテンプレートとしてPCRを行なったところ、およそ400bp, 600bp付近を中心に数本のバンドが認められたので、これらをサブクローニングしたのち、シークエンスを行なった。単離したファミリーメンバーのうち、新規の遺伝子と考えられるものについては、そのPCR産物のcDNAプローブを作製し、生直マウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、cDNAの全長を得ることを試みた。また、PCR法により得られた数種のファミリーメンバーについては、PCR産物を基にcRNAプローブを作製し、in situ hybridization法により発生過程神経系におけるそれぞれの遺伝子発現部位を検討した。

＜結果と考察＞

PCR法により得られた５つのクローンは、塩基配列よりその全てがLIMモチーフにおいて特異的に保存されているシステインやヒスチジン、およびホメオドメインのコンセンサス配列を有しておりこのファミリーのメンバー遺伝子であると考えられた。また、これらのクローンと既知のファミリー遺伝子の塩基配列を比較検討したところ、この５つのクローンは、既知のLH-2, isl-1, およびXlim-1のものが２種(ここではMXH-1, 2と名付けた）の計４種のマウスホモログと、既知のものとは相同性の低い新規遺伝子と考えられるもの１つから成ると考えられた（図１）。このうち、新規遺伝子については、その全長を得るために生直マウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、coding region の塩基配列を既知遺伝子と比較したところ、LIM モチーフ及びホメオドメインでは相同性が高いものの、それ以外の領域ではホモロジーが低いことが明らかとなった。我々はこの遺伝子をL3と名付けたが、L3の構造上の特徴としては、ホメオドメインとLIM モチーフの間の領域が他のメンバーに比して短いこと、およびホメオドメインの3' 側の領域にセリン、プロリンが豊富なこと、の２点が挙げられる。

次に我々は発生段階の発現の変動を検討する目的でNorthern blotを行なったところ、L3 mRNA の全長は約4kbで、胎生中期には既に強く発現しているもののその後発現が徐々に減弱することが示された。

胎生期神経系におけるL3の発現部位を検討するために、発現が強い胎生１０日目のマウス胎児を用いて in situ hybridization 法を行なったところ、L3の遺伝子発現部位は極めて限局されており、神経系では medial ganglionic eminence (MGE)の一部にのみ、それ以外では 第一鰓弓 由来の構造の一部である上顎と下顎に限局して発現が認められた（図２）。他にMGEと第一鰓弓に発現が認められるホメオボックス遺伝子としてはDlx-1,2 が挙げられるが、Dlx-1,2はMGEだけではなくその周辺の領域にも発現しており、また鰓弓 に関しても１番目だけではなく、２、３、４番目の鰓弓 にも発現しており、L3の発現部位はDlx-1,2と比較してもより限局したユニークなものであった。生直後およびadultのマウス脳においても、発現は減弱しているものの、対角帯核、マイネルト核などコリナージックニューロンが豊富な部位に引続き限局して発現しており、L3がこれらの部位の分化ならびに細胞系譜の維持に深く関与することが示唆された。

次に各ファミリーメンバーの遺伝子発現部位を比較したところ、概してLH-2は終脳胞を中心とする前脳に、MXH-1, 2は後脳、脊髄にその発現がみられた。さらに詳細に検討すると、間脳では、MXH-1の発現がepithalamus, ventral thalamus, hypothalamusに認められるものの、dorsal thalamusには発現がないのに対し、LH-2の発現はそのdorsal thalamusにのみ認められた。同様のことは中脳、MGEでも観察され、中脳では表層にLH-2、深層にMXH-1が、またMGEでは表層にLH-2が、それ以外の領域ではL3が発現しており、お互いに境界を接した極めて相補的な発現が明らかとなった。これらの発現部位は近年提唱されている前脳の分節構造とよく一致しており、これらのクローンが各々の前脳の分節構造の分化ならびにその細胞系譜の維持に深く関与していることが示唆された。

＜文献＞

Bourgouin, C. et al. Neuron (1992) 9: 549-561

Freyd, G. et al. Nature (1990) 344: 876-879

Karlsson, O. et al. Nature (1990) 344: 879-882

Michelsen, J.W. et al. Proc Natl Acad Sci USA. (1993) 90: 4404-4408

Taira, M. et al. Genes Dev. (1991) 6: 356-366

Thor, S. et al. Neuron (1991) 7: 881-889

Xu,Y. et al. Proc Natl Acad Sci USA (1993) 90: 227-231


```
VYHLNCFTCTTCNKMLTTGDHFGMKDSLVY--CRLHFEALLQ   LH-2(Rat)
VFHVNCFCCTVCHTPLTKGDQYGUUDALIY--CRTHYSIARE   Apterous(Drosophila)
VFHLNCFTCMMCNKQLSTGEELYIIDENKFV-CKEDYLNNNN   Xlim-1(Xenopus)
VFHIRCFQCSVCQRLLDTGDQLYIMEGNRFV-CQSDFQTATK   lin-11(C.elegans)
VFHVECHCCSLCGRHLSPGEQILVDDTWMTVSCMSHYPPQWD   mec-3(C.elegans)
VYHUECFRCVACSRQLIPGDEFALREDGLF--CRADHDVVER   isl-1(Rat)
VYHLSCFCCCVCERQLQKGDEFVLKEGQLL--CKGDYEKERE   lmx-1(Rat)
  :  :: :  :   :  :           :
  H  CF C  C   L  G           C              CONSENSUS
  :  :: :  :   :  :           :
VCHVNCFTCMMCNKQLSTGEELYIIDENKFG-CKEDYLSNXS   MXH-1
VYHWECFTCMVCNKQLSTGEELYVIDENKFV-CKDDYLSSSS   MXH-2
XCHIECFRCSVCSRQLLPGDEFSLREHELL--CRADFGLLLE   mls1-1
VYHVDCFACFSCKRQLSTGEEFALVEEKVL--CRVHFDCMLD   L3
VYHVECFTCTTCNKMLTTGDHFGMKDRLVY--CRLHFEALLQ   LH-2
```

図１　既知のLH蛋白(上段７種)及び今回PCR法で得られた５種のクローン(下段)の２番目のLIMモチーフにおけるアミノ酸アライメント。中段にコンセンサス配列を示す。



図２　胎生10日齢マウスにおけるL3の遺伝子発現部位。L3の発現部位はMGE(arrow)と上顎、下顎(arrowheads)に限局していた。

35 ephサブファミリーに属する新規リセプターチロシンキナーゼの遺伝子クローニングと神経系における発現

森徹自、和中明生、田口明彦、松本和政、遠山正彌
（大阪大学医学部第二解剖）

〔要約〕 ephサブファミリーに属するRTKは、神経系に比較的多く発現することがNorthern blottingにより知られ、神経系の発生に関与することが示唆されている。cDNAライブラリーのスクリーニングの結果、既知の遺伝子であるsek,elk,eckの３種類と新たな遺伝子esk(eph-related sensory neuron kinase)が得られた。発生過程のマウス組織においてin situ hybridiationを行って、遺伝子発現局在を比較したところ、この４クローンは非常に異なる発現パターンを示すことがわかった。eckを除く３者はいずれも神経系に広く発現していた。特にeskは感覚神経系（三叉神経節、内耳の感覚上皮、嗅上皮、後根神経節）に特異的に発現していた。発生中期以降の大脳皮質におけるsek,elk,eskの発現パターンの経時的変化を比較すると、この３者はelk,sek,eskの順により早期に分化したニューロンに発現し、機能していることが示唆された。eckは発生初期に神経系に発現ピークが見られるが、それ以降は肺、顎下腺、消化管上皮、腎臓などの神経系以外に発現が見られた。以上のことから、これらのRTKは構造上の類似という点で同じサブファミリーに分類されているが、神経系の形態形成に対して何らかの機能的役割分担があることが示唆された。

＜目的＞

細胞の増殖分化に重要とされているレセプターチロシンキナーゼ(RTK)は現在までに多数クローニングされ、いくつかのサブファミリーに分類されている。その中の一つにephサブファミリーがあり、PCR法などにより10数種類の遺伝子が存在していることが知られている（2-6）。これらはいわゆるorphan receptorであり，リガンドも，生理的機能も明らかではないが，現在までにNorthern blottingの解析によって発生過程の神経系に比較的強く発現していることが知られている．このことから，このサブファミリーメンバーは神経系の発生に重要な役割を担うことが考えられ，しかも生体内で最も複雑な神経系の発生にはもっと多くの未知なRTKが関与している可能性がある．そこで我々はこのサブファミリーに属する新規の遺伝子を同定するためにマウスcDNAライブラリーのスクリーニングをおこなった．また，得られた遺伝子の機能を探る目的で，組織における遺伝子発現の局在をin situ hybridization法により検討した．

＜方法＞

スクリーニングのプローブとして，このサブファミリーに特異的に保存されているアミノ酸配列をもとに，48merの変性オリヌクレオチドプローブを合成した．ラムダgt10に組み込まれた胎生10.5日のマウスcDNAライブラリーを弱い条件下でスクリーニングした．得られたcDNAフラグメントをもとにcRNAプローブを合成し，マウス胎児（E13.5,15.5,17.5）および生後７日（Ｐ７）とadultとして生後６週齢（６Ｗ）の脳においてin situ hybridizationを行った．

＜結果と考察＞

スクリーニングの結果，既知のelk,eckに対するマウスホモローグとsek，そして既知のＲＴＫとはアミノ酸レベルで約50％という低い相同性しか示さない１つの新規のクローンの合計４種類を得た．次に神経発生に対するこれらＲＴＫの機能を探るためにマウス胎児（胎生中期以降），および生後７日，６週齢のマウス脳における遺伝子発現局在を検討した．その結果，４種のRTKは非常に異なった発現パターンを示すことがわかった．特に今回得られた新規のクローンについては他の３種では発現が観察されなかった末梢感覚神経系の組織（三叉神経節，後根神経節，内耳の感覚上皮，嗅上皮）に特異的に発現が観察され，感覚神経系の発生に深く関与していると考えられる．よって，我々はこのクローンに対してesk(eph-related sensory neuron kinase)と一時的に命名した．中枢神経系における発現の推移としてはsek,eskは全段階で強く発現していたのに対し，elk,eckはそれぞれ胎生後期，中期に発現ピークが認められたという違いがあった．このうち，sek,elk,eskはＥ15.5からＰ７までの大脳皮質内における発現パターンは非常に対照的であった．Ｅ15.5では脳室周囲の未分化細胞層にはsekが，それに対してより表層の外套部分にはelkが比較的強く発現しているが，E17.5になるとsekの方がelkに対してより表層に発現の中心が移動していることが明らかになった．P7においてもこのような傾向は引き続きみられる．eskはsek,elkの両者に対して常に中間層に発現が強い．大脳皮質内の神経細胞はまず脳室周囲で分化した後，皮質表層へと移動し，層構造を形成することがよく知られている．この事実を考慮した場合，この３者は，elk,esk,sek

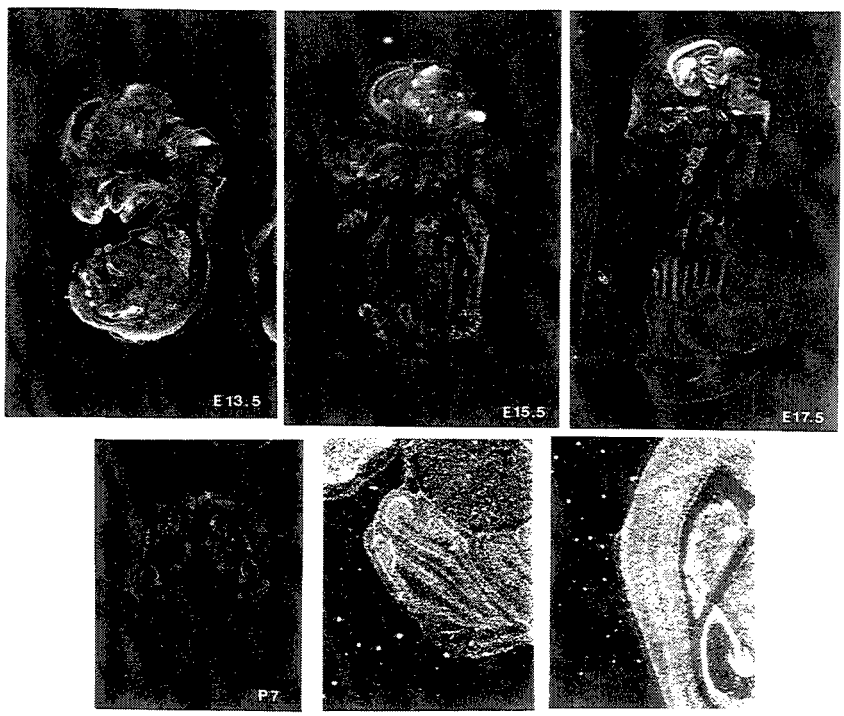
の順に早く分化した細胞に発現していることがわかり，神経細胞分化の時期の調節に関与している可能性がある．また小脳においてもsek,eskはPurkinje細胞層，elkは顆粒細胞層と，同一組織内でも全く異なる細胞集団に発現局在がある．eskが他と特に異なっている点は，胎生期に一過性に現れるsubplateに発現が認められたことであり，大脳皮質ニューロンと，視床などの下位のニューロンとのシナプス結合の調節に対して機能していることが予想される．

eckはE17.5以降になると神経系よりも肺，顎下腺，腎臓，消化管上皮に発現が強くみられる．eckはもともとepithelial cell kinaseとして，上皮組織に多く発現するRTKとして報告された．神経組織も，上皮組織も共に発生学的には外胚葉由来である．発生初期の神経系にeckの発現が観察されたことに対する考察の一つとして考えられることは，この時期の神経組織は分化が不完全で，上皮組織の性格を若干残しているのではないかということである．

以上のことから，４種類のＲＴＫは，その一次構造上おなじサブファミリーに分類されてはいるが，各々の遺伝子発現部位には明らかな局在があるため，何らかの機能的分担があると思われる．ごく最近、eckに対するリガンドとしてB61が報告された(1)。ephサブファミリーメンバーの細胞外ドメインにおいてシステイン残基がよく保存されていること、また、B61がsekなどにも非常に弱いながらも結合能力があることから、リガンドもまた1つのファミリーを形成している可能性がある。いずれにせよephサブファミリーRTKは神経系の発生，分化に深く関与していることは本研究の結果から明らかであり，そのリガンドも含めてこのサブファミリーは神経系の形態形成を研究する上で非常に重要であると考えられる．

＜文献＞

1) Bartley, T.D. Nature 368 (1994) 558-560.
2) Hirai, H. et al. Science 238 (1987) 1717-1720.
3) Gilardi-Hebenstreit, P. et al. Oncogene 7 (1992) 2499-506.
4) Lai, C. et al. Neuron 6 (1991) 691-704.
5) Lhotak, V. et al. Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 2496-502.
6) Lindberg, R.A. et al. Mol. Cell. Biol. 10 (1990) 6316-24.



esk mRNA のin situ hybridization
E13.5, E115.5, E17.5, P7, 及びP7の小脳と大脳皮質

36 ミクログリアのサブタイプの同定とその性質

澤田　誠、錫村　明生、田中　正彦、丸野内　棣
（藤田保健衛生大学・総医研・応用細胞、医学部・神経内科）

〔要約〕
マクロファージコロニー刺激因子を欠損するop/opマウスと正常マウスを比べてミクログリアの分析を行い、ミクログリアには少なくとも２つのサブタイプが存在することを見いだした。サブタイプのうち一方はM-CSFにより数が増大するのに対し、他方のグループはGM-CSF依存的に数が増大する事がわかった。op/opマウスでは前者が非常に少なく、培養系でM-CSFを補っても回復しなかった。免疫組織化学的検討からop/opマウス脳に存在するミクログリアは骨髄細胞特異抗体で染色されることがわかり、ミクログリアは他の臓器で見られる組織特異的マクロファージに比べ未分化な状態にあることが推定できる。今回の成績はミクログリアの起源やその脳内での役割の多様性の解明の糸口になるかもしれない。

ミクログリアは中枢神経系サイトカインネットワークの中心的な細胞であるばかりでなく、マクロファージ様の性質を持つことから中枢神経系では炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり、変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くと考えられている。ミクログリアの増殖や分化はいくつかのコロニー刺激因子により調節されることなどから、その起源はマクロファージと同様に間葉由来の単球系の細胞であると推定されているが、他の組織マクロファージとの起源や性質の違いなど詳しくは判っていない。我々は、大理石病モデルマウスのうちop/opの遺伝子型を持つものがマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF)を欠損するために成熟した単球-マクロファージを持たないことに着目し、脳内でのミクログリアの存在の有無やその性質を調べた。

[方法]
B6C3Fe-a/a-opの交配でえられる新生+/+, +/op, op/opの脳を用いて各個体での混合グリア培養によるミクログリアの性質の検討と分化に伴った脳内ミクログリアの免疫染色による検討を行った。各個体の遺伝子型はPCR-制限酵素切断法で同定した。混合グリア培養では無刺激、ミクログリアの増殖や活性化に関与することが判っているコロニー刺激因子類やインターロイキン類による刺激を行い色素法(CV法)や細胞数計測で調べた。また貪食細胞蛍光染色法でミクログリアを特異的に染色してFACSにより分析した。ミクログリアの免疫染色ではF4/80や骨髄細胞特異抗体を用いて染色した。

[結果]
op/op由来の混合グリア培養では正常動物で培養後10日から15日で見られるphase-bright round cell (PBRC) が全く見られなかった（図１）。しかしグリア細胞をトリプシン-EDTAで分解し非処理プラスチック培養皿への特異的接着で回収されるミクログリアは正常動物のものと変わらなかった。正常およびop/op由来の混合グリア培養を各種サイトカインで処理すると、IL2+LPSやIL4による増殖は両者で見られたものの、GM-CSF処理では増殖はするがPBRCの形態が異なり、またM-CSF処理ではop/opのPBRCが非常に少なかった。M-CSFにたいする応答性の減少はCV法でも確認できた。一方、FACSによる分析では正常動物においてfoword vs. light scatter (FS-90LS)の２次元展開で２つのグループに分類できることがわかった。このときop/op由来のミクログリアはそのうち一方が著しく減少していた（図２）。さらに１つのグループはM-CSFにより数

が増大するのに対し、他方のグループはGM-CSF依存的に数が増大した。免疫組織化学的検討ではop/opマウス脳に存在するミクログリアは骨髄細胞特異抗体で染色されることがわかった。

[結論]

今回の結果から脳内のミクログリアは少なくとも２つのサブタイプが存在することが明らかになった。その内の一方はGM-CSFにより増殖し、また骨髄細胞特異抗体で染色されることから、他の臓器で見られる組織特異的マクロファージに比べ未分化な状態にあることが推定できる。したがってミクログリアは、他の組織特異的マクロファージが骨髄で分化してから血流により各臓器へ移動するのとは異なり、さらに前の分化段階に、おそらくは個体発生の早い段階で造血系幹細胞が骨髄に移動するのと同時期に脳に移動したものではないかと考えられる。ミクログリアに２つのサブタイプが存在することの生物学的意義はまだわからないが、何らかの役割分担があると考え、現在サブタイプのそれぞれを精製して性質を比較したり、切片培養による解析で脳の中での役割を検討している。ところで前述のような多岐にわたるミクログリアの性質は、これまでのところ複数の性質を持つ異なる活性化状態があり、活性化因子の違いや活性化を受けるときのミクログリアの状態によって多種類の機能を発現すると考えてきた。これは単離精製したミクログリアが培養下で生体内で見られる形態や推定される性質をとることからも示唆されていた。しかし今回の成績によりサブタイプの存在が明らかになったため、ミクログリアの多様性について今までとは違った説明できるかもしれない。

[謝辞]　ミクログリアのFACS分析では藤田保健衛生大学総医研細谷弘美博士に、PCR-制限酵素切断法の分析では加藤景子さんにご協力いただきました。感謝いたします。

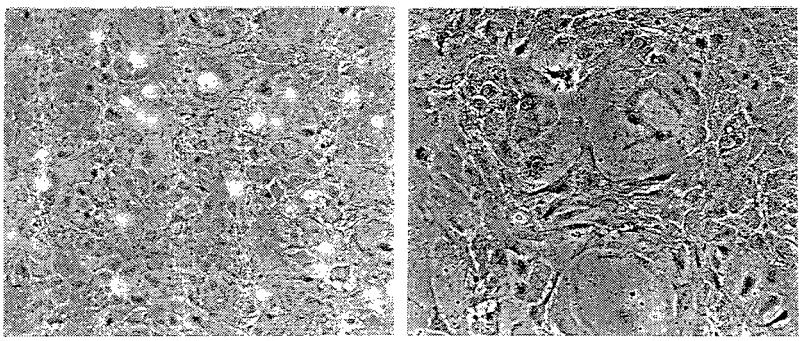


図１　培養１４日目の正常(左)およびop/op(右)の混合グリア培養の形態.

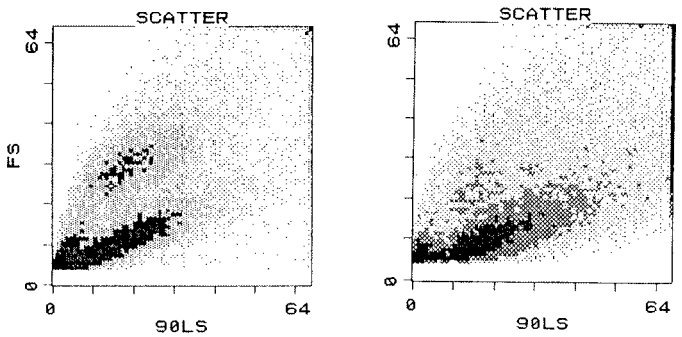


図２　FACSによるサブクラスの同定.正常(左)およびop/op(右)の二次元解析

37　ラット脳のＭＡＰ１キナーゼ活性について

藤井敏弘、渡辺正知、中村晶、近藤慶之
（信州大学　機能高分子）

【要旨】
ラット脳の微小管よりポリ-L-アスパラギン酸（PLAA）法で得られたMAP1画分中にMAP1を基質とするリン酸化酵素活性を見出した．このキナーゼ活性はMAP1のSer残基を、塩基性ポリペプチドの存在下で活性化された場合はThrもリン酸化した．ホスフォセルロースカラムクロマトグラフィーにおいて３つのピークに分かれた．基質特異性，薬物感受性などから２つはカゼインキナーゼⅠ，Ⅱ様であった．他のひとつはMAP1と共に溶出され、ホトアフィニティーラベルにおいてSDS-PAGE上６５ｋＤａのATP結合ポリペプチドが認められた．

【目的】
微小管付随タンパク質 MAP2はA-キナーゼ，CaMキナーゼ，C-キナーゼなどの多くのキナーゼによりリン酸化を受け、MAP2が持つ多種の生体高分子，細胞内オルガネラと相互作用のいくつかはリン酸化反応により調節を受ける．また、タウにおいてもそのリン酸化はチューブリン重合促進能やリン酸化タウがＰＨＦ主成分であることからその解明が進んできている (1)．一方、MAP1 (1A, 1B) はMAP2と同量近く脳微小管標品中に含まれており、heavy chain に加え２～３本の light chains から構成される複雑な分子であるが、機能に関する知見は以外と少ない (2)．本研究において、我々が開発したMAP1の分離方法で得られた画分にMAP1をリン酸化するキナーゼ活性を見出したので、これについて検討した．

【方法】
粗MAP1画分はラット脳からtaxolとPLAAを組み合わせた方法で得た (3)．MAP1及びキナーゼの部分精製はPLAA-Sepharose，phosphocellulose カラムクロマトグラフィーで行った．キナーゼ活性は5 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 1 μg/ml pepstatin, 6 μMないし 30 μM $[\gamma\text{-}^{32}P]$ATPを含む50 mM Mes buffer (pH 7) 中で反応させた．リン酸化反応はP-81フィルターを用いた固体支持法とSDS-PAGEとオートラジオグラフィーで測定した．

【結果と考察】
微小管，粗MAP1，粗MAP2画分を10 μM cAMPの有無の条件で内因性のキナーゼ活性を測定した (Fig. 1)．微小管と粗MAP2画分においてはcAMPにより活性化されるキナーゼが含まれているのに対して、粗MAP1画分にはcAMPに依存性がなく、MAP1を基質とするキナーゼ活性が含まれていた．６Ｍ尿素を含む5%ゲルで分析したところ、MAP1A, 1B ともにリン酸化を受けていた．そこで、このキナーゼをMAP1キナーゼと名付けた．微小管標品中にはA-キナーゼがMAP2と結合していることが以前より知られており、MAP1キナーゼ活性がA-キナーゼ活性により隠蔽されていたものと考えられる．MAP1キナーゼ活性は cGMP, Ca^{2+}, カルモデュリン, PS により影響を受けず、Mg^{2+} (10 mM), NaCl (100 mM) により５０～１００％程度の活性化が見られた．MAP1以外にMAP2, phosvitin をよい基質にし、MAP1のリン酸化は塩基性のタンパク質により活性化された．

PLAA-Sepharoseを用いてMAP1の精製を行ったところ、キナーゼ活性はMAP1と一致して溶出した．また、ゲルろ過における溶出においてもMAP1とほぼ一致したことから、このキナーゼはMAP1と結合していることが考えられた．PLAA-Sepharose溶出後のMAP1キナーゼを含むMAP1はphosphocellulose カラムクロマトグラフィーで３つのピークに分かれた (Fig. 2)．それぞれのピーク活性をP-1, P-2, P-3とし、各々のキナーゼの性質を検討した．P-1はMAP1の溶出とほぼ一致し、phosvitinよりもMAP1をよい基質とした．この活性はpoly-L-lysine, poly-L-arginine, protamine, histones により５～１０倍活性化され、ヘパリン感受性は低かった．P-2は phosvitinよりもcasein をよい基質として、histonesを全くリン酸化しなかった．10 μg/ml以上のpoly-L-lysineの添加ではむしろ阻害を受け、また、50 μg/mlのheparinで８０％程度、25 μM CKI-7で５０％以上の阻害を受けることからカゼインキナーゼⅠ様であった．P-3はcaseinよりもphosvitinをよい基質として、

histonesを全くリン酸化しなかった．Poly L-lysineで2～3倍活性化を受け、5 ng/ml以上のheparinで80%以上の阻害作用が示され高いheparin感受性が示唆された．また、合成基質(RRREEETEE) をリン酸化したことなどからカゼインキナーゼII様であった．

[α-^{32}P]8-Azido-ATPをP-1, P-2, P-3と混合しUV(254 nm) 照射後、SDS-PAGEとオートラジオグラフィーでATP結合タンパク質を分析したところ、P-1においてのみに65kDaのポリペプチドのラベル化が観察された．

MAP1をリン酸化するキナーゼとしてカゼインキナーゼが知られており、微小管と結合している可能性も報告されている(4)．MAP1BがPDPKsによりリン酸化を受けることも示唆されてきている(5)．本キナーゼの同定とリン酸化がMAP1機能に与える影響の検討が必要であり、さらに脳の発達過程でMAP1含量が著しく変動するため、MAP1キナーゼとの関係が注目される．

【文献】

1. 藤井敏弘 (1994) 薬学雑誌 114, 435-447
2. Langkopf, A., Hammarback, J.A., Muller, R., Vallee, R.B. and Garner, C.C. (1992) J. Biol. Chem., 267, 16561-16566
3. Fujii, T., Nakamura, A., Ogoma, Y., Kondo, Y. and Arai, T. (1990) Anal. Biochem., 184, 268-273
4. Diaz-Nido, J., Serrano, L., Mendez, E. and Avila, J. (1988) J. Cell Biol., 106, 2057-2065
5. Ulloa, L., Avila, J. and Diaz-Nido, J. (1993) J. Neurochem., 61, 961-972

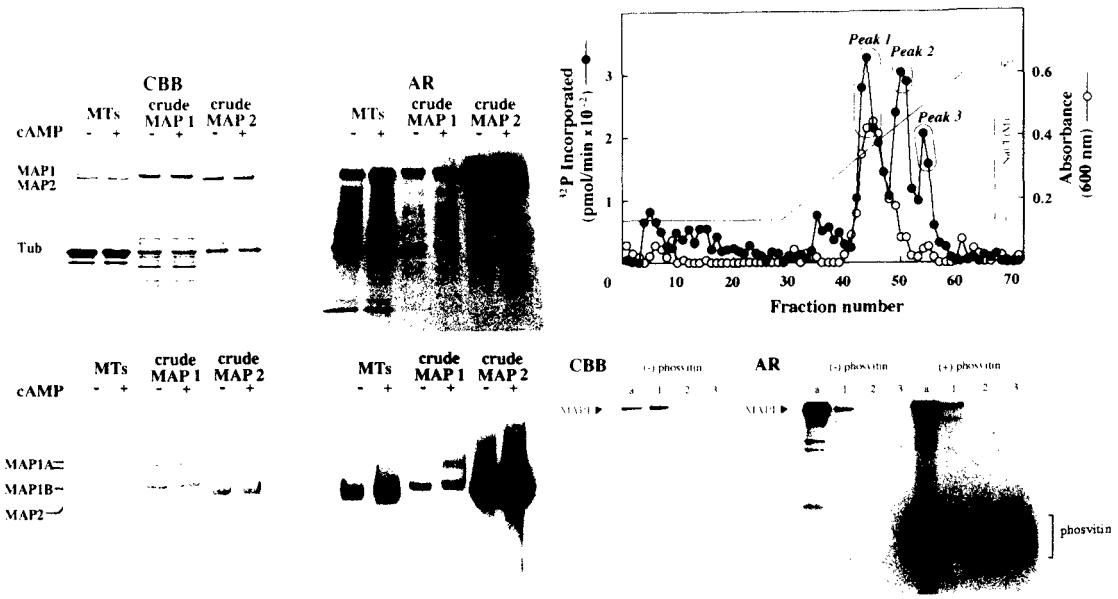


Fig. 1. Phosphorylation of Microtubule Proteins by Endogenouse Kinase(s)

Microtubules, crude MAP1 and crude MAP2 obtained from rat brain were incubated with 30 μM [γ-^{32}P]ATP for 5 min at 37℃. The samples were subjected to SDS-PAGE on 5-20% or 5% polyacrylamide gel in 6 M urea. Proteins were visualized by Coomassie staining (CBB), and phosphoprotein by autoradiography (AR).

Fig. 2. Chromatography of Pure MAP1 Fraction on Phosphocellulose

MAP1 from PLAA-Sepharose column chromatography was applied on a phosphocelluose column. Fractions were collected and analyzed for protein (○). MAP1 kinase activity was assayed with phosvitin (●). Fractions 43-45, 50-51 and 54-55 were named P-1, P-2 and P-3, respectively. Applied samples (a), P-1, P-2 and P-3 were phosphorylated with (+) or without (-) phosvitin. Proteins were visualized by Coomassie staining (CBB), and phosphoproteins by autoradiography (AR).

38　タウのリン酸化・脱リン酸化と脳ｃｄｃ２様キナーゼ／ｃｄｋ５

久永真市、岸本健雄　（東工大、生命理工）

［要約］
タウ蛋白のin vivoにおけるリン酸化について調べるため以下の二種の実験を行った。(1)ブタ脳粗抽出液中におけるタウのｃｄｋ５によるリン酸化、(2)ラット脳培養神経細胞におけるタウのリン酸化。これらの実験から次のことが示唆された。ｃｄｋ５によるタウのリン酸化部位の一つはＳｅｒ２３５であるが、この部位は胎児と成熟ラットでリン酸化状態が異なっていた。脳抽出液中ではオカダ酸感受性と非感受性のプロティンフォスファターゼ（ＰＰａｓｅ）がこの部位を脱リン酸化した。培養神経細胞をオカダ酸処理するとタウの電気泳動度が減少し、タウ１との反応性が失われた。Ｃａイオノフォアで処理すると電気泳動度は増加したが、Ｓｅｒ２３５の脱リン酸化は見られなかった。In vivoでのタウのリン酸化はリン酸化部位毎に異なるキナーゼ・ＰＰａｓｅが働き複雑に制御されているようである。

［目的］
タウは神経軸索に主に存在する熱安定性の微小管結合蛋白である。タウの異常リン酸化はアルツハイマー病患者脳内のＰＨＦ形成と関連し、多くの関心を集めている。また、タウのリン酸化は微小管重合能とも関連した重要な問題でもある。近年、タウを基質とする多くのプロティンキナーゼ（ＰＫ）やプロティンフォスファターゼ（ＰＰａｓｅ）が報告されている[1]。しかし、in vivoにおけるタウのリン酸化状態やそれに関わるＰＫやＰＰａｓｅについては解っていないことが多い。昨年度、我々はニューロフィラメント蛋白をリン酸化するキナーゼを精製し、それが脳ｃｄｃ２様キナーゼ／ｃｄｋ５であること、及び、ブタ脳粗抽出液中の主要なタウキナーゼであることを述べた[2,3]。本大会ではよりin vivoに近い条件でのタウのリン酸化・脱リン酸化について検討を加えたのでその結果について報告する。

［方法］
ｃｄｋ５はブタ脳より脱リン酸化したニューロフィラメント蛋白を基質にして精製した[2]。タウはＩｑｂａ１等の方法に従って、微小管蛋白を低ｐＨで熱処理することにより単離した[4]。タウの脱リン酸化は６７°Ｃでアルカリフォスファターゼ処理により行った。タウのリン酸化は^{32}Ｐの取り込み、または、リン酸化状態を識別する抗体によるブロッティングで調べた。抗体は主にタウ１（ヒトタウの最も長いアイソタイプのＳｅｒ１９９とＳｅｒ２０２の脱リン酸化型を認識する）とＳＭＩ３３（脱リン酸化型Ｓｅｒ２３５を認識する）を用いた[5]。

［結果］
ブタ脳粗抽出液中のタウのリン酸化の大部分はｃｄｋ５によることが、ｃｄｋ５の阻害剤であるブチロラクトンＩを用いた実験より示されている。しかし、粗抽出液中のタウをｃｄｋ５でリン酸化しても、ｃｄｋ５のリン酸化部位であるＳｅｒ２３５のリン酸化は観察されなかった。プロティンフォスファターゼ１（ＰＰ１）と２Ａ（ＰＰ２Ａ）の阻害剤であるオカダ酸存在下では、一時的

にリン酸化されるようになることから（図1）、脳抽出液中にはＳｅｒ２３５を脱リン酸化できるオカダ酸感受性と非感受性のＰＰａｓｅが存在すると思われた。

ラット胎児脳タウのＳｅｒ２３５はＳＭＩ３３とは反応せず、リン酸化状態にあることが示された。胎児脳神経培養細胞をオカダ酸処理するとタウの電気泳動度が減少し、タウ１抗体と反応しなくなった（図２Ａ）。また、Ｃａイオノフォアで処理すると電気泳動度が増加した（図２Ｂ）。サイクロスポリンでこの移動度の変化が阻害されることから、カルシニューリン（ＰＰ２Ｂ）の関与が考えられた。しかし、いずれの処理でもＳＭＩ３３との反応性は現れなかった。

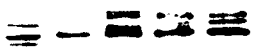
［考察］

In vivoにおけるタウのリン酸化はリン酸化部位により異なったＰＫとＰＰａｓｅにより制御されている複雑な系である。タウ１の認識するＳｅｒ１９９とＳｅｒ２０２はオカダ酸感受性のプロティンフォスファターゼにより通常は脱リン酸化状態に保たれている。タウ１との反応性の消失にはｃｄｋ５は直接は関与していないようであった。ＳＭＩ３３で識別されるＳｅｒ２３５はラットの週令によりリン酸化状態が異なっていた。ラット胎児脳初代神経培養細胞内ではこの部位はオカダ酸感受性のＰＰａｓｅによっても、ＰＰ２Ｂによっても脱リン酸化されないようであった。ただし、ＰＰ２Ｂはタウの電気泳動度に影響を与える別のリン酸化部位の脱リン酸化に関わっているようであった。

［参考文献］

(1)長谷川成人 (1993) 生化学, 65, 469-473. (2) Hisanaga,S., et al., subumitted. (3) Hosoi,T., et al., submitted. (4) Grundke-Iqbal,I., et al., (1986) J.Biol.Chem. 261, 6081-6089. (5) Lichtenberg-Kraag,B., et al., (1992) Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 89, 5384-5388.

図1　A



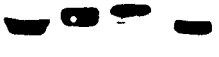
1　2　3　4　5

B



1　2　3　4　5

図2　A



1　2　3　4　5　6

B



1　2　3　4

図1　ブタ脳粗抽出液中でのタウＳｅｒ２３５のリン酸化に対するオカダ酸の影響。ブタ脳粗抽出液を１０ｕＭオカダ酸存在下（Ｂ）、非存在下（Ａ）で１ｍＭＡＴＰを加え、３７°Ｃでインキュベートした。タウのＳｅｒ２３５のリン酸化状態はＳＭＩ３３を用いたブロッティングで調べた。

図2　ラット胎児脳培養神経細胞内でのタウのリン酸化におよぼすオカダ酸とＣａイオノフォアの影響。（Ａ）、１００ｎＭオカダ酸、未処理（１、４）、３０分（２、４）、６０分（３、６）処理。（Ｂ）５ｕＭＡ２３１８７、未処理（１、３）と３０分処理（２、４）。但し、レーン４はサイクロスポリン存在下。（Ａ）の１－３はヒトタウ抗体、（Ａ）の４－６と（Ｂ）はタウ１によるブロッティング。

39 プロリン指向性蛋白質燐酸化酵素によるMARCKS燐酸化反応

山本秀幸、荒金　太、久永真市*、福永浩司、岸本健雄*、宮本英七
(熊本大学医学部・第一薬理、*東京工業大学・生命理工)

〔要約〕

cdc2 キナーゼと tau protein kinase II (TPKII) は未成熟脳に多く、神経細胞の細胞質にも存在することが知られている。今回、細胞質内における cdc2 キナーゼと TPKII の生理機能を明らかにする目的で基質蛋白質の同定を試みた。生後1日目のラット脳細胞上清分画と cdc2 キナーゼあるいは TPKII で燐酸化反応を行なうと SDS-PAGE で分子量約8万 (80K 蛋白質) と約 4.6万 (46K 蛋白質) の二種類の蛋白質が強く燐酸化を受けた。80K 蛋白質は熱安定性であり、プロテインキナーゼC (PKC) でも燐酸化を受け、Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate (MARCKS) であることが示唆された。ラット脳より精製した MARCKS は 80K 蛋白質と同一の分子量を示し、cdc2 キナーゼにより MARCKS 1モル当たり約5モル、TPKII により約3モルの燐酸が取り込まれた。cdc2 キナーゼと TPKII による燐酸化部位は PKC による燐酸化部位とは異なっていた。さらに、PKC による MARCKS の燐酸化反応は MARCKS とカルモデュリンとの結合を阻害し、cdc2 キナーゼと TPKII による燐酸化反応は本結合を増強した。これらの結果は神経細胞内の細胞質の cdc2 キナーゼと TPKII の主要な生理機能の一つが MARCKS の機能の調節であることを示唆している。

cdc2 キナーゼは未成熟脳の神経細胞の細胞質と核内に存在することが知られている (1)。また、cdc2 キナーゼの類似酵素である TPKII は成熟脳の細胞質より分離精製されたが、未成熟脳で、より多く発現していることが報告された (2)。今回、両酵素の細胞質内での生理機能を明らかにする目的で、未成熟脳の細胞質に多く存在する基質蛋白質の同定を試みた。

〔方法〕

ラット脳より、MARCKS (3)、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) (4)、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (5)、PKC (6)、蛋白質脱燐酸化酵素2Aのホロ酵素 (2Ah) (7)、カルシニューリン (8)、牛脳より蛋白質脱燐酸化酵素2Aの触媒サブユニット (2Ac) (7)、豚脳より TPKII (9)、ヒトデ卵母細胞より cdc2 キナーゼ (9) を精製した。燐酸化反応 (10)、脱燐酸化反応 (8) は既報の方法、^{125}I-カルモデュリンとの架橋実験は Graff らの方法 (11) によりおこなった。

〔結果及び考察〕

細胞上清分画中の基質蛋白質の同定：生後一日目と成熟ラット脳をホモジナイズ後、100,000 g で 20 分間遠心して細胞上清分画を分離した。細胞上清分画を 60℃で5分間処理した後、各種燐酸化酵素での燐酸化反応を検討した。cdc2 キナーゼにより数種類の蛋白質の燐酸化が認められた。これらの中で、分子量約8万 (80K 蛋白質) と約 4.6 万 (46K 蛋白質) のみが成熟脳に比べて、一日目の脳に、より多量に存在した。PKC と TPKII によっては、80K 蛋白質と 46K 蛋白質のみが強く燐酸化された。CaM キナーゼII と cAMP 依存性プロテインキナーゼでは両蛋白質は燐酸化されなかった。細胞上清分画を 100℃で3分間処理後、遠心し、熱安定性蛋白質を分離した。両蛋白質は上清に回収された。ラット脳より MARCKS を精製し、cdc2 キナーゼと TPKII による燐酸化反応を 80K 蛋白質と比較した。a) MARCKS は 80K 蛋白質と同一の分子量を示した。b) MARCKS と 80K 蛋白質は PKC によりセリン残基が、cdc2

キナーゼと TPKII によりセリンとスレオニンの両残基が燐酸化された。c) 各種酵素での燐酸化後の V8 プロテアーゼによる一次元ペプチドマップでは MARCKS と 80K 蛋白質のペプチドマップが一致した。さらにいずれの酵素によるペプチドマップもほぼ同様のパターンを示した。これらの結果より 80K 蛋白質が MARCKS であることが明らかとなった。

MARCKS の cdc2 キナーゼと TPKII による燐酸化反応：PKC、cdc2 キナーゼ、TPKII による 30分間の燐酸化反応により、MARCKS 1 モル当たりそれぞれ、5.7、4.9、3.4 モルの燐酸が取り込まれた。cdc2 キナーゼと TPKII による MARCKS 燐酸化反応と PKC による燐酸化反応とでは以下の点で異なっていた。a) トリプシン処理後の二次元ペプチドマップは異なったパターンを示した。b) PKC による MARCKS 燐酸化反応は過剰のカルモデュリンにより約 70%が抑制された。cdc2 キナーゼと TPKII による MARCKS 燐酸化反応は約 30%しか抑制されなかった。c) PKC により燐酸化された MARCKS は 2Ah と 2Ac で強く脱燐酸化された。cdc2 キナーゼと TPKII により燐酸化された MARCKS は 2Ah でのみわずかに脱燐酸化された。カルシニューリンは MARCKS を脱燐酸化しなかった。d) MARCKS とカルモデュリンの結合を架橋実験により検討した (図1)。PKC による燐酸化により結合はコントロールの約 11%に抑制された。cdc2 キナーゼと TPKII による燐酸化により結合は約 130%に増強された。

これらの結果より MARCKS が cdc2 キナーゼと TPKII の良好な基質であり、両酵素と同様に未成熟脳の細胞質分画に多いことが示された。V8 プロテアーゼによる一次元ペプチドマップが PKC とほとんど変わらないことから、cdc2 キナーゼと TPKII による燐酸化部位もカルモデュリンやアクチンとの結合部位の近傍にあると考えられる。実際に本部位の近傍にはセリン、プロリン配列とスレオニン、プロリン配列が存在する。これらの結果は cdc2 キナーゼと TPKII が MARCKS の燐酸化を介してカルモデュリンやアクチンの機能を変化させ神経細胞の発達に関与していることを示唆している。

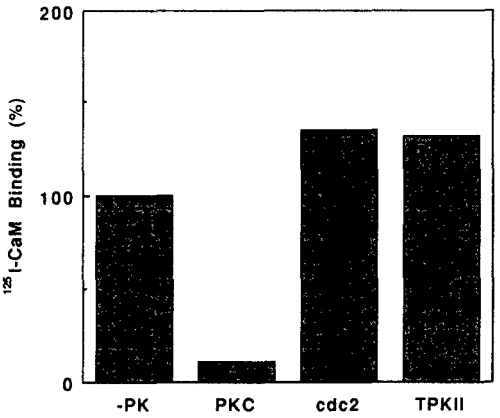


図1. MARCKS 燐酸化反応のカルモデュリンとの結合に対する影響

精製した MARCKS を各種の酵素で燐酸化した後、^{125}I-カルモデュリンとの結合実験を行なった。4 回の実験の代表例を示す。

〔文献〕

1) Okano H.J., Pfaff D.W. and Gibbs R.B. *J. Neurosci.* **13**, 2930-2938 (1993).
2) Kobayashi S., Ishiguro K., Omori A., Takamatsu M., Arioka M., Imahori K. and Uchida T. *FEBS Lett.* **335**, 171-175 (1993).
3) Patel J. and Kligman D. *J. Biol. Chem.* **262**, 16686-16691 (1987).
4) Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K. and Miyamoto E. *J. Neurochem.* **39**, 1607-1617 (1982).
5) Miyamoto E., Petzold G.L., Kuo J.F. and Greengard P. *J. Biol. Chem.* **248**, 179-189 (1973).
6) Wooten M.W., Vandenplas M. and Nel A.E. *Eur. J. Biochem.* **164**, 461-467 (1987).
7) Yamamoto H., Saitoh Y., Fukunaga K., Nishimura H. and Miyamoto E. *J. Neurochem.* **50**, 1614-1623 (1988).
8) Goto S., Yamamoto H., Fukunaga K., Iwasa T., Matsukado Y. and Miyamoto E. *J. Neurochem.* **45**, 276-283 (1985).
9) Hisanaga S., Ishiguro K., Uchida T., Okumura E., Okano T. and Kishimoto T. *J. Biol. Chem.* **268**, 15056-15060 (1993).
.0) Yamamoto H., Fukunaga K., Lee K. and Soderling T.R. *J. Neurochem.* **58**,1110-1117 (1992).
.1) Graff J.M., Young T.N., Johnson J.D. and Blackshear P.J. *J. Biol. Chem.* **264**, 21818-21823 (1989).

40 海馬長期増強における Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの内在性基質

福永浩司，D. Muller*，宮本英七
熊本大・医学部・第一薬理，*ジュネーブ大・医学部・薬理

〔要約〕

あらかじめ ^{32}P-燐酸でインキュベートして細胞内ATPプールをラベルした海馬切片を用いて，LTP誘発後のCA1領域におけるCaMキナーゼIIの自己燐酸化反応と内在性基質の燐酸化反応について検討した．CA1錐体細胞への入力線維を両側性に高頻度刺激するとLTPが発現する．LTP誘発後1時間においてCaMキナーゼIIのαとβサブユニットへの燐酸の取り込みはコントロール（低頻度刺激）の125～135％に上昇した．同様の条件で，前シナプスでの本酵素の基質であるsynapsin Iへの^{32}P-燐酸の取り込みは131％に上昇した．一方，後シナプスでの基質であるMicrotubule-associated protein 2 (MAP2)の燐酸化反応は115％に上昇した．NMDA受容体阻害剤であるAP5でLTPの発現を阻害するとCaMキナーゼII，synapsin IおよびMAP2のin situでの燐酸化反応の亢進は完全に消失した．これらの結果はCaMキナーゼIIはLTP誘発に伴ってシナプス前，後の両部位において活性化され，シナプス可塑性の発現に関与することを示している．

【目的】

海馬のシナプス長期増強発現，維持にはシナプス前部，後部においてプロテインキナーゼが重要な役割を果たしている．なかでもCaMキナーゼII (1)とプロテインキナーゼC (2)のCa^{2+}非依存性活性がLTP誘発に伴って，上昇することが知られている．しかしながら，これらのプロテインキナーゼの標的分子は不明であり，LTP発現の分子機構は解明されていない．本研究では^{32}P-燐酸でラベルした海馬切片を用いて，in situでの燐酸化反応を解析することにより，CaMキナーゼIIの標的分子ならびにそれらの燐酸化反応のシナプス可塑性との関わりについて検討した．

【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 (3)に従った．海馬切片をあらかじめ^{32}P-燐酸とインキュベート後，^{32}P-燐酸存在下でCA1を両側性に高頻度刺激 (HFS)あるいは低頻度刺激 (Control)した．刺激後1時間でCA1錐体細胞層をパンチアウトして，液体窒素にて凍結した．Triton X-100，プロテインホスファターゼおよびプロテア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．抽出液の一部を用いて，蛋白定量，および全蛋白質への^{32}P-燐酸の取り込み量を測定した．等量の蛋白質を含む細胞抽出液から，CaMキナーゼII，synapsin I，MAP2の特異的抗体を用いて，^{32}P-CaMキナーゼII，^{32}P-synapsin I，^{32}P-MAP2を免疫沈降させ，それぞれの蛋白質への^{32}P-燐酸の取り込み量をバイオイメージアナライザーにて定量した(4)．結果はコントロール刺激の切片から得られた値を100%として割合 (%)で表わした．

【実験結果と考察】

CaMキナーゼIIはN末端より286番目のスレオニン残基の自己燐酸化反応によりCa^{2+}非依存性に変わる．私達は海馬CA1のLTP誘発に伴ってこのCa^{2+}非依存性活性とCa^{2+}／カルモデュリン依存性活性(全活性)が上昇することを報告した (1)．最初にCa^{2+}非依存性活性の上昇が自己燐酸化反応を介して起こ

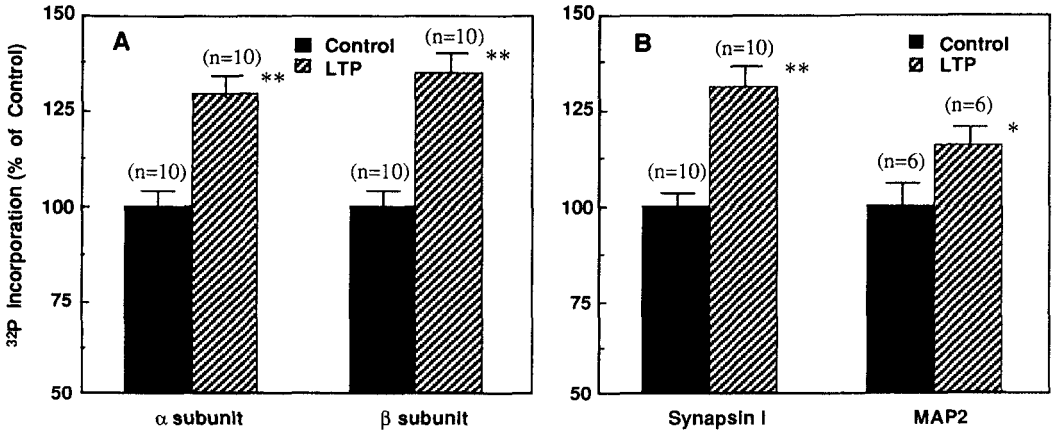


図1、海馬長期増強 (LTP) に伴う CaM キナーゼ II の自己燐酸化反応 (A) および Synapsin I, MAP2 の燐酸化反応 (B) の亢進。図の ( ) 内は例数を示す。*, $p< 0.05$; **, $p< 0.01$

ることを確認するために in situ での CaM キナーゼⅡへの ^{32}P-燐酸の取り込みを調べた．コントロール群，高頻度刺激群で全蛋白質への ^{32}P-燐酸の取り込み量には差は見られなかった．しかしながら，CaM キナーゼⅡのαとβサブユニットへの ^{32}P-燐酸の取り込み量は各々，128%，134% と有意に増加していた (図 1A).

synapsin I はシナプス前部に局在する蛋白質で神経伝達物質の放出を調節している．一方，MAP2 は樹上突起，スパインなどのシナプス後部に主に存在している．両者は in vitro では CaM キナーゼⅡの良い基質である．そこでLTP 誘発後に CA1 におけるこれらの基質の in situ での燐酸化反応を調べた．CaM キナーゼⅡの自己燐酸化反応と同様に，LTP 誘発に伴って，synapsin I，MAP2 への ^{32}P-燐酸の取り込みはそれぞれ，131%，115% と有意に増加していた (図 1B)．さらに，synapsin I に関して一次元のペプチドマップを行ない，CaM キナーゼⅡの燐酸化部位である site 2 のへの ^{32}P-燐酸の取り込みが上昇していることを確認した．NMDA 受容体阻害剤である AP5 で海馬切片を処理すると LTP の発現は完全に阻害された．同時に CaM キナーゼⅡ，synapsin I，MAP2 への in situ での燐酸化反応の亢進も完全に消失した．このことはこれらの燐酸化反応の亢進が LTP 発現に伴って起こる特異的な反応であることを示している．

本研究では，synapsin I の燐酸化反応をモニターすることによって，シナプス前部において CaM キナーゼⅡの活性が LTP 誘発に伴って上昇していることを明らかにした．特に，この synapsin I の燐酸化反応の亢進が NMDA 受容体阻害剤で完全に阻害されることから，CaM キナーゼⅡのシナプス前部での活性化反応に逆行性伝達物質が関与する可能性が示された．この synapsin I はシナプス可塑性発現における CaM キナーゼⅡの標的分子のひとつであると考えられる．さらに，シナプス後部において MAP2 の燐酸化反応が亢進することを合わせて考えると，シナプス前，後の両部位において高頻度刺激に伴って CaM キナーゼⅡは活性化され，シナプス可塑性の発現に関与していると考えられる．

【文献】

1) Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E. & Muller, D. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 7863-7867.

2) Klann, E., Chen, S. J. & Sweatt, J. D. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 24253-24256.

3) Dunwiddie, T. & Lynch, G. (1978) *J. Physiol.* 276, 353-367.

4) Fukunaga, K., Soderling, T. R. & Miyamoto, E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 22527-22533.

41 Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase V における燐酸化反応とその活性調節機構

太田 英正、杉田 竜太郎 、伊藤 直史、望月 秀雄、日高 弘義
（名古屋大学・医・薬理）

〔要約〕

Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase （以下 CaM kinase ）は、記憶、神経伝達物質の放出や遺伝子発現への関与が示唆されている。我々は、新しい CaM kinaseであるCaM kinase V を発見しその酵素学的性質を研究してきた。CaM kinase Vは、brain extract の多くの蛋白質を燐酸化することによりCaM kinase II や CaM kinase IV と同様に多機能性の CaM kinase であると考えられている。CaM kinase V には、分子間反応によりCa^{2+}/calmodulin 依存性の自己燐酸化反応を受けながらその酵素活性を上昇させる独特な活性制御機構を認める。またCaM kinase V をその自己燐酸化部位 にて燐酸化し活性化させる新しい CaM kinase による活性調節機構も存在することが示唆された。

＜方法＞

酵素活性測定は合成ペプチドである syntide-2の燐酸化反応により測定した。また自己燐酸化反応はsyntide-2 を加えずSDS-PAGEにて分離した後 autoradiogram (Fujix BAS 2000 system)にて測定した。

＜結果及び考察＞

CaM kinase Vの自己燐酸化と酵素活性の変化を経時的に測定した（Fig. 1）。自己燐酸化と酵素活性は同様な曲線を示すことによりその酵素活性は分子間反応に依存していると考えられる。またCa^{2+}非存在下では自己燐酸化も酵素活性の上昇も見られず、自己燐酸化させた後EGTA を加えると酵素活性は見られなくなる。即ちCaM kinase V は Ca^{2+}/calmodulin 非存在下で自己燐酸化活性を持たず、その点でCaM kinase II 及びCaM kinase IV とは異なる。またCaM kinase V の精製の過程にて発見されたその活性を上昇させるactivation factor（以下activator）の効果を示す（Fig.2）。そのactivator により酵素活性は約20倍に上昇した。activator による CaM kinase V の燐酸化反応を autoradiogram にて示す (Fig.3)。CaM kinase V の自己燐酸化のバンドが同定しえない条件下においてactivator を加えると41kDaと64kDaに燐酸化バンドを認めた。64kDaのバンドは activator のみでも認められ、それは activator の自己燐酸化に由来すると考えられる。またCaM kinase V をあらかじめ放射活性のないATPにて十分に自己燐酸化させた後 activatorを加えた時にはそれ以上の燐酸化をうけない。以上のことから activator はCa^{2+}存在下で CaM kinase V をその自己燐酸化部位にて燐酸化し、その活性を上昇させる新たなCaM kinase であると考える。また activator は CaM kinase IV の活性も上昇させるため、新しいCaM kinase kinaseであることが示唆された。

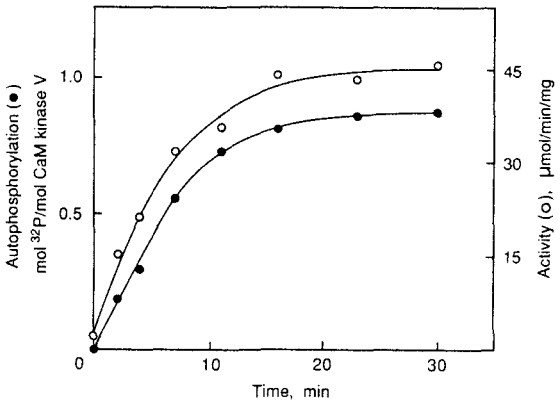


Fig.1 CaM kinase V の活性及び自己燐酸化反応の経時的変化

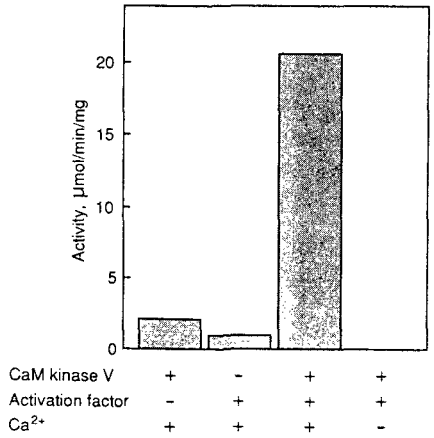


Fig.2 CaM kinase V 活性における activator の効果
種々の条件下にてCaM kinase V 活性をsyntide-2による燐酸化反応にて測定した。

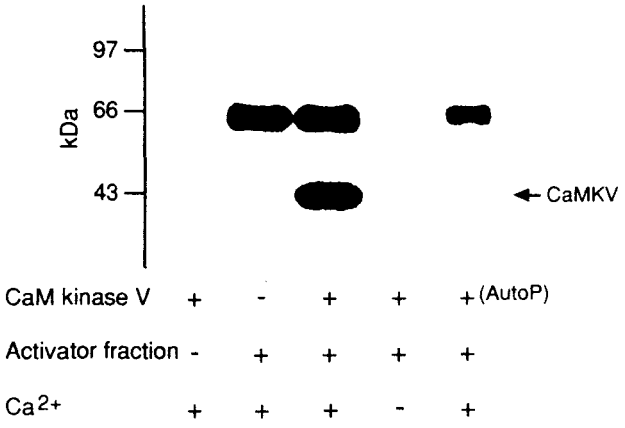


Fig.3 activator による CaM kinase V の燐酸化反応

種々の条件下にて[γ-^{32}P] ATP ともに incubation しSDS-PAGE 後 autoradiogram を行なった。

42 神経特異蛋白質 NAP－22 の解析

前川昌平[1,2,3]、中村俊[3]
([1]東大・院・理・生化、[2]京都工繊大・応用生物（現）、[3]国立精セ・神経研診断)

「要約」 NAP-22 は神経細胞の膜分画に多く存在する分子量 22,000 の酸性蛋白質であり GAP-43(neuromodulin) や MARCKS(Myristoylated Alanine Rich C-Kinase Substrate) とよく似た物理化学的性質を持つ。今回 in vitro の実験により NAP-22 が Ｃ－キナーゼ（PKC）の基質になること、このリン酸化がカルモジュリン（CaM）の存在によって阻害されること、リン酸化によりカルモジュリンとの結合が阻害されること等を見いだした。またシナプス部に存在することが知られているシンタキシン、シナプトタグミン、VAMP-2 等の蛋白質に対する特異抗体を用いた免疫沈降物中に NAP-22 が存在することを抗体を用いて確認した。これらの知見は NAP-22 がシナプス部位において神経伝達に関与していることを示唆している。

脳組織より単離された NAP-22 はシナプス部位に局在することが免疫組織化学的に明らかにされている。 NAP-22 の細胞内機能を知る目的でこの蛋白質の in vitro リン酸化と CaM 結合能について GAP-43 の場合と比較しつつ検討した。また免疫学的手法により細胞内での結合蛋白質の解析を試みた。

「方法」 **1. 蛋白質の調製** CaM はウシ脳より、PKC はウサギ脳より各々調製した(3,6)。1モル当り 1.1 モルのダンシル基が結合したダンシル化カルモジュリン（DN-CaM）は Johnson & Whitenauer(1) の方法により作成した。NAP-22 は以前の報告に従い(4)、GAP-43はラット脳の膜画分の Triton X-100 による可溶化後カラムワークにより精製した(5)。Ｇ－キナーゼはウシ肺より調製したものをプロメガ社より購入し ブタ精巣由来カゼインキナーゼⅡは宮田愛彦博士（都臨床研）より供与された。

2. リン酸化反応 PKC によるリン酸化は 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EGTA, 0.5 mM $CaCl_2$, 0.05 mg/ml phosphatidylserine, 0.02 mM [γ-^{32}P]ATP, 0.25 mM Na_3VO_4, の条件下 30°C で行った。他のキナーゼ反応は各々の至適条件下で行った。

3. カルモジュリンと NAP-22 との結合 両者の結合は CaM affinity カラム及びDN-CaM の蛍光変化により測定した。蛍光測定は30°C, 10 mM Mes-KOH, pH 6.7, 75 mM NaCl, 0.2 mM EGTA, 1 mM $CaCl_2$, の条件下 励起波長 340 nm, 測定波長 490 nm で行った。

4. 免疫沈降 ラット脳のＰ2画分を 1% Triton X-100, 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.2 mM EGTA, 1 mM PMSF, の液でホモゲナイズ後 2万g、１０分間の遠心上清を材料とした。抗体は CNBr-activated Sepharose 4B に直接カップリングしたものを用いた。

「結果」 **1 リン酸化及びリン酸化阻害物質の解析** アミノ酸配列より NAP-22 は PKC、Ｇ－キナーゼ、カゼインキナーゼⅡの基質となりうることが推測されたのでこれらのキナーゼ類でリン酸化を試みたところ PKC のみによりリン酸化された。一方粗精製画分中の NAP-22 はリン酸化されなかったのでこの画分中にリン酸化阻害因子の存在が考えられた。そこでこの阻害因子の精製を試みこれを CaM と同定した。CaM によるリン酸化の阻害は GAP-43 のリン酸化阻害の場合よりはるかに強いので CaM は NAP-22 により強く結合すると考えられた（図１）。蛍光測定の結果は DN-CaM と NAP-22 の解離定数として 1.2 nM

が得られ GAP-43 と CaM のそれ(0.2μM-3μM)とは大きな差があることがわかった。またこのリン酸化は NAP-22 と CaM の結合を阻害することが CaM affinity カラムを用いた実験より明らかになった(5)。

2 免疫沈降実験 NAP-22 がシナプス部位に局在することよりこの部位に存在する蛋白質との相互作用が考えられ シンタキシン、シナプトタグミン、VAMP-2 等に対する抗体を用いて得られた免疫沈降物中での NAP-22 の存在を検討しその存在を確認した（図２）。また抗 NAP-22 抗体の免疫沈降物中にもこれらの蛋白質を検出した。

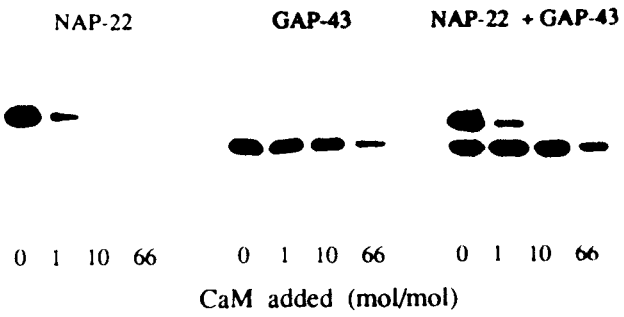


図１ NAP-22とGAP-43のPKCによるリン酸化に対する CaM の効果

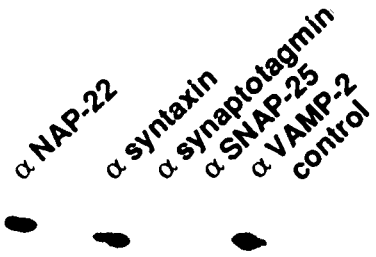


図２ 各種抗体を用いた免疫沈降物中の NAP-22 の存在

「考察」 NAP-22 が 強い CaM 結合能をもちこの活性がリン酸化により阻害されることと NAP-22 がシナプス部に局在していることから NAP-22 はこの部位にあって CaM の動員に関与しこれを PKC が調節するというスキームが考え得る。実際 NAP-22 の神経細胞内濃度は 20-40μM と計算されるがその局在よりシナプス部ではより高濃度で存在すると考えられる。神経系における CaM の濃度は 60μM といわれているのでこれらはよい対応を示す(2,5)。NAP-22 がシナプス部位に局在する諸蛋白質と共に免疫沈降法により回収されることはこの蛋白質が神経系における刺激ー分泌連関に関与している可能性を示していると考えている。

本実験に用いた PKC は室伏擴博士（東大・院・理系）より、抗シンタキシン抗体、抗 VAMP-2 抗体は阿部輝雄博士（新大・脳研）より、抗シンタキシン抗体、抗シナプトタグミン抗体、抗 SNAP-25 抗体、抗 VAMP-2 抗体は高橋正身博士（三菱化成生命研）より各々供与されたものであり本実験はこれらの方々との共同研究であることを付記いたします。

「文献」

1. Johnson, J.D., and Whittenauer, L.A. (1983) Biochem. J. **211** 473-479
2. Klee, C.B., and Vanaman, T.C. (1982) Adv. Prot. Chem. **35** 213-321
3. Maekawa, S., and Abe, T. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. **97** 621-627
4. Maekawa, S., Maekawa, M., Hattori, S., and Nakamura, S. (1993) J. Biol. Chem. **268** 1501-1504
5. Maekawa, S., Murofushi, H., and Nakamura, S. (1994) J. Biol. Chem. in press
6. Mori, A., Aizawa, H., Saido, T.C., Kawasaki, H., Mizuno, K., Murofushi, H., Suzuki, K., and Sakai, H. (1991) Biochemistry **30** 9340-9346

43 アルコール依存症におけるアセトアルデヒド代謝酵素の遺伝子型の影響

岩橋和彦，宮武良輔，洲脇寛，中村和彦，*市川佳幸、*松尾義則，**早原敏之，***細川清．香川医科大学精神神経科，*生化学，***同附属病院，**国立療養所南岡山病院臨床研究部

[はじめに] 飲酒時のフラッシング反応の有無やアルコールの大量飲酒には アルコールを代謝するアルコール脱水素酵素(ADH)ではなくむしろ アルコールの代謝産物で毒性の強いアセトアルデヒドを代謝するアセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)が関与するとの報告が多い．また一方で 我々は，アルコールとアセトアルデヒドの両方を代謝し しかもアルコールによって誘導される肝酵素でMEOS(microsomal ethanol oxidizing system)の一つでもあるCYP2E1が アルコール飲酒（消費）量の後天性の増加に関与している事を発見した(Table 1)．そこで今回は このCYP2E1の酵素活性がより高いと予測されるC$_2$という対立遺伝子について ALDH2*1遺伝子と同様に アルコール依存症と相関があるかを調べ検討した．

[対象と方法]

1．対象：DSM-III-Rでアルコール依存と診断された男性49名と健常者の男性41名を対象とした．

2．方法：これらの対象者の血液を同意の上で採取し，DNAを精製し ALDH2とCYP2E1の遺伝子多型(ALDH2*1，ALDH2*2，および C$_1$，C$_2$)と遺伝頻度についてPCR(Polymerase Chain Reaction)法やRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphysm)法にて調べた[1]．なお プライマーについては ALDH2とCYP2E1の遺伝子配列から考案した．PCR (94°C 1min，51°C 2min，72°C 2min，extention time 5sec，30 cycle) は終量50μlとし DNA 100ng，MgCl$_2$ 1,25mM，dNTP 200μM，プライマー 5pmol を加えた[1]．

[結果]

ALDH2とCYP2E1の遺伝子頻度を示す(Table 2，3)．AHDH2*1については アルコール依存症群では その遺伝子頻度が有意に高く 逆にALDH2*2の遺伝子頻度は有意に低かったが C$_1$，C$_2$については 遺伝子頻度に両群で差はなかった。

[考察]

従来から言われているように先天的なアルコール耐性に関与しているALDH2*1遺伝子はアルコール依存症発症に強い相関があることが認められる一方，CYP2E1の 少なくともC$_2$遺伝子については アルコール依存症への発展との関連は見つからなかった。現段階では後天的な飲酒量増加より 先天的なアルコール耐性が アルコール依存への発展の要因の一つである可能性が強い。

Table 1. Alcohol consumptions of persons whose genotypes of ALDH2 are ALDH2*1/ALDH2*2 (heterozygote).

CYP2E1 genotype	C1/C1	C2/C2 or C1/C2
Number of subjects	11	8
(age)	37.6±8.1	38.5±4.5
Max alcohol consumption	18.8±8.7	*97.8±41.0

*P<0.05
(MEAN±S.D.)

Table 2. ALDH2 genotype frequency and allele frequency in alcoholic and non-alcoholic Japanese.

	Genotype frequency			Allele frequency	
	ALDH2*1/1	ALDH2*1/2	ALDH2*2/2	ALDH2*1	ALDH2*2
Alcoholics	45	6	0	*.94	**.06
Non-alcoholics	37	32	6	.71	.29

*,** P<0.05

Table 3. CYP2E1 genotype frequency and allele frequency in alcoholic and non-alcoholic Japanese.

	Genotype frequency			Allele frequency	
	C1/C1	C1/C2	C2/C2	C1	C2
Alcoholics	36	11	4	.80	.20
Non-alcoholics	51	18	6	.81	.19

［文献］（１）アルコール依存症におけるアルデヒド代謝酵素の遺伝子型.
岩橋和彦、中村和彦、洲脇寛、宮武良輔、松尾義則、市川佳幸.
アルコール研究と薬物依存、２９、５９－５８、１９９４.

44 PCR法によるRamsay Hunt症候群患者からの水痘,帯状疱疹ウイルスDNAの検出

〔著者〕 村上信五、中城有喜*、溝淵睦彦*、羽藤直人、柳原尚明
〔所属〕 (愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室 *愛媛大学医学部神経精神医学教室)

〔要約〕
Ramsay Hunt症候群が水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)の感染により生じることは血清抗体価の上昇、あるいは耳介水疱中からVZVが検出されることによって証明されている。しかし、口腔内水疱や神経、筋組織からVZVが検出、同定された報告はなく、顔面神経麻痺が出現する機序についてはいまだ解明されていない。今回われわれはRamsay Hunt症候群患者から耳介、口腔水疱、神経内液、神経鞘、後耳介筋、鼓室粘膜、髄液を採取した。本検体からDNAを抽出し、PCRを用いてウイルスDNAを増幅し、高頻度にVZV DNAを検出することに成功した。

[はじめに]

Ramsay Hunt症候群は顔面神経麻痺、眩暈、難聴、耳介の水疱により特徴づけられる症候群である。この急性期、あるいは回復期に水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)の抗体価が上昇すること、また耳介水疱からウイルスが検出されることよりVZV感染がこの疾患の原因であることが証明されている[1]。Ramsay Hunt症候群についての剖検や側頭骨の研究は多いが、本症候群の主症状が顔面神経であるにもかかわらず、神経組織からVZV抗原の検出、同定はいまだ報告がない[2]。顔面神経からウイルスを検出することは、顔面神経麻痺の病因、病態を解明するために不可欠である。今回われわれは、Ramsay Hunt症候群患者の顔面神経の神経梢および神経内液、後耳介筋、鼓室粘膜、髄液よりPCRを用いてVZV DNAを検出した。

[方法]

症例は12症例で、年齢は20から59歳。高度顔面神経麻痺、神経麻痺を呈した7症例においては発症より12日から32日後に神経減圧術を施行した。残りの症例では麻痺は軽度で保存的に治療した。Ramsay Hunt症候群は上記の臨床症状と血清VZV抗体価の上昇を指標に診断した。また外傷、腫瘍による顔面神経麻痺患者7例を対照とした。すべての患者に説明と同意を得て、検体を採取した。標準とするVZV DNA株は弱毒性水痘ウイルス(岡株)から製剤された弱毒性水痘ワクチン(ビケン)を使用した。検体は使用するまで−80Cで保存した。検体をプロテアーゼ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に従った[3]。用いたプライマーの塩基配列はセンスプライマー；5'-TACGGGTC TTGCCGGAGCTGGTAT-3'、アンチセンス；5'-AATGCCGTGACCACCAAGTATA AT-3'である[4]。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。用いたVZVgene29に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ(5'-ACT CACTACCAGTCATTTCT-3')は^{32}Pで末端標識した。

[結果と考察]

PCR産物をゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、サザンブロット分析を行った[図1]。また各組織におけるVZV DNAの検出結果を表1にまとめた。既に報告がされているように、耳介水疱のすべてからウイルスDNAが検出された。またRamsay Hunt症候群の主症状である顔面神経麻痺に直接関与する顔面神経の神経内液、神経鞘からはそれぞれ4例／6例、3例／5例と高頻度にVZV DNAが検出された[図1(a)]。また顔面神経支配筋である後耳介筋や鼓室粘膜からも4例／6例、2例／3例検出された[図1(b)]。さらに髄液からも2例／10例検出することができた[図1(c)]。発症後、数週間経過し、水疱が消退しているにもかかわらず、今回の方法で水疱以外の組織からVZV DNAを高率に検出することができた。なお対照検体からはウイルスDNAは検出されなかった。現在原因が不明とされているBell麻痺(水疱を伴わない顔面神経麻痺)においても本法により原因ウイルスを同定、検出できる可能性が示唆された。

[文献]

1) 池田　稔ら　(1981) 耳鼻と臨床　27; 223-227

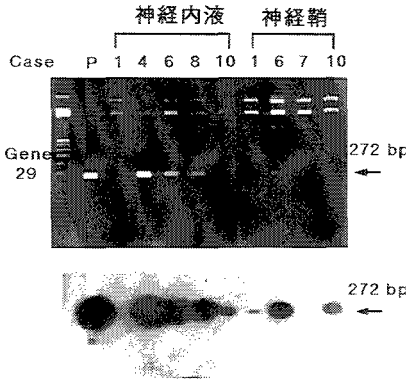
2) Zajtchuk, J. T. et al (1972) Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 81; 331-338

3) Gilden, D. H. et al (1992) Journal of infectious disease. 166; s30-s34

4) Mizobuchi, M. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5; 476-484

図1　PCR産物をゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色しサザンブロット分析を行ったもの。Pは水痘ワクチンを用いたpositive control。

a) 神経内液および神経鞘



b) 後耳介筋および鼓室粘膜

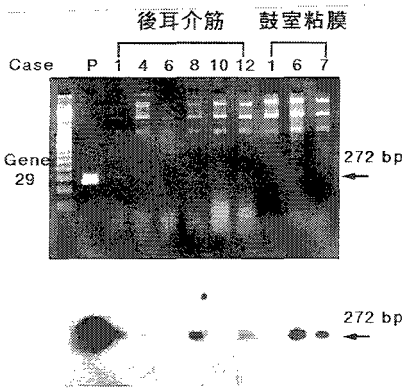
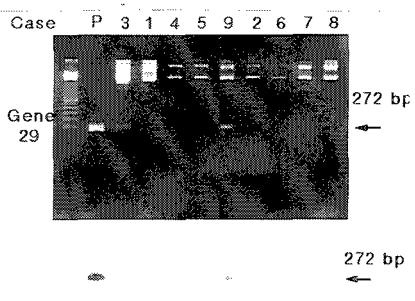


表1　各組織におけるVZV DNAの検出

Case		耳介水泡	口腔内水泡	神経内液	神経鞘	後耳介筋	鼓室粘膜	髄液	血液
1	SM	NA	NA	X	O	O	X	X	X
2	HI	O	NA	NA	NA	NA	NA	X	X
3	KI	O	NA	NA	NA	NA	NA	O	X
4	TT	NA	O	O	NA	O	NA	X	X
5	HI	O	NA	NA	NA	NA	NA	X	X
6	YO	NA	NA	O	O	X	O	X	X
7	AH	NA	NA	X	X	NA	O	X	X
8	NS	NA	NA	O	X	O	NA	X	X
9	TN	O	O	NA	NA	NA	NA	O	X
10	SY	NA	O	O	O	X	NA	X	X
11	EK	O	NA	NA	NA	NA	NA	NA	X
12	KO	NA	NA	NA	NA	O	NA	NA	X

NA; not available

c) 髄液



45 Fisher症候群患者から分離された*Campylobacter jejuni*のリポ多糖とGQ1bガングリオシドの分子相同性

瀧　孝雄、結城伸泰、飯田静夫、田井　直*

東京医歯大・分子医化、*都臨床研・腫瘍免疫

要約

我々は昨年の本会でGBS患者から分離されたPEN 19型*C.jejuni*のリポ多糖がGM1様構造を有することを発表した。本年は、感染後神経疾患の発症機序において病原体と神経成分の分子相同性が普遍的に存在するかを別の疾患で検討した。モノクローナル抗GQ1b抗体を用いて、Fisher症候群(FS)患者から分離された*C.jejuni*のリポ多糖がGQ1b様構造を有するかを検討した。免疫化学的にGQ1b様構造の存在を示し、FSにおいても病原体と神経成分の分子相同性の存在を証明した。

目的：我々はこれまでに、(1)*C. jejuni*腸炎後Guillain-Barre症候群(GBS)患者の急性期に血清抗GM1ガングリオシド抗体価が上昇すること、(2)GBS患者から分離されたPEN 19型*C. jejuni*のリポ多糖がGM1様構造を有することを明らかにしてきた。本研究では、感染後神経疾患の発症機序において病原体と神経成分の分子相同性が普遍的に存在するかを、GBSの亜型として捉えられているFisher症候群(FS：急性に発症する外眼筋麻痺、小脳性失調、深部腱反射消失を3徴とする)から分離された病原体で検討する。

方法：(1)*C. jejuni*が分離されたFS患者２例の血清抗ガングリオシド抗体を検索した。
(2)モノクローナル抗GQ1bガングリオシド抗体を用いて、分離されたPEN 2型*C. jejuni*のリポ多糖がGQ1b様構造を有するかを検討した。

結果：(1)２例とも抗GQ1b抗体が陽性であり(図1)、抗体価は経過とともに低下していった。
(2)FS患者から分離された*C. jejuni*2株のリポ多糖がGQ1bエピトープを有することが免疫化学的に示された(図2)。

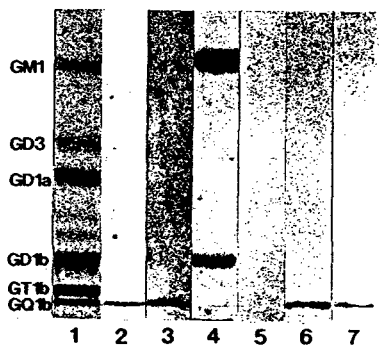


図1

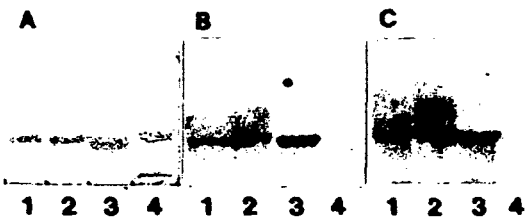


図2

図1　*C. jejuni*感染後FS、GBS患者血清、モノクローナル抗GQ1b抗体とヒト小脳ガングリオシドの結合

レーン1：レゾルシノール試薬による化学発色。レーン2, 3：*C. jejuni*感染後FS患者血清、レーン4：*C. jejuni*感染後GBS患者血清、レーン5：正常対照血清、レーン6, 7：モノクローナル抗GQ1b抗体GMR13、7F5を用いた免疫染色。

*C. jejuni*感染後FS患者血清中の抗体、モノクローナル抗GQ1b抗体がGQ1bと結合している。*C. jejuni*感染後GBS患者血清中には、GM1, GD1bと結合する抗体を有する。正常対照血清中にはガングリオシドに反応する抗体を認めない。

図2　モノクローナル抗GQ1b抗体とFS患者から分離された*C. jejuni* (PEN 2型)リポ多糖の結合

パネルA：オルシノール試薬による化学発色。パネルB, C：モノクローナル抗GQ1b抗体GMR13、7F5を用いた免疫染色。レーン1, 2：FS患者から分離された*C. jejuni* (PEN 2型)リポ多糖。レーン3：腸炎患者から分離された*C. jejuni* (PEN 2型)リポ多糖。レーン4：GBS患者から分離された*C. jejuni* (PEN 19型)リポ多糖。

モノクローナル抗GQ1b抗体は、FS患者から分離された*C. jejuni* (PEN 2型)リポ多糖、腸炎患者から分離された*C. jejuni* (PEN 2型)リポ多糖と結合するが、GBS患者から分離された*C. jejuni* (PEN 19型)リポ多糖とは結合しない。

結論：FS患者から分離された*C. jejuni*のリポ多糖がGQ1b様構造を有することがわかり、GBS以外の疾患においても病原体と神経構成成分の分子相同性の存在が証明され、その普遍性が示唆された。

考察：(1)GQ1bはラットの小脳糸球やヒトの動眼、滑車、外転神経の髄外部分の傍絞輪部に豊富に局在することが免疫組織化学的に示されている。(2)抗GQ1b抗体の存在は、小脳性失調、外眼筋麻痺と相関する。(3)ボツリヌス中毒では外眼筋麻痺を呈するが、興味深いことにボツリヌス毒素はGQ1bに結合することが知られている。(4)抗GQ1b抗体は細胞傷害活性を有する。また、本研究により、(5)FS患者から分離された*Campylobacter jejuni*のリポ多糖がGQ1b様構造を有することが明らかにされた。これらの事実から抗GQ1b抗体がFSの発症に関与していることが強く示唆される。

FSの発症機序として、GQ1b様構造を有する病原体に感染し、免疫寛容の破綻をきたすような免疫遺伝学的背景(HLAがその一因であろう)を有する患者において抗GQ1b抗体が産生され、小脳糸球や動眼、滑車、外転神経の傍絞輪部に抗GQ1b抗体が結合し、小脳性失調や外眼筋麻痺が生じるものとわれわれは考えている。

文献：1) Yuki N, et al. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. J Exp Med 178:1771-1775, 1993. 2) Yuki N, et al.: Frequent presence of anti-GQ1b antibody in Fisher's syndrome. Neurology 43:414-417, 1993. 3)Yuki N, et al.: Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Fisher's syndrome. Ann Neurol (in press) 4) Yuki N, et al. Beneficial effect of plasmapheresis on Fisher's syndrome. Muscle Nerve 16:1267-1268, 1993.

46 ニーマンピック病神経型と非神経型における遺伝子変異の検討

井田博幸、衛藤義勝
(東京慈恵会医科大学小児科)

〔要約〕
ヒトニーマンピック病 (NPD) は酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) 欠損によって生じる脂質蓄積症であるが、本症は神経症状を呈するA型と呈さないB型が存在する。本症におけるgenotype/phenotypeの相関を検討するため、PCR法にてASM遺伝子を8分割して増幅し、各フラグメントをサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、A型において ^{1237}G→T (E258X) のナンセンス変異がhomoallelicに、B型において 1201-1202 CG→GC (E245Q) と14bpの挿入 (fsP626) がheteroallelicに認められた。E258XとE245Qの変異をASM cDNAに導入し発現させたところ、前者ではほとんど酵素活性の上昇を認めなかったのに対し、後者ではコントロールの約30%の酵素活性の上昇を認めた。以上より酵素活性を上昇させない遺伝子変異は重症型のA型を、ある程度酵素活性を上昇させる遺伝子変異はB型を引き起こすことが推察された。

［目的］酵素欠損によって生じる種々の脂質蓄積症において、genotype/phenotypeの相関が近年明らかにされている(1, 2)。しかしながらASMの欠損によって生じるNPDについては明らかにされていない。そこで我々は日本人NPD A型1例とB型1例について遺伝子解析を行ったので報告する。

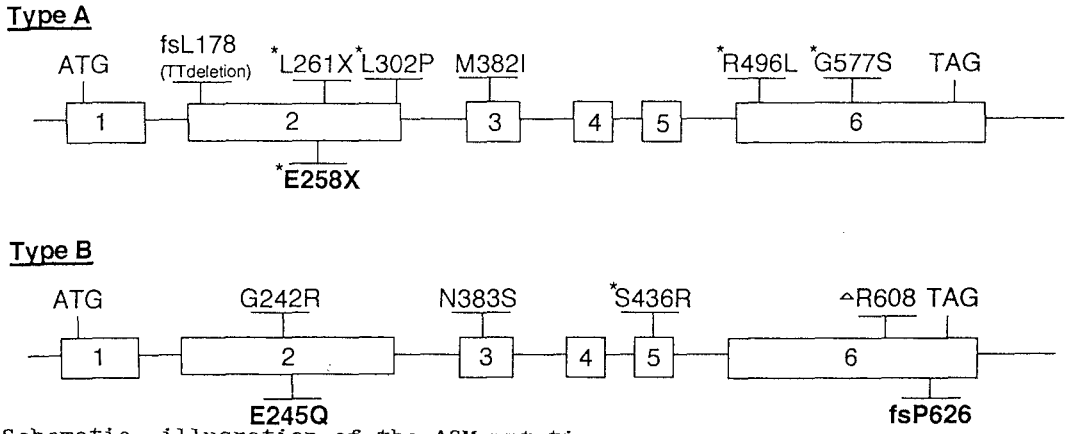
［方法］1. 塩基配列の決定：培養皮膚線維芽細胞からgenomic DNAを分離し、9組のプライマーを用いてPCR法にてASM遺伝子の全エクソンを増幅した。PCR産物についてSSCP分析を行った。異常な泳動度を示したものを、TAクローニングキットを用いてサブクローニングし、Sanger法にて塩基配列を決定した。2. ドットブロットハイブリダイゼーション：塩基配列に異常のあったPCR産物についてAllele Specific Oligonucleotide (ASO) ハイブリダイゼーションを行った。3. 変異導入及び変異DNAの発現：全長ASM cDNA (hPSM-55-463T)に上記変異をKunkel法を用いて導入した後、変異DNAをpCDEベクターに組み込み、これらconstructsをリポフェクチンを用いてCOS-7細胞にtransfectionした。72時間後に細胞を掻きとり、ASM活性を［メチル－^{14}C］スフィンゴミエリンを基質として測定した。

［成績］1. 変異の同定：SSCP分析の結果、A患者ではエクソン2に、B患者ではエクソン2とエクソン6に異常が認められた。塩基配列決定の結果、A型患者ではエクソン2において ^{1237}G→Tの変異が同定された。この変異はコドン258のグルタミン酸をストップコドンに変化させるナンセンス変異であった(E258X)。さらにASOハイブリダイゼーションの結果、患者はこの変異をhomoallelicにもっていた。B型患者ではエクソン2において

1201-1202 CG→GC の変異が同定された。この変異はコドン245のグルタミン酸をグルタミンに変化させていた(E245Q)。またエクソン6においては14bpの挿入が認められ、この変異はフレームシフトをおこし、本来のストップコドンより3'側に新しいストップコドンを生じさせていた(fsP626)。E245Qの変異をASOハイブリダイゼーションで検討したところ、患者は heteroallelic であった。また fsP626 は multiclone の塩基配列の結果、heteroallelic であった。以上よりB型患者は、E245Q と fsP626の compound heterozygoteであった。

2. 発現実験：A型患者で同定された変異を導入したconstruct (pcDE-ASM-1237T)を発現させたが、ASM 活性は12.4 nmol/hr/mg protein とその上昇はほとんど認められなかった。これに対し、B型患者で同定された変異を導入したconstructs (pcDE-ASM-1201GC)の場合、30.6 nmol/hr/mg proteinとコントロールの約30%の上昇が認められた。

［考察］現在までNPDの欠損酵素である ASMの遺伝子変異はユダヤ人を中心に10例報告されているが、今回我々の報告した E258X、E245Q、fsP626は今までに報告のない新しい変異であった。NPDにおける変異を図1のようにまとめると、13 変異のうち10はエクソン2とエクソン6に集中していた。このことからエクソン2とエクソン6は ASM 活性発現に重要な部分であることが示唆された。さらにエクソン2またはエクソン6にミスセンス変異またはナンセンス変異が homoallelic に生じるとA型になるという genotype/phenotypeの関係が存在した。



Schematic illusration of the ASM mutations
The location of the thirteen mutations in the ASM gene causing Type A and B NPD are indicated. Open boxes indicate ASM exons and straight lines indicate introns. Mutations with * are homo-allelic, and without * are heteroallelic. Mutations written in bold letters are identified in present study.

図1

［文献］

1. Sibille A., Eng C.M., Kim S.J., Pastores G., and Grabowski G.A. (1993) Am. J. Hum. Genet. 52, 1094-1101

2. Polten A., Fluharty A.L., Fluharty C.B., Kappler. J., von Figura K. and Gieselman V. (1991) N. Engl. J. Med. 324, 18-22

47 ゴーシェ病の中枢神経障害の病因に関する研究：CBEを用いての実験的ゴーシェ病

○衛藤義勝、山本敏晴、川目裕、上原恵子、大橋十也、井田博幸
（東京慈恵会医科大学小児科）

〔要約〕

ゴーシェ病はタイプI, IIに分類され，タイプIIでは中枢神経障害が強く、生後１－２歳で死亡する。遺伝子型では日本人ゴーシェ病では１４４８C変異が最も多く４０％を占め、次いで７５４A変異が多いが、遺伝子型からではゴーシェ病の神経障害の病因は明らかでない。今回conduritol B epoxide (CBE)を 10ug/mlの濃度でhuman oligodendroglioma(HOG)とhuman neuroblastoma(HNB)の細胞に添加すると著明なbeta-glucosidaseの酵素活性の阻害がみられ、同時にHOG細胞では明らかなglucocerebrosideの蓄積が見られた。しかし神経細胞由来のHNB細胞ではその蓄積は明らかでなくHOG細胞に著明な封入体像が見られHOG細胞に特異的であつた。またFla－２による細胞内カルシウム濃度はCBE添加に伴いHNB細胞とHOG細胞とでは明らかな異なりを示し、HOG細胞では持続的な細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた.以上の点からゴーシェ病では神経細胞でのグルコセレブロオシドの蓄積は軽度と考えられ、細胞の種類により蓄積のheterogeneityがあることが証明された。またゴーシェ病の神経障害の要因として蓄積物質による細胞内カルシウム濃度が上昇し神経伝達機構での障害が示唆された。

目的：ゴーシェ病はリソゾーム酵素のbeta-glucosidaseの酵素欠損により肝、脾臓などの網内系組織にglucocerebrosideが蓄積する疾患で、臨床的には発症年齢によりタイプ I, II, IIIに分類されている。タイプ II, IIIでは中枢神経症状をきたすが、その病因に関しては明らかでない。我々は日本人ゴーシェ病患者３２例の遺伝子解析ではタイプI, IIでの明らかな遺伝子型での差異は見い出されず、より詳細な解析が必要と思われた。本研究ではゴーシェ病の中枢神経障害の病因を明らかにするため、beta-glucosidaseの特異的阻害剤であるconduritol B epoxide(CBE)をHOG, HNB 細胞に添加し、その蓄積効果ならびに細胞内カルシウム代謝を検討したので報告する。

方法：

１）変異遺伝子の同定：患者白血球、皮膚線維芽細胞よりDNAを抽出し、PCR法、SSCP法, ASO法などを用いてゴーシェ病患者の変異遺伝子を同定した。詳細はKawame等[1-2]、Ida等[3]の方法に準じた。

２）beta-glucosidaseの測定：4MU-beta-glucopyranoside を基質としてOhashi等[4]の方法に準じて測定した。

３）HOG, HNB細胞はCalifornia大学Dr. Campagnoniより提供をうけた。CBEの添加効果はCBEを10ug/ml mediumの濃度で添加後時間をchaseし、beta-glucosidaseの活性を測定，又、薄層クロマトによるglucocerebrosideの蓄積を検討すると同時にグルタールアルデヒドで固定後細胞内蓄積を電顕にて検討した。

４）細胞内カルシウム$[Ca^{+2}]_i$の測定はMorita等の方法[5]によるfura 2/AM法により測定した.

結果：

１）神経型、非神経型ゴーシェ病の遺伝子解析：表１に示す如く１５例あまりの日本人ゴーシェ病患者の神経型、非神経型の変異遺伝子の分布を示した。約４０％を１４４８C(Leu444Pro)の変異が占めそのほか日本人に多い７５４A (Phe213ILeu)が２０％程度認められユダヤ人に多い1226Gは全てのアリルで認められなかつた。神経型、非神経型では明らかな差異は認められなかつた。

２）CBE添加後のbeta-glucosidase活性とglucosylceramideの蓄積：　HOG, HNB 細胞両者で10ug/mlのCBE添加後１０分でほぼ９９％の活性の阻害が見られ（図１）、HOGでは２４時間後では著明なglucocerebrosideの蓄積が見られた。HNB細 胞では同様な条件では明らかなglucocerebroside の蓄積は見られなかつた。

表１。日本人ゴーシェ病の遺伝子変異の分布

	6433C/6433C	6433C/?	6433C/3548A	3548A/?	3548A/3548A	?/?
Type 1	2	1	3	0	0	3
Type 2	0	2	0	2	0	0
Type 3	0	1	1	0	0	0
Total (15)	2	4	4	2	0	3

図１

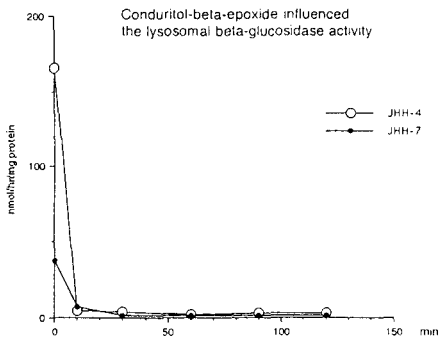
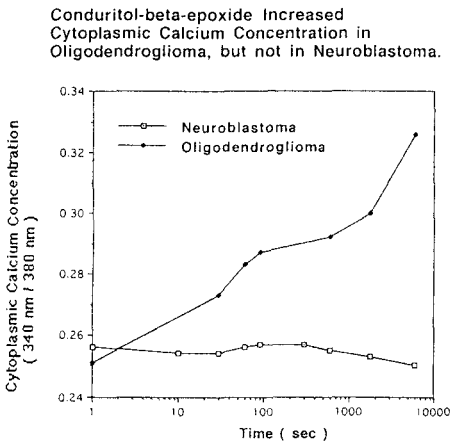


図２



３）CBE添加後の形態的観察：電子顕微鏡による観察ではHOG細胞ではミエリン状或いは顆粒状の封入体が多数みられたが、HNB細胞では明らかなMCB (membraneous cytoplasmic inclusion)は認められなかった。

４）細胞内カルシウム濃度：CBE添加後細胞内に著明な蓄積を認めたHOG細胞と蓄積が見られないHNB細胞でのfura-2による細胞内カルシウム濃度を測定するとHOG細胞では添加後１０秒で著明な細胞内カルシウム濃度は上昇が見られたがHNB細胞では上昇は見られなかつた（図２）。

考察：

ゴーシェ病での神経障害の病因を明らかにするため、日本人ゴーシェ患者のglucocerebrosidase遺伝子の解析を検討したところ１４４８Cの変異が最つとも多く、次いで７５４Aの変異が多い。神経型と非神経型との遺伝子変異の差異は明確ではない。全アリルの４０％はまだ同定していないことより今後の研究において明らかにされることも考えられる。ゴーシェ病の神経障害の病因を検討するため実験的ゴーシェ病モデルをオリゴデンドログリア細胞由来のHOG細胞並びに神経細胞由来のHNB細胞にglucocerebrosidaseの特異的阻害剤のCBEを添加glucocerebrosideの蓄積の効果を検討するとHNB細胞ではその蓄積は軽微であつたことからゴーシェ病の神経細胞ではglucocerebrosideの蓄積がほとんど見られないことと何らかの関連していることが示唆された。即ちglucocerebrosideの蓄積は細胞により異なることを示しており、糖脂質代謝動態の活発な細胞ではより酵素阻害効果が大きく組織障害が強いことを示している。ＨＯＧ細胞ではCBE添加に伴う細胞内カルシウムのINFLUXが大きく細胞内カルシウムの放出が少ないことは細胞内情報伝達機構の障害が示唆された。又リピドーシスの脳障害の病因として本研究の成果は重要な貢献をするものと考える。

文献：

1) Kawame H. and Eto Y.: Amer. J. Human Genet. 49: 1378-1380, 1991.
2) Kawame H., Hasegawa Y., Eto Y. Human Genetics 90: 294-296, 1992.
3) Ida H., Eto Y. et al: Human Genetics, submitted, 1994.
4) Ohashi T., Eto Y.: J. Inherited Metab. Dis. 16: 881-885, 1993.
5) Yamamoto T., Tokoro T. an Eto Y.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 198: 438-444, 1994.

48 Adrenoleukodystrophy の分子遺伝学的研究

〔著者〕 小林卓郎、安武多恵子、新納信江、山田猛、古谷博和
〔所属〕 (九州大学医学部脳研神経内科)

〔要約〕

Adrenoleukodystrophy (ALD)は性染色体劣性の脱髄性疾患である．最近その原因遺伝子が単離され、それを元に我々は患者における本遺伝子異常を検討した．患者由来の細胞におけるSouthern blot解析では明らかな欠失は見られなかったが、培養線維芽細胞のNorthern blotでは一例においてまったくmRNAが検出されなかった．他の患者のmRNAの塩基配列を検討するとミスセンス変異が見られ、それらは進化的に保存されているアミノ酸であるため蛋白質機能に異常をきたしている可能性がある．一方、本遺伝子より推定されるアミノ酸配列よりペプチドを作成しその抗体を作成した．その抗体が認識する蛋白質は約80 kDaの膜蛋白であり、免疫蛍光染色では正常細胞の細胞質内に顆粒状に染まった．しかし、mRNAの発現のない患者細胞ではそれらの蛋白質は検出されなかった．

Adrenoleukodystrophy(ALD) あるいはadrenomyeloneuropathy (AMN)は性染色体劣性遺伝形式をとり、5-15歳の男児あるいは成人男子に発症する疾患である。本症の病理は中枢、末梢神経の脱髄であり、本症の生化学的特徴として、組織、血液中の VLCFA の増加があるが、この現象が脱髄にどのように関与しているかは不明である。1993年 Mosserらがその原因と思われる遺伝子を単離した。そこで我々はその遺伝子の性質と、それがコードする蛋白質の生理的な機能およびALD, AMNにおける遺伝子異常を検討するために以下の実験を行ったので報告する。

材料および方法

本研究では全ての材料は培養膚線維芽細胞を用いた。患者症例は ALD 1例(#29)、AMN 5例(#163、170、225、240、249) である。DNA, RNA の抽出は従来の方法に従った。プローブとして用いるALD遺伝子の cDNAはHela 細胞よりRNAを抽出し、逆転写酵素ーPCR法により得た。塩基配列の決定はRNAより逆転写酵素で処理した cDNAを 6 カ所に分け、PCRを行った後、サブクローニングし、dideoxy 法にて行った。一方、cDNA より推定されるアミノ酸配列 C末より適当なペプチドを合成した。それぞれをヘモシアニンに結合させた後ウサギに免疫し、4-6 週後に抗血清を得た。

結果および考察

1. ALD遺伝子の発現分布

Mosserらはその遺伝子が筋肉、肺、心臓に多く発現し、大脳や副腎には少ないと報告しているが、我々のNothern blot の結果は彼らと異なり、ヒトにおいては全ての組織に約4.2 kbのバンドがみられ、その量は各組織間に著明な差はみられなかった。このことはALDが神経系の疾患であり、筋肉、肺、心臓のみの疾患でないことをむしろ支持する。同時に行なった培養線維芽細胞はそのうちでも一番多く発現がみられたため、今後の実験はそれを用いて行なった。同様にマウスにおいても約4.2kbのバンドが各組織にみられた。

2. ALD患者における遺伝子解析

６名のALD患者にSouthern blotを行なったが、大きい欠失は明らかでなかった。Northern blotでは#163の患者では全くバンドが見られなかったが、他の５名の患者では量、大きさとも正常と差が見られなかった（図１）。そこで、それぞれのcDNAの塩基配列を決定したところ、#240の患者では塩基番号1920のG→A変異が見られた。この変異は512番目のグリシンよりセリンのアミノ酸置換を伴っていた。この変異は新しくPstIという制限酵素切断部位を作るため、PCR産物を消化したところ#240の患者のみ切断され、正常人２０名においては全く切断されなかった。512グリシンはいわゆるATP結合蛋白群の発生学的に保存されたATP結合部位の中に存在し、また、マウスのALD蛋白でも保存されているため、セリンへの変異はおそらく蛋白質の機能的変化を生じているものと考えられる。同様に、#249の患者はC→Tの変異があり、やはり発生上保存されている部位にあたる660アルギニン→トリプトファンへのアミノ酸置換が認められた。さらに#170の患者でも場所は異なるがミスセンス変異が見られた。すでに欧米ではいくつかの変異がALD患者において報告されており、今後それらの相違を確かめていく必要がある。

3. ALD蛋白の性質

C末部ペプチド認識する抗体を用いてwestern blotを行なうと、正常細胞において、約80kDaのバンドがみられた。しかし、#163の細胞ではそのバンドが見られなかった。#163細胞はALD遺伝子の発現が見られていないことより、この約80kDaバンドがALD遺伝子の産物であると考えられた。さらに、このことを確かめるためにcDNAをpCAGGS(β-actin promoterを持つ発現ベクター）に組み込ませ、293T細胞（ヒト腎細胞ライン）に発現させたところ、やはり約80kDaのバンドが見られた（図２）。次に、本抗体を用いて、細胞内局在を免疫蛍光染色で検討したところ、正常細胞では細胞内に顆粒状に蛋白が染色され、細胞分画では膜分画に存在した。今後、本蛋白がどのような生理機能を持つのかを検討していく予定である。

図１ Northern blot analysis of ALD protein mRNA in cultured fibroblasts

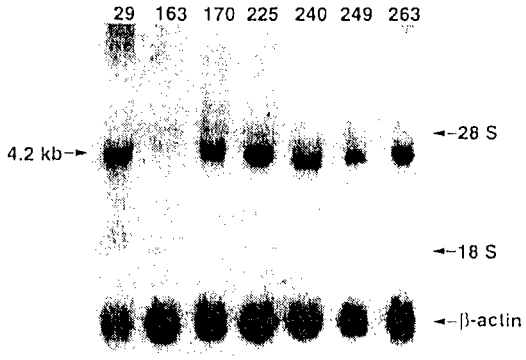
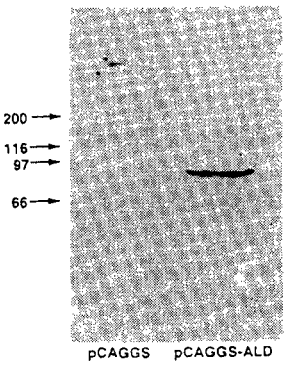


図２ Transfection of ALD protein cDNA in 293T cells



49 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）におけるCAG繰り返し配列のsomatic mosaicismについて

〔著者〕 上野修一、小牟禮　修*、久野貞子*、
〔所属〕 小谷泰教、近藤啓次、佐野　輝
（愛媛大・医・神経精神医学、*国立宇多野病院・神経内科）

〔要約〕
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）は常染色体優性遺伝性の神経変性疾患で、最近12番染色体短腕に存在する遺伝子のCAG-triplet繰り返し配列の伸張が病因であることが明らかにされた。今回我々は、DRPLA患者の種々の剖検組織からのgenomic DNAと特異なプライマーを用いたPCRを行なってCAG-tripletの繰り返し数を検討した。その結果、組織・部位により繰り返し配列の伸張度が異なることを明らかにした（somatic mosaicism）。また、疾患の病変部位である中枢神経系ではCAG-tripletの繰り返し数が他の組織に比し増加しているという結果を得た。中でも変性の中心の場である歯状核や淡蒼球では繰り返し数の広がりが認められ、somatic mosaicismの程度が大きいことが推察された。精巣上体でも繰り返し数の広がりが認められ、本疾患の遺伝特性との相関が考えられた。

［緒言］ 遺伝性歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（Dentatorubral pallidoluysian atrophy : DRPLA）は常染色体優性遺伝性の神経変性疾患で、遺伝の背景には「世代を経るに従い症状が重篤化し発症年齢が若年化する」という表現促進効果（anticipation）が特に男性経由の際に存在する[1]。Anticipationの認められる遺伝性疾患では当該遺伝子のtriplet伸張が病因となることが明らかになってきたが、本年に入りDRPLAの病因遺伝子は第12番染色体短腕に存在し、同染色体に存在するある種の遺伝子のCAG-triplet繰り返し配列の伸張が病因であることが解明された[2)3)]。DRPLAの病因遺伝子はCAG-triplet繰り返し配列を蛋白質翻訳部位内に含み、この種の遺伝子異常はHuntington病（HD）、Kennedy病、脊髄小脳失調症1型に見られる。HDでは当該遺伝子産物は種々の組織で豊富に発現していることが知られ、なぜ神経系の中でも特異な部位の変性を引き起こすかは未だ不明である。HDではCAG-triplet繰り返し配列のsomatic mosaicismが特異な部位変性の原因に関与すると最近報告されたが[4]、今回我々はDRPLA患者の剖検組織でDRPLA遺伝子のCAG-triplet繰り返し配列somatic mosaicismの検討をした。

［実験方法］ DRPLA患者の剖検組織は、患者の死後8時間以内に取りだし、-80度Cで実験に使用するまで保存した。遺伝子の検討については患者の家系構成員の方々に十分説明を行ない、同意を得た。Genomic DNAの精製はWangらの方法[5]で行なった。PCRは既報[2]に基づき^{32}P-dCTPを使用して行い、6% denatured polyacrylamide gelで電気泳動の後、乾燥させて-80度Cで1夜感光し現像した。

［結果と考察］ 図1に示された患者は42歳時に小脳症状で発症した成人発症型DRPLA患者で59歳で死亡した。白血球のgenomic DNAでのCAG-tripletの繰り返し数は両対立遺伝子で各々60回と18回であった。中枢神経系では前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉、尾状核、被殻、淡蒼球外節、淡蒼球内節、視床、小脳皮質、歯状核、橋のそれぞれの部位を検討し、また末梢組織では、肺、心筋、肝臓、

食道、小腸、脾臓、腎臓、骨格筋、精巣上体、精巣で検討を行なった。中枢神経系においては CAG-triplet の繰り返し数が他の組織に比し増加しているという結果を得た。中でも変性の中心の場である歯状核や淡蒼球では繰り返し数の広がりが認められ、somatic mosaicism の程度が大きいことが推察された。小脳皮質では明らかに CAG-triplet の繰り返しが短かった。各臓器では、ほとんどの臓器で CAG-triplet の繰り返し数はほぼ同様であり中枢神経系に比べてやや少ない傾向があった。精巣上体においては繰り返し数の広がりが認められた。症例２（図２）は３７歳時に不随意運動で発症した成人発症型で DRPLA 患者で５４歳で死亡した。白血球の genomic DNA での CAG-triplet の繰り返し数は両対立遺伝子で各々５８回と２４回であった。症例１で認められた歯状核や淡蒼球での繰り返し数の広がりと小脳皮質での明らかな CAG-triplet の繰り返しの短かさが全く再現された。

以上の結果から、DRPLA では組織・部位により病因遺伝子の CAG-triplet の繰り返し配列の伸張度が異なること（somatic mosaicism）、疾患の病変部位である中枢神経系では CAG-triplet の繰り返し数が他の組織に比し増加しており、中でも歯状核や淡蒼球では繰り返し数の広がりが認められ、somatic mosaicism の程度が大きいことが明らかとなった。精巣上体でも繰り返し数の広がりが認められ、本疾患の遺伝特性との相関が考えられた。

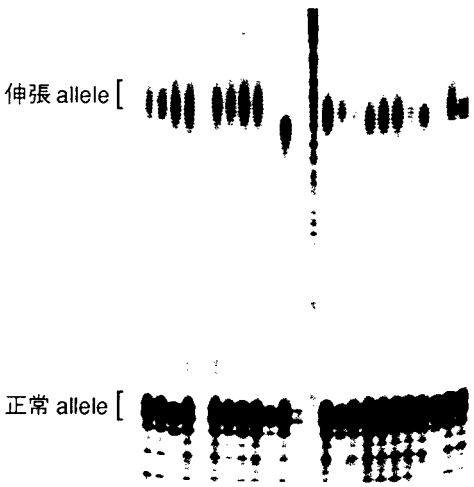


図１（症例１）　lane 左から：前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉、尾状核、被殻、淡蒼球外節、淡蒼球内節、視床、橋、小脳皮質、歯状核、marker、肺、心筋、肝臓、食道、小腸、脾臓、腎臓、骨格筋、精巣上体、精巣、白血球



図２（症例２）　lane 左から：側頭葉、尾状核、被殻、淡蒼球、視床、小脳皮質、歯状核

[文献]　1）Sano A. et al. Hum. Genet. in press
2）Nagafuchi S. et al. (1994) Nature Genet. 6, 14-18
3）Koide R. et al. (1994) Nature Genet. 6, 9-13
4）Telenius H. et al. (1994) Nature Genet. 6, 409-414
5）Wang L. et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1774

50　ミエリン形成期前段階におけるシュワン細胞の細胞死

中尾純治、村上善紀、植村慶一
（慶應義塾大学医学部・生理学教室）

〔要約〕末梢神経系のミエリン形成の前段階に、シュワン細胞が神経軸索を認識し正確に一対一に対応して接着することが知られている。この現象のメカニズム解明のために、抗Thy1抗体を用いたimmunopanning法により新生児期のラットの坐骨神経から直接シュワン細胞のみを分離・培養する方法を確立し、ミエリン形成前の増殖期にあるシュワン細胞の性質を検討した。このようにして培養したシュワン細胞は、従来の方法に従って数日かけて得たシュワン細胞と著しく性質が異なっており、その多くは、培養開始後に漸次細胞死をおこした。しかもこの細胞死は核染色像や核DNAのゲル電気泳動のパターンから判断してアポトーシスによるものであり、フィブロネクチンのコートによりシュワン細胞と培養皿の接着を増強することや、不死化したシュワン細胞株の培養上清に含まれる液性因子によって部分的に回避できることが明らかとなった。このことから増殖期のシュワン細胞のうち神経軸索に接着できないものは細胞死を起こしてゆき、生き残ったシュワン細胞と軸索が一対一の対応関係になるという可能性が考えられた。

［緒言］　哺乳動物の末梢神経系のミエリンは、シュワン細胞が神経細胞からの情報に従って、その性質を多様に変化させながら増殖・分化していくことによって形成される。シュワン細胞はまず神経軸索束を取り囲みながら急速に増殖し、次に成長した太い軸索束と一対一に対応しその周囲を取り囲んだ後に増殖を停止し、最後にミエリン形成を開始する。このように末梢神経系の正常なミエリン形成がおこなわれるためには、シュワン細胞と神経軸索が正確に一対一に対応することが前提となると考えられるが、このメカニズムは知られていない。このメカニズム解明のためにミエリン形成前の増殖期に特有なシュワン細胞の性質を検討する目的で、抗Thy1抗体を用いたimmunopanning法により新生児期のラットのシュワン細胞のみを迅速かつ効果的に分離・培養する方法を確立し、この方法で観察されたシュワン細胞の性質がミエリン形成前にシュワン細胞と神経軸索が一対一に対応するメカニズムとどのように関与するか解明を試みた。

［方法］

1.　従来の方法によるシュワン細胞の培養：　Brokesらの方法[1]を若干改良して用いた。生後12時間以内のラットの坐骨神経を無菌的に採取し、1%コラゲナーゼを含むdefined medium(DM)[2]に浸し、CO_2incubator内で1時間酵素処理をおこなった。さらにpipettingにより細胞を分散させフィブロネクチンをコートした培養皿上でDMEM/10%FCSを用いて培養を開始した。24時間後に有糸分裂阻害剤であるcytosine arabinoside(10^{-5}M)を加えて2日間培養を継続し、混在する線維芽細胞を選択的に除去することによってシュワン細胞を得た。　2.　immunopanning法によるシュワン細胞の培養：　線維芽細胞は細胞表面にThy1を発現しているがシュワン細胞は発現していないことを利用してimmunopanningをおこなった。まず培養皿を4℃で一晩、抗マウスIgG抗体(50mM Tris・HCl, pH 9に溶解)でコートした。コートした培養皿はPBSで洗浄後、PBSに溶解した抗Thy 1 抗体を1時間反応させた後に、2mg/mlのBSA溶液でブロッキングしさらにDMで洗浄した。この培養皿に、上記の方法にて坐骨神経の細胞を分散させたものをDMに再浮遊させて加え、CO_2incubator内で20分間インキュベイトした。この条件下ではThy1を発現している線維芽細胞は選択的に培養皿に付着するが、シュワン細胞は付着できず浮遊しているのでこれを回収し、DMEM/10%FCSを用いて培養した。　3.　核DNAのゲル電気泳動：　核DNAのゲル電気泳動法はWhiteらの方法[3]によった。

［結果と考察］

immunopanning法によって生後12時間以内のラットの坐骨神経から得られたシュワン細胞をDMEM/10%FCSを用いて培養したところ、12時間以内に多くのシュワン細胞が細胞死をおこすことが観察された(Fig. 2-a)ので、この現象について詳細な検討を加えた。まず、immunopanning法によって得たシュワン細胞をテラサキプレートを用いて培養し、細胞数の経時的変化を検討した。培養開始後シュワ

ン細胞の細胞数は、漸減していき12時間後に43.7%になった(Fig. 1)。このシュワン細胞の細胞死は、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンをコートしたテラサキプレートを用いて培養すると、部分的に回避された(Fig. 1)。さらに、コレラ毒素を用いて増殖させて継代を繰り返す過程で不死化したシュワン細胞株の培養上清を加えて培養することによっても部分的な細胞死の回避が見られた(Fig. 1)。しかしながら、従来の培養方法によって数日間培養して得たシュワン細胞を剥離し、再びテラサキプレート上に培養したときはほとんど細胞死をおこさなかった。

つぎに上記のシュワン細胞の細胞死の形態について検討した。panning法により培養した後に細胞死をおこしたシュワン細胞の核をよう化プロピジウムで染色したところ、アポトーシスを示唆する所見である濃縮像や断片化像が認められた(Fig. 2-b)。細胞死がアポトーシスによるものであることをより確かにするために、このシュワン細胞の核のDNAを抽出しゲル電気泳動にかけ、ラダーの形成を確認した。

panning法により神経軸索から分離して培養したのちのシュワン細胞の増殖を検討するため、増殖の指標としてこのシュワン細胞の核へのbromodeoxyuridine(BrdU)の取り込みを調べた。その結果BrdUを取り込みつつ生存している細胞やBrdUを取り込んだのちに細胞死をおこした像が多数観察された。このことから、数日間培養したシュワン細胞と違って、増殖期に神経軸索から分離した直後のシュワン細胞はin vitroでもしばらくは増殖を続けており、この増殖が細胞死に関与する可能性が示唆された。

以上の結果は増殖期にあるシュワン細胞が神経軸索から離れると細胞死を起こりやすい状態になることを示唆している。神経軸索と接着できなかったシュワン細胞が細胞死をおこすことで、ミエリン形成前にシュワン細胞が神経軸索と一対一の対応になると考えられた。現在、このようなことが、in vivoで実際におこっているか否か検討している。

［文献］ 1)Brockes,J.P. et al (1979) *Brain Res.* 165 , 105-118. 2) Bottenstein, J. E. and Sato, G. H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 , 514-517. 3) White,E. at al. (1984) *J. Virol.* 52 , 410-419.

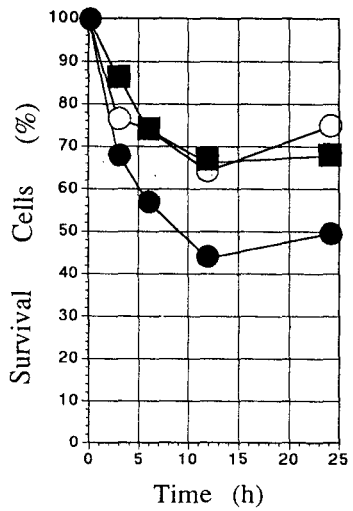


Fig. 1 immunopanningによって得たシュワン細胞の生存数の経時的変化
● 無処理
■ フィブロネクチンコート
○ 不死化シュワン細胞株の培養上清

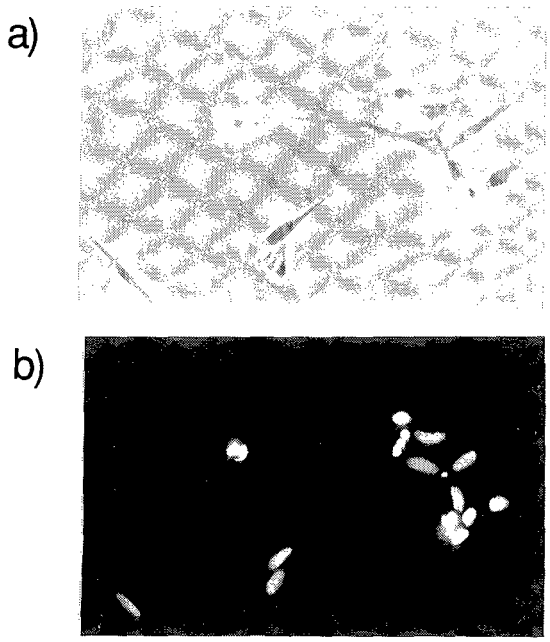


Fig. 2 immunopanning法によるシュワン細胞の培養開始12時間後にみられた細胞死
a) 位相差顕微鏡写真
b) よう化プロピジウムによる核染色像

51 低分子量ストレス蛋白質に高いホモロジーをもつ20-kDa蛋白質(p20)：ラット後肢筋における発達、坐骨神経切除、腱切断に伴う変化について

稲熊　裕、長谷川かおり、伊東秀記、加藤兼房
（愛知県コロニー発達障害研究所、生化学）

〔要約〕

低分子量ストレス蛋白質(sHSP)に類似したp20は、これまで知られているsHSP(αBクリスタリンおよびHSP27)と同様、筋組織に多く存在する。p20がラット後肢筋において、筋組織の発達、あるいは神経支配によってどのような発現の制御を受けるかを調べて以下の結果を得た。

(1) ヒラメ筋のp20は2週齢から4週齢にかけて急速に増加し、αBクリスタリンに似た発現を示した。長肢伸筋と大腿直筋では、2週齢以降に著明な変化はなかった。
(2) 舌、横隔膜、心筋においても生後から4週齢にかけて急速に増加した。
(3) 坐骨神経切除あるいは腱切断によって、ヒラメ筋のp20はαBクリスタリンおよびHSP27と同様に減少した。一方、長肢伸筋では神経切除のときsHSPが増加したのに対し、p20の濃度に変化は認められなかった。また、腱切断した場合には、p20、sHSPのいずれも変化しなかった。

ラット骨格筋から低分子量ストレス蛋白質(αBクリスタリンおよびHSP27)を精製する過程で得られた分子量約20-kDaの蛋白質(p20)は、そのアミノ酸の一次構造が低分子量ストレス蛋白質に高いホモロジーをもつ未知の蛋白質であった(Fig. 1)[1]。また、p20は筋組織中で分子量70 kDa以下の解離型と200-300 kDaの重合体として存在した[1]。p20の組織分布を調べたところ、αBクリスタリンおよびHSP27と同様にヒラメ筋、心筋、横隔膜に高濃度で存在した[1, 2]。一方、我々は、筋組織のsHSPの発現が神経支配の影響を受けていることをこれまでに報告している[3]。今回、p20が筋組織の発達過程でどのように発現するのか、また坐骨神経切除や腱切断によってどのように影響されるかを調べた。

［方法］

Wister/STラット(Slc)を用いた。1週齢から4週齢のヒラメ筋、長肢伸筋、大腿直筋および生後0日、3日、6日、8日、2週、3週、4週齢の舌、横隔膜、心筋の各筋組織を採取し、発達に伴うp20の変化を観察した。坐骨神経切除および腱切断には10週齢のラットを用い、片側を手術し、対側をコントロールとし、術後10日目に組織を採取した。各組織中のp20[1]、αBクリスタリン[2]およびHSP27[3]は、組織重量の10倍量の緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA)ホモジェネートの遠心(125,000 rpm, 40 min)上清をサンドイッチ型イムノアッセイ法によって測定した。

［結果］

1週齢から4週齢のラットのヒラメ筋ではp20は1週齢で99±17 ng/mg proteinであったのが2週齢から4週齢にかけて急速に増加し、8.86±1.10 μg/mg proteinとなり、ほぼ成獣のレベルに達した(Fig. 2)。これはHSP27よりもむしろαBクリスタリンのパターンに類似していた。長肢伸筋では1週齢で176±15 ng/mg protein、2週齢以降で約700-900 ng/mg protein、また、大腿直筋でも、1週齢で185±85 ng/mg protein、2週齢以降は約300-500 ng/mg proteinと2週齢以降に著明な変化はなかった(Fig. 2)。その他の筋組織として舌、横隔膜、心筋のp20を調べたところ、これらの組織においても成長に伴って増加した(data not shown)。坐骨神経切除あるいは腱切断するとヒラメ筋ではαBクリスタリンやHSP27と同様に減少した(Fig. 3)。一方、長肢伸筋では神経切除によってαBクリスタリンやHSP27が増加したのに対し、p20に変化は認められなかった(Fig. 3)。

［考察］

p20は蛋白質として、(1) 生体内でsHSPと重合体を形成する。(2) 熱ストレスに対する応答として可溶性分画から不溶性分画に移行する。(3) 熱ストレスによって重合型から解離型に変化する。と

いう低分子量ストレス蛋白質に共通した性質をもつことから、p20がストレス蛋白質の一員である可能性が示唆された [1]。しかし、ラット組織のp20は熱ストレスによって誘導を受けない点でαBクリスタリンおよびHSP27と異なっていた[1] 。p20の筋組織発達に伴う変化はαBクリスタリンに似ていたが、筋組織内での発現の制御に関してはαBクリスタリンおよびHSP27 [3]といくつかの点で異なることが明らかとなった。

[参考文献]

[1] Kato, K., Goto, S., Inaguma, Y., Hasegawa, K., Morishita, R., and Asano, T. (1994) J. biol. Chem. 269, 15302-15309

[2] Kato, K., Shinohara, H., Kurobe, N., Inaguma, Y., Shimizu, K., and Ohshima, K. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1074, 201-208

[3] Inaguma, Y., Goto, S., Shinohara, H., Hasegawa, K., Ohshima, K. and Kato, K. (1993) J. Biochem. 114, 378-384

Fig. 1　ラットαBクリスタリン、ヒトp20およびラットp20のアミノ酸配列の比較

Fig. 2　ラット後肢筋（ヒラメ筋、長肢伸筋、大腿直筋）に含まれるp20の発達に伴う変化

Fig. 3　坐骨神経切除あるいは腱切断を行ったときのヒラメ筋および長肢伸筋におけるp20の変化

Fig. 1

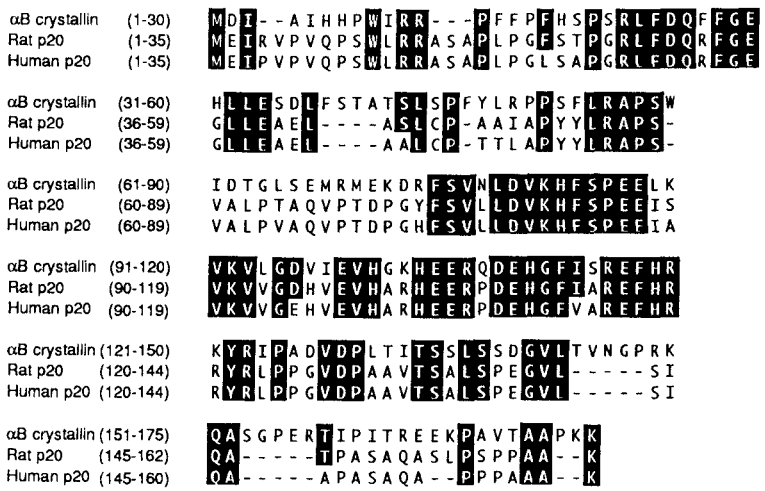


Fig. 2

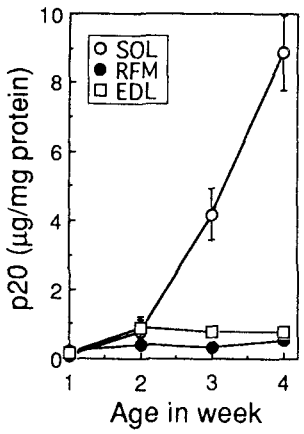
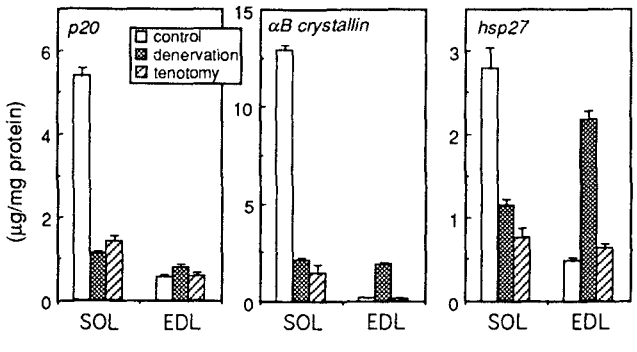


Fig. 3



52 培養セロトニン産生細胞におけるトリプトファン水酸化酵素レベルの決定要因としての酵素タンパク分解について

長谷川宏幸，大黒一哉
（西東京科大・バイオサイエンス）

〔要約〕

RBL2H3細胞（ラット，basophilic leukemia cell line）のトリプトファン水酸化酵素は酵素タンパク質のターンオーバーが著しく速いことが示された。培養下の細胞にシクロヘキシミド（CHX）を与えて，タンパク質合成を阻害すると，細胞の持つトリプトファン水酸化酵素活性は急激に消失し，その半減時間は，約20分であった。また，CHXを洗浄して除くと，いったん消失した酵素活性は急速に回復した。本実験では，1）生細胞内での基質の代謝回転の測定によってはかられるトリプトファン水酸化酵素の細胞内活性の測定，2）細胞を凍結融解してから実施した非細胞系での酵素活性測定，および，3）〔^{35}S〕メチオニンによるパルスラベルーチェイスとそれに引き続く特異抗体を用いた電気泳動実験によって，トリプトファン水酸化酵素の分解を観察した。その結果，単層培養下のRBL2H3細胞内において本酵素はタンパク質分解と，それに等しい速度での酵素の新生という著しく速い代謝回転によって酵素量を細胞レベルで維持していることが強く示唆された。

はじめに

ラットRBL2H3細胞は，自らセロトニンを合成して分泌顆粒に蓄える。培養下のこの細胞は人為的な抗原物質とそれに対する特異抗体（IgE）に応答して顆粒放出を行うなど好塩基球および肥満細胞に固有の細胞特性のいくつかを残している樹立細胞株である。我々は，この細胞を末梢性のセロトニン合成／分泌細胞のモデルとして用い，セロトニン生合成経路の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素の細胞内における活性調節機構を研究してきた。本細胞は多量のセロトニンを蓄積するが，トリプトファン水酸化酵素の活性は微弱である。一方，マウス由来の肥満細胞腫，P-815，はトリプトファン水酸化酵素を多量にもち，本酵素精製の出発材料として多用されてきた。ところで，トリプトファン水酸化酵素に対する特異抗体を用いたマウス諸臓器に対する免疫組織化学的検索によれば，末梢のセロトニン産生細胞は，細胞あたりのトリプトファン水酸化酵素量の分布に著しい多様性を示している（1）。すなわち，それぞれの細胞の置かれた部位と，生理的な状況に応じて，細胞レベルで酵素量が調節されているものと思われる。われわれは細胞レベルでの酵素量を規定する調節機構を解明する目的で，まず，酵素タンパク質のターンオーバーについて検討した。トリプトファン水酸化酵素タンパク質のターンオーバーに関しては，これまでの報告では，ラットの脳において，半減期は2-3日（2），また，松果体では75分（3）という値が推定されている。本実験ではRBL2H3細胞内におけるトリプトファン水酸化酵素のきわめて速いターンオーバー（半減時間，20分）を観察した。この結果は文献的にもっとも速いと言われるいくつかタンパク質と比較できるものであった。

材料，方法

培養細胞：RBL2H3細胞は，国立衛生試験場内細胞バンクより，提供された。細胞は，10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Mediumで培養した。抗トリプトファン水酸化酵素抗体：マウス肥満細胞より精製したトリプトファン水酸化酵素を抗原としてウサギを免疫し，抗血清を得た。免疫沈降実験には，このウサギ抗体を一次抗体とし，沈降にはパンソルビン（Calbiochem）を用いた。酵素活性の測定： 1）5HTP蓄積による生細胞内トリプトファン水酸化酵素活性の測定は，Nagatsuの方法（4）を96穴プレート上のRBL2H3細胞に適用した。培養下の細胞に芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素に対する阻害剤（NSD-1015, 400 μM）を与え（30 min）5HTPの蓄積量をもって細胞内にて実際に稼働した酵素活性とした。2）活性酵素現存量は，培養下の細胞をPBS(-)で洗浄し，凍結融解により細胞を破壊した後，Fe^{2+}（50 μM）とDTT（15 mM）による活性化処理を行い，至適条件をあたえる基質溶液を加えて酵素反応を行わせた。パルスラベルーチェイス実験：培養下のRBL2H3細胞（10^6 cell/35 mm-dish）をメチオニンを含まない培地中に60分間おいたのち，〔^{35}S〕メチオニン（200 μCi/ml, Tran ^{35}S-label, ICN）を含む培地にて10分間ラベルした。また，チェイスは，ラベル後，速やかに非標識メチオニンを含む培地に置換し，所定の時間，経過せしめた。この標識実験ののち，細胞を1 % NP-40/50 mM Tris-HCl (pH 7.8) にて溶解し，抗トリプトファン水酸化酵素特異抗体にて免疫沈降を行い，10% ポリアクリルアミド-SDS-電気泳動の後，フルオログラフィーを行った。タンパク質バンドへの^{35}S取り込みの定量はデンシトメトリーで行った。

実験結果

1）単層培養下のRBL2H3細胞の細胞内における5HTPへの転換速度を芳香族-L-アミノ酸脱炭酸酵素存在下に蓄積する5HTPの定量によって求めた。この方法では，細胞は生理的な活動に近い代謝を行っていると仮定できる。0.01 から30 μM のCHX存在下に1時間培養し，細胞内活性を測定したところCHXの1 μM 以上では5HTP蓄積は認められなかった。同様の方法で，活性消失の時間経過を観察した結果，半減時間は約20分であった。

2）非細胞系において，細胞抽出液にトリプトファン水酸化酵素反応の至適条件を与えて，活性を持つ酵素の現存量を計測した。この方法でも，CHX 処理によるトリプトファン水酸化酵素の消失が観察された（図1）。活性の半減時間は，約20分であった。また，CHXを洗浄で除くといったん消失した酵素活性は急速に回復することが観察された。

3）〔^{35}S〕メチオニン存在下でのトリプトファン水酸化酵素タンパクへの^{35}Sの取り込みを，本酵素に対する特異抗体を用いて検討した。本酵素のサブユニットと思われる分子量53 k のバンドへの^{35}Sの取り込みが観察され，チェイス実験ではこのバンドの減衰が観察された。このバンドはより長時間の取り込み実験によってもさらに濃くなることはなかった。このバンドの減衰速度をデンシトメーターによって数値化した結果，その半減時間は約20分であった（図2）。一方，より小さな分子量（20,000 以下）の免疫陽性の濃厚なバンドが観察された。このバンドについては今のところ抗トリプトファン水酸化酵素抗体に対して陽性であること以外の情報はない。

4）マウス由来の肥満細胞腫，P-815 は細胞内に多量のトリプトファン水酸化酵素を持つ。この細胞の抽出液をRBL2H3細胞抽出液と混合することによって，RBL2H3細胞抽出液中にトリプトファン水酸化酵素を分解する活性を検出することができた。

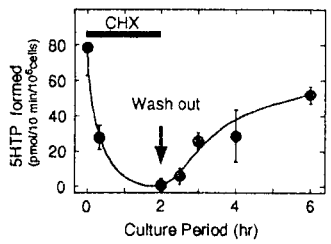


図1　シクロヘキシミド処理に伴うRBL2H3細胞内トリプトファン水酸化酵素現存量の変化：
非細胞系での酵素活性は，CHX(1 μg/ml)処理により完全に消失した。洗浄を行うと酵素活性は急速に回復した。

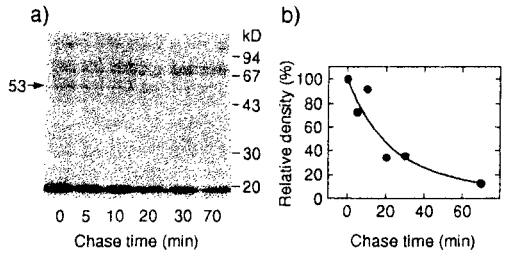


図2　パルスラベル-チェイス実験によるRBL2H3細胞内トリプトファン水酸化酵素のタンパク質分解の解析：
[^{35}S]メチオニンで10分間ラベル後，図に示した時間チェイスした。細胞溶解液を免疫沈降にかけ，SDS-PAGE，フルオログラフィーを行った。a: フルオログラム，b: 53kのバンドのデンシトメトリー。

考察

細胞内酵素レベルは新規生合成速度とその分解除去速度の平衡で決まる。それぞれの速度を決定する因子が何であるにせよ，定常状態では合成速度と分解速度とは等しい。RBL2H3細胞においてセロトニン産生の律速酵素である，トリプトファン水酸化酵素が，細胞自身の持つ除去機構によってきわめて迅速に除去されていることが示された。これは単層培養下に生理的に進行するプロセスであり，細胞レベルでの酵素量の調節機構を構成するものと考えられる。半減時間から推定される，タンパク質分解速度は，今日までに報告されている細胞内酵素タンパク質の分解の例と比較してもきわめて速いものである。ＣＨＸによるタンパク合成阻害下で観察された分解速度は定常状態での本酵素の生合成速度と等しいと考えられる。したがって，本実験が観察したトリプトファン水酸化酵素のきわめて急速な分解速度は，本細胞の定常状態での比較的低い酵素活性が生合成量の抑制によってではなく，活性酵素の積極的な分解除去により達成されていることを示している。RBL2H3細胞を末梢性のセロトニン合成細胞のモデルとして考えるならば，本実験は，セロトニン産生細胞における主要細胞機能を決定するトリプトファン水酸化酵素の現存量の調節がタンパク質分解によって達成されていることを強く示唆した。

文献

1．　Ohtsuka, H., Iwanaga, T., Hasegawa, H., Ichiyama, A., and Fujita, T. (1991) *BioMed. Res.* 12, 131-142
2．　Meek, J. L. and Neef, N. H. (1972) *J. Neurochem.* 19, 1519-1525
3．　Sitaram, B. R. and Lees, G.J. (1978) *J. Neurochem.* 31, 1021-1026
4．　Nagatsu, T., Sawada, M., Yamaguchi, T. (1983) *Neurochem. Int.* 5, 603-609

53 ホルボールエステルによるヒスタミン H_1 受容体遺伝子転写活性増加と受容体アップレギュレーション

福井 裕行
（大阪大学医学部・第二薬理学）

〔要約〕

ヒト子宮癌由来培養細胞（HeLa 細胞）に発現するヒスタミン H_1 受容体はホルボールエステルによりアップレギュレーションが引き起こされ、H_1 受容体密度は約 2 倍になった。このアップレギュレーションには蛋白キナーゼ C の関与が示唆された。アップレギュレーションの引き起こされた HeLa 細胞はヒスタミン受容体シグナルが約 3 倍増加した。この受容体アップレギュレーションは蛋白合成過程の転写および翻訳阻害薬によって抑制された。アップレギュレーションに先行して H_1 受容体 mRNA レベルは上昇した。ヒトヒスタミン H_1 受容体遺伝子のプロモーター領域にはホルボールエステルに反応する転写活性調節因子結合部位が見いだされた。ホルボールエステルは H_1 受容体遺伝子プロモーター活性を約 2.5 倍増加させた。

〔実験方法〕

HeLa 細胞は 10% ウシ胎児血清を含むイーグル MEM 培地で培養した。ヒスタミン H_1 受容体の測定は [^{3}H]メピラミン結合試験によりおこなった。イノシトールリン酸の測定は [^{3}H]*myo*-イノシトールでラベルした HeLa 細胞を一定時間インンキュベーションし、生成した [^{3}H]イノシトールリン酸をアニオン交換カラム（AG 1）で精製し、放射能を測定することによりおこなった。プロモーター活性の測定はヒトヒスタミン H_1 受容体遺伝子の 3'-非翻訳領域（2,160 bp）をルシフェラーゼ遺伝子をもつ PicaGene basic vector にサブクローニングし、HeLa 細胞にトランスフェクションし、一定時間インキュベーションし、ルミノメトリーによるルシフェラーゼ活性の測定によりおこなった。

〔成績〕

1. ホルボールエステル（phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA）は HeLa 細胞の H_1 受容体のアップレギュレーションを引き起こし、受容体密度を約 2 倍増加させた（表 1）。この増加は 20 時間後にピークに達した。PMA の EC_{50} は 11 nM であった。PMA による H_1 受容体アップレギュレーションは 5 種類の蛋白キナーゼ C 阻害薬のいずれによっても抑制された。受容体アップレギュレーションの引き起こされた HeLa 細胞はヒスタミン刺激によりイノシトールリン酸の蓄積が約 3 倍増加した。

表1. PMA刺激および無刺激のHeLa細胞における[^{3}H]メピラミン結合試験

	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg 蛋白)
コントロール	2.7 ± 0.2	106.4 ± 0.9
PMA (1 μM)	1.7 ± 0.1*	191.2 ± 2.0*

*$p < 0.001$

2. PMAによるH_1受容体アップレギュレーションはアクチノマイシンD、シクロヘキシミドにより抑制された。PMAによりH_1受容体mRNAレベルは上昇し、6時間後にピークに達した。

3. ヒトヒスタミンH_1受容体遺伝子プロモーター領域にAP-1部位が見いだされた。ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性の測定により、ヒトH_1受容体遺伝子プロモーター活性はPMAにより約2.5倍増加した(表2)。

表2. H_1受容体遺伝子プロモーター活性

	ルシフェラーゼ活性 (%)
コントロール	100 ± 7
PMA (1 μM)	250 ± 39*

*$p < 0.001$

〔考察〕

ホルボールエステルはヒスタミンH_1受容体遺伝子プロモーターの転写活性を増加させ、H_1受容体のアップレギュレーションを引き起こす。このH_1受容体アップレギュレーションには蛋白キナーゼCの関与が示唆される。ヒトヒスタミンH_1受容体遺伝子プロモーター領域(1)にはAP-1部位が存在するが、H_1受容体アップレギュレーションに関与することが示唆される。H_1受容体アップレギュレーションに対応してH_1受容体シグナルは増加する。H_1受容体アップレギュレーションは種々のヒスタミンの関与する生理および病理機能において重要な意義を有すると考えられる。

〔文献〕

1. Fukui, H., Fujimoto, K., Mizuguchi, H., Sakamoto, K., Horio, Y., Takai, S., Yamada, K., and Ito, S. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 894-901

54 ヒスタミンH1受容体のリガンド認識機構について

大田 和美、林 秀行、鏡山 博行、福井 裕行*
（大阪医大・医化学、*大阪大学医学部・第二薬理）

[要約]

ヒスタミンH1受容体は、各種組織の平滑筋、副腎髄質、心臓、血管内皮細胞、および脳に分布し、脳においてはニューロン、グリアおよび血管内皮細胞にその発現が確認されており、これら受容体の中枢神経系における機能には興味がもたれる。H1受容体は、イノシトールリン酸ー細胞内Ca^{2+}を介し、情報伝達を行うが、リガンド認識のメカニズムについては不明であった。今回、我々はクローン化したヒトH1受容体を用いて、H1受容体と他の活性アミン受容体間のホモロジーより推察されるリガンド認識部位に、部位特異的変異導入法を用いて変異受容体を作製し、機能解析を行った。その結果、アゴニストの結合および受容体の活性化には、Asp^{107}とAsn^{198}の二つのアミノ酸残基が必要であり、アンタゴニストの結合にはAsp^{107}が必須であることが示唆された。

[目的]

ヒスタミンH1受容体におけるリガンド認識機解明

[方法]

クローン化したヒトヒスタミンH1受容体において、ヒスタミンのアミノ基認識部位と考えられる第3膜貫通領域内のAsp^{107}およびイミダゾール基認識部位と考えられる第5膜貫通領域内のThr^{194}およびAsn^{198}の3個のアミノ酸残基に部位特異的変異導入法を用いて、変異受容体を作製し、CHO細胞に恒久的に発現させた。受容体の発現はNorther blotsにより確認し、ほぼ同じ程度の発現と考えられるクローンについてH1受容体拮抗薬である[^{3}H]メピラミンの結合およびヒスタミン刺激による[^{3}H]イノシトールリン酸の蓄積を測定した。また、Ki値は5nMの[^{3}H]メピラミン存在下で測定された。

[結果]

Ala^{107}変異受容体では[^{3}H]メピラミンの結合およびヒスタミンの結合は完全に消失したのに対し（Table 1）、Asn^{107}, Glu^{107}変異受容体では[^{3}H]メピラミンおよびヒスタミンの親和性はwild-typeの約50倍程度まで低下した（Table 1）。また、Ala^{194}変異受容体では[^{3}H]メピラミンに対する親和性は軽度上昇したのに対し、ヒスタミンの親和性はほとんど変化しなかった（Table 1）。Ala^{198}変異受容体では[^{3}H]メピラミンに対する親和性は変化しなかったのに対し、ヒスタミンの親和性は著明に減少した（Table 1）。これらのことからH1受容体におけるアンタゴニストの結合にはAsp^{107}が不可欠であるが、Thr^{194}およびAsn^{198}は必要なく、アゴニストの結合にはAsp^{107}およびAsn^{198}が重要であることが示唆された。

ヒスタミン刺激による[^{3}H]イノシトールリン酸の蓄積はAla^{107}変異受容体では完全に消失したのに対し、Asn^{107}, Glu^{107}およびAla^{198}変異受容体では有意な減少を認めたが、完全には消失せず、Ala^{194}変異受容体では変化は認められなかった（Fig.1）。また、ヒスタミンの親和性とヒスタミン刺激による[^{3}H]イノシトールリン酸の蓄積の間には正の相関が認められた。

[考察]

H1受容体は7回膜貫通型のロドプシンタイプの受容体であり、他の活性アミン受容体（$\alpha 2$, $\beta 2$, H2受容体）とのホモロジーおよびこれらの変異受容体の研究により、ヒスタミンのアミノ基およびイミダゾール基はそれぞれ第3膜貫通領域内のAsp^{107}および第5膜貫通領域内のThr^{194}およびAsn^{198}と相互作用していると考えられ、これらの残基を別の残基に置換した変異受容体を作製し、機能解析を行った。

Ala^{107}変異受容体ではメピラミン結合は完全に消失したのに対し、Ala^{194}変異受容体およびAla^{198}変異受容体ではメピラミンに対する親和性は減少しなかったことより、アンタゴニストの結合にはAsp^{107}が不可欠であるが、Thr^{194}およびAsn^{198}は必要ないことが示唆された。さらに構造活性相関の研究からメピラミンを含むH1受容体拮抗薬の構造上の特徴として、二つの芳香族置換基を二つまたは三つの原子で結んだアミノ基構造が上げられるが、このこととのAsp^{107}必要性を考慮すると、アンタゴニストの結合にはAsp^{107}を介するイオン結合とThr^{194}およびAsn^{198}近傍の疎水結合の関与が示唆された。

また、Ala^{107}変異受容体ではヒスタミンの結合は完全に消失したのに対し、Ala^{194}変異受容体ではヒスタミンの親和性はほとんど変化しなかったが、Ala^{198}変異受容体ではヒスタミンの親和性は著明に減少したことから、H1受容体におけるアゴニストの結合にはAsp^{107}およびAsn^{198}が重要であることが示唆されるが、アゴニストの結合とアゴニストによる受容体の活性化の正の相関を考慮すると、Asn^{198}は受容体の活性化にも必須のようにに思えるが、Asn^{198}はアゴニストの受容体への結合には関与するが受容体の直接の活性化には関与していない可能性が考えられる。即ちアゴニストによる受容体の活性化に関与する、これら三つの残基と別の残基の存在が考えられる。事実、Ala^{198}変異受容体ではヒスタミンの親和性は著明に減少したにもかかわらず、ヒスタミン刺激による[^{3}H]イノシトールリン酸の蓄積は少ないながらも有意に上昇していた(Fig.1)。

以上のことより、H1受容体におけるアゴニストの結合にはAsp^{107}およびAsn^{198}が重要であること、アンタゴニストの結合にはAsp^{107}が不可欠であるが、Thr^{194}およびAsn^{198}は必要ないことが示された。これらの新しい知見は今後のリガンドの研究に役立つものと考える。尚、H1受容体におけるより詳細なリガンド認識機構の解明には、さらなる変異受容体およびそれらに対する各種リガンドの作用などの研究が必要であろう。

H1 receptor	[^{3}H]mepyramine		histamine
	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg)	Ki (μM)
Wild-type	1.04±0.01	1.54±0.26	16.9±0.1
Ala^{107}	n.d.	n.d.	n.d.
Asn^{107}	131±14	1.50±0.26	n.d.
Glu^{107}	52±9	5.67±0.90	n.d.
Ala^{194}	0.33±0.01	1.89±0.04	59.9±3.8
Ala^{198}	1.18±0.14	0.32±0.01	13100±1200

Table 1. Antagonist binding properties of wild-type and mutant H1 receptors expressed in CHO cells

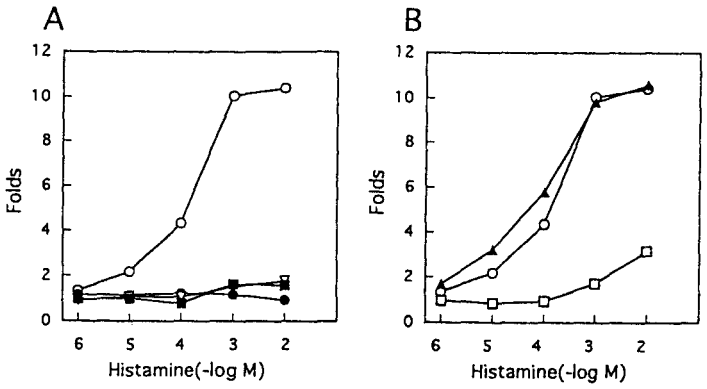


Fig. 1. **Histamine-induced IPs accumulation in transfected CHO cells.** *Panel A.* wild-type receptor (O), ,Ala^{107} mutant receptor (●), Asn^{107} mutant receptor (▼), Glu^{107} mutant receptor (■) *Panel B .* wild-type receptor (O), Ala^{194} mutant receptor (▲), Ala^{198} mutant receptor (□): The results are presented as fold increase in IPs above basal levels in the absence of histamine.

55 ＡＴＰ誘発内向き電流およびドパミン放出に対するアデノシンの両方向性制御

井上　和秀、小泉　修一
(国立衛生試験所．薬理部)

〔要約〕
ラット副腎髄質クロム親和性細胞由来ＰＣ１２を用いて，アデノシンによるＧＴＰ結合蛋白を介したＡＴＰ誘発内向き電流、細胞内Ｃａ濃度上昇およびドパミン（ＤＡ）放出の制御について検討した．アデノシンは，ＧＴＰ結合蛋白を介して，ＡＴＰにより惹起された内向き電流，ならびに細胞内Ｃａ濃度上昇を低用量では抑制し，高用量では増強した．すでに報告したＤＡ（3,10）およびセロトニン（9）によるポジティブフィードバックと共に，ＡＴＰ受容体／チャネル活性はその代謝物アデノシンによっても巧妙に制御されていることが明かとなった．

外液ＡＴＰがＡＴＰ受容体を刺激し、非選択性のカチオンチャネルを活性化し、そこを介して流入したＣａイオンにより神経伝達物質を放出することはすでに報告した（1,2,4-8,）．またＡＴＰ受容体／チャネル活性はセロトニン（9）やＤＡ（3,10）により促進的に制御されていることも明らかにした．今回は、ＡＴＰの生体内代謝物アデノシンによって促進・抑制の両方向性の制御について報告する．

［方法］ＰＣ１２は既報（4）に従って培養した。すなわち、ダルベコーの改変イーグル培養液に７％牛胎仔血清，７％馬血清および硫酸ゲンタマイシン（50μg/ml）を加えた培養液中、37℃、10％ＣＯ2空気中で無菌的に培養した。これをコラーゲンコートしたディッシュに播種、培養し、２日目に実験に用いた。電気生理実験は既報（11）に従い、whole cell recordingにより行った。ＤＡ放出実験ならびに細胞内Ｃａ濃度測定実験は既報（11）に従い行った。

［結果］アデノシンは1mMまで用量を高めても単独では内向き電流を惹起しないが，ATP(30μM)により引き起こされた内向き電流を低濃度（1μM）では抑制し，高濃度（10-100μM）では増強した（Fig.1）．両作用とも可逆的であり，アデノシン適用後１分の洗浄で作用は消失した．百日ぜき毒素(PTX，2ng/ml，20時間)で細胞を処理した場合，あるいはＧＤＰβＳ（500μM）で細胞内を環流した場合には，抑制作用も増強作用も認められなくなった．このことは，両作用の発現にはGTP結合蛋白が介在していることを示唆している．一方，細胞内をタンパク質りん酸化酵素阻害剤　K252b（1μM）で環流した場合，アデノシン低濃度での抑制作用のみが消失した．従って，これらの作用は互いに異なる様式により発現するものと考えられる．アデノシンのＡＴＰ誘発電流に対する作用と同様の作用がＡＴＰによる細胞内Ｃａ濃度上昇に対しても認められた．アデノシン（100μM）はまたＡＴＰにより引き起こされたＤＡ放出を増強した（Fig.2）．この作用はA2受容体アゴニストでも誘発され、一方PTXあるいはA2受容体ブロッカーで抑制された．

［考察］アデノシンは，ＧＴＰ結合蛋白を介して，ＡＴＰ誘発内向き電流を低用量では抑制し，高用量では増強した．この結果から、次のことが予測される．すなわち、神経細胞終末からシナプス間隙に放出されたＡＴＰは，ポストシナプス細胞のＡＴＰ受容体を刺激して内向き電流を惹起するが，一方でエクトＡＴＰase等で急速に代謝されてアデノシンとなり，ＡＴＰ誘発電流を制御する．ＡＴＰが低濃度に放出される場合には生成されるアデノシンは少量であり，その作用は抑制的である．一方，高頻度刺激で大量にＡＴＰが放出される場合にはＡＴＰそのものによって引き起こされる反応も大であるが，さらに生成されるアデノシンも大量，高濃度となりＡＴＰの作用を増強することになる．このように，アデノシンはＡＴＰ受容体の活性に対してきわめて特徴的な制御を行う可能性が出てきた．

［文献］1. K. Inoue, K.Nakazawa, M.Ohara-Imaizumi, T.Obama, K.Fujimori, and A. Takanaka. (1991) Br.J.Pharmacol., 102, 581-584.
2. K. Inoue, K.Nakazawa, M.Ohara-Imaizumi, T.Obama, K.Fujimori, and A. Takanaka. (1991) Br.J.Pharmacol., 102, 851-854.
3. K.Inoue, K. Nakazawa, T. Watano, M. Ohara-Imaizumi, K. Fujimori, and A. Takanaka. (1992)

Eur.J.Pharmacol., 215, 321-324.
4. K.Inoue, K.Nakazawa, K.Fujimori, and A.Takanaka. (1989)^ Neurosci.Lett., 106, 294-299.
5. K.Nakazawa and K.Inoue. (1992) J.Neurophysiol., 68, 2026-2032.
6. K.Nakazawa, K.Fujimori, A.Takanaka, and K.Inoue. (1990) J.Physiol.(London), 428, 257-272.
7. K.Nakazawa, K.Fujimori, A.Takanaka, and K.Inoue. (1991) J.Physiol.(London), 434, 647-660.
8. K.Nakazawa, K.Inoue, K.Fujimori, and A.Takanaka. (1991) Pflugers Arch. 418, 214-219
9. K.Nakazawa, K.Inoue, S.Koizumi and K.Inoue. (1994) Pflugers Arch., in press.
10. K.Nakazawa, T.Watano and K.Inoue. (1993) Pflugers Arch., 422, 458-464.
11. M.Ohara-Imaizumi, K.Nakazawa, T.Obama, K.Fujimori, A.Takanaka and K.Inoue. (1991) J.Pharmacol.Exper.Thera., 259, 484-489.

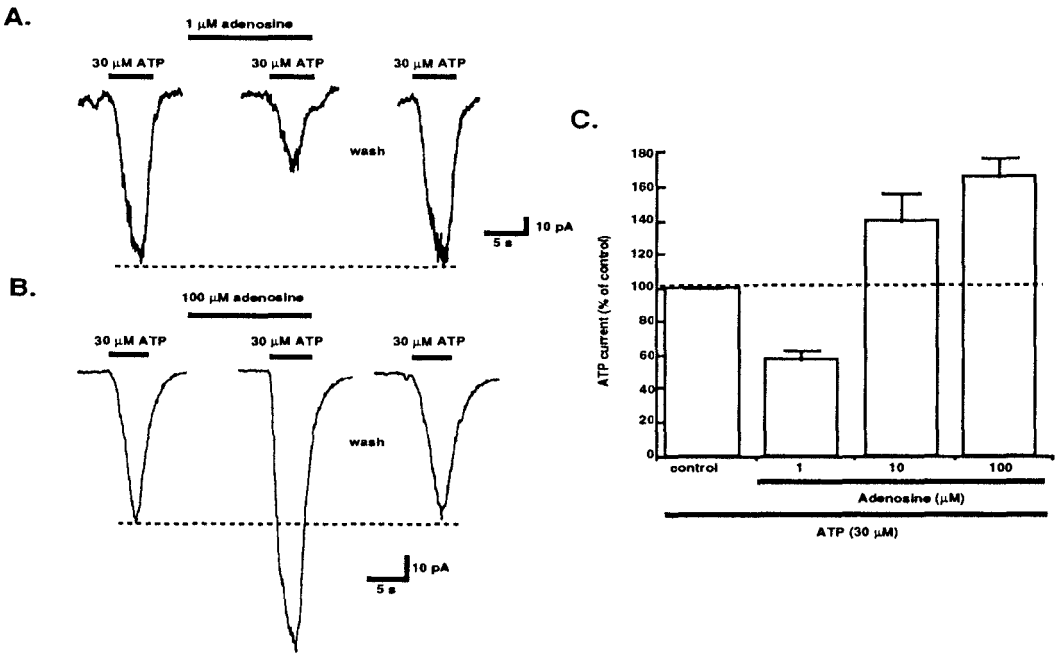


Fig.1 The effects of adenosine on the current activated by ATP (30μM) in PC12 cells. Holding potential was -60mV. Adenosine was present 30s before and during aplication of ATP. A: Inhibition by 1μM adenosine. B: Enhancement by 100μM adenosine. C: Concentration-dependent modulation by adenosine. Each bar represents mean ± SEM from 5 to 8 cells tested.

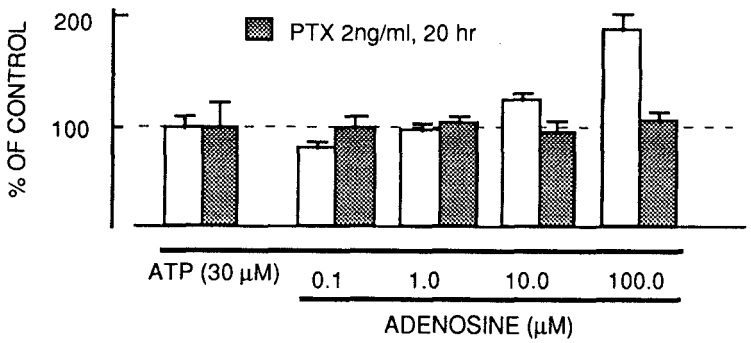


Fig.2 Effect of adenosine on ATP-evoked dopamine release via PTX-sensitive mechanism. Each bar represents mean ± SEM of 3 data.

56 一酸化窒素（NO）誘発性acetylcholine放出におけるperoxynitriteの役割

大熊誠太郎、陳　大志、桂　昌司、長谷川武史*、栗山欣弥
（京都府立医科大学・薬理、*同・放射性同位元素研究室）

〔要約〕
一酸化窒素（NO）により誘発されるacetylcholine（ACh）放出におけるperoxynitriteの機能的役割について、初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討を加えた。*N*-Methyl- D-aspartate(NMDA)受容体刺激およびNO donor［sodium nitroprusside(SNP)および*S*-nitroso- *N*-acetylpenicillamine (SNAP)］によりの誘発されたACh放出は、いずれもhemoglobinの添加により消失した。また、これらの方法により生成されたNOによるACh放出は、superoxide scavengerであるsuperoxide dismutaseおよびceruloplasminにより用量依存的に抑制された。さらに、合成したperoxynitriteは用量依存的なAch放出の促進をもたらした。以上の結果より、NO誘発性ACh放出はNOとsuperoxideとの反応により生成されるperoxynitriteを介して生じる可能性が示唆される。

［目的］
NOは中枢神経系において神経伝達物質様作用を有しており、海馬における長期増強に関与し、あるいはguanylate cydaseを活性化することによりcGMPの生成を促進し、諸種の神経伝達物質放出を生じさせるなど、多くの機能的役割を果たしていると考えられている。一方、NOはsuperoxideと容易に反応してperoxynitriteに変換されることが報告されている（2、5）。このperoxynitriteは強い酸化能を持つとともに、容易にプロトン化されてNO_2ラジカルとヒドロキシラジカルに分解されることが知られている（1、4）。そこで、本研究ではNOにより誘発される神経伝達物質の放出におけるperoxynitriteの意義についてマウス大脳皮質より調製した初代培養神経細胞を用い、内在性のacetylcholineの放出量を測定することにより検討した。

［実験方法］
胎齢15日目のマウス胎児新皮質を用いて、既報に従って神経細胞を単離したのちに初代培養し（3）、培養13日目の神経細胞を実験に供した。100μMのeserineを含有するKrebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB: pH 7.4)中で37℃、10分間のpreincubationののちに、5分毎のincubation（37℃）を行い、各fractionより得たbufferをHPLCに適用してbuffer中に放出された内在性AChを測定した。すべての薬物は第4 fractionのincubation開始時に添加し、薬物存在下において観察されたACh放出量は、第3 fractionで得られた放出量（basal release）で除することにより算出された百分率で表わした。NMDA受容体刺激によるACh放出の検討にはMg^{2+}を含有しないKRBを用いた。Peroxynitriteの合成はBeckmanらの方法に準じて行った（1）。

［結果及び考察］
NMDAは用量依存的に神経細胞からのACh放出を増大させた。このNMDA誘発性ACh放出は、NMDA受容体拮抗薬であるMK-801により用量依存的に阻害された。同様に、SNPおよびSNAPはいずれも用量依存的なACh放出の亢進をもたらしたが、その促進効果の強さはSNAPのほうが

SNPに比して約10倍強力であった。また、NMDA誘発性およびNO donor誘発性ACh放出は、hemoglobinによって用量依存的に低減した。このことから、NMDA誘発性およびNO donor誘発性ACh放出はNOを介して生じたものであると考えられる。

NOはsuperoxideと容易に反応して強力な酸化能を有するperoxynitriteを生成することが知られている（2、5）ことから、次にsuperoxideを反応系から除去した場合のNO誘発性ACh放出の変化について、superoxide dismutase(SOD)およびceruloplasmin(CP)を反応系に添加することにより検討した。NMDA誘発性ACh放出はSODにより用量依存的に抑制され、同様の抑制効果がSNPおよびSNAP誘発性ACh放出においても観察された（Fig. 1)。CPもSODの場合と同様に、NO誘発性ACh放出を低下させた。この結果から、NOによるACh放出促進作用にはsuperoxideの存在が必須である可能性が強く示唆され、またperoxynitriteの生成を介してNOによるACh放出の誘発が発現されるものと考えられる。そこで、NOとsuperoxideとから生成されるperoxynitriteのACh放出に及ぼす作用について合成したperoxynitriteを用いて検討したところ、Fig. 2に示すように、AChはperoxynitriteにより用量依存的に放出されることが明らかとなった。以上の結果から、NO誘発性ACh放出はNOおよびsuperoxideにより生成されるperoxynitriteを介して招来される可能性が示唆される。

[文献]

1.Beckman, J.S. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1620-1624. 2.Blough, N.V. and Zafiriou, O.C. (1985) Inorg. Chem. 24, 3502-3504. 3.Ohkuma, S. et al. (1990) Eur. J. Pharmacol. 189, 277-285. 4.Radi, R. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 4244-4250. 5.Saran, M., Michel, C. and Bors, W. (1990) Free Radicals Res. Commun. 10, 221-226.

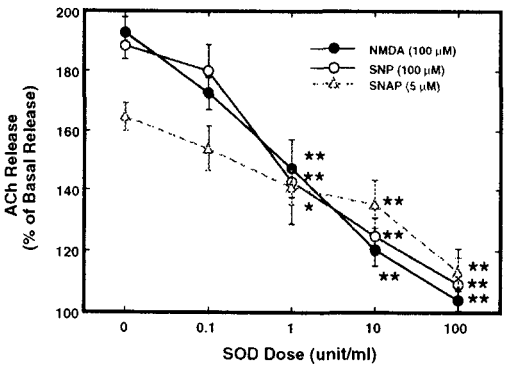


Fig. 1 Effect of Cu^{2+}, Zn^{2+} Superoxide Dismutase (SOD) on N-Methy-D-Aspartate (NMDA)-, Sodium Nitroprusside (SNP)- and S-Nitroso-N-Acetyl-penicillamine (SNAP)-Induced Acetylcholine (ACh) Release from CerebralCortical Neurons

The basal releases for NMDA, SNP and SNAP were 4.63 ± 0.72, 4.88 ± 0.51 and 4.63 ± 0.46 pmol/mg protein/fraction, respectively.
**p<0.05 and **p<0.01, compared with the value determined in the presence of NMDA, SNP or SNAP alone (Dunnett's test, N=4).*

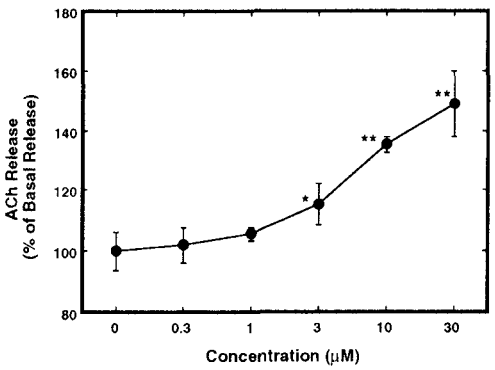


Fig. 2 Effect of Peroxynitrite on Acetylcholine (ACh) Release from Cerebral Cortical Neurons

The basal release was 4.33 ± 0.26 pmol/mg protein/fraction.
**p<0.05 and **p<0.01, compared with the basal value (Dunnett's test, N=4).*

57 セロトニンによるラット前頭葉アセチルコリン分泌の制御機構（Ⅰ）：セロトニン分泌促進剤Fenfluramineの効果

平野 均、 山田 通夫、 H.C. Fibiger*

（山口大学医学部神経精神科、ブリティシュ・コロンビア大学医学部精神科*）

〔要約〕

セロトニン(5-HT)による前頭葉アセチルコリン(ACh)分泌の制御機構を解明する目的で、脳微小透析法により経時的に前頭葉ACh分泌を測定した。5-HT分泌促進剤のfenfluramineは容量依存的(3, 10mg/kg:i.p.)に前頭葉ACh分泌を増加した。透析プローブを介したfenfluramineの前頭葉への局所投与(100μM: 60分間)によっても、ACh分泌は著しく増加した。このfenfluramineのACh増加作用は、選択的5-HT再取り込み抑制薬のfluoxetineの前投与(10mg/kg: 60分前)によって著しく抑制された。以上から、中枢5-HT神経伝達の増加は前脳基底部－皮質ACh神経系に促進的に作用し前頭葉からのACh分泌を増加させること、このACh神経系の終末部が5-HTの作用部位の一つであることが示唆された。

【目的】

縫線核の5-HTニューロンは、前脳基底部－皮質ACh神経系の神経細胞体部および神経終末部に投射していることが示されている(1,2)。また、ACh神経系と5-HT神経系を同時に破壊したり、あるいは抗コリン剤や抗5-HT剤を同時に投与すると、老齢ラットで認められるような重篤な認知・学習機能の障害が生じるが(3,4)、個別の処置や単独の投与だけではそのようなレベルの障害はおきないことが近年報告されるようになり、記憶・学習機能におけるAChと5-HTとの関連が注目されてきている。

一方、5-HT神経系は前脳基底核－皮質ACh神経系に対して抑制的に作用していることがこれまでの研究から示唆されており(5,6)、上述の知的機能における5-HTとAChとの関連とは矛盾するように思われる。そこで、今回われわれは高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器(HPLC-ECD)と一体化した脳微小透析法を用いて、5-HTによる前頭葉ACh分泌の制御機構を解明する目的で、以下の実験を行った。

【方法】

体重250-350gのWistar系雄性ラットを使用し、PaxinosとWatsonの脳図譜に従い(7)、pentobarbital(40-60mg/kg, i.p.)麻酔下で前頭葉に透析プローブの留置手術を行った(AP: +2.7mm, DV: -2.5mm)。２日後、無麻酔・自由行動下のラットの前頭葉にNaCl(125mM),KCl(3.0mM),CaCl2(1.3mM),MgCl2(1.0mM),NaHCO3(23mM)を含む人工脳脊髄液を5μl/minで還流した。約２時間後から10分間隔でACh分泌量の測定を開始し、分泌値は最初の薬物投与前の6連続検体を加算平均した値を100としその相対で表示した。また、２要因分散分析の統計解析にはその値を用いた。fenfluramineとfluoxetineは、salineに溶解し投与した。局所投与のfenfluramineは、人工脳脊髄液中に溶解しpHを補正した後使用した。

【結果】

fenfluramine(3mg/kg, 10mg/kg: i.p.)は容量依存性に前頭葉ACh分泌を増加させた(P=0.001)。また、両群のACh分泌値は対照群(saline,i.p.)と比較して有意に高値であった(P=0.020, P<0.001:図１)。透析プローブを介して局所投与(60分)された100μMのfenfluramineは前頭葉ACh分泌を有意に増加させたが(P=0.048)、10μMでは増加は認められなかった(図２)。

fluoxetine(10mg/kg, i.p.)は、単剤ではAChの基礎分泌値に著明な影響を与えなかった(図３)。しかし、fenfluramine(10mg/kg)によるACh分泌増加作用はfluoxetineの前投与(10mg/kg, 60分前)により著しく抑制され、ACh分泌値はsaline投与群と比較し有意の低値を示した(P=0.004:図 4)。

【考察】

fenfluramineの腹腔内投与、および局所投与によってラット前頭葉におけるACh分泌が著名に増加した。fenfluramineは5-HT神経終末から5-HT分泌を促進するため(8)、5-HT神経伝達の増加によってACh分泌の増加がもたらされたことが示唆された。これは、5-HT再取り込み抑制薬のfluoxetineの前投与によってfenfluramineのACh増加作用が著しく抑制されたことによっても支持された。すなわち、fenfluramineの5-HT分泌亢進作用はトランスポーターを介して5-HT神経終末に取り込まれ後に発現すると推測されており(8)、この実験結果はfluoxetineがfenfluramineの5-HT神経終末への取り込みを阻害したためと考えられる。また、5-HT神経は前脳基底部－皮質ACh神経系の細胞体部および終末部へ投射していることが報告されている(1,2)。今回、fenfluramineの前頭葉への局所投与によってACh分泌が増加したことから、5-HTの作用部位の一つはこのACh神経系の終末部である可能性が示唆された。

予想に反して、fluoxetineによっては前頭葉のACh分泌は増加しなかった。fenfluramineおよびfluoxetineは共に5-HTニューロンの細胞体上の自己受容体に働き、発火頻度と5-HT合成を低下させるが、fenfluramineが発火頻度に関わらず神経終末から5-HT分泌を促進し続けるのに対して、fluoxetineの場合は発火頻度の低下にともない神経終末からの5-HT分泌が漸減していくためであろうと考えられる。

以上から、中枢5-HT神経伝達の増加は、前脳基底部－皮質ACh神経系に促進的に作用し前頭葉からACh分泌を増加させること、またその神経終末部が作用部位のひとつであることが示唆された。

【参考文献】

(**1**) Semba, K., Reiner, P.B., McGeer, E.G. and Fibiger, H.C. (1988) J. Comp. Neurol. 267: 433-453. (**2**) Moore, R.Y., Halaris, A.E. and Jones, B.E. (1978) J. Comp. Neurol. 180: 417-438. (**3**) Richter-Levin, G. and Segal, M. (1989) Brain Res. 477: 404-407. (**4**) Riekkinen Jr., P., Sirviö, J. and Riekkinen, P. (1990) Brain Res. 527: 342-345. (**5**) Barnes, J.M., Barnes, N.M., Costall, B., Naylor, R.J. and Tyers, M.B. (1989) Nature 338: 762-763. (**6**) Siniscalchi, A., Beani, L. and Bianchi, C. (1990) Eur. J. Pharmacol. 175: 219-223. (**7**) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) 2nd ed, Academic Press, London. (**8**) Fuxe, K., Farnebo, L.-O., Hamberger, B. and Ögren, S.-O. (1975) Postgrad. Med. J. 51 (Suppl. 1): 35-45.

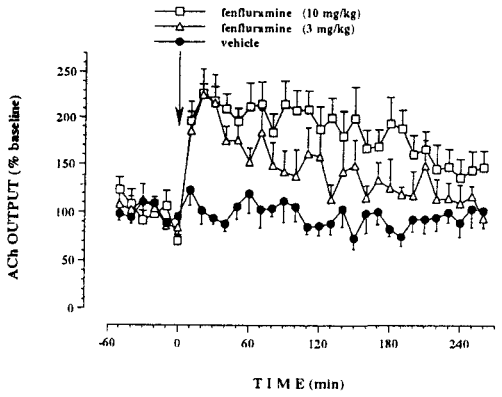


Fig. 1. Effects of fenfluramine (3 and 10 mg/kg, i.p., n=8 and 6 respectively) and vehicle (saline, i.p., n=10) on basal ACh output in the frontal cortex. Points and vertical bars represent mean ± S.E.M. in all figures.

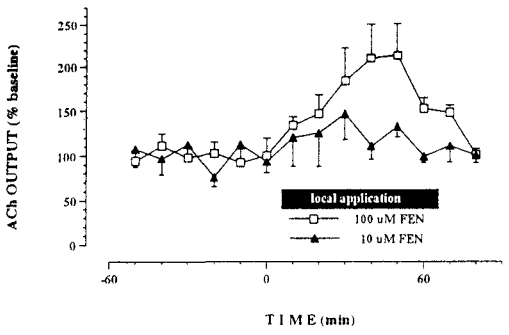


Fig. 2. Effects of fenfluramine (10 and 100 uM, n=7) on basal ACh output in the frontal cortex.

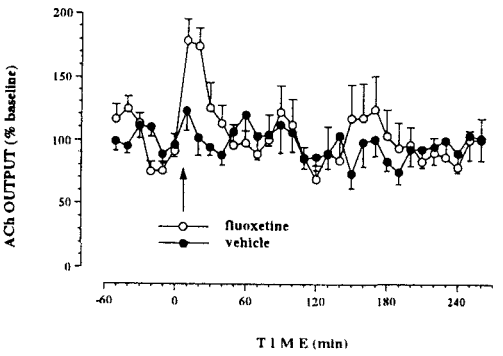


Fig. 3. Effects of fluoxetine (10 mg/kg, i.p., n=8) and vehicle (saline, i.p., n=10) on basal ACh output in the frontal cortex.

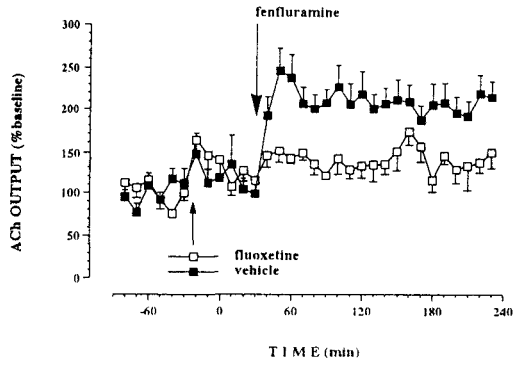


Fig. 4. Effects of fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) on fenfluramine-induced (10 mg/kg, i.p.) increase in ACh release in the frontal cortex. Fluoxetine (n=8) and vehicle (n=6) were injected 60 min before administration of fenfluramine.

58 開口放出のPriming Stepに対するMastoparanの抑制作用

御園生　裕明、今泉　美佳、池田　顕、熊倉　鴻之助
（上智大学・生命研・神経化学）

〔要約〕

ウシ副腎髄質クロマフィン細胞におけるCa^{2+}依存性開口放出において、3量体Gproteinの一つGoが開口放出機構に対して抑制的調節因子として働いていることを我々は明らかにしている（1）。Goの抑制的調節がツーステップ・モデル（2）において、プライミング・ステップと開口過程のどちらに対して働いているのかを明らかにする目的で、高透過性細胞（Leaky細胞）でのCatecholamine（CA）放出に対するMastoparan（MP）の影響を調べた。ATP依存性およびATP非依存性に対するMPの作用を検討した結果、MPはMgATP非依存性CA放出は抑制せず、MgATP依存性CA放出だけを顕著に抑制した。さらにMPはdigitonin処理中に加えたMgATPのpriming作用の結果と思われるCA放出の増大を完全に抑制した。以上から、クロマフィン細胞の開口放出機構において、Goはプライミング・ステップに対して抑制的調節因子として働いていることが示唆される。

AunisらはGoとGiを直接活性化するハチ毒ペプチドMastoparanが同様の抑制作用を持ち、その抑制がGo抗体によって打ち消されることを報告し、Goが開口放出機構に対して抑制的調節因子として働いているという我々の結果を支持している（3）。一方クロマフィン細胞の開口放出機構は顆粒を放出可能な状態にするMgATP依存性プライミング・ステップと、Ca^{2+}依存性MgATP非依存性の開口過程からなるというツーステップ・モデルが提唱されている（2）。Digitonin処理により得られるLeaky細胞では、100μMCa^{2+}刺激によって2分以内に終了するMgATP非依存性の速いCA放出が引き起こされる。これは既にprimingされている顆粒からの放出と考えられている。一方digitonin処理後にMgATP存在下でCa^{2+} 10μMの刺激を行うと、2分以降12分まで持続するCA放出が起こる。この放出はMgATP primingによる顆粒の供給に裏打ちされている（Fig.1）。我々はGoの抑制的調節が上に述べたツーステップ・モデルにおいて、プライミング・ステップと開口過程のどちらに対して働いているのかを明らかにする目的で、高透過性細胞（Leaky細胞）でのCatecholamine（CA）放出に対するMastoparan（MP）の影響を調べた。

［実験方法］

クロマフィン細胞はウシ副腎髄質から既報（1）に従って調製、10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagles Medium中で単層培養し、培養4～10日目の細胞を実験に用いた。CA放出実験は、まず培養細胞をCa^{2+}-free Locke's液で洗浄し、その後digitonin buffer（20μM digitonin、140mM Na-glutamate、5mM glucose、5mM EGTA、20mM PIPES、pH6.8）に置き換え、37℃、4分間incubationしてLeaky細胞を調製した。ATPのpriming効果をみる場合はdigitonin buffer中に5mM MgATPを加えた。ATP非依存性放出はCa^{2+}-EGTA buffer A（140mM Na-glutamate、5mM glucose、5mM EGTA、20mM PIPES、遊離Ca^{2+}濃度100μM、pH6.8）中での

1.5分間の放出を測定した。ATP依存性放出はCa^{2+}-EGTA buffer B（Ca^{2+}-EGTA buffer Aに5mM MgATPを加えたもの、遊離Ca^{2+}濃度10μM）中での10分までの放出を測定した。Mastoparanはdigitonin処理中あるいはCa^{2+}刺激時に5μMから40μMの濃度で加えた。Buffer中に放出された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。

［結果及び考察］

leaky細胞をMgATP非存在下、Ca^{2+} 100μMで1.5分間刺激することにより得られる、MgATP非依存性のCA放出は40μMの濃度のMPでまったく抑制されなかった。一方leaky細胞をMgATP存在下、Ca^{2+} 10μMで10分間刺激して得られるMgATP依存性のCA放出はMPにより濃度依存的に抑制された。このMgATP依存性CA放出の抑制が、ATPのpriming作用を抑制した結果なのかを明らかにするために、digitonin処理中にMgATPを加ることによりみられるMgATP非依存性のCA放出の増大に対するMPの影響を調べると、MPをMgATPと同時に作用させることによって、ATP前処理による放出の増大が完全に抑えられた。さらにleaky細胞をMgATP存在下、非存在下、Ca^{2+} 10μMで10分間刺激した時のCA放出のタイム・コースをとると、1分、2分までの放出はMgATPの有無に関係しないが、それ以降はMgATP存在下でのみ放出量が時間と共に増加した。ところがこの時MPを添加しておくとMgATP存在下でも2分以降の放出が完全に抑えられた。Aunisらの報告により、MPの抑制作用はGoを活性化によることが示されている。従って今回の我々の実験結果から、Goの抑制的調節はATP依存性プライミング機構に対して働いていることが示唆された。

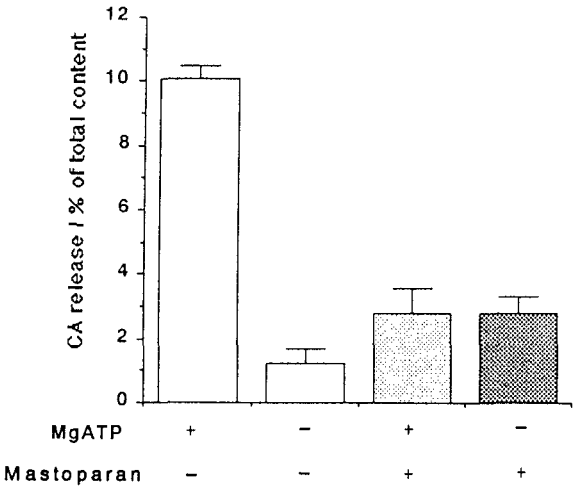


Fig.1 ATP依存性priming効果に対するMastoparanの作用

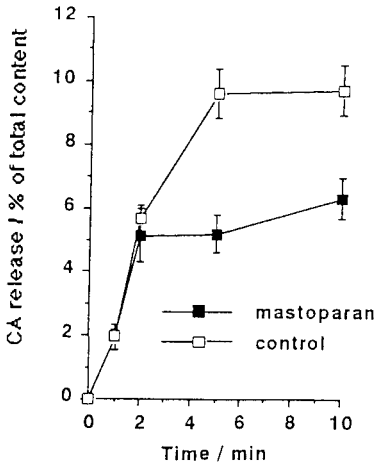


Fig.2 ATP依存性CA放出のタイムコースに対するMastoparanの影響

［文献］

1. Ohara-Imaizumi,M., Kameyama,K., Kawae,N., Takeda,K., Muramatsu,S., & Kumakura,K. (1992) J.Neurochem. 58, 2275-2284.
2. Bittner,M.A. & Holz,R.W. (1992) J.Biol.Chem. 267, 16219-16225.
3. Vitale,N., Mukai,H., Rouot,B., Thiersé,D., Aunis,D., & Bader,M.F. (1993) J.Biol.Chem. 268, 14715-14723.

59 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体

IV ドーパミンD1、D2受容体作動薬および拮抗薬の脳内微量注入による自傷行為の誘発および抑制

岡村　均*、村上　剛**、中村　享***、井端泰彦*
（京都府立医科大学　*第二解剖，**麻酔，***歯科）

［要約］新生仔期6-hydoroxydopamine (6-OHDA) 脳室内投与ラットの自傷行為 (self-mutilation behabior: SMB) モデルを用いて、我々は脳内ドーパミン(DA)系の部位特異的変動を探ってきた。今回ドーパミン神経系のどの部位が、自傷行為発現関与しているのかを検討する目的で、ドーパミン作動薬及び拮抗薬の脳内微量注入を試みた。L-DOPA 腹腔内投与にてSMBを誘発したラットは、D1 受容体拮抗薬 SCH-23390 (5mg/10μl) を両側黒質に投与したときのみ SMB が止まり、片側黒質または両側線条体に投与してもSMB は継続した。D2 受容体拮抗薬 YM-09151-2 (1mg/10μl, 10mg/10 ml) はどの部位に投与しても SMB 抑制は出来なかった。D1 受容体作動薬 SKF-38393 (1mg/10μl), D2 受容体作動薬 LY-141865 (1mg/10μl) を各々単独投与した時、両側黒質、両側線条体，または黒質、線条体の4カ所投与してもSMBは誘発されなかった。SKF-38393, LY-141865 の混合液を両側黒質に投与しても SMB は誘発されなかったが、混合液を黒質、線条体の4カ所に投与すると SMB は誘発された。この結果は自傷行為誘発には両側の線条体・黒質の D1 とともに D2 受容体の刺激が必要であるが、自傷行為の抑制には黒質 D1 受容体の抑制が重要であることを示唆している。

［目的］　新生仔期 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 脳室内投与により脳内ドーパミンニューロン系を高度に破壊したラットは、成熟後ドーパミン過感受性行動として激しい自傷行為 (self-mutilation behavior: SMB) を示す[1]。このラットを用いて我々はこれまでに、黒質一背側線条体及び腹側被蓋野のドーパミンニューロンの特異的脱落[2]、黒質及び腹側被蓋野の D2 自己容体の消失[3]、黒質網様帯の D1 受容体の増大[4] が SMB を示すラットにのみ特異的に認められることを明らかにした。今回これらのドーパミン神経系の異常をきたす部位が、自傷行為発現にどのように関与しているのかを検討する目的で、ドーパミン作動薬及び拮抗薬の脳内微量注入を試みた。

［方法］　新生仔期Wistar系ラット（1日齢及び3日齢）に desipramine 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 を大槽内に投与した。4-6 週齢にて末梢性AADC阻害剤であるRo-4-4602 (50 mg/kg, ip) 前処置後 L-DOPA (100 mg/kg, ip) を負荷し行動評価を行い SMB (+) 群を選択した。SMB 判定は身体の咬傷を確認することにより行った。8-12 週齢にて pentobarbital 麻酔下に両側黒質、両側線条体、また両側の線条体と黒質の両方に、ガイド、ダミーカニューラを挿入し，麻酔覚醒後 4-48 時間の後に以下の実験を行った。1）腹腔中に L-DOPA (100 mg/kg) を投与し SMB を発現させた後、黒質または線条体に D1 受容体拮抗薬 (SCH-23390, 5mg/10μl) または D2 受容体拮抗薬 (YM-09151-2, 1mg/10μl, 10mg/10μl) を投与し SMB の消長をみる．2）D1 受容体作動薬 (SKF-38393, 1mg)、D2 受容体作動薬 (LY-141865, 1mg/10μl)、または SKF-38393 と LY-141865 の混合薬（各 1mg/10μl）を黒質、線条体 またはこの両方に注入する。動物の行動の観察は薬投与後最低2時間行った。また、実験終了後 脳を 4%パラボムアルデヒドで固定し，脳切片を作成し，ガイドカニューラの刺入部位を確認した。

［結果］　1）L-DOPA 腹腔内投与にて SMB を誘発したラットは、SCH-23390 を両側黒質に投与したときのみ SMB が止まり、片側黒質または両側線条体に投与しても SMB は継続した。YM-09151-2 はどの部位に投与しても SMB 抑制は出来なかった。2）SKF-38393, LY-141865 を単独投与した時、両側黒質、両側線条体，または黒質、線条体の4カ所投与しても SMB は誘発されなかった。3）SKF-38393, LY-141865 の混合液を両側黒質に投与しても SMB は誘発されなかったが、混合液を黒質、線条体の4カ所に投与すると SMB は誘発された。

［考察］Breese ら[1]により発見されたヒトの自傷行為の実験モデルとしての新生仔期 6-hydoroxydopamine (6-OHDA) 脳室内投与ラットはドーパミン神経系が自傷行為に密接に関与していることを示している．しかし現在までのところ解明されているのは，1）全身的なL-DOPA やD1 受容体作動薬の投与が誘発すること，2）D1 受容体拮抗薬は抑制することであり，どの脳内部位がどのような機序をへて自傷行為にいたるのか，または抑制するのかはいまだ不明である．我々はこれまで免疫組織化学，in vitro receptor autoradiography, HPLC, in situ hybridization などを用いてこの新生仔期 6-OHDA 脳室内投与自傷行為ラットにおけるを用いてドーパミン神経系の異常部位を検索し、1）黒質-背側線条体系及び腹側被蓋野－腹側線条体系のドーパミンニューロンの特異的脱落、2）黒質及び腹側被蓋野の D2 自己受容体の消失、3）黒質網様帯の D1 受容体の増大が SMB を示すラットにのみ特異的に認められることを明らかにした[2),3),4)]。今回の脳内微量注入法による解析は，自傷行為誘発には，脳内で最も高密度に存在する線条体・黒質のドーパミン受容体 D1，D2 の両受容体の刺激が重要であることを示し，また前頭皮質のドーパミン神経系および受容体は一義的には関与しないことを示唆している．SCH-23390 の微量注入の実験は，自傷行為の抑制には線条体 D1, D2 受容体は直接には関与せず，黒質 D1 受容体が最も重要であることを示唆している。この結果は自傷という奇異な行動様式そのものを説明するものでなくても，その発現および抑制に，黒質-線条体ドーパミン神経系および黒質の D1 受容体を発現する線条体-黒質GABA神経系が深く関与することを示している．

[文献]
1) Breese et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 167-176 (1987)
2) 岡村均、横山ちひろ 他　神経化学 30, 332-333 (1991)
3) 岡村均、横山ちひろ 他　神経化学 31, 112-113 (1992)
4) 岡村均、横山ちひろ 他　神経化学 32, 278-279 (1993)

Table1.　脳内ドーパミン受容体拮抗薬投与により L-DOPA (100 mg/kg, ip) 負荷後出現する SMB を抑制する頻度　（抑制数／全施行数）

	SCH-23390 (5 mg/10μl)	YM-09151-2 (10 mg/10μl)
線条体片側	0/6	0/6
線条体両側	0/5	0/5
黒質片側	0/8	0/5
黒質両側	10/10	0/5

Table2. 脳内ドーパミン受容体作動薬投与時のSMB発現頻度 （発現数／全施行数）

	SKF-38393 (5 mg/10μl)	LY-141865 (5 mg/10μl)	SKF-38393 + LY-141865 (5 mg/10μl + 5 mg/10μl)
線条体片側	0/6	0/4	0/5
線条体両側	0/4	0/3	0/4
黒質片側	0/4	0/4	0/6
黒質両側	0/7	0/5	0/8
線条体両側 +黒質両側	0/5	0/5	5/5

60 シナプス活動、グルココルチコイドによって調節される脳の誘導型プロスタグランジン合成酵素

山形 要人
（大阪大学医学部第一薬理）

〔要約〕 シナプスの可塑性は、学習や記憶などの脳の高次機能を考える上で非常に良いモデルである。特に可塑性の長期的保持には遺伝子発現が変化していると考えられる。そこで、シナプス活動によって調節される遺伝子を明かにするために、ラットを電気ショック後、急速に誘導される海馬のImmediate Early Genes (IEGs)を単離した。その中の一つが誘導型のプロスタグランジン合成酵素（シクロオキシゲナーゼ２、COX-2)をコードしており、脳のシナプス活動に影響を与える種々の処置（電気ショック、テタヌス刺激、NMDA受容体の非競合的拮抗剤MK801 など）によって、その発現量が変化した。また、cox-2 mRNA は、グルココルチコイドによって大脳皮質での発現が部分的に抑制された。以上のことから、COX-2 の発現が神経活動及びグルココルチコイドによって調節されることで、その生成産物であるプロスタグランジンが脳の可塑性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

海馬、小脳、大脳皮質などの脳内の神経細胞は、そのシナプス活動に応じて、可塑的に変化する。このシナプス活動依存性の神経の可塑性は、発達期における神経回路網の形成だけでなく、記憶や学習など脳の高次機能の分子メカニズムを考える上で、非常に良いモデルである。このシナプスの可塑性は、伝達効率の変化だけでなく、シナプス結合の形態学的変化を伴うと考えられる。特に、記憶の長期的保持には伝達効率の変化ではなく、シナプス結合の変化が生じていると考えられ、シナプス活動に応じて脳内の遺伝子発現が変化することが強く示唆される。そこで、本研究では脳、特に記憶の形成保持に重要と考えられている海馬で、シナプス活動によって発現が変化する遺伝子を単離するために、ラットを電気ショックした後、海馬のcDNAライブラリーを作製し、Subtraction 及びDifferential hybridization法を用いて、刺激後急速に誘導される海馬のImmediate Early Genes (IEGs)をいくつか単離した(1-4) 。今回は、そのうち一つのIEG が誘導型のプロスタグランジン合成酵素（シクロオキシゲナーゼ２）をコードしていたので報告する。

［方法］

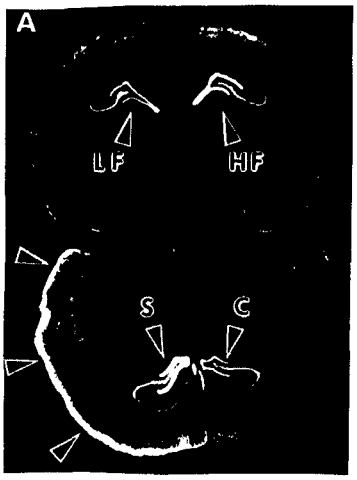
ラットに電気ショック(5) を与え、刺激前及び刺激後４時間の海馬からcDNAライブラリーを作製した。ライブラリーの作製、Subtraction 及びDifferential hybridizationは既報通り(6) 行い、λZapII をベクターとして用いた。Northern hybridization, in situ hybridization 法、DNA シークエンスも既報の方法 (7-8)に従った。

［結果と考察］

シナプス活動によって発現が変化する遺伝子を単離するために、ラットを電気ショックし、刺激前及び刺激４時間後の海馬からcDNAライブラリーを作製し、そのsubtraction ライブラリーを調整した後、differential hybridizationを行い、刺激後急速に誘導される海馬のImmediate Early Genes (IEGs)を多数単離した。そのうち一つのcDNAをシークエンスしたところ、それが誘導型のプロスタグランジン合成酵素（COX-2 、シクロオキシゲナーゼ２）をコードすることがわかった。そこでほぼ完全長のラットcox-2 cDNAを単離し、その一次構造を決定した。ラットのCOX-2 は604 個のアミノ酸より成り、マウス (9)、ヒト(10)及びニワトリ(11)COX-2 とそれぞれ96%、86%、81%の高い相同性が見られた。また２ヶ所のヘム結合部位、活性チロシン残基、アスピリンでアセチル化されるセリン残基はラットCOX-2 でも保存されていた。COX-2 は、誘導されないCOX-1 とアミノ酸レベルで

64%の相同性があり、両者の最も大きな構造上の違いはCOX-2 のC末端側に17個のアミノ酸の挿入が見られることである。Northern hybridizationで電気ショック後のcox-2 mRNAの時間経過を調べたところ、海馬で刺激後30分以内に急速に誘導され、その増加は8時間を経ても続いていた。これは他の転写因子をコードするIEGsの時間経過より明らかに遅くcox-2 の遺伝子発現の特徴の一つと言える。

次にin situ hybridization 法で、脳内のmRNAの発現を調べたところ、痙攣刺激で海馬歯状回の顆粒細胞層及び大脳皮質第2層にcox-2 mRNAの急速な誘導が認められた（図）。また貫通線維をテタヌス刺激し、海馬歯状回の顆粒細胞にLTP （Long-term potentiation）を誘導すると、cox-2 mRNAも誘導された（図）。そこでCOX-2 蛋白質も誘導されるかどうかを調べるために、C末端側の挿入アミノ酸配列に対するCOX-2 に特異的な抗体を用いて免疫組織化学を行なうと、COX-2 が電気ショックによって、海馬の歯状回顆粒細胞を中心に誘導されることがわかった。次にcox-2 遺伝子の生理的な神経活動による調節を調べるために、MK801 を投与（3mg/kg）したところ、大脳皮質第2層を中心にcox-2 mRNAが減少し、さらに片側の眼球内にTTX を注射すると、対側一次視覚野のcox-2 mRNA量が減少した。また、神経活動以外の調節因子として、グルココルチコイドがcox-2 mRNAをdownregulateすることが知られているので、デキサメサゾン(4mg/kg)を投与し、電気ショック前後でのcox-2 mRNAの発現をin situ hybridization法で調べたところ、海馬では大きな変化は見られなかったが、大脳皮質を中心にcox-2 mRNAの減少が見られた。以上のことから、脳のCOX-2 がシナプス活動及びグルココルチコイドによって調節されていることが明らかになった。これはこの酵素の生成産物であるプロスタグランジン量が、脳の局所で、神経活動あるいはグルココルチコイドによって調節されていることを示唆する。現在、プロスタグランジンは前シナプス性及び後シナプス性に中枢の神経伝達を調節すると考えられており、特に興奮性アミノ酸による脱分極を亢進する(12)という報告もある。そこで、この酵素の阻害剤である非ステロイド系抗炎症剤のシナプス可塑性への影響を調べることが次の課題になるであろう。



電気刺激、高頻度テタヌス刺激によるcox-2 mRNAの誘導
LF：低頻度刺激
HF：高頻度刺激
C　：対照
S　：電気ショック

［文献］

1) Yamagata, K., et al.(1993) Neuron 11,371-386.
2) Yamagata, K., et al.(1994) J.Biol.Chem., in press.
3) Yamagata, K., et al.(1994) Learning & Memory, in press.
4) 山形要人 (1994) 生体の科学 45, 139-144.
5) Cole, A.J., et al. (1990) J.Neurochem. 55, 1920-1927.
6) Lanahan, A., et al.(1992) Mol.Cell Biol. 12, 3919-3929.
7) Yamagata, K., et al.(1990) Neuron 4, 469-476.
8) Saffen, D.W. et al. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85, 7795-7799.
9) Kujubu, D.A. et al. (1991) J.Biol.Chem. 266, 12866-12872.
10) Hla, T. and Nelson, K. (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89, 7384-7388.
11) Xie, W., et al. (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88, 2692-2696.
12) Kimura, H., et al. (1985) Brain Res. 330, 235-244.

61 マウス胎生期の脳における 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase 遺伝子の発現

笠間弘美，栗原　正
（創価大・生命研・神経化学）

〔要約〕脳の 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase（CNP）はオリゴデンドログリアの分化に伴って出現し，ミエリン形成に連動して増加していく．CNP mRNA の発現はミエリン形成時にピークに達し，その後は減少する．近年，RT-PCR 法で，特定の mRNA をきわめて感度よく検出することができるようになった．今回我々は，CNP がミエリン形成以前の早い時期の脳の分化にも関与している可能性を考え，RT-PCR 法によりマウス胎生期の脳で CNP mRNA の発現を検索した．その結果我々は，CNP の mRNA が低レベルながらマウス胎生期を通して脳に存在し，発育に伴う変化では胎生１６日付近にピークがあることを見いだした．

脳のミエリン形成に連動して増加するタンパクには，Proteolipid Protein（PLP），Myelin Basic Protein（MBP），および 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase（CNP）が知られている．これらのタンパクはいずれもオリゴデンドログリアで合成され，PLP と MBP は構造タンパクとしてミエリン膜を形成するのに対し，CNP はオリゴデンドログリアの細胞質内にとどまる．CNP はオリゴデンドログリアの突起やミエリンの内舌・外舌に濃度が高く，ミエリンラメラ中では周期線の細胞質部分に存在する[1, 2]．CNP の C 末端にはイソプレニル化のコンセンサス配列があり、実際に試験管内で CNP のイソプレニル化が起こることが確認された[3]．形質膜の内側に付着することが CNP の機能発現に必要と思われる．CNP はミエリンの形成と維持に重要な役割を果たしていると考えられるが，CNP の機能はいまだに解明されていない．CNP 遺伝子には転写開始点が２箇所あり，これに選択スプライシングが伴い，mRNA が２つ（mRNA I と mRNA II）できる[4-6]．近年，RT-PCR 法で，特定の mRNA をきわめて感度よく検出することができるようになった．今回我々は，CNP がミエリン形成以前の早い時期の脳の分化にも関与している可能性を考え，RT-PCR 法によりマウス胎生期の脳で上述の２つの CNP mRNA の発現を検索した．

［実験方法］

マウスの脳を各発育段階で取り出して RNA を調製し，ランダムプライマーを用いて Reverse Transcriptase（RT）反応を行なった．次に，図１に示すプライマーを用い，マウス CNP の mRNA I と mRNA II の配列を PCR で別々に増幅した．PCR は30 サイクル反応させた．プライマー A（5'-AGCATC CACCATTCAAGGGTGCTT-3'）とプライマー C（5'-TCGTGGTTGGTATCATCAAGCACA-3'）の組み合わせでは mRNA I の配列 532 bp が，プライマー B（5'-ACATAGTACCCGCAAAGGCGGTGA-3'）とプライマー C の組み合わせでは mRNA II の配列 421 bp が増幅されると予想された．これらのPCR 産物は 3' 端 374 bp がmRNA I と mRNA II に共通の配列である．PCR 反応は Total RNA 10 μg から生じた RT 産物について行ない，PCR反応終了後反応液の 1/20 をアガロースゲル電気泳動にかけた．このゲルから DNA ブロットを作り，^{32}P 標識 cDNA（cDNA I の HindIII 断片 691 bp）とハイブリダイズさせた．

［実験結果および考察］

まず，生後８日のマウス脳 RNA で，CNP の mRNA I と mRNA II の配列が増幅されるかどうかテストした．プライマー A とプライマー C の組み合わせでは予想された 530 bp のバンド（mRNA I の配列）が，プライマー B とプライマー C の組み合わせでは予想された 420 bp のバンド（mRNA II の配列）がゲル上ではっきり認められた．PCR 産物はいずれも CNP の cDNA プローブとハイブリダイズした．検出感度はノーザンハイブリダイゼイションにくらべて比較にならないほど高いことがわかった．

図２はマウスの各発育段階の脳 RNA から得た RT-PCR 産物を示す．ノーザンハイブリダイゼイションで見られたように[8]，mRNA I と mRNA II はともにミエリン形成時にピークに達しその後減少した．

この減少は mRNA I で著しく，アダルトでは mRNA II が主成分と思われた．RT-PCR では新たに次のことが明らかになった．1）CNP の mRNA は低レベルながらマウス胎生期を通して（少なくとも検索した胎生１３日以降）脳に存在する．2）胎生期ではアダルトと同様に mRNA II が主成分と思われる．3）マウス胎生期の脳で発育に伴う変化を見ると胎生１６日付近にピークがある．マウス胎生１６日はラジアルグリアが発達しニューロン前駆細胞の移動が活発に行われる時期で，CNP はミエリン形成とは別にこのような早い時期の脳の分化にも関与している可能性が示唆された．

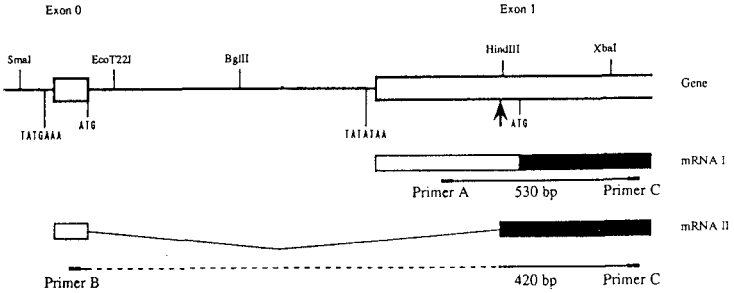


図１　マウス CNP 遺伝子の上流域の構造と mRNA 配列増幅に用いた PCR プライマーの位置．エクソン１内の矢印はスプライスアクセプターサイトを示す．mRNA I から 400 アミノ酸の CNP I が，mRNA II から 420 アミノ酸の CNP II が翻訳される[4, 7]（mRNA の黒塗り部分が翻訳領域）．

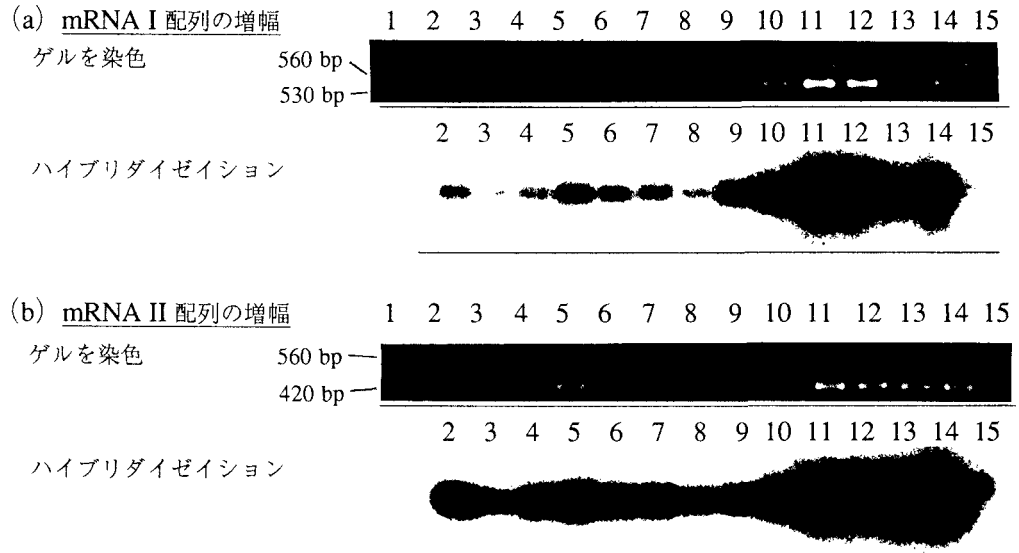


図２　マウスの各発育段階の脳 RNA から得た RT-PCR 産物．（a）はプライマー A とプライマー C で mRNA I の配列を，（b）はプライマー B とプライマー C で mRNA II の配列を増幅した．RT-PCR 産物はアガロースゲルで電気泳動し，エチジウムブロマイドで染色してバンドを確認するとともに，DNA ブロットを作って ^{32}P 標識 cDNA とハイブリダイズさせた．レーン１，サイズマーカー；レーン２，E13；レーン３，E14；レーン４，E15；レーン５，E16；レーン６，E17；レーン７，E18；レーン８，P0；レーン９，P3；レーン１０，P7；レーン１１，P15；レーン１２，P22；レーン１３，アダルト；レーン１４および１５，cDNA I (a) or cDNA II (b)．E13-18 で胎生期の日齢を，P0-22 で生後の日齢を示す．

［文献］

1) Trap, B.D. et al. (1988) J. Neurochem. 51, 859-868
2) Kurihara, T. et al. (1992) Adv. Sec. Messenger & Phosphoprot. Res. 25, 101-110
3) Braun, P.E. et al. (1991) J. Neurosci. Res. 30, 540-544
4) Kurihara, T. et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 1074-1081
5) Monoh, K. et al. (1993) Gene 129, 297-301
6) 服部和枝ら (1993) 神経化学 32, 562-563
7) Kurihara, T. et al. (1992) Neurosci. Lett. 138, 49-52
8) Kurihara, T. et al. (1989) Mol. Brain Res. 5, 247-250

62 ミエリンプロテオリピッド蛋白質遺伝子ファミリー —ミエリン形成脊椎動物での普遍的存在—

北川一夫[1]、松本昌泰[1,2]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]、David R. Colman[3]
（大阪大学医学部第一内科[1]、神経内科[2]、米国マウントサイナイ医科大学[3]）

〔要約〕
ミエリンプロテオリピッド蛋白質(PLP)とDM-20は、一部の進化した魚類を除き四肢動物のみに存在する唯一の遺伝子からの産物とされてきた。我々は昨年PCR法を用いミエリンを形成する最も進化的に古い魚類とされる軟骨魚類脳からDM-20に関連した遺伝子ファミリーを形成する３種類の遺伝子(DMα,β,γ)の存在と脊髄白質におけるDMα,γの発現を明らかにし,PLP/DMsの発生学的な起源がイオンチャンネル蛋白質と同一である可能性を示唆してきた[1]。本研究では今日最も豊富に存在する魚類である硬骨魚類脳からDMファミリー（DMβとDMγ）をクローニングし、ミエリン形成脊椎動物におけるPLP/DMsファミリーの普遍的な存在を示すとともに、軟骨魚類DMαに対する抗体をあらたに作成しDMαポリペプチドが中枢ミエリンにN-グリコシル化された26kD蛋白質として存在することを明らかにした。

〔はじめに〕：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40%以上を占める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[2]。これらPLPsは種を越えて高度に保存されており、膜貫通領域及びその近傍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ことが知られている[3]。一方、進化的に古い脊椎動物である魚類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[4]。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蛋白質であることが証明されているが、四肢動物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。しかしながらPLPsにPoと同様な細胞接着作用を示す実験結果が今日まで得られていない事やPLPsの点変異によりミエリン形成不全のみならずオリゴデンドロサイトの細胞死をきたすこと、さらにミエリン形成以前の神経発生過程におけるDM-20遺伝子の発現[5]などの事実は、PLPsがミエリン構成要素として以外にオリゴデンドロサイトの分化、生存といった重要な役割を果たしている事を強く示唆している。我々は昨年PCR 法を用い軟骨魚類脳から遺伝子ファミリーを形成する3種類のDM-20に関連したDMs(DMα,DMβ,DMγ)をクローニングし、PLP/DMsがミエリンを形成する最古の脊椎動物にも、その遺伝子が発現されている事を示した[1]。興味深いことに軟骨魚類DMs の部分アミノ酸配列が、同じ軟骨魚類ニコチン性アセチルコリンレセプターの膜貫通部分のアミノ酸配列とホモロジーを示し、PLP/DMsのミエリン構成要素として以外の役割が、膜を介した物質の輸送を担うことにより発揮されている可能性が示唆された。本研究では軟骨魚類より進化的に新しいとされる硬骨魚類脳からDMs ファミリーをクローニングし、PLP/DMsのミエリンを形成する脊椎動物における普遍的な存在を示すとともに、すでにクローニングされている軟骨魚類DMs の一種、DMαの部分ペプチドに対する抗体を作成し、軟骨魚類脳ミエリンにおけるDMのポリペプチドとしての存在と、そのグリコシル化の有無を明らかにすることを目的とした。

〔方法と結果〕：

1)硬骨魚類(Brachiodanio rerio)脳からのPLP/DM-20関連蛋白質DMsの分子クローニング

PCRクローニング：Brachidanio rerio脳からAGPC法により精製したRNAを用い逆転写酵素ーPCRによるクローニングを行った。PCRに用いる変性プライマーとしてラットPLP/DM-20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。ラット脳RNA から生成したcDNAをPLP1,PLP3のプライマーの組合せで増幅した場合、PLPは475bp、DM-20は370bpのPCR産物を生じ、PLP1、PLP4の組合せで増幅した場合、PLPは720bp、DM-20は615bpのDNAバンドを生ずる。Brachiodanio rerio脳RNAからoligo(dT)プライマーを用い逆転写酵素により生成したfirst strand cDNAをPCR反応の鋳型DNAとして用いた。94°C 1分、45°C 2分、72°C 3分のPCR反応を40サイクル行った後、1%アガロースゲル電気泳動でPCR産物を調べたところ、PLP1,PLP3のプライマーでは370bp、PLP1,PLP4の組合せでは615bpと哺乳類DM-20に一致したサイズのもののみが得られた。それぞれのPCR産物をHinfI, HaeIII, HphIの制限酵素で消化したところ各PCR産物に含まれる大部分のDNAは均一なものであることが示唆された。各々のDNAバンドを低融点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塩基配列を決定した。その結果PLP1,PLP3のプライマーの組合せで得られたPCR産物からのクローンは軟骨魚類DMβと89.5%の一致を、またPLP1,PLP4のプライマーか

ら得られたPCR産物からのクローンも軟骨魚類DMγと76.3%の一致を示すものであった。

RNAブロット：Brachiodanio rerio脳から精製した10μgのtotal 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random labelingし用いた。DMβから作られたプローブは4.0kb、DMγは4.4kbのバンドを認識し各々のDMに対応したmRNAの存在が示された。

2)軟骨魚類(Torpedo californica)脳ミエリン分画におけるDMαポリペプチドの同定

すでにクローニングされているTorpedo californica DMαの親水性領域のアミノ酸配列に一致した合成ペプチド(AVKSVFGEFRTTMCGRCVSATF)に対するポリクローナル抗体を家兎において作成し、イムノブロット法に供した。比較のため抗bovine Po抗体を用いたイムノブロット法も行った。Torpedo californica脳からの粗ミエリン画分の調製はショ糖密度勾配遠心法により行った。粗ミエリン分画の脱グリコシル化には1%SDS 存在下煮沸変性後、0.1%SDS,1%NP-40存在下にpeptide-N-glycosidase Fを添加し37°C 16時間酵素反応を行った。Torpedo californica脳粗ミエリン分画のクマージー染色では29kD,26kD,16kDなどに蛋白質バンドを認め、そのうち29kD, 26kDの蛋白質は抗Po抗体で認識された。一方、DMαに対する抗体は脳ホモジネートよりも粗ミエリン分画ではるかに強く26kD蛋白質を認識した。また抗体の特異性は合成ペプチドそのものによるinhibitionにより確認された。粗ミエリン分画を脱グリコシル化したところDMαに対する抗体で認識される蛋白質は約3kD分子量が減少し、N-グリコシル化されていたことが明らかとなった。

〔考察〕：今回Brachiodanio rerio脳からのDMsファミリーのクローニングとTorpedo californica DMαの部分アミノ酸配列に対し作成した抗体を用いたイムノブロットを行い、DMsファミリーがミエリンを形成する脊椎動物に普遍的に存在し、少なくともその内の一種DMαは脳ミエリンにN-グリコシル化された蛋白質として発現していることを明らかにした。Brachidanio rerio脳からクローニングされたDMsファミリー(DMβ, DMγ)を軟骨魚類(Squalus acanthius)DMs、ラットDM-20と比較すると以下のような特徴があげられる。

①膜貫通領域及びその近傍でDMsファミリーのアミノ酸配列がよく保存されていること
②哺乳類でミエリン形成不全を引き起こすPLP/DM-20のアミノ酸置換が魚類DMsファミリーに決して出現しないこと
③親水性領域における荷電基が保存されていること
④第三番目と第四番目の膜貫通領域の間にある親水性領域においてシステイン残基が、ラット、魚類を通じてよく保存されていること
⑤同領域において魚類DMsではN-グリコシル化を受け得るアルギニン残基が存在すること

①は膜貫通領域がDMsの機能発現にとって重要な構成要因であること、②は哺乳類PLP/DM-20、魚類DMsを含む全てのDMファミリーが共通の機能を有し、その発現がミエリン形成不全を引き起こすアミノ酸残基の置換で阻害されうること、③は細胞内ドメインに存在する荷電基が他の細胞内構成要素（例えばミエリン塩基性蛋白質）との相互作用に重要であること、④はシステイン残基がジスルフィド結合やアシル化を通して蛋白質の三次元構造の形成に関与し、機能発現に必要なものであること、⑤はDMsのN末端、C末端が細胞内に存在する膜トポロジーを有すること、などを示すものと考えられる。

昨年から本年にかけて、哺乳類脳においてもPLP/DMsファミリーが存在し[6]、個体発生段階におけるPLP/DM-20の発現量がオリゴデンドロサイトの分化、生存に強く影響することがトランスジェニックマウスを用いて示されるようになった[7,8]。PLP/DMsファミリーの生体にとって必須な機能の発現には、膜を介した物質輸送を伴う情報伝達が関与しているものと想定される。

〔文献〕：

1)Kitagawa K et al.: Neuron 11:433,1993
2)Kirschner D et al.: In Myelin, P. Morell, ed,pp. 51-95, 1984
3)Hudson L:Ann. NY Acad. Sci. 605:155, 1990
4)Waehneldt TV: Ann. NY Acad. Sci. 605:15, 1990
5)Ikenaka K et al.:J. Neurochem. 58:2248, 1992
6)Yan Y, et al.: Neuron 11:423, 1993
7)Readhead C et al.: Neuron 12:583, 1994
8)Ikenaka K et al.:Abstract. Soc. Neurochem 24:2 48, 1993

63 ミエリン塩基性蛋白質3'非翻訳部位RNAの遺伝子発現における影響について

上野修一、近藤啓次、小谷泰教、佐野輝、柿本泰男、A. T. カンパニオーニ*
（愛媛大学 医 神経精神医学 * UCLA Medical School Psychiatry）

〔要約〕

レポーター遺伝子であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）cDNAの3'側にミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein, MBP）cDNAの3'蛋白質非翻訳部位（3'-untranslated region, 3'-UTR）を結合した合成cDNAを真核細胞発現プラスミッドベクターpcDNA3に導入し、種々の哺乳類培養細胞で発現させた。その結果、オリゴデンドロサイト由来の培養細胞では、他の培養細胞系に比べMBP3'-UTRを含んだCATを導入するとCAT活性が約2倍に上昇した。mRNAの定量の結果では、オリゴデンドロサイト由来の培養細胞においてのみRNAの発現が十数倍に上昇していた。この結果から、MBPcDNAの3'-UTRには細胞特異性のあるシス転写因子活性が含まれると推測された。

はじめに

MBPの発現は、発生の段階で非常に巧みに制御されており、その制御は遺伝子転写の段階のみならず、転写後にも制御を受けていることがわかっている[1]。先に我々は、種々の長さのUTRを持ったMBPcRNAを人工合成し、UTRが蛋白質翻訳効率を変化させることを、ウサギ網状赤血球と麦芽細胞抽出液を用いた細胞外蛋白質翻訳系において検討した[2]。その結果、5'および3'-UTRの両方がMBPの蛋白質発現に重要であることを示した。今回、我々は培養哺乳類細胞にMBPの3'-UTRcDNAを含むレポーター遺伝子を発現させ、RNA量と酵素活性を指標にMBPの非翻訳部位RNAの影響を調べた。

方法

プラスミドの作成：CMVプロモーターを使って発現するpcDNA3プラスミドにCATcDNAのみを含むもの、CATに加えてMBPの3'-UTRcDNAを含むものを作成した。また、トランスフェクションの効率を計るために、別にルシフェラーゼを含むpcDNA3を作成した。

培養細胞：NIH3T3細胞、T antigenを用いて不死化させたマウスオリゴデンドログリア細胞 (N20.1)、COS-1細胞を用いた。

トランスフェクション：燐酸カルシウム共沈法を用いた[3]。トランスフェクションの効率を検定するために、標準としてルシフェラーゼを含むpcDNA3を目的のpcDNA3プラスミッドと同時にトランスフェクションした。

酵素活性の測定：CAT活性の測定は、SeedとSheenの方法[4]、ルシフェラーゼ活性はWoodの方法に従った[5]。

RT-PCR：RNAをAPGC法に基づいて精製した後、逆転写酵素を用いてcDNAとし、木下と下遠野の方法にしたがってβ-actinを指標に定量を行なった[6]。

結果

各々の培養細胞中のCAT活性の結果を表1に示す。MBPの3'-UTRの挿入は、オリゴデンドロサイト系の細胞であるN20.1のみで酵素活性を上昇させた。この結果が、遺伝子転写によるものか又は蛋白質翻訳によるものかを確認するために特異的RNA量をRT-PCR法を用いて定量を行なった。定量性の確認のために、1）CATとβ-actinのprimerが干渉し合わないことと、CAT遺伝子発現量の定量性が直線的であることを確認した。その上で、CAT-m RNAの発現量をN20.1とNIH3T3で比較した。NIH3T3では、ほぼ同量のCAT-m RNAが発現しているのに対してN20.1においてはCAT-m RNAがMBPを含むプラスミッドをトランスフェクションしたもので十数倍増えていることが示された（図1）。

考察

今回の実験系でMBP-3'UTRを含むCATcDNAがオリゴデンドロサイト系の細胞のみにおいてCAT-mRNAの発現を増加させていた事実は、MBPの3'-UTRcDNAの一部が、遺伝子発現においてシスに働く遺伝子転写因子として活性を持っていることが示唆される。一般に、転写活性因子は、遺伝子の5'側、すなわち転写されるべき遺伝子の上流に存在するが、MBPにおいてはRNAとして転写される部分自身が転写活性に関与するという大変興味深い結果を得た。MBP遺伝子は、より大きな遺伝子の一部であることがわかっており、その組織、細胞内発現は全く異なっている[7]。転写因子活性が、MBP遺伝子の3'側にある今回の事実は、この異なった遺伝子発現と関係を示唆するものである。

オリゴデンドロサイト系の細胞であるN20.1では、転写活性のMBP-3'UTRによる増大は十数倍とCAT活性の上昇に比べて高かった。このRNA量と蛋白質量とが異なっている事実は、転写以後に何らかの阻害がかかっていることを示唆する。N20.1は、SV40のガン抗原（T antigen）で不死化させた細胞であり、MBP mRNAが確認されるにもかかわらず、MBPの存在が確認されていない[8]。N20.1では、転写以後で遺伝子発現を抑制する因子が存在するためではと考えられているが詳細は不明である。この因子が今回の実験でもMBPの3'蛋白質非翻訳部位に結合して、蛋白質への翻訳を押さえている可能性も考えられる。

表1　培養細胞でのMBP3'UTRの効果ー

培養細胞にCATまたはCAT+MBP3'UTRを含むpcDNA3を遺伝子導入し、luciferase pcDNA3を標準としてCAT活性を調べた。

培養細胞	CAT活性／luciferase活性±標準偏差 (N = 6)		
N20.1	209*	±	101
NIH3T3	116	±	58
COS-1	113	±	42

*: P < 0.05

図1　RT-PCR法によるCATmRNAの定量ー



遺伝子導入した培養細胞からAPGC法を用いてRNAを抽出し、木下と下遠野らの方法[6]によってRT-PCRによるCAT-mRNAの定量を行なった。上方のバンドがβ-actinで、下方のバンドがCAT。各々のレーンはPCR回数を変え増幅したものである。CATのプライマーを加えた後に12サイクル増幅し、β-actinのプライマーを加えて左より、それぞれ計21, 24, 27, 30, 33, 36サイクル増幅した。各々のサンプルは左から、CAT pcDNA3、CAT/MBP3'UTR pcDNA3、CAT pcDNA3、CAT/MBP3'UTR pcDNA3をN20.1に遺伝子導入したものである。β-actinの発現は両者でほぼ同様であるが、CATの発現は、3サイクル以上の差があり、MBP3'UTRを含むCATmRNAはCATのみに比べて十数倍高いと考えられる。

参考文献

1）Campagnoni A. T. et al. (1987) J Neurosci. Res. 17, 102-110　2）Ueno S. et al. (1994) J. Neurochem. 62, 1254-1259　3）Chen C. A.and Okayama H. (1988) BioTechniques 6, 632-638　4）Seed B. and Sheen, J.-Y. (1988) Gene 67, 271-277　5）Wood K. V. (1990) Promega Notes, 28.　6）木下朝博、下遠野邦忠（1992）蛋白核酸酵素 37, 135-143　7）Campagnoni A. T. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 4930-4938　8）Verity A. N. et al. (1993) J. Neurochem. 60, 577-587

64　1本鎖CRE結合蛋白質（ssCRE-BP）の遺伝子発現と性質

大杉　武、青木義矢、谷口直子、中野浩一、田中秀和、三木直正
（大阪大　医　第一薬理）

〔要約〕
モルヒネ慢性投与により変化する核蛋白質がマウス小脳に存在し、1本鎖のcAMP response element (CRE)を特異的に認識して結合するすることを見いだしている。今回、この蛋白質の機能を解析するために、マウス脳のssCRE-BPのcDNAをクローン化し、ノーザンブロット及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST) との融合蛋白質を用いて、ssCRE-BPの機能を検討した。ノーザンブロットではssCRE-BPは主に、脳において発現を認めた。マウス小脳より精製したssCRE-BPのDNA結合能は、カゼインやDNAアフィニティカラムのflow through分画を加えることにより、特異的に増大するが、ssCRE-BPのGSTとの融合蛋白質のDNA結合能もカゼイン依存性に増加した。従って、GST-融合蛋白質を用いて、ssCRE-BPの機能やssCRE-BPと相互作用し、DNA結合活性を増加させる因子について解析できると考えられる。

［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、培養神経細胞や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、2）。この蛋白質は、1本鎖のCRE に特異的に結合する。今回、この1 本鎖CRE 結合蛋白質(ssCRE-BP) のcDNAクローンを用いて、GSTとの融合蛋白質を作製し、ssCRE-BPの機能について検討した。

［実験方法］
1）ノーザンブロット：マウスの各組織より、total RNAを抽出し、アガロースゲルに泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した。^{32}Pでラベルした DNAプローブとハイブリダイゼーションし、オートラジオグラフィーを行った。
2）GST-融合蛋白質の作製：ssCRE-BPのcDNAをpGEX-2T発現ベクターに挿入し、大腸菌内でssCRE-BP とGSTとの融合蛋白質を産生した。このGST-融合蛋白質をグルタチオン-セファロースカラムによって、精製した。
3）ゲルシフトアッセイ：既報に準じて行った（2）。
［結果及び考察］
1）マウスの脳、肝臓、肺、心臓などを用いて、ノーザンブロットにより、ssCRE-BPの組織発現を検討した。その結果、マウスの脳に高い発現を認めた（図1）。このことから、ssCRE-BPが、脳において重要な機能を持つことが示唆された。
2）ssCRE-BPをGSTとの融合蛋白質として、大腸菌内で大量に発現させ、DNA結合能をゲルシフトアッセイによって、調べた。大腸菌で産生したssCRE-BPは、マウス小脳から

精製したssCRE-BPと同様、１本鎖CREに結合した。マウス小脳のssCRE-BPは精製するにともない、この蛋白質のDNA結合活性が減少すること、また、カゼインやDNAアフィニティカラムのflow through分画を加えることにより、DNA結合活性が回復することを見いだしている（３）。ssCRE-BPのGST-融合蛋白質もカゼインにより、DNA結合活性が増加することがわかった（図２）。このことから、GST-融合蛋白質を用いて、ssCRE-BPのDNA結合活性を調節する因子について検討することができると思われる。ssCRE-BPと蛋白間相互作用する因子群を解析することにより、脳で重要な働きをしていると思われるssCRE-BPの機能について調べることができると考えられる。ssCRE-BPはN-末端側にグリシンを多く含み、また、C-末端側にはグルタミン、グルタミン酸が多く存在する構造をしている。現在、ssCRE-BPのどの部分が１本鎖CREやカゼインと結合するのに重要なのか検討を行っている。

［文献］
（１）Osugi, T. et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 174, 25-31.
（２）Osugi, T. et al., (1994) Mol. Brain Res., 21, 256-262.
（３）大杉　武、他, (1993) 神経化学, 32 (1), 64-65.

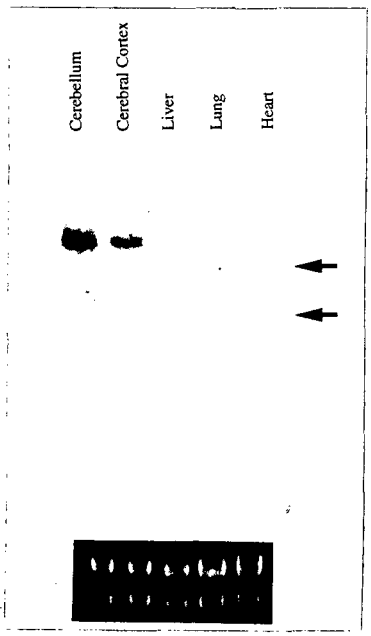


図１．ノーザンブロットによるssCRE-BPの組織発現
上下の矢印はそれぞれ、２８ｓ、１８ｓを示す。

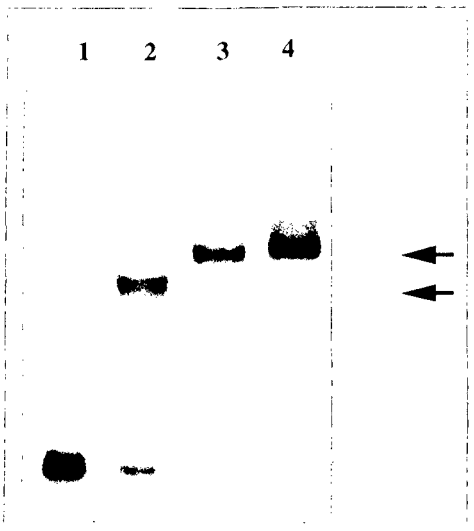


図２．ゲルシフト法によるGST-ssCRE-BP-融合蛋白質の解析
矢印はDNA-蛋白質複合体を示す。
1. プローブのみ
2.マウス小脳の核抽出液
3.GST-ssCRE-BP-融合蛋白質
4.GST-ssCRE-BP-融合蛋白質+カゼイン

65 ラットC6グリオーマ細胞における細胞質型ホスホリパーゼA2のIL-1βによる誘導とその遺伝子上流解析

森井 博史[1) 3)]、尾崎 美和子[3)]、Rajes Qvist[3)]、渡辺 恭良[2) 3)]
([1)] 新技術事業団さきがけ研究21細胞と情報、[2)] バイオ認識プロジェクト、[3)] 大阪バイオサイエンス研究所)

〔要約〕
ラットC6グリオーマ細胞より細胞質画分と膜画分を調製し、ホスホリパーゼA2 (PLA2) 活性を測定した。PLA2活性は両画分に検出され、その活性はCa^{2+}濃度依存性を示した。これらの活性は、C6グリオーマ細胞をインターロイキン1β (IL-1β) で長時間刺激することにより顕著に増加した。このようなIL-1βの作用は、35 U/ml (70 pg/ml) の低濃度で最大に達し、IL-1受容体を介するものと考えられる。また、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドにより抑制されるため、IL-1βによりPLA2遺伝子の発現が誘導されたと考えられる。そこで、PLA2遺伝子の上流解析を試み、その転写調節領域にIL-1βにより誘導されることが知られている転写因子NF-IL6やNF-kBの結合部位が存在していることを見出した。

細胞質型ホスホリパーゼA2 (PLA2) は刺激に応答して、末梢組織ばかりではなく中枢神経系においても多彩な生理活性が報告されているプロスタグランジン (PGs) 等の前駆体であるアラキドン酸を生成する重要な酵素である。最近、ヒト単球系白血病細胞であるU937細胞からその酵素が精製され，更にそのcDNAも単離された(1-3)。この細胞質型PLA2は、遺伝子発現の実験等から細胞内情報伝達系にカップルして活性化され、それに続くアラキドン酸カスケードを活性化していると考えられている。
アストロサイトにおいては、IL-1β等のサイトカインによりPGsが産生されることが知られており、これらPG類が神経細胞の興奮を調節し、あるいは脳損傷時においてアストロサイト自身の増殖を抑制したりすることが示唆されている。また、ヒト脳を用いた免疫組織化学の研究からも細胞質型PLA2がアストロサイトに局在していることが報告されている(4)。本研究においては、アストロサイトの実験モデルとしてラット脳由来のグリオーマ細胞であるC6細胞を用いて、IL-1βによる細胞質型PLA2遺伝子の誘導を見いだしたので報告する。また、その遺伝子の発現調節を探索するため、遺伝子の上流解析も行ったので併せて報告する。

〔実験方法〕
ラットC6グリオーマ細胞はDMEM培地／10%FCSで培養した。細胞は、ホモゲナイズ緩衝液 (0.25 M Sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl (pH7.4)) で洗浄した後、破砕した。未破砕の細胞等を除くため、3,000g x 30分間の遠心後、その上清を再度100,000g x 1時間超遠心した。この上清を細胞質画分、沈澱を膜画分とした。PLA2活性は、2 μM 1-palmitoyl-2-[1-^{14}C] arachidonyl phosphatidyl choline, 4 mM $CaCl_2$, 1 mg/ml fatty acid-free BSA, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0)の条件下で反応させ、遊離アラキドン酸をTeramoto et al.(5)の方法により測定した。
細胞質型PLA2遺伝子のプロモーターおよび転写調節領域は、報告されているヒトcDNAの5'非翻訳領域

をプローブとしてヒトEMBL3ゲノミックライブラリーよりスクリーニングし、単離した。

[結果ならびに考察]

ラットC6グリオーマ細胞から調製した細胞質画分並びに膜画分の両画分においてPLA2活性を見出した。両者の活性にはCa^{2+}が必須であった。また、還元剤であるジチオスレイトールによってもそれらの活性が阻害されないため分泌型PLA2ではないと考えられる。両画分とも 60-100 pmoles / mg protein / 30 minの活性が得られ、ヒト単球白血病細胞U937の1／10程度の低い値であった。

35U/ml human recombinant IL-1β (hr IL-1β)でC6細胞を72時間処理後、細胞質画分並びに膜画分においてPLA2活性は共に約3倍の増加を示した。この様なhr IL 1β効果は、48時間以上の長期間の処理が必要であった。また、この効果は、hr IL-1β濃度に依存したもので35U／mlで最大に達した。さらに、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドによりこの様な増加は抑えられた。従って、hr IL-1βによるPLA2活性の増加はPLA2遺伝子の発現誘導によるものであると考えられる。実際、ノーザンブロット解析でもhr IL-1βによるPLA2遺伝子mRNAの誘導が観察された。これら両画分のPLA2は分子挙動が非常に類似しており、膜画分におけるPLA2は細胞質型酵素が膜に結合したものと考えられるが、さらなる解析を現在行っている。

つぎに、PLA2遺伝子の発現調節を探索するために遺伝子の上流解析を行った。ヒトPLA2遺伝子cDNAの5'非翻訳領域をプローブとしてヒトEMBL3ゲノミックライブラリーをスクリーニングし、3種のクローンを得た。そのうちの1種がエクソン1、プロモーター、並びに転写調節領域を含んでいた。他の2種にはそれぞれ、エクソン2と3、エクソン4が散在していた。現在、上流約1 kbpまでの塩基配列を決定し、TATA-boxの配列が2カ所、その上流にはNF-IL6、NF-kBの結合モチーフ、また、AP-1等の結合モチーフも見出されている。特にNF-IL6やNF-kBはIL-1により誘導される転写因子であることが知られており、PLA2遺伝子の発現誘導には長期間の処理が必要であること、また、C6細胞においてIL-1によりNF-kBが誘導されることが報告されていること(6)を考慮に入れると、IL-1が直接ではなくNF IL6やNF-kB遺伝子の誘導を介してPLA2遺伝子の発現を誘導していることが示唆される。

(参考文献)

(1) Clark J.D., Milona N., and Knopf J.L. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 7708-7712.

(2) Clark J.D., Lin L. L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N., and Knopf J.L. (1991) Cell, 65, 1043-1051.

(3) Sharp J.D., White D.L., Chiou W.X., Goodson T., Gamboa G.C., McClure D., Burgett S., Hoskins A., Skatrud P.L., Sportsman J.R., Becker G.W., Kang L.H., Roberts E.F., and Kramer R.M. (1991) J.Biol. Chem., 266, 14850-14853.

(4) Stephenson D.T., Manetta J.V., White D.L., Chiou X.G., Cox L., Gitter B., May P.C., Sharp J.D., Kramer R.M., and Clements J.A. (1994) Brain Res., 637, 97-105.

(5) Teramoto T., Tojo H., Yamano T., and Okamoto M. (1983) J. Biochem. (Tokyo), 93, 1353-1360.

(6) Moynagh P.N., Williams D.C., and O'neill L.A.J. (1993) Biochem. J., 294, 343-347.

66 リポ多糖によってラット脳内に誘導型NO合成酵素が発現する

鈴木映二*/**、新谷太*/**、永田清*、山添康*、中木敏夫*、
神庭重信**、加藤隆一*、浅井昌弘**
慶應義塾大学医学部**精神神経科学教室、*同薬理学教室

〔要約〕
ラットにリポ多糖を腹腔内投与し、脳内に誘導型の一酸化窒素合成酵素（iNOS）が発現されるかどうかを調べた。Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法（RT-PCR法）を用いてmRNAの発現を検出した。その結果、海馬、視床下部、前頭皮質、脳幹、小脳においてリポ多糖を投与したラットではiNOSmRNAが検出されたが、対照群では、確認されなかった。

[目的]
近年、一酸化窒素（NO）が神経伝達物質の一つであることの証明が蓄積されてきている[4]。NOは生体内においてL-arginineからNO合成酵素（NOS）を介して産生される。神経系における酵素としては、比較的一定量存在する神経型NOS（nNOS）の存在が知られている[6]。生体内神経系における、iNOSについては詳しく知られていない。そこで今回の研究では、iNOSがリポ多糖の全身投与によって1）脳内で発現するか、2）発現するとしたらどのような分布になっているか、3）その発現はデキサメサゾンの前投与によって抑制されるかを検討した。

[方法]
SD系雄ラットに、15mg/kg のリポ多糖（LPS群）あるいは生理的食塩水（対照群）を腹腔内投与した。デキサメサゾンの前処置は、0.5mg/kgを生食に均一に混濁して、リポ多糖を投与する30分前に腹腔内投与した（LPS+DEXA群）。経時的変化をみるために各時間後に、また脳内あるいは体内分布をみるためにリポ多糖を投与した6時間後に、エーテル麻酔下で断頭し速やかに脳、肝臓、肺、副腎を取り出した。さらに脳を、海馬、視床下部、前頭皮質、脳幹、小脳に分けた。各組織よりグアニジンイソシアネートー超遠心法により全RNAを抽出し、次にOligotex dt-30 super（TAKARA）を用いてmRNAに精製した。されにこれを鋳型としてSuper-script IIを用いてcDNAを合成した。
PCRはNunokawaらの方法[5]を若干改変して行った。変性、アニーリング、合成は各々94, 60, 72℃で1, 1, 1.5分行った。内部標準としてはglyceraldehyde-3-phosphate (G3PDH)をLuiらの方法に従って増幅した。PCR産物は1.5%アガロースゲルにて分離し、エチジウムブロマイド染色後紫外線照射下にて写真撮影した。各バンドはレーザーデンシトメーターにて定量した。

[結果]
PCRによって塩基配列より予想される830bpの長さの産物が得られた。これはmRNA をcDNAに転写せずそのまま鋳型に用いた場合出現しなかったことから、genomic DNA の混入によるものではないと思われた。
図1aに全脳、図1bに肝臓のリポ多糖投与後の経時的変化を示した。両臓器においてともに3時間後からバンドが認められ、２４時間後にも濃度の低いバンドが確認された。
図２に示すようにすべての脳部位と肝臓、副腎において、対照群ではPCR産物を認めなかったが、肺では濃度の低いバンドが見られた。リポ多糖投与後はすべての部位でバンドが確認できた。

[考察]
神経系に存在するNOSとしてはnNOSが従来研究対象となり、脳内分布や小脳における長期抑圧および海馬における長期増強などの機能にも関連して深く調べられてきた[3]。生物活性を調べた研究からはCa非依存性（誘導型）NOSは脳内で発現していないことが示唆された[7]が、その後培養細胞を用いた実験によ

りiNOSが誘導されることが示された[1]。

内毒素であるリポ多糖が全身臓器でiNOSを誘導することは知られていたが、今回はラットの神経系に広く誘導されることが示された。さらに、RT-PCR法による定量性には議論の余地があるものの、その誘導がデキサメサゾンによって抑制される傾向があることも示された。一般的にはリポ多糖は血液脳関門を通過しないと考えられているので、iNOSの発現は何らかの因子を介して誘導されたと想像される。病態生理学的には、敗血性ショック時の意識障害などの精神症状とiNOS の誘導が関連しているかも知れない。しかし、今回の結果は脳内の血管平滑筋のiNOSが誘導された可能性も否定できないため、今後組織化学的研究も含め検討中である。ところで神経系におけるiNOSの誘導は、Koprowski (1993)らによってすでに確認されている[2]が、彼らはウイルス性脳炎モデルにて示しており、細菌性内毒素の腹腔投与にてiNOSの誘導を示した今回の結果は、全身感染症での中枢神経系に対するNOSの効果という点で、病態生理学的に異なった意義があると思われる。

[文献] 1) Galea E. et al. (1994) J Neurosci. Res. 37:406-414. 2) Koprowski H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:3024-3027. 3) 工藤雅治、渋木克栄 (1993) 医学のあゆみ 166:158-160. 4) Murphy S. et al. (1993) TINS 16:323-328. 5) Nunokawa Y. et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 191:89-94. 6) Ogura T. et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:1014-1022. 7) Salter M. et al. (1991) FEBS 291:145-149.

「謝辞」本研究の一部は平成6年度慶應義塾大学医学部研究奨励費によった。

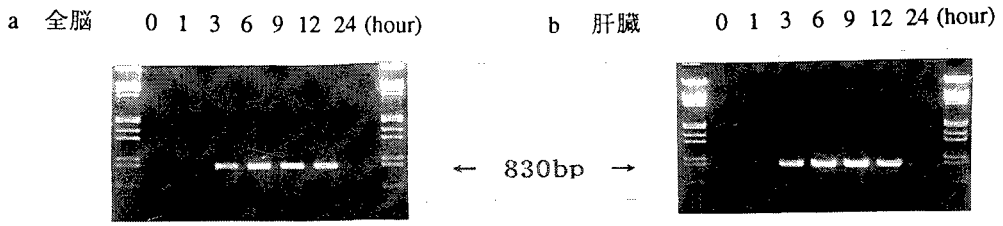


図1 LPS腹腔内投与後のmRNAにおけるiNOS誘導の経時的変化

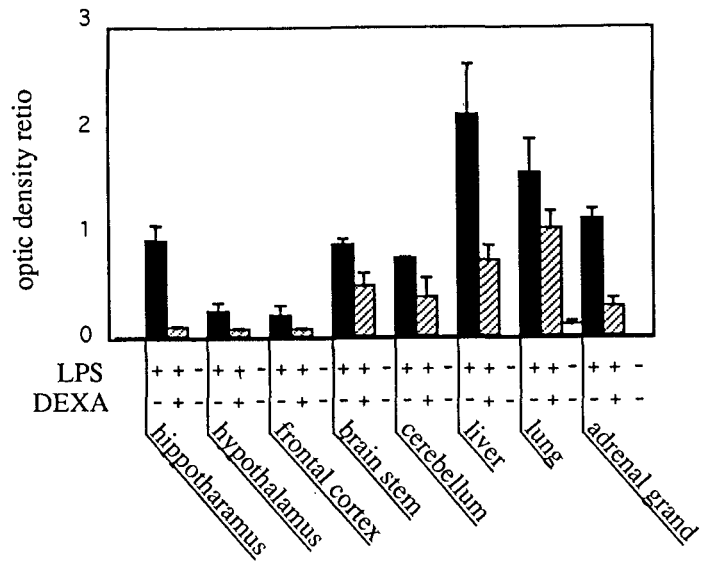


図2

脳各部位と全身臓器におけるLPSによるiNOSのmRNA発現の誘導とデキサメサゾン(DEXA)による抑制

67　中枢神経系におけるIL-10の産生とその作用について

水野　哲也、錫村　明生*、澤田　誠**、丸野内　棣**
（名古屋大学神経内科、藤田保健衛生大学*神経内科**応用細胞）

〔要約〕

マクロファージの機能を抑制し、抗炎症性に働くIL-10の中枢神経系での産生およびミクログリアに対する効果を検討した。マウス混合グリア培養から分離したアストロサイト、ミクログリアはともにIL-10を産生し、これはRT-PCRによるIL-10 mRNAの発現と上清中のIL-10活性により確認された。IL-10は、用量依存的にミクログリアのサイトカイン産生能を抑制し、ミクログリアの酸フォスファターゼ活性も抑制した。GM-CSFのミクログリア増殖作用に対しては抑制効果は示さなかった。以上より、IL-10は、アストロサイト、ミクログリアから産生され、中枢神経系でのサイトカインネットワークにおいて抑制性の調節因子として作用していることが明らかになった。

（目的）抑制性サイトカインとして同定されたIL-10は、Th2細胞、マクロファージなどから産生され、マクロファージの機能を抑制し、抗炎症性に働くことが知られている(1)。この抑制性サイトカインが、中枢神経系でも産生されるのか、また、マクロファージに近似したミクログリアに対してどのような作用を持つのかを検討した。

（方法）A. アストロサイト、ミクログリアにおけるIL-10産生の検討

C3H/HeNマウス全脳初代混合培養からアストロサイト、ミクログリアを分離し、無刺激、LPS刺激下(0.1,0.01,0.001μg/ml)で24時間培養した。上清中のIL-10活性をmurine IL-10 ELISA kit　にて測定し、培養した細胞からtotal RNAを抽出し、RT-PCR法によって、IL-10のmRNA発現を既報のごとく(2)検討した。

B. IL-10のミクログリアに対する作用の検討

1. ミクログリアのサイトカイン産生能に対する効果の検討: 分離したミクログリアにIL-10をそれぞれ1,10,100U/ml加え、24時間培養し、RT-PCRによってIL-1β, TNFα、IL-6　のmRNA発現が抑制されるか検討した。

2. ミクログリアの酸フォスファターゼ活性に対する効果の検討: ミクログリアを無刺激、LPS刺激下(0.1μg/ml)で培養し、これに、IL-10を1,10,100U/ml加え、3日間培養し、酸フォスファターゼ活性を測定した。

3. GM-CSFのミクログリア増殖作用に対する効果の検討: GM-CSF存在下で、IL-10を1,10,100U/ml加え、3日間培養し、増殖能をMTT colorimetric　法で測定した。

（結果）アストロサイト、ミクログリアともにIL-10のmRNA発現を認め(図1.2.)、ともにIL-10活性を認めた(図3.)。ミクログリアのサイトカイン産生能に対しIL-10はIL-1、IL-6、TNFα産生を用量依存的に抑制した。酸フォスファターゼ活性も抑制した(図4.)。GM-CSFのミクログリア増殖作用に対しては、抑制効果を示さなかった。

(考察) 中枢神経系においてグリア細胞や神経細胞は、脳内で独自のサイトカインネットワークを形成している。IL-1 やTNFαはアストロサイトの増殖に働き、GM-CSFはミクログリアの増殖や活性化を引き起こす(3)。TGF-βのようにミクログリアの増殖や活性化を抑制するサイトカインも知られるようになった(4)。マクロファージの機能を抑制するIL-10 が、中枢神経系で産生されるかどうかは、これまで報告がなかった。今回の検討でアストロサイト、ミクログリアともにIL-10 を産生することが確かめられた。さらに、IL-10 はミクログリアのサイトカイン産生、酸フォスファターゼ活性を抑制し、脳内のサイトカインネットワークにおいて抑制性の調節因子として作用していることがわかった。

(文献)

1. Howard,M., O'Garra,A. and Ishida,H., Biological properties of interleukin 10. J.Clin.Immunol., 12:239.1992.

2. Sawada,M., Suzumura,A. and Marunouchi,T., TNF α induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia, Brain Res., 583:296. 1992.

3. Suzumura,A., Sawada,M. and Marunouchi,T., Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro., J. Neuroimmunol., 30:111. 1990.

4. Suzumura,A., Sawada,M. and Marunouchi,T., Transforming growth factor- β supresses activation and proliferation of microglia in vitro., J.Immunol.,151:2150. 1993.

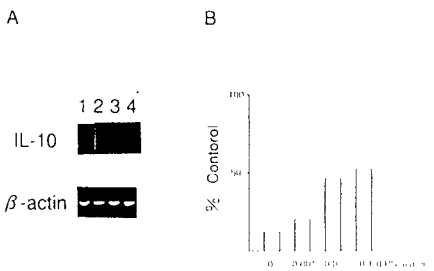


図1. アストロサイトにおけるIL-10 のmRNA発現
LPS刺激で発現は、容量依存的に増強された。

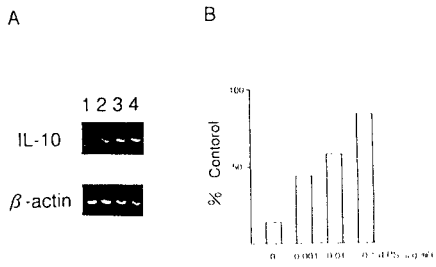


図2. ミクログリアにおけるIL-10 のmRNA発現
ミクログリアにおいても、LPS刺激で発現は容量依存的に増強された。

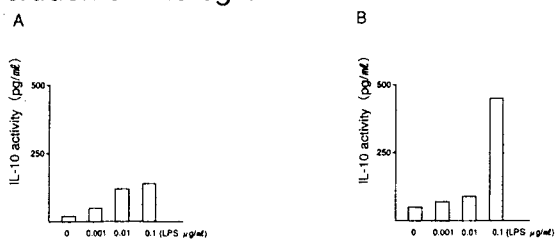


図3. A. アストロサイトにおけるIL-10 活性
アストロサイトでは、上清中の活性は低く、細胞破砕により活性が測定できた。
LPS刺激で活性は、容量依存的に増強された。

B. ミクログリアにおけるIL-10 活性
ミクログリアでは、上清中のIL-10 活性が測定でき、LPS刺激（0.1μg/ml）で、活性が増強された。

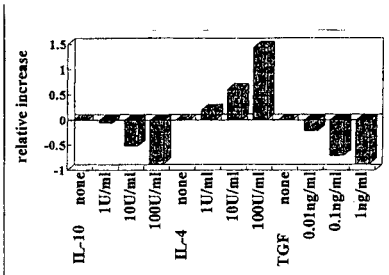


図4. ミクログリアの酸フォスファターゼ活性に対するIL-10 、IL-4 、TGF の効果の検討
IL-10 は、TGFと同様にミクログリアの酸フォスファターゼ活性を抑制した。

68 ラット視床下部における拘束ストレスによるモノアミン代謝の亢進ならびに血漿ACTHの増加におけるインターロイキン-1の関与

新谷　太[1,2]、中木敏夫[2]、佐藤耕一[1]、神庭重信[1]、加藤隆一[2]、浅井昌弘[1]
慶應義塾大学医学部　[1]精神神経科学教室、[2]薬理学教室

〔要約〕生体がストレスを受けた際の視床下部における神経内分泌学的な機能変化に対するインターロイキン-1（IL-1）の関与について調べた。ストレスによる視床下部-下垂体-副腎皮質系（HPA axis）の活性化や視床下部でのモノアミンの放出促進がIL-1の作用であるかどうかを調べるために、ラット視床下部のIL-1受容体を阻害した状態で拘束ストレスをかけ、血漿ACTH濃度と前視床下部でのNE濃度を調べた。IL-1受容体の阻害は、IL-1受容体アンタゴニスト（IL-1Ra）を直接視床下部に投与することで行った。その結果、IL-1Raの前処置が拘束ストレスによって引き起こされる視床下部でのNEの濃度の上昇、さらに、血漿中のACTH濃度の上昇を抑制することが明かになった。これらの結果は、拘束ストレスが視床下部において生物学的活性を有したIL-1が拘束ストレスによって引き起こされるモノアミンの放出の促進やHPA axisの活性化の調節に役割を果していることを示唆する。

＜目的＞　最近、ストレスによって引き起こされるHPA axisの亢進やモノアミンの放出の上昇などの中枢神経系内における反応に対して、IL-1がなんらかの役割を果している可能性が示唆されている（1-3）。拘束ストレスによって引き起こされる神経内分泌学的な変化に対する視床下部でのIL-1の役割を調べるために、われわれはラットの視床下部へのIL-1Raの直接投与を行う実験をデザインした。IL-1RaはIL-1とほぼ同じ分子量を持ち、I型IL-1受容体を拮抗的に阻害することが知られている（4,5）。すなわちわれわれは、拘束ストレスによるラット視床下部でのモノアミンの上昇や血漿ACTHの上昇がIL-1Raの投与によって抑制されるかどうかを調べた。

＜方法＞視床下部のモノアミン濃度の測定には、脳マイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィーを使った。また、マイクロダイアリシスプローブを挿入した視床下部内に直接的に試薬を投与するために、側管付きマイクロダイアリシスプローブを用いた。Sprague-Dawley雄性ラット（7-8週齢）をペントバルビタール（30 mg/kg）の腹腔内投与によって麻酔をかけ、ガイドシャフトを定位的に左右の前視床下部に植え込んだ（bregma後方1.5 mm、正中線より側方4.5 mm、頭蓋骨表下方7.0 mm、垂直線に対して25度 の傾斜、Paxinos & Watsonのアトラスによる。）。実験前日、マイクロダイアリシスプローブを視床下部に挿入した後、ハンクス溶液を3 μl/minの速度で潅流し、その透析液を20分間隔で2時間以上にわたり回収した。拘束ストレスをかける60分前に、IL-1Raまたはその溶媒を各側の前視床下部に直接投与した。IL-1Raは、0.1% BSAを含む滅菌ハンクス溶液に1 mg/mlの濃度で溶かし、2 μlを投与した。拘束ストレスは前述のサンプル回収を中断することなく行われ、6時間続けられた。回収されたサンプルを直ちに高速液体クロマトグラフィーシステムで分析した。血漿ACTHの濃度の測定に関する実験では、以前報告した方法を使って、ラットをペントバルビタール（30 mg/kg）の腹腔内投与によって麻酔をかけ、頚静脈内に血液を採取するためのポリエチレンチューブを装着するための手術を施した（1）。また、両側の視床下部に直接薬物を投与するために、ポリエチレンチューブを設置する手術に引き続いて、26ゲージの針を両側の前視床下部に以前報告した方法によって挿入した（1）。実験当日、まず、拘束ストレスを開始する60分前に、実験日の午後2時から4時の間に1 mlの血液をポリエチレンチューブを通じて安静の状態に置かれたラットの頚静脈から採取した。血液は氷冷されたEDTA入りガラス管に移した。ガラス管に入った血液を静かに攪拌した後、遠心にかけ（10000 g, 10 min, 4 °C）、血漿をプラスチック管に移し、ACTH測定まで-20 °Cで保存した。ACTHの測定は以前報告された方法を用いて行った（1）。拘束ストレスをかける直前にも1 mlの採血を行い、引き続き30、60、120、240、360分後にも1 mlの採血を繰り返した。IL-1Raは0.1% BSAを含む滅菌ハンクス溶液に1 mg/mlまたは10 mg/mlの濃度で溶かし、2 μlを投与した。

＜結果と考察＞　拘束ストレスによる視床下部でのNEの増大に対するIL-1Raの効果を調べる実験では、まず溶媒を投与した場合は、NEの濃度は増加し拘束ストレス開始後60分で、前値の約3倍のピークにまで達した。一方拘束ストレスをかける60分前にIL-1Raを投与した場合は、拘束ストレスによるNE濃度の上昇は有意に抑制された（Fig. 1）。次に、拘束ストレスによる血漿ACTH濃度の増大に対するIL-1Raの効果を調べる実験では、両側の前視床下部に溶媒を直接投与した場合は、投与後60分の血漿ACTH濃度は、投与に必要な操作だけで僅かな増加を認めたが、拘束ストレス開始後、血漿ACTH濃度は急速に上昇し、30分後に約20倍のピークに達した。その後急速に減少し、360分後に前値に戻った。2 μgのIL-1Raを拘束ストレスの60分前に投与した場合は、拘束ストレスによる血漿ACTH濃度の上昇は拘束ストレス後30分から120分にかけて有意に抑制された。20 μgのIL-1Raを拘束ストレスの60分前に両側の前視床下部に直接投与した時も、同様の抑制効果がみられた（Fig. 2）。以上の結果から、拘束ストレスによって引き起こされた視床下部でのNEの上昇と、血漿ACTH濃度の上昇は、視床下部へのIL-1Raの直接投与によって有意に抑制されることが分かった。これらの結果は、モノアミンと血漿ACTH濃度の上昇というストレス反応が視床下部におけるIL-1を介するものであるという考えと一致する。

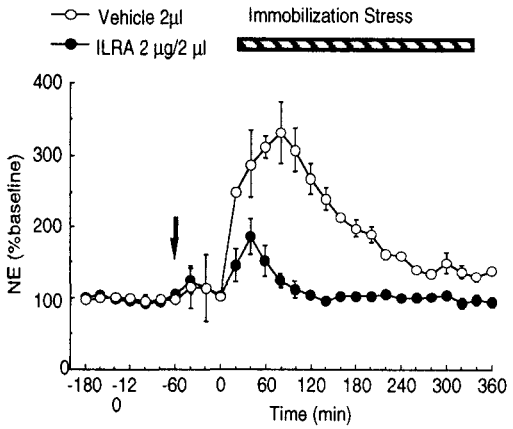


Fig. 1 Effects of IL-1Ra administered into the rat anterior hypothalamus through a microinjection tube on hypothalamic levels of NE in response to immobilization stress. Arrows represent the timing of IL-1Ra administration (2 μg/2 μl; solid circles) and vehicle (open circles) simultaneously administered into the contralateral side. Horizontal hatched bars represent the periods of stress. One hundred percent values of the amines and metabolites are; NE, 2.13 ± 0.21 (pg/20 min defined as the mean ± SEM of 8 samples). Open circles vs solid circles; $P < 0.05$, $n = 8$.

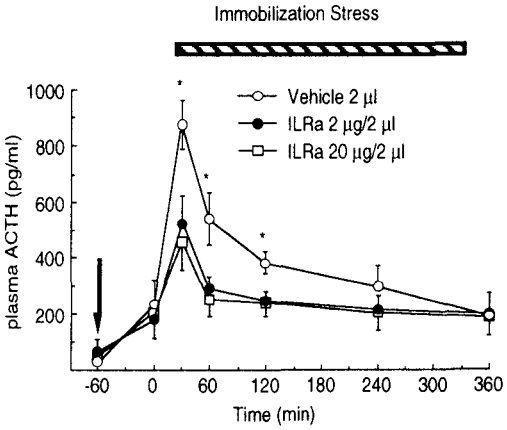


Fig. 2 Effects of IL-1Ra on plasma levels of ACTH in response to immobilization stress. IL-1Ra or vehicle was administered directly into the anterior hypothalami at 60 min after initiating stress exposure. Arrows represent the timing of IL-1Ra (2 μg/2 μl; solid circles, 20 μg/2 μl; open squares) or vehicle (2 μl; open circles) injection. Horizontal hatched bars represent the period of IS exposure. *; open circles vs solid circles; $P < 0.05$, $n = 8$.

＜文献＞

1.Shintani, F., S. Kanba, T. Nakaki, M. Nibuya, N. Kinoshita, E. Suzuki, G. Yagi, R. Kato, and M. Asai. 1993. Interleukin-1b augments release of norepinephrine, dopamine and serotonin in the rat hypothalamus. J. Neurosci. 13:3574-3581.

2.Berkenbosch, F., J. V. Oers, A. del Rey, F. Tilders, and H. O. Besedovsky. 1987. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. Science 238:524-526.

3.Sapolsky, R., C. Rivier, G. Yamamoto, P. Plotsky, and W. Vale. 1987. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropine-releasing factor. Science 238:522-524.

4.Dinarello, C. A. and S. M. Wolff. 1993. The role of interleukin-1 in disease. New Engl. J. Med. 328:106-113.

5.Eisenberg, S. P., R. J. Evans, W. P. Arend, E. Verderber, M. T. Brewer, C. H. Hannum, and R. C. Thompson. 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. Nature 343:341-346.

69 HNK－1関連抗原に対する抗体とサイトメガロウイルス感染

窪田和興　黒谷篤之　後藤希代子　阿部敏明
帝京大学医学部小児科

〔要約〕

サイトメガロウイルス（CMV）感染とHNK－1関連抗原に対する抗体との関連をCMV抗体陽性群の血清及びCMV抗体陰性群の血清を用いて検討した。CMV陽性群は、CMV陰性群に比べsulfated glucuronyl glycosphingolipids（SGGL）に対する抗体が有意に上昇していた。さらに、CMV抗体価の上昇に伴い、抗SGGL抗体価も上昇する傾向がみられた。この抗SGGL抗体は、SGPGに比べSGLPGに強く結合する特異性の高い抗体であり、P0蛋白質にも反応した。また、ELISA法により抗ヘパラン硫酸（HS）抗体とCMV抗体価についても検討したが相関を認めなかった。

（緒言）　最近、脱髄性末梢神経障害であるGuillain-Barre症候群（GBS）において糖鎖に対する自己抗体が病態に深く関与していることが報告され注目されている。我々はこれまでGBSの自己抗体の標的と考えられているヒト末梢神経ミエリンの糖鎖抗原の解析を行ってきた（1、2）。GBSの原因として、先行する呼吸器、消化器等の感染時に生じた様々な抗体が、末梢神経ミエリンの糖鎖抗原と交差する可能性が考えられている。サイトメガロウイルス（CMV）はGBSの先行感染として同定されるウイルスのなかで頻度の高いもののひとつであるが（3）これまでCMVと神経系の共通抗原の存在は明らかではなかった。我々はCMVに感染したときに末梢神経系の糖鎖に対する抗体が産生されるかどうか検索し、先天性CMV感染症の患児血清中に末梢神経ミエリンに特徴的な硫酸化糖脂質に対する高力価の抗体が検出されることをみいだした。一般にCMVによる感染は不顕性感染となる場合が多く、健常人においても高いCMV抗体価を示す場合がある。今回、先天性CMV感染症患児以外にも測定対象を広げCMV感染との相関を検討した。

（材料及び方法）　尿中からCMVが分離された先天性CMV感染症の新生児を含む、対象血清78例についてCMV抗体価をELISA法により求め、CMV陽性群（5か月～28才(10.9 ±9.5)、58名）、CMV陰性群（5か月～53才(6.9 ± 7.4)、20名）に分けた。抗原として用いた糖脂質（SGGL、CSE）は既報（2）により末梢神経より精製した。ヘパラン硫酸はウシ腎由来を使用した。SGGL、CSE、ヘパラン硫酸を抗原として被検血清のIgG、IgM抗体価をELISA法で測定した。CMV、HSV－IgG抗体価の測定はELISAキット（エンザイグノスト、ベーリングベルゲ社）を用いて測定した。P0蛋白質に対する抗体は末梢神経ミエリンをSDS－PAGEにかけWestern blotting法により検討した。

（結果）1）CMV抗体と抗SGGL抗体　抗SGGL抗体価の検討ではCMV陽性群では、IgG、IgM共にCMV陰性群に比べ有意に上昇していた（図1）。CMV抗体価10000 ≦（CMV－high）群ではさらに高値となり、CMV感染に伴い、抗SGGL抗体価が高値となる事がわかった（表1）。抗CSE抗体もCMV感染に伴い上昇する傾向がみられたが、抗SGGL抗体ほど顕著でなかった。CMVと同じヘルペス族の1種である単純ヘルペスウイルスに対する抗体価と抗SGGL抗体価との関連は認められなかった。HNK－1抗原としてしられるSGGLには構成糖として5糖から成るSGPGと、ラクトサミン構造が繰返した7糖のSGLPGの2種類が知られている（図2）。CMV感染症の患者血清中の抗SGGL抗体の特異性をTLC免疫染色法により更に検討すると

、特にＳＧＬＰＧに対する親和性が非常に高かった。

２）P0蛋白質に対する抗体　末梢神経系のＨＮＫ－１糖鎖を含む糖蛋白であるＰ０に対してＣＭＶ感染症の患者血清中の抗体が結合するか調べた。Western blotting法により検討したところ、これらの患者血清中には抗P0抗体が検出された。

３）ヘパラン硫酸に対する抗体　ＳＧＧＬに対する抗体が産生される機構のひとつとしてヘパラン硫酸などの硫酸化多糖に対する抗体が交差する可能性が考えられたのでＥＬＩＳＡ法によりヘパラン硫酸に対する抗体価を測定した。ＣＭＶ陽性群で抗ヘパラン硫酸抗体価はＩｇＧ、ＩｇＭ共に陰性群に比べ有意差を認めなかった（図３）。

（考察）以上の検討から、ＣＭＶ感染にともない抗ＳＧＧＬ抗体が産生される事が示された。この抗体はＳＧＰＧに比べＳＧＬＰＧに強く結合する、特異性の高い抗体でありP0蛋白質にも反応した。この抗体の特異性はモノクローナル抗体ＨＮＫ－１のそれと非常に近似しているがその詳細なエピトープは異なると考えられ、ヘパラン硫酸に対する抗体とも異なると考えられた。ＨＮＫ－１糖鎖を含んだ糖蛋白質または複合糖質がＣＭＶ感染過程において何らかの役割を担っているためこのような抗体が特異的に産生されたとも考えられる。今後このような点について更に検討を加える予定である。

表1　CMV抗体価の上昇と抗CSE、抗SGGL抗体価の変化

	CMV-	CMV+		
			CMV-low	CMV-high
CMVtiter	640> n=20	640≦ n=58	640～10000> n=34	10000≦ n=24
抗CSE抗体値				
IgG	0.086±0.081	0.146±0.188 *	0.115±0.075 *	0.194±0.253 *
IgM	0.135±0.095	0.149±0.118	0.125±0.093	0.187±0.144 *
抗SGGL抗体値				
IgG	0.068±0.066	0.132±0.138 * *	0.120±0.127 * *	0.152±0.155 * *
IgM	0.145±0.111	0.352±0.193 *	0.307±0.161 *	0.421±0.224 * *

それぞれのCMV-との比較　* P<0.05
* * P<0.001

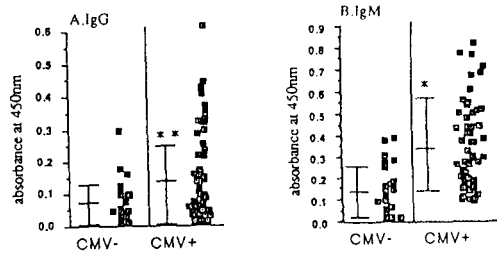


図1　CMV抗体価と抗SGGL抗体

CMV-　N=20　　* P<0.05
CMV+　N=58　　* * P<0.001

SGPG : SO3 -GlcUβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-Cer

SGLPG :SO3 -GlcUβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-Cer

図2　SGGLの構造

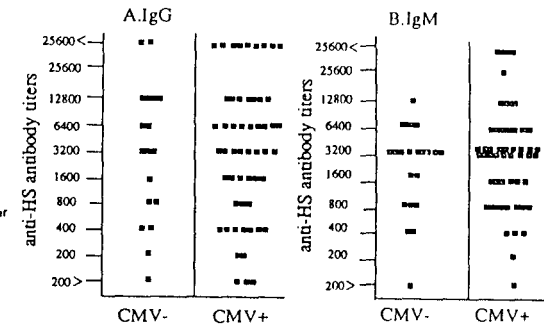


図3　CMV抗体価の上昇と抗ＨＳ抗体価

CMV-　N=24
CMV+　N=60

文献

1) Ogawa-Goto,K.et al(1992).J.Neurochem.59:1844-1449
2) Ogawa-Goto,K.et al(1993).J.Neurochem.61:1398-1403
3) Winer,J.B.et al.(1988). J.Neurol.Neurosurg.Psychiat.51:613-618.

70　抗HCNP抗体によるラット末梢神経系の免疫組織化学的検討

片田栄一* 三竹重久* 松川則之* 岩瀬環* 大塚康史* 継泰城* 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)を抗原として作成したポリクローナル抗体を用いて、１１日齢および４週齢Ｗｉｓｔａｒ系ラット末梢神経系の免疫反応陽性部位を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた免疫組織化学にて検討した。その結果、脳幹；迷走神経背側核の神経終末、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、脳脊髄神経節；後根神経節の神経細胞内顆粒、三叉神経節およびラセン神経節の一部神経細胞、交感神経節の一部神経細胞、末梢神経；自律神経終末（十二指腸の筋間および粘膜下神経叢の神経細胞と神経線維、諸臓器の血管壁における神経終末）に抗ＨＣＮＰ抗体陽性産物を認めた。さらに免疫電顕にて、後角、側柱での神経終末の免疫陽性産物はシナプス前部に認められ、１１日齢では主としてシナプス小胞に、４週齢ではシナプス小胞とシナプス前部細胞質内に局在した。１１日齢の腎小血管壁での神経終末の免疫陽性産物はシナプス小胞として観察された。

［はじめに］
我々は、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１１個のアミノ酸から成るペプチドを同定し、Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide(HCNP)と命名した（１）（２）。昨年の本学会で我々は、抗ＨＣＮＰ抗体を用いてラット神経系を免疫組織化学的に検討し、大脳皮質、海馬、線条体の神経細胞、視床の一亜核、視床下部、迷走神経背側核、脊髄後角と側柱の神経終末、大脳、脳幹、脊髄の白質でのグリア細胞などを中心に免疫反応陽性を認めたことを報告した（３）。今回我々は１１日齢および４週齢Ｗｉｓｔａｒ系ラット末梢神経系において抗ＨＣＮＰ抗体陽性部位を光学および電子顕微鏡を用いて検討を加えたので報告する。

［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をCNBr-Activated Sepharose 4B (Pharmacia)によりaffinity精製した。２）Western blot法：１１日齢の前脳、膵臓、心筋、骨格筋、十二指腸の組織抽出液を１５％ポリアクリルアミドゲルにて分離後、Immobilon膜にブロットし免疫反応後ＥＣＬ法にてＨＣＮＰ様免疫活性を持つ分子を可視化した。３）免疫組織化学：Ｗｉｓｔａｒ系ラット雄（１１日齢６匹、４週齢６匹）を対象とした。ネンブタールにて麻酔処理後、１１日齢、４週齢の各２匹ずつブアン固定液で右心、気管、消化管を経て固定し、さらに４℃下でブアン固定液に１週間浸漬させ、全身固定したラットを数ブロックに切断しパラフィン包埋し、頭部から尾部にかけ中軸断で５００μmごとに４μmの切片を作製した。さらに各日齢のラット２匹ずつから脳および脊髄を摘出しブアン固定液に室温で浸漬した。脳は２４時間、脊髄は約１週間固定後、パラフィン包埋し光学顕微鏡用に厚さ４μmの切片を作製した。光顕および電顕標本ともに抗ＨＣＮＰ抗体を用いて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を実施し、また連続切片において一次抗体としてTyrosine Hydroxylase(TH)およびMyelin basic protein(MBP)に対する抗体による染色を施行し、光学顕微鏡下で比較した。免疫電顕は１１日齢、４週齢の各２匹ずつをネンブタール麻酔下で４％パラホムアルデヒドと０．１％グルタールアルデヒド混合液で灌流固定し、脊髄、腎を５０～７０μmに薄切、免疫染色しＤＡＢで発色後、１％オスミウムで再固定し脱水後エポン樹脂に包埋した。光顕下で免疫反応陽性部位を同定し、超薄切電顕試料を作成した。無染色、あるいは電子染色（酢酸ウラン、鉛）試料の観察を行った。

［結果］

1）Western blot法：１１日齢の前脳、膵臓、心筋、骨格筋、十二指腸で２３ｋＤａに抗ＨＣＮＰ抗体陽性バンドを認めた（図１）。２）免疫組織所見：抗ＨＣＮＰ抗体による免疫反応陽性部位を以下に記載する。脳幹；迷走神経背側核の神経終末、脊髄；後角の神経終末および一部神経細胞（図２）、側柱の神経終末、脳脊髄神経節；後根神経節の神経細胞内顆粒、三叉神経節およびラセン神経節の一部神経細胞、交感神経節の一部神経細胞（図３）、末梢神経；自律神経終末（十二指腸の筋間および粘膜下神経叢内の神経細胞および神経線維、諸臓器での血管壁における神経終末）。免疫電顕では後角、側柱での神経終末の免疫陽性産物はシナプス前部に認められ、１１日齢では主としてシナプス小胞に、４週齢ではシナプス小胞とシナプス前部細胞質内（図４）に存在した。１１日齢の腎小血管壁での神経終末の免疫陽性産物はシナプス小胞（図５）として観察された。いずれの陽性産物も対照試験では陰性であった。３）抗ＨＣＮＰ抗体と抗ＴＨ抗体による連続切片における交感神経節の免疫反応陽性部位の比較では、抗ＴＨ抗体陽性の神経細胞の一部に抗ＨＣＮＰ抗体でも陽性を認めた。また抗ＨＣＮＰ抗体と抗ＭＢＰ抗体による連続切片における末梢神経の免疫反応陽性部位の比較では抗ＨＣＮＰ抗体陽性神経線維は抗ＭＢＰ抗体では陰性で、逆に抗ＭＢＰ抗体陽性神経線維は抗ＨＣＮＰ抗体で陰性であった。

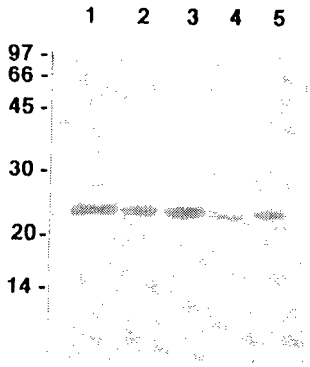


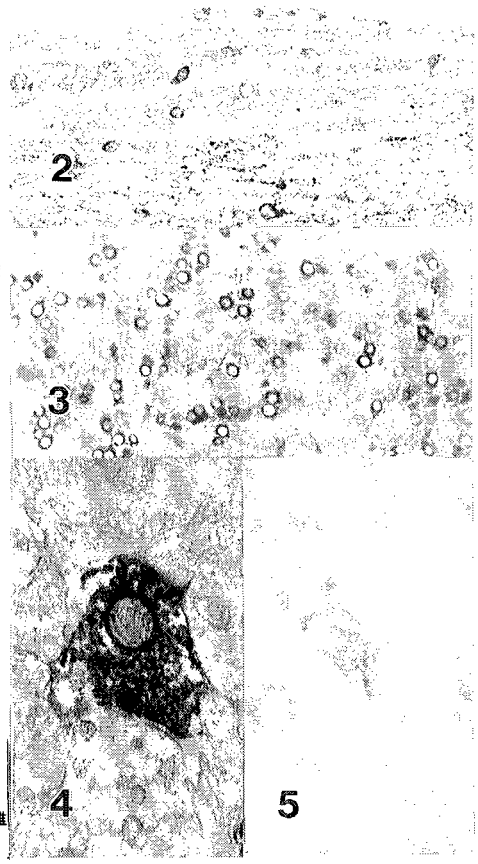
図１．Western blotting
各レーンの蛋白量は40μg．分子量はkDaで表示．１前脳 ２膵臓 ３心筋 ４骨格筋 ５十二指腸

図２．後角
（光顕）

図３．交感神経節
（光顕）

図４．４週齢の後角
（電顕 ×３０ｋ）

図５．１１日齢の腎小血管壁
（電顕 ×１５ｋ）



（表１）

（運動神経系）								
部位	側索	－	前角	－	前根	－	末梢神経	
免疫反応性	（－）		（－）		（－）		（－）	
（知覚神経系）								
部位	後索	－	後角	－	後根	－	後根神経節 三叉およびラセン神経節	－ 末梢神経
免疫反応性	（＋）		（＋）		（－）		（＋）	（－）
（自律神経系）								
部位	側柱 迷走神経背側核	－	前根 後根	－	交感神経節	－	内臓平滑筋または内臓血管への節後線維	
免疫反応性	（＋）		（－）		（＋）		（＋）	

［考案］

抗ＨＣＮＰ抗体による１１日齢および４週齢Ｗｉｓｔａｒ系ラット末梢神経系における免疫反応性の結果を表１に示す。今回、抗ＨＣＮＰ抗体を用いて後角、後根神経節、および交感神経節、その節後線維と自律神経終末にも免疫反応陽性部位を認め、ＨＣＮＰおよびＨＣＮＰ前駆体蛋白が末梢神経系（特に自律神経系および知覚系）の機能に介在する可能性が示唆された。

［文献］(1)Ojika, K., et al.(1992)Brain Res., 572, 164-171 (2)Ojika, K., et al.(1994) Dev.Brain Res.,79,1-9 (3)三竹重久 他.(1993)神経化学32, 168-169

71 脳内のNF-AT like DNA-binding protein

浅沼幹人，西林佐紀子，近藤洋一，岩田恵美，小川紀雄，森 昭胤
（岡山大医・分子細胞医学研・神経情報学部門）

〔要約〕 末梢リンパ球においてinterleukin-2 (IL-2)遺伝子のpromoter領域のNF-AT結合element (NF-AT site)に作用する転写制御因子NF-ATは，IL-2の産生さらにT cellの活性化をもたらし，免疫反応に深く関与している。NF-AT site結合蛋白の脳内での存在および分布について，マウスおよびラットの脳核抽出液を用いelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)で検討した。脳内各部位の組織において脾臓のものと同様の移動度をもつNF-AT site結合蛋白の2つのbandが認められ，過剰の非標識プローブ添加により消去された。以上から，中枢神経系においても末梢リンパ球でのNF-ATと同様のNF-AT like DNA-binding proteinが存在することが示唆された。

[目的] 末梢リンパ球において，NF-ATはinterleukin-2 (IL-2)遺伝子のpromoter領域のNF-AT結合element (NF-AT site)に作用し，IL-2の産生さらにT cellの活性化をもたらす転写制御因子として，免疫反応に深く関与している(1)。さらに，免疫抑制剤cyclosporin A (CsA)の作用機構でkey factorとなる転写制御因子としても注目されている(2)。すなわち，抗原，macrophageからのIL-1がT cellレセプターに結合するとtyrosine kinase, inositol triphosphate系，さらにCa/calmodulin依存性phosphataseのcalcineurinが活性化される。calcineurinは転写制御因子NF-ATの脱リン酸化をもたらし，その脱リン酸化されたNF-ATは核内に移行しIL-2遺伝子上流のNF-AT siteに結合し，転写が惹起されIL-2が産生される。CsAはレセプター蛋白cyclophilinとcomplexを形成し，calcineurinの脱リン酸化活性を阻害し，NF-ATの核内移行を阻害することで，T cellでのIL-2産生を抑制し，その免疫抑制機能を発揮する。

近年，神経障害後に惹起される免疫反応に関する知見が報告され，末梢刺激に対して中枢神経系でcytokineが発現し，中枢神経系でも免疫反応が発現していることが明らかになっている。我々も，CsA末梢投与が一過性脳虚血後の海馬でのレセプターの変化に，またpentylenetetrazole誘発けいれん発作の重症度に影響を及ぼすことを見い出した(3,4)。

そこで，NF-AT site結合蛋白の脳内での存在および分布について検討する目的で，マウスおよびラットの脳核抽出液を用いelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)にて検討した。

[方法] 核抽出液の調製：7週齢雄性ICRマウスおよびSDラットを用い，ネンブタール(50 mg/kg, i.p.)麻酔下で脳血管内の血球成分を除くために左心室より冷却生理的食塩水で充分に潅流し，断頭後脳から前頭皮質，海馬，前頭基底部，線条体，視床＋中脳，菱脳，小脳を，末梢からは脾臓の各組織を取り出した。Schreiberらの方法(5)に従い各組織より核抽出液を調整した。核抽出液は蛋白定量後，使用時まで-80℃で凍結保存した。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)：murine IL-2のpromoter領域のNF-AT site (-290～-276)を含む合成オリゴヌクレオチドを5'末端を3,4塩基突出させannealした2本鎖DNAプローブの3'末端を[α-^{32}P]dCTPとDNA polymerase Iを用いてラベルした。核抽出液(4 μg), 20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 2 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 80 mM NaCl, 2 μg Poly (dI-dC), 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, DNAプローブ(200 pg)のmixtureを23℃で15分間インキュベート後，4%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動(11V/cm, 4℃, 2.5時間)した。泳動後ゲルを乾燥し，オートラジオグラフィーを行った。

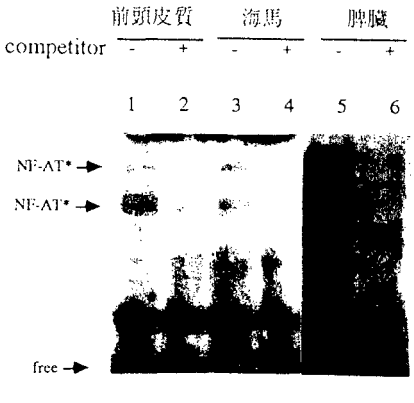


Fig.1. ラット前頭皮質，海馬，脾臓におけるNF-AT site結合蛋白
標識NF-AT site プローブ (NF-AT*)によるEMSA
competitorとして100倍量の非標識NF-AT site プローブを用いた
(lane 2,4,6)

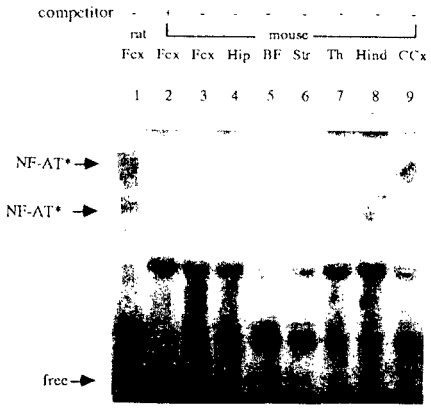


Fig.2. 脳各部位におけるNF-AT site結合蛋白
標識NF-AT site プローブ (NF-AT*)によるEMSA
Fex, 前頭皮質; Hip, 海馬; BF, 前頭基底部; Str, 線条体
Th, 視床; Hind, 菱脳; CCx, 小脳

[結果] ラット各組織からの核抽出液を用いたEMSAでは，脾臓だけでなく，弱いながらも前頭皮質，海馬においても2つのbandが得られ，移動度も脾臓のものと同じであった(Fig. 1: lane 1,3,5)。両bandともに100倍量の非標識プローブの添加により消去された(Fig. 1: lane 2,4,6)。upper, lower bandよりも移動度の速いbandは過剰非標識プローブの添加により影響されず，非特異的結合蛋白と考えられた。マウス各脳部位の核抽出液を用いたEMSAでは，視床＋中脳＞菱脳＝海馬＞前頭皮質＝小脳＞前頭基底部＝線条体の順に強い2つのbandが認められ(Fig. 2: lane 3-9)，過剰非標識プローブの添加により消去された(Fig. 2: lane 2)。また，両bandはラットでのband(Fig. 2: lane 1)と同様の移動度であった。

[考察] Jainらは近年，T cellからの核抽出液を用い，様々な刺激に対して早期に誘導される最初期遺伝子のc-*fos*, c-*jun* mRNAの転写産物Fos, Jun蛋白の複合体AP-1(遺伝子上流のTREに結合する)が，IL-2遺伝子上流域のNF-AT siteに結合するNF-AT (NF-ATn)の構成成分であることを報告している(6)。すなわち，AP-1は核内でpre-existing NF-AT (NF-ATp)とtrimerを形成しNF-AT siteに結合するか，あるいはNF-AT siteに近接するelementに結合し蛋白-蛋白間の相互作用により転写調節を行うと考えられる。本検討でも脾臓においてNF-ATpとAP-1のtrimerと考えられるupper bandと，NF-ATpのlower bandの2つのNF-AT site結合蛋白が認められた(Fig. 1: lane 5)。一方，各脳部位の組織においても弱いながら脾臓のものと同様の移動度をもつNF-AT site結合蛋白のconstitutiveな2つのbandが認められ(Fig. 2)，さらにこのNF-AT like DNA-binding proteinは薬物けいれん刺激において発現が増強した。また，upper bandは過剰の非標識TREプローブ添加により減弱することから，AP-1との重合体を示している可能性が示唆された。中枢神経系においても，末梢リンパ球でのNF-ATと同様のNF-AT like DNA-binding proteinが存在することが明らかとなった。

[文献]

1. Shaw, J-P et al. Science 241: 202-5 (1988).
2. Emmel, EA et al. Science 246: 1617-20 (1989).
3. Ogawa, N et al. Neurosci Lett 152: 173-6 (1993).
4. Asanuma, M et al. Jpn J Psychiat Neurol, in press.
5. Schreiber, E et al. Nucleic Acid Res 17: 6419 (1989)
6. Jain, J et al. Nature 356: 801-4 (1992).

72 酸性線維芽細胞成長因子の内分泌系および交感神経系に対する作用

大村　裕、松本逸郎、佐々木和男、新島　旭
（日本臓器・生物活性研、長崎大学・医学部、富山大学・工学部、新潟大学・医学部）

〔要約〕

酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）の抗体を用いた免疫組織化学的研究によれば、内分泌系や交感神経系と密接に関係する視床下部室傍核のニューロンは免疫陽性である。そこで本研究ではaFGFと内分泌系及び交感神経系との関係につき検討した。麻酔下ラットを用いてaFGFを第３脳室内に投与すると血漿コルチコステロン値とエピネフリン値が用量－反応的に有意に増加した。この血漿コルチコステロン値の上昇は抗ＣＲＦ抗体の第３脳室内前投与によって有意に抑制されたが、エピネフリン値の上昇には無効であった。一方、副腎交感神経の切除は血漿エピネフリン値の上昇を有意に阻害したが、血漿コルチコステロン値の上昇には無効であった。aFGFと交感神経系の関係をさらに電気生理学的に調べるため、脾臓交感神経活動を記録しながらaFGFを第３脳室に投与するとその活動は数時間にわたり上昇し、用量－反応的であった。血漿コルチコステロン値の上昇や脾臓交感神経活動の上昇はaFGFの静脈内投与でも認められた。以上の結果は、aFGFが自己免疫疾患に有効である可能性を示唆する。

［緒言］酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）は脳室壁の上衣細胞によって産生される。上衣細胞は、摂食やグルコースの腹腔内投与により脳脊髄液中に増加したグルコースに反応してaFGFを遊離する。遊離されたaFGFは摂食中枢ニューロンに取り込まれて摂食を抑制し（１）、一方海馬のニューロンに取り込まれて学習・記憶を促進する（３）。aFGFはまた内分泌系や交感神経系と密接に関係する視床下部室傍核のニューロンに取り込まれる（２）。そこで本研究ではaFGFと内分泌系及び交感神経系との関係につき検討した。

［方法］血漿コルチコステロンやエピネフリンの測定にはウィスター系雄性ラット（300-350 g）を用いた。実験開始日より1週間前にネンブタール麻酔下で薬物投与用カニューレを第３脳室に、採血用カテーテルを右心房内に慢性的に留置した。実験当日、第３脳室内留置カニューレを通して、生理食塩水に溶解したaFGFをネンブタール麻酔下の動物に10 μｌ投与した。投与前10分と投与後20、40、60、90、120、150、180分に血液をカテーテルを介して採取し、直ちに血漿成分を遠心分離した。血球成分は再度生理食塩水に分散し、すみやかに動物に返した。採取した血漿成分は測定するまで-30° Ｃで凍結保存し、3週間以内に測定した。コルチコステロンはジクロルメタンで抽出した後、ＴＬＣで精製し、蛍光法で測定した。aFGFは静脈内にも投与した。脾臓交感神経活動のaFGFに対する応答はウレタン麻酔下のラットで調べた。開腹後、脾臓交感神経を末梢端で切断し、その中枢側より双極電極で導出した。aFGFは慢性的に留置したカニューレを通して第３脳室に、あるいはカテーテルを通して静脈内に投与した。

［結果］aFGFを第３脳室に1および10 ng（0.06および0.6 pmol）投与すると、投与1時間後には血漿コルチコステロン値は対照期の10 μg/100 mlからそれぞれ20および38 μg/100 mlに用量－反応的に増加した（図１）。血漿エピネフリン値も10 ngのaFGFの投与で対照期の250 pg/mlから3時間後には2 ng/mlへと上昇した。抗CRF抗体の第3脳室への前投与は、血漿コルチコステロンの上昇を有意に抑制したが（図２）、血漿エピネフリン値の上昇に対しては無効であった。一方、副腎交感神経の切除は血漿エピネフリンの上昇を阻害したが、血漿コルチコステロンの上昇には無効であった。血漿コルチコステロン値はaFGFの静脈内投与（10 ng）によっても対照期の10 μg/100 mlから1時間後には20 μg/100 mlへと増加した。脾臓交感神経の活動もaFGFの第3脳室内投与（50-200 ng/10 μl）や静脈内投与（50 ng/0.1 ml）で有意に増加し、その増加は数時間にわたった。

［考察］本研究の結果、aFGFは内分泌系および交感神経系に作用することが判明した。室傍核小細胞部にはCRF含有ニューロンが存在し、CRFの遊離はACTHを介して副腎からコルチコステロンの放出を促す。すなわち、aFGFは視床下部－下垂体－副腎系を介して血漿コルチコステロンを増加した。このコルチコステロンは免疫担当細胞の活性を抑制することが知られている。aFGFによる血漿エピネフリンの上昇は交感神経系による。交感神経活動の活動増加は脾臓交感神経で実際に確認された。脾臓交感神経活動の増加は抗原認識を必要としないで腫瘍細胞などを破壊するNK（Natural Killer）細胞の活性を抑制する。以上の結果は、aFGFが免疫抑制的に働き、自己免疫疾患などに有効であることを示唆する。

［文献］１．Hanai K., Oomura Y., Kai Y., Nishikawa K., Shimizu N., Morita H. and Plata-Salaman C.R.(1989): Am. J. Physiol. 256 R217-R223, ２．木村　宏、遠山育夫(1993):Molec. Med. 30 1002-1009, ３．Oomura Y., Sasaki K., Suzuki K., Muto T., Li A., Ogita Z., Hanai K., Tooyama I., Kimura H. and Yanaihara N.(1992) Am. J. Clin. Nutri. 55 278S-282S.

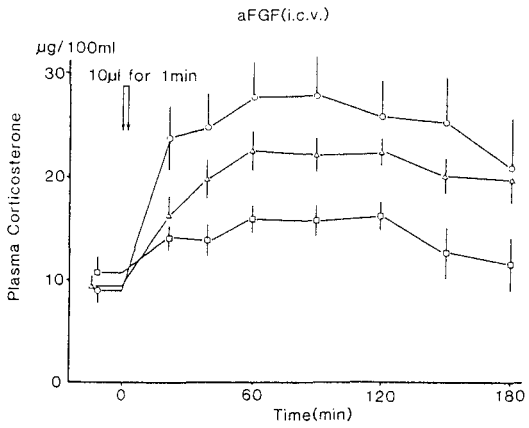


図１　脳室内aFGF投与による血漿コルチコステロンの増加。□、生理食塩水。△、aFGF 1 ng。○、aFGF 10 ng。

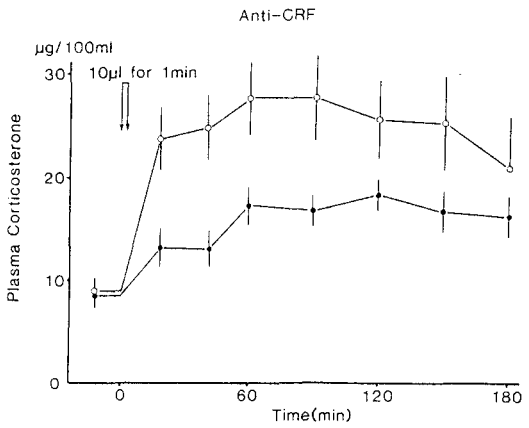


図２　抗CRF抗体前投与による血漿コルチコステロン上昇の阻害。○、aFGF。●、抗CRF抗体＋aFGF。

73 肝細胞成長因子（HGF）の神経栄養活性

浜之上 誠[1]、竹本 なぎさ[1]、松本 邦夫[2]、中村 敏一[2]、中嶋 一行[1]、高坂 新一[1]
[1]国立精神・神経センター神経研究所・代謝研究部、[2]大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍生化学研究部

〔要約〕
我々はこれまでミクログリア由来プラスミノーゲン（PGn）が中枢ニューロンに対し神経栄養活性を有することを見いだし、その作用機序について検討を行ってきた。今回はアミノ酸配列がPGnと非常に高い相同性を示す肝細胞成長因子（HGF）に注目しその神経栄養活性について解析を行った。その結果HGFはPGnと同様、突起伸展やドーパミンの取り込みの促進など中枢ニューロンに対し神経栄養活性を示すことを明らかにした。

「はじめに」
ミクログリアの中枢神経系における機能については従来から貪食細胞として機能するとみられてきた。しかし最近ミクログリアより様々なサイトカインが分泌されることやミクログリアの培養上清がニューロンの生存維持に働くことが示されて以来(1)、ミクログリアは単に貪食細胞としてだけではなくより積極的にニューロンに働きかけていることが示唆されている。我々はこれまでミクログリアの培養上清中にセリンプロテアーゼの一つであるPGnが存在すること(2)、またこのPGnが大脳皮質組織片の突起伸展活性(3)や中脳ドーパミン作動性ニューロンの生存維持、成熟活性を有することを報告してきた。(4)今回はこのPGnと構造的に極めて類似しているHGFに注目し解析を行った。

「実験方法」
大脳皮質組織片に対する栄養活性の検討： 胎性17日のラット胎仔より大脳皮質を切り出し機械的に小片化した後コートしたディッシュに播種した。その後様々の因子を加え無血清MEM培地中にて2日間培養し組織片の直径以上に突起を伸展している組織片の割合を測定した。
中脳細胞に対する栄養活性の検討： 胎性17日のラット胎仔より中脳を取り出し分散した後$1\times10^6/cm^2$の密度でコートしたディッシュに播種し無血清DF培地にて培養した。24時間後に因子を添加し2日後に^3H標識のドーパミンの取り込み能を測定した。
カゼインザイモグラフィー： PGnあるいはHGFをSDS-PAGEにて分離した後、2%カゼインと200単位のウロキナーゼを含むゲルと重ね合わせ37℃にてインキュベーションを行い、アミドブラックにて染色した。

「結果」
HGFの神経栄養活性 大脳皮質組織片の突起伸展に対してHGFは濃度依存的に突起伸展活性がみられその最大活性を示す濃度は約30nMであった（図1A）。 また中脳細胞に対する活性としてドー

パミン取り込み能を測定したところHGFは濃度依存的にドーパミン取り込みを促進しその最大効果を示す濃度は約1nMであった（図1B）。

HGFの構造とプロテアーゼ活性　PGnのザイモーゲン活性部位のうちHGFでは2カ所でアミノ酸の置換が起こっておりプロテアーゼ活性はないと推測されている。これを実際にカゼインとウロキナーゼを用いたザイモグラフィーにより検討を加えたところ図2のようにHGFにはプロテアーゼの活性は認められなかった。

「考察」

HGFとPGnとのアミノ酸配列の相同性は約41%でありエクソン、イントロンの関係もよく保存された蛋白である。PGnは神経栄養活性を持っているが、これとよく似たHGFも中枢ニューロンに対し神経栄養活性を持っていることが今回明らかとなった。PGnはプロテアーゼ活性を持っておりこのことが神経栄養活性に必須である可能性が考えられてきた。しかしながらカゼインザイモグラフィーの結果からも明らかなようにプロテアーゼ活性のないHGFがPGnと同様の神経栄養活性を持っていることを考えると、PGnの神経栄養活性にはプロテアーゼ活性は直接関与していないと推測された。現在PGn及びHGFの作用メカニズムについてレセプターレベルでの解析を続けている。

「文献」

1) Nagata,K., Takei,N., Nakajima,K., Saito,H. and Kohsaka,S. (1993) J. Neurosci. Res. 34, 357-363

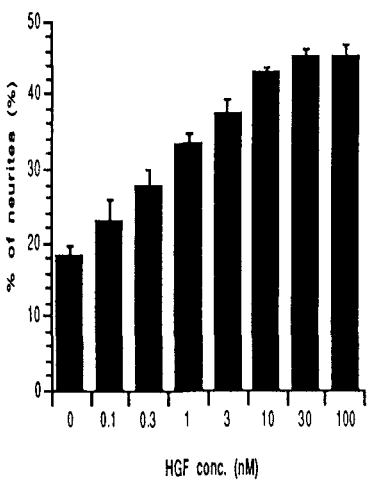
2) Nakajima,K., Tsuzaki,N., Nagata,K., Takemoto,N. and Kohsaka,S. FEBS Lett. (1992) 308, 2, 179-182

3) Nagata,K., Nakajima,K., Takemoto,N., Saito,H. and Kohsaka,S. Int. J. Dev. Neurosci. (1993) 11, 227-237

4) Nagata,K., Nakajima,K. and Kohsaka,S. Dev. Brain Research (1993) 75, 31-37

5) Nakamura,T., Nishizawa,T., Hagiya,M., Seki,T., Shimonishi,M., Sugimura,A., Tashiro,K. and Shimizu,S. (1989) Nature 342, 440-443

図1　A　突起伸展に対する活性　B ドーパミン取り込みに対する活性



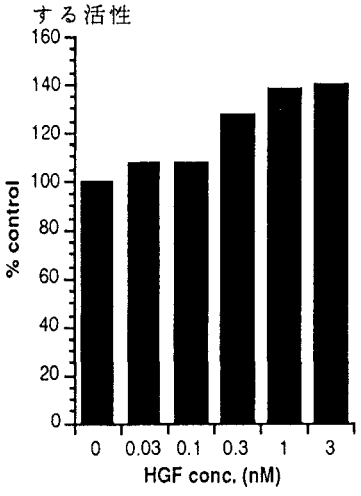
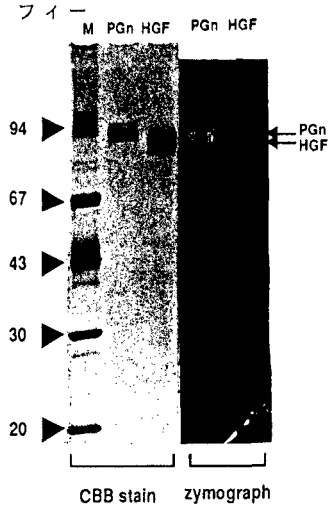


図2　カゼインザイモグラフィー



74 神経成長因子で誘導される転写因子 NDF1 のcDNA クローニング

樋口宗史、李炳生、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕 神経ペプチド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化を起こすcisエレメント(NGFRE)が存在する。このNGFREのAP1-like(-74/-63)とSp1-like site(-62/-51)には２つの２本鎖DNA結合蛋白質NDF 1,2が結合する(1)。このうちNDF1は脳及び肺に特異的に存在し、神経系由来のcell lineに豊富に発現する核蛋白質である(2)。NGF刺激はNDF1の結合活性を特異的に増加させるので、NDF1はNGFによる神経遺伝子の転写誘導における重要な転写因子と考えられた。今回、我々はラットPC12 cell λgt11cDNAライブラリーからNDF1のクローニングを試みた。southwestern法を用いて、二本鎖オリゴ(-80/-51)プローブに結合する26kDaの核蛋白質として単離、同定した。β-galactosidase-NDF1融合蛋白質はNGFREのAP1-like siteに特異的に結合した。

［目的］ NGFによる高親和性受容体(TrkA) のチロシンキナーゼ活性化は、３０分以内に蛋白合成に依存しないMAP kinase リン酸化カスケードを介して、転写制御因子をコードするimmediate early genesの発現誘導を引き起こす。このPC12細胞の神経分化の初期過程は最近詳細に明らかになりつつある (3-5)。しかし、それに続いて起きる、数時間以降の、蛋白合成を介する神経特異遺伝子群 late genesの転写誘導機構はまだ不明のままである。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。

交感神経に発現するNeuropeptide Y(NPY)遺伝子はNGF刺激のlate geneであり、蛋白合成を介して著しいNPY遺伝子転写活性化が生じる(6)。この転写活性化はNPY遺伝子のプロモーター上48bpのNGF-response element (NGFRE) によって引き起こされる。興味深いことに、NGFREはの上流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おり、やはり系統発生的に重要な転写因子が結合すると考えられた。私達はこれまでNGFREの二本鎖、一本鎖塩基配列に特異的に結合するDNA結合蛋白質の存在と神経系での発現を報告してきた(1,2)。 二本鎖DNA結合蛋白質のうち、AP1-like site (-74/-63)に結合するNDF1はNGFの刺激に伴いDNA結合活性が増加するので、NGFによるNPY遺伝子の転写誘導における重要な転写因子と考えられた。

そこで今回、NGFによる NPY遺伝子のNGFREを介する転写活性化機構を明らかにする目的で、ラット PC12 cell cDNA ライブラリーからNDF1のcDNAクローニングを行った。

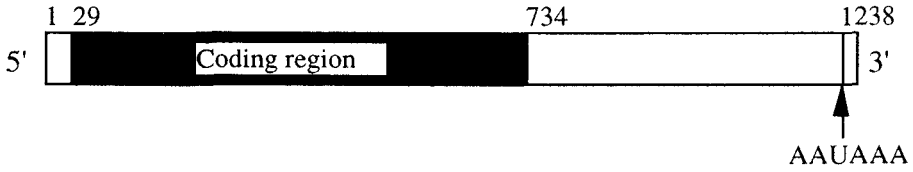
［方法］ 核抽出液の調整： PC12細胞及び、Iversenらの方法で分画した脳各部位から粗核分画を作成した後、Dignamらの方法(7)で核抽出液を得た。
ゲルシフトアッセイ： ラットNPY遺伝子のNGFREの上流30bpオリゴヌクレオチドNGFUdsを5'末端ラベルし, 2本鎖にアニーリングしてから、核蛋白質との結合を12mM Hepes-KOH(pH7.9), 60 mM KCl, 12% glycerol存在下に、行なった(1,2)。
UV クロスリンキング： ゲルシフト反応液中で254nm UVを０℃、1-1.5時間照射し、DNA-蛋白質複合体をSDS-PAGEにて解析した。
cDNAクローニング： ラットPC12cell 及び脳λgt11 cDNAライブラリーをsouthwestern法(8)でスクリーニングし、Sanger法により塩基配列を決定した。さらに、得られた陽性クローンからβ-galactosidase融合蛋白質を作成し、ゲルシフトアッセイで解析した。

［結果］ （１）PC12細胞及び脳には、NGFRE 上流30 bp領域NGFUdsのAP1-like site (-74/-63)に結合し、NGF処理で結合活性の増加する核蛋白質が特異的に存在する。UVクロスリンキングとsouthwestern解析によりこの蛋白質の分子量は26 kDaであることが解った。

（２）NGFUdsによるsouthwestern法によるスクリーニングにより、ラットPC12 cell cDNA library (2x 10^5 pfu) から１種類から成る5個の陽性クローンを、ラット脳cDNA library (9x 10^5 pfu)から、２種類からなる13個の陽性クリーンを得た。ラット脳からの２種類のクローンのうち１種類はPC12細胞由来のものと同一の蛋白質をコードしていた。
（３）PC12細胞と脳に共通なcDNAは26kDaの蛋白質(235アミノ酸残基、705 bp）のコード領域を有し、その中に２つの核移行シグナルを持った新しい蛋白質であった。
（４）この蛋白質が確かにNDF1であるかを確認するために、ラットPC12 cell cDNA libraryから得た陽性クローンからβ-galactosidase融合蛋白質を作成し、ゲルシフトアッセイを行った。図２に示すように融合蛋白質(βgalactosidase-NDF1(89-235))はNGFRE上流領域に特異的に結合し、その結合はAP1-like siteを含むNGFUdsとNGFDE1(-80/-63)で拮抗されることが解かった。

[考察]　以上のように、NGF刺激後蛋白合成を介して誘導される転写因子NDF1をクローニングした。現在、神経特異的なNDF1遺伝子の発現をNorthern blotで解析している。さらに今後、このcDNAを発現ベクターで発現させ、NDF1の機能を追及していきたい。

図１　塩基配列より推定されたNDF1 cDNAの構造





Competitor	-	+Sp1	+AP1	+Uds	+DE1	+mtDE1
結合活性	100%	120%	100%	0%	25%	90%

図２　融合蛋白質(βgalactosidase-NDF1(89-235))のNGFUdsによるゲルシフト
ラベルしたNDFUdsに対して100倍量のオリゴの拮抗をみた。mtDE1はmutant AP1 like-siteを持つ。

文献

(1) Higuchi,H. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 1553-1560.
(2) 樋口宗史、金哲熙、三木直正(1993)　神経化学、32巻、30-31頁
(3) Qui, M.-S. and Green, S.H. (1992) Neuron 9, 705-717.
(4) Verdi, M.-S. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3949-3953.
(5) Leevers, S.J. et al. (1994) Nature 369, 411-414.
(6) Sabol, S.L. and Higuchi, H. (1990) Mol. Endocrinol. 4, 384-392.
(7) Dignam, J.D. et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489.
(8) Singh, H.et al. (1988) Cell, 52, 415-423.

75　成長抑制因子(GIF)によるβ-amyloid toxicityの減弱

内田洋子[1]、増水章季[2]、井原康夫[3]
(都老人研神経病理[1]、日本電子ESR応用研究室[2]、東大脳研病理[3])

〔要約〕
成長抑制因子（GIF）の発芽し終えたニューロンへの作用を培養大脳ニューロンを用いて検討した。胎性１７日ラットの大脳ニューロンを培養し、培養７日目にGIF(0.25～1.0μM)を添加したところ、GIFはニューロンの細胞死を引き起こさず、その生存を維持した。また、GIF (0.5 μM)添加によってβ1–42 (2.5 μM)の細胞毒性が減弱された。ESR-スピントラッピング法によってフリーラジカル消去能を測定したところ、GIFに•OH消去能が認められたことから、GIFの発芽し終えたニューロンへの保護作用はフリーラジカルの消去を介していると考えた。

成長抑制因子（GIF）は神経栄養因子存在下で培養大脳ニューロンの生存と突起形成を抑制するメタロチオネイン様の蛋白として正常老人脳より単離同定された（１）。GIFは当初、正常老人脳に存在するが、アルツハイマー病(AD)脳では減少しているとされていたが、その後、ADのみならず種々の変性疾患の病変部でニューロン死と相関して減少していることがわかった（２）。しかし、GIFの減少がニューロン死の原因なのか、それとも結果なのかはわかっていなかった。そこで、今回は、GIFの減少がニューロン死の原因になりうるのかどうかを調べるために、GIFの作用を再検討した。

［方法］ニューロンの培養と細胞生存率の測定：胎生17日令のラットより大脳を取りだし、trypsin-DNase1でdissociateして細胞を得た。Gelatin-polyornithinecoatしたmicroplateに4.5×10^4個／wellの細胞をまき、10%牛胎児血清含むMEMで培養した。培養７日目に、無血清培地(MEMN2)に交換し、GIFやβ-amyloid (β1-40, β1-42)を添加してさらに３日間培養し、MTT法で細胞生存率を測定した。
O_2ラジカル(O_2^-)とOHラジカル(•OH)消去能の測定：O_2^-はヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で発生させ、DMPOにトラップして、DMPO-O_2^-をESR-スピントラッピング法で定量した。•OHは、DETAPACにキレートしたFe^{2+}とH_2O_2により発生させ、DMPOにトラップして、DMPO-OHをESR-スピントラッピング法で定量した。

［結果と考察］（１）GIFは発芽し終えたニューロンの生存を維持する
大脳ニューロンの播種時にGIFを加えると、AD脳抽出液の存在にも関わらず、培養ニューロンの生存や突起形成は阻害される。しかし、大脳ニューロンの培養７日目にGIFを加えると、GIFは、細胞死を引き起こすのではなく、細胞の生存を維持した（図１）。この培養にはアストロサイトなども混入しているため、MTT法で測定した細胞生存率がニューロンの生存率を反映しているかどうかを、ELISAによるMAP2およびGFAPレベルの定量によって確かめた。その結果、GIF添加によってMAP2レベルは増加したが、GFAPレベルは変わらなかったため、GIFはニューロンの生存を維持していると考えた。メタロチオネインには、ニューロンの生存を維持する作用はなく、むしろ生存を阻害した（図１）。以上の結果から、GIFは発芽しようとするニューロンの生存や

突起形成を抑制するが、発芽し終えたニューロンに対してはニューロンの生存を維持すると考えた。

（2）GIFはβ-amyloid proteinによるニューロン死を抑制する

大脳ニューロンの培養7日目に、aged β1-40 (0.625～5.0 μM)、aged β1-42 (0.625～5.0 μM)をそれぞれ添加し、3日後にMTT法で細胞生存率を測定したところ、どちらのペプチドにも細胞毒性が認められた（図2）。対照としてaged amylin (1.25～5.0 μM)を同様に添加したが、細胞毒性は認められなかった。次に、培養ニューロンにβ-peptide (2.5 μM)を添加する直前に、GIF 0.125～1.0 μMを添加したところ、β1-40の毒性は抑制されなかったが、0.5～1.0 μMのGIFによってβ1-42の細胞毒性が減弱された（図2）。

（3）GIFにはOHラジカル消去能がある

ESR-スピントラッピング法により、GIFにフリーラジカル消去能があるかどうかを調べた。GIF(2～6 μM)には、O_2^-消去能は無いものの、•OH消去能があることがわかった。メタロチオネイン(2～6 μM)には、O_2^-消去能も•OH消去能も無かった。以上の結果から、GIFの、発芽し終えたニューロンへの生存維持作用やβ-peptide毒性の緩和は、フリーラジカルの消去を介していると考えた。

［文献］(1) Uchida Y et al: Neuron, 7: 337-347 (1991)
(2)内田ら: 神経化学, 32: 40-41 (1994)
(3) Pike CJ et al: Brain Res, 563: 311-314 (1991)
(4)Manthorpe M et al: Dev Brain Res, 25: 191-198 (1986)

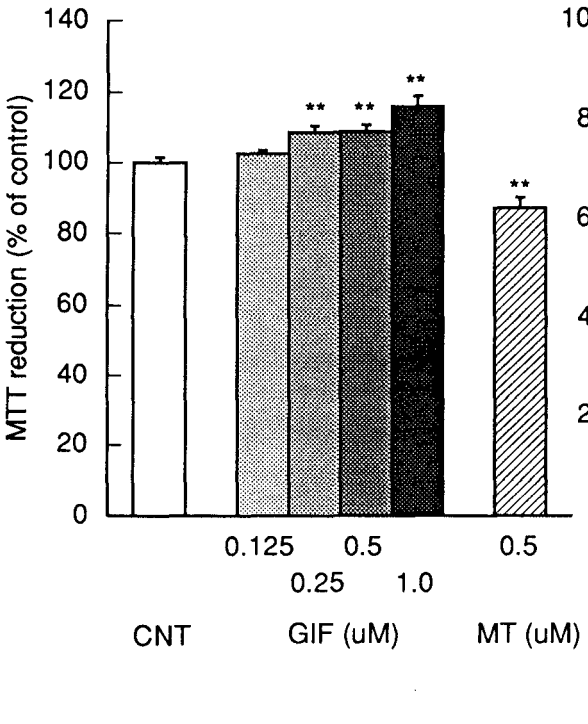


図1．発芽し終えたニューロンへのGIFの生存維持作用 (** P<0.01 vs CNT)

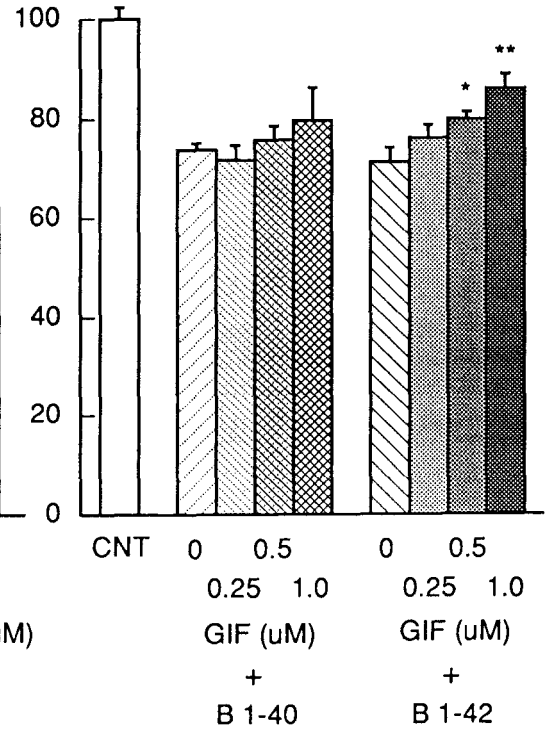


図2．β-amyloidの細胞毒性へのGIFの影響 (* P<0.05, ** P<0.01)

76 マウス胎児期におけるニューロトロフィン-3遺伝子の発現

東條英明、高見健治*、改正善彦、中田貢、阿部敏男**、志甫理***、五十嵐貢一
(武田薬品開拓第二研究所、*薬剤安全性研究所、**実験動物管理室、***ROR研究部)

〔要約〕

ジーンターゲッティング法により、染色体上のニューロトロフィン-3 (NT-3) 遺伝子を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*)で置換したマウスを作製した。NT-3(+/-)およびNT-3(-/-)マウスの胎児におけるβ-ガラクトシダーゼの発現は10日胚では中枢および下顎に観察された。13-15日胚ではその発現箇所は末梢感覚神経、運動神経および交感神経の終末組織に広く観察された。特に、三叉神経の終末組織に強い発現がみられた。また、三叉神経節、後根神経節および脊髄前角運動ニューロン自体にもNT-3の発現がみられ、これらの細胞でNT-3がautocrineに作用していることが示唆された。

(緒言) 我々は、神経栄養因子の生体内ににおける機能を明らかにするため、マウスES細胞を用いてNT-3欠損マウスを作製した。NT-3遺伝子を標的破壊する際、この遺伝子の発現パターンも同時に容易に観察できるように、*lacZ*をNT-3蛋白質をコードする遺伝子領域と置換した。この変異をヘテロに持つマウス (NT-3(+/-)マウス) は、野性型マウスと比較して外見上変化が無かった。これに対しホモ変異マウス (NT-3(-/-)マウス) は胎性中期より、末梢感覚神経節において細胞数減少および、NT-3の高親和性受容体である*trkC*の発現減少がみられた。さらに、生後まもなく重篤な運動失調を呈した。しかしながら、NT-3が高発現している領域の一つである脊髄では異常が見られなかった。今回、NT-3(+/-)およびNT-3(-/-)マウスの胎児を用いて、NT-3の*in vivo* での発現パターンをX-gal染色により観察した。

(方法) NT-3遺伝子はその蛋白質をコードする遺伝子領域の43番目のコドンから終止コドンまでを相同組み換えによりin frameに*lacZ*と置換した。Whole embryoは1%グルタルアルデヒド/PBSで固定後、1mM X-gal, 3mM フェリシアン化カリウム, 3mM フェロシアン化カリウム, 1mM 塩化マグネシウム, 0.1% Triton X-100/PBSで染色した。組織切片は、粉末ドライアイス上で胎児を凍結後、クリオスタットで薄切して作製し、上記の方法で固定、染色した。

(結果と考察) NT-3の発現は10日胚(E10)では、中脳、体節および下顎に観察された。E13-17になると中枢での発現は相対的に減少し、末梢感覚神経、運動神経および交感神経の終末組織即ち、Whisker-pad、虹彩、耳、外性器、骨格筋、内臓壁等に広く認められた。尚、lacZの発現パターンはHomozygoteとHeterozygoteで差はなかった。これらの結果は、組織培養ニューロンに対するNT-3の活性を示した報告(1-6) を支持する。また、従来報告されている、脊髄前角運動ニューロン、後根神経節ニューロンのみならず(7, 8)、三叉神経節のニューロンにも発現が見られ、NT-3のautocrine様の作用が広く存在する可能性が示唆された。

（参考文献）

1. Kaisho et al., (1990) *FEBS Lett.* 266, 187-191.
2. Ernfors et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 5454-5458.
3. Rosenthal et al., (1990) *Neuron*, 4, 767-773.
4. Horn et al., (1990) *Nature*, 344, 399-341.
5. Maisonpierre et al., (1990) *Science*, 247, 1446-1451.
6. Jones & Reichardt, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 8060-8064.
7. Schecterson & Bothwell, (1992) *Neuron*, 9, 449-463.
8. Sendtner et al., (1992) *Nature*, 360, 757-759.

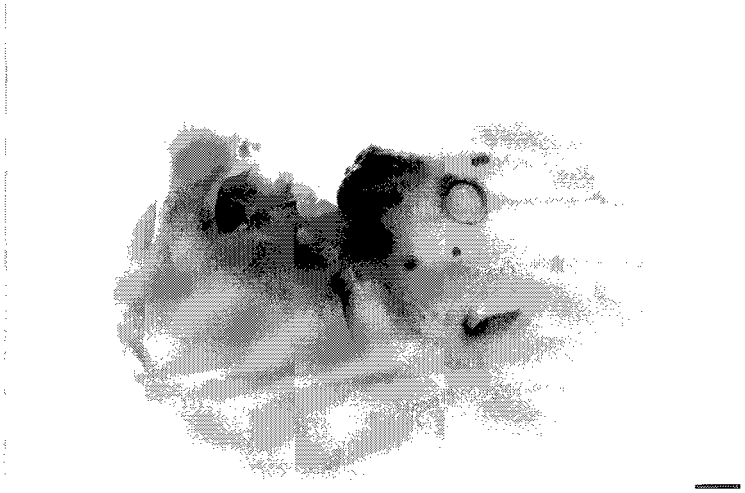


Figure1. NT-3(-/-) マウス (E14) におけるlacZの発現 (Scale bar, 1 mm)



Figure 2. NT-3(-/-)マウス(E17)の三叉神経節におけるlacZの発現 (Scale bar, 100 μm)

77　プロサポシンの海馬錐体細胞保護作用

佐野輝[1]、松田正司[2]、温同春[2]、小谷泰教[1]、近藤啓次[1]、
上野修一[1]、柿本泰男[1]、吉村裕之[3]、阪中雅広[2]
（愛媛大・医・神経精神[1]、第2解剖[2]、実験実習機器センター[3]）

〔要約〕 4種のサポシン（スフィンゴ脂質活性化蛋白質）の前駆体蛋白質であるプロサポシンは中枢神経系では特定の神経細胞および神経線維に豊富に含まれており、独自の機能を担っていることが推察されてきた。今回我々はスナネズミを用いて虚血海馬CA1領域の錐体細胞の遅発性細胞死モデルを作成し、プロサポシン脳室内注入が神経保護作用を有するか否かを検討した。その結果、プロサポシンに著明な海馬錐体細胞保護作用があることが判明した。すなわち、前脳虚血3時間前から7日間プロサポシンを脳室内に持続投与すると用量依存性に生存細胞数の増加ならびに学習行動改善が認められた。

[緒言] サポシンはスフィンゴ脂質の水解酵素群を活性化する小蛋白質群であり、4種のサポシンA、B、C、Dは前駆体蛋白質プロサポシンの各ドメインに含まれる[1)]、プロサポシンの量およびプロセッシングのレベルは組織によりかなり異なることが実証されてきた[2)]。すなわち異化作用の強い臓器である肝臓、脾臓ではプロセスされたサポシンが豊富に存在し、興奮性組織の脳神経系や筋肉組織では前駆体型であるプロサポシンが主要な型として認められる。さらにプロサポシンはサポシンの前駆体として存在するのみならず、プロセスされないそのままの形で細胞外液特に脳脊髄液に豊富に存在し、末梢組織においても血小板から刺激に応じて機能性に放出される[3)]。プロサポシンは精巣で精子形成過程の特定の時期にセルトリ細胞から精細管に分泌されることが知られており、精子細胞の分化過程を制御する可能性が示唆されている[4)]。またプロサポシンは脳の成長発達の段階ではシナプス形成期に豊富に出現する[2)]。これらの事実からプロサポシンは神経細胞の分化生存と密接に関係していることが考えられ、プロサポシンが神経組織を維持栄養する可能性が示唆されてきた。

[実験方法] ハロセン麻酔下に12週齢の雄スナネズミの背部皮下にミニ浸透圧ポンプを移植し、ポンプの針チューブを左側脳室内に植え込んだ。虚血負荷3時間前からプロサポシン（100、240 ng/day）、生理的食塩水又は0.5%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理的食塩水（PBS/BSA）を7日間持続注入した。前脳虚血モデルは直腸温および脳温を37±0.2度に維持しながら両側総頸動脈を3分間遮断することにより作成した。偽手術群でも同様に生理的食塩水を脳室内に注入した。虚血7日後にステップダウン型受動的回避学習装置を用いて訓練施行を実施し、翌日反応潜時を測定して学習能力の指標とした。その後スナネズミ脳を灌流固定しパラフィン包埋した。さらに5 ㎛の切片をクレシルバイオレットで染色し、海馬CA1領域の生存錐体細胞数をイメージアナライザーでカウントした。各群（n = 6-8）の学習実験および神経細胞数計測結果をMann-Whitney U-testを用いて有意差検定に供した。

[結果と考察] Prosaposin 240 ng/dayを脳室内注入すると受動的回避学習実験の潜時が生理的食塩水又はPBS/BSA注入群に比して有意に延長し、学習能力は偽手術群に匹敵する程に改善した（図1）。海馬CA1領域の組織的検索でも、プロサポシン投与により生存神経細胞数が増加することが判明した（図2）。これを数値化すると、偽手術群では247±3 cells/mm、生理的食塩水もしくはPBS＋BSAを注入した虚血群では各々137±12, 147±13 cells/mm、プロサポシン240 ng/dayを注入した虚血群では202±11 cells/mmとなっていた（図3）。Medial septal nucleusにはプロサポシンを含む神経細胞が豊富に存在し、その支配領域である海馬錐体細胞周辺にはプロサポシン含有神経線維が多数認められる[5)]。スナネズミ海馬CA1錐体細胞は一過性前脳虚血後遅発性細胞死を引き起こすことが知られている。今回の研究で虚血後の学習行動障害ならびに遅発性神経細胞死に対してプロサポシンが保護効果を発揮するこ

とが確認された。その作用機構については推測の域をでないが、プロサポシン自身には活性化蛋白質活性や保護蛋白質安定化作用がないことにより[6) 7)] GM1 をはじめとするガングリオシドとの相互作用[8)] を介して虚血神経細胞の機能維持・回復を促進する可能性が示唆される。

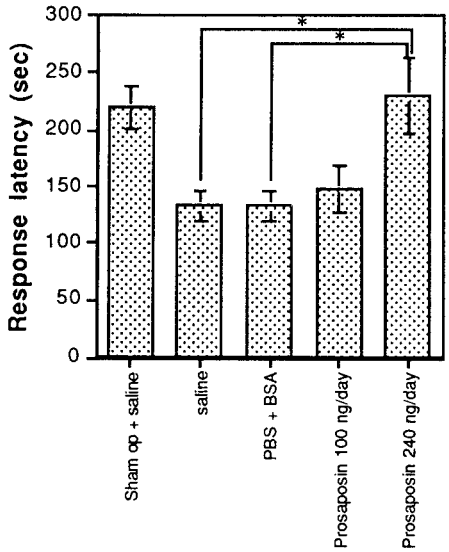


図1　3分虚血による砂ネズミ学習障害に対するプロサポシンの効果　*: p<0.05

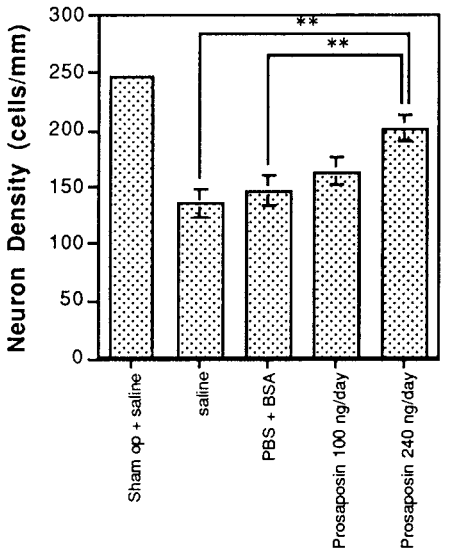


図3　海馬CA1領域の生存錐体細胞数に対するプロサポシンの影響　**: p<0.01

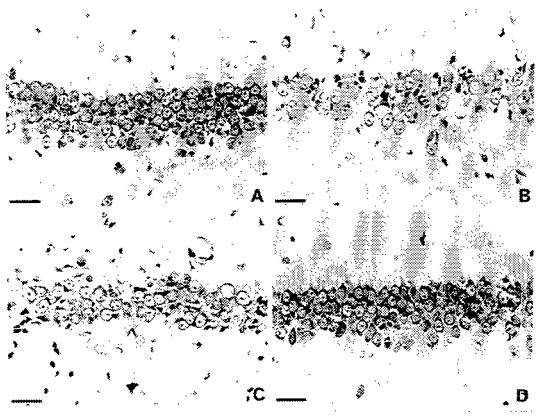


図2　3分虚血（±）砂ネズミ海馬CA1領域。A：sham-operation + saline注入、B：虚血負荷 + saline 注入、C：虚血負荷 + prosaposin (100 ng/day) 注入、D：虚血負荷 + prosaposin (240 ng/day) 注入。Bar = 100 μm。

[文献] 1）O'Brien J. S. & Kishimoto Y.: FASEB J. 5: 301-308, 1991
2）Sano A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 165: 1191-1197, 1989
3）Hineno T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 176: 668-674, 1991
4）Collard M. W. et al.: Biochemistry 27: 4557-4564, 1988
5）Kondoh K. et al.: J. Comp. Neurol. 334, 590-602, 1993
6）Kondoh K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 181, 286-292, 1991
7）Itoh K. et al.: J. Biol. Chem. 268, 1180-1186, 1993
8）Hiraiwa M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 11254-11258, 1992

78　プロサポシンの坐骨神経再生促進作用

小谷泰教[1]、佐野輝[1]、松田正司[2]、近藤啓次[1]、
上野修一[1]、柿本泰男[1]、阪中雅広[2]
（愛媛大・医・神経精神[1]、第2解剖[2]）

〔要約〕プロサポシンは神経系に豊富に存在するが、その生理的機能は未だ不明である。今回我々はモルモット坐骨神経切除後の再生に対するプロサポシンの効果を検討したところ、プロサポシンが強力な末梢神経再生促進作用を持つことを見い出した。すなわち、プロサポシンは濃度依存性に再生神経の線維数、断面積を増大させた。至適有効濃度（20 ng/ml）はこれまで報告された成長因子群より低濃度であった。

[緒言] 四種のスフィンゴ脂質活性化蛋白質であるサポシンA、B、C、Dは、同一の前駆体であるプロサポシンから生じる[1)]。プロサポシンはサポシンの前駆体としてのみならず、神経系等の組織でプロセスされることなく機能していることが考えられている[2)]。またプロサポシンは精巣で精子形成過程の特定の時期にセルトリ細胞から精細管に分泌されることが知られ、精子細胞の分化を制御している可能性が示唆されている[3)]。プロサポシンは脳や筋肉組織に豊富に存在しプロセスされないそのままの形で細胞外へ分泌されること[4)]や、成長の過程で脳のシナプス形成期に豊富に出現すること[2)]等より神経細胞の分化とも関係していることが考えられ、神経栄養因子としての役割を担う可能性が示唆されてきた。In situ hybridizationの実験結果から、プロサポシンは後根神経節を中心とした末梢神経にも豊富に発現していることが知られている[5)]故、今回我々はin vivoでの末梢神経再生に対するプロサポシンの効果について検討した。

[実験方法] 200～250gの雄モルモットを抱水クロラール麻酔後、両側坐骨神経を2mm切除し、断端間が6mmとなるようにシリコンチューブで架橋した。片側にプロサポシンを最終濃度が2、10、20、40、200ng/mlとなるようPBSに溶解してコラーゲン溶液と混和してゲル化し、対照側には同量のPBSをコラーゲンと共にゲル化した。神経切除3週間後、動物を灌流固定し、両側のシリコンチューブに覆われた再生神経を取り出し中央部を切断した。切除した神経および再生神経をエポン樹脂に包埋して落切し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡下で切除神経の線維数および再生神経線維数を数え、イメージアナライザーによって切除神経の断面積および再生神経中央部の断面積を計測し、各々の割合を求めた。各群5～7匹の結果の統計解析にはPaired t-testを用いた。

[結果と考察] プロサポシン20ng/ml注入側と対照例の再生神経の横断面を図1に示した。プロサポシン注入群では線維数、断面積ともに対照に比較して増大していたが、強拡大写真（図1C、D）では線維密度には有意な変化は認められなかった。切除神経の線維数および断面積に対する再生神経の線維数および断面積の割合をプロサポシン注入群と対照群で比較し、数値化したものが図2および図3である。プロサポシン濃度が20ng/ml時に神経線維数および断面積が対照に比較し最も強く増加した。また、プロサポシンの濃度が200ng/mlの時には逆に神経線維数および断面積の再生を抑制する傾向に働くという結果が得られた。以上の事実からプロサポシンは20ng/mlの至適濃度において坐骨神経の再生を促進する結果が得られた。この濃度はすでに末梢神経再生促進作用が報告されているNGFよりも10^2～10^5倍低く[6)7)]、コラーゲンゲル法で報告されているaFGFよりも20倍低い濃度である[8)]。今回の結果はプロサポシンが末梢神経再生を促進することを示しており、プロサポシンが神経栄養因子として機能する可能性を示唆するものである。ちなみにプロサポシン自身には活性化蛋白質活性や保護蛋白質安定化作用はないが[9)10)]神経再生促進作用が確認されているGM1をはじめとしたガングリオシドに対して結合能を有することが最近明らかにされている[11)]故、このことがプロサポシンの作用機構の解明に何らかの鍵

を与えるものと期待される。

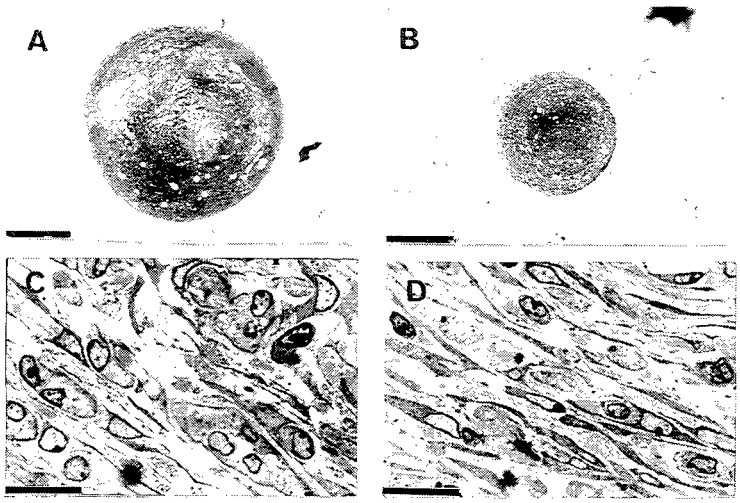


図1　プロサポシンの坐骨神経再生促進作用。A：プロサポシン 20 ng/ml（20倍）、B：対照（20倍）、C：プロサポシン 20 ng/ml（600倍）、D：対照（600倍）。Bar = 500 μm（A、B）、20 μm（C、D）。

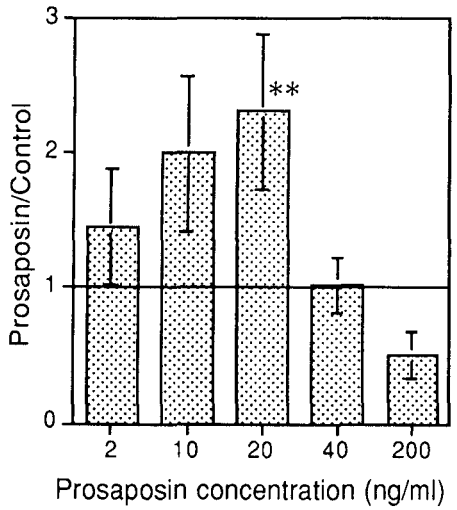


図2 再生坐骨神経線維数に対するプロサポシンの影響（Mean ± SE, n = 5-7）** : p < 0.01

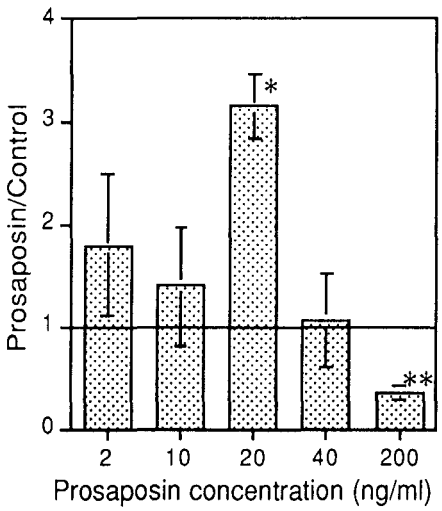


図3 再生坐骨神経断面積に対するプロサポシンの影響（Mean ± SE, n = 5-7）* : p < 0.05

[文献] 1）O'Brien J. S. & Kishimoto Y.: FASEB J. 5: 301-308, 1991
2）Sano A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 165: 1191-1197, 1989
3）Collard M. W. et al.: Biochemistry 27: 4557-4564, 1988
4）Hineno T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 176: 668-674, 1991
5）Sprecher-Levy H. et al.: Cell. Mol. Biol. 39: 287-299, 1993
6）Chen Y.S. et al.: Exp. Neurol. 103: 52-60, 1989
7）Rich K. M. et al.: Exp. Neurol. 105: 162-170, 1989
8）Cordiero P. G. et al.: Plast. Reconstruct. Surg. 83, 1013-1019, 1989
9）Kondoh K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 181, 286-292, 1991
10）Itoh K. et al.: J. Biol. Chem. 268, 1180-1186, 1993
11）Hiraiwa M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 11254-11258, 1992

79　生後ラット脳から培養した種々のコリン作動性ニューロンとその生存維持

阿比留 康弘、野々村 健、西尾 チカ、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)、脳由来神経栄養因子 (BDNF) だけでなく、培地を高カリウムに変えることによる脱分極刺激や cAMP 誘導体の添加によっても、その生存が維持される。そこで、中枢神経系のその他のコリン作動性ニューロンへの生存維持作用を前脳基底野の場合と比較した。その結果、線条体のコリン作動性ニューロンでは、NGF と cAMP 誘導体は前脳基底野の場合と同様に生存維持作用を示したが、BDNF と高カリウム刺激は効果を示さなかった。以上の結果は、同じコリン作動性であっても、ニューロンの生存維持機構に大きな違いがあることを示唆している。現在、中枢神経系の他の領域についても検討中である。

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。既に、我々はシナプス形成終了期にあたる生後 2 週齢ラット培養系において前脳基底野コリン作動性ニューロンが神経成長因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) 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)。さらにこのニューロンは、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や、cAMP 誘導体の添加によっても生存維持される (4)。そこで今回、中枢神経系の様々な領域のコリン作動性ニューロンの生存維持機構を比較する目的で、まず線条体のニューロンに対する NGF、BDNF、高カリウム刺激、cAMP 誘導体の効果を調べたので報告する。

〔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 (1)(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。細断した組織を papain 消化の後、得られた生細胞を $3\sim5\times10^5$ cells / cm^2 の割合で、polyethyleneimine でコートした 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、培地を無血清 TIP/DF 培地に交換し種々の添加物を加え 3〜6 日間培養した。NGF は雄マウス顎下腺から調製し、BDNF および毛様体神経栄養因子 (CNTF) は Regeneron 社より戴いたヒト組換え型を使用した。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) 活性の測定を行う (1) と共に、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 (4)。

〔結果と考察〕

図 1 は、生後 2 週齢ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンへの NGF、BDNF、高カリウム刺激、cAMP 誘導体の効果を調べたものである。また、図 2 は、これら因子の効果を線条体コリン作動性ニューロンを用いて調べたものである。前脳基底野においては既に報告した結果と同じく、これら因子は全て、ChAT 活性を有意に上昇させていた (1)(2)(4)。この活性の上昇が生存 ChAT 陽性ニューロン数の違いによることは既に報告した通りである。一方、線条体の場合は、NGF と cAMP 誘導体の添加によって、ChAT 活性は有意な上昇を示しているが、BDNF および高カリウム刺激は効果がなかった。線条体における NGF による ChAT 活性の上昇が生存 ChAT 陽性ニューロン数の違いによることを、表 1 で示した。

興味深いことに、線条体におけるコリン作動性ニューロンの生存維持が高カリウム刺激によって影響されなかったにもかかわらず、蛋白質合成阻害剤 cycloheximide はこのニューロン死を抑制する傾向を示した。

以上の結果は、非投射型のニューロンである線条体のコリン作動性ニューロンは、投射型の前脳基底野コリン作動性ニューロンとは異なり、BDNF や高カリウム刺激には応答しなかったことを示している。この違いがニューロンの非投射型と投射型の違いなのか、また投射するしないによってそのニューロンのシナプス形成の時期やニューロンの成熟の時期が異なることが、応答性の違いとなっている可能性もある。現在、さらに種々の領域、例えば脳幹部や脊髄のコリン作動性ニューロンを用いて検討中である。

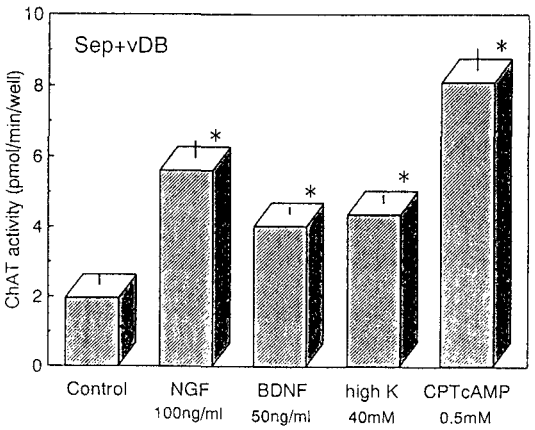


図１：生後２週齢ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンに対して生存維持に働く因子。 ＊印はp< 0．０１で有意であることを示す。

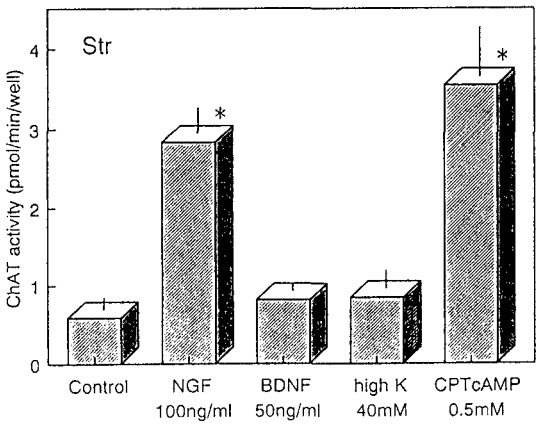


図２：生後２週齢ラット線条体コリン作動性ニューロンに対して生存維持に働く因子。 ＊印はp< 0．０１で有意であることを示す。

Factor(dose)	ChAT+ cells(cells/well)	% control
Control	19 ± 8	(100)
NGF(100ng/ml)	57 ± 4	300

表１：生後２週齢ラット線条体のChAT陽性細胞数に対するNGFの効果。

〔文献〕

(1) 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.

(2) Nonomura,T. and Hatanaka,H. (1992) Neurotrophic effect of brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal rats. *Neurosci. Res.*, **14**, 226-233.

(3) 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.

(4) Nakamura,M., Nishio,C., Nonomura,T. and Hatanaka,H. (1994) High potassium and cyclic AMP analog promote neuronal survival of basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal two-week-old rats. *Dev. Brain Res.*, in press.

80 アストロサイトによる赤血球分化増殖因子エリスロポエチンの生合成

〔著者〕
〔所属〕
増田　誠司、永尾　雅哉、佐々木　隆造
京都大学農学部食品工学科

〔要約〕
神経細胞にはエリスロポエチン(EPO)レセプターが発現していることを報告した(4)。今回我々はラット胎仔大脳初代培養の上清中にEPO(脳EPO)が分泌されることを発見し、中枢神経系におけるEPOの生合成を示した(5)。脳EPO生合成は、酸素分圧により遺伝子発現レベルで調節されていた。脳EPOの*in vitro*における生物活性は血清EPOより強かった。EPO生合成細胞を同定するため、大脳初代培養系よりEPO産生細胞を不死化したところ、アストロサイトがEPOを生合成していた。以上より、EPOは神経系ではアストロサイトが産生することが明らかとなり、神経細胞に対してパラクライン様式で作用していると考えられた。

［序］　赤血球分化増殖因子エリスロポエチン(EPO)は、赤血球の産生量を制御する糖タンパク質ホルモンである(3)。EPOは成体では腎臓、胎仔では肝臓で産生され、血流を介して骨髄や脾臓中の赤血球前駆細胞に作用する(1,7)。これまでEPOの作用は、赤血球系細胞に限定されると考えられてきたが、我々は神経細胞としての性格を持つPC12細胞や、コリン作動性神経細胞株SN6に機能的なEPOレセプター(EPO-R)が発現していることを発見した(4)。さらにEPOが成体マウスのコリン作動性神経の生存にも作用することが示され(2)、EPOは神経栄養因子作用を持つと考えられた。ここで問題となるのは、脳は出生前後に血液脳関門により血流から隔絶されるため(6)、血流中のEPOは中枢神経系に作用することは出来ないことである。したがってEPOが中枢神経細胞に対して生理機能を持つならば、EPO自身が脳内で生合成される必要がある。そこで脳におけるEPOの生合成について大脳初代培養系を用いて検討した。

［方法］　EPOの生合成制御－胎齢19日のラット大脳を、DMEM/10%FCSにて5%、21% O_2で初代培養した。培地の交換は3日ごとに行い、上清のEPO活性をEIAにより測定した。EPO mRNAの発現量をRT-PCRにより比較した。EPOの生物活性および分子量－大脳初代培養系より分泌されてくるEPOを、抗ヒトEPO MoAb R2により精製した。EPOの生物活性は、EPO依存性細胞株Ep-FDC-P2によるMTT法、およびマウス胎仔肝臓細胞を用いたコロニー形成法により評価した。分子量は、抗EPO PoAb を用いたWestern blotting により決定した。EPO生合成細胞の同定－*SV*40 large T抗原遺伝子を大脳初代培養細胞に導入し、EPO生合成細胞株を得た。これらの細胞株について、抗GFAP抗体で染色した。

［結果］　EPOの生合成制御－5% O_2で培養した大脳初代培養系では、培養12日目ごろより脳EPOが検出され始め、産生量が徐々に増加した。一方大気圧21% O_2では、脳EPOはほとんど産生されなかった（図1）。また酸素分圧が下がるとEPO産生量は増加し、酸素分圧依存性を示した。このときEPO mRNA量は、低酸素分圧下で顕著に誘導されており、低酸素状態でのEPO産生の増加は、遺伝子発現レベルで調節されていることが明らかとなった（図2）。EPOの生物活性および分子量－脳EPOの生物活性は血清EPOよりも強かった。またEPO-Rの細胞外領域(sEPO-R)によりこの作用は完全に阻害され、EPOの特異的作用であることが判った（図3）。次に脳EPOの分子量を調べたところ33kDaであるのに対し、血清EPOは35kDaであった。両者をsialidase処理すると共に31kDaになり、分子量の差はシアル酸含量の違いによることが判った。脳EPOの活性が高かったのはシアル酸含量が少ないためと推測された。EPO生合成細胞の同定－*SV*40 large T抗原を導入し不死化した細胞を、抗GFAP抗体で染色したところ、いずれも陽性であった（図4）。これよりEPO産生細胞はアストロサイトであることが明らかになった。

［考察］　EPOはこれまで赤血球産生にのみ作用すると考えられてきたが、我々はEPO-Rが神経細胞に発現していることを見いだし、アストロサイトがEPOを生合成することを明らかにした。これはEPOが中枢神経細胞に対して何らかの生理機能を担っていることを強く示唆する。今後EPOの中枢神経系での生理機能を明らかにする必要がある。

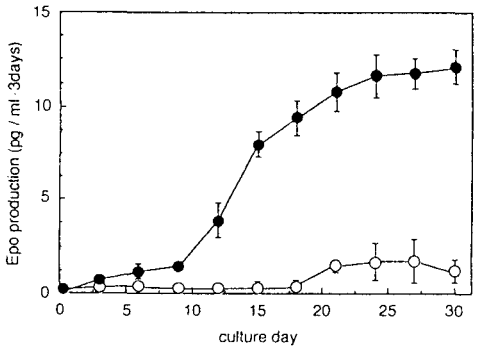


図1　ラット大脳初代培養によるEPO生合成の酸素分圧依存性
（●：5%02, ○：21%02で培養）

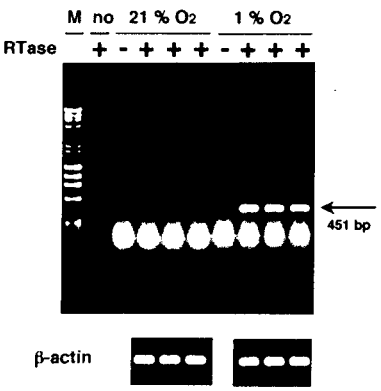


図2　ラット大脳初代培養における脳EPO mRNA の酸素分圧依存性
（←：EPO specific product）

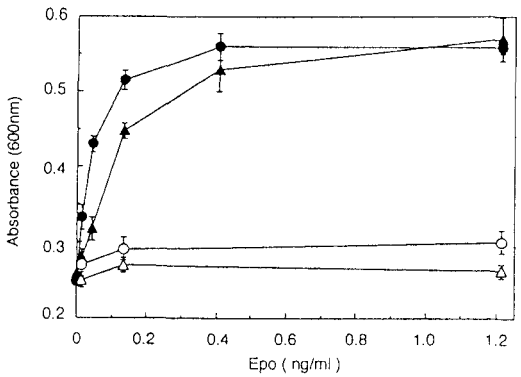


図3　Ep-FDC-P2を用いたin vitro EPO生物活性
（●：脳EPO, ○：脳EPO+EPO-Rの細胞外領域,
▲：血清EPO, △：血清EPO+EPO-Rの細胞外領域）

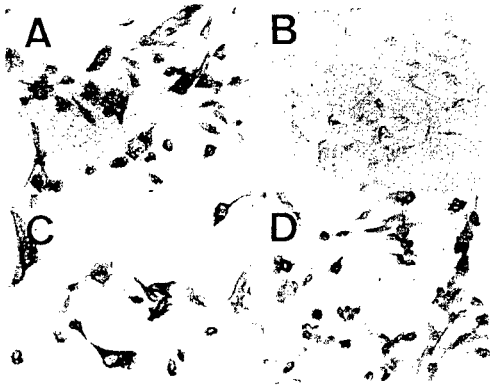


図4　EPO産生細胞株の抗GFAP染色
（A, C, D：抗GFAP抗体, B：コントロール抗体,
A, B: clone Z1, C: clone D2, D: clone D3）

1. Jacobson, L. O., Goldwasser, E., Fried, W., and Plzak, L. (1957) *Nature* **179**, 633-634
2. Konishi, Y., Chui, D.-H., Hirose, H., Kunishita, T., and Tabira, T. (1993) *Brain Res.* **609**, 29-35
3. Krantz, S., B. (1991) *Blood* **77**, 419-434
4. Masuda, S., Nagao, M., Takahata, K., Konishi, Y., Gallyas, F., Jr., Tabira, T., and Sasaki, R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1128-11216.
5. Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Uada, M., and Sasaki, R. (1994) *J. Biol. Chem.* in press
6. Mollgrad, K., and Saunders, H., R. (1986) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **12**, 337-358
7. Zanjani, E., D., Poster, J., Burrington, H., Mann, L., I., and Wasserman, L., R., (1977) *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 640-644

81　ラット組織におけるニューロトロフィン-3の濃度

仙波りつ子、新谷麻江[1]、加藤兼房
（愛知県コロニー・研究所、[1]武田薬品（株）・開拓第二研究所）

〔要約〕

私達は、組み換えヒトニューロトロフィン-3(rhNT-3)に対するモノクローン抗体(MAb3W3)およびNT-3のC-末端10個のペプチド抗体を調整し、酵素免疫測定系を確立した。この測定系では、3pg以上のNT-3の測定が可能であり、神経成長因子(NGF)および脳由来神経栄養因子とはまったく交差しなかった。生後一カ月齢のラット雄の脳のNT-3含量は、海馬がもっとも高く（6.3 ng/g湿重量）、小脳、嗅脳および中隔野にも検出された。しかしながら、他の部位では検出できなかった。一方、末梢組織では、脳に比べ比較的高い値が得られた。膵臓では、892 ng/g湿重量と海馬の約150倍のNT-3が検出された。その他、脾臓では膵臓の約1/7、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、横隔膜および副腎では約1/20-1/30であった。ペプチド抗体で海馬および膵臓を免疫染色すると、前者ではCA3の錐体細胞が染色され、後者では外分泌細胞が染色された。また、膵臓におけるNT-3は分子量約12 kDaと、rhNT-3よりやや低分子であった。

ニューロトロフィン-3(NT-3)は、神経成長因子(NGF)ファミリーに属する神経栄養因子であり、末梢神経系では、迷走神経細胞の生存を維持することが報告されている(1)。脳ではノルアドレナリン系の神経細胞の生存を維持するという報告がでてきている(2)。NT-3mRNAは、脳および末梢組織に比較的広く存在することが知られているが、そのプロテイン濃度に関する報告はまだない。今回、NT-3のペプチド抗体およびモノクローン抗体を用いて酵素免疫測定系を確立し、ラットの各組織のNT-3濃度を測定したので報告する。

［実験方法］酵素免疫測定系の確立：モノクローン抗体3W3(MAb3W3)は、CHO-N1/N2細胞の培養液から精製した組み換えヒトNT-3(rhNT-3)を抗原として常法に従って調整した(3)。MAb3W3は、protein G Sepharose 4 fastカラムで精製した。一方、ペプチド抗体は、NT-3 のカルボキシ末端の10個のペプチド(CALSRKIGRT)を合成し,ヘモシアニンに結合した後ウサギに免疫し,その抗血清から調整した。NT-3特異抗体はrhNT-3をカップリングさせたSepharose 4Bカラムで精製した。精製ペプチド抗体を常法に従ってガラクトシダーゼで標識した(4)。NT-3のプロテインの含量は、MAb3W3と標識したペプチド抗体を用いたサンドイッチ型酵素免疫測定法により測定した。NT-3の測定：組織を10 vol.のbuffer GHでホモゲナイズし、28,000g、20分遠心した上清をNT-3の測定に供した。免疫組織化学：脳および膵臓はSchmechel溶液で固定し、パラフィンで包埋後厚さ10μmの切片として使用した。切片をペプチド抗体と反応させABC法で検出した。Western blotting：膵臓をサンプルバッファーでホモゲナイズし、13.5%のゲルで分離した。ニトロセルロース膜に転写後、ペプチド抗体を用いて化学発光法により検出した。

［結果および考察］すでに報告したように、MAb3W3はNT-3の生理活性を消失させた(3)。また、精製したペプチド抗体はNT-3のみに反応し、BDNFおよびNGFとはまったく交差しなかった。図に確立したNT-3の酵素免疫測定系の標準曲線を示す。3pg以上のNT-3を検出できたが、

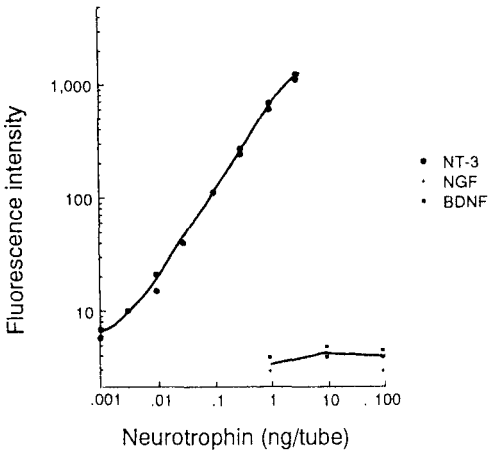


Fig. β-D-Galactosidase activity as a function of the concentration of NT-3, NGF and BDNF. Fluorescence intensity, 1,000=1 μM 4-methyl-umbelliferone.

Levels of NT-3 in various regions of the brain from SD rats at one month of age.

Region	NT-3 (ng/g wet weight)
Olfactory bulb	0.54 ± 0.09
Hippocampus	6.30 ± 1.06
Septum	0.91 ± 0.14
Striatum	ND
Cerebral cortex	ND
Cerebellum	0.71 ± 0.16
Hypothalamus	ND

averages ± S.D. of the results from 5-6 animals.
ND, not detectable

NGFおよびBDNFとは100 ngでもまったく交差しなかった。NGFの酵素免疫測定系(>0.3pg)に比べ10倍ほど感度が低かったが、モノクローン抗体およびペプチド抗体を使用していることから、まずまずの感度と思われる。表に生後1カ月のラットの脳内NT-3の分布を示す。脳では、海馬の含量が最も高く、6.3 ng/g湿重量であり、NGF含量の約5倍であった。NT-3mRNAの検出される小脳および嗅球、また、中隔野でのNT-3含量は0.5-1.0 ng/gであったが、その他の部位では検出できなかった。NGFに比べNT-3の検出される部位は限られていることが明らかとなった。これは、mRNAの結果(5)ともよく一致している。一方、末梢組織のNT-3含量は、脳に比べいずれも比較的高い値を示した。もっともNT-3含量の高い組織は膵臓であり、892 ng/g湿重量であった。脾臓では、133 ng/gであり、心臓、腎臓、肝臓、副腎では40 ng/g前後、胸腺、横隔膜では20-30 ng/gであった。膵臓のNGF含量も比較的高いがNT-3は約200倍ほど存在した。また、前立腺のNGF含量は精巣にくらべ8倍高かったが(4)、NT-3は前立腺の方がやや低かった。雄マウス顎下腺のNGF含量はきわめて高いが(5 mg/g)、予備実験で、NT-3含量はきわめて低いことを観察している。ペプチド抗体で脳の免疫染色をすると、海馬のCA3の錐体細胞が染色された。一方、膵臓は外分泌細胞が染色されるようである。これもNGFの場合と同様であった。NT-3のペプチド抗体が認識する膵臓の抗原は分子量約12 kDaであり、rhNT-3よりやや低分子であった。以上の結果、脳に比べ、NT-3含量は迷走神経の標的組織をはじめ末梢組織に高いことがわかった。とくに、膵臓の含量は高く、その機能は興味あるところである。

［謝辞］本研究の一部は文部省科学研究費、重点領域研究「老年痴呆の分子機構」の援助を受けた。免疫組織化学に協力いただいた当研究所、長浜真人博士に感謝します。

［文献］(1) Hohn A., Leibrock J., Bailey K. and Brade Y.-A. (1990) Nature, 334, 339-341. (2) Arenas E. and Persson H. (1994) Nature, 367, 368-371. (3) Shintani A., Watanabe T., Kuroshima K., Ichimori Y., Kurokawa T., Igarashi K. and Sasada R. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 1500-1507. (4) Katoh-Semba R., Semba R., Kashiwamata S. and Kato K. (1989) J. Neurochem., 52, 1559-1565. (5) Katoh-Semba R., Semba R., Kato H., Ueno M., Arakawa Y. and Kato K. (1994) J. Neurochem. , 62, 2141-2147.

82 マウス脳内NT-3量の加齢による変化

改正善彦、新谷麻江、西田真由美、福元宏明＊、五十嵐貢一
（武田薬品工業(株) 開拓第２研究所、＊創薬第１研究所）

〔要約〕

我々は、ニューロトロフィン-３(NT-3)に対する抗体(3W3抗体)をβ-ガラクトシダーゼで標識したものを用いて、サンドイッチによるエンザイムイムノアッセイ(EIA)法を確立した。さらに、我々はこのEIA法によりマウス脳内のNT-3含量を測定したので報告する。8週齢マウス脳各部位におけるNT-3含量は海馬と小脳で高く、皮質、線条体、中脳、間脳、脳幹では低い値を示した。また、このことはRT-PCR法によるNT-3遺伝子発現量と一致した。次に、海馬と小脳での加齢による変化を調べたところ、海馬でのNT-3量は1週齢から14週齢までは 23.2～30.4 ng/g tissue であったが、20週齢には 12.5 ng/g tissue まで低下することが明らかになった。これに対し、小脳におけるNT-3量は、1週齢では高い値を示すが、8週齢から20週齢の間は約 10 ng/g tissue となり、加齢による変動はみられなかった。

（目的）

ニューロトロフィン-３ (NT-3) は、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、およびニューロトロフィン-４／５ (NT-4/5) と高い相同性を持った神経栄養因子である[1,2,4]。NT-3遺伝子は脳のみならず末梢組織においても発現がみられており、成体マウスの脳では海馬および小脳での発現が高い[3,5]。しかし、生体のNT-3タンパクの検出についてはこれまで報告がほとんどない。一方、NT-3に対する中和活性を有する抗体(3W3抗体)が取得されており Horse radish peroxidase で標識した3W3抗体を用いたサンドイッチによるEIA系も確立されている[6]。本発表ではこのEIA系をさらに改良して、β-ガラクトシダーゼで標識したものを２次抗体としたEIA系により、はじめてマウス脳内のNT-3含量を測定できたので報告する。

（方法）

C57BL/6マウスは日本クレアより購入し、脳を摘出した後、各部位に分けた。EIA；各部位を抽出溶液 (50 mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1 % Triton X-100, 0.01% thimerosal, 2 % BSA, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 40 KIU/ml aprotinin) に懸濁し、ホモジネーターにより破砕した。次に、4℃、12,000 rpm にて遠心分離した後の上清をEIAに供する試量とした。EIAはShintani らの方法を改変して行った[6]。即ち、１次抗体として、10 μg/ml の抗NT-3抗体 (3W3抗体) のFabフラグメントを、２次抗体として、β-ガラクトシダーゼで標識した3W3抗体 (0.26 μg/ml) を、さらに、蛍光基質としては 50 μMの 4-methyl-umbelliferyl-β-D-galactoside を用いた。RT-PCR；各組織から ISOGEN (ニッポンジーン) によりRNAを調製し、Riverse transcriptase により first strand cDNA を合成したものを鋳型としてPCRを行った。

（結果）

本EIA系は、１ウエル当り 0.4 pg (4 pg/ml) のNT-3を測定することが可能であり、生体内NT-3測定の有効な系であると考えられた。次に、脳内各部位におけるNT-3含量を測定した。8週齢マウス脳各部位におけるNT-3含量は海馬と小脳で高く、皮質、線条体、中脳、間脳、脳幹では低い値を示した（図１）。また、このことはRT-PCR法によるNT-3遺伝子発現量と一致した（図２）。次に、海馬と小脳での加齢による変化を調べたところ、海馬でのNT-3量は1週齢から14週齢までは 23.2～30.4 ng/g tissue の値を示したが、20週齢に

は 12.5 ng/g tissue まで低下した（図３）。これに対し、小脳においては、1週齢では 20 ng/g tissue 以上とNT-3含量が多かったが、8週齢から20週齢の間は約 10 ng/g tissue となり、加齢による大きな変動はみられなかった（図３）。

（考察）

成体マウス脳において、NT-3含量の多い部位は海馬と小脳であり、これはNT-3遺伝子発現量の多い部位と一致していた。即ち、NT-3は標的組織由来で産生されて働く以外にもオートクラインまたはパラクラインに作用しうることが示唆された。また、海馬におけるNT-3量が20週齢のマウスにおいて低下することから、海馬でのNT-3量の低下と老化過程とが関連する可能性も示唆され、興味深い。

（文献）

(1) Hohn et al. *Nature* 344, 339-341 (1990). (2) Kaisho et al. *FEBS Letters* 266, 187-191 (1990). (3) Kaisho et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 379-385 (1991). (4) Maisonpierre et al. *Science* 247, 1446-1451 (1990). (5) Maisonpierre et al. *Neuron* 5, 501-509 (1990). (6) Shintani et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1500-1507 (1993).

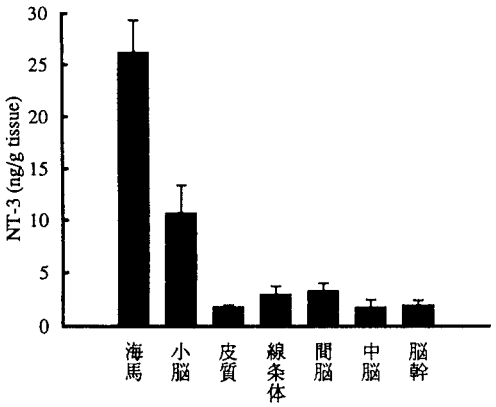


図１ ８週齢マウス脳各部位における NT-3レベル

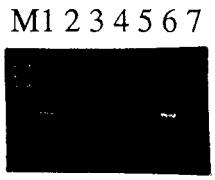


図２ ８週齢マウス脳各部位における NT-3遺伝子発現

M; マーカー、1; 海馬、 2; 皮質、3;線条体、4;間脳、 5;中脳、 6;小脳、 7;脳幹

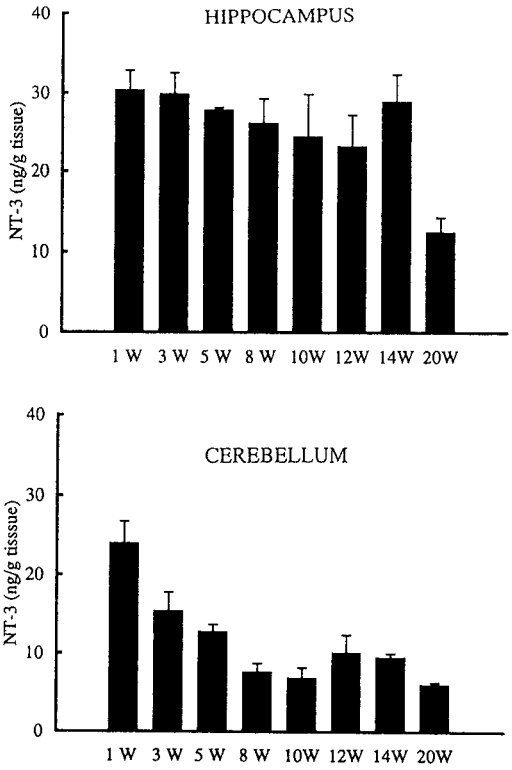


図３ 海馬および小脳におけるNT-3レベルの加齢変化

83 神経系細胞上のエリスロポエチン受容体

永尾 雅哉、 増田 誠司、 安田 佳子*、 佐々木 隆造
（京都大学農学部食品工学、* 近畿大学医学部第1解剖）

〔要約〕

エリスロポエチン（EPO）は赤芽球系の前駆細胞に特異的に作用してその増殖・分化を促進することにより赤血球量を調節する糖蛋白質ホルモンである。しかし、我々はEPO受容体が副腎髄質由来のクロム親和性細胞であるPC12やコリン作動性ニューロン株SN6上に存在することを見いだした。PC12細胞にEPOを添加すると増殖促進や神経突起の伸展は見られないものの、一過的細胞内カルシウム濃度の上昇やモノアミン含量の上昇が見られることより、EPOは神経系で栄養因子的に作用しているのではないかと考えられた。

一方、免疫組織化学的手法によって、マウス胚・胎児神経系発生部位におけるEPO及びEPO受容体の存在を見いだした。EPOは神経系形成に重要な機能を果たしている可能性がある。

［目的］

EPOは赤芽球系細胞に特異的に作用すると考えられてきた。しかし、最近多くのサイトカインが多様な生物活性を示し、そのうち脳において機能しうるものも多く知られるようになってきた。そこで我々はEPOが神経系でも作用しうるのではないかと考え、まずEPO受容体が神経系に存在するかどうか検索し、次にその受容体を介してEPOが作用しうるかについて検討することにした。

［方法］

PC12、SN6細胞にEPO受容体が存在することを^{125}I標識したEPOとの結合実験により検討した。次にPC12細胞上に存在するEPO受容体が赤芽球系に見られるEPO受容体とcDNA配列上は同一であるか否かにつき、RT-PCR法を用いてcDNAをクローニングし、塩基配列決定を行った。またPC12細胞上のEPO受容体蛋白の存在についてEPO受容体のN末端配列に対する抗体や架橋実験により検討した。またPC12細胞にEPOを添加した際の一過的な細胞内カルシウム濃度上昇をfura-2を用いて測定した。さらにモノアミン含量の上昇をESA's Coulometric-detector Array Gradient Systemを用いて検討した。

［結果］

^{125}I標識EPOを用いた結合実験につきScatchard解析を行ったところ、PC12、SN6細胞には解離定数Kd=16nM程度の一相性を示す（ラット赤芽球系細胞ではKd=95pM, 1.9nM程度の二相性）極めてEPOに対する親和性の低いEPO受容体が存在することがわかった[1]（図1）。しかしRT-PCR法によるcDNAクローニングの結果、赤芽球系と神経系のEPO受容体のコード領域は全く同一であった。次にEPO受容体のN末端配列に対する抗血清を用いたウエスタン解析の結果、神経系で発現しているEPO受容体は赤芽球系のものより少しサイズが小さかった（図2）。恐らくEPO受容体のC末端側が欠失していると考えている。また、標識EPOとの架橋実験では赤芽球系と異なる結果を得た（図3）。赤芽球系で架橋される蛋白は既知のEPO受容体ではなく、未知の別のサブユニット[2]と考えられており、神経

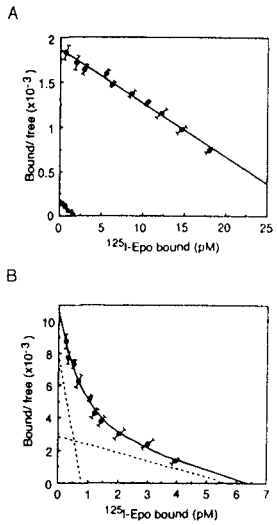


図1. EPO 受容体のScatchard 解析
(A) 神経系細胞、(○)SN6, (●)PC12
(B) 赤芽球系細胞

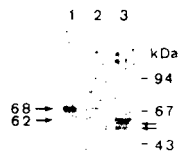


図2. EPO 受容体のウエスタン解析
lane 1. TSA8細胞、lane 2. ラット脾臓細胞
lane 3. PC12細胞のEPO 受容体

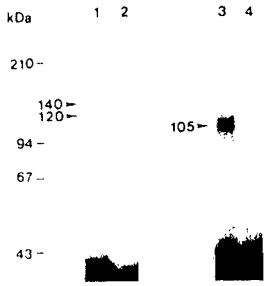


図3. 標識EPO を用いた架橋実験
lane 1. ラット赤芽球系細胞、lane 3. PC12細胞
lane 2, lane. 4はそれぞれlane 1, lane 3の反応の際に
非標識のEPO で処理したもの

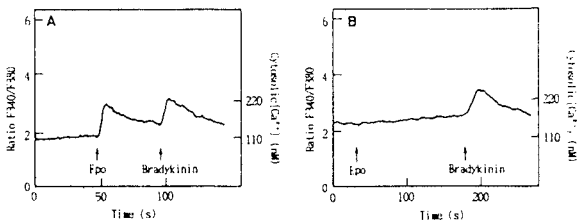


図4. PC12細胞におけるEPO 添加時の細胞内
カルシウム濃度変化(A)-EGTA, (B)+EGTA

系では更に別のサブユニットが存在するのではないかと考えられた。

またPC12細胞にEPO を添加すると一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇（図４）やモノアミン含量の上昇が見られることより、神経細胞上のEPO 受容体は機能的なものであることがわかった。

一方マウス胎児の組織切片につき免疫組織化学的手法でEPO 及びEPO 受容体の存在部位を解析した。その結果、胎生８日目の胚[3]、および胎生10日目の神経上皮で両者の存在が確認された。更に発生が進んだ胎児について現在解析を進めている。

[考察]

神経系でEPO が作用しうることを本研究で示した。しかし、EPO は成体では腎臓で産生され血流を介して脾臓に存在する赤芽球系の標的細胞にエンドクリン様式で作用する。脳には血液脳関門が存在するため、このEPO は中枢神経系に到達することは出来ない。この点については本大会で共同研究者の増田が発表するようにアストロサイトでEPO 産生が見られることから[4]、EPO は脳でパラクリン様式で作用していると我々は考えている。

[文献]

1) Masuda, S., et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 11208-11216
2) Nagao, M., et al. (1992) Blood 81, 2503-2510
3) Yasuda, Y., et al. (1993) Develop. Growth & Differ. 35, 711-722
4) Masuda, S., et al. (1994) J. Biol. Chem. in press

84 プロテオグリカン型チロシンホスファターゼの同定と性質

前田信明、浜中裕喜、野田昌晴
（岡崎国立共同研究機構、基生研）

〔要約〕

蛋白質チロシンホスファターゼ（PTPase）は、細胞内蛋白質のチロシン燐酸化レベルの調節を通じて、様々な細胞機能を制御していると考えられている。最近、極めて多様な、受容体様の構造をもつ PTPase の存在が明らかになってきた(1,2)。 今回、我々は、ラット脳よりプロテオグリカン型の PTPase の精製を試みた。生後８日目のラット全脳より調製した P2+P3 画分を 1% CHAPS で可溶化し、これを DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィー、及び CsCl 密度勾配遠心法で分画することにより、膜結合型プロテオグリカン画分を調製した。この画分には、CHAPS 抽出物中の全PTPase 活性の内、約２%が回収された。このプロテオグリカン画分をさらに亜鉛ーアフィニティークロマトグラフィーで分画することにより、PTPase 活性は、PGPTP-I と PGPTP-II 画分に分離した。PGPTP-I 画分は、300 kDa のコア蛋白質をもつコンドロイチン硫酸プロテオグリカンから成り、PGPTP-II 画分は、330, 230, 140, 125 kDa のコア蛋白質をもつコンドロイチン硫酸プロテオグリカンから構成されていた。各画分の PTPase 活性は、vanadate, molybdate, 亜鉛イオンにより強く阻害され、NaF には非感受性であった。以上の結果は、脳の膜結合型プロテオグリカンの一部は、受容体型 PTPase として細胞情報伝達に直接的に関与していることを示唆している。

［はじめに］

近年、ほ乳類中枢神経系に、多くのプロテオグリカンが存在することが明らかにされつつあるが、その機能的意義は充分に明確ではない(3)。一方、PCR 等の手法により、受容体様の構造を示す多様な PTPase が同定されつつある(1,2)。受容体型 PTPase は、細胞内のホスファターゼ領域、膜貫通領域、及び細胞外領域からなる膜蛋白質である。 ホスファターゼ領域は、各 PTPase で著しい相同性を示すが、細胞外領域は、NCAM 様の構造をもつもの、carbonic anhydrase 様の領域をもつものなど、非常に多様な構造を示す。我々は、一部のプロテオグリカンの蛋白チロシン燐酸化レベル調節への直接的関与を想定し、ラット脳の膜結合型プロテオグリカンの中に、 PTPase 活性をもつものが存在する可能性を検討した。

［方法］

生後８日目のラット全脳より調製した P2+P3 画分を 1% CHAPS で可溶化し、DEAE-Toyopearl カラムで分画した。0.25 M NaCl でカラム洗浄後、0.6 M NaCl で溶出した蛋白質をさらに、CsCl 密度勾配遠心法で分画した。密度 1.4-1.5 g/ml の画分に回収されたプロテオグリカンをさらに、亜鉛アフィニティークロマトグラフィー、及び ヘパリン アガロースにより分画した。PTPase 活性の測定は、チロシン燐酸化 Raytide (PTPase)及び、p-nitrophenyl phosphate (pNPPase) を用いて行った。

［結果］

図１は、CsCl 密度勾配遠心の結果を示す。プロテオグリカンは、一般的に CsCl 溶液中で比重が大きくなるため、この手法で一般蛋白質から分離できる。ほとんどの蛋白質は、遠心管上部の低密度領域に回収されているのに対し、PTPase 活性の大部分は、密度 1.3 g/ml 以上の高密度領域に回収された。図１の横棒で示した画分をさらに亜鉛ーアフィニティークロマトグラフィーで分画した（図２ A）。PTPase 活性の一部は、カラムに吸着し 5 mM イミダゾールで溶出された（PGPTP-I）。非吸着画分は、ヘパリンーアガロース カラムで分画した （図2 B）。PTPase 活性の約70% はカラムに吸着し、NaCl 濃度勾配により溶出した(PGPTP-II)。図３は、各画分の SDS-PAGE の結果を示す。コンドロイチナーゼ ABC未処理サンプルでは、両画分共、プロテオグリカン特有の幅広いスメアが観察される。一方、酵素処理すると、PGPTP-I では、300 kDaのコア蛋白質のみが、PGPTP-II では、330, 230, 140, 125 kDa のコア蛋白質が出現した。PGPTP-I 及び PGPTP-II のチロシン燐酸化 Raytide に対する Km と Vmax は、各々 20 μM, 12000 nmol/min/mg 及び,23 μM, 2000 nmol/min/mg であった。両画分共、PTPase の一般的な阻害剤である vanadate, molybdate, 亜鉛イオンにより強く阻害されたが、NaF では阻害されなかった。PGPTP-I は、SDS-PAGE 上で

コア蛋白質バンドが一本しか見られないこと、及び、Vmax が既報の PTPase と同等であることから、ほぼ純品であると考えられる。PGPTP-II については、さらに精製を進めると共に、renaturation 法により、どのコア蛋白質バンドが酵素活性を示すかを検討している。

［考察］

ほ乳類の脳には、多様なプロテオグリカンが存在し、様々な細胞外基質成分や成長因子群と結合することにより、細胞間相互作用に多彩な調節効果を及ぼしていると考えられている。今回、我々は、脳の膜結合型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一部が、PTPase そのものであることを示した。このことは、脳のプロテオグリカンが種々のチロシンキナーゼと共に、細胞内チロシン燐酸化レベルの調節を通じて、細胞情報伝達に直接的に関与していることを示している。

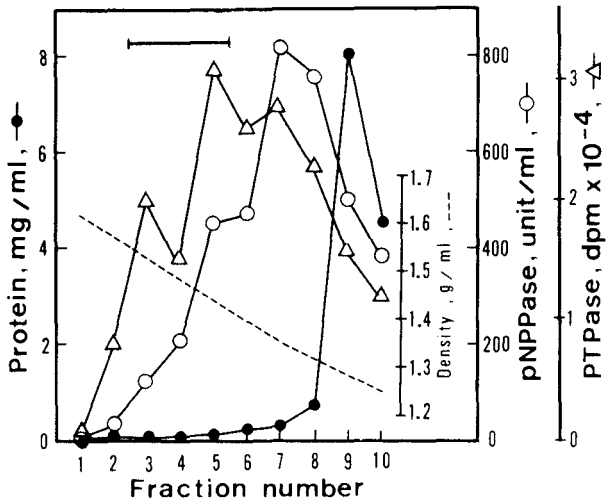


図1. CsCl 密度勾配遠心法による
プロテオグリカン型 PTPase の分離

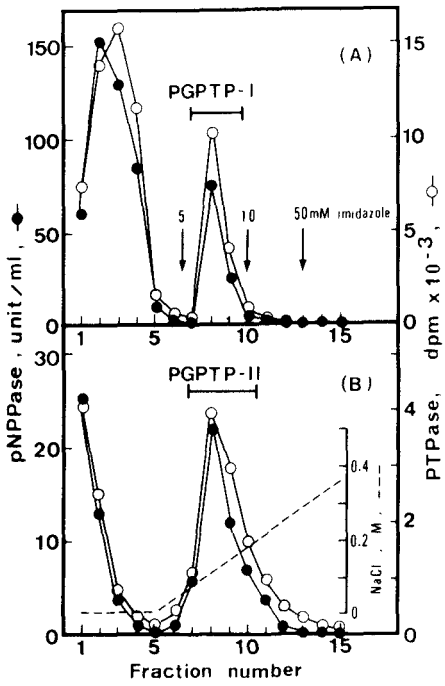


図2. プロテオグリカン型 PTPase の
(A) 亜鉛— 及び (B) ヘパリン—
アフィニティークロマトグラフィー
による分画

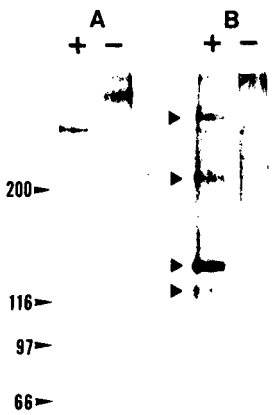


図3. PGPTP-I (A), -II (B) のSDS-PAGE
コンドロイチナーゼ ABC 処理 (+) 及び
未処理 (-) サンプルを泳動し、CBB 染色した。

［文献］

(1) Charbonneau et al. (1992) Annul. Rev. Cell Biol. 8, 463-493.
(2) Walton and Dixon (1993) Annul. Rev. Biochem. 62, 101-120.
(3) Herndon and Lander (1990) Neuron 4, 949-961.

85 ビデオマイクロスコープを用いた細胞動態リアルタイム解析

-RBL-2H3細胞における開口放出とプロテインキナーゼCの動態解析を中心に-

小澤光一郎、升島努
（広島大・医・総合薬・薬品分析化学）

〔要約〕

微小領域での細胞動態の解析を細胞が生きた状態でリアルタイムに解析することを目的として、明視野微分干渉像と蛍光像が同時に観察できるビデオマイクロスコープ（ＶＭ）を構築し、rat basophilic leukemia (RBL-2H3)細胞におけるヒスタミンの開口放出現象の解析とプロテインキナーゼC(PKC)の細胞内動態の解析を試みた結果、次の知見を得た。１）開口放出のtime-courseの検討を行った結果、抗原抗体(DNP-BSA)刺激による開口放出は主にPKCの活性化に依存しており、カルシウムイオノフォアー(A23187)刺激による開口放出はPKCとホスホリパーゼDの両者の活性化に依存している可能性が示唆された。２）PKCを特異的に蛍光標識するfim-1を用いた解析の結果、ホルボールエステルあるいはDNP-BSA刺激により、ＰＫＣが細胞質から酸性分泌顆粒および細胞膜に移行する様子が、リアルタイムで観察された。

近年の顕微鏡技術及びその周辺技術の進歩によって、これまではとても見えないと思われていた速い現象や暗い現象を映像化し解析することが可能となった[1)]。その一つが、光学顕微鏡を細胞の世界を覗く入口として用い、これにビデオカメラ・画像解析装置を組み合わせたビデオマイクロスコープ(ＶＭ)法であり、細胞が生きた状態でミクロレベルでの動態解析を行うことが可能である。一方、我々は肥満細胞あるいは細胞内情報伝達機構解明のためのモデル細胞として利用されているrat basophilic leukemia (RBL-2H3)細胞を用い、プロテインキナーゼC(PKC)各アイソザイムが機能的に役割分担していることを報告した[2)、3)]。今回、ＶＭ法を用いRBL-2H3細胞における分泌顆粒の開口放出現象の解析とPKCの細胞内動態の解析を試みた。

【実験方法】

①ビデオマイクロスコープ(ＶＭ)：Zeiss社Axiovert 135-TV型倒立顕微鏡を用い、微分干渉像をCCDカメラで、同時に蛍光像をSITカメラで捉え、画像解析装置により画像処理を行った。

②RBL-2H3細胞の培養：RBL-2H3細胞は滅菌カバーグラス上で培養し、実験に使用した。

③Fim-1による細胞内PKCの標識：細胞内PKCの標識はPKCを特異的に蛍光標識するfim-1[4)]存在下で、RBL-2H3細胞をプレ・インキュベートすることにより行った。

【結果および考察】

①RBL-2H3細胞における酸性分泌顆粒の開口放出現象の解析

ＶＭ法を用いたRBL-2H3細胞における分泌顆粒開口放出現象の観察結果を、図１に示す。抗原抗体(DNP-BSA)刺激による個々の分泌顆粒の開口放出現象は、33 msec以下の反応であり、その後約200 msecで膜は元の状態に回復した。この顆粒は、quinacrineにより蛍光標識され、刺激に応じquinacrine蛍光が細胞外へ放出されたことから、ヒスタミンを含む酸性分泌顆粒で

あること[5]が示唆された（結果省略）。

酸性分泌顆粒の開口放出現象のtime-courseを解析した結果、DNP-BSA刺激の場合は、１つのピーク(peak Ⅰ)のみが認められ（図２A, control）、カルシウムイオノフォアー（A23187）刺激の場合は、２つのピーク(peak Ⅱ, Ⅲ)が認められた（図２B, control）。PKC阻害剤（Ro31-8425）及びphosphatidate hydrolase阻害剤（proranolol）を用いた実験結果より(図２A, B)、DNP-BSA刺激による開口放出(peak Ⅰ)は主にPKCの活性化に依存しており、A23187刺激による開口放出はPKC(peak Ⅱ)とホスホリパーゼD(peak Ⅲ)の両者の活性化に依存している可能性が示唆された。

②ＰＫＣの細胞内動態リアルタイム解析

Fim-1で細胞内ＰＫＣを特異的に蛍光標識した後に、RBL-2H3細胞をphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)刺激した結果、蛍光標識PKCが細胞質から分泌顆粒および細胞膜に移行する像が観察され(図３)、この移行はPKC阻害剤(calphostin C)により抑制された（結果省略）。さらに、DNP-BSA刺激によっても、同様な移行が認められた（結果省略）。

以上、ＶＭ法を用い、RBL-2H3細胞でのヒスタミンの開口放出における細胞内情報伝達機構の解明を行った結果、各種刺激に応じ、それぞれ異なる機構が異なる時間軸に沿って働いていること、PKCが分泌顆粒および細胞膜に局在化すること、等がリアルタイムで明らかになった。

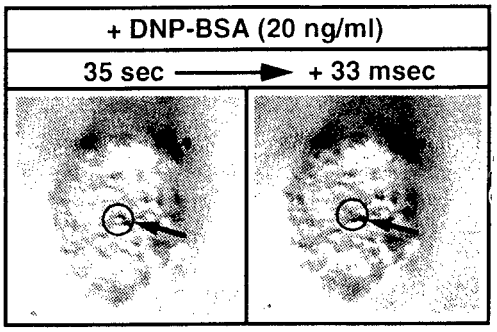


図１ DNP-BSA刺激による分泌顆粒の開口放出

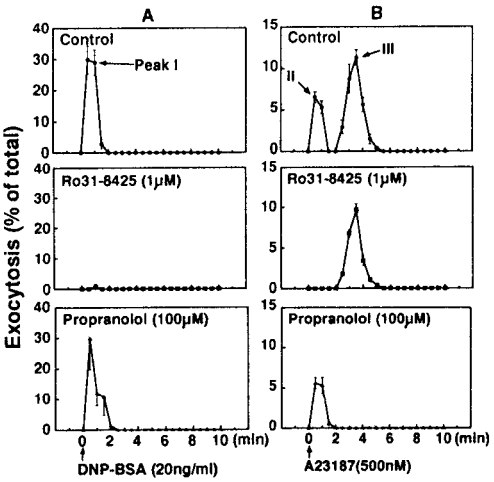


図２ 各種阻害剤のDNP-BSAあるいはA23187刺激による開口放出への影響 (n=7-9)

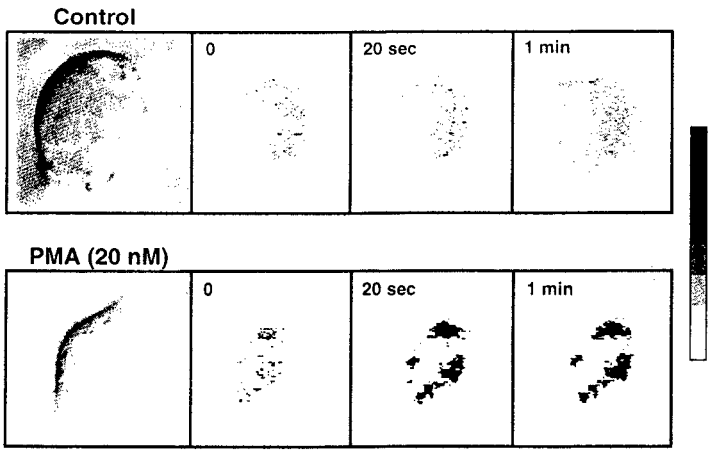


図３ Fim-1標識PKCの細胞内動態リアルタイム解析

【文献】1) Hayakawa, T. (1992) In "Image Analysis in Biology" (Haeder, D.-P. ed.), pp.75-86. 2) Ozawa, K. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1749-1756. 3) Ozawa, K. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2280-2283. 4) Chen, C. -S. and Poenie, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15812-15822. 5) Henkart, P. A. (1988) *Biochem. Biophys. Acta* **939**, 459-466.

86 CaM-キナーゼⅣのカルシウム/カルモデュリンによる不活性化とマグネシウムイオンによる再活性化

木谷隆子、奥野幸子、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化学）

〔要約〕
ラット脳より精製したカルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素Ⅳ（CaM-キナーゼⅣ）をカルシウムイオン／カルモデュリン（Ca^{2+}/CaM）存在下でインキュベーションすると、温度依存性、時間依存性に活性を失い、元の活性の30～40%程度の活性しか持たない不活性型に変化した。これにEGTAを加えてCa^{2+}をキーレートした後、Mg^{2+}を加えると酵素は温度依存性、時間依存性に再活性化され、元とほぼ同じ活性をもつ状態に回復した。ミオシン軽鎖キナーゼ（ＭＬＣＫ）、カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素Ⅱ（CaM-キナーゼⅡ）、カルシニューリンなどもCa^{2+}/CaMによって活性を失うことが報告されており、その生理的な意義は明らかではないが、活性の発現にCa^{2+}/CaMを必要とする幾つかのカルモデュリン依存性酵素が、一方でCa^{2+}/CaMによって不活性化する機構を持っていることは興味深く思われる。

［目的］
最近、CaM-キナーゼⅡがCa^{2+}/CaMによって失活することが明らかになった（1）ので、CaM-キナーゼⅣについても検討した。

［方法］
CaM-キナーゼⅣはラットの小脳より宮野の方法（2）の改良法で精製した。酵素のタンパク量はPetersonの方法（3）で測定した。CaMはニワトリ脳のCaMのcDNAを大腸菌で発現しGopalakrishnaの方法（4）で精製した。CaM量はA_{280} (1 mg/ml) = 0.21（5）を用いて測定した。Ca^{2+}/CaMによるCaM-キナーゼⅣの不活性化は50 mM Mops (pH 7) / 2 mM dithiothreitol / 10% ethylene glycol / 0.05% Tween 40 / 0.1 mM $CaCl_2$ / 200 nM CaM中で、Mg^{2+}による再活性化は50 mM Mops (pH 7) / 2 mM dithiothreitol / 10% ethylene glycol / 0.05% Tween 40 / 0.1 mM EGTA / 5 mM Mg-acetate中で、30度で行った。CaM-キナーゼⅣの活性は50 mM Mops (pH 7) / 2 mM dithiothreitol / 0.1 mM $CaCl_2$ / 1 μM CaM / 40 μM syntide-2 / 100 μM [γ-^{32}P]-ATP / 5 mM Mg-acetate中で30度5分間のインキュベーション後、^{32}Pのsyntide-2への取り込みをP-セルロース法（6）で測定した。

［成績と考察］
CaM-キナーゼⅣをCa^{2+}/CaM存在下、30度でインキュベーションすると、図1に示すように、酵素は活性を失っていき7分後には元の活性のほぼ40%程度まで減少する。これにEGTAとMg^{2+}両者を加えると活性は上昇し、5分後にはほぼ完全に元の活性に回復した。これにCa^{2+}を加えてインキュベー

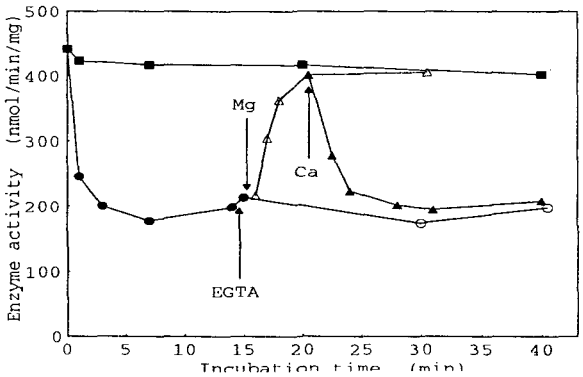


図1 CaM-キナーゼⅣのCa^{2+}/CaMによる不活性化とMg^{2+}による再活性化。
CaM-キナーゼⅣ（50 nM）をCa^{2+}/CaMとインキュベーション（●）し、14.5分後にEGTA（○）、15.5分後にMg^{2+}（△）、21.5分後にCa^{2+}（▲）を添加し、図に示した点で酵素活性を測定した。Ca^{2+}、CaM、Mg^{2+}などを加えないでインキュベーションしたもの（■）をコントロールとした。

ションを続けると再び活性は40%まで減少した。このCa^{2+}/CaMによるCaM-キナーゼⅣの不活性化に対するCaM濃度の影響を調べたところ、図2に示すように、酵素1分子当たり、CaMほぼ1分子で引き起こされていることが明らかになり、恐らく酵素の活性化に関与しているCaM結合部位にCaMが結合すると時間依存性に酵素を不活性型に変換するものと推定された。こうして不活性化されたCaM-キナーゼ

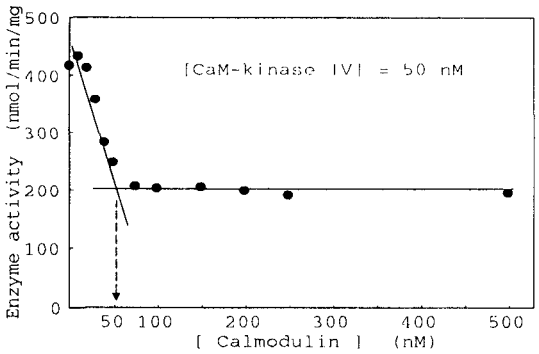


図2 CaM-キナーゼⅣの不活性化に及ぼすCaM濃度の影響。
CaM-キナーゼⅣ（50 nM）をいろいろな濃度のCaMと30度で20分間インキュベーションした後、酵素活性を測定した。

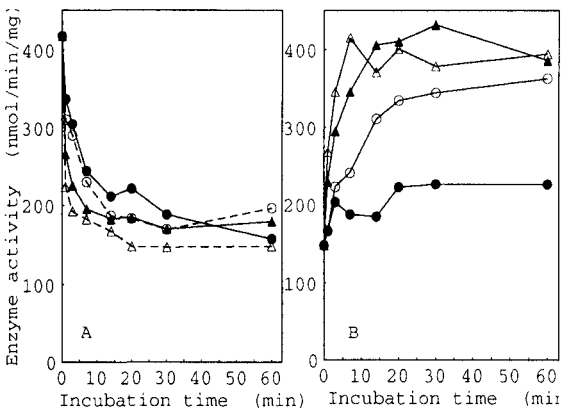


図3 不活性化反応（A）、再活性化反応（B）の温度依存性。
Ca^{2+}/CaMによる活性化反応、EGTA/Mg^{2+}による再活性化反応を、0度（●）、10度（○）、20度（▲）、30度（△）で行った。

表1 CaM-キナーゼⅣの再活性化。
CaM-キナーゼⅣ（50 nM）をCa^{2+}/CaMと20分間インキュベーションして不活性化した後、0.1 mM EGTA、5 mM Mg^{2+}、0.1 mM ATP、0.1 mM syntide-2を表に示したような組み合わせで加えて10分間インキュベーションした後、酵素活性を測定した。

Additions	Specific activity	
	nmol/min/mg	%
Control	482	100
-	165	34
EGTA	185	38
Mg^{2+}	187	39
EGTA / Mg^{2+}	422	87
ATP	166	34
ATP / EGTA	179	37
ATP / EGTA / Mg^{2+}	370	77
Syntide-2	164	34
Syntide-2 / EGTA	191	40
Syntide-2 / EGTA / Mg^{2+}	418	87

Ⅳは EGTA と Mg^{2+} 存在下でインキュベーションすると活性が元に回復する（図1）が、表1に示すように、再活性化反応はEGTAとMg^{2+}の両者を必要とした。syntide-2やATPなどの基質は再活性化反応に影響しなかった。図3に示すように、Ca^{2+}/CaMによる不活性化反応、EGTA/Mg^{2+}による再活性化反応はともに温度依存性であったが、特に再活性化反応は強く温度に依存した。また、また酵素の反応速度論的な解析からこれらの活性の変化は主としてVmaxの変化であると考えられた。

［文献］

(1) Ishida, A., Kitani, T., Okuno, S., and Fujisawa, H. (1994) *J. Biochem.* 115, 1075-1082
(2) Miyano, O., Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1198-1203
(3) Peterson, G. L. (1977) *Anal. Biochem.* 83, 346-356
(4) Dedman, J. R., Potter, J. D., Jackson, R. L., Johnson, J. D., and Means, A. R. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8415-8422
(5) Gopalakrishna, R. and Anderson, W. B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 830-836
(6) Roskoski, R., Jr. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 3-6

87 C6細胞におけるhsp27およびαBクリスタリンのストレス応答のアラキドン酸カスケード阻害剤による修飾

伊東秀記、稲熊　裕、長谷川かおり、小澤　修、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕

Confluent培養時のC6グリオーマ細胞では、hsp27とαBクリスタリン（以下αB）は殆ど発現していないが、熱ストレスあるいは亜砒酸ストレスを負荷すると両蛋白質の濃度は著しい増加を示す。ところがストレス負荷時に indomethacin (IMC, cyclooxygenaseの阻害剤)、nordihydroguiaretic acid (NDGA, lipoxygenaseの阻害剤)、あるいは melittin (MLT, phospholipase A_2 を活性化)を共存させると hsp27、αB の誘導はさらに促進された。一方、quinacrine (QNC, phospholipase A_2 の阻害剤) は上記のストレス誘導を阻害した。これらの結果より、低分子量ストレス蛋白質であるhsp27およびαBのストレス誘導にはアラキドン酸カスケードが関与し、細胞内遊離アラキドン酸濃度の上昇がストレス誘導を促進することが示唆された。

アラキドン酸あるいはその代謝産物であるプロスタグランジンがhsp70, hsp90の熱ストレス応答を修飾することが報告されている(1-4)。また、HeLa細胞を、cyclooxygenaseの阻害剤であるサリチル酸ナトリウムに暴露するとHSFのDNA結合能が活性化され（3）細胞外よりアラキドン酸を加えるとHSF1の活性化をともなってhsp70、hsp90遺伝子の転写が促進されること（4）が報告され、炎症反応におけるストレス蛋白質の関与が示唆されている。今回、我々は、低分子量ストレス蛋白質、hsp27とαB、のストレス応答がアラキドン酸カスケード阻害剤によってどのように修飾されるか、ラットC6グリオーマ細胞を用いて解析した。

【実験方法】

C6細胞は10%FCSを含むDMEM液中 (2 ml/dish) で培養し、confluent 培養の細胞をそれぞれの薬剤に1時間暴露した。熱ストレスは、薬剤添加して10-15分後に培養皿を42-44℃で15分間加熱負荷した。亜砒酸ストレスは、薬剤と同時期に50-200μM　亜砒酸ナトリウムを培地に加えて行った。1時間後に正常の培地に置換し、37℃で培養を継続し、16時間後に細胞をPBSで洗ってから、各dishは-20℃で保存した。各dishの細胞は0.3mlのPBSでsuspendし、sonicate後、遠心(150,000 x g/20 min)上清中のhsp27、αBおよび(hsp70)を分析した。

hsp27およびαBの濃度はイムノアッセイ法（5、6）にて測定し、ng or μg /mg proteinで表した。hsp70は市販のモノクローナル抗体を用いてWestern blot法で解析した。

【結果】

confluent培養のC6中のhsp27は0.5 ng/mg protein以下、αBは数十ng/mgと低濃度であるが、中程度の亜砒酸ストレス(100 μM/1h)で, 16時間後にはhsp27は30-60 ng/mg、αBは1μg/mg前後の濃度に増加した。この亜砒酸ストレス負荷を、アラキドン酸よりプロスタグランジンの産生に関与するcyclooxygenase (Fig. 1) の阻害剤、IMCの共存下で行うと、両蛋白質の誘導が促進された(Fig.2)。IMCの誘導促進作用は濃度依存的であった。phospholipidよりアラキドン酸遊離を触媒するphospholipase A_2 (Fig. 1) の活性化剤であるMLTを共存させても両蛋白質の誘

導は促進された(Fig.2)。アラキドン酸代謝に関与するもう一つの酵素, lipoxygenase (Fig.1) を阻害するNDGAも亜砒酸ストレスによるhsp27、αBの誘導を促進した (Fig. 3)。一方、phospholipase A_2 の阻害剤であるQCNは、両蛋白質の誘導を阻害した (Fig. 3)。これらの薬剤処理中に細胞外よりアラキドン酸 (100 μM) を加えると、NDGA による促進作用はさらに増加し、QCN による抑制作用は回復する傾向が認められた (Fig. 3)。また、同じ検体中のhsp70の応答は、hsp27およびαBと同じように修飾されていることがWestern blot 分析で分かった。亜砒酸ストレス応答に対するこれらの薬剤の効果は、熱ストレス応答の場合も認められたが、効果は亜砒酸ストレス応答の場合に比べて少なかった (Fig. 4)。

【考察】

低分子量ストレス蛋白質のストレス応答もアラキドン酸カスケードと関連をもち、細胞質での遊離アラキドン酸濃度の上昇を通して、hsp27, αB のストレス応答が促進されることが示唆された。今後、これらの現象の生理的意義とストレス蛋白質の生理活性の解明を目指したい。

【文献】

1. Ohno, K., et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 19764-19770
2. Holbrook, N.J., et al. (1992) Mol. Cell. Biol., 12, 1528-1534
3. Jurivich, D.A., et al. (1992) Science, 255, 1243-1245
4. Jurivich, D.A., et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2280-2284
5. Inaguma, Y., et al. (1993) J. Biochem., 114, 378-384
6. Kato, K., et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta, 1074, 201-208

Fig. 1

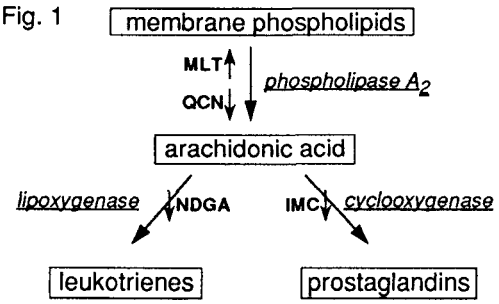


Fig. 2

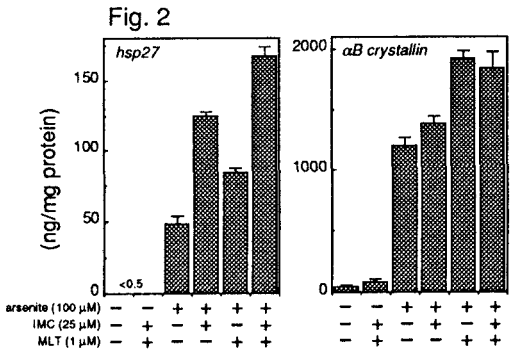


Fig. 3

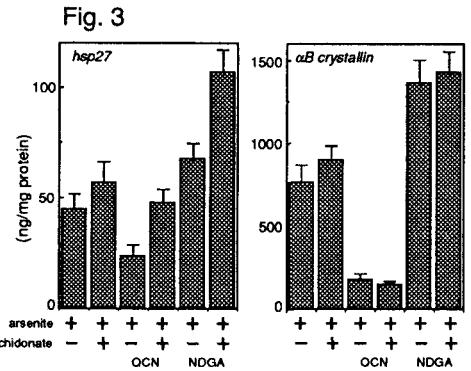
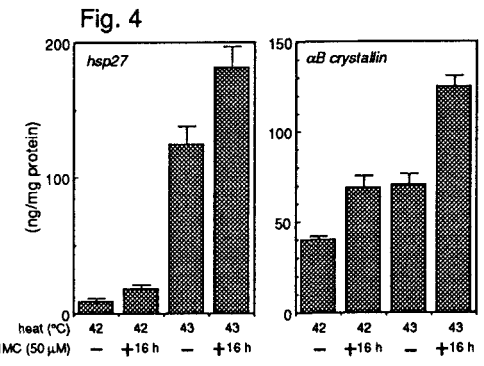


Fig. 4



88 GAPIII、新しいGTPase-activating proteinファミリーメンバー

馬場広子, Babbet Fuss, Joseph B. Watson, and Wendy B. Macklin
(Mental Retardation Reseach Center, UCLA, U.S.A.)

〔要約〕

rasGTPase-activating protein (GAP)はrasの内在性GTPaseを活性化させることにより、GTPに結合した活性型rasからGDPに結合した不活性型rasへの変換を行なう調節蛋白である(5)。哺乳類ではこれまでに2種類のGAP、すなわちp120GAPと神経線維腫症一型(NF1)遺伝子産物であるNeurofibrominが知られている。我々はラットオリゴデンドロサイトcDNAライブラリーを用いてdifferential screeningを行ない、得られたクローンの一つが新しいタイプのGAPをコードしていることを確認し、GAPIIIと名付けた。GAPIIIは、rasGAPに特徴的なGAP-related domain (GRD)の部分で既知のGAPとアミノ酸配列に明らかな類似性を持つが、それ以外の部分でも、Drosophilaで報告されたGap1 (DmGap1)と類似性が認められ、哺乳類におけるDmGap1のホモログであると思われた。GAPIIIのmRNAは脳に多く発現し、発達の過程で発現量も増加した。培養グリア細胞および脳切片の*in situ*ハイブリダイゼーションにおいて、GAPIIIのmRNAはニューロンとオリゴデンドロサイトに特異的に発現していることを確認した。

〔目的〕 rasは様々な細胞において、活性型と不活性型の相互変換によって増殖あるいは分化における分子スイッチの役割をはたしている。我々はrasの活性調節蛋白の一種であるGAPに特徴的なアミノ酸配列を有する新しいcDNAをクローニングし、そのコードする蛋白の構造上の特徴とmRNAの発現部位、脳における局在について検討した。

〔方法〕 1) cDNAライブラリースクリーニング；ラット培養オリゴデンドロサイトから作成したcDNAライブラリーを用い、brain cDNAとliver cDNAをそれぞれプローブとしてdifferential screeningを行なった。脳特異的あるいは明らかに脳で発現の多いクローンを選択し、塩基配列を決め、GenBankで既知の配列との類似性を検索した(2)。2) GAPIIIの同定；GRDを持つ蛋白をコードしたcDNAの全長を有するクローンは、ラットGAPIII cDNAをプローブとしてマウス脳cDNAライブラリーから分離した(3) 3) GAPIII mRNAの局在；ラットの各臓器から抽出したpoly(A)+ RNA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なった。幼若ラット脳よりグリア細胞を培養し、digoxigeninでラベルしたGAPIII cDNAを用いてAmur-Umarjeeらの方法(1)により*in situ*ハイブリダイゼーションを行なった。又、生後19日齢のマウス脳の凍結切片を用いてBartschらの方法(4)に従って*in situ*ハイブリダイゼーションを行なった。digoxigeninラベルしたGAPIII cRNAをプローブとして用いた。

〔結果および考察〕 GAPIII cDNAの全長(4,116 bp)の塩基配列から、このcDNAは843のアミノ酸から構成される分子量96 kDaの蛋白をコードしていた。図1に既知の蛋白とのアミノ酸配列の類似性をもとにしたGAPIII蛋白の構造上の特徴と他のGAPとの比較を示した。GRD (IV)の部分ではすべての既知のGAPと明らかな類似性を示した。GRD以外の部分での

アミノ酸配列においても(I-VI) DmGap1 (7)と類似性を示すことから、GAPIIIが哺乳類におけるDmGap1のホモログである可能性が示された。GAPIIIはGRDの他に Ca^{2+}-dependent phospholipid-binding domain (C2) (6)、Pleckstrin homology domain (PH) (8)などの情報伝達に関連した蛋白に見られる機能ドメインと類似の配列を持つが、p120GAPに認められるSH2、SH3ドメインとの類似性は見られず、rasを介した情報伝達系における他の蛋白(リセプターを含む)とのかかわり方が、GAPIIIとp120GAPでは異なっていることが予想された。次に、この新しいGAPIII mRNAの発現の特徴を解析した結果、他の臓器に比して脳に発現が多く認められた(図2)。このmRNAは少なくとも胎生16日齢の脳で認められ、発達に伴って発現量は増加した。培養グリア細胞の*in situ*ハイブリダイゼーションでは、GAPIII mRNAはオリゴデンドロサイトには発現しているが、アストロサイトでは明らかな発現は認めなかった。脳切片を用いた*in situ*ハイブリダイゼーションでは、GAPIII mRNAは大脳皮質、海馬、小脳のニューロンに局在し、白質の細胞でも少量ではあるが発現を認めた。このGAPIIIを含めた哺乳類の細胞に認められる3種のGAPの、ras情報伝達系におけるそれぞれの役割を検索することは、正常細胞の分化、増殖のメカニズムとともに、NF1で見られるような腫瘍形成のメカニズムの理解のためにきわめて重要であると思われた。

[References]

1. Amur-Umarjee, S. et al. (1993) *J. Neurosci. Res.* **36**, 99-110
2. Baba, H. et al. *J. Neurochem. Res.* in press
3. Baba, H. et al. (1994) *Trans. Am. Soc. Neurochem.* **25**, 73
4. Bartsch, S. et al. (1992) *J. Neurosci.* **12**, 736-749
5. Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993) *Nature* **366**, 643-654
6. Clark, J.D. et al. (1991) *Cell* **65**, 1043-1051
7. Gaul, U. et al. (1992) *Cell* **68**, 1007-1019
8. Musacchio, A. et al. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 343-348

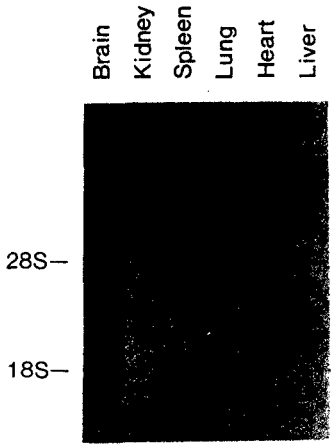


Figure 2. Northern blot analysis of GAPIII mRNA expression.

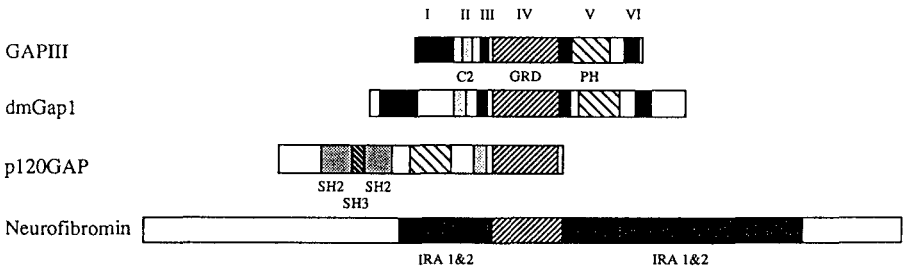


Figure 1. GAP structural relationships.

89 コレシストキニン-B受容体を介する細胞内シグナル伝達とその細胞生物学的意義についての検討

松井　利充、谷口　泰造、伊藤　光宏、村山　徹、岩田　暢子、千原和夫
（神戸大学医学部・第３内科）

〔要約〕

最近、私達はヒト大脳よりコレシストキニン(CCK)-B受容体cDNAをクローニングしその一次構造を決定した。さらに受容体cDNAを真核細胞に導入・発現し受容体の生物学的・生化学的機能の解析を進め、その細胞増殖促進作用を報告した。今回、接着斑に局在しv-*src*の標的蛋白質である$p125^{FAK}$(focal adhesion kinase)がG蛋白共役型のCCK-B受容体を介するシグナルによりチロシンリン酸化されるとともに、CCK-B受容体cDNA発現細胞において著明なストレスファイバーの形成と弱い膜ラフリングを誘導することを見いだした。さらに、CCKは血小板由来成長因子(PDGF)同様c-*src* や低分子量G蛋白の$p21^{ras}$を活性化した。すなわち、CCK-B受容体は、チロシンキナーゼ型成長因子受容体よりの細胞内シグナル伝達系とクロストークするとともに、細胞増殖促進作用のみならず、アクチン細胞骨格の再構築を介し神経細胞のmotilityに関与している可能性が示唆された。

〔目的〕中枢神経系のCCKは大脳皮質、大脳辺縁系、線条体など動機付けや情動、記憶、学習および認識プロセスに関与する領域に多量に存在し、種々の生理的役割を果たし疾病にも深く関与していると考えられているがその詳細は明らかでない。最近私達は、世界で初めてカルチノイド腫瘍よりガストリン受容体を(4)、さらにヒト大脳よりCCK-B受容体を、胃粘膜よりガストリン受容体をクローン化し、両ペプチド受容体が単一のG蛋白共役型受容体で、CCKが無血清培地において本受容体発現細胞の生存および増殖を促進することを明らかにした(1,6)。また*in situ* ハイブリダイゼーションにて、CCK-B受容体mRNAは大脳皮質錐体細胞に最も強く発現し、その他種々の領域にも特異的な発現が認められることを報告した(5)。本研究において、CCK-B受容体を介する細胞内情報伝達系を解析するとともに、その生物学的意義を検討した。

〔方法〕ヒトCCK-B受容体cDNA発現ベクターを、NIH3T3細胞に導入し、CCK関連ペプチドの生化学的・生物学的機能につき、PDGFのそれと比較し検討した。細胞増殖促進作用は[^{3}H]チミジンの取り込みおよび無血清培地における生存曲線にて検討した。増殖因子などによって誘導される初期応答遺伝子発現は特異的cDNAを用いノーザンブロット法にて解析した。細胞内Ca^{2+}はFura2AMを用い測定した。CCKに誘導される細胞内情報伝達におけるチロシンキナーゼ系との連鎖経路を、抗リン酸化チロシン抗体や抗FAK抗体, 抗Erk-CT1抗体を用い免疫沈降法および免疫ブロット法で検討した。MAPキナーゼ活性はMonoQカラムにて可溶性細胞質画分を分画後、ミエリン塩基性蛋白を基質として、またSRCキナーゼの活性はエノレースを基質として抗v-*src*抗体を用い*in vitro*キナーゼアッセイ法にて測定した。　RASの活性化は抗Ras抗

体を用い薄層クロマトグラフィーにてGTPおよびGDP結合型RASの定量により測定した。ローダミン・ファロイジン染色にてアクチン細胞骨格の動態を検討した。

[成績] CCK-8は細胞のDNA合成および細胞増殖を促進させるとともにPDGF同様に、初期応答遺伝子（*c-fos, c-myc, c-jun*）を誘導した。 また、イノシトールリン酸産生や細胞質内Ca^{2+}を上昇させるのみならず、用量依存性にMAPキナーゼ、および、p125FAKなど種々の細胞質内蛋白のチロシンリン酸化を誘導した。チロシンリン酸化によりMAPキナーゼ活性は著明に上昇した。さらに、$p60^{c\text{-}src}$および$p21^{ras}$もCCK刺激により活性化された。 p125FAKのチロシンリン酸化や、$p60^{c\text{-}src}$および低分子量G蛋白活性化の生物学的意義を解明するため、CCKによるアクチン細胞骨格におよぼす影響を検討したが、PDGFが5分以内に著明な膜ラフリングを、それに遅れて弱いストレスファイバーの形成を誘導したのに対して、CCK-8は、5分以内に著明なストレスファイバーの形成と弱い膜ラフリングを誘導した。

[考察] CCKのシグナルは2種類の特異的膜受容体、CCK-A(消化管型)およびCCK-B(脳型)受容体を介し伝達される。CCK-B受容体は、CCKのみならずガストリンに対しても高親和性を有し、脳細胞、胃壁および腸管クロマフィン様細胞などに分布している。中枢神経系におけるCCKの生理的意義の解明には、ヒト大脳および消化管よりCCK-B/ガストリン受容体をクローン化し、その構造および機能を解析することが大変重要である。CCK-B受容体は、細胞増殖促進作用のみならず、アクチン細胞骨格の再構築を介し神経細胞のmotility にも関与している可能性が示唆された。また私たちはすでにPDGFがグリア細胞の分化制御のみならず(3)、神経系の細胞に対しNGFやFGFなどと同様にその生存・分化にも関与していることを報告してきた(2)。中枢神経系においてCCKのシグナルがこれらの成長因子からの情報伝達とクロストークし神経細胞の生存・分化にも関与している可能性も示唆される。

[文献]

1. Ito, M., Matsui, T., Taniguchi, T., Tsukamoto, T., Murayama, T., Arima, N., Nakata, H., Chiba, T., and Chihara, K. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 18300-18305.
2. Matsui, T., Sano, K., Tsukamoto, T., Ito, M., Takaishi, T., Nakata, H., Nakamura, H. and Chihara, K. (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 1153-1160.
3. McKinnon, R., Matsui, T., Dubois-Dalcq, M., Aaronson, S. (1990) *Neuron* 5, 603-614.
4. Nakata, H., Matsui, T., Ito, M., Taniguchi, T., Inomoto-Naribayashi, Y., Arima, N., Kinosita, Y., Chihara, K., Hosoda, S. and Chiba, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1151-1157.
5. Shigeyoshi, Y., Okamura, H., Inatomi, T., Matsui, T., Ito, M., Kaji, H., Abe, H., Nakata, H., Chiba, T. and Chihara, K. (1994) *Brain Res.* 640:81-92.
6. Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Matsui T., Ito, M., and Chihara, K. (1994) *Cytogenet. Cell Genet.* 65,184-185.

90 神経幹細胞に対するＡＰＰの作用

林要喜知、柏木久美子、中島光業、太田淳、川島拓司、＊吉川和明
（森永乳業・生科研、＊大阪大学・蛋白研）

〔要約〕

神経系の発生過程におけるヒト型アルツハイマー病β/A4アミロイド蛋白質前駆体(APP)の生理作用を検討するため、APPをラット線条体神経幹細胞の初代培養系に添加し、次の結果を得た。1)APPは塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)と共に幹細胞のコロニー形成率を増加させた。2)その作用はAPPの中でもクニッツ型プロテアーゼ阻害領域をもつ分子種が強かった。3)APPとbFGFは相加的に作用した。この作用はbFGFと他のクニッツ型阻害剤の間でも認められた。4)APP770の増加作用の少なくとも一部は、プロテアーゼ阻害領域が関与している可能性が示唆された。以上の結果から、APP、特にプロテアーゼ阻害領域をもつAPP751や770は分泌性の神経幹細胞増殖因子として働き得ることが示唆された。

［緒言］アルツハイマー病β/A4アミロイド蛋白質前駆体(APP)の生理作用については不明の点が多い。APP遺伝子は神経系の形成時期の前後からニューロン、あるいはそれらの前駆体細胞で強く発現しており[1]、ニューロンの発生分化に関与することが推定される。また、最近、APPの細胞外領域にはいくつかの機能領域が存在する報告がなされていることから[2)-5)]、APPはニューロンの機能維持にも重要な働きを有するものと考えられる。本研究では、中枢神経系由来の神経幹細胞の増殖制御に及ぼすAPPの生物効果を検討したので、その結果を報告する。

［方法］神経幹細胞の調製：ラット胎児（胎生14,15日）の脳から線条体を分離し、ピペット操作により細胞を単一細胞に分散させた後、ポリオルニチン塗布皿を用いて無血清培地にて一週間培養した。APPの調製：ヒトAPP695,770 cDNAを発現プラスミドに組み込み、COS7細胞で一過性に強制発現させた。その培養上清、あるいは他の細胞培養上清からAPPを部分精製、ないしは精製サンプルを調製した。また、APP分子の細胞外領域の部分を含む融合タンパク質を調製するため大腸菌発現ベクターpEZZ18（ファルマシア）にAPPのPCR増幅DNA断片を組み込み、菌体抽出物よりアフィニティーカラムによって分離・精製した。無血清培養液で透析後、神経幹細胞培養系に添加した。

［結果および考察］ラット胎児脳より調製した線条体細胞懸濁液を培養皿に移し、インキュベートするとニューロンは良く生存するが、全く増殖しなかった（図1）。しかし、既に幹細胞増殖因子として知られているbFGFを添加すると約0.1-0.4%の細胞が増殖コロニーを形成した。従って、線条体細胞集団の一部は、未分化非増殖性神経前駆体細胞と考えられた。そこで、本培養系にAPP770、APP695あるいは両者を添加したところ、bFGFの場合と同様に神経幹細胞によるコロニー形成が認められた。APP770のコロニー形成作用はAPP695と比べ強い傾向にあった。この作用の少なくとも一部は、APP770のもつクニッツ型プロテアーゼ阻害領域に起因する可能性がある。次に、幹細胞増殖作用においてAPP770がbFGFなどの成長因子との相互作用を調べたところ（図2）、増殖作用に対する相加効果が認められた。また、APP以外のクニッツ型プロテアーゼ阻害剤（例えばアプロチニンやウリナスタチン）もAPP770と同様な相加効果を示したが、プロテアーゼ阻害剤単独では、それぞれ作用効果が異なった。また、他種のプロテアーゼ阻害剤は全く増殖効果を示さなかったため、本増殖活性はプロテアーゼ阻害活性とは対応していない可能性が考えられた。APPの細胞外分泌量は、細胞周期やリン酸化により影響をうけ[6)-8)]、生理的条件下で分泌されているβ/A4蛋白質の量も変化すると推測される[7)-10)]。従って、幹細胞増殖因子作用をもつbFGFと同様に、APP分子や他のいくつかの

クニッツ型プロテアーゼインヒビターは、神経系の初期発生時において神経幹細胞の増殖調節を介して神経系の成熟分化に関わっていると考えられる。

〔文献〕1)Yoshikawa,K.et al.(1990)Biochemi.Biophys.Res.Commun.171,204-209. 2)Mattson,M.P. et al.(1993)Neuron10,243-254. 3)Bush,A.I.et al.(1993)J.Biol.Chemi.,268,16109-16112. 4)Miyazaki,K.et al.(1993)Nature362,839-841. 5)Kibbey,M.C.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90,10150-10123. 6)Jacobsen,J.S.et al.(1994)J.Biol.Chemi.,269,8376-8382. 7)Hung,A.Y.et al.(1993) j.Biol.Chemi.,268,22959-22962. 8)Hung,A.Y.and Selkoe,D.J.(1994)EMBO J.B,534-542.7)Haass,C. et al.(1992)Nature,359,322-325. 8)Seubert,P.et al.(1992)Nature,359,325-327. 9)Shoji,M.et al.(1992)Science,258,126-129. 10)Busciglio,J.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.90,2092-2096.

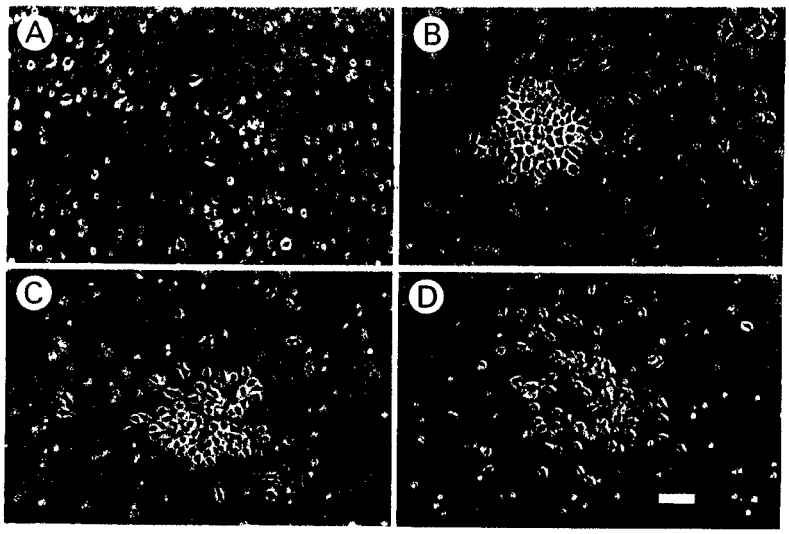


図1.ラット胎児線条体細胞無血清培養。Aは、無血清培地のみで5日間培養した。B-Dは、bFGF(5ng/ml)(B)、APP695(30μg/ml)(C)、及びbFGF＋APP675(D)存在下で5日間培養した。その後、(D)では培地を無血清培地に変え、更に10日間培養したものである。

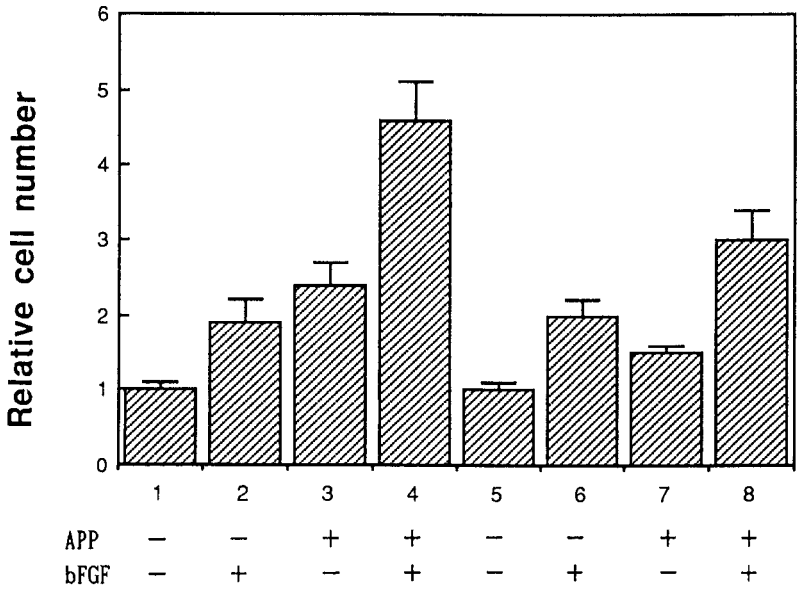


図2.ラット胎児線条体細胞の増殖に及ぼすbFGFとAPP分子の相加効果。可溶性APP分子(30μg/ml)及びbFGF(5ng/ml)の存在下、非存在下で線条体細胞をそれぞれ1週間培養し、それぞれの細胞数を算出した。

91 トランスグルタミナーゼにより架橋されたアルツハイマーβ/A4アミロイドペプチドの神経細胞毒性

佐々木　隆造、増田　誠司、品川　理佳、伊倉　宏司*、高畑　京也**
（京都大学農学部、*京都工芸繊維大学物質工学科、**岡山大学農学部）

〔要約〕

トランスグルタミナーゼはペプチド鎖中のＧｌｎ残基とＬｙｓ残基間のε-(γ-Ｇｌｕ)Ｌｙｓイソペプチド結合形成反応を触媒し、重合物を形成する。アルツハイマー病発症の原因ではないかと考えられているβ/Ａ４ペプチドがトランスグルタミナーゼで重合化することを発見した。重合化β/Ａ４ペプチドはＰＣ12細胞のＮＧＦによる分化誘導を阻害し、細胞死を引き起こした。また胎生18日ラットの海馬および中隔野由来の神経細胞の神経突起の伸張を阻害し、細胞を死にいたらしめた。重合化ペプチドは無処理のペプチドよりはるかに強い毒性を示した。

〔目的〕 アルツハイマー病の代表的病理所見の一つとして、脳における老人斑の形成すなわちアミロイドタンパク質の細胞外沈着がある。アルツハイマー病発症の分子機構は未だ明確ではないが、本タンパク質の沈着が本疾病の要因の一つであることを示唆する知見が報告されている。アミロイドタンパク質沈着物は難溶性であり、その主成分はβ/Ａ４ペプチド（β/Ａ４）と呼ばれるもので、約40残基のアミノ酸からなり2個のＬｙｓと1個のＧｌｎを含む。β/Ａ４は、約700残基のアミノ酸からなる膜貫通型の前駆体タンパク質から派生する。本研究は、ペプチド鎖中のＧｌｎ残基とＬｙｓ残基の間でε-(γ-Ｇｌｕ)Ｌｙｓイソペプチド結合を形成するトランスグルタミナーゼが、アルツハイマー病における老人斑の形成に関与する可能性を究明することを目的としたものである。今回は、β/Ａ４がトランスグルタミナーゼにより架橋されること、架橋されたβ/Ａ４が神経系細胞にたいして分化抑制効果や生育毒性をもつことなどを示す結果について報告する。

〔方法〕 トランスグルタミナーゼは、モルモット肝抽出液から免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製した(1)。β/Ａ４は、合成した部分長（1-28）と完全長（1-40）のものを適宜使用した。分子間架橋形成反応の進行は、反応生成物をＳＤＳ-ＰＡＧＥにかけ分子サイズの変化を見ることにより判定した。ＰＣ12細胞のＮＧＦによる分化誘導は、ＰＬＬコートプレート上で無血清培地を用いて行った。海馬および中隔野部位の神経細胞を胎生18日のラット胎児から分離し、初代培養神経細胞系として用いた。

〔結果〕 β/Ａ４（1-28）とβ/Ａ４（1-40）はともにトランスグルタミナーゼにより架橋され多量体化されることが判った(2)。架橋反応により多量体化したβ/Ａ４は、ＰＣ12細胞の分化誘導時にみられる神経突起の伸張を阻害し、最終的には細胞死を引き起こした。海馬および中隔野の神経細胞についても、多量体β/Ａ４は神経突起の伸張を抑制し、細胞死を引き起こした。これらの結果は、トランスグルタミナーゼがアルツハイマー病に見られる老人斑の形成に関与している可能性を示唆するものである。

文献

（１）伊倉宏司、佐々木隆造（1991） 化学と生物、29巻、81-89
（２）Ikura, K., Takahata, K. and Sasaki, R. (1993) FEBS Lett. 326, 109-111

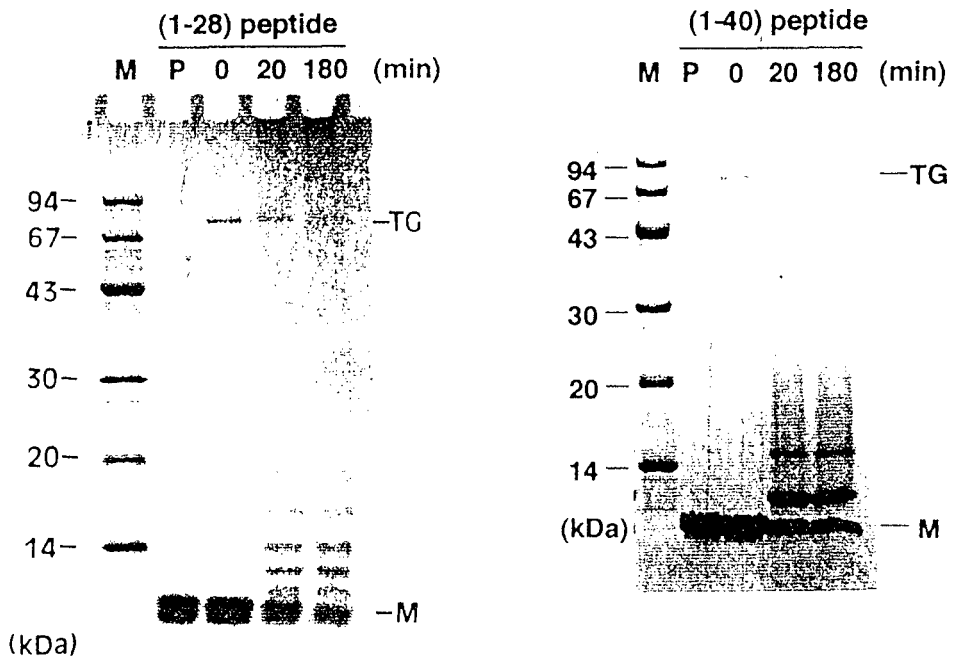


図１．β/Ａ４ペプチド（部分長1-28、全長1-40）のトランスグルタミナーゼによる重合化．
ＴＧ，トランスグルタミナーゼ； Ｍ（右下），モノマー； Ｐ，酵素なしで180分反応．

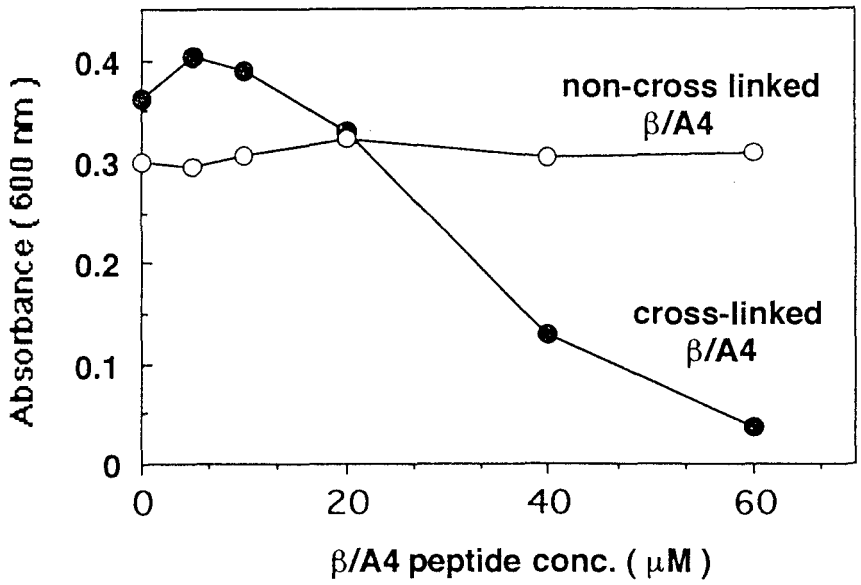


図２．トランスグルタミナーゼにより重合化したβ/Ａ４ペプチドの神経細胞毒性．
ラット海馬ニューロンを3日培養した時の生存細胞数（ＭＴＴ assay）．

92　アルツハイマー病脳変性神経細胞における ニューロフィラメントの異常

中村　祐[1・2]、武田雅俊[1]、新川久義[3]、服部英幸[4]、播口之朗[1]、西村　健[1]

([1]大阪・医・精神、[2]小坂病院、[3]狭山病院、[4]美原病院)

〔要約〕アルツハイマー病海馬（凍結浮遊切片）において神経細胞骨格の主構成成分であるニューロフィラメントの病態における関与について種々のニューロフィラメントに対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。200KDaニューロフィラメント（ＮＦ－Ｈ）のリン酸化及び非リン酸化エピトープに対する抗体は、多くの神経原線維変化様構造物、変性神経細胞及び変性神経突起を染色した。家族性アルツハイマー病脳海馬のみにおいて68KDaニューロフィラメント（ＮＦ－Ｌ）のＣ末端テイル領域に対する抗体が多くの変性神経細胞及び変性神経突起を染色した。これらのことからアルツハイマー病の病態にニューロフィラメントが関与している可能性が示唆された。

アルツハイマー病脳においてみられる神経原線維変化はτ蛋白などの細胞骨格系がその構成成分であり、病態に密接に関与していると考えられている。ニューロフィラメントは神経細胞の主要細胞骨格のひとつであり、アルツハイマー病神経細胞において異常がある可能性が考えられ、詳しく検索することは細胞骨格系の変化を探る上で有用であると考えられる。

方法

１：ＮＦ－Ｌに対する抗体（α-TL）の作成：精製した牛ＮＦ－Ｌをthrombinにて消化の後、tail断片（18KDa)をDEAE-Sphacelにて精製した。tail断片を兎に免疫し、serumを採取の後、affnity-purifyを行った［1］。

２：免疫組織化学染色法：家族性アルツハイマー病１例、ＳＤＡＴ１例、対照１例(Alz-50 negativeな症例)のホルマリン固定した海馬をクリオスタットにて１５μmの浮遊切片を作成した。表に示す抗体を用いて、0.1% Triton X-100/Tris-buffered saline/ 10 % normal goat serumにて４℃にて２日間反応させたのち、Vectastain kitを用いて、DABにて発色させた。アルツハイマー病の病理的変化の指標としてAlz-50にて染色を行った。

抗体名	抗原	希釈	由来
Alz-50	tau (phosphorylated)	5 x(medium)	Davies P
NR4	NF-L	300 x	Amersham
α-TL	NF-L tail (18KDa)	1 μg/ml	[1]
NE14	NF-H (phosphorylated epitope)	500 x	Amersham
SMI-31	NF-H (phosphorylated epitope)	300 x	Sternberger-Mayer Inc.
SMI-32	NF-H (non-phosphorylated epitope)	300 x	Sternberger-Mayer Inc.
SMI-34	NF-H (phosphorylated epitope)	300 x	Sternberger-Mayer Inc.

結果

１：ＮＦ－Ｌに対する抗体による検討

市販されているＮＦ－Ｌに対するモノクローナル抗体（NR4,Amersham）はフォルマリン固定の標本を浮遊切片においても染色せず、今回、ＮＦ－Ｌのｃ末断片に対してポリクローナル抗体（αTL）を作成・精製した。対照脳海馬においては、α-TLは一部の神経細胞を弱く染色し、軸策を強く染色した。家族性アルツハイマー病海馬においては、変性神経細胞の一部が強く染色され、また、一部の変性神経突起も強く染色された。また、ＳＤＡＴ海馬ではこのような変化は見られなかった。

２：ＮＦ－Ｈに対する抗体による検討

ＮＦ－Ｈに関しては市販の抗体数種を用いて検討した。リン酸化ＮＦ－Ｈエピトープに対する抗体としてはNE14(ウェスタンブロットにて脱リン酸化処理にて染色性消失)及びSMI-31/34抗体を用い、非

リン酸化ＮＦ－Ｈエピトープに対する抗体SMI-32を用いた。対照脳ではNE14は軸策のみを染色し、SMI-32は神経細胞体及び軸策・神経突起を染色した。両アルツハイマー病脳においてはNE14は一部の変性神経細胞を染色し、SMI-32は神経原線維変化様構造物、変性神経細胞及び変性神経突起を染色した。

考察

従来よりニューロフィラメントについて検討されているのはそのサブユニットであるＮＦ－M／Ｈであり、ＮＦ－Ｌについての知見は乏しい。それは従来のNF-Lに対する抗体がフォルマリン標本を染色しにくいためであり、今回作成した抗体（α-TL）は浮遊切片ではＮＦ－Ｌを強く染色する。今回、検討した家族性アルツハイマー病海馬において変性神経細胞にＮＦ－Ｌが蓄積している所見が得られたが、ＳＤＡＴではその様な所見はみられなかった。　しかし、ＮＦ－Ｈに対する抗体による所見では大きな差異は見られなかった。これらのことから、アルツハイマー病においてその病態にニューロフィラメントが関与することが示唆される。ＮＦ－Ｌに関してはアルツハイマー病の急性期に関与する可能性や家族性アルツハイマー病のみに関与する可能性が考えられ、今後の検討を要する。

参考文献 [1] Nakamura Y、Takeda M、Aimoto S、Hariguchi S、Kitajima S and Nishimura T: Acceleration of bovine neurofilament L assembly by deprivation of acidic tail domain. *Eur. J. Biochem.* 212:565-571、1993.

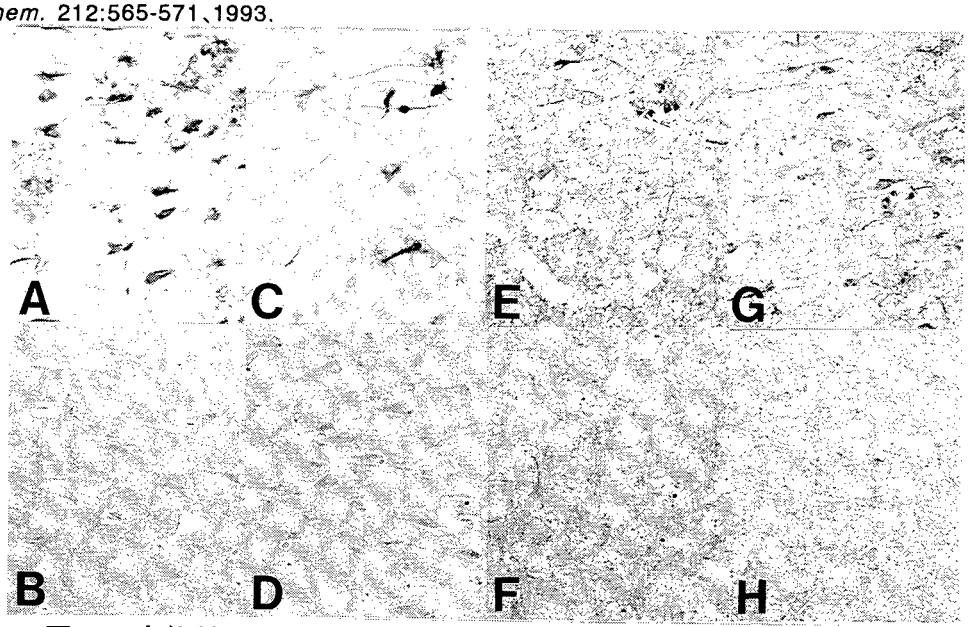


図１：家族性アルツハイマー病脳海馬（Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｇ）及び
対照脳海馬（Ｂ、Ｄ、Ｆ、Ｈ）の比較
Ａ、Ｂ：Alz-50、Ｃ、Ｄ：α-TL、Ｅ、Ｆ：NE14、Ｇ、Ｈ：SMI-32

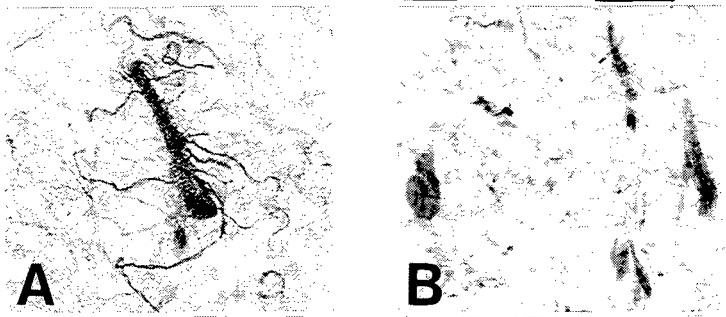


図２：α-TL（Ａ）及びSMI-32（Ｂ）により染色される変性神経細胞

93　軽微な頭部衝撃の繰り返しにより惹起される細胞骨格蛋白の変化

○金山　巌、武田雅俊、新川久義、西村　健
大阪大学医学部精神医学教室

〔要約〕
軽微な衝撃が頭部に繰り返し作用した場合の影響をみるため、fluid percussion装置を用いてラット脳に機械的傷害を加え、その脳組織の神経細胞および細胞骨格蛋白の変化について免疫組織化学的に検討した。重度の機械的傷害が1回だけ作用した場合、衝撃部位の大脳皮質深層部で6時間後をピークに急性期蛋白の発現がみられ、それと比較して軽度機械的傷害が1回だけ作用した場合には衝撃部位の大脳皮質表層部で1時間後をピークにその発現がみられ、重度衝撃と軽度衝撃では急性期蛋白発現の時間経過と局在部位に差異が認められた。そしてこの軽度衝撃が頭部に頻回に作用した場合には、衝撃部位の大脳皮質における一部の神経細胞胞体内にリン酸化ニューロフィラメント、MAP2の異常な蓄積が認められた。それ自体でさほど傷害を来さない程度の衝撃が慢性に繰り返し作用することにより、特徴的な細胞骨格蛋白の変化が惹起され、重度衝撃が及ぼす変化と異なることが示唆された。

（目的）　アルツハイマー病の患者は対照例と比較して頭部外傷の既往が有意に多いという疫学調査(1)により、アルツハイマー病のrisk factorとして、年齢、女性、ダウン症の家族歴のほか頭部外傷があげられる。またボクサー経験者におこるDemenntia pugilisticaは頭部に繰り返し機械的傷害をうけた結果であると考えられ、その剖検脳では大脳皮質の広範な領域で多数の老人斑、神経原線維変化が認められている(2,3)。そこで我々はラット頭部に軽微な機械的傷害が繰り返された場合にアルツハイマー病と類似した病理過程が促進されるかについて検討した。

（方法）　雄ウィスター系ラット(300-350g)をケタミン麻酔下にて固定し、歯科用ドリルを用いて右頭頂側頭部に硬膜を傷つけず直径4.8mmの骨窓をつくり、長さ5cmのテフロンチューブをcyanoacrylateで周辺部の頭蓋骨に装着した。テフロンチューブ内は生理食塩水で満たし、fluid percussion装置(4)に連結した。金属製のおもりを目盛り盤の一定の目盛りから落下させて頭蓋内に一定の圧力がかかるようにした(1.0atm-4.3atm)。percussionを終了したラット、再度percussionを施行するまでのラット、percussionを施行しない対照群は、テフロンチューブの先端に栓をしてゲージに戻した。最終衝撃施行して一定期間後にラットを灌流固定し、ホルマリン固定後、その脳組織についてH.E染色、Nissl染色で脳障害の程度を評価し、ABC法による免疫染色を行なった。免疫染色についてはHSP72、ubiquitin、APP、MAP2、GFAP、リン酸化ニューロフィラメント200K蛋白、脱リン酸化ニューロフィラメント200K蛋白に対する抗体を使用した。

（結果）　それぞれの目盛りからおもりを1回だけ落下させた場合、圧力の増加にともない衝撃部位における神経細胞脱落も増加した。そこで軽度衝撃の特徴を明らかにするため軽度衝撃と重度衝撃が1回だけ作用した場合の急性期蛋白の変動を比較検討した。重度の機械的傷害(4.0atm)が1回作用した場合、衝撃部位にて神経細胞脱落が著しく認められ、傷害側の大脳皮質深層で衝撃後6時間をピークにHSP72などの急性期蛋白の染色性の亢進がみられた。またそれから時間的に少し遅れて衝撃部位周辺において、細胞体がリン酸化ニューロフィラメントで強陽性に染色されるニューロンが増加した。これに比較して軽度の機械的傷害(1.0atm)が1回作用した場合は神経細胞脱落はほとんど認められず、傷害側の大脳皮質表層で衝撃後1時間をピークにHSP72の染色性の亢進がみられた。そこでこの軽微な機械的傷害(1.0atm)が慢性に加わった場合を検討するため、毎日連続して7回衝撃を施行したところ、1週間後に衝撃部位においてGFAPの増生、MAP2の減少がみられ、一部の神経細胞胞体内はリン酸化ニューロフィラメント（図1）、MAP2（図2）で強陽性に染色された。しかし海馬などの遠隔領域においては対照と比較して有意な差異は認められなかった。

（考察）　以上の結果より、重度衝撃の場合は障害が深層におよび、ニューロンを保護しようと急性期蛋白が大量に発現するものの、著しく神経細胞が脱落し深層に残存している一部のニューロンで6時間後をピークに染色性がみられるが、軽度の場合は急性期蛋白は1時間をピークに大脳皮質表層部分に発現し、ニューロンに保護的に作用し、神経細胞はほとんど脱落しないと考えられる。そしてこの軽微な機械的傷害が頭部に繰り返し作用することによって、特徴的な細胞骨格蛋白の変化が惹起され、重度の機械的傷害によってもたらされる変化とは異なることが推定された。アルツハイマー病などの神経変性疾患では軸索損傷によると考えられるニューロフィラメントの異常蓄積が報告されており(5,6)、またアルツハイマー病の病理としてdiffuse axonal injuryや慢性炎症、脳血液関門破綻なども推定されており、

このモデル動物はアルツハイマー病の病理過程の解明に役立つものと考えられる。

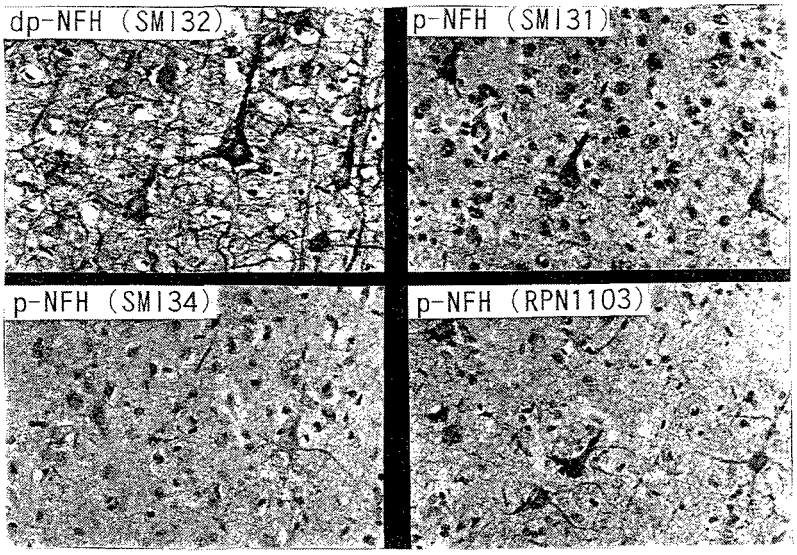


図１　衝撃部位におけるリン酸化ニューロフィラメントの局在の変化

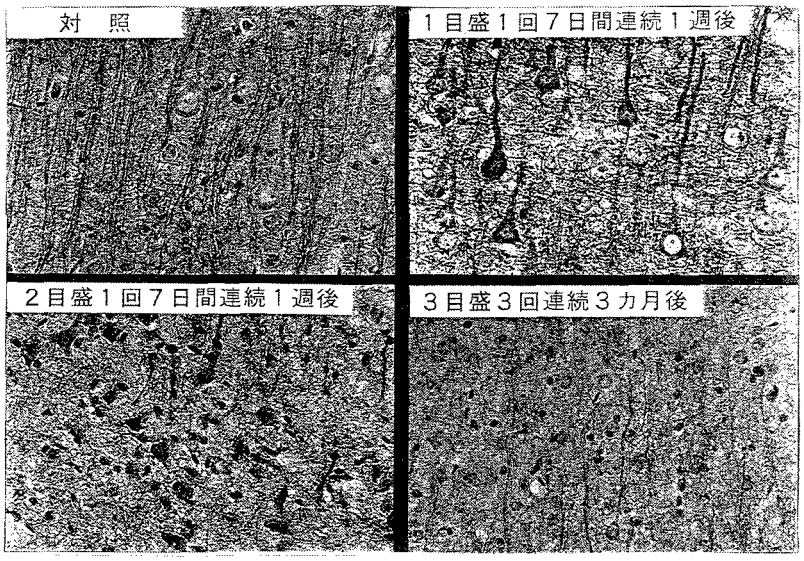


図２　抗MAP2抗体による免疫染色

（文献）
(1) Mortimer JA, van Duijin CM et al.(1991) Int. J. Epidemiol. 20;S28
(2) Corsellis JAN, Brunton CJ et al.(1973) Psychol. Med. 3;270-273
(3) Roberts GW, Allsop D, Bruton CJ.(1990) J. Nerol Neurosurg. Psychiatry 53;373-378
(4) Dixon C, Lyeth B et al.(1987) J. Neurosurg. 67;110-119
(5) Kosik KS, Duffy LK et al(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81;7941-7945
(6) Cote F, Collad J-F et al(1993) Cell 73. 35-46

94 アルツハイマー病脳に特徴的な遺伝子の同定：カルボキシメチルトランスフェラーゼ

山本明広、北村大介*、渡辺　武*、白沢卓二#、近藤威史、森　啓
（都精神研・分子、*九大・生医研・感染防御、#都老人研・分子病理）

〔要約〕 アルツハイマー病(AD)脳に特徴的な遺伝子を同定する目的でdifferential hybridizationをおこない、その結果、５つのクローンを得た。ここではその１つであるカルボキシメチルトランスフェラーゼ(CMT)について検討した。AD脳におけるCMT mRNAおよびタンパク量は正常脳より多く発現されていることが、ノーザンブロットとウェスタンブロットの解析からわかった。抗CMT抗体は、AD脳に特徴的な異常構造物である神経原線維変化を染色した。共焦点レーザー顕微鏡観察によって、CMTとユビキチン、タウがほぼ同一の存在様式をとることがわかった。また、CMTの生物学的機能を知るため、CMT遺伝子欠損マウスの作成を試みた。

目的

アルツハイマー病脳に特徴的な遺伝子を同定することは、家族性アルツハイマー病原因遺伝子の解明にも比肩する興味ある内容をもつ。これまでのdifferential hybridization法によっては、GFAPやチューブリンなどが同定されている。これはAD脳が変性疾患であり、２次的な反応であるグリオーシスを反映しているためと考えられる。われわれは、こうした知見からニューロンにのみ由来する遺伝子をクローニングするため、グリア細胞増殖前の胎生15日のラット脳からcDNAライブラリーをスクリーニングすることにした。そして、今回得られた遺伝子のCMTは、タンパク質中の光学異性体のラセミ体アスパラギン酸、イソアスパラギン酸を修復・除去する機能があると考えられるものである。こうした異常ラセミ体タンパク質は、AD脳ばかりでなく、老化組織内でも蓄積していることが知られている。最近、D-アスパラギン酸を含む合成アミロイドタンパクアナローグの重合能を、生化学的に調べた結果、正常のものより重合能が促進されていることがわかった。こうしたことより、ラセミ体やその関連酵素のCMTに関する知見はAD脳の生化学にとって、重要な示唆を与えると思われる。

方法

マウスのCMTゲノムは、C57BL/6由来のラムダDashIIあるいはEMBL3ライブラリーより、ヒトCMTのBamHI/SphI断片(250bp)およびマウスCMTのPCR断片(800bp)をプローブにしてクローニングした。

ターゲティングのDNAコンストラクトは、ネオマイシン耐性(neo)遺伝子とチミジンキナーゼ(tk)遺伝子をもつプラスミド、pPNTを利用して、エクソン２－３を含む14.6kbのマウスゲノムをneo遺伝子で置換して作成した。

結果と考察

図１にノーザンとウェスタンブロット法によるCMTmRNAとタンパクの分析結果を示す。これから明らかなように、正常脳よりAD脳におけるCMTの発現が亢進している。さらに、これらの形態学的な分布を、CMT相補鎖のリボプローブを用いたin

situ hybridization法によって、特に錐体細胞に強く発現されていることがわかった。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察から、CMTは細胞体と変性神経突起の神経原線維変化において、タウやユビキチンとともに存在することが明らかになった。一方、老人斑にはCMTが見出されなかったが、アミロイドが神経原線維変化と異なり、細胞外沈着であることを考えると、CMTが老人斑に反応していないことが理解できる。しかし、このことは、アミロイドタンパクがラセミ体アミノ酸を含んでいないことを意味しているわけではない。実際、神経原線維変化だけでなく、老人斑アミロイドタンパクにもD-アスパラギン酸が存在することが証明されている。

ジーンターゲティングのためのコンストラクト（図-2）は、NotI消化により、直鎖状としてES細胞(E14)に導入した。5'側よりtk遺伝子、10.4kbのロングアーム、neo遺伝子、0.8kbのショートアームの構成とし、tk遺伝子とneo遺伝子は逆方向とした。25 μgのコンストラクトDNAを5X10^{6}のES細胞にトランスフェクトし、G418およびガンシクロビルによるポジティブ・ネガティブ選択法を用いて、約200のクローンを得た。なお、ガンシクロビルによる濃縮率は約5倍であった。これらのクローンから、ゲノムDNAを抽出し、PCRスクリーニングをおこなった結果、4つのクローンがさらに得られた。

また、homologous recombinationを確認するため、各領域における5種類のプローブを用いて、サザーンブロットをおこなった。図-3(b)に見られるように、3'側プローブを用いたBamHI/EcoRI消化で、#84のクローンが予期された11.4kbのバンドが見られた。また、図-3(c)の5'側プローブでBamHI/XhoI消化でも、#84のクローンが期待される8.9kbのバンドを示した。このクローンを、38個のC57BL/6胚にに注入した。さらに、これを疑似妊娠させた雌の子宮に戻したところ、雄1匹、雌2匹のキメラマウスが得られた。

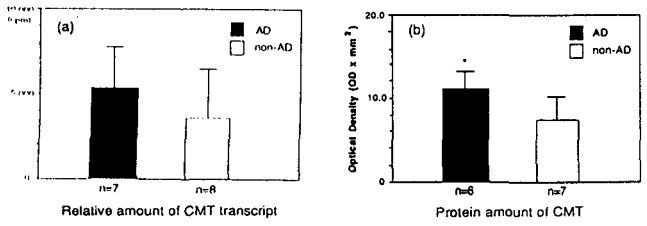


図-1. AD脳におけるCMTのmRNA(a)とタンパク量(b)

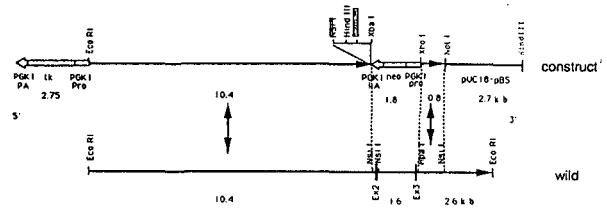


図-2. ジーンターゲティングのためのコンストラクト

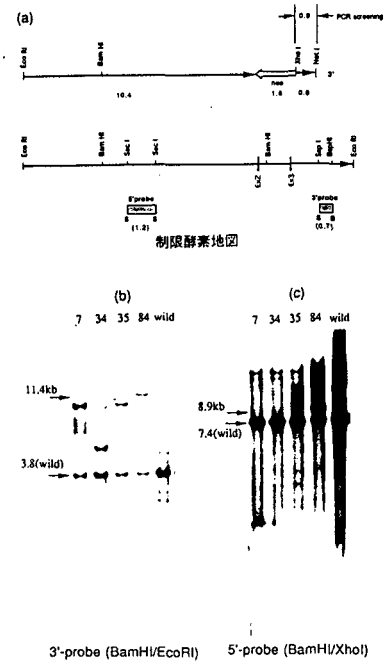


図-3. Recombinant確認のためのサザーンブロット

95 老人脳における apolipoprotein E の genotype とアルツハイマー病病変ならびに関連遺伝子発現制御

小山文隆, 井原康夫
(東京大学医学部脳研脳病理)

〔要約〕
我々は東京都老人医療センターの連続剖検例より得た老人脳についてapolipoprotein E (ApoE) genotype とその mRNA level を測定し, 同時にアルツハイマー病 (AD) 病変である老人斑 (SP)、神経原線維変化 (NFT)、およびアミロイドアンギオパチー (CAA) の形成の程度を免疫組織学的に、またβタンパク質前駆体 (APP) とタウの発現制御を生化学的に調べた。老人脳の genotype は ApoE2/3、3/3、3/4、および 4/4 で、3/3 が最も多かった。ApoE2/3 脳では AD 病変が認められなかったが、その他の genotype では認められた。ApoE3/3 脳では皮質の 55%、34%、24% にそれぞれ SP、NFT、および CAA が認められた。ApoE4/4 脳ではこれらの病変の出現頻度は高かった。他方、ApoE genotype は ApoE、APP、およびタウ mRNA レベルあるいは後者二つの differential expression に影響を与えなかった。これらの結果より ApoE4/4 は老人脳においてAD 病変の形成を促進し、ApoE2/3 は抑制するが、それは APP、タウの遺伝子発現の変化によるものでないことが分かった。

[目的] アルツハイマー病 (AD) は大脳皮質における多数の老人斑 (SP) と神経原線維変化 (NFT) の存在で特徴づけられる。また AD 脳ではアミロイドアンギオパチー (CAA) を伴うことが稀ではない。最近 apolipoprotein (Apo) E の allele ε4 が sporadic、early-、および late-onset familial AD (FAD) の risk factor であることが報告された。すなわち、これらの AD では、通常の人口に比べ、ε4 allele の頻度が有意に高い[1-5]。今回我々は、ApoE genotype あるいは mRNA level が 、1) 三つの AD 病変形成に影響を与えるか、2) AD 関連遺伝子である APP とタウの遺伝子発現に影響を与えるか、について老人脳で検討した。

[方法] 老人脳は東京都老人医療センターの連続剖検 38 例を用いた[6,7]。SP、NFT、CAA の脳における蓄積程度は免疫組織学的に、β (1-28)タンパク質抗体、タウ抗体を用いて解析した。老人脳よりグアニジンイソチオシアネート法で total RNA を調製した。ApoE の genotype は mRNA を逆転写酵素で逆転写した ApoE cDNA をPCR で増幅し、HhaI で切断して決定した。ApoE、APP、タウの遺伝子発現は nuclease S1 protection 法で解析した。

[結果] 38 の老人脳は ApoE2/3、3/3、3/4、および 4/4 にタイプ別され、3/3 が最も多かった。SP、NFT、および CAA は ApoE2/3 脳では認められなかったが (SP のみ有意差あり)、他の genotype では認められた。ApoE3/3 脳では皮質の 55%、34%、24% に SP、NFT、および CAA が認められた。ApoE4/4 脳ではこれらの病変の出現頻度が高く、genotype の中では最も高かった(SP のみ有意差あり; Fig. 1)。ApoE3/3、3/4 の脳では SP は CAA を必ずしも付随していなかったが、ApoE4/4 では付随していた。他方、ApoE genotype は ApoE、APP、およびタウ mRNA レベルあるいは後者二つの differential expression に影響を与えなかった。

[結論] ApoE4/4 は老人脳においてAD 病変の形成を促進し、ApoE2/3 は抑制するが、それは APP、タウの遺伝子発現の変化によるものでないことが分かった。

[文献]

1. Corder et al. Science 261, 921-923 (1993).
2. Rebeck et al. Neuron 11, 575-580 (1993).
3. Saunders et al. Neurology 43, 1467-1472 (1993).
4. Strittmatter et al. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 90, 1977-1981 (1993).
5. Van Duijin et al. Nature Genet. 7, 74-78 (1994).
6. Oyama et al. J. Neuropathol. Exp. Nerol. 50, 560-578 (1991).
7. Oyama et al. J.Neurochem. 60, 1658-1664 (1993).

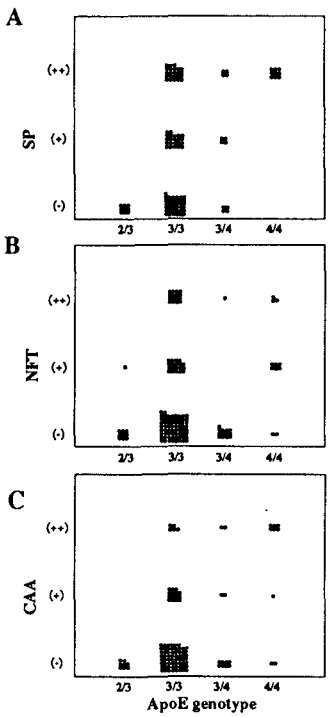


Fig. 1. ApoE genotype vs abundance of SP (A), NFT (B), and CAA (C). Each closed circle represents the degree of each lesion in a given tissue section.

96 βアミロイド過剰発現下における神経細胞代謝の変化

国下 龍英、池田 幸弥、荒木 亘、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〕

アミロイド前駆体蛋白(APP)遺伝子を導入をした新生マウス由来コリン作動性神経細胞株で、ムスカリン系アセチルコリン受容体(MuR)m1の機能の低下と不活型PKCの増加が見いだされた。この事からAPPの過剰発現が神経細胞体にシグナル伝達由来のカルシウム(Ca)代謝異常を招き、細胞の生育不全を引き起こす可能性が示唆された。

[研究目的]

脳におけるアミロイド沈着はアルツハイマー病及びダウン症候群の病理学的指標の一つであり、その沈着部位は神経細胞の脱落部位と良く相関している。更に、APP遺伝子に変異を持つ家族性アルツハイマー病やダッチ型アミロイドーシス/遺伝性脳出血の発見は、アミロイドと神経細胞死の関連を強く示唆している。しかし、なぜAPP誘導体が分化した神経細胞のみに毒性を持つのか、その時神経細胞内では何が起きているのか、ダウン症候群の様にAPPが過剰に産性された場合APP自体に神経毒性はないのか、など幾つかの点は現在不明である。本研究はこれらの点を明らかにすることを目的に、APPを過剰に産性する神経細胞株のシグナル伝達に関連した代謝について検討した。

[研究方法]

1.細胞培養：新生マウス中隔野由来コリン作動性神経細胞株SN49にマウスAPP695 cDNAを導入した細胞株SN49MA(1)と親株SN49及びベクターのみを導入したSN49PX株を10%FCS/DMEM培地で培養した。

2.細胞内Ca濃度測定：カバーガラス上に細胞を培養し、Fura-2/AMを添加した後carbacholおよびMuRアンタゴニストで刺激した。Ca濃度の変化は二波長蛍光光度計により測定した。毒素による前処理は測定18時間前に培地にそれを加えることにより行った。

3.PKC活性の測定：細胞を蛋白分解酵素阻害剤存在下細胞質画分と膜画分に分画した。膜画分は更に界面活性剤で処理した後、細胞質画分と共に和田らの方法（3）に従い活性の測定に供した。

4.G蛋白の発現：細胞膜画分の蛋白を電気泳動後、PVDF 膜に転写し、Gq,Gi,Go,Gs各サブクラスに対する抗体で免疫染色した。定量はデンシトメトリーで行った。

5,ジアシルグルセロール(DAG)濃度の測定:Preiss らの方法（2）によった。

[研究結果]

MuRへの刺激に対し一過性に生じるCa流入はSN49MAのみで優位に減少していた（図1）。Ca流入に関るMuRサブタイプは、図1に示す様にpirenzepine感受性m1と判明し、百日咳菌及びgallamine感受性m2サブタイプには本質的変化は見られなかった。MuR下流のG蛋白含

量はGoのみMAで増加し、m1サブタイプに関連するGq蛋白含量に変化はなかった。次に、m1

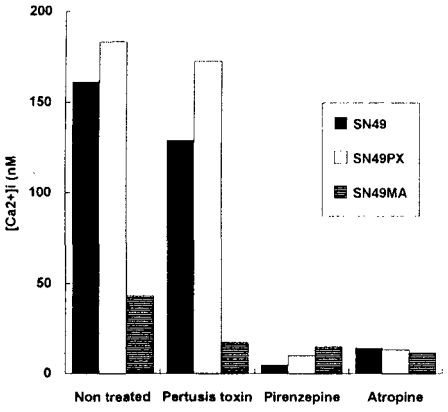


図１： カルバコール刺激によるCaの細胞内流入。

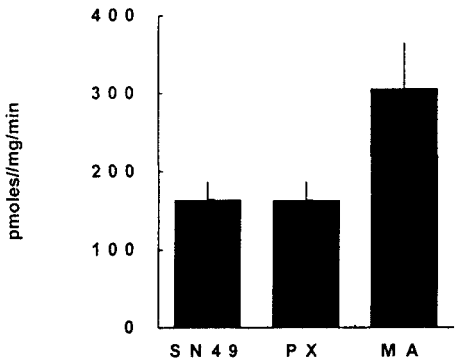


図２： 細胞質画分におけるPKC活性。

サブタイプシグナル伝達で下流に存在するPKCの活性を調べた（図２）。PKC活性はSN49MAのみで細胞質由来活性が約２倍に増加していた。しかし、膜結合型活性に変化は見られなかった。また、PKCの活性調節因子の一つであるDAG含量はSN49MAで親株の約70%に減少していたが、同様の変化はSN49PXでも見出された(SN49：2.5±0.1 nmoles/mg)。

[考察]

コリン作動性神経細胞株SN49におけるAPP過剰生産の影響は、MuRm1とその下流のCa制御シグナル伝達系に現れていることが示された。これらの伝達系に関る酵素群や因子は神経伝達物質の情報伝達だけでなく、細胞の一般代謝において重要な役割を担っている。したがって、APP過剰生産の影響は細胞代謝全体に現れるものと考えられ、最悪の場合は神経細胞が死に至ると想像される。更に、神経細胞が他種の細胞に比べてアミロイドに対して脆弱であることも、APP過剰生産の影響が神経伝達物質の受容体に顕著に現れたことと関連していると考えられる。ダウン症候群ではAPPmRNAが正常の1.5倍発現しており、アルツハイマー病においても局所的にIL１-βの増加とそれに伴うAPP産性の昂進が報告されている。したがって、本知見と同様の現象が脳内で生じている可能性が示唆された。

[謝辞]

本研究の一部はヒューマンサイエンス振興財団受託研究費、厚生省長寿科学研究費、笹川医学医療研究財団研究助成金の援助のもとに行った。

[参考文献]

1) Araki, W., Kunishita, T., Ikeda, S., Takahashi, K., and Tabira, T. (1994) *Neurosci. Lett.* 167, 125-127.

2) Preiss, J., Loomis, C. R., Bishop, E. P., Stein, R., Niedel. J. E., and Bell, R. M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8597-8600.

3) Wada, S., Tasumoto, Y., Kosano, H., Kugai, N., and Nagata, N. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1074:182-188.

97 Alzheimer病およびDown症脳分画におけるAβ免疫反応性の生化学的検討

柳澤勝彦[1]、新海泰久[1]、井原康夫[1]、尾高麻乃[2]、鈴木伸宏[2]、嶋田裕之[3]
(東京大学・医・脳研・脳病理[1]; 武田薬品・開拓一研[2]; 東京医大・病理[3])

〔要約〕
Amyloid core を豊富にもつAlzheimer 病(AD)脳と, 広範なdiffuse plaque を示しながらamyloid core を示さないDown 症 (DS) 脳の大脳皮質をショ糖密度勾配遠心法により分画し、抗 β-アミロイド蛋白 (Aβ) モノクローナル抗体を用いたWestern blot および sandwich EIAにて生化学的に解析した. AD脳においてはショ糖密度1.5/2.0M界面に強いAβ免疫反応性を認めた. DS脳においては1.0/1.2M、1.2/1.5M界面に強い反応を認める一方、1.5/2.0M界面における反応は僅かであった. AβのN末側および中間部を認識するモノクローナル抗体の反応性は、AD脳,DS脳とも軽画分においてAβのC末側を認識する抗体の反応性に比して弱かった. AβのC末側を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたWestern blot およびEIAより、脳内蓄積Aβの主成分は$Aβ_{1-42}$であることが示唆された.

(序論)

AD脳におけるAβの蓄積は、その前駆体であるamyloid precursor protein (APP)の代謝異常に基づくと考えられるが、詳細は不明である. また生理的にも産生されるAβが不溶化しamyloid形成に至る機序も不明である. 本研究においては, Aβ沈着の早期変化と考えられる diffuse plaqueを広範に示した、死亡時３６歳のDS剖検脳を対象とし、AD脳との比較のうえに、Aβの存在様式を生化学的に検討した. さらに脳内蓄積Aβの分子種に関し、AβのC末側を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて検討を加えた.

(方法)

(1)ショ糖密度勾配遠心　病理学的に診断の確定されたＡＤ１０例、広範なdiffuse plaqueを示しながらamyloid coreを示さないＤＳ１例、さらに病理学的に異常を認めない対照加齢１０例を対象とした. 髄膜、血管、白質を除去した大脳皮質を4倍容量の蛋白分解酵素阻害剤含有Tris-saline bufferを用いて、Daunce homogenizerによりホモジナイズし、540,000g, 15分遠心した. 得られた沈渣を1.0Mショ糖でホモジナイズした後, 1.2/1.5/2.0Mショ糖の上に重畳し24,000g, 2時間遠心し、不連続密度勾配を作成した. 1.0/1.2M, 1.2/1.5M, 1.5/2.0M 界面をそれぞれ採取し、生化学的に解析した.

(2)Western blot analysis　ショ糖密度勾配遠心にて得られた画分25μgをacetoneにて脱脂後、2%SDS, 8M urea含有Laemmli bufferに溶解し、tricine-SDS polyacrylamide gelにて電気泳動した. PVDF膜に転写後、抗Aβモノクローナル抗体 (BAN-50; 抗Aβ1–16, BA–27; 抗Aβ1–40, BC-05; 抗Aβ35–43, 6C6; 抗Aβ1–16, 4G8;抗Aβ17-24) を用いてenhanced chemiluminescence system (Amersham)にて検出した.

(3)Sandwich EIA　BAN-50 を第一抗体として固相化し, HRP標識のBC-05あるいはBA-27を第二抗体としたsandwich EIA systemを用いた. 各画分を 100% formic acidで処理し抽出されたAβを定量した.

(結果および考察)

AD脳においてはショ糖密度1.5/2.0M界面に最も強いAβ免疫反応性を認めた. 一方、DS脳におけるAβの免疫反応性は1.0/1.2Mおよび1.2/1.5M界面において認め、1.5/2.0M界面においては明らかでなかった (Fig.1). AD脳およびDS脳の両者において1.0/1.2Mおよび1.2/1.5M界面におけるBAN-50および4G8の反応性は、BC-05の反応性に比して著しく弱かった(Fig. 1,2). AD脳およびDS脳の両者においてBA-27の反応性は明らかではなかった(Fig.2). AD脳1.5/2.0M界面およびDS脳1.0/1.2M界面におけるsandwich EIAによるAβ定量の結果、$Aβ_{1-42}$はそれぞれ52 および 17 pmole/mg proteinであった. 一方、$Aβ_{1-40}$は前者においては1.5 pmole/mg proteinであったが、後者においては検出されなかった(Fig. 3). BA-27, BC-05はそれぞれ$Aβ_{1-40}$, $Aβ_{1-42}$のC末端を特異的に認識することが報告されており (1,2), 今回の実験結果から脳内に蓄積するAβは, ADの病期に関係なく$Aβ_{1-42}$が主体であることが示唆された. またADの早期病変を示したDS脳に関する実験結果から, Aβは初期において密度の低いpreamyloidとして蓄積し、次第に密度を増しamyloid coreへと成長していくことが推察された.

（文献）
1. Suzuki N. et al .Am J Pathol (in press)
2. Suzuki N. et al. Science 264,1336-1340,1994



Fig.1
Western blot of the sucrose gradient fractions immunolabeled with BC-05 or BAN-50. Ho: homogenate of the cerebral cortex, Sp: supernatant obtaind by the centrifugation, F1, F2, F3: 1.0/1.2M, 1.2/1.5M, 1.5/2.0M interfaces, respectively.
AD: Alzheimer 's disease, DS: Down's syndrome

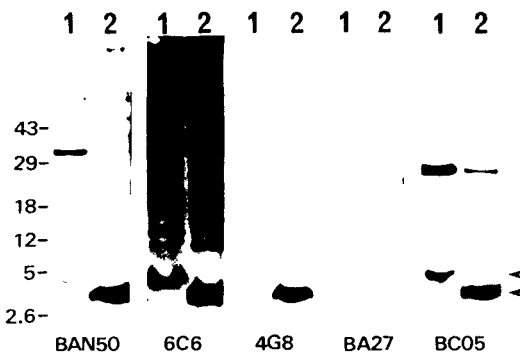


Fig.2
Western blot of the proteins from DS 1.0/1.2M interface (1) and AD 1.5/2.0M interface (2). The blots were immunolabeled with Aβ monoclonal antibodies.

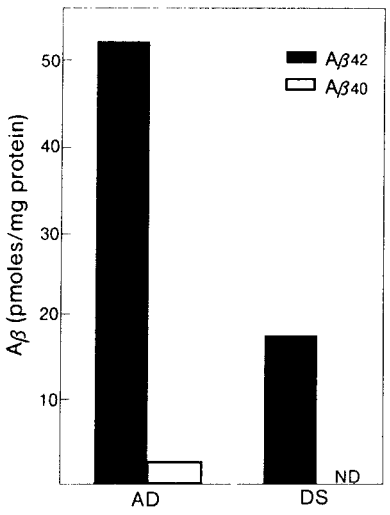


Fig. 3
Quantitation of Aβ in AD 1.5/2.0M and DS 1.0/1.2M interfaces by sandwich EIA. (ND; not detected)

98 頭蓋内外血管可溶性画分におけるβアミロイド蛋白の定量

〔著者〕 新海泰久[1]、柳澤勝彦[1]、井原康夫[1]、尾高麻乃[2]、鈴木伸宏[2]、吉村正博[3]
〔所属〕 （東京大・医・脳研・脳病理[1]、武田薬品工業・開拓一研[2]、東京都監察医務院・病理[3]）

〔要約〕 ヒト脳髄膜、頭蓋内外血管可溶性画分におけるβ-アミロイド蛋白(Aβ)、Aβ1-40およびAβ1-42、をtwo-site enzyme immunoassay(EIA)により定量し、以下の結果を得た。
1.頭蓋内血管、髄膜、脳底動脈および中大脳動脈においてAβを検出した。2.頭蓋外血管、内頸動脈および大動脈におけるAβ量は検出感度以下ないしは、痕跡程度であった。3.Aβ1-40,Aβ1-42の量はほぼ等しかった。今回の実験結果より、Aβは頭蓋内血管にのみ検出され、これはアミロイド・アンギオパチー(CAA)の選択性の基礎である可能性が示唆された。

[序論]
Aβの沈着はアルツハイマー病(AD)の主要な病理学的特徴の一つであるが、生理的にも産生されるAβが蓄積され、アミロイドへ成長していく過程は不明である。本研究においては、Aβ沈着の一つの様式であるCAAに焦点をあて、頭蓋内外の血管および髄膜を対象にAβの定量的解析を行った。

[方法]
(1)実験対象：20歳代から90歳代までの剖検により得られたヒト脳髄膜(後頭葉)、脳底動脈、中大脳動脈、頭蓋外内頸動脈、大動脈を対象とした。
(2)試料調製：湿重量約50mgの各組織を9倍容量の50mM Tris-saline buffer (pH7.6; 1mM EGTA, 0.5mM DIFP, 0.5mM PMSF, 1μg/ml TLCK, 1μg/ml antipain, 0.1μg/ml pepstatin, 1μg/ml leupeptinを含む)を用いてTeflon/glass homogenizerにてホモジナイズした。100,000gで15分間遠心し、上清をbuffer EC (20mM phosphate buffer, pH7.0, 0.4M NaCl, 2mM EDTA, 10% Block Ace, 0.2% bovine serum albumin, 0.05% NaN_3, 0.075% CHAPS)にて5倍希釈しEIAに供した。
(3)two-site EIA: Suzukiらの方法(1)に従い、抗Aβモノクローナル抗体、BAN-50(抗Aβ1-16)、BA-27(抗Aβ1-40)、BC-05(抗Aβ35-43)を用いた。BAN-50を第一抗体としてマイクロプレート(Nunc社)に固相化し、試料あるいはスタンダードを加えた後、horseradish peroxidase標識のBA-27,BC-05を第二抗体として反応させた。スタンダードとして、合成Aβ(Bachem社)を使用した。最後にTMB microwell peroxidase system (Kirkegaard & Perry Labs.)で発色させ、450nmの吸光度を測定した。

[結果]
1.頭蓋内血管および髄膜において、Aβを検出した(Fig.1-2)。
2.頭蓋外内頸動脈、大動脈におけるAβ量は検出感度以下(<0.08pmol/g wet weight)ないしは、痕跡程度であった(Fig.3)。
3.Aβ1-40, Aβ1-42の量はほぼ等しかった。

[考察]
CAAは頭蓋内髄膜、大脳皮質の主に小動脈に認められる病変である。今回の実験結果はAβの血管内蓄積が頭蓋内血管に選択的に生じていることを示唆した。頭蓋内外の血管系における差異をもたらす理由は不明であるが、Aβ産生源や血管によるAβの捕捉の観点から頭蓋内環境の特殊性を考慮する必要がある。最近RoherらはAD脳髄膜血管においてAβ1-42:Aβ1-40が58:42であることを報告した(2)。本研究においてもこれらのAβ分子種の量はほぼ等しく、これまで報告された脳実質内アミロイドのAβ1-42の優位性(3)と比較すると、血管内におけるAβ蓄積の特異性が推察された。

[文献]
1. N. Suzuki et al., Am. J. Pathol. in press
2. A. E. Roher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10836-10840(1993)
3. A. E. Roher et al., J. Biol. Chem. 268, 3072-3083(1993)

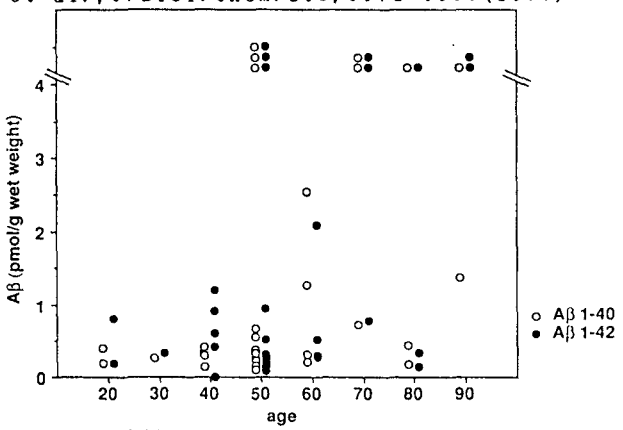


Fig.1 MENINGES

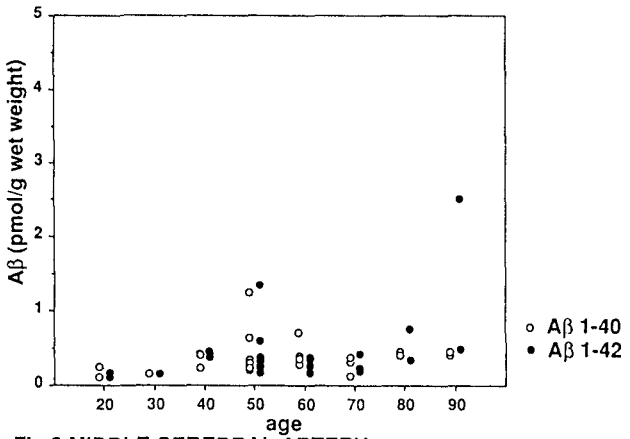


Fig.2 MIDDLE CEREBRAL ARTERY

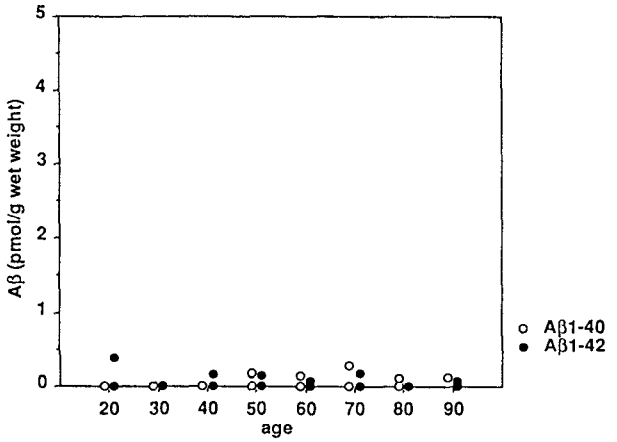


Fig3. Aorta

99 アミロイドβタンパクのC末端特異的酵素免疫測定法

尾高麻乃、石橋祥弘、菊池崇、北田千恵子、鈴木伸宏
（武田薬品工業(株)・開拓第一研究所）

〔要約〕

アミノ酸39-43残基からなるアミロイドβタンパク(Aβ)の物理化学的性質や沈着様式は、C末端側アミノ酸数残基の長さの違いによって大きく異なることが報告されている。われわれは、Val^{40}をC末端とする短鎖型の分子種およびAla^{42}をC末端とする長鎖型の分子種がADにおいて果たす役割を明らかにすることを目的として、$Aβ_{1-40}$および$Aβ_{1-42(43)}$のC末端部をそれぞれ特異的に認識するモノクローナル抗体BA27およびBC05を樹立した。次いで、これらの抗体とAβのN末端を認識する抗体BAN50とを組み合わせることにより、$Aβ_{1-40}$と$Aβ_{1-42(43)}$との分別定量が可能な高感度の酵素免疫測定法(ELISA)を確立した。また、逆相HPLC、ELISAおよびMSを用いて、ヒト神経芽細胞腫IMR-32株の培養上清中のAβを分離同定した結果、IMR-32株は他の培養細胞に比べて大量の$Aβ_{1-40}$を産生するとともに、わずかながら$Aβ_{1-42}$をも産生していることがわかった。Aβの産生制御機構および蓄積機構の解明は、ADの発症とAβとの関係を考える上で注目すべき重要な課題のひとつであり、われわれの確立したAβのC末端特異的ELISAはそのための有用なツールになると期待できる。

【目的】 Aβの物理化学的性質や沈着様式はC末端側アミノ酸数残基の長さの違いによって大きく異なることが報告されている(1)。本研究では、ADの発症とAβとの関係を探るべく、$Aβ_{1-40}$および$Aβ_{1-42(43)}$に特異的な酵素免疫測定法(ELISA)を構築した。さらに、これらを用いて培養細胞の産生するAβについて検討を行った。

【方法】 $Aβ_{1-16}$、$Aβ_{1-40}$、$Aβ_{35-43}$、および$Aβ_{25-35}$とウシサイログロブリンとの複合体を免疫原として、マウスモノクローナル抗体BAN50、BA27、BC05、およびBS85をそれぞれ作製し、ELISAに用いた(3,4; 図1)。ヒト神経芽細胞腫IMR-32株はnon-essential amino acids (NEAA) および10% FCSを含むEagle's MEM培地を用いて、37℃、5% CO_2存在下で培養した。培養上清中のAβを精製する目的で、細胞をconfluentにまで培養したのち、NEAAおよび5%FCSを含むEagle's MEM培地（1L）に置換後2日間培養し、上清を採取した。この培養上清から、BAN50を固定した抗体カラムを用いるaffinity chromatographyによりAβを部分精製し、さらにこれをTSKG3000PWカラム（東ソー）を用いるゲルろ過HPLCにより分画した。ELISAにより同定したゲルろ過のAβ陽性画分をVydac C4カラム(The Separations Group社) を用いる逆相HPLCにより分画し、得られた画分について、ELISAおよびLSIMS (liquid secondary ion mass spectrometry) 測定 (JEOL JMS-HX110HF) を行った。

【結果】 AβのN末端部に対する抗体BAN50を一次抗体として96穴マイクロプレートに固定し、AβのC末端認識抗体 BA27, BC05, およびBS85のそれぞれを西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）で標識したものを二次抗体として、互いに特異性の異なる3種類の高感度なサンドイッチELISAを構築した（表1）。BA27は$Aβ_{1-42}$と1.3%の交差反応性を示したが$Aβ_{1-40}$にかなり特異性が高く、一方の

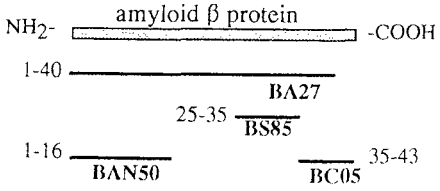


図1　Aβと各抗体の免疫原

表1　サンドイッチELISAの特異性

一次抗体	二次抗体	Reactivities for synthetic Aβ (%)* 1-38	1-39	1-40	1-42
BAN50	BA27	0.7	1.7	100	1.3
	BC05	0	0	0	100
	BS85	100	100	100	100

* BA27, BS85についてはAβ1-40に対する反応性を100とした場合の、BC05についてはAβ1-42に対する反応性を100とした場合の交差反応性を示した。

BC05は、Aβ1-42(43)に極めて特異的でAβ1-40とは交差しなかった。したがって、これらの測定系を組み合わせることにより、Aβ1-40とAβ1-42(43)との分別定量が可能であることがわかった。次に、ヒト神経芽細胞腫IMR-32株の産生するAβ分子種を同定するため、逆相HPLC画分中のAβをELISAにより定量し（図2）、それぞれの免疫活性画分を濃縮してLSIMSを測定した。その結果、BA27活性画分からは主としてAβ1-40を、BC05活性画分からは微量ながらAβ1-42を検出した。

【考察】　われわれが確立したAβのC末端部に特異的な高感度のELISAは、Aβ1-40とAβ1-42(43)との分別定量が可能であるという点で特徴的である。また、これらの測定系を応用することにより、IMR-32株は未分化の状態でも、大量のAβ1-40とともに、わずかながらAβ1-42をも産生することを確認した。脳の免疫組織染色(2)や家族性アルツハイマー病関連遺伝子座のひとつであるAPP717位の変異遺伝子導入細胞株の培養系(3)において、われわれの抗体を用いた研究により、アミロイド沈着やADの発症における長鎖型Aβの重要性がさらに示唆されている。したがって、minor speciesであるAβ1-42の産生制御機構および沈着機構の解明は、AβとADの発症との関係を探る上で注目すべき課題のひとつであると考えられ、本ELISAはその課題解決のためのツールとして役立つものと期待できる。

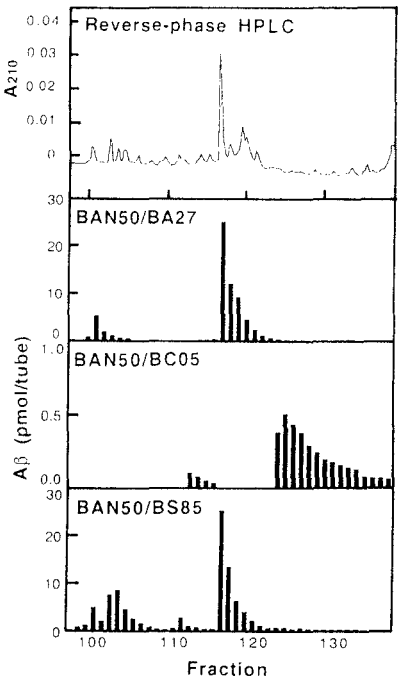


図2　IMR-32株培養上清由来Aβの逆相HPLCによる分画とELISAによるAβの定量

【参考文献】

1. Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. Jr. (1993) *Biochemistry* 32, 4693-4697.
2. Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. *Neuron*, in press.
3. Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.-D., Odaka, A., Otvos L. Jr., Eckman, C., Golde, T.E., and Younkin, S.G. (1994) *Science* 264, 1336-1340.
4. Suzuki, N., Iwatsubo, T., Odaka, A., Ishibashi, Y., Kitada, C., and Ihara, Y. *Am. J. Pathol.*, in press.

100　特異抗体による髄液中HCNPの測定法の検討とその応用

継　泰城、小鹿幸生、松川則之、岩瀬　環、大塚康史、三竹重久、片田栄一
（名古屋市立大学第二内科）

〔要約〕

ヒト髄液中のHippocampal cholinergic neurostimulating peptide(HCNP)を、抗HCNP抗体にてradioimmunoassay法により測定することが可能であった。各種の神経疾患における髄液中HCNP量は痴呆性疾患で非痴呆性疾患に比べ有意に高値を示した。

〔はじめに〕

中隔核－海馬系コリン作動性ニューロンは記憶関連経路として重要視されている。小鹿らは、海馬からコリン作動性ニューロンの分化・発育に作用する新規ペプチド（HCNP）を精製し、その構造を決定した[1]。精製されたHCNPは、N末端がアセチル化された11個のアミノ酸からなるペプチドで、ヒトHCNPのcDNA解析から23kDaの前駆体蛋白に由来する[2]。抗HCNP抗体を用いて、ヒト髄液中のHCNPをradioimmunoassay（RIA）法により測定し、さらに、痴呆性疾患との関連について検討した。

〔対象および方法〕

(1)free-HCNP（synthesized de-acetylated HCNP）のヨウ素(^{125}I)標識はBolton-Hunter法を用いた。Bolton-Hunter試薬(BHR) 17.1pmolにfree-HCNP 2.05nmol/31μlを加え、4℃で4時間反応させた。その後、glycine 250μmol/500μlを加え、4℃で1時間ブロッキングした。Sep-pack C_{18} cartridgeを用い、25%MeCN＋0.05%TFAで未反応のBHRを分離除去後、50%MeCN＋0.05%TFAで抽出した。0.25%gelatinを含む緩衝液を加え、最終20mlとし4℃で保存した。

(2)特異抗体はfree-HCNPをKLHに結合し、家兎を免疫し得られた抗血清を用いた。55℃、30分間非活性化した血清 2mlを、free-HCNP結合 Sepharose 4B columnで抗HCNP抗体(IgG)をaffinity精製した。精製抗体はcentricon-50を用いて0.2mlにまで遠心濃縮し、PBS 1.8mlを加え、-40℃で凍結保存した。

(3)ＲＩＡ法：sample 100μl、希釈[^{125}I]free-HCNP 50μl(≒3500cpm)および20倍希釈の抗HCNP抗体 20μlを加え、4℃で反応させた。二次抗体には Amerlex-M IgG(Amersham) 0.4mlを用い30℃、30分間反応させ、遠心上清を除去し、放射活性を測定した。

(a)RIA法における特異性の検討：各種濃度のfree-HCNPまたはHCNP(0.03pmol～250pmol/100μl)とHCNP前駆体蛋白（100pmol、500pmol、3nmol/100μl）をsampleとして用いた。

(b)髄液の前処理と反応条件の検討（internal standerd 添加）：6.5%BSA 50μlを含む髄液1300μlと、それにinternal standerd（ISTD）としてfree-HCNP 7.81pmolを添加した髄液を凍結乾燥し、0.25%BSAを含む緩衝液(50mM Tris-HCl＋1mM EDTA pH7.8) 250μlで再溶解し、100μlをsampleに用いた（髄液は５倍に濃縮、ISTDは 3.12pmol/100μl）。また、一次抗体

との反応時間を24、48、72時間(hr)に変え検討した。

(c)測定の再現性の検討：同一髄液を3回測定した。

(4)各種神経疾患134例（痴呆性疾患21例；平均年齢62.8±11.2歳、男11例と女10例、非痴呆性疾患113例：平均年齢45.6±17.1歳、男61例と女52例）で髄液中HCNP量の定量を実施した。

〔結果〕

RIA法における[^{125}I]free-HCNPの放射活性はfree-HCNPにより、図1のように抑制されたが、100 pmol、500pmol、3nmol/100μlのHCNP前駆体蛋白では87.1%、84.6%、93.1%と抑制を受けなかったことから、今回用いたRIA法ではHCNP前駆体蛋白は測定できず、HCNPが特異的に測定できることが判明した。髄液2検体にBSAを添加、濃縮して測定した髄液中HCNP量は1.8pmol、2.1pmol/100μlで、ISTDとして3.12pmolのfree-HCNP添加した際の総HCNP量はそれぞれ5.6pmol、5.4pmol/100μlと髄液濃縮処理によるHCNPの喪失は少ないことが判明した。また、一次抗体添加後、反応産物量は48hrまでは漸増傾向を、それ以上の反応時間では減少を示した。時を異にして測定した髄液2検体の3回の平均はそれぞれ0.47±0.06、0.41±0.02pmol/100μlと良好の再現性を示した。以上より髄液中のHCNP量の測定には、①髄液にBSAを添加し、凍結乾燥操作により5倍に濃縮し、②一次抗体添加後の反応時間は24時間とした。本法を用いて髄液中のHCNP量を多数例で測定してみると、非痴呆性疾患の0.87±0.24pmol/μlに比較し、痴呆性疾患では1.29±0.46pmol/100μlと有意に（P<0.001）高値を示した（図2）。

図1

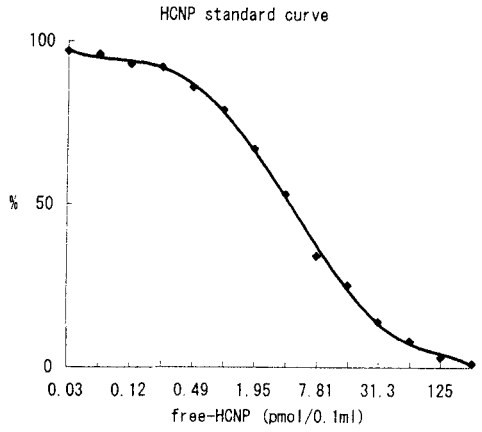
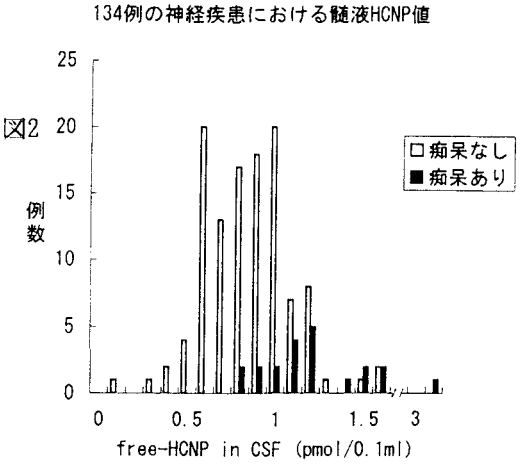


図2



〔考察〕

今回用いた抗HCNP抗体はWestern blotでHCNP前駆体蛋白を認識するが[3]、RIA法では前駆体蛋白は測定できず、HCNPまたはfree-HCNPと反応を示した。RIA法によるヒト髄液中HCNP量の測定法を確立し、各種神経疾患で検討したところ、痴呆性疾患の髄液中HCNP量は非痴呆性疾患に比べ高値を示した。髄液中HCNP量と、記憶に関与する臨床症状との関連が示唆され、今後、さらに詳細に検討する必要があると考えられた。

〔文献〕1) K.Ojika,et al.(1992) Brain Research,572;164-171

2) 東藤直樹　他（1992）神経化学,31;258-259

3) 三竹重久　他（1992）神経化学,31;88-89

101 D-Ser 含有β-amyloidによるコハク酸脱水素酵素の特異的低下作用および海馬神経細胞変性作用について

山田紀子、桜庭祐子、熊谷善弘、金子 勲
（三共株式会社・神経科学研究所、第一生物研究所）

〔要約〕
β1-40, β25-35 及び[D-Ser^{26}] β25-35 は解糖系エネルギー に依存するHeLa細胞に対しては細胞毒性を発揮することなく電子伝達系のKey enzymeのsuccinate dehydrogenase(SDH)活性(MTT還元能)を特異的に抑制し、ミトコンドリア 内のMTT formazanの形成を阻害した。一方、これらのβ-amyloidは呼吸系に依存する海馬神経細胞には細胞毒性を発揮した。このことはβ-amyloidの作用点(primary target)がミトコンドリア のSDH の抑制であることを支持する。D 型アミノ酸置換β-amyloidの中では、[D-Ser^{26}] β25-35 が最もSDH 抑制活性が強く(IC50=10-20 nM) 、[D-Asn^{27}] β25-35 及び[D-Asp^{27}] β25-35 等は弱かった。β-amyloidによるSDH の抑制はcycloheximid, actinomycin D 及びPTX 処理で阻害されず、de novo のタンパク合成及びPTX 感受性G タンパクはβ-amyloidのSDH 抑制のシグナル伝達には関与していないものと推定した。

[目的] 前回、我々はβ-amyloidの各種培養細胞株及び海馬神経細胞に及ぼす影響を調べた結果、1)β-amyloidのprimary targetはmitochondria電子伝達系のkey enzymeであるsuccinate dehydrogenase(SDH)の特異的抑制であり、2)その抑制活性発現にはβ-amyloidの高次構造(β構造)が必須である、3)細胞の生死はそのエネルギー産生(解糖 or 呼吸) 系に依存する、4)[D-Ser^{26}] β25-35 は脳内のプロテアーゼに抵抗性があることを示唆した[1, 2]。今回、β1-40及びβ25-35 のSDH 活性抑制のメカニズムについて研究すると共に、D-Ser, D-Asp, D-Asn 等を含むβ-amyloidを合成し、それらのSDH 活性抑制作用、高次構造及びラット海馬神経細胞に対する影響について調べた。

[方法] 1)ペプチド合成: β-amyloid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、0.1% TFA-CH_3CN中でC18 逆相HPLCで単離・精製した。2)細胞培養: HeLa細胞は10% 非働化 FBSを含むMEM 中で培養した。PC12細胞は非働化10% 馬血清・5%FBS を含むDMEM中で継代し、アッセイ時に3% FBS/DMEM 培地或いは10%GIT/DMEM 培地で96穴plate で培養した。ラット胎仔海馬神経細胞はYankner らの方法[3]に準じた。3)細胞生存度評価法: MTT 還元能測定法及びCell counting kit(WST-1 + 1-methoxy PMS)(同仁科学) は常法に従った。ラット胎仔海馬神経細胞の場合はMAP2染色陽性の海馬神経細胞数を計測した。各種β-amyloid類は特に記載しない限り、超音波処理で培地に溶解後、希釈し細胞に添加した。

[結果と考察]

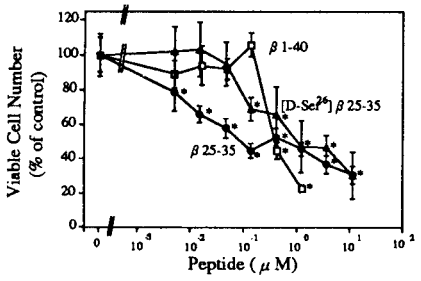
1)β25-35 によるSDH 活性抑制の特徴: 10% FBS/MEMで培養したHeLa細胞にβ25-35 を添加し、そのSDH 活性(MTT還元能) の変化を経時的に調べた結果、添加直後にはSDH 活性は低下しないが、6 時間後に有意な低下がみられ、24-48 時間後には最大の低下が認められた(細胞毒性なし) 。このことはβ25-35 の作用発現には何らかの細胞の情報伝達が関与することを示唆する。そこで、β25-35 と同時にcycloheximid及びActinomycin D を添加し、24時間後のSDH 活性抑制作用を調べたが、β25-35 による抑制作用を阻害することはなかった。また、百日咳毒素(PTX) を前処理してもβ-amyloidによる作用に影響を与えなかった。従って、de novo の蛋白質・RNA 合成及びPTX 感受性のG タンパクは

β-amyloidによるSDH活性抑制作用のシグナル伝達には関与していないものと推定された。一方、PC12細胞の場合、血清存在下(3%FBS)ではβ25-35添加後、48-72時間で最大の抑制作用がみられるが、血清無添加(10%GIT)では添加6時間で抑制がみられるものの、その後抑制作用は経時的に減弱した。PC12細胞が放出するプロテアーゼにより分解されるものと考えられる。

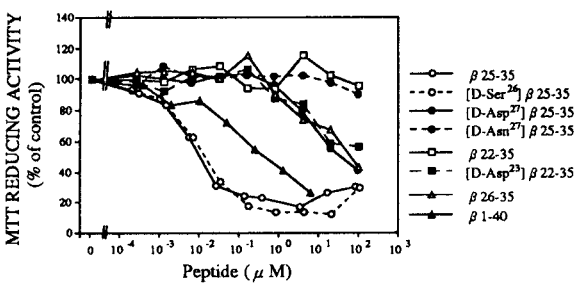
2) β-amyloidによるミトコンドリア内での不溶性MTT formazanの形成阻害: コントロールのHeLa細胞にMTTを添加し、顕微鏡下で観察すると、還元された不溶性MTT formazanがミトコンドリア内に蓄積したが、β25-35、β1-40及び[D-Ser^{26}] β25-35存在下では、その蓄積が認められなかった。このことはβ-amyloidの作用部位がミトコンドリアのSDHの抑制であることを支持する。

3) 各種D-型アミノ酸含有β-amyloidによるSDH抑制活性: アルツハイマー病患者の脳にはD-Asp(11%)及びD-Ser(6.2%)が存在することが報告されている。そこで、D-Asn, D-Asp及びD-Serなどを含むβ-amyloidのSDH活性抑制活性をHeLa細胞を用いて調べた。その結果、[D-Ser^{26}] β25-35はβ25-35と同等もしくはそれ以上に強いSDH抑制活性(IC50=10-20 nM)をもつが、[D-Asn^{27}] β25-35、[D-Asp^{23}] β22-35及びβ22-35、N末のGlyが欠けたβ26-35は抑制活性を殆ど持たなかった。一方、[D-Asp^{27}] β25-35は弱いながら抑制活性が認められた(IC50 = 10 μM)。

4) β1-40、β25-35及び[D-Ser^{26}] β25-35によるラット胎仔海馬神経細胞の変性作用: SDH抑制活性の強いβ25-35、[D-Ser^{26}] β25-35及びβ1-40をYankner らの方法に準じて、ラット胎仔海馬神経細胞培養系(96穴plate)に添加し、培養後(24時間)、MAP2免疫染色を行い、生存海馬神経細胞を計測した結果、いずれのβ-amyloidも濃度依存的に生存海馬神経細胞数を減少させ、50%阻害濃度は100-800 nM程度であった。本条件下で、MTTを添加するとコントロールの神経細胞にみられるミトコンドリア内の不溶性formazanはβ-amyloidを添加した神経細胞には殆ど観察されなかった。以上のことは、β1-40、β25-35のみならず脳内のプロテアーゼに抵抗性のあるD-Ser置換β-amyloidが、電子伝達系(complex II)及びTCA cycleのKey enzymeであるSDHの活性を抑制することにより、脳神経細胞を障害する可能性を示唆する。



βアミロイドの
海馬神経細胞の生存に対する作用



D-アミノ酸置換βアミロイドの
MTT還元能に対する作用 (HeLa細胞)

[文献]
(1) 亀之園正弘, 他 (1993) 神経化学, 32, 108 (2) 金子勲, 他 (1993) 神経化学, 32, 148
(3) Yankner, B. A. et al. (1990) Science, 250, 279

102 βアミロイドA4ペプチドのイムノアッセイ系と髄液および脳抽出液中で検出される免疫活性について

藤兼房、長谷川かおり、伊東秀記、稲熊　裕、大野紘宇[1]、山本良平[2]
（愛知県コロニー・研・生化、[1](株)カイノス、[2]クラボウ技研）

〔要約〕
βA4ペプチド(App597-636、A1-40）およびその前半（A1-20）と後半（A21-40）部分に対する抗血清をウサギで作製し、A1-40結合セファロースカラムでそれぞれの特異抗体を精製した。精製抗体はそれぞれA1-40と反応したが、β蛋白質前駆体(App）とは反応しなかった。抗A1-40で脳切片を染色すると、βA4が沈着していると思われる部分が染色された。三種類の抗体を組み合わせてサンドイッチＥＩＡ系を調製すると、抗A1-40をポリスチレン球に不溶化させ、抗A21-40をガラクトシダーゼ標識した系が最も高感度で、100 pg 以上のβA4 が検出測定でき、髄液(CSF)および脳抽出液中にはこの測定系に反応する約50 kDaの蛋白質が存在した。

アルツハイマー病患者の脳に沈着するβアミロイドA4ペプチド（以下A4）が種々の細胞株で産生され培地中に分泌されること、また、ヒトの髄液や血中でも検出されることが報告されている（1,2）。しかし、その生理的意義については不明である。上記の報告を確認するために、A4の特異抗体を用いた高感度測定系を確立した。CSFおよび脳抽出液で測定した結果と、この系で測定される抗原について検討した結果を報告する。

【方法と材料】

ペプチド抗原および抗体：A1-40、A21-40、およびA1-20+Ile-Cys（図１）を合成し、前二者はグルタールアルデヒドで、後者はマレイミド結合試薬を用いて、それぞれヘモシアニンとの結合物を作製し、免疫原とした。抗血清のIgG分画をA1-40結合セファロースカラムにかけ,カラムを1 M NaCl を含む緩衝液(pH 7)で洗った後、カラムに結合している抗体を溶出した。また、コントロールとして市販のウサギ抗A4抗体（ベーリンガー）も使用した。

イムノアッセイ系：ポリスチレン球を抗体不溶化固相に、ガラクトシダーゼ（大腸菌）を抗体標識酵素として使うサンドイッチEIA系を作製した。

Western blotting：SDS-PAGE後に泳動蛋白質をニトロセルロース膜に転写し、4% BSA溶液でブロック後に一次抗体（３時間）ついでHRP標識二次抗体（２時間）と反応させ、ケミルミネセンス法 (Runaissance, Dupon, NEN)で発色させた。

【結果】

図２に三種類の抗体を組み合わせた（固相抗体/酵素標識抗体）測定系の標準曲線を示した。固相に抗A1-40、標識抗体としてA21-40を使った系がもっとも高感度で、100 pg/tube以上のA4が測定できた。この測定系に100 ngのA1-21あるいはA21-40 を共存させると標準曲線の上昇が著しく抑えられ、測定系の特異性を確認できた。CSFおよび脳抽出液中のA4免疫活性は検体量に比例して増加測定され、体液、組織液中のA4が定量できることが分かった。ヒトCSF中のA4活性は、3 ng/ml 以上で、ほとんどが 10 ng/ml以下であった。しかし、100 ng/ml を越える検体もあった。剖検時に得られた大脳灰白質の可溶

性画分の凍結検体を測定した結果を図３に示した。アルツハイマー患者(AD)および対照患者(CN)の側頭葉(Temp) および前頭葉(Front) の抽出液すべてで検出され、ほとんどが 5 ng/mg protein 以下であった。しかし、2-3の症例でAD、CNともには高い値を示した。脳およびCSF 中で測定される抗原を確かめるためにそれぞれのWestern blotting を行った。抗A1-40で染色した結果を図４に示した。すべての検体で約50 kDaのバンドが染色された。他の２種類の抗体および市販の抗A4抗体でも同じバンドが染色された。なお、抗A1-40を用いたAD患者脳切片の免疫組織化学染色ではアミロイド沈着部位が染色された。

【考察】

抗体あるいは測定系で認識されている50 kDaの抗原はAppの断片である可能性が高いが、これを確認するために、抗体カラムを使って脳抽出液よりこの蛋白質を精製し、そのアミノ酸配列を解析することを検討している。しかし、今回の結果と既報の結果(1,2)との違いに関しての理由は今のところ分からない。

本研究は 橋詰良夫 博士（愛知医大 加齢研)の協力を得て行われた。

【文献】

1 Haass, C., et al. (1992) Nature, 359, 322-325

2 Seubert, P., et al. (1992) Nature, 359, 325-327

Fig. 1

Amino acid sequences of peptide prepared as antigens

1) A_{1-20} + IC
DAEFRHDSGY EVHHQKLVFFIC

2) A_{21-40}
AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV

3) A_{1-40}
DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV

Fig. 2

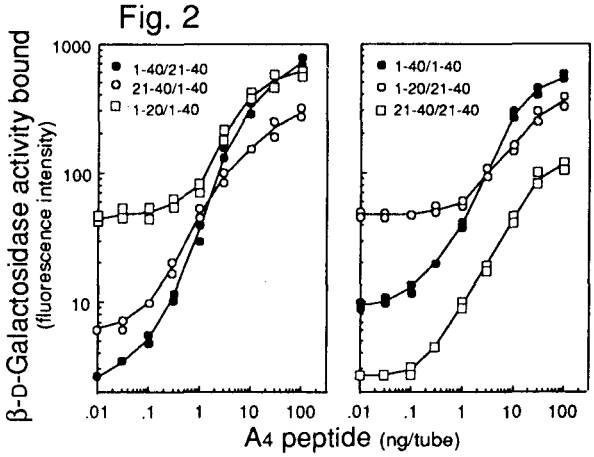


Fig. 3

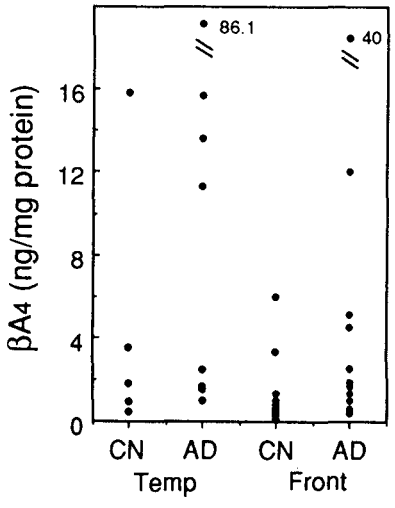
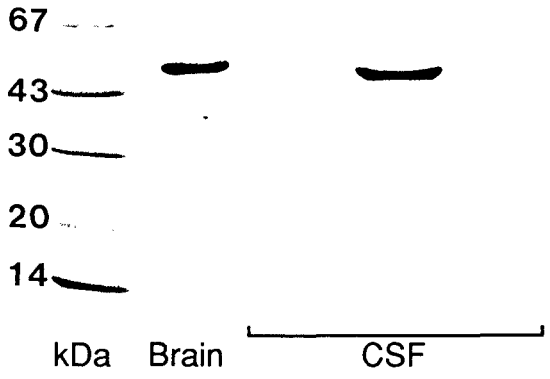


Fig. 4



103　ＰＨＦタウの異常リン酸化部位の同定

長谷川成人[1]、森島真帆[1]、瀧尾擴士[2]、鈴木政美[3]、吉田裕孝[1]、千谷晃一[3]、井原康夫[1]
[1]東京大学脳研病理、[2]理化学研究所生体分子解析、[3]藤田保健衛生大学総医研

〔要約〕

アルツハイマー病脳に出現する異常線維構造物ＰＨＦは異常にリン酸化されたタウ（PHFタウ）を基本骨格としている[1)]。PHFタウのこれまで未同定であったtau 1およびＣ末端領域の異常リン酸化部位をイオンスプレー質量分析とアミノ酸配列分析により同定した。その結果、Ser/Thr-Proモチーフをもつ１０個所、そうでない９個所のセリン又はトレオニン残基のリン酸化部位を確認した。リン酸化部位はSer262を除いて微小管結合領域をはさんだ両側に位置していた。また、１９個所の内、８個所は胎児型タウに検出されないリン酸化部位であった。これらの非胎児型のリン酸化がタウの不溶化に関係している可能性がある。

アルツハイマー病（ＡＤ）では微小管結合蛋白の一種であるタウが異常にリン酸化されたかたちでＰＨＦという線維構造をとり、神経細胞内に蓄積している。しかしながらその異常リン酸化の意味、タウの不溶化のメカニズムは不明である。われわれは、ＡＤ脳からＰＨＦの基本骨格をなすPHFタウを高度に精製し、正常のタウとの詳細な比較において３箇所の異常リン酸化部位（Ser-262, Thr-231, Ser-235）と２箇所の異常リン酸化領域（tau 1およびＣ末端領域）を同定した[2)]。PHFタウのリン酸化が胎児型タウのリン酸化によく似ていることから、生後１日齢のラットタウを用いて胎児型タウのリン酸化部位を同定した（ヒトタウで、Ser-198, -199, -202, -235, -396, -400, -404, 及びThr-181, -217, -231に相当する部位）[3)]。PHFタウと胎児型タウはリン酸化依存性抗体との反応性という点でよく似ているが、微小管重合促進活性等の性質は異なっている[4)]。本研究ではこれまで分析困難であったPHFタウのtau1領域とＣ末端領域を蛋白質化学的に解析し、PHFタウに特異的なリン酸化部位を同定することを試みた。

[方法]

PHFタウは、ＡＤ脳のサルコシル不溶性画分をグアニジン塩酸で抽出し、ゲル濾過、逆相HPLCにより精製した。tau 1およびＣ末端領域のペプチドは、PHFタウの *Achromobacter lyticus* protease 1(AP1)消化物より、逆相HPLCで分離した。精製ペプチドはさらに固定化トリプシン、Asp-Nを用いて小断片化し、逆相HPLCで分離した。この際、胎児型タウを同様に処理し、逆相HPLCでのピークの溶出位置、形、大きさを比較して、PHFタウに特異的なペプチドを検出した。得られたすべてのペプチド画分について質量分析を行い、リン酸化ペプチドとリン酸基の数を同定すると共に、リン酸化ペプチドをアルカリ条件下でエタンチオー

ル処理し、アミノ酸配列分析を行うことで、リン酸化部位を同定した。

[結果]

PHFタウのtau 1およびC末端領域はトリプシン、キモトリプシン、V8等の各種のプロテアーゼに強い抵抗性を示したため、これまでこの領域の解析が困難であったが、固定化トリプシンとAsp-Nを高濃度に使用することにより、再現性よく小断片化することが可能となった。tau 1領域の固定化トリプシン消化により約１２のHPLC画分が得られた。また、C末端領域からはAsp-Nに続く固定化トリプシン消化により約２０のHPLCピークが分画された。PHFタウに特異的なピークに注目しながら、リン酸化部位の同定を行った結果、tau 1領域ではSer-198,-199,-202, Thr-205,Ser-208,-210,Thr-212,-217が、C末端領域ではSer-396,-400,Thr-403,Ser-404,-409,-412,-413,-422がリン酸化部位として同定された。PHFタウのリン酸化部位の内、Ser-198,-199,-202,Thr-217,-231,Ser-235,-396,-400,-404,-409,-413は胎児型タウにも検出される部位であるが、PHFタウでは胎児型タウより高度にリン酸化されていた。残りのThr-205,Ser-208,-210,Thr-212,Ser-262,Thr-403,Ser-412,-422はPHFタウに特異的な部位と考えられた。

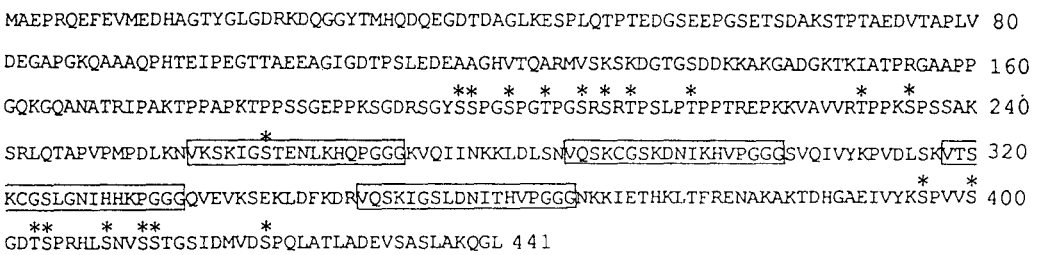
[文献]

1) Lee, V.M.-Y., et al.(1991) Science 251, 675-678.

2) Hasegawa, M., et al.(1992) J.Biol.Chem. 267, 17047-17054.

3) Watanabe, A., et al.(1993) J.Biol.Chem. 268, 25712-25717.

4) Yoshida, H. and Ihara, Y. (1993) J.Neurochem. 61,1183-1186.



図．PHFタウのリン酸化部位（PHFタウの蛋白質化学的解析により同定されたリン酸化部位を＊で示した．）．枠内は微小管結合領域．

104. アルツハイマー病脳の異常リン酸化タウのリン酸化部位について

以倉康充, 工藤 喬, Inge Grundke-Iqbal¶, Khalid Iqbal¶, 武田雅俊, 西村 健
(大阪大・医・精神医学, ¶New York Institute for Basic Research)

〔要約〕
アルツハイマー病(AD)脳における異常リン酸化タウのリン酸化部位の関与の程度を知る目的で、AD脳ホモジネートを用いタウの異なるリン酸化部位を認識するモノクローナル抗体であるTau-1およびPHF-1と反応させ、それぞれの抗体が認識する異常リン酸化タウ量を検討した。その結果Tau-1により検出される異常リン酸化タウ量は、PHF-1によるそれと比べて多いことが示された。Tau-1、PHF-1の認識部位はそれぞれタウの$Ser^{199\cdot202}$、Ser^{396}であることから、Ser^{199}およびSer^{202}が異常リン酸化タウにおいてより重要な意味を持つことが示唆された。

〔目的〕
ADに特徴的な神経病理学的変化として、老人斑と神経原線維変化(NFC)がある。NFTsは更にpaired helical filaments(PHF)と呼ばれる構造物からなるが、その主要構成成分は異常リン酸化された微小管関連蛋白質、タウであることがわかっており、近年その研究は異常リン酸化を起こすkinaseの同定に焦点が絞られ、これまで多くの知見が得られている。これまで異常リン酸化タウには9ヶ所のリン酸化部位が推定されているが、すべてのリン酸化部位がリン酸化されているとは考えにくく、我々はリン酸化部位間でリン酸化の程度の違いが存在すると考えている。本研究ではタウの異常リン酸化部位のうち$Ser^{199\cdot202}$、Ser^{396}(Figure)について、いずれの部位が量的に有意にリン酸化されているかを検討し、ADの病変形成においてより重要な異常リン酸化部位を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕
11例のAD剖検脳、3例の正常剖検脳 (Netherlands Brain Bankより提供) の側頭葉灰白質より作製したホモジネートをSample Buffer (50mM Tris (pH7.6), 200mM NaCl[Tris- bufferd Saline(TBS)], Protease Inhibitors(1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride, 0.015 μM Aprotinin, 1 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin), Phosphatase Inhibitors(1mM Na_3VO_4, 5mM KF)にて総蛋白量が1 μg/5 μlとなるよう調整し、幅1cm毎に格子状にマークしたnitrocellulose膜(pore:0.2 μm)に5 μlずつ吸着させた。

Tau-1反応用のnitrocellulose膜を室温で30分間乾燥後、150mlの3%(wt/vol)Bovine Serum Albumin(BSA)-TBS-0.1%NaN_3にて室温で1時間Blockingした。100mlのTBSにて10分間、2回洗浄した。脱リン酸化のため15mlのAlkaline Phosphatase (226units/ml; Boehringer Mannheim), Phosphatase Inhibitors, 100mM Tris (pH8.0) にて37℃、18時間incubateした。対照として同じ試料を吸着させたnitrocellulose膜をAlkaline Phosphataseを加えないbufferでincubateした。PHF-1反応用NCは脱リン酸化を要しないのでこの過程は行わなかった。

100mlのTBSで10分間、3回洗浄の後200mlの5%BSA(wt/vol)-TBS-0.05%Tween-20(vol/vol)にて室温で1時間Blockingし、Blocking Bufferで1:25,000に希釈したTau-1と1:250に希釈したPHF-1をそれぞれ加え、室温で16時間incubateした。

200mlのTBS-0.05%Tween-20で10分間、4回洗浄後、0.05 μg/mlの^{125}I標識抗マウスIgG抗体(Amersham)を15mlapplyし、室温で2時間incubateした。十分な洗浄の後 (20ml; 1分×2回、200ml; 30分×3回、200ml; 1時間×3回) nitrocellulose膜を1cm角に切り、Gamma Counter(Packard)にてradioactivityを測定した。

［結果］

Table. *CPM of total tau in AD and Control Brain*

AD	*dptau-1*	*nondptau-1*	*PHF-1*
91-327	11129	6122	7579
88-272	6018	2447	7051
89-154	15464	3203	16470
89-181	6995	2859	7702
89-166	21142	6530	7937
89-194	9078	4498	5353
89-10	19234	4926	9100
88-325	22241	5777	9704
89-260	8704	3836	7880
91-309	3680	3138	6506
89-183	13845	4236	7267
Average	**12503**	**4324**	**8413**
Controls			
91-230	2512	2256	4442
92-001	3096	2876	5001
89-294	3551	3444	4839
Average	**3053**	**2859**	**4761**

dp:dephosphorylated　non dp:not dephosphorylated

AD脳ホモジネートでは脱リン酸化する事によりTau-1で認識されるタウのCPMは脱リン酸化しない場合に比べ増加したが、正常脳では変化は見られなかった。従ってSer$^{199\cdot202}$がリン酸化されているタウがAD脳で増加していることが示された。またPHF-1で認識されるタウのCPMは、ADでは正常者より増加しており、Ser^{396}がリン酸化されているタウがAD脳で増加していることが示された。

［考察］

Tau-1はSer$^{199\cdot202}$が両方ともリン酸化されていない場合にこの部分を認識する抗体であり、AD脳では認識されない。またPHF-1はSer^{396}がリン酸化されている場合にこれを認識する抗体で、正常脳では認識されない。したがって異常リン酸化タウの量は、脱リン酸化の前後でTau-1で検出されるタウの量の差として測定できる。その結果、AD脳は正常者に比べSer$^{199\cdot202}$では約2.6倍、Ser^{396}では約1.8倍の異常リン酸化タウが存在することが今回明らかにされた。従ってSer$^{199\cdot202}$がSer^{396}に比しリン酸化を受けている程度が大きいと考えられた。これは直ちにSer$^{199\cdot202}$がより病態に関与することを示すものではないが、異常リン酸化において部位的な有意性が存在するという事実は、種々のリン酸化部位がそれぞれ均等に病理に関与するのではなく、ADの病理変化を引き起こすのにあたり、より特異的なリン酸化部位が存在する可能性を示唆するものと思われる。

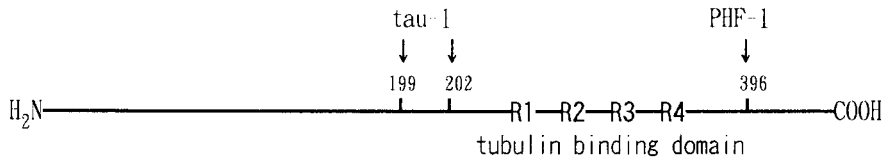


Figure. *Phosphorylation site of AD P-tau*

105 タウプロテインキナーゼII (TPK II)の活性調節サブユニット(p23)

内田庸子、石黒幸一、大沼純、米倉小百合、高松昌子、今堀和友
（三菱化成生命科学研究所）

〔要約〕
TPK IIは触媒サブユニット/cdk5と未知の活性調節サブユニット/p23の複合体である。p23のcDNAの配列決定をした結果、p23は分子量34,000の新規蛋白質（pre-p23）の99番目のアミノ酸残基からC-末端までに相当することがわかった。Northern解析によると、mRNAは一種であった。これらのことから、p23は前駆体pre-p23の切断により生ずると推定された。ラット脳におけるこの前駆体mRNAの発現量は新生児期に多く、TPK IIの活性変化とよく一致した。

[目的]
アルツハイマー病患者の脳に蓄積しているPHFは高度にリン酸化されたタウ蛋白質で構成されている。我々は、このタウをPHF-タウに変換する酵素系としてTPK II/TPK Iによるリン酸化システムを提出した(1)。すなわち、TPK IIによりあらかじめリン酸化されたタウはTPK Iによるリン酸化を受けやすくなり、PHFエピトープをもつようになる。また、このリン酸化システムは神経回路を形成する新生児期の脳でも働いている(2)。

精製TPK IIは、脳特異的cdc2-related kinaseであるcdk5と、23kDaの蛋白質(p23)から構成されていた(3)。TPK IIの活性の発現には、cdk5に加えてp23の共存することが必要である(4)。通常、サイクリン依存性キナーゼはサイクリンと結合して活性化され、cdk5の場合にはサイクリンD1と結合することが知られているが、神経系に存在するcdk5の活性化機構を理解するには、活性調節サブユニットp23の本体およびその性質を解析する必要がある。

[方法]
1. クローニングと塩基配列決定。p23の部分配列に基づき、guessmerを合成し、プローブとした。これを用いて、牛大脳cDNAライブラリーからp23のcDNAのクローンを2ケ得た。 cDNAをベクターpUC19のuniversal linker中のEcoRI siteにつなぎ、dideoxy法で配列決定した。

2. 活性測定。合成ペプチド基質(pro-Src)を用いて、常法通り行った(3)。

3.Northern解析。 全RNAを各種発育段階のラット脳からAGPC法でえた。 mRNAを全RNAからdynabeads-oligo(dT)$_{25}$で精製した。Northern解析はHybond-N+膜を用い、フォルムアミド法で行った。プローブ1または2(図1)でハイブリダイズした。

[結果]
p23cDNAの塩基配列を決定した結果(図1)、 189番目に最初のATGがあり、 その周辺配列はKozakのruleに合致し、開始コドンと推定された。このATGに続いて924ヌクレオチドのORFが存在した。それは分子量34,000の新規蛋白質をコードしており、その中の99番目のAlaからのアミノ酸配列がp23のN-末端配列(p23-N)と一致した。

Norther解析により、p23のプローブ1でも、34kDa蛋白質の配列を含むプローブ2でも、同一のmRNA(4.3kb)だけが検出された。この結果、p23は34kDa蛋白質(pre-p23)を前駆体とし、その分子中のPhe-Ala結合の切断により生じると推定された。

p23のC末端配列(p23-C)に対する抗体を結合させたprotein G-Sepharoseにより、牛新生児脳由来の粗TPK II活性画分を免疫沈降した。この免疫沈降物をWestern blotすると、抗p23-N抗体でp23が検出されるだけでなく、抗cdk5抗体でcdk5も見いだされた(図2)。さらに、この沈降物はTPK II活性を示した。これは、TPK II活性画分ではcdk5とp23が複合体を形成していることを示している。この方法でラット脳抽出液のTPK II活性を測定すると、新生児期に活性が高まっていた。

Northern解析により、各発育段階のラット脳で、pre-p23のmRNAの発現量を調べた(図3)。その発現量は、生後1週間以内に最大で、その後減少していき、5週から16週頃までが最低で、年齢が高くなると少々増加してくる。その変動はTPK II活性の変動とよく一致していた。 cdk5のmRNA(2.4kbと1.3kb)は1-3週に最大となった後、同様に推移するが、その変動幅は極めて小さく、発現量は高レベル

を保ったままであった。脳抽出液中に多量の不活性な cdk5 monomer が見つかることからみても、TPK II活性は p23 に支配されていると考えられる。

[考察]

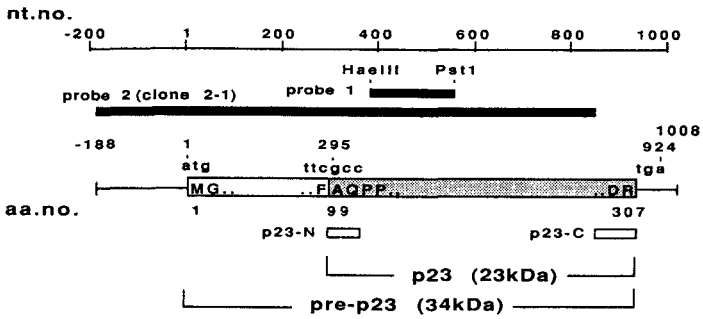
p23 はサイクリン D1 とは異なる蛋白質であるが、cdk5 と複合体を形成して、活性化する「活性化因子 cdk5 activator」の機能を示す。p23 の C- 末端側半分はサイクリン D1 と弱いホモロジーをもつので、この部分が cdk5 との結合に関わっていると推測した。p23 の N- 末端側には種々のプロテインキナーゼの認識部位が散在し、前駆体の 1-98 領域は塩基性アミノ酸に富んでいる。それぞれ特殊な機能と関連しているかもしれない。

生後 1 週以内の pre-p23 の発現と TPK II活性の増大は、この時期に胎児型のタウのリン酸化が盛んに起こることと一致しており、pre-p23 の発現が新生児期での TPK II／TPK I 系によるタウのリン酸化を支配していると推測された。

[文献]

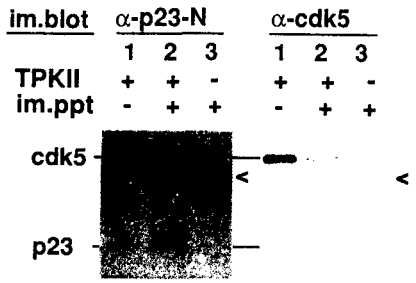
(1)Ishiguro, K. et al., J.Biol.Chem., 267, 10897-10901(1992).
(2)Arioka, M. et al., J. Neurochem., 60, 461-468(1993).
(3)Kobayashi, S. et al., FEBS Lett., 335, 171-175(1993).
(4)Ishiguro, K. et al., FEBS Lett., 342, 203-208(1994).

図 1.TPK II の活性調節サブユニット p23 とその前駆体 pre-p23 の一次構造



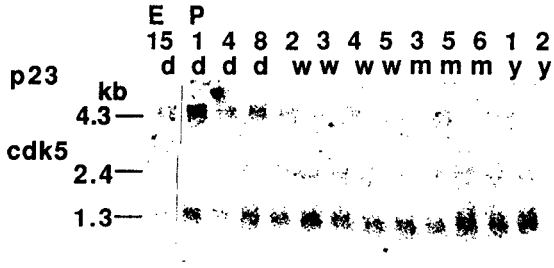
p23-N、p23-C: 合成ペプチド（抗体作製用）

図 2.TPK II活性画分と protein G- 抗 p23-C 抗体との免疫沈降物の Immunoblot



TPK II :TPK II活性画分、
im.ppt: 免疫沈降操作、
α - p23-C: 抗 p23-C 抗体、
α - cdk5: 抗 cdk5 抗体、
<: 抗体由来のバンド。

図 3. ラット脳の pre-p23 mRNA と cdk5 mRNA の発育変化



Ed: 胎児の日齢、Pd: 生後の日齢、w: 週齢、m: 月齢、y: 年齢

106　タウプロテインキナーゼⅠのラット胎仔神経系における分布

藤田　忍、高橋美帆、長谷川　準子、今堀　和友
（三菱化成生命科学研究所，プロジェクト２）

〔要約〕アルツハイマー病脳に見られるＰＨＦに特徴的なタウタンパクのリン酸化を行う酵素として同定されたタウプロテインキナーゼⅠ（ＴＰＫⅠ）のラット胎仔の神経系での分布を免疫組織化学的に調べた。胎生１０日（Ｅ１０）に胚全体に発現が見られたが、Ｅ１２以降胎生期をとおして分化した中枢・末梢ニューロンにさらに強い反応が観察された。とくに若い神経繊維束が強染した。大型ニューロン細胞体の染色パタンからＴＰＫⅠは主として細胞質に存在すると考えられた。これらの結果よりＴＰＫⅠはニューロンの分化および神経繊維の伸長に関与していると予想される。

ＴＰＫⅠはタウタンパクのSer199, Ser396（ヒト最長タウアイソフォームの残基番号）などＰＨＦに特徴的なリン酸化部位をリン酸化する酵素として同定され（１、２）、cDNAクローニングの結果グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β（ＧＳＫ3β）と同じ酵素であることが知られた（３）。ラット海馬初代培養ニューロンに対するアミロイドベータペプチドの毒性をＴＰＫⅠアンチセンスオリゴヌクレオチドが抑制することから、ニューロンの細胞死にＴＰＫⅠが関与すると考えられる（４）。一方本酵素はラットで脳に多く、主としてニューロンに見いだされ、また生後幼若期の脳で特に多く発現していることから、神経系の形成に何らかの生理的役割をもつと考えられる（５）。この生理的役割を明らかにすることは重要であるし、またそこからＴＰＫⅠの病理的役割の理解への手がかりが得られる可能性がある。本研究ではラット胎仔の神経系におけるＴＰＫⅠの分布を調べた。

［方法］　抗体　抗ＴＰＫⅠ／ＧＳＫ3β抗体Ｃ－１および抗ＧＳＫ3α抗体Ｃ－α はそれぞれラット酵素のＣ末合成ペプチドに対してウサギで作製しアフィニティ精製したもので、その特異性は既に報告した（５）。モノクローナル抗体（MAb）T1,7 はラットＴＰＫⅠのＣ末２９残基合成ペプチドに対して免疫したBALB/cマウスとミエローマ653をもちい通常の方法により作製したもので、ラット脳ホモジネートに対するイムノブロットで４５kDaのバンドを特異的に染める。神経マーカーとして抗βチュブリンⅢ（MAb SDL.3D10,Sigma）、抗タウ（MAb TAU 2,Sigma）を用いた。　イムノブロット　各齢の全脳ホモジネートを電気泳動・転写したものに、MAb T1.7 を用いクロロナフトールを基質としてABC法により検出した。　免疫組織化学　エーテル麻酔下にWistar ラットよりとりだした胎仔は、氷冷後４％パラホルムアルデヒド／0.1Mリン酸緩衝液中４℃で一晩固定したものを20%蔗糖／PBSに沈め、OCTに包埋して13μm凍結切片を作製した。免疫染色はビオチニル化抗ウサギ抗体とFITC-ストレプトアビジン（Amersham）を用いる蛍光法、またはDABを基質としてABC法（Vector）によった。

［結果と考察］　まずイムノブロットによりラット胎仔脳でのＴＰＫⅠ量の変化を調べた。MAb T1.7により胎生12日（E12）で明瞭に検出されるバンドはE16にかけて強くなり、その後生後2週まではぼ一定のレベルを維持するが、成熟ラットでは大きく減弱していた（図１）。この成熟脳での減少は先の報告と一致する（５）。Ｅ12からＥ16は脳で分化したニューロンの割合が急速に増大する時期にあたる。

免疫組織化学的にはMAb T1.7と抗体Ｃ－１は同じ染色パタンであったがＣ－１のほうが染色強度が強かったので以下では後者を用いた。Ｅ9胚では反応が弱かったがＥ10になると予定神経組織と予定非神経組織の両方において免疫活性の増強がみられた（図２Ａ）。これは神経細胞の分化に先だってＴＰＫⅠが増加していることを示し、本酵素が細胞分化の決定などにも関与している可能性が考えられる。さらに最初に分化したニューロン（坑神経特異的βチュブリン抗体陽性細胞）においてＣ－１免疫活性が増強し、特に神経突起が強染した。Ｅ12以降中枢・末梢の全域において分化したニューロンがよく染まり、視神経・脊髄神経などの繊維束が最も強い反応を示した（図２ＢＣ）。これらの結果はＴＰＫⅠが神経軸索の伸長に関与していることを示唆する。事実ＴＰＫⅠがリン酸化する部位のいくつかに対応すると考えられるリン酸化は幼若型タウにみいだされている（６）。

Ｅ12頃以降の胎仔において非神経組織の染色は神経組織に比べて弱いが、例外的にレンズに強い反

応がみられた（図２Ｃ）。ＴＰＫＩ／ＧＳＫ３βのアイソフォームであるＧＳＫ３αに特異的な抗体Ｃ－αの免疫活性の分布は胎仔期を通してＴＰＫＩのそれに基本的に似ていたが、非神経組織において、より強い反応が観察され、また中枢神経系においては脳室壁・脊髄中心管壁が特に強染した（図２Ｄ）。大型のニューロンの細胞体ではＣ－１は細胞質をよく染色し、ＴＰＫＩは主として細胞質に存在すると考えられた（図２Ｅ）。

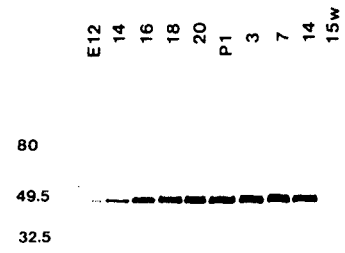


図１．ラット胎生周生期脳でのＴＰＫＩの発現．各齢全脳ホモジネートのMAb T1.7によるイムノブロット

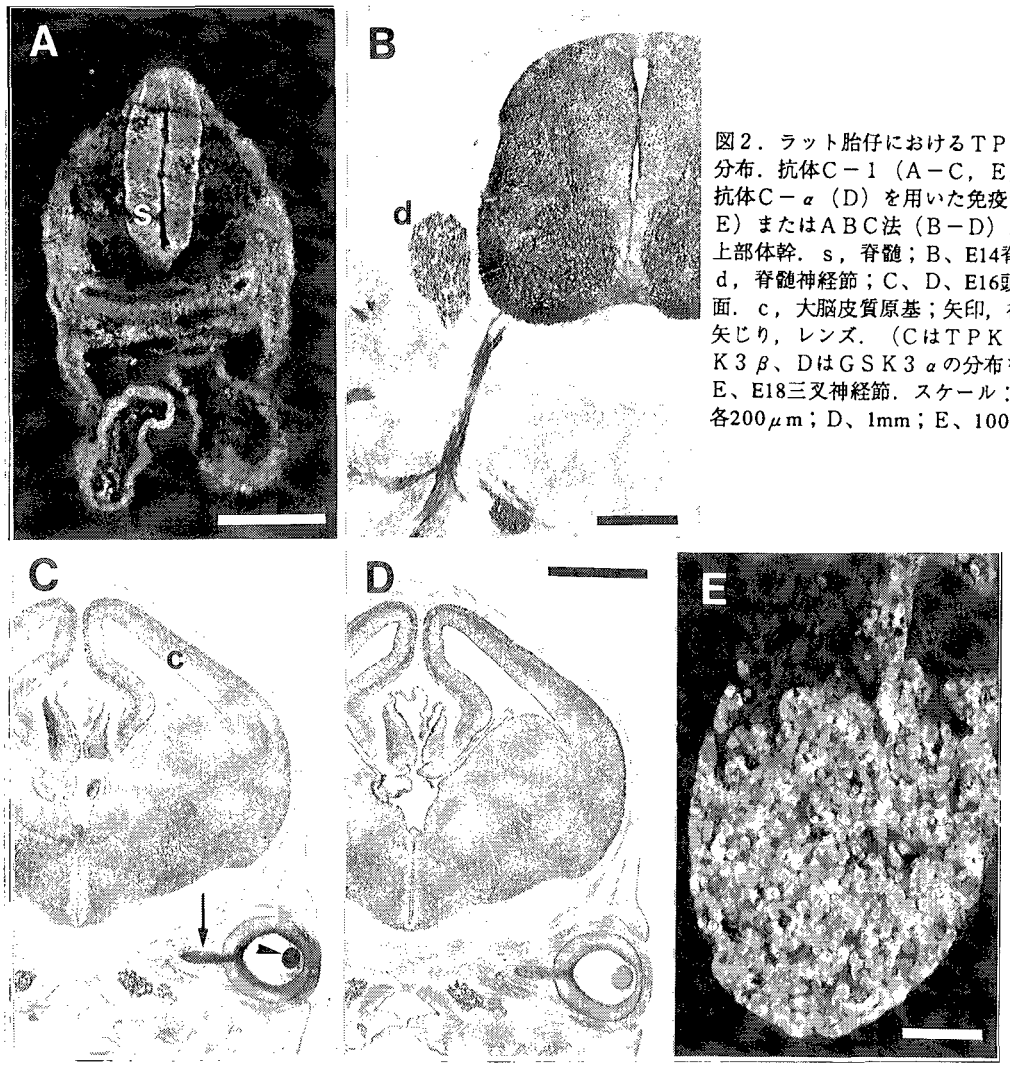


図２．ラット胎仔におけるＴＰＫＩ等の分布．抗体Ｃ－１（Ａ－Ｃ，Ｅ）または抗体Ｃ－α（Ｄ）を用いた免疫蛍光法(Ａ，Ｅ）またはＡＢＣ法（Ｂ－Ｄ）．Ａ、E10上部体幹．ｓ，脊髄；Ｂ、E14脊髄横断面．ｄ，脊髄神経節；Ｃ、Ｄ、E16頭部前額断面．ｃ，大脳皮質原基；矢印，視神経；矢じり，レンズ．（ＣはＴＰＫＩ／ＧＳＫ３β、ＤはＧＳＫ３αの分布を示す．）Ｅ、E18三叉神経節．スケール：Ａ、Ｂ、各200μｍ；Ｄ、1mm；Ｅ、100μｍ.

本研究は佐藤一紀博士、および富沢　香代子、加藤　利佳両氏の協力によっておこなわれた。

［文献］ (1) Ishiguro, K., *et al., J. Biochem.* 104, 319-321 (1988). (2) Ishiguro, K., *et al., J. Biol. Chem.* 267, 10897-10901 (1992). (3) Ishiguro, K., *et al., FEBS Lett.* 325, 167-172 (1993). (4) Takashima, A., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7789-7793 (1993). (5) Takahashi, M., *et al., J. Neurochem.* 63,245-255 (1994). (6) Hasegawa, M., *et al., J. Neurochem.* 60, 2068-2077 (1993).

107 グルタミン酸応答におけるc-fos, zif/268誘導に対する細胞外カルシウム流入の優性的効果

津田正明
（岡山大学・薬学部・微生物）

【要約】
マウス小脳顆粒細胞において、N-methyl-D-aspartate(NMDA)あるいはカイニン酸(KA)刺激によってc-fos, zif/268誘導が引き起こされるが、その時間経過は3-4時間におよぶ長期的なものだった。一方、グルタミン酸(Glu)によるものは、刺激後30分にピークを持つ短期的なものであった。これは、NMDAの場合はCa^{2+}流入が持続的に起こっているためと考えられた。そこで、Glu刺激後2時間で再びNMDAなどで刺激を加えた所、Ca^{2+}流入とともにc-fos, zif/268誘導が認められた。シクロヘキシミド投与でc-fos, zif/268のスーパー誘導が起こるので、Glu投与2時間後には、これら遺伝子発現の抑制系が働いているものと考えられた。従って、細胞外Ca^{2+}の細胞内流入は、c-fos, zif/268誘導を常に引き起こす優性的効果を持つことが明らかとなった。

【目的】 神経細胞のシナプス可塑性には、グルタミン酸レセプター活性化に伴うCa^{2+}の細胞内流入が重要な役割を果たしている。一方、脳虚血時における神経細胞死には、細胞外グルタミン酸濃度の異常上昇によって引き起こされるCa^{2+}の細胞内異常流入が関係している可能性がある。従って、神経細胞のグルタミン酸応答性を理解する上で、細胞外Ca^{2+}の細胞内流入が重要な鍵を握っている。すでに、グルタミン酸レセプター活性化で、c-fosを始めとする最初期遺伝子(immediate early genes)の発現誘導の起こることが知られている。また、神経細胞死に伴って、c-fosの長期的誘導の起こることが報告されている(1)。これら一連の転写制御因子遺伝子の誘導は、シナプス可塑性あるいは神経細胞死に関わる遺伝子の発現をさらにコントロールしている可能性がある。そこで、Ca^{2+}の細胞内流入がc-fosおよびzif/268誘導に与える影響について、小脳顆粒細胞の初代培養系を用いて検討した。特に、NMDA刺激によって認められる長期的c-fos誘導について解析を行った。

【方法】 出生後一週目マウス(ICR)の小脳より、顆粒細胞の初代培養系を調製した。培養開始後5-7日目に培地をLocke's溶液(5 mM HEPES[pH 7.4], 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時間後にグルタミン酸(Glu), NMDA, カイニン酸(KA)を加えた。刺激後、適切な時間に細胞を集め、細胞質RNAを調製しノザンハイブリダイゼーションを行った。また、核抽出液を調製し、TRE(TPA-responsive element)をプローブにゲルシフトアッセイを行った。細胞内へのCa^{2+}流入は、$^{45}Ca^{2+}$の細胞内取り込みで測定した。

【結果】 すでに、NMDA, KA刺激によるc-fos誘導は、細胞外Ca^{2+}の細胞内流入によって引金の引かれることを報告している(2)。また、NMDA刺激の場合はNMDAレセプターチャンネルを通じて、KA刺激の場合は電位依存性Ca^{2+}チャンネル(VGCC)を通じてCa^{2+}が流入し、c-fos誘導が引き起こされることを明らかにしている。

図に示したようにNMDA, KA(100 μM)刺激の場合のc-fos誘導の時間経過は、3-4時間に渡る長期的なものだった。一方、50 μMのGlu刺激では、刺激後30分にピークを示す短期的な

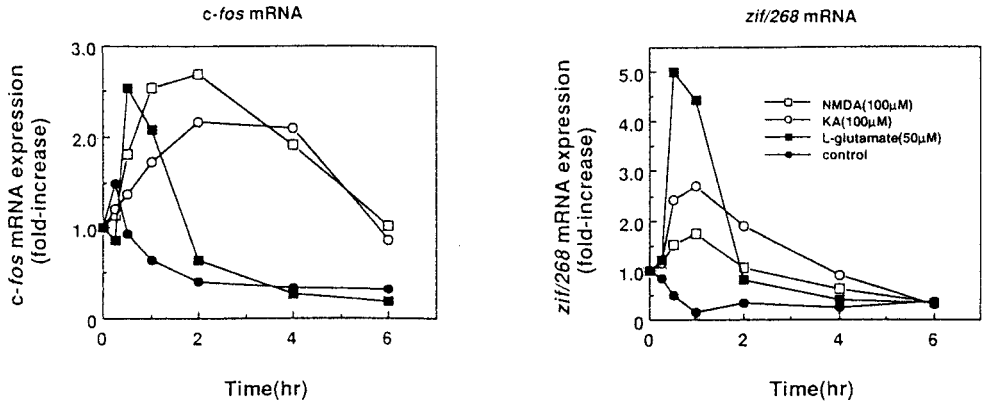


図1. 各種薬剤刺激によるc-fos, zif/268mRNA発現の時間経過

c-fos誘導が認められた。この傾向は、zif/268誘導にも認められた。刺激後の$^{45}Ca^{2+}$の細胞内取り込みを調べた所、2および4時間後では、Glu刺激に比べてNMDA刺激において高い取り込みが認められた。また、Glu, NMDA投与2時間後には、Locke's溶液中に刺激有効濃度のGluが存在しないこと、一方、NMDAは存在することが明らかとなった。

c-fos誘導には、誘導後、c-fosmRNAの発現を抑制する自動制御系の働くことが知られている。Glu刺激後シクロヘキシミドを加えてc-fos, zif/268mRNA発現を調べた所、スーパー誘導が認められた。即ち、Glu刺激後これら遺伝子発現の抑制系が働いていることが明らかとなった。そこで、Glu刺激後2時間で再びNMDAあるいはVGCCアゴニストBAY K8644を加えてCa^{2+}流入を引き起こした所、抑制系が働いているにも拘らずc-fos, zif/268の誘導が認められた。

【考察】 c-fos, zif/268発現に対する抑制系が働いていても、Ca^{2+}の細胞内流入はこれら遺伝子の発現誘導を起こすことが明らかとなった。即ち、細胞外Ca^{2+}の細胞内流入は、c-fos, zif/268誘導に対して常に優性的な効果を持つことを示している。NMDA刺激による長期的なc-fos誘導は、Ca^{2+}流入が持続的に起こってしまって、Ca^{2+}流入の優性的効果が長期的に及んでいるためと考えられる。この培養系における現象は、脳虚血等で引き起こされる神経細胞死の予想される状況や、神経細胞死に伴った長期的c-fos誘導をもうまく説明するものと思われる。このCa^{2+}流入の優性的効果が過剰に作動して、c-fos等の一連の遺伝子群の過剰発現が誘導されて、神経細胞死のスイッチが入ってしまうことが十分に考えられる。最近、一酸化窒素(NO)が、NMDAレセプターからのCa^{2+}流入を抑え、結果的にc-fos誘導を抑制することを認めている。すなわち、NOはCa^{2+}流入による優性的効果に対して抑制的に働き、神経細胞保護作用をもつことが予想された。

【文献】

1. Smeyne, R. J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S. J., Miao, G. G., Schilling, K., Robertson, L. M., Curran, T. and Morgan, J. I. (1993) Nature 363, 166-169.
2. Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1992) J. Neurochem. 59, 2067-2075.

108 グルタミン酸の神経系株化培養細胞（ＰＣ１２）毒性に対する抗酸化性薬剤probucolの効果

内藤通孝、梅垣宏行、井口昭久
（名古屋大学医学部老年科学）

〔要約〕

神経系株化培養細胞（ＰＣ１２細胞）を用いて、glutamateの神経細胞毒性に対する抗酸化作用を合わせ持つ抗高脂血症薬であるprobucolおよび抗酸化性ビタミン（α-tocopherol）の効果を培養液中に放出されるＬＤＨを指標として検討した。probucolは５μＭ以上の濃度で細胞障害をほぼ完全に抑制するとともに、glutamate暴露による細胞内TBARSの増加を完全に抑制した。probucolはglutamate暴露前に前処理した場合にも有効であり、さらに、glutamate暴露後数時間してから添加した場合にも部分的に有効であった。α-tocopherolもglutamateによる細胞障害を抑制した。

【緒言】glutamateは中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質として数種類の受容体を介して働いているが、過剰な濃度のglutamateはかえって神経細胞に対して障害性に作用し、虚血性脳障害の他、Huntington病、Alzheimer病などにおいても重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。今回、我々はラット副腎髄質褐色細胞腫由来の神経系株化培養細胞ＰＣ１２を用いて、glutamateの神経細胞毒性に対する抗酸化性抗高脂血症薬probucolおよび抗酸化性ビタミンα-tocopherolの効果を検討した。

【材料・方法】ＰＣ１２細胞はＭＥＭ＋５％ＦＢＳ＋５％ＨＳにて常法に従って培養した。単離浮遊したＰＣ１２細胞を約１×１０^{5}個/wellの密度で播種し、２４時間後に１０mM glutamateを含む培養液に交換し、抗酸化性物質（probucol、α-tocopherol、ＢＨＴ）の存在下または非存在下でさらに２４時間培養し、培養液中に放出されたＬＤＨおよび残存細胞ＬＤＨを測定し、細胞障害の指標とした。細胞内過酸化脂質はOhkawaらの方法に準じてthiobarbituric acid-reacting substances （ＴＢＡＲＳ）を測定した。

【結果】probucolは１μＭ以上の濃度でglutamate（１０mM）による細胞障害を抑制し、５μＭ以上ではほぼ完全に抑制した。α－tocopherol（５０μＭ）もglutamateによる障害を抑制した。ＢＨＴ（１０μＭ）は部分的に細胞障害を抑制した。また、細胞をprobucolまたはα-tocopherolで２４時間前処理することによってもglutamateの毒性は抑制された。さらに、

glutamate暴露３時間後にprobucol（５０μＭ）を加えても、その障害性は８５％、６時間後でも２１％抑制された。しかし、１２時間後の添加では抑制効果はなかった。

glutamate存在下で２４時間培養することによって細胞内ＴＢＡＲＳは有意に増加した。probucoによる前処理または同時処理はＴＢＡＲＳの増加を完全に抑制した。

【考察】以上の結果より、臨床的に用いられている抗酸化性物質probucol およびα-tocopherolがglutamateのＰＣ１２細胞障害に対して防御的に働くことが明かとなった。glutamateの神経細胞毒性は虚血性脳障害の進展に関与すると考えられており、これらの抗酸化性物質がその進展抑制に働く可能性が期待される。

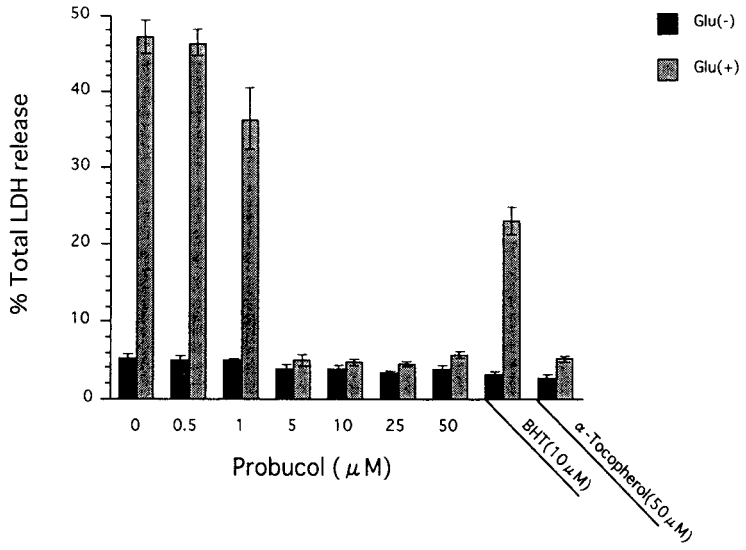


図　glutamateのＰＣ１２細胞毒性に対するprobucolの効果

109 アミノ酸交換輸送系を介するグルタミン酸神経細胞死の成因と防御

馬渡一浩[1]，杉谷加代[1]，安井裕子[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交換輸送系の一つであるシスチン／グルタミン酸交換輸送系（xc⁻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。そこで今回，ＧＳＨ枯渇以後の酸化的ストレス状況下における細胞内障害性をグルタミン酸添加後の細胞膜の脂質過酸化，解糖系の中心酵素活性，細胞内ＡＴＰ濃度および核内ＤＮＡの断片化を指標として検討した。またこの細胞死に対する活性酸素種（ＲＯＳ）の関与や，細胞死抑制物質も併せて検討し，その成因を究明した。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倍増加した。また，細胞死に先立ってＡＴＰ濃度は有意に低下，核内ＤＮＡの断片化が観察され，さらに，早期に細胞内ＲＯＳの増加が認められた。他方，カタラーゼ，ＴＭＰＯ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。以上の事実から，グルタミン酸添加により細胞内ＧＳＨ減少の結果，細胞内ＲＯＳの消去能力が低下し，細胞の膜，ミトコンドリアおよび核に不可逆的な変化が生じたと考えられる。さらに抑制物質の検討から活性酸素種として$O_2^{\cdot-}$，H_2O_2および・OHの関与が示唆された。

〔序〕 シスチン／グルタミン酸交換輸送系（xc⁻系）は，Ｃ６グリオーマ細胞や網膜グリア細胞において細胞内ＧＳＨレベル維持機構として重要な役割を果たしている（3-5）。我々は，既に，細胞外に過剰のグルタミン酸が存在すると，このxc⁻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（５）。そこで今回，ＧＳＨ枯渇以後の酸化的ストレス状況下における細胞内障害性について細胞膜脂質，酵素活性，ミトコンドリア機能，核ＤＮＡに焦点を絞り生化学的に検討し，同時に抑制物質の探索により，この細胞死の成因を解明すべく本実験を企画した。

〔方法〕 Ｃ６グリオーマ細胞はＤＭＥＭ培地（５％牛胎児血清含有）で培養した。膜の脂質過酸化や核内ＤＮＡの断片化については，既報に従った（６）。同時に，Oberhammerらの方法（７）によりHoechst 33258を用いて核染色を行い，蛍光顕微鏡下にて観察した。さらに解糖系の中心酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水酵素（GA3PDH）活性をGiblinらの方法（２）により測定した。次に細胞内ＡＴＰ濃度の経時的変化を生物発光法（８）（ルシフェリン・ルシフェラーゼ発光）により測定した。さらに活性酸素の関与を調べるため 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いてBondyらの方法（１）により活性酸素種（ROS）の産生を測定した。細胞死抑制物質のスクリーニングには抗酸化剤やラジカルスカベンジャーとしてカタラーゼ，tetramethyl-pyrroline N-oxide（TMPO）をグルタミン酸と同時添加した。細胞死の判定は，ＬＤＨ活性の測定にて行った。

〔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時間から徐々に細胞の変性

がおこり，２４時間には大部分の細胞は死滅した(4)。これに伴って産生される膜の過酸化脂質は，添加１４時間頃から増加傾向が認められ，２４時間では対照に比して約２倍に増加した。また核ＤＮＡの染色像では添加１５～１６時間頃より核の凝集像や濃縮像が認められ，次第に異常細胞数が増加した。電気泳動上でもＤＮＡの断片化が観察された。細胞内ＡＴＰ濃度は，添加８時間より低下傾向が認められ１６時間以降では有意に低下した（図１）。細胞内ＲＯＳの産生については，添加５時間より増加傾向が認められ，８～１６時間で有意に増加した。次に，グルタミン酸にビタミンＥ，カタラーゼや$O_2^{\cdot}$のトラップ剤であるＴＭＰＯを添加し培養したところ細胞死が有意に抑制された（図２）。

〔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）膜の過酸化脂質の増加，２）核内ＤＮＡの断片化，３）細胞内ＡＴＰ濃度の低下，４）細胞内ＲＯＳの増加が認められた。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，細胞内ＲＯＳの消去能力が低下し，細胞の膜，ミトコンドリア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，ＴＭＰＯの添加により有意に細胞死が抑制されたことから$O_2^{\cdot}$，H_2O_2および・OHの関与が示唆された。

図1. 細胞内ATP濃度の経時的変化

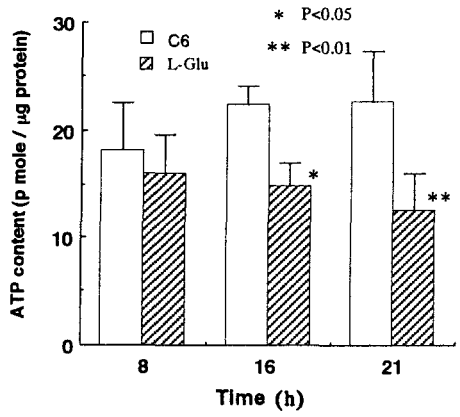
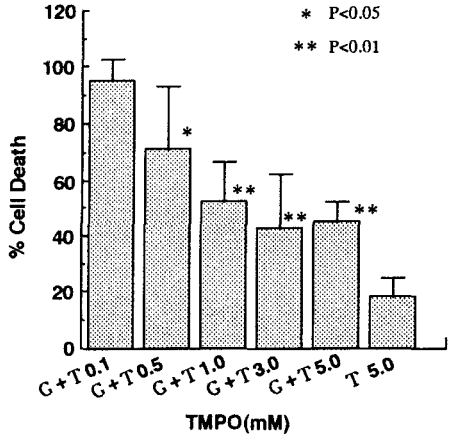


図2. TMPOによる細胞死抑制効果



〔文献〕

1. Bondy, S. C., and Lee, D. K. (1993) *Brain Res.* **610**, 229-233
2. Giblin, F. J., Reddan, J. R., Schrimscher, L., Dziedzic, D. C., and Reddy, V. N. (1990) *Exp. Eye Res.* **50**, 795-804
3. Kato, S., Ishita, S., Sugawara, K., and Mawatari, K. (1993) *Neuroscience* **57**, 473-482
4. Kato, S., Negishi, K., Mawatari, K., and Kuo, C.-H. (1992) *Neuroscience* **48**, 903-914
5. 加藤　聖，安井裕子，高寺恒雄 (1993) *実験医学* **11**, 182-187
6. 馬渡一浩，安井裕子，石田外樹，加藤　聖 (1993) *神経化学* **32**, 90-91
7. Oberhammer, F. A., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R., Purchio, A. F., Bursch, W., and Schulte-Hermann, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5408-5412
8. Stanley, P. E., and Williams, S. G. (1969) *Anal. Biochem.* **29**, 381-392

110 ラット海馬神経細胞初代培養系におけるnon-NMDA受容体を介する神経細胞死に対するYM90Kの作用

大野和茂、岡田正路、小原厚行、山口時男
山之内製薬株式会社 第一創薬研究所

〔要約〕

ラット海馬神経細胞初代培養系を用いてnon-NMDA受容体を介する神経細胞死に対するYM90Kの保護作用を検討した。non-NMDA受容体を介する神経細胞死として、カイニン酸神経細胞毒性単独及びcyclothiazide併用により増強したAMPAの毒性について実験を行った。YM90Kはカイニン酸及びcyclothiazideにより増強したAMPAの神経細胞毒性に対し抑制作用を示した。YM90Kは、各薬物の用量作用曲線に対する作用より、カイニン酸及びAMPAに対し競合的阻害、cyclothiazideに対し非競合的阻害作用を有することが示唆された。カイニン酸300μMに対するIC50は、YM90Kが0.8 μM、NBQXが0.4 μM、GYKI 52466が9.4 μMであった。また、30μM AMPA、30μM cyclothiazideの神経毒性に対するIC50は、YM90Kが1.3μM、NBQXが0.9 μM、GYKI 52466が16.6μMであった。カイニン酸曝露3時間後にYM90Kを添加した場合でも有意な神経細胞保護作用を示した。以上のように、YM90Kはnon-NMDA受容体を介する神経細胞死を強力かつ、曝露3時間後においても、抑制したことから、脳虚血の際神経細胞が過剰なグルタミン酸に持続的に曝露された後でも保護作用を示す可能性が示唆された。

【目的】

我々は、YM90KがAMPA受容体結合実験で高親和性を有し、AMPA誘発の細胞内カルシウム濃度上昇を抑制すること、また局所及び全脳虚血モデルにおいて神経細胞保護作用を示すことを報告してきた(1, 2, 3, 4)。 今回ラット海馬神経細胞初代培養系を用いてnon-NMDA受容体を介する神経細胞死に対するYM90Kの作用を検討した。non-NMDA受容体のアゴニストとしてAMPA及びカイニン酸が知られているが、培養系においてカイニン酸は神経細胞死を誘発するがAMPAは神経細胞毒性が非常に弱いことが知られている(5, 6)。 最近になりcyclothiazideがAMPA受容体の脱感作を抑制し、AMPAの神経細胞毒性を増強することが報告されている(6, 7, 8, 9, 10, 11)。そこで、カイニン酸及びcyclothiazideにより増強したAMPAの毒性に対するYM90Kの作用を検討した。

【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(Wister; Slc)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 により消化し、レンズフィルターを用い細胞塊を除き、10%血清を含むMEMにて細胞浮遊液にした。分離した神経細胞を poly-l-lysine coating 48 well plate 上に4 x 10^5 / cm^2の密度で播種し、24時間後、無血清培地（MEM, 20 mM HEPES, 6 g/l glucose,1 mM sodium pyruvate, 1 mg/ml BSA, 2 mM L-glutamine, 25 μg/ml transferrin, 25 μg/ml insulin, 25 ng/ml selenium, 100 μM putrescine, 1 nM T3, 20 nM progesterone, 20 ng/ml corticosterone, 1 μM tocopherol acetate, 1 μg/ml arachidonic acid, 0.5 μg/ml docosahexaenoic acid）に交換した。グルタミンは用時調製とした。培地交換は2回／週で行なった。以下の実験には培養9日目以降の細胞を用いた。

(2)カイニン酸神経細胞毒性

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。薬物曝露時には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(12)。NMDA受容体を介する細胞死を除くため、10μMのMK801を添加し実験を行った。

カイニン酸曝露後のYM90Kの神経細胞保護効果については、カイニン酸曝露0、1、3、7、9時間後にYM90Kを添加し、カイニン酸曝露から24時間後、培養上清中のLDH活性を測定した。

(3)cyclothiazideにより増強したAMPA毒性

薬物曝露時には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。NMDA受容体を介する細胞死を除くため、10 μMのMK801を添加し実験を行った。

(4)LDH活性の測定

培養上清中のLDH活性は、日立736型自動分析装置を用いて、rate assay法により測定した。活性値はinternational units (IU)で表し、1 IUは37°Cで1分間に1μMのピルビン酸を生成させる酵素量である。

なお、本実験に使用したcyclothiazide、NBQX及びGYKI 52466は、全て当研究所の坂本修一らによって合成されたものを用いた。AMPAはTocrice、カイニン酸はSigma、MK801はRBIより購入したものを用いた。

【結果】

(1)カイニン酸神経細胞毒性

YM90Kはカイニン酸神経細胞死の用量作用曲線を右方シフトさせた。300 μMカイニン酸に対するIC50値は、YM90Kが0.8 μM、NBQXが0.4 μM、GYKI 52466が9.4 μMであった。

300 μMカイニン酸曝露後に10 μM YM90Kを添加する実験において、3時間後まで有意に神経細胞毒性を阻害した。

(2)cyclothiazideにより増強したAMPA毒性

YM90Kはcyclothiazideにより増強したAMPA毒性において、AMPAの用量作用曲線を右方シフトさせた。また、cyclothiazideの用量作用曲線に対しては最大反応を抑制した。30 μM AMPA、30 μM cyclothiazideの神経毒性に対するIC50値は、YM90Kが1.3 μM、NBQXが0.9 μM、GYKI 52466が16.6 μMであった。

【考察】

YM90Kはカイニン酸の神経細胞毒性及びcyclothiazideにより増強したAMPAの神経細胞毒性に対し、神経細胞保護作用を示した。YM90Kはカイニン酸及びAMPAに対し競合的阻害、cyclothiazideに対し非競合的阻害作用を有することが示唆された。カイニン酸曝露3時間後にYM90Kを添加した場合でも有意な神経細胞保護作用を示したため、YM90Kは脳虚血において、神経細胞がグルタミン酸に曝露された後でも保護作用を示す可能性が示唆された。

【参考文献】

1)Ohmori, J., Sakamoto, S., Kubota, H., Shimizu-Sasamata, M., Okada, M., Kawasaki, S., Hidaka, K., Togami, J., Furuya, T. and Murase, K. (1994) J. Med. Chem., 37(4), 467-475.

2) Okada, M., Hidaka, K., Togami, J., Ohno, K., Tada, S., Ohmori, J., Sakamoto, and Yamaguchi, T. (1992) Soc. Neurosci. Abstr., 18, 86.

3) Shimizu-Sasamata, M., Kawasaki, S., Yatsugi, S., Ohmori, J., Sakamoto, S., Koshiya, K., Usuda, S. and Murase, K.I. (1992) Soc. Neurosci. Abstr., 18, 86.

4) Yatsugi, S., Takahashi, T., Kawasaki-Yatsugi, S., Koshiya, K., Sakamoto, S., Hanada, T., Shishido, T, Uematsu, D. and Shimizu-Sasamata, M. (1993) Soc. Neurosci. Abstr., 19, 293.

5) Koh, J.Y., Goldberg, M.P., Hartley, D.M. and Choi, D.W. (1990) J. Neurosci., 10, 693-705.

6) May, P.C. and Robison, P.M. (1993), J. Neurochem., 60(3), 1171-1174.

7) Partin, K.M., Patneau, D.K., Winters, C.A., Mayer, M.L. and Buonanno, A. (1993) Neuron, 11(6), 1069-1082.

8) Yamada, K.A. and Tang, C.M. (1993) J. Neurosci., 13(9), 3904-3915.

9) Moudy, A.M., Yamada, K.A. and Rothman, S.M. (1992) Soc. Neurosci. Abstr., ; 18, 757.

10) Zorumski, C.F., Yamada, K.A., Price, M.T. and Olney, J.W. (1993) Neuron, 10, 61-67.

11) Donevan, S.D. and Rogawski, M.A. (1993) Neuron, 10, 51-59.

12) Koh, J. Y. and Choi D. W. (1987) J. Neurosci. Methods, 20, 83-90.

111 砂ネズミ脳虚血における脳内Ca^{2+}誘発性Ca^{2+}放出チャンネルの変化に関する研究

野崎博之，福内靖男，田中耕太郎，五味愼太郎*，美原　盤**，野川　茂，永田栄一郎，近藤太郎
（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）

〔要約〕砂ネズミ一側総頚動脈結紮モデルにおいて局所脳血流量および脳組織Ryanodine受容体結合能を経時的に測定し，Ca^{2+}誘発性Ca^{2+}放出チャンネル（CICR）の変化について検討した．ハロセン麻酔下に右総頚動脈を結紮，結紮後30分，2時間，6時間の時点で覚醒状態下，[^{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，クリオスタットにて連続脳切片を作製し，[^{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．Ryanodine受容体結合能は，重度虚血動物の海馬CA1のみで虚血後30分で低下傾向を示し，虚血2時間および6時間後には有意な低下を示した．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の機能的異常が比較的早期より海馬の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．我々は既に報告したように，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(1)．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^{2+}-induced Ca^{2+}release: CICR)の存在が注目されている．我々は既に砂ネズミ一側総頚動脈結紮モデルを用い，6時間虚血負荷において，結紮側海馬CA1で特異的にryanodine結合量が減少していることを報告した(2)．そこで今回さらに虚血早期におけるCICR動態について経時的に検討を行ったので報告する．

【方法】実験には体重60～100gの砂ネズミ38匹を用いた．ハロセン麻酔下に頚部正中切開し右総頚動脈を結紮し，それぞれ30分，2時間，6時間後に覚醒状態下に[^{14}C]Iodoantipyrine法により局所脳血流量（LCBF）を測定した(4)．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20 μm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，病理組織標本用に分けた．

① 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．

② Ryanodine binding用脳切片標本は，室温のbuffer A (20mM PIPES-KOH (pH 8.0), 1.0M KCl, 550 μM ATP, 100 μM $CaCl_2$, 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=67.2～87.0 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15 μM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(3)．

③ 病理組織標本用のスライドは，トルイジンブルー染色を施行した．

④ [^{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た．また結紮側虚血中心部の視床外側核LCBFが50ml/100 g/分以上の動物を第1群とし，50ml/100 g/分未満の動物を第2群とし，LCBFのデータと共に定量的検討を行った．

【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Pao_2以外では有意差を認めなかった（表1）．

表１：生理学的パラメータ

	Pao_2(mmHg) 30分	2時間	6時間	$Paco_2$(mmHg) 30分	2時間	6時間
第１群	99.0±15.9	97.7±19.3	92.4±25.2	38.0±10.6	30.8± 8.8	37.7±16.1
第２群	148.8±10.6**	124.2±30.0*	119.1±25.8	29.4±11.5	28.6±13.3	30.3±17.1

	pH 30分	2時間	6時間	MABP (mmHg) 30分	2時間	6時間
第１群	7.33±0.06	7.28±0.17	7.31±0.10	85.5±18.4	81.6± 7.5	89.2±18.1
第２群	7.40±0.22	7.28±0.18	7.26±0.21	73.8±13.9	74.4± 9.3	90.7±16.2

(mean ±SD, * p<0.05, ** p<0.01)

（２）局所脳血流量（LCBF）

結紮側では第２群で第１群と比較して小脳を除くすべての領域で著明なLCBFの減少を認めた（表２）.

（３）Ryanodine特異的結合量

Ryanodine特異的結合量は，結紮後２時間・６時間の時点で第２群では第１群と比較して結紮側の海馬CA1領域（p<0.05）で有意な低下を認め，結紮後30分では低下傾向を認めた．その他の部位では有意差を認めなかった（表３）.

表２：結紮側LCBF (ml/100 g/min)

		30分	2時間	6時間
大脳皮質（運動領野）	第１群	70.8±41.9	139.5±37.4	121.2±35.8
	第２群	1.8± 1.1**	3.0± 4.0**	2.8± 5.5**
大脳皮質（感覚領野）	第１群	75.8±47.8	131.5±32.4	117.6±50.7
	第２群	0.3± 0.4**	1.8± 2.4**	0.2± 0.4**
海馬CA1	第１群	68.3±26.0	86.6±25.6	94.8±41.8
	第２群	3.0± 3.3**	5.2± 5.5**	8.0± 8.0**
海馬CA3	第１群	67.8±23.4	89.9±21.5	82.6±32.7
	第２群	1.8± 1.8**	3.6± 2.7**	3.0± 4.4**
海馬歯状回	第１群	79.3±27.3	97.6±27.3	99.0±37.5
	第２群	5.5± 6.9**	6.5± 7.0**	14.5±13.5**
小脳半球	第１群	111.6±20.3	122.5±26.8	124.2±24.3
	第２群	101.0±50.9	90.1±29.0	121.5±14.4

(mean ±SD, * p<0.05, ** p<0.01)

表３：結紮側Ryanodine結合量 (fmol/mg)

		30分	2時間	6時間
大脳皮質（運動領野）	第１群	9.53±0.58	7.47±3.24	13.12±3.57
	第２群	9.08±2.66	8.15±1.73	12.46±6.69
大脳皮質（感覚領野）	第１群	8.58±0.46	7.95±3.42	12.68±2.55
	第２群	9.37±3.33	8.41±2.70	10.70±4.58
海馬CA1	第１群	12.19±4.13	10.07±3.30	11.81±3.14
	第２群	7.81±0.66	6.42±2.12*	8.09±2.25*
海馬CA3	第１群	12.25±1.60	13.48±3.83	17.90±3.14
	第２群	12.94±1.77	12.05±2.94	13.95±1.96
海馬歯状回	第１群	9.49±1.16	10.50±3.77	14.10±3.64
	第２群	10.31±1.57	9.93±3.43	11.08±3.94
小脳半球	第１群	7.20±1.60	4.02±2.10	5.26±1.19
	第２群	5.47±1.75	4.83±1.90	6.52±1.54

(mean ±SD, * p<0.05)

【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，結紮後２時間・６時間の時点で虚血側海馬CA1においてのみ有意に低下を示し，結紮後30分の時点で既に低下傾向を認めたことから，同部位のCICR動態に比較的早期から大きな擾乱が生じている可能性が示唆された．CICRとcyclic AMP dependent protein kinaseの機能的関連も指摘されており，我々の検討でも２時間虚血において海馬CA1でのみcyclic AMP dependent protein kinaseの活性は低下していた(5)．今後の更なる検討により脳内second-messenger系の各構成要素の脳虚血における障害の進展過程が明らかとなるものと考えられた．

【文献】

(1) 永田栄一郎，他 (1993) 臨床神経, 33: 726-732.
(2) 野崎博之，他 (1993) 神経化学, 32: 82-83.
(3) Padua R.A., et al. (1991) Brain Res., 542: 135-140.
(4) 高嶋修太郎，他 (1990) 自律神経, 27: 38-45.
(5) 田中耕太郎，他 (1994) 第19回脳卒中学会総会抄録集: 149.

112 大脳皮質傷害に伴い発現上昇する遺伝子の検索

－ Ser/Thr protein kinase遺伝子ｓｇｋの傷害脳における発現 －

今泉和則[1,3]，津田　学[1,3]，和中明生[2]，遠山正彌[2]，高木　勉[1]
（大阪大学医学部・分子脳機構（田辺）寄付講座[1]，解剖学第二講座[2]，田辺製薬生化研[3]）

〔要約〕

脳傷害時に誘導される遺伝子を取得する目的で、ラット大脳皮質を片側性に破壊し、３日後にｍＲＮＡを抽出してディファレンシャル・ディスプレイを行った。その結果、脳傷害時に発現レベルが上昇するｃＤＮＡフラグメント４種を取得し、この中から病巣部周辺に強いシグナルが認められたｓｇｋ遺伝子について発現解析を行った。ｓｇｋ遺伝子は脳傷害後３日目から発現レベルが上昇し、少なくとも14日間は高い発現レベルを維持した。in situ ハイブリダイゼーション解析から傷害部周辺の強いシグナルはオリゴデンドロサイト由来のものであることが示唆された。また、ラット脳の発生過程における発現様式の検討から、本遺伝子は生直後に一過性に誘導され、成熟脳では発現レベルは低下していた。生直後にｓｇｋ遺伝子を強く発現する細胞は大脳皮質表層のニューロンや海馬の錐体細胞などの特定のニューロン群であった。

〔緒　言〕

中枢神経系に傷害を与えると、脳組織の変性および再生過程でグリア細胞の増殖、マクロファージの浸潤あるいは神経突起の発芽等の変化がみられる。このような脳組織の再生過程でＦＧＦやＢＤＮＦなどの神経栄養因子をはじめとして多くの分子の発現レベルが変化し、脳組織の再構築が行われる(1,2)。これまでに脳組織の再生過程における分子レベルの変化については、詳細に検討されておらず、また、再生に関連して発現パターンが変化する未知の遺伝子も数多く存在するものと思われる。そこで今回、ディファレンシャル・ディスプレイ法により傷害脳で発現レベルが上昇する遺伝子の取得を試み、目的のクローンを４種取得した。この中で特に傷害部周辺に強いシグナルが観察されたｓｇｋ遺伝子の発現解析を行った。なお、ｓｇｋ遺伝子はラット乳癌の細胞株からグルココルチコイドで誘導される遺伝子としてクローニングされ、その塩基配列および予想されるアミノ酸配列からSer/Thrﾌﾟﾛﾃｲﾝｷﾅｰｾﾞﾌｧﾐﾘｰに属することが示されている(3,4)。しかし、この遺伝子産物の酵素活性および基質あるいはin vivoでの発現様式および機能等については明らかにされていない。

〔材料および方法〕

ディファレンシャル・ディスプレイ：８週齢Wistar雄ラットの片側大脳皮質に外科用ナイフで傷をつけ、３日間飼育した後、対照側および破壊側の大脳皮質からそれぞれｍＲＮＡを抽出した。このｍＲＮＡから12種の$dT_{11}MN$ primerを用いて一本鎖ＤＮＡを合成した。ディファレンシャル・ディスプレイ法は既報(5,6)の方法に準じた。なお、arbitrary primer には１）5'-CTGCATAGGT-3'，２）5'-AGGTCACTGA-3'の２種のprimerを用いた。

ノーザンブロッティングおよびin situ ハイブリダイゼーション：ノーザンブロッテイングには、ディファレンシャル・ディスプレイで取得したｓｇｋ遺伝子のｃＤＮＡフラグメント（３'側 608bp）からランダムプライマー法により作製したｃＤＮＡプローブを用いた。in situ ハイブリダイゼーションには上記ｃＤＮＡを鋳型に作製したDIG標識ｃＲＮＡプローブを用い、抗DIG抗体により可視化した。

〔結　果〕

1）ディファレンシャル・ディスプレイにより脳傷害時に発現レベルが上昇する遺伝子４種を取得し、傷害部周辺に特に強いシグナルがみられたｓｇｋ遺伝子について解析を進めた。

2）ｓｇｋ遺伝子は脳傷害後３日目から発現レベルが上昇し、少なくとも14日間は高い発現レベルを維持した（図１）。

2）脳傷害時に本遺伝子を強く発現する細胞は損傷部周辺のオリゴデンドロサイトであることが示唆された（図２）。

3）成熟ラット正常脳ではｓｇｋ遺伝子は脳各部位に存在するオリゴデンドロサイトと海馬のＣＡ２およびＣＡ３の錐体細胞に発現がみられた。

4）ｓｇｋ遺伝子は生直後に特定のニューロン群に一過性に発現レベルが上昇し、加齢に伴って発現レベルは低下した。

〔考　察〕

ｓｇｋ遺伝子は脳傷害時に損傷部周辺のオリゴデンドロサイトで発現誘導がみられたことから、脳組織の再生、特にミエリンの再形成に関連した一連の再生現象に深く関与することが示唆された。また、生直後に特定のニューロン群に一過性に強い発現がみられることから、これらニューロン群の発生過程に重要な役割を果している可能性がある。

〔文　献〕

1. Dugich-Djordjevic, M. M. et al. (1992) Neuron. 8, 1127-1138.
2. Finklestein, S. P. et al. (1988) Brain Res. 460, 253-259.
3. Liag, P. et al. (1992) Science. 257, 967-971.
4. Liag, P. et al. (1993) Nuc. Acid. Res. 21, 3269-3275.
5. Webster, M. K. et al. (1993) Mol. Cell. Biol. 13, 2031-2040.
6. Webster, M. K. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 11482-11485.

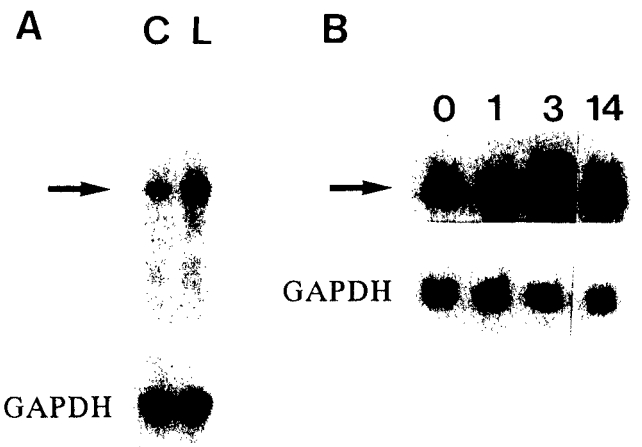


図1 (A) 脳傷害後3日目のsgk遺伝子のノーザンブロッティング
C：対照側、L：傷害側。内部標準としてGAPDHのcDNAプローブを用いた。
(B) 脳傷害後各時期でのsgk遺伝子の発現パターン
数字は傷害後の日数を示す。



図2 脳傷害部におけるsgkおよびPLP遺伝子の分布
(A) sgk遺伝子の分布、(B) (A)の隣接切片におけるPLP遺伝子の分布。
矢頭は両遺伝子の分布が類似する領域。

113 ラット局所脳虚血中及び血流再開後の脳内NO産生増大とその由来 - NO電極装置を用いたin vivo直接定量 -

長藤寿昭[1)]、杉山昌一[1)]、松居　徹[2)]
中外製薬（株）創薬第四研究所[1)]、埼玉医大総合医療センター脳外[2)]

[要約]
ラット左中大脳動脈（MCA）閉塞中に、患側大脳皮質表層部の一酸化窒素（NO）産生は二相性の時間経過をもって増大した。血流再開後の急性期に於いても、NOの産生増大が観察された。一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害剤の一つであるN^G-nitro-L-arginine（L-NNA）（1 mg/kg i.p.）の投与によりこれらNO産生の増大は明らかに抑制され、この時、浮腫の軽減と梗塞巣の縮小が観察された。NO産生増大の由来を明らかにする目的で、患側大脳半球から脳微小血管を単離しNOS活性の経時変化を調べたところ、比較的急性期のNO産生増大期にはCa^{2+}依存性恒久型NOS（cNOS）が、またそれ以降のNO産生増大期にはCa^{2+}非依存性誘導型NOS（iNOS）活性が有意に増加することが判明した。以上の実験成績は、脳微小血管にはcNOSとiNOSの両者が存在し、脳虚血中あるいは血流再開後、これら異なるNOSアイソフォームが異なる機構により活性化されることを示唆している。

[背景と目的] 現在のところ、NOS阻害剤の局所脳虚血中あるいは血流再開後の病理組織学的変化に対する作用は、一定した結論が得られていない（1）。我々は詳細な用量依存的検討から、L-NNAは一時的前脳虚血後の海馬CA1領域に発生する神経細胞壊死と永久あるいは一時的局所脳虚血後に発生する脳浮腫に対して、限られた比較的低用量域のみ改善作用を有することを報告してきた（3-5）。これら一連の我々の実験成績は、上述したこれまでの矛盾する報告に一つの原因を提示すると共に、永久あるいは一時的局所脳虚血後に脳内でNO産生が増大することを示唆するものである（2）。そこで今回我々は、脳虚血中と血流再開後に於ける脳内NO産生をNO微小電極装置を用いてin vivoの条件で直接定量することを試みた。さらに、脳微小血管内のcNOSとiNOS活性の経時変化も併せて検討した。

[実験方法] SD系成熟雄性ラットを気管内挿管後、３０％O_2, ７０％N_2O, 1.5 - 2.0％ハロセンの混合ガスによる全身麻酔下に調節呼吸を行い、右大腿動脈から血圧をモニターした。虚血側大脳皮質表層部のNO産生と血流量は、それぞれInter Medical社製のModel NOE-55とアドバンス社製のレーザー血流計を用いて測定した。次いで、左MCA本幹のレンズ核線条体動脈起始部をミニクリップを用いて閉塞した（3、4、6）。L-NNA（1 mg/kg i.p.）は、4時間永久閉塞モデルではMCA閉塞5分前と3時間後に、また2時間閉塞後2時間再開通モデルではMCA閉塞5分前と血流再開1時間後に投与した。一定時間後、大脳皮質の組織を用いて比重値を、またHE染色した大脳半球の冠状断脳連続切片を用いて梗塞巣を定量した（3、5）。脳微小血管内のcNOSとiNOS活性は、以前我々が報告した様に[^{3}H]-L-arginineから[^{3}H]-L-citrullineへの変換量を測定する方法で行った（6）。

[実験成績] ラットの左MCAを閉塞すると、１５-３０分後に患側大脳皮質表層部のNO濃度は2.4-4 μM増大し、その後一旦虚血前のレベルに戻ったが、3-4時間後に再び約1.6μMの増大を示した（図１A）。一方、2時間閉塞後2時間血流を再開通するモデルでは、再開1-2時間後に約6μMのNO濃度上昇を認めた。L-NNA（1 mg/kg i.p.）を4時間永久閉塞モデルではMCA閉塞5分前と3時間に、また2時間閉塞後2時間再開通モデルではMCA閉塞5分前と血流再開1時間後に投与すると、上述した脳内NO産生の増大は明らかに減少した（図１B）。同様な用量とタイミングで投与されたL-NNAは、4時間永久閉塞モデルと2時間閉塞後2時間再開通モデルの両者で、患側大脳皮質表層部の比重値の低下を抑制し、大脳皮質領域の梗塞巣の面積を縮小させた。またこの改善作用は、後者のモデルに於いて顕著であった。次に、虚血中あるいは血流再開後に観察された脳内NO産生増大の由来を探るために、脳微小血管に着眼し、cNOSとiNOS活性の経時変化を調べた。その結果、永久閉塞モデルでは１５分後にcNOS活性がコントロールの９０６％に増大し、その後の4時間後と２４時間後にはiNOS活性が９２０％と９２２％に増大していた（図２A）。一方2時間閉塞後2時間再開通モデルでは、再開１５分後にcNOS活性がコントロールの5倍以上に増大することが明らかとなった（図２B）。

[考察] 今回の我々の実験成績は、脳虚血中、及び脳虚血後に脳内のNO産生が増大することの直接的な証拠を提出するものである。興味深いのは、虚血中のNO産生の経時変化は二つのピークを持つことである。

得られた脳微小血管中のNOS活性の経時変化は、虚血１５分後のNO産生増大にはcNOS活性上昇が、また虚血３-４時間後のNO産生増大にはiNOS活性上昇が、少なくとも部分的に寄与していることを示唆している。同様な観点から、血流再開１５分後のNO産生増大には脳微小血管中のcNOSの活性上昇が関与するものと考えられる。NOS活性上昇の機序は不明であるが、cNOSの活性上昇には細胞内へのCa^{2+}の流入が、またiNOSの活性上昇には免疫担当細胞からのサイトカイン産生増大が関与するものと推察される。これまで我々が報告してきたL-NNAの虚血性脳浮腫、脳梗塞巣の改善作用の作用機序を考察する上で、４時間永久閉塞モデルよりも損傷の程度が大きかった２時間閉塞後２時間血流再開するモデルに於いて、より顕著なL-NNAによる改善作用が認められたことは注目に値する。即ち、血流再開後様々な経路から大量に発生するO_2^-とNOとの反応から連続的に発生する種々の活性酸素種が引き起こす脂質過酸化による透過性増大や、ミトコンドリア電子伝達系関連酵素や解糖系を構成する酵素阻害によるエネルギー枯渇をL-NNAは抑制するのではないかと想像される。

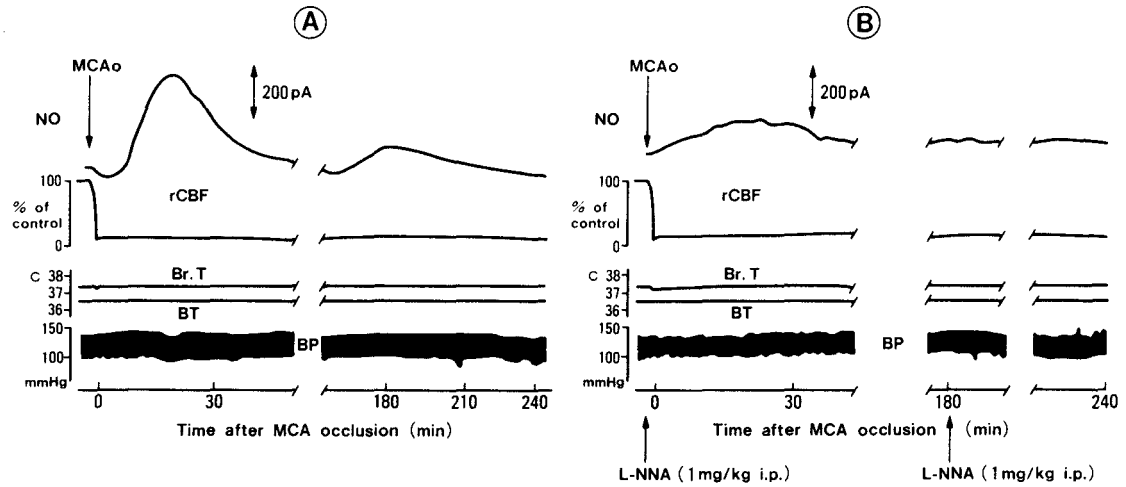


図１．ラット左MCA閉塞中の患側大脳皮質内のNO産生、脳血流量(rCBF)、側頭筋内温度(Br. T)、直腸内温度(BT)、体血圧(BP)の変動(A)とL-NNAの作用(B)

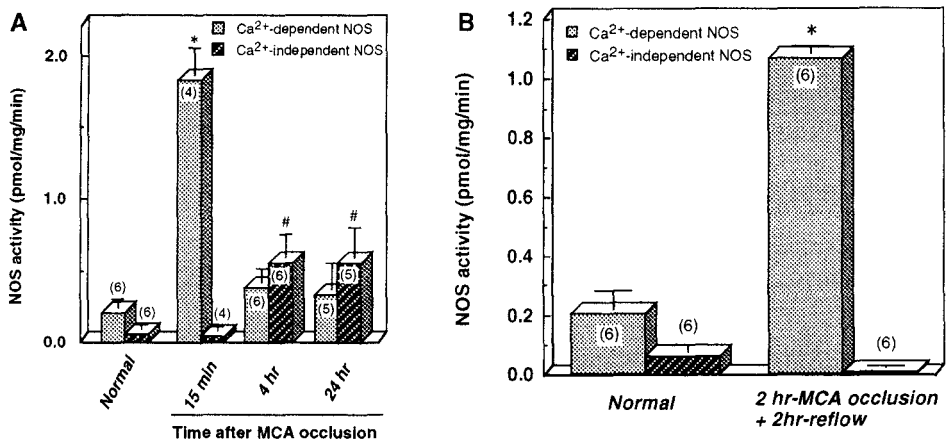


図２．ラット左MCA閉塞中(A)と血流再開中(B)に患側大脳半球から単離した微小血管のNOS活性の変化

[引用文献]

1. Iadecola C. et al. (1994) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 175-192.
2. Malinski T. et al. (1993) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 355-358.
3. Nagafuji T. et al. (1992) *Neurosci. Lett.* 147, 159-162.
4. Nagafuji T. et al. (1993a) *J. Neurochem.* 61, S142.
5. Nagafuji T. et al. (1993b) *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.* 248, 325-328.
6. Nagafuji T. et al. (1994) *Acta Neurochir.* 60, 285-288.

114　一過性脳虚血後のATP・ユビキチン依存性蛋白質分解系の変化

上久保　毅[1) 2)]、林　敬[1)]、野賀　正史[1) 3)]、大川　清[1)]
東京慈恵会医科大学　1）医化学　2）脳神経外科　3）精神神経科

（要約）一過性脳虚血後の砂ネズミ脳における蛋白質ユビキチン化酵素及びATP依存性プロテアーゼの酵素活性を測定した。10分間の前脳虚血後、蛋白質ユビキチン化酵素の活性に変化は見られなかったが、再灌流30分後に一過性に20Sプロテアーゼ活性の増加、26Sプロテアーゼ活性の低下が認められた。一過性脳虚血後、ATP・ユビキチン依存性蛋白質分解系は不可逆的障害を受けていないが、再灌流早期のユビキチン化蛋白質の増加には26Sプロテアーゼの活性低下が関与している可能性が示唆された。

（目的）ユビキチンは、変性蛋白質に複数の酵素の作用によりATP依存性に結合し、ユビキチン化蛋白質はATP依存性の26Sプロテアーゼにより分解される（1, 7, 8, 11）。神経細胞は他の組織と比べて、細胞内ATP量が速やかに枯渇することより、虚血時にはATP依存性蛋白質分解系が抑制されることが予想される。一方、脳虚血後にユビキチンの免疫反応性が減弱し、細胞死をきたす部位ではユビキチンの免疫反応性が回復しないことから、脳虚血後の神経細胞死に蛋白質ユビキチン化の障害及び、それに伴う変性蛋白質の蓄積が関与するという仮説が提示された（9）。しかし我々の検討では、一過性前脳虚血後、再灌流早期にむしろユビキチン化蛋白質は増加していた（2, 3, 4, 5）。今回、脳虚血のATP・ユビキチン依存性蛋白質分解系への影響を検討するために、蛋白質ユビキチン化酵素及びATP依存性蛋白質分解酵素の活性を測定した。

（方法）ハロセン麻酔下に砂ネズミ（60～80g）の両側頚動脈を10分間閉塞した。再灌流後経時的に海馬及び大脳皮質（n=10～12）を摘出し、緩衝液（0.25M Sucrose, 1mM DTT, 0.5mM EDTA, 10μg/ml leupeptin, antipain, chymostatin, pepstatin A, 1mM APMSF, 20mM Tris-HCl, pH 7.5）中でホモジェナイズ後、100,000 x g 1時間遠心、上清を試料とした。海馬は4匹をまとめて1試料（n=2～3）とした。A．ユビキチン化酵素活性の測定：熱変性^{125}I-リゾチームと試料をATP regenerating system、hemin存在下にインキュベート後、4-20% SDS-PAGEで分離、オートラジオグラフィー後イメージアナライザーBAS 2000（FUJI）により分子量30KDa以上のユビキチン化リゾチームの定量を行ない、ユビキチン化酵素活性とした。さらに、大脳皮質の試料からユビキチン化酵素を部分精製し（6）同様に活性を測定した。B．ATP依存性プロテアーゼの活性測定：大脳皮質の各試料をATP regenerating systemを含む緩衝液中で37°C 1時間反応させた後、15-35%グリセリン密度勾配遠心法で分画し（10）、各画分の蛍光基質（Suc-LLVY-MCA）の分解活性を測定した。また、分画前の各試料中のプロテアーゼ含量をラット抗プロテアソーム抗体を用いたイムノブロット法で比較した。

（結果）A．虚血後、海馬、大脳皮質ともに蛋白質ユビキチン化酵素活性には変化は認められなかった（図1）。また、大脳皮質から部分精製した酵素活性にも変化は認められなかった（図2）。B．ATP存在下に試料を37°C 1時間反応させると、グリセリン密度勾配遠心法により26Sと20Sの各プロテアーゼに該当する二峰性のペプチダーゼ活性が認められた（図3）。虚血後26S及び20Sプロテアーゼ活性のピークの総和に明らかな差は見られなかったが、再灌流30分後において一過性の20Sプロテアーゼ活性の増加、26Sプロテアーゼ活性の低下を認めた（図3、図4）。26S及び20Sプロテアーゼの含量には明らかな差は認められなかった（図5）。

（考察）神経細胞は抽出操作中においてもATPが枯渇しやすいため、あらかじめATPとインキュベートした場合のみ26Sプロテアーゼ活性が確認できた。20Sプロテアーゼは、ATP存在下に26Sプロテアーゼに会合することが

知られているが、再灌流30分後において、in vitroでその会合が一過性に抑制されたと考えられるが、その機序は不明である。今回の結果より脳虚血によりATP・ユビキチン依存性蛋白質分解系は障害を受けていないことが明らかになったが、ユビキチン化蛋白質の増加に関しては、虚血-再灌流によるユビキチン化される基質蛋白質の増加、さらに26Sプロテアーゼの一過性の活性低下も関与することが示唆された。

（謝辞）

ラット抗プロテアソーム抗体を提供して頂いた徳島大学酵素科学研究センター、田中啓二博士、実験動物を提供して頂いた大正製薬総合研究所、唐沢康子博士、荒木博陽博士、グラディエントメーカーを貸与して頂いた第一製薬中央研究所、田中淳二博士に感謝いたします。本研究は文部省科学研究費（05770441）の補助を受けた。

（文献）

1. Ganoth, O., Leshinsky, E., Eytan,E. and Hershko, A. (1988) J. Biol. Chem. 263, 12412-12419
2. Hayashi, T., Takada, K. and Matsuda, M. (1991) Mol. Chem. Neuropath. 15, 75-82
3. Hayashi, T., Takada, K. and Matsuda, M. (1992) J. Neurosci. Res. 31, 561-564
4. Hayashi, T., Takada, K. and Matsuda, M. (1992) Neuroreport 3, 519-520
5. Hayashi, T., Tanaka, J., Kamikubo, T., Takada, K. and Matsuda, M. (1993) Brain Res. 620, 171-173
6. Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Chiechanover, A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 8206-8214
7. Hershko, A. (1988) J. Biol. Chem. 263, 15237-15240
8. Hough, R., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1987) J. Biol. Chem. 262, 8303-8313
9. Magnusson, K. and Wieloch, T. (1989) Neurosci. Lett. 96, 264-270
10. Orino, E., Tanaka, K., Tamura, T., Sone,S., Ogura, T. and Ichihara, A. (1991) FEBS Lett. 284, 206-210
11. Waxman, L., Fagan, J.M. and Goldberg, A.L. (1987) J. Biol. Chem. 262, 2451-2457

図1 脳虚血後の蛋白質ユビキチン化酵素活性の変化

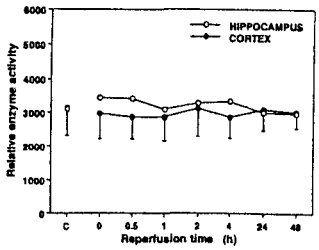


図2 脳虚血後の大脳皮質から部分精製した、蛋白質ユビキチン化酵素活性の変化

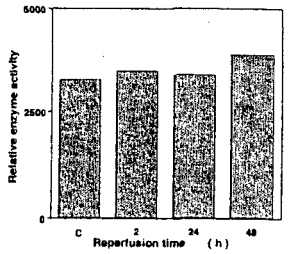


図4 脳虚血後の20S及び26Sプロテアーゼ活性の比の変化

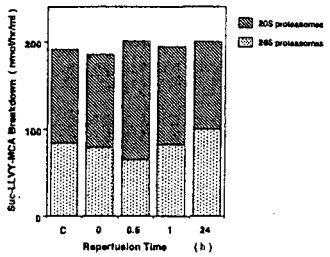


図3 脳虚血後の大脳皮質ATP依存性プロテアーゼ活性の変化

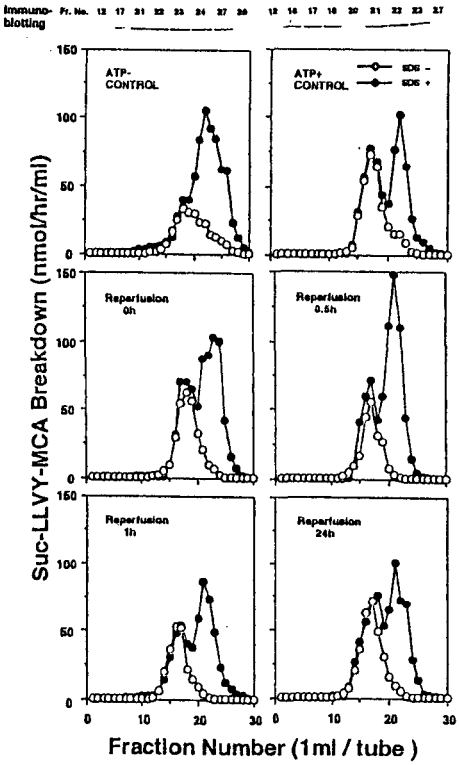
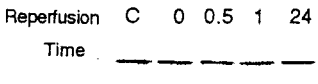


図5 脳虚血後のproteasome量の変化



115 培養神経細胞を用いたin vitro脳虚血モデルに於けるグルタミン酸の遊離と細胞傷害に対するグルタミン酸受容体拮抗剤及びカルシウムチャンネル阻害剤の作用

木村　真奈美、宮川　武彦、片山　幸一、西沢　幸夫
（エーザイ株式会社　筑波研究所）

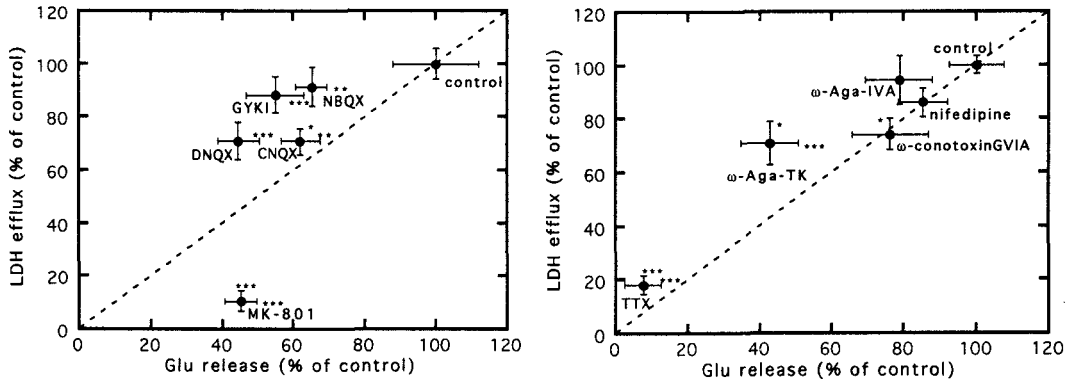
〔要約〕グルタミン酸受容体拮抗剤とカルシウムチャンネル阻害剤を用いて、培養神経細胞のin vitro虚血モデルにおけるグルタミン酸の遊離と細胞傷害に対する作用を検討した。虚血処置によるグルタミン酸の遊離と細胞傷害は、NMDA受容体拮抗剤MK-801によってともに顕著に抑制され、グルタミン酸の遊離に比べ細胞傷害に対しより強い抑制効果が認められた。一方、non-NMDA受容体拮抗剤は細胞傷害よりグルタミン酸の遊離に強い抑制効果を示した。non-NMDA受容体拮抗剤NBQXは単独では細胞傷害を殆ど抑制しないが、MK-801と同時添加することによりMK-801に比べより顕著な抑制が観察された。また虚血処置によるグルタミン酸遊離と細胞傷害は、P-タイプカルシウムチャンネル阻害剤ω-Aga-TKによっても有意に抑制された。N-タイプ阻害剤ω-conotoxin GVIAで細胞傷害に抑制傾向が見られたが、L-タイプ阻害剤nifedipinは有意な抑制を示さなかった。以上の結果から、虚血によって引き起こされるグルタミン酸の細胞外への遊離には、グルタミン酸受容体の活性化ならびにカルシウムチャンネルの活性化を伴うことが明らかとなった。

（目的）　虚血性神経細胞傷害の原因として細胞内カルシウムの異常な上昇と細胞外に遊離されるグルタミン酸毒性の関与が疑われているが、カルシウムの流入経路、グルタミン酸の遊離のメカニズムについては未だ十分に解明されていない。細胞内カルシウムの流入経路としては、グルタミン酸受容体と電位依存性カルシウムチャンネルが主に働いていると考えられる。一方神経終末においては、non-NMDA受容体(4)およびカルシウムチャンネルからのカルシウムの流入がグルタミン酸遊離を促進すると考えられている。NMDA受容体拮抗剤は虚血による細胞傷害に抑制効果を示すことが報告されてきたが、non-NMDA受容体拮抗剤はin vivoにおける抑制効果は報告されているものの、in vitroでは抑制効果がないと報告されていた。また、中枢神経系に於いては種々神経伝達物質の遊離にPおよびN-タイプカルシウムチャンネルが関与していることが明かとされてきたが、虚血時のカルシウムチャンネルの関与についてはN-タイプ阻害剤ω-conotoxin GVIAが虚血時のドーパミンの遊離を抑制し(8)、虚血に於ける細胞傷害に効果があったことが報告されている(9)もののほとんど報告がなされていない。そこで、培養神経細胞を虚血条件下に置いたときに見られるグルタミン酸遊離の増大および引き続いて起こる細胞傷害に対する、グルタミン酸受容体拮抗剤およびカルシウムチャンネル阻害剤の作用について検討を行った。

（方法）　大脳皮質培養神経細胞はラット胎仔(E17)より調製し、5% 牛胎仔血清を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)中で15-17日間培養後用いた。虚血処置は、95%N_2/5%CO_2で置換したチャンバー内で神経細胞をグルコースを除いた緩衝液中(37℃)でインキュベーションして行った。グルタミン酸の定量は蛍光検出器を用いHPLCで行った。虚血処置後の神経細胞はDMEMに戻し、CO_2インキュベーター中で更に一日培養した後に、細胞外LDHを測定し細胞傷害の程度を検討した。種々拮抗剤および阻害剤は、緩衝液、培養液ともに添加した。

（結果）　虚血処置によるグルタミン酸の遊離は、NMDA受容体拮抗剤MK-801によって抑制された。MK-801はグルタミン酸の遊離抑制作用も示したが、細胞傷害をより強く抑制した。一方、non-NMDA受容体拮抗剤NBQXは、グルタミン酸の遊離を有意に抑制するものの細胞傷害は抑制しなかった。non-NMDA受

容体拮抗剤の中では、グルタミン酸遊離抑制の強い拮抗剤は細胞傷害も抑制する傾向が見られた。NBQX単独では細胞傷害を抑制しないが、MK-801と同時添加することによりさらに顕著な抑制を示した。虚血処置により引き起こされたグルタミン酸の遊離と細胞傷害は、P-タイプカルシウムチャンネル阻害剤ω-Aga-TKによって有意に抑制された。P-タイプ阻害剤ω-Aga-IVAによっては、抑制傾向は見られたが有意差はなかった。N-タイプ阻害剤ω-conotoxin GVIAによって細胞傷害に抑制傾向が見られた。L-タイプカルシウムチャンネル阻害剤nifedipineによっては有意な抑制は見られなかった。またナトリウムチャンネル阻害剤TTXによってグルタミン酸遊離および細胞傷害に対し顕著な抑制が見られた。



（図1）大脳皮質神経細胞の虚血処置により細胞外へ遊離されたグルタミン酸、LDHに対する各種グルタミン酸受容体拮抗剤(MK801 10 μM, NBQX 30 μM, CNQX 100 μM, DNQX 100 μM, GYKI 200 μM) 各種チャンネル阻害剤(ω-Aga-TK 1 μM, ω-Aga-IVA 1 μM, ω-conotoxin GVIA 3 μM, nifedipine 3 μM, TTX 1 μM) の抑制作用の相関を示した。薬剤を加えない場合のグルタミン酸、LDHの遊離を100%とした。* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

（考察）*in vitro*虚血実験において、NMDA受容体は直接細胞傷害に関与しているだけでなく、グルタミン酸の遊離を促進することによって間接的にも細胞傷害に関与することが示唆されている(3, 7)。*in vivo*虚血では、non-NMDA受容体拮抗剤GYKIはグルタミン酸, GABAの遊離を抑制することが報告され(1, 2)、NBQXはグルタミン酸の遊離を阻害し神経傷害にも効果があることが報告された(5)。*in vitro*虚血モデル実験において、non-NMDA受容体の拮抗剤は単独では細胞傷害抑制効果を示さないが、NMDA受容体拮抗剤存在下では抑制効果を増強することが報告されたが(6)、そのメカニズムは明かにされていなかった。今回の結果から、グルタミン酸などの興奮性アミノ酸の遊離を抑制することにより細胞傷害を抑制することができること、またnon-NMDA受容体拮抗剤は興奮性アミノ酸遊離の抑制作用を持つことが明らかとなった。また、*in vitro*虚血モデルで見られるグルタミン酸遊離の少なくとも一部は、電位依存性カルシウムチャンネルの活性化に依存していることが示唆された。高濃度KCl刺激によるグルタミン酸遊離では、ω-Aga-IVAの方がω-Aga-TKより強い阻害作用を示す。高濃度KCl刺激時、虚血時に見られる両カルシウムチャンネル阻害剤の作用の差異は、阻害するカルシウムチャンネルの分子種およびその局在性の違いを示唆している。

（参考文献）(1) Arvin, B., Lekieffre, D., Graham, J. L., Moncada, C., Chapman, A. G. and Meldrum, B. S. (1994) *J. Neurochem.* 62, 1458-1467 (2) Babak, A., Claudia, M., Eliane, L.P., Astrid, C. and Brian, S. M. (1992)*Neuro Report*, 3, 235-238 (3) Choi, D. W. and Lobner, D.C. (1993) *Neurology*, 43, A339 (4) Ferkany, J. W., Zaczek, R. and Coyle, J. T. (1982) *Nature*, 298, 757-759 (5) Gaspary, H. L., Simon, R. P., Zarow, G. J., Greenberg, D. A. and Graham, S. H. (1993) *Neurosci. Abstr.* p850 (6) Kaku, D. A., Goldberg, M. P. and Choi, D. W. (1991) *Brain Research*, 554, 344-347 (7) Lobner, D. and Lipton, P. (1990) *Neurosci. Lett.* 177, 169-174 (8) Ooboshi, H., Sadoshima, S., Yao, H., Nakahara, T., Uchimura, H. and Fujishima, M. (1992) *J. Neurochem.* 58, 298-303 (9) Yamada, K., Teraoka, T., Morita, S., Hasegawa, T. and Nabeshima, T. (1994) *Neuropharmacology*, 33, 251-254

116 Fas抗体によるグリオーマ細胞のアポトーシス誘導とスフィンゴミエリン情報伝達系

白石哲也、中川摂子、戸田啓介、木原俊壱、鞠　硯、田渕和雄
（佐賀医科大学　脳神経外科）

〔要約〕

培養ヒトグリオーマ細胞(T98G)はFas抗原を高度に発現し、抗Fas抗体を作用するとapoptosisが誘導されることを報告してきた(1)。今回我々は抗Fas抗体結合後の細胞内情報伝達の経路を明らかにするためにスフィンゴミエリン情報伝達系に関して検討した。Fas抗体処理後30分以内にT98G細胞のスフィンゴミエリン分画の減少が認められた。スフィンゴミエリンの分解産物で膜透過性のあるC2 ceramideを投与すると、24時間後より生細胞数の減少、細胞核の凝集、電気泳動におけるDNA ladder patternの観察、*in situ* nick end labeling 染色による細胞核の染色等の所見が得られ、apoptosisの誘導が確認された。抗Fas抗体により誘導されるT98Gのアポトーシスにスフィンゴミエリン代謝系の関与が示唆された。

【目的】我々は培養グリオーマ細胞(T98G)がFas抗原を発現し、抗Fas抗体がアポトーシスを誘導することを昨年の本会で報告した(1)。Apoptosisは高度に制御された機構と考えられているが、その細胞内シグナル伝達系に関する研究は少ない。最近HL60およびU937においてTNFαおよびIL-1β処理後誘導されるapoptosisにスフィンゴミエリン代謝系が関与していることが報告されている(2,3)。本研究はFas抗原によるアポトーシスの情報伝達系を解明する目的で、スフィンゴミエリン情報伝達系に注目し、抗Fas抗体処理による変化を観察した。

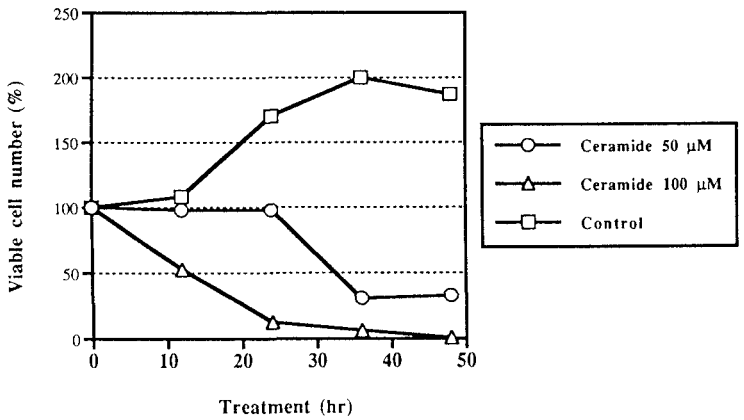
【方法】T98G細胞に抗Fas抗体(50 ng/ml; MBL社)を作用させ、0,5,10,15,30分後に細胞を回収し、Folch液にて脂質を抽出し、イアトロスキャン分析にてリン脂質分画を測定した(4)。スフィンゴミエリンの分解産物で膜透過性のあるC2 ceramide (N-Acetyl-sphingosine; Matreya)を培養液中に種々の濃度で添加し、光顕的に形態変化を観察するとともに細胞増殖曲線を作製した。また細胞よりDNAを抽出し、2%アガロースゲルによる電気泳動を行った。さらにGavrieliら(5)の*in situ* nick end labeling法を用いてDNA 断片化をきたしている細胞核を染色し観察した。

【結果】抗Fas抗体作用30分後にスフィンゴミエリン分画が初期値に比し約30%減少した。C2 ceramideにより時間ならびに濃度依存性に生細胞数は減少した(Fig. 1)。処理後12時間より凝集したクロマチンを有する細胞が増加し(Fig. 2)、電気泳動ではapoptosisに特徴的なDNA ladder patternが認められた(Fig. 3)。またnick end labeling染色にて、クロマチンの凝集がみられる細胞核が明瞭に検出された。

【考察】最近Fas ligandがcytotoxic T cellから単離され(6)、Fas抗原の生理的な役割が解明されつつあるが、その細胞内情報伝達系は不明である。最近HL60およびU937においてTNFαおよびIL-1β処理後誘導されるapoptosisにスフィンゴミエリン代謝系が関与していることが報告されている(2,3)。Fas抗原はTNF受容体スーパーファミリーに属しており(7)、同様な細胞内情報伝達システムを利用している可能性が高いと考えられる。今回の我々の実験よりスフィンゴミエリンの代謝産物であるceramideが実際にT98G細胞にapoptosisを誘導し、抗Fas抗体処理によりスフィンゴミエリンが代謝されることが確認された。以上の結果から抗Fas抗体により誘導されるT98Gグリオーマ細胞のアポトーシスにはスフィンゴミエリン代謝系が関与していることが示唆された。今後他の情報伝達系とのクロストークやエンドヌクレアーゼとの関連などを解明する必要があると思われる。

【文献】(1) 白石哲也　他(1993)神経化学 32, 100 (2) Obeid M, et al. (1993) Science 259, 1769 (3) Jarvis WD, et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91, 73
(4) 狩野元成　他(1976) 最新医学 31, 2002 (5) Gavrieli Y. et al. (1992) J Cell Biol 119, 493 (6) Suda T. et al. (1993) Cell 75, 1169 (7) Itoh N. et al. (1991) Cell 66, 233

Fig. 1 Cytocidal effect of C2 ceramide in T98G



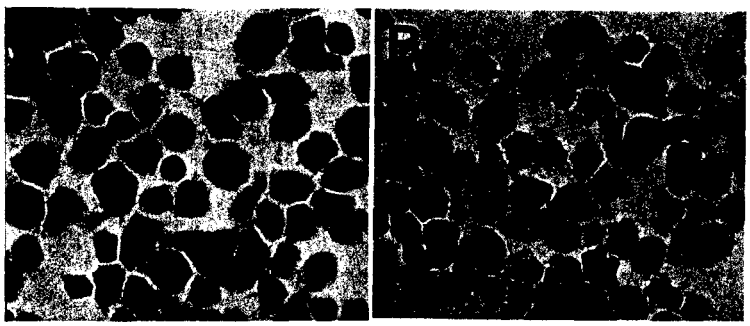


Fig. 2 Morphological changes of T98G treated by C2 ceramide
A: control, B: 24hr after treatment

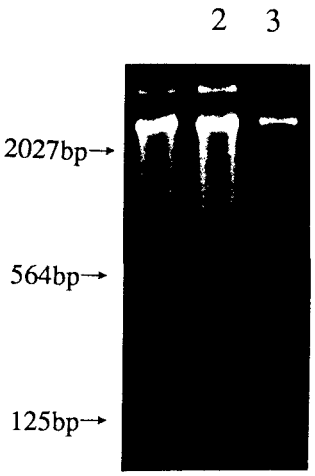


Fig. 3
DNA fragmentation induced by C2-ceramide in T98G
1: incubation for 12h,
2: 24h,
3: control

117 脳内在性Catechol-isoquinolinesによるパーキンソン病ラットモデルの作成

丸山和佳子[1)]、直井信[2)]

[1)] 名古屋大、医、神経内科、 [2)] 名工大

「要約」

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の発見以来パーキンソン病(PD)が内在性神経毒により発症するとの仮説が提唱されている。我々は過去数年ドパミン(DA)よりヒト脳で生成される1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol, Sal)に着目し研究してきた。Salは脳内でN-methyltransferaseにより1, 2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (NMSal)となり[1)] さらに酸化され1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-isoquinolinium ion (DiMeDHIQ$^+$)となることを証明した[2)]。今回我々はSal誘導体であるこれらcatechol-isoquinolineを用いたラットPDモデルを作成した。catechol-isoquinolineをラット脳内に注入し、行動と脳内モノアミンレベルの変化を検討した。(R)-NMSalと DiMeDHIQ$^+$はラットに無動、筋硬直等のPD類似の神経症状を惹起し、同時に脳内DAを著明に低下させることが示された。このPDモデルのDA細胞傷害の機序につき検討を行った。

「方法」

ラットの線条体に脳定位手術を行いKrebs-Ringer solutionに溶解したcatechol-isoquinolineを注入した。3ないし4日後ラットをpentobarbitalにて麻酔し断頭脳切片をrodent brain matrixにて作成し生化学的分析に用いた。また脳を20% formaldehydeで固定し病理的検討を行った。神経伝達)物質の定量はHPLC-multi ECD system (NEUROCHEM)により[3)]、Sal, NMSalはHPLC-ECD, DiMeDHIQ$^+$はHPLC-fluorimetric detection (FD)にて測定した。

「結果」

catechol-isoquinolineを脳内に注入し行動の変化を観察した。(R)-NMSal, DiMeDHIQ$^+$により、無動、不随意運動、回転、筋硬直が認められた。一方(R)Salそのものや、脳内で通常生成されない(S)Sal, (S)NMSalによては行動の変化は認められなかった。線条体に(R)-NMSal, DiMeDHIQ+を注入したラット脳で線条体と黒質の存在部位に相当する切片におけるモノアミン量の変化を示す(図1)。神経終末(線条体 Brain-II)、細胞体(黒質 Brain-VII)ともにDAが顕著に低下したが、セロトニンは変化しなかった。またNMSal. DiMeDHIQ$^+$の定量を行ったところ、

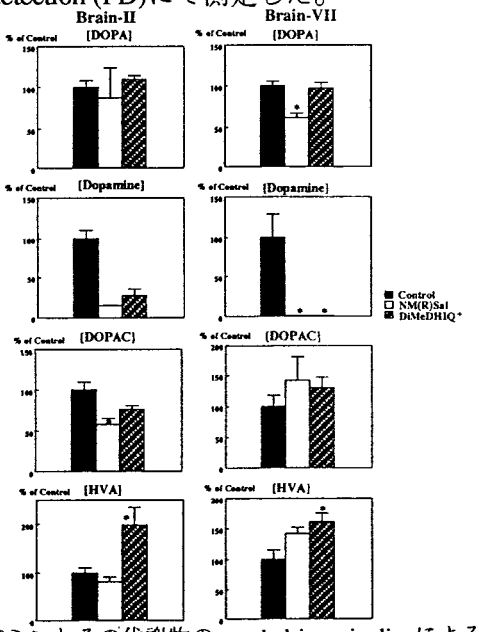


図1 ラット脳内ドパミンとその代謝物のcatechol-isoquinolineによる変化

図2に示す様にDiMeDHIQ⁺がより多く蓄積され、また(R)-NMSal注入の場合のみ黒質に酸化体の蓄積が認められた。

この選択的な蓄積の機序を明らかにするためhuman dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y細胞を用いこれらcatechol-isoquinolineの細胞内への取り込みを検討した。(R)-, (S)-NMSalのみがDA transporterによりとりこまれ(Table 1)、反応速度論解析によりMichaelis-Mentenの式に従う取り込みが認められたのは(R)-NMSalであり、Km, Vmaxはそれぞれ102 ± 37 μM, 66 ± 3 pmol/min/mg proteinと得られた。

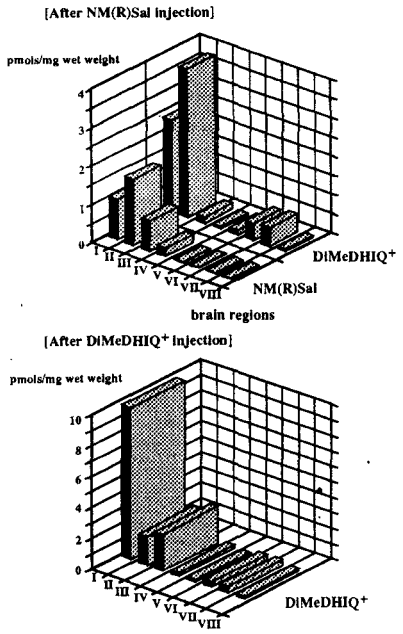


図2 ラット脳内におけるcatechol-isoquinolineの蓄積
ラット脳は吻側より2 mmの厚さで切られ、IからVIIIの8枚のスライスに分けられた。

Table 1

	Relative uptake velocity (% Control)				
	(R)-NMSal	(R)-Sal	(S)-NMSal	(S)-Sal	1,2-DiMeDHIQ+
Dopamine	54.7 ± 6.5*	193 ± 46.5	50.4 ± 8.7*	88.5 ± 5.9	420 ± 18.8
Mazindol	51.0 ± 7.5*	244 ± 19.3	48.2 ± 15.0*	99.6 ± 8.4	191 ± 31.2
Nomifensine	61.9 ± 13.7*	213 ± 26.2	73.1 ± 3.3*	150 ± 27.5	119 ± 8.5

* $p < 0.05$

「考察」

これらの結果はヒト脳内でDAから生成されたcatechol-isoquinolineがN-メチル化と酸化反応によりDA細胞に対して選択性と細胞毒性を増すことを示している。すなわちDA細胞への取り込みにはN-メチル化された還元体、また細胞毒性と蓄積には酸化体であることが必要となる。我々はDiMeDHIQ⁺がメラニンと結合し、Fe(II)/Fe(III)の比が減少することによりその結合が減少することを最近報告した[4]。DiMeDHIQ⁺が加齢によるFe(III)の増加により細胞内に放出され、ATP産生を阻害することによりより細胞死をもたらす可能性がある。

「文献」

1) W. Maruyama, et al. (1992) J. Neurochem. 59, 365-400. 2) W. Maruyama, et al. (1993) Neurosci. Lett. 149, 115-118. 3) M. Naoi, et al., (1994) Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Plenum Press, in press. 4) M. Naoi, et al., (1994) Neurosci. Lett. 171, 9-12

118 ラット大脳皮質微小管重合に対する慢性ストレスの影響

貴家康男、朝倉幹雄、宮本聖也、長田賢一、今福 淳
（聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室）

〔要約〕慢性変動ストレス (chronic variable stress; CVS) と慢性単一ストレス (chronic fixed stress; CFS) のラット大脳皮質微小管重合に対する作用を比較し、生体防御機制における意義を考察した。
1. 急性単回拘束ストレス 1 時間および tail-pinch 5 分間施行後、微小管重合初速度は増加した。
2. フォスファターゼ阻害薬 (calyculin A, orthovanadateNa) 存在下で試料を調製した場合、拘束 CFS 3 日間施行後は微小管重合初速度は増加するが 7 日間施行後には回復した。しかし フォスファターゼ阻害薬非存在下で調製した場合、拘束 CFS 7 日間施行後も重合初速度は増加した。
3. CVS 3 日間と 7 日間施行 5 分後および 8 時間後のいずれも、フォスファターゼ阻害薬存在の有無にかかわらず重合初速度が増加した。
4. 微小管重合抑制は CFS 後に起こり、CVS 後では見られないことからストレスに対する適応あるいは防御機制を反映すると考えられる。
5. CFS 7 日後の微小管重合初速度の回復 (抑制) は、何らかのリン酸化反応に基づくと考えられ、基質蛋白質 として MAPs (MAP2/ τ 因子) のリン酸化による可能性が示唆された。

〔緒言〕ストレスに対する生体反応あるいは防御機制として CRF (corticotropin releasing factor) の制御を受けたノルエピネフリンやセロトニンの代謝回転，更にこれらモノアミン受容体情報伝達系の調節機構が議論されているが，結果的に産生される各セカンドメッセンジャー固有のプロテインキナーゼによるリン酸化反応とその基質蛋白質の役割について知られていない。我々は cyclic AMP 依存性キナーゼ，Ca^{2+} / リン脂質依存性キナーゼおよび Ca^{2+} / カルモジュリン依存性キナーゼⅡの基質である微小管関連蛋白質Ⅱ (MAP2/ τ 因子) に焦点を当て，ストレスによって引き起こされるセカンドメッセンジャー以降のリン酸化反応を知るために、チューブリンの重合特性から MAPs の機能を評価した。また、予測可能な単一ストレスの連続では慣れを生じるため、うつ病モデルとして症状、構成概念および予測の妥当性が高いと評価されている慢性変動ストレス (CVS) [1] を施行し、慢性拘束ストレスおよび急性単回ストレスの結果と比較した。

〔方法〕ウィスター系雄性ラット (BW 250-400 g) を用いた。CVS は Murua らの方法[2] に準じて、金網による拘束 , 4 ° C cold swimming, shaking, tail-pinch を無作為な順に施行した。また CFS として拘束ストレスを定時に 3, 7 日間施行した。動物は最終ストレス終了より 5 分後と 8 時間後に断頭屠殺し大脳皮質を摘出した。脳組織は PIPES buffer (EGTA, Mg^{2+}, フォスファターゼ阻害薬を含む) 中でホモジナイズ後、脱重合のため氷中に 60 分間静置後 , 100,000 g, 4 ° C, 1 時間遠心分離し粗微小管標品を調製した。チューブリン重合実験は 350 nm における吸光度を経時的に測定した。

〔結果〕＜1.急性単回ストレスの大脳皮質チューブリン重合の時間経過に対する影響＞ フォスファターゼ阻害薬 (calyculin A, orthvanadate Na) 存在下で試料を調製した場合、単回拘束ストレス 1 時間施行し解除後 30 分の結果、微小管重合初速度は増加したが最大重合は変わらない (Fig. 1A)。この重合初速度の増加は拘束ストレスを 3 日間施行した後も認められた。また tail-pinch を 1 分間と 5 分間施行し 5 分後に断頭屠殺した結果，1 分間処置では対照と有意な差は認めないが、5 分間処置では著明に重合初速度を増加し、最大重合も若干増加した (Fig. 1B)。

＜2. 拘束 CFS のチューブリン重合に対する作用＞ 拘束ストレスを 7 日間施行し最終処置から解放 5 分後および 8 時間後に断頭した結果，calyculin A 存在下で調製した場合、重合初速度は対照群と同じレベルまで回復した (Fig. 2A)。しかし calyculin A 非存在下では 5 分後、8 時間後いずれも重合初速度は増加した (Fig. 2B)。

＜3. CVS のチューブリン重合に対する作用＞ CVS 7 日間施行し最終処置から解放 5 分後 Mg^{2+} のみで調製した場合、重合初速度は増加したが (Fig. 3A)、calyculin A で調製した場合重合初速度は増加し 8 時間後も増加は持続した (Fig. 3B)。

〔考察〕大脳皮質微小管の重合特性は CFS 後と CVS 後で明かに異なる結果を示した。CFS 7 日間後、重合初速度は calyculin A 非存在下で調整した場合は増加し calyculin A 存在下では回復しているという結果から、CFS 7 日間で引き起こされた何らかのリン酸化によって重合が抑制されたと考え

られ，基質の第一候補としてMAP2/τ因子が考えられる。このCFS後の重合初速度の正常化は、ストレスに対する適応変化や防御機制を反映すると考えられる。それに対してCVSでは7日後も新たなストレッサーに対して防御機制が作動しない可能性が示唆された。我々は抗うつ薬長期投与後、チューブリンの重合が抑制されることを見いだし、その機序としてリン酸化されたMAPsよる可能性を報告した[3]。以上より抗うつ薬の長期投与はMAPsのリン酸化を促進して重合を抑制することによってストレスに対する生体の防御機制を促進あるいは惹起している可能性が考えられる。急性単回ストレス時の重合初速度の増加の機序については、ノルエピネフリンやセロトニンの遊離に由来するか、またはCRFの関与について、モノアミン合成酵素阻害薬およびCRF阻害の効果、さらに部分精製したチューブリンとMAP2の再重合実験を現在検討中であり当日報告する。微小管は細胞骨格としてだけでなく『微小管輸送システム』として軸索輸送と蛋白質の小胞輸送や遊離など細胞内情報伝達系としての重要な役割が注目されている。ストレスに対する防御機制や抗うつ薬の作用機序に関して微小管重合のリン酸化と脱リン酸化による制御機構の生理的意義を考察する。

〔文献〕 (1) Katz, R. J. & Sibel, M., (1982) Pharmacol. Biol. Behav.,16: 973., (2) Molina, V. A. et al. (1990) Pharmacol.Biol.Behav., 35: 335., (3) 宮本聖也，朝倉幹雄他 (1993) 神経化学 32: 536.

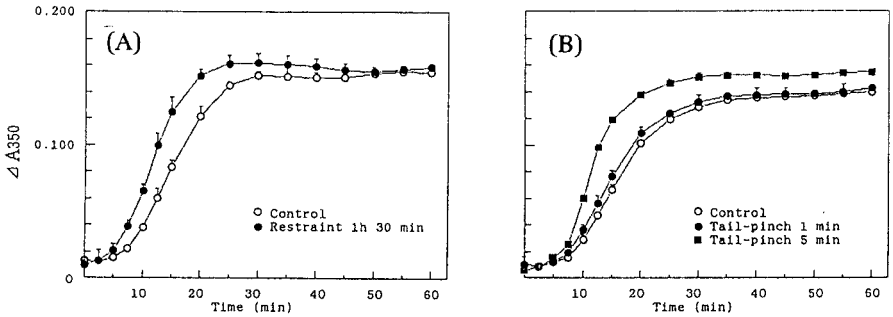


Fig. 1 Effect of single restraint (A) and single tail-pinch stress (B) on tubulin polymerization.

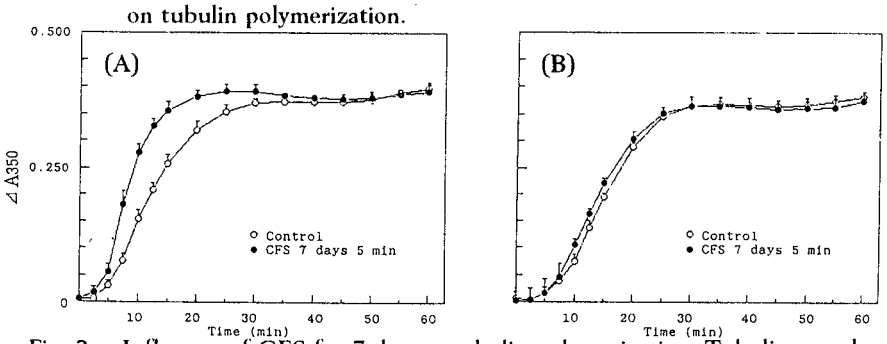


Fig. 2 Influence of CFS for 7 day on tubulin polymerization. Tubulin samples were prepared without (A) or with (B) phosphatase inhibitors.

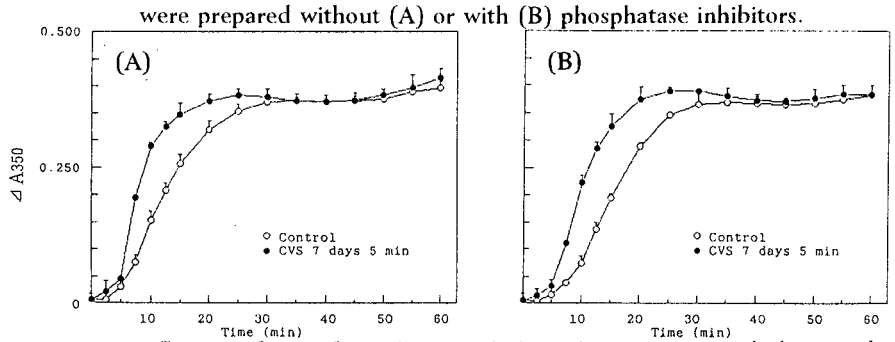


Fig. 3 Influence of CVS for 7 day on tubulin polymerization. Tubulin samples were prepared without (A) or with (B) phosphatase inhibitors.

119 脱髄疾患モデル、ミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）トランスジェニックマウスの解析

鹿川　哲史、井上　芳郎*、御子柴　克彦+、池中　一裕
（国立生理研・神経情報、*北大・医・第一解剖、+東大・医科研・化学）

〔要約〕
我々はin vitroの解析でミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）遺伝子にオリゴデンドロサイトの分化促進活性を見出した事を報告した。しかし、トランスジェニックの系を用いてin vivoでＰＬＰ遺伝子を過剰発現させるとミエリン形成不全や脱髄など、オリゴデンドロサイトの異常を引き起こした。これは過剰産生されたＰＬＰ蛋白質がオリゴデンドロサイトのゴルジ体や小胞体に蓄積され、細胞内小器官の機能を障害していることが原因であると考えられた。

〔緒言〕
近年、ミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）遺伝子は、進化的に非常に保存された遺伝子であり、わずか１アミノ酸置換の点突然変異や、遺伝子重複変異により、重篤なミエリン形成障害が引き起こされる事が報告された（ペリツェウス・メルツバッヘル病）（１）。更に最近では、伴性痙性対麻痺（ＳＰＧ２）の原因もＰＬＰ遺伝子の１アミノ酸置換であることが示された（２）。これらのことはＰＬＰが単なるミエリンの構造蛋白質でないことを示唆しており、病因の究明が切望されている。我々は、ＰＬＰ遺伝子突然変異マウス、及び、我々が作製したＰＬＰ－トランスジェニックマウスを解析する事によって、ＰＬＰ遺伝子産物ＤＭ－２０が細胞分化に機能していることを明らかにしてきた（３）。
昨年の本学会で、我々はオリゴデンドロサイトの分化誘導活性を測定するin vitroの実験系の確立と、それを用いたＰＬＰ遺伝子産物の分化促進活性について報告した。我々が開発した強制発現レトロウイルスベクターを用い、ＰＬＰ又はＤＭ－２０ｃＤＮＡを非神経系の細胞であるＮＩＨ３Ｔ３に導入したところ、その培養上清にオリゴデンドロサイト分化促進活性が検出された。ＰＬＰやＤＭ－２０蛋白質は強制発現細胞のゴルジ体や粗面小胞体に局在していた。すなわち、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又は放出を制御していることが示唆された（４）。
ところが、ＰＬＰ遺伝子過剰発現疾患モデルマウスであるＰＬＰ－トランスジェニックマウスの同時期（生後５日）には、むしろ分化の抑制が観察された。今回はこのＰＬＰ－トランスジェニックマウスの病因について詳細に解析した。

〔方法〕
１．電子顕微鏡観察　マウスの各発生段階における小脳及び脊髄を２％オスミウム酸で固定し、酢酸鉛で染色した。
２．免疫組織化学　生後２０日令マウスを４％パラホルムアルデヒドにより固定し、脊髄を厚さ１０μｍの凍結切片とし、抗ＰＬＰ抗体及び、オリゴデンドロサイトのマーカーである抗ＭＢＰ抗体、アストロサイトのマーカーである抗ＧＦＡＰ抗体、神経細胞のマーカーである抗ＭＡＰ２と２重染色した。
３．ウエスタンブロット法　マウス全脳の蛋白質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、ナイロンメンブランへ転写し、抗ＰＬＰ抗体及び抗ＭＢＰ抗体で染色した。

〔結果〕
我々は、ＰＬＰ遺伝子全長４５Ｋｂを用い、２コピーの外来性遺伝子を有するトランスジェニックマウスを作製し、保有している。導入ＰＬＰ遺伝子のホモ接合体（plp/plp）は企図震戦を示し、強直性痙攣を伴って生後１月前後で死亡した。生後２０日齢の小脳白質部分は正常マウスでは軸索のほとんどが有髄であるが、ＰＬＰ－トランスジェニックホモ接合体マウス（plp/plp）を電子顕微鏡を用いて観察すると、ほとんどの軸索にはミエリンが巻いておらず、オリゴデンドロ

サイトの細胞体には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、細胞自身が変性していることが明らかとなった。ＰＬＰ－トランスジェニックマウスの組織を凍結切片法で観察したところ、本来はその多くがミエリンに局在しているＰＬＰがオリゴデンドロサイトの細胞体近くに濃縮されており、細胞体が膨潤していた。このようなオリゴデンドロサイトは突起も貧弱で、ミエリンも低形成であった。in vitroの系での結果から、ＰＬＰ遺伝子産物はゴルジ体や祖面小胞体に産生され、ここでの分化因子放出に関する機能が示唆されていた。しかし、ＰＬＰ遺伝子がオリゴデンドロサイトに過剰に発現したことで、その細胞内小器官の機能を障害し、逆に細胞の異常や分化の遅延を招いたことが考えられた。

一方、ヘテロ接合体マウスは生後数カ月頃から軽度の痙攣と下肢の麻痺などホモ接合体とは異なる症状を発症する。多発性硬化症及び痙性対麻痺との対応も考えられ、有益性が期待されるモデル動物である。電子顕微鏡により、このマウスには顕著な脱髄が観察され、脊髄の神経軸索の変性像も観察された。このマウスの脱髄様式を検討するため、生後１２カ月の脳を抗ＰＬＰ抗体及び抗ＭＢＰ抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。ＰＬＰは野生型とほぼ同量の検出されたが、ＭＢＰは著減していた。ＰＬＰは細胞体で産生され、ＭＢＰはｍＲＮＡが運ばれミエリン近くで翻訳されることから、ヘテロ接合体マウスのオリゴデンドロサイトはミエリンを維持できず脱髄を起こすが、その細胞体は変性せず残存していることが示唆された。

〔考察〕

最近、ＤＭ－２０はＤＭ遺伝子ファミリーを形成しており、構造的にはシビレエイのアセチルコリンレセプターやラットのグルタミン酸受容体タイプ１型の膜貫通ドメインと相同性が高いことから、イオンチャネル活性を持つことが示唆されている（５、６）。その中には神経細胞特異的に発現し神経突起伸展に関する機能を有するものも含まれており、ＤＭ遺伝子ファミリーは神経系特異的なイオンチャネルを形成する事によって、神経系分化を制御する遺伝子群である可能性もある。ＰＬＰは進化の過程で新たなエクソンを獲得し、ミエリン蛋白質としても機能するようになった事が示唆された。このようにＰＬＰ遺伝子は神経分化と密接に関係しているため、その突然変異は様々な神経症状を引き起こすと考えられる。

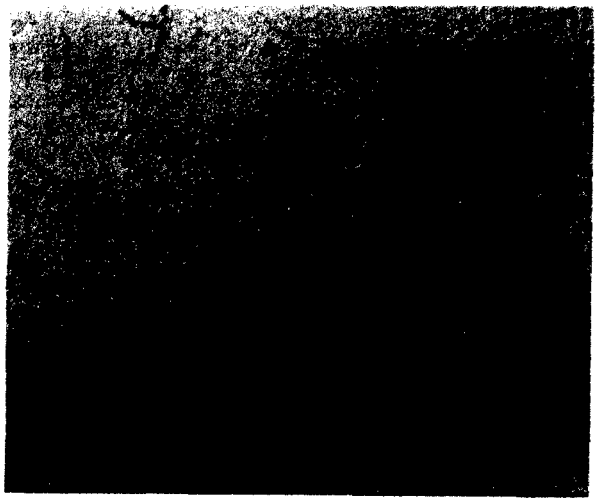


図１．ＰＬＰ－トランスジェニックホモ接合体マウス、脊髄灰白質の抗ＰＬＰ抗体染色像
正常ではミエリンに移行するＰＬＰの多くがオリゴデンドロサイトの細胞体にとどまっている。オリゴデンドロサイトの突起は貧弱でほとんどミエリンを巻いていない。

〔参考文献〕

1. I. D. Duncan, et al. ed. (1990) Myelination and Dysmyelination. Ann. N. Y. Acad. Sci. vol. 605.
2. P. Saugier-Veber, et al. (1994) Nature Genet. 6, 257-262.
3. T. Kagawa et al. (1994) Neuron, in press.
4. 山田真久、他 (1993) 第３６回日本神経化学会大会論文集、32, 46-47.
5. Y. Yan et al. (1993) Neuron, 11, 423-431.
6. K. Kitagawa et al. (1993) Neuron, 111 433-448.

120 顔面神経麻痺モデルマウスにおける単純ヘルペスウイルスDNA検出

村上信五、土居孝至＊、溝渕睦彦＊、羽藤直人、柳原尚明
（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室、＊愛媛大学医学部神経精神医学教室）

〔要約〕

単純ヘルペス１型ウイルス耳介接種によるマウスの顔面神経麻痺モデルの神経組織、髄液からPCR法を用いてウイルスを検出した。麻痺発症マウスでは、患側顔面神経や脳幹、三叉神経節、髄液に高率にウイルスDNAが検出され、麻痺中には顔面神経と脳幹において全例検出可能であった。しかし、麻痺の発症しなかったマウスでは顔面神経や脳幹からはウイルスは検出されなかった。麻痺回復後３か月経過しても、一部のマウスからはウイルスDNAが検出された。

［はじめに］

ベル麻痺、いわゆる特発性顔面神経麻痺の病因は、ウイルス感染、虚血、自己免疫などの関与が挙げられている。なかでもウイルス、特に単純ヘルペスウイルス(HSV-1)は、1)神経組織に強い親和性がある、2)ベル麻痺患者の一部で血清抗HSV抗体価が有意に変動することなどからベル麻痺の病因として有力視されている。最近われわれは、マウス耳介にHSV-1を接種し実験的に一過性の顔面神経麻痺の作成に成功した[4]。今回本動物モデルにおいて顔面神経麻痺の病因を明らかにする目的でHSV DNAを神経組織、髄液からPCR法を用いて検出したので報告する。

［方法］

動物は、生後４週の雌のBalb/cマウスを用いた。ペントバルビタール１mgを腹腔内に投与した後、右側耳介後面を27G注射針で十分擦過した。この部位にHSV１型（KOS株、4.50×10^6pfu/ml)を25μl（1.13×10^5 pfu)、対照群には生理食塩水を25μl接種した。麻痺はウイルス接種後６から９日の潜伏期間後約50％のマウスに発症し、３から７日間持続した後に完全寛解する。図１に示すように、接種後３日、10日、麻痺回復後12日目、麻痺回復後３か月後にそれぞれ顔面神経、脳幹、三叉神経節、髄液、血液を採取した。ウイルスDNA抽出は、組織をプロテアーゼ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。用いたプライマーの塩基配列は、センスプライマー; 5'-CCACCGAGCGGCAGGTGATC-3', アンチセンス; 5'-GCCGACCGCCCTGCTCGTGCT-3'である[1]。PCR溶液や増幅条件は既報の方法に従った[2]。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[3]を用いた。

［結果と考察］

HSV-1接種と検体採取をした時期を図１に示す。図２に麻痺発症時期における代表的なマウスの各組織のPCR増幅産物を電気泳動後、エチジウムブロマイド染色とサザンブロット分析の結果を示した。表１は全結果をまとめたものである。接種後10日目の麻痺発症マウスでは麻痺側の顔面神経に全例、非接種側にも高率にウイルスDNAが検出でき

た。麻痺回復後３ヶ月経過しても、数例で顔面神経、脳幹、三叉神経、髄液でウイルスDNAが検出された。以上のことより、顔面神経麻痺の発症にはウイルスの顔面神経への感染が不可欠であるが、感染が成立していても必ずしも麻痺が発症しないことが明らかになった。また、麻痺回復後３ヶ月経過しても一部の組織からウイルスDNAが検出されたことより本法が高感度でありウイルスDNAの検出には非常に優れていると考えられた。

[文献]

1. Dowbenko, D.J. and Lasky, L.A. (1984) J.Virol. 52: 154-163
2. Mizobuchi, M., Frohman, M.A. et al. (1991) Mol.Endocrinol. 5: 476-484.
3. Mizobuchi, M. and L.A. Frohman. (1992) BioTechniques 12: 350-353.
4. Sugita, T., Murakami, S. et al. Annal. Otology. Rhinol. Laryngol.(in press)

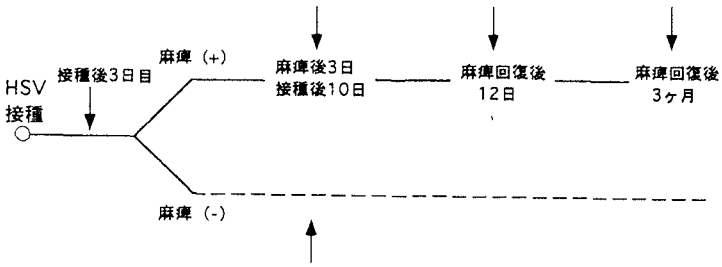


図1. HSV接種と検体採取時期
ウイルス接種後モデル
マウスの経過と検体採
取時を矢印で示した。

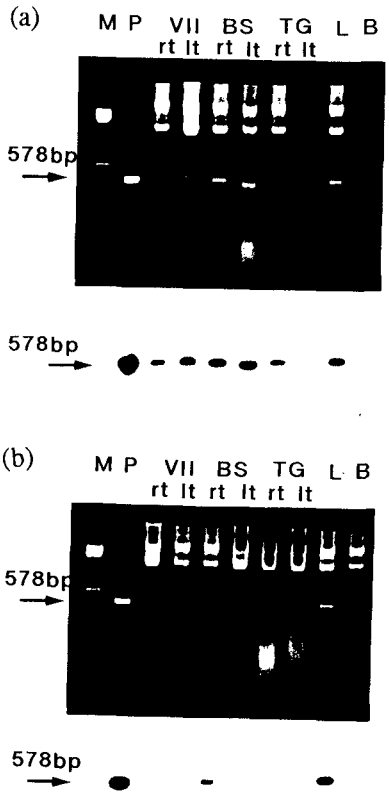


図2. HSV接種後、麻痺中と非麻痺マウス
組織中のウイルスDNAのPCR検出。
エチジウムブロマイド染色と、サザンブロット法を行なった。
(a):接種後10日、麻痺後３日目。
(b):接種後10日、麻痺非発症。
M：Molecular Marker　P：Positive control
VII：顔面神経　BS：脳幹　TG：三叉神経節
L：髄液　B：血液

		顔面神経		脳幹		三叉神経節		髄液	血液
		右	左	右	左	右	左		
コントロール		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
接種３日目		2/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	2/4	0/4
接種後10日目	麻痺あり	4/4	3/4	4/4	4/4	2/4	0/4	4/4	0/4
	麻痺なし	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4	0/4
麻痺回復12日目		1/4	0/4	1/4	2/4	0/4	0/4	1/4	0/4
麻痺回復３ヶ月目		1/4	0/4	1/4	2/4	1/4	0/4	1/4	0/4

表1. モデルマウスの全経過中のDNA検出結果
各時期における４匹のモデルマウス中DNA検出陽性であったものを示した。

121 ラットの眼組織および網膜内における S－抗原分布の定量的解析

加藤尚彦，木島正哉＊
（横浜市立大医・第一生化；＊眼科）

〔要約〕

S-抗原（SAg, retinal arrestin）は網膜の光受容機能を調節し，また動物に Experimental Autoimmune Uveoretinitis (EAU) を誘発する．Lewis（SAg高感受性）及びBrown Norway（BN, SAg 低感受性）ラットの眼球から微小凍結乾燥組織片（0.4-3.9 μg）試料を調製した．ウシ網膜から精製した SAgと試料を 0.4μlのSDS-緩衝液に溶解し，Micro-slab gel 電気泳動法を工夫して，分離蛋白質を微量定量した．精製 SAgは single spotを与え，標準曲線は 10 ng/well まで SAg量と比例した．SAgは Lewisラットの角膜，光彩，水晶体，毛様体，強膜には見られず，脈絡膜には低濃度で見い出された．SAg の網膜濃度は Lewisラットと BNラットで有意差は無かった．Lewis 網膜内では，杆・錐体層に高濃度の SAg が見いだされた．

網膜可溶性抗原（S-抗原，SAg）は動物に注射すると，Experimental Autoimmune Uveoretinitis (EAU) を惹起する．またこの蛋白質は Retinal Arrestin とも呼ばれ，燐酸化 Rhodopsinの脱燐酸化を阻害し Phototransduction を調節する事が知られている（1,2）．EAUはExperimental Autoimmune Encephalitis (EAE) と並んで，自己免疫性神経疾患の発症機序を研究する為の重要な Model である．眼組織や網膜内での SAg の濃度と分布を知る事はその機能や EAUの病態を理解する上で必須な条件となるが，今まで組織化学的（3,4）また半定量的（5,6）な解析しかなされていなかった．そこで我々は微少試料を分析する為のMicro-Western Blot法を新たに開発し，眼球組織内の SAg 定量と分布の解析を試みた．

実験方法

［**凍結乾燥試料**］ ラット［オス，6 週齢，Lewis系，SAg高感受性；Brown Norway（BN）系，ASg低感受性］を恒温恒湿，点灯 7 am；消灯 7 pm の条件下で飼育し，各 5 匹を用いた．眼球を液体窒素に投入して凍結した眼球から，厚さ 15μm の凍結切片を切り出して凍結乾燥した．乾燥切片から図２と４に示す眼組織小片を，また網膜切片より図３に示す網膜内の各層を切り出し，秤量した後そのまま試料（0.4-3.9 μg 乾燥重量）とした（7）．

［**S-抗原および抗体**］ S-抗原は牛網膜より Dorey ら（8）に従って調製し，白色家兎に等量の完全 adjuvant と共に注射して調製した．

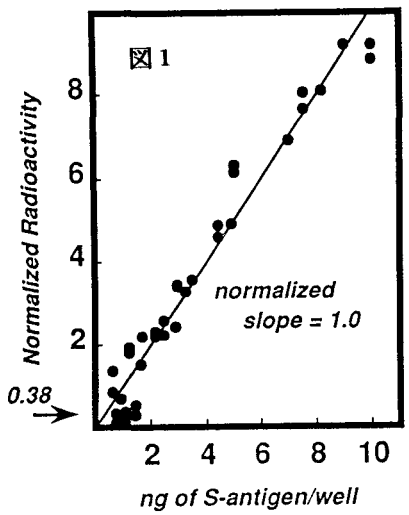
［**Micro-Western Blot 法**］ 真鍋らの小型二次元電気泳動用の小 mold（40x40x1 mm；9）を用い，SAgと試料を 0.4 μlのSDS-緩衝液に溶解し，濃縮 gel（17x37x1 mm）の上部に形成した micro-well（0.5x0.5x7mm）に顕微鏡下で加え，分離 gel（20x37x1mm）の上部で 10 mm電気泳動した後，分離蛋白質を PVDF膜に転移させた．SAg抗体-^{125}I-protein A を SAgに結合させ，その放射能を Fuji BAS2000 Bio-Image Analyzerを用いて定量した．

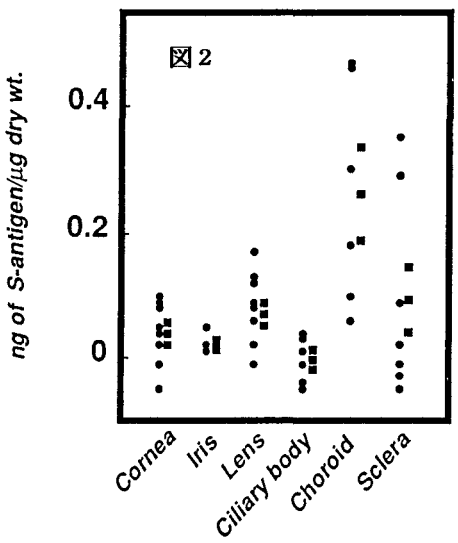
結果及び考察

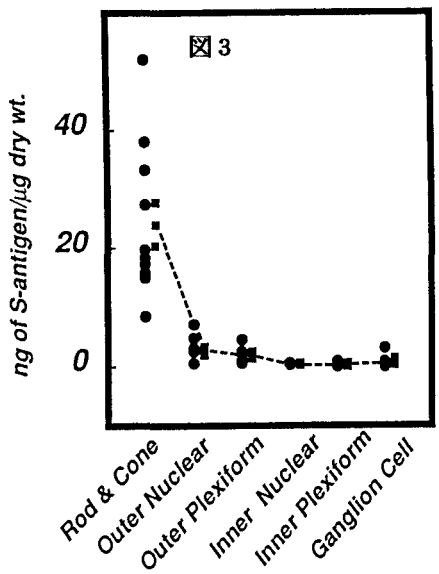
［**Standard Curve**］ ^{125}I の比放射活性や Analyzer の感光板への露出時間により値が異なるので，7 回の測定での Curve の傾度を 1 とし，全ての Plot を１つの図に表した（図１）．よい直性が得られ，下限測定値は 0.38 ng S-抗原蛋白/well であった．

［**眼組織内の SAg 分布**］ Choroid に有意な低濃度(0.261±0.073,±SEM, 試料数 9；単位は図と同じ）のS-抗原が見られた（図２）．後述する様に杆・錐体層に高濃度に含まれる SAg が（図３），外節の shedding により色素細胞に貪食され，色素細胞が外節から離れて Choroid に付着して試料中に含まれるためと考えられる．網膜には Choroid の 20 倍の濃度の SAg が含まれていた（図４）．

［**網膜内の SAg 分布**］ 網膜内では SAg は杆・錐体層（23.8±3.6, 11）に濃縮されており，外顆粒層（2.62±0.65, 10）と外網状層（1.86±0.62, 6）に低濃度に見い出された（図３）．それぞれの層には光受容細胞の細胞体と軸索および synapse が含まれる事を示している．







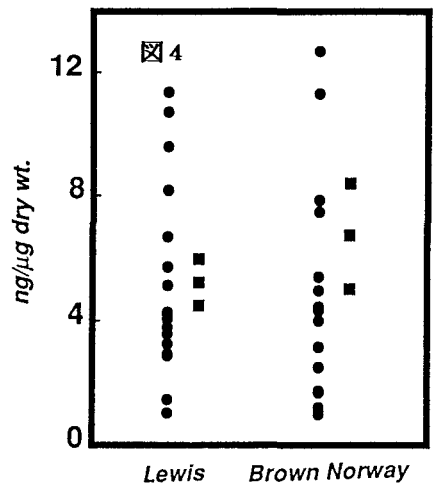


図1．正規化した Standard Curve（本文参照）；
図2．Lewis ラット眼組織内の S-抗原分布；
図3．Lewis ラット網膜内のS-抗原分布；図4．S-抗原高感受性（Lewis）及び低感受性（Brown Norway）ラットの網膜 S-抗原濃度　各●は個々の測定値を，真中の■は平均値，上下の■は±SME を表す．

［**SAg 感受性と網膜内 SAg 濃度**］　SAg 高感受性の Lewis ラット（5.21±0.75, 17）と低感受性の BN ラット（6.71±1.75, 16）の間には，網膜の SAg濃度差は見い出されなかった（図4）．EAU の誘導には，網膜内の SAg 濃度は決定的な要因とはならないと考えられる．

ここに述べた Micro-Western Blot による解析は，EAU の炎症の動態や SAg の杆・錐体層および松果体内の日内変動等の解明に有力な手段となると思われる．

文　献

1) Palczewski,K. et al. (1992) Neuron, 8: 117-126. 2) Hoffmann,K.P. et al. (1992) J. Biol. Chem. 22: 15701-15706. 3) Kaslow,C.M. et al. (1972) Int. Arch. Allergy, 44: 11- 20. 4) Faure, J.P. et al. (1990) Curr. Eye Res. 9 Suppl: 163-167. 5) Philip,N.J. et al.FEBS Lett. 225: 127-132. 6) Craft,C.M. et al. (1990) J. Neurochem. 55: 1461-1473. 7) Lowry,O.H. and Passonneau,J.V. (1972) Quantitative histochemistry: A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York. 8) Dorey,C. et al.(1982) Ophthalmic Res.14: 249-255. 9) Manabe,T. et al. (1984) Anal. Biochem. 143: 39-45.

122 インターフェロン投与による脳内セロトニンの減少

横谷 昇[1、2]、勝元 栄一[1]、尾崎 宜洋[1]、高 治義[1]、切池 信夫[1]、
山上 榮[1]
（大阪市大、神経精神[1]、刀根山結核研究所）

〔要約〕
インターフェロン（ＩＦＮ）の長期投与が脳内のトリプトファン（Ｔｒｐ）代謝に及ぼす影響を調べるため、雄ｄｄＹマウスにＩＦＮを投与し、脳内のＴｒｐとその代謝産物の量およびＴｒｐ代謝酵素の活性を測定した。１４日間連日投与終了後、インドールアミン－２、３－ジオキシゲネース（ＩＤＯ）活性は４５％上昇し、その産物であるキヌレニン（ＫＹＮ）は３２％増加した。一方、ＩＤＯの基質であるＴｒｐは２４％減少し、ＫＹＮと異なるＴｒｐ代謝経路に属するセロトニン（５ＨＴ）は４４％減少した。このＩＦＮによる脳内５ＨＴの減少はＩＦＮ療法の際生じるうつ症状と関連する可能性がある。

［目的］
ＩＦＮ療法の際しばしば精神症状の出現が問題となるが特にうつ症状の出現頻度が高いとされている。ＩＦＮがＩＤＯ活性を誘導することが知られているが、この酵素はＴｒｐを代謝してＫＹＮを生合成するため、酵素誘導されるとＴｒｐ量の減少を来たすと考えられる。一方、うつ病と５ＨＴが関連することは知られているが、５ＨＴもＴｒｐ代謝産物のひとつであり、ＫＹＮと異なった経路に属するのでＴｒｐ量が減少すると５ＨＴ量も減少すると考えられる。もしＩＦＮによって脳内の５ＨＴ量が低下するなら、それがＩＦＮ療法で生じるうつ症状と関連するのではないかと考えて、ＩＦＮ投与がマウス脳のＴｒｐ代謝に対する影響を調べた。

［方法］
雄ｄｄＹマウスに1X10^{4}単位のＩＦＮ（マウスＩＦＮ－α、ヒトＩＦＮ－α、ラットＩＦＮ－γ）を連日投与し、脳内のＴｒｐ、ＫＹＮ、５－ヒドロキシトリプトファン（５ＨＴＰ）、５ＨＴ、５－ヒドロキシインドール－３－酢酸（５ＨＩＡＡ）の量と、ＩＤＯ、トリプトファンヒドロキシレース（ＴＰＨ）、芳香族アミノ酸デカルボキシレース（ＡＡＤＣ）、モノアミンオキシデースＡ（ＭＡＯＡ）の酵素活性を測定した。測定には常法に従い高速液体クロマト、分光光度計、蛍光光度計、電気化学検出器を用いて行った（1－3）。

［結果］
マウスＩＦＮ－αとヒトＩＦＮ－αによるトリプトファン代謝に対する効果はほぼ同様であった。ＩＦＮ－αとＩＦＮ－γは３日目までは、いくつかの点で異なっていたが、７日目以降はほぼ同様の結果を示した。ＩＦＮ－αとＩＦＮ－γの異なる点は、ＩＦＮ－γは１日目よりＩＤＯを誘導したが、ＩＦＮ－αでは７日目より誘導を示した(Fig.1C)。１４日目には、ＩＤＯは４５％誘導され(Fig.A)、ＫＹＮは３２％増加した(Fig.B)。ＩＤＯの基質であるＴｒｐは２４％減少し(Fig.C)、ＫＹＮと異なるＴｒｐ代謝経路に属する５ＨＴＰ、５ＨＴ(Fig.D)、５ＨＩＡＡはそれぞれ３０％、４４％、１７％減少した。Ｔｒｐより５ＨＴＰを生合成するＴＰＨ活性は３０％上昇し、５ＨＴＰより５ＨＴを生合成するＡＡＤＣス活性は２０％上昇し、５ＨＴより５ＨＩＡＡを生合成するＭＡＯＡ活性は１４％低下した。

［考察］
ＩＦＮ－αとＩＦＮ－γとのＩＤＯに対する誘導の時間的差異は、両ＩＦＮの誘導機構が異なるためと考える。１４日以上の連日投与の結果より、ＩＦＮはＩＤＯを誘導し、ＫＹＮ経路にむかうＴｒｐ消費が亢進するために、５ＨＴ経路にむかうＴｒｐの欠乏を来

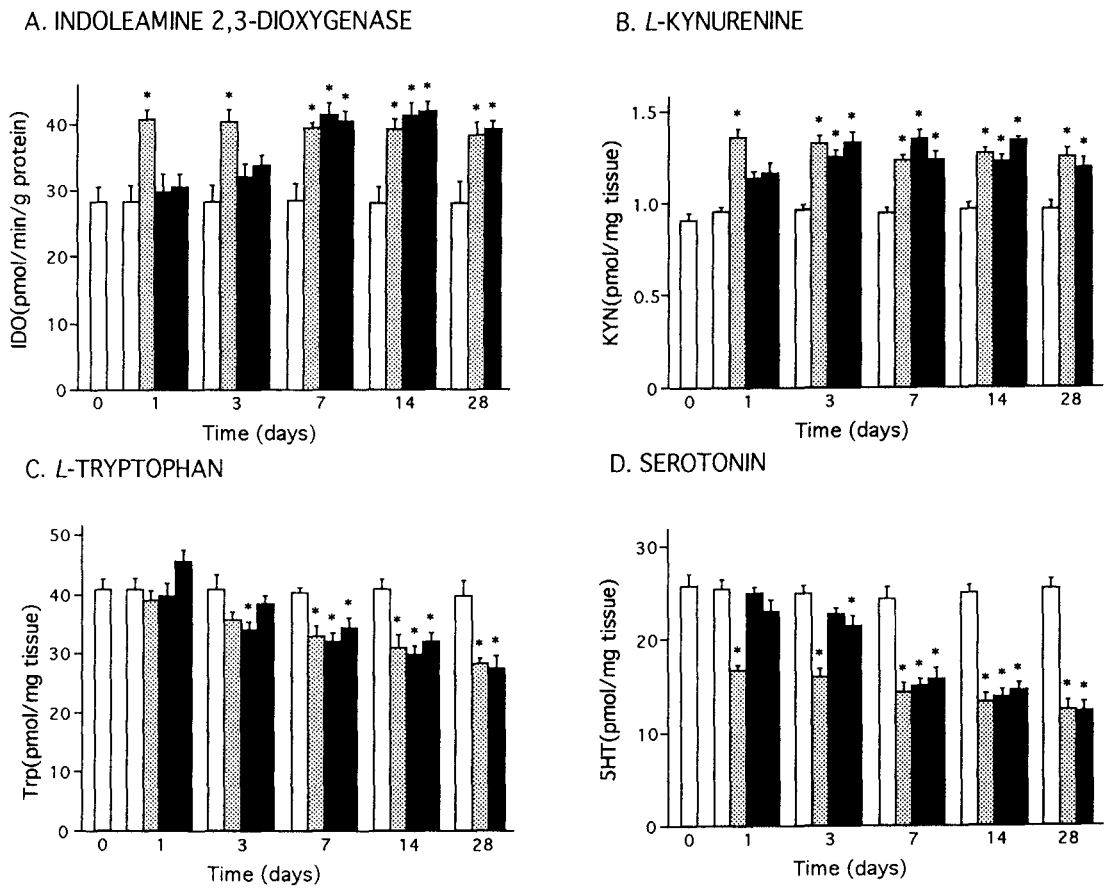


Fig. The enzyme activities of indoleamine 2,3-dioxygenase and the concentrations of *L*-kynurenine, *L*-tryptophan and serotonin in brains of control saline treated mice and interferon treated mice.
Open bars, saline control; light stippled bars, rat interferon γ; dark stippled bars, human interferon α; solid bars, mouse interferon α. Values are expressed as mean ±SEM.
* is indicated a significance ($p<0.05$) compared to control at the same time.

たし５ＨＴ生成量が減少すると考えられる。５ＨＴの減少とうつ症状との関連については実験結果を有さないが、Ｔｒｐを減少させるとうつ状態を生じるという報告があることから（４）、ＩＦＮによって生じる５ＨＴの減少がうつ症状の原因となる可能性を示唆する。

［文献］

1.Suzuki S. and Mori A. (1992) *Neurochem. Res.* 17, 693-698.
2.Nagatsu T. (1991) *J. Chromatogr.* 566, 287-307.
3.Holmes E.W. (1988) *Anal. Biochem.* 172, 518-525.
4.Young S.N., Smith S.E., Pihl R.O., and Ervin F.R. (1985) *Psychopharmacology* 87, 173-177.

123 ＥＬマウスにおけるアロプリノール急性投与後の脳内ＳＯＤアイソザイム活性の変化とその抗痙攣作用発現機序

村島善也，多田博史*，篠崎たき子，諸岡啓一**，鈴木二郎***

（東京都精神研，国立療養所千石荘病院*，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ﾏｳｽにアロプリノールを経口投与後、経時的に脳内SODｱｲｿｻﾞｲﾑ活性の変化を見て、その作用機序について検討した。

ELﾏｳｽのSOD活性は海馬で著しく低下しているが、これは Cu,Zn-SODが、1/10 近くに低下しているためであった。頭頂皮質では、むしろ高めであったが、これは Cu,Zn-SODが増大しているためで、Mn-SOD はむしろ低下していた。海馬では、SOD活性はアロプリノール投与後6時間で約10倍にも上昇するが、この全てが、Cu,Zn-SOD であった。48時間後でも頭頂皮質、海馬ともに高値を示したが、これも Cu,Zn-SOD によるものであった。以上の結果より、ELﾏｳｽにおけるアロプリノールの痙攣作用の発現には、海馬におけるﾌﾘｰﾗｼﾞｶﾙ消去酵素であるSODｱｲｿｻﾞｲﾑの中の Cu,Zn-SOD が、海馬に部位特異的に起こる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、アロプリノール急性投与後におけるSODｱｲｿｻﾞｲﾑ活性の局在と経時変化を明かにし、その抗痙攣作用機序に関わるｱｲｿｻﾞｲﾑの役割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：生後5週齢より、ほうりあげ刺激を与え発作閾値の十分低くなった30週齢EL[s]28匹を用いた。75 mg/kgのアロプリノールを経口投与後発作が、ｺﾝﾄﾛｰﾙされた6時間後(10匹) と再び発作閾値が回復し、金網の上にのせただけで発作を起こすようになった48時間後(9匹)を、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、8-20mgの試料を得、8-12％のﾎﾓｼﾞｪﾈｰﾄとした。対照としては無処置の30週齢ELﾏｳｽ9匹と、その母系であるddYﾏｳｽを当研究所にて近交系とした30週齢 ﾏｳｽ10匹を用いた。

total 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ｱﾄｸﾛｰﾑ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ｱﾄｸﾛｰﾑ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1mUnit /μg protein として表示している（図１、２）。

各ＳＯＤアイソザイム活性の測定法：SOD には、Cyanide に感受性のある Cu,Zn-SOD Extracellular SOD (EC-SOD) とCyanide に感受性の無い Mn-SOD, Fe-SOD 等のｱｲｿｻﾞｲﾑがある。ﾎﾓｼﾞｪﾈｰﾄを 800 U SOD/ml になるように Wing Buffer[3] にて希釈し、最終濃度 1mM NaCN 共存下と非共存下で 37℃ 2時間ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝする。Mn-SOD は Cyanide によって全く阻害されないため、NaCN 非共存下の SOD 活性から、NaCN 共存下の SOD 活性を差し引いたものが、Cu,Zn-SOD 活性となる。

［結果］

アロプリノール投与後の頭頂皮質における total ＳOD活性および各アイソザイム活性の経時的変化：対照のddYと比べると、投与前 ELでは、Mn-SOD がやや低く、逆に正常では弱い活性しか持たない Cu,Zn-SOD 活性が約7倍に高くなっていた。発作がｺﾝﾄﾛｰﾙされている、投与後6時間では、Mn-SOD はｾﾞﾛﾚﾍﾞﾙ近くまで低下していたが、Cu,Zn-SOD活性はほとんど変化がなかった。再び発作閾値が低くなってくる48時間後では、Mn-SOD は失活していたが、Cu,Zn-SOD活性は依然高値を示していた （図１）。

アロプリノール投与後の海馬における total ＳOD活性および各アイソザイム活性の経時的変化：対照のddYと比べると、投与前 ELでは、Mn-SOD が 1/4 程度に低下しており、 Cu,Zn-SOD 活性は実に 1/10 近くまで低下していた。これにアロプリノールを投与すると、投与後6時間では、Mn-SOD はｾﾞﾛﾚﾍﾞﾙまで低下していたが、Cu,Zn-SOD活性は20倍以上に上昇していた。48時間後では、Mn-SOD は投与前と変わりがなくなっていたが、Cu,Zn-SOD活性は10倍近い高値を示していた （図２）。

［考察］

昨年我々は、本大会において、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より、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報告した。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]ことが知られている。また、SODの各ｱｲｿｻﾞｲﾑの機能については、Mn-SOD は腫瘍化や呼吸器系の組織傷害と関連している事が知られており[7]、Cu,Zn-SOD は、脳虚血の侵襲に対して強い抵抗性を発揮する事が知られている[8]。ELﾏｳｽ海馬では、単に total SOD 活性が低いだけでなく、Cu,Zn-SOD が1/10と極めて低くなっており、かつ、アロプリノール投与によって酵素誘導がおこるのも Cu,Zn-SOD である事を考えると、アロプリノールによる海馬での Cu,Zn-SOD 活性の特異的誘導が中枢神経系での抗組織傷害作用を持ち、本剤の抗てんかん作用機序の中心を成すものと思われる。

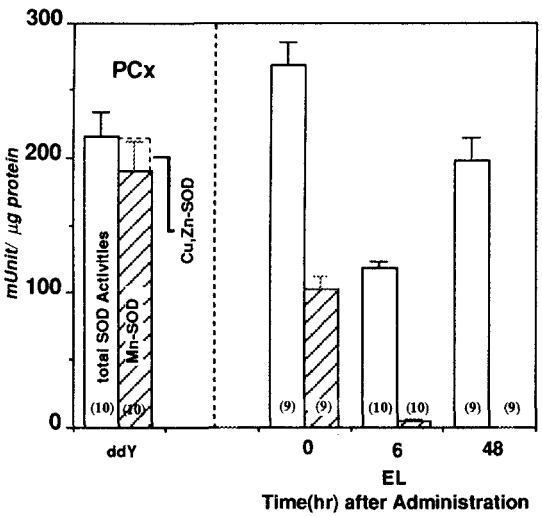


図 1

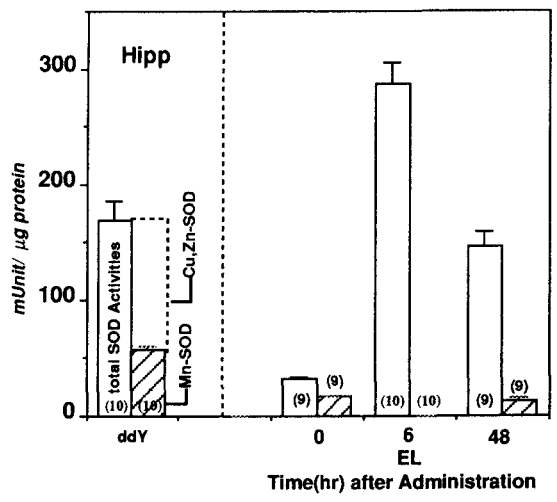


図 2

［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.
7. Russell, W. J. et al. (1993) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 9(6) 610-616.
8. Yang-G et al. (1994) Stroke 25(1) 165-170.

124 上頚神経節細胞の脱分極による生存と神経成長因子による Lタイプ Ca^{2+} チャンネル発現量の増加との相関。

田中 秀逸、小池 達郎*
(佐賀医大・化学、*北大・院理学研究科・行動知能)

〔要約〕
新生児ラットより単離直後の上頚神経節 (SCG) 細胞は、高 K^+ 培地中では細胞死を起こすが、ベラトリジンによる脱分極では培地中の Ca^{2+} に依存して生存可能となった。Fura-2 を用いての細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定の結果、高 K^+ 処理後の sustained $[Ca^{2+}]_i$ はこれらの若い神経細胞では 91 nM と低く、神経成長因子 (NGF) 存在下で 5 ～ 7 日培養された SCG 細胞では 238 nM となり、高 K^+ により生存可能となることが判った。RT-PCR 法を用いての Lタイプ Ca^{2+} チャンネル mRNA の定量によると、この転写物量は 3 日間の NGF 処理で急激に増加し、Day 5 で一定レベル (Day 1 の約35倍) に達することが判った。これらの結果は、Lタイプ Ca^{2+} チャンネル mRNA の発現は NGF による正の制御を受けて上昇すること、この増加レベルが *in vitro* での高 K^+ によるステージ依存的な神経細胞生存と相関していることを示している。脱分極刺激は NGF の効果を促進することが報告されていることから、ラット SCG 神経細胞では節前節後の両シナプスからの刺激が、相互に増強し合いながら細胞の生存を制御していることを示唆するものである。

〔目的〕
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られている。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り、アポトーシス的な細胞死であることが示唆された。ラット SCG から得られた神経細胞は、生存のために NGF を必要とし、培養液から NGF を除くと新たな mRNA, 蛋白質合成に依存した細胞死を起こし 2 ～ 3 日で死ぬ (6)。5 ～ 7 日培養後の SCG 細胞は、高 K^+ 培地によって Lタイプ Ca^{2+} チャンネルを介した $[Ca^{2+}]_i$ の増加レベルに相関して生存することが判っている (4)。ところが、新生児ラットより単離直後の若い SCG 細胞は、高 K^+ 培地による脱分極では生存が維持されない (5)。若い SCG 細胞は、Ca^{2+} に依存した機構では生存できないのか、あるいは生存するには高 K^+ による Ca^{2+} 流入量が少ないのか調べた。その結果、高 K^+ による生存応答には NGF による Lタイプ Ca^{2+} チャンネル量の増加が必要であることが判った。

〔実験方法〕
細胞は、生後 1 日のラットの SCG からコラーゲナーゼ処理により取り、コラーゲンコートしたプレートにまき、10% 牛胎児血清、50 ng/ml NGF を含む EMEM で培養した。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 (4)。NGF 除去は、0.5% のマウス NGF に対する抗体を用いて行なった。細胞の生死の判別は、0.2% トリパンブルー処理で染色される細胞を 4 % パラホルムアルデヒドで固定後、顕微鏡下で直接算出することにより行った。$[Ca^{2+}]_i$ は fura-2 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 (4)。RT-PCR に用いた RNA (各4.0 神経節 / φ35 mm ディッシュ) はグアニジンチオシアネートを用いて抽出した。Lタイプ Ca^{2+} チャンネルのプライマーは、ラットで発現していることが知られている Lタイプ Ca^{2+} チャンネルの遺伝子配列を基に約 1 Kbp の産物が得られるような 20 bp (5', 3' 側とも) を用いた。対照に用いた G3PDH についてはクローンテック社のキットを用いた。PCR 産物は、両者ともサイクル数 35 回までは指数関数的に増加することを ^{32}P を用いた実験により確認した。

〔結果と考察〕
高 K^+ による脱分極が神経細胞の生存を維持することは、種々の系で知られている。我々は、5 ～ 7 日培養後のラット SCG 細胞も高 K^+ 培地によって生存し、その効果が Lタイプ Ca^{2+} チャンネルを介した $[Ca^{2+}]_i$ の増加レベルに相関していることを報告した (4)。しかし、新生児ラットより単離直後の若い SCG 細胞は、高 K^+ 培地中では細胞死を起こす (図 1)。この若い SCG 細胞はベラトリジン (3 μM) による脱分極では Na^+

チャンネルからの Ca^{2+} 流入 (3) に依存して生存可能となることから、Ca^{2+} に応答した細胞内機構は機能しうることが示唆された。そこで、Lタイプ Ca^{2+} チャンネルの発達がステージ依存的に起こると考え、Fura-2 を用いて高 K^+ 処理後の $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。その結果、SCG 細胞の高 K^+ への応答性は NGF 存在下での培養時間に伴って高まること (図2)、K^+ 処理後の sustained $[Ca^{2+}]_i$ は若い神経細胞では 91 nM と低く、NGF 存在下で5～7日培養された SCG 細胞では 238 nM となり、高 K^+ により生存可能となることが判った。さらに、RT-PCR 法を用いてLタイプ Ca^{2+} チャンネル mRNA の発現レベルの定量を行なった結果、この転写物量は、培地中の NGF の濃度に依存して増加すること、3日間の NGF 処理で急激に増加しDay 5 で一定レベル (細胞当たりで Day 1 の約35倍) に達すること (図3) が判った。これらの結果は、L タイプ Ca^{2+} チャンネル mRNA の発現は NGF による正の制御を受けて上昇すること、この増加レベルが *in vitro* での高 K^+ によるステージ依存的な神経細胞生存と相関していることを示している。ラット SCG は発生段階で NGF を受け取る以前に節前神経細胞の神経支配が完了すること (7)、さらには、脱分極刺激が細胞の NGF 依存性 (2) や NGF の高親和性受容体 ($gp140^{trk}$) の発現 (1) を高めることが報告されている。これらの事実は、ラット SCG 神経細胞では、節前節後の両シナプスからの刺激が、即ち脱分極刺激と NGF が、相互に増強し合って細胞の生存を制御していることを示唆するものである。

〔参考文献〕

1. Birren *et al.* (1992) *Science* **257**, 395-397.
2. Coughlin and Collins (1985) *Dev. Biol.* **110**, 392-401.
3. Jacques *et al.* (1981) *Biochem.* **20**, 6219-6225.
4. Koike and Tanaka (1991) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **88**, 3892-3896.
5. Koike *et al.* (1993) *Ann. New York Acad. Sci.* **707**, 356-358.
6. Martin *et al.* (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 829-844.
7. Rubin (1985) *J. Neurosci.* **5**, 685-696.

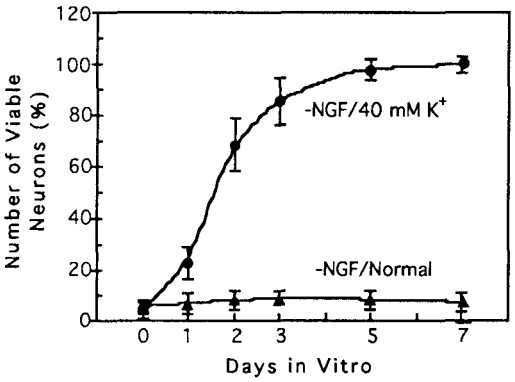


図 1. 培養 (NGF 処理) 日数に伴う SCG 細胞の高 K^+ による生存率の上昇. 0～7日の培養後 NGF を除去し、40 mM 及び 5 mM K^+ でさらに36時間培養した後、細胞の生存率を求めた。1視野当たり400個以上の細胞を数えている (Mean ± SEM, n =3)。

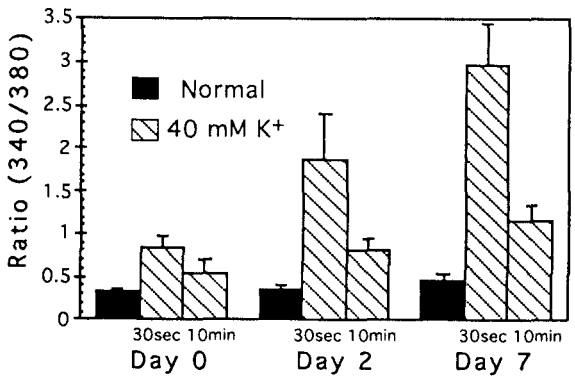


図 2. 培養 (NGF 処理) 日数に伴う SCG 細胞 の高 K^+ への応答性 ($[Ca^{2+}]_i$)の変化. (Mean ± SD, n =20).

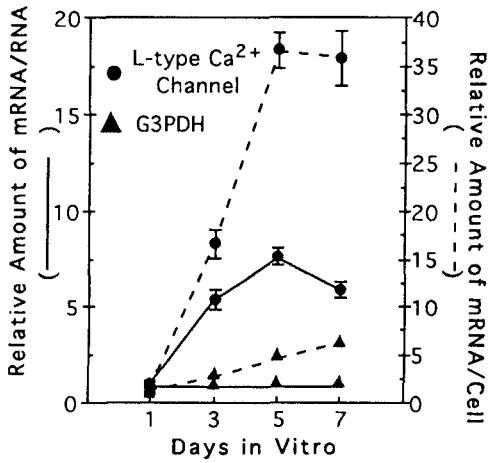


図3. 培養(NGF処理) 日数に伴う SCG 細胞でのL-タイプ Ca^{2+} チャンネル mRNA 及び G3PDH mRNA 発現量の変化. Annealing, 60°C; 30 cycles (Mean ± SEM, n = 3).

125 Estrogenが扁桃核培養神経細胞の生存率に与える効果

○鬼頭昭三、仙波純一、三好理絵*、金澤美穂
(放送大学、Royal Free Hospital School of Medicine, LONDON*)

〔要約〕

ラット 扁桃核培養神経細胞に各種の濃度の estradiol を加えた結果、１０$^{-9}$M～１０$^{-5}$Mの範囲内で濃度依存的に cytoprotective に働き、１０$^{-4}$M以上では protective な作用が抑えられ、むしろ cytotoxic に働くことが知られた。また、培養神経細胞に １０$^{-5}$Mの estradiol を加えることによって、１０分以上にわたる long-term の Ca^{2+} 濃度の上昇を認め、この上昇は、部分的に dihydropyridine 系 Ca^{2+} channel blockerによって抑制された。

目的: Baulieu らによるneurosteroid の発見以来、steroid hormone の脳内神経機構に対する影響が注目されている。また、estrogen が視床下部の β-endorphin 含有神経細胞に対して毒性を示すことが報告されている。

本研究では、steroid hormoneと神経細胞死に関する研究の一部として、estorgen がラット扁桃核培養神経細胞に及ぼす効果について培養神経細胞のパーセント生存率という立場から観察することを目的とした。更にこの扁桃核培養神経細胞に対する estrogen の作用のメカニズムを探るために、fura-2 fluorometry による Ca^{2+}imaging 実験を行った。

方法： 神経細胞の生存率は LDH effluxmetry により算出した。ラット胎仔由来の扁桃核神経細胞を１０%FBS を含むDMEM培地で７日間～１０日間培養し、実験に用いた。この神経細胞に１０$^{-9}$M～１０$^{-3}$Mの各種の濃度の estradiol を添加し、一晩培養した。その後、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。また、上記のラット扁桃核培養神経細胞を fura-2 fluorometry の対象として用いた。fura-2に３７℃で60分間細胞を暴露させた。細胞を落射型倒立顕微鏡下に置き、１ μM tetrodotoxin を含む BSS で灌流した。キセノンランプを光源とし、３４０nmと３６０nm の励起光による蛍光の強度の比を算出した。細胞から発する蛍光を高感度テレビカメラを通してブラウン管モニター上に写しだし、フォトダイオードを置いて輝度の測定を行った。また、更にArgus 100 を用いて解析を行った。

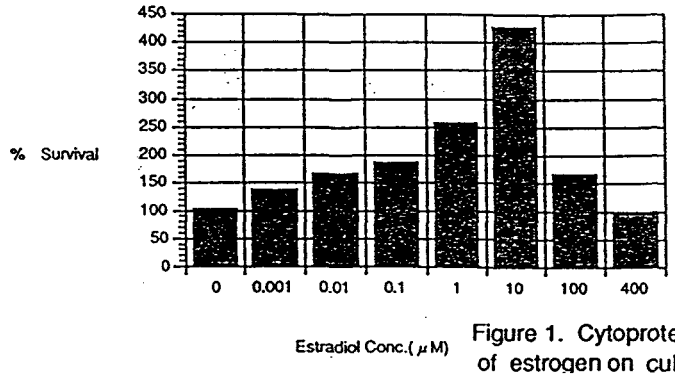


Figure 1. Cytoprotective and cytotoxic effects of estrogen on cultured amygdala neurons

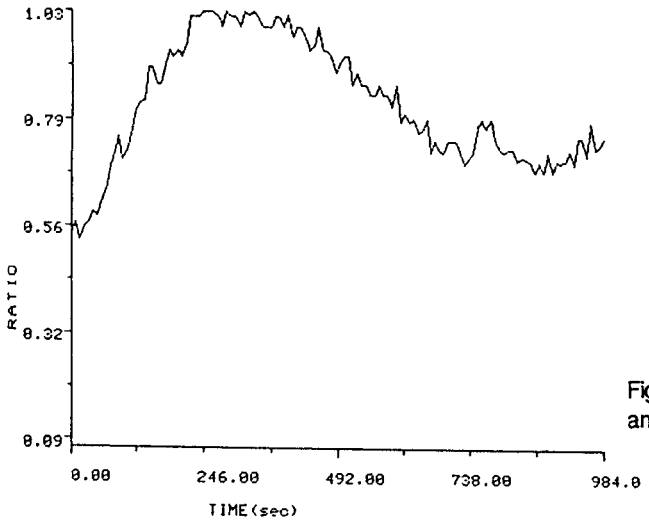


Figure 2. Ca^{2+} elevation in cultured rat amygdala neurons induced by estradiol

結果: Estradiol は濃度１０$^{-9}$M～１０$^{-5}$Mの範囲内で、濃度依存的にして細胞生存率を上昇させた。しかし１０$^{-4}$M以上の濃度では細胞保護作用が抑制され、細胞生存率が低下した(Figure 1) 。ラット扁桃核培養神経細胞に１０$^{-5}$Mの estradiol を加えて３０秒間作用させ、細胞内 Ca^{2+}濃度の推移を観察した結果、古典的神経伝達物質や神経ペプチドによるCa^{2+}濃度の上昇ではみられないような、１０分間以上にわたる long-term のCa^{2+}濃度の上昇を認めた(Figure 2) 。このCa^{2+}濃度の上昇は、dihydropyridine 系 Ca^{2+} channel blocker である nifedipine によって部分的に抑制された。

考察: 情動の場である扁桃核では、estrogen 受容体が豊富に存在している。我々は steroid hormone と神経細胞死に関する研究の一部として glucocorticoid がラット海馬培養神経細胞に対するカイニン酸の毒性を用量依存的に増強することを認め、この増強をニコチンが抑制することを報告してきた。本実験では、この一環としてestrogen の扁桃核培養神経細胞の細胞生存率に対する単独効果を観察した。

Estrogen は、低濃度では細胞保護的に働き、高濃度では細胞保護作用が消失し、逆に細胞障害の方向に働くことを認めた。これらの作用のメカニズムを検討するために、fura-2 fluorometry により細胞内 Ca^{2+} の推移を観察したところlong - term の Ca^{2+}濃度の上昇を認めた。この上昇は部分的に dihydropyridine系Ca^{2+} channel blocker によって抑制されたので、L型 channel を通して Ca^{2+} が流入していることが考えられた。この long- term Ca^{2+}濃度上昇は遺伝子を介する long- term effect と考えられ、mRNA 阻害剤の効果についてさらに検討を加えた。

参考文献

S.Kito, R. Miyoshi : Effect of glucocorticoid on hippocampal neurons in vivo and vitro studies. Neurochemical Research , 18, 832, 1993

G.C. Desjardins, J. R. Brawer, and A. Beaidet : Estradiols selectively neurotoxic to hypothalamic β-endorphin neurons. Endocrinology,132, 86-93, 1993

G.Jiang, P.A.Poole-Wilson, P. M. Sarrel, S. Mochizuki, P. Collins and K. T. Macleod : Effect of 17 β-oestradiol on contraction, Ca^{2+} curemt and intracellular free Ca^{2+} in guinea-pig isolated cardiac myocytes, Br. J. Pharmacology, 106, 739-745,1992

126 新規神経細胞保護物質carquinostatin Aの海馬神経細胞および樹立神経系細胞株におけるグルタミン酸毒性抑制効果

新家 一男
(東京大学・分生研)

〔要約〕
脳虚血疾患の治療薬としてグルタミン酸レセプターのアンタゴニストや鉄キレーターあるいは抗酸化物質が注目されている。我々は、Harvard大のJ. T. Coyle等によって作製された神経系ハイブリドーマであるN18-RE-105細胞株におけるグルタミン酸毒性を指標として微生物よりグルタミン酸毒性抑制物質の探索を行い新規物質carquinostatin Aを発見した。Carquinostatin Aは初代海馬神経細胞に対するグルタミン酸毒性を低濃度で抑制した。また、ラット肝ミクロソームを用いた脂質過酸化抑制試験においてcarquinostatin Aはビタミンと同等の抗酸化活性を示した。

【目的】脳虚血によって引き起こされる神経細胞壊死は、グルタミン酸による興奮毒性によるものであると言われている。グルタミン酸はNMDAレセプターやAMPA/KAレセプターを介し、細胞内にCa^{2+}を流入させ、様々な酵素を活性化し、細胞内にフリーラジカルを蓄積させ神経細胞を死滅させる。また、グルタミン酸が細胞内グルタチオン濃度を減少させ、細胞内にフリーラジカルを蓄積させることも知られている。さらに筋萎縮性側索硬化症(ALS)がSODの欠損によって引き起こされることが報告されたことから、これらの神経疾患に対する抗酸化物質の効果が期待されている。しかしながら、抗酸化物質による神経細胞の保護効果は、未だ十分に研究されていないのが現状である。そこで我々は抗酸化作用を有する新規化合物carquinostatin Aの神経細胞保護効果について検討した。

【方法】ラット初代網膜細胞とマウス神経芽細胞腫とのハイブリドーマであるN18-RE-105細胞を2×10^3 cells/cm^2となるようにプレーティングした。これに10 mMのL-Gluを添加し、24時間後に細胞の生死を判定する。初代海馬神経細胞の調製は既報の方法にしたがい(1, 2)、妊娠18日齢のラット胎児より5～10 $\times 10^4$ cells/cm^2となるように調製した。培養3日後、11日後にそれぞれ1 mM (24 hr) および100 μM (10, 30 min) のL-Gluで処理し、24時間後に細胞の生死を判定した。細胞の生死は培養液中に遊離してくるLDH (乳酸脱水素酵素) の活性を測定することにより定量した。初代培養については抗68K-NF抗体にて染色し、神経細胞であることを確認した。

抗酸化活性の評価は、ラット肝ミクロソームの過酸化反応により産生した過酸化脂質量をチオバルビツール酸(TBA) により検出する方法(TBA法) により行った。

【結果】Carquinostatin Aは濃度依存的にN18-RE-105細胞におけるグルタミン酸毒性を抑制した(Fig. 1)。本細胞におけるグルタミン酸毒性はビタミンEや脳代謝賦活薬であるidebenoneによっても抑制されることが知られているため(3)、これらの薬剤との活性の比較を行った。Carquinostatin A、ビタミンEおよびidebenoneは共にN18-RE-105細胞におけるグルタミン酸毒性を抑制したが、carquinostatin Aはこれらの薬剤と比較して10～100倍強い活性を示した(Fig. 2)。Carquinostatin Aは培養初期 (3 DIV) の初代海馬細胞に対するグルタミン酸毒性をほぼ完全に抑制した。これに対し、11日間 (11 DIV) と比較的長期培養した海馬細胞に対しては0.4

μMの濃度で50～60%の活性であった(Fig. 3)。しかし、carquinostatin A処理群とコントロール群を抗68K-NF抗体で染色し比較したところ、神経細胞そのものは、ほぼ同等の生存率であった。N18-RE-105細胞においてビタミンEのような抗酸化物質が活性を示すことから、次にcarquinostatin Aの抗酸化活性を検討した。その結果、carquinostatin Aはビタミンとほぼ同等の抗酸化活性を示すことが判明した(Fig.4)。

以上の結果より新規化合物carquinostatin Aは神経細胞保護作用を有することが明かとなり、その作用機構の一部は抗酸化活性によるものであることが示唆された。今後は、より詳細にcarquinostatin Aの神経細胞保護作用について検討する予定である。

Fig. 1. N18-RE-105細胞に対するcarquinostatin Aの細胞保護効果

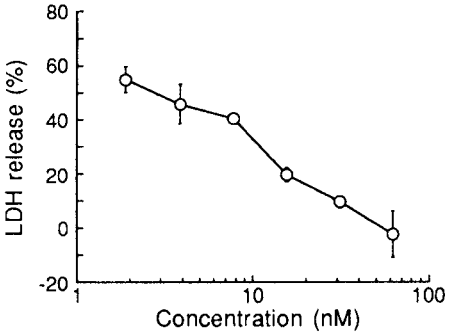


Fig. 2. N18-RE-105細胞に対する各種薬剤の細胞保護効果(nM)

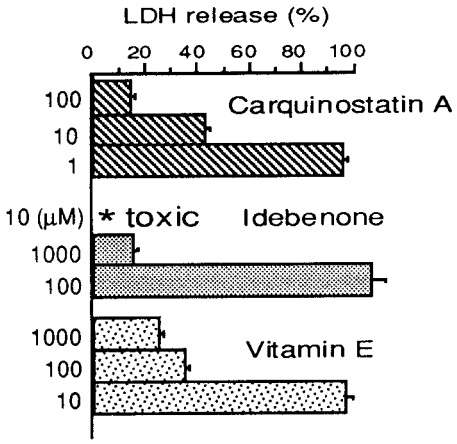


Fig. 3. ラット初代海馬神経細胞に対するcarquinostatin Aの細胞保護効果

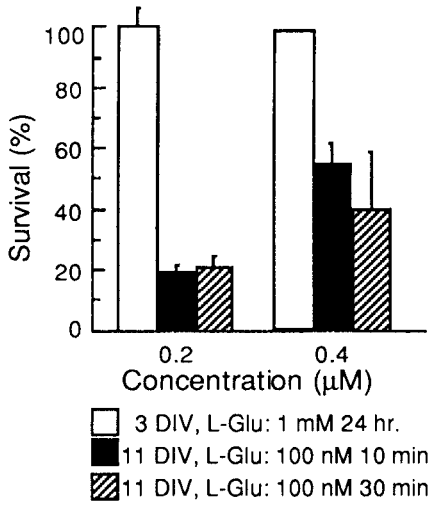
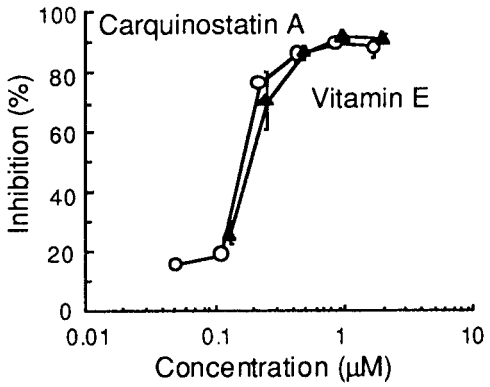


Fig. 4. ラット肝ミクロソームにおけるcarquinostatin Aの脂質過酸化抑制効果



【参考文献】

1. Eiji Kohmura *et al.* (1991) Neurosci. Lett., 121, 159-162.
2. J. Y. Koh *et al.* (1990) J. Neurosci., 10, 693-705.
3. Masaomi Miyamoto *et al.* (1989) J. Pharmacol. Exp. Ther., 250, 1132-1140.

127 グルタミン酸により引き起こされる培養神経細胞死におけるATP量変化の時間経過

中村 洋一[1], 辻 浩司[1,2], 片岡 喜由[1]
（愛媛大学医学部・[1]生理学, [2]整形外科）

〔要約〕

培養脊髄神経細胞を0.3 mMグルタミン酸に15分間暴露し，その後通常の培地に戻すという処理により，神経細胞は24時間後にはほとんど死滅する。この時のATPの細胞内含量の変化を時間を追って測定した。培養細胞の全ATP量はグルタミン酸暴露開始直後から素早く減少し，3分後には60%になり，さらに徐々に減少を続け4時間後には30%にまで減少し，その後は24時間後まで変化がなかった。しかしながら，障害細胞から培地中に放出される乳酸脱水素酵素(LDH)活性はグルタミン酸暴露後2時間程度遅れて12時間後までほぼ直線的に増加した。これらの結果から，培養神経細胞のグルタミン酸暴露による細胞死は，*in vivo*で一過性脳虚血後の海馬CA1錐体細胞にみられる遅延性神経細胞死とは似て非なる現象であると結論しうる。

〔緒言〕

培養神経細胞を低濃度のグルタミン酸に暴露することにより遅延性の細胞死が起こることはよく知られており(1)，*in vivo*における一過性脳虚血でみられる遅延性神経細胞死(2)の*in vitro*モデル実験系としてしばしば利用されている。*in vivo*では虚血再潅流後に減少したATP量が一旦回復し(3)，その後徐々に細胞が死んでいくことから正に遅延性の細胞死であるといえる。我々はグルタミン酸暴露による培養神経細胞死が実際に遅延性に起こるのかどうかを明らかにする目的で，その死に至る過程のATP量の変化を時間を追って測定した。

〔方法〕

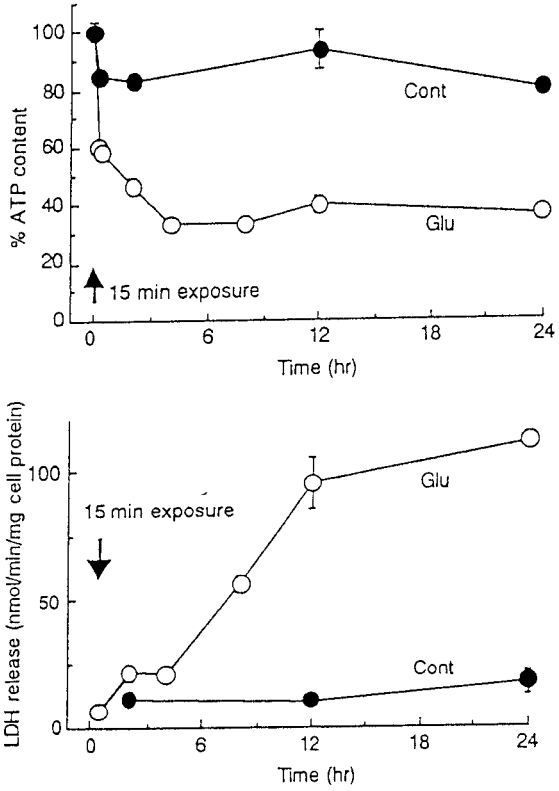
神経細胞は胎生14日ラットの脊髄から単離し，ポリエチレンイミンでコートしたプラスチックカバースリップ上に12日間培養した(4)。途中AraC処理すること及び無血清培地を用いることにより，約70%以上の細胞がMAP2陽性の神経細胞であった。神経細胞をグルコースを含むHepes緩衝Krebs-Ringer溶液(HKR)で30分前処理した後，グルタミン酸を含むHKRに15分間暴露し，その後無血清培地に戻し24時間さらに培養した。適当な時間間隔で細胞の付いたカバースリップを取り出し，その過塩素酸抽出液から蛋白量とATP含量，培地中のLDH活性から細胞の障害度を測定した。ATPはイオンペア逆相クロマトグラムによるHPLCシステムにより，蛋白はBSAを標準とするBradford法により，LDH活性はピルビン酸を加えることによるNADH消費速度の増加から定量した。

〔結果〕

培養神経細胞を0.3 mMグルタミン酸に暴露すると，ATP量は直ちに減少し始め，3分後には60%になった。15分の時点で通常の培地に戻した後も徐々に減少を続け4時間後には30%にまで減少した。その後24時間までATP量は低いままであり回復相はみられなかった。一方，この実験に用いた同じ細胞から培地中へ放出されたLDHの活性は，グルタミン酸暴露後1--2時間程度遅れて12時間後までほぼ直線的に増加し，その後おおよそ一定値であった。

〔考察〕

培養神経細胞を高濃度のグルタミン酸に暴露した際には，Na^+流入とそれに引き続くCl^-，H_2Oの流入による細胞の破裂を伴う急性の細胞死が起こる(1)。しかしながら比較的低濃度のグルタミン酸ではNMDAチャネルからのCa^{2+}流入が引き金となる遅延性の細胞死が起こるとされている(1)。一方，*in vivo* において，一過性脳虚血後に海馬CA1錐体細胞が虚血2-3日後から脱落を始める現象が見いだされ(2)，「遅延性神経細胞死」とよばれている。前述の低濃度グルタミン酸による培養神経細胞死はこの「遅延性神経細胞死」の*in vitro* モデル実験系として利用されることが多い。*in vivo* では虚血再潅流後に減少したATP量が一旦回復することが明らかとなっており(3)，その後徐々に細胞が死んでいくことから正に遅延性の細胞死であるといえる。本研究では培養神経細胞を低濃度グルタミン酸に暴露した場合，ATP含量が直ちにかつ素早く減少し，その後24時間の間回復することがないことが明らかとなった。このことは培養神経細胞の遅延性の細胞死は*in vivo*における「遅延性神経細胞死」とは似て非なる現象であり，in vitroモデル実験系としての解釈には充分な注意が必要であることを喚起している。



Time course after glutamate exposure of the changes in ATP content (top) and in LDH-release (bottom) from cultured spinal neurons. The spinal neurons were exposed for 15 min to 0.3 mM glutamate (○) in HKR, and then returned in SF-medium. ATP content in the neurons and the activity of LDH released into the post-incubation medium were assayed at the time points indicated (mean ± S.E.M, n = 3). Values of the control (●) indicate those obtained without glutamate. Data are expressed in percentages of ATP content at 0 h. Both assays of ATP content and LDH-release were carried out using the identical coverslips of the cells.

〔文献〕

(1) Choi, D.W. and Rothman, S.M., Annu. Rev. Neurosci., 13 (1990) 171-182.
(2) Kirino, T. Brain Res., 239 (1982) 57-69.
(3) Arai, H., Passonneau, J.V. and Lust, W.D. Metab. Brain Dis., 1 (1986) 263-278.
(4) Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T. and Kataka, K. Neuroscience, 55 (1993) 445-449.

128 MK-801の虚血ニューロン死保護作用：脳温自動制御システムによる検討

柳瀬 尚人，章 龍，三谷 章，片岡 喜由
（愛媛大学医学部・第一生理）

〔要約〕
我々が独自に開発した脳温自動制御システムを用い，正常脳温維持下にNMDA型グルタミン酸受容体のチャンネルブロッカーであるMK-801の虚血ニューロン死保護作用について検討した。恒温器内に小型テレメーターを装着したスナネズミをおき，自由行動下の脳温を連続モニターし，MK-801（5 mg/kg, 10 mg/kg）腹腔内投与30分後にChandlerらの方法（1）により，無麻酔下に5分間の前脳虚血を負荷した。MK-801投与による脳温低下を防ぐために（2），温風ヒーターのon-offを自動制御し4日間脳温を約37℃に維持した。脳虚血負荷7日後に海馬CA1領域の虚血ニューロン死の程度を組織学的に観察したところ，MK-801 10 mg/kg投与群では明らかに虚血ニューロン死が防御された。以上の結果から，MK-801はNMDA型グルタミン酸受容体への直接作用だけでも虚血ニューロン死を防御することが示唆された。

〔目的〕
これまでの虚血ニューロン死に関する研究で，脳虚血中の脳温がその後発生する神経障害に重要な影響を及ぼすことが明らかにされている。たとえば，スナネズミ海馬ＣＡ１野においては，虚血中の脳温が2℃低温化しているだけで虚血ニューロン死は大幅に軽減される（3）。このように虚血ニューロン死の発生過程において重要な因子となっている脳温を正確にモニターすることは，虚血負荷条件の安定化あるいは各種薬剤の虚血ニューロン死保護作用の正確な評価のためにも必要であるが，スナネズミやラットなどの小動物のin vivo脳温を容易に長時間にわたって測定記録する技術はこれまでのところ開発されていなかった。そこで，我々は脳温自動制御システムを独自に開発し，このシステムを用いてMK-801の脳温に対する影響及びその虚血ニューロン死保護作用について検討した。

〔方法〕
フローセン麻酔下にスナネズミの両側総頸動脈に絹糸をループ状にかけ，その絹糸の両先端を動物の背側皮膚に固定したダブルルーメンカテーテル内を通して，体外に誘導した。そして，重さ約1ｇ，大きさ9×15 mmの脳温テレメーター（Mini-Mitter社製）をその直径0.5 mmの針状サーミスターの先端部が海馬領域に位置するように頭蓋骨に固定した。脳温変動は，テレメーターによりパルス信号の発振頻度の変化として送信され，そのパルス信号をチューナーを用いて受信し，データをコンピューターを用いて数日間連続記録した。さらに，動物を26℃の恒温器内に置き，コンピューターのフィードバックによる温風ヒーターのon-off応答により脳温を自動制御し，MK-801（5 mg/kg, 10 mg/kg）を虚血負荷30分前に腹腔内投与し脳温を37℃前後に維持しながら，あらかじめ留置しておいた絹糸両先端部を引くことにより無麻酔下で5分間脳虚血を負荷した（1）。その後4日間脳温を約37℃に維持し，虚血負荷7日後に海馬CA1領域の虚血ニューロン死の程度を組織学的に観察した。

〔成績〕
MK-801投与による脳温変動：MK-801（5 mg/kg, 10 mg/kg, i.p）投与直後，脳温は一時的に0.5から1.5℃程度上昇したのち，降下し始めた。5 mg/kg投与した群では投与2時間後には脳温は34.5～35.5

℃になり，10 mg/kg 投与した群では投与 2 時間後には脳温は 33.5～35 ℃になり，この低脳温化は約48時間持続した（図 1a）。

MK-801 のニューロン死保護作用：MK-801（5 mg/kg, 10 mg/kg, i.p）投与 30 分後に 5分間脳虚血を行い，その後の脳温を 37 ℃前後に 4 日間維持した（図 1b）。虚血負荷 7 日後に組織学的に海馬 CA1 領域の虚血ニューロン死の有無を観察すると，MK-801 10 mg/kg 投与群で明らかにニューロン死保護作用が認められた（図 2）。

〔考察〕

以上の結果から，本システムは一過性脳虚血および薬物投与により発生する脳温変化を正確にモニターでき，さらには脳温コントロールも可能であり，脳機能に及ぼす脳温の影響に関する基礎的知見を得るための有用なシステムであると考えられる。また，本システムを用いMK-801は低脳温化作用を有することが再確認されたが，10 mg/kg の投与量では 4日間の脳温 37 ℃コントロール下でも虚血ニューロン死保護作用があることが判明した。

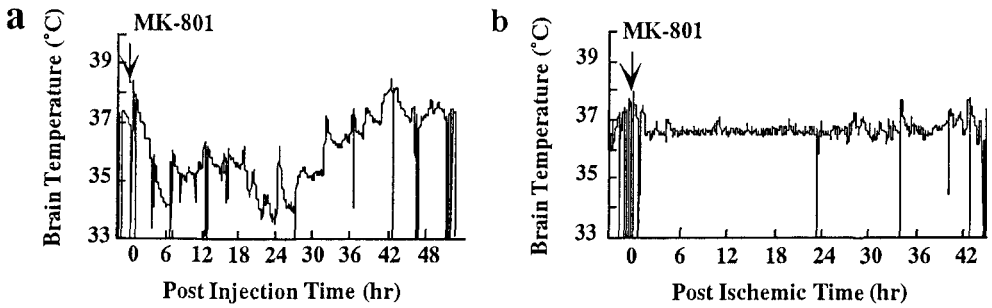


図 1．脳温制御システムによる脳温の記録：（a）は脳温制御システムを解除し室温 26 ℃下の MK-801 10 mg/kg 投与後の脳温変化，（b）は MK-801 10 mg/kg 投与後脳温制御システム下の虚血後の脳温の変化

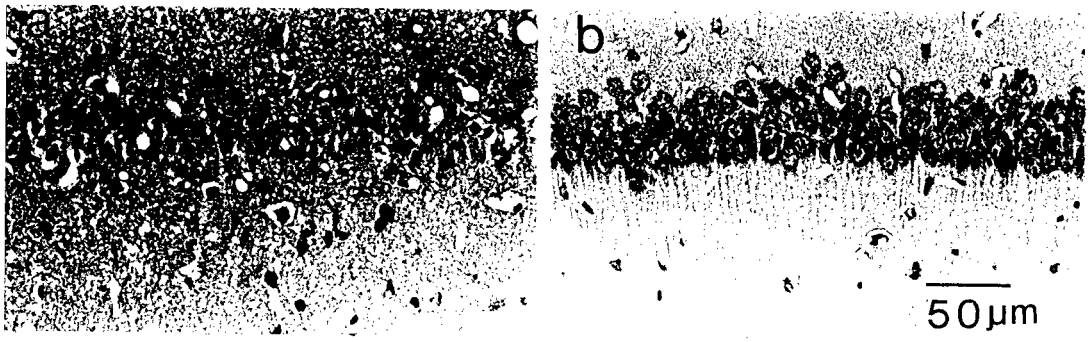


図 2．海馬 CA1 領域の組織像（Hematoxylin-eosin 染色）：（a）は 5 分間虚血のみ負荷した Control，（b）は MK-801 10 mg/kg を虚血 30 分前に投与した動物より取ったスライス

〔文献〕

(1) Chandler M.J., DeLeo J.,Carney J.M. (1985) *J. Pharmacol. Methods* 14, 137-146
(2) Buchan A., Pulsinelli, W.A. (1990) *J. Neurosci.* 10(1), 311-316
(3) Welsh F.A., Sims, R.E., Harris V.A. (1990) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10(4), 557-563

129　中枢ニューロンのアポトーシスに関与する遺伝子探索の試み

米増 知子、岡 哲志、西尾 チカ、榎戸 靖、畠中 寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕
中枢ニューロンのアポトーシスを研究する際のモデルとして、我々は以前よりラット胎仔からの初代培養ニューロンを高酸素気相濃度 (50% oxygen atmosphere) 下におき酸素負荷によって生じるニューロン死の系を用いてきた。この系は、比較的多くのニューロンを短時間に一斉にアポトーシスにより、死にいたらしめることができる点で、アポトーシスに伴う遺伝子群の解析には優れている。今回、この系にさらに改良を加え、アポトーシスに伴って変動することが期待される遺伝子の解析を試みた。今回は、ラット胎仔全脳からのニューロンを用いることで、量的な点の改善を図った。この系は 50% 酸素気相下において12時間後に半数程度のニューロンが死に、24時間後ではほとんど全てのニューロンが死んだ。蛋白質合成阻害剤 cycloheximide は、死を完全に抑制し、その commitment time は 4 時間であった。

ニューロンは発生段階のかなり早い時期に分裂能力を失う。ニューロンは非分裂細胞として各々が定められた時期に訪れる死を待つ運命にあるといえるのかもしれない。ニューロンの死は運命的選択を受けると考えられる発生初期の他にも、外界からストレスを受けた時、また生物個体に神経疾患や脳障害が生じた時など様々な場合に観察される。最近、主に発生過程に観察される死（一般に programmed cell death と呼ばれる）について報告されていたアポトーシスという形態の死に方が、必ずしも生理的とはいえないような様々な死の場合においても観察されることが分かってきた。大半のアポトーシスによる細胞死にはRNA や蛋白質の新規合成が必要であることが示されており、細胞に内在する能動的な cell death program（すなわち自殺プログラム）の存在が示唆されている。脳神経系においても、アポトーシスは末梢神経系、中枢神経系で古くから観察されているが、ニューロンのアポトーシスの分子機構を明らかにする解析は、非常に遅れている。ニューロンをアポトーシスに導く遺伝子について解析するためには、死が短時間でかつ同調的に生じるような優れた系が必要であり、また多くのニューロン数を確保する必要があった。我々は、この目的に応じてラット胎仔全脳からの培養ニューロンのアポトーシス系を確立したのでここに報告する。

〔実験方法〕
ラット胎仔 (E20) からの中枢ニューロンの初代培養は既報に従った (1)。ラット胎仔の脳を摘出し、脳膜を剥離させ、全脳を鋭利なメスで細断した。これらは L-15 培地中に集め、パパイン処理によって消化の後、5% 準胎仔牛血清、5% 馬血清を含む DF (DME:F12 = 1:1) 培地中に懸濁し、ピペットにより分散させた。遠心により、血清を含まない TIP/DF 培地に交換した後、6×10^5 cells/cm^2 で 6-well plates (Costar 社) にまいた。通常気相酸素濃度 (20% oxygen atmosphere) で 1 日培養の後、50% 気相酸素濃度のインキュベータに移した。
生細胞の計測には、ヘマトキシリン染色で総細胞数をカウントすると共に、抗MAP2抗体（東大・理、室伏擴先生よりいただいた）による免疫組織化学的染色を行い、陽性細胞の数をカウントした。

〔結果〕
ラット全脳からの培養ニューロンは、TIP/DF 培地中では 50% 酸素気相下において 12 時間後に半数程度のニューロンが死に、24時間後ではほとんど全てのニューロンが死んだ。蛋白質合成阻害剤 cycloheximide は、1 μM 添加により完全にニューロン死は抑制された（図1）。cycloheximide の用量

依存性を調べたところ、5 μM では少し細胞毒性を示した。図 1 に見られるように、高酸素負荷で 24 時間後にみられるニューロン死は、MAP2 染色、およびヘマトキシリン染色によって、死んだニューロンでは、neurite が消失していることが観察された。

50% 酸素負荷で誘導されるニューロン死は、cycloheximide を、酸素負荷後 3 時間までに添加すると、ほぼ完全に防止できた（図 2）。しかし、5 時間後に添加しても全く効果がなかった。4 時間後はデータが大きくふれ、中間的時期であることを示していた。この結果は、アポトーシスに関わる細胞内蛋白質は酸素負荷開始 4 時間で発現を始め、5 時間後では発現が終了することを示している。死の commitment time は 4 時間であることを示している。この時間経過は、数回の実験でほとんど変わらず、実験毎の差異がなかった。

そこで、我々は中枢ニューロンのアポトーシスに関わる遺伝子を単離する目的で、これら遺伝子発現が高いことが期待される、50% 酸素負荷後 3 時間または 5 時間後のニューロンを用い、RNA の解析を行っ手いる。ライブラリーを作成し、ここから differential hybridization 法を用いて未知のアポトーシス関連遺伝子を単離する試みをつづけている。また、既知のアポトーシス関連遺伝子（*bcl-2* など）や細胞周期関連遺伝子（サイクリン D など）の発現変動についても検索した。

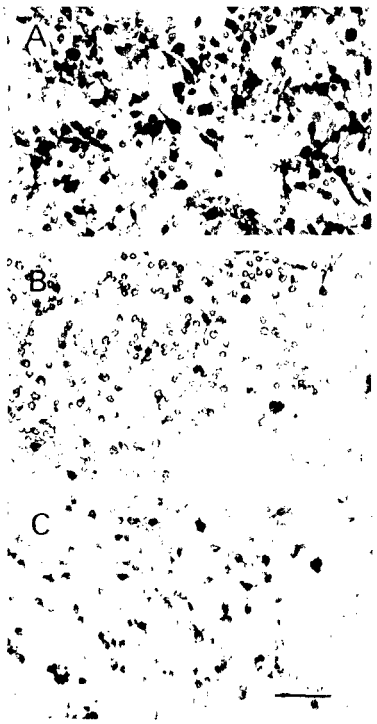
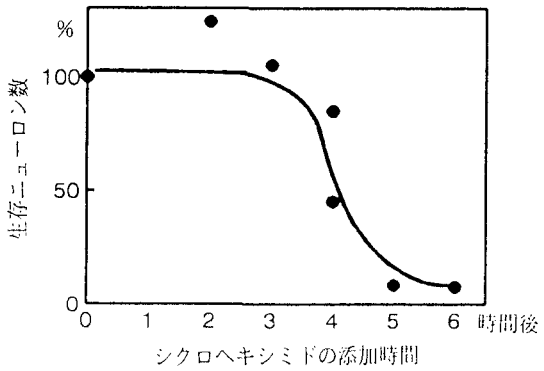


図 1. 高酸素負荷に誘導される中枢ニューロン死は蛋白質合成を必要とする。 (A) 20% 酸素濃度、(B,C) 50% 酸素濃度で 24 時間培養した後、抗 MAP2 抗体による免疫染色を行った。(C) には1 μM の cycloheximide を添加した。バーは 100 μm である。

図 2. 高酸素負荷に誘導される中枢ニューロン死の commitment time 。 50% 酸素濃度で 24 時間培養した後、生存 MAP2- 陽性細胞数を計測した。横軸の時間は、細胞を 50% 酸素濃度においてから、1 μM の cycloheximide を添加した時間を示す。生存ニューロン数は 50% 酸素濃度に移す直前のニューロン数を、100% とした値である。



〔文献〕

1. Y. Enokido, Y. Akaneya, M. Niinobe, K. Mikoshiba and H. Hatanaka, (1992) Basic fibroblast growth factor rescues CNS neurons from cell death caused by high oxygen atmosphere in culture. *Brain Res.*, **599**, 261-271.
2. Y. Enokido and H. Hatanaka, (1993) Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere. *Neurosci.*, **57**, 965-972.
3. Y. Enokido, T. Yonemasu, T. Kubo, M. Ichikawa and H. Hatanaka, (1994) Oxygen toxicity induces apoptotic neuronal in cultured rat hippocampal neurons. in "Recent Developments of Alzheimer's and Parkinson's Diseases" eds by I. Hanin, M. Yoshida and A. Fisher, Plenum Press, New York, in press.

130 高酸素負荷による培養中枢ニューロン死へのリン酸化酵素阻害剤の生存維持効果

榎戸 靖、久保 武一、岡 哲志、畠中 寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成部門）

〔要約〕
高酸素負荷による神経細胞死の誘導が何らかの細胞内シグナル伝達経路を介したものであるかを知る手がかりとして、リン酸化酵素阻害剤によるニューロンへの生存維持効果を検討した。その結果、酸素負荷によるニューロン死は 30～100 μM の H-7、H-8 の添加により顕著に抑制された。一方、チロシンリン酸化阻害剤である herbimycin A や genistein では逆に細胞死が促進される様子が観察された。さらに、生理的ニューロン死との比較モデルとして小脳顆粒細胞の脱分極刺激除去にともなうニューロン死の系を用いて同様の実験を行ったところ、H-7 でのみ生存は維持され、H-8 では細胞毒性がみられた。興味深いことに、酸素負荷によるニューロン死では poly(ADP-ribose) polymerase の阻害剤である 3-aminobenzamide によりニューロン死の遅延が観察された。以上の結果は、酸素毒性によるニューロン死では脱分極刺激除去よる小脳顆粒細胞の死とは異なる経路を介して細胞死のシグナルが伝えらえることを示唆すると共に、その一部が DNA 障害と関連したものである可能性が考えられる。

細胞内の酸素代謝にともなって生じる酸素ストレスが、老化や疾患の原因となる遍在的な細胞障害を引き起こすことが知られている。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。しかしながら、こうした様々な障害によって生じるニューロン死の細胞内メカニズムについては現在でも明らかでない点が多い。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される[3,4]、(2) ニューロン死は蛋白質および RNA 合成阻害剤によって阻止される、(3) ニューロン死にともない核内 DNA の断片化、さらには (4) 高 K^+ による生存維持効果が観察されることを報告してきた[5]。今回、ニューロン死に関わる細胞内経路を知る手掛かりとして蛋白質リン酸化酵素阻害剤による生存維持効果および細胞内蛋白質のリン酸化の変動について、脱分極刺激を除いたときにみられる小脳顆粒細胞のニューロン死との比較検討を行なった。

【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[1,2]。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 シトシンアラビノシド を含む TIP/DF 完全合成無血清培地にかえ、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。小脳顆粒細胞の培養および脱分極刺激除去によるニューロン死の誘導は生後ラットを用い、既法を修正した方法により行なった[2,6]。生後 9 日目のラット小脳を酸素バブルした L-15 培地に集め、上記の海馬と同様にカルチャープレートにまいた。翌日培地を 26 mM カリウムと 1 μM シトシンアラビノシド、 5% 馬血清を含む MEM 培地に換え、4 日間培養した。その後、培地を通常濃度のカリウム (5.4 mM) を含む MEM 培地に換え、ニューロン死を誘導した。高濃度カリウム (26mM) を含む MEM 培地は培地に加える $NaHCO_3$ を $KHCO_3$ に置き換えて調製した。生存細胞の割合は、抗 MAP2 抗体 (新延、御子柴先生より供与) による免疫染色とニグロシンによる死細胞の染色による細胞数のカウントおよび MTT assay を用いて評価した。リン酸化酵素阻害剤などの薬剤はプレートをインキュベータへ移す前あるいは脱分極刺激を止めると同時に添加した。時間経過にともなう細胞内リン酸化蛋白質パターンの変動は、リン酸化チロシンおよびリン酸化セリンに対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより観察した。

【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する。この時、キナーゼ阻害剤である H-7、 H-8 をそれぞれ添加すると、ニューロン死は顕著に抑えられ、通常培養時で細胞毒性が見られ始める培養 3 日目まで半数近くのニューロンの形態および生存が維持された。同様の結果は H-89 によっても観察されたが、その構造類似化合物で阻害作用がほとんどない H-85 では細胞死は全く抑えられなかった。また、herbimycin A や genistein では細胞死は促進された(図1)。さらに、生理的ニューロン死との比較モデルとして脱分極刺激除去後にみられる小脳顆粒細胞死への阻害剤の効果を見たところ、H-7 によってのみニューロン死は抑えられた。さらに、細胞死に DNA の障害が関与しているかどうかを知る手がかりとして、poly(ADP-ribose) polymerase の阻害剤である 3-aminobenzamide を添加したところ酸素負荷によるニューロン死でのみ細胞死の遅延が見られた。以上の結果は高酸素負荷によるニューロン死に小脳顆粒細胞でのニューロン死とは異なる細胞内シグナル経路が関与すると同時に、その一部が DNA 障害を介したものである可能性を示唆している。現在、リン酸化チロシン、リン酸化セリンに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングなどにより、ニューロン死の過程でリン酸化が促進される蛋白質の解析を行っている。

【文献】
1)榎戸 靖、久保武一、市川真澄、畠中 寛、(1993) 神経化学 **32** 186-187. 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., (1993) *Neuroscience.*, **57** 965-972. 6)Lasher, R.S and Zagon, I. S. (1972) *Brain Res.*, **41** 482-488.

図 1.

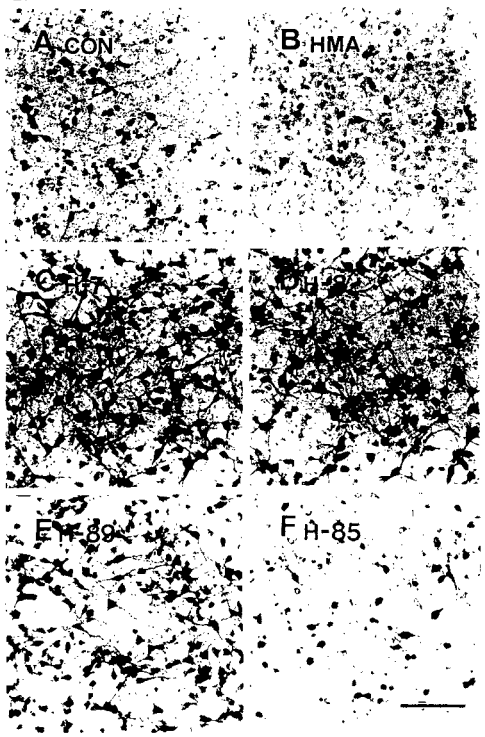


図 2.

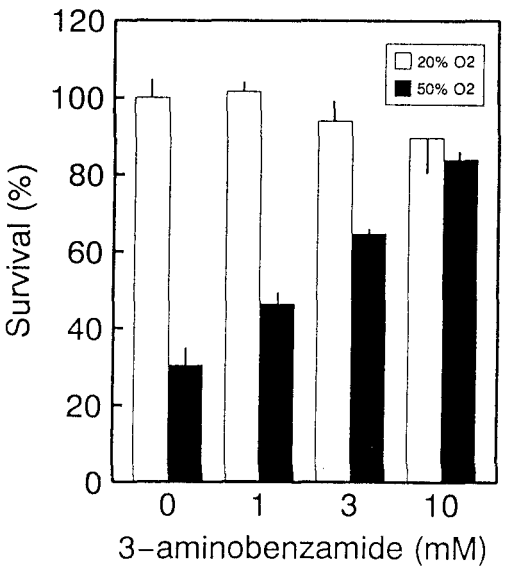


図 1. 50% 気相酸素下でみられる培養海馬ニューロン死への蛋白質リン酸化酵素阻害剤による生存維持効果
E20 ラット海馬ニューロンをそれぞれの薬剤の共存下、50% 気相酸素で 48 時間培養した時後の MAP2 陽性ニューロンの様子。A) コントロール、B) 0.1 μM herbimycin A、C) 100 μM H-7、D) 30 μM H-8、E) 10 μM H-89、F) 30 μM H-85。スケール 100 μm。

図 2. 50% 気相酸素下で見られる培養海馬ニューロン死への細胞死抑制効果
E20 ラット海馬ニューロンを50% 気相酸素下、それぞれの濃度の 3-aminobenzamide とともに 36 時間培養し生存細胞数を MTT assay で定量したもの。

131 エトポシド（etoposide）により誘発される培養大脳皮質神経細胞死

中島光業、*村瀬真一、**古川昭栄、柏木久美子、太田　淳、川島拓司、林要喜知
（森永乳業．生科研、*慶応大学．医．解剖、**岐阜薬科大学．分子生物）

〔要約〕　培養神経細胞に対するエトポシドの細胞死誘発効果を検討した。ラット胎児大脳皮質より調製した神経細胞は、エトポシド（１０μｇ／ｍｌ）存在下１０時間以内に死滅した。死滅した細胞のＤＮＡは断片化され、電気泳動でラダー状のバンドが認められた。この細胞死は、転写阻害剤（アクチノマイシンD）及び翻訳阻害剤（シクロヘキシミド）によって阻止され、またキナーゼ阻害剤（1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methyl-piperazine：Ｈ－７）でも阻止された。エトポシドで死滅した細胞のほとんどは、オルガネラの膨張、細胞膜の破壊及び核膜の一部破壊等の形態的変化を示した。しかし、培地にビタミンＥを添加すると、死細胞の約２６％において、細胞膜の破壊がなくなると共に、核の凝縮が認められた。以上の結果より、エトポシドは培養大脳皮質神経細胞に対してシグナル伝達によって調節されるプログラム細胞死を誘発し、また、その細胞死に伴う形態変化は、神経細胞をとりまく微小環境により大きく異なる可能性が示された。

［緒言］脊椎動物の神経細胞は、発生過程で生じたうちの約半数が成熟に至る過程で死滅する(2,8)。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が活性化されることで起こると考えられている(9,13)。プログラム神経細胞死のin vitroのモデル系としては、これまでに、末梢神経系では発生過程の特定の時期の交感神経細胞、知覚神経細胞などを用いた培養系が知られており（5,11）、また、中枢神経系のモデル系も最近報告されている（1,4,10）。今回私たちは、抗がん剤であるエトポシドが中枢神経系の神経細胞にプログラム細胞死を誘発することを見いだしたので、その結果を報告する。

［方法］ラット胎児（Ｅ１９）大脳皮質神経細胞の調製は既報に従った（6,7）。血清入り培地で懸濁した細胞をポリオルニチン塗布培養ウェルまたはデッシュに１－５ｘ１０^4 cells/cm^{2}の密度でまいた。翌日、無血清培地（ヒトトランスフェリン（5 μg/ml）、ウシインシュリン（5 μg/ml）、プロゲステロン（20nM）、ウシ血清アルブミン（0.5％）を含む）に交換し、エトポシド、アクチノマイシンD、シクロヘキシミド、Ｈ－７、ビタミンＥ等の試験試薬を添加した。細胞死の判定は、トリパンブルーの排除能を指標に行った。細胞内ＤＮＡの抽出は、既報に従った（14）。1.5%アガロースゲル電気泳動（3μg/lane）後、エチジウムブロマイドでＤＮＡを染色した。電子顕微鏡観察は、細胞をパラフォルムアルデヒドとグルタルアルデヒドで固定した後、エポン樹脂に包埋し、超薄切片を作製して行った。

［結果］培養大脳皮質神経細胞にエトポシド（10 μg/ml）処理を施すと、４時間後には細胞死が検出され、１０時間までに８０％以上の細胞が死滅した。次に、このエトポシド誘発神経細胞死に対するタンパク質合成阻害剤及びシグナル伝達調節剤の効果を検討した。シクロヘキシミド（0.12-3.3 μg/ml）とアクチノマイシンD（12-333 ng/ml）は、いずれも細胞死を阻止した（図１．（Ｂ）カラム８）。また、キナーゼ阻害剤（Ｈ－７；111-1000 μM）もこの細胞死を抑制した。

無血清条件下、１ｘ１０^5 cells/cm^{2}以下の細胞密度で培養すると、皮質神経細胞は２－３日で自然に死滅するが、この細胞死はビタミンＥやＫの添加により阻止される（図１．（Ｂ）カラム２，３，４）（6,7）。死細胞のＤＮＡを抽出し、1.5%アガロースゲル電気泳動で分析したところ、ＤＮＡは全く分解されていなかった。一方、エトポシド処理により死滅した神経細胞では、ＤＮＡの分解が見られ、ラダー状のＤＮＡフラグメントが検出された（図１．（Ａ））。エトポシド処理による細胞死は、ビタミンＥやＫで阻止出来ず、ＤＮＡの分解も同様に認められた。

細胞の形態を電子顕微鏡下で観察したところ、エトポシド存在下あるいは非存在下で死滅した細胞のほとんどで、オルガネラの膨張、細胞膜の破壊、また、核膜の一部破壊などの形態変化が観察された。一方、エトポシドと同時にビタミンＥを培地に添加すると、死細胞の約２６％において核の凝縮が認められた。また、オルガネラの膨張は見られるものの、細胞膜の破壊もなくなった（図２）。

［考察］エトポシドによって誘発される培養大脳皮質神経細胞死は、蛋白質合成阻害剤で阻止され、ラダーを含むＤＮＡの分解も検出されることから、プログラム細胞死であると考えられる。また、この細胞死はキナーゼ阻害剤（Ｈ－７）で阻止されることから、シグナル伝達によっても調節されることが示唆された。Ｈ－７は作用濃度の違いでいろいろなキナーゼに対し阻害効果を持つことが知られており（3）、本神経細胞死抑制に関しては100 μM以上で作用が見られることから、Ｃキナーゼ（inhibition constant [Ki]=6.0 μM）やｃＡＭＰ，ｃＧＭＰ依存性キナーゼ（そ

れぞれ[Ki]=3.0, 5.8μM）以外のキナーゼの関与も考えられる。

エトポシドは、免疫系細胞やその他種々の株化細胞に対してアポトーシスを誘発することが知られている（12）。今回の培養大脳皮質神経細胞を用いた実験では、エトポシド単独処理が、むしろネクローシスに近い形態変化を引き起こした。しかし、培地にビタミンEを加えることで、核の凝縮などアポトーシス様の特徴が観察された。この結果は、プログラム神経細胞死の形態が、細胞をとりまく環境によって影響を受けることを示唆している。

［文献］(1) Enokido, Y. and Hatanaka, H. (1993) Neuroscience 57, 965-972. (2) Franklin, J. L. and Johnson, E. M. (1992) TINS 15, 501-508. (3) Hidaka, H. et al. (1984) Biochemistry 23, 5036-5041. (4) Kure, S. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 39-45. (5) Martin, D.P. et al. (1988) J. Cell Biol. 106, 829-844. (6) Nakajima, M. et al. (1991) Neurosci. Lett. 133, 49-52. (7) Nakajima, M. et al. (1993) Dev. Brain Res. 73, 17-23. (8) Oppenheim, R. W. (1991) Annu. Rev. Neurosci. 14, 453-501. (9) Raff M. C. (1992) Nature 356, 397-400. (10) Ratan, R. R. et al. (1994) J. Neurochem. 62, 376-379. (11) Scott, S. A., and Davies, A. M. (1990) J. Neurobiol. 21, 630-638. (12) Sen, S. and D'Incalci, M. (1992) FEBS Lett. 307, 122-127. (13) Wyllie, A. H. et al. (1980) Int. Rev. Cytol. 68, 251-305. (14) Yonish-Rouach, E. et al. (1991) Nature 352, 345-347.

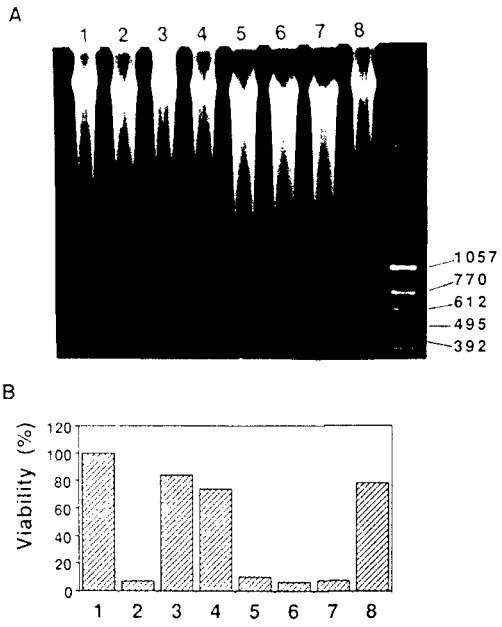


図1．エトポシド存在下、非存在下で培養した神経細胞のＤＮＡ分析、およびその生存数
（A）レーン１：培地交換時の神経細胞から抽出したＤＮＡ，レーン２：４８時間培養，レーン３：ビタミンＥ（１０$^{-7}$Ｍ）添加、４８時間培養，レーン４：ビタミンＫ（１０$^{-7}$Ｍ）添加、４８時間培養，レーン５：エトポシド（１０μｇ／ｍｌ）添加、１０時間培養，レーン６：エトポシドおよびビタミンＥ添加、１０時間培養，レーン７：エトポシドおよびビタミンＫ添加、１０時間培養，レーン８：エトポシドおよびシクロヘキシミド（１μｇ／ｍｌ）添加、１０時間培養，右端はマーカーＤＮＡ
（B）ＤＮＡ抽出時の生存細胞数（％）；カラム番号は、それぞれ（A）のレーン番号に対応する

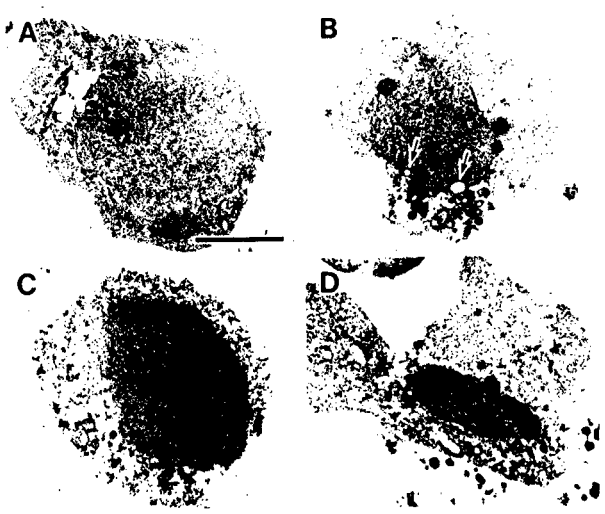


図2．エトポシド存在下、非存在下で培養した神経細胞の電子顕微鏡写真
（A）エトポシド非存在下１２時間培養
（B）エトポシド非存在下７２時間培養
（C）エトポシド（１０μｇ／ｍｌ）存在下１２時間培養
（D）エトポシドおよびビタミンＥ（１０$^{-7}$Ｍ）存在下１２時間培養
Ｂａｒ＝３μｍ.

132 グルタミン酸神経細胞毒性における血小板活性化因子の関与の検討

野上 予人、平島 豊、高久 晃
(富山医科薬科大学・医・脳神経外科)

〔要約〕血小板活性化因子（PAF）が虚血性脳障害に関与する可能性をラット培養大脳皮質神経細胞を用いて検討した。家兎抗PAF免疫グロブリン(aPAF-IgG)や抗PAF剤（BN52021、CV6209、E5880）はグルタミン酸による大脳皮質神経細胞の細胞死を抑制した。さらに培地中に加えたPAFの神経細胞障害性を、培養細胞に一度取り込まれたFura-2の漏出を指標に検討した。その結果、10^{-8}Mの低濃度のPAFでも対照と比べ、Fura-2の漏出に差を認めた。培養神経細胞を用いた実験結果より、グルタミン酸による神経細胞死の機構に神経細胞より培地中に放出されたPAFが関与する可能性が示唆された。

［目的］

in vivo 脳虚血モデルに対する抗PAF剤の有効性が報告され[2,4]、最近では培養神経細胞を用いた実験で、グルタミン酸による神経細胞死に対してBN52021が抑制効果を持つことが報告された[5]。一方、培養神経系細胞(NG108-15,PC12)に対して、exogenousに加えたPAF(3.5-10μM)がcytotoxic effectをもつとする報告がある[3]。しかし、その濃度はラット大脳で報告された産生濃度[7]より高濃度で、病的状態で産生が亢進したとしても、非生理的な高濃度と考えられる[6]。

本研究ではaPAF-IgGや構造の異なった抗PAF剤についてもそのグルタミン酸神経細胞毒性に対する抑制効果を検討した。さらにexogenousに加えられた、より低濃度のPAFが神経細胞に対して障害を与えるか否かを検討した。

［方法］

E18のラット胎仔脳の大脳皮質から、酵素処理および機械的処理により細胞を分散し、5%PNCS/5%HS/DMEMにて細胞浮遊液を作成した。polyethylenimmineでコートした24wellおよび48wellのマルチプレートに$4x10^5/cm^2$の密度で播種し、24時間後、無血清培地(DMEM,15mM HEPES,1mM sodium pyruvate,5μg/ml transferrin,5μg/ml insulin,6.3ng/ml progesterone,30nM selenium,100μM putrescine)に交換した。さらに6日間、2回／週で培地交換し、実験に供した。

1）グルタミン酸神経細胞毒性に対する抗PAF剤の抑制効果：培養7日目にグルタミン酸1mMを含む上記無血清培地に60分間曝露した後、無血清培地で2回洗浄後グルタミン酸不含無血清培地に戻して細胞死を誘発した。24時間後、培養上清中のLDH活性を測定し細胞死の判定を行った。下記抗PAF剤はグルタミン酸曝露中とその後判定までの24時間培地中に添加した。aPAF-IgGはポリクローナル抗体を用い、蒸留水にて溶解した。aPAF-IgGに対する対照として、preimmune rabbit IgGを用いた。BN52021、CV6209、E5880はDMSOに溶解した。DMSO最終濃度は0.1%になるようにし、対照やIgG群にも0.1%添加した。

2）PAFによる神経細胞障害：培地中に加えられたPAF（10^{-9}-10^{-4}M）の細胞障害性を、Abeらが培養血管内皮細胞障害の判定に用いたFura-2法[1]を応用し検討した。神経細胞を、Fura-2/AM（2μM）を含む無血清培地で37℃、30分間loadingし、Fura-2/AMを細胞内に取り込ませた。2回洗浄後、無血清培地に戻し、120分間のpreincubationを行った。次にPAFを含む無血清培地で60分間培養し、細胞膜が傷害され、培地中に漏出したFura-2(Fura-2/AMは細胞内acetyl esteraseによりFura-2となり、細胞外へ出れなくなる。)の蛍光を350nmの励起波長、500nmの蛍光波長で測定した。なお、全LDH量と全Fura-2量は0.05%Triton X-100を含む培地で処理したものを測定した。

［結果］

1）グルタミン酸神経細胞毒性に対する抗PAF剤の抑制効果（図1）：preimmune IgGはグルタミン酸神経細胞毒性に影響を与えなかった。aPAF-IgGは抑制効果を示し、その効果は濃度依存的であった。BN52021は100μMで抑制効果を示した。CV6209は10nM、100nMで効果を示した。E5880は10nM、100nM、1μMで効果が認められた。CV6209、E5880は10μM以上の濃度でその強い界面活性作用によると考えられる細胞破壊が早期より認められた(Data not shown.)。

2）PAFによる神経細胞障害（図2）：exogenousに培地中に加えたPAFは10^{-8}Mの濃度より濃度依存的に神経細胞よりのFura-2の漏出を生じさせた。

［考察］

in vivo 脳虚血モデルに対する抗PAF剤の有効性が報告され、その効果がPAFの脳血流低下作用、血液脳関門透過性亢進作用、血管収縮作用を抑制することによると考えられてきた[2,4]。最近、培養神経細胞を用いて、グルタミン酸による神経細胞死に対してBN52021が抑制効果をもつことが報告され、上記の様な血管や血流を介した細胞性および液性因子の関与の無い状態でも抗PAF剤が直接神経細胞に保護効果をもつことが示唆された[5]。我々は、aPAF-IgGや、BN52021と構造の異なるPAF受容体アンタゴニストであるCV6209、E5880も抑制効果をもつことを示した。このことはPAFがグルタミン酸による神経細胞死の機構に何らかの形で関わっている可能性をさらに強く支持するものと考えられた。

PAFは非常に微量(pM-nM order)で生理活性を示すメディエーターである。μM orderでのPAFの作用はその界面活性作用により生じた細胞膜の変化による非生理的な結果の可能性がある[6]。細胞障害の判定法として広く利用されているLDH法では10μM PAFでも細胞障害を捉えられなかった。Fura-2法は細胞障害の極めて初期の変化や軽度の細胞障害を検知できるため[1]、我々はこれを利用した。Fura-2法での結果は低濃度のPAFが細胞障害を生じうることを示している。今後、グルタミン酸曝露による神経細胞中および培地中のPAFの産生増加の有無を検討する予定である。

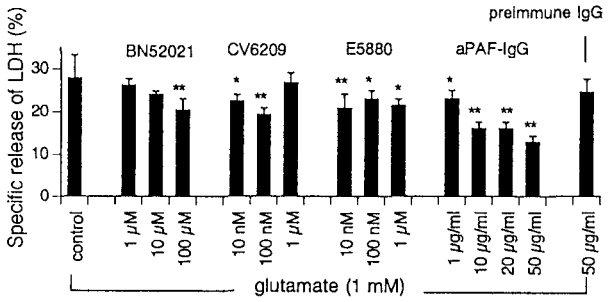


図1. グルタミン酸神経細胞毒性に対する各種抗PAF剤の抑制効果

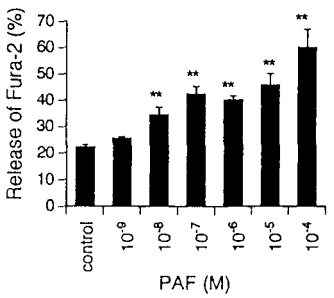


図2. PAFによる神経細胞障害

* p<0.05 vs. control group
** p<0.01
(ANOVA followed by Fisher's LSD test)

［参考文献］

1.Abe M et al.(1988)PG LT EFA 34,69-74
2.Feuerstein G et al.(1990) Stroke 21,Ⅲ-90 - Ⅲ-94
3.Kornecki E and Ehrlich YH (1988)Science 240,1792-1794
4.Lindsberg PJ et al.(1991) Ann Neurol 30,117-129
5.Prehn JHM and Krieglestein J (1993)J Neurosci Res 34, 179-188
6.Sawyer DB and Andersen OS (1989)Biochim Biophys Acta 987,129-132
7.Kumar R et al.(1988)Biochim Biophys Acta 963,375-383

133 シグマ受容体に作用する脳内内在性物質

富樫俊二・小林　徹・細木俊宏・伊藤　陽
（新潟大学医学部精神医学教室）

〔要約〕　シグマ受容体に作用する内在性物質がラット脳および牛脳から分離された。この内在性物質は１M酢酸、エーテルで抽出され、Sep-Pak C18や抗ハロペリドールモノクローナル抗体結合セファロース４ＢによるアフィニティークロマトグラフィーおよびＨＰＬＣなどを用いて精製された。[^{3}H]-haloperidolや[^{3}H]-DTGとラット脳膜標品のシグマ受容体との結合を阻害する内在性物質は、９５℃、１５分間の熱処理に対して安定であり、トリプシン、キモトリプシンなどのプロテアーゼに対しても安定である。この物質は大脳皮質、尾状核、脳幹、小脳など広範囲の脳から抽出され、また肝臓にも存在している。ゲルろ過クロマトグラフィーから分子量は700 以下と推測される。

〔目的〕

シグマ受容体にはN-allylnormetazocine(SKF 10047), pentazocine, cyclazocineなどの精神作用のある薬物が作用する一方、ハロペリドールをはじめとする多くの抗精神病薬や最近開発されてきた非定型抗精神病薬のいくつかも結合する。また分裂病患者死後脳においてシグマ受容体が変化しているという報告があることなどからシグマ受容体は精神分裂病の病因や治療作用に関与している可能性がある。

しかしながら現在まで、シグマ受容体に作用する内在性物質は不明であり、そのためシグマ受容体の生理作用も不明な点が多い。そこで今回私達は、抗ハロペリドールモノクローナル抗体を結合させたアフィニテークロマトグラフィーやＨＰＬＣを用いてシグマ受容体に作用する内在性物質を精製する実験を行った。

〔方法〕

エーテル麻酔下で摘出したラット全脳あるいは牛脳を出発材料とした。組織の10倍容の１M酢酸中でポリトロンホモジナイズした後、遠心分離(27,000 ×g, 30 min)した。上清に２倍容のジエチルエーテルを加え、エーテル相をロータリーエバポレートしたのち凍結乾燥した。それを 0.1 % トリフルオロ酢酸に溶解し、Sep-Pak C18(Waters)に吸着させ、60 %アセトニトリルで溶出した。溶出分画を凍結乾燥した後、Tris 緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.1 mM PMSF)に溶解し、抗ハロペリドールモノクローナル抗体結合セファロース４Ｂカラムにかけた。Tris 緩衝液と蒸留水で洗浄したのち、0.1 M 酢酸で溶出した。それをさらに逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製した。

アッセイは[^{3}H]-haloperidolや[^{3}H]-DTG(di-tolyl-guanidine)とラット脳膜標品との結合阻害実験で行った。

〔結果及び考察〕

1.内在性物質はトリプシン(0.1 mg, 1140 U)、α－キモトリプシン(0.1 mg)などの酵素を作用させても活性があり、また９５℃、１５分間の熱処理に対しても安定である。

2.透析膜を通過し、Sephadex G-10 および G-15 によるゲルろ過クロマトグラフィーで分画されることから、内在性物質の分子量は 700 以下と推測される。また陽イオン交換カラム（アクセルＣＭ, Waters）に吸着し、0.1 % TFA/water で溶出されることから、正に荷電している。

3．μボンダスフェアC18 を用いた HPLCで、内在性物質はアセトニトリルの 0 %から 60 %グラジエントで溶出され、三つのピークが認められた。

4．内在性物質は前頭葉、尾状核、脳幹、小脳など牛脳の広範囲に存在し、またラット肝臓にも存在している。

これまで内在性物質を明らかにしようとした試みはいくつかあり、分子量 4,000 と10,000 のペプチドであるという報告[2]と分子量７００前後の低分子量の物質であるという報告[1]がある。我々の研究結果は後者と類似しているが、同一のものであるかは明らかでない。

今回我々は内在性物質を精製するために、抗ハロペリドールモノクローナル抗体を結合させたアフィニテークロマトグラフィーを行った。この抗体はハロペリドールのフェニールピペリジニールリングを中心とした部分を認識していることが分かっている[3]。従って得られた内在性物質はそれに相応する立体構造をもっていると推測される。

ＨＰＬＣで三つの分画が[^{3}H]-haloperidolとシグマ受容体との結合を抑制し、このうち Fraction 19 の活性が最も高かった（Fig. 1）。今後 これらの分画について gas chromatography - mass spectrometry などを用いてさらに精製していきたい。

［謝辞］

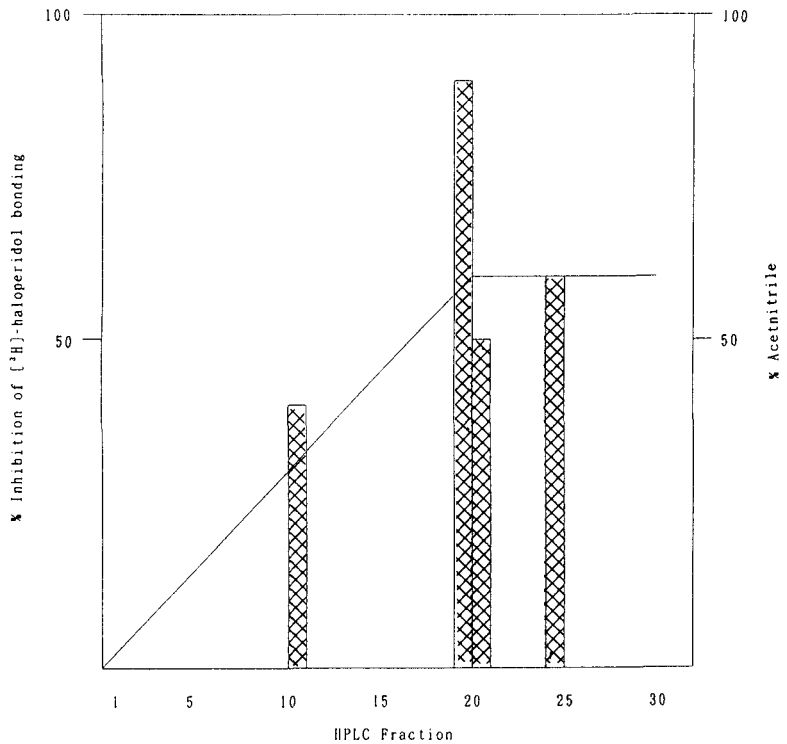
本研究をご指導いただきました新潟大学脳研究所神経化学教授佐武　明先生に深謝いたします。

［文献］

1. Patterson, T.A., Connor, M. and Chavkin, C. (1994) Sigma Receptors, ed. by Itzhak, Y., Academic Press, pp 171-189.

2. Su, T., Weissman, A.D. and Yeh, S.-Y. (1986) Life Sci. 38, 2199-2210.

3. 冨樫俊二（1992）精神神経薬理, 14, 193-203.



134 ボツリヌスB型神経毒素受容体としてのシナプトタグミン・ガングリオシド複合体

西木禎一[1]、根本康夫[2]、吉田　明[3]、高橋正身[1]、小崎俊司[4]
([1]三菱化成生命研、[2]大阪大学・医、[3]早大・人総研、[4]大阪府大・農)

〔要約〕
ボツリヌス毒素は神経終末からの伝達物質の遊離を阻害する。毒素作用の発現にはシナプス前膜上の受容体への結合が必須である。これまでに、私たちはガングリオシドG_{T1b}あるいはG_{D1a}の存在下でボツリヌスB型毒素と結合するタンパク質をラット脳から精製し、その性状からシナプトタグミンであることを示した[1]。今回、大腸菌で合成させたシナプトタグミンをガングリオシドとともにリン脂質膜に組み込むと、B型毒素が特異的に結合することがわかった。B型毒素に対する親和性はアイソフォームにより異なり、シナプトタグミンIの解離定数は2.3 nM、IIは0.23 nMであった。また、毒素はシナプトタグミンII遺伝子を発現させた培養細胞に結合した。以上の成績から、シナプス前膜上でガングリオシドG_{T1b}/G_{D1a}と複合体を形成したシナプトタグミンIIがボツリヌスB型毒素受容体である可能性が示唆された。

[序文]

ボツリヌス毒素（A～G型）はコリン作動性神経終末に作用し、アセチルコリンの遊離を阻害することで弛緩性麻痺をひき起こす。毒素の作用発現過程は、①受容体への結合②細胞質内への侵入③神経伝達物質の遊離阻害、の3段階に分けて考えられている。毒素は、受容体結合を担う重鎖と、毒素の作用本態であるプロテアーゼ活性を持つ軽鎖がS-S結合で結ばれた2本鎖構造をしている。単離した軽鎖自体は毒性を示さず、重鎖を介する受容体結合が毒素作用発現に必須であるが、受容体の分子レベルでの解明はほとんど行われていない。既に報告したように、私たちはラット脳からB型毒素結合タンパク質の精製に成功した[1]。このタンパク質はガングリオシド存在下でのみ毒素結合活性を発揮した。このタンパク質の部分アミノ酸配列がシナプトタグミンの配列と一致したことから、B型毒素受容体がシナプトタグミンとガングリオシドの複合体であることが示唆された。シナプトタグミンはシナプス小胞やシナプス前膜に局在するタンパク質で、ラット脳では少なくとも2種類のアイソフォームIとIIが発現している[2]。今回、大腸菌あるいは培養細胞で発現させたシナプトタグミンを用いて、毒素受容体としての性状を検討した。

[方法]

B型毒素はボツリヌスB型菌の培養液から精製し、クロラミンT法により[^{125}I]で標識した。シナプトタグミンIのcDNAは既報の方法[3]で、IIのcDNAはラット脳cDNAを鋳型としてPCR法で単離した。シナプトタグミン遺伝子の発現プラスミドで大腸菌BL21(DE3)pLysS株を形質転換した。発現させたシナプトタグミンを部分精製し、ガングリオシドとともにリン脂質膜に再構成した後、[^{125}I]標識B型毒素と反応させた。シナプトタグミンII発現チャイニーズハムスター卵巣由来（CHO）細胞は、真核細胞での発現プラスミドをリン酸カルシウム法で導入することにより作製し、ガングリオシドで処理後、[^{125}I]標識毒素と反応させた。細胞の免疫染色は、固定せず膜の透過性も変化させずに、シナプトタグミンIIのN末端に対する抗体（PAb Stg2N）とFITC標識2次抗体を用いて既報の方法により行った[4]。

［結果および考察］

[^{125}I]標識B型毒素はシナプトタグミンと濃度依存性に結合した（Fig. 1）。スキャッチャード解析により算出した解離定数はIが約2.3 nM、IIが約0.23 nMで、アイソフォーム間で毒素に対する親和性が異なった。ラット神経系ではIは主に中枢に、IIは主に末梢に発現している[2]。IIの生体内分布と毒素に対する高親和性を考え合わせると、末梢神経終末部に対するボツリヌス毒素の特異性をうまく説明することができ、シナプトタグミンIIがB型毒素受容体タンパク質である可能性が高いと考えられる。

シナプトタグミンII発現CHO細胞をガングリオシドG_{T1b}あるいはG_{D1a}で処理するとB型毒素の結合がみられた（Fig. 2）。細胞への[^{125}I]標識毒素の結合は、未標識B型毒素およびその重鎖により阻害され、軽鎖あるいはA型毒素では影響を受けなかった。細胞をPAb Stg2Nを用いて免疫染色したところ細胞膜上に特異的な蛍光が観察された。以上の結果より、B型毒素が重鎖を介してシナプトタグミンのN末端部分と結合することが示唆された。シナプトタグミンは分子内に1ケ所膜貫通領域をもち、N末端部分をシナプス小胞内に向けている[5]。小胞の開口分泌が起こる際、シナプトタグミンのN末端は細胞外に露出すると考えられる。したがって、シナプス前膜へ移行したシナプトタグミンがガングリオシドと会合するとすれば、この複合体を認識してB型毒素がシナプス前膜に結合すると予想される。

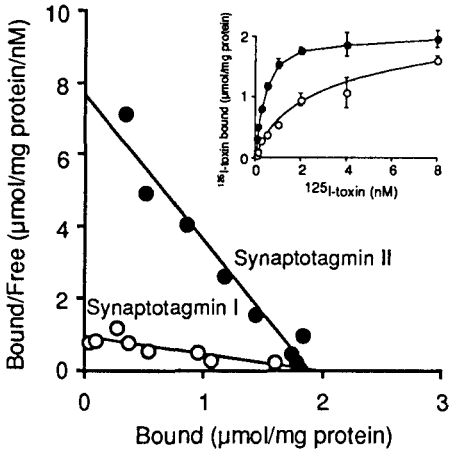


図1．大腸菌で合成したシナプトタグミンに対する[^{125}I]標識B型毒素の結合．飽和結合実験（挿入図）のデータを、コンピュータプログラムSP123を用いてスキャッチャードプロット解析した．

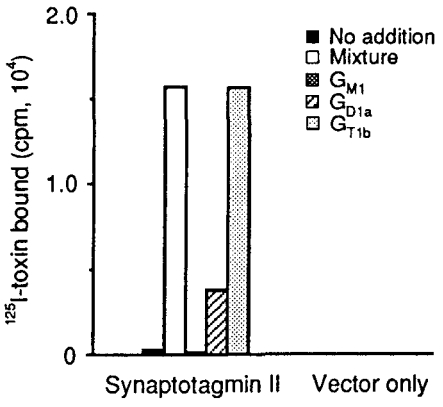


図2．シナプトタグミンII発現CHO細胞に対する[^{125}I]標識B型毒素の結合に及ぼすガングリオシドの影響．

［引用文献］

1. Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10498-10503
2. Geppert, M., Archer, B. T., and Südhof, T. C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13548-13552
3. Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., El Far, O., Sato, K., Martin-Moutot, N., Newsom-Davis, J., Takahashi, M., and Seagar, M. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3625-3629
4. Shoji-Kasai, Y., Yoshida, A., Sato, K., Hoshino, T., Ogura, A., Kondo, S., Fujimoto, Y., Kuwahara, R., Kato, R., and Takahashi, M. (1992) *Science* **256**, 1820-1823
5. Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R., and Südhof, T. C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 623-629

135 ヒトグルタミン酸トランスポーターのクローニング、発現およびその染色体部位の決定

川上秀史、田中光一*、中山隆安、井上健、高井節夫**、山田清美**、中村重信
（広島大学医学部第３内科、*国立精神神経センター神経研究所疾病研究４部、
**国立国際医療センター研究所遺伝研究室）

「要約」

ヒトグルタミン酸トランスポーターhGluT-1のcDNAクローニングをおこなった。cDNAより推定される蛋白は、542個のアミノ酸、６回の膜通過ドメインからなり、ラットやマウスのhGluT-1と９７%の相同性を示した。卵母細胞に発現させたhGluT-1は、グルタミン酸に対して高い親和性（Km=78.4μM)と、細胞外液のNa^+に依存性を示した。hGluT-1mRNAの発現は、脳に最も多く、肺、心臓、筋肉、胎盤にも見られた。fluorescence in situ hybridization法によって、hGluT-1遺伝子は、ヒト第5染色体p13に局在する事を明らかにした。

「目的」

グルタミン酸は、脳における主要な神経伝達物質であり、学習や記憶など複雑な生理機能に関わっている一方で、細胞外のグルタミン酸濃度の上昇は、虚血時の脳や変性疾患において神経細胞死を引き起こすと考えられている。グルタミン酸トランスポーターは、細胞外のグルタミン酸濃度を調整する重要な物質であり、3つのサブタイプ、ラットGluT-1(GLAST)、ラットGLT-1、ウサギEACC1が知られている(1,2)。我々は、神経変性疾患におけるグルタミン酸トランスポーターの役割を明らかにするため、ヒトグルタミン酸トランスポーター hGluT-1のcDNAクローニングを行い、その発現および染色体部位を決定した(3)。

「方法」

1）cDNAクローニング

λ-ZAPIIベクターに組み込まれたヒト大脳cDNAライブラリー(30万プラーク）をラットGluT-1 cDNAをプローブとしてスクリーニングし陽性クローンを得た。これらクローンを、プラスミドへ転換した後、RNAを合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に注入し、グルタミン酸の取り込みを検討した。取り込み陽性クローンの１つ(phGluT-1) の塩基配列を、dideoxy chain termination法により決定した。

2）ヒトGluT-1 の卵母細胞による発現

phGluT-1を鋳型としてT３ RNA polymeraseによりRNAを合成し、アフリカツメガエルの卵母細胞に4-6 ngの合成ＲＮＡを含む40 nl の水を注入した。注入２－３日後に、グルタミン酸トランスポーターの活性を測定した。取り込み実験は、[^{3}H] glutamate を含む５０mlのND96(96mM NaCl, 2mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$, 5mM Hepes pH 7.5)溶液へ１個の卵母細胞を移すことにより開始し、60分後急速に洗浄し、1%ＳＤＳで可溶化後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

3）ノザンブロッテング

Human Multiple Tissue Norhen Blot (polyA$^+$) (CLONTECH) に対して、phGluT-1 から切り出した569塩基対の*Eco*RI-*Bgl*II断片をプローブとしておこなった。

4）染色体部位の決定

ニックトランスレーションでビオチン化したhGluT-1 cDNA (3.9kbp)をプローブとして、fluorescence in situ hybridizationを行い、Ｒバンド染色体上でFITCのシグナルの位置を分析した。

「結果」

1）31個のハイブリダイゼイションシグナル陽性クローンを単離し卵母細胞で発現させた。うち3クローンがグルタミン酸取り込み活性を示し、そのうちの1クローンphGluT-1の塩基配列を決定した。塩基配列から予想される蛋白は、542個のアミノ酸からなる分子量59,569の蛋白でラット及びマウスのGluT-1に対して97%のアミノ酸配列が相同性を示し、2箇所の糖鎖結合部位と6回の膜通過部位が想定された。

2）卵母細胞に発現させたhGluT-1は、グルタミン酸に対して高い親和性（Km=78.4μM）と細胞外液の Na^+ に依存性を示した(Fig.1)。また0.1mMのL-glutamate,L-asparate,D-asparate,DL-Threo-b-hydroxyasparate, L-cysteine sulfateで抑制されたがD-glutamateおよびL-homocysteateでは、抑制されなかった。また3mMのdihydrokainate,L-a-aminoadipateで抑制された。

3）hGluT-1のmRNAの発現は、ノザンブロッテングにより4.0kbのバンドとして脳に最も強く、さらに肺、心臓、骨格筋、胎盤に認められた（Fig.2)。

4）hGluT-1遺伝子は、ヒト染色体5p13に位置した。

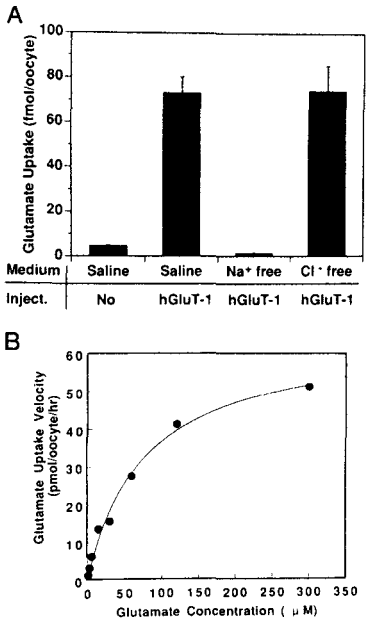


図1 グルタミン酸の取り込み

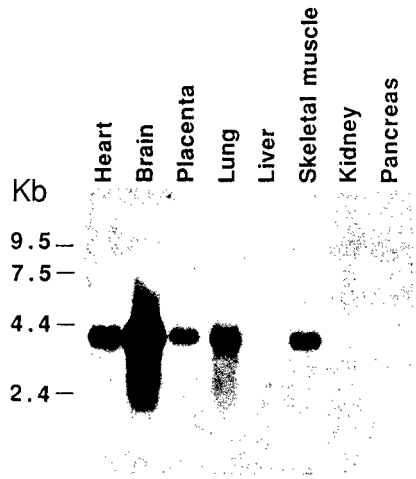


図2 hGluT-1mRNAの組織分布

「考察」

ヒトGluT-1は、ラット及びマウスGluT-1と高い相同性を示し、その機能の重要性を反映している。薬理学的解析では、これまでラット脳等で報告されているものと異なる感受性を示し、グルタミン酸トランスポーターの多様性を反映していると思われる。現在ヒト染色体5p13に連鎖する遺伝性神経疾患は見出されていないが、GluT-1の機能を考慮すると今後この領域に注目して解析する必要がある。

「文献」

1) Kanai Y, Smith CP, Hediger MA; Trends Neurosci 16: 365-70 (1993).

2) Tanaka K; Expression cloning of a rat glutamate transporter. Neurosci Res 16: 149-53(1993).

3) Kawakami H, Tanaka K, Nakayama T, Inoue K, Nakamura S; Biochem Biophy Res Commun 199:171-176 (1994).

136 PC12細胞における高KCl, ATPによる[^{3}H]ノルアドレナリン放出とG蛋白質(Go)

小田 温子、村山 俊彦、野村 靖幸
(北大薬学部、薬効学)

(要約)

ラット褐色細胞腫由来PC12細胞は、KClによる脱分極刺激やATP受容体刺激により[^{3}H]ノルアドレナリンを放出した。NGF 2日間処理や、Goα-プラスミドDNAのトランスフェクションによりGoαの発現量を増加させてもこの放出作用は影響を受けなかった。また、PC12細胞を百日咳毒素(PTX)で処理しても影響がなかった。コレラ毒素(CTX)で2日間処理するとGoα発現量は増加したが、ノルアドレナリン放出は減少した。したがって、PC12細胞におけるノルアドレナリン放出にGoαは関与しないと考えられる。

(緒言)

G蛋白質の一種であるGoは、神経組織に高濃度存在することが知られている。このGoの機能はまだ十分には解明されていないが、神経細胞の分化に伴って上昇すること(1)や、N型Ca^{2+}チャネルの抑制に関与すること(2)が明らかとなり神経機能との関わりが推定されている。そこで、ラット褐色細胞腫由来PC12細胞を用い、ノルアドレナリン放出におけるGoの役割を検討した。NGF2日間処理や、Goα-プラスミドDNAのトランスフェクションは、いずれもGoαの発現量を増加させたが、KClやATP刺激によるノルアドレナリン放出には何ら影響を与えなかった。PC12細胞を百日咳毒素(PTX)で処理し内在性のGoをADPリボシル化しても影響がなかった。コレラ毒素(CTX)で1～2日間処理するとGoα発現量は増加したにもかかわらず、ノルアドレナリン放出は減少した。これらのことよりPC12細胞におけるノルアドレナリン放出に、Goαは関与しないことが示唆された。

(実験方法)

細胞培養；DMEM (+5% FCS、+5% HS)中、10% CO_2存在下で培養した。

薬物処理；100 ng/ml NGF、1μg/ml コレラ毒素あるいは百日咳毒素を加え、1～2日間、 DMEM (+0.5%FCS、 +0.5% HS)中で培養した。

トランスフェクション；リン酸カルシウム法を用いた。

ノルアドレナリンの放出；PC12細胞を[^{3}H]ノルアドレナリンで2時間ラベル後、洗浄し反応時間10分で放出実験を行った。

Goα発現量の確認；抗Goα抗体を用いたWestern blotting 、ならびにpertussis toxinによる[^{32}P]ADPリボシル化により行った。

(結果および考察)

PC12細胞においては神経成長因子による突起伸長の際、Goの免疫活性が成長円錐に限局して存在することが報告されている(3)。今回我々は100 ng/ml NGF や1 μg/ml CTXでPC12細胞を2日間処

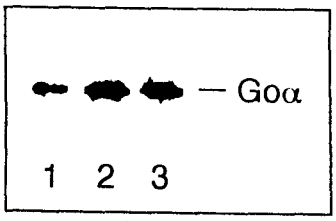
理すると、形態変化、突起の伸長を認め、このとき同時にGoα量が増加していることを確認した(Fig. 1)。増加の割合はどちらも、無処理細胞の2倍程度であった。また、Goα-プラスミドDNAをリン酸カルシウム法によりトランスフェクトするとGoα量が2倍程度増加した(Fig. 2)。NGF処理やトランスフェクションによりGoα量を増加させた場合には、KCl、ATP刺激によるノルアドレナリン放出に影響はなかった(Tab. 1,2)。またCTX処理の場合にはノルアドレナリンの放出はむしろ減少した(Tab. 1)。また細胞を百日咳毒素処理し内在性のGo 、Gi蛋白質の90%以上をADPリボシル化した場合にもノルアドレナリン放出に影響は見られなかった。これらのことより、PC12細胞におけるノルアドレナリンの放出には、Goは積極的には関わっていなと推定した。今回、CTXによりノルアドレナリンの放出が減少したことから他のG蛋白質の関与も考えられ、さらに検討中である。

(文献)

(1) Asano, T., Morishita, R., Sano, M. and Kato, K. : J. Neurochem., **53** :1195-1198, 1989

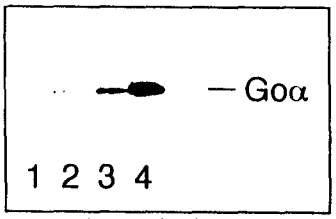
(2) Heschler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W. and Schultz, G. : Nature, **325** :445-447, 1987

(3) Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Kennedy, T. E., Neer, E. J. and Fishman, M. C. :Nature, **344** :836-841, 1990



Lane 1 : None
Lane 2 : 100 ng/ml NGF
Lane 3 : 1 μg/ml CTX

Fig. 1 Immunoblot analysis of Goα in NGF- and CTX-treated PC12 cells



Lane 1 : Mock
Lane 2 : 10 μg pCMV5-Goα
Lane 3 : 20 μg pCMV5-Goα
Lane 4 : 30 μg pCMV5-Goα

Fig. 2 Immunoblot analysis of Goα in PC12 cells transfected with pCMV5-Goα

Tab. 1 Effects of NGF- and CTX- treatment on [^{3}H]NA releases

	[^{3}H]NA released (%)		
	None	100 ng/ml NGF	1 μg/ml CTX
None	100	109.3 ± 44.2	149.6 ± 24.9
50 mM KCl	287.0 ± 38.8	259.3 ± 38.2	204.4 ± 24.3
300 μM ATP	287.5 ± 19.6	314.0 ± 34.4	223.7 ± 0.1

CTX : 24 h , NGF : 48 h

Tab. 2 Effects of KCl and ATP in pCMV5-Goα-transfected PC12 cells on [^{3}H]NA releases

	[^{3}H]NA released (% of total)	
	Mock (pCMV5)	pCMV5-Goα
None	6.1 ± 0.7	7.3 ± 1.5
50 mM KCl	15.3 ± 2.1	14.4 ± 3.6
300 μM ATP	19.8 ± 3.4	21.2 ± 4.0

137 グルタミン酸受容体刺激による培養海馬神経細胞のMAPキナーゼ活性化機構

栗野雅仁[1)2)]、福永浩司[1)]、生塩之敬[2)]、宮本英七[1)]
[1)]熊本大・医・第一薬理、[2)]熊本大・医・脳神経外科

〔要約〕

ラット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を介するMitogen-activated protein kinase（MAPキナーゼ）の活性化反応と細胞内カスケードについて検討した。ミエリン塩基性蛋白質を基質とした活性ゲル内燐酸化法にてMAPキナーゼの活性を測定すると、グルタミン酸は、代謝型受容体と N－methyl－D－aspartate（NMDA）受容体を刺激することによりMAPキナーゼを活性化した。この活性化反応はプロテインキナーゼC（PKC）の阻害剤の前処置あるいは細胞内PKCのダウンレギュレーション反応により有意に抑制された。さらに、あらかじめ^{32}P－燐酸でラベルした細胞を用いて調べると、グルタミン酸刺激に伴うMAPキナーゼ活性の上昇は、MAPキナーゼの分子内チロシン残基の燐酸化反応の上昇と相関した。しかし、Raf－1燐酸化反応の上昇は認められなかった。以上の結果より、海馬神経細胞においてグルタミン酸は，代謝型およびNMDA受容体を介してMAPキナーゼを活性化すること、その活性化反応に細胞内Ca^{2+}及びPKCの関与が示唆された。

[目的]

MAPキナーゼは種々の増殖因子刺激で活性化され、細胞の増殖、分化に関与している（4）。MAPキナーゼの活性化機構のひとつとして、受容体型チロシンキナーゼ、Ras、Raf－1、MAPキナーゼキナーゼ、MAPキナーゼというカスケードが知られている（5）。近年、本酵素は神経細胞にも存在して、神経伝達物質により活性化されることが報告されているが（1）、その機序及び生理的役割は不明である。一方、グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として、シナプス伝達、神経細胞死、シナプス可塑性に重要な役割を果たしている。本研究では、培養神経細胞におけるグルタミン酸刺激に伴うMAPキナーゼの活性化機構について検討した。

[実験方法]

生後24時間以内のラット脳より福永らの方法に従い培養海馬神経細胞を作成した（2）。培養神経細胞を10μMグルタミン酸にて一定時間処理した後、液体窒素にて凍結した。プロテインフォスファターゼ及びプロテアーゼ阻害剤を含む緩衝液にてホモジナイズした後、細胞抽出液を得た。細胞抽出液中のMAPキナーゼの活性をミエリン塩基性蛋白質を基質とした活性ゲル内燐酸化法（3）によって測定した。酵素活性は刺激を加えなかった培養細胞での活性を100％として割合（％）で表した。さらに、あらかじめ^{32}P－燐酸でラベルした培養海馬神経細胞を、グルタミン酸及び塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）で刺激した後、細胞抽出液中のMAPキナーゼ、Raf－1の燐酸化反応をそれぞれ抗ホスホチロシン抗体と抗Raf－1抗体による免疫沈降法によって測定した。

[結果と考察]

最初に本研究で用いた培養海馬神経細胞におけるMAPキナーゼの存在をイムノブロッティング法によって確認した。MAPキナーゼは2つのアイソザイム、即ち44－及び42－kDaのバンドとして認められた。次にグルタミン酸の濃度及び活性化反応の時間経過について調べた。MAPキナーゼはグルタミン酸10μM

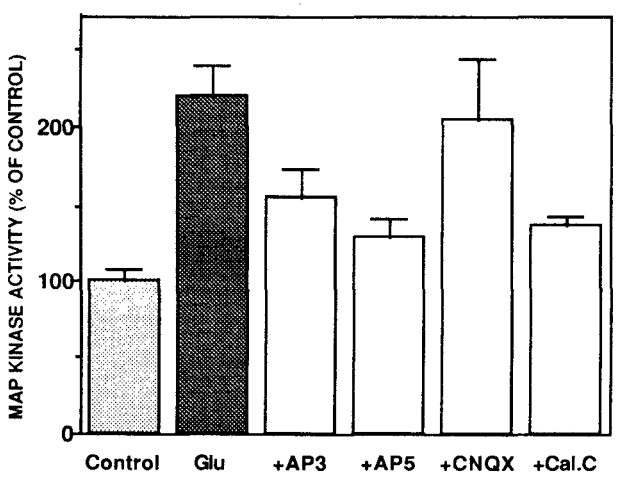


図1　グルタミン酸刺激に伴うＭＡＰキナーゼの活性化反応に対する各阻害剤の効果

の濃度で最大に活性化された。酵素活性は、約１分後より有意に上昇し、１０分後に最大に達した後、約３０分後にコントロールレベルに戻った。グルタミン酸受容体はイオンチャンネルを有するＮＭＤＡ受容体とnon−ＮＭＤＡ受容体、さらにＧ蛋白質と共役する代謝型受容体に分類される。そこで、それぞれの受容体に特異的なアゴニストの投与によるＭＡＰキナーゼの活性を測定した。ＮＭＤＡ受容体と代謝型受容体刺激によってＭＡＰキナーゼの活性化反応が認められ、non−ＮＭＤＡ受容体刺激では活性化されなかった。次に、グルタミン酸受容体のアンタゴニストを用いて調べると、ＮＭＤＡ受容体と代謝型受容体の阻害剤であるD−2−amino−5−phosphonovalerate（ＡＰ５）、DL−2−amino−3−phosphonopropionate（ＡＰ３）前処置によって、ＭＡＰキナーゼの活性化反応は部分的に抑制され両者の共存下で完全に抑制された。non−ＮＭＤＡ受容体阻害剤である6−cyano−7−nitro−quinoxaline−2, 3−dione（ＣＮＱＸ）では抑制効果は認められなかった（図１）。また、これらの反応はＰＫＣ阻害剤であるカルフォスチンＣ（図１；+Cal.C）やＰＫＣのダウンレギュレーション処理により有意に抑制された。一方、チロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステイン処理では弱い抑制効果しか見られないことより、グルタミン酸刺激によるＭＡＰキナーゼの活性化反応にはチロシンキナーゼはほとんど関与しないと考えられた。Ｒａｆ−１は、ＭＡＰキナーゼと同様に、それ自身が燐酸化されることにより活性化されるプロテインキナーゼである。あらかじめ^{32}Ｐ−燐酸でラベルされた培養神経細胞における、グルタミン酸及びｂＦＧＦ刺激後のＭＡＰキナーゼとＲａｆ−１の燐酸化反応を調べた。グルタミン酸及びｂＦＧＦ刺激によってＭＡＰキナーゼのチロシン残基の燐酸化反応は上昇した。Ｒａｆ−１の燐酸化反応はｂＦＧＦ処理によって上昇したが、グルタミン酸処理では変化しなかった。このことより、神経細胞におけるグルタミン酸刺激によるＭＡＰキナーゼの活性化機構にＲａｆ−１は関与しないことが示唆された。以上の結果より、海馬神経細胞において、グルタミン酸は、ＮＭＤＡ及び代謝型受容体を介してＭＡＰキナーゼを活性化し、その反応におけるＰＫＣの関与が示された。細胞外液のカルシウムイオンを除去するとＭＡＰキナーゼのグルタミン酸による活性化反応は大部分消失した。さらに、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシン刺激によってＭＡＰキナーゼ活性が上昇し、この上昇はＰＫＣダウンレギュレーション反応によっても消失しない。これらの結果はＰＫＣを介する活性化機構とは異なるカルシウムイオンを介するＭＡＰキナーゼ活性化機構が存在する可能性を示唆している。

[文献]

1) Bading, H., & Greenberg, M.E. (1991) *Science* 253, 912-914

2) Fukunaga, K., Soderling, T.R., & Miyamoto, E. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 22527-22533

3) Geahlen, R.L., Anostario, M.Jr., Low, P.S., & Harrison, M.L.(1986) *Anal.Biovhem.* 153, 151-158

4) Ray, L.B., & Sturgill, T.W. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84, 1502-1506

5) Wood,K.W.,Sarnecki, C., Roberts, T.M. ,& Blenis, J. (1992) *Cell* 68, 1041-1050

138 [^{3}H]-YM-09151-2は強力なσ2受容体リガンドである

氏家 寛、石原武士、坂井研一*、秋山一文、黒田重利
(岡山大学医学部神経精神医学教室、*神経内科教室)

〔要約〕

σ受容体結合実験に用いられてきた従来の放射性リガンドには種々の問題があるため新しい方法を確立した。[^{3}H]-YM-09151-2はD2/D3/D4のリガンドとして知られているが、これがNa^+ free buffer中、25nM spiperone存在下ではσ受容体に特異的にしかも高親和性に(Kd=1.48±0.31 nM、ラット全脳crude membrane画分)結合することを見いだした。また、各σリガンドの阻害Ki値のランクオーダーが[^{3}H]-SKF 10047や[^{3}H]-(+)-3-PPPに対するKi値と相関せず、[^{3}H]-BIMU-1やラット心臓での[^{3}H]-DTGに対するKi値に相関することから、σ2サブタイプに結合することが明らかとなった。これまでσ2受容体に選択性の高いリガンドは知られておらず、また得られる放射活性も従来のσリガンドと比べてはるかに強いことから、σ受容体研究において極めて有用な放射リガンドであると思われた。

【はじめに】σ神経系は中枢神経系内で様々な生理作用に関与していることが推定されているが、その正確な機能については不明な点が多い。これらを解明する手段の1つとして受容体結合実験があるが、これまに報告されているσ受容体をラベルする放射性リガンドには共通した問題点を有している。すなわち[^{3}H]-SKF 10047、[^{3}H]-DTG (1,3-di-o-toly-guanidine)、[^{3}H]-(+)-3-PPPによるものがあるが、親和性が数十nMと低く、そのため高濃度の放射性リガンドを使う必要があるので、非特異結合が高くなり、不安定となる。この問題は特に定量的ARGの際には大きな障害であった。そこで、より適した放射性σリガンドを探す必要がある。本研究ではその候補として[^{3}H]-YM-09151を使用した。YM-09151-2(nemonapride、cis-N-(1-benzyl-2-methyl-pyrrolidin-3-yl)-5-chloro-2-methoxy-4-methylaminobenzamide)は強いD2/D3/D4のリガンドとして知られるが、われわれは既にσ受容体にも非常に強い親和性を有することを報告してきた[1]。

【方法と結果】

1) bufferの組成およびincubationの条件：D_2受容体結合には1価陽イオン、特にNa^+イオンの影響を受けることが知られており、Na^+ freeでは親和性が1/8に低下することが報告されている。一方、σ受容体はNa^+イオン存在下では結合が阻害されるので、McCann & Su[2]の勧める5mM K^+phosphate bufferを使用し、更に残存するD_2/5HT_{1A}成分を除去するため25nM spiperoneを加えた。受容体標品にはラット全脳のcrude membrane分画を用いた。

24℃では120分後にピークに達した。0℃では結合は1/3に低下した。bufferのpHでは7.2～8.0ではpH7.6で最もよく結合した。tissue linearityでは1.1～30mg wet tissue/tubeまで直線状であった。非特異結合は10μMのDTGを用いた場合total countの約20%であった。DTGの代わりに10μMのhaloperidolを加えても非特異結合の割合は不変であった。

2) Scatchard解析：[^{3}H]-YM-09151-2の0.2～60nMまでの16pointでScatchard解析した(Fig. 1)。結合はone siteでKd=1.49 ± 0.32 nM、Bmax = 833.3 ± 100.5 fmol/mg proteinであり、高い親和性が得られた。

3) phenytoin添加による検討：300μMのphenytoinを加えると342～363%の結合の増加がみられ、他のσリガンドでの受容体結合の場合と同じ結果であった。

Fig. 1 Scatchard Analysis of [3H]-YM-09151-2 Binding to Rat Brain

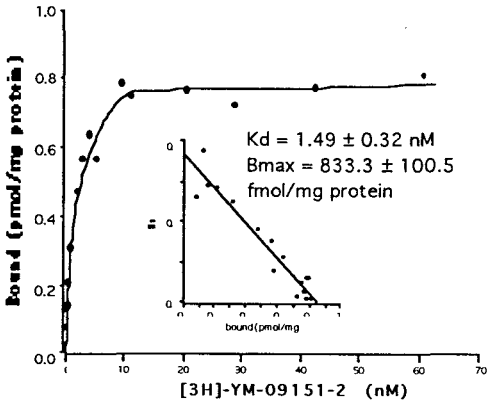
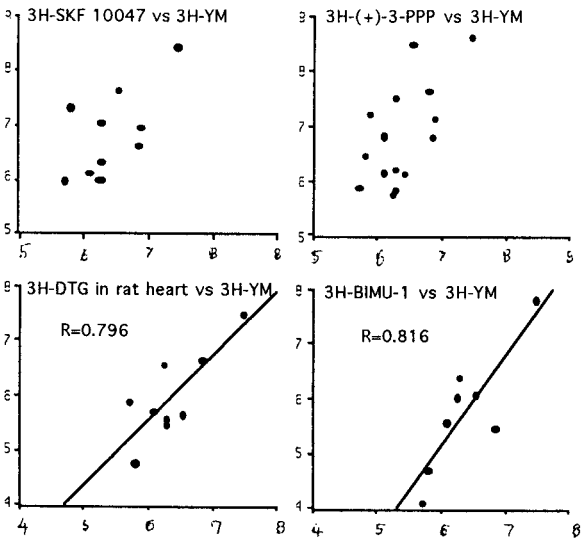


Fig.2 Correlation of pKi in [3H]-YM-09151-2 Assay with σ1 or σ2 Receptors



4）各σリガンドのKi値の検討：3nMの[^{3}H]-YM-09151-2結合に対し、haloperidol、SKF-10047、3-PPP、butaclamol、pentazocineなど27種類の薬物を9濃度に展開し、各阻害曲線を調べ、Ki値を算出した。各種σリガンドによるKi値（Tabel 1）ではSR-31742Aが最も強く3.06nMで、以下YM-09151-2、N-100、haloperidolの順であり、benzomorphan類の(+)-pentazocine、dextromethorphan、(+)-SKF 10047は弱かった。これまで他の放射性リガンドに対するKi値と比べてみると、σ1をラベルするラット脳での[^{3}H]-(+)-3-PPPや[^{3}H]-(+)-SKF10047に対するKi値[3]とは相関せず（Fig. 2）、guinea pigの海馬での[^{3}H]-BIMU-1結合[4]やラット心臓での[^{3}H]-DTG結合でのKi値[5]と相関を示すことから、[^{3}H]-YM-09151-2がσ2受容体サブタイプをラベルすることがわかった。

5）[^{3}H]-YM-09151-2を用いたラット脳でのARG macroARGでは[^{3}H]-YM-09151-2は小脳、大脳皮質、海馬、赤核、運動神経核などに強く、従来報告されているσ1受容体サブタイプの分布と共通する点もあったが、線条体、側坐核、黒質、外側中隔などでも強く分布しておりその分布様式は異なっていた。

【考察】[^{3}H]-YM-09151-2はこれまで$D_2/D_3/D_4$受容体のリガンドとして知られていたが、今回の研究からNa^+ free、低濃度K^+ phosphate buffer中では特異的にσ受容体に結合することが明らかとなった。この結合はsulprideで全く阻害されないこと、displacerをDTGの代わりにhaloperidolにしても非特異結合の割合は不変であったことからdopamine受容体成分はないことがわかった。Scatchard解析からはone siteであること、そのKdは1.49 nMと非常に高いことがわかり、有用な放射性σリガンドあることがわかった。更に種々のσリガンドのKi値から[^{3}H]-YM-09151-2でラベルされるσ受容体がσ2受容体サブタイプであることが明らかとなった。現在σ2受容体サブタイプをラベルする放射性リガンドはσ1/σ2をラベルする[^{3}H]-DTGと5HT3/σ2をラベルする[^{3}H]-BIMU-1しか知られておらず、σ2のみをラベルするものとしては[^{3}H]-YM-09151-2がはじめてである。しかも、前2者は通常のアッセイ条件では1000dpm/tube程度であるのに比べ、[^{3}H]-YM-09151-2は10000～60000dpm/tubeと遥かに高い放射活性がえられた。[^{3}H]-YM-09151-2はσ2受容体をラベルする放射性リガンドとして非常に有用性の高いものであることがわかった。

Table 1. Affinities of Sigma ligands at [3H]-YM-09151-2 Binding Sites in Rat Brain

Drug	Ki (nM)	Pseudo Hill slope
SR-31742A	3.06 ± 0.23	0.57 ± 0.18
YM-09151-2	7.62 ± 1.71	1.08 ± 0.20
N-100	8.08 ± 4.13	0.73 ± 0.18
Haloperidol	34.1 ± 9.1	0.56 ± 0.11
BMY 14802	128.7 ± 14.8	0.74 ± 0.07
(-)-Butaclamol	144.0 ± 47.4	0.72 ± 0.03
(±)-Pentazocine	161.7 ± 43.6	0.56 ± 0.05
(+)-Pentazocine	293.9 ± 195.8	0.47 ± 0.06
Dextromethorphan	390.5 ± 154.6	0.68 ± 0.05
Spiperone	531.2 ± 114.7	0.98 ± 0.18
(+)-3-PPP	533.4 ± 379.1	0.60 ± 0.03
Rimcazole	540.4 ± 162.1	0.66 ± 0.07
(+)-Butaclamol	578.7 ± 91.4	0.75 ± 0.01
Phencyclidine	678.2 ± 496.9	0.92 ± 0.18
(-)-3-PPP	808.1 ± 469.6	0.63 ± 0.06
Remoxipride	1325 ± 744	0.79 ± 0.04
(+)-SKF 10047	1597 ± 918	0.52 ± 0.06
DTG	1682 ± 627	0.66 ± 0.04
(-)-SKF 10047	1977 ± 119	0.77 ± 0.01
Methamphetamine	2752 ± 942	0.83 ± 0.19
Clozapine	2843 ± 560	0.92 ± 0.11
SCH 23390	5504 ± 1991	0.99 ± 0.12
Cocaine	7084 ± 2935	0.80 ± 0.16
Sulpiride	> 10000	
MK-801	> 10000	
Dopamine	> 10000	
5-HT	> 10000	

[文献]
1）図子義文,ほか. 精神薬療基金年報, 第22集: 255-262,1990. 2）McCann, D.J. and Su, T.P Neurosci Lettt, 141: 239-242, 1992. 3）Walker, J.M., et al. Pharmacol Rev, 42: 355-402, 1990. 4）Bonhaus, D.W., et al. J Pharmacol Exp Ther, 267: 961-970, 1993. 5）Dumont, M. and Lemaire, S. Eur J Pharmacol, 209: 245-8, 1991.

139 スルピリドによる線条体ドパミン放出に対するＡＴＰ感受性Ｋ⁺チャネルオープナーの影響

田中隆彦・吉田真美・横尾秀康・溝口克弘・田中正敏
（久留米大・医・薬理）

〔要約〕

黒質・線条体dopamine (DA) 神経終末に存在するDA autoreceptor のDA放出調節機構におけるATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) の役割を、脳内透析法を用いて検討した。K_{ATP} opener であるcromakalim (CRM)またはnicorandil (NIC)を透析膜を介してラット線条体に投与すると、両薬物ともに同部位よりのDA放出を用量依存性に抑制した。sulpiride (DA D2 receptor antagonist, 10^{-5}M, SLP)を同様にして線条体に投与すると、同部位よりのDA放出は有意に増加した。CRM (10^{-4}M) またはNIC (10^{-5}M)を線条体に透析膜を介して1時間投与し、CRM またはNIC 存在下にSLP (10^{-5}M)をさらに同部位に投与すると、SLP によるDA放出増加は完全に抑制された。これらの結果は、線条体においてK_{ATP}の活性化がin vivo における内因性DA放出を抑制すること、さらに、線条体DA autoreceptor によるDA放出調節機構はK_{ATP}の活性化を介して生じていることを示唆している。

（緒言） ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) は細胞内のATP 濃度によりその開閉が調節されているK^+ channelであるが、線条体におけるK_{ATP}の存在やdopamine (DA) 神経機能との関係は十分に解明されていない。in vitroの電気生理学的実験では黒質に存在するDA D2 receptor (somatodendritic DA autoreceptor) はK^+ channelの活性化を介して、DA発火頻度を抑制的に調節する(2) と報告されていたが、それを否定する報告もある (1)。今回の実験の目的は、K_{ATP} opener とDA D2 receptor antagonistを用いて、K_{ATP}の線条体DA autoreceptor を介するDA放出調節機序におけるin vivo での役割について、脳内透析法により検討することである。

（方法） Wistar系雄性ラット(250-310g)の右線条体 (A:+0.5, L:2.5, V:5.5 mm)に透析膜(U字型)を植え込み、手術24-48 時間後に脳内透析実験を施行した。実験は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/分で灌流し、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液に溶解し、線条体に局所投与した。K_{ATP} opener であるcromakalim (CRM)またはnicorandil (NIC)の線条体DA放出に及ぼす影響を検討するために透析液中のDAレベルが安定してから、両薬物を10^{-5}、10^{-4}、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。SLP の線条体DA放出に及ぼす影響を検討するためにSLP (10^{-5}M)を線条体に1時間投与した。別の実験として、CRM またはNIC のSLP による線条体DA放出増加に及ぼす影響を検討するために、CRM (10^{-4}M) またはNIC (10^{-5}M)を線条体に1時間投与後にCRM またはNIC 存在下に、SLP (10^{-5}M)をさらに1時間投与した。

（結果と考察） CRM またはNIC の線条体投与により、同部位からの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。DA放出の最小値は、CRM (10^{-3}M)では基礎値の42%、NIC (10^{-3}M) では基礎値の52% であった（図1）。著者らはK_{ATP} blockerであるquinine を今回と同様の

方法で線条体に局所投与し、その部位でのDA放出が用量依存性に増加すること、さらにこのquinineによるDA放出増加がNIC により抑制されることを報告している (3,4)。このことは、線条体にK_{ATP}が存在し、K_{ATP}の活性化が同部位からの内因性DA放出を抑制し、K_{ATP}の抑制が内因性DA放出を増加することを示している。SLP の線条体局所投与によるDA放出の増加は、線条体神経終末にあるDA autoreceptorの競合的拮抗により生じると考えられている (5)。CRM やNIC により線条体のK_{ATP}が活性化されると、このSLP によるDA autoreceptor 阻害によるDA放出増加は完全に抑制された。このことから、in vivo において黒質・線条体DA神経終末に存在するDA autoreceptor はK_{ATP}の活性化を介してDA放出を抑制的に調節していることが示唆された。

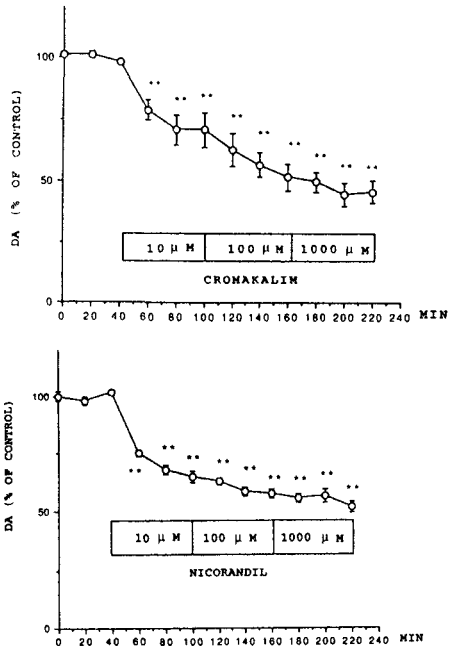


図1 cromakalim とnicorandilの線条体dopamine(DA) 放出に及ぼす影響

**: p<0.01 vs basal values

(one-way ANOVA と Newman-Keuls test, N=4)

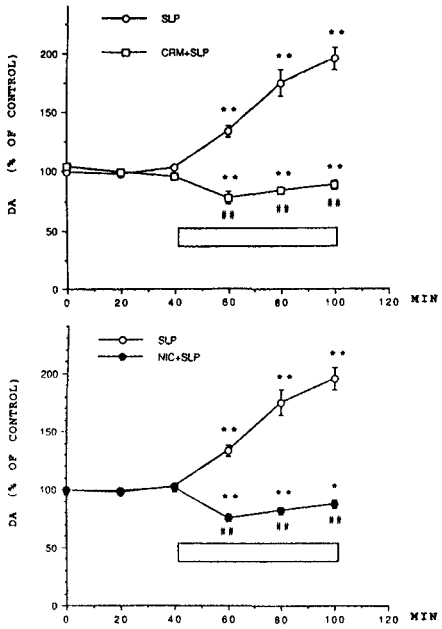


図2 sulpiride(SLP, 10^{-5} M)による線条体dopamine(DA)放出変化に及ぼすcromakalim(CRM, 10^{-4}M)とnicorandil(NIC, 10^{-5}M) の影響

*,**: p<0.05, p<0.01 vs basal values

##: p<0.01 vs SLP (Student's t-test)

(SLP:N=5, NIC or CRM+SLP: N=4)

(文献)

1. Hicks G.A. and Henderson G. (1992) Neurosci.Lett. 141, 213-217.
2. Lacey M.G. et al. (1987) J.Physiol. 392, 397-416.
3. Moure C. et al. (1989) Brain Res. 486, 159-164.
4. Tanaka T. et al. (1992) J.Neurochem. 59, 1640-1645.
5. Tanaka T. et al. (1993) Jap.J.Pharmacol. 61, 129.
6. Westerink B.H.C. and De Vries J.B. (1989) Neurosci.Lett. 99, 197-202.

140 ラット大脳皮質NMDA受容体イオンチャンネル複合体への[^{3}H]TCP と[^{125}I]MK 801 結合の比較

山本敏文[1,2]、山本秀子[1]、諸治隆嗣[1]
(東京都精神医学総合研究所・精神薬理[1]、横浜市大大学院総合理学研究科・分子認識[2])

〔要約〕ラット大脳皮質シナプトソーム膜を用い、[3H]Thienyl-phencyclidine(TCP) と [125I]MK-801 結合の特性について調べた。[3H]TCP 結合は glutamate, glycine, Mg および spermine により単独で結合が増加した。一方、[125I]MK-801 結合は spermine 以外、単独での結合の増加は認められず、glycine, Mg あるいは glutamate のいずれかが存在したときのみ、結合は増加した。glutamate による [125I]MK-801 結合の増加は、Mg(300μM) 存在下で glycine(10μM) 存在下の場合よりも低濃度から現れたことから、Mg には glycine より強い co-agonist としての作用があることが示唆された。以上の結果は TCP や Phencyclidine(PCP) は完全には開いていないチャンネルに結合している可能性を示しており、MK-801 とは異なるN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体イオンチャンネル複合体の状態を認識していることを示唆している。

NMDA受容体イオンチャンネル複合体は、glutamate, glycine や spermine などにより調節されており、そのチャンネル機能はチャンネル内に結合部位を持つ [3H]TCP や [3H]MK-801 結合により調べることが出来る(2)。これまで我々は、十分に内因性の影響物質を洗浄除去した大脳皮質膜標品を用い、[3H]TCP 結合が glutamate, glycine および Mg により単独で増加する可能性を示唆してきた(3)。今回、[125I]MK-801 を用いて、微量の内因性物質を含む膜タンパクの量を、その影響が見られないまでに減らすことにより、[3H]TCP 結合と [125I]Mk-801 結合を比較し、[3H]TCP が完全には開いていない状態のチャンネルを認識していることを見いだしたので報告する。

【実験方法】

Wistar 系雄性ラット (200-250 g) の大脳皮質粗シナプトソーム膜を、50 mM Tris-HCl buffer/10 mM EDTA (pH 7.6) で繰り返し洗浄し、-80℃で保存した。実験当日、5 mM Tris-HEPES buffer (pH 7.6) でさらに2回洗浄した。[3H]TCPおよび[125I]MK-801 結合実験は、膜標品(5μg protein/tube) と 5 nM [3H]TCP(1509.6 GBq/m mol: NEN) あるいは 40 pM [125I]MK-801(81.4 TBq/m mol: NEN) を 5 mM Tris-HEPES buffer(pH 7.6) 中で、25℃ 2 時間反応させた。反応は、セルハーベスターを用い迅速な吸引ろ過により停止し、グラスフィルター上の放射活性を測定した。非特異的結合の測定には、30μM PCP と 10μM MK-801 を、それぞれ用いた。

【結果】

[125I] MK-801 結合は、glutamate, glycine あるいは Mg 単独での有意な結合増加は認められず、それぞれ glycine(10μM), Mg(300μM) あるいは glutamate(10μM) の存在下で結合の増加が見られた(Fig.1)。glutamate の [125I]MK-801 結合増加作用は、glycine(10μM) よりも Mg(300μM) の存在下で強く、最大効果は同じであった。glycine による結合増加も glutamate の場合と同様、Mg 存在下の方が強いものの、最大効果は glutamate より低かった。低濃度での Mg の結合増加作用は、glutamate(10μM) あるいは glycine(10μM) のいずれかの存在で認められ、その最大効果は glutamate および glycine による最大効果と同程度まで達した。一方、spermine では単独の結合増加が認められ、glutamate または glycine の添加によりさらに結合は増加した。(Fig.1C)

同じ膜標品を使った [3H]TCP 結合では、[125I]MK-801 結合とは異なり、glutamate, glycine, Mg単独でも濃度依存的に結合は増加した(Fig.2)。これらの単独作用は、それぞれglutamate(10μM),

glycine(10 μM) あるいは Mg(300 μM) の添加により強くなり、最大効果も増強された。

【考察】

これまで MK-801 と PCP はNMDA受容体イオンチャンネル複合体のチャンネル内部に位置する同一の部位に結合すると考えられており(1)、結合は use-dependent でチャンネルが開いた時のみ結合するため、glutamate 単独では結合せず、co-agonist として glycine が必要とされている(4)。今回の実験結果は、[125I]MK-801 結合がこれまでの報告と同様、 spermine 以外で単独作用は認められず、MK-801はチャンネルが完全に開いた状態で結合するものと考えられる。一方、[3H]TCP 結合は glutamate, glycine そして Mg の単独で活性化されることが明かとなった。同一膜標品を用いた結合実験であるため、[125I]MK-801結合実験で単独作用が見られないことから残存するアミノ酸類の影響はないものと考えられる。したがって [3H]TCP は [125I]MK-801 とは異なり、完全には開いていない状態のチャンネルに結合できることが示唆された。

glutamate による [125I]MK-801 結合の増加には、glycine (10 μM) よりも Mg(300 μM) の添加がより強い作用を示しており、低濃度 Mg が co-agonist としてチャンネルの open に作用している可能性を示唆している。また spermine は単独での結合活性化作用を持つことから、低濃度 Mg の作用部位は spermine の部位とは異なり、アロステリックに NMDA 部位と glycine 部位に共役しているものと推測される。

【文献】

(1) Fagg, G.E. (1987) Neurosci. Lett., 76, 221-227.

(2) Foster, A.C. and Wong, E.H.F. (1987) Br. J. Pharmacol., 91, 403-409.

(3) Hori, H., Yamamoto, T., Hatta, K. and Moroji, T. (1991) Synapse, 8, 13-21.

(4) Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987) Nature, 325, 529-531.

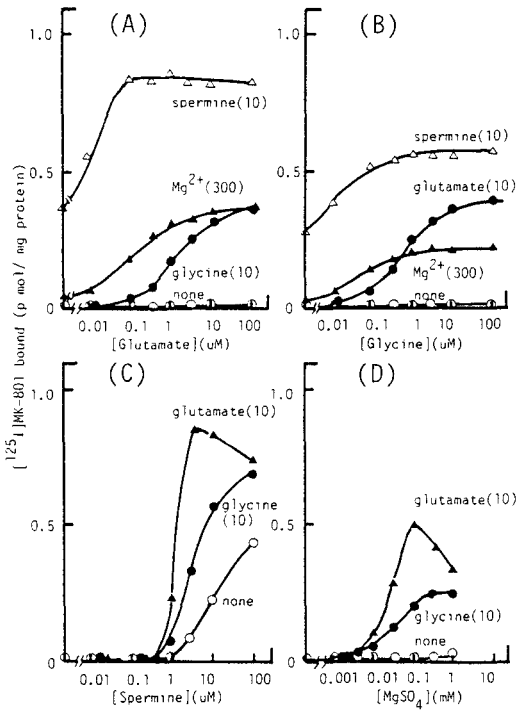


Fig. 1. [125I]MK-801 binding.

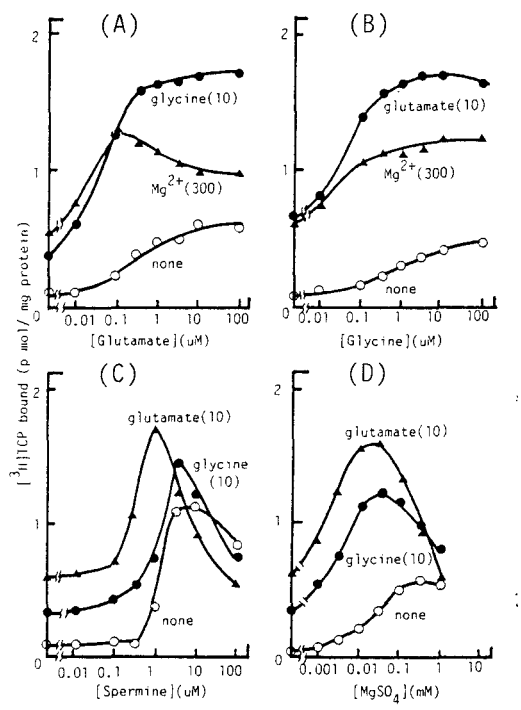


Fig. 2. [3H]TCP binding.

141 一酸化炭素の合成阻害薬ZnPPはシナプトニューロソームからのグルタミン酸の放出を抑制する

篠村徹太郎、中尾慎一、村川雅洋、森健次郎
(京都大学附属病院麻酔科)

〔要約〕
グルタミン酸放出機構における一酸化炭素(CO)の作用を、生体内CO産生酵素(heme-oxygenase)阻害薬Zinc Protoporphyrin(ZnPP)を用いてシナプトニューロソームで調べた。ZnPPはグルタミン酸の放出を抑制した。ZnPPと類似の構造を持つCopper Protoporphyrin(CuPP)にはCO産生の抑制作用はないが、グルタミン酸の放出にも影響は認められなかった。COはguanylyl cyclaseの活性化を通して細胞内情報伝達に関わると考えられているが、我々の系にdibutyryl-cGMP(dbcGMP)を投与してもZnPPによる抑制効果は拮抗されなかった。ZnPP, CuPPともにシナプトニューロソーム中のcGMP量は変えなかった。ZnPPはCOの産生抑制を介してグルタミン酸放出を抑制すると考えられるが、その作用機序はシナプトニューロソームにおいてはcGMPを介しているとは考えがたい。

[目的]
一酸化炭素（CO）は、近年、神経伝達物質として注目されている。COの中枢神経系での作用として、長期増強の消失、ならびに成立した長期増強の抑制が報告されている。グルタミン酸受容体が長期増強の成立に関与していることが示唆されており、我々はグルタミン酸放出とCOとの関係に注目した。また、COの標的として、soluble guanylyl cyclase の活性化を通した細胞内でのcGMPの増加が報告されている(1)。本研究では、シナプトニューロソームにおいて、CO産生の抑制物質であるZnPPがグルタミン酸放出に及ぼす影響を調べ、cGMPとの関連を検討した。

[方法]
1）シナプトニューロソームの調製。Wistarラットの大脳皮質よりHollingsworth らの方法によってシナプトニューロソームを調整した(2)。タンパク質濃度は0.66mg/mlとし、調整後6時間以内に使用した。
2）グルタミン酸濃度の測定。Nichollsらの方法によった(3)。シナプトニューロソームの懸濁液2 mLにNADP 1 mM, Glutamate Dehydrogenase 104 U, を加え、日立Spectrophotometer F-2000にて、340 nm(excitation), 460 nm(emission) の2波長をもちいて測定した。KCl 30 mMによる脱分極によって放出されたグルタミン酸を脱分極後300秒間定量した。カルシウムの存在下(カルシウム 1.2 mM)でのグルタミン酸の放出量からカルシウム非存在下(EGTA 0.5 mM)でのグルタミン酸放出量を引いたものをカルシウム依存性のグルタミン酸放出とした。
3）cGMP量の測定。AmershamのRIA測定キットを用いた。

[結果]
図1で左よりコントロール、10 μM ZnPP, 10 μM CuPPによるグルタミン酸の濃度変化を示す。Heme Oxygenaseの阻害剤であるZnPP 10 μMの投与により、カルシウム依存性のグルタミン酸の放出量が抑えられた。また、10 μM CuPP によってはグルタミン酸の放出量に変化はなかった。
10 μM ZnPPによるグルタミン酸放出の抑制は100 μM dbcGMPを加えることによって拮抗されなかった。(図2) 10 μM ZnPP, 10 μM CuPPをそれぞれ加えたときのシナプトニューロソーム中のcGMP量を測定したが、コントロールと比べて減少していなかった。(表1)

[考察]
ZnPPは、シナプトニューロソームからのグルタミン酸放出を濃度依存的に抑える(4)。Heme Oxygenase活性を阻害せずCOの産生に関わらないCuPPによっては、グルタミン酸放出は影響を受けないことから、COがグルタミン酸放出に関わると考えられる。COはsoluble guanylyl cyclaseを活性化して

細胞内のcGMP濃度を上げると報告されている。しかし、本実験においてはdbcGMPを加えてcGMP濃度を増加させてもZnPPによる抑制効果は拮抗されなかった。実際にcGMP濃度は、ZnPPによって減少していなかった。よって、シナプトニューロソームのグルタミン酸放出機構においては、COからguanylyl cyclaseの活性化によるcGMP濃度変化の関与はすくないと考えられる。

[文献]

1. Verma, A., Hirsch, D. J., Glatt, C. E., Ronnett, G. V. and Snyder, S. H. (1993) Science, 259, 381-384
2. Hollingsworth, E. B., McNeal, E. T., Burton, J. L., Williams, R. J., Daly, J. W. and Creveling, C. R. (1985) J. Neurosci., 5, 2240-53
3. Nicholls, D. G., Sihra, T. S. and Sanchez-Prieto, J. (1987) J. Neurochem., 49, 50-57
4. Shinomura, T., Nakao, S. and Mori, K. (1994) Neurosci. Lett., 166, 131-134

図　1　シナプトニューロソームからのグルタミン酸放出量の時間変化

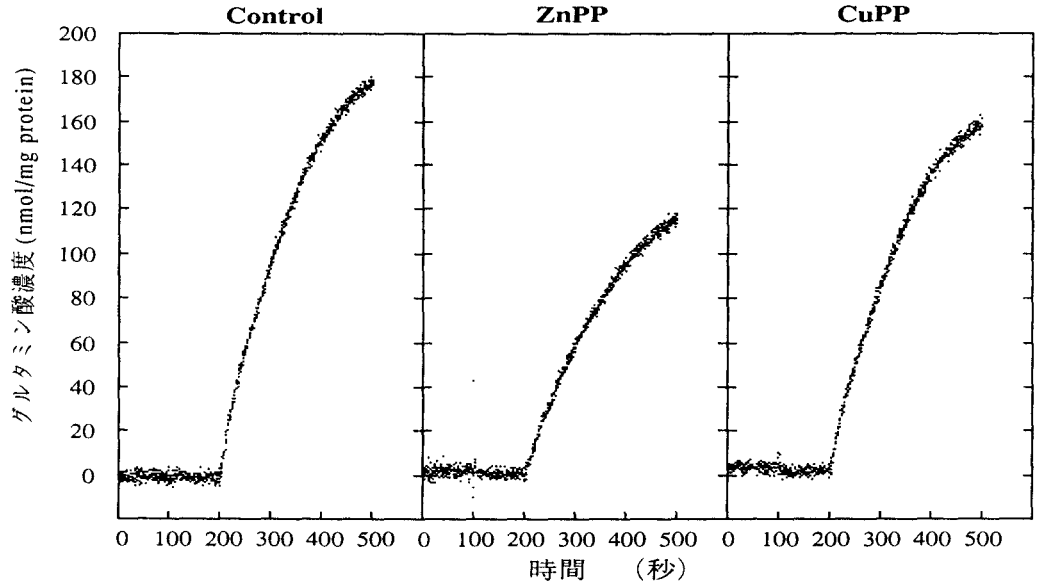


図 2　300秒間に放出されるグルタミン酸量に及ぼすZnPP, dbcGMPの効果

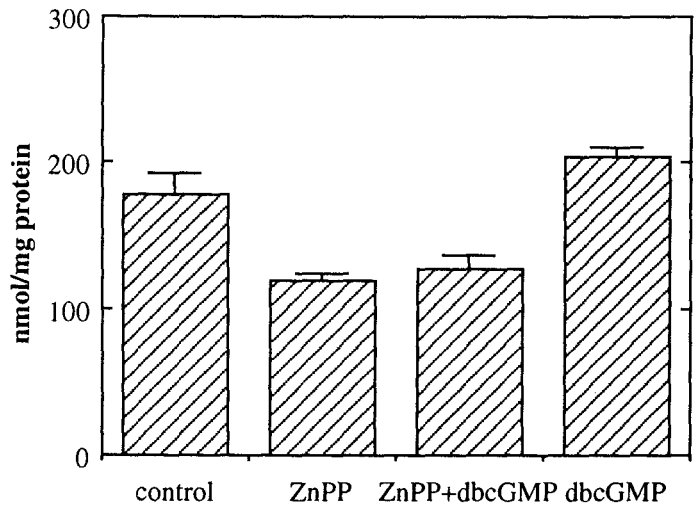


表1

シナプトニューロソーム中のcGMP濃度

control	7.08±0.81
10 μM ZnPP	7.68±0.07
10 μM CuPP	7.89±0.33

数値はmean ±SD

142 老人斑アミロイド生成機序に関する研究

池田 幸弥、国下 龍英、荒木 亘、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]

アルツハイマー病(AD)における病理学的特徴である老人斑の主成分であるアミロイドβタンパク質(Aβ)は、39 - 43個のアミノ酸より構成され、膜タンパクであるβアミロイド前駆体タンパク質(βAPP)が酵素的な切断を受けて生成すると考えられている。AD発症におけるAβの果たす役割は未だ不明であるが、最近早期発症家族性アルツハイマー病(FAD)の数家系でβAPP遺伝子内のAβ領域近傍にいくつかの異なる突然変異が見い出され、AD発症とAβ即ちβAPPの代謝との関連がより強く示唆された。

我々はCOS 7細胞にβAPP695 (wild type)及び3種の変異βAPP695(βAPP695 ^{595,596}KM-NL, ^{642}V-I, ^{618}E-Q)を発現させ、βAPPの代謝と変異との関連を検討した結果、ヒト培養細胞を用いた報告と同様にFAD Swedishの家系で発見された変異(βAPP695 ^{595,596}KM-NL)を導入した時のみAβの著しい分泌増加が認められた。

[目的]

アルツハイマー病は家族性及び孤発性いずれの場合においても病因論的にはheterogeneousな疾病である。しかしながらアルツハイマー病において大脳および脳血管壁へ特徴的に沈着するアミロイドの主要構成成分であるアミロイドβタンパク質(Aβ)の生成及び凝集・沈着は、発症メカニズムの中心に位置するものと推定される。これを裏付けるように家族性アルツハイマー病(FAD)やアミロイドーシスを伴った遺伝性脳出血(HCHWA-D)で見い出されたβアミロイド前駆体タンパク質(βAPP)の変異がAβの分泌増大や凝集の促進を誘起することが最近の研究により示された(1 - 3)。そこで我々は、βAPPの代謝と変異との関連を検討するため、human βAPP遺伝子を培養細胞に強制発現させるin vitroモデルの作製を試みた。

[方法]

βAPP695 (wild type)及び変異βAPP695 cDNAをEF1-αプロモーターの制御下で発現させるベクターに組み込んだ。変異βAPP695としてはFAD或いはHCHWA-Dで見い出されたpoint mutation即ちβAPP695 ^{595,596}KM-NL, ^{642}V-I, ^{618}E-Qの3種を用いた。各種βAPP695を組み込んだベクターをCOS 7細胞にLipofection法にて導入し、48 - 72時間後の細胞を解析に供した。導入βAPP695の発現と代謝の解析はNorthern blot法、Western blot法及び[^{35}S]methionineで代謝的に標識した細胞タンパク質の免疫沈降法で行った。免疫沈降には抗$Aβ_{1-28}$ (Affi 28)、抗$Aβ_{1-40}$ (SGY2133)及び抗βAPP695 C末(Ac24)の各抗体を用いた。

[結果・考察]

導入したβAPP695(wild type)の発現は、ベクターのみを導入したcontrolに較べRNAレベルで約5倍の上昇が見られ、更にタンパク質レベルでもβAPP695の過剰発現が確認された。そこで3種の変異βAPP695を加えてCOS細胞における発現と代謝を免疫沈降法で解析した結果、βAPP695の発現は標識時間の長短(30分或いは16時間)にかかわらずwild typeと変異βAPP695間で差異は認められなかった(Fig.1)。しかしAβの分泌はFAD Swedishの家系で発見されたAβN末直前の2つのアミノ酸の変異(βAPP695 ^{595,596}KM-NL)を導入した時のみ著しい増加が認められた(Fig 2)。FAD Swedishの変異を持つβAPPをヒトの培養細胞に発現させた場合Aβの分泌が増加することは既に報告されているが、今回サル由来の培養細胞においても同様の結果が得られβAPP代謝の普遍性が示された。このようにCOS 7細胞はAβ生成に関わる代謝経路を解析するのに極めて有効であり、現在本細胞におけるβAPP 695及び変異βAPP695の代謝を詳細に検討している。

[文献]

1. Cai, X.-D., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1993). Science 259, 514 - 516.
2. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConloue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992). Nature 360, 672 - 674.
3. Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Inouye, H., Surewicz, W. K., Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., and Kirschner, D. A. (1992). Biochemistry 31, 10716 - 10723.

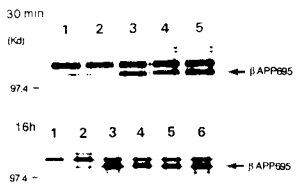


Fig. 1 Expression of βAPP695 in COS cells.
1 : no transfected, 2 : vector alone, 3 : βAPP695 wild type, 4 : βAPP695 ^{595,596} KM-NL, 5 : βAPP695 ^{642} V-I, 6 : βAPP695 ^{618} E-Q

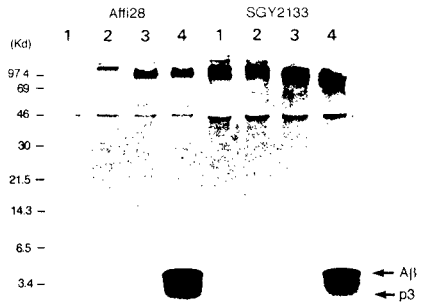


Fig. 2 Increased secretion of Aβ from COS 7 cell transfected with FAD Swedish mutant βAPP695 cDNA.
1 : no transfected, 2 : vector alone, 3 : βAPP695 wild type, 4 : βAPP695 ^{595,596} KM-NL

143 髄液中tau測定によるアルツハイマー病診断の試み

降矢芳子、平井俊策*、細田健治†、佐原成彦、宇佐美美穂子、森　啓
(東京都精神分子生物、*群馬大学神経内科、†帝人株式会社診断医療研究所)

〔要約〕　アルツハイマー病の臨床診断は問診とCT、MRI等の画像診断に負っている。その客観的診断基準は確立しておらず、また確定診断は死後の剖検脳を用いた神経病理学検索によってなされ、生前診断は困難である。アルツハイマー病と鑑別すべき疾患である脳血管性痴呆は、動脈硬化を基礎に持つことが知られており、ある程度予防は可能である。現在痴呆患者の増加は社会的問題となりつつあり、アルツハイマー病の早期診断は重要であると考える。今回我々はアルツハイマー病患者の髄液中のタウが、正常者および他神経疾患患者に比し有意に増加していることをみいだした。髄液中タウの測定は、数値としての客観的評価となりえることから、アルツハイマー病の生前の確定診断に一助に成りうると考えた。

［材料および方法］1) ヒトタウの精製：ヒト脳よりタウ蛋白を硫安分画、ホスホセルロース、逆層系HPLCを用いた方法[1]によって高度に精製し、抗原および定量測定系の標準物質として用いた。
2) 抗体の作成：精製したタウをウサギあるいはマウスに免疫し、各々ポリクローナル、モノクローナル抗体を得た。
3) 抗ヒトタウ抗体のF(ab')2HRP標識：抗ヒト抗体を精製後、ペプシン消化を行いMBS結合させ、ゲル濾過HPLC(Toso3000SW)にて精製した。また0.1Mリン酸pH6.5緩衝液に溶解したHRPをアセチルメルカプトサクシニルアンヒドリドと反応させ、ヒドロキシアミンで未反応基をブロックしたのち両者を混合し、HRP標識した抗ヒトタウ抗体のF(ab')2を得た。
4) サンドウイッチ法によるタウの定量：ポリスチレンに抗ヒトタウ抗体を吸着させたのち、1%BSAにてブロックを行い、0-5ng/mlに希釈した標準物質のタウあるいはヒト髄液を4℃で一晩結合させた。タウをサンドウイッチしたHRP標識した抗ヒトタウ抗体のF(ab')2をテトラメチルベンジジン発色させ、0.1NH_2SO_4にて反応停止後、OD450を測定した。
5) 髄液：症状および各種検査により臨床的に診断された各種神経疾患患者および神経疾患を除外された対照者から腰椎穿刺により髄液を採取し、測定まで−80℃にて凍結保存した。

［結果］ヒトタウを抗原として得られたポリクローナル抗体のエピトープを図1に示す。この部位はタウの最も壊れにくい部分であり、プロテアーゼ等の存在する髄液中のタウを測定することに適している。0-5ng/mlに希釈した標準物質のタウの測定により得られた標準直線（図2）をもとにして髄液中のタウ濃度を求め、図3に示した。アルツハイマー病患者（以下AD）では対照者および髄膜炎、パーキンソン病患者に比し髄液中タウが有意に増加していることが示された。1例ではあるが一酸化炭素中毒患者では非常な高値を示した。

［考察］AD脳の病理学所見には大脳皮質の広汎な神経細胞脱落と萎縮があり、特徴的な異常蓄積物質としてはPHFおよびβアミロイド蛋白が認められる。この両者は正常老人脳を始めとして各種神経疾患において認められるが、PHFは直接細胞死との関連を示すものと考えられている。PHFの主要構成成分はタウであり、髄液中のタウを測定することは重要であると考える。
タウは分子量45−55kDの神経細胞に特異的な微小管結合蛋白である。このため髄液中のタウ値は神経細胞由来のものを測定していると考えてよい。これは血液脳関門が破壊されている髄膜炎において特に高値を示さないことからも理解される。AD患者髄液においてタウが高

値を示したことは、広範な神経細胞死により神経細胞内のタウが髄液中に流出したためと考えられる。同様にPHFを認める神経変性疾患であるパーキンソン病患者では対照群と大差ない値を示したことはパーキンソン病の病巣が黒質、線状体等のごく狭い範囲に局在しているためと考えられた。急性の広範な神経細胞障害をきたす一酸化炭素中毒患者で非常な高値を示したことからも、タウが神経細胞死を反映すると考えられた。または慢性的に進行する疾患であり、髄液中のタウが患者で高値を示すことは、AD脳において神経細胞が慢性進行的に壊れ続けていることを示している。

現在、病的蛋白として,AD患者髄液中の可溶性異常リン酸化タウ(A68)やアミロイドβ蛋白を測定するということも検討されている。A68の場合は髄液中のホスファターゼやプロテアーゼの存在により、抗体のエピトープによっては異常リン酸化を認識するのは困難であることが報告されている[2]。アミロイドβ蛋白に関しては、最近、早発AD性患者髄液中の可溶性アミロイドβが対照者に比し増加しているということが発表された[3]。髄液中のタウは神経細胞死を反映するものであり疾患特異性は高くないが、痴呆を呈する疾患の鑑別には、各種検査による除外診断を行った上で、補助診断として有用であると考えた。髄液中タウの絶対値を数値として客観化しえたことも、最近の知見[2]とともに新たな展開になりうると期待される。

また、髄液はアルブミンをはじめとする各種蛋白に富むため、微量蛋白は髄液を濃縮するなどの行程を経ねばならず臨床現場でのルーチン化は困難であった。今回我々はサンドウイッチ法を用いることにより、微量である髄液中タウの定量を前処理なしに鋭敏かつ正確に、しかも多くのサンプルを簡便に測定することができたことも、臨床現場における診断法として有用であると考えた。

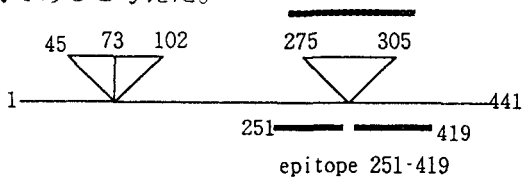


図1　抗タウ抗体(ポリクローナル)のエピトープ

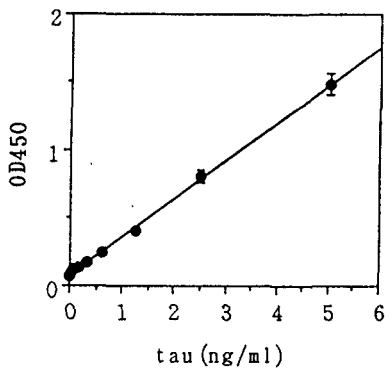


図2　ヒトタウ標準直線

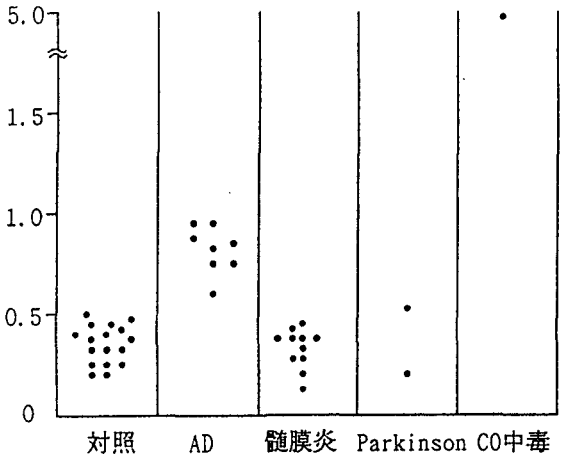


図3　各種神経疾患における髄液中タウ値

[参考文献]
1)Endo, R. et al:Brain Res 601, 164-172 (1993)
2)Vandermeeren, M. et al: J Neurochem 61, 1828-1834 (1993)
3)Nakamura, T. et al: Ann Neurol (in press)

144 β–アミロイド蛋白脳室内持続投与によるアルツハイマー型痴呆モデル動物の作製 －加齢および神経成長因子との関係－

新田淳美、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〕 アルツハイマー型痴呆患者脳には、β–アミロイド蛋白の沈着が観察されている。我々は、すでに、合成β–アミロイド蛋白(1-40)をラット脳室内に持続的に注入することにより学習記憶能力およびコリン作動性神経系に障害が観察されることを報告している。本研究では、同モデル動物を用いてβ–アミロイド蛋白と加齢および神経成長因子との関係について検討した。β–アミロイド蛋白を2週間注入後、8週齢のラットでは、海馬のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が減少し、前頭葉皮質の神経成長因子含量が増加した。一方、20週齢および24カ月齢のラットでは、脳各部位において両者とも変化がなかった。これらの実験結果から、*in vivo*でのβ–アミロイド蛋白の障害作用は、加齢の影響を受け、神経成長因子の合成調節機構にも関与していることが示唆された。

高齢化社会を迎え、老年期痴呆患者が急増し社会的に深刻な問題になりつつある。特に、アルツハイマー型痴呆は、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。我々は、ラットの脳室内へβ–アミロイド蛋白(1-40)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が低下し、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すること、さらに注入後2週間目に海馬細胞が変性することを、すでに、報告している（5、7）。これらの実験結果は、アルツハイマー型痴呆モデル動物の開発に結びつくと考えられる。一方、神経成長因子は、脳内コリン作動性神経の栄養因子として知られているが、アルツハイマー型痴呆の患者での機構については、よく分かっていない。そこで、本研究では、β–アミロイド蛋白のコリン作動性神経系への障害作用が加齢によりどのように変化するのか、および、その際、脳内神経成長因子含量が変化するのかどうかについて検討した。

【実験方法】実験には、8週齢、20週齢および24カ月齢の雄性ラットを用いた。1群の動物は、5匹とした。アミロイド蛋白(1-40: Bachem, Ca)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（7）。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。2週間の持続注入の後断頭し、脳分割後、コリンアセチルトランスフェラーゼ（3）およびコリンエステラーゼ活性（1）、ならびに神経成長因子含量（4）を測定した。

【実験結果】8週齢のラットではコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が海馬で有意に減少した(Fig. 1)。しかし、20週および24カ月齢のラット脳では変化がなかった。また、他の脳部位（前頭および頭頂葉皮質、線条体）では、アミロイド注入群と溶媒注入群の間に差は観察されなかった。コリンエステラーゼ活性は、いずれの週齢群においても脳各部位でアミロイド蛋白注入による変化は観察されなかった。一方、神経成長因子含量は、8週齢のラットでは前頭葉皮質において有意に増加したが、他の週齢では全ての脳部位において変化がなかった(Fig. 2)。

【考察】神経成長因子は中枢ではコリン作動性神経系の栄養因子として働いていることが知られている。アルツハイマー型痴呆患者脳では、コリン作動性神経系に障害が観察されることから、同症と神経成長因子の関連が注目されている。我々は、ラットの脳に損傷を与えることにより脳内神経成長因子含量が増加することを報告している（2、6）。本実験から、β-アミロイド蛋白による障害においても、神経成長因子含量が上昇することが明らかとなった。また、神経成長因子含量が上昇する頭頂葉皮質ではアセチルコリントランスフェラーゼ活性が溶媒群のレベルに保たれること、神経成長因子のレベルが増加しない海馬では、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性が低下することが明らかとなった。

老化における脳機能の変化については、明らかにされていないことが多い。β-アミロイド蛋白によるコリン作動性神経系の障害は、若齢ラットにおいてのみ発現することが明らかとなった。この実験結果は、老齢ラット脳ではアミロイド蛋白の毒性に対して何らかの防御機構が存在することが考えられるが、今後詳細な検討が必要と思われる。

【参考文献】

(1) Ellman, G. L., Courtney, K. D. Andres, Jr. V. A. and Featherstone, R.M. (1961) *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95

(2) Nitta, A., Furukawa, Y., Hayashi, K., Hiramatsu, M., Kameyama, T., Hasegawa, T.and Nabeshima, T. (1992) *Neurosci. Lett*. 144, 152-156

(3) Nitta, A., Hayashi, K., Hasegawa, T. and Nabeshima, T. (1993) *J.Neural Transm [G-sect.]* 93, 37-46

(4) Nitta, A., Hasegawa, T. and Nabeshima, T. (1993) *Neurosci. Lett.* 163, 219-222

(5) 新田淳美、福田種男、西村京子、伊東亜紀雄、長谷川高明、鍋島俊隆　(1994) 第24回日本神経精神薬理学会年会発表要旨集、印刷中

(6) Nitta, A., Furukawa, Y., Hayashi, K., Hasegawa, T. and Nabeshima, T. (1994) *Biol. Pharm. Bull.* 17, 34-38

(7) Nitta, A., Itoh, A., Hasegawa, T. and Nabeshima, T. (1994) *Neurosci. Lett.* 170, 63-66

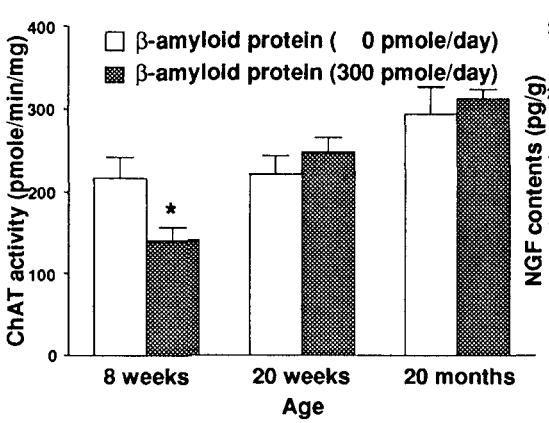


Fig. 1 Age-related changes in ChAT activity in the hippocampus after continuous infusion of β-amyloid protein.
***p<0.05 vs vehicle (0 pmole β-amyloid protein: 0 pmole/day)-treated rats (Tukey's test)**

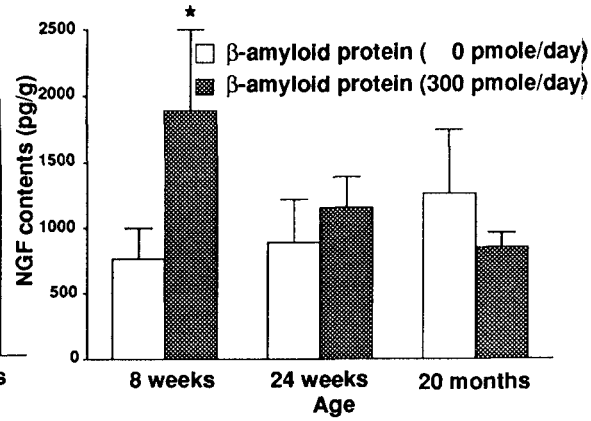


Fig. 2 Age-related changes in NGF contents in the frontal cortex after continuous infusion of β-amyloid protein.
***p<0.05 vs vehicle (0 pmole β-amyloid protein: 0 pmole/day)-treated rats (Tukey's test)**

145 アルツハイマー病アミロイドのAß蛋白以外の構成成分 NACの前駆体蛋白質の組織依存的alternative splicing

上田健治、森　啓
東京都精神医学総合研究所・分子生物学研究部門

〔要約〕 最近アルツハイマー病(AD)アミロイドに未知の構成成分NACが存在することが示され、その前駆体蛋白質(NACP)のcDNAがクローニングされた。今回、alternative splicingによって生じたと思われるアイソフォーム型NACPcDNAがクローニングされた。このcDNAは112アミノ酸をコードしており、先にクローニングされたNACPcDNAの84ヌクレオチド（28アミノ酸）が欠損していた。RT-PCRによる解析から、この２種類のNACPmRNAは共に胎児脳と成人脳に存在するが、長鎖型の方が短鎖型よりも多量に発現していた。Northern blot解析から、この２種類のNACPアイソフォームは組織依存的にalternative splicingされて発現していることが示唆された。

〔緒言〕 精製ADアミロイドから生化学的に分離同定され、免疫組織化学的にアミロイド繊維上に局在が示されたNAC(Non-Aß Component)は、cDNAクローニングにより140アミノ酸をコードする前駆体蛋白質(NACP)の存在が予測され、19kDa蛋白質として検出された(1)。今回我々は、ヒト胎児脳cDNA libraryからalternative splicingにより生じたと思われる1096bpのNACPアイソフォームcDNAをクローニングし、その組織特異的発現様式を検討した。

〔方法〕 cDNAクローニング：PCRによりNACPcDNAの一部を増幅しプローブとして用い、ヒト胎児脳cDNA libraryをスクリーニングした(1)。 RT-PCR：ヒトpoly(A)$^+$RNAはClontechから購入した。胎児脳(#6525-1, lot35301)、成人脳(#6516-1, lot35291)、胎児肺(#6528-1, lot2Y086)、成人肺(#6524-1, lot34401)。逆転写反応にはrandom hexamersをprimerとして用い、PCR primersは２種類のNACPアイソフォームをそれぞれ特異的に増幅するようにデザインした(Fig.1B)。 Northern blot解析：ヒトMultiple Tissue Northern (MTN) blotはClontechより購入した(#7760-1, lot32409)。84-bp insert cDNAのみをPCRにより増幅し特異プローブとして用いた。

〔結果と考察〕 NACPアイソフォームcDNA：ヒト胎児脳cDNA libraryから得られたクローンHFB1-3は、塩基配列決定の結果、先にクローニングされたNACPcDNA HBS6-1(1)のnt#40と1214の二つの*Eco*RI部位間に相当するが、coding配列中の一部が欠損していることが判明した(Fig.1A)。欠損部位はnt#357から440の84bpであり、その結果アミノ酸残基#102のK(AAG)はスプライス後も保存され、従って#103のNから#130のEまでの28アミノ酸残基が欠損した短鎖型NACPアイソフォーム(NACP112)が形成されることになる。 RT-PCR：NACPcDNA HFB1-3は胎児脳cDNA libraryから得られたことから、このアイソフォームNACP112は胎児特異型である可能性があり、この点をRT-PCRにより検討した。二つの組み合わせのprimersはそれぞれ一つのアイソフォームのみを増幅するようにデザインされた(Fig.1B)。即ち、C1-Tはinsertのない場合にのみ働き306bpのcDNAを産成し、C1-FN1はinsertのある場合にのみ370bpの産物を増幅する(Fig.1C)。このことはcDNAクローンHBS6-1(+insert)とHFB1-3(－insert)を用いて確かめられた(Fig.2, lanes5,6&7,8)。RT-PCRの結果、－insert型は胎児と成人組織両方に検出された(Fig.2, lanes1-3)。成人肺には検出されなかったが(Fig.2, lane4)、検出レベル以下に発現している可能性はある。一方+insert型も胎児と成人両組織に検出され(Fig.2, lanes9-12)、明らかに+insert型の方が多量に発現していると思われる。

Northern blot解析：84-bp insert cDNAを特異プローブとして、ヒト各組織由来のNorthern blotを解析したところ、+insert型は脳だけでなく、骨格筋にも比較的多量に発現していることが判明した(Fig.3, lanes2&6)。又、新たに6.6kbのtranscriptが骨格筋と心臓に弱く検出された(Fig.3, lanes1&6)。これはもう一

つのalternative splicingの可能性を示唆するが、このプローブと強い相同性を有する蛋白質ファミリーとのcross-hybridizationである可能性もある。何故ならばNACPは*Torpedo*とratより同定された神経特異蛋白質synucleinのヒト型であるらしいことが最近報告され(2)、蛋白質ファミリーを形成することが見出されたからである。

いずれにせよこの二つのNACPアイソフォームは脳で最も多量に発現しており、その機能とアミロイド形成の関係は今後の検討課題である。

［謝辞］本研究の一部は斉藤綱男博士(UCSD)との共同研究で行われた。

［文献］1. Uéda, K., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11282-11286. 2. Jakes, R., *et al.*(1994) *FEBS Letters*, 345: 27-32.

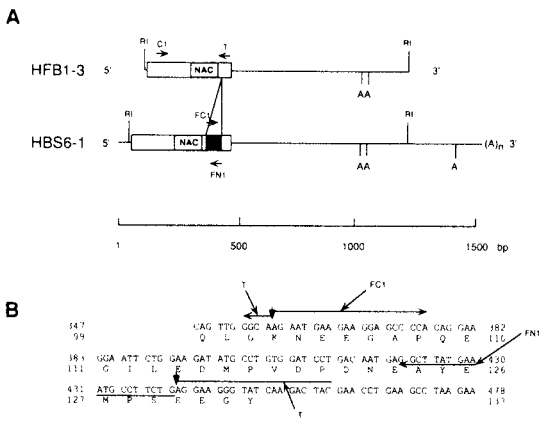


Fig. 1. **A**, Schematic illustration of the cDNA clones HFB1-3 and HBS6-1. The insert region is shaded. RI, *Eco*RI site. A, polyadenylation site. **B**, Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 84-bp insert deleted in HFB1-3. Nucleotide residues and amino acids are numbered as reported (1). Arrowheads on nt #357 and 440 indicate potential spliced junction sites in HFB1-3. **C**, Potential RT-PCR products that could be obtained from two pairs of PCR primers and with NACP mRNA with or without 84-bp insert. Sizes of the products in base pairs.

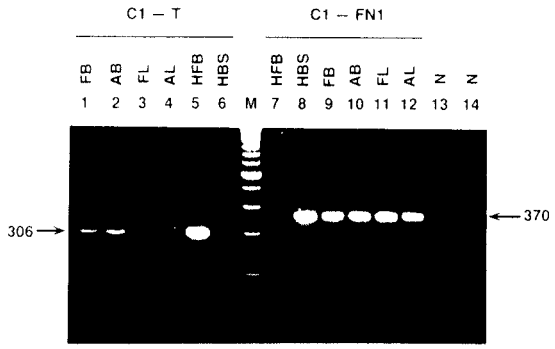


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products. Lanes 1-6, and 13 are with the primer pair of C1-T; lanes 7-12, and 14 are with C1-FN1. F, fetal; A, adult; B, brain; L, lung; HFB, NACP cDNA HFB1-3; HBS, NACP cDNA HBS6-1; N, no templates. M, 100 bp DNA ladder. NACP cDNAs served as a control as described in the text. Sample volumes applied in lanes 9-12 were adjusted to be a half of those in lanes 1-4.

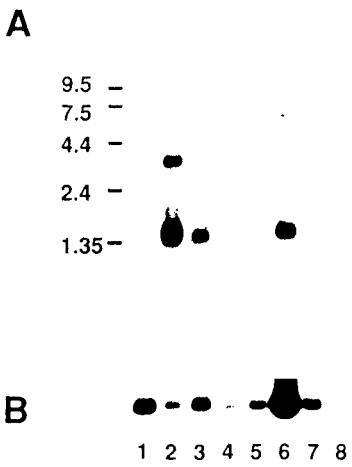


Fig. 3. Northern blot analysis of NACP mRNA with the 84-bp insert specific probe. Normal human tissues. Lane 1, heart; lane 2, brain; lane 3, placenta; lane 4, lung ; lane 5, liver; lane 6, skeletal muscle; lane 7, kidney; lane 8, pancreas. **A** was probed with NACP 84-bp insert cDNA specific probe. **B** with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenate (GAPD) cDNA. A 6.6 kb transcript was detected in skeletal muscle and weakly in heart.

146 大脳白質に存在するアミロイドβ蛋白前駆体およびそのC端断片の解析

徳田隆彦、亀谷富由樹、田中喜久子、*池田修一、
東京都精神医学総合研究所・分子生物、*信州大学・第三内科

〔要約〕ダウン症患者および正常対照者の大脳白質からアミロイド前駆体蛋白(APP)およびそれに由来する成分を系統的に分離精製して、化学分析を行い、ヒトの脳内におけるAPPの分解代謝過程を検討した。被検脳の大脳皮質および白質をTris緩衝液可溶画分(TB)およびTris/Triton緩衝液可溶画分(TB/T)に分画した。TB画分からは分子量93-123 kDaの分泌型APP、TB/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。大脳白質から分離精製した分泌型APPおよびC端断片には、大脳皮質の場合と同様に、通常のα-secretaseによるプロセシングとは異なる部位で切断されているisoformが存在し、APPの分泌経路において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＞
脳アミロイドの主な構成成分であるアミロイドβ蛋白(Aβ)は、その前駆体蛋白(APP)から生じるが、APPの代謝過程およびAβの生成機序は不明のままである。我々はこの生成機序の解明のために、大脳皮質に存在するAPPおよびそれに由来する成分の系統的な分離精製、化学分析を行い、ヒトの脳内ではどのようなAPPの分解代謝が起こっているのかを検討してきた。本年度は、大脳白質に存在する種々のAPP isoformおよびC端断片の解析を行ったので報告する。

＜方法＞
ダウン症候群患者および正常対照者の大脳皮質および白質を9倍量の10mM Tris/0.2M NaCl緩衝液でhomogenizeし、47,000xgで遠心した上清(TB画分)と、この沈殿を10mM Tris/0.2M NaCl/0.5% Triton-X100緩衝液でhomogenizeし、47,000xgで遠心した上清(TB/T可溶画分)とに分画した。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りAPPおよびそれに由来する成分を精製し、以下のAPPの各部分に対する抗体(2)を用いたimmunoblotting、N末端アミノ酸配列分析等の解析を行った。用いた抗体: 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、山口晴保博士より供与していただいた)、抗757抗体(Aβ1-10)、抗R37抗体(APP-695 681-695)

＜結果と考察＞
被検脳の大脳白質から得たTB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(図1)。TB/Tのヘパリン結合画分からは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(図2)。正常者、アルツハイマー病患者およびダウン症候群患者の大脳皮質の解析で得られた結果(1,3,4)と同様に、大脳白質に由来する分泌型APPおよびC端断片の解析からは、一部のAPP

(APP695由来)では、通常のα-secretaseによるプロセシングとは異なり、完全なAβ配列を含むアミロイド原性C端断片が生じていた(図1)。大脳白質にアミロイド原性C端断片が存在することは、ヒト脳でAPPが輸送され分泌される経路においてアミロイド原性C末端およびAβが生じる可能性を示唆すると考えられた(5)。

＜文献＞
1. Allsop D., Kennedy H.E. & Kametani F. (1993) Alzheimer's disease: Advances in clinical and basic research, pp.421-429
2. Ishii T., Kametani F., Haga S. & Sato M. (1989) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 15, 135-147.
3. Kametani F., Tanaka K., Ishii T., Ikeda S., Kennedy H.E. & Allsop D. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 392-398
4. Kennedy H., Kametani F. & Allsop D. (1992) Neurodegeration 1, 59-64
5. Tokuda T., Tanaka K., Kametani F., Ikeda S. & Yanagisawa N. Neurosci. Lett. (in press)

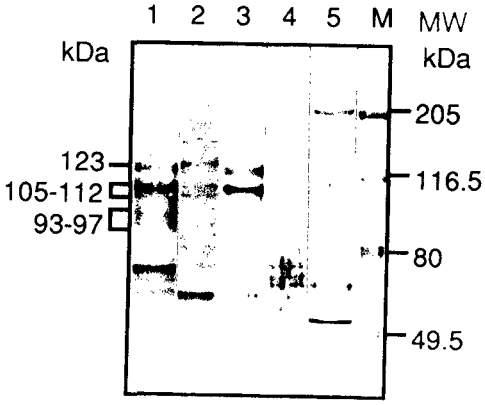


図1 ダウン症候群患者の大脳白質から得たTB画分より精製した分泌型APPのimmunoblottingによる分析
lane1: 抗T97抗体、lane 2: 抗R98抗体、lane 3: 抗Z31抗体、lane 4: 抗757抗体、lane 5: 抗R37抗体によるimmunoblotting。

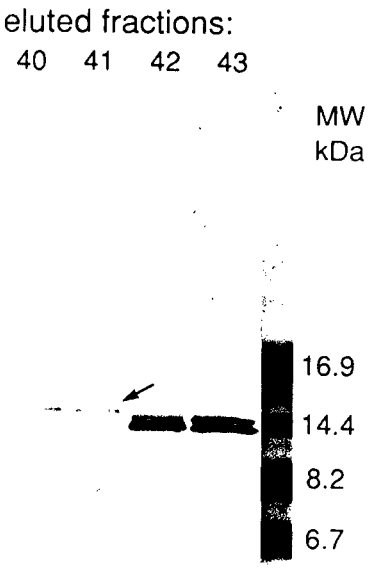


図2 ダウン症候群患者の大脳白質から得られたTB/T画分より精製したAPP-C末端断片のSDS電気泳動とimmuno-blotting
各画分をSDS電気泳動後、抗R37抗体を用いてimmunoblottingを行った。矢印のband (15.5kDa)はAβ配列に対する抗体(抗757抗体: Aβ1-10)にも反応した。

147 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アミロイド前駆体蛋白代謝

小町裕志，柳澤勝彦*，白崎康文**，宮武　正***
（東京医科歯科大学・医・神経内科，*東京大学・医・脳研・脳病理，
第一製薬探索二研，*都臨床研）

〔要約〕 アルツハイマー病脳の海馬膜画分においてはPKC(β)の免疫反応性の低下が報告され，また，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が示されている．さらに，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．すでに，我々はレセルピン投与ラット脳海馬膜画分でのPKC(β)の減少を報告した．今回，レセルピン投与ラット海馬可溶性画分での可溶性APPの減少を認めた．以上より，アルツハイマー病脳における上行性モノアミンの障害に起因するPKC細胞内局在の変化が，APPの異常代謝を引き起こしている可能性が考えられる．

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]，記憶形成との関連で注目される．アルツハイマー病脳の海馬膜画分においてはPKC(β)の免疫反応性の低下が報告され[3]，また，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が示されている[4]．すでに、我々はレセルピン投与ラット脳海馬膜画分でのPKC(β)の減少を報告した[5]．今回，レセルピン投与ラット脳におけるAPPの変化について検討した．

方法：体重約200g Wistar 雄ラットを用いた．レセルピン腹腔内単回投与群は，5mg/kgを腹腔内投与し，6時間後にハロセン麻酔下に断頭，海馬および線条体を摘出した．対照群には，vehicleを腹腔内投与した．また，レセルピン経口投与群は，レセルピン100mg/kg含有する飼料を4週間自由摂取させ，最終日に海馬を摘出した．それぞれの摘出試料の約40mgをphosphate buffered saline(pH7.4)500μlでホモジナイズし，100,000g，30分間遠心し，可溶性APP(APPs)を含む可溶性画分と膜画分とを得た．膜画分は，0.5%Triton-X 100，phosphate buffered saline-緩衝液(pH7.4) 500μl で懸濁し，同条件で再度，遠心分離して，full-lengthのAPPを含む上清を得た．それぞれの画分について，DEAE Sepharose イオン交換カラムにて部分的に精製した後、Western blotを行い，APPのN末側およびC末側に対する抗体（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し，デンシトメータにて定量的検討を行った．

結果：レセルピン腹腔内単回投与ラットの可溶性画分ではAPPsは対照ラットに比して減少傾向を示し，また，膜画分ではfull-length APPは対照ラットに比して増加傾向を示した（図1）．可溶性画分のAPPsの定量的解析結果では，レセルピン腹腔内単回投与で，APPsの免疫反応性は，海馬での有意な減少を認めたが，線条体では変化を認めなかった(図2Ａ)．レセルピン経口投与においても，APPsの免疫反応性は，海馬の可溶性画分で有意な減少を示した(図2Ｂ)．

考察：Masliahらはアルツハイマー病脳の海馬膜画分において，PKC(α)とPKC(β)の免疫反応性の低下を報告した[3]．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[6,7]．我々は，既に，レセルピン投与ラットの海馬においてのみPKC(β)の免疫反応性が，その膜画分では有意に減少し，細胞質画分では有意に増加することを報告した[5]．今回の実験で，レセルピン投与によってPKC(β)の変動を認めた海馬において，APPの代謝が変化していることが明らかとなった．これらの結果から，アルツハイマー病脳における上行性モノアミンの障害に起因するPKC細胞内局在の変化が，APPの異常代謝を引き起こしている可能性が考えられる．

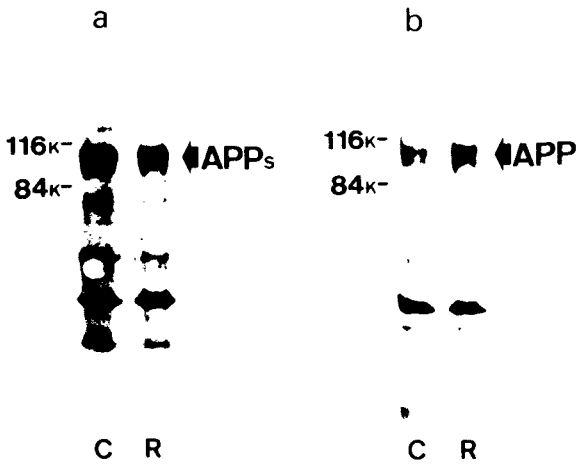


図1 Immunoblots of the homogenates of hippocampus from control and reserpinized rat brains, labeled with NAPP.
panel a; cytosolic fraction, b; membrane fraction, C; control rat, R; reserpinized rat

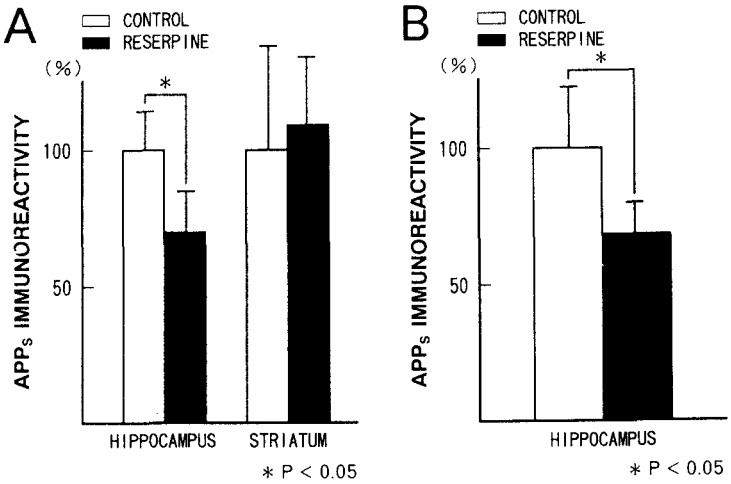


図2 Quantitative analysis of immunoblots for APPs in the cytosolic fractions
Rats were reserpinized by single intraperitoneal injection (A) or peroral administration for 4 weeks (B).

REFERENCES

1. Saito, N. et al. (1988) J.Neurosci. 8, 369-382.
2. Yoshida, Y. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 9868-9873.
3. Masliah,E. et al. (1990) J.Neurosci. 10, 2113-2124.
4. Buxbaum, J.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 6003-6006.
5. Komachi, H. et al. (1994) Brain Res. 634, 127-130
6. German, D.C. et al. (1992) Ann. Neurol. 32, 667-676.
7. Mann, D.,M. et al. (1984) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 47, 201-203.

148 アミロイド前駆体蛋白の糖鎖構造に関する検討

斉藤史明、柳澤勝彦*、谷　昭義**、宮武　正***
(東京医科歯科大学・医・神経内科、東京大学・医・脳研・脳病理*、
武田薬品開拓第1研究所**、東京都臨床研***)

〔要約〕

近年、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。そこで我々はアミロイド前駆体蛋白（APP）の糖鎖構造を明らかにすることを目的として、APPに対するレクチン染色を施行し、そのN結合型糖鎖の構造を検討した。APP751遺伝子をtransfectしたC6ラットグリオーマ細胞の培養上清中の可溶性APP（APPs）を精製し、SDS-PAGEの後、lectin blotを行った。125kDに認められるAPPsのbandはDSA、LCA、PHA-E_4、RCA_{60}、RCA_{120}、SSA、UEA-Iの各レクチンに対して反応を示した。一方、Con-A、PHA-L_4、MAMに対する反応は認められなかった。これらの結果からAPPsのN-結合型糖鎖はbisecting GlcNAcを有する3本鎖以上の分岐をもつ複合型糖鎖で、還元末端のNアセチルグルコサミンにフコースがα1→6結合を、非還元末端にはβガラクトースにシアル酸がα2→6結合、あるいはフコースがα1→2結合する構造を有することが推測された。

［目的］アルツハイマー病脳に沈着するβアミロイドタンパク（Aβ）はAPPからの切り出しにより生じるが、その詳細な機序に関しては未だ不明である。APPのプロセッシングにはAβドメイン内で切断を受けて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が再び細胞内へ取り込まれlysosomeへと運ばれるendosomal-lysosomal pathwayとが知られている(1)。一方、APPは2ヶ所のN-結合型糖鎖結合可能部位を持つ糖蛋白であり(2)、我々は本学会でAPPのN-結合型糖鎖がAPPの細胞外への分泌に影響を及ぼす可能性があることを報告した(4)。そこで今回我々はAPPの糖鎖構造を明らかにすることを目的として、培養上清中のAPPsをglycanase処理の後Western blotで検討するとともに、APPsを精製し、lectin blotによりN-結合型糖鎖の構造を検討した。

［方法］APP751遺伝子をtransfectしたC6グリオーマ細胞の培養上清をN-glycanase(Oxford glycosystem)、endo-β-N-acetylglucosaminidase H(Endo-H,Sigma)、neuraminidase(Sigma)およびO-glycanase(Genzyme)で処理した後、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により検討した。一方培養上清中のAPPsをDEAE Sepharose F.F.、Superdex 200 pg、Mono Q、Pro RPCおよびSMART μRPC (以上Pharmacia)の各カラムを順次用いて精製した。精製したAPPsはSDS-PAGEののちbiotin標識レクチン、concanavalin A(Con A)、lentil lectin(LCA)、Datura stramonium agglutinin(DSA)、phytohemagglutinin E_4(PHA-E_4)、phytohemagglutinin L_4(PHA-L_4)、Ulex europaeus agglutinin I(UEA-I)、Ricinus communis agglutinin 60(RCA_{60})、Ricinus communis agglutinin 120(RCA_{120})、Sambucus siebolldiana agglutinin(SSA)、Maackia amurens lectin(MAM)（以上Honen）によるlectin blotを行ない、ECLにより検出した。また、RCA_{60}、RCA_{120}、SSA、UEA-IについてはN-glycanaseによる処理の後に再度lectin blotを行なった。

［結果］C6グリオーマの培養上清中には125kDにAPPsのbandが認められた。このbandはN-glycanase処理により約4kD、neuraminidase処理により約15kD、neuraminidase処理に引き続くO-glycanase処理により約19kD分子量が減少したが、Endo-Hでは明らかな分子量の変化は認められなかった(Fig.1)。一方、APPsは精製後125kDに加えて98kDにbandが認められるようになったが、両bandともに吸収抗体で免疫反応性は消失した。精製したAPPsのlectin blotでは、DSA、LCA、PHA-E_4、RCA_{60}、RCA_{120}、SSAおよびUEA-Iに対する反応が認めら

れたが、Con-A、PHA-L_4、MAMに対する反応は認められなかった。また、APPsをN-glycanase処理後にRCA$_{60}$、RCA$_{120}$、SSA、UEA-Iによるlectin blotを行なったところ、これらlectinに対するAPPのs反応性は消失した(Fig.2)。

［考察］C6グリオーマの培養上清中のAPPsはヒト脳脊髄液中のAPPsと同様に[3]、N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖両者の糖鎖付加を受けていることが示された。また、Endo-H処理後に明らかな分子量の低下が認められないことから、N-結合型糖鎖は複合型糖鎖である可能性が示された。一方、lectin blotの結果からAPPsのN-結合型糖鎖はbisecting GlcNAcを有する3本鎖以上の分岐をもつ複合型糖鎖で、還元末端のNアセチルグルコサミンにフコースがα-1→6結合を、非還元末端にはβガラクトースにシアル酸がα2→6結合、あるいはフコースがα1→2結合している構造を有することが推測された。

［文献］(1) Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y. & Selkoe, D. J., Nature, 357 (1992) 500-503. (2) Pahlsson, P., Shakin-Eshleman, S.,H., & Spitalnic, S., L., Biochem. Biophys. Res. Commun. 189 (1992) 1667-1673. (3) Saito, F., Yanagisawa, K., & Miyatake, T., Mol. Brain Res., 19 (1993) 171-174. (4) 斉藤史明、柳澤勝彦、谷 昭義、宮武 正、神経化学 32、(1993)498-499.

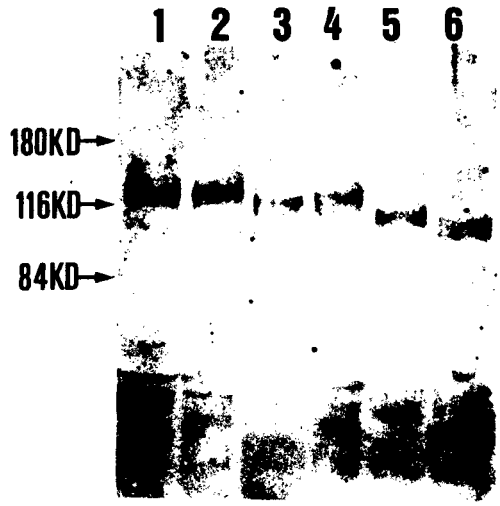


Fig. 1 Enzymatic deglycosylation of APPs in the medium of C6 glioma cell. Lane 1: preincubation, Lane 2: incubation without enzymes, Lane 3: N-glycanase, Lane 4: Endo-H, Lane 5: Neuraminidase, Lane 6: Neuraminidase and O-glycanase.

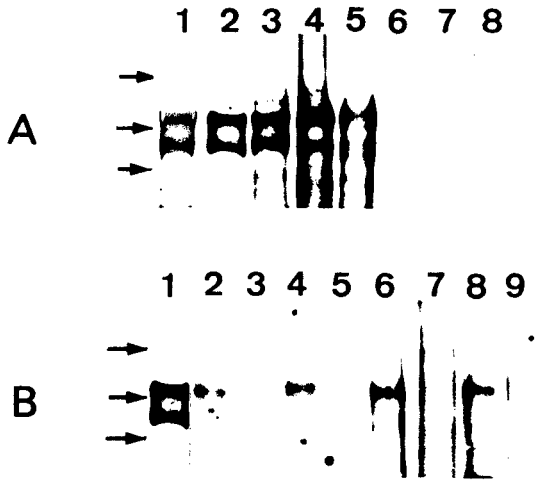


Fig. 2 Lectin blot analysis of purified APPs. A; Lane1 : silver staining, Lane 2: immunoblot, Lane 3: LCA, Lane 4: DSA, Lane 5: PHA-E4, Lane 6: PHA-L4, Lane 7: Con-A, Lane 8: MAM. B; Lane 1: immunoblot, Lane 2, 3: RCA60, Lane 4, 5: RCA120, Lane 6, 7: UEA-I, Lane 8, 9: SSA. Lane 3, 5, 7, 9 was blotted after N-glycanase treatment. Arrowa indicate molecular weight standard, 180, 116 and 84kD, respectively.

149 ヒト眼組織における蛋白カルボキシメチル化酵素の遺伝子発現

児玉俊夫、鳥飼治彦*、武田良平**、溝渕睦彦**、四宮博人***、大橋裕一
（愛媛大学眼科学、*愛媛労災病院眼科、**愛媛大学精神神経医学、***愛媛大学細菌学）

〔要約〕

ヒト眼組織におけるIsoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase（以下PIMTと略す）の分布および白内障化に伴う変化についてmRNAの発現を指標として検討した。ヒト正常眼組織において、RT-PCR（Reverse Transcribed-Polymerase Chain Reaction）法では水晶体上皮および網膜に本酵素の遺伝子発現が認められ、Southern blot法によりPIMTのcDNAの一部と確認した。各眼組織におけるPIMTのmRNA量をNorthern blot法で分析したところ、水晶体上皮とわずかに網膜に検出された。正常水晶体と白内障のmRNA量を比較すると、白内障水晶体でmRNA量が有意に減少していた。老化蛋白修復機能を持つと考えられているPIMTの遺伝子発現量が白内障で減少していたことより、水晶体の透明性維持に本酵素が関与していることが推測される。

〔 はじめに 〕

細胞内の蛋白質は、老化にともなってL型アミノ酸が立体異性体、即ちD型アミノ酸を生じるラセミ化、脱アミド化およびβ-アイソマー化などによって本来の機能を失う(1)。ヒト眼組織においても、水晶体で加齢や白内障化によりD-アスパラギン酸が増加することが報告されている(2)。カルボキシメチル化酵素は、これらの異常アミノ酸の処理機構に関与していると想定されている。PIMTはD-アスパラギンとL-イソアスパラギン酸残基のβ-カルボキシル基をメチル化する酵素で、メチル化された蛋白質は脱メチル化されて正常な蛋白質にもどる。そのため、本酵素は老化蛋白質を修復するうえで重要である(1)。我々はヒト正常眼組織と白内障水晶体におけるPIMTの遺伝子発現を調べ、本酵素の機能を検討した。

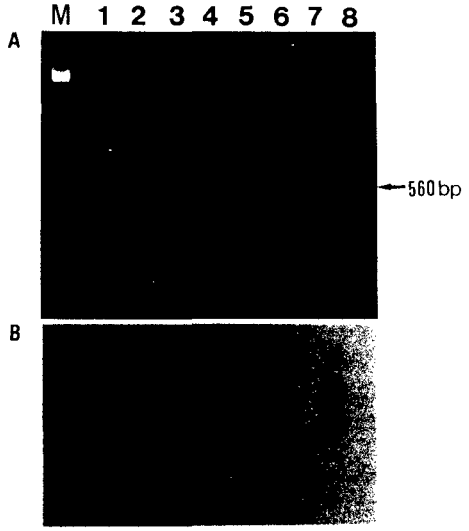
〔 方法 〕

すべての角膜提供者や家族に説明と同意を得た。摘出した眼球より分離した虹彩、毛様体、水晶体、脈絡膜および網膜と、手術により得た白内障水晶体を試料とした。各試料より全RNAをChomczynskiらの方法(3)で抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを得て、PCRを行った。PCR産物の確認としてSouthern blot法を行った。プローブに用いたcDNA部位(146bp)は報告されている配列(4)をもとに、他のメチル化酵素と共通なドメイン部分を避けて選んだ。PCRの条件、Northern blot法やプローブラベリング法は既報に従った(5,6)。Northern blot法のオートラジオグラフィーの結果は、バイオイメージアナライザー(BAS1000)により解析した。

〔 結果と考察 〕

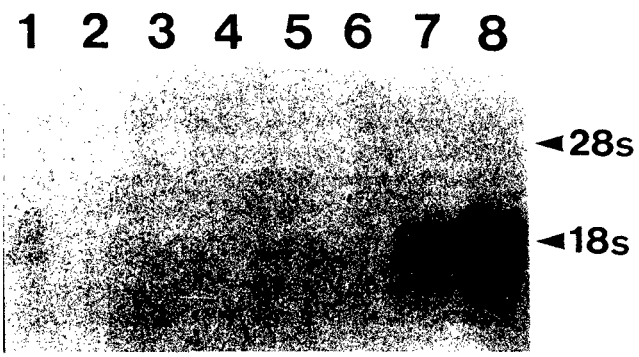
RT-PCR法で水晶体上皮と網膜でPIMTのcDNAに相当するサイズ560bpの増幅物を確認した（図1-A）。Southern blot法でもRT-PCR法の結果と同様に、水晶体上皮と網膜にのみバンドが得られたので、このPCR産物はPIMTのcDNAの一部と確認できた（図1-B）。各眼組織のRNA量をNorthern blot法で解析したところ、水晶体上皮とわずかに網膜に遺伝子の発現がみられた（図2）。白内障水晶体は正常水晶体に比較するとPIMTのRNA量は有意に（$P<0.01$）減少していた（図3）。以上より、白内障や老人性黄斑変性症の病因とも考えられる老化蛋白質を修復する機能を水晶体と網膜が有している可能性や、白内障で本遺伝子発現が減少していたことより、水晶体ではその透明性維持に本酵素が関与している可能性が示唆された。

〔文献〕
1. Barten, D. M. and O' Dea, R. F. (1990) Life Sciences 47 : 181-194.
2. Masters, P. M., Bada, J. L. et al(1977) Nature 268 : 71-73.
3. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162 : 156-159.
4. MacLaren, D. C., Kagan, R. M. et al(1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 185 : 277-283.
5. Mizobuchi, M. and Frohman, L. A. (1992) BioTechniques 12 : 350-353.
6. Mizobuchi, M., Frohman, M. A. et al(1991) Mol. Endocrinol. 5 : 476-484.



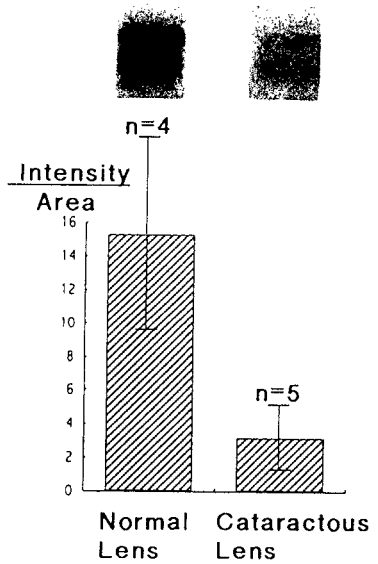
（図１）ヒト眼組織におけるPIMTの遺伝子発現
Ａ：ＰＣＲ産物のアガロース電気泳動図
Ｂ：PCR施行後のSouthern blot 分析

M : Molecular marker, 1. Cornea, 2. Lens epithelium,
3. Decapsulated lens, 4. Iris, 5. Ciliary body,
6. Choroid, 7. Retina,
8. Negative control(non RT;retina)



（図２）各眼組織におけるPIMTのNorthern blot分析

1. Retina, 2. Choroid, 3. Iris, 4. Ciliary body,
5. Cornea, 6. Decapsulated lens(normal),
7. Lens epithelium(cataract), 8. Lens epithelium(normal)



（図３）正常水晶体と白内障水晶体におけるRNAレベルの変化

グラフは平均±標準偏差を示す

150 メタンフェタミン慢性投与ラットにおけるチロシン水酸化酵素 mRNAレベルの検討

石丸 昌彦、橋本 隆紀*、小幡 邦彦**、深間内 文彦
(東京医科歯科大学難治疾患研・プロジェクト研究室、*清瀬病院、**生理学研究所・神経化学)

〔要約〕
MAP (5 mg/kg, i.p.) 慢性投与ラットの脳組織におけるチロシン水酸化酵素 (TH) の転写レベルを、*in situ* hybridization および Northern blot analysis によって検討した。*in situ* hybridization の結果、TH mRNAシグナルは中脳領域に限局して認められ、MAP投与群では生食対照群に比較して顕著な減少傾向が認められた。またNorthern blot analysis の結果、MAP投与群の中脳サンプルにおけるTH mRNA は、生食対照群に比較して約37%の減少を示した (p=0.053) 。以上の結果は、中等量MAPの慢性投与によってTHの転写が低下傾向を示すことを示唆しており、MAPによる異常行動や逆耐性現象、神経毒性などとの関連において興味深い所見である。

[序言]

メタンフェタミン (MAP) を始めとするアンフェタミン類の生体に対する効果は、用量に応じて異なった様相を示す。すなわち、低用量では移所行動の増加や常同行動などの異常行動が見られ、かつMAP反復投与によって逐次増強する (逆耐性現象) 。これらの異常行動および逆耐性現象はドーパミン神経伝達の活性化によるものと考えられ、これを支持する所見としてカテコラミン代謝の律速段階酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の、辺縁系での活性上昇を示唆する報告がある (1) 。一方、高用量のアンフェタミン類を反復ないし持続投与すると黒質線条体ドーパミン・ニューロンに対する毒性が顕著に現われ、線条体のTH活性は低下することが知られている (2, 3) 。そこでアンフェタミン類がTHに及ぼす影響をより詳しく検討するため、MAP中等量 (5mg/kg) を慢性投与したラットの脳組織を用い、*in situ* hybridization および Northern blot analysis によってTH mRNAレベルを測定した。

[方法]

生後7週齢のSprague-Dawley 系雄性ラットを1週間ハンドリングの後、MAP (5 mg/kg/ml i.p.)または生理食塩水を14日間連日投与した。各回投与後に行動を観察し、Dougherty とEllinwood (4) の異常行動評価尺度に従って評価した。投与終了後、1週間の休薬期間後に断頭屠殺。*in situ* hybridization では、断頭後速やかに全脳を摘出しドライアイス粉末中で凍結、−20℃のクライオスタット内で12 μm厚の切片を作製。THのcDNA を鋳型とする *in vitro* transcription 法によってジゴキシゲニン-UTP を取り込ませて作製した、非放射性RNA プローブを用いてハイブリダイズさせ、抗ジゴキシゲニン抗体-アルカリフォスファターゼによる発色反応でシグナルを検出した。Northern hybridization 法(各 n=7)では、断頭後速やかに中脳腹側を切り出しAGPC法(5)によってRNAを抽出、アガロース・ゲル電気泳動で分離した後、ナイロン・フィルター上にキャピラリー・トランスファーし、THのcDNAを鋳型とするランダム・プライム法によって作製した^{32}P標識DNAプローブを用いてハイブリダイズさせ、X線フィルムに1-2週間感光させた。得られたシグナルをデンシトメーターで定量化した後、*t*-検定によって統計学的比較を行った。

［結果］

MAP投与群は各回投与後に常同行動を主体とする異常行動を示し、投与反復とともに異常行動は増強した。*in situ* hybridization の結果、TH mRNA シグナルはドーパミン系の細胞体が局在する中脳の黒質・腹側披蓋野に限局して認められ、MAP投与群では生食対照群と比較して明らかな減少傾向を示した（図1-a,b）。これを定量的に確認するため中脳腹側組織からRNAを抽出してNorthern blot analysisを行った結果、MAP群のTH mRNAシグナルは生食対照群と比較して約37%の低下を示したが、統計学的に有意ではなかった（p=0.053, 図2）

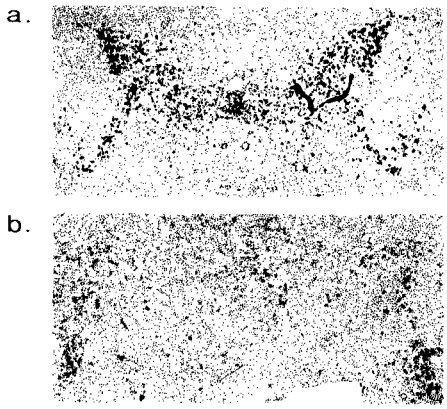


図1. *In situ* hybridization (中脳水平断)
a. 生食対照 b. MAP投与動物

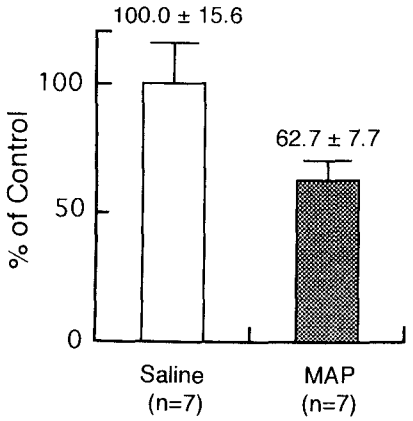


図2. Northern blot analysis
(mean ± SEM)

［考察］

本研究の用量域と投与スケジュールでは通常MAPは逆耐性現象を惹起するものとされ、本実験でも異常行動の逐次増強が認められた。同じ用量域のMAP反復投与（MAP 6 mg/kg、14日間）で、Toruらは中脳辺縁系のTHのVmax増大を報告しており（1）、逆耐性現象におけるドーパミン過活動の機序としてTHの活性亢進が想定される。しかしながら本研究の結果、THのmRNAレベルは、MAP反復投与によってむしろ減少傾向を示した。従って、逆耐性現象におけるTH活性の亢進に関しては、TH遺伝子の転写促進以外の機序を考慮する必要がある。また近年、アンフェタミン類の低用量持続投与によって新線条体のドーパミン終末のほか、外側手綱核に起始を持つ反屈束の軸索でも変性の生ずることが報告され（6）、逆耐性現象と神経毒性との関係が問題となっている。本実験で見られた TH mRNA の減少についても、ドーパミン系細胞に対するMAPの神経毒性の可能性を含めて検討する必要がある。

［謝辞］

TH の cDNA は、Colnell 大学 Dr. Donald J. Reis から供与された。

［文献］

1) Toru, M. et al. (1982) Adv. Biosciences, 37:107-121
2) Ellison, G. et al. (1978) Science, 201:276-278
3) Hotchkiss, A.J. et al. (1979) Life Sciences, 25:1373-1378
4) Dougherty, G.G. and Ellinwood, E.H. (1983) Physiol. Behav., 30:607-612
5) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem., 162:156-159
6) Ellison, G. (1992) Brain Res. 598:353-356

151 ラット脳におけるIsoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferaseの遺伝子発現 "in situ ハイブリダイゼーション法を用いて"

武田良平、溝渕睦彦、柿本泰男
(愛媛大学医学部精神神経医学教室)

〔要約〕
Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase(PIMT)は、広く哺乳類に存在し、脳、睾丸と赤血球に酵素活性が高く、ノーザンブロット分析でも本酵素の遺伝子は、脳と睾丸に強く発現している。そこで、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、PIMT遺伝子発現のラット脳での局在性を分析した。脳と睾丸以外での組織では、反応はほとんど認められなかった。脳では、神経細胞に特異的に反応が認められた。海馬のCA1およびCA3領域の錐体細胞層に主に局在し、大脳皮質では各層に散在していた。しかし、被殻尾状核には反応はほとんど認められなかった。

[はじめに]
細胞内の蛋白は、老朽化に伴いラセミ化やアイソマー化し、本来の機能および構造蛋白の性質を失う。PIMTは、蛋白のラセミ化やアイソマー化により生じたL-イソアスパラギン酸やアスパラギン酸残基のβ-カルボキシル基をメチル化させる酵素である。この反応でメチル化を受けた蛋白は、自然に脱メチル化され元の正常蛋白にもどる。従って、本酵素(PIMT)は老化蛋白を修復する作用があると推定されている。
われわれは、現在までラットの脳と睾丸でのcDNA構造の相違、成長加齢に伴う酵素活性やRNAレベルの変化を分析してきた[1]。今回、脳における本酵素の遺伝子発現の局在をin situ ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。

[方法]
動物は、生後5ケ月のWistar系雄ラットを用い、摘出した各組織は凍結切片とした。プローブは、既報のラット脳cDNA配列[1, 2]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を避け、しかもalternative splicingを受けないと推定される部位を選んだ[3]。制限酵素部位を付加したプライマー(sense primer; 5'-GGAGAATTCGGAAGATTGATATTGCC-3', antisense primer; 5'-GGAGAGCTCTGGACCACTGCTTTTC-3')を合成し、ラット脳からRT-PCR増幅した。ゲル精製したPCR産物を制限酵素で切断後、Bluescript KSに挿入しプラスミド精製した。digoxigenineラベルのセンスとアンチセンスプローブ(146 nt)は、それぞれT3, T7 polymeraseで合成した。ハイブリダイゼーション、抗体反応や発色反応は、既報の方法に従い行なった[4]。

[結果と考察]
脳と睾丸以外での組織では、反応はほとんど認められなかった。脳では、神経細胞に特異的に反応が認められた。図1. に示しているように、海馬のCA1およびCA3領域の錐体細胞層に主に局在し(1-A)、大脳皮質では各層に散在していた(1-C)。しかし、被殻尾

状核には反応はほとんど認められなかった。この結果は、ノーザンブロット分析の分布とほぼ一致している。さらに、PIMTの推定されている機能である老朽化蛋白修復作用との関連において、本酵素の遺伝子発現が神経細胞に特異的であることは興味深い。

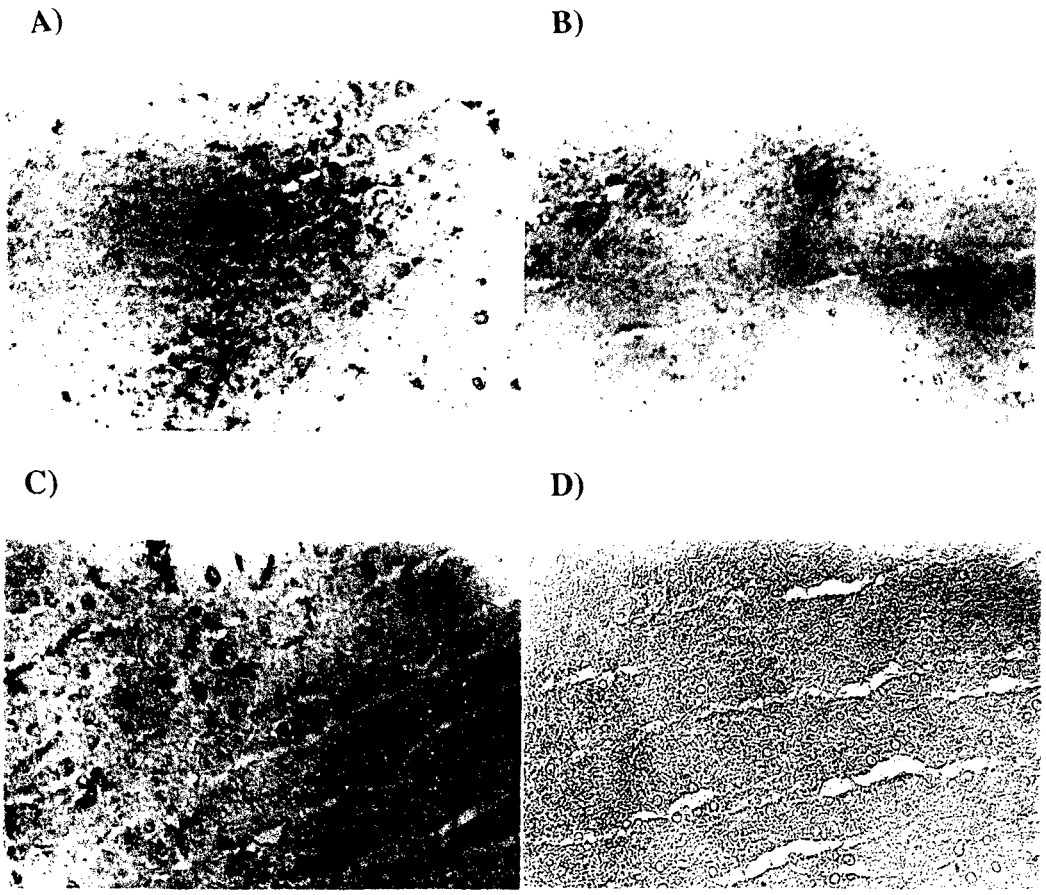
[謝辞]

in situ ハイブリダイゼーション法を御指導して下さった、愛媛大学医学部第二解剖学教室の先生方に深謝致します。

[文献]

1. Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R. and Kakimoto, Y. (1994) J. Neurochem. 62, 322-8.
2. Sato, M., Yoshida, T. and Tuboi, S. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 342-7.
3. Henzel, W.J., Stults, J.T., Hsu, C.A. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15905-11.
4. 野村慎太郎と稲澤譲治. (1994) 細胞工学. 別冊9. 脱アイソトーププロトコール.

図1、PIMT のラット脳における in situ hybridization
A)B)は、海馬、C)D)は、大脳皮質である。
A)C)は、アンチセンス　B)D)は、センスプローブを用いた。



152 A-172 細胞におけるアルドース還元酵素の発現調節

西村千尋、桂仝
（国立小児病院・小児医療研究センター・小児薬理）

〔要約〕

糖尿病合併症発症に関与するアルドース還元酵素の発現調節機構につき、ヒトglioblastoma 由来の細胞株 A-172 を用いて検討した。高濃度グルコース、インスリン、種々の性ホルモン、fibroblast growth factor 等の存在下で本酵素蛋白の発現は変化しなかったが、高濃度NaCl 存在下では酵素蛋白の著明な発現上昇を認めた。この変化は可逆的で細胞内 mRNA の変動に対応し、NaCl をsorbitol 或いは raffinose に置き換えても認められた。

糖尿病合併症の発症機構の一つにアルドース還元酵素（AR）を介するポリオールの代謝異常が近年注目されている。本酵素はNADPH を補酵素としてグルコースからポリオール（sorbitol）を生成する酵素であるが、その生理的役割は腎臓髄質で尿濃縮に関わるオスモライトとしてのポリオール生成(1)以外、未だ不明である。最近我々は新しいイムノアッセイ法を用いた解析でヒト組織でのAR 発現に個体差があり、糖尿病患者で高値を示す例が多いことを見出した（2,3)。そこで今回糖尿病病態におけるARの個体内発現の変動の可能性につき培養神経系細胞にて検討を加えた。

方法

ウシ胎児血清(FCS) 0-10% 添加DMEM培地にてA-172を培養し、種々の生理活性物質を添加して一定時間後細胞可溶画分のAR蛋白量をイムノアッセイにて測定した。また細胞よりtotal RNAを抽出し、ヒトAR 及び glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAをプローブとしてノザンブロットによりARのmRNA変化をイメージアナライザーにて定量的に解析した。

結果と考察

グルコース（30mM）、インスリン（human recombinant,1μM）、testosterone (200ng/ml)、β–estradiol (10ng/ml)、progesterone (10 ng/ml)、FSH (porcine, 150ng/ml)、LH (equine, 20I.U./ml)、prolactin (sheep, 100ng/ml)、fibroblast growth factor (acidic, human recombinant, 10ng/ml) をそれぞれ添加して4時間から168 時間培養し、A-172細胞におけるAR蛋白発現量を測定したが、いずれについても有意の変化を認めなかった。

一方150 mMのNaClを含むDMEMに10 % FCSを添加した培地ではA-172の細胞内AR量は24時間後より有意に増加し、120-168 時間後にほぼプラトーに達した

（図１）。高濃度NaCl 添加培地にて120 時間培養した細胞を再び通常培地に戻すとAR 発現量は減少し、この 発現の変化は可逆的であることが明らかとなった。

A-172 におけるAR の発現増加は添加NaCl 濃度7 5 m M でも認められ、またNaCl を 125-250 mM の sorbitol 或いは raffinose に置き換えても認められたことから、細胞外浸透圧の上昇によりもたらされることが示唆された。さらにこのAR酵素量の変化を mRNA レベルで解析したところ、細胞内 AR mRNA は150 mM NaCl 存在下24 時間で約10 倍、120 時間で約42 倍に上昇し、以後低下した（図2）。

A-172 に見出されたこのような浸透圧によるAR の発現調節は、同じくAR を発現し神経系細胞由来とされるIMR-32 には認められなかったが、肝臓由来の細胞株Chang Liver では認められた。糖尿病合併症発症に関わるAR の合併症発症組織における酵素蛋白発現調節機構の解明は、今後の重要な検討課題と考えられる。

文献

1. Bagnasco,S., Uchida,S., Balaban,R., Kador,P., and Burg,M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **8 4**, 1718-1720
2. Nishimura,C., Saito,T., Ito,T., Omori,Y., and Tanimoto,T. (1994) *Diabetologia* **3 7**, 328-330
3. Nishimura,C., Hamada,Y., Tachikawa,T., Ishikawa, T., Gui,T., Tsubouchi,J., Hotta,N., Tanimoto,T., and Urakami,T. *Clin. Chem.*, in press.

図 1

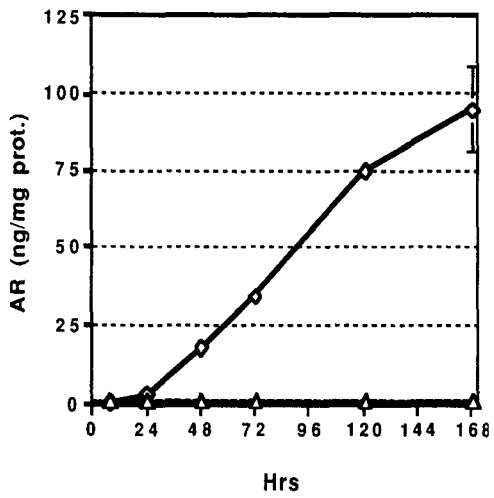
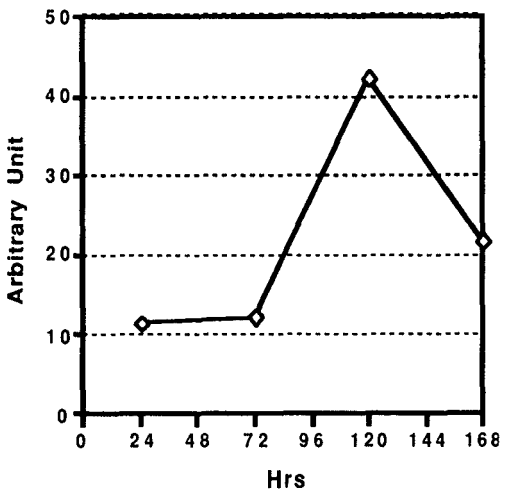


図 2



△-△ A-172 in control medium

◇-◇ A-172 in the medium supplemented with 150 mM NaCl

153 Artifactを利用したCompetitive PCR "脳下垂体の蛋白メチル化酵素mRNAの定量化"

佐藤誠　溝渕睦彦*　武田良平*　村尾孝児　高原二郎
(香川医科大学第一内科、*愛媛大学神経精神医学)

〔要約〕

PCRは、微量のDNAやRNAから目的の遺伝子を増幅することができるが、一般的に定量性に乏しい。しかし、Competitive PCRの開発により、目的のDNAやRNAの定量化が可能となっている。この方法は、同じプライマーで目的のDNAやRNAと長さが違うか、あるいは同じ長さでも塩基配列が異なるPCR産物(Internal standardまたはCompetitor)を同時に競合増幅させ定量する方法である。現在まで、Internal Standardの作製方法は幾つか報告されているが、煩雑で長時間を要する。今回われわれは、PCRでArtifactの産物を作りInternal Standardとして利用する方法を確立し、脳下垂体の蛋白カルボキシメチル化酵素(Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase; PIMT)mRNAの定量化を試みた。

[はじめに]

PCRを遺伝子定量に応用する場合の問題点は、幾つかある。しかし、適切なDNA断片の長さや至適サイクル数で、しかも同じプライマーを用いての競合増幅はかなりの定量性を示す[1, 2]。従って、目的遺伝子と同じプライマーで増幅可能であり、しかも適切な長さのInternal Standardを作成する事が重要となる。現在まで、Internal Standardの作成方法は幾つか報告されているが、煩雑で長時間を要する[3, 4]。今回われわれは、PCRで人工的にArtifactを作りInternal Standardとして利用する方法を確立した。しかも、用いたそれぞれのプライマーにrestriction siteを付加し、プラスミドに挿入しRNAを作り(cRNA)、逆転写時の効率も一定にした。

[方法]

用いたプライマーは(sense primer; 5'-GGAGAATTCGGAAGATTGATATTGCC-3', antisense primer; 5'-GGAGAGCTCTGGACCACTGCTTTC-3')で、ラットのPIMTのcDNA配列[5]から選び、それぞれにrestriction siteを付加した。Artifactバンドの作成は、ラットのgenomic DNAを鋳型にし、最初の10サイクルは37 Cと低いアニーリング温度で増幅した後、続いて51 Cで30サイクル増幅した。Bluescript KSに挿入後、制限酵素で直線化し、T7 RNA polymeraseでcRNAを作成しDNase処理後、Chomczynskiらの方法[6]でRNA抽出した。ラット下垂体のtotal RNAも同様の方法[6]で抽出した。cDNAは、これらのRNAからランダムプライマーで逆転写し得た。サザンブロット分析のプローブはantisense primerを^{32}Pで末端ラベルし、シグナルの強さは、BAS1000で分析した。

[結果と考察]

図1-A)にプロトコールをまとめた。最も重要な点は、増幅されたArtifactが両方のプライマーから増幅されている事である。確認のために、同じPCR条件で、一方のプライ

マーのみでPCRを行なった結果と比較した[図1-B); lane 1-3]。目的のArtifactと本来増幅される遺伝子のバンドをゲル精製した[図1-B); lane 4&5]。このInternal Standardを用いて、脳下垂体のPIMTmRNAのCompetitive PCRを行なった。図2に示されているように、RNA濃度を変えても比較的うまく競合増幅している。

[文献]

1. Piatak, M., Luk, K-C. et al. (1993) BioTechniques 14: 70-80.
2. Siebert, P.D. and Larrick, J.W. (1993) BioTechniques 14: 244-249.
3. Heuvel, J.P.V., Tyson, F.L. et al. (1993) BioTechniques 14: 395-398.
4. Forster, E. (1994) BioTechniques 16: 18-20.
5. Mizobuchi, M., Murao, K. et al. (1994) J. Neurochem. 62: 322-328
6. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162: 156-159

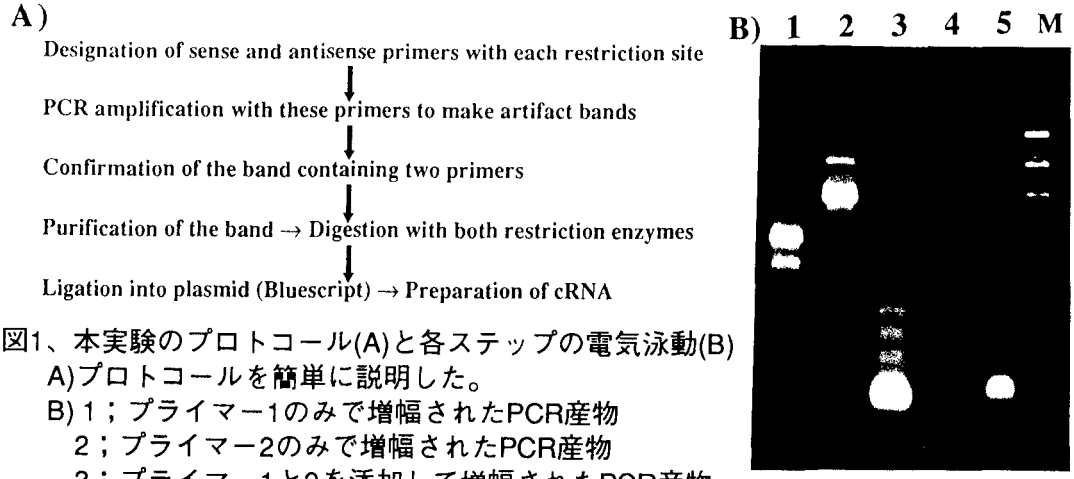
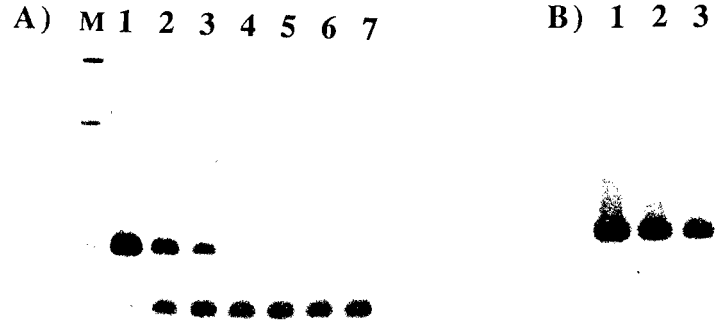


図1、本実験のプロトコール(A)と各ステップの電気泳動(B)
A)プロトコールを簡単に説明した。
B) 1；プライマー1のみで増幅されたPCR産物
2；プライマー2のみで増幅されたPCR産物
3；プライマー1と2を添加して増幅されたPCR産物
4；ゲル精製後のArtifactバンド
5；本来増幅されるべきバンド M; Molecular Marker

図2；脳下垂体蛋白メチル化酵素mRNAのcompetitive PCR
A)0.4μg total RNAから逆転写し、1ng～10fgまでのcRNAを用いた（10倍希釈）
B)0.05μg total RNAから逆転写し、1ng～10fgまでのcRNAを用いた。



154 トランスジェニックマウスにおけるCCK遺伝子の発現解析

伊藤 康宏[1,2]、 石橋 晃[1]、 花岡 和則[3]、 桑野 良三[2]
（新潟大 農 畜産[1]，同 遺伝子実験施設[2]，北里大 理 生物[3]）

【要約】
生体内に於けるCholecystokinin(以下CCKと略)量の増減は、遺伝子からの転写段階で制御されている。CCKの個体レベルで遺伝子発現を観察するためにトランスジェニックマウスの作出を試みた。CCK遺伝子の組織特異的発現を規定すると思われる5'上流域を含む2.4Kbpにレポーター遺伝子としてβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)を用いた融合遺伝子を作製した。lacZのN末端には内在性のガラクトシダーゼと区別するための核移行シグナル(NLS),translation stop sequence,動物細胞における翻訳開始のconsensus sequenceを挿入した。この融合遺伝子をB6C3HF1マウス受精卵の雄性前核に顕微注入した後、偽妊娠状態のICRマウスの卵管に移植してトランスジェニックマウスを作出した。今回、移植した1230個の受精卵より164匹が生まれ、その内の7匹が導入した遺伝子を含むトランスジェニックマウスであった。

【目的】
大脳皮質と上部小腸に局在するCCKペプタイドの生理機能を解析するため、我々は今までにCCK cDNAと遺伝子をクローニングしmRNAの脳内分布、発育に伴う変化、及び脳核抽出液を用いた無細胞転写系による発現調節の研究を行なってきた[2,4,5,6]。本研究においてはマウスの発育に伴う脳・腸におけるCCK遺伝子の発現時期、ならびに摂食行動に伴って中枢神経系と上部小腸に於けるCCK遺伝子発現がどのように対応しているかを観察できるマウスを作出し解析する。

【方法・結果】
導入遺伝子の作製　　レポーター遺伝子としてβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)を用いた。lacZの8アミノ酸残基欠失しているpMC1871(Pharmacia)のN末端に核移行シグナル(NLS)を挿入した。さらに、NLS lacZの5'端に人工合成したtranslationstopsequence,動物細胞における翻訳開始のconsensus sequence (Kozak)[3]、を結合したベクターを試作した。

培養細胞への遺伝子導入　　1×10^5個のC6細胞を35mm dishに蒔き5%,37℃で一晩培養し、4μgのプラスミドDNAをChen-岡山法[1]によるトランスフェクション後60時間培養後、X-galを用いてlacZ活性の染色を行った。X-galで細胞核が染色され内在性のガラクトシダーゼ活性と区別できるNLSの効果が確認された。プロモーターを持たないベクターのみでも*lacZ*の発現が観察された。これはプロモーター以外からの転写による*lacZ*の発現と思われたのでSV40由来poly A addition sequenceをプロモーターの

上流に挿入した。これにより図1に示す様に*lacZ*の発現が抑えられた(pNuLacZ)。このベクターを用いれば解析したい遺伝子のプロモーター活性測定に効果的であることがわかった。MMLVのプロモーター(pNuMoLacZ)に比較して弱いがCCK上流2.4Kbp(pCCKNuLacZ)のプロモーター活性が認められたので個体に導入した場合においても十分なプロモーター活性を示すものと思われる。

トランスジェニックマウスの作出　　CCKプロモーターを挿入したベクターを直鎖状に制限酵素処理し、B6C3HF1マウス受精卵の雄性前核に顕微注入した後、偽妊娠状態のICRマウスの卵管に移植してトランスジェニックマウスを作出した。移植した1230個の受精卵より164匹が生まれ,Southern分析の結果［図2］7匹が導入した遺伝子を含むトランスジェニックマウスであった。今回のトランスジェニックマウスの出生率は他の報告と同程度であった。(得られた7系統に於て順次F1,F2を交配中)。

【考察】

CCKに対する抗体を用いた免疫組織化学実験では、体内に蓄積しているCCKにも反応する。CCK mRNAに対するin situ hybridizationにおいても、検出感度などの要因により細かな細胞レベルでの観察は難しい。今回、トランスジェニックマウス作出が成功したことにより、組織切片におけるCCK遺伝子の発現の解像度が増し、摂食、外界からの刺激によって誘導されるCCK遺伝子を選択的に観察することが可能となる。



図 1　Transient expression of *LacZ* gene

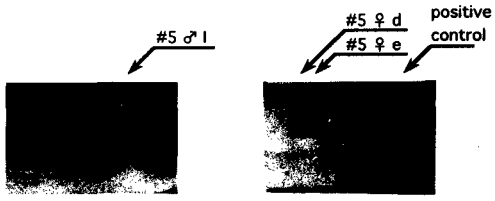


図 2　PCR-Southern blot analysis of mouse genomic DNA

【文献】

1 Chen, C., and Okayama, H., (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7** , 2745-2752
2 Hasegawa, M., Usui, H., Araki, K., Kuwano, R., and Takahashi, Y., (1986) *FEBS Lett.* **194** , 224-226
3 Kozak, M., (1989) *J. Cell Biol.*, **108** , 229-241
4 Kuwano, R., Araki, K., Usui, H., Fukui, T., Ohtuka, E., Ikehara, M., and Takahashi, Y., (1984) *J. Biochem.* **96** , 923-926
5 Kuwano, R., Araki, K., Usui, H., Suzuki, Y., and Takahashi, Y., (1992) *J. Neurochem.* **58** , 304-310
6 Takahashi, Y., Kuwano, R., Usui, H., Araki, K., Hasegawa, M., and Suzuki, Y., (1989) *Arch. Histol. Cytol.* **52** , 63-68

155　蛋白リン酸化酵素阻害薬の培養神経細胞移動に及ぼす影響

小林　聡[1,2]、林　謙介[1]、伊佐かおる[1]、井上　洋[2]、大江千廣[2]、白尾智明[1]
([1]群馬大学医学部行動分析学、[2]同脳神経外科学)

〔要約〕

小脳顆粒細胞の再凝集塊を用いた培養系において、神経細胞移動を再現し、これに対する蛋白リン酸化酵素阻害薬の影響を解析した。蛋白リン酸化酵素阻害薬K252aを培地に添加後、神経細胞移動は有意に阻害され、顆粒細胞の形態が小型紡錘形から大型不整形へと敏速に変化した。免疫細胞化学的検索により、顆粒細胞内のF-actinの局在の変化が明らかとなった。以上の所見から、神経細胞移動において、マイクロフィラメント系の細胞骨格が重要な役割を果たしていることが示唆された。

［目的］中枢神経系の発生過程において、神経細胞の移動がみられる。我々は、小脳顆粒細胞の再凝集塊を用いた培養系において、細胞移動を再現し、細胞移動のメカニズムの解明を試みてきた[2)]。今回、我々はこの実験系において、蛋白リン酸化酵素阻害薬の細胞移動に対する影響を解析した。

［方法］生後２日目のラット小脳より、単離小脳顆粒細胞を得、これを約12時間培養し、再凝集塊を形成させた[1)]。これを、ラミニン塗布カバーグラス上にて培養した。培地は、ホルモン添加無血清培地を用い、これに蛋白リン酸化酵素阻害薬K252a(1-200nM)あるいはH-7(20-200μM)を添加し、12時間培養後、再凝集塊からの突起伸展と細胞移動の状態を位相差顕微鏡下に観察し、ホルマリン固定後、免疫細胞化学的に検索した。

［結果］（１）これまで報告されてきたように[3、4)]、ラミニン塗布カバーグラス上では、再凝集塊からの突起伸展とこれに伴う細胞移動が認められた。（２）培地にH-7あるいはK252a添加時に、再凝集塊からの細胞移動が阻害された。培地からK252aを除去すると、可逆性に突起伸展と細胞移動が再開した。（３）突起伸展と細胞移動の関係を明らかにするために、我々は、突起の長さの半分を越えて移動した細胞の割合を、migration indexと定義した。コントロールとH-7のanalogueであるHA1004では、このindexはほぼ一定であり、このindexが突起伸展に対する細胞移動の状態をよくあらわしていると考えられた。コントロールに比べ、H-7あるいはK252a添加時では本指数が低下し、突起伸展に関わらず細胞移動が阻害されたことを示している(Fig. 1)。特に、K252a添加時に本指数が著明に低下した。（３）免疫細胞化学的検索を行い、細胞の形態と細胞骨格系の変化について検討した。コントロールにおいては、小型紡錘形の細胞が大部分を占め、これらは突起上に存在していた。小型紡錘形の細胞においては、F-actinとdrebrinとは共に細胞膜近傍に局在していた。K252aを添加すると、１～２分間で、顆粒細胞の形態は大型化し、filopodia様の突起を多数持った扁平不整形の細胞となった(Fig. 2)。この細胞では、F-actinは細胞質内にstress fiber様に線維状に存在しており、また、drebrinは細胞質内にび漫性に存在していた。Filopodia様突起にはF-actinが存在したが、drebrinはその基部にのみ存在した。β-

tubulin, MAP2, neurofilament に対する抗体を用いた免疫染色では、小型紡錘形細胞から大型不整形細胞への変化において、これらの細胞骨格形の変化は明らかでなかった。

［考察］コントロールにおいて大部分を占める小型紡錘形の細胞は、突起上に存在しており、移動中の細胞と考えられた。一方、K252aを添加後にみられた大型不整形の細胞は、停止している細胞と思われた。これら大型の細胞では、F-actinとdrebrinとが解離していたことから、drebrin非結合型のアクチンフィラメントの出現が細胞移動の停止と関係あるのではないかと考えられた。

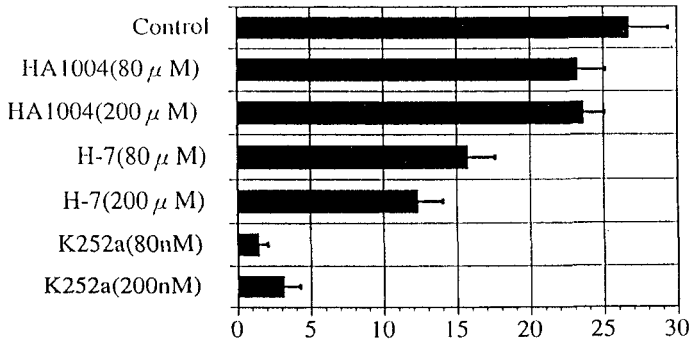


Fig. 1
Migration index(培養開始12時間後、突起の長さの半分以上移動した細胞数の全移動細胞数に対する割合)

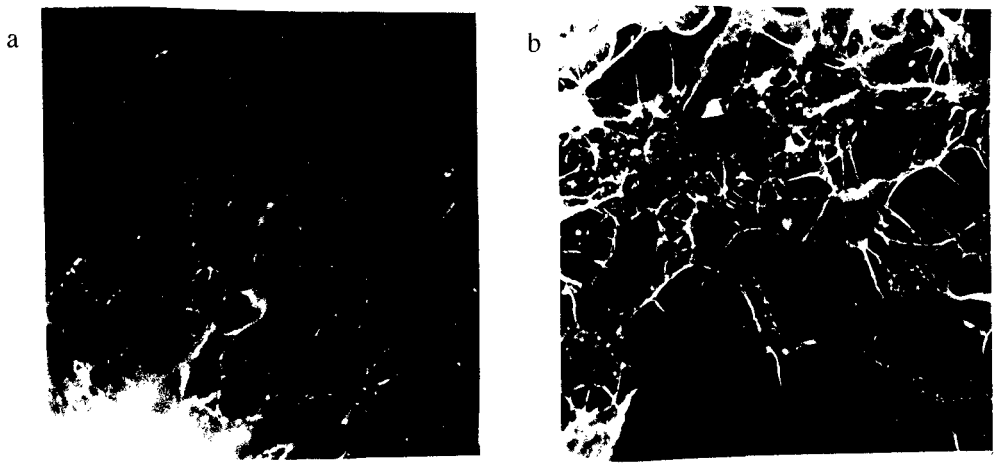


Fig. 2 細胞形態の変化 (Rhodamine-phalloidin)
a:コントロール　b：K252a添加時

［文献］

1) H. Asou, et al : Cell adhesion molecule L1 guides cell migration in primary reaggregation cultures of mouse cerebellar cells, Neurosci. Lett., 144: 221-224, 1992
2) S. Kobayashi, T. Seki and T. Shirao : Analysis of cerebellar granule cell migration in vitro, Neurosci. Res. Suppl. 18 : S122, 1993
3) I. Nagata and N. Nakatsuji : Granule cell behavior on laminin in cerebellar microexplant cultures, Dev. Brain Res., 52: 63-73, 1990
4)N. Nakatsuji and I. Nagata : Paradoxical perpendicular contact guidance displayed by mouse cerebellar granule cell neurons in vitro, Developement, 106: 441-447, 1989

156 ジーントラップ法により同定された遺伝子GT1のマウス脳における発現

今井祐二[1]、鈴木豊[1,3]、松井崇裕[3]、和中明生[2]、遠山正彌[2]、高木勉[1]
（大阪大学医学部・分子脳機構（田辺）寄付講座[1]、第二解剖[2]、田辺製薬生化研[3]）

〔要約〕
マウス胚性腫瘍細胞P19は高濃度のレチノイン酸（RA）で処理することによって神経系の細胞に分化することが知られている。われわれは神経細胞の分化を制御する分子機構を研究する目的で、レポーター遺伝子（β-ガラクトシダーゼ；lacZ）を含むジーントラップベクターをP19細胞に導入した。導入した細胞を分離し、RA誘導後のlacZの発現をモニターした。その結果、RA誘導後lacZの発現量が変化するクローンをいくつか見いだした。これらのクローンの一つ、No.1はRA誘導後lacZの発現が顕著に上昇する。No.1クローンにおいてトラップされた遺伝子由来のcDNA(GT1 cDNA)をクローニングした。GT1 cDNAは全長約9000bpで1840アミノ酸からなるオープンリーディングフレームが存在した。ホモロジー検索では既知遺伝子との相同性は認められなかった。GT1タンパクにはシグナルペプチドはなく、3ヶ所のN-グリコシレーション部位およびグリコサミノグリカン結合部位が1ヶ所存在した。マウス脳でのmRNA発現部位をin situ ハイブリダイゼーションで調べた結果、神経細胞特異的な発現が認められた。また、ペプチド抗体を用いた免疫組織化学でも神経細胞特異的な発現が認められた。以上のことから、脳でのGT1の発現は神経細胞特異的であることが示唆された。

〔緒言〕
神経細胞では、その分化や生存に関与する因子として神経成長因子（NGF）などいくつかのものは既に知られているが、これら既知の因子以外にも神経細胞の分化あるいは成長に関与する因子が数多く存在することが予想されている。マウス胚性腫瘍（EC）細胞P19は、RAやジメチルスルホキシド（DMSO）で処理すると様々な細胞に分化することが知られている(4,5)。たとえば、P19細胞は高濃度（1μM）のRAで処理すると神経系の細胞に分化する(1,2)。EC細胞をモデルとして、神経系細胞の分化を制御する分子機構を解明しようという試みが数多くなされている(5)。われわれは、神経細胞の分化モデルとしてP19細胞を用い、RA誘導後発現量が変化する遺伝子をジーントラップ法で単離した。
今回、これらのうちRA誘導後一過性に発現誘導される遺伝子GT1を単離し、解析したので報告する。

〔方法〕
ジーントラップ法：レポーター遺伝子（lacZ）およびneo耐性遺伝子を含むジーントラップベクターU2(3)を制限酵素XbaIで線状化したのちエレクトロポレーション法でP19細胞に導入し、neo耐性クローンを選択した。得られたクローンをRA処理し、lacZの発現をX-gal染色で調べた。
トラップ遺伝子の単離：トラップされた遺伝子の5'側染色体DNAをプラスミドレスキュー法で、また、トラップされた遺伝子とlacZの融合転写産物から、トラップ遺伝子由来cDNAの一部をlacZをプライマーとした5'-RACE法でそれぞれ回収した。
In situ ハイブリダイゼーション：GT1 cDNAの一部（約500bp）をpBluescriptにサブクローニングし、DIGラベルしたcRNAプローブを作製した。ハイブリダイゼーションシグナルの検出はアルカリフォスファターゼ発色で行った。
免疫組織化学：GT1タンパクの676～690番目に相当するペプチドを合成し、これを用いてウサギを免疫した。得られた抗血清からペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーでペプチド抗体を精製した。免疫反応は一次抗体としてアフィニティー精製したペプチドを用い、FITC標識した二次抗体で検出した。

〔結果と考察〕

ジーントラップ法で得られたクローンNo.1は、RA処理によりlacZの発現が顕著に上昇した。このクローンにおけるジーントラップベクター挿入先の染色体DNAおよびcDNAの一部をそれぞれプラスミドレスキュー法、5'-RACE法で回収した。回収したトラップ遺伝子の一部をプローブとして完全長のcDNAを取得した。GT1 cDNAは全長約9000bpで1840アミノ酸からなるオープンリーディングフレームが存在した。GT1タンパクにはシグナルペプチドはなく、N-グリコシレーション部位とグリコサミノグリカン結合部位が存在した。このことから、GT1タンパクはプロテオグリカンコアプロテインの一種である可能性が示唆された。

マウス脳におけるGT1 mRNAの発現部位をin situ ハイブリダイゼーションで調べた結果、GT1mRNAの発現は神経細胞特異的であった（図1）。また、ペプチド抗体を用いた免疫組織化学でGT1タンパクの発現部位を調べたところ、タンパクの発現も神経細胞特異的であった

ノーザンブロットにより、マウス臓器および脳の発生過程におけるGT1 mRNAの発現を調べたところ、調べた臓器では発現量に差はあるもののいずれにも発現が認められた。また、脳の発生過程での発現は一定であった。

以上のことから、GT1の発現は脳特異的ではないが、脳での発現は神経細胞特異的であることが判った。

〔文献〕

(1). Jones-Villeneuve, E.M.V., McBurney, M.W., Rogers, K.A., and Kalmins, V.I. (1982) J. Cell Biol. 94, 253-262.

(2). Jones-Villeneuve, E.M.V., Rudinicki, M.A., Harris, J.F., and McBurney, M.W. (1982) Mol. Cell Biol. 3, 2271-2279.

(3). Niwa, H. et al. (1993) J. Biochem. 113, 343-349.

(4). Rudinicki, M.A., and McBurney, M.W. (1987) IRL Press 19-49.

(5). Sleigh, M.H. (1992) BioEssays 14, 769-775.

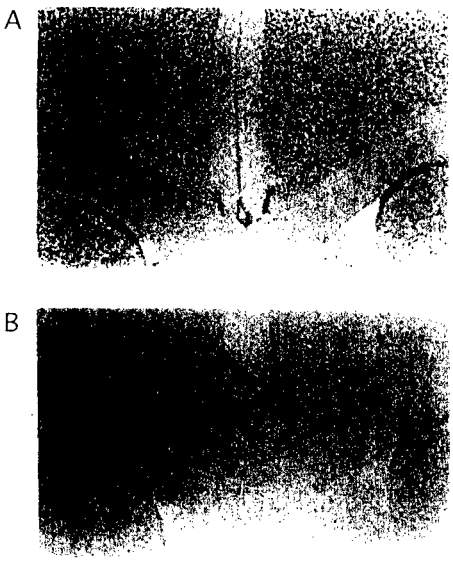


図1. In situ ハイブリダイゼーション
A. antisense プローブ
B. sense プローブ

157 ラット胎仔の神経系におけるニューロカンの分布と発達に伴う変化

仙波りつ子、渡辺英治、大平敦彦
（愛知県コロニー・研究所）

〔要約〕
胎生10.5日齢から15.5日齢までのラット胎仔を用いて、ニューロカンの分布をモノクローン抗体1G2を用いて調べた。さらに、知覚神経節の軸索形成とニューロカン出現との関連性についても検討した。まず、胎生13.5日齢のラットで1G2抗体による染色部位を検討した。その結果、脳では、延髄の翼板、後脳、間脳および終脳外部に接したmarginal layerとの境界部分に、脊髄では、boundary capおよびroof plateに染色が見られた。boundary capにおける染色は胎生12.5日齢から観察され、13.5日齢でその反応性は最大となり以後減少した。roof plateにおける染色は、胎生13.5日齢から観察され胎生14.5日齢で強くなった。後根神経節は、胎生12.5日齢頃神経節としての形態が観察されるようになり、求心性の軸索は13.5日齢までにboundary capに達していた。軸索とboundary capの接点における1G2抗体の染色性は、胎生13.5日齢以降いずれも低く、軸索が脊髄内を伸張する14.5日齢頃には、roof plateの1G2抗体による染色性が高くなった。さらに、胎生13.5日齢の脊髄とboundary capを含む組織のWestern blottingから、1G2陽性物質が、ニューロカンであることが立証された。以上の結果から、ニューロカンは、後根神経節の軸索形成時期および部位に出現することがわかった。このようなニューロカンの時間的、空間的出現およびPC12D細胞に対する突起形成阻害作用を考えあわせると、ニューロカンは後根神経節の軸索伸長の障壁として作用し、軸索の方向性を決定している思われる。

私達は、ニューロカンを含む脳のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンがPCD12細胞の突起形成および細胞増殖を阻害することをすでに明らかにした(1,2)。PC12細胞は知覚および交感神経節のモデル細胞であるので、PC12細胞に観察されたような現象が生体でみられるかどうかを検討したところ、ニューロカンが後根神経節の軸索形成に関与することを示唆する結果を得た（3）。そこで、今回、軸索形成の様子とニューロカンの出現時期および部位を加齢を追って検討したので報告する。

［実験方法］胎生10.5日齢から15.5日齢のラット胎仔をブアン溶液あるいはパラホルムアルデヒドで固定した。ブアン固定した胎仔は、パラフィン包埋後厚さ10 μmの切片にし、パラホルムアルデヒド固定した胎仔は、ビブラトームで厚さ50-100 μmの切片にして使用した。DiIによって後根神経節の軸索をラベルした胎仔は30℃で約一カ月incubateした後厚さ50 μmの切片にした。Western blotting：胎生13.5日齢のラット胎仔から脊髄およびboundary capを含む部分を取り出し、PBSでホモゲナイズし、27,000g、30分遠心後、上清と沈査にわけた。それぞれの半量はコンドロイチナーゼ処理をして、残りの半量は未処理のままSDS-PAGEに供した。PVDF膜に転写後、1G2抗体(4)と反応させ、ABC法により検出した。

［結果および考察］まず、ニューロカンの抗体である1G2を用いて、胎生13.5日齢のラット胎仔を免疫染色した。神経管内の染色を除くと、1G2抗体の染色部位は非常に限られており、脳では、延髄の翼板、後脳の翼板および基底板、間脳（将来の視床）および終脳（新皮質）外部

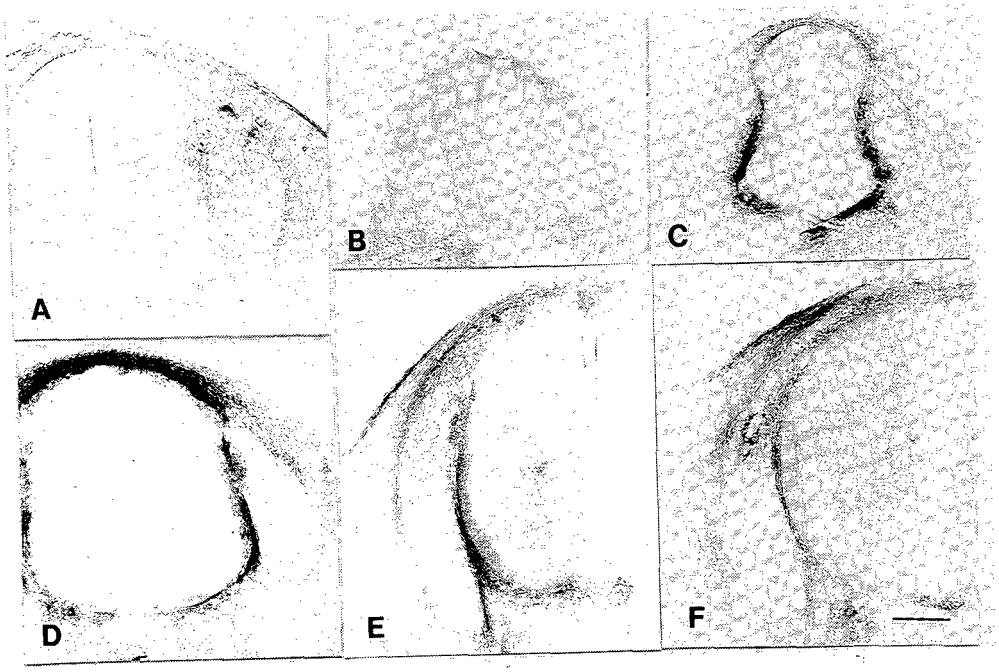


Fig. Developmental changes in the appearance of neurocan in the boundary cap and in the roof plate of spinal cord of rat embryo. A , a control section at embryonic day 13.5; B, C, D, E and F, sections stained with MAb 1G2 at embryonic days 11.5, 12.5, 13.5, 14.5 and 15.5, respectively. Bar, 200 μm.

に接したmarginal layerとの境界部分にみられた。また、脊髄では、脊髄外部に接した部分（boundary cap）とroof plateに1G2抗体の染色が観察された。次に、脊髄周辺における1G2抗体の染色部位を加齢を追って調べた。boundary capの染色は胎生12.5日齢以前には観察されなかった。その後、1G2抗体の染色性は胎生13.5日齢まで増加し、その後減少した。一方、グリアの障壁の出現するroof plateでは、胎生13.5日齢より1G2抗体による染色が観察されはじめ、その染色性は14.5日齢後ではboundary capより強かった。後根神経節は胎生12.5日齢ごろその神経節としての形態が明らかになり、それ以前には観察されなかった。DiIで後根神経節の軸索をラベルしたところ、求心性の軸索は13.5日齢までにboundary capに到達し、その後脊髄に侵入することがわかった。1G2抗体は胎生12.5日齢のboundary capをほぼ一様に染色したが、胎生13.5日齢以降では、軸索の接する部分を染色しなかった。Western blottingにより、胎生13.5日齢のラットの脊髄とboundary capを含む部分のPBS可溶性画分にプロテオグリカンと思われる物質が検出された。コンドロイチナーゼ処理後、220および150 kDaのバンドが検出できることから、boundary capに局在する1G2染色性のプロテインはニューロカンであることがわかった。これらの結果は、後根神経節の軸索形成時期に、ニューロカンがboundary capおよびroof plateに出現することを示している。ニューロカンが軸索形成の障壁になると考えると、ニューロカンの出現部位および時期は、後根神経節の軸索形成とちょうど相応していることをが明らかとなった。

［謝辞］本研究の一部は文部省科学研究費の援助を受けた。組織切片作成に協力いただいた当研究所、松田素子博士に感謝します。

［文献］1) Oohira A., Matsui, F. and Katoh-Semba R. (1991) J. Neurosci., 11, 822-827. 2) Katoh-Semba R. and Oohira A. (1993) J. Cell. Physiol., 156, 17-23. 3) 仙波りつ子、大平敦彦 (1993) 神経化学, 32, 52-53. 4) Oohira A, Matsui F., Watanabe E., Kushima Y. and Maeda N. (1994) Neuroscience, 60, 145-157.

158　筋由来神経突起伸長促進因子の同定

西宗裕史、田口隆久＊

（大阪大学・基礎工学・生物工学、＊通産省大阪工業技術研究所・生体分子工学）

〔要約〕　座骨神経を切断したニワトリの下腿部除神経筋の抽出液には，運動ニューロンのみならず中枢神経系の終脳神経細胞特異的に*in vitro*で神経突起伸長を促進させる蛋白質因子が含まれている。この因子の同定のため，この作用を抑制するモノクローナル抗体の作成とそれを用いたcDNAのクローニングを試みた。63kD蛋白質を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いてニワトリ脚下腿部除神経筋のcDNAライブラリーから得られたcDNAクローンをpGEX GeneFusion Systemを用いて大腸菌HB101で発現し，精製した。この精製蛋白質をニワトリ胚終脳神経細胞の初代解離培養系に投与し，突起伸長促進活性を持つことを確認した。以上よりクローン化した遺伝子にコードされる蛋白質は，神経突起伸長を促進する活性を有する。

［目的］

神経伝達を遮断された骨格筋では再神経支配を促すような様々な現象が起こる。その一つとして，運動ニューロン軸索末端発芽が促進される(1，2)。骨格筋は，運動ニューロンの軸索を誘引することにより積極的に再神経支配を起こしている。この様な作用は，骨格筋により合成される蛋白質因子の作用であることが報告されている。発生段階において運動神経細胞死を抑制する働きのある様々な神経栄養因子が報告されるようになったが(3，4)，再神経支配時の軸索伸長に注目して因子の完全な同定を行った例はない。

また非常に興味深いことにこの因子は中枢神経系の終脳神経細胞に特異的に作用する(5)。このことは脳神経系内部にも同様の，もしくは類似した因子が存在する可能性を示唆している。学習獲得に脳内シナプスの形態変化を伴う可塑性が関与している可能性があり，軸索終末での発芽現象を含む神経突起伸長は脳の高次機能の観点から重要性を増してきている。中枢神経細胞の神経突起伸長を促進する蛋白質因子，特に領野特異的にその作用を持つ因子の報告はまだない。本研究では，筋由来因子に関する研究成果を活用して中枢神経系内の終脳神経細胞に特異的に作用する神経突起伸長促進因子の同定を試みる。

［実験方法］

５日齢ヒヨコの座骨神経を部分切除して除神経し，術後３日目に除神経下腿骨格筋を摘出し(5)ホモゲナイズした。この筋抽出液をを抗原として，BALB/cマウスに腹腔内注射により免疫した。脾細胞を摘出しミエローマ（PAI）と細胞融合し，ELISAによるスクリーニングでモノクローン抗体産生細胞を調製した。

神経突起伸長促進活性測定は既報に従った(5)。５日齢ニワトリ胚終脳神経細胞の初代解離培養系に筋抽出液または精製蛋白質を投与し，培養開始２４時間後に細胞体の２倍以上の長さの神経突起を持つ細胞の割合を比較して神経突起伸長促進活性を検討した。抗体による阻害実験は，蛋白質投与時点に抗体を同時投与し先と同様の培養系により効果を検討した。

前述と同様に除神経し，術後３日目に除神経下腿骨格筋よりmRNAを精製した。このmRNAを鋳型としてoligo-dT-primer法により、cDNAライブラリーを作成した。モノクローナル抗体を用いたプラーク法によりこのcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたcDNAクローンをpGEX GeneFusion System(Pharmacia)を用いて大腸菌HB101で発現し，グルタチオン

結合セファロースカラムを用いて精製した。この精製融合蛋白質を特異的プロテアーゼで切断し，前述の初代解離培養系に投与し，突起伸長促進活性を検討した。

［結果及び考察］

除神経ニワトリ下腿部骨格筋の筋抽出液に存在する63kD蛋白を認識する２つのモノクローナル抗体，4D2a，3A1が得られた。4D2a抗体は，筋抽出液に見られる神経突起伸長促進活性を阻害する（図１）。様々な条件検討にもかかわらず4D2a抗体を用いたアフィニティーカラムの作成が成功しなかったため，同一抗原を認識することがドットブロットで確認されている3A1抗体を用いてカラムを作成した。3A1抗体イムノアフィニティーカラムを用いて除神経筋抽出液より精製した63kD蛋白質は，５日齢ニワトリ胚終脳神経細胞の初代解離培養系において神経突起伸長活性を示した。63kD蛋白は下腿部骨格筋及び終脳において発生段階の進行に伴い発現量が減少する方向の調節を受けていることがウェスタンブロットによる解析から明らかになった。

除神経筋cDNAライブラリーから4D2a抗体を用いたスクリーニングにより得たクローンを大腸菌HB101で発現した。精製した発現蛋白を前述の初代解離培養系に投与し検討したところ濃度依存的な突起伸長を示した（図２）。0.5μg/mlまでは確実にこの活性を示しているのでこの蛋白は突起伸長活性を有するを判断した。

分子量・活性の観点から考えると，この因子は新規な物質である可能性が高く，また予備的なcDNAクローンの解析もこのことを支持している。今後はこの因子の構造を完全に解析しさらに，受容体，類似分子の解析へと研究を進めていく。

［謝辞］本研究を進めるに当たり，大石勲，小柳智，植田淳子の各氏の研究協力を得たことをここに記して感謝する。

［文献］
1. Henderson, C. E., et al. (1984) Dev. Biol., 104, 336-347
2. Henderson, C. E., et al. (1983) Nature, 302, 609-611
3. Oppenheim, R. W., et al. (1992) Nature, 360, 755-757
4. Henderson, C. E., et al. (1993) Nature, 363, 266-270
5. Taguchi, T., et al. (1987) Dev. Brain Res., 37, 125-132

図１　筋抽出液の神経突起伸長活性に対するモノクローナル抗体4D2aの効果

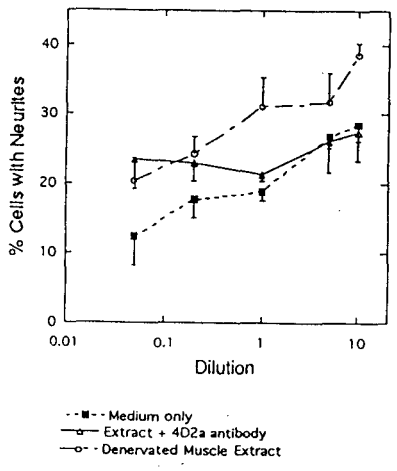
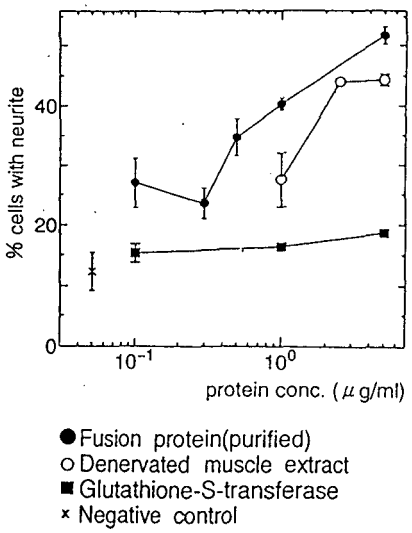


図２　cDNA発現蛋白の神経突起伸長促進活性



159 小脳プルキンエ細胞におけるスフィンゴ脂質の存在意義

ーセラミド合成阻害剤Fumonisin B1による解析ー

古屋茂樹、小野謙一*、平林義雄

理化学研究所国際フロンティア研究システム糖細胞情報研究チーム

*ヘキスト医薬総合研究所

〔要約〕神経細胞におけるスフィンゴ脂質の存在意義を明らかにすることを目的に、セラミド合成阻害剤Fumonisin B1 (5)の、小脳神経細胞、特にプルキンエ細胞の生存と発達過程に与える影響を初代培養系において解析した。Fumonisin B1は全細胞の生存率にほとんど影響を与えない濃度で、[^{3}H]-galactose, glucosamineおよび[^{14}C]-serineの脂質画分への取り込みを阻害した。Leu-4抗体により免疫組織化学的にプルキンエ細胞を同定し、細胞数と形態を調べるとFumonisin濃度依存的に細胞数が減少し、樹状突起の形成不全が顕著になっていた。これらのFuminisinの効果は培地に化学合成セラミドを添加することにより消失することからスフィンゴ脂質類はプルキンエ細胞の生存と樹状突起形成過程に関与しているものと推定された。

[緒言]ガングリオシド、スフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質は神経細胞に圧倒的に多く発現しているにも関わらずその機能は今だ明らかではない。我々はこれまでに脳内微量ガングリオシド成分であるGD1α (4)が小脳においてはプルキンエ細胞に特異的に発現していることを免疫組織化学とミュータントマウスの糖脂質分析により明らかにしてきた(2)。また特異的モノクローナル抗体VJ-41 (7)による免疫組織化学によりプルキンエ細胞にスフィンゴミエリンが多く発現していることを観察した。以上の結果からプルキンエ細胞はスフィンゴ脂質に富み、その組成は他の小脳神経細胞と著しく異なっていると考えられた。そこで我々は、スフィンゴ脂質類のプルキンエ細胞における機能の解析からこれらの脂質類の中枢神経細胞における生理的意義を理解することを目的に、セラミド合成阻害剤Fumonisin B1によるスフィンゴ脂質合成阻害のプルキンエ細胞に及ぼす影響を検討した。

[実験方法]

1，初代培養　Fischer (1)の報告に準じ胎児(E20)ラット小脳をトリプシンで分散後無血清培養した。培地は約5日毎に半量交換した。Fumonisin B1は培養開始後6日目から添加した。培養細胞の生存率はMTTアッセイキット（フナコシ）で調べた。[^{3}H]-galactose, glucosamineおよび[^{14}C]-serineによる標識はFumonisin添加後約10日後にそれぞれ10 μCi/ml, 1.5 μCi/mlの濃度で行ない、6日間培養後脂質を抽出しTLC,フルオログラフィー、フジイメージアナライザーBAS2000で分析した。

2、免疫細胞化学　Weber and Schachner (6)の方法でLeu-4抗体(6)により免疫化学染色を行った。Leu-4抗体染色陽性のプルキンエ細胞を顕微鏡下で観察、計数した。ガングリオシドGD1αに対する特異的モノクローナル抗体KA-17による染色(2, 4)、抗スフィンゴミエリンモノクローナル抗体VJ-41 (7)による染色も同様に行った。

[結果と考察] 小脳神経細胞初代培養系へのFumonisin B1の添加は全細胞生存率に対し2 μMの濃度ではほとんど影響を与えなかった。そこで2 μM Fumonisin存在下でのスフィンゴ脂質合成を[^{3}H]- galactose, glucosamineによる糖鎖へ、および[^{14}C]- serineのセラミド部分への取り込みで調べるとそれぞれコントロールの約57%, 53%に低下していた。TLCで脂質標識パターンを比較すると[^{3}H]- galactose, glucosamine標識の場合ガングリオシドへの取り込みはほぼ均一に減少していたのに対し(Fig. 1)、[^{14}C]-serine標識ではスフィンゴミエリンの合成が30%に低下しガングリオシドなどの糖脂質と比べると際だって阻害されていた。Fumonisin濃度が増加するにつれ培養中のプルキンエ細胞数が減少していった(Fig. 2)。その際樹状突起の伸展、分岐が阻害されたプルキンエ細胞が多く見られるようになり(Fig. 3)、それらの比率がFumonisin濃度に依存して増加していた(Fig. 2)。免疫組織化学によりこのようなプルキンエ細胞ではGD1αやスフィンゴミエリンの著しい減少が確認された。興味深いことに樹状突起形成に比べFumonisin処理によりプルキンエ細胞の軸索伸長はあまり影響を受けていなかった。2 μMのFumonisinによるプル

キンエ細胞の生存に対する影響は同濃度のNBD-ceramideを加えることにより打ち消され、樹状突起形成もほぼ回復した。その際添加したNBD-ceramideはNBD-sphingomyelinに代謝されていた。以上の結果より初代培養系という条件下でスフィンゴ脂質がプルキンエ細胞の樹状突起形成、生存に不可欠であることが示された。

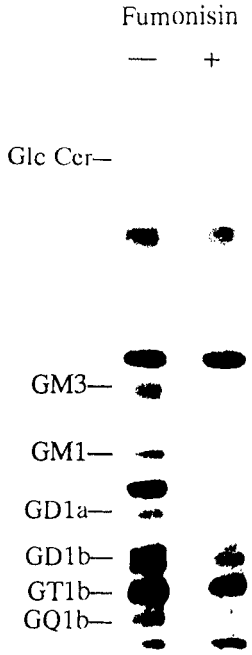


Fig. 1 Inhibition of glycolipid biosynthesis in cerebellar neuronal culture by Fumonisin B1

Fig. 2 Effect of Fumonisin B1 on Purkinje cell survival

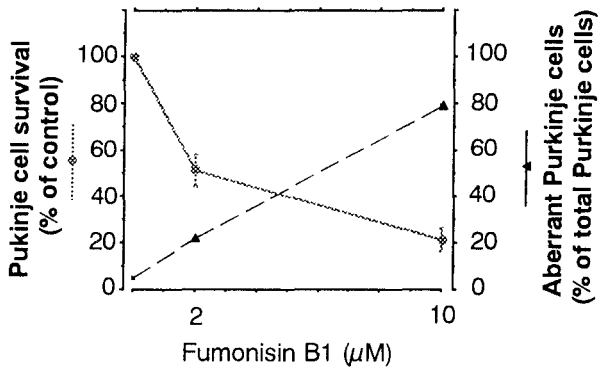
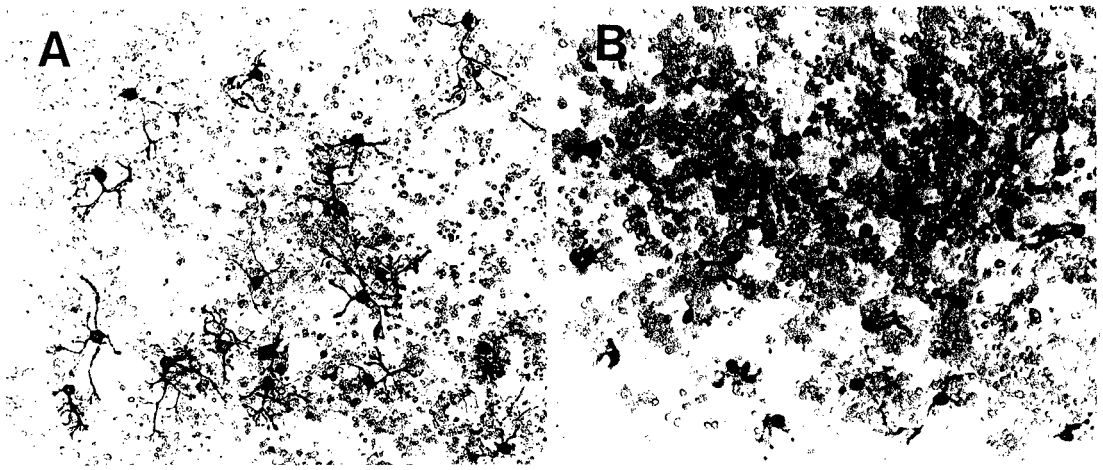


Fig. 3 Immunostaining of Purkinje cells with Leu-4 antibody
(A) control, (B) Fumonisin B1[2 μM] treated culture



[参考文献]

1. Fischer, G. (1982) *Neurosci. Lett.* **28,** 329-335.
2. Furuya, S. *et al.*, submitted for publication
3. Garson, J.A., Beverley, P.C.L., Coakham, H.B., and Harper, E. I. (1982) *Nature* **298,** 375-377
4. Hirabayashi, Y., Hyogo, A., Nakao, T., Tsuchiya, K., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Kon, K., and Ando, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265,** 8144-8151
5. Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., and Merrill, A.H.,Jr. (1991) *J. Biol. Chem.* **266,** 14486-14490
6. Weber, A., and Schachner, M. (1984) *Brain Res.* **311,** 119-130.
7. Yamamoto, K., Ono, K., Nakahara, K., Kitamura, K., Yagita, H., and Okumura, K. (1988) *Cancer Res.* **48,** 3148-3152

160 エイ脳のガングリオシド：新しいハイブリッド型ポリシアロガングリオシドの同定

中村　和生、　小嶋　久子、　玉井　洋一
(北里大学・医学部・生化学)

〔要約〕

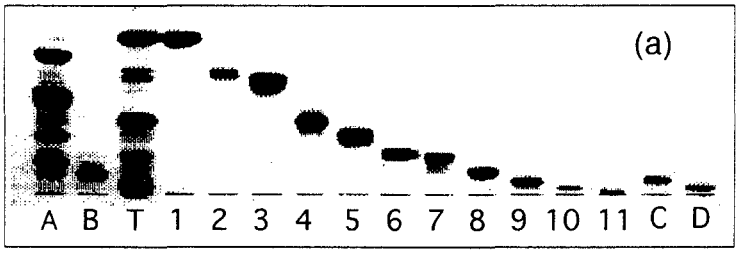
軟骨魚類板鰓類に属するソコガンギエイの一種、ドブカスベの脳から、１１種のガングリオシドを精製単離した。主要成分はGM2、GD2であり、神経組織としては相対的に多量のFucosyl－GM1を含むことが特徴的であった。また５種類のハイブリッド型ガングリオシド（ａ、ｂまたはｃ系列とα系列との構造を合わせ持つ分子種）を検出し、このうち２種類は今までに報告のない新しいポリシアロガングリオシドであることが分かった。

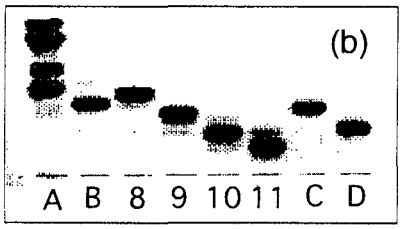
［緒言］脊椎動物の進化に伴う神経系ガングリオシドの変化に関する研究の一環として、軟骨魚類について分析を行った結果、我々はアブラツノザメ（*Squalus acanthias*）脳から従来報告のなかった新しいガングリオシド（GTx）を発見し、その構造をNeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glc-Cerと決定した（１）。これは従来知られているａ系列とα系列とのハイブリッド型の構造である。その後Andoらによりウシ脳からGTxと同じ構造を持つガングリオシド（GT1aα）が同定され（２）、またHirabayashiらにより、GT1aαにさらにシアル酸１分子が結合したGQ1bαが報告されている（３）。これらのガングリオシドはコリン作動性ニューロン特異的抗体と反応する事が示されており（２、３）、生理的役割が注目される。本研究ではサメと同じく板鰓類に属するドブカスベ（*Bathyraja smirnovi*）脳について分析を進め、５つのハイブリッド型ガングリオシドを検出し、上述の分子種以外にさらに２種類の新しい構造を推定した。

［方法］ドブカスベ脳より常法により脂質を抽出し、DEAEトヨパールカラムクロマトグラフィーによって酸性脂質画分を得た。これをイアトロビーズカラムによって精製し、ガングリオシドを単離した。ポリシアロガングリオシドはさらにHPLC（Aquasilカラム、２－プロパノール／ヘキサン／KCl系）にて精製した。糖組成はメタノリシス後TMS誘導体としてGLCによって分析した。糖の結合位置はメチル化後、アルジトールアセテートとしてGC/MS分析した。シアル酸の結合位はメチル化後、メタノリシスしてTMS誘導体として行った。コア構造が同一のポリシアロガングリオシドは、α2,3-特異的シアリダーゼ（タカラ）と5.6mMギ酸処理（80℃、30分）を併用し、その分解生成物を分析することにより構造を推定した。

［結果］図１ａに示すように、BS-1からBS-11（それぞれ図の１から１１に対応）の１１種のガングリオシドがTLC上単一バンドとして精製された。このうちBS-1からBS-7は分析の結果既知の分子種であり、それぞれ、GM2、Fucosyl-GM1、GD3、GD2、GT3、GTx、GT2と同定された。BS-8及びBS-９はテトラシアロ、BS-10はペンタシアロ、BS-11は（おそらく）ヘキサシアロであり、いずれもTLC上の移動度は既知物質とは一致しなかった（図１ｂ）。これらのガングリオシドのコア構造は、メチル化分析の結果全てガングリオテトラオシルセ

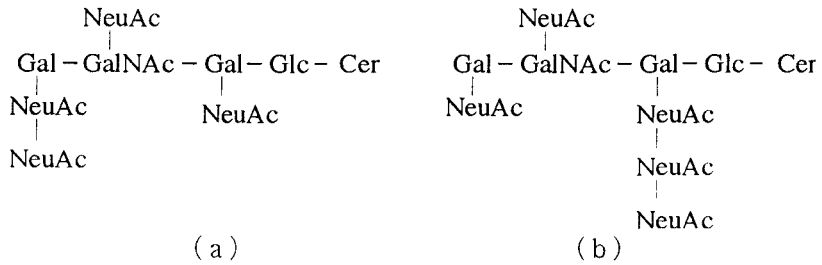
ラミドであり、GTxと同様に還元末端から３残基の糖（Gal-GalNAc-Gal）の全てに少なくとも１残基のシアル酸が結合していることが判明した。BS-8はα2,3-特異的シアリダーゼで水解されなかった。このことは、BS-8の還元末端のガラクトースには２分子のシアル酸が結合していることを示唆している。また弱酸分解によりGT1aを生じ、GD1bは生じないことからその構造は図２ａの様に推定された。BS-10はα2,3-特異的シアリダーゼで水解されることから還元末端のガラクトースに結合しているシアル酸は１分子だけであることが示唆された。弱酸水解の結果を考えあわせて、その構造を図２ｂのように推定した。BS-９とBS-１１については解析中である。





図．１　精製ガングリオシドのTLC．（ａ）クロロホルム・メタノール系．（ｂ）アセトニトリル・イソプロパノール系．Ａ：ウシ脳ガングリオシド，Ｂ：GQ1b，Ｔ：カスベ脳総ガングリオシド，Ｃ：GQ1c，Ｄ：GP1c．１～１１：精製ガングリオシドBS-１～BS-１１に対応．

図２



［考察］

軟骨魚類脳で発見されたハイブリッド型ガングリオシドは、哺乳類（ウシ）脳でも微量ながら存在することが示され、その系統発生的な分布が興味深い。またコリン作動性ニューロンに特異的な抗原である可能性が示唆されており、その生理活性に興味が持たれるが、我々は現在神経系の培養細胞を用いて、一般的にガングリオシドが持つのと同様な神経突起の伸長作用があるかどうかを検討している。

［文献］

(1) Nakamura, K., Inagaki, F., and Tamai, Y (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 9896-9900
(2) Ando,S., Hirabayashi, Y., Kon, K., Inagaki, F., Tate S., and Whittaker,V.P. (1991) *J. Biochem.* 111, 287-290
(3) Hirabayashi,Y., Nakao, T., Irie, F., Whittaker, V.P., Kon, K., and Ando, S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 12973-12978

161 PC12細胞の神経突起形成に関与するシアル酸転移酵素とその阻害剤 KI-8110 の影響

小嶋久子、中村和生、玉井洋一
(北里大・医・生化学)

〔要約〕
糖ヌクレオシド KI-8110 はシアル酸転移酵素阻害剤である。PC12細胞にKI-8110を作用させて、神経成長因子(NGF)による細胞分化時におけるCMP-シアル酸：ガングリオシド α2→3 シアル酸転移酵素 (ST) 活性を測定した。（1）NGFによるPC12細胞の分化時の各種ガングリオシド合成STFの活性を測定した結果、GM3からGD3を合成するα2→8STと、GM1からGD1a を合成するα2→3 ST 活性が増加したことから、神経突起形成とSTが連動していることが示唆された。（2）ST阻害剤の影響を検討するため培地にKI-8110を添加すると、10μM以上ではGM1からGD1aを合成するST活性が40%以下に低下し、細胞増殖も抑えられた。（3）NGFの存在下にKI-8110を添加すると、ST 活性は10μM で対照の72%程度であるが、突起の形成率には影響がなかった。（4）あらかじめ KI-8110存在下で 培養した PC12細胞にNGFを添加した時には、ST 活性は阻害されたが突起形成は NGF のみの添加時と変わらなかった。以上の結果から、KI-8110 は神経系細胞である PC12細胞のα2→3 ST の活性を阻害するが、NGF による突起形成には影響を与えないことが示唆された。

［緒言］ ラットpheochromocytoma 由来 PC12 細胞は神経成長因子 (NGF) に応答して神経突起を形成する。我々は先に神経突起形成の初期分化の際にガングリオシド等の糖脂質組成が変化し、対応する各種糖脂質合成糖転移酵素の活性が変化することを報告した(1)。そこで、シアル酸転移酵素(ST)の活性を制御することによって、NGF によって惹き起こされる神経突起形成過程に変化があるか否かを調べることを目的として、PC12細胞に対するST阻害剤 KI-8110 の影響を検討した。シアル酸ヌクレオシド複合体であるKI-8110 は、リンパ細胞やcolon adenocarcinoma 細胞の表面複合糖質へのCMP-シアル酸の取り込みを抑えること、実験的な colon cancer cell の転移を阻害することなどが報告されている(2-4)が、神経系細胞についての検討は行われていない。

［方法］ 細胞：PC12 細胞は10% FBS, 5% horse serum を添加した RPMI-1640培地を使用し、collagen coated dish で培養した。試薬：KI-8110はメクト株式会社から供与された。NGF （タカラ）は50ng/ml の濃度で使用した。ST活性の測定：基質のガングリオシド、Triton CF-54 、Mg^{++}の存在下で 細胞ホモジネートによる^{14}C-CMP-Sialic acidの取り込みを37℃で行い、反応産物をSep-Pak C18 カートリッジで精製した後に、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

［結果と考察］（1）図 1 にNGFによるPC12細胞の分化に伴う各種ガングリオシド合成ST活性の変化を測定した結果を示す（NGF処理後24時間）。GD3 とGD1a合成酵素活性が突起形成とともに 2 ～ 3 倍に増加するのが認められた。（2）PC12 細胞にKI-8110を添加した時（48時間）のST活性をTable 1に示した。KI-8110が10μMで27%、1μMでは40%とST活性が阻害され、この時には細胞増殖も抑えられたが、100nM以下ではST活性も細胞増殖にも影響がなかった。（3）PC12細胞にNGFを作用させると、48時間で約90%の細胞に10μm以上の突起が観察され

た。NGF共存下にKI-8110を作用させると、細胞の突起形成率はKI-8110が10μMでも90-100%とNGFのみの時と変わらなかったが、ST活性はTable 2に示したように低下した。（4）次にあらかじめKI-8110を30時間作用させたPC12細胞に、NGFを添加して培養後24時間のST活性と突起形成率を調べた。ガングリオシド合成はTable 2に示したように低下したが、突起形成はNGFのみの時と違いがなかった。

以上の結果から、糖ヌクレオシドKI-8110は神経系細胞であるPC12細胞に対しても、ガングリオシド合成のST活性を阻害するが、NGFによる突起形成には影響を与えないことが示された。ここではα2→3 STについての結果を示したが、α2→8ST活性（GD3合成酵素）についても検討したいと考えている。

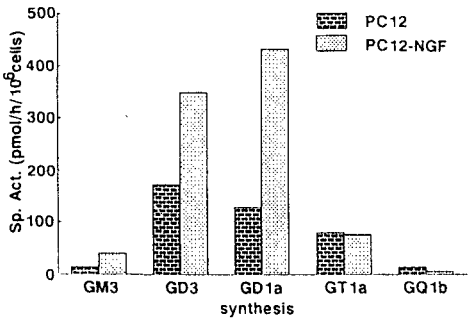


図 1.　PC12細胞のシアル酸転移酵素活性

Table 1. Effect of KI-8110 on CMP-sialic acid: GM1 sialyltransferase activity of PC12 cells.

Treatment		Specific activitiy (pmol/h/10^6 cells)
Control		253.0 ± 19.2
KI-8110	10 μM	69.1 ± 30.8
	1 μM	102.8 ± 12.4
	100 nM	242.0 ± 17.5
	10 nM	225.5 ± 20.2

Table 2. Effect of KI-8110 on GM1 sialyltransferase activity during cell differentiation induced by NGF.

Treatment		Sp. act. (pmol/h/10^6 cells)
Control		253.0 ± 19.2
NGF		350.1 ± 32.0
NGF + KI-8110	10 μM	182.6 ± 8.9
	1 μM	206.2 ± 13.7
	100 nM	207.8 ± 30.4
Pretreatment with KI-8110	10 μM	62.9 ± 30.8
	1 μM	84.4 ± 13.9
	100 nM	123.9 ± 30.3
	10 nM	231.9 ± 9.5

［文献］

1.小嶋ら (1993)　生化学（第66回生化学会抄録）**65**, 706

2.Kijima-Suda, I., et al. (1985) *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 730-739

3.Kijima-Suda, I., et al. (1988) *Cancer Res.* **48**, 3728-3732

4.Harvey, E.B. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 571-575

162 Neuro 2a細胞へのGD3合成酵素遺伝子の導入と細胞分化

小島 直也[1]、黒澤 信幸[1]、西 達也[2]、花井 陳雄[2]、辻 崇一[1]
([1]理研、国際フロンティア、糖遺伝情報、[2]協和発酵（株）、東京研究所)

〔要約〕

細胞表面の糖脂質は細胞の分化やガン化などの過程で顕著に変化することが知られているが、細胞の分化やガン化に於ける糖脂質の役割については良くわかっていない。しかし、神経細胞においては特異的なガングリオシドの生合成とその発現が細胞の分化や神経突起の伸長と相関性があることが知られている。またNeuro 2aを含むいくつかの神経細胞株では外からガングリオシドを加えることによって細胞が分化し神経突起が伸張することが知られている。しかしながら、これら外因性のガングリオシドがどのようなメカニズムで神経突起の伸長を促進するのかということについては外因性ガングリオシドの物理化学的性質が複雑であるのと、外因性ガングリオシドが分解されて多くの副生成物を生じるために、未だにはっきりしていない。これらの問題を克服する一つの方法は、ガングリオシドのde novoの合成とその発現を変化させることである。我々は最近、GD3合成酵素のcDNAのクローニングに成功した（1）。この酵素は、b-及びc-系列のガングリオシドの生合成の鍵を握る酵素である（図1）。Neuro 2a細胞はGM3やb-系列のガングリオシドを殆ど発現しておらず、a-系列ガングリオシド(GM1, GD1a)を多く発現している（2）。そこでガングリオシドのde novoの合成系とその発現を変化させる目的で、GD3合成酵素のcDNAをNeuro 2a細胞に導入しGD3合成酵素を強制発現させた。その結果GD3合成酵素のcDNAを導入したNeuro 2a細胞はGD3及びb-系列ガングリオシドを発現するようになり、さらに神経突起を自発的に伸張するようになった。

実験方法

哺乳動物細胞の発現ベクターであるpcD-SRαにGD3合成酵素のcDNAとblasticidin-S-deaminaseの遺伝子を組み込みpSRb-GD3を構築した。これをNeuro 2a細胞に電気穿孔法で導入し、5 μg/ml blasticidin-S-塩酸塩でセレクションした。およそ２０クローンのblasticidin-S-塩酸塩耐性株が得られ、それぞれをサブクローニングした。ガングリオシドの発現は抗GM3、抗GD3、抗GQ1bモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーあるいは蛍光顕微鏡で特異的なガングリオシドの発現を確認した。

結果及び考察

pSRb-GD3を導入し5 μg/ml blasticidin-S-塩酸塩に対して抵抗性を示したNeuro 2a細胞のコロニーはコントロールの細胞に比べて劇的な形態変化を示していた。即ち、GD3合成酵素のcDNAを導入した細胞はコロニーの周囲に多数の神経突起が伸張しているのが認められたが（図２A、B）、ベクターのみを導入した細胞ではそのような神経突起の伸長は見られなかった（図２C）。自発的な神経突起の伸長は各コロニーからクローニングした細胞でも観察された。抗GD3モノクローナル抗体を用いてGD3の発現を調べたところ、親株、ベクターのみを導入した細胞（N2a-brs)ではGD3が殆ど発現していないにも拘わらず、GD3合成酵素のcDNAを導入した細胞（N2a-GD3)のみがGD3を発現するようになっていた（図３）。さらに元来殆ど発現していないb一系列ガングリオシドのひとつであるGQ1bの発現もN2a-GD3では認められた。したがってGD3合成酵素のcDNAを導入したしたことによって細胞のガングリオシドのde novoの合成とその発現が変化し、b-系列ガングリオシドを合成、発現するようになったと考えられた。細胞が自発的に神経突起を伸張することから、細胞が分化した可能性が考えられたので細胞の増殖とチミヂンの取り込みを調べ

たところ、N2a-brs及び親株に比べて両者とも著しく減少していた。さらにN2a-GD3はアセチルコリンエステラーゼの染色で多くの細胞が染色された。従って細胞はGD3合成酵素のcDNAを導入したしたことによって分化したと考えられる。

以上の結果は、GD3合成酵素のcDNAを導入したしたことによって細胞のガングリオシドのde novoの合成とその発現が変化し、GD3あるいはGQ1bを含むb一系列ガングリオシドが細胞上に限定的に発現したことにより、細胞が分化し自発的に神経突起を伸張するようになったことを強く示唆している。

（1）Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., & Nishi, T. (1994) J. Biol. Chem. 269, 15950-15956.

（2）Yamashita, T., Tsuji, S., & Nagai, Y. (1991) Glycobiology, 1, 149-154.

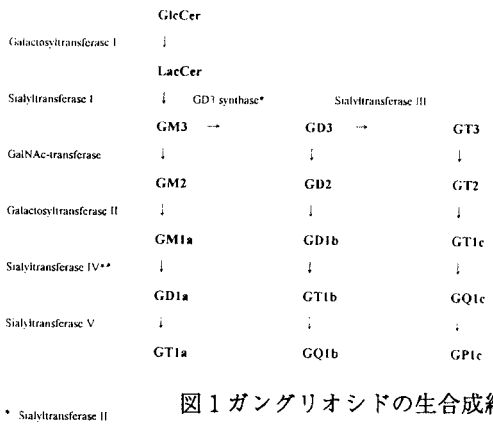


図1ガングリオシドの生合成経路

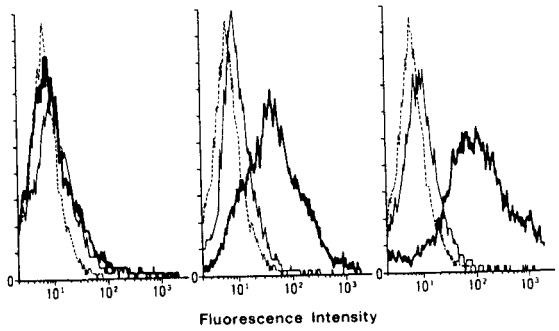


図3 N2a-GD3（太線）及びN2a-brs（細線）のガングリオシドの発現。左、GM3, 中央、GD3, 右、GQ1b,

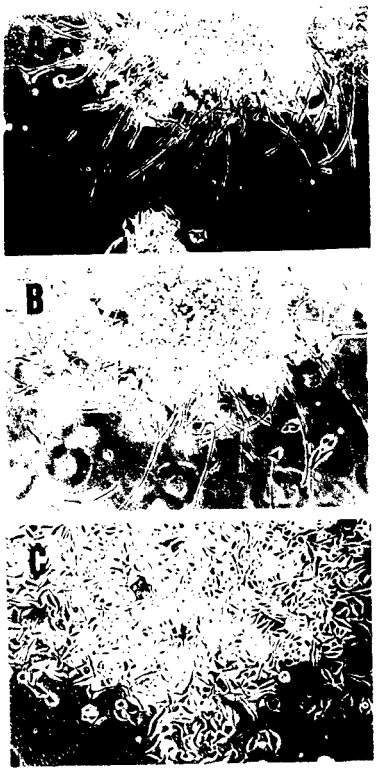


図2 GD3合成酵素のcDNAを導入した細胞（A, B）及びベクターのみを導入した細胞（C）の形態変化

163 α－ヒドロキシ脂肪酸含有スルファチドに親和性の高いモノクローナル抗体の作成と神経化学への応用

崔　永喜、岩森正男
（東京大学医学部・生化学）

〔要約〕
スルファチドの機能解明を目的に、ヒト脳より単離したスルファチドを抗原としてモノクローナル抗体を作成した。得られたモノクローナル抗体の特異性は既報のものとは性質が異なり、αヒドロキシ脂肪酸やフィトスフィンゴシンを疎水性鎖に含むスルファチドと強い反応性を示した。また、反応性は少し低いがノンヒドロキシ脂肪酸含有スルファチド、セミノリピド、ラクトシルスルファチドとも同程度に反応した。しかし、リゾセミノリピドとは全く反応しなかった。スルファチドを含む胃癌細胞とも強い反応を示した。また、TLC プレート上の抗原との反応はプレートの種類によって大きく変化することも認めた。さらに、マウス脳におけるスルファチドの発現を解析すると、小脳では胎生17日から急激に増加し、大脳では同濃度に達するのは生後一日であった。

スルファチドはガラクトセレブロシドとともにミエリンの脂質性主要構成成分となっている。ミエリンでの機能としてミエリン塩基性蛋白質の保持が予想され、また、腎においてはイオンチャンネルとしての働き、血液中においては血液凝固因子との関係（１）、胃においてはHelicobacter pylori の受容体としての働き（２）が調べられているが、その機能は十分に明らかにされていない。スルファチドの機能解析において特異的プローブは不可欠であり、モノクローナル抗体が威力を発揮するため、作成例と抗体の特異性、組織染色への応用が報告されている（３、４）。我々も同様にスルファチドの機能解明を目的にモノクローナル抗体を作成したが、その特異性は既報の抗体とは異なり、脳スルファチドの主要分子であるα－ヒドロキシ脂肪酸含有スルファチドと強い反応を示し、脳における機能解明に有用な性質を持っていることが明らかになった。

方法

モノクローナル抗スルファチド抗体の作成：ヒト脳より精製したスルファチドをフロイント完全アジュバントとともに免疫し（C57BL)、常法に従ってミエローマ(P3･X63･AG8･653)と脾リンパ球とをハイブリドーマとしモノクローナル抗体を作成した。

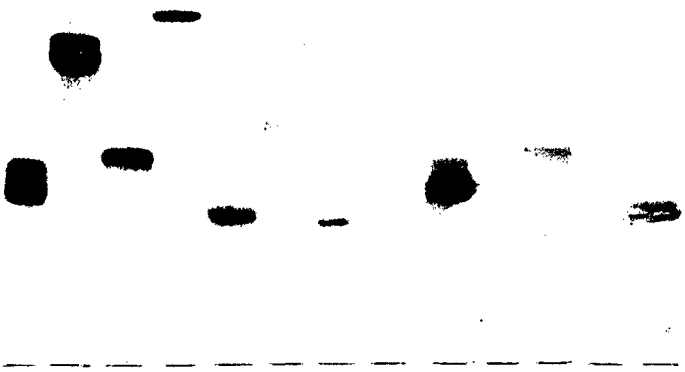
抗体の特異性：ELISA とTLC-immunostaining法により抗体の反応を解析した。抗原として用いたGalCerはヒト脳、I^3SO_3-GalDG （セミノリピド）はブタ精巣、I^3SO_3-LacCerはヒト子宮内膜癌組織より単離し、コレステロール硫酸は化学合成した。また、GalDG , リゾセミノリピドはセミノリピドより調製した。

ウサギ各組織とマウス脳のスルファチド：各組織より常法に従って（５）脂質を抽出し、TLC-immunostaining法による検出は抽出液をそのまま用い、化学的発色の場合は、酸性脂質に分離後、TLC-densitometryによる分析を行った。

結果と考察

モノクローナル抗スルファチド抗体の性質：得られたモノクローナル抗体はIgM クラスであり、抗原として用いたヒト脳スルファチド（α－ヒドロキシ脂肪酸とノンヒドロキシ脂肪酸の割合は

図1　モノクローナル抗スルファチド抗体のTLC-Immunostaining



6:4)と強い反応を示した。しかし、TLC-immunostaining法で解析すると、プレートの種類によって著しい反応性の違いが観察された。Merck とMachery-Nagel はほとんど反応せず、Schleicher & Schuell （図1）とSigma は強く反応した。この反応性の違いは用いている結合補助剤の影響であることが明らかになった。図1に示すように、本抗体はヒト脳スルファチドのみならず、セミノリピド、ラクトシルスルファチドとも反応するが、リゾセミノリピドとは全く反応しなかった。また、スルファチドの分子種で反応性を比較すると、ヒト胎便より得たフィトスフィンゴシン含有スルファチド、脳のα－ヒドロキシ脂肪酸含有スルファチドがノンヒドロキシ脂肪酸含有スルファチドよりも強く反応した。

ウサギ各組織の酸性脂質：細胞の種類によって分布の異なる酸性脂質には硫糖脂質、ガングリオシド、コレステロール硫酸があるが、硫糖脂質のウサギ各組織における分布を調べると、脳、腎睾丸、消化管に特に高濃度に含まれ、組織分布には大きな特徴があることが改めて確認できた。

マウス脳スルファチドの発達に伴う濃度変化：TLC-immunostaining法により、脳の発達に伴うスルファチドの濃度変化を調べると、乾燥重量当たりの濃度が急激に増加するのは、小脳においては胎生16日から17日にかけてであり、大脳では出生後1日であることが明らかになった。オリゴデンドログリアやシュワン細胞のマーカーとして、またミエリンの主要成分としてスルファチドはその硫酸基による酸性を細胞膜に付与するとともに、3硫酸ガラクトースによる特異的構造をも付与している。TLC の種類によって抗体の反応が変化することからも予想されるように細胞膜上の抗原性は膜の構成成分による影響を強く受ける性質を持っているようである。ちなみに、プレートの種類による反応性の違いは糖鎖の長い糖脂質では見られない。どのような因子がスルファチドの反応性に影響を与え、神経機能に関係しているのかを解析する上で本抗体は非常に有用なプローブとなると思われる。

文献

1. 原　厚、上村敬一、岡野　照、武富　保 (1994) 脂質生化学研究 36、297-301
2. Saitoh H, Natomi H, Zhao W, Okuzumi K, Sugano K, Iwamori M and Nagai Y (1991) FEBS Lett. 282,385-387
3. Goujet-Zalc C, Guerci A, Dubois G and Zalc B (1986) J.Neurochem. 46, 435-434
4. Fredman P, Mattsson L, Andersson K, Davidsson P, Ishizuka I, Jeansson S, Mansson J-E and Svennerholm L (1988) Biochem.J. 251,17-22

164 シナプシンＩは生体内でＳＰキナーゼの基質である

谷口　寿章、楠畑　雅、鈴木　政美、千谷　晃一
（藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・医高分子部門）

〔要約〕
シナプシンＩは従来Ａキナーゼ、ＣａＭキナーゼⅡによるリン酸化に応じてその生理機能、即ちシナプス小胞膜、アクチン繊維との結合が可逆的に調節されていることが知られている。シナプシンＩの生体内におけるリン酸化を詳細に解析するために、本研究では、ウシ脳より精製したシナプシンＩをトリプシンまたはリジルエンドプロテアーゼで分解し、キャピラリー高速液体クロマトグラフ（ＨＰＬＣ）にエレクトロスプレー質量分析計を直結した、ＬＣ／ＭＳ法を用いてリン酸化ペプチドを検索した。その結果、既知のリン酸化部位以外に，未知のリン酸化部位を含むペプチドが見い出された。エドマン分解による分析で残基５５３のセリン（Ｓｅｒ５５３）がリン酸化されていることがわかった。このセリンは直後にプロリンが存在し、シナプシンＩが生体内でＭＡＰキナーゼやｃｄｋ５などのいわゆるＳＰキナーゼの基質となっていることを示している。

[目的]
シナプシンＩとシナプス小胞膜、アクチン繊維との相互作用は、ＣａＭキナーゼⅡ，Ａキナーゼによるリン酸化によって調節されている。従って生体内でのシナプシンＩの翻訳後修飾を詳細に研究することはその生理機能を解明するために重要である。本研究ではin vivoでのリン酸化を含む翻訳後修飾を、精製したシナプシンＩをプロテアーゼで処理し、得られたペプチドをＬＣ／ＭＳ法を用いて詳細に解析した。

[方法]
シナプシンＩはウシ脳膜画分より定法（１）により精製した。精製したシナプシンＩはリジルエンドプロテアーゼまたはトリプシンで処理し、得られたペプチド混合物をキャピラリーＨＰＬＣをエレクトロスプレー質量分析計に直結したＬＣ／ＭＳ法（２）で解析した。逆相ＨＰＬＣカラムで分離したペプチドは、質量分析計で直接その質量を測定し、ｃＤＮＡのシークエンスより推定されるアミノ酸配列と比較することで同定した。リン酸化ペプチドはリン酸化されていないペプチドに比べ８０Ｄａ大きい質量を示すはずである。リン酸化部位は、単離したリン酸化ペプチドを気相シークエンサーで分析し、ホスホセリンより生じるデヒドロアラニンの量比により同定した。

[成績]
ウシ脳より単離したシナプシンＩのトリプシン消化物は、２個のリン酸化ペプチドを含むことが見い出された　（図１）。このうち１個のペプチド（Ｔ５２）は既知のＣａＭキナーゼⅡによ

るリン酸化部位（Ｓｅｒ６０５）を含むもので、他は（Ｔ４７）ＣａＭキナーゼIIによるリン酸化部位のＮ末側の（５３２－５５６）の未知のリン酸化部位に由来するものであった。Ｎ末端付近に存在するＡキナーゼによるリン酸化部位（Ｓｅｒ９）、及びＣａＭキナーゼIIによるリン酸化部位のうちの１カ所（Ｓｅｒ５６８）を含むペプチドはリン酸化されていなかった。リン酸化ペプチドを逆相ＨＰＬＣカラムで単離し、エドマン分解によりリン酸化部位を解析したところ，Ｓｅｒ５５３がリン酸化されている事が見い出された。リン酸化セリンの直後にプロリンが存在する事から、シナプシンＩは生体内でＭＡＰキナーゼやｃｄｋ５等のいわゆるＳＰキナーゼの基質であることが分かった。

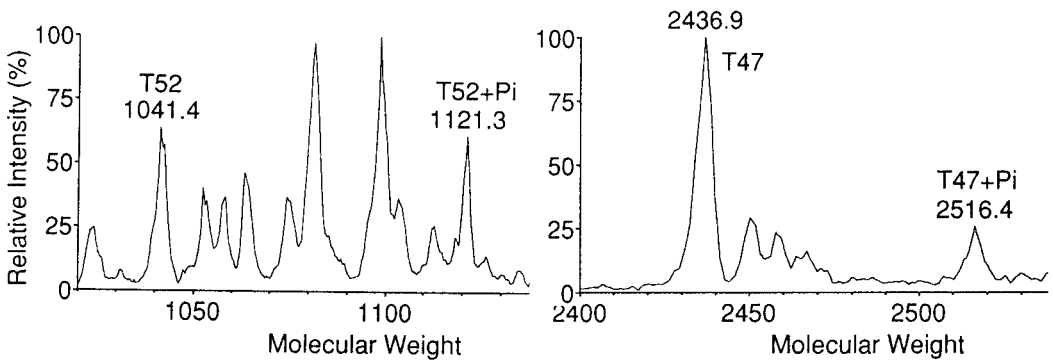


図１．ＬＣ／ＭＳ法で見い出されたリン酸化ペプチドのマススペクトル。ＣａＭキナーゼIIによるリン酸化部位を含むペプチド（Ｔ５２）（左）と未知のリン酸化部位を含むペプチドＴ４７（右）は、それぞれ８０Ｄａ大きいリン酸化ペプチドを伴っていることが分かる。

[考察]

シナプシンＩは従来からＣａＭキナーゼII及びＡキナーゼの基質であることが知られていたが、他のキナーゼによるリン酸化は、in vitroでプロリン特異的キナーゼによりリン酸化されると言う報告（3）があるのみである。本研究の成果により、シナプシンＩがいわゆるＳＰキナーゼにより生体内でリン酸化されていることが明らかとなった。in vivoでリン酸化されているセリン（Ｓｅｒ５５３）は文献４に報告されているリン酸化部位（Ｓｅｒ５５１）とは異なるので、別のキナーゼによるものと考えられる。ＰＣ１２細胞でＮＧＦによりシナプシンＩが未知の部位のリン酸化が促進されると言う報告（4）と考えあわせると、生体内ではシナプシンＩの機能が未知のＳＰキナーゼにより調節されていることが示唆される。

[文献]

1.Czernik, A.J., Pang, D.T., and Greengard, P. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7518-7522.

2.Taniguchi, H., Manenti, S., Suzuki, M., and Titani, K., (1994) J. Biol. Chem. in press.

3. Hall, F.L., Mitchell, P., and Vulliert, P.R. (1990) J. Biol. Chem. 265, 6944-6948.

4. Romano, C., Nichols, R.A., and Greengard, P (1987) J. Neurosci.7,1300-1306.

165 ストレス蛋白質hsp27の細胞内存在様式の変動とその生理的意義

長谷川かおり、稲熊　裕、伊東秀記、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕

1)ヒトグリオーマ細胞 U251 MG の粗抽出液の50%硫安分画を[γ-^{32}P]ATPとマグネシウム存在下でインキュベートすると、重合型のhsp27 (L-hsp27) がリン酸化され、解離し、遊離型 hsp27 (S-hsp27) に変換した。2)細胞をホルボールエステル (PMA)で前処理し、L-hsp27をS-hsp27に変換させると、細胞の熱耐性は著しく低下した。3)ストレス誘導されたhsp27は、大部分がL-hsp27として増量し、それが再度のストレスに対して速やかに解離した。これらの結果よりL-hsp27のリン酸化を伴う解離はストレスに対する緊急の応答機構であり、細胞内のL-hsp量はそのストレス耐性と密接に関連していることが示唆された。

細胞を各種ストレスに暴露したり、ホルボールエステル、サイトカイン、あるいはオカダ酸などを作用させるとhsp27のリン酸化が促進されることが知られている。我々は、hsp27が細胞内では300-500 kDaのL-hsp27と7 kDa以下のS-hsp27として存在し、上記のhsp27のリン酸化が促進される条件下では L-hsp27が S-hsp27 に変換することを見つけ報告してきた(1-3)。今回は、cell-free系で、L-hsp27 が ATP/Mg^{2+} 存在下で、内因性の protein kinase （おそらくMAPKAP kinase 2）によってリン酸化され、S-hsp27に変換することを証明し、さらにその変換機構の生理的意義を検討したので報告する。

【方法】

細胞培養およびストレス負荷：confluentに達したU251 MGあるいは U118 MGグリオーマ細胞(10% FCSを含む培地、4 ml/60 mm dish)を用いた。各種薬剤は培地に添加して、37℃で1時間作用させた。誘導させる場合は新しい培地に換えてさらに十数時間培養を続けた。hsp27の解離を観察する実験では、直ちに細胞をPBSで洗って凍結保存した。熱ストレスは、培養皿をパラフィルムでシールして、45℃の恒温槽に15分間浮遊させて負荷した。凍結皿に0.3 mlのPBSを加え、細胞を剥してから超音波処理し、125,000 *x* g, 40 minの遠心上清を分析に用いた。

Cell-free 系でのリン酸化：8枚の150-mm皿で培養したU251 MG細胞を集め、上記のように細胞の可溶性分画を得た。これに硫安 (50%飽和)を加え、塩析された分画を遠心して集め、1 mlの50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (含5 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 M NaF, 1 mM PMSF, 0.36 mM pepstatin A) に溶解し、これを同じ溶液に対して0℃で4時間透析した。不溶物を遠心除去後約150μgの蛋白質を含む上清を、25 mM Tris-HCl, pH 7.5 (含7.5 mM $MgCl_2$, 0.4 mM $CaCl_2$, 1.25 mM DTT, 2 μM okadaic acid, 0.1 μM PMA, 0.1 mM [γ^{32}P]ATP (10 μC/mmol), 0.5 mM PMSF, 0.05 M NaF) に加え(final vol. 60 μl), 30℃で20分間インキュベート後に氷冷の10 mM EDTAを150 μl加えて反応を止めた。この200 μlを庶糖濃度勾配遠心した。

庶糖濃度勾配遠心(SDG): 検体200 μlを3.5 mlの10-40% sucrose 上に乗せ130,000 *x g*, 4℃で16時間遠心し、チューブ底より15分画した。各分画中のhsp27はEIA法(4)にて測定した。また、^{32}P-標識hsp27は、EIAに使用している抗体結合ポリスチレン球でトラップし、液体シンチレーションカウンターで測定した。

【結果と考察】

細胞抽出液中のhsp27とそのkinase活性は50%硫安飽和で塩析される。それでこの分画を調整し、これを[γ-^{32}P]ATPと$MgCl_2$存在下30℃で反応（白丸対照は0℃で放置）させると、図1に示すようにL-hsp27がS-hsp27に解離し、^{32}P-標識hsp27の大部分はS-hsp27分画に存在した。この結果は、L-hsp27がリン酸化を受けてS-hsp27に解離することを示す直接的な証拠である。0.1μM PMAに1時間暴露することは細胞への侵襲性はほとんどなく、しかもこの間に大部分のL-hsp が S-hsp27 に解離する。この処理をした細胞に直ちに熱ストレス(46℃/20 min)を負荷し、細胞の生存率を調べて見ると、対照細胞（inactive analogueである 4α-PMA に暴露、あるいは無処理）に比べ著しく低下していた（表1）。すなわち、L-hspが減少している状態では熱ストレスに対する耐性が低いことが示唆された。一方、熱ストレス (45℃/15 min) あるいは亜砒酸ストレス(200 μM/1 h) 負荷後16時間のU118 MG 細胞中のhsp27は 2倍以上に増加し、その大部分はL-hsp27として存在した（図2）。この細胞に亜砒酸ストレスを再度負荷すると、直ちにL-hsp27の大部分が S-hsp27 に解離した（図2）。以上の結果より、L-hsp27 のリン酸化を伴う解離は、ストレスに対する緊急の応答機構であり、細胞内のL-hsp量はそのストレス耐性と密接に関連していることが推測された。

【文献】

1) 稲熊　裕、長谷川かおり、後藤幸代、加藤兼房 (1993) 神経化学 32, 248-249

2) 加藤兼房、長谷川かおり、後藤幸代、稲熊　裕 (1993) 神経化学 32, 250-251

3) Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S. & Inaguma, Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 11274-11278

4) Kato, K., Shinohara, H., Goto, S., Inaguma, Y., Morishita, R. & Asano, T. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 7718-7725

Fig. 1

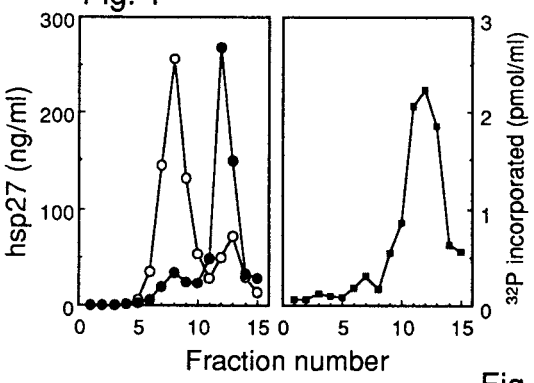
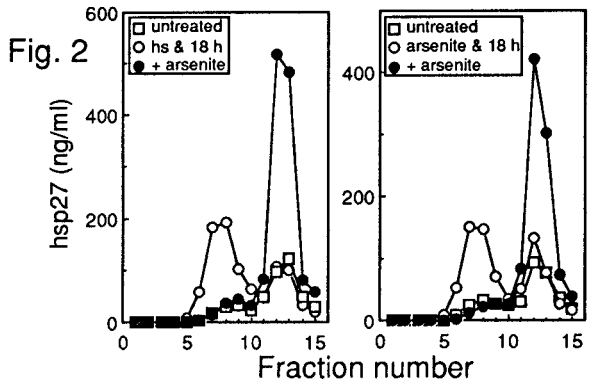


Table 1. *Effect of pretreatment with PMA on thermal resistance of U251 MG cells*

pretreatment	heating at 46°C/20 min	relative resistance (%)
none	−	100
none	+	26.4
4α-PMA (0.1μM)*	+	23.7
PMA (0.1 μM)*	+	8.2

* incubated at 37°C for 1 h

Fig. 2



166 Cキナーゼの主要基質タンパク質MARCKS(myristoylated alanine-rich C-kinase substrate)のMAPキナーゼによるリン酸化

楠畑 雅、古橋 潔、鈴木 政美、千谷 晃一、谷口 寿章
（藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・医高分子部門）

〔要約〕

脳におけるCキナーゼの主要基質タンパク質であるMARCKSは、Cキナーゼによるリン酸化に応じてシナプス小胞膜、アクチン繊維と可逆的に結合することが知られている。ウシ脳より単離、精製したMARCKSをエレクトロスプレー質量分析法で分析すると、in vivoでリン酸化された多くの分子種よりなることが観測された。高速液クロに質量分析計を直結した、LC／MS法を用い、in vivoでのリン酸化部位の詳細な解析を行ったところ、既知のCキナーゼによるリン酸化部位以外に6カ所の新しいリン酸化部位が見い出された。これらの部位は、いずれもホスホセリンの直後にプロリンが存在し、MARCKSが生体内でMAPキナーゼなどのいわゆるSPキナーゼの基質となっていることがわかった。実際、ウシ脳より精製したMAPキナーゼは、6カ所のリン酸化部位のうち、主要な3つのリン酸化部位をリン酸化した。以上の結果は、Cキナーゼと共にMAPキナーゼが、MARCKSのリン酸化を通じて、伝達物質の放出の制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。

[目的]

MARCKSとシナプス小胞膜との相互作用は、Cキナーゼによるリン酸化、脱リン酸化、ミリスチル化、脱ミリスチル化など、ダイナミックな翻訳後修飾によって調節されている（1、2）。エレクトロスプレー質量分析法による分析は、その高精度（1Da以下）、高分解能（10Da程度）によって、これらの翻訳後修飾の直接観測を可能とする。実際、単離精製したMARCKSが、ミリスチル化型、非ミリスチル化型を含み、また、数種類のリン酸化型を含むことが既に明らかにされている（3）。本研究ではin vivoでの修飾部位を詳細に解析する為に、精製したMARCKSをプロテアーゼで分解し、得られたペプチドを高速液体クロマトグラフィーをエレクトロスプレー質量分析計に直結したLC／MS法で解析した。

[方法]

MARCKSはウシ脳膜画分よりカルモジュリンカラムを用いて精製した（3）。MAPキナーゼはウシ脳よりDrewesらの方法に準じて精製した（4）。精製したMARCKSをリジン特異的プロテアーゼ、トリプシンで処理し、キャピラリー高速液クロをエレクトロスプレー質量分析計に直結したLC／MS法で解析した。逆相カラムで分離したペプチドは、質量分析計でその質量を決め、cDNAのシークエンスより推定されるアミノ酸配列と比較することで同定した。リン酸化部位は、単離したリン酸化ペプチドを気相シークエンサーで分析し、ホスホセリンより生じるデヒドロアラニンの量比により同定した。

[成績]

脳より単離したＭＡＲＣＫＳをリジン特異的プロテアーゼで処理すると、６個のリン酸化ペプチドが見い出された。このうち１個のペプチドのみが既知のＣキナーゼによるリン酸化部位に由来するもので、残りは全て一次構造上分子の中央に位置するＣキナーゼのリン酸化ドメインよりＮ末端側に由来し、全てリン酸化セリンの直後にプロリンが存在する（図１）。リン酸化の程度はＳｅｒ－１１６（３５%）＞Ｓｅｒ－９９（３０%）＞Ｓｅｒ－２６（２５%）の順に多く、他は１０%以下であった。ウシ脳より精製したＭＡＰキナーゼは、ＭＡＲＣＫＳをリン酸化した。エレクトロスプレー質量分析法で分析すると、２及び３個のリン酸が導入された分子種が観測された（図２）。ＬＣ／ＭＳ法によりリン酸化部位を同定すると、in vivoでの３カ所の主要なリン酸化部位が、同じ順でリン酸化されていた。

^{108}EGEAAEPG[S]PTAAEGE

^{39}HVKVNGDA[S]PAAAEPG

^{74}AAAGSGAA[S]PAAAEKD

^{91}AAAPDAGA[S]PVEKEAP

^{21}AAVAS[S]PSKANGQENGH

^{128}ASSTS[S]PKAEDGATPSP

図１．新しく見いだされたＭＡＲＣＫＳのリン酸化部位とその周辺の一次構造

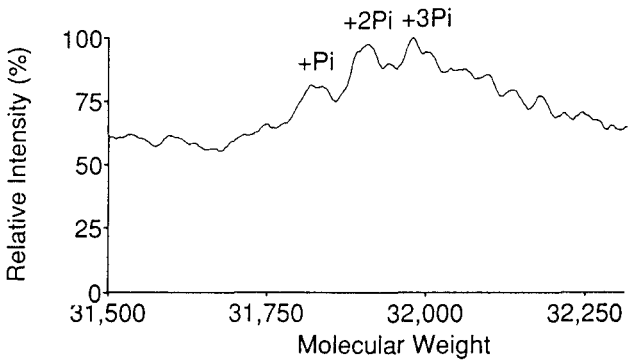


図２．エレクトロスプレーイオン化法によるＭＡＰキナーゼでリン酸化したＭＡＲＣＫＳの質量分析

[考察]

Ｃキナーゼの主要基質タンパク質として知られているＭＡＲＣＫＳは、Ｃキナーゼ以外のいわゆるＳＰキナーゼにより生体内でリン酸化されていることが明らかとなった。脳より精製したＭＡＰキナーゼが３カ所の主要なリン酸化部位でＭＡＲＣＫＳをリン酸化することから、ＭＡＲＣＫＳが、生体内でＭＡＰキナーゼの基質であることが推定される。このことは、ＣキナーゼとＭＡＰキナーゼが共通の基質タンパク質をもち、ＭＡＲＣＫＳのリン酸化を通じて伝達物質放出の制御に関わっていることを示唆する。

[文献]

1.Taniguchi, H. and Manenti, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9960-9963.

2. Manenti, S., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. and Taniguchi, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 6878-6881.

3. Manenti, S., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. and Taniguchi, H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22310-22315.

4. Drewes, G., et al. (1992) *EMBO J.* **11**, 2131-2138.

167 ＰＮＰ１４ファミリータンパク質の精製と一次構造の解析

中条茂男、中谷一泰
（昭和大・薬・生物化学）

〔要約〕神経細胞特異的リン酸化タンパク質phosphoneuroprotein 14 (PNP 14, Mw=14,276))に対する抗体と交差反応を示すタンパク質を牛大脳、および小脳に見い出した。組織ホモジネートの上清をDE-52カラムを用いて分析すると、PNP 14は0.25 M NaClで溶出されたが、0.2 M NaClで溶出された分画に抗PNP 14抗体と反応するタンパク質を認めた。このタンパク質を精製後、部分一次構造を決定し、ホモロジー検索を行ったところ、synuclein (SYN) 1と同定された。SYN1はラット脳cDNAライブラリーからクローニングされたアミノ酸140残基より構成される分子量14,515の酸性タンパク質であった。その一次構造上のホモロジーはPNP 14に対して55.7%であったが、N末領域に共通のアミノ酸配列が認められた。SYN1は脳に特異的なタンパク質であり、大部分がシナプトソーム膜に結合して存在していると考えられている。また、そのファミリーとしてSYN2、およびSYN3の存在が推定されており、PNP 14を含む脳特異的タンパク質ファミリーを形成していると考えられる。以上の結果から、中枢神経系において、PNP 14は可溶性画分で、SYN1はシナプトソーム膜と異なる部位で同様の生理機能を発現している可能性が示唆される。

脳はその高次機能を発現するために他の組織には見られない特異的なタンパク質の発現が認められる。PNP 14の組織内分布は精巣において、中枢神経系の約1/3の発現が認められる程度で、他の組織ではほとんど検出されない(1,2)。PNP 14はこれまでに、EGF受容体、$pp60^{v\text{-}src}$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(CaM-kinase II)によりセリン残基がリン酸化されること(3)、および$pp60^{c\text{-}src}$やPI3-キナーゼと複合体を形成することから情報伝達系に重要な役割を演じていることが示唆されている(4)。本実験では、牛脳を用いたPNP 14精製過程において、抗PNP 14抗体と反応するタンパク質を見い出したので、その一次構造を明らかにしPNP 14と比較した。また、種々のタンパク質リン酸化酵素の基質になるかどうかについても検討した。

【実験方法】

牛大脳、および小脳からPNP 14とそのファミリータンパク質の精製は既報に従って行った(1)。タンパク質の検出はSDS-PAGE後、クマシーブルー染色、およびイムノブロットにより行った。一次構造の解析は精製標品をトリプシン、キモトリプシン消化し、得られたペプチドを逆相HPLCで単離後、ABI 473A気相プロテインシーケンサーを用いて行った。

【実験結果・考察】

神経細胞特異的リン酸化タンパク質phosphoneuroprotein 14 (PNP 14, Mw=14,276))に対する抗体と交差反応を示すタンパク質を牛大脳、および小脳に見い出し、均質に精製した。その存在量はいずれも全可溶性タンパク質の0.05%で、PNP 14の約1/2であった。精製標品のSDS-PAGE/クマシーブルー染色、および抗PNP 14抗体を用いたイムノブロットの結果を図1に示した。精製標品を用いて部分一次構造を決定し、ホモロジー検索を行ったところ、ラット脳cDNAライブラリーからクローニングされたアミノ酸140残基より構成されるSYN1(5)と同定された(図2)。SYN1とPNP 14における一次構造上のホモロジーは55.7%であったが、N末側から62アミノ酸までのアミノ酸配列を比較すると僅か5アミノ酸に置換が認められるだけで、種の違いを考慮すると非常に高いホモロジーが認められた(図3)。また、PNP 14においてこの領域に特徴的に保存されている繰り返し配列(KTKEGV)もSYN1に認められた。一方、63番目のアミノ酸からC末側までのホモロジーは低く、C末端付近に僅かに認められる程度であった。ラットPNP 14(6)とSYN1のcDNAを比較検討した結果、両者はそれぞれ独立した遺伝子から転写、翻訳されていると考えられた。また、SYN1がタンパク質リン酸化酵素の基質になるかどうかを

検討した結果、PNP 14同様EGF受容体、pp60$^{v\text{-}src}$によりチロシン残基が、またCaM-kinase IIによってもリン酸化された。以上の結果とSYN1はシナプトソーム膜に結合して存在していると考えられていることから、中枢神経系においてSYN1はシナプトソーム膜で、PNP 14は可溶性画分(1,7)で同様の生理機能を発現し、その機能がリン酸化反応を介して調節されている可能性が示唆される。

【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) Shibayama-Imazu, T., Okahashi, I., Omata, K., Nakajo, S., Ochiai, H., Nakai, Y., Hama, T., Nakamura, Y., and Nakaya, K. (1993) Brain Res., 622, 17-25.

(3) Nakajo, S., Tsukada, K., Omata, K., Nakamura, Y., and Nakaya, K. (1993) Eur. J. Biochem., 217, 1057-1063.

(4) 中条茂男、塚田和彦、中谷一泰 (1992) 神経化学、31, 518-519.

(5) Maroteaux, L., and Scheller, R. H. (1991) Mol. Brain Res., 11, 335-343.

(6) Tobe, T., Nakajo, S., Tanaka, A., Mitoya, A., Omata, K., Nakaya, K., Tomita, M., and Nakamura, Y. (1992) J. Neurochem., 59, 1624-1629.

(7) Nakajo, S., Shioda, S., Nakai, Y., and Nakaya, K. (1994) Mol. Brain Res., in press.

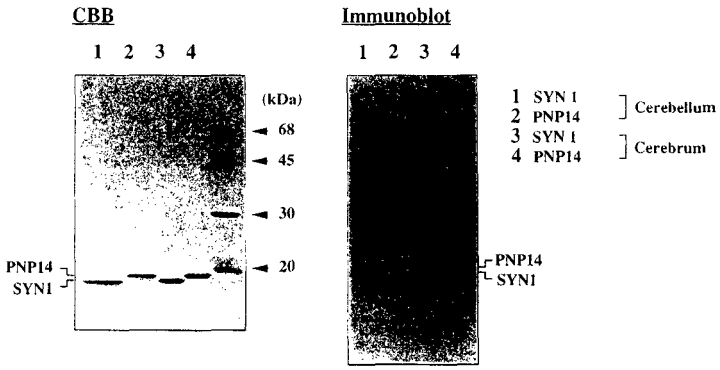


図1.

図1．牛大脳、小脳から精製したタンパク質(SYN1)、およびPNP 14のSDS-PAGEと抗PNP 14抗体を用いたイムノブロット。

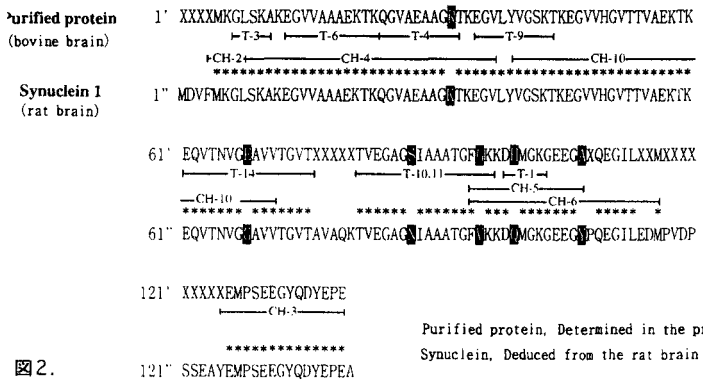


図2.

図2．精製タンパク質とSYN1のアミノ酸配列。T,トリプシン消化ペプチド; CH,キモトリプシン消化ペプチド。

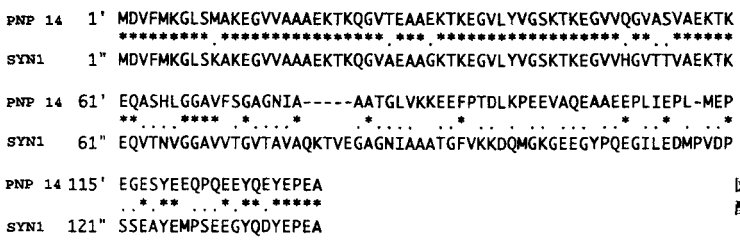


図3.

図3．SYN1とPNP 14のアミノ酸配列。＊は同一アミノ酸を示す。

168 PC12細胞でのCa^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの強制発現による神経突起伸展の抑制

田島和周、山本秀幸、小野常彦、Sodering, T. R.*、宮本英七

（熊本大・医・第一薬理、*オレゴン医科大）

〔要約〕

Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMキナーゼII) αサブユニットのcDNAを有する発現ベクターを作成した。これをPC12細胞に導入し、ネオマイシン耐性の複数の安定クローン細胞を確立した。得られた安定クローン細胞では、CaMキナーゼII活性は約1.2倍と約2.1倍に増加した。ノーザンブロット法およびイムノブロット法で酵素活性に応じた酵素の発現が確認された。イオノマイシン刺激により強制発現したCaMキナーゼIIは、内在性酵素と同様に活性化され、同時に微小管付随蛋白質2 (MAP2) の燐酸化が増強された。安定クローン細胞では、1mM ジブチリルcAMP 刺激により誘導される神経突起形成が酵素の発現量に応じて抑制された。これらの結果は、強制発現したCaMキナーゼIIが細胞内で機能し得ること、神経突起形成抑制に関与することを示唆している。

［目的］

Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMキナーゼII) は、神経細胞に多量に存在し、神経伝達物質の合成や分泌、長期増強に代表されるシナプス伝達の可塑性、細胞骨格蛋白質の調節など、主要な神経機能の調節に関与することが報告されている(1)。我々は、CaMキナーゼIIの神経細胞分化における役割を明らかにする目的で、本酵素の発現量の異なる安定クローン細胞を確立し、細胞内での本酵素の活性化反応と神経突起形成に与える影響を検討した。

［方法］

マウス脳CaMキナーゼII αサブユニットのcDNA（オレゴン医科大学D.A. Bricky博士より提供）(2)を、動物細胞の発現ベクターであるpCAGGSneo（東京大学宮崎純一博士より提供）に組み込んだ。ラット副腎髄質褐色細胞腫由来のPC12細胞に、このプラスミドを電気パルス法で強制導入し、ネオマイシンを含む培地で継代することで安定クローン細胞を得た。CaMキナーゼII活性とcAMP依存性蛋白質燐酸化酵素（cAMPキナーゼ）活性は、Hashimotoらの方法により測定した(3)。ノーザンブロットは、ラット脳CaMキナーゼII αサブユニットの全長cDNAをランダムプライマー法でラベルしたプローブを用いて行なった。細胞内でのCaMキナーゼIIの活性化反応は、既法(4)により行った。CaMキナーゼIIの自己燐酸化反応およびMAP2の燐酸化反応は、細胞を^{32}P-正燐酸でラベルし、イオノマイシン2 μMで5分間刺激した後、0.1%トリトン-X100を含むRIPA緩衝液でホモジナイズし、免疫沈降法にて検討した。 神経突起伸展は、細胞をコラーゲン塗布した35mm dishに5×10^3個づつ細胞を撒き、24時間後に1mM dbcAMPを加え、さらにその24時間後に撮影して測定した。150から300個の細胞を調べ、細胞体の2倍以上の長さの突起を持つ細胞の割合を算出した。

［結果と考察］

CaMキナーゼII活性が、約1.2倍（α5）と約2.1倍（α10）に増加した安定クローン細胞を確立した。（図1）安定クローン細胞では、ノーザンブロット法およびイムノブロット法により、CaMキナーゼII

活性に応じたCaMキナーゼIIαサブユニットの発現が確認された。wild type細胞では、本法によって、内在性CaMキナーゼIIがほとんど検出されず、PC12細胞の持つCaMキナーゼIIは、マウス脳のCaMキナーゼIIαとは、その構造が異なることが示唆された。イオノマイシン2μMの5分間の刺激で分子量約5.2万の内在性CaMキナーゼIIとCaMキナーゼIIαの自己燐酸化反応が増強した。さらにいずれの細胞でもCa^{2+}/カルモデュリン非依存性活性が、イオノマイシン刺激で全活性の約4%から約15%に上昇した。これらの結果から発現した酵素が、細胞外からの刺激で内在性のCaMキナーゼIIと同様に活性化されることが確認された。また安定クローン細胞では、wild type細胞に比べ、MAP2の燐酸化反応が増加していた。さらにイオノマイシン刺激によりその燐酸化反応は増強された.

つぎに安定クローン細胞を用いて、dbcAMP刺激による神経突起伸展について検討した。いずれの細胞もdbcAMPを加えないときは、神経突起の伸展はほとんどみられなかった。1mM dbcAMP投与後24時間にて、wild type細胞では、神経突起の伸展が認められた。CaMキナーゼIIαを導入した細胞では、神経突起伸展の程度がwild type細胞に比べて悪く、α10がα5よりさらに減少していた。cAMPキナーゼ活性はいずれの細胞においても著名な差を認めなかった。これらの結果は、強制発現したCaMキナーゼIIが何らかの理由で神経突起伸展を抑制していることを示唆しているが、その機構については不明である。現時点では、dbcAMPによるPC12細胞の神経突起伸展作用機構についての解明がなされていない。dbcAMPは、cAMPキナーゼ活性化反応を介し作用していると考えられ、この反応に対するCa^{2+}のCaMキナーゼII活性化反応がどのように相互作用するかについてさらに解析することが必要であろう。

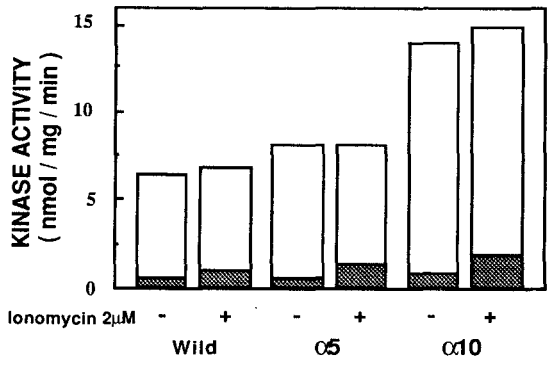


図1　イオノマイシン刺激によるCaMキナーゼIIの活性化反応
イオノマイシン刺激後の細胞上清分画での酵素活性を示す。酵素活性はCa^{2+}/カルモデュリン非存在下（▩）あるいは存在下（□）で測定した。
実験は、6回繰り返し、再現性を確認した。図には代表的一例を示す。

1)Hanson, P.I. and Schulman, H. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 559-601

2)Hanley, R.M., Payne, M.E., Cruzalegui, F., Christenson, M.A. and Means, A.R. (1989) *Nucleic Acid Res.* **17**, 3992

3)Hashimoto, Y. and Sodering, T.R. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 418-425

4)Fukunaga, K., Sodering, T.R., and Miyamoto, E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22527-22533

169　ラット大脳ＣａＭキナーゼⅣの酵素化学的性質

亀下　勇、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化学）

〔要約〕
ラット大脳から従来の方法で得たＣａＭキナーゼⅣをＤＥＡＥ－ＮＰＲ・ＨＰＬＣカラムにかけたところ、顕著な酵素活性の低下がみられた。この酵素（ＮＰＲ－ＰＫⅣ）に、カラムで分離した別の画分を添加すると、加えた量に依存して酵素の活性化がみられた。この酵素の活性化反応にはCa^{2+}／ＣａＭとＡＴＰが必要であった。また、ＮＰＲ－ＰＫⅣは以前の酵素に比べると自己リン酸化反応がゆっくり進み、その反応は分子内反応であることがわかった。これらの結果から以前のＣａＭキナーゼⅣ標品中に共存するアクチベータは、ＣａＭキナーゼⅣをリン酸化するCa^{2+}／ＣａＭ依存性プロテインキナーゼであることが示唆された。

ＣａＭキナーゼⅣは、脳ならびに胸腺に豊富に存在する多機能性プロテインキナーゼである(1)。本酵素は、自己リン酸化(2,3)、Ａ－キナーゼ(4)ならびに内在性のプロテインキナーゼ(5)によるリン酸化で活性調節を受けることが知られている。ラット大脳から従来の方法(3)で精製したＣａＭキナーゼⅣをＤＥＡＥ－ＮＰＲ・ＨＰＬＣカラムにかけたところ、酵素化学的性質の異なる酵素が得られた。今回は、このＮＰＲカラムで精製したＣａＭキナーゼⅣの酵素化学的性質について検討を加えた。

［実験方法］
ＣａＭキナーゼⅣはラット大脳より精製した標品(3)をさらにＤＥＡＥ－ＮＰＲ・ＨＰＬＣカラム(6)に通し精製した。酵素活性は、^{32}Ｐ-ＡＴＰから合成基質のsyntide-2あるいはpeptide-γに取り込まれるリン酸の量を測定した。

［結果ならびに考察］
ＤＥＡＥ－ＮＰＲ・ＨＰＬＣにかける前の酵素（ＰＲ－ＰＫⅣ）とカラム精製後の酵素（ＮＰＲ－ＰＫⅣ）によるpeptide-γのリン酸化のタイムコースは図１Ａに示したように全く異なるパターンを示した。ＰＲ－ＰＫⅣは、反応中の活性化がみられるのに対し、ＮＰＲ－ＰＫⅣは活性も低く、ほぼ直線的なタイムコースを示した。この結果からＮＰＲカラムにより酵素のアクチベータが除かれた可能性が考えられたので、ＮＰＲカラムで分離した別の画分のＮＰＲ－ＰＫⅣに対する添加効果を調べてみた。酵素より低塩濃度で溶出する画分にアクチベータ活性が検出された。活性化は加えるアクチベータの量に依存し、また熱処理したアクチベータは活性化効果を示さなかった（図１Ｂ）。また、Ca^{2+}／ＣａＭ、ＡＴＰ存在下にアクチベータとＣａＭキナーゼⅣをプレインキュベーションしておくと、酵素は活性化状態に変化した。これに対し、Ca^{2+}、ＣａＭいずれを除いてもプレインキュベーションの効果は見られず、ＡＴＰを除いたプレインキュベーションではむしろ酵素活性の低下がみられた（図１Ｃ）。これらの結果から、以前の酵素標品中に共存していたアクチベータはCa^{2+}／ＣａＭ依存性プロテインキナーゼであることが示唆された。ＮＰＲ－ＰＫⅣはＰＲ－ＰＫⅣに比べ自己リン酸化反応がゆっくり進行し、９０分後のリン酸の取り込みは酵素１モル当り0.71-0.78モルであった。酵素濃度を変えて自己リン酸化反応を行った時の比活性が、図２のように濃度に関係なくほぼ一定の比活性を示すことから反応は分子内反応と考えられた。ＰＲ－ＰＫⅣを用いた自己リン酸化反応では分子間反応がみられたが(3)、これは共存するアクチベータによるＣａＭキナーゼⅣのリン酸化によるものと考えられた。ＮＰＲ－ＰＫⅣと自己リン酸化ＰＫⅣのキネティックパラメータを表１にまとめて示した。ＮＰＲ－ＰＫⅣではpeptide-γに対するVmaxが特に低く、またsyntide-2に対するKmが非常に大きな値を示した。自己リン酸化酵素では、基質に対するKmの低下がみられるがsyntide-2に対するVmaxの大きな変化は見られなかった。以前の精製酵素でみられた酵素反応の特徴は、その標品中に微量に共存するアクチベータの影響を受けていたものと思われる。

［文献］
(1) Miyano, O., Kameshita, I. and Fujisawa, H. (1992) J. Biol. Chem. 267, 1198-1203
(2) Frangakis, M. V., Ohmstede, and Sahyoun, N. (1991) J. Biol. Chem. 266, 11309-11316
(3) Kameshita, I. and Fujisawa, H. (1993) J. Biochem. 113, 583-590
(4) Kameshita, I. and Fujisawa, H. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 191-196
(5) Okuno, S. and Fujisawa, H. (1993) J. Biochem. 114, 167-170
(6) 亀下勇、石田敦彦、藤澤仁 (1993) 神経化学 32, 466-467

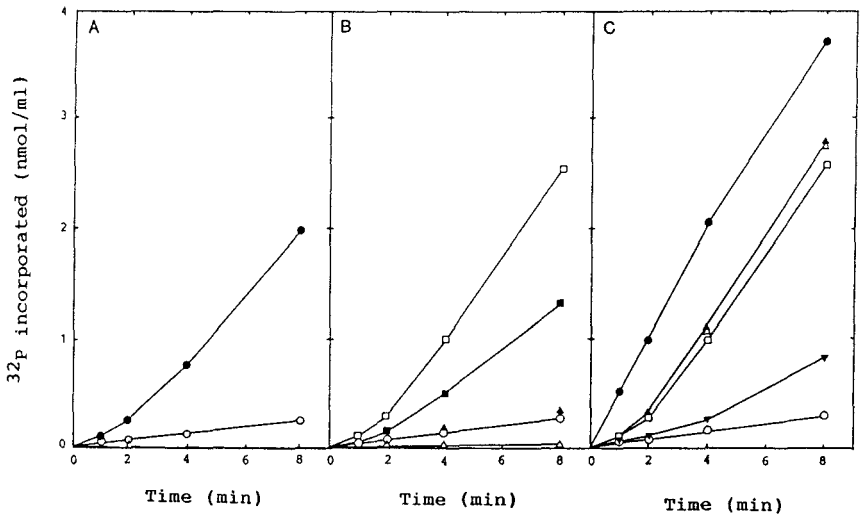


図1　CaMキナーゼIVによるpeptide-γのリン酸化反応
(A) 反応液：^{32}P-ATP, peptide-γ, Ca^{2+}, CaM, Enzyme
NPR-PKIV(○)、PR-PKIV(●)添加により反応スタート
(B) NPR-PKIV(○)、NPR-PKIV + Activator(3ng、■;6ng、□)、Activator(△)
NPR-PKIV + Heat treated Activator(▲)添加により反応スタート
(C) NPR-PKIV (○)添加により反応スタート
反応液：^{32}P-ATP, peptide-γ, Ca^{2+}, CaM, NPR-PKIV, Activator
下記のComponentを除いてPreincubation (4 min)した後
NPR-PKIV + Activator(□), peptide-γ(●), CaM(△), Ca^{2+}(▲), ^{32}P-ATP(▼)
それぞれを添加して反応スタート

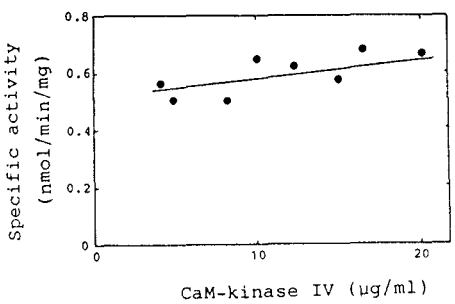


図2　自己リン酸化反応に及ぼす酵素濃度の影響

表1　CaMキナーゼIVのキネティックパラメーター

	NPR-PKIV		Autophosphorylated PKIV	
	Km or Ka (μM)	Vmax (nmol/min/mg)	Km or Ka (μM)	Vmax (nmol/min/mg)
ATP	27	806	5.5	896
Syntide-2	71	773	2.1	990
Peptide-γ	67	90	9.4	942
CaM	0.059	775	0.035	935

170 遺伝的運動障害ﾗｯﾄの小脳形成不全とｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸代謝調節系

國井修一[1,4]・田丸政男[2]・Dekker-Ohno京子[3]・藤田公和[4]・安藤正人[4]・永田　豊[4]・錫村明生[5]（[1]椙山女学園大,[2]鈴鹿医科技大,[3]名大環医研,[4]藤田保衛大・医・生理,[5]神経内科）

[要約]

遺伝的後弓反張様の運動障害をもつﾗｯﾄ(Dilute-opisthotonus rat;Dopﾗｯﾄ)の小脳組織内遊離ｱﾐﾉ酸神経伝達物質代謝に関与する酵素のうち、ｸﾞﾘｱ細胞中に局在しglutamate(Glu)からglutamine(Gln)を合成する酵素のglutamine synthetase(GS)、および神経終末に局在しGlnからGluを生成するglutaminaseの活性を測定した。その結果、小脳組織中のGS活性は、Dopﾗｯﾄと対照との間で差異は見られなかったが、glutaminase活性はDopﾗｯﾄの小脳中で有意に減少していた。組織切片染色像では、Dopﾗｯﾄ小脳小葉の発達が不良で顆粒細胞層が薄く、Purkinje細胞の変性・脱落とともに分子層内ﾆｭｰﾛﾝも一部脱落し、反応性に小型のｸﾞﾘｱ株細胞が多数浸潤していた。また、IP_3抗体を用いた免疫組織染色では、Dopﾗｯﾄ小脳Purkinje細胞の樹状突起の形成不全が認められた。以上の所見から、Dopﾗｯﾄで発現する運動失調の原因の一つとして、小脳の低形成に伴う神経終末部でのｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸代謝系の異常およびPurkinje細胞の樹状突起の形成不全が示唆された。

Dopﾗｯﾄは生後12日齢頃より横転を繰り返すようになり、３週齢では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して、自ら哺乳することが出来ずに死亡に到る遺伝性突然変異動物である(1)。 我々は、Dopﾗｯﾄの中枢神経系組織について興奮性神経伝達候補物質のｱﾐﾉ酸含量を測定し、Gluおよびその前駆物質であるGln含量がDopﾗｯﾄ小脳組織中で減少していることを既に報告した(2)。今回は、これらｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸作動性神経伝達物質の生成および分解に関する酵素系について測定した。また、これらﾗｯﾄから小脳組織切片を作製し、これにH.E.染色、 Kluver-Barrera染色およびIP_3抗体を用いた免疫染色法をおこなって、小脳組織の形態像およびPurkinje細胞の樹状突起形成状況などについて観察した。

[実験方法]

名古屋大学環境医学研究所で飼育・維持されているBN-dop系（Dopﾗｯﾄの系統維持用近交系）より得られた運動障害の遺伝子をﾍﾃﾛで持つ雌とMITC系（運動障害のない正常系統）との雄とをかけあわせ供試動物群とし、この両親から得られたF_1同志の交配によって得られたF_2を実験に使用した。生後12日齢でこのF_2仔動物のうち、上述の運動障害(1)が観察された７匹をDopﾗｯﾄ群、症候を示さない７匹を対照群とした。生後16日齢仔ﾗｯﾄをｴｰﾃﾙ麻酔下で断頭屠殺し、小脳を摘出して凍結保存した。遊離ｱﾐﾉ酸含量は、小脳組織を磨細後、ethanolで抽出した上層をｱﾐﾉ酸自動分析機により測定した。組織中のglutaminase活性はGraham and Aprisonの方法(2)で、GS活性はPrusiner and Milnerの方法(4)でそれぞれ定量した。

[実験成績と考察]

①小脳組織中のｱﾐﾉ酸含量: Dopﾗｯﾄおよび対照ﾗｯﾄ小脳内で興奮性神経伝達物質のｱｽﾊﾟﾗｷﾞﾝ酸(Asp)含量は、両動物群間で有意な差異は見られなかった(図1)。しかし、Gluおよびその前駆物質であるｸﾞﾙﾀﾐﾝ(Gln)含量は、Dopﾗｯﾄ小脳で対照群よりも有意に低下しており既報(3)と一致していた。他のｱﾐﾉ酸類の小脳内含量は、Dopﾗｯﾄおよび対照ﾗｯﾄで差異は認められなかった。

②小脳内のGS活性およびglutaminase活性:Dopﾗｯﾄ群小脳内GS活性は対照群との間に有意な差異は見られなかったが、glutaminase活性はDopﾗｯﾄ群で対照群に比較して有意に低下($p<0.05$)していた(図2)。glutaminaseは神経終末部に局在することから、Dopﾗｯﾄ群小脳組織内でこの酵素活性が低下していたことは、形態組織学的に顆粒細胞層およびPurkinje細胞層の低形成との関連性が示唆された。GS活性は両群間で変化が見られなかったことから、ｸﾞﾘｱ細胞内でのGluからGlnへの代謝系には特に異常が存在しない可能性が示唆された。

③小脳の組織学的検索：Dopﾗｯﾄ小脳では、小脳皮質溝の陥入形成が不充分であり、対照群に比較して顆粒細胞層が薄く認められた。また、Purkinje細胞体の脱落変性像がDopﾗｯﾄ小脳では多数認められた。さらに対照群に比較して、Dopﾗｯﾄ小脳では外星状細胞やﾊﾞｽｹｯﾄ細胞などの大型の神経細胞消失がみられ、代償的に小型の楕円形の神経膠細胞体（ﾐｸﾛｸﾞﾘｱ）が多数浸潤していた。IP_3抗体を用いた免疫組織学的方法による染色像では、Purkinje細胞の樹状突起形成がDopﾗｯﾄ小脳で極めて不良であることが確認された(当日発表展示)。以上のことから、Dopﾗｯﾄで発現する運動失調の原因の１つとして、遺伝的小脳低形成に伴う神経終末部内でのｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸代謝系の異常、およびPurkinje細胞の樹状突起の形成不全による神経伝達障害が推察された。

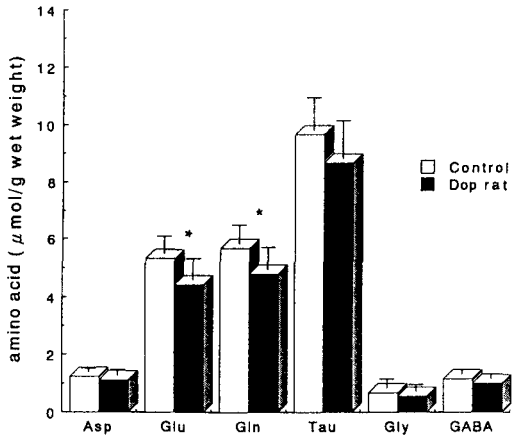


Fig.1. Comparion of amino acid concentration in cerebellum. *:p<0.05

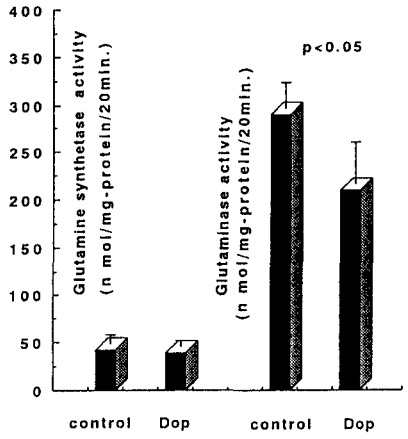


Fig.2. Comparison of glutamine synthetase and glutaminase activity of control and Dop rat cerebellum.

[謝辞] 本研究で使用したIP_3抗体を御供与下さいました東京大学医科学研究所 御子柴克彦教授に感謝いたします。

[文献](1)Dekker-Ohno, K. et al.(1993) *Lab. Anim. Sci.* 43. 370-372.(2)Graham, L. T. Jr. and Aprison, H. M.(1969) *J. Neurochem. 36. 559- 566.* (3)國井修一、他(1993)*藤田学園医学会誌* 17. 157-162.(4)Prusiner, S. and Milner, L.(1970) *Anal. Biochem.* 37. 429-438.

171 発作感受性 El マウス脳における発作後の AP-1 DNA 結合能について

勝元栄一、尾崎宜洋、横谷 昇*、山上 榮
（大阪市立大学医学部神経精神医学教室、*大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所）

〔要約〕

我々は既に El マウスの放り上げ刺激による発作後において c-*fos* mRNA、Fos 蛋白質の発現が El および ddY マウスへの bemegride 投与による発作の場合より延長していることを報告した[2),3),4),5)]。今回は転写制御因子である AP-1 の DNA 結合能について、けいれん後の変化を検討した。El[s] では刺激を与える前より AP-1 結合能は比較的高く、放り上げ刺激による発作後 90 分で peak となり、その後も結合能は持続し、96 時間後に元の level に戻った。また、El 群に bemegride によってけいれんを誘発させた時よりも DNA 結合能の上昇している時間は長かった。ddY における AP-1 結合能はその上昇も持続時間も少なかった。このことは、El[s] が週一回の放り上げ刺激で発作を繰り返し、Fos、Jun 蛋白質が誘導されて AP-1 が形成され、発作感受性を高める何らかの遺伝子を誘導しているのではないかと推測された。

（目的）Fos、および Jun family は hetero または homodimer を形成し AP-1 となり、遺伝子転写制御因子として機能するといわれている。今回は El マウスの発作後の AP-1 の DNA 結合能について検討を加えたので報告する。

（方法）El[s] に放り上げ刺激を加え、El[s]、El[ns]、ddY に対して bemegride 16 mg/kg 体重を腹腔内に注射し、発作を誘発させ、経時的に得た脳より Dignam らの方法[1)]により核抽出液を調製した。核抽出液（25 μg 蛋白質）と 4 μg の poly (dI-dC) を 15 分間室温で前処理を行った後、[α-^{32}P]-dATP と DNA polymerase I の Klenow fragment で 5' 末端をラベルした 2 本鎖 oligonucleotide（5'-TGATCCG GCTGACTCATCACTAG-3')を添加し、30 分間室温で反応させた。反応液を 4 % polyacrylamide-gel 電気泳動（150 V、100 min.）で DNA-蛋白質複合体と free の DNA 断片と分離した。泳動後 gel を濾紙に移し、乾燥させ、autoradiography を行った。

（結果）El[s] では刺激を与える前より AP-1 結合能は比較的高く、放り上げ刺激を加えて発作を起こすと、90 分後に peak となり、その後も結合能は持続し、96 時間後に元の level に戻った。El[s] に bemegride を注射し、発作を起こさせたときもほぼ同様の経時的変化を示した。しかし、48 時間後には元のレベルに回復するが、96 時間後にはそれよりも低下していた。El[ns] の場合では、刺激前の DNA 結合能は El[s] よりやや低かった。注射による発作後は 90 分で peak となり、24 時間後には注射前の level になった。ddY では注射前の結合能は僅かに認められるのみであり、bemegride による発作後も結合能の上昇は認められたが、El に比べその程度は少なかった。

（考察）ddY 群では El マウスと異なり AP-1 結合能が発作誘発前で殆どみられず、bemegride 発作後も僅かであった。このことは発作非感受性によると考えられる。また、El[s] で El[ns] より結合能が持続していることはてんかんに相関する遺伝子を AP-1 が制御し、週一回の放り上げ刺激によって発作感受性が上昇することを示唆する結果であった。

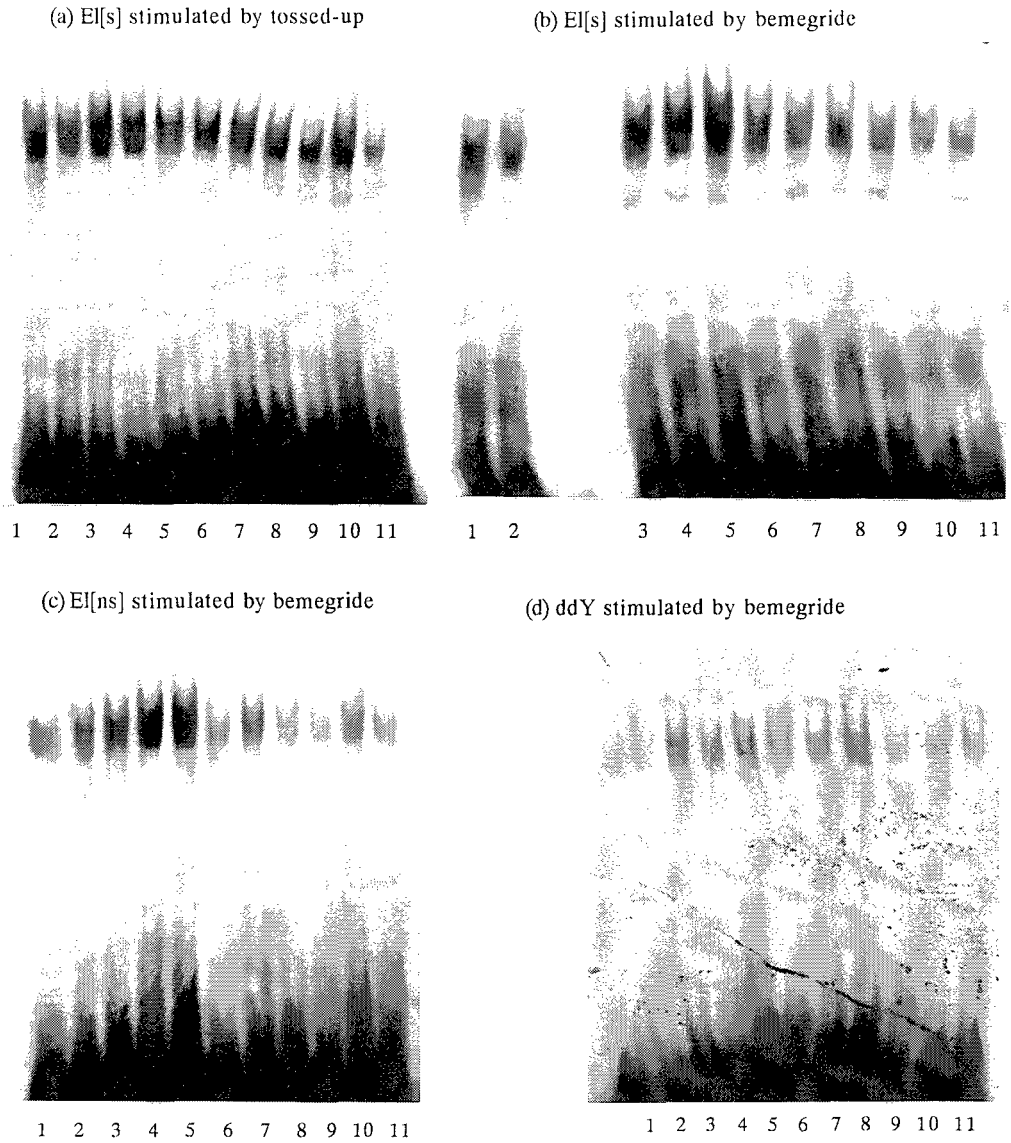


Fig. 1 Autoradiograms of gel retardation assay. Lane 1 : nonstimulation, 2 : 30 min after seizure, 3 : 60 min, 4 : 90 min, 5 : 2 hr, 6 : 4 hr, 7 : 6 hr, 8 : 24 hr, 9 : 48 hr, 10 : 72 hr, 11 : 96 hr.

（参考文献）

1. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489.
2. Katsumoto, E., Ozaki, T., Yamagami, S., Yokotani, N., Mui, K. and Onishi., H. (1992) NEUROSCIENCES 18 Supplement, 221-225.
3. 勝元栄一、山上　榮、尾崎宣洋、横谷　昇、撫井弘二、大西　博 (1993) てんかん研究 11, 1-8.
4. 勝元栄一、横谷　昇、撫井弘二、大西　博、山上　榮 (1993) 神経化学 32, 66-67.
5. Katsumoto, E., Yokotani, N., Mui, K., Onishi, H. and Yamagami, S. (1994) Jpn. J. Psychiatry Neurol. 48, (In press).

172 El マウス脳におけるポリ(A)結合蛋白質について

木岡哲郎、山上榮
（大阪市立大学医学部神経精神科）

〔要約〕
われわれは、既に El マウスの固有の痙攣発作によって、ポリ(A)ポリメラーゼの活性が低下し、mRNAの翻訳活性も低下することを報告してきた。今回は、ポリ(A)ポリメラーゼの活性に影響を与え、ポリ(A)鎖の保護の役割を持つポリ(A)結合蛋白質(PABP)についてfilter-binding assay で検討した。発作によって、核内の結合蛋白質の binding activity は60%に低下し、細胞質の結合蛋白質は90%に低下した。これらのことから、発作によって、結合蛋白質が変化してポリ(A)鎖との結合力が低下し、ポリ(A)鎖の安定性や、ポリ(A)$^+$mRNA活性に影響を与えると推測した。

（目的）El マウスの固有の痙攣発作によるポリ(A)結合蛋白質の変化を観察し、El マウス脳におけるmRNA翻訳に与える影響を明らかにする。

（方法）マウス脳より、細胞核画分と細胞質画分を調製し、その粗抽出液を用いてfilter-binding assay [4]を行った。反応混液は、2ngの[^{3}H]-poly(A)、100μgのpoly(C)、粗抽出液の蛋白質（0.1-0.3unit)を含んだbuffer A (0.1M NaCl, 30mM Tris-HCl (pH. 8.0), 15mM 2- mercaptoethanol, 1mM EDTA, 1mM PMSF) 合計100μlとなるように調製した。25°Cで10分間インキュベートを行い、1mlの氷冷したbuffer B (60mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH. 8.0), 1mM EDTA) を加え反応を停止した。混液を24mm nitrocellulose filter (HAMP, Millipore) に通した後、filterは5mlのbuffer Bで洗浄し、乾燥し、カウントした。1unitは1ngのpoly(A)と結合する蛋白質の単位とした。

（結果）poly(C)に変えて、ラベルしていないpoly(A)を反応液に加えたときのカウントを非特異的活性としてpoly(A)結合の活性より除いた。以上による細胞核内PABP活性は、El マウスの痙攣発作直後で、発作間歇期の70%台に低下し、120分後には元の値に回復した(Fig.1)。これに対し、細胞質のPABP活性は僅かしか低下しなかった(Fig.2)。肝臓の細胞核の活性は、発作によって変化が見られなかった(Fig. 3) 。発作間歇期における細胞核のPABP活性を母系であるddYマウスとEl(s)マウスで比較したところ、El(s)マウスが有意に高値を示した(Table 1)。

（考察）PABPはmRNAの3'末端のポリ(A)鎖と結合し、保護するとともにmRNAの安定化をはかる[1]。PABPを除去すると、mRNAの半減期の減少がみられたという報告[2]がある。そのため、今回の実験で得られた発作後のPABP活性の低下はmRNAの不安定化を惹き起こすと考えられる。既に報告したポリ(A)$^+$mRNA翻訳活性の低下はポリ(A)鎖の変化によると予想していたが、このPABPの変化はポリ(A)鎖の異常を惹き起こす誘因になると考えられる。発作間歇期におけるPABP活性がElでddYより高値であったことは、頻回の発作によるリバウンドによる上昇の可能性が示唆される。細胞核のPABPは細胞質に比較して痙攣の影響が強いが、細胞核と細胞質のPABPでは分子量、構造に相違があるため[3]と考えられる。活性の低下もPABPの持ついくつかのドメインが発作により損傷を受けたとも推測される。今後はElとddYのPABPの構造的な差異を検討する必要がある。

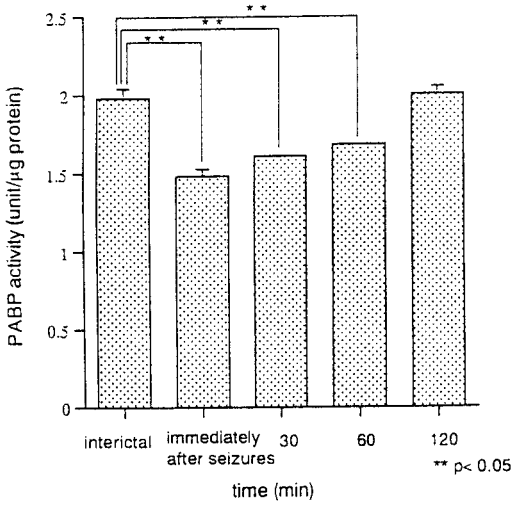


Fig. 1, Alteration of PABP activity of nuclei in brain induced after the seizures of El mice.

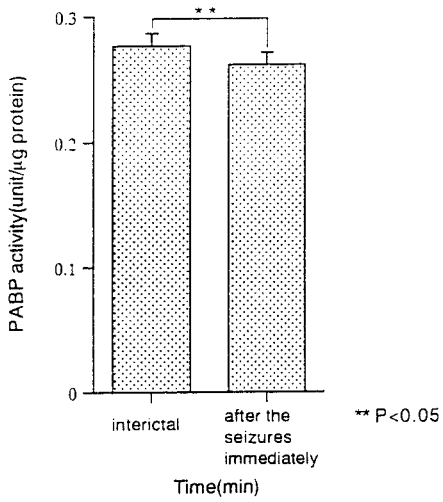


Fig. 2, Alteration of cytoplasmic PABP activity in brain immediately after the seizures.

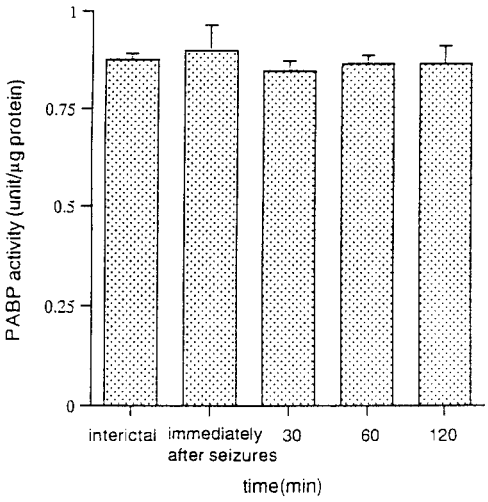


Fig. 3, Alteration of PABP activity in liver nuclei by seizures of El mice.

Table 1 . Poly(A)-binding activities(unit/μg protein) in both the brain and liver nuclei of interictal El and ddY mice

	Mouse	
	El	ddY
Brain	1.94±0.06	1.19± 0.09
Liver	0.94 ± 0.07	0.87± 0.09

** p< 0.05 Significantly different by Student's t test

1) Baer B.W. and Kornberg R.D. (1983) J.Cell. Biol. 96 717-721

2) Bernstein P. , Peltz S.W. and Ross J. (1989) Mol. Cell. Biol. 9 659-670

3) Sachs A. B., Bond M. W. and Kornberg R. D. (1986) Cell 45 827-831

4) Sachs A. B. and Kornberg R. D. (1985) Mol. Cell. Biol .5 1993-1996

173 EIマウス脳mRNAの翻訳活性におよぼすpoly（A）鎖の影響

中西亜紀、撫井弘二、木岡哲朗、黒田陽子、山上栄
（大阪市大・医・神経精神）

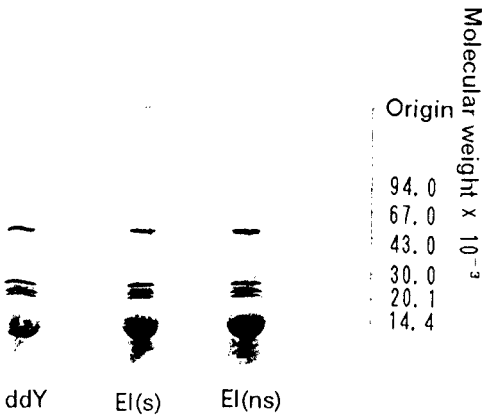
〔要約〕
遺伝性痙攣素因を有するEIマウス脳のpoly(A)$^+$mRNAの翻訳活性とpoly(A)鎖の役割について、兎網状赤血球ライセートを用いたin vitroの系で検討し、poly(A)鎖長について7M尿素-polyacrylamide gel電気泳動を用いて検討した。
我々は既に、痙攣履歴のあるEI[s]、履歴のないEI[ns]の翻訳活性は、発作非感受性のddYマウスより有意に低値を示すことを報告した(6)。RNase Hによりpoly(A)$^+$mRNAのpoly(A)鎖を除去すると、3群マウスの翻訳活性の差はなくなり、翻訳産物のSDS-PAGEの結果でも質的、量的差異は認められなくなった。3群マウスmRNAのpoly(A)鎖長をゲル電気泳動で検討したが、ここでも明かな差異は見い出せなかった。これらの結果より、EIマウスではtranslationの過程において、poly(A)鎖の存在の有無によって異常が生ずることを示唆した。

〔目的〕mRNAの翻訳活性の調節には、5'cap、5'非翻訳領域、3'非翻訳領域及びpoly(A)鎖などが関与すると考えられている(9)。ddYマウスに比べてEIマウス脳では、poly(A)鎖を添加・伸長するpoly(A)ポリメラーゼ活性が生後14日頃より低下すること(1)や、poly(A)$^+$mRNAの翻訳活性が低濃度のpoly(A)添加で促進すること(3,4)から、poly(A)鎖が遺伝的な翻訳活性の障害に関与していると推測される。本研究では、EIマウス脳poly(A)$^+$mRNAの翻訳活性に対するpoly(A)鎖の影響をin vitroの系で検討した。同時にpoly(A)鎖長についても比較検討した。
〔方法〕実験には、生後28日より週1回の放り上げ刺激を与え、生後75日頃より強直間代痙攣を起こした生後100日目の痙攣履歴のあるEI[s]と、生後放り上げ刺激を与えなかった痙攣履歴のないEI[ns]、発作非感受性のddYマウスを用いた。マウス脳から既報(5)に従いpolysomal poly(A)$^+$mRNAを調製した。mRNAをoligo dTと結合させ、RNase Hを用いてpoly(A)鎖を切断した後、phenol－chloroform法でmRNAを抽出した(2,7)。mRNAを[^{35}S]-methionineを含むrabbit reticulocyte lysateの系に加え、in vitroで蛋白質を合成し、[^{35}S]-methionineの取り込みによって翻訳活性を比較した。その翻訳産物は、SDS-PAGEを行った後autoradiographで解析した。また、マウス脳より調製したpolysomal poly(A)$^+$mRNAの3'末端を[^{32}p]Cpで標識した後、RNase Aを用いてmRNAを消化してpoly(A)鎖を取り出し、phenol-chloroformで処理した後、7M尿素-12%polyacrylamide gelにて電気泳動を行い、autoradiographにて解析した(8)。
〔結果〕poly(A)鎖除去後のmRNA 5μg/mlを用いた時の、[^{35}S]-methionineの蛋白質への取り込みの結果をTab. 1に示す。3群マウス間で、翻訳活性に有意差は認められなかった。Fig. 1に翻訳産物のSDS-PAGEのautoradiographを示す。20KDから67KDの間にmajor bandを認め、質的・量的差異は認められなかった。Fig. 2に7M尿素-12%polyacrylamide gel電気泳動のautoradiographを示す。3群マウス間でpoly(A)鎖長に明かな差異は認められなかった。
〔考察〕EI[s]、EI[ns]およびddYマウスのpoly(A)$^+$mRNAよりRNase H処理によりpoly(A)鎖を除去し、in vitroの系で[^{35}S]-methionineの蛋白質への取り込みを比較検討した。その結果、3群間で翻訳活性に差は認められなかった。また7M尿素polyacrylamide電気泳動の結果より、poly(A)鎖長は3群間で明かな差異が認められなかった。これは、以前の3群マウスのpoly(A)$^+$mRNAの翻訳活性を、ddYを100%とするとEI[s]で71.8%、EI[ns]で51.8%と両EI群で著名に低下していた結果(6)や、両EI群では低濃度のpoly(A)の添加で翻訳活性が促進した成績(3,4)などと考え合わせると、EIマウス脳mRNAではtranslationの過程において、poly(A)鎖の関与する段階でなんらかの障害が存在するものと推測される。翻訳産物のSDS-PAGEの結果では、前回のpoly(A)$^+$mRNAを用いたものでも、今回のpoly(A)鎖除去後のmRNAを用いたものでも3群間において質的差異は認められず、EIマウスのtranslationの過程における異常は、特異的な蛋白質をコードするmRNAに限られたものではなく、幅広いmRNA種に対応すると考えられる。これらの結果、EIマウスにおける発作感受性が生ずる可能性があるのかも知れない。

Table 1. Effect of mRNA, which were digested poly(A) tails using RNase H, on incorporation of [^{35}S]-metionine into protein in vitro.

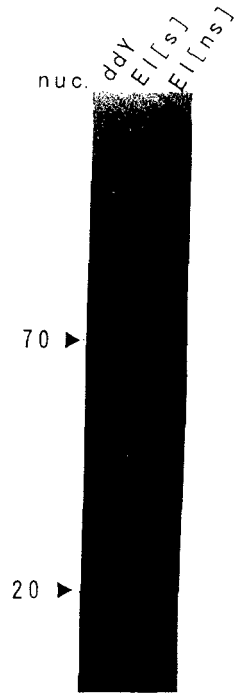
Mice	[^{35}S]-protein, dpm $\times 10^4$ / μl	%control
ddY	5.44 ± 1.11 (n=15)	100
El(s)	5.44 ± 1.17 (n=12)	100
El(ns)	6.48 ± 1.16 (n=17)	119

Standard assays with [^{35}S]-methionine were set up with 5 μg/ml poly(A) tail digested mRNA. Incubation time was 60 min.



Autradiogram of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for protein synthesis by ddY, El(s) and El(ns) mouse brain mRNA preparations which were digested poly(A) tails using RNase H.

Fig. 1



Autoradiogram of 7M urea-polyacrylamide gel electrophoresis for poly(A) tail length of ddY, El(s) and El(ns) mouse brain poly(A)$^+$ mRNA.

Fig. 2

[文献]
(1)Kioka, T. et al. (1989) 医学のあゆみ, 153, 397-398.
(2)Krane, I. M. et al. (1991) Mol. Endocr., 5, 469-475.
(3)Mui, K. et al. (1992) J. Neurochem., 58(suppl), 284.
(4)Mui, K. et al. (1993) 大阪てんかん研究会雑誌, 4, 9-15.
(5)Mui, K. et al. (1989) Jpn. J. Psychiatr. Neurol., 43, 573-574.
(6)Nakanishi, A. et al. (1991) J. Neurochem., 57(suppl), 71.
(7)Robinson, B. G. et al. (1988) Science, 241, 342-344.
(8)Sachs, A. B. (1989) Cell, 58, 857-867.
(9)Sachs, A. B. (1990) Cell Biol., 2, 1092-1098

174 ラット脳内モノアミン濃度およびアセチルコリン濃度におよぼすイサチン（内因性モノアミンオキシダーゼ活性阻害物質）の影響

浜上尚也、遠藤　泰、平藤雅彦、南　　勝
（北海道医療大学薬学部薬理学教室）

〔要約〕　我々はこれまで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)活性は有意に低値をとることを報告した(1)。SHRSPの血圧と腎MAO活性は有意な負の相関関係を示した。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SHRSPの尿中ならびに脳内から抽出した内因性MAO活性阻害物質（トリブリン）の一つがイサチンであることを報告した(2)。最近、*in vitro* 系においてイサチンはアセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性阻害作用も有していることが報告された(3)。この内因性MAO活性阻害物質の役割を検討すべくイサチン投与よるラット脳内モノアミン濃度とアセチルコリン(ACh)濃度の変動について検討した。イサチンをWKYに単回投与すると延髄、海馬、小脳、線条体および大脳皮質のNE濃度が有意に上昇した。また脳内のセロトニン(5-HT)濃度も有意に上昇し、5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)/5-HTの値すなわち5-HTの代謝回転は有意に減少した。イサチンをWKYに投与すると線条体のACh濃度は有意に上昇した。これらの結果よりイサチンはWKY脳内のNE、5-HTおよびACh濃度の調節に深く関与していることが示唆された。

〔目的〕　SHRSPの高血圧進展や脳卒中発症にMAO活性の低下が深く関与していることをすでに報告した。GC-MSを用いてSHRSPの尿中や脳内に内因性MAO活性阻害物質としてイサチンが存在することも見出してきた。そこでイサチンをWKYに投与し脳内NEや5-HT濃度変化について検討した。さらに、近年イサチンはAChE活性を抑制すると報告されている(3)ことからイサチン投与による脳内ACh濃度変化におよぼす影響についても検討した。

〔方法〕　正常血圧のWKYにイサチン(50ならびに 200mg/kg)を単回腹腔内投与し2時間後に脳を摘出し常法に従い7分割した。脳内モノアミン濃度はHPLC-ECDにより測定した。脳内ACh濃度の測定にはマイクロウェーブを使用するのでモノアミン濃度測定とは別立てで行った。各部位のACh濃度は固定化酵素カラムを接続したHPLC-ECDにより測定した。モノアミン濃度およびACh濃度はそれぞれLowry法で得たタンパク量により補正し算出した。

〔結果〕　1)イサチン腹腔内投与2時間後のラット脳内NE濃度は大脳皮質、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与群の2.18±0.31 (mean±SD) 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と有意に上昇した。2)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)は有意に低下した。3)イサチン腹腔内投与2時間後のWKY脳内ACh濃度はイサチンの用量に依存して上昇する傾向を示し、とくに線条体では無投与群の0.17±0.03 nmol/mg proteinに比較しイサチン(200 mg/kg)投与群で

は0.24±0.05 nmol/mg proteinと有意に上昇した(Fig. 1)。

〔考察〕　我々はすでにSHRSPの血圧とMAO活性が逆相関することを以前に報告している。さらにSHRSPの脳や尿中には内因性MAO活性阻害物質がWKYに比較して多く存在し、その一つがイサチンであることを見出した(4)。イサチンは組織MAO活性を用量依存的かつ競合的に拮抗する。しかしながら脳内のMAO活性に対する影響についてはいまだ明らかにされていない。今回はイサチン投与による脳内モノアミン濃度への影響を検討した。また、イサチンは*in vitro*系で脳のAChE活性を抑制するとの報告がある。そこで*in vivo*で外因的にイサチンを投与後、脳を7分割し各部位のACh濃度変化についても検討した。脳内のほとんどの部位でモノアミン濃度およびACh濃度は増加しとくに大脳皮質、線条体で著明であった。これはMAO活性およびAChE活性が抑制された結果、モノアミン濃度およびACh濃度が上昇したものと考えられる。詳細な機序はさらに検討が必要であるがイサチンが生体内においてモノアミン濃度およびACh濃度の調節に深く関与していることが示唆された。モノアミンと同時にACh濃度が上昇する薬物はほとんど見あたらず重大な発見と思われる。今後、生理的意義を含めさらなる研究が必要である。

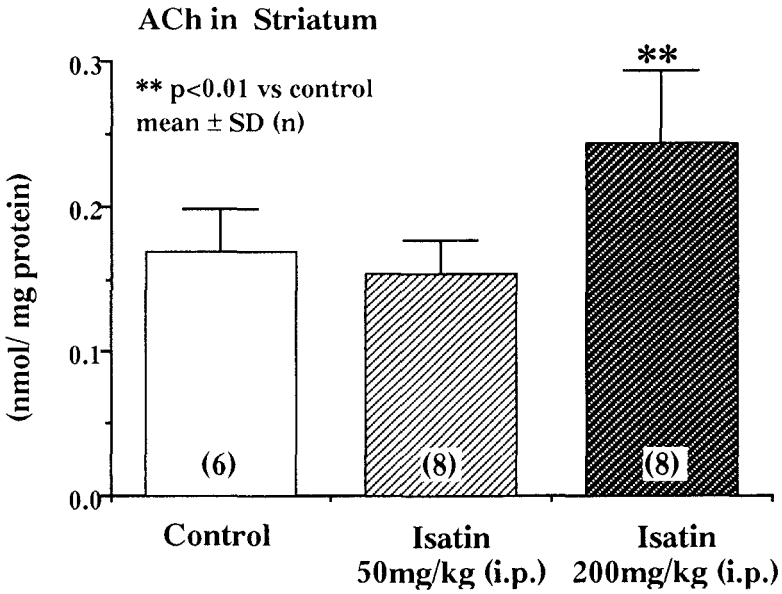


Fig. 1　Effect of isatin (i.p.), an endogenous inhibitor of MAO, on the acetylcholine (ACh) concentration in striatum of WKY.

〔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. (1994) Biogenic Amines 10, 99-110.　(3) Kumar, R., Bansal, R. C. and Mahmood, A. (1993) Biogenic Amines 9, 281-289. (4)Hamaue, N., Minami, M., Kanamaru, Y. et al. (1992) Biogenic Amines 8, 401-412.

175 ラット脳における神経特異的ビジニン類似カルシウム結合タンパク質（ＮＶＰ）ｍＲＮＡの発現に対するフェンサイクリジンの急性および遅延性の効果

梶本康雄，白井　豊，村上直也，楊　常青，北村　登，白川　治，西野直樹
（神戸大学医学部精神神経科）

〔要約〕

フェンサイクリジン（ＰＣＰ）の乱用者では精神分裂病様の陽性症状のみならず陰性症状を伴う精神病像がしばしば認められ、ＰＣＰの投与をうけた動物はアンフェタミンモデルよりもより包括的な分裂病モデルとしての可能性を指摘されている。カルシウム結合タンパク質はセカンドメッセンジャーであるカルシウムイオンを介して生体内の情報伝達に関与している。近年分裂病における細胞内情報伝達系の異常の存在が明らかにされつつあるが、今回我々は、分裂病の病態にカルシウム結合タンパク質が関与しているのではないかと考え、ラットに高用量のＰＣＰを投与し、神経特異的ビジニン類似カルシウム結合タンパク質（ＮＶＰ）の major isoformである NVP-1 mRNA の発現に対するＰＣＰの急性（１時間後）および遅延性（24時間後）の効果をノーザンブロット法により調べた。その結果、 NVP-1 mRNA はＰＣＰ投与１時間後では嗅内皮質で統計学的に有意の減少を示し、24時間後では側坐核において有意の減少を示した。その他の部位では著明な変化を認めなかった。ＰＣＰによる遅延性の神経生化学的変化として NVP-1 mRNA の発現が側坐核で減少していたことから、ＰＣＰ精神病の病態さらには精神分裂病の病態におけるカルシウム結合タンパク質の異常の関与が示唆された。

【緒言】

アンフェタミンなどの覚醒剤やフェンサイクリジン（ＰＣＰ）の乱用者が精神分裂病とよく似た病像を呈することは知られているが、ＰＣＰ精神病では幻覚や妄想に加えて情意鈍麻や自閉などの陰性症状のみられるのが特徴とされている。ＰＣＰの投与をうけた動物は陰性症状発現のメカニズムを含めた分裂病モデルとしての可能性を指摘されており、ＰＣＰ投与動物における神経生化学的変化を明らかにすることは、分裂病の病態を明らかにする糸口を与えるものと思われる。

近年、分裂病の生化学的異常として、ドパミン系の異常のみならず細胞内情報伝達系の異常の存在が明らかにされつつある。

カルシウム結合タンパク質はセカンドメッセンジャーであるカルシウムイオンを介して生体内の情報伝達に関与している。最近になって新しいカルシウム結合タンパク質が次々と見つかっているが、その多くは機能的役割が明らかでない。今回我々は、新しい神経特異的カルシウム結合タンパク質である神経特異的ビジニン類似カルシウム結合タンパク質（ＮＶＰ）(3, 4)に着目した。ＮＶＰには複数のアイソフォームが存在し、いずれも脳特異的に発現しているが、それぞれ異なる脳内分布を示している [Table 1]。ＮＶＰもまたその機能的役割については明らかではないが、ＮＶＰと高い相同性をもつ Frequeninがシナプスに多く存在し神経伝達物質の遊離を促進すること (5)、また Recoverin が網膜の光情報伝達においてカルシウムセンサーとして働くこと (1)などがわかっており、ＮＶＰもまたカルシウム濃度依存的な activatorあるいは inhibitorとして脳内で働いている可能性がある。

今回我々は、ラットに高用量のＰＣＰを投与し、ＮＶＰの major isoformである NVP-1 mRNA の発現に対するＰＣＰの急性（１時間後）および遅延性（24時間後）の効果をノーザンブロット法により調べた。

【実験方法】

ＳＤ系雄性ラット（体重300-350g）にＰＣＰ8mg/kgを皮下投与し１時間後および24時間後に断頭した。対照群には生理食塩水を同様に皮下投与した。取り出した脳から、分裂病に関係があると考えられている部位を中心に、内側前頭皮質、前帯状回皮質、側坐核、海馬、視床、扁桃体、嗅内皮質、小脳の８部位を厚さ1.5mm の切片から直径1.5mm のパンチで取り出し、－８０℃で保存した。

ＰＣＰ群，対照群ともにＡＧＰＣ法により抽出した total RNA １５μgをアガロースゲル電気泳動後ナイロンメンブレンにブロットしたのち、NVP-1 cDNAを^{32}Ｐで標識したものをプローブとして用いたノーザンブロット法によって解析した。得られたオートラジオグラムはβアクチンとの比を用いてバイオイメージングアナライザー（Bas-2000）で定量化した。また、各群の比較はStudent's t-test によった。

【結果】 [Fig. 1]

ＰＣＰ投与１時間後の NVP-1 mRNA の発現量をみると、嗅内皮質で39％と対照群に比べて統計学的に有意の減少($P<0.01$)を示した。その他の部位においては、側坐核で25％の減少傾向を示した以外は著明な変化を認めなかった。

ＰＣＰ投与24時間後では、側坐核において１時間後の減少傾向に続き42％と統計学的に有意の減少($P<0.05$)を示した。その他の部位では著明な変化を認めなかった。

【考察】

ＰＣＰは当初麻酔薬として開発されたが、麻酔後12－72時間、麻酔からの回復時に幻覚や興奮、思考障害などがみられ臨床応用が断念された経緯がある。さらにラットにおける近年の研究により、ＰＣＰの異常行動発現作用は、遅延性でまたその血中濃度がピークを越えた後まで続くと言われている。また、ラットに今回の実験と同様高用量のＰＣＰ(8.6mg/kg)を皮下投与し脳内のグルコース利用率を調べた実験では、投与後３時間は一過性にグルコース代謝が増えるが、その後減少し、24時間後にグルコース代謝は最低となり、この減少は48時間後まで続くと報告されている（2)。

これらの事実は、ＰＣＰの高用量投与の場合、急性効果すなわち投与後１時間後よりむしろ遅延性効果すなわち投与後24時間後における神経生化学的変化がＰＣＰによる精神症状発現により重要である可能性を示唆している。

今回我々の実験で、中脳辺縁系のドパミン神経の投射部位であり分裂病との関係が言われている側坐核において、ＰＣＰ投与24時間後に NVP-1 mRNA の発現が減少していたことは、ＰＣＰによる遅延性の神経生化学的変化として興味深い結果であり、ＰＣＰ精神病の病態さらには精神分裂病の病態における責任病巣部位としての側坐核の重要性ならびにカルシウム結合タンパク質の異常の関与が示唆された。

【謝辞】

ＰＣＰを御供与下さいました国立精神神経センター西川徹先生ならびに㈱山之内製薬に深謝致します。

【文献】

1) Dizhoor A. M. et al. (1991) Science 251, 915-918.
2) Gao X. M. et al. (1993) Eur. J. Pharmacol. 241, 7-15.
3) Kajimoto Y. et al. (1993) J. Neurochem. 61, 1091-1096.
4) Kuno T. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 1219-1225.
5) Pongs O. et al. (1993) Neuron 11, 15-28.

Table1. Distribution of NVP isoform mRNAs in the rat brain

Region	NVP-1	NVP-2	NVP-3
Cerebral cortex	++	++	–
Hippocampus	+++	++	–
Caudate-Putamen	++	+	–
Olfactory bulb	+	+	–
Midbrain	+++	+	–
Thalamus	+++	+	–
Hypothalamus	+++	+	–
Cerebellum	+++	–	++
Pons-Medulla oblongata	+++	–	±

Intensities of the signals are expressed as follows: +++, most intense, ++, intense; +, moderate; ±, weak; –, not detected.

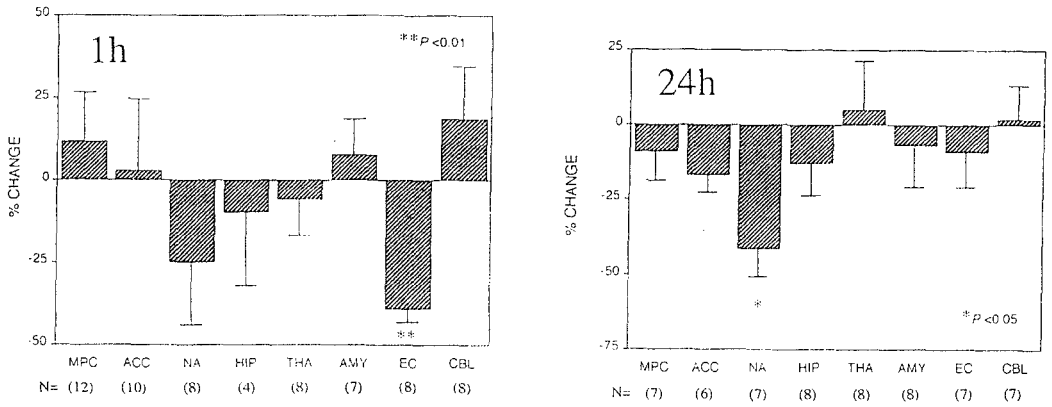


Fig. 1　Effects of PCP on the Expression of NVP-1 mRNA

Data are presented as average % change from the pararell values in control rats.
Values represent the mean±S. E. M. The number of experiments is given in brackets.

176 Methamphetamineの急性および亜慢性投与による AP-1結合タンパク質の変化

石原武士、柏原健一*、氏家　寛、清水義雄、秋山一文
(岡山大学医学部神経精神医学教室、*神経内科学教室)

〔要約〕

ラット脳において、methamphetamine（以下MAP)の急性および亜慢性投与によるAP-1結合タンパク質の変化をゲルシフトアッセイによって検討した。検討部位としては、側坐核（shell）、帯状回皮質、線条体（背外側部）を選んだ。MAP急性投与（4　mg/kg, i.p.）では各部位でAP-1結合タンパク質は経時的に著明に増加し、MAP投与後180分でピークに達し、その後は減少した。一方、連続14日間MAPを1日1回投与（4 mg/kg, i.p.）し、その最終投与から4週間後の定常状態においては、各部位でAP-1結合タンパク質は減少する傾向が認められた。また、c-Fosやc-JunなどAP-1結合タンパク質を構成するタンパク質に対する抗体を用いて、MAP急性および亜慢性投与によるAP-1結合タンパク質の質的な変化を検討した。MAP急性投与では各部位でc-Fos、c-Junが増加していたが、亜慢性投与後の定常状態では主にc-Jun以外のJun　familyのタンパク質が認められ、Fos familyのタンパク質は検出できなかった。

【はじめに】

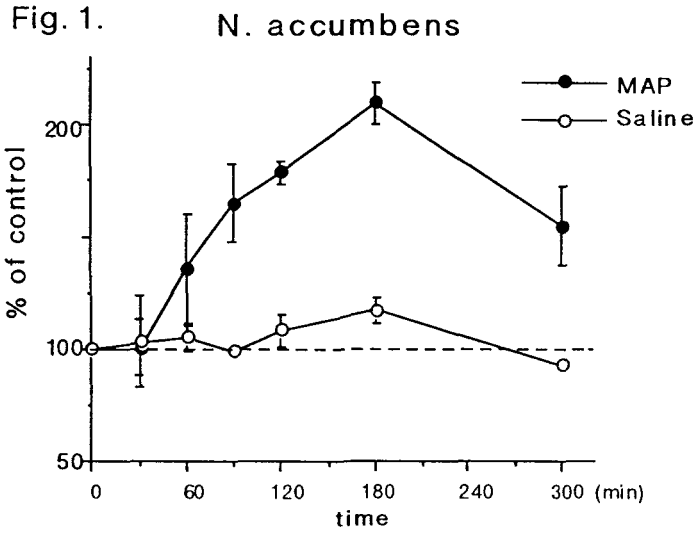
核内に存在するAP-1結合タンパク質は遺伝子の転写調節に深く関わっており、新たな環境への暴露や様々な精神刺激薬の投与で増加することが知られている。従って、AP-1結合タンパク質の変化は、精神刺激薬によってもたらされる精神異常やいわゆる逆耐性現象での一連の脳内機構の変化と関連していることが考えられる。今回、我々は、精神刺激薬であるMAPを用いて、急性投与後および亜慢性投与後の定常状態でのAP-1結合タンパク質の量的・質的変化を検討した。

【方法と結果】

(1)MAP急性投与（Fig. 1.）

ハンドリングを行ったラットにMAP（4 mg/kg, i.p.）または生食を1回のみ投与し、30、60、90、120、180、300分後に断頭した。側坐核、帯状回、線条体から核タンパクを抽出し、^{32}PでラベルしたAP-1配列（5'－TGACTCA－3'）を含むオリゴヌクレオチドと反応させ、ゲルシフトアッセイを行いオートラジオグラフィーによって結果を調べた。

MAP急性投与により、各部位においてAP-1結合タンパク質は経時的に著明に増加し、投与後180分でピークに達した。(n=3)

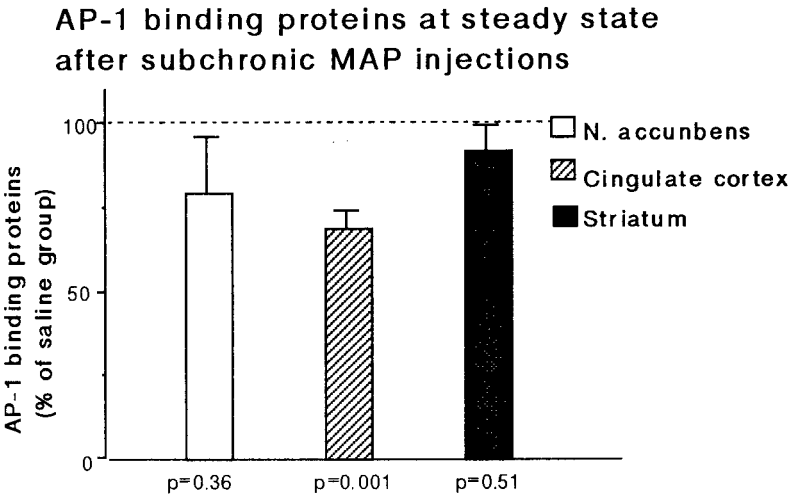


(2)MAP亜慢性投与後の定常状態（Fig.2.）

ハンドリングを行ったラットにMAP（4 mg/kg, i.p.）または生食を連続14日間投与し、最終投与から4週間後の定常状態において、AP-1結合タンパク質を調べた。

MAP亜慢性投与後の定常状態では、AP-1結合タンパク質は減少する傾向が認められた。帯状回皮質では有意に減少していた。(n=12～16)

Fig.2.

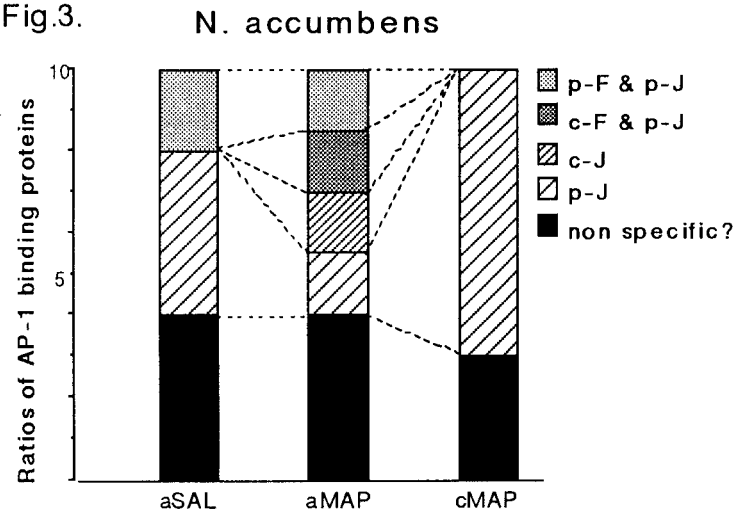


(3)AP-1結合タンパク質の質的変化（Fig.3.）

抗c-Fos抗体（c-F）、抗c-Jun抗体（c-J）、抗Fos family（c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2）抗体（p-F）、および抗Jun family（c-Jun、JunB、JunD）抗体（p-J）を用いて、MAP急性投与後（aMAP）および亜慢性投与後の定常状態（cMAP）でのAP-1結合タンパク質の構成を調べた。

MAP急性投与後では、c-Fosおよびc-Junの増加が認められた。

Fig.3.



MAP亜慢性投与後の定常状態では、主にc-Jun以外のJun familyのタンパク質が認められたが、Fos familyのタンパク質は検出できなかった。

【まとめ】

MAPの急性投与後および亜慢性投与後の定常状態でのAP-1結合タンパク質の変化を検討した。MAP急性投与ではAP-1結合タンパク質は増加し、c-Fosおよびc-Junも増加していた。MAP亜慢性投与後の定常状態では、AP-1結合タンパク質は減少傾向にあり、主にc-Jun以外のJunファミリーのタンパク質が認められた。AP-1結合部位はダイノルフィンやエンケファリンなどの神経伝達物質の前駆体をコードする遺伝子の上流にあり、AP-1結合タンパク質はそれらの転写を制御していることが知られている。AP-1結合タンパク質の変化は、精神刺激薬による作用と関連していることが考えられるが、MAP亜慢性投与後の定常状態におけるAP-1結合タンパク質の質的および量的な変化は、MAPによってもたらされる逆耐性現象を構成するひとつのメカニズムを示しているのかもしれない。

177　ハロセン麻酔による低体温ラットの髄液中神経化学物質濃度の検討

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〕
成熟ラット（体温３７℃）をハロセン麻酔し、約２時間後の体温が３２℃になった時点で採取した髄液中の６種類の神経化学物質（MHPG, DOPAC, HVA, TRP, KYN, 5-HIAA）の濃度を多種目神経化学物質測定装置(Neurochem, ESA社）を用いて測定した。結果を体温を37℃に維持したラットから採取した髄液中の神経化学物質濃度と比較した。その結果、KYN 以外の物質は低体温ラットでは常体温ラットに比べて有意に低下($p<0.001$）していた。以上の事実を前回の学会で報告した老化ラットの髄液中の神経化学物質濃度と比較し、ハロセン麻酔による低体温のラットの髄液への影響と加齢による影響との関連を考察した。

〔目的〕
低体温は虚血中の脳神経細胞に対して保護的に作用することが知られており、脳血管障害の低体温療法が注目されつつある(2)。また高齢者では低体温が死因に関係していることが多い。しかしながら、低体温の生体内での機構は充分には解明されていない。今回ハロセン麻酔によって低体温（32℃）となったラットの髄液中の６種のアミン類（MHPG, DOPAC, HVA, TRP, KYN, 5-HIAA）の濃度を「Neurochem」を用いて測定し、常体温（37℃）下でのラットの髄液中の各物質濃度と比較検討し、ラット髄液中のアミン類の濃度がどのように変化するかを検討したので報告する。

〔方法〕
月齢４－６箇月のウィスター系雄性ラット１２匹（体重３００－４００g）を低体温群(32 ℃) ６匹と常体温群(37 ℃) ６匹に分類した。各ラットはハロセン麻酔（２%）下に気管切開し、人工呼吸器を装着した。気管切開後のハロセン濃度は１%とした。直腸温はサーモメーターで測定した。低体温ラットはハロセン麻酔によって体温を低下させ、常体温ラットはヒートパッドとヒートランプにて直腸温を３７℃に維持した。右大腿動脈から全身血圧をモニターした。実験室内の温度は24.6℃に維持された。実験は結果の日内変動を考えて午後２時～４時に施行された。
各ラットは後頭下の皮膚・皮下組織・筋膜を剥離して脊髄硬膜を露出した。26Gの注射針を大槽に刺入し、針吸引によって髄液（150-200 μl)を迅速に採取し、0.02M の酢酸で処理した後、-80 ℃に凍結保存した。髄液50 μl を逆相クロマトカラム(C18) に注入し、「Neurochem」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) の濃度を測定した。測定濃度は平均値±標準誤差で表示し、統計的有意性の判定にはt-検定を使用した。

〔結果〕
（１）低体温ラット群の実験中の直腸温の推移は図２に示される。常体温ラット群の実験の時間経過は低体温ラット群とほぼ同様である。
A：体温記録開始時(36.7 ℃)　B：気管切開時(35.9 ℃)　C：大腿動脈確保時（33.2℃)
D：髄液採取時（32.1℃)　E：終了時(31.7 ℃)

（２）髄液中各種アミン類の濃度（ng/ml）（図３参照）

	MHPG	DOPAC	HVA	TRP	KYN	5－HIAA
常体温群	21.7±2.9	13.3±2.4	30.6±4.2	383 ±83	53.7±8.5	126 ±20
低体温群	13.1±1.8	3.85±0.29	6.72±1.45	109 ±14	50.8±5.6	67.0±5.7

両群間でＫＹＮ以外の物質は低体温群で有意に低下していた（$p<0.001$)。

（３）ＫＹＮとＴＲＰの比（ＫＹＮ／ＴＲＰ）は常体温群で 0.156±0.021, 低体温群で 0.513±0.072 であり、統計的に有意な差を認めた（$p<0.001$）（図４参照）。

〔考察〕

ハロセン麻酔による低体温ラットの髄液中カテコラミン系とインドールアミン系の神経化学物質の濃度は常体温ラットに比べて減少するものが多かった。体温調節中枢は視床下部にあり、低体温ではセロトニン系が関与し、高体温ではノルエピネフリン系が関与する(5)。またセロトニン受容体1Aは低体温に関係し、セロトニン受容体2は高体温に関係しているとの報告もある(3)。この実験では低体温にはセロトニン系とカテコラミン系の両方が関与していることが示唆された。Hirvonenらは、外部から低体温ストレスをモルモットにかけた実験で、髄液中のカテコラミン濃度は上昇するとしている(4)。この実験とは異なる結果となったのは、ハロセン麻酔では内部から低体温を誘導しているためと考えられる。この実験ではKYN 濃度は低体温と常体温でほぼ同様となったことからは、KYN 代謝系が低体温ストレスに対して代償性に作用している可能性が示唆される。実際KYN は更にNMDA拮抗作用を持つキヌレニン酸(KYNA)とNMDA協調作用をもつキノリニン酸(QUIN)に分解されることが知られている。またNMDA拮抗剤であるMK-801には神経細胞を虚血から保護する作用があり、その際体温が低下することも報告されている(1)。従って、低体温の神経化学的機構にはNMDA受容体が関与していることが示唆される。KYN とTRP の比(KYN/TRP) が低体温で有意に上昇していたことは、前回の学会で報告した老化ラットの髄液所見と類似している(6)。低体温ではTRP の低下が顕著であり、老化ラットではKYN の上昇が顕著であったが、低体温と老化の髄液への影響には似た面があると考えられる。

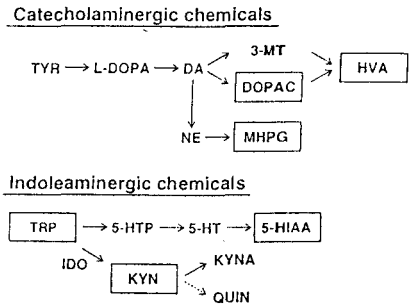
〔結語〕

ハロセン麻酔による低体温ラットの髄液中のカテコラミン系とインドールアミン系の神経化学物質濃度は低下するものが殆どであり、老化の影響と似た面もある。しかし、低体温の実験はそのモデルによって結果が異なる可能性もあり、今後更に検討を要する(7)。

〔文献〕

(1)Corbett, D. et al. (1990). Brain Res 514, 300-304.
(2)Ginsberg, M. D. et al. (1992). Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 4, 189-225.
(3)Gudelsky, G. A. et al. (1986). Neuropharmacology 25, 1307-1313.
(4)Hirvonen, J. et al. (1989). Med. Sci. Law, 29, 130-135.
(5)Hissa, R. (1990). Act Med Res 49, 3-15.
(6)Wada, H. et al. (1994). Biogenic Amines 10, 221-225.
(7)Wada, H. et al. (1994). Biogenic Amines in press.

図1



(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

図2

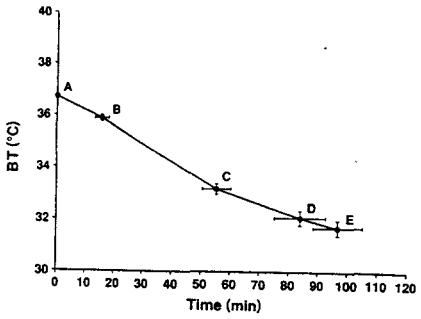


図3

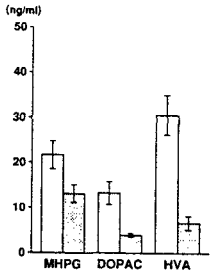
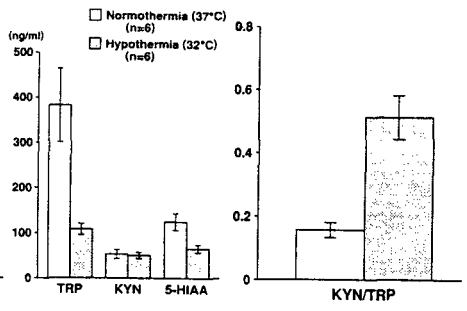


図4



178 脳内diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA発現に及ぼすethanolの影響について

桂 昌司、大熊誠太郎、辻村 敦*、栗山欣弥
(京都府立医大・薬理、*脳・血管老化センター)

〔要約〕
内在性ベンゾジアゼピン(BD)様物質として知られているdiazepam binding inhibitor (DBI)の、アルコール依存の形成およびその成立過程における脳内での生合成変化とその調節機構について、マウス大脳皮質ならびに初代培養大脳皮質神経細胞(培養細胞)を用い、DBI mRNA発現量の面より検討した。Ethanol (EtOH)の単回投与は、マウス大脳皮質内DBI mRNA発現量に何ら影響を及ぼさなかったが、EtOHの長期連用に伴うアルコール依存ならびに禁断症状発現時には、マウス大脳皮質におけるDBI mRNA発現量に著明な増加が認められた。また、持続的にEtOHを培養細胞に曝露した場合においても、EtOHの添加濃度ならびに処置時間に依存したDBI mRNA発現量の増加が認められた。さらに、マウス大脳皮質および培養細胞において認められたEtOH処置に伴うDBI mRNA発現量の増加は、BD受容体のagonistであるflunitrazepamの前処置によりEtOH非投与時のレベルにまで低下した。なお、対照として用いたβ-actin mRNAの発現量は、いづれの実験系においても何らの変化を認めなかった。以上の成績より、EtOHはマウス大脳皮質および培養細胞においてDBI mRNAの発現量を増加させること、またEtOH投与に伴うDBI生成の増加にはBD受容体が関与していることが示唆される。

[目的]
DBIがラット脳内においてGABA作動性神経のpresynaptic vesicleにおいて、GABAと共存する約11kDaの内因性生理活性物質であることが見いだされて以来(2)、その中枢神経機能における役割が注目されている。これまでのGABA$_A$受容体を中心とした受容体結合実験ならびに電気生理学的検討の結果、DBIはβカルボリン類と同様BD受容体に対してinverse agonistとしての薬理活性を示すものと考えられている。近年、DBIの単離とそれに続いてDBI cDNAの塩基配列が明らかとなり、脳内における分布や各種病態時におけるDBIの変化についても検討されているが、脳内における生理的役割についてはなお不明の点も多い。我々は、これまでに薬物依存の形成およびその成立過程における意義をみる一端として、nicotine連続投与の影響を検討し、nicotineが脳内においてDBI mRNA発現の増加を招来することを明らかにした(3)。そこで、今回我々は他に薬物依存を起こすことが知られているアルコールに着目し、アルコール依存およびその禁断症状発現時における脳内DBI mRNA発現量の変化について検討した。

[実験方法]
アルコールの急性投与は、ddY系雄性マウス(体重30g)にEtOH (3 g/kg) を腹腔内に投与することにより行った。アルコール依存動物の作製および禁断スコアの測定は、Goldsteinの方法(1)に準じて行った。培養細胞(4)へのEtOHの曝露は、Hanks液で希釈したものを培養皿中に直接添加することにより行い、EtOH長時間曝露の場合は、12時間おきに初回添加量の半量を添加し、最終的に培養14日目に実験に用いた。DBI mRNA発現量の測定は、FastTrack™ mRNA Isolation kit (Invitrogen)を用いてpoly(A)$^+$RNA を精製し、ノーザンブロットによる解析を行った。DBIのcDNA断片をランダムプライマーと[^{32}P]dCTPによりラベルしたものをプローブとしてハイブリダイゼーションに用い、DBI mRNAをBAS/2000 image analizerにより解析した。

[結果および考察]
BD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BD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、DBIもこれらBD系薬物と同様にBD受容体に対して親和性を有する内在性生理活性物質として知られ、中枢神経系に対しては不安を誘発する物質であると考えられている。しかし、その生成および調節機構に関して

は不明な点も少なくない。したがって、本研究では薬物依存を起こす薬物としてアルコールに着目し、脳内DBI mRNA発現量に及ぼす影響を検討した。

先ず、アルコールの単回投与に伴う急性効果について検討したところ、EtOH (3 g/kg, *i.p.*)はマウス大脳皮質内DBI mRNA発現量に何ら影響を及ぼさなかった。つぎに、アルコールの長期連用に伴うアルコール依存ならびに禁断症状発現時のDBI mRNA発現量の変化について検討した。マウス大脳皮質におけるDBI mRNA発現量は、アルコール依存ならびに禁断症状発現時のいづれにおいても著明な増加を示した(図1)。また、EtOHを培養細胞に曝露した場合においても、EtOHの添加濃度および処置時間のいづれにも依存したDBI mRNA発現量の増加が認められ、培養液中からEtOHを除去した場合には*in vivo*で得られた成績と同様、DBI mRNA発現量はさらに一過性の上昇を示した(図2)。なお、対照として用いたβ-actin mRNAの発現量には、いづれの実験系においても何らの変化も認められなかった。

つぎに、アルコール禁断症状発現時に認められる痙攣発作は、BD受容体のagonistにより抑制されることが知られていることから、アルコール処置に伴うDBI mRNAの発現量の増加がBD受容体を介するものかどうかについてさらに検討を加えた。マウス大脳皮質および培養細胞において認められたEtOH処置に伴うDBI mRNA発現量の増加は、flunitrazepamの前処置によりEtOH非添加時のレベルにまで低下した。したがって、EtOH処置に伴うDBI mRNA発現量の増加は、BD受容体を介して調節されている可能性が強く示唆される。

以上の成績より、EtOHはマウス大脳皮質および培養細胞のいづれにおいてもDBI mRNAの発現量を増加させること、EtOHによる脳内DBI生成の調節にはBD受容体が関与していること、さらにアルコール依存の成立と禁断症状の発現にDBIの生成が関与している可能性が示唆される。さらに、このDBI mRNA発現量の増加がnicotineによっても引き起こされることから(3)、EtOHに特異的というよりはむしろ、種々の薬物依存の形成および成立過程にDBI mRNAの発現が関与している可能性が考えられる。

[文献]

1) Goldstein, D.B., J.Pharmacol.Exp.Ther. **180**, 203-215 (1972). 2) Guidotti, A. *et al.*, Nature **257**, 553-555 (1978). 3) Katsura, M. *et al.*, Neurosci. Lett. **168**, 1-4 (1994). 4) Ohkuma, S. *et al.*, Int.J.Devl.Neuroscience **4**, 383-395 (1986).

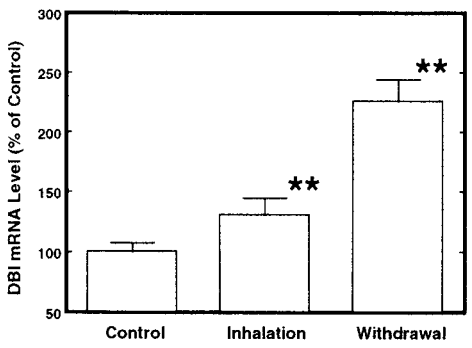


Fig. 1 Effects of Continuous Ethanol (EtOH) Inhalation and its Withdrawal on Diazepam Binding Inhibitor (DBI) mRNA Level in Mouse Cerebral Cortex

***p<0.01, compared with the control value (Scheffe's test, N=8).*

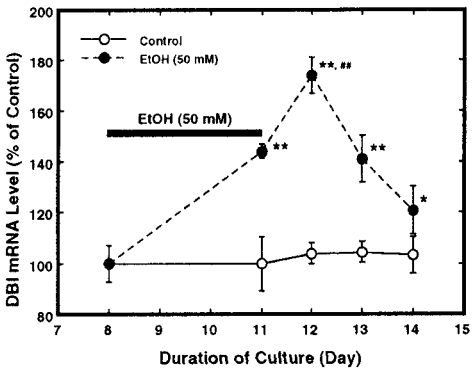


Fig. 2 Changes in the Level of Diazepam Binding Inhibitor (DBI) mRNA in the Primary Cultured Cerebral Cortical Neurons During Ethanol (EtOH) treatment and EtOH Removal

**p<0.05 and p<0.01, compared with each control value (Bonferroni's test, N=4).*
##p<0.01, compared with the value determined in the presence of EtOH (3 days) (Student's t-test, N=4).

179 ミュータントマウス小脳におけるNO/cGMP系の検討

池田正行1)，松井京子3)，石原好弘4)，湯浅龍彦2)，室田誠逸1)
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)
国立精神神経センター神経研4部3)，都神経研神経病理4)

〔要約〕

小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，病理学的変化の異なるStaggerer (SG), Wriggle Mouse Sagami (WMS)[1]の2種のミュータント小脳で，NO合成酵素(NOS)活性とサイクリックGMP(cGMP)含量を測定し，運動障害の指標と比較した．NOS活性はSGでは対照の5.8%に低下していたがWMSでは有意な変化はなかった．cGMP含量はSGでは対照の3.3%，WMSでは43%に低下していた．一方運動障害はWMSの方が著明だった．以上の結果はSG, WMSでは異なるNO/cGMP系の異常が存在することを示す．このNO/cGMP系の異常と，それぞれの系の運動障害の間の解離は，何らかの代償機序か，あるいはNO以外の神経伝達が運動障害を修飾していることを示唆する．

緒言：非定型的神経伝達物質であるNOを生成するnitric oxide synthase(NOS)は脳の各部位の中でもとくに小脳に活性が高いので[2, 3]，NOは小脳での神経伝達に重要な役割を果たしていると考えられる．本研究の目的は小脳機能におけるNOの意義を探ることにある．その目的で，病理学的変化と運動障害の程度の異なる2種類のミュータントマウス小脳で，NOのマーカーであるNOS活性とcGMPを測定し，これらのマーカーと運動障害の指標と比較した．

材料と方法：小脳ミュータントマウスは12-16週齢のStaggerer (SG)とWriggle Mouse Sagami (WMS)を，対照としては無症状のlittermatesを用いた．NOS活性は既報のごとくcitrulline産生を指標にHPLCを用いて測定した[2, 3]．cGMP含量はマイクロウェーブ照射(3.5 kW, 1.3 sec)した小脳からトリクロル酢酸で抽出後RIAにて測定した．また70x70 cmのopen fieldでのlocomotor activityと5分間あたりの転倒回数を指標として運動障害の評価も行なった．

結果：(Fig. 1-4) 小脳あたりのNOS活性はSGで対照の5.8%に低下していたがWMSでは有意な変化がなかった．cGMP含量はSGでは対照の3.3%に低下し，WMSでは43-%に低下していた．一方運動障害はSGよりもWMSの方により強く，locomotor activityはSGでは対照と比較して有意な変化はなかったがWMSでは対照の20%にまで低下していた．転倒回数もSGでは5分間に11回に対しWMSでは5倍の55回だった．

考案：SGでのNOS活性とcGMPの含量の低下は，顆粒細胞の消失，プルキンエ細胞の著減といった病理学的変化にほぼ対応している．一方光顕レベルで病理学的変化がほとんどないWMS小脳で，NOS活性が低下していなかったにもかかわらず，cGMP含量が低下していた．このことから，NOSニューロンである顆粒細胞とcGMP-産生細胞であるプルキンエ細胞あるいはバーグマングリアの間の情報伝達が障害さ

れている可能性，あるいはNO以外にグアニル酸シクラーゼの活性化因子があり，WMSはこの未知の因子が障害されている可能性のいずれかが考えられる．またSG，WMSの運動異常がNO/cGMP系の異常と相関しなかったことは，何らかの代償機序か，あるいはNO以外の神経伝達が運動障害を修飾していることを示唆する．

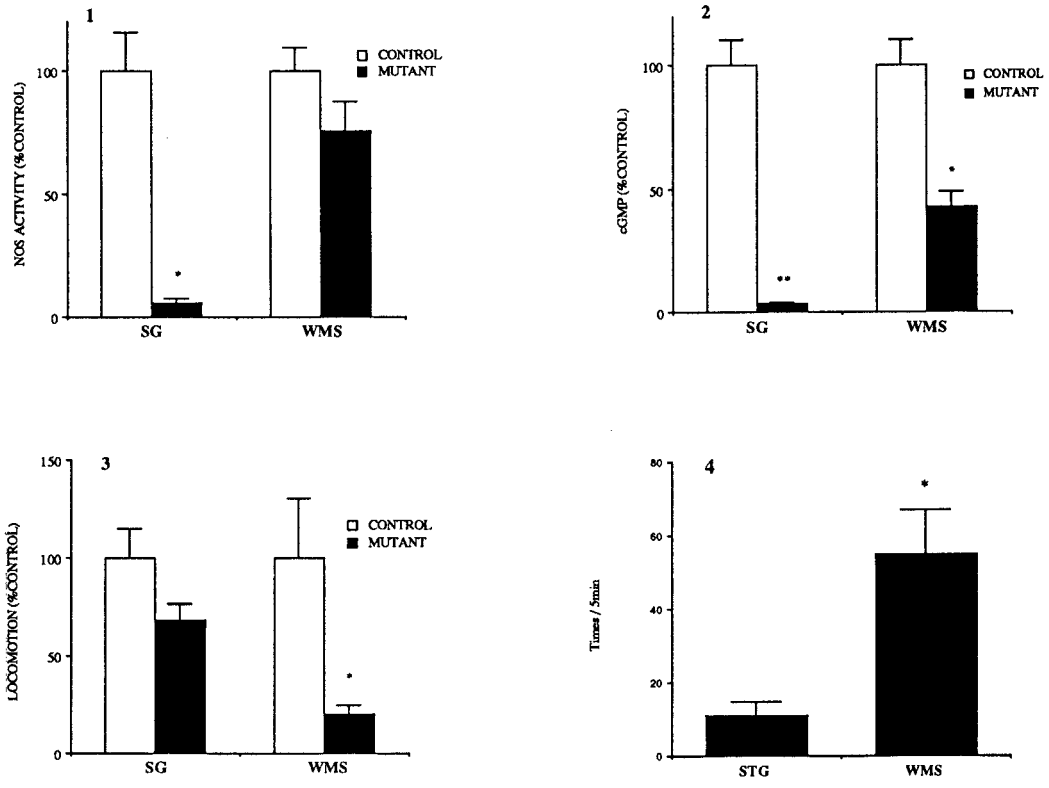


Fig. 1. Cerebellar nitric oxide synthase (NOS) activity of Staggerer(SG) (n=6), Wriggle Mouse Sagami (WMS) (n=6) and control mice (n=6 each). Values are expressed as % of control value±S.E.M.. *P<0.01 in unpaired two-tailed Student's *t*-test. Fig. 2. Cerebellar cGMP content of SG, WMS and control mice. *P<0.05, **P<0.01. Fig. 3. Locomotion of SG, WMS and control mice. *P<0.05. Fig. 4. The number of falls of SG, WMS. *P<0.01

文献

1. Ikeda, M., Mikuni, M., Nishikawa, T.&Takahashi, K. (1989) Brain Res 495, 337-348.
2. Ikeda, M., Morita, I., Murota, S., Sekiguchi, F., Yuasa, T.&Miyatake, T. (1993) Neurosci Lett 155, 148-150.
3. 池田正行, 森田育男, 室田誠逸, 湯浅龍彦&宮武　正. (1993) 臨床神経 33, 992-994.

180 脳血管性痴呆モデルとしての脳血流慢性低潅流ラットの基礎的検討

田中健一、小川紀雄、堀 耕治[1]、野村正彦[1]、近藤洋一、浅沼幹人、森 昭胤
（岡山大学 医学部 神経情報学、[1]埼玉医科大学 第一生理）

〔要約〕
前脳の持続的血流低下による慢性的な脳血流低潅流状態が、明度弁別学習の慢性的な障害を引き起こし、その障害にアセチルコリン系神経伝達機構の異常が関連している可能性が示されたことから、両側総頚動脈結紮による脳血流慢性低潅流ラットは脳血管性痴呆モデルとしての有用性が示唆された。

［目的］
老年期痴呆に対する関心の高さから、近年、脳血管障害を主な原因とする脳血管性痴呆に関しても、盛んに研究がなされている。しかし、脳血管性痴呆の病態モデルは一過性脳虚血スナネズミや4動脈閉塞-再潅流ラットなどの一過性の脳虚血モデルで代用されており、しかも、そのほとんどは急性期における検討である。ところが、脳血管性痴呆の臨床病態を考慮すると、起因となる脳血管障害が発症した後の慢性期における病態が重要と考えられるようになってきた。特に、不完全な脳虚血が長期にわたり継続している状態は脳血管性痴呆の病因として可能性が高いことが報告されている（5）。そこで、不完全な脳虚血状態である、両側総頚動脈結紮による脳血流慢性低潅流ラットの脳血管性痴呆モデルとしての可能性を検討した。初めに、両側総頚動脈結紮6週後に前脳皮質の脳血流量を測定した。明度弁別学習による学習記憶障害の評価は両側総頚動脈結紮6週後より行なった。また、両側総頚動脈閉塞3,6,12週後に大脳皮質、海馬、線条体および視床＋中脳をそれぞれ取り出し、学習・記憶など知的機能に関連するアセチルコリン（ACh）系神経伝達機構の慢性低潅流による影響をコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）活性とムスカリンレセプター（mACh-R）結合能を指標として検討するとともに、組織学的検討も行った。

［方法］
1．実験動物：9週齢の雄性Wistar系ラット（日本クレア、東京）240-260gを用い、ペントバルビタール（50 mg/kg）麻酔下、両側総頚動脈を露出して絹糸にて結紮した後、皮膚を結合した（低潅流群）。偽手術群は、両側総頚動脈結紮を除いて、低潅流群とすべて同じ条件下で行なった。
2．局所脳血流量の測定：両側総頚動脈結紮6週後に前脳皮質における局所脳血流量を水素クリアランス法にて測定した（1）。
3．ACh系における生化学的指標の測定：mACh-R結合とChAT活性は両側総頚動脈結紮3,6,12週後に断頭屠殺して、測定に供した。mACh-R結合の測定は粗膜画分を用い、[3H]-QNBによるラジオレセプターアッセイを行なった（4）。ChAT活性はHabaらの方法にて測定した（2）。なお、蛋白定量はBio-radの測定キットを使用した。
4．組織学的測定：組織学的検討は3,6,12週後に4%パラホルムアルデヒドにて潅流固定した後、脳を取り出し、マイクロスライサーにて冠状断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン、クリューバー・バレラ染色およびGFAP免疫染色を行なった。
5．オペラント型明度弁別学習：偽手術群と低潅流群の弁別学習行動の変化を観察した。実験期間中の体重は自由摂食時の85%を維持するよう給餌統制した。学習実験には前面パネルの反応レバー直上に3個のランプを配置したオペラント箱を用い、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行なった（3）。正刺激（S+）下の反応はVI 15-sスケジュールで間欠的に餌強化し、負刺激（S-）下の反応は無強化とした。1日の訓練はS+とS-をそれぞれ20回行ない、1セッションとした。最初の30セッションは点灯をS+、消灯をS-とする原学習訓練を行ない、続いて消灯をS+、点灯をS-とする逆転学習訓練を行なった。

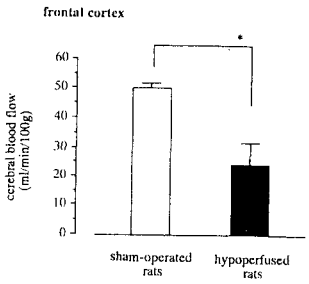


Fig. 1 Regional CBF in the rat frontal cortex at 6 weeks after hypoperfusion. Values are the mean ± SEM. *p<0.05 vs sham-operated rats.

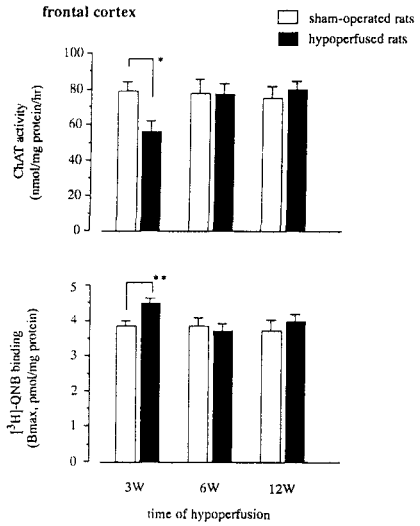


Fig. 3 Time course of changes in ChAT activity and mACh-R density (Bmax) in the rat frontal cortex after hypoperfusion. Values are the mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 vs sham-operated rats.

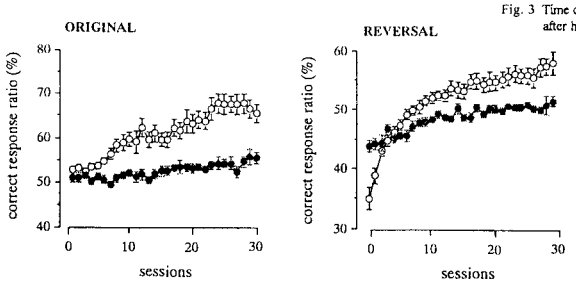


Fig. 2 Correct response ratio plotted against sessions. Values are the mean ± SEM.

［結果・考察］

両側総頚動脈結紮により、6週後という慢性期においても、前脳皮質における局所血流量が偽手術群に比べ、51.8%低下していた（Fig.1）。また、両側総頚動脈結紮により、3週後以降検討したすべての時点で、大脳皮質や線条体において、白質の粗しょう化が認められたことから、前脳を中心とした持続的血流低下に起因する可能性が示された。一方、明度弁別学習において、弁別成績の指標である、正反応率（総反応数に占める正解数の割合；Fig. 2）はORIGINAL、REVERSALともに低潅流群に比べ偽手術群のほうが、総反応数がほぼ同程度であるにもかかわらず、全般的に高い値を示した。さらに、記憶や学習といった知的機能との深い関連性が報告されている、アセチルコリン系神経伝達機構の変化は、結紮3週後において学習／記憶に関係する前脳皮質でシナプス前部の指標であるChAT活性が偽手術群に比べ、有意に低下したのに対し、シナプス後部の指標であるmACh-R結合能は有意に増加した（Fig.3）。よって、明度弁別学習における学習障害に、アセチルコリン系の機能低下が関与している可能性が示されたが、6,12週後には少なくともこの2つの指標は正常化しているので（Fig.3）、他の要因も考慮する必要がある。両側総頚動脈結紮に起因する慢性的な脳血流低潅流状態は3週後以降持続して、脳白質部位の障害とアセチルコリン系神経伝達機構の機能低下があいまって、学習記憶障害を示すものと考えられる。以上より、両側総頚動脈結紮による脳血流慢性低潅流ラットは脳血管性痴呆の病態モデルとして有用であると思われる。

（謝辞：局所脳血流量測定にご協力いただいた岡山大学医学部脳神経外科の河内博士に深謝いたします。）

［文献］

1. Aukland, K. et al, (1964) Circulation Res. 14, 164-187.
2. Haba, K. et al, (1988) Neurochem. Res. 13, 951-955.
3. Hori, K. et al, (1993) Brain Res. 621, 296-300.
4. Ogawa, N. et al, (1983) Brain Res. 263, 348-350.
5. Rogers, R.L. et al, (1986) Neurology 36, 1-6.

181 学習課題遂行ラットにおける中隔-海馬コリン作動性神経の調節：in vivo microdialysis 法による検討

山室　裕、堀　耕治、岩野　仁[1]、田中淳一[2]、野村正彦
（埼玉医科大学第一生理・[1]精神医学、[2]鳴門教育大学人間形成基礎講座）

［要約］
中隔から海馬へ投射しているコリン作動性神経は、記憶・学習に密接な関係を持つと考えられている(2,5,6,7)。また、脳幹から中隔へ導入される様々な神経系がこのコリン作動系を調節しているという神経解剖学的な所見も認められる(1,4)が、学習課題遂行時にこの関係を調べた報告は殆ど見られない。今回我々は、弁別学習課題遂行中のラットを用い、海馬においてアセチルコリン(Ach)を、中隔においてはドーパミン(DA)とその代謝物(DOPAC、HVA)をin vivo microdialysis法により測定した。その結果、課題遂行時に中隔DOPAC、HVAレベルが基底値から有意に上昇し、中隔へ入力するDA作動性神経が活性化する事が示された。また、課題遂行直後に中隔DAレベルの一過性の上昇も確認された。海馬Achレベルは学習課題遂行時に有意な増加が観察され、AchとDAの課題遂行開始後の相対的%に正の相関が認められた。この結果から、学習課題遂行時、海馬でのAch放出に中隔に入力するDA系の関与が示唆された。

学習行動に対する中隔—海馬コリン作動系の関与を調べる端緒として、学習課題遂行時のラット海馬Ach放出と中隔においてこの作動系の調節に関わると考えられるDAおよびその代謝物を脳内微小透析(in vivo microdialysis)法を用い定量、検討した。

【方法】　11個体のFischer 344系雄ラットを用い、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)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行った(3)。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20s)とし、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、さらにランプの消灯をS+、点灯をS-とする逆転訓練を上記と同様に行った。30セッションの逆転訓練の後、内側中隔野領域ならびに海馬CA1領域にガイドカニューレを刺入した。刺入から2～3日後に直管型で透析膜長1mmのプローブをガイドカニューレに挿入し、Ringer液にて灌流した。12時間以上の灌流後、透析液を20分毎に採取し基底値が安定した後、ラットをオペラント箱に入れ透析実験を行った。20分間の透析液を1試料とし、連続6試料採取した。最初の3試料は学習訓練下で採取し、後半の3試料は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ならびにAchは、電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフを用い定量した。尚、透析プローブの刺入位置は、実験終了後ホルマリン灌流を行い脳を摘出し、組織標本にて確認した。これにより内側中隔、海馬の両標的部位への刺入が確認された8個体についてデータ解析した。

【結果および考察】　訓練過程における反応数の推移をFig. 1に示した。訓練の進行に伴い、R+(S+下の反応)とR-(S-下の反応)は原学習、逆転学習とも明瞭に分化した。訓練終了時の正反応率(S+下の反応数/Total反応数×100)はそれぞれ82.9±2.2、83.0±1.8%であった。Fig. 2にAch、DA およびDOPAC、HVAの継時的変化を課題遂行前3試料の平均を基底値とし、それに対する相対的な比率で示した。Achは、訓練セッション開始とともに急激な上昇が確認された[$F(8,56)=12.079$, $p<0.001$]。DAは、訓練開始直後に一過

性の上昇が認められ、セッションの進行に伴い減少した[F(8,56)=4.180, p<0.001]。DOPAC、HVA レベルは訓練開始から増加し、終了後徐々に減少した[DOPAC: F(8,56)=6.433, p<0.001, HVA: F(8,56)=12.492, p<0.001]。また、海馬Ach、中隔DAの両者とも測定が可能であった7個体について、訓練開始以降の相対比率に有意な正の相関が確認された[F(1,6)=14.706, r=0.864, p<0.05]。以上の結果から、学習課題遂行により中隔へ入力するDA作動性神経系が活性化すること、ならびに学習課題遂行時、海馬でのAch放出に中隔でのDA放出が関わっている可能性が示唆された。

【文献】
1) Costa E, Panula P, Thomson HK and Cheney DL (1983) Life Sci 32:165-179
2) Hepler DJ, Olton DS, Wenk GL and Coyle JT (1985) J Neurosci 5:866-873
3) Hori K, Tanaka J and Nomura M (1993) Brain Res 621:296-300
4) Lindvall O and Stenevi U (1978) Cell Tissue Res 190:383-405
5) Nilsson OG, Shapiro ML, Gage FH, Olton DS and Bjorklund (1987) Exp Brain Res 67:195-215
6) Sutherland RJ, Whishaw IQ and Regehr JC (1982) J Comp Physiol Psychol 96:563-573
7) Whishaw IQ (1985) Behav Neurosci 99:979-1005

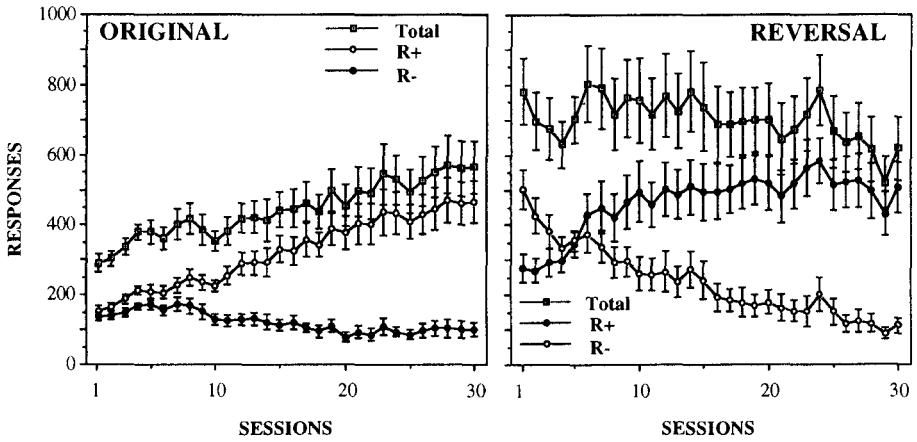


Fig. 1 Responses plotted against sessions. Each point represents the mean ±SEM.

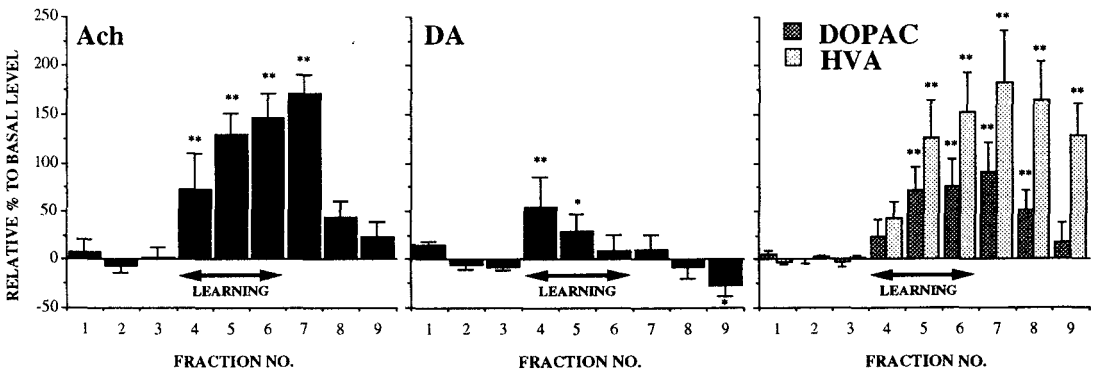


Fig. 2 Extracellular levels of Ach in hippocampus and DA, DOPAC and HVA in septum during dialysis experiment. *p<0.05, **p<0.01 vs basal level.

182　摂取不飽和脂肪酸とラットの明暗弁別学習能
－行動、シナプス形態、膜表面構造変化及びシアル酸分布との関連－

吉田　敏、宮崎真理*、竹下正純*、奥山治美**
（大分医科大学・実験実習機器センター、*生化学、**名古屋市立大学薬学部）

〔要約〕
ラットにn-3系不飽和脂肪酸が豊富なシソ油を与えた群（Ｐ群）と、n-6系が多くn-3系が非常に少ないサフラワー油群（Ｓ群）では、明暗弁別学習などの学習行動に差がでることが知られている。そのメカニズムを明らかにするために、海馬CA1領域の前シナプスの構造を詳細に検討したところ、学習行動後のシナプス小胞の数が、Ｐ群の方がＳ群より有意に多かった。しかし、学習前のシナプスの構造には両群で有意な差は見られなかった。学習後で初めて両群に差の現れた現象として、小胞体膜表面の水和構造、糖鎖の構造、およびシアル酸の分布の変化を検出した。その結果、学習能のＰ群とＳ群との差は、シナプス小胞の代謝変化と関係があり、学習行動そのものと膜の脂肪酸の変化との共同作用により引き起こされた膜の酸性糖鎖の変化が、重要な要因の一つと考えられた。

人を含めたいくつかの動物種で食餌性の不飽和脂肪酸、特にn-3とn-6系の多不飽和脂肪酸のバランスの変化で、学習能に影響を与えることが知られている。ラットの明暗弁別学習能の試験では、学習の開始初期ではあまりＰ群とＳ群とで学習能に有意な差は出ないで、１０セッション以上試験を進めていかないと有意な差が現れないことから[1]単純に脳の脂肪酸組成が変わったと言っても直ちに学習能を変えるのではないと考えられる。そこで、学習の前と後で調べて、学習前にはＰとＳ群とで差がないが、学習後に初めて両群で差が出てくるような分子レベルでの変化を調べることが重要になる。そこで、まず電子顕微鏡レベルでのシナプスの構造の変化、細胞内カルシュウムイオン濃度調節に関与する小胞体の性質、小胞体膜のどこに変化が出るか全体的に観測するための膜の赤外分析、そして膜のシアル酸の量の変化について検討した。

〔方法〕
ラット（ドンリュウ）を用いた明暗弁別学習の試験のやり方、シナプスの電子顕微鏡での観測の仕方はすでに報告している[1,2]。小胞体からのカルシュウムの遊離の測定は、Fura2を用いて行った。小胞体膜の微量赤外分析の方法は総説を参照されたい[3]。シアル酸の定量は、塩酸加水分解、及びシアリダーゼ(C.perfringens)による分解（３７℃）の方法で膜から最大遊離させ、蛍光検出試薬（タカラ）を用いてHPLCにより行った。

〔結果と考察〕
明暗弁別学習能の試験は、報告されているようにＰ群とＳ群で１５セッション頃から有意な差が出てくることを確認し、弁別の条件を逆転させた方法でも学習能に差が出ることも確認した。学習後のラットの海馬CA1領域（stratum radiatum）を電子顕微鏡で観察し、シナプス小胞(SV)の単位面積当たりの数を数えると、Ｐ群の方がＳ群よりも有意に多いことがわかった。図１に正反応率(CRR)とSVの数との関係を示した。しかし、学習前のラットの同じ領域のSVの数には両群で有意な差はなく、Ｓ群では学習前も後もその数に余り変化がないことがわかった。これはSVの代謝回転がn-3とn-6の脂肪酸のバランス及び学習行動によって影響されることを示している。

SVの代謝回転或いは刺激依存性の神経機能の変調が細胞内のカルシュウム濃度によって影響される可能性を考え、学習後のＰとＳ群から精製したミクロソーム(Ms)のCa^{2+}取り込み能とIP_3結合能を検討したが、両群で有意な差はなかった。また、そのMsの赤外吸収スペクトルを測定すると、図２のA,Bに示したように、1740cm^{-1}付近に見られるリン脂質のsn-2脂肪酸エステル(C=O)と水との水素結合の状態が、学習後の両群で差が出ており、Ｐ群の方がより水素結合が弱まっている事を示し、Ｓ群では学習前のものとあまり差がなかった。図２のCには、モデルとして豚脳のMsの場合、シアリダーゼで加水分解するとBのような変化が起こることを示した。1080cm^{-1}付近の赤外吸

収にも学習後で初めてＰとＳ群で差が出ること、脂肪酸組成自体は学習前後でほとんど変化しないこと、などから、酸性糖脂質糖鎖の変化が示唆された。そのMsのシアル酸の高感度測定を行った。図３に示すように、全部のシアル酸量を測定できる塩酸による遊離法では、学習の前と後とでは有意に後の方がシアル酸が減っているのに対し、ＰとＳ群の間では差がなかった。しかし、シアリダーゼで遊離するシアル酸量には学習後のＰとＳ群で有意差があった。これはＰ群の方が学習後にシアル酸の付き方に変化が生じたのに対し、Ｓ群ではそのような変化がおこっていないと考えられ、脂肪酸組成と学習行動（刺激）との協同的複合的な影響の重要性が指摘できる。

〔文献〕1.Yamamoto N. et al. (1987) J.Lipid.Res. 28,144-151. 2. Yoshida S. et al.(1993) in Adv. Polyunsaturated Fatty Acid Res. pp.265-268, eds. Yasugi et al. 3.吉田　敏,(1994)膜学実験シリーズⅠ、pp.291-297,共立出版.

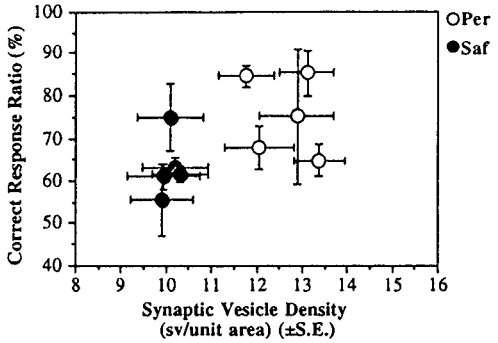


図１
明暗弁別学習の正反応率（Correct Response Ratio）と各個体の海馬シナプス小胞の密度との関係。
正反応率（全反応回数の中の正反応回数の割合）は各ラット個体が２０－２５セッションで示した正反応率の統計処理したものを示し、縦バーは、SDを示す。後シナプスの肥厚部に接している前シナプスの0.2μm四方の面積にあるSVの数を横軸に示した。240-260のシナプスを数えた。

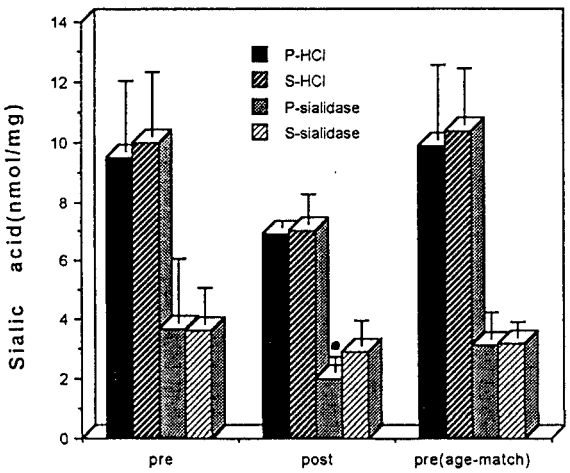


図３
塩酸或いはシアリダーゼ処理で遊離してくるシアル酸量の変化。
Pre,学習前。Post,学習後。Pre(age-match),学習前でPostのものとageを合わせたもの。（約４カ月齢）

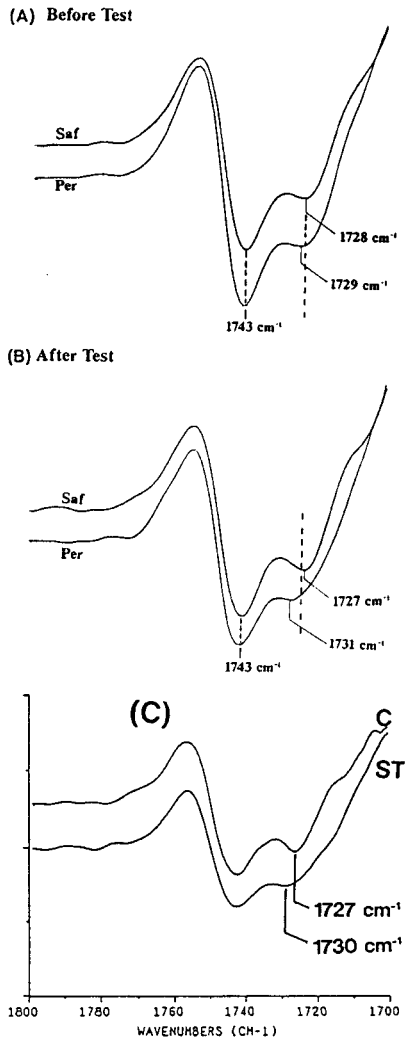


図２
フーリエ変換赤外分光法によるミクロソーム膜のエステルC=O結合の伸縮振動由来の吸収の２次微分スペクトル。
A,Bは、Ｐ群とＳ群のスペクトルの例。Cは、豚の脳ミクロソームでの例で、STはSialidase-treated、Cはコントロール。

183 老年痴呆症治療薬を目指す新規 Prolyl endopeptidase 阻害剤、JTP-4819 の生化学的性質及び薬理活性

砥出 勝雄、岩本 陽子、藤原 教子
(日本たばこ産業 (株) 医薬総合研究所)

〔要約〕

新規 Prolyl endopeptidase (PEP) 阻害剤、JTP-4819 はラット脳 PEP 活性に対し、強力かつ、特異的な阻害作用 (IC_{50}：0.8 nM) を示した。Ex vivo における PEP 活性に対し、JTP-4819 (3 mg/kg, p.o.) は投与3時間後においても強く、持続的な阻害作用を示した。JTP-4819 は精製 PEP による Substance P (SP)、Arg-vasopressin (AVP)、TRH の分解を抑制し、それぞれ 4.5、7.8、9.2 nM の IC_{50} 値を示した。さらに、JTP-4819 は前頭葉皮質及び海馬からの ACh 遊離促進作用を示した。以上、JTP-4819 は PEP 阻害作用を介し、神経ペプチドの機能亢進及び ACh 神経伝達賦活作用を併せもつ老年痴呆症治療薬としての開発が期待される化合物である。

老年痴呆症患者の脳において ACh や神経ペプチドの伝達障害が報告されている(1, 2)。PEP は学習・記憶機能に関与することが報告されている神経ペプチド AVP、SP、TRH 等 (3, 4) の C末端プロリンのカルボキシル側を選択的に切断するセリンプロテアーゼである(5)。これらの背景をもとに、我々は PEP 阻害作用を介し神経ペプチドの賦活を作用機序とする老年痴呆症治療薬の開発に着手、その結果、強力かつ特異的な PEP 阻害作用を有する (S)-2-[[(S)-2-(hydroxyacetyl)-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-N-(phenylmethyl)-1-pyrrolidinecarboxamide (JTP-4819) を見出した。今回、JTP-4819 の PEP 阻害作用の生化学的性質及び薬理活性の指標として脳透析法を用い ACh 遊離作用について検討したので報告する。

[方法] 実験には Wistar 系及び Fisher 系雄性ラット (211 g- 381 g) を用いた。

1) PEP 活性：ラット脳を 0.1 M リン酸緩衝液でホモゲナイズし、10,000 rpm で 20 分遠心後その上清を酵素画分として用いた。基質として 200 μM 7-(Suc-Gly-Pro)-4-methylcoumarinamide を用い、反応後生成する 7-amino-4-methylcoumarin を蛍光光度計 (ex.370 nm; em.460 nm) により測定した(6)。さらに、ラット血漿に JTP-4819 を加え、37 ℃で 30 分間インキュベート後に血漿中に存在する JTP-4819 の PEP 阻害作用を検討した。PEP の阻害様式はゲルろ過法により検討した。Ex vivo における PEP 阻害活性は薬物投与1及び3時間後、脳を摘出、大脳皮質、海馬、線条体、延髄、小脳及び中脳＋視床下部に分割後、in vitro の際と同様の方法で PEP 活性の測定を行なった。

2) 酵素特異性：各種精製酵素及び基質を用い、JTP-4819 は最高 100 μM の濃度まで検討した。

3) 神経ペプチドの分解：精製 PEP を基質である SP 、AVP あるいは TRH と反応後、残存する SP 、AVP あるいは TRH ならびに生成したこれらの代謝物を HPLC/UV にて測定した。

4) 脳透析：Pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) 麻酔下、前頭葉皮質 (A:+3.2, L:-4.9, V:-3.5 mm) 及び海馬 (A:-6.5, L:-4.5, V:-3.5) にガイドカニューレを植え込み、術後 26－48 時間後に透析プローブを挿入、ACh 量を HPLC/ECD により測定した(7)。尚、JTP-4819 は注射用蒸留水に溶解し、還流開始約4時間後、ACh の basal level が安定した後投与した。

[結果および考察] JTP-4819 は 0.8 nM (IC_{50}) の低濃度で PEP 阻害作用を示した (図 1)。生体内には種々のプロリン特異的分解酵素が存在するが、JTP-4819 は各種酵素に対し阻害作用を示さず、PEP にのみ特異的な阻害作用を示した (表 1)。血漿とのインキュベート後も JTP-4819 は強い PEP 阻害作用を示し、血中における本剤の安定性が示唆された。Ex vivo による PEP 阻害作用を脳内部位別に検討したところ、JTP-4819 (3 mg/kg, p.o.) は投与 1 及び 3 時間後も大脳皮質及び海馬を含め各脳部位とも強い阻害作用を示した。さらに、JTP-4819 は SP、AVP 及び TRH の PEP による分解を低濃度で抑制し (図 2)、神経ペプチドの機能亢進作用が推察された。一方、前頭葉皮質及び海馬からの ACh 遊離に対し、JTP-4819 (1 及び 3 mg/kg, p.o.) は促進作用を示したことから、ACh 神経伝達の賦活作用を有することも示唆された。

以上、本剤は PEP 阻害作用を介し、SP、AVP 及び TRH 等のプロリン含有神経ペプチドの分解を抑制することにより、これらの機能を亢進させ, かつ ACh 神経伝達賦活作用を併せもつユニークな薬剤として老年痴呆症に対し有効性を発揮するものと思われる。

[謝辞] 各種精製酵素を供与頂いた長崎大学薬学部薬品製造工学、芳本忠教授に深謝します。

[文献]

1) Beal M.F. and Mazurek M.F. (1987) Neurology 37, 1205-1209. 2) Ferrier I.N. et al. (1983) J. Neurol. Sci. 62, 159-170. 3) Schlesinger K. et al. (1983) Biochem. Behav.19, 655-661. 4) Taira K. and Kaneto H. (1987) Folia pharmacol. japon. 89, 243-252. 5) Walter R. et al. (1980) Mol. Cell. Biochem. 30, 111-127. 6) Kato T. et al. (1980) J. Neurochem. 35, 527-535. 7) Toide K. et al. (1993) Eur. J. Phamacol. 233, 21-28.

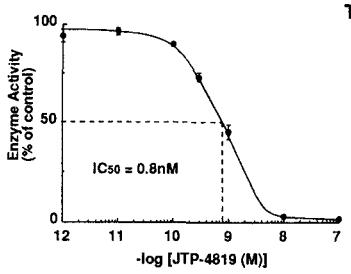


Fig1 Effect of JTP-4819 on rats brain prolyl endopeptidase activities. The data expressed mean ± S.E. (n=3).

Table 1 Inhibitory effect of JTP-4819 on PEP and the related enzyme activities

Enzyme	Source	Substrate	IC_{50} (μM)
Prolyl Endopeptidase	Rat brain	Suc-Gly-Pro-MCA	0.0008
Prolyl Endopeptidase	F. meningosepticum	Z-Gly-Pro-ßNA	0.0043
Dipeptidyl aminopeptidase IV	F. meningosepticum	Gly-Pro-ßNA	>100
Proline iminopeptidase	B. coagulans	Pro-ßNA	>100
Aminopeptidase P	E. coli	Gly-Pro-ßNA	>100
Prolidase	X. maltophlia	Leu-Pro	>100
Carboxypeptidase P	X. maltophlia	Z-Pro-Leu	>100
Leucine aminopeptidase	Porcine kidney	Leu-MCA	>100
Trypsin	Bovine pancreas	Pro-Phe-Arg-MCA	>100
Chymotrypsin	Bovine pancreas	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	>100
Elastase	Pocine pancreas	Ala-Pro-Ala-MCA	>100
Cathepsin B	Bovine spleen	Z-Arg-Arg-MCA	>100

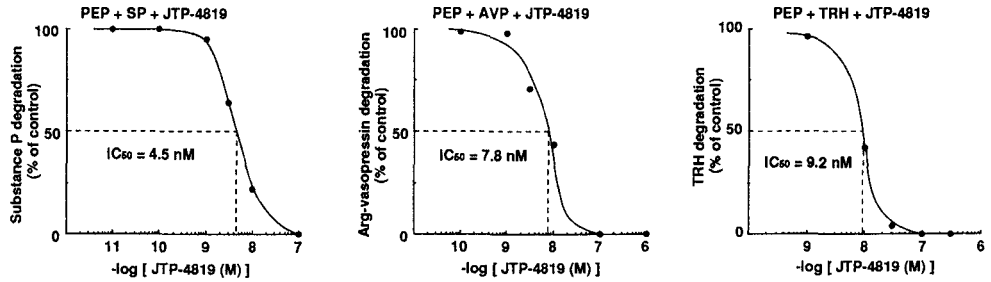


Fig2 Effect of JTP-4819 on the degradation of neuropeptides by purified PEP from *Flavobacterium meningosepticum*

184 大脳皮質体性感覚野におけるLTPに伴うシナプトフィジンおよびシナプシンの消長

山口知子[1]・川上順子[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。一次感覚野でのLTP誘導率は低かった。SIIの組織をLTP 10分後と 60分後に摘出し、ただちに液体窒素で凍結した組織についてシナプトソ-ム小胞膜マーカータンパクであるシナプトフィジンおよびそのリン酸化・脱リン酸化によって神経伝達物質の放出を調節しているシナプシンの変化を検索したところ、シナプトフィジンはLTP 10分後で対照組織の2.5倍に増加しており、60分後には非LTP対照レベルに復する群と増加レベルを保っている群とに別れた。これは、われわれがすでに発表しているPKC活性の消長（1）でも観察された現象で興味がもたれる。またシナプシン抗体陽性バンドは細胞質および膜分画でLTP 10分後に著しい増加が認められ、可溶画分では60分後では非LTP対照レベルへの復帰が観察されたが膜画分では増加が維持されていた。

LTPは記憶モデルとして、特に海馬でよく研究され、その成立および維持に関する分子機構に様々なキナーゼの関与が示唆されている。また，大脳感覚中枢野においても、視床のVPLにおけるテタヌス刺激で特にネコでは大脳二次体性感覚野(SII)においてはLTPの成立が100%認められ（一次体性感覚野(SI)では６例中２例）感覚記憶のよいモデル系と思われる（２）。我々は、昨年の本大会においCam KIIによる内在基質のリン酸化の上昇が分子機構の一端を担っていることを報告した（5）。このリン酸化基質としてはシナプシンおよびCam KII α および β サブユニットがリン酸化のターゲットとなっていると思われる。多くのキナーゼの複雑な関与と共に最近、海馬の歯状回において、LTPに伴うシナップス小胞タンパクの増加がLTP後期の３時間後に観察されたが４５分では認められなかったという報告が発表されたが（３）、彼らの主張するこれらシナップス小胞タンパクの誘導発現とは異なり、われわれの系においてはむしろLTPの初期に著しい増加が認められたことは、タンパクの誘導発現とは違う、機能タンパクへのプロセッシングの過程がテタヌス刺激で誘導されているものと思われる。

［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（2）。テタヌス刺激側及び対側の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 ℃で保存した凍結組織を2mM EGTA,10mM 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 ml/ml),0.1% Triton X-100中でホモジナイズおよび超音波処理し、4 ℃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。

シナプトフィジンおよびシナプシンのウエスターンブロットによる同定：試料を10-20%グラジエントゲルにてSDS-PAGE分離後、PVDF膜にセミドライ法でブロットし、一次抗体はミラノ、Dipartimento di Ricerca Biologica e Tecnologica の Dr. J.Meldolesi （抗シナプトフィジン）および Dr. F. Valtorta（抗シナプシン）から供与されたものを用い、ウエスターンブロットの検出にはProtein A を用いたECL検出システム法（アマーシャム）により、デンシトメトリーによって免疫染色のバンドの定量化を実施した。

[結　果・考　察]

シナプシン抗体はシナプシンⅠａ,Ⅰｂ およびⅡａ,Ⅱｂに反応しているがCamK IIによってリン酸化されるのはシナプシンⅠであることが知られている。一方シナプシンⅡはPKCよてリン酸化されるが(4)、LTP10分後、可溶画分および、膜画分での著しい免疫陽性バンドの増加はこれらキナーゼの基質の著しい増加がLTPによって起こっている。またシナプス膜に局在するシナプトフィジンもLTP10分後で対照の250%の増加が認められ、60分後ではこれらシナプス関連タンパクの増加は対照レベルに復する場合と、依然として増加を保っている場合が観察されていることは、われわれがすでに発表しているように(1)、キナーゼの消長とも一致する興味ある現象と思われる。LTPの成立とその維持に関わる分子機構として、プレおよびポストシナプスでの複雑な分子関与が提唱されているが、最近、Lynch ら(3)によって報告されているように、海馬におけるLTPの後期にのみシナプス関連タンパクの増加が認められたという結果が、われわれの感覚中枢野におけるLTPの成立機構とどう関わるか興味ある知見と思われる。



1　2　3　4　5　6

[図 1] LTP によるSII における
シナプシンの変動。
レーン：１−３（可溶画分）
レーン：４−６（膜画分）
１、４：対照（低頻度刺激）
２、５：LTP　１０分後
４、６：LTP　６０分後



1　2　3　4　5

[図 2] LTP によるSII 膜画分に
おけるシナプトフィジンの変動。
レーン１：LTP　１０分後
レーン２−４：LTP　６０分後
レーン５：対照（低頻度刺激）

[文　献] (1) Kawakami Y.,Miyata M. and Yamaguchi T.(1994) J.Neurosci. 投稿中 (2) Kawakami Y. and Ashida H.(1993) Brain Res. 605,147-154. (3) Lynch M.A.,Voss K.L.,Rodoriguez J. and Bliss T.V.P. (1994) Neurosci. 60, 1-5. (4) Valtorta F.,Benfenati F. and Greengard P.(1992) J.Biol.Chem. 267(11), 7195-7198. (5) 山口知子、宮田真理子、川上順子 (1993) 神経化学 32(1) , 328-329.

185　脳発育障害ラットにおける脳内物質変化と八方向放射状迷路学習機能

田丸政男，清水　遵[1]，平田ゆかり[2]，松谷天星丸[2]，永田　豊[2]
（鈴鹿医療大・医用工学，[1]愛知淑徳大，[2]藤田保健衛生大・医）

【要　約】　妊娠11-13日の母ラットにmethylazoxymethanol(MAM)を15mg/kg連続腹腔内投与し、出生後の成熟仔ラットの大脳皮質及び海馬内のノルアドレナリン(NA)、セロトニン(5HT)量及びアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性を測定した。また八方向放射状迷路学習テストを試行して、空間記憶の機能も検討した。MAMラットの大脳皮質及び海馬重量は、何れも対照の約20%の有意な低下を示し、小頭症であることが認められた。大脳半球及び海馬当りにおけるNA及び5HT量の低下は見られなかったが、ChAT活性は、両部位共に対照の約20%の有意な低下を示した。MAMラットの八方向放射状迷路学習成績は，対照ラットに比較して多少劣ったが、15試行で学習基準に達し、通常手続きの放射状迷路学習が可能であることが示された。MAMラットでは、遅延選択テストにおいて遅延15分以上で急激な成績の低下を示し、作業記憶の障害が示唆された。以上のことから、MAM小頭症ラットの大脳半球及び海馬におけるコリン作動性神経系の脱落が、作業記憶の障害に何等かの影響を及ぼしたことが示唆された。

【目的】

胎生期における種々の環境因子の障害によって、成長後に出現する中枢神経系の異常は、各組織の発育課程が異なるために、その障害の時期に大きく影響される。アルキル化剤のMAMを妊娠15日目の母ラットに一回腹腔内投与すると、その仔動物に著しい小頭症が発現する(1)。私共は、胎生の11又は13日目のMAM一回投与ラットが、15日投与より小頭症が軽度にもかかわらず、オペラント明度弁別学習成績が劣ることを既に報告した(2)。そこで本実験では、妊娠11-13日目のMAM連続投与ラットを用いて、モノアミン量の定量、及び学習や記憶に関与するとされるコリン作動性神経系(5-7)の指標酵素の活性を測定し、酵素活性と空間識別能力との関係を検索した。空間識別能力には、Oltonの八方向放射状迷路学習テストを試行した。この学習課題は、迷路外の視覚的手掛かりの空間的関係の記憶（参照記憶）と、その試行内での選択または未選択の記憶（作業記憶）を必要とし、空間記憶の検討には好都合の課題である。

【実験方法】

動物はWistar-Imamichi系の白鼠を用い、雌雄を交配した翌日を妊娠１日目とし、妊娠11日から３日間、MAM-acetateを15mg/kg腹腔内に連続投与した。自然分娩で出生した仔ラットを、実験開始の3ヶ月齢まで飼育した。八方向放射状迷路学習には、実験群及び対照群共に雄ラット９匹を用い、既報(3)の方法に従って行った。１試行はラットが８走路全てのペレットを獲得するか、あるいは10分経過した時点で終了し、１日１試行で学習基準（最初の８選択のうち７選択以上の正選択が２日以上続く）に到達するまで行なった。習得訓練試行終了の翌日より３日間は、各ラットの作業記憶の正確さを検討するための、遅延選択テストを行なった。テスト第一日目に、ラットが８走路のうち最初の４走路を選択し終えると、ラットを直ちに迷路から取り出し、ホームケージに移す。５分後に再びラットを迷路内に戻し、残りの４走路の選択テストを試行させた。同様の方法で２日目は１５分の遅延で、３日目には３０分の遅延で選択テストを行なった。遅延選択テスト終了後、各ラットは飽食状態にして２週間飼育した。各ラットをエーテル麻酔下で断頭屠殺し、摘出脳を大脳皮質及び海馬に分け、Rossierら(4)の方法に従ってアセチルコリン合成酵素のcholine acetyltransferase (ChAT) 活性を脳懸濁液について測定した。またNE及び5HT量は、HPLCで分離しECD検出した。

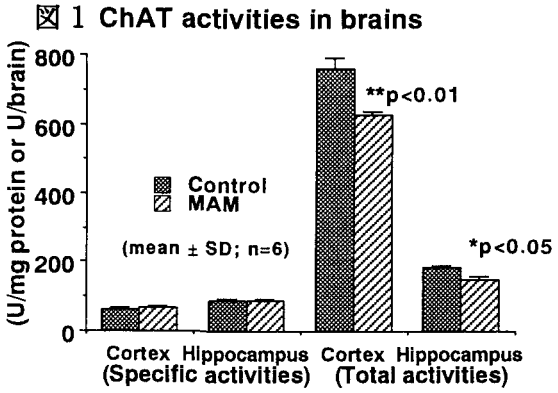
【結果と考察】

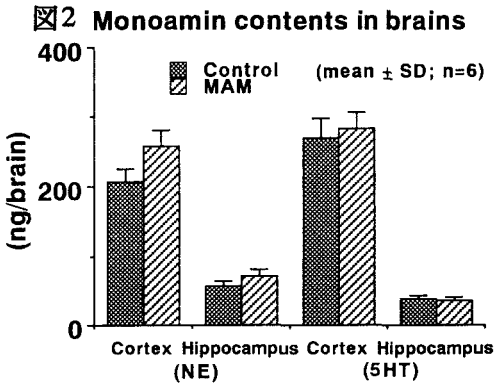
MAM群の全脳重量は、対照の約15%の有意($P<0.05$)な低下を示し、また部位別にみても大脳皮質及び海馬の重量も何れも対照の約80%の有意($P<0.05$)の低値が見られ、小頭症であることが認められた（データ示さず）。大脳皮質及び海馬のホモジェネイトにおけるChAT活性は、MAM群の両部位で脳あたりで、対照の約20%の有意の低下を示し、コリン作動性神経系の脱落が示唆された。しかし、蛋白当りの比活性は両部位共に対照との間には大きな差は認められなっかた（図1）。一方、MAMラットの大脳皮質及び海馬における脳あたりのNE及び5HT量は、対照に比し大きな変化はなかった(図2)。

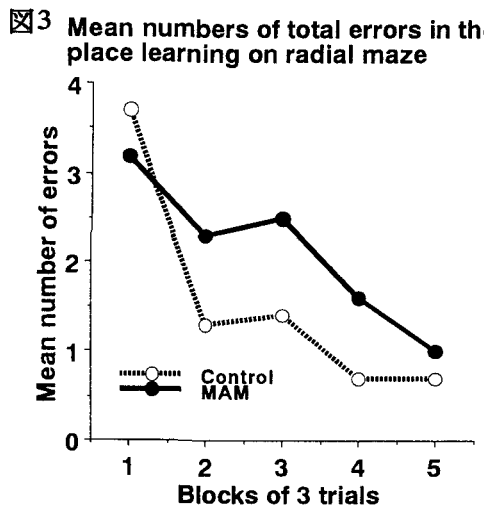
八方向放射状迷路学習成績は、15試行を5ブロックに分けた場合の各ブロックごとの平均誤反応が、MAMラット群及び対照群共に、訓練の経過に伴って誤反応数は漸次減少し学習効果が見られた

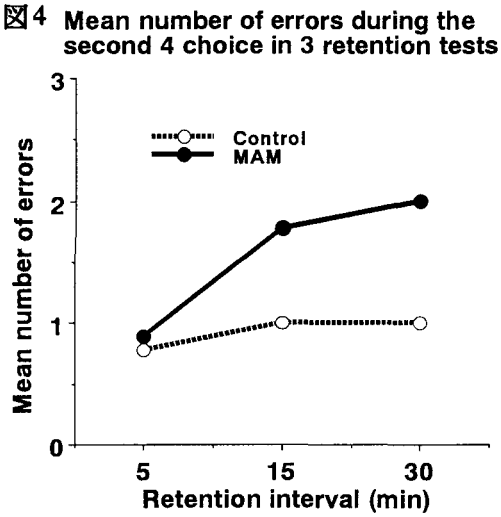
[F(4,64)=9.59, P<0.01]が、各ブロックにおける両群の間には有意な差はなかった（図3）。また両群の遅延後の最初の4選択における正反応数の平均は、ラットが遅延前の4選択全てを記憶している場合、遅延後の最初の4選択でランダムに走行して餌を獲得できる期待値は2.73である。対照群は30分の遅延においても、ほぼ同じ正反応数を維持し、期待値 2.73を上回ったが、 MAM群では15分以上の遅延で正反応数が減少し期待値2.73を下回り、30分の遅延おいては両群間に有意差(P<0.05)が認められた(データ示さず)。また、誤反応数は遅延前に選択した走路を遅延後に再び選択した回数の合計で、MAM群では30分の遅延において、有意(P<0.05)に誤反応数の増加が認められ（図4）、作業記憶および記憶の固定に何等かの障害があることが示唆された。

大脳皮質や海馬におけるコリン作動性ニューロンが、空間認識能力に重要な役割を演ずることは、多くの脳損傷実験や薬理学的研究によって示唆されている(5-7)。本実験で示された、MAM小頭症ラットの大脳皮質及び海馬でモノアミン作動性ニューロンの脱落は示されず、一方、コリン作動性ニューロンの脱落が著しく、このことがMAMラットの空間記憶障害の要因の一つになった可能性が示唆された。









【文献】 (1) Spaze, M. and Laquer, G.L. (1968) *Proc. Soc. Biol. Med. 129:705-710.* (2) 松谷ら (1977) *神経化学16:57-60.* (3) Tamaru, M. et al. (1992) *Neurosci. Res. 14: 13-25.* (4) Rossier. J. et al. (1973) *FEBS Lett. 32: 231-234.* (5) Pepeu, G. et al. (1973) *Brain Res. 57: 153-164.* (6) Olton, D.S. and Feustle, W.A. (1980) *Exp. Brain Res. 41: 380-389.* (7) Toumane, A. et al. (1988) *Behav. Brain Res. 30: 225-234.*

（現所属：松谷天星丸、川村学園女子大学）

186 ラットの時間制限給餌による rebound hyperphagia に閉所条件を加えた時の摂餌行動と前頭葉ドパミン代謝

藤嵜 泰利[1)]、切池 信夫[1)]、井上 幸紀[1)]、奥野 正景[1) 2)]、伊藤 英樹[1) 3)]、
栗岡 政典[1)]、吉村 敬一[1) 4)]、山上 榮[1)]
1）大阪市立大・医・神経精神医学教室 2）三国丘病院 3）宝塚三田病院
4）浅香山病院

〔要約〕
ラットに1日2時間の時間制限給餌を7日間施行後、自由摂餌に戻したときに生じる rebound hyperphagia に、閉所条件を加えたときの摂餌行動と前頭葉dopamin(DA)代謝の変化について検討を加えた。ラットの時間制限給餌により生じるrebound hyperphagiaの2時間の摂餌量は、２２時間絶食後の２時間の自由摂餌に比べ、約153％まで増加した。そして、これに閉所条件を加えると摂餌量はさらに約176％まで増加した。rebound hyperphagia に閉所条件を加えたときの前頭前皮質（PFC）の細胞外液中DA濃度は、閉所条件を加えないものおよび絶食後の自由摂餌群に比し有意な変化を示さなかった。しかし、DOPACおよびHVA濃度は摂餌時に有意に増加しており、前頭前皮質（PFC）のDA代謝が亢進していることが示唆された。今回の結果よりrebound hyperphagia に閉所条件を加えた時さらに摂餌量が増加することにPFCのDA代謝の亢進が関与してい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に1日2時間の時間制限給餌を7日間繰り返した後、自由摂餌を再開すると rebound hyperphagia となること、そして、これに閉所条件を加えるとさらに rebound hyperphagia が増強されることを報告してきた[4)]。一方、摂餌行動やストレス条件下でPFCのDA代謝が亢進することが報告されている[1,2)]。そこで今回我々は、この rebound hyperphagia 及び、これにストレスとして閉所条件を加えたときのPFCにおけるDA代謝についてマイクロダイアリシス法にて検討を加えた。

方法　実験動物および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[3)]。すなわち、Wistar系雌性ラット（12週齢、180-210ｇ）に chloral hydrate 麻酔下で Paxinos and Watson の図譜[5)]に従い guide cannula を前頭前皮質（AP +2.7mm、L +0.5mm、V -1.5mm from Bregma and dura surface)に挿入し、固定した。ラットを8時-20時を暗期とする明暗恒常条件下で個別の飼育用アクリルケージ（300x300x350mm)で飼育し、術後7日以上の回復期間の後、ラットを3群に分けた（ｎ＝３）。そのうち2群には、1日のうち11時から13時の2時間に摂餌させる時間制限給餌を7日間にわたって施行した。8日目の測定日の9時に膜長3ｍｍのＩ字型透析プローブを挿入し、10時から11時までのDA、3、4-dihydroxyphenylacetic 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。時間制限給餌をおこなった2群のうち1群は、11時に前報[4)]の100ｘ150ｘ100ｍｍのステンレスグリッドのケージに移し閉所条件を加えてから、11時から13時まで餌はあるが摂取することができない見せ餌刺激を行い、13時から自由に摂餌をさせた(A群）。他の1群は、閉所条件を加えずに同様に見せ餌刺激2時間を加え、その後自由に摂餌をさせた（B群)。残りの1群は対照群として 測定日前日の13時に餌を取り除き、22時間絶食させた後、閉所条件を加えないで、見せ餌刺激の後自由に摂餌をさせた（C群）。実験期間中、水分摂取は自由に行わせた。
細胞外液中DA,DOPAC,HVA濃度変化の統計学的解析には、実験条件と時間とを２因子とする２元配置分散分析を行い、有意な差を認めた場合、各時間において1元配置分散分析を行った後、2群の比較に Scheffe's test を用いた。摂餌量の検定には *t* -test (paired)を用いた。

結果および考察　制限給餌を施行する前の３日間の一日当りの摂餌量すなわち自由摂餌量は３群間に統計学的有意差を認めなかった。自由摂餌開始後の２時間の摂餌量の平均値はA群10.8±0.4g,B群9.4±1.7g,C群6.1±1.1gであり、A群、B群ともC群に比べ有意に増加しており rebound hyperphagia

が観察された。さらに、A群はB群よりも増加する傾向にあり rebound hyperphagia が閉所条件によりさらに増強されることが示唆された。rebound hyperphagia に閉所条件を加えたときのPFCにおけるDA代謝をマイクロダイアリシス法にて測定した結果、DA濃度は標準偏差が大きかったため、閉所条件を加えないものおよび22時間絶食後の自由摂餌群と比べて、統計的有意差を見いだせなかったが、DOPAC、HVA濃度は他の2群に比し有意に増加していた(Fig.1)。PFCのDA系は、摂餌行動やストレスにより代謝が亢進するという報告[1,2]もあり、今回の結果から、rebound hyperphagia に閉所条件を加えた時さらに摂餌量が増加することにPFCのDA代謝の亢進が関与している可能性が示唆された。

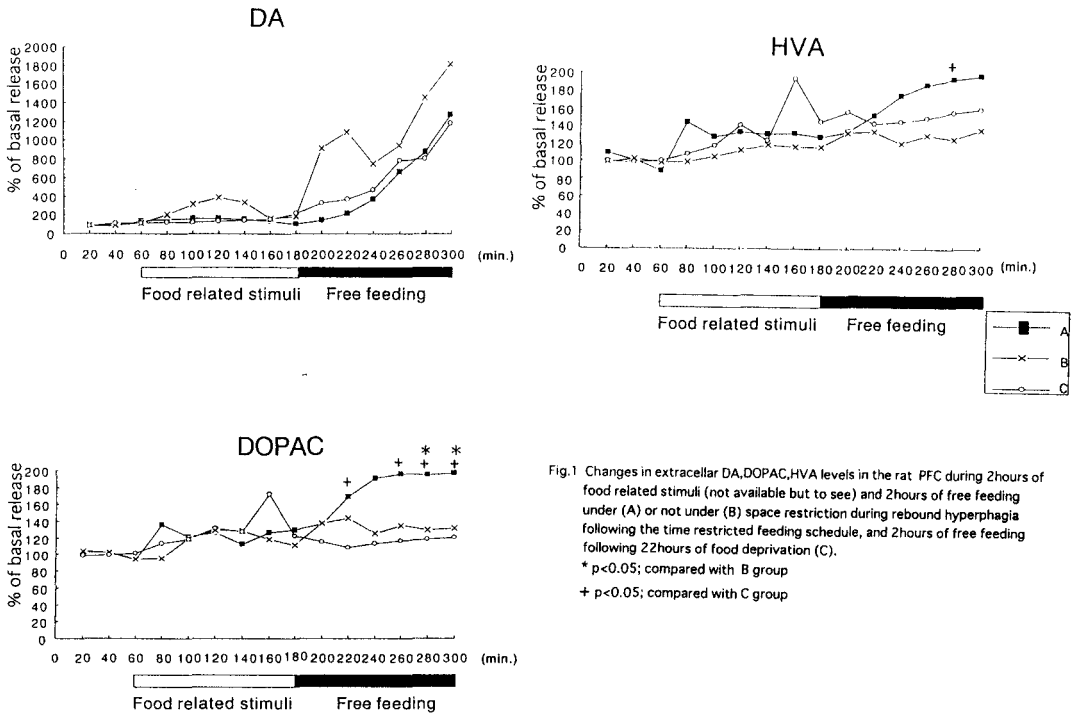


Fig.1 Changes in extracellar DA,DOPAC,HVA levels in the rat PFC during 2hours of food related stimuli (not available but to see) and 2hours of free feeding under (A) or not under (B) space restriction during rebound hyperphagia following the time restricted feeding schedule, and 2hours of free feeding following 22hours of food deprivation (C).
* p<0.05; compared with B group
+ p<0.05; compared with C group

（参考文献）

1) Abercrombie,ED. et al (1989) J. Neurochem. 52, 1655-1658 2) Hernandez,L. et al (1990) BRAIN RES BULL 25(6), 975-979 3) **井上幸紀他** (1990) **神経化学** 29、256-257 4) **奥野正景他** (1992) **神経化学** 31、442-443 5) Paxinos,G. and Watson,C.(1982) The Rat Brain,Academic Press.

187 アンギオテンシン作動性入力による正中視索前核領域のモノアミン代謝の促進

田中淳一、牛込彰彦、山室 裕*、仮屋勝秀*、堀 耕治*、野村正彦*
（鳴門教育大・人間形成基礎、*埼玉医大・第一生理）

〔要約〕

正中視索前核(MnPO)におけるアンギオテンシン(ANG)作動性およびモノアミン作動性神経の統合的役割を検討した。MnPOは脳弓下器官(SFO)由来のANG作動性入力を受けていることから、SFOの電気刺激がMnPO領域のモノアミン代謝に及ぼす影響についてマイクロダイアリシス法により調べた。SFO刺激によりMnPO領域のノルアドレナリン(NA)、ドーパミン (DA)、DAの代謝産物である3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)およびhomovanillic acid (HVA)濃度は有意に上昇した。次に、ANG IIのアンタゴニストであるSaralasin (Sar)を第三脳室内に投与した。Sar投与により、MnPO領域のNA、DOPACおよびHVA濃度は減少した。これらの結果より、SFOからのANG作動性入力はMnPO領域のモノアミン代謝に対し促進的に働くことが考えられた。

第三脳室前腹部に位置するMnPOは、飲水行動の誘起、血圧調節やバゾプレッシン分泌調節に関与していることが知られている（1, 3）。MnPOは、SFOからのANG作動性（2, 5）および脳幹由来のモノアミン作動性（4）ニューロンの神経支配を受けている。先に、我々は、MnPOにはSFOと脳幹（A1NA細胞群）の両方かの神経入力を受けているニューロンが存在すること（6）、ANG変換酵素阻害剤の脳室内投与がMnPO領域のモノアミン代謝を抑制すること（7）を確認している。これらの知見から、SFOからのANG作動性入力がMnPO領域でのモノアミン代謝に何らかの影響を与えていることが考えられる。そこで、本研究では、SFOの電気刺激あるいはANGIIアンタゴニストであるSarの脳室内投与がMnPO領域のモノアミン代謝におよぼす影響についてマイクロダイアリシス法を用いて検討した。

[方法]

ネンブタール麻酔下のWistar系雄ラット(240-320 g)のMnPOへステンレス製ガイドカニューレを入れ、SFOへ同心型ステンレス製刺激電極を刺入あるいは第三脳室にステンレス製カニューレを刺入た後、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のプローブをガイドカニューレを介してMnPOへ刺入し、リンゲル液で６時間以上潅流した。SFOの電気刺激（0.6 mA, 5-20 Hz, 0.2 ms duration）は３０分間行った。第三脳室へは生理食塩水に溶解したSar(5μg, 1μl/2 hr)または生理食塩水(1μl)を注入した。透析は流速1μl/minで行った。透析液中のNA、DA、DOPACおよび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定量した。透析プローブ、刺激電極ならびにカニューレの刺入部位は、実験終了後脳組織標本を作成し確認した。

[結果と考察]

SFOの電気刺激より、MnPO領域のNA、DA、DOPACおよびHVA量は増加し、刺激頻度の上昇に伴った増加が観察された（Fig. 1）。第三脳室へのSar投与により、MnPO領域のNA、DOPACおよびHVA量は有意な減少を示したが、DA量の変化は見られなかった（Fig. 2）。一方、生理食塩水投与による影響は観察されなかった（Fig. 2）。以上の結果より、SFOからのANG作動性神経路はMnPO領域のモノアミン代謝を促進する働きがあることが示唆された。MnPOニューロンの一部はSFOと脳幹からの神経性入力を受けているという電気生理学的所見（6）より、SFOからのANGニューロンはMnPO領域のモノアミンニューロンの軸索終末にシナプスを形成しており、モノアミンニューロンの神経伝達を調節していることが推察される。

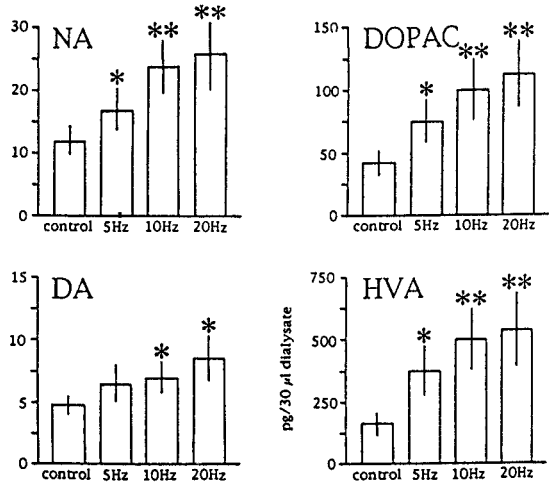


Fig. 1. Changes in extracellular NA, DA, DOPAC and HVA in the MnPO area in response to electrical stimulation of the SFO. Mean ± S.E.M. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

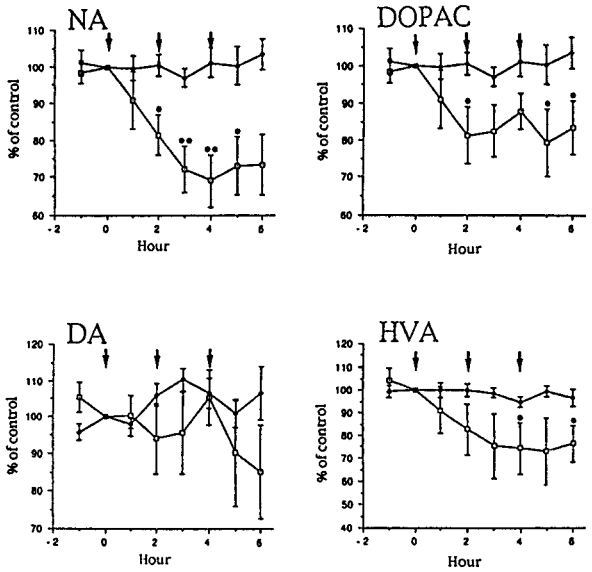


Fig. 2. Changes in extracellular NA, DA, DOPAC and HVA in the MnPO area in response to injections of Sar (open square) or saline (closed diamond) into the third ventricle. Arrows indicate the injection times. Mean ± S.E.M. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. 0hr.

[文献]

1) Lind, R.W. & Johnson, A.K. (1982) J. Neurosci., 2, 1043-1051.
2) Lind, R.W. et al. (1984) Brain Res. 321, 209-215.
3) Mangiapane, M.L. et al. (1983) Neuroendocrinology, 37, 73-77.
4) Saper, C.B. et al. (1983) Neurosci. Lett., 42 285-291.
5) Tanaka, J. et al (1987) Exp. Brain Res., 68, 579-585.
6) Tanaka, J. et al. (1992) Neuroreport, 3, 946-948.
7) 田中淳一他 (1993) 神経化学, 32, 454-455.

188 老齢ラットに対するアマンタジンの行動薬理作用

溝渕睦彦、堀口　淳、柿本泰男
（愛媛大学医学部神経精神医学教室）

〔要約〕

アマンタジンは、抗パーキンソン作用のみならず、脳血管障害による老人性痴呆や意識障害患者の意欲と自発性減退を改善させる。そこで、本薬物を老齢ラットに投与し、オープンフィールド法により自発活動量と8方向放射状迷路による迷路学習を行なった。オープンフィールド法でのLocomotionは、アマンタジン投与1日目から2日目で著明に増加し、維持された。この結果は、100mg/kg投与群でもっとも著明であった。rearingは、やや減少傾向を示したが、groomingは、100mg/kg投与群のみ著明に減少した。8方向放射状迷路学習では100mg/kg投与群がもっとも学習能力が低く、次に20mg/kg投与群で、対照群が誤選択が、最も少なかった。迷路実験中の運動量は、100mg/kg投与群は、老齢ラットに対しては著明に減少し、一ケ所にとどまっていた。以上より、アマンタジンは、迷路学習能を低下させ、運動量ではオープンフィールドと迷路で相異なる結果を示した。

[はじめに]

アマンタジンは、抗パーキンソン病薬として用いられ、この効果は、主に中枢ドパミン神経活動の亢進作用による。すなわち、ドパミン生合成促進、神経終末からの放出促進および同レセプターの直接刺激などが考えられる。一方、アマンタジンは、抗パーキンソン作用のみならず、脳機能賦活作用を持ち、脳血管障害による老人性痴呆症や意識障害患者の意欲と自発性減退を改善する効果が知られている[1]。われわれも、失外套症候群や脳梗塞患者に対してアマンタジンが著明な臨床効果を発揮することを報告した[3、4]。そこで、本薬物を老齢ラットに投与し、自発活動量と迷路学習を指標に、行動薬理学的検討を行った。

[方法]

（A）動物および薬物投与法；ラットは、生後24ヶ月の老齢ウイスター系雄ラット、体重450～560gを用いた。ラットは、アマンタジン20mg/kg、100mg/kg投与群と蒸留水2ml投与の対照群の3群に分け、各群8匹用いた。

（B）自発活動量の測定；自発活動量は、オープンフィールド装置を用いた。投与前10日間、投与中10日間、中止後5日間、毎日各3分間、連続25日間観察し、Locomotion、rearing、groomingの各項目について、頻度と継続時間を計測した。

（C）迷路学習；迷路はOltonらの8方向放射状迷路を用いた。各アームの先端には、径2cmの給餌用カップに、糖水1mlを入れた。実験前10日から給餌制限を行ない、実験期間中は体重を約80%に維持した。1日間2方向、3日間4方向の迷路学習を行わせた後に、本実験を1日1試行、連続10日間行った。選択したアームの位置と、8つすべてのアームの餌を取り終わるまでに要した時間を記録した。ラットがすべてのアームの餌を取り終わるか、15分間経過した時点で中止し、これを1試行とした。測定の検定には、分散分析を行った後に、student t testを用いた。

[結果と考察]

オープンフィールド法でのLocomotionは、アマンタジン投与1日目から2日目で著明に増加し、維持された。この結果は、100mg/kg投与群でもっとも著明であった。rearingは、やや減少傾向を示したが、groomingは、100mg/kg投与群のみ著明に減少した。Fig.1は、ラットが放射状迷路実験中に各アームに何分とどまっていたかを示したものである。20mg/kg投与群は対照群とほぼ同じで、特に4日目以後は約15秒と一定している。100mg/kg投与群では初日6分、以後次第に短くなっているが、10日目でも50秒で他の2群より著明に長い。100mg/kg投与ラットは、アームの出口から中央のプラットホームに出ることを恐がり、一ケ所にじっと止まっている事が多く、時にアーム内を往復したり、出口でsniffingを繰り返すことがあった。したがって、オープンフィールドでは、アマンタジンによLocomotionは著明に増加したが、迷路実験においては、逆に極端に低下した。迷路学習能は、最初の8選択中の正反応数（Fig.2）と各試行毎の誤選択数（Fig.3）で評価した。最初の8選択中の正反応数では、対照群と20mg/kg投与群は、1日目から10日目までほとんど変動がなく、約6回の正反応を示している。100mg/kg投与群は、多少変動するが正反応は約4回と他の2群に比較して有意に低い。100mg/kg投与群は、最初の3日間1ケ所にとどまることが多いため、誤選択数は少なく、逆に7日目以後は極端に増加する。したがって、正しく学習能を誤選択数から評価することは出来ない。対照群では、初日から3日間は一試行中平均7.5回誤選択があったが、4日目から次第に低下し、9日目、10日目には約3.5に減少した。一方20mg/kg投与群では、1日目、2日目で8.5回、以後変動はあるものの最終の10日目でも6.5回とかなり誤選択が多い。学習能に関する研究は少ないが、Davies等は条件回避反応を上げると報告している[2]。しかし、本実験では老齢ラットに対して、アマンタジンは、学習能を低下させる作用を持つと考えられる。

[文献]

1.Castaigno,P.andLaplane,D.(1974)Lanouvellepresseme'dicale.3.1663-1664

2.Davies,JA.,Jackson,B.etal.(1974)Neuropharmacolbgy.13.199-204

3.堀口　淳,溝渕睦彦,柿本泰男 臨床脳波.(1986)28.35-38

4.堀口　淳,溝渕睦彦,柿本泰男 精神医学.(1986)28.907-915

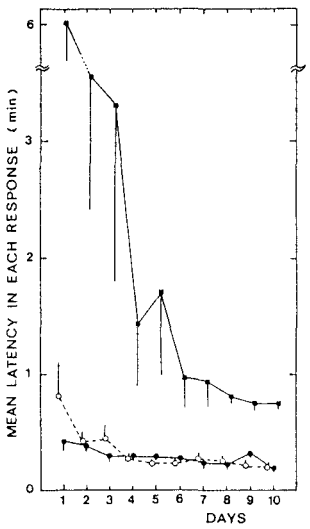


Fig. 1 迷路実験中の運動量

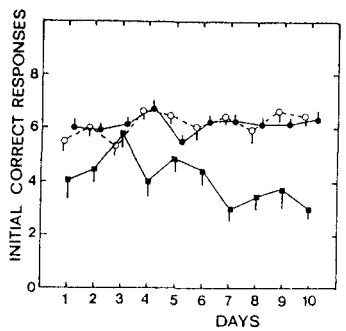


Fig. 2 正反応数

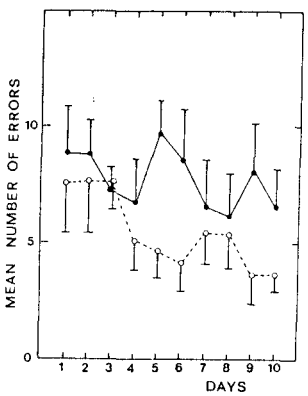


Fig. 3 誤選択数

○— —○ controls, ●——● 20mg/kg amantadine treated group, ■——■ 100mg/kg amantadine treated group. mean ± S. D.

189 ラットの時間制限給餌による rebound hyperphagia に対する飼料内容と fluvoxamine の効果

井上幸紀[1)]、切池信夫[1)]、藤嵜泰利[1)]、栗岡政典[1)]、伊藤英樹[1・2)]、奥野正景[1・3)]、吉村敬一[1・4)]、山上榮[1)]
1) 大阪市立大学(医) 神経精神医学教室 2) 宝塚三田病院 3) 三国ヶ丘病院 4) 浅香山病院

〔要約〕 ラットに1日2時間の時間制限給餌を7日間施行後自由摂餌に戻したときに生じる rebound hyperphagia に対する飼料内容の影響およびこれらに対する fluvoxamine の効果について検討を加えた。さらに、in vivo microdialysis 法を用い、fluvoxamine 腹腔内投与時の視床下部内側部におけるセロトニン放出に及ぼす影響についても検討を行った。Rebound hyperphagia における摂餌量は、高炭水化物および高脂肪含有飼料において標準飼料と異ならなかったが、高蛋白質含有飼料では減少した。Fluvoxamine は高炭水化物および高脂肪含有飼料において rebound hyperphagia における摂餌量を有意に減少させ、高蛋白質含有飼料では減少させなかった。また、fluvoxamine の腹腔内投与により視床下部内側部で 5-HT 放出の増加、5-HIAA 濃度の減少というセロトニンの再取り込み阻害作用を示す結果を認めた。以上のことから、時間制限給餌から開放したときにみられる rebound hyperphagia に対して fluvoxamine は抑制効果を有し、この効果は高炭水化物及び高脂肪含有飼料において顕著に認められ、rebound hyperphagia においてセロトニン系神経の機能低下が示唆された。

はじめに 我々は摂食障害の生物学的な基盤を解明するために、ラットに1日2時間の制限給餌を繰り返すと脳内セロトニン代謝が亢進し、自由摂餌を再開すると rebound hyperphagia 状態となり、そのとき脳内セロトニン代謝が低下することを報告してきた[2)]。そしてこれを摂食障害において生じる過食のひとつの model と考え、過食の脳内機序を明らかにするために種々の検討を加えてきた[1) 3)]。今回我々は、この rebound hyperphagia に対する飼料内容の影響およびこれに対するセロトニンの選択的再取り込み阻害薬である fluvoxamine の効果について検討を加えた。さらに、in vivo microdialysis 法を用い、fluvoxamine 腹腔内投与時の視床下部内側部におけるセロトニン放出におよぼす影響についても検討を行った。

方法 Wistar 系雌性ラット（12 週齢、180-220 g）を 8 時から 20 時を暗期とする明暗恒温条件下で 1 週間飼育し実験に供した。飼料は表 1 に示した異なる組成の飼料を用いた。飲料水は水道水で、実験期間中自由に飲用させた。

＜実験1＞ 標準飼料による1 日 2 時間 (11:00-13:00) の時間制限給餌を 7 日間にわたり加えた後ラットを 4 群に分け、各々に標準飼料、高炭水化物含有飼料、高蛋白質含有飼料、高脂肪含有飼料を与え、さらに各群をfluvoxamine 30 mg/kg /ml 投与 (i.p.) 群と同量の生理食塩水投与群の 2 群に分け、8 日目から 14 日目まで自由に摂餌させ、この間における摂餌量の変化を観察した。摂餌量の測定は自由摂餌期間の薬物投与後 1 , 2 , 3 時間および 24 時間後に測定した。最終的に各群が 8 匹となるようにした。

＜実験 2 ＞ ラットを抱水クロラール(400 mg/kg i.p.) で麻酔し、ガイドカニューレを Paxinos and Watson の図譜[4)] に従い視床下部内側部（冠状縫合部より後方に 2.5 mm, 左側方に 0.5 mm, 深さ 7.5 mm ）に挿入し、セメント固定した。そして10 日以上の回復期間の後、fluvoxamine 30 mg/kg /ml を腹腔内投与し in vivo microdialysis 法により細胞外液を 30 分毎に 3 時間回収し、5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 濃度を HPLC-ECD にて測定した。

統計学的解析として、時間と飼料内容又は薬物を 2 因子として繰り返しのある二元配置分散分析を行った。有意な差異を認めた場合、各時間において一元配置分散分析を行った後、2 群の比較に Scheffe's Test を行った。

結果および考察 Rebound hyperphagia 状態における高炭水化物含有飼料、高脂肪含有飼料、高蛋白質含有飼料の摂餌量におよぼす影響について Fig.1. に示した。Rebound hyperphagia 1 日目の 1, 2, 3 時間および 24 時間における摂餌量は高炭水化物および高脂肪含有飼料では標準飼料と異ならなかったが、高蛋白質含有飼料では減少した。これらの傾向は 4 日目まで続いた。Fig. 2, 3, 4. に各飼料による

rebound hyperphagia の状態における fluvoxamine の摂餌量に対する効果を示した。Fluvoxamine は高炭水化物および高脂肪含有飼料における rebound hyperphagia の摂餌量を有意に減少させたが、高蛋白質含有飼料では減少させなかった。

Fluvoxamine 30 mg/kg を腹腔内投与したとき、5-HT 濃度は有意に上昇し投与 3 時間後で基礎放出値に比し約 332% 増加し、5-HIAA 濃度は投与 3 時間後で約 38% 減少した。

本研究において、時間制限給餌から開放後に見られる rebound hyperphagia において、主に炭水化物ならびに脂肪の摂餌量が増加し、これが fluvoxamine 投与により抑制されることが明らかになった。Rebound hyperphagia の状態においては脳内セロトニン代謝が低下しており[2]、fluvoxamine は 5-HT の再取り込みを阻害し、rebound hyperphagia における炭水化物ならびに脂肪の摂餌量を抑制したことから、時間制限給餌後に見られる rebound hyperphagia の状態においては脳内セロトニン系神経の機能低下が関与しているものと考えられた。

Table.1. Food contents

	standard	fat rich	carbohydrate rich	protein rich
contents	CE-2	CE-2 + cow fat 20%	CE-2 + corn starch 30%	CE-2 + milk protein 40%
1) crude protein	24.8	20.0	12.6	49.1
2) crude fat	4.4	20.5	2.7	2.6
3) crude fiber	3.5	3.2	2.7	2.6
4) crude ash	7.0	5.5	4.3	4.2
5) solble nitrogen	51.6	40.0	71.1	36.1
6) water	8.7	10.8	6.6	5.4
*) carbohydrate (3+5)	55.1	43.2	73.8	38.7
Cal/100 g	345.2	424.5	359.1	364.2

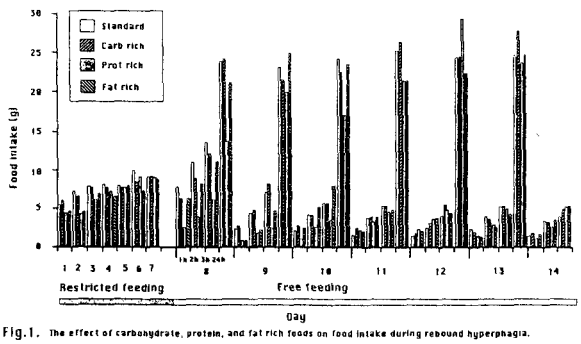


Fig.1. The effect of carbohydrate, protein, and fat rich foods on food intake during rebound hyperphagia.

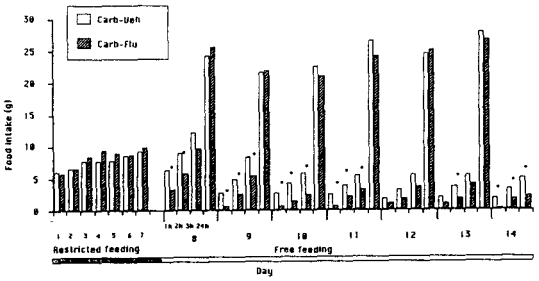


Fig. 2. Effects of fluvoxamin on intake of carbohydrate rich food during rebound hyperphagia.
* p<0.05 compared with vehicle injection group.

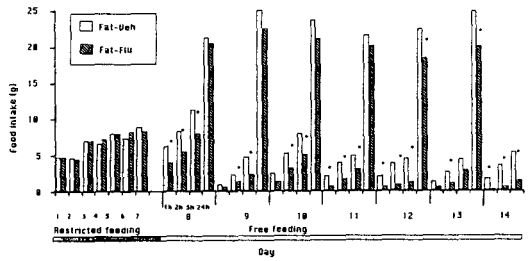


Fig.3. Effects of fluvoxamin on intake of fat rich food during rebound hyperphagia.
* p<0.05 compared with vehicle injection group.

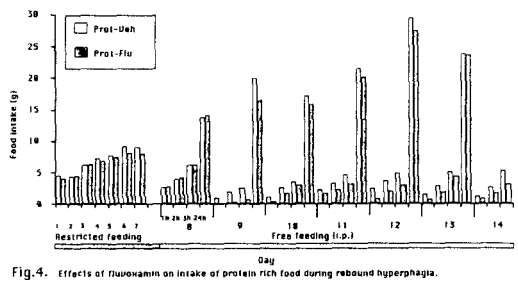


Fig.4. Effects of fluvoxamin on intake of protein rich food during rebound hyperphagia.

<参考文献> 1) 伊藤英樹他 (1993) 神経化学 32, 484-485. 2) 奥野正景他 (1991) 神経化学 30, 440-441. 3) 奥野正景他 (1992) 神経化学 31, 442-443. 4) Paxinos G and Watson C (1986) The Rat Brain, Academic Press.

190 コカイン反復投与による痙攣感受性の経時変化とNMDA受容体および脳内ポリアミンとの関係

霜里　和朗
（川崎医科大学・薬理）

〔要約〕
コカイン反復投与が引き起こす痙攣感受性の経時変化に対するMK-801の効果と、コカイン処理が脳内ポリアミン濃度に及ぼす影響について、ddY系雄マウスを用いて調べた。コカイン50 mg/kgの反復投与により、はじめは痙攣感受性の亢進が認められたが、後に耐性が生じた。MK-801は用量依存的に痙攣の感受性亢進を抑制した。SCH 23390は感受性亢進の獲得をやや遅延させたが、スルピリドは影響を与えなかった。コカイン処理は、3日目と6日目のプトレシンを生理食塩水処理に比べて3～6倍に増加させ、また6日目における線条体と海馬のスペルミジン、および3日目における小脳のスペルミンを増加させた。以上の結果は、コカイン反復投与による痙攣の感受性亢進には、NMDA受容体とそのモデュレーターであるポリアミンが関与する可能性を示唆する。

【緒言】コカインは近年、わが国でも乱用の兆しが認められる依存性薬物であるが、痙攣誘発作用が大きいことが知られている(2)。コカインの中枢作用はシナプスにおけるドーパミン（DA）の再取り込み阻害効果により引き起こされる。一方、痙攣にはN-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体が関与すると言われている(3)。これらの事実に基づき、私たちはコカイン反復投与による痙攣感受性の経時変化に対する、DAおよびNMDA受容体拮抗薬の影響をマウスを用いて調べた。さらにポリアミンの脳室内投与がマウスの痙攣活性に影響を与えることから(1,4)、コカイン処理によって脳内ポリアミンが増加し、それが痙攣誘発活性に影響を与える可能性が考えられる。そこで本研究では、脳内ポリアミン濃度に対するコカイン処理の影響についても検討した。

【方法】本研究にはddY系雄マウスを用いた。対照溶液、またはSCH 23390 (0.1-0.5 mg/kg)、スルピリド(10-50 mg/kg)、あるいはMK-801 (0.1-0.4 mg/kg)でマウスを前処理し、その３０分後にコカイン60 mg/kgを投与した。この前処理とコカイン投与を１日１回、６日間反復し、コカイン投与による痙攣感受性の経時変化に対する前処理の影響を調べた。さらに生理食塩水またはコカイン50 mg/kg反復投与マウスの脳について、３日目と６日目の投与前、および最終投与終了３日後に、皮質、線条体、海馬、間脳、中脳、および小脳に分割し、各部位のプトレシン、スペルミジン、スペルミン、カダベリンを液体クロマトグラフィー(5)により測定して、ポリアミンに対するコカイン処理の影響を調べた。

【結果】コカイン50 mg/kg初回投与は痙攣誘発効果をほとんど示さなかった。その反復投与により、痙攣感受性は、はじめの３、４日間は段階的に亢進したが、５、６日目には耐性に転じた。コカイン反復投与による痙攣の感受性亢進は、MK-801により用量依存的に抑制され(Fig. 1)、SCH 23390により遅延された。しかしスルピリドはそれには影響を与えなかった。コカイン反復処理は、３日目における線条体、海馬、小脳のプトレシンを対照の２４０～３９０%に、また６日目における全ての部位の濃度を３００～６１０%に有意に増加させた(Fig. 2)。スペルミジンは、コカイン反復処理によって、６日目の線条体と海馬において、対照の１２６および１３５%に有意に増加した。スペルミンは、３日目の小脳で有意な増加が認められた以外は、コカイン処理によって影響を受けなかった。

【考察】種々の薬剤による痙攣、扁桃核キンドリング、LTPなどはNMDA受容体の拮抗薬により抑制される(3)。コカイン誘発痙攣もMK-801により抑制されたことから、コカインによって移引き起こされる痙攣には、NMDA受容体が関与することが示唆される。コカインの精神的・身体的興奮作用は中

核DA系が重要な役割を果たしているが、D2受容体阻害はこの現象に影響を与えなかった。しかしながら、SCH23390はコカイン反復投与による痙攣感受性の亢進を遅延させた。これらの結果は、コカイン誘発痙攣にはD2受容体は関与しないが、D1受容体はその感受性亢進に補助的に作用することを示している。NMDA受容体の機能はポリアミンにより調節されることが明らかにされている(6)。さらにポリアミンの脳室内投与がマウスの痙攣活性に影響を与えることが報告されている(1,4)。本研究により、コカイン処理が脳内ポリアミン濃度を増加させることが観察された。これらの事実は、コカイン反復投与による痙攣感受性の経時変化に、少なくともその一部は、ポリアミンが関わっている可能性があることを示唆するものと、思われる。

【謝辞】本研究は渡辺悟博士（川崎医科大学・薬理）との共同研究により行われた。信頼性の高いポリアミン測定を行った渡辺博士に感謝する。

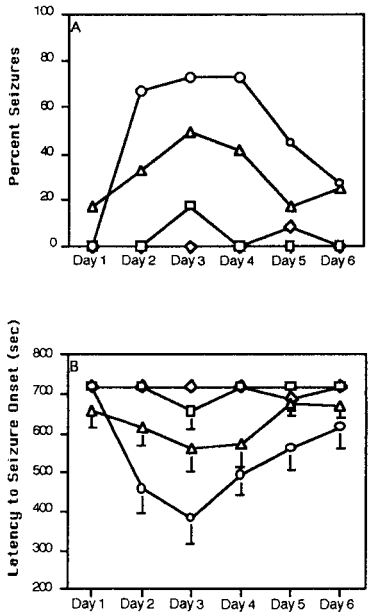


Fig. 1. Effects of MK-801 on cocaine-induced seizures following repeated injection of 60 mg/kg cocaine in ddY mice. Mice were treated with saline (○), or 0.1 (△), 0.2 (□) or 0.4 (◇) mg/kg MK-801.

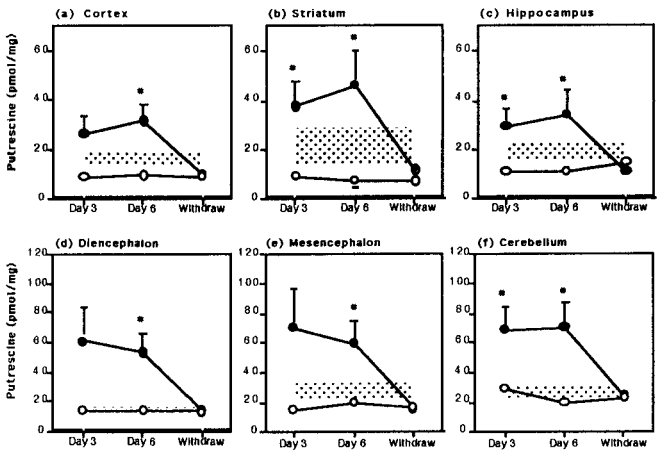


Fig. 2. Effects of cocaine treatment on putrescine in various brain regions of ddY mice. Mice were treated with cocaine (●) or saline(○).

【文献】

3. Anderson, D.J., Crossland, J., and Shaw, G.G. (1975) Neuropharmacology 14, 571-577.
1. Marley, R.J., Witkin, J.M., and Goldberg, S.R. (1991) Brain Res. 542, 1-7.
2. Morimoto, K. (1989) Neurosci. Biobehav. Rev. 13, 253-260.
4. Singh, L., Oles, R., and Woodruff, G. (1990) Eur. J. Pharmacol. 180, 391-392.
5. Watanabe, S., Sato, S., Nagase, S., Tomita, M., Saito, T., and Ishizu, H. (1993) J. Liq. Chromatogr. 16, 619-632.
6. Williams, K., Romano, C., Dichter, M.A., and Molinoff, P.B. (1991) Life Sci. 48, 469-498.

191 ラット脳トランスグルタミナーゼ

大橋 博、竹内 裕
(萬有製薬つくば研・生物工学)

〔要約〕

トランスグルタミナーゼ（TGase）は、ペプチド鎖中グルタミン残基のカルボキシアミド基をアシル供与体とし、一級アミンのアミノ基をアシル受容体として、タンパク質に対するアミンの共有結合的導入や、タンパク質間の架橋形成を触媒する。本酵素は哺乳動物の諸組織や体液中に広く分布し、多様な分子形態をとる。脳においても本酵素の存在が知られており、神経伝達物質の放出、長期増強（記憶）等への関与が示唆されている。そこで、私達は本酵素の中枢神経系での機能を明らかにするために、まずラット脳からのTGaseの精製とその性質を調べた。ラット脳ホモジェネートの遠心上清から、DEAE ion exchange、heparin affinity、casein agarose affnity chromatographyにより、脳TGaseを単一にまで精製した。標品はSDS-PAGE上で75kDaの分子量を示し、Ca^{2+}依存性であった。Putrescineとdimethyl caseinに対するKm値は、0.3mMと0.05mMであった。GTPが、本酵素をATPに比べ約百倍強く阻害した。モノヨード酢酸による阻害から、cysteine残基が活性に関与していると思われた。また、本酵素は既知のTGaseに対する抗体でほとんど認識されなかった。

［実験方法］TGase活性は、dimethyl casein への［1,4-^{14}C］-putrescineの取り込みを測定することでおこなった(1)。蛋白定量は、BSAを指標としてBradford法で行なった(2)。SDS-PAGEは、パジェルNPU-10L(10% acrylamide gel)を用い製造者（アトー株式会社）の説明書に従って行なった。ゲルの銀染色は、第一化学薬品の2D-銀染色試薬IIを用いて行なった。Western blot分析は、蛋白をBio-Rad トランスブロットSDセルを用いたセミドライ方式でHybond C extra 膜(Amersham)へ移し、種々のTGaseに対する抗体で反応させた後、検出をAmershamのECL Western blotting detection systemで行なった。ラット脳からの精製に用いた緩衝液は、40mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTTであり、必要に応じて0.25mM PMSF, 5mM benzamidine, 10ug/ml leupeptin, 50ug/ml pepstatin A, 10ug/ml nafamostat mesilate (Fusan), 12.8ug/ml aprotinin等のprotease inhibitorを添加した。

［成績］ラット脳(40匹、約80g湿重量)からのTGase精製過程をTable 1に示す。脳ホモジェネートの遠心上清（蛋白3.36g)から、DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography (Fig. 1, 約0.3M NaClで活性溶出)、Heparin-5PW HPLC (Fig.2, 約0.25M NaClで活性溶出)、及びcasein agarose column chromatography (Fig. 3)により、SDS-PAGE (Fig. 4)上で75kDaの単一なバンドを示す8.45ugのラット脳TGase（収率2.88%, 精製度11,400倍、比活性11,000nmol/hr/mg)を得た。この精製標品は、組織型であるモルモット肝TGaseに対する抗体(Cub 74, KYLE),ヒト表皮型TGaseに対する抗体、ヒト血漿型TGaseに対する抗体、ヒト血液凝固第13因子に対する抗体では認識されなかった。ラット脳TGaseは、活性発現にCa^{2+} (EC_{50}=0.4mM)を必要とし、Mg^{2+}では阻害をうけないが、Zn^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+}では活性が抑制された。pH8-9.5で最大活性を示し、putrescineとdimethyl caseinに対するKm値は、各々0.3と0.05mMであった。TGase活性は、ATP (IC_{50}=1mM)よりGTP (IC_{50}=10uM)で、より強く阻害をうけた。ラット脳TGaseは、モノヨード酢酸で完全に活性を阻害され、活性発現にcysteine残基が必要と思われた。

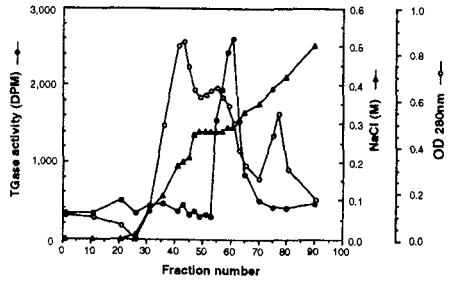


Fig.1. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography of rat brain TGase.

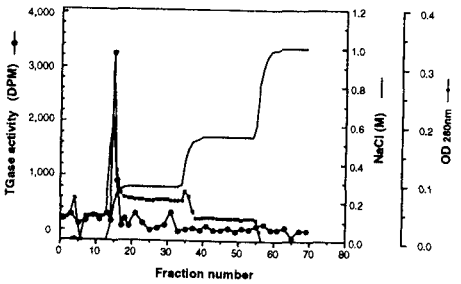


Fig. 2. Heparin-5PW column chromatography of rat brain TGase.

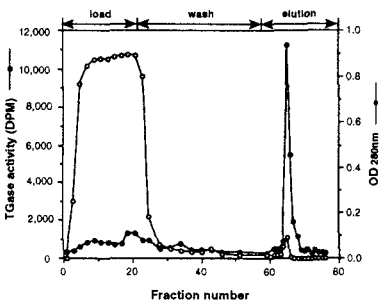


Fig. 3. Casein agarose column chromatography of rat brain TGase.

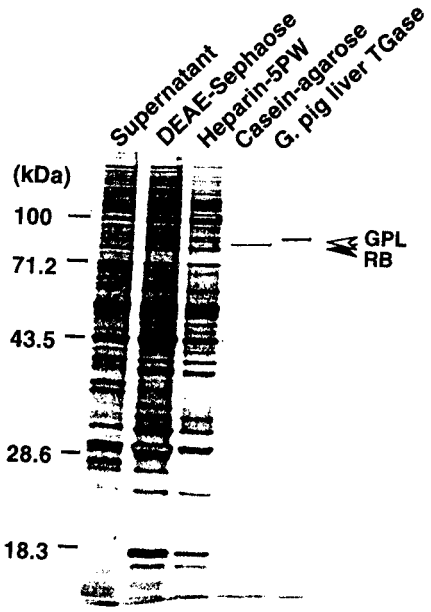


Fig.4. SDS-PAGE analysis of fractions obtained during purification of rat brain TGase. GPL and RB indicate guinea pig liver TGase and rat brain TGase, respectively.

Table 1. Summary of purification of rat brain TGase.

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (nmol/hr)	Specific activity (nmol/hr/mg)	Purification (n-fold)	Yield (%)
Supernatant	666.7	3,360	3,240	0.964	1	100
DEAE-Sepharose	27.3	301.6	860	2.85	2.96	26.5
Heparin-5PW	5.85	60.3	381	6.32	6.56	11.8
Casein-agarose	4.9	0.00845	93.2	11,000	11,400	2.88

［考察］ラット脳TGaseは、比活性、Ca^{2+}依存性、GTPによる阻害、基質に対する親和性等で、組織型TGaseに似ているが、SDS-PAGE上でモルモット肝TGaseと分子量が異なり、既知のTGaseに対する抗体で認識されなかった事から、ラット脳TGaseは、新しいタイプのTGaseの可能性があり、本酵素の中枢神経系での機能を明らかにするためにさらなる研究が望まれる。

［文献］

(1). Lorand, L., Campbell-Wilkes, L.K., and Cooperstein, L. (1972) Anal. Biochem. 50, 623-631.

(2). Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.

192 脳内のピリドキサルリン酸の変動に伴うピリドキサルキナーゼ(PLK)活性の変化について

朝倉正、平河多恵、大川清、日比望*
(慈恵医大・医化学、*SRL.研)

〔要約〕
脳内のピリドキサルリン酸(PLP)の変動に伴うピリドキサルキナーゼ(PLK)活性の変化について調べた。PLPの合成阻害剤であるデオキシピリドキシンを腹腔内投与すると、脳内PLP量は63%に減少したが、PLK活性には有意な変化はなかった。一方、カテコールアミンの遊離促進、貯蔵阻害が知られているレセルピンの投与では、PLPは95-103%とその変動は少なく、PLK活性にも有意な変化は全くなかった。また、これらの薬物投与によるPLKのタンパク質レベルでの量的変化を我々の作製した抗PLK抗体を用いて測定すると、やはりどの条件下においても変化はなかった。このことから、脳内PLP量の調節はPLKの発現とは無関係であり、単にPLKに対するproduct inhibitionによることが示唆された。

PLPはアミノ酸脱炭酸酵素の補酵素の1つであり、脳内では特にドーパミン、セロトニン、γ-アミノ酪酸などの神経伝達物質の産生に関与している。そのため、補酵素PLPの脳内含有量は一定に調節されている。一方、脳内PLP量を減少させると、PLK活性は上昇（発現）するという報告(1)や、PLPを補酵素とする酵素の反応産物であるドーパミンやセロトニン等の減少により、脳内PLK活性が上昇するという報告がある(2)。我々は、PLKをウシ脳より精製し抗体を作製した(3)ので、このPLKの変化を酵素活性のみならずタンパク質量の変化として解析することを試みた。

[実験方法]
ハムスター（10w,♀,140g）に5-50mg/kgレセルピン、あるいは100mg/kgデオキシピリドキシンを腹腔内投与し、6,24時間後に断頭により脳を摘出、10mM KPBでホモゲナイズし、100,000g上清を得る。この上清中のPLK活性（ヒドラジンによる発色)、内在性PLP量（HPLCによる蛍光検出)、内在性ドーパミン、セロトニン量（HPLCによる電気化学検出）をそれぞれ測定した。また、PLKタンパク質量の変動は抗PLK抗体を用いた各群上清のSDS-PAGE、ウェスタンブロットによるシグナルから求めた。

[結果]
1.レセルピンおよびデオキシピリドキシンの効果
レセルピン投与による脳内PLK活性、PLP量には有意な変化は認められなかった（図1)。しかし、ドーパミン、セロトニン量は5-12%と有意に減少しており、レセルピンの効果は十分に現われていた。
デオキシピリドキシンの投与によっては、脳内PLP量は24時間で63%に減少していたが、PLK活性には有意な変動は認められなかった（図1）。
調製した酵素液には投与したレセルピンやデオキシピリドキシンが共存している可能性があり、PLK活性測定に影響を及ぼすことも考えられる。そこで、

これらの薬物の活性測定への効果について調べた。レセルピンはPLK活性測定に対して0.05mMまでの範囲で何ら影響は認められなかったが、デオキシピリドキシンは0.1、1.0mMでそれぞれ50、92%阻害した。

2.免疫反応性タンパク質としてのPLK

上記のPLK活性の測定では、各投与薬物による阻害（特にデオキシピリドキシン）が考えられ、PLKの活性値とタンパク質量が一致しない可能性も考えられるので、抗PLK抗体によるPLKタンパク質量をウェスタンブロットのシグナルより求めた。図2で示すように、レセルピン、デオキシピリドキシン投与に対していずれもPLKの量的変化は認められなかった。

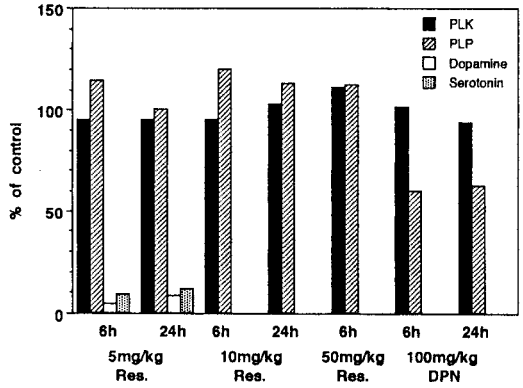


図1. 5-50mg/kg レセルピン(Res)および100mg／kg デオキシピリドキシン(DPN)投与後（6,24時間）のハムスター脳内PLK, PLP, ドーパミン, セロトニンの変化.

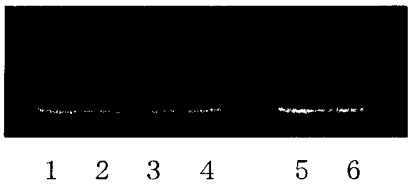


図2. ウェスタンブロットによるPLK量の変動. 1,5, コントロール； 2, 5mg/kg Res.； 3, 10mg/kg Res.； 4, 50mg/kg Res.； 6, 100mg/kg DPN.

[考察]

Ebadiら(1,2)は、レセルピン投与により脳内カテコールアミンが減少すると、それを補償するために補酵素PLPを増加させるためにPLK活性が上昇すると報告しており、さらに、脳内PLP量を減少させた場合もやはりPLP量を回復するためにPLKが誘導されてくると報告している。しかし、我々の結果では、デオキシピリドキシンでハムスター脳内のPLP量を減少させても、PLKは活性の上昇もタンパク質の発現増加もなかった。彼らはPLKの変化を活性の測定のみでみているが、タンパク質の変動としては捉えていない。我々は、抗PLK抗体を作製することによりPLKの変動を酵素活性のみならずタンパク質の量的変動として捉えた。レセルピン投与においても同様にドーパミン、セロトニンの減少は明確に認められるものの、PLK活性、タンパク質量共に変化はなかった。また、この結果を確認するためマウスにレセルピンおよびデオキシピリドキシンを投与しても、ハムスターの結果と全く同様にPLK活性には変化が認められなかった。さらに、抗ビタミンB6剤であるセミカルバジドをマウスに投与して脳内PLP量を減少させても、PLK活性には何ら影響はなかった。

以上のことから、脳内PLP量の調節にはPLKの誘導とは無関係に、PLP自身によるproduct inhibitionによりその量が調節されているように思われる。

[文献]

1. Ebadi,M.S. et al. (1968) J. Neurochem., 15:659-665.
2. Ebadi,M.S. et al. (1970) J. Neurochem., 17:941-948.
3. Ohkawa,K. et al. (1994) Neurochem. Res., in press.

193　ヒト血漿中および尿中のモノアミンおよびその代謝物質の多項目同時測定

藤田　興、坂本　秀生、川井　薫*、石田　松雄**、伊藤　哲彦**、葛谷博磁
（藤田保健衛生大学　総医研、*短期大学　生化、**桶狭間病院　精神科、***医学部　精神科）

〔要約〕

血漿中及び尿中モノアミン性神経神経伝達物質およびその代謝物質を、血漿では朝5時と午後13時の2回、尿では24時間尿について多項目にわたり同時分析した。同時に前駆アミノ酸のtyrosine(Tyr)とtryptophane(Trp)、および日内変動が知られている血液ドーパミンβ-水酸化酵素（DBH）活性も測定した。一般的には13時の方に高値を示す物質が多かった（特にEN、NE、DBH）が、HVA、VMA、5HIAAでは13時の方が低値を示す傾向にあった。MHPGでは13時の方が高値を示した。5HTでは変動の傾向は認められなかった。尿中への排泄については、HVA、VMA、5HIAA、Tyr、Trpでは、いずれも同じような割合で排泄され個体差も小さかったが、NE、EN、5HTでは個体差が大きかった。

［目的］　カテコールアミン、セロトニンなどのモノアミンおよびそれらの代謝物質の測定は、基礎的にも臨床的にも重要な位置にある。本研究は、近年開発されたモノアミンおよびその代謝物質の多項目同時分析機器(HPLC/multi-eledtrode detdetection system ;Neurochem,米国ESA)を使用し、ヒトの同一個体の血漿中及び尿中の13種の物質を同時測定し、神経機能解析のためのより豊富な情報を得る事を目的とした。また、カテコールアミンの分泌と共に放出され、神経機能との関連が考えらる血液ドーパミンβ-水酸化酵素（DBH）活性は、日内変動し、朝5時に最低値を、午後13時に最高値を示(1)ので、血漿についてはDBH活性も測定した。

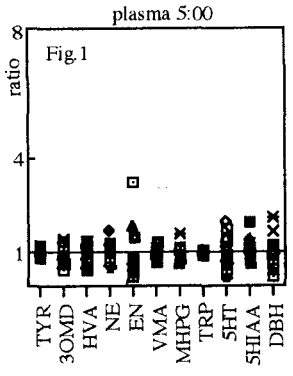
［方法］　血液DBH活性が最低値を示す朝5時と最高値を示す（1）午後13時の2回採血し、尿は24時間尿を過塩素酸存在下に蓄尿した。対象者は、健常志願者の男性21～36才までの10名および女性21～22才までの5名で、全員が同じ条件で食事および睡眠をとった。採血はEDTA-2Na入り真空採血管で採血し、30分以内に遠心分離（4℃,1,500×g,10分）し、得られた血漿および尿は測定時まで-80℃で保存した。　1．モノアミンおよびその代謝物質の測定　血漿1mlに対し70%過塩素酸を43μl加え、混和後遠心分離（4℃,10,000g,10分）して除タンパクを行い、尿は0.1N過塩素酸で1/10に希釈した後、それぞれの検体をニューロケムで測定した。　2．カテコールアミンの測定　血漿600μlに6%過塩素酸300μlを添加後2分間混和、1.5M酢酸ナトリウムを120μl加え30秒間混和、遠心分離（4℃,10,000g,10分）除タンパクをした。尿は1/200に希釈した。それぞれの検体を全自動カテコールアミン分析装置HLC-725CA（東ソー）で測定した。　3．DBH活性の測定　血漿50ulを用いて測定した(1)。基質にチラミンを用い、生成したオクトパミンをHPLCで分離して、自然蛍光（励起波長270nm、蛍光波長300nm）を測定した（1）。　4．クレアチニンの測定　クレアチニナーゼ・TOOS法により測定した。

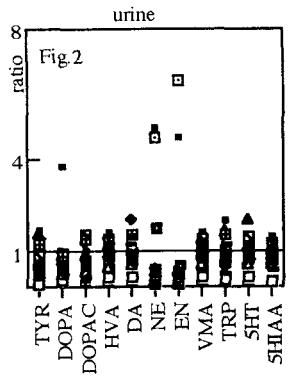
［成績および考察］　1．血漿ではTyr、3OMD（3-O-methyl-DOPA）、HVA（homovanillic acid）、NE（norepinephrine）、EN（epinephrine）、VMA（vanillylmandelic acid）、MHPG(3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol、Trp、5HT（serotonin）、5HIAA（5-hydroxyindolcacetic acid）が、尿ではTyr、DOPA(3,4-dihydroxy-phenylalanine)、DOPAC(3,4-dihydroxyphenylacetic acid)、HVA、DA(dopamine)、NE、EN、VMA、Trp、5HT、5HIAAが測定可能であった。血漿中の5HTは大部分血小板由来と考

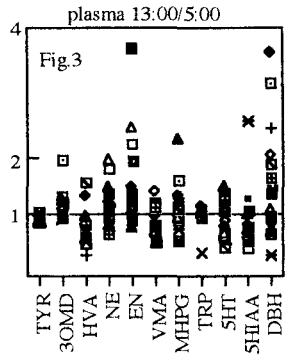
Table 1

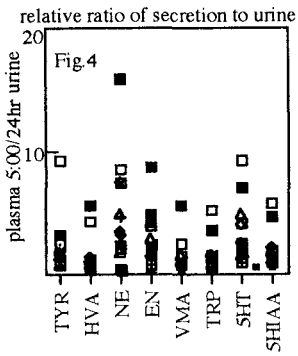
	plasma 5:00 ng/ml MEAN	S.D.	plasma 13:00 ng/ml MEAN	S.D.	13:00/5:00 ratio MEAN	S.D.	uirne mg/g creatinin MEAN	S.D.
TYR	6474.7	661.0	6122.5	515.3	0.95	0.05	10.61	5.95
DOPA							0.05	0.05
3OMD	21.24	6.27	22.69	4.83	1.07	0.26		
DOPAC							0.44	0.24
HVA	11.92	3.44	8.85	3.72	0.74	0.30	3.94	1.71
DA	0.014	0.006	0.009	0.003			0.240	0.114
NE	0.162	0.049	0.179	0.065	1.11	0.36	0.551	0.868
EN	0.02	0.02	0.02	0.02	1.24	0.78	0.11	0.21
VMA	7.69	1.34	6.25	1.57	0.81	0.23	2.74	1.15
MHPG	5.34	1.20	5.79	1.52	1.08	0.39		
TRP	4634.4	322.1	4432.3	800.3	0.96	0.18	10.36	5.35
5HT	105.78	59.24	90.77	51.17	0.86	0.33	0.29	0.13
5HIAA	5.00	1.47	4.30	2.44	0.86	0.50	4.29	1.91
DBH	24.12	11.17	29.62	13.85	1.23	0.94		

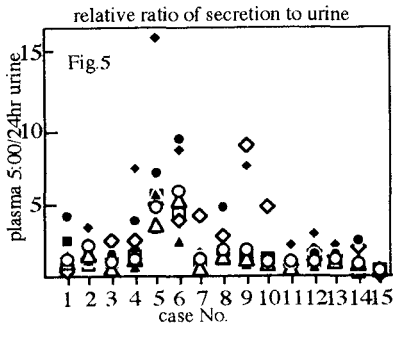
DBH=nmoles/min/ml, n=15











えられる。

2．平均値と標準偏差値、および日内変動比（13時／5時）の平均値と標準偏差値を表1に示す。また個体差については図1（血漿朝5時の値を平均値と比較）および図2（尿の値を平均値と比較）に示す。血漿で個体差が小さいのはTyrとTrpで、大きいのはEN、5HT、DBHであった。個体差は13時の血漿の方が大きかった（データは示されていない）。尿では一般的に血漿より個人差が大きく、特にNEとENでバラツキが大であった。しかし5HTとDOPAでは、DOPAでの例外的と思われる1例を除けば個人差は小さかった。

3．血漿についての日内変動について、5時の値に対する13時の比を図3に示す。変動が小さいものはTyrとTrpで、3OMDも1例を除けば小さかった。変動が大きいものはEN、NE、DBHで、変動が小さいものは個体差も小さく、変動が大きいものは個体差も大であった。一般的には13時の方に高値を示す物質が多かったが、HVA、VMA、5HIAAでは13時の方に低値を示す個体が多かった。MHPGでは13時の方が高値を示した。

4．尿中への排泄割合（尿中mg/g creatinin値に対する血漿5時のng/ml値の比を便宜的に計算。値が高い程排泄割合が小さい）を図4に示す。HVA、VMA、5HIAA、TYR、TRPについては、同一個体2例を除けば個体差が小さく、また夫々同じような値を示した。NE、EN、5HTでは個体差が大きかった。各種物質の個体別尿中排泄割合をみてみると図5に示すように、排泄割合の小さい個体は、どの物質についても排泄割合が小さい傾向にある（個体5、6）。

［文献］ (1) Kawai,K., Maruta,K., Nagatsu,T., Teradaira,R., Matdui,R., Ito,T., Ohtani,M., Shinohara,Y., and Fujita,K.(1992) Biogenic Amines 9,83-98

194 [1-^{13}C]D-glucose を用いた *in vitro* ^{13}C-MRSによる脳内アミノ酸代謝コンパートメントの研究

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]

脳内アミノ酸、特にグルタミン酸 (Glu)、グルタミン (Gln) の代謝がコンパートメント化されていることは古くから主張されてきた[1]。今回、我々は ^{13}C を用いた実験から代謝コンパートメントの実体と機能的意義を明らかにするため、[1-^{13}C]D-glucose からの ^{13}C のアミノ酸への組込み量を調べることにより検討した。ラットの尾静脈より ^{13}C-glucose を投与した後、7.5、15、30、60、120分後に脳組織よりアミノ酸分画を抽出し、NMR で分析した。^{13}C-glucose 投与後、7.5 分では Glu の 4 位 (C-4) の炭素への ^{13}C 組込み量は最も高く、C-4 に対する 2 位 (C-2) 及び 3 位 (C-3) の組込み量の割合はそれぞれ、 17%, 18%であり、Gln のその割合は 40%, 24%であった。これは、Gln の C-2 への組込は C-3 位への組込の 1.7 倍であることを示しており、この現象は Glu では認められなかった。Gln の C-2 / C-3は、^{13}C-glucose 投与後、15 分後で最も高く (1.8 倍) その後減少してゆき、120 分後には 1.2 倍となった。これらの結果は、脳内で glucose から Glu 及び Gln が生成される経路には代謝速度の異なる、少なくとも二つの代謝プールが存在することを示しており、ピルビン酸カルボキシラーゼ (anaplerotic pathway) とグルタミン合成酵素の局在がグリアであることを考え合わせると、代謝コンパートメントはニューロンとアストログリアであることが強く示唆された。

[はじめに]

我々はすでに本学会において、ラットで腹腔に投与された ^{13}C-glucose からの ^{13}C が遊離アミノ酸へ組込まれるパターンが、脳では他の組織と比べ特異的で[2]、脳のパターンは発育過程に伴って著しく変化することを報告し[3]、また、神経組織由来の実験腫瘍 (グリオーマ) でも異なることを見いだしている[4]。今回、我々は ^{13}C-glucose を用い、脳特異的にみられるアミノ酸の代謝パターンが形成される背景について検討を行い、Glu, Gln の代謝コンパートメントの実体を明らかにしたので報告する。

[方法]

Wistar 系の生後 6 週令の雄ラットの尾静脈から体重 1kg 当たり 1g の [1-^{13}C]D-glucose を投与した後、7.5、15 、30、60、120 分後にそれぞれ頭部にマイクロウエーブ (東芝製、TMW-6402型) を、4.8 KW, 1.2 秒照射し瞬時に脳を固定した後、脳組織よりアミノ酸分画を抽出した。アミノ酸分画を乾固した後、D_2O で作成したリン酸 buffer (pH 7.4) で溶解し、sodium trimethylsilyl propionate (TSP) を外部標準とし、JEOL EX-400 で分析 (pulse width 45° , spectral width 30, 120Hz, acquisition time 1.088sec, 64,000 time-domain points, 8-s pulse interval, 3,000 scans) し, TSP のピーク高に対する各アミノ酸各位のピーク高 (サテライトピークを含む) を求め、それをもとに脳組織 300mg または蛋白量 30mg当たりの相対ピークを求めた。

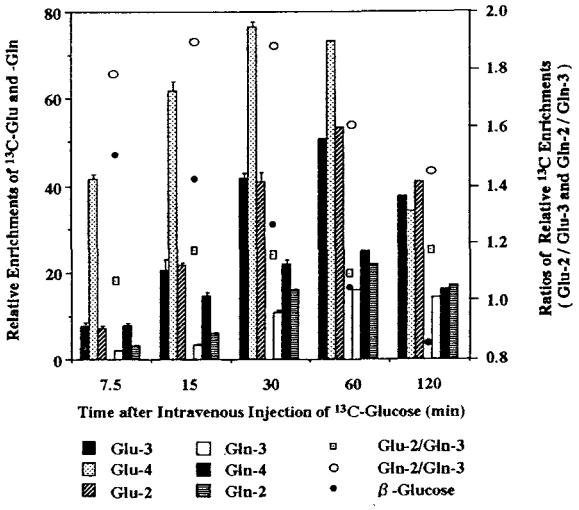
[結果および考察]

[1-^{13}C]D-glucose (g/kg) を静注すると脳内 ^{13}C-glucose は経時的に急速に減少する (Fig. 1)。一方、Glu の C-4 への ^{13}C の組込は速やかに増加し 30 分後に最高値を示し、その後減少した。Glu の C-2, C-3 への組込はほぼ同率で進行するが C-4 に比べると遅れて増加し始め、60 分後まで増加し、その後減少し、120 分後には C-4 より高値を示した。これは、α-ケトグルタル酸 (α-Kg) からアミ

ノ基転移酵素による Glu 生成系の代謝速度が速いという脳ミトコンドリアの特性によるものと思われる。Gln の場合も C-4 に最も高い ^{13}C の組込がみられ 60 分後に最高値を示した。Gln の C-2, C-3 にも組込まれるが、C-4 に対する比率は ^{13}C-glucose 投与後 7.5 分では Glu のものより高く、また、C-2 への組込は常に C-3 より高値を示し ^{13}C-glucose 投与後 15 分で最高値（1.8）となり、その後減少した。Gln が Glu から同一の代謝プール内で生成されるとするとこの現象は説明されず、特定の代謝コンパートメントを考えなければならない。すなわち、ピルビン酸（^{13}C-3）→ アセチル CoA → α-Kg（^{13}C-4）→ Glu（^{13}C-4）を経由する代謝プールの大きいコンパートメントがニューロンにあり、一方、ピルビン酸カルボキシラーゼ（anaplerotic pathway：ピルビン酸に CO_2 を固定する経路）と Gln 合成酵素がアストログリヤに局在すること[5,6]を考え合わせると、ピルビン酸（^{13}C-3）→ オキザロ酢酸（^{13}C-3）→ α-Kg（^{13}C-2）→ Glu（^{13}C-2）→ Gln（^{13}C-2）の経路を含む代謝速度の速い、プールの小さいコンパートメントがアストログリアに存在することを強く示唆している。

また、GABA への組込みは C-2 に最も高いが（Table 1）、C-4/C-3（anaplerotic pathway による ^{13}C 組込みは C-4）は遅れて、60 分後に 1.45 を、120 分後には 1.2 を示しており、Glu 脱炭酸酵素（GAD）がシナプス部に局在する事[7]を考え合わせると、アストログリアで生成された Gln はシナプス部に取り込まれ、脱アミド化された後、GAD で GABA が生成される経路が考えられる。これらのことから、シナプス部にもコンパートメントが存在する事が示唆された。

Time Course of ^{13}C Label Incorporation into Glutamate and Glutamine in Rat Brain from [1-^{13}C]Glucose



Time Course of 13C Label Incorporation into GABA from [1-13C]Glucose.

Time (min)	7.5*	15*	30*	60**	120**
GABA-3	0.80 ± 0.06	1.54 ± 0.13	3.59 ± 0.51	4.00	4.50
GABA-2	3.69 ± 0.19	6.38 ± 0.30	9.54 ± 1.24	9.10	5.43
GABA-4	0.83 ± 0.08	1.68 ± 0.18	3.72 ± 0.48	5.81	5.41
GAGA-4/-3	1.05	1.09	1.03	1.45	1.20

The values were indicated in relative enrichments.
The values indicated * means ± SD of three rats and ** means of two rats.

[文献] 1) S. Berl et al. (1961) J. Neurochem. 7, 186-197. 2) 金松知幸、高原ひろみ、平野修助、塚田裕三 (1992) 神経化学：31、576-577。3) 金松知幸、塚田裕三、平野修助 (1991) 神経化学：30、74-75。4) T. Kanamatsu & Y. Tsukada (1994) Neurochem. Res.: 19, 603-612. 5) R. P. Shank et al. (1985) Brain Res.: 329, 364-367. 6) M. D. Norenberg & A. Martinez-Hemandez (1979) Brain Res.: 161, 303-310. 7) L. P. Miller & D. L. Martin (1973) Life Sci 13, 1023-1032.

195 高等動物の脳におけるリゾ型イノシトールリン脂質を介した新規のＰＩ代謝について

小林　哲幸、奥山　治美
（名古屋市立大学・薬学部）

〔要約〕　ラット脳の膜画分に存在するリゾ型イノシトールリン脂質に特異的なホスホリパーゼC（lysoPI-PLC）について解析した。本酵素は、従来報告のあるイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC（PI-PLC）とは分離して可溶化された。この可溶化酵素を用いてPI-PLCとの相違を調べた結果、PI-PLC阻害ペプチド感受性や免疫交叉性が異なっており、lysoPI-PLCは新規のPLCであることが示された。また、２アシル型リゾホスファチジルイノシトールは、１アシル型と同程度にlysoPI-PLCの良い基質となった。我々は既に、ラット脳の可溶性画分にPIを選択的に加水分解するCa^{2+}非依存的なホスホリパーゼA_1（PI-PLA$_1$）が存在することを見い出しており、以上の結果から、Ca^{2+}非依存的にPIからリゾ型PIが生成し、さらにモノアシルグリセロールとイノシトールリン酸へと変換される代謝経路の脳における存在が示唆された。

【はじめに】　各種ホルモンや神経伝達物質による細胞の機能発現においてイノシトールリン脂質（PI）代謝の重要性が明らかにされている。その中心的な役割を演じているとされるCa^{2+}依存的なPI特異的ホスホリパーゼC（PI-PLC）について研究が進み各種アイソザイムが同定されている（1）。しかし、アラキドン酸の放出機構をはじめ脳内PIの代謝制御に関して不明の点も多く、他の酵素の関与が予想される。

lysoPI-PLCは、リゾ型PIを特異的に加水分解してモノアシルグリセロール（MG）とイノシトールリン酸を生成する酵素である。我々は、ラット脳のシナプス形質膜にlysoPI-PLC活性が存在することを見い出した（2）。今回、従来報告のあるPI-PLCとの異同を明らかにするためにラット脳膜画分からの可溶化標品を行い、PLC阻害ペプチド感受性や免疫交叉性を比較検討した。さらに、我々は既にラットやウシ脳の可溶性画分にPIを選択的に加水分解するCa^{2+}非依存的なホスホリパーゼA$_1$（PI-PLA$_1$）が存在することを報告している（3,4）。lysoPI-PLCとPI-PLA$_1$の代謝上の関係についても考察した。

【方法】

ラット脳の分画：ラット脳を緩衝液(20mM Tris-HCl pH7.4 －1mM EDTA －100μM PMSF －1μg/ml leupeptin)中でホモジナイズ後、1,000ｇ、５分の上清を10万ｇ１時間の遠心分離にかけ可溶性画分（Ｓ２）および膜画分（Ｐ２）を得た。Ｐ２を１M塩化ナトリウムを含む緩衝液でホモジナイズし、膜表在性タンパク質の可溶化を行い、10万ｇ、１時間遠心上清をＳ３として得た。この沈殿（Ｐ３）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た後、10万ｇで１時間遠心分離し上清をＳ４として得た。沈殿は１％コール酸、あるいは１M塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄後、0.5％デオキシコール酸ナトリウムと0.25M塩化ナトリウムを含む緩衝液でホモジナイズしてさらに可溶化を行い、10万ｇ、１時間の遠心分離により上清（Ｓ５）を得た。

ＰＬＣ活性の測定：　[2-^{3}H]グリセロール標識の１アシル型リゾホスファチジルイノシトール（lysoPtdIns）またはPtdInsを基質として、酵素反応により生成する[^{3}H]標識のMGまたはジアシルグリセロール（DG）をDoleの試薬を用いて溶媒分画し、液体シンチレーションカウンターで測定してPLC活性を求めた。lysoPI-PLC活性は100μM lysoPtdIns －80mM Tris-HCl pH8.2 －0.3mM $CaCl_2$－0.1mM EDTA 、PI-PLC活性は主に300μM PtdIns －50mM Hepes pH7.0－3mM $CaCl_2$－1mM EDTA－1mg/mlデオキシコール酸Naを標準アッセイ系として用いた。

【結果と考察】

ラット脳の膜画分に存在するlysoPI-PLCおよびPI-PLCを可溶化によって分画した。既に報告のあるように、PI-PLCは１M塩化ナトリウムおよび１％コール酸ナトリウムによって可溶化され、ほとんどの活性がＳ３とＳ４に回収された。一方、その際lysoPI-PLC活性の大部分は膜に残り、0.5％デオキシコール酸ナトリウム－0.25M塩化ナトリウムによりこの活性の大部分はＳ５に可溶化された（Fig.1）。

γ型のPI-PLCにはPI-PLCのアイソザイムβ、γ、δのいずれの活性をも阻害するPLC活性阻害領域（PCI領

域）が存在し（5）、それらに共通なX、Y領域で形成される活性中心に直接作用すると考えられている。今回、PCI領域中の8残基のアミノ酸からなる阻害活性を有するペプチド（YRKMRLRY）（5）を合成し、lysoPI-PLCとPI-PLCが区別されるかを検討した。まず、ラット脳の膜（P 2）および可溶性画分（S 2）のPLC活性に対するPCIペプチドの効果を調べた結果、PI-PLC活性はP 2、S 2ともにペプチドによって阻害された（Fig.2）。lysoPI-PLC活性は、S 2ではPI-PLC活性と同様の阻害を受けたが、P 2画分ではほとんど阻害されなかった。S 2のlysoPI-PLC活性は、この画分に多量に存在するPI-PLCのlysoPI分解活性であり、これがペプチドによって阻害されたと考えられた。S 3、S 4、S 5に対しては、可溶化したPLC活性についてもPI-PLCは阻害を受けることが確認され、一方、lysoPI-PLCはほとんど阻害されなかった（Fig. 3）。

抗ラットPI-PLCδ1ウサギ血清を抗X、Y領域の抗体として利用してImmunoblottingを行った。その結果、PI-PLC活性の強いP 2、S 3、S 4にはPI-PLCδ、β、（あるいはγ）が検出された。しかし、lysoPI-PLCの濃縮されたS 5には、強いバンドは検出されなかった。

以上の結果からlysoPI-PLCはPI-PLCの全てのアイソザイムに存在するX、Y領域と高い相同性をもたない新規のPLCであり、既知のPI-PLC（β、γ、δ）とは異なる酵素であると考えられた。

ところで、我々は既に、ラットやウシ脳にPIを選択的に分解するCa^{2+}非依存的なPI-PLA1が存在することを見い出している（3,4）。本活性の結果生成する2アシル型lysoPtdInsも1アシル型と同程度にlysoPI-PLCで分解されることが示され、代謝上リンクしている可能性が考えられる。このリゾ型PIを介する代謝系の神経機能における役割については今後の検討課題であるが、従来のPI-PLCとは別のPI特異的代謝経路として興味深い。

謝辞：貴重な抗体をご供与下さり、有益なご助言をいただきました本間好博士（東京都老人総合研）に感謝致します。

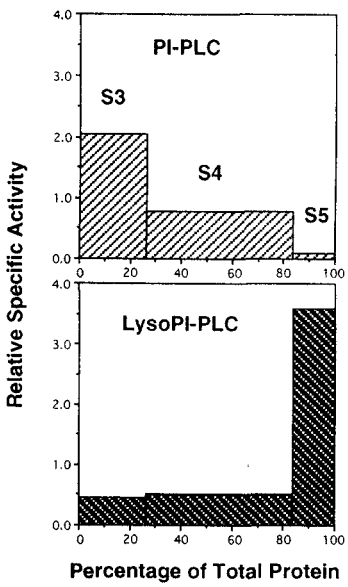


Fig. 1 Solibilization of PI-PLC and lysoPI-PLC from rat brain membranes.

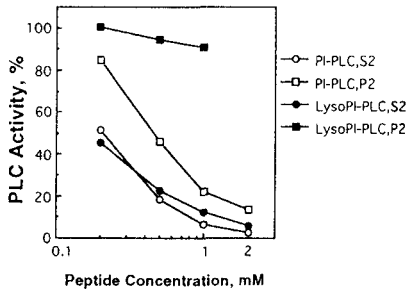


Fig. 2 Effect of PCI-peptide on the phospholipase C activities of rat brain membrane and soluble fractions.

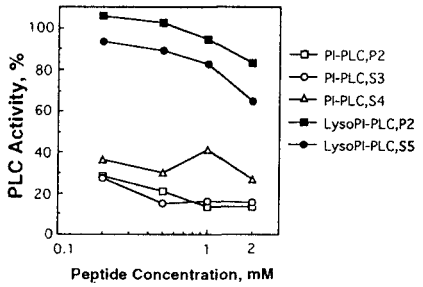


Fig. 3 Effect of PCI-peptide on the phospholipase C activities of rat brain membrane and solubilized fractions.

【参考文献】

1. Rhee,R.S., Suh,P.-G., Ryu,S.H., and Lee, S.Y. (1989) Science 244, 546-550.
2. Tsutsumi,T., Kobayashi,T., Ueda,H., Yamauchi,E., Watanabe,S. and Okuyama,H. (1994) Neurochem.Res. 19, 399-406.
3. Ueda,H., Kobayashi,T., Kishimoto,M., Tsutsumi,T. and Okuyama,H. (1993) J.Neurochem. 61, 1874-1881.
4. Ueda,H., Kobayashi,T., Kishimoto,M., Tsutsumi,T., watanabe,S. and Okuyama,H. (1993) Biochem.Biophys.Res.Commun. 195, 1272-1279.
5. Homma,Y. and Takenawa,T. (1992) J.Biol.Chem. 267, 21844-21849.

196 ラットにおけるiminodipropionitrile誘発ジスキネジアに対する免疫抑制剤cyclosporin Aの影響

岩田恵美、浅沼幹人、西林佐紀子、近藤洋一、小川紀雄、森 昭胤
（岡山大医・分子細胞研・神経情報学部門）

〔要約〕 免疫抑制剤cyclosporin A (CsA)を用いて，ラットIDPN誘発ジスキネジアへの免疫反応の関与について検討した．CsAとIDPNの同時投与により頚部ジスキネジアは著しく増悪した．IDPNとCsAを連日投与した群では線条体，側坐核，前頭皮質においてDA含量はIDPN単独投与群に比して有意に増加していた．また，electrophoretic mobility shift assayの結果，cAMP response element (CRE) 結合活性は，IDPN+CsA投与によりIDPN単独投与群に比してさらに増加した．これらの結果より，CsAはCRE結合の活性化を介してジスキネジアを増悪させること，ならびに免疫反応がジスキネジア発症に関与している可能性が示唆された．

【目的】 Iminodipropionitrile (IDPN)投与によって惹起されるラットのジスキネジアは，ひとたび発症すれば永続し，ストレスで増悪し，睡眠中にはみられないなど，ヒトの特発性ジスキネジアに極めて類似したすぐれた動物モデルである(1)．すなわち，正常のラットでは見られない，水平・垂直方向の頚部ジスキネジア，回旋運動，易興奮性などの永続的な運動行動異常が見られる．また，IDPN誘発ジスキネジアモデル動物は多面的な神経伝達物質系の機能異常を伴うことが報告されている(2)．

近年，中枢神経系において免疫ネットワークの存在が示唆されており，我々も，一過性脳虚血やけいれん発作における脳機能障害過程に，免疫抑制剤 cyclosporin A (CsA)が影響を及ぼすことを明らかにした (3,4)．

今回，我々はIDPN誘発ジスキネジアへの免疫反応の関与の有無を明らかにするために，ラット IDPN誘発ジスキネジアモデルを用いて， CsA併用投与の影響を異常運動行動，カテコールアミン含量の変化，転写制御因子の DNA結合活性に注目して検討した．

【実験方法】 7週齢雄性SD系ラット(体重230-250g)にIDPN (100 mg/kg)を1日1回，7日間腹腔内投与した．CsA (5 mg/kg)は毎回 IDPN投与の1時間前に腹腔内投与した．IDPN, CsAの対照として生食，溶媒をそれぞれ同様に投与した．最終投与より3週間後に，カテコールアミンおよびその代謝産物測定ならびにelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)による転写制御因子の DNA結合活性の解析を行った．脳内NA, DA, DOPAC, HVA濃度はマイクロウェーブ照射後部位分けした脳組織より，既報に従い高速液体クロマトグラフィー法で測定した(2)．EMSAでは断頭屠殺後取り出した脳各部位より核抽出液を調整した．2本鎖DNAプローブ; CRE (5'-GATTCGTGACGTCAGCACAGG-3')およびTRE (5'-GATTCGTGACTCAGCACAGG-3')の3'-末端を，大腸菌ポリメラーゼIを用い[α-^{32}P]dCTPで標識した．核抽出液と放射性プローブを反応させた後，ポリアクリルアミドゲル電気泳動により特異的DNA-蛋白質複合体を分離し，ゲルを固定，乾燥してオートラジオグラフィーを行った．得られたバンドはイメージスキャナー (Epson GT-6500)で読みとり，optical densityをImage 1.44で定量した．

【結果および考察】 CsAのIDPNとの同時投与によりIDPN誘発頚部ジスキネジア (head twitching)の発現時期が早まり，しかもその頻度および重症度は著しく増悪した (表 1)．

IDPNとCsAを連日投与した群では線条体，側坐核，前頭皮質においてDA含量はIDPN単独投与群に比して有意に増加していた．また，DOPACはIDPN単独投与群に比して線条体において有意に増加した．EMSAによる解析の結果，CRE 結合活性は，IDPN単

表 1　CsA+IDPN投与の IDPN誘発 head twitchingへの影響

	head twitching (No./min)
vehicle + IDPN	45.67 ± 1.96
CsA　+ IDPN	90.33 ± 8.52

IDPN最終投与21日後，mean ± S.E.M (n=6)

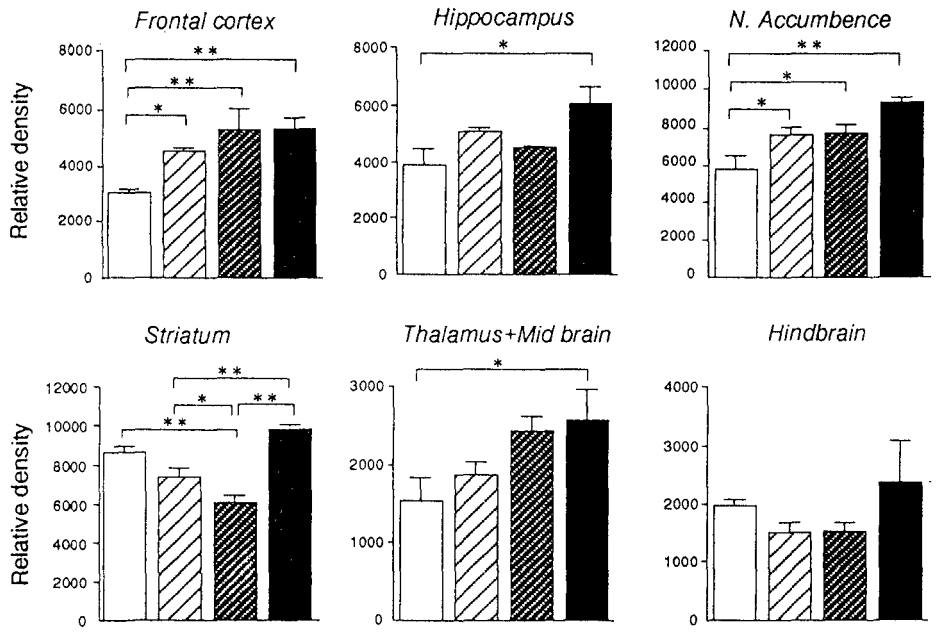


図 1　IDPN誘発ジスキネジアラットにおける CsA投与のCRE結合活性への影響

□ 溶媒 + 生食を連日投与，　▨ 溶媒 + IDPNを連日投与

▩ CsA + 生食を連日投，　■ CsA + IDPNを連日投与

独投与により対照群に比して前頭皮質，側坐核において有意に増加し，海馬，視床+中脳においても同様の増加傾向を認めた．逆に線条体，菱脳では減少する傾向が認められた．また，IDPNとCsAを連日投与した群では線条体において，CRE結合活性はIDPN単独投与群に比してさらに有意に増加していた．このCsAによる増加傾向はその他の脳部位においても認められた (図 1)．これらの成績は，IDPN+CsA投与により直接，あるいは二次的にCRE-binding protein(CREB)のリン酸化の増大や核内への移行の促進がもたらされ，CRE結合能が増強されたと考えられる．さらに，カテコールアミン合成酵素 tyrosine hydroxylase (TH) の遺伝子の上流領域にCREが存在することから，IDPN+CsA投与による脳内 DA含量の増加は，一部はこの CREBのCRE結合活性の増加に基づくものであると考えられる．以上のように，CsAはCRE結合の活性化を介してジスキネジアを増悪させること，ならびに免疫反応がジスキネジア発症に関与している可能性が示唆された．

【文献】
1. Ogawa, N. et al. (1991) Brain Res., 556:271-279
2. Ogawa, N. et al. (1990) Eur. Neurol., 30(supp 1):31
3. Ogawa, N. et al. (1993) Neurosci. Lett.,152:173-176
4. Asanuma, M. et al. (in press) Jpn. J. Psychiat. Neurol.

197 末梢神経障害と小脳失調を呈する症例にみられたGal(β1-3)GalNAc基を認識するIgM M蛋白

楠 進、等誠司、千葉厚郎、田井直*、金澤一郎
（東京大学医学部・神経内科、*都臨床研・腫瘍免疫）

〔要約〕

感覚障害優位の末梢神経障害、小脳失調と口蓋ミオクローヌスを示した症例にみられたIgM M蛋白の結合特異性を検討したところ、糖脂質GM1, GD1b, GA1に特異的に結合し、これらの糖脂質の末端に存在するGal(β1-3)GalNAc基を認識することがわかった。このIgM M蛋白の抗体活性は髄液中にも検出された。この患者血清および精製IgMによる免疫組織染色では、小脳顆粒細胞層、歯状核、下オリーブ核および脊髄の灰白質が染色された。GD1bにmonospecificなモノクローナル抗体(GGR12)も同様の染色パターンを示したことから、患者血中IgM M蛋白による免疫組織染色は同M蛋白のGD1bに対する抗体活性を反映していると考えられた。免疫組織染色でみられたIgM M蛋白の中枢神経組織への結合は、本症例の小脳失調と口蓋ミオクローヌスの発症機序に関与している可能性が考えられた。

糖脂質GM1, GD1b, GA1の糖鎖末端に共通に存在するgalactosylβ1-3NAcetylgalactosaminyl[Gal(β1-3)GalNAc]基を認識するIgM M蛋白は、lower motor neuron diseaseに伴うことが最初に報告された(2)。その後運動障害優位型あるいは感覚運動障害型の末梢神経障害にもみられることが報告されている(3)。一方IgM paraproteinemiaを伴う末梢神経障害に小脳失調などの中枢神経障害が合併するものがあることは知られているが、そうした例のIgM M蛋白の反応特異性の検討は調べ得た限りではまだない。今回われわれは末梢神経障害と小脳失調を呈しIgM M蛋白を伴った症例を経験したので、そのM蛋白の反応特異性につき解析し、それを用いて免疫組織化学的に検討して、M蛋白の病態への関与の可能性について考察した。

[方法] 症例は79歳男性。約3年の経過の歩行時のふらつきを主訴として当科受診。神経学的診察では小脳障害と両膝以下の温痛覚および振動覚の低下をみとめ、四肢深部反射は消失していた。筋力低下はみられなかった。また口蓋ミオクローヌスと立位をとらせたときなどの四肢のミオクローヌスがみられた。血清IgMが939mg/dlと高値であり、IgMλ型のM蛋白がみられた。

血中抗糖脂質抗体をELISA法で検討した。用いた抗原はGM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b, galactocerebroside, GA1, CDH, CTH, paragloboside, fucosyl GM1, LM1, Forssman, globosideとSGPGの18種類である。また抗体活性は薄層クロマトグラム(TLC)免疫染色でも検討した。さらに髄液中の抗体活性もELISA法で検討した。またGM1を結合したOctyl Sepharoseカラムを用いて血清中のGM1に結合する抗体を精製した。

神経疾患のない剖検例の延髄・小脳・脊髄・後根神経節・前根および後根の凍結切片をアセトン処理し、患者血清(1:500)、GM1カラムを用いた精製抗体(1:50)、正常ヒト血清(1:250)と4℃ overnightで反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体とdiaminobenzidineを用いて免疫染

色した。同時に抗GD1bモノクローナル抗体(GGR12)と抗GM1モノクローナル抗体(GMR16)による染色についても検討した。

[結果] 患者血清中にはGM1, GD1b, GA1に対する高力価のIgMλ型抗体活性(1:32000)がみられた。この抗体活性はTLC免疫染色でも確認された。GM1カラムを用いて精製した抗体分画は血中IgM M蛋白と同様の位置に泳動された。この分画はGM1以外にGD1b,GA1とも同程度の反応性を示し、同じ抗体(IgM M蛋白)がこれら三種の抗原の糖鎖末端に共通に存在するGal(β1-3)GalNAc基を認識すると考えられた。また髄液中にも同様の抗体活性が認められた(抗体価1:80)。

免疫組織化学的検討では、患者血清と精製IgM M蛋白は小脳顆粒細胞層、歯状核、下オリーブ核、脊髄灰白質を染色した。しかし末梢神経系では特異的な染色はみられなかった。正常ヒト血清では染色はみられなかった。抗GD1bモノクローナル抗体は患者IgM M蛋白と同様の部位を免疫染色した。同時に末梢神経系では既報告のように後根神経節細胞や脊髄前・後根の傍絞輪部を特異的に染色した(1)。抗GM1モノクローナル抗体によっては同様の染色はみられなかった。

[考察] Gal(β1-3)GalNAc基を認識するIgM M蛋白が感覚障害優位の末梢神経障害に伴ってみられることはまれである。またIgM paraproteinemiaを伴う末梢神経障害に小脳失調を伴う症例でIgM M蛋白の反応特異性を検討した報告はこれがはじめてである。本例のIgM M蛋白は免疫組織化学的に小脳顆粒細胞や歯状核および下オリーブ核と結合したが、これは小脳失調や口蓋ミオクローヌスの発症機序にIgM M蛋白が関与している可能性を示唆している。抗GD1bモノクローナル抗体が同様の染色性を示すことから、このIgM M蛋白の神経組織への結合性は、M蛋白のGD1bとの反応性を反映していると考えられる。また今回の免疫組織染色の条件ではM蛋白の末梢神経組織への結合はみられなかったが、後根神経節細胞や傍絞輪部に存在するGD1b抗原(1)にIgM M蛋白が結合して感覚障害型末梢神経障害をきたしている可能性があり、今後染色の条件等を変えてさらに検討する必要がある。

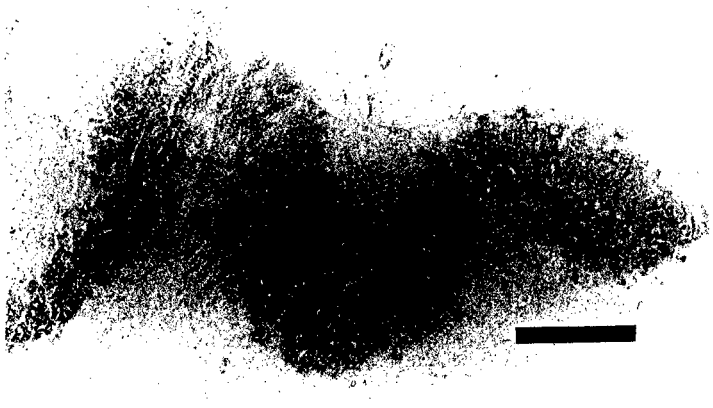


図 患者血中IgM M蛋白によるヒト小脳歯状核の免疫染色
Bar=0.5mm

文献

1. Kusunoki, S., et al. (1993) Muscle Nerve 16, 752-756
2. Latov, N., et al. (1988) Neurology 38, 763-768
3. Sadiq, S.A., et al. (1990) Neurology 40, 1067-1072

198 ラット小脳皮質の発達過程における ガングリオシドの局在分布

小谷政晴、寺島俊雄*、田井　直
（都臨床研・腫瘍免疫、*都神経研・解剖）

【要約】　ラット小脳の発達過程におけるガングリオシド (GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, GM3, GD3, GD2および*O*-Ac-disialoganglioside)の発現分布を特異的なモノクローナル抗体 を用いて，免疫組織化学的に解析した。各ガングリオシドは、発達過程において細胞および層に特徴的な分布変化を示した。例えば、GM1は，その発達過程において主にバーグマングリアに分布し、発達が進むにしたがって減少していく傾向が認められた。このことは，TLC および TLC-immunostaining における解析においても確認された。*O*-Ac-disialoganglioside は，生後１日目と５日目の小脳では外顆粒層に発現していた。ところが，生後１０日目以降ではプルキンエ細胞層にもその発現が認められ、発達が進むにしたがって分子層にも明瞭に観察された。TLC-immunostaining の結果から，生後１日目から１０日目までは主に*O*-Ac-GD3 が，生後２０日目から３０日目では*O*-Ac-LD１が，それぞれ発現していることが示唆された。

昨年の本大会において，成熟ラット中枢神経組織（小脳，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）の免疫組織化学的局在分布について報告した(3)。また，幾つかの微量ガングリオシドも主要ガングリオシドと同様に細胞および層構築に特異的に分布していることを観察している。これまで，ラット脳ガングリオシドは，その発達過程において質的量的に変化することが報告されている(6)。このことから，ガングリオシドは脳の形態形成に関与する分子と予測されてきた。しかし、ラット脳の発達過程におけるガングリオシドの局在分布の変化について、特異的なモノクローナル抗体(MAb)を用いて免疫組織化学的に解析した報告は極めて少ない。そこで、ラット小脳皮質の形成過程における種々のガングリオシド（GM1，GD1a，GD1b，GT1b，GQ1b，GM3，GD3，GD2および*O*-Ac-disialoganglioside）ならびにGalCerとSulfatideの局在分布について免疫組織化学染色法により解析し、その発現の時期ならびにその染色パターンから機能的役割を考察した。

【方法】　①組織：生後１，５，１０，２０および３０日目のWistar rat の小脳を用いた。②MAbs：本実験に使用したMAbは，表１に示した。③免疫組織染色：凍結組織切片を作製した後、冷アセトンで固定し、その後は常法に従って間接蛍光抗体法にて行った。④各組織からのガングリオシドの抽出：Svennerholm and Fredman の方法に従って行った(4)。⑤TLC および TLC-immunostaining：Tai らの方法に従って行った(5)。

【結果および考察】

生後の各時期のラット小脳から抽出したガングリオシドの生化学的解析の結果を図1-A に示した。主要ガングリオシドでは、GD1a、GD1bおよびGQ1bは発達に伴って増加する傾向が認められたが、GM1は減少傾向を示した。GT1bは有意な量的変化を認めなかった。さらに、各ガングリオシドに特異

的なMAbを用いたTLC-immunostainingによって主要および微量ガングリオシドの量的変化の検討を行った(図1-B)。抗GM1 MAbの反応性は、TLCでの結果と同様に発達に伴って減少した(図1-B-a)。抗GQ1b MAbは、生後1日目のガングリオシド画分には全く反応しなかったが、生後10日目以降では顕著な反応を示した(図1-B-b)。抗*O*-Ac-disialoganglioside MAbは、TLC上でのRf値から*O*-Ac-GD3と*O*-Ac-LD1に反応していると考えられた(図1-B-c)(2)。次に、特異的なMAbを用いて免疫組織染色を行った。各ガングリオシドは、発達過程において細胞および層に特徴的な分布変化を示した。例えば、GM1は、発達過程を通じてバーグマングリアに発現していた。しかし、その発現量は発達に伴って減少していることが観察された。バーグマングリアは、外顆粒細胞層の細胞が内顆粒細胞層への移行をガイドすると考えられている(1)。また、この移行時期は、生後約3週間で終了する。GM1のバーグマングリアでの発現パターンから、GM1はガイド分子の1つとしての可能性が示唆された。また、抗*O*-Ac-disialoganglioside MAbは、生後1日目から10日目までは主に外顆粒層と分子層を染色したが、これは*O*-Ac-GD3に反応していると考えられた。生後10日目以降では、プルキンエ細胞層と分子層を染色し、これは*O*-Ac-LD1との反応によるものと考えられた。分子層における発現は、その染色パターンからプルキンエ細胞の樹状突起であろうと思われた。*O*-Ac-LD1は、プルキンエ細胞の成熟に伴って発現してくる分子の1つであることが示唆された。しかし、その機能的役割ついては現在のところ不明であり、今後検討していく予定である。

表1. ガングリオシドに対する特異的MAb。

Ganglioside	MAb	Isotype
GM1	GMB16	IgM (κ)
GD1a	GMR17	IgM (κ)
GD1b	GGR12	IgG3 (κ)
GT1b	GMR5	IgM (κ)
GQ1b	GMR13	IgM (κ)
GM3	GMR6	IgM (κ)
GD3	GMR19	IgM (κ)
GD2	GMR7	IgM (κ)
O-Ac-disialo-ganglioside	GMR2	IgM (κ)
Gal Cer	AMR20	IgM (κ)
Sulfatide	AMR43	IgG3 (κ)



図1. MAbsによるラット小脳発達過程におけるガングリオシドのTLC-immunostaining. (A) 1日目(レーン1)、5日目(レーン2)、10日目(レーン3)、20日目(レーン4)、30日目(レーン5) から抽出したガングリオシド画分の TLC。(B) 同様の試料の MAb による TLC-immunostaining。a; anti-GM1, b; anti-GQ1b, c; anti-*O*-Ac-disialoganglioside.

【文献】

(1) Altman, J. (1972) J. Comp. Neur., 145, 399-464.
(2) Denise, K. H. et al. (1990) J. Neurochem., 54, 1598-1607.
(3) Kotani,M. et al. (1993) Glycobiology, 3,137-146.
(4) Svennerholm,L.and Fredman,P. (1980) Biochem. Biophys. Acta, 617, 97-109.
(5) Tai, T. et al. (1987) J. Biol. Chem., 262, 6803-6807.
(6) Yu, R.K. et al. (1988) J. Neurochem., 50, 1825-1829.

199 ガングリオシド投与によるタイラ-脳脊髄炎ウイルス(TMEV)による脱髄疾患の抑制

井上敦, 高昌星, 武富保*

(信州大学第3内科, *信州大学脂質生化学)

〔要約〕TMEVはピコルナウイルスに属し感受性マウスに脳内接種すると接種40日目ころより慢性進行性の脱髄疾患を発症する.この病因は免疫機序によるとされその類似性よりヒトの多発硬化症(MS)の動物実験モデルとされる. 一方複合糖脂質であるガングリオシドはマイトジェンや抗原によるT細胞の反応性を抑制し,免疫系に種々の影響を与えることが知られている. またガングリオシドは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)や実験的自己免疫性神経炎(EAN)を抑制することが知られており,その自己免疫疾患に対する有用性が注目されている.今回われわれはTMEVにより誘導される免疫性脱髄疾患にガングリオシドを投与し疾患にどのような影響を与えるかについて免疫学的に種々の方法を用いて検討した.その結果effector期にガングリオシド投与した群では臨床症状の発現は著しく抑制された. 組織学にもガングリオシド投与群では変化は軽微であった.炎症性サイトカインであるIL-1, TNFα活性も症状,組織所見に一致して低下していた.免疫学的にはウイルス抗原に対するT細胞増殖反応, 遅延性過敏反応はガングリオシド投与群で低下が認められた.これに対してウイルス抗体価はPBS投与群とガングリオシド投与群で差が認められずガングリオシドによる抑制機序はT細胞の抑制による可能性が示唆された.

(実験方法) 動物: 近交系SJL/Jマウスはジャクソンラボより購入した. ウイルス:TMEVのBeAn8386株をBHK-21細胞内で増殖させ, 精製した.マウスへのTMEVの接種: $1.3X10^6$pfuのTMEVを30μlをメトキシフルレンでの麻酔下にて右大脳半球内に注入した.ガングリオシド:混合牛ガングリオシド(GM1-19%, GD1a-40%, GD1b-16%, GT1b-19% average MW1756, Fidia Research Lab)を使用した.マウスを各10匹のABCD の4群に分けた. A群は脳内接種前7日(d-7)から7日後(d7)までガングリオシド100mg/kgを連日皮下注射した. B群はPBSを同様にして投与した. C群は脳内接種後14日目(d14)から28日目(d28)までガングリオシド100mg/kgを連日皮下注射した. D群ではPBSを同様にして投与した.臨床症状を連日観察し, 40日目にマウスの耳の皮内に紫外線で不活化したTMEVを注射しその腫脹を計測することにより遅延性過敏反応を測定した.測定後エ-テル麻酔下にて採血したのちPBSにて灌流した.こののち脊髄と脾臓を無菌的に取り出した. 脊髄の一部は組織学的に検索した.又脊髄および脾臓よりリンパ球を分離し,短期間培養しその培養上清中の炎症性サイトカイン(TNFα, IL1)をELISAにて測定した. 又個々のリンパ球のTNFαの産生能について, ELISPOT法にて検討した. また脾臓のリンパ球についてはウイルス, PHA, ConAに対するT細胞増殖反応を, ガングリオシド存在下, 非存在下にてトリチウムチミヂンの取りこみにより測定した. 採取した血清中の抗TMEV抗体はELISA法にて測定した.

(結果) 臨床経過:ガングリオシド投与群では, A群では脳内接種40日目までに80%発症した. C群では40日目までの発症は10%であり, 明らかに発症は抑制された. PBS投与群であるB群, D群では40日目までには100%発症した(Fig.1).抗TMEV抗体:抗TMEV抗体は4群とも上昇を認めた.抗体価は4群間で有意な差異は認められなかった(Fig.2).組織所見:神経症状を呈したマウス

はすべて血管周囲の単核細胞浸潤, 脱髄の所見を認めた. C群未発症のマウスでは上記の所見はほとんどみられず,あっても軽度であった.遅延性過敏反応:抗原を注射した耳の腫脹による検索ではC群にて低下しており,臨床症状と相関した. 他の3群はいずれも遅延性過敏反応の亢進を認めたが,3群間では差異はみられなかった(Fig.3). T細胞増殖反応:ウイルス及びPHA, ConAに対するT細胞増殖反応はA, B, D群ともに亢進していた.これに対しC群では遅延性過敏反応と同様C群では低下していた(Fig.4).炎症性サイトカイン:培養上清,及び血清中のTNFα, IL1ともにA,B,D群にて高値を呈した. これに対しC群では低値であり, 臨床症状と相関した. ELISPOT法による個々の細胞のTNFαの産生能も同様な結果でありA,B,D群に比べC群では脊髄浸潤細胞, 脾細胞ともに個々の細胞のTNFαの産生能は低下していた.

Fig.1

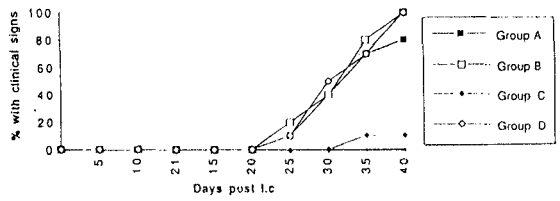


Fig.2

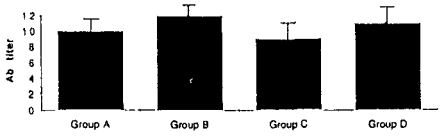


Fig.3

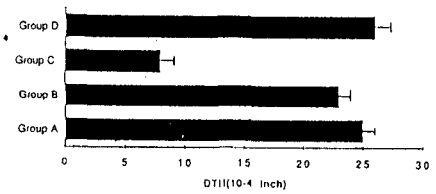
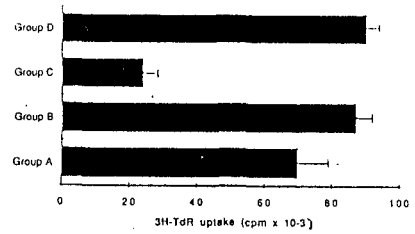


Fig.4



(考察) TMEVにより誘導される脱髄疾患はMSの動物実験モデルであり,MSの発症機序の解明及び治療法の研究に重要である.一方ガングリオシドは細胞の形質膜の構成分であり, 細胞間の接着, 認識, 細胞の分化, 増殖に重要な役割を果たしていることが知られている(2). またガングリオシドを投与することによりT細胞の増殖が抑制されることが知られている(3). このためT細胞が病因となる実験的自己免疫性神経炎や実験的自己免疫性脳脊髄炎におけるガングリオシドの効果が検討され, その疾患を抑制効果が指摘されてきた(4,5).TMEVにより誘導される脱髄性脳脊髄炎もその発症機序はウイルス直接の細胞破壊ではなく,免疫機序によるものでT細胞が重要な役割を果たしていることが知られる(1).今回の我々の研究でもこれまでの報告と同様にT細胞を中心とする免疫細胞が局所で組織破壊を行ういわゆる efffector期のガングリオシド投与により疾患が抑制され, T細胞の抑制が種々のデ-タより示された.また炎症性サイトカインも抑制されており, T細胞抑制に引き続く2次的なものと考えられた.これに対しB細胞への影響はみられなかった.これらの研究はMSの新たな治療法を考えるうえで重要と考える.

(文献)

(1)Gerety SJ, Karpus WJ .(1994) J Immunol 152:908-918. (2)Hakomori S.(1990) J Biol Chem 265,18713-18716. (3)Robb RJ (1986)J Immunol 136,971-976
(4)Shimada K, Koh C-S(1994).Cell Immunol 154:231-239.(5)Zielasek J, Jung S, (1994)J Neuroimmunol 43,103-112.

200 サル末梢神経ミエリンP2蛋白の一次構造解析について

坂本 安、北村邦男、東山智子、野村恭一*、植村慶一**、野村正彦
(埼玉医科大学・第1生理、*神経内科、**慶応大学・医学部・生理)

〔要約〕 1) 精製サル末梢神経 P2 蛋白のリジルエンドペプチダーゼとStaphylococcus Aureus (V8)プロテアーゼ消化物、ブロムシアン分解物を逆相系 HPLC を用いて単離し、そのアミノ酸配列分析と質量分析結果から N- 末端側の一部を除く一次構造を推定した。

2) ウシ、ヒト、ウサギ P2[1~3] とサルにおけるアミノ酸の置換部位を比較すると、比較的種が近いヒト、サル間のアミノの置換は、6 箇所であると考えられた。置換部位は、Arg(39)->Thr, Ala(80)->Thr, Asn(98)->Asp, Asn(100)->Lys, Asp(110)->Asn, Val(115)->Ala であり、ウシ P2 において 実験的アレルギー性神経炎 (EAN)の抗原活性の認められる 60-80 残基付近は、conservative でありアミノ酸の置換は存在せず各種間において保存性の高い領域であった。また、これらの置き換りは Thr->Arg を除き遺伝子コードの1塩基置換で説明可能であった。

〔はじめに〕

末梢神経ミエリンの塩基性蛋白質として MBP と P2 蛋白質が存在する。これらの蛋白は、ミエリン細胞膜の内側に存在する極めて塩基性の蛋白で、内膜同士の接着に関与すると考えられている。 P2 蛋白の存在量は動物種に依存してかなりの相違があり、 MBP と P2 の存在量が反比例することが知られている。例えば、モルモットおよびラットにおける P2 の存在量は、極めて少量であり神経系の進化を探る上で興味深い蛋白の一つである。

〔実験方法〕

1) サル P2 蛋白の精製と各消化ペプチドは次の様な HPLC システムにより分離した。

システム	(カラム)	(ソルベント A)	(ソルベント B)
{逆相系}			
A	Tosoh ODS 2PW 4.6mm I.D. X 150mm	0.1% TFA* / H_2O	0.1% TFA / CH_3CN
B	Tosoh ODS-TX 4.6mm I.D. X 150mm	0.1% TFA / H_2O	0.1% TFA / CH_3CN
C	Shim Pack CLC ODS 4.6mm I.D. X 150mm	0.1% TFA / H_2O	0.1% TFA / CH_3CN
D	Shim Pack CLC ODS 4.6mm I.D. X 150mm	0.1% HFB** / H_2O	0.1% HFB / CH_3CN
{ゲル濾過系}			
E	Tosoh G300SW XL 8mm I.D. X 300mm	0.1% TFA, 35% CH_3CN / H_2O	

* トリフルオロ酢酸、 ** ヘプタフルオロ酪酸

2) ミエリン酸抽出物の調製は、 Kitamura 等の方法に従った[4]。

3) 酸抽出物からの P2 蛋白の単離は、システム A を用いて行った。

4) リジルエンドペプチダーゼ消化ペプチド:

無修飾で 37℃、 24 時間消化後システム B で分離精製し (Fig. 1)、comigration 画分を、システム C を用いて単離精製した。

5) S. aureus (V8) プロテアーゼ消化ペプチド:

精製 P2 蛋白をピリジルエチル化後、システム D を用いて脱塩した。37℃、 48 時間の消化を行った後、システム B で分画し(Fig. 2)、comigration 画分をシステム C 又は D で単離精製した。

6) ブロムシアン分解ペプチド:

室温にて4時間分解後、システム A を用いて分画し、再分画のためにシステム C を用いた。

7) アミノ酸配列分析は、ABI 気相シーケンサー(470A)を用いて行った。

8) 液体クロマトグラフィー - 質量分析(LC-MS)は、JEOL JMS-AX505H 質量分析装置にファルマシアスマートシステムを接続し、野村化学 ODS-HG カラム(0.3mm I.D. X 150mm)を用いて行った。

〔結果と考察〕

一次構造解析結果を Fig. 3 に示した。精製されたサル P2 蛋白は、その N- 末端アミノ酸配列分析が進まないことから、他の P2 蛋白と同様に N- 末端がアシル化を受けてブロックされていることが示唆された。ブロックの種類と N- 末端側3残基の配列分析は現在検討中である。また、V8 ペプチダーゼ消化物より精製された V8 ペプチドにおけるアミノ酸配列分析では 10 ステップ目の Trp(97) で反応が劇的に止まり、この後にウシ P2 同様にAsn-Gly結合が存在しAsn98がβペプチド型に転移するためエドマン反応が進まなく成るものと思われた。そのため、 V8 ペプチドをトリプシン消化後、液体クロマトグラフィー - 質量分析装置

(LC-MS)を用いて検討した結果、 V8T2 ペプチドは、質量数 628を有しておりトリプトファン以後のアミノ酸配列はウシ P2 と等しいと推定されたが更に詳細な解析を遂行中である。また、V8ペプチダーゼ消化に関して Gly(6) , Gln(87) も C- 末端側で非特異的切断を受けたが、消化時間が 48 時間と比較的長かった事に起因するものと思われた。未修飾サル P2 のブロムシアン分解ペプチド CB3 , CB4 フラグメントを含むフラクションは、これらのペプチドの疎水性度が大きく異なっているにもかかわらず、2種類の異なった HPLC システム A, D 上で1つのピークを示し、 PTH アミノ酸がほぼ等量検出されたため Cys(117) , Cys(124) 間に S-S 結合が存在することが確認された。

現在までに報告されている各種間のアミノ酸置換を Fig. 4 に示したが、サル P2 は、ヒトと比較した場合、6 箇所の置換が見られ Thr(39)->Arg以外はコドンの 1 塩基置換で説明することが可能であった。また、我々は、ウシ P2 蛋白の Leu(66) ～ Arg(78) の領域に強い EAN 抗原活性が存在することを報告しているが、今回のサル P2 蛋白に関してもこの領域付近は conservative である。従ってアミノ酸の置換が見られないこの領域の立体構造の保存性は高いと予想され、3次構造と抗原性との関係にも興味が持たれる。

【文献】 1)Kitamura *et. al.*, *Biomed. Res.*, *2*, 347-369 (1981) 2)Suzuki *et.al.*, *J. Neurochem.*, *39*, 1959-1762 (1982) 3)Ishaque *et.al.*, *J. B. C.*, *257*, 592-595 4)Kitamura *et. at.*, *B. B. A.*, *379*, 582-591, (1975)

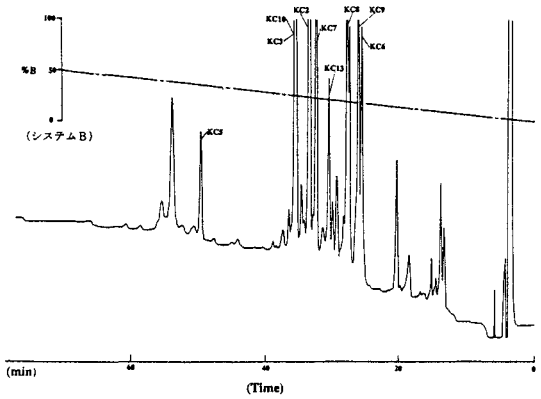


Fig.1 HPLC of Lysyl Endopeptidase digested peptides

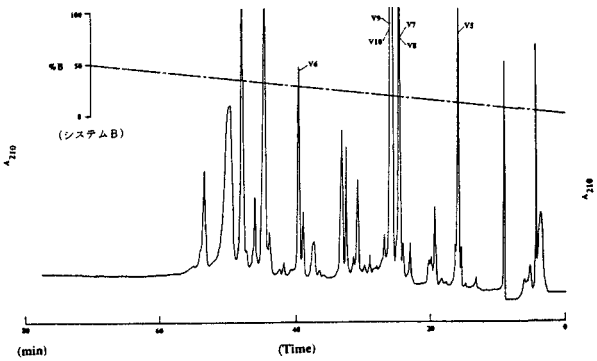


Fig.2 HPLC of V8 peptidase digested peptides

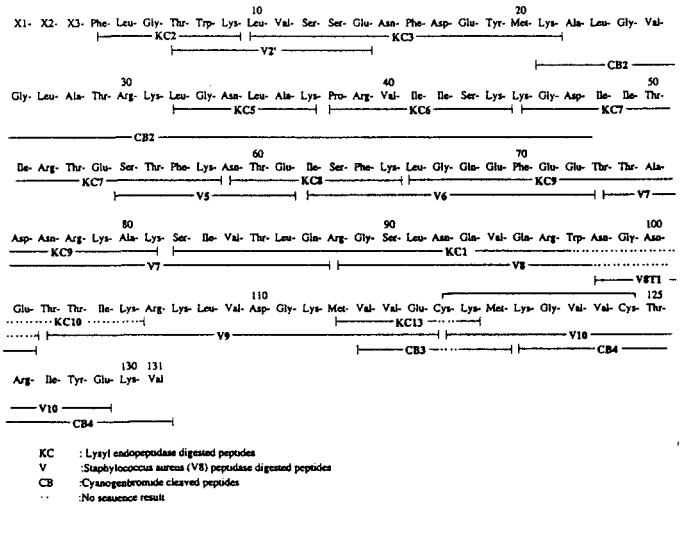


Fig. 3 Amino acid sequence of monkey P2 protein

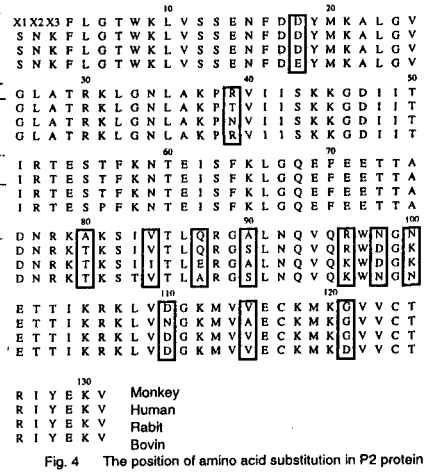


Fig. 4 The position of amino acid substitution in P2 protein

201 末梢神経系におけるPASII/PMP-22およびconnexin32の分布

宮崎唯雄、武田泰生、川野 仁*、嶋津 孝**、戸谷重雄***、植村慶一

(慶應義塾大学医学部生理学、解剖学*、脳神経外科***、愛媛大学医学部医化学第一**)

〔要約〕最近、種々の遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子の研究が進展し、PASII/PMP-22、P0 および connexin 32 の発現異常がその原因となることが示された[1]。しかしこれら蛋白質のミエリンにおける役割は未だ明らかにされていない。今回、PASII/PMP-22 蛋白質の C 末端ペプチドに対する特異ポリクローナル抗体および connexin 32 に対するモノクローナル抗体を用いてそれぞれの蛋白質の分布を検討した。その結果、1) 哺乳動物の末梢ミエリン画分に抗 PASII/PMP-22 抗体に陽性の 20 - 24kD のバンドが認められた。一方、ラットの gap junction 画分では connexin 32 抗体によって肝臓では 30kD、末梢ミエリンでは 60kD 部分に主要なバンドが検出された。2) PASII/PMP-22 は P0 と同様に末梢ミエリン鞘の層構造部分に、connexin 32 はランヴィエ絞輪付近に限局して発現が見られた。3) 初代培養系において未成熟シュワン細胞では PASII/PMP-22 の発現は認められないが、神経軸索を取り巻く成熟シュワン細胞には強い発現が認められた。以上の結果よりPASII/PMP-22及びconnexin 32が末梢神経系の異った部位に発現しており、更に異った機能を持つことが示唆された。

[目的]

幼若なシュワン細胞は分裂増殖の後、神経軸索を重層し、周期線および周期間線同志の相互接着により強固なコンパクトミエリンを形成する。ミエリン構成蛋白質の正常な発現と特異的な機能がミエリンの形成と形態維持に重要な役割を果している。Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は末梢神経系において脱髄、オニオンバルブの形成、再ミエリン化を主徴とする疾患であるが、これはミエリンの形成及び維持機構に異常があり脱髄と再生を繰返した結果である。最近、CMT 病に関する原因遺伝子が解析され type 1A では PASII/PMP-22[2]、type 1B では P0、type X では connexin 32[3]の異常が報告された。我々はこれまでに P0 蛋白質の構造と機能に関する研究を行い、P0 蛋白質がホモフィリックな結合によるコンパクトミエリンの形成に関与することを明らかにした。今回、他の CMT 病関連遺伝子である PASII/PMP-22 および connexin 32 に着目し、抗体を用いた免疫染色法によりこれら蛋白質の組織内分布に関して検討を行ったので報告する。

[方法]

1. PASII/PMP-22 ポリクローナル抗体の作製：PASII/PMP-22 の C 末端部分 12 個のアミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、逆相 HPLC にて分離精製した。これを抗原として家兎に免疫し作製した。Connexin 32 のモノクローナル抗体 (6-3G11) は愛媛大・医・医化学第一教室において作製された。

2. ウエスタンブロッティング：PASII/PMP-22 の検出に関しては検体として Wiggins らの方法に従いラット、マウスおよびヒトの坐骨神経から、また Norton らの方法に従いコイの脳から、それぞれミエリン画分を調製した。一方、connexin 32 の検出に関してはラットの肝臓、心臓、脳および末梢ミエリン画分をそれぞれ調製した。調製した検体をそれぞれの抗体 (x100 希釈) を用いて免疫染色を行った。

3. 免疫組織染色：成熟ラット坐骨神経の厚さ 3 μm の凍結切片を作製し、各切片を抗体に反応させた後 peroxydase 法を用いて DAB 発色させ、それぞれ免疫反応の組織分布を比較検討した。

4. 免疫細胞染色：出生直後のマウスから脊髄後根神経節を採取し、poly-L-lysineをコートしたカバーグラス上でそれぞれ 7 日および 40 日間培養した。3% パラホルム-PBS 溶液で固定した後、PASII/PMP-22 抗体を用いて免疫反応させ、FITC ラベル化 2 次抗体にて蛍光発色させた。

[結果]

（1）ウエスタンブロットによる解析：PASII/PMP-22 抗体の免疫染色の結果、マウスおよびラットの末梢ミエリン分画では分子量約 20kD 部分に、ヒトのミエリン分画では約 24kD 部分に主要なバンドが検出された。コイの脳には哺乳動物の末梢神経系の P0 様蛋白質が存在するが、PASII/PMP-22 抗体に反応するバンドは検出されなかった。一方、ラットの各組織を用いたウエスタンブロッティングにおける connexin 32 の発現は肝臓では分子量約 30kD 部分に、末梢ミエリン画分では約 60kD 部分にそれぞれ単一のバンドが検出された。（2）免疫組織染色による検討：成熟ラットの坐骨神経を用いて抗 PASII/PMP-22 抗体で免疫染色した結果、P0 と同様にミエリン鞘に強い発現が認められた。抗 connexin 32 抗体で免

疫染色すると、ミエリン鞘のランヴィエ絞輪付近に限局して陽性反応が観察された。ミエリン鞘における connexin 32 の詳細な分布は現在免疫電顕を用いて解析中である。(3)ミエリン形成期における発現：新生仔マウスの脊髄後根神経節細胞の初代培養において、培養開始後 7 日の未成熟シュワン細胞には PASII/PMP-22 の発現は認められなかった。培養 40 日後のシュワン細胞は神経軸索の周囲に接着しており、PASII/PMP-22 の強い発現が認められた。Connexin 32 の発現様式に関しては現在検討中である。

[考察]

PASII/PMP-22 蛋白質は 4 つの膜貫通部位をもつ疎水性の膜蛋白質である。この蛋白質は末梢ミエリンの PASII 蛋白質として我々のグループによって見出され[4]、その後マウスの線維芽細胞において cell-arrest に伴って発現してくる蛋白質、またラットの坐骨神経において損傷に伴って発現量が低下する蛋白質として同定され PMP-22 と命名された。一方、connexin 32 は肝臓をはじめ各種の組織に存在するが、末梢神経系における存在は不明であった。最近、connexin 32 が CMT 病 type X の原因遺伝子として同定され、connexin 32 が末梢神経系ランヴィエ絞輪周辺部位に発現する可能性が示された[3]。今回の実験でラット、マウス、ヒトの末梢ミエリンにおいて PASII/PMP-22 はコンパクトミエリンの膜構造部分に、connexin 32 はランヴィエ絞輪付近に発現していることが確認され、さらに PASII/PMP-22 に関してはシュワン細胞が神経細胞に接触しミエリンが形成される時期に発現してくることが明らかとなった。PASII/PMP-22 の時間的あるいは空間的な発現様式は P0 のそれとほぼ同じであり、この結果は PASII/PMP-22 が GAS 蛋白質のように細胞増殖停止と分化誘導因子としての機能を有することを示唆すると共に、P0 と同様にミエリンの形成と維持に関与している可能性を示すものである。一方、ランヴィエ絞輪はシュワン細胞の細胞質が存在している部位であり、connexin 32 がミエリン鞘を形成したシュワン細胞に必要な各種イオンや栄養源をギャップ結合によって輸送し、コンパクトミエリンの形態維持に関わっている可能性が考えられる。

図 1

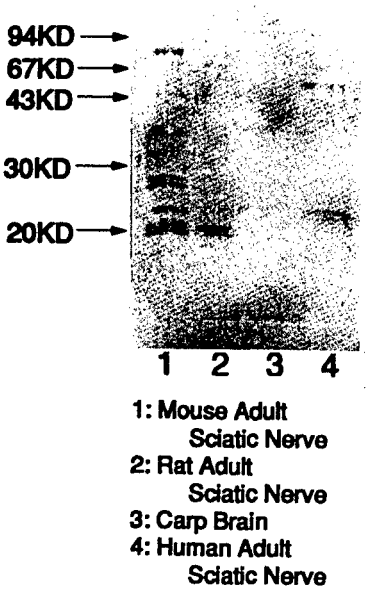


図 2



（図 1）各哺乳動物末梢ミエリン画分における PASII/PMP-22 のウェスタンブロット解析
（図 2）成熟ラット坐骨神経における connexin 32 の発現

[文献]

（1）植村慶一、臨床分子医学、1：30－40（1993）
（2）Patel PI.et al、Nature Genet、1：159－161（1992）
（3）Bergoffen J.et al、Science、262：2039－2042（1994）
（4）Kitamura K,Uyemura K, et al、Biochem.Biophys.Acta、455：806-810（1976）

202 末梢神経ミエリンPAS-II/PMP22蛋白質糖鎖の構造とHNK-1抗原性

能村邦男、田中早苗、澤辺真紀、坂本安、西島樹重*、渋谷匡子、吉村和法、寺田庄一、野村正彦
(埼玉医大・第一生理、*第三内科)

〔要約〕末梢神経ミエリンに存在する糖蛋白質であるPAS-II/PMP22蛋白質の主要な糖鎖(FLM1)の構造はsulfated-GlcA β Gal β GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 4)(GlcNAc β 2Man α 3)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAcであると決定した。endo-β-galactosidase消化によって得られたsulfated-GlcA-Galとリン脂質との共有結合物のHNK-1抗体との反応性の検討の結果、sulfated-GlcA-Gal糖鎖のHNK-1抗原性は極めて弱いが明かな反応性を認めた。従って、PASII/PMP22蛋白質は神経系の細胞接着蛋白質の1種であることが示唆された。又、同時にHNK-1抗原性は硫酸化グルクロン酸が結合している糖鎖構造にも依存していると考えられた。

神経系の細胞接着糖蛋白質の多くは硫酸化グルクロン酸を含む糖鎖を含有しており、硫酸化グルクロン酸の細胞接着機能への関与が注目されている。我々は以前ウシ末梢神経ミエリンに存在する2種の糖蛋白質の内P0糖蛋白質の主要な糖鎖(GP5)もまた硫酸化グルクロン酸(sulfated-GlcA)を含む糖鎖構造を有することを報告した(1)。今回末梢神経ミエリンに存在するもう1つの糖蛋白質であるPAS-II/PMP22蛋白質の主要な糖鎖(FLM1)の構造を解析し、HNK-1抗体反応性を有する硫酸化グルクロン酸を含有することを明かにしたので報告する。

【実験方法】糖ペプチドの精製と蛍光標識：既報に従いウシ末梢神経ミエリンより部分精製したPAS-II/PMP22糖蛋白質由来の糖ペプチド画分をdithiothreitolにて還元後N-2-(2-pyridylamino)ethyl]maleimide (和光純薬)にてシステイン残基のチオール基を蛍光標識した(1,2)。蛍光標識糖ペプチドはODS-HPLCにて精製した。
ピリジルアミノ化糖の精製：糖ペプチドはglycopeptidase A消化(3)後、ピリジルアミノ(PA)化した(4)。PA化オリゴ糖は順相系（TSK-Amido-80 あるいはWakosil 5NH2）及び逆相系(Shimpak-CLC-ODS)HPLCにて精製した。
構成糖の分析：試料は凍結乾燥の後、4N Trifluoroacetic acid-2N HClを使用した気相加水分解を行なった。単糖分析はWaters 625型HPLC（metal free）にCarboPac PA1 カラムとpulsed amperometric 検出器(Dionex)を接続して行なった。
neoglycolipidの作製とHNK-1抗原性の検討：endo型酵素消化により遊離されたオリゴ糖の還元末端をMizuochiらの方法(5)に従いphosphatidylethanolamine dipalmitoylと共有結合させneoglycolipidを作製した。各neoglycolipidはthin layer chromatography（和光純薬 Silicagel 70 FM plate）を行なった後、一次抗体として200倍希釈のHNK-1抗体(Becton-Dickinson)、二次抗体として500倍希釈peroxidase-conjugated goat-anti-mouse-IgM(Tago)を使用し、diaminobenzidine発色した。その他の方法は既報に従った(1)。
【結果と考察】FLM1の糖組成分析、fast-atom bomberdment 質量分析、^{1}H-NMRの結果からFLM1はMan3,Gal1, Fuc1, GlcNAc5, GlcA1及び硫酸1モルからなることが明かとなった。endo-β-galactosidase消化産物はγ-globulinのtype M糖鎖［GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 4)(GlcNAc β 2Man α 3)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc-PA］と二次元HPLC上で一致した。又、N-acetylhexosaminidase処理により非還元末端の2モルのGlcNAcを除去した糖鎖を更にendo-β-galactosidase消化し得られた産物はGlcNAc β 2Man α 6(Man α 3)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc-PAに一致した（図1)。従って、硫酸化グルクロン酸はMan α 1-6Man β 側鎖に結合していることが明かとなった。FLM1はbisecting GlcNAcを有することから赤インゲンマメ赤血球凝集素(PHA-E4)に結合すると考えられたのでPHA-E4-agarose を使用したaffinity chromatographyを行なった結果、P0-GP5は全く結合しないもののFLM1糖鎖の場合には明かな結合が認められた(図2)。従って、FLM1に

bisecting GlcNAcが存在することが確かめられた。以上の結果からFLM1の構造は図3に示したものであることが判明した。P0蛋白質の主要な糖鎖の１つであるGP5の場合は硫酸化グルクロン酸はMan α 1-3Man β側鎖に結合している(図3)ことと照らしあわせると、両者の生合成経路の観点から極めて興味深い結果である。FLM1は硫酸化グルクロン酸を含有することからHNK-1抗体に対する反応性を有すると考えられたが、水溶性オリゴ糖を固定化することが不可能であったため脂質と共有結合させる(neoglycolipid)ことによりそのHNK-1抗原性を検討することとした。PA化P0-GP5糖鎖からはendoglycosidase-Hによりオリゴ糖を遊離させ、そのneoglycolipidのHNK-1抗原性を確認した(図4)。しかしながら、FLM1の場合はendoglycosidase-H, F, Dはいずれも作用しなかったので、endo-β-galactosidaseで遊離させたsulfated-GlcA-Galのneoglycolipidを作製し、そのHNK-1抗原性を検討した(図4-lane 6)。その結果、sulfated-GlcA-Galは極めて弱い反応性ではあるがHNK-1抗体と反応することが明かとなり、PAS-II/PMP22糖蛋白質もまた神経系の細胞接着蛋白質の１つであることが示唆された。又、P0-GP5よりendo-β-galactosidaseで遊離させたsulfated-GlcA-Galの場合も同様に極めて弱いHNK-1抗原性を示したことから、HNK-1抗原性は硫酸化グルクロン酸が結合している糖鎖構造にも依存していると考えられた。

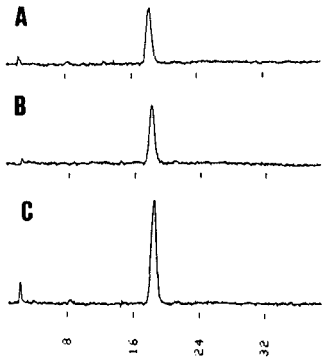


図1.逆相HPLCによるアミノピリジル化糖鎖の比較
A. endo-β-galactosidase処理したPA化FLM1オリゴ糖
B. ヒトγ-globulin PA化糖鎖F［Galβ4GlcNAcβ2Manα6(GlcNAcβ2Manα3)Manβ4GlcNAcβ4(Fucα6)GlcNAc-PA］を5N-acetyl-hexosaminidase処理後β-galactosidase消化して得たもの［GlcNAcβ2Manα6(Manα3)Manβ4GlcNAcβ4(Fucα6)GlcNAc-PA］
C. 上記A及びBの試料を混ぜて溶出。

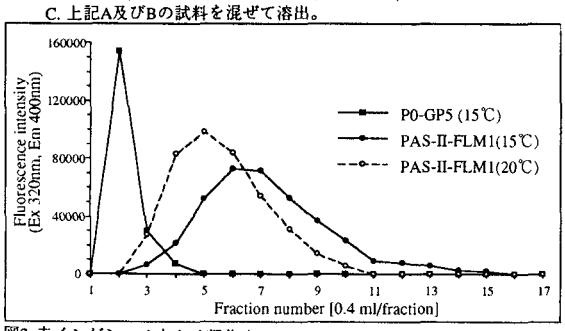


図2.赤インゲンマメ赤血球凝集素(E4-PHA)によるaffinity chromatography PA化FLM1及びPA化P0-GP5の混合試料について、容量容量0.5mlのカラムより溶出した後（20℃及び15℃）、各画分をODS-HPLCにて分析定量した結果。20℃のPA化P0-GP5の溶出パターンは15℃の場合と同じであったので省略。

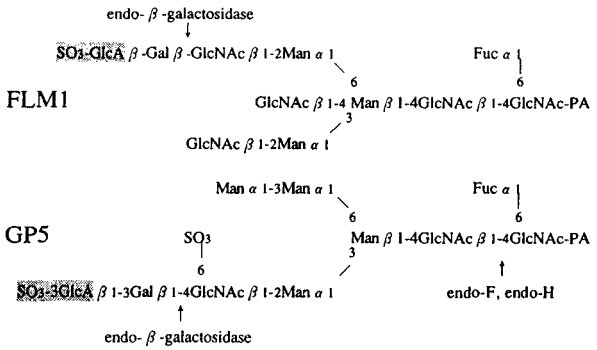


図3. ウシPAS-II/PMP22の糖鎖(FLM1)の構造とP0糖蛋白の糖鎖(GP5)との構造比較
endo型glycosidaseの作用部位する部位を併記した。

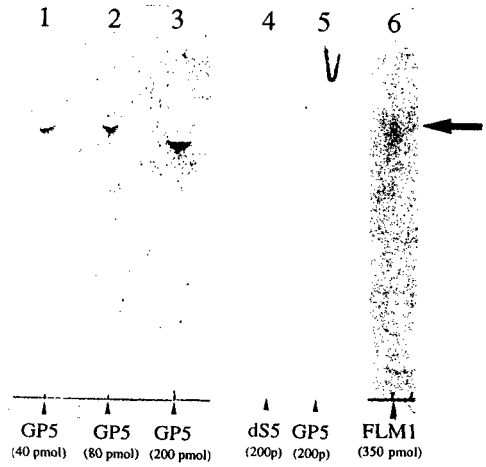


図4. NeoglycolipidsのTLC後のHNK-1抗原性の検討。
条件：1～5；chloroform-methanol-water(C:M:W=105:100:28)による展開
6；C:M:W=60:35:8による展開
各溶媒にて展開後HNK-1酵素標識抗体により染色
試料：1～3, 5；P0-GP5からendo-glycosidase Hにより遊離したオリゴ糖のneoglycolipid
4；脱硫酸したP0-GP5からendo-glycosidase Hにより遊離したオリゴ糖のneoglycolipid
6；FLM1からendo-β-galactosidase処理により遊離したオリゴ糖のneoglycolipid(350 pmol)

【文献】(1) 北村ら(1992)神経化学,31,422-423 (2) 北村ら(1993) 生化学, 65, 1023 (3) Takahashi,N. et al. (1987) Biochemistry, 26, 1137 (4) Yamamoto,S. et al. (1989) J.Biochem. (Tokyo), 105, 547 (5)Mizuochi.T. et al. (1989) J. Biol Chem., 264, 13834

203 ラット脳のグリア細胞における1型グルコーストランスポーター（GLUT1）の発現

Yu Shun, 遠山育夫, Ding Wei Guang*, 木村　宏
（滋賀医科大学．分子神経研、*第二生理）

〔要約〕
1型グルコーストランスポーター（GLUT1）の部分ペプチドを人工合成しポリグルタミン酸に結合させた後、それをハプテン抗原として家兎に免疫し抗血清を得た。得られた抗血清はウエスタンブロットでGLUT1の分子量に相当する約46kDaの単一バンドを明瞭に検出した。この抗血清を用いてラット脳を染色したところ、毛細血管に加え多数のグリア細胞を観察した。GLUT1とアストロサイトのマーカーGFAPないしミクログリアのマーカーOX42との免疫二重染色法では、GLUT1陽性グリアはOX42陰性でミクログリアではないと考えられた。GLUT1陽性グリアの一部はGFAP陽性でアストロサイトと思われたが、ほとんどのGLUT1陽性グリアはGFAP、OX42ともに陰性でオリゴデンドロサイトと推測された。

「緒言」
1型グルコーストランスポーター（GLUT1）は、はじめ赤血球から抽出されたが、その後脳を含む体内の多くの組織でmRNAが発現していることが明らかとなった。脳では主として血管内皮細胞に局在し、血液脳関門を介する血中グルコースの脳内取り込みに重要な役割を果たしているものと推測されている（1）。しかしいくつかの免疫組織化学的研究では、GLUT1は血管内皮細胞のみならず、グリア細胞をはじめとする神経外胚葉由来の細胞にも存在する可能性が指摘されている(2,3)。今回われわれは、GLUT1の部分合成ペプチドに対する抗体を作製し、免疫組織化学的にラット脳内を検索したところ、多数のグリア細胞を明瞭に検出できた。そこで本研究では、アストロサイトのマーカーであるGFAPおよびミクログリアのマーカーであるOX42との免疫二重染色法でどの種のグリアがGLUT1を含有しているのか検討したので報告する。

「方法」
抗体の作製：GLUT1のアミノ酸配列からラットおよびヒトに共通する領域を選択し、その部分ペプチド（DEIASGFRQGGASQSDKTPE；461-480）を人工合成した。このペプチドを水溶性カルボジイミドでポリグルタミン酸に結合させてハプテン抗原を作製し、家兎に免疫して抗血清を得た。
抗体の特異性はウエスタンブロットおよび吸収テストで検定した。

ウエスタンブロット：ラット脳を1 mg/ml のロイペプチン,ペプスタチン, 100 mg/ml のPMSFを含むトリス緩衝液でホモジネートし、遠心分離後その上清を疎細胞質分画として分取した。沈殿は1%のTriton-X100を含むトリス緩衝液にて可溶化し、遠心分離後その上清を集め、疎膜分画として用いた。電気泳動後、ＰＶＤＦ膜に電気的に転写してGLUT1抗体と反応させた。合成ペプチドには2カ所のトリプシン消化部位が存在することから、各分画の一部を2 mg/ml のトリプシンで37℃で20分間反応させ、ウエスタンブロットに供した。

免疫組織化学：Wistar系雄ラットを用い、2-4%パラホルムアルデヒドを含む固定液で灌流固定後、脳を摘出し、後固定した。15%蔗糖液で数回洗浄した後、クリオスタットで20　μmの連続切片を作製し、免疫組織化学に供した。一万倍に希釈したGLUT1抗体と4℃で3日間反応させ、ABC法で免疫染色した。切片の一部は、ウエスタンブロットと同様にトリプシンと反応させた後に、GLUT1抗体で免疫染色した。免疫二重染色は、まずニッケル加ジアミノベンチジン（DAB）でGLUT1を青色に呈色した後、グリアマーカーに対する抗体と反応させ、DABで茶色に染色した。グリアマーカーとしては、アストロサイトの検出にグリア繊維性酸性蛋白（GFAP）抗体を、マイクログリアの検出にはOX42抗体を用いた。

「結果」
ウエスタンブロットでは膜分画および細胞質分画ともに46kDaの単一バンドを検出したが、トリプシ

ン消化したサンプルでは、陽性バンドは全く検出されなかった(Fig. 1)。免疫組織化学では、脳内毛細血管が染色されるとともに強陽性のグリア細胞を多数観察した（Fig. 2A）。GLUT1陽性グリアの一部は血管に突起を伸ばしアストロサイト様の形態を示した（Fig. 2A）。ウエスタンブロットの結果と同様に、トリプシン消化した切片では陽性グリアはほとんど観察されなかった（Fig. 2B, C）。吸収血清では、陽性グリアは染色されなかった（Fig. 2D）。免疫二重染色の結果、GLUT1陽性グリアの一部はGFAP陽性を示したが、ほとんどのGLUT1陽性グリアはGFAP、OX42ともに陰性であった（Fig. 2E）。

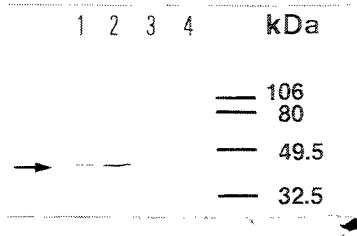


Fig. 1 Western blot of rat brain homogenate probed with GLUT1 antiserum. Lane 1: crude cytosolic fraction, Lane 2: crude soluble memebrane fraction, Lane 3: crude cytosolic fraction after trypsin digestion, Lane 4: crude membrane fraction after trypsin digestion. 50 μg protein was electrophorased on each lane.

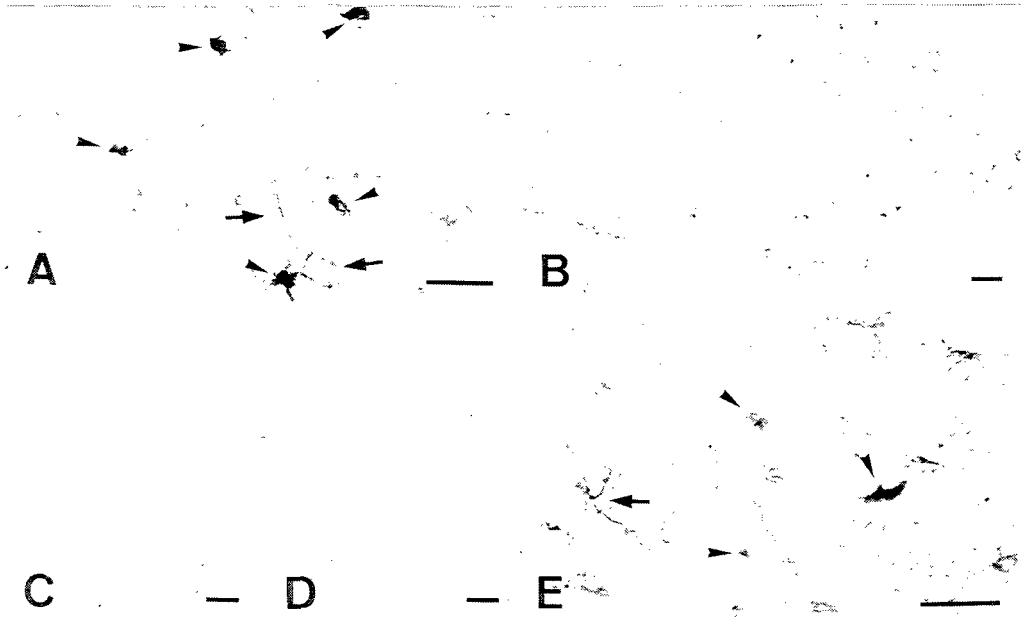


Fig. 2 GLUT1 immunostainings in the rat midbrain (A) and dentate gyrus (B, C, D), and pons (E). A: GLUT1-positive cells (arrowheads) and capillaries (arrows). B, C, D: Nearby sections stained with the GLUT1 antiserum (B, C) or the antiserum preabsorbed with 10^{-4} M of GLUT1 peptide (D). C: a trypsin-treated section. E: Double immunostainings for GLUT1and GFAP. Most of GLUT1-positive cells (arrowheads) are GFAP-negative. However, a glial cell shows GLUT1-positive somata with GFAP-positive processes (arrow). Bars = 50 μm.

「考察」

初期の免疫組織化学的研究では、脳内ではGLUT1は毛細血管にのみ存在すると報告されている（1）。しかしながら、最近では毛細血管にのみならずグリア細胞にも陽性反応を検出するという報告が多くみられ（2,3）、本研究の結果もそうした最近の報告に一致する。グリアマーカーとの免疫二重染色の結果では、ミクログリアではGLUT1を発現していないこと、アストロサイトの一部がGLUT1を発現していることが明らかとなった。しかしながら、GLUT1陽性アストロサイトは少数で、多くのGLUT1陽性グリアはGFAP、OX42ともに陰性であったことから、オリゴデンドロサイトであると考えられた。

「文献」

1. Tanaka, K., Kasahara, M., Oka, Y., et al., Acta Histochem Cytochem 26: 165-178 (1993).
2. Devaskar, S, Zahm, DS, Holtzclaw L, et al., Endocri 129: 1530-1540 (1991).
3. Devaskar, S., Chundu, K., Zahm, DS, et al., Develop Brain Res 67: 95-103 (1992).

204 マウス発育に伴う脳内ドーパミン局在性の変化

-免疫組織染色によるヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼの局在性との比較-

深谷健司[1]、池田和正[2]、佐藤嘉兵[2]、中川滋木[3]

（日本大学農獣医学部　獣医第二病理[1]、応用生物科学[2]、医学部　生化学[3]）

〔要約〕

マウスの生後0、2、4、7、14、28、35日目の脳を取りだし、ドーパミンの局在性の変化を免疫組織染色により検討した。さらにマウスのヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）に対する特異抗体を用い、ドーパミン抗体と共に免疫二重染色を行い、両者の局在性の変化を比較検討した。ドーパミンは生後0日目から大脳皮質、小脳、海馬に局在した。一方、HGPRTは生後4日目までは海馬顆粒層にはほとんど認められなかったが、7日目からはドーパミン陽性細胞の一部に出現し、28日目以降は海馬顆粒層全体にわたってドーパミンと同時局在した。海馬及び大脳皮質では初期発育段階においてドーパミンはHGPRTに先行して存在し、発育が進行するに従い、同一細胞内に両物質の存在が認められるようになった。この事はマウス脳の発育段階においてHGPRTとドーパミンが重要な機能上の関連性を持つことを示唆している。

[目的]

Lesch-Nyhan症候群では、自咬症で代表される重篤な神経症状が小児期に発症することが知られている[1]。本症はHGPRTの遺伝的完全欠損を有しており、剖検患者の脳内でドーパミンが極端に減少している[2]ことが神経症状の直接的な原因と考えられている。しかし、HGPRTとドーパミンの機能上の関連性については全く知られていない。過去に我々はマウス脳を用い、発育段階でHGPRTが海馬に急激に増加することを示した[3]。本研究では、発育段階におけるマウス脳内のドーパミンの局在性の変化を調べ、HGPRTの局在性と比較することにより両物質の脳における関連性について検討することを目的とした。

[方法]

妊娠後期 ddYマウスより誕生した子マウス、生後0、2、4、7、14日目、及び別に入手した3、4、5週齢ddYマウスを用いた。エーテル麻酔下で断頭し、氷上で脳を摘出後直ちに4%パラフォルムアルデヒドで固定した。それぞれ5μmの脳矢状断組織切片を作成し、抗ドーパミン血清（SFRI）を一次抗体として用い、SAB法により免疫染色を行った。発色はDABにより行った。さらに各切片は抗ドーパミン血清と抗HGPRT血清を用い、HISTOSTAIN-DS KIT（ZYMED Lab. Inc.）により免疫二重染色を行った。

[結果]

ドーパミンは生後0日目から大脳皮質、小脳、海馬に局在が認められた。海馬では生後7日目に顆粒層より伸びる樹状突起にドーパミンを認めたが、以後、この局在は消失した。小脳ではプルキンエ細胞の細胞質に存在し、生後日数による大きな変化は認められなかった。線条体には7日目からドーパミンの局在が認められたが、生後4日目まではむしろ染色性は低かった。一方、HGPRTは生後4日目までは海馬顆粒層にはほとんど認められなかったが、7日目からはドーパミン陽性細胞の一部に出現し、21日目以降は海馬顆粒層全体にわたってドーパミンと同時局在した。海馬及び大脳皮質では初期発育段階においてドーパミンはHGPRTに先行して存在し、発育が進行するに従い、ドーパミン局在細胞にHGPRTが発現する事が示された。

[考察]

ドーパミンはHGPRT発現に先行してマウス脳の発育段階初期においてHGPRT陽性細胞にかなりの割合で含まれている事が見い出された。マウスHGPRTは発育初期の生後4日目までは脳内のレベルが低く、生後7日目から急激に増加することが報告されており[3]、発育初期においてはドーパミンがHGPRTの発現に必要な因子である可能性のあることを示唆している。HGPRTを完全に欠損しているLesch-Nyhan症の患者の脳ではドーパミンの極端な減少のあることが報告されている。本研究ではマウス脳の発育段階においてHGPRTとドーパミンの間に機能上の関連性のある事が示されたが、ヒトにおいて同様の現象が発育段階で起こるとすればLesch-Nyhan症では発育に伴い発現する重篤な神経症状が脳内の同一神経細胞中に存在するHGPRTとドーパミンに係る代謝異常により起こる可能性も考えられる。

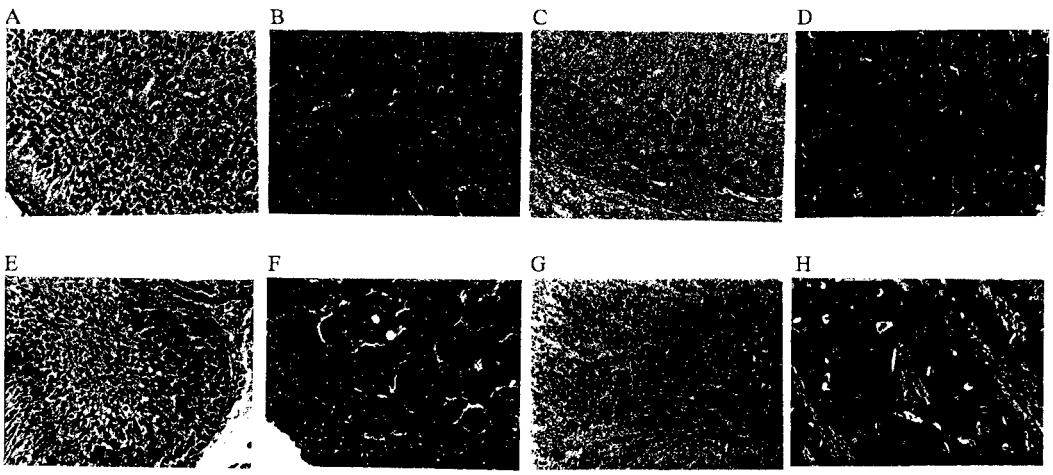


図1. ドーパミン抗体による免疫組織染色

A:：大脳皮質　生後2日目　B：大脳皮質　生後21日目　C：海馬　生後7日目　D：海馬　生後21日目

E：小脳　生後2日目　F：小脳　生後14日目　G：線条体　生後2日目　H：線条体　生後21日目

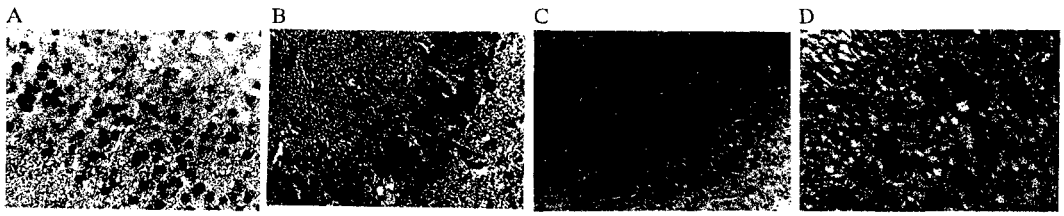


図2. HGPRT及びドーパミン抗体による免疫二重染色

A：大脳皮質　生後14日目　B：海馬　生後4日目　C：海馬　生後21日目　D：小脳　生後14日目

[文献]

1) Kelley, W. N. and Wyngaarden, J. B. (1983) The Metabolic Basis of Inherited Disease, ed 5. New York, McGraw-Hill. 1115-1143.

2) Lloyd, K. G. et al. (1981) N. Engl. J. Med. **305**, 1106-1111.

3) Ikeda, K. et al. (1993) enzyme & protein **47**, 65-72.

205 上皮増殖因子 (EGF) の PC12h-R 細胞および大脳皮質ニューロンに対する栄養因子作用

山田 雅司、榎戸 靖、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) の大脳皮質ニューロンに対する神経栄養因子作用を、ラット中枢ニューロンの培養系を用いて検討した。昨年度本大会で、EGF が PC12 細胞の亜株である PC12h-R 細胞の神経様細胞への分化誘導を引き起こすことを報告した。今回、大脳皮質ニューロンおよび PC12h-R 細胞に対する EGF の栄養因子作用の比較を試みたので報告する。EGF は、胎仔期のラット (E20) 脳の大脳皮質ニューロンを50%気相酸素濃度下で培養した際に見られる細胞死を防ぐことがわかった。この EGF の作用は濃度依存的であり10 ng/ml で最大効果を示した。一方、PC12h-R 細胞に対する EGF の作用も濃度依存的であり1 ng/ml で最大効果を示した。これらの系を用いた EGF 作用の解析は、EGF の神経栄養因子作用の機構解明につながるものと考えられる。

上皮増殖因子 (EGF) は、様々な細胞に対し細胞増殖促進作用を示すことが知られている。EGF は、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。昨年度、PC12 細胞の亜株で、速いNGF応答を示す PC12h-R 細胞が EGF に応答して神経細胞様に分化することを発見し報告した (1)。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 (2)。

以前我々は、培養中枢ニューロンが高酸素負荷により細胞死を起こすことを報告した。培養海馬ニューロンにおけるこの細胞死を詳細に調べた結果、この細胞死はアポトーシスの形態をとり、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) により抑えられることが分かった (3,4)。今回我々は、培養大脳皮質ニューロンの高酸素負荷による細胞死を EGF が抑えることを明らかにした。また、大脳皮質ニューロンと PC12h-R 細胞に対する EGF の栄養因子作用の比較を試みたので報告する。

【実験方法】

胎仔ラット中枢ニューロンの初代培養は既報に従って行った (5)。胎仔ラット脳より切り出した大脳皮質部位を L-15 培地中に集め、パパイン処理により消化した後、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、ポリエチレンイミンコートした 24 穴プレートに 5×10^5 細胞/cm^2 の密度でまいた。翌日 1μM AraC を含む TIP/MEM に換え、気相酸素濃度を 20 および 50% に設定したインキュベータ内で 2.5 日間培養を行った。生細胞は、MTT 法により定量化を行った。

PC12h-R 細胞の培養は既報通り行った (6)。細胞はコラーゲンコートした 6 穴プレートにまき、EGF あるいは NGF 存在、非存在下で 2 日間培養をした後、細胞の直径の 2 倍以上の長さの突起を持つ細胞の数を測定した。

【結果と考察】

図1に示すように PC12h-R 細胞は、EGF により濃度依存的に突起伸展を示すことが分かった。この時の最大効果濃度は 1 ng/ml、ED_{50} の値は 0.03 ng/ml となった。ここには示さないが、EGF による PC12h-R 細胞でのアセチルコリンエステラーゼ活性の上昇においてもほぼ同様の濃度依存曲線が得られた。図 2 に示すように EGF は濃度依存的に高酸素負荷にともなう培養大脳皮質ニューロンの細胞死

を抑えることが分かった。この時の最大効果濃度は 10 ng/ml、ED_{50} の値は 0.3 ng/ml となり、PC12h-R 細胞の場合と比べ 1 ケタ高濃度側にずれた濃度依存曲線が得られた。培養大脳皮質ニューロンに対する EGF の作用を考えるときに問題になることとしてアストロサイトの関与が考えられる。そこで、20% 気相酸素濃度で 2 日目の GFAP 陽性細胞数を測定したところ、50 ng/ml EGF 添加および無添加群においてそれぞれ全ニューロン数の0.08%と0.4%であった。この様に今回の培養系においてはアストロサイトの混在の割合は非常に少なく、しかも EGF の存在によりその混在の割合はさらに低くなることから、この EGF の神経栄養因子作用はアストロサイトを介したものではないと考えられる。

今後、培養大脳皮質ニューロンおよび PC12h-R 細胞に対する EGF 作用の詳細な解析や比較は、EGF の神経栄養因子としての作用機序の解明につながると考えられる。また、PC12h-R 細胞は、EGF のニューロンに対する栄養因子作用を研究する上でのよいモデルとなるのではないかと我々は考えている。

図1.

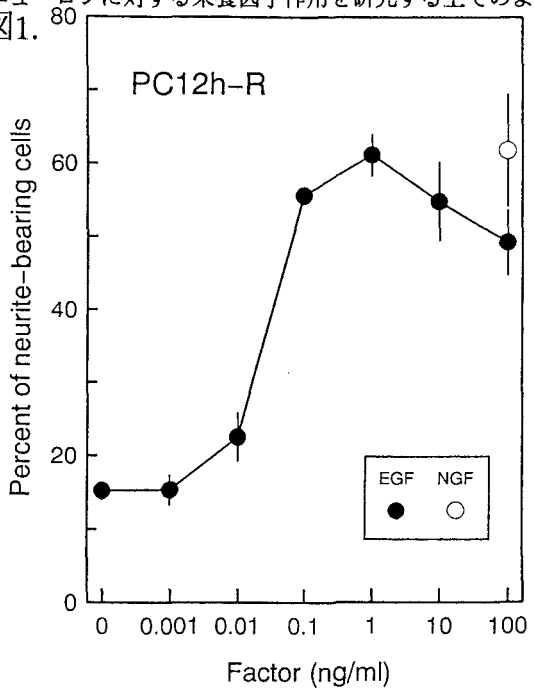


図2.

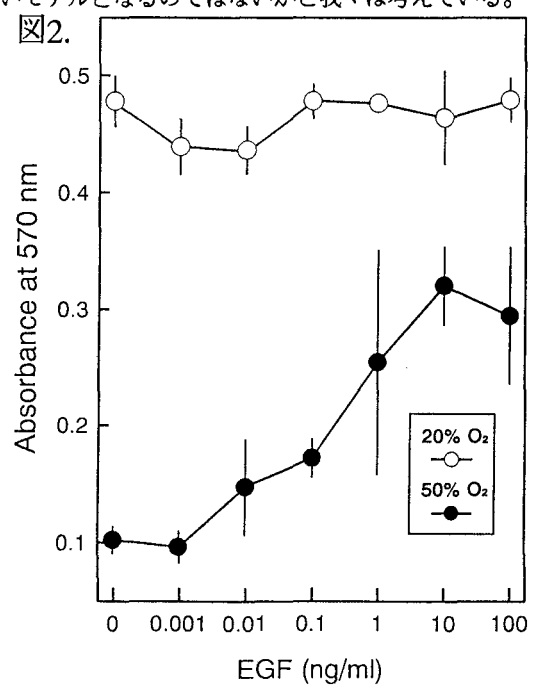


図1. EGF による PC12h-R 細胞の突起伸展。 PC12h-R 細胞を100ng/ml NGF 添加 (白丸、○)、および EGF 濃度を変えて (黒丸、●) 2日間培養した後、細胞の直径の2倍以上の長さの突起を持つ細胞の割合を測定した。

図2. 高酸素負荷による大脳皮質ニューロンの細胞死に対する EGF の抑制効果。 大脳皮質ニューロンを EGF の濃度を変えて20% (白丸、○) および50% (黒丸、●) 気相酸素下で2.5日間培養した後、MTT 法により生細胞を定量化した。

【文献】

(1) 山田雅司、池内俊彦、畠中　寛 (1993) 神経化学 32, 134-135.
(2) Morrison, R. (1993) Neurotrophic Factor, Academic Press, 339-357.
(3) Enokido, Y. et al. (1992) Brain Res. 599, 261-271.
(4) Enokido, Y. and Hatanaka, H. (1993) Neurosci. 57, 965-972.
(5) Hatanaka, H. and Tsukui, H. (1986) Dev. Brain Res. 30, 47-56.
(6) 畠中　寛 (1990) 神経生化学マニュアル, 羊土社, 106-110.

206　ラット胎仔脳ニューロン前駆細胞のソーティングの検討

由之端万里、塚田裕三
(創価大学・生命科学研究所)

〔要約〕プライマリーカルチャーに供するニューロン前駆細胞（NPCと略称）は神経管の組織を構成する主要細胞の一つであり、種々のタンパク性因子によって増殖分化し、発生初期の神経細胞の増殖分化の研究に適している。しかし、フィブロブラスト等の細胞からなるべく早く分取することが研究条件には望ましい。そこで我々は、フローサイトメトリーがNPC分取法として有効かどうかを検討した。その結果、短時間にフィブロブラストを含まない高純度のNPCがソーティングできることが示唆された。

［はじめに］

哺乳動物の神経細胞、ニューロンの起源は胎仔の初期の神経管から、管の内腔の一層を構成する分裂能を持つ細胞が増殖、肥厚して上衣層を形成し、さらに外側に移動してニューロンに分化する。胎仔脳のプライマリーカルチャーでは増殖の盛んなNPCを単離後培養する種々の方法[1]があるが、神経管形成時（E12）の胎仔脳では髄膜の剥離が難しく、培養するとフィブロブラストの混入を認める。またNPCはフィブロブラストと容易に接着して形態変化することから液性因子のNPCに対する作用を反映させるには、NPCを短時間で純粋に単離することが重要であり、これが満たされれば増殖分化の研究に寄与できる。

今回、フローサイトメーター（以下FCMと略称）を用いてトリプシン処理後の細胞懸濁液からNPCのみをソーティングし、プライマリーカルチャーを試みた。

［実験方法］

1）細胞懸濁液の調整：ラット胎仔（E12）の神経管の後脳と髄脳の境界を実体顕微鏡下で切断し、前脳を含む胎仔脳を得た。その胎仔脳を0.5%トリプシン、0.04% DNaseと共にインキュベートした後、洗浄し、１０%FBSを含むDF倍地中でピペッティングして細胞懸濁液とした。

2）フローサイトメトリー：FCM（EPICS）はアルゴンレザーの488nm（15mW出力）により、100μmのポアサイズのフローセルを用いた。シース液は予め滅菌ろ過したPBSとした。細胞懸濁液中の細胞の解析は個々の細胞がレザーに照射された時に生ずる散乱光の強度をパラメーターとするLight Scatter Analysisによった。この方法ではレザーに照射された細胞の散乱光の0°方向（Foward scatter、FSと略称）と90°方向（Side scatter、SSと略称）を検出し、測定結果はワークステーションの画面上にFSとSSの２パラメーターとして細胞の分布と密度からなるサイトグラムをディスプレイできる。１つのドットは個々の細胞を表わし、その分布は細胞の大きさと細胞質構造の違いを反映している。目的の細胞はサイトグラムの細胞の分布から推定できれば画面上で領域を指定してソーティングできる。FCMの感度と分解能の至適条件の設定は蛍光標識のビーズ（DNA check）によった。

3）細胞培養：無菌的に分取した細胞は１%のコンデションメディウムを含む無血清培地[2]（Insulin, Transferrin,Putrescine,Progesteron／DF）中で、予めポリエチルイミンをコートしたチェンバースライドにて３７℃、５%CO_2で培養した。培地交換は２－３日ごとに行った。

［結果］

細胞懸濁液中のNPCの同定：ラット胎仔脳からトリプシン処理で得た細胞懸濁液をFCMに適応すると、FSとSSのパラメーターによりFig.1aに示すような細胞分布が画面上にディスプレイされた。目的の細胞集団を同定するために、Murphyら[3]及びKitaniら[4]の方法（培養法）を準処して得た３つの細胞集団のそれぞれと比較検討した。培養法では細胞の接着性の違いにより、Homophilic aggregationを惹起して細胞塊を形成するNPC、短時間にプラスティクへ接着するフィブロブラスト等、また接着せずに浮遊したままの細胞の３種に分かれた。これらを別々に集め、NPC及びフィブロブラストについてはトリプシン処理で再度、細胞懸濁液とし、FCMによる解析を行った。その結果をFig.1b（NPC）、Fig.1c（フィブロブラスト）、

Fig.1d（浮遊細胞）に示した。

胎仔脳からトリプシン処理で得た細胞懸濁液（Fig.1a: Whole cells）と培養法で調整したNPC（Fig.1b）を比較すると、Fig.2a（Whole cells）の楕円形のマークの位置に相当する細胞集団が目的のNPCであることが同定できた.

ソーティング及び培養：Fig.2aで、楕円形のマークの位置の細胞をソーティングした後、再度FCMに適応して解析した結果をFig.2b に示す。またソーティング後の細胞は培養した。培養直後をFig.3aに示し、2日後にはニューロン様の突起を認めた（Fig. 3 b）。

［考察］

胎仔脳のプライマリーカルチャーではフィブロブラストなどNPC以外の細胞の混在が認められる.既法では細胞接着の差や選択培地などの方法を用いてNPCを高純度に分離している。しかし、このような条件でも、NPCの分離の過程でフィブロブラストとの接触を伴う。そのため一夜も培養すると既に分化の形態が観察される。それゆえ、発生初期のNPCの増殖分化の研究にはまずNPC分離法が問題である。 今回、神経管から酵素処理した細胞懸濁液を直ちにFCMに適応し、短時間に高純度のフィブロブラストを除外したNPCが分離される可能性が示唆された。現在、この系で如何なる分化因子が関与しうるかについて検討をしている。

Fig.1

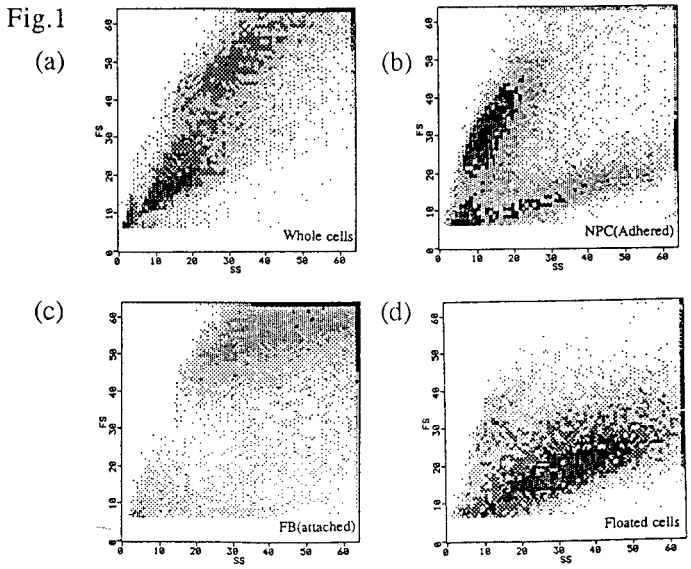


Fig.2

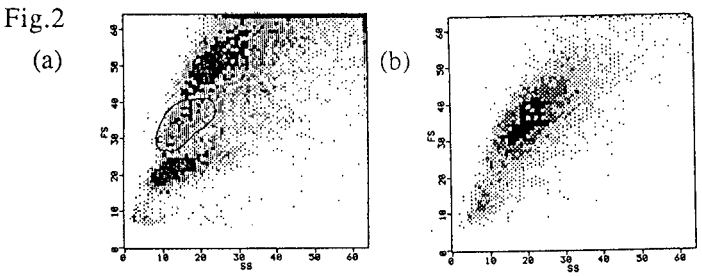
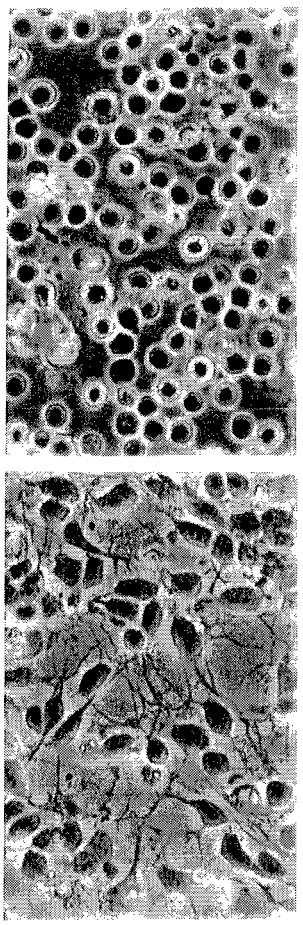


Fig.3



［文献］

1. C Gensburger, G Labourdette, and M Sensenbrenner. (1987) FEBS Lett. 217,1-5
2. BA Reynolds, W Tetzlaff, and S Weiss (1992) J Neurosci. 12, 4565-4574
3. M Murphy, J Drago, and PF Bartlett. (1990) J Neurosci Res. 25, 463-475
4. H Kitani, R Shiurba, T Sakakura, and Y Tomooka.(1991) In vitro Cell. Dev. Biol. 27A, 615-624

207　リン酸化ペプチドによるNGF シグナル伝達経路の解析

下家　浩二、山田　雅司、池内　俊彦、相本　三郎[1]、田中　真人[2]、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成、[1]蛋白質工学基礎研究センター、[2]三菱化成生命研）

〔要約〕
細胞膜上に存在する膜貫通型チロシンキナーゼTrkA は 神経成長因子（NGF） と結合することにより細胞質側に存在するチロシン残基が自己リン酸化される。このリン酸化が NGF シグナルの細胞内への伝達の引き金となっている。そこで、TrkA の細胞質側に存在する 10 ヶ所のチロシン残基を含むチロシンリン酸化ペプチドを合成し、シグナル伝達に必須なチロシン残基の同定を試みた。まず、これらリン酸化ペプチドおよびコントロールの非リン酸化ペプチドをマイクロインジェクション法によりPC12h-R 細胞に取り込ませ、TrkA の特定チロシンリン酸化部位に結合するシグナル伝達タンパク質がリン酸化ペプチドによってTrkA への結合阻害がかかると考えられる系を構築した。これにより突起伸長をもたらすシグナル伝達経路が遮断されるか否かを調べた。

神経成長因子 (NGF) のレセプターである TrkA は細胞膜上に存在する膜貫通型チロシンキナーゼで、NGF が結合することで自己リン酸化し、細胞質側のチロシン残基がリン酸化される。リン酸化したチロシン残基の近傍において、Shc、PI-3'kinase の p85 subunit、PLC-γなどのシグナル伝達タンパク質が結合することが知られている（ 1, 2, 4 ）。このメカニズムによって特定のチロシン残基からのリン酸化シグナル伝達経路が活性化し、遺伝子発現を伴う細胞の分化、生存へと導かれる。そこで、特定チロシン残基からのシグナル伝達の存在を明らかにすることを目的として TrkA の特定リン酸化チロシン残基を含むリン酸化ペプチドを合成し、マイクロインジェクション法により PC12 細胞中に取り込ませることにした。用いた細胞はPC12h-R 細胞で、この細胞は、PC12h細胞よりサブクローン化されたもので、NGF による応答が早く、1〜2 日後に十分な突起伸長を見ることのできる細胞である。我々は、この細胞を用いることでリン酸化シグナルに関する以下の解析を行った。

これらのペプチドにより、通常 TrkA に結合するシグナル伝達タンパク質は結合阻害を受け、結果としてPC12h-R細胞は突起伸長を阻害されることが期待される。今回、Shc、PI-3' kinaseのp85 subunit、PLC-γのそれぞれが結合するドメインのリン酸化ペプチドのマイクロインジェクションを試み、突起伸長を指標にした解析を行ったので報告する。

[実験方法]

リン酸化ペプチドの合成：ペプチドはFmoc アミノ酸を用いる固相合成法により合成した。保護ペプチド樹脂を1 M trimethylsilyl bromide・thioanisole / trifluoroacetic acidで処理し、得られた粗生成物を逆相液体クロマトグラフィーで精製した。精製したペプチドを質量分析およびアミノ酸分析により確認した。PC12h-R細胞の培養：PC12h-R 細胞の培養は既報通りおこなった (3)。細胞はポリエチレンイミンならびにコラーゲンコートしたカバースリップ上にまいた。マイクロインジェクション後の細胞は、36時間培養した。 蛍光抗体染色：各種ペプチドのマイクロインジェクションは、緑膿菌ベリプラズムのタンパク質BraC に核移行シグナルを融合させたP4K4BraC(T) と混合して行った。抗 BraC 抗体による間接蛍光抗体法で特異的に核が染色される細胞をマイクロインジェクションの陽性細胞とした。

[結果と考察]

Fmoc 固相合成法に従って、表1に示す 10 種のペプチドを合成した。このうちサンプル番号 Y499 の位置に Shc、Y760d の位置に PI-3'kinase p85 subunit、Y794 の位置に PLC-γ がそれぞれ結合することが報告されている（2、4）。今回、Y499 と Y760d から開始すると考えられるシグナル伝達経路を遮断することによる効果を見るために、Y499 と Y760d を同時にインジェクトした。また、インジェクトした細胞は、NGF 存在下と非存在下に分けて培養した。コントロールとして、非リン酸化ペプチドをインジェクトしたが解析するに至っていない。そこで、Y499 と Y760d を同時にインジェクションした細胞とインジェクションされていない周辺の細胞について比較検討した。NGF 存在下では、Y499 と Y760d を同時にインジェクションしたにもかかわらず、有意な差は見られなかった。NGF 非存在下でも差がみられなかった（表2）。このことは、TrkA の Y499 と Y760 のチロシンリン酸化部位はシグナル伝達には必ずしも必須なものではなく、他のチロシンリン酸化部位を経由してシグナルが伝達されていることが考えられる。現在、Y794 など他のリン酸化ペプチドについてもマイクロインジェクションによる解析を進めている。

[文献]

(1) Obermeier, A., et al.(1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22963-22966. (2) Loeb, M. D., et al.(1994) *J. Biol.Chem.* **269**, 8901-8910. (3) 畠中 寛 神経生化学マニュアル, 羊土社, (1990) 106-110. (4) Stephens, M. R., et al.(1994) *Neuron* **12**, 691-705.

表1

SAMPLE	SEQUENCE	SAMPLE	SEQUENCE
Y499	MENPQ*YFSDTCVH	*Y684*	YSTDY*YRVGGRTM
Y594	MVFE*YMRHGDLN	*Y704*	PESIL*YRKFSTES
Y643	AAGMV*YLASLHFV	*Y726*	WEIFT*YGKQPWYQ
Y679	MSRDI*YSTDYYRV	*Y760d*	PDV*YAIMRG
Y683	IYSTD*YYRVGGRT	*Y794*	LAQAPPS*YLDVLG

表2

SAMPLE	INJECTED CELL NUMBER	NEURITE BEARING CELL NUMBER (%)
Y499&Y760d+NGF	23	10(43.5)
NO SAMPLE +NGF	27	10(37.0)
Y499&Y760d-NGF	26	1 (3.8)
NO SAMPLE -NGF	20	0 (0.0)

表1　リン酸化チロシン残基を含む合成ペプチドのアミノ酸配列
TrkA の細胞質側に存在するチロシン残基の周辺のアミノ酸配列に相当するリン酸化ペプチドを合成した。＊はリン酸化チロシン残基を示す。

表2　マイクロインジェクトした合成ペプチドの突起伸長阻害効果
マイクロインジェクション後、36 時間で細胞の突起伸長を測定した。インジェクトされた細胞(蛍光ラベルされた細胞)(1 行目と 3 行目)とインジェクトされなかった周辺の細胞 (2 行目と 4 行目) における結果を示す。細胞体の 1 倍以上の長さの突起を持つ細胞数を計測した。

208 PC12D細胞におけるMAPキナーゼ(ERK1&2)の活性化および細胞内移動

佐野 護、岩永 操
(愛知県コロニー研究所、形態学部)

〔要約〕
1、PC12D細胞は、NGF,dbcAMP,Staurosporine(SS)により、数時間で神経細胞様形態分化が誘導される。ERK1,ERK2の活性化は、NGF、FGF処理した細胞で顕著に認められたが、dbcAMP,PMAでは、わずかに、またSSでは認められなかった。
2、NGFによって活性化されたERK1およびERK2は、10分後に核への移行現象が観察されたが、同様の形態変化を誘導するdbcAMP,SSでは、その様な変化は観察されなかった。
3、MAPキナーゼの活性化と細胞分化の密接な関連性を考える仮説があるが、少なくとも、dbcAMP,SSによるPC12D細胞の分化誘導過程は、MAPキナーゼの活性化を経由しないと考えられる。

［目的］MAPキナーゼ(MAPK=ERK)カスケードは、細胞外からの信号を細胞内に伝達する普遍的な機構として認識されつつある。PC12細胞では、NGFによって、迅速且つ持続的なMAPKの活性化が引き起こされ、交感神経様細胞分化が誘導される事実から、MAPKカスケードが神経分化誘導に介在する可能性が示唆されている（1-3)。PC12細胞に一定の分化誘導を示すcAMP上昇薬やPMAにもMAPK活性化能が認められている(3,4)。EGF, K^+,カルバコールによるMAPK活性化は持続性がない点で、分化誘導能を示さない事と関連付けて解釈出来る(1,4,5)。MAPKは免疫蛍光による観察から、活性化されると核への移行が報告され、遺伝子制御にかかわる可能性が示唆されている(6,7)。著者らの用いているPC12D細胞は、NGFやdbcAMP処理により、新たな遺伝子発現を経ず、数分で形態変化が生じ、数時間内に神経突起が誘導される(2,8,9)。 またPC12D細胞では、極低濃度のスタウロスポリン(SS)が、NGF同様に神経突起を誘導する(10)。PC12D細胞に於いて、MAPK（ERK1&2)抗体を用いて、酵素活性の測定やその局在変化を調べ、細胞形態分化と本酵素の関係について検討した。

［実験方法］(1)細胞抽出 細胞をHEPES-Hanksで3回洗浄後、同液中でNGF,dbcAMPなどを加え、37度で培養された細胞の0.1%SDS抽出液を得、免疫沈降やウエスターンブロットの試料として供した。(2)ウエスタンブロット SDS-PAGE(13%)で分離後、ニトロセルロースにブロットし、抗ERK1、抗ERK2(UBI社製)を用い、ABC法で染色した。(3) MAPK活性の測定 抗ERK抗体結合ProteinA-Agaroseと沈降した酵素分画と^{32}P-ATP, MBP(Myelin Basic Protein)を反応、SDS-PAGE(13%)を行い、MBPへの燐酸の取り込みを調べた。(4) 免疫蛍光 Poly-Lysコートしたカバースリップ上に培養したPC12D細胞を用いた。培養液にNGFなどを添加し、インキュベーション後、パラフォルムアルデヒド溶液(3.7%)で固定、0.1%トリトンX100で処理し、ABC法、最後にストレプトアビジンフローレッセインで蛍光染色した。

［結果と考察］NGF, bFGF処理された細胞抽出液中のMAPK活性を調べた結果、対照に比べ明確な活性上昇が認められた。dbcAMP、PMAにも一定の活性化が見られたが、SSによる活性上昇は見られなかった（図1）。抗ERK1, 抗ERK2抗体それぞれによる細胞抽出液のウエスターンブロットのバンドは、44Kおよび42K付近に認められた（図2）。ERK1はNGFにより活性化されると、高分子側のシフトバンドが厚くなる変化が認められたが、SS,dbcAMPなど処理後の細胞抽出液には見られなかった（図2）。 これは、燐酸化により活性化されたERK1酵素蛋白と解釈されている。 PC12D細胞では、dbcAMP,SSによって、NGFの場合と同様の神経突起誘導が起こる。これらの事実から、全ての神経突起誘導がMAPKの活性化を介して起こるとの仮説は否定されると思われる。 ERK1, ERK2抗体に反応する抗原の免疫蛍光法による細胞内局在を調べたところ、いずれも細胞質に微慢性の広がりを見せたが、NGF処理後、10分で既に,ERK1, ERK2いずれも核への移行が認められた（図3）、しかし,dbcAMP、SSの場合には、類似の変化

を認める事が出来なかった（図省略）。Conventional なPC12細胞では、細胞分化は一般に数日を要し、新たなRNA合成が必要とされる。Conventional なPC12細胞を用いて, NGF処理後 30-90分で、ERK1の核への移行を認めたTraverseら は、核へ移行したMAPキナーゼが、RNA合成制御を介して、その後に起こる細胞分化を誘導すると解釈している(6)。しかし、PC12D細胞では、MAPKの核移行と同時期に、既に細胞形態の劇的な変化が進行する(9)。 しかも、形態分化誘導に必ずしも新たなRNA合成が必要とされない事実も既に報告した(8)。 従って、NGFによって生じる敏速なMAPKの核移行は、細胞分化誘導の全体に関わるプロセスとは考えられない。 PC12D細胞で得られた、MAPKの活性化および核移行現象の観察は、本酵素がNGFシグナルを細胞の分化誘導に導く1プロセスとして、どのように位置付けられるかについて、新たな示唆を提供すると思われる。MAPKの核移行については、NGFによる形態分化の際のみに、観察された点で、信頼度が高く、今後この現象の解析に、有効な系と思われる。

図1、免疫沈降MAPKによるMBPの燐酸化のオートラジオグラフィー
細胞を10分間、無添加(1),SS (2), PMA (3), dbcAMP(4), FGF(5), NGF(6)で処理した。

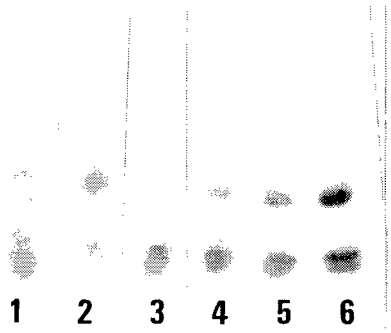


図2、抗ERK1、抗ERK2によるイムノブロット
(1)対照、(2 SS, (3) NGF10分処理細胞

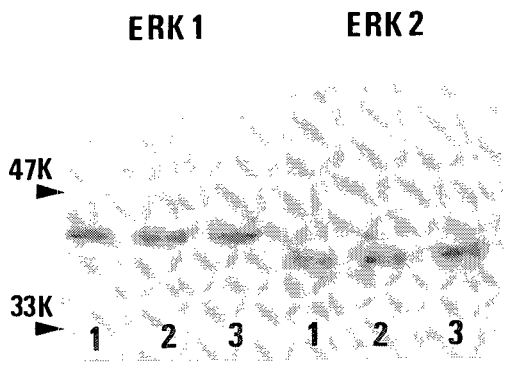
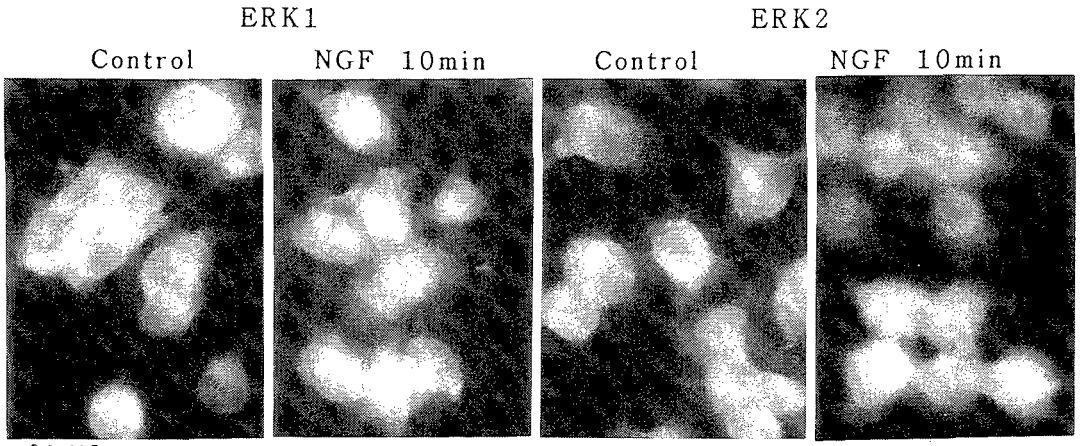


図3、NGFによるERK1, ERK2 の核移行を示す免疫蛍光写真



[文献] (1) Gotoh et al.(1990) *Eur.J.Biochem.* 193, 661. (2) Sano et al.(1990) *J. Neuro· chem.*55, 427. (3) Lloyd and Wooten (1992) *J.Neurochem.*59,1099. (4) Frodin et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 6207. (5) Constance et al.(1990) *J. Cell Biol.*110, 731. (6) Traverse et al. (1992) *Biochem.J.* 288, 351. (7) Nguyen et al. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 9803. (8) Sano and Kitajima (1992) *J.Neurochem.*58,837. (9) Sano and Iwanaga (1992) *Cell Str. Func.* 9, 341. (10) Sano et al.(1994) *Brain Res.* 639, 115.

209　PC12細胞におけるInterleukin-6の細胞死抑制作用

梅垣宏行[1]　山田清文[2]　内藤通孝[1]　亀山　勉[3]　井口昭久[1]　鍋島俊隆[2]
（名古屋大学・医・老年科[1]　名古屋大学・医・医療薬学・病院薬剤部[2]
名城大学・薬・薬品作用[3]）

〔要約〕
Interleukin-6（IL-6）はNGFと同様にPC12細胞を神経細胞様に分化させることが報告されている。今回我々はPC12の細胞死に対するIL-6の作用を検討した。血清除去によりPC12は細胞死をおこすが、IL-6は有意にその細胞死を抑制した。しかし、IL-1α,IL-1β,およびIL-2はPC12細胞の細胞死に対して25から100ng/mlの濃度範囲では影響をおよぼさなかった。IL-6の細胞死抑制作用は血清除去の前後に添加すると血清除去と同時に添加した場合と比較して有意に増強された。またCaイオノフォア（A23187）添加によるPC12の細胞死に対してもIL-6は抑制作用を示した。以上の結果よりIL-6はPC12の細胞死に対して抑制的な作用を有することが示唆された。

〈緒言〉　近年アルツハイマー病脳に，免疫系サイトカインであるIL-6が存在することが証明され同病の病理にIL-6が関与しているという仮説(1)が提唱されるなど中枢神経系と免疫系との相関が注目されている。IL-6はPC12を神経細胞様に分化させること(2)、およびラットの培養神経細胞の生存を延長させること(3)(4)が報告されており、神経栄養因子としての作用を有することが示唆されている。今回我々はPC12を用いてIL-6の細胞死に対する作用を検討した。

〈方法〉　PC12細胞は５％馬血清、10％牛胎児血清　ペニシリンG（50U/ml）、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（+））にて培養した。IL-6は0.1％のBSAを加えたPBSに溶解した。
血清除去の実験では細胞をPBSと無血清のDMEM（DMEM（-））にて洗浄したのちコラーゲンコートしたプレートに1～1.5×10⁴個/cm²の密度でDMEM（-）にて培養した。
A23187はDMSOに溶解し、DMSOの最終濃度が0.1％となるようにDMEM（-）で希釈した。
生存細胞数の定量は、血清除去では48hr後、Caイオノフォア添加では24hr後にMTT法(5)、もしくはLDHの培地中への漏出量を測定することにより行った。

〈結果と考察〉血清の除去により生存細胞数は経時的に減少し、血清除去の48hr後には約30％に減少した。PC12細胞の血清除去による細胞死に対してIL-6は有意な抑制作用を示したがIL-1α,IL-1β、IL-2は25～100ng/mlの濃度範囲では抑制作用を示さなかった。（図１）ＤＭＥＭ（+）での培養ではIL-6は今回用いた濃度範囲でPC12の生存に影響を与えなかった。
血清除去によるPC12の細胞死に対するIL-6の抑制作用は抗IL-6抗体によって拮抗された。
これらの実験では血清除去と同時にIL-6を添加したが、次に50ng/mlのIL-6を血清除去の20hr前より処置したところその作用は有意に増強された。（図２）
また，A23187（１μM）の添加によってもPC12の細胞死が誘発されたが、IL-6はこのCaイオノフォア誘発性の細胞死に対しても抑制的に働いた。（図３）

IL-6はNGFと同様にPC12細胞を神経細胞様に分化させることが報告されているが、今回の結果より、細胞死に対する保護作用も有することが明らかになった。

血清除去あるいはCaイオノフォア添加によるPC12の細胞死はアポトーシスによるとの報告があり、 IL-6の細胞死抑制の機序の解明はアポトーシスの解明にも繋がりうるものとして興味深い課題である。

謝辞：IL-6を提供して頂いた大日本製薬株式会社、IL-1αとIL-1βを提供して頂いた大塚製薬株式会社、IL-2を提供して頂いた武田薬品工業株式会社に感謝いたします。

文献：1) Vandemaeele,P.et al(1991) Immunol.Today12,217-219

2) Satoh,T.et al. (1988) Mol.Cell.Biol.8,3546-3549

3) Hama,T.et al(1989) Neurosci, Lett, 104 340-344

4) Hama,T.et al (1991) Neuroscience,40,453-464

5) Mosmann,T.(1983) J.Immunol Methods,55-63

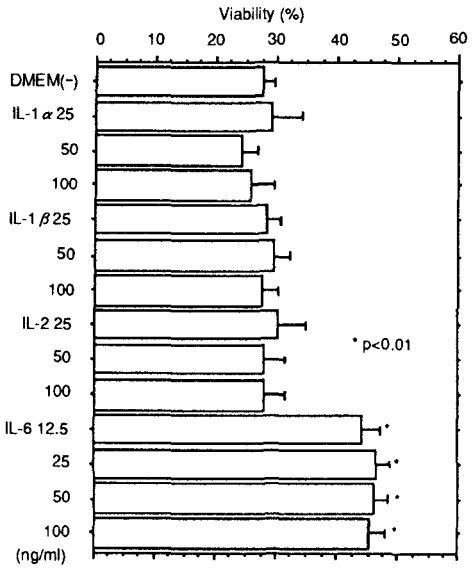
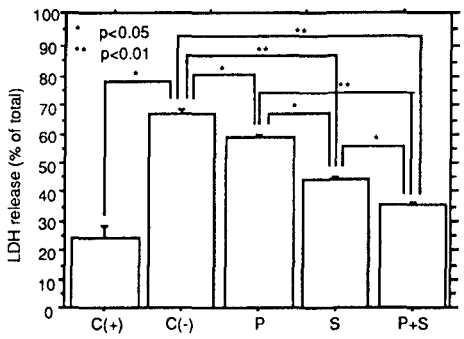


図1.血清除去に伴うPC12の細胞死に対する各種interleukinの作用 (MTT assay)
viability：DMEM(-)で培養開始時の細胞数を100%とする



C(+)：control (DMEM(+))
C(-)：control (DMEM(-))
P：血清除去20hr前にIL-6 50ng/ml添加し、血清除去後はIL-6添加せず
S：血清除去と同時にIL-6 50ng/mlを添加
P+S：血清除去20hr前よりIL-6 50ng/mlを添加し、血清除去時に再度IL-6 50ng/mlを添加

図2. 血清除去によるPC12の細胞死に対するIL-6の作用

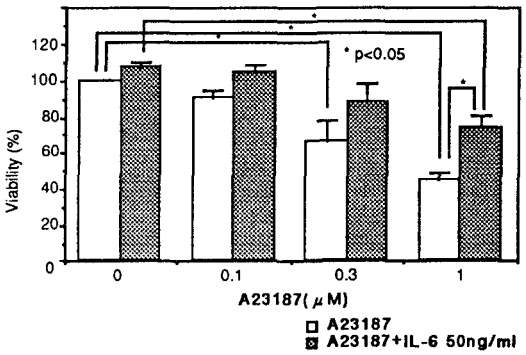


図3. A23187添加によるPC12の細胞死に対するIL-6の作用 (MTT assay)

210 Dibutyryl cyclic AMPにより分化誘導されたアストロサイトのNGF産生と神経栄養効果

左合正周、吉田一成、上口裕之、稲葉　真、大谷光弘、戸谷重雄
（慶應義塾大学医学部脳神経外科）

〔要約〕

アストロサイトは種々の神経栄養効果を有すると考えられ、今までに、培養アストロサイトのNGF産生がサイトカインの刺激により協調的に増強されるとともに、NGFを介さない神経栄養効果の増強もみられることを明らかにしてきた。一方、培養アストロサイトはdibutyryl cyclic AMP (db-cAMP)により細胞分化に影響を受けることが知られている。今回は、アストロサイトの神経栄養効果に対するdb-cAMP前処置とサイトカインの刺激の影響について検討を行った。IL-1β、TNF-αの刺激によるNGF産生能増強はdb-cAMP未処置のアストロサイトの方が強く認められ、中隔野ニューロンとアストロサイトのco-culture系におけるIL-1β、TNF-αのアストロサイトを介する中隔野ニューロンのCAT活性増強効果は、db-cAMPにより前処置された方が強く認められた。以上より、db-cAMPによる分化誘導により、アストロサイトのサイトカインによる神経栄養効果調節が変化することが示された。

［目的］

これまで、培養アストロサイトのNGF産生、およびnon-NGF type cholinergic neurotrophic activityが、acidicおよびbasic fibroblast growth factor (FGF)、interleukin 1-β (IL-1β)、tumor necrosis factor-α (TNF-α)などのサイトカインの刺激により協調的に増強されること、サイトカインはアストロサイトを介し中隔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てきた[1,2,3]。一方、培養アストロサイトはdb-cAMPにより分化誘導を受けることが知られている[4]。今回は、db-cAMP前処置より分化誘導を受けたアストロサイトの神経栄養効果に対するサイトカインの影響について検討を行った。

［方法］

1．アストロサイトのNGF産生調節

ラット新生仔海馬及び大脳皮質組織片を10%FCS添加DMEM/F-12にて初代培養を行い、酵素処理により継代したアストロサイトを24-well culture plateにて2.0 x 10^5/wellの細胞密度で培養を開始した。培養開始24時間後よりdb-cAMP (1 mM) を48時間作用させPBSで洗浄後、無添加、及びIL-1β (50units/ml)＋TNF-α (100ng/ml)を添加した培養液にて12時間培養後、培養液中のNGFを2-site ELISAにて定量した。また、各wellの細胞数をトリプシン処理後Coulter counterにて測定した。

2．中隔野ニューロンとアストロサイトのco-culture系における検討

同様にアストロサイトの培養を行い、その上にラット胎生16日中隔野由来細胞をトリプシン処理し、1%BSA添加N2にてco-cultureを行った。24時間後よりIL-1β (50 units/ml)＋TNF-α (100 ng/ml)を添加し、4日間培養後CAT活性を測定した。

［結果］

db-cAMP未処理のアストロサイトのほうが、IL-1β+TNF-αの刺激によりNGF産生量は増強された。また、db-cAMP処理によりアストロサイトは上皮様から、星状に形態が変化するとともに、増殖は抑制された(Fig.1)。中隔野コリン作動性ニューロンのCAT活性は、IL-1β+TNF-αを添加しない場合では、db-cAMP処理による変化は認められなかったが、IL-1β+TNF-αの刺激によるCAT活性の上昇は、db-cAMP処理されたアストロサイトのほうが、未処理のものより強く認められた(Fig.2)。

［結論］

db-cAMPにより分化誘導を受けたアストロサイトの中隔野コリン作動性ニューロンに対する神経栄養効果はサイトカインにより活性化されるが、そのメカニズムは、分化誘導前と比し変化している可能性が示唆された。

Fig. 1 : NGF production of astrocyte:
Effect of cytokines and db-cAMP pre-treatment

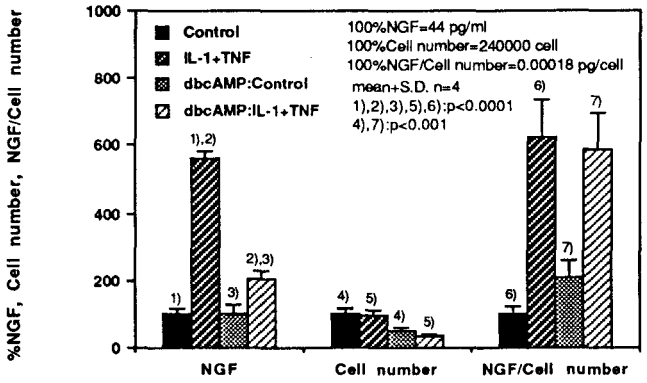
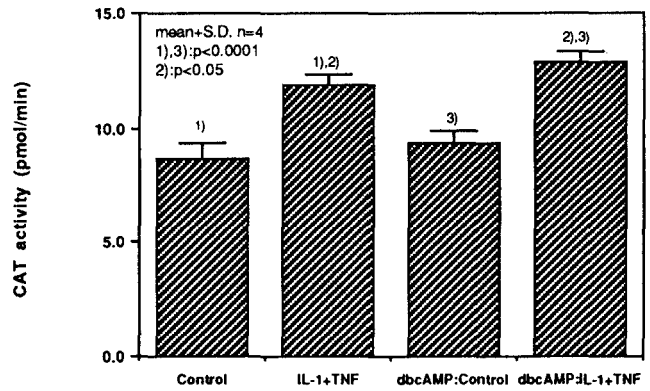


Fig. 2 : CAT activity of septal neurons co-cultured with astrocytes:
Effect of cytokines and db-cAMP pre-treatment



1. Yoshida K. and Gage F.H. (1992) Brain Res. 569, 14-25.

2. Yoshida K., et al. (1992) J. Neurochem. 59, 919-931.

3. 左合正周, 他. (1993) 神経化学 32 (1), 396-397.

4. Bridoux A-M., et al. (1986) Dev. Neurosci. 8, 31-43.

211 培養脳軟膜細胞はIGF-II/IGFBP-2とβ-trace proteinを産生する

石川巧一、大江良秀、壁谷建志、*篠田元扶、立元一彦
群馬大学・内分泌研究所・生理学、*医学部・動物実験施設

〔要約〕 脳軟膜（pia materとarachnoid）の生理機能を追究する為に、脳軟膜細胞の培養系を確立し、得られた条件培養液中に存在する主要蛋白質の単離・同定を行なった。SDS-PAGEにより、5個（7 kD, 16 kD, 18 kD, 27 kDと32 kD）の主バンドが確認された。精製した蛋白それぞれのN末端アミノ酸配列を解析し、7 kD蛋白のアミノ酸配列はIGF-IIに、16 kD, 18 kD並びに32 kD蛋白はIGFBP-2のアミノ酸配列に一致することが判明した。また、27 kD蛋白を酵素分解して得られたペプチドのアミノ酸配列はβ-trace protein（プロスタグランヂン-D-合成酵素）のそれと一致していた。これらの実験成績は脳軟膜が脳／髄液関門や血液循環の調節に関与する以外に、脳実質細胞の生存や機能維持等に関しても重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

[緒言] 脳軟膜が脳／髄液関門や血液循環に関わっていることは従来から知られており、詳細に検討されている。最近、私達は視床下部ー下垂体系において、下垂体摘除（終末切離）により再生されてくるvasopressin神経線維が軟膜の移植片に多量に侵入することを見い出した。この事実は脳軟膜が神経線維の伸展や生存維持にも関与している可能性を示唆している。事実、培養脳軟膜細胞の条件培養液の添加により視床下部神経のin vitroにおける生存率が著しく上昇した。そこで、今回、軟膜の生理作用の一端を更に明らかにする目的で、軟膜細胞の培養系を確立し産生・分泌される主要蛋白を単離・精製し化学的同定を目指した。また、その神経細胞に与える影響も神経培養系を用いて解析した。

[方法] 実験は全てWistar系のラットを用いた。脳軟膜は生後1－2日目の動物から採取した。得られた軟膜は氷冷した10%FCS含有Hepes buffered-DMEM中で細切（<1mm2)し、37℃、5% CO_2下に1週間培養した。混入してくる神経細胞やmicrogliaを取り除いた後、再度1週間培養した後にFCSを含まないDMEMに交換し3－4日間培養したものを条件培養液として採集した。生理活性の検討に用いた神経細胞の培養は既に報告した方法[1]で行なった。

条件培養液（1000 ml）を濃縮したのち、一部をSDS-PAGEにかけ、5個の主要バンドが確認された。予備実験により神経細胞の生存率を上昇させる因子はヘパリンカラムに親和性のあることが確認されたので、同カラムにより4個の分画（flow through, 0.6 M NaCl, 0.8 M NaClと2 M NaCl)を得た。27 kD蛋白はflow through分画から、7 kD, 16 kD, 18 kD 並びに32 kD蛋白は0.6 M NaCl分画から、SDS-PAGE, HPLCなどにより単離・精製した。得られたそれぞれの蛋白のN末端アミノ酸配列を解析した。

[結果] 1、条件培養液の神経細胞生存促進活性はヘパリンカラム0.6 M NaCl分画に溶出される。生存促進作用は大脳皮質、視床下部、並びに小脳の神経細胞に対しても発現する。2、精製蛋白のアミノ酸配列分析の結果は表1にまとめてある。0.6 M NaCl分画に溶出されてくる7 kD蛋白のN末端アミノ酸配列はIGF-IIの部分配列と一致した。また、16 kD, 18 kD並びに32 kD蛋白のN末端アミノ酸配列はIGFBP-2の部分と一致した。3、27 kD蛋白のN末端アミノ酸配列は決定できなかった。ブロックされているものと考えられる。そこで、精製した27 kD蛋白を酵素分解し、得られた2個のペプチドのアミノ酸配列解析を行なった。2個のペプチドのアミノ酸配列はいずれもβ－trace protein(プロスタグランヂン－D－合成酵素）のそれと同一であった。

[考察] 本研究により、条件培養液に含まれる神経細胞の生存促進作用は広範な細胞に対して認められること並びに活性が認められるヘパリンカラム0.6 M NaCl分画にはIGF-IIが多量に存在することが明らかとなった。生存促進因子はIGF-IIと考えられる。IGF-IIは脳内に多量に存在し、脳脊髄液中ではIGFBP-2との複合体として存在していることが知られている。mRNAの分布様式[2]と今回の実験成績を考え合わせると、脳軟膜が脳内のIGF-II/IGFBP-2の主たる産生部位である可能性が示唆される。また、脳脊髄液中に多量に存在するβ－trace protein（＝プロスタグランヂン-D-合成酵素）も脳軟膜で産生していると考えるのが妥当である。プロスタグランヂン-Dは旧来から強い中枢作用を有していること。殊に、睡眠との関わりが指摘されてきたことは、軟膜の生理的役割を考える上で興味深い。いずれにしても、脳軟膜の新しい機能－脳実質細胞の機能や生存維持に関与する可能性－が示唆される。

7 kD-1：		Ala-Tyr-Arg-Pro-Ser-Glu-Thr-Leu-
7 kD-2：		Tyr-Arg-Pro-Ser-Glu-Thr-Leu-(Cys)-Gly-
16 kD：		Met-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-His-Leu-Ser-Leu-
18 kD：		Glu-Val-Leu-Phe-Arg-(Cys)-Pro-Pro-(Cys)-Thr-
32 kD：		Glu-Val-Leu-Phe-Arg-(Cys)-Pro-Pro-(Cys)-Thr-
27 kD	peptide-1：	Phe-Ile-Thr-Phe-Ser-Lys-
	peptide-2：	Glu-Leu-Leu-Phe-Met-(Cys)-Glu-Thr-Val-Val-Ala-Pro-Ser-Thr-Glu-

表1 脳軟膜培養細胞から精製された蛋白質のN末端アミノ酸配列

[参考文献]

1) Ishikawa, K., Ohe, Y., Okutomi, Y., Takeuchi, T., Suzuki, M. (1992) Neuroendocrinology 55,193-198.
2) Bondy, C.A., Werner, H., Roberts, C.T. Jr., LeRoith, D. (1990) Mol. Endocrinol. 4, 1386-1398

212 ウシ脳細胞外マトリックス糖タンパク質と移動型免疫グロブリンスーパーファミリィ分子sGP74

石岡憲昭、佐藤淳子
（東京慈恵会医科大学医科研、生化学）

〔要約〕

神経系培養細胞の突起伸長作用を示す移動型分子sGP74の化学構造を解析した結果、膜結合型の免疫グロブリン（Igs）超遺伝子ファミリィ系タンパク質の一つであるアンキリン結合タンパク質（ABGP186）の細胞外Igs部位と同一であることを明らかにした。一方、ウシ脳細胞外マトリックス糖タンパク質の分離分析を小麦胚芽レクチン（WGA）に対する結合性を指標におこない、主要な糖タンパク質（mGP80と命名）として、分子量（MW）80kDa、等電点（pI）4.0-5.0の酸性タンパク質を精製した。このmGP80は、コンカナバリンA（Con A）に対しても結合性を有していた。またmGP80をリガンドとしたアフィニティカラムにsGP74画分を作用させたところ、移動型分子sGP74と相互作用する可能性を示唆する結果が得られた。

《はじめに》中枢神経系のタンパク質をCon A に対する結合性を指標に、移動型Igsスーパーファミリィタンパク質の検索をおこない、神経突起伸長作用を示す糖タンパク質sGP74の存在を明らかにしてきた[1,2]。我々は、sGP74を含む移動型神経細胞調節因子と相互作用するタンパク質が細胞外マトリックスに存在する可能性を考え、ウシ脳細胞外マトリックス糖タンパク質の分離分析をおこなった。

《実験方法》*1）WGA結合性細胞外マトリックス糖タンパク質の調整：*ウシ脳不溶性画分抽出液をWGA-アフィニティカラムに作用させ、N-アセチル-D-グルコサミン溶出により得た画分をWGA結合性細胞外マトリックス糖タンパク質標品とした。*2）二次元電気泳動：*二次元電気泳動（2DE）は、既報[3,4]の方法に従い、染色は、WGA-及びCon A-パーオキシダーゼ法[4]を用いた。*3）mGP80の分離：*WGA結合性細胞外マトリックス糖タンパク質画分のイオン交換HPLCによる分離後、ゲル濾過カラムを用いたHPLCにより最終的にmGP80を分離精製した。*4）mGP80-アフィニティ：*精製mGP80をアフィゲル10に結合させたアフィニティゲルにsGP74を含むCon A結合性糖タンパク質画分を作用させ、チオシアン酸ナトリウムで溶出した。

《結果》*1）WGA結合性細胞外マトリックス糖タンパク質群の分析：*2DE分析の結果を図1に示した。pI3.5-6、MW60-200kDaの比較的酸性、高分子領域にWGA結合性細胞外マトリックス糖タンパク質群が特徴的に検出された。特にWGAに対して比較的弱い結合性を示すがクマシー染色で検出される主要タンパク質としてpI4.0-5.0、MW80kDaの位置にmGP80を同定した（図1の↓）。*2）mGP80の分離精製：*イオン交換HPLCにより得たmGP80画分をゲル濾過HPLCに添加し、最終的にmGP80を精製した。図2の矢印で示したようにmGP80は、ほぼ単一ピークとして分離溶出され、SDS電気泳動のクマシー染色及びWGA染色は単一バンドを与えた（図3）。*3）mGP80-アフィニティ：*mGP80-アフィニティにより得たチオシアン酸ナトリウム溶出画分のSDS電気泳動の結果、sGP74との親和性

が示された（図4）。さらにsGP74以外にもMW約120kDaのタンパク質に対する親和性も明らかになった。

《考察》sGP74を含む移動型神経細胞調節因子と相互作用するタンパク質が細胞外マトリックスに存在する可能性を考え、ウシ脳細胞外マトリックス糖タンパク質の分離分析をおこない糖タンパク質mGP80を得ることができた。mGP80-アフィニティの結果、特異性等については、今後の課題としても、移動型免疫グロブリンスーパーファミリィ分子sGP74と相互作用する可能性が示唆された。

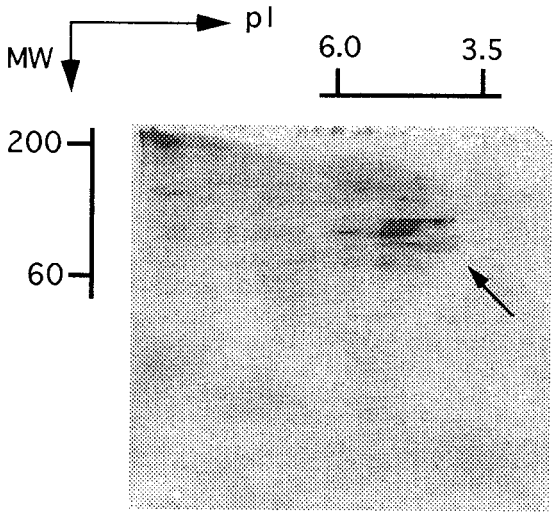


図1、WGA結合性細胞外マトリックス糖タンパク質の2DE分析

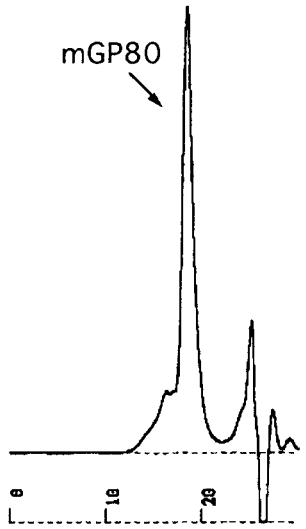


図2、ゲル濾過HPLCによるmGP80の精製

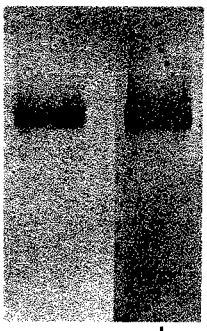


図3、精製mGP80のSDS電気泳動像
a:クマシー染色
b:WGA-パーオキシダーゼ染色

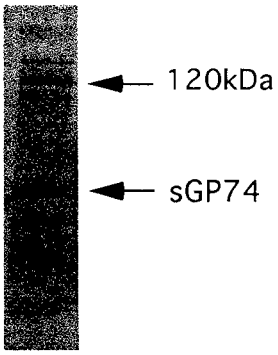


図4、mGP80-アフィニティ

《文献》(1)石岡憲昭、佐藤淳子、中村純太、大久保辰雄、栗岡　晋. 神経化学. 32：406-407(1993). (2) Ishioka,N., Sato,J., and Kurioka,S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199(3):1174-1180(1994). (3) Ishioka,N., Oda,T., Natake,Y. and Kurioka,S. Neurochemical Research, 15:475-481(1990). (4) Ishioka,N., and Kurioka,S. Neurochemical Research, 17:1011-1014(1992).

213 トリプシン処理したヒドラに誘起されるグルタチオン応答を利用した生理活性物質の検出

花井一光

(滋賀医科大学分子神経生物学研究センター・神経化学)

腔腸動物ヒドラの還元型グルタチオンで誘発される持続時間の長い触手球形成応答は超微量の様々の生理活性物質で修飾を受けるという興味深い性質を示す（1,3）。一方この反応はヒドラの飼育場所に依存し、大津で飼育するとそのままではこの反応は発現しない。しかし、餌のアルテミアをふ化させる条件に注意し、ヒドラをトリプシンで処理してやるとこの反応が発現し、生理活性物質感受性も示すようになることがわかった。生きているヒドラをトリプシン処理(0.3 μg/ml)してやると、グルタチオン結合蛋白が顕著に増加した。従って、トリプシン処理を行うことによってより多くのグルタチオン結合部位が露出するものと考えられる。

【序】

ヒドラの触手球形成応答は様々な生理活性物質に敏感に修飾される。演者はこれを福岡の実験室で見出したが、大津では、同じ株のヒドラを同じように飼育しているにもかかわらず、この反応を示さない。しかし大津で飼育したヒドラでもトリプシンで処理してやるとこの反応を示し（2）、適当な活性化条件下では生理活性物質による修飾も起こることがわかったのでこれを報告したい。

【実験方法】

行動応答の調べ方：実験室で飼育しているヒドラを1mM $NaHCO_3$/1mM $CaCl_2$ (BC 液)に移す。この液に３０分以上つけてからトリプシンを加える。規定の時間後新しいBC液に換え応答を調べるまでこのままにしておく。応答を調べる際には１０匹のヒドラをシャーレにとり液を 2 ml, 1 mM PIPES/1 mM $CaCl_2$ に換えた。場合によってはこの時、1 pgの酸性型線維芽細胞成長因子 (aFGF) を加えた。５分静置後、刺激液を加える。刺激液として2 mM S-methylglutathioneを10 μl 加えた（最終濃度10 μM)。応答は刺激後１分ごとに反応しているヒドラをカウントし、６分から１０分までの応答をすべて加算して定量化した。

ヒドラのグルタチオン結合蛋白：トリプシン処理したヒドラ、あるいはトリプシン処理していないヒドラ数万匹をホモジェナイズし、５０％蔗糖液の重層して、遠心後底にに沈む分画を集めた。これを２％オクチルグルコシド液で可溶化した。この可溶化液をグルタチオンを固定化したトヨパールのカラムに乗せ、0.5% NP-40を含むほう酸緩衝液でよく洗った後、吸着した蛋白質を7M Urea/0.05M K_2CO_3/0.5% NP-40で溶出した。これをN-Hydroxysucciimidylbiotinを利用してビオチン化し、SDS電気泳動（５％ゲル）にかけ、PVDF膜に転写した後アルカリフォスターゼ化ストレプトアビジンを利用して蛋白を検出し

た。

【結果と考察】

トリプシン処理による触手球形成応答の活性化：大津で飼育したヒドラもトリプシンで処理してやるとグルタチオン刺激に伴って強い（持続時間の長い）触手球形成応答を示した。この活性化は数分という短時間で起こった（2）。トリプシンの濃度は 10 fg/ml から 1 μg/ml まで有効であった。キモトリプシン、パパイン、トロンビンでも観察されたが、プロテアーゼ K では見られなかった。いずれにしてもトリプシンは調べたプロテアーゼの中では最も強く応答を活性化した。

生理活性物質に対する感受性の発達：次にこうして活性化した応答が生理活性物質による修飾を受けるかどうか調べてみた。本実験では、aFGF の存在下で応答を観察した。すると応答の活性化に応じて、aFGF による応答の修飾が観察された（図 1）。10 pg/ml トリプシンで応答を活性化した場合には処理後 6 時間で応答を有意に抑制した。100 pg/ml トリプシンで活性化した場合には、処理後 3 0 分ですでに応答は抑制されていた。1 ng/ml の場合には処理直後には応答は抑制されたが、3 時間後には抑制は見られなくなった。これから、aFGF 感受性を示すためには最適なトリプシン処理条件があることがわかる。

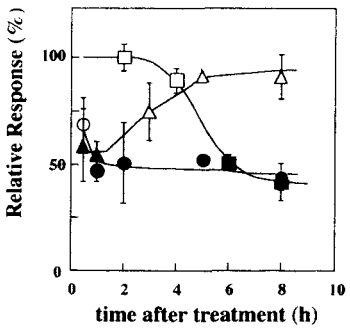


図 1　グルタチオン応答の aFGF 感受性の発達
ヒドラを 5 分間トリプシンで処理してからグラフで示された時間放置後、0.5 pg/ml aFGF 存在下での応答を測定した。□）、10 pg/ml ；○）、100 pg/ml ；△）、1 ng/ml　トリプシンで処理。黒印は aFGF 非存在下のものより有意に($p<0.01$) 抑制された応答を示す。

トリプシン処理によるグルタチオン結合蛋白の増加：グルタチオン結合蛋白をグルタチオントヨパールに結合する蛋白として分離した。ヒドラを生きている状態でトリプシン処理 (0.3 μg/ml) してからグルタチオン結合蛋白を分離すると、顕著に強いバンドが検出された。従って、トリプシン処理を行うことによってより多くのグルタチオン結合部位が露出することが考えられる。

【文献】

(1) Hanai, K., Kato, H., Matsuhashi, S., Morita, H., Raines, E., Ross, R. (1987) J. Cell Biol. 104, 1675-1681

(2) Hanai, K., Matsuoka, Y. (1994) Olfaction and Taste XI, in press

(3) Hanai, K., Oomura, Y., Kai, Y., Nishikawa, K., Morita, H., Shimizu, N., Plata-Salaman C-R.. (1989) Amer. J. Physiol. 256: R217-R223

214 HCNP pro-protein のシナプス内局在

三竹重久*、鈴木龍雄、野路久仁子、片田栄一*、藤森 修**、小鹿幸生*
(名市大・第一生化学、*第２内科、**第二解剖)

〔要約〕
ラット中隔核のアセチルコリン産生を促進するHippocampal Cholinergic Neurostimulating peptide (HCNP)を抗原として作成したポリクローナル抗体を用いて、ラット脳内のHCNP様免疫活性をWestern blottingおよび光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いた免疫組織化学にて解析した。Western blottingにて、ラット前脳から調製したSoluble, P_2,シナプトソーム画分, ミエリン標品中に分子量23 kDaのHCNP pro-proteinの強い免疫活性を、P_1画分には中等度の、シナプス膜画分、ミトコンドリア標品中には弱い免疫活性を認めた。シナプス後肥厚部画分にはバンドは認められなかった。HCNP pro-proteinは、前脳、脳幹、大脳皮質、海馬、小脳から調製したシナプトソーム画分のいずれにも認められた。前脳シナプトソーム標品を浸透圧にてバンクさせた後、低速遠心(10,000g, 5分)あるいは高速遠心(100,000g, 60分)でそれぞれ上清と沈さに分けwestern blottingにて調べたところ、HCNP pro-proteinはシナプトソームの可溶性画分およびシナプス小胞内に分布すると考えられた。さらに免疫電顕法にてシナプス内局在を調べたところ、HCNP免疫活性はシナプス前側のみに局在しており、神経終末の細胞質およびシナプス小胞内への局在が観察された。以上の結果、HCNPのpro-proteinが神経終末内に局在し、何らかのシナプス機能の調節に関与していることが示唆された。

〔序論〕
我々は、中隔核培養細胞の分化を促進する因子として１１個のアミノ酸から成るペプチドを同定し、Hippocampal Cholinergic Neurostimulating peptide (HCNP)と命名した（１）。昨年の本学会で我々は、抗HCNP抗体を用いてラット脳を組織学的に検索し、視床、視床下部などに神経終末様の点状に染色される部位があることを報告した（２）。今回は免疫電顕法と脳の細胞下分画の Western blottingによりHCNPの免疫活性の神経終末内局在を確認した。

〔方法〕
抗体： 合成HCNPをヘモシアニンに結合させたものを抗原として家兎を免疫し、得られた血清から抗HCNP抗体を affinity purifyした。細胞下分画は Suzuki and Siekevitz の方法（３）に従った。一部のシナプトソームは低張バッファー中にてバンクさせた後、 10,000g, 5分 (low speed) ないし100,000g, 60分 (high speed) の遠心により上清と沈さに分画した。タンパクを15% ポリアクリルアミドゲルにて分離後、Immobilon膜にブロットし、免疫反応後ECL法にてHCNP様免疫活性を持つ分子を可視化した。
免疫電顕：Wistar rat (11日齢、1ヶ月齢、雄）をネンブタール麻酔下で4%パラホルムアルデヒドと0.1%グルタールアルデヒド混合液で潅流し、視床下部を 50μmに薄切した。そのあと0.1% Triton X-100で処理してから免疫染色を行った。２次抗体はSABキット（ニチレイ）を用いた。DABで発色後、1%オスミウムで再固定し脱水後エポン樹脂に封入した。光顕で視床下部傍室核を同定し、超薄切電顕試料を作成した。

無染色、あるいは電子染色（酢酸ウラン、鉛）した試料の観察を行った。

[結果]

Western bolttingにて、ラット前脳から調製したSoluble, P_2, シナプトソーム画分, およびミエリン標品中に分子量23 kDaのHCNP pro-proteinの強い免疫活性、P_1画分には中等度の、シナプス膜画分、ミトコンドリア標品中には弱い免疫染色性を認めた。シナプス後肥厚部画分にはバンドは認められなかった。HCNP pro-proteinは、前脳、脳幹、大脳皮質、海馬、小脳から調製したシナプトソーム画分のいずれにも検出された。前脳シナプトソーム標品を低張にてパンクさせた後、低速遠心(10,000g, 5分）あるいは高速遠心(100,000g, 60分)でそれぞれ上清と沈さに分けたところ、HCNP pro-proteinの分布はシナプトフィシンの分布とは明らかに異なっていた。さらに免疫電顕法にてシナプス内局在を調べたところ、HCNP免疫活性はシナプス前側のみに局在しており、シナプス後部側には観察されなかった。シナプス前側では細胞質およびシナプス小胞内への局在が観察された。

[結論]

HCNP自身、あるいはHCNP pro-proteinが神経終末内の細胞質あるいはシナプス小胞内に局在していることが明らかになった。このことはHCNPあるいはHCNP pro-proteinが神経伝達のモジュレーターとして働いている可能性を考えさせる。

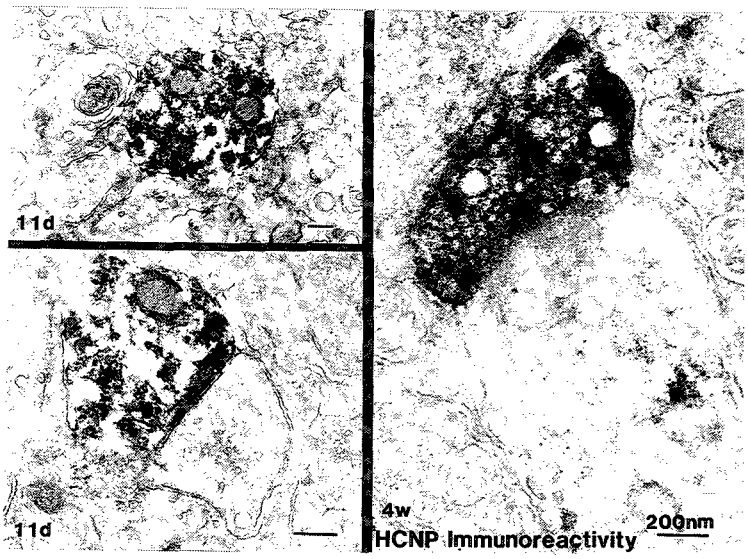


図1. 抗HCNP抗体を用いた免疫電顕
神経終末内の細胞質とシナプス小胞が染まっている。

[文献] **(1)**. Ojika, K. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2567-2571. **(2)**. 三竹重久　他 (1993) 神経化学32, 168-169. **(3)**. Suzuki and Siekevitz (1989) J. Neurochem., 53, 1751-1762

215　肝性脳症モデルラットの脳内5-HT$_2$ 受容体に関する研究

兼子幸一[1]、車地暁生[1]、山田佐登留[2]、藤代　博[1]、渡辺明子[1]、融　道男[1]
(1東京医科歯科大学神経精神医学教室、2東京都立梅ヶ丘病院)

〔要約〕
肝毒性物質thioacetamide(TAA)をラットに投与して作成した肝性脳症モデル動物を用いて、脳内セロトニン代謝産物の測定および脳内セロトニン5-HT$_2$受容体結合実験を行った。セロトニン5-HT$_2$受容体数は、(±)-1-(2,5-dimethoxy-4-〔^{125}I〕iodophenyl)-2-aminopropane(〔^{125}I〕DOI)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解析した。セロトニンの代謝産物である5-hydroxyindoleaceticacid(5-HIAA)は、今回測定した内側前頭皮質、線条体の何れの部位においても、従来の報告通り、対照群に比べて肝性脳症群で有意な増加を示した。また、前頭皮質を、内側(FC-1)、背側(FC-2)、背外側(FC-3)、腹外側(FC-4)、腹側(FC-5)の5部位に分けて〔^{125}I〕DOI特異的結合の測定を行ったが、肝性脳症群は対照群に比べてFC-1、FC-2、FC-3で有意な減少を、FC-4、FC-5で減少傾向をそれぞれ示した。以上の、5-HIAAの増加およびセロトニン5-HT$_2$受容体数の減少から、TAA投与による肝性脳症モデルラットの前頭皮質ではセロトニン系ニューロンの活動性亢進が生じていることが考えられ、意識障害の病態へのセロトニン系ニューロンの関与の可能性が示唆された。

〔目的〕
肝性脳症では、神経系に対して活性あるいは毒性を示す物質が肝による代謝を受けずに全身循環中に増加することが病因に関与すると考えられている。アンモニアの増加など様々な仮説が提唱されているが、その他多くの因子が病態に関与していると推定されている。セロトニン系に関しても、セロトニン(5-HT)およびその代謝産物 5-HIAAの増加が、肝性脳症死後脳、患者の脳脊髄液、肝性脳症モデル動物の脳で報告されている(1,3)。これらの物質の増加は、肝不全で5-HTの前駆物質tryptophanの血中濃度が増加していること、tryptophanに対する血液脳関門の透過性亢進が想定されていることに基づいているが、セロトニン系ニューロンの活動性との関係については十分わかっていない。本研究では、脳内セロトニン系代謝産物の増加とセロトニン系ニューロンの活動性の関連を検討するため、ヒトの急性肝不全に伴う肝性脳症に類似の病態を呈する実験動物モデルである肝毒性物質thioacetamide(TAA)投与ラットを用いて、脳内セロトニン代謝産物の測定およびセロトニン5-HT$_2$受容体アゴニスト DOI の結合実験を行った。

〔対象と方法〕
1)肝性脳症モデルラットの作成(2):Sprague-Dawley系雄性ラット(体重250g前後)にthioacetamide(TAA) 600mg/kg を連続3日間、腹腔内に投与し、これを肝性脳症群とし、対照群にはsaline を腹腔内に投与した。低血糖、電解質異常による意識障害を避けるため、TAAの初回投与12時間後から、5% glucose、0.45% saline、10mEq /l KClからなる補液10mlを12時間毎に両群に皮下投与した。意識障害の程度は7項目の神経学的反射を評価することで判定した。典型的な意識障害の進展では、初回投与から約40時間経過した頃から意識障害が生じ、約55時間で痛覚刺激に対する反射が消失する深昏睡 (stage 4)に至る。実験には、TAAの初回投与後48時間以上生存し、深昏睡に達した個体のみを用いた。深昏睡に達した段階で断頭した後に脳を取り出し、〔^{125}I〕DOI 結合実験を行う場合はisopentane(-43℃) で凍結した。2)セロトニン代謝産物の測定:内側前頭皮質、線条体、の2部位から0.1N過塩素酸で抽出した組織を超音波処理した後、$CHCl_3$で洗浄してから10,000回転、10分間の遠心操作を行い、上清中の5-HIAA含量をHPLC- ECD (EICOM)を用いて測定した。3)レセプター結合実験の試料と*in vitro*レセプター結合実験:クライオスタット(約-23℃)で厚さ20μmの冠状断の凍結脳切片を作成し、ゼラチンコートした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。50mM Tris HCl(pH 7.40)、0.5mM EDTA、10mM $MgSO_4$、0.1 % ascorbic acid、0.1% BSA、10μM pargylineからなるアッセイバッファーを使用し、〔^{125}I〕DOI(約2200Ci / mmole)濃度は200pM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90分間インキュベートし、アッセイバッファーで10分間、2回、蒸留水で1回の洗浄の後に室温で風乾させた。ディスプレーサーとしては1μMの5-HT$_2$受容体アンタゴニスト ketanserinを用いた。4)オートラジオグラフィー像の作成:脳切片をAutoradiographic〔^{125}I〕microscale (Amersham)とともに^{3}H-Hyperfilm (Amersham)に約96時間露光後、現像を　行った。5)〔^{125}I〕DOI 特異的結合の定量:画像解析装置(Image Research)を用いて、前頭皮質、皮質下諸核の合計11部位の関心領域について特異的結合(fmoles/mg tissue)をAutoradiographic〔^{125}I〕microscaleを参照して求めた。6)統計処理:脳内セロトニン代謝産物、〔^{125}I〕DOI 特異的結合の何れの検定にも Student t-test を用いた。

〔結果〕
1)脳内セロトニン代謝産物の測定:測定を行なった内側前頭皮質(対照群3.77±0.20、肝性脳症群5.72±0.33、単位

ng/mg protein)、線条体(対照群8.38±0.89、肝性脳症群24.77±1.10)の何れの部位においても、セロトニン(5-HT)代謝産物である5-HIAAは、肝性脳症群で有意な増加を示した(何れもp<0.01)。

2) [125I] DOI 結合実験

i) 前頭皮質：前頭皮質を、内側(FC-1)、背側(FC-2)、背外側(FC-3)、腹外側(FC-4)、腹側(FC-5)の5部位に分け、セロトニン5-HT_2受容体が密に分布する皮質第4層を測定したが、肝性脳症群は対照群に比べて、FC-1、FC-2、FC-3で[125I] DOI 特異的結合の有意な減少を(FC-1、FC-2の危険率は0.02、FC-3の危険率は0.01)、FC-4、FC-5で減少傾向をそれぞれ示した。これに対して、大脳皮質の他の部位では2群間に差はなかった。

ii) 皮質下核：側坐核、線条体(背側)、前障の3部位で測定を行なったが、2群間に差はなかった。

〔考察〕

セロトニン代謝産物である5-HIAAは、測定した2部位で肝性脳症群が有意な増加を示し、肝性脳症死後脳及び肝性脳症動物実験モデルの脳、脳脊髄液で報告されている5-HIAAの増加が確認された。一方、[125I] DOI 結合実験の結果からは、セロトニン5-HT_2受容体数の減少が、肝性脳症群の前頭皮質で生じていることが示された。受容体数の減少は、神経終末からのセロトニン放出の増加による見かけ上の減少または受容体数の down-regulation の何れか、あるいは両方の現象に基づくと考えられるが、肝性脳症でのセロトニン受容体機能に関する報告は少なく、意識障害の病態への関与は明らかでない。しかし、前頭皮質での5-HIAAの増加と[125I] DOI 特異的結合の減少という実験結果を併せて考えると、前頭皮質ではセロトニン系ニューロンの活動性亢進が生じていることが考えられ、TAA投与による肝性脳症モデルラットでは意識障害の病態にセロトニン系ニューロンが関与している可能性が示唆される。

〔文献〕

(1) Borg, J. et al. (1982) J. Neurol. Sci. 57, 343-356.
(2) Gammal, S. et al. (1990) Hepatology. 11, 371-378.
(3) Yurdaydin, C. et al. (1990) Hepatology. 12, 695-700.

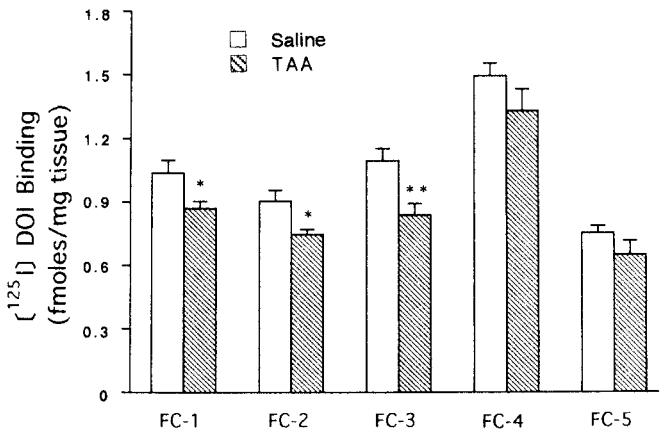


図1 前頭皮質における[125I] DOI結合(n=7 対照群、n=8 肝性脳症群)
FC-1：内側、 FC-2：背側
FC-3：背外側、FC-4：腹外側
FC-5：腹側
mean±SE
* p<0.02
** p<0.01

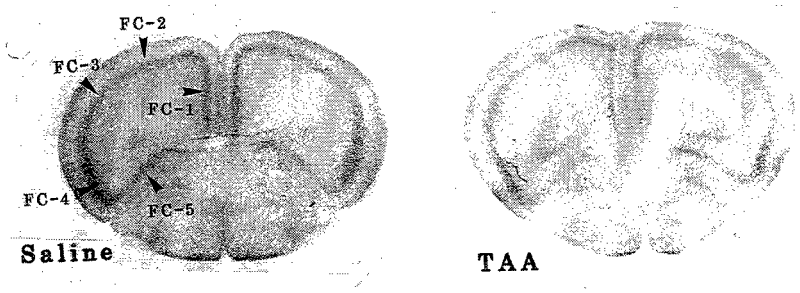


図2 前頭皮質の[125I] DOI全結合のオートラジオグラム(冠状断)。左が対照群(矢印は、関心領域の設定部位を示す)、右が肝性脳症群。

216　新規セロトニン1A受容体作用薬, MKC-242のマウス強制水泳に対する作用

プラニー・ソンブンタム, 松田敏夫, 鈴木　眞, 浅野省一,
田熊一敞, 馬場明道
(大阪大学・薬学部・薬理)

〔要約〕

新規セロトニン1A(5-HT1A)受容体アゴニスト5-[3-{(2s)-(1,4-benzodioxan-2-ylmethyl)amino}propoxy]-1,3-benzodioxol hydrochloride(MKC-242)の抗うつ作用について、マウス強制水泳法により検討した。MKC-242は用量依存的にマウス強制水泳不動時間を有意に短縮した。MKC-242の不動時間短縮作用は5-HT1A受容体アンタゴニストWAY100135、β受容体/5-HT1A受容体アンタゴニストpropranolol前処置により消失した。5-HT合成阻害薬p-chlorophenylalanine(PCPA)前処置マウス、5-HT神経毒5,7-dihydroxytryptamine(5,7-DHT)処置マウスにおいても、MKC-242の有意な不動時間短縮作用が認められた。これらの成績は、MKC-242がポストシナプス5-HT1A受容体の活性化を介して抗うつ作用を発現していることを示唆している。

【目的】

中枢5-HT受容体には多くのサブタイプが存在していることが薬理学的、分子生物学的研究により明らかになっている。その中の5-HT1A受容体は、早くよりその選択的アゴニスト(8-OH-DPAT)が開発されたこと、またその受容体に親和性を持つbuspirone等のazapirone化合物に抗不安作用、抗うつ作用が認められたことより、最も研究されているサブタイプの一つである。MKC-242は新規5-HT1A受容体アゴニストであり(1,2)、ラットにおいて抗不安作用、抗うつ作用を有することが明らかにされている(3)。本研究においては、MKC-242の抗うつ作用発現機構を追求する目的で、マウス強制水泳の不動時間に対する作用を解析した。

【方法】

実験にはddY系雄性マウスを用い、強制水泳はPorsoltら(4)の方法に準じて行った。マウスに5分間の強制水泳(水温25℃のシリンダー内)を5日間行い、6日目に6分間の強制水泳を行い不動時間を測定した。薬物は、テスト前30分に腹腔内投与した。脳内アミン含量はHPLC-ECD法(5)により測定した。α1受容体反応を検討する目的で、培養アストロサイトのCa^{2+}レスポンスを既報の方法(6)に従って測定した。

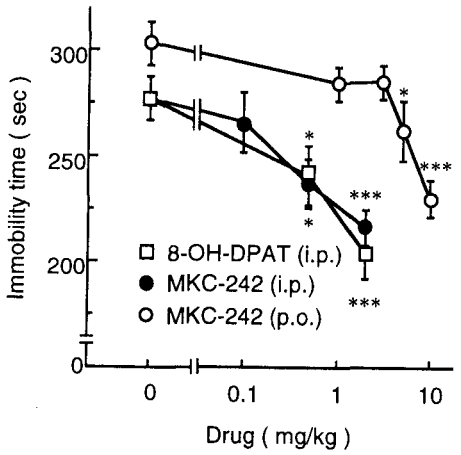
【結果】

マウス強制水泳テストにおいて、MKC-242は腹腔内投与、経口投与いずれにおいてもマウスの不動時間を短縮させた(図1)。一方、MKC-242にはマウスの自発運動量増加作用は認められなかった。MKC-242の不動時間短縮作用は5-HT1A受容体アンタゴニストにより拮抗された。PCPA(400 mg/kg, i.p., 5日, 3日, 1日前)、5,7-DHT(75μg/4μl, i.c.v., 14日前)投与より脳内5-HT含量は約35%、15%に低下した。これらのマウスにおいて、MKC-242は強制水泳の不

動時間短縮作用を示した(図2)。MKC-242はin vitro結合実験にいてα1受容体に親和性を示し、培養グリア細胞の系でノルアドレナリンによる細胞内Ca^{2+}の増加を抑制した。α1受容体アンタゴニストprazosin、WB4101も不動時間短縮作用を示したが、MKC-242は不動時間短縮作用を示す用量で眼瞼下垂を引き起こさなかった。

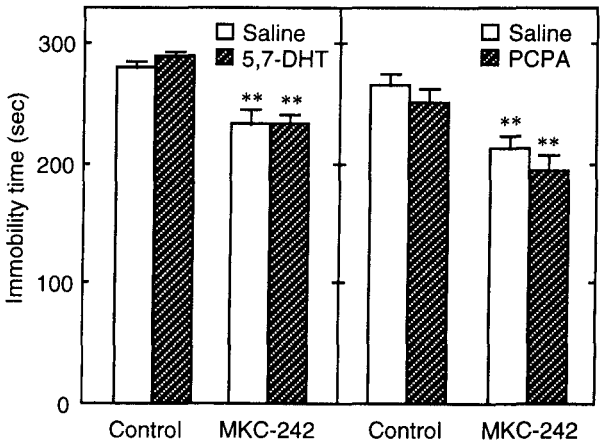
【考察】

本研究において5-HT1A受容体アンタゴニストを用いることにより、MKC-242が5-HT1A受容体を介して抗うつ作用を発現していることが示された。8-OH-DPATの抗うつ作用機構に関して、PCPA或いは5,7-DHTを用いた実験でポストシナプス5-HT1A受容体を介した作用であるとの成績と、プレシナプス5-HT1A受容体を介した作用であるとの成績が報告されている。両薬物を用いた本研究では、いずれの場合も、MKC-242の抗うつ作用発現にポストシナプス5-HT1A受容体が関与していることが示唆された。又、MKC-242がα1受容体アンタゴニスト作用を有していることが示されたが、この作用は本薬物の抗うつ作用に寄与していないと考えられた。



* $p < 0.05$, *** $p<0.001$, different from control.

図1. Porsolt試験不動時間に対する作用（平均±S.E.）



**$P < 0.01$, different from control.

図2. MKC-242の不動時間短縮作用に対するPCPA 5,7-DHT前処置の影響（平均±S.E.）

【文献】

(1)吉川　崇，松田敏夫，田熊一敞，鈴木　眞，江川三生，戸部昭広，馬場明道（1993）神経化学，32，532-533.　(2)田畑礼子，阿部倫一，斎藤健一，江川三生，戸部昭広，松田敏夫，馬場明道（1993）薬物・精神・行動 13，455.　(3)阿部倫一，田畑礼子，江川三生（1993）薬物・精神・行動13，456.　(4)Porsolt, R.D., Bertin, A. and Jalfre, M. (1977) Arch. int. Pharmacodyn. 229, 327-336.　(5)Matsuda, T., Seong, Y.H., Aono, H., Kanda, T., Baba, A., Saito, K., Tobe, A. and Iwata, H. (1989) Eur. J. Pharmacol. 170, 75-82.　(6)Takuma, K., Matsuda, T., Yoshikawa, T., Kitanaka, J., Gotoh, M., Hayata, K. and Baba, A. (1994) Bioichem. Biophys. Res. Commun. 199, 1103-1107.

217 拘束ストレスに対する情動的適応能の加齢変化と大脳辺縁系内モノアミン動態との関連

李 踐偉[1)]、武田弘志[1)]、高田 香[1)]、馬場 剛[1)]、松宮輝彦[1,2)]、渋谷 健[1)]
1）東京医科大学薬理学教室　2）東海大学医学部薬理学教室

〔要約〕
ストレス適応の形成機構における脳内モノアミン作働性神経系の役割を考究する一環として、加齢に伴う急性拘束ストレスに対する情動的適応能の変化と大脳辺縁系内serotonin(5-HT), norepinephrine(NE)およびdopamine(DA)作働性神経系動態との関連について神経化学的に検討した。拘束ストレス負荷により、若齢および老齢ラット共にstruggling, vocalizationなどの情動的ストレス反応を著明に発現した。また、若齢ラットでのこれらストレス反応の発現はストレス負荷時間に依存して著明に減少したが、老齢ラットでは負荷時間中維持されるか、あるいは軽度に減少した。拘束ストレス負荷により、若齢ラットの扁桃体において、5-HTの合成および代謝回転の促進、また、海馬、中隔野での5-HT代謝回転の促進が認められたが、老齢ラットでは変化は生じなかった。若齢ラットの扁桃体、海馬、中隔野においてNE代謝回転の促進が認められた。さらに、老齢ラットの扁桃体、中隔野でもNE代謝回転の促進が生じたが、海馬では観察されなかった。拘束ストレス負荷により、若齢および老齢ラットの中隔野においてDAの合成促進が認められた。以上の成績から、急性拘束ストレスに対する情動的適応能は、加齢に伴い低下することが明らかとなった。また、この適応能の低下には、大脳辺縁系内5-HT作働性神経系および海馬におけるNE作働性神経系の拘束ストレッサーに対する応答の減弱が関連するものと思われる。

【目的】 ストレスに対する適応の形成は、重要な生体防御機構の1つである。しかしながら、ストレス適応の形成機構に関する神経化学的報告(1-4)は少なく、その詳細についてはなお研究すべき点が多い。我々は、先に反復拘束ストレッサーに対する脳内応答系(認識・処理・対処の機構)の一部に5-HT作働性神経系が関与し、この神経系の拘束ストレッサーに対する応答機能の維持あるいは増強がストレス適応の形成要因の1つであることを報告した(3,4)。本研究では、ストレス適応の形成機構をさらに、詳細に考究する目的で、急性拘束ストレスに対する情動的適応能の加齢変化と大脳辺縁系内5-HT, NEおよびDA作働性神経系動態との関連について神経化学的に検討した。

【実験方法】 1.拘束ストレス負荷と情動的ストレス反応の評価：実験には10週齢(若齢)および110週齢(老齢)のSprague-Dawly系雄性ラットを用いた。ストレスは室温(23±1℃)で、1時間の間、背臥位に強制拘束し負荷した。拘束ストレス負荷による情動反応の経時的変化は、struggling数(もがき数)およびvocalization数(鳴き声数)を指標として評価した。さらに負荷後に、radioimmunoassay法(^{125}I CORTICOSTERONE KIT, ICN)による血清corticosterone濃度の測定を行った。2.脳内5-HT, NE, DAおよびその関連代謝物の測定：拘束ストレス負荷後、脳を摘出し、扁桃体、海馬、中隔野を分離して、サンプルとした。また、酸化還元スクリーン検出モードを導入した多重クーロメトリーHPLC(5)を用い、各脳部位における5-HT, NE, DAおよび関連代謝物[5-hydroxy-indole-3-acetic acid(5-HIAA), 4-hydroxy-3-methoxyphenyl glycol(MHPG), 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid(DOPAC)]量を同

時測定した。さらに、測定した各物質量から5-HIAA/5-HT, MHPG/NEおよびDOPAC/DAの値を算出し、5-HT, NEおよびDA代謝回転を解析評価した。

【実験結果】1.ストレス反応：拘束ストレスが誘発するstrugglingの発現数は、若齢ラットでは、経時的に減少したが、老齢ラットではストレス負荷時間に依存した推移は認められなかった。また、vocalizationの発現数は、若齢および老齢ラット共に負荷時間に依存して減少したが、その減少率は、若齢ラットの方がより著明であった。さらに拘束ストレス負荷により、両ラットの血清corticosterone濃度は有意に増加($p<0.001$)した。2.脳内モノアミン動態(1)モノアミン含量：拘束ストレス負荷により、若齢ラットの扁桃体、海馬、中隔野において5-HIAA含量の増加が認められた。また、5-HT含量は、扁桃体で増加、中隔野で減少が観察された。一方、老齢ラットでは、いずれの脳部位においても5-HTおよび5-HIAA含量に変化が生じなかった。若齢および老齢ラットの扁桃体、中隔野においてMHPG含量の増加が認められた。また、若齢ラットの海馬でも同様に、MHPG含量が増加したが、老齢ラットの海馬では変化が生じなかった。さらに、若齢および老齢ラットの中隔野においてDA含量、DOPAC含量が増加したが、扁桃体、海馬では特記すべき変化は認められなかった。(2)モノアミン代謝回転(Fig.1)：拘束ストレス負荷により、若齢ラットの扁桃体、海馬、中隔野のいずれの脳部位においても5-HIAA/5-HT値は有意に増加($p<0.05$)したのに対して、老齢ラットでは、変化は認められなかった。また、若齢ラットの扁桃体、海馬および中隔野内MHPG/NE値の有意な増加($p<0.001$)が生じた。老齢ラットの扁桃体および中隔野においてもMHPG/NE値の増加が観察されたが、海馬では認められなかった。一方、拘束ストレスは、若齢および老齢ラットの扁桃体、海馬、中隔野におけるDOPAC/DA値には影響を及ぼさなかった。

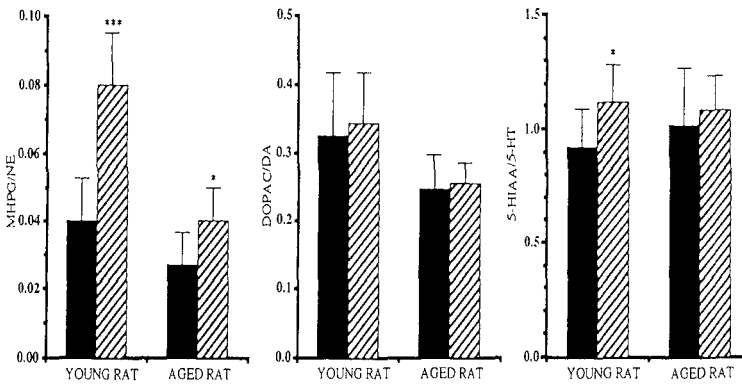


Fig.1 Changes in NE, DA and 5-HT turnovers in amygdala of rat brain by restraint stress exposure. ■: Control and ▨: Restraint stress(1hr)
Each column represents the mean ± S.D. of 6-7 animals. * : $p<0.05$ and *** : $p<0.001$

【考察】以上の成績から、急性拘束ストレスに対する情動的適応能は加齢に伴い低下することが明らかとなった。この適応能の加齢変化は、脳内応答系に入力されるストレス情報に対する認識能の差によるものではなく、情報に対する処理および対処能の衰退に起因することが推察される。さらに、加齢による情動的適応能の低下には大脳辺縁系内5-HT作働性神経系および海馬におけるNE作働性神経系のストレッサーに対する応答の減弱が関与するものと思われる。

【文献】(1) Cohen,R.M., Cohen,M.R. and McLellm,C.A.(1986) Pharmacol.Biochem.Behav. 24,1587-1592 (2) Kennett,G.A., Diclonson,S.L. and Curzpna,G. (1986) Brain Res. 330,253-263 (3) 増田幹生、武田弘志、渋谷 健(1993)日薬理誌101,187-196 (4) 武田弘志、松宮輝彦、増田幹生、渡辺美由紀、渋谷 健(1992)ストレス科学7,90-96 (5) Takeda,H., Matsumiya,T. and Shibuya,T.(1990) J.Chromatogr.515,265-278

218 活動性ストレスが誘発する脳内生理活性アミン動態変化の神経化学的意義

武田弘志[1)]、泉澤　恵[1)]、高田　香[1)]、李 踐偉[1)]、馬場　剛[1)]、松宮輝彦[1,2)]、渋谷　健[1)]
1）東京医科大学薬理学教室　　2）東海大学医学部薬理学教室

〔要約〕
活動性ストレスが誘発するストレス反応の発現機序を考究する目的で、ストレス反応発現時の脳内serotonin(5-HT), norepinephrine(NE), dopamine(DA)およびcholine(Ch)作働性神経系の動態変化、さらにはこれら神経系動態の相互関連について神経化学的に検討した。活動性ストレス負荷モデルラットは、ストレス反応の発現形式および強度の相違からtype 1およびtype 2に層別可能であった。また、type 1モデルは、type 2モデルに比較してより重篤なストレス反応を発現する特徴が認められた。Type 1およびtype 2モデルに共通して、脳内5-HT作働性神経系では5-HT合成あるいは代謝回転の抑制、Ch作働性神経系でのCh取り込みあるいはacetylcholine(ACh)合成の抑制およびNE作働性神経系におけるNE代謝回転の促進などの神経化学的変化が認められたが、その発現脳部位には相違が観察された。また、type 1モデルのDA作働性神経系ではDA合成あるいは代謝回転が促進したが、type 2モデルでは生じなかった。以上の成績から、活動性ストレスが惹起するストレス反応の発現には、脳内5-HTおよびCh作働性神経系の活性低下とNEおよびDA作働性神経系の活性亢進が関与することが示唆された。さらにストレス反応の発現強度は、神経化学的変化が引き起こされる脳部位の違いに基づくものと思われる。

【目的】 活動性ストレスは、摂食障害と運動過多が密接に関連し、多様なストレス反応を惹起することが知られている。しかしながら、活動性ストレスが誘発するストレス反応の発現機序に関する神経化学的報告(1,3,4)は少なく、その詳細についてさらに検討を要する。本研究では、活動性ストレスの反復負荷過程におけるストレス反応の推移と特徴を吟味すると共に、ストレス反応発現時の脳内5-HT, NE, DAおよびCh作働性神経系の動態特性、さらにはこれら神経系動態の相互関連について神経化学的に検討した。

【実験方法】 1.活動性ストレス負荷：実験には体重180-190gの健常なSprague-Dawly系雄性ラットを用いた。活動性ストレスは、回転籠付き個別ケージ内で、1日1時間（午前10-11時）の制限給餌条件下で7日間飼育することにより反復負荷した(1)。2.脳内生理活性物質の測定：活動性ストレスの反復負荷後、直ちに脳を摘出した。さらに、脳組織より、大脳皮質前頭部、扁桃体、中隔野、海馬、視床下部、中脳、延髄-橋、線条体および小脳の9部位を分離しサンプルとした。各脳部位における5HT,NE, DAおよび関連代謝物[5-hydroxyindole-3-acetic acid(5-HIAA),4-hydroxy-3-methoxyphenyl glycol(MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)]量の高感度同時測定には、酸化還元スクリーン検出モードを導入した多重クーロメトリーHPLC(2)を用いた。また、AChおよびCh量は、熱分解GC/MS(1)を用いて測定した。

【実験結果】 1.ストレス反応の変化：活動性ストレスの7日間反復負荷により、回転数（走行運動量）の著明な増加が誘発され、さらにこの回転数の増加パターンには、①活動性ストレス負荷初日より著明な回転数の増加が惹起され、5日目前後にピークに達し、その後徐々に減少するパターン(Type 1)と②活動性ストレス負荷初日より実験期間を通

じて漸増的な回転数の増加を示すパターン(Type 2)が認められた。また、Type 1モデルに直腸体温の低下、副腎重量の増加ならびに脾臓、胸腺重量の減少などの重篤なストレス反応が特徴的に認められた。2. 脳内生理活性物質の動態変化：(1)5-HT動態：活動性ストレス負荷モデルラットのType 1では、大脳皮質前頭部、扁桃体、中隔野、海馬、視床下部、中脳、延髄-橋、線条体、小脳において5-HTおよび5-HIAA含量、あるいは5-HIAA含量が有意に減少($p<0.05-0.001$)した。また、Type 2モデルでは、扁桃体、中隔野、海馬、中脳、小脳の5つの部位で、5-HTと5-HIAAの両含量、あるいは、5-HIAA含量が減少した(Fig. 1)。(2)NE動態：Type 1モデルの扁桃体、視床下部、中脳においてNE含量の減少とMHPG含量の増加、また、延髄-橋、小脳ではMHPG含量の増加が認められた。Type 2モデルでは扁桃体、視床下部、中脳においてMHPG含量が増加した。さらに、Type 1あるいはType 2モデルに共通して、海馬内NE含量の減少および線条体内NE含量の増加が観察された。(3)DA動態：Type 1モデルの海馬、視床下部、延髄-橋、小脳において、DAとDOPACの両含量あるいはDOPAC含量が増加した。一方、Type 2モデルでは変化は認められなかった。(4)ACh動態：Type 1の活動性ストレス負荷モデルラットでは、海馬、視床下部、中脳、延髄-橋および小脳で、また、Type 2モデルでは、海馬、中脳、小脳の脳部位においてAChとCh両含量あるいはCh含量が有意に減少($p<0.05-0.001$)した。

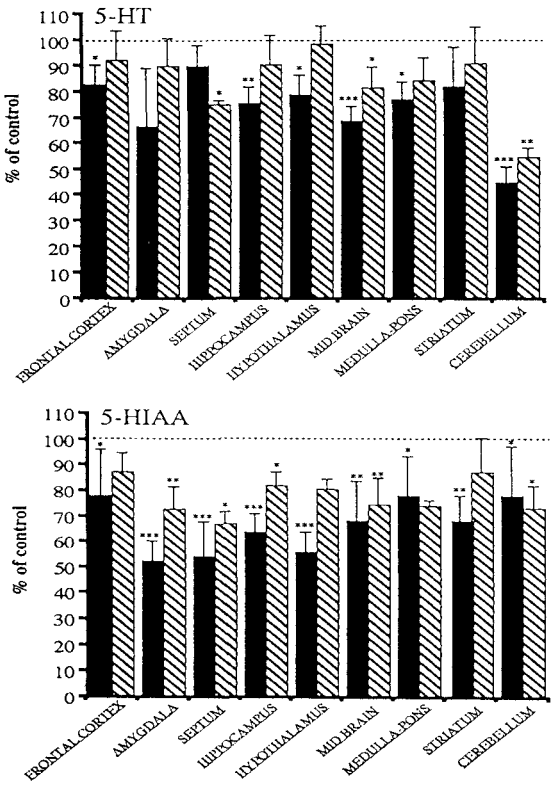


Fig. 1 Changes in 5-HT and 5-HIAA contents in the rat brain regions after the repeated exposure to activity-stress. ····· :control level, ■ :activity- stress (Type 1) and ▨ :activity-stress(Type 2). Each column represents the mean±S.D. of 5-8 animals. *:$p<0.05$, **:$p<0.01$ and *** :$p<0.001$.

【考察】本研究で得た成績から、活動性ストレス負荷モデルラットは、そのストレス反応の発現形式および強度の相違から2つのタイプに層別可能である(1)。また、活動性ストレスが惹起するストレス反応の発現には、脳内5-HTおよびCh作働性神経系の活性低下とNEおよびDA作働性神経系の活性亢進によって引き起こされる脳内神経間の相互干渉が関与すると考えられる。また、ストレス反応の発現強度は、神経化学的変化が惹起される脳部位の違いに基づくものと思われる。

【文献】(1) 泉澤 恵、武田弘志、渋谷 健(1994) 東京医科大学雑誌 52,209-217 (2) Takeda,H., Matsumiya,T. and Shibuya,T.(1990) J.Chromatogr.515,265-278 (3) Tsuda,A. and Tanaka, M.(1990) Ann.N.Y. acod.Sci.597,146-158 (4) Rea,M.A. and Hellhammer,D.H.(1984) Psychother.Psychosom.42,218-223

219　運動ニューロン疾患脊髄における細胞質ダイニンの変動

豊島　至、小松眞史、長谷川一子*、正宗　研
（秋田大学医学部第一内科、*北里大学東病院神経内科）

〔要約〕

細胞質ダイニンの運動ニューロン疾患（MND）脊髄内における変動を検討する目的で、新たに抗細胞質ダイニンモノクロナル抗体を作成した。ウシ脊髄細胞質ダイニンを精製し5個のモノクロナル抗体を得た。いずれも70 kDa中間鎖抗体であった。各組織の細胞質ダイニンの濃度をウサギとニワトリで検討した。ウサギでは肺に最も多く、ニワトリでは脳、肺、心筋、筋胃でほぼ同等に多く見られた。脊髄凍結切片をABC法で染色すると、対照ヒト脊髄で抗細胞質ダイニンモノクロナル抗体は、細胞体、樹状突起、軸索を染めた。MND脊髄では軸索腫大を強く染めた。これは、MNDにおける速い軸索内輸送の障害を示唆している。

[はじめに]

運動ニューロン疾患（MND）脊髄において、軸索腫大に高燐酸ニューロフィラメント蛋白質、微小管関連蛋白質、キネシンが蓄積することを報告した（1）。また、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定量的検討から、MND脊髄で両者が減少していることをみた（2）。今回は、軸索腫大における速い逆行性の軸索内輸送について検討する目的で、細胞質ダイニンの抗体を作成しMND脊髄の免疫染色をした。

[方法]

ウシ脊髄の細胞質ダイニンの精製は、抗鶏胚脳ダイニン中間鎖モノクロナル抗体である 70.1(3) によるイムノアフィニテイーカラムを用いた。細胞質ダイニンは、重鎖（520 kDa）中間鎖（70 kDa）軽鎖（50 kDa）からなっていた。これをBalb/cマウスに免疫して653ミエローマと融合させ、5個のモノクロナル抗体を得た(BDIC1, BDIC2, BDIC3, BDIC4, BDIC7)。いずれも70kDa中間鎖抗体であった。BDIC1, BDIC4, BDIC7がよい種間交差性を示し、ヒト、ウサギ、ニワトリで特異的に反応した。

MND 5例と対照非神経筋疾患3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・アセトンで急速凍結し保存したものをＡＢＣ法で免疫染色した。

[結果]

各組織の超遠心上清の細胞質ダイニンの濃度を、ウサギとニワトリで、キネシンの濃度と比較検討した(図１)。細胞質ダイニン検出にはBDIC7、70.1、キネシンにはCKHC3（4）を用いた。キネシンが、ウサギとニワトリで脳にのみ多いのに対し、細胞質ダイニンは、ウサギでは肺に最も多く、ニワトリでは脳、肺、心筋、筋胃でほぼ同等の高濃度であった。腎では両者は極めて少量であったが、イムノアフィニテイーカラムでは相当量が回収された。また、ニワトリ骨格筋で相当量の細胞質ダイニンがみられ、ウサギでも少量が検出された。

脊髄凍結切片の免疫染色では、対照ヒト脊髄で細胞質ダイニンモノクロナル抗体は、灰白質の細胞体、樹状突起、軸索を染めた。白質、神経根内の軸索も染色された。MND脊髄では、連続切片を高燐酸化ニューロフィラメント蛋白質抗体で染色して軸索腫大を同定した。抗細胞質ダイニン抗体で軸索腫大は他の部分より強く染まる傾向を示した(図２)。

[考察]

各組織における細胞質ダイニンの濃度はキネシンと顕著に異なっており、キネシンが脳に特異的に多いことは、脳にのみ発達したプラス端方向性の微小管依存性輸送系が存在することを示唆している。脳に特異的なキネシンがあること（1）と関係しているかもしれない。細胞質ダイニンの濃度の差は、小胞輸送系の密度を反映していると考えられるが、今回は中間鎖のみの検討であるので重鎖の測定も必要である。

MNDの腫大軸索内には、キネシンに加え逆行性運動蛋白質である細胞質ダイニンが蓄積することが明らかになった。これは、MNDにおける両方行性の速い軸索内輸送の障害を示唆している。

[謝辞] MND脊髄を分与下さいました秋田赤十字病院　廣田紘一先生に深謝致します.

[文献] 1) 豊島至他、神経化学31:562-3, 1992.　2) 豊島至他、神経化学32:74-5, 1993.
3) Steuer ER et al, Nature 345:266-8, 1990. 4) Toyoshima I et al, J Cell Biol 118:1121-31, 1992

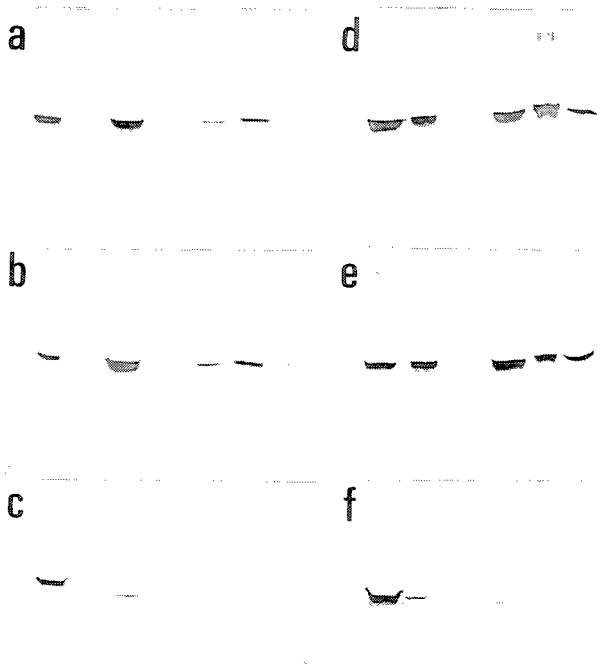


図１モーター蛋白質濃度の組織による差異
a-c ：ウサギ、d-f：ニワトリ
a, d：BDIC7抗細胞質ダイニン中間鎖抗体
b, e ：70.1抗細胞質ダイニン中間鎖抗体
c, f：CKHC3抗キネシン重鎖抗体
ウサギは左から　脳,腎,肺,肝,心筋,胃,骨格筋
ニワトリは左から　脳,肺,肝,心筋,筋胃,骨格筋

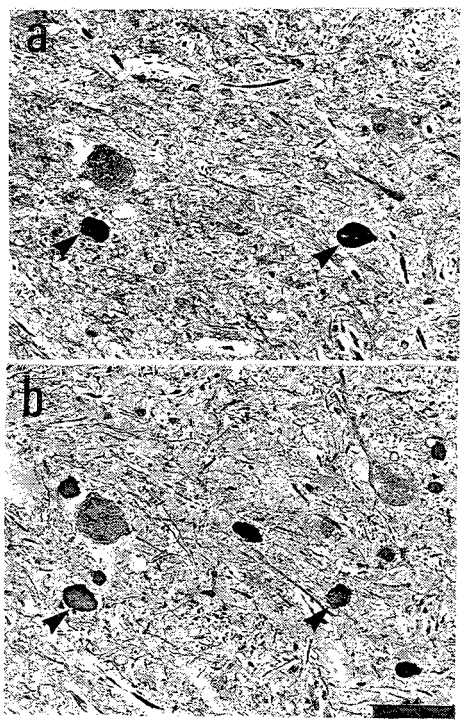


図２　MND脊髄の免疫染色
a：BDIC4
b：高燐酸化NFP-H抗体
矢頭：軸索腫大　バー：100μm

220 フェンサイクリジン（PCP）のラット線条体GABAニューロン活動に及ぼす影響

本藤久雄、中村薫、中原辰雄*、米澤裕次、堤哲之、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)のラット線条体におけるGABAニューロン活動におよぼす影響について脳内透析法により調べた。PCP7.5mg/kg腹腔内投与または1mMの局所投与は100mMの高カリウム(K^+)刺激誘発性のGABA遊離に対して有意な抑制効果を示した。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 100μMの局所投与によっても同様な結果が得られた。これらのPCP及びMK-801の効果はNMDA 1mMを同時に投与することにより拮抗された。以上から，PCPは線条体におけるGABAニューロン系に対して抑制的に作用し，その作用の少なくとも一部はNMDA受容体阻害作用によるものと考えられた。

〔目的〕

フェンサイクリジン(PCP)は，精神分裂病に近似した精神症状を惹起することから，最近注目されている乱用薬物であり，我々もこれまでPCPについて一連の行動薬理学的・神経化学的研究を行ってきた。

GABAは脳内における代表的な抑制性神経伝達物質であるが，PCPが実験動物に惹起する異常行動をGABAergicな薬物が抑制するとの報告[3,5,8]があり，PCPの作用に脳内のGABAニューロン系が関与している可能性がある。そこで今回我々はPCPのGABAニューロン系への影響を脳内微小透析法を用いて検討した。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GABAニューロン系へのNMDA受容体阻害作用の関与について検討するため，より選択的な同作用を有するMK-801のGABAニューロン系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線条体に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20分毎に採取し，o-phthaldialdehyde(OPA)誘導体化したのち蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーに注入し，細胞外GABA濃度を測定した。

灌流開始後，細胞外GABA濃度の基礎値及び100mMの高カリウム(K^+)刺激誘発性のGABA遊離に及ぼすPCP及びMK-801の影響を検討した。薬物の効果は腹腔内投与の場合は時間経過で表示し，局所への灌流投与の場合は40分間(2collection)分のGABA濃度の合計（薬物投与前のGABA濃度に対する百分率で表示）を対照と比較することにより表示した。

〔結果〕

PCP7.5mg/kgの腹腔内投与は透析液中のGABAの基礎値には有意な変化を及ぼさなかったが，高K^+刺激によるGABA遊離には有意な抑制効果を示した(Fig.1)。腹腔内投与の場合と同様にPCP(1mM)の灌流によっても高K^+刺激によるGABAの増加は抑制された。PCPと同様にMK-801(100μM)の灌流によっても高K^+刺激によるGABAの増加は抑制された。PCP及びMK-801の効果はNMDA 1mMを共に灌流することにより拮抗された(Fig.2)。

〔考察〕

脳内透析法を用いて得られた透析液中のGABAの意義については，果してそれがneuronal activityを反映しているかどうかについてなお論議[1,7,9]がある。一般に透析液中の神経伝達物質が神経活動を反映していることの基準としてその物質がCa^{2+}依存性やTTX感受性を示すこと等があげられている。今回の我々の予備的検討では，基礎値についてはCa^{2+}依存性及びTTX感受性を示さなかった。他方，高K^+刺激による透析液中のGABAの増加は，約50%がCa^{2+}依存性及びTTX感受性を示した。このことから，高K^+刺激誘発性のGABAの増加は少なくとも一部は神経細胞からのvesicularなGABAの遊離によるものと思われる[2]。従って今回示されたPCPによる高K^+刺激誘発性のGABA遊離に対する効果が，よりGABAニューロン系のneuronal activityの変化を反映したものではないかと考えられる。

PCPは多様な薬理作用を持っているが，その最も基本的なものはNMDA受容体の非競合的阻害作用といわれている。今回，PCPに比しより選択的なNMDA受容体の非競合的阻害剤であるMK-801によっても，PCPと同様に高K^+刺激によるGABAの増加は有意に抑制され，これらPCP及びMK-801の作用はNMDAにより拮抗されたことから，PCPの作用の少なくとも一部はNMDA受容体阻害を介したものと考えられる。既に線条体においてNMDAがGABAを放出させる事が指摘されて来ており[4,6,10]，その性格についてはなお一定の見解は得られていないが，今回我々の報告したPCPの効果は，このようなGABAニューロンに対するNMDA受容体の作用を介したものである可能性がある。

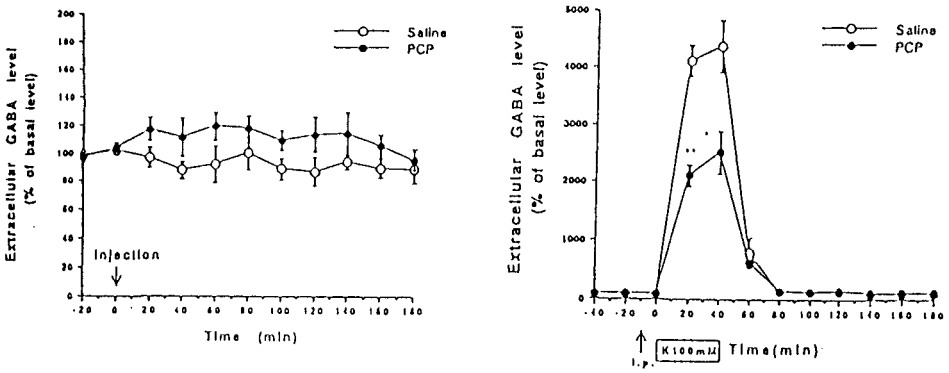


Fig. 1 Effect of the systemic injection of PCP (7.5mg/kg i.p.,) on the basal and high potassium (100mM) evoked extracellular GABA levels in the striatum of freely moving rats. The arrow and the column indicate the injection of PCP and the perfusion of 100mM KCl, respectively. The average value for the two samples before injection was taken as the basal pretreatment value (100%). All values represent the mean ± S. E. M. from 4-5 rats. **P<0.01, *P<0.05 as compared to the respective control group by Scheffe's test.

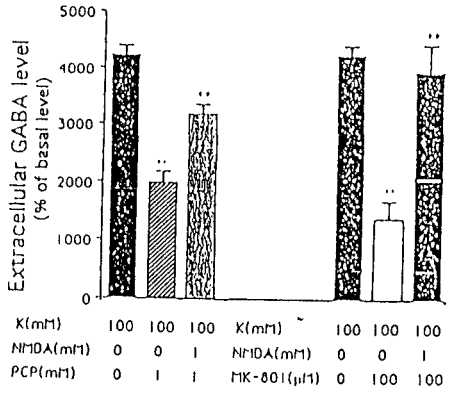


Fig. 2 Effect of the local perfusion of PCP and MK-801 on the high potassium evoked GABA release and the effect of the local co-perfusion of NMDA (1mM) with PCP or MK-801. After collecting the basal pretreatment samples, the medium was perfused for 40 minutes at the compositions indicated below the columns. The results are the extracellular GABA levels (mean ± S.E.M. from 4 rats) expressed as the percent of the basal pretreatment GABA level. **P<0.01 as compared to the control, ++P<0.01 as compared to the group which PCP or MK-801 was perfused without NMDA by Scheffe's test.

[文献]
1) Bourdelais, A. J. and Kalivas, P. W. (1992) J. Neurochem., 58, 2311-2320. 2) Campbell, K. et al. (1993) Brain Res. 614, 241-250. 3) Freed, W. J. et al. (1980) Psychopharmacol., 71, 291-297 4) Galli, et al. (1992) Neurosci. 50, 769-780. 5) Menon, M. K. et al. (1980) Pharmacol. Biochem. Behavior 12, 113-117. 6) Morari, M. et al. (1993) J. Neurochem., 60, 1884-1893. 7) Osborne, P. G. (1990) J. Neurosci. Methods 34, 99-105. 8) Seiler, N. et al. (1992) Pharmacol Biochem. Behavior 41, 603-606. 9) Timmerman, W., et al. (1992) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 345, 661-665. 10) Weiss, S. (1988) J. Neurochem. 51, 435-441.

221 単純ヘルペス1型および2型ウイルスDNAのPCRを利用しての同時型別診断とCompetitive PCRを用いてのウイルスDNAの定量化

土居孝至、溝渕睦彦、中城有喜、武田良平、柿本泰男
(愛媛大学医学部神経精神医学教室)

〔要約〕

単純ヘルペス(HSV)脳炎は、主にHSV-1型により引き起こされる劇症致死脳炎である。一方、HSV-2型は性器、産道感染から新生児脳炎を惹起する。従って本脳炎の迅速鑑別診断の確立は、臨床上非常に重要となる。今回われわれは、HSV-1とHSV-2型DNAに特異的かつ共通なDNA配列部位で、しかも増幅産物の長さが異なる様にプライマーを選択した。本プライマーを用いてPCRを行ない、それぞれの株種のDNAから578 bp (HSV-1)と621 bp (HSV-2)のPCR産物を増幅することで、一度にHSVの型別診断法を確立した。さらに、このPCR産物の長さの違いを利用してCompetitive PCRを行ない、ヘルペス脳炎患者髄液中のHSV-1 DNAの定量化を行った。

[はじめに]

HSV-1型脳炎は、疫学的に非流行性であり、小児では初感染直後まれに脳炎を発症することがある。しかし、多くは知覚神経節などに潜伏感染していたHSV-1が、再活性化され脳実質に侵入し、中枢神経組織を破壊し劇症壊死性脳炎を引き起こす。一方HSV-2型は、稀に産道感染から新生児脳炎を起こし致死的となる。しかし、多くのHSV-2型脳炎は成人例で髄膜炎、脊髄炎が多く、最近脊髄炎や髄膜脳炎の日和見感染や慢性再発が注目されている[1]。従って、本脳炎の迅速型別診断の確立は、臨床上非常に重要となっている。

今回われわれは、HSV-1とHSV-2型DNAを同時に区別できる様にプライマーを選択し、PCRを用いて迅速に鑑別する方法を確立した。さらに、この長さの違いを利用してCompetitive PCRを行ない、ヘルペス脳炎患者髄液中のウイルスDNAの定量化も試みたので報告する。

[方法]

標準とするHSV-1とHSV-2株の DNA は北海道大学歯学部坂岡博先生より頂いた。ヘルペス脳炎患者から脳脊髄液を採取し、使用するまで -80C で保存した。PCR増幅に用いたプライマーは、図１に示した様に、HSV-1とHSV-2に共通であるがHSVに特異的な部位で、しかもプライマー間のDNAのHSV-1に43 bpの欠損が存在する。PCR溶液や増幅条件は既報の方法[4]に従った。それぞれ25 p molのプライマー1 (5'-CCACCGAGCGGCAGGTGATC-3')とプライマー2 (5'-GCCGACCGCCTGCTCGTGCT-3')を用い[2, 3]、35サイクル(95 C; 90 sec, 60 C; 80 sec, 73 C; 60 sec)増幅した。髄液は50 μl PCR溶液中に5 μl 添加した。PCR産物5 μl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。サザンブロット後のシグナルの強さは、BAS1000を用いて解析した。尚、プローブ作成とラベル方法は、溝渕らの方法を用いた[5]。

[結果と考察]

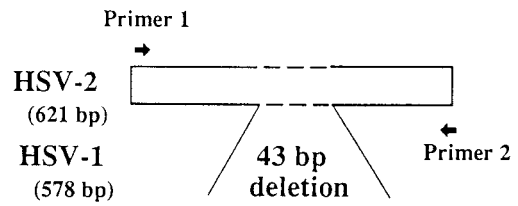
図2に各種HSV株DNAをPCR増幅し、電気泳動後エチジウムブロマイド染色した結果を示した。各DNAはPCRチューブ(50 μl)当たり、それぞれ10^{-12}g入れ35サイクル増幅した。HSV-1の株種はlane1-3までNSH-668, 39-3-2と8916-YLで、HSV-2はlane4-6でそれぞれTKM-899, B-335とB-336である。尚、標準DNA増幅の感度は、10^{-14}gまでエチジウムブロマイド染色で、10^{-15}gまでサザンブロット法で検出可能であった。

次に、この長さの相違を利用してHSV-1 DNAを定量するためにCompetitive PCRを行なった。HSV-1 DNAを一定量(10^{-13}g)加え、標準HSV-2 DNAを10^{-10}gから連続10倍希釈しPCRを行なった(図3)。比較的濃度依存性に競合して、各DNAが増幅されている。さらに、ヘルペス(HSV-1)脳炎患者髄液5 μl添加しCompetitive PCRを行なった(図4)。サザンブロット後BAS1000で分析した結果(図4-b)、HSV-1 DNAは約10^{-14}g/5 μl存在している。

[文献]

1. Britton, C. B., Mesa, T. R. et al. (1985) Neurology 35: 1071
2. Dowbenko, D.J. and Lasky. L.A.(1984) J. Virol. 52: 154
3. McGeoch, D. J. et al. (1988) J. Gen. Virol. 69: 1536
4. Mizobuchi, M., Frohman, M.A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5: 476
5. Mizobuchi, M. and L.A. Frohman. (1992) BioTechniques 12: 350

図1. ウイルスDNAとプライマーの説明図



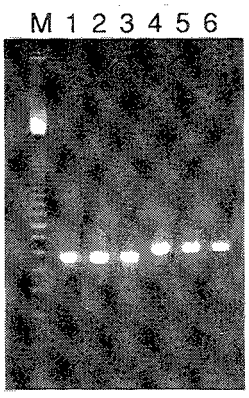


図2. 各種HSV株のPCR増幅
HSV-1, HSV-2 とも各PCRチューブ中にそれぞれ10^{-12}g加えた。
M; Molecular Marker

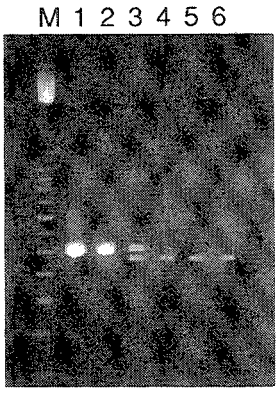


図3. 標準DNAを用いてのcompetitive PCR
HSV-1 DNAは全て10^{-13}g、HSV-2 DNAは1-6までそれぞれ10^{-10},10^{-11},10^{-12},10^{-13},10^{-14},10^{-15}g加えた。

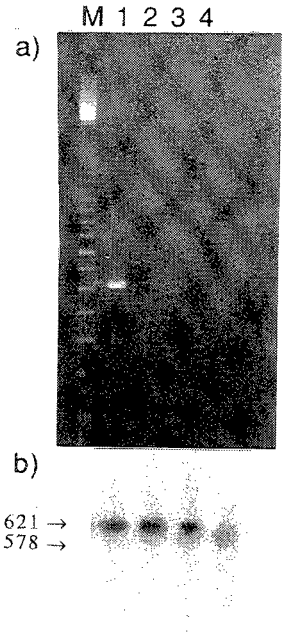


図4. HSV-1 脳炎患者髄液のcompetitive PCR
HSV-1 DNAは髄液5μl、標準HSV-2 DNAは1-4までそれぞれ10^{-12},10^{-13},10^{-14},10^{-15}g加えた。

222 筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）患者脊髄および血清トランスグルタミナーゼ（ＴＧ）活性と臨床症状との関連性

藤田公和・安藤正人・青木則久・楠戸正子[1)]・山口幸子・入谷克己・永田　豊・本多虔夫[2)]
（藤田保健衛生大学・医学部・生理、リハビリテーション医学[1)]、横浜市民病院・神経内科[2)]）

［要約］ ALSで死亡した患者から摘出した脊髄と、非神経疾患患者から死後摘出した脊髄中の組織トランスグルタミナーゼ(TG)活性を測定した結果、ALS患者の胸髄と腰髄部の横断面全ての部位で、非患者の活性値と比べて著明な低値を認めた。そこで、脊髄中のTG活性値が患者の血清中の酵素活性値にどのように反映されるかを検証するため、ALS患者から採血した血清中のTG活性を測定して、臨床症状（運動麻痺の進行状態）との対応を検討した。臨床症状の悪化度を数値化した尺度（本多のALS scale）は、ALS患者の運動麻痺の進行程度に対応して0から500点までと規定した。運動麻痺が比較的軽度の発病初期と考えられる scale値が100点前後のALS患者から得た血清中のTG活性値は、健常者の値（19.88pmol/100μl/h.）と比べてむしろ高くなる傾向が認められた（35pmol）。しかし、臨床症状がさらに悪化して、scale値が300点以上になると、ALS患者血清のTG活性値は極めて低下していた（5～10pmol）。このことは、ALS患者脊髄中で進行するニューロン変性に伴って、初期には血清中に漏出する変性指標酵素のTG活性値が増加し、神経細胞が変性・脱落すると、漏出する酵素活性値も低下している可能性を示唆している。したがって、血清中のTG活性値の変動は、ALS患者の臨床症状の悪化の程度を示唆する生化学的指標の一つとなり得る可能性が強く示唆される。しかし今後、ALS以外の種々の神経変性疾患についても同様の結果が認められるかどうか、さらに詳細に検討する必要があろう。

［目的］ 神経細胞質内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らかとなっている。そのため、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(1,4)。我々はALS患者脊髄組織内で、TG活性値が非神経疾患患者脊髄と比較して減少傾向にあることを昨年の本学会で報告した(3)。今回の実験では、さらに測定症例数を増やして患者脊髄内のTG活性値の変動について調べるとともに、臨床的にALSと診断された患者血清中のTG活性値と、種々な病期で実施した採血と同時に判定された本多のALS scale値（全身的な臨床症状を一定の基準に従って数値化し、症状が悪化するほど数値が高くなる）(5)との関連性について調べた。その結果から、血清TG活性値が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検討した。

［実験材料および方法］ ALS患者（4例）およびALS患者とほぼ同年令の非ALS患者（8例）の脊髄組織は、遺族の承諾を得て死後3～19時間経過で摘出し、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（14例）およびALS患者とほぼ同年令で神経疾患のない正常男女（11例）から採取した。また肝臓障害（肝炎、肝硬変）の患者(11例)から得られた血清についてもTG活性値を測定した。摘出された胸髄と腰髄は厚さ約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酵素試料として、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(6)に準じて行った。

［結果および考察］ ALS患者の死後摘出した胸髄と腰髄のTG活性値は、組織学的に特徴的な神経変性が認められる前角（前索）と側索部のみならず、病変が少ない後角と後索部でも非神経病患者脊髄の25%～62%の範囲にまで著明に減少しているのが観察された（図１）。したがって、神経変性が進行して、死亡に至ったALS患者脊髄では、組織中のTG活性値は大部分消失しているため、このような著明な酵素活性値の低下が示されたと考えられる。次に、ALSの種々の病期の患者から採血した血清中のTG活性値と、本多の提唱するALS scale値との関連性について検討した。このscaleは77の評価項目からなり、手引き書に従って、全身的な神経学的臨床症状を一定の基準で点数化することによって、疾病の進行状態を客

観的に評価しようとするものである。ALS患者とほぼ同年齢で健康な11名の男女から得られた血清中のTG活性値は19.88±4.04pmol/100μl/h.であったが、このscale値が50～150点の範囲で、麻痺や筋萎縮の程度が比較的軽度のALS患者血清中のTG活性値は、35pmol程度にまで増加していた。しかし、scale値の増加に伴って活性値は次第に減少し、scale値が250前後以上から416までの患者では、TG活性値は5～10pmol程度であった（図２）。組織内TG活性値は組織傷害後、変性開始初期に著明な増加を示し、変性過程が進行するに従って徐々に低下していくことが認められている。したがって、ALS scale値の低い脊髄ニューロンの変性初期には、組織中から血清中に漏出するTG酵素も多いが、病末期で脊髄内組織変性が進行すると、組織内TG活性も低下し、血液中に漏出するTG活性値も低値になると推測された。しかし、脊髄以外の他の臓器からの血液中へのTG酵素活性漏出も当然考慮する必要がある。肝臓は生体内で最も高いTG活性値を示すため、種々肝障害（肝炎、肝硬変など）患者から採取した血清中のTG活性値を測定した。その結果、それらの平均値は14.81±5.35pmolと、正常者よりもやや低値であった。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(2)。今回示されたALS患者血清とその臨床症状との関連性は、さらに脊髄組織周囲を循環している脳脊髄液内TG活性値を調べることによって、より直接的に確かめられると考えられる。また、ALS以外の神経系組織の変性疾患（パーキンソン病など）の血清で今回と同様のTG活性値の変動が認められるかなど、さらに詳細に検討を行う必要があろう。しかし、ALSのような神経変性疾患患者の臨床症状の悪化と、血清内TG活性値との関連性が明らかにされるならば、臨床症状からばかりではなく、この血清の生化学的指標を調べることによって、病気の予後や治療効果などを判断する一助になりうる可能性が示唆されることになる。

[謝辞] 本研究の一部は、平成6年度文部省科学研究費（重点領域、NO,06272235）の援助を受けて行われた。

[文献] (1)Ando et al.(1991)J.Neurochem.57.1848-1854.(2)D'Argenio et al(1989)Gut.30.950-954.(3)藤田ら(1993)神経化学.32.520-521.(4)Gilad et al.(1985)J.Neurochem.44.1385-1390.(5)本多(1992)神経治療学.9.271-278.(6)Lorand et al(1972)Anal.Biochem.50.623-631.

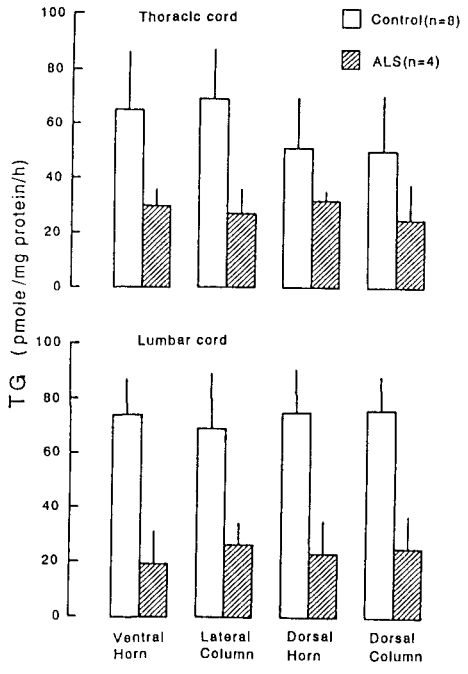


図１．ALSおよび非神経疾患患者脊髄組織内のTG活性値

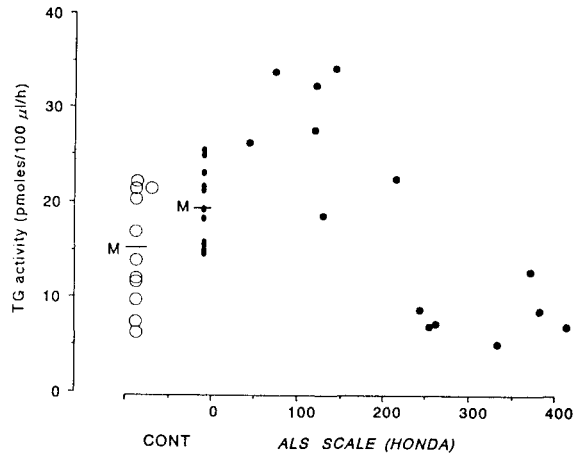


図２．ALSと診断された患者血清中のTG活性値

ALS患者は採血とほぼ同時期に本多のALS scaleを適用して全身的な麻痺や筋萎縮の進行状態を数値化した。対照者(CONT)のうち●はALS患者とほぼ同年齢の健康な男女、○は40-60歳の肝障害患者

223 運動ニューロン病の基底核病変（2）
－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〕
基底核病変を伴う運動ニューロン病(MND)において神経病理学的には病変を認めるのに関わらず臨床的には錐体外路症候が認められない点に注目し，前回MNDの基底核における神経伝達物質等の変動を抗メト・エンケファリン抗体，抗サブスタンスP抗体を用いて検討した[1]．今回は抗カルバンジンD28K抗体を用いて免疫組織学的に検討し，抗カルバンジンD28K抗体で染色される神経線維はMND黒質障害群で増加，黒質-淡蒼球-ルイ体障害群で減少を認めた．抗GFAP抗体による染色結果から黒質障害群と黒質-淡蒼球-ルイ体障害群とは連続した病態である可能性が示唆されており，抗カルバンジンD28K抗体による染色結果はdenervation supersensitivityやsprout，および細胞脱落による染色性低下との関連が推定された．カルバンジンD28Kと錐体外路系症状の発現との関係は明かではないが，MND基底核障害群で神経伝達物質の変動が認められた．

＜緒言＞
神経病理学的に基底核病変を伴う非典型的MNDの存在に注目し報告してきている[2)3)]．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，神経伝達物質の変動の側面から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20剖検例で，病型は全例とも狭義の筋萎縮性側索硬化症とした．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3剖検脳とした．
方法：神経病理学的なMNDの診断は常法に従った．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-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，基底核病変なし群の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次抗体を前回に引き続き抗メト・エンケファリン抗体(和光純薬)，抗サブスタンスP抗体(アマシャム)，抗GFAP抗体(ニチレイ)，今回から抗カルバンジンD28K抗体(シグマ)を加えて行った．染色は前回同様，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今回対象とした自験MND20症例は基底核病変群5症例(25%),基底核病変なし群15症例(75%)に分類できた.基底核病変群の詳細は黒質病変群3症例(15%),黒質-淡蒼球-ルイ体病変群2症例(10%)であった.

2．基底核の免疫染色結果

1)抗メト・エンケファリン抗体,抗サブスタンスP抗体での染色結果

前回同様,正常対照群および基底核病変なし群と基底核病変群の間ではメト・エンケファリン,サブスタンスP含有細胞の明らかな量的な変動は認められなかったが,基底核病変群で神経線維径の増大を認めた.

2)抗カルバンジンD28K抗体による染色結果

抗カルバンジンD28K抗体による免疫染色では正常対照群で,淡蒼球黒質は淡染する.抗カルバンジンD28K抗体による染色は剖検時の条件により変動が大きいとされているため,染色時には本抗体により強染色される小脳プルキンエ細胞を対照として染色した.染色結果は表1に示す.基底核病変を有するMNDではエンケファリン,サブスタンスP含有神経細胞の減少は明かではなかったが,黒質-淡蒼球-ルイ体病変を有するMND群でGABA系と存在をほぼ同一とするカルバンジンD含有細胞の減少が示唆された.また,病変群ではstriosome構造が明らかで無くなる傾向を認めた.

表1．抗カルバンジンD28K抗体による染色結果

	淡蒼球外節	淡蒼球内節	黒　質
基底核病変なしALS群	nc(13/15)	nc(13/15)	nc(9/15)
	↑(2/15)	↑(2/15)	↓(6/15)
黒質障害群	↑(3/ 3)	↑(3/ 3)	↑(2/ 3)
			↓(1/ 3)
N-P-L障害群	nc(2/ 2)	nc(2/ 2)	↓(2/ 2)

nc:no change, N-P-L:nigro-pallido-Luysian

＜考案＞

自験MND例の検討から,MNDの基底核病変で脱落変性する神経細胞はエンケファリン,サブスタンスP含有細胞ではなく,GABA系の神経細胞である可能性が示唆された.しかし,エンケファリン,サブスタンスP含有細胞の神経線維径の増大は何らかの神経細胞体の異常を示唆しているも考えられ,基底核病変を有するMNDでは,神経伝達物質等の含有神経細胞および神経線維全般に何らかの変化が生じている可能性も推定された.

参考文献

1)長谷川一子:運動ニューロン病の基底核病変－組織化学的検討－.神経化学32:538-539,1993.

2)K.Hasegawa,H.Kowa,S.Yagishita:Extrapyramidal involvement in Motor Nueron Disease. J Neurol Sci 108:137,1992.

3)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.

224 グルココルチコイドはアンフェタミンにより惹起される初代培養神経細胞の[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGの変化を増強する

山本秀子、山本敏文*、鷺直樹、楊献紅、諸治隆嗣
（東京都精神研・精神薬理、横浜市大・総合理・分子認識*）

〔要約〕 ラット初代培養大脳神経細胞をグルココルチコイド(GC)でsubchronicに処理すると5nMの[^{3}H]TCP存在下でのINTACT CELL BINDINGは用量依存性に増加した。しかし、ミネラルコルチコイドではその作用は見られなかった。一方、subchronicにアンフェタミン(AMP)処理した培養神経細胞の[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGの増加はこのGCによる[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGの増加と相加的であった。GC処理細胞を用いた[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGのScatchard解析から、[^{3}H]TCP結合の親和性の増加と結合量の減少が明かとなった。In Vivoではストレス負荷またはGC投与がAMPによるbehavioral sensitizationを増強することを考慮すると、今回得られた結果はIn VitroでのsubchronicなAMPまたはGC処理がNMDA受容体/イオンチャンネルのDown regulationという共通の作用を引き起こすことを示唆している。

[目的] 前回、我々はラット培養神経細胞への[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGがsubchronicなAMP処理により顕著に増加することと細胞及び細胞由来膜画分を用いたScatchard解析から[^{3}H]TCP結合のSensitization と Down regulationが生じていることを報告した(1, 2)。ラットへのAMP連続投与による逆耐性形成はNMDA受容体/イオンチャンネルの競合的・非競合的阻害剤の投与により抑制されることが報告されており、AMPによる逆耐性形成にNMDA受容体/イオンチャンネルがなんらかの役割を果たしていることが示唆されている(3-7)。一方、血中のステロイド特にGCはストレス負荷により上昇するが、連続ストレス負荷またはGC投与を受けたラットはAMP連続投与により引き起こされる行動異常をより強く示すことが報告されており(8, 9)、ストレスにより上昇するGCが神経細胞に及ぼす作用はAMPによる逆耐性形成機構と接点を有するのではないかと考えられる。従って、本研究ではGC処理によるラット培養神経細胞の[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGに及ぼす影響を検討し、AMP処理により惹起される変化と比較することによって、AMPとGCに共通する機構の手がかりを得ることを目的としている。

[方法] 文献2と同様に行なった。

[結果及び考察] コルチコステロン(CORT)により6日間処理した初代培養神経細胞を用いて5nMの[^{3}H]TCP存在下で[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGを測定すると、濃度依存性の増加が見られた(図1)。しかし、デオキシコルチコステロンによる処理では変化は見られず、また、デキサメタゾンを用いても濃度依存性の[^{3}H]TCP結合増加が見られたので、CORTはGC受容体を介してNMDA受容体/イオンチャンネルに影響しているものと考えられる。CORT10μMの8日間処理が[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGに及ぼす影響をScatchard解析すると、無処理培養細胞への[^{3}H]TCP結合と比較して、Kd及びBmax値の低下が見られ、この変化はAMPによる変化と類似していた(図2、表1)。AMP10μM、CORT3μMまたは両方の薬物によってsubchronicに7日間処理すると、AMPとCORTで共に処理した細胞では[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGが単独で処理した細胞への結合よりも増大し、AMPとCORTの[^{3}H]TCP結合に及ぼす作用には相加性が認められた(図3)。この結果は初代培養神

経細胞を用いたIn Vitroの実験系ではAMPにより誘導されたNMDA受容体/イオンチャンネルの変化がGCにより増強されることを示しており、AMPによる逆耐性形成にNMDA受容体/イオンチャンネルが関与していることを考えると、In VivoでのGCまたはストレス負荷によるAMP逆耐性形成助長はAMP及びGCがNMDA受容体/イオンチャンネルという共通の機構を介している可能性がある。

[文献](1)山本秀子等、神経化学、30巻230-231。
(2)山本秀子等、神経化学、31巻590-591。
(3)Karler et al., (1989)Life Sci., 45, 599-606.
(4)Karler et al., (1990) Brain Res., 537, 76-82(1990)
(5)Wolf et al., (1991)Brain Res., 562, 164-168.
(6)大森哲郎等、神経化学、32巻486-487。
(7)Stewart et al., (1993) Psychopharmacol., 110, 125-132.
(8)Herman et al., (1984)Psychopharmacol., 84, 431-435.
(9)Deroche et al., (1992)Brain Res., 584, 309-313.

表1

Effect Of Subchronic Treatment Of Corticosterone Or Amphetamine On The Affinity And Binding Capacity In [^{3}H]TCP Intact Cell Binding

INTACT CELL BINDING	Kd [nM]	Bmax [pmol/mg protein]
CONTROL	34.2 ± 3.9 (3)	2.72 ± 0.04 (3)
CORTICOSTERONE (10μM, 8 days)	17.9 ± 1.4 (3) *	1.93 ± 0.05 (3) ***
CONTROL	24.6 ± 3.9 (7)	5.93 ± 0.63 (7)
AMPHETAMINE (20μM, 8 days)	12.1 ± 1.7 (4) *	2.84 ± 0.51 (4) **

*; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001.

図1

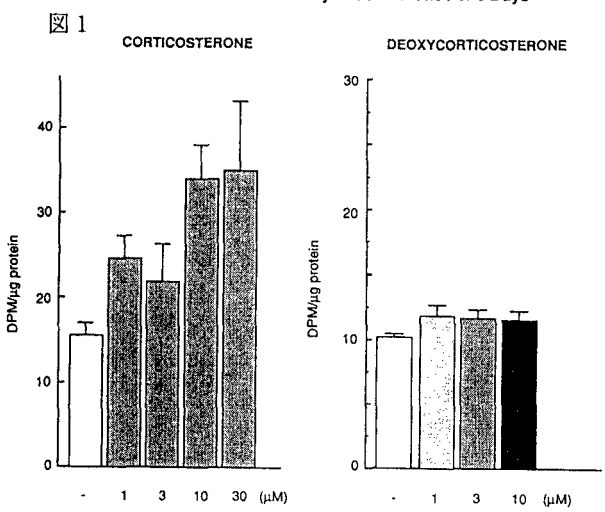


図3

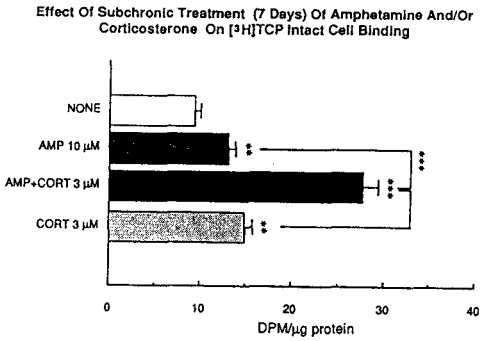
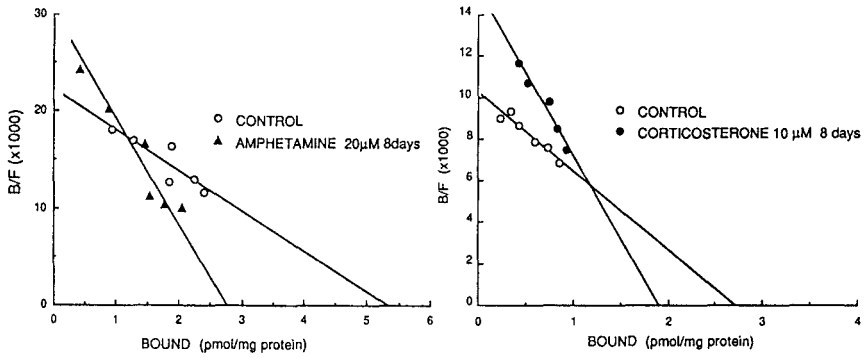


図2 Scatchard Plot Of [^{3}H]TCP Intact Cell Binding To Cultured Neuron Treated With Amphetamine Or Corticosterone



225 ラットアストロサイトのグリアフィラメントによるマイクロフィラメント重合促進

伊藤仁一、磯部真理
（名市大・医・生化 I）

〔要約〕

培養ラットアストロサイトより脱重合抽出されたグリアフィラメント画分（ＧＦ）はα－シアロシルコレステロール（ＳＣ）存在下において、同アストロサイトより脱重合抽出されたマイクロフィラメント画分（ＭＦ）の重合を著しく促進した。ＧＦのＭＦ重合促進作用は 7.5－15 μM のＳＣ存在下において特に強く、5 μg/200 μl ＧＦは 7.5 μg/200 μl のＭＦの重合を８倍促進した。しかしながら、あらかじめＧＦを重合させるとＭＦ重合促進作用は非重合型ＧＦに比べ１／２以下に減少した。またＧＦは重合したＭＦ（再構成マイクロフィラメント様フィラメント、ＭＦフィラメント）に対するＳＣの脱重合作用を強く抑制した。ＳＣ存在下におけるウサギ骨格筋アクチン重合をウシレンズビメンチンが促進したことからＳＣ存在下におけるＭＦとＧＦの相互作用がアクチン・ビメンチンの相互作用を介したものであることが示唆された。

α－シアロシルコレステロール（ＳＣ）はアストロサイトを成熟型アストロサイトへと形態を変化させ、またコントロール細胞においてマイクロフィラメントが形成するストレスファイバー構造を消失させ、グリアフィラメントによって形成されるネットワークも崩壊させる [1,2]。わたしたちは再構成系においてＳＣがＭＦおよびＧＦの重合を dose-dependent に抑制し、重合したＭＦおよびＧＦ（ＭＦフィラメントおよびＧＦフィラメント）の脱重合を促進することを示し、これはＳＣがこれらフィラメントの主要構成タンパク質であるアクチンあるいはビメンチン（未分化アストロサイトにおいてはビメンチンがグリアフィラメントの主要構成タンパク質）に直接作用した結果であることを明らかにした [3,4]。さらにわたしたちはＳＣでＭＦ重合の臨界濃度を上昇させる再構成系を用いて、ＭＦの重合に対するＧＦの作用を検討した結果、ＳＣ存在下においてＭＦがＧＦ重合を促進することを見いだし、アクチンによるビメンチン重合促進がその要因の１つであることを示した。今回ＳＣ存在下の再構成系においてＭＦの重合に対するＧＦの作用を新たに検討したので報告する。

（実験方法）

１．ラットアストロサイトの培養：胎性１６日目のラット胎児大脳より髄膜を除去し、0.1% トリプシンで処理した後、これを 20% FCS/DMEM にて１週間の一次培養および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 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 の遠心で沈殿画分（粗細胞骨格画分）を得た。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０℃１時間脱重合抽出し、100,000 x g で、１時間の遠心上清を脱重合型マイクロフィラメント画分（ＭＦ）とした。またＭＦに 150 mM KCl と 10 mM $MgCl_2$ を添加し、３７℃１時間重合させることにより最大重合量に達した再構成マイクロフィラメント様フィラメント（ＭＦフィラメント）を 100,000 x g, １時間の遠心で沈殿画分として回収した [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。得られた遠心上清を脱重合型グリアフィラメント画分（ＧＦ）とし、100 mM NaCl と10 mM $MgCl_2$ を添加し、ＭＦフィラメントの場合と同様に３７℃１時間インキュベートして グリアフィラメント様フィラメント（ＧＦフィラメント）を得た [3]。

（実験結果および考察）

１５μＭ ＳＣ存在下においてＧＦはＭＦの重合を濃度依存的に促進し、等量のＭＦ自身を添加したときに比べ約２倍のＭＦ重合促進作用を示した。 また 7.5－15 μM のＳＣ存在下でＧＦのＭＦ重合促進作用は最も強く、４μｇのＧＦは 150 mM NaCl、10mM $MgCl_2$、および 15 μM ＳＣ 存在下で 7.5 μg/200 μlのＭＦの重合を８倍促進した。昨年報告したように、ＭＦはＳＣ存在下においてＧＦの重合を促進することから、ＭＦとＧＦは相互に重合を促進しあうことが示唆された。またＭＦによるＧＦ重合促進の場合と同様に、重合型のＧＦ（ＧＦフィラメント）は脱重合型であるＧＦに比べて大きくＭＦの重合促進作用が低下した。すなわち 7.5 μM ＳＣ存在下において、10 μg/200 μlのＭＦの重合を５μｇのＧＦは４倍促進したにもかかわらず、重合型のＧＦは 1.5倍促進したにとどまった（図１）。ＧＦは４℃ではＭＦの重合を３倍促進したのみであったが重合温度の上昇と共にその促進作用も上昇した。

ＳＣはＭＦフィラメントの脱重合を促進することが既にわかっているが、ＧＦはこれを著しく抑制した。すなわち、３μg/200 μlのＭＦを３７℃で１時間インキュベートして再構成されたＭＦフィラメントを 30 μM ＳＣと３７℃２時間インキュベートすると 100,000 x g 遠心で沈殿されたＭＦフィラメントは１／３に低下し、特にＭＦフィラメントに含まれるアクチン量は３０％以下に減少した。しかしながらＳＣと同時に４μｇ ＧＦを共存させると遠心沈殿されたＭＦフィラメント中に含有されるアクチン量は６５％に上昇した。さらにＭＦをＧＦ共存下で前重合させるとＳＣとのインキュベーション後においても８０％のアクチンがＭＦフィラメント中に回収された。

ウサギ骨格筋アクチン（5 μg/200 μl）は 11.3 μM ＳＣ存在下でウシレンズビメンチン（2 μg）により重合が２倍促進された（図２）。このことからＳＣ存在下におけるＧＦによるＭＦ重合促進はグリアフィラメントの主要構成タンパク質であるビメンチンによるマイクロフィラメントの主要構成タンパク質であるアクチンの重合促進に強く関わることが示唆された。

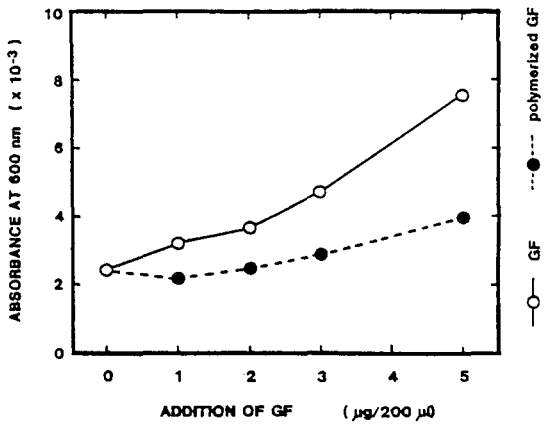


図１． 1.5 μM ＳＣ存在下におけるＧＦと重合型ＧＦのＭＦ重合促進作用の比較

10 μg/100 μl のＭＦを1.5 μM ＳＣおよび各濃度のＧＦあるいは重合型ＧＦが存在する再構成系において３７℃、１時間重合した。再構成されたフィラメントは１０万ｇ、１時間の遠心沈殿として回収され、SDS-PAGE され、600 nm の吸収によりアクチン量を定量した。

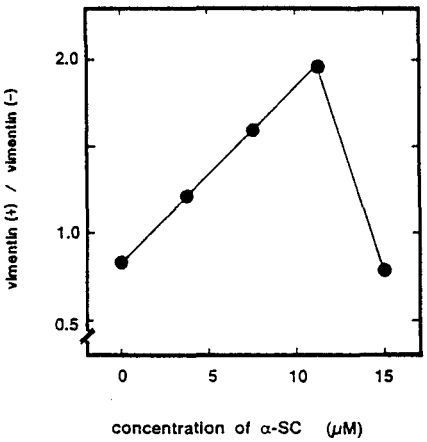


図２． アクチン重合に対するビメンチンの効果

各濃度のＳＣおよびウシレンズビメンチン（１μM）存在下においてウサギ骨格筋アクチン（５μg/100 μl）を３７℃１時間重合させた。１０万ｇ１時間の遠心沈殿を SDS-PAGE し、アクチンバンドを 600 nm の吸光で定量した。

（文献）

1) J. Ito et al., Brain Res., 481, 335-343, 1989
2) J. Ito et al., J. Neurochem., 61, 80-84, 1993
3) J. Ito et al., Neurochem. Int., in press
4) J. Ito et al., J. Neurochem., 62, 235-239, 1994

226 エンドセリンによる培養アストロサイト Stress Fiber形成に対するC3酵素の阻害

小山 豊、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕エンドセリン(ET)によるstress fiber形成における、低分子量GTP結合タンパクrhoの関与を検討した。無血清培地中でのdibutyryl cAMP(DBcAMP)による培養アストロサイトの処置は、stress fiberの消失を起こした。ET-3(1 nM)は、DBcAMP処置された細胞にstress fiberの再形成を起こした。DBcAMP処置されたアストロサイトの細胞質へのC3酵素(20μg/ml)の注入は、ET-3によるstress fiber形成を完全に抑制した。ET-3(50 nM)によるアストロサイトの細胞内Ca^{2+}増加は、C3酵素により影響されなかった。ET-3によるアストロサイトのstress fiber形成は、H-7(30μM)の存在下では認められなかった。これらのことは、ETはrhoタンパクを介してアストロサイトのstress fiber形成を起こすことを示唆する。

アストロサイトは、中枢におけるエンドセリン(ET)の標的細胞である。脳内エンドセリンの産生は、傷害時に高まり、脳傷害に対する病態生理的な反応を担うと考えられている。しかし、ET受容体の活性化が、アストロサイトの機能へ及ぼす影響は明かではない。我々は、ETのアストロサイトの機能に対する作用を検討し、ET-3がcAMPアナログによる培養アストロサイトの形態分化を抑制すること(2)、そしてこのETの作用がアストロサイトの細胞骨格アクチンの重合、特にstress fiberの形成を伴うものであること(3)を示している。最近、細胞増殖因子によるstress fiber形成にras-like低分子量GTP結合タンパクである"rho"が関与することが示された(4)。そこで、今回はETによるアストロサイトのstress fiber形成におけるrhoの関与を、リボシル化によりこの働きを特異的に阻害するボツリヌス菌由来C3酵素を用いて検討した。

【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日齢のWistar系ラット大脳より、既報の方法で調製した(2)。

2．培養アストロサイトへのマイクロインジェクション：培養アストロサイトを、20 mM HEPES緩衝液を含んだ無血清培地中で、0.25 mM dibutyryl cAMP (DBcAMP)で120分処置し、stress fiberの消失を起こした。ボツリヌス菌由来C3-リボシルトランスフェラーゼ(C3酵素；和光純薬)は、injection buffer(10 mM Tris/HCl pH 7.4, 120 mM KCl,)で 20μg/mlとし、マーカーとしてのマウスIgG(0.5mg/ml)と共に、先尖したガラスキャピラリーにて、形態変化した培養アストロサイトの細胞質に注入した。

3．F-アクチンの観察：薬物による処置後、細胞を3%パラホルムアルデヒド、0.1%Triton X-100で固定し、ローダミン-ファロイジン染色を行い蛍光顕微鏡下F-アクチンの観察を行った。マイクロインジェクションされた細胞の場合、FITC-抗マウスIgG抗体を染色時に加え、細胞質中に強いFITC蛍光を有する細胞のみF-アクチンを観察した。

【結果】

無血清培地中での 0.25 mM DBcAMPによる120分の処置は、培養アストロサイトに細胞質の退行を伴う形態変化を起こした。この形態変化に伴いアストロサイトのstress fiberは消失した（図1B）。 DBcAMP処置に続く1 nM ET-3の60分の処置は、アストロサイトに stress fiberの再形成を起こした（図1C）。ET-1、sarafotoxin S6b、ETb受容体アゴニストである[$Ala^{1,3,11,15}$]-ET-1 もET-3と同じ強さで、DBcAMPで処置された細胞にstress fiber形成を起こした。サイトカラシンB(5μM)、W-7(20μM)およびmyosin-light chain kinase阻害薬であるML-9(50μM)による培養アストロサイトの処置もstress fiberを消失させたが、1 nM ET-3は、これらの細胞にもstress fiberを形成させた。一方、ET-3は、protein kinase C

(PKC)阻害薬であるH-7(30μM)存在下では、DBcAMP処置された培養アストロサイトにstress fiberの形成を起こさなかった（図1D）。DBcAMP処置されたアストロサイトへのマウスIgG(0.5mg/ml)のみの注入は、ET-3によるstress fiber形成に影響しなかったが、C3酵素(20μg/ml)の注入は、stress fiber形成を完全に抑制した(図2)。ET-3(50μM)によるアストロサイトの細胞内Ca^{2+}の増加は、C3酵素の注入で影響されなかった。

【考察】

C3酵素の細胞内注入は、ET-3による培養アストロサイトのstress fiber形成を抑制した。C3酵素は、低分子量GTP結合タンパクであるrhoをリボシル化しその活性をなくす(1)。よって、今回の結果は、ETによるアストロサイトのstress fiber形成にrhoタンパクが関与することを示唆する。血小板、リンパ球において、rhoはPKCにより促進的調節を受けることが示されている(5)。ET-3の作用がH-7により阻害されたことは、アストロサイトにおいてもrhoは、PKCの下流で機能する事を示す。

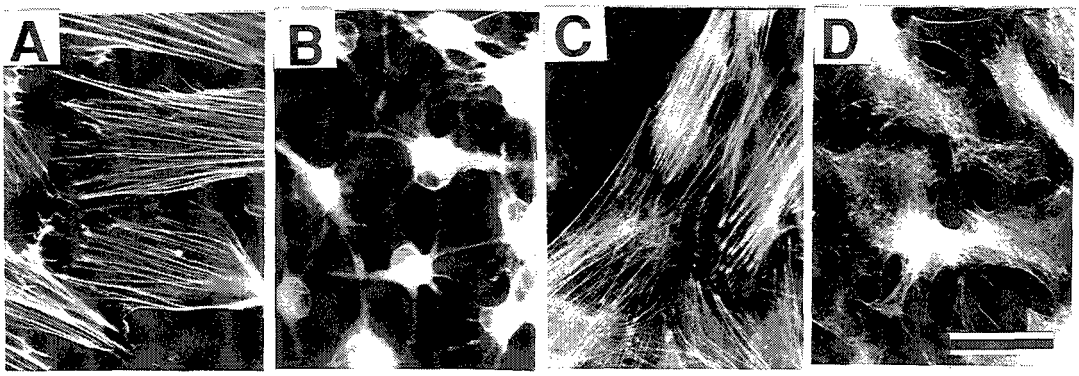


図１．ET-3によるstress fiber形成に対するH-7の阻害：0.5 mM DBcAMPでの120分間処置後、培養アストロサイトを、1 nM ET-3および30μM H-7で更に60分間処置し、F-アクチンを観察した。（A）:薬物非処置、（B）:DBcAMP処置後、（C）:ET-3添加60分後、（D）:ET-3およびH-7添加60分後　Bar=25μm

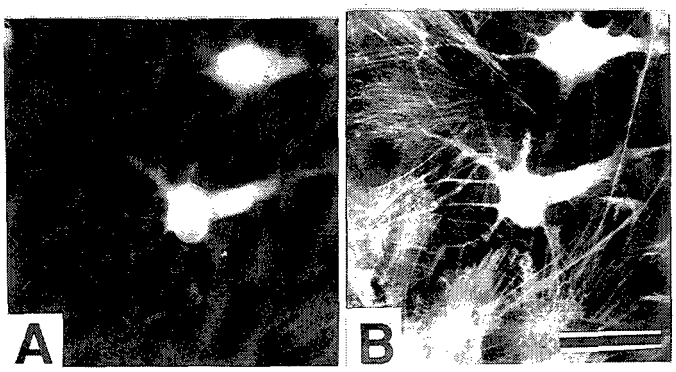


図２．C3酵素によるstress fiber形成の阻害：培養アストロサイトを、0.5 mM DBcAMPで120分間処置した後、C3酵素を細胞質中へ注入した。1 nM ET-3を加え、60分後にF-アクチンを観察した。（A）:FITC蛍光像、C3酵素を注入された細胞のみ観察される。（B）:F-アクチン染色像、FITC蛍光を示す細胞には、stress fiberの形成が認められない。Bar=25μm

【引用文献】

1. Aktories K., Braum U., Rosener S., Just I. and Hall A. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. **158**:209-213.
2. Koyama Y., Ishibashi T., Hayata K. and Baba A. (1993) Brain Res. **600**:81-88.
3. Koyama Y. and Baba A. (1994) Neuroscience in press
4. Rdley A. and Hall A. (1992) Cell **70**:389-399.
5. Tominaga T., Sugie K., Hirata M., Morii N., Fukuda J., Uchida A., Imura H. and Narumiva S. (1993) J. Cell Biol. **120**:1529-1537.

227 ラット大脳シナプス後部におけるドレブリン-アクチン複合体

林　謙介、石川良樹*、何　暁玲、白尾智明
（群馬大学医学部　行動分析、*薬理）

〔要約〕　神経細胞に豊富なアクチン結合蛋白ドレブリンは成体ではadult type（ドレブリンA）が発現しており、シナプス後部に局在する。ラット脳内のドレブリンAの局在を調べたところ嗅球、大脳皮質に特に多く存在していた。大脳皮質よりシナプトソームを調製し、ドレブリン抗体との反応を電子顕微鏡でみるとドレブリンはシナプス後部の細胞骨格に結合していた。アフィニティーカラムによりドレブリン-アクチン複合体を分離すると、220K、190K、130K、90Kの蛋白が付随してきた。それぞれミオシンII, V, I、ゲルゾリンと思われた。そこでドレブリンの、アクチンとミオシンとの相互作用に対する影響を調べてみると、ドレブリンは固定したミオシン上のアクチンの滑りを阻害した。ドレブリンは大脳皮質においてシナプス後部のアクトミオシン系の動態に影響を与え、形態変化に基づいた神経の可塑的機能に一役を担っているのではないかと考えている。

（導入）発生過程に脳で一過性に現われる蛋白として同定されたドレブリンは、主に次の３つの理由から神経細胞の形態の変化に重要と考えられる（４、５）。１、神経発生過程で遊走中の神経細胞や樹状突起形成中の樹状突起に、つまり形態変化の激しい時期と場所で強く発現している。２、F-アクチンと強く結合し、トロポミオシン、α-アクチニンと競合する。３、非神経細胞への強制発現は細胞骨格の動態に大きく影響し、樹状突起様の形態が形成される。

ところで、ドレブリンはalternative splicingによってembryo型からadult型へのisoform変換を起こす。adult型は神経細胞特異的と考えられシナプス後部に強く局在している。今回は成体の脳におけるドレブリンAの機能を探ることを目的に、ラットドレブリンAの脳内分布、及び他蛋白との相互作用について調べた。

（材料と方法）シナプトソームは蔗糖密度勾配により調製しアガロースゲルに包埋した後、抗ドレブリン抗体、ＨＲＰ標識二次抗体、ＤＡＢで染色し電子顕微鏡で観察した。アフィニティーゲルはproteinA-Sepharoseにモノクロン抗体をdimethyl pimelimidateで架橋したものを用いた。組織の可溶化には5mMTris、150mMNaCl、1%ＮＰ-４０、0.5mMＤＴＴ、Proteinase inhibitorsを基本として用い、10,000ｘｇ上清を出発材料とした。motility assayは、カバーグラス上に固定したミオシンの上をローダミンファロイジンで標識したF-アクチンを滑らせ、平均速度を精製ドレブリン存在下、非存在下で測定した。

（結果）

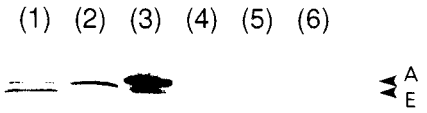
１）ドレブリンAは嗅球と大脳皮質に多く存在し、他の部域、特に小脳皮質では少なかった（図１）。大脳皮質の免疫組織化学では抗ドレブリン抗体による染色は抗ＳＶＰ３８抗体による染色と極めて類似し、シナプスの分布を思わせる顆粒状を呈する。そこで大脳皮質よりシナプトソームを調製し、ドレブリンの局在を調べたところ、ドレブリンはシナプス後部の細胞骨格に結合していることがわかった（図２）。

２）ドレブリンの結合している細胞骨格の構成成分を知るために、大脳皮質の１％ＮＰ-４０抽出物より抗ドレブリン抗体-アガロースゲルに結合する蛋白を銀染色で検出すると、ドレブリン、アクチンの他に220K、190K、130K、90Kのバンドが見られた（図３）。前者３本はＡＴＰにより溶出されることと分

子量とからそれぞれ、ミオシンII, ミオシンV, ミオシンIであると考えられる（図4）。90Kのバンドは抗ゲルゾリン-モノクロン抗体によってゲルゾリンであると同定された（図5）。フォドリン、α-アクチニン、トロポミオシンは、immunoblotによっても検出されなかった。
3）ドレブリンのアクトミオシンへの影響を調べるために、motility assayをおこなった。ドレブリンの過剰量存在下ではF－アクチンのミオシンに対する滑り速度は減少した（図6）。

（考察）シナプス伝達の可塑的変化に伴いspine（2）やpostsynaptic density（1）に形態変化が起こることが報告されており、またspine中にはアクチンとミオシンが豊富に存在することがわかっている（3）。ドレブリンはspine中のアクトミオシンの性質に影響し、シナプス構造の形態変化に基づいた神経の可塑的機能に関わっているのではないかと考えている。
（謝辞）免疫電顕観察に関して、群馬大学内分泌研究所、高田邦昭教授のご指導に感謝いたします。

（文献）(1)Desmond.N.L.and Wiliam B.L.(1986)J. Comp. Neurol.253,476-482 (2)Fifkova,E.(1985)Cell. Mol. Neurobiol. 5, 47-63 (3)Morales,M. and Fifkova,E.(1989)J. Comp.Neurol. 279,666-674 (4)Shirao,T., et al.(1990)Neurosci. Res.Suppl.13,S106-S111 (5)Shirao,T,et al.(1992)NeuroReport 3, 109-112



（図1）各神経組織中のドレブリン。Immunoblot。（1）ウサギ嗅球、（2）ウサギ大脳皮質、（3）ラット大脳皮質、（4）ラット小脳皮質、（5）ラット脳幹部、（6）ラット脊髄、（A）adult type、（E）embryo type



（図2）シナプトソームにおけるドレブリンの局在。

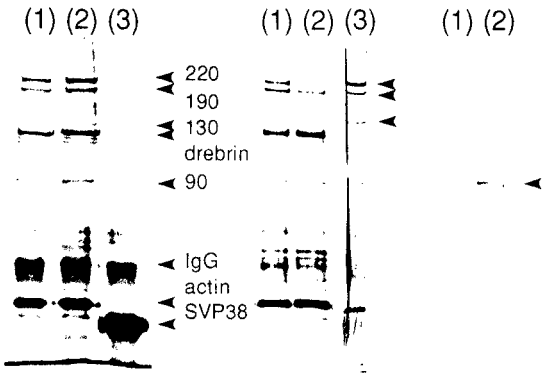
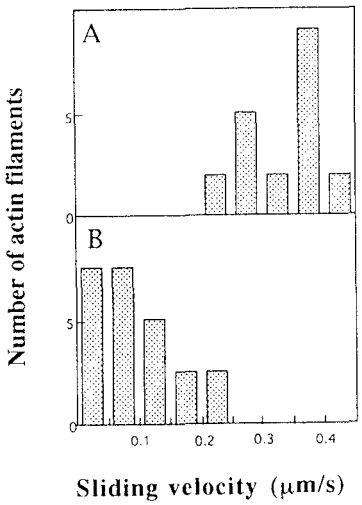


図3　図4　図5

（図3）Immuno affinity gelに結合する蛋白。銀染色。（1）（2）ドレブリンの異なるepitopeに対するモノクロン抗体（それぞれM2F6、M2H1）を使用。（3）SVP38に対するモノクロン抗体を使用。
（図4）抗ドレブリン抗体-ゲルへの結合物。（1）ATP溶出前、（2）ATP溶出後、（3）ATP溶出物
（図5）抗ゲルゾリン抗体によるimmunoblot。（1）ウサギ脳粗抽出物、（2）抗ドレブリン抗体-ゲルへの結合物



（図6）Motility assay（A）ドレブリン非存在下、（B）アクチンに対してモル比2倍のドレブリン存在下

228　シナプシンＩとカルスペクチンとの結合解析

伊賀　正英、乾　誠、祖父江　憲治
（大阪大学医学部・神経生化学）

〔要約〕
神経伝達物質放出における細胞膜骨格蛋白質の関与を明かにすることを目的として、シナプス小胞蛋白質シナプシンＩと細胞膜骨格蛋白質カルスペクチンとの結合の解析を行った。シナプシンＩとカルスペクチンとの結合はＫｄが6.72nMと高い親和性を示した。この結合は、イオン強度依存性であった。シナプシンＩはｃＡＭＰキナーゼおよびカルモデュリン（ＣａＭ）キナーゼIIによりそれぞれ異なった部位が燐酸化されることが知られているが、これら両キナーゼによるシナプシンＩ燐酸化によりシナプシンＩとカルスペクチンとの結合量は約５０％の阻害を受けた。また、シナプシンＩ、カルスペクチンは共にＣａＭ結合能を有するが、ＣａＭは両蛋白質の結合へ影響を与えなかった。さらに、カルスペクチンのシナプシンＩへの結合部位をシナプシンＩのＮＴＣＢフラグメントを用いて解析した。その結果、シナプシンＩのミドル領域にカルスペクチンが結合することが明かとなった。以上の結果は、細胞膜骨格蛋白質カルスペクチンが神経伝達物質放出に関与する可能性を示唆する。

緒言

シナプシンＩは神経終末においてアクチンと結合し、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している（１）。カルスペクチンは細胞膜骨格を形成する主要蛋白質であるが、シナプス前部では、電顕上カルスペクチンと思われるフィラメントが細胞膜より細胞質側に突き出している像が報告されている（３）。また、in vitroにおいてシナプシンＩがカルスペクチンに結合することが既に報告されている（４）。今回、我々は神経伝達物質放出における細胞膜骨格蛋白質の関与を明かにすることを目的として、シナプシンＩとカルスペクチンとの結合の詳細な解析を行った。

方法

１.シナプシンＩとカルスペクチンとの結合の定量：ウシ脳より単離したシナプシンＩをTween 20存在下にドット状にニトロセルロース膜上にのせ、ＢＳＡでブロックした後、^{125}Ｉで標識したカルスペクチンと室温で４時間インキュベートした。カルスペクチンの結合量は、ニトロセルロース膜上の放射性活性から定量した。

２.カルスペクチンのシナプシンＩへの結合部位の同定：シナプシンＩをＮＴＣＢ(2-nitro-5-thiocyanobenzoic)で分解しＮＴＣＢフラグメントを得た。これらのフラグメントをＳＤＳ電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写し、^{125}Ｉで標識したカルスペクチンと室温３時間インキュベートした。ニトロセルロース膜は洗浄後、オートラジオグラフィーで解析した。

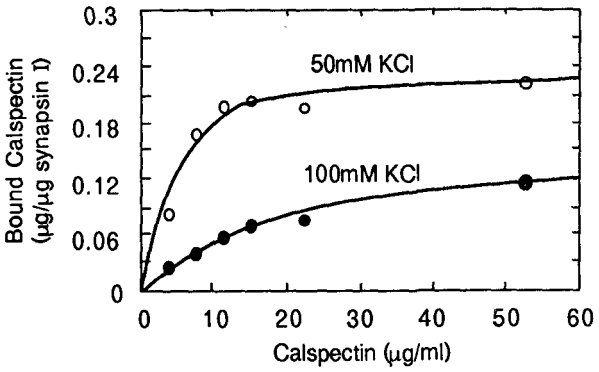


図１　カルスペクチンのシナプシンＩへの結合

結果と考察

シナプシンＩとカルスペクチンとの結合の性質を明かにするため、単離シナプシンＩ及びカルスペクチ

ンを用いて結合実験を行った。図１にシナプシンＩのカルスペクチンへの結合のカルスペクチン濃度依存を示す。両者の結合は、Ｋｄが約10nMと非常に高い親和性を示した．この結合はイオン濃度依存性で、100mMＫＣｌでは50mMＫＣｌに比しＢｍａｘが約５０％減少した．また、この結合はCa^{2+}非依存性であった。シナプシンＩおよびカルスペクチンは共にＣａＭ結合能を有することが知られているが、ＣａＭは両蛋白質の結合にはCa^{2+}濃度のいかんにかかわらず影響を与えなかった。シナプシンＩはｃＡＭＰキナーゼおよびＣａＭキナーゼIIによりそれぞれシナプシンＩの頭部および尾部が燐酸化される。これら燐酸化のカルスペクチン結合への効果を調べた結果、図２に示す様にいずれの燐酸化によっても約５０％の阻害を受けた。さらに、カルスペクチンのシナプシンＩへの結合部位をシナプシンＩのＮＴＣＢフラグメントを用いて解析した。カルスペクチンは、７８ｋ、７６ｋ、５４ｋ、５１ｋ、４０ｋ、１６ｋ、１５ｋのフラグメントと結合し、３５ｋ、３６ｋの尾部フラグメントには結合しなかった。カルスペクチンの結合したフラグメントは、いずれも１６ｋ、１５ｋのミドル領域を含んでおり、カルスペクチンがシナプシンＩのミドル領域に結合することが明かとなった。しかしながら、２９ｋの頭部フラグメントにも弱い結合が見られることから、頭部にも親和性の弱い結合部位が存在することは否定できない。現在、電顕で両者の結合を確認中である。

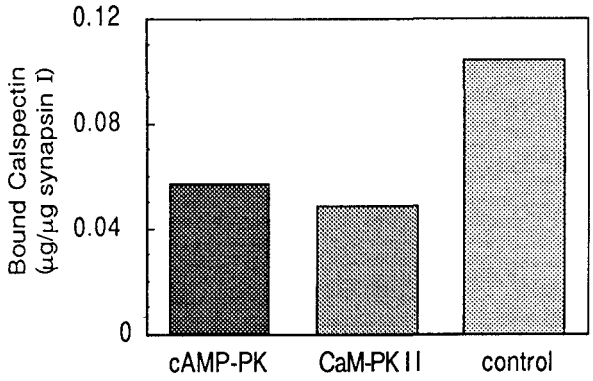


図２　シナプシンＩ燐酸化のカルスペクチン結合への影響

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、またCa^{2+}依存性のアクチンネットワークからのシナプス小胞の遊離に重要な役割を果たすと考えられている（４）。今回の結合解析結果から、シナプシンＩとカルスペクチンが非常に高い親和性を有することが示され、神経伝達物質放出機構に細胞膜骨格蛋白質が積極的に関与する可能性が示唆された。シナプシンＩとカルスペクチンとの結合の生理的意義は現時点では不明であるが、シナプス小胞のシナプス前膜への誘導、結合やシナプス小胞のリサイクリングなどに関与する可能性が考えられる。

参考文献

1. Greengard,P.,Valtorta,F.,Czernik,A.,J.,and Benefenati,F.(1993)Sience 259,780-785
2.Hirokawa,N.,Sobue,K.,Kanda,K.,and Yorifuji,H.(1989)J.Cell.Biol.108,111-126
3.Landis,D.,M.,D.,Hall,A.,K.,and Reese,T.,S.(1989)Neuron 1,201-209
4.Sikorski,A.F.,Teriecki,G.,Zagon,I.,and Goodman,S.R.(1991)J.Cell.Biol.114,313-318

229 ラット胎仔ドレブリンの精製と解析

石川良樹、佐々木洋、林謙介*、白尾智明*、小浜一弘
(群馬大学医学部・薬理、*同・行動分析)

〔要約〕ラット胎仔脳からドレブリンの精製に成功した。精製したドレブリンの生化学的解析を行ったところ、アクチン繊維と解離定数1.2 x 10^{-7} M、アクチンとのモル比1:5で結合することがわかった。またドレブリンはトロポミオシンのアクチン結合を強く阻害した。大過剰のトロポミオシンがドレブリンのアクチン結合を阻害することから、ドレブリンはトロポミオシンと拮抗的にアクチンに結合していると考えられる。ドレブリン遺伝子を導入したCHO細胞を蛍光抗体法で調べたところ、アクチン繊維が良く発達しているにもかかわらずトロポミオシンがアクチンから遊離していた。そのような細胞ではアクチン繊維にドレブリンが結合していた。以上の結果から、神経突起伸長過程において、ドレブリンがアクチン繊維に結合してトロポミオシンを遊離させることにより、アクチン繊維をダイナミックな状態に保つ役割をしていると考えられる。

[目的] ドレブリンは神経発生特異的に発現する蛋白質で、既に抗体が作成され、遺伝子もクローニングされている。この遺伝子を培養細胞に導入すると神経突起様構造をとることから、ドレブリンが突起形成に関与していると示唆されている。また蛍光抗体法により、アクチン繊維上に存在することがわかっている。しかしこの蛋白質の精製が難しかったせいで、その蛋白化学的解析は全く成されていなかった。そこで今回、ドレブリンの精製と解析を試みた。

[方法] ドレブリンの精製：ラット18日胚脳を生理的塩濃度でホモジェナイズし、超遠心後の上清を3分間ボイルする。遠心後、上清の0-20g/dl硫安画分をDEAE-toyopearlにかける。ドレブリン画分をSuperose 6でゲル濾過し、精製ドレブリンを得た。
アクチン結合実験：ドレブリンにアクチン繊維を混ぜ、30分間インキュベーションしたのちエアフュージで超遠心する。実験によってはさらにトロポミオシンを混ぜる。上清と沈殿をSDS電気泳動にかけ、デンシトメーターでそれぞれの蛋白量を決定する。
遺伝子導入：アクチンプロモーターとドレブリンA遺伝子をMIW-DAベクターに組み込み、リン酸カルシウム法でCHO-K1細胞に導入する。細胞を固定後、抗ドレブリン抗体、抗トロポミオシン抗体、ローダミンファロイジンで蛍光染色する。

[結果] ドレブリンのアクチン結合能：ドレブリンの濃度を増やしていくと、アクチンと共沈するドレブリン量も増えていく（図1）。ドレブリン単独では沈殿しないことから、精製したドレブリンはアクチン結合能があることが示された。アクチン:ドレブリンが5:1のところで結合は飽和した。解離定数（結合飽和の1/2の遊離ドレブリン濃度）は1.2 x 10^{-7} Mであった。
トロポミオシンのアクチン結合の阻害：様々な濃度のドレブリン存在下でトロポミオシンのアクチン結合を調べた（図2A）。ウシ脳トロポミオシン（黒丸）、ニワトリ平滑筋トロポミオシン（白丸）とも、ドレブリンにより強く結合が阻害された。次に大過剰のトロポミオシン存在下でドレブリンのアクチン結合を調べたところ（図2B）、ドレ

ブリンの結合が阻害された。このことは、ドレブリンとトロポミオシンが拮抗的にアクチン繊維と結合している事を示唆している。

ドレブリン遺伝子を導入したCHO細胞の蛍光抗体染色（図３）：ドレブリン遺伝子を導入した細胞（白矢印）ではアクチン繊維が良く発達している（A）が、トロポミオシンは染色されない（B、D）。このことは、細胞内においてもドレブリンがトロポミオシンのアクチン結合を阻害していることを示唆している。

[考察] トロポミオシンは、ゲルゾリン、ADF、ビリンなどのアクチン繊維切断・脱重合因子からアクチン繊維を守って安定化する働きが知られている。細胞内局在をみても、ストレスファイバーに多く存在し、ラッフリング・メンブレンやマイクロスパイクなどダイナミックに動いているアクチン繊維上にはあまり存在していない。我々は今回の結果から、ドレブリンがアクチン繊維からトロポミオシンを追い出すことによって、アクチン繊維をよりダイナミックな状態にし、突起形成をおこしやすくしているのではないかと考えている。

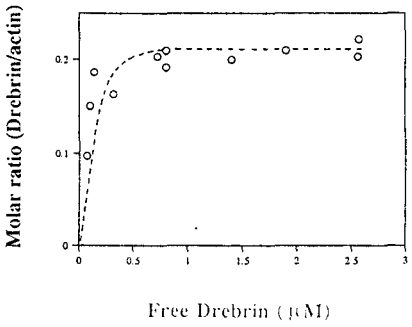


図１、ドレブリンのアクチン結合能

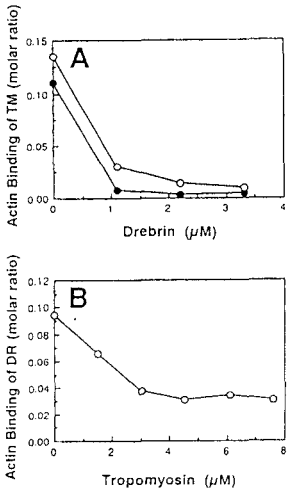


図２Ａ、トロポミオシンのアクチン結合能に対するドレブリンの影響。Ｂ、ドレブリンのアクチン結合能に対するトロポミオシンの影響。

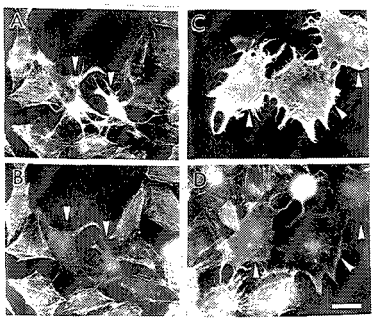


図３、ドレブリン遺伝子を導入したCHO細胞の２重染色。Ａ、ローダミン・ファロイジン染色；Ｂ、抗トロポミオシン抗体染色；Ｃ、抗ドレブリン抗体染色；Ｄ抗トロポミオシン抗体染色。

230 軸索に存在する微小管結合蛋白タウの特性

田代　朋子、　孫　小燕*、　小宮　義璋
（群馬大学医学部・分子病態、　*リハビリテーション医学研究施設）

〔要約〕
軸索微小管の安定化に対する微小管結合蛋白(MAPs)の関与を調べる目的で、軸索の主要MAP であるタウ蛋白について、軸索内における存在様式、分子種、軸索内輸送を解析した。
1.二種類の抗タウ抗体を用いて検索したところ、軸索では分子量 56K～67K の４本の主バンドが検出された。これらは、過塩素酸処理、加熱処理、二次元電気泳動によりタウと確認された。
2.軸索タウの約75% は、ニューロフィラメント(NF)蛋白や安定重合型チューブリンとともに、低温Triton不溶性画分に回収された。これを更に0.85M 蔗糖中で遠心沈殿して細胞骨格成分を精製した場合もタウは沈殿に濃縮される。タウは遅い軸索内輸送で運ばれており、最も遅い成分 SCa (slow component a)に多く含まれる。
3.二次元電気泳動により比較すると、脳可溶性画分より調製した微小管に含まれるタウは多数の分子種から成るが、軸索タウは分子種が少なく、塩基性の弱いものに限定されている。

神経突起内の微小管は、他の細胞質微小管に比べて高度に安定化されており、突起の形成と維持に重要な役割を果たすと考えられている。我々はこれまで、軸索内輸送系を利用して、このような軸索微小管の性質を明らかにするとともに[1]、成長、再生などに伴う安定性の変化について検討してきた[2,3]。微小管の安定性を制御する機構として、(1) MAPs の結合、(2) 他のフィラメント系、特に NF との相互作用、(3) チューブリン自体の化学修飾、などが主として候補に挙げられている。このうち(2) については、坐骨神経の系では安定化に対する寄与は40% 程度と考えられる結果を得[4]、昨年の本学会でも報告した[5]。今回はMAPsの関与を調べるために、軸索の主要MAP であるタウ蛋白について、その存在様式、分子種、軸索内輸送などを解析した。

＜方法＞軸索細胞骨格蛋白の分画：７週齢ラット前根を出発材料として、1% Triton を含む溶液で抽出し、100,000g、１時間の遠心で可溶性画分と不溶性画分に分別した。不溶性画分は 0.85M 蔗糖を含む溶液に懸濁し、浮遊画分と沈殿に遠心分離した。沈殿は更に、8M尿素を含む溶液でホモジェナイズし、上清と沈殿に遠心分離した。各画分をSDS ゲル電気泳動または二次元電気泳動(NEPHGE)した後、イムノブロット法によりチューブリン、アクチン、タウ蛋白を検出した。

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50 uCi(0.2ulx2)を注入し、２週間後に坐骨神経と前根を摘出して、6mm の連続切片にした。各切片を凍結破砕後、上記の方法で Triton 可溶性画分と不溶性画分に分別した。各画分を更に加熱処理し、タウ蛋白を分別した。標識蛋白は電気泳動後、Fujix BAS2000 により検出、定量した。

＜結果と考察＞　二種類の抗タウ抗体（抗ニワトリ・タウ；Sigma 、抗ヒト・タウ；東大・井原

先生より供与）を用いて検索したところ、軸索では両抗体と反応する分子量 56K～67K の４本のバンドが検出された（図 1）。これらは、2.5%過塩素酸処理あるいは加熱処理後も可溶性を示すこと及びその二次元電気泳動パターン（図 2参照）より、タウ蛋白であることが確認された。

軸索タウの約75% は低温Triton不溶性画分に回収された（図1a）。この画分は、主に遅い軸索内輸送のSCa で運ばれる安定重合型細胞骨格に相当し、NF蛋白および軸索に特徴的な不溶性チューブリン（全チューブリンの約 50%）が主成分である[1-3]。タウ蛋白は、やや速いSCb にも存在するが、SCa に含まれるものの方が多い。更に、0.85M 蔗糖中で遠心沈殿して残存する膜成分やミエリン成分を除去し、細胞骨格成分を精製すると、タウ蛋白もこの沈殿に濃縮される。一方、8M尿素によりNF蛋白を溶出した場合には、タウ蛋白はほとんど可溶化されない（図 1）。

タウ蛋白は、スプライシングによって６種の分子種を生じる上に、リン酸化などの翻訳後修飾を受けて更に多数の分子種に分かれることが知られている[6]。脳微小管では、塩基性が強くみかけの分子量が小さいものから、塩基性が弱く分子量の大きいものまで多数の分子種が検出される（図2a）。軸索タウは、微小管タウに比べて分子種が少なく、塩基性の弱いものに限定されている（図 2b)。低温Triton可溶性画分では56K の分子種が、不溶性画分では65K の分子種が主成分であり、何れも電荷の異る数個のスポットから成る（図2c、2d)。

以上のように、軸索タウには不溶性画分に含まれるものが多く、脳微小管のタウとは分子組成も大きく異るなど、軸索固有の安定重合型チューブリンの形成に関与する可能性が示唆された。

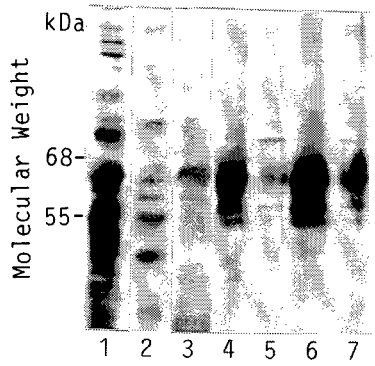


図.1: 軸索の各画分に含まれるタウ蛋白

(1) 脳微小管 (2)低温Triton可溶性画分 (3) 低温Triton不溶性画分 (4) 0.85M 蔗糖沈殿 (5) 0.85M蔗糖浮遊画分 (6) 8M尿素沈殿 (7) 8M尿素抽出画分。

各画分(15ug 蛋白) を SDSゲル電気泳動後、抗タウ抗体(Sigma) でイムノブロットした。

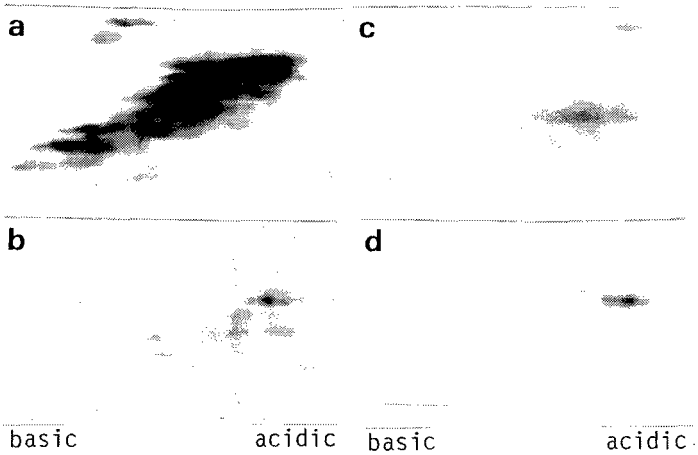


図.2: 脳微小管タウと軸索タウの二次元電気泳動による比較

一次元目にNEPHGE、二次元目に SDSゲル電気泳動を行い、抗タウ抗体(Sigma) でイムノブロットした。(a)脳微小管 (b)軸索タウ (c) 軸索の低温Triton可溶性画分 (d)低温Triton不溶性画分から得られた 8M 尿素沈殿。(b) は (c)と (d)を等量混合したもの。

(1) Tashiro T. & Komiya Y. (1989) J. Neurosci., 9, 760-768 (2) Tashiro T. & Komiya Y. (1991) J. Neurosci. Res., 30, 192-200 (3) Tashiro T. & Komiya Y. (1991) J. Neurochem., 56, 1557-63 (4) Tashiro T., Imai R. & Komiya Y. (1994) J. Neurochem., 63, 291-300 (5) 田代朋子，今井礼子，小宮義璋 (1993) 神経化学，32, 360-361 (6) Goedert M., Crowther R.A., Garner C.C. (1991) TINS, 14, 193-199

231 T98ヒトグリオーマ細胞のタウリンの uptake に及ぼすプロテインキナーゼCと cyclic AMP の関与

中村博彦、黄縄好*、高倉公朋*
（都立駒込病院脳神経外科、*東京女子医大脳神経センター脳神経外科）

〔要約〕

T98 ヒトグリオーマ細胞を用いて、タウリンの uptake に及ぼすプロテインキナーゼCと cyclic AMP の関与について検討した。T98細胞のタウリンの uptake は Na^+ dependent で high-affinity system(Km = 27.0±3.2 μM, Vm = 10.7±2.5 pmole/3 min per mg protein) が存在しており、タウリン投与 90 分後には細胞内濃度が細胞外の約 1000 倍に達した。PDBu(100 nM) を投与するとタウリンの uptake は 30 分後より減少し、60 分後にはコントロールの 68% まで減少した。H-7 (100 nM) はタウリンの uptake には影響を与えないが、PDBu の 30 分前に投与すると、タウリンの uptake の減少効果の EC50 が 41 nM から 83 nM に上昇した。また isoproterenol(1μM) によっても 15 分後には 73% に減少した。これらの結果により、タウリンの uptake についてもA, Cキナーゼの系が関与していることが明らかになった。

タウリン(taurine) はグルタミン酸とともに脳内に豊富に存在するSH基を含む分子量125のアミノ酸であり、膜の安定化など種々の生理学的な役割が想定されている。グリオーマ細胞におけるタウリンの生理的な機能は不明であるが、悪性グリオーマには正常脳に比して高濃度のタウリンを含んでいることが知られており（1）、T98細胞を用いてヒトグリオーマ細胞のタウリン摂取の特徴と、プロテインキナーゼC及び cyclic AMP の関与について検討した。

1. 材料と方法

T98 細胞を 10%FCS を含む Eagle's minimum essential medium (MEM) で 35mm の culture dish (Nunc/AS, Denmark) に培養し、飽和状態に達した後冷 PBS で2回洗浄し 1.5ml の Krebs-Hepes (PH 7.4) 液で 30 分間培養した。その後 phorbor-12,13-dibutylate(PDBu), H-7 , isoproterenol (ISP) などの薬剤を含む Krebs-Hepes 培養液に交換し、一定時間後 37 kBq/ml の 3H-Taurine (10μM) を含む Krebs-Hepes 液 に交換し、3分間に細胞内に摂取された (3H)-Taurine を測定した。

2. 結果

T98 細胞のタウリンの uptake は Na^+-dependent で high affinity system(Km = 27.0±3.2 μM, Vm = 10.7±2.5 pmole/3 min/mg

protein) が存在した(Fig. 1)。PDBu(100 nM) を投与するとタウリンの uptake は 30 分後より減少し、60 分後にはコントロールの 68% まで減少した。H-7 (100 nM) はタウリンの uptake に影響を与えなかったが、PDBu の 30分前に投与するとタウリンの uptake の減少効果の EC^{50} が 41 nM から 83 nM に上昇した(Fig 2)。また、T98 細胞は isoproterenol(1μM) により 15 分後には細胞内の cyclic AMP が約 50 倍に増加するが、uptake は逆に 73% に減少し propranolol(5 μM)によって効果が抑制された。

3．考察

タウリンは脳内に多量に存在し、グリオーマ組織に更に大量に含まれるアミノ酸であるが、ヒトグリオーマ細胞におけるタウリンの動態はほとんど知られていない。T98 培養細胞を用いてヒトグリオーマ細胞のタウリンの uptake について検討すると、ラットグリアやグリオーマ細胞と同様に、Na^+-dependent で high-affinity system を有していた。タウリンの release については、C6 細胞でホルボールエステルや isoproterenol により増加することを報告しているが（2）、uptake は T98 細胞でも C6 細胞同様(unpublished data) 逆に減少した。これらの結果はヒトグリオーマについても、ラットのグリアやグリオーマと同様なタウリンの transport system が存在し、AおよびCキナーゼの系によりコントロールされていることが明らかになった。したがって、タウリンに関してヒトグリオーマ細胞で得られた研究結果が、ヒトグリアにおけるタウリンの動態をある程度反映していると考えられる。

4．文献

1.Rémy,C., Arú, C., Ziegler, A., Sam Lai, E., Moreno, A., Le Fur, Y., and Décorps, M.(1994) J. Neurochem. 62, 166-179

2.Nakamura, H., Huang S.H., Takakura, K.: Neurochem Res (1993) 18, 851

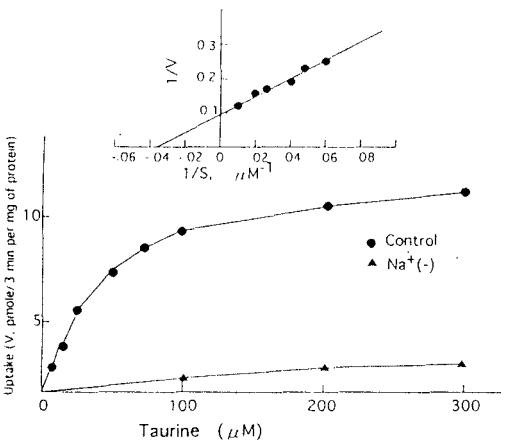


Fig.1 Kinetic analysis of the taurine uptake in T98 glioma cells

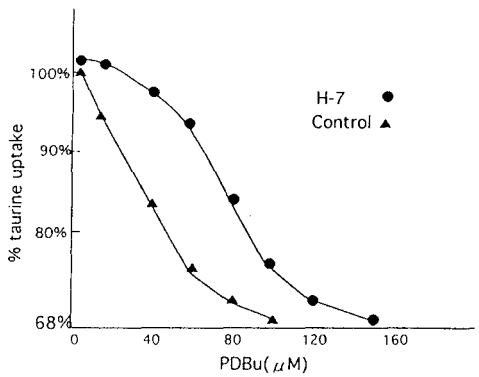


Fig. 2 Inhibition by PDBu on the taurine uptake in T98 cells

232　培養小脳顆粒細胞のＮａポンプアイソフォーム

井上　順雄，曽我　智子，中山　孝，加藤　尚彦
（横浜市立大学，医学部，第一生化学）

〔要約〕
初代培養小脳顆粒細胞には，３種類のNaポンプ（α１型，α２型，α３型）が存在し，各α鎖の存在量は培養とともに増加した．培養前は，普遍型(α１型)Na,K-ATPase活性が全体の７４％であったが，１３日間培養して細胞が分化すると，普遍型活性が約３倍，脳型(α２型とα３型)活性が約９倍増加し，両活性がほぼ等しくなった．この時，全体のNa,K-ATPase活性は約５倍に増加した．１３日間培養した細胞において，実際にイオンを輸送するNaポンプの約９０％は普遍型Naポンプであった．しかし，グルタミン酸で細胞を刺激すると，脳型と普遍型Naポンプがほぼ同等にイオンを輸送した．

神経細胞が正常に機能するためには，Naポンプ（Na,K-ATPase）が維持する細胞内外のイオン濃度勾配が必須である．これまで我々は，ラット大脳由来の初代培養成熟神経細胞に，すべての組織に普遍的な普遍型（α１型）Naポンプと，脳などの限られた組織に特徴的な脳型（α２型とα３型）Naポンプが存在することを報告した(1,2)．そして，これらのNaポンプアイソフォームが，細胞の興奮後や細胞内エネルギー欠乏時に，異なった活性調節を受けることも明らかにした(3,4)．今回は，ラット小脳由来の初代培養顆粒細胞を用いて，Naポンプアイソフォームを解析した．

［実験方法］

小脳顆粒細胞の培養は，Thangniponらの方法(5)を基本にして若干の変更を行なった．生後８日目のSDラットの小脳から，大脳神経細胞の培養法と同様に単離細胞を得，ポリエチレンイミンコートした100mmディッシュまたは24マルチウェル上にまき(1)，５％準胎児牛血清と５％馬血清を含むBME（25 mM KCl存在）中(5)で２週間後まで培養した．細胞の不溶性分画を調製し，Western blot解析とNa,K-ATPase活性測定を行った．Western blotには３種類のα鎖に特異的な抗体（UBI社）を用い，アイソフォームを解析した．Na,K-ATPase活性測定は，100 mM NaCl, 10 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 2 mM ATP, 50 mM Imidazole-HCl緩衝液（pH 7.4）中，37℃で10分間行い，10 mM Strophanthidinによって阻害される活性をNa,K-ATPase活性とした(1)．細胞へのK+の取り込み測定は，130 mM NaCl, 2 mM KCl（^{42}KClを含む），0.8 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, 5 mM glucose, 25 mM Hepes-imidazole緩衝液(pH 7.3)中，37℃で１２分間行い，1 mM Ouabainによって阻害される活性をNaポンプ活性とした．アイソフォームのNa,K-ATPase活性およびNaポンプ活性は，ジギタリス阻害に対する感受性の相違によって，阻害を受けやすい脳型と阻害を受けにくい普遍型に分けた．

［実験結果と考察］

初代培養小脳顆粒細胞には，３種類のα鎖（α１鎖，α２鎖，α３鎖）が存在し，各α鎖の存在量は培養により細胞が分化するとともに増加した（図１）．細胞の分化に伴うNaポンプ存在量の増加は，

Na,K-ATPase活性の増加によって定量的に示される（図２）．培養１３日間に脳型活性（α２型とα３型活性の和；Strophanthidinに対する*Ki～1μM*）は約３倍，普遍型（α１型；*Ki～1mM*）活性は約９倍増加し，全体の活性は約５倍増加した．その結果，１３日間に脳型活性の割合は２６％から４８％に増加した．これは大脳由来の初代培養神経細胞と同様に(1,2)，顆粒細胞にも３種類のNaポンプが存在し，細胞の分化とともに脳型Naポンプが発現することを示す．１１～１３日間培養し分化した顆粒細胞のNaポンプ（細胞内へのK+取り込み）活性においても，普遍型（Ouabainに対する*Ki～0.1μM*）活性と脳型（Ouabainに対する*Ki～10μM*）活性が区別できる（図３）．無刺激時では，脳型活性の割合は１２％であったが，100 μMグルタミン酸で刺激した後では，４３％になった．

これはグルタミン酸刺激により，脳型活性が４．３倍増加するのに対して普遍型活性は２３％減少するためである．このとき，全体の活性は２０％増加した．このような細胞興奮後に起こるNaポンプアイソフォームに特徴的な活性変化は，すでに報告した培養大脳神経細胞の結果(3)と基本的に一致するものである．これは「神経細胞に存在するNaポンプアイソフォームの生理的機能が異なり脳型Naポンプが興奮後のイオン環境の修復に重要である」という我々の仮説(3,4)を裏付けるものと考えられる．

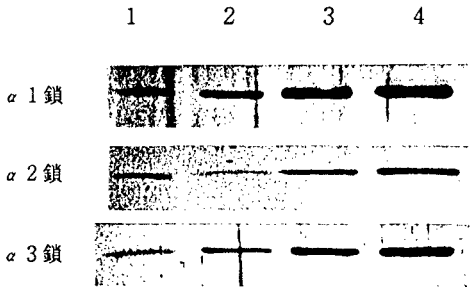


図１．ラット小脳顆粒細胞のNaポンプα鎖のWestern blotによる解析
小脳顆粒細胞（培養日数）：1(0日), 2(1日), 3(5日), 4(13日)

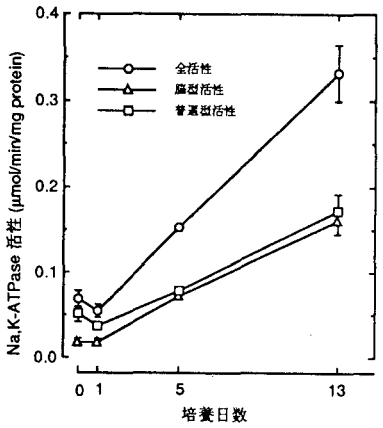


図２．小脳顆粒細胞の培養に伴うNa,K-ATPase活性変化

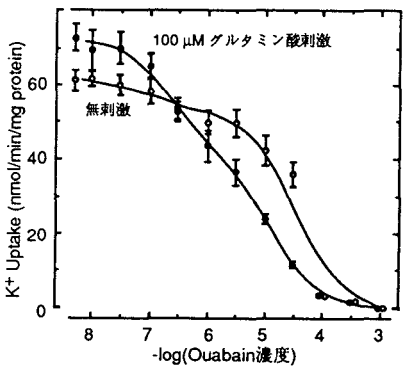


図３．グルタミン酸刺激による小脳顆粒細胞（培養１１～１３日間）のNaポンプ活性変化

[文献]

1. Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H. (1988) J. Biochem. 104, 349-354.
2. Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H. (1988) Prog. Clin. Biol. Res. 268B, 91-96.
3. Inoue, N. and Matsui, H. (1990) Brain Res. 534, 309-312.
4. 井上順雄 (1991) 生化学, 63, 356-359.
5. Thangnipon, W., Kingsbury, A., Webb, M., and Balazs, R. (1983) Dev. Brain Res. 11, 177-189.

233 ヒトグルタミン酸トランスポーターに対する 2-(carboxycyclopropyl)glycineの作用

山下拓史　張玉祥　川上秀史　中村重信
(広島大学医学部第三内科)

〔要約〕
ヒトグルタミン酸トランスポーターのcDNAであるhGluT-1の遺伝子導入を行なったCOS7細胞を用いて、metabolic glutamate receptorの選択的なアゴニストである2-(carboxycyclopropyl) glycine(CCG)を始め各種薬物がグルタミン酸取り込みに与える影響を検討した。この細胞のKmは21μMで、高親和性であることが示唆された。CCGの(2R,1'R,2'R) isomerであるD-CCG-I、(2S,1'S,2'S) isomerであるL-CCG-I は弱いグルタミン酸取り込み阻害作用を認め、(2S,1'S,2'R) isomerであるL-CCG-IIIおよび(2S,1'R,2'S)isomerであるLCCG-IVは強いグルタミン酸取り込み阻害作用を認めた。また、ドーパミンD2アゴニストであるbromocriptineと、高親和性コリン取り込み促進作用を持つMKC-231はグルタミン酸取り込みに対し影響を与えなかった。

〔目的〕
グルタミン酸系ニューロンにおいては、シナプス間隙からグルタミン酸を取り除くことは神経伝達における基本的な過程である。この過程は、高親和性グルタミン酸トランスポーターによって行われる。最近、EACC1、GluT-1(GLAST)、GLT-1の3種類のグルタミン酸トランスポーターのcDNAがクローニングされ、神経疾患の治療への応用が期待されている。今回我々は、ヒトグルタミン酸トランスポーターのcDNAであるhGluT-1(1)の遺伝子導入を行なったCOS7細胞を用いて、薬理学的特性について検討した。

〔方法〕
1) 遺伝子導入：hGluT-1をexpressin vector pcDNA3に組み込み、pcDNA3hGluT-1を作製した。1x10^{7}のCOS7細胞をPBSに分散させ、pcDNA3hGluT-1(20μg)を加え、electroporationを行った。DMEMに10%(v/v)牛胎児血清を加えた培地で3日間培養した後、実験に供した。
2) グルタミン酸取り込みの薬理学的解析：hGluT-1の遺伝子導入を行ったCOS7細胞をL-[^{3}H]glutamic acid(50nM、1mCi/ml)と伴にPBS中で、37℃で15分間incubateし、細胞に取り込まれたL-[^{3}H]glutamic acidの放射活性を測定した。Na free PBSを用いて同様の実験を行ない、差を実際の取り込みとした。Eadie-Hofstee plotに基づくMichaelis定数(Km)と最大速度(Vmax)を求めた。また、L-glutamate、L-aspartate、D-aspartateおよびDL-threo-β-hydroxyaspartate(THA)、dihydrokainate(DHK)、L-α-aminoadipate(AAD)のグルタミン酸取り込み阻害作用を調べた。
3) 2-(carboxycyclopropyl)glycine(CCG)のグルタミン酸取り込みに対する作用：グルタミン酸のアナログCCGの(2R,1'R,2'R)isomerであるD-CCG-I、(2S,1'S,2'S)isomerであるL-CCG-I 、(2S,1'S,2'R)isomerであるL-CCG-IIIおよび(2S,1'R,2'S)isomerであるLCCG-IVのグルタミン酸取り込みに対する影響を検討した。また、bromocriptineと2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-n-(2,3-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrofuro [2,3-b]quinolin-4-yl)acetoamide (MKC-231)のグルタミン酸取り込みに対する影響検討した。

〔結果〕
1) hGluT-1の遺伝子導入を行なったCOS7細胞のKmは21μM、Vmaxは228pmol/mg protein/minであった(図1)。THAは80%以上の強い取り込み阻害作用を認め、AADでは弱い取り込み阻害作用を認めた(図2)。
2) D-CCG-IとL-CCG-Iは10μMの濃度で軽度のグルタミン酸取り込み阻害作用を認めた。L-CCG-IIIおよびLCCG-IVは10μMで強いグルタミン酸取り込み阻害作用を認めた(表1)。
3) bromocriptineは10^{-4}～10^{-9}Mの濃度でグルタミン酸取り込みに対する作用は認めなかった(表1)。
4) MKC-231は10^{-4}～10^{-9}Mの濃度でグルタミン酸取り込みに対する作用は認めなかった(表1)。

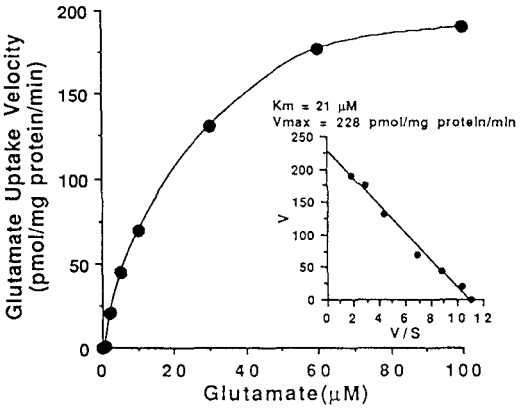


図1. Eadie-Hofstee plot

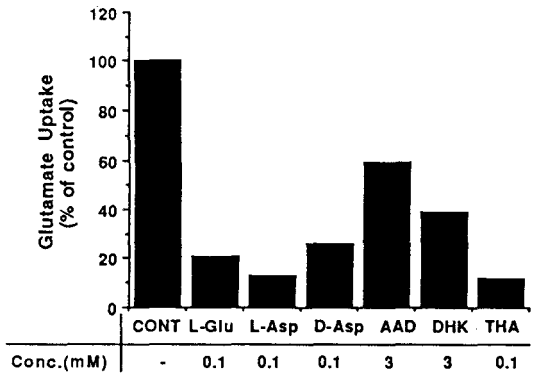


図2. グルタミン酸取り込み阻害薬の効果

Compound	Concentration(μM)	Displacement(%)
D-CCG-I	10	51±5
L-CCG-I	10	32±2
L-CCG-III	10	69±8
L-CCG-IV	10	68±5
Bromocrittine	1	1.7±2
MKC-231	1	1.1±1

表1. 2-(carboxycyclopropyl)glycine(CCG)、bromocriptine、MKC-231のグルタミン酸取り込みに対する影響

〔考察〕

今回我々は、hGluT-1を発現させたCOS7細胞を用いて、CCGsを始め各種薬物がグルタミン酸取り込みに与える影響を検討した。この細胞におけるKmは21μMで、Xenopus oocytesに発現させたhGluT-1のKm(78.4μM)(1)と比べて小さいことから、より親和性が高いことが示唆された。

CCGsは、グルタミン酸のアナログであり(2)、8種類のisomerが存在する(3)。CCGsのうちL-CCG-IとL-CCG-IIはmetabolic glutamate receptor(mGluR)の選択的なアゴニストで、mGluRを介して作用することが知られている(4)。L-CCG-IIIおよびL-CCG-IVはNMDAレセプターを介した脱分極作用を持ち、L-CCG-IIIは脱分極を介して強力なグルタミン酸取り込み阻害作用を示すことが報告されている(2)。今回我々はCCGsのグルタミン酸取り込みに対する影響を検討したところ、D-CCG-IとL-CCG-Iの取り込み阻害作用は弱く、L-CCG-IIIおよびLCCG-IVの取り込み阻害作用は強かった。この結果はラット小脳のシナプトソームを用いた結果(5)と一致していた。bromocriptineはdopamine D2アゴニストとしての作用の他に、シナプス小胞へのグルタミン酸取り込みを促進することが知られている(6)。今回我々はbromocriptineのグルタミン酸取り込みに対する作用を検討したが、10^{-4}～10^{-9}Mの濃度でグルタミン酸取り込みに対する促進作用や抑制作用は認められなかった。MKC-231はラット海馬シナプトソームにおいて高親和性コリン取り込み促進作用を持つが、10^{-4}～10^{-9}Mの濃度でグルタミン酸取り込みに対する有意な作用は認められなかった。

文献 1) Kawakami, H., et al., (1994) Biochem. Biophys. Res. Comm. 199, 171-176.
2) Shinozaki, H., et al., (1989) Br. J. Pharmacol. 98,1213-1224.
3) Shimamoto, K., et al.,: (1991) J. Org. Chem. 56, 4167-4176.
4) Ishida, M., et al.,: (1990) Brain Res. 537, 311-314.
5) Robinson, M. B., et al.,: (1993) J. Neurochem. 60, 167-179.
6) Carlson, M. D., et al.,: (1989) J. Neurochem. 53, 1889-1894.

234 ラット海馬におけるγ-アミノ酪酸によるグルタミン酸放出調節機構

土田晃敬、田中佐知子、木内祐二*、小口勝司*、吉田武美
（昭和大・薬・毒物学、*医・第一薬理学）

〔要約〕
ラット海馬におけるグルタミン酸（Glu）作動性神経のシナプス終末からの Glu 放出調節におよぼす γ－アミノ酪酸（GABA）神経系の関与について in vivo ブレインマイクロダイアリシス法を用いて検討を行った。100 mM KCl の灌流は透析回収液中の Glu 濃度を基礎濃度の約 3.5 倍に増加させた。1 mM GABA および $GABA_B$ 受容体の特異的 agonist である baclofen（1 mM）の前処置はこの高カリウム刺激による Glu 濃度増加を有意に減少させた。以上の結果からラット海馬における Glu 放出には GABA 神経系の調節機構が存在し、特に $GABA_B$ 受容体の関与が示唆された。

【目的】 Glu は、中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり、海馬において記憶や学習に関与していると考えられている LTP（長期増強）を誘発することが知られており、また虚血性神経細胞死や痙攣発作などの一因としても注目されている。一方、GABA は抑制性神経伝達物質であり、その受容体はクロライドイオンチャンネルと複合体を形成している $GABA_A$ 受容体と、GTP 結合蛋白質と共役してカリウム及びカルシウムイオンチャンネルに作用する $GABA_B$ 受容体の 2 つのサブタイプが存在する。GABA 受容体はシナプス後膜だけでなくシナプス終末部にも存在し、オートレセプターとして機能するとともに他の神経伝達物質の放出調節も行うことがラット脳海馬細胞[1]、小脳顆粒細胞[2]および大脳皮質シナプトソーム[3]を用いた in vitro の系で報告されている。しかしながらin vivo の系での GABA と他の神経終末間の相互作用についての検討は少ない そこで本研究では、in vivo ブレインマイクロダイアリシス法を用いてラット脳海馬における Glu 作動性神経からの Glu 放出に対する GABA による調節機構について検討を行った。

【実験方法】実験動物には Wistar 系雄性ラット（体重 200-250g）を用いペントバルビタール麻酔下頭蓋骨を固定し歯科用ドリルで穴を開け、海馬内（Bregma より A 4.5, L 4.7, V 4.7 mm）にガイドカニューレを挿入固定した。手術 3 日後、透析プローブ（ 膜長 2 mm Eicom 社製 ）を挿入し、その翌日に無麻酔無拘束下に灌流実験を行った。 リンゲル液を 2 μl／min の流速であらかじめ 2 時間以上灌流した後、20 分毎に透析液を回収した。基礎濃度測定のために 100 分間サンプリングした後、薬物を溶解させたリンゲル液を 20 分間、次に 100 mM KCl を含むリンゲル液を 20 分間灌流した。透析回収液中のアミノ酸濃度は o-phthalaldehyde で誘導体化し HPLC-蛍光検出器を用いて測定した

【結果および考察】ラット海馬透析回収液中の Glu濃度は、高カリウム刺激により基礎濃度の約 3.5 倍に増加し脱分極刺激により Glu の放出増加が生じることが示された。1 mM GABA 前処置は高カリウム刺激による Glu 濃度増加を有意に抑制した(Fig.1)。この GABA による Glu放出調節機構が $GABA_A$ および $GABA_B$ 受容体のいずれのサブタイプの関与によるものかを明かにするため、$GABA_A$ 受容体 agonist の muscimol および $GABA_B$ 受容体 agonist の baclofen を用いて更に検討を行った。高カリウム刺激前に 1 mM baclofen を処置したところ、高カリウム刺激による Glu 放出増加を完全に阻

害し、更に、Glu 濃度を基礎濃度の 60 % まで減少させた（Fig. 2）。これは baclofen による神経終末部の電位依存性カルシウムチャンネルの抑制により Glu の基礎放出の減少が生じたものと考えられる。一方 1mM muscimol 前処置では基礎濃度を一過性に減少させたが高カリウム刺激による Glu 放出増加が生じた（Fig. 2）。この結果から、脱分極刺激による Glu 放出増加に対する GABA の抑制作用に $GABA_A$ 受容体が直接関与している可能性は低いと考えられる。以上の結果から、ラット脳海馬においては GABA による Glu 放出調節機構が存在し、特に $GABA_B$ 受容体がその放出調節に関与していることが示唆された。またデータには示さなかったがナトリウムチャンネル賦活剤である veratridine の Glu 放出に対する効果を検討したところ、0.05 mM veratridine は Glu 放出を増加させ、この増加は 1 mM GABA 前処置により抑制された。この結果も、GABA 受容体を介した Glu 放出調節機構が働いている可能性を示唆している。現在更に veratridine 刺激による Glu 放出に対する GABA 受容体各サブタイプの agonist の作用を検討中である。

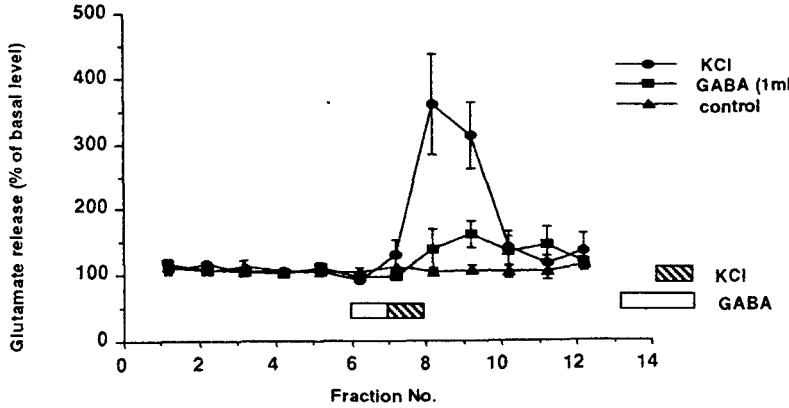


Fig.1 100 mM KCl 刺激 Glu 放出に対する GABA の効果

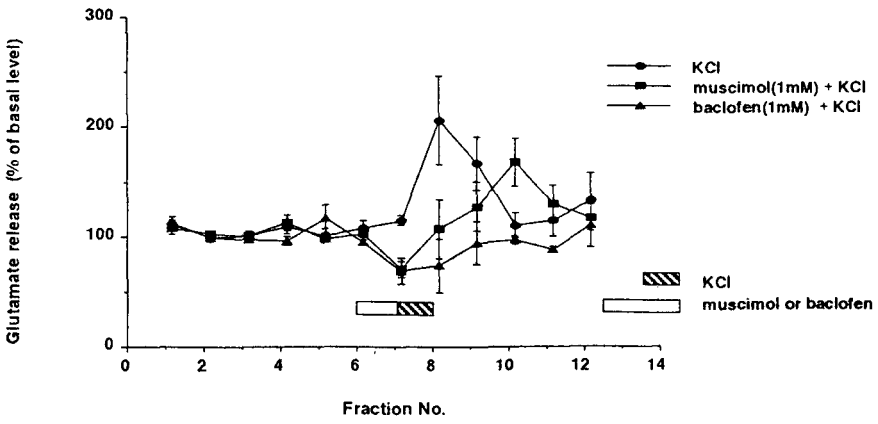


Fig. 2 100 mM KCl 刺激 Glu 放出に対する GABA 受容体 agonist の効果

【文献】 (1) Scanziani, M. et al (1992) Neuron. 9, 919-927
(2) Travagli, R. A. et al (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 258, 903-909
(3) Pend, M. et al (1993) Brain Res. 604, 325-330

235 NMDA 誘発細胞外タウリンとドーパミン濃度増加機構の相違

菅原 恵、芝軒 信次、石川 紘一
（日本大学・医学部・薬理）

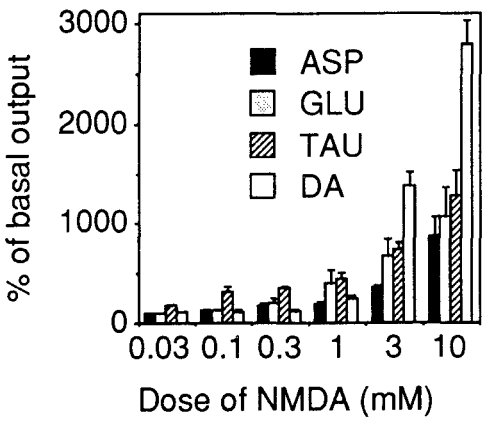
〔要約〕

興奮性アミノ酸の細胞外神経伝達物質（アミノ酸および ドーパミン：DA）濃度におよぼす影響を脳内微小透析法により調べた。N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) の脳内局所投与 (0.03-10 mM 10 min) により、アミノ酸（アスパラギン酸：ASP、グルタミン酸：GLU およびタウリン： TAU) および DA 濃度は用量依存的に上昇した。TAU は低濃度のNMDA (0.03 mM) 適用においても有意な増加が認められたが、ASP、GLU あるいは DA は高濃度の NMDA (1 mM 以上) 適用によってのみ有意な増加が観察された。NMDA (1 or 3 mM) の持続適用により、上記アミノ酸および DA の持続的な遊離増加が認められた。NMDA 持続適用 1 時間以降において脱感作反応が DA 遊離において強く観察された。 NMDA (1 mM) 持続適用によるアミノ酸および DA 増加作用は作用は、 AP-5 (1 mM) の存在下で拮抗された。一方、 DNQX (0.1 mM) の存在下において DA 増加作用は強く抑制されたが TAU 増加作用は全く影響されなかった。以上の結果より、TAU 濃度は NMDA 投与に対し、DA に比し高感受性を示すことが明らかになった。また、高濃度 NMDA による DA 遊離促進が内因性の GLU 酸遊離増加を伴い、非 NMDA 受容体の活性化を介して引き起こされる可能性が示唆された。

脳内細胞外アミノ酸（とくに TAU）およびドーパミン濃度が、外因性興奮性アミノ酸 (NMDA) の脳内局所投与により増加することが知られている (1,3,4)。ラット線条体細胞外タウリン濃度は NMDA の全身投与 (10 mg/kg, i.p.) により、 NMDA 受容体の活性化を介して有意に増加する (1)。しかしながら、線条体 DA 濃度は NMDA の全身投与 (10-60 mg/kg, i.p.) より著明な変動を認めなかった。これらの事実は、NMDA 投与によるタウリンとドーパミン遊離増加機序あるいは NMDA に対する反応性（感受性）が異なることを示唆する。このことを明かにするために、用量-反応相関および NMDA の作用機構を検討した。

[実験方法]

実験には Wistar 系雄性ラット（体重 300-350 g）を用いた。ペントバルビタール麻酔下、Paxinos & Watson (2) の脳図譜に従って、透析プローブ用ガイドカニューレ (Eicom) を線条体に植え込んだ。術後 72 時間以上経過後、透析用プローブ (Eicom) を挿入、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、プローブを 2 µl/min の速度で灌流した。アミノ酸濃度はプローブから得られた灌流液を 20 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は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-

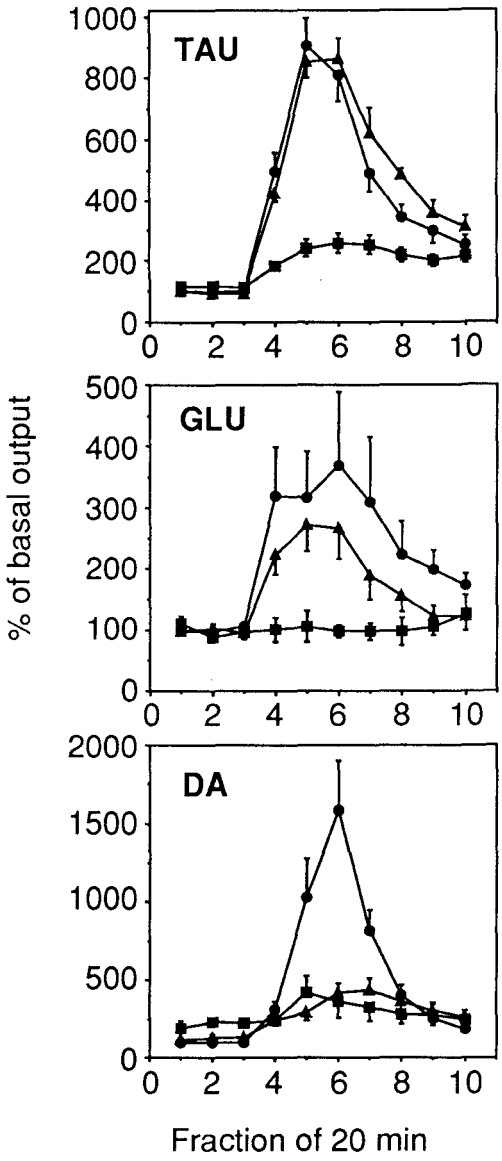


図一1. 細胞外アミノ酸およびドーパミン濃度におよぼす NMDA 局所投与 (0.03-10 mM, 10 分間) の影響
結果はベスーラインに対する百分率で表し、平均値±標準誤差 (N=6-8) で示した。

ECD によりドーパミン関連物質 (DA, DOPAC および HVA) を測定した。

[実験結果および考察]

細胞外 TAU 濃度の増加を引き起こす NMDA (10-60 mg/kg, i.p.) の全身投与を行ったところ、DA 濃度は著明な影響を受けなかった。しかしながら、NMDA (0.03-10 mM) の脳内局所投与 (10 分間) により、用量依存的に細胞外アミノ酸および DA 濃度の上昇が認められた。TAU においては、低濃度の NMDA (>0.03 mM) により有意な増加が観察されたが他のアミノ酸である ASP や GLU、あるいは DA 濃度の有意な増加は、高濃度の NMDA (>1 mM) 適用の場合のみ認められた (図—1)。一方、DA の代謝産物である DOPAC および HVA は用量依存的に減少した。これらの結果は、TAU とASP、GLU あるいは DA の外因性 NMDA 受容体興奮薬に対する反応性 (感受性) が異なることを示唆する。NMDA (1 or 3 mM) の持続適用により、ASP、GLU、TAU および DA の持続的増加が認められたが、適用 1 時間以降において DA の増加作用に明らかな脱感作反応が認められた。これらの NMDA による増加作用は、NMDA 受容体遮断薬である AP-5 (1 mM) の存在下において強く抑制された。一方、非 NMDA 受容体遮断薬である DNQX (0.1 mM) 存在下においても NMDA による DA 増加作用は、強く抑制が認められたが、TAU に対する NMDA の作用は全く影響を受けなかった (図—2)。これらの結果は、NMDA によるアミノ酸 (とくに TAU) と DA の増加作用機構に差異が認められること、および NMDA によるDA の増加機構に内因性グルタミン酸遊離増加 (2) を介して引き起こされる非 NMDA 受容体の活性化が関与している可能性が示唆された。



図—2. グルタミン酸受容体遮断薬 (AP-5; ■あるいは DNQX; ▲) 存在下あるいは非存在下 (●) におけるNMDA 持続適用による細胞外アミノ酸および DA の変動

NMDA (1 mM) は 4 番目のフラクションより、プローブを介して持続適用した。AP-5 (1 mM) および DNQX (0.1 mM)は NMDA 適用 60 分前より灌流液中に加えた。

[引用文献]

1) Morari, M., O'Connor, W.T., Ungerstedt, U. and Fuxe, K. (1993) J. Neurochem. 60, 1884-1893
2) Paxinos, G. and Watson, C. (1982) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York
3) Shibanoki, S., Kogure, M., Sugahara, M. and Ishikawa, K. (1993) J. Neurochem. 61, 1698-1704
4) Young, A. M. J. and Bradford H. F. (1991) J. Neurochem. 56, 1667-1683

236 ラット海馬におけるNMDA投与後のNO濃度の上昇 －NOマイクロセンサー法を用いて－

横山秀克、平松緑、土橋宣昭*、森則夫*
山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所、福島県立医科大学*

〔要約〕

Malinskiらの原法に基づいて、NOマイクロセンサーを製作した。続いて、ペントバルビタール麻酔下で、ラットの右側海馬背側部にNOマイクロセンサーを留置した。術後2-4日後にNMDA20mg/kg(5ml/kg)を腹腔内に投与し、NO濃度を無麻酔無拘束下で測定したところ、NO濃度が著明に上昇した。しかし、このNO濃度の上昇はNO合成酵素阻害剤であるN-monomethyl-L-arginineの前処置(30mg/kg, i.p.)により阻止された。本研究から、NMDAレセプター刺激により脳内のNO濃度が上昇すること、NOマイクロセンサーが脳内のNOの挙動を探るうえで有効な手段であること、が示唆された。

はじめに

海馬にはNMDAレセプターが高密度に存在し(4)、長期増強効果やてんかん現象に深く関与している(1)。近年、これらのNMDAレセプターの作用の一部がNOを介するものであることが明らかにされた。すなわち、NMDAレセプターが興奮すると、細胞内にカルシウムが流入し、NO合成酵素(NOS)が活性化される。そして、NOSはアルギニンからシトルリンとNOを産生し、このNOが神経伝達物質として脳の機能を修飾したり制御していることが想定される(1)。

しかし、NOの代謝は非常に速く、その濃度変化を捉えることは極めて困難である。この目的にかなうものとして、わずかに化学発光法と吸光光度法が知られているが、NOと共にNO_2^-をも測定してしまい、その選択性に問題があり(3,6)、また感度も低い。一方、十分な感度でNOを測定できるものに、ダブルパルスアンペロメトリー法がある。これはNOの酸化電流値を計測するものである。しかし、NOとNO_2^-の酸化電位が近接しているため、この方法もNOとNO_2^-を区別できない(5)。しかし、最近Malinskiら(5)は感応部分にポルフィリンを電解重合し、その表面をナフィオンでコーティングした、NOのみに選択的に応答する電極を考案した。本研究では、彼らが考案した方法に基づいてNOマイクロセンサーを作製し、無麻酔無拘束下でNMDA投与後のラット海馬におけるNO濃度の変化を計測した。

方法

Malinskiら(5)の原法に改良を加えてNOマイクロセンサーを作成した。まず、カーボンファイバー(ϕ 10μm)をテフロン溶液を用いて絶縁した。続いてエポキシ樹脂を用いて絶縁したカーボンファイバー10本をガラス管(ϕ 1mm)内に封入し、その先端断面を研磨した(カーボンファイバー電極)。そのカーボンファイバー電極を0.1N NaOHを含む1mMのNickel Tetrakis (3-methoxy-4-hydroxy-phenyl) Porphyrin (Ni-TMHPP)溶液中においてサイクリックスキャンし、Ni-TMHPPをカーボンファイバー電極の断面に酸化電解重合した。Ni-TMHPPを重合した電極を5%低級アルコールを含むナフィオン溶液に浸漬し、風乾の後、NOマイクロセンサーの作用極として使用した。NOマイクロセンサーの対極には白金線を、参照極には銀/塩化銀電極を用いた。

NOをリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、この溶液にNOマイクロセンサーを浸漬した。ダブルパルスアンペロメトリー法(650mV/600msec, 690mV/200msec)により、各種NO濃度に対応した触媒酸化電流値の検量線を得た。以後、この検量線をもとに検出電流値よりNO濃度を算出した。

実験動物としてWistar系雄性ラット(200-250g)を用いた。ペントバルビタール麻酔下(25mg/kg, i.p.)で、定位的に右側海馬背側部に作用極を留置し、対極と参照極を対側半球の硬膜外に留置した。これらの動物をA群(n=5)とB群(n=4)の2群に分けた。さて、NOはけいれんに伴って上昇する可能性がある。したがって、NMDAそのものの作用をみるためにsubconvulsive doseのNMDAを用いる必要がある。そこで、予備実験として、NMDA20, 40, 80mg/kgをラットの腹腔内に投与した。NMDAは生理食塩水に溶解した。20mg/kgでは行動上には何の変化も観察されなかったが、40mg/kg以上ではミオクローヌス、疾走発作等のてんかん症状が観察された。そこで、本研究では20mg/kgのNMDAを用いた。術後2~4日後に、A群には生理食塩水を5ml/kg腹腔内に投与し、その30分後にNMDA20mg/kg(5ml/kg)を腹腔内に投与した。また、B群にはNOSの阻害剤であるN-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)30mg/kg(5ml/kg)を投与し、30分後にNMDA20mg/kgを腹腔内に投与した。いずれの群のラットでも、無麻酔無拘束下でNOを計測した。

結果

生理食塩水、L-NMMA、NMDAいずれの薬物の投与後にも明らかな行動上の変化はみられなかった。

A群のいずれのラットでも、生理食塩水を投与した時にはNO濃度には変化はみられなかった。しかし、NMDAを投与すると約5分後よりNO濃度が上昇し始め、約20分後にはピークに達した(Fig.1A)。その後、NO濃度は次第に下降し約50分後には投与前のレベルに戻った。ピーク時のNO濃度はNMDA投与前のレベルより約1μM上昇していた。一方、B群のラットでは、L-NMMA投与後のNO濃度には変化がみられず、また、この処置によりNMDA投与によるNO濃度の上昇が全例で抑制された(Fig.1B)。

考察

本研究では、Malinskiらの方法に準じてNOマイクロセンサーを作製した。そして、このマイクロセンサーを用い、subconvulsive doseのNMDA投与後にラットの海馬でNOが上昇すること、また、このNO濃度の上昇はNOSの阻害剤であるL-NMMAより阻止されることを明らかにした。これらの所見は、NMDAレセプターの刺激によりNOSが活性化され、NOが産生されるという生化学的事実(1)と一致する。

さて、本研究で用いたNOマイクロセンサーの特徴はNO_2^-の影響を除外してNOのみに選択的に応答することである(5)。L-NMMAの前処置により、NMDA投与後のNO上昇が完全に抑制されたという事実は、このようなNOマイクロセンサーの特異性を反映しているものと考えられる。もし、NOマイクロセンサーがNO以外の物質にも応答するなら、このような完全抑制が起こることは考えられない。NOマイクロセンサーのもうひとつの特徴は、その高い感度にある。電気化学的手法でNO濃度を表現するからである。事実、本研究ではsubconvulsive doseのNMDAに十分応答した。いずれにしても、本研究の結果から、NOマイクロセンサーは脳内のNOの挙動を理解する上で優れた手法であることが示された。そして、本センサーによりNMDAがNOの産生を促すという直接的な証拠が得られた。

謝辞

本発表を承認された会員外共同研究者、山形県テクノポリス財団・吉村哲彦氏、東北大工学部・内田勇氏、末永智一氏、河西奈保子氏、同薬学部・小林長夫氏に感謝します。

文献

1)Bread DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamete-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9030-9033, 1989.

2)Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide. Annal Neulology. 32: 297-311, 1992.

3)Huygen C, Lanting RW. Short communications on the Saltzman factor. Atmos Environ. 9: 1027, 1975.

4)Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of rat NMDA receptor. Nature 354: 31-37, 1991.

5)Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. Nature 358: 676-677, 1992.

6)Menon NK et al. Reduction of biological effluents in purge and trap micro reaction vessels and detection of endothelium-derived nitric oxide by chemiluminescence. J Mol Cardiol. 23: 389, 1991.

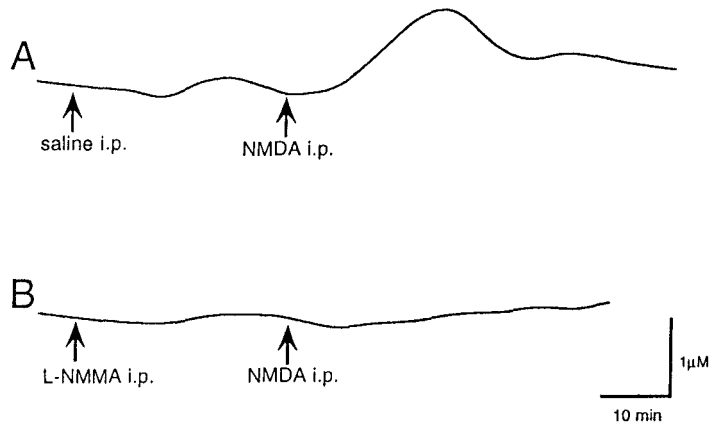


Fig.1.
Continuous monitoring of NO concentration in rat hippocampus under freely moving state. When saline was intraperitpneally injected, there was no overt change in NO concentration. However, intraperitoneal NMDA (20mg/kg) caused a marked increase in NO concentration, begining about 5 min after NMDA and reaching the maximal level at about 20 min after (A). Such an elevation was completely blocked by pre-treatment with L-NMMA (30mg/kg).

237　培養ウシ副腎クロム親和細胞からの一酸化窒素刺激によるカテコールアミン遊離

李　憲、竹内　宏
（岐阜大・医・第一生理）

〔要約〕副腎髄質クロム親和細胞におけるカテコールアミン遊離機構に対する一酸化窒素（NO）の影響を明らかにするために、培養ウシ副腎クロム親和細胞からのカテコールアミン遊離および細胞内カルシウム濃度に対するNOの影響を検討した。種々の濃度のニトロプルシッド（SNP）およびL-Arginine刺激により著明なカテコールアミン遊離が生じた。一方、Arginine誘導体で細胞を刺激しても、カテコールアミン遊離は生じなかった。しかしながら、L-Arginine刺激により誘発されたカテコールアミン遊離は、これらのArginine誘導体により、著明に抑制された。また、SNPあるいはL-Arginine刺激に対して細胞内カルシウム濃度は変化しなかった。これらの結果から、L-Arginineを基質として生成されるNOにより副腎クロム親和細胞からカテコールアミン遊離が生じること、また、このカテコールアミン遊離の調節には細胞内カルシウム調節機構は関与していないことが示唆された。すなわち、副腎クロム親和細胞はNOの標的細胞であり、NO刺激によりカテコールアミン遊離が生じることが明らかとなった。

［目的］最近、生体内において、NOが神経伝達物質として作用する可能性が示唆されている。一方、免疫組織学的にNO合成酵素（Constitutive NO synthase, CNOS）は神経組織、および、血管内皮にのみ存在することが証明されており、神経組織においては、中枢のみならず、末梢神経系、特に、副腎髄質に多量に存在することが報告されている[1)]。しかしながら、副腎髄質におけるNOの機能、特に、副腎クロム親和細胞との関連については明らかにされていない。そこで、本研究においては、副腎クロム親和細胞におけるカテコールアミン遊離機構に対するNOの影響を明らかにするために、培養ウシ副腎クロム親和細胞を用いて、カテコールアミン遊離および細胞内カルシウム濃度に対するNOの影響を検討した。

［方法］　培養副腎髄質クロム親和細胞の調整：定法に従って、ウシ副腎髄質より髄質細胞を単離した後、3-8日培養した。カテコールアミン遊離の測定には単層培養細胞を、また、細胞内カルシウム測定には浮遊培養細胞を用いた。
カテコールアミン遊離：カテコールアミン遊離実験を行う際、細胞を含むプレートを取り出し、培養液を取り除いた後、プレートにKrebs-HEPES 液を加え、10分間プレインキュベーションを行った。その後、溶液中に種々の濃度のSNP、または、L-Arginineを加えて細胞を刺激した。Krebs-HEPES 液中および細胞内のカテコールアミン量は、高速液体クロマトグラフおよび電気化学検出器を用いて測定した。カテコールアミン遊離量は、刺激前に存在したカテコールアミン含有量に対する割合で表わした。
細胞内カルシウム濃度：細胞内カルシウム濃度の測定を行う際は、浮遊クロム親和細胞に、カルシウム指示薬であるfura-2を負荷した。その後、Krebs-HEPES 液に細胞を再浮遊させた後、蛍光光度計を用いて測定した。

［結果および考察］　本研究において、種々の濃度のSNP刺激により著明なカテコールアミン遊離が生じ、30 μM、10分間でプラトーに達した（図1）。SNPは、溶液中において、自発的にNOを遊離する物質として知られているので、これらの結果は、NO刺激により副腎クロム親和細胞からカテコールアミン遊離が生じることを示唆している。さらに、L-Arginine刺激に対する副腎クロム親和細胞の反応を検討したところ、種々の濃度のL-Arginine刺激によっても、著明なカテコールアミン遊離が生じ、100 μM、10分間で最大値に達した（図2）。一方、Arginine誘導体であるL-Monomethyl-arginine（L-NMMA）やL-Nitro-arginine-methylester（NAME）で細胞を刺激しても、カテコールアミン遊離は生

じなかった（図2）。しかしながら、L-Arginine刺激により誘発されたカテコールアミン遊離は、これらのArginine誘導体により、著明に抑制された（図3）。近年、Moncadaらのグループは、血管内皮や神経組織において、L-ArginineがL-Citrullineに変換する際に、NOSの触媒によりNOが生成されることを証明した[2), 3)]。このことから、本研究における、L-Arginine刺激により誘発されるカテコールアミン遊離は、L-Arginineを基質として培養細胞中のNOSにより生成されるNO刺激により生じていることが明らかとなった。

本研究において、SNPまたはL-Arginine刺激による細胞内カルシウム濃度の変化は見られなかった（図4）。一般に、副腎クロム親和細胞に対するアゴニストとして知られる物質（アセチルコリン、ニコチン、高カリウム、ブラジキニン等）の刺激による細胞からのカテコールアミン遊離は、細胞内カルシウム濃度の調節によることが知られている。しかしながら、現在の結果は、NO刺激によるカテコールアミン遊離には、細胞内カルシウム濃度調節機構は関与していないことを示唆している。現在このNO刺激によるカテコールアミン遊離が、如何なる機構に依存するのかを検討中である。

以上、副腎クロム親和細胞は、NOの標的細胞であり、NO刺激によりカテコールアミン遊離が生じることが明らかとなった。

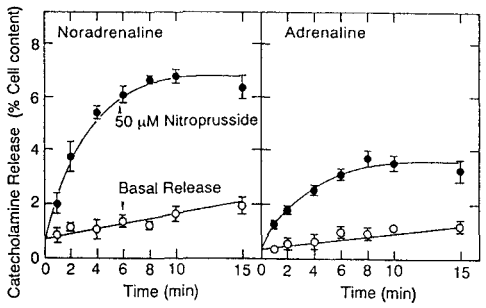


図１．Effects of SNP on catecholamine (CA) release from cultured bovine adrenal chromaffin cells.

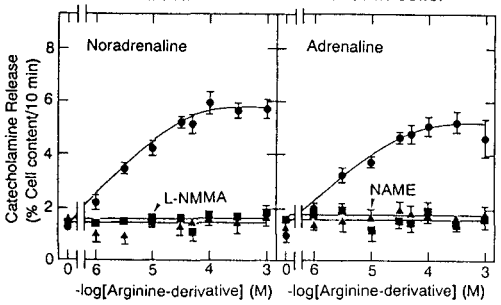


図２．Effects of various concentrations of arginine-derivatives on CA release from the cells.

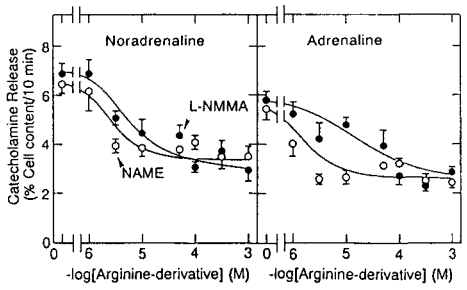


図３．L-Arginine刺激によるCA遊離に対する種々の濃度のArginine誘導体の影響。○，100 μM L-Arginine + NAME; ●，100 μM L-Arginine + L-NMMA

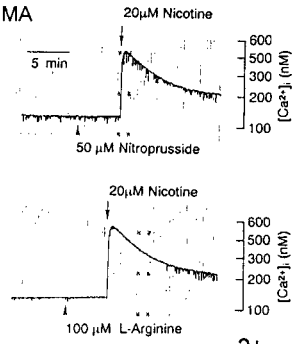


図４．Effects of NO on $[Ca^{2+}]_i$.

[文献]

1）Bredt, D.S. et al.: Nature 347:768-770, 1990.
2）Palmer, R.M.J. et al.: Nature 333:664-666, 1988.
3）Moncada, S. et al.: Pharmacol. Rev. 43:109-142, 1991.

238　一酸化窒素による神経伝達物質遊離における Na^+-Ca^{2+}交換系の関与

浅野省一，松田敏夫，田熊一敞，馬場明道
（大阪大学・薬学部・薬理）

〔要約〕

一酸化窒素(NO)産生薬であるsodium nitroprusside(SNP)、cGMPの膜透過性アナログである8-Bromo-cGMPのラット脳切片、シナプトゾームNa^+依存性Ca^{2+}取り込みに対する作用を検討した。SNP、8-bromo-cGMPによりCa^{2+}取り込みの有意な促進が見られた。又、ラット線状体in vivo microdialysisの実験において、SNP局所投与により細胞外セロトニン(5-HT)量が増大することが示された。この5-HT遊離作用はNa^+-Ca^{2+}交換系の阻害薬3,4-dichlorobenzamilの存在により抑制された。これらの成績はNOによる神経伝達物質の遊離にNa^+-Ca^{2+}交換系が関与していることを示唆する。

【目的】

NOは神経伝達物質としてLTP、LDPに関与していることが知られている(1,2)。また、脳切片、in vivo microdialysis法での検討でNOが神経伝達物質を遊離させるという報告(3,4)がある。一方Na^+-Ca^{2+}交換系は細胞内外のNa^+濃度勾配によりCa^{2+}を輸送し、細胞内Ca^{2+}濃度調節に関与する重要な膜蛋白である。本研究ではNOの神経伝達物質遊離作用におけるNa^+-Ca^{2+}交換系の関与を明らかにするため、NOの神経標品Na^+-Ca^{2+}交換系に対する作用と、NOの5-HT遊離作用に対するNa^+-Ca^{2+}交換系阻害薬の作用について検討した。

【方法】

実験にはWistar系雄性ラット(100-350g)を用い、Na^+-Ca^{2+}交換活性は既報の方法(5)に従って測定した。すなわち、脳切片、シナプトゾームにおいてはモネンシン存在下の$^{45}Ca^{2+}$取り込みを、シナプス膜小胞においては160mMNa^+で平衡化した小胞へのNa^+-free条件下での$^{45}Ca^{2+}$取り込みを検討することで行った。In vivo microdialysisは抱水クロラール麻酔下でガイドカニューラを埋め込み、1日後に透析プローブを線条体に差し込み、無拘束無麻酔下でリンゲル液を灌流し、灌流液中の5-HT量をHPLC-ECDにて測定した。薬物はリンゲル液に溶解して灌流することで投与した。

【結果及び考察】

脳切片、シナプトゾームにおいてNO産生薬であるSNPはNa^+イオノフォアであるモネンシン非存在下のCa^{2+}流入に影響を与えなかったが、モネンシン存在下のCa^{2+}流入を著明に増加させた。またこの作用はSNPの用量に依存的であり、10μM以上で有意に増加していた(図1)。このSNPの作用はNOをトラップして不活性化するヘモグロビン50μMによって消失した。SNPはNOを産生するが、そのNOのターゲットの一つとして細胞内可溶性グアニル酸シクラーゼが考えられる。Na^+依存性のCa^{2+}取り込みは8-Br-cGMPによっても増加したが、SNPのcarrier

compoundであるフェリシアンイオンによっては影響を受けなかった。シナプトゾームでみられるSNPによるCa^{2+}取り込みの増加の詳細な機構を解明するため細胞質分画を除去したシナプス膜小胞を用いた検討を行った。シナプス膜小胞において8-Br-cGMPはNa^{+}依存性Ca^{2+}流入を増加させたがSNPは作用しなかった(図2)。以上のことよりNOがcGMPを介してNa^{+}-Ca^{2+}交換系を活性化することが示された。阻害薬を用いた実験からシナプス膜小胞でのcGMPの作用にはcGMP依存性蛋白燐酸化酵素は関与していないことが考えられた。図3はin vivo microdialysisの成績を示している。SNP(100μM)局所投与により細胞外5-HT濃度の上昇がみられ、この作用はNa^{+}-Ca^{2+}交換系の阻害薬である3,4-dichlorobenzamilにより抑制された。以上の成績は、NOによる神経伝達物質の遊離にNa^{+}-Ca^{2+}交換系が関与していることを示唆している。

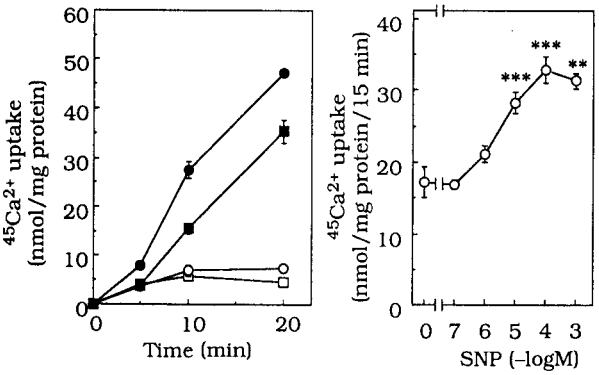


Fig. 1 Effect of SNP on monensin-induced $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat brain slices.

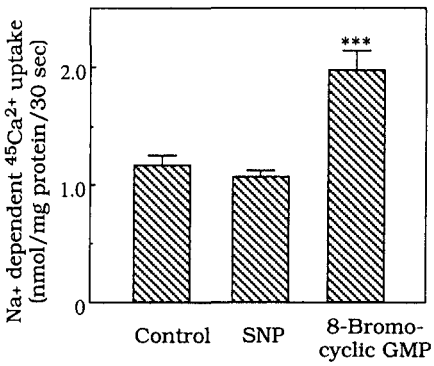


Fig. 2 Effect of SNP and 8-Bromo-cyclic GMP on Na^{+}-dependent $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat synaptic plasma membrane vesicles.

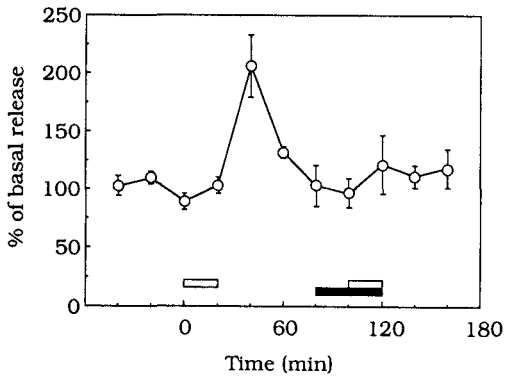


Fig. 3 Changes in 5-HT concentration in striatal microdialysis samples after Ringer's solution containing 100μM SNP was applied by retrodialysis either in the presence or absence of 20 μM 3,4-dichlorobenzamil (DCB), an inhibitor of Na^{+}-Ca^{2+} exchanger. Holizontal bars indicate perfusion with DCB (*solid bar*) and SNP (*open bars*).

【文献】

(1)O'Dell, T.J., Howkins, R.D., Kandell, E.R., and Arancio O. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88, 11285-11289.

(2)Sibuki, K. and Okada, D. Nature (1991) 349, 326-328.

(3)Lonart, G., Wang, J. and Johnson, K.M. (1992) Eur. J. Pharmacol. 220, 271-272.

(4)Prast, H. and Philippu, A. Eur. J. Pharmacol. (1992) 216, 139-140.

(5)田熊一敞, 松田敏夫, 橋本 均, 浅野省一, 馬場明道 (1993) 神経化学 32, 246-247.

239 白鼠上頸部交感神経節内一酸化窒素依存性環状ＧＭＰ生成系におよぼすカルバコール伝達刺激の影響とその細胞局在

安藤正人・立岑廷族・楠戸正子・永田　豊　(藤田保健衛生大・医・生理)

[要約]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、組織内一酸化窒素(NO)発生に依存した環状GMP(cGMP) 生成系におよぼすムスカリン性受容体アゴニスト(カルバコール:Carb)刺激の効果を検索した。①cGMPの分解を抑制するIBMXを溶液中に添加した条件で、Carb(100μM)を作用させると、著明なSCG内cGMP生成の増大(109.8 pmoles/mg protein;8.7倍)が示された。この節内cGMP生成の最大効果は、Carb添加後2分から5分迄の極めて短時間以内に認められた。次に、NO合成酵素(NOS) を特異的に阻害するN^{G}-monomethyl-L-arginine(L-NMMA, 50 μM)をCarbと共に溶液中に添加(5分間)すると、CarbによるSCG内cGMP生成の増大効果は約1/4以下に抑制された。このことは、SCGニューロン膜上のムスカリン性受容体をCarb刺激することで、明かにSCG内のL-arginine を前駆物質として発生した NO が guanylate 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。②Carb(100 μM)刺激依存性にSCG組織内で発生するNOを、hemoglobin (20μM)を添加して、組織間隙中で特異的に捕捉・無効化すると、このcGMP生成促進効果は 1分以内に速やかに消失した。従って、NO伝達体の大部分はその発生部位から一旦細胞外液に拡散した後、再び同一あるいは隣接ニューロン内へ移行して、cGMP生成系を亢進している可能性が推測された。 ③Carb刺激で増大した節内cGMPレベルは、superoxide dismutase (30 U/ml)を共存させても有意な変動は見られなかった。しかし、NOS酵素の活性発現部位のリン酸化を促進するCa^{2+}依存性リン酸化酵素の活性化剤(フォルボールエステル、1μM)の存在下では、cGMP生成量は約60%に迄低下した。④非手術神経節標本で認められる Carb刺激によるNO依存性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標本でも保持されていた。しかし、節後軸索切断手術を施して(1週間)ニューロンの逆行性変性・脱落とグリア細胞の増殖を来たした標本では、Carb刺激による cGMPレベルの上昇効果は完全に失われた。従って、Carb刺激に応答してSCG内で NO依存性にcGMP生成系を促進する一連の反応過程は、グリア細胞群ではなく交感性ニューロンに限局した現象であることが明確となった。

[序]白鼠上頸部交感神経節(SCG)標本は、 コリン作動性の節前神経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豊富に取り囲む比較的単純な組織である。節前神経末端に電気刺激(10 Hz) を与えると、節後神経細胞内で環状GMP(cGMP)量が急速(数分以内)かつ著明に増大(約4.4倍)することを認めている。この促進効果はムスカリン性拮抗剤のatropine の添加で有意に抑制されることから、SCG内のコリン作動性神経伝達過程ではムスカリン性受容体と共役した cGMP生成系の存在が明かとなっている(1)。 一方、神経芽細胞腫の培養系で、L-arginine(L-Arg) を前駆物質として一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)の触媒作用で発生するNOが、可溶性guanylate cyclase(GC)を活性化して細胞内cGMPの生成量を促進する知見が報告されている(3)。そこで今回は、ムスカリン性アゴニストのカルバコール(Carb) を添加した生理溶液中でSCGを好気的にインキュベーションして、組織内で生成されるcGMP生成量から、 NO依存性のcGMP生成系を検討した。 さらに、SCG標本の節前神経切断手術を行い節前神経末端の変性を生じさせた標本、あるいは節後神経軸索の切断手術により逆行性に 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同様に比較実験を行い、Carb刺激によるNO依存性cGMP生成系が神経細胞体あるいはグリア細胞の何れの細胞成分で発現しているのか検証した。

[実験方法]① Wistar系成熟白鼠を用い、pentobarbital 麻酔下に、既報(1) に従い一側のSCGの節前神経を切断(denervation)し、反対側神経節の節後神経軸索を頭蓋内に入る直前で切断(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トしたSCG標本内cGMP生成量は、Honmaら(2) の高感度RIA法により定量した。

[実験成績と考察]①Carb刺激によるSCG内NO依存性cGMP生成系: cGMPの分解を抑制する3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX, 0.5 mM)を含む生理溶液中にCarbを種々の濃度で添加し、好気的条件下(37° C)でインキュベーション(5分間)を行うと10μMから濃度依存性にSCG内cGMP生成の増大が見られ、 100μM 濃度で109.8 pmoles/mg protein(約8.7倍)の最大値に達した。さらに、Carb添加濃度を上昇(～1mM) させると節内cGMP生成量は逆に減少した。次に、NOSを特異的に阻害するN^{G}-monomethyl-L-arginine(L-NMMA, 50μM)をCarbと共に溶液中に添加すると、CarbによるSCG内cGMP生成の著明な増大効果は約1/4以下に抑制された。このことから、SCGニューロン膜上のムスカリン性受容体をCarb刺激することにより、SCG内の内因性 L-Arg基質から NOSの触媒反応で発生したNOがGC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。②Carb刺激で神経細胞内で発生するNOの組織内伝達経路とその調節: 図1に示すように、生理溶液中へCarb(100μM) を添加してインキュベートすると、添加後15秒以降からSCG内cGMP量の増加が見られ、この上昇は2〜5分で最大レベルに達した。Hemoglobin(Hb)のヘム部分は細胞膜を通過することは出来ないが、細胞外間隙に拡散するNOを捕捉・無効化する作用が知られている(5)。そこで、Hb(20μM)を溶液中に添加すると、Carb刺激による節内cGMP生成促進効果は 30秒〜1分以内に急速に消失するのが示された。この結果から、細胞内で発生したNOの大部分はその発生部位から一旦細胞外液に拡散した後、再び隣接した同種ニューロン内へ速やかに移行して、そこでGCを活性化してcGMP生成系を亢進している可能性が推測された。一般に、生体組織中で発生するNOは活性酸素と反応して 活性型NO_2に代謝されるが、この時superoxide dismutase(SOD)のscavenger作用を受ける可能性が指摘されている。そこで、溶液中へ SOD(30U/ml)を添加すると、Carb刺激で増大するcGMPレベルはやや低下する傾向が示されたが有意な変動ではなかった。このように、神経伝達刺激によって神経細胞内で発生したNOが活性酸素消去系によって積極的な調節を受けている可能性は否定的であった。培養した鼠神経芽細胞腫のニューロン内では、Ca^{2+}依存性リン酸化酵素(PKC)がNOS酵素の活性発現部位をリン酸化してNOSの失活をもたらす結果、 NO発生量が減少することが報告されている(4)。今回、PKCの活性化剤であるフォルボールエステル(TPA、1μM)を Carbと共にSCGに作用させると、 cGMP生成の上昇効果は約60%に迄抑制された。 一方、溶液中にトリフルオペラジン (TFP、10μg/ml)を添加してcalmodulin の作用を阻害した条件では、 Carbによる節内cGMP生成の促進効果には殆ど影響が見られなかった。 つまり、PKCがCarb刺激に依存したNO発生量を抑制的に制御している可能性が推定された。 ③Carb刺激によるSCG内NO依存性cGMP生成系の細胞局在: 図2に示すように、Carb刺激によるcGMP生成促進の効果は、 予めdenervationを行い神経末端のワーラー変性を生じさせた標本では、約1/2以下に低下するのが認められた。 さらに、L-NMMAあるいはHbをCarbと共に作用させた時には、Carb刺激により増大したSCG内cGMPレベルは何れも有意に抑制(約1/6)された。 一方、axotomyを施して交感性神経細胞の逆行性変性・脱落とグリア細胞の増殖を来たした SCG標本にCarbを添加して刺激しても、 節内cGMP生成量の有意な上昇効果は認められなかった。また、Carbと L-NMMAあるいはHbを同時に添加しても、axotomized SCG標本のcGMP生成への変動効果は全く見られなかった。この成績から、 SCG内にはムスカリン性コリン作動性受容体を介して細胞内で発生した NOが、 容易に細胞間隙に拡散し再び同一のあるいは近接する同種細胞内に移行して、速やかにcGMP生成系を亢進する一連の過程が存在するが、この機能代謝系は神経節内節前神経末端やグリア細胞で発現するのではなく、明かに交感性ニューロンに限局していることが明確に示された。以上の検討から、NOは神経細胞内あるいは神経細胞間での情報伝達体として、生理的シナプス伝達の過程で機能的な修飾作用を担っている可能性が強く推定された。

[謝辞]本研究の一部は、平成5年度文部省科学研究費(一般研究: 05680685)の援助を受けて行われた。

[文献] (1)Ando et al. (1983) ***Brain Res.*** 267:313-321 (2)Honma et al. (1977) ***Biochem. Med.*** 18:257-273(3)Hu et al. (1993) ***J. Neurochem.*** 61:578-585(4)Kanba et al. (1986) ***Eur. J. Pharmacol.*** (5)Martin et al. (1985) ***J. Pharmacol. Exp. Ther.*** 232:708-716.

図1. Carb刺激によるSCG内cGMP生成の経時変化とHbによる抑制効果

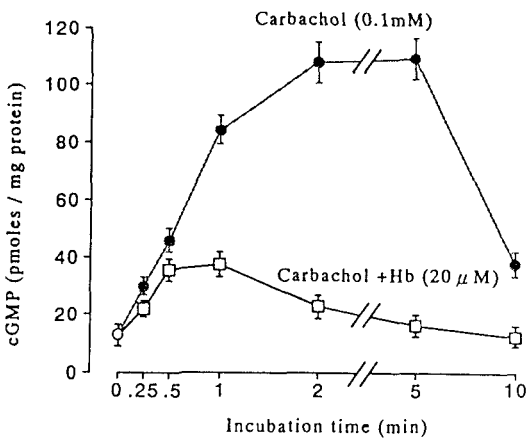
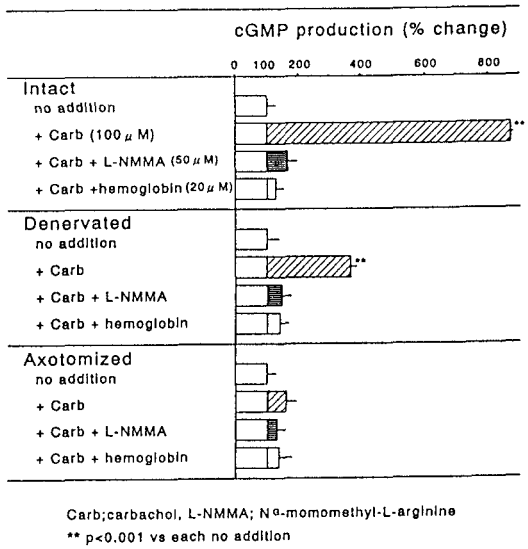


図2. Carb刺激によるSCG内cGMP生成の細胞局在



240 ラットシナプス画分のMAPキナーゼカスケード

鈴木龍雄，野路久仁子
(名市大・第一生化学)

〔要約〕

ラット脳から種々のシナプス画分を調製し、内在するMAPキナーゼ(MAPK)カスケードのコンポーネントを調べた。Western blottingでは、すべての画分にMAPKおよびMAPKキナーゼ(MAPKK)が存在していた。シナプス後肥厚部(PSD)画分以外では抗MAPK抗体に反応する2本のバンドがみられた。それらは、Extracellular signal-regulated kinase 1, 2 (ERK1とERK2)と考えられた。PSD画分にはERK2のみが検出された。2種のRafタンパク質(Raf-1, B-Raf)及びRasタンパク質もシナプス画分に見いだされた。調べたすべての画分にMAPKの基質が存在していた。また、sea star MAPK (p44mapk)はsoluble画分とP_1画分の基質を強くリン酸化したのに対してXenopus MAPK (ERK2タイプ)はPSD画分の基質を特に強くリン酸化した。以上の結果を総合して考えると、(1)シナプス、特にシナプス後側にも非神経細胞と同様なMAPKカスケードが存在する。(2)シナプス後側にはMAPKのうちERK2が存在し、シナプス特異的基質のリン酸化を介して何らかのシナプス機能に関与していることが示唆された。

〔序論〕

MAPKは、種々の増殖刺激で活性化され、細胞の成長、分化、トランスフォーメーションやT細胞の活性化、卵のfertilizationなどに中心的な役割を果たしている。最近、脳にも、特に神経細胞の樹状突起にMAPKが存在していること(1)、グルタミン酸刺激や電気刺激によるMAPKの活性化が報告されている(2)。さらに、MAPKカスケードを構成すると考えられているRafキナーゼの存在も免疫電顕法によりシナプス後部に局在すること(3)、長期増強の発現に伴うRaf免疫原性の増加(4)が報告されている。以上の報告は、MAPKカスケードが、細胞増殖のシグナル伝達系以外にも、シナプスにおいて、神経伝達のモデュレーションに関係した機能を担っていることを示唆する。今回、我々は、シナプスにおけるMAPKカスケードコンポーネント(Ras, Raf, MAPKK, MAPK)の局在を調べ、シナプス内のMAPK基質の検索を行なった。

〔方法〕

MAPKの精製とシナプス画分の調製：活性型Xenopus oocyte MAPKは西田栄介博士（京大）から供与を受けた。p44mapk (Sea Star)はUBIから購入した。Soluble画分、P_1, P_2, シナプトソーム，シナプス膜(SPM), PSD画分は、Wistarラットから既報(5)に従って調製した。

抗体：抗MAPK抗体、抗MAPKKモノクローナル抗体は西田栄介博士（京大）から供与を受けた。抗Raf-1抗体、抗B-Raf抗体はUBIから、抗Ras (pan)抗体はBoehringer社から購入した。

MAPK基質の検索：各画分は60℃で20～30分間処理して内在性のキナーゼ活性を失活させた。いずれかのMAPKと[γ-^{32}P]ATPを添加して25℃、60分間リン酸化反応を行なった後、SDS-PAGE/オートラジオグラフィーによって基質を検出した。

〔結果〕

Western blottingでは、調べたすべての画分にMAPKおよびMAPKKのバンドが検出された。PSD画分以外では抗MAPK抗体に反応する2本のバンドがみられた。それらは、ERK1とERK2 (6) と考えられた。PSD画分にはERK2のみが検出された。Rafタンパク質は2種 (Raf-1, B-Raf) ともPSD画分に見いだされた。Ras蛋白質(2種)はシナプトソーム、SPM画分に検出されたが，PSD画分中には検出されなかった。PSD画分中では、MAPKKとERK2は生後1週ではひじょうに少ないが生後3週に急速に増加しアダルトのレベルに達した。シナプトソーム画分ではMAPKKとERK2はPSD画分と似た発育変化を示すが、ERK1は生後3週目以降減少した。それぞれの画分に精製したMAPKを加えて行った基質検索では、sea star MAPK (p44mapk) がsoluble画分とP_1画分の基質を強くリン酸化したのに対してXenopus MAPK (ERK2とアミノ酸配列で97%のホモロジーを持つ) はPSD画分の基質を特に強くリン酸化した。

[結論]

シナプスにおいても、細胞増殖のシグナル伝達系と同様の MAPKカスケード (ただしMAPKはERK2) が存在し、シナプス特異的基質のリン酸化を介して、何らかの神経伝達の修飾を行なっている可能性が示唆された。

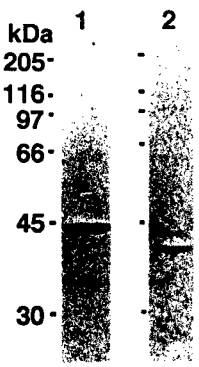


図1
PSD画分のWestern blot
1. anti-MAPKK antibody
2. anti-MAPK antibody

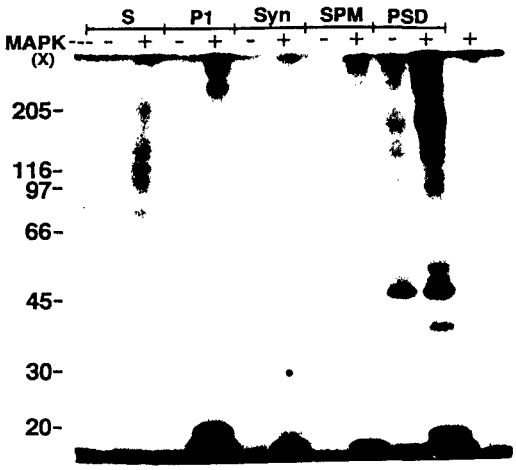


図2
Substrates for Xenopus MAP kinase
S and Syn stand for soluble and synaptosome fractions, respectively.

[文献]

(1) Fiore, R. S.et al. (1993) Neuroscience, 55, 463-472 **(2)** Baraban, J. M.et al. (1993) J. Neurochem. 60, 330-336; Bading, H. and Greenberg, M. E. (1991) Science, 253, 912-914 **(3)** Miháy, A.et al. (1991)Brain Res., 547, 309-314 **(4)** Miháy, A. et al. (1990) Neurosci. Lett., 116, 45-50 **(5)** Wu, K.et al. (1986) J.eurochem., 46, 831-841 **(6)** Boulton et al. (1991) Cell, 65, 663-675

241 ラット脳一酸化窒素合成酵素に対するアルカインの阻害作用

加太英明，横井功，浅原弘嗣*，森昭胤
（岡山大学・医・分子・神経情報，*整形外科）

〔要約〕

海産の軟体動物や環形動物に含まれるグアニジノ化合物であるアルカインの，ラット脳内一酸化窒素合成酵素(NOS)活性に対する効果について検討した．その結果，アルカインは拮抗型と非拮抗型の混合型で可逆的にNOS活性を阻害した．そのKi値は，18.68μMであり，よく知られているNOS阻害剤のN$^{\omega}$-monomethyl-L-arginineよりもやや弱い阻害効果を示した．従来報告されているNOS活性阻害剤は，すべてArg分子中のグアニジノ基が修飾された構造を持つのに対し，アルカインは，ω位のグアニジノ基は修飾されていない．従ってアルカインはNOSのArg結合部位の化学的性質及び一酸化窒素産生機構を調べるための有用な薬物であると考えられる．

生体内において一酸化窒素(NO)はグアニジノ化合物の1つであるアルギニン(Arg)から一酸化窒素合成酵素(NOS)により合成されるが，近年神経系におけるシグナルメッセンジャーとして働き，シナプスの可塑性，神経細胞死に関与していることが報告されている(2)．NO合成機構を解明する上で，NOSとArgの結合様式を決定する事は重要であり，そのためには様々な構造をもつ阻害剤の開発が必要である．しかしながら従来開発されたNOS阻害剤はすべてArgのグアニジノ基が修飾された構造をしている(1)．すでに我々は，グアニジノ基の修飾されていない化合物22種についてNOS活性阻害作用を調べた結果，α-グアニジノグルタル酸およびアルカインがNOS活性阻害効果を持つことを報告している．そこで今回アルカインについて，さらに詳しくその阻害様式を検討しKi値を求めた．

［実験方法］

ラットを断頭後直ちに脳を取り出し，3倍量の緩衝液(pH.7.4, 20mM Tris-HCl, 2mM EDTA)でホモゲナイズした後，21,000xgにて20分間遠心分離しその上清を陽イオン交換カラム(Dowex 50Wx8, Na^+ form)を通すことによりArgを除いた溶液を素酵素溶液とした．この素酵素溶液60μlに$CaCl_2$，NADPHはそれぞれ750μMおよび1mM，アルカインは20または40μM，Argは40μMとなるように加え，37℃にて15分間インキュベイトし，生成したNO_2^-+NO_3^-を測定してNOS活性を求めた．

［結果］

今回用いた方法により測定したラット脳NOS活性のKmおよびVmaxはそれぞれ4.08±0.18μM，257±7.4pmol (NO_2^-+NO_3^-) formation /mg protein /min (mean±SEM, n=13)であった．アルカインの阻害様式は拮抗型と非拮抗型の混合型で可逆的にNOS活性を阻害した．その

Ki 値は，18.68 ± 2.03 μ M であり α −factor は 3.86 ± 0.77(mean ± SEM, n=13) であった．

［考察］

NOS は，Arg のイミノ窒素を酸化することにより NO を生成すると報告されている．従来報告されている NOS 活性阻害剤は，すべて Arg 分子中のグアニジノ基が修飾された構造を持っており，そのほとんどが NOS 活性を拮抗的に阻害することが報告されている (1)．一方アルカインは，ブタンの両側にグアニジノ基の結合した構造をしており (Fig.1)，従って ω 位のグアニジノ基を残した構造をしている．その阻害様式は拮抗型と非拮抗型の混合型であり，可逆的に NOS 活性を阻害した (Fig.2)．今回測定されたアルカインの Ki 値は 18.68 ± 2.03 μ M であり，この阻害効果はよく知られている NOS 阻害剤の N^{ω} −monomethyl−L−arginine よりもやや弱い．これら構造的特徴および阻害様式より，アルカインは NOS の Arg 結合部位の化学的性質及び NO 産生機構を調べるための有用な薬物であると考えられる．他方，Reynolds は，アルカインはシナプスにおける NMDA 受容体におけるポリアミン結合部位の拮抗阻害剤であると報告している (3)．NOS は NMDA 受容体を介した Ca^{2+} の流入により活性化され，それにより生成した NO は神経細胞内外でシグナルメッセンジャーとして働き，シナプスの可塑性にも関与していると考えられている (2)．従って，アルカインは NMDA 受容体に対しても，NOS に対しても阻害剤として働き，両者の構造的関連を示す物質としても興味深い．

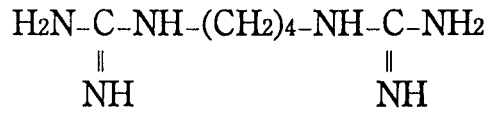


Fig.1 The structure of arcaine

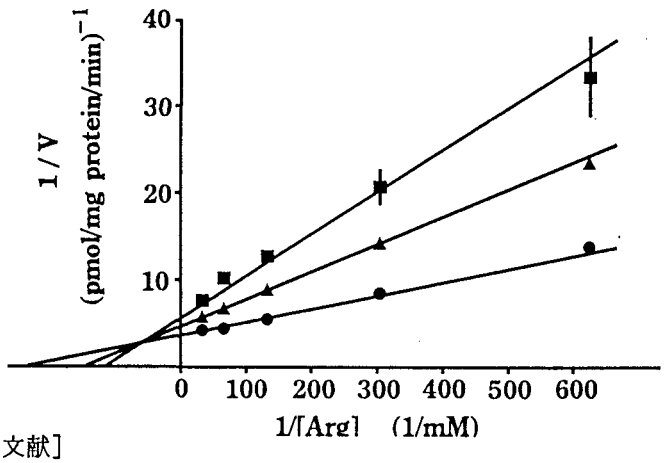


Fig.2 Effect of arcaine on NOS activity. Incubations were carried out without arcaine(● ,n=13) and with 20 μ M(▲ ,n=7) or 40 μ M (■ ,n=6) of arcaine. The figure showed the Lineweaver−Burk plot, and bars represent SEM.

［文献］

(1) Knowles RG., Palacious M., Palmer RMJ., and Moncada S. (1990) Biochem J. 269, 207−210.

(2) Nathan C. (1992) FASEB J. 6, 3051−3064.

(3) Reynolds IJ. (1990) Eur. J. Pharmacol. 177, 215−216.

242 老齢ラット大脳皮質におけるα_1-アドレナリン受容体刺激性イノシトール三リン酸産生の変化

宮本 篤、木村永一、大鹿英世
（札幌医大・医・薬理）

〔要約〕

ラット大脳皮質におけるα_1-アドレナリン受容体情報伝達機構の加齢に伴なう変化を検討した。本研究では、3（若齢），6（成熟）および24（老齢）か月齢の雄性Wistar系ラットを使用した。大脳皮質スライス標本において非刺激下でのイノシトール三リン酸（IP_3）量は、加齢に伴ない上昇している傾向が認められた。ノルエピネフリン（NE）刺激によるIP_3産生は、3と6か月齢との間に変化は認められなかったが、24か月齢での受容体刺激による産生量は3ないし6か月齢との比較において有意に増加していた。各月齢の大脳皮質より調製した膜標品において加齢に伴なうG蛋白質サブユニット（Giα，Goα，Gqαおよび$G\beta$）量の変化を検討したが、有意な差は認められなかった。大脳皮質膜標品において、NE刺激によるGTPase活性は加齢に伴ない有意に上昇し、これらの活性上昇はプラゾシンの併用によりほぼ完全に阻止された。このことから、老齢大脳皮質におけるα_1-アドレナリン受容体刺激性IP_3産生量の増加には、受容体－G蛋白質間の共役機構変化が関与している可能性が示唆された。

〔緒言〕

近年、細胞情報の受容と伝達の仕組みが精力的に研究され、これらの成果を基礎として神経伝達機構が分子レベルで明らかにされつつあり、〝広義の老化〟などは細胞情報受容伝達異常として捉えうることが明らかになってきた（1－9）。標的細胞の受容情報伝達機構は、個体のホメオスタシスの維持に重要な因子である。神経系の中でも、カテコールアミンことにノルエピネフリン（NE）作動系は、古くから覚醒・学習・記憶などに関与しており、アルツハイマー病の病態と関連していることを示唆する報告も多い。今回我々は、脳受容情報伝達機構の老化に伴なう変化をさらに検索する目的で、α_1-アドレナリン受容体情報伝達系の共役機構について検討した。

〔実験方法〕

実験には、若齢（3か月齢），成熟（6か月齢）および老齢（24か月齢）雄性Wistarラットを使用した。ラット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（2）でスライス標本および粗膜分画を調製した。スライス標本におけるIP_3量の測定は、既報の方法（4）でD-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate [^{3}H]assay system (Amersham)を用いて行なった。粗膜標品におけるG蛋白質サブユニット量の検討は、既報の方法（8）で抗G蛋白質抗体(AS/7, GC/2, QL and SW/1)を用いWestern blot 法で行なった。粗膜標品におけるG蛋白質GTPase活性の測定は、既報の方法（4）で[γ-^{32}P]GTPを用いて行なった。蛋白は、BSAを標準としてLowry法で定量した。フィルムに転写したWestern blot法の結果は、Soft Laser Scanning Densitometerで解析した。

〔実験結果および考察〕

若齢，成熟および老齢ラット大脳皮質スライス標本における非刺激下およびNE刺激下（1分間）でのIP_3産生の変化をFig. 1に示す。50μM NE刺激によるIP_3産生は、若齢および成熟（3および6か月齢）大脳皮質での産生量と比較し、老齢（24か月齢）大脳皮質で有意($p<0.05$)に増加していた。しかし、非刺激下におけるIP_3産生量は加齢に伴ない増加している傾向は認められたものの有意な増加ではなかった。この結果は、大脳皮質α_1-アドレナリン受容体情報伝達機構に老化変化が生じていることを示すと共に、我々のこれ迄の報告（[^{3}H]inositolラベルによる[^{3}H]inositol phosphates産生の老化による増加）と一致した。そこで、Fig. 2では加齢に伴なう大脳皮質G蛋白質サブユニット量の変化を検討した。しかし、いずれの月齢においても、Giα(40/41 kDa)，Goα(39 kDa)，Gqα(42 kDa)および$G\beta$(35/36 kDa)サブユニット量に有意な加齢変化は見出せなかった。これらの結果は、老化耳下腺細胞（4）や老化心室

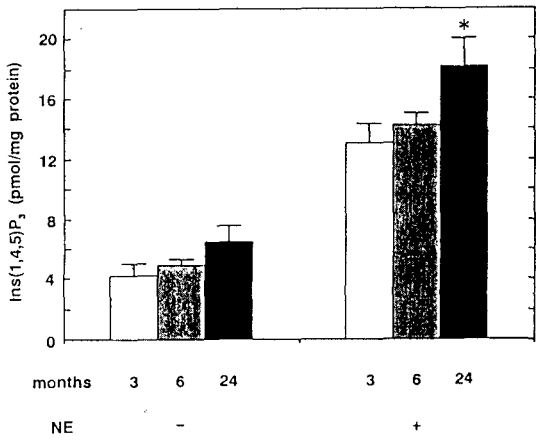


Fig. 1 Age-dependent changes in the endogeneous inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) concentration and NE-stimulated IP_3 production in cerebral cortex.

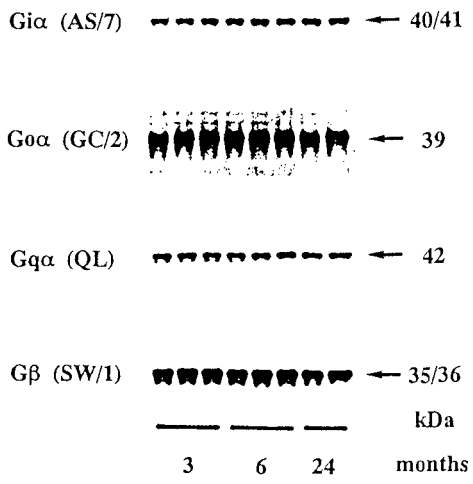


Fig. 2 Western blot analysis of G protein subunits in membranes of cerebral cortex during aging.

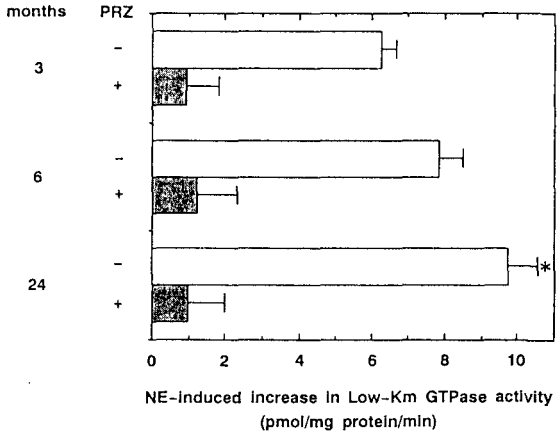


Fig. 3 Age-dependent changes in NE-induced increase in Low-Km GTPase activity in membranes of cerebral cortex.

筋（８）での成績と一致しており、ホスホリパーゼＣ活性化の情報変換・増幅因子としてのＧ蛋白質量は正常老化では変化しないことを示唆している。そこでFig. 3では、α_1-受容体－Ｇ蛋白質間の共役機構を検討すべく、受容体刺激性のＧＴＰａｓｅ活性を検討した。５０μＭ ＮＥ 刺激によるＧＴＰａｓｅ活性化は、加齢に伴ない上昇していることが認められ、若齢での活性化と比較し老齢大脳皮質で有意($p<0.05$)に上昇していた。以上の成績から、大脳皮質α_1-アドレナリン受容体刺激性ＩＰ$_3$産生の老化に伴なう増加は、Ｇ蛋白質量の変化によるものではなく、その受容体－Ｇ蛋白質間の共役機構変化が一部関与している可能性が示唆された。

〔参考文献〕

1. Miyamoto, A. and Ohshika, H. (1989) Gen. Pharmacol. 20, 647-651
2. Miyamoto, A. et al. (1990) J. Neurochem. 55, 70-75
3. Miyamoto, A. et al. (1992) Exp. Gerontol. 27, 211-219
4. Miyamoto, A. et al. (1992) Am. J. Physiol. 262(Cell Physiol.), C1181-C1188
5. Villalobos-Molina, R. et al. (1992) Eur. J. Pharmacol. 226(Mol. Pharmacol.),129-131
6. Miyamoto, A. et al. (1993) Exp. Gerontol. 28, 349-359
7. Miyamoto, A. et al. (1993) Life Sci. 53, 1873-1878
8. Miyamoto, A. et al. (1994) Eur. J. Pharmacol. 266(Mol. Pharmacol.), 147-154
9. Miyamoto, A. and Roth, G.S. (1994) Exp. Mol. Mammalian Gerontol., CRC (in press)

243 コリン作動性神経終末におけるアセチルコリン放出の加齢変化

田中康一、安藤　進
（東京都老人総合研究所・生体膜部門）

〔要約〕

中枢神経終末（シナプス）におけるコリンアセチル転移酵素(ChAT)活性とアセチルコリン(ACh)合成及び放出の加齢変化について大脳皮質より調整したシナプトソームを用いて検討した。マウス、ラットともChAT活性並びにACh合成量に加齢変化は認められなかった。一方、高カリウム刺激によるACh放出はラット、マウスともに老齢で有意に低下していた。シナプトソーム内のAChレベルに加齢変化はなく、放出されるAChの全AChに対する割合(%release)が低下していることが明かとなった。これらの結果から、コリン作動性前シナプス機能が低下するのはACh放出の低下によるものと考えられた。

脳機能の加齢低下の要因としてコリン作動性神経系の機能低下が考えられている(3,7)。ヒト並びにラットやマウスなどの実験動物を用いてコリン作動性神経機能の種々のパラメータ（コリン作動性ニューロン数、コリン取り込み、ChAT活性、ACh合成、ACh放出、ACh受容体）の加齢変化について数多くの報告がなされている。しかしながら、それらの結果には一定の傾向が示されているとはいい難く脳機能の加齢低下の要因は未だに明かとなっていない。演者らは、脳機能の加齢低下の原因はシナプスにあるとする「シナプス老化」(1)の観点から、シナプス機能の加齢変化について神経化学的に検討している(2,7,8)。本研究ではラットとマウスという異なる種の動物から得た大脳皮質シナプス標品を用いてシナプスにおけるACh合成活性と放出について検討した。

実験方法

シナプトソームの調製：生後6か月齢と30か月齢のFischer344ラットおよび8か月齢と30か月齢C57BL/6マウスの大脳皮質部よりFicoll密度勾配遠心法(4)によりシナプトソームを調製した。

ChAT活性の測定：シナプトソームをTriton X-100を含む25mMリン酸緩衝(pH 7.4)に懸濁し酵素液とした。基質液（2mM　塩化コリン、0.2mM　アセチルCoA、0.3M　NaCl、20mM　リン酸緩衝液）を加え、37℃で30分間インキュベートした。過塩素酸を添加し反応を停止後、エチルホモコリン（EHC）を加え遠心した。遠心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（HPLC-ECDシステム）に導入しACh量を測定した。

ACh合成量の測定：エゼリンを含むKrebs-Ringer液にシナプトソームを懸濁し、37℃で30分間インキュベートした。反応を過塩素酸添加によって停止し、既知量のEHCを加え遠心し、その上清を試料とした。試料中のACh量をHPLC-ECDシステムで定量した。

ACh放出量の測定：シナプトソームを37℃、30分間インキュベート後、氷冷し反応を停止した。Krebs-Ringer液でシナプトソームを洗浄した後、再び同緩衝液に懸濁した。高濃度カリウムを含むKrebs-Ringer液を加え最終カリウム濃度を50mMに調整し、37℃、5分間のインキュベーション中に上清に放出されたACh量をHPLC-ECDシステムにて測定した。

結果と考察

図1に示すように成熟と老齢動物のシナプトソームにおけるChAT活性には差が認められなかった。図2にはシナプトソームにおけるACh合成量の加齢変化を示す。既に、神経終末におけるACh合成量には加齢変化を認めないことを報告しているが、今回の実験においてラットのシナプトソームにおいてもACh合成には加齢変化がないことが確かめられた。このようにChAT活性にもACh

合成にも加齢変化はないことから、シナプス単位でみた場合はACh合成系は加齢による影響は受けないものと考えられる。

50mMカリウム刺激によるシナプトソームからのACh放出の加齢変化を表に示す。高カリウム刺激によるACh放出量は、マウスおよびラットともに老齢では成熟時に比べ約25%低下していた。また、老齢においてシナプトソームに存在するACh量は減少していないにもかかわらず、シナプトソーム内の総AChに対する高カリウム刺激で放出されるAChの割合（%releae）が有意に低下していることが明かとなった（表）。GibsonとPeterson(6)は、マウス脳切片を用いた実験においてACh合成活性が老齢で著しく低下しており、老齢でのACh放出の低下はその合成活性が低下したためと結論づけている。しかしながら、本研究でACh合成活性および神経終末内のAChレベルには加齢変化が認められなかったことから、ACh放出の低下は放出されるべきACh量の減少によるのではなく、放出機構そのもの障害によることが示唆された。以上の結果から、シナプスからのACh放出の低下が老齢におけるシナプス機能の低下の主たる要因であることが考えられた。

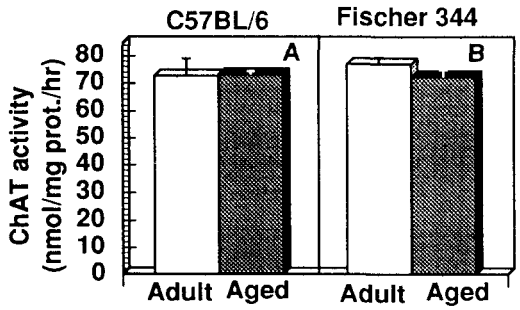


図1 マウス(A)およびラット(B)シナプトソームにおけるChAT活性

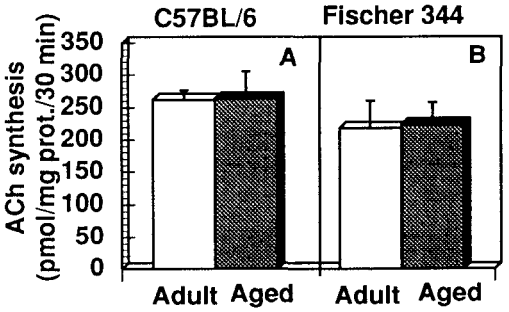


図2 マウス(A)およびラット(B)シナプトソームにおけるACh合成

		Total ACh in synaptosomes (pmol/mg prot.)	ACh released with 50mM K (pmol/mg prot./5 min)	% release	n
C57BL/6 mouse	Adult	197.5 ± 5.9	34.5 ± 1.0	17.5 ± 0.1	3
	Aged	187.2 ± 12.1	24.9 ± 4.2*	13.3 ± 1.5**	3
Fischer 344 rat	Adult	249.3 ± 49.1	47.6 ± 8.8	19.2 ± 1.3	6
	Aged	231.5 ± 16.3	35.2 ± 4.0*	15.2 ± 1.3**	6

表 マウスおよびラット脳シナプトソームからの高カリウム刺激による ACh放出

*,p<0.05: **,p<0.03 (two-tailed student t-test)

文 献

1) 安藤 進 (1994) 神経精神薬理、**16**, 103-111 星和書店
2) Ando,S. and T anaka,Y. (1990) *Gerontol.*,**36**, 10-14
3) Bartus,R.T., Dean,R.L., Beer,B. and Lippa,A.S., (1981) *Science* , **217**, 408-417
4) Booth,R.F.G. and Clark,J.B., (1978) *Biochem.J.*,**176**, 365-370
5) Decker,M.W . (1987) *Brain Res. Rev.*, **12**, 423-438
6) Gibson,G.E. and Peterson,C., (1981) *J.Neurochem.*, **37**, 978-984
7) Tanaka,Y . and Ando,S. (1990) *Brain Res.*, **506**, 46-52
8) Tanaka,Y . and Ando,S., (1992) *J.Biochem.*, **112**,117-121

244 老齢ラット脳における一酸化窒素合成酵素含有神経細胞の減少

山田 清文、野田 幸裕、鍋島 俊隆
(名古屋大学・医・医療薬学・薬剤部)

〔要約〕老化に伴う脳内の一酸化窒素合成酵素（ＮＯＳ）含有神経細胞の変化について検討するために、老齢および若齢ラット脳のNADPH-diaphorase (NADPH-d) 染色および脳内ＮＯＳ活性の測定を行った。若齢ラットに比較して、老齢ラットのNADPH-d 陽性神経細胞数は線条体では約３０％、大脳皮質では約５０％減少していた。画像解析の結果、このNADPH-d 陽性神経細胞数の減少は比較的大きな細胞の消失によることが明らかとなった。老齢ラットの脳内ＮＯＳ活性は、若齢ラットに比較して小脳においては有意に低下していたが、大脳皮質、線条体および海馬では差は認められなかった。以上の結果より、老齢ラットでは脳内におけるＮＯの産生能が変化していることが示唆された。

〔緒言〕老化により学習記憶などの高次中枢機能が低下することはよく知られている。加齢に伴う記憶障害にコリン作動性神経系の機能低下が関与していることが示唆されているが、老年期の記憶障害をこのコリン仮説のみで説明することは困難である。一方、ＮＯはlong-term potentiation、学習記憶あるいはグルタミン酸の神経毒性などに関与する新しい情報伝達物質として注目されている（１、２）。本研究では、加齢に伴う高次中枢機能の低下にＮＯが関与しているかどうかを明らかにするために、老齢ラット脳のＮＯＳ含有神経細胞の変化について検討した。

〔実験方法〕実験には、Wistar系雄性老齢ラット（３０ヵ月齢）および若齢ラット（３ヵ月齢）を使用した。NADPH-d 染色：脳を4% paraformaldehyde/PBSで固定後、20 μmの凍結切片を作製し、これをβ-NADPH (1 mg/ml), nitro blue tetrazolium (0.5 mg/ml), Triton X-100 (0.3%)を含む0.1M phosphate buffer (pH 7.2) 中で２時間反応させた。NADPH-d 陽性神経細胞数および細胞体の面積の測定は画像解析装置 (C. IMAGING SYSTEMS, Compix Inc.) を用いて行った。ＮＯＳ活性：脳をホモジナイズした後、20,000xgで45分間遠心分離し、その上清を粗酵素標品とした。ＮＯＳ活性の測定は、L-[^{3}H]arginineを基質として産生される[^{3}H]citrulline量を定量することにより行った。

〔結果および考察〕大脳皮質および線条体にNADPH-d 陽性神経細胞は散在していたが、海馬ではその数は非常に少なかった。若齢ラットに比較して、老齢ラットのNADPH-d 陽性神経細胞数は線条体では約３０％、大脳皮質では約５０％減少していた。Nissl 染色では若齢ラットと老齢ラットとの間に差は認められなかった(Table 1)。画像解析の結果、老齢ラットでは比較的大きなNADPH-d 陽性細胞（> 50 μm^2)が減少していることが明らかとなった(Fig. 1)。NADPH-d 陽性神経細胞数の減少にもかかわらず、老齢ラットの大脳皮質、線条体および海馬ではＮＯＳ活性に変化は認められなかったが、小脳で

は若齢ラットに比較してＮＯＳ活性が有意に低下していた(Fig. 2)。以上の結果より、老齢ラットでは脳内のＮＯＳ含有神経細胞が選択的に減少し、ＮＯ産生能が変化していることが示唆された。

〔謝辞〕ＮＯＳ活性の測定にご協力していただきました名城大学薬学部微生物学教室の杉原久義教授ならびに小森由美子助手に深謝いたします。

〔参考文献〕

(1) Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1992) Neuron 8, 3-11.

(2) Chapman, P.F., Atkins, C.M., Allen, M.T., Haley, J.E. and Steinmetz, J.E. (1992) NeuroReport 3, 567-570.

Table 1.Reduction of the density of NADPH-d positive cells in the brains of aged rats.

Brain Area	N	Area examined	NADPH-d positive cells		Neuronal Density
		(mm2)	Number	Densitiy (cell/mm2)	(cell/mm2)
Cerebral cortex					
Young rats	6	15.6 ± 0.1	113.7 ± 5.6	7.3 ± 0.4	652.3 ± 10.0
Aged rats	6	15.2 ± 0.1	57.2 ± 2.2 **	3.8 ± 0.2 **	653.6 ± 9.6
Striatum					
Young rats	6	5.35 ± 0.04	135.5 ± 9.7	25.4 ± 1.9	688.9 ± 11.5
Aged rats	6	5.33 ± 0.02	91.8 ± 4.5 **	17.2 ± 0.8 **	686.0 ± 17.4

**P<0.01 vs young rats.

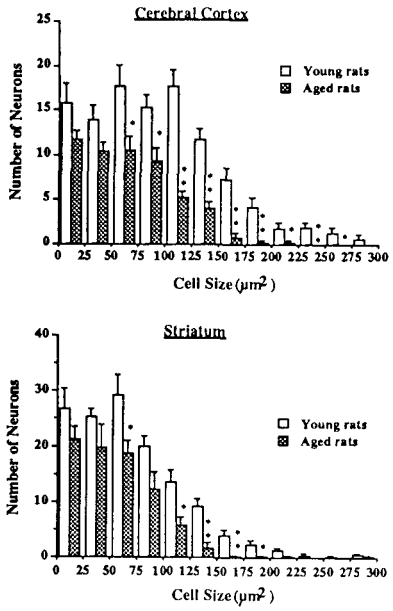


Fig.1 The histograms of NADPH-d positive cells in the cerebral cortex and striatum of the young and aged rats.
*P<0.05, **P<0.01 vs young rats

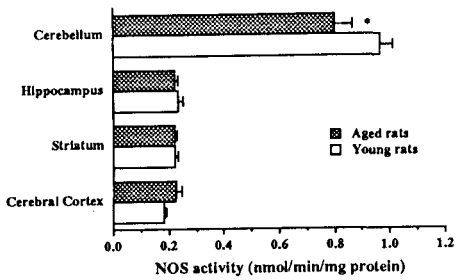


Fig. 2 NOS activity in the discrete brain regions of young and aged rats
*P<0.05 vs young rats

245 β-アミロイドによる神経細胞死におけるアミロイド前駆体蛋白質（ＡＰＰ）の役割

高島明彦、*山口晴保、石黒幸一、佐藤一紀、星野歳三、野口かおり、今堀和友（三菱化成生命研、*群馬大学医療短大）

〔要約〕ラット海馬初代培養細胞にβ-アミロイドを投与すると２４時間後に神経細胞死が観察される。この神経細胞死は蛋白合成阻害剤、RNA合成阻害剤で阻止されることから能動的な細胞死であることが明らかになった。β-アミロイド投与に対応して増大する蛋白質を抗体を用いて検索したところ、アミロイド前駆体蛋白質(APP)の顕著な増大が観察された。これはTPK１のアンチセンスオリゴヌクレオチド前処理によって完全に抑制された。アミロイド前駆体蛋白質のアンチセンスオリゴヌクレオチドで前処理した培養細胞系ではβ-アミロイドによる神経細胞死を一部阻止することができた。このことから、β-アミロイド投与によるアミロイド前駆体蛋白質の顕著な増大はTPK１の下流にあり、β-アミロイドによる神経細胞死機構に関与することが示唆された。

序論

アルツハイマー病の病理学的特徴は主にβ-アミロイドの蓄積による老人班、リン酸化タウの蓄積である神経原繊維変化、と神経細胞死が上げられる。アミロイド仮説(1)ではβ-アミロイドが直接、神経細胞死とタウのリン酸化に関与すると考えられている。神経の初代培養系ではβ-アミロイドにより神経毒性と神経原繊維変化に特有のエピトープが出現することが報告され(2,3,4)、この仮説を支持している。我々は、この神経細胞死系を用いて、この神経細胞死にタウのリン酸化酵素であるTPK１が関与することを明らかにしてきた(5)。今回我々はβ-アミロイドによる神経細胞死機構を更に明らかにする目的でβ-アミロイド投与に対応して増大する蛋白質を検索し、TPK１との関連を検討した。

方法

ラット１８日胚から単離した海馬初代培養細胞を用いて実験を行った。細胞は５％馬血清、及５％牛胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium中で３７Cで培養し、実験には培養５日目の細胞を用いた。細胞死活性のあるβ-アミロイドの部分ペプチドAβ(25-35)（GSNKGAIIGLM)を合成し用いた。合成されたAβ(25-35)は純水で2mMに調製され、20μMになるように培養液に添加し実験を行った。β-アミロイド処理した細胞はPBSで洗ったあとプロテアーゼインヒビターを含むMESバッファー（pH6.8）中でホモゲナイズされ、遠心後の細胞抽出液はSDS-PAGE電気泳動で分離後抗APP抗体（２２ｃ１１）を用いたウエスタンブロットで解析した。細胞毒性の検定は培養細胞の位相差顕微鏡写真を撮り神経細胞数を計数し、コントロールの培養細胞中に生存している神経細胞数に対する割合で表わした。

結果と考察

海馬培養細胞をβ-アミロイド処理後各時点で細胞を集めその細胞抽出液のウエスタンブロットを抗APP抗体（２２ｃ１１）を用いて行うと、細胞内APPはβ-アミロイド処理後顕著な増大を示し、１２時間後にはβ-

アミロイド未処理細胞の約９倍に増大していた（図１）　この観察されたAPPは大きさが約100kDでAPPのKunitz domainを認識する抗体とは反応しなかった。即ち、β-アミロイド処理によって神経細胞のAPP_{695}の増大が引き起こされることが示唆された。APPアンチセンスオリゴヌクレオチド前処理し、そこにβ-アミロイドを加えると、このAPPの増加は抑制された。この時、未処理及びセンスオリゴヌクレオチドで処理したものではβ-アミロイドにより生存する神経細胞の数は２４hr後にコントロールの約３０％に減少するのに対しアンチセンスオリゴヌクレオチド前処理したものは約６０％の神経細胞が生存した（図２）。このことは、β-アミロイドによる神経細胞死に細胞内のAPP増加が関与することを示唆している。

TPKIはβ-アミロイドによる神経細胞死に関与する。そのアンチセンスオリゴヌクレオチド前処理ではβ-アミロイド処理２４hr後においてもコントロールの約８０％の神経細胞の生存を示した。この時細胞内のAPPはほぼβ-アミロイド未処理の細胞と同じレベルであった（図３）。一方APPアンチセンスオリゴヌクレオチドはTPKIに対して影響を与えなかった。即ち、β-アミロイドによる神経細胞死のカスケードにおいて細胞内のAPP増加はTPKIの下流に位置することが示唆された。

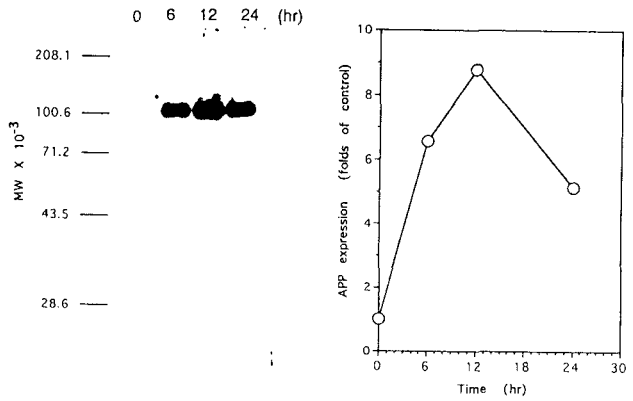


図１　β-アミロイド処理による細胞内のAPP変化

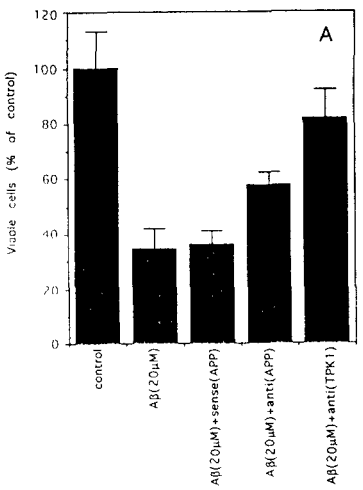


図２アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞死抑制効果

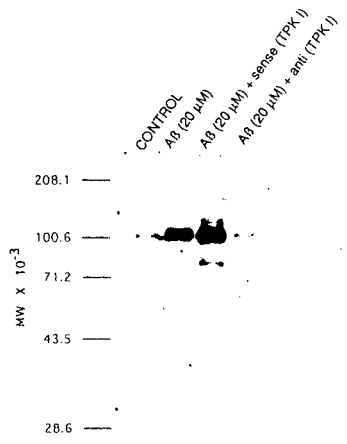


図３　TPK Iによる細胞内のAPP量の調節

参考文献

1．Hardy, J. A. & Higgins, G.A., (1992) *Science* **256**, 184-185 .

2．Yankner, B., A., Dawes, L. R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster,-Granite, M. & Neve, R. L. (1989) *Science* **245**. 417-420.

3．Busciglio, J. & Yankner, B. A., *Soc. Neurosci. Abstr.* 7, 517. 10 (1991)

4．Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. & Rydel, R., E. (1992) *J. Neurosci.* **12**, 376-389.

5．Takashima, A., Noguchi, K., Hoshino, T., & Imahori, K. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7789-7793 .

246 β-アミロイド蛋白脳室内持続投与ラットにおけるコリン作動性およびドパミン作動性神経系の機能障害－in vivo microdialysisによる検討－

伊東亜紀雄、新田淳美、西村京子、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〕
アルツハイマー型痴呆は重篤な認知障害を引き起こす神経変性性の疾患であるが、その治療法は確立されていない。その背景には、同症を的確に反映するモデル動物が存在しないことが挙げられる。このことから、同症モデル動物の開発は、治療法の確立に重要であると思われる。本研究では、アルツハイマー型痴呆患者脳に沈着が認められるβ-アミロイド蛋白を脳室内に持続注入したラットのアセチルコリンおよびドパミンの遊離をin vivo brain-microdialysis法により検討した。その結果、β-アミロイド注入により、ニコチン刺激によるアセチルコリンおよびドパミンの遊離は有意に低下していた。また、high K刺激によるドパミンの遊離が有意に低下していた。これらの実験結果は、β-アミロイド蛋白の沈着がin vivoにおいて神経機能を低下させることを示唆するものであり、またβ-アミロイド注入動物がアルツハイマー型痴呆モデル動物として有用であると考えられる。

アルツハイマー型痴呆（AD）は、発症機序は明らかではないが、前脳基底核から皮質へ投射するコリン作動性神経が変性脱落し、重篤な認知障害を示す神経変性性の疾患である。しかし、その治療方法は確立されておらず、人々の高齢化とともに発症率が増加し、深刻な社会問題となっている。現在の治療薬の開発においては、化学的、物理的な脳の損傷あるいは薬物投与による学習・記憶障害モデル動物が利用されているが、これらモデルでは老人斑や神経原線維変化といった病理学的変化を伴っていない。このような病理学的変化と行動障害の両者を的確に示す、より病態に近いモデル動物が存在しないことが、治療法開発の遅れの一つの原因として考えられる。

一方、AD患者脳に見られる老人斑の主要構成成分であるβ-アミロイド蛋白の培養条件下での生化学的性質については研究がなされており、その神経毒性などが報告されている（1）。このことから、β-アミロイド蛋白の異常な沈着が神経変性を引き起こすことが考えられる。しかし、生体全体に対する影響などの研究・報告はあまりなされていない。最近我々は、β-アミロイド蛋白（1-40）をラット脳室内に持続注入することにより、β-アミロイド蛋白の沈着が起こり、学習・記憶能およびコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）活性が減少することを見い出した（2）。これらのことから、β-アミロイド蛋白持続注入動物は、ADの病態を反映したモデル動物として有用であることが示唆される。今回我々は、このβ-アミロイド蛋白（1-40）持続注入が、脳内で神経機能にどのような影響をおよぼすのかin vivo brain-microdialysis法を用いて検討した。

【実験方法】実験には、Wistar系雄性ラット（β-アミロイド蛋白持続注入開始時に体重280-330 g）を用いた。β-アミロイド蛋白持続注入方法は、Nitta et al.（1994）の報告に従った。今回は学習・記憶およびChAT活性に影響の見られた1日あたり300 pmolの持続注入群について実験を行った。持続注入開始10-14日後にペントバルビタール麻酔下で、dialysis用プローブを前頭皮質および海馬を含む部位（ACh測定）および線条体（DA測定）に挿入し、歯科用セメントで固定した。翌日、無麻酔無拘束下でリンゲル液による潅流を開始した。潅流開始約2時間後、nicotine（3 mM; NIC）を含むリンゲル液に交換し、30分間（ACh）および60分間（DA）潅流した後、元のリンゲル液に交換し、潅流を続けた。約3時間後に100 mMのK^+（high K）を含むリンゲル液で15分間（ACh）および30分間（DA）それぞれ潅流した。回収したリンゲル液をHPLC-ECD法により分析を行った。

【実験結果】30分間のNICの潅流により、偽手術群およびβ-アミロイド注入群ともにACh遊離量が増加した。しかし、β-アミロイド注入群におけるACh遊離量は、偽手術群と比較して有意に低かった（Fig. 1a）。また、NICによるDAの遊離増加が偽手術群では観察されたが、β-アミロイド注入群では観察されなかった。（Fig. 1b）。high K刺激によるAChの遊離増加には、両群間に有意な差は観察されなかった（Fig. 2a）。しかし、AChの場合とは異なりβ-アミロイド注入群のhigh K刺激によるDAの遊離増加は、偽手術群に比較して有意に低かった（Fig. 2b）。

【考察】今回我々は、ニコチン刺激した場合のAChおよびDA遊離が、β-アミロイド蛋白を持続注入したラットにおいて減少していることを見い出した。このことは、β-アミロイド蛋白の異常な沈着が、神経伝達物質の遊離を障害しており、その障害作用は神経伝達物質の遊離を調節していると考えられているニコチン性アセチルコリン受容体の機能を低下させることによることを示唆するものである。一方、high K刺激によるACh遊離には差が見られなかったのに対し、DA遊離の増加はβ-アミロイド注入により低下していたことから、β-アミロイドの生体に対する作用は神経系により異なることも考えられた。学習・記憶能およびChAT活性の低下と今回の実験結果から、β-アミロイド蛋白がin vivoにおいて神経毒性を示し、神経系の機能低下を引き起こすことが明らかとなった。またβ-アミロイド注入動物が、より病態に近いモデル動物として有用であり、今後、治療薬の開発に役立つものと思われる。

【参考文献】

(1) Yankner, B. A., Duffy, L. K., and Kirshner, D. A. (1990) *Science* 250 , 279-282
(2) Nitta, A., Itoh, A., and Nabeshima, T. (1994) *Neurosci. Lett.* 170 , 63-66
(3) Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, T., and Ogata, E. (1993) *Nature* 362 , 75-79

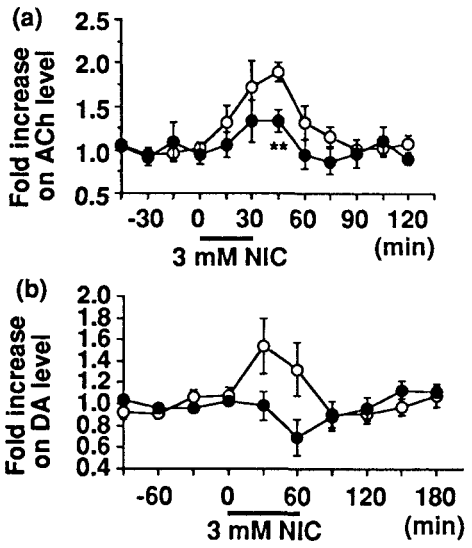


Fig. 1 Effects of nicotine (NIC: 3 mM) on extracellular level of acetylcholine (ACh, a) and dopamine (DA, b) in vehicle- and ß-amyloid-infused rats.
(a) F(1, 92)=6.866; p<0.05 (2-factor ANOVA),
** p<0.01 vs. vehicle-infused rats (Scheffe F-test)
(b) F(9, 64)=2.267, p<0.05 (2-factor ANOVA)
—○— Vehicle —●— Amyloid

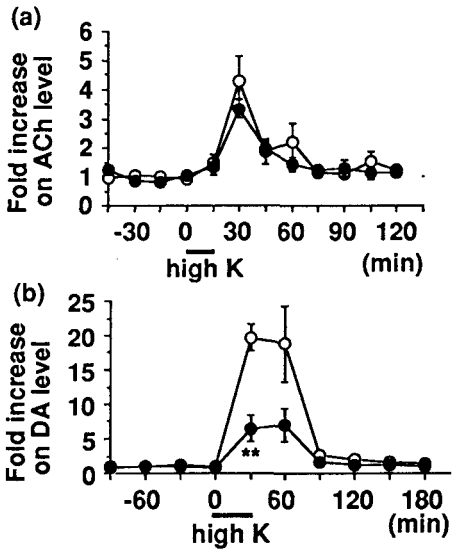


Fig. 2 Effects of high potassium (high K, 100 mM) on extracellular level of acetylcholine (ACh, a) and dopamine (DA, b) in vehicle- and ß-amyloid-infused rats.
(a) There was no difference between vehicle- and ß-amyloid-infused rats.
(b) F(9, 79)=5.878, p<0.01 (2-factor ANOVA),
**p<0.01 vs. vehicle-infused rats (Scheffe F-test)
—○— Vehicle —●— Amyloid

247 アミロイド前駆体蛋白の発現および選択的スプライシングの変化に対する血清除去の影響

須藤慎治、川上秀史、中村重信

（広島大学医学部第三内科）

〔要約〕

アミロイド前駆体蛋白(APP) mRNAの発現の調節機序を明らかにする目的で、培養液の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の発現は血清除去24時間後より経時的な増加を示した。この増加に伴うAPPmRNAの選択的スプライシングの変化に関する検討では、exon7,8すなわちKPIinsert部分を含まないAPP695が有意に減少し、KPI insert部分を含むAPP770が増加の傾向を示した。さらに、exon15を欠くL-APPの比率は有意に増加した。以上の結果より、グリア系細胞において APP 遺伝子は血清中の因子により発現の調節を受け、生理的あるいは病的な条件下で異なった発現をしていることが推定された。

〔目的〕

アミロイド前駆体蛋白(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、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。一方、血清中には様々な因子が存在し、お互いに複雑に作用し合いながら遺伝子発現をはじめ、細胞の機能を調節している。そこで、ＡＰＰ遺伝子発現の調節因子を明らかにする目的で、培養液中から血清を除去したときのAPPmRNAの発現の変化に関してグリア系細胞の性格を有するＣ６グリオーマ細胞を用いて検討した。

〔方法〕

1）血清除去 ：C6 glioma cell を、100mm dish に$8x10^5$/dish の細胞密度で播種し、10%牛胎仔血清を含む DME medium中で24時間培養後に、DMEMで洗い、無血清のDMEMに交換して血清除去を行った。また、対照として10%血清を含むDMEMで培養を行った。

2）Northern blot 解析：血清除去後に一定時間培養した後、細胞から total RNA を抽出し、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APPcDNAプローブとハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーを行った。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ー BAS2000 で測定して行った。

3）APP mRNA の選択的スプライシングパターンの解析：APP遺伝子の選択的スプライシングのパターンの解析は RT-PCR法を用いて行った。細胞から抽出した total RNA1μg から reverse transcriptase によりcDNAを合成し、図１のようにexon7,exon8（①）、またはexon15（②）をはさむようにプライマーを作製し、foward primerの5'側を^{32}P でエンドラベルしてPCRにて増幅を行った。得られた産生物を8%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、各バンドの相対的放射線量をイメージアナライザーで測定して定量化した。

〔結果〕

1）血清除去による APPmRNA 発現量の変化

血清除去によりＣ６グリオーマ細胞は突起を伸展させるといった形態的変化が認められ、同時に細胞の増殖は抑制された。血清除去によりAPPmRNA の発現は24時間以降著明に増加し、48時間後には10%血清含有培地での対照と比較して約４倍の発現の増加を認めた（図２）。

2）KPI insert domain (exon7,8) の選択的スプライシングの検討

血清除去により48時間後には対照と比較して、total APPにしめるAPP695の比率は13.6±0.21%から４８時間後には8.71±0.28%に有意に減少し（$p<0.05$)、APP770は逆に増加の傾向を示した（図３）。

3）L-APP(exon15)の選択的スプライシングの検討

血清除去に伴い exon15を欠く L-APP isoform の比率は 19.5±0.70% から48時間後には 39.4±0.21%に有意に（$p<0.005$)増加した（図４）。

〔考察〕

培養液中の血清除去により、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たことと、細胞数の検討から血清除去により増殖は抑制された。このことから、C６グリオーマ細胞は血清除去に伴って分化が生じたと考えられる。血清除去による遺伝子発現への変化として、NaveらはC６グリオーマ細胞において血清除去に伴ってmyelin proteolipid protein (PLP) geneの発現が著明に増加したと報告している(1)。また、グリア系の前駆細胞である oligodendrocyte-type 2 astrocyte (O-2A) progenitor cellもin vitroで血清を除去した培地中でoligodendrocyteに分化誘導が起こることも知られている(2)。したがって、今回の血清除去に伴うAPP mRNAの発現の増加の機序として１）C６グリオーマ細胞がグリア系の前駆細胞からの分化誘導に伴って生じた、２）血清中にAPPの発現に対する転写抑制因子が存在し、血清除去に伴い、この因子も同時に除去されたため、発現が増加した可能性が考えられた。血清除去に伴う APP mRNAのalternative splicingの検討で、KPI 部分を含まないAPP695の比率の減少とKPI 部分を含むAPP770の増加の傾向を認めたことは、グリオーマ細胞が分化に伴いAPP770を多く発現している non-neuronal cellとしての性格を持つようになったことを反映するのかもしれない。さらに、最近報告されたexon15を欠くLeukocyte-derived APP(L-APP) (3)はニューロン以外の組織に広く発現しているとされているが(4)、その機能や発現の調節機序に関してはまだ不明であり、β/A4蛋白の直前のconformationの変化がβ/A4蛋白のprocessingに影響を及ぼす可能性も示唆されている。今回の結果はL-APPが血清中の因子により調節を受け、そのalternative splicing patternが変化し得ることを示し、さらにL-APPの割合がAPP全体の40%に達したことからこのisoformも重要な機能を有している可能性が示唆された。しかし、L-APPの生理的、病的な意義についてはさらに検討を要する。

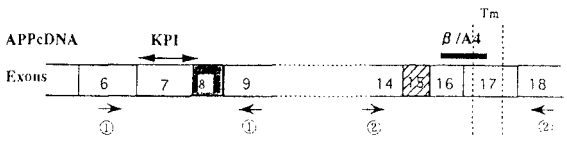


図１．APP cDNAの模式図
各種プライマーの位置を示した。

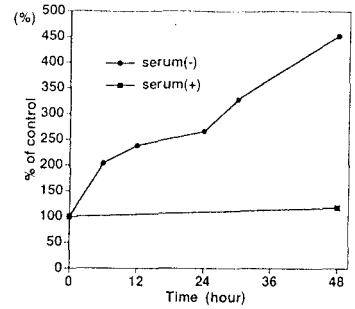


図２．血清除去後のAPPmRNAの発現のtime course

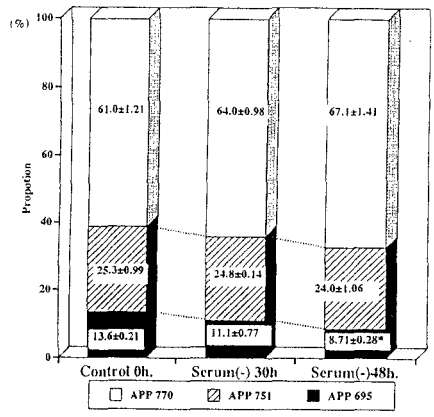


図3.Exon7,8(KPIinsert部分）の選択的スプライシングの血清除去後の変化
数字はtotalAPPにしめる各isoformの割合を示す。(mean ±S.E.M.)
*p<0.05 (Student t-test,n=3)

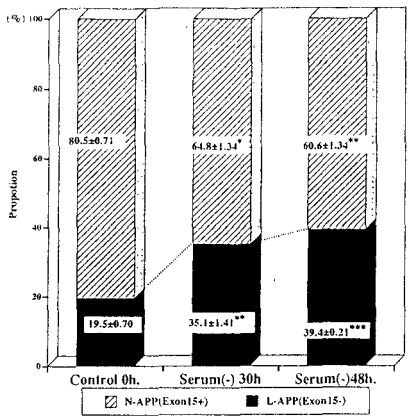


図4.Exon15(LAPP) の選択的スプライシングの血清除去後の変化
数字はtotalAPPにしめる各isoformの割合を示す。(mean±S.E.M.)
*p<0.05,**p<0.01 ***p<0.005 (Student t-test,n=3)

[文献]

(1) Nave, K. A., et al., (1991) J. Neurosci. **11**, 3060-3069.
(2) Raff, M. C., et al, (1983) Nature **303**, 390-396.
(3) Konig, G., et al, (1992) J. Biol. Chem. **267**, 10804-10809.
(4) Sandbrink, R., et al, (1994) J. Biol. Chem. **269**, 1510-1517.

248 実験的頭部外傷ラットにおける神経成長抑制因子(GIF)の発現動態について －共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学的検討－

保住 功、犬塚 貴、平岩雅男*、石黒 英明、宇多 裕*、辻 省次
新潟大学脳研究所神経内科、新潟薬科大学衛生化学*

〔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、GIFの機能については充分に解明されていない。我々はすでにGIFの抗体を作製し、頭部外傷モデルラットにおいてWestern, Northern blotting法によりGIFとGIFmRNAの変動を検索し、術後3日から上昇し、術後21日をピークとし、有意な上昇は少なくとも術後28日まで持続することを明らかにした。今回我々は同モデルを経時的に免疫組織化学的に検索した。マイクロスライサーで浮遊切片を作製し、0.3% Triton溶液を用い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。GIF陽性細胞は外傷周囲における反応性アストロサイトに認められ、術後5～7日目ではGIFは細胞体に、術後14～21日目にGIFは細胞体のみならず突起にも強く認められた。これらの所見はWestern, Northern blottingの結果に極めて良く対応した。GIFはmRNA、蛋白の発現だけでなく、局在においてもGFAPとは明らかに異なっており、神経組織修復機構におけるGIFの機能を考える上で重要であると考えられた。

アルツハイマー病の脳ではGIFが減少していることが明らかにされたが[1)、2)]、その生物学的機能についてはいまだ充分に明かにされていない。昨年我々は頭部外傷モデルラットにおけるGIFのmRNA、蛋白の変動について検索した。今回、同モデルを共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に免疫組織化学的な検討を行った。

【方法】

① 頭部外傷モデルラットの作製：200g、雌、Sprague-Dawleyラットの両側大脳にstab woundsを作製した。経時的に術後0, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28日目に検索した。このモデルはすでにGFAP, GFAP mRNAについて検索し、報告したものと同じである[3)、4)]。

② 組織学的検索：ラットはエーテル麻酔後PLP固定液で灌流固定し，6時間浸潤固定後、マイクロスライサーDTK-1000（堂阪イーエム）を用いて50μmの厚さの浮遊切片を作製した。

③ 抗体：抗GIF抗体は昨年報告したラットGIFに特異的な配列の合成ペプチドに対する抗体を用いた[5)]（1:20)。抗GFAP抗体(Boehringer-Mannheim社, 1:200)、抗MAP-2抗体(Amersham社, 1:400)を細胞同定のために用いた。一次抗体と48時間反応させた後、二次抗体としてFITC-抗ウサキIgG(DAKO社, 1:40)、Rhodamine-抗マウスIgG(DAKO社,1:40)を用い6時間反応させた。抗体の希釈には0.02%ないし0.3%Triton添加PBSを用いた。一次抗体の希釈液には非特異的反応を抑えるため、5%BSAをPBSに加えた。抗原に用いた合成ペプチドを吸収試験に用いた。

④ 倒立型共焦点レーザー顕微鏡LSM 410(Carl Zeiss社)で観察した。

【結果】

Triton溶液は0.3%の方が0.02%より抗体の組織への浸透性が良かった。免疫組織化学的検索でGIFは正常脳の表面の神経膠性血管周囲限界膜におけるアストロサイトに免疫活性が認められ、皮質内の細胞にも弱陽性の反応が認められた。術後1日目に脳表近くに極少数GIF陽性細胞が認められた。術後5～7日目にGFAP強陽性の反応性アストロサイトは外傷周囲に多数出現するが、GIF免疫活性はそれらの細胞体にのみ認められた。術後14～21日目GIF免疫活性は反応性アストロサイトの細胞体のみならず突起にも強く認められた。GIF活性はGFAP強陽性の反応性アストロサイトに認められ、吸収試験で吸収された。

【考察】

我々はすでにGIFの抗体を作製し、頭部外傷モデルラットにおいてWestern, Northern blotting法によりGIFとGIF mRNAの変動を検索し、術後3日から上昇し、術後21日をピークとし、有意な上昇は少なくとも術後28日まで持続することを明らかにした。今回共焦点レーザー顕微鏡による観察で、GIF陽性細胞は外傷周囲の反応性アストロサイトに認められ、術後5～7日目では免疫活性は細胞体に認められた。術後14～21日目に細胞体のみならず、突起にも強く認められた。これらの所見はWestern, Northern blottingの結果に極めて良く対応する。GIFはmRNA、蛋白の発現だけでなく、局在においてもGFAPとは明らかに異なっており、神経組織修復機構におけるGIFの機能を考える上で重要であると考えられた。

共焦点レーザー顕微鏡は、マイクロスライサー切片など厚い標本の観察が可能で、突起を持つ中枢神経系の細胞の観察に適する。感度的にも優れ、二重染色、画像処理も容易で、今後至適条件を検討することでin situ hybridizarionへの応用も充分に期待できる。

【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. I. Hozumi et al (1990) Brain Res 524, 64-71
4. I. Hozumi et al (1990) Brain Res 534, 291-294
5. I. Hozumi et al (1993) 神経化学 32, 116-117



Fig. 1 術後7日目のGIF染色
GIF免疫活性は主にreactive astrocyteの細胞体に認められる。



Fig. 2 術後14-21日目のGIF染色
GIF免疫活性は細胞体のみならず、突起にも強く認めれる。

Fig. 1, 2とも三次元立体構築を行い、stereoimagingにしてある。
全て同一条件での撮影である。

249 アミロイド小体(Corpora Amylacea)の生理学的あるいは病理学的機能について

徳武 哲
(都精神研・分子生物)

〔要約〕
Alzheimer病および非痴呆老人の剖検脳からアミロイド小体(Corpora Amylacea)を精製し、走査型電顕で観察後その中に含まれる元素のスペクトルを付設したX-線分析装置により調べたところ、Na, Cl, P, Sの顕著なピークが観察され、さらに小さなピークとしてK, Ca, Al, Si が検出された。これらの元素がアミロイド小体に含まれていることは mapping法による元素分布の測定により確かめた。また、剖検脳の凍結切片に含まれるアミロイド小体の元素分析や分布解析でも類似のが結果が得られた。これらの結果に加え、アミロイド小体が血管の周囲や大脳皮質の軟膜下等血液や脳脊髄液が接触する近くに見いだされることから、老化に伴い、血液や脳脊髄液より脳細胞に侵入した無機塩類をアミロイド小体は吸収蓄積する機能を持っているのではないかと推測された。

アミロイド小体は老化に伴い、血管の周囲や大脳皮質の軟膜下のアストロサイトに見いだされる直径5-20 μm の封入体である(2, 6, 7, 11)。この小体は痴呆や特定の脳神経疾患と相関性は見られず、健常な老人脳にも見いだされ、また染色性や組成より主に多糖類より構成されていると思われているが(1, 4, 5, 8, 9, 10)、難分解性の構造を持つため蓄積しているとも思われず、単に過剰に作られ糖が蓄積したものと考えら、生理学的あるいは病理学的機能が不明確であるため、あまり関心を持たれてこなかった。アミロイド小体やリポフスチンは、老人斑や神経原線維変化の精製の過程で混入してくるが、比重が大きく固くて無機塩類の蓄積が予測されたため、元素分析を試みた。その結果と小体の分布や組成より、生理学的あるいは病理学的機能を考察した。

〔実験法〕

アミロイド小体は、アルツハイマー病 (45才) および非痴呆老人 (87才) の冷凍保存した剖検脳より調製した(12, 13) 。調製は剖検脳5gをhomogenize後、stainless meshおよびnylon meshによる濾過、蔗糖溶液を用いた分画遠心、8M尿素溶液処理等により得た高密度画分(100-200 μg)を用いた。この画分を蛍光顕微鏡で観察すると、主にアミロイド小体とリポフスチンが含まれていた。この画分を蒸留水でよく洗浄後、少量の水(0.1 $m\ell$) に懸濁し、一滴をThermanox cover にとり乾燥させ、カーボン蒸着後走査型電顕(SEM, JEOL 6100)で観察し、さらにエネルギー分散型X-線分析装置(EDS, JED-2000)で含まれている元素のスペクトルを測定した(15 kV, 100sec, Dead Time 20%) (3)。元素の分布は全領域を64×64の区域に分け、各々の区域について100 msecづつ元素に特異的なX-線のエネルギーの強度の測定を行った。

〔結 果〕

Fig. 1 は高密度画分中のアミロイド小体の SEMの観察像である。空気中で乾燥させているので、表面がゴツゴツし微細構造はやや変形しているが、全体の形は保たれている。

Fig. 2 はアミロイド小体に含まれる元素の EDSにより得られたスペクトルで、Na, Cl, P, Sの顕著なピークが観察された。小さなピークとしては、K, Ca, Al, Si が見られた。

Fig. 3 は主要元素の分布状態を mapping法により調べたもので、これらの元素が、小体に濃縮あるいは蓄積していることが分かる。

紙面の都合で詳細なデーターは割愛したが、剖検脳の凍結切片に含まれる小体の元素分析でも類似のスペクトルが得られた。凍結切片の場合 Kの顕著なピークが見られた。凍結切片を用いた元素分布の測定でも、検出された元素が小体に蓄積していることが確かめられた。 Alzheimer病と非痴呆老人では含まれている元素に著しい違いは見られなかった。 Sはシステインあるいはスルフォン酸基によるものと思われる。AlとSiは、昨年の本学会で報告したようにリポフスチンに多く蓄積していた(13)。

［考　察］

アミロイド小体の主要成分は glucose polymerであり、それに多くのリン酸基が結合したものと考えられている。これに小量のムコ多糖類やアミノ糖、タンパク質が含まれている。この小体の組成、小体のの分布、本実験の結果を考え合わせると、アミロイド小体は、glucose polymer を骨格とし、リン酸基、スルフォン酸基、アミノ基等をイオン交換体とするイオン交換Sephadexのようなものであり、老化に伴い血液や脳脊髄液から脳細胞に侵入した無機塩類を吸収し、小体が成長するにつれて不可逆的に保存蓄積する生理的あるいは病理的機能を持っているものと推定される。

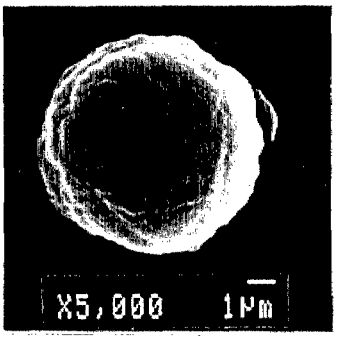


Fig. 1. Corpora amylacea observed by SEM.

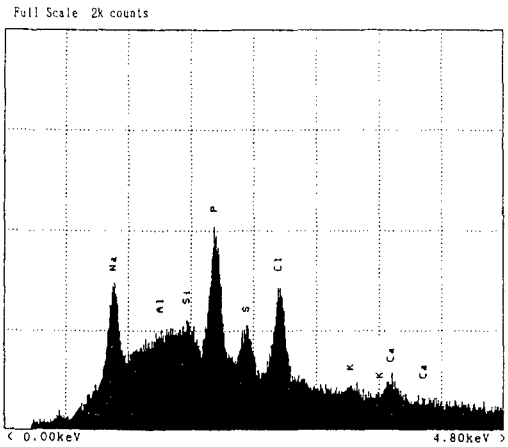


Fig. 2. Elemental analysis of corpora amylacea by EDS.

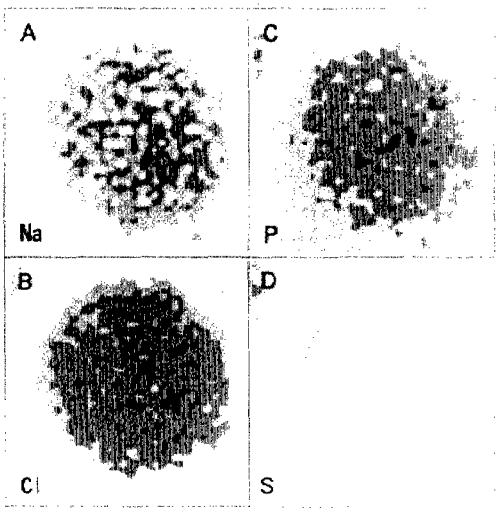


Fig. 3. Mapping analysis of elements in corpora amylacea.

［文　献］

(1)Cisse, S., Perry, G., Lacoste-Royal, G. et al., Acta Neuropath., 85, 233-240 (1993)
(2)Ferraro, A. & Damon, L.A., Arch. Path., 12, 229-244 (1931)
(3)Goldstain, J.I., Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis, (Plenum, 1980)
(4)Liu, H.M., Anderson, K. & Caterson, B., J. Neuroimmunol., 14, 49-60 (1987)
(5)Palmucci, L., Anzil, A.P. & Luh, S., Acta Neuropath., 57, 99-102 (1982)
(6)Ramsey, H.J., J. Neuropath. Exp. Neurol., 24, 25-39 (1965)
(7)Robitaille, Y., Carpenter, S., Karpati, G. & Diamauro, S., Brain, 103, 315-336 (1980)
(8)Sakai, M., Austin, J., Witmer, F. & Trueb, L., Arch. Neurol., 21, 526-544 (1969)
(9)Stam, F.C. & Roukema, P.A., Acta Neuropath., 25, 95-102 (1973)
(10)Steyaert, A., Cisse, S., Merhi, Y. et al., J. Neurosci. Meth., 31, 59-64 (1990)
(11)Takahashi, K., Agari, M. & Nakamura, H., Acta Neuropathol., 31, 151-158 (1975)
(12)Tokutake, S. & Oyanagi, S., Neurosci. Lett., 163, 15-18 (1993)
(13)徳武哲、神経化学、32, 510-511 (1993)

250 Post Synaptic Density (PSD) におけるアミロイド 前駆体蛋白 (APP)の局在に関する検討

下川雅丈[1,2]、鈴木龍雄[3]、柳澤勝彦[4]、石浦章一[2]、宮武　正[5]
(東京医科歯科大神経内科[1]、東大・分子細胞生物学研[2]、名古屋市大・医・生化[3]、東大・脳研・病理[4]、都臨床研[5])

〔要約〕

ラット大脳ホモジネートから鈴木らの方法に従いショ糖密度勾配遠心およびTriton X-100可溶化によって post synaptic density (PSD) を分離した。PSD をアミロイド前駆体蛋白 (APP) N末端およびC末端、アミロイドβ蛋白に対するポリクローナル抗体を用いてECL Western blot 法で検討した。PSDには APPのN末端およびアミロイドβ蛋白に対する抗体の免疫反応性を認めたが、APPのC末端に対する抗体の免疫反応性は認められなかった。この事実は、PSDにはC末端を欠いたいわゆる分泌型APPが存在することを示す。従来、分泌型APPは血中や脳脊髄液中など細胞外での存在が確認されていたが、今回の検討で神経細胞内のPSDにも局在することが示された。分泌型APPはPSDに局在し、シナプスに関連した何らかの生理機能を担っていると推察された。

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。我々は脳における APPの機能を明らかにすることを目的とし、 APPのシナプスでの局在を検討してきた。昨年の神経化学会では full-length の APPが synaptic plasma membrane に局在し、シナプス小胞には APPが存在しないことを報告した。今回はpost synaptic density (PSD) を精製し、生化学的に検討した。

方法：鈴木らの方法(1)に従い Sprague-Dawley ラット脳よりPSDを精製した。すなわち、大脳ホモジネートからsynaptosomeを分画し、これをTriton X-100に暴露したのちショ糖密度勾配遠心にかけてPSDを得た。PSDの精度は電顕および蛋白電気泳動パターンで確認した。

これを9%SDS-PAGEないし10-16.5%Tris-Tricine SDS-PAGEで展開し、APPのN末側およびC末側に対するポリクローナル抗体 (NAPP, CAPP：東大脳研　井原康夫教授提供) 、アミロイドβ蛋白に対するポリクローナル抗体 (R17：都精神研　亀谷富由樹博士提供) を用い、ECL Western blot を行なった。

結果：1. 大脳ホモジネート、シナプトソーム、PSDに分子量105kDaの免疫反応性をNAPPで認めた。これはNAPPの吸収試験で消失した。

2. PSDのみに分子量105kDaのR17の免疫反応性を認めた。

3. 大脳ホモジネート、シナプトソームに分子量105kDaのCAPP免疫反応性を認めたが、PSDではCAPP免疫反応性は認められなかった。

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。だが、その生理機能は不明のままである。最近、C末を欠いた分泌型APPがシナプス

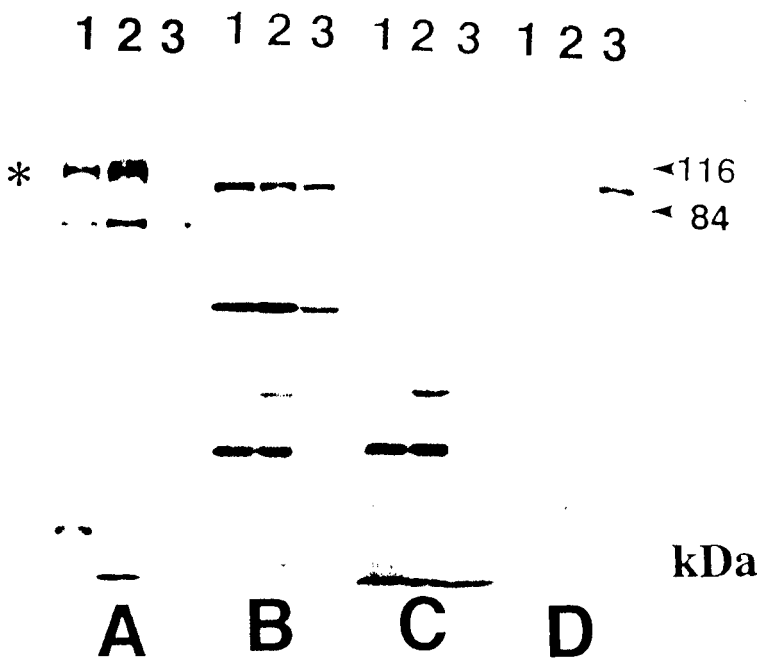
の可塑性に関係することが報告された(2)。PSDはCAMキナーゼIIを主要構成蛋白とするシナプス後膜直下の酵素に富んだ構造物である。その機能は十分明らかではないがシナプス伝達に関係するといわれている。また、CAMキナーゼIIはシナプス長期増強（LTP）との関係で注目されている。

今回の検討でC末を欠いた分泌型APPがPSDに局在することが示されたが、これはAPPがシナプス活動において何らかの生理機能を担っていることを示唆するものと考えられる。

文献：(1). Suzuki, T., Okumura-Noji, K., Ogura, A., Kudo, Y. and Tanaka, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 89, 109-113

(2). Mattson, M.P., Cheng, B., Culwel, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I. and Rydel, R.E. (1993) *Neuron* 10, 243-254

図　PSDのWestern blot analysis(9%SDS-PAGE)
lane 1：脳ホモジネート　lane 2：synaptosome　lane 3：PSD
※：APP
A：APPのC末に対する抗体（CAPP）
B：APPのN末に対する抗体（NAPP）
C：抗原ペプチドで吸収したAPPのN末に対する抗体
D：アミロイドβ蛋白に対する抗体（R17）



251 脳卒中自然発症高血圧ラットにおける脳内エンドセリンの関与

山下康子、山下樹三裕、丹羽正美、片岡泰文、谷山紘太郎
長崎大学、医学部、第2薬理

〔要約〕

脳血管障害による神経細胞障害へのエンドセリン (ET) の関与を知るために、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用い、脳卒中を発症したラット (30 ー 40 週齢) 脳で、^{125}I-ET-1 をリガンドとした受容体オートラジオグラフィー法による ET 受容体の変動と特性および免疫組織化学法による ET 様免疫活性、さらにグリアの変動について調べた。その結果、卒中病変の認められた部位で、ET 受容体結合量が著明に増加し、かつ ET 様免疫活性の明確な増加が認められた。また増加した ET 受容体は BQ-123 (ET_A antagonist) および IRL 1620 (ET_B agonist) のいずれでも部分的に置換された。アストロサイトは脳血管病変およびその周囲も含めて増加がみられた。ミクログリアの集積も認められた。以上、SHRSP の ET 受容体、ET 様免疫活性、アストロサイトおよびミクログリアの増加が認められること、また増加した ET 受容体には ET_A および ET_B 両受容体が混在することから、脳血管障害による神経細胞障害の過程に ET が深く関与していることが示唆された。

(緒言) 我々はこれまでに、一過性前脳虚血負荷により遅発性神経細胞障害をひきおこしたラットの海馬 CA1 領域で ET_B 受容体結合量および ET 様免疫活性ともに著明に増加し、増加した ET_B 受容体はミクログリア上に最も高密度に存在し、ET 様免疫活性は アストロサイト上に存在すること[1)2)]、またカイニン酸を脳室内投与したラットの海馬および梨状葉皮質でも著明な神経細胞障害に伴った ET 受容体およびアストロサイトの消失をきたす一方、その周囲では ET_B 受容体、ET 様免疫活性およびアストロサイトが増加することを報告し[3)]、諸種神経細胞障害に ET が重要な役割を担っていることを報告してきた。一方、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) は遺伝的に若年期から高血圧を発症し、加齢とともに脳卒中を発症することがしられている[4)]。そこで今回は、SHRSP で発症した脳卒中においても ET が関与しているかどうかを調べるために卒中を発症したSHRSP 脳内の ET 受容体および ET 様免疫活性の変動を検討した。

(方法) 30 週齢から 40 週齢の SHRSP で、行動特性から脳卒中を発症していると思われるラットをエーテル麻酔下断頭し、摘出脳の連続切片 (20μm) を作製した。これら切片を ^{125}I-ET-1 (2nM) をリガンドとして 4°C、48 時間 incubate することにより結合実験を行ない、Hyperfilm-^{3}H に感光させオートラジオグラムを得た。その後、エマルジョンオートラジオグラフィーも行った。ET_A および ET_B 受容体への選択的結合は、それぞれ ET_B agonist、IRL 1620 10μM または ET_A antagonist、BQ-123 10μM 存在下で、また非特異的結合は 1μM 非放射性 ET-1 存在下で incubate することにより得た。隣接

連続切片を 4% paraformaldehyde で 30 分間室温固定し、anti-ET-1 (Peninsula)、anti-glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP、Biomeda) および *Griffornia simplicifolia* B4-isolectin (GSA- Isolectin B4 , Sigma) を用いて、ABC 免疫組織化学法の常法に従い染色を行なった。

(結果および考察) 脳卒中を発症したラットでは明期での運動量が増加し、運動の日内リズムが乱れ、体重も減少した。脳重量は増加し、脳軟化、限局性出血、さらに液化変性および嚢胞形成を示す例もみられた。これら脳血管障害の認められた部位で、ET 受容体結合量が著明な増加を示し、ETA antagonist である BQ-123 10μM および ETB agonist である IRL 1620 10μM のいずれでも部分的に置換された。これらの共存下では ET-1 1μM 存在下と同様の置換がみられたことより、増加した ET 受容体には ETA および ETB 両受容体の混在が示唆された。また、ET 受容体が増加を示した部位に一致して ET 様免疫活性の著明な増加が認められ、アストロサイトはその周囲も含めて明らかな増加を示した。またミクログリアの集積がみられる病変もあった。一方、脳卒中を発症していないラットでは ET 受容体および ET 様免疫活性ともに変化はなかった。正常血圧を示す Wistar Kyoto 系ラットでは 18 ヶ月齢でも変化はみられなかった。以上、遺伝的に高血圧を発症し、加齢とともに脳卒中を発症した SHRSP 脳内の脳血管障害部位において、ETA および ETB 受容体の増加とともに ET 様免疫活性も著明に増加した。脳卒中においても ET 系の活性化が示唆され、脳卒中における脳神経細胞障害への ET の関与がさらに支持された。

(文献) 1) Yamashita, K. et al. , Cell. Mol. Neurobiol. 13, 15-23, 1993 2) Yamashita, K. et al. , J. Neurochem.(in press) 3) Sakurai-Yamashita,Y. et al. , Jap. J. Pharmacol. 64 (suppl) 197p, 1994 4) Okamoto, K. et al. Circ. Res. 34/35 (suppl.1) 143-153, 1974

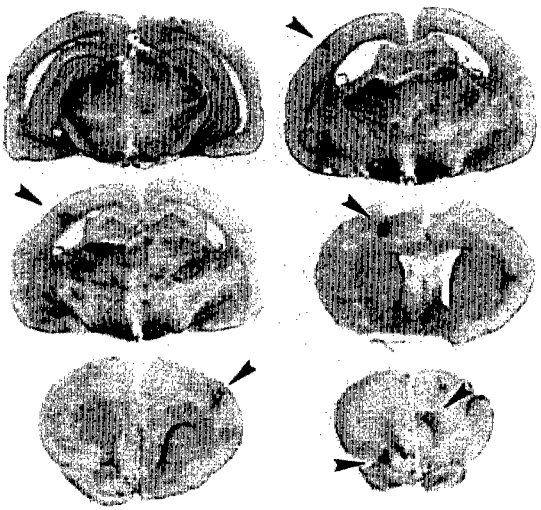


Fig. 1 Receptor autoradiograms of ^{125}I-ET-1 binding sites in the brain of SHRSP

252 アストログリアからの低酸素暴露によるOxygen Regulated Proteins (ORPs)と再酸素化によるHSP72の誘導とそのメカニズム

○桑原敬介[1]、松本昌泰[1,2]、前田裕輔[1]、堀　修[1]、上田周一[2]、小川　智[1]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
大阪大学医学部第一内科[1]、同神経内科[2]

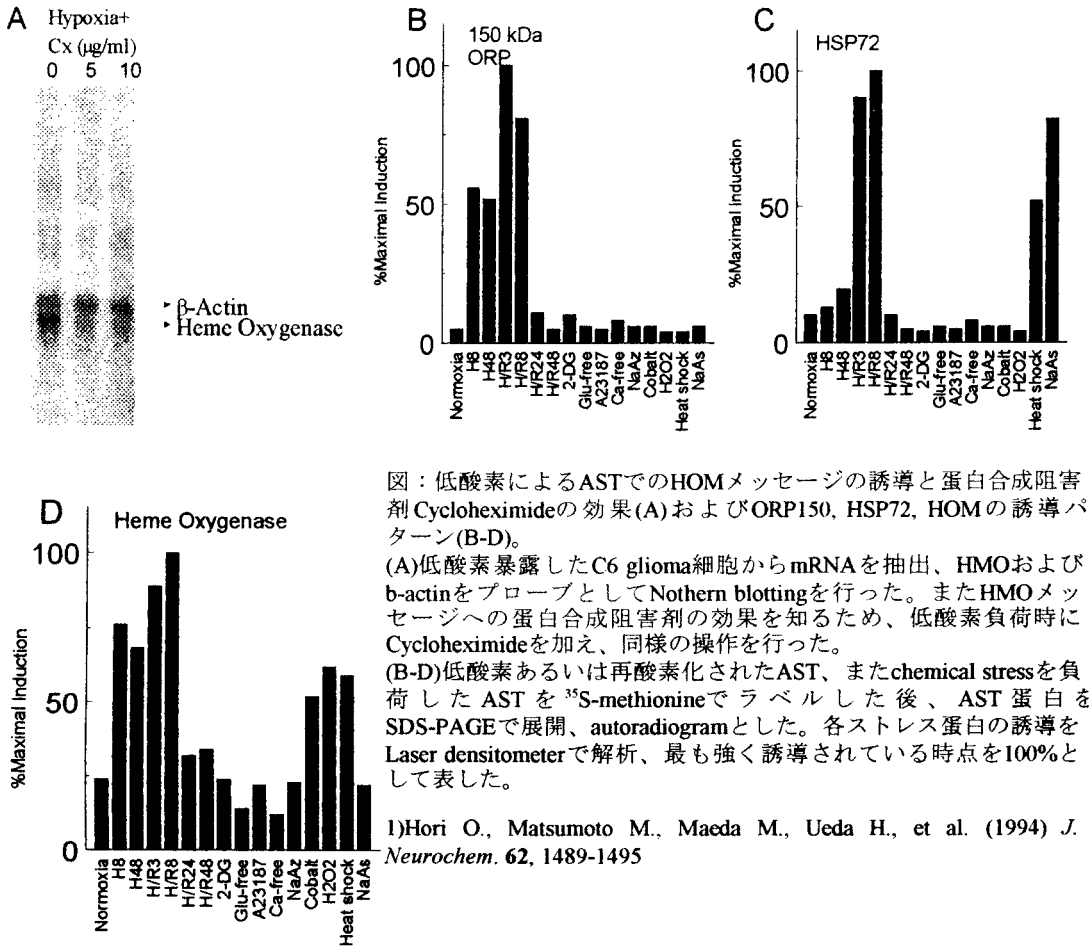
〔要約〕　ラット培養アストログリア(AST)を低酸素暴露する事によって、AST内には分子量が150, 94, 78, 33, 28 kDaのストレス蛋白が誘導された。これらのストレス蛋白のうち、分子量が33 kDaのストレス蛋白は他のchemical stressによる誘導パターン、特異抗体を用いたWestern blotによってheme oxygenase(HMO)と同定された。Northern blotは低酸素によるHMOメッセージの誘導がcycloheximideによって抑制される事を示し、HMOの誘導がheat shock elementを介さない、低酸素特異的な機序による事を示した。更に150 kDaのストレス蛋白は低酸素負荷時のみに誘導されるORPであり、そのN末アミノ酸配列はそれが従来に報告の無い新たなストレス蛋白であることを示した。また再酸素化によってASTにはHSP72が誘導され、その誘導は再酸素化時に発生する活性酸素と関連することが明らかとなった。

<目的>臓器虚血に対する負荷応答を理解するため、我々は大規模な組織培養レベルでの低酸素負荷モデルを確立し、アストロサイト(AST)の虚血・再潅流に伴うエネルギー代謝を詳細に検討して来た[1]。本研究では更に大量ASTを培養、低酸素暴露することによってASTに低酸素によって特異的に誘導される蛋白の同定を試みた。

<方法および結果>新生ラット脳よりASTを分離培養し以下の実験に供した。ASTを48時間低酸素暴露(pO_2<10 torr)し、再酸素化すると細胞内に分子量150, 94, 78, 72, 33, 28 kDa のストレス蛋白の誘導がクマシー染色にて認められた。^{35}S-methionineでラベルされた細胞蛋白のSDS-PAGEのautoradiogramによれば、これらのストレス蛋白のうち分子量が94, 78, 28 kDaのものはASTを2-deoxy glucose(2-DG)やカルシウムイオノフォアで処理することによっても誘導されるため、細胞内の低グルコースによって誘導されるglucose regulated proteins (GRPs)であると考えられた。分子量33 kDaのストレス蛋白は低酸素暴露後8時間以内に誘導され、GRPsとは異なり2-DGでは誘導されず、熱ショック、ヒ素、コバルトなどの重金属、活性酸素負荷にて誘導されること、更に特異抗体を用いたWestern blottingによって、HMOである可能性が示唆された。一方、低酸素によるHMOの誘導はASTのcell lineの一つであるC6 gloimaでも見られ、Northern blottingによって低酸素負荷によってHMOのメッセージが著増すること、またcycloheximide処理することによってHMOメッセージの誘導が抑制されることが明かとなり、HMOの誘導がheat shock factorを介さない、より低酸素特異的な蛋白新生を介するメカニズムによって起こっていることを示唆した。分子量150 kDaのストレス蛋白の誘導も低酸素暴露8時間後から見られたが、この蛋白は低酸素特異的に発現し、上述のどの化学的刺激でも誘導されなかった。一方、150 kDaのストレス蛋白をイオン交換クロマトグラフィーにて分離、限外ろ過後、preparative SDS-PAGEにて精製した後micro protein sequencingを試み得られたN末端アミノ酸

配列は、150 kDaの蛋白がこれまでに報告されていない新たなペプチドである事を示した。一方、72 kDaのストレス蛋白は、主に再酸素化後に誘導されたが、正常酸素分圧下でも熱ショック、ひ素などのchemical stressによって誘導されること、更に抗マウスHSP72モノクローナル抗体を用いたWestern blottingによって、HSP 72であることが示された。また低酸素下にあるASTにあらかじめNADPH oxidase阻害剤であるdiphenyl iodonium(DPI)を加えると、それは再酸素化に伴う活性酸素の産生を完全に抑制するとともに、HSP72の発現も抑制し、再酸素化に伴って発生する活性酸素がHSP72の誘導を引き起こしている事が示唆された。また、DPIで処理したASTでは、SDS-PAGE上再酸素化に伴って誘導されるいくつかの蛋白が誘導されず、再酸素後のHMOの消失も見られなかった。

<結語>以上より、ASTは低酸素負荷を特異的に感知する機構を持ち、それによって低酸素特異的なOxygen regulated proteins (ORPs)の誘導を引き起こすことが明かとなった。また、ASTを再酸素化する事によってHSP72が誘導されるが、これにはNADPH oxidaseの発火に伴う活性酸素の関与が示された。



図：低酸素によるASTでのHOMメッセージの誘導と蛋白合成阻害剤Cycloheximideの効果(A)およびORP150, HSP72, HOMの誘導パターン(B-D)。
(A)低酸素暴露したC6 glioma細胞からmRNAを抽出、HMOおよびb-actinをプローブとしてNothern blottingを行った。またHMOメッセージへの蛋白合成阻害剤の効果を知るため、低酸素負荷時にCycloheximideを加え、同様の操作を行った。
(B-D)低酸素あるいは再酸素化されたAST、またchemical stressを負荷したASTを^{35}S-methionineでラベルした後、AST蛋白をSDS-PAGEで展開、autoradiogramとした。各ストレス蛋白の誘導をLaser densitometerで解析、最も強く誘導されている時点を100%として表した。

1)Hori O., Matsumoto M., Maeda M., Ueda H., et al. (1994) *J. Neurochem.* **62**, 1489-1495

253 低酸素暴露によるアストログリアのGlucose Regulated Proteins(GRPs)の発現とその虚血下における役割

○小川 智[1]、松本昌泰[1,2]、前田裕輔[1]、堀 修[1]、上田周一[2]、桑原敬介[1]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
大阪大学医学部第一内科[1]、同神経内科[2]

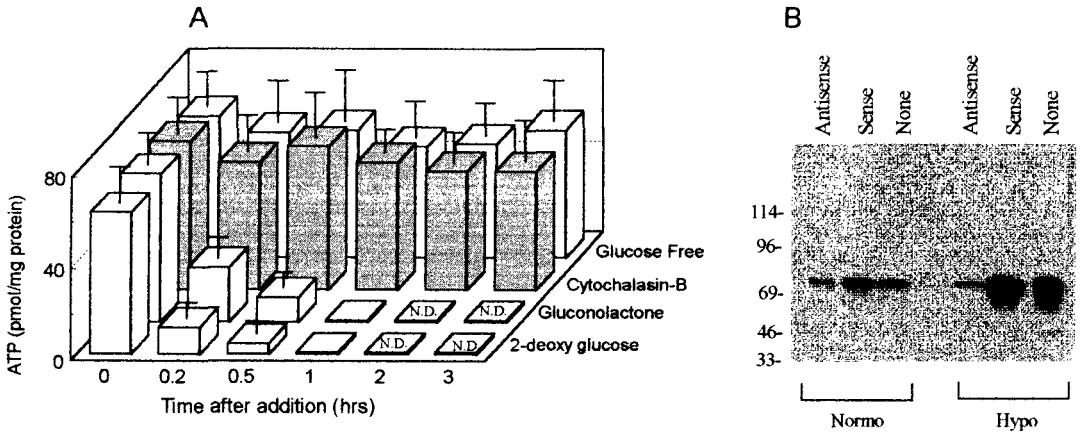
〔要約〕 ラット培養アストログリア(AST)を低酸素暴露する事によって、AST内には分子量が150, 94, 78, 72, 33, 28 kDaのストレス蛋白が誘導された。これらのストレス蛋白のうち、分子量が94, 78, 28 kDaのものは、正常酸素分圧下にあるASTを2-deoxyglucoseやカルシウムイオノフォアで処理する事によっても誘導されたため、GRPsである可能性が示しめされた。さらに78 kDaのストレス蛋白のアミノ酸配列はGRP78のそれと一致した。低酸素暴露によってAST内のエネルギー代謝は嫌気性代謝へとシフトしたが、これに伴って細胞内glycogenが枯渇、細胞内の低glucoseをきたし、これがGRPsの誘導を引き起こすと考えられた。また、低酸素下ASTへのGRP78のantisense oligonuceotidesの導入は、GRP78の誘導を抑えるとともに、ASTの神経保護機作の一つであるglutamate uptakeを傷害した。

<目的>ASTは脳において最も豊富に存在し、虚血・再潅流など脳血管障害に伴う環境変化に最も強い細胞種であるだけでなく、これらの環境下にあっても神経細胞を保護する働きを有する。本研究では、AST の虚血時におけるストレス応答を理解するため、低酸素暴露によりAST内に誘導されるストレス蛋白の同定と、そのエネルギー代謝の解析を試みた。

<方法および結果>新生ラット脳よりMcCarthyらの方法に従って、ASTを分離、第2代まで継代培養し以下の実験に供した。既報[1]にしたがって、低酸素下で^{35}S-methionineでラベルし、細胞蛋白のSDS-PAGE (4-20%)にて展開、autoradiogramとすると、低酸素暴露によってAST 内には分子量約150, 94, 78, 72, 33, 28 kDa の蛋白が誘導された。これらの蛋白の発現は低酸素暴露後約8時間後から48時間後、更に再酸素化8時間後まで見られたが、正常酸素下にあるAST にはこれらの蛋白の発現はほとんど見られなかった。これらの蛋白のうち94, 78, 28 kDaの蛋白はAST を2-deoxyglucoseやカルシウムイオノフォアに暴露することによって誘導されたが、細胞外の低glucose負荷では誘導されなかった。これらのストレス蛋白のうち78 kDaのものは豊富にその存在が確認されたため、その精製を試みた。1% NP-40にてAST より細胞内蛋白を抽出、イオン交換クロマトグラフィー法にて分画したのち限外ろ過にて蛋白を濃縮、10% SDS-PAGE上に展開、PVDF paperに転写し、78 kDaストレス蛋白のmicro-protein sequencingを行った。この結果、78 kDaのストレス蛋白のアミノ酸配列は78 kDa glucose regulated protein (GRP78)のアミノ酸配列と全て一致、78 kDaのストレス蛋白がGRP78であることが証明された。一方、^{3}H-deoxyglucoseをトレーサーとして評価されたASTのglucose取り込は低酸素負荷によって約1.5倍にしか上昇しなかった。これに反して、低酸素暴露によって細胞内glucose、glycogen量は低酸素暴露後急激に減少し、48時間後で約1/3となった。低酸素下のAST内のATP量は、正常酸素下のそれの70%程度に保持されていたが、解糖系の阻害剤である

2-deoxyglucoseや、glyocgenの分解阻害剤であるgluconolactoneは急激な細胞内ATPの減少と細胞死をもたらした。これに反して無glucose mediumやglucose transporterの阻害剤であるcytochalacin-Bは低酸素下のASTのエネルギー代謝に影響を与えなかった。一方、血管内皮細胞(EC)を用いた検討では、低酸素暴露によってECのglucose取り込は約10倍に上昇、これに伴ってgluocse transporter-1抗原の誘導が見られたが、GRPsの誘導は見られず、同様に虚血負荷に強いとされる細胞間でも虚血ストレスに対する負荷応答に差のある事が示された。抗ヒトGRP78抗体を用いたWestern Blottingによると、低酸素環境下にあるASTへのGRP78 anti-sense oligonucleotideの導入は、低酸素暴露によるASTのviabilityには影響を与えなかったが、細胞内のGRP78の発現を抑制するとともに、このanti-sense oligonucleotideは、ASTの最も重要な神経保護機作の一つであるglutamate uptakeを、低酸素環境下にあるASTにおいてのみ選択的に抑制した。

<結語> 以上より、AST は低酸素暴露による細胞内低グルコースに対してGRP78をはじめとする、大量のGRPsを産生することが明らかとなった。またGRPsは、低酸素環境下でAST の神経保護機作が保持されるために極めて重要な役割を担っている可能性が示唆された。



図：低酸素環境下のASTのエネルギー代謝に対する各種代謝阻害剤の効果(A)とGRP78 antisense oligonucleotideのGRP78発現に対する影響(B)。(A)ASTを6-well plateに植え、24時間低酸素暴露した後、2-deoxyglucose (20 mM), gluconolactone (5 μM), cytochalasin-B (5 μM)、を加え、また低酸素チャンバー内で無glucose mediumに入れ替えた。一定時間後、1M PCAにて細胞内ATPを抽出、HPLCにてATP量を計測した。細胞蛋白含有量はBradford法にて測定した。(B)AST(10^6 cells)にGRP78のantisenseおよびsense oligonucleotide (20 μM)を添加、そのまま24時間正常酸素下、または低酸素下で24時間培養した後、1% NP-40にて細胞蛋白を抽出、7.5% SDS-PAGEに展開した後、抗ヒトGRP78抗体を用いたWestern Blotを行った。

1)Kuwabara K., Ogawa S., Matumoto M., et al. *Proc. Natl. Accad. Sci. (U.S.A.)*. 1994, in press.

254 ラット局所脳虚血モデルにおけるＨＳＰ２７の誘導とＨＳＰ７０との相違

加藤宏之、劉暁宏、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〕
ラット局所脳虚血モデルにおける低分子ストレス蛋白（ＨＳＰ２７）の誘導を免疫組織化学染色を用いて検討した。右中大脳動脈を１時間閉塞後、１日、３日、７日、および、１４日後に脳を灌流固定し、凍結切片をＡＢＣ法を用いて、ＨＳＰ２７およびＨＳＰ７０の免疫染色を行った。両者とも偽手術群では染色されなかった。ＨＳＰ７０は１日、３日後に脳梗塞辺縁部皮質の神経細胞が染色されたが、７日、１４日後にはほとんど消失した。これに対して、ＨＳＰ２７はアストロサイトが染色され、その範囲は梗塞周辺部皮質に広範に、一部対側半球皮質まで、さらに海馬や脳幹部まで広く及び、１日後より１４日後まで持続して見られた。このように、ＨＳＰ７０は虚血辺縁部の、いわゆるペナンブラ領域の神経細胞に見られ、神経細胞の虚血ストレスを表していると考えられたが、ＨＳＰ２７は虚血周辺に広範に反応性アストロサイトに誘導され、長期に持続し、障害からの修復や組織の再構成などに関係していると推測された。

【目的】
細胞に加えられた種々の有害なストレスは、ストレス蛋白の合成を主体としたストレス応答を誘導する。そして、ストレス蛋白の誘導は障害に対する抵抗性の獲得に働くことが知られている。脳虚血においても、ストレス蛋白のひとつであるＨＳＰ７０の合成が虚血後に見られることが報告されてきた。しかし、低分子ストレス蛋白ＨＳＰ２７の合成誘導については前脳虚血モデルでの報告があるだけである(1)。そこで、今回われわれは、ヒトの脳梗塞により近い動物モデルであるラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、ＨＳＰ２７の合成誘導を検討し、合わせてＨＳＰ７０の誘導と比較した。

【方法】
雄性Wistar ratを用い、小泉ら(2)の方法で、ハロセン麻酔下に右内頸動脈経由で糸付き栓子を挿入することによって、中大脳動脈を１時間閉塞し再開通させた。栓子除去後、１日、３日、７日、および、１４日後に脳を4% paraformaldehydeで灌流固定し、sucroseに浸潤後20ミクロンの凍結切片を作成した（各群n=4-5）。ＡＢＣ法を用いて、常法通り免疫組織化学的にＨＳＰ７０およびＨＳＰ２７を染色した。抗ＨＳＰ７０抗体はAmersham社製（1:500）、抗ＨＳＰ２７抗体は文献(3)のもの（4μg/ml）を用いた。グリア細胞の同定のため、ＧＦＡＰ染色（アストロサイト）およびレクチン染色（ミクログリア）を併用した。

【結果】
ＨＳＰ７０：偽手術群では全く染色されなかった。１日後および３日後には虚血辺縁部の大脳皮質の神経細胞が染色されたが、梗塞に陥った虚血中心部は非特異的にのみ染色された。７日後および１４日後には辺縁部の神経細胞の染色は消失した。

ＨＳＰ２７：偽手術群では淡く染色された。１日後には虚血巣の神経細胞が染色されることもあったが、むしろアストロサイトが主に染色され、その範囲は虚血周辺部皮質に広範に、一部対側半球皮質まで見られ、さらに海馬にまで広く及んだ。３日後、７日後および１４日後も同様にアストロサイトが強く染色されたが、その範囲は、中脳（上丘、内側膝状体、黒質）から、一部の動物では対側海馬にまで及んだ。

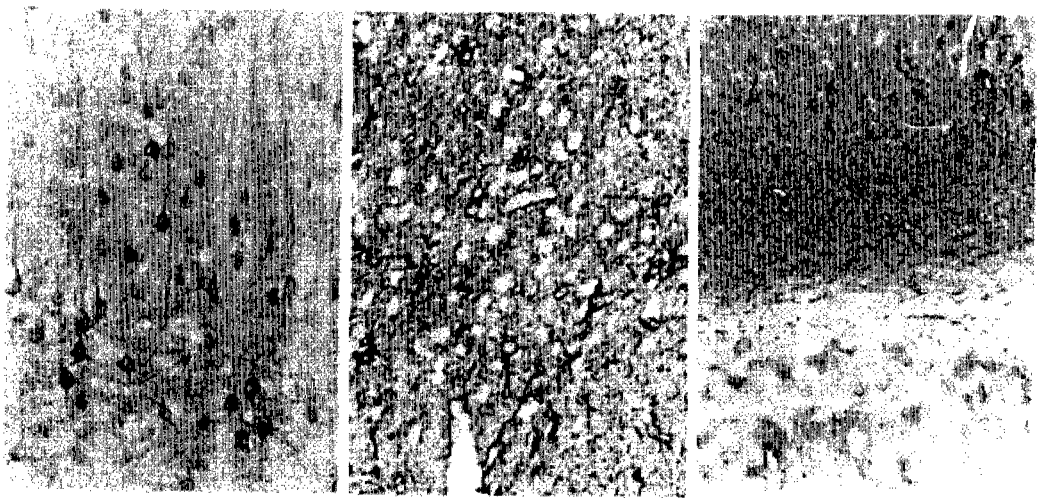
【考察】

本実験により、局所脳虚血後に低分子ストレス蛋白のＨＳＰ２７の合成が虚血巣の周辺のかなり広い範囲の反応性アストロサイトに長期間に渡って誘導されることが示された。これに比較してＨＳＰ７０の合成の誘導は虚血辺縁部の狭い範囲の神経細胞に１ないし３日後にのみ誘導されるにすぎなかった。このように、ＨＳＰ７０は虚血辺縁部の、いわゆるペナンブラ領域の神経細胞に見られ、神経細胞の虚血ストレスを表していると考えられたが、梗塞に陥った虚血中心部では蛋白合成の障害により誘導されなかった。ＨＳＰ２７は虚血周辺部に広範に反応性アストロサイトに誘導され、長期に持続したので、障害からの修復や組織の再構成などに関係していると推測された。したがって、脳虚血後における神経細胞障害とその修復、再生の機構において、ＨＳＰ２７はＨＳＰ７０と全く異なった役割を果たしていると考えられる。

【文献】

(1) Kato H. et al. (1994) Brain Res. 634: 235-244.
(2) 小泉仁一、他 (1986) 脳卒中 8: 1-8.
(3) Inaguma Y. et al. (1993) J. Biochem. 114: 378-384.

図１　左：虚血辺縁部皮質の神経細胞のＨＳＰ７０染色（１日後）。中：虚血周辺部皮質のアストロサイトのＨＳＰ２７染色（３日後）。右：梗塞巣（図上）周辺から海馬（図下）にかけてのアストロサイトのＨＳＰ２７染色（１４日後）。



255 一過性脳虚血後海馬CA1野に発生するグルタミン酸受容の変化

三谷 章、柳瀬 尚人、片岡 喜由
（愛媛大学医学部第一生理）

〔要約〕

一過性脳虚血により遅発性神経細胞死がプログラムされた海馬CA1錐体細胞においては、虚血後1時間から12時間の期間でグルタミン酸誘発性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強反応が観察され、その発生機構にNMDA受容体の関与が考えられた。

〔目的〕

一過性脳虚血後、数日の時間経過の後、海馬CA1野において領域選択的に発生する遅発性神経細胞死は、虚血中領域非選択性に濃度上昇する細胞外グルタミン酸とそれに呼応して領域選択性に濃度上昇する細胞内カルシウムイオンによって引き起こされると考えられている（1-4,6）。しかしながら、濃度上昇した細胞外グルタミン酸及び細胞内カルシウムイオンはともに血流再開後速やかに虚血前値にまで復し、海馬CA1錐体細胞死発生まで上昇することはないとされている。それゆえ、遅発性神経細胞死の発生機序として、海馬CA1錐体細胞を直接細胞死に導くなんらかの要因が虚血後から細胞死が発生する2-4日の期間において発現していることが想定されている。最近、グルタミン酸受容体のアンタゴニストであるNBQXの虚血後投与によりスナネズミの一過性脳虚血による遅発性神経細胞死が効果的に防御されることが報告され（5）、細胞死に導く要因として虚血後におけるグルタミン酸受容体の関与が示唆されている。本研究では、この細胞死に導く一要因としてのグルタミン酸受容体の虚血後機能変化を、一過性脳虚血後海馬CA1錐体細胞において観察されるグルタミン酸受容体を介するカルシウムイオン流入機構の変化をもとに検索した。

〔方法〕

ハロセン麻酔下において5分間の一過性脳虚血を負荷したスナネズミから虚血後1、3、6、9、12そして24時間の時点で海馬スライスを作製し、細胞内カルシウムイオン蛍光指示薬rhod-2をloadingした後、細胞内カルシウムイメージングシステムをもちいて、グルタミン酸及びNMDA刺激により誘発される細胞内カルシウムイオン濃度変化を計測した。

〔結果〕

5分間の一過性脳虚血を負荷された海馬CA1野においては、虚血を負荷されていない海馬CA1野と比較して、虚血後1時間から12時間の期間でグルタミン酸刺激により誘発される細胞内カルシウムイオン濃度上昇が有意に増大し、この増加傾向は虚血24時間後の時点においても観察された（図1A）。この脳虚血を負荷された海馬CA1野において観察される細胞内カルシウムイオン濃度上昇増加は、NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストD-APVに

より抑制された（図1B）。NMDAにより誘発される細胞内カルシウムイオン濃度上昇も海馬CA1野においては虚血1時間から12時間の期間において有意に増大しており、特に虚血3-9時間後において著明であった(図2)。5分間の一過性脳虚血では遅発性神経細胞死が発生しない海馬CA3野においては、虚血1時間後においてのみ有意な増加が観察された。

〔考察〕

遅発性神経細胞死がプログラムされた海馬CA1錐体細胞において虚血後1時間から12時間の期間で観察されるグルタミン酸誘発性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強反応は、D-APVで抑制され、またNMDA誘発性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇についても同様の増強反応が観察されたことから、その発生機構にNMDA受容体の関与が考えられる。虚血後、伝達物質として正常レベルで放出されるグルタミン酸によりカルシウムイオンの過度の細胞内流入が起こり、カルシウムポンプ活性化等による細胞内エネルギーの消費が高まる可能性が考えられ、このことが虚血性遅発神経細胞死の一因となっているかもしれない。

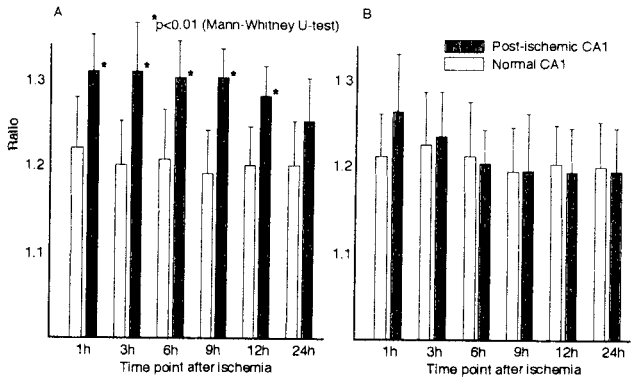


図1　スナネズミ虚血後海馬CA1野におけるグルタミン酸誘発性細胞内カルシウムイオン濃度上昇．A:グルタミン酸10mMに対する蛍光強度の変化（刺激前値に対する比で表している- 縦軸）横軸は5分間の一過性脳虚血後の経過時間．B:D-APV 100μM 添加による抑制効果．各グループ（n =6-8).

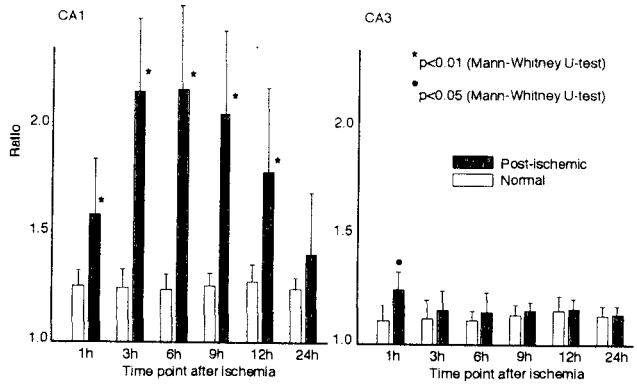


図2　スナネズミ虚血後海馬スライスにおけるNMDA誘発性細胞内カルシウムイオン濃度上昇．NMDA25μMに対するCA1野及びCA3野での蛍光強度の変化（刺激前値に対する比で表している- 縦軸）横軸は5分間の一過性脳虚血後の経過時間．各グループ（n =8-10).

〔文献〕 (1) Choi, D.W. (1988) *Neuron* **1,** 623-634 (2) Mitani, A., Kadoya, F., and Kataoka, K. (1990) *Neurosci. Lett.* **120,** 42-45 (3) Mitani, A., Takeyasu, S., Yanase, H., Nakamura, Y., and Kataoka, K. (1994) *J. Neurochem.* **62,** 626-634 (4) Rothman, S.M., and Olney, J. W. (1986) *Ann. Neurol.* **19,** 105-111 (5) Sheardown, M. J., Nielsen, E. Ø., Hansen, A. J., Jacobsen, P., and Honoré, T. (1990) *Science* **247,** 571-574 (6) Siesjö, B.K., and Bengtsson, F. (1989) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **9,** 127-140

256 ラット大脳皮質可溶性分画中に認められる一酸化窒素合成酵素活性に対する各種阻害剤の作用比較

杉山昌一、長藤寿昭、内藤成孝
（中外製薬（株）創薬第四研究所）

〔要約〕
ラット大脳皮質可溶性分画中にL-[^{3}H]-arginineからL-[^{3}H]-citrullineへの変換活性が認められ、一酸化窒素合成酵素（NOS）の特異的阻害剤であるN^G-nitro-L-arginine（L-NNA）がこれを濃度依存的に阻害した。ラット大脳皮質シナプトゾーム分画中にも同様の活性が認められ、L-NNAは両者に対して同程度の阻害感受性（IC_{50}値）を示したことから、ラット大脳皮質可溶性分画中に認められるNOS活性は主としてN-cNOS（神経細胞に恒久的に存在し、Ca^{2+}/calmodulinに依存性のNOS）であると推察された。ラット大脳皮質可溶性分画中に認められるNOS活性に対する種々NOS阻害剤の阻害作用を比較検討したところ、L-NNA、N^G-cyclopropyl-L-arginine（L-CPA）、N^G-nitro-L-arginine methyl ester（L-NAME）、N^G-amino-L-arginine（L-AA）、N^G-iminoethyl-L-ornithine（L-NIO）、N^G-monomethyl-L-arginine（L-NMMA）、N^G-allyl-L-arginine（L-ALA）、7-nitro indazole（7-NI）、amino guanidine（AG）の順にN-cNOS活性を阻害することが判明した。

一酸化窒素（NO）は、脳においてNMDAレセプターを介したシナプスの伝達効率の長期変化[1]や脳血流の調節[2]など、細胞間のシグナル伝達に重要な機能を果たす物質である。一方、NOは毒性を持つ物質としても知られ、培養神経細胞において、NOがNMDAレセプターを介したcytotoxicityに関与するという報告[3]、中大脳動脈閉塞による局所脳虚血によって生じる脳浮腫、脳梗塞、及び遅発性神経細胞死をNOS阻害剤が改善するという報告[4,5]がなされ、NO及びNOSが虚血性脳血管傷害の発生に関与することが強く示唆されてきている。現在までに、小脳のNOSを生化学的に検討した報告は多いが、大脳皮質のNOSを生化学的に検討した報告は少ない。更に、ラット中大脳動脈閉塞によって生じる梗塞領域は主として大脳皮質であるという事実を考慮すると、大脳皮質のNOSを生化学的に検討することは、虚血性脳血管傷害の発生機序解明に重要であると考えられる。そこで、今回大脳皮質可溶性分画中のNOS活性の性質を生化学的に検討した。

[実験方法] 1）大脳皮質可溶性分画の調製：SD系雄性ラットを断頭し大脳皮質を分取した。大脳皮質湿重量の10倍量の50mM Tris/HCl（pH 7.4）、1mM DTT溶液中でホモゲナイズし、ホモゲネートを1000 x gで10分間遠心し上清を得た。これを更に、100,000 x gで1時間遠心し、その上清を大脳皮質可溶性画分画として使用した。2）シナプトゾーム分画の調製：我々の既報[6]の方法に従って大脳皮質から調製した。3）NOS活性の測定：我々の既報[7]の方法に従って行った。反応液は、100nM L-[^{3}H]-arginine、1mM NADPH、1mM EDTA、1.25mM $CaCl_2$、10μ g/ml calmodulin、100μ M BH_4、10μ M FAD、10μ M FMN、と50mM Tris/HCl（pH 7.4）から構成され、37度で10分間インキュベーションした。NOS活性は、L-[^{3}H]-arginineからL-[^{3}H]-citrullineへの変換量であらわし、阻害剤の阻害感受性は酵素活性を50% 阻害する濃度（IC_{50}値）で示した。4）その他：L-CPAとL-ALAは、中外製薬（株）で合成した。実験成績は平均値 ± 標準誤差の平均値で表示した。

[実験成績] NOSの特異的阻害剤であるL-NNAは、ラット大脳皮質可溶性分画中のL-[^{3}H]-arginineからL-[^{3}H]-citrullineへの変換活性を濃度依存的に阻害し、そのIC_{50}値は、16.9 ± 3.6 nMであった。反応液中のCa^{2+}とcalmodulinを取り除いたところ、この分画中のNOS活性は消失した。同様に、ラット大脳皮質シナプトゾーム分画中にも同様の活性を認め、この活性に対するL-NNAの阻害感受性（IC_{50}値）は11.2 nMであった。次に、大脳皮質可溶性分画中のNOSに対する種々阻害剤の阻害感受性を検討した（Table 1）。被試験化合物と得られたIC_{50}値は以下の通りである。即ち、L-NNA（16.9 nM）、L-CPA（27.3 nM）、L-NAME（79.4 nM）、L-AA（152.5 nM）、L-NIO（277.0 nM）、L-NMMA（337.8 nM）、L-ALA（992.0 nM）、7-NI（4.82 μM）、AG（20.26 μM）であった。

[考察] NOSは、大きく3タイプのアイソザイムが知られている。神経細胞に恒久的に存在し、その活性がCa^{2+}/calmodulinに依存するタイプをN-cNOS、血管内皮の主に膜分画に恒久的に存在し、その活性がCa^{2+}/calmodulinに依存するタイプをE-cNOS、そしてlipopolysaccharideやサイトカインによりマクロファージ

などで誘導され、その活性がCa^{2+}/calmodulinに依存しないタイプをiNOSと呼んでいる[8]。今回得られた成績の中で、大脳皮質の可溶性分画中にはCa^{2+}/calmodulin非依存性のNOS活性が存在しないことと、大脳皮質シナプトゾーム分画中のNOS活性に対するL-NNAのIC_{50}値と大脳皮質可溶性分画中のそれとがほぼ一致することから、大脳皮質可溶性分画中のNOS活性は主としてN-cNOSであることが示唆された。

現在、NOS阻害剤として、L-NNA、L-NMMA、L-NAME、L-NIOがよく使われている[8]。1990年以降、新しいNOS阻害剤としてL-AA、L-CPA、L-ALA、7-NI、AGが報告されてきているが、現在のところ、N-cNOSに対するこれら全ての阻害剤の阻害感受性を同一の方法で比較検討した報告はなされていない。今回の阻害感受性検討の結果より、L-NNAが最もN-cNOSを強く阻害すること、新しく報告されてきた阻害剤の中ではL-CPAがL-NNAについでN-cNOSを阻害すること、よく用いられる阻害剤であるL-NMMAのN-cNOSに対する阻害作用は比較的弱いものであることが判明した。今後の課題としては、これらNOS阻害剤のN-cNOS活性阻害感受性の強さと虚血性脳血管傷害軽減の程度の関係を調べることが必要であろう。

Table 1. 各種阻害剤の**N-cNOS**に対するIC_{50}値

Test compund	IC_{50} values
L-NNA	16.9 ± 3.6 nM (4)
L-CPA	27.3 ± 6.6 nM (3)
L-NAME	79.4 ± 11.6 nM (3)
L-AA	152.5 ± 55.7 nM (3)
L-NIO	277.0 ± 58.7 nM (3)
L-NMMA	337.8 ± 24.7 nM (3)
L-ALA	992.0 ± 162.4 nM (3)
7-NI	4.82 ± 0.99 μM (3)
AG	20.26 ± 4.17 μM (3)

[引用文献]

1. Schuman, E.M., Science, 254 (1991) 1503 - 1506.
2. Iadecola, C. et al., J.Cereb. Blood Flow Metab., 14 (1994) 175 - 192.
3. Dawson, V.L. et al., J. Neurosci., 13 (1993) 2651 - 2661.
4. Nagafuji, T. et al., Neurosci. Lett., 147 (1992) 159 - 162.
5. Nagafuji, T., Eur. J. Pharmacol. - Environ. Toxicol. Pharmacol, 248 (1993) 325 - 328.
6. Nagafuji, T. et al., J. Neurochem., 58 (1992) 362 - 368.
7. Nagafuji, T. et al., Acta Neurochir, Suppl. 60 (1994) 285 - 288.
8. Knowles, R.G. and Moncada, S., Biochem. J., 298 (1994) 249 - 258.

257 MARCKSのホスファチジルセリン結合部位 ー大腸菌発現系での解析ー

中岡隆志、小島直也*、辻　崇一*
東大医学部第4内科、*理研・国際フロンテイア・糖遺伝情報

〔要約〕

ラット脳より精製したMARCKSが、ホスファチジルセリンに特異的に結合しうることを昨年度報告した。大腸菌で発現したMARCKSはラット脳から精製したMARCKSと同様にホスファチジルセリンに特異的に結合することから、大腸菌発現系を用いてMARCKSのホスファチジルセリン結合部位について解析した。グルタチオンSートランスフェラーゼ（GST）との融合タンパクとして発現させたミュータントを用いてホスファチジルセリン結合能を検討したその結果、ラットMARCKSの98T－152Sの部位にホスファチジルセリン結合部位が存在する事が明かとなった。

MARCKSは、Cキナーゼの主要なリン酸化基質であり、細胞内情報伝達系に関与していると考えられる[1]。細胞内でのMARCKSの生理的役割についてはほとんど分かっていないが、細胞膜および細胞骨格系との相互作用が重要な意味を持つと考えられている。MARCKSは細胞膜に存在するタンパク性の因子の介在なしに直接リン脂質を認識して細胞膜に会合する可能性が示唆されている[2,3]。MARCKSと細胞膜との結合はCキナーゼによるリン酸化で調節を受けている[4]。MARCKSとホスファチジルセリンとの会合はCキナーゼによるリン酸化で明らかに阻害される。このことはMARCKSとホスファチジルセリンとの会合そのものが生理的に大きな意味を持つことを示唆している。我々は、既に大腸菌で発現させたリコンビナントのMARCKSがホスファチジルセリンに結合し得ることを報告しているが、今回、大腸菌発現系を用いてMARCKSのホスファチジルセリン結合能について解析した。

実験方法）

リポソーム　ブロッテイング　既に報告した方法に基き[3]、ユニラメラーの^{3}H-コレステロール標識リン脂質／コレステロール　リポソームを調製した。精製したタンパクをSDS-PAGE電気泳動後、ナイロン膜に転写した。ナイロン膜をブロッキング後、^{3}H-コレステロール標識リン脂質／コレステロール　リポソームと室温で16時間インキュベートした。洗浄後、乾かしたナイロン膜をフルオログラフィーで検討した。

ELISA　リン脂質を50%エタノール中で96穴プレートに吸着させ、ブロッキング後、精製したタンパクと16時間インキュベートした。非吸着タンパクを洗浄した後、リン脂質と結合したタンパクを抗ラットMARCKS抗血清を用いて定量した。

MARCKSミュータントの発現　ミュータントは全てMutagene kit（バイオラッド）を用い、全長の翻訳領域をpBluescriptSK+にクローニングしたプラスミドより調製し、DNAシーケンスを確認した。大腸菌発現ベクター、pGEX-2T（ファルマシア）に組み込んだクローンを大腸菌ストレインBL21(DE3)pLysSにトランスフォームし、GSTとの融合タンパクを発現させた。融合タンパクはグルタチオンーセファロース　4B(ファルマシア)を用いて精製した。

結果)

1. ＧＳＴ融合タンパクとして発現させたミュータントMARCKSはラット脳から精製したMARCKSと同様にホスファチジルセリンに結合した。ＧＳＴ融合タンパク、GST 6-309 及びGST 6-180はその結合特異性においてもラットMARCKSと同様、ホスファチジルセリン特異的であった(Table 1)。
2. GST 6-152はGST 6-180と同様ホスファチジルセリンに結合したが、GST 6-135のホスファチジルセリンへの結合は認められなかった。
3. GST 98-180はGST 6-180と同様ホスファチジルセリンに結合したが、GST127-180のホスファチジルセリンへの結合は認められなかった(Figure 1)。
4. 以上より、ラットMARCKSの９８Ｔ－１５２Ｓの部分が、ホスファチジルセリンへの結合に重要であると考えられた。

考察)

GST融合タンパクとして発現したミュータントがホスファチジルセリン結合能を持つことから、MARCKSがホスファチジルセリンに会合するのはミリスチル化、糖付加に関係ないことが明らかとなった。９８Ｔ－１５２Ｓの断片は、塩基性アミノ酸のクラスター（145K-150R)があり、この部分はホスファチジルセリンへの結合に重要であるが、これ以外にもN端側のヘリックス構造が結合に非常に重要であることが示唆された。また、この断片は、親水性アミノ酸を多く含んでいることから、ホスファチジルセリンとの結合は、疎水的なものだけではないと考えられる。

MARCKSはカルシウム非依存的にホスファチジルセリンに結合するが、Ｃキナーゼはカルシウム依存的にホスファチジルセリンと結合することが知られており、Ｃ２ドメインがその結合部位であることはよく知られている。９８Ｔ－１５２の断片をＣ２ドメインと比較したが、ホモロジーは認められなかった。このことはMARCKSとＣキナーゼとが異なった様式でホスファチジルセリンと相互作用するものと考えられる。

文献)

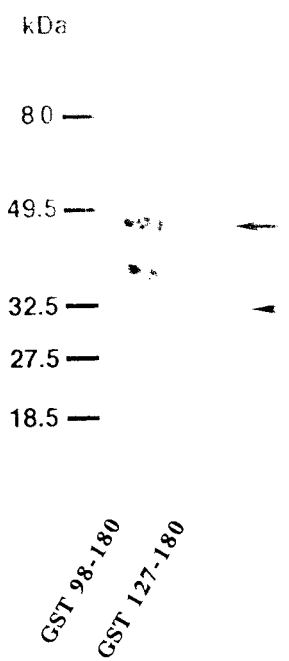
1. Blackshear, P. J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 1501-1504
2. Taniguchi, H., and Manenti, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 9960-9963
3. Nakaoka, T., Kojima, N., Hamamoto, T., Kurosawa, N., Lee, Y. C., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Tsuji, S. (1993) *J. Biochem.* 114, 449-452
4. Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A. C., and Aderem, A. (1991) *Nature* 351, 320-322

Table 1.　MARCKS のリン脂質への結合

ELISAに従い、各タンパクのリン脂質への結合を定量し、
ホスファチジルセリン（ＰＳ）への結合を１００％として表した。
PI：ホスファチジルイノシトール。　PC：ホスファチジルコリン。

	PS	PI	PC
ラットMARCKS	100%	4%	0%
GST6-309	100%	7%	0%
GST6-180	100%	6%	0%

Fig. 1.
リボソームブロッティング



258 エタノール慢性投与はイノシトール三リン酸受容体数をラット小脳で減少させる

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〕

イノシトール三リン酸(IP_3)受容体へのエタノールの作用をラット小脳、海馬にて検討した。*In vitro* では、エタノールは1Mまで添加しても、IP_3受容体結合能には直接作用しなかった。一方、エタノール慢性投与ラット小脳において、IP_3受容体数の減少を認めた。しかし、海馬ではIP_3受容体結合能にエタノール慢性投与は影響を与えなかったことから、エタノールに対するIP_3受容体の感受性に部位差があることが示唆された。アルコール慢性投与ラット小脳におけるIP_3量やIP_3受容体mRNA量は対照群と差がない。以上のことから、エタノール慢性投与によるIP_3受容体数の減少はアゴニストであるIP_3量の変化やmRNAの合成阻害によるものではないことが推定された。

[目的]

アルコール耐性、依存の分子機構を解明するために、エタノールの中枢神経系への作用に関する研究は盛んに行なわれている。しかし、今だ未解決な部分が多い。最近、細胞内情報伝達系の一つであるであるリン脂質代謝系へのエタノールの作用の有無が注目されてきている(3)。そこで、本研究ではリン脂質情報伝達系のなかでIP_3量、IP_3受容体および、IP_3受容体mRNAへのエタノールの慢性作用をラット脳で検討した。

[方法]

エタノール慢性投与実験

Wistar系雄性ラット(体重約200 g)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。

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(7)。反応液は50 mM Tris-HCl、(pH 8.3)、1 mM EDTA、IP_3 (10 nM-1 μM)、[^{3}H]IP_3 (1 nM)および小脳、海馬膜標品(0.2-0.4 mg)から成り、4℃、10分間反応させた。反応後に膜標品と結合した[^{3}H]IP_3の放射活性を測定した。

IP_3量測定

IP_3量測定は、既報を一部改変して行なった(5)。小脳、海馬膜標品はhomogenize buffer (0.4 M $HClO_4$, 1 mM EDTA)でホモジナイズし、タンパクを除去した後、KOH(1M; containing 75 mM HEPES)でpH 7.5に滴定し、60 min 氷中に放置。その後、遠心(2000 g, 15 min, 4 ℃)し、上清のIP_3量をIP_3測定キットを用い行なった。

IP_3受容体mRNA量の測定

ラット小脳からのトータルRNAの調製は既報に従った(2)。IP_3受容体のcDNAの5'末端の3箇所に相補的なプローブを使用し、検出はジゴキシゲニンラベル化学発光システムによった。

［成績］

1)エタノールのIP_3受容体への作用

エタノールの急性添加 (*in vitro*)はIP_3受容体結合能に1 Mまで変化を与えなかった（結果は示さず）。一方、エタノール慢性投与ラット小脳では、対照群に比べIP_3受容体のIP_3に対する親和性（Kd）は変化なく、受容体量(Bmax)の減少が示された(Table; $p < 0.05$; $n = 8$)。海馬では、Kd, Bmax ともに変化は認められなった(Table; $p < 0.05$; $n = 8$)。

2）エタノールのIP_3量への作用

エタノール慢性投与ラットでは、対照群に比べIP_3量は、小脳、海馬においてともに有意差は認められなかった(Figure; hippocampus; controls, 72.7±4.9; alcohols, 66.9±4.3 pmol/mg protein, cerebellum; controls, 86.0±4.9; alcohols, 84.8±2.8 pmol/mg protein, $p > 0.05$; $n = 8$)。

3）エタノールのIP_3受容体mRNAへの作用

IP_3受容体のmRNA量をノーザンブロットにより検討した。IP_3受容体mRNA量は、エタノール慢性投与ラットおよび対照群において差は認められなかった（結果は示さず）。

［考察］

エタノール慢性投与によりIP_3受容体数が小脳で減少するという今回の結果は、エタノール慢性投与マウス小脳において、IP_3受容体数が減少するという報告(6)に一致した。しかし、海馬ではIP_3受容体数に変化は認められなかったことから、この減少は少なくともラットでは部位特異的であることがわかった。また、エタノール慢性投与により、小脳のIP_3量は変化しなかった。このことから、エタノール慢性投与によるIP_3受容体数の減少は、IP_3量の変化によるものではなかった。

さらに我々は、エタノール慢性投与が、IP_3受容体mRNA量には影響を与えないことを認めた。この結果より、エタノール慢性投与は、IP_3受容体のDNAからmRNAの転写には作用せず、mRNAの翻訳の低下、またはIP_3受容体タンパク質の分解の増加に影響を与えていることが示唆された。

IP_3受容体は小脳のPurkinje細胞に豊富に存在する(2)ことより、IP_3受容体機能が低下すればPurkinje細胞、小脳機能が低下することが考えられる。興味深いことに、小脳皮質のPurkinje 細胞は、歯状核、視床を介して運動野、前運動野に投射し、行動の開始、制御に重要な役割を果している(4)。このことより、慢性のアルコール摂取によりPurkinje細胞機能が低下し、小脳機能が障害されることが、アルコール依存症患者の異常飲酒行動と関連しているかもしれない。

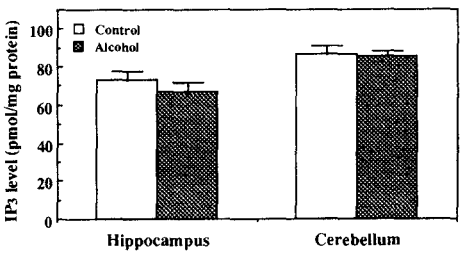
［文献］

1) Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) *Anal. Biochem.* 162. 156-159. 2) Danoff S. K. and Ross C. A. (1994), *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 18. 1-16. 3) Hock J.B.et al (1992), *FASEB. J.* 6.2386-2396. 4) Modell J. G. et al. (1990), *J. Neuropsychiatry* 2. 123-144. 5) Shimizu M. et al (1993), *J. Neurochem.* 60. 595-601. 6) Smith T. L. (1987), *Life Sci.* 41. 2863-2868. 7) Worley P. F. et al (1987), *J. Biol. Chem.* 262.12132-12136.

TABLE The values of Kd and Bmax of IP_3 binding in rat brain

	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg/protein)
Hippocampus		
Controls	6.88±0.69	0.43±0.02
Alcohols	7.23±0.51	0.44±0.03
Cerebellum		
Controls	18.46±1.03	12.00±0.31
Alcohols	18.15±0.62	10.42±0.42*

FIGURE Effect of chronic ethanol treatment on IP_3 level in rat brain



259 エタノールによるホスホリパーゼC活性の抑制

西田 朗[1)]、斎藤 浩[1)2)]、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〕
ホスホリパーゼC(PLC)へのエタノールの作用をラット大脳皮質の膜および細胞質画分で検討した。高濃度(100mM以上)のエタノールは、PLCを抑制したが、この抑制は膜画分のみでなく、細胞質画分でも観察された。また、エタノールの代謝産物であるホスファチジルエタノール(PEt)は濃度依存的(10μM以上)にPLCを抑制した。エタノールやPEtによる抑制はPLCのサブタイプ(β_1,γ_1,δ_1)に対する抗体を前処置しても阻害されなかった。これらのことから、エタノールおよびPEtは、PLCに直接しかもサブタイプ非選択的に抑制することが解かった。

［目的］
ホスホリパーゼC(PLC)は細胞膜のリン脂質であるホスファチジルイノシトールニリン酸(PIP_2)を加水分解してイノシトール三リン酸とジアシルグリセロールという二つのセカンドメッセンジャーを産生する。我々は、エタノールがラット脳のPLC活性を抑制することを既に報告している(4)が、その抑制機序やPLCサブタイプに特異的をもつかどうかなど不明であった。そこで、本研究ではラット大脳皮質細胞質画分やPLCの主な3種のサブタイプ(β_1,γ_1,δ_1)に特異的な抗体を使用して、エタノールのPLC活性への作用を検討した。一方、エタノールによる抑制は比較的高濃度(100mM以上)で認められることから、通常の飲酒量でエタノールが直接PLC活性を抑制することは考えにくい。そこで、エタノールの代謝産物で非生理的リン脂質であるホスファチジルエタノール(PEt)のPLC活性への作用を検討した。

［方法］
膜と細胞質標品の作成
既報どうりに行なった(4)。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、その上清を細胞質画分、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。抗体の前処置は4℃で2時間行った。
PLC活性測定
既報どうりに行なった(4)。反応液は0.1% sodium deoxycholate、80 mM KCl、2 mM EGTA、1.6 mM $CaCl_2$、20 mM Tris-maleate、pH6.5、0.04 mM phosphatidylethanolamine、0.2 mM [^{3}H]phosphatidylinositol4,5-二リン酸と膜または細胞質画分(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。

［成績］
エタノールのPLC活性への作用
ラット脳ではPLCは膜のみではなく細胞質にも存在し、この細胞質のPLC活性も膜同様にエタノールにより抑制された(図1)。PLCの主要な3種のサブタイプβ_1,γ_1,δ_1)に対する抗体を前処置後エタノールのPLCに対する作用を検討した。その結果、いずれの抗体を前処置してもエタノールはPLC活性を抑制したことから、サブタイプ非選択的な抑制作用であることが推定された。
ホスファチジルエタノールのPLC活性への作用
PEtはラット前大脳皮質細胞質画分のPLC活性を10 μM以上から濃度依存性に抑制した(図2)。

PLCのサブタイプ$\beta_1,\gamma_1,\delta_1$)に対する抗体を前処置しても、PEtはPLC活性を抑制した。このことから、エタノールと同様に、PEtによる活性抑制もサブタイプ非選択的であると推定された。

［考察］

エタノールおよびPEtは膜画分のみでなく細胞質画分のPLC活性も抑制した。このことからPLCの抑制は膜の撹乱による間接的な抑制ではなく、直接作用であることが示唆された。PLCは主に3種のアイソザイム(β, γ, δ)に分類されている(1)が、この アイソザイム$\beta_1,\gamma_1,\delta_1$)に特異的な抗体を前処置してもエタノールやPEtのPLC活性の抑制を阻害しないことから、エタノールとPEtは共にPLCのアイソザイム間で相同性の高い領域(おそらく触媒部位)に作用するのではないかと考えられた。

エタノールに比較して、PEtは低濃度(10μM程度)でPLC活性を抑制したことは大変興味深い。Lundquvistら(3)はNG108-15細胞でPEtがIP_3量を増大させると報告しており今回の結果とは一致しなかった。この相違は、ラット脳と培養細胞の差、cell free systemとwhole cellの差などによると考えられたが、今後の検討課題の一つである。PEtはエタノール存在下で産生される非生理的リン脂質であるが、脳神経系を含む種々の組織で産生することが報告されている(1)。このPEtは長期間生体内に蓄積されることから、長期アルコール飲酒の中毒作用がPEtによる可能性が指摘されている(2, 3)。アルコール依存症の患者では慢性的にPEtが産生され、このPEtが何らかの病態メカニズムに関与している可能性があり、そのひとつとしてPLCへの作用が関与する可能性がある。

［文献］

1)Cockcroft, S. and Thomas, G.M. (1992) Biochem. J. 228, 1-14 2)Mueller, G.C. et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 9778-9782 3)Lundqvist, C. et al (1993) J. Neurochem. 60, 738-744 4)斎藤ら (1992), 神経化学 32, 462-463.

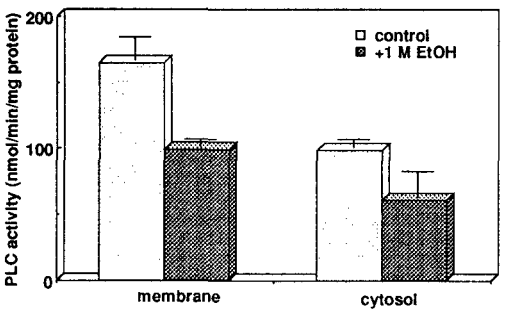


Fig.1 Effect of EtOH on PLC activity in membrane and cytosol of rat frontal cortex

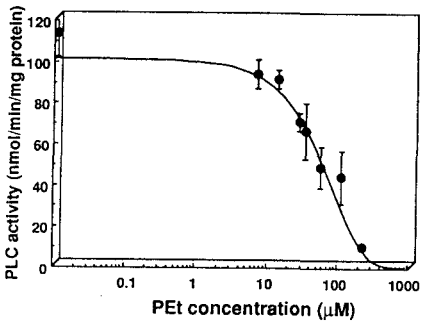


Fig.2 Effect of PEt on PLC activity in cytosol of rat frontal cortex

260 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：ラット線条体での老化に伴った変化

八田愼一、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)活性促進性調節の、老化に伴う変化について、24月齢(老化群)のラット線条体膜標品を用いて検討した。2月齢(対照群）ラット大脳から調製したGppNHp結合型Tu(Tu−GppNHp)によって線条体膜ACは活性化され、さらにD1ドパミン感受性AC活性の促進がみられた。一方、老化群から調製したTu−GppNHpによるAC活性ならびにD1ドパミン感受性AC活性の促進は減弱していた。G蛋白質サブユニットのImmunoblotting、および光親和型非水解性GTP類似体のAAGTPを用いた Photoaffinity Labeling の結果から、線条体Gs、Giの蛋白質量・機能において老化に伴った変化は認められなかった。これらの結果は、Tu−Gs連関を介したAC促進性調節は老化に伴って減弱し、この減弱はTuからGsへのグアニンヌクレオチドの転移反応の低下によるものであることを示唆している。

【目的】 これまでに我々は、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およびGsと連関し、G蛋白質への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)活性の抑制性ならびに促進性調節に関与していることを報告した(2,3)。このことは、神経組織での、老化に伴う細胞骨格系の変化が神経系ACの応答性変化に関与している可能性を示唆しており、ラット大脳皮質では老化に伴って、Tu−Gi連関の低下と、TuによるAC抑制性調節の減弱が認められた(5)。一方、Tu−Gs連関によるAC活性の調節が老化によってどのように影響されるのかまだわかっていない。この点について検討するため、本研究は、2月齢(対照群)と24月齢(老化群)のラットから調製したTuと線条体膜標品を用い、Tu−Gs連関とその際のAC促進性調節の変化について検討を行った。

【方法】 Wistar系雄性ラットを用い、線条体粗膜分画の調製、AC活性の測定、光親和型非水解性GTP類似体である [^{32}P]P^3−(4−azidoanilido)−P^1−5′−GTP([^{32}P]AAGTP)による Photoaffinity Labeling、およびG蛋白質サブユニットとTuの Immunoblottingは Hatta *et al.* (4,5)の方法で行った。Tuの調製はRasenick and Wang (6) の方法によって行い、TuをGppNHpあるいは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。

【結果】 ラット脳より調製したTu−[^{32}P]AAGTPを線条体膜標品とインキュベートすると、Tuに結合していた[^{32}P]AAGTPはTuから線条体膜標品中のGsαおよびGiαへと結合し、TuからGsα、GiαへのGNの転移が示された(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すると、対照群ではTu−GppNHpによってBasalの約134%までACは活性化された(Fig. 2)。一方、老化群でのTu−GppNHpによるACの活性化は対照群と比較して有意($P<0.01$)に低下していた。Tu−GppNHpのD1ドパミン感受性AC活性に対する効果について検討したところ、対照群ではTu−GppNHp (10^{-5} M)によってSKF 38393刺激性AC活性の効果的な促進が認められた(Fig. 3)。しかしながら、老化群でのTu−GppNHpによるSKF 38393刺激性AC活性の促進は、対照群と比較して低下していた($P<0.01$)。線条体膜標品中のG蛋白質サブユニット（αsH、αsL、αi、αo、αq、β)量ならびにTu量をImmuniblottingによって解析した結果、対照群と老化群での量的な差は認められなかった(結果未提示)。さらに[^{32}P]AAGTPを用いたPhotoaffinity Labelingによって解析したGsおよびGiでのGN結合活性においても、対照群と老化群での差はなかった(Fig. 4)。

【考察】 先に我々は、ラット大脳皮質でのTu−Gi連関を介したAC活性抑制性調節が老化に伴

って減弱していることを報告した(5)。さらに、ラット線条体を用いた今回の結果 (Figs. 2, 3)から、TuによるAC促進性調節の老化に伴った減弱が示唆された。老化に伴った、G蛋白質とTuの量的変化や、GsおよびGiの機能的変化は認められなかったことから、TuによるAC促進性調節の減弱は、TuとGsとの連関を介したGNの転移反応(Fig. 1)の低下によるものと考えられた。細胞骨格系機能の変化が示されているアルツハイマー型老年痴呆で、AC促進性調節の低下が示されている(1,7)。Tu-G蛋白質連関の変化がこのような疾病でみられるAC情報伝達系の変化と関連している可能性が考えられ、今後さらに検討を加えたい。

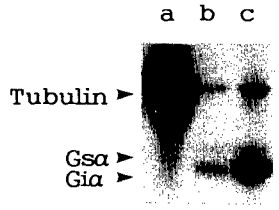


Fig. 1 Transfer of nucleotide from tubulin (Tu) to G proteins. Rat striatal membranes were incubated with 2 μg (lane b) or 10 μg (lane c) of Tu-[^{32}P]AAGTP for 5 min at 30°C and those membranes were washed and resuspenden for photoaffinity labeling. After UV irradiation, quenching and washing, 30 μg 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.

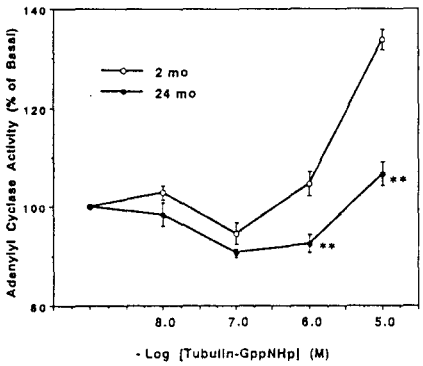


Fig. 2 Tu-GppNHp-dependent activation of adenylyl cyclase activity in rat striatal membranes from 2-month-old (2 mo) and 24-month-old (24 mo) rats. The value are mean ± SEM of eight experiments.

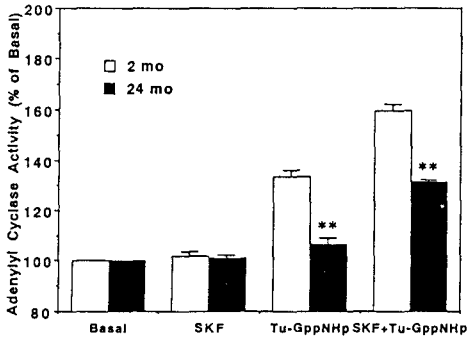


Fig. 3 Effects of Tu-GppNHp on the R(+)SKF 38393(SKF)-stimulated adenylyl cyclase activity in striatal membranes. The concentrations of agents used; R(+)SKF 38393, 10^{-5} M; Tu-GppNHp, 10^{-5} M. The values are mean ± SEM of six experiments.

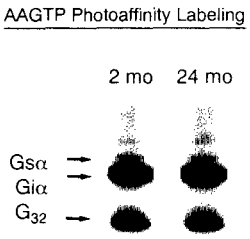


Fig. 4 Photoaffinity labeling of [^{32}P]AAGTP in rat striatal membranes. The autoradiographs are representative of five similar experiments.

【文献】

(1) Cowburn R.F., O'Neill 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、芦澤 健、齋藤利和、大鹿英世 (1992) 神経化学 31, 506-507
(3) 八田愼一、雨宮紀人、芦澤 健、齋藤利和、大鹿英世 (1993) 神経化学 32, 478-479
(4) Hatta S., Marcus M.M., and Rasenick M.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5439-5443
(5) Hatta S., Ozawa H., Saito T., and Ohshika H. (1994) J. Neurochem. (in press)
(6) Rasenick M.M. and Wang Y. (1988) J. Neurochem. 51, 300-311
(7) Schnecko A., Witte K., Bohl J., Ohm T., and Lemmer B. (1994) Brain Res. 644, 291-296

261　ヒト・ヒポカルシン遺伝子 のクローニング

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 ライブラリーよりヒト・ヒポカルシン cDNA を単離し、全塩基配列を決定した。ヒト・ヒポカルシン cDNA は 582 bp の蛋白質翻訳領域を持ち、193 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていた。ヒト・ヒポカルシン cDNA の蛋白質翻訳領域の塩基配列はラットと 92％の相同性を示し，予想アミノ酸配列はラットと完全に一致した。ヒト多臓器ノーザンブロットパネルを用いた解析から，ヒト・ヒポカルシン mRNA は約 2 kb で，脳に特異的に認められた。また、ヒト-ハムスター体細胞雑種ゲノムDNA を用いた解析から、ヒト・ヒポカルシン遺伝子は、第 1 染色体上に存在することが明らかとなった。

［　緒言　］

ヒポカルシンは、大脳の海馬錐体細胞に特徴的に存在する 3 個の EF-hand 構造を持つ分子量約 23 k Da のカルシウム結合蛋白質である[1]。ヒポカルシンは生理的カルシウム濃度で1分子あたり3分子のカルシウムを結合し、カルシウム濃度に依存して海馬細胞膜と可逆的に結合する性質を持っている。また，細胞膜との相互作用には、ヒポカルシンのアミノ末端がミリスチン酸化を受けていることが必要である[2]。最近、ヒポカルシンと相同性の高い蛋白質が、網膜[3) 4) 5)] および脳[6) 7) 8)] より同定されており、これらの蛋白質は神経系において新しい蛋白質ファミリーを形成しているものと考えられる。網膜視細胞に存在する分子種は、明暗順応に際してロドプシンのリン酸化をカルシウム依存性に制御することで光情報の伝達効率を調節している[5) 9)]。脳では少なくとも 6 種類の分子種が存在しており、分子種ごとに分布している神経細胞が異なっている[8) 10) 11)]。いずれも生理機能については明らかにされていないが、各々が存在している神経細胞内で、神経細胞に特異的な共通の機構により情報伝達の調節に関与していると思われる。我々は，このカルシウム結合蛋白質ファミリーに属する分子種と精神神経疾患との関連を追求する目的で、ヒト cDNA クローンの解析を行っている。今回は、ヒト・ヒポカルシン cDNA をクローニングし、染色体上の局在について検討した。

［　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・ヒポカルシン cDNA をプローブとして low stringency condition でスクリーニングした。2）ノーザンブロット：ヒト多臓器ノーザンブロットパネル（ BIOS. USA ）を用い，ヒト・ヒポカルシン cDNA をプローブとして行った。3 ）染色体番号の同定：ヒト-ハムスター体細胞雑種ゲノムDNA（ BIOS. USA ） に対し，プライマーとして以下の配列を用い，ポリメラーゼ連鎖反応 （PCR） を行った (sense : CAAGCTGTGGTCCGAGATGT ; antisens : CCACATAGAAGATTCCTGTG)。 ヒト・ヒポカルシン遺伝子を選択的に増幅するため、各プライマーとも 2 箇所の塩基置換（下線）を導入した。

［　結果と考察　］

ヒト脳 cDNA ライブラリーを、ラット・ヒポカルシン cDNA をプローブとしてスクリーニングしたところ，5 個の独立したクローン (hHLP1~5) を得た。このうち、hHLP1 について全塩基配列を決定した。hHLP1 は全長 840 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 22,426 Da, 等電点 4.72 のポリペプチドをコードしていた（図-1）。 hHLP1 の蛋白質翻訳領域の塩基配列はラットと 92％の相同性を示し，予想アミノ酸配列はラットと完全に一致したことから， hHLP1 はヒト・ヒポカルシン cDNA であると判断した。ノーザンブロットによる解析では、ヒト・ヒポカルシン mRNA は、ラットと同様に約 2 kb のバンドとして検出され，脳に特異的であった。また、ヒト-ハムスター体細胞雑種ゲノムDNA を用いた解析から、ヒト・ヒポカルシン遺伝子は第 1 染色体上に存在することが明らかとなった（表-1）。同じ蛋白質ファミリーに属するヒト・リカバリンの遺伝子は第１７染色体上に存在し[12)]、ヒト・ヒポ

カルシン様蛋白質２（hHLP2，昨年度 BDRP1 として報告した）の遺伝子は第２染色体上に存在すること[13]から、この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。

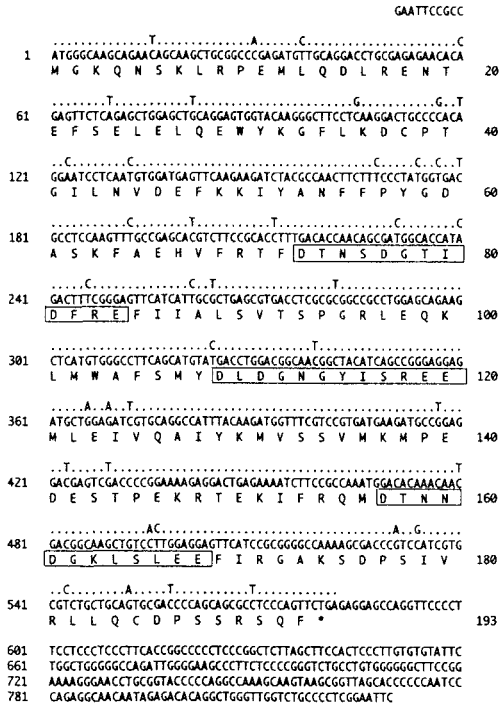


Figure 1. Nucleotide sequence of human hippocalcin and its deduced amino acid sequence. Rat nucleotides (first line) are only shown when different from human.

［参考文献］：1) Kobayashi M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 511-517 : 2) Kobayashi M. et al. (1993) J. Biol. Chem. 286, 18898-18904 : 3) Yamagata K. et al. (1990) Neuron 2, 469-476 : 4) Dizhoor A.M. et al. (1991) Science 251, 915-918 : 5) Kawamura S. and Murakami M. (1991) Nature 349, 420-423 : 6) Takamatsu K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 245-251 : 7) Okazaki K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 185, 147-153 : 8) Hidaka H. and Okazaki K. (1993) Neurosci. Res. 16, 73-77 : 9) Kawamura S. (1993) Nature 362, 855-857 : 10) Saitoh S. et al. (1993) Neurosci. Lett. 157, 107-110 : 11) Saitoh S. et al. (1994) Neurosci. Lett. 171, 155-158 : 12) Murakami A. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 234-244 : 13) Kobayashi M. et al. (1994) Biochim. Biophys. Acta (in press)

Table 1. Chromosomal mapping of the human hippocalcin gene.

Cell		Chromosome Number																						
Line	Hippocalcin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
212	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
324	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
423	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
683	+	*	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
734	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
750	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
756	-	-	-	-	-	D	+	+	-	-	-	-	*	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
803	-	-	-	-	*	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
811	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
852	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
867	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
909	-	-	-	-	-	D	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
937	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	*	-	-	-	+	-	-	-
940	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1006	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	*
1049	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1079	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1099	+	+	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Concordant																									
	+/+	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	2	3	0	0	1	1	3	0	3	2	0	0
	-/-	16	15	14	14	6	14	14	13	15	15	15	15	13	13	14	14	15	14	13	14	14	15	14	13
Discordant																									
	+/-	0	4	4	4	0	4	4	4	4	4	4	3	2	1	4	4	3	3	1	4	1	2	4	4
	-/+	0	1	2	2	10	2	2	3	1	1	1	1	3	3	2	2	1	2	3	2	2	1	2	3
Discordancy (%)		0	25	30	30	50	30	30	35	25	25	25	27	25	20	30	30	27	25	20	30	15	15	30	35

For each hybrid cell line, the presence (+) and absence (-) of each of the human chromosome in the hybrid is indicated in the columns under Chromosome Number. "+" indicates >30% of the cells contain the given chromosome; "*" indicates 5-30% of the cells contain the given chromosome; "D" indicates multiple deletions in the given chromosome. In the column labeled Hippocalcin, the presence (+) or absence (-) of the PCR product for human hippocalcin gene in each cell line is indicated. Concordant hybrids have either retained (+/+) or lost (-/-) the human specific hippocalcin band with a specific chromosome. Discordant hybrids have retained the human specific hippocalcin band without a specific chromosome (+/-), or the reverse (-/+).

262 ムスカリン受容体のGタンパク質共役受容体キナーゼによるリン酸化：m1，m2サブタイプ特異性

芳賀和子、亀山仁彦、芳賀達也
（東京大学医学部脳研究施設生化学部門）

〔要約〕

ムスカリン性アセチルコリン受容体m２サブタイプはGタンパク質共役受容体キナーゼGRK2（＝βアドレナリン受容体キナーゼ＝βARK1）によってアゴニスト依存性にリン酸化される。アゴニスト結合m２受容体はGRK2の基質であると同時に活性化物質として作用する。m１受容体はGRK2によってアゴニスト依存性にリン酸化されない。m１受容体はGRK2の被リン酸化能はあるが活性化能がないためと推測される。

m２受容体のアゴニスト依存性リン酸化はGタンパク質βγサブユニットによって促進され(1､2)、βγサブユニットはGRK2のC末端部分に作用する(3､4)。m２受容体のリン酸化部位は細胞内第３ループ(I3)と同定された(5)。I3とグルタチオンSトランスフェラーゼの融合タンパク質I3-GSTはβγサブユニットとマストパランによって相乗的に活性化される。マストパランの効果はm２受容体の細胞膜直下の細胞内部分ペプチドによっても再現される（右図３の１，５，６のペプチド）(6)。これらの結果はGRK2がβγサブユニットとアゴニスト結合受容体によって相乗的に活性化されることを示唆する(7)。本報告では、ムスカリン受容体m１サブタイプのGRK2によるリン酸化をm２のリン酸化と比較検討した。

［**方法**］ムスカリン受容体m１，m２サブタイプ、GRK2はバキュロウイルスSf9細胞系を用いて発現させ、精製した(3)。I3-GSTは大腸菌に発現させ、精製した。リン酸化は既報に従って測定した(6)。

［**結果**］ムスカリン受容体m１サブタイプのGRK2によるリン酸化はm２に比べて弱く、アゴニストによって活性化されなかった（図１：ここでm１のリン酸化は高受容体・高GRK2の条件で行っている）。一方、I3ループのペプチドはm１，m２いづれのものもGRK2によって同様にリン酸化され、そのリン酸化はマストパランによって活性化された（図１）。m２受容体の細胞内第３ループを除いた変異種は、I3-GSTのリン酸化をアゴニスト依存性に促進した（図２）。この結果は、アゴニストと結合したm２受容体がリン酸化部位と活性化部位の２カ所でGRK2と相互作用することを示している。活性化部位としては細胞膜直下の細胞内部分が考えられる。図３に示すように、膜直下のペプチドによってm２受容体のリン酸化の阻害が見られた（この実験では高濃度のGRK2を用い低濃度ペプチドによる活性化は見られない条件で行っている）。m１とm２サブタイプはI3のN末端部分（図中２）でアミノ酸配列が異なることが知られている。m２のペプチド２はリン酸化を阻害したが、m１のペプチド２は阻害しなかった。m２ペプチドを認識するGRK2の部位がm１ペプチドを認識しないことを示すと考えられる。

［**考察**］m１受容体がGRK2によってアゴニスト依存性にリン酸化されないのは、リン酸化部位が認識されないためではなく、m１受容体がGRK2を活性化しないためと考えられる。I3N末端部分とGRK2の相互作用の有無が、m１とm２の基質特異性を決定する１つの要因となっていると推測される。

図1 ：m1,m2受容体及びm1,m2受容体細胞内第３ループ(I3)ペプチドのリン酸化

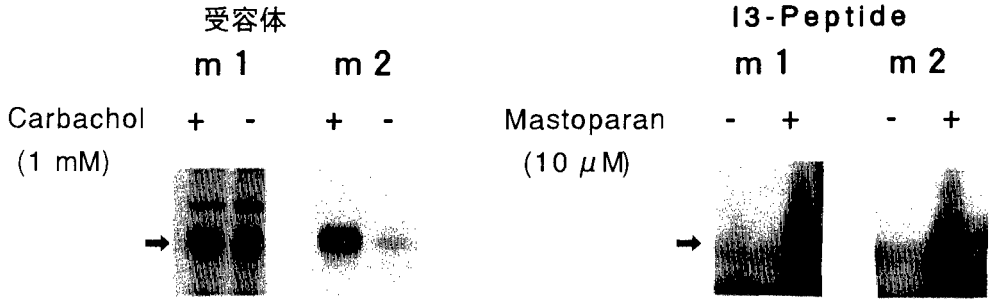


図２ ：m2-I3ペプチドとGlutathione S-Transferaとの融合タンパク質(I3-GST)のリン酸化: I3欠損ｍ２によるアゴニスト依存性活性化

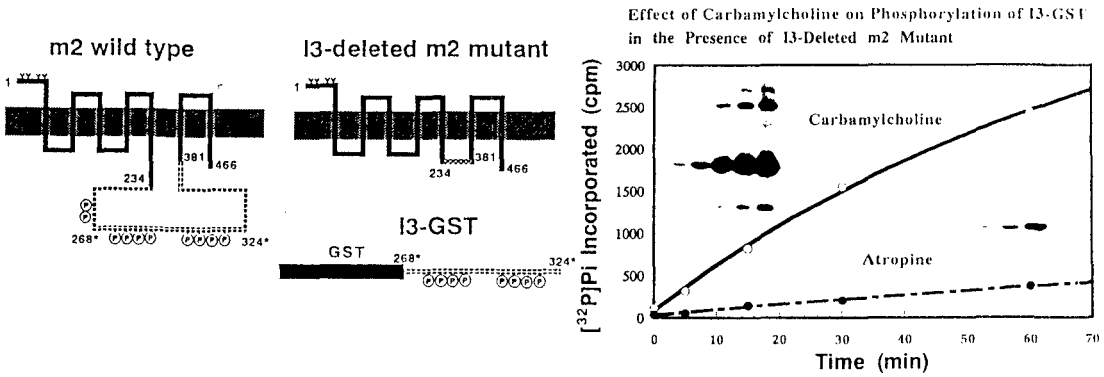
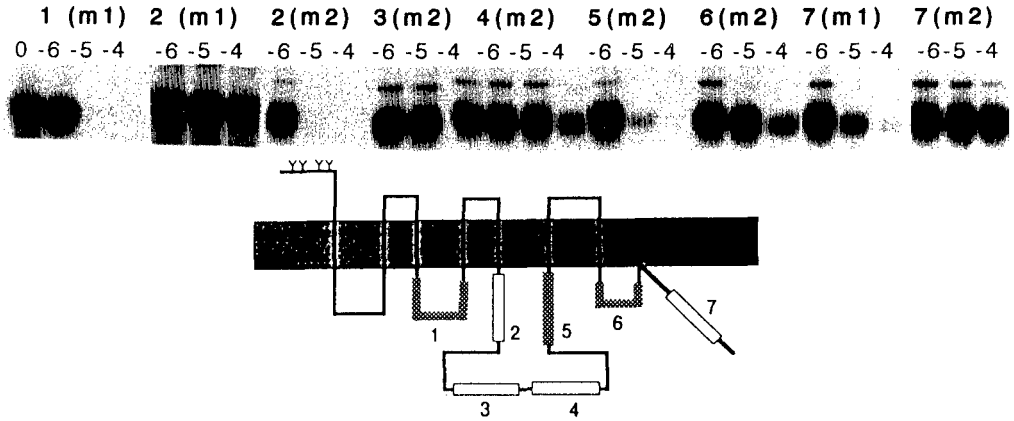


図３ ：m1,m2受容体の部分ペプチドによるm2受容体リン酸化の阻害。



REFERENCE: **1**. Haga, K. and Haga, T. (1990) FEBS Lett. 268, 43-47; **2**. Haga, K. and Haga, T. (1992) J. Biol. Chem. 267, 2222-2227; **3**. Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Kotani, K., Katada, T., and Fukada, Y. (1993) J. Biol. Chem. 268, 7753-7758; **4**. Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C., and Lefkowitz, R. J. (1993) J. Biol. Chem. 268, 8256-8260; **5**. Nakata, H., Kameyama, K., Haga, K., and Haga, T. (1994) Eur. J. Biochem. 220, 29-36; **6**. Haga, K., Kameyama, K., and Haga, T. (1994) J. Biol. Chem. 269, 12594-12599; **7**. Haga, T., Haga, K., and Kameyama, K. (1994) J. Neurochem. in press.

263 セロトニン受容体を介するアデニル酸シクラーゼ活性におよぼす抗うつ薬慢性処置の効果

清水雅美[1)]、西田　朗[1)]、福田裕恭[1) 2)]
斎藤　浩[1) 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〕

セロトニン(5-HT)受容体を介するアデニル酸シクラーゼ活性の調節機構に対する抗うつ薬の慢性効果を調べる目的で、NG108-15細胞を用いて検討し、次の結果を得た。1) NG108-15細胞への8μM amitriptyline(AMI)の3日間の慢性処置は、forskolin刺激によるcAMP産生を増加させ、この作用は5-HT共存下でさらに増強された。2) 5-HTによるcAMP産生の増強は、5-HT_4受容体のantagonistであるGR113808およびICS205-930により抑制されたが、5-HT_1および5-HT_2受容体のantagonistでは抑制されなかった。3) 5-HTによるcAMP産生の増強は、cycloheximideおよびactinomycin Dの前処置により抑制された。以上の結果より、NG108-15細胞へのAMIの慢性処置は5-HT受容体を介するアデニル酸シクラーゼの活性を増強し、これは5-HT受容体/アデニル酸シクラーゼ系の調節に関連する何らかの蛋白質の合成が促進される結果と考えられた。

［目的］

抗うつ薬の慢性投与によるモノアミン受容体の数や機能の変化に関して多くの検討が行われている。5-HT受容体に関しては、5-HT_2受容体のdown-regulationと5-HT_2受容体に連関したホスファチジルイノシトール代謝系の減弱が報告され(1,2,4)、抗うつ作用との関連が指摘されている。一方、アデニル酸シクラーゼに連関する5-HT受容体(5-HT_{1A}、$_{1B}$受容体)に関しては、抗うつ薬の慢性投与による活性の減弱(3)、または変化のないことが報告されており(5)、一致した結論は得られていない。そこで本研究では、neuroblastomaとgliomaの雑種であるNG108-15細胞にAMIを慢性処置し、5-HT受容体を介するアデニル酸シクラーゼ活性の変化について検討した。

［方法］

NG108-15細胞は10%牛胎仔血清、1 mM glutamine、10mM hypoxanthine、1.6 mM thymidineを含むDulbecco's modified Eagle's mediumを用いて培養した。細胞は直径35-mmのdishにサブカルチャーし、medium中にAMIを加え3日間処置した。Pertussis toxinは、AMI処置の最終20時間細胞に処置した。Cycloheximideおよびactinomycin Dの効果の検討は、それぞれ5mg/mlおよび20mg/mlを細胞に2時間処置し、続いてAMIを16時間処置することにより行った。処置した細胞はHEPES-buffered Krebs Ringerで洗浄した後、各種agonistで10分間刺激し、perchloric acidを加え反応を停止させた。反応液はtubeに移し中性に調整し氷上に保存した。1時間後遠心し、上清中のcAMP量をアマーシャムのcAMP assay kitを用い定量した。

［成績］

1)forskolinおよび各種agonist刺激によるcAMP産生におよぼすAMI慢性処置の効果

NG108-15細胞への8μMAMIの慢性処置は、basalのcAMP量は変化させないが、0.1μM forskolin刺激によるcAMP産生を有意に上昇させた。forskolin刺激に5-HT(0.1-100μM)を併用したところAMI処置群においては5-HTの濃度依存性にcAMP産生のさらなる増強が観察された(Fig. 1)。また、5-HT_4受容体のagonistである5-methoxytryptamineの併用もforskolinによるcAMP産生をAMI処置群において弱いながら増強した。しかしながら、8-OH-DPAT、carbachol、clonidine、NAのforskolinによるcAMP産生に対する抑制作用はAMI処置により影響されなかった。このときAMI処置群と無処置群で細胞の蛋白量に変化は認めなかった。

2) cAMP産生の5-HTによる増強作用に対する5-HT受容体antagonistの作用

AMI処置細胞において観察される5-HTによるcAMP産生の増強は5-HT_4受容体のantagonistであるGR113808およびICS205-930により抑制された。しかし、5-HT_1や5-HT_2受容体を阻害するspiperone、SCH23390、pindololによっては抑制されなかった(Fig. 2)。

3) cAMP産生の5-HTによる増強作用に対するpertussis toxin前処置の影響

5-HTの増強効果はpertussis toxinの前処置(100ng/ml, 20h)により影響されなかった。

4) cAMP産生の5-HTによる増強作用に対するcycloheximideおよびactinomycin D前処置の効果

AMI処置細胞において観察される5-HTによるcAMP産生の増強は、cycloheximid (5μg/ml)およびactinomycin D (20μg/ml)の前処置により抑制された。

[考察]

AMIを慢性処置したNG108-15細胞において、forskolin刺激によるcAMP産生の5-HTによる増強作用が観察された。この増強作用は5-HT_4受容体のantagonistにより抑制されたことから、AMIの慢性処置がアデニル酸シクラーゼに促進性に連関する5-HT受容体の機能を上昇させる可能性が示唆された。一方、forskolin刺激によるcAMP産生の8-OH-DPATによる抑制作用はAMI処置により変化せず、加えて5-HTによる増強作用はpertussis toxinの前処置により影響されないことから、AMI処置はアデニル酸シクラーゼに抑制性に連関する5-HT受容体の機構に対しては影響しないと考えられた。

5-HTによるcAMP産生の増強は、cycloheximideおよびactinomycin Dの前処置により抑制されることから、AMIの慢性処置は転写を促進することによりアデニル酸シクラーゼに連関する5-HT受容体を増加させるかあるいは受容体機能の調節に関係する蛋白質の合成を促進する可能性が考えられた。

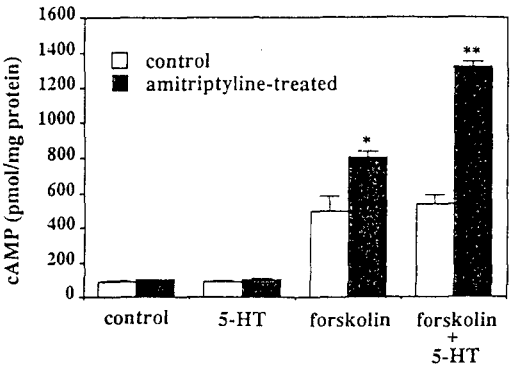


Fig.1 Modulation by 5-HT of forskolin-stimulated cAMP accumulation in NG 108-15 cells treated with amitriptyline.
Cells were treated with and without 8 μM amitriptyline for 3 days. The media were replaced with HEPES-buffered Krebs-Ringer, and the cells were incubated with 10 μM 5-HT, 0.1 μM forskolin alone, or forskolin plus 5-HT for 10 min at 37°C. Data represents the mean±S.E. values of nine separate experiments. *P<0.05, **P<0.01 versus control cell.

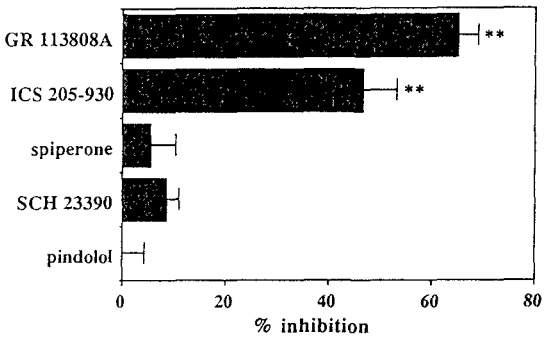


Fig. 2 Effect of various 5-HT receptor antagonists on 5-HT-induced enhancement of cAMP accumulation in amitriptyline-treated cells.
Cells were preincubated with GR 113808A (30 μM), ICS 205-930 (30 μM), spiperone (30 μM), SCH 23390 (30 μM), or pindolol (30 μM) for 10 min and then were stimulated with 0.1 μM forskolin alone, or forskolin plus 10 μM 5-HT for 10 min at 37°C in the presence of each antagonist. Data are expressed as percentages of the values obtained with forskolin plus 5-HT in the absence of the antagonist. **P<0.01 versus forskolin plus 5-HT of amitriptyline-treated cell..

[文献]

1) Kellar K.J. et al. (1981), *Eur. J. Pharmacol.* 69, 515-518. 2) Kendal D.A. and Nahorski S.R. (1985), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233, 473-479. 3) Newman M.E. and Lerer B. (1988), *Eur. J. Pharmacol.* 148, 257-260. 4) Peroutka S.J. and Snyder S.H. (1980), *Science* 210, 88-90. 5) Varrault A. et al. (1991). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257. 433-438.

264 神経系に特異的分布を示すカルシウム結合蛋白質, ニューロカルシン(Neurocalcin)標的蛋白質について

岡崎勝男、井上繁雄、日高弘義
名古屋大学医学部薬理学講座

〔要約〕

当教室にて発見された神経特異的蛋白質、ニューロカルシンの機能を明らかにする目的で、ニューロカルシンδの標的蛋白質を検索すると同時に、抗ニューロカルシンδ抗体を作成し、組織分布を調べた。^{125}I-ニューロカルシンδを用いたゲルオーバーレイ法において、10 kDa, 14 kDa, 27 kDa, 36 kDa及び50 kDaのバンドがカルシウム依存性に検出された。ニューロカルシンδ-アフィニティカラムには、10 kDa, 11 kDa, 19 kDa, 24 kDa, 36 kDa, 50 kDa及び70 kDaの蛋白質がカルシウム依存性に結合した。アフィニティカラムより溶出された蛋白質を酵素処理して得たペプチドのアミノ酸分析より、S100ß(10kDa), S100α(11kDa), calmodulin(19kDa), myelin basic protein(24kDa), tubulin(50 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa) であることがわかった。精製したS100ßを用いてzero-length crosslinkingによる解析を行ったところ、ニューロカルシンδはS100ßと1:1に結合することがわかった。S100ファミリーに属するカルサイクリン、カルギザリン、カルヴァスクリンと^{125}I-ニューロカルシンδの結合を検討したところ、カルサイクリンと中程度の親和性を示した。抗ニューロカルシンδ抗体を用いた免疫組織化学的検討では、脊髄神経節ニューロンの核及び、脊髄白質のグリア細胞の細胞質にニューロカルシンδの存在が示唆された。これらの結果よりニューロカルシンδはグリア細胞などにおいてS100ßとの相互作用によってカルシウム情報伝達系に関与していると考えられた。

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(1993, Neurosci. Res.)。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、ウシの大脳、小脳, 網膜(1992, B.B.R.C.), 嗅球（1993, Neurosci. lett.)、副腎等(1993, J. Endcrinol.)、神経特異的な発現を示すことが知られている。 ウシ脳より得られたcDNAクローン産物であるニューロカルシンδは分子量22,284で１分子当り２分子のCa2+と結合することがわかった。今回、ニューロカルシンの神経細胞における機能を探る目的で、ニューロカルシンδの標的蛋白質を検索した。また発現ニューロカルシンδに対する抗体を作制して免疫組織学的検討を行い、他のアイソフォームとの分布の違いを検討した。

「方法」ニューロカルシンδはMBPとの融合蛋白質としてE. Coliに発現させた。アミロースレジンを用いて粗精製ののち、Factor Xaにてdigestionした。Q sepahroseを用いて、MBPと分離後、W-77カラムを用いて精製した。ニューロカルシンδアフィニティカラムは100mgの発現ニューロカルシンδ を用いてCNBr-activated sepahrose とカップリングさせた。ウシ脳200gをホモゲナイズし、超遠心にて得た上清に1mM $CaCl_2$ となるように加え、カラムにアプライした。1mM EGTA にて溶出された分画を C18 逆相カラムを用いて分離したのち、lysyl endopeptidase 又は V8 proteaseでdigestion した。HPLCで分離したペプチドはペプチドシークエンサーを用いて解析した。Bolto&Humter法にてラベルした^{125}I-ニューロカルシンδを用いて、1mM $CaCl_2$ または

1mM EGTA 存在下にゲルオーバーレイ法にてニューロカルシンδ結合蛋白質を解析した。また、EDC及びNHSを用いたZero-length crosslinking法により、stoichiometryを分析した。免疫組織染色は、発現ニューロカルシンδをウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体を用いてABCキットにより行った。

「結果」ニューロカルシンδアフィニティクロマトグラフィーにより10 kDa, 11 kDa, 19 kDa, 24 kDa, 36 kDa, 50 kDa, 70 kDa の蛋白質がカルシウム依存性に結合した。ペプチドシークエンスの結果、それぞれのバンドはS100ß(10 kDa), S100α(11 kDa), calmodulin(19kDa), myelin basic protein(24kDa), tubulin(50 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa)と一致した。^{125}I-ニューロカルシンδのゲルオーバーレイでは10 kDa, 14 kDa, 27 kDa, 50 kDaのバンドが陽性であった。精製したS100ßを用いて行ったゲルオーバーレイでも^{125}I-ニューロカルシンδはカルシウム依存性に結合した。S100ファミリーに属するカルサイクリン、カルギザリン、カルヴァスクリンについて同様の検討を行ったところ、カルサイクリンはS100ßに比べて弱い結合を示したが、、カルギザリン及びカルヴァスクリンは殆ど結合しなかった。ニューロカルシンδは2-mercaptoethanol 存在下において、電気泳動上multipleなバンドとして見られた。zero-length crosslinking法による検討では、カルシウム存在下では10 kDa 、24 kDa、48 kDaのバンドに加え、34 kDaのバンドが検出された。抗ニューロカルシンδ抗体を用いた免疫組織学的検討では、脊髄白質のグリア細胞の細胞質がよく染まった。

「考察」 S100ファミリーは2 EFハンドタイプのカルシウム結合蛋白質であり、細胞周期や細胞増殖、分泌に関連して発現するものが多い。特にS100蛋白質はよく研究されており、S100ß, S100α0, S100αの3つのアイソフォームが知られているが、S100ßは神経系の中でも特にグリア細胞に多く発現されている。同じくグリア細胞に多く発現されるニューロカルシンδがS100ßとカルシウム依存性に結合することが明かとなり、ニューロカルシンδが細胞において中枢神経系において、細胞周期や細胞増殖、分泌などの重要な機能における細胞内カルシウム情報伝達に関わっていることが示唆される。又、アイソフォームにより神経系での発現細胞がの違いが明らかになり、また複数の標的蛋白存在が示唆されることからニューロカルシンがアイソフォームにより別の標的蛋白質が存在する可能性または、それぞれのアイソフォームが複数の標的蛋白質を制御している可能性が考えられる。

「参考文献」

1. Hidaka, H., and Okazaki, K. (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. Nakano, A., Terasawa, M., Watanabe, M., Usuda, N., Morita, T., and Hidaka, H. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., 186,1207-1211
5. Nakano, A., Terasawa, M., Watanabe, Kato, M., Nirura, Y., Usuda, N., Morita, T., and Hidaka, H. (1992) J. Endocrinology 138,283-290
6. Bastianelli, E., Okazaki, K., Hidaka, H., and Pochet, R. (1993) Neurosci. Lett., 161, 165-168.

265 カルバコール刺激依存性の白鼠上頸部交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性化におよぼす一酸化窒素合成酵素阻害剤の抑制効果

安藤正人・立岑廷族・楠戸正子・永田　豊　(藤田保健衛生大・医・生理)

[要約]摘出白鼠上頸部交感神経節(SCG) を生理溶液中でインキュベーションを行う際、ムスカリン性アゴニストのcarbachol(Carb, 100μM) を添加して節後ニューロンの脱分極性変化を 生じさせると、神経細胞質内の至適Ca^{2+}濃度に依存して可溶性タンパクの架橋反応を促進する酵素・transglutaminase(TG)は短時間(30分以内)で著明に(約10倍)活性化される。 このCarb刺激依存性のSCG内TG活性の増大現象の過程に一酸化窒素(NO) の関与の有無を検索するため、NO合成酵素阻害剤の N^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) の添加効果を検討した。①Carb(100μM)刺激で著明に上昇した節内TG活性値は、 L-NMMA(50μM)添加によって約1/2レベルに迄抑制された。この抑制効果は、NO発生反応の基質であるL-arginine(L-Arg)を過剰量(0.5mM)溶液中へ添加すると、完全な回復が見られた。従って、SCGニューロン内では膜のコリン作動性ムスカリン受容体を介したCarb刺激に応答して、節内L-Arg由来の NO発生が促進した結果、細胞質内TGの活性化が短時間で進行する可能性が示唆された。②Carb刺激依存性のSCG内 TG活性の増大効果は、細胞組織間隙でNOガスを捕捉するhemoglobin(20μM)を添加すると、有意に抑制(-70%)された。このように、 Carb刺激によりニューロン内で発生したNOは、一旦細胞外に拡散し再び隣接する標的神経細胞質内に取り込まれて、TGの活性化を調節している情報伝達様式が推測された。 ③環状GMP(cGMP)合成酵素を阻害するmethylene blue (0.5 mM)を溶液中に添加しても、 Carb刺激で増大した節内TG活性に変動を及ぼさなかった。つまり、SCG内ではNO依存性のcGMP生成と TGの活性化の過程には直接的な反応連鎖は認められなかった。④Carb刺激で上昇する節内TG活性値は、細胞核内endonucleaseを阻害するaurintricarboxylic acid (0.1 mM)の添加でやや低下(-25%)したが有意な変動ではなかった。一方、核内DNA情報がmRNAへ転写される過程、あるいはリボゾーム上でのタンパク合成への翻訳過程をそれぞれ抑制するactinomycin D(1.0μg/ml)、あるいはcycloheximide(10μg/ml)を作用させても、Carb依存性のTG活性亢進効果には何れも無効であった。すなわち、コリン作動性脱分極刺激は神経細胞膜の興奮を生じ、その過程で発生するNOに依存して上昇するTG酵素の活性調節は、細胞核から伝達される情報系には支配されていない可能性が推定された。

[序]摘出交感神経節(SCG)内には、 コリン作動性神経伝達刺激により脱分極性電位変化を生ずる節後交感性ニュ-ロンが豊富に含まれている。 この標本を *in vitro* でインキュベーションしながら、脱分極剤のacethylcholine(ACh、100μM)を生理溶液中に添加すると、SCGの神経細胞質内では至適なCa^{2+}濃度に依存して可溶性タンパクの架橋反応を触媒・促進するtransglutaminase(TG)は、短時間(30分以内)で著明に活性化されることを既に我々は認めている。さらに、このAChによる節内TG活性の促進効果はatropine の添加で有意に抑制されたことから、SCGニューロン膜上のムスカリン性受容体刺激に応答して細胞質内 TG酵素が活性化される現象と理解された(1)。 一方、ムスカリン性アゴニストのcarbachol(Carb)で摘出SCG標本を刺激すると、やはり短時間(5分以内) に節内環状GMP(cGMP) 生成が最大値に達するのが見られた。この時、一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)阻害剤のN^G-monometh-yl-L-arginine(L-NMMA)を共存させると、Carb刺激によるSCG内cGMP生成促進効果は完全に拮抗された。これらの成績から、SCGニューロン内ではムスカリン性受容体刺激によって、cGMPのみならずNOが種々の機能発現に関与してその細胞内情報伝達体として作用している可能性が推測された(2)。そこで、Carb脱分極刺激を加えた時SCG組織内で変動するTG活性の調節機序を検証すると共に、Carb刺激依存性のTG活性変動におよぼすL-NMMAの添加を検索して、神経細胞膜の興奮状態がTG活性を変動させる時に、NOが如何なる関与をしているのか検討した。

[実験方法]ウレタン麻酔下にウイスター系成熟白鼠の両側頸部より、既報(1,2)に準じてSCG標本を摘出して、以下のインキュベーション実験に供した。生理溶液中に薬剤を添加添加した条件でインキュベートしたSCG標本は、Lorandらの方法(4)によりTG活性を測定し、また節内cGMP生成量はHonmaらの方法(3)で定量した。

[実験成績と考察]①Carb刺激によるSCG内TG酵素の活性化におよぼすL-NMMAの抑制効果: 図1に示すように、生理溶液中に添加するCarbを濃度変化させてSCG標本を好気的にインキュベーション(37° C)すると、低濃度 (10μM)から濃度依存性に節内TG活性の上昇が見られ、100～500μM濃度で最大活性値(図2: 約10倍)に達した。 この節内TG活性の促進効果はCarb(100μM)添加後、30分で最大レベルに達した。従って、AChのみならずCarb刺激によるSCG内TGの著明な活性化効果は酵素タンパクの誘導ではなくて、 酵素タンパク分子の構造変化に基づく *Km*値 の減少と *Vmax*値の増加に起因した変動であることが示された。次に、NOSを特異的に阻害する L-NMMA(50μM)を Carb(100μM)と共に溶液中に添加してSCG標本をインキュベートすると、

Carb刺激で増大した節内TG活性値は 強く抑制(約1/2)されるのが見られた(図1)。 この時、NO発生反応の代謝基質であるL-arginine(L-Arg)の過剰量(0.5mM)を添加すると、CarbによるTG活性の刺激効果の完全な回復が見られた(図2)。従って、SCGニューロン膜のムスカリン性受容体刺激によって節内L-Arg 由来のNO発生が促進された結果、細胞質内TGの活性化が短時間で進行した可能性が示唆された。②Carb刺激によるNO依存性TG活性調節系とcGMP生成系におよぼすhemoglobin(Hb)あるいはmethylene blue(MB)添加効果の相違: SCG標本にCarb(100μM)を添加してインキュベートすると節内cGMP生成が著明に促進(約8.7倍)されたが、この時細胞間隙に拡散するNOガスを捕捉・無効化するために Hb(20μM)を溶液中に添加すると、Carb刺激で上昇した cGMP生成量はほぼ対照レベルに迄低下するのが明かとなっている(2)。一方、Carb刺激に依存するSCG内TGの活性化は、Hbの添加により約1/3のレベルに迄低下するのが示された。従って、Carb刺激によって、SCGニューロン細胞質内で発生した NOガスの大部分は細胞外間隙に放出された後、再び近隣の同種細胞内に取り込まれてTG酵素の活性促進とcGMP生成を亢進する情報伝達経路が存在することが推察された。そこで、Carb添加によってNO依存性に生成するcGMPが、さらにNO依存性のTG活性の調節因子として作用しているのか否かを検討するため、cGMP合成酵素を特異的に阻害するMB(0.5mM) の添加効果を比較した。Carb刺激に依存した節内cGMP生成の増大は、MBの添加で明かに消失したが、TGの活性促進効果にはMBの影響は認められなかった。つまり、SCG内ではNO依存性のcGMP生成系とTG活性化の過程とは、 相互に直接的な連鎖はないものと理解された。④Carb刺激による交感神経細胞質内TGの活性化におよぼすendonuclease (ENase)、転写および翻訳過程阻害剤の影響: Carb刺激で活性化される節内TG活性値は、細胞核内ENaseを特異的に阻害するaurintricarboxylic acid(0.1mM)添加によりやや低下(-25%)するのが認められたが有意な変動ではなかった。一方、核内DNA情報がmRNA へ転写される過程、あるいはリボゾーム上でのタンパク合成への翻訳過程をそれぞれ抑制するactinomycin D(1.0μg/ml)、または cycloheximide(10μg/ml)を溶液中に共存させても、Carb依存性の TG活性亢進に対して抑制効果は何れも全く見られなかった。これらの実験から、コリン作動性脱分極刺激によって神経細胞膜の興奮過程で発生するNOに依存したTG酵素の活性促進に対する代謝調節は、細胞核から細胞質への情報伝達過程から独立して作動している可能性が推定された。最近、NO発生に起因するapoptosis誘発機序に関して、細胞内解糖系酵素(GAPDH)のリボシル化反応をNOが促進する結果、エネルギー担体のATP産生が障害される成績が報告されている(5)。今回の実験結果で見られたように、コリン作動性ムスカリン性受容体刺激によって神経細胞膜の脱分極性興奮状態でNOが発生し、その結果NOがさらに短時間以内で細胞質内TG酵素の活性促進を引き起こす現象の解釈では、これら一連の反応系がタンパク生合成で見られるような細胞核の情報支配を受けないことから、細胞質内エネルギー代謝の障害変動との関連性についても、さらに詳細な検討が必要であろう。

[謝辞]本研究の一部は、平成5年度文部省科学研究費(一般研究: 05680685)の援助を受けて行われた。

[文献](1)Ando et al.(1994)*Neurosci. Res.* 12:356-365 (2)安藤正人他(1994) *神経化学* 33:印刷中 (3)Honma et al. (1977) *Biochem. Med.* 18:257-273 (4)Lorand et al.(1972) *Anal. Biochem.* 50:623-631 (5)Zhang & Snyder (1992)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9382-9385.

図1. SCG内TG活性におよぼすCarb添加濃度変化の影響とL-NMMAによる抑制効果

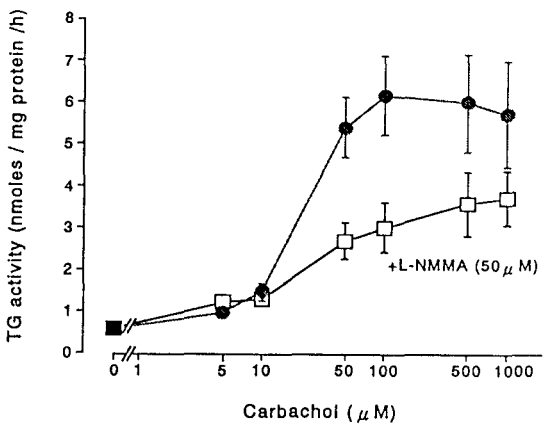
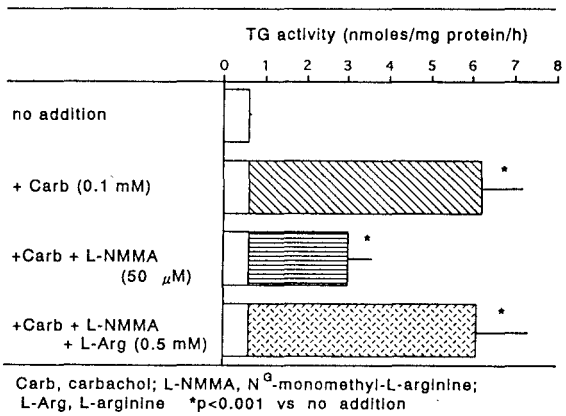


図2. Carb刺激による節内TG活性化およぼすL-NMMAの抑制効果とL-Argの回復作用



266 ラット脈絡叢、脳室上衣におけるsrc、H－ｒａｓ細胞性癌遺伝子産物の発現について

菅谷　慶三*、塩田　清二**、竹田　二美代***、中井　康光**、竹田　稔***
（*都立神経病院・神経内科、昭和大・**第一解剖、***第一生化）

〔要約〕
ラット脳内における src, H-ras 細胞性癌遺伝子産物の分布、局在の加齢による変化を免疫組織化学にて検討した。c-src は tyrosine kinase 活性をもつ60 kd の蛋白質(pp60c-src), c-H-ras は21kd のG蛋白質 (p21c-H-ras)をコードしているが、ラット脈絡叢、脳室上衣で、生後0日から1.5年の各加齢過程において持続して免疫陽性を認めた。限局した特定の組織で、life span に発現していることは、脈絡叢および脳室上衣細胞の特異的機能に pp60c-src, p21c-H-ras が関与していることが示唆された。さらにこれらの発現は、以下に示す興味ある特徴を有していた。１）従来報告されている他の組織における pp60c-src, p21c-H-ras は細胞の分化過程で強く認めるが（１、２）、脈絡叢および脳室上衣では、分化過程では弱く加齢により強く認めた。RT-PCR 法による転写レベルでの発現も同様の所見が観察された。2）pp60c-src は細胞膜関連蛋白質であるが、脈絡叢および脳室上衣細胞において、pp60c-src はゴルジ体と考えられる核周囲に免疫陽性を認めた。pp60c-src のこのような細胞内局在は Rous sarcoma virus を感染させた細胞で知られているが（３）、正常組織では報告されておらず、癌化との関連からも興味ある現象と考えられた。

はじめに〕細胞性癌遺伝子は細胞の増殖、分化過程において重要な役割を果たしているだけではなく情報伝達因子のコンパートメントとして、正常細胞の様々な機能に関与していると考えられている。我々は細胞性癌遺伝子の脳内における生理的機能を明らかにするため、各種細胞性癌遺伝子の加齢による分布、局在の変化を検討してきた。今回は src, H-ras 細胞性癌遺伝子のラット脈絡叢、脳室上衣における発現について報告する。

方法〕免疫組織化学：生後０日、６週、３ヵ月、６ヵ月、１.5年の Wistar rats をペントバルビタールにて麻酔後４％パラホルムアルデヒドにて潅流固定し大脳を取り出した。冠状断にて切片を作成後、pp60v-srcに対するポリクローナル抗体（Transformation Research , Inc.）および p21v-H-ras に対するモノクローナル抗体（Oncogene science , Inc.）を用いてＡＢＣ法にて染色した。Kinase Assays ：生後６ヵ月の Wistar rats より、脈絡叢、脳室上衣を、生後３週の rats より線条体、海馬、視床を取り出し、Resh（３）らの方法に従じ pp60c-src に対する kinase assays を行った。RT-PCR：生後６週、６ヵ月、１.５年の Wistar rats

より脈絡叢、脳室上衣、大脳皮質、線条体、海馬を取り出し、Total RNA を Chomczynski らの変法により抽出した。RT-PCR は Gene Amp RNA PCR kit (Perkin-Elmer Cetus, Inc.) を用いて c-src, c-H-ras 特異的 primer にて増幅した。

結果および考察〕免疫組織化学の結果を表に示す。脈絡叢上衣細胞および側脳室、第三脳室上衣細胞において、pp60c-src は核周囲に半月状に陽性反応を、p21c-H-ras は細胞質に陽性反応を認めた。これらの反応は生後０日から１.５年にかけ持続して認めた。また他の組織での反応とは対称的に加齢が進むにつれ強い反応を示した。RT-PCR による mRNA レベルでの検討でも同様の所見が観察された(Fig)。kinase assays により脈絡叢、脳室上衣において pp60c-src は kinase activity を示した。以上より、src , H-ras 癌遺伝子産物が、ラット脈絡叢および脳室上衣の特異的機能に関与していることが示唆された。

TABLE I

Relations between immunoreactivity to anti-pp60$^{c\text{-}src}$ and anti-p21$^{c\text{-}H\text{-}ras}$ antibody in the choroid plexus and ependyma and ageing.

	0 day	6 weeks	3 months	6 months	1.5 years
pp60$^{c\text{-}src}$					
choroid plexus	+	+	+	++	+++
ependyma	-	-	+	++	+++
p21$^{c\text{-}H\text{-}ras}$					
choroid plexus	+	+	++	++	+++
ependyma	++	+	+	+	+

Immunohistochemical staining densities were determind from serial coronal sections. Based on relative immunohistochemical staining, the signal was less than or equal to background (-), weak (+), moderate (++) or strong (+++).

文献〕(1) Cartwright, C. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85 (1988) 3348
(2) Mizoguchi, A., Mol. Brain Res., 5 (1989) 31
(3)Resh, M. D., J. Cell Biol., 100 (1985) 409

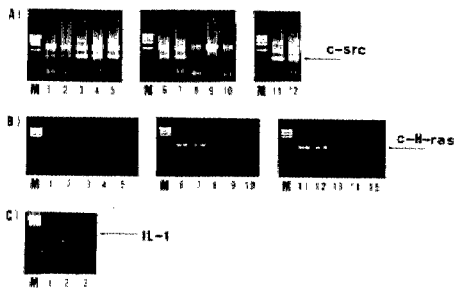


Figure shows electrophoresis of cDNA amplified by RT-PCR with a specific set of primers for c-src(A) or c-H-ras (B) gene. Total RNA was obtained from the choroid plexus(lanes 1,6,11), ependyma (2,7,12), cerebral cortex(3,8,13), striatum (4,9,14) or hippocampus(5,10,15) of 6 week-(lanes 1~5), 6 month-(6~10), and 1.5 year(11~15)-old rats.

267 脳腫瘍におけるVEGF(Vascular endothelial growth factor)の免疫組織化学的検討

下川尚子、白石哲也、戸田啓介、鞠　硯、田渕和雄
（佐賀医科大学　脳神経外科）

〔要約〕　血管新生とは様々なangiogenic factorが血管内皮細胞に働きかけ引き起こす現象である。我々はこれまでに脳腫瘍におけるVEGF (vascular endothelial growth factor) の発現をmRNA レベルで解析し、VEGFが脳腫瘍の血管新生に関与している可能性が高いことをつきとめた。今回はVEGFの蛋白レベルでの発現を免疫組織学的に検討した。その結果、脳腫瘍115例中94例(82%)で陽性所見が認められた。High grade glioma, low grade glioma , pituitary adenoma , meningiomaの順で陽性率が高かった。VEGFの発現は von Willebrand因子染色による血管新生の程度と正の相関関係が認められた。

（目的）　血管新生を促進する因子としては、b FGF (basic fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), PlGF (placenta growth factor)そしてVEGF(vascular endothelial growth factor ; 血管内皮成長因子)等が知られている。VEGF は内皮細胞に特異的に発現しているFlt (VEGF receptor) に結合し作用を発現する(2)。他の増殖因子に比べて内皮細胞増殖効果が強く、血管の透過性を亢進させる作用を有するとされている(1)。悪性脳腫瘍の周囲には脳浮腫が伴い病状の進行に大きな影響をもたらすが、このことは脳腫瘍にVEGFが関与している可能性を示唆するものと考えられる。

我々は、現在までに手術摘出標本についてNorthern blot analysisを行いVEGF mRNAが発現していることを確かめた。今回、我々はVEGFの蛋白レベルの発現を免疫組織化学的に確認したので報告する。

（対象と方法）　ホルマリン固定パラフィン包埋された脳腫瘍手術摘出標本115例をマイクロウエーブによる抗原賦活を行った後にanti -human VEGF protein polyclonal 抗体（A-20:Santa Cruz Biotechnology,X100)を一次抗体とする免疫組織化学的染色 (Labeled streptavidin-biotin法) を行った。また、血管内皮細胞に特異的に発現しているvon Willebrand因子をanti-von Willebrand factor polyclonal 抗体 (A082:DAKO) を用いて免疫染色した。その染色像から新生血管の程度を評価した。

（結果・考察）　脳腫瘍115例中94例 (82%) でVEGF蛋白陽性であった (Table 1)。陽性率の高い腫瘍型としてはhigh grade glioma , low grade glioma , pituitary adenoma , meningioma の順で、症例数は少ないがmalignant lymphoma , hemangioblastomaでも陽性率が高率であった (Table 2)。VEGFは細胞質に均一に染色され、high grade glioma (Fig. 1) , pituitary adenoma (Fig. 2) では陽性細胞は比較的均一に分布していた

がmeningiomaでは斑状に分布していた。VEGFの陽性率が高くなるに従ってvon Willebrand因子陽性率も増加していた (Table 3)。一方、VEGF陰性でかつvon Willebrand因子陽性率が高い腫瘍群もあった。これらの腫瘍ではVEGF以外の血管新生因子が関与していると考えられ、血管新生という現象が複数の因子により制御されていることを示していると考えられる。

Histology	Positive / total cases
High grade glioma	32 / 37 (87%)
Low grade glioma	8 / 10 (80%)
Medulloblastoma	1 / 2
Pituitary adenoma	20 / 26 (77%)
Meningioma	10 / 15 (67%)
Neurocytoma	0 / 1
Neurinoma	1 / 1
Hemangioblastoma	4 / 4
Hemangiopericytoma	0 / 1
Malignant ependymoma	1 / 1
Malignant lymphoma	9 / 9 (100%)
Malignant melanoma	2 / 2
Metastatic brain tumor	6 / 6 (100%)
Total	94 / 115 (82%)

Table 1 The expression of VEGF protein in brain tumors

	–	±	1+	2+	3+	4+
high grade glioma	••	••••	••••	•••••	•••••	•••••
low grade glioma	•			••••		
pituitary adenoma	•••	•••	••	•••••	•••••	•••••
meningioma		•	•••	•••••	•	
medulloblastoma	•	•		•		
central neurocytoma	•					
malignant lymphoma			•	••	••••	••
hemangioblastoma					••	••
hemangiopericytoma	•					
malignant melanoma			•	•		
metastatic brain tumor			•••	•	•	

Table 2 The expression of VEGF in brain tumors

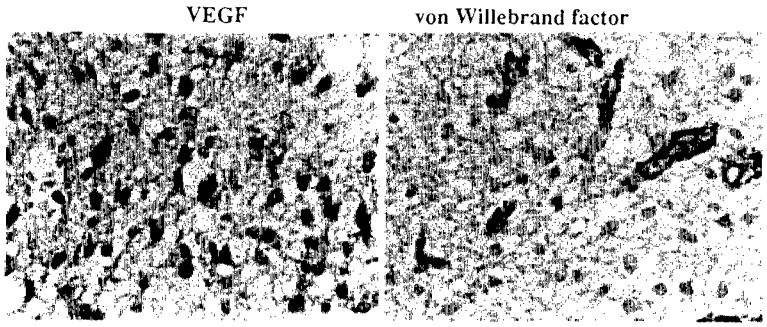


Figure 1 The expression of VEGF and vonWillebrand factor in glioblastoma

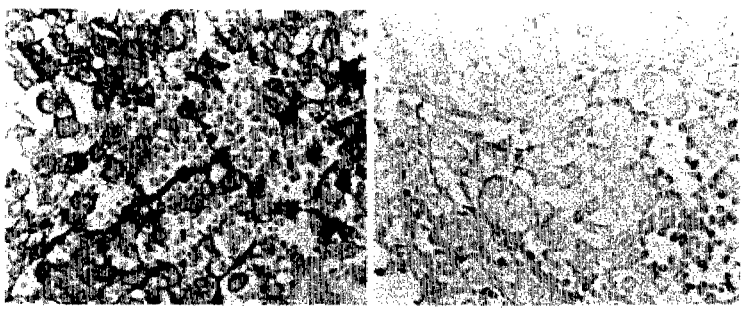


Figure 2 The expression of VEGF and vonWillebrand factor in pituitary adenoma

VEGF \ von Willebrand factor	1+	2+	3+	4+	5+
–	•			•	
±	•	•		••	•
1+	••	•			
2+	••	••	••	••	
3+		••	••	••	••
4+		•		••	

Table 3 Correlation between VEGF and von Willebrand factor

(文献)
1) Connolly, D. T. Vascular permeability factor; a unique regulator of blood vessel function. Journal of Cellular Biochemistry, 47: 219-223, 1991.
2) de-Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. and Williams, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science, 255: 989-91, 1992.

268 熱ショック蛋白質HSP65を発現するラット・シュワン細胞株

遠藤 真澄、由村 健夫＊
（国立多摩研究所・生体防御部、九州大学医学部脳研、神経内科＊）

〔要約〕ラット坐骨神経由来シュワン細胞株に、mycobacterial 65-kDa 熱ショック蛋白質(HSP65)の抗体で認識されるdeterminantを持つ抗原の構成的な発現を認めた。樹立した細胞株Ｔ９３は、S-100, laminin, GFAP, NCAMを発現していた。免疫組織化学的な検討で、３種類の HSP65モノクローナル抗体 A5B, 3A, B2C により、Ｔ９３の主に細胞質が染色された。Western blotの解析により、65-50 kDa 付近に HSP65抗体と反応するバンドが認められた。熱ショックストレスにより、35 kDa 付近にも新たにバンドを認めた。Mycobacteriaと末梢神経との間に共通抗原の存在が示唆された。

{目的}

熱ショック蛋白質HSPは、真核細胞から原核細胞にいたるまで、系統発生学的にその一次構造が非常によく保存されている。従って外来性の細菌等に発現するHSPに対して成立した免疫が自己HSPやその他の自己抗原に対しても交叉反応し、それが種々の疾患の病因の一端ではないかと考えられている。ハンセン病は、*Mycobacterium leprae* による慢性の感染症であり、末梢神経が選択的に冒される。この *M. leprae* による末梢神経障害においても、発症機序としてその構成蛋白であるHSP65に対する免疫応答が、末梢神経系に対して交叉反応する機構が関与している事が考えられる。そこで本研究は、*M. leprae* のターゲットであると考えられるシュワン細胞を、ラット末梢神経より得て細胞株を確立し、HSP65抗体との交叉反応性について検討した。

{実験方法}

１、細胞培養

生後２－３日令の SD 系ラット坐骨神経より、既報(1)のごとくシュワン細胞を調製した。DMEM/10% FCS、3μM forskolin の存在下４－８代継代培養した後、poly-L-lysine coating dish 付着性の細胞を選別し、さらに passage を繰り返しながらDMEM/10% FCS で３カ月以上継代して、シュワン細胞株Ｔ９３を樹立した(2,3)。

２、免疫組織化学

Ｔ９３ を 0.5% Triton X-100 を含む 4% paraformaldehyde で固定した後、各種一次抗体を反応させ、ABC法にて染色を行った。一次抗体は、抗ウシS-100 (Dako), 抗laminin (Sigma), 抗ラットThy1.1 (Cedarlane), 抗GFAP (clone G-A-5, Sigma), 抗ラットNCAM (Chemicon) 抗体を用いた。また、剖検より得たヒト末梢神経よりミエリン P2, P0 蛋白を精製した後それぞれの抗体を作成し、一次抗体として用いた。

３、HSP 65 の発現

HSP 65 の発現は、抗 mycobacterial HSP 65 モノクローナル抗体 A5B(epitope AA 235-319), 3A (AA 398-437), B2C (AA 482-528) を用いて、免疫染色法と cell extract の Western blot で検討した。

{実験結果}

シュワン細胞株Ｔ９３ は、10% FCS 加および無血清培養 (DMEM:F12=1:1, supplemented with 10 μg/ml insulin, 10 μg/ml transferrin, 30 nm sodium selenite, 50 nm hydrocortisone, 300 pm T3 and 2 mg/ml albumin)で、ともに何等特別な因子を加えずに増殖した。血清加培養では bipolar, multipolar な形態の細胞が混在していたが、無血清培養では多くの細胞が long bipolar な形態を呈した（図１Ａ，Ｂ）。免疫染色の結果、Ｔ９３ は 10% FCS 加および無血清培養いずれにおいても、また継代期間に関係なく S-100蛋白陽性、Thy-1.1 陰性であり、laminin, GFAP, N-CAMを発現していた。しかし、ミエリン抗原である P2, P0は、免疫組織化学的には検出できなかった。Ｔ９３ の約50% が 抗 HSP65 mab A5b, 3A, B2C で染色され、主に細胞質が濃染された（図２）。Cell extractを用いた Western blotでは、65-50 kDa 付近に数本のバンドが検出された（図３Ａ）。また43℃、90分間熱ショックをかけ24時間回復させた細胞では、35-30 kDa 付近にもバンドが見られた（図３Ｂ）。

{考察}

ラット・シュワン細胞株 T９３ は、S-100, laminin, GFAP, NCAM が陽性、Thy1.1, P2, P0 は陰性であることから、ミエリン非形成シュワン細胞と考えられる。また構成的に抗 HSP65 抗体で認識される determinant を有する抗原を発現していた。この事は mycobacteria と末梢神経との間に共通抗原が存在する事を示唆する。今後、HSP65 特異的リンパ球が、共通抗原を発現している T９３ を認識するかどうか等、molecular mimicry の機構が *M. leprae* による末梢神経障害の発症に関与しているか否かを解明していく。

「謝辞」

本研究の一部は、大山健康財団の研究助成金の援助のもとに行われた。

非会員共同研究者；野間口　博子、虎谷　聡（国立多摩研究所・病原微生物部）

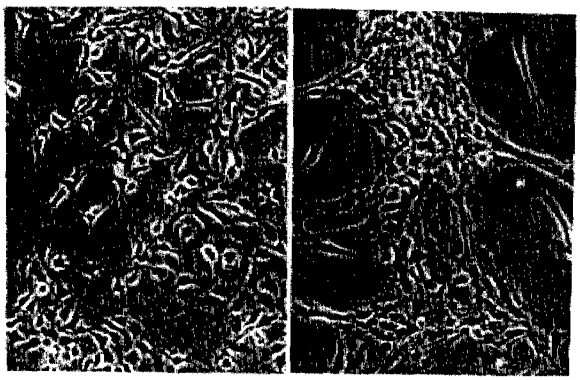


図１　10% FCS 加 (A) および無血清培養 (B) におけるシュワン細胞株Ｔ９３



図２　抗HSP65抗体 3A による免疫染色像

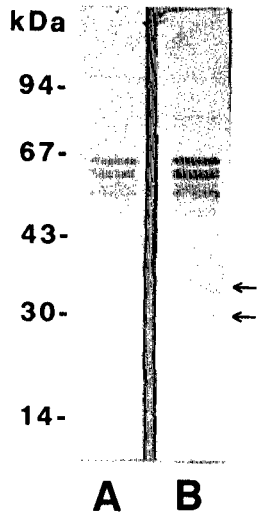


図３　抗HSP65抗体 3A による cell extract の western blot
A ; 非ストレス加の細胞
B ; 43℃, 90分間の熱ショックの後、24時間回復させた細胞

{参考文献}

1) Brockes J., Fields K.L. and Raff M.C. (1979) Brain Res. 165, 105-118.
2) Goda S., Hammer J., Kobiler D. and Quarles R.H. (1991) J. Neurochem. 56, 1354-1361.
3) Yoshimura T., Kobayashi T., Goda S. and Goto I. (1994) Neurochem. Res. 19, 735-741.

269 ウシ脳の神経・アストログリア細胞に局在する新しいSerpinに関する研究

西堀正洋、近井高志、川端昌弘、佐伯清美
（岡山大学医学部薬理）

〔要約〕
ウシ脳から Serine proteinase inhibitor (Serpin) super-familyに属する新しい 43kDa 蛋白質 (B-43) を精製した。B-43 の C 末端アミノ酸配列は GDN/PN-1、白血球 elastase inhibitor 等と相同性が高かった。B-43 はヘパリンに対する親和性がなく、urokinase, elastase, thrombin, plasmin と SDS 抵抗性複合体を形成することはなかった。免疫組織化学的検討で B-43 が大脳皮質 III ～ VI 層の神経細胞と白質の線維性アストロサイトに発現していることが明らかになった。これらの結果は、B-43 が GDN/PN-1 とともに神経細胞・アストロサイトに発現し、協同的に機能している可能性を示唆している。

（緒言）
Serine proteinase と、Serine proteinase inhibitor (Serpin) による生体機能の調節は、凝固・線溶系の反応、補体の活性化反応において中心的な役割を演じることはよく知られているが、最近中枢神経系の発生あるいは変性・再生過程においても重要な役割を果たすことが示唆され注目されている。Glia-derived nexin / protease nexin-1 (GDN/PN-1) は neuroblastoma の突起伸展活性を有する因子として、C6 glioma の培養上清中に見出された Serpin である。本研究で、我々は、ウシ脳から GDN/PN-1 と相同性を有する新しい 43kDa セルピン蛋白質 (B-43) を精製し、脳内細胞局在について検討した。

（方法）
B-43 はウシ脳ホモジネート上清を 85℃、10分間熱処理した後、DEAE-cellulose, Sephadex G-75, CM-cellulose, RP-HPLC により精製した。精製B-43 は CNBr 処理後、Lys-C endopeptidase 消化し、得られた peptide 断片のアミノ酸配列を決定した。B-43 とヘパリンとの結合性は、CM-cellulose elute を Heparin-Sepharose 4B カラムにかけることにより調べた。urokinase, elastase, thrombin, plasmin との複合体形成能は 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 で精製 B-43 と proteinase を 37℃ でインキュベートし、90 分後に反応液を SDS-PAGE , Western blotting で分析した。免疫組織化学的検討ではウサギで得た α-B-43 ポリクローナル抗体を用いた。

（結果と考察）
精製された B-43 から得られたペプチドを分析したところ、いずれも Serpin superfamily と相同性のある配列を有していた。特に、Serpin の C 末端領域に対応するペプチドは相同性が高かった。アミノ酸組成分析の結果も、B-43 が GDN/PN-1 や leukocyte elastase inhibitor と類似するアミノ酸構成であることを示していた。B-43 は GDN/PN-1 と異なり、ヘパリンに対する親和性を持たず、urokinase, thrombin を含むいずれの proteinase とも複合体を形

成しなかった。これらの性質は GDN/PN-1 と全く異なっていた。免疫組織化学的検討で、B-43 がウシ大脳皮質第 III ～ VI 層の神経細胞と白質領域の線維性アストロサイトに局在することが明きらかとなった。α-B-43 抗体はアストロサイトの突起よりも細胞体を強く染色したが、血管壁に接着していると思われる部位では再び強い陽性の所見が得られた。このような特徴的な分布は B-43 と脳血管のバリアー機能との関連を示唆するものと思われる。

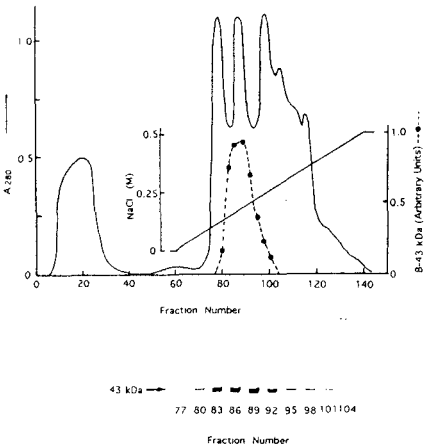


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of B-43
B-43 was determined by Western blotting.

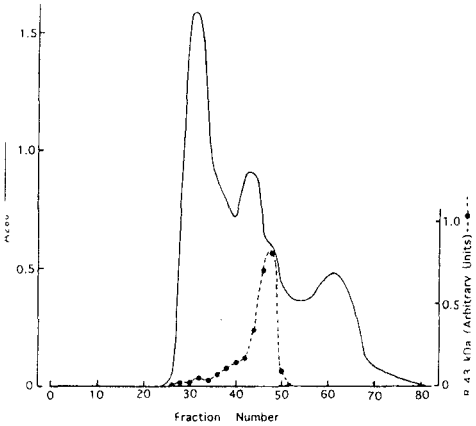


Fig. 2. Sephdex G-75 column chromatography of B-43

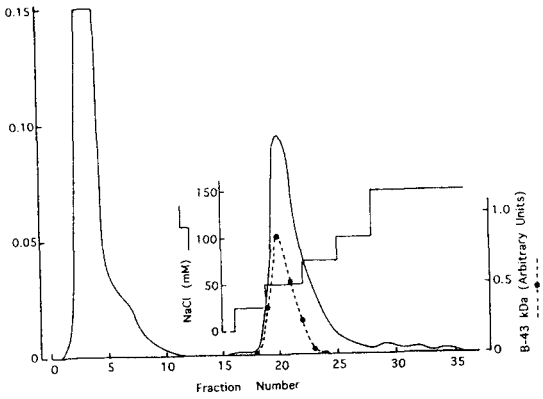


Fig. 3. CM-cellulose column chromatography of B-43

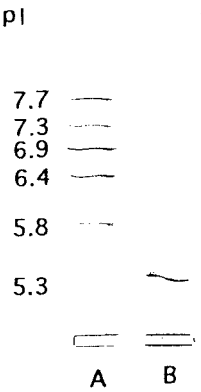


Fig. 4. Isoelectric focusing of B-43

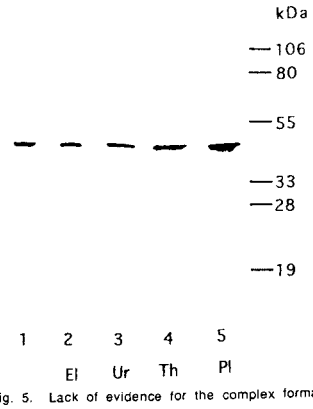


Fig. 5. Lack of evidence for the complex formation of B-43 with proteinases

Comparison of the Amino Acid Composition of Bovine 43 KDa Protein with Those of Human Protease Nexin-I(hPN-I) and Horse Leukocyte Elastase Inhibitor(HLEI)

Amino Acid Residues	Bovine 43 KDa Protein	hPN-I	HLEI
Aspartic acid/ Aspargine	44	41	35
Threonine	28	22	20
Serine	37	33	17
Glutamic acid/ Glutaamine	59	26	37
Proline	18	21	14
Glycine	25	19	19
Alanine	28	28	29
Valine	23	34	14
Methionine	17	10	7
Isoleucine	12	31	16
Leucine	36	31	37
Tyrosine	10	5	10
Phenylalanine	21	19	19
Lysine	4	29	25
Histidine	8	8	7
Arginine	16	14	12
Cysteine	ND	3	2
Tryptophan	ND	5	ND

From Gloor et al. (1986) Cell 47, 687-693.
From Protemps et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 7364-7369.
Not determined.

270 コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの遅発性神経細胞死防止機能

岡本　基，森　秀治
（岡山大学・医療短大・衛生技術）

〔要約〕

脳の主要な細胞外マトリックス分子のひとつであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ＣＳＰＧ）の機能を解明する目的で、ラットの大脳皮質および海馬の初代培養神経細胞を用いて高濃度のグルタミン酸暴露後にみられる遅発性細胞死に対する作用を検討した。新生児ラット脳から精製した可溶性ＣＳＰＧをグルタミン酸暴露直後に添加すると、暴露２４時間後の神経細胞死が有意に減少した。この作用は大脳皮質、海馬のいずれの神経細胞に於いてもみられ、用量依存性であった。また、ゲル濾過で分画したＣＳＰＧを用いた実験結果から２５０ｋＤ，２２０ｋＤのコア蛋白をもつＣＳＰＧ分子が防止作用をもつと考えられた。ＣＳＰＧの防止作用の機序は不明であるが、暴露２時間後の投与でも防止効果がみられたことから、グルタミン酸受容体刺激後に起こる細胞内変化を防止すると考えられた。

【目的】

ＣＳＰＧは脳の主要な細胞外マトリックス分子であり、神経突起の伸展等組織形成に関与することが知られているが[1]、成熟脳にも存在することから組織形成以外の機能ももっていると考えられる[4]。我々は、ラット大脳皮質の初代培養神経細胞を用いて興奮性アミノ酸（ＥＡＡ）による細胞死に対する影響を検討し、ＣＳＰＧがグルタミン酸２４時間暴露による神経細胞死を防止し、これがコア蛋白の作用によることを報告した[2]。本研究ではＣＳＰＧの神経細胞死防止作用を更に検討する目的で、グルタミン酸による大脳皮質および海馬神経細胞の遅発性細胞死に対する防止作用について検討した。

【方法】

ＣＳＰＧは0ohiraらの方法[3]に準じて、生後８～１０日目のＳＤラット脳の可溶性分画からDEAE-Sephacelを用いたイオン交換クロマトグラフィーとSepharose CL4Bを用いたゲル濾過により精製した。神経細胞は胎生１８日目のＳＤラット脳からトリプシン消化により調製し、１０％ＦＣＳを含むダルベッコ改変ＭＥＭ／ハムＦ１２等比混合培地（ＤＦ培地）に懸濁後、5×10^5／cm^2の濃度で２４穴プレートに撒いた。培養７日目に暴露用電解質液中で１０分（大脳皮質）ないし５分（海馬）グルタミン酸に暴露した後、トランスフェリン、インスリン、プロゲステロン、セレニウムを含む無血清ＤＦ培地に切り替え、２４時間後に培養上清中のＬＤＨ活性を測定し、神経細胞死の指標とした。ＣＳＰＧは、原則としてコア蛋白にして１０μｇ／ｍｌの濃度で、暴露直後に無血清ＤＦ培地に添加した。

【成績】

大脳皮質神経細胞は、グルタミン酸濃度５０～１０００μＭの範囲で有意な遅発性細胞死を引き起こし、１００～１０００μＭの範囲でＣＳＰＧの防止効果がみられたので、以下の実験では大脳皮質、海馬とも２００μＭ濃度で暴露した。このグルタミン酸濃度では、ＣＳＰＧはコア蛋白にして１～２０μｇ／ｍｌの濃度で用量依存性に大脳皮質および海馬神経細胞の遅発性細胞死を防止した。ＣＳＰＧの添加時期をグルタミン酸暴露直後、２、６、および１２時間後で比較したところ、大脳皮質、海馬神経細胞のいずれにおいても暴露直後と２時間後に添加した場合に防止効果がみられ、６および１２時間後にはみられなかった（図１、）。　以上の実験で添加したＣＳＰＧは数種の異なる分子の混合物と考えられるので、どの分子が防止作用をもつかを検討する目的でSepharose CL4B溶出分画を３つの分画に分けて採取し、防止効果を比較したところ、早期に溶出される分画Ⅰ、Ⅱ（Kav＝0.1～0.4）で防止効

果がみられ、分画Ⅲ（Kav＝0.4～0.6）ではみられなかった。各分画をコンドロイチナーゼABC消化物後SDS－PAGEで分析したところ、分画Ⅰ、Ⅱには250kD、220kDのコア蛋白が含まれていたが、分画Ⅲには含まれていなかった。また、cycloheximide, actinomycin D, aurintricarboxylic acid(ATA)の防止効果を検討したところ、前二者は効果を示さなかったが、ATAは大脳皮質神経細胞でのみ防止効果がみられ、海馬神経細胞ではみられなかった。

【考察】

本研究の結果は、脳可溶性CSPGが初代培養神経細胞を用いたin vitroの系でグルタミン酸による遅発性神経細胞死を防止することを示している。興奮性アミノ酸による遅発性細胞死は、脳虚血、酸素欠乏、てんかん発作重積状態でみられる神経細胞死や慢性変性疾患における神経細胞脱落の原因のひとつとされており[1]、CSPGがin vivoでもこうした病的状態における神経細胞死に関わっていることを示唆するものである。

CSPGの作用機序は不明であるが、グルタミン酸暴露2時間後の投与でも防止効果がみられたことから、グルタミン酸受容体刺激後におこる細胞内変化を防止すると考えられる。また、この遅発性神経細胞死防止作用には主に250kDまたは220kDのコア蛋白が関与していると考えられる。ATAの防止効果から、大脳皮質神経細胞ではendonucleaseが細胞死に関与するが、海馬神経細胞では関与しないこと、CSPGはendonuclease活性抑制とは別の機序で細胞死を防止することが示唆されたが、これらの点については今後更に検討が必要である。

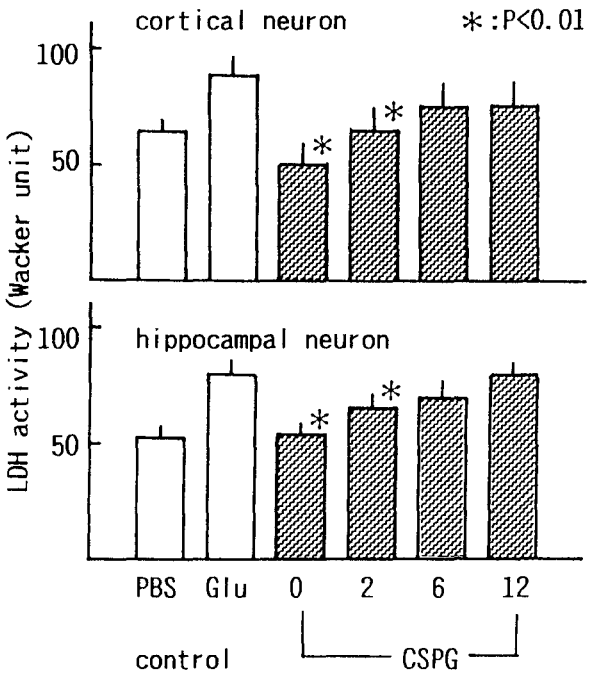


図1．CSPG添加時期と遅発性神経細胞死防止効果
大脳皮質神経細胞は10分間、海馬神経細胞は5分間、電解質溶液中で200μMのグルタミン酸に暴露した。暴露後無血清培地に交換し、直後、2，6，および12時間後にCSPGをコア蛋白にして10μg／ml濃度で添加し、暴露24時間後に培地中のLDH活性を測定した。PBS：グルタミン酸のかわりにPBS（－）に暴露。Glu：グルタミン酸暴露後、CSPGのかわりにPBS（－）添加。

1.Choi, D.W., (1988) Neuron 1:623-634
2.Okamoto, M., et al.(1994) Brain Res., 637:57-67
3.Oohira, A., et al.(1991) J. Neurosci., 11:822-827
4.Rauch,U., et al.(1992) J. Biol. Chem. 267:19536-19547

271 シナプス後神経細胞脱落後残存シナプス前神経終末の機能的意義：虚血性グルタミン酸放出

三谷　章、松田　正司*、阪中　雅広*、片岡　喜由
（愛媛大学医学部　第一生理、*第二解剖）

〔要約〕

target cell を失った残存シナプス前神経終末の機能的意義を明らかにするための一研究として、残存シナプス前神経終末からの虚血性グルタミン酸放出を検索した。3.5分間脳虚血の前処置によりスナネズミ海馬CA1野にあらかじめ錐体細胞死を発生させた。この海馬CA1野では平均70％のシナプス前神経終末が残存していた。再度負荷された5分間脳虚血に対し細胞外グルタミン酸レベルは有意な増加を示さなかった。このことから、target を失った残存シナプス前神経終末が、虚血性高濃度細胞外グルタミン酸放出により周囲の神経細胞及びグリア細胞に拡延性神経障害を起こす可能性は少ないと思われる。

〔目的〕

中枢神経系において、target cell を失ったシナプス前神経終末がその脳領域に比較的長期間残存していることが多くの脳疾患で知られている。たとえば、一過性脳虚血により神経細胞死が発生した脳領域においては、数カ月間ほぼ正常な形態学的特徴を備えたシナプス前神経終末が残存していることが報告されている（2）。脳虚血性神経細胞死の場合、このtarget を失ったシナプス前神経終末が周囲の神経細胞及びグリア細胞に何らかのシナプス外情報伝達を行い拡延性神経障害を起こす可能性も考えられるが、その機能的意義は不明である。本研究では、このtarget を失った残存シナプス前神経終末の機能的意義を明らかにするための一研究として、残存シナプス前神経終末からの虚血性グルタミン酸放出を検索した。

〔方法〕

スナネズミ海馬CA1野の錐体細胞を脱落させるために、マイクロダイアリシス実験７日前にハロセン麻酔下で3.5分間の一過性脳虚血を負荷した。7日後、ハロセン麻酔下にて、そのような処置を施したスナネズミの海馬CA1野に0.5mm（膜長）マイクロダイアリシスプローブを装着し、5分間脳虚血負荷により放出される細胞外グルタミン酸を2分30秒毎に回収し、回収液に含まれるグルタミン酸量を酵素的サイクリング法にて定量した。実験終了後、動物を深麻酔下にて経心臓的に灌流固定し、光学顕微鏡を用いてプローブの位置及びCA1錐体細胞死発生の確認を、電子顕微鏡を用いて残存シナプス前神経終末数の計測をそれぞれ行った。

〔結果〕

錐体細胞死を起こしている海馬CA1野において、平均70％のシナプス前神経終末が残存

していた（図1）。このような海馬CA1野においては、5分間一過性虚血中、通常この動物で認められる虚血前値の15-20倍の高濃度細胞外グルタミン酸流出は観察されず、虚血前値のわずか2倍程度の細胞外グルタミン酸レベルの増加が観察された（図2）。

〔考察〕

虚血中濃度上昇するグルタミン酸の起源として、以前はグルタミン酸作動性神経終末から放出される伝達物質としてのグルタミン酸がその起源として考えられていたが、その後の研究（1、4）によりこの考えは不適当で、虚血性グルタミン酸放出におけるシナプス前神経終末からの放出成分はあまり多くないと考えられるようになった（3）。今回、シナプス前神経終末がそのtarget を失うことにより機能変化を起こし虚血性細胞外グルタミン酸放出を起こす可能性を検討したが、そのような結果は得られなかった。今後は、target cell を失った残存シナプス前神経終末が通常どのようなシナプス外情報伝達に関与しているのかについて検討する。

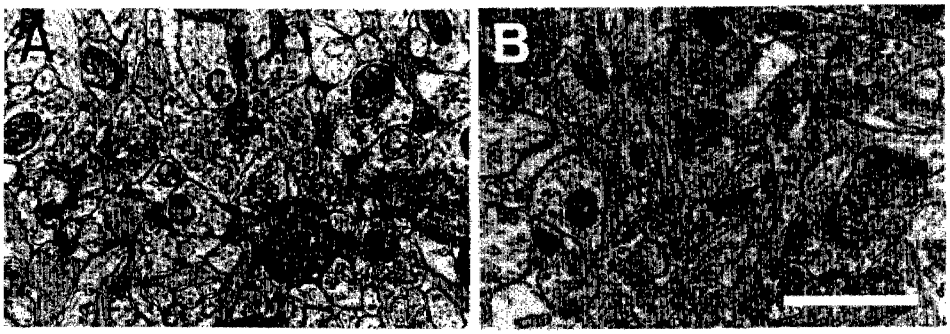


図1　スナネズミ海馬CA1野の電顕像．A: 7日前に負荷された3.5分間脳虚血の前処置により錐体細胞は脱落しているが，シナプス前神経終末は正常像を呈している．B: Sham-control. Bar=1 μM.

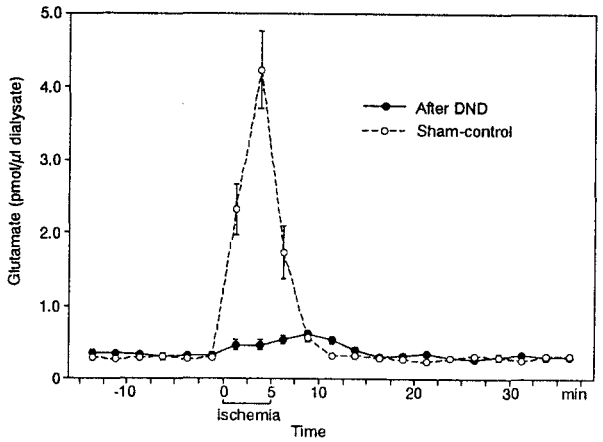


図2　海馬CA1野における虚血性細胞外グルタミン酸レベルの変化．
—●—はCA1錐体細胞が脱落し，シナプス前神経終末が平均70％残存している海馬CA1野での変化．-○-は Sham-control．データは平均値±SEM.（ともにn=6）縦軸は2.5分ごとに回収された回収液中のグルタミン酸レベル．横軸は虚血開始時刻からの時間（分）.

〔文献〕(1) Kauppinen, R. A., McMahon, H. T., and Nicholls, D. G. (1988) *Neurosci.* **27,** 175-182 (2) Kirino, T., Tamura, A., and Sano, K. (1990) *Brain Res.* **510,** 17-25 (3) Mitani, A., Andou, Y., Matsuda, S., Arai, T., Sakanaka, M., Kataoka, K. (1994) *J. Neurochem.* in press (4) Sánchez-Prieto, J., and González, P. (1988) *J. Neurochem.* **50,** 1322-1324

272 脳虚血後のラット脳のアセチルコリンの変化

金光秀晃、中込忠好、久保田勝、岩崎克典*、藤原道弘*、田村晃
（帝京大学・医・脳神経外科、*福岡大学・薬学部・応用薬理）

〔要約〕
中大脳動脈(MCA)閉塞による脳虚血後のラット脳のアセチルコリンレベルの経時的変化を測定した。アセチルコリンはＨＰＬＣ－ＥＤ法を用いて行なった。虚血側の大脳皮質、尾状核被殻のアセチルコリンレベルは対照群(sham手術群)に比べて有意な低下が見られた。しかしながら、虚血側の視床、反対側のアセチルコリンレベルは対照群に比べて変化がなかった。

［目的］　アセチルコリンは重要な神経伝達物質の一つであり、空間認知障害に関与していると言われている。我々は以前、局所脳虚血後の空間認知障害がアセチルコリンレベルの低下に関与していることを報告した[1]。今回は局所脳虚血後空間認知訓練を始める前の1-4週間目のアセチルコリンの経時的変化を追ってみた。
［方法］　290-330gの雄wisterラットの左MCA を2%ハロセン吸入麻酔下で閉塞した。手術は田村ら[2]のMCA閉塞モデルを用いた。動物を側位に固定し、経眼窩的に電気双極凝固鑷子によって左MCA を永久的に閉塞した。対照群としては、左MCAを露出しただけのsham手術ラットを用いた。ラットは手術 1，2，4 週間後、マイクロウェーブで処理・断頭し、大脳を素早く摘出し、虚血中心である尾状核被殻、大脳皮質、視床部分を摘出、重量測定した。それらの部分を500μlの1Nギ酸-アセトン（15:85）の混合溶液を加えて超音波破砕器で30秒間ホモジナイズした。20分間氷冷後、20分遠心した。450 μlの上清をエッペンドルフチューブにとり、同量のエーテルを加えて20分間振盪し、再び20分間氷冷後、遠心した。下層の水層を採取し、窒素ガスで蒸発乾固後、測定するまで-80℃で保存した。100μlの蒸留水で試料を溶かし、HPLC-ED法でアセチルコリンを測定した。
［成績］　図に示すように、虚血側の大脳皮質、尾状核被殻のアセチルコリンレベルは脳虚血後 1，2 週間目、大脳皮質では 4 週目においても対照群に比べてと有意に低下した。一方、虚血側の視床は対照群に比べてと有意な低下はみられなかった。反対側に関しては3部分とも対照群に比べてと有意な低下はみられなかった。
［考察］　これらの結果よりMCA閉塞によりマイネルト核より大脳皮質への投射するアセチルコリン作動性システムが傷害され、大脳皮質、尾状核被殻のアセチルコリンレベルが低下したことが暗示され、空間認知傷害の原因となることが示唆された。
［文献］
1) Kanemitsu, H., Tamura, A., Nagashima, H., et. al. (1991) J. Cereb. Blood Flow Metabol. 11(Supl. 2):S111
2) Tamura, A., Graham, D.I., McCulloch, J., et. al. (1981) J. Cereb. Blood Flow Metabol. 1:53-60

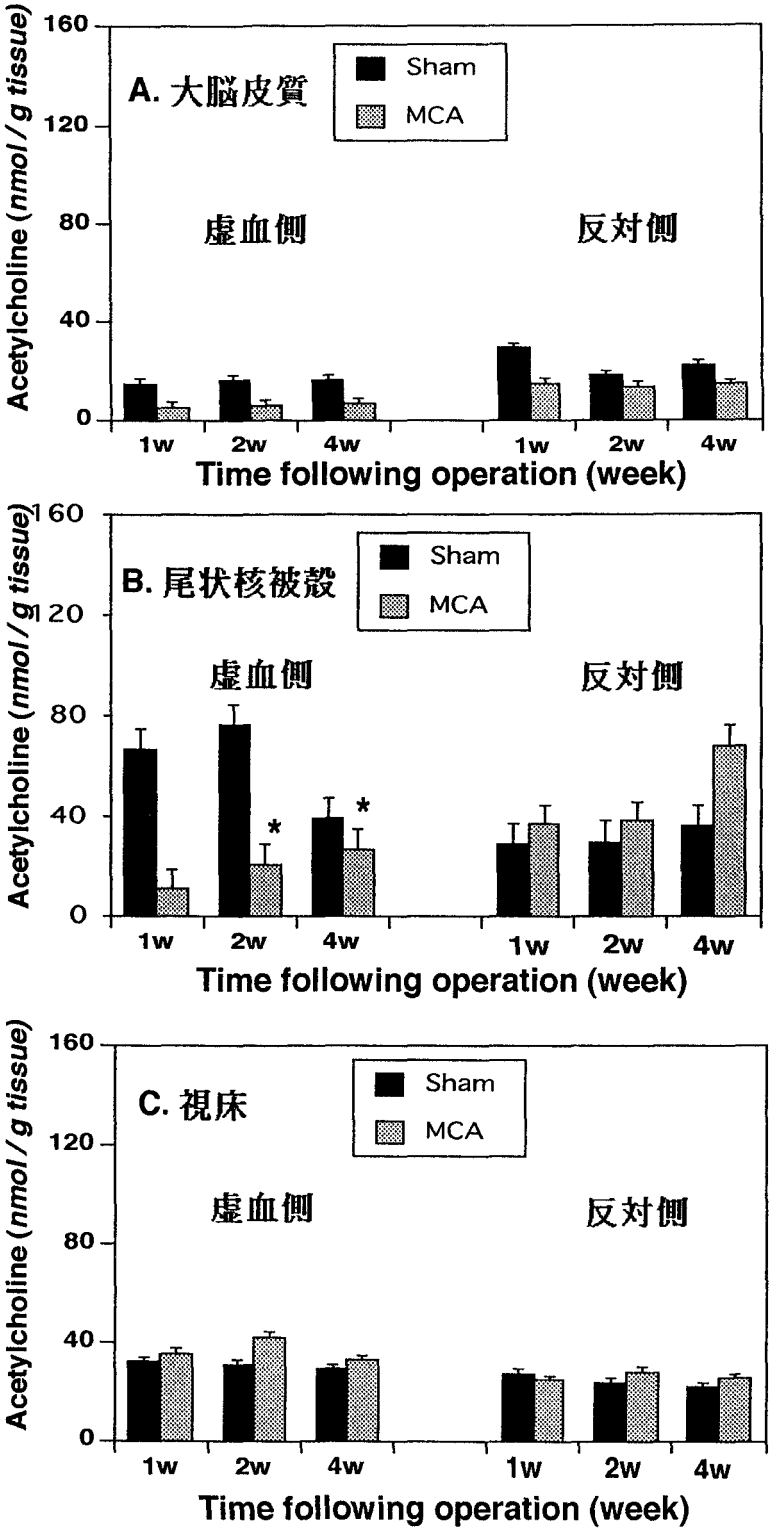


図
脳虚血後のアセチルコリンレベルの変化

数値は平均±標準誤差

MCA群の各値はSham群の対応する値と*t'test*で比較された。(3 way ANOVA followed by post hoc analysis)

(* $p<0.05$)

273 ラット大脳皮質修復過程における神経ペプチド 発現の動態

重吉康史、岡村 均*、阿部廣巳、井端泰彦*、千原和夫
【神戸大学第三内科、京都府立医大第二解剖*】

［要約］ 最近、種々の神経ペプチドが、神経伝達物質、神経修飾物質としての作用以外にも神経栄養因子としての作用をもつことが明らかとなってきている。今回我々は、大脳皮質に物理的な傷害を与え、その周辺に生じる神経伝達物質、特に神経ペプチドの mRNA レベルにおける変化を解析した。ラットの大脳皮質体性感覚野に深さ1mm－3mm の傷害を作成し、その後２日目、５日目、７日目にペントバルビタール麻酔下において左室より還流固定を行ない脳を取り出した後、cRNA プローブを用いた in situ hybridization 法を用いて mRNAの発現量を解析した。その結果、VIP mRNA は傷害近傍の大脳皮質の細胞に於て著明な増加反応を示した。増加反応は特に傷害後５日目においてあきらかであった。ENK mRNA は傷害部位に隣接して認められ、大量の密集した細胞が強い ENK mRNA シグナルを示した。特に正常部位と傷害部位の境界の細胞において著明な増加反応を示した。GAD mRNA はわずかに反応の増強が認められるが CCK, SOM の mRNA は特異的な反応を示さなかった。これらの反応は神経系の生存、再生に関与するとおもわれる。

［目的］ 神経系の傷害に対して、傷害部位では複雑な神経修復機転が生じる。それに伴い、傷害部位においてNGF, FGF, TGF などの成長因子およびその受容体が増加することが、免疫組織学、in situ hybridization 法などによって明らかになってきた(1)(2)。最近、種々の神経ペプチドが、神経伝達物質、神経修飾物質としての作用以外にも神経栄養因子としての作用をもつことが明らかとなってきている。今回我々は、大脳皮質に物理的な傷害を与え、その周辺に生じる神経伝達物質、特に神経ペプチドのmRNAレベルにおける変化を観察することにより神経組織の修復過程に於ける神経ペプチドの動態を解析した。

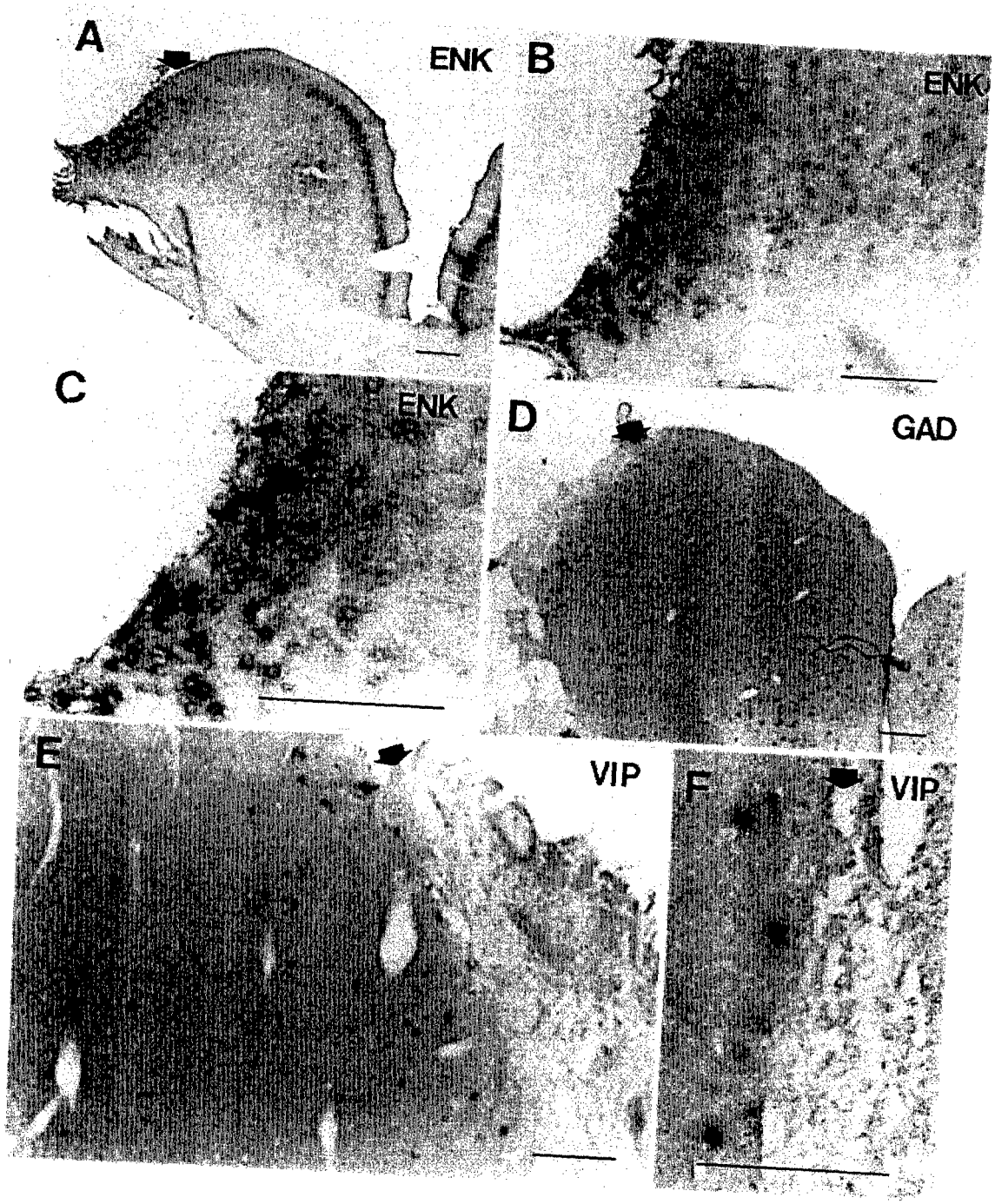
［方法］ ８週令Wistar 系雄ラットの体性感覚野に深さ 1mm－3mmの傷害を作成し、その後２日目、５日目、７日目に左室よりペントバルビタール麻酔下において還流固定を行ない脳を取り出した後、Digoxigenin および ^{35}S にてラベルした cRNA プローブ (Vasoactive intestinal peptide (VIP), Enkephalin (ENK), Glutamate decarboxylase (GAD), Cholecystokinin (CCK), Somatostatin (SOM)) を用いた in situ hybridization 法にて mRNA の発現量を解析した。

［結果］ 傷害近位部の大脳皮質に於て強い VIP mRNA のシグナル を示す細胞を認めた。この反応は特に傷害後５日目においてあきらかであった。mRNAの増加した細胞は、大脳皮質の二層、三層を中心に散在性に存在した。VIP mRNA をもつ細胞の分布密度は傷害近位部に於ても、反対側の非傷害対象部位との差を認めなかった。ENK mRNA もまた、傷害部位近傍において著明な増加を示した。mRNAの増加は傷害後７日目に最も著明であった。これらのmRNAの増加した細胞は、ほとんどが傷害部位と正常組織の境界部に集簇性に存在した。GAD mRNA シグナルは傷害部近傍の大脳皮質では上昇する傾向はあるものの、著明な差は認めなかった。CCK, SOM, の mRNA は特異的な反応を示さなかった。

［考察］ 最近神経ペプチドの神経栄養因子作用について種々の報告がなされている(3)。その中でも、VIP は様々な神経栄養因子作用を示すこと、即ち、発生初期に於ける脳内の諸細胞に対して分裂を促進すること、アストログリアに作用して神経栄養因子を分泌させ神経細胞死を抑制することなどが知られている。今回の実験に於て傷害近傍に於て VIP mRNA のを強く発現している細胞を認めた。これらの細胞は層構造を有し、分布パターンが非傷害側の同部位と近似していることにより、通常存在している VIP 神経細胞中の VIP mRNA が増大している所見と考えられる。傷害部位には神経膠細胞の集積が存在し、神経膠細胞を介し神経栄養因子作用を示すVIPが増加することは、神経細胞の生存、維持、再生、に対して合目的な反応と考えられる。ENK mRNA もまた、傷害部位近傍の細胞において著明な増加反応を示した。傷害部位と正常組織の境界部の神経膠細胞増生部位に集簇性に存在することは、この ENK mRNA を発現している細胞は神経膠細胞である可能性を示唆しているが、その解明は今後の検討課題である。

（文献）

1) Logan et al. J. Neuroscience 12, 3828-3837
2) Lindholm et al. J. Cell. Biol. 117, 395-400
3) Fleur et al. Physiol. Reviews 71, 1017-1046



Digoxigenin-labeled cRNA プローブを用いた in situ hybridization. 矢印は傷害部位を表す. (A) (B) (C) 傷害部近傍のENK mRNA の分布。傷害部に接する大脳皮質に大量の ENK mRNA を持つ細胞が集積している。 (D) 傷害部近傍の GAD mRNA の分布。(E) (F) 傷害部近傍のVIP mRNA の分布。傷害近傍に於てVIP mRNA を強く発現する細胞を認める。 Bar = 200 μ m

274 ラット大脳皮質における局所脳虚血再潅流後の蛋白質の質的量的変化

○北原功雄＊、萩原民雄＊＊、水島秀勝＊、松本清＊、竹田　稔＊＊
昭和大学　脳神経外科＊　第１生化学＊＊

〔要約〕
ラット大脳皮質において一時的局所脳虚血モデルを作成し、虚血再潅流後の脳に起こる蛋白質の質的量的変化をSDS-PAGE法により経時的に調べた。コントロール側および虚血側より調製した各細胞画分のうち、虚血側のサイトゾール画分にのみ8種の蛋白質の増加を認めた。このうちの1つはアミノ酸配列分析からアルブミン、またもう1つは特異抗体との反応性からトランスフェリンと同定された。この2種を含めた8種の蛋白質はいずれも血清由来の蛋白質であり、虚血再潅流後、16時間と8日にピークを示す二峰性の増加パターンを示した。これら血清由来の蛋白質の出現する機構は不明であるが、血管透過性を抑制する薬剤の前投与のみでは著明に抑制することはできなかった。

【目的】臨床的に脳梗塞をはじめとする虚血性疾患においては、脳虚血により脳実質細胞、特に神経細胞に何らかの障害が加わり、脳実質内部環境に急激な変化が起こる。この変化に対処するため種々の情報が伝達制御され、結果として様々な変化が起こる。今回我々は虚血侵襲後に起こる脳の変化を探る目的で蛋白質の量的、質的変化について検討した。

【方法】全身麻酔下、Wistar系成熟雄ラット(300g)の右中大脳動脈をクリップにて、30分間遮断後再潅流し、一過性脳虚血モデルとした。右側を虚血側、左側を非虚血側として、再潅流後経時的に大脳皮質を採取して、常法に従い細胞分画を行い、各細胞分画に含まれる蛋白質をSDSーポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）法により比較検討した。又デキサメサゾン、インドメサシン、NO阻害剤の投与により、これら血清由来蛋白質の出現が抑えられるか否かについて検討した。

【結果、考察】虚血再潅流後、1、2、4、8、16時間、1、2、4、8、16、30日を経た大脳皮質に存在する蛋白質を経時的に比較すると、サイトゾール画分では3～4種の蛋白質が偽手術と比較して増加していたが、他の画分では顕著な差は認められなかった。これらの蛋白質は、虚血再潅流後8時間から認められ、16時間及び8日目にピークを示す二峰性の増加パターンを示した(図1)。この中で最も量的に多い67kDaの蛋白質をイオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて単離精製した後、TPCK-トリプシン消化し、得られたペプチドフラグメントをアミノ酸配列分析したところアルブミンであることが明らかになった(図2)。この結果からアルブミン以外の増加蛋白質も血清由来である可能性を考え、抗ラット全血清抗体を用いたイムノブロット法により調べたところ、蛋白質染色で確認できた4種を含む7種の蛋白質がアルブミンと類似した増加傾向を示し、いずれも血清由来であることが示唆された。またそのうちの１つは特異抗体との反応性からトランスフェリンであると同定された。これらの蛋白質の出現する機構として血管壁の破綻による血管外への蛋白質の濾出が考えられ、血管透過性を妨げる薬剤の投与を施行したところ、インドメサシン、デキサメサゾンの大量投与により若干抑制されたものの、明らかなものとはいえなかった。

【結論】虚血再潅流後、大脳皮質にアルブミン、トランスフェリンを含む複数の血清蛋白質の増減が見られた。これらは、ほぼ２週間で虚血前と同じ状態となる。これらの血清蛋白の出現する機構は、血管透過性の亢進による蛋白質の濾出以外にも多くの因子が考えられるようである。その役割は現在検索中であるが、これらの蛋白質の二峰性の増加パターンは虚血侵襲後の脳の障害を考える上で興味深い。

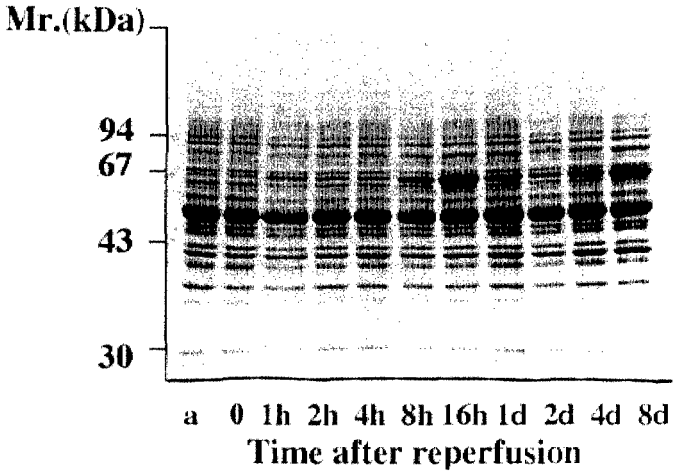


図１：ラット大脳皮質における虚血再潅流後の蛋白質の経時的変化
（10%ポリアクリルアミドゲル、クマシーブル染色）
a:無処置 h:虚血再潅流後の経過時間を示すd:虚血再潅流後の経日を示す

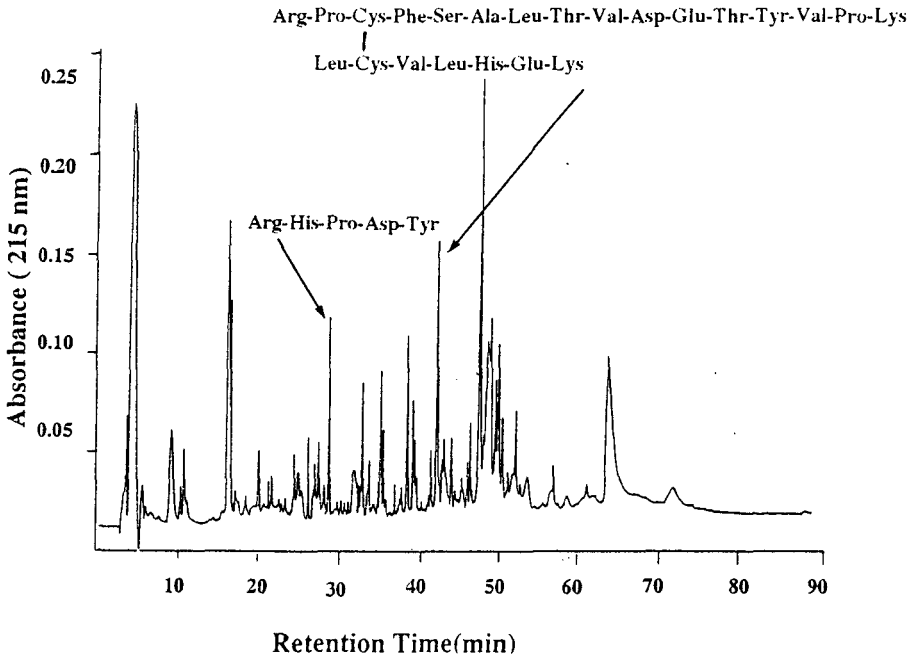


図２：虚血再潅流後の増加する67kDaの蛋白質のペプチドマップと部分アミノ酸配列

275 慢性脳血流低下モデル動物に特徴的な白質障害の形成機序について

車谷隆宏、武田雅俊、工藤　喬、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週間以上飼育した成熟モンゴル砂ネズミを作成した。
このモデル動物では脳血流低下状態の持続と共に増大する白質病変の出現が高頻度に認められた。今回はこの白質病変の発現機序を明らかにするために白質の構成蛋白について検討を行なった。
慢性脳血流低下モデル動物ではウェスタンブロッティング法により、白質ホモジェネート中のグリア線維性酸性蛋白（ＧＦＡＰ）が正常対照群の約３．５倍に有意に上昇しており、リン酸化ニューロフィラメント２００ｋ（ｐＮＦ２００ｋ）の減少傾向とミエリン塩基性蛋白（ＭＢＰ）の有意な減少が認められた。ＭＢＰ量についてＥＬＩＳＡ法により検討したところモデル動物において約７０％に減少していた。
これらの結果から、白質の構成物のうち少なくとも軸索髄鞘が障害されていることが確認された。

緒言）
われわれは慢性的な脳血流低下が脳機能に及ぼす影響を検討する目的で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モデル動物として検討を加えてきた。このモデル動物では、ステップダウン方式受動回避反応の学習能が低下し、また、脳室拡大、白質粗鬆化等の白質病変の出現が高頻度であり、しかもこれらの病変は血流低下時間と共に増大した[1),2),3)]。
今回は、このような白質病変の発現機序を明かにすることを目的として、白質の主要構成物である軸索、軸索髄鞘およびアストロサイトのマーカーを用いて以下の検討を行なった。

方法）
外科処置
成熟モンゴル砂ネズミ（雌、体重６０－８０ｇ、日本動物）の片側総頸動脈をペントバルビタール麻酔下（７０ｍｇ／ｋｇ）に露出し、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に加工したコイル状クリップを装着して狭窄をくわえ、１週間の回復後、他側総頸動脈にも同様の狭窄をくわえ、これを慢性脳血流低下モデル動物群とした。一方、同じコイルを総頸動脈に触れる操作だけ（疑似手術）を行なったものを対照群とした。手術後２カ月間飼育した慢性脳血流低下モデル動物群と対照群について、以下の検討を行なった。

ウェスタンブロッティング
蛋白濃度を一定に希釈した対照群とモデル動物群の白質ホモジェネートを７．５％ゲルにて電気泳動し、これをイモビロン（Ｂｉｏ　Ｒａｄ）に転写して、モノクロナル抗ＧＦＡＰ抗体（Ａｍｅｒｓｈａｍ）、モノクロナル抗ｐＮＦ２００ｋ抗体（Ａｍｅｒｓｈａｍ）、モノクロナル抗ＭＢＰ抗体（Ｓｅｒｏｔｅｃ）をそれぞれ一次抗体として反応させた。発色はアルカリフォスファターゼ発色基質（Ｂｉｏ　Ｒａｄ）にて行なった。それぞれバンドの濃度をデンシトメトリー（島津ＣＳ－９０００）を用いて計測した。

ＥＬＩＳＡ
総蛋白濃度を０．２μｇ／μｌとなるように希釈した白質の各ホモジェネートを試料とし、モノクロナル抗ＭＢＰ抗体を固相化抗体、ポリクロナル抗ＭＢＰ抗体を第１抗体としたサンドウィッチ法を用いて、対照群およびモデル動物群のＭＢＰ量を比較検討した。第２抗体にはアルカリフォスファターゼ標識のものを用い、発色はＰＮＰＰで行った。

結果）
ウェスタンブロッティング
図１に、抗ＧＦＡＰ抗体による白質ホモジェネートのウェスタンブロッティングを行い、デンシトメトリーにて定量した結果を示す。モデル動物ではＧＦＡＰが対照群の約３．５倍に有意に上昇していることが認められた。

図２に抗ｐＮＦ２００ｋ抗体によるウェスタンブロッティングの結果を示す。モデル動物においてｐＮＦ２００ｋの減少傾向が認められた。

図３に抗ＭＢＰ抗体によるウェスタンブロッティングの結果を示す。モデル動物においてＭＢＰが有意に減少していることが認められた。

図１から３は、いずれも対照群を１とした。

ＥＬＩＳＡ

図４にＥＬＩＳＡによる白質ホモジェネートのＭＢＰの定量結果を示す。モデル動物においてＭＢＰが対照群の約７０％に減少していることが認められた。

考察）

このモデル動物の特徴的な神経病理学的所見は脳室拡大と白質粗鬆化で、しかもこの白質病変は脳血流低下時間と共に増大するものであった。今回ウェスタンブロッティングとＥＬＩＳＡを用いた定量により、このモデル動物では軸索髄鞘の主要蛋白であるミエリン塩基性蛋白の有意な減少が示された。これらの結果から、白質の構成物のうち少なくとも軸索髄鞘が障害されていることが確認された。

これに対してリン酸化ニューロフィラメント２００ｋについては今回の検討結果では有意な差は得られず、更に検討を要するものと思われる。リン酸化ニューロフィラメント２００ｋは老化脳、アルミニウム接種脳等において増加することが報告されており、また本モデル動物でも神経病理学的検討により大脳基底核におけるリン酸化ニューロフィラメント２００ｋの増生を既に報告している。今後はリン酸化・非リン酸化ニューロフィラメント２００ｋを認識する抗体を用いたＥＬＩＳＡによる検討などを加えて、リン酸化、非リン酸化ニューロフィラメント２００ｋそれぞれの量変化の検討を行なう予定である。

グリア線維性酸性蛋白の増加は既に報告した神経病理学的検討の結果とよく符合するものであり、反応性アストロサイトの増生が白質における変化になんらかの関連を有することを示唆しているものと思われる。

近年、脳血管性痴呆のうち進行的な白質病変を特徴とするビンスワンガー病が注目されている。本モデル動物は学習能の低下と進行的な白質病変を呈し、ビンスワンガー病の病態に近い可能性が示唆される。我々は、白質構成タンパクの経時的変動を検討することで、慢性脳血流低下にともなう白質病変の発生機序、さらにビンスワンガー病の発生機序について何らかの示唆を得られるのではないかと考えており、今後もこれらについて更に検討を加える予定である。

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

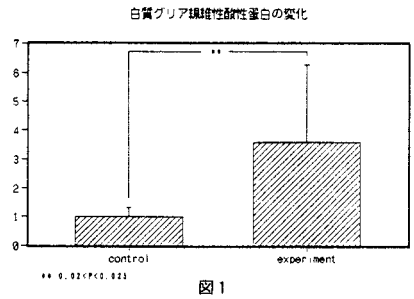


図１

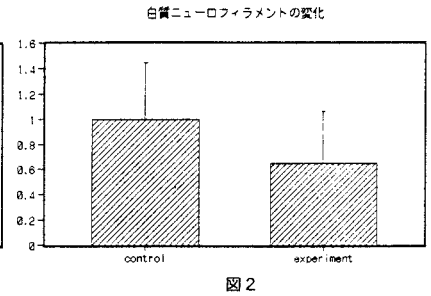


図２

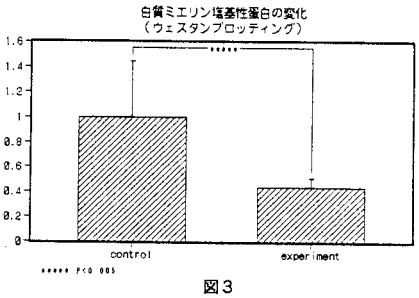


図３

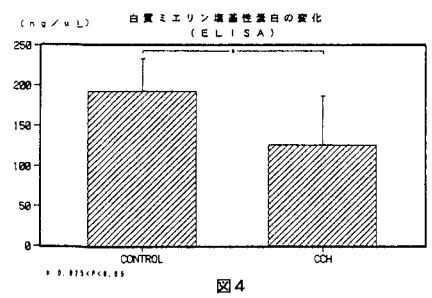


図４

276 ＰＣ１２細胞死における蛋白質リン酸化 ――プロテインフォスファターゼの検討

小野寺宏，岩本竜明，武田篤，望月るり子，糸山泰人，
小林孝安*，田村真理*
（東北大学医学部神経内科，＊東北大学加齢研遺伝子情報）

〔要約〕

神経細胞死における蛋白質リン酸化機構の重要性が報告されているが，細胞死を誘導した場合の蛋白質脱リン酸化酵素については殆ど解析されていない．NGF除去によるPC12細胞死をモデル系として，（1）細胞死誘導時の蛋白質リン酸化レベルの変化をパルスラベルにより，（2）チロシンリン酸化蛋白をウエスタンブロットにより，（3）serine／threonine protein phosphataseの発現レベルをノーザンブロットによりそれぞれ検討した．細胞死の誘導により40, 38, 32, 18 kDaのリン酸化蛋白のスポットが消失し，100 KDaのスポットがあらたに出現した．細胞死が不可逆的となるNGF除去48時間後には，チロシンリン酸化蛋白のバンドの多くが認められなくなった．細胞死の誘導後にもprotein phosphatase(ppと略) pp1, pp2A,pp2CのmRNAの変動は認められなかった

蛋白のリン酸化と神経細胞死との関連が注目されているが，神経変性疾患における蛋白リン酸化異常はプロテインキナーゼを中心に研究されてきた．異常にリン酸化を受けた蛋白の蓄積は脱リン酸化酵素が正常の機能を失っている事の反映でもある．神経栄養因子の欠乏が神経細胞死の重要な誘因のひとつだが，NGFにより神経様細胞に分化したPC12 (rat pheochromocytoma)は，培養液中のNGFを除去約３日後に細胞死に陥る事が知られている．しかもNGF除去翌日であればNGFの再投与により細胞死を抑止しうる．そこで，PC12細胞死をモデル系として神経細胞死誘導時の蛋白質脱リン酸化酵素の変化について検討した

方法

PC12細胞をNGF(50 ng/ml)にて神経様細胞に分化させ11-12日間培養後，培地よりNGFを除去して細胞死を誘導した．（１）蛋白リン酸化レベル；NGF分化，NGF除去24時間後，48時間後の各群において，無機リン（0.1mCi/2.5 ml）で90分ラベルし，二次元電気泳動後オートラジオグラムを得た．（２）蛋白のチロシンリン酸化；定法どおりSDS-ポリアクリルアミド電気泳動後，ウエスタンブロットにより検討した．（３）serine/threonine protein phosphatases；NGF分化，NGF除去24時間後，36時間後，48時間後の各群におけるpp1,pp2A, pp2Cの各catalytic subunitのmRNAレベルをノーザンブロットにより検討した．

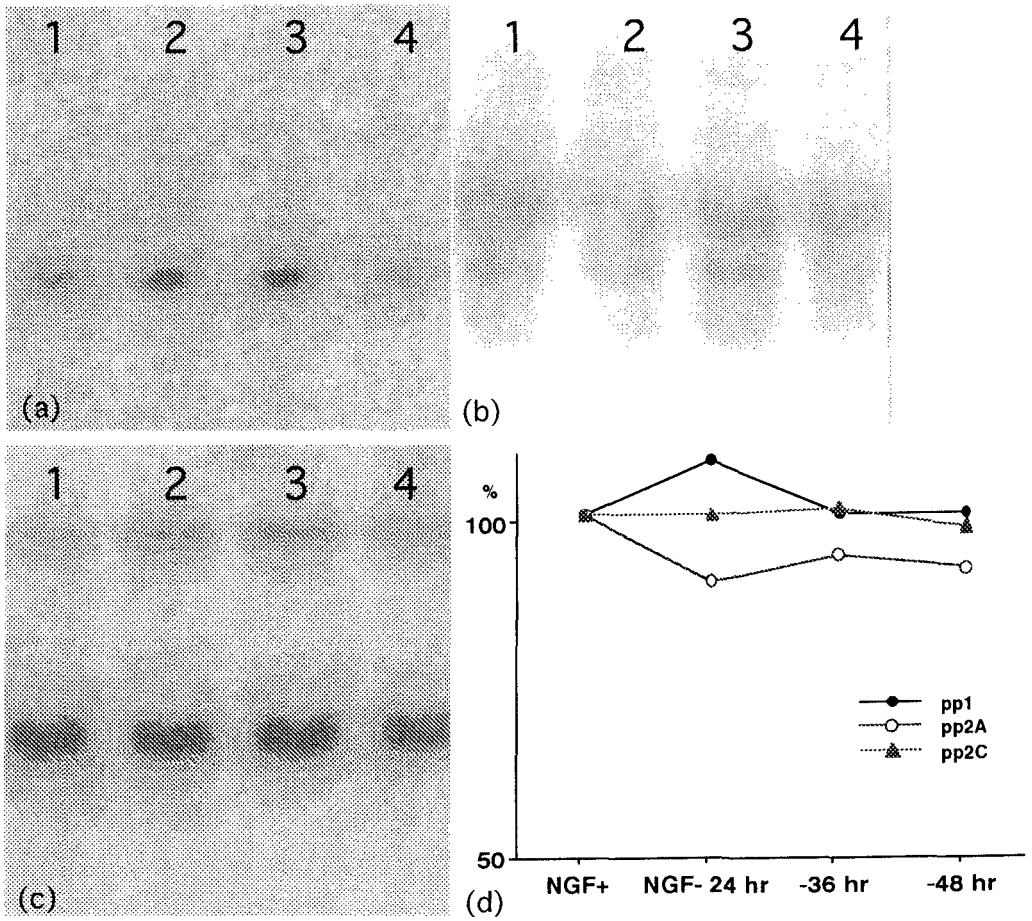
結果と考察

蛋白のリン酸化レベルをNGF分化群と比較すると，NGF除去24時間後，40,38, 32,18 kDaのスポットが減弱消失した．これらのスポットはNGF除去48時間後にも同様の変化を示した．一方，NGF除去48時間後には100 kDa(PI=4-5)の蛋白のリン酸化が著明に増強していた．チロシンリン酸化蛋白は，NGF除去24時間後ではNGF非除去群との差は著明ではなかったが，NGF除去48時間後120,50 kDaのバンドが減弱していた．protein phosphatase catalytic subunitのうち，pp2Aの

mRNAレベルがNGF除去後にわずかに減少する傾向があったが，pp1,pp2Cのレベルには変化が無かった．

PC12細胞はNGFにより神経様細胞に分化するが，NGF刺激はNGF受容体-trkを介するチロシンリン酸化からMAP kinase等へと引き継がれる．神経細胞死においてMAP kinase以降のシグナル伝達機構がどのように関与しているかは不明だが，細胞死に先行するリン酸化レベルの変化が認められる事から，脱リン酸化酵素の活性も変動していると考えられる．pp2Cを除くserine/threonine protein phosphataseは活性サブユニットと種々の調節サブユニットとのヘテロポリマーを形成しており，さらにpp1のように不活化蛋白との結合による活性調節を受けている場合もあるので，本細胞モデルでは，転写翻訳後のレベルでフォスファターゼ活性が制御されていると推測された．

図1
NGF除去後PC12におけるserine/threonine protein phosphatase 1,2A,2C mRNAレベル（ノーザンブロット）．(a)pp1, (b)pp2A, (c)pp2C, (d)mRNA シグナルの経時変化．レーン1，分化群；レーン2，NGF除去24時間；レーン3，NGF除去36時間；レーン4，NGF除去48時間



277　小脳形成期に特有なタンパク質の検索と同定

内田　和久[1,2]、中山　洋[1]、篠田　友孝[1]、礒辺　俊明[1]
([1]東京都立大学・理学部、[2]協和発酵・東京研究所)

〔要約〕

神経系の形成に関与する蛋白質とその遺伝子の分離同定を目的に、出生後のラット小脳タンパク質の変動を2次元電気泳動法で解析した。生後ラットから経時的に小脳を摘出し、8M尿素で可溶化した小脳蛋白質を2次元電気泳動により分離して得た一連の電気泳動像の比較から、小脳形成過程でのみ発現する約20のタンパク質を検出した。これらのタンパク質をゲルより抽出、またはゲル中で直接プロテアーゼ消化して生成したペプチドフラグメントをキャピラリーLCで分離してエドマン分解あるいは質量分析法でアミノ酸配列を決定し、タンパク質／遺伝子データベースと照合してスポットの同定を行った。既知タンパク質では、神経細胞の分化に関連するリン酸化型および非リン酸化型stathmin、レチノイン酸結合タンパク質やP2タンパク質と相同で、網膜の視神経の分化に関連するfatty acid binding proteinなどが同定できた。また、新規タンパク質の一つは神経特異的な核因子と類似したアミノ酸配列をもっていた。

はじめに　ラット小脳は出生後に分化成熟することが知られており、また発生学的、解剖学的、電気生理学的知見が豊富な点でも、回路形成を含む哺乳動物の神経系形成の問題を分子レベルで解析するのに適した系と考えられる。我々は小脳形成とその制御に関与するタンパク質／遺伝子を分離、解析する目的で、未成熟な小脳で特異的に発現するタンパク質の検索をすすめている。組織内に発現しているタンパク質の直接的な解析は、小脳形成にともなうリン酸化や糖鎖の変化、プロセッシングの変化など、タンパク質の翻訳後修飾の変化を検出し得る点で優れている。従来の2次元HPLC法による解析(1)では、cell-cycle motifをもち顆粒細胞の分化との関連が注目されるV-1、leucine-rich repeatをもつ新しい核内因子V-2 (LANP)タンパク質を分離してその構造と小脳形成過程での発現様式を明らかにした（2,3）。本報告では2次元電気泳動を用いる同様のアプローチにより、未成熟な小脳に特有なタンパク質をより系統的に検索して解析した。

材料と方法　生後0, 3, 7, 12, 21, 30, 180日のラット（ウイスター系）より小脳を摘出し、8M尿素と0.5% NP-40を含む緩衝液でタンパク質を抽出した。抽出液は直接変性剤存在下で2次元電気泳動し、ゲルを銅染色法で染色後、目的のスポットを切り出してタンパク質を抽出、またはゲル中で直接プロテアーゼで消化した。消化物はキャピラリーLC（内径1mm x10 cm）で分離し、得られたペプチドのアミノ酸配列はエドマン分解による従来法（ABI 473A）あるいはLC／質量分析法(FinniganMat TSQ7000）で決定した。

結果と考察　小脳の形成過程にだけ検出されたタンパク質のうち図1に矢印で示した主要なスポット（#1-6）についてまず解析を行った。#1と#2はラット脳の神経細胞あるいは免疫系細胞の分化との関連が注目されているリン酸化型と非リン酸化型の

stathmin（4,5）、＃3はレチノイン酸結合蛋白質やP2蛋白質と類縁で、網膜の神経細胞の分化に関連するfatty acid binding protein (6)、＃4は神経特異的なユビキチン化蛋白質C末端水解酵素 (7) と同定できた。＃1、2、4については組織の腫瘍化によって発現量が増加することも知られている。＃5と＃6はいずれも新規タンパク質であり、このうち一つには神経特異的な核因子に類似なアミノ酸配列が認められた。

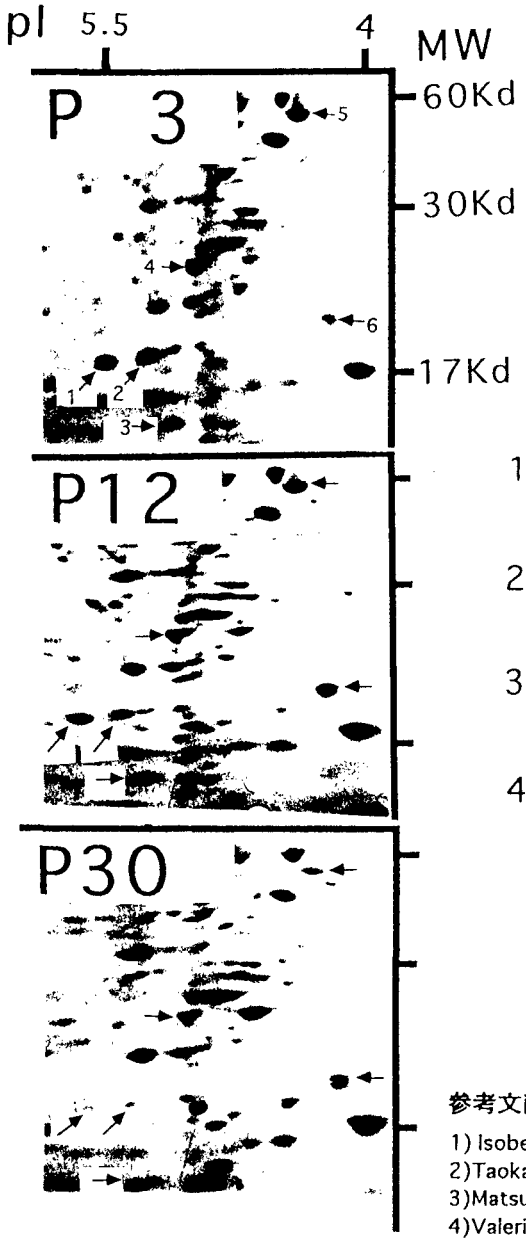


図1.生後3,12,30日ラット小脳蛋白質の2D-PAGE像

P3,P12,P30は生後3,12,30日目をそれぞれ示す。 抽出液5ulを micro 2D-PAGE で分離。 CBB 染色した。図中のスポット番号に対応する蛋白質の名称と決定した部分アミノ酸配列を示した。

1. 非リン酸化型 stathmin
(ENREAQMAAKLERLREK)

2. リン酸化型 stathmin
(ESVPEFPLXPPKK)

3. fatty acid binding protein
(VVIRTQATWK)

4. ubiqutin C-terminal hydrolase
(neuron cytoplasmic protein9.5)
(MQLKPMEINPE-)

参考文献

1) Isobe T., et al (1991) J.Chromatogr. 588,115-123
2)Taoka M., et al (1994) J. Biol. Chem. 269, 9946-9951
3)Matsuoka K., et al (1994) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.(in press)
4)Valerie D., et al (1989) J.Biol.Chem. 264,12134-12137
5)John R. S., et al (1992) J.Immunol. 149, 1191-1198
6)Roseline G. (1993) Exp.Eye Res. 56, 95-106
7)Thompson R. J.,et al (1987) FEBS Lett 210, 157-160

278 胎児期の脳に特異的に発現するタンパク質の解析

萩原民雄、竹田二美代、竹田稔
（昭和大、医、第一生化学）

〔要約〕
脳神経系は胎児期における発生分化から出生後の成熟を経てやがて老化し、死に至る過程で絶えず変化している。一方、神経細胞は再生しないがために加齢に、あるいは疾病に伴って死滅し種々の神経機能が障害されることが生物学的に大きな問題を来す。脳全体に発現しているタンパク質は何千種類ともいわれているが、これら全てのタンパク質が終始発現しているわけではなく、あるものは恒常的に、またあるものは一過性に働くべき時期に働くべき場所において機能している。我々は従来中枢神経系に発現するタンパク質の量的、質的変動の面から加齢に伴う脳の障害について研究を進めてきた。今回は中枢神経系の形成期に当たる胎児期に注目し、この時期に特異的に発現するタンパク質について解析を行った。

［実験方法］妊娠１４－２１日における胎児および生後０日－２年以上を経たWistar系ラットを用いた。動物をエーテル麻酔した後、十分脱血して速やかに脳を摘出した。脳を１０倍容のHomogenization Buffer［50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.32 M sucrose, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, antipain, leupeptin, pepstatin A （各10 μg/ml）］中でホモジナイズ後、遠心分離によりサイトゾール画分を得た。各サイトゾール画分をイオン交換カラムTSK DEAE-5PWを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分画した。溶出は20 mM Tris-HCl (pH 7.5)中で0-0.6 M NaCl直線濃度勾配により行った。DEAE-5PWで得られたフラクション、あるいはこれをさらにTSK G3000SWXLにてゲル濾過して得られたフラクションをSDS-PAGEにて分析した。同一条件で得られた各齢の同一フラクションを比較して胎児期に特異的あるいは多量に存在するタンパク質についてディスクゲルを用いた調製用電気泳動により単離精製した。精製標品は常法に従いリジルエンドペプチダーゼにより限定分解後、逆相カラムによりフラグメントを分取してプロテインシークエンサーにてアミノ酸配列分析を行った。また、質的変化の一つとしてタンパク質のリン酸化を調べるため、DEAE-5PWで得られたフラクションをSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜にトランスファーして抗ホスホチロシン、ホスホセリン、ホスホスレオニン抗体を用いてイムノブロットを行った。

［結果と考察］妊娠１４－２１日における胎児および生後０日－２年以上を経たラットより得られたサイトゾール画分そのものをSDS-PAGEにて分析しても、それほど顕著な差は見いだせなかった。また、図１に示すようにDEAE-5PWを用いたイオン交換クロマトグラフィーの溶出プロフィールも大部分のピークは妊娠１４日目の胎児と生後２年以上を経た老齢ラットを比較してもほぼ一致しており顕著な差は見られなかったが、各フラクションをSDS-PAGEにて分析するとこの段階でも約３０種類のタンパク質バンドに顕著な差が見られた。一方、タンパク質のリン酸化に変化があるか否かを抗ホスホチロシン、

ホスホセリン、ホスホスレオニン抗体を用いたイムノブロットによる間接法で調べたが、この方法ではいずれの場合も顕著な変化は見いだせなかった。SDS-PAGEで変化の見られたタンパク質のうち胎児期に特異的に存在するものあるいは多量に存在するものを１０種類について精製を試みた。精製法にはアミノ酸配列分析を目的としていることおよび簡便性からLaemmli系による調製用電気泳動を選んだ。単離したタンパク質は0.1 % SDS存在下0.1 M Tris-HCl (pH 9.0)中でリジルエンドペプチダーゼにより限定分解後、フラグメントを逆相カラムで分取した。現在、得られたフラグメントのアミノ酸配列分析を進めている。また、これら胎児期に発現するタンパク質が神経芽腫細胞株等の分化時にも見られるものなのかどうかについても検討しており、あわせて報告したい。

図1

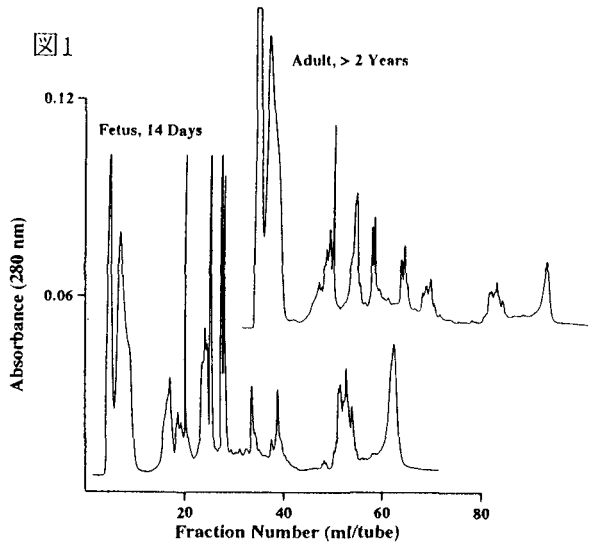
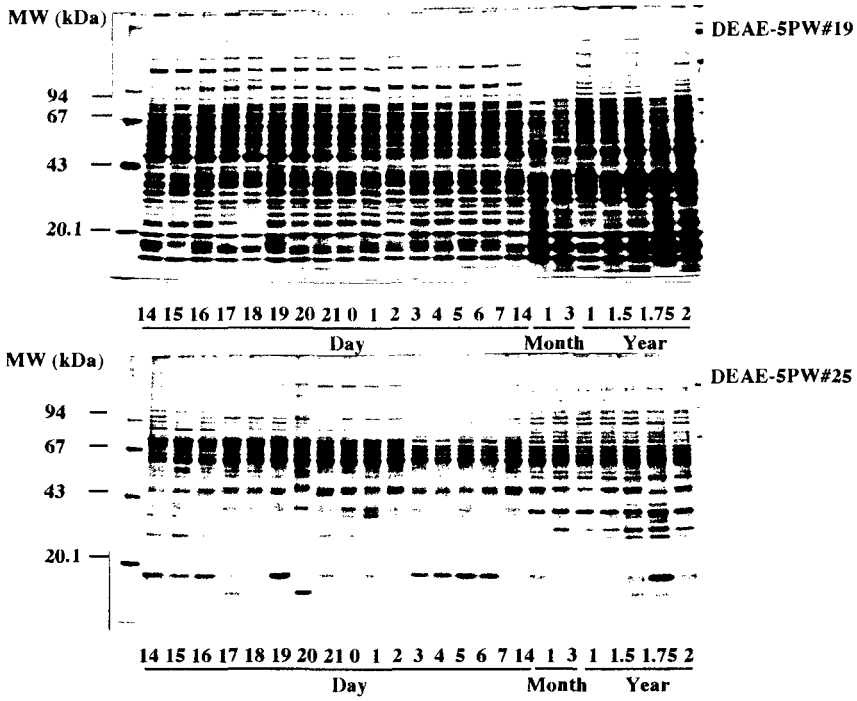


図1　妊娠14日目の胎児脳および２年齢以上の老齢ラット脳より得たサイトゾール画分をDEAE-5PWで分画したときの溶出プロフィール

図2　図1のようにして得られた各齢の同一フラクションをSDS-PAGEで分析した。フラクション＃19では49、73kDa、フラクション＃25では75、86kDaのタンパク質に変化が見られる。

図2



279 抗ＭＡＧ抗体を用いたミエリン特異的タンパク質遺伝子の発現制御機構の解析

松田義宏、小糸寿美、山元 弘
（国立精神･神経センター神経研究所、免疫研究部）

[要約]
アルメニアン・ハムスターをマウス脳ミエリン画分で免疫し、MAG(myelin associated glycoprotein)を発現させた3T3トランスフェクタント細胞に対する反応を指標にスクリーニングすることによって、MAG特異的単クローン抗体(2B6)を得た。同抗体はMAGの細胞外領域を認識して結合し、その分子量よりサブクラスはIgGであることが示唆された。ミエリン形成期におけるMAGの役割を検討する目的で、この抗体を新生仔マウスに腹腔内投与し、脳内のMAGmRNAをRT-PCR法によって経日的に定量したところ、ミエリン形成の開始期に著増すべきL型アイソフォームの発現が著しく抑制された。また、同時にPLP(proteolipid protein)の発現も有意な低下を示したが、S型MAGアイソフォームやDM20には変化が認められず、抗体のMAGへの作用がミエリン形成に関与する分子の発現を阻害すること、MAGとPLPの発現調節に何らかの相関があることが示唆された。

ミエリン形成において、MAGはミエリン形成細胞（オリゴデンドロサイト或はシュワン細胞）と神経軸索との直接の接着に関与するという役割が想定されているが、その作用機序は未だ明らかでない。我々はこれまでに、RT-PCR法を利用してMAG各アイソフォームの微量定量法を確立し、マウス脳の生後成熟過程において、ミエリン形成初期にはL型アイソフォームの発現が著増する一方、完成期にはS型が主に関与するようになるという役割分担を示唆する実験成績を得た(1)。本研究では、その発現制御機構、細胞間接着機構に検討を加えるために、特異的単クローン抗体を作成した。この抗体を新生仔マウスに投与し、脳内のミエリン形成期におけるMAGの発現に対する効果をin vivoで調べたところ、L-MAGの発現が著しく抑えられると同時に、PLPの発現も抑制を受けることが認められ、ミエリン特異的タンパク質の発現に何らかの相関制御が働いていることが示唆された。

[方法]

1. L-MAG/3T3トランスフェクタント細胞の作成：マウスL-MAGのcDNAを発現ベクターBCMGSneo(バーゼル免疫研究所烏山一先生より分与された)に組み込み、リポソーム法によってBALB/3T3細胞に導入・発現させた。

2. 抗マウスMAG単クローン抗体の作成：マウス脳から分画遠心法、ショ糖密度勾配遠心法によってミエリン画分を調製し、Quarlesらの方法(2)に従って部分精製したMAG標品でアルメニアン･ハムスターを免疫した。その脾細胞をマウスミエローマP3U1細胞と融合させ、MAG/3T3細胞を抗原として用いたELISA法によって抗MAG抗体産生ハイブリドーマを選択した。

3. RT-PCR法：マウス脳からGTC法で総RNA画分を調製し、逆転写によりcDNAを得た後、選択的スプライシングによって生じるMAG及びPLPのそれぞれ2種のアイソフォームを分別できる特異的プライマーを用いて20-30回のPCRを行った。基質中に^{32}P-dCTPを加えておき、生成したDNA中に取り込まれた放射活性から各mRNAの相対的定量を試みた。

[結果と考察]

上述の方法により、MAG/3T3細胞に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマクローン2B6を得た。本抗体は生細胞とも反応性を示すことから、MAGの細胞外領域に作用することが示唆された。また、ウェスタンブロッティング法において反応性を持たないことから、何らかの高次構造を認識するものと考えられる。SDS-PAGE法による推定分子量より、サブクラスはIgGと推定された。

血液脳関門が未完成とされる出生直後のマウスに100μgの2B6抗体を腹腔内投与した後、4、6、8日目における脳内MAG遺伝子の発現をRT-PCR法で定量したところ、図1に示すように、PBSを投与した対照動物に比べてL-MAGのmRNA量が著しく低下していた。同時にPLPについても検討してみると、やはり発現の上昇が著明に抑制されていた。このとき、β-actinの発現はほぼ一定であり、MAG及びPLPのそれぞれ選択的スプライシングによるアイソフォームであるS-MAG及びDM-20にも有意な変化は認められなかった。これらの結果は、抗MAG抗体の作用下にL-MAGとPLPの遺伝子の発現が特異的に抑制を受けたことを示しており、ミエリン形成開始期に重要な役割を担う両分子の発現調節機構が相関するものであることを示唆した。

[文献]

(1) 松田、小糸、山元 (1994) 第67回日本生化学会大会

(2) Quarles, R. H. and Pasnak, C. F. (1977)
Biochem. J. 163, 635-637

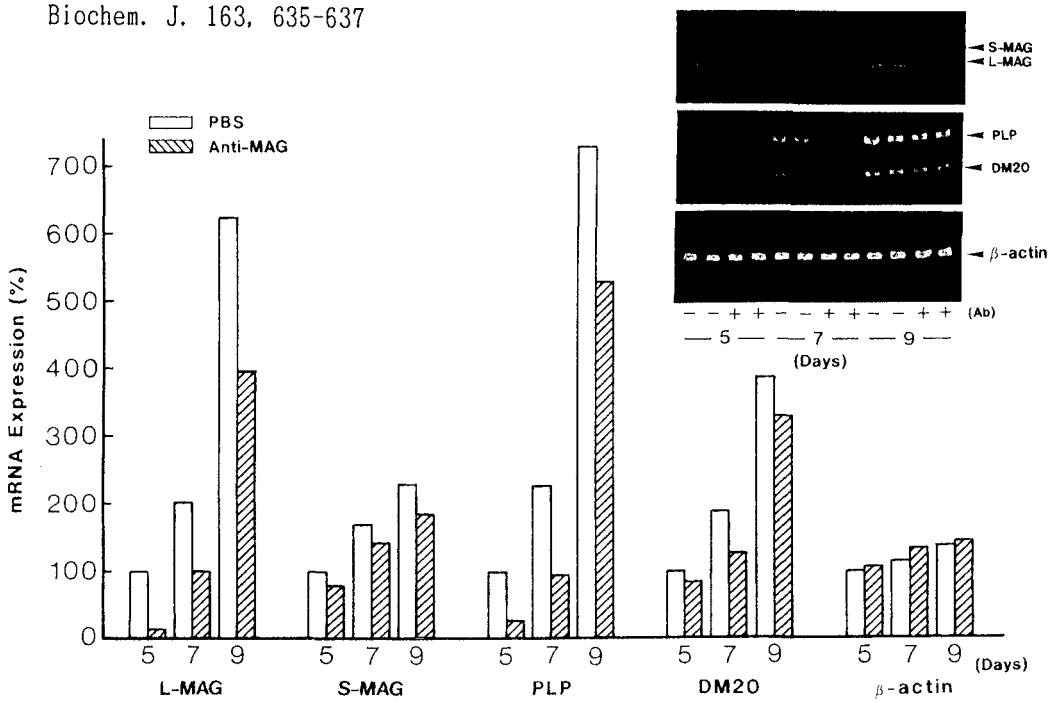


図1．抗MAG抗体によるミエリン特異的タンパク質の発現変化。生後5日目のPBS投与動物の各mRNA量を100とする相対量で表示した。写真は、RT-PCR産物をポリアクリルアミド電気泳動後、EtBr染色したもの。

280 発達分化するラット小脳各層の一酸化窒素合成酵素（NOS）活性

王 瑋，井上順雄，中山 孝，加藤尚彦，石井當男＊
（横浜市立大医第一生化；＊第二内科）

〔要約〕

ラットの小脳外顆粒細胞は出生後分化し，全臓器組織中最も多く NOS を発現する内顆粒神経細胞層を形成する．そこで既に開発した NOS 微量定量法を用いて，小脳層の分化過程の解析した．出生後（P）0,3,7,12,15,21 日及び 6週齢（成熟）ラットの小脳の凍結乾燥切片を調製し，各層を顕微鏡下で切り出して秤量した後試料とした．また N^G-L-nitroarginine（NArg，NOSの特異的阻害物質）を P3-12 の間連日腹腔内注射し，P12 の小脳を分析した．P3-15 の外顆粒層を採取出来たが，そのNOS活性は殆ど一定であった．分子層は P12から採取可能な厚さとなり，そ活性はP12-21の間増加し成熟レベルに達した．内顆粒層の活性は P3-21の間は増加し，P21で殆ど成熟レベルに達した．NArgを注射すると，P12小脳の内外顆粒層のNOS活性は測定出来なくなり，内外顆粒層は薄化して細胞が分散して分布し，分子層は相対的に厚く見えた．

ラットの小脳では，出生後分裂細胞である外顆粒細胞が最外層を形成し，分化して内顆粒細胞層に移動し，３週までにシナプス形成を完成して発達を終える（1）．内顆粒細胞は組織化学的にNOS 活性の一部を表すと考えられる Diaphorase 染色で強く染まり（2），NOS の免疫組織化学と活性測定によれば，全臓器の細胞中最も多く NOS を発現している（3,4）．そこで新たに開発したNOS 活性の微量測定法（5）を用いて，新生児から出生後 21日（P0-P21）のラットと成熟ラット（6 週齢）の小脳の外顆粒層，分子層，内顆粒層における NOS 活性を測定し，小脳の発達成熟過程を解析した．

実験方法

［**凍結乾燥層試料**］ P0,3,7,12,15,21 及び成熟 Sprague-Dawley ラットの小脳の凍結乾燥切片（厚さ 15μm）を調製し，顕微鏡下で各層の小片を切り出して秤量（50-1,800 ng 乾燥重量）して試料とした（6）．

［**N^G-L-nitroarginine（NArg）投与法**］NOS の特異的阻害物質である NArgを P3-12 の間毎日１回 50mg/kg体重（0.5～1.4 mg/回）を腹腔内注射し，P12 の小脳を用いた．成熟ラットには連続 4 日同様に注射して（16 mg/回），その小脳を試料とした．

［**NOS 活性微量測定法**］ 1.28 μl の反応液（100 mM HEPES-NaOH, pH7.0; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1.25 mM $CaCl_2$; 1μg/ml Calmodulin;100 μM Arginine; ±500 μM NArg; 15 μM NADPH; 3.0 mM Nicotinamide; 0.2 mM PMSF; 10 μg/ml の Antipain, Pepstatin, Leupeptin; 大気圧下で約 260 μMの O_2を含む）を，蒸発を防ぐ為に Parapffin 油を満たした Terasaki Plateの小さい well（上面と底の径 4 と 1 mm，厚さ 2 mm）の底にとり，油層を通して顕微鏡下で乾燥切片試料を加えて反応させた．20 ℃で 30 分反応後，1.28 μlの 0.3 M HClを加えて反応をとめ，95 ℃で 15分加熱して試料中の酵素を変性させると共に未反応の NADPHを破壊した．全溶液の小滴を NADP cycling 反応液に加え，生成された $NADP^+$を 4,000 倍増幅して測定した．ArgとNArg存在下の活性を非特異的 $NADP^+$生成（NspNADP）活性，Arg のみの存在下での活性から NspNADP活性を差し引いた活性を NArgで特異的に阻害されるNOS 活性とした．

結果及び考察

［**小脳層の NOS 活性**］ 内顆粒層の NOS活性は P3-21 の間増加して，成熟レベルに達した（図１）．NspNADP活性は P12まで減少し，P21 から成熟レベルまで再び増加していた．外顆粒層は P3-15で採取出来たが，全 Stageでほぼ一定の NOS および NspNADP 活性が見い出された（図２）．分子層は次第に発達して P12から採取可能となるが，NOS 活性は以後成熟レベルまで増加を続けた（図３）．新生児（P0）の小脳には明瞭な層構造が見られないので，全体の皮質の活性を調べた．外顆粒層は Diaphorase 染色には染まらず（2），本報告で初めてその存在を示した．これらの結果は，Neuorblast かまたは内顆粒層に移行する前の premigratory cell が既に NOS を発現しており，移行後の顆粒細胞が Purkingje やその他の細胞とシナプス結合を形成し，Network を造る

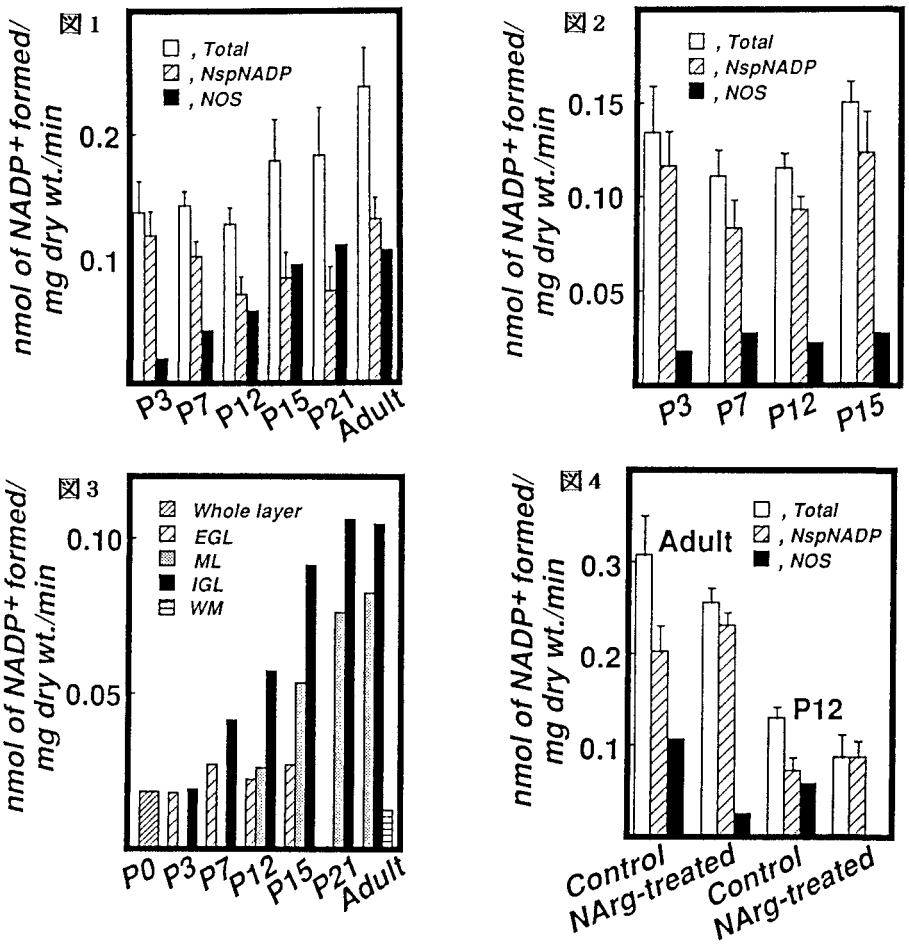


図1．発達する内顆粒層の NOS 活性．Total，Argのみを含む反応液での活性；NspNADP，Arg と NArg を含む反応液での活性；NOS，前2者の差で NOS活性を表す．柱グラフの上の棒は SD．（以下同じ）；　図2．外顆粒層の NOS 活性．；　図3．発達する小脳内各層の NOS活性．P0 では層構造が明かでなく全層の活性を，成熟小脳につては白質の活性を示す．EGL，外顆粒層；ML，分子層；IGL，内顆粒層；WM，白質；　図4．NArg を投与したラットの内顆粒層の NOS活性．NArg 投与（注射）の方法は本文参照．

過程で，顆粒細胞全体（細胞体・軸索・シナプスなど）の NOS が増加することを意味している．

［**NArg の in vivo における効果**］　NArg注射により成熟小脳の homogenate 17 %；分子層 27 %；顆粒層 21 %；白質 0%の NOS活性が残った（内顆粒層のみについて図4に示す）．そこでP12 の内顆粒層について調べると，NOS 活性は測定出来なかった．P12 の外顆粒層は薄くなり，分子層にかけて細胞が疎らに分布し，内顆粒層も同様な変化を示した．NO が Neuroblast の分裂と分化に何等かの役割を果している事を推測させる．

文　献

1) Altman,J. (1972) J. Comp. Neurol. 145: 339-464. 2) Bruening,G. (1993) J. Neurosci. Res. 36: 580-587. 3) Bredt,D.S. et al. (1990) Nature (London), 374: 768-770. 4) Salter, M. et al. (1991) FEBS Lett. 291: 145-149. 5)王璋 et al.(1993) 神経化学, 32: 260-261.6) Lowry,O.H. and Passonneau,J.V. (1972) Quantitative histochemistry: A flexible system enzymatic analysis. Academic Press, New York.

281 マウス神経芽腫細胞の神経突起伸展に対するプロテインキナーゼ、カルモジュリン阻害剤の効果

上村敬一、武富 保　　(信州大・医・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に対するスフィンゴシンの抑制効果の機序を明かにする目的で、神経突起の伸展におけるカルモジュリンとプロテインキナーゼの関与について検討した。カルモジュリン阻害剤 W-7, calmidazolium, trifluoperazine は、いずれも神経突起の伸展を濃度に依存して抑制した。一方、プロテインキナーゼ阻害剤 H-7, H-89, genistein の存在下でも神経突起の伸展がみられたことから、(1) NS-20Y 細胞における神経突起伸展はカルモジュリンを介した機構により調節されていること、(2) スフィンゴシンの神経突起伸展に対する抑制効果は、カルモジュリンに依存する経路による可能性があ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、糖脂質合成酵素の阻害剤の存在下で強く抑制されること[2]、またスフィンゴシンを培地に添加すると神経突起の伸展抑制や退縮が起こること[3]から、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た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が、神経突起の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ことをすでに報告した[3]。今回、その機序を明らかにする目的で、神経突起の伸展に対する各種プロテインキナーゼ阻害剤、カルモジュリン阻害剤の効果を検討した。

[方法]

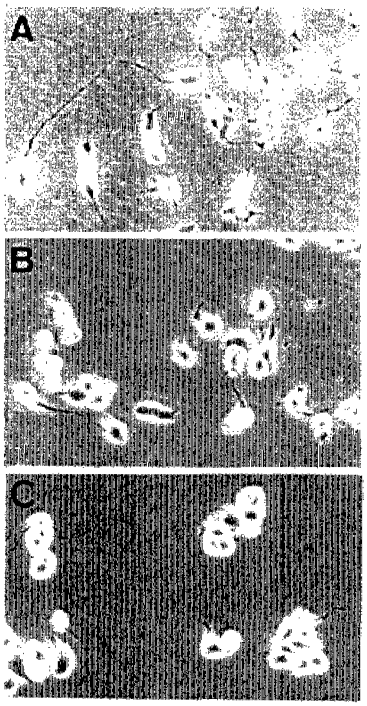
マウス神経芽腫細胞 NS-20Y (2×10^4 個) を Petri dish (9 cm^2) に播き24時間培養した後、培地を 10% fetal calf serum 含有 Dulbecco's MEM より serum-free medium (2 ml) に交換、さらに24時間培養してから神経突起の伸展を測定した[2]。W-7, trifluoperazine, H-7 は純水に、他の阻害剤は dimethyl sulfoxide に溶解して、培地交換時に添加した。Dimethyl sulfoxide のみ (最終濃度 0.33% 以下) を含む対照は、神経突起の伸展に影響が無かった。

[結果と考察]

NS-20Y 細胞は、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)。この神経突起の伸展は、カルモジュリンを阻害することが報告されている W-7, calmidazolium, trifluoperazine を培地に添加するとその濃度に依存して抑制された (Fig. 1B, C and Fig. 2)。一方、プロテインキナーゼ阻害剤 H-7 (1-50 μM) と H-89 (0.3-3 μM) は神経突起の伸展をまったく抑制せず、プロテインキナーゼCおよびcAMP依存性プロテインキナーゼの活性化は、血清を除いた培地中での神経突起の伸展とその維持に重要な関与はしていないものと思われた (Table 1)。また、genistein (10-100 μM) の添加

によるチロシンキナーゼの阻害も神経突起の伸展に影響を与えなかった。

NS-20Y 細胞における神経突起伸展はカルモジュリンを介した機構により調節されており、またスフィンゴシンの神経突起伸展に対する抑制効果がカルモジュリンに依存する経路による可能性が示唆された。スフィンゴシンはμM濃度でカルモジュリン依存性酵素を阻害することが知られている[1]。KN-62 (0.3-3 μM) は神経突起伸展を抑制しなかったので (Table 1)、Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII以外のカルモジュリンに依存した機構が神経突起伸展に関与している可能性があると考えられた。



[文献] (1) Jefferson, A.B. & Schulman, H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 15241-15244
(2) Uemura, K. et al. (1991) J. Biochem. 110, 96-102
(3) Uemura, K. et al. (1993) J. Biochem. 114, 610-614

Table 1 Effects of protein kinase inhibitors on neurite outgrowth in NS-20Y cells.

Addition	μM	% Cells with neurites	
		+Inhibitor	Control
H-7	50	62.1±3.1	63.4±3.0
H-89	3	54.5±5.1	51.3±1.8
Genistein	100	52.5±1.1	50.2±2.6
KN-62	3	63.1±2.8	58.0±5.6

Fig. 1 Effects of calmodulin inhibitors on neurite outgrowth of NS-20Y cells in serum-free medium. (A) Control; (B) W-7 (10 μM); (C) calmidazolium (0.5 μM).

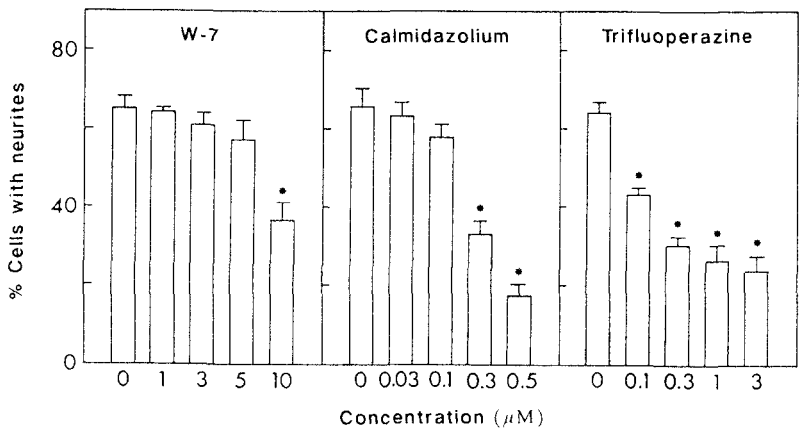


Fig. 2 Inhibition of neurite outgrowth in NS-20Y cells by calmodulin inhibitors.

282 胚性腫瘍細胞の神経系分化におけるプロテインホスファターゼの発現変動

笹原洋二、小林孝安、田村眞理
（東北大学・加齢研、遺伝子情報）

〔要約〕

マウス胚性腫瘍細胞であるＰ１９細胞の、レチノイン酸（ＲＡ）依存性神経系分化過程における、セリン／トレオニンホスファターゼ（ＰＰ１、２Ａ，２Ｂおよび２Ｃ）の発現変動につき検討した。その結果、ＰＰ１（１α及び１γ１）ｍＲＮＡ発現に変動は見られず、ＰＰ２Ｂは、ＲＡ添加に依存してｍＲＮＡ及び蛋白量は共に上昇（約３倍）し、ＧＡＰ４３も同様の傾向を示した。一方、ＰＰ２Ｃについては、総活性は変動しないものの、分化過程で選択的スプライシングによる、イソタイプの発現の変換がみられた。これに対し、ＰＰ２Ａの触媒サブユニット（２Ａα及び２Ａβ）は、ＲＡ非存在下でも、初期凝集塊形成期より、ｍＲＮＡ、蛋白量及び酵素活性が共に上昇（約２～４倍）し、その高レベルの発現は、ＲＡ依存性に神経系へ分化する過程でも維持された。現在、各々のホスファターゼの発現変動の意義について検討中である。

［序論］

Ｐ１９細胞は、初期細胞凝集塊形成及び10^{-6}Ｍレチノイン酸処理により、神経細胞及びグリア細胞へ分化し、神経系分化の培養モデル系として重要である。現在まで、哺乳動物細胞の主要なタンパク質セリン・トレオニンホスファターゼは、基質特異性、阻害剤に対する感受性や、金属イオン要求性などの酵素学的性質から、４種類（ＰＰ１、２Ａ，２Ｂ及び２Ｃ）に分類されており（１）、各々の中枢神経系における発現（２－４）や、機能（５、６）に関して知見が得られつつある。今回我々は、蛋白質脱リン酸化が神経系細胞の分化に果たす生理的役割を知る目的で、上記培養系における各ホスファターゼの発現変動を検討した。

［方法］

Ｐ１９細胞は、レチノイン酸10^{-6}Ｍ存在下で４日間懸濁培養して細胞凝集塊を形成させ、トリプシン処理後、更に２日間単層培養を行った。ノーザンブロット解析は、分化過程各時間においてＡＧＰＣ法によりtotal ＲＮＡを調製し、各ホスファターゼサブタイプに特異的なｃＤＮＡフラグメントをプローブとして用いて行った。細胞粗抽出液についての免疫染色は、ＰＰ２ＡおよびＰＰ２Ｂの活性サブユニットに対する特異的抗体を用いて行った。粗抽出液中の各ホスファターゼ活性は、リン酸化ヒストンを基質として測定した。ＰＰ２Ａ活性は、インヒビターII存在下における金属イオン非要求性活性として、またＰＰ２Ｃ活性は、オカダ酸非感受性及びMg^{2+}依存性活性として測定した。

［結果と考察］

図１に神経系分化過程における形態及びＧＡＰ４３ｍＲＮＡ量の変化を示した。この過程において、図２に示す如くＰＰ１（１αおよび１γ１）ｍＲＮＡには量的変動が観察されなかった。ＰＰ２Ａの触媒サブユニット（２Ａα及び２Ａβ）のｍＲＮＡ量は、ＲＡの存在、非存在に関わらず初期凝集塊形成時よ

り上昇したが、ＲＡを添加した場合のみ、その後単層培養に移しても、高レベルは維持された。又ＰＰ２Ｂの発現レベルは、凝集塊形成時にＲＡ無添加系では上昇しないが、ＲＡを添加すると経時的に上昇した。更にＲＡ添加系では、単層培養に移した後に、ＰＰ２Ｂの発現量が更に上昇した。これらＰＰ２ＡおよびＰＰ２Ｂの発現量の変化は、蛋白質レベルおよび活性レベルでも、同様の結果を得た。一方、ＰＰ２Ｃαのｍ ＲＮＡ量は不変であった。ＰＰ２Ｃβについては、未分化状態では、２．８ｋｂｍＲＮＡのみ発現していたが、神経細胞の分化に伴い、３．３ｋｂｍＲＮＡ（ＰＰ２Ｃβ－１）の発現上昇が観察された。以上の結果から、神経系の分化過程において、各種プロテインホスファターゼが、それぞれ特異的な機能を担っている可能性が示唆された。特異的な阻害剤やアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、個々のホスファターゼ分子種の機能の解析が、現在進行中である。

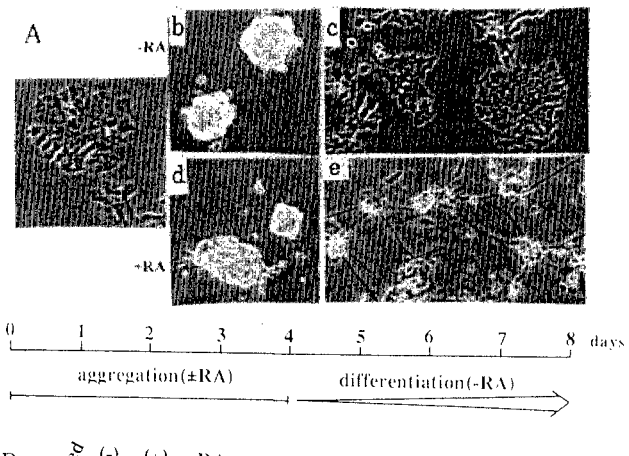


図１
Ａ Ｐ１９細胞のＲＡ依存性の神経系への分化
a 無処理Ｐ１９細胞
b ＲＡ無添加系のaggregation culture
c ＲＡ無添加系のmonolayer culture
d ＲＡ添加系のaggregation culture
e ＲＡ添加系のmonolayer culture
Ｂ Ｐ１９細胞の分化過程におけるＧＡＰ４３の発現
（ノーザン解析）

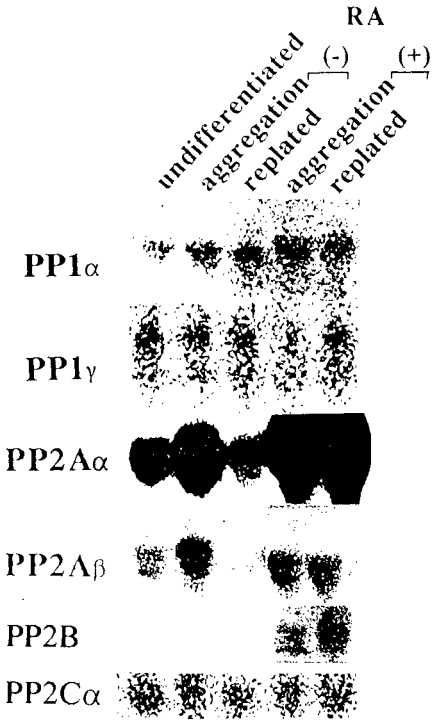


図２ Ｐ１９細胞の分化過程における各種プロテインホスファターゼの発現
（ノーザン解析）

［文献］

(1) Cohen, P. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, 453-508.
(2) Abe. H., *et al.* (1992) Mol. Brain Res. 13, 283-288.
(3) Terasawa, T., *et al.* (1993) Arch. Biochem. Biophys. 307, 342-349.
(4) Abe. H., *et al.* (1994) Mol. Brain Res. 22, 138-143.
(5) Lu, Y. W., *et al.* (1994) Nature 369, 230-238.
(6) Fukunaga. K., *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268, 130-137.

283　ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける坐骨知覚神経の再生に対するシロスタゾールの作用

山本　恵史、保田　好信
大塚製薬株式会社徳島研究所

＜要約＞　ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットを用い、坐骨神経凍結傷害後の神経再生速度および後根神経節(DRG)のオルニチン脱炭酸酵素(ODC)活性に対して、抗血小板薬であるシロスタゾールの作用を検討した。　1) 糖尿病ラットにおける傷害後の神経再生速度は、STZ 投与後10週で顕著に低下した。　2) 傷害後に軸索が再生し始めるまでの時間を示す潜伏期は、STZ 投与後5週で1.5倍に増加した。 3) 正常ラットにおけるDRGのODC活性は傷害後24hrをピークに2.5倍上昇した。しかしSTZ投与後10週の糖尿病ラットでは、ODC活性の誘導はほぼ消失していた。 4) シロスタゾールは潜伏期に対して影響を及ぼさなかったものの、糖尿病ラットで低下した神経再生速度およびODC活性誘導の障害をともに抑制した。以上の結果から、糖尿病ラットで遅延した神経再生にODC活性誘導の障害が深く関わっていること、さらにシロスタゾールは糖尿病ラットにおいて低下した神経再生速度を改善したことから、糖尿病性神経障害において予防効果を有することが示唆された。

＜目的＞　シロスタゾールは、抗血小板作用、抗血栓作用および血管拡張作用などを有し、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。昨年本学会において、我々は糖尿病ラットの坐骨神経運動繊維で低下した遅い軸索輸送をシロスタゾールが改善することを報告した[1]。本試験では、STZ誘発糖尿病ラットを用い、坐骨神経傷害後の神経再生速度および後根神経節で誘導されるODC活性に対するシロスタゾールの作用を検討した。

＜実験方法＞　1.糖尿病の誘発：　糖尿病ラットは、6週令のラット(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(50mg/ml/kg)を尾静脈内投与し誘発した。
2.群分けおよび投薬：　糖尿病ラットはSTZ投与3日後に血糖値を測定し、血糖値 400mg/dl以上のラットをSTZcontrolおよびSTZ＋cilostazolに群分けした。群分け後、Normal＋cilostazolとSTZ＋cilostazol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.神経凍結傷害および再生軸索の距離：　神経凍結傷害は、STZ投与後5週あるいは10週に、ラットをエーテル麻酔下で大腿中央部分の坐骨神経を露出し、液体窒素で凍結させた直径約2mmの銅線を神経に20秒程押しあてて起こした。この凍結傷害の3、5、7日後に軽いエーテル麻酔下で再度坐骨神経を露出し、Pinch-reflex test[2]を実施して再生された軸索の距離を測定した。
4.ODC活性の測定：　神経凍結傷害を上記と同様に右側の坐骨神経に行い、傷害後の24hr、48hrおよび72hrにL4およびL5のDRGを左右摘出した。DRGを緩衝液でホモゲナイズした後、100,000gの遠心により得られた上清中のODC活性をMcleanらの方法[3]に準じて測定した。

＜結果＞　1．軸索再生に対するシロスタゾールの作用：　再生された軸索の距離を傷害後の日数に対してプロットすると直線が得られ、その傾斜から軸索の再生速度が、また、直線と横軸の交点から潜伏期が計算できる（図1）。STZ投与後10週の再生速度は、NormalおよびNormal＋cilostazolがそれぞれ3.73および3.78mm/ 日であるのに対し、STZcontrolは 2.43mm/日に低下していた。STZ＋cilostazol の再生速度は 3.60mm/日を示し、シロスタゾールは、糖尿病ラットにおける再生速度の

低下を抑制した。糖尿病ラットの潜伏期は正常ラットに比べ1.5倍に増加した。シロスタゾールは潜伏期に対して影響を及ぼさなかった。

2．傷害後のODC活性誘導に対するシロスタゾールの作用：　傷害後のDRGにおけるODC活性は、正常ラットで傷害後24hrをピークに2.5倍上昇した（図2）。STZ投与後10週の糖尿病ラットではこの酵素誘導はほとんど消失していた。ODC活性のピークは傷害後48hrに遅延していたが、シロスタゾールは活性誘導の障害を抑制した。

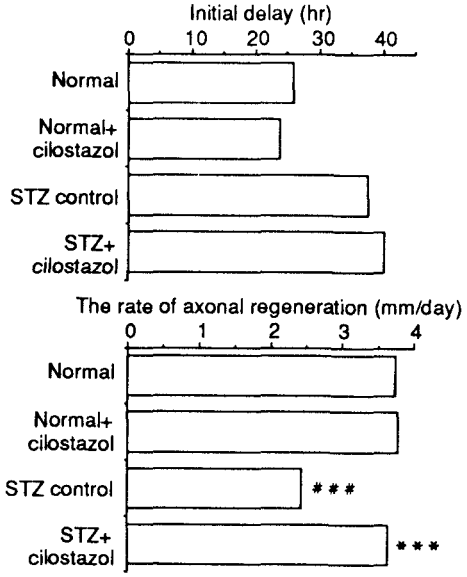


図1　神経傷害後の坐骨知覚神経再生能に対するシロスタゾールの作用（N=7-8）
###：P＜0.001 Normalに対する有意差。
***：P＜0.001 STZ controlに対する有意差。

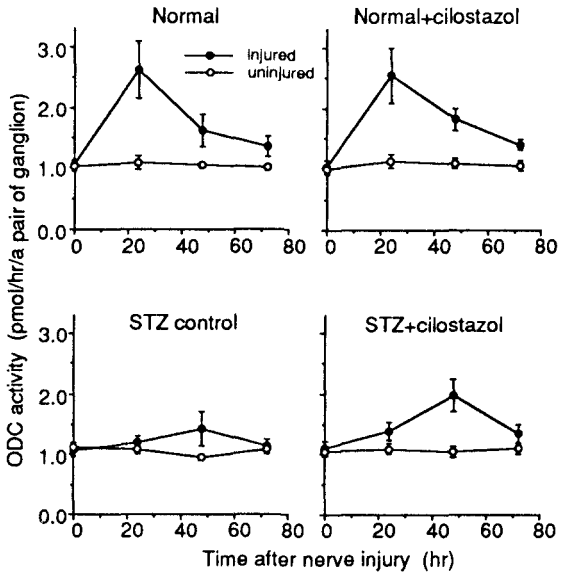


図2　神経傷害後の後根神経節におけるODC誘導に対するシロスタゾールの作用（N=7-8）

＜考察＞　以前から、傷害後のDRGではODC活性の誘導が認められており、この酵素誘導は神経再生やNeuronの生存に不可欠であることが報告されている[3),4)]。本試験結果からも、STZ誘発糖尿病ラットにおける傷害後の神経再生速度の低下および潜伏期の延長にODC活性の誘導が密接に関連していることが確認された。糖尿病ラットでは傷害後の潜伏期が延長していたことから、障害部位から細胞体へ運ばれる"再生シグナル"の輸送過程に障害が生じている可能性が考えられる。現在のところ、傷害に反応してODC活性を誘導させる再生シグナルの実体は明らかにされてはいない。しかしこの候補として、傷害部位付近で産生される神経栄養因子があげられている。シロスタゾールがＯＤＣ誘導の障害を抑制したことは、シロスタゾールが神経栄養因子の産生低下を抑制した結果であるのかもしれない。これらの詳細については不明であり今後の課題でもある。

＜文献＞

1．山本恵史、保田好信、小宮義璋（1993）神経化学 32、420-421.
2．P. A. R. Ekstrom. and D. R. Tomlinson. (1989) J. Neurosci. 98, 231-237.
3．W. G. Mclean., J. E. Chapman. and N. A. Cullum. (1987) Diabetologia. 30, 963-965.
4．C. Pekiner. and W. G. Mclean. (1990) Br.J. Pharmacol. 101, 978-980.

284 微小管関連蛋白質MAP1Bの細胞外ドメインのリン酸化と培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成への関与

村本和世[1,2]、谷口寿章[3]、川原正博[1]、小林和夫[1]、諏訪牧子[4]、美宅成樹[4]、黒田洋一郎[1]
[1]東京都神経研・神経生化、[2]東京大・医・薬理、[3]藤田保健衛生大・総医研・医高分子、[4]東京農工大・工

〔要約〕ラット大脳皮質細胞を単離培養するとニューロン間にシナプスが形成される。この時、培養初期より細胞膜をほとんど透過できないprotein kinase阻害剤K-252bを添加すると、シナプスの形成数が著しく減少した[1,2]。また、K-252bは、培養細胞の膜外表面で生じていると考えられる蛋白質リン酸化反応をも阻害した。したがって、これらの膜蛋白質の細胞外ドメインのリン酸化が、ニューロン間のシナプス形成において重要な役割を果たしていることが考えられた。このシナプス形成に関与する膜蛋白質を同定するために、蛋白質の細胞外ドメインをリン酸化させる条件で、[γ-^{33}P] ATPを細胞外液に数分間加えた。膜蛋白質を可溶化後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で解析を行ない、オートラジオグラフィーによりリン酸化された蛋白質を検出した。いくつかの蛋白質バンドは非常に早い時間経過でリン酸化された。これらのバンド中の蛋白質の同定を試み、まず最高分子量でK-252bの効果の強い単一バンドを選んで切り出し、この蛋白質の部分アミノ酸配列の決定を行なった。その結果、この蛋白質は微小管関連蛋白質MAP1Bであることが判明した。さらに、従来細胞内蛋白質と考えられていたMAP1Bに膜貫通部位の存在する可能性も示唆された。これらの結果から、MAP1Bの細胞外ドメインのリン酸化が皮質ニューロン間のシナプス形成に関与している可能性が示唆された。

【はじめに】

これまでの研究で、ラット大脳皮質細胞を単離・培養し、培養されたニューロン同士が突起を伸展し、多数のシナプスを形成する系に、細胞膜を透過しない蛋白質リン酸化酵素阻害剤K-252bを添加すると、シナプス形成が阻害されることが判明した[1,2,3]。この阻害は、電子顕微鏡を用いた形成シナプス数の計測によっても確認された[2]。

リン酸化酵素阻害剤、K-252bの膜を透過しないという性質から、阻害剤の標的となるリン酸化は細胞外で起こっていることが考えられた。ニューロンも含めて、様々な細胞の膜外表面には、細胞外ドメインを基質とするエクト型蛋白質リン酸化酵素が存在することが報告されており[4]、最近注目されつつある[5]。大脳皮質培養細胞膜表面にはこの様にリン酸化される蛋白質ドメインが存在し、K-252bがこのリン酸化を阻害していることを既に報告している[6]。本報告では、この酵素基質はシナプス形成において重要な役割を果たしている機能分子と考え、基質蛋白質の同定を試みた。

【方法】

ラット大脳皮質ニューロンの培養は、既報[1,2]のように18日令のラット胎仔から大脳皮質を取り出し、パパイン消化後6穴プレートを用いて行なった。蛋白質の細胞外ドメインをリン酸化する条件で[γ-^{33}P]ATPを細胞外に極く短時間添加して培養細胞でのリン酸化反応を行なった。[γ-^{33}P]ATPがエクトATPase等で^{33}P無機リンに分解され、細胞に取り込まれた後改めて[γ-^{33}P]ATPに合成し直されて細胞内リン酸化反応に用いられるのを防ぐため、^{33}P無機リンが生じたとしても充分に希釈されてしまう様に多量の非標識無機リンを添加した。リン酸化されたタンパク質をSDS-PAGEとオートラジオグラフィーで解析した。又このリン酸化反応時にK-252bを添加し、そのバンドのリン酸化が阻害されるかどうかを調べた。

さらに、放射性ラベルの取り込まれた蛋白質バンドのうち、K-252b阻害効果が強く最高分子量のものをゲルより切り出し、プロテアーゼを用いて部分ペプチドを得た。これをHPLCによって単離し、質量分析及びアミノ酸シークエンサーにかけてそのアミノ酸配列を決定した。

【結果及び考察】

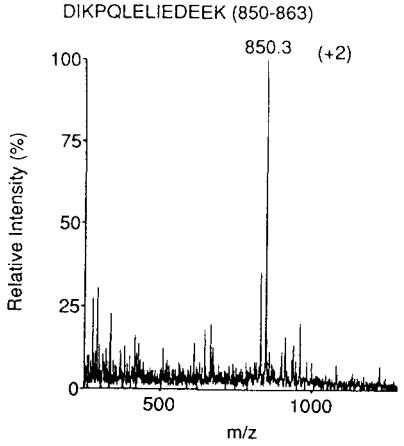
上記の方法により細胞外のリン酸化を解析した所、既に報告しているように、^{33}Pのとり込まれる複数のバンドが認められた[6]。これらのバンドのリン酸化は、反応の立ち上がりの時間経過も速く、しかもK-252bによって阻害を受けるため、細胞外のものと考えられた[6]。

K-252bは、シナプス形成という細胞機能とリン酸化反応の両者を阻害したため、基質となる蛋白質に

はシナプス形成に関与しているものが必ずあることが考えられた。そこで、複数の基質の中からリン酸化が速やかに起こり、K-252bで著しく阻害され、かつSDS-PAGEのみで明瞭な単一バンドとして得られた高分子量(212KDa以上)の基質蛋白質を選び、その分子の同定を試みた。プロテアーゼ処理後のHPLCで単一ピークとして得られた三つの部分ペプチドについてアミノ酸配列を決定した（図１）。その結果、この蛋白質は微小管結合蛋白質のうちあまり研究されていないMAP1Bと一致する事が明らかとなった。MAP1Bは、その発現時期や成長錐への局在、リン酸化・脱リン酸化の形状差による分布の違いなどから、ニューロンの分化（おそらくシナプスの形成過程）に重要な役割を果たしている可能性がある[7,8,9]。

これまで、MAP1Bは、微小管に付随して精製されてきたというような経緯から、膜貫通部位の検討が行なわれていなかった。これまでの研究の流れから、MAP1Bの膜蛋白質としての可能性が高いので、コンピューターを用いた膜貫通部位予測[9]を行なった。その結果、MAP1Bアミノ酸配列中に１個所、明瞭な膜貫通領域が存在する事が判明した。この部位は、通常のKyte & Doolittleのhydrophobicity解析によっても膜貫通部位で、microtubulesの結合部位と糖結合部位の中間にあった（図２）。従って、MAP1Bには細胞外ドメインが存在し、この部分のリン酸化によってシナプス形成に対して調節的な役割を果たしている可能性が示唆された。

図１　ゲルからのバンド切り出しで得られた蛋白質を限定分解し、HPLCで分離して得られたペプチドの内の一つ（分子量1698.6）のESIマススペクトル。＋２は２価イオンのシグナルであることを示す。（obs.）は、質量分析計で得られた分子量、（calc.）はアミノ酸シークエンサーで得られたアミノ酸配列から計算した値を示す。両者が一致するので、この配列が正しいことが確定できる。



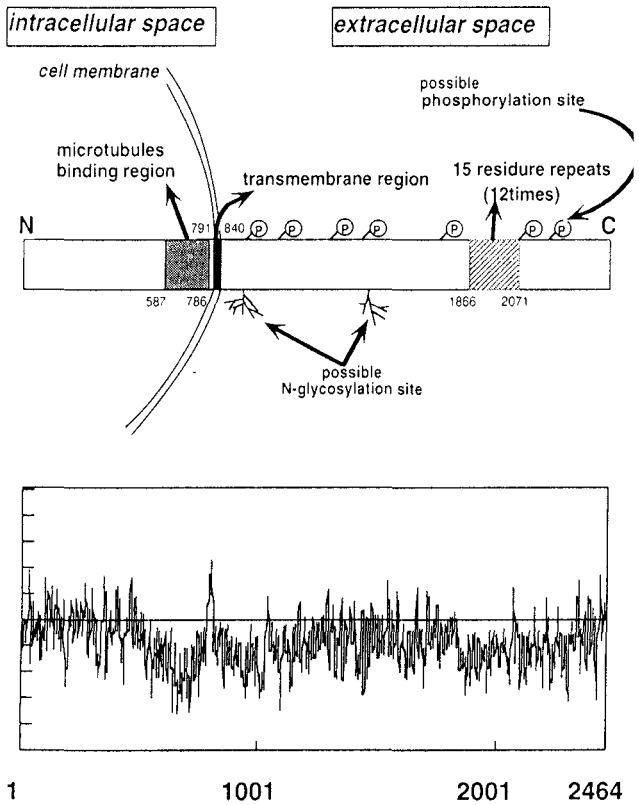


図２　Kyte & Doolittleに基ずいたhydro-phobicity blot（下）とMAP1Bの分子構造（上）。791番目から840番目のアミノ酸配列の間に膜貫通領域があると推定される。

【文献】 1)Muramoto,K. et.al. (1988) Proc.Jpn.Acad.Ser.B 64: 319. 2)Kuroda,Y. et.al. (1992) Neurosci.Lett. 135: 255. 3)Muramoto,K. et.al. (1993) Neurosci.Lett. 163: 163. 4)Ehrlich,Y.H. et.al. (1986) Nature 320: 67. 5)Asch,A.S. et.al. (1993) Science 262: 1436. 6)村本和世他 (1991) 第64回日本生化学会、東京.7)Mansfield,S.G. et.al. (1992) J.Neurocytol. 21: 1007. 8)Sato-Yoshitake,R. et.al. (1989) Neuron 3: 229. 9)Suwa,M. et.al. (1993) Biochem.Biophys.Res.Commun. 191: 782.

285 成長円錐におけるシナプス前終末関連蛋白の局在

五十嵐 道弘、小宮 義璋
（群馬大・医・分子病態学）

〔要約〕胎生１７日から生後１４日目に至るまでのラット前脳より成長円錐画分を採取し、ウェスタンブロッティングにより、シナプス前終末に特徴的な種々の蛋白の発現を検討した。既に胎生１７日目の成長円錐には、今回調べた６種の蛋白（synaptophysin, synaptotagmin, SNAP-25, rab3A, syntaxin 1A, synaptobrevin)全てのバンドが検出されたが、少量であった。Synaptophysin以外の５種は、生後２日目まで急増し、以後１４日目までほとんど量的な変化は見られなかった。Synaptophysin のみは生後７日目にピークがあった。この結果から、in vivo においても、軸索成長円錐がシナプス前終末に変化するよりもかなり前から、exocytosis関連蛋白が成長円錐に存在していることが明らかとなった。

成長円錐は成長期の神経突起の先端に形成される特殊構造で、神経成長の場である外、将来的にシナプス終末に変化する構造でもある。近年、シナプス前終末に特徴的な蛋白（シナプス小胞蛋白やシナプス前膜結合性蛋白など）が１０種以上明らかとなり、それらの多くが伝達物質の放出、即ちCa^{2+}感受性のexocytosis (regulated exocytosis) に関与することが強く示唆されている(1,2)。成長円錐はシナプス形成以前に伝達物質を放出することが培養細胞で示されているがこれはCa^{2+}非依存性である(3)。成長円錐の機能がシナプス終末の性質に変化する際、これらのシナプス前終末蛋白の局在に変化が見られることを想定して、成長円錐の発達に伴うこれらの蛋白の発現を検索したので報告する。

【方法】胎生１７日より生後１４日目までのラット前脳よりショ糖密度勾配遠心法により、成長円錐画分を採取した(4)。シナプス小胞蛋白として、synaptophysin, synaptobrevin (VAMP-2), rab3A, synatotagmin; シナプス前終末形質膜に存在する蛋白として、SNAP-25とsyntaxin 1A の存在をウェスタンブロッティングによって確かめた。抗synaptophysin抗体（モノクローナル；Behringer ）以外の抗体は高橋正身博士より供与していただいた（抗synaptobrevin及び抗SNAP-25 抗体は兎由来のポリクローナル抗体、その他はモノクローナル抗体）。

【結果】今回検討した６種のシナプス特異蛋白は、いずれも胎生１７日目の成長円錐に既に少量ながら、存在していた（図１）。さらにsynaptophysin 以外の５種の蛋白は、生後２日目までに成長円錐における局在量が急激に増大し、以後１４日目まで成長円錐画分では量的に変化しなかった。Synaptophysin は生後５日目までは緩やかに増加し、７日目に５日目の２倍以上の発現量となったが、その後、１４日目にはやや低下した。成熟脳由来のシナプトソームと比較すると、いずれの蛋白も、成長円錐での局在量は３分の１程度であった。

他の比重の大きい画分と成長円錐画分でのsynaptophysin の局在量を比較した（図２）。生後５日目までは成長円錐での発現は他の画分に比べてきわめて少ないが(5)、生後７日目ではほぼ均等に存在し、生後１４日目では成熟シナプトソームの比重に相当する画分の方が成長円錐より多量のsynaptophysin を含んでいた。

【考察】既に培養神経細胞の成長円錐において、一部のシナプス関連蛋白の存在が免疫組織化学的に示されているが(6,7)、今回の結果からin vivo でも成長円錐にかなりの量のシナプス関連蛋白が既に発現していることが明らかとなった。従って、「成長円錐にシナプス関連蛋白が局在化することによって、シナプス前終末化が起こる」のではない、と考えられる。シナプス関連蛋白の成長円錐における生理的意義は不明であるが、(a) synaptic contactが生じた際、これらの蛋白が速やかなシナプス小胞の形成に役立つ、(b) 神経成長における膜の拡張に役立つ(8)、(c) 神経成長の際に糸状足の形成に関与する(9)、などの可能性がある。

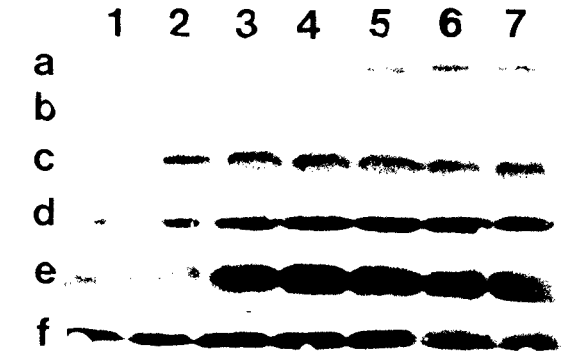
またsynaptophysin のみは他のシナプス関連蛋白と挙動を異にしているが、これは(a) 他のシナプス特異蛋白は非分泌細胞や酵母細胞などにもhomologue が見いだされるのにsynaptophysin にはそれがないこと(10)、(b) 他の蛋白は膜の融合過程(docking and fusion processes)に関与することが想定されているが、synaptophysin の機能ははっきりしないこと(11,12)、などからsynaptophysin の機能的特性に関係する可能性がある。Ca^{2+}依存性の伝達物質放出は生後7日目以降の成長円錐から起こっていることを示唆するデータがあるので(13)、シナプス機能の成熟化過程とこれらシナプス関連蛋白の発現がどのように関係しているかを現在検討している。

本研究に使用した抗体を提供していただいた高橋正身博士（三菱化成生命研）に深謝する。

【文献】

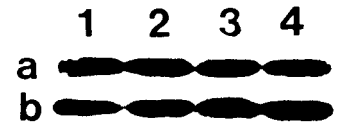
1) Sudhof TC, De Camilli P, Niemann H, Jahn R ('93) Cell **75**: 1-4.
2) Sudhof TC, Jahn R ('91) Neuron **6**: 665-77.
3) Young SH ('86) Dev Biol **113**: 373-80.
4) Igarashi M et al ('90) Dev Brain Res **51**: 1-9.
5) Saito S, Fujita T, Komiya Y, Igarashi M ('92) Dev Brain Res **65**: 179-84.
6) Mundigl O et al ('93) J Cell Biol **122**: 1207-21.
7) Osen-Sand A et al ('93) Nature **364**: 445-8.
8) De Camilli P ('93) Nature **364**: 387-8.
9) Feany MB, Buckley KM ('93) Nature **364**: 537-40.
10) Bennett MK, Scheller RH ('93) Proc Natl Acad Sci USA **90**: 2559-63.
11) Sollner T et al ('93) Cell **75**: 409-18.
12) Sollner T et al ('93) Nature **362**: 318-24.
13) Taylor J, Gordon-Weeks PR ('89) J Neurochem **53**: 834-43.

図1　成長円錐画分でのシナプス関連蛋白
総蛋白量： 50 μg；　抗体希釈倍率： 1,000倍
(a) synaptophysin; (b) rab3A; (c) synaptotagmin;
(d) synaptobrevin; (d) synataxin 1A; (f) SNAP-25



1: 胎生17日(E17); 2: E20; 3: 生後 2日(P2);
4: P5; 5: P7; 6: P10; 7: P14

図2　**Synaptophysin の局在**
(a) 生後 7日；(b) 生後14日



1. 成長円錐画分
(0.32 M/0.75 M sucrose 界面)
2. 0.75 M/0.9 M sucrose 界面
3. 0.9 M/1.05 M sucrose 界面
4. 1.05 M/1.2 M sucrose 界面

286 サイトカインによる培養グリア細胞の分化調節

伊藤康宏、澤田　誠、錫村明生*、丸野内　棣
（藤田保健衛生大学総医研応用細胞、*神経内科）

〔要約〕
マウス中枢神経系のグリア前駆細胞が発現するサイトカイン受容体を測定し、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への分化を司るサイトカインの役割を考察した。マウス脳混合培養でのIL-2Rの発現は生後5日目でピークに達し、LPSで刺激したものでは、さらに12日目にもピークが現われた。IL-3R、IL-4Rはともに2日目にはピークが出現し、10日目以降に再び増加した。

中枢神経系から産生されるサイトカインは、免疫系とは異なった特有の作用を有し、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細胞の増殖や分化に関与していると考えられている。本研究では、サイトカイン受容体mRNAの新しい定量法を開発しマウス一次培養における脳混合培養細胞において、オリゴデンドロサイトおよびミクログリアの分化および増殖に関与すると考えられているIL-2、ミクログリアの分化を調節しているIL-3、-4のそれぞれの受容体mRNAの量的推移を調べ、グリア細胞の分化過程を考察した。

〔方法〕
脳一次混合培養は、C3H/HeN新生マウスより培養に移した。培養液はEagle' MEM培地に10% FCS、0.5μ g/mlインスリンおよび0.2%グルコースを添加したものを使用した。total cellular RNAはそれぞれ0、2、5、8、12、15、20、25日目にChomczynskiとSacchiの方法により採取し、RT-PCR法 (1) にてIL-3、-4受容体mRNAの半定量を行った。また、IL-2受容体についてはPCR産物に欠失を導入したものをクローニングし、競合法による定量法を確立して測定した。

〔結果〕
IL-2受容体は、生後5日目にピークとなり、以後徐々に減少した。LPSで刺激した脳混合培養ではIL-2受容体は12～15日目にもピークが現われた。IL-3受容体は、2日目にピークが出現し以後低下したが、10日目ごろから再び増加した。IL-4受容体は、2日目にピークが出現し以後低下したが、10日目ごろから再び増加した。

〔考察〕
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 (2)、その前駆細胞からの分化は生後5日目ごろと考えられている。したがって今回みら

れたIL-2受容体の増加は、オリゴデンドロサイトの分化に一致したものと考えられる。また、LPSでの刺激により、10日目ごろからIL-2受容体が増加しているが、ミクログリアはLPSで刺激するとIL-2受容体が誘導され (3)、ミクログリアの増殖に一致してIL-2受容体が増加することが認められた。IL-3、-4受容体の増加はミクログリアまたはアストロサイトの増殖に伴うものと考えられる。

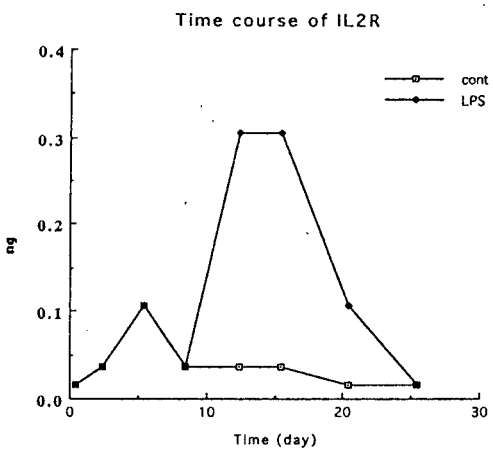
本研究ではマウス一次培養細胞から経時的にIL-2、-3、-4受容体 mRNAを測定し、オリゴデンドロサイトおよびミクログリアに対するそれぞれのサイトカインの機能を考察したが、これらはグリア細胞の活性、増殖、分化の調節など細胞間の情報伝達に関与していると考えられる。

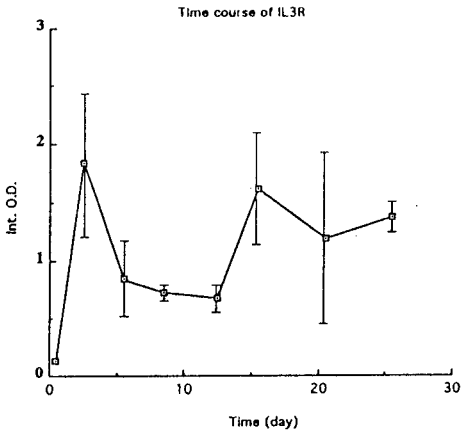
〔参考文献〕

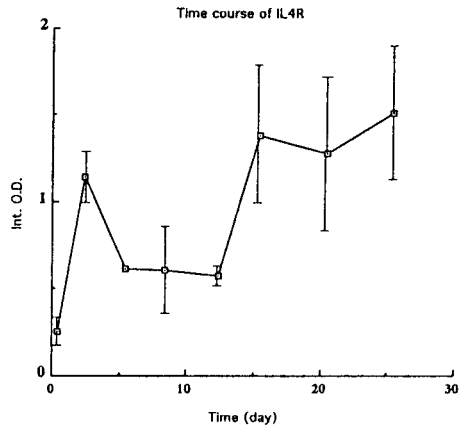
1 : Sawada, M. et al. (1992) Brain Res., 583. 296 - 299

2 : Benvenisite, E. N. et al. (1986) Nature, 321. 610 -613

3 : Sawada, M. et al. 投稿中







287 CMT, HNPP 患者線維芽細胞における PMP-22 遺伝子の発現

由村 健夫、佐田 正一郎、後藤 幾生
（九州大学医学部脳研神経内科）

〔要約〕 Charcot-Marie-Tooth 病type 1A (CMT1A)、Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) 患者の培養線維芽細胞を用いて、peripheral myelin protein-22 (PMP-22) 遺伝子の発現を検討した。PMP-22 遺伝子の発現は細胞の増殖状態に大きく依存するため、培養状態を同じにしてPMP-22 mRNA を定量した。10％血清培地から無血清培地にするとcontrol, CMT1A, HNPP いずれの細胞でも時間とともに PMP-22 mRNA 量は増加した。しかし、10％血清培地、24時間無血清、48時間無血清いずれの状態でも control に比べてCMT1A では128～155％にmRNA 量は増加しており、HNPP では42～64％に低下していた。DNA 合成は無血清培地で時間とともに低下したが、いずれの状態でも３種の細胞間に差はなかった。PMP-22 遺伝子発現はその遺伝子量に比例することが示された。しかし、PMP-22 遺伝子の発現が細胞増殖を一次的に抑制している結果は得られなかった。

[はじめに]

PMP-22 は末梢ミエリン蛋白の一つである。CMT1A はほとんどの症例において１つのalleleでPMP-22遺伝子の重複（すなわち遺伝子量が1.5倍）(1) があり、HNPPでは１つのalleleでPMP-22遺伝子の欠損（遺伝子量は半分）(2) があることが知られている。このことからPMP-22のoverexpression, underexpression がこれらの病態に深く関与していることが想像されている。PMP-22 はまた細胞増殖の停止に伴って発現してくるgrowth-arrest specific genes (Gas)の一つであるGas-3と同一のものであることも報告されている。すなわち、PMP-22遺伝子発現の比較には細胞増殖状態が同じであることが前提となる。今回我々はCMT1A, HNPP患者培養線維芽細胞を用い、培養条件を同一にしてPMP-22mRNA と細胞のDNA合成を比較検討した。

[方法]

1) 細胞培養：神経学的所見、末梢神経伝導速度、末梢神経生検より臨床的にCMT1あるいはHNPPが確実な症例の皮膚切片より線維芽細胞を培養した(3)。

2) PMP-22遺伝子量：線維芽細胞よりDNAを抽出し、Eco RIで消化後サザンブロットを行った。プローブはPMP-22 cDNAと対照プローブとしてamyloid precursor protein (APP) cDNA を用いた。PMP-22 band/APP band 比を定量した。

3) PMP-22 mRNA の定量：10％血清培地、無血清培地24 時間、無血清培地48 時間で線維芽細胞よりRNAを抽出し、ノーザンブロットを行った。プローブはPMP-22 cDNAと対照プローブとしてβ-actin cDNA を用い、PMP-22/β-actin 比を定量した。

4) DNA 合成：bromodeoxyuridine (BrdU) の DNA への取り込みを抗BrdU抗体で検出した。細胞増殖はBrdU-positive 核数 (%) で表した。

[結果]

1) 線維芽細胞のDNA分析で、PMP-22(11.8 kb)/APP比はnormal control では0.65-0.77 であったが、CMT1A では1.04, HNPP では0.36 とPMP-22 遺伝子量がそれぞれ1.5 倍、0.5 倍になっていることに合致する結果であった。

2) PMP-22 mRNA （図１、２）はいずれの細胞でも血清培地で低く、無血清培地24時間、無血清培地48時間と増加した。control 細胞と比較するといずれの状態でもCMT1Aでは28 ～55％高く、HNPP では36 ～58％低かった。

3) DNA 合成（図２）は無血清培地で低下したが、いずれの状態でも３種の細胞間に有意な差はなかった。

[考察]

CMT1A, HNPP でPMP-22 の遺伝子量にほぼ比例してその発現も変化していることが示された。このようなoverexpression あるいはunderexpression がミエリン形成不全、ミエリンの圧迫に対する脆弱性の原因となっている可能性示された。しかし、遺伝子の重複あるいは欠損の長さは1.5 Mb にも及ぶことから、他の遺伝子の関与も否定できない。

Gas-1 の強制的な過剰発現により細胞増殖は低下することが報告され、Gas-1 は細胞増殖を一次的にコントロールしている可能性が示されている。しかし、PMP-22 （すなわちGas-3） の発現はCMT1AとHNPPでは少なくとも 2 倍以上違うにもかかわらず、DNA合成には差がないことから、PMP-22 が細胞増殖を一次的に制御している可能性は支持されなかった。

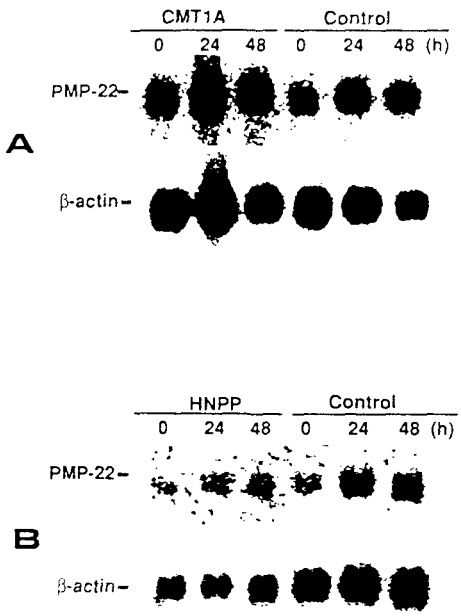


図 1 PMP-22遺伝子発現
(A)CMT1A (B) HNPP

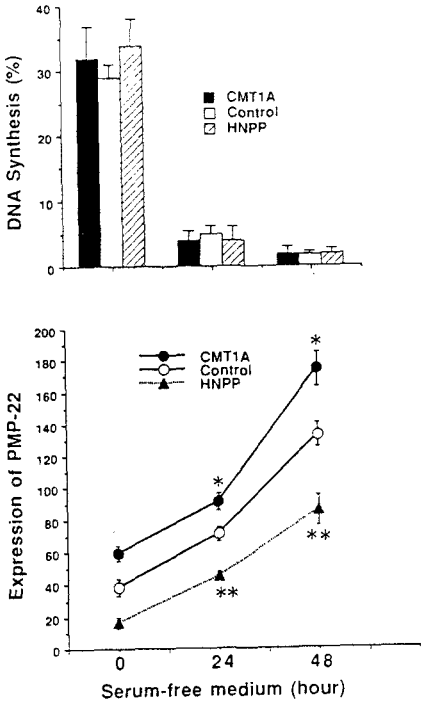


図 2 血清培地、無血清培地24時間
無血清培地48時間での
（上段） DNA合成
（下段） PMP-22 mRNA

文献
(1) Valentijn et al. (1992) Nature Genet 1, 166-170.
(2) Chance et al. (1993) Cell 72, 143-151.
(3) Yoshimura et al (1993) Brain Res 617, 55-60.

288 cAMP specific phosphodiesterase阻害剤投与による脳内転写制御因子CREBのDNA結合活性の変化

西林佐紀子，浅沼幹人，近藤洋一，岩田恵美，小川紀雄，森 昭胤
(岡山大医・分子細胞研・神経情報学部門)

〔要約〕cAMP specific phosphodiesterase阻害剤であるrolipramをラット腹腔内に単回投与し，脳内転写制御因子cAMP response element binding protein (CREB)のDNA結合能の変化をelectrophoretic mobility shift assayにて検討した。標識CREプローブを漸増させた飽和実験では，rolipram投与により前頭基底部でのCREBのCRE結合capacityが約14%増加していた。したがって，rolipramは脳内cAMPを増加させ，CREBを介する転写機構を活性化し得ると考えられた。

[目的]

cAMP response element binding protein (CREB)は特殊なタンパク構造(ロイシンジッパー)を持つ転写制御因子である。レセプターを介した細胞内二次情報伝達系，特にadenylate cyclase系の活性化はプロテインキナーゼAによるCREBのリン酸化をもたらす。これにより，CREBは核内に移行し標的遺伝子DNAの上流域に位置するcAMP response element (CRE)に結合し，その標的遺伝子の転写活性を調節している(1)。RolipramはcAMPに特異的なphosphodiesteraseの阻害剤であり，Schneiderらはrolipramをin vivoで末梢投与すると脳内cAMP濃度が特異的に増加すると報告した(2)。今回われわれはrolipramを単回投与し，cAMP濃度が増加している状態でのCREBの結合の性質を多面的にelectrophoretic mobility shift assay で検討した。

[方法]

サンプルの調製: 3ヵ月齢雄性Fisherラットにrolipram((±)-rolipram;(±)-4-(3-cyclopentyloxy-4-methoxy)phenyl-2-pyrrolidone)を腹腔内投与し(1.0mg/kg)，対照としては生理食塩水を等量投与した。注射2時間後に断頭屠殺し線条体，前頭基底部を取り出した。Schreiberらの方法(3)で脳組織内より核抽出液を調整した。得られた核抽出液は蛋白定量後，使用時まで-80℃で凍結保存した。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA): コンセンサスな配列を含む2本鎖DNAプローブ，CRE (5'-GATTCGTGACGTCAGCACAGG-3')，TRE (5'-GATTCGTGACTCAGCACAGG-3')と，mutantとしてCRE-m (5'-GATTCGTGCATTCAGCACAGG-3')を合成した。5'末端を3塩基突出させたプローブは3'末端を[α-^{32}P]dCTPとDNA polymerase I(Klenow flagment)を用いてラベルした。核抽出液(5 μg), 20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 2 mM Tris- HCl, 1 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 80 mM NaCl, 2 μg Poly(dI-dC), 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, DNAプローブ(2-600 pg)のmixtureを20℃で15分間インキュベート後，4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動(11V/cm, 4℃, 2.5時間)した。泳動後ゲルを乾燥し，オートラジオグラフィーを行った。得られたシグナルはイメージスキャナー(Epson GT-6500)で読みとり，optical densityをImage 1.44で定量した。

[結果および考察]

Rolipram単回投与によりラット前頭基底部，線条体ともにCRE結合量の増加が示された。このシグナルはmutantプローブによって消失した。前頭基底部において反応液中に非標識CREプローブ(0, 0.33, 1, 3.33, 10 ng/μl)を添加すると，CRE結合が濃度依存的に阻害された(図1左)。Rolipram投与群での置換曲線は左方移動し，rolipram投与によってCRE結合はより少量の非標識CREプローブで置換可能であることが明らかになった(図1右)。また，標識CREプローブ(1, 3.33, 10,100, 300 ng/μl)のみを用いた飽和実験では，

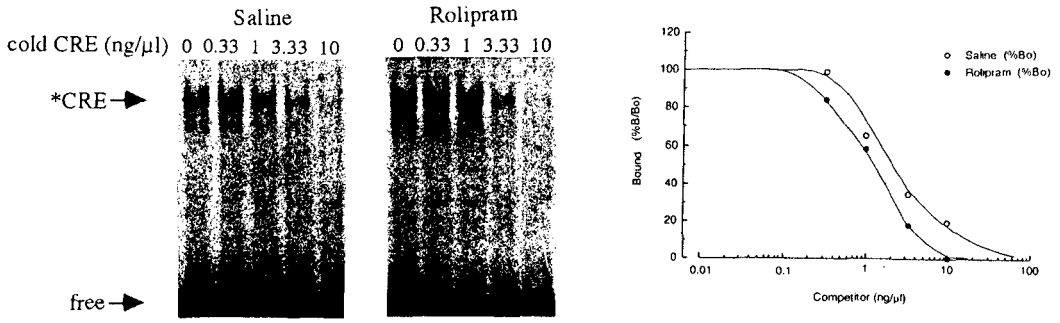


図1. ラット前頭基底部でのCRE結合に対するrolipramの影響
(左)一定量の標識CREプローブ(*CRE)に対して非標識CREプローブをcompetitorとして濃度依存的に添加したEMSA
(右)非標識CREプローブによるCRE結合(B: bound)に対する置換曲線
(competitor非添加時のCRE結合活性B0を100とした)

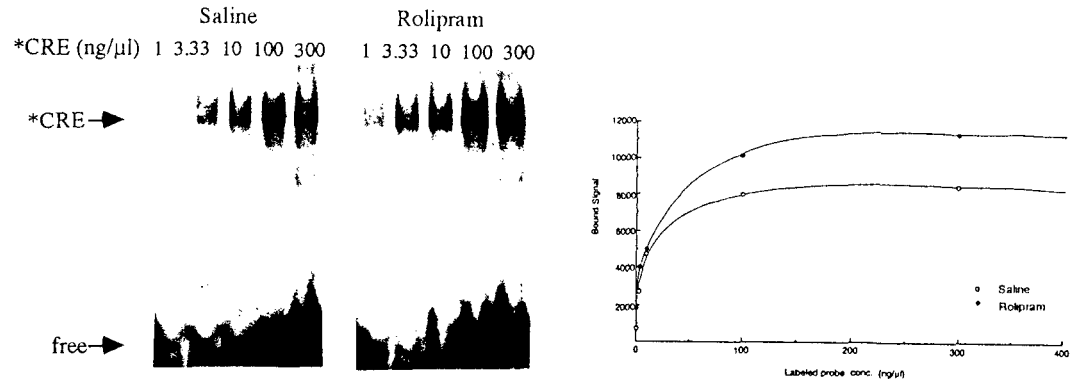


図2. ラット前頭基底部でのCREB結合に対するrolipramの影響
(左)標識CREプローブ(*CRE)を濃度依存的に添加したEMSA
(右)標識CREプローブによるCRE結合の飽和曲線

CREタンパク複合体のシグナルが濃度依存的に漸増する飽和曲線が得られた(図2右)。Rolipram投与により前頭基底部のCREBのCREへの結合capacityが約14%増加することが，飽和実験により明らかになった。これらの結果よりrolipramは脳内cAMPを増加させ，CREBを介しての様々な遺伝子の転写機構を活性化し得ると考えられる。

すでに我々は，若壮齢ラットへのrolipram慢性投与により脳内choline acetyltransferase (ChAT)活性が増加することを報告したが(4)，ChAT遺伝子上流にCREが存在することから(5)，rolipramのChAT活性への作用もCREBのCRE結合活性の増強作用に基づくものと考えられる。また，CREBはFosやJunとヘテロダイマーを形成しTRE配列とも親和性があることから，非標識TREプローブによる競合実験を行った結果，両群ともにCRE結合を置換するためには標識CREプローブの100倍量の過剰な非標識TREプローブを要した。したがって，CRE結合タンパクはTREにcross-talkするものの，CRE自身に対する結合に比べ著しく小さいと考えられた。

[文献]
1. Maekawa, T. et al. (1989) *EMBO J.* **8**, 2023-2028
2. Schneider, H.H. (1984) *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1690-1693
3. Schreiber, E.et al. (1989) *Nucleic Acid Res.* **17**, 6419
4. Asanuma, M. et al. (1993) *Arch. Gerontol. Geriatr.* **16**, 191-198
5. Bejanin, S. et al. (1992) *J. Neurochem.* **58**, 1580-1583

289 マウス小脳顆粒細胞初代培養系における核内CREおよびAP-1結合活性に対するγ-ヒドロキシ酪酸の効果

石毛久美子、伊藤芳久、福田英臣
（日本大・薬・薬理）

〔要約〕

マウス小脳顆粒細胞初代培養系から調製した核抽出液を用いて、γ-ヒドロキシ酪酸(GHB)の核内cyclic AMP responsive element (CRE)およびactivator protein 1 (AP-1) DNA結合に対する影響をゲルシフト法により検討した。細胞をGHBで処置すると、核内CREおよびAP-1 DNA結合活性は、濃度依存的に上昇した。CREおよびAP-1 DNA結合活性は非放射性のCREまたはAP-1 DNAプローブで阻害されたが、CRE結合に対してはAP-1 DNAよりCREの親和性が、またAP-1 DNA結合に対してはCREよりAP-1 DNAの親和性が約4倍高かった。また、核抽出液をc-fosまたはc-junの抗体で前処置すると、AP-1 DNA結合は阻害されたが、CRE結合は影響を受けなかった。GHBによるCREおよびAP-1 DNAの結合上昇はともにGABA$_B$受容体の特異的拮抗薬であるCGP 35348によって拮抗された。以上より、GHBはGABA$_B$受容体を介して核内CREおよびAP-1 DNA結合活性を上昇させること、およびAP-1 DNAに結合する蛋白質はfos/jun複合体であり、CRE結合蛋白質とは異なっていることが示唆された。

〔目的〕 GHBは生体内でもGABAから産生され、神経伝達物質として作用する可能性も示唆されている物質である(1)。また、GHBはてんかん小発作様症状を誘発させることが示されており(3)、GHB誘発てんかん小発作にともなってfos蛋白が発現することも報告されている(5)が、GHBの遺伝子レベルに対する影響には不明な点が多く残されている。そこで、GHBの遺伝子レベルに対する影響を検討するため、マウス小脳顆粒細胞初代培養系において核内CREおよびAP-1 DNA結合活性に対するGHBの影響を検討した。また、GHBにより誘導されるCREおよびAP-1 DNA結合蛋白質の性質についても検討を加えた。

〔方法〕 小脳顆粒細胞初代培養系は、生後7-8日目のddY系マウス小脳より調製した。培養は10 μMシトシンアラビノシド、25 mM KClおよび10%牛胎児血清を含むminimum essential medium中で行った。核抽出液は、培養8-9日目にSakuraiらの方法(2)に準じて調製した。ゲルシフトアッセイは、^{32}Pで標識した2本鎖AP-1 DNA (5'-GATCCGGCTGACTCATCACTAG-3')またはCRE (5'-GATTGGCTGACGTCAGAGAGCT-3')をプローブとしてSonnenbergらの方法(4)に準じて行った。電気泳動後、ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィー法でゲル中の放射能を検出した。

〔結果〕 マウス小脳顆粒細胞初代培養系の核内CREおよびAP-1 DNA結合活性はGHBの処置により、濃度依存的に上昇した。CREおよびAP-1 DNA結合の上昇はGHBの処置時間にも依存していた。また、GHBによるCREおよびAP-1 DNAの上昇はGABA$_B$受容体の特異的拮抗薬であるCGP 35348によって拮抗された（図1)。CRE結合は非放射性CREおよびAP-1 DNAの添加により濃度依存的に抑制された(図2A)が、その阻害強度はCREの方が約4倍強かった。AP-1 DNAの結合も非放射性CREおよびAP-1 DNAの添加により濃度依存的に抑制された(図2B)が、その阻害強度はAP-1 DNAの方が約4倍強かった。一方、核抽出液をc-fosまたはc-jun抗体で18時間前処置してからゲルシフトアッセイを行ったところ、AP-1 DNA結合は両抗体の処置でともに阻害されたが、CRE結合は影響を受けなかった。また、小脳顆粒細胞初代培養系を用いた受容体結合実験においてCGP 35348およびGHBは、^{3}H-baclofen結合を抑制した。

〔考察〕　小脳顆粒細胞初代培養系をGHBで処置すると、核内CREおよびAP-1 DNA結合活性の上昇が認められたが、この上昇がGABA$_B$受容体の特異的拮抗薬であるCGP 35348によって拮抗されることから、GHBは、GABA$_B$受容体を介して作用していることが示唆された。また、AP-1 DNAに結合する蛋白質はfos/jun複合体で、CREに結合する蛋白質とは異なっていることが示唆された。CRE結合蛋白質の性質については今後さらに検討する予定である。

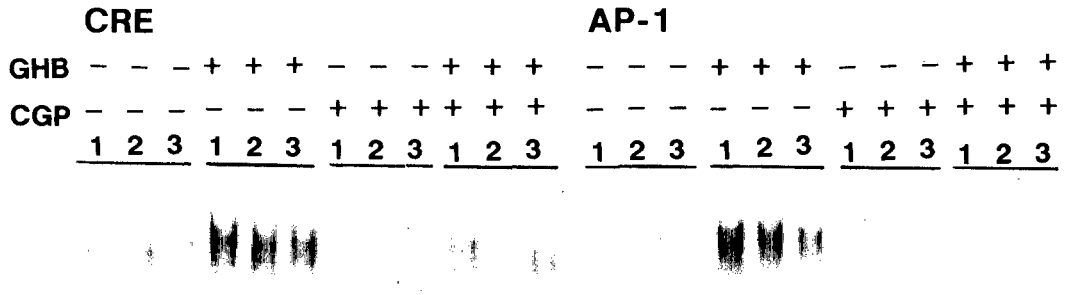


図1　GHBによるCREおよびAP-1 DNA結合活性の上昇とCGP 35348による拮抗
1 mM CGP 35348存在下または、非存在下に1 mM GHBで1時間処置した細胞から核抽出液を調製した。写真は3回の実験結果を示しており、数字は実験回数を示す。

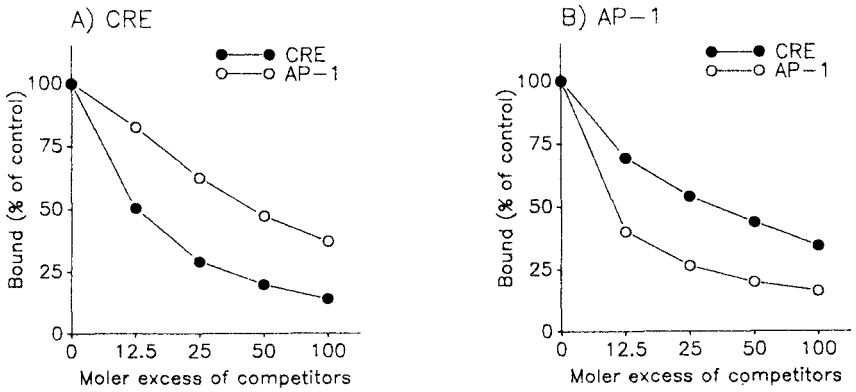


図2　非放射性CREまたはAP-1 DNAによるCREおよびAP-1 DNA結合活性の阻害
核抽出液は1 mM GHBで1時間処置した細胞から調製した。

〔文献〕 1 Vayer, P., Mandel, P., and Martre, M. (1987) Life Sci. 41, 1547-1557
2 Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T., and Tsuda, M. (1992) J. Neurochem. 59, 2067-2075
3 Snead, O.C. (1991) Neuropharmacology 30, 161-167
4 Sonnenberg, J.L., Mitchelmore, C., Macgregor-leon, P.F., Hempstead, J., Morgan, J.I., and Curran, T. (1989) J. Neurosci. Res. 24, 72-80
5 Zhang, X., Ju, G., and Le Gal La Salle, G. (1991) NeuroReport 2, 469-472

290 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C/EBPβのリン酸化反応と発現調節

矢野茂敏*、**、福永浩司*、滝口正樹***、生塩之敬**、森　正敬***、宮本英七*
（熊本大・医・*第一薬理、**脳神経外科、***分子遺伝）

〔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CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)βの発現調節および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、C/EBPβ mRNAは早期に増加し、刺激後1時間で最大となった。2）アストロサイト核抽出液を用いたゲルシフト法にて、C/EBPβのDNA結合活性がグルタミン酸受容体刺激後6時間で上昇することが認められた。3）[^{32}P]無機リン酸でラベルしたアストロサイトにおいて、グルタミン酸受容体刺激によりC/EBPβのリン酸化反応が上昇した。この反応は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）の自己リン酸化反応に相関した。また、グルタミン酸受容体刺激によるC/EBPβ mRNAの発現とリン酸化反応の上昇は、細胞内カルシウムに依存していた。以上の結果から、培養アストロサイトにおいて、グルタミン酸受容体は細胞内カルシウムを上昇させることによりCaMキナーゼIIを活性化し、C/EBPβの発現とリン酸化反応を調節していることが示唆された。

〔目的〕

グルタミン酸受容体は、細胞内カルシウム濃度を上昇させることにより、神経細胞死や、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ことが知られている。我々はこれまでに、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の活性化反応を明らかにしてきた（4）。最近、転写調節因子のひとつであるC/EBPβが、CaMキナーゼIIでリン酸化を受けることが下垂体由来細胞株を用いた実験で明らかとなった(3)。本実験では、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C/EBPβの発現調節およびリン酸化反応を遺伝子レベル、蛋白レベルで解析し、CaMキナーゼIIの関与を検討した。

〔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(1)により行なった。種々の時間グルタミン酸により細胞を刺激後、全RNAを単離し、C/EBPβ cDNAを用いたRNAブロットを行った。mRNAの定量はバイオイメージアナライザーにて測定した。同様の刺激後、Schreiberら（2）の方法にしたがってアストロサイト核抽出液を得、^{32}Pでラベルしたoligonuculeotideを用いたゲルシフト法によりC/EBPβの結合活性を解析した。*In situ*でのCaMキナーゼIIの自己リン酸化反応とC/EBPβ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可溶性分画を得た。CaMキナーゼIIおよびC/EBPβ特異抗体にて免疫沈降し、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。

〔結果と考察〕

グルタミン酸受容体刺激によるC/EBPβ mRNAレベルの変動を調べた。培養アストロサイトを500 μM

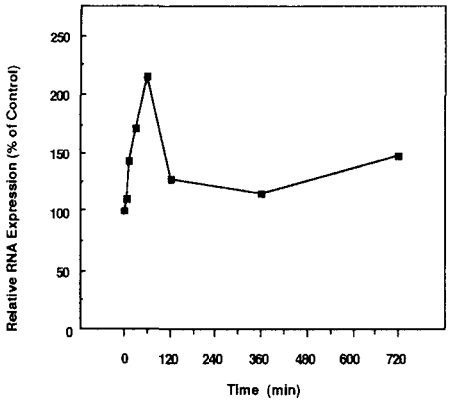


図1　グルタミン酸受容体刺激によるC/EBP　βmRNAの経時的変化

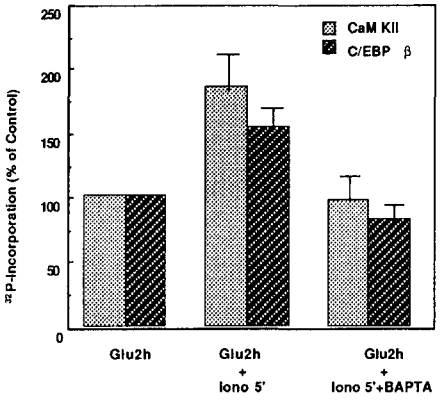


図2　CaMキナーゼII、C/EBP　βの *in situ* でのリン酸化反応におけるグルタミン酸の効果

グルタミン酸で各時間刺激すると、C/EBPβ mRNAは刺激後1時間でコントロール（刺激0時間）の約2倍に増加し、その後減少した（図1）。この増加は、グルタミン酸濃度依存性であり、培養液中のCa^{2+}を必要とした。次にアストロサイト核抽出液中のC/EBPβのDNA結合活性を調べた。細胞を500 μMグルタミン酸で各時間刺激すると、刺激後6時間でC/EBPβ結合活性の上昇を認めた。以上の結果は、培養アストロサイトにおいてC/EBPファミリーが、グルタミン酸受容体刺激により、遺伝子レベルで調節を受けていることを示している。さらに *in situ* でのCaMキナーゼIIの自己リン酸化反応とC/EBPβのリン酸化反応の解析を行なった。培養アストロサイトをグルタミン酸 500 μMで2時間刺激後、5 μMイオノマイシンで5分間刺激した。CaMキナーゼIIの自己リン酸化は刺激前に比べ1.8±0.4倍に増加し、BAPTA-AMで完全に抑制された。C/EBPβのリン酸化反応は刺激後1.6±0.2倍に増加し、BAPTA-AMで完全に抑制された（図2）。CaMキナーゼIIの自己リン酸化反応およびC/EBPβのリン酸化反応は細胞内カルシウムに依存性であり、両者の反応の変動はよく相関した。

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受容体刺激によりC/EBPβが誘導を受けることが示唆された。さらにC/EBPβは、アストロサイト細胞内でCaMキナーゼIIによりリン酸化を受ける可能性が考えられた。C/EBPβはIL4, IL6などのサイトカインや、IGF-IIなどの増殖因子の転写を制御していることが知られており、またCaMキナーゼIIによるリン酸化反応で転写活性が上昇することが報告されている（3）。以上を総合すると、グルタミン酸は、培養アストロサイトにおいてCaMキナーゼIIを活性化し、C/EBPβの発現の制御および転写の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

[文献]

1) McCarthy, K. D., and de Vellis, J. (1980) *J. Cell Biol.* 267, 12197-12201

2) Schreiber, E., Matthias, P., Muller, MM., and Schaffner, W. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 6419

3) Wegener, M., Cao, Z., and Rosenfeld, MG. (1992) *Science* 256, 370-373

4) Yano, S., Fukunaga, K., Ushio, Y., and Miyamoto, E. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 5428-5439

291 ラット海馬の長期増強（ＬＴＰ）に関連して発現する遺伝子の検索の試み

丸山　敬、葛目　博子、川村　勇樹、淺田　英穂、関野　祐子＊、小幡　邦彦
国立生理学研究所・神経化学、＊新技術さきがけ

〔要約〕

Ｋチャンネル阻害剤tetraetylammnonium（ＴＥＡ）によって誘因されるラット海馬スライスの長期増強に関連して発現される遺伝子を差分法とin situ hybridization（ＩＳＨ）を用いて検索することを試みた。ＴＥＡ処理したスライスよりλＺＡＰｃＤＮＡライブラリを作成し、脳全体のＲＮＡによって差分を行った。５０個程度のクローンよりそれぞれアンチセンスのプローブを作成し、ＩＳＨにより特異な細胞に発現している遺伝子を検索していった。その結果、あるニューロンにのみ発現しているものが数個見いだされた。まだ機能などはまったく不明であるが、新しい遺伝子の同定が期待される。

＜目的＞

ラット海馬スライスにおける長期増強は記憶のモデルとして注目されている。この現象は反復する電気刺激後に伝達効率が上昇するというものである。その分子機構としてＮＭＤＡ受容体の活性化などが提唱されている（１）。しかし、電気刺激によるＬＴＰは、限局された領域の現象であり、未知の遺伝子の検索は困難であった。最近になり、Ｋチャンネルの阻害剤の一つであるＴＥＡ（tetraethylammonium）処理によっても同様の現象が観察されることが報告された（２）。ＴＥＡ処理では海馬スライスの多くのニューロンでＬＴＰが誘発されると考えられる。そこで、ＬＴＰ処理した海馬スライスのメッセージから通常の脳全体のメッセージを差分して、ＬＴＰに関連した遺伝子の検索をめざした。スクリーニングとしては、in situ hybridization（ＩＳＨ）によって、ある特定の細胞だけに発現していることを指標とした。

＜方法＞

ラット海馬スライスは、通常の方法により作成しＴＥＡの効果を確認した（３）。その後、ＲＮＡを抽出しオリゴテックスによってpoly Aを精製し、Stratagene社のλＺＡＰシステムによりｃＤＮＡライブラリを作成した。このライブラリをヘルパーファージにより一本鎖のアンチセンスライブラリとした。脳全体のＲＮＡを精製し、InVitrogen社のサブトラクターによりビオチン化した。大過剰のビオチン化脳ＲＮＡと海馬由来の一本鎖ＤＮＡを混合すると、共通のメッセージは、ビオチン化したＲＮＡと二本鎖を形成し、フェノール抽出によって取り除くことができる（４）。残った一本鎖ＤＮＡを大腸菌にトランスフェクトすることによって差分ライブラリを作成した。

このライブラリからクローンを一個ずつひろい、プラスミドを調製し、ＲＮＡプローブを得た。これらのプローブによって海馬でＩＳＨを行い、特異的に発現しているクローンを検索した。

＜結果および考察＞

50個程度のクローンを検索したところ、いくつかのクローンが海馬の一部のニューロンだけで特異的に発現していることが見いだされた（図参照）。塩基配列、発現の詳細については、現在検討中である。

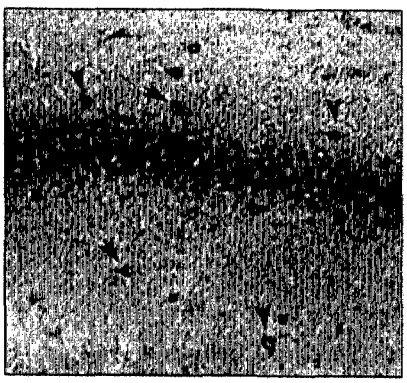
ＬＴＰの分子機構については、すでに確定された受容体などの活性化や既存のタンパク質の燐酸化などを中心に議論が進められている。我々は未知の遺伝子の検索を目的として、ＴＥＡ処理によって出現する遺伝子を差分法によって検索している。その結果、数個、特異的な発現が見られる遺伝子が特定されつつある。その機能や、ＬＴＰとの関連については全く不明であるが、なんらかの新しい興味ある遺伝子が見いだされる可能性が期待される。

1. 谷藤　学 (1993) 生物物理 33,39-45
2. Aniksztejn, L and Ben-Ari, Y. (1991) Nature 349, 67-69
3. Sekino, Y., Hashimoto, T. and Obata, K. (1992) Proc. Japan Acad. 68, Ser.B 191-195
4. Maruyama, K., Usami, M., Aizawa, T. and Yoshikawa, K. (1991) Biochem. Bipophys. Res. Commun. 171, 204-209

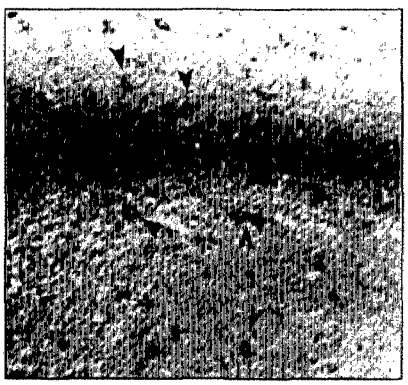
図説明

海馬ＣＡ１領域のクローン＃１、＃２のＩＳＨ

介在ニューロンと考えられる幾つかの神経細胞が特異的に染色されている。(矢印)



clone #1



clone #2

292 ヒトグリオーマ細胞株KG-1-C 細胞におけるβ_1およびβ_2アドレナリン受容体の発現調節：副腎皮質ホルモン、甲状腺ホルモン、およびレチノイン酸の効果

佐藤厚子、西崎　純*、伊野美幸、足立　淳、長谷川　浩、朝倉幹雄、松井宏晃
（聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室、*誠心会　神奈川第二病院）

〔要約〕β_1及びβ_2アドレナリン受容体(AR)をともに発現しているヒト由来グリオーマ細胞株KG-1-C細胞を見いだした。[^{125}I]-(-)Iodocyanopindolol結合は、Bmax = 175 fmol/mg protein、Kd = 10 pM、β_1AR:β_2AR = 46 %:54 %であった。RT-PCR法によりmRNAを定量すると、β_1 AR < β_2 AR であった。KG-1-C細胞をdexamethasone(DEX)処理(500 nM、2日間)すると、無処理対照群に比して、β_2AR のβ_1 ARに対する相対比は増加したが、総βAR数には変化がなかった。KG-1-C細胞をretinoic acid(RA)処理(10 μM、5日間)すると、DEX処理とは逆に、β_1ARのβ_2ARに対する相対比は増加したが、総βAR数には変化がなっかった。一方、KG-1-C細胞をtriiodothyronine(T_3)処理(100 nM、2日間)したが、β_1ARとβ_2ARの相対比、総βAR数いずれもにも変化は認められなかった。これらの結果から、KG-1-C細胞には、glucocorticoidやRAなどのホルモンに依存性のβAR遺伝子発現調節機構が存在しており、ヒト神経系におけるβ_1AR、β_2AR遺伝子の発現調節機構を研究するうえで有用な細胞であることが示唆された。

抗うつ薬に共通の薬理・生化学的示標として、ラット大脳皮質のβアドレナリン受容体(βAR)（特にβ_1AR)の減少が報告され、抗うつ薬投与後のβ_1AR遺伝子の転写あるいは翻訳活性の低下、mRNAの安定性の減少などが想定されており、抗うつ薬作用機序解明には、β_1ARの転写、翻訳そして蛋白質レベルでの変化を総合的に理解することが必要である。従来βAR発現調節に関する研究に、ラットC6 gliomaが汎用されてきたが、我々は、神経系におけるヒトβAR発現調節機構解明には、βARを発現する神経系由来細胞の使用が必要と考え、β_1ARおよびβ_2ARを発現している、ヒトグリオーマ細胞株KG-1-C細胞を見いだし、ホルモン依存性のβAR発現調節機構について検討した。

〔 方法 〕

1：細胞培養－－ヒトグリオーマKG-1-C細胞[1]は、10%の牛胎児血清、抗生物質を含むデルベッコ改変イーグル最小培地(DME)を用い、10%CO_2存在下、37℃で培養した。dexamethasone(DEX)、retinoic acid(RA)はそれぞれ培養液中に添加し最終濃度500nM、10 μMにて、前者は48時間、後者は5日間暴露した。甲状腺ホルモン(T_3)については、細胞を予め無血清培地Opti-MEM^{R}にて48時間培養し、その後、同培地に最終濃度100nMとなるよう添加し48時間培養した。

2：βアドレナリン受容体遺伝子転写物の定量法－－AGPC法により精製した全RNAからcDNAを合成後、ヒトβ_1AR；5′-TCGTGTGCACCGTGTGGGCC-3′、5′-AGGAAACGGCGCTCGCAGCTGTCG-3′、ヒトβ_2AR:5′-GCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC-3′、5′-CCCATCCTGCTCCACCTGGCT-3′をプライマーに、cyclophilin, GAPDH, β-actin mRNAを内部標準に用い、RT-PCR法による発現量の定量を行った[2]。

3:[^{125}I]-(-)Iodocyanopindolol ([^{125}I]CYP)結合実験－－[^{125}I]CYP結合実験は、既報の方法[3]に従い行い、Scatchard plots 及び結合阻害曲線は非線形最小二乗法によりコンピュータ解析した。

〔 結果 〕

1:KG-1-C細胞βARの薬理学的性質－－KG-1-C細胞とラットC6 gliomaの[^{125}I]CYP結合飽和実験のScatchard plotsをFig.1に示す。Kdは KG-1-Cが9.22 pM、C6 gliomaが9.85 pMで両者に有意な差はなかった。総βAR数はKG-1-Cが175.5 、C6 glioma が 106.5 fmol/mg proteinで、KG-1-Cが約1.6倍多かった。[^{125}I]CYP結合阻害実験の結果をFig.2に示した。非線形最小二乗法により解析すると、Hill 係数は0.52～0.73で、いずれも two-stateモデルに適合した。CGP 20712Aによる阻害曲線の高親和性成分(β_1AR成分を示す)は46% 、低親和性成分(β_2AR成分を示す)は54%で、一方、ICI118551による阻害曲線の高親和性成分(β_2AR成分を示す)は54% 、低親和性成分(β_1AR成分を示す)は46%であったことより、KG-1-Cで発現しているβARの46%はβ_1AR、54%はβ_2ARであった(Fig.2)。

2:KG-1-C細胞におけるホルモン依存性βAR発現調節－－DEX処理（500nM 、48 時間）するとCGP 20712Aによる阻害曲線の低親和性成分の比率が対照に比べ増加し(Fig.3)、β_2AR mRNAが増加する傾向を認めた（結果図示せず）。100 nM T_3で48時間処理したが、CGP 20712A による阻害曲線の高、低親和性成分の割合には変化はなかった(Fig.4)。RA処理（10 μM、 5 日間）するとCGP 20712Aによる阻害曲線の高親和性成分が増加し(Fig.5)、β_1AR mRNAが増加する傾向を認めた（結果図示せず）。なお、いずれの処置でも総βAR数に変化は認められなかった。

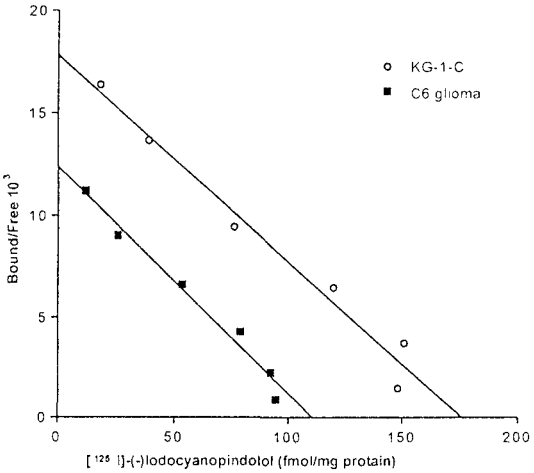


Fig.1 Scatchard plots of [^{125}I]-(-)Iodocyanopindolol binding in C6 glioma and KG-1-C cells.

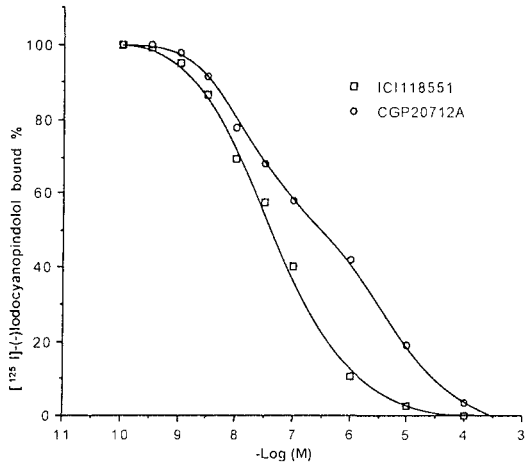


Fig.2 Displacement curves of [^{125}I]-(-)iodocyanopindolol binding by CGP 20712A or ICI118551 in KG-1-C cells

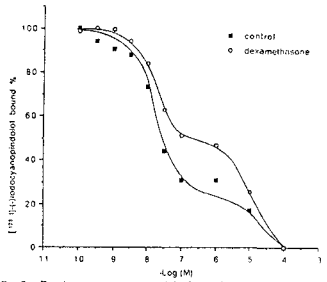


Fig.3 Displacement curves of [^{125}I]-(-)iodocyanopindolol binding by CGP 20712A in control and dexamethasone-treated KG-1-C cells

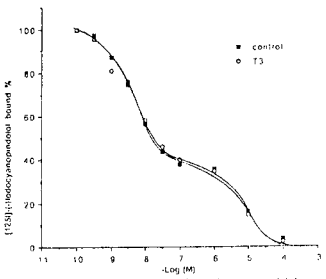


Fig.4 Displacement curves of [^{125}I]-(-)iodocyanopindolol binding by CGP 20712A in control and triiodothyronine-treated KG-1-C cells

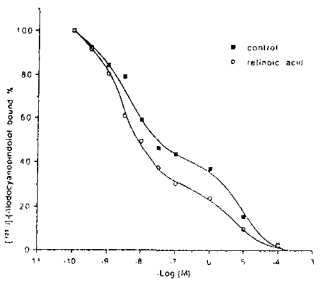


Fig.5 Displacement curves of [^{125}I]-(-)iodocyanopindolol binding by CGP 20712A in control and retinoic acid-treated KG-1-C cells

[考察]

DEXやcAMP依存性にβ_2AR遺伝子発現が増加することが報告された[4]。Fig. 3に示すように、KG-1-C細胞では500 nM DEX処理によりβ_2AR成分が増加しており、β_2AR遺伝子発現の増加に起因すると考えられる。一方、総βAR数には有意な変化を認めなかったことから、β_1AR遺伝子の発現あるいは翻訳活性が減少した可能性が考えられたが、有意なβ_1AR mRNAの減少は認められなかった。ヒトβ_1AR遺伝子プロモーター領域にはthyroxine responsive element(TRE)が存在する[5]が、Fig. 4に示すようにT$_3$処理後にβ_1AR成分の変化が認められなかったことより、KG-1-C細胞では、C6 gliomaと同様に、核T$_3$結合蛋白質の発現量が少ないためT$_3$の効果が認められなかったものと考えられた。我々は、ヒトβ_1AR遺伝子プロモーター領域にRA responsive elementが存在することを同定しており[5]、Fig. 5に示すようなRA処理後のβ_1AR成分の増加が、β_1AR遺伝子発現の増加に基づく可能性が考えられる。KG-1-C細胞はβ_1AR、β_2ARをともに発現し、ホルモン依存性のβAR発現調節機構を有しており、今後、神経系におけるヒトβARの発現調節に関する研究に有用であると思われる。

[参考文献]

1) Miyake, E.(1979) Acta Neuropathologica **46**, 51-55.
2) Ungerer, M.et al.(1993) Circulation **87**, 454-463.
3) Burgisser, E., and Lefkowitz, R. J.(1984) in *Brain Receptor Methodologies* (Marangos, P.J. et al. eds)Part A, pp.229-253, Academic Press, Orland, FL
4) Collins,S. et al.(1992)Trends in Pharmacol. Sci. **17**, 37-39.
5) 足立 淳(1992)聖マリアンナ医科大学雑誌、**20**, 246-261.

293 脊髄の分化過程におけるグリシン受容体α1・α2サブユニットmRNAの分布の変化

渡辺　えり*,**,　赤木　宏行*
(*群馬大学医学部薬理学教室, **麻酔・蘇生学教室)

〔要約〕

胎生期（14日胚）から成熟期（50日齢）にかけてのラット脊髄に発現する2種類のグリシン受容体サブユニット（α1・α2）mRNAの分布様式を，*in situ* hybridization法を用いて解析した．α1mRNAの発現量は動物の成長に伴って増加する傾向を示したのに対し，α2mRNAを含有する細胞の数は加齢とともに減少した．しかし，成熟動物においても後角の一部の細胞ではα2mRNAが発現していることが認められた．幼若期（10日齢）の脊髄にはα1・α2mRNAが同一ニューロンに共存することを示唆する結果が得られた．

[目的]

抑制性シナプス伝達に関与するグリシン受容体チャネルはα・βの2種類のサブユニット蛋白で構成される．この中で，リガンド結合能をもつαサブユニットには複数の亜種（α1～α4）が存在する．ラット脊髄組織においては，細胞が成熟するにつれてα2からα1への発現切り換えが起こることが，電気生理学的(1)および生化学的手法(2)を用いた研究により示唆されている．本研究では，胎生期から成熟期のラット脊髄におけるα1およびα2mRNAの発現を組織細胞化学的手法を用いて比較検討することを目的とした．

[方法]

胎生14，18日（以下E14，18），生後0，5，10，21，50日齢（P0～50）のWistar系ラット脊髄をエーテル麻酔下に摘出し，5μmの既固定凍結切片を作製した．プラスミド（pBluscript SK(-)）に挿入したα1・α2サブユニットのcDNA断片（サイズはそれぞれ156bpと213bp．両者の相同性は76%）を鋳型に用いてin vitroで合成したアンチセンス鎖RNAをプローブとして用いた．Hybridizationおよびその後の組織の処理はSimmonsらの方法(4)に従った．対照としてセンス鎖RNAをプローブに用いた実験を行い，比較した．

[結果と考察]

1）P21およびP50の組織においてα1アンチセンスプローブと結合するRNAの発現を示す強いシグナルが観察された．シグナルは灰白質の前，後角にわたって遍在していた（図1）．これは，Satoらの報告（3）に一致する．これに対しセンスプローブを用いた切片からは，顕著な陽性シグナルが観察されなかった．

2）α1mRNAの発現はラットの加齢とともに増加することが組織化学のレベルで示された（図1）．これはblot hybridizationにより得られた結果(2)と一致する．E14組織においてもシグナルが検出できることから，α1mRNAは脊髄ニューロンの分化過程の早い時期から発現しているものと思われる．

3）α 2mRNAはE14からP0までの時期の脊髄において強いシグナルとして検出された．E14では外套層，P0では灰白質全域にわたってほぼ均一に分布していた．その後発現量は日齢を経るにつれ減少する傾向を示した（図1）．しかし，P21，P50の後角組織において，α 2シグナル陽性細胞が少数ながら検出された（図2）．このことから，ある種の成熟ニューロンにおいてはα 2サブユニットもグリシン受容体の構成蛋白としてシナプス伝達に関与することが示唆される．

4）P10組織の連続切片を比較したところ，同一のものと推定される前角細胞（おそらく運動ニューロン）において，α 1およびα 2 mRNAがともに発現していることが確認された．胎生～幼若期の脊髄ニューロンに存在するグリシン受容体チャネルの単一分子はα 1およびα 2タンパクで構成される集合体(heteromeric assembly)である可能性が電気生理学的実験によって示唆されているが(5)，今回の実験結果はそれを組織化学の見地から支持するものと考える．

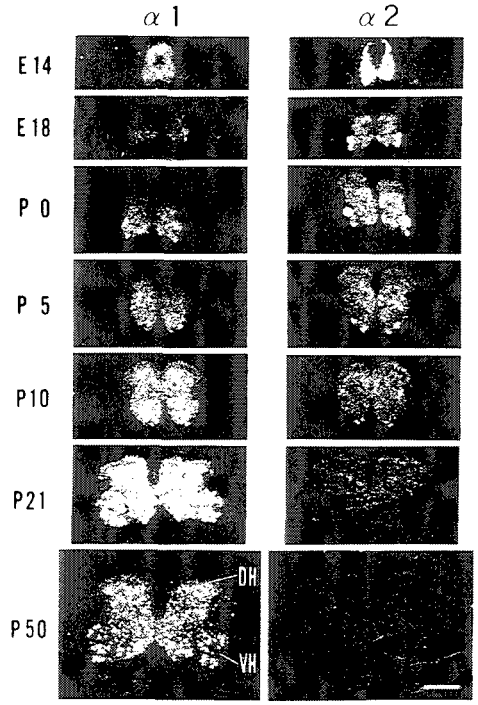


図1　各日齢のラット脊髄におけるグリシン受容体α 1・α 2サブユニットmRNAの分布（×5対物レンズによる暗視野像）
ＶＨ：前角，ＤＨ：後角
スケール・バーは５００μｍ

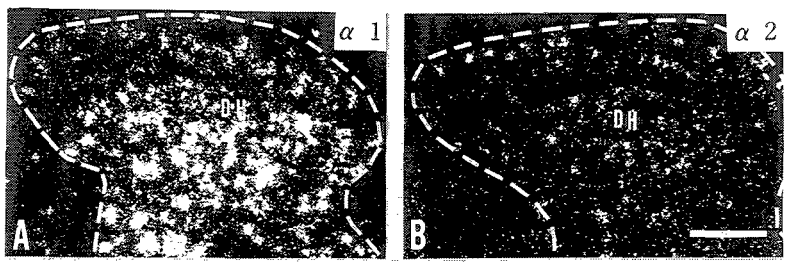


図2　Ｐ５０のラット脊髄後角におけるα 1・α 2サブユニットｍＲＮＡの分布
（×２０対物レンズによる暗視野像）
点線内は灰白質，ＤＨ：後角，スケール・バーは１００μｍ

[文献]
(1)Akagi, H., and Miledi, R. (1988) *Science* 242, 270-273
(2)Akagi, H., Hirai, K., and Hishinuma, F. (1991) *FEBS lett.* 281, 160-166
(3)Sato, K., Zhang, J. -H., Saika, T., Sato, M., Tada, K., and Tohyama, M. (1991) *Neuroscience.* 43, 381-395
(4)Simmons, D. M., Arriza, J. L., and Swanson, L. W. (1989) *J. Histotechnol.* 12, 169-181
(5)Takahashi, T., Momiyama, A., Hirai, K., Hishinuma, F., and Akagi, H., (1992) *Neuron* 9, 1155-1161

294 A Simple Protocol for Amplification of cDNA Ends (SPACE) 法 "ヒト脳の蛋白カルボキシメチル化酵素のcDNA配列決定"

溝渕睦彦、四宮博人*、佐藤誠**、武田良平
(愛媛大学神経精神医学教室、*細菌学教室、**香川医科大学第一内科)

〔要約〕

PCRを用いてcDNAをクローニングする方法は、現在まで幾つか報告されている。われわれも、nested RACE法 (Rapid Amplification of cDNA Ends)を用い、種々のcDNAの構造解析を行なってきた。しかし、既報のいずれの方法も、cDNAの長さや立体構造上の問題などから多くの限界がある。今回われわれは、cDNAライブラリーを鋳型とし、ベクターDNAと目標とする遺伝子の既知部分のプライマーを用い、二段増幅(nested amplification)し、簡単に迅速決定する方法を確立した。この方法は、サザンブロット分析なしに、5'と3'両方向にcDNA walkingが可能である。この方法を用いて、ヒト脳の蛋白カルボキシメチル化酵素のcDNA配列を決定した。

[はじめに]

PCRを利用して既知の一部分のDNA配列をもとに、未知のgenomic DNAやcDNA配列を決定する方法が幾つか報告されている。例えば、gene walking [1], anchor adaptor [2], inverse PCR [3]やわれわれが開発したRAGE 法[4]などがある。一方、cDNAに関しては、Frohmanらのnested RACE等が報告されている[5-7]。今まで、われわれもnested RACE法を用いて幾つかのcDNAを分析した[8,9]。しかし、長いcDNA(約5 kb以上)や立体構造をとりやすいcDNAなどはPCR増幅し解析できない。そこで、cDNAライブラリーを鋳型とし、簡単でしかも迅速にcDNA walkingする方法を確立し、ヒト脳の蛋白カルボキシメチル化酵素のcDNA配列を決定した。

[方法]

使用したヒト脳cDNA ライブラリーはClontech社から購入した。このライブラリーは、ベクターがlamda gt 11で、EcoR Iをクローニング部位としている。二段増幅に用いたlamda gt 11のプライマーは、クローニング部位(EcoR I site)から160 nt (外部プライマー; 5'-AGCAGGTCAGTGCGTAC-3')と43 nt (内部プライマー; 5'-GACACCAGACCAA CTGG -3')離して作成した。PCRの条件は、35サイクル(94 C; 80 sec, 50-58 C; 90 sec, 74 C; 3 min)で増幅し、一回目のPCR産物をTEで 20倍希釈後、5μlを二回目の鋳型として増幅した。PCRの溶液等は既報の方法を用いた[8]。目的のDNAは、アガロース電気泳動後DEAE membrane で精製した。

[結果と考察]

図1-A)で、SPACE法を簡単に説明した。一回目と二回目のPCR産物のうち、バンドの長さの差が[(λo-λi; 117 nt)+So-Si]で、しかも主バンドが、目的のcDNA断片である。ここでの注意点は、図1-B)で示しているようにクローニング部位には目的とするcDNAの断片が幾つか挿入されている。従って、目的とするcDNAのバンドは数個増幅される。しかも、センスとアンチセンスが逆向きに、約半分の割合で挿入されているため、3'末

端部はgene specific センスプライマー(So, Si)で、5'末端はアンチセンスプライマー(Ao, Ai)で増幅する。この際、ベクタープライマーは同じもの(λo, λi)を用いることができる。図1-C)に、一回目と二回目のPCR産物と精製後の目的の主バンドを示している。このバンドを鋳型として、asymmetric PCR後direct sequencingした電気泳動を図2に示した。本SPACE法を用いて、ヒト脳の蛋白カルボキシメチル化酵素のcDNA配列を決定した。

[文献]

1. Parker, J.D., Rabinovitch, P.S. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055
2. Roux, K.H. and P. Dhanarajan. (1990) BioTechniques 8: 48
3. Ochmann, H.A., Gerger, S. et al. (1988) Genetics 120: 621
4. Mizobuchi, M. and Frohman L.A. (1993) BioTechniques 15: 215
5. Frohman, N.A. and Martin, G.R. (1989) Technique 1:165
6. Loh, E.Y., Elliott, J.F. et al. (1989) Science 243: 217
7. Ohara, O., Dorit, R.L. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5673
8. Mizobuchi, M., Frohman, M.A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5: 476
9. Mizobuchi, M., Murao, K. et al. (1994) J. Neurochem. 62: 322

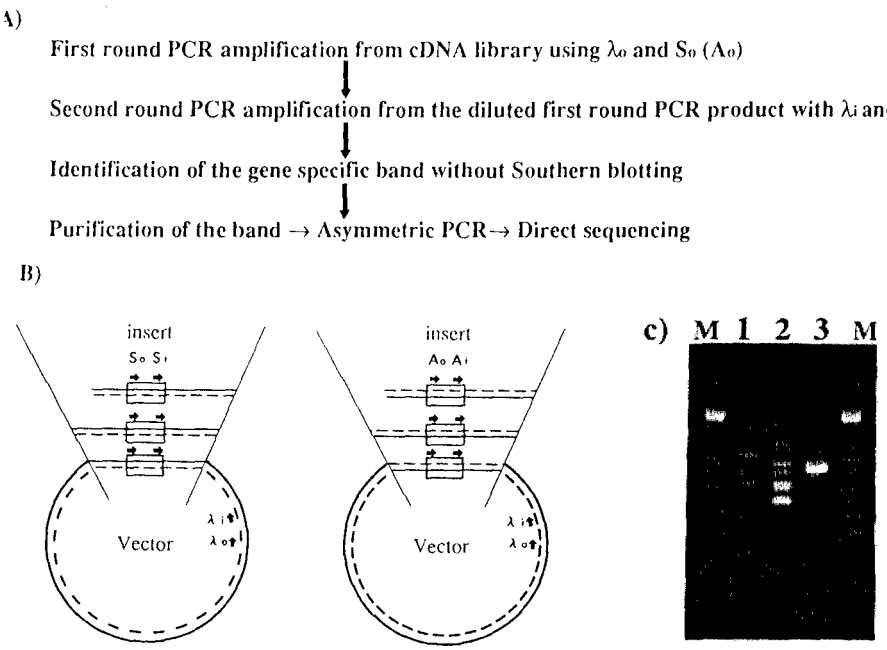


図1、SPACE法の説明図とPCR産物
A) SPACE法のプロトコールを簡単に示した。
B) PCRのプライマーと鋳型の関係
λ; ベクター上のプライマー
S; 既知部分のgene specific センスプライマー
A; 既知部分のgene specific アンチセンスプライマー
i; inner o; outer
C) PCR産物のアガロースゲル電気泳動（エチジウムブロマイド染色）
M; Molecular Marker, 100bp Ladder
1; 一回目のPCR産物
2; 二回目のPCR産物
3; ゲル精製後の目的バンド



図2、シークエンスゲル電気泳動の図。左からGA,T,C.

295 Haloperidol, (-)-Sulpiride およびSCH23390腹腔内投与によるマウス脳のc-*fos*とc-*jun* mRNA 発現

尾崎 宜洋[1]、勝元 栄一[1]、横谷 昇[2]、山上 榮[1]
大阪市立大学医学部神経精神医学教室[1)] 大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所[2)]

〔要約〕
ddYマウスの腹腔内に Haloperidol（以下HP）、(-)-Sulpiride（以下SP）及びSCH23390を注射したときのマウス脳内 c-*fos*とc-*jun* の発現をRNase protection assay を用いて調べた。その結果、HP、SPのどちらにおいても c-*fos*とc-*jun* の発現は、用量依存的に増加し、経時的には投与30分後に最大の発現を示した。ただ、SPのほうは、誘導の時間的な延長が見られた。また、SCH23390の注射では、c-*fos*とc-*jun* の発現は認められなかった。以上より、c-*fos*とc-*jun* の発現は Dopamine D_2 receptor に関与すると考えられた。

〔目的〕
c-*fos*、c-*jun*は、immediate early gene のひとつであり、c-*fos* は、抗精神病薬の投与によって誘導されることが報告されている(4)。我々は、HP、SP及びDopamine D_1 antagonist SCH23390をマウスの腹腔内にそれぞれ注射したときのc-*fos*とc-*jun* の発現をRNase protection assay によって調べた。

〔方法〕
1．HP、SP及びSCH23390投与マウス：5週令のddY雄性マウスに3% acetic acid に溶解したHP(0.1,0.2,0.5,0.8,1,2,4及び8mg/kg体重)、SP(10,20,30,40,80,100及び200mg/kg)およびSCH23390(0.1,0.2,0.5,0.8,1,2,4及び8mg/kg)を microsyringe で腹腔内に注射した。

2．cRNA probe の調整：マウスc-*fos* のcDNA 配列を基にDNA primer を合成し、RT−PCR法によりc-*fos* cDNA を精製し、PGEM7G(+)に挿入した(1)。c-*jun* cDNA は、供与されたものをPGEM7G(+)に挿入した(5)。合成されたcDNA を鋳型にして in vitro transcription により[^{32}P]-UTPを用いて、それぞれcRNAを合成し、probe として実験に供した。

3．RNase protection assay ：cRNA probe (8×10^4 cpm) と sample RNA(10 μg)を18時間45℃でhybridizationを行った。その後、RNase で処理し、PAGE を行った(6)。さらに、-80℃で48時間 autoradiography を行い、結果をdensitometer で scan した。

〔結果〕
HP注射30分後におけるc-*fos* の発現誘導は、用量依存的な上昇を示し、8mg/kgで最大の発現誘導を示した(Fig.1)。また、HP1mg/kg注射した場合のc-*fos*発現の経時的変化は、注射15分後より誘導が始まり、30分後でピークに達し、120分以後の発現量は僅かに認められただけであった(Fig.2)。c-*jun* については、c-*fos*と同様、用量依存的に上昇を示したが(Fig.1)、経時的には、30分後にピークとなった、c-*fos* に比べると、60,120,180および360分後と発現量は徐々に低下した(Fig.2)。 他方、SPの注射では、注射30分後のc-*fos*とc-*jun* の発現誘導は、HP同様用量依存的に増大し、100mg/kgで最大の発現誘導を示した(Fig.3)。SP20mg/kg注射したときの経時的変化については、やはりHP同様注射30分後にピークに達し、以後低下したが、HPに比べると c-*fos*とc-*jun* ともに明らかな誘導の延長を示した(Fig.4)。SCH233390 を投与したときは、c-*fos*とc-*jun* ともに発現誘導 は、vehicleを投与したときと同様、僅かに見られただけであった。また、SCH233901mg/kgを前投与し、30分後にSP20mg/kg 投与したときのc-*fos*とc-*jun* 発現誘導の経時的変化では、注射30分後にピークを示した後低下し、120分後には発現が認められなかった(Fig.5)。 なお、vehicle である3% acetic acid を投与しても僅かにc-*fos*とc-*jun* 発現がみられたが、低濃度のHPやSPに比べても有意に低値であった。

〔考察〕
Dopamine D_1,D_2 antagonist HPおよび Dopamine D_2 antagonist SP投与によって、c-*fos* 、c-*jun* ともに発現誘導が認められ、Dopamine D_1 antagonist SCH23390投与で両者の誘導が認められなかったことより、c-*fos* 、c-*jun* の誘導は、Dopamine D_2 receptor 遮断作用に相関するのではないかと推測しうる(2)。また、SCH23390前投与後、SPを投与したときのc-*fos* 、c-*jun* 誘導の経時的変化がHPに近いことを考慮すると、HP投与に比べてSP投与したときc-*fos* 、c-*jun* 誘導の減衰が遅延した理由は、SP投与の場合、Dopamine D_2 receptor を遮断することによって Dopamine D_1 receptor の感受性が高まり、結果的に内因性の dopamine が dopamine D_1 receptor を刺激し(3)、dopamine D_2 receptor 遮断作用との相乗作用でc-*fos* 、c-*jun* 誘導の減衰が遅延したと考えられる。

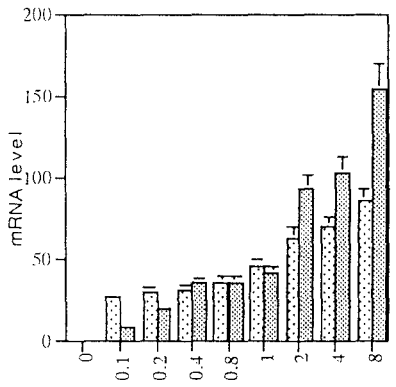


Fig.1 Dose HP(mg/kg)

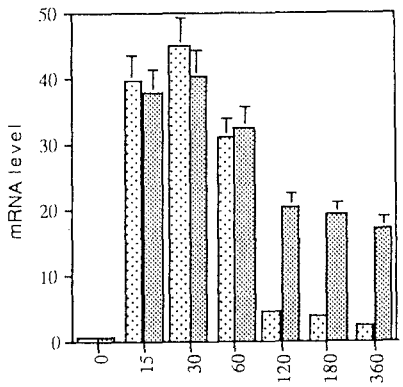


Fig.2 Time after HP injection(min)

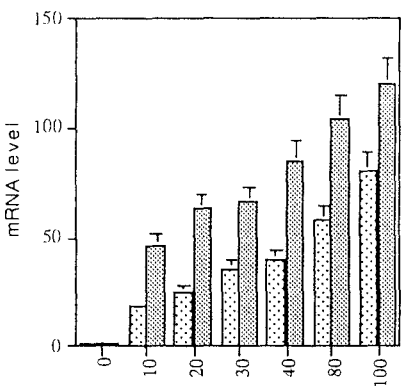


Fig.3 Dose SP(mg/kg)

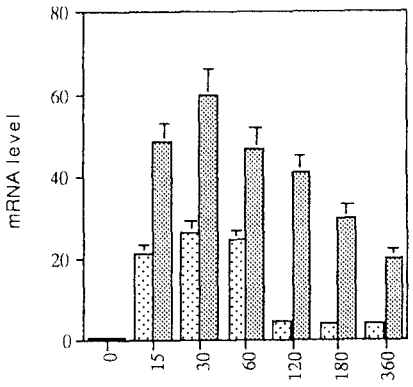


Fig.4 Time after SP injection(min)

Fig.1 and 2: Quantitative densitometory of the c-fos(▨) and c-jun(▨) mRNA expressions in mouse brain at 30 min after HP(0.1 to 8mg/kg) injection and at different times by the injection of HP(1 mg/kg).
Fig.3 and 4: Quantitative densitometry of the c-fos and c-jun mRNA expressions in mouse brain at 30 min after SP(10 to 100mg/kg) injection and at different times by the injection of SP(20 mg/kg).
Fig.5: Quantitative densitometry of the c-fos and c-jun mRNA expressions in mouse brain at different times by the injection of SP(20 mg/kg) following that of SCH23390(1 mg/kg).

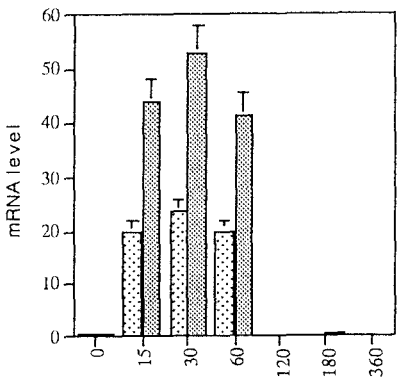


Fig.5 Time after SP injection(min)

References

(1) Van Beveren C. et al. (1983) Cell 32, 1241-1255.
(2) Dragunow M. et al. (1990) Neuroscience 37,2,287-294.
(3) Morelli M. et al. (1993) Neuroscience 53,3,673-678.
(4) Miller J.C. (1990) J. Neurochemistry 54, 1453-1455.
(5) Lamph W. W. et al.(1988) Nature 334,629-631.
(6) Zinn K. et al. (1983) Cell 34,865-879.

296 アルツハイマー病脳における神経原線維変化に関与するタウ因子の燐酸化と脱燐酸化反応

小野常彦[*,**]、山本秀幸[*]、田島和周[*]、久永真市[***]、岸本健雄[***]、宮川太平[**]、宮本英七[*]
（熊本大・医・[*]第一薬理、[**]神経精神医学、[***]東工大生命理工）

〔要約〕

アルツハイマー病脳における神経原線維変化の主な構成成分は燐酸化タウ因子であることが知られている。さらに、その燐酸化反応にはプロリン指向性蛋白質燐酸化酵素の関与が示唆されている。本研究ではプロリン指向性蛋白質燐酸化酵素により燐酸化したタウ因子を基質とし、その脱燐酸化反応を検討した。cdc2 キナーゼと TPKII (tau protein kinase II) 及びグリコーゲン合成酵素キナーゼ３α (GSK3α) により燐酸化されたタウ因子は蛋白質脱燐酸化酵素２Aのホロ酵素 (PrP2Ah) とカルシニューリン (CaN) によって脱燐酸化を受けた。さらに脱燐酸化反応の部位特異性を検討するためタウ因子において異常燐酸化部位として詳細に検討されている１９９番目と２０２番目のセリン残基、及び３９６番目のセリン残基を燐酸化した二種類の燐酸化ペプチドを合成し各々のペプチドに対するポリクローン抗体を作成した。牛脳より精製したタウ因子には作成した二種類の抗体に対する反応性が認められた。PrP2Ah と CaN による脱燐酸化反応によりタウ因子の電気泳動上の移動度が増加した。抗体による脱燐酸化部位の検討で、セリン１９９、２０２とセリン３９６が PrP2Ah と CaN によって脱燐酸化を受けることが明らかとなった。以上の結果よりタウ因子の異常燐酸化部位の脱燐酸化反応に PrP2A と CaN が関与する可能性が示唆された。

[目的]

アルツハイマー病脳に存在する神経原線維変化の主要な構成成分は燐酸化タウ因子であることが知られている。燐酸化反応を触媒する蛋白質燐酸化酵素の存在が明らかであるとともに、脱燐酸化反応を触媒する蛋白質脱燐酸化酵素の阻害が示唆される。神経原線維変化に存在する燐酸化タウ因子の形成過程を明らかにする目的で、関与する蛋白質脱燐酸化酵素の同定を試みた。

[方法]

既報の方法によりタウ因子をウシ脳から精製した(1)。ラット脳より、GSK3α (2)、PrP2Ah (3)、CaN (4)、ウシ脳より蛋白質脱燐酸化酵素２Aの触媒サブユニット (PrP2Ac) (5)、ブタ脳より TPKII (6)、ヒトデ卵母細胞より cdc2 キナーゼ (7)、大腸菌の発現系により蛋白質脱燐酸化酵素２C（PrP2C）（東北大学、田村真理博士より提供）を精製した。ヒト最長タウ因子(8)の Ser-199, Ser-202, Thr-205（Peptide-1）および Ser-396（Peptide-2）を含む２種類のペプチドを合成した。さらに Peptide-1、Peptide-2 の Ser-199, 202, 396 に化学的に燐酸を結合させた合成燐酸化ペプチドを家兎に免疫し、ポリクローン抗体 (anti-PP-1、anti-PP-2) を作製した。

[結果および考察]

cdc2 キナーゼ、TPKII、GSK3α はタウ因子を燐酸化した。cdc2 キナーゼ、TPKII を用いて燐

Protein phosphatase	Dephosphorylation (%)			
	CaMKII	cdc2 kinase	TPKII	GSK3α
2Ac	65.3	0	0	33.7
2Ah	86.1	51.9	82.8	52.8
CaN	51.8	26.0	65.6	43.4
2C	79.9	0	0	0

表1　CaMキナーゼII、cdc2キナーゼ、TPKIIおよびGSK3αにより燐酸化されたタウ因子の各種蛋白質脱燐酸化酵素による脱燐酸化反応
燐酸化タウ因子を基質とし、それぞれの脱燐酸化酵素を加え３０℃、２０分間反応後、脱燐酸化の程度を測定した。各燐酸化酵素により取り込まれた燐酸量は１モルタウ因子あたり約0.6モルに調整した。

酸化したタウ因子は、PrP2Acや PrP2Cでは脱燐酸化を受けず、PrP2AhとCaNでのみ脱燐酸化を受けた（表1）。またGSK3αを用いて燐酸化したタウ因子は、PrP2Acによっても脱燐酸化された（表１）。精製したタウ因子は、作成した二種類の抗体と反応し、Ser-199, 202及びSer-396が部分的に燐酸化を受けていることが示された。PrP2AcとPrP2Ah、CaNによる脱燐酸化反応により、タウ因子のSDS-PAGE上の易動度は低分子量側に変化した。PrP2AhとCaNによる脱燐酸化反応によってのみanti-PP-1による免疫反応性は消失した。一方anti-PP-2による免疫反応性はPrP2Ac及びPrP2Ah、CaNによって消失した。さらに上記三種類の蛋白質燐酸化酵素により再燐酸化反応を行なうと、anti-PP-1に対する免疫反応性はすべての酵素により回復したのに対し、anti-PP-2による免疫反応性はGSK3αによってのみ回復した。免疫組織学的研究によりアルツハイマー病脳の神経原線維変化は、両方の抗体で染色されることが確認された。以上の結果より神経原線維変化内に存在する異常燐酸化部位の脱燐酸化反応にPrP2AとCaNが関与する可能性が示唆された。神経原線維変化内の燐酸化タウ因子においてはセリン１９９、２０２、３９６の部位すべてが燐酸化されていることよりアルツハイマー病脳ではこれら二種類の脱燐酸化酵素による脱燐酸化反応の広範な機能不全が示唆される。

[文献]

1) Yamamoto, H., Fukunaga, K., Goto, S., Tanaka, E., and Miyamoto, E. (1985) *J. Neurochem.* **44**, 759-768

2) Yang, S. D., Song, J. S., Yu, J. S., and Shiah, S. G. (1993) *J. Neurochem.* **61**, 1742-1747

3) Yamamoto, H., Saitoh, Y., Fukunaga, K., Nishimura, H., and Miyamoto, E. (1988) *J. Neurochem.* **50**, 1614-1623

4) Goto, S., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Iwasa, T., Matsukado, Y., and Miyamoto, E. (1985) *J. Neurochem.* **45**, 276-283

5) Saitoh, Y., Yamamoto, H., Ushio, Y., and Miyamoto, E. (1989) *Brain Res.* **489**, 291-301

6) Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T., and Imahori, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10897-10901

7) Hisanaga, S., Ishiguro, K., Uchida, T., Okumura, E., Okano, T., and Kishimoto, T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15056-15060

8) Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R. A. (1989) *Neuron* **3**, 519-526

297 アルツハイマー病脳におけるイオンチャンネルの変化

池田正行*, Deborah Dewar**, James McCulloch**
*東京医科歯科大学　大学院細胞機能制御学,
**Wellcome Surgical Institute, University of Glasgow

〔要約〕

アルツハイマー病(AD)大脳皮質におけるイオンチャンネル(IC)の変化を，マクロオートラジオグラフィーにより検討した．AD脳ではCa依存性Kﾁｬﾝﾈﾙは側頭葉，後頭葉の両部位で対照より約20-30%増加していた．ATP依存性Kﾁｬﾝﾈﾙは側頭葉で約20%減少していたが後頭葉では不変，電位依存性Caﾁｬﾝﾈﾙは側頭葉，後頭葉ともに不変だった．各ICの密度は隣接切片での老人斑密度，ChAT活性のいずれとも相関しなかった．今回の検討で各ICが一様な変化を示さなかったことは，各ICの変化が神経細胞の消失による単なる二次的な減少だけではないことを示す．また既知のADﾏｰｶｰである老人斑やChAT活性の低下との相関が見られなかったことは，ICの変化がこれまで知られていたものと異なったADの病態を反映している可能性を示唆する．

目的：イオンチャンネル(IC)は細胞膜の興奮や細胞内環境維持に重要な役割を果たし，神経変性疾患の成立を含む神経細胞障害の過程にも関与している可能性も考えられる[1]．しかし神経伝達物質とその受容体に比較して，ヒトの脳の疾患ではICはほとんど検索されていない．本研究ではアルツハイマー病(AD)へのICの関与の可能性を考え，AD死後脳を用い，マクロオートラジオグラフィーにより3種のIC密度の定量隣接切片でを行った．更に隣接組織で老人斑の密度ならびにCholine acetyltransferase (ChAT) 活性を定量し，IC密度との相関関係も検討した．

材料と方法：検索したのは年齢，性別，死後時間をﾏｯﾁさせた神経疾患のない対照7-例とKhachaturianの基準により神経病理学的に確認したAD9例の患者の死後脳である（表1）．これら患者の脳より，関心領域である下側頭葉皮質(Brodmann 20野)と後頭葉皮質(同 17野)を切り出し，クライオスタット上で20mmの凍結切片を作成し，IC-定量のｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾌｨｰに用いた．検索したのはCa依存性Kﾁｬﾝﾈﾙ(Apamin結合)，ATP-依存性Kﾁｬﾝﾈﾙ(Glibenclamide結合)，電位依存性Caﾁｬﾝﾈﾙ(PN200-110結合)であり，得られたｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾑ上のIC密度をﾃﾞﾝｼﾄﾒﾄﾘｰにより定量した．また隣接組織で老人斑密度を算定し，Fonnumの方法によりChAT活性の測定も行った．

結果：AD脳ではCa依存性Kﾁｬﾝﾈﾙは側頭葉，後頭葉の両部位で対照より約20-30%増加していた．ATP依存性Kﾁｬﾝﾈﾙは側頭葉で約20%減少していたが後頭葉では不変，電位依存性Caﾁｬﾝﾈﾙは側頭葉，後頭葉ともに不変だった．側頭葉の老人斑密度は後頭葉の2倍弱だった．ChAT活性は側頭葉，後頭葉ともに対照の1/2程度に低下していた．各ICの密度は老人斑密度，ChAT活性のいずれとも相関しなかった．

考察：これまで我々はAD脳海馬で各ICを別個に検討してきた[1, 2, 3]．今回は大脳皮質を用いて隣接切片で同時定量を行ったが，各ICは一様な変化を示さなかった．

このことは，各ICの変化が神経細胞の消失による単なる二次的な減少だけではなく，各ICはそれぞれ異なった調節を受けていると考えられる．また既知のADﾏｰｶｰである老人斑やChAT活性の低下との相関が見られなかったことは，今回の検討で見られた変化がこれまで知られていたものと異なったADの病態を反映している可能性を示す．

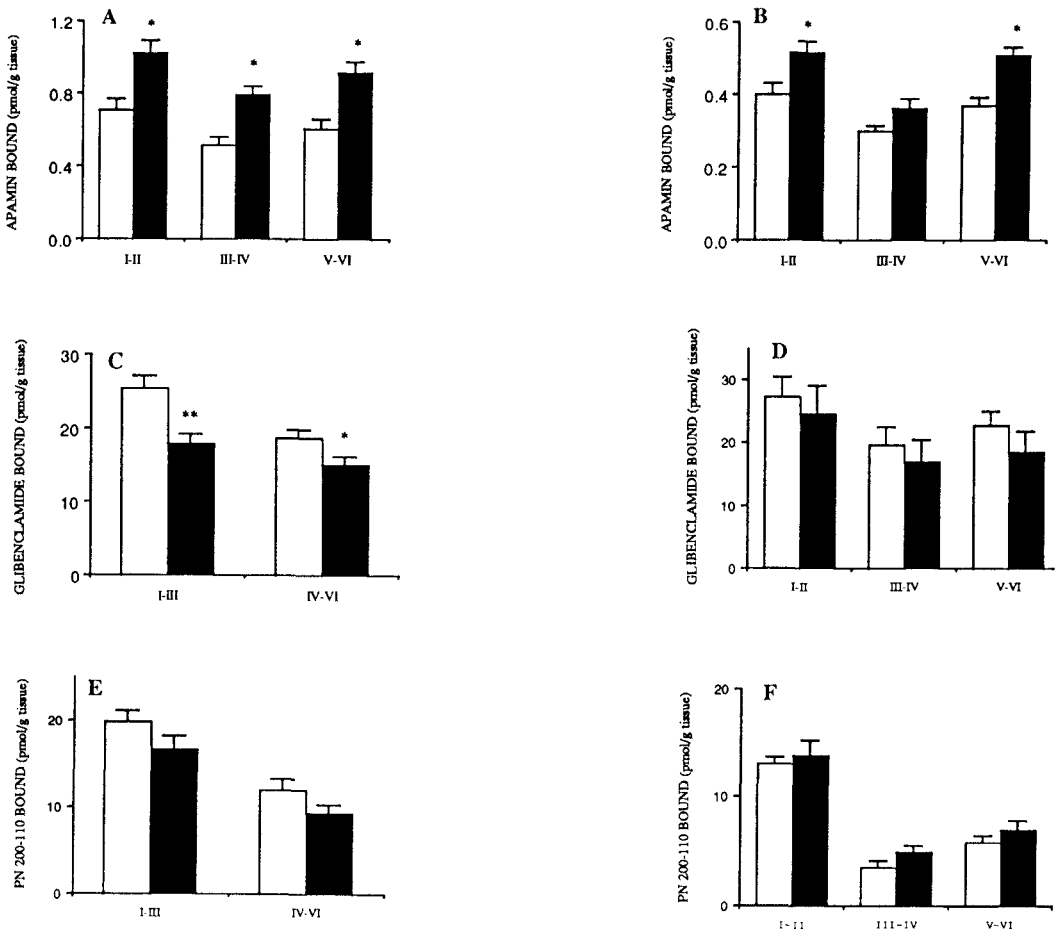


Figure. Quantitative autoradiographic measurements of 3 types of ion channels/receptors in the temporal (A, C, E,) and occipital (B, D, F,). (A,B) [^{125}I]Apamin, (C,D) [^{3}H]glibenclamide and (E,F) [^{3}H]PN 200-110 binding sites. Histograms are mean±S.E.M. for 7 controls and 9 Alzheimer cases. **P<0.01, * P<0.05 by unpaired two-tailed Student's t-test.

文献

1. Ikeda, M., Dewar, D.&McCulloch, J. (1991) Brain Res 567, 51-56.
2. Ikeda, M., Dewar, D.&McCulloch, J. (1992) Brain Res 589, 313-319.
3. Ikeda, M., Dewar, D.&McCulloch, J. (1993) J Neural Transm [P-D Sect] 5, 177-184.

298 加齢に伴う学習障害とイノシトールリン酸受容応答の変化

齋藤 巨志、中村 静雄、大野 知親
（サントリー生物医学研究所、薬効薬理研究室）

〔要約〕
加齢に伴い学習機能が低下することはよく知られているが、我々も能動的条件回避学習試験でこれを確認した。さらに、この現象を細胞内セカンドメッセンジャーの一つである inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) に焦点をあて解析した。大脳皮質における各種受容体刺激による phosphoinositide (PI) 代謝回転、IP_3 binding について検討した結果、加齢に伴い norepinephrine (NE), carbachol (CCh) および ibotenate (IBO) 刺激によるPI代謝回転は低下したが、serotonin (5-HT) および quisqualate (QA) 刺激によるPI代謝回転には変化はみられなかった。また、IP_3 binding は老齢ラット（24-25ヶ月齢）で有意に低下していたが、IP_3 contentには変化は認められなかった。以上の実験結果から、Ca^{2+} 動員刺激応答連関において、大脳皮質の各種細胞膜上受容体を介した情報伝達機能の低下のみならず、細胞内セカンドメッセンジャーであるIP_3の受容体レベルでの機能低下が加齢に伴う学習障害に関与していることが示唆された。

〔緒言〕
我々は第35回本学会において加齢に伴う学習障害にはコリン神経系ならびにモノアミン神経系の機能低下が関与していることを報告した(3)。このような加齢に伴う学習障害の発生メカニズムには神経伝達物質および受容体レベルの障害だけではなく、イノシトールリン酸セカンドメッセンジャー系の障害が関与しているといわれている(1,2)。そこで今回我々は学習行動、および大脳皮質の各種受容体刺激によるイノシトールリン脂質代謝に及ぼす加齢の影響を検討し、さらに、大脳皮質 IP_3 binding 能およびIP_3 contentの加齢変化についても検討した。

〔方法〕
Fischer 系雄性ラット（young; 12-13 週齢、middle aged; 12-13 ヶ月齢、old aged; 24-25 ヶ月齢）を使用した。学習はtwo-way shuttle box を用いて1日20試行6日間訓練した。訓練終了後、脳を氷冷下に摘出し、速やかに大脳皮質を分画した後、IP_3 bindingおよびIP_3 content測定用サンプルは -80℃で保存した。PI代謝回転の測定：分画した大脳皮質より前報(5)に従い、シナプトニューロゾーム画分を得た。これにmyo-[2-^{3}H]inositol (15 μ Ci/ml)を添加し、37℃, 95% O_2-5% CO_2気層下で2時間インキュベートして標識した。標識シナプトニューロゾームを10mM LiCl 存在下に、各種アゴニスト(NE 20 μ M, CCh 1mM, IBO 100 μ M, QA 10 μ M, 5-HT 20 μ M)で刺激し、生成した[^{3}H]inositol phosphatesを分離し液体シンチレーションカウンターで計測した。[^{3}H]IP_3 bindingの測定：Supattapone(8)らの方法に従い、大脳皮質を緩衝液 (50mM Tris·HCl, 1mM EDTA) 中でホモジナイズし1000×g, 4℃, 10min 遠心し、上清を35000×g, 4℃, 20min遠心した後、沈査を同緩衝液に懸濁し、2.5nM [^{3}H]IP_3 を加え4℃, 10minインキュベートした後にフィルター濾過法で測定した。IP_3 contentの定量：大脳皮質を0.4M $HClO_4$, 1mM EDTA 10倍容を加えてホモジナイズし、2000×g, 4℃, 15minで遠心分離した後IP_3測定キット(Amersham)を用いて定量した。

〔結果〕
(i) 学習行動：能動的条件回避学習課題において、加齢に伴い回避数の低下ならびに回避反応潜時の延長が認められた(Fig.1)。(ii) PI 代謝回転：加齢に伴い NE, CCh および IBO 刺激によるPI 代謝回転は低下したが、5-HT および QA 刺激によるPI 代謝回転には変化はみられなかった(Fig.2)。(iii) IP_3 binding ：大脳皮質において老齢ラット(24-25ヶ月齢)で有意な減少がみられた(Table 1)。(iv) IP_3 content：大脳皮質において加齢に伴う変化はみられなかった(Table 2)。

〔考察〕

能動的条件回避学習テストで獲得障害を示した老齢ラット大脳皮質において、無刺激でのPI代謝回転には加齢の影響はなかったが、NE, CCh およびIBO刺激によるPI代謝回転は加齢に伴いそれぞれ約20%低下した。この現象ついては、NEおよびアセチルコリンの各受容体は加齢に伴い結合能が低下すること(6,7)や、また、これらの受容体-G蛋白-ホスホリパーゼC連関が加齢により変化すること(1)などが報告されており、代謝調節型グルタミン酸受容体刺激(IBO) の場合も同様の機序に基づくことが推察された。5-HTの場合も同様に結合能が加齢に伴い減少するという報告はある(4)。しかしながら、今回の実験では、5-HT刺激によるPI代謝回転に変化は認められず、QA 刺激の場合も同様であった。5-HT およびQA 刺激によるPI代謝回転は加齢による影響を受けなかった理由については不明であり今後の検討課題である。このように、細胞膜受容体を介するPI代謝応答は受容体の種類によって加齢の影響に違いがみられたが、IP_3 結合能は老齢ラットで低下していたことから、受容体刺激によりPI代謝回転が上昇した場合においてもIP_3による細胞内Ca^{2+}貯蔵部位 (ER)からのCa^{2+}動員が減弱しており、神経細胞の賦活が不十分であることが推察された。加齢に伴いイノシトールリン脂質セカンドメッセンジャー系の機能低下が学習障害に関係していることが示唆されたがさらに詳細な検討は必要である。

(1) Bothmer, J. and Jolles, J. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1225, 111-124.
(2) Li, P.P., Vecil, G.G., Green, M.A. and Warsh, J.J. (1992) Neurobiol. Aging 13, 89-92.
(3) 中村静雄、大野知親 (1992) 神経化学 31, 408-409.
(4) Petkov, V. V., Petkov, V. D. and Stancheva, S. L. (1988) Gerontology 34, 14-21
(5) 齋藤巨志、中川勇三、石原高文、木村享史、長嶋和郎 (1990) 神経化学 29, 472-473.
(6) Scarpace, P. J. and Abrass, I. B. (1988) Neurobiol. Aging 9, 53-58.
(7) Schwarz, R. D., Bernabei, A. A., Spencer, C. J. and Purslay, T. A. (1990) Pharmacol. Biochem. Behav. 35, 589-593.
(8) Supattapone, S., Worley, P. F., Barabana, J. M. and Snyder, S. H. (1988) J. biol. Chem. 263, 1530-1534.

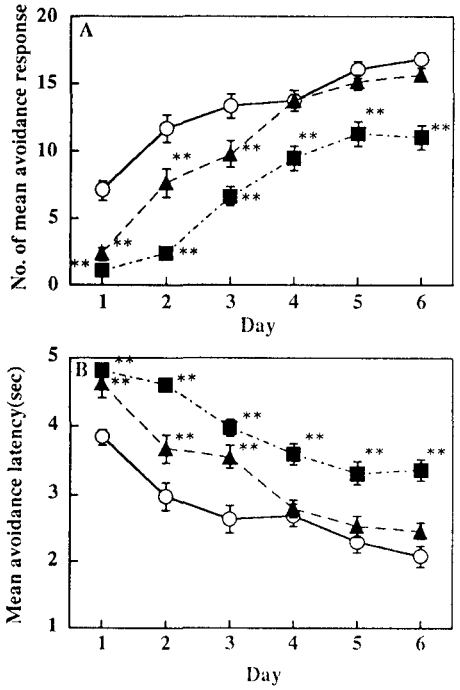


Fig.1 Effect of aging on avoidance response (A) and latency (B) of two-way shuttle box task in rats

—○— Young (N=20) - -▲- - Middle (N=19)
- - -■- - - Old (N=22)

** p < 0.01 vs young adult rats (Dunnett's test)

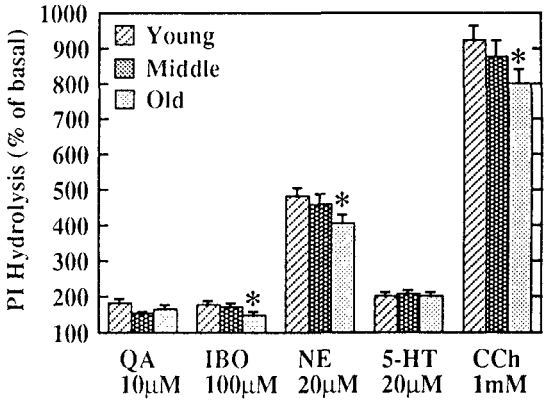


Fig.2 Various agonist-stimulated PI hydrolysis in cerebral synaptoneurosomes of various aged rat
* p<0.05 vs young adult rat (Dunnett's test)

Table 1. [^{3}H]inositol 1,4,5-trisphosphate binding

	Cerebral Cortex (fmol/mg of protein)	
Young	16.6 ± 0.5	(6)
Middle	14.5 ± 1.3	(7)
Old	11.8 ± 0.4**	(6)

** p<0.01 vs young adult rats (dunnett'stest)

Table 2. Basal level of inositol 1,4,5-trisphosphate content

	Cerebral Cortex (pmol/mg of protein)	
Young	83.5 ± 2.1	(5)
Middle	86.1 ± 3.0	(5)
Old	88.2 ± 5.0	(5)

299 チロシン残基脱リン酸作用を有する酸性ホスファターゼのAlzheimer病脳における変動

下濱 俊、藤本貞毅*、谷口隆之**、木村 淳

(京都大学医学部神経内科、京都薬科大学生化学*生物**)

〔要約〕

Alzheimer病(AD)脳ではチロシン残基の異常なリン酸化が指摘されている。酸性ホスファターゼ(AcP)のうち、低分子量AcPにリン酸化されたチロシン残基を脱リン酸する作用があることが報告されている。本研究では、AD脳におけるAcPについて検討した。ヒト脳には高分子量と低分子量のAcPが存在していた。AD群では対照群に比べ低分子量AcP活性が有意に低下していた。ウシ脳より精製した分子量約17 kDaの低分子量AcPを抗原に作製した特異抗体により、低分子量AcPがニューロンの細胞質および神経突起部に存在していることを確認した。AD群では対照群に比べ低分子量AcPのタンパク量には有意な差は認められなかったが、単位タンパク量当りの活性が有意に低下していた。ラット脳でこの低分子量AcPが分子量約170 kDaタンパクのリン酸化されたチロシン残基を脱リン酸することが明らかとなった。さらに、このタンパクが、epidermal growth factor (EGF) receptorである可能性が示唆された。また、この170 kDaタンパクのリン酸化されたチロシン残基は死後時間による影響を受けやすいことが判明した。

[目的] AD脳ではチロシン残基の異常なリン酸化が指摘されている(5)。AcPのうち、低分子量AcPにリン酸化されたチロシン残基を脱リン酸する作用があることが報告されている(1)。本研究では、AD脳におけるチロシン残基の異常なリン酸化機構における低分子量AcPの役割について検討する。AcP活性について測定するとともに、低分子量AcPに対する特異抗体を作製し、細胞内分布およびタンパクレベルの解析を行なうとともにその脳内基質について検討した。

[対象および方法] 年齢，死後剖検までの時間に差を認めないAD群と対照群を対象とした。AcP活性はp-nitrophenyl phosphateを基質として測定した(2)。ウシ脳より低分子量AcPを精製し(4)、それを抗原に特異抗体を作製し、その抗体を用いて免疫染色で細胞内分布を、Western blottingでタンパクレベルの解析を行なった。リン酸化されたチロシン残基の同定は特異抗体を用いた免疫化学的検討で行った。

[結果] Sephadex G-100カラムゲルクロマトグラフィーを用いてAcPを分離溶出すると、ヒト脳には高分子量と低分子量のAcPが存在していた。亜鉛依存性の別種のAcPも存在していた。AD群では対照群に比べ低分子量AcP活性が有意に低下していた。高分子量および亜鉛依存性のAcP活性は対照群とAD群間で有意な差は認められなかった。ウシ脳より低分子量酸性ホスファターゼを分子量約17 kDaの活性を有するタンパクとして精製した。これを抗原に作製した特異抗体により、低分子量AcPが一部のニューロンの細胞質および神経突起部に局在していることを確認した（図1）。AD群では対照群に比べ低分子量AcPのタンパク量には有意な差は認められなか

ったが、単位タンパク量当りの活性が有意に低下していた。また、ラット脳組織にこの低分子量AcPを作用させることにより、この低分子量AcPが分子量約 170 kDa タンパクのリン酸化されたチロシン残基を脱リン酸することが明らかとなった（図２）。また、EGF receptor に対する特異抗体を用いた免疫化学的検討により、この分子量約 170 kDa タンパクが、EGF receptor であることが示唆された。ラット脳でリン酸化されたチロシン残基の死後時間による変化について検討すると、この170 kDa タンパクのリン酸化されたチロシン残基は、死後時間による脱リン酸化の影響を受けやすいことが判明した。

［考察］AcP は自然界に広く存在する酵素である。今回の検討で、ヒト脳組織の細胞質分画に分子量の異なるAcPが存在し、AD脳においては低分子量AcP活性が対照脳に比べ有意に低下していることが示された (6)。ウシ脳より精製した低分子量AcPに対する特異抗体による免疫化学的検討により、低分子量AcPがAD脳において一部不活性化されていることにより酵素活性が低下していることが推測された。生理学的には、この低分子量AcPがチロシン残基を脱リン酸する脳内基質の同定が重要となるが、今回の検討で、脳内基質が分子量約 170 kDa のタンパクであることが判明した。すでに、肝臓から精製した低分子量AcPが自己リン酸化されたEGF receptor のチロシン残基を脱リン酸させることが報告されていたが (3)、低分子量AcPの脳内基質であることが判明した分子量170 kDa の脳内タンパクが、EGF receptor そのものである可能性が示された。低分子量AcPは、EGF receptor のリン酸化状態の調節を介してEGF-EGF receptor coupling signal transduction 機構に重要な働きをしている可能性が示唆される。しかも、そのチロシン残基のリン酸化の状態は死後変化を受けやすいことが明らかになり、ヒト剖検脳を用いて検討する際は注意すべき点である。

［文献］ (1)Chernoff J.et al.(1985) Arch Biochem Biophys 240:135-145; (2)Fujimoto S.et al.(1984) J Biochem (Tokyo) (1984) 96:1079-1088; (3)Ramponi G.et al.(1989) FEBS Lett 250: 469-473; (4)Saeed A. et al.(1990) Physiol Chem Phys & Med NMR 22:81-94; (5)Shapiro I.P.et al.(1991) J Neurochem 56: 1154-1162; (6)Shimohama S.et al. (1993) Ann Neurol 33:616-621

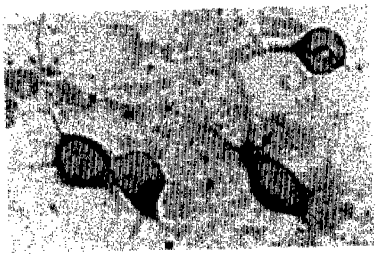


図１　低分子量AcPのニューロン内での局在

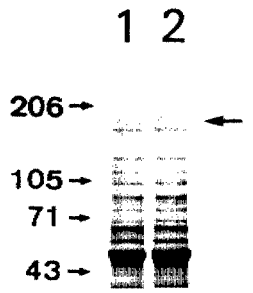


図２ラット脳内リン酸化チロシン残基タンパク
１：低分子量AcP (-)、２：低分子量AcP(+)
←が低分子量AcPの脳内基質タンパク

300 アミロイドβ蛋白のミクログリア走化性刺激の機序に関する検討

中井 真通，中岡 大樹，山口 徹，波多腰 正隆，柿木 達也，保田 稔，
前田 潔，田中 千賀子（兵庫県立高齢者脳機能研究センター）

〔要約〕

アミロイドβ蛋白はラット新生児脳初代培養細胞から得られたミクログリアの走化性を刺激することが報告されている。しかしながらその機序に関してはいまだ不明な点が多い。私どもはラット新生児脳初代培養細胞から得られたミクログリアを用い，アミロイドβ(25-35) がラットミクログリア上のどのレセプターと結合することで走化性を引き起こすかを検討した。アミロイドβ(25-35)，Substance P はいずれもラットミクログリアの走化性を亢進させ，その作用はtachykininレセプターアンタゴニストのSpantideにより部分的に阻害された。SEC レセプターに特異的なアゴニストである Peptide105Yはミクログリアの走化性を亢進させた。このことはアミロイドβ(25-35) が SEC レセプター及び tachykininレセプターを介してラットミクログリアの走化性を高めている可能性を示唆していると考えられた。

（目的）

アルツハイマー病患者の脳実質内に多数出現する老人斑の構成成分の一つであるアミロイドβ蛋白は40-43 個のアミノ酸からなり、ラット胎児海馬神経培養細胞に対してneurotoxic あるいはneurotrophic な作用を持ち、アルツハイマー病発症との関連が注目されている。ところでアミロイドβ蛋白はラット由来培養の走化性を亢進させることも報告されており (1)、アルツハイマー病患者の脳内にミクログリアが多数出現していることから (2)、脳内での炎症反応や炎症にともなうさまざまな酵素類の放出による神経変性にアミロイド蛋白が関与している可能性が考えられている。そこでアミロイドβ蛋白がどのような機序でミクログリアの走化性を亢進させているのかをラット新生児脳初代培養細胞から得られたミクログリアを用いて検討した。

（方法）

1－3 日令ラット新生児脳を0.25%トリプシン0.01% DNase I にて処理し、得られた細胞を10% hycloneを含むDMEM/Ham's F12混合培地にて２週間培養した。この培養細胞フラスコを225rpm 1 時間振盪し、浮遊した細胞をプラスチック皿に接着させ、付着細胞を回収し95% 以上の純度のミクログリアを得た。走化性の検討はNeuroprobe 社のケモタクシスチャンバーを用いて行った。即ち$1x10^6$個のミクログリアをアッパーチャンバーに、さまざまな濃度のReagentsをロワーチャンバーに加え、5 μm 孔径メンブランで両者を区切り６時間培養を行った。ロワーチャンバー側に遊走してきたミクログリアをギムザ染色し遊走細胞数をカウントした。

(結果)

アミロイドβ(25-35)は 1 pM から 10 nM の間で容量依存性にラットミクログリアの走化性を亢進させた。SEC レセプターに特異的なアゴニストである Peptide105Y は 10 pM から 1 nM の間でやはり容量依存性にラットミクログリアの走化性を亢進させた。Tachykinin antagonist であるSpantide はアミロイドβ(25-35)によるミクログリアの走化性亢進を部分的に抑制した。一方 Substance P もラットミクログリアの走化性を亢進させ、この作用はSpantide により抑制された（図１）。

(考察)

アミロイドβ(25-35)のミクログリアの走化性亢進作用はtachykininアンタゴニストであるSpantide により部分的に抑制され、またSEC レセプターに特異的なアゴニストである Peptide105Y がミクログリアの走化性亢進作用を示した。このことはアミロイドβ(25-35) がSEC レセプターおよび tachykinin レセプターを介してミクログリアの走化性を亢進させている可能性を示していると考えられた。

(文献)

1. Davis, J. B., et al., (1992) The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease is chemotactic for mononuclear phagocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 189:1096-1100.

2. Carpenter, A. F., et al., (1993) Morphometric analysis of microglia in Alzheimer's disease. J. neuropath. and Exp. neurol., 52:601-608.

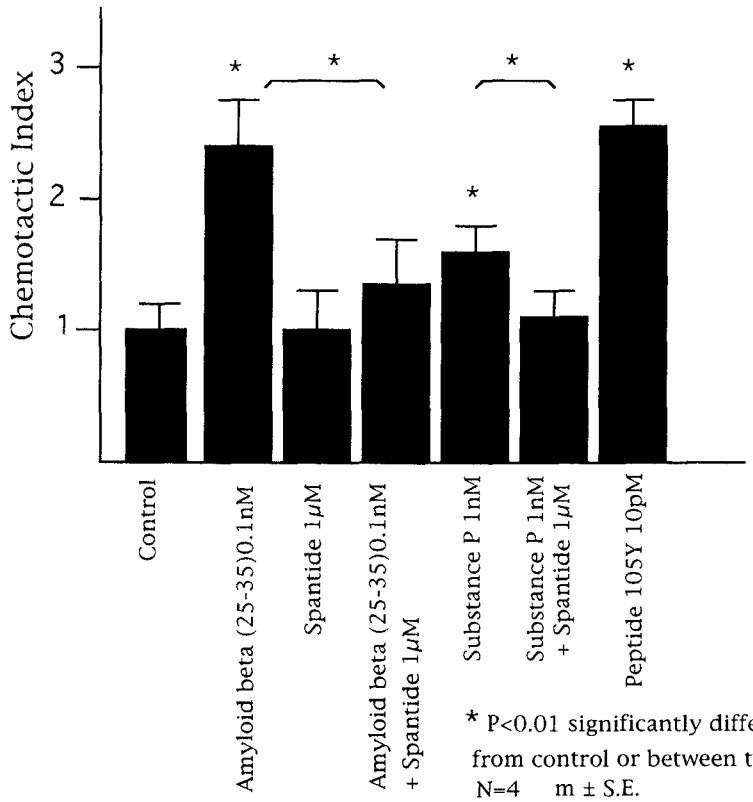


図１，ラットミクログリアに対する種々の試薬の効果

301　アルツハイマーβアミロイド蛋白のaggregationと神経毒性：アルミニウムによる促進

川原正博、加藤みどり、村本和世、小林和夫、森　啓*、黒田洋一郎
東京都神経科学総合研究所、神経生化学、*東京都精神医学総合研究所、分子生物

〔要約〕　アルツハイマーβアミロイド蛋白のaggregationにおよぼすアルミニウム、鉄、亜鉛などの金属の影響を検討した結果、アルミニウムは他の金属に比べて顕著にaggregationを促進することが判明した。これはアルミニウムのキレーターであるdeferoxaminにより抑制された。また、βアミロイド蛋白の残基の違いによるaggregationの差異をβ1-40とβ1-42を用いて比較したところ、何れもアルミニウムにより促進され、β1-42はβ1-40に比べてaggregateしやすく、より高分子量の多量体を形成することが判明した。更に、アルミニウム処理したβ1-40を海馬初代培養神経細胞に投与し、顕著な神経毒性とβアミロイドの沈着を観察した。

βアミロイド蛋白は、老人斑の主要構成成分であり、39～43残基からなる低分子量蛋白である。最近のβアミロイド蛋白の神経毒性の研究(1)から、βアミロイド蛋白自身が神経細胞死を起し、アルツハイマー病の発症機序に関与する可能性が示唆されている。また、βアミロイド蛋白は疎水性が高く、aggregateして多量体となりやすいが、単量体では神経毒性が少なく、多量体化する事によって毒性が増強されるという報告がある(2)。従って、aggregationを促進、あるいは阻害する因子が、アルツハイマー病の発症機序に重要な役割を果たしていることが考えられる。演者等は、合成βアミロイド蛋白(β1-40)のaggregationがアルミニウムにより、大きく促進されることを見出しており(3)、今回の実験では、鉄、亜鉛などその他の金属の影響の検討を行った。また、老人斑に端役から沈着し(4)、その大部分を構成していると報告される(5)β1-42についても、2個の残基の違いによるaggregationの差をβ1-40と比較した。更に、βアミロイド蛋白の培養海馬神経細胞に対する神経毒性を検討し、形態観察を行った。

【方法】

βアミロイドの前処理

β1-40 およびβ1-42は BACHEM 社より購入、Milli-Q水にて 1 mg/ml の濃度に溶解した。これを 25 mM HEPES緩衝液(pH7.0)中で、37℃、24時間incubateし(終濃度0.25mg/ml)、以後の実験に用いた。この前処理の際に、$AlCl_3$, $FeCl_3$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $CdCl_2$などの金属水溶液を添加した。

SDS-PAGE及びimmunoblotting

前処理したβアミロイドをSDS-polyacrylamide gel (16.5%)電気泳動によりtris-tricine法を用いて分離し、銀染色、あるいはPVDF膜に転写し、抗βアミロイド蛋白抗体(αß42)により免疫染色を行った。

神経毒性

ラット胎児（胎齢18日）より海馬を摘出し、papain酵素によりdissociateした後、polyethylenimineによりコートしたカバーガラス上にて培養を行った。培養液としてDulbecco's MEMに5% horse serum, 5% new born calf serumを加えたものを用いた。培養8日後に、培養液から、血清を除き、β1-40を添加し、4～7日後に、4% paraformaldehydeにて固定し、形態を観察した。

【結果】

β1-40は37℃、24時間の前処理によって、その一部分がaggregateし、2量体を形成した。Zn、Fe、Cu、Cd などの金属（1mM）の添加によって、そのaggregationは促進され、2～3量体を形成するのが観察された。同様の現象はPb、Mnなどによっても観察された。しかしながら、同濃度のAlの添加によっては、ゲル上端にまで至る顕著な高分子量のaggregationが観察された（図１）。このAlによるaggregationは、Alのキレーターである DFO(deferoxamine等モルにより抑制され、一旦aggregateしたβ1-40もDFO存在下、95℃、5分間加熱する事により再び溶解した。また、図2に示すように、β1-40は通常2量体から3量体を形成するのに比べて、β1-42はaggregateしやすく、3時間の前処理だけで4量体及び6量体を主として形成した。β1-42においてもβ1-40同様に、Alによるaggregationの促進が観察された。

前処理したβ1-40を海馬初代培養神経細胞に添加し、抗MAP2抗体により、染色した所、神経細胞の変性が見られ、Alを添加して前処理した場合には、より顕著なdegenerationが観察された（図３）。また、コントロールに比べて、β1-40を添加した神経細胞ではprocessの著しい退縮が見られた。更に、添加4日後に、抗βアミロイド抗体(αß42)) により染色した結果、前処理していないβ1-40を添加した場合には、β1

-40の沈着は、ほとんど見られなかったが、前処理したβを添加した場合には、繊維状の沈着が広く広がり、Alを共存させて前処理した場合には、より密で、特徴的な沈着が観察された。

【考察】

飲料水中のAlとアルツハイマー病との発症率とに関する疫学調査などから、Alがアルツハイマー病の危険因子であることはほぼ明らかになったと言って良い(6)。演者等は、培養ニューロン系にAlを長期投与した際に、タウ、βアミロイドの蓄積などが生じることを明らかにして来たが(7)、長年に渡り微量ずつ脳内に蓄積したAlが(8)今回示したように、βアミロイドのaggregationを促進させ、神経細胞死を引起こすことが可能であると考えられる。また、aggregationによるβシート構造の形成と神経毒性との関連は、蛋白化学的にも興味深く、Alによるaggregationの促進は、そのメカニズムを検討する良いモデル系に成りうると考えられる。

【参考文献】(1)Yankner, B. A. et al. *Nature*, 250, 279-282. (1990); (2) Pike,C.J., et al.,*Brain Res.* , 563, 311-314 (1991). (3) Kawahara,M.et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ,198, 531-535 (1994). (4)Iwatubo et al.,*Neuron*, 12, (1994) in press. (5)Roher,A.E. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 90,10836-10840(1993). (6) 川原正博、黒田洋一郎、*公衆衛生研究*,42, 520-525 (1993).; (7) Kawahara,M. et al., *Biochem. Biophys. Res.Commun.*, 189, 1317-1322 (1992). (8),Kobayashi,K. et al., *Proc.Japan Acad.*Ser.B, 66, 189-192(1990).

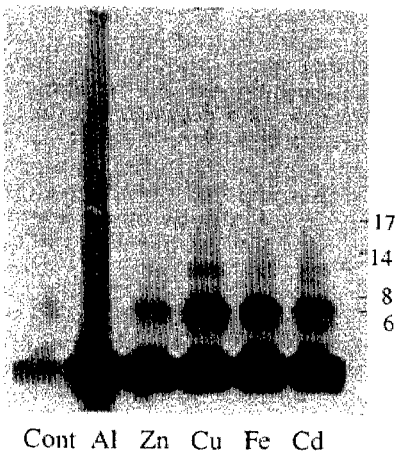


図1．種々の金属のβ1-40のaggregationに及ぼす影響
金属（1mM）存在下で、37℃、24時間incubateした。

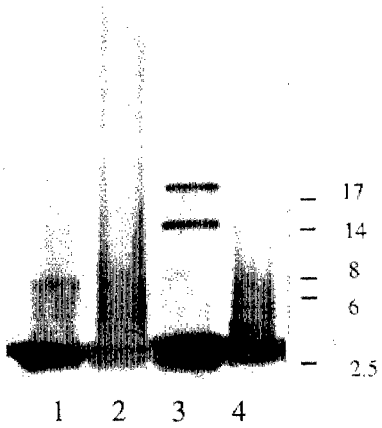


図2．β1-40とβ1-42の比較
各々37℃3時間前処理の後、泳動を行った
1:ß1-40(control); 2:ß1-40(+Al);
3:ß1-42(control);4:ß1-42(+Al)

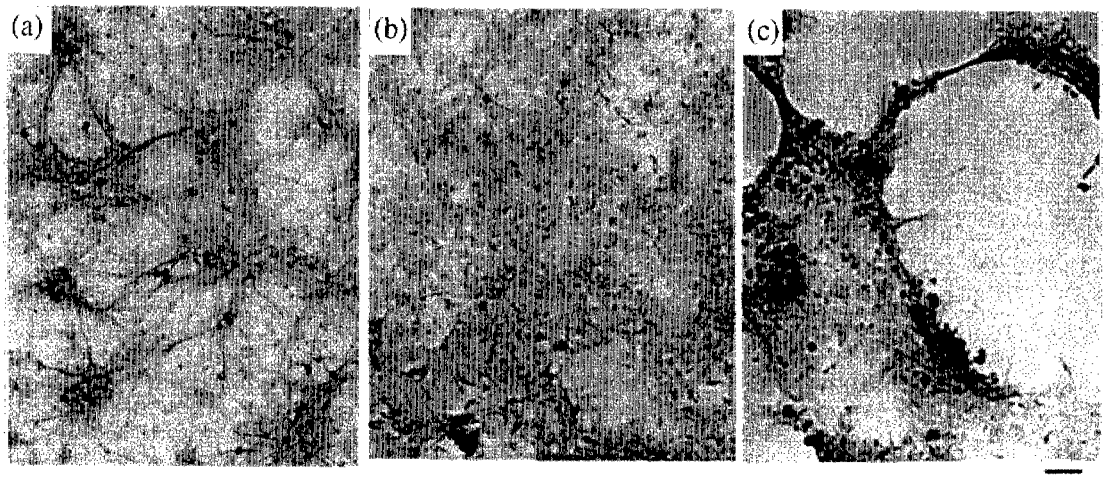


図3．海馬神経細胞に対する神経毒性
前処理したβ1-40（20μg/ml）を投与し、7日後に固定、抗MAP2抗体により染色し、DABにより発色させた (a):control, (b):前処理したß1-40, (c):Al1mM存在下で前処理したß1-40 —:100μm

302　バキュロウイルス発現系を用いたタウ蛋白の合成

宇佐美　美穂子、降矢　芳子、佐原　成彦、森　啓
（東京都精神研・分子生物）

〔要約〕
4リピート部分を含むヒトのタウ蛋白CDNAを組み込んだバキュロウイルス(BT－1ウイルス)をSf9細胞に感染させ、タウ蛋白を発現させた。BTウイルスを感染させた細胞では、すでに報告されているように光学顕微鏡下、細胞が紡錘状に変形する形態変化が観察された。抗ヒトタウ抗体を用いたイムノブロットの結果分子量55KDのバンドが特異的に検出された。この抗タウ抗体陽性蛋白は高塩濃度下の加熱処理によって細胞から可溶化されず、またグアニジン塩酸溶液によっても約半量程度が不溶性画分に残留していた。このことよりSf9細胞にて発現させたタウ蛋白は、正常の脳組織において存在するような可溶性の状態ではなく、非常に溶けにくい構造をつくって細胞内に蓄積しているものと考えられる。

［目的］　微小管関連蛋白の一種であるタウは神経組織に豊富に存在しており、特に軸索内に局在していることが知られている。またタウはアルツハイマー病をはじめとする、いくつかの神経疾患において脳組織に不溶性構造物(PHF)として沈着していることは周知の事実であり、それらの神経疾患との関連において注目されている蛋白である(2,5)。バキュロウイルス系を用いたタウ蛋白の発現については、すでにいくつかの報告があり（1,4）昆虫細胞(Sf9)に神経細胞様の突起を生じさせることが判明している。しかしその生化学的性質の解析及び蛋白としての利用についてはまだ充分なされているとはいえない。私たちは発現されたタウ蛋白の生化学的解析および疾患の解明の研究に供する事を目的としてヒトのタウ（4リピート）のcDNAを組み込んだウイルスをSf9細胞に感染させその蛋白を得ることを試みた。

［方法］　4リピートを含むヒトタウcDNA（3）をバキュロウイルス転移ベクターに組み込み線状ウイルスまたは野生型ウイルスと共にSf9細胞に共感染させた。得られた培養液からプラーク法により組み換え型ウイルス(BTｳｲﾙｽ)を単離した。BTウイルスは増幅後、Sf9細胞に感染させ24時間培養してタウ蛋白を発現させたのち細胞を採取した。タウ蛋白の検出はSDSPAGE、イムノブロットを用いて行なった。

［結果］　1、Sf9細胞（図1A）にBTウイルスを感染させると、すでに報告されているように細胞は紡錘形に変化し、突起様の構造が観察された（図1B)。

2、発現したタウ蛋白は分子量約55KDであり、SDSPAGE上単一バンドを示した。タウ蛋白としての同定は以下の抗体を用いて行なった。pool 1;70－192、tau 1;191－204、pool 2;299－385、tau 4;323－337、tau 0;354－369、tau 5;403－412、tau 6;420－429。タウ蛋白はこれらのいずれの抗体によっても検出され、またいくつかのモノクロナール抗体とも反応した（図2）。

3、次に、細胞からタウ蛋白の精製を行なうために細胞をホモジネートしたのち高塩濃度下で熱変性させ、可溶性画分へのタウ蛋白の回収を試みた。図3に見られるようにタウ蛋白はその大部分が沈澱画分に存在し、ほとんど抽出されなかった。さらにこの沈澱画分をグアニジン塩酸で処理すると一部は溶解したが、未だ不溶性画分に半量程度残留していた。

［考察］　BTウイルス感染によってSf9細胞に発現したタウ蛋白は正常脳組織に存在するのとは異なる様式で細胞内に蓄積していることが判明した。これはおそらく過剰発現により非常に不溶性な形になっていることによると考えられる。今後この蛋白の性質および可溶化の検討を行なうとともに、あらたなタウ発現バキュロウイルスクローニングを行なっていきたい。

［参考文献］

1, Chen,J., Kanai,Y., Cowan,N.J., and Hirokawa,N.(1992) Nature 360, 674−677

2, Endo,R., Ogawara,M., Iwatubo,T., Nakano,I., and Mori,H. (1993) Brain Res. 601, 164−172

3, Goedert,M., Spillantini,M.G., Jakes,R., Rutherford,D., and Crowther,R.A. (1989) Neuron 3, 519−526

4, Knops,J., Kosik,S., Lee,G., Pardee,J.D., Cohen−Gould,L., and McConlogue,L. (1991) J. Cell Biol. 114, 725−733

5, Mori,H., Hamada,Y., Kawaguchi,M., Honnda,T., Kondo,J., and Ihara,Y. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 1221−1226

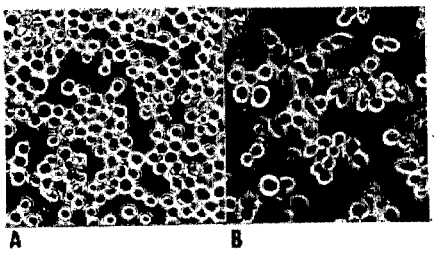


図１、Sf９細胞の形態変化

A, コントロール細胞

B, BTウイルスに感染させた細胞

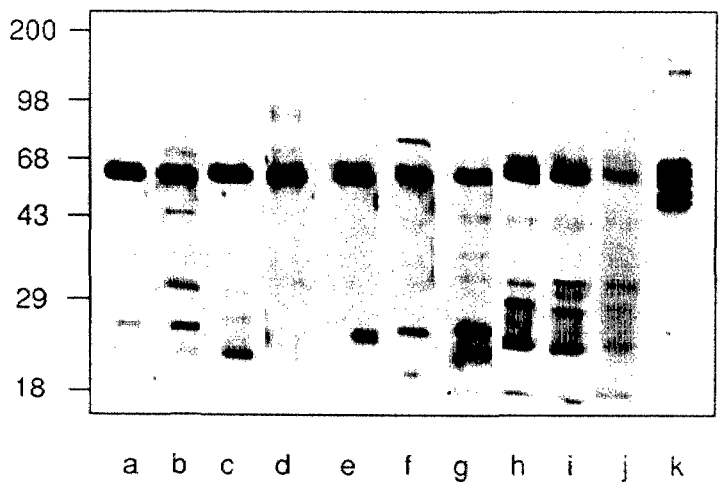


図２、タウ抗体を用いた発現蛋白のイムノブロット

a ; pool 1, b ; tau 1, c ; pool 2, d ; tau 4, e ; tau 0, f ; tau 5, g ; tau 6, h ; c−10, i ; 3−1G, j ; E−4 k ; pool 2、 kのみラット脳タウ。本文中の数字は参考文献３のアミノ酸配列番号による各抗体のエピトープ位置をしめす。

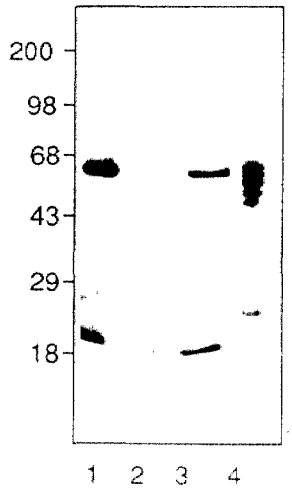


図３、発現したタウ蛋白の可溶化

１、細胞　２、可溶性画分

３、不溶性画分

４、ラット脳タウ

303 シナプトタグミンのカルモデュリン結合能

乾　誠、祖父江憲治
（大阪大学医学部・神経生化学）

〔要約〕
神経伝達物質放出におけるCa^{2+}制御機構の解明を目的としてCa^{2+}結合蛋白質とシナプス小胞蛋白質との結合を解析した結果、カルモデュリン（CaM）がシナプトタグミン（Syt）と結合することを見い出した。CaMとSytとの結合は、ラット脳のシナプトゾームを用いた抗Syt単クローン抗体による免疫沈降で認められた。さらに、精製蛋白質を用いたイムノアフィニティーカラム、CaMアフィニティカラム、及びSytを挿入したプロテオリポソームによる遠心法でこれを確認した。CaMとSytとの結合は、Ca^{2+}非依存性で、Kdは約0．3μMであった。また、CaMは、SytのC2領域を含む細胞質ドメインに結合した。さらに両者の結合は、プロテイン・キナーゼCによる燐酸化で著明に阻害された。以上の結果は、CaMがSytを介して神経伝達物質放出のCa^{2+}制御に関与する可能性を示唆する。

［はじめに］
神経伝達物質放出は、Ca^{2+}チャンネルを介する細胞外からのCa^{2+}流入がその引金となっている。シナプス小胞蛋白質Sytは、Ca^{2+}、燐脂質結合能を持ったC2領域を有しており神経伝達物質放出のCa^{2+}制御に関与すると想定されている（4）。また、Sytは、前シナプス膜のニューレキシン（5）やシンタキシン（1）と結合することから、シナプス小胞の前シナプス膜への結合に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、Sytとこれらの蛋白質の結合は、Ca^{2+}非依存性である。本研究では、神経伝達物質放出のCa^{2+}制御機構を明かにすることを目的としてSyt とCa^{2+}結合蛋白質との結合を検討した。その結果、SytとCaMが結合することを見い出し、両者の結合の解析を行った。

［実験方法］
1．抗Syt抗体による免疫沈降：ラット脳シナプトゾーム分画をTriton X-100で可溶化した後、抗Syt単クローン抗体を結合させたSepharose 4Bを用いて免疫沈降し、沈降物を抗CaM抗体によるイムノブロットで解析した。
2．精製蛋白質を用いたSytとCaMの結合解析：抗Syt抗体のイムノアフィニティーカラムによる解析では、精製したSytとCaMをCa^{2+}或はEGTA存在下でインキューベイトし、カラムに添加、洗浄後、0.1 M Glycine-HCl, pH 2.5で溶出した。CaMアフィニティーカラムによる検討では、Sytをカラムに添加し、0.3 M NaClで溶出した。遠心法による結合実験では、まずTriton X-100存在下にフォスファチジルコリンとSytとを混合し、Bio-Beads SM-2を用いることによりプロテオリポゾームを再構成した。このプロテオリポゾームにCa^{2+}或はEGTA存在下でCaMを加え遠心後、沈澱物を電気泳動により解析した。
3．CaM結合量の定量：CaM結合量の定量は、^{125}I－CaMを用い抗Syt抗体による免疫沈降で測定した。

［成績及び考察］
ラット脳のシナプトゾーム分画を抗Syt抗体を用いて免疫沈降した結果を図1に示す。蛋白質染色でSyt以外に幾つかのバンドが認められるが、このうち分子量約20,000のバンドは、SDS電気泳動上C

a^{2+}存在下、非存在下でその易動度が変化すること及び抗ＣａＭ抗体と反応することからＣａＭと同定した。この両者の結合は、精製蛋白質を用いた抗Ｓｙｔ抗体イムノアフィニティーカラム及びＣａＭアフィニティーカラムでも確認された。この結合は、Ca^{2+}非依存性で、１％ Triton X-100で著明に阻害された。さらに界面活性剤非存在下での結合を調べるため、精製したＳｙｔをリポソームに再構成し、このプロテオリポソームを用いてＣａＭとの結合実験を行った。その結果、ＣａＭは、Ca^{2+}非存在下にプロテオリポゾームと結合した。ＣａＭのリポソームへの結合は、Ca^{2+}存在下、非存在下にかかわらず認められなかった。ＣａＭのＳｙｔへの結合をさらに詳細に検討するため、^{125}Ｉ－ＣａＭを用いて免疫沈降によりＣａＭ結合量を定量した。図２にＥＧＴＡ存在下でのＣａＭ結合の濃度依存性を調べた結果を示す。ＣａＭ結合の親和性は、約０．３μＭであった。さらにＣａＭの結合部位を調べるため、トリプシン処理したＳｙｔフラグメントをＣａＭアフィニティークロマトグラフィーで解析した。ＣａＭは、ＳｙｔのＣ２領域を含む細胞質ドメインのリジン・クラスターよりもＣ末端側に結合することが明かとなった。Ｓｙｔは、ＣａＭ・キナーゼII（６）、カゼイン・キナーゼII（２，３）、プロテイン・キナーゼＣ（６）により燐酸化されることが知られている。ＣａＭ結合に対する燐酸化の効果を検討した結果、ＣａＭ・キナーゼII、カゼイン・キナーゼIIではＣａＭ結合量に影響を与えないのに対し、プロテイン・キナーゼＣによる燐酸化では著明なＣａＭ結合量の減少が認められた。Ｓｙｔは、それ自身Ca^{2+}結合蛋白質であることが知られているが、今回の結果は、さらにＣａＭがCa^{2+}センサーとしてＳｙｔの機能を制御し神経伝達物質放出の調節に関与している可能性を示唆する。

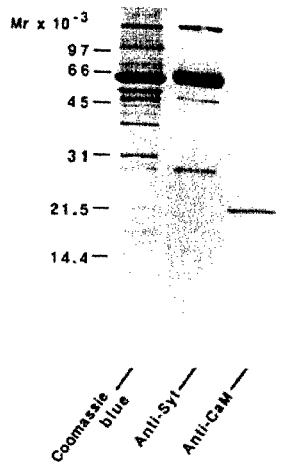


図１　シナプトゾーム分画の抗Ｓｙｔ抗体による免疫沈降

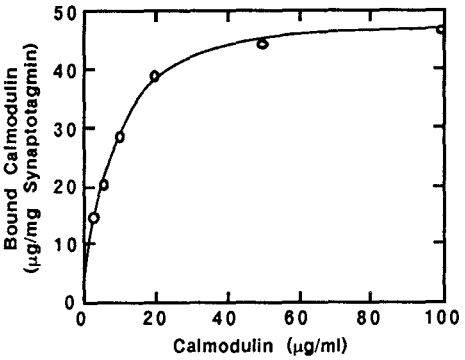


図２　ＳｙｔのＣａＭ結合の濃度依存性

［文献］

1. Bennett, M. K., Calakos, N., and Scheller, R. H. (1992) *Science* 257:255-259

2. Bennett, M. K., Miller, K. G., Scheller, R. H. (1993) *J. Neurosci.* 13:1701-1707

3. Davletov, B., Sontag, J-M., Hata, Y., Petrenko, A. G., Fykse, E. M., Jahn, R., and Sudhof, T. C. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:6816-6822

4. Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., and Sudhof, T. C. (1990) *Nature* 345:260-263

5. Petrenko, A. G., Perin, M. S., Davletov, B. A., Ushkaryov, Y. A., Geppert, M., and Sudhof, T. C. (1991) *Nature* 353:65-68

6. Takahashi, M., Arimitsu, Y., Fujita, S., Fujimoto, Y., Kondo, S., Hama, T., and Miyamoto, E. (1991) *Brain Res.* 551:279-292

304 セロトニンによるラット前頭葉アセチルコリン分泌の制御機構（Ⅱ）：Fenfluramineによるアセチルコリン分泌増加作用は5-HT_2受容体を介する

平野　均、　山田　通夫、　H.C. Fibiger*
（山口大学医学部神経精神科、ブリティシュ・コロンビア大学医学部精神科*）

〔要約〕

セロトニン(5-HT)による前頭葉アセチルコリン(ACh)分泌の制御機構を解明する目的で、脳微小透析法により経時的に前頭葉のAChを測定した。fenfluramine(10mg/kg)のACh分泌増加作用は、ドパミン(DA) D_1受容体阻害薬のSCH 23390の前投与(0.3mg/kg, 30分前)によっても抑制されなかった。3mg/kgのfenfluramineのACh分泌増加作用は、methysegide(5mg/kg)とketanserin(5mg/kg)の双方の前投与(30分前)で抑制されたが、10mg/kgの作用はmethysergideでは抑制されなかった。以上から、fenfluramineによる前頭葉ACh分泌増加作用は5-HT_2受容体を介して行われており、中枢DA神経系の亢進によるものではないことが示唆された。

【目的】

前脳基底部から大脳皮質全域に投射する前脳基底部－皮質ACh神経系には、その細胞体部と終末部に5-HTニューロンが縫線核から投射しており(1,2)、また両部位には5-HT受容体が存在することが報告されている(3,4)。近年、QuirionらはそのACh神経路の細胞体上には5-HT_1受容体が、また終末部上には5-HT_2受容体が存在することを示唆した(5,6)。

さきに、我々は5-HT分泌促進薬のfenfluramineの腹腔内投与と局所投与によって前頭葉ACh分泌が増加することを報告し、5-HT神経系がACh分泌に促進的に関与していることを示唆した。しかし、fenfluramineだけでなく5-HT自体が中枢ドパミン(DA)神経系の活動を亢進させること(7)、さらにDA agonistのapomorphineやamphetamineによっても前頭葉のACh分泌が増加することが報告されており(8)、fenfluramineによるACh分泌の増加は5-HTの直接作用ではなくDA神経系を介した作用である可能性も考えられる。DayとFibigerにより(8)、DAによる前頭葉ACh分泌は主にD_1受容体を介していることが報告されているので、今回はD_1受容体阻害薬のSCH 23390を前投しfenfluramineのACh分泌増加作用に与える影響を検討した。さらに、AChの分泌増加に関与する5-HT受容体の種類を解明する目的で、非特異的5-HT阻害薬のmethysergideと5-HT_2受容体阻害薬のketanserinを使用した。

【方法】

体重250-350gのWistar系雄性ラットを使用し、PaxinosとWatsonの脳図譜に従い(9)、pentobarbital(40-60mg/kg, i.p.)麻酔下で前頭葉に透析プローブの留置手術を行った(AP: +2.7mm, DV: -2.5mm)。２日後、無麻酔・自由行動下のラットの前頭葉に$NaCl$(125mM), KCl(3.0mM), $CaCl_2$(1.3mM), $MgCl_2$(1.0mM), $NaHCO_3$(23mM)を含む人口脳脊髄液を5μl/minで還流した。約２時間後から10分間隔でACh分泌量の測定を開始し、分泌値は最初の薬物投与前の6連続検体を加算平均した値を100としその相対で表示した。また、２要因分散分析にはその値を使用した。SCH 23390はH_2Oに、methysergideとketanserinはsalineに溶解し投与した。

【結果】

SCH 23390(0.3mg/kg, s.c.)は、H_2O(s.c.)と比較して前頭葉のACh分泌を著しく低下させた(P=0.014)。fenluramine(10mg/kg, i.p.)によるACh分泌増加作用はSCH 23390の前投与(0.3mg/kg, 30分前)によっても抑制されず、前頭葉ACh分泌値は対照群(saline, i.p.)と比較して有意に高値を示した(P=0.042:図１)。

methysergide(5mg/kg, i.p.)は、投与初期一過性にACh分泌を増加させその後低下させたが、全体的にはACh分泌には著明な影響を与えなかった。3mg/kgのfenfluramineのACh分泌増加作用は、methysergideの前投与(5mg/kg, 30分前)によって完全に抑制されたが、10mg/kgの作用は抑制されなかった(P=0.005:図２)。ketanserin(5mg/kg, i.p.)は、methysergideと類似した影響をAch分泌に与えたが、同様に全体的には著明な影響を与えなかった。3mg/kgおよび10mg/kgのfenfluramineのACh分泌増加作用は、ketanserinの前投与(5mg/kg, 30分前)によって、完全に抑制された(図３)。

【考察】

fenfluramineの前頭葉ACh分泌増加作用は、DA D1受容体遮断薬のSCH 23390の前投与によっても抑制されなかった。このことから、fenfluramineによるACh分泌の増加はDA神経系を介したも

のではないことが示唆された。

3mg/kgのfenfluramineのACh分泌増加作用は、methysergideとketanserinの両者によって抑制されたが、10mg/kgの増加作用を抑制し得たのはketanserinのみであった。methysergideは、5-HT_1および5-HT_2受容体遮断作用を合わせ持つ非特異的遮断薬である。一方、ketanserinは5-HT_2の特異的な遮断薬であることから、fenfluramineの前頭葉ACh分泌の増加作用は5-HT_2受容体を介して行われている可能性が高い。Quirionらは前脳基底部－皮質ACh神経系の神経終末上に5-HT_2受容体が存在することを示唆したが(6)、ketanserinのACh分泌抑制作用はこの受容体を介している可能性が考えられる。

以上の結果から、fenfluramineによるラット前頭葉ACh分泌増加作用はDA神経系を介したものではなく、5-HT_2受容体を介する5-HT神経伝達の増加によってもたらされることが示唆された。

【参考文献】

(**1**) Jones, B.E. and Cuello, A.C. (1989) Neuroscience 31: 37-61. (**2**) Lidov, H.G.W., Grzanna, R. and Molliver, M.E. (1980) Neuroscience 5: 207-227. (**3**) Pazos, A. and Palacios, J.M. (1985) Brain Res. 346: 205-230. (**4**) Zilles, K., Werner, L., Qü, M., Schleicher, A. and Gross, G. (1991) Neuroscience 42: 473-481. (**5**) Quirion, R. and Richard, J. (1987) Synapse 1: 124-130. (**6**) Quirion, R., Richard, J. and Dam, T.V. (1985) Brain Res. 333: 345-349. (**7**) Benloucif, S. and Galloway, M.P. (1991) Eur. J. Pharmacol. 200: 1-8. (**8**) Day, J. and Fibiger, H.C. (1992) Synapse 12: 281-286. (**9**) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) 2nd ed, Academic Press, London.

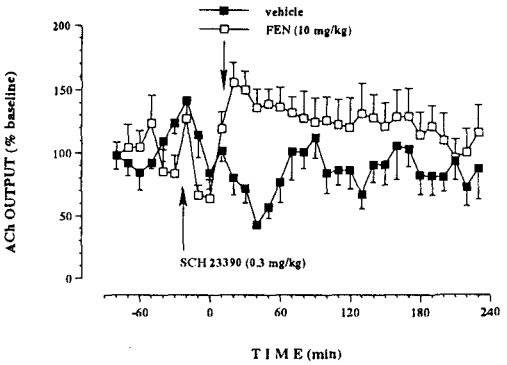


Fig. 1. Effects of SCH 23390 on fenfluramine-induced (10 mg/kg, i.p.) increase in ACh release in the frontal cortex. Fenfluramine (n=6) and vehicle (saline, i.p., n=6) were injected 30 min after administration of SCH 23390. Points and vertical bars represent mean ± S.E.M. in all figures.

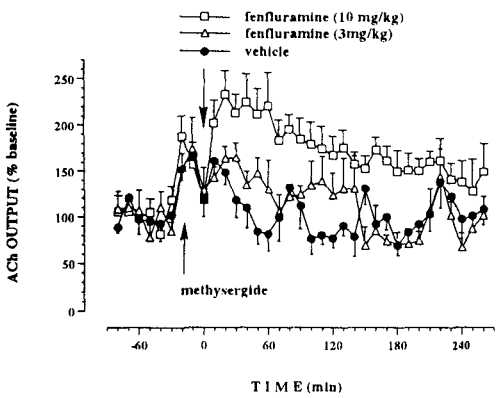


Fig. 2. Effects of methysergide (5 mg/kg, i.p.) on fenfluramine-induced (3 and 10 mg/kg, i.p., n=6 respectively) increase in ACh release. Fenfluramine and vehicle (saline, i.p., n=6) were injected 30 min after administration of Methysergide.

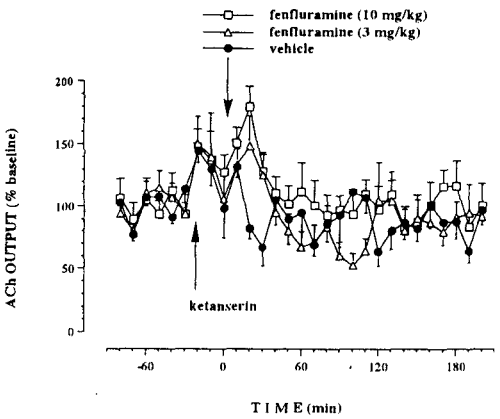


Fig. 3. Effects of ketanserin (5 mg/kg, i.p.) on fenfluramine-induced (3 and 10 mg/kg, i.p., n=8) increase in ACh release in the frontal cortex. Fenfluramine and vehicle (saline, i.p., n=7) were injected 30 min after administration of ketanserin.

305　G蛋白質の各種γサブユニットの性質と脳内分布

浅野富子、森下理香、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕

G蛋白質の各種γサブユニットに対する抗体を作製し、これを用いてラットにおけるγの脳内分布を調べた。いずれの部位にもγ_2とγ_3が多く存在していたが、γ_7は線条体にのみ高濃度存在し、他の部位では低かった。一方、脳以外の組織にはγ_{S1}がおもに存在していた。つぎに、γの機能的差異を知るため、異なるγを含むβγ複合体（$\beta\gamma_1$、$\beta\gamma_2$、$\beta\gamma_3$、$\beta\gamma_7$、$\beta\gamma_{S1}$）を精製し、まだ調べられていない性質について、比較検討した。プロテインキナーゼCによるリン酸化を行うと、γ_{S1}のみがリン酸化を受けた。そのリン酸化部位はセリンであった。つぎに、A_1アデノシン受容体と$G_o\alpha$との共役に対するβγの効果を比較すると、$\beta\gamma_2$、$\beta\gamma_3$が強く、$\beta\gamma_1$はとくに弱かった。

G蛋白質のβとγサブユニットは生理的条件下では、常に複合体として挙動している。αと同様、βγもアデニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼC、K^+チャネル、PI3-キナーゼの活性調節など多彩な機能をもつことが明らかになりつつある。βは4種類、γは7種類が知られているが、これまでに報告されているβγ複合体の機能の違いはγによると推定されている(1,2)。γの多様性の生理的意義を明らかにするするため、今回、γの脳内および組織分布について検討した。ついで、γの機能的差異を知るため、γの異なるβγのまだ調べられていない種々の性質を比較検討した。

[方法]

抗体の作製：ウシγ_2とγ_3のN末端およびγ_7のC末端のアミノ酸配列に一致したペプチドをヘモシアニンに結合させ、ウサギを免疫した。抗血清をアフィニティカラムで精製した。βγ複合体のプロテインキナーゼC（Cキナーゼ）によるリン酸化：ラット脳からのCキナーゼの精製、およびCキナーゼによる各種βγ複合体のリン酸化はKitanoら(3)の方法に従って行った。A_1アデノシン受容体とG_oの再構成：A_1アデノシン受容体はNakataの方法（4）に従って精製した。精製受容体を粗リン脂質膜へ組み込み、そこへ$G_o\alpha$と各種βγの等モルの混合物を加え再構成し、[^{35}S]GTPγSの結合を測定した。

[結果]

抗γ_2および抗γ_3はそれぞれのγと特異的に反応したが、γ_7に対する抗体はγ_7だけでなく、γ_2、γ_3、γ_{S1}とも反応した。そこでγ_7の抗体でγの脳内分布を調べると図1のようであった。γ_2、γ_3に相当するバンドはそれぞれの特異抗体で検出した結果とよく一致した。γ_2とγ_3はどの部位にも比較的高濃度存在したが、γ_7は線条体にのみ著しく高く、他の部位では低かった。脳以外のほとんどの組織では、γ_{S1}が主要なγであった。各種βγ複合体をCキナーゼでリン酸化すると、γ_{S1}にのみリン酸の取り込みがみられた。そのリン酸化部位はセリンであった。リン酸化はβγがαと結合すると減少した。種々の濃

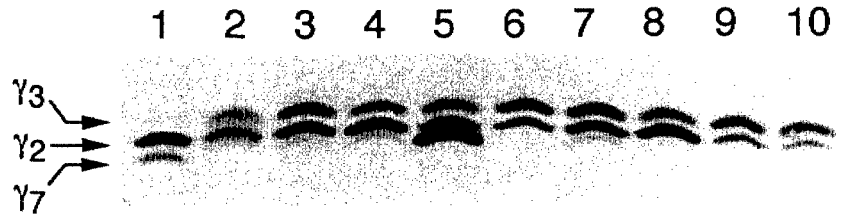


図１．各種γサブユニットのラット脳内分布

γ_7に対する抗体（各種γと反応）によるイムノブロット。 1) 精製$\beta\gamma$混合物， 2) 嗅球、3) 大脳皮質，4) 海馬，5) 線条体，6) 小脳，7) 中脳，8) 視床下部，9) 脳幹，10) 脊髄。

度のA_1アデノシン受容体に$G_o\alpha$と各種$\beta\gamma$の混合物を再構成した系において、アゴニストR-PIA存在下での$G_o\alpha$へのGTPγS結合を測定した（図２）。$\beta\gamma_7$に比べ、$\beta\gamma_2$と$\beta\gamma_3$を加えた場合の方が結合量が多く、$\beta\gamma_1$の場合は非常に少なかった。

[考察]

γの脳内や組織分布は各γによって異なっており、細胞によって機能しているγが異なることを示している。脳内ではとくにγ_7が線条体に高濃度存在することが特徴的であるが、この部位に高濃度存在することが知られているドーパミン受容体などとの関連も予想される。Cキナーゼによるリン酸化がγ_{S1}にほぼ特異的にみられたが、この生理的意義は現時点では不明である。γ_{S1}は神経系以外の細胞に多い分子種であるのでそれらの細胞の情報伝達の調節に関わっている可能性がある。各種$\beta\gamma$のアデノシン受容体とG蛋白質との共役促進作用は、$\beta\gamma_2$と$\beta\gamma_3$が強く、$\beta\gamma_1$が弱かった。ロドプシン－Gtの系においては本来の$\beta\gamma$である$\beta\gamma_1$が最も強く、$\beta\gamma_{S1}$も同様の効果を示した（2）。このことはγが受容体を識別していることを示唆している。

本研究は深田吉孝博士（東大）との共同研究である。

[文献]

(1) Iniguez-Lluhi, J., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 23409-23417. (2)Asano, T., et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 20512-20519. (3) Kitano,T., et al. (1986) Methods Enzymol 124, 349-352. (4) Nakata, H. (1989) J. Biol. Chem. 264, 16545-16551.

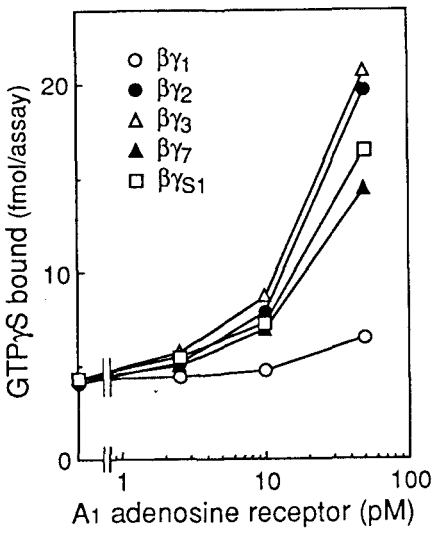


図２．A_1アデノシン受容体によるG_oの活性化に対する各種$\beta\gamma$の効果。

250 pM （終濃度）$G_o\alpha$と等モルの各種$\beta\gamma$の混合物とアデノシン受容体を再構成し、1 μM GDP、10 μM R-PIA、2 nM $[^{35}S]$GTPγS存在下で$[^{35}S]$GTPγSの結合を測定した。

306　脳腫瘍におけるBcl-2およびBcl-xの免疫組織化学的発現

白石哲也、中川摂子、戸田啓介、田渕和雄
（佐賀医科大学　脳神経外科）

〔要約〕
我々は脳腫瘍組織においてアポトーシスが数%の頻度で自然発生していることを報告してきた。今回はアポトーシスを抑制する因子に注目し、脳腫瘍組織上のBcl-2およびBcl-xの発現を免疫組織化学的に検索し、両者の相関につき検討した。検索した72例中の陽性率はBcl-2が71%、Bcl-xが56%であり、いずれも細胞質にび漫性に染色された。臨床的に悪性度の高い腫瘍群 (high grade astrocytoma, medulloblastoma, malignant lymphoma) でBcl-x陽性率がBcl-2陽性率より高値をとる傾向にあった。逆に臨床的に悪性度の低い腫瘍群 (meningioma, neurinoma, pituitary adenoma, dysembryoplastic neuroepithelial tumor)でBcl-2の方が高い陽性率を示した。個々の腫瘍ではBcl-2とBcl-xの発現が逆相関を示す傾向にあった。今回の結果より脳腫瘍においてはBcl-2とBcl-xが相補的にアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

【目的】最近、腫瘍とアポトーシスとの関係が注目され始めている。我々はこれまで培養グリオーマ細胞に抗Fas抗体および抗癌剤を投与することでアポトーシスを誘導できることを報告してきた(1)。また脳腫瘍組織においてアポトーシスが数%の頻度で自然発生していることを確認している（投稿中）。腫瘍にはアポトーシスを誘導する因子と抑制する因子が存在するが、今回はアポトーシスを抑制するBcl-2とその関連蛋白の1種であるBcl-xについてそれらの脳腫瘍組織における発現を検索し、両者の関係を検討した。

【方法】72例の手術時生検脳腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより6 μm切片を作製した。切片を10 mMのクエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で12分間マイクロウエーブ処理による抗原の賦活化を行った。一次抗体は抗ヒトbcl-2単クローン抗体(DAKO)および太田成男博士（自治医科大学生化学）より供与された抗bcl-x単クローン抗体(clone 35-6-4)を使用した。Labeled streptavidin-biotin法を用いた免疫組織化学染色を行った。高倍率で1000個以上の細胞をカウントし、陽性染色核の全核数に対する割合を求めた。その染色性を0%を-、25%未満を+、75%未満を++、75%以上を+++と定義した。

【結果】マイクロウエーブによる抗原賦活化を行うことでBcl-2およびBcl-xともに染色性が劇的に改善した。今回検索した脳腫瘍の組織とBcl-2およびBcl-xの免疫組織化学的発現をTable 1に示した。陽性率はBcl-2が71%、Bcl-xが56%であり、いずれも細胞質にび漫性に染色された(Fig. 1)。臨床的に悪性度の高い腫瘍群 (high grade astrocytoma, medulloblastoma, malignant lymphoma) でBcl-x陽性率がBcl-2陽性率より高値をとる傾向にあった。逆に臨床的に悪性度の低い腫瘍群 (meningioma, neurinoma, pituitary adenoma, dysembryoplastic neuroepithelial tumor)でBcl-2の方が高い陽性率を示した。個々の腫瘍ではBcl-2とBcl-xの発現が逆相関を示す傾向にあった。

【考察】*bcl-2* (B cell lymphoma/leukemia 2)遺伝子はヒト濾胞性B細胞リンパ腫の染色体転座の解析から発見された癌遺伝子の一つであり(2)、最近アポトーシスを抑制し細胞の寿命を長くすることが発見され注目されている(3)。我々は培養グリオーマ細胞においてBcl-2蛋白が高発現していることを報告している（Brain Tumor Pathology印刷中）。さらに今回の研究より脳腫瘍生検組織においても約70%でBcl-2の発現が認められた。これらの腫瘍群（特に増殖能の低い脳腫瘍群）ではBcl-2によって細胞の寿命を長くすることで生存に有利に働いていると推測される。一方Boiseらは(4) *bcl-2*とは独立してapoptosisを調整している*bcl-x*を単離した。今回の研究からはBcl-2の発現とBcl-xの発現とに逆相関が認められた。脳腫瘍が複数のアポトーシス関連遺伝子によって制御されている可能性が示唆された。

【文献】(1) 白石哲也　他(1993)神経化学 32, 100 (2) Tsujimoto Y, et al. (1985) Science 228, 1440 (3) Vaux D. L., et al. (1992) Science 258, 1955 (4) Boise, L. H., et al. (1993) Cell 74, 597

Table 1 Immunohistochemical expression of Bcl-2 and Bcl-x in various brain tumors

Histology	total cases	Bcl-2				Bcl-x			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
low grade astrocytoma	12	2	5	5	0	2	2	6	2
high grade astrocytoma	28	11	13	2	2	10	3	10	5
medulloblastoma	7	3	2	0	2	4	2	1	0
malignant lymphoma	10	3	0	1	6	2	4	2	2
meningioma	6	1	1	1	3	5	0	1	0
neurinoma	3	0	0	0	3	5	0	1	0
pituitary adenoma	3	1	0	0	2	3	0	0	0
DNT	3	1	0	0	2	1	1	1	0

DNT: dysembryoplastic neuroepithelial tumor

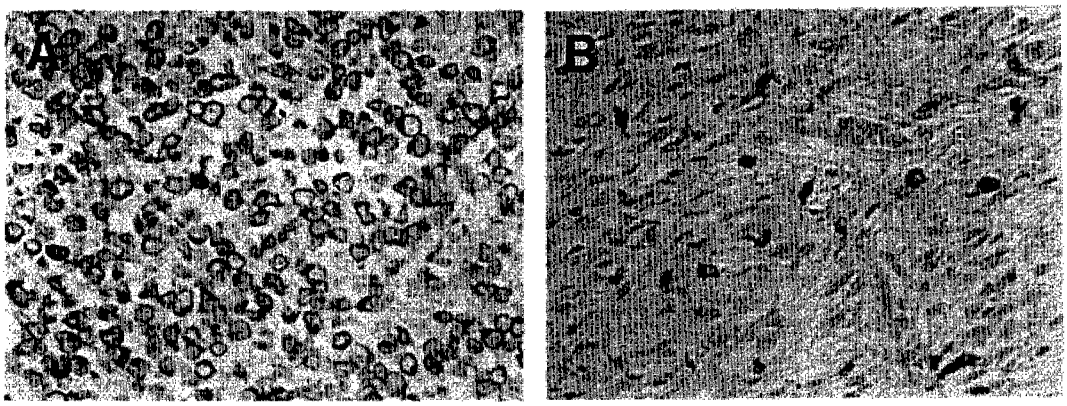


Fig. 1 Immunohistochemical staining of Bcl-2 and Bcl-x
A: Bcl-2 staining. Malignant lymphoma (x400).
B: Bcl-x staining. High grade astrocytoma (x400).

307 神経ペプチドによる achatin-I 興奮作用の修飾

劉 国君，翁 述民，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興奮性ペプチド，achatin-I を圧により神経細胞に局処投与して得られる内向き電流 (I_{in}) は，軟体動物の神経ペプチドである FMRFamide, APGW-amide, oxytocin 3x 10-6 Mの bath 投与により有意に抑制された．従ってこれらのペプチドは，achatin-I の作用に対して，神経修飾作用を持つ．

［はじめに］Achatin-I (Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp) は Achatina 神経細胞の興奮性神経伝達物質であると同時に，5-hydroxytryptamineの作用，また FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH_2)，APGW-amide (Ala-Pro-Gly-Trp-NH_2)など神経ペプチドの作用を修飾することから，神経修飾物質として働いていると考えられた（3，4，6，7）．本研究ではさらに，FMRFamide, APGW-amide, oxytocin, [Ser^2]-Mytilus inhibitory peptide ([Ser^2]-MIP) (Gly-Ser-Pro-Met-Phe-Val-NH_2)などの神経ペプチドの，achatin-Iにより引き起こされた興奮に対する修飾作用を検討した．なお FMRFamide は最初アサリ (Macrocallista nimbosa) の神経節から（8），APGW-amideはナガニシ (Fusinus ferrugineus)から（5），[Ser^2]-MIPはイガイ (Mytilus edulis) から（2），それぞれ分離されたペプチドである．なお oxytocin は，水棲カタツムリ (Lymnaea stagnalis)の神経節中に見付かっている（1）．

［実験方法］Achatina神経節中に同定される2つの巨大神経細胞，v-RCDN (ventral-right cerebral distinct neurone)および PON (periodically oscillating neurone) が，実験に使用された．その細胞体に2本のガラス微小電極を刺入して，膜電位固定を行った．Achatin-I はガラス毛細管ピペットに充填され，圧 (1-2 kg/cm^2, 400 msec, 10^{-3} M) により神経細胞に局所投与された．神経ペプチドは 3 x 10-6 M の濃度に生理溶液により溶かされ，実験標本に灌流で与えられた．

［結果と考察］achatin-I ならびに本研究で実験に用いられた神経ペプチドの直接作用ならびに修飾作用を，Table 1 に要約する．すなわち achatin-Iにより引き起こされた I_{in}は，FMRFamide, APGW-amide, oxytocin により抑制された．

さらに achatin-Iを与える圧の持続時間を変えて (50 - 500 msec)用量（圧投与持続時間）・作用曲線を描き，これに対する神経ペプチドの作用を調べたところ，これらペプチドの抑制作用は，すべて非競合的であった (Fig. 1)．すなわちこれらペプチドの achatin-Iに対する抑制作用は，achatin-I receptorに対する作用ではないと考えられる．先に証明された achatin-I のこれら神経ペプチドの作用にたいする修飾作用の場合も，やはり非競合的であった．これらの実験事実より，achatin-I ならびにこれらの神経ペプチドは，Achatina神経細胞に対して直接作用を持つと同時に，それよりも薄い濃度で，お互いがお互いを修飾し合っていると考えられる．これら修飾作用の機構はまだ解析されてないが，恐らくいずれかの細胞内情報伝達機構が絡んでいるように予想される．

References
(1) Ebberink RHM and Joosse J, Peptides 6(Suppl 3), 451-457, 1985
(2) Hirata T et al., Biochem Biophys Res Com 152, 1376-1382, 1988
(3) Kamatani Y et al., Biochem Biophys Res Com 160, 1015-1020, 1989
(4) Kim KH et al., Eur J Pharmacol 194, 99-106, 1991
(5) Kuroki Y et al., Biochem Biophys Res Com 167, 273-279, 1990
(6) Liu GJ and Takeuchi H, Eur J Pharmacol 231, 259-265, 1993
(7) Liu GJ and Takeuchi H, Eur J Pharmacol 240, 139-145, 1993
(8) Price DA and Greenberg MJ, Science (NY) 197, 670-671, 1977

Table 1. Direct and modulatory effects of neuroactive peptides includng achatin-I on the Achatina giant neurones.

Peptide	Direct effects on:		Modification of peptide effects by achatin-I on:		Modification of achatin-I effects by peptides on:	
	v-RCDN	PON	v-RCDN	PON	v-RCDN	PON
Achatin-I	I_{in}	I_{in}				
FMRFamide	I_{out}	(-)	enhance		suppress	suppress
APGWamide	I_{out}	(-)	suppress		suppress	none
Oxytocin	(-)	I_{in}		suppress	none	suppress
[Ser^2]-MIP	I_{out}	(-)	none		none	

v-RCDN, ventral-right cerebral distinct neurone.
PON, periodically oscillating neurone. I_{in}, inward current.
I_{out}, outward current. (-), no direct effect.

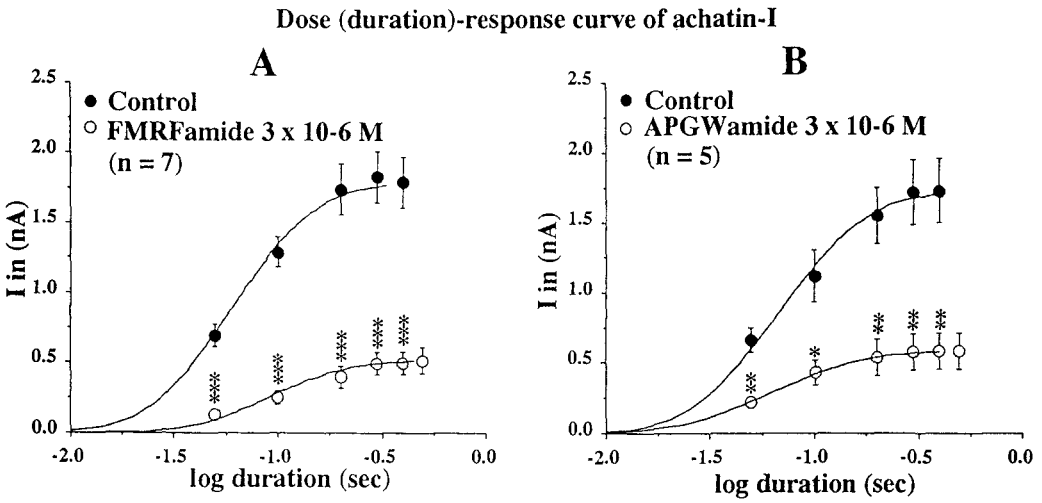


Fig. 1. Effects of FMRFamide (A) and APGW-amide (B) at 3 x 10^{-6} M on the dose (pressure duration)-response curves of achatin-I, applied pneumatic pressure (1 kg/cm^2, 10^{-3} M and 5 min interval), using v-RCDN (ventral-right cerebral distinct neurone). (●), in physiological solution (control). (○), under peptide perfusion. Abscissa, duration of the achatin-I pressure ejection in logarithmic scale (sec); ordinate, inward current (I_{in}) produced by achatin-I (nA) (small vertical bar: SEM). Student's t-test for paired data of I_{in} under the peptide against control (*, $P < 0.05$; **, < 0.01; ***, < 0.001).

308 Achatina fulica 巨大神経細胞に対する L-グルタミン酸関連物質の作用

張　唯，荒木陽子，ツキジデス・L・サルンガ，竹内　宏
（岐阜大・医・第1生理）

〔要約〕
アフリカマイマイ (Achatina fulica Férussac) 巨大神経細胞4個のうち，3個は L-Gluにより内向き電流 (I_{in})を生じるが，他の1個，すなわち v-LCDN (ventral-left cerebral distinct neurone) は，L-Glu にはほとんど感受性がなく，そのかわり threo-β-hydroxy-L-glutamic acids (tL-BHGA)ならびに erythro-L-BHGA (eL-BHGA) により，外向き電流 (I_{out}) を発生した．この I_{out} は，細胞膜の K^+ に対する透過性上昇により生じるが，このチャネルが活性化されるために，ATPaseの活性が必要であった．

［はじめに］先にある種の Achatina 巨大神経細胞が，L-Glu でなく L-BHGA に感受性があることが見付けられた（1，3）．本研究では，これらの物質を圧により神経細胞に局処投与して，その作用を膜電位固定下で定量的に観測した．

［実験方法］Achatina神経節中に同定される v-LCDN (ventral-left cerebral distinct neurone), PON(periodically oscillating neurone), RAPN (right anterior pallal nerve neurone), d-RPLN (dorsal-right parietal large neurone), RPeNLN (right pedal nerve large neurone)が，実験に用いられた（2）．2本のガラス微小電極を細胞体に刺入し，膜電位固定を行った．L-Glu, L-BHGA およびその誘導体は，ガラス毛細管ピペットに充填され，圧 (2 kg/cm^2, 400 msec, 10^{-2} M)により神経細胞に局所投与された．

［結果と考察］5個の Achatina 神経細胞に対する L-Glu, tL-BHGA およびその誘導体が引き起こす膜電流の大きさを，Table 1 に要約する．V-LCDNは L-Gluに感受性がなく，そのかわり tL-BHGA, eL-BHGA により I_{out} を生じた．この神経細胞では，quisqualate が強力な agonistであった．他の4個の神経細胞は，L-Glu により I_{in}を生じた．

v-LCDNで細胞外液の K^+ 濃度を変えて，tL-BHGA の局処投与による電流・電圧曲線 (I-V curve)を測定した．この曲線が Y = 0となる点が，その平衡電位である．tL-BHGA 作用の平衡電位 ($E_{tL-BHGA}$) は，外液の K^+ が濃くなるにつれて右方に移動した．$E_{tL-BHGA}$を E_K と考えれば，その値は Nernst equationによく一致し，この I_{out} の発生は，膜の K^+ に対する透過性上昇によると結論された (Fig. 1, A)．v-LCDNにおける tL-BHGAの用量（圧持続時間）・作用曲線の E_{max} 値は，10^{-5} M ouabainにより大きく減少した．すなわちこの薬物により，tL-BHGA の作用は非競合的に抑制された．tL-BHGA の作用に関連する K^+ チャネルが活性化されるために，ATPase活性が必要であると結論された (Fig. 1, B)．

References
(1) Takeuchi H et al., Comp Biochem Physiol 93C, 263-268, 1986
(2) Takeuchi H et al., In: Neurobiology Molluscan Models ed. by Boer HH et al., Elsevier, PP 100-104, 1987
(3) Watanabe K et al., Eur J Pharmacol 111, 57-63, 1985

Table 1. The current (nA) induced by L-glutamate (L-Glu), threo-β-hydroxy-L-glutamic acid (tL-BHGA) and their derivatives, ejected by the pneumatic pressure (2 kg/cm^2, 400 msec, 10^{-2} M) on the Achatina giant neurones (n > 4).

Neuron	Current	L-Glu	D-Glu	tL-BHGA	eL-BHGA	tD-BHGA	eD-BHGA
v-LCDN	I_{out}	1.0±0.3	0.7±0.2	6.6±0.3	5.8±0.6	1.8±0.2	1.2±0.2
PON	I_{in}	8.7±1.2	0.3±0.1	10.3±3.0	0.9±0.2	0.3±0.2	0.3±0.1
RAPN	I_{in}	7.4±1.5	0.5±0.1	4.2±0.8	0.7±0.2	0.9±0.3	0.4±0.2
d-RPLN	I_{in}	3.6±0.4	0.9±0.1	1.3±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1	0.8±0.2
RPeNLN	I_{in}	16.1±3.1	0.7±0.2	15.3±2.6	0.5±0.1	0.8±0.3	0.6±0.2

Neuron	NMDA	Kainate	Quisqua	AMPA	Iboten	GABA
v-LCDN	0.0	0.0	5.5±0.4	0.0	0.0	0.0
PON	0.5±0.2	0.2±0.1	5.3±1.0		8.7±2.5	
RAPN	0.7±0.1	2.0±0.3	2.9±0.8		7.3±2.3	
d-RPLN	0.8±0.2	2.2±0.3	1.4±0.3	2.9±0.4	0.9±0.1	
RPeNLN	0.6±0.1	0.5±0.1	8.3±2.9	5.6±1.6	9.5±2.5	

I_{in} (inward current), and I_{out} (outward current). Quisqua (quisqualate), and Iboten (ibotenate).

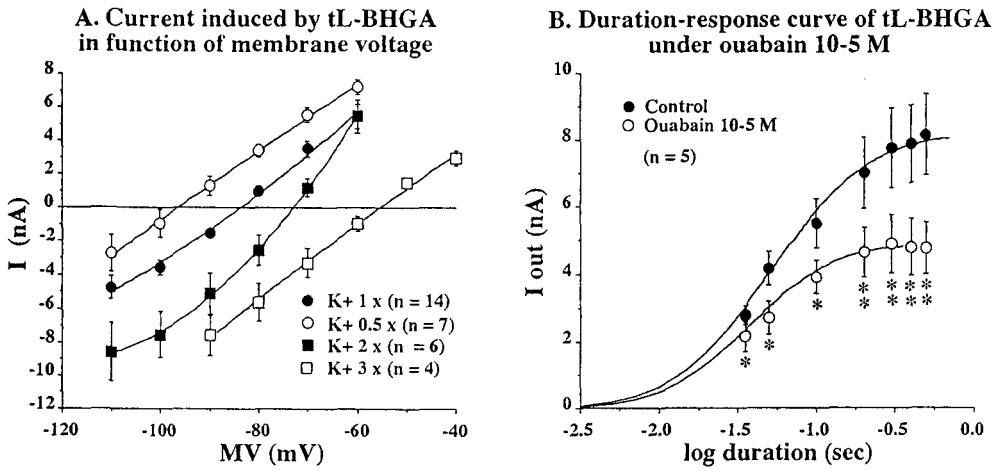


Fig. 1. Outward current (I_{out}) induced by threo-β-hydroxy-L-glutamic acid (tL-BHGA) of v-LCDN. A, Current-voltage (I-V) relations produced by tL-BHGA, ejected by pneumatic pressure (2 kg/cm^2, 400 msec, 10^{-2} M) under varied extracellular K^+ concentrations. Abscissa, membrane potential (mV); ordinate, current produced by tL-BHGA (nA) (small bar: SEM). B, Effects of ouabain at 10^{-5} M on dose (pressure duration)-response curves of tL-BHGA (1 kg/cm^2, 10^{-2} M), obtained by varied pressure durations (50 - 500 msec). Abscissa, pressure duration in logarithmic scale (sec); ordinate, I_{out} (nA) (small bar: SEM). Student's t-test for paired data of the tL-BHGA-induced current under ouabain against that in the physiological solution (control) (*, $P < 0.05$; **, < 0.01).

309 Achatina fulica 巨大神経細胞に対するカテコールアミンの作用

ムハンマド・エマドゥディン，劉　国君，韓　暁燕，竹内　宏
（岐阜大・医・第1生理）

〔要約〕

アフリカマイマイ（Achatina fulica Férussac）神経節に同定される巨大神経細胞のうち，3個の神経細胞が，dopamine (DA) に感受性を持つ．すなわち RVMN (right visceral multiple spike neurone), d-RPeAN (dorsal-right pedal anterior neurone), v-LCDN (ventral-left cerebral distinct neurone)である．このうち RVMN, d-RPeANは，DA, epinine (EP), L-noradrenalin (L-NA) により，内向き電流 (I_{in})を発生する．これら2個の神経細胞に対する DA の作用は，SKF83566, UH232 により非競合的に拮抗される．これに対して v-LCDNは，DA, EPにより，外向き電流 (Iout) を発生し，それに対する DA の作用は，sulpiride により競合的に，UH232 により非競合的に拮抗される．

［はじめに］先に DA を始めとする catecholamines の作用が bath 投与により，Achatinaの巨大神経細胞で研究された（1，2）．また ergometrineなどのバッカクアルカロイドが，DA の agonistとして働くことが，bath投与で指摘された（3，4）．本研究では，DA感受性神経細胞の DA およびその関連物質の圧による局処投与 (2 kg/cm^2, 400 msec, 10^{-2} M) を行い，その作用を膜電位固定下で定量的に観測した．

［実験方法］3個の Achatina 巨大神経細胞，RVMN, d-RPeAN, v-LCDN が実験に用いられた．その細胞体に電極を2本刺すことにより，膜電位固定が行われた．

［結果と考察］3個の神経細胞に対する，DAとその関連物質，また ergometrineの作用を，Table 1 に要約する．3個の神経細胞ともに，octopamine, synephrine といった monophenolaminea，また ergometrineには感受性がなかった．Ergometrineを bath投与すると，DAと同じ作用が長く続くことが確かめられているが（3，4），圧による局処投与では，この物質には作用がなく，これは bath 投与による場合に transsynapticな作用が混入したのか，それとも圧による局処投与では，薬物の作用時間が短すぎるのか結論されない．RVMN, d-RPeANの2つの神経細胞は，ともに DA, epinine (EP), L-noradrenalin (L-NA)により I_{in}が発生した．これに対して v-LCDN では，DA, EPにより I_{out} が発生し，L-NAはほとんど作用を示さなかった．RVMN, d-RPeAN の DA による I_{in}は，K^+に対する膜透過性の上昇に依存し，v-LCDNのDAによる I_{out} は，K^+に依存した．DAの用量（投与持続時間）・作用曲線を測定し，それに対する SKF83566 (D_1-antagonist), sulpiride (D_2-antagonist), UH232 (D_3-antagonist) の作用を検定した．その結果を Table 2に要約する．RVMN, d-RPeAN では，SKF83566, UH232 の存在下で，この曲線の E_{max} が著しく減少した．すなわちその拮抗様式は，非競合的であった．これに対して v-LCDN では，この曲線は sulpirideの存在下で，右方に移動した．すなわちその拮抗様式は，競合的であった．この神経細胞で，同じ曲線は UH232の存在下で，E_{max}が著しく減少した．すなわちその拮抗様式は，非競合的であった (Fig. 1)．

References
(1) Ku BS and Takeuchi H, Eur J Pharmacol 114, 1-8, 1985
(2) Ku BS and Takeuchi H, Eur J Pharmacol 124, 21-19, 1986
(3) Miyamoto M et al., Arch int Pharmacodyn Ther 241, 49-67, 1979
(4) Miyamoto M et al., Arch int Pharmacodyn Ther 245, 56-73, 1980

Table 1. The current (nA) induced by catecholamines and their derivatives, ejected by the pneumatic pressure (2 kg/cm^2, 400 msec, 10^{-2} M) on the Achatina giant neurones (n > 4).

Neurone	Current	DA	L-NA	L-A	EP	DL-OA	DL-SY	Me-erg
RVMN	I_{in}	11.4±0.8	7.5±1.1	3.0±0.6	6.9±1.7	0.0	0.0	0.0
d-RPeAN	I_{in}	5.1±0.4	4.2±0.9	1.2±0.4	3.0±0.4	0.0	0.0	0.0
v-LCDN	I_{out}	1.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	1.7±0.3	0.0	0.0	0.0

I_{in} (inward current), and I_{out} (outward current). DA (dopamine), L-NA (L-noradrenalin), L-A (L-adrenalin), EP (epinine), DL-OA (DL-octopamine), DL-SY (DL-synephrine) and Me-erg (methylergometrine).

Table 2. Effects of dopamine (DA) receptor antagonists at 3 x 10^{-5} M on the current induced by DA, ejected by the pneumatic pressure (2 kg/cm^2, 400 msec, 10^{-2} M), of the Achatina giant neurones (n > 4).

Neurone	Current	SKF83566 (D_1-antagonist)	Sulpiride (D_2-antagonist)	UH232 (D_3-antagonist)
RVMN	I_{in}	suppressed (NC)	unaffected	suppressed (NC)
d-RPeAN	I_{in}	suppressed (NC)	unaffected	suppressed (NC)
v-LCDN	I_{out}	unaffected	suppressed (C)	suppressed (NC)

NC (non-competitive), and C (competitive).

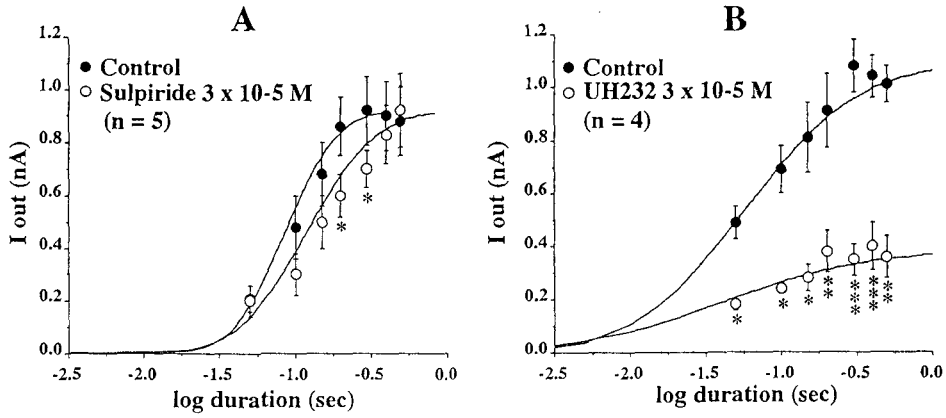


Fig. 1. Dose (pressure duration)-response curves of dopamine (DA), ejected by pneumatic pressure (2 kg/cm^2 and 10^{-2} M), on v-LCDN (ventral-left cerebral distinct neurone) under sulpiride (A) and UH232 (B) at 3 x 10^{-5} M. Abscissa, pressure duration in logarithmic scale (sec); ordinate, outward current (I_{out}) (nA) (small bar: SEM). (●), in the physiological solution (control); (○), under a drug. Student's t-test for paired data of the DA-induced current under a drug against that of control (*, P < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001).

310 5HT3受容体作用薬のドパミン代謝に対する影響は遺伝学的な選択によって変異する - モデル動物による検討-

盛政忠臣、金行孝雄*、庄盛敏廉
（岡山大学医学部・神経内科、*岡山県立大学）

〔要約〕

筆者らは、成熟雄性動物に一般的に見られる攻撃性について注目して、攻撃性が高い群と低い群とに、遺伝学的に選抜育種を行って検討モデル動物としてのを加えてきた。さらに、この攻撃行動とセロトニン（5 HT）神経系との密接な関係を明らかにしてきた。本研究では、中枢神経作用に対する作用が注目されている、5HT3受容体の選択的作用剤（アゴニスト；2-Me-5HTとアンタゴニスト；MDL72222）の脳内ドパミン代謝に対する作用について、これらの動物を用いて比較検討を加えた。攻撃性の低い群では、どちらの薬剤も、同様なドパミンの放出代謝の顕著な抑制結果を示した。攻撃性の高い群では、逆に、一部の脳部位でドパミン代謝の亢進が示された。これらの二つの動物群では、ドパミンの放出と代謝に対する、5HT3受容体を含む神経制御機構が顕著に異なることが明らかにされた。今後、これらの動物モデルは、その相違点を比較して明らかにすることにより、5HT3受容体の神経制御機構がドパミン神経終末に対する関与のしかたを解明するために、重要な貢献をするものと考えられる。

【目的】5HT3受容体が様々な神経機構に関与していることは多く議論（3）されてきたところである。特に、5HT3受容体の選択的遮断剤（アンタゴニスト）は、morphine等の神経刺激剤によるドパミン放出の亢進を抑制（5）することの他、ドパミンの放出代謝に関与を示すという報告（1,2）もあるが、報告は少なくて、5HT3受容体とドパミンの放出代謝の相互関係の詳細は不詳である。筆者らは、雄性マウスの中から攻撃性が高い群（H）と低い群（L）とに、遺伝学的に選抜分離を行って、両群の間に、5HT代謝（4）とその受容体の機序に顕著な相違点のあることを明らかにして報告してきた。本研究では、5HT3受容体のドパミン神経終末に対する制御機構を明らかにする目的で、筆者らが作成してきたモデル動物を用いて、5HT3受容体選択的作用剤（アゴニストまたはアンタゴニスト）をこれらの動物に投与して、ドパミンの放出と代謝に対する影響について比較検討を行った。

【実験方法】実験動物には、既報（4）のモデル動物（HおよびL群）から、さらに選抜育種を重ねてきたものを用いた。5HT3受容体に対する選択的薬剤は、アゴニストとして2Me-5HT（0, 2.5 ,10mg/kg, sc）または、アンタゴニストとしてMDL72222（0, 2.5, 10mg/kg, sc）を用いた。これらの薬剤を投与した30分後に、ddyマウスに対して5分間のpaired-open field testを行った。その直後に、頭部をマイクロウエーブ処理して、微小脳部位（前頭葉皮質；f.c.、前方帯状回；c.c.、内側鼻状鉤状回；ent. c.）を得た。これらの脳部位から、HPLCにより、ドパミン（DA）とその代謝産物（DOPAC, HVA）を測定した。統計的な比較は、薬物非投与（0mg/kg: PBS）群に対するt-testによった。

【結果と考察】L群の動物では、5HT3受容体アゴニストまたはアンタゴニストの投与により、いずれの脳部位においても、DA,DOPACまたはHVAの有意な減少（表.1）が示された。これらの結果は、5HT3受容体の制御機構が、ドパミンの神経終末に対してドパミンの放出代謝を抑制的に制御していることを反映していることを示唆するものと考えられた。ここで、アゴニストとアンタゴニストの投与（全身；sc）が同様の結果を示したのは、節前性と節後性の両方の作用結果を反映したものと考えられる。この点については、今後の詳細な検討が必要である。

一方、H群の動物においては、これらの薬剤投与により、一部の脳部位でドパミンの放出代謝の亢進を示す結果（表.1）が示された。しかしながら、L群で示されたような、ドパミンの放出代謝を反映する顕著な抑制結果は、示されなかった。

5HT3受容体選択的作用薬剤を用いた以上の結果から、筆者らが作成したモデル動物（HとLの二つの動物群の間）では、ドパミンの放出と代謝におよぼす、5HT3受容体を含む神経制御機構が顕著に異なることが明らかにされた。今後、これらのモデル動物は、その相違点を比較して明らかにすることにより、5HT3受容体の神経制御機構がドパミン神経終末に対する関与のしかたを解明するために、重要な貢献をするものと期待される。

paired-open field testの行動薬理学的な実験結果からは、5HT3受容体選択的作用薬剤の作用は、明らかでなかった。

【文献】

1) Benloucif S, et al (1993) J.Pharmacol.Exp.Therap.,265(1), 373-377.
2) Chen J, et al (1992) Synapse, 10, 264-266.
3) Greenshaw AJ (1993) Trend.Pharmacol. Sci., 14(7), 265-270.
4) 盛政忠臣他.(1992) 神経化学,32(1),288-289.
5) Pei Q, et al (1993) Eur.J.Pharmacol., 230, 63-68.

表.1　攻撃性モデル動物（HとL群）に対する5HT3受容体の選択的作用剤（2-Me-5HTとMDL72222）の急性投与による脳部位（f.c., c.c., ent.c.）におけるドパミン代謝に対する影響。
略号は、本文参照。値は、pmol/mg protein (mean ±sem)
★; p<0.05 by decrease, ☆ p<0.05 by increase against the control, respectively.

f. c.	DA	DOPAC	HVA
L/ PBS	4.7±0.3	1.6±0.2	5.5±0.6
L/2Me5HT2.5	3.6±0.8	2.0±0.4	7.3±2.3
L/2Me5HT10	1.9±0.3 ★	1.8±0.8	6.9±0.8
H/PBS	1.9±0.3	0.9±0.1	4.8±1.1
H/2Me5HT2.5	1.6±0.3	0.9±0.2	5.9±1.4
H/2Me5HT10	1.5±0.2	1.8±0.9	3.5±0.4

f. c.	DA	DOPAC	HVA
L / PBS	3.8±0.4	4.6±0.4	3.7±0.5
L / MDL1	2.8±0.2	2.3±0.3 ★	3.0±0.4
L / MDL10	2.5±0.3	2.1±0.3 ★	3.1±0.6
H / PBS	2.7±0.2	1.6±0.2	2.9±0.2
H / MDL1	4.4±0.9 ☆	3.1±0.5 ☆	4.5±1.4
H / MDL10	2.7±0.3	1.8±0.2	3.7±0.8

c. c.	DA	DOPAC	HVA
L/ PBS	9.6±1.2	3.3±0.6	5.7±0.5
L/2Me5HT2.5	6.2±1.0 ★	3.8±0.7	3.5±0.4 ★
L/2Me5HT10	6.1±0.7 ★	3.1±0.21	4.2±0.5 ★
H/PBS	4.8±0.5	1.8±0.4	2.8±0.3
H/2Me5HT2.5	5.7±0.6	2.1±0.3	3.1±0.2
H/2Me5HT10	5.1±0.6	2.2±0.2	3.3±0.3

c. c.	DA	DOPAC	HVA
L / PBS	5.6±0.8	1.9±0.3	3.3±0.7
L / MDL1	2.4±0.6 ★	1.2±0.2 ★	1.6±0.2 ★
L / MDL10	2.0±0.2 ★	0.6±0.1 ★	0.8±0.1 ★
H / PBS	4.0±0.8	0.8±0.2	1.7±0.1
H / MDL1	3.3±0.7	0.9±0.2	1.0±0.2
H / MDL10	4.4±0.8	1.3±0.1	1.3±0.3

ent. c.	DA	DOPAC	HVA
L/ PBS	7.2±1.0	1.2±0.2	2.5±0.8
L/2Me5HT2.5	4.3±0.9 ★	1.1±0.3	1.1±0.2
L/2Me5HT10	4.5±0.7 ★	0.9±0.2	1.6±0.2
H/PBS	3.4±0.5	1.1±0.1	1.4±0.2
H/2Me5HT2.5	7.0±0.6 ☆	0.9±0.1	2.4±0.6
H/2Me5HT10	3.6±0.4	0.8±0.1	1.3±0.1

ent. c.	DA	DOPAC	HVA
L / PBS	4.3±0.7	2.8±0.5	4.5±3.0
L / MDL1	2.6±0.3 ★	0.9±0.1 ★	1.6±1.0
L / MDL10	3.5±0.2	1.1±0.2 ★	1.4±0.7
H / PBS	3.9±0.3	1.0±0.3	0.6±0.1
H / MDL1	4.4±0.4	1.7±0.3	2.8±2.1
H / MDL10	3.4±0.7	1.8±0.4	5.6±2.7

311 Signal Transduction of BDNF/trkB in PC12 cells

Zhang Jian, Hattori Seisuke, Nakamura Shun
Div. of Biochem. and Cell. Biol., Natl Inst. of Neurosci., NCNP

〔要約〕A cDNA clone of mouse trkB was expressed in a rat pheochromocytoma cell line PC12 cell. The expression of the cDNA was under the control of methallothionein promoter, which is activated by heavy-metal ions. The addition of BDNF to the culture medium supported the survival of the transformants in a serum free condition. The full induction of trkB by addition of cadmium induced neurite extension of the transformants. BDNF activated autophosphorylation of trkB and caused the accumulation of a GTP-bound Ras. These results suggested that BDNF/trkB activates the similar signal transduction pathway in PC12 cells as NGF/trk does.

Introduction TrkB is a gene of tyrosine protein kinase highly related to trk that encodes a receptor for Nerve Growth Factor (NGF) (1). trkB tyrosine kinase receptor specifically binds to Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), but not to NGF, and plays important roles in development of central and peripheral nervous system(2). It has been well known that rat pheochromocytoma PC12 cell expressing high level of intrinsic trk tyrosine protein kinase product gp140trk. The tyrosine phosphorylation of gp140trk by NGF induces the accumulation of RAS•GTP (3,4) and neural differentiation of PC12 cells. We are interested in the difference of the signal transduction mechanism between BDNF/trkB and NGF/trk. To understand this in detail, we have transfected PC12 cell with trkB and found that the differentiation of the transfected PC12 cell is induced by BDNF in concomitant with accumulation of RAS•GTP.

Experimental Procedure One day before the transfection, PC12 cells were seed at 5-6 x10^5/60 mm dish. phMTtrkB and pSV2neo were cotransfected by using Lipofectin regent (GIBCO BRL). After 24 hours, cells were transferred to 100 mm dish in DMEM containing 10% FCS, 5% Horse serum and selection by G418 was started after 2 days. A cDNA clone of mouse trkB was from Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute and BDNF from Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Result and Discussion A cDNA clone of mouse trkB was conditionally expressed in PC12 cells with a Neo^r gene as a selection marker. From more than 40 G418^r clones, two independent clones (PB11 and PB17) were isolated as trkB expressing cell lines based on slot blot analysis of total RNA as well as neurite extension ability with BDNF addition. The transformant was not able to survive in a serum

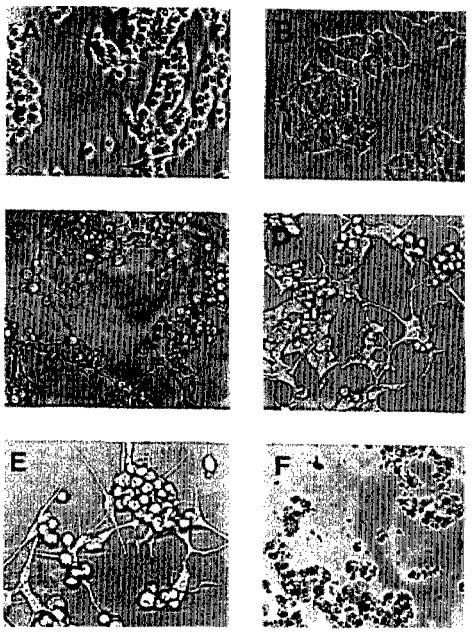


Fig. 1

free condition in the absence of BDNF (Fig. 1A). BDNF addition supported cell survival (Fig. 1B) and neurite extension when trkB was fully induced by cadmium (Fig. 1D). In contrast, a parental PC12 cell line was not maintained by BDNF in a serum free condition (Fig. 1F). The expression of trkB was further confirmed by Western blot analysis using a trkB specific antibody (Fig. 2). Fig. 3 shows that both clones express trkB and that the basal level of trkB expression is different between two clones. We next examined the autophosphorylation of trkB by BDNF. The cell lysates of the transformants stimulated with BDNF or not were immunoprecipitated by a trkB antibody and the precipitates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis by a monoclonal antibody against phosphotyrosine. BDNF-dependent phosphorylation of p145 kDa protein was observed in Fig. 4. This result shows autophosphorylation of trkB by BDNF. Then, we tested whether BDNF could activate accumulation of GTP-bound Ras in the transformants. The activation of accumulation of Ras•GTP was significant in the presence of BDNF (Fig. 5). These data are consistent with the idea that BDNF/trkB transduces differentiation signal through activation of its receptor tyrosine kinase and of Ras-pathway in PC12 cells(5, 6).

Fig. 2

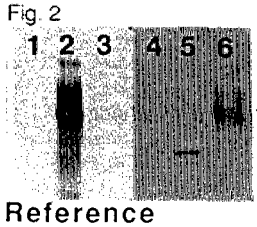


Fig. 3

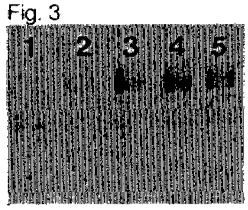


Fig. 4

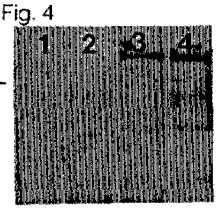
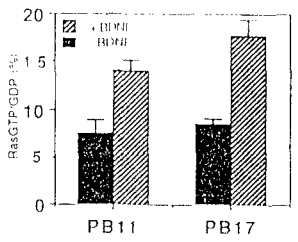


Fig. 5



Reference

1. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., et al. (1991) Cell 66, 395-403
2. Klein,R., Smeyne, R.J., Wurst, W., et al. (1993) Cell 75, 113-122
3. Muraya, K., Hattori, S., Nakamura, S. (1992) Oncogene 7, 277-281
4. Kaplan, D., Martin-Zanca, D., Parada, L. F. (1991) Nature 350, 158-160
5. Squinto, S.P., Stitt, T.N., et al. (1991) Cell 65, 885-893
6. IP, N.Y., Stitt, T.N., et al. (1993) Neuron 10, 137-149

Legends to figures

Fig.1 Survival and differentiation of a PC12 cell line expressing trkB by BDNF. The transformant (A~D), Parental PC12 cells (E, F) A, F12/DMEM medium; B, 50 ng/ml BDNF; C, 0.5 μM cadmium; D, F, 0.5 μM cadmium and 50 ng/ml BDNF; E, 0.5 μM cadmium and 50 ng/ml NGF.

Fig.2 *Specification of an anti-trkB antibody.* COS7 cells transfected with pEF-trkA(lanes 2, 5), pEF-trkB (lanes 3, 6) and pEF-Bos(lanes 1, 4) were lysed and the lysates were absorbed by wheat germ agglutinin-agarose (E. Y. Labs.). Precipitates were separated by 7.5% SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose filter (S & S), followed by blot with anti-GST.trkA (1: 2000) (lanes 1, 2 ,3) and anti-GST.trkB (1:2000) (lanes 4, 5 ,6). Detection was by ECL system (Amersham Life Sci.). TrkA- and trkB-specific protein sequences are from N-termini that do not contain the transmembrane and tyrosine kinase domain.

Fig. 3 Western blot analysis of gp145 trkB expression. Cells were cultured in the presence (3, 5) or absence (1,·2,4) of cadmium for one overnight and the lysates were prepared by WGA as described in the legend to Fig. 2. The precipitates were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis by an anti-trkB antibody. lane 1, PC12 cells; lane 2, 3, a clone PB11; lane 4, 5, another clone PB17.

Fig. 4 Autophosphorylation of trkB by BDNF. The transformants (lanes 1, 2, clone PB11; lanes 3, 4, clone PB17) were cultured in the presence of 1 μM cadmium overnight and stimulated by 100 ng/ml BDNF for 2 min. Then, cells were washed twice with ice-cold PBS and the lysates were immunoprecipitated with anti-trkB (SC-12, Santa Cruz). The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with a monoclonal antibody against phosphotyrosine. Lanes 1, 3, in the absence of BDNF; Lanes 2, 4, in the presence of BDNF.

Fig. 5 Activation of accumulation of GTP-bound Ras in a transformant. Cells were cultured, labeled by [^{32}P]orthophosphate as described before (3). Stimulation by 100 ng/ml BDNF was for 2 min. Ras-bound guanine nucleotide was analyzed as described before (3).(PB11: $P<0.05$, PB17: $P<0.01$)

312 低酸素・再酸素化によるアストログリアよりの神経栄養因子・IL-6の誘導：そのメカニズムと虚血脳における発現

○前田裕輔[1]、松本昌泰[1,2]、桑原敬介[1]、大槻俊輔[1]、小川　智[1]、柳原武彦[2]、鎌田武信[1]
大阪大学医学部第一内科[1]、同神経内科[2]

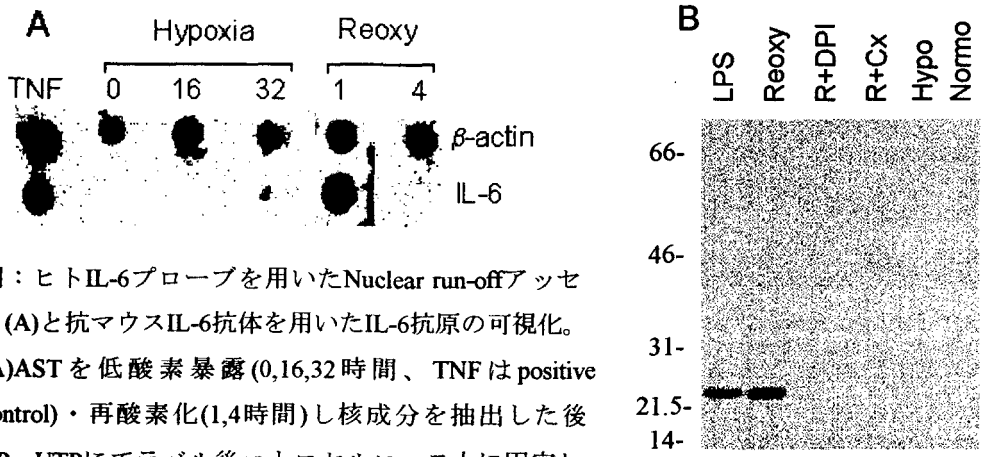
〔要約〕　**脳虚血・再潅流においてアストログリア(AST)が神経細胞に対してどのような保護機作を発揮しているかを知るため、ラット培養ASTを低酸素暴露、再酸素化してどのようなサイトカインが誘導されるかを検討した。再酸素化されたAST培養上清中には明らかなIL-6活性が誘導され、その産生は再酸素化後4-8時間をピークに見られ、低酸素下にあるAST上清にはIL-6活性は見られなかった。Nuclear run-offアッセイはIL-6の転写速度が低酸素暴露によって、また再酸素化後爆発的に増加する事を示した。再酸素化によってASTには活性酸素が誘導されたが、NADPH oixdase阻害剤であるdiphenyl iodoniumは活性酸素の発生とIL-6の産生をともに完全に抑制した。またASTからのIL-6の誘導は砂ネズミ脳虚血モデルの免疫組織染色でも確認された。以上より、ASTは脳虚血・再潅流の場において神経保護因子であるIL-6の産生を通じて神経保護機作を発現していることが示された。**

<目的>アストロサイト(AST)は炎症や外傷などのストレスに応答、神経保護機能を発現することから、脳血管障害などの虚血・再潅流の場においても、ASTが何らかの神経保護因子を産生する事が考えられる。我々はこれを細胞レベルで実証するため、細胞培養系での低酸素・再酸素化モデルを用いて培養ASTがどのようなサイトカインを産生しうるかを検討した。

<方法及び結果>新生ラット脳よりMacArthyらの手法にしたがってASTおよびマイクログリアを分離、第2代まで系代培養したASTを既報の方法[1]によって低酸素環境(pO_2<10 torr)に暴露した後、再酸素化した。再酸素化したAST培養上清にはPC-12細胞の分化を促進する活性が存在し、その作用は抗IL-6中和抗体にて阻害されたが、抗NGF中和抗体は効果を示さなかった。IL-6 dependent cellであるMH-60細胞を用いたIL-6の活性定量によれば、ASTのIL-6産生は再酸素化後4-8時間後ピークに達し、約32時間後には検出されなくなった。IL-6活性は正常酸素下にあるAST上清中には見出されず、また再酸素化する前の低酸素下にあるASTでは、培養上清中にも細胞内にも検出されなかった。低酸素・再酸素化に伴ってASTからは、Tumor Necrosis Factor、IL-1など他の炎症性サイトカイン活性は検出されず、さらに、中枢神経系におけるもう一つのサイトカイン産生細胞であるマイクログリアでも再酸素化によるIL-6の誘導は見られなかった。Nuclear run offアッセイはIL-6の転写速度が低酸素負荷によって明らかに、また再酸素化後ごく短時間に限って爆発的に増加することを示した(図A)。RT-PCR法によって半定量的に計測されたAST内のIL-6 transcript量も低酸素負荷によって増加、再酸素化2時間をピークとして急増、以後減少した。さらに、抗IL-6抗体を用いた免疫沈降法は、低酸素下では細胞上清、また細胞内にもIL-6抗原が検出されないのにもかかわらず、再酸素化に伴ってIL-6抗原が出現する

ことを示した(図B)。低酸素下のASTにhydrogen peroxideを添加する事によって活性酸素を負荷すると、負荷後4-8時間後にIL-6活性が誘導され、また、化学的発光法は、再酸素化に伴い、AST内に再酸素化15分以内に活性酸素が発生することを示し、これはxanthine oxidase阻害剤であるallupurinolにて阻害されなかった。これに対しNADPH oxidase阻害剤であるdiphenyl iodoniumは活性酸素の発生とIL-6の誘導を共に完全に抑制、Cytochrome-C法でも再酸素化に伴うASTのNADPH oxidaseの活性化が確認された。また、再酸素化後のAST培養上清は分化したPC-12細胞の低酸素・再酸素化による細胞障害を明らかに軽減し、この作用は抗IL-6中和抗体で失活した。更に、砂ネズミ脳虚血モデルにおいて、両側頚動脈血流遮断(5分)・再潅流後24-48時間をピークとして、虚血に際して神経細胞がより脆弱とされる海馬領域のそれに比し、皮質のIL-6活性は約4-5倍の増加を認め、免疫組織染色でも、皮質領域のASTを中心に明らかなIL-6抗原の発現を認めた。

<結語>ASTは虚血・再潅流時に際し、NADPH oxidaseの活性化によって、再酸素化を感知、IL-6を選択的に産生することを明かとした。またこのASTに誘導されるIL-6がPC-12細胞に対して分化及び保護因子として働くこと、更にIL-6の発現が虚血に脆弱な海馬領域より、虚血に対してより抵抗性を示す皮質領域に顕著に見られることから、ASTが神経保護因子であるIL-6の産生を通じて、かかる病態下の神経細胞を保護している可能性のあることが示された。



図：ヒトIL-6プローブを用いたNuclear run-offアッセイ(A)と抗マウスIL-6抗体を用いたIL-6抗原の可視化。(A)ASTを低酸素暴露(0,16,32時間、TNFはpositive control)・再酸素化(1,4時間)し核成分を抽出した後^{32}P-αUTPにてラベル後ニトロセルロース上に固定したIL-6プローブと反応させた後、autoradiogramとした。(B)ASTを低酸素下で^{35}S-methionineでラベルし、再酸素化した後抗マウスIL-6抗体でimmunoprecipitationし、10% SDS-PAGE上に展開、autoradiogramとした。LPSはLipopoly sacharideによるpositive control、DPI, Cxは再酸素化時に加えられたdiphenyl iodoniumおよびcycloheximideをそれぞれ表わす。

1)Hori O., Matsumoto M., Maeda M., Ueda H., Ohtsuki T., Stern M., Kinoshita T., Ogawa S., and Kamada T. (1994) *J. Neurochem.* **62**, 1489-1495

313 インターロイキン2により発現誘導されるミクログリア特異的遺伝子の解析

井幡　巌[1),2)]、今井嘉紀[1)]、矢部　裕[2)]、高坂新一[1)]
（国立精神・神経センター神経研・代謝[1)]、　慶應義塾大学・医・整形外科[2)]）

〔要約〕

インターロイキン－２（IL-2）は、T細胞の分化増殖因子として同定されたサイトカインであるが我々は以前IL-2が大脳皮質ニューロンに対して神経栄養効果を示すことを報告した。今回IL-2が示す神経栄養活性の作用機序を解明する目的で、ラット胎仔脳初代培養系にIL-2を添加した際に発現する遺伝子をDifferential Display法を用いてスクリーニングした。その結果、IL-2添加により特異的に発現が増加する0.9kbのmRNAを同定した。さらに、Northern Blot法による解析により脳内ではミクログリアにおいて特異的に発現していることが明らかとなった。又、臓器別には脾臓、精巣で強い発現が認められた。現在、我々は、ラット脳cDNAライブラリーからDifferential Display法で得られたフラグメントをプローブとしてスクリーニングを行い全構造解析を行っている。

我々はT細胞の分化増殖因子として同定されたIL-2がラット胎仔脳初代培養系において神経栄養活性を示すことを報告した[1)]。そこで今回はその作用機序を解明する目的でラット胎仔脳初代培養系にIL-2添加した際に特異的に発現が増加する遺伝子のスクリーニングを行った。

方法

大脳皮質ニューロンは既報の方法[1)]に準じて胎生17日のラットより分離し10%FCSを含むMEM培地を用い高密度（$2x10^7$ cells/ϕ 10cmシャーレ）に培養した。培養開始後2日目にIL-2を最終濃度が、50U/mlとなるように添加した。添加後、0,1,6,24時間後にtotal RNAを抽出し、RT法によりcDNAを作製した。そのcDNAをtemplateとしてLiangらにより開発されたDifferential Display法[2)]を用いスクリーニングを行った。5' primerとして任意に決定した10merのprimerを、3' primerにはmRNAの3'末端poly A部分の境界側とアニールするように合成したprimerを用いて^{32}P-dCTPの存在下にPCR法を行った。^{32}P標識PCR産物を6%変性アクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、乾燥しX線フィルムに感光させた。得られた種々のバンドの内からIL-2添加により特異性に発現が増加するバンドを特定し、再びPCR法で増幅後サブクローニングし塩基配列を決定した。さらに、それをプローブとしNorthern Blot法、ラット脳cDNAライブラリーからのスクリーニングを行った。各種培養細胞は既報の方法に従って調整した[3)]。

結果および考察

Differential Display法によりラット胎仔脳初代培養系においてIL-2添加により誘導される遺伝子を検討したところ、添加後1時間目から24時間目までに明らかに増加するバンド

が認められた。そのバンドを抽出し再びPCR法で増幅後サブクローニングしたものをプローブとしNorthern Blot法を行ったところ時間経過とともに増加する0.9kbの単一のバンドであることが判明した（図１）。さらにラット各種培養細胞（ニューロン、アストログリア、ミクログリア、フィブロブラスト）での発現をNorthern Blot法により検討してみると、ミクログリアでのみ特異的に発現していることが明らかになった（図２）。次に成熟ラットの臓器別の発現をみてみると脾臓、精巣で強い発現を認め、脳、肺、腎臓で弱い発現を認めた。

以上の結果より今回ラット胎仔脳初代培養系においてDifferential Display法により発現の増加が認められた遺伝子は、ミクログリアで特異的に発現しており、IL-2添加によりその発現が誘導されるものと考えられる。現在、ラット脳cDNAライブラリーからDifferential Display法で得られたフラグメントをプローブとしてスクリーニングを行い全塩基配列を決定している。本遺伝子の機能としては現在のところ全く不明ではあるが、IL-2によるミクログリアの増殖や機能調節に密接な関連性があるものと推定される。更にIL-2が持つ神経栄養活性がミクログリアを介したものである可能性も考えられ現在これらの点につき検討を加えている。

文献

1)Shimojo, M., Imai, Y., Nakajima, K., Mizushima, S., Uemura, A., and Kohsaka, S.: Neurosci Lett. 151(1993)170-173

2)Liang, P., Averboukh, L., and Pardee, A. B.: Nucleic Acids Res. 21(1993)3269-3275

3)Saitoh, S., Iijima, N., Ikeda, M., Nakajima, K., Kimura, M., Katsuki, M., Mori, T., and Kohsaka, S.: Mol. Brain Res. 12(1992)155-161

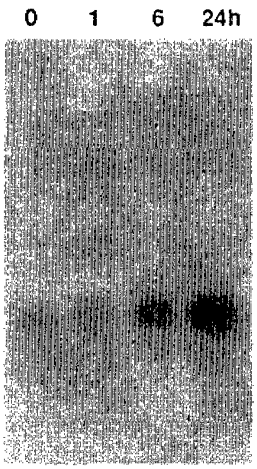


図1、ラット脳初代培養細胞へのIL-2添加による、0.9kb mRNA発現誘導のノーザンブロット解析

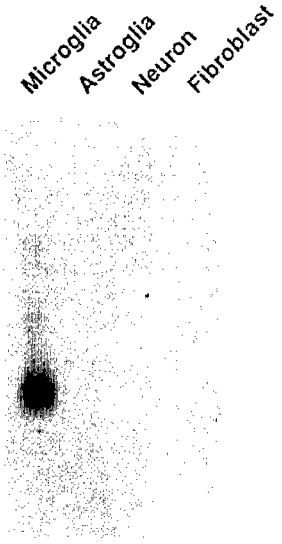


図2、ラット脳由来各種細胞での0.9kb mRNA発現量のノーザンブロット解析

314 培養アストロサイトにおけるbFGFの産生調節とその生物活性について

上口裕之、吉田一成、若本寛起、左合正周、
稲葉真、佐々木光、大谷光弘、戸谷重雄
慶應義塾大学脳神経外科

〔要約〕

我々は、各種サイトカインが、アストロサイトによるNGFおよびnon-NGF type neurotrophic factorの産生・分泌を増強し、これによりアストロサイトの前脳基底野コリン作動性ニューロンあるいは脳幹部コリン作動性ニューロンに対するcholinergic neurotrophic activityを増強することを明らかにしてきた。今回はこのような分泌性因子に加え、アストロサイトの抽出液中にbFGFが存在し、その発現量がIL-1βあるいはEGFにより増加することがWestern blottingにて確認された。また、アストロサイト抽出液は、bFGFと同様、GFAP陽性細胞に対する増殖促進作用を有し、この作用は、IL-1βあるいはEGF添加により増強された。

【目的】

我々はこれまでに、IL-1β, TNF-αなどのサイトカインが、アストロサイトによるNGFおよびnon-NGF type neurotrophic factorの産生・分泌を増強し、これによりアストロサイトの前脳基底野コリン作動性ニューロンあるいは脳幹部コリン作動性ニューロンに対するcholinergic neurotrophic activityを増強することを明らかにしてきた[1,2,3]。一方、このような分泌性因子に加え、アストロサイトはFGFをはじめとする非分泌性因子も産生することが報告されており、それらも何らかの生理作用を有していると考えられる。今回は、各種サイトカインが、アストロサイトの細胞抽出液中のbFGF含量を増加すること、またこれらの細胞抽出液が有するGFAP陽性細胞に対する増殖促進作用について検討した。

【方法】

1)新生仔ラット海馬由来培養アストロサイトを2回継代後、poly-L-lysine処理したculture dishにて2.5%FCS-MEMを用いて培養し、無添加、IL-1β 50U/ml、TNF-α 100ng/ml、あるいはEGF100ng/ml添加24時間後に細胞抽出液の作成およびCoulter counterによる細胞数算定を行った。細胞抽出液の作成は、培養アストロサイトをHBSSにて2回洗浄後cell scraperにて回収し、0.2mM PMSF存在下にsonificationした後、遠心分離にてcell debrisを除去した。

2)既知濃度のbFGFのWestern blotにより得られたbandをimage analyzerにより解析することによりstandard curveを作成した。同時に、細胞抽出液のWestern blotにより得られたbandを同様に解析することにより、抽出液中のbFGF含量を定量した。

3)胎生17日ラット大脳を、poly-L-ornithine処理したcoverslip上で1%BSA-N2にて培養し、翌日bFGF、各種細胞抽出液を添加し、4日後に160倍1視野におけるGFAP陽性細胞数をcountした。

【結果】

1)無添加、IL-1β、TNF-α、あるいはEGF添加24時間後のアストロサイトの細胞数は、各群において差が認められなかった。

2)各種濃度のbFGFのWestern blotにより得られたbandの面積×濃さの値は、bFGF濃度と直線関係にあり、本法により定量可能であることがことが判明した。

3)アストロサイト抽出液中には、18kD, 22kD, 24kD-bFGFが存在しており、IL-1βあるいはEGF添加により、18kD-bFGFの発現量が増加した(Fig. 1)。

4)bFGFは、GFAP陽性細胞に対する増殖促進作用を有し、アストロサイト抽出液にも同様の作用が認められた。また、この作用は、IL-1βあるいはEGF添加により増強された(Fig. 2)。

【考察】

各種サイトカインは、アストロサイトのNGF産生を刺激することが知られているが、上記の結果より、アストロサイトのbFGFの産生も、IL-1βあるいはEGFにより刺激されることが確認された。さらに、アストロサイトの細胞抽出液は、bFGFと同様に、GFAP陽性細胞に対する増殖促進作用を有し、この作用はbFGF発現量と相関が認められた。サイトカインにより刺激を受けたアストロサイトは、NGF等の分泌性因子に加え、bFGF等の非分泌性の因子を産生し、障害された神経回路網の修復において一役を担っているものと推測される。

Fig. 1 : bFGF content in cell extracts of resting or cytokine-activated astrocytes

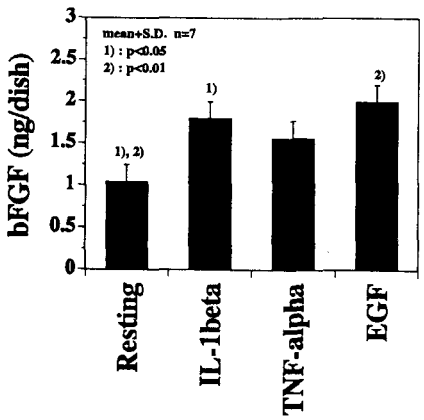
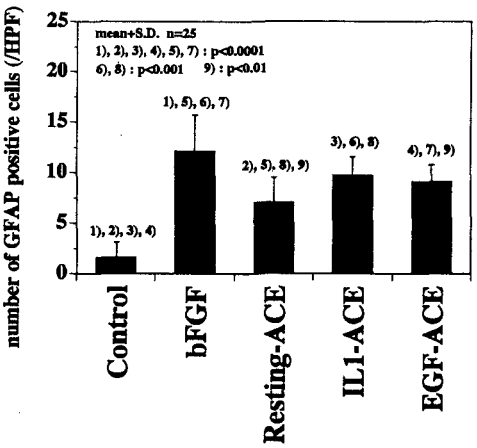


Fig. 2 : Proliferative effects of bFGF or astrocytic cell extracts on GFAP-positive cells



Resting-ACE : cell extract of resting astrocyte
IL1-ACE : cell extract of IL1-activated astrocyte
EGF-ACE : cell extract of EGF-activated astrocyte

1.Yoshida K. and Gage F.H. (1991) Brain Res. 538, 118-126.

2. Yoshida K., et al. (1992) J. Neurochem. 59, 919-931.

3. 左合正周, 他. (1993) 神経化学 32 (1), 396-397.

315 自発的な不死化による成熟マウス・シュワン細胞株の樹立

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）

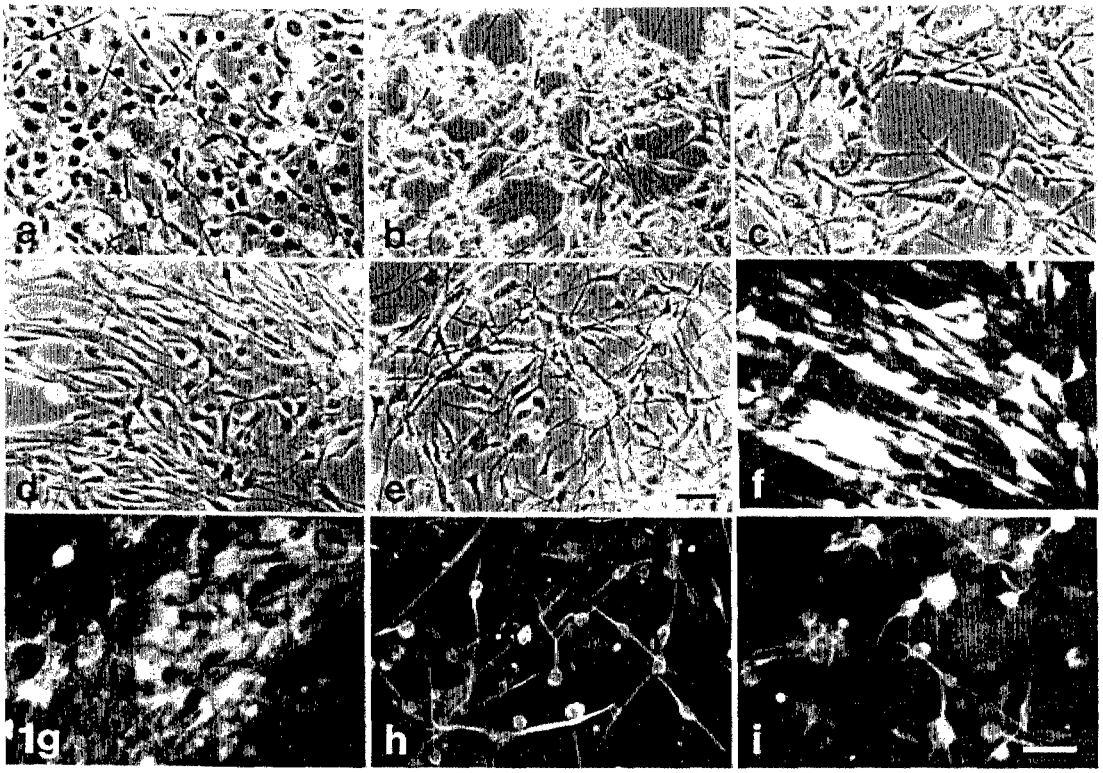
〔要約〕

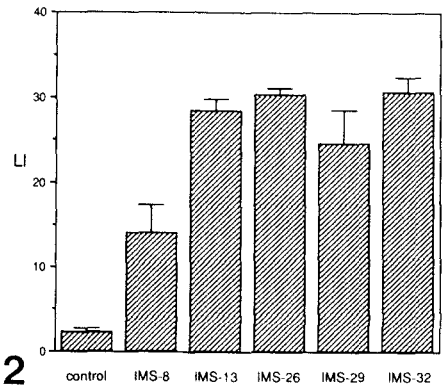
成熟マウス後根神経節・末梢神経より得られたシュワン細胞を長期培養したところ，培養6-8ヶ月後よりコロニーを形成しはじめ，自発的に不死化したと考えられる細胞株5株を得た．蛍光抗体法では培養初代シュワン細胞と同様，いずれもS100, laminin, vimentinが陽性であり，一部はGFAP陽性であった．これら細胞株の培養上清を，コロニー形成前のシュワン細胞培養に添加し，S100/BrdU二重標識免疫蛍光抗体法にて増殖効果を判定したところ，5株全ての培養上清に増殖活性を認めた．このことより，得られた不死化シュワン細胞株はautocrine growth controlを受けている可能性が考えられた．

〔はじめに〕　末梢神経系におけるシュワン細胞の機能と役割をin vitroで解析するうえで，安定したシュワン細胞株を得ることは重要と考えられる．これまでシュワン細胞樹立株に関する報告は乏しく，近年になって，glial growth factor (GGF)-forskolin 持続刺激による樹立株 (7,8) 及びSV40 large T 抗原遺伝子を用いたtransfectionによる樹立株 (9-11) のほか，細胞の自発的な不死化 (spontaneous immortalization)による株樹立の報告 (1,2,4,5) がみられる．今回我々は，成熟マウス・シュワン細胞の自発的な不死化により細胞株を得，その培養上清中にシュワン細胞増殖活性を見出した．

〔方法〕　生後4-6週のICR (CD-1)マウスより，深エーテル麻酔下にて頚～腰部後根神経節および連続する末梢神経を採取し(11)，0.125% collagenase, 8 units/ml dispaseにて37°C 1時間処理後，100 μm径nylon mesh に通して分散，遠心洗浄ののちplastic dish に植え初代培養とした．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つつ，ほぼ月に２度の割合で継代を行なった．維持培地として，5-10% FCS/Dulbecco MEM を用いた．シュワン細胞の同定には，poly-L-lysine処理したcoverslip上の細胞をparaformaldehyde, methanol固定の後，S100, laminin, vimentin GFAPに対する蛍光抗体法を施行した．シュワン細胞に対するproliferation assay として，培地に不死化細胞の培養上清を添加し24時間培養，さらに10 μM 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(12)．

〔結果と考察〕　初代培養は，神経細胞，シュワン細胞，線維芽細胞からなっており，抗Thy1.2および補体の反復処理し継代することにより，ほぼ純粋なシュワン細胞培養系を得た(12)．このシュワン細胞を6-8ヶ月培養維持したところ，コロニーを形成しはじめ，不死化したと考えられる細胞株5株 (IMS-8, 13, 26, 29, 32) を得た．これら細胞株の形態は様々で，長～短紡錘形細胞からなっていた(Fig.1.a-e)が，蛍光抗体法では培養初代シュワン細胞と同様，いずれもS100, laminin, vimentin が陽性であり，不死化シュワン細胞が得られたと結論した(Fig.1.f-h)．またIMS-26, 29, 32ではGFAPも陽性であった(Fig.1.i)．これら細胞株が液性制御因子を産生・分泌し，いわゆるautocrine growth controlを受けている可能性を調べるために，無血清培地で48時間培養し，培養上清を得た．これをコロニー形成前のシュワン細胞培養に添加し，S100 / BrdU二重標識免疫蛍光抗体法にて増殖効果を判定したところ，5細胞株全ての培養上清に増殖活性を認めた(Fig.2)．これまでシュワン細胞のautocrine growth controlに関しては，proliferativeなもの(3,8)とinhibitoryなもの(4,6)が知られており，前者ではPDGF-BBが想定されている．そこで，不死化シュワン細胞5株の培養上清を濃縮しSDS-PAGE, western blot を行ったが，PDGF-BBは検出されず，他の増殖因子である可能性が示唆された．以上のことから，得られた不死化シュワン細胞株はautocrine growth controlを受けていると考えられ，培養上清を精製検討中である．





2

Fig.1a-e.Phase contrast microscopy of spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells; IMS-8 (a), IMS-13 (b), IMS-26 (c), IMS- 29 (d), IMS-32 (e). Bar = 50 μm. Fig.1f-i. Immunofluorescence microscopy of IMS-32 cells; S100 (f), laminin (g), vimentin (h), GFAP (i). Bar = 50 μm.

Fig.2. Mitogenic activities of conditioned media obtained from IMS cells. Untransformed long-term Schwann cells were incubated for 48 hours in 10 % conditioned media obtained from IMS cultures. BrdU was added for the final 24 hours and double immunofluorescence staining was performed. Results are the percentage of S100-positive cells with labelled nuclei (labeling index;LI).

〔文献〕

1. Bolin LM, Iismaa TP, Shooter EM. (1992) J Neurosci Res 33:231-238.
2. Boutry JM, Hauw JJ, Gansmuller A, et al. (1992) J Neurosci Res 32:15-26.
3. Eccleston PA, Collarini EJ, Jessen KR, Mirsky R, Richardson WD. (1990) Eur J Neurosci 2:985-992.
4. Eccleston PA, Mirsky R, Jessen KR. (1991) Development 112:33-42.
5. Goda S, Hammer J, Kobiler D, Quarles RH. (1991) J Neurochem 56:1354-1361.
6. Muir D, Varon S, Manthorpe M. (1990) J Cell Biol 111:2663-2671.
7. Porter S, Clark MB, Glaser L, Bunge RP. (1986) J Neurosci 6:3070-3078.
8. Porter S, Glaser L, Bunge RP. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:7768-7772.
9. Ridley AJ, Paterson HF, Noble M, Land H. (1988) EMBO J 7:1635-1645.
10. Tennekoon GI, Yoshino J, Peden KWC, et al. (1987) J Cell Biol 105:2315-2325.
11. Watabe K, Yamada M, Kawamura T, Kim SU. (1990) J Neuropathol Exp Neurol 49:455-467.
12. Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, Toyohara K, Sakai O. (1994) J Neurosci Res (in press).

316 抗BINP（brain injury-derived neurotrophic peptide）抗体による神経栄養因子の解析

浜　登希子、石黒　麻利子*、小倉　明彦**、村山　美由紀

（三菱化成生命科学研究所、*現国立精神神経センター、**現大阪大学理学部）

〔要約〕

中枢神経系において損傷時には神経栄養因子と総称される因子が増加していることが明らかになってきており、私たちはこれまでに脳の損傷部位から神経栄養因子を精製しその構造解析を行う過程で得られたペプチドの一部アミノ酸配列を基にして合成したペプチド(BINP : brain injury-derived neurotrophic peptide)で神経栄養因子様活性があることを報告した(1)。また、このBINPにたいするポリクローナル抗体が得られた。そこでこの抗体を用いてBINPをその構造に含む神経栄養因子についての検討を行った。その結果、この神経栄養因子は、グリア細胞で合成分泌されていることが明らかとなった。

脳においてニューロンの分化、生存維持に重要な役割を果たしている因子の一つに神経栄養因子と総称される蛋白性の液性因子がある。また、最近では脳の損傷時にはこのような神経栄養因子が損傷部位で増加しており、損傷のある程度の修復がなされていることが明らかになってきた。私たちは、分化の終了した神経系において、損傷時に出現しニューロンの生存維持に働く神経栄養因子について研究を進めてきており、ラット脳損傷部位から神経栄養因子の精製を行ってきた。精製された新しい神経栄養因子の構造解析を行う過程で得られたペプチドのアミノ酸配列を基に合成したペプチド(BINP)で神経栄養因子活性が見られた(1)。また、このBINPに対するポリクローナル抗体を得ることができた。そこでこのanti-BINP-antibodyを用いてBINPを含む新しい神経栄養因子についての検討を行った。

［実験方法］

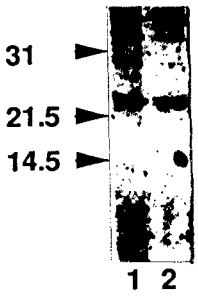
抗体は、精製した神経栄養因子をトリプシン分解することによって得られた二つのペプチドのアミノ酸配列に相当するプライマーで、傷をつけたラット脳から調製したmRNAを用いて得られたPCR産物（アミノ酸２５個）を合成し、KLH(keyhole limpet haemocyanin)と結合させたものを抗原とし、ウサギの皮内に注射して作成した。血清の精製はBINPをEAH-Sepharose4Bに結合させたペプチドカラムを用いた。アストロサイトは、ラット１９－２０日胎児大脳より加藤らの方法(2)に従って分離し１０％young calf serumを含むＤＭＥＭ培地で 培養した。アストロサイトconditioned medium(CM)は、無血清ＤＭＥＭ培地中で２４時間培養した培養液を集めた。蛋白の検出は、SDS/PAGE後western blottingし、ＥＣＬ法(Amersham)により検出した。

神経栄養因子活性は、先に報告したように(1)生後約１０日のラット中隔を用いた初代培養でコリナージックニューロンへの生存維持作用をChAT(cholineacetyltransferase)活性を指標として調べた。

免疫染色は、ラット脳からの初代培養を用いて行った。細胞を４％PFA(paraformaldehyde)で固定し、一次抗体にanti-BINP-antibodyとmonoclonal anti-GFAPを用いて二重染色を行った。

［結果と考察］

活性ペプチドBINPに対するポリクローナル抗体を得ることができた。この抗体は、マウスから精製したNGFや、bFGFをimmunoblottingで認識せず、またその活性も阻害しなかった。よってBINPを含む神経栄養因子(IDF : injury derived factor)は、BINPのアミノ酸配列から予想される様に、NGF,bFGFとは異なるものであった。神経栄養因子(IDF)は脳の損傷部位から精製されたものであり、グリア細胞由来であることが予想された。そこでアストロサイト培養上清（血清を含む）を硫安３０－５０％で濃縮しFPLCによりsuperose 12によるゲル濾過を行ったところ約20-30kdに相当するフラクションに神経栄養因子活性が見られた。また、この活性フラクションにanti-BINP-antibodyを加えるとその活性が阻害されることから、anti-BINP-atibodyは活性を阻害し、このフラクションにanti-BINP-antibodyで認識される活性因子があることが示された。さらに、アストロサイト無血清培養上清(CM)を同様に硫安で濃縮し、ＳＤＳ／ＰＡＧＥ後blottingしanti-BINP-antibodyで検出したところ約30kdの蛋白が検出され、この蛋白のバンドは抗体を前もってBINPで吸収すると消えることから、BINPを含む神経栄養因子は、アストロサイトが約30kd蛋白として分泌していることが明らかとなった（図．１）。また、このバンドを電気泳動後きりだしゲルから蛋白を抽出して活性をしらべたところ生後ラットを用いた中隔野の初代培養で生存維持活性がみられた。一方、anti-BINP抗血清をBINPによるペプチドカラムで精製しラット胎生１８日の海馬からの初代培養を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、GFAPにpositiveな細胞が染色された。



図．１アストロサイト培養液中の蛋白
無血清培養液を硫安で濃縮し12.5%ポリアクリルアミドゲルでSDS/PAGE後bulottingした。
lane 1;anti-BINP抗体１μgで検出、lane 2; anti-BINP抗体１μgをBINP１μgで吸収

以上の結果から、BINP抗体で認識される神経栄養因子はアストロサイトで合成分泌され、しかもそのアストロサイトは、GFAPpositiveなアストロサイトであることが示された。従ってこの因子が神経系に何らかの異常が生じた際にアストロサイトで合成分泌されることが強く示唆された。

［参考文献］

(1)石黒、村山、大森、浜　　神経化学　32, 410 (1993)
(2)加藤、田中　　組織培養　8, 217-224 (1982)

［謝辞］

この研究を進めるにあたり、ペプチドを合成していただいた佐藤　一紀博士（三菱化成生命研、ペプチド研究室）に深く感謝致します。また討論頂いた藤田　忍博士、高垣　洋太郎博士（三菱化成生命研）に深く感謝いたします。

317 NGF/*trkA* カスケードを介する神経細胞の分化誘導に与える *N-myc* 遺伝子の影響

岡藤 隆夫、 前川 喜平、 衛藤 義勝、 松島 宏
（東京慈恵会医科大学小児科）

〔要約〕

神経成長因子 (NGF) および、その受容体 (TkA) からなるカスケード (NGF/trkA カスケード) は神経細胞の分化・成長に重要な役割を果たす。本研究では未分化神経細胞における *N-myc* 遺伝子の持続的発現がNGFによる神経細胞の分化誘導に如何なる影響を及ぼすかについて検討した。中枢神経系の神経芽細胞腫株 B104と、その *N-myc* 持続発現株 C6 のそれぞれにヒト trkA 発現ベクターをトランスフェクションし、細胞表面上に trkA を発現するクローン株 B104-trkA、C6-trkA を樹立した。B104-trkA, C6-trkA の NGF 短時間処置は発現した trkA の活性化、各種シグナル伝達路中間体のチロシン燐酸化および *c-fos* mRNA の一過性発現を引き起こした。一方 NGF 長期投与は B104-trkA において増殖抑制を伴う形態学的分化と各種神経特異的遺伝子の発現誘導をもたらしたが、C6-trkA においては、こうした変化は全く認められなかった。以上の結果から持続的 *N-myc* の発現は NGF/trkA カスケードによる神経細胞の分化誘導を *c-fos* 遺伝子の活性化以降の過程でブロックすると考えられた。

（目的） proto-oncogene trkA によってコードされる蛋白（TrkA）は NGF に対する高親和性受容体として作用することが知られている。これまで我々は未分化神経系細胞内に人為的に導入した trkA cDNA が低親和性 NGF 受容体（gp75 ^{NGFR}）の非存在下においても機能的 NGFR を構築し、NGF 投与に引き続いて、未分化神経細胞を最終分化（terminal differentiation）へと誘導すること。さらにこの際、過剰発現している内因性 *N-myc* mRNAの発現を抑制することを報告した（4）。そこで今回は持続的 *N-myc* の発現が NGF/trkA カスケードによる神経細胞の分化誘導に如何なる影響を及ぼすかを検討した。

（方法） 内因性の機能的 NGFR を発現しないラット中枢神経系の神経芽細胞腫株 B104（5） およびその *N-myc* 導入株 C6 （1）のそれぞれに、ヒト trkA cDNA をトランスフェフェクションし、trkAの持続発現株 B104-trkA および C6-trkA を樹立した（3）。各々のトランスフェクタントのNGFに対する反応性は既報（2、4）の方法に順じて行った。

（結果および考察） トランスフェクタントの樹立： B104、C6のそれぞれに trkA cDNA 発現ベクターをトランスフェクションした後、trkA の発現クローンをノーザンブロットおよび抗- trk 抗体を用いたFACS 解析にてスクリーニングした。すべての trkA 発現クローンは NGF投与 3 0 分で、*c-fos* mRNA の一過性発現をきたした。 NGF/trkA カスケードの検討： 樹立した B104-trkA, C6-trkA クローン株の NGF投与に引き続く各種シグナル伝達路中間体につき比較検討した。抗-trk抗体を用いた免疫沈降法とそれに続く抗-フォスホチロシン抗体によるウエスタンブロットでは B104-trkA, C6-trkA ともにNGF投与後 5 分で140-kDaの チロシンリ酸化されたTrkA 蛋白が免疫沈降されたが、Parental の B104 及び C6 ではTrkA蛋白は全く検出されなかった。

また、B104-trkA, C6-trkAではともにNGF投与後 PLCγ-1、Erk-1、Erk-2の活性化が等しく起こることも確認された。以上の結果はNGF/trkAカスケードがB104-trkA及びその *N-myc* 持続発現株C6-trkAの両細胞内で等しく作用していることを示唆する。 細胞分化: NGFの長期投与はB104-trkAの明らかな増殖抑制を伴う形態学的な分化(図1)と神経特異的遺伝子(NF-L, GAP-43, MAP-2)の発現を引き起こしたが、このような変化はC6-trkA細胞のNGF投与後には認められなかった。またParental及び各trkAトランスフェクタントでは内因性の $gp75^{NGFR}$ が発現していたが、B104-trkA細胞ではNGF投与後24時間でこの内因性の $gp75^{NGFR}$ mRNA発現がほぼ完全に抑制された（図2）。すでに我々は未分化神経細胞内に人為的に導入したtrkA cDNAがそれ単独で機能的NGF受容体を構築し、NGF投与に引き続いて未分化神経細胞を最終分化段階へと誘導すること。さらに、この際過剰発現している内因性の *N-myc* mRNAの発現を抑制することを報告した（1）。しかし今回の結果から、*N-myc* の持続発現はNGF/trkAカスケード自体には影響を与えないが、*c-fos* 活性化以降の神経細胞分化に関わる遺伝子発現の転写を抑制するものと考えられた。

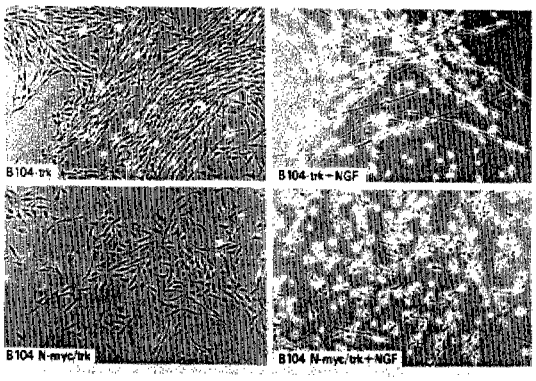


図1. B104-trkA及びC6-trkA (B104 N-myc/trkA) 細胞のNGF（100 ng/ml）投与（7日間）に伴う形態学的変化。

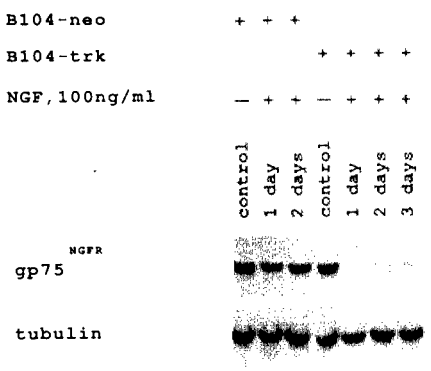


図2. B104-trkA細胞のNGF投与に伴う内因性 $gp75^{NGFR}$ mRNAの発現抑制(ノーザンブロット)。

(文献)

1. Bernards, R., Dessain, S.K., Weinberg, R.A. (1986) Cell 47, 667-674
2. Matsuhsima, H., Bogenmann, E. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 5015-5020
3. Matsushima, H., Bogenmann E. (1993) Methods in Neurosci. 12, 156-168
4. Matsuhsima, H., Bogenmann, E. (1993) Mol. Cell Biol. 13, 7447-7456
5. Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., et al. (1974) Nature 249, 224-227

318 ラット脳におけるＮＴ－３様免疫交差活性の分布

古川昭栄、杉原祐志、古川美子
（岐阜薬科大学・分子生物）

〔要約〕 ニューロトロフィン(NT)-３特異的な二種類の抗ペプチド抗体(抗V2,抗V4抗体)を作製しこれを用いてラット脳におけるNT-3様免疫交差活性(LI)の分布を調べた。大脳皮質、梨状葉皮質、海馬、偏桃体、手綱核、黒質、赤核、稜形体、小脳分子層およびプルキンエ細胞など、脳のほぼ全域にわたり種々のニューロンや樹状突起／軸索が陽性となり、多様な染色像が観察された。エピトープが異なる二種の免疫交差活性はほぼ同じニューロン種に分布していたが、ニューロンによっては両者の細胞内局在パターンが異なっていた。

【目的】神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン(NT)-3、NT-4/5 はニューロトロフィンと総称されるNGFファミリー神経栄養因子である。ニューロトロフィンmRNAとその高親和性受容体である trk遺伝子ファミリーmRNAは成熟ラット脳の種々のニューロンを中心として広範に発現[1,2,3]しており、その発現時期[4]も考慮すると、ニューロトロフィンの脳での役割は脳の形成、発達、ニューロンの分化や生存、機能維持にまで及ぶと推定される。生体内での機能を明らかにするためにはmRNAの発現ばかりでなく、産生、輸送、作用の結果としてのニューロトロフィン分子の局在を組織、細胞レベルで明らかにする必要がある。しかし存在量が微量であること、相互の高い構造類似性のため特異抗体が得にくいなどの理由により現在のところ成功例は少ない。我々はニューロトロフィン分子間でアミノ酸置換の大きい領域を選びこの部分の抗体を用いてラット脳におけるNT-3様免疫交差活性(LI)の分布を調べた。

【方法】抗血清の作製：ニューロトロフィン分子間でアミノ酸置換率が高いV2領域(アミノ酸No.40-49:NH_2-GEIKTGNSPV-COOH)、V4領域(No.92-99:NH_2-SENNKLVG-COOH)のペプチドをkeyhole-limpet hemocyanin に共有結合したものを抗原としてそれぞれ２匹のウサギに免疫した。得られた抗血清の一部は抗原ペプチド結合カラムにより特異抗体をアフィニティ精製した。

免疫染色：6-7 週齢 Wistar 系雄ラットをネンブタール麻酔下、2%パラホルムアルデヒドで灌流、脳を同液で2時間固定、30%庶糖液で置換、O.C.T.compoundに包埋し凍結した。30-50 μmの凍結切片を0.3% Triton X-100を含むPBSで 10,000-30,000倍希釈した抗血清または0.1 μg/mlのアフィニティ精製抗体と4 ℃で一夜反応後アビジン－ビオチンペロキシダーゼ複合体法で可視化した。

【結果】抗体の特異性：エンザイムイムノアッセイ(EIA)法では、NT-3-V2、V4ペプチドに対する抗体（抗V2、抗V4と略）はそれぞれの抗原ペプチドのみを認識し NGF、BDNF、NT-4/5の対応する領域の合成ペプチドとは結合しなかった。また組換え型BDNF、NT-3およびマウスNGFのうちNT-3のみに結合することをEIAとイムノブロッティングの両方で確認した。

大脳皮質、海馬での免疫交叉活性：抗V2抗体では大脳皮質、海馬の全域にわたり無数の陽性微小点像が検出され細胞体が抜きでる像となった(図１)。この点状構造は大脳皮質では分子層が最も高密度、海馬ではほぼ均一であった。抗V4抗体では大脳皮質で低密度の同じ構造が見られ大脳皮質III-V 層の錐体ニューロンの細胞質とその上向き樹状突起が強く染色された(図２)。海馬ではCA-2が強くCA-1,3は中等度に染色された。CA-4と歯状回の染色は弱かった。

その他の部位：多くの場合細胞体または樹状突起／軸索が染色された。嗅結節、偏桃核群、梨状

葉皮質、膝状体、手綱核、黒質、赤核、稜形体、小脳分子層はいずれかの抗体または両方で強く染色された。背側中隔核、ブローカ対角帯、乳頭核、視床下部背内側核、弓状核、腹側被蓋野、上丘、外側絨帯、橋核、青斑核、三叉運動核、オリーブ核、腹側蝸牛核、前庭神経核群、巨大細胞性網様核、顔面運動神経核、小脳核、プルキンエ細胞は中等度に染色された。脳梁軸索内に微小点状構造が多数観察された(図１)。このほか線状体、無名質、フォレル H1,2 野、種々の視床核群、縫線核、種々の網様核群、小脳顆粒細胞などが弱くまたは散在的に染色された。

【考察】脳のほぼ全域にわたり種々のニューロンや樹状突起／軸索が陽性となり多様な染色像が観察された。無数の微小点状構造は幼若ラットでは見られないことから神経突起の発達やシナプス形成とと関連すると推定された。エピトープの異なるV2-LIとV4-LIはほぼ同じニューロン種に分布するが両者の細胞内局在が大きく異なるニューロンタイプも存在した。免疫動物個体や固定の程度の違いではなくNT-3分子のプロセッシング、受容体との結合や分解など、細胞内局在の変化に伴う分子構造の変化が抗体による認識の変化になったと推定される。今回の結果はmRNAの分布や、異なる抗ペプチド抗体による最近の報告[5]と大筋で一致し、新しく NT-3-LI陽性ニューロン種を同定し、多種多様な神経突起内のNT-3-LI 分布を可視化することができた。これらは脳におけるNT-3の機能を解明してゆく上で有益な情報であると考えられる。

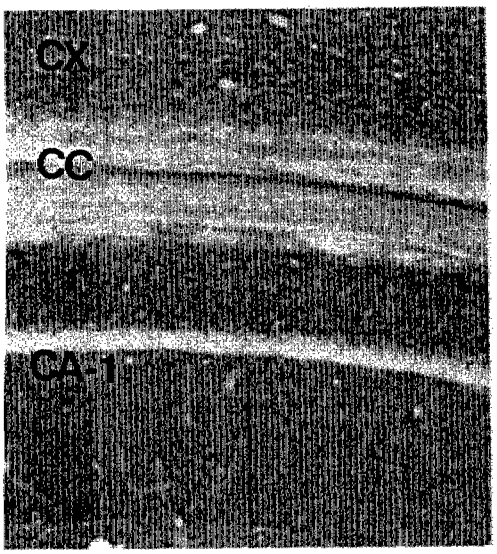


図１ 抗Ｖ２抗体によるNT-3-LI染色像
大脳皮質(CX)、脳梁(CC)、海馬CA-1領域(CA-1)
倍率 200X

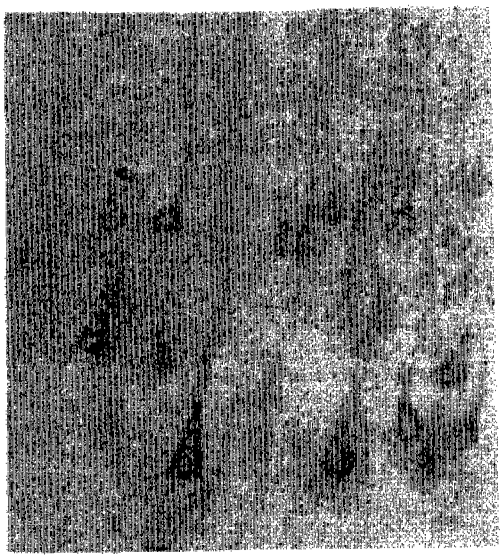


図２ 抗Ｖ４抗体によるNT-3-LI染色像
大脳皮質第V層
倍率 400X

【引用文献】

1) Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H: Neuron, 5, 511-526 (1990); 2) Phillips HS, Hains JM, Laramee GR, Rosenthal A, Winslow JW: Science, 250, 290-294 (1990); 3) Ceccatelli S, Ernfors P, Villar MJ, Persson H, Hokfelt T: Proc Nat Acad Sci USA, 88, 10352-10356 (1991); 4) Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Linsay RM, Yancopoulos GD: Neuron, 5, 501-509 (1990); 5) Zhou X, Rush RA: Brain Res., 643, 162-172 (1994)

319 脊髄損傷に伴うＢＤＮＦおよびＮＴ－３様免疫交差活性の脊髄内動態

後藤昭彦、富田泰次、中村信之、池上亮介、替地恭介、室田景久、古川昭栄＊
（東京慈恵会医科大学・整形外科、＊岐阜薬科大学・分子生物）

ＢＤＮＦとＮＴ－３を特異的に認識する抗ペプチド抗体を作製し、免疫組織染色法を用いてラットの脊髄において損傷前後の免疫交差活性（ＬＩ）の動態について調べた。正常脊髄では灰白質（特に運動ニューロン）、軸索が染色された。脊髄を全切断後、断端の吻側５㎜のポイントで４週間にわたり経時的に調べたところ、ＢＤＮＦ－ＬＩについては運動ニューロンの染色性は維持されるが、軸索は染色が弱まり、４週後には灰白質に強陽性のアストロサイト様の細胞が出現した。また、ＮＴ－３－ＬＩについては軸索の染色は弱まったが、運動ニューロンの染色性は３週後に一過性に強くなった。正常時にはＢＤＮＦおよびＮＴ－３は脊髄を軸索内輸送されており、損傷が加えられると直後に輸送低下をきたすと考えられる。この一方で、損傷修復に向け、アストロサイトがＢＤＮＦ、運動ニューロンがＮＴ－３を産生する機構が働くものと考えられる。

［目的］ＮＧＦファミリーを形成するＮＧＦ、Brain-Derived Neurotrophic Factor（ＢＤＮＦ）、Neurotrophin- 3（ＮＴ－３）は、ニューロンの分化、生存維持、再生に関与する蛋白性因子であり、ニューロトロフィン（ＮＴs）と総称されている。[8] ｍＲＮＡは脳や脊髄に広く発現しているが、脊髄における機能と役割については、ほとんど不明である。[2)5)6)] この解明のためには分子レベルでの局在を明らかにする必要がある。しかし、ＮＧＦファミリー分子間の構造の類似性、生体内存在量が低いなどの理由からこれらの栄養因子を蛋白質として特異的に検出する方法は確立されていない。そこでＮＴsを特異的に検出するためにＮＧＦファミリー分子間で特異的な構造部分のペプチドを合成し、これらを抗原として特異抗体を作製した。[9] さらにこの抗体を用いた免疫組織染色法によりラットの脊髄におけるＢＤＮＦおよびＮＴ－３様免疫交差活性（ＬＩ）の分布、損傷後の動態について調べた。[3]

［方法］1)抗ニューロトロフィンペプチド抗体：ＮＴs 間で相同性の低いV2領域（アミノ酸No.40-49）のペプチドを化学合成して、これをkeyholelimpet hemocyaninに結合させ、ウサギに免疫して抗血清を得た。なお、化学合成したペプチドは以下の如くである。
ＢＤＮＦ－V2：ＥＫＶＰＶＳＫＧＱＬ　ＮＴ－３－V2：ＧＥＩＫＴＧＮＳＰＶ
2)実験動物：生後６週齢のウイスター系ラットを用いネンブタール麻酔下に背部を正中切開し、傍脊柱筋を鈍的に剥離、第13胸椎の椎弓を切除後、第13胸髄節高位において全脊髄を切断した。術後３日、１、２、３、４週目に２％パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い脊髄を採取し、後固定の後、Ｏ．Ｃ．Ｔ．コンパウンドで凍結包埋した。断端の吻側５㎜の脊髄を30～50μmの切片とした後、免疫組織染色を行った。
3)免疫交差活性の検出：切片を0.3 %(V/V)Triton X-100を含むＰＢＳで希釈した抗血清に１日反応させた後、0.3 %H_2O_2で内因性ペルオキシダーゼを失活させる。次いでビオチン化抗ウサギIgG抗体、アビジン－ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体の順に反応させ、ジアミノベンジジン、ニッケルアンモニウム、H_2O_2を含む発色液で可視化した。
［結果］ＢＤＮＦ－V2、ＮＴ－３－V2抗体は、エンザイムイムノアッセイ法ではそれぞれの抗原ペプチドのみ認識し、ＮＧＦ、ＮＴ－５の対応する合成ペプチドとは結合しなかった。また、組み換えＢＤＮＦ、ＮＴ－３およびマウスＮＧＦによるイムノブロット法でそれぞれの抗体と特異的に結合することを確認した。正常脊髄では、ＢＤＮＦ－ＬＩ、ＮＴ－３－ＬＩがいずれも灰白質で中等度に、白質で弱く染色された。灰白質内では、運動性の神経細胞（α運動ニューロン）（図１、２）および後角の海綿質付近が強く染色された。白質では、軸索および放射状に配行するグリア細胞（S-100 陽性）が弱く染色された。損傷後の脊髄では、運動ニューロンは４週後まで染色性が維持されていたが、３週後には一過性に染色性が強くなっていた。この傾向はＮＴ－３－ＬＩに著明であった（図３）。軸

索は３日後までは染色されるが、１週以降はほとんど染色されなかった。また、グリア細胞は染色性を維持し４週後まで認められた。４週後の灰白質ではアストロサイトとみられる細胞がＢＤＮＦ－ＬＩで多数染色された（図４）。

［考察］ＢＤＮＦ、ＮＴ－３は脊髄内に存在していることが判明した。白質全体にわたり軸索が染色されたことから、多種のニューロンがこれらのＮＴｓを栄養因子として利用しており、軸索内輸送を行っていると考えられる。[7] 損傷４週後にＢＤＮＦ－ＬＩ陽性のアストロサイト様細胞が多数出現したことより、これらがＢＤＮＦの生産を介して損傷修復に関与している可能性がある。胎性期にＮＴ－３が運動ニューロンの生存を維持し、運動ニューロン自身もこれらのｍＲＮＡを発現すると報告されているが、損傷３週後に運動ニューロンのＮＴ－３－ＬＩが増加したことから、損傷脊髄では同様の機転が働き、運動ニューロン自身が産生するＮＴ－３が運動ニューロンの機能維持に関与していると考えられた。[1) 4)]

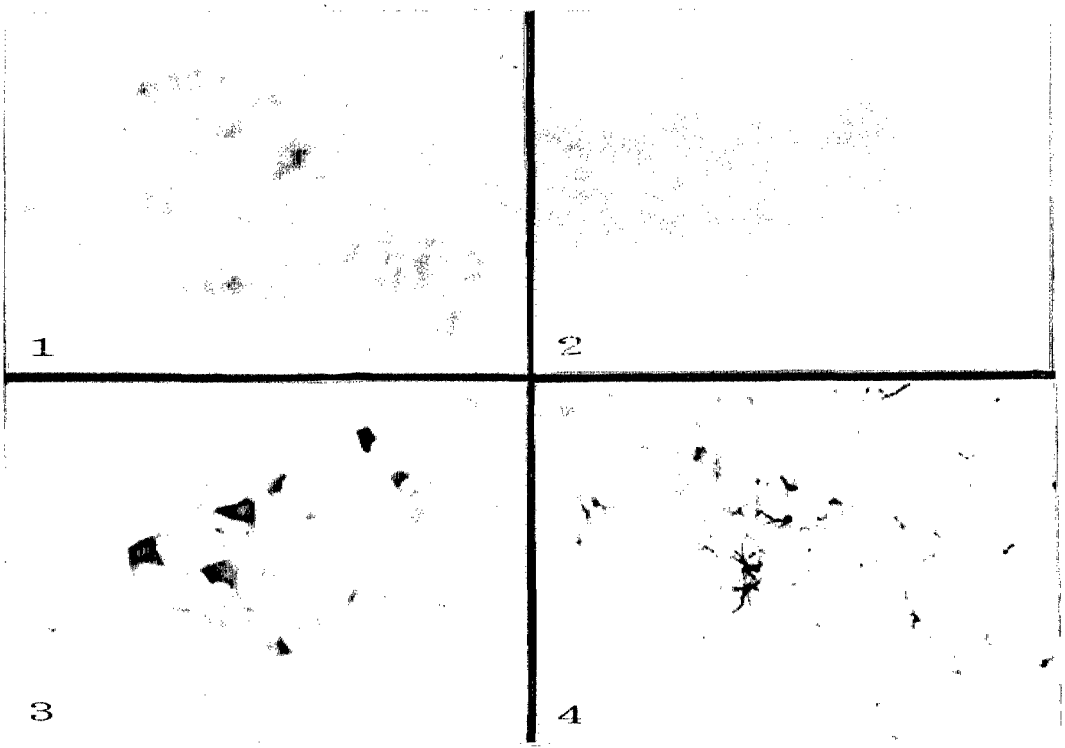


図１：正常の脊髄前角部（ＮＴ－３－ＬＩ）　２００倍
図２：正常の脊髄灰白質（ＢＤＮＦ－ＬＩ）　２００倍
図３：損傷３週後の脊髄前角部（ＮＴ－３－ＬＩ）　２００倍
図４：損傷４週後の脊髄灰白質（ＢＤＮＦ－ＬＩ）　２００倍

［文献］

1)C.E.Henderson,et al.(1993) Nature,363,266-270
2)C.E.Henderson,et al.(1993) Restor.Neurol.Neurosci.,5,15-28
3)J.Frisen,et al.(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.,89,11282-11286
4)L.Schnell,et al.(1994) Nature,367,170-173
5)P.Ernfors,et al.(1991) Eur.J.Neurosci.,3,953-961
6)P.Ernfors,et al.(1993) Mol.Brain Res.,17,217-226
7)P.S.DiStefano,et al.(1992) Neuron,8,983-993
8)Q.Yan,et al.(1993) J.Neurobiol.,24,1555-1577
9)X.Zhou,et al.(1993) Brain Res.,621,189-199

320 レチノイン酸による培養交感神経細胞のニューロトロフィン依存性変化： trkBの発現誘導とBDNFによる生存

小林 三和子、松岡 一郎、栗原 堅三
(北海道大学・薬・薬剤学)

〔要約〕 レチノイン酸によるラット培養交感神経細胞のニューロトロフィンレセプター発現変化とそれに伴うニューロトロフィン依存性の変化を解析した。新生ラットより単離した上頸神経節(SCG)ニューロンを0.1 μMレチノイン酸存在下で6日間培養すると、本来高いレベルで発現しているtrkA-mRNAの発現が抑制され、チロシンキナーゼドメインを含むtrkB-mRNAの発現が誘導された。一方、trkC-mRNAについては、チロシンキナーゼドメインの発現に変化はみられなかった。またp75低親和性ニューロトロフィンレセプターmRNAは、レチノイン酸により約2倍に増加した。SCGニューロンに対する各ニューロトロフィン (NGF、BDNF、NT-3) の生存維持効果を解析した結果、レチノイン酸処理によりBDNF依存的に生存する細胞が出現し、機能的なtrkBレセプターが発現することが明らかとなった。

〔目的〕

神経堤細胞の分化により生ずる交感神経細胞は、標的とシナプスを形成する以前(約胎生15日目)にNT-3に対する高親和性レセプターであるtrkCを発現する。続いて標的組織と接続し、NGFを供給されるようになる出生直後には、NGFの高親和性レセプターであるtrkAを優位に発現するようになる。培養下でも交感神経細胞のニューロトロフィン依存性がNT-3＞NGFからNGF＞NT-3に変化することが報告されている[1,2]。しかし、このようなニューロトロフィン依存性の獲得機構およびその後の特異性の転換機構は明らかではない。一方、我々は、レチノイン酸が培養交感神経細胞に作用して、その伝達物質合成能を転換することを報告している[3]。そこで今回、ニューロトロフィン依存性の変化に対するレチノイン酸の関与を明らかにするため、SCGニューロンの初代培養系を用いて、レチノイン酸によるニューロトロフィンレセプターmRNAの発現変化および各ニューロトロフィンの生存維持効果を解析した。

〔方法〕

SCGニューロンの培養：生後2-3日目のラットSCGより定法に従って細胞を単離し、40 ng/ml マウスNGF(Promega)およびN2-supplememtを含むF-12培地を用いて培養を開始した[3]。培養2日目より3日間10 μM Ara-Cで処理し、非神経細胞の増殖を抑えた。さらにバイオアッセイには、ヒトリコンビナントBDNFおよびNT-3(Regeneron)、抗マウスNGF抗体(和光)を用いた。 RT-PCRによるレセプターmRNAの定量：細胞より抽出した全RNAをDNaseI処理後、cDNAを合成した。[α-^{32}P] dCTPを含む反応液中でPCRを行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、増幅された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定量した。増幅したcDNA領域は以下のとおりである： trkA, 291-908[4]; trkB(e), 116-607; trkB(k), 1422-1931[5]; trkC(e), 186-739; trkC(k), 1459-1943[6]; p75, 160-713[7]. trkA、trkB(e)およびtrkC(e)は細胞外ドメイン、trkB(k)およびtrkC(k)はチロシンキナーゼドメインに位置する。

〔結果と考察〕

新生ラットより得たSCGニューロンを0.1 μMレチノイン酸存在下で6日間培養すると、trkA-mRNAの発現がレチノイン酸非存在下の50 %に抑制された(図1)。またtrkB-mRNAの発現はレチノイン酸により、細胞外ドメインにおいて6倍、チロシンキナーゼドメインにおいて4.5倍にそれぞれ増加した(図1)。この結果は、BDNFに対する機能的なレセプターと考えられる全長のtrkBレセプターの発現がレチノイン酸により誘導されることを示唆している。このことは、通常はBDNF依存性を示さないSCGニューロンが、レチノイン酸処理によりBDNF存在下で生存できるようになることから確かめられた(図2)。

一方、trkC-mRNAの細胞外ドメインの発現はレチノイン酸により4倍に増加したが、チロシンキナーゼドメインの発現は変化しなかったことから(図1)、機能的なNT-3のレセプターの発現に変化はないと考えられる。このことは、レチノイン酸処理によってNT-3依存的に生存する細胞数の増加がないことからも確かめられた。またニューロトロフィンファミリーに共通な低親和性レセプターであるp75のmRNAの発現は、レチノイン酸処理により約2倍に増加した(図1)。これらの結果は、in vivo においてもレチノイン酸が、ニューロトロフィン依存性獲得の初期に作用することを示唆する。今後、神経の発達段階に伴うレチノイン酸応答性細胞の割合の変化を明らかにすることが重要と考えられる。

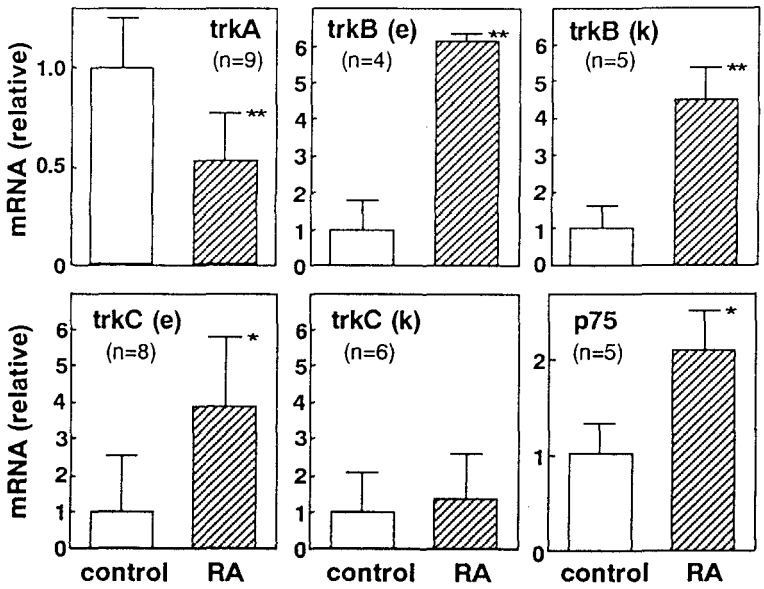


図1. レチノイン酸によるSCGニューロンのニューロトロフィンレセプターmRNAの発現変化
培養2日目より0.1μMレチノイン酸で6日間処理した。コントロールのニューロンにおいて増幅されたcDNA断片に取り込まれた放射活性をそれぞれ1とした。
RA; 0.1μMレチノイン酸
＊ $p<0.01$
＊＊ $p<0.001$

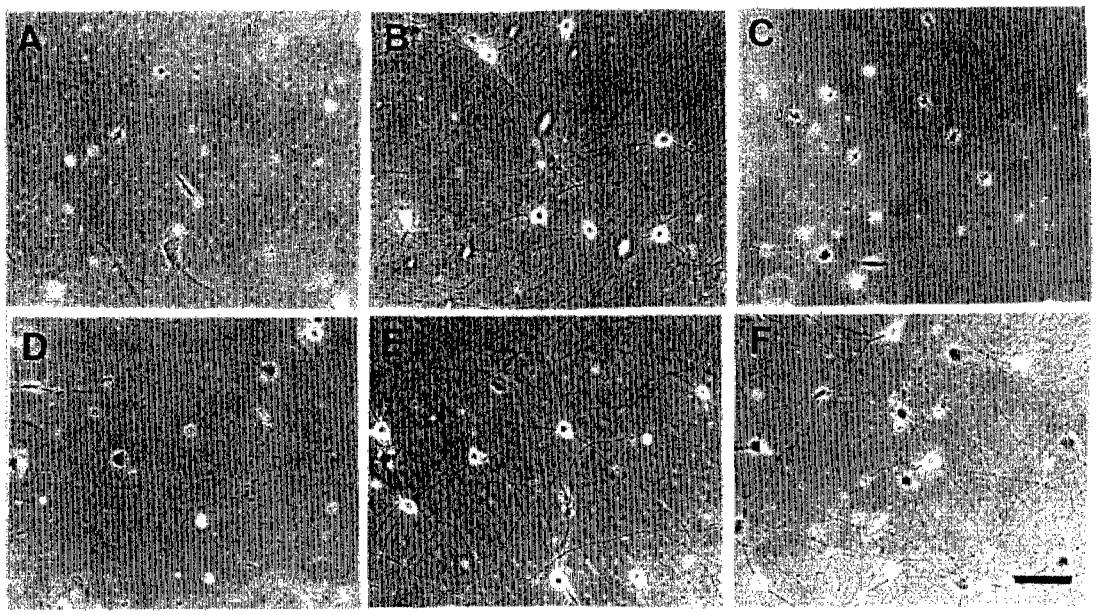


図2. レチノイン酸によるニューロトロフィン依存性の変化
(A-C) SCGニューロンをNGF存在下で3日間培養後、A)抗NGF抗体、B)NGF、C)BDNF+抗NGF抗体存在下で6日間培養した。(D-F)培養2日目よりNGF+レチノイン酸で2日間培養後、D)レチノイン酸+抗NGF抗体、E)レチノイン酸+NGF、F)レチノイン酸+BDNF+抗NGF抗体存在下で6日間培養した。NGF、BDNFは40 ng/ml、抗NGF抗体は2 μg/ml、レチノイン酸は0.1 μMで作用させた。bar, 100 μm.

〔参考文献〕

(1) Birren, S. J., et al. (1993) *Development* **119**, 597-610 (2) DiCicco-Bloom, E., et al. (1993) *Neuron* **11**, 1101-1111 (3) Kobayashi, M., et al. (1994) *FEBS Lett.* **337**, 259-264 (4) Meakin, S. O., et al. (1992) *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **89**, 2374-2378 (5) Middlemas, D. S., et al., (1991) *Mol. Cell Biol.* **11(1)**, 143-153 (6) Valenzuela, D. M., et al. (1993) *Neuron* **10**, 963-974 (7) Kojima, M., et al. (1992) *Mol. Brain Res.* **16**, 267-273

321 ニューロトロフィンの中枢ニューロンにおける初期応答と生存維持作用は必ずしも一致しない

野々村健、久保武一、畠中寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕

生後 2 週齢ラット前脳基底野ニューロンに対する各ニューロトロフィンの生存維持作用と、c-*fos* の誘導を指標とした応答細胞数とを比較した。BDNF と NT-4/5 は多くの細胞で c-*fos* を誘導し、それと対応して顕著な MAP2 陽性ニューロンの生存維持がみられた。また、NGF に対する応答細胞数はわずかで、MAP2 陽性細胞数にも変化はみられなかった。ところが、NT-3 は比較的多くの細胞が応答しているにも関わらず、全ニューロン数には影響を与えなかった。このことから成熟したニューロンに対するニューロトロフィンの役割はこれまで知られていた生存維持のみではなく、より多くの機能を有することが示唆される。

NGF、BDNF、NT-3 及び NT-4/5 は高い相同性を保った一群の神経栄養因子であり、ニューロトロフィンと総称されている。我々は、中枢ニューロンに対するニューロトロフィンの生理作用の解析を、前脳基底野コリン作動性ニューロンをモデルにして行ってきた。昨年、分化を終えた時期のコリン作動性ニューロンが NGF 依存型と BDNF 依存型、そしてその両方の支配を受けうるグループとに区別されることを報告した (1) (2)。また、この発生段階のニューロンには NT-3 は生存維持作用を示さないことも明らかとしている。前脳基底野では *trk*A、*trk*B だけでなく、*trk*C の発現も知られているが、その役割についてはほとんど調べられていない。そこで今回は、NT-3 の栄養因子作用についての解析を行ったので、それを他のニューロトロフィンと対比させて報告する。

〔実験方法〕

生後2週齢ラット前脳基底野、海馬ニューロンの初代培養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。4～6時間後、 TIP/MEM 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、6日間培養した。培養後、抗 MAP2 抗体で免疫染色された細胞を顕微鏡下で計測するか、又は MTT アッセイ (4) を利用して、生存ニューロン数を判定した。各ニューロトロフィンに対する応答細胞の同定は、培養 3 日後各ニューロトロフィンで 2 時間処理し、抗 c-*fos* 抗体（ Oncogene Science ）で免疫染色することで行った。ニューロトロフィンは既報のものを使用した (1)。

〔結果と考察〕

NT-3 は胎仔期の前脳基底野ニューロンのアセチルコリン作動性ニューロン合成酵素活性とアセチルコリンエステラーゼ活性を弱くではあるが誘導させたが、生後 2 週齢では生存維持効果が消失していた。そこで、 NT-3 の中枢ニューロンに対する栄養因子効果を探る手がかりとして、前脳基底野の全ニューロン数に対する生存維持効果を調べた（図 1 ）。BDNF と NT-4/5 は共に無添加の対照群に対して約 2 倍のニューロンの生存を促進したが、NGF と NT-3 は効果が観察されなかった。NGF はその応答細胞がコリン作動

性ニューロンに限局されることがわかっているため、全ニューロン数の変化には影響しないと考えられる。NT-3について同様の解釈ができるかを、c-*fos* 誘導細胞を同定することで解析した（図２）。その結果、全ニューロンに対するc-*fos* 誘導細胞はコントロール、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 についてそれぞれ 0.76%、2.5%、20%、7.9%、22% であった。ニューロトロフィン添加による生存MAP2陽性ニューロン数と応答細胞数とには対応がみられたが、NT-3 処理により比較的多くの細胞が応答しているにもかかわらず、MAP2陽性細胞数に変動がみられなかった。*trk*B、*trk*C を共に高く発現している海馬ニューロンについて同様の実験を行ったところ、BDNF と NT-3 は海馬ニューロンの生存維持には効果がみられなかった。ところが、多くの海馬ニューロンは、生存維持効果を示さなかったBDNF と NT-3 処理により、c-*fos* を誘導した。以上の結果は、分化段階が終了したニューロンに対してニューロトロフィンは必ずしも生存維持にのみ機能するのではないことを示唆している。

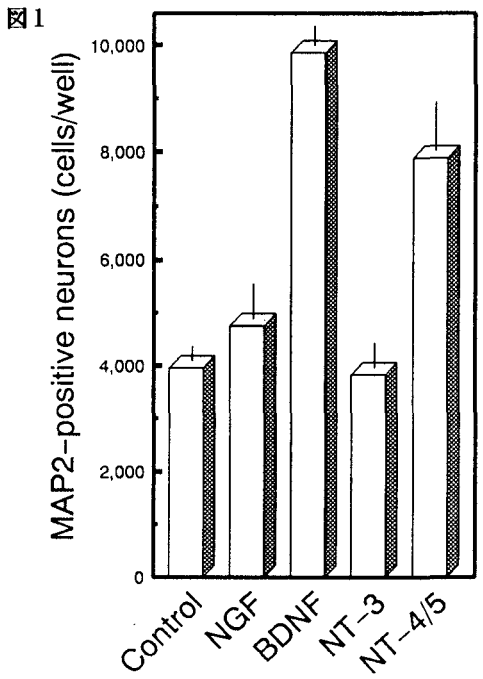
〔参考文献〕

（１） 野々村健、小島正己、西尾チカ、畠中寛 (1993) 第36回日本神経化学会

（２） Nonomura, T., Lindsay, R.M., and Hatanaka, H. submitted

（３） Nonomura, T. and Hatanaka, H. (1992) *Neurosci. Res.* **14**, 226–233

（４） Hansen, M.B., Nielsen, S.E. and Berg, K. (1989) *J. Immunol. Methods* **119**, 203–210



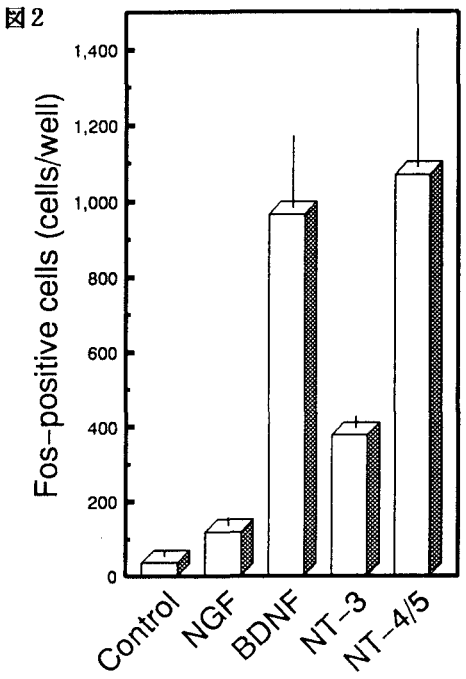


図１ 初代培養ラット前脳基底野ニューロンの生存に対するニューロトロフィンの効果

ニューロトロフィンはそれぞれ 50ng/ml の濃度で加えた。

図２ 各ニューロトロフィン処理後の前脳基底野ニューロンにおける Fos 陽性細胞数

ニューロトロフィンをそれぞれ 100ng/ml の濃度で、37℃、120min 処理した後、固定、染色した。

322 砂ネズミ一過性前脳虚血後の神経細胞におけるMitogen-inducible Cyclooxygenase（Cox2）の誘導

大槻俊輔、松本昌泰、北川一夫、馬渕卓真、萬代研二、松下幸司、小川智、上田周一、山形要人、三木直正、柳原武彦、鎌田武信（大阪大学第一内科、神経内科、第一薬理）

〔要約〕Mitogen-inducible cyclooxygenase (cox2)は、外界からの様々な刺激時に速やかに産生誘導され、アラキドン酸からプロスタグランジンへの産生経路を触媒する。このcox2の誘導は、細胞増殖や分化等の促進に関わると考えられている。本研究では、脳虚血時における海馬神経細胞のcox2の誘導について検討した。Northern blottingにおいて、再灌流3、8時間目に海馬cox2 mRNAの発現が観察された。またin situ hybridization法により虚血後のcox2 mRNAの誘導は、海馬錐体細胞層と顆粒細胞層に認められた。このcox2 mRNAの発現は、虚血侵襲に対する神経細胞の細胞応答現象の一つと考えられ、虚血時のストレス刺激情報の細胞間および細胞内情報伝達機序に関わる可能性を示唆した。

【目的】我々は昨年の本学会で、脳虚血時に細胞内情報伝達系におけるsecond messengerであるチロシンキナーゼの活性化やアラキドン酸代謝酵素5-lipoxygenaseの細胞内移行と活性化を報告してきた。一方、アラキドン酸代謝系酵素cyclooxygenaseのうち、外界からの様々な刺激に対して発現するmitogen-inducible cyclooxygenase (cox2)は、細胞増殖や分化等の細胞応答に関与し(1)、神経細胞に於いては、興奮性アミノ酸刺激時に発現され、シナプス可塑性に関わると考えられている(2)。今回、アラキドン酸過酸化反応やグルタミン酸過剰負荷が生じる脳虚血-再灌流時における海馬神経細胞のcox2の誘導について検討した。

【方法】成熟雄性砂ネズミ(Meriones Unguiculatus, 体重50-65g)を対象とした。軽エーテル麻酔下に両側総頸動脈を剥離、麻酔覚醒後杉田クリップにて５分間閉塞する事により虚血を作成した。虚血中の体温は37℃に維持した。cox2 cDNA(2)はBamH1制限酵素処理後、5'末端から526塩基番目までの部分をサブクローニングし、probeを作成した。A 再灌流3,8,24,48時間後、断頭屠殺し（各n=2～3）、海馬を摘出し、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroformにより総RNAを抽出した。0.66M formaldehyde添加1% agarose電気泳動後、GeneScreen Plus膜にキャピラリー転写し、^{32}p標識DNA probeを用いNorthern blottingを施行した(3)。B 再灌流6時間後にリン酸緩衝化4% paraformaldehydeにて灌流固定、パラフィン包埋後、背側海馬を含む切片を作成した(3)。切片はproteinase K処理後、digoxigenin標識RNA probeを用いin situ hybridizationを施行した。対照は非虚血群を用いた。

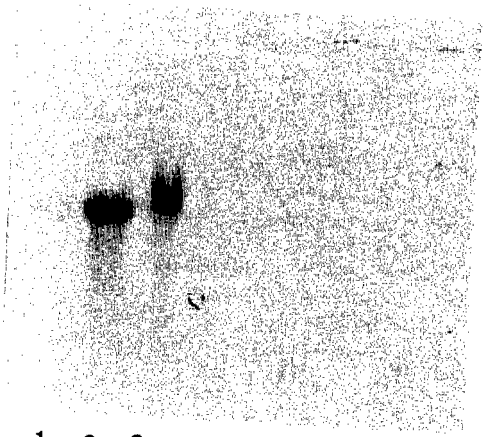
【結果】A Northern blottingにおいて、非虚血時ではtrace程度しか認めなかったcox2 mRNAは、再灌流3、8時間に発現誘導が観察された（図１）。虚血24時間以降は、非虚血時レベルに復した。B 非虚血時ではcox2 mRNAはin situ hybridizationでは検出感度以下であったが、虚血再灌流後、海馬CA1-4の錐体細胞層および歯状回顆粒細胞層にcox2 mRNA信号が観察された（図２）。

【考察】砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて、虚血-再灌流早期に海馬神経細胞にcox2 mRNAの誘導が観察された。再灌流時に於けるcox2遺伝子の発現は、グルタミン酸過放出や活性酸素負荷を主とする虚血-再灌流侵襲に対する神経細胞の普遍的な細胞応答と考えられ、immediate early geneの性格を有し、細胞内にまたは近接細胞にcyclooxygenase代謝産物を介して刺激情報伝達機序に関わるものと考えられた。

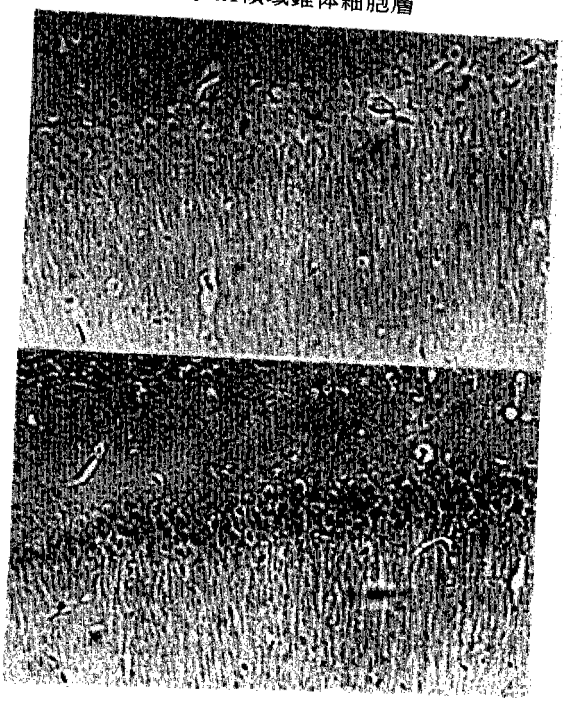
【文献】

1. Shimizu, T. and Wolfe, L.S. (1990) J. Neurochem. 55, 1-15.
2. Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., and Worley, P.F.(1993) Neuron 11, 371-386.
3. Kitagawa, K., Sinoway, M.P., Gould, R.M., and Colman, D.R. (1993) Neuron 433-448.

【図1】cox2 mRNAのNorthern blotting
左のlaneから順に1:control, 2:3h, 3:8h, 4:24h, 5:48h



【図2】cox2 mRNAのin situ hybridization
コントロール（上段）と虚血後6時間後（下段）
海馬CA1領域錐体細胞層



人名索引 （ＡＢＣ順，番号は演題番号を表します）

（A）

阿部廣巳…… 273
阿部輝雄…… 1
阿部敏明……69
阿部敏男……76
阿比留康弘……79
足立淳…… 292
相本三郎…… 207
赤川公朗……24
赤木宏行…… 293
秋山一文…… 138•176
安藤正人 170•222•239•265
安藤進…… 243
青木則久…… 222
青木義矢……64
荒金太……39
荒木亘……96•142
荒木陽子…… 308
淺田英穂…… 291
浅原弘嗣…… 241
浅井昌弘 ……66•68
朝倉幹雄…… 118•292
朝倉正…… 192
浅野省一…… 216•238
浅野富子…… 305
浅沼幹人 22•71•180•196•288
阿相皓晃……21
東泰孝…… 7

（B）

馬場明道…… 216•226•238
馬場広子……88
馬場剛…… 217•218

（C）

Campagnoni, A.T ……63
章龍…… 128
陳大志……56
千葉厚郎…… 197
千原和夫……89•273
近井高志…… 269
Colman, D.R. ……62

（D）

Dekker-Ohno, K.…… 170
Dewar, D.…… 297
Ding Wei Guang …… 203
土居孝至…… 120•221

（E）

海老原達彦……26
Emaduddin, M. …… 309
遠藤泰…… 174
遠藤泰久……10
遠藤真澄…… 268
榎戸靖…14•129•130•205
衛藤義勝…… 46•47•317

（F）

Fibiger, H.C. ……57•304
藤原道弘…… 272
藤井敏弘……37
藤森修……70•214
藤本貞毅…… 299
藤嵜泰利…… 186•189
藤澤仁……86•169
藤代博…… 215
藤城正敏…… 261
藤田公和…… 170•222
藤田興…… 193
藤田忍…… 106
藤原教子…… 183
深間内文彦…… 150
深谷健司…… 204
福田英臣…… 289
福田裕恭…… 258•259•263
福井裕行…… 53•54
福元宏明……82
福永浩司… 39•40•137•290
福内靖男…… 111
降矢芳子…… 143•302
古橋潔…… 166
古市貞一……20
古川昭栄…… 131•318•319
古川美子…… 318
古玉大介……20
古谷博和……48
古屋茂樹…… 159
Fuss, B. ……88

（G）

五味愼太郎…… 111
後藤昭彦…… 319
後藤幾生…… 287
後藤希代子……69
Grundke-Iqbal, I. …… 104
桂仝…… 152

（H）

芳賀和子…… 262
芳賀達也…… 262
萩原民雄…… 274•278
浜登希子…… 316
浜中裕喜……84
浜之上誠……73
浜上尚也…… 174
韓暁燕…… 309
花井一光…… 213
花井陳雄…… 162
花岡和則…… 154
飯田静夫……45
播口之朗……92•275
長谷川浩…… 292
長谷川宏幸……52
長谷川準子…… 106
長谷川かおり… 51•87•102•165
長谷川一子…… 219•223
長谷川成人…… 103
長谷川武史……56
橋本喜次郎…… 220
橋本隆紀…… 150

波多腰正隆…… 300
畠中寛……14•27•79•129 130•205•207•321
畠瀬修……13
羽藤直人……44•120
八田愼一…… 260
服部英幸……92
服部成介…… 311
早原敏之……43
早川徹……12
林秀行……54
林謙介…… 155•227•229
林敬…… 114
林要喜知……90•131
何暁玲…… 227
日比望…… 192
日高弘義……41•264
東真木子……32
東山智子…… 200
樋口宗史…… 25•74
平林義雄…… 159
平藤雅彦…… 174
平井俊策…… 143
平岩雅男…… 248
平河多恵…… 192
平松緑…… 236
平野均……57•304
平野誠…… 220
平島豊…… 132
平田ゆかり…… 185
久永真市…… 38•39•296
西沢幸夫…… 115
等誠司…… 197
本多虔夫…… 222
本藤久雄…… 220
堀耕治…… 181•187•180
堀修…… 252•253
堀口淳…… 188
堀川洋…… 1
星野歳三…… 245
細田健治…… 143
細川清……43
細木俊宏…… 133
保住功…… 248
黄縄好…… 231

（ｉ）

茨木京子…… 1
井幡巖…… 313
井端泰彦……59•273
市川佳幸……43
井田博幸…… 46•47
伊賀正英…… 228
五十嵐貢一…… 76•82
五十嵐道弘…… 285
井口昭久…… 108•209
井原康夫 75•95•97•98•103
池田和正…… 204
池田顕……58
池田真…… 9
池田正行…… 179•297
池田幸弥……96•142
池田修一…… 146
池上亮介…… 319
池中一裕……25•119
池内俊彦……27•205•207
伊倉宏司……91
以倉康充…… 104
今福淳…… 118
今堀和友…… 105•106•245
今井嘉紀…… 313
今井祐二……33•156
今泉和則……12•112
今泉美佳……58
稲葉真…… 210•314
稲熊裕… 51•87•102•165
伊野美幸…… 292
井上敦子…… 5
井上敦…… 199
井上洋…… 155
井上和秀……9•55
井上健…… 135
井上幸紀…… 186•189
井上順雄…… 232•280
井上繁雄…… 264
井上芳郎……19•119
乾誠…… 228•303
犬塚貴…… 248
Iqbal, K.……104
入谷克己…… 222
伊佐かおる…… 155
石橋晃…… 154
石橋祥弘……99
石田松雄…… 193
石毛久美子…… 289
石黒英明…… 248
石黒幸一…… 105•245
石黒麻利子…… 316
石原武士…… 138•176
石原好弘…… 179
石井當男…… 280
石川巧一…… 211
石川紘一…… 235
石川良樹…… 227•229
石丸昌彦…… 150
石岡憲昭…… 212
石浦章一…… 250
磯部真理…… 225
磯部俊明…… 277
板野俊文……13
板野泰弘……16
井藤英喜…… 177
伊藤英樹…… 186•189
伊東秀記… 51•87•102•165
伊藤仁一…… 225
伊藤光宏……89
伊藤直史……41
伊藤康宏…… 286
伊藤芳久…… 289
伊東亜紀雄 …… 246
伊藤陽…… 133
伊藤哲彦…… 193
伊藤康宏…… 154
糸山泰人…… 254•276

岩橋和彦……43
岩森正男……163
岩本竜明……276
岩本陽子……183
岩永操……208
岩野仁……181
岩崎克典……272
岩瀬環……70•100
岩田恵美…22•71•196•288
岩田暢子……89
泉澤恵……218
（J）
鞠碌……18•116•267
（K）
壁谷建志……211
加太英明……241
替地恭介……319
鏡山博行……54
鹿川哲史……119
貝淵弘三……29
改正善彦……76•82
梶本康雄……175
柿木達也……300
柿本泰男 63•77•78•151•188•221
鎌田武信 62•252•253•312•322
亀下勇……169
亀谷富由樹……146
亀山仁彦……262
亀山勉……209
上口裕之……210•314
上久保毅……114
金松知幸……194
金山巌……93
金澤一郎……197
金澤美穂……125
神庭重信……66•68
金子勲……101
兼子幸一……215
金光秀晃……272
金行孝雄……310
仮屋勝秀……187
笠間弘美……61
柏原健一……176
柏木久美子……90•131
片田栄一……70•100•214
片岡喜由 11•127•128•255•271
片岡泰文……251
片山幸一……115
加藤宏之……254
加藤兼房……51•81•87•102
165•254•305
加藤みどり……301
加藤隆一……66•68
加藤聖……109
加藤尚彦……121•232•280
勝元栄一……122•171•295
桂昌司……56•178
川端昌弘……269
川原正博……284•301
川井薫……193
川上秀史……135•233•247
川上順子……184
川目裕……47
川村勇樹……291
川野仁……201
川島拓司……90•131
木原俊壱……18•116
木島正哉……121
菊池崇……99
菊池哲朗……5
金哲熙……25
木村永一……242
木村宏……203
木村淳……299
木村真奈美……115
木岡哲郎……172•173
切池信夫……122•186•189
岸本健雄……38•39•296
北田千恵子……99
北川一夫……62•322
北原功雄……274
北村大介……94
北村邦男……200•202
北村登……175
木谷隆子……86
鬼頭昭三……125
木内祐二……234
小林和夫……284•301
小林正明……261
小林雅文……2
小林三和子……320
小林聡……155
小林孝安……276•282
小林卓郎……48
小林哲幸……195
小林徹……133
児玉俊夫……149
小暮久也……254
高昌星……199
小浜一弘……229
小原厚行……110
高坂新一……73•313
小池達郎……17•124
小糸寿美……279
小泉修一……9•55
小嶋久子……160•161
小島正己……14•27
小島直也……162•257
小町裕志……147
小松眞史……219
小宮義璋……230•285
小牟禮修……49
近藤啓次……49•63•78
近藤威史……94
近藤太郎……111
近藤洋一 22•71•180•196•288
近藤慶之……37
近藤啓次……77
河野朋子……23
越川憲明……2
小谷政晴……198
小谷泰教……49•63•77•78
高治義……122

小山　豊…… 226
小崎俊司…… 134
小澤　修……87
久保武一……14•130•321
窪田和興……69
久保田　勝…… 272
工藤　喬…… 104•275
工藤佳久…… 6
熊谷善弘…… 101
隈原英子……26
熊倉鴻之助……58
國井修一…… 170
国下龍英……96•142
久野貞子……49
郭　哲輝……25
栗原堅三…… 320
栗原　正……61
栗野雅仁…… 137
栗岡政典…… 186•189
栗山欣弥……56•178
黒田重利…… 138
黒田洋一郎…… 284•301
黒田陽子…… 173
黒澤信幸…… 162
黒谷篤之……69
車谷隆宏…… 275
車地暁生…… 215
楠畑　雅…… 164•166
楠戸正子…… 222•239•265
楠　進…… 197
桑原敬介…… 252•253•312
桑野良三…… 154
葛目博子…… 291
葛谷博磁…… 193

（L）

李　踐偉…… 217•218
李　憲…… 237
李　炳生……74
劉　国君…… 307•309
劉　暁宏…… 254

（M）

馬淵卓真…… 322
Macklin, W.B.……88
前田　潔…… 300
前田信明……84
前田裕輔…… 252•253•312
前川喜平…… 317
前川昌平……42
萬代研二…… 322
丸野内棣…… 36•67•286
丸山　敬…… 291
丸山和佳子…… 117
政田哲也……13
正宗　研…… 219
増田誠司……80•83•91
升島　努……85
増水章季……75
松田正司…… 77•78•271
松田敏夫…… 216•238
松田義宏…… 279
松井秀樹……13
松井宏晃…… 292
松井京子…… 179
松井崇裕…… 156
松居　徹…… 113
松井利充……89
松川則之……70•100
松宮輝彦…… 217•218
松本逸郎……72
松本和政……33•34•35
松本　清…… 274
松本邦夫……73
松本昌泰 62•252•253•312•322
松本　孝…… 220
松尾義則……43
松岡一郎…… 320
松島　宏…… 317
松下幸司…… 322
松谷天星丸…… 185
馬渡一浩…… 109
McCulloch, J. …… 297
三枝理博……26
美原　盤…… 111
三木直正 25•31•64•74•322
三木新也…… 5
御子柴克彦……20•119
南　勝…… 174
三品昌美…… 1
御園生裕明……58
三須良実…… 5
三竹重久……70•100•214
美宅成樹…… 284
三谷　章…… 128•255•271
三浦正幸……21
宮川太平…… 296
宮川武彦…… 115
宮本　篤…… 242
宮本英七… 39•40•137•168
290•296
宮本聖也…… 118
宮武良輔……43
宮武　正…… 147•148•250
宮脇敦史……20
宮崎真理…… 182
宮崎唯雄…… 201
三好理絵…… 125
溝渕睦彦…44•120•149•151
153•188•221•294
溝口克弘…… 139
水野哲也……67
水島秀勝…… 274
望月秀雄……41
望月るり子…… 276
桃井　隆……32
森　昭胤… 22•71•180•196
241•288
森　啓 94•143•145•301•302
森　寿…… 1
森　健次郎…… 141
森　正敬…… 290
森　則夫…… 236
森　秀治…… 270
森　徹自……33•34•35

森井博史……65
盛政忠臣……310
森島真帆……103
森下理香……305
森田誠治……5
森田貴雄……1
諸治隆嗣……140•224
諸岡啓一……123
本橋伸高……258•259
撫井弘二……173
武笠毅……32
Muller, D. ……40
村井為敦……2
村上章……10
村上直也……175
村上信五……44•120
村上哲英……13
村上剛……59
村上善紀……50
村川雅洋……141
村本和世……284•301
村尾孝児……153
村瀬真一……131
村島善也……123
村山美由紀……316
村山徹……89
村山俊彦……136
室田景久……319
室田誠逸……179

（N）

鍋島俊隆 144•209•244•246
長藤寿昭……113•256
長井忍布……30
永尾雅哉……80•83
長尾省吾……13
永田栄一郎……111
永田清……66
永田豊 170•185•222•239•265
雉野智子……31
内藤通孝……108•209
内藤成孝……256
中福雅人……29
中川摂子……18•116•306
中川滋木……204
中川康史……29
中込忠好……272
中原辰雄……220
中平健祐……25
中井真通……300
中井康光……266
中嶋一行……73
中島光業……90•131
中条茂男……167
中木敏夫……66•68
中村晶……37
中村博彦……231
中村薫……220
中村和彦……43
中村和生……160•161
中村信之……319
中村重信……135•233•247
中村俊……29•32•42•311
中村静雄……298
中村亨……59
中村敏一……73
中村洋一……11•127
中村祐……92
中西亜紀……173
中野浩一……64
中尾純治……50
中尾慎一……141
中岡大樹……300
中岡隆志……257
中城有喜……44•221
中田貢……76
仲田義啓……5
中谷一泰……167
中山洋……277
中山孝……232•280
中山隆安……135
中澤美奈子……15
直井信……117
根木哲朗……13
根本康夫……3•134
新川久義……92•93
新島旭……72
西達也……162
西林佐紀子…22•71•196•288
西堀正洋……269
西田朗……258•259•263
西田真由美……82
西島樹重……202
西木禎一……134
西宗裕史……158
西村千尋……152
西村京子……246
西村健…92•93•104•275
西野直樹……175
西尾チカ……79•129
西崎純……292
新田淳美……144•246
丹羽正美……251
野田昌晴……84
野田幸裕……244
野賀正史……114
野上予人……132
野川茂……111
野口かおり……245
野口鉄也……261
野路久仁子……214•240
野村恭一……200
野村正彦 180•181•187•200•202
野村靖幸……15•16•30•136
野々村健……14•79•321
野崎博之……111

（O）

小幡邦彦……24•150•291
小田温子……136
小田毅……17
尾高麻乃……97•98•99
小高亜矢子……32
小川紀雄 22•71•180•196•288
小川智 252•253•312•322

荻田喜代一…… 7•8
小口勝司…… 234
小倉明彦…… 316
大黒一哉……52
大橋博…… 191
大橋裕一…… 149
大江良秀…… 211
大川清…… 114•192
大熊誠太郎……56•178
大野紘宇…… 102
大野和茂…… 110
大野知親…… 298
大沼純…… 105
大鹿英世…… 242•260
太田英正……41
太田淳……90•131
大田和美……54
大槻俊輔…… 322
小鹿幸生……70•100•214
岡哲志……14•129•130
岡田正路…… 110
岡田泰士……13
岡藤隆夫…… 317
岡本仁……25
岡本基…… 270
岡村均……59•273
岡崎勝男…… 264
奥野正景…… 186•189
奥野幸子……86
奥山治美…… 182•195
小野謙一…… 159
小野常彦…… 168•296
小野寺宏…… 276
大江千廣…… 155
大橋十也……47
大平敦彦…… 157
大村裕……72
大塚康史…… 100
折茂肇…… 177
長田賢一…… 118
大杉武……64
大谷光弘…… 210•314
大塚康史……70
大槻秀夫……12
大槻俊輔…… 312
小山文隆……95
尾崎美和子……65
尾崎宜洋…… 122•171•295
小澤光一郎……85

（Q）

Qvist, R. …… 65

（R）

柳鐘薫…… 4

（S）

佐田正一郎…… 287
佐伯清美…… 269
Saffen, D.W. ……26
鷺直樹…… 224
左合正周…… 210•314
佐原成彦…… 143•302
崔永喜…… 163
斉藤史明…… 148
斎藤浩…… 258•259•263
斎藤茂治…… 261
齋藤利和…… 260
齋藤巨志…… 298
坂井研一…… 138
酒井紀…… 315
榊孝之……12
坂本秀生…… 193
坂本安…… 200•202
阪中雅広…… 77•78•271
崎村建司…… 1
桜庭祐子…… 101
Salunga, T.L.……308
佐野輝…… 49•63•77•78
佐野護…… 208
笹原洋二…… 282
佐々木光…… 314
佐々木和男……72
佐々木隆造……80•83•91
佐々木洋…… 229
貴家康男…… 118
佐藤昭夫…… 177
佐藤厚子…… 292
佐藤淳子…… 212
佐藤嘉兵…… 204
佐藤一紀…… 245
佐藤耕一……68
佐藤誠…… 153•294
澤辺真紀…… 202
澤田誠…… 36•67•286
関口真理子…… 3
関野祐子…… 291
仙波純一…… 125
仙波りつ子……81•157
芝軒信次…… 235
渋谷匡子…… 202
渋谷健…… 217•218
重吉康史…… 273
志甫理……76
嶋田裕之……97
嶋津孝…… 201
清水遵…… 185
清水雅美…… 258•259•263
清水義雄…… 176
下田耕治……20
下濱俊…… 299
下川雅丈…… 250
下川尚子…… 267
下家浩二…… 207
霜里和朗…… 190
新家一男…… 126
品川理佳……91
新海泰久…… 97•98
新納信江……48
篠田元扶…… 211
篠田友孝…… 277
四宮博人…… 149•294
篠村徹太郎…… 141
篠崎たき子…… 123
新谷麻江…… 81•82
新谷太…… 66•68

塩田清二…… 266
白井豊…… 175
白石哲也…18•116•267•306
白川治…… 175
白尾智明…… 155•227•229
白崎康文…… 147
白沢卓二……94
庄盛敏廉…… 310
祖父江憲治…… 228•303
Sodering, T.R.…… 168
曽我智子…… 232
Somboonthum, P. …… 216
須藤慎治…… 247
菅原恵…… 235
菅谷慶三…… 266
杉原裕志…… 318
杉田竜太郎……41
杉谷加代…… 109
杉浦弘子……23
杉山昌一…… 113•256
孫小燕…… 230
諏訪牧子…… 284
洲脇寛……43
鈴木映二……66
鈴木恵理香……24
鈴木眞…… 216
鈴木政美…… 103•164•166
鈴木伸宏……97•98•99
鈴木龍雄…… 214•240•250
鈴木豊…… 156
鈴木二郎…… 123
錫村明生…… 36•67•286

（T）

田平武……96•142
田渕和雄…18•116•267•306
多田博史…… 123
田口明彦……33•34•35
田口隆久…… 158
田井直……45•197•198
平英一…… 25•31
田島和周…… 168•296
高田香…… 217•218
武田良平…… 151•153•294
高木博…… 6
高木勉 12•28•33•112•156
高羽夏樹……31
高原ひろみ…… 194
高原二郎…… 153
高橋慶吉…… 142
高橋正身…… 3•134
高橋美帆…… 106
高畑京也……91
高井節夫…… 135
高久晃…… 132
高倉公朋…… 231
高松研…… 261
高松昌子…… 105
高見健治……76
高島明彦…… 245
武田篤…… 276
竹田二美代…… 266•278
武田弘志…… 217•218
武田雅俊… 92•93•104•275
竹田稔…… 266•274•278
武田良平…… 149•221
武田泰生…… 201
武井延之……10
竹本なぎさ……73
竹下正純…… 182
武富保…… 199•281
竹内宏 237•307•308•309
竹内裕…… 191
瀧孝雄……45
滝口正樹…… 290
瀧尾擴士…… 103
田熊一敞…… 216•238
玉井洋一…… 160•161
田丸政男…… 170•185
田村晃…… 272
田村眞理…… 276•282
田中千賀子…… 300
田中秀和……64
田中秀逸…… 124
田中淳一…… 181•187
田中順一…… 315
田中健一…… 180
田中喜久子…… 146
田中光一…… 135
田中耕太郎…… 111
田中正彦……36
田中真人…… 207
田中正敏…… 139
田中佐知子…… 234
田中早苗…… 202
田中隆彦…… 139
田中康一…… 243
谷昭義…… 148
谷口弘樹……28
谷口寿章…… 164•166•284
谷口直子……64
谷口泰造……89
谷口隆之…… 299
谷山紘太郎…… 251
田代朋子…… 230
立岔廷族…… 239•265
立元一彦…… 211
寺田庄一…… 202
寺島俊雄…… 198
千谷晃一…… 103•164•166
戸田啓介…18•116•267•306
戸田正博……21
富樫俊二…… 133
東田千尋……30
遠山正彌…12•28•33•34•35
112•156
砥出勝雄…… 183
東條英明……76
徳田雅明……13
徳田隆彦…… 146
徳武哲…… 249
富田泰次…… 319
富山勝則…… 2
遠山育夫…… 203

鳥飼治彦…… 149
融道男…… 215
戸谷重雄…21•201•210•314
豊原敬三…… 315
豊島至…… 219
土田晃敬…… 234
土橋宣昭…… 236
津田学……12•112
津田正明…… 107
継泰城……70•100
辻浩司……11•127
辻省次…… 248
辻崇一…… 162•257
塚田裕三…… 194•206
堤哲之…… 220
辻村敦…… 178

（U）

内田和久…… 277
内田庸子…… 105
内田洋子……75
内村英幸…… 220
内富庸介…… 258•259
宇田裕…… 248
上田周一…… 322
植田弘師…… 5
上田健治…… 145
上田周一…… 252•253
上原恵子……47
上原孝……15
上村敬一…… 281
上野修一…… 49•63•77•78
植月太一……23
氏家寛…… 138•176
梅垣宏行…… 108•209
宇佐美美穂子…… 143•302
牛込彰彦…… 187
生塩之敬…… 137•290
植村慶一… 21•50•200•201

（W）

和田博夫…… 177
若本寛起…… 314
和中明生…12•28•33•34•35 112•156
王瑋…… 280
渡部和彦…… 315
渡辺明子…… 215
渡辺英治…… 157
渡辺えり…… 293
渡辺雅彦……19
渡辺正知……37
渡邊建彦…… 4
渡辺武……94
渡辺恭良……65
Watson, J.B. ……88
張唯…… 308
温同春……77
翁述民…… 307

（Y）

矢部裕…… 313
山田和雄……12
山田清文…… 209•244
山田清美…… 135
山田雅司…… 205•207
山田通夫……57•304
山田紀子…… 101
山田佐登留…… 215
山田猛……48
山上榮 122•171•172•173 186•189•295
山形要人……60•322
山口晴保…… 245
山口幸子…… 222
山口時男…… 110
山口知子…… 184
山口徹…… 300
山本明広……94
山本秀子…… 140•224
山本秀幸……39•168•296
山元弘…… 279
山本良平…… 102
山本敏文…… 140•224
山本敏晴……47
山本恵史…… 283
山室裕…… 181•187
山之端万里…… 206
山下拓史…… 233
山下樹三裕…… 251
山下康子…… 251
山脇成人…… 258•259•263
山添康……66
柳原尚明……44•120
柳原武彦 62•252•253•312•322
柳澤勝彦 97•98•147•148•250
谷内一彦…… 4
柳瀬尚人…… 128•255
楊常青…… 175
楊献紅…… 224
矢野茂敏…… 290
保田稔…… 300
安田佳子……83
保田好信…… 283
安井裕子…… 109
安武多恵子……48
横井功…… 241
横尾秀康…… 139
横谷昇…… 122•171•295
横山秀克…… 236
米田幸雄…… 7•8
米倉小百合…… 105
米増知子…… 129
米沢裕次…… 220
吉田明…… 6•134
吉田裕孝…… 103
吉田一成…… 210•314
吉田敏…… 182
吉田武美…… 234
吉川和明…… 23•90
吉川真悟……20
吉村裕之……77
吉村和法…… 202
吉村敬一…… 186•189
吉村正博……98
由村健夫…… 268•287

吉　岡　　亨…… 6
吉　田　真　美…… 139
Yu Shun　……203
湯　浅　龍　彦…… 179
湯　口　貴　導……12
結　城　伸　泰……45
（Z）
Zhang Jian　…… 311
張　　玉　祥…… 233

神経化学　33巻　第1号

平成6年9月6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　(有)成進社印刷所