ISSN：0037－3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry

Vol. 34 (No. 2), 1995

平成７年６月

神経化学

第38回 日本神経化学会大会論文集

PROCEEDING OF THE 38th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE SOCIETY FOR NEUROCHEMSTRY

於 京都

7月1日(土), 7月2日(日)

Vol. 34 (No. 2), 1995

日本神経化学会

編　集　委　員

（ＡＢＣ順）

赤　池　昭　紀	（京大・薬・薬理）
福　居　顯　二	（京都府立医大・精神）
花　井　一　光	（京都府立医大・物理）
長谷川　武　史	（京都府立医大・同位元素）
橋　本　泰　道	（嵯峨病院）
橋　本　恒　一	（京都府立医大・薬理）
井　端　泰　彦	（京都府立医大・解剖）
木　村　　宏	（滋賀医大・分子神経生物）
木　村　　淳	（京大・医・神経内科）
栗　山　欣　弥	（京都府立医大・薬理）
水　野　　昇	（京大・医・高次脳形態）
能　登　　直	（京都府立医大・精神）
岡　村　　均	（神戸大・医・解剖）
奥　田　千恵子	（京都パスツール研究所）
大　熊　誠太郎	（京都府立医大・薬理）
佐　藤　公　道	（京大・薬・分子作用制御）
谷　口　隆　之	（京都薬科大・生物）
上　田　國　寛	（京大・医・臨床検査）
米　田　幸　雄	（摂南大・薬・薬理）
中　嶋　照　夫（代表）	（京都府立医大・精神）

目　　次

1．胚性腫瘍細胞の神経細胞分化における β－Citryl－L－Glutamate の変動 …… 18
楢原正則、岩佐朱美、濱　堯夫、三宅正治
（神戸学院大学薬学部生理化学講座）

2．脊髄神経細胞の発達における Helix－loop－helix transcription factors の役割について … 20
須田喜久夫、佐藤　潔
（順天堂大学・脳神経外科）

3．多能性神経幹細胞株における細胞の分化および多様性を制御する遺伝子群の発現…… 22
金子忠広[1,2]、中川康史[2,3]、貝淵弘三[1]、中村　俊[2]、中福雅人[1,2]
（[1]奈良先端大・バイオ、[2]国立精神神経センター・神経研、[3]東大医科研）

4．小脳形成期に特有なタンパク質の解析…… 24
内田和久[1,2]、中山　洋[1]、新開史子[1]、篠田友孝[1]、礒辺俊明[1]
（[1]東京都立大学、[2]協和発酵・東京研究所）

5．神経分化に関与する新規遺伝子 N16K の cDNA クローニング及びその解析 …… 26
斎藤祐見子、丸山　敬[1]、川島誠一
（東京都臨床医学総合研究所・遺伝情報、[1]国立生理学研究所・神経化学）

6．末梢ミエリン構成蛋白質 PASⅡ／PMP22 の機能解析 …… 28
武田泰生、宮崎唯雄、植村慶一
（慶応義塾大学・医学部・生理学教室）

7．ラット胎児脳に特異的に発現するタンパク質の解析…… 30
萩原民雄、青木和子、倉石　博、佐藤督忠、西垣　裕、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大学医学部第 1 生化学）

8．ラット胎児脳の可溶性画分に存在する Rho GDI 様タンパク質…… 32
青木和子、倉石　博、佐藤督忠、西垣　裕、萩原民雄、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大学・医・第 1 生化学）

9．ラット胎児脳可溶性画分に存在するサイクリン様タンパク質…… 34
倉石　博、青木和子、佐藤督忠、西垣　裕、萩原民雄、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大学・医・第一生化学）

10. ラット胎児脳に特異的に発現する35kDaタンパク質の解析 …… 36
佐藤督忠、青木和子、倉石　博、西垣　裕、萩原民雄、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大学・医・第一生化学）

11. ラット胎児脳に特異的に発現する40kDaのタンパク質の解析 …… 38
西垣　裕、青木和子、倉石　博、佐藤督忠、萩原民雄、竹田　稔
（昭和大学医学部第一生化学）

12. ハロセン麻酔による低体温老化ラットの髄液中神経化学物質濃度の検討…… 40
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）

13. ヒト剖検脳を用いた正常老人・脳血管性痴呆老人及びAlzheimer型痴呆老人におけるHCNP遺伝子発現量の検討…… 42
松川則之[1,2]、岡田秀親[3]、小鹿幸生[1]、東藤直樹[4]
（[1]名古屋市立大学第二内科、[2]野依福祉村病院・長寿医学研究所、名古屋市立大学分子研・生体高分子、[4]住友製薬総合研究所・創業第三研究所）

14. 細胞内に出現するAβについて…… 44
宇佐美美穂子、佐原成彦、森　　啓
（東京都精神医学総合研究所・分子生物学部門）

15. アルツハイマー病脳におけるニューロフィラメントの構成異常…… 46
中村　祐[1,2]、武田雅俊[1]、新川久義[3]、西村　健[1]
（[1]大阪大・医・精神、[2]小阪病院、[3]狭山病院）

16. ラット網膜および大脳皮質におけるカルレチニンおよびカルビンディンの加齢変化…… 48
山口知子、P. Papazafiri[1]、P. Podini[1]、J. Meldolesi[1]
（東京女子医科大学・生化学、[1]DIBIT San Raffaele Institute, Milano）

17. アルツハイマー型老年痴呆、アポリポ蛋白Eとエストロゲン…… 50
柏木知宏、本庄英雄、卜部　諭、岡田弘二、[1]林　正浩、[1]林　健蔵
（京都府立医科大学産婦人科、[1]奈良平城園）

18. タウはラットの組織で広く発現している…… 52
顧　擁軍、小山文隆、井原康夫
（東京大学医学部脳研病理）

19. アルツハイマー病脳の神経原線維変化に存在する燐酸化タウの脱燐酸化反応…… 54
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）

20. B型MAO阻害剤、deprenyl、の慢性投与による老齢マウス脳内の生化学的老化マーカーの変動…… 56
江頭　亨
（大分医科大学　薬理学教室）

21. 軽微な頭部頻回衝撃によるタウ蛋白の変化－Alzheimer病の病理過程との関連性－ …… 58
金山　巌、武田雅俊、新川久義、工藤　喬、西村　健
（大阪大学医学部精神医学教室）

22. アルツハイマー病脳上清におけるモノクローナル抗体Tau－1とPHF－1を用いた非PHFリン酸化タウの定量…… 60
以倉康充、工藤　喬、Inge Grundke－Iqbal[1]、Khalid Iqbal[1]、武田雅俊、西村　健
（大阪大学医学部精神医学教室）
（[1]New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities）

23. 無血清初代培養神経細胞における過剰リン酸化タウの発現と、低濃度オカダ酸の長期暴露による変化について…… 62
柏木雄次郎、工藤　喬、中村　祐、以倉康充、武田雅俊、西村　健
（大阪大学医学部精神医学教室）

24. ラットのrebound hyperphagiaに閉所ストレスを加えた時の摂餌行動と視床下部セロトニン代謝…… 64
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]三国丘病院、[4]浅香山病院）

25. ラットの時間制限給餌によるrebound hyperphagiaに閉所ストレスを加えた時の摂餌行動と側坐核ドパミン代謝…… 66
藤嵜泰利[1]、切池信夫[1]、井上幸紀[1]、栗岡政典[1]、奥野正景[1,2]、
伊藤英樹[1,3]、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）

26. トリのインプリンティング行動に関与する神経伝達物質の検索…… 68
塚田裕三、金松知幸、高原ひろみ、加藤久子
（創価大学・生命科学研究所）

27. 脳老化促進マウスの学習・記憶力及び免疫機能低下のaFGFによる防止 …… 70
大村　裕[1]、佐々木和男[2]、李　愛軍[3]、吉井春夫、深田有理子、
家後　壽[1]、遠山育夫[4]、花井一光[4]、木村　宏[4]、野村靖幸[5]
（日本臓器製薬（株）生物活性科学研、[2]富山大学工学部、[3]九州大学医学部、
[4]滋賀医科大学、[5]北海道大学薬学部）

28. *In vitro* 血液脳関門モデルの確立－アストロサイトによる物質透過性の変化－…… 72
磯部一郎、渡辺貴夫[1]、加藤泰治
（名市大・医・分子医研・生体制御、[1]同・薬・製剤）

29. K252a による培養小脳顆粒細胞移動抑制のメカニズム …… 74
田中聡一[1,2]、小林　聡[1]、林　謙介[1]、平井俊策[2]、白尾智明[1]
（[1]群馬大学医学部行動分析学、[2]同神経内科）

30. キネクチンの神経組織内分布…… 76
豊島　至、菅原正伯、加藤一麿、和田千鶴、正宗　研
（秋田大学医学部第一内科）

31. 亜鉛イオンによる UTP 応答の抑制作用…… 78
小泉修一、井上和秀
（国立衛生試験所・薬理）

32. 新規抗精神病薬 OPC－14597 のラット脳 substance P 神経系に及ぼす影響…… 80
井上敦子[1]、三木新也[1]、内田諭希[1]、菊地哲朗[2]、森田誠治[2]、仲田義啓[1]
（[1]広島大・医・総合薬・薬解、[2]大塚製薬・徳島新薬三研）

33. Pyridoxal phosphate－6－azophenyl－2', 4' －disulphonic acid（PPADS）はマウス脳シナプス膜における $\alpha\beta$ －methylene ATP 結合を増強する …… 82
堀　誠治、川村将弘、渡部和彦[1]、田中順一[1]、酒井　紀[2]
（東京慈恵会医科大学第 1 薬理、[1]同神経病理、[2]同第 2 内科）

34. CaMBP64 の分子的性質とその組織分布 …… 84
亀下　勇、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化学）

35. PC12h 細胞および初代培養神経細胞からの神経伝達物質の開口放出に対する抗 HPC－1 抗体の効果…… 86
九島洋一、山口和彦、藤原智徳、赤川公朗
（杏林大学　医学部　第二生理学教室）

36. 開口放出のプライミング・ステップに対する抑制調節…… 88
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）

37. マウス神経芽腫細胞における各種複合脂質の塩基へのグリシンの間接的関与の ^{15}N 安定同位体元素による解析…… 90
武富　保、上村敬一、倉橋　寿[1]
（信大・医・加齢適応研究センター・神経加齢、[1]松本歯大・薬理）

38. NMR－スペクトロスコピー法による^{13}C－ブドウ糖投与に伴うラット脳内アミノ酸代謝の研究…… 92
金松知幸、高原ひろみ、塚田裕三
（創価大学生命科学研究所）

39. サル末梢神経ミエリン糖蛋白質糖鎖の構造解析…… 94
北村邦男、坂本　安、吉村和法、渋谷匡子、寺田庄一、野村恭一[1]、野村正彦
（埼玉医大・第一生理、[1]神経内科）

40. グリオーマに対するOK－MC（OK－432－activated mononuclear cells）養子免疫療法におけるFas/Fas ligand系の関与 …… 96
戸田啓介[1,2]、白石哲也[1]、広津辰美[1]、福山幸三[1]、峯田寿裕[1]、田渕和雄[1]
（[1]佐賀医科大学脳神経外科、[2]同法医学講座）

41. ラット海馬からの［^{3}H］ノルアドレナリン放出－NO donorによる促進－ …… 98
佐藤壮一、村山俊彦、野村靖幸
（北海道大学薬学部薬効学講座）

42. 一酸化窒素（NO）誘発性［^{3}H］GABA放出機構 …… 100
大熊誠太郎、桂　昌司、陳　大志、栗山欣弥
（京都府立医科大学・薬理）

43. 拘束ストレス時におけるラット海馬アセチルコリン放出と血中エピネフリン、ノルエピネフリン、血糖の変化…… 102
田島稔久、遠藤英俊、鈴木祐介[1]、伊苅弘之[1]、井口昭久[1]、後藤峰弘[2]
（中部病院・老年科、[1]名古屋大学・老年科、[2]愛知医科大学・臨床検査）

44. ベラトリジン刺激アミノ酸系伝達物質放出のγ－アミノ酪酸による調節機構
－in vivo脳内微小透析法およびCa流入実験による検討－ …… 104
田中佐知子、土田晃敬、佐藤陽一、木内祐二[1]、小口勝司[1]、吉田武美
（昭和大・薬・毒物学、[1]医・第一薬理学）

45. 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（Ⅲ）：背側縫線核電気刺激の影響…… 106
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）

46. 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(Ⅳ)：5－HT_3受容体の役割 … 108
平野　均、山田通夫
（山口大学医学部神経精神医学講座）

47. ATP 感受性 K^+ チャンネルブロッカーの線条体ドパミン放出に及ぼす影響 …… 110
田中隆彦、吉田真美、横尾秀康、溝口克弘、長森　健、浜田直之、
富田　克、田中正敏
（久留米大・医・薬理）

48. Benzazepine 系薬物によるラット線条体の一過性 dopamine 遊離機構 …… 112
富山勝則、越川憲明、小林雅文
（日本大・歯・薬理）

49. 一酸化窒素による神経終末セロトニン取り込みの抑制作用…… 114
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）

50. フェレット腸管からのセロトニン脱顆粒と求心性迷走神経活動におよぼす強心配糖体の影響… 116
玉飼博之、小川隆志、浜上尚也、遠藤　泰、南　勝
（北海道医療大学薬学部薬理学教室）

51. 低張あるいは高張溶液灌流下における NMDA 誘発細胞外ドーパミン増加作用 …… 118
菅原　恵、芝軒信次、秦　英代[1]、石川紘一
（日本大学・医学部・薬理、[1]民生科学協会・総合研）

52. ラット海馬におけるドーパミンD_2型受容体の分布とその特性－in vitro レセプターオートラジオグラフィーによる [^{3}H]YM－09151－2 の結合部位について…… 120
横山ちひろ、岡村　均、井端泰彦
（京都府立医科大学・第二解剖）

53. ラット脳におけるドーパミンD 4 レセプター mRNA の分布－TTダイマー法による In situハイブリダイゼーション－…… 122
清水義雄、秋山一文、浜村貴史、小路武彦[1]、黒田重利
（岡山大学医学部神経精神医学教室、[1]長崎大学医学部第三解剖学教室）

54. ラット大脳皮質 NMDA 受容体イオンチャンネル活性化状態の多様性 …… 124
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]横浜市立大学大学院総合理学研究科・分子認識）

55. 初代培養神経細胞を用いた *in vitro* 実験系における $\sigma-1$ 受容体の薬理学的特性 …… 126
山本秀子[1]、山本敏文[2]、奥山　茂[3]
（[1]東京都精神研・精神薬理、[2]横浜市大・分子認識、[3]大正製薬・創薬研）

56. ラット前脳における CCK－B 受容体を介した神経伝達：Double－labeling in situ hybridization を用いた解析 …… 128
重吉康史、岡村　均、阿部廣巳[1]、井端泰彦、千原和夫[1]
（京都府立医大第二解剖、[1]神戸大学第三内科）

57. カルバコール刺激による白鼠上頸神経節内トランスグルタミナーゼ活性化に至る NO 情報伝達様式と SOD 酵素の関与 …… 130
安藤正人、立岔延族、楠戸正子、藤田公和、永田　豊
（藤田保健衛生大・医・生理）

58. C 6 細胞における hsp27 および α B クリスタリンのストレス応答：サイクリック AMP を介する修飾…… 132
加藤兼房、伊東秀記、長谷川かおり、稲熊　裕、小澤　修、浅野富子
（愛知県コロニー・研・生化）

59. C 6 細胞における hsp27 および α B クリスタリンのストレス応答：ホルボールエステルおよびオカダ酸による促進…… 134
加藤兼房、稲熊　裕、伊東秀記、長谷川かおり、浅野富子、小澤　修
（愛知県コロニー・研・生化）

60. C 6 細胞における hsp27 および α B クリスタリンのストレス応答：プロスタグランジンによる修飾…… 136
伊東秀記、稲熊　裕、長谷川かおり、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

61. 大脳皮質 β アドレナリン受容体－Gs－アデニル酸シクラーゼ情報伝達系機能調節へのビタミン B_{12} の関与…… 138
八田愼一、渡部正行[1]、小沢寛樹[1]、斎藤利和[1]、高畑直彦[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）

62. 小脳選択性を示す抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質…… 140
米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

63. PC12 細胞分化への Ca^{2+}／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ強制発現の影響と MAP 2 燐酸化反応 …… 142
田島和周、山本秀幸、小野常彦、宮本英七
（熊本大・医・第一薬理）

64. Sodium fluoride によるホスホリパーゼ C の抑制作用 …… 144
西田　朗[1]、福田裕恭[1,2]、清水雅美[1]、斎藤　浩[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）

65. 組換え型14－3－3蛋白質によるトリプトファン水酸化酵素活性化の分子機構 …… 146
市村　徹、内山順二、伊藤美津樹、堀米恒好、小俣三郎、国広沖之[1]、梶　裕之[1]、磯辺俊明[1]
（新潟大理学部化学、[1]東京都立大学理学部生物化学）

66. 新規ドーパミンD3、D4受容体アンタゴニスト YM－43611 の生化学的性質について …… 148
日高和幸、多田祥子、松本光之、山口時男
（山之内製薬株式会社・第一創薬研究所）

67. ラット脳内の末梢型ベンゾジアゼピン受容体の生後発達及びハロペリドール反復投与による変化 …… 150
車地暁生、兼子幸一、融　道男
（東京医科歯科大学医学部・神経精神医学教室）

68. ラット大脳皮質アストロサイトにおけるセロトニン受容体によるアデニル酸シクラーゼの活性化と抗うつ薬の慢性効果 …… 152
清水雅美[1]、西田　朗[1]、福田裕恭[1,2]、斎藤　浩[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）

69. 脳の転写因子（AP－1）と DNA 結合能におよぼす抗精神病薬の影響について …… 154
尾崎宜洋[1]、勝元栄一[1]、横谷　昇[2]、古塚大介[1]、山上　榮[1]
（[1]大阪市立大学医学部神経精神医学教室、[2]大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所）

70. ラット小脳内N－メチル－D－アスパラギン酸認識ドメイン DE NOVO 生合成のストレスによる促進 …… 156
韓大健[1]、荻田喜代一、米田幸雄
（[1]マリオン・メレル・ダウ株式会社開発研究所枚方センター、摂南大・薬・薬理）

71. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脊髄から得られた特異タンパク質の解析 …… 158
藤田公和、安藤正人、永田　豊、本多虔夫[1]、松井太衛[2]、千谷晃一[2]
（藤田保健衛生大・医・生理、[1]横浜市立市民病院、[2]総医研・医高分子）

72. Machado－Joseph 病の遺伝子変異の特徴 …… 160
丸山博文、中村重信、松山善次郎、川上秀史
（広島大学医学部第三内科）

73. ベル麻痺の原因ウイルスの同定 …… 162
村上信五、中城有喜[1]、土居孝至[1]、武田良平[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]神経精神医学教室）

74. アルコール中毒症発症機序におけるアデノシンの役割－アデノシンA1受容体遺伝子を導入したNG108－15細胞におけるエタノールの影響－ …… 164
浅井清文[1]、石井　晃[2]、Adrienne S. Gordon、Ivan Diamond
（Ernest Gallo Clinic and Research Center and Department of Neurology, University of California, San Francisco、[1]名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門、[2]浜松医科大学法医学教室）

75. Phencyclidine誘発行動の耐性および逆耐性発現における一酸化窒素の関与 …… 166
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）

76. メタンフェタミンおよびフェンサイクリジンの脳グルタミン酸トランスポーター（GLT－1）免疫活性に対する部位特異的効果…… 168
白川　治、梶本康雄、白井　豊、楊　常青、北村　登[1]、斎藤尚亮[2]、西野直樹
（神戸大学医学部・精神神経科、[1]神鋼病院・神経科、[2]神戸大学バイオシグナル研究センター・分子薬）

77. methamphetamine反復投与のphencyclidine誘発行動に及ぼす影響 …… 170
本藤久雄、中村　薫、中原辰雄[1]、松本　孝、堤　哲之、橋本喜次郎、河村幸佐、平野　誠、内村英幸
（国立肥前療養所・情動行動障害センター、[1]九州大学・理・化学教室）

78. 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 …… 172
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）

79. ラット脳内モノアミンおよびアセチルコリン濃度変化におけるイサチンの役割…… 174
浜上尚也、遠藤　泰、平藤雅彦、南　勝、富樫広子[1]、松本真知子[1]、斎藤秀哉[1]
（北海道医療大・薬・薬理、[1]北海道大・医・第一薬理）

80. 近交系マウスを用いた選抜育種による逆耐性モデル動物の作成；線条体におけるドパミン代謝の変化…… 176
盛政忠臣、千場純治[1]、金行孝雄[2]、庄盛敏廉
（岡山大学医学部神経内科、[1]同動物実験施設、[2]岡山県立大学）

81. ペンチレンテトラゾール誘発痙攣によるマウス大脳皮質プロテインキナーゼCの動態…… 178
古塚大介[1]、黒田陽子[1]、木岡哲郎、勝元栄一[1]、横谷　昇[2]、尾崎宣洋[1]、中西亜紀[1]、山上　榮[1]
（[1]大阪市立大学医学部神経精神医学教室、[2]大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所）

82. EL マウスにおける脳内 SOD 活性の発作履歴及び発達過程における変化 …… 180
村島善也、鈴木二郎[1]
（都精神医学研・神経生理、[1]東邦大学・医・精神医学）

83. キンドリングけいれん誘発ラットの海馬における AP－1 DNA 結合活性の経時変化 …… 182
柏原健一、佐藤圭子[1]、石原武士[2]、秋山一文[2]、庄盛敏廉
（岡山大学・神経内科、[1]国立療養所南岡山病院・臨床研究部、[2]岡山大学・神経精神科）

84. 発作間欠期の El マウス脳における AP－1 DNA 結合能と発作感受性との相関について …… 184
勝元栄一、尾崎宜洋、横谷　昇[1]、古塚大介、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）

85. パーキンソニズムを惹起する神経毒1, 2－dimethyl－6, 7－dihydroxyisoquinolinium ion のヒト脳内分布と生合成に関する研究…… 186
丸山和佳子[1]、高橋　勤[2]、直井　信[3]
（[1]名古屋大医学部神経内科、[2]江南女子短期大学、[3]名古屋工業大学）

86. Neuropeptide Y の中枢神経内 Dopamine Release に及ぼす影響と高血圧における意義について…… 188
津田和志、増山善明[1]、Menek Goldstein[2]
（和歌山県立医科大学循環器内科、[1]東京労災病院、[2]New York University Medical Center）

87. サイトカイン産生腫瘍のマウス脳転移モデルの作成について…… 190
中井真通、高内　茂、山口　徹、保田　稔、柿木達也、前田　潔、田中千賀子
（兵庫県立高齢者脳機能研究センター）

88. 遺伝的運動障害ラットの脳内モノアミン量およびそれらの代謝物の変動…… 192
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、[2]鈴鹿医科技大、[3]名大環医研、[4]藤田保衛大・医・生理）

89. 実験的小頭症ラット線条体のドーパミン及びその代謝物の変化：in vivo microdialysis 法による検討…… 194
田丸政男、平田ゆかり[1]、松谷天星丸[2]、永田　豊[2]
（鈴鹿医療大・医用工学、[1]藤田保健衛生大・医・法医、[2]同生理）

90. Nicotine 曝露に伴う脳内 diazepam binding inhibitor（DBI）mRNA 発現増強機序の解析・196
桂　昌司、大熊誠太郎、栗山欣弥
（京都府立医科大学薬理学教室）

91. 中枢神経系の幹細胞に強く発現しているRNA結合蛋白質 mouse－Musashiの同定と機能解析…… 198
榊原伸一[1,3]、今井貴雄[1]、小川正晴[2]、御子柴克彦[3]、岡野栄之[1]
（[1]筑波大・基礎医・分子神経生物、[2]高知医大・第2生理、[3]東大医科研・化学）

92. 海馬CA1錐体細胞によるNOSmRNAの発現…… 200
遠藤光敏、植村研一
（浜松医科大学　脳神経外科）

93. Deletion mutant RNAを内部標準に用いたRT－PCR/HPLCによる組織中微量NGFmRNAの定量法の開発…… 202
清水博喜、黒木　淳、荒川義弘、山西嘉晴
（エーザイ株式会社・筑波研究所）

94. 抗うつ薬連投によるセロトニン2C受容体mRNA発現 …… 204
東田道久、渡辺裕司
（富山医科薬科大学・和漢薬研究所・生物試験部門）

95. グルタミン酸レセプター活性化で誘起される遺伝子発現カスケードの解析…… 206
津田正明、佐野訓明
（岡山大学・薬学部・微生物）

96. γ－ヒドロキシ酪酸によるマウス小脳顆粒細胞初代培養系の核内CREおよびAP－1 DNA結合活性増加におけるCa^{2+}の関与…… 208
石毛久美子、伊藤芳久、福田英臣
（日本大・薬・薬理）

97. 低酸素・再酸素化により発現誘導される新規RNAスプライシング調節因子
－アストロサイトのin vitro低酸素モデルを用いて－ …… 210
松尾徳幸[1,5]、小川　智[2]、今井祐二[4]、高木　勉[4]、山下俊英[3]、
甲村英二[3]、早川　徹[3]、遠山正彌[1]、和中明生[1]
（大阪大学医学部　[1]第二解剖、[2]第一内科、[3]脳神経外科、[4]分子脳機構(田辺)、[5]大日本製薬）

98. 1本鎖CRE結合蛋白質（ssCRE－BP）のDNA結合活性を増加させる因子について …… 212
大杉　武、丁　　云、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

99. ラット・ヒポカルシンのゲノム遺伝子の解析…… 214
小林正明、斎藤茂治、黒木貴夫[1]、斎藤　優、野口鉄也、高松　研
（東邦大学・医学部・第二生理、[1]第一脳外）

100. トランスジェニックフィッシュによるNecdin遺伝子プロモーター活性と神経特異発現の検討・216
郭　哲輝、金　哲熙、田中秀和、植月太一[1]、吉川和明[1]、岡本　仁[2]、三木直正
（大阪大学・医・薬理、[1]大阪大学・蛋白研、[2]慶応大・生理）

101. アデノウィルスを介したラット脳内へのドパミンD２受容体の遺伝子移入…… 218
伊苅弘之、Mastrangeli A[1]、加藤修一[3]、Zhang L[2]、Chenak JM[2]、kuo H[2]、Crystal RG[1]、Ingram DK[2]、Roth GS[2]
（名古屋大学医学部老年科、[1]Cornell University Medical School, [2]National Institute on Aging／NIH, [3]山形大学第一内科）

102. Z型Myc配列を認識する核内蛋白質の探索 …… 220
荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大学・薬・薬理）

103. ヒト肝臓GTP cyclohydrolase Ⅰの精製と性質 …… 222
坂本秀生、藤田　興、池亀　守[1]、永津俊治[2]、葛谷博磁
（藤田保健衛生大学・総医研・分子生物学、[1]短期大学・生体機能代行装置学、総医研・神経化学）

104. ２次元ゲル小脳タンパク質データベース構築のための新しいタンパク質構造解析法…… 224
中山　洋[1]、内田和久[1・2]、田岡万悟[1]、金井みち子[3]、瀬田和夫[1]、磯辺俊明[1]、篠田友孝[1]、奥山典生[4]
（[1]東京都立大学理学部、[2]協和発酵東京研究所、[3]フィニガンMAT、[4]神奈川歯科大歯科生体工学）

105. ２次元電気泳動や２次元HPLCとMALDI－TOF質量分析法を組み合わせた脳のタンパク質のマッピング…… 226
瀬田和夫、中山　洋、磯辺俊明、Arnd Ingendoh[1]、金井みち子[1]、奥山典生[2]
（都立大・理、[1]フィニガンMAT、[2]神奈川歯科大・生体工学）

106. マウス間脳神経細胞におけるアロマターゼ発現調節機構の解析…… 228
堂前純子[1]、田中　亮[1]、原田信広[2]
（[1]名市大・医・生化Ⅰ、[2]藤田保衛大・総医研・分子遺伝）

107. ラット小脳初代培養神経細胞に特異的に発現されるガングリオシドの解析…… 230
川島育夫、永田　功[1]、田井　直
（都臨床研・腫瘍免疫、[1]都神経研・細胞生物）

108. 縦隔悪性腫瘍の患者血清に認められた抗神経細胞抗体の抗原分布とその特異性…… 232
吉村和法、金子　厚[1]、山室　裕、細川　武[1]、北村邦男、濱口勝彦[1]、野村正彦
（埼玉医科大学・第一生理、[1]神経内科）

109. グルタチオンS－トランスフェラーゼ（GST）融合蛋白質として発現させたグルココルチコイドレセプターに対する抗血清の作製…… 234
森本昌史、森田規之、河田光博
（京都府立医科大学・第一解剖）

110. E2F及びE1Aの発現によって誘発される成熟神経細胞のDNA合成能について…… 236
須田喜久夫、佐藤　潔
（順天堂大学・脳神経外科）

111. ラット顔面神経切断により誘導される顔面神経核のプラスミノーゲンアクチベーターについて・238
中嶋一行、Martin Reddington[1]、高坂新一、Georg W. Kreutzberg[1]
（国立精神・神経センター，神経研，代謝，[1]Department of Neuromorphology, Max－Planck Institute of Psychiatry）

112. グリオーマにおけるp53とCdk阻害蛋白質（p16, p21）の免疫組織化学的検索 …… 240
白石哲也、井上崇文、福山幸三、戸田啓介、田渕和雄
（佐賀医科大学　脳神経外科）

113. 過剰なNa^+流入による培養上頸神経節細胞のアポトーシスの機構 …… 242
小池達郎、中山　恒、小田　毅、田中秀逸
（北大院理行動知能学、佐賀医科大）

114. 培養上頸神経節細胞のアポトーシスのCa^{2+}による制御…… 244
中山　恒、信川貴子、小池達郎
（北大院理行動知能学）

115. ミエリン形成前過程におけるシュワン細胞のアポトーシス…… 246
中尾純治[1]、村瀬真一[2]、篠田　純[1]、川村光毅[2]、植村慶一[1]
（[1]慶應義塾大学医学部・生理学教室、[2]解剖学教室）

116. ラット中枢神経系由来神経芽細胞腫、B50とB104、で観察されたアポトーシスについて …… 248
久永真市、岸本健雄
（東京工業大学・生命理工学部）

117. 脳虚血負荷による脳内Activator protein 1の変動 …… 250
東　泰孝、荻田喜代一、米田幸雄、章　龍[1]、柳瀬尚人[1]、三谷　章[1]、片岡喜由[1]
（摂南大・薬・薬理、[1]愛媛大・医・第一生理）

118. タイプI－NO合成酵素選択的阻害剤：δ－(S－methylisothioureido)－L－norvalineはラット一時的局所脳虚血後の梗塞巣を縮小する…… 252
武藤　厚、杉山昌一、長藤寿昭、牧野俊彦、松居　徹[1]、宮内達雄、名畑博之
（中外製薬（株）富士御殿場研究所、[1]埼玉医大総合医療センター脳外）

119. 脳虚血時のヒトグルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の逆行性輸送について…… 254
山下拓史、川上秀史、張　玉祥、中村重信
（広島大学医学部第三内科）

120. 慢性脳血流低下による神経軸索とミエリンの経時的変化…… 256
車谷隆宏、武田雅俊、工藤　喬、以倉康充、西村　健
（大阪大学・精神医学教室）

121. グルタミン酸細胞死と活性酸素種…… 258
安井裕子[1]、馬渡一浩[2]、本間啓子[2]、加藤　聖[1]
（[1]金沢大・医・神経情報研伝達、[2]金沢大・医療短大・衛生）

122. 遅延性神経細胞死における神経成長因子受容体の関与…… 260
板野俊文、政田哲也[1]、徳田雅明[2]、松井秀樹[2]、長尾省吾[1]、畠瀬　修[2]、
村上哲英
（香川医科大学、生物学、[1]脳神経外科学、[2]生理学）

123. 過酸化水素の Glioma 細胞障害活性に及ぼす細胞内グルタチオン濃度の影響 …… 262
飯田昌孝、松本　清、坂上　宏[1]、竹田　稔
（昭和大学・脳神経外科、[1]第１生化学）

124. 培養アストロサイトカルシウムパラドックス障害における $Na^+ - Ca^{2+}$ 交換系の役割 …… 264
田熊一敞、松田敏夫、橋本　均、浅野省一、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

125. ラット大脳皮質におけるニューロトロフィンとその受容体蛋白質の発現…… 266
福光秀文、古川美子、古川昭栄
（岐阜薬科大学分子生物）

126. BDNF による小脳顆粒細胞アポトーシス抑制の細胞内機構 …… 268
久保武一、野々村健、小島正己、榎戸　靖、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

127. ラットの生後発達に伴う脳のニューロトロフィン－３の変化…… 270
仙波りつ子、加藤兼房
（愛知県コロニー・研究所）

128. レチノイン酸およびニューロトロフィンによる trk レセプター発現変化…… 272
小林三和子、栗原堅三、松岡一郎
（北海道大学・薬・薬剤学）

129. プロサポシンの末梢神経再生促進作用のターゲット神経細胞…… 274
小谷泰教[1]、松田正司[2]、阪中雅広[2]、近藤啓次[1]、上野修一[1]、佐野　輝[1]
（愛媛大・医・[1]神経精神、[2]第2解剖）

130. ウシ脳 ConA 結合性糖タンパク質中に存在する強疎水性タンパク質とその PC12 細胞に対する影響…… 276
石岡憲昭、佐藤淳子
（東京慈恵会医科大学医科研・生化学）

131. 可溶性 Myelin－associated glycoprotein（MAG）の神経突起伸展促進作用…… 278
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）

132. フローサイトメトリーで分取した胎仔脳ニューロン前駆細胞に対する成長栄養因子の影響…… 280
山之端万里、村田康子、塚田裕三
（創価大学・生命科学研究所）

133. カイニン酸投与後におけるラット脳内 HGFmRNA 発現について …… 282
金澤美穂[1]、俣賀宣子[2]、仙波純一[1]、三浦理絵[3]、深間内文彦[2]、中村敏一[4]、鬼頭昭三[1]
（[1]放送大学、[2]東京医科歯科大学難治疾患研究所、[3]Royal Free Hospital School of Medicine、[4]大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター）

134. Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide（HCNP）Processing Enzyme の部分精製…… 284
大塚康史、小鹿幸生
（名古屋市立大学・第二内科）

135. 抑制性サイトカインによるミクログリアのサイトカインレセプターの発現抑制…… 286
澤田　誠、錫村明生、丸野内棣
（藤田保健衛生大総医研応用細胞）

136. 培養神経細胞における上皮増殖因子（EGF）のリン酸化シグナル解析 …… 288
山田雅司、榎戸　靖、池内俊彦、畠中　寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成部門）

137. クリングル構造を持つ神経栄養因子…… 290
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）

138. 脳ファシンの解析：アクチン線維結合・束化能に及ぼすドレブリンの影響…… 292
佐々木洋、林　謙介[1]、白尾智明[1]、石川良樹、小浜一弘
（群馬大学医学部薬理、[1]同・行動分析）

139. アクチン結合蛋白ドレブリンAによる細胞骨格および細胞接着の変化…… 294
池田圭朗[1,2]、白尾智明[3]、戸谷重雄[2]、植村慶一[1]
（慶應義塾大学・医・生理、[1]脳神経外科、[2]群馬大学・医・行動分析）

140. 開口放出機構におけるアクチン・ネットワークの役割…… 296
今泉美佳、御園生裕明、池田　顕、熊倉鴻之助
（上智大学・生命科学研究所・神経化学）

141. バナジン酸によるアストロサイト細胞骨格アクチンの再構成…… 298
小山　豊、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

142. ラットアストロサイトの細胞骨格に対するガングリオシドの作用…… 300
伊藤仁一、磯部真理
（名古屋市立大学医学部・生化学Ⅰ）

143. 分裂病患者死後脳左上側頭回における細胞骨格蛋白 fodrin の非対称性変化 …… 302
北村　登[1]、西野直樹、梶本康雄、白井　豊、楊　常青、小牟禮　修、
橋本健志[2]、白川　治
（[1]神鋼病院・神経科、[2]兵庫県立高齢者脳機能センター、神戸大学医学部・精神神経科）

144. プロリン指向性蛋白質燐酸化酵素による MARCKS と MAP 2 の燐酸化反応 …… 304
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、東京工業大学・生命理工）

145. ラットグリオーマC 6 細胞における容量性 Ca^{2+} 流入について…… 306
竹村晴夫、井本憲志、坂野晶司、八田慎一、大鹿英世
（札幌医科大学医学部薬理学教室）

1 胚性腫瘍細胞の神経細胞分化における β-Citryl-L-Glutamateの変動

楢原正則*、岩佐朱美、濱　尭夫、三宅正治
(神戸学院大学薬学部生理化学講座)

〔要約〕
[要約]
β-Citryl-L-Glutamate (以下、β-CG) は、幼若ラット脳内に高濃度存在し、神経細胞の分化に伴って変動することから神経細胞分化に関与するのではないかと推定してきた。そこで、胚性腫瘍細胞の一種であるP19細胞をレチノイン酸で神経系の細胞に分化させ、これにβ-CGが関与するのか検討した。まずβ-CGに特異的な抗体を作製し免疫組織化学的検討を行ったところ、神経細胞のみに特異的に存在することがわかった。また、P19細胞内のβ-CG濃度はP19が神経細胞に最も多く分化する時期に一致して高濃度となった。以上よりβ-CGは、神経細胞の分化、成長に何らかの役割を果たしていることがより強く示唆された。

[目的]
これまでの研究により、β-CGは神経細胞[1]を始めとして、精子細胞[2]、水晶体細胞[4]それぞれの細胞が分化成長する時期に一致して各々の組織で高濃度となることを明らかにしてきた。また、β-CGを特異的に分解する酵素も単離し、脳においては、このβ-CG水解酵素活性が上昇するにつれて、脳内β-CG濃度が減少することも確認した[3]。これらのことより、β-CGは、脳、精巣、レンズ各組織の成熟過程において重要な役割を担っていると予想されるが、いまだその真の生理作用は不明である。そこで今回、最近神経系の発生のモデルとして注目されている胚性腫瘍細胞P19を用いて、神経系の細胞分化にβ-CGがどの様に関与するのか検討した。

[実験方法]
β-CGをBovine Thyroglobulinに縮合させ、ハプテン・キャリアー抗原としてウサギに免疫し抗血清を得た。この抗血清は常法に従いγ-グロブリン分画とし、β-CGをリガンドとしたβ-CG-Sepharose4B アフィニティーカラムで精製した。さらにβ-CGと類似の構造を持ち、生体内にその存在が確認されいる物質を混合リガンドとしたAffigel 15により不要な抗体を吸収精製した。この抗体のβ-CGに対する特異性はELISAにより確認した。
胚性腫瘍細胞P19は常法に従い、レチノイン酸を含む培地で4日間培養し神経系の細胞へ分化誘導を行った後、レチノイン酸を含まない培地で12日間培養を行い、特異的β-CG抗体を用いて神経細胞やグリア細胞が出現してくる培養4、7、9日目の細胞について、免疫組織化学的検索を行った。さらに経時的にβ-CGを部分精製し、HPLCを用いて定量を行った。

[結果と考察]

免疫3カ月後に比活性の高い抗血清が得られた。これを精製し、ELISAで特異性を検討したところ、β-CGのみに特異的に反応するポリクローナル抗体が得られた。分化誘導したP19に対して、このβ-CG特異的抗体を用いて免疫染色を行ったところ、グリア細胞は染色されず、神経細胞のみに特異的な染色が見られ、なかでも突起がより濃く染まっていた(図1)。また、HPLCによるβ-CGの定量の結果、β-CGはP19が神経系の細胞に分化するのに一致して一過的に高濃度となり、その後減少することがわかった。これは、これまでに様々な哺乳動物の脳内β-CG含量を測定した結果と一致するものであった。

以上のことよりβ-CGは神経細胞内に存在し、脳内での神経細胞の分化、成熟過程に何らかの形で生理的役割を果たしているのではないかと推定された。また、最近注目されている胚性腫瘍細胞P19が神経系の細胞の発生分化におけるβ-CGの役割を検討するよいモデル系であることが判った。

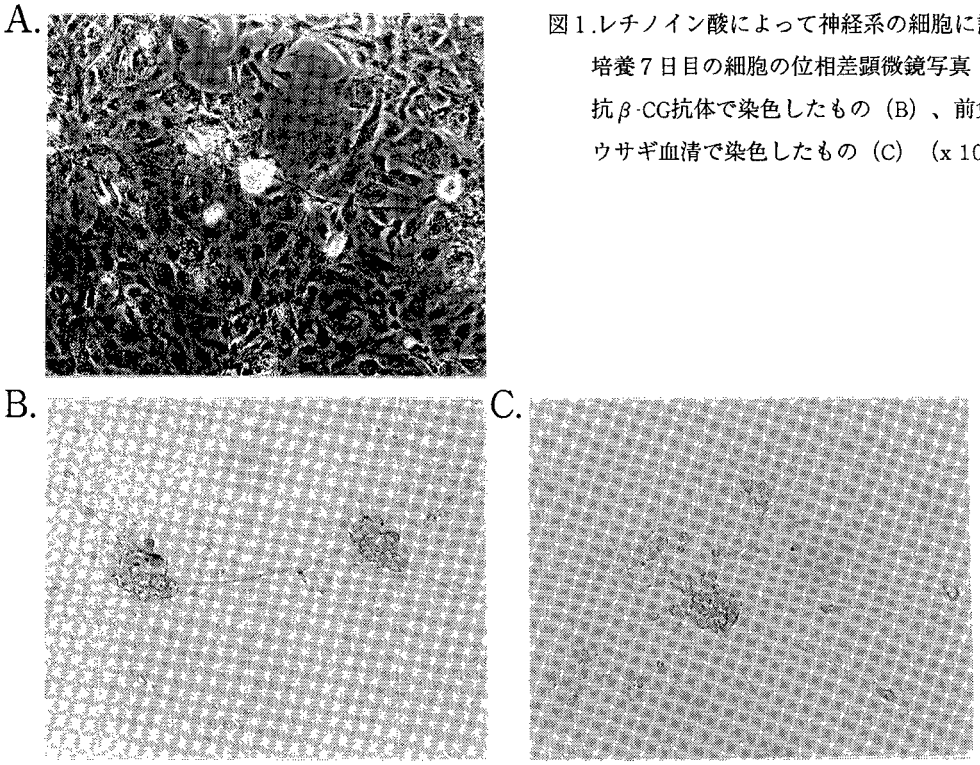


図1.レチノイン酸によって神経系の細胞に誘導後、培養7日目の細胞の位相差顕微鏡写真(A)、抗β-CG抗体で染色したもの(B)、前免疫ウサギ血清で染色したもの(C) (x 100)

[引用文献]

(1) Miyake M. et al. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.* 544, 656-666.

(2) Miyake M. et al. (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* 719, 495-500.

(3) Miyake M. et al. (1992) *J. Neurochem.* 59, 1654-1660.

(4) Tsumori M. et al. 未発表

2 脊髄神経細胞の発達におけるHelix-loop-helix transcription factorsの役割について

須田喜久夫、佐藤　潔
（順天堂大学　脳神経外科）

〔要約〕

Basic helix-loop-helix (HLH) transcription factorsは無脊椎から脊椎動物における筋肉及び神経形成の制御に関連する重要な因子と考えられている。2種のclass A basic HLH transcription factor GE1, GE12 (GEs)がchick embryoの神経管から同定され、その発現がmotoneuronsではなく、interneuronsのみに認められた。これらのGEsの発現を同時にantisense oligonucleotidesによって抑制すると、分化したinterneuronsの細胞死が生じたが、cell cycleあるいはDNA合成に対してはその影響は認められなかった。一方、個々にこれらのGEsの発現を抑制しても全くその効果は認められなかった。以上の結果よりGEsは神経管の神経細胞において、その分化の初期を制御するとともに、GEsも含めたb-HLH transcription factors間においては機能的余剰が存在している可能性が示唆された。

【目的】神経管の発達においては、神経上皮細胞が分裂の過程を経て神経芽細胞となり、さらに、時間的、空間的な発生秩序に基づいてmotoneuronやinterneuronへと異なった神経細胞へ分化していくが、この神経管発達形成過程を制御する分子生物学的メカニズムは未だ明らかにされていない。b-HLH transcription factorは無脊椎から脊椎動物における筋肉及び神経形成の制御に関連していると思われる (1, 2) が、最近、我々はchick の神経管よりclass A b-HLH transcription factors cDNAs (GE1, 12) (GEs)をPCR法によってisolateし、その局在も*in situ* hybridizationにて確認した。即ち、neurogenesisのpeakに当たるday3の神経管において、GE1, GE12ともcell cycleのS期に入ったcell及び分化し始めたcellが存在するventricular zoneのdistal regionにhigh levelに発現しており、motoneuronが存在するintermediate zoneのventrolateral regionにはGEsの発現が認められないことより、GEsは分裂あるいは分化し始めたinterneuronに発現するものと考えられた(4,6)。本研究ではこのGEsの発現を抑制する目的でGEsに対するantisense oligonucleotides (antisenseと称す)を神経管 から単離したdissociated cells cultureに投与し、神経細胞の分裂、分化が如何に修飾されるかを検討した。

【対象・方法】ふ卵3日目のchick embryの神経管から細胞群を単離せしめ、EGFを含んだ無血清培地下で培養した。BrDU(10μM)はplatingと同時に24時間添加し、また、antisense(50μM)は6時間毎に投与し、1)培養48時間後にこれらの細胞を固定し、anti-BrDU、anti-neurofilament (NF) MAbを一次抗体とした二重染色(3)にて神経細胞の分裂、分化を検索した。また、培養24時間後にこれらの細胞を固定し、2)^{3}H-thymidine incorporation assayにてDNA合成が、そして、3)flow cytometryにてcell cycleが如何に修飾されるかも併せ検討した。さらに、4)すべてのclass A bHLH transcription factorsに対し、binding siteを有するimmunoglobulin enhancer κE2 sequenceをもつradiolabeled oligonucleotidesをcontrolあるいはantisenseを6時間毎に24時間添加した培養細胞のextractions中に加え、Scholerら(5)の方法に準じてelectrophoretic mobility shift analysis (EMSA) を施行し、GEsの合成をblockするか否かantisenseの有効性を確認した。

【結果】antisense は6時間ごとに5回投与された結果、GE1, GE2, GE12のHLHregionにあるsequenceに相補的なantisense GEa1, GEa2, GEa3の投与は約20%のdouble labeled cellsの減少をもたらしたが、control群そして、GE1及びGE12に特異的なantisense (GE1a1, GE1a2, GE12a1, GE12a2)を投与した群ではdouble labeled cellsの減少は認められなかった(Fig.1,2)。しかし、thymidine assayにおいては、antisense 投与群では、細胞数はcontrol群に比し、著明に減少したが、control群と同様にDNA合成に関しては全く影響を受けなかった。また、flow cytometryではantisense 投与群では、cell cycleのどのphaseにおいてもその細胞数に関し、

control群との間に統計学的な有意差は認められなかった。また、EMSA法の結果においては、control群ではa, b, cと３つのDNA-protein complexesがdetectされているが、HLH regionに相補的なantisenseの投与によってこれらのDNA-protein complexesは著明に減少した(Fig. 3)。

【結論】antisenseを用いてGEsの発現抑制を試みた結果、培養48時間後にはdouble labeled cellsの減少が認められたが、培養24時間後には、それら培養細胞の細胞数は減少したが、DNA合成及びcell cycleに関しては影響は認められなかった。以上の結果を踏まえると、GEsの発現を抑制することによって、interneuronsへと分化し始めているpost-mitoticな細胞が細胞死へと導かれると考えられた。そして、一つのclass A bHLH transcription factorの発現を抑制しても神経管構成細胞の発達に何の障害ももたらさず、すべてのGEsの発現を同時に抑制すると細胞死が生じるということは、神経形成期におけるclass A bHLH transcription factorsにおける機能的余剰の存在も示唆された。これらの結果よりGEsは神経管の神経細胞の分化を制御する重要な因子であると考えられ、今後、この因子の動態を解明することが、脊髄破裂等の神経管発生異常に対する遺伝子レベルでの病態究明につながるものと推察された。

【文献】

1. Campos-Ortega J.A. and Jan Y.N. (1991) Annu. Rev. Neurosci 14: 399-420.
2. Johnson J.E, Birren S.J, Anderso, D.J. (1990) Nature 346: 858-861.
3. Nakane P.K (1968) J. Histochem. Cytochem 16: 557-563.
4. Neuman T, Keen A, Knapik E et al. (1993) Eur. J. Neurosci 5: 311-318.
5. Scholer HR, Balling R, Hatzopoulos AK et al. (1989) EMBO J 8: 2551-2557.
6. Suda K, Nornes HO and Neuman T. (1994) Neurosci letter 177: 87-90.

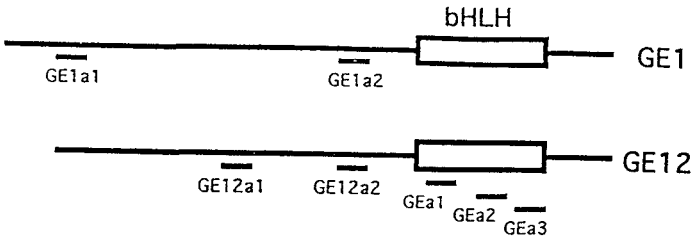


Fig. 1

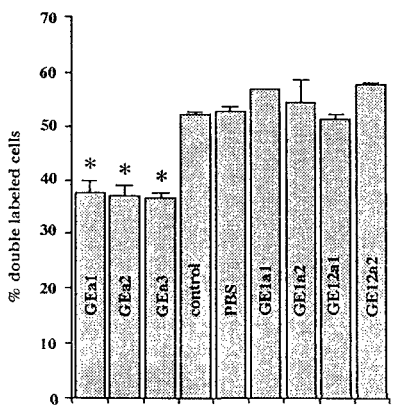


Fig. 2

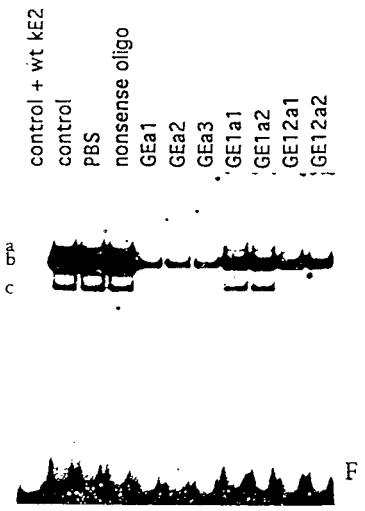


Fig. 3

3 多能性神経幹細胞株における細胞の分化および多様性を制御する遺伝子群の発現

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

[要約] ラット胎児脳の神経上皮組織より樹立した多能性神経幹細胞由来の細胞株を用いて、その増殖および分化を制御すると考えられる遺伝子群の発現をノザン解析法およびRT-PCR法により検討した。もちいた神経幹細胞株はいずれも神経細胞の分化に重要な役割を果たしていると推測されている、*MASH1, E47, HES1, HES5, Id1, Notch1, Notch2* などを発現していた。さらに、発生期の前脳あるいは中脳領域において部位特異的に発現する一連のホメオボックス遺伝子の発現を解析したところ、*Otx1, Emx2, Dlx-1* 遺伝子はいずれの細胞株においても共通して発現している一方、*Pax* 遺伝子群については、個々の細胞株がそれぞれ異なる *Pax* 遺伝子を発現していることが明らかとなった。このように発生過程の神経系において"位置情報"として機能すると考えられる遺伝子の発現が個々の神経幹細胞において異なるという知見は、神経回路網形成の基盤となる脳の領域特異的な細胞分化の制御が、神経細胞の分化以前の幹細胞の段階ですでに行なわれていることを示唆するものと考えられる。

[序言] 我々はラット胎児脳の神経上皮組織より樹立した多能性神経幹細胞由来と考えられる培養細胞株を用いて、その増殖および分化の機構についての解析をおこなっている。もちいた細胞株はいずれも特定の培養条件下に中枢神経系の主要な3種類の細胞系列であるニューロン、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する多分化能を保持している（昨年度本大会で発表）。本研究ではこれら樹立神経幹細胞株をもちいて、幹細胞からのニューロン／グリアへの分化、あるいは脳の領域特異的な分化を制御すると考えられる各種遺伝子の発現を解析した。

[実験材料と方法] 5種類の神経幹細胞株 (MNS-8, MNS-57, MNS-70, MNS-71, MNS-92) はいずれも、ラット胎児 (E12) 前脳および中脳部分の神経上皮細胞の初代培養細胞に、ヒト c-Myc とエストロゲン受容体との融合タンパク質をコードする遺伝子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、これら細胞株が単一細胞由来であることが確認されている。各種遺伝子の発現は、細胞株より調整したRNAサンプルをもちいたノザン解析法およびRT-PCR法により検討した。

[結果と考察] 本研究においてもちいた神経幹細胞株はいずれも、*in vivo* の神経上皮組織において発現が認められ神経幹細胞の分化に重要な役割を果たしているものと推測されている、HLH型転写因子遺伝子の一群である *MASH1, E47, HES1, HES5, Id1*, あるいは膜貫通型受容体分子である *Notch1, Notch2* などを発現していることが明らかになった。またMNS-8細胞をもちいて、幹細胞からのニューロン／グリアへの分化に伴うこれら遺伝子の発現変化を解析したところ、*Id1* 遺伝子の発現が分化誘導に伴って著明に減少するのに対して、*E47, Notch1, Notch2* 遺伝子の発現は逆に増加していた。現在これら遺伝子の分化誘導における役割を明らかにするため、幹細胞における遺伝子の過剰発現あるいは発現抑制の効果を検討中である。次に、発生過程の脳において特定の部位に発現するホメオボックス遺伝子の発現を解析した。もちいた細胞株においては前脳あるいは中脳領域において発現する *Otx1, Emx2, Dlx-1* などの遺伝子が共通して発現していた。またホメオドメインと共にペアードドメインを有する *Pax* 遺伝子群について調べたところ、MNS-8, MNS-57 細胞においては *Pax-6* が強く発現し *Pax-3* は発現しておらず、逆にMNS-71細胞においては *Pax-3* が強く発現し *Pax-6* の発現は弱かった。またMNS-8細胞は *Pax-6* とともに *Pax-5* を発現しており、MNS-70, MNS-92 細胞においては、*Pax-3, Pax-5, Pax-6* いず

れの発現も非常に弱いか検出感度以下であった。すなわち今回解析した神経幹細胞株においては、個々の細胞株がそれぞれ異なる *Pax* 遺伝子の発現パターンを有することが明らかとなった。このように単一細胞由来のクローナルな神経幹細胞株において、それぞれ特定のセットのいわゆる"位置情報遺伝子"が発現しているという結果は、脳の発生において神経管形成後早期の神経上皮組織に存在する幹細胞の段階で、すでに脳の領域特異的な細胞分化の制御が行なわれていることを示唆するものと考えられる。従って本研究でもちいた神経幹細胞株は、神経回路網形成の基礎である神経細胞の多様性獲得の初期過程の分子基盤を解析していくためのモデルとなりうることが期待される。

[結語] 我々が樹立した多能性神経幹細胞由来の培養細胞株は、ニューロン／グリアへの分化、あるいは脳の領域特異的な細胞分化を制御すると考えられる各種遺伝子群を発現していることが明らかとなった。これら遺伝子の機能を詳細に解析するモデル系となることが期待される。

図１　多能性神経幹細胞株におけるMASH1, HES-1/5, Notch1, Notch2の発現。５種類の細胞株についてRT-PCR法により解析した。

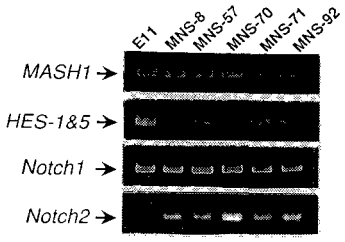


図２　多能性神経幹細胞株における各種領域特異的遺伝子の発現。

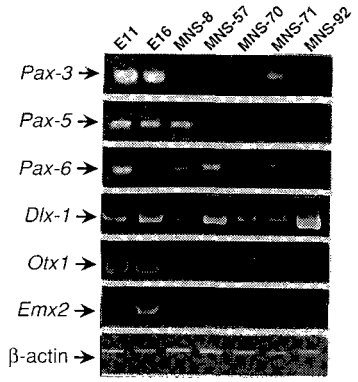
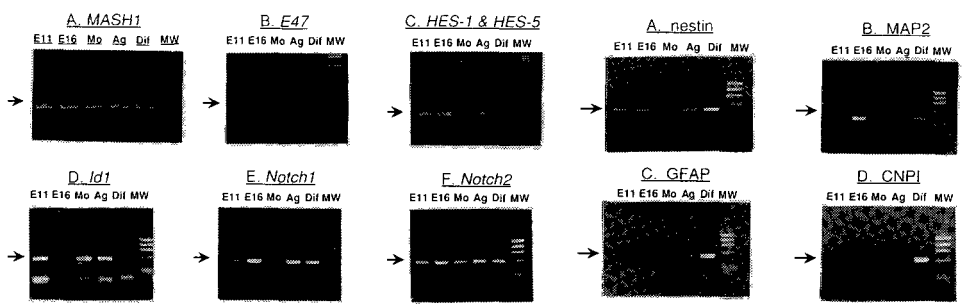


図３　MNS-8細胞における各種遺伝子の発現パターンの比較。
パネル１：MASH1, E47, HES, Id1, Notch1, Notch2の発現、パネル２：nestin, MAP2, GFAP, CNPIの発現



4 小脳形成期に特有なタンパク質の解析

内田和久[1,2]、中山　洋[1]、新開史子[1]、篠田友孝[1]、礒辺俊明[1]
（[1]東京都立大学、[2]協和発酵・東京研究所）

〔要約〕　中枢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、２次元電気泳動法で検出された４００種類のラット小脳タンパク質の成熟過程での変動を解析し、小脳形成過程に特有なタンパク質を１６種類検出した。これらのタンパク質をプロテアーゼ消化して得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。同定された１０種類の蛋白質のうち9種類は既知の蛋白質であった。これらの蛋白質のなかには、顆粒細胞の分化に関与するlipid-binding protein や、PKC や MAPKinaseの細胞内基質でもあるMARCKS、リンパ球の増殖制御に関与するリン酸化型、非リン酸化型の stathmin などが含まれる。これらの蛋白質は多種多様な組織や細胞で発現し、細胞の増殖や分化、組織形成などでの機能が推定されるシグナル伝達系の蛋白質であった。

はじめに　小脳は発生学的、解剖学的、電気生理学的知見が豊富で、ｹﾞｯ歯類では主に出生後に発生が進むことが知られており、哺乳動物の中枢神経系の形態形成を分子レベルで理解するのに適した系である。そこで、我々はその分子機構を明らかにするために、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できる点で優れている。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LANP（V-2）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てきた（2,3）。本報告では2次元電気泳動法を用いて、より系統的な検索を行った。

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。8M尿素を含む緩衝液でタンパク質を抽出し、変性剤存在下で２次元電気泳動し、泳動像を比較して、生後からおおよそ成熟が完了する21日のあいだにだけ存在するタンパク質を検出した。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　小脳の形成過程に特有な16種類のタンパク質とタンパク質を、生後から成体なるまで発現が持続するタンパク質の一部とともに表に示した。解析した１０種類の蛋白質スポットのうち９種類は既知蛋白質であった。顆粒細胞の分化に関与する Lipid-binding protein（ｽﾎﾟｯﾄ３）や細胞内のシグナル伝達経路の重要な要素であるMAPKinaseやPKCの基質であるMARCKS（ｽﾎﾟｯﾄ　１２及び１３）のほか、組織の腫瘍化により発現量の増加が知られているstathmin（ｽﾎﾟｯﾄ１、２）や ubiquitin C-terminal hydroxylase （ｽﾎﾟｯﾄ４）など、いずれも細胞周期の制御にかかわる蛋白質であった。また、MARCKS では小脳の成熟過程でのリン酸化修飾の変化が観察されたのに対して、stathmin のリン酸化の程度は成熟過程を通じてほぼ一定であった。また、Lipid-binding proteinとubiquitin C-terminal hydroxylaseに関して、脳での特異的な発現が報告されているが、他のタンパク質は多種多様な組織の増殖分化過程でも発現していた。さらに、小脳の形態形成に関する機能を評価することで、これらのタンパク質の形態形成の分子機構における役割が明らかにできると考えられる。

No.	名称	同定法	参考文献
小脳形成期に特有なタンパク質			
1	stathmin	ENREAQMAAKLERLREK	(4)
2	stathmin	ESVPEFPLXPPKK	
3	Fatty-Acid Binding protein	VVIRTQATXK ,LVDYQNFDEYMK	(5)
4	解析中		
5	ubiquitin C-terminal Hydorolase	MQLKPMEINPE-	(6)
6	解析中		
7	parathymosin	SVEAAAELSAK	(7)
8	LANP(V-2)	2D-PAGE	(3)
9	新規蛋白質		
10	解析中		
11	解析中		
12	myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)	QEAAAAPEPGAATADK AEEPAPGATADDAPSAAGPE	(8)
13	myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)	LSGFSFKK	
14	解析中		
15	解析中		
16	V-1 protein	immunostain	(2)
発現が持続的なタンパク質			
A	cytochromeC oxidase subunit VIa	LVPYQMV-	
B	cystatin beta	EKHDELSYF-	
C	Thiol-specific anti-oxidant protein	QITVNDLPVGR SLSQNYGVLK	
D	P.E.A.-binding protein	GNDIGTVLSEYV-	
E	calmodulin	2D-PAGE	
F	14-3-3 protein	immunostain,2D-PAGE	
G	calreticulin	2D-PAGE	
H	tubulin	2D-PAGE	
I	actin	2D-PAGE	
J	albumin	2D-PAGE	

決定した部分アミノ酸配列を1文字表記で示した（xは未同定アミノ酸）。2D-PAGEは既知のマップの泳動位置と比較して同定したことを示す。immunostainはそれぞれの特異抗体によるウエスタンブロットで同定したことを示す。

参考文献

1) Isobe Toshiaki.,et.al. (1991) J.Chroatogr. 588,115-123
2) Taoka Masato.,et.al. (1994) J.Biol.Chem. 269,9946-9951
3) Matsuoka Kunie.,et.al. (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 91,9670-9674
4) John R.S.,et.al. (1992) J.Immunol. 149,1191-1198
5) Lei Feng,et.al. (1994) Neuron 12,895-908
6) Tompson R.J.,et.al. (1987) FEBS Lett 210,157-160
7) M.Clinton, et.al. (1989) B.B.R.C. 158,855-862
8) Jianxun Li,et.al. (1992) Cell 70,791-801

5 神経分化に関与する新規遺伝子Ｎ１６ＫのｃＤＮＡクローニング及びその解析

斎藤祐見子　丸山敬＊　川島誠一
東京都臨床医学総合研究所・遺伝情報、＊国立生理学研究所・神経化学

〔要約〕
dibutyryl cyclic AMP処理をしたマウス NS20Y 細胞由来サブトラクションライブラリーを作成し、プラス・マイナス法を併用することにより、神経分化に伴ってその発現量が著しく増加するクローン N16K-a, N16K-b を単離した。N16K-b は N16K-a に５７塩基のインサーションが挿入されたスプライシングフォームである。これらの cDNA が指令するタンパク質はそれぞれアミノ酸数２１２、１８７個で、その構造は既知のモチーフとは特に高い類似性は見られない新規の分子である。ノーザン解析により、N16K-a,-b ともに成熟マウスでは脳、脊髄に特異的に発現し、さらにマウス脳の発生過程で一時的に増加する興味深い特徴を持つ遺伝子であることが示唆された。さらに、ペプチド抗体の作成により、N16K-a, -b はともに神経分化関連の新規タンパク質として存在することが明らかになった。

マウスＮＳ２０Ｙ細胞は dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) により神経突起伸長を開始し、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性 (1) や MAP5 による免疫染色が増強する。このため神経分化機構を研究するために適した培養細胞モデル系と考えられる (2)。そこで、dbcAMP 48時間処理をした NS20Y 細胞由来サブトラクションライブラリーを作成し、神経系分化に特異的な新しいクローンN16K-a　及びそのスプライシングフォームである N16K-b を得たので報告する。

（方法）

[サブトラクションライブラリー作成、プラス・マイナス法、cDNAクローニング] dbcAMP48時間処理をしたNS20Y細胞からＲＮＡを抽出しオリゴテックスによりpolyAを精製し、Stratagene社のラムダＺＡＰシステムによりcDNAライブラリーを作成した。このライブラリー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ーとした。未分化NS20Y細胞の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。大過剰の未分化ＲＮＡと分化細胞由来の一本鎖ＤＮＡを混合し、分化・未分化共通のメッセージをフェノール抽出により取り除く。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りサブトラションライブラリーを作成した (3)。このライブラリーからプラス・マイナス法さらにノザンブロットにより、分化特異的に発現しているクローンを検索した。N16Kの５末側への伸長はＲＡＣＥ法(Gobco-BRL社) 及びN16K５末側特異プライマーからのラムダgt10 extensionライブラリー作成とスクリーニングにより行った。

[抗体の作成] N16K-a, N16K-bの共通部分及びそれぞれのＣ末端の２０－１５推定アミノ酸に対する合成アミノ酸抗体を作成し、この抗体をペプチドアフィニティクロマトグラフィーで精製後使用した。

（結果及び考察）

サブトラクションとプラス・マイナス法の併用により、NS20Y細胞の神経分化時にその発

現が著しく増大するクローンN16K-a と N16K-a に５７塩基のインサーションが挿入された N16K-b を単離した。N16K-a, N16K-b とも、その発現は dbcAMP添加後１２時間で出現し始め、４８時間で最大に達し、１２０時間後には減少する。各cDNA が指令するタンパク質はアミノ酸数２１２、１８７個で、in vitro translation による結果とほぼ一致した。ともに中央部にアミノ酸６個が３回繰り返す構造を持つが、既知のタンパク質とは特に高い類似性を持たない新規の分子である。成熟マウスにおいては、N16K mRNA は脳、脊髄に分化したNS20Y細胞と同じ大きさの単一バンドが見られるが、精巣など他の臓器ではシグナルは検出できなかった。次にマウス脳発達に伴う N16K-a mRNA の変化を検討した。その発現は胎生１０日頭部には見られないが、胎生１４日脳では発現し、生後１日に最大になり、成熟脳では減少することが判明した。次に、N16K-a, N16K-b の共通部分及びそれぞれのC末端の推定アミノ酸に対するペプチド抗体（計３種）を作成し、タンパク質としての動態を検討した。western blotting では N16K-a, N16K-b タンパク質ともに未分化NS20Y細胞ではほとんど検出できないが、dbcAMPによる分化でそれぞれ約28kDa, 23kDa として出現し、その時間経過は mRNA の場合とほぼ一致した。本タンパク質の細胞や組織における局在や分化過程における機能については現在検討中である。

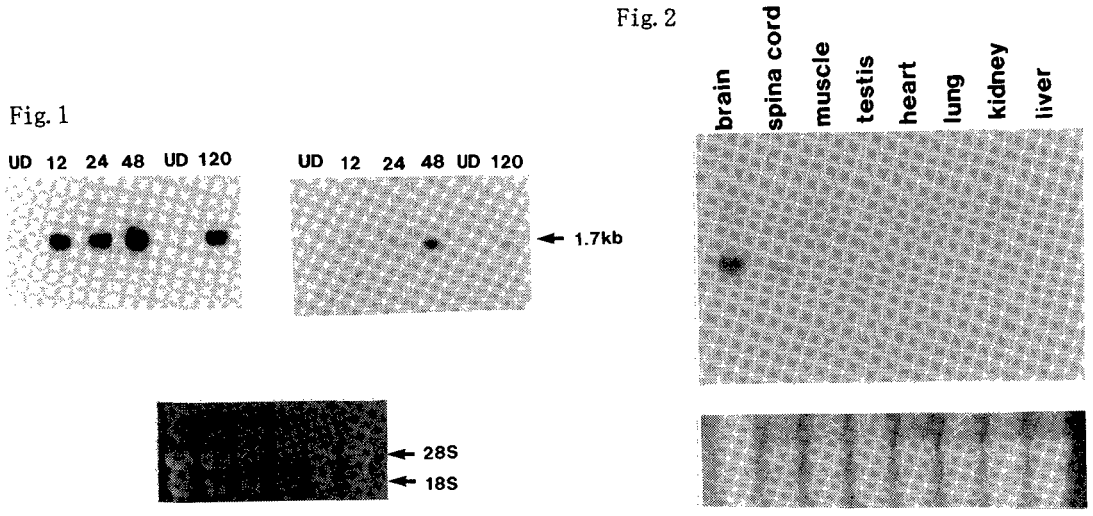
NS20Y細胞を分与して下さった小倉明彦先生（大阪大学）、ペプチド作成及び抗体作成の全面的な指導をしていただいた西道隆臣博士（臨床研遺伝情報）に深く感謝致します。

（参考文献）

1. Amano, T., Richelson, E. and Nirenberg, M (1972) PNAS 69, 258-263
2. O'Brien, JS., Carson, GS., Seo, HC., Hiraiwa, M. and Kisimoto, Y (1994) PNAS 91, 9593-9596
3. Maruyama, K., Usami, M., Aizawa, T. and Yoshikawa, K. (1991) BBRC 171, 204-209

Fig. 1 Nothern blotting によるN16K-a, N16K-b の神経分化における変化
NS20Y細胞を1mM dbcAMP未処理(UD), 処理下(12, 24, 48, 120時間)で培養した後、 total RNAを抽出し、N16K-a プローブ（左）N16K-b 特異的insert部分（右）を用いて Nothern blot を行った。

Fig. 2 Nothern blotting による N16K の成熟マウスにおける組織発現
N16K-a, b に共通なプローブを用いて Nothern blot を行った。



6 末梢ミエリン構成蛋白質　PASII/PMP22　の機能解析

武田泰生、宮崎唯雄、植村慶一
慶應義塾大学・医学部・生理学教室

〔要約〕最近、種々の遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子が解明され、これらは末梢ミエリン構成蛋白質である P0、PASII/PMP22 および connexin 32 の発現異常に起因することが明らかとなった。我々はこれまでに、抗体を用いてそれぞれの蛋白質の分布を検討し、P0 及び PASII/PMP22 がミエリンのラメラ層構造部分に、connexin 32 がランビエ絞輪近傍に限局して発現することを明らかにした。本研究では PASII/PMP22 遺伝子のクローニング並びに PASII/PMP22 遺伝子導入による強制発現細胞株の確立を行い、細胞増殖における PASII/PMP22 発現の影響について検討した。その結果、1）PASII/PMP22 mRNA の発現を示した細胞株の分裂増殖能は、宿主 C6 細胞及び発現ベクターのみを導入した対称 C6 細胞の増殖に比べて著しく低下した。2）BrdU を培養液に添加し 6 時間後の BrdU 取込みを検討した結果、PASII/PMP22 発現細胞は対称 C6 細胞に比べて明らかな低下を示した。以上の結果から、ミエリン形成に伴い強く発現する PASII/PMP22 はシュワン細胞の分裂停止及び分化誘導に深く関与している可能性が示唆された。

【目的】

末梢神経系の発生初期において分裂増殖したシュワン細胞は、その後、自らの形態を変えながら神経軸索を重層し、そして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。末梢ミエリンの正常な形成と機能の維持にはミエリン構成蛋白質群の適切な発現とそれら相互間の正確な機能連絡が極めて重要であると考えられる。Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病及び Dejerine-Sottas (DS) 病はミエリン形成不全、オニオンバルブの形成、再ミエリン化を主徴とする常染色体優性遺伝性神経疾患であるが、それぞれ CMT type 1A は PASII/PMP22、type 1B は P0、type X は connexin 32 等のミエリン構成蛋白質の発現異常に起因していることが報告された[1]。我々は末梢ミエリンの形態形成に関わる分子機構の解明を目的としてこれまでにこれら原因蛋白質の組織内分布を検討し、P0 及び PASII/PMP22 がミエリンのラメラ層構造部分に、connexin 32 がランビエ絞輪近傍に限局して発現することを明らかにした[2]。本研究は CMT type 1A 原因遺伝子の PASII/PMP22 の機能解析を目的として、PASII/PMP22 の cDNA クローニング、強制発現細胞株の樹立及び細胞の分裂増殖における PASII/PMP22 過剰発現の影響について検討を行った。

【方法】

ラット PASII/PMP22 強制発現細胞株の樹立：ラット PASII/PMP22 蛋白質領域をコードする cDNA を RT-PCR を用いてクローニングした。これを β-アクチンプロモーターにより制御可能な発現ベクターに挿入し、リン酸カルシウム法を用いてラット C6 グリオーマ細胞に導入、ネオマイシン類似体の G418 0.6mg/ml 存在下で耐性細胞株を選択し、更にラット PASII/PMP22 cDNA (1-278) をプローブとして mRNA の発現により、PASII/PMP22 強制発現細胞株を選別した。PASII/PMP22 強制発現細胞を用いて、継代培養及び BrdU 取込みを調べ、細胞増殖における PASII/PMP22 発現の影響を検討した。

細胞増殖能の解析：戸田らの方法[3]に従い、1）対照細胞群及び形質導入細胞群をそれぞれ一定細胞数 (1×10^4 cell/6cm plate) 播き、経日的 (1-4 日) に細胞総数を計測して分裂増殖能を比較した。2）それぞれの細胞を 24 時間培養後、10μM bromodeoxy uridine (BrdU) を添加し更に 6 時間培養した。細胞を固定した後、抗 BrdU 抗体及び FITC ラベル化 2 次抗体を用いて免疫染色し、BrdU の核への取込みを比較検討した。

【結果】

PASII/PMP22 mRNA の 発現：選別した 2 種の形質導入細胞における PASII/PMP22 mRNA の発現量を RNA dot blot northern hybridization により他の対照細胞群及びラット坐骨神経における発現と比較検討した。ラット繊維芽細胞由来の L 細胞、C6 対照細胞群に対し、2 つのクローン細胞株 (#10, #30) では PASII/PMP22 mRNA の強い発現が認められた。一方、成熟ラット坐骨神経では更に強い発現が認められた（図 1）。

PASII/PMP22 遺伝子導入による細胞増殖抑制：1×10^4 細胞を培養開始後 24 時間毎に総数を計測した結

果、対照 C6 細胞群は著しい増殖能を示し 96 時間後には 2.2 x 10^6 個に増加した。一方、形質導入細胞群の分裂増殖能は低く、96 時間後では 3.2 x 10^5 個であった。BrdU を培養液に添加し 6 時間後の BrdU 取込みを検討した結果、対称 C6neo 細胞では総数の約 75% が BrdU 陽性であるのに対し、PASII/PMP22 形質導入細胞 (#10) では約 50% に減少した（図２）。

【考察】

PASII/PMP22 は末梢ミエリンを構成する蛋白質の一つとして同定された[4]、分子量約 20 kD の疎水性糖蛋白質である。PASII/PMP22 は繊維芽細胞の増殖停止に伴って発現する GAS3 蛋白質[5]と同一であり、末梢神経系においてミエリンの形態形成に伴って強く発現してくることから、シュワン細胞の増殖－分化過程に関与している可能性が示唆されている。新生マウスの脊髄後根神経節細胞とシュワン細胞の共培養系を用いたこれまでの実験から、培養初期に見られる未成熟シュワン細胞での PASII/PMP22 の発現は極めて弱いが、神経軸索伸長に伴い軸索周囲に接着したシュワン細胞は PASII/PMP22 を強く発現する事実を明らかにした[2]。この結果は、分裂増殖段階にある未分化なシュワン細胞が軸索からの情報で成熟し、分化誘導を受ける過程でこの蛋白質が特異的に発現する可能性を示唆している。今回の PASII/PMP22 形質導入細胞がその発現に伴い分裂増殖を低下する結果は、PASII/PMP22 が細胞の分裂増殖停止機構に関与している可能性を強く示唆している。

CMT 病 1A において PASII/PMP22 遺伝子上の様々な変異が報告されている[1]が、これまでに解析された疾患では、遺伝子の重複及び欠損に伴う発現量の異常が主な原因とされている。PASII/PMP22 遺伝子/蛋白質の発現が正常の 1.5 倍に増加すると CMT 病 1A、正常の 0.5 倍に減少すると圧感受性遺伝性ニューロパチー (HNPP) が発症する。本研究結果は、未成熟シュワン細胞に PASII/PMP22 が過剰発現することに伴う分裂増殖能の低下がミエリン形成不全の起因となる可能性を示唆するものであり、正常なミエリン形成の為には PASII/PMP22 の発現量を一定レベルに保つ必要性が考えられる。

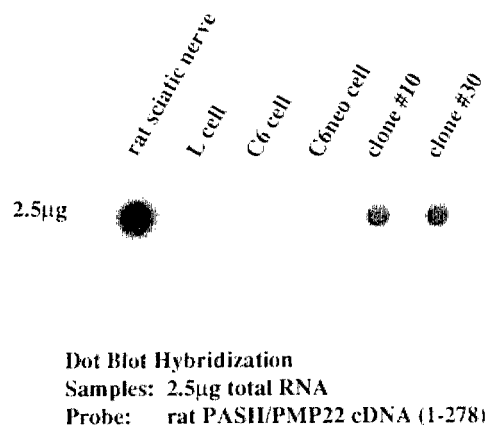


図１． RNA dot blot hybridization によるPASII/PMP22 mRNA の発現

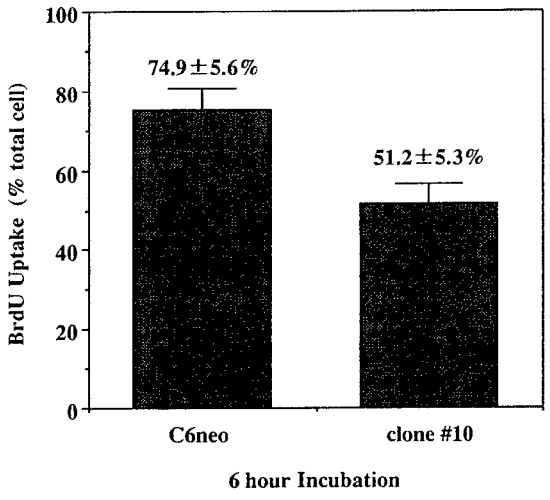


図２． PASII/PMP22 過剰発現による C6 グリーオマ細胞への BrdU 取込みの抑制

【文献】

1) Uyemura, K. et al., J. Biochem. 116: 1187-1192, (1994). 2) Miyazaki, T. et al., Neurochem. Int. in press, (1995)., 3) Toda, M., et al., J. Neurochem. 63: 1975-1978, (1994)., 4) Kitamura, K. et al., B.B.A. 455: 806-810, (1976)., 5) Schneider, C. et al., Cell 54: 787-793, (1988).

7 ラット胎児脳に特異的に発現するタンパク質の解析

萩原民雄、青木和子、倉石　博、佐藤督忠、西垣　裕、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大学医学部第１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おり、我々はこの機能的変化のメカニズムを探ることを目的として中枢神経系に発現するタンパク質の量的質的変化の面から解析を続けてきた。昨年も報告してきたように、現在は特に神経系の形成期に当たる胎児期に発現するタンパク質を中心に解析を行っている。脳可溶性画分に存在するタンパク質の量的変化を探るため胎生１４日目から生後２年以上を経た老齢ラットについて経時的に分析を行うと、胎生期に豊富に存在するが成熟ラットには見出せないタンパク質が３０種類近く存在する。これらのタンパク質を単離してその部分アミノ酸配列を分析し、データバンクと照合してタンパク質の同定を行った。これまでに非ヒストン核タンパク質であるHMG-1、elongation factor-1などの既知タンパク質に加え、サイクリン様タンパク質、RhoGDI(GDP-Dissociation Inhibitor)類似タンパク質など一次構造未知の新規タンパク質も見出すことができた。現在、これらのタンパク質の詳細な解析を進めるとともに、未同定のものについても同定を続けている。

［方法］

妊娠１４～２１日における胎児および生後０～２年以上を経たWistar系ラットを用いた。ラットをエーテル麻酔した後、充分脱血して速やかに全脳を摘出した。脳を１０倍量のHomogenization Buffer [50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 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 の直線濃度勾配により行った。DEAE-5PWより得られたフラクション、あるいはこれを更にTSK G3000SWXLカラムを用い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DEAE-5PW同一フラクション番号ごとに比較することによって胎児期に特異的あるいは多量に存在するタンパク質を検索した。検索した目的とするタンパク質を含むフラクションを調製用電気泳動にて分離し、銅染色法によりタンパク質を確認して目的とするタンパク質バンドをゲルより切り出し、回収した。単離したタンパク質を常法に従いリシルエンドペプチダーゼ（AP1）により限定分解後、逆相カラム Shodx C18-5B を用いた高速液体クロマトグラフィーによりペプチドマッピングを行い、得られたフラグメントのアミノ酸配列分析を行った。決定した部分アミノ酸配列はデータバンクに照会してホモ

ロジー検索を行った。また、質的変化の一つとしてタンパク質リン酸化の変化を探るため、前述のTSK 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たイムノブロットを行った。

［結果と考察］

妊娠１４～２１日目の胎児および生後０日～２年以上を経たラットより得られたサイトゾールそのものをSDS-PAGEで分析してもそれほど顕著な差は見いだせなかった。又、図に示すようにDEAE-5PW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の場合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で分析すると、この段階でも約３０種類のタンパク質バンドに顕著な量的差が見られた。一方、タンパク質のリン酸化に変化があるか否かを抗リン酸化アミノ酸抗体を用いたイムノブロットによる間接法で調べたが、この方法ではリン酸化セリン、リン酸化スレオニン、リン酸化チロシンいずれの場合もタンパク質の量的変化ほど顕著な変化は見られなかった。SDS-PAGEによる分析で量的に胎児期に多く存在するタンパク質約２０種類を調製用電気泳動法によりそれぞれ単離し、リシルエンドペプチダーゼあるいはトリプシンで限定分解して得られたフラグメントについてアミノ酸配列分析を行った。ホモロジー検索の結果、既知タンパク質としてelongation factor-1やnonhistone chromosomal protein HMG-1などが同定された。また、未知タンパク質としてcyclin様タンパク質、低分子量Gタンパク質の調節因子に相同性を示すものなど、既知タンパク質と近縁の関係にある一次構造未知タンパク質に加え、既知タンパク質に有為な相同性を示さない未知タンパク質を見出した。現在、これらのタンパク質の解析を進めるとともに、新たに胎児特異的タンパク質の単離を続けている。

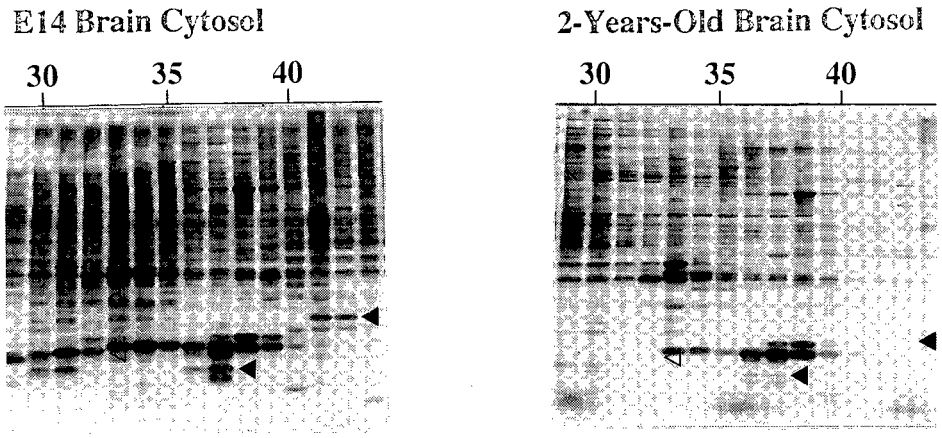


図１　サイトゾール中のタンパク質をDEAE-5PWクロマトグラフィーにより分離した後、各フラクションに含まれるタンパク質をSDS-PAGEにより分析し、胎児期に特異的に存在するタンパク質を検索した。図には妊娠１４日目の胎児のものと生後２年以上を経た老齢ラットのものとを比較ししている。泳動パターンの上の数字はDEAE-5PWクロマトグラフィーにより得られたフラクションの番号を示しており、印のついている質バンドは変化の見られるタンパク質の例である。

8 ラット胎児脳の可溶性画分に存在するRho GDI様タンパク質

青木和子、倉石　博、佐藤督忠、西垣　裕、萩原民雄、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大学・医・第1生化学）

〔要約〕

中枢神経系の細胞分裂は出生とともに停止するが、加齢に伴ってその細胞機能は絶えず変化している。私たちは中枢神経系の形成や加齢に伴った障害との関連性を探るためタンパク質発現量の変化の点から解析を行ってきた。胎生14日から生後2年までのラットの脳から可溶性画分を調製し、SDS-PAGEにより分析したところ、胎児脳に特異的に出現するタンパク質が20種類以上認められた。これらのうち胎生期には多量に存在し、生後7日以内に急激に減少するSDS-PAGE上の分子量が30kDaのタンパク質を単離し、部分アミノ酸配列分析を行った。得られた部分アミノ酸配列の一部は低分子量Gタンパク質の1種Rhoの調節タンパク質であるRho GDI(GDP-dissociation inhibitor)と完全に一致していたが、他のアミノ酸配列は全く異なっていた。また、分子量もRho GDIとは異なることからこのタンパク質はRho GDIに近縁の新しい調節タンパク質であることが考えられる。

（実験方法）

妊娠14~21日目及び生後0日～2年のWistar系ラット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。10倍容のHomogenization Buffer [50mM Tris-HCl(pH7.5), 5mM EDTA, 5mM EGTA, 1mM DTT, 0.32M Sucrose, 0.5mM PMSF及びpepstatin A, leupeptin, antipain, 各2μg/ml] 中でホモジナイズ後、遠心分離により可溶性画分を得た。これをTSK DEAE-5PWカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画し、各分画ごとにタンパク質の経時的変化を見た。タンパク質の発現量に顕著な差が見られた分子量30 kDa のタンパク質を単離するため、妊娠17日目のラットを上記と同様の方法で処理して、調製用電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを銅染色してタンパク質を確認し、分子量30 kDaのタンパク質バンドを切り出し、回収した。このタンパク質標品を常法に従いAP1(Acromolactor protease 1)消化した後、フラグメントを逆相カラムShodex C18-5Bにて分離して、Milligen/Biosearch ProSequencer model 6625にてそれぞれアミノ酸配列分析を行った。

（結果と考察）

胎児（妊娠14日目）及び老齢ラット（2年齢）の脳より調製した可溶性分画のタンパク質を、陰イオン交換クロマトグラフィーによって分画した後にSDS-PAGEにより分析すると、胎児期のみに存在する分子量30 kDaのタンパク質バンドが認められた。発現時期を調べたところ、このタンパク質は胎生期に多量に認められ、それ以降急激に減少

していた。調製用電気泳動により単離した30 kDaタンパク質のAP1消化フラグメントについて5つの部分アミノ酸配列分析を行った。その中の2つはRho GDIのアミノ酸配列に一致し、他のアミノ酸配列はそれに一致しなかった。また、このタンパク質の分子量が明らかにRho GDIより大きいことから、この30kDaの胎児タンパク質はRho GDI近縁の新しい調節タンパク質であると考えられる。現在、部分アミノ酸配列を基に胎生17日目ラット脳cDNAライブラリーよりこのタンパク質のcDNAクローニングを進めるとともに、実際にRhoあるいは他の低分子量Gタンパク質に対してGDI活性を持つかどうか検討している。

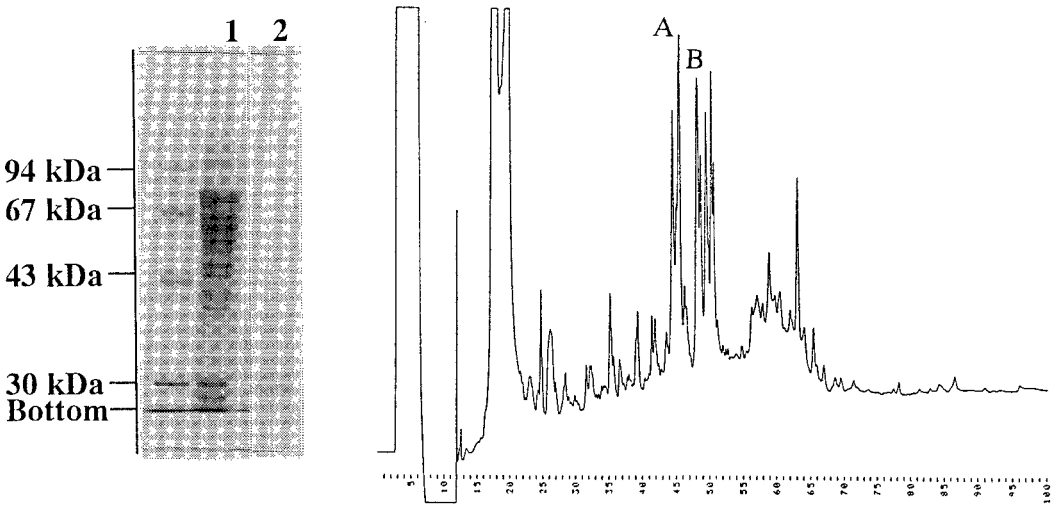


図1 単離した30kDa タンパク質とAP1 消化物のペプチドマッピング

１０％ポリアクリルアミドゲルを用いて単離前の30kDaタンパク質を含むDEAE-5PW溶出フラクション＃26 (Lane 1) と単離した30kDaタンパク質 (Lane 2) をSDS-PAGEにて分析した。ペプチドマッピングはShodex C18-5Bカラムを用いて、0--60 % アセトニトリル直線濃度勾配により行った。

```
Fragment A          T L E E D E E E L F K
              36    | | | | | | | | | | |    52
 Rho GDI       E I K T L E E D E E E L F K M R A


Fragment B          L F R F A S E N D L
              51    | | | | | | | | | |          69
 Rho GDI       R A K L F R F A S E N D L P E W K E R
```

図2 30kDa タンパク質の部分アミノ酸配列

AP1 消化により得られたフラグメントのうち、図２に示したＡおよびＢについてアミノ酸配列分析を行ったところ、RhoGDI タンパク質に一致していた。

9 ラット胎児脳可溶性画分に存在するサイクリン様タンパク質

倉石　博、青木和子、佐藤督忠、西垣　裕、萩原民雄、竹田二美代、竹田　稔
（昭和大学・医・第一生化学）

中枢神経系の発生分化や老化に関しては、過去にも様々な研究がなされてきた。我々は中枢神経系の形成や加齢に伴う機能変化について調べるため、様々な時期に特異的に発現するタンパク質を同定し、中枢神経系の発達や障害との関連性を解明していくことを目的としている。今回、ラット胎児脳に特異的に存在し、老齢ラットには認められない分子量33KDaのタンパク質を見いだし、その精製を試みるとともに一次構造解析を行った。調整用電気泳動により単離した33KDaタンパク質のトリプシン限定消化フラグメントについてアミノ酸配列分析を行ったところ、その一部は細胞周期の調節に関与する核タンパク質であるサイクリンと一致したが、その他のフラグメントは既知タンパク質とは有意なホモロジーを示さなかった。また、SDS-PAGE上の分子量も既知のサイクリンとは一致しないことから、このタンパク質はサイクリンファミリーに属する一次構造未知の新しいタンパク質と考えられる。

（実験方法）

妊娠１４－２１日目における胎児及び生後０日－２年以上を経たWistar系ラットをエーテル麻酔した後、十分脱血して速やかに胎児を取り出し、脳を摘出した。１０倍量のHomogenization Buffer［50mM Tris-HCl（pH7.5）， 5mM EDTA, 5mM EGTA, 1mM DTT, 0.32M Sucrose, 0.5mM PMSF, 及び pepstatin A, leupeptin, antipain 各20 μg/ml］中でホモジナイズ後、細胞分画を行い可溶性画分を得た。これをTSK DEAE-5PWカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画し、各分画ごとにタンパク質の経時的変化を見た。タンパク質の発現量に顕著な差が見られた分子量33KDaを単離するため、妊娠１４日目のラットを上記と同様の方法で処理し、調整用電気泳動を行った。電気泳動後のゲルより銅染色にて確認した分子量33KDaのタンパク質バンドを切り出し、回収した。このタンパク質標品を常法に従いトリプシン消化した後、フラグメントを逆相カラムShodex C18-5Bにて分離し、Milligen/Biosearch ProSequencer model 6625によりそれぞれアミノ酸配列分析を行った。また、リン酸化の有無を抗リン酸化アミノ酸抗体を用いたイムノブロットによる間接法にて調べた。

（結果と考察）

胎児（妊娠１４日目）及び老齢ラット（２年齢）の脳より調製した可溶性画分のタンパク質を、陰イオン交換クロマトグラフィーによって分画した後にSDS-PAGEにより分析すると、胎児期にのみ存在する分子量33KDaのタンパク質バンドがみられた。（Fig1 B, fraction #41-44）発現時期を詳細に調べたところ、このタンパク質は妊娠１４日－１７日に多量にみられ、それ以降急激に減少していた。調製用電気泳動によ

り単離した33KDaタンパク質のトリプシン消化フラグメントについてアミノ酸配列分析を行ったところ、その中の一つは核タンパク質であるサイクリンのアミノ酸配列と完全に一致していた（Fig 2）。しかしながら、他のフラグメントについては既知タンパク質との間に有意なホモロジーは現れなかった。また、分子量の点でも既知のサイクリンとは異なっている。さらに翻訳後修飾の一つとしてタンパク質のリン酸化を調べるため、抗ホスホスレオニン抗体、抗ホスホセリン抗体、抗ホスホチロシン抗体を用いたイムノブロットを行ったところ、この33KDaタンパク質は抗ホスホスレオニン抗体にのみ反応したことから、このタンパク質が脳内でリン酸化を受けている可能性が示唆された。現在、得られたアミノ酸配列情報をもとに妊娠１７日目胎児脳cDNAライブラリーよりクローニングを行うとともに、このタンパク質が実際に生体内でリン酸化を受けているのかどうか、及び関与するプロテインキナーゼが何であるかについても検討している。

Figure 1
陰イオン交換クロマトグラフィーとSDS-PAGEによる妊娠１４日目ラット胎児と２年齢老齢ラットの脳における発現タンパク質の比較

Aのfraction#はBのlane#に対応する。
胎児側のRene#41-42に矢印に示したように33KDaのタンパク質バンドがみられるが、老齢ラット側では認められない。

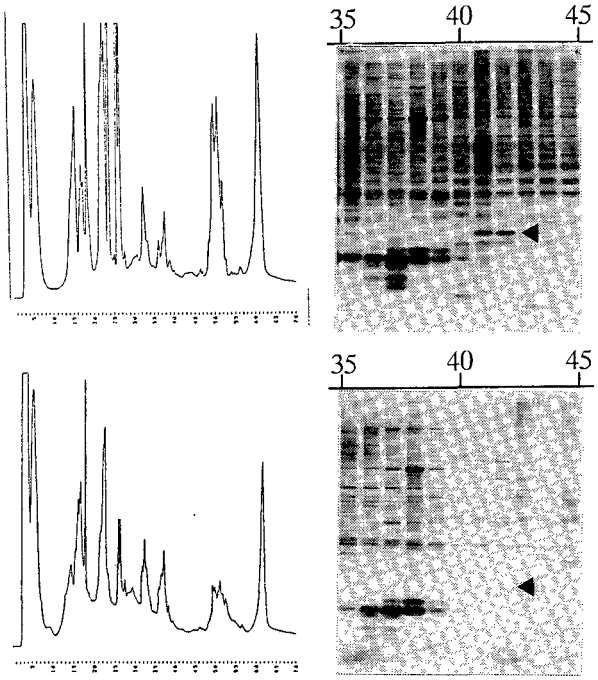


Figure 2　トリプシン消化フラグメントのアミノ酸配列

Fragment 1　・・ATPLSPTVTLSMSADVPLVVEYK・・
CYCLIN　・・TKATPLSPTVTLSMSADVPLVVEYKIAD・・

Fragment 2　・・・・・LSQTSNVDK・・・
CYCLIN　・・・NGNIKLSQTSNVDKEEE・・・・

10 ラット胎児脳に特異的に発現する３５ｋＤａタンパク質の解析

佐藤督忠　青木和子　倉石博　西垣裕　萩原民雄　竹田二美代　竹田稔

（昭和大学・医・第一生化学）

〔要約〕

我々は以前より脳神経系の発生分化から老化にともなう様々な機能変化や病的変化のメカニズムを探ることを目的としてタンパク質の量的、質的変化に着目した解析を行ってきた。今回、ラット胎児脳に特異的に存在し、老齢ラットでは認められない分子量３５ｋＤａのタンパク質を見い出しその精製を試みるとともに、１次構造解析を行った。結果をホモロジー検索したところ、ヒトのＨＬＡ－ＤＲ結合タンパク質 I[1)]に非常によく似た配列をしていることが分かった。しかし、このタンパク質はヒトに報告されているのみであり、また報告されている分子量と今回のものとでは異なっており、今後更なる解析が必要と思われる。

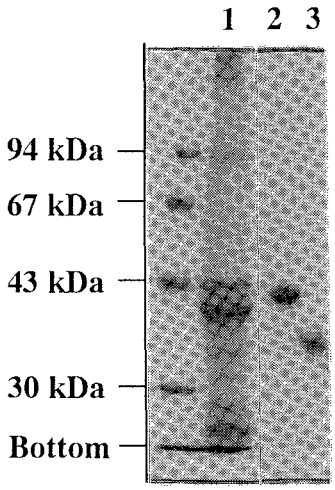
（方法）

妊娠１４～２１日目のＷｉｓｔａｒ系ラットを麻酔後、脱血し素早く胎児を取り出し全脳を摘出した。また比較のため生後０～２年を経たラットも同様にして全脳を取り出した。それらを１０倍量のHomogenization Buffer(50mM Tris-HCl<pH7.5>、0.32M Sucrose、5mM EGTA、5mM EDTA、2μg/ml Antipain Leupeptin Pepstatin、1mM DTT)中でホモゲナイズを行い遠心分離によりサイトゾール画分を得た。これを、ＴＳＫ　ＤＥＡＥ－５ＰＷカラムにて分画し、各分画をＳＤＳ－ＰＡＧＥで比較し経時的変化を見た。ここで胎児に特異的に発現している３５ｋＤａのタンパク質を単離するため、妊娠１７日目のラットを上記と同様の方法で処理し調整用電気泳動を行なった。銅染色にて３５ｋＤａタンパク質を確認後、抽出しリシルエンドペプチダーゼにて消化処理した。Ｓｈｏｄｅｘ　Ｃ１８－５Ｂカラムにてペプチドの分画を行い、アミノ酸配列の分析を行った。

（結果と考察）

得られたアミノ酸配列をホモロジー検索したところＨＬＡ－ＤＲ結合タンパク質Ｉに非常に似た配列が認められた。このタンパク質はｃＤＮＡの塩基配列が知られているのみで、タンパク質としてはまだ同定されていない。構造上は、Ｃ末端付近は主に酸性アミノ酸よりできており、他によく似た構造を持ち同様の働きをすると考えられるＨＬＡ－ＤＲ結合タンパク質Ⅱも報告されている。今回、我々の行った実験では、このＨＬＡ－ＤＲ結合タンパク質ⅡもＩと同一の分画に見い出されており、今後この２つのタンパク質の働きおよびかかわり合いを調べていく必要がある。またＨＬＡ－ＤＲ結合タンパク質Ｉの分子量とＳＤＳ－ＰＡＧＥで胎児に特異的にみられた３５ｋＤａのタンパク質とでは分子量において異なり、ヒトで報告されているものが今回ラットで認められるなど不明な点もあり更に深く研究を進めていく必要があるものと思われる。

図１



単離した胎児特異的 35kDa タンパク質および 40kDa タンパク質のSDS-PAGEによる分析

１０%ポリアクリルアミドゲルを用いて単離前の35kDaタンパク質および40kDa タンパク質を含むDEAE-5PW溶出フラクション#46 (Lane 1) と単離した35kDaタンパク質 (Lane 2) および40kDa タンパク質 (Lane 3)をSDS-PAGEにて分析した（図１）。部分アミノ酸配列分析の結果からそれぞれ HLA-DR 結合タンパク質ＩおよびⅡに高いホモロジーを示した（図２）。

図２

```
Fragment                    KLELSENRIFGGLDRLAEEL--
                            ||||||||   |||   |||
HLA-DR associated    ---KLKKLELSDNRVSGGLEVLAEKCPN---
  protein              65                        119
```

（文献）1)Mark V,et al: Purification and characterization of two putative HLA class 2 associated proteins:PHAP1 and PHAP2.Bio.Chem.Hoppe-Seyler375:113,1994

11 ラット胎児脳に特異的に発現する 40 kDa のタンパク質の解析

西垣　裕、青木和子、倉石　博、佐藤督忠、萩原民雄、竹田　稔
(昭和大学医学部第一生化学)

〔要約〕

哺乳動物の中枢神経系では、胎児期から出生を経て老齢期に至る間に常に同じタンパク質が発現しているのではなく、各時期に発現しているタンパク質はその種類も量も異なっている。それらの内、特に胎児期に発現するものの、出生後、加齢に伴い減少あるいは消失するものは、中枢神経系の発生過程において重要な役割を果たしているものが多い。我々は、Wistar 系のラットを用い、妊娠 14 ～ 21 日目の胎児から出生後 2 年以上経過したものに至るまでの各時期のラット脳のサイトゾールをそれぞれ SDS-PAGE で分析することにより、中枢神経系の発生分化の過程で特異的に発現するタンパク質を同定し、その機能を調べることを目的としている。今回は、ラット胎児脳に特異的に認められるタンパク質の中で分子量 40 kDa のタンパク質を単離し、アミノ酸配列を調べた。このタンパク質は初めに cDNA からその存在が推定されたタンパク質でヒト白血球抗原 HLA-DR 結合タンパク質[1]と考えられる HLA-DR-Associated ptotein Ⅱ と高いホモロジーが認められた。HLA-DR およびその結合タンパク質は、ヒト主要組織適合抗原系において重要な役割を果たしている分子であり、これとホモロジーを示すタンパク質が脳に存在するということは興味深い。

(実験方法)

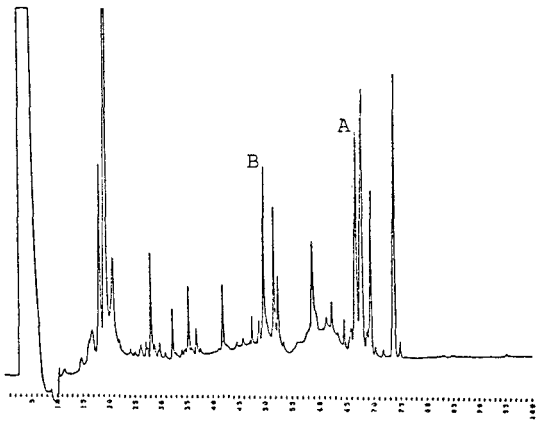
妊娠17 日目の Wistar 系のラットを用い、エーテル麻酔した後に充分脱血する。その後、速やかに胎児を取り出し、脳を摘出した。10 倍量の Homogenization Buffer [50 mM Tris/HCl (pH 7.5)、1 mM DTT、0.32 M sucrose、0.5 mM EDTA、0.5 mM EGTA、0.5 mM PMSF、及び pepstatin A、leupeptin、antipain 各 10 μg/ml] 中でホモゲナイズした後に、遠心分離によりサイトゾール画分を得た。これを TSK DEAE-5PW カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分画し、同一条件で得られた各齢の同一フラクションをSDS-PAGE により比較して胎児期に特異的あるいは大量に存在するタンパク質を分析した。胎児期に発現する 40 kDa のタンパク質は、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シルエンドペプチダーゼを用いて限定分解後、逆相カラム Shodex C18-5B 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。

(結果と考察)

妊娠 17 日目の Wistar 系のラットの胎児脳のサイトゾール画分を TSK DEAE-5PW カラムを用いたHPLC で分画したところ、胎児期に認められ、出生後速やかに減少する SDS-PAGE 上の分子量が 40 kDa のタンパク質を見いだした。このタン

パク質を単離した後、リシルエンドペプチダーゼを用いて限定分解し、得られたフラグメントのアミノ酸配列より分析を行った。ホモロジー検索の結果、得られた部分アミノ酸配列はヒトの HLA-DR 結合タンパク質 Ⅱに対して複数のフラグメントで高いホモロジーが認められた。しかしながら、その分子量はHLA-DR 結合タンパク質Ⅱとは異なっていた。HLA-DR そのものは白血球抗原の一つであり、これと相互作用すると考えられる細胞内タンパク質が脳内にも存在するということは興味深い。また、イオン交換クロマトグラフィーによる分画においてこの 40 kDa タンパク質と同一フラクションから HLA-DR 結合タンパク質Ⅰと高い相同性を示すタンパク質も見出しており、それぞれのタンパク質が相互作用を持っていることも予想される。今回、ホモロジーの認められた 2 つのタンパク質 HLA-DR 結合タンパク質Ⅰ及びⅡはいずれも初めに cDNA からその存在が推定されたタンパク質で、既にタンパク質が単離されているがその機能については不明である。現在、このタンパク質の cDNA クローニングを行うとともに同一フラクションに存在する HLA-DR 結合タンパク質Ⅰとの相互作用について検討している。

参考文献　1) Mark V., Shitsu B., Hilde G., Lewa A.A.,Thomas C.,Bodo Z., Hartmut D. K. and Norbert H. (1994) Biol. Chem. 375, 113-126



fragment A　RQHEEPESFFTW- TDHSDFAGDELGEVIK
178 212
HLA-DR-Associated protein Ⅱ　SRKRQHEEPESFFTWFTDHSDAGADELGEVIKDDI

fragment B　SGYRIDFYFDENPYEN
116 140
HLA-DR-Associated protein Ⅱ　DIKSGYRIDFYFDENPYENKVLSK

Figure 1. 40 kDa タンパク質のペプチドマップと、部分アミノ酸配列

40 kDa タンパク質をAP-1で消化したフラグメントを逆相カラム Shodex C18-5B を用いた高速液体クロマトグラフィーで分析した。マップ上の fragment A と fragment B をプロテイン・シークエンサーにてアミノ酸配列分析を行った。

12 ハロセン麻酔による低体温老化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〕近年、低体温の脳神経細胞保護作用が注目され、多方面から検討されている(1)。著者らはこれまでの報告において、常体温老化ラット・低体温成熟ラット・常体温成熟ラットの髄液中の神経化学物質(MHPG, DOPAC, HVA, TRP, KYN, 5-HIAA)濃度を「ニューロケム」(多種目神経化学物質測定装置, ESA社)で測定し、常体温老化ラットでは常体温成熟ラットに比べてＫＹＮ濃度の特異的増加があり、低体温成熟ラットでは常体温成熟ラットに比べてＫＹＮ以外の物質濃度が低下し、常体温老化ラットと低体温成熟ラットではＫＹＮ／ＴＲＰ比の上昇が共通に認められることを報告してきた(2,3)。今回、低体温老化ラットの髄液中の各種物質濃度を同様に測定し、各ラット群の特徴を比較検討したので報告する。

〔目的〕ハロセン麻酔による低体温老化ラットの髄液中神経化学物質濃度が低体温成熟ラットと同様に変化するかを検討し、成熟ラットと老化ラットの髄液への低体温の影響を比較検討する。

〔対象と方法〕Wistar系雄性老化ラット６匹(月齢22-28 箇月, 体重330-450g)を対象とした。各ラットをハロセン(2%)麻酔下で気管切開し、人工呼吸器を装着した。その後のハロセン濃度は1%とした。右大腿動脈にカニューレを挿入し、全身血圧と心拍数をモニターした。直腸温をサーモメーターで測定した。ラットの後頭下の皮膚を切開し、皮下組織・筋肉を剥離して脊髄硬膜を露出。その後26Ｇの注射針を大槽内に刺入して、髄液80-200μl を吸引採取した。採取髄液量の1/10の0.02M 酢酸で処理した後、-80 ℃に凍結保存した。「ニューロケム」で測定した６種の神経化学物質(MHPG, DOPAC, HVA, TRP, KYN, 5-HIAA)の代謝関係は図１に示される。測定結果は平均値±標準誤差で表示し、以前に報告した常体温成熟ラット、常体温老化ラット、低体温成熟ラットの結果と比較検討した。

〔結果と考察〕（１）低体温老化ラット（A_{32}）の直腸温の低下の推移を低体温成熟ラット（M_{32}）と比較できるようにして図２に示した。A_{32}とM_{32}はほぼ同様の変化を示した。

Ａ：体温測定開始時, Ｂ：気管切開時, Ｃ：大腿動脈確保時　Ｄ：髄液採取時　Ｅ：終了時

（２）常体温成熟ラット（M_{37}), 常体温老化ラット（A_{37}), 低体温成熟ラット（M_{32}), および今回の低体温老化ラット（A_{32}）の髄液中の６種の神経化学物質濃度の測定結果（平均値±標準誤差）をまとめて表１・図３に示した。A_{32}と各群間の比較の結果（統計的有意性）も表１に示した。

	MHPG	DOPAC	HVA	TRP	KYN	5HIAA
M_{37}	21.7±2.9 *	13.3±2.4 **	30.6±4.2***	383 ±83 *	53.7±8.5 *	126 ±20 *
A_{37}	22.4±2.3 *	8.7 ±1.8***	23.0±3.3***	345 ±62 *	94.1±8.9***	154 ±41 *
M_{32}	13.1±1.8 **	3.85±0.29	6.72±1.45 *	109 ±14	50.8±5.6 *	67.0±5.7
A_{32}	45.4±8.0	3.76±0.42	2.89±0.25	98.2±12.0	32.9±5.5	52.1±7.5

表１：神経化学物質濃度の測定結果（単位ng/ml）(*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001)

（3）KYNとTRPの比（KYN／TRP）の各群（M_{37}・A_{37}・M_{32}・A_{32}）での結果を図4に示した。A_{32}(0.405±0.137)ではA_{37}(0.305±0.045)・M_{32}(0.513±0.072)と同様にM_{37}(0.156±0.021)に比べてKYN／TRPは上昇していた($p<0.05$)。

（4）M_{37}を100%とした時の各群（A_{37}・M_{32}・A_{32}）の値A_{37}／M_{37}，M_{32}／M_{37}，A_{32}／M_{37}を図5に示した。A_{37}／M_{37}とM_{32}／M_{37}の間に"相同性"を認めた。またA_{32}／M_{37}ではMHPGの上昇が特徴的であった。

〔結論〕常体温老化ラットA_{37}と低体温成熟ラットM_{32}の髄液中の6種の物質濃度の変化パターンに相同性を認めた。低体温成熟ラットM_{32}と低体温老化ラットA_{32}ではNE系の活性化の閾値に差のあることが示唆された(4)。

〔文献〕(1)Ginsberg, M. D. et al. (1992) Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 4, 189-225.
(2)Wada et al. (1994) Biogenic Amines 10, 221-225.
(3)Wada et al. (1994) Biogenic Amines 10, 535-542.
(4)Wada et al. (1995) Biogenic Amines in submission.

〔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1：測定物質の代謝関係図

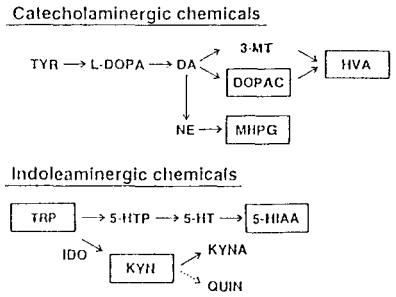


図2：直腸温の推移

(—— ：A_{32} ------ ：M_{32})

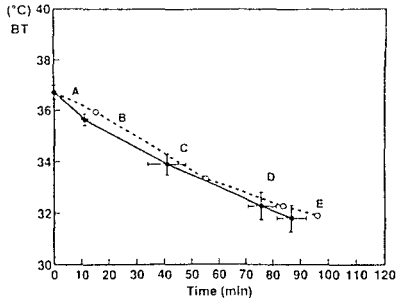


図3：神経化学物質濃度の測定結果

(□：M_{37} ||||：A_{37} ≡：M_{32} ▨：A_{32})

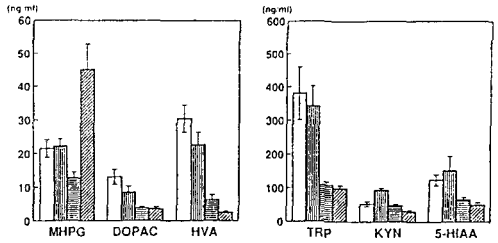


図4：KYN／TRP比

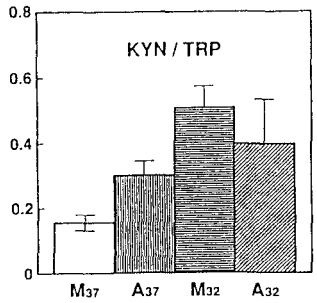
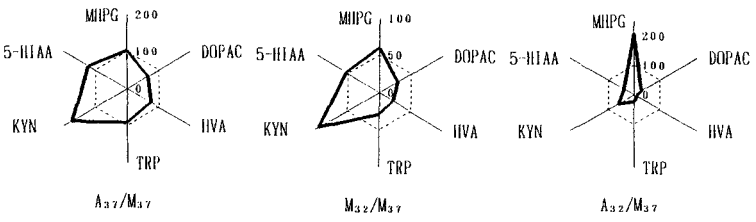


図5：A_{37}／M_{37}，M_{32}／M_{37}，A_{32}／M_{37}



13 ヒト剖検脳を用いた正常老人・脳血管性痴呆老人及びAlzheimer型痴呆老人におけるＨＣＮＰ遺伝子発現量の検討

松川則之[1.2] 岡田秀親[3.] 小鹿幸生[1] 東藤直樹[4]
（1.名古屋市立大学第二内科 2.野依福祉村病院・長寿医学研究所 3.名古屋市立大学分子研・生体高分子 4.住友製薬総合研究所・創業第三研究所）

〔要約〕
Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) は、ラット脳中隔野培養組織に対するアセチルコリン合成促進活性が見いだされている(1)(2). ヒト剖検脳を用い,ノーザン・ブロット法により正常老人・脳血管性痴呆老人およびAlzheimer型痴呆老人における海馬でのヒト型HCNP前駆体遺伝子の発現量の検討を行った. 正常老人・脳血管性痴呆老人に比較して、Alzheimer型痴呆老人において有意な発現量の低下が明らかとなった.

＜はじめに＞

HCNPは、ラット中隔核培養組織において、アセチルコリン合成を誘導する新規ペプチドである. その構造は、Acetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu-OHの１１アミノ酸より成る(2). また、HCNPは、fimbria-fornix lesion rat に対する脳室内へのカニュレーションによって、水迷路学習に対する有意な改善効果が認められている(3). ラットHCNP前駆体遺伝子に対応するヒト型cDNA遺伝子が、ヒト胎盤由来cDNAライブラリーより単離され(4)、それにより、ラットHCNPのアミノ酸配列に対応すると推定されたヒトHCNPにおいても、ラット脳中隔野培養組織に対しラットHCNPと同様の生理活性が示された(５). 今回我々は、ヒト剖検脳を用い、正常老人・脳血管性痴呆老人およびAlzheimer型痴呆老人の海馬でのヒト型HCNP前駆体遺伝子の発現量をノーザン・ブロット法を用いて検討した.

＜対象および方法＞

野依福祉村病院における高齢者８剖検脳を対象とした. 症例は、７２－８５歳の男性４例・女性４例で臨床病理学的診断が明らかにされた正常老人２例・脳血管性痴呆３例・Alzheimer型痴呆３例である. 死後、剖検までの時間は1.5-５時間であった. 剖検時より-80℃に保存された凍結組織標本を用い、AGCP法（acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method)に従い、total RNAの分離を行った. ヒト型HCNP前駆体遺伝子のほぼORF(open reading frame)に一致する650bpのcDNAをプローベとしてノーザン・ブロッティングを行った. 感光フィルムよりDual-wave length flying-spot scanner (Shimadzu CS-9000)を用い定量化し、βactinにて補正した.

＜結果＞

表１に今回用いた症例の背景について記した。海馬におけるヒトHCNP前駆体mRNAの発現量は、正常老化例や脳血管性痴呆例に比較し、Alzheimer型痴呆例で低下を示した(図１)。また、このAlzheimer型痴呆例でのmRNA量の低下はβactinのmRNAによる補正後も同様であった。(図２)

＜考察＞

Alzheimer型痴呆症において、海馬でのヒトHCNP前駆体遺伝子の発現量が、低下している可能性が示された。しかしながら、症例数が少ない点、痴呆症のステージの問題、海馬以外の部位との比較など今後の課題と考えられた。また、昨年の本大会において、我々は正常老人に比較しAlzheimer型痴呆老人の髄液中のHCNPペプチドは上昇している可能性を報告した(5)が、今回のデータと合わせAlzheimer型痴呆症の病態との関わりに興味がもたれる。

症　　例	臨床病理学的診断	罹病期間	死　因	剖検までの時間
a. 80才　男	正常老化	—	心不全	3時間
b. 76才　男	正常老化	—	心筋梗塞	2時間
c. 76才　女	SDAT	2年	急性心不全	2時間
d. 80才　女	SDAT	6年	呼吸不全	5時間
e. 79才　男	SDAT	9年	肺炎	4時間
f. 72才　女	脳血管性	6年	肺炎	1.5時間
g. 85才　男	脳血管性	2年	肺炎	4時間
h. 77才　女	脳血管性	5年	心不全	3時間

表1　凍結組織標本の内訳

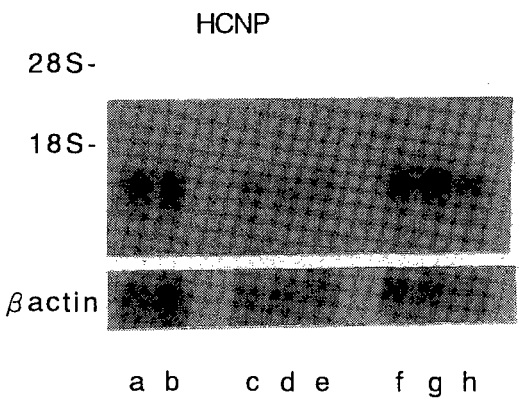


図1　Northern blot: total RNA 10ug/lane
a.b; 正常　c.d.e; Alzheimer型痴呆
f.g.h 脳血管性痴呆

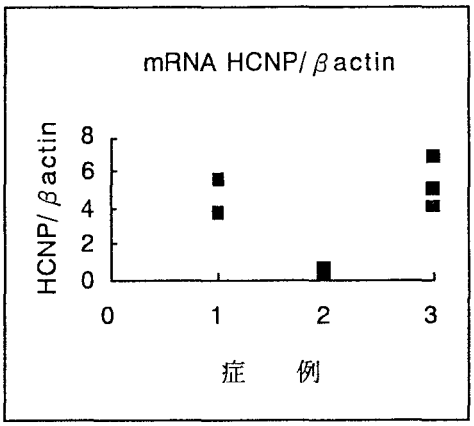


図2　HCNP/βactin；1：正常2例
2:Alzheimer型痴呆3例　3: 脳血管性痴呆3例

＜参考文献＞
1）Ojika,K. and Appel,S,H. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,2567-2571 2) Ojika,K. et.al. (1992) Brain Res.,572,164-171. 3) 岸田晶祥他、神経化学、31(1)、404-405、1992
4) Tohdoh,N, et.al.,Mol.Brain.Res.1995,in press. 5) 小鹿幸生他、神経化学、31(1),260-261,1992.
6) 継泰城他、神経化学、33(1),234-235,1994

14 細胞内に出現するAβについて

宇佐美美穂子、佐原成彦、森啓
（東京都精神医学総合研究所・分子生物学部門）

〔要約〕
アルツハイマーβアミロイド前駆体蛋白（APP)のβ領域よりC末端までをコードするcDNA (CT-100)及び、その5'側にシグナル配列を付加したcDNA(SCT-100)をCOS-1細胞に導入して、その発現及び代謝の相違を検討した。1、CT-100を導入した細胞においてその抽出液でAβ抗体に反応する4KDのバンドが検出されたが、SCT-100では検出されなかった。2、CT-100導入により産生される4KDのバンドはcDNA導入後比較的短時間（24-48時間）のみ見られすぐ消失した。SCT-100では導入後24-168時間を通じて検出されなかった。3、細胞外に溶出される可溶性AβはCT-100, SCT-100共に検出された。以上の違いはcDNAのシグナル配列の有無によって生じる代謝経路の相違によるものと考えられる。

［目的］
cDNAを導入した培養細胞において、可溶性のAβが細胞外へ分泌されることについては、すでに多くの報告がある(1, 2, 3)。しかし、細胞内でのAβの存在の報告は少ない(5)。今回私たちはAPP CT-100 cDNAを導入したCOS-1細胞内にその発現の初期のみにAβが見られたことを見い出したので報告する。

［方法］
COS-1細胞に各cDNAをDEAE-dextran法で導入した。代謝阻害剤はcDNA導入3時間後に培養液中に添加し培養期間を通じて存在させた。細胞内発現蛋白の分析には、トリスートリシンゲル電気泳動、イムノブロットを用いて行った。定量化にはデンシトメトリーを使用した。培養液中のAβは^{35}Sメチオニンを用いて代謝ラベルし、免疫沈降させたのち電気泳動、オートラジオグラフィーにより検出した。抗体はβ1-28、β1-42（Aβの1-28またはAβ1-42の合成ペプチドに対してそれぞれ作製されたもの）、βter40、βter42（Aβの終末40番目のアミノ酸または 42番目のアミノ酸をそれぞれ認識するもの）を使用した。。

［結果］
1、CT-100 c DNAを導入した細胞の抽出液において、Aβ抗体に反応する分子量4KDのバンドが検出された（図1）。しかし、SCT-100では見られなかった（図1）。

2、細胞内Aβの出現及び存在をcDNA導入後の時間経過を追って観察すると、Aβは導入後比較的短時間内に現れ、その後は消失することが判明した（図2、A）。この出現の時間は実験毎に多少変動がみられた。

3、一方、細胞外に分泌されるAβはCT-100, SCT-100共に検出された（図、3）。分泌されるAβは遺伝子導入2日後にもっとも高くその後低下することはすでに報告した。

4、細胞内のAβがCT-100を導入した細胞のみで見られることは、これらの産物の合成や代謝に何らかの相違がある可能性が考えられたので、種々の代謝阻害薬を用いて検討した。CT-100およびSCT-100の産物は、APP のC末端に対する抗体を用いて分析すると、全長と考えられる12KDと9KDの断片とが検出された。9KDの断片はAPPのαセクレターゼによって切断されたC末端部分の電気泳動上の位置と一致していた。これらの産物をデンシトメーターを用いて定量化した（表1）。Brefeldin AによりCT-100では12KD蛋白が検出されたが、SCT-100では著しく低下していた。

［考察］
Brefeldin Aは小胞体からゴルジ体への蛋白の輸送を阻害することをはじめとして、細胞内のプロセシング過程にその作用を及ぼすことが知られている。この薬物の効果がCT-100とSCT-100により異なることはこれらのプロセシングの経路が同一ではない可能性を示していると考えられ、その差が細胞内のAβの出現に関わるものと思われる。

また輸送小胞の$^{+}$H-ATPaseの選択的阻害剤として知られているBafilomycin Aの処理により、12KD産物が著しく減少し9KDの断片が増加することはαセクレターゼの切断がゴルジ体内で生じるという報告（4）と一致するものと考えられる。

細胞内Aβが短期間内に消失する原因およびその機構についは不明であるが、正常細胞においてはAβが短い半減期で分解される可能性がある。このことは、Aβの代謝には分泌に加えて細胞内分解という2つの経路があることを示唆しており、アミロイドの沈着機構を探るうえでも重要であると考えられる。

[参考文献]
1, Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey,C., Mellon, A., Ostaszewski, B., Lieberburg, I., Koo, E., Schenk, D., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1992) Nature 359, 322-325
2, Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M.G., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormick, R., Wolfert, R., Selkoe, D.J., Lieberburg, I., and Schenk, D. (1992) Nature 359, 325-327
3, Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X.-D., Mackay, D.M., Tintner, R., Frangione, B., and Younkin, S.G. (1992) Science 258, 126-129
4, Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1989) Cell 57, 115-126
5, Wertkin, A.M., Turner, R.S., Pleasure, S.J., Golde, T.E., Younkin, S.G., Trojanowski, J.Q., and Lee, V. M.-Y.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9513-9517

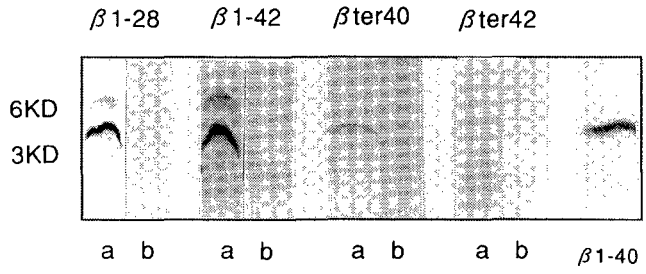


図1　CT-100またはSCT-100 cDNAを導入したCOS-1細胞抽出液のイムノブロット
a; CT-100 cDNA　b; SCT-100 cDNAを導入した細胞

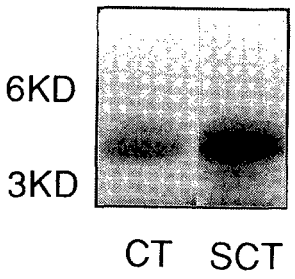


図3　cDNAを導入した細胞の培養液中に検出されるAβ

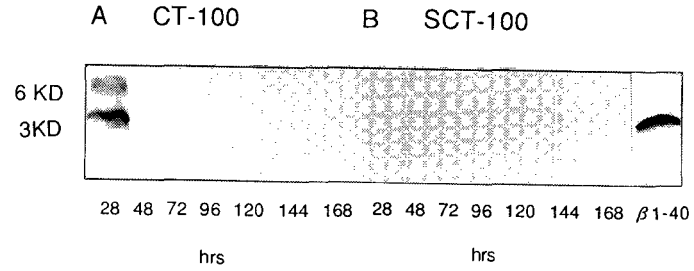


図2　細胞内でのAβ出現の経時変化
A; CT-100,　B;SCT-100

表1　種々の代謝阻害剤によるCT-100及び、SCT-100のcDNA細胞内産物の変化　(%)

		none	Brefeldin A	Bafilomycin	Monensin	Colchcine	Chloroquine
CT-100	12KD	74	93	10	66	87	78
	9KD	26	7	90	34	13	22
SCT-100	12KD	68	-	19	84	67	77
	9KD	32	-	81	16	33	23

15 アルツハイマー病脳における ニューロフィラメントの構成異常

中村　祐[1.2]、武田雅俊[1]、新川久義[3]、西村　健[1]
（1大阪大・医・精神、2小阪病院、3狭山病院）

〔要約〕アルツハイマー病前頭葉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ウエスタンブロットにて検討した。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及びNF-Lに対するモノクローナル抗体では、アルツハイマー病脳においてNF-Lの量の減少がみられた。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を用いて、ウエスタンブロットを行いNF-Lとの比で検討すると、アルツハイマー病脳においてリン酸化NF-Hの割合が増加していることが示された。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の構成異常が関与している可能性が示唆された。

我々はこれまでにアルツハイマー病脳にお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、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が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、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することを報告した。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、今回はニューロフィラメントの構成についてウエスタンブロットにて検討した。

方法

アルツハイマー病１０例、対照３例の前頭葉（－８０℃で保存）を２倍量の10M Urea/ 10 mM Bis-Tris/HCl(pH6.5)のもとでpolytronにてホモジェネイトし、100,000 x gにて３０分間遠心した。その上清をSDS-PAGEにて電気泳動を行い、Nitro plus2000に転写し、各抗体（下記表）にてProtoblot system (Promega)を用い染色した。膜上で抗体で認識される蛋白量は、Image Master 1D(Pharmacia)を用いて対照と比較で半定量を行った。

抗体名	抗原	希釈	由来
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-32	NF-H (non-phosphorylated epitope)	300 x	Sternberger-Mayer Inc.

結果

１：ＮＦ－Ｌに対する抗体による検討(ＮＦ－Ｌの半定量)

NF-Lに対するモノクローナル抗体（NR4）で半定量した場合はアルツハイマー病脳におけるNF-L量は対照の５８％（ｔ検定で$p=0.059$）であり、NF-LのC末端テイル領域に対する抗体（α-TL）で半定量した場合はアルツハイマー病脳におけるNF-L量は対照の７２％（ｔ検定で$p=0.060$）であり、アルツハイマー病脳においてNF-Lの量の減少が見られた。

２：ＮＦ－Ｈ／ＮＦ－Ｌ比の検討

NF-Hに関しては市販の抗体を用いて検討した。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)を用い、非リン酸化NF-Hエピトープに対する抗体としてはSMI-32を用いた。各抗体にて認識されるNF-H量を半定量し、NF-Lの量との比を各々の検体について求めた。対照脳の値を平均したものを１として補正を行い、NE14とSMI-32で認識される量の関係をplotした（図１）。NR4でNF-Lを半定量した場合は、アルツハイマー病脳におけるNE14で認識されるNF-H量はNF-Lの比で対照の２２７％（ｔ検定で$p=0.0024$）であり、SMI-32で認識されるNF-H量はNF-Lの比で対照の１２０％（ｔ検定でｐ＝０．０８３）であった。α-TLでNF-Lを半定量した場合も同

様の結果が得られ、アルツハイマー病脳におけるNE14で認識されるNF-H量はNF-Lの比で対照の１７６％（ｔ検定で$p=0.0021$）であり、SMI-32で認識されるNF-H量は対照の１０３％（ｔ検定でｐ＝０．４２４）であり、アルツハイマー病脳においてNF-H量の増加、特にリン酸化NF-H量の相対的な増加が見られた。

考察

前回、アルツハイマー病脳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、アルツハイマー病脳においてニューロフィラメント系に異常のあることが示された。Neurofilament geneのtransgenic mouseにおいて、ニューロフィラメントの異常蓄積がみられ、ニューロフィラメントの構成異常がその病的変化の原因である可能性がある[2,3]。これらの知見から今回アルツハイマー病脳においてニューロフィラメントの構成についてウエスタンブロットにて検討した。結果として、NF-L量の減少と相対的なリン酸化NF-H量の増加がみられ、アルツハイマー病の病態にニューロフィラメントの構成異常が関与している可能性が示唆された。

参考文献

[1] Nakamura Y, Takeda M, Aimoto S, Hariguchi S, Kitajima S, Nishimura T, Eur. J. Biochem. 212:565-571,1993. [2] Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland W, Cell 73:23-33,1993.
[3] Cote F, Collard J-F, Julien J-P, Cell 73:35-46,1993.

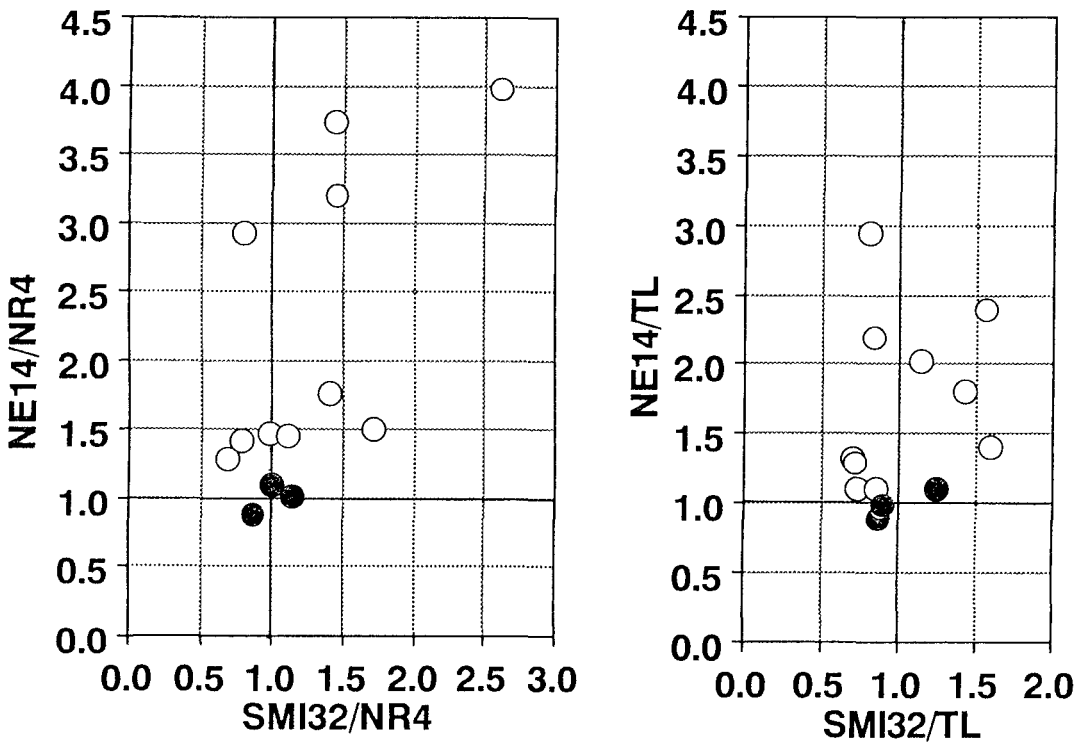


図　リン酸化及び非リン酸化ＮＦ－Ｈ／ＮＦ－Ｌ比

対照脳及びアルツハイマー病脳前頭葉に含まれるNF-L量をNR4及びα-TLで半定量し、リン酸化NF-Hに対する抗体NE14で認識されるNF-H量及び非リン酸化NF-Hに対する抗体SMI32で認識されるNF-H量を求め、NF-L量に対する比で表した（対照脳３例の平均値を１とした）。

●：対照脳（３例）　　○：アルツハイマー病脳（１０例）

16 ラット網膜および大脳皮質におけるカルレチニンおよびカルビンディンの加齢変化

山口　知子、P. Papazafiri *, P. Podini*, J. Meldolesi*
(東京女子医科大学・生化学、*DIBIT San Raffaele Institute,Milano)

〔要約〕

ラットの２週齢から３０ケ月齢までの網膜および大脳皮質前頭野、視覚野から組織を抽出し、ニューロンの可溶画分にある高親和性カルシウム結合タンパクのカルビンディン-D28K(CaB)およびカルレチニン(CaR)の加齢変化を調べた。これらの変化を二種類のシナップス小胞のマーカータンパク、すなわちシナップス小胞膜貫通タンパクのシナプトフィジン(Sph)およびそのリン酸化ー脱リン酸化によって伝達物質の放出をコントロールしているシナプシン１(Syn1)の消長と対比して考察した。これら分子の免疫組織化学的検索の結果と合わせて検討した結果、大脳皮質と網膜での加齢変化は分子間に相異が認められた。網膜におけるCaBは加齢とともに減少するが、大脳皮質に比べて７－８倍高密度に局在するCaRの加齢変化は認められない。一方、シナップスのマーカータンパクであるSphおよびSyn1は網膜でのみ加齢による減少が認められた。大脳皮質に比べて著しく低分布の網膜でのSyn1の加齢変化は１０ケ月齢の成熟ラットですでに低レベルに達し、網膜の加齢に敏感に変動する分子であるが、ニューロンの可溶画分にある高親和性カルシウム結合タンパクのうち少なくとも感覚ニューロンに密に局在しているCaRの加齢変化は認められなかった。

［緒言］ 神経系におけるカルシウムのホメオスターシスの加齢変化は様々な観点から研究されてきているが、従来は主に膜レベルでのチャンネルあるいは受容体、ポンプ、トランスポーター、また細胞内小胞体膜におけるIP3受容体等が主流とされてきた。　しかし、近年、ニューロンの可溶画分に局在する高親和性のカルシウム結合タンパクが注目されて来ている(1,2)。カルモジュリンのファミリータンパクとしてのカルビンディン（CaB）およびカルレチニン(CaR)はそれら局在ニューロンの相異からニューロンのサブセットの分類に用いられているが、それらの分子機能については、未だ明らかにされていない(3,4)。これらカルシウム結合タンパクのニューロンにおける機能は単にカルシウム緩衝効果に過ぎないとすれば、カルモジュリンを初めとする普遍的カルシウム結合タンパクがニューロンでも豊富に存在しているところから、特異的ニューロンのみに発現しているこれらの分子ファミリーの機能は何であろうか。また神経系におけるカルシウムのホメオスターシスの加齢変化はこれらニューロンの可溶画分に局在する高親和性のカルシウム結合タンパクとどうかかわっているかについて、ラットの網膜および大脳皮質中枢野における加齢変化を調べた(5,6)。

［方法］　Splangue-Dawleyの２週齢から３０ケ月齢雄ラットを用いた。断頭後、眼球を摘出し、網膜を剥離し、一方はただちにドライアイスで凍結しー８０℃で保存、片方は免疫組織染色のために固定液中（4%フォルムアルデヒドとリン酸緩衝液（125mM,pH7.4）中に溶かした0.25%グルタールアルデヒド混合液）に保存した。大脳皮質も同様に前頭葉、海馬および視覚野を切除して一方は溶桔保存し、他方は固定

液中に保存した。抗マウスーCalbindin D28K　および抗ウサギーCalretininポリクロナル抗体はSWant(Switzerland)社から購入、抗ウサギSynaptophysin(Sph)抗体はDe Camilliから抗ウサギSynapsin 1(Syn1)抗体はF.Valtortaから供与された。ウエスターンブロットおよび免疫組織染色法は前法にしたがった(5)。

[結果・考察] Fig.1 に示されているように、CaBとCaRの網膜における分布は著しく異なる。すなわち、CaBの網膜と大脳皮質におけるタンパク当たりの分布のオーダーはほぼ同じであるが、加齢変化は網膜だけで観察され、生後の2週齢で最も高く、2ケ月齢から減し、30ケ月齢では60%に減少する。一方CaRの網膜における分布は著しく大脳皮質と異なり、全体にタンパク当たりで7－8倍の高密度で分布している。CaBと同様に生後週齢では高く、2ケ月齢から以降、30ケ月齢に至るまで、ほとんど変化しないことが観察された。シナップス小胞関連タンパクは生後からシナップス形成期の1ケ月齢までは増加して、その後大脳皮質で加齢変化は見られないが、網膜ではSphは徐々に、そしてCaRとは逆比例して著しく少ない分布を示すSyn1の加齢による減少は既に2ケ月齢をピークに12ケ月齢で20%レベルまで減少していた。これらの加齢変化の消長はFig.2の網膜の免疫組織化学的検索によっても示され、CaBは網膜の外網状層にまたCaRは内網状層に局在している。視覚の加齢変化とこれら網膜の分子機能との関わりについてはいまのところ結論は得られておらず、今後の問題と思われる。

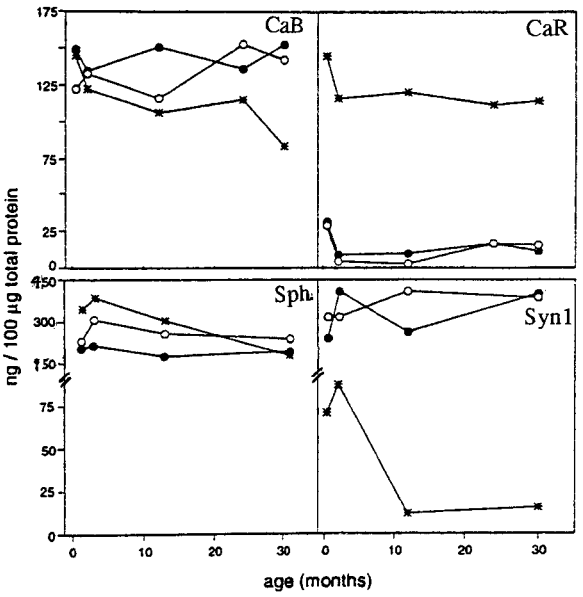


Fig. 1. Expression levels of the four proteins in the frontal(●) and occipital(○) cortex and in the retina(▲) of rats of different ages. The results shown are averages of the assays in 2-4 rats, carried out by microdensitometry of 125I-protein-A labelled Western blot audiograms . Data varied by less than 10%.

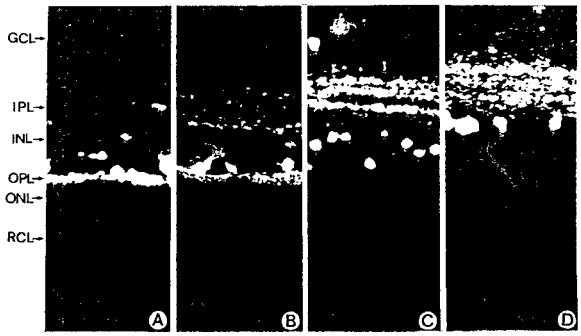


Fig. 2. Distribution of CaB(A,B) and CaR(C,D) in the retina of 2(A,C) and 30(B,D) month old rats as revealed in the confocal microscope.The indication of various retinal layers:GCL=ganglion cell layer,IPL=inner plexiform layer,INL=inner nuclear layer,OPL=outer plexiform layer,ONL=outer nuclear layer,RCL=rod and cone layer

[文献]

1. Baimbridge,K.G. et al (1992)Trends Neurosci.15,303-308

2.Heizmann,C.W. et al (1991)Trends Biochem Sci.16,98-103

3.Yamaguchi,T. et al (1991)Neurosci.Lett.131,79-82

4.Chard,P.S. et al (1993)J.Physiol.472,344-849

5.Villa,A. et al (1994)Europ.J.Neurosci.6,1491-1499

6.Papazafiri,P. et al (1995)Neurosci.Lett.186,65-68

17　アルツハイマー型老年痴呆、アポリポ蛋白Eとエストロゲン

柏木知宏、本庄英雄、卜部　諭、岡田弘二、林　正浩*、林　健蔵*

（京都府立医大産婦人科、奈良平城園*）

〔要約〕

アルツハイマー型老年痴呆に罹患している女性の臨床症状に対するエストロゲンの改善効果を二重盲検法で確認した。またエストロゲンがアポリポ蛋白Eを抑制しアルツハイマー型老年痴呆女性の臨床症状を改善している可能性が考えられた。

（目的）　アルツハイマー型老年痴呆（AD）は高齢化社会が進むにしたがい全世界の重要問題となっている。現段階においてはADの記憶障害などの中核症状に対する特効薬はほとんど存在しない。これまでわれわれは閉経後女性において血清中エストロンサルフェート（E_1－S）濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。ADに罹患している18例の女性における血清中　E_1－S濃度は同じ年齢の正常女性に較べ有意に低かった。そこでADに罹患している7例の女性（80．1±2．9y．o．　M±SD）にE_1－Sを主成分とする抱合型エストロゲン（CE）1．25mg／日を6週間経口投与し、7例中　6例に投与3週間後から記憶、見当識と計算力などの臨床症状の改善がみられた。今回エストロゲン剤投与による臨床症状改善効果を二重盲検法にて検討し、さらにアポリポ蛋白Eとエストロゲンとの関係を追及した。

（方法）1．ADはDSM－Ⅲ－Rの診断基準に基いて精神科医により診断された。ADに罹患している14例（83．7±4．5y．o．M±SD）に二重盲検法で各々3週間、CE1．25mg／日あるいはプラセボーのどちらかを投与した。改訂長谷川式簡易知能評価スケール（HDS－R）、国立精研式痴呆スクリーニングテスト（NSD）およびMini－Mental　State　Exa

ｍｉｎａｔｉｏｎ（ＭＭＳ）の３種類の痴呆テストを投与前及び投与後第３週目に施行した。

2．３７－６７歳までの６８例の女性においてアポリポ蛋白を測定した。

（結果）1．ＣＥ投与群において投与前および投与後第3週目におけるＨＤＳ－Ｒの合計点は前者では１７．３±５．６２　後者では２０．７±５．０２であった。ＣＥ投与群において有意にこれらの三種すべてのテストでスコアの改善を認めた（ｐ＜０．０５）。プラセボー投与群においては有意な変化を認めなかった。

2．血清エストラジオール濃度（Ｅ２）が２０ｐｇ／ｍｌ以上の症例ではアポリポ蛋白Ｅ（Ａｐｏ　Ｅ）は3．７５±１．１３ｍｇ／ｄｌ、Ｅ２が２０ｐｇ／ｍｌ未満の症例においてはアポＥは４．８０±１．４９ｍｇ／ｄｌで有意に高値を示した。閉経後女性にホルモン（エストロゲン）補充療法を施行することによりアポＥは顕著に抑制された（ｐ＜０．０１）。

（考察）ＡＤの少なくとも臨床症状の改善にエストロゲンが有効であると考えられる。ＡＤの老人斑はアミロイドからなる。アミロイドの主成分はβ－蛋白である。アポリポ蛋白Ｅはβ－蛋白の沈着を促進する一つの因子と考えられている。またアポリポ蛋白Ｅのε４対立遺伝子が遅発性ＡＤのリスク因子と報じられている。今回エストロゲンによりアポリポ蛋白Ｅの抑制がみられた。ＡＤにおけるエストロゲンのアポリポ蛋白Ｅへの影響も重要であると考えられそのフェノタイプの分析が急がれる。

（文献）Honjo, H., et al : Senile Dementia - Alzheimer's Type and Estrogen. Horm. Metab. Res. 27 : 204 - 207 (1995) (in press)

18 タウはラットの組織で広く発現している

顧 擁軍、小山 文隆、井原 康夫
(東京大学医学部脳研病理)

[要約] タウは神経系特異的なタンパク質と考えられてきた。今回我々はquantitative RT-PCR法を用いてラットの様々な組織を検討し、その全てでタウが発現されることを見い出した。Cerebral cortex ほどではないが、retina、 skeletal muscle、 cardiac muscle、 thyroid gland、 adrenal gland、 testis、 lung、および kidney でタウ mRNA が比較的高いレベルで発現していた。Stomach、 aorta、 thymus、 liver および spleen でも発現レベルは低いが確認出来た。次に発現しているタウのアイソフォームを検討したところ、thyroid gland、testis、kidney ではほとんど中枢神経型 (low molecular weight) タウで、striated muscle とcardiac muscleでは "big tau"と呼ばれる末梢神経型 (high molecular weight)タウが発現していた。Retinaとadrenal glandには両方の型のタウが存在した。Western blot 法によるタンパク質レベルの解析でも、mRNAレベルでの結果を確認した。以上の結果より、タウ遺伝子は神経系以外の組織で広く発現していることが分かった。

[目的] タウは微小管結合タンパク質の一つで、 微小管重合を促進し安定化することが知られている。 またタウはアルツハイマー病(Alzheimer's disease, AD)脳における神経原線維変化(Neurofibrillary tangle, NFT)の主要構成成分である(1, 2)。また、タウには三つの領域における alternative splicing により分子多様性が存在する。N末端側に29個あるいは58個のアミノ酸の挿入により3種のアイソフォーム(L,M,S型)が生じる。C末端側繰り返し配列が三つのものと四つのもの(それぞれ3および4リピート型)がある(1, 2)。さらに、ラット末梢神経のタウには254個のアミノ酸が挿入されており、"big tau"と呼ばれる(2)。タウは神経系特異的なタンパク質と考えられているが、最近、ミオパチー患者やクロロキン処理したラットの筋細胞にタウが存在することが免疫組織学的に示されている(3, 4, 5)。このことから、 病的条件下でタウ遺伝子が神経系以外の組織でも発現される可能性が考えられた。そこで我々はラットの様々な組織におけるタウの発現をmRNAおよびタンパク質レベルで検討した。

[方法] 10週齢の Wistar 雄ラットを断頭し、 様々な組織を速やかに取り出し、−80℃で凍結保存した。Total RNA は Trizol 試薬を用いて調製し、OD260値により定量した。cDNAはランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素で合成した。

Quantitative PCRは以下のように行なった。タウおよび glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (タウの発現の内部標準)プライマーを合成し、それぞれのプライマーのantisense strandの5'末端を ^{32}Pで標識した。これら2組のプライマーを共存させ、一本のチューブで94℃ 45秒、 45℃ 3分、72℃ 2分のPCR反応を 21サイクル行なった。 100μl反応系あたり鋳型としてtotal RNA 40 ngより逆転写したcDNAを用いた。タウの分子多様性を調べる場合は、多様性を与えるそれぞれの領域のプライマーを合成し、 antisense strandの5'末端を32Pでラベルして、94℃ 45秒、 55℃ 3分、72℃ 2分のPCR反応を25サイクル行なった。PCR産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、イメージアナライザー(Fuji BAS2000)で放射能強度を測定した。

タンパク質レベルのタウの検出は以下のように行なった。各組織一定量をホモジナイズし、100℃ 5分熱処理し、 可溶性画分を得た。Western blot を行なった後、Tau1と5E2などの抗体と反応し、 ECLシステムで検出した。

[結果] 図1は各組織でのタウ mRNA の発現を示している。 筋組織に加え、ここで調べた組織全てでタウ mRNA を検出出来た。その中で2種類の横紋筋(skeletal muscle、cardiac muscle)と二つの内分泌組織(thyroid gland、adrenal gland)と二つの臓器(lung、kidney)では、比較的高いレベルのタウ mRNA が存在していた。

Kidney、thyroid glandおよび testis では中枢神経型タウが発現するが、skeletal muscle と cardiac muscleでは "big tau" がほとんどであった。 Retina と adrenal gland には両方の型のタウが存在していた。

タウのN末端側アイソフォームに関して、Cerebral cortex ではS型は40%、M型は41%、L型は19%であった。これと比べて、横紋筋ではS型タウが少なく、testis、thyroid gland、kidney および retina では多く発現していた。また、C末端側アイソフォームに関し、Cerebral cortex では3リピートは7%しか発現しておらず、大部分は4リピートだったが、testis では70%、thyroid glandでは40%、kidneyでは43%の3リピート型タウが発現していた。

各組織におけるタウの存在を確かめるため、熱安定性画分を Western blot 法で検討した。ここで調べた全ての組織でタウをタンパク質レベルで検出することが出来た。また、タウのアイソフォームはmRNAの結果とほぼ一致した。さらにこれらのタウは一部リン酸化されていることもわかった。

以上の結果より、タウは神経系以外にも様々な組織に存在することが分かった。

[考察] これまで、タウは神経細胞特異的なタンパク質と考えられてきた。しかしタウは testis で発現し、nuclear reshaping と vesicle transporting の機能が考えられている(6)。Liver と kidney での mRNA の存在も報告されている(7)。また、免疫組織学的方法で患者の skeletal muscle のほかにヒトの retina でタウが神経系細胞でも非神経系細胞でも発現していることも示されている(8)。我々は神経系以外の組織でも広く発現していることをmRNAおよびタンパク質レベルで示した。また、リン酸化されていたタウの一部はADのNFTに特異的に存在するエピトープも有していることが分かった。神経系以外の組織においてタウが存在する細胞種類および部位、機能については不明な点が多い。今後リン酸化部位の決定および in situ hybridization 等でさらに検討する必要がある。

[文献]

(1)Goedert M. (1993) TINS, 16:460-465
(2)Goedert M. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:1983-1987
(3)Askanas V. et al. (1994) Am. J. Pathol., 144: 177-187
(4)Lübke U. et al. (1994) Am. J. Pathol., 145:175-188
(5)Murakami N. et al. (1995) Muscle and Nerve (in press)
(6)Ashman J. et al. (1992) Biol. Reprod., 46:120-9
(7)Kenner L. et al. (1994) Hepatology, 20:1086-9
(8)Löffler K. et al. (1995) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36:24-31

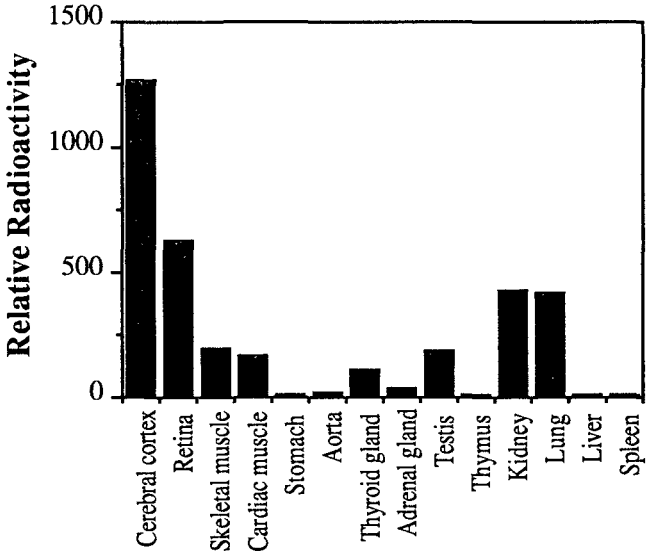


Figure 1. Relative amount of tau mRNA expressed in rat tissues. Reverse transcribed cDNA from the same amount of total RNA in various tissues were used as templates for quantitative PCR.

19 アルツハイマー病脳の神経原線維変化に存在する燐酸化タウの脱燐酸化反応

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(AD)脳における神経原線維変化の主な構成成分は過剰に燐酸化されたタウ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(PDPK)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を基質とし、その脱燐酸化反応を検討した。cdc2キナーゼとcyclin-dependent kinase 5 (cdk5) 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)によって脱燐酸化された。さらに脱燐酸化反応の部位特異性を検討するためにタウの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（セリン１９９とセリン２０２）、及び３９６番目のセリン残基（セリン３９６）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製した。牛脳より精製したタウには作製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の電気泳動上の移動度が増加した。さらに成熟脳のタウに比べ燐酸化を強く受けていることが知られている胎児脳のタウ（胎児タウ）を基質として用いた脱燐酸化反応では、蛋白質脱燐酸化酵素1(PrP1)、PrP2AhとCaNにより電気泳動上の移動度の増加が観察された。抗体による脱燐酸化部位の検討では、セリン１９９及びセリン２０２、セリン３９６がPrP1、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PDPKで燐酸化されたタウの脱燐酸化反応にPrP1、PrP2AとCaNが関与する可能性が示唆された。

[目的]

AD脳に存在する神経原線維変化の主要な構成成分は過剰に燐酸化されたタウ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異常が示唆される。今回、神経原線維変化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]

タウを牛脳(1)、胎児タウをラット脳(2)より精製した。ラット脳より、GSK3α(3)、PrP2Ah(1)、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cdk5(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。PrP1の触媒サブユニットは、ベーリンガーマンハイムヤマノウチより購入した。ヒト最長タウ(8)のセリン１９９、セリン２０２、スレオニン２０５（Peptide-1）およびセリン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のセリン１９９、２０２、３９６に化学的に燐酸を

結合させた燐酸化ペプチドを合成し家兎に免疫し、ポリクローン抗体(anti-PP-1、anti-PP-2)を作製した(9)。

[結果および考察]

cdc2キナーゼ、cdk5、GSK3αはタウを燐酸化した。cdc2キナーゼ、cdk5を用いて燐酸化したタウは、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。またGSK3αを用いて燐酸化したタウは、PrP2Acによっても脱燐酸化された。精製したタウは、作製した二種類の抗体と反応し、セリン１９９、セリン２０２及びセリン３９６が部分的に燐酸化を受けていることが示された。PrP2AhとCaNによる脱燐酸化反応により、タウのSDS-PAGE上の移動度は増加した。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。さらに胎児タウを基質としPrP1、PrP2Ah、CaNとPrP2Cにより脱燐酸化反応を行なったところPrP1、PrP2AhとCaNによってSDS-PAGE上の移動度は増加した（図１）。anti-PP-1、anti-PP-2に対する免疫反応性はPrP1、PrP2AhとCaNによる脱燐酸化反応により消失した（図１）。以上の結果より神経原線維変化内に存在するタウの燐酸化部位の脱燐酸化反応にPrP1、PrP2AhとCaNが関与する可能性が示唆された。今後、AD脳での三種類の酵素によるタウの脱燐酸化の異常を詳細に検討する必要がある。

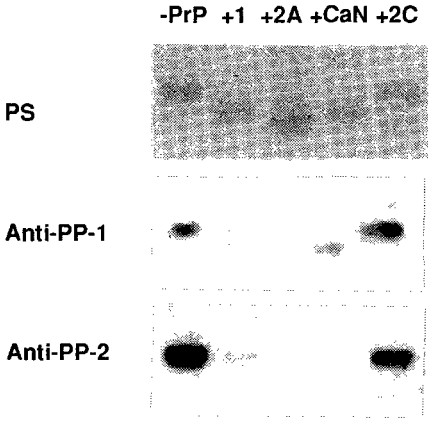


図１　各種蛋白質脱燐酸化酵素による胎児タウの脱燐酸化反応
胎児タウを基質としそれぞれの脱燐酸化酵素を加え脱燐酸化反応後、電気泳動を行ない蛋白染色、およびanti-PP-1, anti-PP-2によるイムノブロットを施行した。

[文献]

1) Yamamoto, H., Saitoh, Y., Fukunaga, K., Nishimura, H., and Miyamoto, E. (1988) *J. Neurochem.* **50**, 1614-1623

2) Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., and Ihara, Y. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17047-17054

3) Yang, S. D., Song, J. S., Yu, J. S., and Shiah, S. G. (1993) *J. Neurochem.* **61**, 1742-1747

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

9) Ono, T., Yamamoto, H., Tashima, K., Nakashima, H., Okumura, E., Yamada, K., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Miyakawa, T., and Miyamoto, E. (1995) *Neurochem. Int.*, in press

20 B型MAO阻害剤、deprenyl、の慢性投与による老齢マウス脳内の生化学的老化マーカーの変動

江頭　亨

大分医科大学　薬理学教室

〔要約〕Deprenyl による寿命延長の作用機序をMAO阻害剤および抗うつ薬を用い、生化学的老化マーカーに対する効果から比較検討した。12ヶ月齢の ddY系雄性マウスに deprenyl, clorgyline, imipramine および mianserine を3ヶ月間経口投与した。老齢マウス脳のMAO-A およびMAO-B 活性は若年マウスに比較して、それぞれ低下および増加するが、deprenyl および clorgyline 投与でいずれも著明に低下した。老齢マウス脳の脂質過酸化物に対してこれら薬物はなんら影響を与えなかった。一方、deprenyl長期投与でのみ、脳の Mn-SOD および血漿中 Cu,Zn-SOD の有意な活性増加が認められた。これら薬物にはラジカル消去作用は認められなかった。deprenyl による寿命延長作用の機序として、deprenyl長期投与による老齢マウス脳の MAO-B活性の低下と SOD活性の増加が関わっているものと思われる。

長寿科学は興味ある命題の一つである。最近、deprenyl投与でラットの寿命が延長するとの興味ある報告が出された[1]。Deprenyl は Knoll[2] により MAO-B阻害剤として報告されて以来、抗うつ薬として使用されたが、現在、抗パーキンソン薬としての可能性が検討されている。そこで、今回この deprenyl による寿命延長効果の作用機序を解明すべく、この効果が MAO阻害作用、抗うつ作用またはその他の作用に因るものであるかを、数種の MAO阻害剤および抗うつ薬を用いて、種々の生化学的老化マーカーを指標にして比較検討した。

〔実験方法〕

12ヶ月齢の雄性マウスに deprenyl(0.5mg/kg/day), clorgyline(0.5mg/kg/day), imipramine(20mg/kg/day), mianserine(20mg/kg/day) を3ヶ月経口投与した。投与終了後、脳および血漿を採取し、-80°Cで保存した。Monoamine oxidase(MAO) 活性：脳ミトコンドリアを酵素試料とし A型MAO (MAO-A)活性は [^{14}C]-5-HT を、B型MAO(MAO-B)活性は [^{14}C]-β-PEA を基質として radioisotope法で測定した[3]。脳過酸化脂質量：脳の過酸化脂質量は *t*-butyl hydroperoxideで刺激する chemiluminessence法で測定した[4]。Superoxide dismutase (SOD)活性：脳および血漿中の Mn-SOD および Cu,Zn-SOD およびラジカル消去能は電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて測定した[5]。

〔結果〕

(1). MAO活性：若年マウス脳に比べ老齢マウス脳の MAO-A活性は有意に減少し、MAO-B活性は有意に増加していた。この老齢マウスに MAO-A およびMAO-B の阻害剤である clorgyline, deprenyl を慢性投与したところ、それぞれ有意な活性低下を示した。一方、抗うつ薬である imipramine および mianserine慢性投与の場合は、imipramine投与で MAO-B活性が低下した以外はなんら活性変化は認められなかった（図１）。

(2). 脳脂質過酸化物：脳ホモジェネイトの 800xg上清を用いて脳脂質過酸化物量を測定したところ、若年マウス脳に比べ老齢マウス脳の脂質過酸化物量は約 2.5倍に増加していた。この老齢マウスに 4種の薬物を慢性投与しても、この脳の脂質過酸化物量には変化は現われなかった。

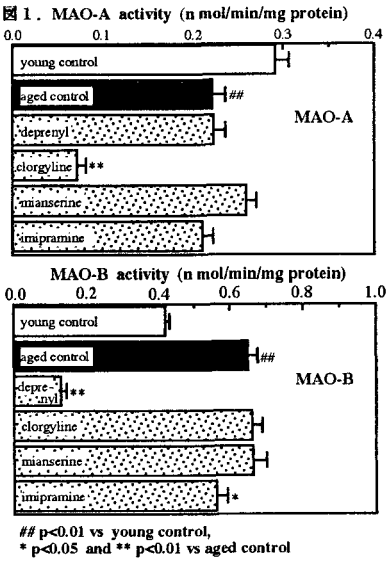
(3). SOD活性：脳中の Cu, Zn-SOD, Mn-SOD および血漿中の Cu,Zn-SOD を ESR を用いて測定した。若年マウス脳にくらべ老齢マウス脳の Cu,Zn-SOD および Mn-SOD活性は増加傾向にあった。この老齢マウスに 4種の薬物を慢性投与したところ、deprenyl投与群で脳中の Mn-SOD活性の有意な増加が見られた。しかし、その他の薬物では有意な変化は認められなかった。一方、血漿中の Cu,Zn-SOD活性も deprenyl投与群での

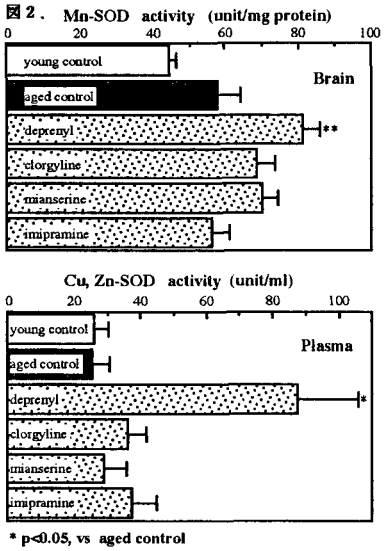
み、有意な増加が見られた（図２）。

(4). ラジカル消去能：この 4種の薬物にラジカル消去能があるか否かを ESRを用いて、*in vitro* で検討した。しかし、4種薬物とも、superoxide anione (O_2^-), hydroxyl radical (·OH) および安定ラジカル (DPPH radical) をトラップする作用は有していなかった。

〔考察〕

Deprenyl投与で寿命が延長する作用機序の一つとして、脳の老化が抑制される事が考えられる。Deprenyl は MAO-B の阻害剤として知られており、その慢性投与により老化で増加していた MAO-B 活性を著明に阻害した。一方、MAO-A の阻害剤である clorgyline の慢性投与は MAO-A活性を著明に阻害したが、clorgyline には寿命延長効果が見られない事から、MAO-B活性を阻害する事に意味があるのかもしれない。事実、l-dopa の長期投与でマウスの寿命が延長するとの報告がある[6]。また、脳内 dopamine 含量と寿命とは関連があるとの報告もある[7]。この事より、deprenyl の慢性投与で MAO-B活性が阻害され、dopamine含量が増加した事によるかもしれない。一方、老化につれ MAO-B活性が増加することが知られている。この事は、MAO-B の活性化でモノアミンの代謝が亢進し、アルデヒドや活性酸素種などのフリーラジカルが多量に放出され、脳における脂質過酸化の惹起・進展が脳の老化に関連していると考えられる。MAO-B活性を阻害する事はこのフリーラジカル発生を抑制する事に関わるかも知れない。脳における脂質過酸化亢進を抑制するためには、フリーラジカルの発生を抑制するか、抗酸化作用の亢進および抗酸化物質の増加による事が考えられる。今回、4種の薬物を投与したが、老齢マウスの脳の脂質過酸化を抑制しなかった。また、この4種の薬物とも活性酸素種の O_2^- や ·OH、また安定ラジカルの DPPH radical をトラップしなかった。この事より、deprenyl はフリーラジカル発生を抑制する事には直接関わっていないものと思われる。しかし、deprenyl慢性投与でのみ、脳および血漿中の SOD活性の増加が認められた。一般的に、SOD は O_2^- の消去酵素であり、フリーラジカルが関与した病態との関わりが良く知られている。また、比代謝率あたりの SOD活性と寿命とに正の相関があるとの報告もある[8]。この事より、deprenyl による寿命延長効果の一因として、deprenyl 慢性投与により抗酸化酵素であるSOD含量増加が考えられる。以上より、deprenyl による寿命延長の作用機序に、MAO-A阻害作用や抗うつ作用は関与していない事が判明したが、この作用が MAO-B阻害効果によるものであるのか、また、deprenyl による直接作用で SOD含量が増加するものであるか、今後の問題である。





〔参考文献〕

(1) Knoll, J. (1988) Mech. Ageing. Dev. 46: 234-262. (2) Knoll, J. et al. (1972) Adv. Biochem. Psychopharmac. 5: 393-408. (3) Egashira, T. et al. (1984) Life Sci. 34: 915-921. (4) Flecha, B.G. et al. (1991) Free Rad. Biol. Med. 10:93-100. (5) Miyagawa, H. et al. (1988) J. Clin. Biochem. Nutr. 5: 1-7. (6) Cotzias, G.C. et al. (1977) Science 196: 549-551. (7) Morgan, D.G. et al. (1987) JAGS 35: 334-345. (8) Tolmasoff, J.M. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 2777-2781.

21 軽微な頭部頻回衝撃によるタウ蛋白の変化
-Alzheimer病の病理過程との関連性-

○金山　厳、武田雅俊、新川久義、工藤喬、西村健
大阪大学医学部精神医学教室

〔要約〕

疫学調査および神経病理学的研究により(2)、頭部外傷はアルツハイマー病のリスクファクターであるとされている。またボクサー脳症患者の剖検脳では老人班、神経原線維変化が多数認められる(3)。これまで我々は、頭部への機械的傷害によりアルツハイマー病と類似した病理過程を示すかどうかについて、頭部外傷モデルを作製し神経病理学的に検討してきた。前回、軽度および重度機械的傷害の単回衝撃における急性期蛋白変動と細胞骨格蛋白の変化による比較検討により、軽度機械的傷害の特徴を明らかにし、1回の衝撃のみではほとんど障害をきたさない軽微な衝撃が繰り返し作用した場合における細胞骨格蛋白の1週間後の変化について、衝撃直下の神経細胞にリン酸化ニューロフィラメントが蓄積することを報告した。今回は、この軽微な衝撃が反復作用した場合の細胞骨格蛋白の変化についてリン酸化ニューロフィラメントに対する抗体、MAP2に対する抗体、tau-1抗体を用いて長期的に検討した。

方法

雄ウィスター系ラット(300-350g)を麻酔下にて固定し、歯科用ドリルを用いて右頭頂側頭部に硬膜を完全な状態にして骨窓をつくり、チューブを周辺部の頭蓋骨に接着した。チューブ内は生理食塩水で満たし、fluid percussion装置に連結した。振り子を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。再度衝撃を施行するラットおよび衝撃を施行しないsham-operation群は、チューブの先端に栓をしてゲージに戻した。軽微な機械的障害(1.0 atm)にて、毎日1回ずつ計7回衝撃を施行し、最終衝撃施行より一定期間後にホルマリン固定後、その脳組織をABC法による免疫染色により細胞骨格蛋白及び関連蛋白の変化を検討した。またtau-1による免疫染色では、アルカリフォスファターゼ処理したものを処理していないものと比較検討した。

結果

衝撃1週間後には衝撃部位で細胞構築の乱れ、GFAPの増生がみられ、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(p-NFH)、MAP2で強陽性に染色されたが、遠隔領域で変化はなかった。しかし1カ月後には、傷害と反対側の大脳皮質、海馬など広範囲にわたって神経細胞脱落がみられ、p-NFHが異常蓄積したニューロンが増加していた。またtau-1で免疫染色したところ、sham-operation群ではアルカリフォスファターゼ処理していないものと処理したものでは、tau-1の染色性に差は認められなかったが、軽度頻回衝撃を施行した実験群では、アルカリフォスファターゼ処理したものの歯状回顆粒細胞層において、アルカリフォスファターゼ処理していないものと比較して核周囲にタウの免疫性の亢進が認められた（Fig.1,Fig.2）。

考察

アルツハイマー病に特徴的とされる神経原線維変化は、paired helical filamentという構造物からなり、その主要成分は異常リン酸化されたタウであることがわかっている。今回使用したtau-1抗体は、タウ蛋白のSer^{199}およびSer^{202}が脱リン酸化されていないと認識しないモノクローナル抗体であり、アルカリフォスファターゼ処理によって、反復衝撃した歯状回顆粒層のニューロンにおけるtau-1の染色性が亢進

したことから、顆粒細胞層ではリン酸化されたタウが増加していることが示唆される。アルツハイマー型痴呆では歯状回の顆粒細胞層に神経原線維変化が認められること、アルツハイマー病などの神経変性疾患においてはニューロフィラメントHの異常な蓄積がみられること(1)や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、アルツハイマー病の動物モデルとして、その病理過程の解明に役立つものと考えられる。

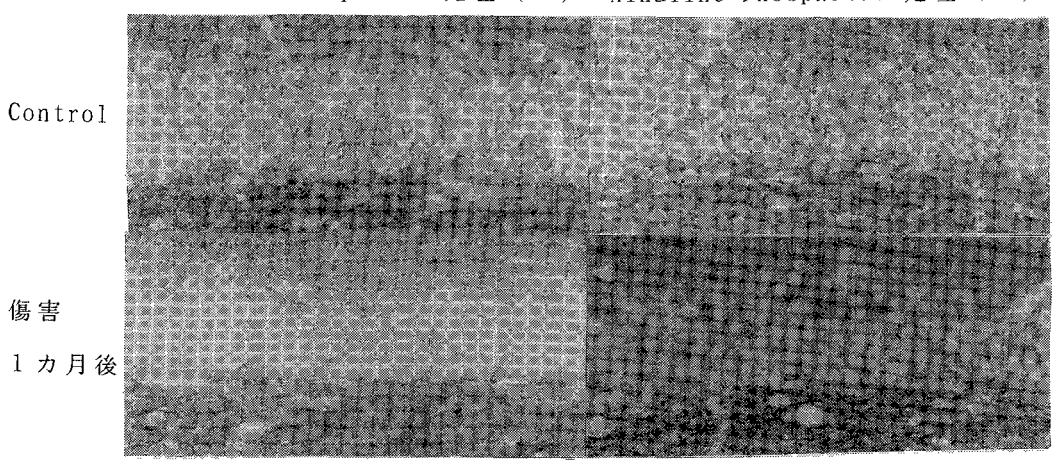


Fig.1　歯状回顆粒細胞層におけるtau-1の免疫染色

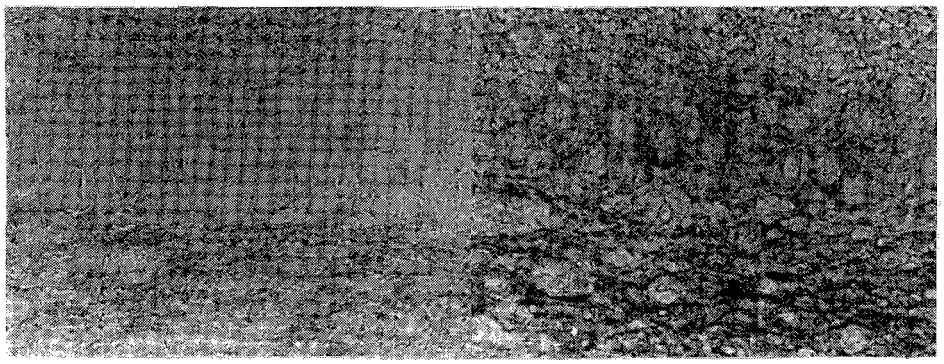


Fig.2　軽度頻回刺激1カ月後の顆粒細胞層における
リン酸化タウの核周囲への蓄積

文献

(1) Cote F, Collad J-F et al(1993) Cell 73, 35-46
(2) Mayeux R, Ottman R et al.(1993) Ann Neruol. 33;494-501
(3) Tokuda T, Ikeda S et al.(1991) Acta Neuropathol. 82;280-285

22 アルツハイマー病脳上清におけるモノクローナル抗体Tau-1とPHF-1を用いた非PHFリン酸化タウの定量

以倉康充、工藤 喬、Inge Grundke-Iqbal*、Khalid Iqbal*、武田雅俊、西村 健
大阪大学医学部精神医学教室
*New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities

〔要約〕

これまでにタウについて報告されているリン酸化部位のうち、モノクローナル抗体Tau-1とPHF-1により検出される部位について、リン酸化タウの定量を行った。対象として8例のアルツハイマー病（AD）患者、6例の年齢を一致させた正常者の死後剖検脳を用い、これらの側頭葉皮質より作製したホモジネートを遠沈し、PHF化していない浮遊性のリン酸化タウをradioimmunoslot-blot法(1)により測定した。その結果、Tau-1部位（アミノ酸配列189-207の1つ以上のSerおよびThr）にはADでは脱リン酸化により3.3ngの非PHFリン酸化タウが検出され、PHF-1部位（リン酸化されたSer^{396,404}）にはADで3.8ngの非PHFリン酸化タウが検出された。

[目的]

微小管関連蛋白の一つであるタウは正常脳でも豊富にみられ、主として軸索内に存在し微小管の安定作用や軸索の形態維持、軸索輸送に関与すると推定されている。AD脳ではタウは過剰にリン酸化された形で存在しており、病理学的所見としての神経原線維変化の微細構造であるpaired helical filaments (PHF)の主要な構成成分である。また、リン酸化により上記のような正常タウの生理的機能がin vitroで失われるため、タウの過剰なリン酸化がADにおいて神経細胞の変性を起こし、広範な神経細胞の脱落につながるとの推定がなされてきた。これまで数ヶ所の過剰なリン酸化部位が報告されているが、リン酸化タウの量についての具体的な報告はなかった。非PHFリン酸化タウはcytosol中に存在するPHF化されていない過剰リン酸化タウであるが、いわゆるPHFタウと同じ部位でリン酸化されており、正常タウからPHFタウへの中間的存在と考えられている(2)。今回我々は、AD患者および正常者の死後剖検脳ホモジネートの上清を用いて部位毎のリン酸化タウ量を測定し、差異の有無について検討した。

[方法]

8例のAD剖検脳、6例の正常対照者剖検脳(Netherland Brain Bandより提供)の側頭葉灰白質より作製したホモジネートを27,000×g, 4℃, 30分遠沈し、上清をSample Buffer(50mM Tris, pH7.6, 200mM NaCl[Tris Buffered Saline(TBS)]), Protease Inhibitors(1mM Phenylmethylsulfonyl Fuluoride, 0.015μM Aprotinin, 1μM Leupeptin, 1μM Pepstatin), Phosphatase Inhibitors(1mM Na_3VO_4, 5mM KF)にて総蛋白量が1μg/5μlとなるよう調整し、幅1cm毎に格子状にマークしたニトロセルロース膜(pore:0.2μm)に5μlずつ吸着させた。また、標準曲線用に精製した非PHFリン酸化タウを0.5-15ngの範囲でブロットした。

Tau-1反応用のニトロセルロース膜を室温で30分間乾燥後、150mlの3%(wt/vol)Bovine Serum Albumin(BSA)-TBS-0.1%NaN3にて室温で1時間Blockingし、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(226U/ml;Boehringer Mannheim), Phosphatase Inhibitors, 100mM Tris(pH8.0)にて37℃、18時間incubateした。PHF-1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、0.05μg/mlの^{125}I標識抗マウスIgG抗体(Amersham)を15ml加え、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）、ニトロセルロース膜を1cm角に切り、Gamma Counter(Packard)にて

radioactivityを測定した。

[結果]

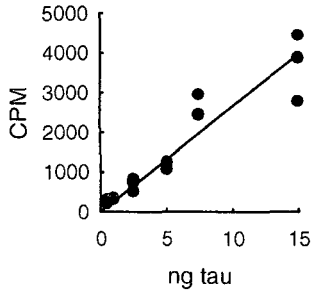


Fig.1 Tau-1による標準曲線

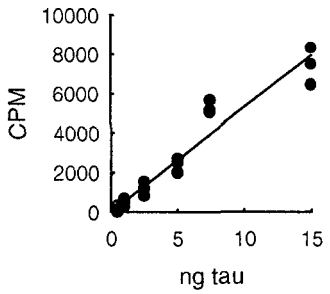


Fig.2 PHF-1による標準曲線

		ng tau/ug protein	
		AD(8)	Normal(6)
Tau-1	脱リン酸化(-)	6.4±0.8	6.0±0.8
	脱リン酸化(+)	9.7±3.5	6.8±1.5
PHF-1		3.8±1.4	2.1±0.2

Table. 上清中の非PHFリン酸化タウ量

Tau-1は正常タウを認識する抗体であるため、非PHFリン酸化タウの量は脱リン酸化後と前のタウの量の差として算出した。その結果1μgの蛋白あたりTau-1部位にはADでは3.3ng、正常者では0.8ngの非PHFリン酸化タウが存在し、PHF-1部位にはADで3.8ng、正常者では2.1ngの非PHFリン酸化タウが存在した。

[考察]

非PHFリン酸化タウはPHFタウと同じリン酸化部位を持ち、タウのリン酸化はまずcytosolで起こりその後PHF化されると推定されている。今回は脳ホモジネート上清を用いて、Tau-1部位およびPHF-1部位について、PHF-1部位により多くのAD P-tauが検出されたが、これはタウの過剰なリン酸化に部位毎に差異が認められ、より優位にリン酸化されている部位が存在することを示している。

昨年の本学会で我々は、脳ホモジネートについて同様な検索を行い、非PHFリン酸化タウとPHFタウの計ではTau-1部位の過剰リン酸化タウはPHF-1部位の約2倍が存在することを示した。今回の結果からAD P-tauは両部位でほぼ同量が存在したことから、Tau-1部位のPHFタウはPHF-1部位の数倍存在するものと考えられ、こうした差違の持つ意義を検討することがADの病態生理の解明に新たな視点を与え得るものと思われる。

また、正常脳においてもAD脳に比べ低いレベルではあるものの非PHFリン酸化タウが検出されたが、最近の研究では正常脳でもタウはPHFタウと同じ部位でリン酸化されており、死後も活性を持つ生体内の種々のphosphataseにより脱リン酸化されるらしいことから(3)、完全に脱リン酸化されずに残ったタウが検出されたと考えられる。

[参考文献]

(1) Khatoon, S., Iqbal, K., et al. (1992) J. Neurochem. 59, 750-753

(2) Köpke, E., Iqbal, K., et al. (1993) J. Biol. Chem. 268(32), 24374-24384

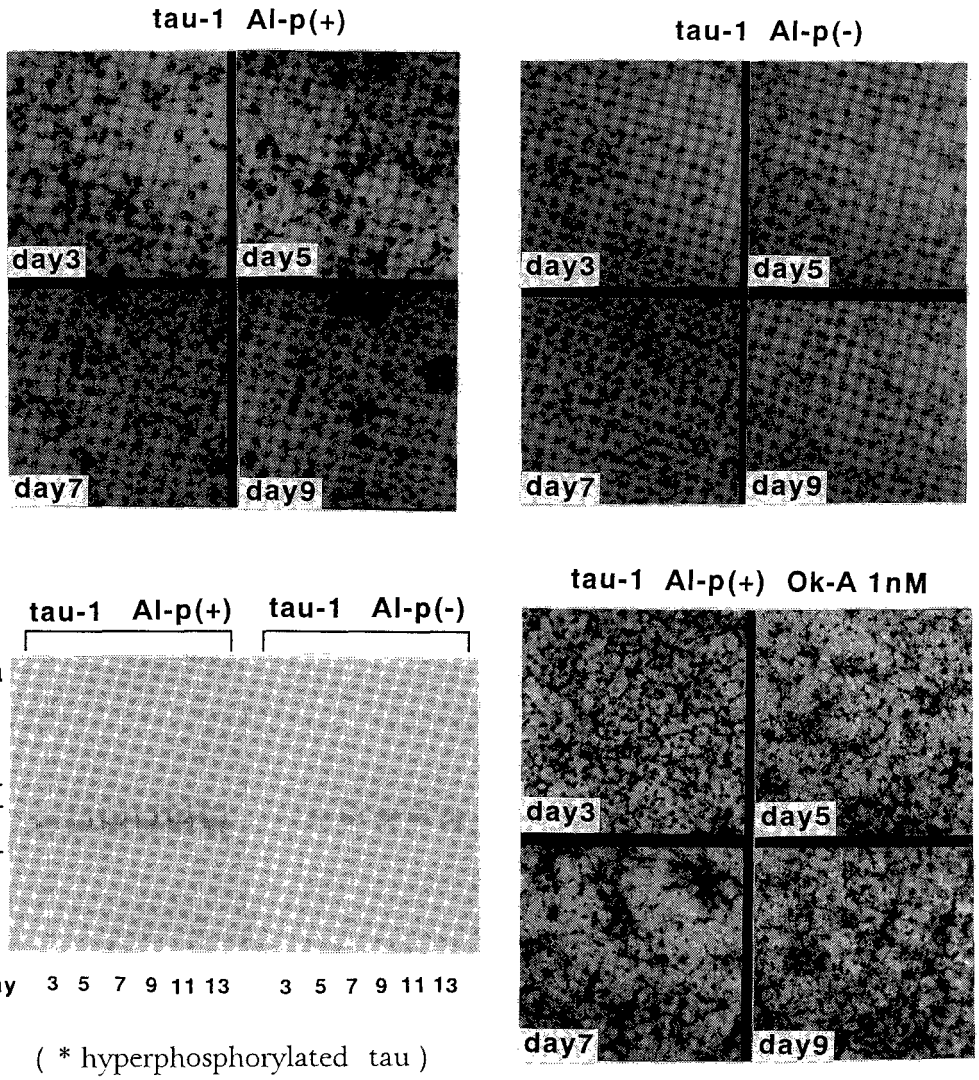
(3) Eriko, S. M., Lee, V. M.-Y., et al. (1994) Neuron 13, 989-1002

23 無血清初代培養神経細胞における過剰リン酸化タウの発現と、低濃度オカダ酸の長期暴露による変化について

柏木雄次郎、工藤　喬、中村　祐、以倉康充、武田雅俊、西村　健
（大阪大学医学部精神医学教室）

〔要約〕
アルツハイマー病脳に出現する神経原線維変化は異常リン酸化タウからなるが(2)、このタウの異常リン酸化を解明するモデルとしての培養系について検討した。無血清初代培養した胎児ラットの神経細胞に発現する過剰リン酸化タウを、免疫組織化学およびウエスタン・ブロッティング法により経時的にその変化を観察したところ、過剰リン酸化タウは神経回路の形成時期に一致して培養３日目頃から徐々に発現量を増し、培養期の中で神経回路の形成がほぼ終了する１１日目頃に最も多い発現量を示している事を確認した。この培養系に、プロテイン・フォスファターゼの強力で特異的な阻害剤であるオカダ酸１ｎＭを培養３日目から添加し長期間（３～１０日）暴露したところ、免疫組織化学において対照群に比してリン酸化タウの免疫反応性の増強を認めた。
〔方法〕
１）細胞培養：胎生１７日齢のウイスター・ラットより大脳を取り出し細断した組織を、トリプシン・ＤＮａｓｅＩで消化し、polyethyleneimine コートした cover slip 上に 5×10^5 ／cm^2 の細胞密度で播種し、無血清培地にて培養した。
２）オカダ酸の添加：ＤＭＳＯで１ｍＭに希釈したオカダ酸（Ok-A）を、無血清培地中に１ｎＭとなるように添加して、このオカダ酸含有無血清培地を用いて培養３日目より２日毎に培地交換を行った。
３）免疫組織化学：単層に培養した細胞をＰＢＳ(-)にて洗浄し、メタノール・酢酸混合液を用いて固定し、ｔａｕ－１、ＰＨＦ－１の各抗体を用いて免疫染色した。なお、ｔａｕ－１抗体は脱リン酸化されたエピトープを認識するため、染色前にアルカリフォスファターゼによる脱リン酸化処理を行なった群と、この処理を行なわなかった群とを比較した。
４）ウエスタン・ブロッティング法：3.5μg／lane の蛋白をＳＤＳ-ＰＡＧＥにて電気泳動し、ｔａｕ－１抗体を用いて immunoblotting した。免疫組織化学と同様の処理を行ない、ペルオキシダーゼ標識した２次抗体を用いた。
〔結果〕
１）胎生１７日目のラット神経細胞を無血清初代培養したところ、過剰リン酸化タウは培養３日目から徐々に発現し、培養１１日目頃に最大の発現量を示した。
２）この培養系に、１ｎＭオカダ酸を培養３日目から加えたところ、免疫組織化学的にリン酸化タウの免疫反応性の増強を認めた。
〔考察〕
胎生期から新生児期の神経回路が盛んに形成される時期には、生理的にタウが過剰にリン酸化され、神経回路が完成し成人になると過剰リン酸化が減少するが、我々の結果は、in vitroでもほぼ同様の変化が生じている事を示している。一方、この培養系にオカダ酸を加えて生じるリン酸化タウの免疫反応性の増強については、オカダ酸がプロテイン・フォスファターゼ１または２Ａ

を阻害することにより脱リン酸化が阻害されて生じるものと考えられるが、それぞれの真の解離定数（1＝200ｎM、２A＝30ｐM）を考え合わせると、プロテイン・フォスファターゼ２Ａが主に関与していると考えられる(1)。この培養系は、今後さらにこれらの変化を定量化すると共に、他のフォスファターゼ・インヒビターによる変化を検討してゆくことで、タウの過剰なリン酸化や脱リン酸化の機序を検討するのに有用なモデルであると考えられる。



(* hyperphosphorylated tau)

〔文献〕
(1) Bialojan, C., et al. (1988) Biochem. J. 256, 283-290
(2) Lee, V. M.-Y., et al. (1991) Science 251, 675-678

24 ラットの rebound hyperphagia に閉所ストレスを加えた時の摂餌行動と視床下部セロトニン代謝

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 に閉所条件を加えた時の摂餌行動と視床下部セロトニン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 の摂餌量は、22時間の絶食後の摂餌に比し2時間後で約180%まで増加した。これに閉所条件を加えると摂餌量はさらに増加し、22時間の絶食後の摂餌の約196%となった。摂餌により視床下部セロトニン濃度はいずれの群においても増加傾向を示した。しかし、rebound hyperphagia を呈したときの視床下部セロトニン代謝は22時間の絶食後の摂餌のそれと有意に差を認めず、また、rebound hyperphagia に閉所条件を加えた時においても22時間の絶食後の摂餌のそれと有意に差を認めなかった。これらのことより、視床下部は摂餌行動に深く関与しているといわれているが、時間制限給餌により生じる rebound hyperphagia およびこれに閉所条件を加えた時にみられる摂餌行動の増強に視床下部セロトニン代謝は関与していないことが示唆された。

はじめに　我々はラットに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、その後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断頭法を用い報告した[3)]。また、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、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) 2) 4)]。視床下部セロトニンは満腹感などに関与し、摂餌行動に深く関与していることが知られている。そこで今回我々は、この rebound hyperphagia および、これにストレスとして閉所条件を加えた時の摂餌行動と視床下部セロトニン代謝の変化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　実験方法は既報[1)]に多少の変更を加えて行った。すなわち、Wistar 系雌性ラット（12週齢、180-220 g）に chloral hydrate 麻酔下で Paxinos and Watson の図譜[5)]に従い guide cannula を視床下部（A -2.7mm, L +0.5mm, V -7.5mm from Bregma and dura surface）に挿入し、固定した。ラットを8時から20時を暗期とする明暗恒温条件下で個別の飼育用アクリルゲージ（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。そのうち一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、11時より閉所条件を加えないで自由に摂餌させた（A群）。他の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日間にわたり施行した。8日目に制限給餌を行った2群のうち1群は閉所条件を加えずに11時より自由に摂餌させた（B群）。他の1群は11時に前報[1)]の 100x150x100 mm の大きさのケージに移し閉所条件を加えてから自由に摂餌させた（C群）。実験期間中、水分摂取は自由に行わせた (n=4-8)。5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 濃度測定日の前日より膜長2ミリの I 時型透析プローブを挿入し、血小板由来のセロトニンの影響を認めなくなったことを確認後、 in vivo microdialysis 法によりそれら濃度を HPLC-ECD にて測定した。9時から15時まで30分毎に回収された視床下部細胞外液のうち、9時から11時までの5-HT, 5-HIAA 濃度を基礎値とした。測定条件として、作用電極はグラファイト電極で電位は +500mV とし、カ

ラムはエイコム社製 Eicompak MA-5ODS (2.5ø x150mm) を用いた。移動相は 0.1M 酢酸Na : 0.1M クエン酸 = 5:1, 10% メタノール, 50mg/l EDTA2Na の混合液で、流速は 0.25 ml/min とした。

各群間における細胞外液中 5-HT, 5-HIAA 濃度変化の統計学的解析として、実験条件と時間を 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。また、各群の摂餌直前の基礎値と摂餌後の各5-HT, 5-HIAA 値の比較、摂餌量の比較には t-test を用いた。

結果および考察　　自由摂餌再開後の 2 時間の摂餌量の平均はA群では 5.2±1.3g, B群では 9.4±1.6g, C群では 10.2±2.3g であり、B群、C群ともにA群に比し有意に増加しており rebound hyperphagia を認めた。さらに閉所条件を加えたC群の摂餌量は B群よりも増加する傾向にあった。これら 3 群の自由摂餌開始後の視床下部細胞外液中の 5-HT, 5-HIAA 濃度の変化を Fig.1 に示した。A群、B群では 5-HT 濃度は摂餌後増加し、各々 210 分後には基礎値の約120 %と180%となった。C群の 5-HT 濃度は摂餌開始 1 時間後に基礎値に比し最大約 130 %まで増加した後漸減した。これらは摂餌により視床下部セロトニン放出が増加するという報告に一致している[6]。しかしB群、C群ともにA群に比し 5-HT 濃度に有意に差を認めなかった。また、 5-HIAA 濃度はいずれの群においても摂餌による有意な変化を示さなかった。視床下部セロトニンは満腹感等に関与し、摂餌行動に深く関わっていることは知られているが、時間制限給餌により生じる rebound hyperphagia およびこれに閉所条件を加えた時にみられる摂餌行動の増強に視床下部セロトニン代謝は関与していないことが示唆された。

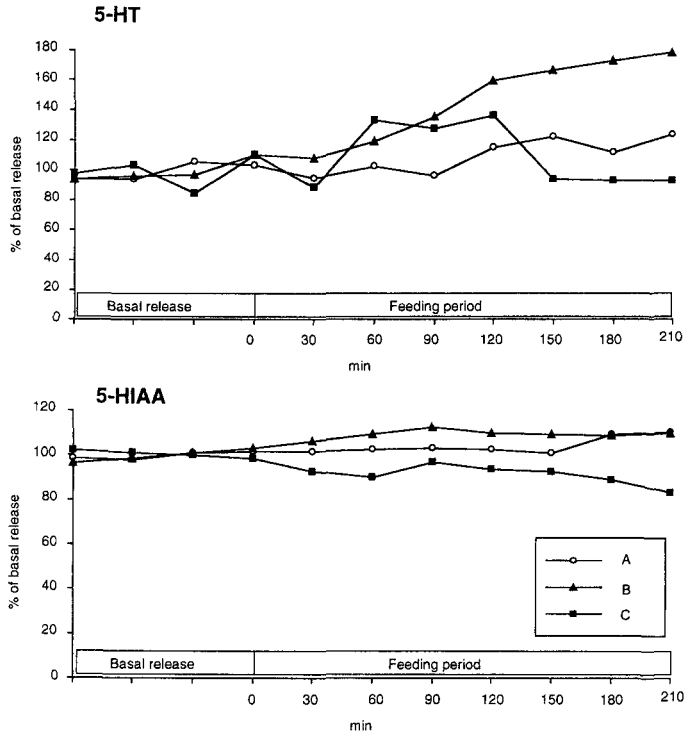


Fig.1. Changes in extracellular 5-HT, 5-HIAA levels in the rat hypothalamus during free feeding following 22 hours of food deprivation (A), free feeding not under (B) or under (C) space restriction during rebound hyperphagia following the time-restricted feeding schedule. Values are expresed as mean.

<参考文献> 1) 藤嵜泰利他(1994) 神経化学 33, 406-407. 2) 伊藤英樹他 (1993) 神経化学 32, 484-485. 3) 奥野正景他 (1991) 神経化学 30, 440-441. 4) 奥野正景他 (1992) 神経化学 31, 442-443. 5) Paxinos G and Watson C (1986) The Rat Brain, Academic Press. 6) Schwartz DH et al. (1989) Brain Res. 479; 349-354.

25 ラットの時間制限給餌によるrebound hyperphagiaに閉所ストレスを加えた時の摂餌行動と側坐核ドパミン代謝

藤嵜　泰利[1)]、切池　信夫[1)]、井上　幸紀[1)]、栗岡　政典[1)]、
奥野　正景[1,2)]、伊藤　英樹[1,3)]、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

〔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、閉所ストレスを加えたときの摂餌行動と側坐核（NAC）の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の一日摂餌量は、22時間絶食後の自由摂餌一日量に比べ、約150％まで増加した。そして、これに閉所ストレスを加えると一日摂餌量はさらに約180％まで増加した。22時間絶食および一日２時間の制限給餌から解放した時の rebound hyperphagia 時にはNACの細胞外液中DA濃度は上昇したが、rebound hyperphagiaに閉所ストレスを加えたときにはDA濃度は上昇しなかった。DOPAC、HVA濃度は３群間で有意な差を認めなかった。以上のことよりNACのDA系は閉所ストレスのrebound hyperphagia増強作用に関連していないことが示唆された。

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、そして閉所ストレスを加えるとさらに rebound hyperphagia が増強されることを報告してきた[3)]。我々は過食の生物学的基盤を明らかにするためにこのモデルを用い脳内の各部位でのモノアミン代謝を検討中である。その中で前回は前頭前皮質のDopamine (DA)代謝が関与していることを報告した[1)]。一方、側坐核(NAC)におけるDA系は報酬過程と関連しており、摂餌行動ではDA濃度は上昇するが、嫌悪性であるストレス条件下では反応が少ないことが報告されている[5,6)]。そこで今回この 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NAC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[2)]。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 [4)]の図譜に従い guide cannula をNAC（AP +1.0mm、L +1.2mm、V -5.0mm 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=4-5)。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。測定日に膜長3ｍｍの I 字型透析プローブを挿入し、DA、3、4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、および homovanillic acid (HVA)濃度の測定値が安定してからの３サンプルの平均値をそれぞれの基礎値とした。対照群として 測定日前日に餌を取り除き、22時間絶食させた後、閉所条件を加えないで自由に摂餌をさせた群（A群）を用いた。時間制限給餌をおこなった2群のうち1群は、閉所ストレスを加えずに自由に摂餌をさせた（B群)。残りの1群は摂餌前に既報[3)]の100ｘ150ｘ100ｍｍのステンレスグリッドのケージに移し閉所ストレスを加えてから、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。摂餌量の検定及び細胞外液中DA,DOPAC,HVA濃度の基礎値に対する変化の検定には t-test (paired)を用いた。

結果および考察　前回の報告と同様に自由摂餌開始後の摂餌量はA群に比べB群、C群とも有意に増加しておりrebound hyperphagiaが観察された(table1)。さらにＣ群の摂餌量はＢ群に比べて増加する傾向を示した。NACにおける細胞外液DA濃度はA群がC群に比べ有意に上昇し、B群もＣ群より上昇する傾向を示した。A群とＢ群の間には有意な差は認めなかった。DOPAC濃度は３群間に有意な差は認めなかった。HVA濃度はA群に比べＢ群が上昇する傾向を示したが、その他の群間に有意な差を認めなかった

(Fig.1)。個々の群では摂餌時の細胞外液DA濃度はA群、B群では有意に上昇したが、C群では有意な上昇を示さなかった。NACにおけるDA濃度は摂餌時に上昇しストレス負荷時には反応しないと報告されているが、今回の結果を考える限りrebound hyperphagia時に摂餌により上昇したDA放出が閉所ストレスを加えることにより減少しており、DOPACおよびHVA濃度がいずれの群においても基礎値より上昇し、これらの群間において差を認めなかったことから、閉所ストレスを加えるとNACの摂餌によるDA放出が抑制される可能性が示唆され、閉所ストレスのrebound hyperphagia増強作用には、NACのDA系は関与していないことが示唆された。

Table 1 Food intake (g)

Group	2Hours	4Hours	24Hours
A	4.5±1.3	6.8±2.5	12.7±2.4
B	6.4±1.3	8.5±1.6	20.6±1.2 *
C	8.0±1.8	10.7±2.0	24.1±1.0 *

* p<0.05 ; compared with Agroup　　Mean±S.E.M

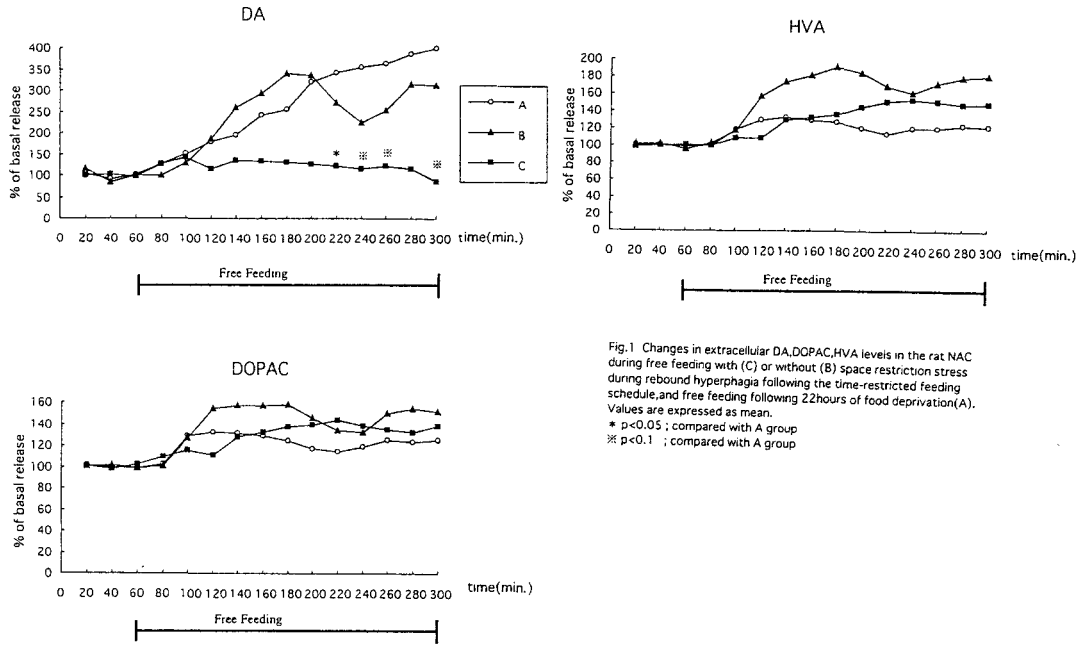


Fig.1 Changes in extracellular DA,DOPAC,HVA levels in the rat NAC during free feeding with (C) or without (B) space restriction stress during rebound hyperphagia following the time-restricted feeding schedule,and free feeding following 22hours of food deprivation(A). Values are expressed as mean.
* p<0.05 ; compared with A group
※ p<0.1 ; compared with A group

参考文献

1)藤嵜泰利他 (1994) 神経化学 33, 406-407　2)井上幸紀他 (1990) 神経化学 29, 256-257　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.　5)Radhakishum FS et al (1988) Neurosci.Lett. 85,351-356　6)吉田真美他 (1992)精神薬療基金研究年報 23, 48-54

26 トリのインプリンティング行動に関与する神経伝達物質の検索

塚田　裕三・金松　知幸・高原　ひろみ・加藤　久子
（創価大学・生命科学研究所）

〔要約〕ホワイトレグホンヒナによるインプリンティング行動(Imp.B.)の数量化を回転カゴを用いて試みた。刺激はカゴの左右から交互に提示した。初期刺激は光のpriming後計２時間、評価刺激は計10分間与えた。刺激側への追従回転数から正反応率を算出してImp.B.形成群・非形成群を選別した。評価３日間での正反応率が常に90％以上のものを形成群とした結果、41％の形成群が選別された。

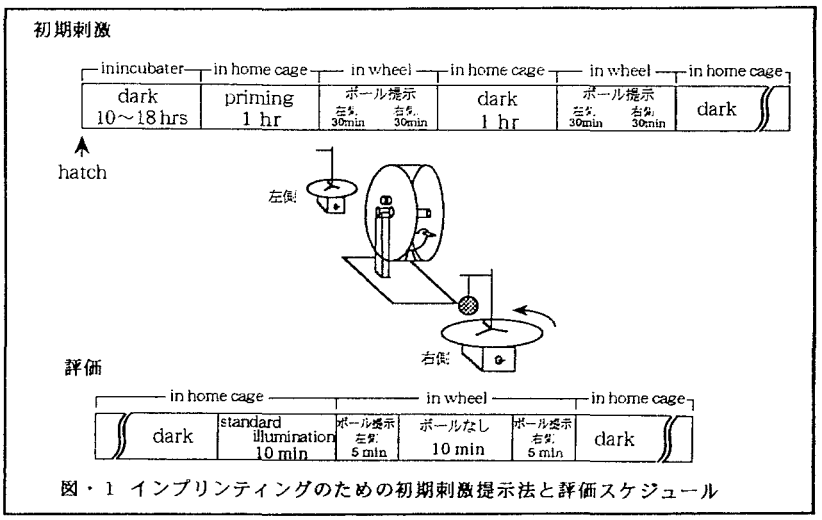
microdialysis法により脳のmedial hyperstriatum ventrale (MHV)部からのグルタミン酸(Glu)放出を調べた結果、形成群ではアセチルコリン(Ach)と同様にImp.B.に伴う放出量の増大が認められた。このことからImp.B.にはMHV部のGlu作動性シナプスが関与することが確かめられた。

〔はじめに〕

アヒル・ニワトリ等の早成性鳥類のヒナに見られるImp.B.とは孵化後の短期間内に初めて受容した刺激に対して恒常的に接近・追従行動を示す現象であり、学習・記憶の原型と見なされる。Imp.B.発現のためにはMHV部が必須であることが[^{14}C]-2-deoxyglucose法[1]により確かめられている。我々は今回Imp.B.を数量的に表示し形成群を選別する方法の開発を試み、併せてImp.B.に伴ってMHV部から放出されるアミノ酸の定量をmicrodialysis法を用いて行った。

〔方法〕

Imp.B.計測装置として直径40cmの回転カゴを用い、カゴが1/32回転(約４cmの移動)した場合に１カウントを数えるよう設定し、回転カゴの中心から左右１m先にturn tableとスタンドを置き、直径14cmの赤ボールをいずれか一方につり下げこれを刺激物体とした。暗室内で孵化したヒナにpriming光を与えた後に初期刺激を与え、翌日から１日１回評価テストを３日間行った。刺激の提示方法は(図１)の如くである。孵化後３日目からはテスト終了後の30分間、餌と水を与えた。３回の評価の結果からImp.B.形成率を次のように求めた。Imp.B.形成率(％)＝{ボールに向かった回転数／ボール提示時の総回転数}×100 。この値が３日間連続して90%以上を示すものをImp.B.形成群とし、90%以上を維持し得なかったものを非形成群とした。３回目のテスト終了後、両群のトリをエーテル麻酔下で脳固定器に固定しmicrodialysis



図・１ インプリンティングのための初期刺激提示法と評価スケジュール

用のガイドカニューレ(頭蓋骨からの深さ1.5mm)をMHV部に埋め込み、翌日評価テストを行った後に透析プローブ(膜長1.5mm)を挿入した。4時間後、運動による影響を最小限にするため回転を止めたケージにトリを入れmicrodialysis装置に接続しリンガー液(流速2 μl /min)で灌流を行った。灌流は静止時・ボール提示時・高カリウム液灌流時について行い15分毎に30 μlの透析液を回収した。この透析液中のアミノ酸をAccQ・Tag法によって定量し追従行動に伴う各種アミノ酸量の変動を調べた。

〔結果および考察〕

Imp.B.の数量化：Imp.B.形成群と非形成群を明確に選別するため図・1に示すスケジュールに従い初期刺激・評価テストを行った結果、Imp.B.形成群は41％、非形成群は59％で後者には日により行動量の変動の大きかったものも含まれている。この方式を採用することにより、刺激に向かっての追従行動のみを評価することでより安定したImp.B.形成群を選別することが出来た。

Microdialysis法によるMHV部からのアミノ酸の放出：1993年本学会でImp.B.に伴いMHV部よりAchが放出されることを報告した[2]。今回はアミノ酸、特にグルタミン酸(Glu)の挙動についてmicrodialysis法で検討を加えた結果、形成群でImp.B.に伴ってGluの放出量の増加が認められた。高カリウム液による灌流ではGluのほかにタウリンやGABAにも放出増加が認められ、これらのアミノ酸もトリ脳における神経伝達物質である可能性が示唆された。我々はすでにアヒルのMHV部へのアトロピンやカイニン酸の局所投与でImp.B.が消失することを報告し[3]、Imp.B.形成に際しMHV部でコリン作動性とGlu作動性シナプスが関与していることを示唆した。今回の実験でMHV部でのImp.B.に伴うGluの放出増加が実証され、Imp.B.形成にはGlu作動性シナプスの活動が関与していることが確かめられた。また、Imp.B.形成時にアヒルのMHV部でKainate-binding proteinやCalmodulinの遺伝子発現のあること[4]及びトリ脳MHV部にNMDA-R1遺伝子の発現のあること[5]が確かめられており、MHV部でのGlu作動性シナプスの重要性が裏付けられている。

表1　灌流液中の各種アミノ酸の濃度変化

a) 形成群

※	1	2	3	4	5	6	7
A.A.			ボール			high K	
Glu	19	13	315	90	2	54	58
Gln	21360	17164	21934	24070	14945	19113	14220
Tau	1428	1059	2574	2622	1598	4205	19581
GABA	–	–	–	–	–	151	181

(pmol/ml)

b) 非形成群

※	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A.A.			ボール			ボール			high K	
Glu	106	4	67	88	97	93	53	6	212	117
Gln	18731	14800	15674	15002	15623	14698	14041	13402	11202	13051
Tau	1132	1381	936	1168	736	683	736	672	5320	10729
GABA	–	–	–	–	–	–	–	–	310	54

※各番号は分画（15分間で30 μl）　(pmol/ml)

〔文献〕(1) Kohsaka, S. , Takamatsu, K. , Aoki, E. & Tsukada, Y. ; Brain Res. (1979) 172 539-544. (2) 金松知幸, 高原ひろみ, 塚田裕三 ; 神経化学 32(1) 330-331. (3) Takamatsu, K. & Tsukada, Y. ; Neurochem. Res. (1985) 10 1371-1391.(4) Kimura, N. , Kurosawa, N. , Kondo, K. & Tsukada, Y. ; Mol. Brain Res. (1993) 17 351-355.(5) Kurosawa, N. , Kondo, K. , Kimura, N. , Ikeda, T. & Tsukada, Y. ; Neurochem. Res. (1994) 19(5) 575-580.

27 脳老化促進マウスの学習・記憶力及び免疫機能低下のaFGFによる防止

大村　裕[1]、佐々木和男[2]、李　愛軍[3]、吉井春夫、深田有理子、家後　壽[1]、遠山育夫、花井一光、木村　宏[4]、野村靖幸[5]
（日本臓器製薬㈱　生物活性科学研[1]、富山大学工学部[2]、九州大学医学部[3]、滋賀医科大学[4]、北海道大学薬学部[5]）

〔要約〕

SAMP8に生後３週後からaFGFを１週１回、皮下注射を持続する。受動的回避学習及びモリス水迷路学習テストで調べると有意に生食水投与群に比し、記憶能力を正常に保させた。これは海馬に投射する内側中隔コリン作動性ニューロンの抗acetylcholine transferase((CAT) 活性を有意にaFGFが上昇させたためである。また、海馬ニューロンのムスカリン受容体の密度が生食水群に比し有意に増大していた。P8における内側中隔コリン作動性ニューロンのCAT活性低下の原因はいまのところ不明である。

P8の免疫機能を液性(IgM) および細胞性免疫(DTH)で調べた。IgM産生は、P8で老化抵抗性マウスR1に比し高く、２ヵ月と７ヵ月で加齢による低下はなかった。DTHではP8は加齢により低下した。しかし、aFGF群ではIgMはR1に近く、DTHは加齢による低下が防がれた。したがって、脳老化と細胞性免疫低下の間に相関があり、aFGFはそれらを正常化できる。

1.老化促進マウス(SAM)の学習記憶能力とaFGF：生後３週後からSAMP8に週１回0.7あるいは７μg/kg aFGF s.c.投与(F)群で、生後10カ月間、対照食塩水投与(S)群に比し有意に学習・記憶能力を正常に維持できた。すなわち受動回避学習ではF群はR1と同等であった。水迷路学習ではF群は水中に隠した足場をS群より早く見出し、足場を除くと、もとあった場所に有意に長く留まっていた。すなわちaFGFにより情動性および空間性記憶が正常に維持できた。抗CAT抗体による免疫組織化学的染色で、内側中隔コリン作動性ニューロンは、S群に比し、F群でCAT活性が高い（図１）。このコリン作動性ニューロン数はS群で約15%減少したが、F群では減少しなかった。また、個々のニューロンのCAT含有量はS群で著明に減少したが、F群はR1に近付いた。MAO-B活性はS群脳での増加に比し、F群では有意に低下した。ムスカリンおよびNMDA受容体密度は大脳皮質で、F群は有意に高い状態を維持した。s.c.投与でaFGFは脳脊髄液中に入らないがaFGF(1-15)は投与10時間後７倍に増加したのでフラグメントで入っている。

2.免疫機能：図２に示す方法で２ヵ月目および７ヵ月目で、トリニトロフェノール(TNP)－ヒツジ赤血球(SRBC)に対する液性免疫でIgM 産生をみると、P8で高い産生を示し加齢による低下は認められない。aFGFはこれを低下させるように働いている（図３）。一方R1では逆にaFGFはIgM産生を上昇させる。T細胞性免疫を遅延型過敏症反応(DTH)で見ると、P8で加齢により低下するがaFGFはその低下を防止している（図４）。

SAMP8における脳老化と細胞性免疫機能低下をaFGFは完全に防止できる。このことはまた学習・記憶能と免疫能とが密接に関係することを示している。

Oomura Y., Sasaki K., Li A. et al. In: The SAM model of senescense, ed. T. Takeda, Elsevier Science, Belrin, 415-418.

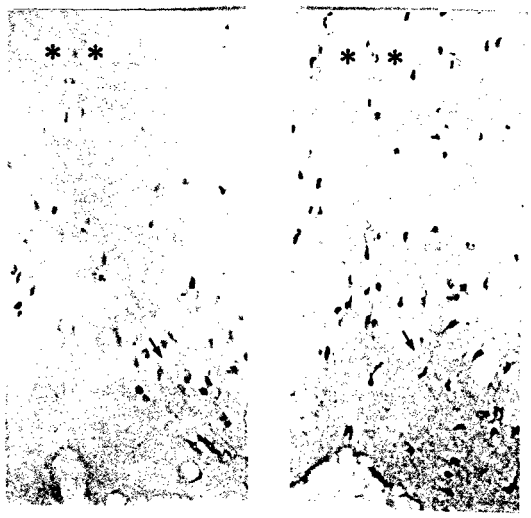


図 1. 抗CAT抗体で免疫組織化学的に染色．左:SAMP8リンガー液投与．右:aFGF 7μg/kg 1週1回皮下投与．両側内側中隔（＊）及びBrocaの対角帯(↑)．両＊の中間は左右脳の間を示す．左，CAT染色性低下のため細胞の形がはっきりみえない．

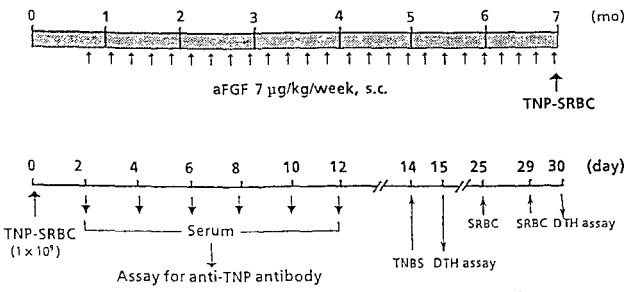
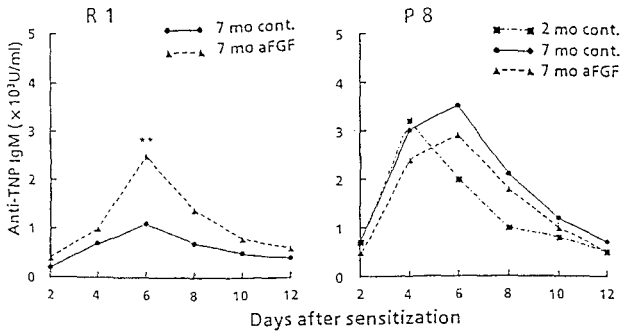


図 2. SAMP8 へのaFGFの投与方法と免疫反応測定法．TNP-SRBC(トリニトロフェニール ヒツジ赤血球)．Assay for anti-TNP antibody，液性免疫(IgM)．TNBS,(トリニトロフェニールベンゼンスルフォネイト)，DTH assay,細胞性免疫；SRBC DTH Assay,細胞性免疫．

図 3. SAMP8における液性免疫．抗TNP IgM 抗体産生に対する加齢およびaFGFの効果．P8によるIgM産生過剰をaFGFは防止．R1の産生低下をaFGFは上昇．



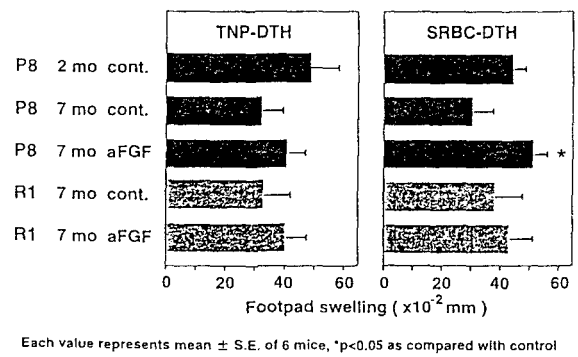


図 4. TNPおよびSRBCによる細胞性免疫(DTH)に対する加齢およびaFGFの効果．加齢による低下をaFGFは防止．

28 *In vitro* 血液脳関門モデルの確立
— アストロサイトによる物質透過性の変化 —

磯部　一郎、渡辺　貴夫*、加藤　泰治
(名市大・医・分子医研・生体制御、*同・薬・製剤)

＜要約＞　哺乳動物の中枢神経系では、種々の血中物質の脳内移行が強く制限されていると同時にグルコースやアミノ酸などは特異的輸送機構により脳内に取り込まれる。これらの機能は血液脳関門(BBB)として認識されており、生体内の巧妙なシステムの一つである。このBBBの生理学的および形態学的性質について、これまでin vivoにおけるさまざまな知見が蓄積されてきた。そしてBBBの構造的な主体は脳毛細血管内皮細胞であること、その内皮細胞の特徴的な機能発現には脳内の環境因子が深く関わっていることが広く認められ、とくに毛細血管外側にその足突起を伸ばして血管に近接しているアストロサイトの役割が注目されている。われわれは、内皮細胞を透過性メンブレンに単層培養し、その物質透過性をin vitroで測定するシステムを使用して、内皮細胞層の物質透過性発現にアストロサイトが重要な機能を果たしていることを示唆する結果を得た。

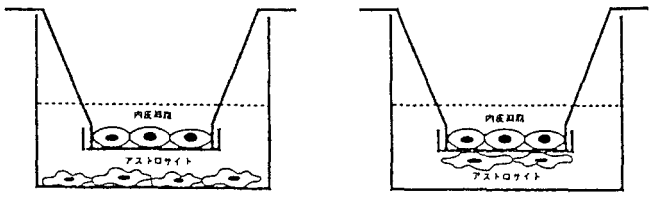
＜実験方法＞　（1）ウシ大動脈内皮細胞(BAEC)の培養：新鮮なウシ大動脈をよく洗浄し、血管内腔を0.5%ディスパーゼで浸して酵素処理した後、血管を切り開き、内皮細胞層をメスで剥離して内皮細胞を得た。培養液には10%ウシ胎児血清含有のDMEM(Dulbecco's)培地を用い、コンフルエントになる毎にトリプシンにて細胞を浮遊させ、継代培養した。実験には8～14代目の細胞を使用した。（2）ウシ脳毛細血管内皮細胞(BBEC)の培養：既報の方法[1]にいくつかの改良を加えて行なった。灰白質部分をカミソリにて細切し、これにディスパーゼ溶液を加えて37℃で30分間インキュベートした。この処理により、組織液は酸性になるので、pH10.0に調製したMEM培地にてpHを中性に保つようにして、さらに120分間インキュベートした。ディスパーゼ処理後、遠心沈渣を13%デキストラン溶液で処理して脂質成分を除き、毛細血管に富んだ沈渣を得た。さらにコラゲナーゼ／ディスパーゼにて4時間処理し、その後50% Percollにて密度勾配遠心法を行い脳毛細血管内皮細胞を得た。（3）ラット胎児脳アストロサイトの培養：既報[2]に従って、胎生16～18のラット脳よりアストロサイトを初代培養し、3代目ないし4代目の細胞を実験に使用した。（4）透過実験：調製したBBECまたはBAECをSnapwell(Costar)のメンブレン上に播種し、アストロサイトをSnapwellを入れる6ウェルプレート上（システム1）ないしはSnapwellの裏面（システム2）に共培養した(Fig..1)。内皮細胞がメンブレン上でコンフルエントになった後、Snapwellのカップごと透過実験用チャンバーにセットし(Fig.2)、透過実験を行なった。トレーサーには細胞に取り込まれず、ほとんどが細胞間間隙を通過すると考えられる[^{14}C]L-glucoseを用いた。システム1については血管外側にあたるチャンバーのL-glucoseの放射活性（30分値）を、システム2では、共培養したアストロサイトの細胞層の影響を除いて評価するためのデータ解析を施して、透過係数を求め比較した。

＜成績＞　（1）BBECの透過性に対するアストロサイトの影響：初代培養のBBECはアストロサイトと共培養すると、システム1・2とも、BBECの単独培養より透過性が抑制された(Fig.3,4)。また4代目まで継代培養したBBECでもシステム1で透過性が抑制されたが、アストロサイトの有無による透過性抑制は初代培養のBBECより大きく現われた。（2）BAECの透過性に対するアストロサイトの影響：システム1ではアストロサイトとの共培養により、BAECの透過性はかえって上昇する傾向があったが(Fig.5)、システム2ではBBECと同様にアストロサイトとの共培養により、BAECでも透過性は抑制された(Fig.6)。

＜考察＞　BBB機能の際だった特徴の一つは、多くの血液中物質の脳内移行を強く制限することである。これは脳毛細血管内皮細胞が細胞間によく発達したタイトジャンクションを有していること、またこの脳血管内皮には細胞内小胞が乏しく、他組織の血管内皮で見られる血管内側と組織側とを結ぶような窓構造がほとんど見られない、といった形態的形質に担われていると考えられている。このような特

徴が脳内の環境因子、とくにアストロサイトによって誘導されてくるという現象が、in vivoの実験で示唆されていた。今回我々は、血管内皮の物質透過性を、血管内皮細胞をメンブレン上に単層培養して評価できるシステムを採用し、これに共培養したアストロサイトの内皮細胞物質透過性に対する影響について検討した。まず、血管内皮としてもともと生体内でBBBを形成しているBBECを用いた場合、システム１でもシステム２でもアストロサイトによりBBECの物質透過性は抑制された。しかしBAECでは、システム２のみ透過性が抑制されたが、システム１ではむしろ透過性が上昇した。この結果は、生体内においてアストロサイトと極めて密接して存在していたBBECは、アストロサイトによってBBB特異的な形質を発現するために必要な初期誘導を受けていたものと思われ、システム１のようにアストロサイトと離れた状態でもアストロサイトの産生する液性因子に反応しその透過性を低下させうると考えられる。一方、生体内でアストロサイトと接触することないBAECは、システム１のように離れた位置にあるアストロサイトからのシグナルには感受性が乏しい。しかしアストロサイトと密接したシステム２では、BBECが生体内で受けたと同様な誘導を受け、その透過性が抑制されるようになるのであろう。

＜文献＞１）Miller DW et al.(1992) J. Tiss. Cult. Meth., 14:217-224. ２）加藤泰治ほか（1982）組織培養 8:217-224.



(A) システム１　(B) システム２

Fig.1　内皮細胞とアストロサイトの共培養システム

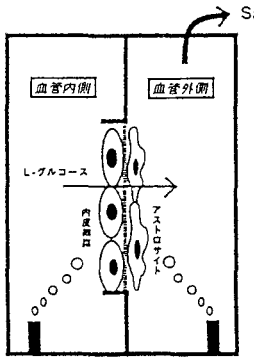


Fig.2

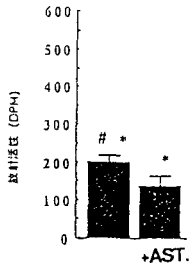


Fig.3　システム１によるBBECの透過性に対するアストロサイトの影響

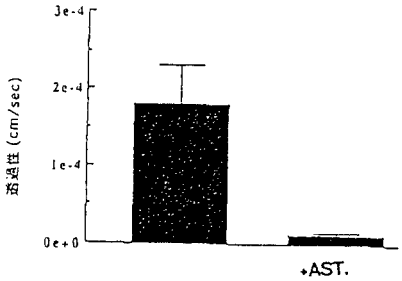


Fig.4　システム２によるBBECの透過性に対するアストロサイトの影響

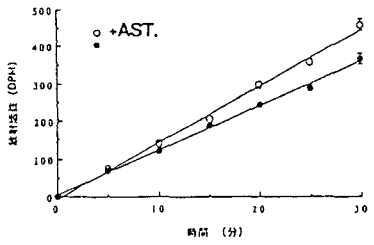


Fig.5　システム１によるBAECの透過性に対するアストロサイトの影響

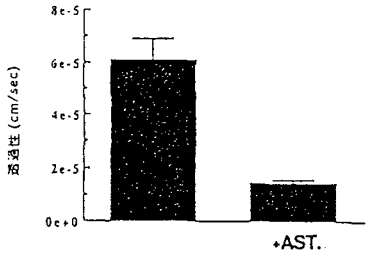


Fig.6　システム２によるBAECの透過性に対するアストロサイトの影響

29 K252a による培養小脳顆粒細胞移動抑制のメカニズム

田中　聡一[*,**]、小林　聡[*]、林　謙介[*]、平井　俊策[**]、白尾　智明[*]
（＊群馬大学医学部行動分析学、＊＊同神経内科）

〔要約〕
小脳顆粒細胞の再凝集塊を用いた培養系で神経細胞移動を再現し[1]、蛋白リン酸化酵素阻害薬 K252a による神経細胞移動抑制のメカニズム解明を試みた。ある程度神経突起伸長、細胞移動をさせた状態でK252a を添加し移動中の細胞を観察すると、細胞は神経突起から離れ、小型紡錘形から扁平大型細胞へと形態変化した。この時細胞質内にストレスファイバー様構造が出現し、それが細胞移動の抑制に関与していると思われた。免疫組織学的検討ではアクチンフィラメントとドレブリンの解離がみられ、ストレスファイバー様構造の出現に関係あるのではないかと考えられた。同じK252 誘導体だが細胞膜透過性のない蛋白リン酸化酵素阻害薬 K252b では、細胞移動の抑制は認められなかった。また、NGF添加による変化はほとんどみられなかった。

【目的】我々は既に、蛋白リン酸化酵素阻害薬 K252a を加えた培地での小脳顆粒細胞培養で神経細胞移動が抑制されることを報告した[2]が、今回そのメカニズム解明を試みた。培養開始時よりK252a が存在すると移動中の細胞に対する効果は明らかに出来ないため、今回ある程度神経突起伸長、細胞移動をさせた状態でK252a を添加した。さらに、K252a の作用部位を明らかにするため、同じK252 誘導体だが細胞膜透過性のない K252b[3] の添加も行った。また、K252a は neurotrophin 作用を阻害することが知られており[4]、K252a による細胞移動抑制は neurotrophin 作用阻害による可能性も考えられ、NGF 添加による影響についても検討した。

【方法】前回の報告と同様、生後 1 日ラットの小脳より顆粒細胞を単離、12 時間培養し再凝集塊を形成させた後、ラミニン塗布カバースリップ上でさらに12 時間培養した。今回 K252a (200 nM) を 培養開始直後ではなく、開始 3 時間後に添加し、Hoffman modulation contrast system を用い時間経過を追って形態観察を行った。一部はホルマリン固定し、免疫組織化学的解析を行った。同様の検討をK252b (1-800 nM) についても行った。また、Human beta NGF (Pepro Tech inc.)を 30 ng/ml 添加したものについても同様の検討を行った

【結果】（1）前回の報告と同様ラミニン塗布カバースリップ上で再凝集塊からの神経突起伸長と小型紡錘形細胞の神経突起上の移動が認められた。（2）K252a を培養開始 3 時間後に添加すると、5 分以内に細胞の形態変化が始まり、培養開始30分以内に細胞は神経突起から離れ、多数の filopodia 様突起を持つ大型扁平形細胞へと形態変化をし、細胞移動は抑制された。（3）免疫組織化学的には、移動中の細胞はアクチンフィラメントおよびドレブリンが細胞膜下に局在していた(Fig. 1 A,B)。また、K252a を加え移動を抑制された細胞はアクチンフィラメントはストレスファイバー様構造をとり(Fig. 1 C)、一方ドレブリンは細胞質内にびまん性に分布していた(Fig. 1 D)。（4）K252b では有意な細胞移動抑制は認められなかった。（5）NGF 添加による変化は認められなかった。

【考察】移動中の細胞は K252a 添加により形態変化をみせ、細胞移動が抑制された。免疫組織化学的解析によりアクチンフィラメントは細胞質内でストレスファイバー様構造をとっていることが明らかとなり、このアクチンフィラメントの変化が細胞の形態変化と細胞移動抑制に関係している可能性が示唆された。一方、アクチン結合蛋白であるド

レブリンは移動中の細胞内でアクチンフィラメントと共に細胞膜直下に共存していたが、K252a 添加により細胞質内にびまん性に分布するようになり、アクチンフィラメントとの解離がみられた。従って、K252a 添加によるアクチンフィラメントの形態変化はドレブリンがアクチンフィラメントと解離することにより生じるのではないかと考えられた。また、同じK252 誘導体であるが細胞膜に対する透過性のない K252b で細胞移動の抑制が認められなかったことより K252a の作用部位は細胞質内であると考えられた。今回、NGF添加による有意な影響は認めなかったが、NGF作用の阻害や他の neurotrophin 添加により変化が現れる可能性もあり、さらなる検討が必要であると思われた。

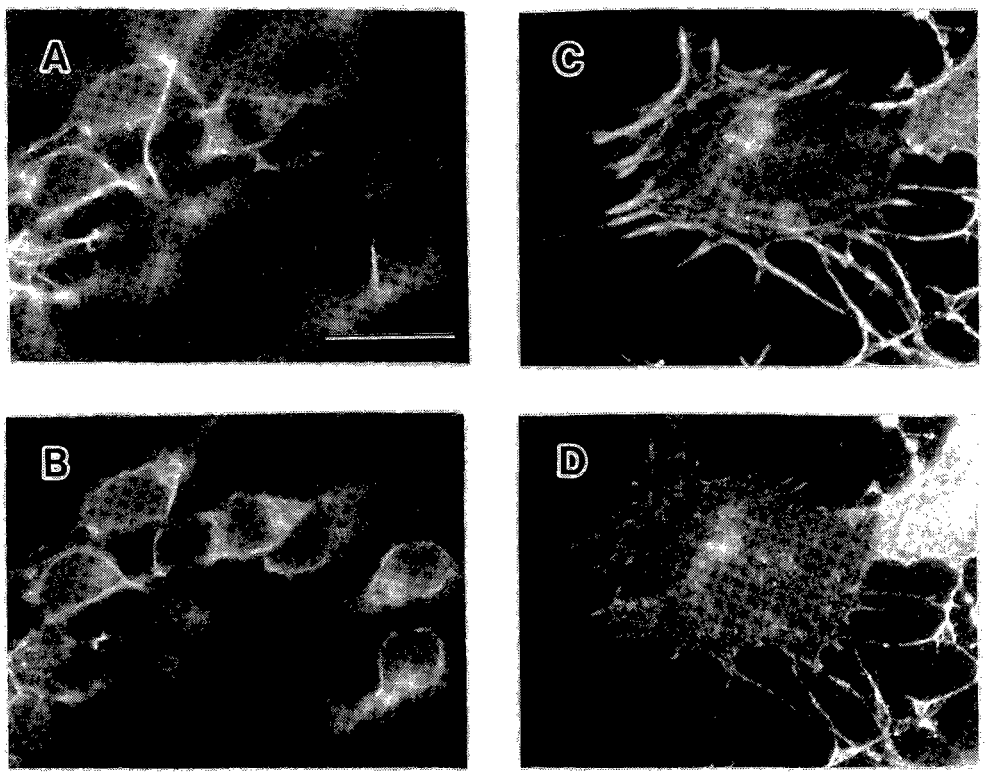


Fig. 1　アクチンおよびドレブリンの二重染色像　(bar＝20 μm)
A,B はコントロール　C,D は K252a (200 nM) 添加
A,C はRhodamine-phalloidin によるアクチン染色　B,D はMAbM2F6によるドレブリン染色

【文献】

1) Asou, H. et al : Cell adhesion molecule L1 guides cell migration in primary reaggregation cultures of mouse cerebellar cells, Neurosci. Lett., 144 : 221-224, 1992

2) 小林ら：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，神経化学　33, 344-345, 1994

3) Nagashima, K. et al : Inhibition of nerve growth factor-induced neurite outgrowth of PC12 cells by a protein kinase inhibitor which dose not permeate the cell membrane, FEBS Lett. 293, 119-123, 1991

4) Koizumi, S. et al : K252a : a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC12 cells, J. Neurosci. 8, 715-721, 1988

30 キネクチンの神経組織内分布

豊島至、菅原正伯、加藤一麿、和田千鶴、正宗研
（秋田大学医学部第一内科）

〔要約〕キネクチンは、分子モーターのひとつであるキネシンの主要な膜性結合蛋白質で、ニワトリでは160 kDaのダブレットである。今回は、キネクチンに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色をした。その結果、ニワトリ神経組織において、神経細胞体が斑状に染色され、特に、脊髄前角運動細胞、脊髄神経節、小脳核が強く染まった。樹状突起は近位のみ染め、遠位樹状突起、軸索は染めなかった。モノクローナル抗体の一部はウシと反応し、同様の結果であった。ウシ脊髄重ミクロソーム分画のキネシンアフィニテイーによってキネクチンが確認された。160 kDaの単一バンドを示した。免疫組織染色からは、キネクチンは、キネシン依存性の膜構造物の輸送の一部のみに関与するものと考えられた。

［はじめに］

微小管依存性の膜小胞輸送には、キネシン、細胞質ダイニンなどの分子モーターが関与する。膜小胞には分子モーターと結合する蛋白質が介在し、その１つがキネクチンである（１）。キネクチンはキネシンに結合する160 kDaのダブレットで、キネクチンに対するモノクローナル抗体による培養線維芽細胞の免疫組織染色では小胞体が染まる。今回は、神経組織中でのキネクチン分布を検討した。

［方法］

抗キネクチンモノクローナル抗体（１）のうち、KR160.7, 9, 10を用いてニワトリの神経系を免疫染色した。ニワトリは、13日胚、孵化時、成体の中枢神経と脊髄神経節を用いた。組織を未固定のまま液体窒素で急速凍結し薄切切片を作成した。乾燥後、室温で10分間3.7％フォルマリン・PBSで固定し、ついで15分間 0.25％Briji35・１％BSA・50 mM NH_4Cl・PBSでpermeabilizeし、LSAB法を施した。抗キネクチンモノクローナル抗体のうち２つがウシと交差反応を示すことが明らかになったのでこれを用いて脊髄の免疫染色を行った。

ウシ脊髄におけるキネクチンの同定を試みた。ウシ脊髄から重ミクロソーム分画を得、洗浄後0.5 M NaCl・0.5%Triton X-100・PMEE'（１）で可溶化した。これをSUK-4抗ウニキネシン重鎖抗体カラムに添加しキネシン結合蛋白質を得た。

［結果］

ニワトリ神経組織において、神経細胞体が斑状に染色され、特に、脊髄前角運動細胞、脊髄神経節、小脳核が強く染まった（図１）。樹状突起は近位のみ染め、遠位樹状突起、軸索は染めなかった。これは、13日胚、孵化時、成体のいずれでも同様であった。ウシ脊髄でも同様であった（図２ｂ）。

ウシ重ミクロソーム分画からキネシンアフィニテイーで得たキネシン結合蛋白質は、多様な分子種を示した。イムノブロットでキネクチンを確認した。キネクチンはニワトリと異なり、160 kDaの単一のバンドを示した（図２ａ）。

［考察］

キネクチンの分布は培養線維芽細胞細胞では小胞体に限局し、免疫染色ではミトコンドリア、ゴルジ体、リソゾームは染まらない。神経系ではシナプス小胞がキネシン依存性であるので（２）キネク

チンの存在の可能性が考えられたが、今回の結果からは否定的である。シナプス小胞にはキネクチンと異なるキネシン結合蛋白質が存在すると考えられる。ウシ脊髄のキネシンアフィニテイーで得られた多様な分子種に含まれているものと思われる。

参考文献　1) Toyoshima, I. et al.: J Cell Biol, 118: 1121-1131, 1992
2) Sato-Yoshitake, R. et al.: J Biol Chem, 267: 23930-23936, 1992



図１．　ニワトリ神経組織の抗キネクチン抗体免疫染色
a: 脊髄運動ニューロン、b: 脊髄神経節、c: 小脳核、d:小脳皮質、バー: 100μm．　成鶏、KR160.10染色

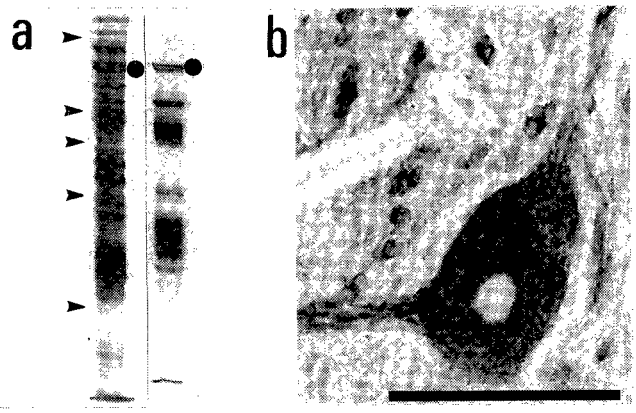


図2．　ウシ脊髄のキネシンアフィニテイー(a)とウシ脊髄運動ニューロンの免疫染色(b)
a: 左から分子量マーカー(205, 120, 94, 64, 30 kDa)、キネシンアフィニテイー分画の銀染色、抗キネクチン抗体(KR160.9)によるイムノブロット、b: KR160.9染色、バー: 100μm．黒点: キネクチン

31 亜鉛イオンによるUTP応答の抑制作用

小泉　修一、井上　和秀
（国立衛生試験所・薬理）

〔要約〕 PC12細胞において、ＡＴＰ受容体の一つ“P_{2U}受容体”を介する応答の存在を確認し、この受容体の選択的作用薬であるＵＴＰ刺激により惹起される細胞内カルシウムイオン濃度（[Ca]i）変化及びドパミン放出動態を観察し、これら応答に対する亜鉛イオンの影響を検討した。ＵＴＰ刺激により一過性及び持続性の[Ca]i上昇が認められ、外液Ca^{2+}除去により持続性の成分のみ消失した。また、亜鉛イオンは、一過性の成分に影響を与えずに、持続性の[Ca]i上昇を抑制した。電位依存性カルシウムチャネル拮抗薬、nicardipine及びカドミウムイオンは、ＵＴＰにより惹起される[Ca]i上昇に影響を与えなかった。さらにＵＴＰは、外液Ca^{2+}依存性にドパミン遊離を引き起こした。亜鉛イオンはこのドパミン放出をも抑制したが、nicardipine及びカドミウムイオンは影響を与えなかった。以上、ＵＴＰは細胞内貯蔵部位からのCa^{2+}遊離及び細胞外Ca^{2+}流入を引き起こすこと、またこの流入経路は電位依存性のカルシウムチャネルとは異なり、亜鉛に感受性のある経路であることが示唆された。

亜鉛は必須微量元素であり、200以上の酵素の構成要素もしくはco-factorとしてタンパク質と強固に結合している(1)。しかし脳内では、神経終末の小胞内に比較的高濃度の亜鉛イオンを蓄えた、いわゆる亜鉛含有神経の存在が確認され(1)、興奮性の刺激によりイオンとして放出されることが報告されている(2)。従って中枢神経細胞は、亜鉛イオンにさらされる機会が比較的多いものと推測される。ＡＴＰが脳内で神経伝達を担っていることが報告されており(3,4)、ＡＴＰ受容体を介する応答も亜鉛イオンにより影響されることが考えられる。亜鉛イオンは電位依存性のカルシウム、カリウム及びナトリウムチャネルなど多くのチャネルに対し抑制性の制御を行うことが知られている(1)。しかし、我々はすでにチャネル形成型ＡＴＰ受容体、“P_{2X}受容体”を介する応答が亜鉛イオンにより顕著に増強されることを報告した(5)。本研究では、PC12細胞において、GTP結合タンパクと共役しているＡＴＰ受容体、“P_{2U}受容体”を介する応答を確認し、亜鉛イオンがこの応答に対しどのような影響を与えるかについて検討した。

［**実験方法**］PC12細胞の培養法(6)、fura-2蛍光法による[Ca]iの測定法(7)及びバッチ法によるドパミン放出実験(8)は、既報に従った。

［**結果及び考察**］P_{2X}受容体/チャネルを介する[Ca]i上昇は、細胞外Ca^{2+}に依存しているが（図１Ａ）、外液Ca^{2+}を除去しても、約３０％のPC12細胞で、ＡＴＰ刺激による[Ca]i上昇が認められた（図１Ｂ）。外液Ca^{2+}非存在下での[Ca]i上昇は、ＡＴＰ及びＵＴＰで惹起されたが、α,β-methyleneATP及び2-methylthio-ATPでは認められなかった。従って、この応答はP_{2U}受容体を介して引き起こされていることが示唆された。ＵＴＰを持続的に細胞に負荷すると、外液Ca^{2+}非存在下では一過性の[Ca]i上昇が（図２、左）、細胞外Ca^{2+}存在下では一過性の上昇とそれに続く持続性の[Ca]i上昇が認められた（図２、右）。ＵＴＰは細胞内貯蔵部位からのCa^{2+}遊離だけでなく、細胞外Ca^{2+}流入をも引き起こすことが明らかとなった。ＵＴＰは細胞外Ca^{2+}に依存したドパミン放出を引き起こした。亜鉛イオンはこの放出を濃度依存的に抑制したが、電位依存性カルシウムチャネル拮抗薬nicardipine及びカドミウムイオンは影響を与えなかった（図３）。また亜鉛イオンは、細胞外Ca^{2+}存在下においてのみＵＴＰ誘発[Ca]i上昇を抑制した。従って、亜鉛イオンは、電位依存性カルシウムチャネルとは異なるCa^{2+}流入経路を抑制することにより、ＵＴＰにより惹起されるドパミン放出を抑制することが示唆された。このCa^{2+}流入経路の実体及びその制御様式、さらには、カチオンチャネルと共役していない他の受容体刺激及び細胞内Ca^{2+}貯蔵部位枯渇により

誘発されるCa^{2+}流入現象との共通性は不明である。以上の結果は、亜鉛イオンがこれらCa^{2+}流入経路研究の "key molecule"となる可能性を提起するものとして非常に興味深い知見である。

[文献] (1) Frederickson CJ, *International Rev. Pharmacol., 31, 145-238, 1989.* (2) Assaf SY & Chung S, *Nature, 308, 269-276, 1984.* (3) Edwards FA et al., *Nature, 359, 145-147, 1992.* (4) Inoue K, et al., *Neurosci. Lett. 134, 215-218, 1992.* (5) Koizumi S, et al., *Brain Res., in press.* (6) Inoue K & Kenimer JG, *J.Biol.Chem., 263, 8157-8161, 1988.* (7) Grynkiewicz G et al., *J.Biol.Chem., 260, 3440-3450, 1985.* (8) Ohara-Imaizumi et al., *J.Pharmacol.Exp.Ther., 259, 484-489, 1992.*

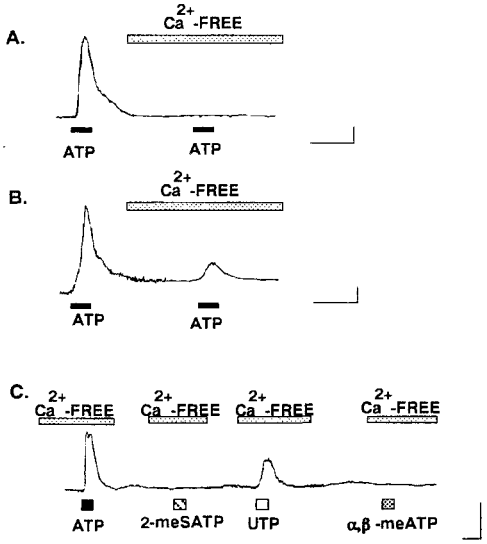


Fig. 1. Typical Ca-responses to ATP and its related compounds in PC12 cells. Horizontal solid bars show the application of 100 μM ATP. Vertical and horizontal scale bars represent 100 nM and 30 s, respectively. A. A rise in [Ca]i evoked by 100 μM ATP in the presence and absence of external Ca in a PC12 cell. ATP failed to produce the rise in [Ca]i when external Ca was removed (horizontal dotted bar) in this cell. B. A rise in [Ca]i evoked by 100 μM ATP in the presence and absence of external Ca in another cell. Unlike the cell shown in A, ATP produced the rise in [Ca]i even when the external Ca was removed from the medium (horizontal dotted bar). C. Changes in [Ca]i evoked by 100 μM ATP, 2-meSATP (hatched bar), UTP (open bar) and a,b-meATP (double hatched bar) in the absence of external Ca (horizontal dotted bars). ATP and UTP, but not 2-meSATP or α,β-meATP, produced a rise in [Ca]i in the same cell.

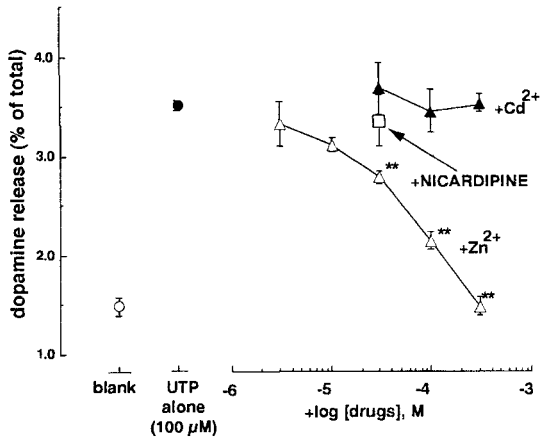


Fig. 3. The effects of Zn, Cd and nicardipine on the UTP-evoked dopamine release form PC12 cells. Open and closed circles show spontaneous dopamine release and the release evoked by 100 μM UTP alone, respectively. Open triangles, closed triangles and an open square show the UTP (100 μM)-evoked responses obtained with Zn, Cd and nicardipine, respectively. These are results from a typical experiment with each data point being mean±s.e.mean of triplicate measurements. Three such experiments were performed. Asterisks show significant difference from the response evoked by UTP alone (**p<0.01).

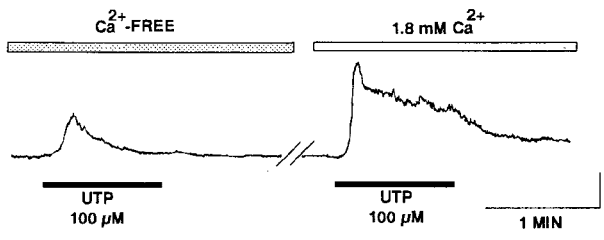


Fig. 2. The time-course of UTP-evoked increase in [Ca]i in PC12 cells. A. Typical Ca-responses to 100 μM UTP in the absence and presence of external Ca. UTP was applied to the cells twice for 1 min (horizontal solid bars) separated by 3 min. The first and the second stimulation were performed in the absence (horizontal dotted bar) and presence (horizontal open bar) of external Ca.

32 新規抗精神病薬OPC-14597のラット脳substance P神経系に及ぼす影響

井上敦子*・三木新也*・内田論希*・菊地哲朗**・森田誠治**・仲田義啓*
(*広島大・医・総合薬・薬解、**大塚製薬・徳島新薬三研)

〔要約〕
新規抗精神病薬OPC-14597 (OPC)を慢性投与したラット脳線条体におけるsubstance P (SP) 神経系の活性について検討し、haloperidol (HAL)慢性投与ラットにおける結果と比較した。HAL投与ラット脳線条体において有意なSP量低下が観察されたが、OPCについては高用量投与群で低下する傾向が観られたのみであった。β-Preprotachykinin (β-PPT) mRNAを定量した結果、薬物投与によるSP量の変化はβ-PPT mRNA転写活性変化によることが示された。また、受容体結合実験では、OPCとHAL投与ラット脳線条体においてSP最大結合数が増加したが、OPC投与ラット群ではKd値も増加した。従ってOPCとHALは異なる作用様式でSP受容体数増加を引き起こすことが示唆されたが、この増加は受容体mRNAの転写促進によるものではなかった。

[序]
OPC-14597 (OPC) はdopamine神経伝達に作用するquinolinone誘導体で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。我々は、OPCあるいはhaloperidol (HAL) を慢性経口投与したラットにおいてdopamine受容体活性が異なって変化することを観察した[1]。大脳基底核dopamine神経はペプチド神経であるSP神経と相互作用していることが知られている。さらに抗精神病薬がペプチド神経系に影響を及ぼすことが報告されている[2]。そこで今回OPCを慢性投与したラット脳におけるSP神経系の変化について、SP含量、preprotachykinin (PPT) mRNA、SP受容体結合活性、SP受容体mRNAを解析することにより検討し、HALについての結果と比較した。

[方法]
1. 薬物慢性投与
OPC (12、100mg/kg) またはHAL (1、2、4mg/kg) を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る高用量である。
2. SP受容体結合実験
ラット脳線条体膜画分をpeptidase inhibitors、10mM MgCl2、0.02% BSAを含む50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 中、NK1受容体特異的ligandである[Sar^9, Met^{11}(O_2)]-^{3}H-SP(NEN、45Ci/mmol) と25℃30分間インキュベーションした後、0.3% polyethyleneimine処理したGF/Bフィルター上B/F分離し、フィルター上の放射能活性を測定して結合量とした。[Sar^9, Met^{11}(O_2)]-^{3}H-SP特異的結合量は2μM SP非存在下での結合量 (全結合量) から存在下での結合量 (非特異的結合量) を差し引いて求めた。
3. SP定量
ラット線条体0.01N HCl抽出物中のSP様免疫活性物質をradioimmunoassayで定量した。
4. RNase protection assay
ラット脳線条体total RNA50μgを各^{32}P-cRNA probeと45℃で12時間ハイブリダイズさせた。続いて

RNase処理し、PAGE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]

HAL慢性投与ラット脳線条体では有意なSP量低下が観察されたが（図1）、OPCについては100mg/kgの高用量投与ラットで低下する傾向が観られたのみであった（図1）。β-Preprotachykinin（β-PPT）mRNAをRNase protection assayで検討した結果、薬物投与によるSP量に対する結果と同様の結果が観察され、薬物投与によるSP量の変化はβ-PPT mRNA転写活性の変化によることが示された（図2）。[Sar^9, $Met^{11}(O_2)$]-^{3}H-SP結合のScatchard解析した結果、HAL投与ラットにおいてはSP結合のKd値には変化を与えず、Bmax値、すなわち最大結合数を有意に増加させた。これに対し、OPC投与ラットにおいてはKd値とBmax値を増加させた（表1）。RNase protection assayでSP受容体mRNAを解析した結果、薬物投与によるSP受容体mRNAの質的量的変化は観察されなかった。従ってSP最大結合数の増加は受容体mRNAの転写促進によるものではないことが示された。以上、OPCは大脳基底核においてSP神経系に影響を及ぼしていることが観察されたが、その作用はHALの作用とは異なった機序によって媒介されていると考えられる。

[文献]

1) 三木新也 他 (1994) 神経化学 33、44-45 2) Angulo, J.A. et al. (1990) Neurosci. Lett. 113, 217-221

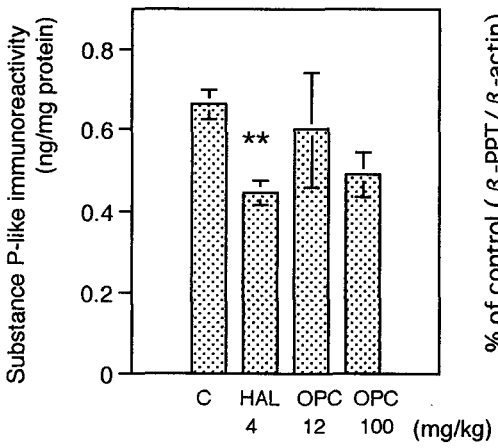


図1 薬物投与ラット脳線条体 substance P量

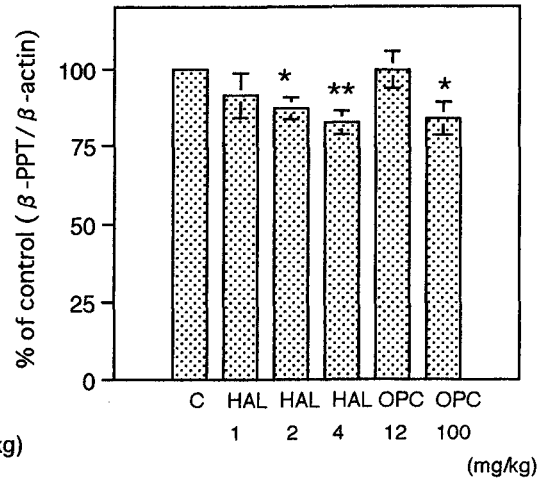


図2 薬物投与ラット脳線条体 β-preprotachykinin mRNA

表1 薬物投与ラット脳線条体における^{3}H-substance P結合定数

		Kd value (nM)		Bmax (fmol/mg protein)	
Control		0.38	±0.03	55.5	±2.8
Haloperidol	1mg/kg p.o.	0.43	±0.06	65.3	±3.2
	2mg/kg p.o.	0.39	±0.04	61.7	±4.9
	4mg/kg p.o.	0.49	±0.10	84.2*	±7.5
OPC-14597	12mg/kg p.o.	0.54*	±0.04	72.6*	±2.7
	100mg/kg p.o.	0.48	±0.04	63.9	±3.0

* $p<0.05$ vs Control

33 Pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS)はマウス脳シナプス膜におけるαβ-methylene ATP結合を増強する

堀　誠治，川村将弘，渡部和彦[1)]，田中順一[1)]，酒井　紀[2)]
（東京慈恵会医科大学第１薬理，[1)]同神経病理，[2)]同第２内科）

〔要約〕

近年，ATPが神経伝達物質としての作用を有することが示され，その受容体はP_2受容体と呼ばれている。P_2受容体の阻害薬として報告されているpyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS)の，[3H]αβ-methylene ATP結合に及ぼす影響を，マウス脳シナプス膜，マウス膀胱膜およびマウス培養Schwann細胞膜を用い検討した。PPADSは膀胱膜，Schwann細胞膜での[3H]αβ-methylene ATP結合を阻害したが，シナプス膜における結合を著しく増強させた。一方，P_2受容体の阻害薬として報告されているreactive blue 2は，この３者における[3H]αβ-methylene ATP結合を濃度依存的に阻害した。以上の成績より，αβ-methylene ATP結合部位（いわゆるP_{2X}受容体）は，中枢神経系と末梢組織では異なる可能性が示唆された。

近年，ATPが，神経伝達物質として作用していることが示されている(2,3)。特に，中枢神経系において，ATPが興奮性伝達物質として作用している可能性が示されて(1,2)より，ATPの中枢神経系における役割が注目されている。ATP受容体（P_2受容体）の性質は輸精管などを中心とする末梢組織において検討されている例が多く，中枢神経系における受容体の神経化学的性質などについて検討を加えたものは殆どない。我々は，マウス脳より調製したシナプス膜を用いてαβ-methylene ATP結合部位（いわゆるP_{2X}受容体）の性質を[3H]αβ-methylene ATPをligandとした結合実験より検討し，ATP類似体の同結合部位に対する阻害のpotency orderが輸精管などで報告されているものと異なることを見いだし，末梢組織と中枢神経系との間で受容体に違いのある可能性を示唆した（第91回日本薬理学会関東部会，1994年，大宮）。今回，我々は，中枢神経系におけるαβ-methylene ATP結合部位の性質，他組織の結合部位との異同を明らかとするために，P_2受容体の阻害薬として報告されているpyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS)およびreactive blue 2 (RB2)(2)のαβ-methylene ATP結合部位に及ぼす影響を，マウス脳シナプス膜，マウス膀胱膜およびマウス培養Schwann細胞膜を用い検討した。

【材料および方法】

１）材料：[3H]αβ-methylene ATP (765.9GBq/mmol) はNew England Nuclear Productsより，PPADSはResearch Biochemicals Internationalより，RB2はFlukaより購入した。ATPはSigma Chemical Co.より購入した。

２）マウス脳シナプス膜の調製：マウス（ddY系，５週令，雄）脳よりZukinらの方法(6)に従い粗シナプス膜を調製した。その膜画分を10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を用いて５回洗浄し，シナプス膜とした。

３）マウス膀胱膜およびSchwann細胞膜の調製：摘出した膀胱を細断した後，10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)にてhomogenizeした後，遠心により膜成分をえた。マウス培養Schwann細胞（IMS32）(4)を，10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)にて低張処理・破壊し，遠心により膜分画を調製した。いずれの膜分画も10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)にて３回洗浄し，-80℃にて保存した。

４）αβ-methylene ATP結合の測定：測定に先立ち，膜を３回洗浄した。膜蛋白，薬物，および[3H]αβ-methylene ATPを含む10mM Tris-HCL緩衝液(pH 7.4)400μlを４℃にて，シナプス膜では15分，Schwann細胞膜では20分，膀胱膜では30分incubateし，遠心法によりその結合量を測定した。特異的結合量は全結合量（非標識ATP非存在下の結合量）より非特異的結合量（1mM非標識ATP存在下の結合量）を差

し引くことにより求めた。

【結果および考察】

P_2受容体の阻害薬と報告されているRB2とPPADSのαβ-methylene ATP結合に及ぼす影響を検討した。RB2は，シナプス膜，Schwann細胞膜，膀胱膜のいずれにおいても濃度依存的に特異的αβ-methylene ATP結合を阻害し(Fig. 1)，そのIC$_{50}$値は，それぞれ4.0x10^{-6}M，1.6x10^{-5}M，1.4x10^{-4}Mであった。PPADSはSchwann細胞膜および膀胱膜では，高濃度で特異的αβ-methylene ATP結合を阻害した（10^{-3}Mにてそれぞれコントロールの40%，37%に低下）(Fig. 2)。しかし，シナプス膜においては，PPADSは，濃度依存的に結合量を増加させた。シナプス膜を用い，PPADS（10^{-4}M）存在下，非存在下にScatchard analysis([3H]αβ-methylene ATP，1-45 nM) を実施した。[3H]αβ-methylene ATPは一つの部位に結合し，PPADSの共存により結合部位の最大結合量が増加することが明らかとなった (Fig. 3, Table 1) 。

膀胱膜においては，RB2，PPADSともにαβ-methylene ATP結合を阻害した。この結果は，従来報告されているもの(5)と一致する。しかし，PPADSはシナプス膜におけるαβ-methylene ATP結合を濃度依存的に増強させた。さらに，RB2による阻害効果も膀胱膜に比し，約30倍強かった。以上の成績より，中枢神経系におけるαβ-methylene ATP結合部位（いわゆるP_{2X}受容体）は，その性質を末梢組織に存在するものとは異にし，PPADSによりそれらの分類が可能となることが示唆された。さらに，Schwann細胞の有する結合部位は，”末梢型”に属する可能性が示唆された。

【文献】

1)Evans, R.J. et al. (1992) Nature 357, 503-505, 1992 2)Fredholm, B.B. et al. (1994) Pharmacol. Rev. 46, 143-156 3)Illes, P. and Norenberg, W. (1993) TiPS 14, 50-54 4)渡部和彦ら (1994) 神経化学 33, 664-665 5)Ziganshin, A.U. et al. (1993) Br.J.Pharmacol. 110, 1491-1495 6)Zukin, S.R. et al. (1994) Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 71, 4802-4807

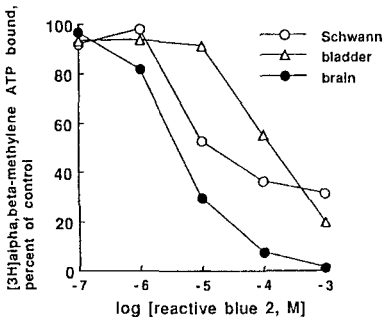


図1　αβ-methylene ATP結合に及ぼすＲＢ２の影響

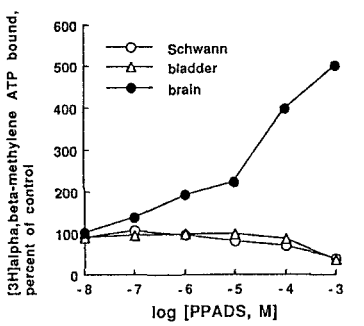


図2　αβ-methylene ATP結合に及ぼすPPADSの影響

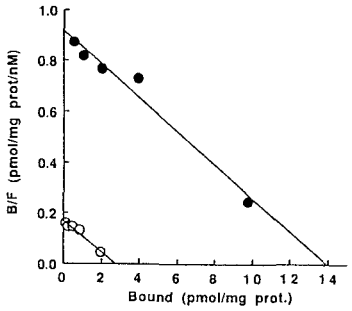


図3　Scatchard plotの１例

●:PPADS（10^{-4}M）存在下，○:PPADS非存在下

表1　PPADSのαβ-methylene ATP結合部位のパラメーターに及ぼす影響

	Bmax (nmol.mg prot)	Kd (nM)
PPADS (-)	3.31	20.2
PPADS 10^{-4}M	14.86	17.0

34 ＣａＭＢＰ６４の分子的性質とその組織分布

亀下　勇、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化学）

［要約］
ラット大脳から精製したＣａＭＢＰ６４の分子的性質を調べた。ＣａＭＢＰ６４の分子量はＳＤＳ－ＰＡＧＥ上では６４ｋＤａを示すのに対し、ゲル濾過法ならびに庶糖密度勾配遠心法から計算すると１３３ｋＤａになることから、二量体タンパク質として存在することが示唆された。また、ＣａＭＢＰ６４に対する抗体を作製し、イミュノブロットにより組織分布を調べたところ、脳の中でも特に大脳に豊富に存在すること、またラットの成長とともにその含量が高くなることが明らかになった。

ＣａＭＢＰ６４は、ラット大脳からＣａＭキナーゼⅣを精製する際、最終ステップのＤＥＡＥ-ＮＰＲ・ＨＰＬＣカラムで酵素と分離して得られるタンパク質である（１）。このタンパク質はＣａＭ結合タンパク質でＣａＭキナーゼⅡとＡキナーゼの非常によい基質になることが明らかにされたが、その機能は未だ不明である（１、２）。このタンパク質の生理機能を解明する目的で、我々はＣａＭＢＰ６４の分子的性質を詳細に調べるとともに、このタンパク質に対する抗体を作製した。この抗体を用いたイミュノブロット法でＣａＭＢＰ６４の組織分布ならびに成長過程における発現量変化等の解析を行った。

［実験方法］
ＣａＭＢＰ６４はラット大脳よりＰセルロースカラム、ＤＥＡＥトヨパール、ＣａＭセファローズ、セファクリルＳ－３００、ＤＥＡＥ－ＮＰＲ・ＨＰＬＣカラムにより精製した（１）。タンパク質の分子量はストークス半径と沈降係数から計算した（３）。ＣａＭＢＰ６４に対する抗体は、そのリン酸化部位周辺のアミノ酸配列をもとに合成したペプチドを、ヘモシアニンに結合した後ウサギに免疫し作製した。

［結果および考察］
大脳から精製したＣａＭＢＰ６４はＳＤＳ-ＰＡＧＥで６４ｋＤａの単一バンドを示した（１）。今回、その他の分子的性質を明らかにし表１にまとめた。庶糖密度勾配遠心法から沈降係数は６．６Ｓ、ゲル濾過法により求めたストークス半径は４９Åとなり、これらの値からネイティブタンパクの分子量は１３３ｋＤａと計算された。これらの結果からＣａＭＢＰ６４は二量体タンパク質として存在することが示唆された。また、等電点電気泳動法により等電点を調べたところ６．３であった。リン酸化部位周辺のアミノ酸配列をもとに１９アミノ酸のペプチドを合成し、ウサギに免疫したところ、イミュノブロット法ならびに免疫沈降法に有用なＣａＭＢＰ６４特異的抗体が得られた。大脳抽出液を用いイミュノブロットを行ったところ、６４ｋＤａのＣａＭＢＰ６４が特異的に染色された（図１）。ラット大脳可溶性画分１０μｇ中のＣａＭＢＰ６４の含量を約５ｎｇと考えると、ＣａＭＢＰ６４はこの画分のおよそ０．０５％を占めるタンパク質であると推測された。この抗体を用い組織分布を調べたところ、脳の可溶性画分に豊富に見られるのに対し、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓には検出されないことがわかった（図２）。また脳内では、小脳、脳幹に比べ大脳皮質に豊富に存在することも明らかになった。さらにラットの成長過程でのＣａＭＢＰ６４量を調べたところ、胎児脳と生後３日の脳には検出されず、その後成長に伴って発現量が増大することがわかった（図３）。

今回の結果からＣａＭＢＰ６４は中枢神経系の中でも特に大脳に豊富に存在し、またラットの成長過程でその発現量が変化するタンパク質であることが明らかになった。本タンパク質がＣａＭ結合性を示し、またＣａＭキナーゼⅡやＡキナーゼによりリン酸化されることなど興味ある性質を示すことから、中枢神経系における何らかの調節機構に関与している可能性が示唆された。

［文献］
(1) Kameshita,I., and Fujisawa,H. (1995) J. Biochem. 117, 85-90
(2) 亀下勇、石田敦彦、藤澤仁 (1993) 神経化学 32、466-467
(3) Siegel,L.M., and Monty,K.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 112, 346-362

表1　CaMBP64の分子的性質

Parameter	Value	Method of determination
Subunit weight	64,000	SDS-PAGE
Stokes radius (Å)	49	Gel filtration
Sedimentaion coefficient ($s_{20,w}$)	6.6	Sucrose-density gradient centrifugation
Molecular weight	133,000	Stokes radius and sedimentation coefficient
Frictional ratio (f/f_0)	1.45	Stokes radius and sedimentation coefficient
pI	6.3	Isoelectic focusing

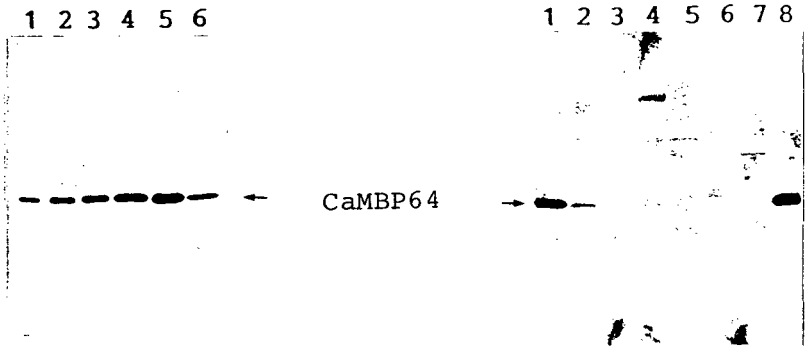


図1　CaMBP64のイミュノブロット
1: 2.4ng CaMBP64
2: 4.8ng
3: 12.0ng
4: 24.0ng
5: 48.0ng
6: 10.0μg 大脳可溶性画分

図2　CaMBP64の組織分布
(各組織可溶性画分)
1: Cerebrum
2: Cerebellum
3: Spleen
4: Liver
5: Kidney
6: Lung
7: Heart
8: CaMBP64



図3　ラット成長過程におけるCaMBP64の発現
(大脳可溶性画分)
1: Fetal
2: 3 days
3: 14 days
4: Adult
5: CaMBP64

35 ＰＣ１２ｈ細胞および初代培養神経細胞からの神経伝達物質の開口放出に対する抗ＨＰＣ－１抗体の効果

九島洋一、山口和彦、藤原智徳、赤川公朗
(杏林大学　医学部　第二生理学教室)

〔要約〕神経特異蛋白質として見出されたＨＰＣ－１／Ｓｙｎｔａｘｉｎ－１Ａの、神経伝達物質の放出機構における役割を検討するため、ＰＣ１２ｈ細胞およびラット海馬初代培養神経細胞に抗ＨＰＣ－１抗体を導入し、その開口放出に及ぼす影響を調べた。その結果、抗ＨＰＣ－１抗体導入によりＰＣ１２ｈ細胞よりのカルシウム依存性ノルエピネフィリン放出およびラット海馬神経細胞のｅｐｓｃが増大することが明らかとなった。これらの結果から、ＨＰＣ－１は神経伝達物質の開口放出過程に関して抑制的に働いていることが示唆された。

【目的】

神経伝達物質の放出は、カルシウムの流入がトリガーとなって引き起こされるが、それ以後の過程は明らかではない。ＨＰＣ－１は細胞内での膜輸送・融合を仲介する蛋白質ファミリーに属する膜結合蛋白質である。このＨＰＣ－１／Ｓｙｎｔａｘｉｎ－１Ａは神経伝達物質の開口放出に関わると考えられている。そこで、今回、ＰＣ１２ｈ細胞およびラット海馬初代培養細胞に抗ＨＰＣ－１抗体を導入した後の開口放出量を測定することで、ＨＰＣ－１の神経伝達物質の放出における機能について検討した。

【方法】

抗ＨＰＣ－１ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製

ラットＨＰＣ－１の膜結合領域を含まない部分の蛋白質を大腸菌に発現させ、精製した。これを抗原としてポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体はラット網膜に対する免疫組織化学および脳の膜画分に対するウエスタンブロットによりスクリーニングした。

ＰＣ１２ｈ細胞からのノルエピネフィリン放出量の測定

^{3}Ｈ－ノルエピネフィリンを取り込ませたＰＣ１２ｈ細胞を、ジギトニンにより高透過性とし、細胞内に抗体分子を導入した。これらの細胞からのカルシウム依存性の^{3}Ｈ－ノルエピネフィリンの放出量を測定して開口放出量を調べた（文献１）。

ラット海馬初代培養細胞におけるシナプス伝達の測定

マイクロアイランド法により海馬神経細胞を培養し、ホールセル・パッチクランプ法を用いて細胞を興奮させ、自己回帰的シナプスを介して生じる興奮性シナプス後電流（ｅｐｓｃ）を記録した。約0.1Hzで、細胞体を脱分極刺激して生じるｅｐｓｃを記録しながら、電極より抗ＨＰＣ－１抗体を細胞内に投与し、細胞体を断続的に脱分極刺激して自己回帰的シナプスによるｅｐｓｃに及ぼす効果を検討した。

【結果と考察】

ＰＣ１２細胞はカルシウム依存性のノルエピネフィリンの放出をおこすことから、神経伝達物質の開口放出のモデルとして用いられる。ジギトニンにより高透過性としたＰＣ１２ｈ細胞を抗ＨＰＣ－１抗体で処理すると、免疫前の血清で処理したものに比べて、カルシウム依存性のノルエピネフィリンの放出量は増大した。同様の結果は異なる２種のポリクローナル抗体について得られた。また、精製したイムノグロブリンを用いても同様の増加が見られた。しかし、抗血清の濃度を高くするとノルエピネフィリンの放

出は変わらないか、むしろ抑制されることがあった。ジギトニン処理をしていない細胞に抗体を与えても効果は見られないので、抗体の作用は細胞内に働いた結果であると考えられた。この抗体が高濃度での結果は、Bennettら（文献２）やGutierrezら（文献３）による抗ＨＰＣ－１抗体によって開口放出が抑制されたとの報告と一致する。しかし、これらの結果は、今回、開口放出の促進が見られたときの抗ＨＰＣ－１抗体の濃度に比べて１０倍以上高濃度の抗体での結果であり、抗体蛋白質の形質膜やシナプス小胞の融合装置への非特異的な作用により開口放出が抑制された可能性が考えられた。以上の結果から、ＨＰＣ－１はＰＣ１２ｈ細胞におけるカルシウム依存性のノルエピネフィリンの放出に関して抑制的に作用していると考えられた。

初代培養細胞した哺乳類中枢神経細胞のシナプス伝達についても、ＨＰＣ－１の作用を抗体を用いて検討した。グリア細胞のマイクロアイランド上にラット海馬神経細胞を単離培養し、孤立して生育している細胞を選び、ホールセル・パッチクランプ法により電気活動を記録したところ、多くの孤立細胞では自己回帰的興奮性シナプスが形成されており、刺激による細胞体の興奮に続くｅｐｓｃが観察された。このｅｐｓｃの大きさは時間とともに単調減少したが、２０－６０分間は安定して記録できた。パッチ電極より抗ＨＰＣ－１抗体（0.3－1.0 mg/ml）を細胞内灌流すると、５分後から２０分後にかけてｅｐｓｃの大きさが一時的に３０－６０％増加した。対照として免疫前のＩｇＧ（0.1－1.0 mg/ml）を用いた場合、このようなｅｐｓｃの一時的な増加は見られなかった。現在、シナプス前末端からのシナプス顆粒放出が増加したのか、シナプス後膜の受容体の感受性が増加したのか検討しているが、この結果はＰＣ１２ｈ細胞で得られた結果と矛盾しない。

以上より、ＨＰＣ－１は神経伝達物質の放出過程において抑制的に作用している可能性が示唆された。

【文献】

(1) S. C. Peppers and R. W. Holtz (1986) J.Biol. Chem. 261: 14665-14669　(2) M. K. Bennett et al. (1993) Cell 74: 863-873　(3) L. M.Gutierrez et al. (1995) Biochem.Biophys. Res. Com. 206: 1-7

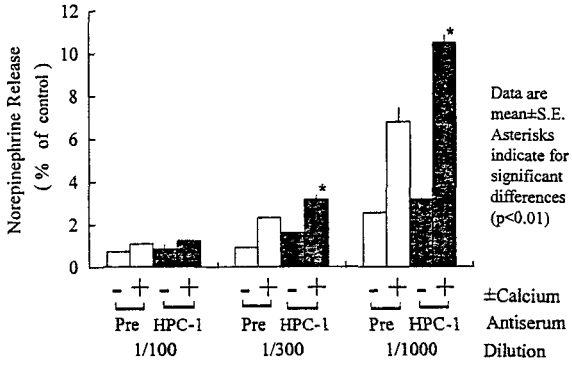


図１．ＰＣ１２ｈ細胞からのノルエピネフィリンの放出．ジギトニン処理した細胞を希釈した抗ＨＰＣ－１抗血清で処理し、カルシウム存在・非存在下でのノルエピネフィリンの放出量を測定し、細胞全体に取り込まれていたノルエピネフィリンに対する割合で表示した。

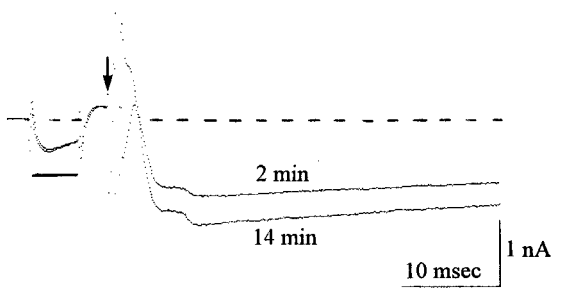


図２．培養した海馬神経細胞における自己回帰的ｅｐｓｃ．ホールセルパッチ電極より抗ＨＰＣ－１抗体（0.3 mg/ml）灌流後、２分、１４分の記録。保持電位は－７０ｍＶ。下線部では－８０ｍＶに保持。矢印は細胞体の脱分極刺激。

36 開口放出のプライミング・ステップに対する抑制調節

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〕
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GTP結合タンパク質の一つ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）。また、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、開口放出のツーステップ・モデルに基づいて検討した結果、MPがプライミング・ステップを選択的に抑制することを明らかにしている。今回我々は、MPがCA放出のタイムコースにおいて、Ca^{2+}刺激後2分までの速い放出には影響を与えず、2分以降の持続的な放出を抑制し、そしてこの抑制が抗Go抗体によって完全に打ち消さることを見いだした。この結果から、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強く示唆される。さらにMPによってプライミング・ステップに対するCa^{2+}の増強作用が低下し、最大の増強を得るのに必要なCa^{2+}濃度も上昇した。このことからGoによる抑制調節の一部はプライミング・ステップのCa^{2+}感受性を低下させることによることが示唆された。

AunisらはGoとGiを直接活性化するハチ毒ペプチドMastoparanがCa^{2+}依存性開口放出を抑制し、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開口可能な状態にするATP依存性プライミング・ステップと、Ca^{2+}依存性ATP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、100μM Ca^{2+}刺激によって2分以内に終了するATP非依存性の速いCA放出が引き起こされる。これは既にプライミング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ATP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ATP依存性プライミングによる顆粒の供給に裏打ちされている（Fig.1）。我々はGoによるプライミング・ステップに対する抑制的調節の詳細を明らかにする目的で、leaky細胞でのCA放出に対する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のプライミング効果をみる場合は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を添加、遊離Ca^{2+}濃度10μM）中での10分までの放出を測定した。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-ECD法により定量を行った。

［結果及び考察］

Leaky細胞をATP存在下、非存在下、Ca^{2+} 10μMで刺激した時のCA放出のタイム・コースをとると、2分までの放出はATPの有無に影響を受けず、この放出は刺激前に内因性のATPによりプライミングを受けた顆粒からの放出であると考えられる。2分以降はATP存在下でのみ放出量が時間と共に増加する。これは2分間のCa^{2+} 刺激で開口可能な顆粒が消費され、その後はプライミングによる顆粒の供給を受けながらの放出となるからである。この時MPによりATP存在下での2分以降の持続的な放出が完全に抑えられた。このMPによる、ATP依存性の持続的な放出に対する抑制は抗Go抗体により完全に打ち消された。抗Go抗体のみ作用させると、2分までの放出には影響を与えなかったが、それ以降の放出がより持続し、放出量が増大した (Fig.2)。またプライミング・ステップは低濃度のCa^{2+}によって促進されることが知られており、1μMCa^{2+}で最大の増強がみられた。ところがMP存在下では、最大の増強を得るためには5μMの濃度のCa^{2+}が必要であった (Fig.3)。これらの結果から、Goの抑制的調節はATP依存性プライミング・ステップに対して働いていることが明らかになり、またその抑制の一部はプライミング・ステップのCa^{2+}感受性を低下させることによることが示唆された。



Fig.1 Two-Step Model for Exocytosis.

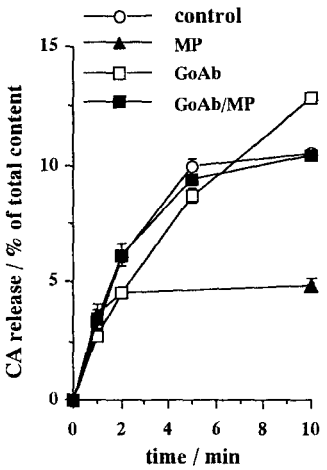


Fig.2 Effects of anti-Go antibody on the inhibitory action of mastoparan.

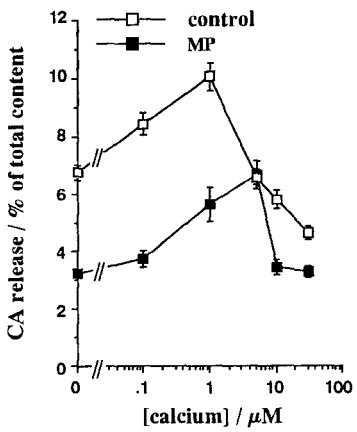


Fig.3 Effect of mastoparan on the ability of various Ca^{2+} on priming step.

［謝辞］

抗Go抗体を供与いただいた、東京大学医学部脳研究施設亀山仁彦先生に感謝します。本研究の一部は文部省科学研究費（05680683; 06044199）の補助を受けた。

［文献］

1. Ohara-Imaizumi,M. et al. (1992) J.Neurochem. 58, 2275-2284. 2. Bittner,M.A. & Holz,R.W. (1992) J.Biol.Chem. 267, 16219-16225. 3. Vitale,N. et al. (1993) J.Biol.Chem. 268, 14715-14723.

37 マウス神経芽腫細胞における各種複合脂質の塩基へのグリシンの間接的関与の ^{15}N 安定同位体元素による解析

武富　保、上村敬一、倉橋　寿*

信大・医・加齢適応研究センター・神経加齢　*松本歯大・薬理

〔要約〕

マウス神経芽腫細胞を［^{15}N］グリシンを含むDMEM培地で計４日間培養後、細胞増殖、形態変化ともに正常な細胞を得た。それらの総脂質を抽出し、各種複合脂質を分離精製後、含有 ^{15}Natom% excessを測定することによって［^{15}N］グリシンが明らかに利用されていることを示した。ホスファチジルセリン（PtdSer）とホスファチジルエタノールアミン（PtdEtn）が高値を示すことからも［^{15}N］グリシンは［^{15}N］L-セリンに変換して利用されることが示唆された。また、このことは ^{15}Natom% excessが低値とは言えスフィンゴシン塩基に認められることからも推論された。

以前にマウスの臓器・組織の複合脂質の塩基の代謝的研究として［^{15}N］コリン、［^{15}N］エタノールアミン、［^{15}N］DL－セリンを用いて行った（1)。今回は培養細胞と［^{15}N］グリシンは比較的安価で、最も単純なアミノ酸だけに生体の化学物質に色々と利用されているので試みた。実験結果は予期に反して、グリセロリン脂質とスフィンゴ脂質の塩基にかなりよく利用されていることを初めて明らかにすることができたので報告したい。

［実験方法］

マウス神経芽腫細胞NS-20Y（1×10^4 個／cm^2）、Neuro2a（2×10^4 個／cm^2）、N1E-115（2×10^4 個／cm^2）を用い、^{15}N－基質含有DMEM培地（２０ml）で、２日間で、同培地交換し、計４日間常法により培養した。細胞増殖は細胞数を常法により測定し、また、形態変化は位相差顕微鏡下で観察された。Bufferでよく洗った細胞より常法により総脂質を抽出した。Folch 法で処理後、シリカゲルの調製用TLC で各種複合脂質が単離された。それらのP含量はBartlett法により、また Optical Emission Spectroscopy法によって ^{15}Natom% excess値を測定した。^{15}N－基質として［^{15}N］グリシン（９９atom%、２００μg／ml）が用いられたが、比較のため［^{15}N］コリン（９５atom%、１００μg／ml）、［^{15}N］エタノールアミン（９５atom%、１００μg／ml）、［^{15}N］DL－セリン（９２．３atom%、２００μg／ml）も用いられた。

［結　　果］

上記の条件で培養したいずれの細胞も正常な増殖が見られたが、^{15}N－基質にかかわりなく３系統のうちNS-20Yが最も増殖が盛んであった。形態変化にも異常は見られなかった。各細胞のリン脂質組成は^{15}N－基質によって著しく変動することはなかった。定常状態での^{15}N－基質の各細胞の各種グリセロリン脂質とスフィンゴ脂質への取り込みは（表－１）に示されるような結果であった。NS-20Yのデータは省略されているが、ここに示されているのとほぼ同じ結果であった。ここから見られるように［^{15}N］グリシンは明らかに複合脂質の塩基生成に利用されていることが明らかとなった。［^{15}N］セリンの取り込みと質的には共通することから［^{15}N］グリシンは一旦［^{15}N］L-セリンに細胞内で変換後利用されることを示唆した。［^{15}N］コリンと［^{15}N］エタノールアミンとのグリセロリン脂質の塩基への利用のされ方とは明らかに違った。

［考　　察］

［^{15}N］グリシンは容易に細胞に取り込まれて、恐らくミトコンドリアに局在する5,10－メチル・テトラヒドロ葉酸：グリシン水酸化メチル転移酵素によって［^{15}N］L-セリンに変換したものと考えられる。［^{15}N］グリシンは比較的安価なだけにこれらの^{15}N安定同位体元素による培養細胞での動的代謝研究には好都合であり、今後更なる追試が期待される。

［文　　献］

(1)Taketomi,T., Uemura,K., and Yuzawa,M. (1980) Jpn J. Exp. Med. 50, 267-273

（表－１）　［^{15}N］基質含有培地で４日間の培養細胞の複合脂質の^{15}N atom% excess値

細　胞	脂　質	［^{15}N］グリシン	［^{15}N］コ リ ン	［^{15}N］エタノールアミン	［^{15}N］DL－セリン
Neuro2a	PtdEtn	4.70	–	33.22	11.73
	EtnPla	3.59	–	36.50	6.81
	PtdSer	6.71	–	0.59	8.80
	PtdCho	0.54	36.23	1.85	0.81
	SM	0.79	7.05	1.29	2.50
	Ceramide	0.60	–	–	1.85
N1E-115	PtdEtn	8.90	–	39.84	13.15
	EtnPla	6.54	–	38.61	5.81
	PtdSer	9.90	–	0.59	7.01
	PtdCho	0.54	27.10	2.67	1.71
	SM	2.60	5.85	1.63	2.80
	Ceramide	1.11	–	–	1.98

EtnPla, エタノールアミンプラスマロゲン；PtdCho, ホスファチジルコリン；
SM, スフィンゴミエリン

38 NMR-スペクトロスコピー法による ^{13}C-ブドウ糖投与に伴うラット脳内アミノ酸代謝の研究

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] 脳内には、解糖系によってブドウ糖より生じたピルビン酸が、ピルビン酸カルボキシラーゼによってオキザロ酢酸となり、TCA 回路に入る代謝経路 (anaplerotic pathway: A. P.) が存在し、その経路がアストログリアに局在することが知られている[1-2]。しかし、この代謝経路の生理学的役割は明らかではない。そこで、脳内でのアミノ酸代謝コンパートメント、特に、A. P. を介したアミノ酸代謝について、[2-^{13}C]D-ブドウ糖(99%, atom excess) を用いて検討を行った。2-^{13}C-ブドウ糖投与 (1g/kg) 30分後では、グルタミン酸(Glu)の 5位に最も多く^{13}C が取り込まれ、それに続き、グルタミン(Gln)の 5位、アスパラギン酸(Asp)の 4(1)位、次いで、GABAの 1位であった。これらの取り込み量の順は、[1-^{13}C]D-ブドウ糖投与後の Glu, Gln の4位、Asp の 2(3)位、GABA の 2位への取り込み順と全く同様であった。一方、2-^{13}C-ブドウ糖由来の ^{13}Cが、A. P. を介してアミノ酸へ直接取り込まれた結果、Glu、Gln の 3位がラベルされていた。これらのラベル量は、5位へのラベル量に対し、正常脳において、Glu で 11%、Gln で 32% であったが、アンモニア負荷状態下 (^{13}C-ブドウ糖投与直前に 3.5mmoles/kg の酢酸アンモンを腹腔内投与) では Glu で 13% とほとんど変化がなく、Gln で 52% に増加していた。また、5位への取り込みは Glu では約10% 減少していたのに対し、Gln では約 30% 増加していた。以上の結果より、脳内のアンモニア処理機構には A. P. が密接に関与していることが明らかとなった。

[はじめに] 我々はすでに本学会において[3]、ラットで、尾静脈に投与された [1-^{13}C]-ブドウ糖 からの ^{13}C が Glu、Gln へ組込まれる際、Gln では 2位への取り込みが 3位への取り込みよりも約1.7倍と高く、この現象は Glu では全く認められなかったことから、Glu, Gln の代謝コンパートメントには、A. P. が関与している可能性を示唆してきた。[2-^{13}C]D-ブドウ糖は解糖系によって[2-^{13}C]-ピルビン酸になり、アセチルCoA を経て TCA 回路に入ると、Glu, Gln の5位、Asp の 4(1)位、GABA の 1位が ^{13}C でラベルされ、A. P. を介してTCA 回路に入ると、Glu, Gln の3位、Asp の 2(3)位、GABA の 3位がラベルされる。したがって、[2-^{13}C]D-ブドウ糖を用いることは、直接 A. P. の代謝活性を知る上で有効である。

[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 [2-^{13}C]D-ブドウ糖を投与した後、15 、30、60、120 分後に、また、腹腔に 3.5mmoles/kg の酢酸アンモンを投与した直後に尾静脈から [2-^{13}C]D-ブドウ糖を投与し 30分後に、それぞれラットの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、脳を摘出し脳部位に分けた後、各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を求め、それをもとに脳組織 300mg 当たりの相対ピークを求めた。

[結果および考察] [2-^{13}C]D-ブドウ糖投与後、15, 30, 60, 120分後の Glu, Gln の 5位、Asp の 1(4)位、GABA の 1位、Ala の 2位への ^{13}C の取り込み量のタイムコースは、[1-^{13}C]D-ブドウ糖投与後の Glu、Gln の 4位、Asp の 2(3)位、GABA の 2位、Ala の 3位への取り込み (昨年本学会で報告) と同様であった。[1-^{13}C]D-ブドウ糖投与の場合、A. P. を介して、TCA 回路へ ^{13}C が取り込まれると、Glu、Gln の 2位がラベルされる。しかし、アセチルCoA を介して TCA 回路へ組み込まれた ^{13}C-炭素

鎖がTCA回路中で一巡することによって、Glu、Glnの2, 3位へも ^{13}C が取り込まれていく。したがって、A. P. のみを調べるために、[2-^{13}C]D-ブドウ糖を用いれば、A. P. を介した代謝によって、Glu、Glnの3位にのみ ^{13}C が取り込まれることから、3位の ^{13}C 量を測定することによって、A. P. の代謝活性を直接知ることが出来る。

Table 1. Time Course of 13C Incorporation into Amino Acids in Rat Brain from [2-13C]Glucose

Time (min)	15	30	60	120
GABA-3	1.750	1.269	1.748	1.352
GABA-1	3.087	4.337	3.996	2.531
Gln-3	2.730	4.526	4.793	4.185
Gln-4	0.864	0.811	1.461	1.231
Gln-2	1.310	2.733	3.047	2.934
Gln-1	2.257	4.443	4.486	4.911
Gln-5	4.585	8.468	7.321	5.503
Glu-3	3.112	4.756	5.145	4.605
Glu-4	0.050	1.445	4.137	3.123
Glu-2	0.959	2.483	4.986	4.046
Glu-1	8.557	14.992	15.162	9.693
Glu-5	29.713	38.503	31.484	18.467
Asp-3	0.787	1.341	2.229	1.292
Asp-2	0.245	1.127	1.352	1.198
Asp-1	4.506	5.480	5.105	2.664
Asp-4	4.386	6.224	5.882	3.648

Rats were killed by microwave at various time after injection of 2-13C-glucose.
The values were indicated in relative enrichments in 300mg of rat brain.
The values indicated means of two rats.

タイムコースの実験(Table 1)より、Gluの3位への取り込みは60分で最高値のを示していたが、Glnの3位への取り込みも60分で最高値を示した。このGluの3位に対するGlnの3位の値の比は常に高値を示し、ほぼ90%に達していた。それに対し、アセチルCoAを介するGluの5位に対するGlnの5位の値の比は、投与後の時間とともに15%から30%へと増加していた。これらのことから、A. P. 及びGln合成酵素がアストログリアに局在する[4-5]ことと考え合わせるとGln合成はA. P. を介してグリアの代謝コンパートメントで行われていることを示すものである。

一方、アンモニアを負荷した場合(Table 2)、Glnの3位への ^{13}C の取り込み量は、2.88倍に増加していたのに対し、Gluの3位への取り込みはほとんど変化していなかった。Glnの5位への取り込みもアンモニアによって1.36倍に増加していが、Gluの5位への取り込みはむしろ減少していた。また、Glu、Glnの5位への ^{13}C 取り込み量に対する、Glu、Glnの3位の ^{13}C 取り込み量の比は、正常脳において、Gluで11%、Glnで32%であったが、アンモニア負荷によってそれらの値はGluで13%と変化がなく、Glnで52%に増加していた。

以上のことから、脳内でのアンモニア処理系は主として、A. P. を介した代謝によって担われていることが明らかとなった。このA. P. を介したGln合成は、アストログリアで行われているものと思われ、ニューロン・グリア間でのGlnやGluの相互移行を含めグリアの機能の一端が明らかとなった。

Table 2.

Effects of Hyperammonemia on 13C Incorporation into Amino Acids in Rat Brain from [2-13C]Glucose

	[2-13C]Glc	Ammo + [2-13C]Glc
	Mean± S.D.	Mean± S.D.
Ala-2	3.273± 0.371	3.794± 0.186
Lact-2	10.002± 0.699	11.562± 0.350
GABA-3	0.472± 0.140	0.906± 0.070
GABA-1	4.847± 0.732	4.469± 0.366
Gln-3	3.578± 0.458	10.311± 0.229
Gln-4	0.025± 0.428	0.849± 0.214
Gln-2	1.097± 0.275	3.153± 0.137
Gln-1	2.595± 0.270	3.836± 0.135
Gln-5	6.974± 0.507	9.456± 0.254
Glu-3	5.686± 0.343	6.617± 0.172
Glu-4	1.272± 0.319	0.613± 0.160
Glu-2	2.982± 0.201	2.579± 0.100
Glu-1	15.007± 1.421	13.148± 0.710
Glu-5	43.892± 3.784	39.166± 1.892
Asp-3	1.324± 0.199	1.091± 0.099
Asp-2	0.979± 0.205	0.897± 0.102
Asp-1	5.093± 0.697	4.073± 0.348
Asp-4	6.068± 0.413	4.857± 0.207

Rats were killed by microwave at 30 min after injection of 2-13C-glucose.
The values were indicated in relative enrichments in 300mg of rat brain.
The values indicated means ± SD of five rats.

[文献] 1) M. S. Patel (1974) J. Neurochem. 22, 717-724. 2) S. C. Cheng et al. (1967) Nature 216, 928-929. 3) 金松知幸、高原ひろみ、塚田裕三(1994) 神経化学 33, 422-423. 4) R. P. Shank et. al. (1985) Brain Res. 329, 364-367. 5) A. Martinez-Hernandez et. al. (1987) Science 195, 1356-1358.

39 サル末梢神経ミエリン糖蛋白質糖鎖の構造解析

北村邦男、坂本安、吉村和法、渋谷匡子、寺田庄一、野村恭一*、野村正彦
（埼玉医大・一生理、神経内科*）

〔要約〕末梢神経ミエリンに存在する２種の糖蛋白質（P0 蛋白、PASII/PMP22蛋白）はミエリン形成に深く関わるものと考えられており、それらの糖鎖の重要性も指摘されている。我々はウシ末梢神経ミエリンについてそれらの糖鎖構造を報告してきたが、今回サル末梢神経ミエリンの糖蛋白質糖鎖構造を解析し両者を比較した。サルP0蛋白質由来のGP4においてはN-アセチルノイラミン酸をもつものとN-グリコリルノイラミン酸をもつものが共存する点が異なっていたが、その他のP0蛋白質及びPASII/PMP22蛋白の主要な糖鎖はウシのものと同一であることが明らかとなった。従って、P0蛋白質とPASII/PMP22蛋白に認められた特異的な糖鎖構造は種を越え且つ組織特異的な糖鎖発現をしているものと考えられ、その構造は末梢神経ミエリン形成に必須なものであろうと推定された。

末梢神経ミエリンに存在する糖蛋白質（P0 蛋白、PASII/PMP22蛋白）はミエリン膜の接着に関与する接着蛋白質と考えられている。両蛋白質は１箇所のN-型糖鎖結合部位をもち、その糖鎖には硫酸化グルクロン酸を含有するものがあることを報告した(1,2)。この硫酸化グルクロン酸構造はN-CAMやMAGといった神経系の接着蛋白質にも存在することが知られており、細胞接着機構への関与が推定されている。P0 蛋白、PASII/PMP22蛋白に認められたこの特徴的な糖鎖構造が接着に必須であるならば、その構造は種を越えて保存されているはずであると考え、今回サル末梢神経ミエリンについて両蛋白質由来の糖鎖構造解析を行なった。

[実験方法]

糖ペプチドの調製：サル末梢神経ミエリン酸不溶性画分を *Streptomyces griseus protease* で消化後、塩およびペプチドをAsahi-GS310 [溶出液；0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)] を用いたHPLCにて除去し、糖ペプチド画分を得た(2)。

Glycopeptidase A 消化及びピリジルアミノ化：糖ペプチドはTakahashiらの方法(3)にてglycopeptidase Aによる17時間の消化後凍結乾燥し、Yamamotoらの方法にてピリジルアミノ(PA)化した(4)。

糖ペプチド及び2アミノピリジル化オリゴ糖のHPLC：PA化オリゴ糖の精製及び同定にはAmido-80 [4.6x250mm]を用いたHPLC及びDevelosil-ODS [4.6x150mm]を用いた２次元HPLCにて行なった(2)。

シアル酸のHPLC：PA化オリゴ糖を0.05%TFA中にて100℃１時間の加水分解を行なった後、Dionex CarboPac PA1カラムを使用したHPLCにて分析した。溶出には0.1MNaOH-0.15MCH3COONa溶液を使用し、Dionex社製pulsed amperometric detector (PAD)にて検出を行なった。

NMR解析：試料は重水中にて凍結乾燥を繰り返した後400M-Hz NMR(JEOL EX400)にて測定した(2)。

[結果と考察]

ウシ及びサルより得たPA化オリゴ糖をODS HPLCで比較したところ、サルにおいてはウシの場合より多くのピークが観察された（図１）。サルの主要なピークa,c,d,eはウシのP0-GP3, P0-GP4, P0-GP5, PASII-FLM1の溶出位置に一致していたが（図１）、念のため２次元HPLC及び^{1}H-NMR解析を行なったところ、各々構造既知のウシP0蛋白由来のGP3, GP4, GP5 及びPASII/PMP-22蛋白由来のFLM1に完全に一致した（データ未掲載）。従って、サルP0 蛋白質及びPASII/PMP-22蛋白質の主要な糖鎖構造はウシのものと同一であることが判明した。しかしながら、サルにおける主要なピークの１つであるピークbのNMRパターンはH-1プロトン、H-2プロトン領域でピークcとほぼ一致するものの、メチルプロトンが１つ欠如しており、シアル酸のH-3aプロトンのケミカルシフト値も異なっていた（図２）。又、negative FAB-MSによる解析の結果ピークbは[M-1]$^{-}$イオンとして2048、ピークc (=GP4)は2032(GP4の分子量の理論値は2033.895）で、その差は16マスであった（未掲載）。従って、ピークbはグリコリルノイラミン酸を含有するGP4であろうと考え、ピークb及びピークcを0.05% TFA中にて加水分解を行ない両者を比較した。その結果、両ピークはODS上でGP3に相当する位置に溶出された（図３）。又、加水分解溶液をCarboPac PA1-HPLCにて分析したところ、ピークbからはN-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)、ピークcからはN-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)が検出された（図４）。従って、ピークbは非還元末端にNeu5Gcをもつ GP4の亜型（NeuGc-GP4と命名)であると結論した（図５）。

以上の結果から、サルにおいてはNeu5Gcをもつ GP4があるものの、やはりウシと同一のGP4 (Neu5Ac-GP4)やその他の主要な糖鎖はウシのものと一致したことから、P0-GP5やPASII/PMP-22-FLM1に認められた

硫酸化グルクロン酸を含有する糖鎖構造は種を越えて存在することが明らかとなった。このような種を越えた厳密な糖鎖構造の発現は末梢神経ミエリン形成に糖鎖が深く関わるものと推定させた。

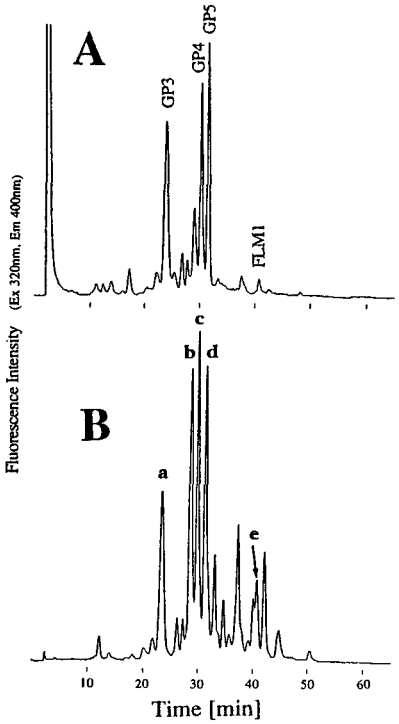


図1.PA化オリゴ糖のODS-HPLCパターン
(A) ウシ末梢神経ミエリン糖蛋白質由来
(B) サル末梢神経ミエリン糖蛋白質由来
ウシにおける構造既知のオリゴ糖に名称を付記した。

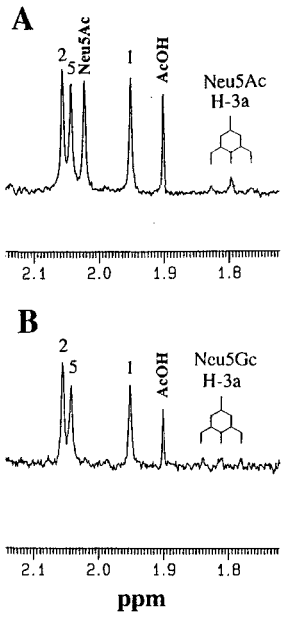


図2.メチルプロトン領域の
^{1}H-NMRパターン
(A) 図1のピークC
(B) 図1のピークB
番号は図5中の番号に対応

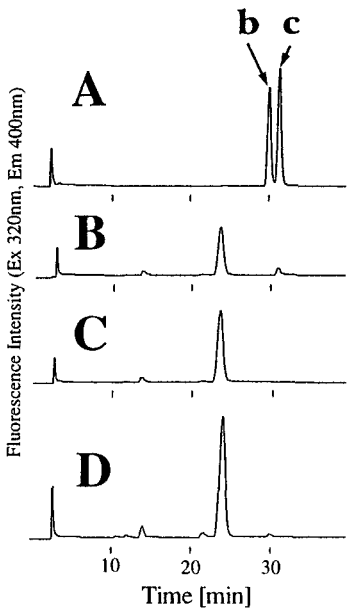


図3.シアル酸除去オリゴ糖のODS-HPLC
パターン
(A) 精製ピークB及びCの混合物
(B) ピークBの脱シアル酸化物
(C) ピークCの脱シアル酸化物
(D) 上記BとCの混合物
脱シアル酸化物は0.05% TFA中にて100℃
1時間加水分解処理して得たもの。

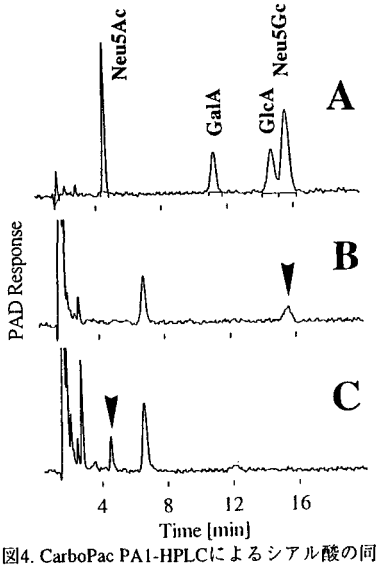


図4. CarboPac PA1-HPLCによるシアル酸の同定
(A) シアル酸及びウロン酸の標準液
(B) ピークBの加水分解物
(C) ピークCの加水分解物
加水分解条件は図3と同じ。遊離された
シアル酸は矢印にて示した。

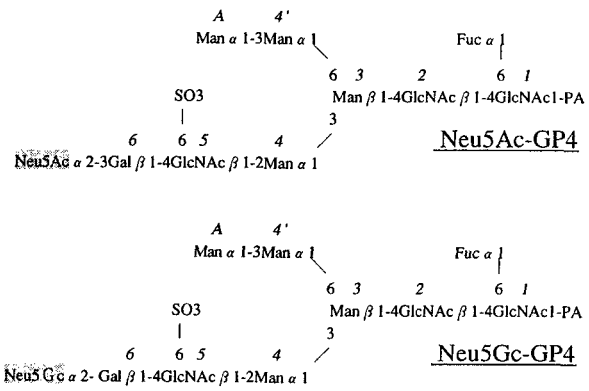


図5. ピークC（上段）及びピークB（下段）の糖鎖構造
ピークCはウシP0-GP4と同一構造。
P0-GP3の構造は網がけ部分のシアル酸のないもの。
P0-GP5の構造は網がけ部分が硫酸化グルクロン酸に置き変わったもの。
PAS-II/PMP-22のFLM1の構造に関しては文献2に記載。

[文献] (1) Uyemura,K. and Kitamura,K. (1991) Comp. Biochem. Physiol.,98C,63-72 (2) 北村ら(1994)神経化学,33,438-439
(3) Takahashi,N. et al. (1987) Biochemistry, 26, 1137
(4) Yamamoto,S. et al. (1989) J.Biochem. (Tokyo), 105, 547

40 グリオーマに対するOK-MC (OK-432-activated mononuclear cells) 養子免疫療法における Fas/Fas ligand系の関与

戸田啓介[1,2]、白石哲也[1]、広津辰美[1]、福山幸三[1]、峯田寿裕[1]、田渕和雄[1]

[1]佐賀医科大学脳神経外科、[2]同法医学講座

〔要約〕

近年、cytotoxic T cells (CTL)の細胞傷害活性にFas/Fas ligand系が関与していることが明らかとなった。我々は悪性脳腫瘍に対してOK-432-activated mononuclear cells (OK-MC)を用いた養子免疫療法を行ってきた。今回、OK-MCの細胞傷害活性の機序を明らかにする目的で、RT-PCR法によりFas ligand mRNAの発現を検討した。その結果Fas ligand mRNAは未処理のperipheral blood mononuclear cells (PBMC)で軽度の発現が認められ、OK-432処理により用量依存性に増加した。これは悪性脳腫瘍に対するOK-432を用いた養子免疫療法がFas/Fas ligand系を介して作用している可能性を示唆するものである。

【目的】 Fasはアポトーシス誘導活性を有する細胞表面蛋白質であり、抗Fas抗体をFas発現細胞に作用させるとアポトーシスが誘導されることが知られている。一方、ヒトFasに対する内因性リガンド(human Fas ligand)が単離され(3)、cytotoxic T細胞の腫瘍細胞傷害活性にFas/Fas ligand系が関与していることが明らかにされた(1)。また末梢T細胞を活性化する種々の条件で、T細胞のみならずnatural killer (NK)細胞にもFas ligandが誘導されることが知られている。我々はこれまで悪性脳腫瘍に対し、NK細胞の一種であるOK-432-activated mononuclear cells (OK-MC)を利用した養子免疫療法を行ってきたが、OK-MCの細胞傷害活性にFas/Fas ligand系が関与しているか否かを解析し、Fas/Fas ligand系を用いた悪性脳腫瘍に対するアポトーシス誘導療法の可能性について検討を加えた。

【方法】 健康成人2名および、患者本人もしくはその家族から同意を得た脳腫瘍患者2名より静脈血を採取し、lymphocyte separation medium (LSM, BIONETICS, U.S.A.)を用いて分離したPBMC (2×10^5/ml)をRPMI 1640に懸濁し、0.25 KE、0.125 KE、0.025 KEのOK-432を加えた後、37℃で24時間培養した。Negative controlとしてOK-432未処理のPBMCを用いた。遠沈後OK-MCを収集した。OK-MCからpoly(A) RNAを抽出し、一本鎖cDNAを調整した後、human Fas ligandのcDNAをPCR法にて増幅した。センスプライマーはATG initiation codonを含んだ24ヌクレオチド(GCCATGCAGCAGCCCTTCAATTAC)で、アンチセンスプライマーはTAA termination codonを含んだ27ヌクレオチド(GTGCTTCTCTTAGAGCTTATATAAGCC)を使用した。PCRは1サイクルが94℃を1分、55℃を1.5分、72℃を2分で、合計30サイクル行った。Positive controlとしてβ-actinをPCR増幅した。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動を行い、同定した。

【結果】 家族あるいは本人のインフォームドコンセント得たうえで施行した8名の悪性脳腫瘍患者に対するOK-MC養子免疫療法の結果をTable 1に示した。8例中2例 (case 1 & 3)で腫瘍陰影の縮小を認めた。Case 6はOK-MC療法直後は腫瘍陰影に変化はみられなかったが、20ヶ月後には消失しており長期生存が得られている。RT-PCR法によるFas ligandの解析では、未処理のリンパ球細胞でもFas ligand cDNAに相当する約840 bpのPCR産物が同定された。このPCR産物はOK-432処理にて用量依存性に増加した (Figure 1)が、健康成人と脳腫瘍患者との間で明らかな差はみられなかった。

【考察】 Cytotoxic T cells (CTL)の細胞傷害機序として従来よりperforin/granzyme系の関与が知られていたが、最近CTL上に発現したFas ligandが標的細胞膜上のFasに結合し、アポトーシスを誘導する経路の存在が明らかとなった。特に$CD4^+$ CTLがこのFas/Fas ligand系を利用しているが、ある条件下では$CD8^+$ CTLのみならずNK細胞にもFas ligandの発現が誘導されることが知られている。我々はヒト培養脳腫瘍細胞において免疫組織化学的にFasの発現を認め、抗Fas抗体処理によってアポトーシスに特徴的な形態学的変化が惹起されることを報告してきた(2)。また手術時生検グリオ

ーマ組織においてFas抗原の発現とmodified TUNEL法を用いて検出したアポトーシスの頻度 (apoptotic index)とが相関するとの結果を得ている(4)。これらは悪性脳腫瘍においてもFas/Fas ligand系が機能している可能性を示唆するものである。今回我々はPBMCにOK-432を作用させるとFas ligandの発現が増強されることを確認した。これは悪性脳腫瘍に対するOK-432を用いた養子免疫療法がFas/Fas ligand 系を介して作用している可能性を示唆するものである。

【文献】(1) Hanabuchi S., et al. (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91, 4930 (2) Shiraishi T., et al. (1994) Bulletin of the Japanese Neurochemical Society 33, 266 (3) Takahashi T., et al. (1994) International immunology 6, 1567 (4) 戸田啓介, 他. 神経免疫研究, 印刷中.

Table 1 Summary of OK-MC therapy for 8 patients

Case No.	Age (yrs)/ Sex	Histology	Tumor response	Survival*/ outcome
1	52, M	Glioblastoma	MR	21 mos / dead
2	59, M	Anaplastic astrocytoma	NC	3 mos / dead
3	61, M	Glioblastoma	MR	19 mos / dead
4	69, M	Glioblastoma	NC	31 mos / dead
5	33, M	Primary sarcoma of the brain	NC	6 mos / dead
6	57, M	Metastatic adenocarcinoma	NC	20 mos / alive
7	58, F	Anaplastic astrocytoma	ND	
8	76, M	Metastatic adenocarcinoma	NC	12 mos / alive

* Survival period is measured from the first immunotherapy treatment

Abbreviations: MR; minor response, NC; no change, ND; not detected.

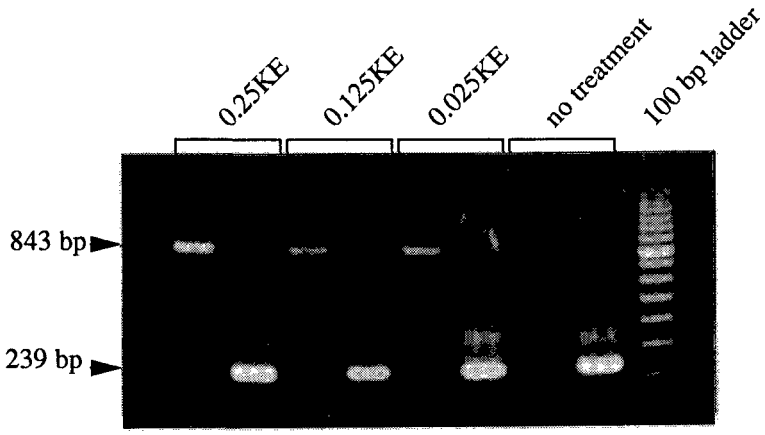


Figure 1 RT-PCR of OK-MC using Fas ligand primers

41 ラット海馬からの[^{3}H]ノルアドレナリン放出 - NO donor による促進-

佐藤　壮一、　村山　俊彦、　野村　靖幸
(北海道大学薬学部薬効学講座)

[要約]
ラット海馬スライスにおいて、NO 化合物 S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)と *l*-cysteine (*l*-Cys) を共存させることにより、[^{3}H]ノルアドレナリン (NA) 放出が促進された。SNAP や *l*-Cys単独では効果はなかった。この放出は、KCl 脱分極刺激とは異なり細胞外 Ca^{2+} の存在は必要なかったが、W7 (Ca^{2+}/calmodulin (CaM) 阻害薬)で完全に抑制された。NO ラジカルを発生させる NOC -18、$NaNO_2$ や S-nitroso-glutathione (S -nitroso-GSH) はそれぞれ単独で cGMP 生成を増加させたが、*l*-Cys などと共存させても[^{3}H] NA 放出は促進させなかった。また、oxy-ヘモグロビン (oxy-Hb) などで NO 化合物による cGMP 生成は抑制されたが、SNAP + *l*-Cys による[^{3}H] NA 放出は抑制されなかった。ペルオキシナイトライト ($ONOO^-$) を発生させる SIN-1 は、単独でも *l*-Cys を加えても[^{3}H] NA 放出やcGMP 生成に影響を与えなかった。従って、SNAP + *l*-Cys は cGMP 生成を介さずに[^{3}H] NA 放出を促進させていると考えられる。SNAP + *l*-Cys は SNAP + *d*-Cys 以上に[^{3}H] NA 放出活性が高かった。また、SNAP + *l*-Cys の起こす[^{3}H] NA 放出は *l*-leucine (*l*-Leu)で競合的に阻害された。従って、SNAP と *l*-Cys により S-nitroso-*l*-Cys が生成した可能性が示唆され、細胞外 Ca^{2+} 非依存的、CaM 依存的に NA 放出を促進していると推察される。

[目的]
NO は、中枢神経系において多彩な神経伝達物質様作用を示すことが報告されている(1)。しかしながら、NOの活性本体及び作用機構には不明の点が多い。我々は、以前に NO donor である sodium nitroprusside (SNP) が還元剤 dithiothreitol (DTT) 共存下でラット海馬スライスから NA 放出を引き起こすことを報告した(2)。また、SNAPは、*l*-Cys や DTT 存在下で NA 放出を促進させた。本研究では、海馬における NO の生理作用、活性分子種やその作用機構を明らかにする目的で、SNAP + *l*-Cys による NA 放出のメカニズムや cGMP 生成に対する作用を検討した。

[実験方法]
1) [^{3}H]NA release : Wistar 系雄性ラット (6-9 週齢) の海馬を摘出し、細断後、メッシュ (300 μm) で濾過してスライス標本を作製した。この海馬スライスを[^{3}H] NA と 37 ℃, 20 min インキュベートした。洗浄後、薬物と共に 37 ℃, 8 min インキュベート後、5 mM EDTA 及び 5 mM EGTA を含む氷冷 buffer を加えて反応を止め、遠心分離後上清に存在する[^{3}H] NA の放射活性を測定した。
2) cGMP accumulation : radioimmunoassay によって測定した。

[結果及び考察]
我々は、先に SNP と DTT を共存させることによって、ラット海馬スライスからの[^{3}H] NA 放出が両薬物の用量に依存して促進されることを報告している(2)。今回 SNAP と *l*-Cys を共存させると、[^{3}H] NA 放出は両薬物の用量に依存して促進されることが示された (Fig. 1)。SNAP 及び *l*-Cys は、それぞれ単独では無効であった。20 mM KCl 刺激及び SNAP + *l*-Cys 刺激による[^{3}H] NA 放出は、両薬物の添加後1 min 以内に最大の[^{3}H] NA 放出を引き起こし、2 min 以降その作用は減少した。20 mM KCl による [^{3}H] NA 放出は細胞外 Ca^{2+} 非存在下では認められなかったが、SNAP + *l*-Cys の作用は細胞外 Ca^{2+} 非存在下でも認められた。W7 で前処理した標本では、W7 の用量に応じて、SNAP + *l*-Cys による[^{3}H] NA 放出が減少した (Table 1)。これらの結果は、SNAP + *l*-Cys による海馬スライスからの NA 放出に、細胞外の Ca^{2+} の存在は必要ないものの、CaM 系が関与していることを示唆している。

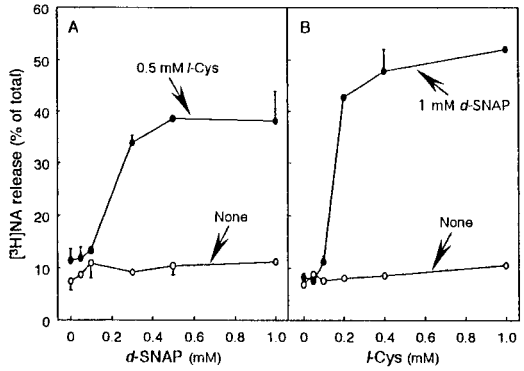


Fig.1 Effect of *d*-SNAP and *l*-Cys on [^{3}H]NA release

Table 1 Inhibition *d*-SNAP-stimulated [^{3}H]NA release from hippocampal slices by calmodulin antagonist W7

	[^{3}H]NA release (% of increase)	
Additions	None	50 μM W 7
20 mM KCl	100	36.4 ± 15.4
1 mM *d*-SNAP + 0.5 mM *l*-Cys	100	6.5 ± 6.5

(n = 3)

次に、他の NO 関連試薬の作用を検討した。NO ラジカルのみを発生するNOC-18 (同仁化学 (株) により提供)、NO ラジカルなどを発生させる$NaNO_2$、S-nitroso-GSH は単独でも、また DTT や *l*-Cys 共存下でも [^{3}H] NA 放出を促進させなかった。一方、SNP、SNAP 、NOC-18、$NaNO_2$や、S-nitroso-GSH は、それぞれ単独で海馬スライスでの cGMP 生成を増加させた (Table 2)。NO ラジカル消去剤 (oxy-Hb、methyleneblue、calboxy-PTIO) により SNP 、$NaNO_2$、NOC-18 による cGMP 生成は抑制された。SNAP、S-nitroso-GSH はそれ自体、細胞膜を透過せず細胞膜との相互作用によって細胞内に NO ラジカルを提供すると考えられている(3)。実際に細胞外に NOラジカル消去剤を加えても SNAP やS-nitroso-GSH によるcGMP 生成は抑制されなかった。$ONOO^-$ を発生させる SIN-1 は、単独でも DTT や *l*-Cys 存在下でも cGMP 生成、[^{3}H] NA 放出促進作用を示さなかった。これらの結果は、SNAP + *l*-Cys による [^{3}H] NA 放出が、cGMP を介していないことを示している。現在、我々は NO 化合物による [^{3}H] NA 放出の活性本体としてニトロソチオール化合物を想定している。また、SNAP 共存下における [^{3}H] NA 放出活性を *l*-Cys と *d*-Cys とで比較したところ、*l*- 体に強い活性が見られた。また、アミノ酸をアッセイ系に共存させたところ *l*-Leu により SNAP + *l*-Cys 作用が競合的に阻害された。このことから、SNAP と *l*-Cys により生成する物質は、おそらく S-nitroso-*l*-Cys ではないかと考えられる。この S-nitroso-*l*-Cys は、*l*-Leu と拮抗する、ある amino acid carrier を介して細胞内に入り、細胞外 Ca^{2+} 非依存的、CaM 依存的に海馬スライスからの NA 放出を促進していると考えられる。

[参考文献]

(1) Rettori, V., Belova, W., Dees, L., Nyberg, M., Gimeno, M. and McCann, S. M. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., 90 , 10130-10134.
(2) 佐藤　壮一、村山　俊彦、野村　靖幸 (1994) 日本薬理学雑誌 105, 20 p.
(3) Kowaluk, E. A. and Hung, H. L. (1990) J. Pharmacol. Exp. Ther., 255, 1256-1264.

Table 2 cGMP accumulation by NO donors in rat hippocampal slices

Additions	cGMP accumulation (nmol / mg protein / 1 min)
None	5.3 ± 0.5
20 mM KCl	4.2 ± 1.6
1 mM *d*SNAP	19.7 ± 1.5
1 mM SNP	19.9 ± 2.7
1 mM NOC-18	15.0 ± 2.1
1 mM $NaNO_2$	13.0 ± 2.6
1 mM S-Nitroso-glutathione	16.6 ± 1.9
1 mM SIN-1	2.9 ± 0.9

42 一酸化窒素 (NO) 誘発性[^{3}H]GABA放出機構

大熊誠太郎、桂　昌司、陳　大志、栗山欣弥
（京都府立医科大学・薬理）

〔要約〕
一酸化窒素 (NO) により誘発される[^{3}H]GABA放出の発現機構について、初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討を加えた。NO donor [sodium nitroprusside (SNP)および*S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP)]によりの誘発された[^{3}H]GABA放出は、いずれもhemoglobinの添加により消失した。これらのNO donorsによる[^{3}H]GABA放出は、incubation bufferからのNa^+あるいはCa^{2+}の除去によりそれぞれ対照群の約50％に低下した。Na^+依存性の[^{3}H]GABA放出はGABA取り込み阻害薬であるnipecotic acidおよび1-(2-(((diphenylmethylene)amino)oxy) ethyl-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridine-carboxylic acid (NO-711) により用量依存的に抑制された。これら阻害薬のNO誘発性[^{3}H]GABA放出抑制作用はCa^{2+}の存在の有無にかかわらず認められた。以上の結果より、NO誘発性[^{3}H]GABA放出はCa^{2+}依存性放出機構およびNa^+依存性のGABA担体輸送機構を介して行われる可能性が示唆される。

［目的］

NOは中枢神経系において、海馬における長期増強、小脳における長期抑制に関与し、あるいはguanylate cyclaseを活性化することによりcGMPの生成を促進するなど、多くの機能的役割を果たしているほか、諸種の神経伝達物質放出を生じさせると考えられている。最近の研究から、神経伝達物質の放出はCa^{2+}依存性放出のほかに、Na^+依存性の神経伝達物質担体輸送系を介しても放出されることが報告されてきている（1、2）。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が上述の放出機構のいずれにより行われるのかについて、マウス大脳皮質より調製した初代培養神経細胞を用い、[^{3}H]GABA放出量を測定することにより検討を加えた。

［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。[^{3}H]GABA放出量の検討は、既報の方法に従って行った（4）。すなわち、100 μ Mのaminooxyacetic acidを含有するKrebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB: pH 7.4)中で37℃、30分間のpreincubationののちに、神経細胞を氷冷したKRBで洗浄し、10分間のincubationを行った。次いで、5分毎のincubation（37℃）を行い、各fractionより得たbufferの一部をliquid scintillation spectrometryにより測定してbuffer中に放出された[^{3}H]GABA量を調べた。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[^{3}H]GABA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。なお、Na^+-free bufferの作製は、Na^+を等濃度のcholineに置換することにより行った。

［結果及び考察］

SNAPおよびSNPはいずれも用量依存的に神経細胞からの[^{3}H]GABA放出を増大させた。SNAPの[^{3}H]GABA放出促進効果はSNPの[^{3}H]GABA放出促進効果に比して約10倍強力であった。また、これらのNO donorにより誘発された[^{3}H]GABA放出は、hemoglobinによって有意に低下した。このことから、NO donor誘発性[^{3}H]GABA放出はNOを介して生じたものであると考えられ、これらのデータは内在性acetylcholineの放出（5）の場合と同様であった。

Incubation bufferからのNa^+の除去により、SNAP誘発性[^{3}H]GABA放出は対照群で認められた[^{3}H]GABA放

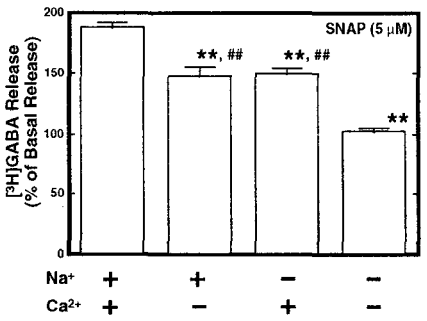
出の約50%まで有意に減少し、またNa^+およびCa^{2+}の除去によりSNAP誘発性[^{3}H]GABA放出は完全に消失した。さらに、Ca^{2+}の除去はSNAP誘発性[^{3}H]GABA放出を約50%低下させることが観察された（Fig.1）。同様の[^{3}H]GABA放出の変化がSNP誘発性[^{3}H]GABA放出においても認められた。これらの結果から、NO誘発性[^{3}H]GABA放出はNa^+依存性およびCa^{2+}依存性の2つの異なる放出機構により行われていることが明らかになった。

Ca^{2+}存在下および非存在下において、SNAP誘発性[^{3}H]GABA放出に及ぼすGABA担体輸送系に対する阻害薬であるnipecotic acidおよびNO-711の作用を検討したところ、Fig. 2に示すように、これら2つの阻害薬はCa^{2+}の存在の有無にかかわらず、用量依存的にSNAP誘発性[^{3}H]GABA放出を抑制した。また、SNP誘発性[^{3}H]GABA放出も同様にこれらの阻害薬により用量依存的に阻害された。以上の実験成績から、NO誘発性[^{3}H]GABA放出はCa^{2+}依存性放出機構およびNa^+依存性GABA担体輸送系の2つの放出機構によって行われることが明らかになった。

[文献]

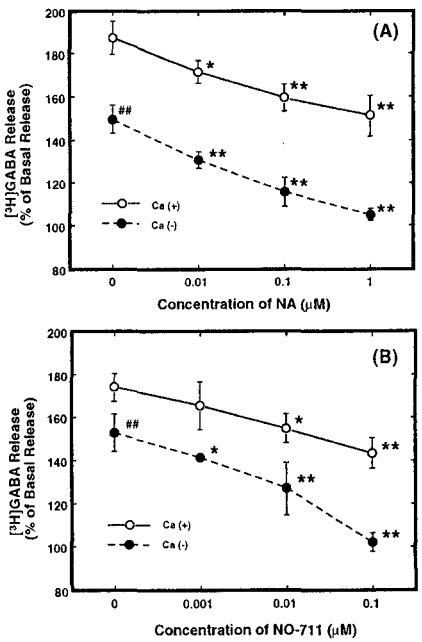
1. Bernath, S. (1992) prog. Neurobiol. 37, 57-91. 2. Levi, G.and Raiteri, M. (1993) Trends Pharmacol. Sci. 16, 415-419. 3. Ohkuma, S. et al. (1990) Eur. J. Pharmacol. 189, 277-285. 4. Ohkuma, S. et al. (1995) J. Neurochem. in press. 5. Ohkuma, s. et al. (1995) Neurosci. Lett. 183, 151-154.

Fig. 1 Effect of Removal of Ca^{2+} and Na^+ on S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine (SNAP)-Evoked Releases of [^{3}H]GABA from Primary Cultured Cerebral Cortical Neurons



The basal release for SNAP was 4545.2 ± 397.1 dpm/mg protein/fraction.
***p<0.01, compared with each value obtained in the presence of Na^+ and Ca^{2+} (Bonferroni's test, N=5).*
##p<0.01, compared with each value obtained in the absence of Na^+ and Ca^{2+} (Bonferroni's test, N=5).

Fig. 2 Effects of (A) Nipecotic Acid (NA) and (B)1-(2-(((Diphenylmethylene)oxy)ethyl)-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridine-carboxylic Acid (NO-711) on [^{3}H]GABA Release Evoked by S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine (SNAP, 5 μM) in the Presence and Absence of Ca^{2+} from Primary Cultured Neurons



The basal releases for SNP were (A) 5159.1 ± 527.3 and (B) 5611.2 ± 497.6dpm/mg protein/fraction, respectively.
***p<0.01, compared with each value obtained in the absence of NA and NO-711 (Dunnett's test, N=4). ##p<0.01, compared with the value obtained the presence of Ca^{2+} and in the absence of NA and NO-711 (Bonferroni's test, N=4).*

43 拘束ストレス時におけるラット海馬アセチルコリン放出と血中エピネフリン、ノルエピネフリン、血糖の変化

田島稔久、遠藤英俊、鈴木祐介*、伊苅弘之*、井口昭久*、後藤峰弘**
（中部病院・老年科、*名古屋大学・老年科、**愛知医科大学・臨床検査）

〔要約〕

拘束ストレス時に海馬のコリン系が活性化することが知られている（1-4,6,7）。今回我々は、脳透析法により拘束ストレス時のラット海馬よりのアセチルコリン放出と血中エピネフリン、ノルエピネフリン、血糖の変化を調べた。その結果、アセチルコリン放出は拘束ストレスの直後に増加し、その後徐々に減少した。血清エピネフリンおよび血糖は拘束ストレスにより徐々に上昇し、45分でピークとなりその後徐々に減少した。血清ノルエピネフリンは拘束ストレスによりただちに上昇し、拘束中高値を維持した。また拘束より解放する際アセチルコリン放出は一過性に増加したが、他は変化しなかった。これらより次のことが推察される。ストレス時のエピネフリン分泌、末梢交感神経活性、血糖調節には何らかの順応機構があり、新たな海馬のアセチルコリン放出増加にもかかわらず末梢での変化がみられなかった。あるいは海馬のアセチルコリン放出は末梢におけるこれらのストレス反応にあまり関与していない可能性がある。

目的　拘束ストレスにより海馬コリン系が活性化することが知られている（1-4,6,7）。我々は以前、海馬コリン系が血糖調節機構に強く関与しており、それは一部副腎を介して行われていることを報告した（5,8）。本研究では、拘束ストレス時の海馬コリン系の活性化と末梢でのエピネフリン、ノルエピネフリン、血糖の変化について調べた。

方法　ペントバルビタール麻酔下にてウィスター系雄ラットの海馬に透析プローブを留置した（AP=-4.3;ML=2.1;DV=-2.1, Paxinos and Watson atlas）。ネオスチグミン10^{-7}M含有人工脊髄液2 μl/minにて潅流開始し、2時間後より15分間隔でサンプリングした。潅流開始3時間後にアクリルボードにプラスチックカラーおよび粘着テープにてラットの四肢を1.5時間固定したのち解放した。得られたサンプル中のアセチルコリンをHPLCにて測定した。また別日、右心房に留置したカテーテルより、同様のスケジュールでストレスを加えたラットより15分間隔で0.3mlずつ採血し、エピネフリン、ノルエピネフリン、血糖を測定した。コントロールとして拘束ストレスを与えないラットで同様のことを行った。統計処理はt検定を用いた。

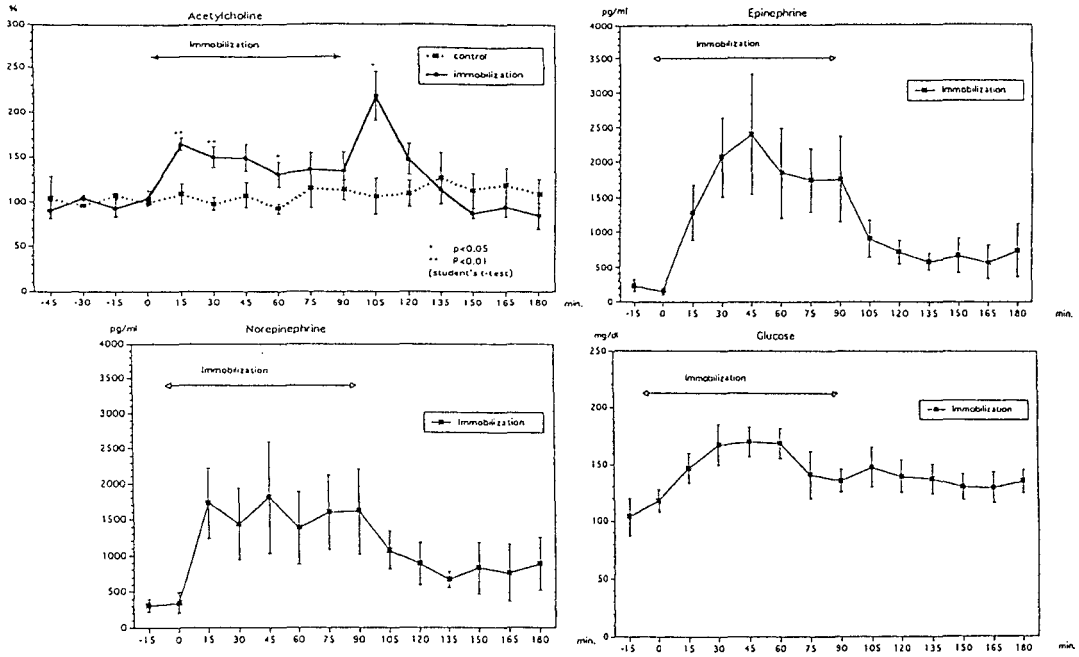
結果　安静時アセチルコリン濃度は51.72±12.0 nmol/lであった。アセチルコリン放出は拘束ストレスの直後163±11%まで有意に増加し、その後徐々に減少した。安静時血清エピネフリン、ノルエピネフリン、血糖値はそれぞれ156±54 pg/ml、343±144pg/ml、118±10mg/dlであった。血清エピネフリンおよび血糖は拘束ストレスにより徐々に上昇し、45分でピークの2402±862pg/ml、170±13mg/dlとなりその後徐々に減少した。血清ノルエピネフリンは拘束ストレスによりただちに1730±493pg/mlと上昇し、拘束中高値を維持した。また拘束より解放する際アセチルコリン放出は再び一過性に134±11%から218±27%へと有意に増加したが、他は変化しなかった。（図1）

考察　我々はこれまでに海馬のコリン系はムスカリニックレセプターを介して中枢性血糖調節に関与しており、末梢では副腎よりのエピネフリン分泌と関連があることを報告している（5,8）。本研究において、拘束ストレスにより海馬コリン系が活性化し血清エピネフリン、ノルエピネフリン、血糖が上昇したことは、これまでの我々のデータと矛盾せず、海馬コリン系の活性化が末梢での変化の引き金となっている可能性がある。しかし、他と異なり血清ノルエピネフリンがストレスの間高値を維持したり、解放する際アセチルコリン放出のみが増加するなど、アセチルコリンの変化と末梢での変化は完全に一致しているわけではない。これらのことから次のことが推察される。ストレス時のエピネフリン分泌、末梢交感神経活性、血糖調節には何らかの順応機構があり、新たな海馬のアセチルコリン放出増加にもかかわらず末梢での変化がみられなかった。あるいは海馬のアセチルコリン放出は末梢におけるこれらのストレス反応にあまり関与していない可能性がある。これらを解明するためには更なる研究が必要である。

文献

1. Finkelstein, Y., Koffler, B., Rabey, J. M. and Gilad, G. M. (1985) Brain Res 343, 314-9
2. Gilad, G. M., Mahon, B. D., Finkelstein, Y., Koffler, B. and Gilad, V. H. (1985) Brain Res 347, 404-8
3. Gonzalez, A. M. and Pazos, A. (1992) Eur J Pharmacol 214, 261-8
4. Gonzalez, A. M. and Pazos, A. (1992) Eur J Pharmacol 223, 25-31
5. Iguchi, A., Uemura, K., Kunoh, Y., Miura, H., Ishiguro, T., Nonogaki, K., Tamagawa, T., Gotoh, M. and Sakamoto, N. (1991) Neuropharmacology 30, 1129-31
6. Imperato, A., Puglisi-Allegra, S., Casolini, P. and Angelucci, L. (1991) Brain Res 538, 111-7
7. Mizukawa, K., Takayama, H., Sato, H., Ota, Z., Haba, K. and Ogawa, N. (1989) Brain Res 478, 187-92
8. Uemura, K., Iguchi, A., Yatomi, A., Miura, H., Honmura, A., Yanase, M. and Sakamoto, N. (1989) Endocrinology 124, 2449-55

図1



44 ベラトリジン刺激アミノ酸系伝達物質放出のγ-アミノ酪酸による調節機構
—in vivo 脳内微小透析法および Ca 流入実験による検討—

田中佐知子、土田晃敬、佐藤陽一、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〕ラット海馬においてベラトリジン刺激によるアミノ酸放出反応に対するγ-アミノ酪酸 (GABA) の調節機構について in vivo 脳内微小透析法を用いて検討を行なった。50 μM ベラトリジンの灌流によって透析回収液中のグルタミン酸濃度は基礎濃度の約 2.5 倍に、またタウリン濃度は約 1.8 倍に増加した。一方、グリシン濃度にはほとんど変化は認められなかった。1 mM GABA を前処置するとベラトリジン刺激によるグルタミン酸放出増加を有意に抑制したが、タウリン放出増加には特に影響を及ぼさなかった。これらの結果より GABA によるアミノ酸系神経伝達物質の遊離調節機構はラット海馬においてはグルタミン酸作働性神経に特有のものであった。さらに、in vivo 実験系で認められた GABA によるグルタミン酸遊離調節機構をさらに検討するため、シナプトソームを用いた ^{45}Ca 流入実験を行った。500 μM GABA の添加により ^{45}Ca 流入は抑制される傾向を示し、500 μM バクロフェンの添加では 57 % にまで抑制された。この結果から脳内微小透析法で認められた GABA によるグルタミン酸放出抑制は $GABA_B$ 受容体を介する Ca 流入阻害の結果生じている可能性が示唆された。

[目的] GABA は抑制性神経伝達物質であり、その受容体は Cl^- チャンネルと複合体を形成している $GABA_A$ とGTP 結合蛋白と共役して K^+ および Ca^{2+} チャンネルに作用する $GABA_B$ 受容体の二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の機能に加え他の神経伝達物質の放出調節を行なうことが in vitro の系で報告されている(1,2)。我々はこれまでに脳内微小透析法を用い、ラット海馬において KCl 刺激によるグルタミン酸放出増加を GABA や $GABA_B$ 受容体のアゴニストであるバクロフェンが抑制することを昨年の本学会にて報告した(3)。今回は Na^+ チャンネル賦活剤であるベラトリジンを放出刺激薬として用い、グルタミン酸、グリシンおよびタウリンの放出に対する GABA による調節機構について検討を行なった。また、神経伝達物質の放出は神経終末へ Ca^{2+} 流入が引き金となって生じることが知られているが、GABA 受容体を介したアミノ酸放出の調節機構に Ca^{2+} が関与しているかを検討するためラット脳シナプトソームを用い、^{45}Ca 流入実験を行なった。

[実験方法] 実験動物には Wistar 系雄性ラットを用いペントバルビタール麻酔下に頭蓋骨を固定し、歯科用ドリルで小孔を開け海馬内 (Bregmaより P:5.8, L:5.0, V:5.0 mm) に8 mm の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, エイコム社製) を挿入し、その翌日に無麻酔無拘束下に灌流実験を行なった。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、GABA を溶解させたリンゲル液を 20 分間灌流し、次に50 μM ベラトリジン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-蛍光検出器にて測定した。

^{45}Ca 流入実験は密度勾配遠心法によりラット脳シナプトソームを調製し GABA およびバクロフェン等の薬物はシナプトソームとともにプレインキュベーション後 ^{45}Ca を含む13.5 mM KCl 溶液を添加して 2 分間インキュベーションを行ない ^{45}Ca 流入を誘発した。続いてセルハーベスターを用いて吸引濾過を行ない、ガラスフィルター上に残った放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

[結果および考察] 50 μM ベラトリジンの灌流によって透析回収液中のグルタミン酸濃度は基礎濃度の約 2.5 倍に増加し、1 mM GABA を前処置するとベラトリジン刺激によるグルタミン酸放出増加は有意に抑制された (Fig.1)。この結果は海馬において Na イオン流入を介する神経活動時のグルタミン酸放出を

GABAが調節していることを示唆している。またベラトリジンの灌流により、タウリン濃度は約1.8倍に増加したが、GABAを前処置してもベラトリジン刺激によるタウリン放出増加に変化は認められなかった(Fig.2)。一方、回収液中のグリシン濃度はベラトリジンを灌流してもほとんど変化は認められなかった。これらの結果よりGABAによるアミノ酸系神経伝達物質の遊離調節機構はラット海馬においてはグルタミン酸作働性神経に特有のものであった。次に、in vivo実験系で認められたGABAによるグルタミン酸遊離調節機構をさらに検討するため、シナプトソームを用いた^{45}Ca流入実験を行った。高カリウム刺激による^{45}Ca流入量と無刺激時の流入量の差を100%と表示すると500 μM GABAの添加により^{45}Ca流入は抑制される傾向を示し、500 μMバクロフェンの添加では57%にまで抑制された。この結果から脳内微小透析法で認められたGABAによるグルタミン酸放出抑制は$GABA_B$受容体を介するCa流入阻害の結果生じている可能性が示唆された。

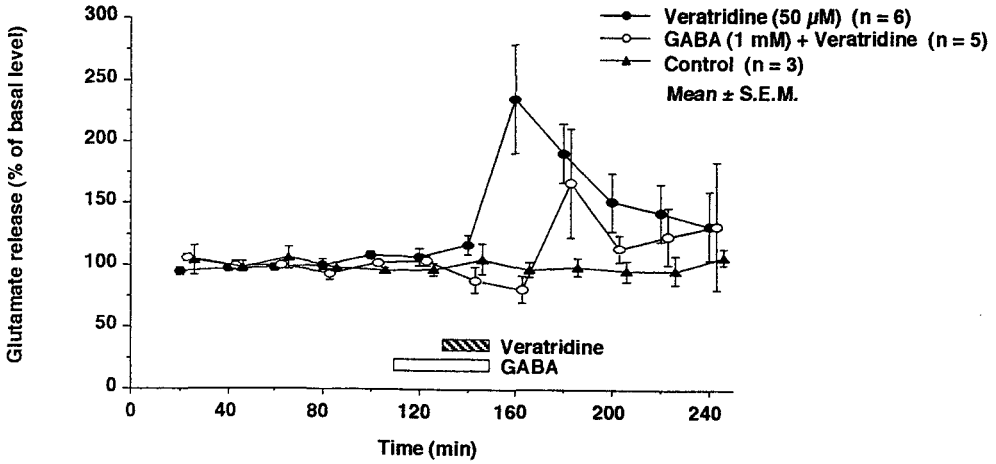


Fig.1 Effect of GABA on veratridine - stimulated glutamete release in rat hippocampus

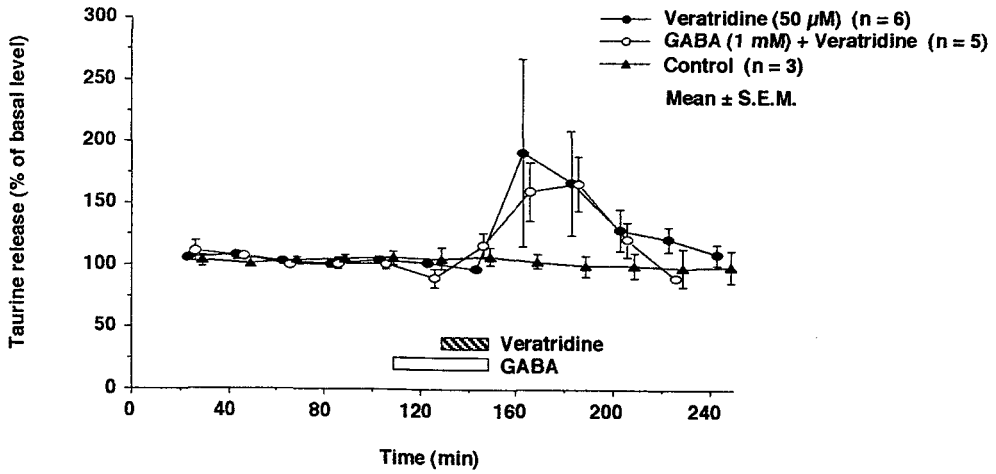


Fig. 2 Effect of GABA on veratridine - stimulated taurine release in rat hippocampus

(1)Scanziani, M. et al. (1992) Neuron 9, 919-927 (2) Pend, M. et al. (1993) Brain Res. 604, 325-330 (3)土田晃敬 他 (1994) 神経化学 33, 502-503

45 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（Ⅲ）：背側縫線核電気刺激の影響

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)による皮質アセチルコリン (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を測定した。背側縫線核 (RD)の電気刺激 (20分間: 60Hz・刺激時間0.2sec・間隔2.1sec)によって、前頭葉ACh分泌は電流依存性に増加した。低電流 (12.5μA)ではAChは増加傾向を示しただけであったが、中・高電流 (25μA・50μA)では有意に増加した。これらRDの電気刺激によるACh分泌の増加効果は、5-HT_2受容体阻害薬のketanserin (5mg/kg)やドパミン (DA) D_1受容体阻害薬のSCH 23390 (0.3mg/kg)の前投与 (30分前)によっては抑制されなかった。以上から、前頭葉ACh分泌を増加させる点ではRDの電気刺激とfenfluramineの作用は共通であるが、その機序は異なったものであることが示唆された。

【目的】

縫線核に起始する5-HTニューロンは、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神経系の細胞体部と終末部に投射している(8,4)。これまでの研究から5-HTはこのACh神経系に対して抑制的に作用していることが示唆されていたが(7)、我々は昨年の本学会で「5-HT分泌促進薬のfenfluramineによって前頭葉ACh分泌が増加する」こと(2)、fenfluramineの作用が5-HT_{2A}受容体阻害薬のketanserinによって遮断される」ことを報告し(3)、『5-HTが5-HT_{2A}受容体を介してACh分泌に促進的に作用する』ことを示した。

5-HTニューロンの細胞体が存在するRDを電気刺激すると、側坐核・海馬などを含む前脳領域で5-HT分泌が亢進する(9,10)。我々はこの点に着目し、5-HTによる前頭葉ACh分泌の制御機構をさらに解明していく目的で、RDを電気刺激し前頭葉ACh分泌に与える影響を検討した。

【方法】

体重270-320gのWistar系雄性ラットを使用し、PaxinosとWatsonの脳図譜に従い(6)、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)。また、RDにはステンレス製双極電極を垂直から35度の角度で挿入した (AP: -7.8mm, DV: -6.4mm)。2日後、無麻酔・自由行動下のラットの前頭葉に100nMのneostigmineを含む人工脳脊髄液 (組成：NaCl 125mM, KCl 3.0mM, $CaCl_2$ 1.3mM, $MgCl_2$ 1.0mM, $NaHCO_3$ 23mM)を5μl/minで還流した。約2時間後から透析液中に回収されるAChを10分間隔で測定した。値は総て実測値で表示し (fmol/min)、また2要因分散分析の統計解析に用いた。電気刺激は60Hzの交流電流を用い、通電時間0.2sec・間隔2.1secのパラメーターで20分間行った。SCH 23390はH_2Oに、ketanserinはsalineにそれぞれ溶解し投与した。

【結果】

電流用量の大きさに従い、RDの電気刺激によって前頭葉ACh分泌が増加した (図1)。12.5μAではACh分泌は増加傾向を示しただけであったが、25μA・50μAでは共に有意に増加した(P=0.003, P<0.001)。RDの電気刺激 (25μA)による前頭葉AChの分泌増加作用は、選択的5-HT_{2A}受容体阻害薬のketanserin (5mg/kg, i.p.)の前投与によっては遮断されなかった (図2：P=0.012)。同様に、選択的D_1受容体阻害薬のSCH 23390 (0.3mg/kg, s.c.)の前投与によっても遮断されなかった (図3：P=0.003)。

【考察】

RDの電気刺激によって、電流依存性に前頭葉ACh分泌が増加した。前頭葉にはRDから5-HT

ニューロンが豊富に投射していること(4)、5-HT分泌促進薬のfenfluramineが前頭葉ACh分泌を亢進すること(2)、RDの電気刺激によって前脳諸部位で5-HT分泌が亢進することが報告されていることから(9,10)、RDの電気刺激による前頭葉ACh分泌の増加はシナプス間隙に増加した5-HTによってもたらされることが示唆された。しかし、電気刺激によるACh分泌の増加は、fenfluramineとは異なり5-HT_{2A}受容体阻害薬のketanserinでは遮断されなかった。DAニューロンもまたRDの構成細胞であり(5)、前頭極部に投射していることから(11)、電気刺激によるACh分泌の増加にDAが関与している可能性も考えられた。DAは主にD_1受容体を介して前頭葉ACh分泌を促進するが(1)、電気刺激の効果はSCH 23390の前投与によっても抑制されなかった。以上から、前頭葉ACh分泌を増加させる点ではRDの電気刺激とfenfluramineの作用は共通であるが、その機序は異なったものであることが示唆された。

【参考文献】

(1) Day, J. and Fibiger, H.C. (1992) *Synapse* 12: 281-286. (2) 平野 均、山田通夫、Fibiger, H.C. (1994) *神経化学* 33: 148-149. (3) 平野 均、山田通夫、Fibiger, H.C. (1994) *神経化学* 33: 642-643. (4) Moore, R.Y., Halaris, A.E. and Jones, B.E. (1978) *J. Comp. Neurol.* 180: 417-438. (5) Ochi, J. and Shimizu, K. (1978) *Neurosci. Lett.* 8: 317-320. (6) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) 2nd ed, Academic Press, London. (7) Robinson, S.E. (1983) *Life Sci.* 32: 345-353. (8) Semba, K., Reiner, P.B., McGeer, E.G. and Fibiger, H.C. (1988) *J. Comp. Neurol.* 267: 433-453. (9) Shannon, N.J., Gunnet, J.W. and Moore, K.E. (1986) *J. Neurochem.* 47: 958-965. (10) Sharp, T., Bramwell S.R. and Grahame-Smith, D.G. (1992) *Life Sci.* 50: 1215-1223. (11) Yoshida, M., Shirouzu, M., Tanaka, M., Semba, K. and Fibiger, H.C. (1989) *Brain Res.* 496: 37-376.

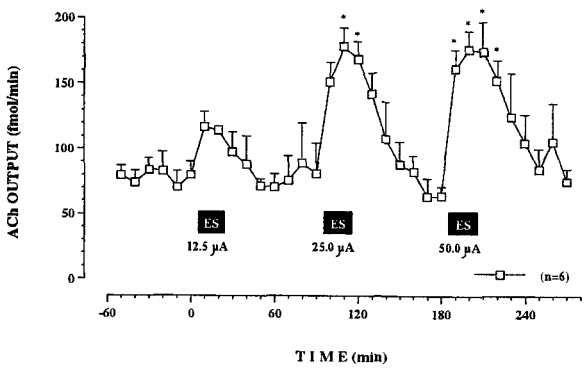


Fig. 1: Effects of electrical stimulation (ES) of the dorsal raphe nucleus with 12.5μA, 25 μA, 50 μA (60 Hz, stimulation duration=0.2 sec, interstimulaus interval=2.1 sec) on ACh release in the frontal cortex. Points and vertical bars represent mean ± S.E.M. in all figures. ES parameters were the same in all experiments. * $p<0.05$ (ANOVA followed by Scheffe F-test).

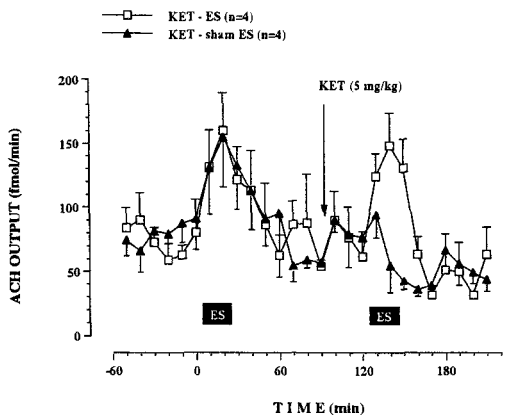


Fig 2: Effects of ketanserin (KET; 5 mg/kg, i.p.) on electrical stimulation (ES) with 25μA-induced increase in ACh release in the frontal cortex. After application of the first ES, both groups were received KET 30 min prior to the second ES. Then one of groups was applied the second ES, nor did the other.

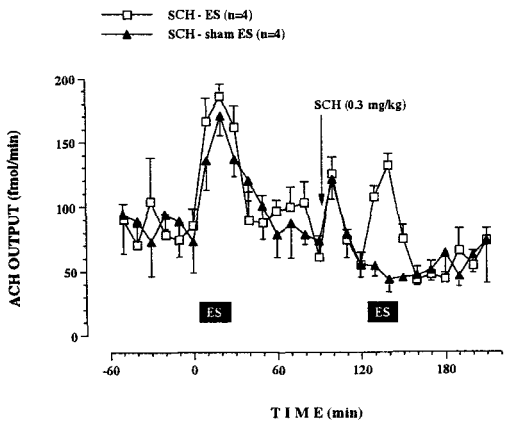


Fig. 3: Effects of SCH 23390 (SCH; 0.3 mg/kg, s.c.) on electrical stimulation (ES) with 25 μA-induced increase in ACh release in the frontal cortex. After application of the first ES, both groups were recieved SCH 30 min prior to the second ES. Then one of them was applied the second ES, nor did the other.

46 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（Ⅳ）：5-HT_3受容体の役割

平野　均、　山田　通夫
(山口大学医学部神経精神医学講座)

〔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_3受容体antagonistのMDL 72222 (0.02mg・0.2mg/kg)とondansetron (0.02mg・0.6mg/kg)は、共にACh基礎分泌値に有意な影響を及ぼさなかった。また、MDL 72222 (0.2mg/kg)はfenfluramine (3mg/kg)の前頭葉ACh分泌増加作用に影響を与えなかった。局所投与された5-HT_3受容体agonistの2-methyl-5HT (1μM, 60分間)は、前頭葉ACh分泌に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、5-HT_3受容体は5-HTによる前頭葉ACh分泌の制御には深く関与していない可能性が示唆された。

【目的】

脳皮質組織切片を用いた*in vitro*の実験から、Barnesらは「5-HTは5-HT_3受容体を介してACh分泌を抑制する」と報告した(1)。Consoloらは5-HT分泌促進薬のnorfenfluramineによる海馬ACh分泌の増加が5-HT_3受容体antagonistによって拮抗されたことから、「5-HTは5-HT_3受容体を介してACh分泌を促進する」と報告した(2)。一方、我々は5-HT分泌促進薬のfenfluramineによる前頭葉ACh分泌増加作用が5-HT_{2A}受容体antagonistのketanserinによって遮断されたことから、『5-HTが5-HT_{2A}受容体を介してACh分泌を促進する』ことを報告した(4,5)。このように5-HTによるACh分泌の制御機構に関しては、研究者によって異なる報告がなされている。そこで、この問題をさらに究明していく目的で、5-HT_3受容体antagonist・agonistを投与し前頭葉ACh分泌に与える影響を*in vivo*で検討した。

【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(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100nMのneostigmineを含む人工脳脊髄液 (組成：NaCl 125mM, KCl 3.0mM, $CaCl_2$ 1.3mM, $MgCl_2$ 1.0mM, $NaHCO_3$ 23mM)を5μl/minで還流した。約2時間後から透析液中に回収されるAChを10分間隔で測定した。値は総て実測値で表示し(fmol/min)、また2要因分散分析に用いた。MDL 72222・ondansetronはH_2Oに、fenfluramineはsalineに、2-methyl-5HTは人工脳脊髄液中 (pH 7.4)にそれぞれ溶解した。

【結果】

MDL 72222 (0.02mg・0.2mg/kg, s.c.)は、用量依存性に前頭葉ACh分泌を増加させる傾向を示したが、対照群（H_2O, s.c.)と比較して両濃度とも有意な差ではなかった(図1)。Ondansetron (0.02mg・0.6mg/kg, s.c.)も、ACh基礎分泌値に対しては有意な影響を及ぼさなかった(図2)。Fenfluramine (3mg/kg, i.p.)のACh分泌増加作用に与えるMDL72222 (0.2mg/kg)の影響を調べるために、fenfluramineとMDL72222を同時投与した。Fenfluramine単独投与群とMDL72222同時投与群とではACh分泌に与える影響には有意な差は認められなかった(図3)。5-HT_3受容体は皮質にも存在することから(6)、透析プローブを介して2-methyl-5HT (1μM, 60分間)を局所投与したが、前頭葉ACh分泌には有意な影響を及ぼさなかった(図4)。

【考察】

2種類の5-HT_3受容体antagonistが前頭葉ACh基礎分泌値に有意な影響を及ぼさなかったことから、「5-HTは5-HT_3受容体を介してtonicにACh分泌を抑制していない」可能性が示唆された。

また、fenfluramineによるACh分泌増加作用と前頭葉ACh基礎分泌値がそれぞれ5-HT_3受容体antagonistとagonistによっては有意な影響を受けなかったことから、「5-HTは5-HT_3受容体を介してphasicにACh分泌を促進していない」可能性が示唆された。以上の結果から、5-HT_3受容体は5-HTによる前頭葉ACh分泌の制御には深く関与していないことが示唆された。

5-HT_3受容体antagonistの投与量/効果の相関は逆U字型を示すことが報告されている(3)。また、Barnesらの報告では5-HT_3受容体antagonistの作用は5-$HT_{2A/2C}$受容体antagonistのritanserinの存在下でのみ発現することから(1)、5-HTによるACh分泌の制御機構に関しては5-HT受容体サブタイプ同士に密接な連関が存在することが予想される。そのため、今後さらに投与濃度の範囲を拡大し、5-HT_{1A}や5-HT_{2A}受容体が遮断された条件下での影響も検討していく予定である。

【参考文献】

(1) Barnes, J.M., Barnes, N.M., Costall, B., Naylor, R.J. and Tyers, M.B. (1989) *Nature* 338: 762-763. (2) Consolo, S., Bertorelli, R., Russi, G., Zambelli, M and Ladinsky, H. (1994) *J. Neurochem.* 62: 2254-2261. (3) Costall, B., Naylor, R.J. and Tyers, M.B. (1990) *Pharmacology & Therapeutics* 47: 181-191. (4) 平野 均、山田通夫、Fibiger, H.C. (1994) *神経化学* 33: 148-149. (5) 平野 均、山田通夫、Fibiger, H.C. (1994) *神経化学* 33: 642-643. (6) Kilpatrick, G.J., Jones, B.J. and Tyers, M.B. (1987) *Nature* 330: 746-748. (7) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) 2nd ed, Academic Press, London.

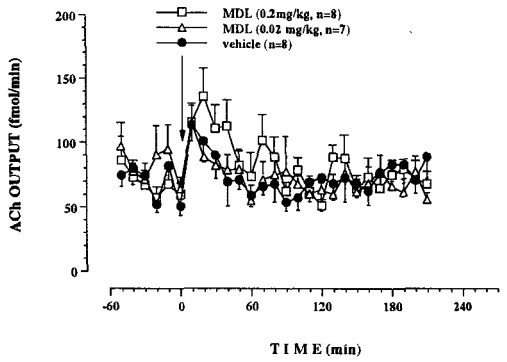


Fig. 1: Effects of MDL 72222 (MDL; 0.02 and 0.2 mg/kg, s.c.) on ACh release in the frontal cortex. Points and vertical bars represent mean ± S.E.M. in all figures.

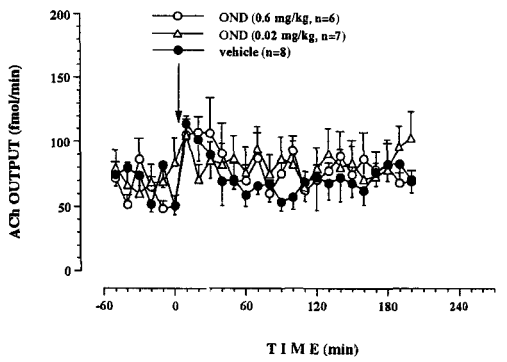


Fig. 2: Effects of ondansetron (OND; 0.02 and 0.6 mg/kg, s.c.) on ACh release in the frontal cortex.

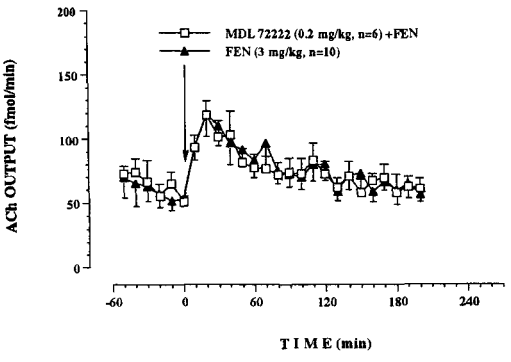


Fig. 3: Effects of MDL 72222 (MDL; 0.2 mg/kg. s.c.) on fenfluramine-induced (FEN; 3 mg/kg, i.p.) increase in cortical ACh release

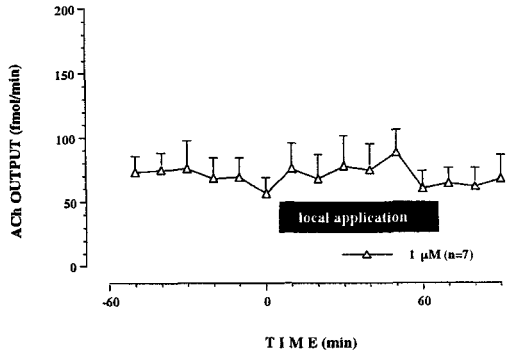


Fig. 4: Effects of 2-methyl-5HT on basal ACh output in the rat frontal cortex.

47 ＡＴＰ感受性Ｋ⁺チャネルブロッカーの線条体ドパミン放出に及ぼす影響

田中隆彦・吉田真美・横尾秀康・溝口克弘・長森健・浜田直之・富田克・田中正敏
（久留米大・医・薬理）

〔要約〕

ラット線条体ドパミン（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} blockerであるglibenclamide(GLB)またはtolbutamide(TLB)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。$GABA_B$ 受容体拮抗薬のphaclofen(PCL,10^{-4}M)を同様にして線条体に１時間投与後、PCL 存在下にGLB(10^{-5}M)を同部位に投与するとGLB 投与によるDA放出の減少は完全に阻止された。$GABA_B$ 受容体作用薬のbaclofen(10^{-4}M) を線条体に投与すると同部位からのDA放出は有意に減少した。これらの結果は、線条体においてK_{ATP}を抑制すると$GABA_B$ 受容体の活性化を生じ、その結果、線条体からのDA放出が抑制されることを示唆している。

（緒言）ATP-sensitive K^+ channel（K_{ATP}）は細胞内のATP が増加すると閉鎖するK^+ channelで、中枢神経内にも存在し、DA(3) やGABA(1) の神経活動に影響を及ぼすと言われている。しかし、DA神経系とK_{ATP}のin vivo における関係の研究は、著者らの報告以外（4)ほとんどなされていない。今回の実験の目的は線条体におけるDA放出へのK_{ATP}の影響を脳内透析法を用いて検討することである。

（方法） Wistar系雄性ラット(260-320g)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} blockerであるglibenclamide(GLB,10^{-6}-10^{-4}M) またはtolbutamide(TLB,10^{-5}-10^{-3}M) の条体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。次に$GABA_B$ 受容体作用薬のbaclofen(BCL,10^{-4}M) を線条体に１時間投与し、DA放出量を測定した。また別の実験として、$GABA_B$ 受容体拮抗薬のphaclofen (PCL,10^{-4}M) を線条体に１時間投与後、PCL 存在下に、GLB(10^{-5}M)をさらに１時間投与した。結果は薬物投与直前の３サンプルの平均を100%として表示した。

（結果と考察）GLB またはTLB の投与により、線条体からのDA放出は、いずれの濃度においても有意に減少し、用量依存性を認めた（図１）。BCL(10^{-4}M)の投与でDA放出量が有意に減少したことから、線条体の$GABA_B$ 受容体の活性化がDA放出を抑制していると考えられる。これはBCL が線条体黒質GABA神経系を刺激し、それにより黒質のDA神経細胞の発火頻度を抑制したために、そのDA神経終末の線条体からのDA放出が減少した可能性とBCL が線条体のGABA神経系を刺激しlocal circuit によって線条体からのDA放出が減少した可能性が考えられる。PCL(10^{-4}M)を単独で投与した時にはDA放出の変化は

生じなかった（図２）。PCL 存在下にGLB(10^{-5}M)を投与するとGLB によるDA放出減少は完全に阻止された（図２）。黒質（1)や縫線核（2)においては、K_{ATP} blockerがGABAの放出を直接に増強すると報告されている。これらの報告を合せて考えると、今回の結果は、線条体においてK_{ATP}の抑制により生じる脱分極が$GABA_B$ 受容体の活性化を生じ、GABA神経系を興奮させ、その結果、線条体からのDA放出が抑制されたことを示唆している。

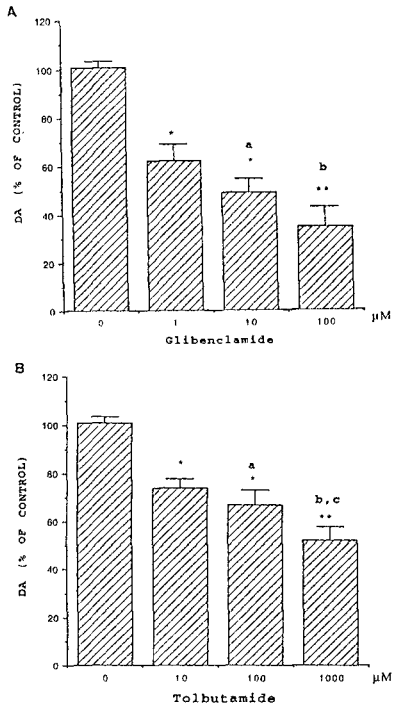


図１ glibenclamide(GLB) とtolbutamide(TLB)の線条体ドパミン（DA）放出に及ぼす影響

A: *,**: p<0.05, p<0.01 vs basal values

a,b: p<0.05, p<0.01 vs 1μM GLB(Student's t-test, N=4)

B: *,**: p<0.05, p<0.01 vs basal values

a,b: p<0.05, p<0.01 vs 10 μM TLB,

c:p<0.05 vs 100 μM TLB(Student's t-test,N=4)

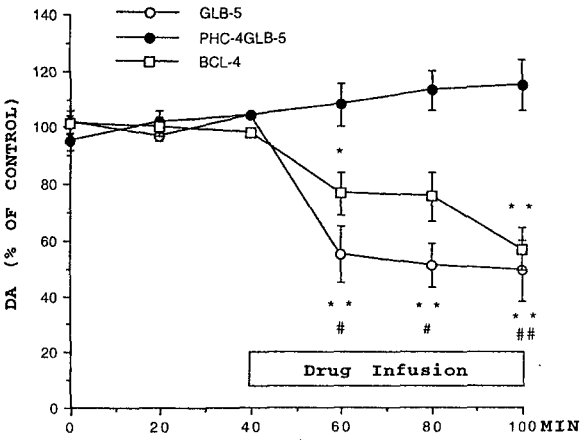


図２ baclofen(BCL,10^{-4} M) による線条体ドパミン(DA)放出に及ぼす影響とphaclofen(PCL,10^{-4}M)のglibenclamide(GLB,10^{-5}M)によるDA放出変化に及ぼす影響

*,**: p<0.05, p<0.01 vs basal values (one way ANOVA,Newman-Keuls test)

#,##: p<0.05, p<0.01 vs PHC+GLB(PHC-4GLB-5) (two way ANOVA,Newman-Keuls test,N=4-5)

(文献)

1. Amoroso S et al (1990) Science 247, 852-854.
2. Haj-Dahmane S et al (1993) Brain Res. 614, 270-278.
3. Moure C. et al. (1989) Brain Res. 486, 159-164.
4. Tanaka T. et al. (1992) J.Neurochem. 59, 1640-1645.

48 Benzazepine 系薬物によるラット線条体の一過性 dopamine 遊離機構

富山勝則，越川憲明，小林雅文
（日本大・歯・薬理）

〔要約〕 脳微小透析法を用いて benzazepine 系薬物をラットの線条体に注入した際の細胞外 dopamine(DA) 動態について検討した。第 34 回神経化学会において，SKF 38393 を直接線条体内に注入した場合に発現する DA 遊離の一過性の著明な増加は，tetrodotoxin(TTX) に非感受性であることを報告したが，今回はこの一過性の DA 遊離亢進がどのようなメカニズムで発現するかについて検討を加えた。SKF 38393 によって生じる一過性の DA 遊離亢進は Ca^{2+} free Ringer 液灌流下でも同様に認められた。他の benzazepine 系薬物である SKF 82958，および d-amphetamine の線条体への注入によっても SKF 38393 と同様の一過性の DA 遊離亢進は認められたが，いずれの効果も nomifensine(100 μM) 灌流下では認められなかった。α-MPT(250 mg/kg i.p.)の前処置によって DA の生合成を阻害しておいた場合には，SKF 38393 による一過性の DA 遊離亢進は影響を受けなかったが，d-amphetamine による DA 遊離は抑制された。以上の結果より，benzazepine 系薬物による一過性の DA 遊離亢進は，膜電位および Ca^{2+}非依存性であり，DA の取り込み機構が関与しているが，d-amphetamine とは異なり newly synthesized cytoplasmic DA を遊離するものではないことが示唆された。

演者らは，第 34 回神経化学会において，透析膜の近傍に薬液注入用のマイクロインジェクションチューブを配置したプローブを用いて薬物を直接線条体内に注入すると SKF 38393 や SCH 23390 などの benzazepine 系薬物が TTX 非感受性の著明な一過性 DA 遊離亢進を惹き起こすことを報告した(1)。今回は d-amphetamine が同様の TTX 非感受性の DA 遊離を惹き起こすことに着目し，d-amphetamine の効果との差について，とくに DA の再取り込み機構や cytoplasmic DA の関与について比較検討を行った。

〔方法〕

SD 系雄性ラット(約 300 g)を用い，pentobarbital(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線条体(A: 9.0 mm, L: 3.0 mm, V: 7.0 mm from interaural line)に挿入固定した。手術 7 日後にマイクロインジェクションチューブ付き直管型プローブ(エイコム社製; 透析膜長 2 mm, cut-off 分子量 50,000)をガイドカニューレに装着固定した。Modefied Ringer 液(NaCl 147.0 nM, KCl 4.0 mM, $CaCl_2$ 1.2 mM, $MgCl_2$ 1.1 mM, pH 6.0)を 2 μl/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，灌流液の交換または薬物の注入を行った。灌流には上記の Ringer 液以外に Ca^{2+} free Ringer 液(NaCl 147.0 nM, KCl 4.0 mM, $MgCl_2$ 2.3 mM, pH 6.0)を用いた。回収した灌流液は 20 分毎にオートインジェクターを用いて HPLC に注入し，電気化学検出器により DA を定量した。Ringer 液で灌流し，安定した時点の 3 回分の平均値を 100 %として，各時点の値を表した。有意差の検定には Mann-Whitney の U-test を用い，有意水準は $p<0.05$ とした。また各群例数は 6 匹ずつとした。

〔結果および考察〕

SKF 38393 による一過性 DA 遊離の亢進は Ca^{2+} free Ringer 液の灌流下でも同様に認められた。この結果は，SKF 38393 の効果が TTX 非感受性であったこと(1)を考え合わせると,SKF 38393 が amphetamine 様の DA releaser としての作用を持つ可能性を推察させる。そこでまず，SKF 38393 の効果における DA 再取り込み機構の関与について nomifensine を用いて検討した。図1A に示すように nomifensine (10 μM)の灌流はそれ自体 DA レベルを約 800 %増加させるが，その時点で SKF 38393 を注入しても著明な一過性 DA 遊離が認められた。しかし 100 μM の nomifensine を灌流し，DA レベルを約 1500 %まで増加させると SKF 38393 による一過性 DA 遊離は認められなくなった(図1B)。同様の効果は他の benzazepine 系薬物である SKF 82958 あるいは d-amphetamine でも認められた(図1B)。この結果は 10 μM の nomifensine の灌流では DA

の取り込みの阻害効果は十分でないこと(2,3)を示すと共に，benzazepine 系薬物による一過性 DA 遊離亢進に DA 取り込み機構が関与していることを示唆するものである。d-Amphetamine による DA 遊離作用は，いわゆる cytosolic pool の newly synthesized DA を，DA transporter を逆方向に移動させることによって惹き起こされると考えられている(4)ので，次にα-MPT を用いて DA の生合成を阻害し，d-amphetamine と SKF 38393 による一過性 DA 遊離効果について比較検討した。その結果，SKF 38393 の効果はα-MPT の前処置によって変化を受けなかった(図2A)が，d-amphetamine の効果はα-MPT により有意に抑制された(図2B)。以上の結果より，benzazepine 系薬物による一過性の DA 遊離亢進は，膜電位および Ca^{2+}非依存性であり，DA 取り込み機構が関与しているが，d-amphetamine の場合とは異なり newly synthesized cytoplasmic DA を遊離するものではないことが示唆された。

〔文献〕

(1)富山勝則　他 (1991) 神経化学 30, 346-347. (2) Tomiyama, et al., (1993) J. Neurochem. 60, 1690-1695. (3) Tateyama, et al., (1993) Eur. J. Pharmacol. 240, 51-56. (4) Butcher, et al., (1988) J. Neurochem. 50, 346-355.

図1 A

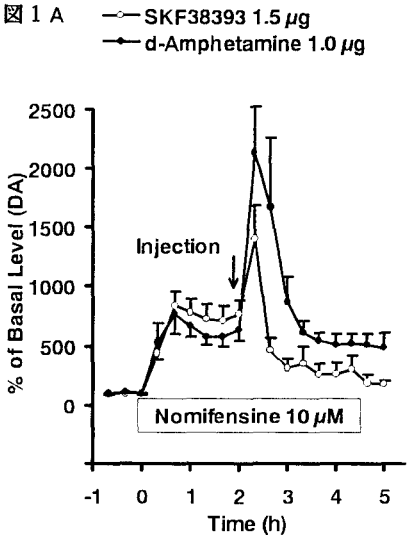


図1 B

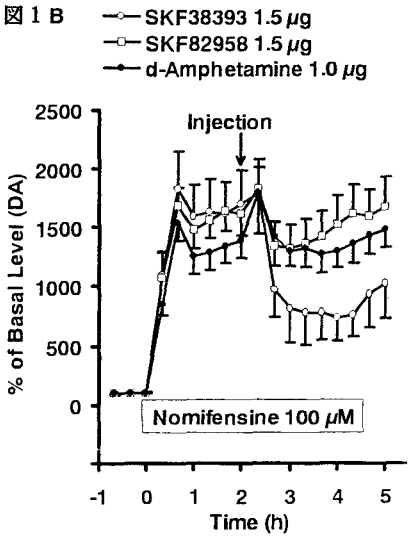


図2 A

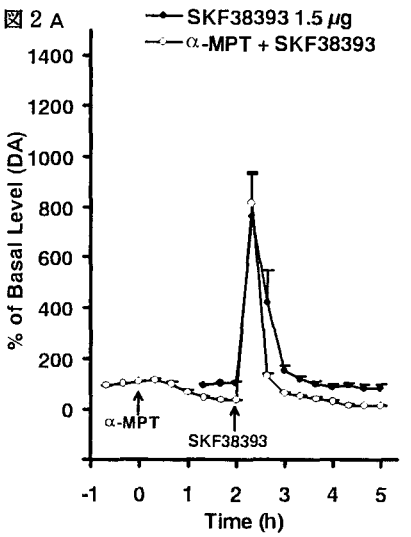
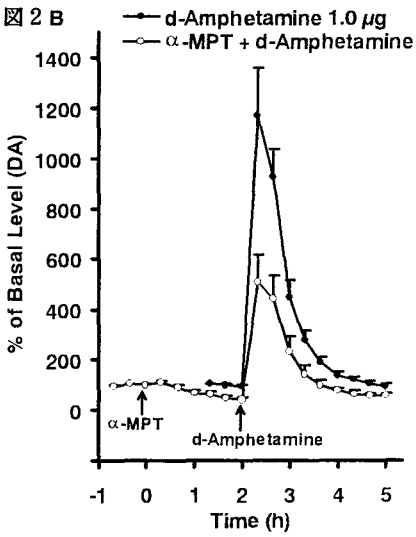


図2 B



49 一酸化窒素による神経終末セロトニン取り込みの抑制作用

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〕

ラット大脳皮質シナプトゾームにおいてセロトニン(5-HT)取り込みに対するNO産生薬の作用を検討した。種々のNO産生薬は5-HT取り込みに対して抑制的に作用した。速度論的解析の結果より、NO産生薬は最大反応速度低下を引き起こすが、ミカエリス定数には影響を及ぼさなかった。[^{3}H]パロキセチン結合実験の結果より、NO産生薬は5-HT結合を変化させなかった。このNO産生薬による抑制作用は、NO産生薬の洗浄後減弱したことから、可逆的であることが示された。Cyclic GMPの膜透過性アナログである8-bromo-cyclic GMP は作用を示さず、NO産生薬による5-HT取り込み抑制作用はcyclic GMP を介さない作用であることが示された。

【目的】

一酸化窒素 (NO)は血管拡張作用、マクロファージによる感染防御作用のほか、中枢神経系においてはneuromodulator として機能しており、グルタミン酸神経毒性、長期増強、長期抑圧などに関与していることが知られている(2)。近年、in vivo、in vitro の系でNOが神経伝達物質遊離・取り込みに対し作用を有することが報告され(3,4,5,6)、当研究室においても in vivo microdialysis を用いた検討よりNO産生薬が線条体での5-HT遊離を亢進させることを示している(1)。この検討においては5-HT取り込み阻害薬存在下の遊離を検討しているため、5-HT取り込みに対するNOの作用は明白にできない。そこで今回我々は神経伝達物質取り込み機構に対するNOの作用を検討した。

【方法】

Wistar系雄性ラット(4-6 週齢 100-200 g)を断頭後速やかに大脳を取り出し、大脳皮質を10倍量の0.32 M sucrose、5 mM Tris-HCl (pH 7.4)でホモジナイズし、ホモジネートを遠心分離 (1,000 × g、10分)した。上清をさらに遠心分離 (15,000 × g、20分)した。得られた沈査を95 % O_2-5 % CO_2で通気したKrebs-Ringer緩衝液 (NaCl 120 mM; KCl 5 mM; $CaCl_2$ 2.5 mM; $MgCl_2$ 1.2 mM; 20 mM Tris HCl (pH7.4); パルギリン 100 μM; グルコース 10 mM; アスコルビン酸 1mM)で懸濁し、95 % O_2-5 % CO_2で通気しながら37℃20分インキュベートした後、遠心分離 (15,000 × g、20分)し、沈査をKrebs-Ringer緩衝液に懸濁したものをシナプトゾームとして実験に用いた。

[^{3}H]5-HT取り込みは以下のようにして行った。シナプトゾームを37℃15分間プレインキュベートした後、終濃度10 nMになるように[^{3}H]5-HTを加えた。3分のインキュベートの後、速やかにワットマンGF/Bフィルターで急速濾過し、さらに4.5 mlの氷冷した洗浄液 (NaCl 120 mM; KCl 5 mM; $CaCl_2$ 2.5 mM; $MgCl_2$ 1.2 mM; 20 mM Tris-HCl (pH7.4); グルコース 10 mM)で3回洗浄した。フィルターを乾燥後、フィルター上の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。薬物はプレインキュベート時に添加した。10 μM フルオキセチン存在下の取り込みをブランクとし、その値を差し引いたものを特異的取り込みとした。

[^{3}H]パロキセチン結合実験は以下のようにして行った。シナプトゾームを37℃15分間プレインキュベートした後、[^{3}H]パロキセチンを加えた。22℃60分のインキュベートの後、速やかにワットマンGF/Bフィルターで急速濾過し、以後は[^{3}H]5-HT取り込み実験と同様に行った。100 μM 5-HT存在下の取り込みを

ブランクとし、その値を差し引いたものを特異的結合とした。

【結果及び考察】

NO産生薬であるnitroprusside (SNP)、3-morpholino-sydnonimine (SIN-1)、NOC-7、NOC-12、S-nitroso-L-cysteine (SNOC)はすべて[^{3}H]5-HT取り込みを用量依存的に抑制した。この抑制作用はNO遊離速度の速いSNOCやNOC-7で強く見られ、NO遊離速度の遅いNOC-12、NO遊離とほぼ同時に産生されるO_2^-とNOが反応しONOO$^-$となり、その後分解されるSIN-1、比較的遊離するNOがNO^+性の強いSNPでは弱いものであった。さらにSNOCに関して詳細な検討を行った。速度論的解析より、SNOCはミカエリス定数を変化させず5-HTトランスポーターの最大反応速度を低下させることが示された。5-HTトランスポーターで5-HTと競合する薬物であるパロキセチンの結合実験の結果より、SNOCは5-HT結合に変化を及ぼさないことが明らかとなった。これらのことよりNOは5-HTトランスポーターに対して非競合的に抑制し、その作用点は5-HT結合以降の取り込み過程にあると考えられる。NO産生薬は以上のように5-HT取り込みに対して抑制的に作用するが、cyclic GMPの膜透過性アナログである8-bromo-cyclic GMPは5-HT取り込みに対し作用を示さず、このNOによる抑制作用はcyclic GMPを介さない作用であることが示された。また、シナプトゾームをSNOCで15分処置後洗浄し、37℃15分インキュベートしたシナプトゾームにおいてもSNOCによる5-HT取り込み抑制作用は観察されるが、部分的に抑制作用は回復しており、NO産生薬による5-HT取り込み抑制作用はシナプトゾームに対する非特異的・不可逆的ダメージによる作用ではないことが示された。以上の成績と現在までに当研究室で明らかにしているNO-cyclic GMP系による線条体における5-HT遊離促進作用を考えあわせると、NOは5-HT取り込み抑制作用及び遊離促進作用をあわせもち、シナプス間隙での5-HT濃度を上昇させることで5-HT神経伝達に対し促進的な制御をかけている可能性が示唆される。

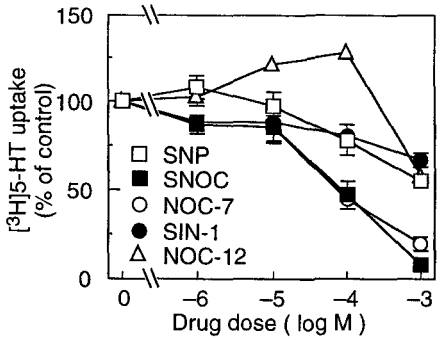


Figure 1. Effects of NO donors on [^{3}H] 5-HT uptake in rat brain synaptosomes.

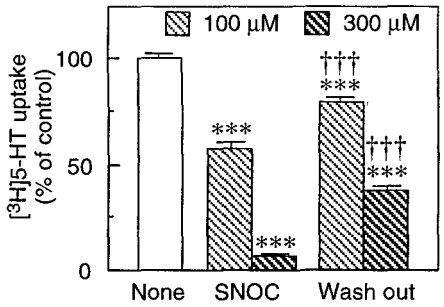


Figure 2. Effect of wash out of SNOC on [^{3}H] 5-HT uptake in rat brain synaptosomes.

【文献】

(1) 浅野省一, 松田敏夫, 田熊一敏, 馬場明道 (1994) 神経化学 33, 510-511.

(2) Lonart, G., Wang, J., and Johnson, K. M. (1992) Eur. J. Pharmacol. 220, 271-275.

(3) Lonart, G., and Johnson, K. M. (1994) J. Neurochem. 63, 2108-2117.

(4) Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., and Snyder, S. H. (1994) Ann. Intern. Med. 120, 227-237.

(5) Pogun, S., Baumann, M. H., and Kuhar, M. J. (1994) Brain Res. 641, 83-91.

(6) Prast, H., and Philippu, A. (1992) 216, 139-140.

50 フェレット腸管からのセロトニン脱顆粒と求心性迷走神経活動におよぼす強心配糖体の影響

玉飼　博之、小川　隆志、浜上　尚也、遠藤　泰、南　勝
（北海道医療大学薬学部薬理学教室）

〔要約〕

強心配糖体は不整脈とともに悪心・嘔吐を惹起する。強心配糖体の嘔吐の作用機序として嘔吐中枢への直接刺激が考えられている。今回、強心配糖体による嘔吐に神経伝達物質であるセロトニン(5-HT)がどのように関与しているかを検討する目的でウアバインを用いて腸管enterochromaffin(EC)細胞からの5-HT脱顆粒ならびに末梢から情報を嘔吐中枢へ伝達する求心性迷走神経活動におよぼす影響を検討した。

ウアバイン投与群の腸管からの5-HT遊離量は対照群に比し有意に増加した。5-HT_3拮抗薬であるグラニセトロンを処置するとウアバインによる5-HT遊離の増加は抑制された。求心性迷走神経活動はウアバイン投与後に用量依存的に上昇した。グラニセトロンを前処置するとウアバインによる求心性迷走神経活動の上昇は抑制された。以上より、強心配糖体による嘔吐の発現には末梢からの求心性迷走神経を介して嘔吐中枢に至る経路も重要であることが示唆された。

〔緒言〕

臨床で用いられている強心配糖体による中毒の前兆として8～26％の頻度で悪心、嘔吐が起こっている[1]。これまで我々は嘔吐のモデル動物フェレットを用いた実験において制癌剤投与の際に腸管ならびに延髄最後野の5-HT濃度が上昇することを見出している。制癌剤誘起性嘔吐の発現時には腸管の5-HTの合成および脱顆粒が亢進し5-HT_3レセプターを介して求心性迷走神経活動が上昇していることを報告した[2,3]。今回、強心配糖体による嘔吐の発現機序を明らかにするために腸管EC細胞からの5-HT脱顆粒ならびに求心性迷走神経活動におよぼすウアバインの影響を検討した。

〔方法〕

1. 5-HT遊離量の測定：フェレットをウレタン(500mg/kg)ならびにα-クロラロース(50mg/kg)で麻酔後回腸部位を摘出した。Milanoらの方法[4]に準じてあらかじめ混合ガス(95％O_2, 5％CO_2)で飽和したModified Krebs液中に約3cmの切片を懸垂した。栄養液槽は温度を37°Cに保ち、混合ガスを通気した状態で20分毎に3時間栄養液を採取した。薬物は栄養液中に混和して用いた。各栄養液中に遊離した5-HT量は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。

2. 求心性迷走神経活動の測定：フェレットをウレタン・α-クロラロースで麻酔後、人工呼吸器で呼吸を管理した。ガラミンにて不動化した後、Yoshiokaらの方法[5]に準じフェレット

を腹臥位に固定し胸腔背面部から迷走神経後枝を剥離切断しその中枢断端を白金イリジウム双極電極上にのせ、求心性迷走神経活動を測定した。得られたパルスをバイオアンプにて増幅しパルスカウンターにより10秒毎に積算した。リアルデータおよび積算データは同時にサーマルアレイレコーダーに記録し、投与前の放電カウントを100％とし薬物投与後の値をパーセント補正して表した。薬物はすべて生理食塩水に溶解し頸静脈から投与した。

〔結果〕

インキュベーション後20分毎の回腸からの5-HT遊離量を表した。対照群と比較してウアバイン投与群の5-HT遊離量は有意に増加し、3時間後まで有意に増加し続けた。また、5-HT_3拮抗薬であるグラニセトロンを処置すると5-HT遊離量は有意に減少した(Fig. 1)。求心性迷走神経活動はウアバイン投与直後に上昇し、その上昇は用量依存的なものであった。またグラニセトロンを前処置すると求心性迷走神経活動の上昇は有意に抑制された(Fig. 2)。ウアバイン(1mg/kg i.v.)を投与されたフェレットは5例中4例が嘔吐を起こし、その内1例は不整脈で死亡した。

〔考察〕

ウアバインを処置したフェレットの摘出腸管より5-HTは有意に遊離量が増加した。5-HT_3拮抗薬のグラニセトロンを処置すると5-HT遊離量が減少し、求心性迷走神経活動の上昇も抑制された。強心配糖体はEC細胞からの5-HT脱顆粒を促進させるが、この5-HT脱顆粒には5-HT_3受容体が関与していることが示唆された。結合組織に遊離した5-HTは迷走神経の末端にある5-HT_3受容体に結合し求心性迷走神経を介して嘔吐中枢に情報が到達していることが確かめられた。

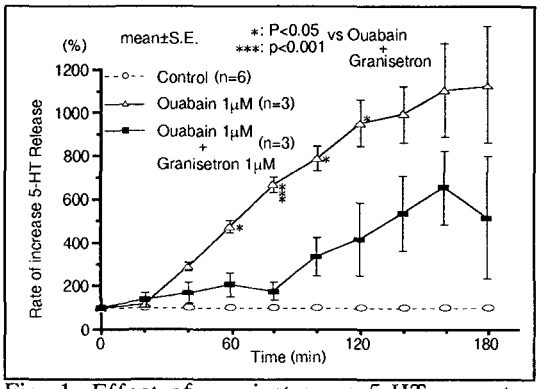


Fig. 1: Effect of granisetron, a 5-HT_3 receptor antagonist, on ouabain-induced 5-HT release from ferret ileum.

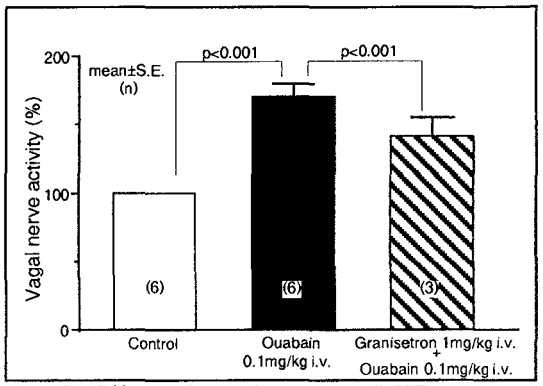


Fig. 2: Effect of granisetron, a 5-HT_3 receptor antagonist, on ouabain-induced increase in afferent vagal nerve activity of ferrets.

〔文献〕

1) 南　勝，斎藤　秀哉．(1993) ジギタリスーその再評価と使い方，新興医学出版社，東京．
2) Endo, T., Minami, M., Monma, Y., et al. (1990) Biogenic Amines 7, 525-533.
3) Endo, T., Minami, M., Monma, Y., et al. (1992) Biogenic Amines 9, 163-175.
4) Milano, S., Simon, C. and Grelot, L. (1991) Clin. Autonomic Res. 1, 275-280.
5) Yoshioka, M., Ikeda, T., Abe, M., et al. (1992) Br. J. Pharmacol. 106, 544-549.

51 低張あるいは高張溶液灌流下におけるNMDA 誘発細胞外ドーパミン増加作用

菅原　恵、芝軒　信次、秦　英代*、石川　紘一
（日本大学・医学部・薬理、*民生科学協会・総合研）

〔要約〕

高張あるいは低張溶液灌流下において、外因性興奮性アミノ酸のラット線条体細胞外ドーパミン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) を線条体内に持続適用 (1 mM) することにより、細胞外ドーパミン濃度の著明な上昇と主要代謝産物である DOPAC および HVA の有意な減少が観察された。高張リンゲル液（150 mM 蔗糖を加えたもの）灌流下において、NMDA によるドーパミン増加作用はほぼ消失した。また、NMDA による DOPAC および HVA の減少作用は減弱された。一方、低張リンゲル液（正常リンゲル液組成から 50 mM NaCl を除去したもの）灌流下において、NMDA によるドーパミン増加作用は増強された。以上の結果より、高濃度の NMDA 適用によるドーパミンの増加機構に細胞障害に伴う細胞膨張 (swelling)、あるいはそれに伴う他の神経伝達物質の遊離増加が関与する可能性が示唆された。

興奮性アミノ酸 (NMDA) を線条体に局所投与することにより、種々の細胞外伝達物質濃度が増加し、NMDA 受容体拮抗薬によりその作用が遮断されることが知られている (1-4,6)。ラット線条体細胞外タウリン濃度は、低濃度 のNMDA 適用 により鋭敏に反応するが、グルタミン酸やドーパミン濃度は高濃度のNMDA を適用した時のみ有意な増加が認められる (3)。浸透圧の変化により細胞外伝達物質濃度が変動することが知られている (2,5) ことより、NMDA 適用による神経伝達物質遊離が細胞障害を伴う浸透圧変化を介して生じる可能性が考えられる。本実験においては NMDA の局所適用により引き起こされる細胞外ドーパミン増加作用におよぼす浸透圧変化の影響を調べた。

[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、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。ドーパミンおよび代謝産物 (DOPAC および HVA) 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 分毎に電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーにより測定した。 実験結果は、ベースライン（薬物およびその他の処置前の 3 フラクッションの平均値を百パーセントとした）に対するパーセントで表し、平均値±標準誤差で示した。

[実験結果および考察]

等張リンゲル液灌流下に NMDA (1 mM) を透析用プローブを介して持続適用することにより、細胞外ドーパミン濃度の著明な増加と主要代謝産物である DOPAC および HVA 濃度の有意な減少が観察された。高張リンゲル液（正常リンゲル液に 150 mM 蔗糖を加えたもの）灌流下にNMDA を持続適用すると、NMDA によるドーパミン増加作用はほぼ完全に消失し、NMDA によるドーパミン代謝産物の減少作用も有意に抑制された（図 1.)。高張リンゲル液のみの灌流により、ドーパミンおよび代謝産物濃度は有意な変動を示さなかった。これらの結果は、NMDA によるドーパミンの増加が、NMDA による細胞外タウリン濃度の増加機構 (2,4) と異なり、浸透圧変化を介している可能性を推測させる。ドーパミンおよび代謝産物濃度は正常リンゲル液組成から 50 mM NaCl を除去した低張リンゲル液の灌流により著明な変動は認められなっかた。一方、上記低張リンゲル液灌流下においてNMDA の同時適用を行ったところ、ドーパミン濃度増加率は軽度に増強されるにすぎなかったが、

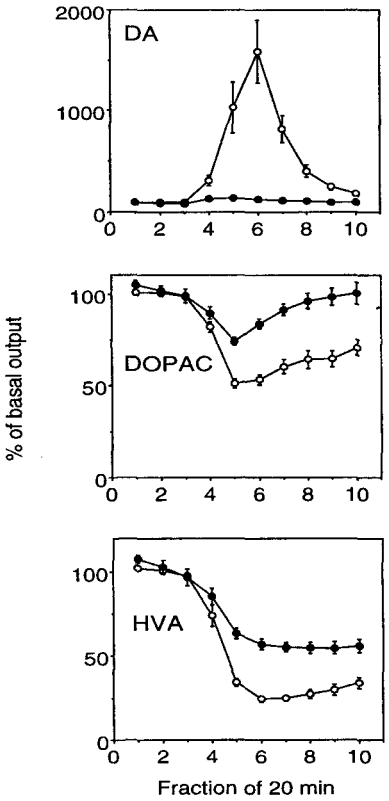


図 1. 等張溶液 (○) あるいは高張溶液灌流下 (●) における NMDA (1 mM) 持続適用による細胞外ドーパミン(DA)および代謝産物濃度の変動
NMDA (1 mM) は 4 番目のフラクションより、プローブを介して持続適用した。高張溶液(正常リンゲル液に 150 mM 蔗糖を加えたもの)は NMDA 適用 60 分前より灌流した。

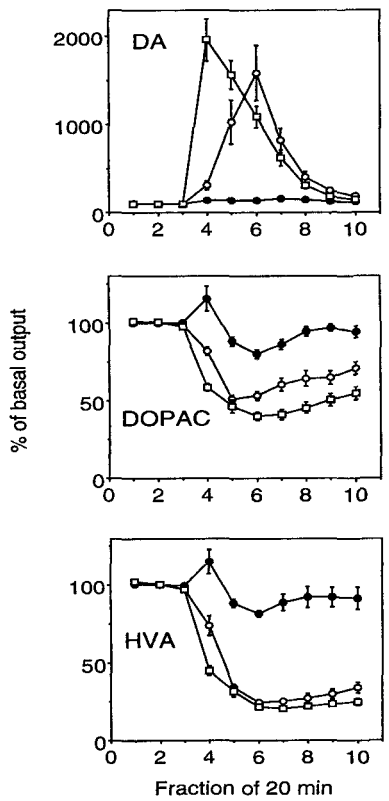


図 2. 等張溶液 (○) および低張溶液 (— 50 mM NaCl; □) 灌流下におけるNMDA持続適用による細胞外ドーパミン (DA) および代謝産物濃度の変動。●,— 50 mM NaCl 灌流のみ
NMDA (1 mM) あるいは低張溶液は 4 番目のフラクションより、灌流した。

正常リンゲル液灌流下での NMDA 適用によるドーパミンの増加が適用直後のフラクションより比較的緩やかであった（最大増加反応は NMDA 適用 60 分後のフラクションで観察される）のに比し低張リンゲル液灌流下における NMDA の同時適用においては、NMDA 適用直後に最大反応が観察された (図 2.)。これらの結果は、軽度の浸透圧変化では神経伝達物質遊離には影響が認められないが、興奮性アミノ酸受容体の活性化が伴うと強い神経伝達物質遊離が引き起こされる可能性を示唆する。以上の結果より、高濃度の NMDA 適用によるドーパミンの増加は細胞障害に伴う細胞膨張 (swelling)、あるいはそれに伴う他の神経伝達物質の遊離増加を介して引き起こされる可能性が示唆された。

[引用文献]

1) Morari, M., O'Connor, W.T., Ungerstedt, U. and Fuxe, K. (1993) J. Neurochem. 60, 1884-1893
2) Shibanoki, S., Kogure, M., Sugahara, M. and Ishikawa, K. (1993) J. Neurochem. 61, 1698-1704
3) 菅原　恵、芝軒信次、石川紘一 (1994) 神経化学 33, 504-505
4) 菅原　恵、芝軒信次、松本　明、九穂泰三、石川紘一 (1995) Neurosciences 21 (Suppl.), 印刷中
5) Solis, J.M., Herranz, A.S., Herreras, O., Lerma, J. and Martin del Rio, R. (1988) Neurosci. Lett. 91, 52-58
6) Young, A. M. J. and Bradford H. F. (1991) J. Neurochem. 56, 1667-1683

52 ラット海馬におけるドーパミンD_2型受容体の分布とその特性—in vitro レセプターオートラジオグラフィーによる[^{3}H]YM-09151-2の結合部位について

横山　ちひろ、岡村　均、井端　泰彦
（京都府立医科大学・第二解剖）

〔要約〕
ラット海馬切片を用いて、ドーパミンD_2型受容体の高親和性リガンドである[^{3}H]YM-09151-2による in vitro レセプターオートラジオグラフィーを行った。その結果、海馬の[^{3}H]YM-09151-2結合部位は、[^{3}H]sulpirideなどこれまでのD_2型リガンドによる報告に比して、海馬全域に広範囲にわたって認められた。その結合密度は、CA1やCA4錐体細胞層、歯状回分子層などに強く、CA3上行層、歯状回門に中等度、CA3のその他の層と海馬支脚に弱いといった明らかな部位特異性を示した。海馬切片を用いて行った飽和実験で得られたKd値は、線条体切片を用いたときのKd値と比べて約5倍高かった。しかし競合実験では線条体切片を用いたときと同様、D_2型受容体の性質を示した。以上の結果は、線条体のD_2型受容体とは異なる結合様式を示すD_2型受容体が、海馬に広く分布していることを示唆する。

＜目的＞　海馬におけるドーパミン神経伝達の存在は臨床上のみならず生理学、薬理学、行動学的所見からも支持されているにもかかわらず、ドーパミン受容体分布の形態学的証拠は乏しいといわざるを得ない。オートラジオグラフィーの手法による海馬ドーパミンD_2型受容体結合の分布がいくつか報告されているが、その結果は用いたリガンドによって異なり、また近年報告されたD_2型受容体として分類されるD_2、D_3受容体 mRNAの分布とも一致しない[1]。そこで今回、D_2型受容体の高親和性アンタゴニストリガンドである[^{3}H]YM-09151-2をもちいた in vitro レセプターオートラジオグラフィーを行い、海馬におけるD_2型受容体結合部位の分布とその特徴について検索した。

＜方法＞　in vivo レセプターオートラジオグラフィーの手法は既報の方法に従った[2]。Wistar系ラット（220-250 g）の脳冠状切片を、0.5 nM 濃度の[^{3}H]YM-09151-2に22℃ 120分間反応させ、洗浄、乾燥後[^{3}H]-Hyperfilmに4週間露光させた。非特異的結合には10μm (+)-butaclamol を加え、コンピュータ画像解析装置によってfilm画像上の特異的受容体結合密度を算出した。露光後の切片はcrecyl violetにて染色し海馬各部位の決定に用いた。

飽和実験および競合実験は、海馬および線条体切片を用いた拭き取り法によった。飽和実験における[^{3}H]YM-09151-2濃度は、30–1200 pMとした。競合実験は0.1 nM濃度の[^{3}H]YM-09151-2で行い、用いた薬物はYM-09151-2、(+)-butaclamol、dopamine(DA)、sulpiride、5-hydroxytryptamine (5-HT)、ketanserine、SCH-23390、8-hydroxy-2-(di-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT)、1,3-di(2-tolyl)guanidine (DTG)である。

＜結果＞　[^{3}H]YM-09151-2を用いたオートラジオグラフィーでは、背側海馬において、歯状回分子層に強い、CA3上行層と歯状回門に中等度の結合密度が認められた（Fig. 1A）。CA3のその他の層と海馬支脚には弱い結合密度しか観察されなかった。腹側海馬では、背側海馬と同様CA1上行層と放射層、CA4錐体細胞層、歯状回分子層に強い、歯状回門には中等度の結合密度が認められたが、CA1網状分子層はCA1のその他の層よりやや弱かった（Fig. 1B）。

海馬切片を用いた[^{3}H]YM-09151-2結合の飽和実験では、Kd値=1.530 nMが得られ、線条体切片を用いた時のKd値=0.315 nMと比べ5倍高かった（Fig. 2A, B）。競合実験では、(+)-butaclamol、sulpiride、dopamine(DA)のKi値は8-OH-DPAT、ketanserine、DTGなどよりも低濃度であり、線条体切片と同様の順位を示した（Fig. 3）。各々の薬物のKi値は、海馬切片を用いた時の方が線条体切片に比べ5–10倍高かった。

＜考察＞　今回我々は、ラット海馬における広範囲かつ部位特異的なドーパミンD_2型受容体の分布をはじめて明らかにした。[^{3}H]YM-09151-2は、ドーパミンD_2型受容体(D_2、D_3、D_4)に非常に高親和性に結合

すると報告されており[3]、実際今回得られた線条体切片におけるKd値=0.315 nMは、拭き取り法においてこれまで最も低い値の一つである。また競合実験において海馬の[^{3}H]YM-09151-2結合は、薬理学的に線条体と同じくD_2型受容体であることを明らかにした。今回の実験で、海馬においてこのように広範囲のD2型受容体の分布が得られたのは、[^{3}H]YM-09151-2がこれまでのD_2型受容体リガンドのなかで最も高親和性、高選択性であるという、リガンドの性質による可能性が高い。

また今回、海馬と線条体切片におけるKd値の違いから、[^{3}H]YM-09151-2結合部位はin vitroにおいて海馬と線条体で異なる結合様式をもつことが明らかになった。これは、D_2型受容体の遺伝子的多様性(D_2、D_3、D_4)によるか、あるいはD_2型受容体の性質を変化させる組織特異性というべき機構が存在するのかもしれない。

＜文献＞ 1) Bouthnet et al., Brain Res., 564 (1991) 203 - 219
2) Yokoyama et al., J. Comp. Neurol., 394 (1994) 121 - 136
3) Tang et al., J. Pharm. Exp. Ther., 267 (1994) 495 - 502

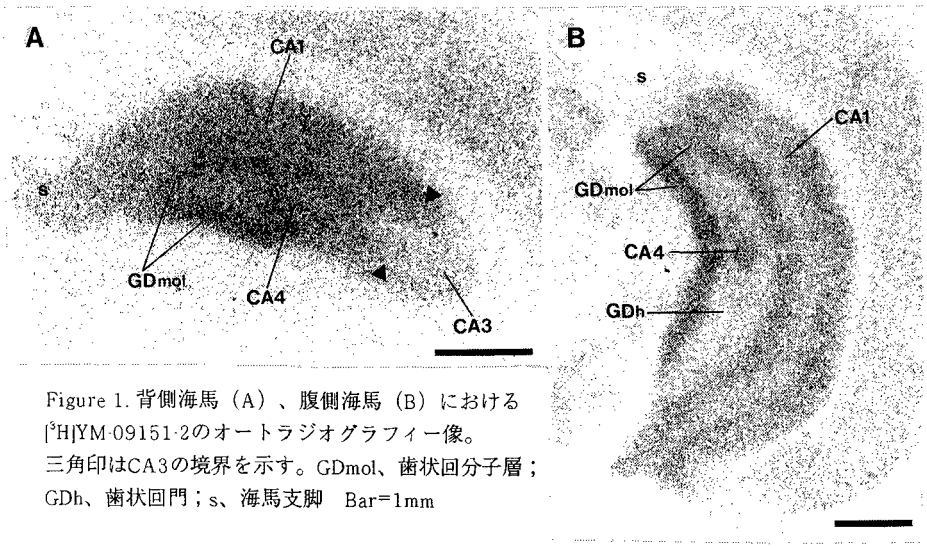


Figure 1. 背側海馬（A）、腹側海馬（B）における[^{3}H]YM-09151-2のオートラジオグラフィー像。
三角印はCA3の境界を示す。GDmol、歯状回分子層；GDh、歯状回門；s、海馬支脚　Bar=1mm

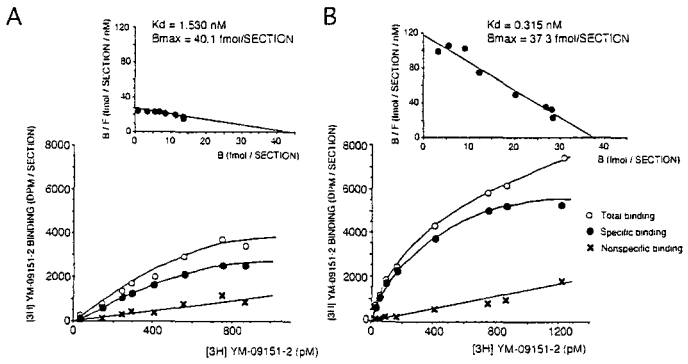


Figure 2. [^{3}H]YM-09151-2結合の、海馬切片（A）、線条体切片（B）における飽和曲線。スキャッチャードプロットおよびKd値、Bmax値をそれぞれ上に示す。

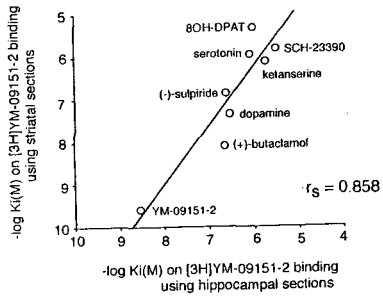


Figure 3. [^{3}H]YM-09151-2結合に対する各薬物Ki値の、海馬と線条体における相関。
r_sはSpearmanの相関係数。

53 ラット脳におけるドーパミンD4レセプターmRNAの分布

-TTダイマー法によるIn situ ハイブリダイゼーション-

清水義雄、秋山一文 、浜村貴史、小路武彦*、黒田重利
（岡山大学医学部神経精神医学教室、*長崎大学医学部第三解剖学教室）

（要約）
ドーパミンD4レセプターはD2レセプターサブタイプの1つであるが、クロザピンに高い親和性を示すという薬理学的な特性を持ち、そのmRNAの分布も皮質と辺縁系に多いという特徴がある[1,2]。しかしこれまで、ラット脳におけるD4レセプターmRNAの詳しい分布は報告されていない。今回我々は、放射性同位元素を用いないTTダイマー法によるIn situ ハイブリダイゼーション[3,4]によってこの分布を検討した。ドーパミンD4レセプターmRNAは前頭皮質に多く分布し線条体には少なかった。

（実験方法）
1）切片の準備；SD系雄性ラットをペントバルビタール(50mg / kg, i.p.)で麻酔した後、生理食塩水と4%パラフォルムアルデヒドを潅流して脳を固定した。取り出した脳は固定液を20%ショ糖で洗浄した後、ドライアイスアセトン液で凍結しクリオスタットで10μmの厚さに切り、シランコートしたスライドグラスに貼り付けた。
2）プローブの作成；D4レセプターをコードするDNAの中から45塩基対を選び、その特異性をGenBankを用いたhomology studyで確かめた。5'末端にTTATTATTAを、3'末端にATTATTを加えた合計60塩基対のオリゴヌクレオチドをDNA synthesizerで合成し、OPC法で精製した。プローブのTTダイマー化は254nmの紫外線照射によって行った。
3）Dot blot ハイブリダイゼーション；プローブに相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを作成し、ニトロセルロースフィルターに1pg,10pg,100pg,1ng,10ng滴下し80℃2時間焼き付けた。5000J,7000J,10000Jの紫外線照射によってTTダイマー化したプローブを用いて免疫組織化学的にシグナルを検出し、至適な紫外線照射量を決定した。
4）In situ ハイブリダイゼーション；前述の通り用意した切片を塩酸処理、プロテアーゼ処理、後固定とアルデヒドの中和で前処理した後、TTダイマー化したプローブを用いてハイブリダイゼーションをおこなった。十分な洗いをおこなった後、HRP標識された抗TTダイマー抗体と反応させニッケル・コバルトDAB法により発色した。
5）対照実験；紫外線照射をしていない非標識プローブを過剰に（100倍）加えて、連続切片においてハイブリダイゼーションをおこない、シグナルの特異性を確かめた。

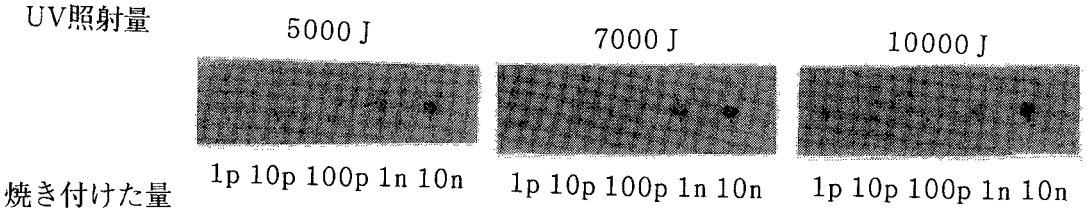
（結果と考察）
1）Dot blot ハイブリダイゼーション；（図1）5000J,7000J,10000Jのいずれにおいても1ng以上でシグナルを認めた。In situ ハイブリダイゼーションには7000Jの紫外線照射をおこなったプローブを用いることにした。

2) In situ ハイブリダイゼーション；（図2）

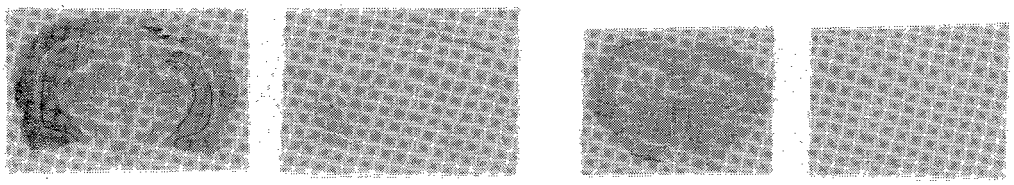
(1) 対照実験ではシグナルを認めないことからシグナルの特異性が確かめられた。
(2) 嗅球、前頭葉皮質にはびまん性にシグナルを認めた。
(3) 側坐核にはシグナルを認めたが、線条体にはシグナルを認めなかった。
(4) 帯状回の深層と側頭葉皮質、後頭葉皮質など皮質の深層にシグナルを認めた。
(5) 歯状回の顆粒層と多形細胞層、海馬の錐体細胞にシグナルを認めた。
(6) 視床下部、扁桃体、黒質緻密層、腹側被蓋野にシグナルを認めた。

これまでラット脳におけるドーパミンD4レセプターmRNAの分布は、ノーザンブロットによると辺縁系と皮質部位に多いとされてきた。ラジオアイソトープで標識されたプローブを用いた場合と較べて、TTダイマー法によるIn situ ハイブリダイゼーションでは顕微鏡レベルでシグナルを検討することが可能である。今回の結果はこれまでの報告と矛盾するものではないが、より細かな分布の検討が出来た。特にドーパミンD4レセプターmRNAが前頭葉を中心とした皮質に多く線条体には少ないことが、このレセプターに対して高い親和性を示すクロザピンの特徴的な治療効果と関係すると考えられた。

（図1）



（図2）



（文献）

1) H.H.M. Van Tol, et al. Nature, 350: 610-614, 1991.
2) K.L.O'Malley, et al. New Biologist, 4: 137-146, 1992.
3) T.Koji and P.K.Nakane. Acta Pathologica Japonica, 40: 793-807, 1990.
4) 中根 一穂 編集, 改訂版 In situ ハイブリダイゼーション手法 ; P.88-130, 学際企画.

54 ラット大脳皮質NMDA受容体イオンチャンネル活性化状態の多様性

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〕 glutamate, glycine, Mg およびspermineの各活性化因子による NMDA(N-methyl-D-aspartate) 受容体イオンチャンネル機能の調節機構を明らかにする目的で、ラット大脳皮質シナプトソーム膜標品への[125I]MK-801 結合の薬理学的性質を検討した。NMDA 受容体イオンチャンネルブロッカーである MK-801, PCP(phencyclidine), SKF10047 および ketamine の [125I]MK-801 結合に対する阻害能を調べたところ、glutamate + glycine および spermine による [125I]MK-801 結合活性化状態は、MK-801 (Ki= 1, 1.5 nM)< PCP (Ki= 11, 18 nM)< SKF10047 (Ki= 72, 102 nM)< ketamine (Ki= 149, 219 nM) の順に親和性は低下し、いずれの Ki 値も同様の値を示した。一方、glutamate + Mg およびglycine + Mgによる結合活性化状態は、glutamate + glycine や spermineの場合に比較して MK-801 で約6倍親和性が低く、その親和性の順も MK-801 (Ki= 7 nM(glutamate+ Mg), 6nM(glycine + Mg))< PCP (Ki= 47, 31 nM)< ketamine (Ki= 798, 510 nM)< SKF10047 (Ki= 1214, 833 nM) となり、SKF10047 と ketamine が逆となった。以上の結果から、NMDA受容体イオンチャンネルは活性化因子の違いにより、薬理学的性質が異なる複数の活性化状態をとることが示唆される。

NMDA 受容体イオンチャンネル複合体は、glutamate, glycine, Mg や spermine といった活性化因子の作用する部位を持つ、複数のサブユニットから構成されていると考えられている(1)。さらに、チャンネルブロッカーとして知られている MK-801, SKF10047 や ketamine は、イオンチャンネル内に位置する PCP 結合部位に作用すると考えられ(2)、[3H]TCP や [3H]MK-801 の結合量の変化によりイオンチャンネルの状態を調べることができる。

我々は、昨年の本学会で、[3H]TCP (thienyl-PCP) と [125I]MK-801 の結合の違いから、NMDA 受容体イオンチャンネルに half-open (half-activated) と full-open (full-activated) の状態が存在し、前者は glutamate, glycine, Mg 単独で起こり [3H]TCP が結合し、後者は spermine 単独あるいは glutamate, glycine, Mg のいずれか2つの同時添加により起こり [125I]MK-801 が結合することを報告した(3)。今回、full-open 状態を認識し結合する [125I]MK-801 をリガンドとして、各種の活性化により起こるイオンチャンネルの状態について、薬理学的な性質を検討した。

【実験方法】

Wistar 系雄性ラット (200-250 g) の大脳皮質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。[125I]MK-801 結合実験は、膜標品 (5 μg protein/tube) と 40pM [125I]MK-801 (81.4 TBq/ mmol: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た迅速な吸引濾過により停止し、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 10 μM MK-801を用いた。

【結果】

glutamate(10 μM) + glycine(10 μM) による [125I]MK-801 結合の増加は、MK-801< PCP< SKF10047< ketamine の順に強く抑制された (Fig. 1)。それぞれのKi値は表１にまとめた。spermine(10 μM) による結合増加も glutamate + glycine の場合と同様に強く抑制され、Ki値も一致した。

Mg(300 μM) + glutamate(10 μM) による結合増加は、 MK-801< PCP< ketamine< SKF10047 の順に親和性が低下しており、明らかに glutamate + glycine や spermine の場合とは異なる結果が得られた。Ki値は、いずれも glutamate + glycine や spermine の場合よりも大きく、親和性が低下していることが明らかとなった。Mg(300 μM) + glycine(10 μM) の場合も、Mg

(300 μM) + glu-tamate(10 μM) と同様に、ketamine と SKF10047 の親和性が逆になり、またいずれの親和性も低い結果となった。

【考察】

NMDA 受容体イオンチャンネル複合体への[3H]MK-801 結合は、glutamate や glycine が同時に存在するときにのみ観察されることから、チャンネル機能を調べる方法として利用されている。我々は、[3H]TCP が glutamate, glycine や Mg により単独で活性化された "half-open" 状態のチャンネルに結合することを前回報告し(2)、NMDA受容体イオンチャンネル複合体には複数のチャンネル活性化状態が存在する可能性を示した。今回得られた結果は、さらに "full-open" 状態のチャンネルにもいくつかの活性化レベルが存在することを示唆している。

Mgとglutamateあるいはglycineによる活性化状態は、glutamate + glycine や spermine による活性化状態の薬理学的なパラメーターと、明らかに違いが認められた。特に MK-801と SKF10047 の親和性が約6-8倍低下しており、このことがketamineとSKF10047の親和性が逆転する結果を引き起こしたものと考えられる。spermine で起こるチャンネル活性化状態とMg/glutamateやMg/glycineで起こるチャンネル活性化状態は、薬理学的に異なる結果は、Mgとポリアミンは同一の部位に作用するものではないことが示唆される。

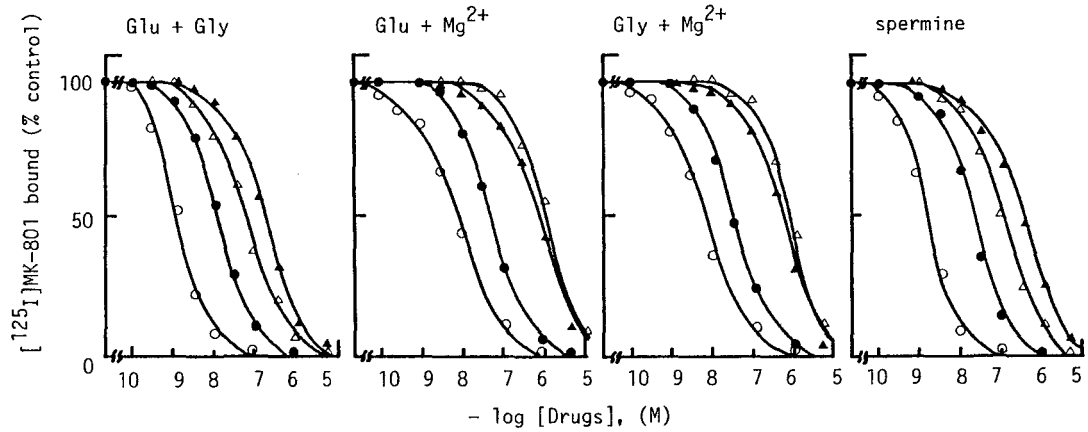
【文献】

(1) Foster, A.C. and Wong, E.H.F. (1987) Br. J. Pharmacol., 91, 403-409.
(2) Fagg, G.E. (1987) Neurosci. Lett., 76, 221-227.
(3) 山本敏文、山本秀子、諸治隆嗣 (1994) 神経化学, 33, 314-315.

表 1: 各活性化状態での阻害定数

Displacer	Ki(nM) glu + gly	glu + Mg	gly + Mg	spermine
MK801	1.01 ± 0.04	6.89 ± 0.50	5.88 ± 0.40	1.52 ± 0.18
PCP	11.21 ± 0.37	47.04 ± 5.37	31.37 ± 2.72	18.39 ± 2.51
SKF10047	72.08 ± 8.69	1214 ± 55	833.3 ± 64.6	102.3 ± 0.4
ketamine	149.0 ± 23.1	789.2 ± 30.6	510.8 ± 28.7	219.2 ± 21.3

Fig. 1. 各活性化状態でのMK-801(○), PCP(●), SKF10047(△), ketamine(▲) による置換。



55 初代培養神経細胞を用いた *in vitro* 実験系における σ-1受容体の薬理学的特性

山本秀子[1]、山本敏文[2]、奥山茂[3]
([1]東京都精神研・精神薬理、[2]横浜市大・分子認識、[3]大正製薬・創薬研)

〔要約〕
初代培養神経細胞へのσ-1選択的リガンドの結合は時間と共に飽和し、4度より37度で高く、4度での結合は可逆的であるが、37度では不可逆的であった。酸性高濃度塩溶液で洗浄後も結合が残存するが、σリガンド前処理によりその結合は減少し、その減少は用量依存的でσ-1受容体に対する親和性と類似していた。更に、endocytosis inhibitorであるphenylarsine oxideが37度での結合を減少させたことから、σ-1受容体はσリガンドの結合により細胞内にinternalizationする可能性が示唆された。

[目的] 代表的な抗精神病薬がシグマ(σ)受容体に高い親和性を有し、また、ある種のσリガンドが抗精神病作用を有することから、最近、σ受容体に関心が向けられている。しかし、σ-1受容体の精製は小脳より報告されているが(1)、作動薬、拮抗薬の分類が未だ不明確であり、内在性作用物質が未同定、σ受容体を介する細胞内情報伝達機構及びσ受容体と関連する生理的役割が明かではないなど基礎的な研究が必要である。σ受容体はσ-1、σ-2 siteが薬理学的に提唱されており、haloperidolは両者に強い親和性を有するが、d体のベンゾモルファン類の方がl体よりσ-1受容体に高い親和性をもち、選択的σ-1リガンド((+)pentazocine、NE-100(2,3)等)が報告されている。今回、我々は、この選択的σ-1リガンドを用いて、生理的条件下で初代培養神経細胞(living cell)上のσ-1受容体の性質について検討した。

[方法] 培養細胞：Wistar系ラット18-19日令胎児大脳を小倉らの方法(4)により無血清培養した。

結合実験：Time course. 細胞は氷冷DMEMで2回洗浄した後、DMEMと標識リガンド(約40,000 counts /well)を加えて、氷上で静置後、37度CO_2インキュベーターで所定の時間インキュベートした後、氷冷Ca^{2+},Mg^{2+}-free phosphate buffered saline(PBS)で2 回洗浄後、酸性高濃度塩溶液 (0.5M NaCl, ajusted to pH 2.5 with HCl)で 2回洗浄した後、0.1N NaOHで可溶化し、細胞に取り込まれた[^{3}H]を液体シンチレーションカウンターで測定した。1mM phencyclidine存在下 での[^{3}H]TCP結合、100μM haloperidol存在下での [^{3}H](+)Pentazocine, [^{3}H]NE-100の結合を各々の非特異的結合(NSB)とした。phenylarsine oxideはDMSOに溶解後、DMEMで希釈して[^{3}H]NE-100と共に細胞に加えた。

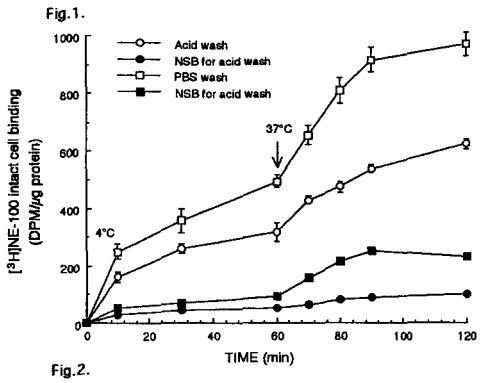
薬物前処理 haloperidol, (+)pentazocine, DTG, corticosterone, progesteroneはDMSOに溶解した後、DMEMで希釈した。(DMSO濃度0.1%以下)。 NE-100はH_2Oで溶解後、DMEMで希釈した。neuropeptide Y(NPY) は0.1%BSA溶液で溶解後、DMEMで希釈した。細胞は37度のDMEMで2回洗浄した後、薬物を含むDMEMを加えて、CO_2インキュベーターで30分インキュベートした後、DMEMで3回洗浄後、[^{3}H]NE-100(約40,000 counts/well)を加えて37度のCO_2インキュベーターで60分インキュベートした後、PBSで2 回洗浄後、酸性高濃度塩溶液で 2回洗浄し、細胞に取り込まれた [^{3}H]NE-100を測定した。

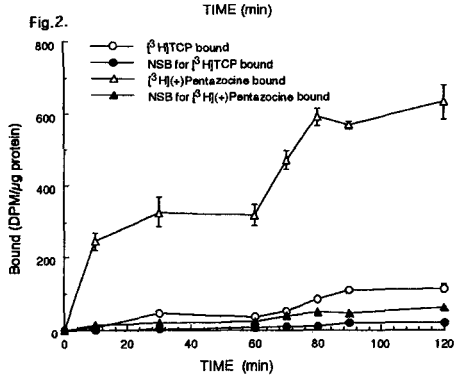
[結果] σ-1選択的リガンド、[^{3}H]NE-100の初代培養神経細胞への結合は、4度、37度において時間と共に飽和した(Fig.1)。結合は温度依存性に増加したが、PBSによる洗浄と細胞表面に結合したリガンドを除去する酸性高濃度塩溶液による洗浄とで差がみられ、酸性高濃度塩溶液による洗浄後にも結合が存在した(Fig.1)。4度で飽和した結合は100μMのhaloperidolまたはNE-100により、dissociationされたが、37度で飽和させた結合はdissociationがほとんど見られず、不可逆的であった(Data not shown)。 [^{3}H](+)Pentazocineの細胞への結合も[^{3}H]NE

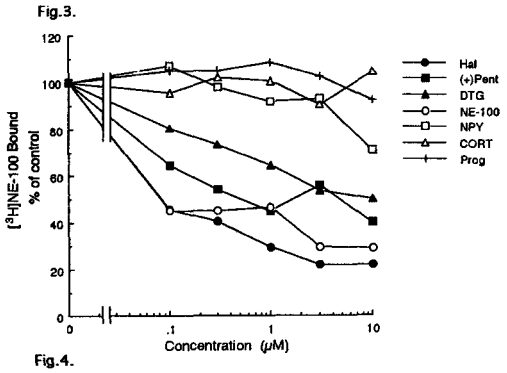
-100の結合と同様、温度依存性の増加を示したが、NMDA受容体イオンチャンネル複合体に結合する[^{3}H]TCPの結合は、[^{3}H](+)Pentazocineまたは[^{3}H]NE-100結合のようには増加しなかった(Fig.2)。細胞を[^{3}H]NE-100結合実験前にσリガンドと37℃でpreincubationさせた後、σリガンドを洗い流して、37℃で60分[^{3}H]NE-100とincubationした。酸性高濃度塩溶液による洗浄後の結合の減少量はhaloperidol, NE-100>(+)pentazocine>DTGの順に多く、NPY、corticosterone、progesteroneでは認められなかった(Fig.3)。10μM phenylarsine oxide存在下での37度での[^{3}H]NE-100結合はcontrolに比べて有意に抑制された(Fig.4)。

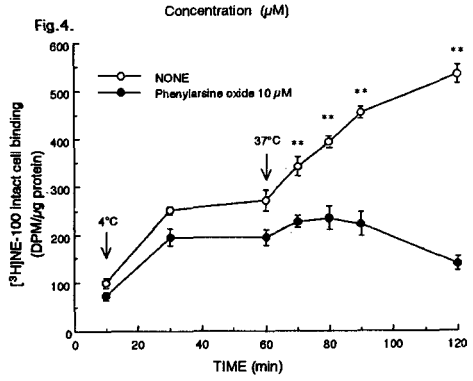
[考察] [^{3}H]NE-100 をリガンドとして、初代培養神経細胞のσ受容体の結合特性を検討した結果、37℃での [^{3}H]NE-100 結合は4℃の場合と異なり、1)σリガンドによって置換されない(pseud-irreversible)、2) 酸性高濃度塩溶液で細胞を洗浄後[^{3}H]NE-100結合が残存する(non-washable, e.g. intracellular fraction)、3)σリガンド前処理により低下する、4) endocytosis inhibitorが37度でのnon-washableな結合を抑制することから、σ-1リガンドのendocytosisが生じていることは明かである。このendocytosisは、神経細胞上の σ-1 受容体にσリガンドが結合して受容体のendocytosisが誘発され、細胞内に取り込まれる (Internalization) 機構による可能性がある。このことはσリガンド前処理がσ-1受容体への結合の減少を引き起こすことによっても支持される。この結合の減少がσ-1受容体に対するσリガンドの親和性と類似したことは、σリガンドがσ-1受容体と結合し、細胞内でその生理的作用を示す可能性を示唆している。また、今回の[^{3}H]TCP結合はσリガンドの結合ほど大きな温度依存性はなく、NMDA受容体イオンチャンネル内に結合する[^{3}H]TCP結合はσリガンドによってdissociationされること(5)から、受容体がendocytosisする可能性は少ないと考えられる。

[参考文献]1. Shuster et al. Brain Res., 670(1995)14. 2. Okuyama et al. Life Sci., 53(1993)PL285. 3. Chaki et al. Eur J.Pharmacol., 251(1994)R1. 4. 小倉明彦、工藤佳久。組織培養14(1988)14. 5. Yamamoto et al., J.Neurosci., 15(1995)731.









56 ラット前脳におけるCCK-B受容体を介した神経伝達：Double-labeling in situ hybridizationを用いた解析

重吉康史、岡村　均、阿部廣巳*、井端泰彦、千原和夫*
【京都府立医大第二解剖、神戸大学第三内科*】

（要約）コレシストキニン(CCK)およびCCK-B受容体は前脳特に大脳皮質に豊富に存在することが知られている。大脳皮質に於て、CCK-B受容体を介してどのような細胞群にCCKが影響を及ぼしているのかを明らかにするため^{35}S でラベルしたCCK-B受容体cRNA probeとDigoxigenin (DIG) でラベルしたg-aminobutyric acid (GABA), Cholecystokinin (CCK), Somatostatin (SOM), Vasoactive intistinal peptide (VIP), とのdouble-labeling in situ hybridization を行なった。その結果、CCKmRNAおよびGADmRNAを持つニューロンとは、CCK-BmRNAは高率に共存したが 、SOMmRNA, および, VIPmRNAを持つニューロンとの共存率は低かった。この結果は、CCKニューロンがautoreceptorを持つ可能性、あるいは、CCKニューロンが広範な神経ネットワークを大脳皮質内で形成している可能性を示唆する。さらに我々は、大脳皮質CCK mRNA陽性ニューロンが、視床網様核に投射する可能性を、retrograde tracer (Fluorobeads) によるニューロンの標識と CCK cRNA probe を用いたin situ hybridization を用いて検討した。即ち、ラット脳のRTNの吻側にtracer を射ち、一週後に還流固定された大脳に対してin situ hybridization を行ない、大脳皮質に於ける、retrograde tracerによる標識と、CCKmRNA の細胞レベルに於ける共存に関して検討を加えた。その結果、大脳皮質帯状回第VI層に存在するretrograde tracer により標識された細胞のうち、かなりのものがCCK mRNA を持つことが明らかにされた。また、^{35}S でラベルしたCCK-B受容体 cRNA probe とDigoxigenin にてラベルしたGAD cRNA probeにてdouble-labeling in situ hybridization を行なうことによって、RTN 内の GABA ニューロンのほとんどのものがCCK-B受容体mRNAを持つことが、明かとなった。このことは、大脳皮質CCK mRNA 陽性ニューロンが、RTN内のGABA ニューロンに対し、CCK-B受容体を介して、影響を及ぼしている事を示している。

（目的）免疫組織学あるいはin situ hybridizationを用いた研究によって、CCK およびCCK-mRNA は大脳皮質に広範にかつ大量に存在することが知られている。また、放射性ligandsを用いた研究によって、CCK受容体もまた、大脳皮質に豊富に存在することが明かとなった。近年、いくつかの哺乳類 に於けるCCK-B受容体のcDNAがクローニングされ、antisense probeを用いた、in situ hybridization が可能となったが(1,2)、その結果も、末梢型とされるCCK-A 受容体に対して、中枢型の受容体とされるCCK-B受容体が、大脳皮質に豊富に存在することを裏付けるものであった。即ち、大脳皮質に於ては、CCKmRNA, CCK-B受容体mRNAともに大量に発現している事が示された。今回我々は、大脳皮質に於けるCCKmRNAとCCK-B受容体mRNAの細胞レベルの共存に関して検討するために、^{35}SによってラベルされたCCK-B受容体 cRNA probe および、Digoxigeninによってラベルされ たCCK cRNA probeを同時にhybridizationすることによって検討した。また、同様の手法を用いて、大脳皮質に豊富に存在する神経伝達物質であるGABA, SOM, VIP を含むニューロン群の活動にCCKが関与しているかどうかを検討するため^{35}SによってラベルされたCCK-B受容体 cRNA probeとDIGによってラベルされたGAD, SOM, VIP cRNA probe をそれぞれ同一切片にhybridization した。

さらに、我々は、大脳皮質CCKニューロンが、視床網様核 (RTN) に投射して、RTNの神経活動に影響を及ぼしている可能性について検討した。RTNは大脳皮質および、視床から、入力を受け、また視床下部背側核群に抑制性の出力を (GABAergic) 投射する事によって、視床の活動を調整していると思われている。RTNはCCK-B受容体mRNAが豊富に存在する細胞群の一つでありRTNの活動状態に対してCCKが何らかの影響を及ぼしていると考えられる。そこで我々は、retrograde tracer による標識とCCK cRNA probeを用いたin situ hybridization を同一切片に行なうことにより、大脳皮質のCCKmRNA含有細胞がRTN に投射していることを証明しようとした。

（方法）すべての実験を通じて、雄の Wistar 系ラット (200-250g)を使用した。

1. Double labeling in situ hybridizaiton

^{35}S でラベルしたCCK-B受容体cRNA probeとDigoxigenin (DIG) でラベルしたGABA, CCK, SOM, VIPcRNA probeはT3,あるいはT7RNA polymeraseを用いて作成した。ラット脳は4%paraformaldehydeにて還流固定を行なった後に取り出し、20%糖液に浸してcryoprotection を行なった後、cryostatにて25μmの切片をとしproteinase K処理およびacetylationを通常の方法にて行なった後、^{35}SにてラベルされたprobeとDIGにてラベルされたprobe を同時に切片にhybridization することによって、double label in situ hybridization を行なった。 DIG によりラベルされたprobeを使用したin situ hybridization の発色過程は、添付文書のプロトコ

ールにしたがった。発色を停止した後、切片をradiotrack emulsion (Ilford K2)に漬け、その後、2－4週間後に現像を行ない、光顕下で観察した。

2. Double labeling of a retrograde tracer and in situ hybridization

Retrograde tracer (Rhodamine Latex Microspheres)5ml をstereotaxisをもちいてRTNの吻側部に、注入し、一週後に同様に還流固定を行ない、DIGにてラベルされたCCKcRNA probe存在下でhybridizationを行なった。その後、tracerによる標識とhybridization signalに関して共存の有無を検討した。

（結果および考察）大脳皮質に於て、CCKmRNAを持つニューロン、GADmRNAを持つニューロンに於ては、高率にCCK-B受容体mRNAが共存したが、SOM, あるいは VIP mRNAのシグナルを持つニューロンはほとんどCCK-B受容体mRNAシグナルを持たなかった。CCK, GAD, SOM, VIP mRNA を持つ大脳皮質体性感覚野のニューロンのうちCCK-B受容体mRNAのシグナルを持つものの比率は、それぞれ、44%、36%、6%、1.4%、であった(Fig.1)。これは、大脳皮質のCCKmRNA含有細胞が、autoreceptorを持つかまたは、CCKmRNAを持つ細胞が、非常に密なネットワークを形成していることを示唆する。

吻側RTNに射たれたretrograde tracer によって、主に三群の細胞群（帯状皮質の第VI 層、視床背内側核、三叉神経核）が標識された。CCK cRNA probe を用いたin situ hybridization を同じ切片に行なうことによって、帯状皮質第VI層のCCKmRNA含有ニューロンの多くがRTNに投射していることが示唆された。また、^{35}S でラベルしたCCK-B受容体 cRNA probe とDigoxigenin にてラベルしたGAD cRNA probeにてdouble-labeling in situ hybridization を行なったが、その結果ほとんどのRTNに於けるGAD mRNA含有細胞に於て、CCK-B受容体mRNAシグナルの共存を認めた (Fig.2)。このことは、大脳皮質CCK mRNA 陽性ニューロンが、RTN内のGABA ニューロンに対し、CCK-B受容体を介して、影響を及ぼしている事を示している。

Fig. 1

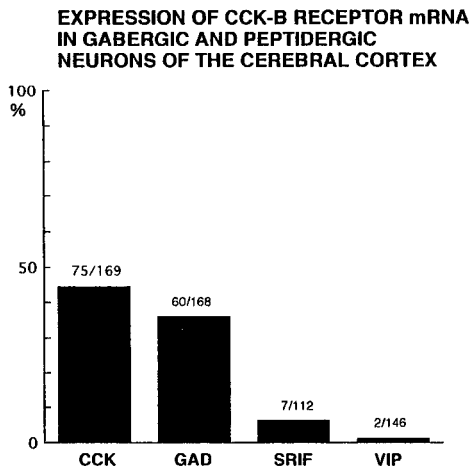
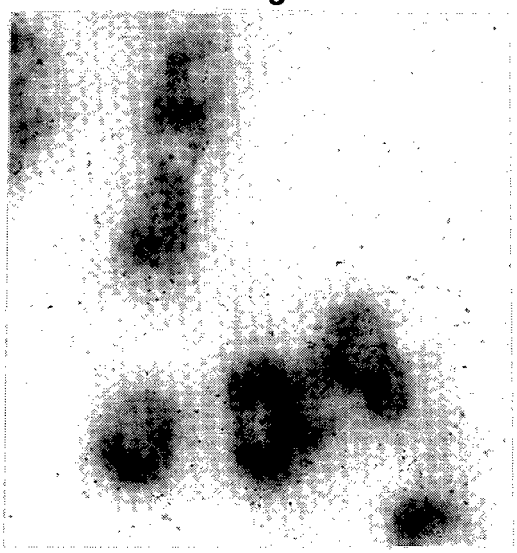


Fig. 2



1 Shigeyoshi, Y., Okamura, H., Inatomi, T., Matsui, T., Ito, M., Kaji, H., Abe, H., Nakata, H. and Chiba, T., Distribution of mRNA for CCK-B receptor in thebrain of Mastomys natalensis: abundant expression in telencephalic neurons, Brain Research, 640 (1994) 81-92.

2 Honda, T., Wasa, E., Battey, J.F. and Wank, S.A., Differential gene expression of CCKA and CCKB receptors in the rat brain, Mol. Cel. Neurosci., 4 (1993) 143-154.

57 カルバコール刺激による白鼠上頸神経節内トランスグルタミナーゼ活性化に至るNO情報伝達様式とSOD酵素の関与

安藤正人・立岑廷族・楠戸正子・藤田公和・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時、ムスカリン性アゴニストのcarbachol(Carb, 0.1mM)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、神経細胞質内の可溶性タンパクの架橋反応(退行性物質代謝)を促進する酵素のtransglutaminase(TG)は短時間(30～45分)で著明に活性化(約10倍)される。このCarb刺激依存性のSCG内TG活性の増大現象は、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤のN^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA;50μM)添加によって約1/2レベルに迄抑制された。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NO発生に依存した細胞質内TGの活性化が短時間で進行する可能性が推定されている(1,2)。今回の検討によって、①Carb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%)されるのが見られた。故に、Carb刺激により神経細胞内で発生したNOは、一旦細胞外に拡散した後再び隣接する標的神経細胞質内に取り込まれて、TGの活性化を誘発する情報伝達様式が推測された。②Carb刺激(30分)によるSCG内TG活性の上昇時には、活性酸素(O_2^-)の消去反応を触媒する酵素superoxide dismutase (SOD)活性が有意に増大(1.5倍)するのが認められた。この時、L-NMMAを同時添加すると節内SOD活性の上昇は完全に消失したが、NO発生反応の基質であるL-arginineを過剰量(0.5mM)溶液中へ添加すると、このSODの活性化は回復した。　このことは、Carb刺激でSCG内で発生するNOは、おそらく近隣のO_2^-との反応を介してOHラジカル(OH·) あるいはperoxynitrateラジカル($ONOO^-$)へと変換される可能性が推測される。そして、生体細胞が持っている合目的的なSOD作用によるO_2^- の消去機構が作動した結果、節内SODの活性化現象が誘発されたと理解される。以上の実験成績から、コリン作動性脱分極刺激はNO依存性に神経細胞質内のTG酵素を活性化して退行性物質代謝を促進するが、さらにNO·とO_2^-との反応系も平行して促進するため、SOD活性化による積極的なO_2^-消去機構が作動して、神経細胞に対する興奮毒性発現の阻止機構が作動して細胞活性が保護される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ー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、ムスカリン性アゴニストのcarbachol(Carb,0.1mM)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(退行性物質代謝)を触媒・促進するtransglutaminase(TG)が、短時間(30～45分)で著明に活性化されることを既に我々は認めている。このCarbによる節内TG活性の促進効果は、一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS) 阻害剤の N^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA, 50μM)により、完全に拮抗された。従って、SCGニューロン内ではムスカリン性受容体刺激によってNOが発生する結果、TG酵素の活性化が引き起こされている可能性が推測されている(1,2)。今回は、Carb刺激を加えた時SCG組織内で発生するNOを捕捉するhemoglobin(20μM)を添加した条件で節内TG活性値を測定して、NOがTGを活性化する情報伝達様式を検証した。一方、NOはラジカル(NO·)として活性酸素(O_2^-)と反応して水酸ラジカル(OH·) あるいはperoxynitrate ラジカル($ONOO^-$) へと変換されるカスケード反応系路が知られている(4)。そこで、Carb脱分極刺激を加えた時SCG組織内で発生するNO·がTGを活性化する調節過程で、O_2^-とさらに反応してこれらラジカルの発生を追求するため、O_2^-消去酵素の superoxide dismutase (SOD)のSCG内活性値の変動を指標に、Carb刺激およびL-NMMAの添加効果を検討し、若干の考察を試みた。

[実験方法]Urethane麻酔下にWistar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てインキュベートしたSCG標本は、Lorandらの方法(3)によりTG活性を測定した。また節内のSOD活性はその各アイソザイムを区別せずに、全活性値を市販の測定キット (SOD-525; BIOXYTECH S.A., France)を用いて、比色法で測定した。

[実験成績と考察]<u>**①Carb刺激によるSCG内TG酵素の活性化におよぼすHbの抑制効果**</u>: 図1に示すよ

うに、生理溶液中にCarb(0.1mM)添加してSCG標本を好気的にインキュベーション(37° C)すると、そのTG活性値は添加後30～45分で最大活性値(約10倍)に達するのを報告している(1,2)。そこで、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、添加10分後以降からCarb刺激で上昇するTG活性値は著明に抑制(約-70%)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、そのTG酵素活性を亢進する情報伝達経路が存在することが推察された。

②SCG組織内SOD活性値におよぼすCarbおよびL-NMMAの添加効果: SCG標本にCarb(0.1mM)を添加してインキュベーションを開始すると、30分後 から節内の全SOD活性が有意に上昇(1.5倍) し、この増大効果はその後さらに60分間持続して認められた(図2)。この時L-NMMAをさらに添加すると、Carb刺激依存性のSOD活性の上昇効果は完全に消失した。しかし、NO合成酵素の基質であるL-arginine(L-Arg)を過剰量(0.5mM)溶液中へさらに添加すると、SOD の活性上昇効果は回復するのが見られた(図3)。このことから、NOは近隣組織内などに存在するO_2^-との反応を介してさらにOHラジカル(OH·)あるいはperoxynitrateラジカル($ONOO^-$) へと変換される可能性が示唆される。そのため、これらの細胞機能を傷害する活性酸素(O_2^-) を消去して細胞を保護する機構が動員される結果、SCG内のSOD活性の増大が見られる可能性が考えられる。以上の実験成績から、コリン作動性脱分極刺激は、NO依存性に神経細胞質内の TG酵素を活性化して退行性物質代謝を促進するが、さらにNO·とO_2^-との反応系が促進されて発生する有害な水酸ラジカルを消去するために、合目的的なSODの活性増大が生じているものと考えられる。

[謝辞]本研究の一部は、平成6年度文部省科学研究費(05680685)の援助を受けて行われた。

[文献](1)Ando et al.(1995) *Neurosci. Res.* in press (2)安藤 他(1994) *神経化学* 33:564-565 (3)Lorand et al.(1972) *Anal. Biochem.* 50:623-631 (4)Olanow (1993) TINS 16:439-444.

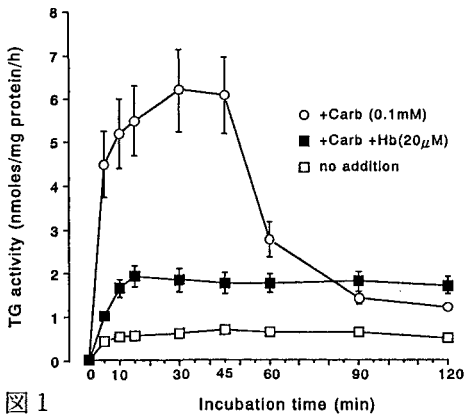


図1

図1．Carb刺激によるSCG内TG活性化におよぼすHb添加効果の経時変化

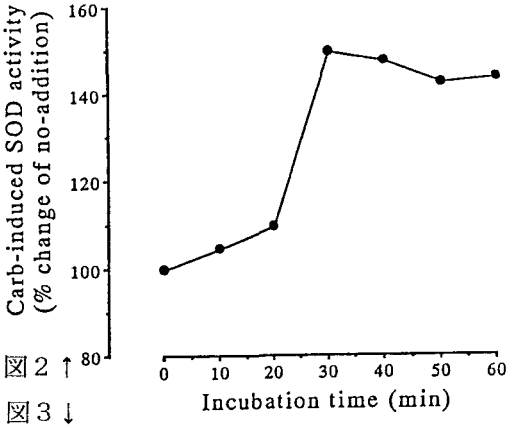


図2 ↑

図3 ↓

図2．Carb刺激によるSCG内SOD活性の経時変化

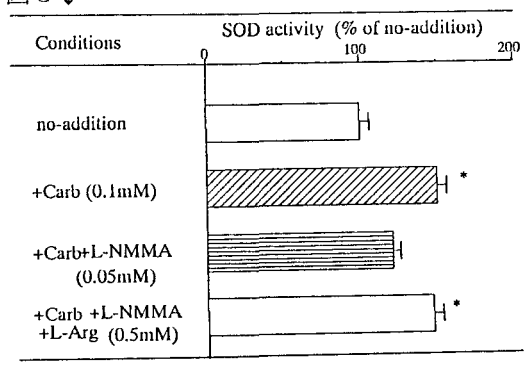


図3． Carb刺激によるSCG内SOD活性化におよぼすL-NMMAの抑制効果とL-Argの回復作用

The value of no-addition is 2.25 ± 0.14 units/mg protein.
* p<0.05 vs no-addition

58 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：サイクリックAMPを介する修飾

加藤兼房、伊東秀記、長谷川かおり、稲熊　裕、小澤　修、浅野富子

（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕　C6 グリオーマ細胞に、熱ストレスあるいは亜砒酸ストレスを負荷すると、細胞可溶性分画の hsp27 とαB クリスタリン（以下 αB）の濃度は増加を示す。ところがストレス負荷時に isoproterenol を共存させると、hsp27 の誘導はさらに促進された。この促進作用は β-adrenergic antagonist である propranolol によって完全に阻止された。また、cholera toxin、forskolin あるいは dibutyryl cAMP を共存させても hsp27 のストレス誘導は促進された。同じ細胞中のαB の誘導は上記の薬剤を共存させると逆に抑制を受けた。一方、hsp70 のストレス誘導はほとんど影響を受けなかった。これらの結果より、C6 グリオーマ細胞における hsp27、αB、および hsp70 のストレス応答は、cAMP を介して異なる修飾を受けていることが推測された。

個体レベルで負荷した熱ストレスに対するストレス蛋白質の応答は多様で、臓器・組織間、あるいはそれらの組織で応答するストレス蛋白質の種類の間に差異があり、ストレス応答が生理的因子によって修飾を受けていることが推測される。我々は、低分子量ストレス蛋白質であるhsp27とαB のストレス誘導が、アラキドン酸カスケードの代謝活性と連関し、細胞質での遊離アラキドン酸濃度の上昇を通して、hsp27、αB および hsp70 のストレス応答が促進されることを報告してきた (1)。hsp70 遺伝子のプロモーター部分に存在する CRE (Cyclic AMP Responsive Element) が hsp70 の転写活性促進に関与していることを示唆する報告 (2) があるが、細胞レベルで cAMP によってストレス誘導が促進されることを示す結果は得られていない。今回、我々は、C6 細胞にストレスを負荷する際に、β-adrenergic agonist である isoproterenol、Gsを活性化する cholera toxin、adenylate cyclase を活性化する forskolin、および dibutyryl cAMP など細胞内 cAMP 濃度を上昇させる薬物を共存させると、hsp27とαB、のストレス応答が修飾されることを見つけたので報告する。

【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43℃で30 分間加熱負荷した。亜砒酸ストレスは、薬剤と同時期に50-100 μM 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 -20℃ で保存した。各 dish の細胞は0.3 m l 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 (3, 4) 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。Northern blot 法による mRNA の解析は、ストレス負荷後 6 時間の細胞よりRNA を抽出し、電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、それぞれの cDNA probe と hybridize した。

【結果】

confluent 培養のC6 中の hsp27 は 0.5 ng/mg protein 以下、αB は10-30 ng/mgと低濃度であるが、中程度の亜砒酸ストレス(50-100 μM/1h)で, 16 時間後には hsp27 は 30 - 60 ng/mg、αB は100-1000 ng/mg 前後の濃度に増加した。この亜砒酸ストレス負荷を、isoproterenol (20 μM) の共存下で行うと、hsp27 の誘導が促進された(Fig.1)。Isoproterenol の誘導促進作用は濃度依存的であった (Fig. 2)。しかし、αB の誘導は、逆に isoproterenol によって抑

制された (Fig. 2) 。Gsを活性化するcholera toxin (2 μg/ml)、adenylate cyclase を活性化するforskolin (20 μM) およびdibutyry cAMP (2.5 mM) も亜砒酸ストレスによるhsp27の誘導を促進し、αB の誘導は抑制した (Fig. 3) 。また、同じ検体中の hsp70 の応答は、hsp27 およびαB と異なり、上記の薬物によってほとんど修飾されないことが 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 (Fig. 4) 。

【考察】

上記の結果は、C6 細胞における低分子量ストレス蛋白質のストレス応答が細胞内 cAMP 濃度の上昇、すなわちprotein kinase A によるリン酸化反応を介して修飾を受けていることを示唆している。しかし、そのリン酸化がそれぞれのストレス蛋白質の発現量に異なる効果をもたらしている機構については不明である。

【文献】

1) Ito, H., et al. (1994) Bulll. Japan. Neurochem. Soc. 33, 208-209
2) Choi, H-S., et al. (1991) J. Biol. Chem., 266, 11858-11865
3) Inaguma, Y., et al. (1993) J. Biochem., 114, 378-384
4) Kato, K., et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta, 1074, 201-208

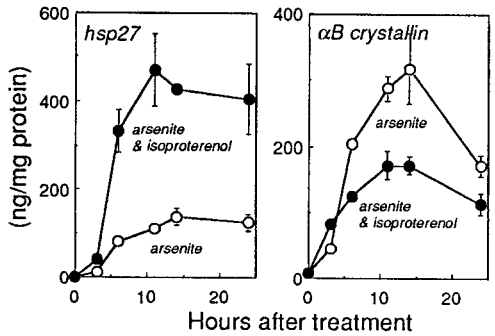


Fig. 1. Effect of isoproterenol on the arsenite-induced accumulation of hsp27 and αB crystallin

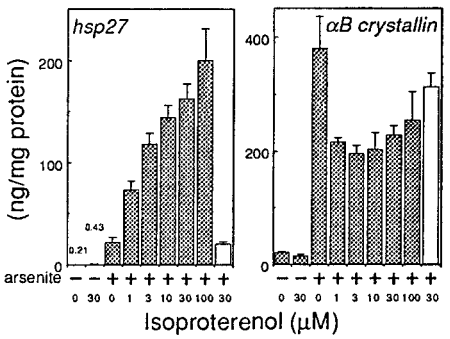


Fig. 2. Dose-dependent stimulation of the arsenite-induced accumulation of hsp27 by isoproterenol
open column: plus 50 μM propranolol

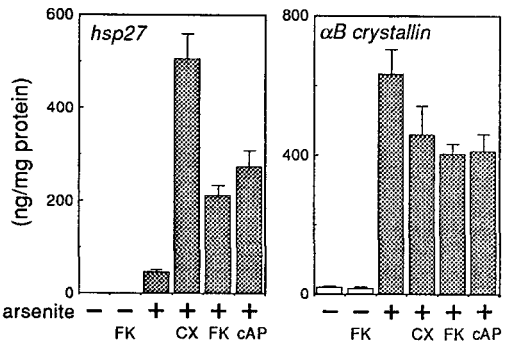


Fig. 3. Stimulation of the arsenite-induced accumulation of hsp27 andαB crystallin by cholera toxin (CX), forskolin (FK) or dibutyryl cAMP (cAP).

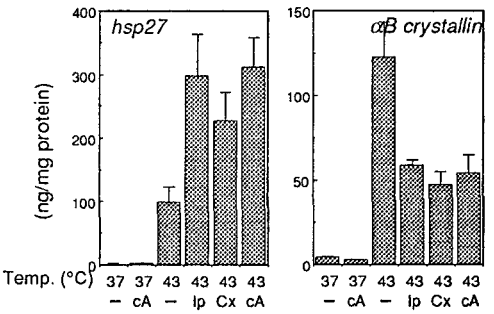


Fig. 4. Effects of isoproterenol (Ip), cholera toxin (Cx) and dibutyryl cAMP (cA) on the heat-stress responses of hsp27 and αB crystallin

59 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：ホルボールエステルおよびオカダ酸による促進

加藤兼房、稲熊　裕、伊東秀記、長谷川かおり、浅野富子、小澤　修
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕C6 グリオーマ細胞に、熱ストレスあるいは亜砒酸ストレスを負荷すると、細胞可溶性分画 hsp27 と αB クリスタリン（以下 αB）の濃度は増加を示す。ところがストレス負荷時にホルボールエステル (PMA) あるいはオカダ酸 (OA) を共存させると、αB とhsp27 の誘導はさらに促進された。この促進作用は熱ストレス誘導の場合でも認められた。また、PMA とOA を同時に作用させるとストレス誘導はさらに促進された。これらの促進作用は phospholipase A2 の阻害剤である quinacrine によって抑制された。一方、細胞からのアラキドン酸遊離も上記のストレス応答と同じようにPMA, OA によって促進されることから、PMA, OA によるストレス応答の促進は、phospholipase A2 の活性化に伴うアラキドン酸カスケードの代謝回転の増加を介して発揮されていることが示唆された。

我々は昨年の本会で、低分子量ストレス蛋白質であるhsp27とαB のストレス誘導が、phospholipase A2 の活性化剤である melittin, mastoparan や、cyclooxygenase, lipoxygenase の阻害剤である indomethacin, nordihydroguaiaretic acid によって著しく促進されること、すなわち、ストレス誘導がアラキドン酸カスケードの代謝活性と連関し、細胞質での遊離アラキドン酸濃度の上昇を通して促進されることを報告した (1)。今回、我々は、C6 細胞にストレスを負荷する際に、protein kinase C (PKC) を活性化するphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、あるいは phosphoserine/phosphothreonine protein phosphatase の阻害剤であるオカダ酸 (OA) を、ストレス負荷時に共存させると、hsp27 とαB、とくにαB のストレス応答が著しく増幅されること、PMA、OA は phospholipase A2 を活性化してアラキドン酸カスケード代謝回転を増加させ、これがストレス応答を促進していることを示す結果を得たので報告する。

【実験方法】

前演題と同じ。

【結果】

confluent 培養の C6 中の hsp27 は 0.5 ng/mg protein 以下、αB は10-30 ng/mgと低濃度であるが、中程度の亜砒酸ストレス (50-100 μM/1 h) あるいは熱ストレス (43℃/30 min) で, 16時間後には hsp27 は 5-50 ng/mg、αB は100-1000 ng/mg の濃度に増加した。このストレス負荷を、PMA (0.1 μM) あるいは OA (0.1-0.2 μM) の共存下で行うと、αB とhsp27 の誘導が促進された (Figs.1, 2)。同じ検体中の hsp70 の応答も PMA, OA によって促進されることが Western blot および Northern blot 分析で分かった。PMA によるストレス誘導の促進は OA 添加によってさらに促進されたが、PKC の阻害剤である staurosporine によって阻止された (Fig. 3)。また phospholipase A2 の阻害剤である quinacrine によっても阻止された。一方、予め取り込ませた[^{3}H]アラキドン酸の、亜砒酸ナトリウム存在下での細胞外遊離は、PMA によって促進され、PMA＋OA によってさらに促進された (Fig. 4)。

【考察】

上記の結果は、C6 細胞における低分子量ストレス蛋白質のストレス応答が PKC によるリン酸化反応を介して修飾を受けていることを示唆している。最近 phospholipase A2 (ser-505) が MAP kinase によってリン酸化され、活性化されること、同じ位置のセリン残基のリン酸化が細胞を PMA 処理した時も見られることが報告されている (2)。PMA によって活性化された PKC が MAP kinase を活性化し、つづいて phosplipase A2 が活性化され、細胞膜 phospholipid からのアラキドン酸の産生が促進され、これがストレス応答を促進すると考えられる。OA も MAP kinase cascade member の脱リン酸化反応による不活化を阻止することにより、結果として phospholipase A2 の活性化に寄与していると思われる。

【文献】

1. Ito, H., et al. (1994) Bulll. Japan. Neurochem. Soc. 33, 208-209

2 Lin, L-L., et al. (1993) Cell, 72, 269-278

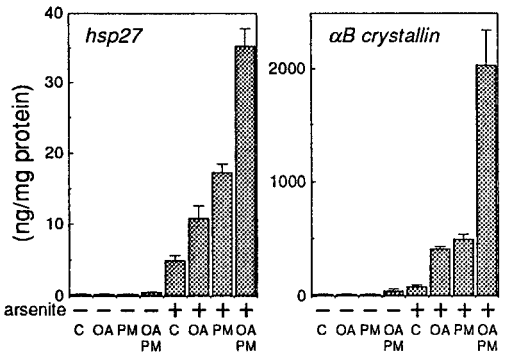


Fig. 1. Stimulation of the arsenite-induced accumulation of hsp27 & αB crystallin by PMA (PM) and okadaic acid (OA)

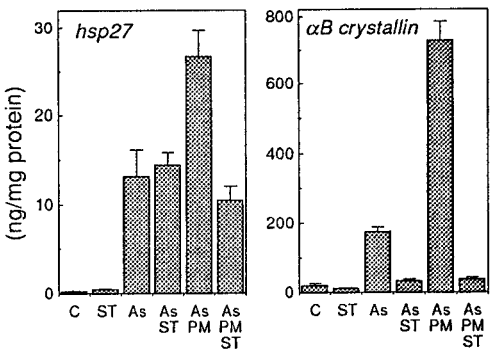


Fig. 3. Inhibition by staurosporine (ST) of the stimulatory effect of PMA (PM) on arsenite (As)- induced responses

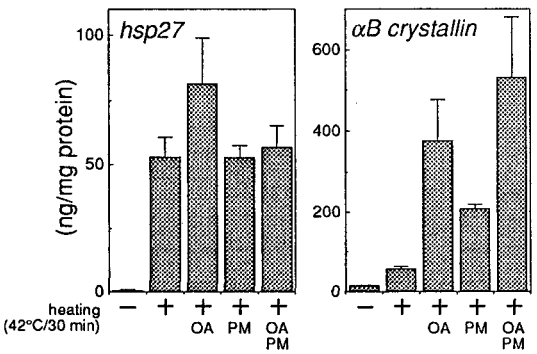


Fig. 2. Effects of PMA and OA on the heat-induced accumulation of hsp27 and αB crystallin

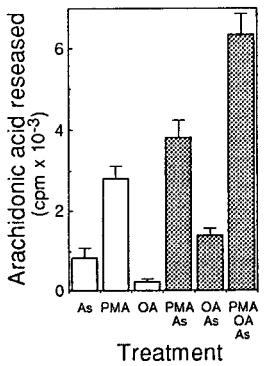


Fig. 4. Stimulation of the release of arachidonic acid by PMA and OA

60 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: プロスタグランジンによる修飾

伊東秀記、稲熊　裕、長谷川かおり、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）はほとん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く増加した。ストレス負荷時に種々のプロスタグランジン（以下PG）を共存させるとhsp27とαBの誘導はさらに促進された。同じ条件下で両蛋白質のmRNAの発現も促進されていた。しかしながら、PGを単独で作用させた場合には両蛋白質の誘導はほとんどみられなかった。以上のことから各種のPGは、confluent培養時のC6グリオーマ細胞に対して、それ自身は、hsp27とαBを誘導する作用は持たないが、ストレスと共存した場合には両蛋白質の誘導を遺伝子発現のレベルで促進することが示唆された。

我々は昨年の本会で、低分子量ストレス蛋白質、hsp27とαBのストレス誘導が、アラキドン酸カスケードの代謝回転と密接に連関し、細胞内遊離アラキドン酸濃度が上昇している状態ではストレス応答が増幅されることを報告した(1)。一方、cyclopentenone構造を持つプロスタグランジン(PGA1、PGA2、PGJ2)が、hsp70あるいはhsp90の誘導を引き起こすことが報告されている(2-5)。その誘導は、HSFのDNA結合能の活性化を伴っており(4, 5)、遺伝子発現の段階での制御が報告されている。また、PGによるストレス蛋白質の誘導は、G1 phaseの細胞や(2)、growing phaseの細胞に対して起こり(4)、confluentの細胞に対しては起こらないことが報告されており(4)、細胞周期とストレス蛋白質の発現との関連が示唆されている。今回我々は、低分子量ストレス蛋白質であるhsp27とαBのストレス応答が、各種のPG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】

前演題と同じ。

【結果】

confluent培養のC6中のhsp27は0.5 ng/mg protein以下、αBは10-30 ng/mgと低濃度であるが、中程度の亜砒酸ストレス(50 μM/1 h)で16時間後にはhsp27は数ng/mg、αBは100 ng/mg前後の濃度に増加した。この亜砒酸ストレス負荷をPGA1、PGA2、あるいはPGJ2の共存下に行うと、両蛋白質の誘導は促進された(Figs. 1, 2)。さらに、PGE2、PGD2を共存させても両蛋白質の誘導は促進された(Figs. 1, 4)。また、同じ検体中のhsp70の応答は、hsp27およびαBと同様に促進されていることが、Western blot分析で分かった。さらに、Northern blot分析によって、これらの条件下では、hsp70、hsp27およびαBのmRNAの発現が高進していることが分かった。しかしながら、各種のプロスタグランジンを単独で作用させた場合には、両蛋白質の誘導は起こらなかった。また、熱ストレス(42℃/15 min)の促進作用は軽度であった(Fig. 3)。

【考察】

低分子量ストレス蛋白質のストレス応答も、cyclopentenone 構造を持つプロスタグランジン (PGA1、PGA2、PGJ2) によって、増幅され、さらにそれらの前駆体であると考えられている PGE2、PGD2によっても増幅された。PGE2、PGD2 が代謝されて、作用している可能性もあり今後、これらの作用機構を明らかにするとともに、その生理的意義の解明を目指したい。

【文献】

1 Ito, H., et al. (1994) Bulll. Japan. Neurochem. Soc. 33, 208-209

2. Ohno, K., et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 19764-19770

3. Santoro, M.G., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, 8407-8411

4. Holbrook, N.J., et al. (1992) Mol. Cell. Biol., 12, 1528-1534

5. Amici, C., et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89,6227-6231

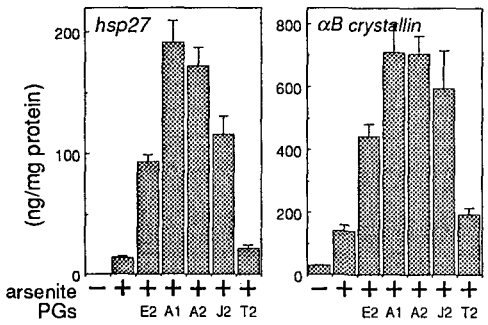


Fig. 1. Stimulation by prostaglandins of arsenite-induced responses in C6 cells
T2 : Thromboxane B2

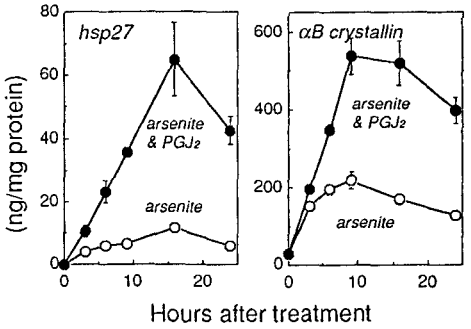


Fig. 2. Time-course of the accumulation of hsp27 and αB crystallin induced by arsenite ± PGJ2

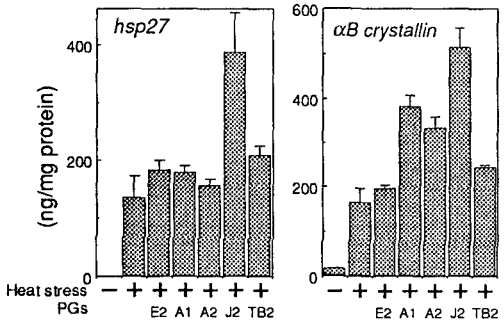


Fig. 3. Stimulation by prostaglandins of heat-induced responses in C6 cells

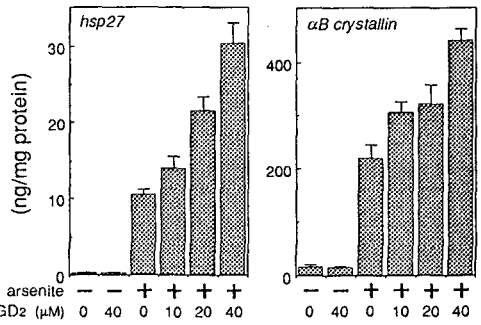


Fig. 4. Stimulation by PGD2 of the arsenite-induced responses in C6 cells

61 大脳皮質βアドレナリン受容体－Gs－アデニル酸シクラーゼ情報伝達系機能調節へのビタミンB_{12}の関与

八田愼一、渡部正行*、小澤寛樹*、齋藤利和*、高畑直彦*、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〕 ビタミンB_{12}(VB_{12})が細胞情報伝達系で果たしている役割を検討する目的で、VB_{12}欠乏ラット(Lack)を用い、βアドレナリン受容体(βAR)－Gs－アデニル酸シクラーゼ(AC)情報伝達系の変化について検討した。Lack大脳皮質膜標品の AC basal活性、forskolin、GppNHp、isoproterenol刺激性AC活性は対照群(Cont)と比較して有意に低下していた。一方、Gs蛋白質量、Gs機能、βARの数および親和性について検討した結果、Cont、Lack間での差異は認められなかった。これらの結果は、VB_{12}の欠乏に伴ってAC触媒サブユニット機能の低下と、βAR－Gs－AC間の機能的共役の障害が生じていることを示唆し、VB_{12}はAC情報伝達系の機能発現のために必要な細胞膜環境を構築することに関与しているものと推測された。

【目的】 様々な精神神経疾患およびその症状とビタミンB_{12}(VB_{12})欠乏との関連性は以前から指摘されてきた(1)。さらに近年、Alzheimer病における視覚認知障害との関係も示唆されている。また睡眠・覚醒リズム障害に対するメチルVB_{12}［メコバラミン］(mVB_{12})の有効性や、mVB_{12}がその合成に関与していることの知られているS－adenosyl－L－methionine(SAM)の抗うつ効果も報告されている。このようにVB_{12}が中枢神経系における細胞反応性の調節に関与していることを示唆する報告は多いが、しかし、その詳細な調節機序は明らかでない。先に我々は、この点について検討する目的で、mVB_{12}欠乏ラットのアデニル酸シクラーゼ(AC)情報伝達系について解析を行った(8)。その結果、VB_{12}欠乏によってAC触媒サブユニット(CAT)の機能低下およびGs－CATの共役障害の生じていることが示された。一方、受容体を介した情報伝達におけるVB_{12}の役割についてはまだ明らかではなく、この点を検討するため、本研究はmVB_{12}欠乏ラットを用い、大脳皮質βアドレナリン受容体(βAR)－Gs－AC情報伝達系の変化について解析を行った。

【方法】 Sprague－Dawley系雄性ラットを用い、mVB_{12}欠乏ラット(Lack)を既報の方法(8)に従って作成した。大脳皮質膜分画の調製、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、G蛋白質αサブユニットのimmunoblottingおよび[^{125}I]pindololによるβAR結合実験は既報 の方法(2,3,7)で行った。

【結果】 Lack大脳皮質膜標品のforskolin(100μM)刺激性AC活性ならびにbasal活性は対照群(Cont)と比較して有意に低下し(結果未提示)、GppNHp(10^{-8}～10^{-4})依存性AC活性でも有意な減少が認められた(Fig.1)。さらに、GppNHp(10^{-6})存在下、isoproterenol(10^{-8}～10^{-4})(ISP)によるACの活性化は、Lackで有意に減弱していた(Fig.2)。一方、βAR結合実験の結果、ContとLackでβAR数および結合親和性での差異はみられなかった(Table 1)。さらに、G蛋白質のimmunoblotting、および[^{32}P]AAGTPを用いた photoaffinity labelingによるグアニンヌクレオチド(GN)結合活性の解析結果でも、G蛋白質サブユニット（αs、αi、αo、αq) 量 (結果未提示)ならびにGsおよびGiでのGN結合活性で両群間での有意な差は認められなかった(Fig. 3)。

【考察】 本研究の結果、Lackでの basal AC活性ならびにforskolin、GppNHp、ISP刺激性活性の低下が観察された。Basal活性と forskolin刺激によるAC活性の低下はLackでのCAT機能の低下を示唆し、このことは先に報告した結果(8)と一致していた。一方、GppNHpおよびISP刺激性AC活性の低下は、ContとLack間でGs蛋白質量、Gs機能、βAR数および親和性での差異が認められなかったことから、βAR－Gs－CAT間での共役機能の障害によるものと考えられた。

VB_{12}欠乏に伴うCAT機能の低下や情報伝達系構成成分間の共役機能障害の原因についてはまだ明白ではない。VB_{12}はSAMの合成に関与し、さらにSAMはメチル基供与体としてphosphatidylethanolamine(PE)のメチル化反応に寄与している。この結果、細胞膜表面で生成されるphosphatidylcholine(PC)によって膜流動性は亢進する。βAR刺激時にはPEのメチル化反応が促進され、その結果生じる膜流動性の亢進はβARとGsとの共役に有利な環境をもたらすことが示唆されている(5)。実際、VB_{12}欠乏に伴ったPC量の低下が報告されており(6)、その結果として膜流動性低下の生じていることが推測される。さらに、CATの機能発現と細胞膜PCとの関連が指摘されている(4)。これらのことから、VB_{12}欠乏に伴って生じるPC量と膜流動性の低下によってCAT機能の低下ならびに共役機能の障害がもたらされている可能性が考えられ、AC系の機能障害の結果、細胞でのcAMP産生は低下し様々な精神神経疾患の要因となる細胞応答異常がもたらされるのであろう。今後さらに検討を加え、これらの点について明らかにしたい。

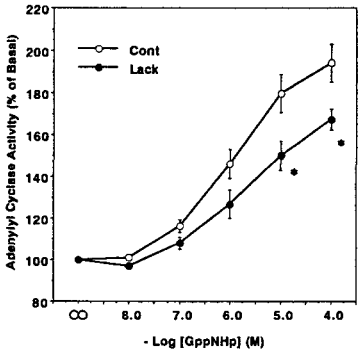


Fig. 1 GppNHp-dependent activation of adenylyl cyclase in control(Cont) and mecobalamin-deficient (Lack) rats. The values are mean ± SEM of six experiments.

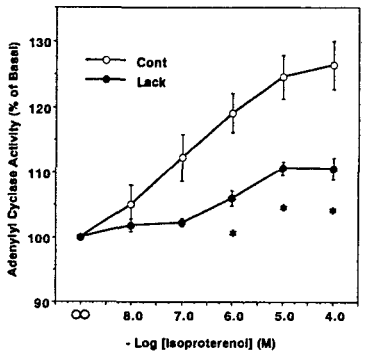


Fig. 2 Activation of isoproterenol-sensitive adenylyl cyclase in control(Cont) and mecobalamin-deficient (Lack) rats. Adenylyl cyclase was assayed in the presence of 10^{-6} M GppNHp. The values are mean ± SEM of six experiments.

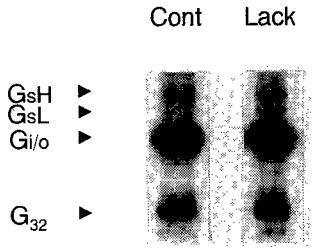


Fig. 3 Photoaffinity labeling of [^{32}P]AAGTP in cotrol(Cont) and mecobalamin-deficient (Lack) rats. The autoradiographs are representative of six similar experiments.

Table 1 Binding characteristics for [^{125}I]pindolol in cerebral cortex membranes from control (Cont) and mecobalamin-deficient (Lack) rats.

Treatment	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (pM)
Control	62.64 ± 1.37	182.26 ± 8.36
Lack	60.63 ± 1.63	181.97 ± 9.80

The values are mean ± SEM of six experiments.

【文献】

(1) Dommisse J. (1991) Medical Hypotheses 34, 131-140
(2) Hatta S., Maucus M.M., and Rasenick M.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5439-5443
(3) Hatta S., Ozawa H., Saito T., and Ohshika H. (1994) J. Neurochem. 63, 1104-1110
(4) Hebdon G.M., LeVine H., Sahyoun N.E., Schmitges C.J., and Cuatrecasas P. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 120-123
(5) Hirata F., Strittmatter W.J., and Axelrod J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 368-372
(6) Kennedy D.G., Blanchflower W.J., Scott J.M., Weir D.G., Molloy A.M., Kennedy S., and Young P.B. (1992) J. Nutr. 122, 1384-1390
(7) Takemura H., Hatta S., Yamada K., and Ohshika H. (1995) Life Sci. (in press)
(8) Watanabe M., Hatta S., Ikeda H., Saito T., and Takahata N. (1995) Neurosci. Res. Commun. (in press)

62 小脳選択性を示す抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質

米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕脳内各部位の可溶性画分および細胞核画分中のリン酸化チロシン、リン酸化セリンおよびリン酸化スレオニンの各抗体陽性蛋白質の一斉分析をウエスタンブロッティング法により行った。小脳の可溶性画分には、他の脳内部位には検出されない分子量70 kDaの抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質(YPP70)が見出された。さらに、小脳の細胞核画分には他のいずれの脳内部位にも検出されない2種類の抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質が見出された。一方、抗リン酸化セリン抗体および抗リン酸化スレオニン抗体の陽性蛋白質は、いずれの脳内部位においても著しい変化は認められなかった。小脳可溶性画分を用いて、YPP70をイオン交換クロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィおよび調製用SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)により単一バンドにまで単離精製した。以上の結果より、小脳の可溶性画分には選択性の高いチロシンリン酸化蛋白質が存在する可能性が示唆される。

真核細胞の細胞内シグナル伝達には、各種機能蛋白質のリン酸化・脱リン酸化が大きく関与することは周知の事実である。細胞膜から細胞核へのシグナル伝達の経路の一つであるMAPキナーゼカスケードも関連酵素蛋白質のチロシン残基、セリン残基あるいはスレオニン残基のリン酸化および脱リン酸化により制御される(2)。また、細胞核内転写制御因子についても、activator protein 1(AP1)の構成蛋白質であるc-Jun蛋白質のホモダイマーのDNA結合能および転写活性がセリン残基のリン酸化・脱リン酸化により調節されること(4)、cAMP response element binding protein(CREB)の転写活性がセリン残基のリン酸化により促進されること(3)、あるいはMaxホモダイマーのDNA結合能がセリン残基のリン酸化により阻害されること(1)などが知られている。

一方、N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターの活性化によるAP1のDNA結合能の増強反応(5)およびCREBのリン酸化反応が海馬と小脳では明らかに異なる事実は、細胞膜から細胞核へのシグナル伝達あるいは細胞核内でのリン酸化・脱リン酸化メカニズムに脳内選択性が存在する可能性を推察させるものである。したがって本研究では、マウス脳内各部位の可溶性画分および細胞核画分における各種リン酸化蛋白質の一斉分析を、各種抗リン酸化アミノ酸抗体を用いたウエスタンブロッティング法により行った。

〔実験方法〕

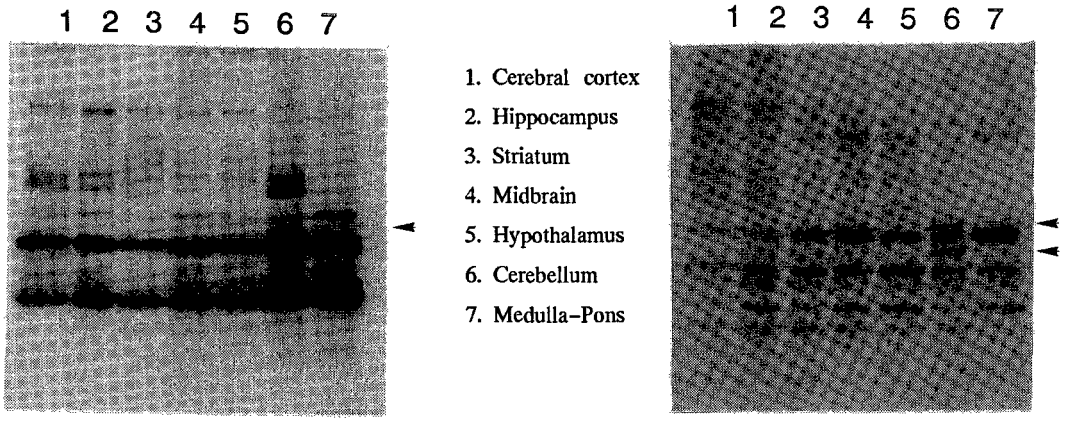
未処置ddY雄性マウス脳を7部位に分画した。脳内各部位を、10mM ピロリン酸ナトリウム、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM EDTA、1 mM EGTAおよび各種蛋白質分解酵素阻害薬を含む20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)でホモジナイズしたのち、20,000gで30分間の遠心分離により可溶性画分を得た。細胞核画分は上記緩衝液でホモジナイズしたのち、ノニデットP-40を用いた方法により調製した。得られた可溶性画分および細胞核画分は、2%SDSおよび5%メルカプトエタノール中で5分間煮沸したのち、SDS-PAGEに適用した。PVDF膜に転写後、リン酸化チロシン、リン酸化セリンあるいはリン酸化スレオニンのモノクローナル抗体およびパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体と反応させた。各抗体陽性蛋白質の検出にはECL法を用いた。

〔実験結果〕

海馬および小脳の可溶性画分には、SDS-PAGE上同一の移動度を持つ数種類の抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質が検出されたが、分子量70 kDaと推定される位置に小脳のみに検出される抗体陽性蛋白質(YPP70)が見出された。このYPP70は、海馬のみならず小脳以外のいずれの脳内部位にも検出されなかった(図1A)。小脳をオルトバナジン酸を除いた緩衝液でホモジナイズした場合、YPP70の抗体反応性は完全に消失した。次に、脳内各部位の細胞核画分について抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質の検索を行ったところ、分子量70 kDaおよび64 kDaの2種類の陽性蛋白質が

小脳に選択的に検出されることが判明した(図1B)。一方、リン酸化セリンおよびリン酸化スレオニンの各抗体陽性蛋白質に関しては、可溶性画分および細胞核画分の両者で脳内部位による量的変化は認められたが、脳内部位に選択的なものは見出されなかった。小脳可溶性画分をDEAEトヨパールカラムに適用したのち、蛋白質をKClの直線的濃度勾配法で溶出したところ、YPP70は0.2 M KCl付近に溶出された。次いで、トヨパールHW-60Fカラムによるサイズ排除クロマトグラフィおよび調製用SDS-PAGEによりYPP70が電気泳動上単一にまで精製された。

図1. 抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質



〔考察〕

本研究では、未処置マウス小脳の可溶性画分および細胞核画分に特異的な数種の抗リン酸化チロシン抗体陽性蛋白質が存在する可能性が示された。中でも、YPP70の抗リン酸化チロシン抗体反応性がチロシンホスファターゼ阻害薬のオルトバナジン酸の添加で影響される事実は、YPP70がチロシンホスファターゼ高感受性を持つチロシンリン酸化蛋白質であり、細胞内シグナル伝達に深く関与する可能性を推察させるものである。また、本研究ではチロシンリン酸化されたYPP70の小脳局在性は明白であるが、小脳以外の脳内部位にも脱リン酸化されたYPP70が存在する可能性は現時点では否定できない。したがって、単離精製したYPP70の蛋白質化学的解析および小脳におけるYPP70の機能解析が今後の課題である。

〔謝辞〕

本研究の一部は、厚生省精神・神経疾患研究委託費(5公-1-17)の援助の下に行われた。

〔文献〕

(1) Berberich, S.J. and Cole, M.D. (1992) Genes & Development 6, 166-176.

(2) Blenis, J. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5889-5892.

(3) Gonzalez, G.A. and Montminy, M.R. (1989) Cell, 59, 675-680.

(4) Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M. and Karin, M. (1991) Nature, 354, 494-496.

(5) Yoneda, Y. and Ogita, K. (1994) Neurochem. Int. 25, 263-271.

63 PC12細胞分化へのCa^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII強制発現の影響とMAP2燐酸化反応

田島和周、山本秀幸、小野常彦、宮本英七
(熊本大・医・第一薬理)

〔要約〕

Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMキナーゼII) αサブユニットのcDNAをPC12細胞に強制導入し、安定クローン細胞を確立した。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、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。すなわち強制発現したCaMキナーゼIIが細胞内で機能しえること、神経突起形成抑制に関与することが示唆された。さらにこれらの細胞を用いて、微小管付随蛋白質2 (MAP2) の燐酸化反応および脱燐酸化反応について検討した。

［目的］

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)。またMAP2は、主要な微小管付随蛋白質のひとつであり、その燐酸化反応により微小管あるいは他の細胞骨格との相互作用が変化することが知られている(2)。今回我々は、CaMキナーゼIIを多量に発現する安定クローン細胞を確立し、本酵素の神経突起伸展に及ぼす役割と、細胞内でのMAP2の燐酸化反応の変化について検討した。

［方法］

マウス脳CaMキナーゼIIα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）(3)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）に組み込み、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来のPC12細胞に強制導入し、複数の安定クローン細胞を得た。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。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。MAP2の燐酸化反応は、細胞を^{32}P-正燐酸でラベルし、イオノマイシン刺激を加えた後に、0.2% SDSと1.2% NP-40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。

［結果と考察］

CaMキナーゼII活性が上昇した安定クローン細胞を確立した。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。イオノマイシン2μM 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。

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II α を導入した細胞では、CaMキナーゼII活性が高い細胞ほど神経突起伸展が抑制された。cAMP依存性キナーゼ活性とMAPキナーゼ活性は、いずれの細胞においても有意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が神経突起伸展を抑制していることを示唆している。

MAP2の細胞内での燐酸化反応について検討した（図1）。wild type細胞では、イオノマイシン2μM刺激でのMAP2の燐酸化反応は、ほとんど変化しなかった。5μM刺激ではその燐酸化反応は著明に減少した。Wild type細胞に比べ約2倍CaMキナーゼ活性が高い α 10細胞では、非刺激時よりMAP2の燐酸化反応はwild typer細胞の約140%と高く、イオノマイシン2μM刺激で燐酸化反応はさらに増加した。イオノマイシン5μM刺激ではMAP2の燐酸化は減少した。両方の細胞でいずれの条件でも[^{35}S]methionineでラベルしたMAP2量に変化は認められなかった。これらの結果は、CaMキナーゼIIの強制発現により、MAP2の燐酸化が増加すること、細胞内でのCa^{2+}濃度の著明な増加により脱燐酸化が引き起こされることが示唆された。今後、MAP2の脱燐酸化反応に対するカルシニューリンの関与を確認するとともにNGFやアセチルコリン刺激時のMAP2の燐酸化反応の変化についても検討する予定である。

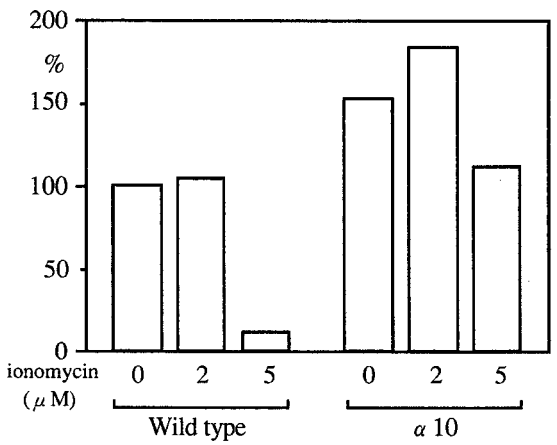


図1　イオノマイシン刺激によるMAP2の燐酸化反応
イオノマイシン2μM あるいは5μM 5分間の刺激によるMAP2の燐酸化量を非刺激時のwild type の値を100%として表示した。
実験は4回繰り返し、再現性を確認した。図には代表的一例を示す。

1)Hanson, P.I. and Schulman, H. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 559-601

2)Goedert, M., Crowther, R.A., and Garner, C.C. (1991) *Trnds Neurosci.* **14**, 193-199

3)Hanley, R.M., Payne, M.E., Cruzalegui, F., Christenson, M.A., and Means, A.R. (1989) *Nucleic Acid Res.* **17**, 3992

64 Sodium fluorideによるホスホリパーゼCの抑制作用

西田　朗[1)]、福田裕恭[1)2)]、清水雅美[1)]
斎藤　浩[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sodium　fluoride(NaF)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。NaFは1　mM以上から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(IC50は約5mM)。30mM以上のNaFはほぼ完全にPLC活性を抑制した。また、GTPγSやGDPβSは単独ではPLCに有意な作用を示さず、NaFによるPLCの抑制にも作用しなかった。これらのことから、NaFはGタンパク質を介した間接作用ではなく、PLCを直接抑制することが示唆された。

［目的］
ホスホリパーゼC(PLC)の活性化機構には受容体チロシンキナーゼによるものとGTP結合タンパク質（Gタンパク質）によるものとがある(1)。Gタンパク質によるPLCの活性化は、Gqファミリーのαサブユニットによるものと、Gタンパク質のβγサブユニットによるものとが明らかにされている。一方、最近ではGタンパク質によるPLCの抑制機構の存在が注目されてきている(2,3)。この抑制機構の解明に、Gタンパク質の活性化試薬としてsodium　fluoride(NaF)が使用され、GタンパクによるPLCの抑制機構の存在の傍証となっている。しかし我々は、NaF-が1　mM以上から、膜画分と細胞質画分のPLCを抑制し、30mM以上ではほぼ完全にPLC活性を抑制することを見出した。これらの結果は、NaFがGタンパク質を介した間接作用ではなく、PLCを直接抑制すること示唆する。

［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。

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-bisphosphateと膜または細胞質画分(0.5μg)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］
NaFのPLC活性への作用
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NaFにより濃度依存性に抑制された(図1)。IC50は膜画分では5.44mM、細胞質画分では4.83mMだった。30m

M以上のNaFはほぼ完全にPLC活性を抑制した。

グアニンヌクレオチドのPLC活性への作用

グアニンヌクレオチドの非水解性アナログであるGTPγSやGDPβS(各々10 μM)は単独ではPLC-に有意な作用を示さなかった。更に、GTPγSやGDPβSはNaFによるPLCの抑制にも作用しなかった。

[考察]

NaF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)に分類されており(1)、PLCγは受容体チロシンキナーゼにより、PLCβはGタンパク質により活性化されることが解っている。30mM以上のNaFはほぼ完全にPLC活性を抑制したことから、PLCのアイソザイムを非特異的に抑制すると考えられた。この結果も、NaFの作用がGタンパク質を介したものではなく、直接作用によることを示唆する。更に、GTPγSやGDPβSはNaFによるPLCの抑制にも拮抗しなかったこともGタンパク質を介した抑制でないことを支持する。

Gタンパク質によるPLCの抑制機構が存在することはほぼ間違いない。しかし、その制御はGタンパク質のアイソザイムや、αとβγの各サブユニットのタイプにより複雑になされるために解明が困難と考えられてきている。ただし、過去の研究ではGタンパク質活性化とPLCの活性制御機構の研究にNaFを使用したために、解析がより複雑になった可能性が示唆される。今後は、その解析を進める上で、NaFの使用には十分な注意が必要と思われる。

[文献]

1)Cockcroft, S. and Thomas, G.M. (1992) Biochem. J. 228, 1-14 2)Litosch, I. et al (1993) J. Biol. Chem. 268, 8692-8697. 3)Watkins, D.C. et al (1994) Biochem. J. 299, 593-596 4)斎藤ら (1992), 神経化学 32, 462-463.

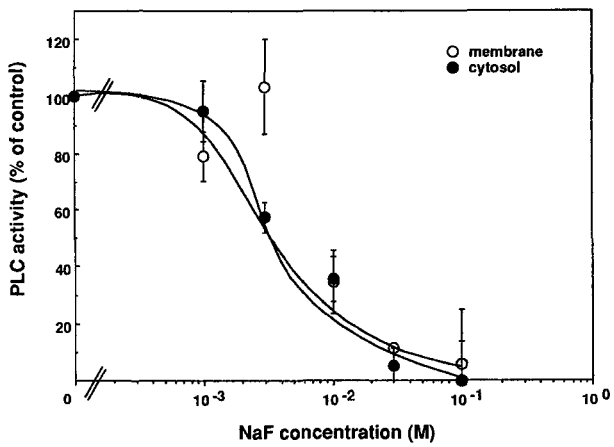


Fig. 1 Effect of NaF concentration on PLC activity

65 組換え型14-3-3蛋白質によるトリプトファン水酸化酵素活性化の分子機構

市村徹、内山順二、伊藤美津樹、堀米恒好、小俣三郎、国広沖之*、梶裕之*、礒辺俊明*
（新潟大理学部化学、*東京都立大学理学部生物化学）

〔要約〕
pGEX-3X発現ベクターに14-3-3蛋白質（以下14-3-3）のη鎖cDNAを挿入したプラスミドを作成し、大腸菌でGST-14-3-3η融合蛋白質を発現した。この組換え型蛋白質は、ウシ脳から分離した14-3-3と同様に、トリプトファン水酸化酵素(以下TRH)を約1.7倍活性化した。またこの活性化はCa^{2+}/CaIMキナーゼによる水酸化酵素のリン酸化に完全に依存した。グルタチオンセファロースを用いて組換え型14-3-3／TRHの結合実験を試みたところ、リン酸化条件下でのみ両蛋白質は複合体を形成することが分かった。これらの結果は、14-3-3はリン酸化されたTRHの活性調節ドメインを標的としてTRHに結合し、その高次構造を変化させることで酵素を活性化するとした分子機構モデルを強く支持した。またこの複合体形成には14-3-3のC末端部分に位置するドメインIIIが重要であることが示唆された。

14-3-3はヒトから酵母にいたるすべての真核細胞に存在する”multigene”ファミリーであり、その分子構造はヒストンやカルモデュリンと同様に極めて高い種保存性を有している。14-3-3には、蛋白質キナーゼが関与するシグナル伝達系での作用を中心に多彩な生理活性が推定されているが、中でもカルシウム依存性蛋白質キナーゼを介した経路でのさまざまな酵素に対する活性化因子としての機能､また(前)ガン関連遺伝子産物であるRaf-1, Bcr, Bcr/Abl, ポリオーマウイルスMT抗原らと結合した細胞の分化、増殖に関わる機能が特に注目されている（5、6）。しかしながら、14-3-3のどのドメインが上述した機能に重要であるのか、またこの蛋白質の多彩な機能は独立したものなのか、それとも細胞内ではクロストークし合っているのか、さらにはそれら以外の機能は存在しないのか等など、依然として多くの点が不明である。本研究では、大腸菌内で発現した組換え型14-3-3と、従来から分子機構が比較的よく調べられているトリプトファン水酸化酵素（TRH）の活性化系を使用して、TRHに対する組換え型14-3-3の分子レベルでの作用を解析するとともに、その結合／活性化ドメインの同定を試みた。

［方法］

PCR法で増幅したウシ14-3-3ηcDNAのORFあるいはその一部に対応するcDNAを、発現ベクター（pGEX-3X; Pharmacia）に組み込み、これを大腸菌（JM109）に導入した。グルタチオンS転移酵素（GST）との融合蛋白質として発現した14-3-3は、グルタチオンセファロース（pharmacia)を用いたアフィニティークロマトグラフィーとDEAE５PWを用いたイオン交換HPLCによって精製した。TRHとカルモデュリン依存性蛋白質キナーゼII (以下PKII）はラット脳幹と大脳灰白質から既法の方法（1）で精製した。TRH活性は既法の手順（4）に従って測定した。

［結果と考察］

精製したGST-14-3-3融合蛋白質は、SDS電気泳動において予想されるサイズ（Mr=54000）の単一バンドであった。この組換え型14-3-3は、ウシ脳から分離した14-3-3と同様に（2、3）、TRHを約1.7倍活性化した（図1、■）。この活性化はPKIIによる酵素のリン酸化に依存しており、リン酸化していない酵素では活性化

は認められなかった（図1、×）。またGSTそのものにはTRH活性化能がなかったことから（図1、○）、この活性化効果は14-3-3分子によるものであると考えられた。

次に、TRHと14-3-3をグルタチオンセファロースゲルとともにインキュベートし、ゲルに吸着したGST-14-3-3にTRHが結合しているかどうかを検討した（図2、レーン3、4）。ゲルのTRH活性を測定したところ、リン酸化条件下で、TRHは14-3-3に結合していることが示された（レーン4：この際、反応系に加えた全TRHの約80％が14-3-3と結合していた）。これに対して、リン酸化していないTRHを用いた場合（レーン3）や、GSTそのものを用いて結合実験を行った場合（レーン1、2）では、TRHと14-3-3、またはGSTとの結合は認められなかった。またこの結果は、TRH抗体を使用したウエスタンブロッテングで、TRHを直接検出することによっても確かめられた。これらの結果は、リン酸化反応に依存してTRHと14-3-3が結合するというこれまでの観察（1）を別の角度から証明するとともに、この結合がTRHの高次構造を変化させ、酵素を活性化するとした仮説（1）を支持するものであった。

TRHとの結合／活性化に関与する14-3-3側の構造を明らかにするために、ドメインIIIを除いた14-3-3（14-3-3η（1-77））を大腸菌で発現し、それを用いて結合／活性化実験を行った。その結果、14-3-3η（1-77）はTRHに対して何の効果を持たない（結合も活性化もしない）ことが分かった（図2、レーン5参照）。このことは、TRHに対する14-3-3側の作用部位としてはドメインIIIが重要であることを示唆している。今後は、ドメインIIIに結合／活性化能があることを確認するとともに、実際の結合部位の同定を行いたい。

TRHの抗体を提供して下さった西東京科学大学の長谷川宏幸博士に感謝致します。

［文献］

1. Furukawa, Y. et al. (1993) *Biochem. Biophy. Res. Commun.* 194, 144-149 2. Ichimura, T et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7084-7088 3. Isobe, T. et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 217, 125-132 4. Yamauchi, T. et al. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5404-5409 5. 市村徹、礒辺俊明 (1995) 生化学、印刷中 6.. 礒辺俊明ら (1995) 実験医学、印刷中

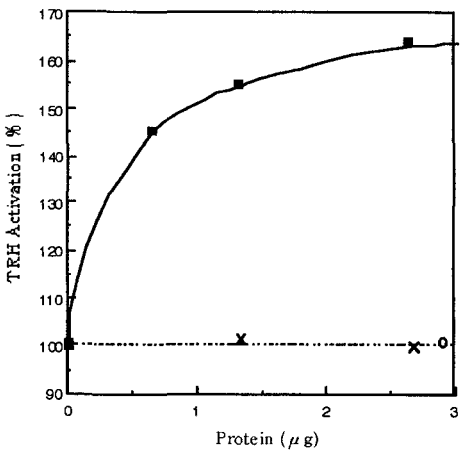
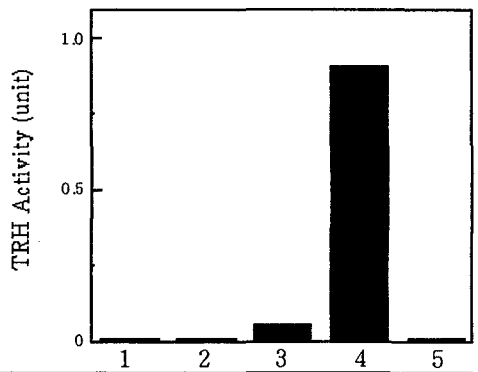


図1.組換え型14-3-3ηによるTRHの活性化

■：GST-14-3-3、o：GST、
×：GST-14-3-3（燐酸化反応を行っていないもの）



	1	2	3	4	5
Phosphoryiation	−	+	−	+	+
GST	+	+	−	−	−
GST/1433η	−	−	+	+	−
GST/1433η(177)	−	−	−	−	+

図2　14-3-3/TRH複合体形成の性質

66 新規ドーパミンD３，D４受容体アンタゴニスト YM-４３６１１の生化学的性質について

日高 和幸，多田 祥子，松本 光之，山口 時男
（山之内製薬株式会社・第一創薬研究所）

〔要約〕

新規ドーパミンD２-like受容体作用薬として創製されたYM-４３６１１のin vitro特性について検討した。YM-４３６１１は、ヒトおよびラットD２-like受容体に高親和性を示し、既存薬とは異なるサブタイプ選択性、すなわちD２受容体に対して約５倍のD３選択性と数１０倍のD４選択性を認めた。YM-４３６１１の受容体作用様式は、ヒトD２，D３，D４受容体をそれぞれ高発現させたCHO細胞株を用いて検討した。YM-４３６１１は、ドーパミン刺激によって各サブタイプ受容体を介して亢進したlow-Km GTP ase活性を抑制した。また、ドーパミンは各サブタイプ受容体を介するadenylate cyclase活性を抑制し、YM-４３６１１はこのドーパミンの用量作用曲線を右方シフトさせた。YM-４３６１１はD２-like受容体以外の神経伝達物質受容体へは非常に弱い親和性を示した。したがって、YM-４３６１１はD３&D４選択性かつ高親和性を有するアンタゴニストである事が明らかになった。

【緒言】 近年の分子生物学の発展により５つのドーパミン受容体遺伝子がクローニングされ、それらはD１-like受容体（D１，D５）とD２-like受容体（D２，D３，D４）のサブファミリーに分類された［１］。D２-like受容体は、古典的分類におけるD２受容体に相当し、精神機能，行動，情動との関連が深く、これら受容体に作用する化合物は抗精神病薬，抗パーキンソン病薬など多数が開発されている。しかしながらD２-like受容体の各サブタイプの生理機能に関しては十分な解明がなされていない［２］。この理由の一つは、薬理学的研究に適したサブタイプ選択的化合物ー特にアンタゴニストーが存在しない事による。我々の研究所で発見されたYM-４３６１１は、既存薬にないD３&D４選択性を有するアンタゴニストである事を見出したので報告する。

【実験方法】 ヒトおよびラットのD２L，D３，D４受容体遺伝子をクローニングし、ラットD４受容体遺伝子はCOS-１細胞に、そのほかの受容体遺伝子はCHO細胞に導入・発現させた。D２-like受容体への親和性は、それぞれの受容体発現細胞の膜標品への［^{3}H］YM-09151-(nemonapride)結合実験によって検討した。D2-like受容体以外の神経伝達物質受容体への親和性は、常法の受容体結合実験によって検討した。low-Km GTP ase活性の測定は、各受容体発現細胞の膜標品における［γ-^{32}P］GTPからのPi遊離量を指標として検討した。Adenylate cyclase活性の測定は、各受容体を発現させたintact cellにおける１０μM forskoline存在下のcAMP産生量を指標として検討した。

【結果と考察】 ラットおよびヒトのD２-like受容体結合実験において、YM-４３６１１は高い親和性を示した。そのサブタイプ選択性は、既存薬と著しく異なり、D２受容体と比較して約５倍のD３選択性と数１０倍のD４選択性を認めた（Table １）。一方、YM- ４３６１１の塩酸塩は

ラットのD1-like, α1, α2, β, 5-HT1A, 5-HT2A, H1, M1, M2受容体結合実験において非常に弱い親和性しか認めなかった（Ki≧4900nM）。

ヒトD2-like受容体を高発現させたCHO単クローン細胞株より調製した膜標品は、それぞれドーパミン刺激によってlow-Km GTP ase活性を用量依存的に亢進させた。このドーパミンの作用は、YM-43611を含むD2-like受容体遮断薬によって阻害され、その阻害強度は結合実験における受容体親和性に相関した。また、いずれの受容体発現細胞株を用いてもドーパミン刺激によってadenylate cyclase活性が用量依存的に抑制された。YM-43611はこのドーパミンの用量作用曲線を右方シフトさせ、競合的アンタゴニストである事を示唆した（Fig. 1）。

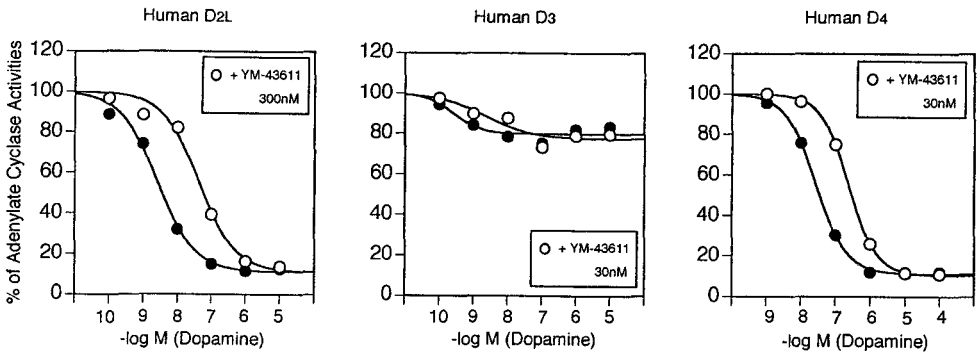
以上の結果より、YM-43611は既存薬にないin vitro特性であるD3&D4選択的アンタゴニスト性と高親和性を有する事が明らかになった。したがって、YM-43611はD3およびD4受容体の生理機能の解明に非常に有用な化合物であると言える。

Table 1. Dissociation constants (Ki) of putative dopamine antagonists for the D2-like receptors.

	human D2-like receptors			rat D2-like receptors		
	D2L	D3	D4.7	D2L	D3	D4
YM-43611	42.9	11.1	2.10	165	35.5	1.85
Haloperidol	0.386	1.51	2.09	0.891	6.15	14.9
Clozapine	72.2	156	36.1	140	394	40.8
Raclopride	0.530	1.01	1690	1.80	5.60	2500
Risperidone	1.13	6.15	13.6	1.84	15.5	16.0
Nemonapride*	0.017	0.053	0.214	0.031	0.196	0.216

The values represent the affinity constants (Ki) in nanomolar concentrations.
* Kd values derived from saturation kinetics at equilibrium.

Fig. 1 Effects of YM-43611 on dopamine induced supression of adenylate cyclase activities in intact human D2-like receptors -expressing cells.



【引用文献】［1］Sibley D.R. (1992) Trends Pharmacol. Sci. 13: 61-69
［2］Taubes G. (1994) Science 265: 1034-1035

67 ラット脳内の末梢型ベンゾジアゼピン受容体の生後発達及びハロペリドール反復投与による変化

車地暁生、 兼子幸一、 融 道男

東京医科歯科大学医学部・神経精神医学教室

〔要約〕

ラット脳内の末梢型ベンゾジアゼピン受容体の生後発達及び代表的な抗精神病薬であるハロペリドール反復投与による変化を、[³H] PK 11195 をリガンドとして用いた受容体結合実験によって調べた。ラット全脳の生後０日から生後６０日までの生後発達による変化を調べたが、特異的[³H] PK 11195結合数はほぼ直線的に増加し、この変化は親和性の変化ではなく最大結合数の変化であることがわかった。また、ハロペリドール(0.3 mg/kg/day, i.p.) を２１日間反復投与すると、嗅球において特異的[3H] PK 11195結合数が増加しており、その増加は最大結合数の変化であることがわかった。しかしながら、大脳皮質、海馬、線条体、小脳などその他の脳部位では、ハロペリドール反復投与による影響は見られなかった。したがって、ラット脳内の末梢型ベンゾジアゼピン受容体の最大結合数は、生後発達や抗精神病薬の反復投与によって変化することが明らかになった。

目的

ベンゾジアゼピン（ＢＺ）系化合物は、抗不安薬や催眠薬として広く臨床にもちいられている。このＢＺ系化合物は、中枢神経系における抑制性の神経伝達物質であるＧＡＢＡ受容体のサブタイプのひとつである$GABA_A$受容体複合体の一部に結合して、その薬理作用をもたらすことが知られており、中枢型ＢＺ受容体と呼ばれている。また、このＢＺ系化合物はこの中枢型ＢＺ受容体とは、生化学的に全くことなる末梢型ＢＺ受容体にも結合し、Ro5-4864 や PK 11195 といったこの受容体に特異的な薬剤も合成されている（１、２）。

この末梢型ＢＺ受容体は、その名前が示す通り、脳だけでなく内分泌器官、性腺、リンパ組織、腎臓、消化器、心・血管系組織、肺および筋肉などの数多くの組織に分布しており、これらの組織では、細胞膜だけでなく、その多くが細胞内のミトコンドリアに分布しており、特に副腎、性腺および脳のグリア細胞においては、ステロイドホルモンの合成過程に関与していることが知られている。また、この末梢型ＢＺ受容体は、内分泌疾患、免疫反応およびストレス反応に関与してことが示唆されており、いろいろな病態との関連も注目されている（１、２）。

本研究では、ラット脳内の末梢型ＢＺ受容体の調節機構を調べる目的で、生後発達の影響やドーパミン受容体のアンタゴニストであり、代表的な抗精神病薬であるハロペリドールを反復投与による変化を調べた。

方法

１）生後発達の変化

ウイスター系の妊娠雌ラットを購入し、１ケージに１匹ずつ飼育した。出産後、仔ラットは６－８匹ずつ、生後０、４、７、１４、２１、３５、６０日に断頭し、脳を取りだし、－８０℃で保存した。なお、離乳は生後２１日に行い、離乳までは仔ラットの数を８－１０匹に調節した。

２）ハロペリドールの反復投与

ウイスター系雄性ラット（投与開始時：約２５０ｇ）に１日に１回、ハロペリドール(0.3 mg/kg) の腹腔内投与を２１日間行い、最終投与から２４時間後に断頭し、脳を取り出して、素早く氷上で、嗅球、大脳皮質、線条体、海馬、小脳、視床と視床下部、嗅皮質、脳幹部の８部位に分けて－８０℃で保存した。なお、コントロール群には、Vehicle (1 ml/kg) を同様に投与した。

３）[³H] PK 11195 結合実験

－８０℃で保存していた脳組織を室温で融解し、５０倍容の Dulbecco's の phosphate buffered-saline （ＰＢＳ）を加えて、ポリトロン型のホモジュナイザー(13500 rpm)で１５秒間ホモジュナイズした。これを２℃で３０分間、遠心分離(40,000g)し、上清をすてた。同様の遠沈操作をもう１回行い、適当量のＰＢＳを加えて脳膜標品を作成した。

受容体結合実験は、脳膜標品および１nMの[³H] PK 11195 (NEN, 85.5 Ci/m mol) を全量 0.6 ml のＰＢＳ中で、４℃で９０分間反応させ、Whatmann GF/B フィルターを用いて、吸引濾過して、さらに１２ ml のＰＢＳで洗浄した。非特異的結合は、１０μMのPK 11195 を用いて求めた。なお、スキャッチャード解析では、最終濃度 0.2 - 15 nM の [³H] PK 11195を用いて行った。

タンパク定量は、Lowry の方法を用いて行った。統計学的解析は、一元分散分析のあとDunnett の多重比較検定または Student の t 検定を用いておこなった。

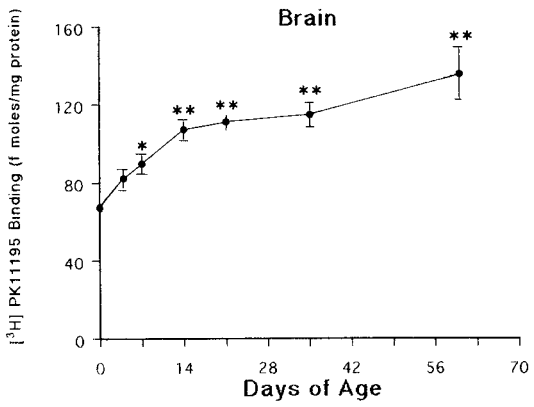
結果

ラット脳内の特異的[³H] PK 11195 結合数の生後発達のよる変化を図１に示す。特異的[³H] PK 11195 結合数は、生後ほぼ直線的に増加し、生後６０日で生後０日の約２倍に増加した。この増加は、

スキャッチャード解析の結果、親和性(Kd)にはほとんど変化がなく、最大結合数(Bmax)の増加であることがわかった（図２）。

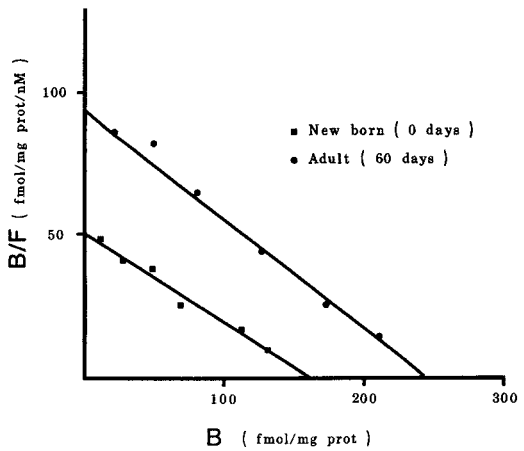
ハロペリドール反復投与によって、嗅球において、特異的[3H] PK 11195 結合数が統計学的に有意に増加していた（fmol/mg protein, mean±SEM ）（コントロール：427±28, ハロペリドール投与：633±50）。しかしながら、その他７部位では有意な変化はみられなかった。さらに、嗅球におけるスキャッチャード解析では、親和性（Kd）には変化がなく、ハロペリドール群の最大結合数（Bmax）が有意に増加していた（表１）。

図１．ラット脳の[3H]PK 11195 結合数の生後発達による変化



＊ p ＜ 0.05, ＊＊ p ＜ 0.01

図２．生後０日及び６０日のラット脳の[3H]PK 11195 結合のスキャッチャード解析



Bmax(fmol/mg prot):New born(160), Adult(243)
Kd(nM):New born(3.18), Adult(2.56)

表１．ハロペリドール反復投与によるラット嗅球の末梢型ベンゾジアゼピン受容体の変化

	Bmax (fmol/mg prot)	Kd (nM)
コントロール群（９）	1370±90	2.17±0.36
ハロペリドール群（８）	1870±113 ＊	2.55±0.46

結果は Mean ± SEM、（ ）内はラットの数を示す。 ＊ p＜0.01

考察

末梢型ＢＺ受容体は、脳内では上衣細胞やグリア細胞に豊富に存在し、部位としては脈絡叢や嗅球に多く分布していることが知られている。本研究によって、ラット脳全体では、末梢型ＢＺ受容体数は生後発達により増加することがわかり、これは受容体タンパクの発現量そのものが成熟にともない増加することによることが示唆された。

ハロペリドールの反復投与によって、末梢型ＢＺ受容体が豊富に存在する嗅球で、その最大結合数が増加することが明らかになったが、これはハロペリドールがドーパミン受容体のアンタゴニストであることから、嗅球において末梢型ベンゾジアゼピン受容体とドーパミン受容体との相互作用が存在することが示唆された。

文献

1. A. L. Parola et al., Minireview : peripheral-type benzodiazepine receptors. Life sciences (1993), 52 : 1329 - 1342.
2. E. Giesen-Crouse (ed), Peripheral benzodiazepine receptors, Academic Press, London, 1993.

68 ラット大脳皮質アストロサイトにおけるセロトニン受容体によるアデニル酸シクラーゼの活性化と抗うつ薬の慢性効果

清水雅美[1)]、西田　朗[1)]、福田裕恭[1) 2)]
斎藤　浩[2)]、山脇成人[2)]
([1)]国立呉病院臨床研究部、[2)]広島大神経精神)

〔要約〕

ラット大脳皮質アストロサイトにおいて、アデニル酸シクラーゼに促進性に連関するセロトニン(5-HT)受容体の特性および受容体活性におよぼす抗うつ薬の慢性処置の効果を検討した。5-HT、5-carboxamidotryptamine(5-CT)、5-methoxytryptamine(5-MeOT)(1nM-100μM)は濃度依存性にcAMP生成を促進し、EC_{50}は5-CTが最も低値であった。5-HTによるcAMP生成の促進は、clozapine、mianserinにより抑制されたが、5-HT_1、5-HT_2、5-HT_3および5-HT_4受容体のアンタゴニストでは抑制されなかった。アストロサイトへのamitriptyline(AMI, 0.5-10μM)の慢性処置は5-HTによるcAMP生成の促進を増強させた(EC_{50}=2.5μM)。しかし、isoproterenol、N-ethylcarboxamidoadenosine(NECA)、forskolinおよびcholera toxinによるcAMP生成の促進はAMIの慢性処置により変化しなかった。以上の結果より、ラット大脳皮質アストロサイトにおいてはアデニル酸シクラーゼを促進性に調節する5-HT受容体が存在し、この5-HT受容体はAMIの慢性処置により活性の調節を受けることが解った。

［目的］

最近、アデニル酸シクラーゼを活性化する5-HT受容体サブタイプの存在が中枢および末梢組織において確認され、5-HT_4、5-HT_6、5-HT_7受容体と呼ばれている。このうち5-HT_6、5-HT_7受容体はすでにクローニングされており、細胞膜7回貫通型でGsタンパク質に連関する受容体であることが解っている(1,3,4)。しかしながら、その局在や機能、薬理学的特性に関しては現在のところ不明な点が多くある。今回我々は、ラット大脳皮質アストロサイトにおいて5-HT刺激によりcAMP生成が促進することを認め、アデニル酸シクラーゼを活性化する5-HT受容体サブタイプの存在を推測し、その薬理学的特性について検討を加えた。また興味深いことに、いくつかの抗精神病薬や抗うつ薬が5-HT_6受容体および5-HT_7受容体に対し高い選択性を有することが報告されている(2)。そこで大脳皮質アストロサイトに三環系抗うつ薬の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促進に対する慢性効果について検討した。

［方法］

胎生20日のラット大脳皮質を取り出し、10%牛胎仔血清、1 mM glutamineを含むDulbecco's modified Eagle's mediumを用いて2週間培養した。振盪により神経細胞、オリゴデンドロサイトを除き、さらに1週間培養した後12穴のプレートディッシュにサブカルチャーした。その後メディウム中にAMIを加え3日間慢性処置した。処置した細胞はHEPES-buffered Krebs Ringerで洗浄した後、各種アゴニストで10分間刺激し、過塩素酸を加え反応を停止させた。反応液はチューブ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)5-HT受容体アゴニストによるcAMP生成の促進作用

ラット大脳皮質アストロサイトにおいて、5-HT、5-CT、5-MeOT(1nM-100μM)は濃度依存性にcAMP生成を促進した(Fig. 1)。EC_{50}はそれぞれ152nM、12nM、88nMであった。

2）5-HTによるcAMP生成の促進に対する5-HT受容体アンタゴニストの効果

5-HT(10μM)によるcAMP生成の促進に対して、clozapine、mianserinは1μM以上の濃度で抑制効果を示した。しかし、5-HT_1および5-HT_2受容体アンタゴニストであるSCH23390、pindolol、5-HT_3受容体アンタゴニストであるICS205-930、5-HT_4受容体アンタゴニストであるGR113808は30μMの濃度でも抑制作用を示さなかった。

3）5-HTによるcAMP生成におよぼすAMI慢性処置の効果

ラット大脳皮質アストロサイトにAMI(0.5-10μM)を3日間慢性処置したところ、5-HT(10μ-M)によるcAMP生成の促進が増強された。このときAMIのEC_{50}は2.5μMを示した。また、AMI(5μM)の慢性処置により、5-HT(10-100μM)刺激によるcAMPの生成量は有意に増加したが、5-HTのEC_{50}は無処置群(143nM)に比べ上昇(895nM)したことから、受容体に対する5-HTの親和性がAMI処置により低下すると考えられた。このときbasalのcAMP量および細胞の蛋白量に変化は認めなかった。

4）Isoproterenol、NECA、forskolinおよびcholera toxinによるcAMP生成におよぼすAMI慢性処置の効果

Isoproterenol(10μM)、NECA(50μM)、forskolin(1μM)およびcholera toxin(1μg/ml)によるcAMP生成の促進はAMI(5μM)の慢性処置により何ら変化しなかった。

［考察］

ラット大脳皮質アストロサイトにおいて、5-HTは濃度依存性にcAMP生成を促進した。cAMP生成の促進は5-HT_1、5-HT_2、5-HT_3および5-HT_4受容体のアンタゴニストでは抑制されず、比較的低濃度のclozapine、mianserinにより抑制された。また、5-HT受容体アゴニストのうち、5-CTが最も高い親和性を示した。これまでに、5-HT_7受容体を発現させたcell lineを用いた受容体結合実験やアデニル酸シクラーゼ活性の測定において、5-CTが高い親和性を示すこと、またclozapine、mianserinが強い阻害作用を有することが報告されている(1,3,4)。以上のことより、ラット大脳皮質アストロサイトにおいてはアデニル酸シクラーゼを促進性に調節する5-HT受容体が存在し、この受容体は5-HT_7受容体に相当するか類似したサブタイプである可能性が考えられた。また、AMIの慢性処置により5-HTによるcAMP生成の促進が増強したが、アデニル酸シクラーゼおよびGsタンパク質の直接的な活性化によるcAMP生成の促進は変化しないことから、AMIは5-HT受容体のレベルで何らかの修飾作用を有し、受容体の数および親和性を調節すると考えられた。このcAMP生成の増強が臨床濃度のAMIにより認められたことは、うつ病との関連を示唆する興味深い知見と考える。

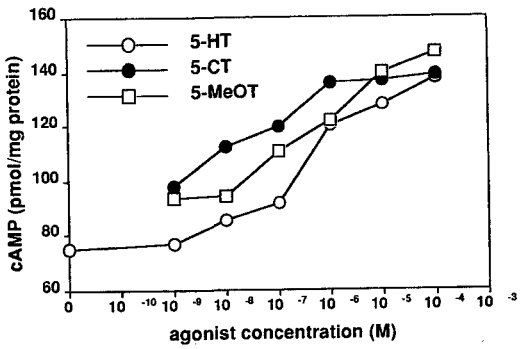


Fig. 1 Dose-response curves of 5-HT receptor agonist on cAMP formation in rat cortical astrocytes

［文献］

1) Bard J.A. et al. (1993), *J Biol. Chem.* 268, 23422-23426. 2) Roth B.L. et al. (1994), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1403-1410. 3) Ruat M. et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8547-8551. 4) Tsou A. (1994), *J Neurochem.* 63, 456-464.

69 脳の転写因子 (AP-1) と DNA 結合能におよぼす抗精神病薬の影響について

尾崎　宜洋*、勝元　栄一*、横谷　昇**、古塚大介*、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]
すでに我々は、Haloperidol(HP)および(-)-Sulpiride(SP)の投与によってマウス脳内にc-*fos*とc-*jun*のmRNAが誘導されるが、選択的D1 receptor遮断薬SCH23390によっては誘導されないことを報告した(4)。今回は、HP、SPおよびSCH23390に加えて、選択的D1 receptor作動薬SKF38393について、Dopamine receptorを介した脳内転写因子Activator protein 1(AP-1)のDNAへの結合能をGel retardation assayを用いて検討した。その結果、HP、SP、SCH23390およびSKF38393すべての薬剤においてAP-1のDNA結合能が認められた。そこで、さらにそれぞれの薬剤を投与した場合に生成されるFosとJunとの関連蛋白質についてWestern blotting法によって比較したところ、SCH23390においてはc-Fosとc-Jun以外の核蛋白質が生成されることが明らかになり、HP、SPおよびSKF38393によって誘導されるAP-1とSCH23390を投与したときに誘導されるAP-1とは構成成分が異なることが示唆された。

[目的]
immediate early geneのひとつであるc-*fos*やc-*jun*の転写産物Fos蛋白やJun蛋白は、Fos-Junヘテロダイマーあるいは、Jun-Junホモダイマーを形成してロイシンジッパー構造を有する転写調節因子AP-1を構成し、そのロイシンジッパーのすぐN末端側に隣接する塩基性アミノ酸に富んだ領域が、gene上流のプロモーター領域にある特異的な配列を認識し結合する。このAP-1がDNAに結合すると、geneの転写活性を調節することが知られている(1)(2)。我々は、HP、SP、SCH23390およびSKF38393、4種類のDopamine receptorに作用する薬剤を投与したときのマウス脳内転写因子AP-1のDNA結合能を調べ、さらに投与したときに発現するFosおよびJunの関連蛋白質についても検討したので報告する。

[方法]
1 Gel retardation assay
薬物の投与方法は、既報(4)に準じて行った。投与したddYマウス脳内よりSchreiberら(5)の方法により調節した核蛋白質抽出液(5 μ g蛋白質)に1 μ g poly(dI-dC)、5mM MgCl2、2.5mM EDTA、2.5mM DTT、250mM NaClおよび20%グリセロールを含む50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)の20 μ lとTRE配列を含むAP-1 probe (5`-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3`)(1x10^4 cpm)を24℃で20分間反応させたあと、4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(100V定電圧、3時間、0.5xTBE buffer)でDNA/蛋白質複合体と遊離probeを分離した。泳動後ゲルを乾燥し、オートラジオグラフでAP-1のDNAへの結合能を測定した。
2 Western blotting
核蛋白抽出液(10 μ g)に同容量のLaemli(3)のsample bufferを加え、5分間沸騰させた。7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分離後、ニトロセルロース膜に転写し、ポリクローナル特異的抗c-Fosおよび抗c-Jun抗体、非特異的抗c-Fosおよび抗c-Jun抗体（Santa Cruz社）にて免疫染色を行った。

[結果]
HP(1mg/kg体重)を注射した場合の経時的な変化は、注射後30分よりAP-1結合能が増加し、120分でピークに達した後、180分、360分と徐々に減少し、24時間後ではvehicleを注射した場合と同じレベルに達した(Fig. 1)。また、注射後120分におけるHPのAP-1結合能は、0.1mg/kg体重よりみられ、その後用量依存的に増加し、8mg/kg体重で最大に達した(Fig. 1)。SP(20mg/kg体重)を注射した場合の経時的な変化でも、注射後120分にAP-1結合能はピークを示し、以後徐々に減少し、24時間ではやはり対照と同じレベルに達した(Fig. 2)。用量依存的なAP-1結合能の増加もまたHPと同様のパターンを示し、100mg/kg体重で最大を示した(Fig. 2)。SCH23390(1mg/kg体重)およびSKF38393(1mg/kg体重)を注射したときのそれぞれのAP-1結合能の経時的変化もまた、注射後30分より結合能が増加したが、24時間では急速に減少し対照と同じレベルに達した(Fig. 3,4)。また、競合実験の結果よりこれらの反応は、特異的であった(Fig. 5)。Western blottingの結果は、HP、SPおよびSKF38393については、c-Fosおよびc-Junともに用量依存的であり、120分をピークとした経時的な変化を示した。。SCH23390については、c-Fosとc-Junの両者とも発現は認められなかったが、c-Fosおよびc-Jun以外の関連蛋白質の発現は、その他3種の薬剤同様のパターンを示した。

[考察]

HP、SPおよびSKF38393を注射した場合は、*c-fos*と*c-jun*のmRNA発現の誘導に引き続いてc-Fosとc-Jun蛋白質が発現し、AP-1を構成しDNA結合能が上昇したと考えられる。SCH23390を注射した場合、*c-fos*と*c-jun*のmRNAは誘導が認められなかったにもかかわらず、AP-1結合能はHP、SPおよびSKF38393と同様に増加傾向を示した。このことは、SCH23390を注射すると、c-Fosやc-Jun以外のFosB、fra、JunBやJunDなどが発現し、これらがAP-1を構成しDNA結合能が高まったと考えられる。以上の結果は、脳内転写因子AP-1のDNA結合能が上昇するにはDopamine receptorが関与することを示唆するものである。

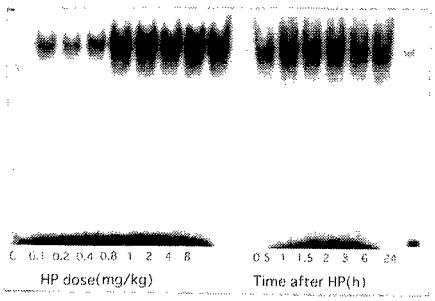


Fig. 1

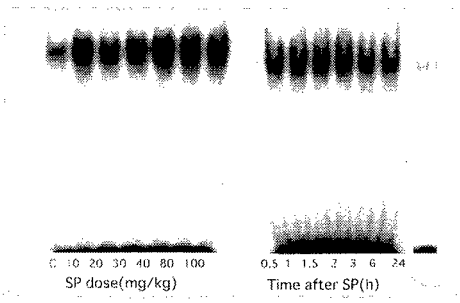


Fig. 2

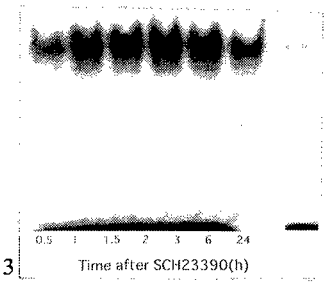


Fig. 3

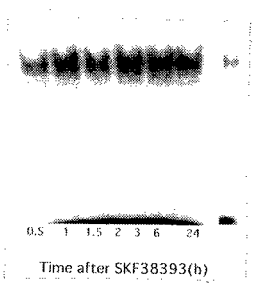


Fig. 4

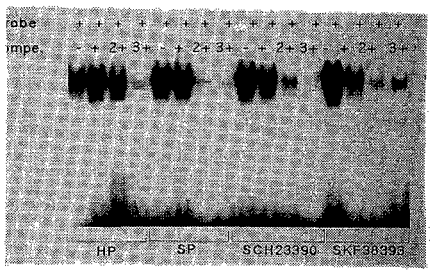


Fig. 5

Fig. 1 Autoradiogram of the AP-1 DNA binding activity in nuclear extracts prepared from ddY mouse brains injected with haloperidol(HP). Left panel shows the AP-1 DNA binding activity at 120min after the injection of HP(0.1-8mg/kg). Right panel shows the AP-1 DNA binding activity at different times after the injection of HP(1mg/kg).

Fig. 2 Autoradiogram of the AP-1 DNA binding activity in nuclear extracts prepared from ddY mouse brains injected with (-)-sulpiride(SP). Left panel shows the AP-1 DNA binding activity at 120min after the injection of SP(10-100mg/kg). Right panel shows the AP-1 DNA binding activity at different times after the injection of SP(20mg/kg).

Fig. 3,4 Autoradiogram of the AP-1 DNA binding activity in nuclear extracts prepared from ddY mouse brains injected with SCH23390(Fig.3) or SKF38393(Fig. 4). These panels show the AP-1 DNA binding activities at different times after the injection of SKF38393(1mg/kg) or SCH23390(1mg/kg).

Fig. 5 This panel shows the sensitivity of these reactions. Each lane contains 5 μg nuclear protein, indicating the effect of addition of unlabeled AP-1 probe(1-100 fold molars) on the AP-1 DNA binding activity(+: 1 fold, 2+: 10 fold, 3+: 100 fold).

[文献]

(1) Freyd G. et al.(1990) Nature 334,876-879. (2) Ingraham H.A. et al. Cell,1990;61:1021-1033. (3) Laemli U.K. (1970) Nature 227,680. (4) 尾崎宜洋他(1994) 神経化学 33,624-625. (5) Schreiber E. et al.(1989) Nucleic Acids Res.17,6419.

70 ラット小脳内 N-メチル-D-アスパラギン酸認識ドメイン DE NOVO 生合成のストレスによる促進

韓大健*、荻田喜代一、米田幸雄
(*マリオン・メレル・ダウ株式会社　開発研究所　枚方センター、
摂南大・薬・薬理)

〔要約〕

拘束水浸ストレス負荷ラット脳内各部位の興奮性アミノ酸(EAA)レセプター結合についてリガンド結合法を用いて検討した。ストレス負荷は、負荷直後ではいずれの脳内部位の[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合にも著変を与えなかったが、負荷 120 時間後では小脳と視床下部の本結合を有意に増強した。両脳内部位の glycine(Gly)認識ドメインへの[^{3}H]Gly 結合および[^{3}H]5,7-dichlorokynurenic acid(DCKA)結合は、同様の条件下においても著明な影響を受けなかったが、両脳内部位の N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)認識ドメインへの[^{3}H]glutamic acid(Glu)および[^{3}H]DL-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoic acid(CGP-39653)結合は、ストレス負荷後 120 時間の時点で有意に増大した。cycloheximide の投与はストレス負荷による視床下部の[^{3}H]Glu 結合の増強に対しては著変を与えなかったが、小脳におけるこの[^{3}H]Glu 結合の増強を有意に阻止した。以上の結果より、拘束水浸ストレス負荷に伴い小脳における NMDA 認識ドメインの新規生合成が促進する可能性が示唆される。

〔緒言〕

ストレス負荷は副腎からのステロイドホルモン類の放出を促進するのみならず、視床下部と線条体における γ-aminobutyric acid(GABA)含量の増大と、Glu 濃度の著明な低下を引き起こす(6)。さらに、ストレスは脳内特定部位における GABA レセプターのリガンド結合能を変動させる(4)とともに、[^{3}H] α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)結合を増強することも報告されている(5)。一方、我々は第 35 回本学会大会において、拘束水浸ストレス負荷が non-NMDA レセプター結合に著変を与えることなく、NMDA レセプター結合を選択的に増強することを報告した(2)。今回は、このストレス負荷に伴う NMDA レセプター結合増強メカニズムを解明する目的で、アゴニスト認識ドメインである NMDA ドメインと Gly ドメインへのリガンド結合について解析した。

〔方法〕

7 週齢の Wistar 系雄性ラット(200-250 g)を金属製拘束ストレスケージを用いて、25℃の湯浴中で鎖骨下まで 3 時間浸すことにより拘束水浸ストレスを負荷した(2)。動物はストレス負荷直後、24 時間後および 120 時間後にそれぞれ断頭致死させた。 cycloheximide はストレス負荷終了直後に 2mg/kg の用量で皮下投与を行ない、負荷 120 時間後に脳を採取した。脳は橋－延髄、小脳、線条体、中脳、視床下部、海馬および大脳皮質の計 7 部位に分画した(1)。各脳内部位は、プロテアーゼ阻害薬を含む緩衝液でホモジナイズしたのち、各ホモジネートを 50,000g、30 分間、遠心分離した。得られた沈渣についてこの遠心分離と懸濁による洗浄操作を 3 回行ったのち、最終的に得られた沈渣を 8 倍量の 0.32 M sucrose 水溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した(7)。実験当日凍結標品を室温融解させたのち、洗浄用緩衝液でさらに 2 回洗浄操作を行った(未処理膜標品)。あるいは、凍結懸濁液を実験当日に 0.08% Triton X-100 で前処理後洗浄した膜標品(トリトン処理膜標品)を結合実験に用いた。[^{3}H]MK-801 結合実験は未処理膜標品を、および他の結合実験はトリトン処理膜標品をそれぞれ用いて行った(3)。統計学的有意差は two-tailed Student`s t-test または one-way ANOVA を用いて判定した。

表 1. [³H]Glu 結合の結合定数

	[³H]Glu 結合	
	K_D(nM)	Bmax (pmol/mg protein)
視床下部		
対照群	39.9±4.9	0.51±0.04
ストレス群	51.6±6.3	0.78±0.10*
小脳		
対照群	52.8±5.2	0.36±0.03
ストレス群	60.7±4.5	0.52±0.03**

mean±S.E. *p<0.05, **p<0.01 vs 対照群

表 2.ストレスによる[³H]Glu 結合増強に対する cycloheximide の影響

	[³H]Glu 結合 (fmol/mg protein)			
	対照群	ストレス群	cycloheximide 群	cycloheximide+ストレス群
海馬	258.7±19.1	288.5±6.6	242.6±24.0	270.8±17.0
視床下部	41.1±4.7	63.6±7.8*	51.8±7.7	58.3±4.8*
小脳	31.4±3.1	43.1±2.0**	27.1±2.1	28.2±3.4##

mean±S.E. *p<0.05, **p<0.01 vs 対照群; ##p<0.01 vs ストレス群

[結果]

[³H]MK-801 結合は、ストレス負荷直後にはいずれの脳内部位においても著明な変化を示さなかったが、負荷 24 時間後には視床下部において、負荷 120 時間後には小脳と視床下部において、それぞれ有意な[³H]MK-801 結合の増強が観察された。この負荷 120 時間の条件下では、視床下部と小脳の[³H]Glu および[³H]CGP-39653 の両結合は約 1.5 倍に増強されたが、海馬においてはこのような増強は認められなかった。これに対して、[³H]Gly および[³H]DCKA の両結合は、これら三種類の脳内部位においてもストレスによる影響を受けなかった。Scatchard 解析の結果、ストレスによる[³H]Glu 結合の増強は視床下部および小脳ともに K_D の変化によるものではなく、B_{max} の上昇に基づくものであることが判明した(表 1)。さらに、蛋白合成阻害剤である cycloheximide をストレス負荷終了直後に投与すると、小脳における[³H]Glu 結合増強は消失したが、視床下部においては有意な変動は認められなかった(表 2)。

[考察]

本実験結果は、拘束水浸ストレス負荷が NMDA レセプター複合体の中でも特に、NMDA 認識ドメインにのみ選択的に影響を与えることを示唆するものである。さらに、蛋白合成阻害剤である cycloheximide の投与がストレスによる[³H]Glu 結合の増強を消失させたことより、拘束水浸ストレスがラット脳内における NMDA 認識ドメインの蛋白質新規生合成を促進する可能性が考えられる。しかしながら、cycloheximide は視床下部での[³H]Glu 結合の増大には影響を与えなかったので、例えば cycloheximide の移行度や NMDA ドメイン蛋白の生合成速度の相違などに加えて、NMDA レセプターの分子多様性なども考慮されなければならない。

[謝辞]

発表の機会を与えて下さったマリオン・メレル・ダウ開発研究所、所長の J. F. Heeg 博士ならびに同副所長の水澤英甫博士に感謝の意を表します。

[文献]

1. Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) *J. Neurochem.*, 13, 655-669.
2. 韓大健、荻田喜代一、米田幸雄 (1992) 神経化学、31、181-182.
3. Han, D., Ogita, K. and Yoneda, Y. (1995) *Neurochem. Int.*, 26, 59-68.
4. Skerritt, J. H., Trisdikoon, P. and Johnston, G. A. R. (1981) *Brain Res.*, 326, 398-403.
5. Tocco, G., Shors, T.J., Baudry, M. and Thompson, R.F. (1991) *Brain Res.*, 559, 168-171.
6. Yoneda, Y., Kanmori, K., Ida, S. and Kuriyama, K. (1983) *J. Neurochem.*, 40, 350-356.
7. Yoneda, Y., Han, D. and Ogita, K. (1994) *J. Neurochem.*, 63, 1863-1871.

71 筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）患者脊髄から得られた特異タンパク質の解析

藤田公和・安藤正人・永田　豊・本多虔夫[1)]・松井太衛[2)]・千谷晃一[2)]
（藤田保健衛生大学・医学部・生理、総医研・医高分子[2)]、横浜市立市民病院[1)]）

［要約］ 筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者と非神経疾患（対照）患者の死後摘出した脊髄標本からタンパクを可溶化し、一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いてタンパク分画を行なった。脊髄標本のタンパク泳動像は、対照患者と比較してALS患者では分子量約50kD付近のタンパクが減少し、36kD付近のタンパク増加が観察された。この50kD付近のタンパクは分子量などから、アストログリアの細胞骨格を形成するGlial Fibrillary Acidic Protein(GFAP)である可能性が推定されたので、抗GFAP抗体を用いて染色性を調べた。その結果、50kDと36kD付近のタンパクはどちらもGFAP抗体に対して明瞭に反応性を示した。さらにそれ以外にも、50kから36kの間に抗GFAP抗体に反応して染色される数本のタンパクバンドが観察された。また、両方のバンドをPVDF膜に転写してN末端アミノ酸配列の決定を試みたところ、50kD付近のタンパクはブロックされていたが、36kD付近に見られるタンパクはN末端から59残基までの頭部が切断されたGFAPのものと完全に一致した。以上の結果から、ALS患者脊髄では何らかの原因でGFAP分子の切断が起こり、異なる性質を持った異常なGFAP分子が増加・蓄積されていることがわかった。

［目的］ 筋萎縮性側索硬化症(ALS)は脊髄運動ニューロンが侵される原因不明の進行性神経変性疾患である。既に我々は、ALS患者脊髄では対照患者と比較して前角のアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性が有意に減少し[5]、側索部の遊離アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）含量が著明に低下していること[3]を報告した。今回我々は、ALS患者と非神経疾患患者脊髄より可溶化したタンパク分画を一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、この疾患の神経変性に特徴的なタンパク分画の検出と同定を試みた。

［実験材料と方法］ ALS患者（2例）と非神経変性疾患患者(2例)の死後3～6時間で脊髄(胸髄および腰髄)を摘出し、-80° Cに凍結した。この凍結脊髄をドライアイス上で厚さ数mmに横断して、それぞれ前索、側索、後索、前角および後角の5部位に組織片を分割した。そして各組織片を以下の方法で分析した。

①脊髄組織の一次元電気泳動： 各脊髄組織片(約3mg-w.w.)をSDSとβ-mercaptoethanolを含む buffer に懸濁し、超音波処理後熱処理（95℃,8min）・可溶化した。さらに遠心(15,000rpm,15min)した後、その上清タンパク分画を既報[7]に従って一次元SDS-PAGE(MW 20-200kD) で展開し解析した。

②アミノ酸配列の決定： ①で得られたタンパクをPVDF膜に転写しクーマシーブルーで染色後、正常と異なる特徴的なバンドの部分を切り取り、プロテインシークエンサーでそのタンパク分画のアミノ酸配列を決定した。

③抗GFAP抗体による免疫染色： SDS-PAGEで得られたタンパクをPVDF膜に転写して、それをポリクローン抗体（CHEMICON、APR）およびモノクローン抗体（BioMakor）を用いて免疫染色した。タンパク染色はクーマシーブルーで行った。

［結果と考察］ 可溶化した脊髄組織を一次元SDS-PAGEで展開して得られた泳動像では、ALS脊髄では対照脊髄で明瞭に認められた分子量約50kD付近のタンパクバンドが著明に減少し、36kD付近のタンパクは逆に顕著な増加が観察された（図１）。50kD付近のタンパクは分子量などから、GFAPである可能性が推定されたため、複数の抗GFAP抗体を用いて染色した。その結果、50kDと36kD付近のタンパクはどちらもGFAP抗体に反応性を示した。さらに50kDから36kDの間に少なくとも５本のGFAP抗体に反応し、染色されるバンドが見いだされた。50kDと36kD両方のタンパクをPVDF膜に転写後切り取って、プロテインシークエンサーでアミノ酸配列を解析したところ、50kD付近のタンパクはN末端がブロックされていてシグナルが得られなかった。しかし36kD付近のタンパクはGFAP分子の頭部の1～59アミノ酸残基が失われ、60残基目以降の配列は完全に一致した（図２）。さらに36kDタンパクよりも少し分子量の大きなタンパクバンドは、N末端から40残基までのペプチドが失われたGFAPであることが判明した。

以上の結果は、ALS患者脊髄では本来対象患者脊髄に存在するGFAP分子が何らかの原因でプロテアー

ゼにより切断されて、異なる性質を持ったGFAPが増加していることを示している。GFAPはアストログリア細胞特異性を持つ細胞骨格タンパクの一つで、Ca^{++} 依存性中性プロテアーゼ（カルパイン）の作用を受けやすいことが知られている[1]。Pulsinelli[6]は虚血によって生じる神経変性の過程では、虚血後のグルタミン酸放出増加によって細胞内の遊離カルシウムイオンが上昇し、細胞質内カルパインが活性化されて構造タンパクと酵素が障害を受けるという一連の生化学的過程が進行する模式図を提起している。従って今回の実験結果は、神経細胞で生じた変性過程が周辺グリアにも波及して、同様の生化学的変化がグリア細胞でも生じている可能性を示唆しているのかもしれない。Delacourte[2]はアルツハイマー病患者の大脳皮質ではGFAPタンパクが正常脳の11倍にまで増加していることを報告している。今回の実験成績は、ALS患者脊髄内で何らかの原因によって頭部が切断された低分子GFAPが蓄積されたことを示している。GFAPのN端側（35残基）はGFAPの重合、脱重合に関わるリン酸化部位が含まれ、GFAPの線維形成の制御に重要と考えられている[4]。またこのような異常GFAP分子は水溶性が増加し、細胞突起形成能などが失われていることが知られており、これが周囲の運動ニューロンや軸索の変性との間に特殊な関連性がありうるものと推察されるので、さらに詳細な分析を進めたい。

[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)Bigbee et al(1983)J. Neurochem. 40. 460-467. (2)Delacourte(1990)Neurology. 33-37. (3)藤田ら(1993)臨床神経学. 33. 985-987. (4)Inagaki(1990)J. Bio. Chem. 265. 472-4729. (5)Nagata et al(1982)Brain Res. 224. 223-229. (6)Pulsinelli(1995)Sci. Am. 17-25. (7)Stone and Hammerschlag(1981)Cell. Mol. Neurobiol. 1. 3-17.

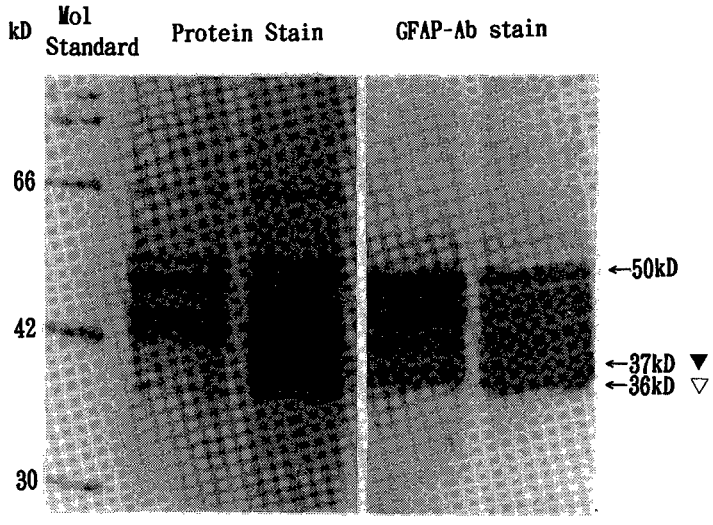


図１　ALSおよび非神経変性疾患患者由来脊髄抽出物のSDS-PAGEおよび抗GFAP抗体との反応性

ALS及び非神経変性病(N)患者由来脊髄のSDS可溶性成分をSDS-PAGEにかけ、クーマシーブルー染色した(Protein stain)。タンパクをPVDF膜にプロット後、抗GFAP抗体(CMN)と反応させ、HRP標識２次抗体とDABを用いて検出した。矢印で示したバンド(50, 37, 36kD)をPVDF膜から切り出し、N末端アミノ酸配列を調べた。

図２　ヒトGFAPの推定アミノ酸配列

cDNAから推定されているヒトGFAPのアミノ酸配列を示す。ALSで増加する37kD（▼）および36kD（▽）バンドのN末端の位置をそれぞれ示す。50kDバンドはシグナルを与えなかったことから、intactなGFAPではN末端がブロックされているものと考えられた。

```
                                        ▼
  1  MERRRITSAA RRSYVSSGEM MVGGLAPGRR LGPGTRLSLA RMPPPLPTRV
              ▽
 51  DFSLAGALNA GFKETRASER AEMMELNDRF ASYIEKVRFL EQQNKALAAE
101  LNQLRAKEPT KLADVYQAEL RELRLRLDQL TANSARLEVE RDNLAQDLAT
151  VRQKLQDETN LRLEAENNLA AYRQEADEAT LARLDLERKI ESLEEEIRFL
201  RKIHEEEVRE LQEQLARQQV HVELDVAKPD LTAALKEIRT QYEAMASSNM
251  HEAEEWYRSK FADLTDAAAR NAELLRQAKH EANDYRRQLQ SLTCDLESLR
301  GTNESLERQM REQEERHVRE AASYQEALAR LEEEGQSLKD EMARHLQEYQ
351  DLLNVKLALD IEIATYRKLL EGEENRITIP VQTFSNLQIR ETSLDTKSVS
401  EGHLKRNIVV KTVEMRDGEV IKESKQEHKD VM
```

72 Machado-Joseph病の遺伝子変異の特徴

丸山　博文、中村　重信、松山　善次郎、川上　秀史
（広島大学医学部第三内科）

〔要約〕

Machado-Joseph病(MJD)の遺伝子は染色体14q32.1に同定され、*MJD1*遺伝子のCAG repeatの伸長が発症の原因である。今回90人のMJD患者について解析したところ、CAG repeat数は発症年齢と逆相関(r=-0.87)を示した。ホモ症例ではこの相関から大きくはずれ、発症年齢が早くなっていた。MJD染色体は61-84のrepeat数であるのに対し、正常染色体は14-34のrepeat数で、両者間で重複を認めなかった。正常染色体においては14repeat数が最多で最短であった。親子間でCAG repeat数を比較すると臨床的なanticipationと関連して子は親よりもrepeat数が多く、減少しているものは認めなかった。親子間、兄弟姉妹間では父親由来の方が母親由来よりもrepeat数の増大は大きかった。3つの臨床病型間の比較では錐体外路症状を主体とする1型が2型3型に比べCAG repeat数は多く、発症年齢は若かった。

〔目的〕

MJDの遺伝子は14q32.1に同定され、原因遺伝子*MJD1*内のCAG repeatの伸長が認められている(1)。このCAG repeat数を多数例で検討し、繰り返し数の分布、発症年齢との相関、親子・兄弟姉妹間の差、臨床病型との比較を行った。

〔方法〕

白血球からDNAを抽出し、PCR反応を行った。ホルムアミドゲル電気泳動により*MJD1*内のCAG repeat数を決定した。臨床診断・病型の決定は'Clinical criteria for diagnosis of Machodo-Joseph disease'(2)に従った。

〔結果と考察〕

CAG repeat数は発症年齢と逆相関(r=-0.87)を示した(Fig.1)。ホモ症例ではこの相関から大きくはずれ、発症年齢が早くなっていた(Fig.1内■で示す)。MJD染色体は61-84のrepeat数であるのに対し、正常染色体は14-34のrepeat数で、両者間で重複を認めなかった(Fig.2)。CAG repeatの伸長が原因の他の疾患では両者間の差は極めて小さいのに対してMJDではその差は大きく、MJDの発症機序は他の疾患と異なっていると考えられる。また正常染色体においては14repeat数が最多・最短で、次いで27-28repeat数が多かった。親子間で発症年齢は子の方が14歳若くなり、CAG repeat数を比較すると子は親よりもrepeat数が平均3.1多く、減少しているものは認めなかった。親子間、兄弟姉妹間では父親由来の方が母親由来よりもrepeat数の増大は大きかった。3つの臨床病型間の比較では錐体外路症状を主体とする1型が2型3型に比べCAG repeat数は多く(Fig.3)、発症年齢は若かった(Fig.4)。このように*MJD1*内のCAG repeat数は発症年齢・臨床病型と強く相関しており、MJDの発症にはCAG repeatの大きさ・量が大きく関与していると考えられる。

Fig.1

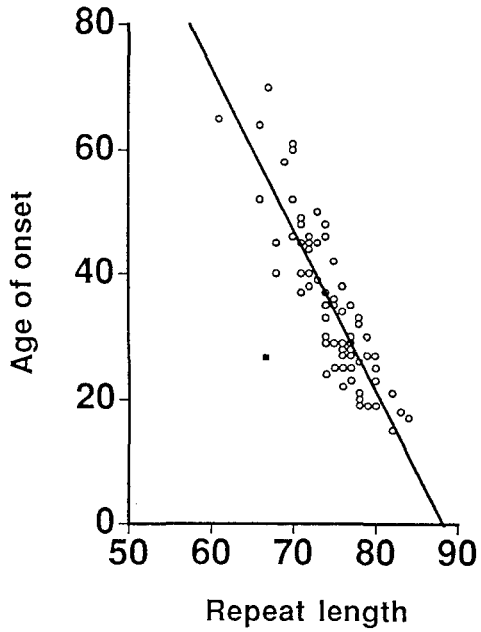


Fig.2

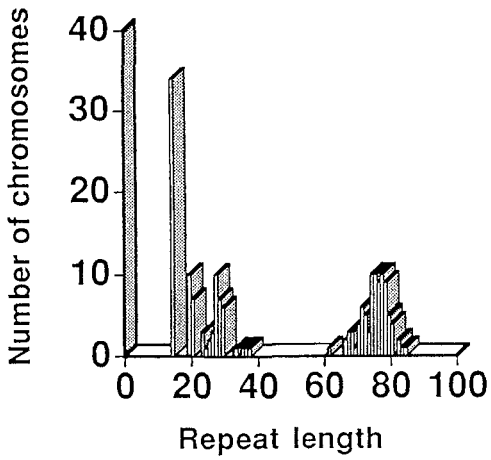


Fig.3

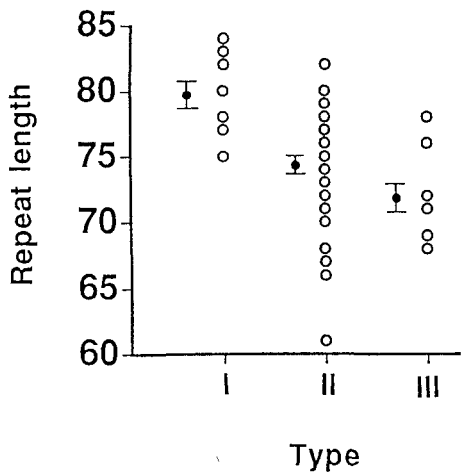
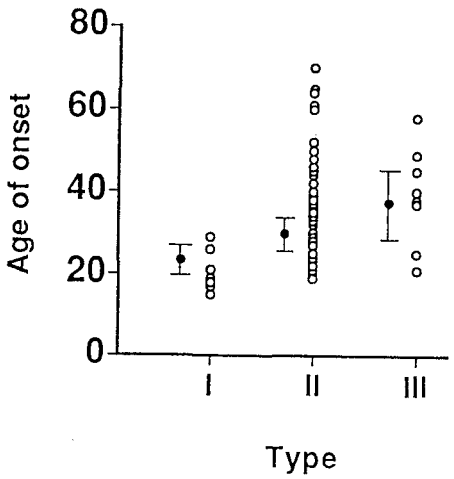


Fig.4



1. Kawaguti, Y., Okamoto T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1994) Nature Genet. 8, 221-228
2. Lima, L., and Coutinho, P. (1980) Neurology 30, 319-322

73 ベル麻痺の原因ウイルスの同定

村上信五、中城有喜＊、土居孝至＊、武田良平＊、
溝淵睦彦＊、羽藤直人、柳原尚明
（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室　＊神経精神医学教室）

〔要約〕

特発性顔面神経麻痺(ベル麻痺)の病因は、ウイルスの感染、虚血、自己免疫などの関与が挙げられている。一部のベル麻痺患者で単純ヘルペスウイルス(HSV-1)血清抗体価が高値であること、また本ウイルスが神経組織に強い親和性を持つことからHSV-1がベル麻痺の原因として有力視されている。しかし、HSV-1が、ベル麻痺の直接的な原因である証明は未だなされていない。今回、われわれは顔面神経減圧術を施行した14名のベル麻痺患者から神経内液、後耳介筋を採取し、DNAを抽出した。またRamsay Hunt症候群や対照患者からも同検体を調整し、PCR増幅した。ベル麻痺患者ではHSV-1 DNAが、Ramsay Hunt症候群では水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)DNAのみが検出され、対照患者ではいずれのDNAも検出されなかった。以上から、ベル麻痺の原因ウイルスがHSV-1 であることが証明された。

[はじめに]

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Ramsay Hunt症候群は水疱からVZVが同定され、本疾患の原因であることが明らかとなった[1]。一方、突然発症する片側の顔面神経麻痺のみのベル麻痺はウイルス感染、虚血、自己免疫の関与などの関与が挙げられているが、その病因の同定は未だなされていない。これらの原因のうち、ウイルス感染が最も有力視されているが[2]、原因ウイルスの直接証明はなされていない。今回、われわれは、保存的治療では麻痺が改善しない症例に顔面神経減圧術を施行し、その際採取した神経内液、後耳介筋からDNAを抽出し、HSV-1、VZV、Epstein-Barr virus (EBV) についてPCR分析を行い、原因ウイルスの同定を試みた。

[方法]

症例は34症例で、ベル麻痺患者が14例、Ramsay Hunt症候群患者が9例、対照患者11例である。年齢は3から70歳。麻痺発症より12日から87日後に顔面神経減圧術を施行した。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、細菌感染、腫瘍による顔面神経麻痺患者6例および、手術を要した慢性中耳炎患者 (中耳の細菌感染症) 5例の計11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、使用するまで-80℃で保存した。検体はプロテアーゼ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]。HSV-1、VZV、EBV DNAを増幅するため５種類のそれぞれのウイルスに特異的なプライマーとオリゴヌクレオチドプローブ (set1-set5)を用いた (表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、さらにサザンブロット分析を行った。

[結果と考察]

各組織におけるウイルスDNAの検出結果を表2にまとめた。HSV-1に特異的であるSet 1、Set 2についてはベル麻痺患者においてのみ検出された。その検出率はSet 1で神経内液で10例/13例 (77%) 後耳介筋で8例/14例 (57%)、Set 2では神経内液で4例/13例(31%) 後耳介筋で7例/14例 (50%) であった。VZVに特異的であるSet 3、Set 4についてはRamsay Hunt症候群患者においてのみ検出され、Set 3では8例/9例(89%)、Set 4では6例/9例 (67%) と高率だった。一方、対照群ではHSV-1、VZV、EBV DNAすべて検出されなかった。今回、ベル麻痺患者の神経内液、及び顔面神経の支配している後耳介筋においてこのようにHSV-1 DNAが高頻度に検出された。原因不明であったベル麻痺の病因がHSV-1であることが明らかとなった。

［文献］

1) 池田　稔ら 耳鼻と臨床 1981; 27; 223-227.

2) McCormic DP. Lancet 1972; 233: 527-530.

3) Mizobuchi M, et al. Mol. Endocrinol. 1991; 5: 476-484.

表1. 用いたプライマーとプローブ

Primer and probe	Sequence (5'-3')
Set 1 (HSV-1)	
sense	ATCACGGTAGCCCGGCCGTGTGACA
antisense	CATACCGGAACGCACCACACAA
probe	TACGAGGAGGAGGGGTATAACAAA-GTCTGT
Set 2 (HSV-1)	
sense	CCACCGAGCGGCAGGTGATC
antisense	GCCGACCGCCTGCTCGTGCT
probe	GAGGCGATCGAGTGGGT
Set 3 (VZV)	
sense	TACGGGTCTTGCCGGAGCTGGTAT
antisense	AATGCCGTGACCACCAA GTATAAT
probe	ACTCACTACCAGTCATTTTCT
Set 4 (VZV)	
sense	GCAAGACGTTTGGTCTTACGAATC
antisense	GAGTTTGTTTCGTCTTCATCCTCT
probe	GGACCTGCTGCCTGTAGTTT
Set 5 (EBV)	
sense	AAGGAGGGTGGTTTGGAAAG
antisense	AGACAATGGACTCCCTTAGC
probe	GTTTAAGAGCTCTCCTGGCT-AGGAGTCACGTAGAAAGGA

表2. 各組織におけるウイルスDNAの検出結果

Patient	no.	HSV-1 Primer set 1 Fluid	HSV-1 Primer set 1 Muscle	HSV-1 Primer set 2 Fluid	HSV-1 Primer set 2 Muscle	VZV Primer set 3 Fluid	VZV Primer set 3 Muscle	VZV Primer set 4 Fluid	VZV Primer set 4 Muscle	EBV Primer set 5 Fluid	EBV Primer set 5 Muscle
Bell's palsy	1	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
	2	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	3	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
	4	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−
	5	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−
	6	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	7	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−
	8	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−
	9	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	10	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−
	11	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−
	12	NA	−	NA	−	NA	−	NA	−	NA	−
	13	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	14	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−
Ramsay Hunt syndrome	1	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−
	2	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
	3	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
	4	−	NA	−	NA	−	NA	−	NA	−	NA
	5	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−
	6	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
	7	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−
	8	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−
	9	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−
Control	1	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	3	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		Nerve		Nerve		Nerve		Nerve		Nerve	
	4	−		−		−		−		−	
	5	−		−		−		−		−	
	6	−		−		−		−		−	
		Muscle		Muscle		Muscle		Muscle		Muscle	
	7	−		−		−		−		−	
	8	−		−		−		−		−	
	9	−		−		−		−		−	
	10	−		−		−		−		−	
	11	−		−		−		−		−	

+ = detectable by Southern blot analysis; − = undetectable; NA =not available.

74 アルコール中毒症発症機序におけるアデノシンの役割

-アデノシンA1受容体遺伝子を導入したNG108-15細胞におけるエタノールの影響-

浅井清文[1]、石井　晃[2]、Adrienne S. Gordon、Ivan Diamond

Ernest Gallo Clinic and Research Center and Department of Neurology, University of California, San Francisco

1.現、名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門

2.現、浜松医科大学法医学教室

要約：NG108-15細胞にアデノシンA1受容体遺伝子を導入し、アデノシンA1受容体とA2受容体（NG108-15細胞は本来A2受容体を発現している）の両者を発現しているNG108-15細胞株を樹立した。この細胞株を用いて急性および慢性エタノール暴露がアデノシンA1受容体に与える影響と、cAMPシグナル伝達系に与える影響を調べた。急性エタノール暴露によるcAMP上昇率は、アデノシンA1受容体を発現することにより低下し急性エタノール暴露時にはアデノシンA1受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、慢性エタノール暴露によるプロスタグランジンE1受容体の脱感作(heterologous desensitization)は、コントロール細胞と同様に生じ、アデノシンA1受容体による影響はみられなかった。したがって、慢性エタノール暴露時には、アデノシンA2受容体がより重要な役割を果たしていることが示唆された。

目的：アルコール中毒症の分子レベルでの発症機序の解明は、培養神経性細胞を使用したり、実験動物を利用したりして各方面から検索が進められている。我々の研究室では、神経性細胞に対するエタノールの影響とアデノシンとの関連性に注目し研究を進めているが、今までのところ以下のようなメカニズムが解明されている。

急性のエタノール暴露は、細胞膜上のアデノシントランスポーターを阻害し、細胞外アデノシン濃度を上昇させる。このアデノシンは、同時にアデノシンA2受容体を刺激する。本来アデノシンA2受容体を発現しているNG108-15細胞では、エタノール暴露によって上昇したアデノシンがA2受容体を介して細胞内cAMPを上昇させる。一方、慢性的にエタノールに暴露したNG108-15細胞では、アデノシンA2受容体の慢性的な刺激により、アデノシンA2受容体ばかりでなくプロスタグランジンE1受容体などのG_s蛋白を介した受容体の脱感作を引き起こす（heterologous desensitization）。このことは、アデノシン受容体アンタゴニスト存在下でエタノール暴露することにより、これらの受容体の脱感作は生じないことにより確認された。

エタノール ⇒アデノシンの取り込み低下 ⇒細胞外アデノシンの上昇
⇒アデノシンA2受容体刺激 ⇒cAMPの上昇 → → →Gs蛋白の低下
⇒heterologous desensitization

今回、より実際の神経細胞モデルに近づけるため、NG108-15細胞にアデノシンA1受容体の遺伝子を導入し、アデノシンA1およびA2受容体の両方を発現した細胞を作成し、この細胞に対するエタノールの影響を調べた。

方法

1、アデノシンA1受容体を発現したNG108-15細胞の樹立：NG108-15細胞にpKCRベクター（SV40プロモーター）を利用しラットアデノシンA1受容体cDNAをトランスフェクトした。Geneticin耐性株を単離し、各クローンについてアデノシンA1受容体の発現を3H-DPCPXの結合アッセイにて確認した。

2、アデノシンA1受容体の機能測定：アデノシンA1受容体を発現したトランスフェクタント（Clone 6とClone 7）およびpKCRベクターのみトランスフェクトしたNG108-15細胞（Clone 4）を、アデノシンA1受容体アゴニストCCPA存在下あるいは非存在下でプロスタグランジンE1で刺激し細胞内cAMP濃度を測定した。

3、急性エタノール暴露：エタノール200 mM、10分間刺激し細胞内cAMPを測定した。

4、慢性エタノール暴露：エタノール200 mM、48時間刺激しアデノシンA1受容体の機能測定およびプロスタグランジンE1刺激による細胞内cAMP測定を行った。

結果および考察

1、アデノシンA1受容体を発現したNG108-15細胞を7クローン樹立することができた。

2、このうち2つのクローン（Clone 6と7）についてアデノシンA1受容体をアゴニストCCPAにて刺激したところ、細胞内cAMP濃度が低下し、Gi蛋白とカップリングしていることが確認できた（図1）。

3、これらクローンに急性エタノール暴露したところ、細胞内cAMPは上昇するものの、対照細胞に比べ上昇率は低く、エタノールによる細胞内cAMPの上昇が、発現したアデノシンA1受容体により修飾された（図2）。しかしアデノシンA1受容体の機能には変化がなかった（表1）。

4、慢性エタノール暴露により、アデノシンA1受容体の機能はやや低下したが完全に脱感作はされなかった（表2）。さらに慢性エタノール暴露された細胞では、プロスタグランジンE_1刺激による細胞内cAMPの上昇率は低下し、heterologous desensitizationが生じた。

5、アデノシンA1受容体を発現している初代培養肝細胞を使用した実験では、慢性エタノール暴露により受容体の超感受性（hypersensitization）が生ずることが報告されており、今回、我々の行った実験の結果とは異なる結果が得られている。肝細胞と神経系細胞では、遺伝子発現の調節機構や、細胞内シグナル伝達系の差異についてさらなる検索が必要と考えられた。

表1、急性エタノール暴露のアデノシンA1受容体に与える影響

clone	% Inhibition by CCPA		
	control	acute ethanol	
Clone 6	34±1	29±2	(n=4)
Clone 7	64±2	64±1	(n=4)
Clone 4	-6±2	-2±4	(n=4)

表2、慢性エタノール暴露のアデノシンA1受容体に与える影響

clone	% Inhibition by CCPA		
	naive	chronic ethanol	
Clone 6	38±2	27±3 *	(n=8)
Clone 7	66±1	51±2 *	(n=8)
Clone 4	-5±2	-12±2	(n=8)

* $p<0.05$

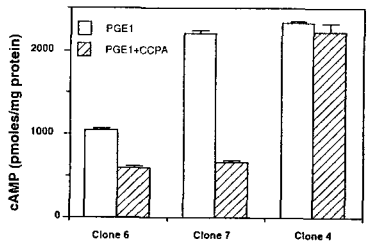


図1、アデノシンA1受容体の機能測定
Clone 6と7はアデノシンA1受容体を発現している。

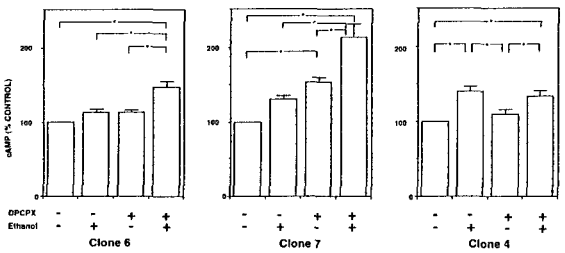


図2、急性エタノール暴露の細胞内cAMP濃度に与える影響

文献

1, Gordon, A. S., Collier, K. and Diamond, I.: Ethanol regulation of adenosine receptor-stimulated cAMP levels in a clonal neural cell line: An in vitro model of cellular tolerance to ethanol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2105-2108, 1986.

2, Nagy, L. E., Diamond, I., Casso, D. J., Franklin, C. and Gordon, A. S.: Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. J. Biol. Chem. 265: 1946-1951, 1990.

3, Nagy, L. E., Diamond, I., Collier, K., Lopez, L., Ullman, B. and Gordon, A.: Adenosine is required for ethanol-induced heterologous desensitization. Mol. Pharmacol. 36: 744-748, 1989.

4, Sapru, M. K., Diamond, I. and Gordon, A. S.: Adenosine receptors mediate cellular adaptation to ethanol in NG108-15 cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 271: 542-548, 1993.

75 Phencyclidine誘発行動の耐性および逆耐性発現における一酸化窒素の関与

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〕

Phencyclidine (PCP)誘発行動の耐性および逆耐性の発現における一酸化窒素 (NO) の役割について行動薬理学的に検討した。また、PCP投与後の脳内NO合成酵素 (NOS)活性ならびにNOS含有神経細胞数についても検討した。PCP (10 mg/kg) により誘発される常同行動 (sniffing, head movement, ataxia) および運動協調性の障害(motor incoordination; MI) は、PCPの連続投与により減弱し（耐性）、運動量増加作用はさらに増強された（逆耐性）。L-NAME (50 mg/kg)をPCP投与の15分前に連日投与すると、ataxia およびMIの耐性発現は抑制され、運動量増加作用の逆耐性はさらに増強された。一方、PCP連続投与により耐性あるいは逆耐性を獲得した動物に対しては、L-NAMEは全く作用を示さなかった。PCP (10 mg/kg)の単回投与により、小脳および大脳皮質のNOS活性は有意に低下したが、連続投与後には抑制作用は消失した。PCPを単回あるいは連続投与したマウスの脳におけるNADPH-diaphorase (NADPH-d) 染色には変化は認められかった。以上の結果より、PCPの連続投与により誘発される耐性および逆耐性の発現にはNOが重要な役割を果たしていることが示唆された。

〔緒言〕Phencyclidine (PCP)は、精神分裂病に似た精神症状を惹起する乱用薬物であり、連続投与により耐性あるいは逆耐性が発現する (1)。一方、一酸化窒素 (NO)は脳の可塑性に関与する新しい情報伝達物質として注目されている (2)。そこで本研究では、PCPの耐性および逆耐性の発現におけるNOの役割について、NO合成酵素 (NOS) 阻害剤NG-nitro-L-arginine (L-NAME)を用いて検討した。

〔実験方法〕実験には、ddY系雄性マウスを使用した。

行動薬理：PCPにより誘発されるsniffing, head movement, ataxia は投与30分後より3分間観察し、スコアー化した。MIは高さ30cmの水平の棒上にマウスをのせ、これに乗っている時間 (cut off time; 30sec)を測定することにより観察した。運動量は投与30分後より30分間計測した。NOS活性測定およびNADPH-diaphorase (NADPH-d) 染色：文献 (3) の方法に従って行った。

〔結果および考察〕PCP (10mg/kg) の単回投与により常同行動（sniffing, head movement, ataxia）、運動量の増加 および顕著なMIが認められた。PCPを14日間連続投与すると、常同行動とMIは減弱（耐性）し、運動量はさらに増加（逆耐性）した (Fig.1)。L-NAMEをPCPと併用すると、ataxiaとMIの耐性発現は抑制され、運動量増加作用の逆耐性はさらに増強されたが、NOS 阻害作用の弱いNG-nitro-D-arginine (D-NAME) を併用しても変化は認められなかった (Fig. 1)。PCP連続投与により耐性あるいは逆耐性を獲

得した動物に対しては、L-NAMEは全く作用を示さなかった。PCP (10 mg/kg)の単回投与により小脳および大脳皮質のNOS活性は有意に低下したが、連続投与後には抑制作用は消失した(Table 1)。PCPを単回あるいは連続投与したマウスのNADPH-diaphorase (NADPH-d) 染色には変化は認められかった。以上の結果より、PCPの連続投与により誘発される耐性および逆耐性の発現にはNOが重要な役割を果たしていることが示唆された。

〔謝辞〕 PCPを合成していただきました名城大学薬学部薬化学教室の古川宏教授、ならびに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と小森由美子助手に深謝いたします。

〔参考文献〕

(1) Nabeshima, T., Fukaya, H., Yamaguchi, K., Ishikawa, K., Furukawa, H. and Kameyama, T. (1987) Eur. J. Pharmacol. 135, 23-33.

(2) Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1992) Neuron 8, 3-11.

(3) 山田清文、野田幸裕、鍋島俊隆 (1994) 神経化学 33, 516-517.

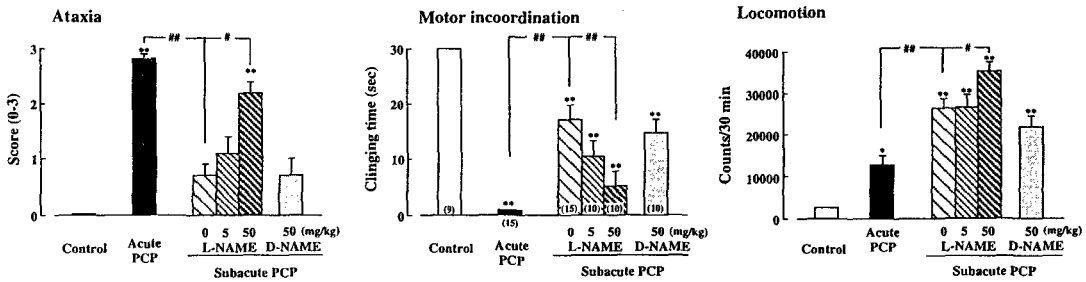


Fig. 1. Effects of L-NAME on the development of tolerance and sensitization to behavioral effects of PCP in mice

***P<0.05, **P<0.01 vs Control. #P<0.05, ##P<0.01 vs acute PCP treatment.**

Table 1. Change in NOS activity in the saline-, acute PCP- and subacute PCP-treated mice.

Brain regions	NOS activity (nmol/min/mg protein)		
	Control	Acute PCP	Subacute PCP
Cerebral cortex	0.16 ± 0.01 (6)*	0.08 ± 0.004 (7)	0.11 ± 0.01 (7)**
Striatum	0.23 ± 0.01 (6)	0.20 ± 0.006 (7)	0.22 ± 0.02 (7)
Hippocampus	0.30 ± 0.01 (6)	0.28 ± 0.012 (7)	0.31 ± 0.01 (7)
Cerebellum	0.42 ± 0.04 (6)*	0.30 ± 0.020 (6)	0.42 ± 0.03 (7)*

NO synthase activity was measured by monitoring the conversion of [3H]arginine to [3H]citrulline. *P < 0.05, **P < 0.01 vs acute PCP treatment.

76 メタンフェタミンおよびフェンサイクリジンの脳グルタミン酸トランスポーター(GLT-1)免疫活性に対する部位特異的効果

白川 治、梶本 康雄、白井 豊、楊 常青、北村 登*、斎藤 尚亮**、西野 直樹
(神戸大学医学部・精神神経科、*神鋼病院・神経科、
**神戸大学バイオシグナル研究センター・分子薬理)

〔要約〕

メタンフェタミン(MAP)やフェンサイクリジン(PCP)投与ラット脳におけるグルタミン酸神経伝達の異常をグルタミン酸トランスポーター(GLT-1)の変化を指標にして調べた。MAPの単回投与では1時間後、視床で32%の有意な減少($p<0.01$)がみられた以外は、有意な変化を認めなかった。行動学的に逆耐性を形成したMAP反復投与群では線条体で51%の有意な増加($p<0.05$)がみられたが、他の部位では有意な変化はみられなかった。PCPの単回投与では1時間後では、有意な変化を認めなかったが、24時間後では前帯状回皮質で29%の有意な増加($p<0.01$)、海馬において対照群の31%まで有意の減少($p<0.005$)を示した。アストロサイトのマーカーであるGlial Fibrillary Acidic Protein(GFAP)の変化はいずれの処置でも変化は認められなかった。

精神分裂病の神経化学的病態として、ドーパミン神経伝達の異常が広く受け入れられているが、ドーパミン以外の神経伝達の異常の関与が示唆されている。なかでもグルタミン酸神経系は、解剖学的にも機能的にもドーパミン神経系と連関し、精神分裂病の種々の病態に関わっていると考えられている。メタンフェタミン(MAP)をはじめとする覚醒剤は、連用により妄想型分裂病と類似した症状をきたすことが知られており、MAP投与ラットはヒトにおける幻覚妄想発現ないしは精神分裂病の再発脆弱性のモデルとして受け入れられつつある。フェンサイクリジン(PCP)は、NMDA型興奮性アミノ酸受容体遮断作用をもち、乱用者では精神分裂病における陰性症状に類似した精神病像がみられることから、PCP投与動物も分裂病のモデルと考えられている。近年、グルタミン酸神経伝達に関与する蛋白としてGLT-1, EAAC1, GLASTの3種類のグルタミン酸トランスポーターの存在が明らかにされ、中でもGLT-1は脳特異的にみられ、アストログリアに局在するとされている(1)。

今回我々は、GLT-1に対する抗体を作製し、MAPないしはPCPの単回投与による急性(1時間後)および遅延性(24時間後)の変化、さらに、MAPの反復投与により行動学的に逆耐性を形成したラット脳での免疫活性の変化を調べた。

〔実験方法〕

実験にはSD系雄性ラットを用いた。

1) MAPないしはPCP単回投与実験

MAP 4 mg/kgまたはPCP 8 mg/kgを皮下投与し、1時間後(急性)および24時間後(遅延性)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。取り出した脳を速やかに1.5mmの前額断切片にスライスし、内側前頭皮質、前帯状回皮質、側坐核、線条体、扁桃体、視床、海馬、嗅内皮質の8部位を直径1.5mmのパンチで取り出した。

2）MAP反復投与実験

MAP4 mg/kgを1日1回、1週間に5回で3週間、計15回皮下投与した。対照群には、生理食塩水を同様に皮下投与した。最終投与から1週間後に、2 mg/kgのMAPを皮下投与して臭いかぎ行動と首振り運動を常同運動の指標にして5段階評価で両方とも4以上になったものを、逆耐性が形成されているとした。MAPの反復投与により、約80%のラットで、行動学的逆耐性を形成した。MAP反復投与群としては逆耐性の形成したラットのみを用いた。さらに1週間飼育した後に断頭し、単回投与と同様にして脳組織を得た。

3）GLT-1免疫活性の定量

各組織から調製したホモジネートについて、抗GLT-1抗体を用いたウエスタンブロットにより対照群と処置群の免疫活性を比較した。発色はPAP法にて行った。アストロサイトのマーカーであるGlial Fibrillary Acidic Protein（GFAP）に対する抗体を用いて、その変化も検討した。結果はデンシトメトリーで定量化し、各群の比較はStudent's t-testによった。

〔結果〕

MAPの単回投与では1時間後、ＧＬＴ－１抗体の免疫活性は、視床だけが32%の有意な減少（$p<0.01$）を示した。24時間後では、今回調べた全ての部位で有意な変化を認めなかった。行動学的に逆耐性を形成したMAP反復投与群では線条体において51%の有意な増加（$p<0.05$）がみられたが、他の部位では有意な変化はみられなかった。PCPの単回投与の場合、1時間後ではいずれの部位でも有意な変化を認めなかったが、24時間後では前帯状回皮質で29%の有意な増加（$p<0.01$）、海馬において対照群の31%と有意の減少（$p<0.005$）を示した。GFAPの変化はいずれの処置でも変化は認められなかった。

〔考察〕

MAP単回投与において1時間後の視床を除けば、GLT-1免疫活性に有意な変化はみられなかったことから、MAP単回投与によるドーパミン神経伝達の変化は、GLT-1免疫活性を指標とした場合、グルタミン酸神経伝達の変化に反映していない可能性が考えられた。一方、行動学的に逆耐性をきたしたMAP反復投与では部位特異的な影響、即ち線条体におけるGLT-1免疫活性の変化をきたすことから、線条体におけるグルタミン酸神経伝達の異常が行動学的逆耐性の形成のみならず分裂病の再発脆弱性とも関連することが示唆された。

PCPは当初麻酔薬として開発されたが、麻酔からの回復時に精神病症状をきたすことから臨床応用が断念された経緯がある。ラットに今回の実験と同様の高用量のPCPを投与したところ24時間後には大脳辺縁系を中心にグルコース利用率が低下することが報告されている（2）。このように、PCPの単回投与では急性効果（投与後1時間）よりむしろ遅延性の効果（投与後24時間）が精神症状の発現に重要と思われる。前帯状回皮質、海馬において示唆された遅延性のグルタミン酸神経伝達の異常は、PCP精神病のみならず分裂病の病態に関与する可能性が考えられた。

〔文献〕

（1）Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., and Kanner, B.I. (1992) Nature 360, 464-467.

（2）Gao, X.M., Shirakawa, O. Du, F. and Tamminga, C.A. (1993) Eur. J. Pharmacol. 241, 7-15.

77 methamphetamine反復投与のphencyclidine誘発行動に及ぼす影響

本藤久雄，中村　薫，中原辰雄*，松本　孝，堤　哲之，橋本喜次郎，河村幸佐，
平野　誠，内村英幸
国立肥前療養所・情動行動障害センター
*九州大学・理・化学教室

〔要約〕

methamphetamine(MAP)の少量慢性反復投与が，phencyclidine(PCP)によってラットに誘発される変化に及ぼす影響について調べた。MAP 5mg/kg,6日間の反復投与処置を行ったラットでは，対照である生食投与群に比し，PCPによって誘発される異常行動のうち，head weaving及びrearingに有意な増強効果が見られた。更に同様の処置により，PCPのドーパミン遊離作用が前頭前野では増強された。以上の結果はMAP慢性反復投与によるNMDA受容体の機能変化を示唆する所見かも知れない。

［目的］

methamphetamine(MAP)の少量慢性反復投与後に生じる逆耐性現象はヒトの精神分裂病の再発脆弱性のモデルとされるが，最近その形成がNMDA受容体阻害剤を同時に投与することにより阻止されることが報告されている。一方phencyclidine(PCP)は，精神分裂病に近似した精神症状を惹起するとされ，NMDA受容体阻害作用を持つことから分裂病のグルタミン酸仮説と関連して最近注目おり，PCPが実験動物に惹起する異常行動がMAPの逆耐性を形成したものでは増強されるとの報告もある。このようにMAP慢性投与におけるNMDA受容体の機能の変化は注目されるが，先にあげたいずれの現象についてもこれを否定する報告もあり未だ一定の結論が得られていない[3)]。そこで我々は今回MAPとPCPの相互作用を検討した。

［方法］

1.行動実験

Wistar 系雄性ラットを用いた。
MAP 5mg/kgを一日一回6日間腹腔内投与し7日間の休薬後，PCP 7.5mg/kgを腹腔内投与して120分間videoに撮影した。対照群には生食を6日間投与したものにPCP 7.5mg/kgを腹腔内投与した。実験終了後10分毎に3分間ずつlocomotor activity,head weaving,rearing,turning及びback pedallingの回数を計測し，ataxiaは鍋島らの評価尺度により評定した。

2.脳内透析法

MAP 5mg/kgを一日一回6日間腹腔内投与し最終投与の6日後，線条体または前頭前野に透析probeを装着した。対照群には同様に生食を投与した群を用いた。手術翌日，自由行動下に毎分2μlで人工脳脊髄液の灌流を開始し，試料を線条体では20分毎に，前頭前野では30分毎に採取し，灌流開始2時間以上経過後，基礎遊離量を3fraction採取した後PCP 7.5mg/kgを腹腔内投与した。灌流液中のdopamine(DA)およびその代謝産物を電気検出器付き高速液体クロマトグラフィにて測定した。なお前頭前野ではDAが微量なため測定条件を一部変更し，DA濃度のみ測定した。

［結果］

MAP 5mg/kgの6日間の前処置により，PCP7.5mg/kgの腹腔内内投与にて誘発されるratの異常行動のうちhead weaving及びrearingが増強された(Fig.1)。同様の処置により，PCPによるDA遊離促進作用が前頭前野では増強されたが，線条体ではこの作用はみられなかった(Fig.2)。

［考察］

今回，行動学的にはPCPによって誘発される異常行動のうちその一部であるhead weavingとrearingにMAP前処置による増強作用がみられた。MAPによる逆耐性やMAPとcocaineとの交差逆耐

性の発現には線条体におけるDA遊離の増加が関与していることが脳内透析法を用いて報告されて来ており，DA神経系の前シナプス性の変化が想定されている[3]。しかし今回の脳内透析法を用いた実験では線条体ではMAP前処置群と対照群間でPCPによるDA遊離作用には差はみられなかった。最近実験条件によっては，amphetamineの逆耐性発現時にもDA遊離の増強を伴わないことがSegalら[2]によって報告されている。今回の我々の結果にも休薬期間やPCPの量が影響を及ぼしたのかも知れない。

我々はPCPが前頭前野におけるDAの遊離作用を有し，その作用の一部にはPCPのNMDA受容体阻害作用が関与していることを報告した。Nishijimaら[1]もNMDA受容体の競合的阻害剤によるDA遊離作用が線条体に比し，前頭前野でより著明であることを報告している。今回，MAPの前処置は前頭前野におけるPCPのDA遊離作用に対して増強効果を及ぼした。これは，MAPの慢性投与により前頭前野のNMDA受容体に機能変化が惹起されることを示唆しているのかも知れない。MAPの逆耐性モデルが精神分裂病のモデルとされることや前頭前野が精神分裂病の病態に深く関与するとされていること等から今回の結果は興味深い所見と思われる。

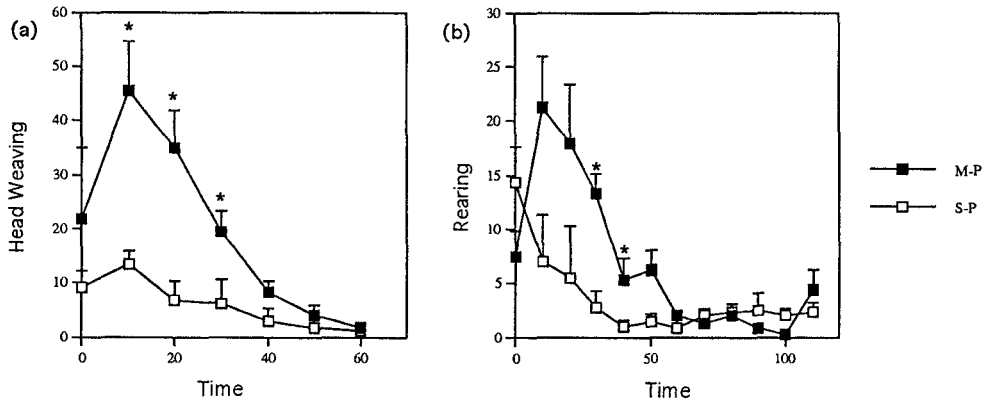


Fig.1 Effects o f PCP on the head weaving (a) and rearing(b) of the rats repeatedly treated with MAP(M-P) or saline (S-P). Each point represents mean ± SEM of 7-8 rats. *p<0.05 compared with S-P group by Student's t-test.

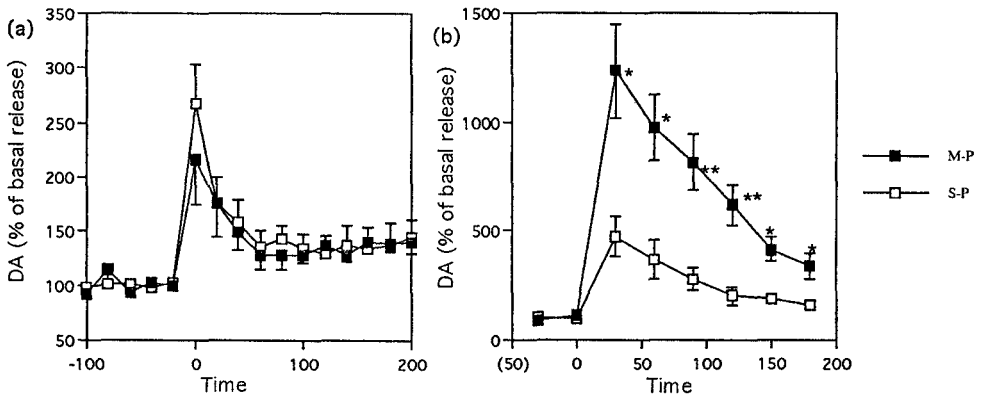


Fig.2 Effects of PCP on the DA release in the striatum (a) and prefrontal cortex (b) of the rats repeatedly treated with MAP(M-P) or saline(S-P). Each point represents mean ± SEM of 4 rats. *p<0.05, **p<0.01 compared with S-P group by Scheffe's F test.

[文献]
1)Nishijima,K. et al.(1994) J. Neurochem.,63,375-378.
2)Segal,D.S. and Kuczenski,R.(1992) Brain Res.,571,330-337.
3)氏家　寛 (1991) 臨床精神医学,20,1483-1498.

78 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の前頭皮質でのセロトニン5-HT_2 受容体数を、同受容体のアゴニスト(±) -1- (2,5-dimethoxy -4- [^{125}I] iodophenyl) -2 amino- propane ([^{125}I] DOI) をリガンドとする前頭皮質膜分画を用いたレセプター結合実験によって検討した。Scatchard解析の結果、最大結合数 (Bmax) は対照群に比べて肝性脳症群で有意に減少していたが、解離定数 (Kd) には2群間の差は認めなかった。実験には、内在性のリガンドを除去した膜分画を用いていることから、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5-HT_2受容体数のdown regulationが生じているが、[^{125}I] DOI に対するセロトニン5-HT_2 受容体の親和性には変化がないと考えられる。これまでに報告されている内側前頭皮質でのセロトニン代謝産物5-hydroxyindole-acetic acid (5-HIAA)の増加および本研究の結果であるセロトニン5-HT_2 受容体最大結合数の減少を考え合わせると、TAA投与による肝性脳症モデルラット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、アンモニアをはじめとする様々な物質の関与が推定されている。セロトニン系に関して、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の結果から、TAA投与による肝性脳症モデルラット前頭皮質での [^{125}I] DOI 結合数の有意な減少を報告した(1)。観察されたセロトニン5-HT_2 受容体数の減少が、最大結合数(Bmax) の減少もしくは解離定数 (Kd) の増加のいずれに基づく現象であるかをを明らかにするために、内在性リガンドを除く操作を行ったTAA投与による肝性脳症モデルラット前頭皮質の膜分画を用いて Scatchard 解析を行った。

〔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% NaCl、10mEq/l KClからなる補液 10ml を12 時間ごと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、TAA の初回投与から約 40 時間経過したころ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後速やかに前頭皮質を切り出し、- 80℃で凍結した。2)前頭皮質膜分画の調製：Cabrera らの方法を一部変更して行った(3)。湿重量の10 倍量の0.32M sucrose でホモジナイズし、30,000×g、15分で遠心。得られた沈渣を30 倍量の、0.5mM EDTA、10mM $MgSO_4$ を含む50mM Tris-HCl buffer(pH 7.7) でホモジナイズした後に37℃ で15 分間インキュベートし、その後30,000×g、10分の遠心を2 回行い、沈渣を同じ bufferで再溶解して結合実験に使用した。3) [^{125}I] DOI 結合実験：湿重量で約1mg の前頭皮質膜分画を0.5mM EDTA、10mM $MgSO_4$, 0.02% ascorbate、10 μM pargylineを含む50mM Tris-HCl buffer(pH 7.7) および [^{125}I] DOI と室温で90 分間インキュベートした。[^{125}I] DOI (2,200Ci/mmole) 濃度は、0.1 nM から 3.0 nM の6 点で展開した。ディスプレーサーとしては、1 μM の 5-HT_2受容体アンタゴニストketanserin を使用した。インキュベート終了後、反応溶液をWhatman GF/C filter で濾過し、5mlの 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.7)で3 回洗浄し、γ カウンターで測定した。タンパク定量は Lowry 法を用いた。4) 統計処理：Student t-test を用いた。

〔結果〕

前頭皮質膜分画のScatchard 解析から、セロトニン5-HT_2 受容体の最大結合数 (Bmax) は対照群に比べて肝性脳症群で有意に減少していた($p<0.05$)(図1)。これに対して、解離定数 (Kd) には2群間の差を認めなかった。図2 に代表的な対照群、肝性脳症群各1 例ずつの Scatchard plot を示す。

〔考察〕

Scatchard 解析の結果から、オートラジオグラフィー法で観察されたTAA 投与肝性脳症モデルラット前頭皮質での〔^{125}I〕DOI 特異結合の減少は、セロトニン5-HT_2 受容体のBmax の減少に基づくもので、Kd の増加を反映したものではないことが明らかとなった。実験には、内在性のリガンドを除く操作を行った膜分画を使用していることから、TAA 投与肝性脳症モデルラット前頭皮質ではセロトニン5-HT_2 受容体のdown regulation が生じていると考えられる。肝性脳症患者死後脳、肝性脳症モデル動物の脳および脳脊髄液で報告されている5-HIAA の増加[4]と、今回の実験結果である前頭皮質でのセロトニン5-HT_2 受容体 Bmax の減少を統合すると、セロトニン系ニューロンの活動性亢進が、TAA 投与肝性脳症モデルラット前頭皮質で起きている可能性が示唆される。肝性脳症の病態に対するセロトニン系ニューロンの関与を検討するために、今後は、意識障害の程度とセロトニン系ニューロンの活動性の間の相関を検討する必要があると思われる。

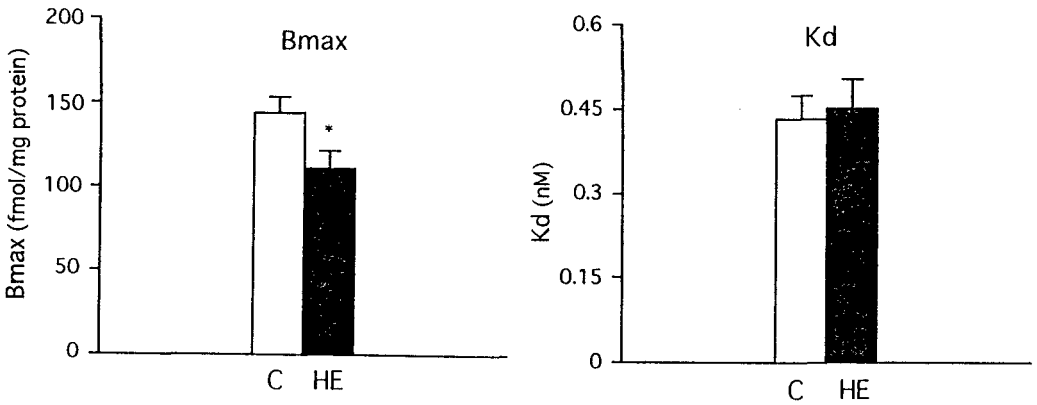
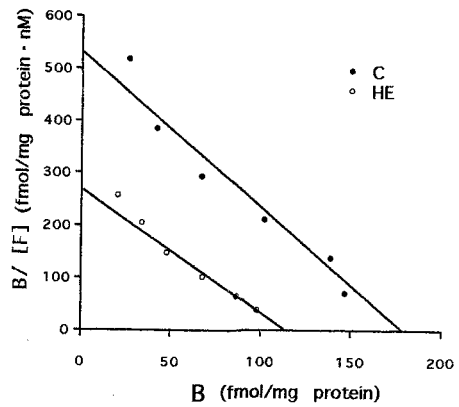


図1.肝性脳症モデルラット前頭皮質膜分画におけるセロトニン5-HT_2受容体の変化
C：対照群 (n=9)、HE：肝性脳症群 (n=7). mean±SE を示す. ＊ $p<0.05$
Bmax：C 144.3±9.3、HE 111.1±10.8 (fmol/mg protein)
Kd：C 0.43±0.04、HE 0.45±0.05 (nM)

図2.対照群および肝性脳症群のラット脳〔^{125}I〕DOI 結合の代表的なスキャッチャード・プロット



〔文献〕(1) 兼子幸一、車地暁生、山田佐登留、藤代 博、渡辺明子、融 道男 (1994)神経化学33:464-465. (2) Gammal, S.H., Basile, A.S., Geller, D., Skolnick, P., and Jones, E. (1990) Hepatology 11, 371-378. (3) Cabrera, T.M. and Battaglia, G. (1994) J.Pharmacol. Exp. Ther. 269, 637-645. (4) Yurdaydin, C., Hortnagel, H., Steindl, P., Zimmermann, C., Pifl, C., Singer, E.A., Roth, E. and Ferenci, P. (1990) Hepatology 12, 695-700.

79 ラット脳内モノアミンおよびアセチルコリン濃度変化におけるイサチンの役割

浜上尚也，遠藤　泰，平藤雅彦，南　勝，富樫広子*，松本真知子*，斎藤秀哉*
（北海道医療大・薬・薬理，*北海道大・医・第一薬理）

〔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)において内因性モノアミンオキシダーゼ(MAO)活性阻害物質であるトリブリン濃度が正常血圧のウィスター京都ラット(WKY)に比較して有意に高値を示すこと，またSHRSPの尿中および脳内トリブリンの一つがイサチンであることをガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーにより同定し報告した(1)．最近，イサチンはアセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性も阻害することが報告された(2)．そこで，イサチンの外因的投与による脳内アセチルコリン(ACh)濃度の変化について検討した．さらに，SHRSPのAChE活性を測定しWKYと比較検討した．イサチンをWKYに投与すると大脳皮質および線条体のACh濃度は有意に上昇した．SHRSPのAChE活性は脳内のほとんどの部位でWKYに比し高値を示し，特に大脳皮質，延髄で有意に高値を示した．以上より，イサチンは脳内ACh濃度調節の一部に関与していることが示唆された．

〔目的〕　我々はSHRSPでは内因性MAO活性阻害物質がWKYに比し有意に高く存在し，その一つがイサチンであることを見出した．WKYおよびSHRSPにイサチンを単回投与すると脳および腎ノルエピネフリンやセロトニン濃度が有意に上昇し，その増加の割合はSHRSPではWKYに比し小さいことを報告した(3)．イサチンをWKYに慢性経口投与すると血圧は無投与群に比較して有意に上昇した(4)．このようにイサチンは生体内モノアミン濃度や血圧の調節に深く関与しているものと考えられる．さらに，最近AChE活性阻害も有することが報告された．そこで本研究ではイサチンによる脳内AChEの阻害効果を検討する目的でイサチンを外因性に投与すると脳内のAch量は変化するか，またイサチンが高濃度に存在するSHRSPの脳内AChE活性はWKYに比較し低値を示すかについて実験を行った．さらに*in vitro*にてAChE活性阻害効果をMAO活性阻害効果と比較検討した．

〔方法〕　WKYにイサチン(50mgならびに200mg/kg)を単回腹腔内投与し，2時間後の脳内アセチルコリン濃度をHPLC-ECD法により測定した．WKYおよびSHRSPの脳内AChE活性はアセチルチオコリンを基質として生成したチオコリンを5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acidと反応させ，5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoate ionを吸光度(412nm)の単位時間の増加量で測定した．なお，脳の分画はGlowinskiらの方法に準じ，ACh濃度およびAChE活性はLowry法にて測定したタンパク量により補正した．

〔結果〕　1) 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，線条体では無投与群の 0.17±0.03 nmol/mg protein (平均±標準偏差)に比較して，イサチン(200mg/kg)投与群では 0.24±0.05 nmol/mg proteinと有意に上昇した．2) AChE活性は線条体で最も高値を示した．SHRSPの脳AChE活性はWKYに比しほとんどの部位で高値を示した．特に延髄

ではWKYの121.28±20.4 μmol/min/g protein に比し，SHRSPでは147.93±22.9 μmol/min/g protein と有意なAChE活性の上昇が認められた(Fig.)．3)イサチン10^{-4}MでMAO活性は80%，AChE活性は5%抑制 された．

〔考察〕 我々はこれまでWKYに比しSHRSPの生体内にイサチンが多く存在し，血圧上昇に一部関与していることを報告した(4)．イサチンは組織内MAO活性を阻害し生体内アミン濃度を増加させるのみならず，*in vitro*においてAChE活性を阻害するとの報告がある(2)．AChEは脳内ACh濃度を調節する重要な酵素である．そこで正常血圧ラットWKYにイサチンを単回投与し脳内ACh濃度の変化を検討した．投与2時間後の脳内のACh濃度はイサチンの用量に依存して上昇した．これはイサチンがAChE活性を阻害し脳内ACh濃度を増加させたものと考えられる．生体内にイサチンが高濃度に存在するとAChE活性は低下すると思われる．しかし，イサチンが高濃度に存在するSHRSPの脳内AChE活性はWKYに比較し高値を示した．次に*in vitro*においてイサチンによるMAO活性抑制率とAChE活性抑制率について検討した．イサチン10^{-4}MでMAO活性は80%抑制されたがAChE活性は5%しか抑制されなかった．したがってイサチンを大量単回投与するとMAO活性およびAChE活性はともに抑制されるが，生体内に存在する濃度の範囲ではより親和性の高いMAO活性を抑制するものと考えられる．脳脊髄液中でSHRSPのACh濃度はWKYに比し減少しているとの報告があり(5)，SHRSPの脳内イサチンとAChE活性およびACh濃度との関連性については今後詳細な検討が必要である．

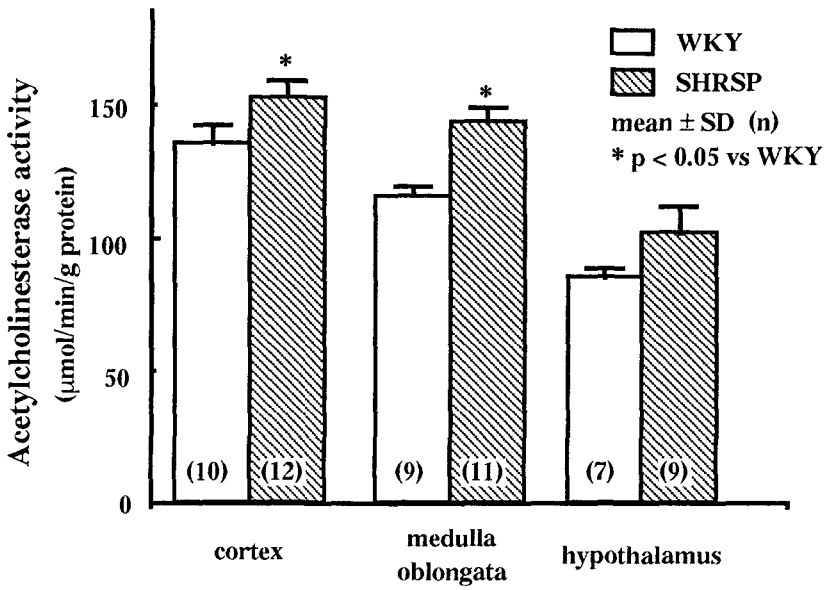


Fig. Acetylcholinesterase (AChE) activity in WKY and SHRSP brain.

〔文献〕 (1) Hamaue, N., Minami, M., Kanamuru, Y. *et al.* (1992) Biogenic Amines 8, 401-412. (2) Kumar, R., Bansal, R. C. and Mahmood, A. (1993) Biogenic Amines 9, 281-289. (3) Hamaue, N., Minami, M., Kanamuru, Y. *et al.* (1994) Biogenic Amines 10, 99-110. (4) 浜上尚也，遠藤泰，南 勝．(1993) 神経化学 32, 352-353. (5) Togashi, H., Matsumoto, M., Yoshioka, M. *et al.* (1994) Neurosci. Lett. 117-120.

80 近交系マウスを用いた選抜育種による逆耐性モデル動物の作成；線条体におけるドパミン代謝の変化

盛政忠臣、干場純治*、金行孝雄**、庄盛敏廉
（岡山大学医学部神経内科、*同動物実験施設、**岡山県立大学）

〔要約〕

近交系マウスC57BL系を用いて、選抜育種により覚醒剤に対する行動感作を示す亜系と示さない亜系への分離を行った。妊娠10日目から10日間連日4mg/kgの覚醒剤を投与した。産仔の雌雄両方について、10週齢の時点で、2mg/kgの覚醒剤に対する薬理反応を測定した。標的とした行動は、locomotionとsniffingに限定した。産仔の雌雄ともそれぞれ、薬理反応が高い個体同士または低い個体同士との組み合わせ交配による選抜育種を繰り返した。その結果、sniffingについては、行動感作を示す亜系(High Sniffing response;HS系)と示さない亜系(Low Sniffing response ;LS系)への分離が、選抜育種の早期から、統計学的にも分布の上でも明らかに示された。
HS系では覚醒剤による用量依存的な行動感作の増強(stereotyped sniffing)を示し、LS系ではそのような変化は示さなかった(対照に対する生食水投与と同様の結果)。
一方、線条体内神経伝達物質のドパミン濃度は、HS系はLS系の64％の有意な低値を示した。さらにHS系のドパミン濃度は、覚醒剤投与量依存的に、有意な増加を示した。
これらの結果から、HS系では、ドパミンの生合成と放出を含む機序に変化が生じていることが示唆された。

覚醒剤により、長期持続的な変化が中枢神経系に生じることは、ヒトの乱用者でも実験動物でも知られている。その病的機序の解明を目的とした研究は多数ある。それらの結果からは、ドパミン神経終末の周辺の変化が示唆されている。一方、乱用者でも実験動物でも、必ずしも全ての個体が同程度の覚醒剤後遺症（行動感作）を示さないことが知られている。
そこで本研究では、この病的機序を明らかにする目的で、遺伝情報のホモロジ-が高い動物を用いて、覚醒剤による行動感作を生じる群と生じない群とに選抜育種法により分離を行い、新しい動物モデルとしての検討を行った。

【実験方法】
実験動物には、遺伝情報のホモロジ-が高い近交系動物の中から、C57BL/6 Cr (SLC)系マウスを用いた。1対1で交配した雌動物に対して、プラグの観察による妊娠を確認した10日目から10日間連日、4mg/kgの覚醒剤（メタンフェタミン）を皮下投与した。
恒温恒湿12時間毎の明暗周期の専用動物室で飼育した。産仔（雌雄それぞれ）に対して、10週齢に至った時点で、2mg/kgの覚醒剤の単回投与の30分後に、オ-プンフィ-ルド上で5分間にわたって、locomotion（K）とsniffing（S）を測定した。測定は、盲試験で行った。
それぞれのスコア別に、高スコア（HSまたはHK）を示した雌雄同士および低スコア（LSまたはLK）を示した雌雄同士を交配させて、選抜育種を繰り返した。
選抜育種の交配は、10組の雌雄で開始した。次の世代の交配には、スコア値が互いに重なる個体は除外した。行動薬理実験を行う場合を含めて、必要な個体数を確保するために、2産目も用いた。この場合、2産目の評価は、1産目の結果と同様に評価した。
統計学的比較には、ANOVAとMann-Whitney U testを用いた。

【結果】
1. sniffingに関しては、覚醒剤に対する感受性が高い(HS)群と低い(LS)群に、第2世代以降から有意で明確な分離が示された図１；　雌でも同様：省略)。
2. locomotionでは、このような分離は示されなかった（図 2；　雌でも同様：省略）。
3. HS群では覚醒剤に対して用量依存的な有意な増加（stereotyped sniffing）を示し、LS群ではそのような変化(図３；　雌でも同様：省略)は示されなかった。
4. 5分間の行動測定を、1分毎に見ると、HS群のsniffingは高値の持続（stereotypy）を示した。それに対して、LS群では、対照群（妊娠期に生食水投与）に対する覚醒剤（2mg/kg）投与群と生食水投与群と同様な低値と経時的な減少を示した(省略)。
5. 線条体内のドパミン濃度は、基礎値として、HS系ではLS系の64％の低値を示した。HS系のドパミン濃度は、覚醒剤投与によって、LS系と同じレベルに上昇を示した(図 4)。

【考察】

本研究では、近交系マウスから選抜育種法により、stereotyped sniffingの行動感作が生じる群（HS）と生じない群（LS）とに分離することに成功した。さらに、HS系の動物では、線条体でのドパミン生合成の抑制（1）と覚醒剤による生合成の変化が明らかにされた。

本研究で選抜育種法の実験に用いた動物は、近交系であり、遺伝情報のホモロジ-は非常に高い。従って、この動物系から作成されたHS群とLS群とを比較することにより、覚醒剤後遺症（行動感作）の発現機序が分子生物学的に解明されることが期待される。

【文献】

1.Koda LY and Gibb JW.(1971) The effect of repeated large doses of methamphetamine on adrenal and brain tyrosine hydroxylase. Pharmacologist. 13: 253.

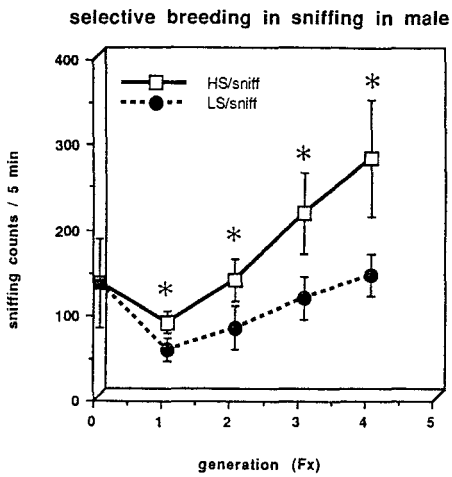


図1　覚醒剤誘発性sniffinngに関する選抜育種の結果（平均±SD）
★；$p < 0.05$、世代（Fx）間の比較

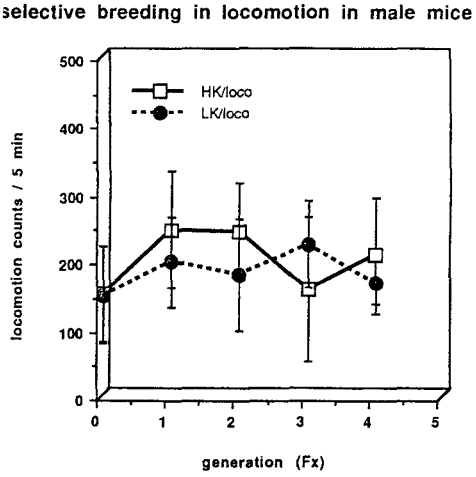


図2　覚醒剤誘発性locomotionに関する選抜育種の結果（平均±SD）

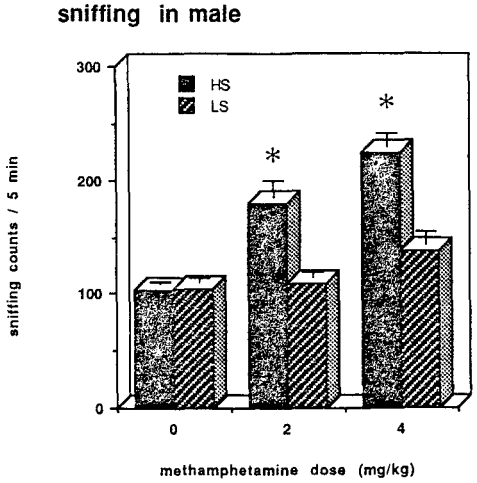


図3　覚醒剤投与量に対するsniffingの変化（平均±sem）
★；$p < 0.05$ 対照群に対して

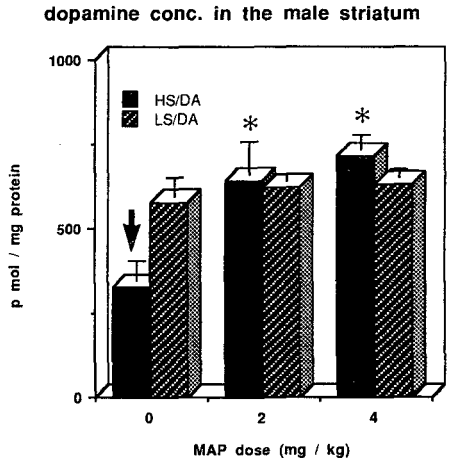


図4　覚醒剤投与量に対する線条体ドパミン濃度の変化（平均±sem）
★、　；$p < 0.05$ 、　はLSとの比較

81 ペンチレンテトラゾール誘発痙攣によるマウス大脳皮質プロテインキナーゼCの動態

古塚大介[1]、黒田陽子[1]、木岡哲郎[1]、勝元栄一[1]、横谷昇[2]、尾崎宣洋[1]、中西亜紀[1]、山上榮[1]
[1] 大阪市立大学医学部神経精神医学教室　[2] 大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所

〔要約〕

生後75日のddYマウスにpentylenetetrazole (PTZ) を投与し痙攣を誘発させた後、大脳皮質より可溶画分と膜画分とを調製し、Protein kinase C (以下PKC) 活性を測定した。痙攣後10分で可溶画分のPKC活性が亢進した。抗PKC isozyme抗体を用いてimmunoblottingを行ったところ、痙攣後10分の可溶画分で 80K PKC-β が増加したが、膜画分では減少した。また、可溶画分で強直痙攣期および痙攣後10分で 50K PKC-β が出現した。以上の結果から、PTZで誘発した痙攣によってPKC-βの膜から細胞質へのtranslocationが起こるとともに、PKC-βの限定分解によりPKC catalytic domain が細胞質に出現し、細胞質のPKC 活性が増加することが示唆された。

はじめに

われわれは自然発症てんかんモデルであるElマウスや PTZ などの薬剤誘発てんかんを用いて、てんかんの原因と病態の解明をおこなっており、1989年にElマウスの海馬と扁桃核において、Ca^{2+}/calmodulin 依存性のリン酸化反応系に異常があり、このことからElマウスの海馬の Ca^{2+}/calmodulin 依存性キナーゼの基質特異性の変化を示唆し(1)、現在そのリン酸化基質の同定を試みている。

今回、PKC について、PTZ 誘発てんかんにおける大脳皮質の膜および可溶画分のPKC活性とPKCのlocalizationを検討し、痙攣という病態下におけるPKC の細胞内の動態について検討したので報告する。

実験方法

1)　生後75日のddYマウスにPTZ(50mg/kg) を腹腔内に投与し、痙攣を誘発させ、強直痙攣期および発作10分後で PKC への痙攣発作の影響を検討した。対照には生理的食塩水を投与した。

2)　大脳皮質を摘出し、1mM PMSF, 10μM leupeptin, 10μM pepstatinA , 10nM calyculin Aを含む 20mM Tris-HCl, pH7.4 溶液で homogenize し、1,000g 10 分間遠心後、その上清を100,000gで1時間遠心し、上清を supernatant fraction、沈渣を particulate fraction とした。

3)　両画分について5mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 50μM[γ-^{32}P]ATPを含む 25mM Tris-HCl, pH7.5中で30μM Ac-$MBP_{(4-14)}$ PKC substrate peptide を基質として、PKC 活性を測定した。

4)　両画分について抗 PKC isozyme 抗体を用いてWestern blottingを行った。

結果

1）　大脳皮質の膜画分と可溶画分におけるPKC活性におよぼすPTZ誘発痙攣の影響

痙攣後10分で supernatant fraction のPKC 活性が対照、強直痙攣期に比べ有意に亢進していたが、particulate fraction では有意な差は認められなかった(Fig.1)。

2）　PKC isozyme 抗体を用いた Western blotting

痙攣後10分で supernatant fraction の 80K PKC-β が増加し、particulate fractionでは減少していた。また、supernatant fraction で強直痙攣期および痙攣後10分で 50K PKC-β が出現してい

た(Fig.2)。PKC-αでも同様な傾向が見られたが、PKC-γは免疫活性が低値で検出できなかった。

考察

PKCは細胞内Ca^{2+}と細胞膜内のイノシトールリン脂質代謝産物である diacylglycerol の2種類の second messengers により活性化される。またPKCは Ca^{2+} 依存性の protease によって、36K の regulatory domain と50K のCa^{2+}非依存性の活性を持った catalytic domain に限定分解され、この catalytic domain は long-term potentiation (LTP) の発現に関与すると言われている(2,3)。

今回、PTZ 誘発痙攣時、PKC-β および PKC-α の細胞膜から細胞質への translocation が生じ、細胞質の PKC 活性が増加した。また強直痙攣期に細胞質で 50K のPKC 免疫活性が観察された。この50K のPKC 免疫活性は PKC の限定分解による Ca^{2+} 非依存性の PKC catalytic domainと考えられた。Ca^{2+} 非依存性の catalytic domain の出現より、この亢進したリン酸化反応の一部は細胞内の Ca^{2+} が低下した後も長時間持続することが予想され、また、細胞膜から細胞質への移行は細胞核内で c-*fos*, c-*jun* などの immediate early genes の発現にも関与することが予想された。

（本研究は平成５年度文部省科学研究費補助金の援助を受けた。）

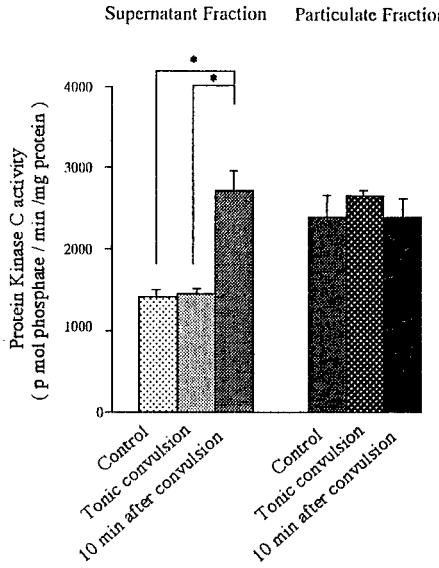


Fig. 1 Effect of PTZ-induced convulsin on cortical PKC activity

* p<0.05, Data are mean + SE (bars).

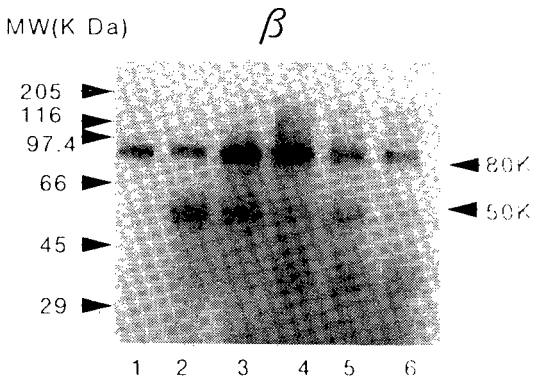


Fig.2 Westernblot analysis by anti-PKC β monoclonal antibody in cortical supernatant and particulate fractions.

lane 1,4: control,
lane 2,5: tonic convulsion,
lane 3,6: 10min after convulsion
lane 1, 2, and 3 : supernatant fraction,
lane 4, 5, and 6 : particulate fraction
Each lane contains 12μg protein.

文献

1) 古塚大介、山上栄、川北幸男 (1990) *大阪てんかん研究会雑誌*, **1**, 31-37

2) Suzuki, T., Okumura-Noji, K., Ogura, A., Tanaka, R., Kakamura, K., and Kudo, Y. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1515-1520

3) Kishimoto,A., Kajiwara, N., Shiota, M., and Nishizuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1156-1164

82 ＥＬマウスにおける脳内ＳＯＤ活性の発作履歴及び発達過程における変化

村島善也、鈴木二郎*
（都精神医学研・神経生理、*東邦大学・医・精神医学）

〔要約〕

生後5週齢より週一回の放り上げ刺激を与え続け、発作閾値が低下してくるEL[s]と、生後全く誘発刺激を与えず、観察する限り発作を経験していないEL[ns]の脳について、ELﾏｳｽてんかん発作の焦点複合を形成する頭頂皮質と海馬に注目して、発達過程を追ってSuperoxide dismutase (SOD)活性を測定した。頭頂皮質については、EL[s]と EL[ns]を問わず、選択的局所神経細胞死の可能性を示唆するSOD活性の上昇を認めた。一方海馬については、EL[s]では10週齢をﾋﾟｰｸとして増大した後、発作閾値が最低となる30週齢で急激な低下を示したが、EL[ns]では発達に伴う大きな変化はなかった。以上の結果より、ELﾏｳｽ頭頂皮質において既に明らかにされているGABA作動系の機能低下[1]は、SOD活性上昇を伴う他の中枢神経変性疾患同様に遺伝的に規定されたものであり、海馬におけるSOD活性の著明な低下は発作履歴によって、GABA作動系ﾆｭｰﾛﾝを含む細胞構築の変化が起こり、異常可塑性が成立したことによる二次的現象であることが示唆された。

［目的］

てんかん原性の成立に関しては、中枢神経障害作用のある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。一方、遺伝性の二次性全般化てんかんﾓﾃﾞﾙであるELﾏｳｽでは、発達過程において、頭頂皮質の極めて限局した部位での、GABA作動系ﾆｭｰﾛﾝの機能低下が発作感受性の亢進と共に起こることが知られている。また、海馬CA1では、逆に頭頂皮質に遅れて、GABA作動系の亢進が認められ、電気生理学的には脱抑制性GABA作動系介在ﾆｭｰﾛﾝの増強が示唆されている[1,2]。そして、この頭頂皮質と海馬が、焦点複合[3]を形成し、てんかん原性が成立していく。そこで、ELﾏｳｽの頭頂皮質と海馬に注目して、SOD活性の発達生化学的検討を行った。

［方法］

脳内領野試料の作製：動物は5,10,20,30,40週齢EL[s]及びEL[ns]の各6匹、計60匹を用いた。頸椎脱臼後断頭し、ｺｰﾙﾄﾞﾙｰﾑ中にて氷上で脳をとりだした。ｽﾃﾝﾚｽ製の剃刀の刃で2mm 間隔で嗅脳側から尾側へと前頭断切片を得、これより頭頂皮質（ＰＣｘ）、海馬（Ｈｉｐｐ）、の２部位について、8-20mg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ELﾏｳｽの母系であるDDYﾏｳｽを当研究所にて近交系としたﾏｳｽ5,10,20,30,40週齢各3匹計15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[4]を改良し、脳内領野10μg湿重量で測定可能な系を確立した。測定原理はﾌｪﾘｼﾄｸﾛｰﾑｃ酸化型(その際の550nmの吸光度：(A_1)が還元型となると550nmの特異吸光(A_2)を示すことを利用している。ｷｻﾝﾁﾝﾅﾄﾘｳﾑを基質としてｷｻﾝﾁﾝｵｷｼﾀﾞｰｾﾞを働かせると1:1でO_2^-を生じる。このﾌﾘｰﾗｼﾞｶﾙがﾌｪﾘｼﾄｸﾛｰﾑｃに対して還元剤として働き550nmの吸光度が一定速度(Ｖ)で上昇していく。このときSODを含んだ試料が加えられるとO_2^-が消去されるためＶは低下してくる。SOD活性は、$A_2-A_1=0.21$ absorbance unit の条件下で$V=0.025$ absorbance units/min が$V=0.0125$ absorbance units/min に低下するときを1 Unit(1U)と定義している。今回のﾃﾞｰﾀでは1μgﾀﾝﾊﾟｸあたりの SOD活性を1 Unit /μg protein として表示している。

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[4] 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] 頭頂皮質における EL[s]とEL[ns]の発達にともなうtotal SOD活性および各アイソザイム活性の変化：EL[s]では生後30週齢まで徐々に増大していった。30週齢対照のDDYは、1.55 U/μg protein であるから10週齢くらいから有意に上昇していることが分かる(Fig.1)。一方発作誘発刺激を全く与えていないEL[ns]では幾分増大の程度は小さいもののEL[s]と大きな差はなく、やはり30週齢まで徐々に増大していった。かつ、この増大分をｱｲｿｻﾞｲﾑで検討してみるとほとんどがCu,Zn-SOD であった。

海馬におけるEL[s]とEL[ns]の発達にともなうtotal SOD 活性および各アイソザイム活性の変化：EL[s]では、10週齢まで増大して行き、20,30週齢で急激に低下してきた(Fig.2)。ところが、発作誘発刺激を全く与えていないEL[ns]では、30,40週齢でわずかに低下するものの生後ずっと殆ど差はなかった。20,30週齢で急激に低下してきたSOD活性のｱｲｿｻﾞｲﾑを検討してみると、低下しているもののほとんどが、Cu,Zn-SOD であった。

[考察]

ELﾏｳｽのSOD活性で特に顕著な変化を示したのは海馬であった。海馬に存在するﾌﾘｰﾗｼﾞｶﾙの作用については、海馬CA1領域での長期増強(LTP)を強化することが報告されている。[5]てんかん原性が成立した海馬ではﾌﾘｰﾗｼﾞｶﾙの活性自体高まっている可能性がある。SOD以外で海馬におけるﾌﾘｰﾗｼﾞｶﾙの消去剤として知られているｸﾞﾙﾀﾁｵﾝについては遺伝性全般化てんかんのﾓﾃﾞﾙであるtottering (tg/tg)ﾏｳｽでは、海馬で著しい低下を示す[6]。この現象はELﾏｳｽにおける海馬SOD活性の著しい低下と考え合わせて、遺伝てんかんﾓﾃﾞﾙで海馬におけるﾌﾘｰﾗｼﾞｶﾙ消去剤の部位特異的低下の存在を示唆している。またSOD活性は中枢神経系の変性疾患では上昇する事が知られている[7]。ELでGABA作動系の限局した機能低下の知られている頭頂皮質でも、同様の機序でSOD活性が上昇していた可能性も考えられる。

Fig.1

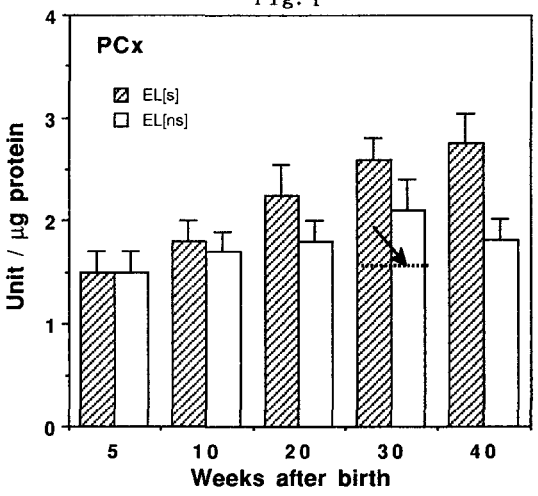


Fig.2

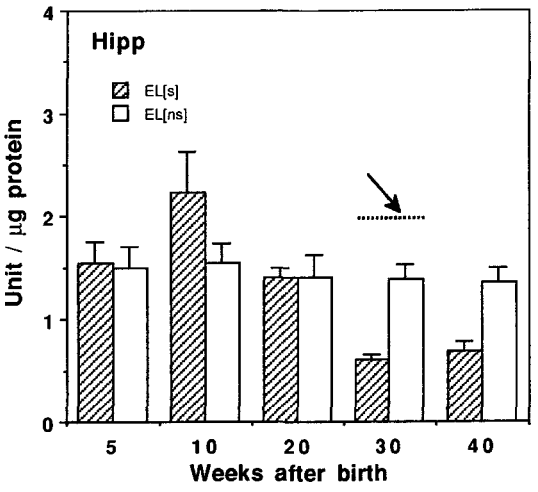


Fig.1 Developmental changes of total SOD activities in the parietal cortex. Hatched bars indicate activities of EL[s] mice and open bars indicate those of EL[ns]. And the arrow indicates the level of control 30 week-old DDY mice.

Fig.2 Developmental changes of total SOD activities in the hippocampus.

[文献]

1.Murashima,Y.L., Kasamo,K. and Suzuki,J. (1992) Neurosciences 18, 63-73
2.Ishida,N., Kasamo.K. and Suzuki,J. (1987) Jpn.J.Neurol.Psychiat. 41,498-499.
3.Suzuki,J. (1989) Art and Science of Epilepsy. (Suzuki,J. ed.) 27-33.
4.Ono,M. et al.(1992) BBRC, 182(3), 1100-1107.
5.Pellmar,T.C. et al (1991) Neuroscience 44(2), 353-359
6.Abbott,L.C. et al (1990) Brain Res -Bull. 25(4), 629-631
7.Ceballos,I. et al (1991) Free Radic. Res. Comm. 13(2), 571-580

83 キンドリングけいれん誘発ラットの海馬におけるAP-1 DNA結合活性の経時変化

柏原健一、佐藤圭子*、石原武士**、秋山一文**、庄盛敏廉
（岡山大学・神経内科、*国立療養所南岡山病院・臨床研究部、
** 岡山大学・神経精神科）

〔要約〕 ラットの一側扁桃核を電流で反復刺激し、扁桃核キンドリングを完成させた。最終けいれん後経時的に断頭し、海馬におけるAP-1DNA結合活性を調べた。その結果、結合活性は刺激後徐々に増加し、2時間後がピーク、以後漸減し、24時間後にはほとんど消失していた。キンドリング完成ラットではけいれん誘発時海馬でAP-1のDNA結合活性が一過性に増加することが明らかとなった。

AP-1は転写制御因子の1つであり、immediate early gene として知られるFosやJun ファミリーに属する蛋白質のヘテロダイマーである。薬物や電気刺激で実験動物にけいれん発作を誘発すると、脳内で幾種かのimmediate early gene （1,2）やAP-1 （3）が増加する事が報告されている。キンドリングは、初回はけいれんを起こさない刺激を反復するうちに後発射持続時間が延長し、全般化けいれんを誘発するようになる現象であり、側頭葉てんかんのモデルと考えられている。また、一旦けいれんを起こすようになると過敏反応性が長期に持続することから中枢神経系の可塑性のモデルともされ、その機序解明に向けての研究がなされている。本研究は、キンドリングにおける中枢神経系の長期持続性変化の獲得過程における転写制御因子の関与を検討する目的で行った。

[方法] ＳＤ系雄性ラットの左側扁桃核にペントバルビタール麻酔下で深部電極を埋め込み、術後回復期間の後に1日1回電気刺激（200～400μA、60Hz正弦波1秒間）を反復した。Racine の分類のステージ5の全身けいれんを5回連続して生じた動物をキンドリング完成ラットとした。1～2週間の刺激休止の後同様の刺激を3回加え、最終けいれん終了直後、30分後、1、2、4、8、24時間後に断頭した。対照群には、同部位に電極を埋めたがキンドリング刺激を加えないラットを用いた。これらの脳から海馬を切り出し、Sakurai et al. (4) の方法により核蛋白抽出液を調整した。プローブとして用いたAP-1のオリゴヌクレオチドの塩基配列は5'-ＣＧＣＴＴＧＡＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＧＧＡＡ-3'である。これを[γ^{32}p]dATP でラベルし、5μｇの核蛋白抽出液に加えた。反応液は4%アクリルアミドゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィーで特異バンドを検出した。バンドのoptical density (OD)を測定し、背景のODに対する百分率を計算した。この値の変化は one-way ANOVA で統計学的に検定した。個々のポイントにおける値と対照群との差異は Fisher PLSD test で検定した。

[結果と考察] 扁桃核キンドリング完成ラットを再刺激してけいれんを誘発し、AP-1活性を経時的に調べると図1のようになった。すなわち、AP-1プローブと核抽出蛋白との結合産物を電気泳動すると、上下2つのバンドが得られた。この結合産物に過量の非ラベルAP-1プローブを加えておくと、上のバンド（upper bands) のみが消失することから上のバンドが特異的なAP-1のDNA結合活性を示すと考えられた。図1の如く、対照ラットの海馬では特異バンドは殆ど出現しなかった。しかし、誘発けいれん後は経時的に活性が増加し、8時間後以降減少した。この様な変化を背景のODを100％として百分率に換算し、各ポイントn=5で平均±ＳＥを求めると図2のようになった。図2からAP-1の結合活性の増加はけいれん誘発後2時間でピークとなり、その後漸減して24時間後にはほぼ対照群のレベルに戻ることが示された。統計学的にはこの増加は有意（ｐ＜0.01）であり、対照群に比べけいれん後1～8時間の間、 AP-1 のDNA結合活性が有意に増加していた。

様々な物理的、化学的刺激によるけいれんにおいて immediate early gene であるc-fos、c-jun mRNA やc-Fos蛋白が増加することが報告されている。AP-1はこのようにして造られたFos やJunファミリー蛋白のヘテロダイマーであり、特定の遺伝子の上流に結合してその転写を制御する。今回の結果からはAP-1のDNA結合活性がけいれん誘発の2時間後をピークに増加することが明かとなった。Hope ら(3)は反復して電撃けいれんを行い、AP-1活性が単回刺激ではけいれん後2時間をピークに増加、以後減少するが、反復刺激後の再刺激では少なくとも1週間、活性の増加が持続することを報告した。私

どもの結果はキンドリング完成後の再刺激ではAP-1活性が２時間をピークに増加するが、24時間以内にもとに戻ることを示しており、彼らの報告する反復電撃けいれん時のような長期持続性の増加は認めなかった。この差異はキンドリングけいれんと、電撃けいれんという物理的刺激による直接的けいれんの発現機序の違いを反映している可能性がある。本実験の結果はキンドリングけいれんに引き続いて海馬でAP-1 DNA結合活性が一過性に増加することを示唆している。今後はこのAP-1の変化がキンドリング発展の背景となる中枢神経系反応性長期持続性変化の獲得過程にどのように関与するかを検討してゆきたい。

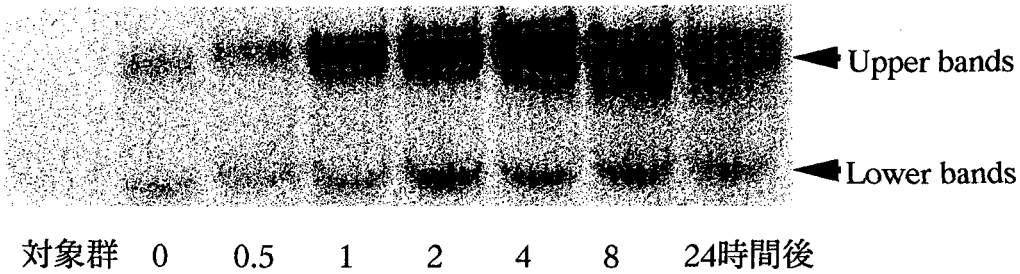


図１、誘発けいれん後の海馬におけるAP-1結合活性の経時的変化を示すオートラジオグラフィー像

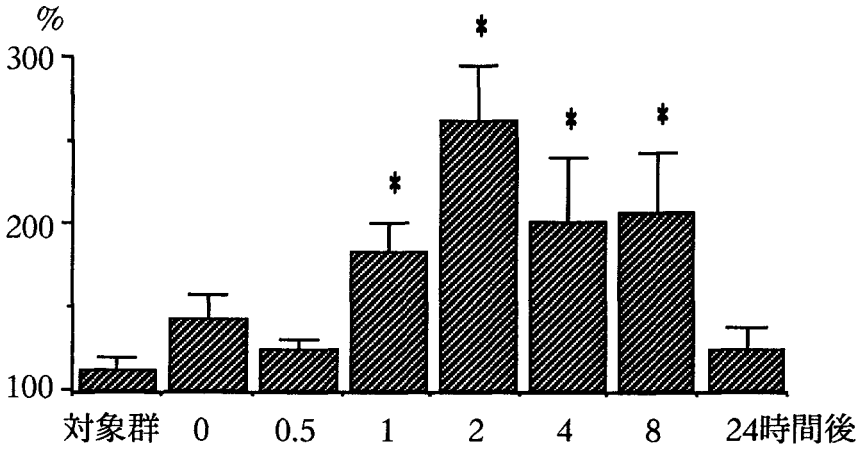


図２、誘発けいれん後の海馬におけるAP-1結合活性の経時的変化
オートラジオグラフィーで得られたODを背景ODに対する百分率で表示した。
各棒グラフは平均±SEを表す。（n=5, *; p<0.05)

[文献]
(1) Dragunow M and Robertson HA. Nature 329: 441-442, 1987.
(2) Lanaud P et al. Exp Neurol 119: 20-31, 1993.
(3) Hope BT et al. J Neurosci 14: 4318-4328, 1994.
(4) Sakurai H et al. J Neurochem, 59: 2063-2075, 1992.

84 発作間欠期のElマウス脳におけるAP-1 DNA結合能と発作感受性との相関について

勝元栄一、尾崎宜洋、横谷　昇*、古塚大介、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、AP-1 DNA結合能のいずれもが、ElおよびddYマウスにおけるペメグリド投与による発作後のものより延長していることを認めている。さらにElマウスのてんかん感受性の獲得と転写制御因子AP-1との関係を検討するために、発育に伴うElマウス脳のAP-1 DNA結合能をddYにおける場合と比較した。その結果、ddYでは、生後3、4週令で、AP-1 DNA結合能は上昇するが、その後は発育に伴い減少し、25週令では殆ど認めなかったに対し、Elでは、3、4週令ではddYと同様であったが、その後放り上げ刺激を与え、痙攣履歴を重ねると、AP-1 DNA結合能はddYと異なりやや減少するが、結合能は持続していた。このことはAP-1がElマウスの発作感受性を高める何らかの遺伝子の誘導をしているのではないかと推測される。

（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[4]。痙攣履歴のあるElマウスに放り上げ刺激を与え、発作を誘発した後の脳におけるAP-1 DNA結合能は、ElおよびddYにペメグリドを注射して起こさせた場合より結合能が長時間持続することを報告した[2]。発作間欠期でもElマウスではその母系で発作非感受性のddYマウスより結合能が上昇していた。このことからElマウスにおいてAP-1がてんかん感受性の獲得に何らかの役割を担っているのではないかと推測し、Elマウスの発作間欠期およびddYマウスにおけるAP-1 DNA結合能をその発育に伴う変化について比較検討を行った。

（方法） Elマウスは生後4週令より放り上げ刺激を週に一度繰り返すことによって、生後8週令から強直間代痙攣発作を起こすようになり、てんかん感受性を獲得したものを用いた。対照としてはElマウスの母系でてんかん非感受性のddYマウスを用いた。El、ddYマウスとも生後3～25週令のものを用いた。それらのマウスより得た脳からDignamら[1]の方法により細胞核抽出液を調製した。細胞核抽出液（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'-TGATCCGGC TGACTCATCATAG-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断片とを分離した。泳動後gelを濾紙に移し、乾燥させ、autoradiographyを行った。

（結果） Fig. 1に示したように、El、ddYとも生後3、4週令ではpositive controlであるEl[s]の放り上げ2時間後ほどではないが、比較的強いAP-1 DNA結合能を認めた。ddYでは徐々に結合能は低下していき、25週令では殆どAP-1 DNA結合能は認められなかった。それに対し

てElではAP-1 DNA結合能は低下していくが、25週令においてもなお結合能が認められた。また、negative controlとして用いたBovine serum albuminではAP-1 DNA結合能は全く認められなかった。

（考察） ElおよびddYマウスともに生後3、4週令において、AP-1 DNA結合能は顕著に出現した。Pennypackerら[3]も、ラット脳において生後1週令でAP-1 DNA結合能が強く発現するが、その後減少していくことを報告している。この生後早期におけるAP-1 DNA結合能の上昇は、グリア細胞のさかんな分化によるものではないかと推測する。ddYではAP-1 DNA結合能は発育と共に低下し、25週令では殆ど認められなくなるのに対して、Elでは発達すると徐々に減少していくが、25週令でもなおAP-1 DNA結合能が認められた。このことから、Elマウスは週に一度の放り上げの反復刺激を加えることによって発作感受性を獲得していくが、この刺激による発作の結果、Fos蛋白質が生産され、AP-1が形成され、このAP-1が転写因子としてでんかんに関連した遺伝子を活性化するのではないかと考えられる。

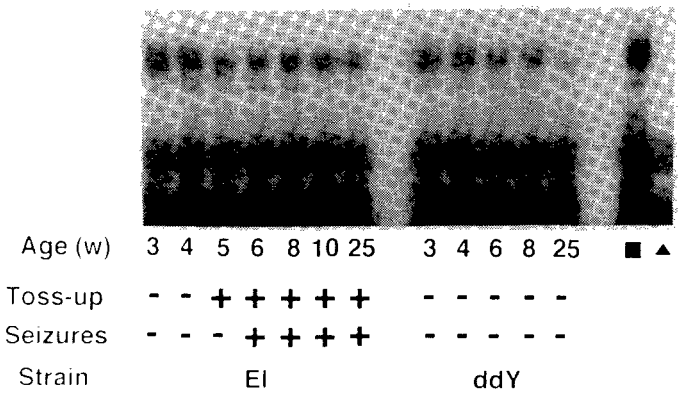


Fig. 1 The alteration of AP-1 DNA binding activities in brains at interictal period of El[s] and ddY mice during the development.

■: Two hours after seizures induced by tossed-up stimulation of 25-week-old El[s] mice (positive control).

▲: Bovine serum albumin 25 μg (negative control).

（参考文献）

1. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489.

2. 勝元栄一、尾崎宜洋、横谷　昇、山上　榮（1994）神経化学 33, 376-377.

3. Pennypacker, K. R., Dreyer, D., Hong, J. S. and McMillan, M. K. (1993) Mol. Brain Res. 19, 349-352.

4. Vogt, P. K. and Tjian, R. （1988） Oncogene 3, 3-7.

85 パーキンソニズムを惹起する神経毒1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-isoquinolinium ion のヒト脳内分布と生合成に関する研究

丸山和佳子[1)]、高橋勤[2)]、直井信[3)]

1)名古屋大学医学部神経内科、2)江南女子短期大学、3)名古屋工業大学）

[要約]

ドーパミンに特異的な神経毒である1(R)-, 2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroiso-quinoline [N-methyl-(R)salsolinol, (R)NMSal]とその酸化体1,2-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion (1,2-DiMeDHIQ+)がヒト脳内で生成されるには少なくとも3段階の酵素反応が関与していることが証明された。特に最初の段階でdopamineとpyruvic acidが酵素的に縮合する反応により1-carboxy, (R)-salsolinol [1-carboxy(R)salsolinol, 1-carboxyl(R)Sal]が生成されることからR型イソキノリンが脳内で特異的に生成されることが示された。ヒト脳の分析によりsalsolinolのR型のみが存在すること、加齢に伴い1,2-DiMeDHIQ+が黒質で蓄積されることが見い出された。以上の結果はヒト脳で生合成されたR型イソキノリンと1,2-DIMeDHIQ+が加齢に伴う黒質ドーパミン神経細胞傷害やパーキンソン病の病因に関与する可能性を示唆している。

[目的]

ドーパミン由来のヒト脳内在性イソキノリンである6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (DHTIQ) 類をラット脳内に投与したところ、(R)NMSal によって無動、固縮、振戦などのパーキンソニズムが惹起され、黒質ドーパミンニューロンの減少が認められた。黒質には(R)NMSalの酸化代謝物である1,2-DiMeDHIQ+の蓄積が認められた。N-methyl-salsolinol (NMSal)の活性はR型のみに認められたことからドーパミンからR型イソキノリンとその誘導体が生合成される反応を検討する。これら神経毒の生合成に関与している段階的な反応は5段階あると考えられ(Fig.1)、step 4 については我々が既にin vivo、in vitro で報告している 酵素反応である[1]。またDHTIQ類のヒト脳内蓄積を検討する。以上得られた結果より神経毒の生成機構とヒトのパーキンソン病における内因につき考察を行う。

[方法]

ドーパミンより1,2-DiMeDHIQ+ に至る生成の各ステップに関与する酵素を明らかとするために、ヒト脳より酵素標品を調整し用いた。反応 1-4 に関与する酵素活性の測定には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 電気化学検出器 (ECD)を、酵素反応5 は蛍光検出器を用いた。同時にヒト脳線状体、黒質などの(R)NMSal 、1,2-DiMeDHIQ+の脳内分布と加齢に伴う蓄積につき検討するために HPLC-多次元ECDを用いた。光学異性体の分離には β-cyclodextrin column を用いた。

[結果および考察]

最初の段階であるドーパミンとピルビン酸の縮合(Step 1)で酵素反応によって、光学異性体のなかでR型のsalsolinol [Sal]のみが生成されることが証明された。この酵素はヒト脳で細胞質画分に存在しドーパミンとピルビン酸に対し約 300 uM のKm 値が得られた。また、最後の段階であるNM(R)Salの酸化に関与する酵素はsemicarbazideによって阻害を受けるミトコンドリアーモノアミン酸化酵素とは異なることが明らかとなり、粗精製した酵素のKm、 VmaxはTable 1に示す。

Sal 、NMSal 、1,2-DiMeDHIQ+をヒト脳内で分析した結果では加齢に伴い前頭葉においてはSal濃度の低下が、黒質においては1,2-DiMeDHIQ+濃度の増加が認められた(Fig. 2)。また脳内に存在するSalは(R)型のみであった [2]。

我々は既にこれらカテコール核をもつイソキノリン類のなかでもNM(R)Salのみがドーパミントランスポーターによってヒトドーパミン神経芽細胞腫に取り込まれることを報告している。ヒト脳内で酵素的に合成されるSalが(R)型であることはこれらイソキノリンのドーパミン神経細胞への特異的蓄積を考える上で重要な意味をもつ。またNM(R)Salの酸化に伴い水酸化ラジカルが生成することをin vivo, in vitroで証明した[3]。 以上の結果はドーパミン由来のイソキノリン類が、脳内で酵素的代謝を受けることによりドーパミン神経に対する特異的蓄積と毒性を獲得するmetabolic bioactivationがパーキンソン病の病因に関与している可能性を示唆している。

[文献]

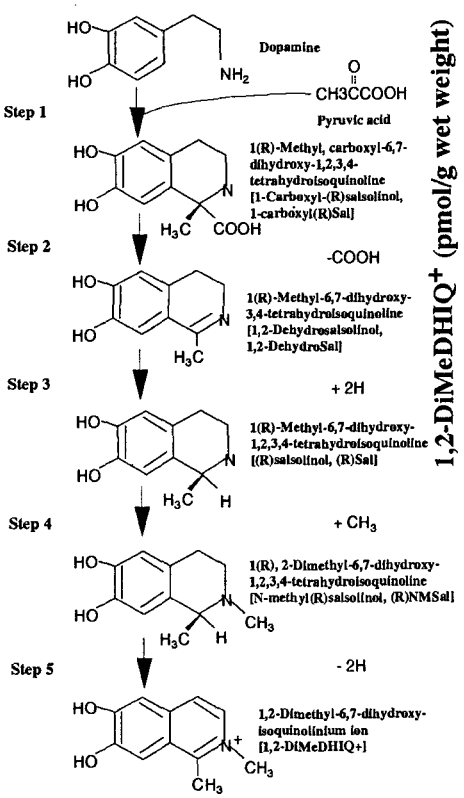
(1) W. Maruyama, et al. J. Neurochem. 59, 395-400 (1992), (2) Y. Deng, et al. J. Chromatograph. in press. ,

(3) W. Maruyama, et al. J. Neurochem. in press.

Table 1 Kinetics of enzymatic oxidation of (R)NMSal and(S)NMSal by the enzyme sample prepared from human brain cortex

	Km (μM)	Vmax (pmol/min/mg protein)
(R)NMSal	911.9±447.0	1368.4±442.1
(S)NMSal	230.9± 47.4	250.6± 16.9

The value represents the mean and SD of threeexperiments



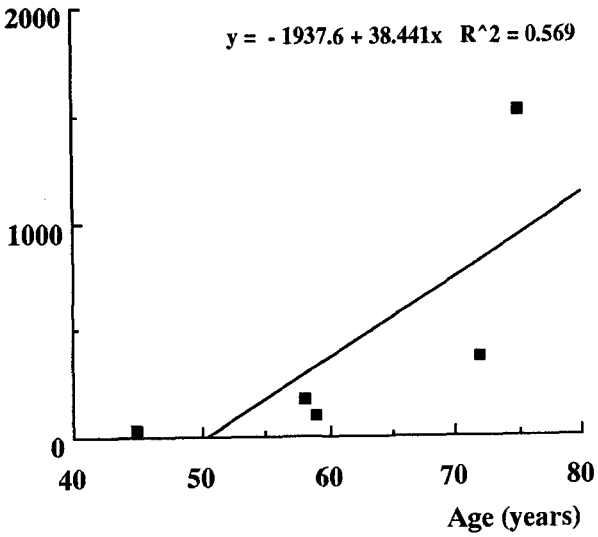


Fig. 2 Age-dependent increase of 1,2-DiMeDHIQ+ in the human brain substantia nigra

Fig. 1 Synthesis of 1,2-DiMeDHIQ+ from dopamine and pyruvate in the human brain

86 Neuropeptide Y の中枢神経内 Dopamine Release に及ぼす影響と高血圧における意義について

津田　和志，増山　善明*，Menek Goldstein**
和歌山県立医科大学循環器内科，東京労災病院*，
New York University Medical Center**

〔要約〕

Neuropeptide Y（NPY）の中枢内 dopaminergic transmission に及ぼす影響と高血圧における意義について検討するため、ラット striatum からの dopamine（DA）release に及ぼす本ペプチドの作用を観察した。NPYはラット striatum からの電気刺激時 DA release を濃度依存性に抑制した。このNPYの作用は D_2-receptor antagonist, sulpiride 存在下や Gi-protein inhibitor である pertussis toxin 処理により有意に減弱した。高血圧自然発症ラット(SHR)の striatum においてもNPYは電気刺激時 DA release を抑制したが、その程度は対照 Wistar-Kyoto（WKY）ラットに比し有意に大であった。以上より、NPYはラット striatum 内 DA release を抑制し、その作用の一部は D_2-receptor、さらには Gi-protein を介するものと考えられた。また、SHR においてNPYの DA release 抑制作用が亢進していることは、本ペプチドが中枢内dopaminergic transmission 調節を介し高血圧の成因、維持機構に一部関与する可能性を示唆するものと考えられる。

〔目的〕

NPYは36個のアミノ酸から構成されるペプチドであるが、中枢ならびに末梢神経組織に広範囲に分布することが知られ[2]、その神経活性調節機序が注目されている。既に我々はNPYがラット hypothalamus や medulla oblongata 内 norepinephrine release を抑制することを報告したが[3,4]、その dopaminergic transmission に及ぼす影響や生理的意義については不明である。そこで本研究ではNPYのラット striatum 内DA release に対する効果を観察し、その作用機序を特に D_2-receptor および Gi-protein との関連から検討した。さらにSHRを用いて高血圧の中枢内 dopaminergic transmission 調節におけるNPYの役割について考察した。

〔対象と方法〕

体重 200～250 g の雄Sprague-Dawley（SD）ラットおよび 9～11週齢 SHR, WKY を断頭後速やかに striatum を摘出し、厚さ 0.3 mm の brain slice を作成した。既法のごとく[5] slice を 0.1 μmol/L 〔^{3}H〕DA でラベル後、両端に platinum electrodes を装着した chamber 内(37℃)に入れ、Krebs-Ringer bicarbonate buffer にて表面灌流を行った。そして灌流を開始してから67分後(S1)と 116 分後(S2)に電気刺激（1 Hz, 2 ms duration, 20 mA, 2 分間）を行った。灌流液は7分毎に採取し、その中に含まれる tritium 量を liquid scintillation spectrometry を用いて測定した。NPYは S2 の14分前に灌流液中に添加し、S2/S1 ratio（fractional release の比）として算出した。また、sulpiride（1×10^{-6} mol/L）は S1 の28分前に灌流液中に加え、その際のNPYの効果を観察した。一方、Gi-protein との関連については brain slice 作成後直ちに pertussis toxin（8 μg/ml）と1時間 incubation し（37℃）、その後上記と同様の方法で実験に供した。数値はmean±SEMで表示し、統計学的検討は分散分析法および Mann-Whitney U-test に

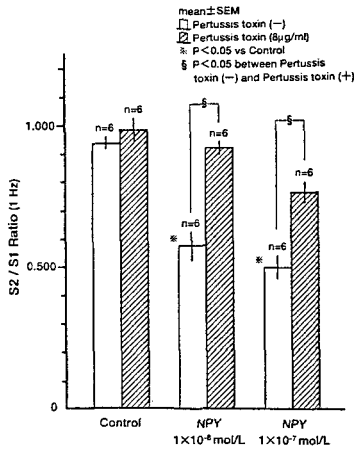


Fig. 1 Effects of pertussis toxin on the NPY-induced inhibition of the stimulation-evoked [^{3}H]DA release in rat striatum

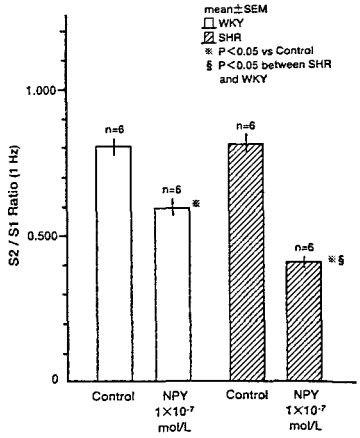


Fig. 2 Effects of NPY on the stimulation-evoked [^{3}H]DA release in SHR and WKY rats

よった。

〔成績〕

(1) NPYはラット striatum 内〔^{3}H〕DA release を濃度依存性に抑制した（S2/S1 ratio：control 0.818 ± 0.020, n = 6, NPY 10^{-8}mol/L 0.544 ± 0.048, n = 6, P < 0.05, NPY 10^{-7}mol/L 0.478 ± 0.033, n = 6, P < 0.05）。(2) Sulpiride 存在下ではNPYの〔^{3}H〕DA release 抑制作用は有意に拮抗された（S2/S1 ratio, NPY 10^{-7}mol/L 0.628 ± 0.018, n = 6, P < 0.05 vs NPY alone）。(3) Pertussis toxin 処理によりNPYの DA release 抑制効果は有意に減弱した（Fig. 1）。(4) SHRにおいて電気刺激時〔^{3}H〕DA release のNPYによる抑制は対照WKYラットに比し有意に大であった（Fig. 2）。

〔考案と結論〕

以上の成績から、NPY は striatum 内電気刺激時〔^{3}H〕DA release を抑制し、本ペプチドが中枢内 DA release 調節因子としての役割を果たすことが示された。従来より、D_2-receptor は DA release に対して抑制的に作用することが知られているが(5)、今回の検討でD_2-antagonist, sulpiride 存在下でNPYの DA release 抑制作用は有意に拮抗された。さらに slice を Gi-protein inhibitor の pertussis toxin で前処理するとNPYの DA release 抑制は有意に減弱した。この成績はNPYの DA release 抑制作用が一部D_2-receptor および Gi-protein を介するものであることを示すものと考えられる。一方、striatum をはじめ中枢内 DA は血圧調節において重要な役割を持つことが報告されているが(1)、NPYの電気刺激時 DA release 抑制作用は SHRでWKYラットに比し有意に亢進していた。高血圧の成因におけるNPYの意義については未だ不明な点が多いが、SHRでNPYに対する感受性の変化が見られることは、本ペプチドが中枢内 dopaminergic transmission 調節を介し血圧調節に一部関与する可能性を示唆すると考えられる。

〔文献〕

(1) Bhargava, H. N. (1984) Eur. J. Pharmacol., 100:109-112.
(2) Everitt, B. J., Hokfelt, T., Terenius, L., Tatemoto, K., Mutt, V. and Goldstein, M. (1984) Neuroscience., 11:443-462.
(3) Tsuda, K., Yokoo, H. and Goldstein, M. (1989) Hypertension., 14:81-86.
(4) Tsuda. K., Tsuda, S., Masuyama, Y. and Goldstein, M. (1990) Hypertension., 15:784-790.
(5) Yokoo, H., Goldstein, M. and Meller, E. (1988) Eur. J. Pharmacol., 155:323-326.

87 サイトカイン産生腫瘍のマウス脳転移モデルの作成について

中井　真通、高内　茂、山口　徹、保田　稔、柿木　達也、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〕

ヒト悪性黒色腫由来のA375細胞はサイトカインのinterleukin-6 (IL-6)を産生している。今回私どもはこの細胞を用いてヌードマウス左心室内に注入する手技を利用し、IL-6産生腫瘍の脳転移モデルを作成した。ヌードマウス左心室内に10^5個のメラノーマ細胞を注入し4-6週間飼育を行ったところ60%のマウス脳内に転移を認めた。脳内転移巣は浸潤性の発育を示し大脳全域にわたり、局所特異性は認められなかった。また転移巣におけるIL-6の産生は免疫学的に確認された。ヌードマウス左心室に注入する細胞数と転移巣の数は相関し、10^3個以下のメラノーマ細胞を注入しても脳転移は認められなかった。脳以外の転移巣を肉眼的に観察したところ骨、肺、副腎、肝臓、精巣への転移が認められた。私どものモデルは一度手技に熟達すれば比較的に安定して高い再現性を得ることが出来る点で優れており、またメラノーマ細胞に様々な遺伝子を導入、発現させることにより脳内での蛋白の局所発現モデルを作る事も可能ではないかと考えられた。

（目的）

脳内におけるペプチド、アミン等の局所的な作用を調べるためにこれまでにトランスジェニックマウス、組織移植、局所注入などの方法が報告されている。ところで、トランスジェニックマウスの場合手技的に煩雑で時間がかかったり、十分な局所発現量を得るのが困難である可能性があったりするという問題があり、また組織移植や局所注入においては臓器侵襲が強いとか溶媒に何を使うかなどの問題があった。一方、腫瘍の脳転移は肺癌、大腸癌、悪性黒色腫等でよくみられる合併症であり、その機構を調べるためにこれまでに様々なモデルが報告されている。今回私どもは悪性黒色腫細胞を用いてこの細胞を脳内に血管性転移させることにより脳内における局所蛋白発現系を作成しようと試みた。

（方法）

A375メラノーマ細胞を10^5、10^4、10^3個/0.1mlとなるようにPBSに懸濁し、オスBalb C Nu/Nu マウス左心室に注入した。マウスは4-6週飼育した後脳を摘出し病理学的検討を行った。他臓器への転移は肉眼的に行い病理学的に確認した。また骨転移に関してはX-rayにより検討した。A375メラノーマ細胞のIL-6産生は5-'CTTCGGTCCAGTTGCCCTTCT-3', 5'-TGCGCAGAATGAGATGAGTT-3'のプライマーを用いてRT-PCRを行い、PCR産生物の塩基配列をオートマチックシークエンサーにより決定することで検討した。またA375メラノーマ細胞の培養フラスコ上およびマウス脳転移巣でのIL-6産生を抗IL-6抗体及びABC kitを用いて検討した。

（結果）

A375メラノーマ細胞からmRNAを抽出し，上記のプライマーを用いてRT-PCRを行い566bpのPCR産生物を得た。この産生物の遺伝子配列をオートマチックシークエンサーにより調べ、ヒトIL-6遺伝子との100%ホモロジーを確認した。また組織培養したA375メラノーマ細胞を抗IL-6抗体及びABC kitを用いて染色し、抗IL-6抗体により染色されることを確認した。このA375メラノーマ細胞をマウス左心室に注入して４－６週後、マウスは悪液質を示し体重減少を来すようになり、その程度は注入した細胞数と相関した。マウス大脳を摘出し、病理学的にA375メラノーマ細胞の転移を調べたところ、腫瘍細胞は脳実質に浸潤性に転移していることが確認された（図１）。10^5個の細胞を注入したマウスの脳転移の部位を病理学的に検討すると表１に示すようにほぼ脳全域に非特異的に転移しており、また脳転移巣の数は注入した細胞数と相関した。転移巣においてA375細胞はIL-6産生を行っていることを抗IL-6抗体及びABC kitを用いて確認した。脳以外の転移を調べたところ、骨、副腎、肝臓、精巣、肺に転移巣が確認された。

（考察）

今回私どもはIL-6を産生するA375悪性黒色腫細胞及びヌードマウスを用いてサイトカイン産生腫瘍の脳転移モデルを作成した。このモデルは手技が比較的に容易であり、かつ安定した成績が得られやすいと考えられた。この系を用いれば、様々な蛋白をコードする遺伝子をメラノーマ細胞に導入しその細胞を脳転移させることで、比較的侵襲の少ない脳内での蛋白の局所発現系を作成しうるのではないかと考えられた。

（文献）

1. Nakai, M., Mundy, G. R., Williams, P. J., Boyce, B., and Yoneda, T., A synthetic antagonist to laminin inhibits the formation of osteolytic metastasis by human melanoma cells in nude mice, 1992, Cancer Res., 52: 5395-5399.

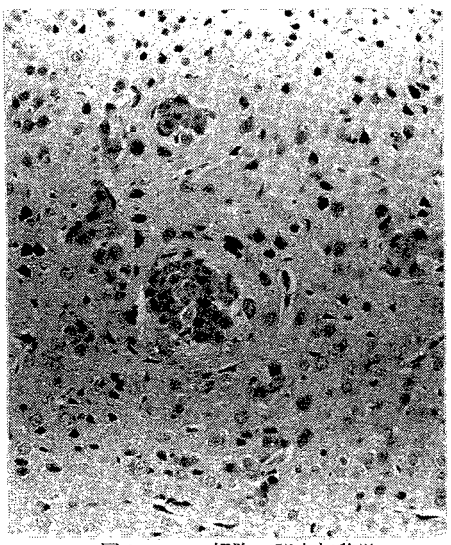


図１　A375細胞の脳内転移巣

Table.I Locations of metastases in the brain of 10 mice given injection of A375 melanoma cells into the left ventricle of heart.

Locations	Number of metastases per mouse
Frontal lobe	0, 2, 0, 2, 0, 0, 0, 0, 0. 0
Parietal lobe	2, 0, 0, 2, 0, 0, 0, 0, 0, 0
Temporal lobe	1, 0, 1, 1, 1, 0, 0, 0, 0, 0
Occipital lobe	1, 1, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0
Hippocampus	0, 2, 0, 0, 0. 0, 0, 0, 0, 0
Putamen	0, 0, 1, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0
Mesencephalon	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0
Septum	0, 0, 0, 1, 0, 1, 0, 0, 0, 0
Total	4, 5, 3, 7, 1, 1, 0, 0, 0, 0

88 遺伝的運動障害ﾗｯﾄの脳内ﾓﾉｱﾐﾝ量およびそれらの代謝物の変動

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,[2]鈴鹿医科技大,[3]名大環医研,[4]藤田保衛大・医・生理）

[要約]

遺伝的後弓反張様の運動障害をもつﾗｯﾄ(Dopﾗｯﾄ)の脳内生理活性ｱﾐﾝおよびその代謝産物を、生後17日齢で測定した。運動失調を示すDopﾗｯﾄおよび、症状を示さない対照群（ﾍﾃﾛ）脳内ﾄﾞｰﾊﾟﾐﾝ(DA)量は、いずれの部位でも対照との間に有意差は見られなかったが、DAの代謝物の3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)は、線条体および延髄で対照群の値の約1.5～2.0倍に有意な上昇を示した。一方、脳内ｾﾛﾄﾆﾝ(5HT)量は、大脳皮質で対照群より軽度の上昇が見られたが、その代謝物5-hydroxy indolacetic acid(5HIAA)は、特に中・間脳および大脳皮質で有意な上昇を示した。以上の結果から、線条体内ﾄﾞｰﾊﾟﾐﾝ作動性ﾆｭｰﾛﾝのｶﾃｺｰﾙｱﾐﾝ代謝回転の亢進、および脳幹部のｾﾛﾄﾆﾝ作動性ﾆｭｰﾛﾝのｲﾝﾄﾞｰﾙｱﾐﾝ代謝亢進が、Dopﾗｯﾄの運動障害の原因の一つである可能性が示唆された。

われわれは既にDopﾗｯﾄの小脳組織でGluおよびその前駆物質であるGln含量が減少していること(1)、ｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ活性の低下が見られることを報告し、これらのことからｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸作動性神経の代謝異常が、Dopﾗｯﾄの運動障害に関連している可能性を示唆した(2)。今回は、神経内各部内の生理活性ｱﾐﾝおよびその代謝産物について測定し、Dopﾗｯﾄに見られる運動障害の原因との関連を検索した。

[実験方法]

BN-dop系（Dopﾗｯﾄの系統維持用近交系）で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て供試動物群とし、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17日齢のF_2仔動物のうち、運動障害が観察された4匹をDopﾗｯﾄ群、症候を示さない4匹を対照群とした。これら仔ﾗｯﾄをｴｰﾃﾙ麻酔下で断頭屠殺し、延髄、小脳、海馬、線条体、大脳皮質、中脳・間脳にそれぞれ分離して凍結保存した。分離脳組織内ﾓﾉｱﾐﾝ量の測定は、0.2M過塩素酸（100μM EDTA・Na_2含有）中で組織を磨細し、その内部標準物質(ｲｿﾌﾟﾛﾃﾚﾉｰﾙ25～100ng)を加えてから、遠心分離(15,000rpm,15min)して除蛋白した。その上清は、1M 酢酸Naを加えて用いてpH 3 に調整して、pore size 0.45μmのﾌｨﾙﾀｰで濾過した後、高速ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰ（ｴｲｺﾑ製）を用いてﾄﾞｰﾊﾟﾐﾝ(DA)、ｾﾛﾄﾆﾝ(5HT)、DOPAC、3-ﾒﾄｷｼﾁﾗﾐﾝ(3MT)および5HIAAを分離し、それぞれを電気化学検出器で定量した。

[実験成績と考察]

①脳内各部DAとその代謝産物・DOPAC含量：DA量は何れの脳部位においても、Dopﾗｯﾄと対照ﾗｯﾄで有意な差異は見られなかった。しかし、DAの代謝産物・DOPAC量は、Dopﾗｯﾄ線条体と延髄において約1.5～2.0倍有意に上昇して認められた(図1左)。しかし、3MT量は対照ﾗｯﾄとの間に何れの脳部位でも変化はなかった。脳内のDA量は、ﾓﾉｱﾐﾝ酸化酵素(MAO)およびｶﾃｺｰﾙ-o-ﾒﾁﾙ転移酵素(COMT)で代謝・不活性化され、それぞれDOPACおよび3MTになる。したがってDopﾗｯﾄ脳では、DA分解の亢進が示唆される。

②脳内各部位の5HTと代謝産物・5HIAA含量：脳内5HT含量は、Dopﾗｯﾄの大脳皮質内で対照群よりも軽度であるが有意($p<0.05$)な上昇が見られたが、その他の部位ではほとんど差異が見られなかった。5HTの代謝産物・5HIAA含量は、Dopﾗｯﾄの全ての脳部位で対照脳よりも有意で著しい上昇が示された(図1右)ことから、脳組織内でのｾﾛﾄﾆﾝ作動性ﾆｭｰﾛﾝのｲﾝﾄﾞｰﾙｱﾐﾝ代謝系の亢進が示唆された。DAは運動機能に密接に関与している大脳基底核で作動する主要な神経伝達物質である。この基底核の機能障害があると臨床的にも種々の錐体外路系の運動障害を生じ、筋緊張の亢進あるいは低下などの障害を起こすことが知られている。また、脳内のｾﾛﾄﾆﾝ作動性ﾆｭｰﾛﾝの異常が、痙攣などの病態に関与することが知られている。今回の実験成績でDopﾗｯﾄでは、大脳皮質内部の神経核部でﾄﾞｰﾊﾟﾐﾝおよびｾﾛﾄﾆﾝ作動性ﾆｭｰﾛﾝの代謝亢進が見られたことから、これらがDopﾗｯﾄの運動障害の一つの原因である可能性が示唆された。

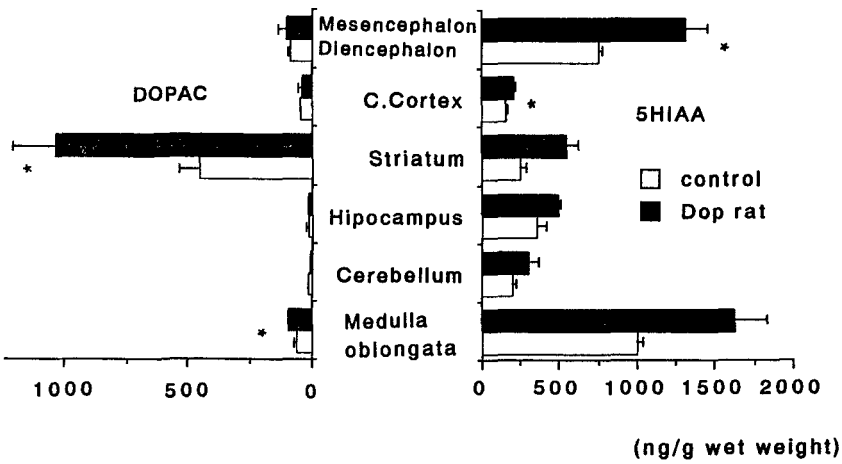


Fig.1. DOPAC and 5HIAA concentration in the brain. *:$p<0.05$

[文献](1)國井修一、他(1993)*藤田学園医学会誌* 17. 157-162.(2)國井修一、他(1994)*藤田学園医学会誌* 18. 113-119.

89 実験的小頭症ラット線条体のドーパミン及びその代謝物の変化:in vivo microdialysis法による検討

田丸政男，平田ゆかり*，松谷天星丸**，永田　豊**
（鈴鹿医療大・医用工学，藤田保健衛生大・医・法医*，同生理**）

【要約】　胎生15日目のmethylazoxymethanol acetate (MAM;25mg/kg)投与による小頭症(MAM)ラットでは，hyperacitivityや環境刺激に対する興奮閾値低下などの行動異常が見られる．MAMラットの線条体重量は対照の約1/2を示し，そのホモジェネイトのドーパミン(DA)濃度は，対照の約3倍の著しい高値を示した．また，MAMラットのin vivo microdialysis法によるDA放出量は，High-K^+(100mM) Ringerによる刺激状態で，対照の放出増加量の約3倍にも達したが，basalでは対照との間に差はなかった．DAの代謝物の3-methoxytyramine (3MT) およびhomovanillic acid (HVA) は，MAMラットのホモジェネイトで対照の約1.4倍の上昇に留まり，3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) は変化がなかった．透析液におけるDOPAC•HVAのbasalでの放出量，及び High-K^+ Ringer による放出の増加量は対照との間に大きな差がなく，MAMラットでも放出されたDAは直ちに再吸収されることが示された．以上のことから，MAMラットで見られる行動異常は，線条体の低形成による相対的なDA量の著しい増加が関与している可能性が示唆された．

【目的】　アルキル化剤の一つであるMAMは，ラット大脳皮質の組織発生期の胎生15日に経胎盤投与されると，出生仔に小頭症が発現する(1)．この小頭症ラットは，脳重量の減少の著しい大脳半球で，モノアミン濃度の増加(2,3)，および線条体のグルタミン酸レセプターの結合部位も，増加していることが示されている(4)．機能的にはhyperactivity(5)であり，音などの環境刺激に対する興奮閾値の低下を示し，空間認知機能も障害されていることが報告されている(4)．また，走行時に後肢がもつれたりする運動機能障害も見られる(6)．そこで，本実験では運動機能の調節に関与する，大脳基底核を構成する線条体のモノアミン量の変動を，脳ホモジェネイトおよびin vivo microdialysis法で検討した．

【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日とし，妊娠15日の母ラットにMAM(25mg/kg)を腹腔内投与し，小頭症ラットを作製した．生後3ヶ月齢の雄性ラットをエーテル麻酔下で断頭屠殺後，線条体をGlowinski & Iversen(7)の方法に従って摘出しドライアイス上で凍結した．線条体は0.1N PCAで摩砕し，遠心上清(15,000g,20min)を0.1M酢酸ナトリウムでpH3.0に調整し，フィルター(0.45 μm)を通したものをHPLC（エイコム）の試料とした．in vivo micodialysisでは，モノアミン定量前日に脳マップ (Paxinos & Watson(8)に従って線条体へガイドカニューレ (Control: A=+0.2, L=3, V=3.5; MAM:A=0,L=2.5,V=3)を付け，翌日透析用プローブを装着して，リンゲル液で透析（流速1 μL/min）を開始した．basal levelが安定した3時間後より，20分ごとに透析液の採取を開始した．脱分極刺激は，100mM K^+を含むリンゲル液で20分間透析し，試料中のDAおよび代謝物は同様にHPLCで分離定量した．

【結果および考察】　①線条体の重量：成熟MAMラットの線条体重量は，68 ±3mg(n=9)で対照ラット(126 ±5mg;n=8)の約1/2の重量で，線条体の低形成が示された．

②線条体ホモジェネイトにおけるDAおよびその代謝物の濃度：MAMラットの線条体のDA濃度は，対照の約3倍の著しい高値を示した（図1）．代謝物の3MTおよびHVAは，MAMラットで対照の約1.4倍の上昇に留まったが（データ示さず），DOPACには大きな変化がなかった（図1）．

③線条体のin vivo microdialysisによるDAおよびDOPAC放出量：Ringer液（4mM K^+含有）の透析によるbasalのDA放出量は，対照との間に大きな差は見られなかった（図2）．また，High-K^+含有のRinger液の20

分間の透析（図2の fraction 4）では，いずれも著しいDAの放出量の増加が見られたが，MAMラットではDA放出量が異常に多く，対照の放出量の約3倍にも達し，ホモジェネイトのDA濃度増加とほぼ同様の増加率を示した．一方，MAMラットのDOPAC（図2）およびHVA（データ示さず）の放出量は，basalおよびHigh-K^+刺激後においても，対照との間に大きな変化はなく，MAMラットでも放出されたDAは直ちに再吸収されることが示された．

MAMラット線条体におけるホモジェネイトのDA含量，およびHigh-K^+刺激後の透析液中のDA放出量の異常な増加に比し，代謝物の増加が著しくないことは，ドーパミン細胞以外のセロトニン細胞やグリア細胞の減少によるモノアミン酸化酵素の活性低下によるもと考えられる．DAは大脳基底核における主要な神経化学伝達物質であり，この部位が運動機能に深く関与している．更に，この部位の障害が無動・筋緊張の亢進・姿勢と平衡の異常などの錐体外路性運動障害を起こすが，これらはパーキンソン病を代表例とするDA量の低下がその病因とされている．本実験のMAMラットでは，神経終末部でのDA濃度は逆に異常に増加しているが，透析液でのbasal levelでは対照と変わりがなかった．脱分極刺激状態ではDA放出量の増加量が，ホジェネイトの増加率と同様に対照の約3倍を示したが，これは線条体におけるドーパミン細胞以外の細胞の低形成による二次的な結果と解釈される．以上のことから，MAMラットで見られるhyperactivityや興奮性増大などの行動異常の物質的背景の一因として，線条体の低形成によるドーパミ作動性神経終末の相対的な増加が関与している可能性が示唆された．

【文献】

(1) Spatze, M. and Laqueur, G.L.(1986) *Proc. Soc. Biol. Med.* ***129****:705-710.*
(2) Matsutani, T. et al. (1980) *J. Neurochem.* ***34****:950-956.*
(3) Tamaru, M. et al. (1988) *Teratology* ***37****:149-157.*
(4) Tamaru, M. et al. (1992) *Neurosci. Res.* ***14****:13-25.*
(5) Nagayoshi, M. et al. (1986) *日本生理誌* ***48****:14-25.*
(6) Tamaru, M. (1994) *Cong. Anom.* ***34****:13-25.*
(7) Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) *J. Neurochem.* ***13****:655-669.*
(8) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) *In: The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. Academic Press, N.Y.*

（現所属：松谷天星丸，川村学園女子大学）

図1 DA and DOPAC levels in the straital homogenate

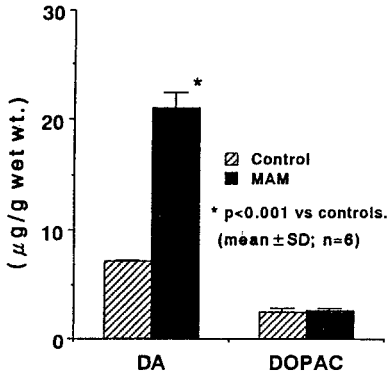
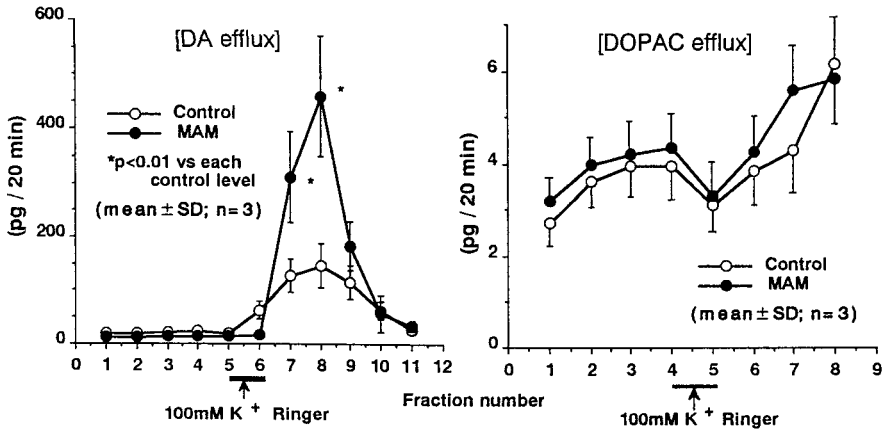


図2 Extracellular levels of DA and DOPAC in the striatum



90 Nicotine曝露に伴う脳内diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA発現増強機序の解析

桂　昌司、大熊誠太郎、栗山欣弥
（京都府立医科大学薬理学教室）

〔要約〕
Nicotineの長期曝露により、培養神経細胞におけるdiazepam binding inhibitor (DBI) mRNA発現量が増加することを著者らは既に報告している(3)。本研究では、nicotine曝露に伴う脳内DBI mRNA発現量増加の発現機序を明らかにする目的で、マウス大脳皮質初代培養神経細胞（培養細胞）を用い、nicotine処置に伴うDBI mRNA発現量の増加に対する種々の薬剤の影響について検討した。培養細胞にnicotineを曝露した場合、培養細胞におけるDBI mRNA発現量はnicotineの添加濃度ならびに曝露時間に依存した増加が認められた。このnicotine曝露に伴うDBI mRNA発現量の増加は、nicotine受容体拮抗薬であるhexamethonium、局所麻酔薬であるdibucaineおよびlidocaine、脱分極阻害薬であるtetrodotoxin (TTX)およびNaチャネル阻害薬であるprocainamideのいづれの薬剤の前処置によっても濃度依存的に抑制された。さらに、nicotine曝露に伴うDBI mRNA発現量の増加は、電位依存性L型Caチャネル遮断薬である(±)-verapamilおよびnifedipineの前処置によっても完全に抑制された。一方、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、nicotine曝露に伴う脳内DBI mRNA発現量の増加は、nicotine受容体活性化に引き続いて生じる電位依存性L型Caチャネルの開口に伴う細胞外Ca^{2+}の流入が関与していることが示唆される。

[目的]

内在性benzodiazepine (BDZ)様物質として知られているDBIが、ラット脳内GABA作動性神経のpresynaptic vesicleにおいてGABAと共存する神経活性ペプチド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BDZ受容体に対してinverse agonistとしての薬理活性を示すことから、内在性不安誘発物質と考えられている(1)。従って、DBIは各種病態発現時の精神症状に深く関与している可能性が考えられるが、脳内における生理的役割については不明の点が多い。我々は、すでに培養細胞を用いてnicotineの長期曝露の影響について検討し、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、今回本研究においてはnicotine曝露に伴う脳内DBI mRNA発現量増加の調節機序の詳細を明らかにする目的で、培養細胞におけるnicotine処置に伴うDBI mRNA発現量の増加に対する種々の薬剤の影響について検討した。

[実験方法]

培養細胞(4)への各種薬剤ならびにnicotine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、培養14日目にDBI mRNA測定用試料として採取した。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。PCRによるマウス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の発現量ををFujix BAS/2000 image analizerにより解析した。

[結果および考察]

培養細胞にnicotineを曝露した場合、培養細胞におけるDBI mRNA発現量はnicotineの添加濃度ならびに曝露時間に依存した増加を示した。このnicotine曝露に伴うDBI mRNA発現量の増加は、nicotine受容体拮抗薬であるhexamethonium (10^{-7}-10^{-5} M)の前処置により完全に消失した。同様に、局所麻酔薬である

dibucaine (10^{-8}-10^{-6} M)およびlidocaine (10^{-6} M)、脱分極阻害薬であるTTX (10^{-12}-10^{-9} M、図1)およびNaチャネル阻害薬であるprocainamide (10^{-6} M)のいづれの薬剤の前処置によっても濃度依存的に抑制された。なお、対照として用いたβ-actin mRNAの発現量は、これらいづれの薬剤の処置によっても何らの変化も受けなかった。以上の成績より、nicotine曝露に伴うDBI mRNA発現量の増加には、nicotine受容体の活性化に伴う神経細胞膜の脱分極が関与していることが考えられる。

つぎに、nicotine受容体刺激に伴うシナプス膜の脱分極は、電位依存性L型Caチャネルの活性化を誘発することから、nicotine曝露に伴うDBI mRNA発現量の増加に及ぼす電位依存性L型Caチャネルの活性化の影響について検討した。(±)-verapamil (10^{-8}-10^{-6} M, 図2)およびnifedipine (10^{-6} M)の前処置は、nicotine曝露に伴うDBI mRNA発現量の増加を濃度依存的に抑制した。この実験成績から、nicotine曝露に伴うDBI mRNA発現量の増加には細胞外からのCa^{2+}の流入に伴う細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が関与していることが推察される。

以上の成績より、nicotine曝露に伴う脳内DBI mRNA発現量の増加は、nicotine受容体活性化に続く電位依存性L型Caチャネルの開口に伴う細胞外Ca^{2+}の流入が関与していることが示唆される。

[文献]

1) Corda, M.G. *et al.*, Neurosci. Lett. **47**, 319-324 (1984). 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).

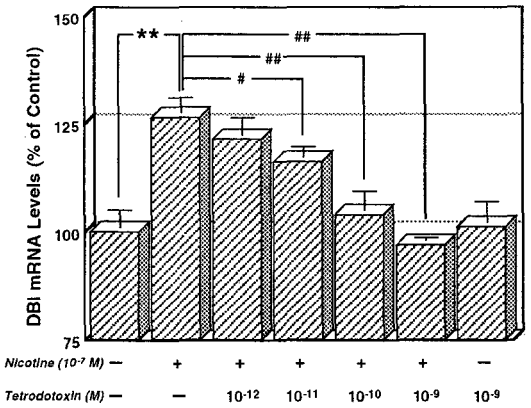


Fig. 1 Effect of Tetrodotoxin on Nicotine-Stimulated Expression of Diazepam Binding Inhibitor (DBI) mRNA in Primary Cultured Cerebral Cortical Neurons

Three μg of total RNA were applied to each lane. DBI mRNA levels were determined by the Fujix BAS 2000 Image Analyzer. Each data represents the mean ± S.E. from 4 separate experiments.
***P<0.01 (Bonferroni's test, N=4).*
#p<0.05 and ##p<0.01 (Dunnett's test, N=4).

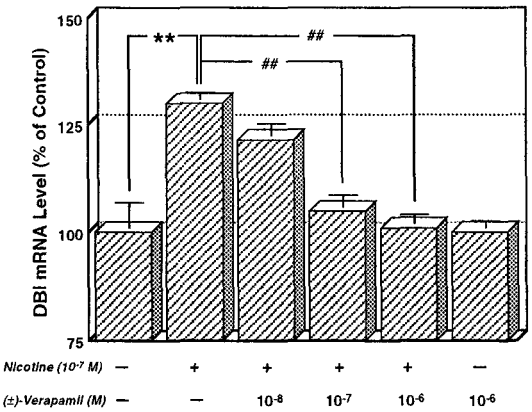


Fig. 2 Effect of Verapamil on Nicotine-Stimulated Expression of Diazepam Binding Inhibitor (DBI) mRNA in Primary Cultured Cerebral Cortical Neurons

Three μg of total RNA were applied to each lane. DBI mRNA levels were determined by the Fujix BAS 2000 Image Analyzer. Each data represents the mean ± S.E. from 4 separate experiments.
***P<0.01 (Bonferroni's test, N=4).*
##p<0.01 (Dunnett's test, N=4).

91 中枢神経系の幹細胞に強く発現しているRNA結合蛋白質 mouse-Musashiの同定と機能解析

榊原伸一[1,3]、今井貴雄[1]、小川正晴[2]、御子柴克彦[3]、岡野栄之[1]
([1]筑波大・基礎医・分子神経生物、[2]高知医大・第２生理、[3]東大医科研・化学)

〔要約〕
神経系の発生過程で生じている細胞系譜に制御された細胞の運命決定機構において、内在的な細胞質因子が、幹細胞の分裂過程において非対称的に 分布することが 予想される。このような 内在的な細胞質因子の例として、我々は、ショウジョウバエ末梢神経系外感覚器の形成過程における非対称的細胞分裂に必要とされ、神経系に強く発現しているRNA結合蛋白質musashi を同定してきた。ここでは、ショウジョウバエ*musashi* の マウス相同分子を同定し、in vitroにおけるRNA結合 能を検討した結果、RNAのGホモポリマーと結合することが明らかとなった。又、神経上皮細胞（幹細胞）の低密度培養の結果、本遺伝子産物は、自己再生する幹細胞において強く発現し、神経細胞あるいはグリア細胞として細胞分化が進む過程において、急速に発現量が低下することが示された。

[緒言] 遺伝子発現の転写後調節は、複雑な神経系の発生過程と可塑性等において重要な役割を果していることが予想される。しかしながら、この神経系における遺伝子発現の転写後調節機構、特にそこに関与する遺伝子産物に関して殆ど知見がなかったが、最近、神経系において、遺伝子発現の転写後調節機構をおこなっている分子のcandidateである神経細胞特異的RNA結合性蛋白質をコードする*musashi* 遺伝子が、ショウジョウバエ神経系に異常を有する変異体のスクリーニングにより同定されている（1）。loss-of-function type の*musashi*変異体の表現型を解析結果より、ショウジョウバエ *musashi* 遺伝子産物は、RNA結合性蛋白質として、post-transcriptional levelにおいて下流遺伝子群の発現を調節することにより、神経発生過程における細胞の運命決定、特に細胞系譜の形成を制御していると考えられる。更に我々は、より複雑で高次の神経系を有する哺乳類における *musashi* 遺伝子ファミリーの役割を明らかにするために、*musashi* 遺伝子のマウス相同分子（*mouse-musashi*）の単離を行った。本研究においては、MOUSE-MUSASHI蛋白質について、1.in vitroにおけるRNA結合能の検討、2.マウス胎生期終脳を出発材料とした低密度培養系において、単離した神経上皮細胞の分化過程における*mouse-musashi* の発現パターンを検討した。

[実験方法] 1.*mouse-musashi* 遺伝子のクローニング：マウス小脳および胎生期全脳cDNAライブラリーを、ショウジョウバエ*musashi* cDNA断片をプローブとして、low stringentの条件でスクリーニングし、*mouse-musashi* 遺伝子をクローニングした。DNAのsequencingは、dideoxy法(2)に従って行った。2.Mouse-musashi 蛋白質のRNA-結合能の検討：大腸菌体内で発現させたMouse-musashi蛋白質のRNA結合能を、North-western法(3)に従って検討した。結合を検討したRNA分子としては、5'-末端標識したRNAホモポリマー(A,C,G,U)あるいはin vitro転写反応によって標識した自分自身のm-RNA (*mouse-musashi* mRNA)を用いた。3.*mouse-musashi* の発現パターンの解析：マウス発育期各ステージの中枢神経系におけるMouse-musashi蛋白質の局在を免疫組織化学的に検討した。また、Mouse-musashi蛋白質発現細胞の細胞型特異性を、マウス胎生期終脳を出発材料とした低密度培養系(4)において検討した。

[結果と考察] ショウジョウバエ*musashi* 遺伝子をプローブとしてlow stringent hybridizationを行い、マウス相同分子（*mouse-musashi*）のcDNAクローニングを行った。推定されたMouse-musashi 蛋白質のアミノ酸配列は、ショウジョウバエMusashi 蛋白質とRRM（RNA-Recognition Motif）部分において60% の同一性を示した。conserved amino acidを計算に入れると相同性は約90%に及ぶことが明らかとなった。このMouse-musashi蛋白質のRNA結合能について検討を行った。全長Mouse-musashi蛋白質とHis-tagの融合蛋白質を大腸菌体内で発現させ、Ni-カラムにて精製し、Northwestern ブロット法により、RNAホモポリマーとの結合能を検討したところ、polyG ホモポリマーとの結合が認められ（図１）、in vitroではG-richな配列が下流標的配列であると考えられた。このことは、競合実験においても確かめることができた。また、Mouse-musashi蛋白質が自分自身のmRNA(*mouse-musashi* mRNA)に結合することが確認された。

次に、Northern blot解析・免疫組織化学の結果、*mouse-musashi* もショウジョウバエの相同分子 *musashi* 同様に神経系特異的に発現していることが明らかとなった。次に、Mouse-musashi蛋白質発現

細胞の細胞型特異性を組織切片および低密度の初代培養細胞の免疫組織化学的手法により検討したところ、nestinと同様に、中枢神経系の未分化幹細胞（CNS stem cell; neuroepithelial cell）において特異的に発現しており、未分化幹細胞の非対称的分裂過程において、自己再生する幹細胞において強く発現する一方、分化していく細胞系譜においては発現量が極めて低く、神経細胞あるいはグリア細胞として細胞分化が進む過程において、その発現はほとんど消失した（図2）。Mouse-musashi蛋白質は、このような発現パターンとショウジョウバエの相同分子(Musashi)との類似性により、哺乳類神経発生過程における細胞の運命決定、細胞系譜の形成を制御していると考えられた。現在、Mouse-musashi蛋白質 が、自分自身以外のどのような遺伝子群の発現をpost-transcriptional levelで調節し、神経系の細胞の運命決定を制御しているのかを解明するために、Mouse-musashi蛋白質が結合する下流標的配列の同定を試みている。

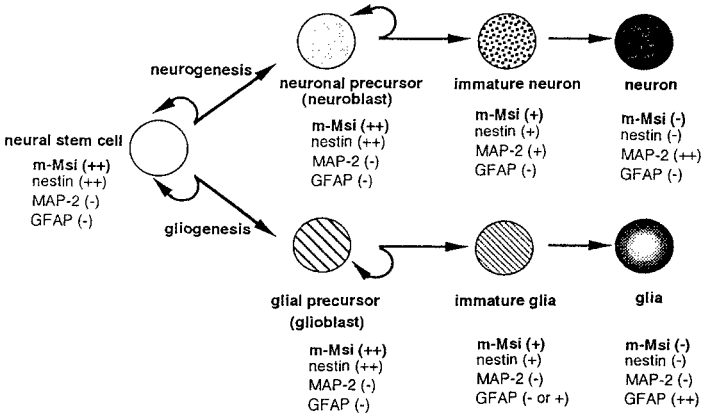


図1　中枢神経系発生過程における　mouse-musashi蛋白質（m-Msi）の発現

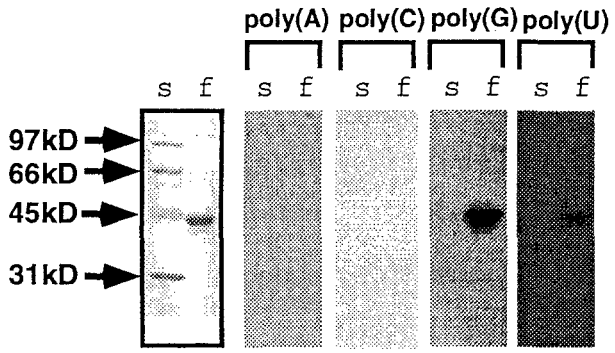


図2　mouse-musashi蛋白質のRNA結合能（Northwestern blot法）
s; 分子量マーカー, f; 全長mouse-musashi蛋白質

[文献]　1.Nakamura,M., Okano, H., et al., :***Neuron*** 13, 67-81, (1994)
2.Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 74: 5463-5467.
3. Siomi, H. et al., (1993) ***Nucl. Acids Res.*** 21, 1193-1198.
4. 仲嶋一範ら (1995) ***実験医学***　印刷中

92 海馬CA1錐体細胞によるNOS mRNAの発現

遠藤光敏、植村研一
（浜松医科大学　脳神経外科）

〔要約〕
ラット海馬CA1錐体細胞は、当初の研究ではnitric oxide synthase (NOS) を発現していないとされていたが、その後の研究では、NOSの局在を反映するとされているNADPH diaphoraseの発現はCA1錐体細胞に認められると、訂正された。そこで、本研究では、海馬CA1錐体細胞がcNOS (constitutive form of NOS) mRNAを発現していることを、specificityとspecific activityがともに極めて高いneural NOSのriboprobeを作成して、in situ hybridizationにて確認した。riboprobeはcNOS (constitutive or neural form of NOS) のcDNAから3種類作成し、そのspecificityはnorthern blotとribonuclease protection assayによって確認した。

（目的）　nitric oxide (NO) は、中枢神経系において神経伝達物質や神経毒としての作用が注目されている。long term potentiation (LTP) では、nitric oxide (NO) がretrograde second messengerとして作用していること、脳虚血障害では、nitric oxide (NO) が神経細胞死に重要な役割をはたしていることが示唆されている(3)(4)(5)。海馬CA1錐体細胞は、LTPにおいてはpostsynaptic neuronであり、一過性前脳虚血後には遅発性細胞死に至る。従って、この海馬CA1錐体細胞がNOSを発現しているかどうかは重要な問題である。当初の研究では、海馬CA1錐体細胞はnitric oxide synthase (NOS) を発現していないとされていたが、その後、NADPH diaphoraseの発現はCA1錐体細胞に認められると、訂正された(1) (2)。そこで、本研究では、海馬CA1錐体細胞がcNOS mRNAを発現していることを、in situ hybridizationにて確認した。

（方法）　ラットcNOS cDNAから、既存の遺伝子とhomologyの少ない部分を選択してこれをtranscription vectorに組み込み、^{35}S-GTP、^{35}S-UTPを用いてin vitro transcriptionによってspecific activityの高いriboprobeを作成した。そのspecificityは、northern blotとribonuclease protection assayによって確認した。ラットの一過性前脳虚血は4-vessel occlusionによって作成した(6)。正常および一過性前脳虚血30日後のラット脳を潅流固定し、脳をとりだして40 μmの切片を作成して、free floating methodによってin situ hybridizationを行った(7)。

（結果）　probeが10.5 KbpのcNOS mRNAを特異的に検出することを、northern blotによって確認した（Fig. 1A）。cNOS mRNAは、小脳に多量に、海馬に微量に認められた（Fig. 1A, 1B）。このprobeを用いてin situ hybridizatoinを行うと、正常海馬では、cNOS mRNAの分布は、CA2を除く錐体細胞層、歯状回顆粒層に認められ、散在性の単独神経細胞は非常に強いcNOS mRNAの発現を示した（Fig. 2A）。CA1錐体細胞におけるcNOS mRNAの発現が錐体細胞によるものであることを確認するために、一過性虚血30日後のラット海馬を調べた。一過性前脳虚血後には海馬CA1錐体細胞は遅発性神経細死に至ることがわかっているので、虚血後のCA1錐体細胞層におけるcNOS mRNAの発現の消失は、CA1錐体細胞自身がcNOS mRNAを発現していることの間接的証明になる（Fig. 2B）。

（考察）　NOSがクローニングされた当初、in situ hybridization、immunohistchemistry、

NADPH diaphorase staining によって、ラット海馬CA1錐体細胞がNOS を発現していないと報告された(1)。しかし、LTP の研究ではCA1錐体細胞による NOS の発現が示唆され、CA1錐体細胞は NADPH diaphorase 陽性であると訂正された (2) (3)。今回の結果と Bredt らの結果の相違は、用いたprobe の specificty、specific activity の差によるところが大きいと考えられる。すなわち、Bredt らは oligo probe 用いているために感度が低く、我々は riboprobe を用いており、さらにさまざまな工夫をして in situ hybridization を行った為に、感度が格段に改善されたと考えられる。

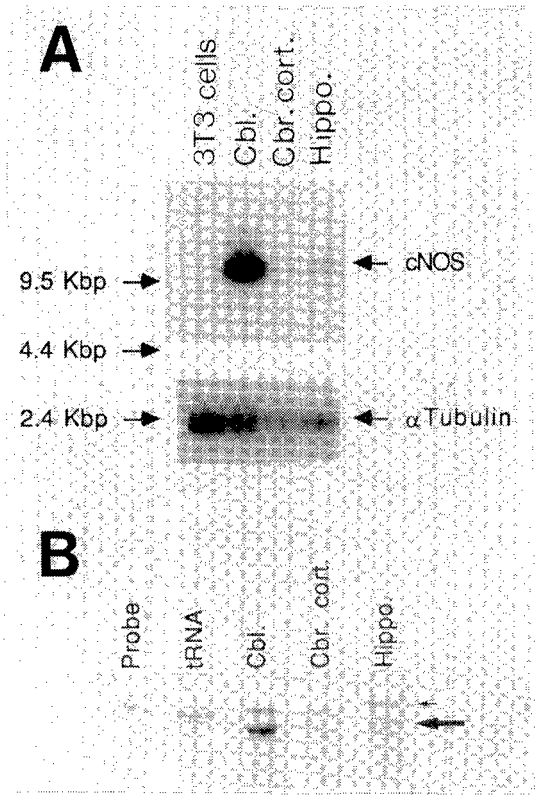


Fig. 1 A: Northen blot
B: Ribonuclease protection assay
Large arrow indicates 393 bp protected cNOS fragment. Small arrow indicates residual undigested cNOS probe.

（文献）

(1) Bredt, D. et al. (1991) Nature, 352: 714-718.
(2) Bredt, D. et al. (1992) Neuron. 8(1): 3-11
(3) Schuman, E.M. et al. (1991) Science, 254: 1503-1506
(4) O'Dell, T.J. et al. (1991) Proc. Nat Acad. Sci. USA, 88 11285-11289.
(5) Kaku, D. et al. (1993) Science, 260: 1516-1518.
(6) Pulsinelli, W.A. et al. (1988) Stroke, 19: 913-914.
(7) Endoh, M. et al. (1994) Molecul. Brain Res. 22: 76-88.

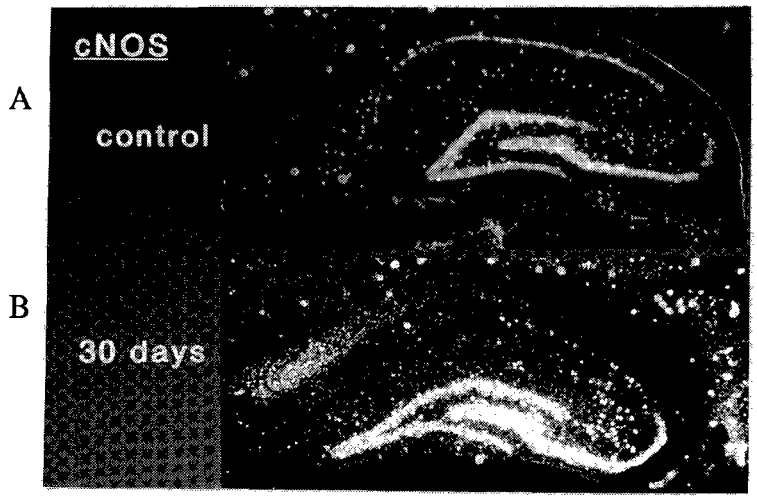


Fig. 2 In situ hybridization of cNOS. A: Control hipppocampus.
B: Ischemia-damaged hippocampus 30 days after transient forebrain ischemia.

93 Deletion mutant RNA を内部標準に用いた RT-PCR / HPLC による組織中微量 NGF mRNA の定量法の開発

清水博喜、黒木淳、荒川義弘、山西嘉晴
（エーザイ株式会社・筑波研究所）

〔要約〕
組織中の微量の神経成長因子 (NGF) の mRNA を測定するために、deletion mutant RNA を内部標準として RNA 抽出と RT-PCR (reverse transcription-PCR) を行い、その反応生成物を HPLC により定量する系を開発した。26 サイクル増幅する系では、NGF 標準 RNA 量が 30 fg /tube 以下であれば検量線は直線となった。検出限界は 1 fg /tube であった。また変動係数 (CV) は、2.8 % (n=5) であった。この方法により、マウス皮膚および海馬の NGF mRNA を定量した。その結果、皮膚では 49.3 ± 15.8 fg /mg tissue (n=10, mean ± SD)、海馬では 357.8 ± 58.3 fg /mg tissue であった。この定量法により、微量な mRNA の絶対量を簡便に、安全に、かつ再現性よく定量することが可能となった。

[はじめに] NGF は標的由来神経栄養因子として、中枢神経においては大脳基底核コリン作働性神経の標的部位である海馬や新皮質などで産生され、末梢においては知覚神経および交感神経の標的部位で産生される。知覚神経の標的部位である皮膚での NGF の発現は、collateral sprouting に重要な役割を果たしていることが知られているが (1)、その微量 mRNA の定量は従来の Northern blotting 法では oligo (dT) カラムを用いて mRNA を濃縮する必要があるなど、操作は煩雑であり定量性も劣る。

近年、微量な mRNA の定量に、RT-PCR が応用されつつある。しかし、PCR では一般にサイクル数の増加とともにテンプレートと PCR 生成物間の検量線の直線性は失われる。そのため直線性を保つには、サイクル数を抑え、微量の PCR 生成物を検出する方法が必須となる。一方、RNA 抽出における回収率のばらつきを考慮し、定量性および再現性を確保するためには内部標準 RNA を用いることが有効である。

今回、我々は、NGF の標準 RNA より 51 base 欠失させた RNA (deletion RNA) を内部標準 RNA とし、これを RNA 抽出時から試料中に添加し、得られた総 RNA について RT-PCR を行い、その反応生成物を HPLC で定量する系を開発した。deletion RNA を内部標準 とすることで、試料間の RNA 回収率や操作上のばらつきを補正し、さらに標準および内部標準 RNA の逆転写効率および PCR での増幅効率の差を最小限に抑えるようにした。また、HPLC により微量の RT-PCR 生成物を検出し、PCR サイクル数を抑えた PCR の直線域での定量が可能となった。この方法により、マウス皮膚および海馬の NGF mRNA の定量を行った。

[方法] NGF mRNA の標準 RNA および内部標準 RNA の作製：RT-PCR によって取得した pre-pro NGF cDNA (930 bp) を Bluescript ベクターに 挿入した pKSpNG から 51bp の deletion を施し (pKSdNG)、さらに pKSpNG および pKSdNG の挿入部位の 3' 末端側に poly (A) (100 bp) を付加した。両プラスミドから RNA polymerase により RNA を合成し、各々標準 RNA (pNG RNA)、内部標準 RNA (dNG RNA) とした。

総 RNA の抽出：ICR マウス (5 週齢、雌) の皮膚および海馬を取り出し、dNG RNA を一定量 (皮膚には 20 fg /mg tissue、海馬には 250 fg /mg tissue) 添加し、AGPC 法 (2) の変法により総 RNA を抽出した。

RT-PCR 反応：総 RNA (皮膚では約 1 μg; 海馬では約 0.1 μg) をテンプレートとし、AMV RTase (宝酒造) と oligo dT-primer を用いて逆転写反応 (37°C 15 min) した後、Taq polymerase (宝酒造) により、PCR 反応 (94°C 2 min, 61°C 2 min, 72°C 5 min で 2 cycle 後、94°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C 2 min で 24 cycle) を行った。NGF 特異的プライマーとして、sense 5'-GCAGACCCGCAACATCACTG-3'、anti-sense 5'-ATCTCCAACCCACACACTGACA-3' を用い、pNG RNA からは 241 bp、dNG RNA からは 190 bp の RT-PCR 生成物を得た。

HPLC による RT-PCR 生成物の定量：非多孔性イオン交換カラム TSKgel DEAE-NPR (35 mm x 4.6 mm i.d.)(東ソー) を用い、RT-PCR 反応液の 20 μl を分析した。溶離液には、20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用

い、0.47 M から 0.58 M の NaCl 濃度勾配溶出を行った (1 試料あたり 17.5 min)。DNA の検出は、UV 検出器（SPD-10A, 島津製作所）により、UV 260 nm (0.002 AUFS) で行った。

[結果] pNG RNA および dNG RNA の RT-PCR は、各々の RNA の 10～30 fg の添加量に比例して RT-PCR 生成物を増加させた (図1)。しかし 60 fg 以上では直線性は損なわれた。また一定量の dNG RNA (10 fg) と pNG RNA (1～30 fg) を同時に加え RT-PCR を行ったところ、内標に対する比率は、加えた pNG RNA (1～30 fg) に対して直線関係が認められた。また HPLC による PCR 生成物の検出限界は、0.2 ng 以下であった。mRNA の RT-PCR による検出限界は、この系では 1 fg /tube であったが、mRNA の量にあわせたサイクル数の設定により、さらに下げることが可能である。さらに、pKSpNG より得られた cDNA を用いて PCR を行い解析したところ、この系での逆転写効率は約 70 %、増幅効率は1 サイクル当たり平均 1.94 倍であった。ただし24～26 サイクルではほぼ 2.00 倍の効率であったため初期の増幅での低効率が示唆された。次に、マウス皮膚および海馬の総 RNA 画分中の NGF mRNA を定量した (図2)。その結果、マウス皮膚および海馬の NGF mRNA 量は各々 49.3 ± 15.8 fg /mg tissue、357.8 ± 58.3 fg /mg tissue (n=10, mean ± SD) であった。また、この系における CV は、2.8 % (n=5) であった。

[考察] 我々は、内部標準 RNA を用いた RT-PCR と高感度の HPLC を組み合わせることで 、組織中の微量 NGF mRNA の定量を可能にした。今回測定したマウス皮膚および海馬の NGF mRNA 量は、我々が poly (A)$^+$画分を用いて Northern blotting 法で得た値 (皮膚; 30 fg /mg tissue, 海馬; 300 fg /mg tissue) とほぼ同レベルであったことからも、この系が妥当な系であると考えられた。RT-PCR で定量を行うためには、添加 RNA と反応生成物との間に直線性が保たれるところで測定を行うことが望ましく、我々の系では、RT-PCR による生成物が、約 150 ng /tube 以下であれば添加 RNA と反応生成物との間に直線性が得られることが明らかとなった。この定量法は、様々な生体内の微量 mRNA の絶対量を測定することが可能であり、簡便性、再現性および RI の必要がないという安全性の点で、非常に有用性の高い方法である。

[文献] 1. Mearow, KM., Kril, Y. and Diamond, J. (1993) *Neuroreport.*, 4, 351-354
2. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.*, 162, 156-159

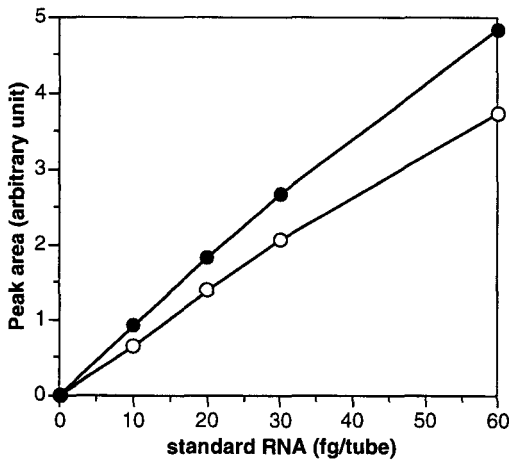


図1. 標準 RNA と内部標準 RNA の添加量と RT-PCR 生成物の関係

●; 標準 RNA (pNG RNA)
○; 内部標準 RNA (dNG RNA)

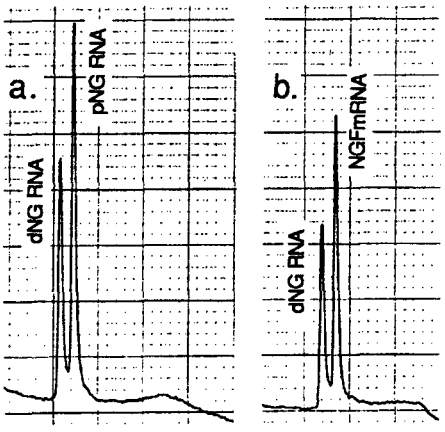


図2. RT-PCR 生成物の HPLC クロマトグラム

a. 標準RNA (pNG RNA および dNG RNA 各々 10 fg) の RT-PCR 生成物
b. 内部標準 (dNG RNA) を 20 fg /mg tissue 添加して抽出したマウス皮膚総 RNA (約1 μg) による RT-PCR 生成物

94 抗うつ薬連投によるセロトニン2C受容体 mRNA 発現

東田 道久、渡辺 裕司
富山医科薬科大学・和漢薬研究所・生物試験部門

〔要約〕

抗うつ薬の脳内 5-HT2C 受容体 mRNA 量におよぼす影響について、in situ hybridization 法を用いて検討した。5-HT2C 受容体の第Ⅲ細胞内ループ近傍に相当する部位に結合するジゴキシゲニン標識 antisense RNA を試験管内合成し、これをプローブとしたところ、脳室内の脈絡叢や海馬、手綱核などで 5-HT2C mRNA が検出された。Imipramine、maprotiline、mianserin 各 20 mg/kg を 1 日 1 回 4 日間経口投与したラットでは、これらの部位での 5-HT2C mRNA 量が増大していることが認められたことから、一部抗うつ薬は、5-HT2C mRNA 発現を促進していることが考えられる。

【目的】

セロトニン受容体は、クローニングおよび共役する細胞情報伝達機構に基づき13種以上ものサブタイプに分類されている。そのうち、5-HT2C サブタイプ受容体（かつては 5-HT1C と称されていた）は最初にクローニングされたセロトニン受容体であり、イノシトールリン脂質代謝に共役し、脈絡叢に特に多く、脳全体に広く分布していることが知られている。しかしながらその生理機能については明確にされていない。抗うつ薬の一部は、急性の作用として 5-HT2C 受容体の遮断薬として作用することが示されている (3-5)。一方、治療薬としての抗うつ薬がその効力を現わすには長期投与が必要とされていること、および 5-HT2C 受容体自体が形質転換活性を有していること (1) から、抗うつ薬が遺伝子発現を介して治療効果を現わしていることも考えられる。そこで本研究では、抗うつ薬連投による脳内 5-HT2C 受容体 mRNA 量の変化を、ジゴキシゲニン標識した同受容体第Ⅲ細胞内ループ近傍の antisense RNA をプローブとして、insitu hybridization 法により検討した。

【方法】

プローブの合成：5-HT2C 受容体 cDNA を組み込んだ pBluscript KS(-) ベクターを、以下の手順で処理することにより、5-HT2C DNA 配列の 1,355 - 1,888 に相当する部分が組み込まれたベクターを再構築した：1) Xho I 切断、Bln I 切断後、形成される 5' 突出末端を平滑化し、ligation、2) Sac I 切断、Bsm I 切断後、形成される 3' 突出末端を平滑化し、ligation した。再構築したベクターより antisense probe を合成する際には、HincⅡ でベクターを切断後、ジゴキシゲニン化 UTP を含む反応液中で、T3 RNA ポリメラーゼを作用させ、以下常法に基づいて、操作を行った。一方、sense probe を合成する際には、Apa I 切断後、T7 RNA ポリメラーゼを用いた。脳切片の作製と in situ hybridization：Wistar 雄性ラット（8 週齢、220 - 250 g）に、各種抗うつ薬を 4 日間、午後 3:00 に経口投与し、最終投与の 60 分後に断頭、脳を取り出し、ドライアイスで凍結後、-80℃ に一晩保存した。クリオスタットを用いて、厚さ 16 μm の脳切片を作製し、ゼラチンコートしたスライドガラス上に接着させ、乾燥後、-80 ℃ で一晩保存した。Hybridization を行う際には、切片を室温に戻した後、4 % パラホルムアルデヒドで固定し、proteinase K 処理、acetylation 処理を行い、プローブと 55℃ で一晩結合させた。結合したジゴキシゲニン化プローブに、アルカリフォスファターゼ活性を有する抗体を付加し、BCIP を基質としたアルカリフォスファターゼ法により、検出した。

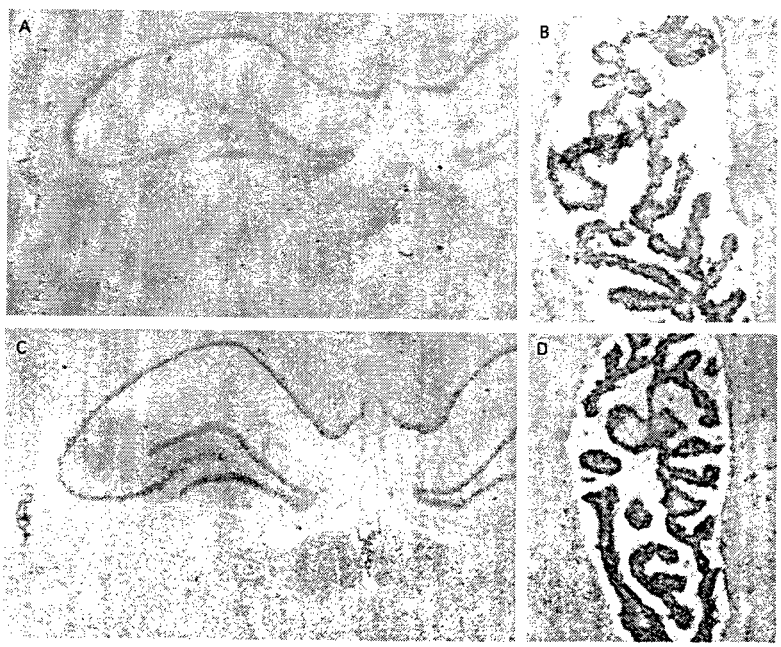
【結果と考察】

5-HT2C 受容体の第Ⅲ細胞内ループから第Ⅳ細胞内部位のＮ末端側に相当する 1,353 - 1,888 に結合するジゴキシゲニン化 antisense RNA をプローブとして 5-HT2C mRNA の脳内分布を検討したところ、

側脳室や第三、第四脳室の脈絡叢に特に強く mRNA が検出され、また海馬 (特に CA3)、手綱核や扁桃体、梨状葉 、視床下部背内側核にも多く存在し、皮質にも弱いながら検出された。一方、sense probe ではこれらの結合はほとんど認められなかった。この結果は ^{32}P を用いたこれまでの知見 (2) とよく一致しており、今回用いたプローブの高い特異性と、第Ⅲ細胞内ループ配列の受容体固有性を示していると思われる。また、ジゴキシゲニン標識は、特異性の高いことに加え、取扱いが容易で安全であること、および検出までの時間が短いことなどから、これまでの放射性標識に変わる有用な検出法であることが示唆された。抗うつ薬を 4 日間連続経口投与したラットから脳切片を作製し、5-HT2C mRNA を検出したところ、20 mg/kg imipramine、20 mg/kg maprotiline、20 mg/kg mianserin 投与ラットにおいて、mRNA 量が増大していることが認められたが、20 mg/kg desipramine では著明な変化は観察されなかった。アフリカツメガエル卵母細胞に mRNA を移入することにより 5-HT2C 受容体を再構成した系で、imipramine、mianserin 等の一部抗うつ薬は、5-HT2C 受容体電流応答を抑制するものの、desipramine は弱いことが示されている (3,4)。今回の知見は、薬物作用の点で類似しており、一部抗うつ薬による急性の作用としての 5-HT2C 受容体抑制が繰り返されることによって、その補償機構としての 5-HT2C mRNA 生成量の増大を生じている可能性が考えられる。5-HT2C 受容体はそれ自体が形質転換活性を有していることが、DNA 導入線維芽細胞において示されていることから (1)、生成された 5-HT2C mRNA および受容体が新たな遺伝子発現を引き起こすことによって、抗うつ作用を示す可能性も考えられる。今回の知見は、一部抗うつ薬の連投が 5-HT2C mRNA 発現に影響を及ぼすことを示しており、5-HT2C 受容体と抗うつ薬との関連性を、遺伝子発現の観点からさらに詳細に検討する必要性があろう。

【参考文献】

1) Julius, D., Livelli, T.J., Jessell, T.M. and Axel, R. (1989) Science 244, 1057-1062.
2) Mengod, G., Nguyen, H., Le, H., Waeber, C., Lubbert, H. and Palacios, J.M. (1990) Neurosci. 35, 577-591.
3) Tohda, M., Takasu, T. and Nomura, Y. (1989) Eur. J. Pharmacol. 166, 57-63.
4) Tohda, M. and Nomura, Y. (1991) Eur. J. Pharmacol. 200, 305-310.
5) Tohda, M., Tohda, C., Oda, H. and Nomura, Y. (1995) Neurosci Lett. in press.



イミプラミン連投によるラット脳セロトニン 2C 受容体 mRNA 発現変化の in situ hybridization 法による検出

水 (vehicle; A,B) およびイミプラミン (C,D) を4日間経口投与したラット脳切片をジゴキシゲニン標識した 5-HT2C antisense RNA プロ-ブと反応させた。B,D は側脳室の拡大図

95 グルタミン酸レセプター活性化で誘起される遺伝子発現カスケードの解析

津田正明、佐野訓明
(岡山大学・薬学部・微生物)

【要約】
カイニン酸(KA)のラット腹腔内投与によるケイレン誘発によって、海馬及び大脳皮質に著しいc-fos誘導が起こり、AP-1活性化とともに脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子の発現誘導が起こる。BDNF遺伝子のプロモーターI上のTRE(TPA-responsive element)類似配列は、AP-1活性化に応答可能であった。さらに、初代培養系において、グルタミン酸レセプターあるいは電位依存性カルシウムチャンネルの活性化でBDNF遺伝子の発現誘導が、AP-1活性化と時間的に呼応して起こることが明らかとなった。また、BDNFmRNAは代謝回転が速く、実際に培養を低KCl濃度(5 mM)で行うとBDNFmRNAは速やかに消失する。一方、高KCl濃度(25 mM)ではBDNFmRNAのレベルは高く保たれ、グルタミン酸刺激を加えても細胞死は起こりにくかった。

シナプス伝達を受けて活性化される機能遺伝子群を明らかにして、その制御機構を解析すれば、神経機能発現メカニズムの一端を理解することも可能である。実際に、グルタミン酸入力でc-fosなどの転写制御因子遺伝子や、BDNF遺伝子の発現誘導が顕著に認められる。そして、これら遺伝子群の発現は、機能上のつながりを持ってカスケード的に活性化されている可能性が強い。しかし、活性化されるAP-1結合活性などが、実際にBDNF遺伝子などの機能遺伝子の発現に関わっているかどうかについては全く明らかになっていない。そこで、この遺伝子発現カスケードの一端を明らかにする目的で、BDNF遺伝子の発現制御機構について、特にAP-1活性化との関連で検討を加えた。

【方法】
成熟ラットにカイニン酸(10 mg/kg)を腹腔内投与して、各時間毎に小脳、海馬、大脳皮質を摘出し、細胞質RNA、核抽出液を調製した。また、一週齢マウス小脳あるいは18日齢ラット胎児海馬から、小脳顆粒細胞及び海馬神経細胞の初代培養系をそれぞれ調製した(1, 2)。培養開始後6-7日目に、グルタミン酸(50 μM)あるいはBay-K8644(2 μM)を加え、同じシャーレの細胞から細胞質RNA及び核抽出液を調製した。各mRNAの発現量はノザンブロットハイブリダイゼーションによって、AP-1結合活性はゲルシフトアッセイによって測定した。神経細胞死の測定は、乳酸脱水素酵素(LDH)法及びFDA(Fluorescein diacetate)による蛍光イメージング法によった。

【結果】
カイニン酸の腹腔内投与後2-4時間目にわたって、海馬及び大脳皮質においてc-fos, fosB, fra-2, c-jun, junBの著しい発現誘導が認められた。BDNFmRNAの発現も、海馬、大脳皮質で、c-fos誘導に少し遅れて4時間目頃から顕著に認められた。
BDNF遺伝子のプロモーターI上のTRE類似配列を含む数種類のDNAプローブを作製し、カイニン酸投与後のラット海馬の核抽出液でゲルシフトアッセイを行った所、DNA結合活性の上昇が認められた。これは、TREによってDNA結合の競合阻害を受けるので、AP-1結合活性によるものと考えられた。また、その上流に結合するMyc配列結合活性は、TREによっても競合阻害を受けることがわかった。
海馬初代培養系にグルタミン酸あるいはBay-K8644を加えると、c-fosなどの発現誘導が1時間目から顕著に認められ、それに遅れてBDNFmRNAの発現量の上昇が認められた。同じ細胞から核

抽出液を抽出しゲルシフトアッセイを行うと、BDNFmRNAの発現上昇と時間的に一致してAP-1結合活性の上昇が認められた。BDNFmRNAの発現上昇は、ニカルジピンで抑えられた。

培地のKCl濃度を5mMに落とすと、c-fosmRNAとともにBDNFmRNAの急激な減少が認められた。また、BDNFmRNAはシクロヘキシミド投与で上昇した。この低KCl濃度では、グルタミン酸刺激を加えると、高KCl濃度(25 mM)に比べて神経細胞死が起こりやすい傾向にあった。

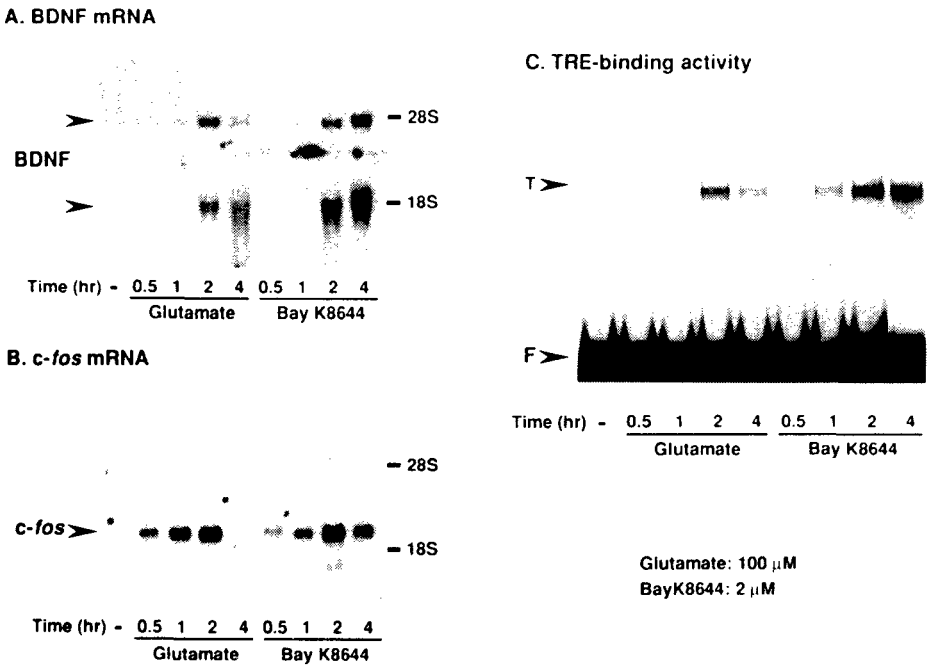


図1. ラット海馬初代神経細胞におけるBDNF(A), c-fos(B)mRNAの発現誘導とAP-1結合活性の活性化(C)

【考察】

生体脳及び初代神経細胞培養系を用いた解析の結果、活性化されたAP-1結合活性がBDNF遺伝子の発現誘導に関わっている可能性が強く支持された。しかし、BDNF遺伝子の発現は、最初期遺伝子の発現様式を示した。BDNF遺伝子の発現レベルの低い細胞では、グルタミン酸刺激で細胞死が起こりやすかったことから、BDNFが二次的に細胞の生存維持に関係した遺伝子群の発現を促していることが予想された。このように、グルタミン酸入力で機能上のつながりを持って、遺伝子発現のカスケードが活性化されている可能性がある。

【文献】

1. Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1992) J. Neurochem. 59, 2067-2075.
2. Ohtani, K., Sakurai, H., Oh, E., Iwata E., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1995) J. Neurochem., in press.

96 γ- ヒドロキシ酪酸によるマウス小脳顆粒細胞初代培養系の核内CREおよびAP-1 DNA結合活性増加におけるCa^{2+}の関与

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において、γ- ヒドロキシ酪酸(GHB)により誘導される核内cyclic AMP responsive element (CRE)およびactivator protein 1 (AP-1) DNA結合活性に対するGABABアンタゴニストの作用およびCa^{2+}の関与を検討した。核内CREおよびAP-1 DNA結合活性は1 mM GHBの処置により上昇したが、GABABアンタゴニストのCGP 35348 (1 mM)および CGP 55845 (1 μM)によりこの作用は拮抗された。1, 2-Bis(2'-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymetyl ester (BAPTA-AM)またはthapsigarginで細胞を前処置するとGHBによるDNA結合活性上昇作用は認められなくなった。以上より、GHBは、GABAB受容体を介して細胞内貯蔵部位からCa^{2+}を遊離させること、また、このCa^{2+}動員が核内CREおよびAP-1 DNA結合活性上昇に重要な役割を果たしていることが示唆された。

〔目的〕 てんかん小発作様症状を誘発させることが示されているγ- ヒドロキシ酪酸(GHB)(1)が、小脳顆粒細胞初代培養系においてcyclic AMP responsive element (CRE)およびactivator protein 1 (AP-1) DNA結合活性を上昇させること、およびこの上昇がGABABアンタゴニストのCGP 35348 (1 mM)で拮抗されることを昨年の本学会で報告したが(2)、その機構については不明な点が残されている。そこでこの度は、GHBによるCREおよびAP-1 DNA結合活性の上昇機構をより明らかにする目的で、DNA結合活性上昇に対するGABABアンタゴニストの影響およびCa^{2+}の関与について検討した。

〔方法〕 小脳顆粒細胞初代培養系の調製、核抽出液の調製およびゲルシフトアッセイは既報の方法で行った(2)。^{32}Pで標識した2本鎖CRE (5'-GATTGGCTGACGTCAGAGAGCT-3')およびAP-1 DNA (5'-GATCCGGCTGACTCATCACTAG-3')をゲルシフトアッセイのプローブとして用いた。受容体結合実験は、[^{3}H]baclofenを放射性リガンドとして既報の方法(3)で遠心法により行った。

〔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、1 mM GHBの処置により上昇したが、1 mM CGP 35348および1 μM CGP 55845の共存によりこの上昇は拮抗された。マウス脳膜標品における[^{3}H]baclofen結合に対するCGP 55845のIC_{50}値もCGP 35348と比較して1,000倍以上低かった。細胞内Ca^{2+}キレート剤であるBAPTA-AMで細胞を前処置すると、GHBによるCREおよびAP-1 DNAの結合活性上昇は抑制された（図1）。また、GHBによるCREおよびAP-1 DNA結合活性上昇作用は小胞体のCa^{2+}-ATPase阻害剤であるthapsigarginの前処置によっても拮抗された（図2）。細胞外液からCa^{2+}を除去した場合もGHBのDNA結合活性上昇作用は認められなくなったが、この条件下ではGABABリガンドの受容体への結合自体も抑制された。

〔考察〕 受容体結合実験よりCGP 55845のGABAB受容体への親和性はCGP 35348よりも1,000倍以上高いことが確認された。この親和性の差は、GHBによるCREおよびAP−1 DNA結合活性上昇に対する両化合物の拮抗作用に反映されていた。我々は、マウス小脳顆粒細胞初代培養系において、GHBが細胞内Ca^{2+}濃度を一過性に上昇させることを報告しており(4)、この結果と本実験結果を考えあわせると、GHBはGABAB受容体を介して細胞内貯蔵部位からCa^{2+}を遊離し、このCa^{2+}動員が核内CREおよびAP−1 DNA結合活性上昇に重要な役割を果たしていることが推察される。また、外液のCa^{2+}は、DNA結合上昇の過程よりもGHBのGABAB受容体への結合に必要であると考えられる。

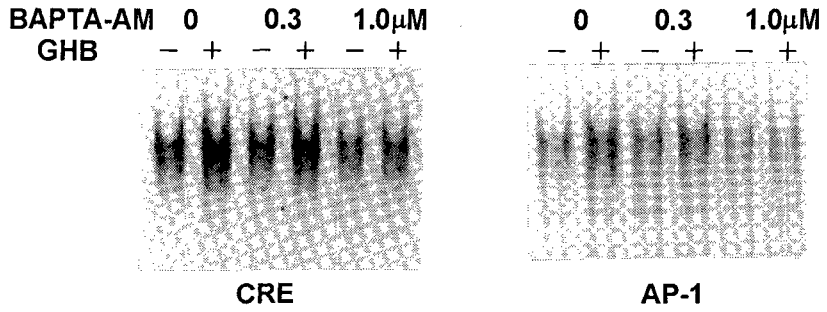


図 1 BAPTA−AMのGHBによるCREおよびAP−1 DNA結合活性上昇の阻害
核抽出液はBAPTA−AMで10分間前処置後、1 mM GHBで60分間処置した細胞から調製した。

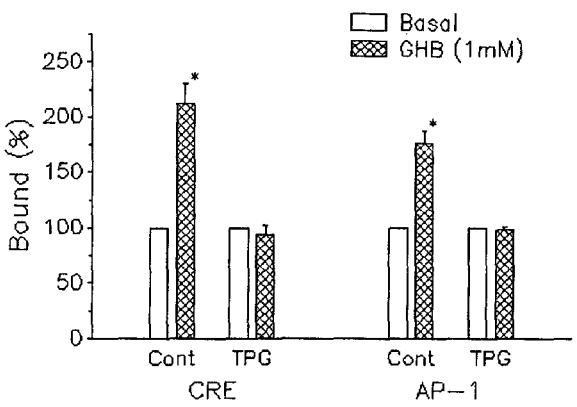


図 2 Thapsigarginのの GHBによるCREおよびAP−1 DNA結合活性上昇の阻害
1 mM thapsigargin (TPG)で2分間前処置後、1 mM GHBで60分間処置した細胞から核抽出液を調製した。各バンドの吸光度をデンシトメーターで測定しbasal値に対する%で表した。グラフは、4例の平均値±SEMで示した。

〔文献〕 1 Snead III, O.C. (1991) Neuropharmacology 30, 161−167
2 石毛久美子, 伊藤芳久, 福田英臣 (1994) 神経化学 33, 612−613
3 Ishige, K., Ito, Y., and Fukuda, H. (1993) Gen. Pharmacol. 24, 1533−1540
4 Ito, Y., Ishige, K., Zaitu, E., Anzai, K., and Fukuda, H. (1995) J. Neurochem. in press

97

低酸素・再酸素化により発現誘導される新規RNAスプライシング調節因子 —アストロサイトのin vitro低酸素モデルを用いて—

○松尾徳幸[1,5],小川智[2],今井祐二[4],高木勉[4],山下俊英[3],甲村英二[3],早川徹[3],遠山正彌[1],和中明生[1]
大阪大学医学部　第二解剖[1)]，第一内科[2)]，脳神経外科[3)]，分子脳機構（田辺）[4)]，大日本製薬[5)]

〔要約〕

培養ラットアストロサイトにおいて低酸素・再酸素化により発現誘導される新規遺伝子RA301を同定した。RA301は288個のアミノ酸よりなるSR蛋白(RNA認識モチーフ、２つのSRドメインを有する)をコードする事が明らかとなった。本因子はショウジョウバエ性決定に機能するスプライス調節因子transformer-2とシークエンス、ドメイン構造上最も相同であり、類似の機能を持つことが示唆された。RA301 mRNAは再酸素化後30分で発現誘導され、この誘導はNADPH oxidase阻害剤であるdiphenyl iodonium (DPI)によりブロックされ、蛋白合成阻害剤cycloheximideではブロックされなかった。以上の事実はRA301の転写がoxygen radicalにより直接制御されていることを示唆している。低酸素・再酸素化時にアストロサイトにおいて発現増強するIL-6に対してRA301のアンチセンスオリゴヌクレオチドは抑制的に働き、培養上清中のIL-6活性を有意に減少させた。またラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて、RA301 mRNAは虚血側大脳半球において血流再開後12時間より発現増強してることが観察された。RA301は低酸素・再酸素化という生体ストレスに対する細胞応答において重要な役割を担う新規因子と考えられる。

(はじめに)

虚血性の臓器傷害は低酸素そのものによる傷害と同時に、再潅流によるダメージも大きな要因となる。このようなストレスにさらされた細胞の応答を分子レベルで検討する目的で培養アストロサイトのin vitro低酸素負荷モデルを用いて、Differential Display法により再酸素化早期に発現誘導される遺伝子群を検索した。取得したいくつかの候補クローンの内、１クローンはホモロジーサーチの結果ショウジョウバエの性決定に関与するRNAスプライシング調節因子tra-2と相同性を有することが判明した。本研究ではこの分子（RA301)の一次構造の決定、培養アストロサイトにおける低酸素、再酸素化状態での発現の経時変化、発現誘導に対するoxygen radicalの関与を検討すると共に、RA301の機能的意義を探る目的で、IL-6産生分泌システム[1)]に対するRA301アンチセンスオリゴヌクレオチドの影響、及びラット中大脳動脈閉塞モデルにおけるRA301 mRNAの発現をin situ hybridization 法を用いて解析した。

(方法と結果)

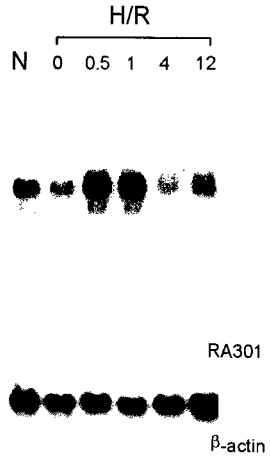
生直後ラット大脳皮質よりのアストロサイトの初代培養はMaCarthyらの方法に準拠して行った。in vitro低酸素負荷(H)は低酸素チャンバー(Coy Laboratory Products)内に培養皿を置くことにより行い[1)]、再酸素化(R)は外気に戻すことにより行った。Total RNAはAGPC法により各時点の細胞より調整し、Differential Display(DD)法及びノザン解析に供した。DD法はLiang and Pardeeの方法を改変して行った。cDNAライブラリーのスクリーニング、シークエンス解析、ノザン解析は定法に従った。DD法を用いて培養アストロサイトにおいて再酸素化早期に発現誘導される遺伝子を検索したところ、いくつかの候補cDNAが得られた。本研究ではこの内の一つRA301について詳しい解析を行った。まずDD法で得られたcDNA断片を用いたノザン解析によりRA301 mRNAは正常酸素濃度下で一定の発現レベルを示すが、低酸素時に低下し、再酸素化15分後より上昇し始め、30分-1時間でピークに達する。その後４時間後には低酸素時のレ

ベルまで低下する。またこの発現誘導はNADPH oxidase inhibitorであるDiphenyl Iodoniumの添加によりほとんど完全にブロックすることが出来た。またこの発現誘導はcycloheximideの添加では影響を受けないことより新規の蛋白合成を介さずに直接oxygen radicalにより調節されている可能性が考えられた。

DD法で得られたcDNAをプローブとしてライブラリーをスクリーニングし、全長cDNAを取得、その一次構造を決定した結果RA301は288個のアミノ酸よりなるSR蛋白をコードしていた。N末とC末にセリン、アルギニン残基に富むSRドメインがあり、中間にはRNA認識モチーフ(RRM)が存在し、構造的に(シークエンスからも)ショウジョウバエのtransformer-2 (tra-2)に最も相同である事がわかった。tra-2はRNAスプライシングの調節因子であることからRA301も同様の機能を持つ可能性があるのでIL-6産生システムに対するRA301のターゲッティングの影響を観察した。IL-6活性はMH-60細胞を用いたバイオアッセイで、蛋白量は特異抗体を用いたウェスタンブロットで測定した。アンチセンスオリゴヌクレオチドはRA301の翻訳開始部を含む3種(YS-59, 60, 61)を作成, 併せてそれらのセンスオリゴも合成し、いずれのオリゴも10μMの濃度で用いた。このうちYS-60のみが効果がありIL-6の産生量、活性ともにコントロールの60%程度まで低下させた。またいずれのオリゴを用いた場合でも細胞の生存率には有意な変化はなかった。また成熟SDラットにおいて動脈瘤用クリップにより片側MCA閉塞再潅流モデルを作成、in situ hybridization法によりRA301 mRNAの発現動態を観察したところ、虚血再潅流後12-24時間後にピークを持って、虚血側大脳半球にRA301 mRNAの発現増強が観察された。

(考察)

RA301は新規のRNA結合蛋白であり、再酸素化のシグナル(おそらくNADPH oxidaseシステムの活性化を介するもの)により直接誘導がかかる非常にユニークな分子であることが判明した。急速なエネルギー、蛋白合成能の復活、ラジカルなどに対する防御などの再酸素化直後の細胞応答の一端を担う重要な機能を有することが考えられるが、これ以外にも新規の細胞内代謝経路が賦活化されている可能性があり、今後の重要な課題である。



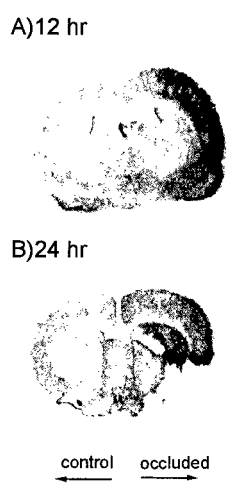


Figure 1. ラット培養アストロサイトにおけるRA301の発現。
正常酸素下(N)および24時間低酸素負荷後、再酸素化したアストロサイトより、再酸素化直後、0.5-12時間後にRNAを抽出、RA301のcDNAプローブを用いてnorhtern blotを行った。下段はβ-actinによるinternal control。

Figure 2. SDラット片側MCA閉塞再潅流モデルにおけるRA301の発現。
成熟SDラットの片側MCA閉塞・再潅流によって脳虚血モデルを作成し、12および24時間後に潅流固定し、in situ hybridization法によってRA301の発現を検討した。

参考文献
1)Maeda Y. et al., *J. Exp. Med.*, **180**, 2298-2307, 1994
2)Hori O. et al., *J. Neurochem.*, **62**, 1489-1495, 1994

98 1本鎖CRE結合蛋白質（ssCRE-BP）のDNA結合活性を増加させる因子について

大杉　武、丁　云、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、DNA結合活性が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ことを見いだしている。この蛋白質(ssCRE-BP)のDNA結合活性は、単独では弱いが、カゼインなど他の因子によって、ssCRE-BPの結合活性は特異的に増大する。今回、ssCRE-BPとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST) との融合蛋白質(GST-ssCRE-BP)を用いて、ssCRE-BPのDNA結合活性を増加させる因子について検討した。ssCRE-BPに結合する因子について調べるために、GST-ssCRE-BPとマウス小脳の核抽出液をインキュベートした後、グルタチオン-セファロースカラムにGST-ssCRE-BPを吸着させた。5 mMグルタチオンによって、GST-ssCRE-BPと共に、50 kDa、38 kDaのポリペプチドが溶出され、ssCRE-BPは他の因子と複合体を形成して存在していることが示唆された。

［緒言］
マウスやラットにおいて、モルヒネを連続投与すると、薬物耐性、依存を生じることが古くから知られているが、その機構に関しては不明な点が多い。我々は既に、ソマトスタチン遺伝子のプロモーター領域のCREを含むオリゴDNAをプローブとしてゲルシフトアッセイを行ない、マウス小脳の核抽出液中にモルヒネの長期投与により変化するDNA結合蛋白質が存在することを報告した（1、2）。この蛋白質は、1本鎖のCREに特異的に結合するが、単独では、DNA結合活性は弱い。しかし、カゼインや核抽出液が存在すると、ssCRE-BPのDNA結合活性は増加した。また、モルヒネの慢性投与により、ssCRE-BPのmRNAや蛋白量は有意に変化しなかった（3）。従って、ssCRE-BPに結合してDNA結合活性を増加させる因子が、モルヒネ慢性投与により、変化する可能性がある。今回、GSTとの融合蛋白質を用いて、ssCRE-BPに結合する因子について検討した。

［実験方法］
1）ウエスタンブロット：マウスの各組織の蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲルに泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した。GST-ssCRE-BPを抗原として、ポリクローナル抗体を作製し、ssCRE-BPを検出した。
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）マウスの小脳、大脳、肝臓、肺、心臓、腎臓、精巣などを用いて、ウエスタンブロットにより、ssCRE-BPの組織分布を検討した。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）モルヒネ慢性投与群のマウス小脳のssCRE-BP量と対照群では有意な差は見られなかった。従って、ssCRE-BPと結合してDNA結合活性を増加させる因子がモルヒネ慢性投与により変化する可能性が示唆された。
3）GST-ssCRE-BPとグルタチオン-セファロースカラムを用いて、マウス小脳の核抽出中に存在するssCRE-BP結合因子について検討した。5 mMのグルタチオンにより溶出される分画に、GST-ssCRE-BPと共に50 kDa、38 kDaのポリペプチドが存在した（図2）。現在、これらのポリペプチドについて検討を行っている。

[文献]
（1）Osugi, T. et al., (1994) Mol. Brain Res., 21, 256-262.
（2）大杉　武、他, (1993) 神経化学, 32 (1), 64-65.
（3）大杉　武、他, (1994) 神経化学, 33(1), 162-163.

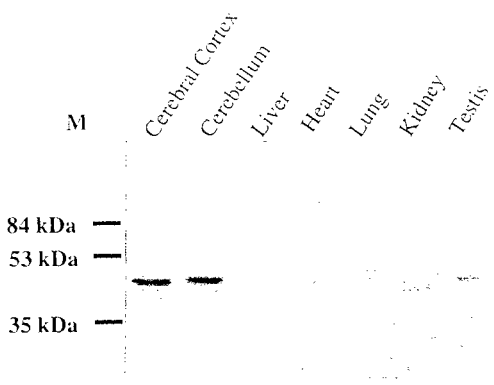


図1．ウエスタンブロットによるssCRE-BPの組織分布

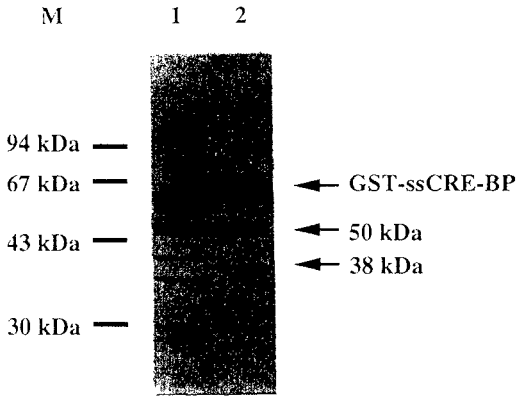


図2．グルタチオンーセファロースカラムから溶出された分画のSDS-PAGE
1.　素通り分画
2.　5 mM グルタチオンで溶出された分画

99 ラット・ヒポカルシンのゲノム遺伝子の解析

小林正明、斎藤茂治、黒木貴夫*、斎藤　優、野口鉄也、高松　研
（東邦大学・医学部・第二生理、*第一脳外）

〔要約〕

ラット白血球由来ゲノム DNA ライブラリーよりヒポカルシンのゲノム遺伝子を単離した。ラット・ヒポカルシン遺伝子は、約 13 kbp のゲノム遺伝子中に3個のエキソンに分断されて存在していた。ラット脳の各領域から得た全 RNA について、プライマー伸長反応および S1 マッピングを行ったところ、海馬および大脳皮質では開始コドン上流 -228 bp (T) からヒポカルシン mRNA の転写が開始されていることが明らかとなった。ヒポカルシンの開始コドン上流域約 1.5 kbp の塩基配列を決定したところ、AP1, NF1 および HSTF (heatshock transcription factor) などの転写調節因子の結合領域の存在が認められた。また、転写開始点上流 -80 bp 近辺には CAAT ボックスが存在していた。

［ **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]。すでにラットおよびヒトの cDNA が単離され、ヒトでの遺伝子座は常染色体 1 番上に haploid あたり single copy で存在していることが明らかとなっている[2]。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[3]。ヒポカルシンと相同性の高い蛋白質が、網膜[4~7]、脳[1),8,9]および神経-筋接合部[10]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ことが明らかとなっている。網膜視細胞には、ロドプシンのリン酸化を高カルシウム濃度で抑制するもの[11]と、guanylate cyclase の活性を低カルシウム濃度で活性化するものの２種が報告されている[7]。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[12,13]。いずれも生理機能については明らかにされていないが、神経細胞内の情報伝達の調節に関与していると思われる。今回、我々はヒポカルシンの海馬に特徴的な転写調節機構を解明する目的で、ラットのゲノム遺伝子のクローニングを行った。

［ **実験方法** ］

1)ゲノム遺伝子クローニング：ラット白血球由来ゲノム DNA ライブラリー (Clontech Labs. USA) を、ラット・ヒポカルシン cDNA の 5'-非翻訳領域 (-174 ~ -1 bp) をプローブとしてスクリーニングした。

2）プライマー伸長反応：合成オリゴヌクレオチド（5'-TACTCCAGAAGGGCCCTCAGACA-3'；ラット・ヒポカルシン cDNA の 5'-非翻訳領域 (-91 ~ -113 bp) の antisense 鎖）について 5' 末端の [^{32}P] 標識を行い、酵母、ラットの肝臓、小脳、大脳皮質および海馬の全 RNA に対し逆転写反応を行なった。ラット・ヒポカルシンのゲノム DNA 中、開始コドン上流域に対し、同じプライマーを用いて reference sequence を作成した。

3）S1 マッピング：ラット・ヒポカルシンのゲノム DNA から、開始コドン上流 約 350 bp をベクター pBSSK(-) に導入し、sense 鎖の一本鎖 DNA を調整した。上述の標識プライマーを用い、相補鎖を合成した後、標識鎖を精製した。この標識鎖を用いて、上述した全 RNA に対する S1 ヌクレアーゼ消化を行った。

［ **結果と考察** ］

ラット白血球由来ゲノム DNA ライブラリーよりラット・ヒポカルシン遺伝子を含む約 13 kbp のゲノム遺伝子を単離し、構造解析を行った。ヒポカルシンの構造遺伝子は3個のエキソン上に存在していた (Fig. 1)。ヒポカルシン分子中の EF-hand 構造のうち、EF1 と EF2 はエキソン１上に存在していたが、EF3 はイントロンにより分断され、エキソン 2 と 3 にまたがって存在していた。ヒポカルシン構造遺伝子中のイントロンの存在位置は、すでに報告されているヒト・リカバリン[14]（網膜に存在する同族分子種）のものと同じであったことから、ファミリーに共通するスプライシング機構

の存在が示唆される。酵母、ラットの肝臓、小脳、大脳皮質および海馬の全 RNA について、プライマー伸長反応および S1 マッピングを行い、ヒポカルシンの転写開始点を決定した (Fig. 2)。いずれの方法でも共通する主要な転写開始点が、海馬および大脳皮質で、開始コドン上流 -228 bp (T) に認められた(cDNA の 5' 端は -174 bp)。また、プライマー伸長反応では開始コドン上流 -180 bp (A) にもシグナルが認められた。酵母およびラットの肝臓からはシグナルは検出されなかった。ヒポカルシンのゲノム遺伝子について、転写開始点を含む開始コドン上流域約 1.5 kbp の塩基配列を決定したところ、AP1, NF1 および HSTF (heatshock transcription factor) などの転写調節因子の結合領域の存在が認められた。また、転写開始点上流 -80 bp 近辺には CAAT ボックスが存在していたことから、転写開始点上流域にプロモーター領域が存在すると考えられる。

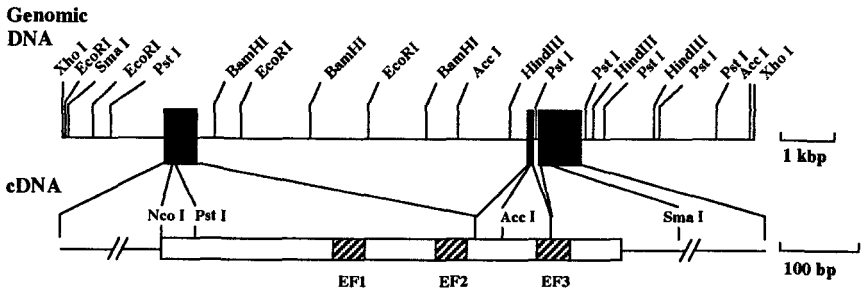


Fig. 1 ラット・ヒポカルシンのゲノム遺伝子の構造

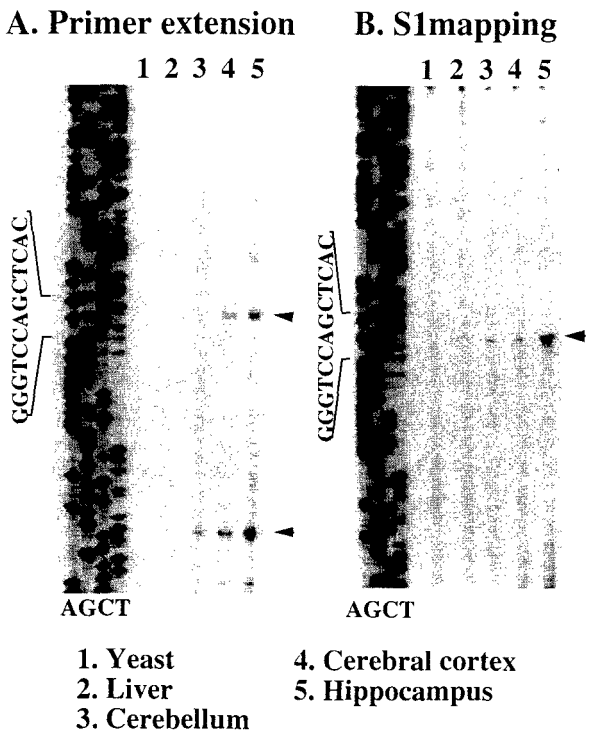


Fig. 2 ラット・ヒポカルシン遺伝子転写開始点の同定

［参考文献］：1) Kobayashi M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 511-517 : 2) Takamatsu K. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 200 (1994) 606-611 : 3) Kobayashi M. et al. (1993) J. Biol. Chem. 286, 18898-18904 : 4) Yamagata K. et al. (1990) Neuron 2, 469-476 : 5) Dizhoor A.M. et al. (1991) Science 251, 915-918 : 6) Kawamura S. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 14579-14582 : 7) Palczewski K. et al. (1994) Neuron 13, 395-404 : 8) Hidaka H. and Okazaki K. (1993) Neurosci. Res. 16, 73-77 : 9) Kajimoto Y. et al. (1993) J. Neurochem. 61, 1091-1096 : 10) Pongs O. et al. (1993) Neuron 11, 15-28 : 11) Kawamura S. (1993) Nature 362, 855-857 : 12) Saitoh S. et al. (1993) Neurosci. Lett. 157, 107-110 : 13) Saitoh S. et al. (1994) Neurosci. Lett. 171, 155-158 : 14) Murakami A. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 234-244

100 トランスジェニックフィッシュによるNecdin遺伝子プロモーター活性と神経特異発現の検討

郭哲輝、金哲熙、田中秀和、植月太一[1]、吉川和明[1]、岡本仁[2]、三木直正
(大阪大・医・薬理、[1]大阪大・蛋白研、[2]慶応大・生理)

〔要約〕
神経細胞特異的蛋白と考えられているnecdin遺伝子を用い、組織特異的発現に関与するcisエレメントをゼブラフィッシュの系で検討した。種々の長さのnecdinプロモーター／レポーター遺伝子を含むプラスミドを作製し、受精卵に注入した。レポーター遺伝子の発現を抗体を用いたwhole mount法で解析したところ、necdin遺伝子上流、-173 から +28の約200bp内に神経特異発現を示すエレメントが存在することを見い出した。この領域には、NRSE (Neuron-Restrictive Silencer Element) や既知DNA シークエンスなどとの強いホモロジーは認められなかった。これらの結果から、ゼブラフィシュ系が神経特異的プロモーターの同定に使用出来る実験系であると考えられた。

Necdin cDNAは、レチノイン酸により神経細胞に分化させたものと、無処理のもの（P１９胚性ガン細胞）とのdifferential hybridization法により単離されたクローンである(1)。組織化学やin situ hybridizationの解析から、コードされているnecdinは、神経細胞に特異的な核蛋白質と考えられている(2)。また、単離されたマウスnecdin遺伝子の解析から5'上流域約900bpには神経分化に関与するcisエレメントが含まれている事なども明らかにされている(3)。

近年、分子生物学の研究材料としてゼブラフィッシュが用いられており、染色体地図や種々の神経系異常ゼブラッフィシュの確立も報告されている(4,5)。ショウジョウバエに比べゼブラフィッシュの方がはるかにヒト神経系に近いこと、受精後２４時間で基本的な神経系が完成し、その体が透明なことから個体を用いた免疫化学などの解析が容易であること、約３カ月で成魚となり産卵することから、トランスジェニックの作製が比較的簡便であろうことなどが考えられる(6)。我々はnecdin 5'上流域の神経特異的発現に関与するcisエレメントについて、ゼブラフィッシュの系でその有用性について検討した。

方法； pCDNAI（或いはBlue script SK-）プラスミドに種々の長さのnecdin 遺伝子上流を、またレポーターとしてトランスデューシンβγサブユニット結合蛋白質であるMEKAの（lacZ）遺伝子をその下流に導入し発現ベクターを作製した。対照としてpCDNAIのCMV（サイトメガロウイルス）プロモーターの下流にMEKA遺伝子を挿入したものを使用した。ゼブラフィッシュ卵の１－２細胞期に発現ベクター（25μg／ml）を約500pl注入し、受精後２４時間目頃での発現をwhole mount法で調べた。卵膜をpronase処理で除き、4%パラホルムアルデヒドを含むバッファーで固定した。0.3% TritonX-100を含むPBSを基本Bufferとして、抗MEKA (-β-galactosidase) 血清との反応、次いで二次抗体・ホースラデッシュパーオキシダーゼとの反応、洗浄を行い、DAB発色を行った。サンプルは、安息香酸ベンジル：ベンジルアルコール（２：１）で透明化し、発現している細胞を検出した。

結果及び考察； 神経細胞膜のマーカーである抗HNK-1などを用いて免疫化学の最適条件や神経細胞の形成、位置などを確認した(7)。Necdinプロモーター（-845 から +63 の約900bp）によるMEKA (lacZ) 遺伝子発現細胞のほとんどが神経細胞であり、受生後２４時間目では主として知覚神経と三叉神経で認められた。２８時間目では、さらに運動神経、介在神経などにも発現が認められた（図１）。他方、逆方向に挿入したプロモーターではレポーター遺伝子の発現は認められなかった。

これらの結果から、使用したマウスnecdinプロモーターには、神経特異的発現に関与するcisエレメントが含まれていること、ゼブラフィッシュが時間的及び空間的なプロモーター活性の測定に使用出来る実験系であることがわかった。Necdinプロモーターによる神経特異的発現は、プラスミドの凍結融解、直線化により著しく低下した。発現パターンがモザイク状であること、個体あたりの発現細胞数が１－３２細胞と少ないことなどは、今後の課題である。今回は、トランスデューシンβγサブユニット結合蛋白質であるMEKA遺伝子(8)をレポーターとして用い、強制発現させたが、２８時間目までには神経細胞の形態変化などは認められなかった。

我々は、cisエレメント解析のため種々の長さのプロモーターを作製し（-291から+28, -173から+28, -123から+28, -86から+28, -63から+63など）、２４時間目での発現パターンを調べた。プロモーター領域5'側の欠除に伴いレポーター遺伝子の発現も著しく低下したが、神経特異発現に必要なプロモーター領域は-173から+28内に存在すると結論した。この領域にはNRSEや既知DNAシークエンスとの強いホモロジーは認められなかった。他方、5'上流-113や-86から+28までのプロモーターを用いた時の発現では神経細胞から皮膚での発現が次第に増え，-63から+63までのものでは、レポーター遺伝子の発現が認められなかった。

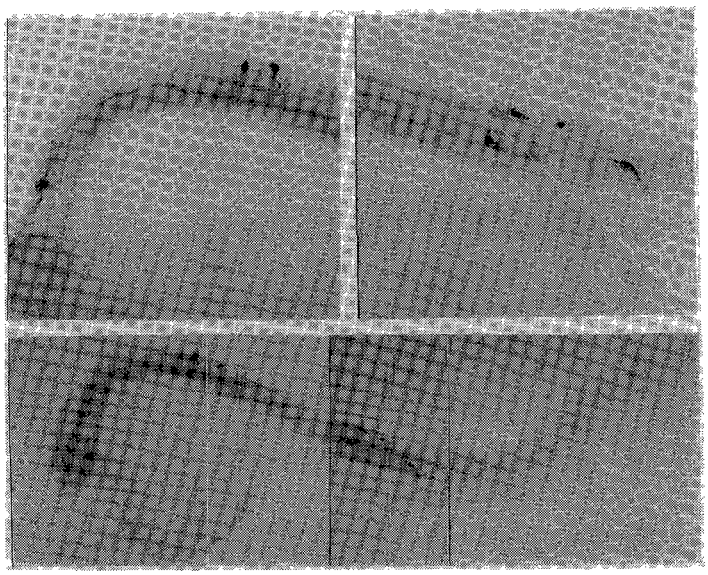


図１、Necdin 5'上流域(-845から+63)/MEKAレポーター遺伝子による神経特異的発現
ゼブラフィッシュ受精卵に発現ベクターを注入し、組織特異的発現を２８時間後に調べた。知覚神経、三叉神経、運動神経、介在神経が染色されたが、非神経細胞は染色されていない

1) Maruyama, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 178, 291-296 (1991)
2) Aizawa, T. et al., Dev. Brain Res., 68, 265-274 (1992)
3) 植月太一ら、神経化学、３３（１）、８０－８１（１９９４）
4) Postlethwait, J. H. et al., Science, 264, 699-703 (1994)
5) Kahn, P., Science, 264, 904-905 (1994)
6) Reinhard, E. et al., Development, 120, 1767-1775 (1994)
7) Metcalfe, Y. K. et al., Development, 110, 491-504 (1990)
8) Kuo, C.-H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 162, 1063-1068 (1989)

101 アデノウィルスを介したラット脳内へのドパミンD2受容体の遺伝子移入

伊苅弘之、Mastrangeli A [(1)]、加藤修一[(3)],Zhang L[(2)]、Chenak JM[(2)]、Kuo H[(2)]、Crystal RG[(1)]、
Ingram DK [(2)]、Roth GS[(2)]

名古屋大学医学部老年科,[(1)]Co r nell University Medical School,[(2)]National Institute on Aging / NIH,[(3)]山形大学第一内科

〔要約〕
ドパミンD2受容体(D2R)は神経系の疾患や加齢に伴う運動機能の低下と関連が深い。本研究ではD2Rを発現させるアデノウィルスベクターを作製してその作用を確認した。ラットD2RのcDNAを入取しシャトルベクターに挿入しpJM17とホモロガスリコンビネーションを行い目的のベクターを作製した。これを培養細胞に感染させノーザン法にてD2RのmRNAを確認しトリチウム標識したD2Rリガンドにて感染した細胞の細胞膜を処理してレセプターアッセイを行いD2Rが膜に存在することを確認した。ラット線条体にベクターを注入し5日後に脳を摘出し同じリガンドを用いてレセプターオートラジオグラフィーを行いD2Rの発現を確認した。

〔目的〕ドパミンD2受容体(D2R)の加齢に伴う減少は運動神経系の機能低下と関連が深い(4,7)。またD2Rの減少はハンチントン病や末期のパーキンソン病でも顕著である(8,9,10)。遺伝子移入の方法を用いれば不足したものを必要な部位に選択的に発現させることが可能である。そこで我々はD2Rを発現させるアデノウィルスベクターを作製しラット脳内でのD2Rの発現を試みた。

〔方法〕①アデノウィルスベクターの作製。ラットD2RのcDNA(1)を入取し制限酵素で消化してシャトルベクターに挿入した。このシャトルベクターとpJM17(6)とを共に293cell(ATCC CRL1537)へ同時にトランスフェクションしホモロガスリコンビネーションさせて目的のアデノウィルスベクターを作製した(AdCMV. DopD2R)。同様にcDNAの組み込まれていないアデノウィルスベクターも作製された(AdCMV. Null)。両者のタイターが確認された(11)。②mRNAの確認。HeLa cell,及びHS24cellに対し10～100plaque forming unit/cell(pfu/cell)の割合でAdCMV.DopD2RとAdCMV.Nullを感染させ3～6日後、ノーザン法を行った。③細胞膜に存在する受容体の確認。HeLa cellを用いて50pfu/cellの割合で感染させ4日後に細胞膜を処理してD2Rのリガンド[^{3}H]スピペロンにてバインディングアッセイを行った。④脳内でのD2Rの発現の確認。3ヶ月齢のラットの線条体左側にはAdCMV.DopD2Rを1×10^8pfu、5μl注入し、右側にはAdCMV.Nullを1×10^8pfu、5μlまたはPBS 5μlまたは無処置とした。5日後に脳を摘出し[^{3}H]スピペロンにてレセプターオートラジオグラフィーを行った。⑤組織学的検索。HE染色及びGlia Fibrillary Acidic Protein(GFAP)免疫組織染色を行った。

〔結果〕①AdCMV.DopD2R及びAdCMV.Null共にタイターは2×10^{11}pfu/ml。②両細胞共にAdCMV.DopD2Rで感染したものには強いメッセージが認められた。AdCMV.Nullで感染した細胞や無処置のものでは認めなかった。③AdCMV.DopD2Rで処理したものはコントロールとした線条体の組織に比べ約2倍のバインディングが認められた。④AdCMV.DopD2Rを注入した周辺に著明な[^{3}H]スピペロンの集積が認められた。AdCMV.NullやPBSを注入したもの及び無処置の脳ではこの様な変化は認めなかった。⑤AdCMV.DopD2R

注入側は他側と比較して特に異常所見を認めなかった。

〔考察〕この報告はウィルスベクターを用いて神経伝達に関わる受容体を脳内へ発現させた最初の報告である。今回In vivoでD2Rが発現したことは明きらかだが、D2RがIn vivoでも膜に存在していることの確認、脳内でD2Rがどのくらいの期間発現し続けるか、ラットの行動に変化が見られるかどうかといった実験が今後必要であろう。今回我々の作製したD2Rを発現させるアデノウィルスベクターはハンチントン病のモデル動物(2)や加齢に伴う運動障害モデル動物(3)を用いて脳内で実際にD2Rがどのような役割を担っているかをさらに解明するための有効な手段になるであろう。更に脳内の異なる部位にD2Rを増加させることで分裂病の病態の検討やモデル動物の作製も考えられる(5,12)。アデノウィルスベクターを用いた遺伝子移入により症状の改善する可能性のある神経系の疾患に対する遺伝子治療の広がりが期待される。

REFERENCES

(1) Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Nature 336, 783-787.

(2) Emerich DF, Sanberg PR (1992) in Animal models of Huntington's disease: From Animal models of neurological disease, I: Neurodegenerative Diseases (Boulton AA, Baker GB, Butterworth RF, eds), pp.65-134. Totowa, NJ: Humana Press.

(3) Ingram DK, Jucker M, Spangler EL (1994) in Behavioral manifestations of aging: From Pathobiology of the Aging Rat (Mohr U, Dungworth DL, Capen CC, ed), pp.149-170. Washington: ILSI Press.

(4) Joseph JA, Roth GS, Strong R (1990) in The striatum, a microcosm for the examination of age-related alterations in the CNS: A selected review: From Review of Biological Research in Aging (Rothstein M, ed), pp.181-189. New York: Alan R. Liss.

(5) Lyon M (1991) in Models of mania and schizopherenia: From Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial, and clinical perspectives (Willner P, ed), pp.253-310. Cambridge: Cambridge U Press.

(6) McGrory WJ, Bautista DS, Graham FL (1988) Virology 163, 614-617.

(7) Morgan DG, Finch CE (1988) Ann NY Acad Sci 515, 145-160.

(8) Reisine TD, Fields JZ, Johnson PC, Bird ED, Yamamura HI (1977) Life Sci 21, 1123-1128.

(9) Rinne JO, Laihinen A, Lönnberg P, Marjamäki P, Rinne UK (1991) Brain Res 556, 117-122.

(10) Rinne UK, Sonninen V, Laaksonen H (1979) in Responses of brain neurochemistry to levodopa treatment in Parkinson's disease: From Advances in neurology (Poirier LJ, Sourkes TL, Bedard PJ, eds), pp.259-274. New York: Raven Press.

(11) Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, Yoneyama K, Fukayama M, Stier LE, Pääkkö PK, Gilardi P, Startford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Jllat S, Pavirani A, Lecocq J-P, crystal RG (1991) Science 252, 431-434.

(12) Seeman P (1993) Arch Neurol 50, 1093-1095.

102 Z型Myc配列を認識する核内蛋白質の探索

荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
ゲル移動度シフト法によりマウス脳細胞核抽出液中のMyc配列認識蛋白質のDNA結合能を測定した。本結合は、反応液中への$MgCl_2$の添加により著明に抑制された。また、$MgCl_2$存在下ではピロリン酸(PPA)の添加により著しい結合の増強が観察されるのに対して、$MgCl_2$非添加条件下ではPPAの添加により阻害されることが判明した。$MgCl_2$添加条件下および非添加条件下のMyc配列結合蛋白質は、それぞれ異なる分子量であることがクロスリンク法により明らかとなった。一方、用いたDNAプローブの紫外部吸収スペクトルは$MgCl_2$非添加条件下には260 nmに極大吸収を示したが、$MgCl_2$の添加によりB型からZ型への変換を示唆する吸収スペクトルの長波長側への移動が観察された。したがって、細胞核抽出液中にはB型およびZ型のMyc配列を認識する蛋白質が存在する可能性が示唆される。

細胞核内転写制御因子の一つであるc-Mycは、核内蛋白質Maxとヘテロダイマーを形成して、2本鎖DNA上の特定の塩基配列[CAC(G/A)TG、Myc配列]に選択的かつ高親和性に結合し、その標的遺伝子に対する転写促進機能を発揮する(2)。このMaxはMadともヘテロダイマーを形成後、Myc/Max複合体と同一のシスエレメントに結合して、Myc/Max複合体による転写促進作用を遮断する(1)。このように、Myc配列には数種類の異なる蛋白質複合体が結合して標的遺伝子の転写調節が行われる。一方、2本鎖DNAにはB型(右巻き)とZ型(左巻き)が存在するが、プリン塩基とピリミジン塩基が交互に配列する場合や、Mg^{2+}あるいはポリアミン類などが存在する場合には、B型からZ型への変換が起こり得ることなどが示されている(5)。また、c-Mycコード遺伝子の転写開始位置上流に存在するZ型DNAが転写調節に関与する可能性が示唆されている(6)。本研究ではMyc配列がZ型に変換しうる塩基配列であることに着目し、Z型DNA結合蛋白質の検索を目的として、マウス脳の細胞核抽出液中のMyc配列結合蛋白質の性質を解析した。

〔実験方法〕
核抽出液の調製：Std-ddY雄性マウス全脳から、ノニデットP-40を用いた方法(4)に準じて核抽出液を調製し、使用時まで-80℃で凍結保存した。DNAプローブ：放射性2本鎖Mycプローブ(5'-CTAGTGACACGTGGCCGGATCA-3')は、dATP[α-^{32}P](111 TBq/mmol, NEN/DuPont社)と、DNAポリメラーゼIのKlenow fragmentを用いたエンドラベリング法により調製した。ゲル移動度シフト法：核抽出液(3-5 μg蛋白質)、1 μg poly(dI-dC)、放射性プローブ(20 fmol、1-12×10^4 cpm)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 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50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)の全量20 μlを25℃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(PAGE、80 mV定電圧、2℃、1.5時間)により分離した。放射能の検出はオートラジオグラフィー法により行った(3)。クロスリンク法：ゲル移動度シフト法と同様の条件で結合反応を行った反応液に254 nmの紫外線を4℃で2時間照射したのち、SDS-PAGEにより結合蛋白質を分離した。

〔実験結果〕
放射性プローブを用いたゲル移動度シフト法により、Myc結合は5 mM以上の$MgCl_2$の添加で濃度依存的に阻害されることが明らかとなった。$MgCl_2$添加および非添加の両条件下で結合反応を行ったのちに、S. aureus V8プロテアーゼ処理による限定分解を行った結果、放射性バンドのゲル上での移動度変化がイオン添加条件により異なることが明らかとなった。次に、両反応条件下で種々のプロテインホスファターゼ阻害薬の添加効果を検討したところ、PPAが$MgCl_2$非添加条件下の結合を1 mM以上の濃度で濃度依存的に阻害するのに対して、$MgCl_2$添加条件下ではPPA添加により著しく結合が増強されることが判明した。しかしながら、他のプロテインホスファターゼ阻害薬(オルトバナジ

ン酸、オカダ酸、カリクリンAおよびマイクロシスチン-LR)はいずれも、Myc結合に著変を与えなかった。両反応条件下でクロスリンク法を行ったところ、結合反応を$MgCl_2$非添加条件下で行った場合に比べて添加条件下の場合の方が高分子量側に放射能が検出された(図1)。さらに、サイズ排除クロマトグラフィによる部分精製標品を両反応条件下でクロスリンクさせた後、調製用SDS-PAGEにより結合蛋白質の精製を試みたところ、両反応条件下の結合蛋白質は明らかに異なることが判明した(図2)。次に、両反応条件下でのプローブの構造変化を解析する目的で紫外部吸収スペクトルを測定した。本プローブは$MgCl_2$非添加条件下で260 nmを極大とする吸収スペクトルを示したが、10 mM $MgCl_2$添加により吸収スペクトルが長波長側に移動した。

図1. クロスリンク法

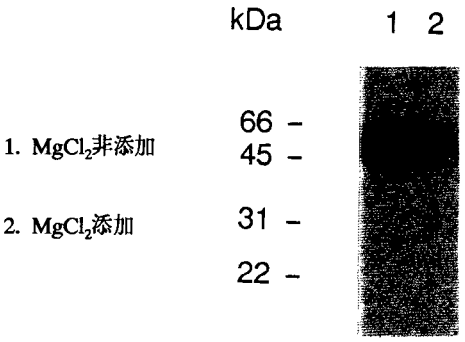
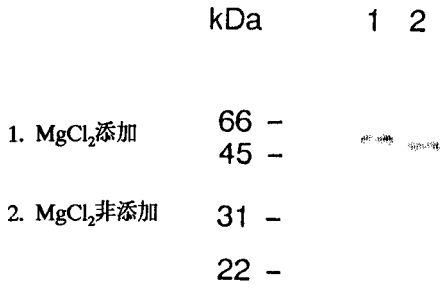


図2. 調製用SDS-PAGE



〔考察〕

Myc結合はMg^{2+}存在下および非存在下でPPA感受性が明らかに異なること、S. aureus V8プロテアーゼを用いたバンドシフトアッセイによる結果が$MgCl_2$存在下と非存在下で異なることおよびクロスリンク法で検出される両反応条件下での結合蛋白質の分子量が本質的に明らかに異なることなどから、$MgCl_2$存在下と非存在下での結合蛋白質が異なることが示唆される。一方、用いたプローブの紫外部吸収スペクトルがMg^{2+}の添加で長波長側に移動した事実は、本プローブがMg^{2+}の添加によりB型からZ型に変換する可能性を示唆するものである(5)。したがって、Mg^{2+}存在下に検出される核内蛋白質はZ型Myc配列を認識する能力を有するる可能性も否定出来ない。今後、この可能性について詳細な解析を進めていきたい。

〔謝辞〕

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

〔文献〕

(1) Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N. (1993) Cell 72, 211-222.

(2) Blackwood, E.M. and Eisenman, R.N. (1991) Science 251, 1211-1217.

(3) Ogita, K. and Yoneda, Y. (1994) J. Neurochem. 63, 525-534.

(4) Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Nucleic Acid Res. 17, 6419.

(5) Thomas, T.J. and Messner, R.P. (1988) J. Mol. Biol. 201, 463-467. 4. Thomas, T.J. and Thomas, T. (1994) Biochem. J. 298, 485-491.

(6) Wittig, B., Wolfl, S., Dorbic T., Vahrson, W. and Rich, A. (1992) EMBO J. 11, 453-4663.

103 ヒト肝臓GTP cyclohydrolase Iの精製と性質

坂本秀生、藤田　興、池亀　守[1)]、永津俊治[2)]、葛谷博磁
藤田保健衛生大学　総医研　分子生物　1) 短期大学　生体機能代行装置学
2) 総医研　神経化学

〔要約〕私達はヒトの肝臓からGTP cyclohydolorase I (GCH)の精製を試み、サブユニット約41 k (SDS-PAGEによる)からなる分子量約800 k (ゲル濾過クロマトグラフィー；GFCによる)の画分及び、分子量約400 k の画分の2箇所に活性のピークを認めた。比活性は前者で280 pmol/min/mg, 後者では64 pmol/min/mgにまで精製された。

［目的］　GCHはguanosine triphosphate(GTP)から7,8-dihydroneopterin triphosphateを生成する、tetrahydrobiopterin合成の第一段階の反応を触媒する律速酵素である。tetrahydrobiopterinは、カテコールアミンとセロトニンを合成する芳香族アミノ酸水酸化酵素の補酵素であり、またarginineらNO生成に必須な因子と考えられている。またヒトGCHのcDNAのクローニングにより3類のcDNAの存在が報告され(1)、ついでそれらのcDNAを大腸菌で発現させると、発現タンパク質の内1種類にのみに活性があると報告されている(2)。私達はGCHタンパク質の発現と成熟タンパク質の性質を知るために、ヒト肝臓のGCHの精製を試みた。

［方法］　ヒト肝臓を50 mM KPB/1 mM EDTA/0.2 mM PMSF, pH7.0でホモジナイズ後、その12,000g上清を加熱処理（64℃まで）して凝固画分を除去した。ついで硫安で塩析し、25-45%飽和画分を陰イオン交換クロマトグラフィー(IEC)(条件は図1に説明）で分離した。さらにクロマトフォーカシング（条件は図2に説明）で得られた活性画分を微量精製システム（SMART System/Pharmacia）で、Mono Qカラム（1.6 x 50mm, Pharmacia)により濃縮後、同Systemによりに GFC（条件は図3に説明）を行って精製した。

活性の測定は、Sawadaら(3),Hatakeyamaら(4)の方法に準じた。すなわちGTPより生成する7,8-dihydroneopterin triphosphateを酸化型にし、ついでアルカリホスファターゼにより脱リン酸化し、生成する酸化型ネオプテリンをHPLC (移動相；10 mM NaPB/1 mM EDTA, pH 7.0,　カラム；DEVELOSIL-ODS, K-5/野村化学、トライローター/日本分光)で分離し、350nmで励起し450 nmでの蛍光を測定した。タンパク質はLowry法により測定し、PAGEはPhast System(Pharmacia)により行い、銀染色を行った。

［結果］　DEAE-IECを行なった結果、図1に示す様に活性のピークを3箇所に認めた。この内総活性および比活性が高かった画分41と42をクロマトフォーカシングにより分離した(図2)。図2では、画分35から46に活性の大部分が分離されたが、その内280 nmの吸収曲線で僅かに肩が認められ、等電点5.5から5.4に相当する画分40から44をMono Qで濃縮後、GFCより分離した（図3)。図3において、画分26と27を中心に活性の大きなピークが、画分30に小さなピークが認められた。しかし画分25と26に280 nmにおける吸収の肩がみとめられたので、画分26と27（ピークI)を、また画分30と31(ピークII,280 nmにおける吸収は画分31にピークの中心がある)を夫々一緒にして、再度GFCを行った。ピークIでは280　nmにおける吸収は画分25から26にピークが、ピークIIでは画分31にピークが認められた（図4 a, 図4 b)。画分26および画分30の分子量は夫々、見かけ上約800 k および約400 k (ferritinより僅かに低分子側に分離)と推定された。GFCの再クロマトグラフィー後のピークIおよびピークIIを夫々、脱塩および凍結乾燥後、常法により処理してnative PAGEおよびSDS-PAGEを行った(図5)。nativePAGEよびSDS-PAGEいずれも均一なバンドではなかったが、ピークIのSDS-PAGE(lane 3) では、ovalbuminより僅かに低分子側の分子量約41 k と推定される位置に、主要なバンドが認められた。ピークII(lane 4)についてもピークIの主要なバンドと同じ位置に、明瞭なバンドが認められた。ピークIIについて見ると活性のピークは画分30に、タンパク質のピークは画分31あることから、ピークIIの他のバンドは、画分31のタンパク質に主として由来するバンドと考えられる。なお、精製による比活性は、crude extract、硫安塩析画分、DEAE-IEC(画分41と42)、クロマトフォーカシング(画分40から44)、GFC(最初のGFCの最高活性画分＃26)の順に、0.58、1.8、3.9、24.3、

64、および280 pmol/mg/minのように変化し、約492倍に上昇した。

［考察］　本研究においてヒト肝臓のGCHは、分子量が約800ｋおよび約400ｋと推定される２種類の型で存在し、そのサブユニットは約41ｋと推定された。ヒト肝臓のGCHの精製については、すでに分子量が約453ｋでそのサブユニットは約149ｋ(5)、また分子量が約440ｋでそのサブユニットは約50ｋ(6)であるとの異なる2つの報告がある。本研究で得た約400ｋの型が、後者の報告のものと類似している。しかしいずれの報告も約800ｋの存在については記載していない。本研究で認められた分子量約800kおよび400kの酵素は、それらのサブユニットはいずれも約41kと考えられることから、これらは構成単位は同じであるが会合数が異なる複合体と考えられる。

cDNAクローニングではサブユニットは27,903と報告されている(1)。ヒトGCHのcDNAを大腸菌に発現させると、分子量約21ｋのものが活性を有する(2)。これらのサブユニットの分子量は、本研究を含めてすでに報告されている結果とは一致しない。

本研究において、DEAE-IECにより活性のピークが３～４つが認められる。結果の項で述べたピークよりも低塩濃度側に分離される画分を、直接GFCにより分離しても先に述べた結果と同様、約800kと400kの画分に活性のピークが認められる。またクロマトフォーカシングにおいて、pH5.6－5.5の画分をGFCにより同様に実験した結果でも、pH5.5－5.4の画分の結果と全く同じであった。これらの結果は、GCHはタンパク質の基本的構成には大きな違いはないが、修飾の相違による荷電状況が僅かに異なる幾つかの存在型があることを示唆するかも知れない。

文献　(1)A.Togari et al., BBRC..187 No,1 (1992) 359-365. (2)M.Gutkicn et al., Biochem J. 302 (1984) 215-221. (3)M.Sawada et al.,Anal.Biochem.154 (1986) 361-366. (4)K.Hatakeyama et al., JBC .264No,36 (1989) 2166-2164. (5)R.Shen et al.,Biochimie 71(1989) 343-349. (6)G.Schoedon et al., EJC 178 (1989)627-634.

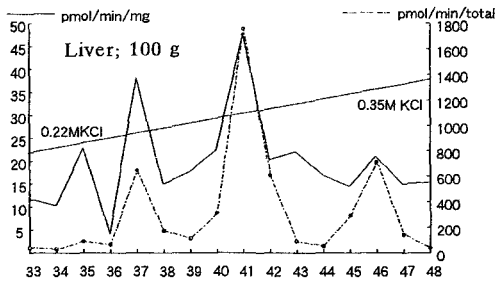


図１. DEAE陰イオン交換クロマトグラフィー
試料; 25-50% 硫安飽和画分. DEAE TOYO Pearl 650S/TOSOH, 16 x 140 mm. 30 mM Tris/0.1 mM EDTA, pH 8.1 のBufferを用い,0.5M KCl濃度までのリニア-グラディエント溶出.流速; 1.5 ml/min.分画 ;5 ml/tube.

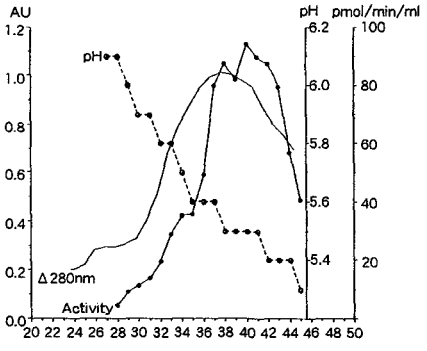


図２. chromatofocusing
試料; DEAE #41,42. Mono-Pカラム/Pharmacia, 5 x 200 mm, 25 mM Triethanolamine, pH8.3とPoly Buffer /Pharmacia 97と94(pH 5.0)で, pH8 - 5までのpH勾配を作成. 流速; 1.0 ml/min. 分画; 1 ml/tube

図３. ゲルロ過クロマトグラフィー
試料;等電点5.5から5.4の画分, Superose 6、3.2 x 300 mm/Pharmacia. 50 mM Tris/0.1 mM EDTA / 0.15M KCl, pH 8.1, 流速; 0.01 ml/min, 分画; 0.05 ml/tube.
他にマーカーとしてthyroglobulin(668k), ferritin(448k), aldorase(158k), BSA(67k)を用いておおよその分子量を求めた。

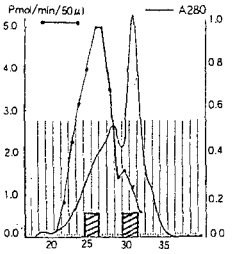
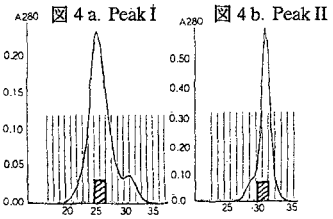


図４. 再ゲルロ過クロマトグラフィー
図３の#25,26および#30,31を夫々合わせて,図３と同じ条件で再クロマトグラフィーを行った。



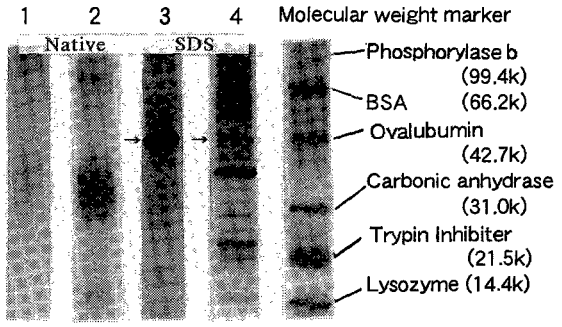


図５. NativeおよびSDS polyacrylamide electrophoresis
1,3; 図４a.Peak Iの試料.　2,4; 図４b.Peak II.の試料.　SDS-PAGEは還元処理して行い、検出は銀染色により行った。

104 2次元ゲル小脳タンパク質データベース構築のための新しいタンパク質構造解析法

[1]中山　洋,[1,2]内田和久,[1]田岡万悟,[3]金井みち子,[1]瀬田和夫,[1]礒辺俊明,[1]篠田友孝,[4]奥山典生
([1]東京都立大学理学部，[2]協和発酵東京研究所，[3]フィニガンMAT，[4]神奈川歯科大歯科生体工学)

〔要約〕
2次元ゲル小脳タンパク質データベースの拡充のために質量分析計を用いたタンパク質の微量構造解析システムを開発した。ラット小脳タンパク質を2次元電気泳動法で分離し,銅染色で検出した。検出したタンパク質スポットをゲルから切り出したのち，SDSを含む緩衝液中で振盪抽出し，逆相HPLCをもちいて脱塩，精製した。得られたタンパク質標品はタンパク質分解酵素で消化したのち，キャピラリーHPLC-ESI/TSQMSシステムにより分子量を測定し,MS/MSによる衝突解離法で部分一次構造を解析した。決定したアミノ酸配列をタンパク質/遺伝子配列データベースと照合することでタンパク質スポットが同定できた。本法は従来法の約10倍の感度向上と分析時間短縮が可能であり2次元ゲル上のタンパク質の同定法として有用である。

（はじめに）2次元電気泳動法はもっとも分離能の高いタンパク質の分離法として，細胞や臓器抽出液などの複雑なタンパク質混合物の分析に広範に使用され，またこうして得られた2次元電気泳動像を基礎とした細胞や臓器のタンパク質データベース化の作業も進められている[1]。従来，データベース構築のためのスポットの同定には，その部分アミノ酸配列を決定してタンパク質/遺伝子データベースと照合する方法が有力であるが，この方法をエドマン分解法を基礎としたアミノ酸配列決定法で適用する場合には，以下の問題点がある。(1)2次元電気泳動法で分離し得るタンパク質量は比較的微量であり，検出されたスポットの同定には多大の労力を要する。主要なスポットでも8-40枚，より微量の成分の分析にはそれ以上のゲルから目的のタンパク質を抽出する必要がある。(2)細胞内のタンパク質の機能は，多くの場合，糖鎖や脂肪酸の付加，リン酸化などの翻訳後修飾によって調節されていることが知られており，その解析が生命現象の理解に不可欠になっている。2次元電気泳動法ではこれらの修飾に由来する移動度の変異を検出し得るにもかかわらず，従来の分析法では翻訳後修飾の解析は困難である。

キャピラリーHPLCとエレクトロスプレーイオン化(ESI)インターフェイスを装着したトリプルステージ4重極型質量分析計(TSQMS)をオンラインで結合したキャピラリーHPLC-ESI/TSQMSシステムはタンパク質，ペプチドの精確な質量測定や構造解析のための新しいシステムとして注目されている。このシステムではピコモルレベルでの翻訳後修飾を含めた一次構造解析が可能であり，2次元電気泳動法で調製したタンパク質の分析に適していると考えられる。しかし，MS/MS法から得られた情報のみで未知タンパク質の構造決定およびタンパク質スポットの同定に成功したという報告は現在までのところ皆無である。

そこで本研究ではゲルからのタンパク質の抽出法，抽出タンパク質の前処理法およびキャピラリーHPLC-ESI/TSQMSシステムによる限定分解ペプチドの分離と構造解析のための基礎条件の検討をおこない，確立した条件を「2次元ゲルラット小脳タンパク質マップ」上のタンパク質スポットの同定に適用した。

（方法）ラット（ウィスター系）より小脳を摘出し，8M尿素溶液でタンパク質を抽出した。抽出液は2次元電気泳動法[2]で分離し，銅染色法でタンパク質を可視化したのち，目的のスポットを切り抜いた。目的タンパク質を振盪抽出し小型のカラム(Phenyl 5PW RP 4.0 i.d. x 10 mm)を用いた逆相HPLCで精製した。これを遠心濃縮器で濃縮して，中和したのちtrypsinで消化して，LC/MS用の試料とした。

ESIインターフェイスを装着した4重極質量分析計(Finnigan MAT,TSQ700)を使用し，試料はキャピラリーC18カラム(0.25-1mm i.d. x 100mm)を用いたHPLCにより分離，MSに導入した。

（結果）MS/MS法による一次構造解析は(1)LC/MSによる分解ペプチドの分離と分子量測定(2)解析する親イオンの選択と衝突解離法で生じた生成イオンのマススペクトル測定(3)生成イオン群の同定とアミノ酸配列決定という手順で行われる。ここでは既知量の標準タンパク質をもちいてキャピラリーカラムHPLC

システムでの分析条件と，イオン化効率を向上するためにポストカラムで添加する有機溶媒組成を最適化した。分子量2000以下のtrypsin消化ペプチドの2価イオンのみを選択，分析することで生成イオンスペクトル解析を単純化した。ここで確立した条件をもちいて5pmol以下での複数のペプチドの一次構造解析が3時間程度で可能であった。これは市販のエドマン分解法を基礎とした自動アミノ酸配列解析装置の約10倍の感度である。これらの検討により，未知タンパク質の構造決定が可能であると考え，本法をタンパク質スポットの解析に適用した。図1にラット小脳の典型的な2次元分離パターンを示した。ここで確立した方法を図1中の矢印のスポットに適用して構造解析を行った例を図2と3に示した。同様の分析で等電点，分子量の異なる多数のタンパク質についてペプチドマッピングおよびアセチル化，リン酸化などの翻訳後修飾を含む一次構造解析が可能であった。本法は未知スポットの同定が可能であり，従来法に比べて分析感度が高くしかも分析時間が短い利点がありより微量のタンパク質を効率よく解析できる点で「小脳2次元ゲルタンパク質データベース」の拡充のために有用であると結論した。

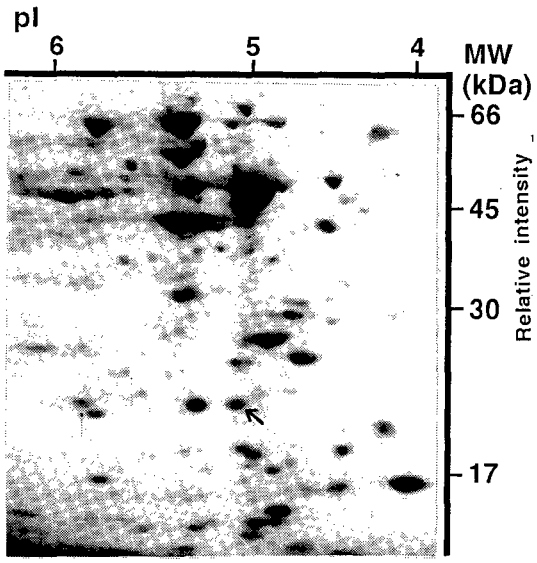


図1 ラット小脳タンパク質の2次元電気泳動像
生後30日，CBB染色。

文献
[1] Celis. J.E., et al.(1992)Electrophoresis,13,893-959
[2] Nakayama, H and Okuyama, T(1993)Bioimage,1,41-46

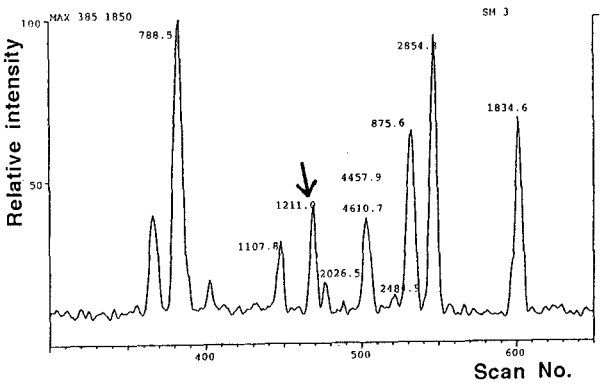


図2 ゲルから抽出したタンパク質のペプチドマッピング
ゲルから抽出したタンパク質をtrypsinで消化し,capillary LC/MSで分析した。図中に各ピークの質量数を示した。

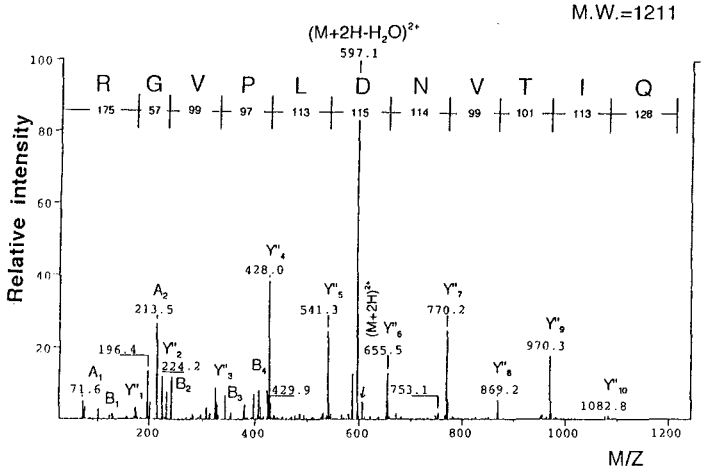


図3 ゲルから抽出したタンパク質のMS/MSによる一次構造解析
図2の矢印のピークの2価イオンを親イオンとしてMS/MSを行った。
この生成イオン群からアミノ酸配列をQITVNDLPVGRと決定した。

105 2次元電気泳動や2次元HPLCとMALDI-TOF質量分析法を組み合わせた脳のタンパク質のマッピング

瀬田和夫、中山　洋、礒辺俊明、Arnd Ingendoh*、金井みち子*、奥山典生**
（都立大・理、* フィニガンMAT、** 神奈川歯科大・生体工学）

〔要約〕

脳に存在するタンパク質のマッピングを目的に、脳組織の抽出液あるいはその分画をマトリックス・アシステッド・レーザー励起飛行時間型質量分析法で分析した。抽出液を硫安分画法で分画し、脱塩した粗抽出液をイオン化のためのマトリックスと混合してそのまま質量分析を行った。この方法で、質量数2,000から80,000にいたる多数のタンパク質が分離、検出された。検出されたタンパク質の精確な質量数をもとにして、S100タンパク質、カルモデュリン、14-3-3、カルビンディン、カルレティキュリン、神経特異エノラーゼなど、一次構造が知られている典型的な脳タンパク質が容易に同定できた。この方法を従来とは異質なタンパク質の分離、同定法として、2次元電気泳動法やHPLCなどと組み合わせることで、組織や細胞のタンパク質のマッピングや個々のタンパク質の解析がより容易になると考えられる。

はじめに

マトリックス・アシステッド・レーザー励起飛行時間型質量分析法（Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of Flight Mass Spectrometry略してMALDI/TOFMS）は、タンパク質や核酸などの生体高分子の精確な質量が簡単な操作で、迅速、高感度に測定できることから、フェムトモルレベルの超微量タンパク質の精密な分子量測定や一次構造解析、リン酸化などの翻訳後修飾の解析など、生命科学分野への様々な応用が期待されている。この方法は、溶液状態のタンパク質や核酸、ペプチドなどの試料を同じく溶液状態の過剰のマトリックス試薬（レーザーの波長光を吸収する物質）と混合し、乾固した試料にレーザー光を照射すると、(1)マトリックスが光励起あるいは光イオン化され、(2)プロトン転移によって被検物質が2次的にイオン化されて、(3)TOF-MSによって分離され、(4)イオン検出器によって検出される。本研究では、この方法を脳のタンパク質マッピングに適用する目的で、脳の粗抽出液、あるいはその粗画分の分析を試みた。

方法

ラットあるいはウシ脳抽出液の硫安沈殿によって得たタンパク質混合物と、これらを分画して調製した各種の試料についてそれぞれに含まれるタンパク質の種類と分子量の精密測定を同時に行った。質量分析計には、リフレクトロンを装備したFinnigan MAT社のVision 2000型を使用した。試料は1-10 pmol/0.5 μlの水溶液を直接金属製の試料ターゲットに乗せ、イオン化のためのマトリックスとして50 mM 2,5-ジヒドロキシ安息香酸溶液0.5 μlを添加して風乾後、分析計のイオン化室にセットして顕微鏡とCCDカメラからの画像で試料マトリックスの状態を確認しながら紫外部波長337nmのレーザー光を照射して被検成分をイオン化し、TOF-MSで分離して測定した。

結果

脳のタンパク質の全体像をみる目的で、ウシ脳抽出液の硫安沈殿画分を水溶液として希釈し、小型の逆相カラムで脱塩した粗分画試料について直接測定を行った。ベースラインを補正して「正規化」したマススペクトルを図1に示した。この試料では、1回の測定で、分子量 2 kDa から 80 kDa におよぶ多数のペプチド・タンパク質ピークが検出された。分子量 30 kDa 以下の比較的低分子量領域のタンパク質が多く検出されるのは、これらがこの実験で使用したマトリックスで効率よくイオン化されたためと考えられる。この領域のスペクトルを拡大して図2A - C に示した。この測定で同時に得られたそれぞれのピークの精密な質量数から、これらのピークにはS100 タンパク質の α 鎖と β 鎖、カルモデュリン、14-3-3 など、脳内での含量が高い一連のタンパク質が検出されていることが確認できた。(1) 操作が簡単で測定は数分で完了する (2) フェムトモル量の試料で測定できる (3) 分離能が極めて高く粗試料からも直接目的のタンパク質を同定できる (4) 得られた分子量の精度が高い（分子量 10,000 に対して誤差 ± 1 Da) などの特徴から、この方法は本実験の目的であるタンパク質のマッピングの他にも、組織や細胞内でのタンパク質変動や翻訳後修飾の解析など、タンパク質が関与するさまざまな生命現象の解析に有用と考えられる。

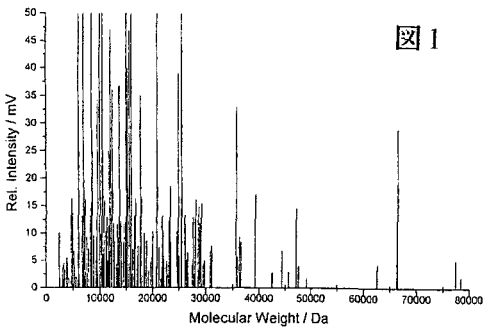


図1

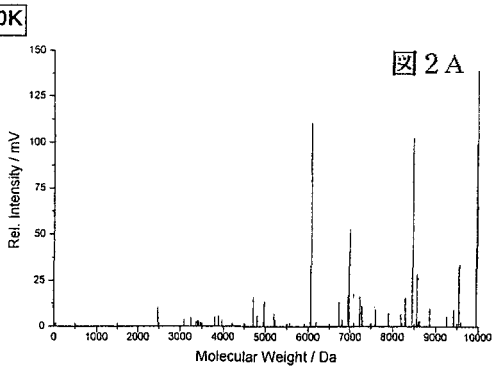


図2A

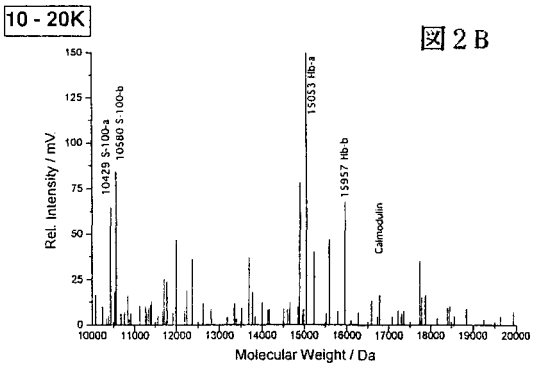


図2B

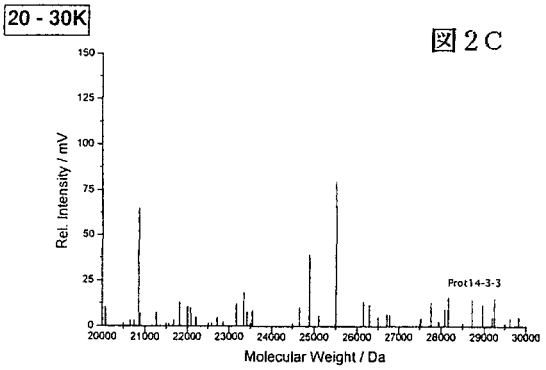


図2C

106 マウス間脳神経細胞におけるアロマターゼ発現調節機構の解析

○堂前純子[1], 田中亮[1], 原田信広[2]
([1]名市大・医・生化I, [2]藤田保衛大・総医研・分子遺伝)

〔要約〕
脳の性分化の決定に関与すると考えられているアロマターゼの発現制御機構を解析するため、胎生10日(E10)からE15のマウス脳を用いたスライス培養、神経細胞培養を行い、アロマターゼ mRNA の発現を調べて以下の結果を得た。

1）E12～E15 の胎児間脳部を用いると、いずれの培養法でもアロマターゼmRNAは2～3 日間の増加を示し、in vivo での変動にほぼ一致した。しかし、アストロサイト及び E13 胚の大脳皮質から得られた神経細胞のアロマターゼmRNAは検出限界以下であった。2）E10, 11 胚を用いた場合には、どちらの培養方法でも、目立ったアロマターゼ mRNA 量の変化はなかった。3）E13 胚間脳の神経細胞をforskolin, dBcAMP存在下で培養すると、アロマターゼ mRNAの増加は抑制された。

これらより、in vitro においてもアロマターゼ mRNA には細胞特異的、部位特異的な発現の認められること、ならびに胎生期の時間経過に伴うアロマターゼ mRNA増加を再現可能で、これはE12 以降の神経細胞自身にプログラムされている可能性が高いことが示された。さらに cAMPが 発現調節の抑制的な second messenger となり得ることも明らかになった。

[目的]

エストロゲンは、女性生殖器のみならず種々の組織で合成され、組織特異的な生理機能に関わっている。アゴニスト・アンタゴニストを用いた多くの実験から、脳内で局所的に産生されたエストロゲンは特定の神経核のニューロンの数や大きさ、ホルモンの分泌様式の差異をもたらし、脳の性分化に関与していることが明らかにされている。エストロゲン生合成の律速酵素はアンドロゲンからエストロゲンへの転換を行なうアロマターゼで、この酵素は脳内では扁桃体、ならびに間脳視床下部視索前野のニューロンに局在している。

しかし、脳アロマターゼの発現制御は他の組織とは異なっており、胎生期の発育や成熟個体へのテストステロン投与で増加することが報告されているのみで、その詳細は不明である。そこでE10～E15のマウス間脳を切り出して二種類の方法で培養し、アロマターゼ mRNA 量の変化を調べた。

[方法]

1）実験動物 ：ICR マウスを用い，膣栓確認日を胎生０日（E0）とした．
2）培養操作：スライス培養は10% FCS 添加 DME / F12 培地を用い、Stoppini et al.（５）ならびに Yamamoto et al.（６）の方法で行った．神経細胞は Arimatsu and Hatanaka（２）による無血清培養を行った．アストロサイトは10% FCS 添加 DME / F12 培地を用いて Ito et al.（４）の方法で調製した。
3）アロマターゼmRNA の定量：蛍光化プライマーを用いた RT-PCR 法（１，３）で行った．

[結果と考察]

間脳組織を厚さ 0.3～0.5 mm のスライスとしてコラーゲン膜上で培養すると，E12-15 胚では2～3日間にわたってアロマターゼmRNAの増加を認め、この間の発現量は in vivo での値にほぼ一致した。一方、E13 胚間脳のパパイン消化で得られた神経細胞でも、in vivo での変動に一致する発現を認めた。しかしE10, 11 胚を用いた場合には、いずれの培養方法においても、培養 3～4日目以降にわずかな増加を見たのみであった（図１）。また、アストロサイトやE13 胚大脳皮質の神経細胞にはアロマターゼmRNAの発現は見られなかった（表１）。以上より、培養細胞レベルにおいてもアロマターゼ mRNAは細胞特異的、部位特異的に発現すること、胎生期の時間経過に伴う増加が再現可能であることが確認さ

れ、これらの発現制御はE12以降の神経細胞自身にプログラムされたものである可能性が高いと考えられた。また、E13胚間脳の神経細胞をforskolin, dBcAMP存在下で培養するとアロマターゼmRNAの増加は抑制され（図２）、cAMPが発現調節の抑制的なsecond messengerとなり得ることが示された。

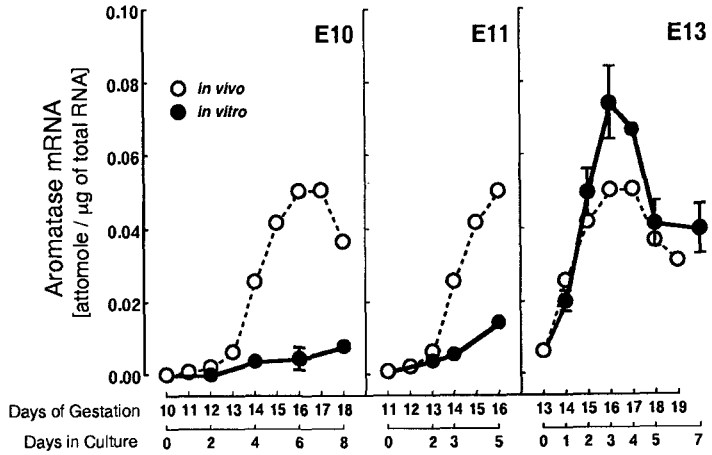


図１：培養神経細胞におけるアロマターゼmRNAの経時的な変化

Cell	Aromatase mRNA (attomole / μg of total RNA)	
	Diencephalon	Cerebral Cortex
Neuron	0.073 ± 0.011	< 0.001
Astrocyte	< 0.001	< 0.001

表１：部位別、細胞別のアロマターゼmRNA発現量
E13胚を用い、神経細胞は培養３日目、アストロサイトは培養１４日目に測定した。

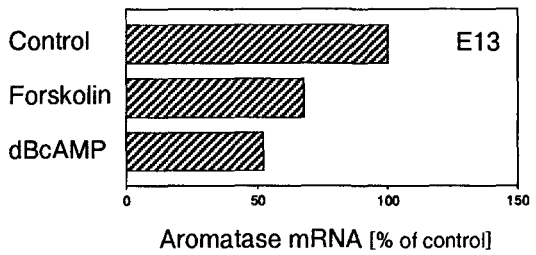


図３：forskolin, dBcAMPのアロマターゼmRNA量に及ぼす効果
E13胚由来の間脳神経細胞を用い、培養３日目に測定した。

［文献］
（１） Abe-Dohmae, S., Tanaka, R., and Harada, N. (1994) Mol. Brain Res. 24, 153-158
（２） Arimatsu, Y. and Hatanaka, H. (1986) Dev. Brain Res. 26, 151-159
（３） Harada, N. and Yamada, K. (1992) Endocrinology 131, 2306-2312
（４） Ito, J., Kato, T., Yamakawa, Y., Kato, H., Sakazaki, Y., Lim, R., and Tanaka, R. (1982) Brain Res. 243, 309-314
（５） Stoppini, L., Buchs, P. -A., and Muller, D. (1991) J. Neurosci. Methods 37, 173-182
（６） Yamanoto, N., Kurotani, T., and Toyama, K. (1989) Science 245, 192-194

107 ラット小脳初代培養神経細胞に特異的に発現されるガングリオシドの解析

川島　育夫、　永田　功*、　田井　直
（都臨床研・腫瘍免疫、*都神経研・細胞生物）

〔要約〕

ラット小脳初代培養細胞に発現されるガングリオシドを３２種類の特異性の高い抗ガングリオシド・マウス・モノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学的手法にて解析した。その結果、細胞特異的にガングリオシドが発現されることが判明した。すなわち、ニューロンでは、ＧＤ１ｂが顆粒細胞を含む小型の神経細胞に、ＧＤ２がＧＤ１ｂ陽性の小型神経細胞の一部に、またＯ－Ａｃ－ＬＤ１がプルキンエ細胞に特異的に発現されることが観察された。一方、グリア細胞では、ＧＭ４、グロボシド、フォルスマン抗原がアストロサイトに、ガラクトセレブロシドとスルファチドがオリゴデンドロサイトに特異発現していた。ＧＤ３は顆粒細胞に強い発現を認めたが、アストロサイトやオリゴデンドロサイトにも弱い発現を認めた。その他のガングリオシドの細胞特異的な発現は認められなかった。このことはガングリオシドがラット小脳初代培養細胞において有用なマーカーとなることを示した。

ガングリオシド（シアル酸含有スフィンゴ糖脂質）は全ての動物細胞の膜構成成分であり、哺乳類の中枢神経系に豊富に存在している。これらガングリオシドは細胞膜の外側に局在し、細胞-細胞間認識、神経突起伸長、シナプス形成、シグナル伝達や、細胞の増殖、分化に関与する事が報告されているが、その機能は未だ不明である。我々は一昨年の本学会において、ラット中枢神経系におけるガングリオシドの局在を抗ガングリオシド抗体を用いた免疫組織化学的手法にて解析し、その結果ガングリオシドが層および細胞に特異的に存在する事を報告した（１）。今回、ラット小脳初代培養細胞を用い、細胞に発現されるガングリオシドを免疫細胞化学的に解析したので報告する。

[実験方法]

初代培養：生後１日目のWistar系ラット小脳を用いRaffらの方法に従い、２－３週間培養を行った（２）。

免疫蛍光染色：培養細胞を4%-paraformaldehydeで１５分間固定後、常法に従い染色を行った。用いた基本的な染色法は以下のとおりである。一次抗体は本研究部門で樹立された３２種類の抗ガングリオシド・マウス・モノクローナル抗体（Table I）と市販の神経細胞のマーカーを組み合わせて用い、室温、１時間反応させた。二次抗体はFITC標識した抗マウスIgM抗体とrhodamine標識した抗マウスIgG抗体を混合したものを用い、更に室温、１時間反応させた。PermaFlourにて包埋後、蛍光顕微鏡にて観察、撮影を行った。

培養細胞の酵素処理および化学処理：培養細胞における抗体の特異性を検討するため、下記の処理を行った後、蛍光染色を行った。①種々可溶化剤処理（Triton X-100, NP-40, Saponin）、②Chloroform/ methanol処理、③アルカリ処理、④Trypsin処理、⑤Neuramidase処理。

ガングリオシドの抽出とTLC免疫染色：常法に従い行った（３）。

[結果および考察]

ラット小脳初代培養細胞に発現されるガングリオシドを特異性の高い抗ガングリオシド抗体を用いた免疫蛍光染色法にて検討した結果をTable Iに要約した。いくつかのガングリオシドは細胞特異的に発現されることが判明した。すなわち、ニューロンでは、ＧＤ１ｂが顆粒細胞と他の小型の神経細胞に強く検出された。しかしながら、プルキンエ細胞を含むグリア系細胞には検出されなかった。ＧＤ１ｂの発現は培養初期では細胞体と神経突起と同程度に認められたが、培養を続けると細胞体での発現量の減少が認められた。ＧＤ２はＧＤ１ｂ陽性で未同定な小型の神経細胞に強い発現が観察された

（現在、細胞を同定中である）。O－Ａｃ－ＬＤ１は、Calbindin D陽性細胞であり、大型の細胞体を有するプルキンエ細胞に特異的に検出された。この染色性は、培養細胞をアンモニア蒸気によるアルカリ処理で消失した。ＧＤ３は顆粒細胞に発現されたが、その発現はＧＤ１ｂとは異なり細胞体にのみ発現が認められた。またアストロサイトやオリゴデンドロサイトにも弱いながら検出された。ニューロンの検出プローブとして汎用されているコレラ毒素の染色性を検討したところ、ＧＤ１ｂの発現パターンと一致した。さらに、培養細胞ではＧＭ１抗体による特異的な染色は認められず、培養細胞をCl.perfringence由来のNeuraminidaseで処理した後、ＧＤ１ｂ抗体の反応性の消失と新たにＧＭ１抗体の反応性が認められた。これらの結果はラット小脳初代培養細胞においてコレラ毒素の結合するガングリオシドがＧＭ１ではなくＧＤ１ｂであることを示した。一方、グリア系細胞では、GFAP陽性のアストロサイトにＧＭ４、グロボジドとフォルスマン抗原の発現が認められ、この発現はオリゴデンドロサイトやニューロンには認められなかった。更に、ＧＭ４がアストロサイトから抽出したガングリオシド分画に存在することをTLC免疫染色にて確認した。オリゴデンドロサイトのマーカーとして知られているスルファチドとガラクトセレブロシドの特異発現も樹立した抗体で確認した。

これらの結果は、ガングリオシドがラット小脳初代培養細胞において細胞を識別する有用なマーカーとなることを示した。今後、細胞特異的に発現されるガングリオシドの生理的意義を解明するため、細胞に特異発現されるガングリオシドを変化させ細胞への影響を検討するつもりである。

[文献]

（１）小谷政晴他、(1993) 神経化学、32, 166-167.
（２）Raff, M.C., et al., (1979) Brain Res. 174, 283-308.
（３）Kawashima, I.. et al., (1993) J. Biochem. 114, 186-193.

Table I. Expression of glycosphingolipids in primary cells cultured from rat cerebellum[1]

Mab to glycolipid[2]	Neuron		Glia		MAb to glycolipid	Neuron		Glia	
	G[3]	P	A	O		G	P	A	O
GMR6 (GM3)	−[4]	−	±	−	GMR8 [GM3(NeuGc)]	−	−	−	−
GMB28(GM2)	−	−	±	−	GMR14[GM2(NeuGc)]	−	−	−	−
GMR16(GM1)	−	−	−	−	GMR3 [GD3(-NeuGc-NeuGc)]	−	−	−	−
GMR17(GD1a)	−	−	−	−	AMR38(GM1-L[5])	−	−	−	−
GMR11(GT1a)	−	−	−	−	AMR40(GD1a-L)	−	−	−	−
GMR19(GD3)	+	−	±	±	AMR19(GD3-L)	−	−	−	−
GMR7 (GD2)	−	−	−	−	AGB43(SM4s)	−	−	−	+
GGR12(GD1b)	+	−	−	−	AMR20(GalCer)	−	−	−	+
GMR5 (GT1b)	−	−	−	−	GGR22(LacCer)	−	−	−	−
GMR13(GQ1b)	−	−	−	−	GMR25(Gg_3Cer)	−	−	−	−
GGR51(GM1b)	−	−	−	−	GMR24(Gg_4Cer)	−	−	−	−
GGR41(GQ1bα)	−	−	−	−	BGR23(Gb_3Cer)	−	−	−	−
AMR10(GM4)	−	−	+	−	BGR47(III^{3}Galα−Gb_3Cer)	−	−	−	−
NGR54(IV^{3}NeuAcα−nLc_4Cer)	−	−	−	−	BMR26(Gb_4Cer)	−	−	+	−
NGR53(IV^{6}NeuAcα-nLc_4Cer)	−	−	−	−	BGR27(IV^{3}GalNAcα−Gb_4Cer)	−	−	+	−
GMR2 (O-Ac-disialoganglioside)	−	+	−	−	NMR52(nLc_4Cer)	−	−	−	−

[1]The expression of glyco lipids in cells was determined by the immunofluorescence technique with specific monoclonal antibodies. [2]Sialic acid moiety of ganglioside is N-acetylneuraminic acid(NeuAc) unless otherwise noted. [3]G, P, A, and O indicates granul cells, Purkinje cells, astrocytes, and oligodendrocytes, respectively. [4]Intensity of cell reactivity: +, strong; ±, weak; −, negative. [5]L indicates ganglioside lactone.

108 縦隔悪性腫瘍の患者血清に認められた抗神経細胞抗体の抗原分布とその特異性

吉村和法、金子　厚*、山室　裕、細川　武*、北村邦男、濱口勝彦*、
野村正彦（埼玉医科大学・第一生理、*神経内科）

〔要約〕縦隔悪性腫瘍を伴った患者の血清より得られた抗神経細胞抗体を用い、その抗原の分布と特異性について免疫組織化学的手法を中心に検討を行った。免疫組織化学的分析より、その抗原は脳梁には存在せず、中枢および末梢神経の神経細胞体に特異的に存在すること、またラット胎生期(E14)ですでに発現されていることが確認された。ウエスタンブロット法による分析により本抗体が認識する抗原の分子量は39～42kDaであることが明らかになった。

悪性腫瘍の経過中に腫瘍細胞の浸潤や転移が認められないにも拘わらず、小脳症状、脳幹症状や末梢神経障害を呈するものがある (1)。これらのうち、患者血清や髄液中に神経細胞に対する自己抗体の存在が証明され、paraneoplastic syndromeとして知られている (2)。最近、その抗体が認識する抗原は神経細胞に特異的な機能を有する蛋白質である可能性を示唆する結果が蓄積している (3,4)。そこで本実験において、縦隔悪性腫瘍を伴った患者血清由来の自己抗体(Ta抗体)を用い、抗原の分布とその特異性を免疫組織化学的手法を中心に検討した。

【実験方法】

(1) 硫酸アンモニウム沈殿法によるIgGの精製：患者血清 100mlとPBS(pH7.4) 100mlを混和し、飽和硫酸アンモニウム溶液 100mlを加え33%硫酸アンモニウム溶液とした。4℃で2時間放置後、8,000 rpmで30分間の遠心分離により沈殿を得た。その沈殿に 100mlのPBSを加え再溶解させ、50mlの飽和硫酸アンモニウムを加えることにより再沈殿させた。これで得られた沈殿を 200mlのPBSに溶解させ、蒸留水に対し透析を行い凍結乾燥した。これをTa抗体と命名した。

(2) 免疫組織化学：12週齢Wistar系雄ラットを4%パラホルムアルデヒドにより固定し、大脳、小脳、脊髄、肝臓、心臓、腎臓、副腎、脾臓、骨格筋、後根神経節の凍結切片(8 μ m)を作製した。上記で得られたTa抗体(20～50 μ g/ml)をそれぞれの組織に対し反応させ、2次抗体として蛍光標識ヤギ抗ヒトIgGを用い、蛍光顕微鏡下で観察した。また、同系統ラットのE14、E18を同様に免疫組織化学的に観察した。

(3) ウエスタンブロット法：成熟Wistar系雄ラットの大脳および小脳をSDS-PAGE用サンプルバッファーでホモジネートした後、電気泳動し、PVDFメンブランへ転写、Ta抗体でイムノブロットした。対照としてはヒト正常血清を用いた。

(4) 神経細胞の初代培養：ラット胎仔(E16)の大脳皮質より神経細胞を採取し、5%牛胎仔血清を含むイーグルMEM培地中で7日間培養した。4%パラホルムアルデヒドで固定し、Ta抗体と神経細胞のマーカーである抗ニューロフィラメント抗体、またアストロサイトのマーカーである抗GFAP 抗体と二重染色し、上述した様に蛍光顕微鏡下で観察した。

【結果】

Ta抗体を用いた成熟ラットの免疫組織化学から、この抗体は特異的に中枢および末梢神経組織の神経細胞を強く認識し(表I)、胎仔E14、E18を同様にTa抗体と反応させたところ、脊髄神経節、中枢神経組織の細胞体が認識された。また、ウエスタンブロット法によりTa抗体が認識する抗原は39から44kDaの分子量をもつ蛋白質であることが明らかとなった(図1)。ラット胎生期(E16)の大脳皮質由来の神経細胞初代培養系において、Ta抗体が認識する細胞体と抗ニューロフィラメント抗体により認識される細胞体は一致した。しかしながら、抗GFAP抗体とTa抗体により認識する細胞は明らかに異なった(図2)。

【考察】

縦隔悪性腫瘍を伴った患者血清由来の自己抗体(Ta抗体)を用いた免疫組織化学的検討により、この抗体が認識する蛋白質はラット脳の神経線維には殆ど存在せず、神経細胞の細胞体に特異的に存在すること

が明らかになった。神経細胞初代培養系においても、T a抗体が神経線維やアストログリア等と神経細胞を識別したという結果は、この蛋白質の特異性を示すものであった。また、ラット胎生期で既に発現されているという結果から、神経細胞の分化や発達にとって重要な因子である可能性が示唆された。

【文献】

(1) Posner J B and Furneaux H M (1990) In:Immunologic Mechanisms in Neurologic and Psychiatric Disease, Raven Press, p187-219
(2) Fathallah-Shaykh H et al (1991) Proc Natl Acad Sci USA, 88:3451-3454
(3) Sakai K et al (1994) Biochem Biophys Res Commun, 199:1200-1208
(4) Szabo A et al (1991) Cell, 67:325-333

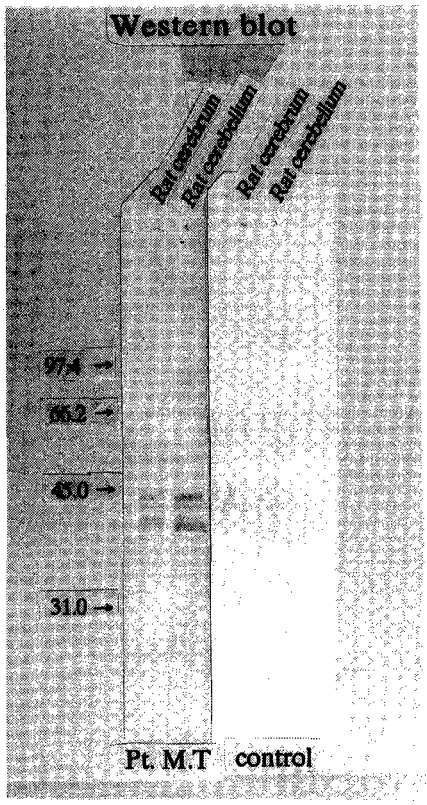


図1:Ta抗体によるラット大脳、小脳ホモジネートのウェスタンブロット

ラットの各種組織におけるTa抗体に対する反応性

大脳	+++
小脳	+++
脊髄	+++
肝臓	-
心臓	-
腎臓	-
副腎	-
脾臓	N.D.
骨格筋	-
後根神経節	+++

+++は陽性を示す。 -は陰性を示す。 N.D.は未検討を示す。

表1:Ta抗体により認識される抗原の組織特異性

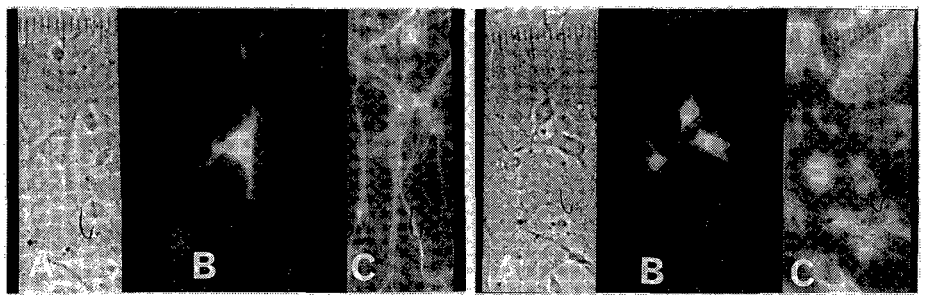


図2:大脳皮質初代培養系におけるTa抗体による免疫染色像　(A)位相差像、(B)Ta抗体、(C-左)抗ニューロフィラメント抗体、(C-右)抗体GFAP抗体

109 グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質として発現させたグルココルチコイドレセプターに対する抗血清の作製

森本　昌史、森田　規之、河田　光博
（京都府立医科大学・第一解剖）

〔要約〕
ラットのグルココルチコイドレセプターの転写調節ドメインをコードするcDNAを用いてグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質を大腸菌で大量発現させた。この融合蛋白質を精製し、グルココルチコイドレセプターの部分を切り出した。これを抗原としてウサギに免疫し、抗血清を得た。抗血清はラット脳、肝臓のホモジネートを用いたイムノブロッティングでグルココルチコイドレセプターの分子量に相当する約97kDaの位置にバンドを認めた。またこの抗体を用いた免疫組織化学において、ラット脳のさまざまな部位に免疫陽性細胞が見られ、ほとんどの細胞で免疫活性は核に局在していた。

［緒言］
グルココルチコイドレセプターは他のステロイドホルモンレセプターと同様に、転写調節ドメイン、DNA結合ドメイン、リガンド結合ドメインからなる蛋白質で、グルココルチコイドのもつ多様な作用のほとんどがこのレセプターを介するものであることが知られている(2)。グルココルチコイドレセプターは神経系をはじめさまざまな組織に発現しており、グルココルチコイドが神経系の細胞の分化、発育に重要な働きをしていると考えられているが、その役割については不明な点が多い。したがってグルココルチコイドレセプターの抗体を用いて神経系における発現、局在の同定はグルココルチコイドの機能を研究をしていくうえで不可欠と考えられる。今回、我々は大腸菌において大量に生産させることができ、溶出条件が穏やかなため抗原性が維持されるといわれているGST融合蛋白質としてラットのグルココルチコイドレセプター蛋白質を調製し、それを抗原としてウサギに免疫し、活性の高い抗血清の作製した。

［方法］
ラットのグルココルチコイドレセプターcDNA (Dr. K. Yamamotoより供与)の転写調節ドメインをコードする領域をpGEX-3X (Pharmacia)に組み込み、大腸菌DH5α株に導入した。isopropyl,β-D-thiogalactoside (ITPG)によって発現を誘導して得たグルココルチコイドレセプターとGSTの融合蛋白質をGST purification modulesを用いて精製し、glutathione sepharose 4B上でFactor Xa (NEB)処理してグルココルチコイドレセプターの部分を切り出し、アミノ酸シークエンサーでその配列を確認した。これをウサギに免疫し、抗血清を得た。抗血清の特異性を調べるために、成熟ラット脳、肝臓のホモジネートを用いたイムノブロッティングおよび成熟ラット脳の凍結切片を用いた免疫組織化学をABC法(Vector)によって行った。抗血清はイムノブロッティングでは1,000倍希釈、免疫組織化学では10,000倍希釈で使用した。また、抗原とした蛋白質によるアフィニティカラムを作り、これにより精製したものと抗血清とを比較した。

［結果］
ラットのグルココルチコイドレセプターcDNAが組み込まれた大腸菌ではIPTGを添加した条件で培養すると融合蛋白質の発現が認められた(Fig. 1)。この融合蛋白質から精製、切り出された蛋白質を抗原として得られた抗血清は成熟ラット脳、肝臓のホモジネートを用いたイムノブロッティングにおいてラットのグルココルチコイドレセプターの分子量に相当する位置に特異的なバンドを認めた(Fig. 2)。
免疫組織化学では、成熟ラット脳のさまざまな部位に免疫陽性細胞が見られた。特に海馬、大脳皮質、小脳などの部位のニューロンで免疫活性が強かった。また細胞内での免疫活性は核に局在していた。
この抗血清は抗原蛋白質をリガンドとしてアフィニティ精製した抗体と同じ特異性を示した。

［考察］

GST 融合蛋白質として目的とする蛋白質を大腸菌に大量に生産させる方法は、可溶化しやすく、精製も容易でさまざまな蛋白質の精製に使われている (6)。ラットのグルココルチコイドレセプターの転写調節ドメインにあたる分子量約 20kDa の蛋白質も GST 融合蛋白質として大腸菌に大量発現させ、精製することができた。

ラットのグルココルチコイドレセプターの蛋白質は従来、ラット肝細胞から精製されているが (7)、この方法で精製した蛋白質を抗原とした抗血清では十分な活性、特異性が得られず、ラットのグルココルチコイドレセプターの抗体としては DNA 結合部位のエピトープを認識するモノクローナル抗体 (4)、カルボキシル末端側のエピトープを認識するモノクローナル抗体 (5) が作られているにすぎず、ラット脳における分布が調べられている (1, 3)。

今回、我々が作製した抗血清はラットのグルココルチコイドレセプターの転写調節ドメインを抗原としたもので、イムノブロッティング、および免疫組織化学の結果から特異性、活性ともに高いものであり、今後、グルココルチコイドレセプターの機能や局在を研究していくうえで有用であると考えられた。

［謝辞］

アミノ酸配列の決定にご協力いただきました栗原達也博士、児玉志保博士（サントリー生物医学研究所）に深く感謝いたします。

［文献］

1) Ahima, R. and Harlan, R., (1990) Neuroscience 39, 579-604
2) Beato, M., (1989) Cell 56, 335-344
3) Cintra, A., Zoli, M., Rosén, L., Agnati, L. F., Okret, S., Winkström, A.-C., Gustafsson, J.-Å. and Fuxe, K., (1994) Neuroscience 62, 843-897
4) Gametchu, B. and Harrison, R. W., (1984) Endocrinology 114, 274-279
5) Okret, S., Winstrom, A.-C.,Wrange, Ö., Andersson, B. and Gustafsson, J.-Å., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1609-1613
6) Smith, D. B. and Johnson, K. S., (1988) Gene 67, 31-40
7) Wrange, Ö., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J.-Å., (1979) J. Biol. Chem. 254, 9284-9290

Fig. 1.

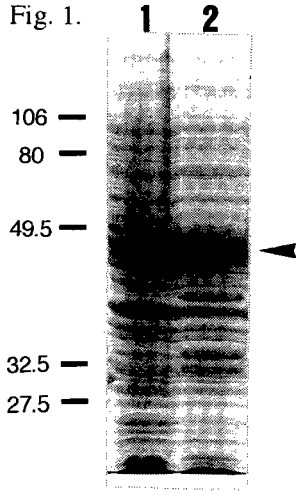


Fig. 2.

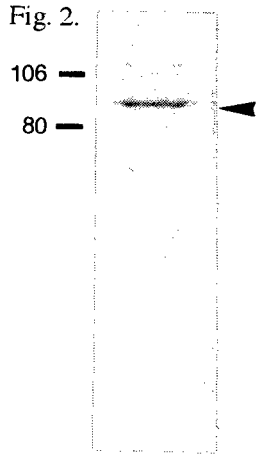


Fig. 1. Induction of the GST fusion protein by IPTG.
Total protein of E. coli treated with (lane 2) or without (lane 1) IPTG were electrophoresed and stained with Coomassie brilliant blue. The fusion protein (*arrowhead*) appeared after IPTG induction.

Fig. 2. Immunoblotting for the homogenate of rat brain.
Proteins were transfered to a PVDF membrane and immunostained with the antiserum. A single band (*arrowhead*) with a molecular weight identical to rat glucocorticoid receptor was detected.

110 E2F及びE1Aの発現によって誘発される成熟神経細胞のDNA合成能について

須田喜久夫、佐藤　潔
（順天堂大学　脳神経外科）

〔要約〕

哺乳類の神経組織ではある特定の部位を除いて成体に至るまでneurogenesisが認められる部位はなく、成熟した神経細胞がDNA合成能を有するという報告は未だ見ない。In vitro studyにてマウスの小脳顆粒細胞にTransfectanを用いたtransfectionによって、また、in vivo studyにて成体ラットの大脳皮質神経細胞にimmunoliposomeを用いたtransfectionによってviral oncoprotein E1A and/or transcription factor E2F1の cDNAsが各々に導入された結果、in vitroでは、37％のE1A陽性神経細胞、43％のE2F1陽性神経細胞がBrdU陽性であり、in vivoでは約15％のE1A陽性神経細胞がBrdU陽性を呈した。これらの結果、E2F1の過剰発現あるいはE1Aの発現後の内因性E2F1の放出が細胞周期の停止に関与していると考えられるtumor suppressor gene, retinoblastoma (Rb)の抑制に打ち勝ち、神経細胞をDNA合成の初期化へと導くことを示唆していると思われた。

【目的】哺乳類の神経組織では嗅球や海馬歯状回などを除いて成体に至るまでneurogenesisが認められる部位はなく(5)、成熟した神経細胞がDNA合成能を有するという報告は未だ見ない。G1からS-phaseへの移行期に作用する重要な因子の一つにE2F1 transcription factorがあり、S-phaseの初期化及び進行にとって必須なgeneの発現を制御している(7)。そして、E2F1の転写活性はRbやp107 proteinsとの複合体の形成によって抑制されており(9)、大脳皮質や小脳においては、成熟神経細胞は比較的高レベルでRbそしてE2F1を発現している(2), (8)。このことはこれらの神経細胞においてはRbとE2F1との間で形成される複合体によって細胞周期が停止させられることを示唆している。そこで、我々はin vitro及びin vivoにおいて分化した神経細胞にE2F1及びE2F1を活性化すると考えられるviral oncogene E1A cDNAsをtransfectionすることによって、その過剰発現がRbの抑制に打ち勝ち、DNA合成を誘導するか否かを免疫細胞化学染色にて検討した。

【方法】生後6日マウスの小脳顆粒細胞を培養し、6日目(day12)にpRc/CMV E1AあるいはE2F1 cDNAsをTransfectan (Promega)を用いて、また、成体ラットの頭頂葉皮質には神経細胞の細胞膜に存在する糖蛋白であるThy1.1に対する抗体と結合したimmunoliposome (3)を用いてpRc/CMV E1A+E2F1 cDNAを定位脳手術にて注入し、transfectionを施行した。In vitroではtransfection終了後、BrdU 10μMを投与し、24時間後細胞を固定。In vivoでは術後9時間及び33時間後よりBrdU 50mg/B.Wgを3時間毎腹腔内に投与し、24時間後断頭し固定。両検体ともmouse anti-E1A, E2F MAb, rabbit anti-neurofilament Ab, rat anti-BrdU MAbを一次抗体に用いた三重染色に供し、transfectionされた神経細胞のDNA合成の有無を検討した。

【結果】In vitro studyではE1AあるいはE2F1陽性神経細胞のBrdU陽性率は各々約37％、43％であり、E1AあるいはE2F1陰性神経細胞においてはDNA合成は認められなかった(n=10)。また、transfectionされていない神経細胞、helix-loop-helix transcription factorであるME1, ME2 cDNAs (6) あるいはvectorのみがtransfectionされた神経細胞においてはDNA合成及びE1A, E2F1の発現は認められなかった (Table1)。一方、in vivo studyにおいては、E2F1とE1Aが1:1の割合で混合され、immunoliposomeを介してtransfectionされたが、E1A陽性神経細胞のBrdU陽性率はtransfection後33時間、57時間において各々15％、5％であった。cDNAを含まないvectorがtransfectionされた動物においてはDNA合成神経細胞は同定されな

かった(Table2)。

【考察】脳において高度な可塑性を有する領域では成熟した神経細胞はretinoblastoma (Rb) tumor suppressor geneを発現する。そのRbはG1 phaseにおいてE2Fと複合体を形成することによりcell growthを抑制する。即ち、S-phaseへの初期化そして進行にとって必要なgenesの誘導を抑制している(1)。一方、Johnsonら(4)はE2F1の発現がqiescent cellsを細胞周期においてS-phaseへ導くと論じた。本研究においてもE2F1の過剰発現あるいはE1Aの発現後の内因性E2F1の放出が大脳皮質、小脳等に豊富に発現しているRbの抑制に打ち勝ち、分化し終えた神経細胞を再びDNA合成の初期化へと導くことを強く示唆するものと思われた。

【文献】

(1) Goodrich DW, Wang NP, Qian Y-W et al. (1991) Cell 67; 293-302.
(2) Helin K, Lees JA, Vidal M et al. (1992) Cell 70; 337-350.
(3) Holmberg EG, Maruyama K et al. (1989) Biochem Biophys Res Comm 165; 1271-1278.
(4) Johnson DG, Schwarz JK, Cress DW et al. (1993) Nature 365; 349-352.
(5) Kaplan MS and Hinds JW (1977) Science 197; 1092-1094.
(6) Neuman T, Keen A, Knapsik E et al. (1993) Eur J. Neurosci 5; 311-318.
(7) Nevins JR (1992) Science 258; 424-429.
(8) Okano HJ, Pfaff DW and Gibbs RB (1993) J. Neurosci 13; 2930-2938.
(9) Weintraub SJ, Prater CA and Dean DC (1992) Nature 358; 259-261.

TABLE 1. Effect of expression of different cDNAs on BrdU incorporation in differentiated cerebellar neurons *in vitro*

Transfection construct	Number of E1A or E2F1 positive neurons	Number of BrdU positive neurons	% BrdU positive neurons
control	0	0	0
pRcCMV	0	0	0
pRcE1A$_{13S}$	10.2±6.9	3.7±2.3	37
pRcE2F1	8.5±5.1	3.6±1.5	43
pRcME1	0	0	0
pRcME2	0	0	0

TABLE 2. Effect of expression of E1A and E2F1 on BrdU incorporation in adult rat cortical neurons *in vivo*

Transfection construct	Number of E1A positive neurons/mm^3	Number of BrdU positive neurons/mm^3	% BrdU positive neurons
control	0	0	0
pRcCMV	0	0	0
pRcE1A$_{13S}$ + pRcE2F1 33 h	458±192	66.7±33.4	14.6
pRcE1A$_{13S}$ + pRcE2F1 57 h	788±188	41.3±33.7	5.2

111 ラット顔面神経切断により誘導される顔面神経核のプラスミノーゲンアクチベーターについて

中嶋一行，Martin Reddington*，高坂新一，Georg W.Kreutzberg*
（国立精神・神経センター，神経研，代謝，*Department of Neuromorphology, Max-Planck Institute of Psychiatry）

〔要約〕
神経の修復、再生機構に関わるグリア由来のプラスミノーゲン(PGn)－プラスミノーゲンアクチベーター(PA)系の役割を探るため、ラット顔面神経の切断を行い、その神経核におけるPA活性の変動を調べた。茎乳突孔で神経を切断すると、切断側の神経核には著しいPA活性の誘導が認められた。その活性は顔面神経切断後３～５日に最大となり、その後減少した。誘導されるPA活性は、ウロキナーゼ型PA(uPA)の特異的阻害剤であるamilorideにより強い阻害を受けた。またそのPAの分子量は約４８kDaでありラット尿中のそれと同一の移動度を示した。これらの結果は顔面神経の切断により神経核に誘導されるPA活性は主にuPAであることを示し、さらにこの現象は運動ニューロンの傷害後、神経核で起こるニューロンの修復、再生過程にuPAによるプラスミン産生系が深く関わることを示唆している。

［目的］
我々はこれまでラット培養ミクログリアが大脳皮質ニューロンおよび中脳のニューロンに対する神経栄養物質を産生すること、そしてそのある部分はプラスミノーゲン(PGn)－プラスミノーゲンアクチベーター(PA)系に由来することを明らかにしてきた(1)。これらの結果は、脳中に存在するPGn-PA系が成長期のニューロンに作用するばかりでなく、神経の修復・再生過程にも関与する可能性を示唆するものであったが、これまで脳実質内における産生または動向すら不明であった。そこでPGn-PA系と神経修復・再生過程の関係を調べるためラット顔面神経切断の系を使用した。頭蓋骨の外側で顔面神経を切断すると、その後脳幹にある神経核ではニューロンの傷害を修復すべく、様々な細胞および物質レベルの変動が起こることが知られている(2)。また、この系は血液脳関門の崩壊がないため、すなわち脳内への血液の浸潤がなく、血液由来の成分の影響を除外できるため、特に血液系成分の変動を解析するためには好適と考えられた。本稿ではラット顔面神経を切断し、その神経核におけるPA活性の反応性に注目し、誘導性のPAにつき検討した結果を報告する。

［方法］
ラット顔面神経切断および組織の調製
実験動物として体重200gのウィスターラット(♂)を使用した。エーテル麻酔下に右側の顔面神経を茎乳突孔で切断した。左側の顔面神経はコントロールとして残した。手術後、１日、２日、３日、５日、１０日目に麻酔下に生理食塩水を用い灌流を行い脳を摘出し、ドライアイスで凍結した。ザイモグラフィー用の組織切片はクリオスタットを用いて顔面神経核の位置で20 μmの厚さで調製した。また顔面神経核のホモジネートは、顕微鏡下に左右の核部分を切り抜き、SDSサンプル溶液［65mM TrisHCl(pH6.8)、2.3％SDS、10％glycerol］に溶解し調製した。
組織切片のザイモグラフィー
20mm角のガラスカバースリップに100 μl の1.5％アガロース溶液［20mM Tris HCl(pH7.5)、2％skim milk、5 μg ヒトPGnを含む］を広げ固化させ、上記のクリオスタット切片を重ね合わせ３７℃で保温した。１４－１６時間後、切片をはがし、カバースリップ上のアガロースを0.5％アミドブラックで染色した。
ポリアクリルアミドゲルのザイモグラフィー
上記顔面神経核のホモジネートを非還元下に10％ポリアクリルアミドゲルのSDS-PAGEを行い、さらに、2.5％Triton X-100による洗浄を行い、1.5％アガロースゲル(組織切片のザイモグラフィーに同じ)に重ね、３７℃で反応させた（３）。１４～１６時間後アガロースを0.5％アミドブラックで染色させた。

［結果］
ラット顔面神経を切断後３日目に顔面神経核の組織切片を調製し切片ザイモグラフィーを行った。図１Ａに示すようにPGn依存性のカゼイン分解は脳幹のふちに点状に見られるものと、神経切断側（右）の顔面神経核に一致する部分(矢印)の２カ所に見られた。前者は顔面神経切断後１日、２日、３日、５日、１０日目の全ての脳幹で検出されたが後者は手術後３－５日に増強し、後、弱くなる傾向を示した。この結果は顔面神経核にPA活性が一過性に誘導されること、そしてそれは脳幹のふちに検出されるPAとは異なるタイプのPAであることを示唆した。
次に神経核に誘導されるPAを同定する目的で、神経切断後３日目の脳組織片を用いてPA活性の性質を検討した。アガロースにPGnが添加されないとカゼイン分解は全く起こらないが(図１Ｂ)，PGn存在下では上記したように２カ所にカゼイン分解が見られた(図１Ａ)。しかしアガロースにuPAの特異的阻害剤であるamilorideを添加すると神経核に見られたスポットがほぼ完全に消失し、脳幹のふちにのみ、いくつかのスポットが観察された(図１Ｃ)。また抗PA抗体で組織片を３０分処理し、ザイモグラフィーを行うと

脳幹のふちに見られたスポットが強く抑制され神経核に一致する部分にのみカゼイン分解が起こった(図1D)。これらの結果は、神経核に誘導されるPA活性は主にuPAであることを強く示唆した。

さらに神経核のPA活性の分子量を求めるために左右の神経核のホモジネート(40μgタンパク)をポリアクリルアミドゲルのザイモグラフィーにより分析した。図2に示したように神経切断を行った右側の神経核(レーン2)にはコントロール側(レーン3)には微量にしか見られない分子量約48kDaのバンドが強く検出された。この位置のPAは分子量70kDaのラットtPAとは全く異なり、ラット尿中に存在するuPAと同一の移動度を示した。またamiloride存在下にザイモグラフィーを行うとこのバンド(48kDa)はほぼ完全に消失した。すなわちこれらの結果も神経核に誘導されてくるPAはuPA型であることを示している。

[考察]

これまでラット顔面神経切断に伴う神経核のPA反応性は不明であったが、組織切片およびポリアクリルアミドゲルのザイモグラフィーを使用することによりuPAの顕著な誘導を明らかにすることができた。uPAが一過性にしかも神経核に限定して誘導される現象は新しい知見であり、uPAの関与するプラスミン生成カスケードが神経の修復・再生過程に関連することを示唆しており興味深い結果であった。

ではuPAは顔面神経核でどのような役割を担っているのか？顔面神経切断によりこれまで核域でいろいろな形態的および物質の変動が知られている（2）。運動ニューロンは形態的変化とともにアセチルコリンエステラーゼ、ニューロフィラメントが減少し、一方糖代謝系酵素やアクチン、チューブリン量が増加する。さらにニューロンの周囲でミクログリアが活性化、移動、増殖し、またアストロサイトも遅延性の反応性を示す。このような状態で推測されるuPAの役割のひとつは細胞膜上のプラスミン活性の調節因子として細胞移動、形態変化に関与している可能性である。次に、ニューロンやグリアの生存あるいは活性化に必要とされる分子の活性化、すなわち成長因子・ホルモン、プロテアーゼなどの不活性前駆体の活性化に働いている可能性がある。また既に我々が報告したように、PGn-PA系はニューロンの突起伸長や成熟にも強い影響を与えることから神経栄養活性の調節因子として作用することも考えられる。

従来中枢神経系でuPAを産生する細胞としてニューロン、アストロサイト、ミクログリアが報告されている。しかしそれらはインビトロにおける結果でありインビボにおける細胞種は特定できていない。現在、我々はそれを知るべき免疫組織学的検討を行いつつある。さらにuPAとともにその生理的基質の存在、局在についても明らかにすることも必要であろう。これらの研究を進めることにより顔面神経核におけるuPAの役割が明らかになると思われる。

[文献]

(1) Nakajima, K. and Kohsaka, S. Neurosci. Res. 17, 187-203 (1993)
(2) Kreutzberg, G.W. Restor. Neurol. Neurosci. 5, 59-60 (1993)
(3) Nakajima, K., Tsuzaki, N., Shimojo, M., Hamanoue, M. and Kohsaka, S. Brain Res. 577, 285-292 (1992)

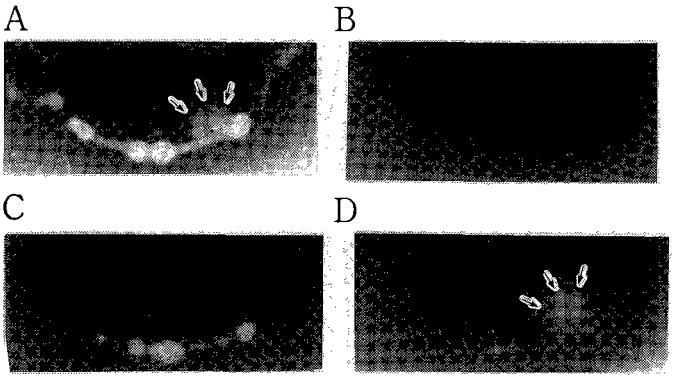


図1　顔面神経核に誘導されるPA活性
顔面神経切断後3日目に脳幹の切片を調製し、以下のようにザイモグラフィを行った。
A: プラスミノーゲンを含むアガロースを使用
B: プラスミノーゲンを含まないアガロースを使用
C: プラスミノーゲンおよび1 mM amilorideを含むアガロースを使用
D: 切片をtPA抗体で処理後、Aと同様にザイモグラフィを行ったもの。

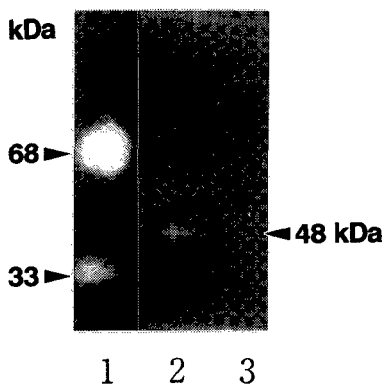


図2　顔面神経核に誘導されるPA活性の分子量
1. ヒトtPA (68 kDa) + ヒト低分子uPA (33kDa)
2. 神経切断側（右側）の神経核ホモジネート (40μg タンパク)
3. コントロール側（左側）の神経核ホモジネート (40μg タンパク)

112 グリオーマにおけるp53とCdk阻害蛋白質(p16, p21)の免疫組織化学的検索

白石哲也、井上崇文、福山幸三、戸田啓介、田渕和雄
（佐賀医科大学　脳神経外科）

〔要約〕

我々はp53遺伝子異常がグリオーマの発生および悪性化に関与していることを報告してきた。今回はcyclin dependent kinase (Cdk)に結合しそれらを阻害する蛋白質のうち、p53によって直接制御を受けるp21と制御を受けないp16との発現を免疫組織化学的に検索し、その意義につき考察した。p16陽性症例はgliosis 100%, astrocytoma 59%, anaplastic astrocytoma 14%, glioblastoma 0%であり、p16はグリオーマの悪性化に伴ってその発現が低下しており、tumorigenicity / tumor progressionに深く関与しているものと思われた。一方、今回検索したほぼすべてのグリオーマでp21は陽性染色されたが、平均陽性率はastrocytomaで5.8%、glioblastomaで8.0%であった。p21陽性率と、p53の陽性率および遺伝子異常との間には相関がみられなかった。

【目的】p53遺伝子の変異が種々のヒト腫瘍の発生に重要な役割を果たしていることはよく知られており、我々はグリオーマでもp53の遺伝子変異が見られることを報告してきた(1)。p53は増殖抑制蛋白質の遺伝子発現を誘導する機能を有しているが、最近その候補としてp21(Waf1/Cip1/Sdi1)が発見された(2)。さらにp53の制御を受けずに細胞周期を負に調節するCdk阻害蛋白質が単離され、その中でもp16(MTS1)は多くの培養癌細胞で欠失していることから、tumorigenicityに深く関与している事が明らかとなってきた(3)。本研究の目的はこれらのCdk阻害蛋白質がグリオーマの発生および悪性化に関与するか否かを検索することである。

【方法】75例の手術時生検グリオーマ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p16ポリクローナル抗体(Pharmingen)と抗ヒトp21モノクローナル抗体(Pharmingen)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。さらに従来報告してきたp53陽性率および遺伝子変異のデータと比較検討した。

【結果】p16の染色像は核に限局して認められ(Fig. 1)、陽性所見を呈した症例の割合はgliosis 3/3、astrocytoma 10/17、anaplastic astrocytoma 2/14、glioblastoma 0/39であり(Fig. 2)、病理組織学的悪性度が高くなるにつれてp16の免疫組織化学的発現率が低下した。p21の陽性反応は腫瘍細胞の核に認められ(Fig. 3)、gliosis 0/5(平均陽性細胞率0%)、astrocytoma 10/12 (5.8%)、anaplastic astrocytoma 5/5 glioblastoma 8/8 (14.1%)、glioblastoma 21/21例 (8.0%)の陽性率を示した。p21平均陽性率はp53正常群では7.2%、異常群では7.6%であり両者間に統計学的有意差を認めなかった。なお次の条件のうち少なくとも１つを満たすものをp53異常群とした。1)遺伝子解析で変異が認められたもの、2) p53が染色されないものかp53陽性率がMIB-1 indexを越えるもの、3) MDM-2の異常発現が認められるもの。

【考察】今回の研究よりグリオーマの病理組織学的悪性化にしたがってp16の発現が低下していることが示された。さらに最近いくつかの施設から同様な報告が認められており(4,5)、脳腫瘍においてもp16の異常がtumorigenicity / tumor progressionに関与しているものと思われる。p21の発現は病理組織学的悪性度およびp53遺伝子の異常の有無に相関が認められなかった。p21は当初p53によって強く制御を受けていると考えられていたが、最近p53-independent pathwayによっても制御を受けていることが確認されている(6)。p21は脳腫瘍のtumorigenicity / tumor progressionには関与していないと考えられた。

【文献】(1) Fukuyama K, et al. (1991) Biological Aspects of Brain Tumors, 317 (2) Noda A , et al. (1994) Exp Cell Res 211, 90 (3) Serrano M, et al. (1993) Nature 366, 704 (4) Jen J, et al. (1994) Cancer Res 54, 6353 (5) Schmidt EE, et al. Cancer Res 54, 6321 (6) Johnson M, et al. (1994) Mol Carcinog 11, 59

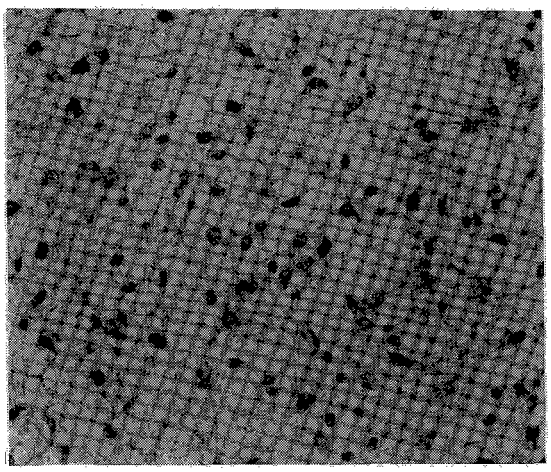
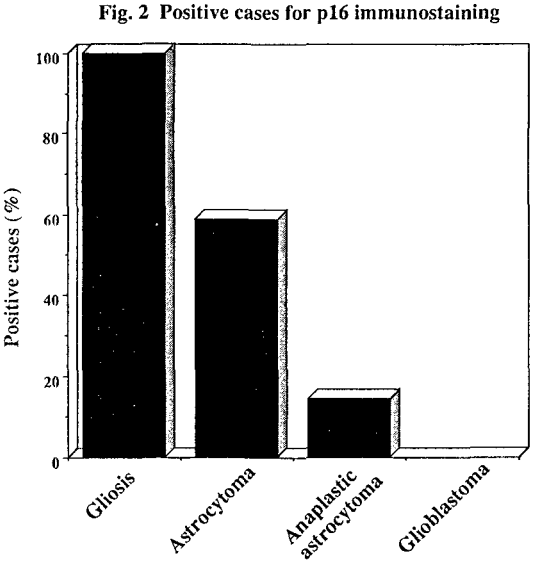


Fig. 1 p16 immunostaining of astrocytoma (x400)



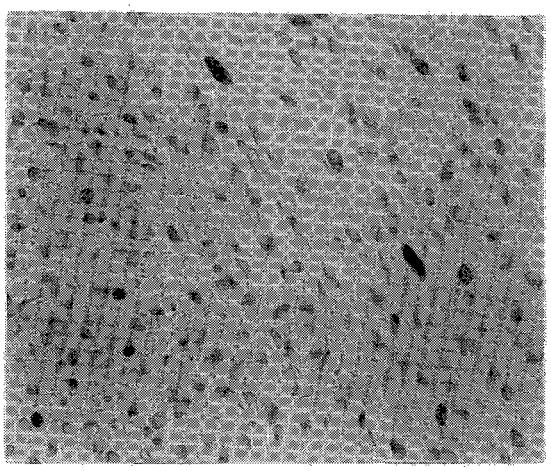
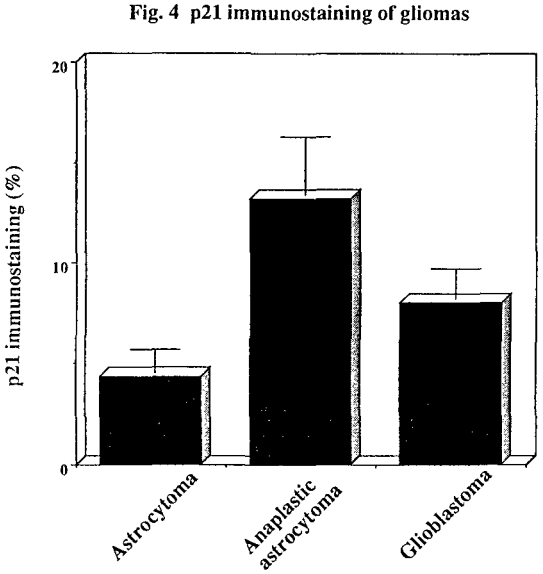


Fig. 3 p21 immunostaining of glioblastoma (x400)



113 過剰なNa+流入による培養上頸神経節細胞のアポトーシスの機構

小池達郎、中山　恒、小田　毅、田中秀逸
(北大院理行動知能学、佐賀医科大)

〔要約〕
ベラトリジン（0.75μM）はNGF除去による上頸神経節細胞の細胞死を抑制することを既に報告したが、1μM以上では神経細胞死を誘発した。ベラトリジンによる細胞死は用量依存的に起こり、テトロドトキシンによる抑制が効く濃度範囲（10μM以下）では、細胞体が縮み染色体の凝縮が起こることから、アポトーシスであろうと考えた。ベラトリジン毒性は低Na+濃度外液では消失した。更に、細胞外液のK+濃度が100mM以上では細胞体の収縮は抑制された。これらの結果から、過剰なNa+流入がRVD (Regulatory Volume Decrease)を経て、上頸神経節細胞のアポトーシスを誘発したと推定した。

細胞死カスケードは本来細胞にプログラムされており、それゆえ生体は増殖、分化、成長、細胞死の精妙なバランスで制御されていると考えられる。この制御された細胞死はそのトリッガーにより種々のカスケード産物を経て共通の機構－DNAの断片化－を伴うと考えることは合理的である。実際、種々のパラダイム例えばスタウロスポリン処理によって神経細胞死が誘導される（1）。我々は細胞内イオンCa2+やNa+に着目してその細胞死制御機構に興味を持った（2、3）。例えば、膜電位依存性Na+チャンネルの活性化剤であるベラトリジンはNGF除去による上頸神経節細胞の細胞死を抑制したが、この効果はNa+イオンの細胞への流入によるものであった（3、6、8）。一方、Na+イオンが過剰に流入すると神経細胞死を誘発し、その効果は神経細胞の成熟に伴って増強された。本報告では過剰なNa+イオンの流入による神経細胞死の機構とその発達について詳細に調べた

[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（2、7）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。非神経細胞の除去のため FUdR 処理をした。

細胞死のアッセイ法：トリパンブルー染色またはニッスル染色を行い、生細胞数を数えた（7）。

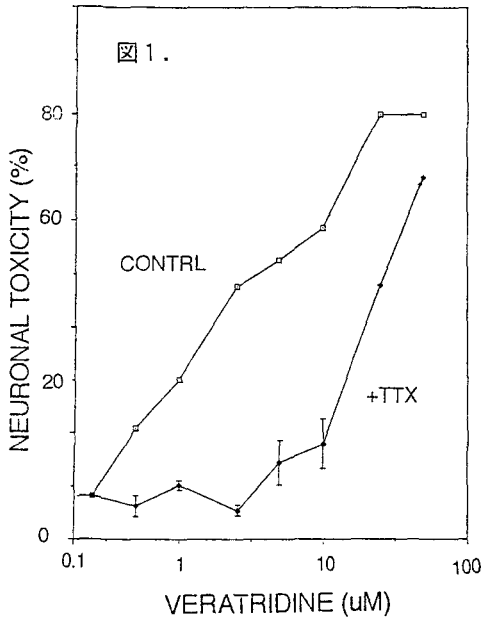
染色体凝縮のアッセイ法：細胞を4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定後、ヘキスト3258（1μg/ml）で15分染色、PBS(-)で洗浄後、染色体の凝縮の有無を蛍光顕微鏡（UV）で観察した。

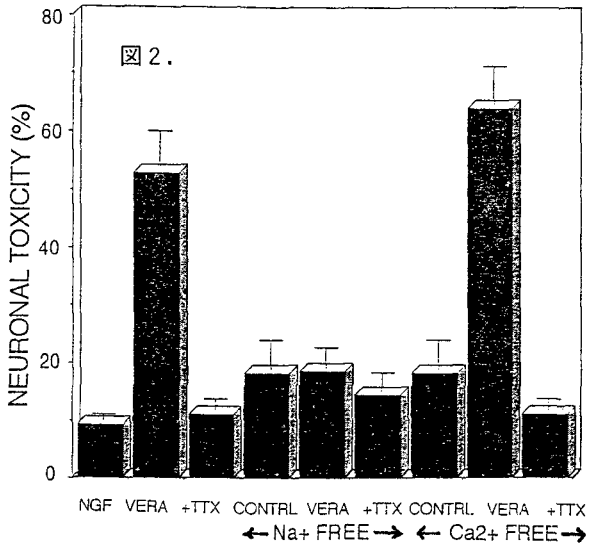
細胞内Ca2+やNa+イオンの定量：細胞内Ca2+やNa+イオンの測定はそれぞれfura-2-AM及びSBFI-AM標識による蛍光画像解析装置により行った（3、6、8）。

[結果]

NGF 存在下1週間培養して十分分化させたラット上頸神経節細胞を、0.1-40μMベラトリジン（VERA）で10－15時間処理すると、用量依存的に毒性を示し、40μMでは約80%の細胞が死滅した（図1）。ところがベラトリジンの毒性は高濃度ではテトロドトキシン（TTX）によって抑えられなかった（図1）。従って、VERA作用の特異性が保たれる範囲で実験する為、その濃度を10μM以下に抑えた。この濃度では蛍光イメージング法によると、細胞外のCa2+もNa+も流入するため、VERAの毒性がCa2+の流入によるのかNa+の流入によるのかを調べた。図2に示したように低Ca2+濃度（ca.100nM）ではVERAの毒性は保たれているのに反し、低Na+濃度（Na+をN-Methylglucamineで置換）ではその作用は完全に失われた。この為、毒性はNa+の流入により、かつ我々の以前の報告（3、6）により適当な流入は細胞死を抑制することから、過剰に流入される為に起こると考えられる。過剰なNa+イオンの流入による細胞死のメカニズムとしては細胞体が縮むこと、ビスベンザミドで染色するとアポトーシスに特徴的な染色体の凝縮が起こることから、アポトーシスであろうと考えた。更に、細胞外液のK+濃度が100mM以上では、VERA毒性は突起のみにとどまり、細胞体の収縮は起こらなかった。これらの結果から、過剰なNa+流入がRVD (Regulatory Volume Decrease)を経て、上頸神経節細胞のアポトーシスを誘発したと推定した（図3）。この毒性は幼若な細胞では顕著には起こらなかった。グルタミン酸毒性ではCl-、Na+、Ca2+イオンなどの透過性が変わるため複雑な系となっているが、

Na+のみを過剰に流入させるパラダイムを用いるとアポトーシスが起こることが示唆された。一般にVERAを使う実験ではかなりの高濃度を用いている（4、5）が、その場合膜電位依存性Na+チャンネルを介しての特異的な効果をみているとはいえず、その結論を受け入れるには慎重にならざるを得ない。





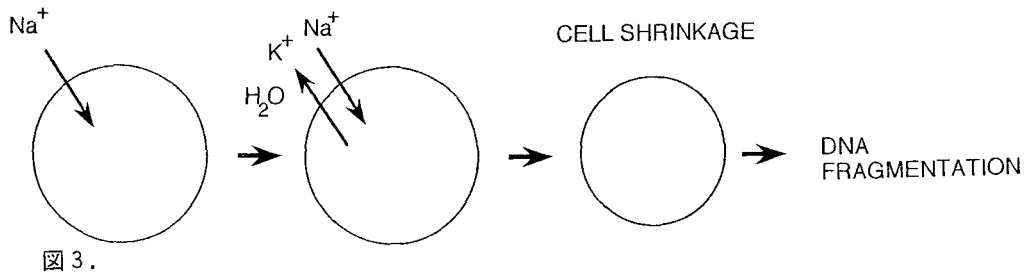


図3.

図1．上頚神経節細胞に対するベラトリジン毒性の濃度効果(生存細胞数を測定(□; 3視野を各々200以上測定した平均値 (mean±SE)), ●は1 μMテトロドトキシンを含む対照値)

図2．ベラトリジンを介した神経細胞毒性に対するCa2+及びNa+イオンの効果(2視野を各々200以上測定した平均値 (mean±SE))（ベラトリジンの濃度は10μMで行った。）

図3．ベラトリジンを介した神経細胞毒性のメカニズム

参考文献

1. Brooks,S.F., Philopott,K., Jacobson,M. et al. (1994) Soc. Neurosci. Abstr. 20: 245
2. Koike,T. and Tanaka,S. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 3892-3896
3. Koike,T. and Tanaka,S. (1992) Soc. Neurosci. Abstr. 18: 49
4. Pauwels, P.J., Van Assouw, H.P., Peeters, L. et al. (1990) J. Pharmacol. Exp. Ther. 255: 1117-1122
5. Raminath, R.R., Strange, K., and Rosenberg, P.A. (1992) Neurosci. 51: 931-939
6. 田中秀逸、小池達郎　神経化学（1993）３２（１）：３０６－３０７
7. Tanaka,S and Koike,T. (1994) Neuropeptide 26: 103-111
8. Tanaka,S and Koike,T. (1995) Neurosci submitted

114 培養上頸神経節細胞のアポトーシスのCa^{2+}による制御

中山　恒、信川貴子、小池達郎
(北大院理行動知能学)

〔要約〕
神経細胞は生存維持の為の細胞内 Ca^{2+}濃度（Ca^{2+}セットポイント）を持つとすれば、その濃度領域より高い及び低い領域では細胞死が起こると予想される。更に、NGF除去による神経細胞死では、栄養因子による細胞内Ca^{2+} イオン制御の欠如からCa^{2+} イオン濃度の低下が起こり、細胞死に至る可能性が示唆される。種々のCa^{2+}キレート剤やCa^{2+}イオノフォアで上頸神経節細胞を処理した実験の結果はこの考えを基本的に支持した。又、NGF除去による上頸神経節細胞死に対するBAPTAの効果を調べると、10-50 μM濃度範囲では細胞死は顕著に遅延した。これらの結果から上頸神経節細胞死のアポトーシスのCa^{2+}による制御機構が示唆された。

我々は上頸神経節細胞や小脳顆粒細胞を用いて膜脱分極作用による神経細胞生存／細胞死抑制の調節機構を調べてきた（2、3）。その作用は高 K^+による脱分極に伴い、L 型 Ca^{2+} チャンネルを介して Ca^{2+}が細胞内に流入し、細胞内Ca^{2+} 濃度が上昇する為である（2）。Ca^{2+}セットポイント仮説では、神経細胞はそれぞれに特異的な、自律的な生存維持の為の細胞内 Ca^{2+}濃度（セットポイント）を持つとされている。実際、上頸神経節細胞や後根神経節細胞は成熟すると NGF 依存性が低下し、細胞内 Ca^{2+}濃度も上昇する（3）。この考えに従えば、神経細胞生存に関する細胞内Ca^{2+}ウィンドウが存在し、Ca^{2+} イオン濃度がより高い領域もより低い領域も細胞死が起こる。更に、NGF除去すると細胞内 Ca^{2+}イオン濃度の低下が起こり、これがトリッガーとなって細胞死に至ることが示唆される（他の系での示唆がある（4））。それ故脱分極が細胞死を抑制し、神経栄養因子は神経細胞が生存可能な細胞内 Ca^{2+}濃度の範囲を広げるとも考えられる。上頸神経節細胞を種々のCa^{2+}キレート剤やCa^{2+}イオノフォアで処理することにより、この仮説の当否を検討した。

[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、5）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 5-7日培養して実験に供した。非神経細胞の除去のため FUdR 処理をした。

細胞死のアッセイ法：トリパンブルー染色またはニッスル染色を行い、生細胞数を数えた（5）。

染色体凝縮のアッセイ法：細胞を 4％パラフォルムアルデヒド溶液で固定後、ヘキスト３２５８（1 μg/ml）で１５分染色、PBS(-)で洗浄後、染色体の凝縮の有無を蛍光顕微鏡（UV）で観察した。又、神経細胞は固定後、Neurofilament (160KD)又はMAP2 抗体染色により確認した。

[結果]

上頸神経節細胞内Ca^{2+}の上昇はDNA断片化を誘導する。

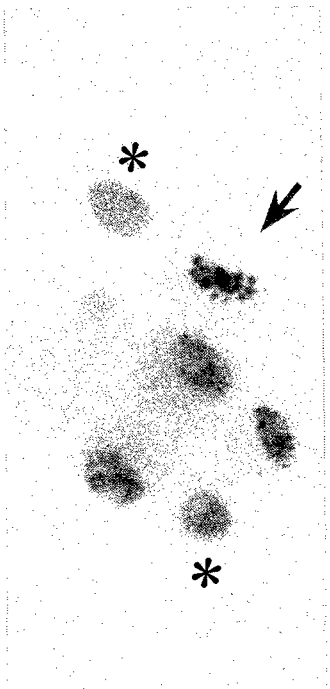
既に、PC12細胞（1）や他の初代培養神経細胞（6）ではCa^{2+}イオノフォアA23187処理によってDNA断片化が起こることが 記載されており、核内のCa^{2+}濃度の上昇が断片化を促進することが示唆されている。A23187は10nMから用量依存的に上頸神経節細胞死を促進し、染色体の凝縮を誘発した。

上頸神経節細胞内Ca^{2+}の減少はDNA断片化を誘導する。

NGF 存在下、ラット上頸神経節細胞をCa^{2+}キレート剤 BAPTA-AM (1,2-Bis (0-aminophenoxy) ethane-NNNN-tetraacetate acetomethoxyester、 100-1000 μM）で１０－１５時間処理すると、細胞体が収縮し、約７０％の細胞が死滅した。ビスベンザミドで染色するとアポトーシスに特徴的な染色体の凝縮が起こることから、アポトーシスであろうと考えた（図１）。

細胞内Ca^{2+}レベルの緩衝化はNGF除去による細胞死を抑制する。

NGF除去による上頸神経節細胞死に対する効果を調べる為に、培地中に同時に1-50 μM BAPTA-AMを加えた。24-48時間後、BAPTAは細胞死を顕著に遅延した（図２）。Kd値の全く異なるBAPTA誘導体例えば、5,5-Dibromo、4,4-Difluoro誘導体などのCa^{2+}キレート剤では効果は見られなかった。ダントロレン（1 μM）はわずかに細胞死を遅らせたが、顕著な効果はなかった。Fura-2蛍光イメージング法による予備的な実験では細胞死に伴って細胞内Ca^{2+}イオン濃度は低下する（90nM - ca. 30nM）ことを示唆しており、細胞内Ca^{2+}濃度の緩衝化により細胞死が遅延されると考えた。現在、この細胞内Ca^{2+}濃度減少に関与するCa^{2+}結合蛋白質の役割を調べる為にPCR法により検索を行っている。



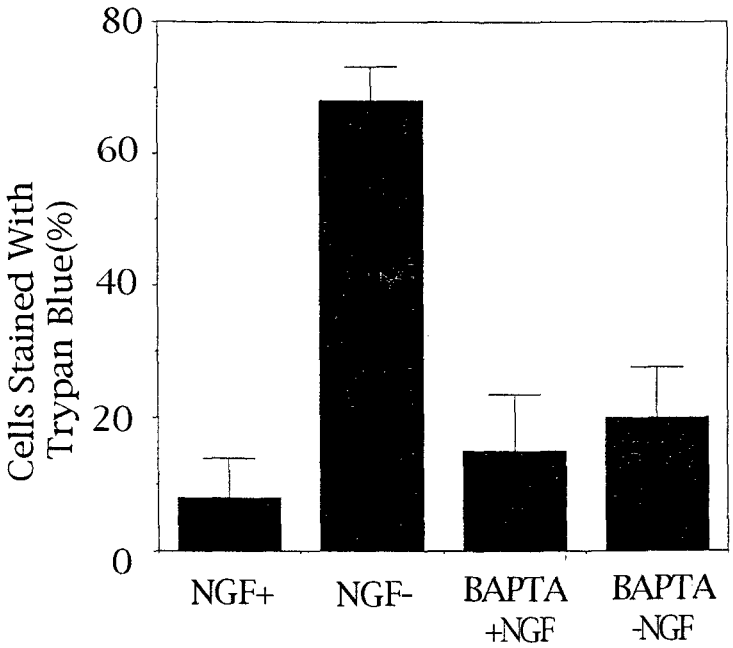


図１（左）．BAPTA-AMによる上頸神経節細胞死（アポトーシス）の誘導：ビスベンザミド染色による染色体の凝縮と断片化の検出（矢印、正常なクロマチンを＊で示す）
図２（右）．NGF除去による上頸神経節細胞死のBAPTA-AMによる抑制 (3視野を各々200以上測定した平均値 (mean±SE))

参考文献

1. Joseph , R., Li, W., and Han, E. (1992) Soc. Neurosci. Abstr. 18: 574
2. Koike, T. , Martin, D.P., Johnson, Jr., E.M. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86: 6421-6425
3. Koike, T. and Tanaka, S. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 3892-3896
4. Magnelli, L., Cianelli, M., Turchetti, A. et al. (1993) BBRC 194: 1394-1397
5. Tanaka, S and Koike, T. (1994) Neuropeptide 26: 103-111
6. Takei, N and Endo, Y. (1994) Brain Res. 652: 65-70

115 ミエリン形成前過程におけるシュワン細胞のアポトーシス

中尾純治[1)]、村瀬真一[2)]、篠田純[1)]、川村光毅[2)]、植村慶一[1)]
(慶應義塾大学医学部・生理学教室[1)]、解剖学教室[2)])

〔要約〕
末梢神経系ではミエリン形成開始の直前に、増殖していた一つのシュワン細胞が一つの神経軸索を認識し接着して増殖を停止することが知られている。これは正常なミエリン形成の前提条件となる重要な現象であるが、その機序はまだ解明されていない。我々は増殖の過程でシュワン細胞が神経軸索に対応する数に過不足なく調節されることに着目しそのメカニズムを検討してきた。抗Thy1抗体を用いたimmunopanning法による迅速な培養法により増殖期のin vivoに近いと考えられるシュワン細胞の性質を検討した結果、その多くは培養開始後に漸次アポトーシスをおこす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は軸索から分離するとアポトーシスが誘導されやすいと考えられた。in vivoでも神経軸索に接着できないシュワン細胞が細胞死を起こし、残ったものが軸索と一対一の対応関係になる可能性が考えられるので、今回、発育過程の末梢神経系でアポトーシスが実際におこっているか否か検討した。その結果、ミエリン形成前過程で多くのシュワン細胞のアポトーシス像が観察された。

〔緒言〕　末梢神経系のミエリン形成過程では、一つのシュワン細胞が一つの神経軸索を正確に認識し、その周りを取り囲んで増殖停止し、最後にミエリン形成がおこなわれることが知られている。ミエリン形成開始時点では、シュワン細胞は神経軸索に対応する数になっている考えられるが、その数の調節のメカニズムは知られていなかった。この現象には、従来の培養法では見いだすことができなかったin vivoで示す何らかのシュワン細胞の性質が関係しているではないかと考えられた。そこでこの性質を検討する目的で、我々は抗Thy1抗体を用いたimmunopanning法による迅速かつ効果的に分離・培養する方法を確立し、この方法で培養したところ、特に増殖期のシュワン細胞では神経軸索から分離した直後はきわめてアポトーシスをおこしやすい状態にあることが明らかとなり昨年の本大会で発表した。すなわちin vivoで増殖しているシュワン細胞のうち神経軸索に接着できなかったものが選択的に細胞死をおこしていき、神経軸索にちょうど対応する数に調節される可能性が考えられた。今回はこのような機序が実際に発育過程の末梢神経系で機能しているか否か検討した。

〔方法〕

1. immunopanning法によるシュワン細胞の培養：　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[1)]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、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[2)]。2. 坐骨神経組織のS-100および核の二重染色：　種々の生後日数のラットを4%パラフォルムアルデヒドで還流固定し、坐骨神経を摘出しさらに4%パラフォルムアルデヒドでに浸潤させて後固定したのちに、クリオスタットを用いて5 μmの切片を作成した。ブロッキングの後に、抗S-100抗体を反応させ、さらに蛍光標識した2次抗体および4 μg/mlのヨウ化プロピジウムで反応させた。

〔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10%血清を含むmediumを用いて培養すると、12時間以内に多くのシュワン細胞が漸次、アポトーシスをおこすことは前回すでに報告した。今回、培養皿の基底に種々の細胞外マトリックスをコートしてアポトーシスを回避できるか否か検討した。フィブロネクチンのコートは強い効果を示したが、コラーゲンやラミニンの効果は少なかった。一方、ポリーLーリジンのコートのみでも、かなりアポトーシス回避の効果認められた。このことから、in vivoで観察されたシュワン細胞のアポトーシスは基質との接着能の強

弱が関係している可能性が考えられた。

次に、発育過程の坐骨神経でも実際にシュワン細胞のアポトーシスが起こっているか否か検討した。生後一日目のラットの坐骨神経から得た組織切片を用いて、抗S-100抗体でシュワン細胞を、またヨウ化プロピジウムによって細胞の核を染色した。その結果、S-100陽性の細胞に一致してアポートシス特有の所見である核が分断している像や濃染している像が認められた(図1)。これに対応する所見が電子顕微鏡によっても観察された。これらのことからin vivoでもシュワン細胞がアポトーシスをおこしていることが明らかとなった。さらに、アポトーシスの所見を示す核がS-100陽性と一致するか否か多数のものを検討した結果、すべてがS-100陽性に一致した。したがって、坐骨神経を構成する細胞のうち、シュワン細胞のみがアポトーシスをおこすと考えられた。また、アポトーシスをおこしているシュワン細胞の割合について生後の経日変化を検討したが、増殖期からミエリン形成期にかけて高頻度のアポトーシスが観察された(図 2)。

今回の実験から、まず培養直後のシュワン細胞のアポトーシスの回避には、シュワン細胞と基質との接着能の強弱が関与していることが明らかとなった。in vivoにおける軸索とシュワン細胞の接着には、N-カドヘリンやL1などの細胞接着因子が関与していると考えられるので、現在、細胞接着因子とアポトーシス回避の関係を検討している。また、in vivoでは特に増殖期に多くのシュワン細胞のアポトーシスが観察されたが、以上の結果を考えあわせると神経軸索に接着出来なかったシュワン細胞がアポトーシスをおこすしていくことで、軸索にちょうど対応する数になる可能性が考えられた。

［文献］ 1) Bottenstein, J. E. and Sato, G. H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 514-517. 2) 中尾純治、村上善紀、植村慶一(1994) 第37回日本神経化学会大会論文集33, 134-135.

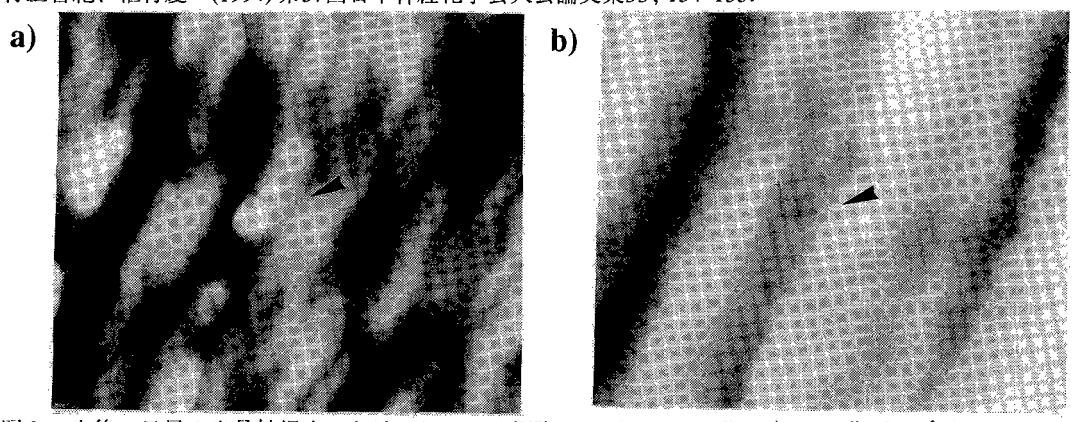


図1：生後一日目の坐骨神経中におけるシュワン細胞のアポトーシス像。a) ヨウ化プロピジウムによる核染色像b) 抗s-100抗体によるシュワン細胞の染色像

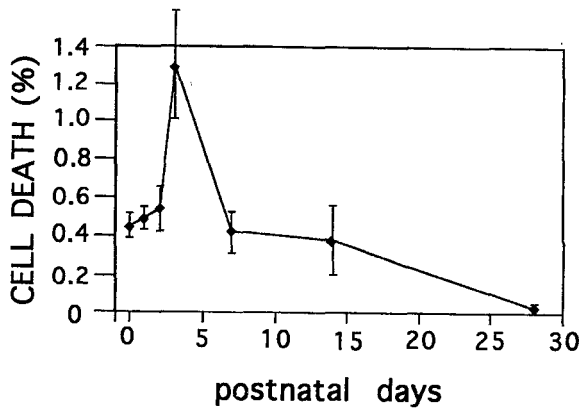


図2：坐骨神経中でアポトーシスをおこしているシュワン細胞の割合の生後日数における変化

116 ラット中枢神経系由来神経芽細胞腫、Ｂ５０とＢ１０４、で観察されたアポトーシスについて

久永真市、岸本健雄
（東京工業大学・生命理工学部）

［要約］
ラット中枢神経由来の細胞株B50とB104は、DBcAMPにより突起を伸ばし、神経細胞様に分化することが報告されている[1]。今回、我々はこれらの細胞が状態の異なる二つの時期（分化後と増殖時）にアポトーシスを起こすことを見つけたので報告する。B50とB104細胞は増殖時でさえもニューロフィラメントやMAP2などの神経細胞特有の細胞骨格蛋白を発現しており、比較的分化程度の高い神経芽細胞腫と考えられた。B50とB104は、DBcAMPを加えると数時間内に突起を伸長させ、24-48時間後にはネットワーク状の突起をもった細胞群となる。しかし、72時間を超えると、浮遊し死んでくる細胞が増加した。この細胞死の様式をDNAの断片化と核の形態により調べたところ、アポトーシスであることが示された。このアポトーシスに対する蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド（CHX）の影響を調べたところ、シクロヘキシミド添加によりアポトーシスの誘導が早められていた。DBcAMP添加前にCHXを加えると分化を経ないで、約12時間後からアポトーシスによる細胞死が見られた。以上の結果から、B50とB104細胞には神経様細胞へ分化した後の寿命にともなうアポトーシスと、増殖時に生存因子の合成を抑えることにより誘導されるアポトーシスがあるのではないかと推測された。

［目的］
アポトーシスは神経の発生過程でみられるプログラム細胞死や、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経細胞死と関連した非常に重要な問題である。神経細胞のアポトーシスについては組織レベルや培養細胞を用いた研究が多くなされ、アポトーシスを誘導または抑制する蛋白質などいくつも見つかってきている。しかし、その仕組みについては未だ殆ど解っていないのが現状である。細胞培養系は均一な細胞が得られ、実験条件の設定が容易であることから、アポトーシスの分子機構を解明するにもよい実験系を提供すると考えられる。アポトーシスの研究によく用いられている培養神経細胞としては、PC12細胞や上頸神経節細胞などがある。しかし、いずれも末梢神経系のもので、中枢神経由来の細胞を用いた実験系の確立は中枢神経細胞のアポトーシスの研究に必須であると考えられる。我々は、ラット中枢神経由来の細胞株であるB50とB104を用いて神経様細胞への分化の過程を調べていたところ、両細胞が、分化をした後にアポトーシスを起こすことを見つけた。本会ではB50とB104細胞で観察された分化後のアポトーシスと増殖時のアポトーシスについて報告する予定である。

［方法］
ラット神経芽細胞腫B50とB104は10%牛胎児血清(FCS)を含むDMEM培地、10%炭酸ガス、37° Cで培養した。分化誘導は1mM Dibutyryl cyclic AMP(DBcAMP)により0.5%FCS、DMEM培地中で行った。DNAの断片化は1-2%アガロースゲル電気泳動によって調べた。核の凝縮はHoechst染色後蛍光顕微鏡で、または超薄切片作製後電子顕微鏡で観察した。

［結果］
B50とB104細胞は共に短い突起をもった繊維芽細胞様の形態をしている。これらは10%血清存在下で増殖し、1mM DBcAMPを加えると突起を長く伸ばし、神経細胞様に分化する。B50、B104はともに増殖時から神経細胞のマーカーとして知られているMAP2、タウ、ニューロフィラメント蛋白などを発現しており、比較的分化程度の高い細胞であると考えられた。但し、両細胞の血清に対する感受性は異なり、B104が血清除去のみでも分化するのに対し、B50は血清除去した後DBcAMPを加えなければ突起を伸展させない。また、B10

4は主に二つの突起をもった両極性の細胞になるのに対して、B50はより突起の多い多極性の細胞になった。これらはDBcAMP添加後、数時間で突起を伸ばし始め、1－2日間は、突起をネットワーク状に張り巡らした細胞群となるが、3日目(72時間) 以降になると浮遊し、死ぬ細胞の割合が増加した。DBcAMP添加後の時間を追ってDNAを回収し、アガロースゲル電気泳動で分離すると、48時間前後から断片化が見られた。また、電子顕微鏡で細胞の形態を観察したところ、核の凝縮と細胞の断片化が観察され、この細胞死はアポトーシスであることが確認された。Hoechst染色による核の凝縮を指標に、分化誘導処理によりアポトーシスを起こしたB50細胞の割合の時間経過を示したものが図1である。このアポトーシスが蛋白合成依存性であるかをCHXを用いて調べたところ、CHXを加えた時間に依存して細胞死が早まることが観察された。血清濃度を下げると同時にCHXを加えると、添加後24時間で細胞死が誘導されていた（図2）。

［考察］

ラット中枢神経由来のB50とB104神経芽細胞腫で2種の細胞死が観察された。DBcAMPで分化させた後で見られるものと、増殖時の細胞から血清を除き、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを加えた時に起こるものである。これらがアポトーシスであることは、DNA断片化と電子顕微鏡による形態観察から示された。2タイプのアポトーシスの違いやその詳しい機構については現在検討中である。特に、細胞周期関連蛋白や細胞骨格との関連から調べている。現時点では、増殖時に見られるアポトーシスは、CHXで阻害されると報告されているアポトーシスとは異なり、生存因子様のものが存在しており、その合成が阻害されることにより誘導されるのではないかと考えている。

［文献］

1. Schubert, D., Heinemann, D., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J. H., Culp, W., & Brandt, B. L. (1974) Nature, 249: 224-227.

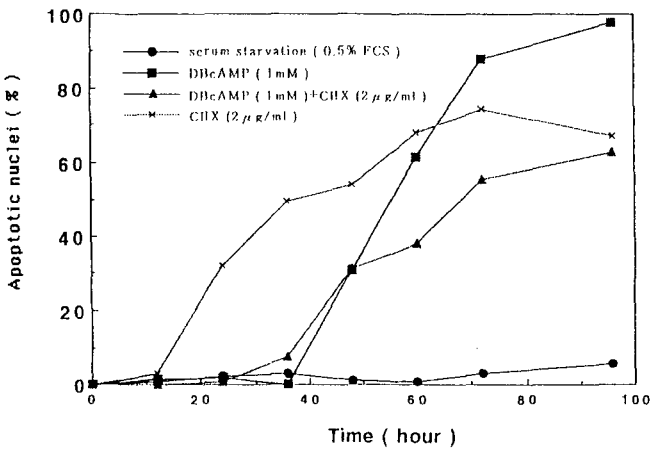


図1　B50細胞をDBcAMPまたはCHXで処理した時に現れる凝縮した核をもつ細胞の割合の時間経過。



図2　B104細胞をCHXで処理した時のDNAの断片化を示すアガロース電気泳動。下の数字はCHX処理後の時間を示す。

117 脳虚血負荷による脳内Activator protein 1の変動

東　泰孝、荻田喜代一、米田幸雄、章　龍*、柳瀬尚人*、三谷章*、片岡喜由*
(摂南大・薬・薬理、*愛媛大・医・第一生理)

〔要約〕
スナネズミ脳内特定部位における転写制御因子Activator protein 1(AP1)のDNA結合能を、オリゴヌクレオチドプローブを用いたゲル移動度シフトアッセイにより検索した。AP1結合能は海馬歯状回に活性が高く、ＣＡ１野およびＣＡ３野などにはほとんど検出されなかった。両側総頸動脈の5分間結紮による一過性脳虚血を負荷すると、海馬ＣＡ１野においては血流再開通１および３時間後に著明なAP1結合能の増強が観察されたが、この増強は６時間後には完全に消失し、その後２４時間目まで認められなかった。一方、ＣＡ３野および歯状回では、血流再開通１時間後に有意な増強が認められ、この増強は再開通後３、６、９および１２時間まで持続したのち、２４時間後には消失することが判明した。以上のように、ＣＡ１野のAP1結合能の増強は一過性であるのに対して、歯状回およびＣＡ３野ではAP1結合能の増強が少なくとも１２時間後までは持続することから、AP1により転写調節される蛋白質が虚血に対する抵抗性の獲得に深く関与する可能性が示唆される。

細胞核内転写制御因子は、遺伝子DNA上のエンハンサー領域やプロモーター領域に見出される特定の塩基配列を認識して高親和性に結合し、標的遺伝子の転写活性を調節する核内蛋白質である。その結果、細胞には長期的あるいは永続的な機能変動が招来されるものと理解される。中でも、ロイシンジッパー構造を持つ転写制御因子AP1は、Fosファミリー蛋白質やJunファミリー蛋白質のホモダイマーあるいはヘテロダイマーであるが、エンハンサー領域の12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA) response element(TRE)に高親和性に結合して、その標的遺伝子の転写を調節する活性を有する。一方、脳虚血負荷に伴う遅発性神経細胞死の発症メカニズムに、AP1結合能の著明な上昇が関与する可能性も報告されている(5)。したがって、本研究では脳虚血脆弱性の出現メカニズムを解明する一端として、海馬内特定部位のAP1結合能の脳虚血負荷後の変動を経時的に追跡した。

〔実験方法〕
脳虚血負荷：一過性脳虚血負荷(2)後各時間毎に脳内各部位を分画採取し(1)、直ちに各部位を液体窒素により凍結させた。核抽出液の調製：凍結脳内各部位から、Nonidet P-40を用いた方法(3)に準じて細胞核抽出液を調製した。得られた核抽出液は使用時まで-80℃に凍結保存した。DNAプローブ：AP1の放射性プローブは、TRE配列を含む2本鎖オリゴヌクレオチド(5'-GATCCGGCTGACTCATCACTAG-3')を、dATP[α-^{32}P](111 TBq/mmol)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作成した。ゲル移動度シフトアッセイ：核抽出液(3-5 μg蛋白質)、1 μg poly(dI-dC)、放射性プローブ(20 fmol、1-12$\times 10^5$ cpm)、10 mM $MgCl_2$、200 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 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（80V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(4)。

〔実験結果〕
一過性脳虚血負荷後、血流再開通１時間後に、ＣＡ１野、ＣＡ３野および歯状回において対照群と比べて有意なAP1結合能の増強が観察された（表１）。この増強は再開通３時間後にはいずれの海馬内部位でも最大の程度を示したが、ＣＡ１野の増強は血流再開通６時間後では消失した。これに対して、ＣＡ３野および歯状回では６

時間後でも有意な上昇が見られたばかりでなく、この上昇は少なくとも１２時間後まで持続した。しかしながら、血流再開通２４時間後にはいずれの海馬内部位でもAP1結合能に著明な変動は認められなかった。

表１　脳虚血負荷に伴うAP1結合能の経時的変化

	AP1 binding(% of control)		
	1 hr	3 hr	9 hr
〔CA1〕			
Sham	100.0±19.6	100.0±13.3	100.0±12.6
Ischemia	185.5±27.9*	265.1±39.7**	92.5±14.8
〔CA3〕			
Sham	100.0±11.7	100.0±13.0	100.0±18.1
Ischemia	280.8±51.2**	445.7±53.5**	362.5±44.6**
〔Dentate gyrus〕			
Sham	100.0±14.7	100.0±11.1	100.0±14.8
Ischemia	279.2±53.6*	345.6±42.0**	279.3±26.5**

*P＜0.05, **P＜0.01, significantly different from the value obtained in control animals.

〔考察〕

本研究により、一過性脳虚血負荷後のAP1結合能の増強は虚血脆弱性の高いＣＡ１野では一過性であるのに対して、虚血抵抗性を示す歯状回およびＣＡ３野では少なくとも１２時間後までは増強が持続することが明かとなった。このことは、AP1結合能上昇の持続性と虚血抵抗性の間に正の相関性が存在する可能性を示唆するものである。さらに、元来のAP1結合能が海馬内では歯状回が高くＣＡ１野に低いという事実(5)を考慮すると、AP1により細胞防御能を有する蛋白質が転写調節される可能性が示唆される。今後、このAP1の標的蛋白質についてさらに詳細なる解析を進めていきたい。

〔謝辞〕

著者らは、非会員の井上恵児氏（現　丸石製薬中央研究所）の研究遂行上の御協力に感謝いたします。本研究の一部はヒューマンサイエンス振興財団基礎研究事業費(4-4-4-⑩)の援助の下に行われた。

〔文献〕

1. Kataoka, K., Mitani, A., Andou, Y., Enomoto, R., Ogita, K. and Yoneda,Y. (1993) Neurochem. Int. 22, 37-43.
2. Mitani, A., Andou, Y., Masuda, S. and Kataoka, K. (1991) Neurosci. Lett. 131, 171-174.
3. Schreiber, E., Mathias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Nucleic Acid Res. 17, 6419.
4. Yoneda, Y., Ogita, K., Kabuto, H. and Mori, A. (1993) Neurosci. Lett. 161, 161-164.
5. Yoneda, Y., Ogita, K., Inoue, K., Mitani, A., Zhang, L., Masuda, S., Higashihara, M. and Kataoka, K. (1994) Brain Res. 667, 54-66.

118 タイプI-NO合成酵素選択的阻害剤：δ-(S-methylisothioureido)-L-norvalineはラット一時的局所脳虚血後の梗塞巣を縮小する

武藤　厚、杉山昌一、長藤寿昭、牧野俊彦、松居　徹*、宮内達雄、名畑博之
（中外製薬（株）富士御殿場研究所、*埼玉医大総合医療センター脳外）

〔要約〕

我々が新規に合成した化合物 δ-(S-methylisothioureido)-L-norvaline(L-MIN)は、ラット大脳皮質可溶性画分中のCa^{2+}依存性構成型NO合成酵素(タイプI/N-cNOS)活性を濃度依存的に阻害し、そのIC_{50}値はN^G-nitro-L-arginine(L-NNA)の約1/3であった。L-MINは、ウシ肺動脈血管内皮細胞(CPAE)中のCa^{2+}依存性構成型NO合成酵素(タイプIII/E-cNOS)とラットCa^{2+}非依存性誘導型NO合成酵素(タイプII/iNOS)よりも、それぞれ40倍以上タイプI-NOSに選択的であった。L-MINあるいはL-NNAをラット中大脳動脈(MCA)閉塞直後と再灌流直後に i.p.投与すると、発生する梗塞巣の面積は用量依存的に縮小した。L-MINや既存のNOS阻害剤のラット脳微小血管中のCa^{2+}依存性構成型NOS活性に対するIC_{50}値は、タイプI-NOS活性に対して得られた値と近似であった。大脳皮質可溶性画分、ラットシナプトゾーム画分、及び脳微小血管画分のCa^{2+}依存性構成型NOSのL-arginineに対するKm値はほぼ一致した。さらに、タイプI-NOSに対する抗体を用いたWestern blotを行った結果、大脳皮質可溶性画分、シナプトゾーム画分、及び脳微小血管画分すべてに約155 kDaに相当する単一のバンドが認められた。以上の実験成績より、タイプI-NOSに対して強力かつ選択的な阻害剤であるL-MINは、一時的局所脳虚血後の梗塞巣形成を改善することが判明した。また、脳微小血管中にはタイプI-NOSに類似したタイプのNOSが存在する可能性も示唆された。

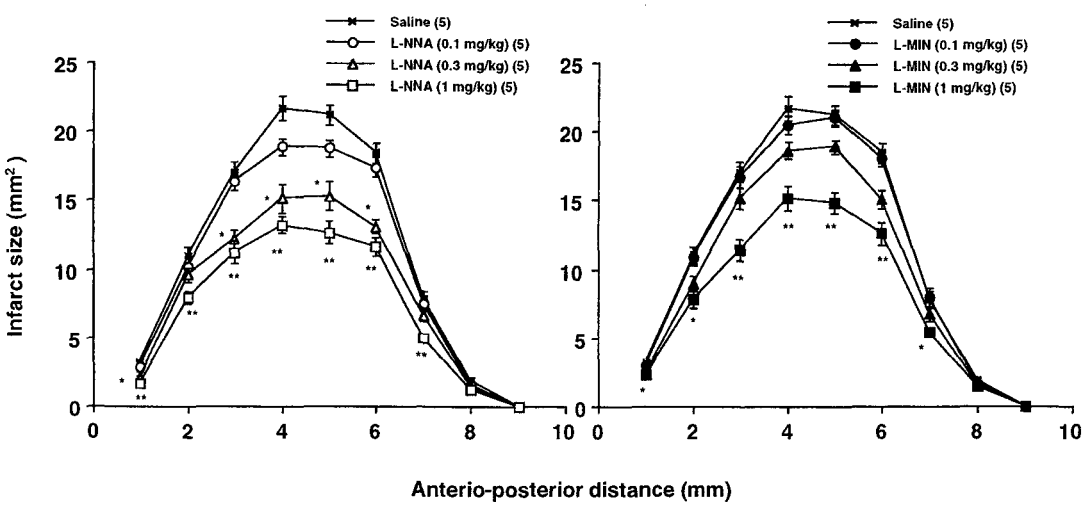
[緒言]近年、脳虚血中と再灌流中に脳内のNO産生は増大し、L-NNAやN^G-nitro-L-arginie-methylester (L-NAME)はこれを抑制し、かつ脳損傷を軽減するといった報告が集積しつつある(7,8)。しかしながら、L-NNAやL-NAMEの治療有効用量範囲は比較的狭い(4,7)。この理由の一つとして、これらの化合物は特定のNOSアイソフォームに対する選択性が低いことが考えられる(7)。今回、我々はタイプI-NOSに選択性が高い化合物を見い出し、本化合物のラット一時的局所脳虚血モデルに対する作用を検討した。

[実験方法]各NOSアイソフォーム画分、シナプトゾーム画分、及び脳微小血管画分の調製、並びにNOS活性の測定：我々の既報の方法(1,2,6,7)に従って行った。MCA閉塞モデル：SD系ラット(雄)を30 % O_2と70 % N_2Oで希釈した1.5-2.0 %ハロセンにより吸入麻酔し、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。2時間後ミニクリップをはずし、2時間再灌流を行った(3,6,7)。中外製薬（株）で合成したL-NNAあるいはL-MIN（0.1, 0.3, 1 mg/kg, i.p.）をMCA閉塞直後と再灌流直後に投与した。再灌流を行った脳から作成した冠状断連続切片をHE染色し、梗塞巣を定量した(3,4,7)。Western blotting：大脳皮質可溶性画分、シナプトゾーム画分、及び脳微小血管画分を我々の既報の方法(5)に従って調製後、8% SDS-PAGEを行った。ニトロセルロース膜に転写後、タイプI-NOSに対するモノクローナル抗体(1μg/ml, Transduction labs)、二次抗体と順に反応させ、ブロットはECL法で検出した。

[結果及び考察]新規に合成した化合物であるL-MINのタイプI-NOS活性に対する阻害効果は、既知NOS阻害剤の中では最も強いL-NNAより約3倍強く、そのIC_{50}値は 5.7 nMであった。L-MINのタイプII-及びタイプIII-NOSに対するIC_{50}値は、それぞれ 247.6 nM、238.1 nMであり、L-MINはタイプI-NOSに対して強力かつ選択的な阻害剤であることが示された。L-MIN(0.1,

0.3,1 mg/kg, i.p.)あるいは同用量のL-NNAをラットMCA閉塞直後及び再灌流直後に投与し、一時的局所脳虚血による梗塞巣形成に対する効果を検討したところ、L-MIN及びL-NNAは用量依存的に梗塞巣面積を縮小させ、L-MINは1mg/kgの用量でL-NNAは0.3と1 mg/kgの用量で有意であった（Fig. 1）。この実験成績により、タイプI-NOS選択的阻害剤 L-MINは虚血性脳血管障害の治療において有益である可能性が示唆された。L-MINはL-NNAに比べ特にタイプIII-NOSに対する阻害活性が弱く、治療有効用量範囲が広がる結果が期待されるが、この証明にはより高用量の投与による検討が必要である。脳微小血管中のCa^{2+}依存性構成型NOSとタイプI-NOSは、L-MINや既存のNOS阻害剤に対してほぼ同一の阻害感受性を示し、大脳皮質可溶性画分、シナプトゾーム画分、及び脳微小血管画分のNOSのL-arginineに対するKm値もほぼ一致した。さらに、タイプI-NOSに対する抗体を用いたWestern blotを行った結果、大脳皮質可溶性画分、シナプトゾーム画分、及び脳微小血管画分全て約155 kDaの単一なバンドが認められた。これらの実験結果は、脳微小血管中のCa^{2+}依存性構成型NOSはタイプIII-NOSよりもむしろタイプI-NOSに類似していることを示している。また、脳虚血と再灌流中に脳微小血管中のNOS活性は上昇するという以前の我々の実験成績(6,7,8)を考え合わせると、虚血性脳血管障害による細胞損傷において、タイプI-NOSと共に脳微小血管中のNOSが深く関与することが示唆される。以上より、L-MINはタイプI-NOSに対して強力かつ選択的な阻害剤であり、一時的局所脳虚血後の梗塞巣形成を軽減することが示された。本化合物は、タイプI-NOS由来の生体内NOの機能を探る上で有用であろう。

Fig. 1. Effects of L-NNA and L-MIN on brain infarction after reversible MCA occlusion



[参考文献]

1. Nagafuji T. et al. (1992) J. Neurochem. 58, 362-368.
2. Nagafuji T. et al. (1992) Brain Res. 571, 265-271.
3. Nagafuji T. et al. (1992) Neurosci. Lett. 147, 159-162.
4. Nagafuji T. et al. (1993) Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol. 248, 325-328.
5. Takuwa Y. et al. (1993) J. Cereb. Blood Flow Metab. 13, 409-415.
6. Nagafuji T. et al. (1994) Acta Neurochir. 60, 285-288.
7. Nagafuji T. et al. (1995) Mol. Chem. Neuropathol. (in press).
8. 長藤寿昭、松居　徹 (1995) 実験医学増刊号「NO研究の最前線」(印刷中).

119 脳虚血時のヒトグルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の逆行性輸送について

山下　拓史、川上　秀史、張　玉祥、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hGluT-1を発現したhGluT-HeLaS3細胞を使って、脳虚血時に起こるトランスポーターを介した逆行性輸送によるグルタミン酸の放出の速度および放出量を検討した。hGluT-HeLaS3細胞にグルタミン酸を取り込ませた後、細胞外Na^+濃度($[Na^+]o$)を低下させると、hGluT-1を介した逆行性輸送によるグルタミン酸の放出を認め、脳虚血時において$[Na^+]o$が低下する範囲内でも逆行性輸送が起こることが確認された。逆行性輸送の速度($[Na^+]o = 0mM$)は、通常の取り込み速度の7.9倍も速く行われ、3分間で全取り込み量の48%が放出された。この逆行性輸送は、100 μM以上の細胞外グルタミン酸により抑制された。脳虚血時に細胞内外のNa^+とK^+の濃度勾配が破綻した時には、通常の取り込みをはるかに上回る速度で大量のグルタミン酸がトランスポーターによって放出されることが示された。

〔目的〕

神経細胞やグリア細胞の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を取り込み、神経毒性のない低い濃度に維持している(1)。このグルタミン酸の取り込みは、細胞内外のNa^+とK^+の濃度勾配に依存している。脳虚血時にこの濃度勾配が破綻すると、グルタミン酸がトランスポーターを介して逆方向に輸送され細胞外に放出されることが知られている(2)。今回われわれは逆行性輸送によるグルタミン酸放出の速度および放出量をヒトグルタミン酸トランスポーターhGluT-1 (3)を発現したhGluT-HeLaS3細胞を使って検討した。

〔方法〕

1. hGluT-1を安定発現したhGluT-HeLaS3細胞の確立とグルタミン酸取り込みの解析

電気穿孔法(200 V, 1600 μF)により、hGluT-1を組み込んだvectorのpcDNA3hGluT-1 (20 μg)をHeLaS3細胞(1 x 10^7)に導入した。geneticinにより細胞を選択し、最も高いグルタミン酸取り込み活性を示したコロニーからhGluT-HeLaS3細胞を確立した。この細胞をKrebs-Ringer HEPES (KRH) buffer中で、37℃でL-[^{3}H]glutamic acidと共にincubateし、細胞内に取り込まれたL-[^{3}H]glutamic acidの放射活性を測定した。NaClをLiClに換えたKRH bufferを用いて同様の実験を行ない、両者の差を取り込み量とした。

2. hGluT-1を介したグルタミン酸の逆行性輸送の解析

hGluT-HeLaS3細胞をL-[^{3}H]glutamic acid(50 nM)を加えたKRH buffer中で37℃で15分間取り込ませた。bufferを取り除き、Na^+濃度の低いKRH buffer (x mM NaCl, 127-x mM LiCl)に暴露させた時に細胞外に放出されるL-[^{3}H]glutamic acidの放射活性を測定した。

〔結果と考察〕

hGluT-HeLaS3細胞はNa^+依存的に高親和性のグルタミン酸取り込みを示し、Michaelis定数(K_m)は21.7 μM、最大速度(V_{max})は1322 pmol/mg protein/minであった。hGluT-HeLaS3細胞のL-[^{3}H]glutamic acid(50 nM)の取り込みは20分まで直線的に増加し、その後飽和した。hGluT-

HeLaS3細胞はHeLaS3細胞に比べ、最大13.2倍の取り込みを示した(Fig. 1)。

脳虚血時には、細胞内のATP濃度が低下するため、Na^+-K^+ pumpの機能が低下し、細胞外K^+濃度が序々に上昇し始める。細胞外K^+濃度の上昇は神経細胞を脱分極させ、細胞内のNa^+濃度が上昇し、細胞外Na^+濃度($[Na^+]o$)が最低で80mMまで低下する(4)。このようにNa^+およびK^+の濃度勾配が破綻した状態では、トランスポーターを介してグルタミン酸が逆行性輸送される。今回われわれは、$[Na^+]o$の低下によるhGluT-1を介したグルタミン酸の逆行性輸送を認め、脳虚血時において$[Na^+]o$が低下する範囲内でも逆行性輸送が起こることが確認された(Fig. 2)。また、逆行性輸送の速度($[Na^+]o$ = 0mM)は、通常の取り込み速度の7.9倍も速く行われ、3分間で全取り込み量の48%が放出された(Fig. 3)。この逆行性輸送は、100 μM以上の高濃度の細胞外グルタミン酸($[Glu]o$)により抑制された(Fig. 4)。今後はこの逆行性輸送を抑制 する物質の発見が期待される。

Fig. 1

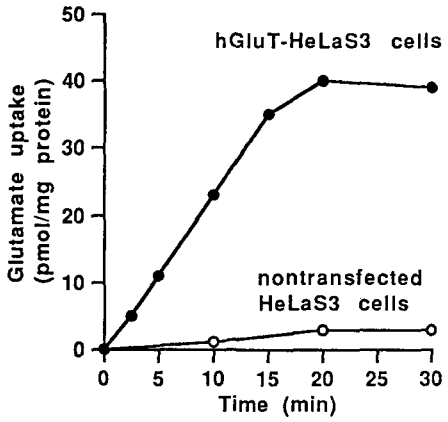


Fig. 2

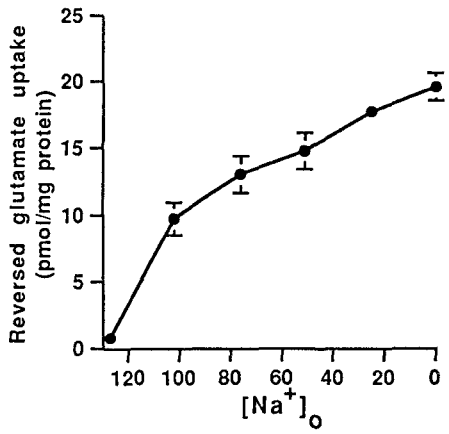


Fig. 3

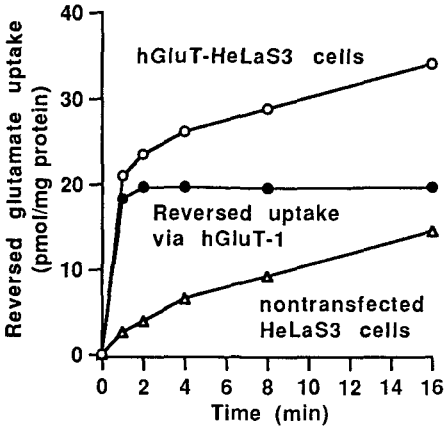
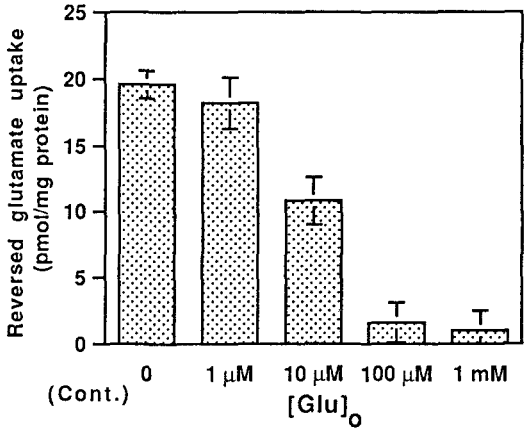


Fig. 4



1. Hertz, L. (1979) Prog. Neurobiol. 13, 277-323
2. Szatkowski, M., Barbour, B., and Atwell, D. (1990) Nature 348, 443-446
3. Kawakami, H., Tanaka, K., Nakayama, T., Inoue, K. and Nakamura, S. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 199, 171-176
4. Szatkowski, M., and Atwell, D. (1994) Trends Neurosci. 17, 359-365

120 慢性脳血流低下による神経軸索とミエリンの経時的変化

車谷隆宏、武田雅俊、工藤　喬、以倉康充、西村　健
（大阪大学・精神医学教室）

要約）
慢性脳血流低下に伴う白質病変形成機序を解明する目的で、その構成要素である軸索及びミエリンの経時的変化について検討した。成熟砂ネズミの両側総頸動脈にコイル状クリップを装着し2カ月間飼育した慢性脳血流低下モデル動物を作成し、白質構成蛋白であるミエリン塩基性蛋白（MBP）、ニューロフィラメントH蛋白（NFH）についてELISA法による測定系を開発して両者の定量結果を経時的に検討したところ、ともに脳血流低下期間の増大に伴って減少を示し、かつMBPの減少時期がNFHに先行するとの結果を得た。この結果から、慢性脳血流低下状態の白質病変ではミエリンのみならず軸索もまた何らかの障害を受けており、かつミエリンの障害が軸索のそれに先行することが示唆された。

緒言）
我々はこれまで脳血流遮断ではなく脳血流低下状態の病理過程について検討するために、成熟砂ネズミの両側総頸動脈にコイル状クリップを装着し2カ月間飼育した慢性脳血流低下モデル動物を作成し検討してきた。このモデル動物では、水素クリアランス法により脳血流量が正常対照群の約75％に低下しており、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)]。今回は本モデル動物に特徴的である大脳白質病変の性質を明らかにするために、神経軸索の構成蛋白であるミエリン塩基性蛋白(MBP)とニューロフィラメントH(NFH)のこのモデル動物における変化を経時的に定量し、慢性脳血流低下状態の動物脳組織についてその軸索構成蛋白の経時的変化を定量的に検討した。

方法）
1．慢性脳血流低下モデル動物の作製
成熟砂ネズミ（雌、体重60-80g、日本SLC）の片側総頸動脈をペントバルビタール麻酔下に露出し、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た。1週間の回復後に他側の総頸動脈にも同様の手技によりコイル状クリップを装着し、一定期間飼育した動物を慢性脳血流低下群とした。一方、コイル状クリップを総頸動脈に触れる操作だけの偽手術を行なったものを対照群とした。
2．ELISA測定系
断頭直後に氷冷下で脳を摘出し白質を切り出した後、4倍容のバッファーを加えてホモジェネナイザーにて脳白質ホモジェネートを作製した。
対照群(N=12)、1週群(N=10)、2週群(N=12)、1カ月群(N=13)、および、2カ月群(N=15)について、総蛋白濃度を0.2μg/μlとなるように希釈した白質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、第2抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgGを用いたサンドウィッチ法により定量した。発色はp-nitrophenyl phosphateによりその吸光度を計測した。NFHのELISA測定系はモノクロナル抗NFH抗体、ポリクロナル抗NFH抗体を用い、その他はMBPの系に準じた。

結果）
ELISAによる定量では、脳血流低下群のMBP量は脳血流低下1週から既に減少傾向を示し、1カ月では有意に減少していた。これに対して、NFH量は脳血流低下1週、2週では全く減少傾向を示さず、脳血流低下2カ月で初めて有意な減

少を示した（図１、図２）。

考察）

今回の結果から、本モデル動物における白質病変はミエリン鞘のみならず、神経軸策の何らかの障害をも含むものであることが判った。オリゴデンドロサイトは浮腫、転移腫瘍、外傷、薬物等のストレス下で、脳組織を構成する他の細胞種に比べて容易に障害を受けやすいことが知られている[4),5),6)]。本モデル動物におけるＭＢＰの低下も、オリゴデンドロサイトが持続的な血流低下に対して比較的敏感に反応した結果ではないかと考えられる。いっぽうＮＦＨの低下は、１カ月後で初めて認められたものなので、クリップ装着直後の障害によるものとは考え難い。本モデル動物に関する以前の神経病理学的な検討で、一部の個体で１カ月以降に出現して経時的に増大する皮質の障害が認められているので[3)]、今回の結果はこれを反映している可能性がある。

今回の結果ではミエリンの異常と軸策の異常との関係の有無については不明であるが、例えばビンスワンガー病で見られる白質病変の検討の中には、オリゴデンドロサイトの障害が軸策の減少に関与することの可能性を指摘するものがある[7),8)]。今回の結果においてミエリンの障害が先行したことに注目すれば、オリゴデンドロサイトの障害が軸策の減少に関与することの可能性が挙げられるものと考えられる。

文献）

1)T.KUDO et al.,Stroke 1990;21:1205-9
2)T.KUDO et al.,Stroke 1993;24:259-65
3)H.HATTORI et al.,Acta neuropathol Berl 1992;84(4):432-42
4)I.Feigin et al.,J Neuropath Exp Neurol 1963;22:500-11
5)E.Sluga,Brain edema, ed. by Klatzo I et al., 1967;223-39, Springer, Berlin-Heidelbelg-NY
6)I.Watanabe et al.,Acta Neuropath Berl 1976;35:1-12
7)H.Yamanouchi et al.,J Neurol 1989;236:382-7
8)H.Yamanouchi et al.,Acta neurol Scand 1991;83:301-5

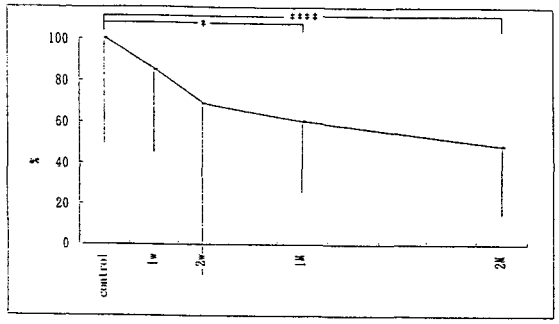


図１　脳血流低下によるミエリン塩基性蛋白(MBP)の経時的変化。ELISA法により白質ホモジェネートのMBPを定量した。実験群のMBP量の経時的変化を対照群を１として標準偏差と共に表示した。
*:0.025<p<0.05
****:0.005<p<0.01

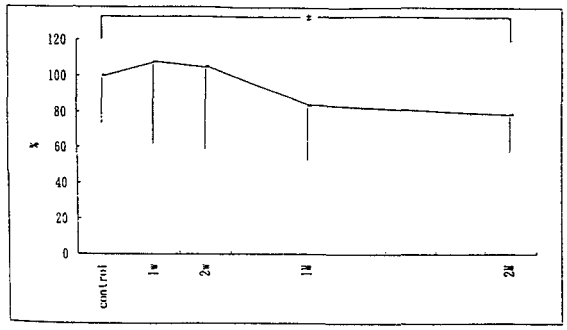


図２　脳血流低下によるニューロフィラメントH(NFH)の経時的変化。ELISA法により白質ホモジェネートのNFHを定量した。実験群のNFH量の経時的変化を対照群を１として標準偏差と共に表示した。
*:0.025<p<0.05

121 グルタミン酸細胞死と活性酸素種

安井裕子[1]，馬渡一浩[2]，本間啓子[2]，加藤　聖[1]
（[1]金沢大・医・神経情報研伝達，[2]金沢大・医療短大・衛生）

〔要約〕 我々は，既にＣ６グリオーマ細胞のグルタミン酸による細胞死が，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た。さらに，ＧＳＨ枯渇以降の酸化的ストレス状況下において，細胞膜脂質過酸化の増加，核内ＤＮＡの断片化，細胞内ＡＴＰ濃度の低下を中心とする細胞内障害が発生することを明らかにした。そこで今回，これらの細胞内障害をもたらす酸化的ストレスの実態，および細胞死抑制物質の検討から，この遅延型細胞死の成因解明にせまることにした。その結果，グルタミン酸による細胞死に先立って細胞内活性酸素種（ＲＯＳ）が約３倍に増加した。また，カタラーゼ，ＴＭＰＯ，ＰＢＮ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。同時に，これらの物質による細胞内ＲＯＳの消去効果が認められた。しかしながら，細胞内ＧＳＨの減少は補償されなかった。以上の事実から，このグルタミン酸細胞死に活性酸素種としてO_2^-，H_2O_2および・OHの関与が強く示唆され，これらラジカルスカベンジャー等は，直接に細胞内ＲＯＳの消去に働くことが考えられた。

〔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濃度維持機構として重要な役割を果たしている（３,４,５）。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）。さらに，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を指標として，生化学的に検討した（７）。そこで今回，このグルタミン酸による細胞死に関与する活性酸素種の実態を明らかにし，各種ラジカルスカベンジャーによる消去効果並びに，細胞死抑制効果を検討したので報告する。

〔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。活性酸素の産生は，2,7-dichlorofluorescin diacetate（DCFH-DA）を用いるBondyらの方法（１,６）より，一定時間内に産生される2,7-dichlorofluoresœin（DCF）を測定することにより評価した。抗酸化剤やラジカルスカベンジャーとしてビタミンＥ，ＳＯＤ，カタラーゼ，tetramethyl-pyrroline N-oxide（TMPO），α-phenyl-N-t-butylnitrone（PBN），dimethylthiourea（DMTU），deferoxamine mesylate，マンニトール，アスコルビン酸をグルタミン酸と同時添加しその効果を検討した。細胞死の判定は，ＬＤＨ活性の測定にて行った。また，細胞内ＧＳＨの測定は既報に従った（４）。

〔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細胞内ＤＣＦを経時的に測定したところ，添加１５～１６時間で有意に増加し，２０～２２時間では対照に比して約３倍に増加した（図１）。添加２４時間以降では，細胞死に伴い測定は困難となった。次に，グルタミン酸にビタミンＥ，カタラーゼ，O_2^-や・OHのトラップ剤であるＴＭＰＯやＰＢＮを添加

し培養したところ細胞死が有意に抑制され，同時に細胞内ＤＣＦの産生も有意に低下していた（表１）。しかしながら，これらの物質は細胞内ＧＳＨの減少を補償しなかった。さらに，ＳＯＤ，ＤＭＴＵ（・OHスカベンジャー），deferoxamine mesylate（Fe^{3+}キレーター），マンニトールやアスコルビン酸を同時添加したが，これらの物質には細胞死抑制効果やＤＣＦ産生の抑制効果は認められなかった。

〔考察〕

Ｃ６グリオーマ細胞におけるグルタミン酸添加後の遅延型細胞死において　１）細胞死に先立つ細胞内ＲＯＳの増加，２）ビタミンＥ，カタラーゼ，ＴＭＰＯ，ＰＢＮの添加による有意な細胞死抑制効果，３）これらの物質による細胞内ＲＯＳの消去効果，４）この時，細胞内ＧＳＨの減少が補償されないことが明らかとなった。以上のことから，このグルタミン酸細胞死に活性酸素種としてO_2^-，H_2O_2および・OHの関与が強く示唆された。また，上記の細胞死抑制物質はシスチン／グルタミン酸交換輸送系に作用するのではなく，直接に細胞内ＲＯＳの消去に働くことが考えられた。さらに，Fe^{3+}キレーターによる細胞死抑制効果が認められなかったことから，・OHの発生にFenton型Harber-Weiss reactionの関与は（２）は明らかではなかった。

図１．細胞内ＤＣＦ産生の経時的変化

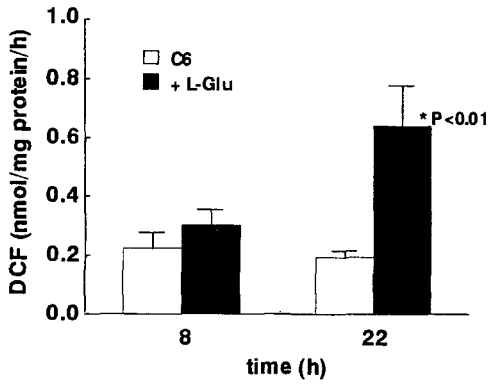


表１．スカベンジャーによる細胞内ＤＣＦ産生抑制効果

	DCF formed (nmol/mg protein/h)
Control	0.19 ± 0.03
L-Glutamate(10mM)	0.63 ± 0.14
L-Glutamate+TMPO(3mM)	0.43 ± 0.07 *
L-Glutamate+PBN(2mM)	0.38 ± 0.10 *
L-Glutamate+vitaminE(100μM)	0.15 ± 0.03 **

(* P<0.05, ** P<0.01)

〔文献〕

1. Bondy, S. C., and Lee, D. K. (1993) *Brain Res*. **610**, 229-233
2. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1989) Free radicals in biology and medicine , 158-173
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. Lebel, C. P., and Bondy, S.C. (1990) *Neurochem Int*. **17**, 435-440
7. 馬渡一浩，杉谷加代，安井裕子，加藤　聖(1994) *神経化学* **33** , 252-253

122遅延性神経細胞死における神経成長因子受容体の関与

板野俊文、政田哲也*、徳田雅明**、松井秀樹**、長尾省吾*、畠瀬修**、村上哲英
（香川医科大学、生物学、脳神経外科学*、生理学**）

〔要約〕一過性の脳虚血後におこる海馬ＣＡ１領域の神経細胞死は神経成長因子の投与によって防ぐことが出来るがその作用機序は判明していない。さらにこの細胞死がアポトーシスであるか否かも議論があるところである。これらの関係を明らかにするため、我々はＮＧＦレセプターの発現を虚血後の時間経過とともに解析し、神経細胞死に先立って海馬の部位特異的に発現する事を明らかにした。このことはさらにＮＧＦレセプターが細胞死誘導タンパク質である可能性を示唆しており、先に挙げた２種の疑問に解答することが出来た。

目的　　遅延性神経細胞死（ＤＮＤ）はアポトシースであるか、否か？その性質の一部を表すＤＮＡのフラグメンテイションは証明されたが、細胞死誘導タンパク質は明らかとなっていない[4]。両者を満たして初めてこの細胞死がアポトーシスと言うことが出来る。一方Rabizadehらは本来発現されていない神経細胞にＤＮＡ導入で低親和性の神経成長因子（ＮＧＦ）受容体(ｐ７５ＮＧＦＲ)を発現させ、どの様な変化が起こるかを解析したところ、ＮＧＦ非存在下では細胞が死に至ることを証明し、ＮＧＦ受容体が細胞死誘導タンパク質の可能性を示唆した[2]。既に本邦でもShigenoらによってＤＮＤはＮＧＦ投与によって阻止されることは報告されている[3]。つまりＤＮＤでもｐ７５ＮＧＦＲが細胞死誘導タンパク質として作用する可能性があるということを示唆する。本実験ではこれを証明するためＤＮＤにおけるｐ７５ＮＧＦＲの発現を免疫組織化学的に解析したので報告する。

方法　　オス砂ネズミ（７０－９０ｇ）を全ての実験に用いた。ペントバルビタール（１０ｍｇ／ｋｇ）とエーテルで麻酔後定法により頚部を切開し、片側の頚動脈を剥離し、ミクロクリップで５分間虚血を行った。この間体温は37.5度に管理した。クリップをはずした後、縫合を行い、２４、４８、７２、９６時間後に深麻酔科でサクリファイした。組織標本用には潅流固定を行い、脳を取り出し、ビブラトーム切片を作成しABC法で免疫染色を行った。ｐ７５ＮＧＦＲ抗体はベーリンガー社製のモノクローナル抗体を用いた。

結果　　図１のAではノーマルの免疫染色を示す。正中に近い歯状回やCA１が薄く染色されているが、神経細胞は染色されていない。Bは虚血後２４時間後の染色を示す。染色される部分は根本的にはノーマルと同様であり、大きな差は認められない。一方Cでは４８時間後を示す。全体に染色が強くなっており、ことにCA3やCA１のstratum radiatum の染色は２４時間に比較して強くなっている。この段階ではまだＤＮＤは起こっていない。Dでは９６時間を示す。特徴的なのはCA１の錐体細胞が明らかに脱落しており、脱落部に抗体が非特異的に残ったせいもあり、強く染色されている。また一方４８時間では強く染色されたCA3のstratum radiatum の染色は消失した。

考察　　従来からの一解釈として外因性のＮＧＦが前脳脳虚血に有効なのはＰ７５ＮＧＦＲをup-regulationするために細胞死を抑制したという考え方があった。しかし本研究によってＤＮＤとＮＧＦが密接に関係するが、むしろ逆にＰ７５ＮＧＦＲが細胞死誘導タンパク質として発現した時に充分なＮＧＦの供給がなければ神経細胞は死の転帰をとるとの可能性もあることを示した。。

ただ少なくともこれから明らかにしなければならないいくつかの問題がある。

実験開始の当初Ｐ７５ＮＧＦＲの発現はCA１のみに限られると予想していたが、現実にはかなり広範に、また時間依存性の変化を示すように発現した。これを合理的に解釈しようとすると、単なるグルタミン酸系のみの関与では遅延性神経細胞死を説明できない。無論ＤＮＤ起こすのはＣＡ１領域の錐体細胞であるから、細胞内の情報伝達系はグルタミン酸系のみに絞って考えることは問題がない。しかしそれにいたるまでにはコリン作動性の神経回路網も関与も考慮する必要がある。現実に中隔野ー海馬神経回路網がＤＮＤと密接に関係しており、中隔野ー海馬切断しておくと、虚血に伴う海馬細胞死はおきないことが報告されている[1)]。最近神経栄養因子はグリアや他の因子（たとえばインターリューキン）とも関係していることも報告されており、従来のようなグルタミン酸系のみに限られた解析では全容を明らかにすることは出来ないと考える。

またＰ７５ＮＧＦＲのアンチセンス等によるダウンレギュレーションが細胞死を抑制するか否か？ＤＮＤの抑制や増悪をおこす薬物とＰ７５ＮＧＦＲの発現量に相関関係があるか否か？等明らかにせねばならない問題は多い。現在これらの課題を検討している。

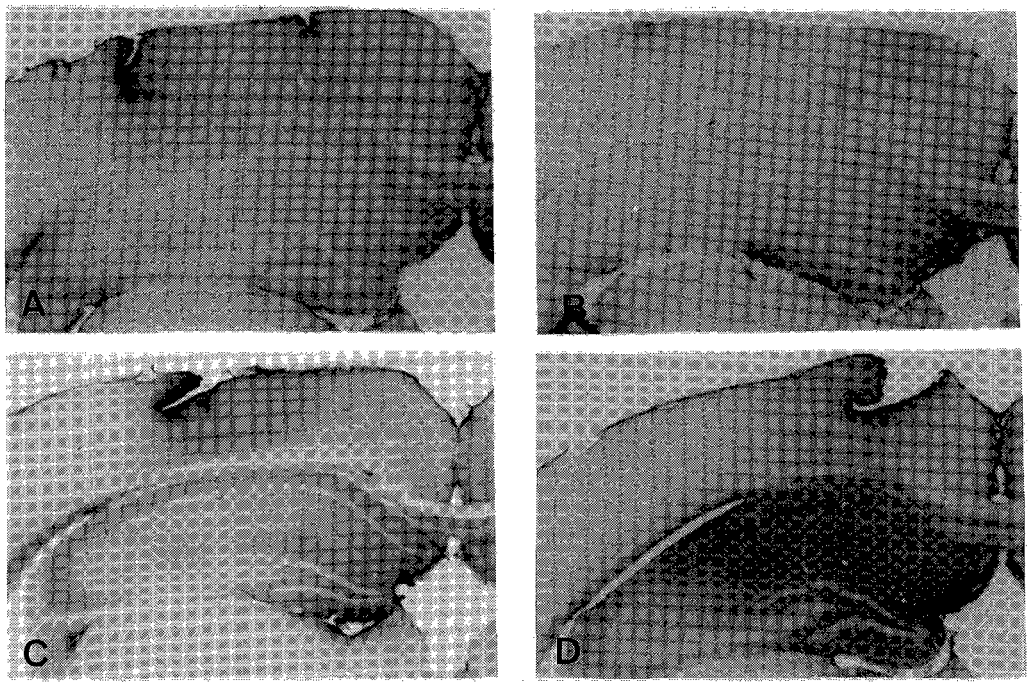


図１　Ｐ７５ＮＧＦＲの免疫組織化学的解析：
A，コントロール；　B，虚血後２４時間；　C，虚血後４８時間；　D，虚血後９６時間

文献

1) Buchan, A. and Pulsinelli, W., Septo-hippocampal deafferentation protects CA1 neurons against ischemic injury. Brain Res. 512:7-14 (1990)

2) Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L-T, Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L. and Bredesen, D.E., Induction of apoptosis by the low-affinity NGFreceptor. Science 261:345-348(1993)

3) Shigeno, T., Mima, T., Takakura, K., Graham, D.I., Kato, G., Hashimoto, Y., Furukawa, S., Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. J. Neurosci. 11:2914-2919 (1991)

4) 佐野圭司監修　田村晃、早川徹、桐野高明、小暮久也編集、　脳虚血Update，文進堂　(1994)

123 過酸化水素の Glioma 細胞障害活性に及ぼす細胞内グルタチオン濃度の影響

飯田 昌孝、松本 清、坂上 宏*、竹田 稔*
(昭和大学 脳神経外科、第1生化学*)

〔要約〕 過酸化水素は3種類の Glioma 細胞株 (T98G, U87MG, KG1C) に apoptosis に特徴的な細胞容積の縮小、クロマチンの凝集、apoptotic body 産生を誘導したが、DNA fragmentation を伴わなかった。フリーラジカルによる細胞障害活性は細胞内グルタチオンにより消去されることが知られている(1)(2)。そこで、細胞内グルタチオンレベルを L-buthionine-［S,R］-sulfoximine (以下 BSO)、N-acetyl-L-cysteine (以下 NAC) を使用してそれぞれ減少および増加させたところ、BSO は濃度依存的に過酸化水素の細胞障害活性を増強させたものの、NAC は過酸化水素に対する保護作用を顕著には示さなかった。Glioma 細胞株の細胞あたりのグルタチオン量はヒト白血病細胞株のそれの 8～344 倍であった。以上の結果より、白血病細胞株と比較して有意に高い Glioma 細胞株の抗癌剤や放射線に対する耐性に、高レベルの細胞内グルタチオン濃度が関与する事が示唆された。

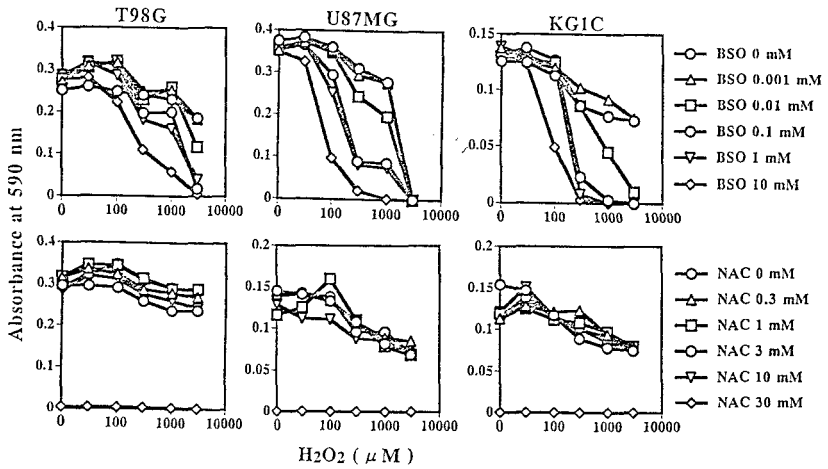
［目的］ 抗癌剤や放射線の抗腫瘍作用にはフリーラジカルの有する強い細胞障害活性が利用されており(1)(2)(3)、更にその耐性には細胞内グルタチオンが関与するといわれている。最近、フリーラジカルの一つである過酸化水素に起因する、ヒト白血病細胞株の apoptosis が報告されたが(4)、Glioma 細胞株におけるその細胞障害性と細胞内グルタチオンレベルとの関係を調べた報告はほとんどなかった。今回、我々は過酸化水素の培養 Glioma 細胞に対する細胞傷害活性が、いわゆる apoptosis の形態をとるかを先ず検証し、人為的に細胞内グルタチオンレベルを操作した条件で、細胞死と細胞内グルタチオンレベルの関係を調べた。

［方法］ Glioma 細胞株(T98G, U87MG, KG1C)を BSO (0～10mM) あるいは NAC (0～30mM) を含む RPMI 1640 培地(+ 10% FBS) 中で、予め24時間の前処置し、細胞洗浄後、30分間種々の濃度の過酸化水素とインキュベーションした。細胞洗浄により過酸化水素を除去し、更に24時間培養を続けた。付着性細胞と非付着性細胞をそれぞれ別個に採取し DNA fragmentation assey (1.8% アガロースゲル電気泳動) および、死細胞数の測定 (トリパンブルー染色) に供した。細胞中のグルタチオンは 5% TCA により抽出し、エーテル洗浄後、酵素リサイクル法により定量し、TCA 抽出残渣中の DNA 量(DAPI 法)で割り、細胞 10^6 個あたりの量に換算して表示した。

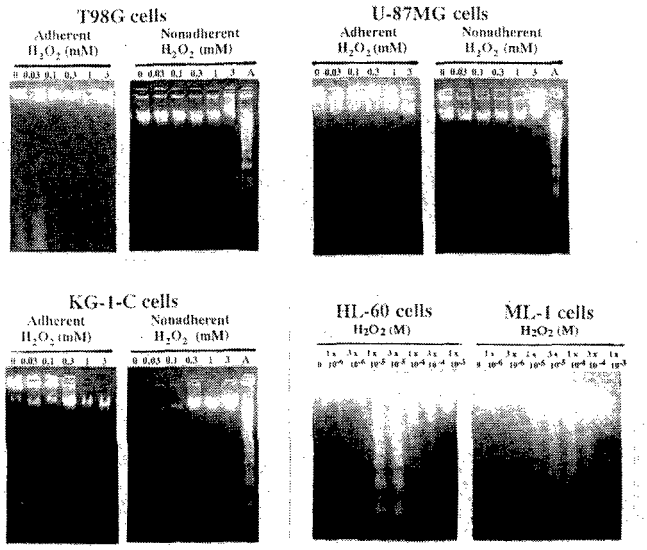
［結果および考察］ 過酸化水素 (0～3mM)と BSO (0～10mM)および NAC (0～30mM) の前処置の効果は Figure 1 に示した。BSO は濃度依存的に過酸化水素の細胞障害活性を増強させたものの、NAC は過酸化水素に対する保護作用を顕著には示さなかった。処置後の細胞には apoptosis に特徴的な細胞容積の縮小、クロマチンの凝集、apoptotic body 産生が観察された。付着性細胞と、死細胞に富む非付着性細胞の DNA の断片化を比較検討したところ、いずれの細胞でも apoptosis の生化学的指標である DNA ladder は観察できなかった(Figure 2)。未処理細胞の 10^6 個あたりの細胞内グルタチオン量は T98G (482 μg) ; U87MG (47 μg) ; KG1C (22 μg) であり、過酸化水素に対して感受性を示す、ヒト白血病細胞株 HL-60 (1.4 μg) ; ML-1 (2.9 μg) に対し 8～344 倍の高値を示した。BSO (0.1～10 mM) は濃度依存性に細胞内グルタチオンレベルをほぼ完全に枯渇させ、過酸化水素に対する細胞の感受性を亢進させた。これに対して、比較的低濃度の NAC (1～3 mM) は、細胞内グルタチオンレベルを若干増加させたが、高濃度側では細胞毒性のために細胞内グルタチオンレベルを低下させた。これに対応して、過酸化水素に対する細胞保護作用が増減した (Table 1)。NAC の酸素ストレスに対する保護作用として、細胞内グルタチオンレベルを上昇させる作用、および、種々のラジカルを消去する活性が報告されている。今回用いた系では、後者の特性が主に作用して NAC の細胞保護効果が顕著に発現されなかったものと推察される。本実験は、細胞内グルタチオンレベルを人為的に操作することにより Glioma 細胞

に薬剤感受性を賦与できる可能性を示唆する。

［文献］ 1) Bielski, B.H.J. et al. (1977) In Free Radical, in Biology, Vol.Ⅲ, 1-51
2) O' Dwyer, P.J. et al. (1992) J. National Cancer Institute 84, 264-267
3) Lai, G.M. et al. (1991) Int. J. Cancer 49, 688-695
4) Lennon, S.V. et al. (1992) Clin Exp Immunol 87, 465-471



Effect of pretreatment with BSO (upper panel) or NAC (lower panel) on H_2O_2-induced cytotoxicity (Fig.1)



Effect of H_2O_2 for DNA fragmentation in human glioma cell lines (T98G, U87MG, KG1C) and myelogenous leukemic cell lines (HL-60, ML-1) (Fig.2)

	T98G		U87MG		KG1C	
Compounds	GSH(μg)	CC50(μM)	GSH(μg)	CC50(μM)	GSH(μg)	CC50(μM)
BSO 0 (mM)	482.1	› 3000	47.4	1344	22.2	› 3000
0.001	314.3	› 3000	24.3	1271	11.1	› 3000
0.01	71.1	2134	3.7	1822	0.1	1110
0.1	6.7	1571	3.1	172	0	126
1	0	2383	2.7	207	0	149
10	0	246	1.6	54	0	62
NAC 0 (mM)	482.1	› 3000	47.4	1344	22.2	› 3000
0.3	396.5	› 3000	32.3	› 3000	22.8	› 3000
1	500.9	› 3000	34.8	› 3000	16.1	› 3000
3	302.7	› 3000	44.6	› 3000	16.9	› 3000
10	143.6	› 3000	31.4	› 3000	15.2	› 3000
30	0	Dead	2.9	Dead	0.3	Dead

(Table 1) Effect of pretreatment with BSO or NAC on the intracellular glutathione level (per 10^6 cells) and cytotoxicity of H_2O_2

124 培養アストロサイトカルシウムパラドックス障害における Na^+-Ca^{2+}交換系の役割

田熊 一敞，松田 敏夫，橋本 均，浅野省一，馬場 明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット培養アストロサイトにおけるカルシウムパラドックスについて検討した。外液Ca^{2+}除去-再負荷により，遅発性細胞死および持続的な細胞内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇が認められた。$[Ca^{2+}]_i$の上昇は，Ca^{2+}チャネル阻害薬により影響を受けずNa^+-Ca^{2+}交換系阻害薬により抑制された。モネンシンとウアバインによるNa^+-Ca^{2+}交換系を介したCa^{2+}流入によっても，同様の遅発性細胞死が認められた。カルシウムパラドックス障害の程度は，Na^+-Ca^{2+}交換系阻害作用を示すアミロライド誘導体，アスコルビン酸，タウリン，Na^+-Ca^{2+}交換系mRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドにより軽減された。

【目的】

Na^+-Ca^{2+}交換系は細胞内Ca^{2+}濃度調節に関与するアンチポーターで，細胞内Ca^{2+}濃度調節を介して細胞の生理機能，病態発現に重要な役割を果たしていると考えられている。中枢神経系においても，脳傷害や脳虚血の際のCa^{2+}流入に関与するなど，本交換系の重要性が示唆されている。我々は，神経細胞の活動環境の維持に貢献しているアストロサイトにNa^+-Ca^{2+}交換系が存在していること(1)，本交換系がアスコルビン酸により調節されていること(2)を報告している。本研究は，虚血再灌流障害におけるグリア細胞Na^+-Ca^{2+}交換系の役割および障害発現機構の解明を目的とし，培養アストロサイトにおけるカルシウムパラドックス障害について検討した。

【方法】

細胞の単離は，生後1-2日齢のS.D.系ラット大脳よりFrangakisとKimelberg(3)の方法に従って行った。10%の牛胎児血清を含むイーグル培地で10～20日培養後二次培養をし，$[Ca^{2+}]_i$測定の実験には1～2日目の細胞を，またその他の実験には10～20日のコンフルエントな細胞を用いた。カルシウムパラドックス処置は，細胞をCa^{2+}-free溶液に暴露後，正常溶液への再置換することにより行った。生存細胞数および$[Ca^{2+}]_i$測定は既報に従い，それぞれMTT法，fura-2を用いた二波長顕微分光測定法により行った(4,5)。ウエスタンブロット解析は，心臓Na^+-Ca^{2+}交換系抗体(SWant)を用いて行った。3,4-ジクロロベンザミルはKaczorowski博士(Merck Sharp & Dohme res. Lab.)より頂いた。

【結果】

培養ラットアストロサイトをCa^{2+}-free溶液に30分間暴露後，正常溶液に戻すと3～5日後に細胞死を示す核の凝集および生存細胞数の減少が認められた(Fig. 1)。一方，低酸素(60分)およびグルタミン酸(0.1～10mM，60分)暴露による遅発性細胞障害は認められなかった。Fig. 2に$[Ca^{2+}]_i$測定の結果を示す。外液Ca^{2+}除去-再灌流により持続的な$[Ca^{2+}]_i$の上昇が認められた。$[Ca^{2+}]_i$の増加は，Ca^{2+}チャンネル阻害薬により影響を受けなかったが，Na^+-Ca^{2+}交換系の阻害薬であるアミロライド，ジクロロベンザミルにより有意に抑制さ

れた。Na^+-Ca^{2+}交換系を介するCa^{2+}流入を引き起こすモネンシンとウアバインの同時処置により，カルシウムパラドックス障害と同様の遅発性細胞死が認められた。本細胞のカルシウムパラドックス障害の程度は，Na^+-Ca^{2+}交換系を促進する外液Na^+除去により促進され，Na^+-Ca^{2+}交換系を阻害するジクロロベンザミル，アスコルビン酸，タウリンにより減弱された。Na^+-Ca^{2+}交換系mRNAに対応するアンチセンスオリゴ(20-mer)前処置は，Na^+-Ca^{2+}交換系の蛋白発現ならびに活性の阻害を示し，カルシウムパラドックス障害を軽減した。

【考察】

近年，アストロサイトーマにおいてNa^+-Ca^{2+}交換系のカルシウムパラドックス障害への関与(6)を示唆する報告がなされているが，本細胞におけるNa^+-Ca^{2+}交換系の機能的役割ならびにカルシウムパラドックス障害は明らかにされていない。本研究は，グリア細胞においてカルシウムパラドックス障害が起こることを，形態学的変化，生存細胞数変化により明らかとした。本障害の発現は細胞内Ca^{2+}の増加と密接に関連しており，細胞膜Ca^{2+}輸送系阻害薬を用いた検討よりNa^+-Ca^{2+}交換系の逆モードが細胞内Ca^{2+}の増加に寄与していることが考えられた。以上の成績は，脳虚血等の脳機能障害発現においてグリア細胞Na^+-Ca^{2+}交換系が関与していることを示唆している。

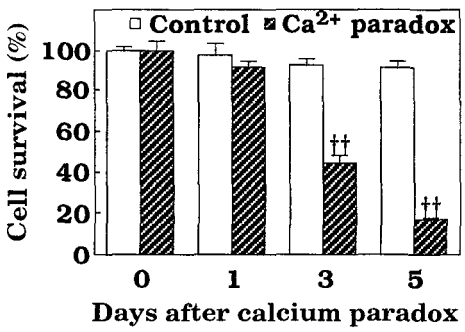


Fig. 1. Time course of cell survival after calcium paradox in cultured rat astrocytes. $^{\dagger\dagger}P<0.01$, different from control (Duncan test).

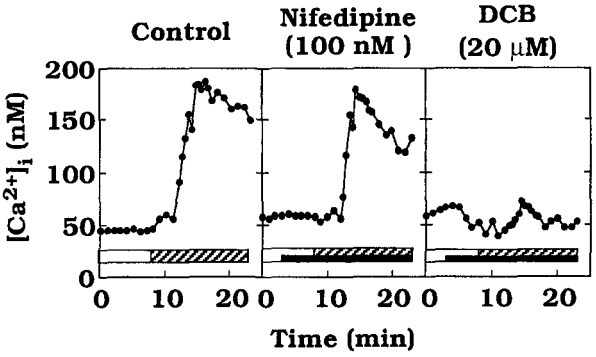


Fig. 2. Effects of Ca^{2+} channel blocker and Na^+-Ca^{2+} exchange inhibitor on Ca^{2+} reperfusion-induced increase in intracellular Ca^{2+}.

【文献】

1) Takuma, K., Matsuda, T., Hashimoto, H., Asano, S. & Baba, A. (1994) *Glia* **12,** 336–342.

2) Takuma, K., Matsuda, T., Asano, S. & Baba, A. (1995) *J. Neurochem.* **64,** 1536–1540.

3) Frangakis, M. J. & Kimelberg, H. J. (1984) *Neurochem. Res.* **9,** 1689–1698.

4) Matsuda, T., Murata, Y., Kawamura, N., Hayashi, M., Tamada, K., Takuma, K., Maeda, S. & Baba, A. (1993) Arch. Biochem. Biophys. **307,** 175-182.

5) Takuma, K., Matsuda, T., Yoshikawa, T., Kitanaka, J., Gotoh, M., Hayata, K. & Baba, A. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. **199,** 1103–1107.

6) Kim-Lee, M. L., Stokes, B. T. & Yates, A. J. (1992) *Glia* **5,** 56–64.

125 ラット大脳皮質におけるニューロトロフィンとその受容体蛋白質の発現

福光秀文，古川美子，古川昭栄
(岐阜薬科大学・分子生物)

〔要約〕

胎生13から20日齢にかけてのラット大脳皮質の形成過程をニューロトロフィン (NGF，BDNF，NT-3)とその高親和性受容体 (TrkA，TrkB，TrkC) の蛋白質発現の観点から観察した。1) 大脳皮質最外層では NT-3と TrkB が全ステージで強く発現し，BDNF，TrkC は一過性で中等度または弱い発現が観察されたが，NGF，TrkAの発現は見られなかった。2) 脳室周囲層では全ステージで NT-3，BDNF の強い発現と，TrkBの中等度の発現が見られた。3) 放射状グリア上を移動中と考えられる細胞にも NT-3，BDNF，TrkB の発現が認められた。以上の結果は複数のニューロトロフィンとその高親和性受容体の発現が特定の時期，部位に調節されていることを示しておりこれらの協調的相互作用が大脳皮質構築に重要な役割を担っていると推定された。

[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 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り，成熟ラット脳では海馬や大脳皮質のほか多種多様なニューロンに分布している[1),2)]。しかし脳の形成・発達過程におけるニューロトロフィンとその高親和性受容体である Trk ファミリーの発現に関する知見は乏しく，生理的役割は不明のまま残されている。ニューロトロフィンの産生・応答がいつ，どのニューロン間で成立し，それがニューロンの死，移動，分化シナプス形成や神経回路網の構築・維持とはとどのように関わっているのか，などの諸問題を明らかにするために我々はラット脳の発生過程における NGF，BDNF，NT-3 およびその受容体蛋白質 TrkA，TrkB，TrkC 免疫交叉活性の分布を検討している。今回，大脳皮質の発達に伴う発現について報告する。

[方法]

特異抗体：NGF，BDNF，NT-3 にそれぞれ特異的な配列のペプチドを抗原としてウサギで抗体を作製し，マウス顎下腺 NGF，組換え型 BDNF，NT-3 を用いた Western blotting 法により特異性を確認した。TrkA，TrkB，TrkC のペプチドに対するウサギ抗体は Santa Cruz社より購入し脳組織の Western blotting により確認した。抗 Myelin associated protein (MAP) II モノクローナル抗体は Amersham 社より購入した。

免疫染色：胎生 (E)13，15，18，20日齢ラットを麻酔下細断，4% パラホルムアルデヒドで 2 時間固定後，常法に従い凍結包埋した。以後の方法については昨年の神経化学会に報告したものに準ずる。

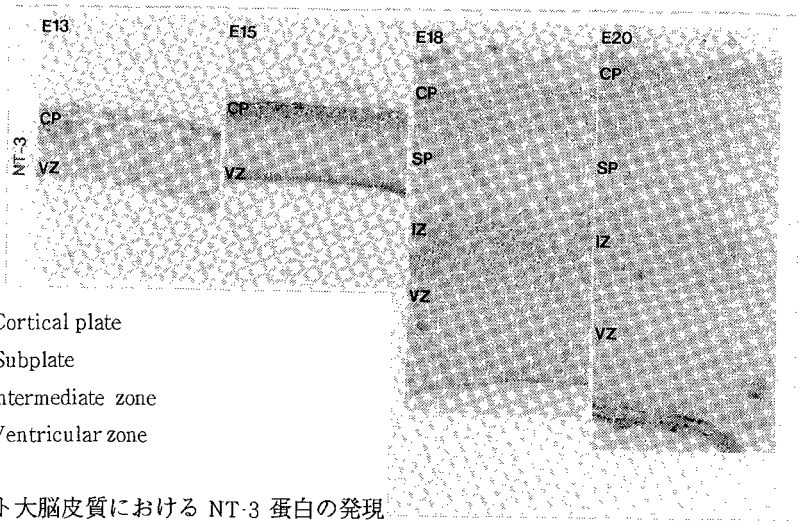
[結果]

ニューロトロフィンおよびその受容体は，中枢のみならず末梢神経系にも特異的分布を示したが，今回は大脳皮質発達過程での発現に焦点を当てた。まず cortical plate 領域では，最外層の細胞層に E13，15，18，20 の全てのステージで NT-3 と TrkB が発現していた。BDNF も同じ領域に E13，15 で発現が認められたが，E18 では減弱した。NGF は E20 でのみ弱い発現が見られた。TrkA の発現は認められず，TrkC は E18 で弱く発現していた。MAP II は E13 で cortical plate 最外層の細胞の一部が陽性となり E15 以降ほとんどが陽性となった。一方脳室周囲層 (ventricular zone) の細胞は，E13，

15，18，20 の全てのステージで，NT-3，BDNF の強いシグナルが，TrkB の中等度のシグナルが認められた。また，放射状グリアを介して移動中と考えられる細胞にも NT-3，BDNF，Trk B が発現していた。TrkA，TrkC，MAP II の染色はこの領域では認められなかった。

[考察]

mRNA レベルの報告[3] に一致して NT-3 の方が BDNF より脳全体の免疫染色性が高かった。MAPII の染色性の変化から判断すると皮質最外層領域の細胞のニューロンへの分化が E13 頃から始まっている。この細胞はその局在部位から，Cajal-Retzuis (CR) ニューロンであると推定される。CR ニューロンは E13 ですでに TrkB と BDNF を発現しており，細胞膜上の TrkB を介して自身が産生する BDNF にオートクライン的に応答することがニューロンへの分化を導く要因の一つと考えられた。このことは BDNF 遺伝子のノックアウトマウスにおいて大脳皮質ニューロンに parvalbumin や neuropeptide Y の発現低下が見られること[4] とも符合する。NT-3 は E13 ですでに CR ニューロンによって産生されるがその受容体である TrkC は E18 に至るまで明瞭な発現が見られず，それ以前のステージでは TrkB を介して作用する可能性も示唆された。一方脳室周囲に見られる BDNF，NT-3，TrkB の発現も注目される。この領域は，細胞分裂とそれに続く細胞移動の起始部であることから BDNF または NT-3 が増殖因子として機能している可能性もある。実際，培養下の未分化ニューロブラストの増殖が NT-3 によって促進されることが報告されている[5]。しかも放射状グリアを足場として皮質内を移動中と考えられる細胞にも NT-3，BDNF，TrkB の発現が見られたことから大脳皮質の層構造を形成するニューロンは，BDNF，NT-3 の作用を受けながら移動し，目的地で最終的に分化を完了するプロセスをたどることが示唆される。以上，未分化細胞や分化後のニューロンによって産生分泌された BDNF や NT-3 はそれらの細胞が同時に発現している TrkB を介してオートクラインまたはパラクライン的に作用し大脳皮質形成に関与することが示唆された。



CP : Cortical plate
SP : Subplate
IZ : Intermediate zone
VZ : Ventricular zone

ラット大脳皮質における NT-3 蛋白の発現

1) 杉原祐志，古川昭栄，古川美子，林恭三　生化学 66 No.7 P688 (1994) 2) 古川昭栄，杉原祐志，古川美子　神経化学 33 No.1 P670-671 (1994) 3) Jones,K.R., et al., (1994) Cell,76,989-999. 4) Peter, C.M., et al., (1990) . Neuron,5,501-509. 5) Kalcheim, C., et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1661-1665

126 BDNF による小脳顆粒細胞アポトーシス抑制の細胞内機構

久保 武一、野々村 健、小島 正己、榎戸 靖、畠中 寛
（大阪大学・蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕
生後 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 日間培養後、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。この細胞死はアポトーシスとして知られている (1)。小脳顆粒細胞アポトーシスは、脳由来神経栄養因子 (BDNF, 50 ng/ml) によって顕著に抑制されることを昨年の本学会において報告した (4)。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が、NGF には細胞死抑制効果は見られず、NT-3 は僅かであるが有意な作用を示すことも合わせて報告した。今回 BDNF のアポトーシス抑制効果をさらに検討する目的で BDNF の用量曲線を求めた。その結果、BDNF の濃度依存的にアポトーシス抑制効果が見られ、ED_{50} の値は約 1 ng/ml となった。この結果は BDNF は TrkB を介する作用であることを強く示唆している。このことは BDNF の添加にともない BDNF の高親和性レセプターである TrkB のチロシン残基がリン酸化されることによっても確かめられた。また、ノザンブロット法により培養した小脳顆粒細胞において *trk*B mRNA の発現も確認した。以上の結果から BDNF は高親和性レセプターである TrkB を介して小脳顆粒細胞のアポトーシスを阻止するものと思われる。

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、脳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 (7) など生理的なアポトーシスの系が知られている。中枢神経系においても生理的アポトーシスの系として小脳顆粒細胞が知られている (1)。この系の特長は、その細胞の均一性、量の豊富さであり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 9 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 4 日間培養後、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。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。昨年の本学会において BDNF が顕著に小脳顆粒細胞のアポトーシスを抑制することを報告したが、今回さらにその下流の細胞内シグナルを含めて BDNF の小脳顆粒細胞に対する作用を検討したので報告する。

実験方法

生後 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 (3)(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 AraC を含む高カリウム培地 (26 mM) に交換し、4 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 (2)。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。Trk のチロシンリン酸化の検出は既報に従い行なった (8)。

結果と考察

小脳顆粒細胞は高カリウム培地で 4 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) に置換するとアポトーシスを起こすが、低カリウム培地への交換と同時に BDNF (50 ng/ml) を添加しておくと顕著にアポトーシスが抑制される。この系を用いて BDNF の用量曲線を描いた（図1）。その結果、BDNF は濃度依存的にアポトーシスを抑制し、その ED_{50} 値は約 1 ng/ml であった。次に BDNF のシグナルがその高親和性レセプターである TrkB を介して細胞内に伝達されているかどうかを調べる目的で、細胞抽出液を抗 Trk 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE 後、抗ホスホチロシン抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった（図2）。その結果 BDNF を添加すると顕著な Trk のリン酸化が見られたのに対して、コントロールや NGF の添加では Trk のリン酸化は見られなかった。また NT-3 は僅かながら有為なアポトーシス抑制効果を示すが、このことから予想されるとおり NT-3 の添加により Trk のリン酸化が観察された。これは TrkC がリン酸化されたものと思われる。さらにノザンブロット法により実験に用いた小脳顆粒細胞が TrkB の mRNA を発現していることが確認された。以上の結果から BDNF は高親和性レセプターである TrkB を介して小脳顆粒細胞のアポトーシスを抑制することが強く示唆された。さらにその下流のシグナルについても現在検討中である。生体内でも生後 2 週齢前後において小脳で BDNF の mRNA の発現量が上昇することが報告されており (6)、今回得られた結果と考えあわせると生体内においても BDNF が小脳顆粒細胞の生存を維持していることが予想された。

文献

1) D'Mello, S. R. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90,** 10989–10993
2) Hansen, M. B. et al. (1989) *J. Immunol. Methods* **119,** 203–210
3) Hatanaka, H. et al. (1988) *Dev. Brain Res.* **39,** 85–95
4) Kubo, T. et al. (1995) *Dev. Brain Res.* in press
5) Lasher, R. S. et al. (1972) *Brain Res.* **41,** 482–488
6) Maisonpierre, P. C. et al. (1990) *Neuron* **5,** 501–509
7) Martin, D. P. et al. (1988) *J. Cell Biol.* **106,** 829–844
8) Yamada, M. et al. (1994) *Brain Res.* **661,** 137–146

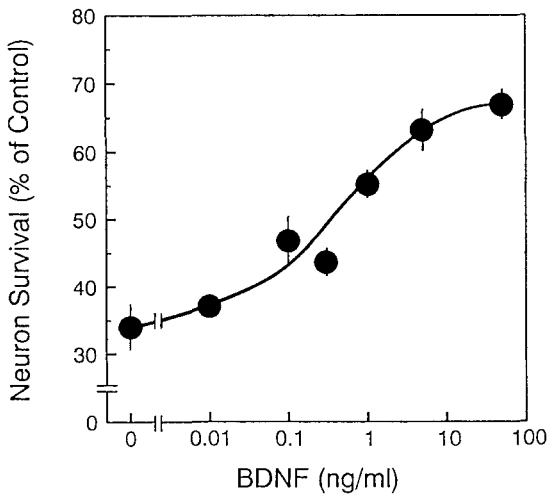


図1 BDNF の用量曲線。低カリウム培地に置換すると同時に BDNF を添加し 2 日後の生細胞数を測定した。縦軸は、高カリウム培地で培養したコントロール群に対する割合で示してある。

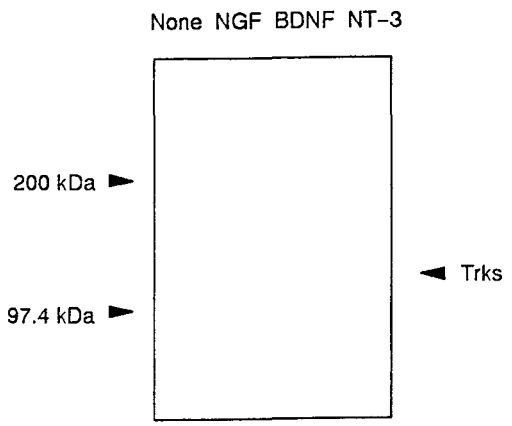


図2 Trk のチロシンリン酸化。Factor 添加 5 分後の結果を示す。用いた抗 Trk 抗体は panTrk 抗体 (8) である。

127 ラットの生後発達に伴う脳のニューロトロフィン-3の変化

仙波りつ子、加藤兼房
（愛知県コロニー・研究所）

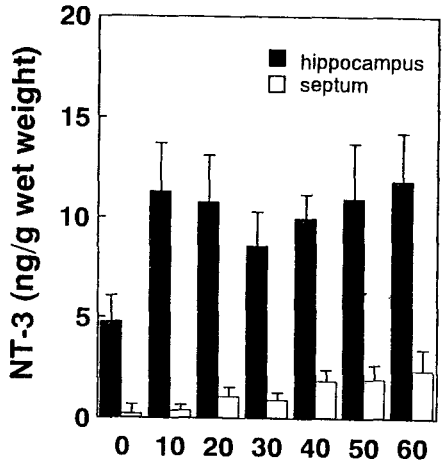
〔要約〕

生後30日齢のラット脳のニューロトロフィン-3(NT-3)は、海馬でもっとも高く、小脳、嗅球および中隔野にも検出されることをすでに報告した。今回、ラットの生後発達に伴うこれら4部位のNT-3濃度の変化を0日から60日齢まで10日おきに調べると同時に脳のNT-3プロテインの分子量を測定した。もっとも顕著な変化が見られたのは小脳で、生後30日齢以前で高く、その後減少した。海馬のNT-3濃度は0日齢以降10日齢までに2倍に増加し、わずかではあるが30-60日齢の間でやや上昇傾向を示した。中隔野では生後増加したのに対し、嗅球では、顕著な加齢変化はみられなかった。これらの結果は、NT-3がtarget-derived neurotrophic factorとして作用するだけでなく、小脳や海馬の顆粒細胞の増殖の制御に関与する可能性を示している。われわれの酵素免疫測定系に反応する海馬のプロテインはSDS-PAGEで14 kDaでありhuman recombinant NT-3と同じ分子量を示すことから、NT-3のnative formのみを測定していることが確認できた。

ニューロトロフィン-3(NT-3)は、脳では青斑核のノルアドレナリン性ニューロンの生存を支持し、末梢神経系では迷走神経や一部の交感および知覚神経細胞の生存を維持することが報告されている(1-2)。NT-3mRNAは、脳および末梢組織に比較的広く存在するが、NT-3の酵素免疫測定系の確立により、NT-3タンパクも各組織に広く分布することが明らかとなった。しかしながら、この分布はNT-3mRNAの分布と必ずしも一致せず、NT-3にclassicalなtarget-derived neurotrophic factorとしての作用以外の機能が示唆された。そこで、今回、NT-3の出現の加齢変化を調べ、機能との関連を推察した。

［実験方法］NT-3濃度：0, 10, 20, 30, 40, 50, 60日齢のラット脳から小脳、嗅球、中隔野および海馬を取り出し、既報のNT-3の酵素免疫測定系によって測定した(3)。海馬のNT-3のWestern blotting：海馬1 gをプロテアーゼ阻害剤存在下で、10容のBuffer GHでホモゲナイズし、28 000 gで20分遠心した。上清をBuffer GHで3倍に希釈したものに、NT-3のモノクローン抗体3W3を結合させたポリスチレンビーズ50個を加え,4℃で16時間撹拌した。ビーズをBuffer Aとりん酸緩衝液で3回ずつ洗浄したのち、0.4%SDSで処理した。SDS抽出物を乾燥させた後、SDSを含まないsample buffer 40 μlで可溶化した。10-20%のグラジエントゲルでSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、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］小脳のNT-3は生後30日齢以前で高く、その後低下した。この結果は、マウスの結果とその傾向が一致していた(4)。海馬では、生後0日齢で低く、その後は0日齢の約2倍の値を示し、さらに、30-60日齢の間でわずかではあるが上昇傾向を示した（図1)。嗅球では、NT-3の濃度に顕著な加齢変化はみられなかったのに対し、中



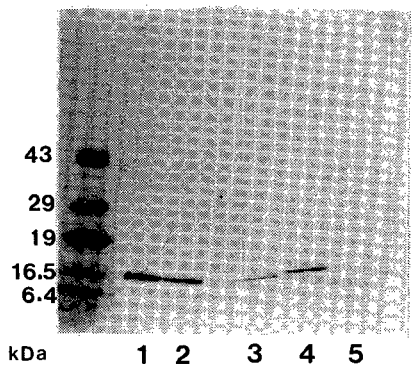


Fig. 1 (left) Developmental changes in levels of NT-3 in the septum and hippocampus.
Fig. 2 (right) Analysis of proteins that immunoreacted with the NT-3-specific antibody in the hippocampus from rats at one month of age. 1 and 2, rhNT-3 (10 and 5 ng, respectively); 3, rhNT-3 recovered from beads (5 ng); 4, hippocampal proteins recovered from beads; 5, NT-3 antibody recovered from beads.

隔野では、生後上昇した。NT-3は青斑核のノルアドリナリン性ニューロンの生存を維持することが知られている(1) が、小脳、海馬、嗅球および中隔野には青斑核からノレアドレナリン性ニューロンの軸索が侵入しており、これらの部位で産生されたNT-3がtarget-derived neurotrophic factorとして、青斑核のニューロンに作用する可能性はおおいに考えられる。また、海馬から中隔野へNT-3が輸送されることも知られていることから(5)、中隔野における生後30齢以降のNT-3の上昇は海馬のNT-3の上昇と関連があるのかもしれない。一方、NT-3mRNAがNGFやBDNFに比べ発達期の脳に高いことから、NT-3の機能として、細胞増殖を制御することが考えられている。ラット小脳では、顆粒細胞の分裂が生後6日頃に開始し、21日頃に停止する。一方、海馬でも、顆粒細胞が生後20日齢までに増殖する。NT-3濃度の高値が顆粒細胞の増殖期とよく一致しており、今回の結果は、NT-3が細胞増殖の制御に関わる可能性を支持している。われわれの酵素免疫測定系に反応する海馬のプロテインはSDS-PAGEで14 kDaとhuman recombinant NT-3と同じ分子量を示すことから（図2）、NT-3のnative formのみを測定していることも確認できた。一方、予備実験ではあるが、膵臓および脾臓のNT-3は生後急激に増加することと、胎生期の心臓や肝臓にNT-3が検出されることがわかってきている。これらの結果は、末梢組織におけるNT-3の機能が脳とは異なり複雑であることをうかがわせる。

［文献］ (1) Arenas, E. and Persson, H. (1994) Nature, 367, 368-371. (2) Rosenthal, A., Goeddel, D.V., Nguyen, T., Lewis, M., Shin, A., Laramee, G.R., Nikolics, K. and Winslow, J.W. (1990) Neuron, 4, 767-773. (3) 仙波りつ子、新谷麻江、加藤兼房 (1994) 神経化学、33, 196-197. (4) Kaisho, Y., Shintani, A., Nishida, M., Fukumoto, H and Igarashi, K. (1994) Brain Res. 666, 143-146. (5) DiStefano, P.S., Friedman, B., Radziejewski, C., Alexander, C., Boland, P., Schick, C.M., Lindsay, R.M. and Weigand, S.J. (1992) Neuron, 8, 983-993.

128 レチノイン酸およびニューロトロフィンによるtrkレセプター発現変化

小林　三和子、栗原　堅三、松岡　一郎
(北海道大学・薬・薬剤学)

〔要約〕 末梢交感神経細胞のtrkレセプター発現に対するレチノイン酸(RA)およびニューロトロフィンの作用を検討した。新生ラット由来の上頸神経節(SCG)ニューロンは高いレベルのtrkA-mRNAを発現し、神経成長因子(NGF)に依存して生存するが、0.1 μMレチノイン酸で6日間処理することにより、trkA-mRNAの減少、チロシンキナーゼドメインを含むtrkB-mRNAの発現誘導がみられた。これに一致して、レチノイン酸で処理したSCGニューロンの中には、NGF非存在下で脳由来神経栄養因子(BDNF)に依存して生存するものが出現した。このBDNF依存的に生存するSCGニューロンは、NGF存在下でレチノイン酸処理したSCGニューロン全体に比べて、さらに高いレベルのtrkB-mRNAを発現するとともに、trkA-mRNAの発現はさらに抑制されていた。また、ニューロトロフィンによるtrk-mRNAの発現変化を解析したところ、レチノイン酸存在下でBDNFがtrkA-mRNAの発現をさらに減少させることを見出した。これらの結果は通常のSCGニューロンおよびレチノイン酸によりtrkBが誘導されたSCGニューロンにおいて、NGF、BDNFはそれぞれ同様の生存維持作用を示すが、trkAの発現に対しては異なる作用を有することを示している。

〔目的〕

発達過程における神経細胞のニューロトロフィン依存性の獲得機構を明らかにするためには、ニューロトロフィンレセプター(trkおよびp75)の発現調節機構を調べることが重要である。また、発現するtrkレセプターの種類が変化することにより、ニューロトロフィン特異性が転換する例が最近報告された[1,2]。ニューロトロフィンレセプターの発現は、1)細胞の内的プログラム[3]、2)種々の分化因子[4,5]、3)リガンドであるニューロトロフィン[6]によって誘導、調節を受けると考えられる。既に我々は、SCGニューロンにおいてレチノイン酸によりtrkB-mRNAの発現が誘導されることを報告した[7]が、今回この系を用いて、レチノイン酸およびニューロトロフィンによるtrkレセプター発現変化について検討した。

〔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、既報[7]に示すように40 ng/ml マウスNGF(Promega)およびN2-supplementを含むF-12培地を用いて培養を開始した。BDNF、NT-3、NT-4はリジェネロン社より供与されたものを用いた。培養の途中でNGFを除く場合、抗NGF抗体(和光)を用いた。 RT-PCRによるtrk-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。使用したプライマー配列は既報[7]に示したとうりで、trkB-cDNAに対するプライマーは細胞内チロシンキナーゼドメインに位置するものを使用した。

〔結果と考察〕

レチノイン酸によりtrkBが発現し、BDNF依存的な生存が可能となったSCGニューロンにおけるtrkA-およびtrkB-mRNAの発現レベルについて検討した(図1)。SCGニューロンをNGF存在下±0.1 μMレチノイン酸で3日間培養後(1st treatment)、NGF＋レチノイン酸またはBDNF＋レチノイン酸を含む培地に置き換え、さらに6日間培養した(2nd treatment)。後者の処理によりtrkBを発現しない細胞は除かれ、BDNFに依存したSCGニューロンの生存率はNGF存在下で培養した時の約50 %となった。BDNF依存性のSCGニューロンにおいてはtrkA-mRNAの発現レベルはNGF存在下レチノイン酸で処理したSCGニューロン(コントロールの約50 %)よりもさらに低かった(コントロールの約20 %)。一方、trkB-mRNAの発現レベルもBDNF依存的に生存するSCGニューロンにおいては、NGF存在下レチノイン酸で処理したニューロンよりさらに高かった。BDNF依存的に生存するSCGニューロンにおいてtrkA-mRNAがさらに低いレベルであることの理由としては、1)NGFが除かれたことによる特異的な作用、あるいは、2)BDNFの特異的なtrkA発現に対する抑制作用である可能性が考えられる。

そこで、SCGニューロンのtrk-mRNA発現調節におけるニューロトロフィンの関与を明らかにするために、以下の実験を行った(図2)。SCGニューロンを、NGF(40 ng/ml)存在下BDNF(40 ng/ml)およびレチノイン酸(0.1 μM)を図中のように組み合わせて6日間作用させた。trkB-mRNAはレチノイン酸処理により顕著に発現が誘導されたが、BDNF単独処理ではこのような効果は見られなかった。BDNFとレチノイン酸の両方を

作用させてもレチノイン酸単独処理に比べてtrkB-mRNA発現量にあまり差がみられなかったことから、SCGニューロンにおいてBDNFはtrkBの発現調節に積極的に関与していないと考えられる。一方、trkA-mRNAの発現量は、レチノイン酸単独処理によってNGFのみを作用させたニューロンの約80 %であったが、BDNFとレチノイン酸の両方を作用させることにより、30 %まで減少した。この結果より、trkA-mRNAの発現調節に関しては、BDNFのtrkBレセプターの活性化を通じた抑制機構が存在すると考えられる。このようなニューロトロフィンによるtrk-mRNA発現調節が、胎生期のラット脳より調製したニューロンあるいは新生ラットのDRGニューロンにおいても同様に起こるかどうか現在検討中である。

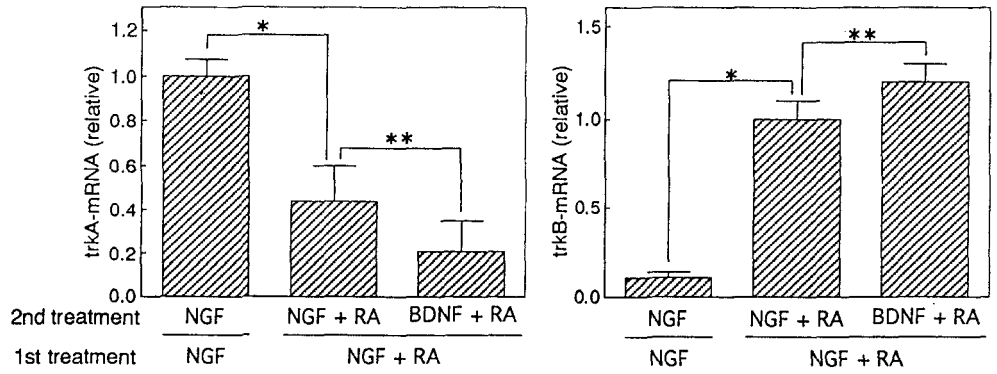


図1. BDNF依存的に生存するSCGニューロンにおけるtrkA-およびtrkB-mRNAの発現量
CGニューロンを40 ng/ml NGF存在下±0.1 μM レチノイン酸(RA)存在下で3日間培養し、その後NGF±レチノイン酸および40 ng/ml BDNF、0.1 μM レチノイン酸、5 μg/ml 抗NGF抗体を含む培地に置き換えさらに6日間培養した。 *, p < 0.001; **, p < 0.05 (n=5)

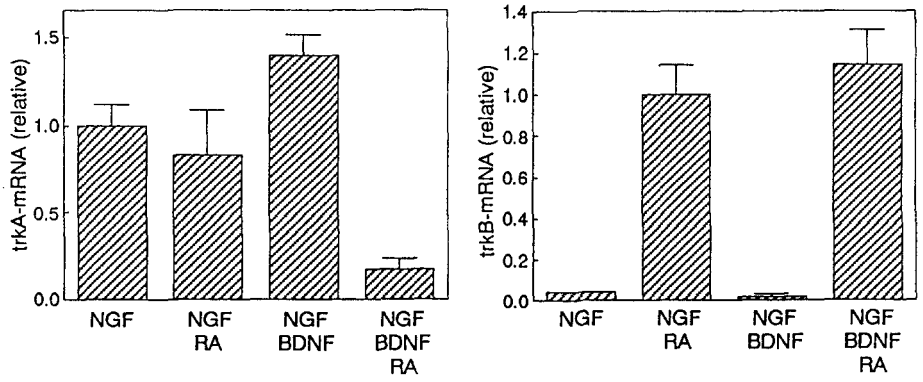


図2. レチノイン酸、BDNFによるtrkA-およびtrkB-mRNAの発現変化
SCGニューロンにレチノイン酸(RA、0.1 μM)、NGF(40 ng/ml)、BDNF(40 ng/ml)を図中に示す組み合わせで6日間作用させ、trkA-およびtrkB-mRNAの発現量をRT-PCRにより測定した。2例の平均とその範囲を示す。

〔参考文献〕

(1) Birren, S. J., Lo, L., and Anderson, D. J. (1993) *Development* **119**, 597-610
(2) DiCicco-Bloom, E., Friedman, W. J., and Black, I. B. (1993) *Neuron* **11**, 1101-1111
(3) Wyatt, S., and Davies, A. M. (1993) *Development* **119**, 635-647
(4) Rodriguez-Tébar, A., and Rohrer, H. (1991) *Development* **112**, 813-820
(5) Birren, S. J., and Anderson, D. J. (1990) *Neuron* **4**, 189-201
(6) Verdi, J. M., and Anderson, D. J. (1994) *Neuron* **13**, 1359-1372
(7) Kobayashi, M., Kurihara, K., and Matsuoka, I. (1994) *FEBS Lett.* **356**, 60-65

129 プロサポシンの末梢神経再生促進作用のターゲット神経細胞

小谷泰教[1]、松田正司[2]、阪中雅広[2]、
近藤啓次[1]、上野修一[1]、佐野輝[1]
（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し、神経栄養因子としての機能が明らかとなっている。我々はモルモット坐骨神経切除後の再生モデルを用いて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、前回の本学会で報告した。今回我々は、プロサポシンの末梢神経再生促進作用のターゲットとなる神経細胞を明らかにするため、坐骨神経切除モルモットの脊髄及び後根神経節のニューロン群に対するプロサポシンの効果を検討した。プロサポシンは、脊髄前角の大型運動ニューロン及び後根神経節の小型知覚ニューロンにおける軸索離断後のニッスル小体の変性（クロマトリーシス）および神経細胞萎縮を防止していることを見い出した。

［緒言］ 4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と考えられる[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[4)]、成長の過程で脳のシナプス形成期に豊富に出現する[2)]。中枢神経系では、海馬錐体細胞の虚血性神経細胞死を脳室内注入したプロサポシンが防止する[5)]。In situ hybridization の実験結果では、プロサポシンは後根神経節を中心とした末梢神経系にも豊富に発現している[6)]。前回の本学会において、我々はモルモット坐骨神経切除後の再生にプロサポシンが濃度依存性に再生を増加させることを示した[7)]。今回我々はこの再生促進効果が、どの神経細胞に影響を与えたのかを検討した。

［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。片側にはプロサポシンを最終濃度が20ng/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、L6～S1の脊髄及び両側L6の後根神経節を取りだし、パラフィンに包埋して落切し、クレシルバイオレット染色後、光学顕微鏡下で運動及び知覚ニューロンの数を数え、画像解析装置によって各ニューロンの断面積を計測した。更に、クロマトリーシスのグレード分類を行い、ニューロンの面積とクロマトリーシスの関係を調べた。また、脊髄に対して抗アセチルコリン合成酵素（ChAT）抗体、後根神経節に対して抗サブスタンスP（SP）抗体を用いて免疫組織化学的検討を行っている。

［結果と考察］ 脊髄、後根神経節とも、プロサポシン注入側とPBS側でニューロンの数には有意な差は認められなかったが、図1及び図2に示すようにプロサポシン注入側に比べてPBS側にクロマトリーシスが著明に認められた。プロサポシン注入側とPBS側とのニューロン群の面積及びクロマトリーシスのグレードの平均を比較したものが図3及び図4である。脊髄、後根神経節ともプロサポシン注入によりニューロンの萎縮とクロマトリーシスが防止されるという結果が得られた。また、クロマトリーシスの傾向は脊髄では大型ニューロン、後根神経節では小型ニューロンに強く認められた（図5、図6）。プロサポシンは坐骨神経切除モルモットの末梢神経再生を促進するが、今回の結果からプロサポシンは特に脊髄前角の大型α－運動ニューロン及び後根神経節の小型温痛覚ニューロンに対して作用している可能性が示唆された。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[8) 9)]海馬錐体細胞保護作用や突起伸展作用を有することが最近明らかにされている[5) 10)]。プロサポシンの分子的作用機構については未だ不明であるが、神経細胞膜に豊富な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明らかにされている[11)]。また、O'Brienらは神経細胞の細胞膜上にプロサポシン特

異受容体の存在を想定しており[10]、今後の研究が待たれるところである。

図1 脊髄前角ニューロンの変化 (Bar 10 μm)

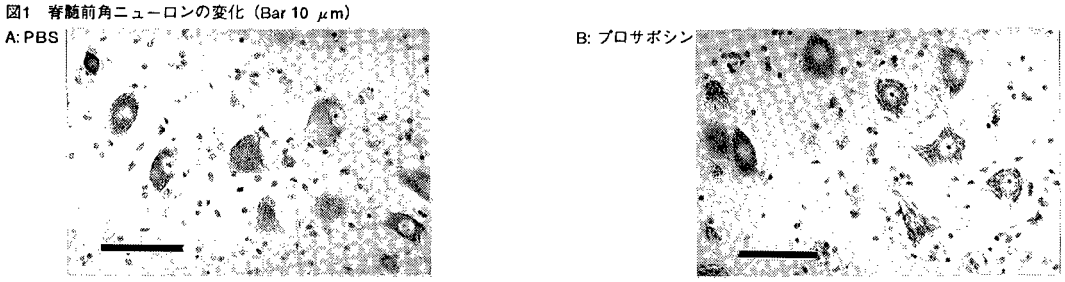
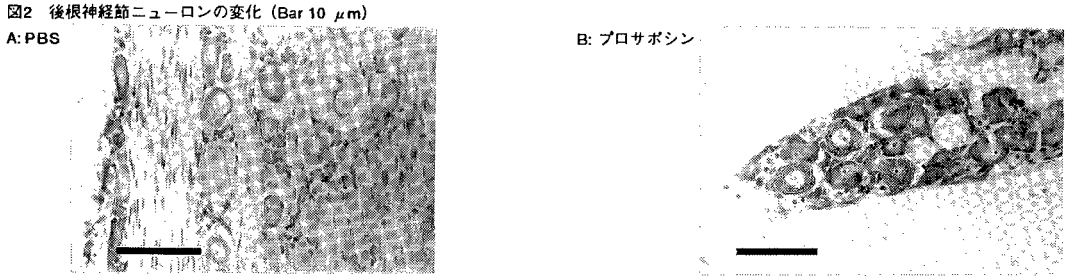


図2 後根神経節ニューロンの変化 (Bar 10 μm)



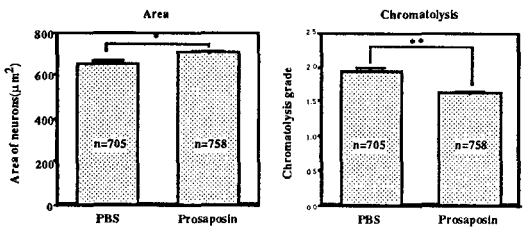


図3 脊髄前角ニューロンの面積とクロマトリーシス

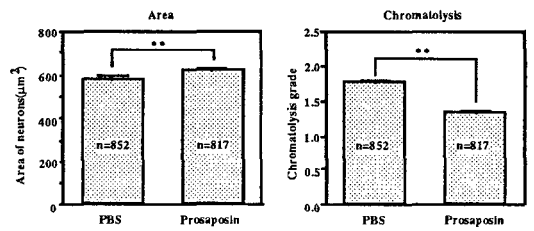


図4 後根神経節ニューロンの面積とクロマトリーシス

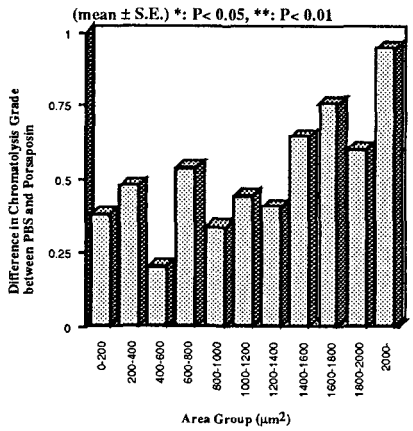


図5 脊髄前角ニューロンの面積とクロマトリーシスの関係

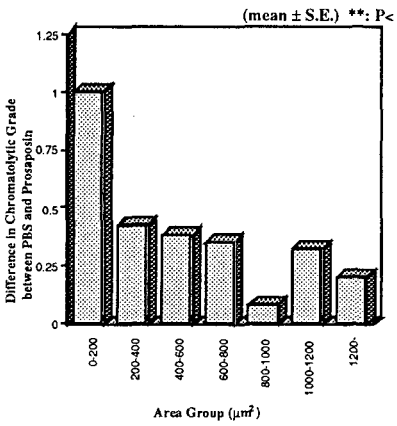


図6 後根神経節ニューロンの面積とクロマトリーシスの関係

[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) Sano A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 204: 994-1000, 1994 6) Sun Y. et al.: Am. J. Pathol. 145: 1390-1398, 1994 6) Chen Y.S. et al.: Exp. Neurol. 103: 52-60, 1989 7) 小谷ら: 神経化学 33: 190-191, 1994 8) Kondoh K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 181, 286-292, 1991 9) Itoh K. et al.: J. Biol. Chem. 268, 1180-1186, 1993 10) O'Brien J. S.et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 9593-9596, 1994 11) Hiraiwa M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 11254-11258, 1992

130 ウシ脳Con A結合性糖タンパク質中に存在する強疎水性タンパク質とそのPC12細胞に対する影響

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〕

ウシ脳抽出液中に存在するコンカナバリンA（Con A）結合性糖タンパク質の分離分析において、特にCon Aに対して強い結合性を示す強疎水性タンパク質を見いだした。このタンパク質（sGP45と命名）は、イオン交換及び疎水カラムHPLCにより分離された。分離sGP45は、二次元電気泳動分析で分子量（MW）45kDa、等電点（pI）5.0～6.0のの範囲に連続する4個のスポットとして検出された。N末端アミノ酸分析の結果は、sGP45のN末端がブロックされていることを示していた。PC12細胞に対する影響を検討した結果、突起伸長作用は、NGFに比べて弱いものの細胞の生存と生長を促進する可能性が示唆された。

《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探索をおこない、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以外にも神経系の細胞に作用する糖タンパク質がCon A結合性糖タンパク質中に存在する可能性を考え、それらの探索を目的としてさらにウシ脳Con A結合性糖タンパク質の分離分析をおこなった。

《実験方法》*1）Con A結合性糖タンパク質の調製と二次元電気泳動：*ウシ脳可溶性画分からのCon A結合性糖タンパク質の調製は、既報[1,2]に従った。二次元電気泳動(2DE)は、既報[3,4]の方法に従い、染色は、クマシー法及びCon A-パーオキシダーゼ法[4]を用いた。*2）sGP45の分離：*Con A結合性糖タンパク質画分のイオン交換HPLCによる分画後、疎水カラムを用いたHPLCにより最終的にsGP45を分離精製した。*3）PC12細胞に対する影響：*PC12細胞は、5%FBS、10%HBS、50u/mlPG、100ug/mlSMを含むRPMI1640培地中で培養し、異なる濃度の分離sGP45を各wellに添加し、10～12日間後の細胞状態を観察した。

《結果と考察》*1）Con A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。特にCon Aに対して比較的強い結合性を示すタンパク質群(図中a,b,c）のうちb群にMW45kDaでpIの異なる連続したスポットとしてのsGP45を同定した（図1bの▼）。*2）sGP45の分離精製：*イオン交換HPLCにより得たsGP45画分を疎水カラムHPLCに添加し、溶離した結果を図2示した。sGP45は、0.01Mの低濃度でほぼ単一ピークとして分離溶出されることから、強疎水性タンパク質であることを示していた。また分離sGP45の2DE像は、主要成分としてMW45kDa、pI5.0～6.0の範囲に連続した4個のスポット群、さらに同様なpIを示すMW30kDaの連続したタンパク質スポット群を与えた（図3）。凍結融解を繰り返すと相対的に45kDaのバンドが減少し30kDaのタンパク質バンドが増加することから、30kDaのタンパク質はsGP45の分解産物と考えられた。*3）PC12細胞に対する影響：*12日間培養後のPC12細胞の状態を図4に示した。NGF（図4B）と比較してsGP45の突起伸長作用は、弱いが、細胞の生存と生長を促進する可能性がコントロール（図4A）との比較から示唆された。12日間培養後のコントロールでは、多くの細胞死が観察された。

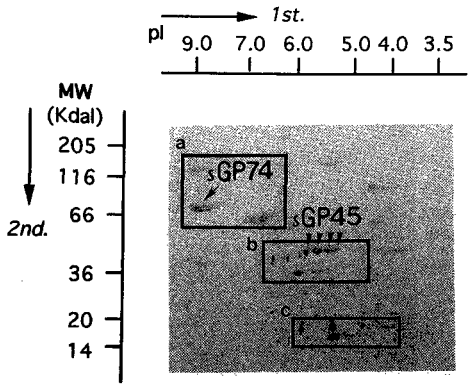


図１、Con A結合タンパク質の2DE像

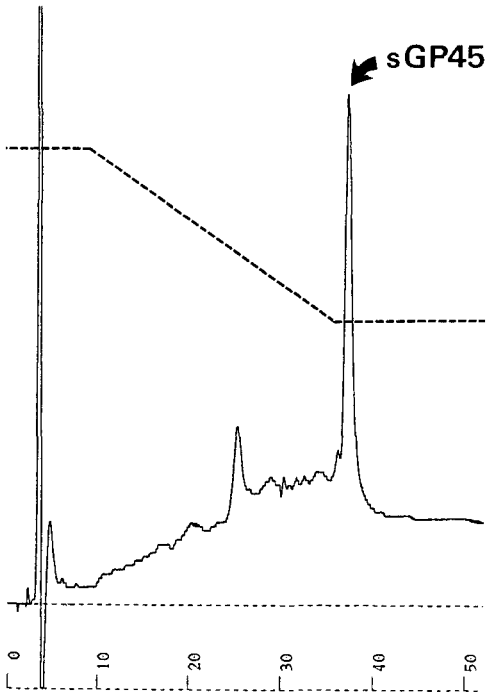


図２、疎水HPLCによるsGP45の分離

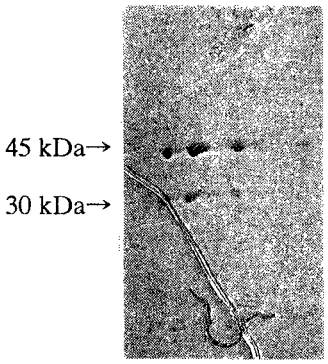
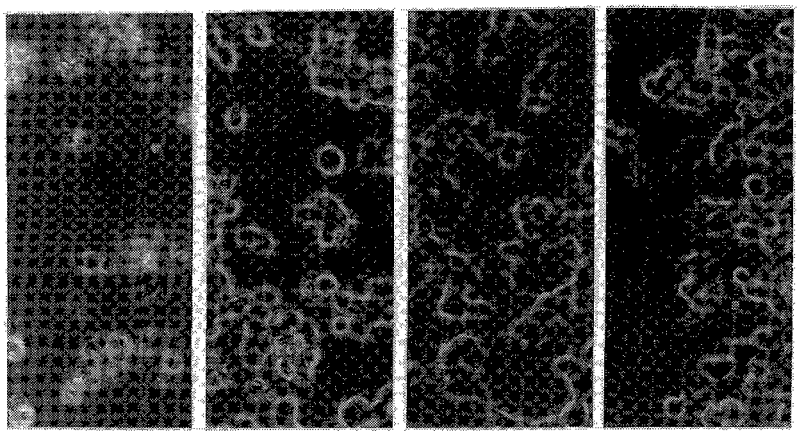


図３、精製sGP45の2DE像

図４、sGP45のPC12細胞に対する影響
A：コントロール
B：NGF (0.1ug/ml)
C：sGP45 (10ug/ml)
D：sGP45 (1ug/ml)



《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).

131 可溶性Myelin-associated glycoprotein (MAG)の神経突起伸展促進作用

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〕

Myelin-Associated Glycoprotein(MAG)には、ミエリン膜内で限定分解を受けて産生される遊離型誘導体(dMAG)の存在が知られているが、その機能はわかっていない。MAGの生理的役割の一端を解明するために、可溶性MAG誘導体を作成し、初代培養神経細胞に対する作用を検討した。マウスMAGの細胞外領域をコードするcDNAとヒトIgG_1のFc部分に相当するゲノムDNAを接合し、発現ベクターBCMGSneoに組み込んだ後、マウスミエローマP3U1細胞に導入、発現させた結果、キメラタンパク質MAG-IgGを効率良く分泌する細胞株が得られた。産生されたMAG-IgGは同一サブユニットがシスチン結合によって会合する2量体で、非還元条件下のSDS-PAGEでは約250K、還元条件下では約130Kの分子量を示した。また、MAGの細胞外領域を非変性条件下にのみ認識する抗MAG単クローン抗体2B6と反応する。培養小脳神経細胞の培地中にMAG-IgG(10 μg/ml)を添加したところ、神経突起の伸展を促進し、培養開始24時間後に神経突起を持つ細胞数が有意に増加すると共に、その突起の長さも著明に増大した。一方、この神経突起伸展促進作用は抗MAG抗体2B6の共存下に抑制される。これらの結果より、遊離型dMAGが脳内で神経栄養因子の一つとして作用する可能性が示唆された。

MAGはミエリン形成細胞に特異的に発現される膜結合性糖タンパク質で、神経細胞と直接の接触を持つことによって、ミエリン形成の初発段階に重要な役割を担うことが想定されている。さらに近年、MAGが神経突起の伸展を促進または抑制することにより、軸索伸長の誘導や再生の制御にも関与する可能性が示唆された。一方、MAGがミエリン内で特異的な切断を受け、dMAGと呼ばれる誘導体として遊離されることが知られているが、その生理的意義はわかっていない(2)。そこで、この遊離型MAGの役割を明らかにするために、可溶性MAG誘導体を調製し、培養神経細胞に対する作用を検討した。

[方法]

1. 可溶性MAG誘導体MAG-IgGの作成：マウスMAGの細胞外領域をコードするcDNAとヒトIgG1のFc部分に相当するゲノムDNA(順天堂大学八木田秀雄先生より分与された）を接合し、発現ベクターBCMGSneoに組み込んだ後、エレクトロポレーション法によってマウスミエローマP3U1細胞に導入した。トランスフェクタント細胞をG418(0.5 mg/ml)存在下に選択培養した後、限界希釈法によるクローニングを行い、MAG-IgGを培地中に効率良く分泌する細胞株(MAG-IgG/P3U1)を得た。分泌されたMAG-IgGはProtein G-Sepharoseカラムクロマトグラフィーにより、均一に精製された。

2. 小脳神経細胞の初代培養：生後1-2日目のマウスから脳を取出し、小脳を分離する。髄膜を除いた後、トリプシン処理によって組織を分散させ、10%FCSを含むDME培地で3

回洗浄後、2%FCSを含むF12/DME(1:1)神経細胞用培地中に細胞を浮遊させた。ポリL-リジンを塗布した培養プレートに1.5x10^5/cm^2の密度で細胞をまき、24時間培養を行った。MAG-IgG或は抗MAG抗体の作用を調べる場合には、培養開始時に所定の濃度を添加した。

[結果と考察]

上述の方法によって得られたMAG-IgG/P3U1株は本キメラタンパク質を極めて効率良く産生、分泌し、10-30μg/mlの濃度で培地中に蓄積させた。産生されたMAG-IgGはウェスタンブロット分析において抗MAG抗体、抗ヒトIgG-Fc抗体の両者と強く反応した。SDS-PAGE法により、分子量は非還元条件下には約250K、還元条件下には約130Kと推定され、シスチン結合形成による2量体構造を取ることが示された。また、非変性条件下にのみMAGの細胞外領域を認識する単クローン抗体2B6(1)との反応も確認され、MAG本来の高次構造を取ることが示唆された。

小脳神経細胞の培養時にMAG-IgGを添加すると、図1に示すように、神経突起の伸展が著明に促進された。24時間の培養後、無添加の細胞はその約20%にしか突起の出現が認められなかったのに対して、MAG-IgG存在下には50%以上が突起を伸ばした。さらに、その神経突起の長さにも著しい差が観察され、MAG-IgG存在下の方が、数倍長いものとなった。一方、MAG-IgGと同時に抗MAG抗体2B6を共存させると、この神経突起に対する促進効果がほとんど消失したことから、この作用はMAGに特異的と考えられる。これらの結果より、可溶性MAG誘導体(dMAG)が神経栄養因子様活性を持つことが示唆された。

[文献]

(1) 松田、小糸、山元 (1994) 神経化学 32, 592-593

(2) Sato, S., Quarles, R. H., Brady, R. O. (1982) J. Neurochem. 39, 97-105

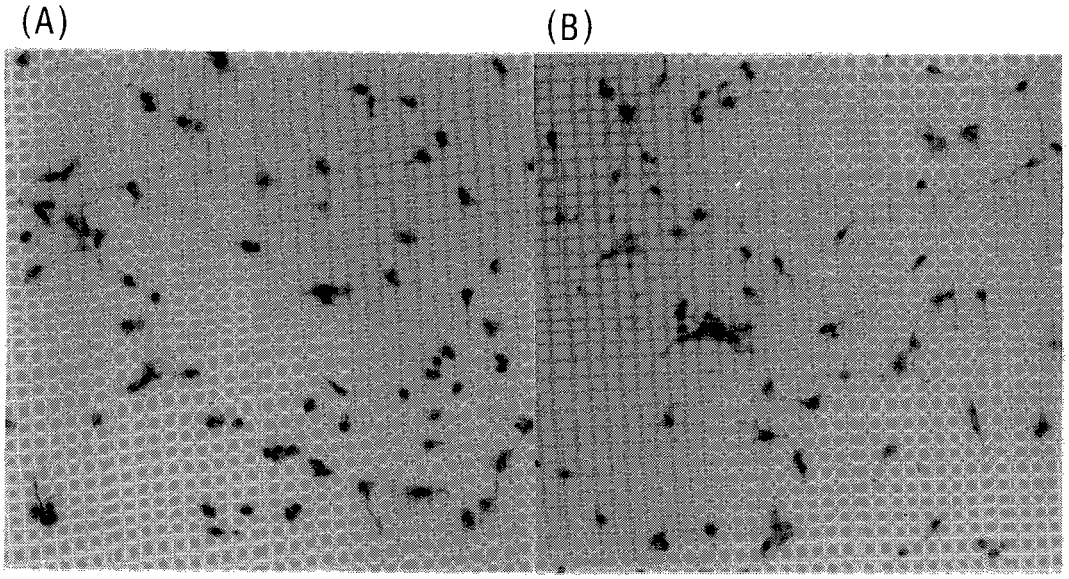


図1．MAG-IgGによる培養小脳神経細胞からの神経突起伸展の促進

小脳神経細胞を10μg/ml MAG-IgG存在下(B)及び非存在下(A)に24時間培養後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫染色を行った。

132 フローサイトメトリーで分取した胎仔脳ニューロン前駆細胞に対する成長栄養因子の影響

山之端万里、村田康子、塚田裕三
(創価大学・生命科学研究所)

〔要約〕

発生初期の胎仔脳からニューロン前駆細胞を迅速に分取するためにフローサイトメトリーを用いる分取法を確立した。分取した細胞の免疫蛍光抗体法による解析ではNestin抗体で陽性であった。分取した細胞は無血清培地に種々の物質を添加して培養し、生存・増殖について検討した。その結果HeparinとbFGFの共存で増殖することが解った。また、Neuroblastomaの株化細胞のコンデションメディウムによる影響についても検討した。

［はじめに］

中枢神経のニューロンは胎仔の初期に形成される神経管を起源にし、ニューロン前駆細胞（以下NPCと略称）を幹細胞とする逐次的な細胞分化の結果によるものであることが示唆されているが、細胞系譜と増殖分化因子については不明な点が多い。それは、神経系とくにニューロンでは分裂能が発生初期に限定されていることや、また初期の前駆細胞は短期間に分化へ移行することがその理由の1つと思われる。そのため、発生初期のラット胎仔脳の神経管から多分化能を持つNPCを速やかに分取することができれば増殖分化について多くのことが解ると考えられたので、この方法を検討し、フローサイトメーターを用いることで迅速かつ高純度のNPCを分取できた[1]。分取した細胞の培養について、従来、神経前駆細胞の培養は1-10% FBSを含むFGFとHeparinの共存で[3]、また、10% FBSでのプレカルチャーの後NGFとbFGFの共存によって[4]、さらに、1% FBSとEGF, TGF-αによる[5]また、無血清培地にEGFを含む培養[6]が報告されている。分取した細胞がどのような栄養因子により影響を受けるかを無血清培地での培養で検討した。

［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、眼胞を除いた前脳を含む胎仔脳を用いた。その胎仔脳を0.1%トリプシンと共に60分間インキュベートした後、0.04% DNaseおよび20% FBSで5分間静置し、DF培地で洗浄し、10% FBSを含むDF培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,COULTER）はアルゴンレザーの488nm（15mW出力）による、100μm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。先に調整した細胞懸濁液（1.7×10^7 cells / ml）を直ちにFCMに適応した。ワークステイションのディスプレイ上でのNPCの位置は、予め培養法にて同定したサイトグラムを選びソート範囲を設定した。

3）細胞培養：無菌的に分取した細胞は血清を含まない無血清培地にて培養した。無血清での培養はDF培地にSodium seleniteを含みTransferrin (TF), Insulin (Ins), Heparin (Hep)を組み合わせて添加し、24孔プレートあるいはチェンバースライドにて37℃、5% CO_2で培養し生存・増殖の程度を調べた。培地交換は3日ごとに行った。また、栄養因子としてaFGF, bFGF, TGF-α, EGF, IGF-IおよびIGF-IIをそれぞれ添加した。

［結 果］

ソーティング：Data rateを600-1200とし1秒間に約300個の細胞を分取するようにした。Fig.1は細胞懸濁液を試料としたサイトグラムを示しており、Fig.1aはソート前でソート範囲Eを設定した。Eの範囲にある細胞は全体に占める細胞の27%であった。Fig.1bはソーティングした後の細胞溶液を遠心し、再度FCMに適応して解析した結果を示した。分取した細胞数は 4.7×10^6 であった。

細胞の生存・増殖に及ぼす因子の検討：分取した細胞は 1×10^4 cell / cm^2 とし、無血清培地で培養した。Table 1に神経系細胞の無血清培養に必須な栄養因子として報告[2]されているTFおよびInsを基に、Hepと

bFGF を添加して培養した結果を示した。培養2日後には Hep と栄養因子を添加して培養した細胞の生存が認められ、その後、Hep とbFGF が共存した時には著しい増殖を示した。一方、TF 或は Ins とbFGFを添加したものは生存増殖の程度が弱かった。

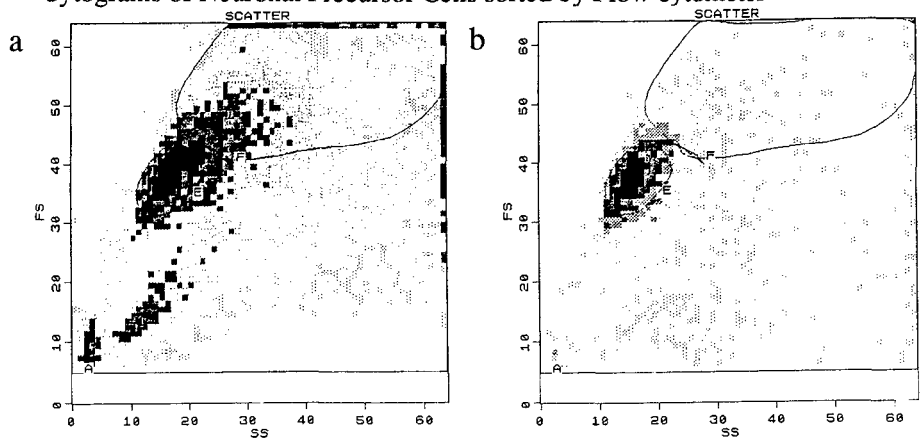
蛍光標識抗体による検討：分取した細胞はチェンバースライドにて培養し、洗浄後、4% Formaldehyde にて固定し、NPC に特異的な Nestin 抗体とインキュベートした。2次抗体は FITC 標識ウサギ抗体を用いた（一部は第37回日本神経化学会にて発表）。尚、Nestin 抗体は国立精神・神経センターの中福雅人氏から分与された。

株化細胞による検討：IMR-20, SCCH-26, NG-1, GOTO (Neuroblastoma) および T98G (Glioblastoma) を培養してコンデションメディウムを作製し、分取した細胞と共に培養し生存・増殖を検討中である。

［考 察］

FCM にて分取した細胞は Nestin 陽性でありNPC であることが確認できた。無血清培養では Heparinが生存維持に影響し、FGFの共存で活発な増殖をすることが解った。aFGFとbFGFの比較では bFGFが強く、また、EGF, TGF-α, IGF-I および IGF-II は同程度の生存増殖を示し、bFGFとの比較ではいずれも弱かった。

Fig. 1 Cytograms of Neuronal Precursor Cells sorted by Flow cytometer



a : perior to a sorting, b : posterior to a sorting, E : region of encircling the NPC cluster. The sorted cells were reanalized by FCM

Table 1 Effects of viability and growth of NPC into culture medium containing indicated factors

Added factors	Day 2	Day 4	Day11
TF,Ins,Hep,*bFGF* only	±	−	−
TF + Ins	±	−	−
TF + Hep	++	+	−
TF + *bFGF*	±	−	−
TF + Ins + Hep	++	+	−
TF + Hep + *bFGF*	++	++	++
TF + Ins + Hep + *bFGF*	++	+++	++++
Ins + Hep	++	+	−
Ins + *bFGF*	+	−	−
Ins + Hep + *bFGF*	++	++	+
Hep +*bFGF*	+	−	−

Death: −, Relative intensity of viability: ±, +, ++, +++, ++++

［文 献］

1. 山之端万里, 塚田裕三. (1994) 神経化学, 33, 446-447
2. J Bottenstein, G Sato. (1979) PNAS 76, 514-517
3. M Murphy, J Drago, and PF Bartlett. (1990) J Neurosci Res. 25, 463-475
4. E Cattaneo and Ron McKay. (1990) Nature. 347, 762-765
5. R Anchan and T Reh. (1991) Neuron. 6, 923-936
6. BA Reynolds, W Tetzlaff, and S Weiss (1992) J Neurosci. 12, 4565-4574

133 カイニン酸投与後におけるラット脳内ＨＧＦｍＲＮＡ発現について

金澤美穂[1]、俣賀宣子[2]、仙波純一[1]、三好理絵[3]、深間内文彦[2]、中村敏一[4]、鬼頭昭三[1]
[1]放送大学、[2]東京医科歯科大学難治疾患研究所、[3]Royal Free Hospital School of Medicine,
[4]大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター

〔要約〕 Hepatocyte growth factor (HGF) は、肝細胞をはじめ多くの組織において増殖因子として働くことが知られてきた生体内物質である。中でも中枢神経系においては、神経栄養因子としての機能をもつことが考えられはじめ、その詳細な検討が必要となってきた。そこで今回は、グルタミン酸のアゴニストであるカイニン酸をラット腹腔内に投与することにより神経細胞障害を起こした際に脳内 HGF mRNA 発現量が変化するかどうかをNorthern Blot解析にて検討した。その結果、カイニン酸投与群の大脳皮質における HGF mRNA 発現量は生理食塩水投与群に比べて増加することがわかった。従って、HGF は神経細胞障害後に神経栄養因子として誘導される可能性があると考えている。

［はじめに］

Hepatocyte growth factor (HGF) は、肝障害後に著明に発現が増加し、肝細胞の再生を促す増殖因子として発見(1)、精製された分子量約 69 KD の α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマータンパクである(2)。発見当初 HGF は、肝細胞にのみ特異的な増殖因子であると考えられていたが、その後研究が進むにつれ腎尿細管上皮細胞、胃粘膜上皮細胞など多くの組織において増殖因子として作用することが明かとなってきた(3)。そこで我々は、中枢神経系においても、HGF は Nerve growth factor (NGF) や Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) などと同様に神経栄養因子としての役割があるのではないかと考えている。事実、HGF レセプターである c-met はNGF やBDNF のレセプターである trk A および trk B とならびチロシンキナーゼ活性を持つプロトオンコジーンに属することがわかっている。そこで、HGF が神経栄養因子としての機能を持つかどうかを明らかにする目的でグルタミン酸のアゴニストでありその大量投与により神経毒性を持つことが知られるカイニン酸をラットの腹腔内に投与し、神経細胞障害後における HGF および c-met mRNA の発現量の変化を Northern Blot 解析を用いて検討した。

［実験方法］

動物には Wistar 系雄性ラット7週令（体重 200g）を用い、カイニン酸（5 あるいは 10 mg/kg）を腹腔内に投与した。対照群には等量の生理食塩水を用いた。ラットはカイニン酸投与後経時的（1, 3, 6, 12,あるいは 24 時間後）に断頭し、直ちに大脳皮質、海馬などを切り出した。各組織の total RNA はチオシアン酸グアニジン法にて抽出した。30 μg の total RNA は 1% アガロース・ホルムアルデヒドゲルで電気泳動後、ナイロンフィルターに転写した。HGF および c-met のcDNA プローブはランダムラベル法を用いて ^{32}P 標識を行い、48 時間ハイブリダイズした。オートラジオグラフィーの結果はパーソナルデンシトメーター（モレキュラーダイナミックス）にて解析した。

［結果および考察］

1. HGF および c-met の脳内における発現量について

はじめに、Northern blot 解析を用いてラット脳内における HGF および c-met の発現が検出できるかどうかの検討を行った。その結果、HGFmRNA は大脳皮質、海馬において発現が認められた（図1）。これら発現部位は先の Jung ら(4)の報告と一致した。

2．カイニン酸投与後の HGFmRNA 発現量の変化について

大脳皮質、海馬においてはカイニン酸投与により前初期遺伝子である c-fos mRNA 発現量が増加することが知られている。そこで、はじめにカイニン酸 5mg あるいは 10mg 投与後の大脳皮質および海馬における c-fos mRNA を調べた。その結果、投与1時間後の大脳皮質および海馬において c-fos mRNA 発現量の著明な増加が認められた（図2）。

そこで次に、カイニン酸 5mg あるいは10mg 投与後の大脳皮質および海馬における HGF mRNA 発現量の変化を経時的に調べた。その結果、HGF mRNA 発現量は無処置群と生理食塩水投与群では変化を認めず、6時間後のカイニン酸投与群は生理食塩水投与群に比べ約2～3倍程度増加することが明かとなった（図2）。この増加傾向はカイニン酸腹腔内投与時の海馬における NGF および BDNF の変化[5,6]と一致し、HGF が細胞傷害の修復機構に関与している可能性が示唆された。

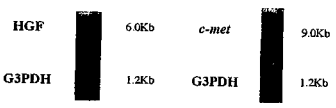


図1．大脳皮質における HGF および c-met mRNA の発現

G3PDH; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

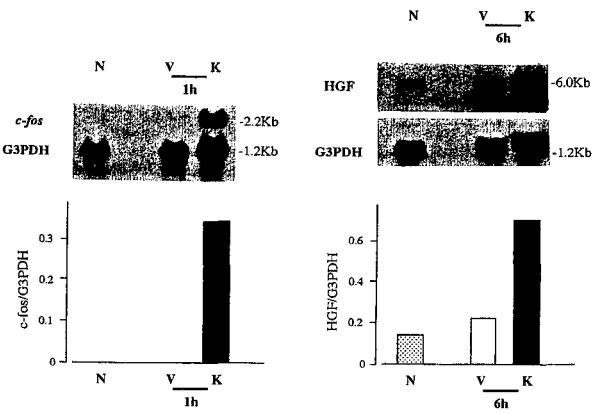


図2．カイニン酸投与後の大脳皮質における c-fos および HGF mRNA の変化

N; Naive　V; vehicle(saline)　K; Kinate

[引用文献]

(1) Nakamura,T. et al. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., 122(3):1450-1459.

(2) Tashiro,K. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3200-3204.

(3) Igawa,T. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 174:831-839.

(4) Jung, W. et al. (1994) The Cell Biology, 126(2):485-494.

(5) Hashimoto, Y. et al. (1992) Neuroscience Letters, 140:203-205.

(6) Dugich-Djordjevic, M. M. (1992) Neuron, 8:1127-1138.

134 Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP) Processing Enzyme の部分精製

大塚 康史、小鹿 幸生
(名古屋市立大学 第二内科)

〔要約〕

Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)を前駆体蛋白からプロセシングする酵素活性がラット海馬組織中に存在する(1)。11日齢ラット海馬組織抽出液より、この酵素活性の部分精製を試みた。硫安分画、ゲル濾過、イオン交換カラム(DEAE, pH6.0)、疎水カラム (Butyl, pH6.0)の4段階を経て、最終精製率は472倍であった。また、活性回収率は65%であった。

[はじめに]

HCNPはラット培養中隔核のcholine acetyltransferase産生を誘導して、アセチルコリン産生を促進するN末端がアセチル化された11個のアミノ酸からなる新規ペプチドであり(2)、約21kDaの前駆体蛋白のN末端に位置する(3)。HCNPおよびその類縁体のRIAによる検討より、ラット組織中にはペプチドおよび前駆体蛋白の両者が存在することから(4)、HCNPは細胞内でプロセシングされると考えられる。しかし、HCNPのプロセシング部分には塩基性アミノ酸は存在せず、他の生物学的活性ペプチドとは異なるプロセシング酵素の存在が示唆される。先に我々は、ラット海馬組織内にHCNPをプロセシングする酵素活性が存在することを示し、その性質について報告した(1)。今回、本酵素活性の部分精製を試みたので報告する。

[対象および方法]

1)11日齢Wistar rat (355匹)の海馬組織片を摘出後、2倍量の150mM NaCl、3mM KCl、1mM EDTA、 1mM DTTを含む 50mM 2-(N-Morpholimo)ethanesulfonic acid (MES) - NaOH pH6.0溶液(以下MES buffer)中で超音波破壊し、超遠沈(30,000rpm×60分間) 後、上清をMillex-GV(0.45μm、Millipore)にて濾過したものを粗抽出液とした(総量78ml)。

2)HCNP前駆体蛋白のうちN末端より26個のアミノ酸からなる合成ペプチド(1-26 peptide:4mg/ml)を基質とし37℃、7時間反応後、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)にて反応を停止させた。C18逆相系カラム(μ Bondasphere 5μ C18-300Å、Waters)とA液：0.1%TFAおよびB液：90%アセトニトリル+0.07%TFAの緩衝系を用いたHPLCにて、アセチル基を除いた合成free-HCNPと同じ溶出時間に出現するpeakの高さを反応産物量とし、合成free-HCNPのpeakの高さとの比より絶対量を算出した。本反応系において1時間あたり1 pmolのfree-HCNPをcleaveする酵素活性量を1単位とした。

3)蛋白量の測定はBradford法に従い、BSAを標準として行った。

4)部分精製は以下の順序にて行った。

①硫安分画：20%-50%硫安画分を30mlのMES bufferに再溶解した(以下AS20-50)。

②AS20-50をProtein Pak 300(2連結、Waters)を用いMES bufferで溶出した。AS20-50 0.9ml注入後毎分0.6mlで溶出し開始14分後より2分毎20画分採取した。

③ゲル濾過クロマトグラフィーの活性画分を、Protein Pak DEAE 5PW(Waters)を用い、A液:3mM KCl、1mM EDTA、1mM DTTを含む20mM MES-NaOH緩衝液pH6.0およびB液:A液＋0.5M NaCl緩衝液pH6.0で分画した。溶出速度は1.0ml/分、開始より5分毎18画分採取した。
④イオン交換クロマトグラフィーの活性画分をcentricon SR3(amicon)にて約10倍に濃縮し、Protein Pak G-Butyl(Waters)を用い、A液:B液＋1.7M $(NH_4)_2SO_4$緩衝液pH6.0およびB液:1mM EDTA、1mM DTTを含む0.1M Na_2HPO_4-HCl緩衝液pH6.0で分画した。溶出速度は1.0ml/分、開始より5分毎24画分採取した。

[結果]

海馬粗抽出液は、全量78ml、総蛋白量は1006.2mg、総酵素活性は81,900単位であった。硫安分画ではAS20-50に酵素活性を認め、蛋白量は912mg、総酵素活性は240,300単位であった。。この処理過程において精製率は1.1倍、活性回収率は293%と上昇した。このAS20-50をゲル濾過クロマトグラフィーにて分画すると、分子量30-100kDaの画分に酵素活性を認め、蛋白量は55.02mg、総酵素活性は184,680単位であり、精製率は18.3倍、活性回収率は225%であった。さらに、この画分をpH6.0の条件でDEAEによるイオン交換クロマトグラフィーを行った。酵素活性は、void画分に認め、蛋白量は28.95mg、総酵素活性は131,450単位、精製率、活性回収率はそれぞれ34.8倍、161%であった。疎水クロマトグラフィーによる分画では、酵素活性画分の蛋白量は2.13mg、総酵素活性は53,450単位であり、最終精製率および粗抽出液の総酵素活性に対する回収率はそれぞれ472倍、65%であった。

表 HCNP processing enzyme の部分精製

	総量 (ml)	総蛋白量 (mg)	総酵素活性 (単位)	精製率	活性回収率 (%)
粗抽出液	78	1006.20	81,900	1.0	100
AS20-50	30	912.00	240,300	1.1	293
Protein Pak 300	72	55.02	184,680	18.3	225
Protein Pak DEAE	90	28.95	131,450	34.8	161
Protein Pak G-Butyl	25	2.13	53,450	472.0	65

[考察]

生物学的活性ペプチドは、より大きな前駆体蛋白からプロセシングされて成熟体となる。HCNPも他のペプチドと同様に前駆体蛋白よりプロセシングされ、その酵素活性はacidicなシスティンプロテアーゼと考えられる(1)。今回我々はこの酵素活性を最終精製率472倍まで部分精製した。今後さらに純度の高い精製を実施し、その構造や作用機序を明らかにし、塩基性アミノ酸残基を近傍に持たない活性ペプチドのプロセシングについて解明したい。

[文献]

(1)大塚康史 他. (1993) 神経化学. 32(1),140-141 (2)Ojika,K., et al. (1992) Brain Res. 572,164-171 (3)Tohdoh,N., et al. (1995) Mol. Brain. Res. in press (4)小鹿幸生 他. (1993) 神経化学. 32(1),138-139

135 抑制性サイトカインによるミクログリアのサイトカインレセプターの発現抑制

澤田誠、錫村明生、丸野内棣
(藤田保健衛生大総医研応用細胞)

〔要約〕 中枢神経系サイトカインネットワークの中心的細胞であるミクログリアに対する抑制性サイトカインの作用を調べた。単離培養下のミクログリアにリコンビナントIL-10を加えるとサイトカイン産生を抑制し、IFNγ によるMHC class II (Ia)抗原の誘導を阻害した。さらにIL-6受容体やCD14の発現や、LPSによって発現誘導されるIL-2受容体の発現を抑制した。しかし増殖能や貪食の活性化などには変化がみられなかった。一方で、TGFβやIL-4などの抑制性サイトカインでは受容体発現に対する抑制作用はみられず、また他の機能に関してもそれぞれのサイトカインで作用が異なっていた。したがって、それぞれの抑制性サイトカインは生体内において異なった役割を持つと考えられる。

近年中枢神経系では多種多様のサイトカインが産生され脳内の細胞の機能や増殖分化などを調節することが明らかになった(1)。脳内のサイトカイン産生の中心的な細胞であるミクログリアやアストロサイトは、サイトカインを産生するばかりでなくいろいろなサイトカイン受容体を発現しそれらのリガンドにより調節を受けるため(2)、脳内のサイトカインの作用は複雑なネットワークを形成していると考えられる(1)。脳内ではIL-1, TNFα, IL-6などの炎症性のサイトカインのほか、TGFβ, IL-4, IL-10などの抑制性のサイトカインも産生され、炎症反応の終息や休止状態の維持に関与していると考えられている(3-5)。ところでサイトカインによる炎症反応を終息させるためには炎症性サイトカインの産生を抑制することが考えられるが、受容する細胞での受容体の発現抑制や不活性化が起こればより効率的であると思われる。そこで今回我々はミクログリアのサイトカイン受容体の発現に対する抑制性サイトカインの作用を調べた。

[方法]

ミクログリアは新生B6マウス脳より調製した混合グリア培養から既報の方法(6)で分離精製した。LPSやIFNγによる刺激およびリコンビナントサイトカインによる処理は、培地交換後にそれぞれを添加して規定の時間培養して行ない、培養上清のサイトカインをバイオアッセイで定量した。同様に処理したミクログリアについて酸性ホスファターゼ活性とNBT還元能についても定量した。また各処理を行ったミクログリアより酸性グアニジン-フェノール法によりRNAを抽出してRT-PCRによりサイトカインやサイトカイン受容体のmRNA発現を調べた。サイトカイン受容体タンパクの量的変動は各受容体タンパクに特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、FACSにより分析した。

[結果]

各抑制性サイトカインによるミクログリアの機能の調節は表1のようになった。一方、サイトカイン受容体の発現に対する作用は、TGFβやIL-4では顕著な変化が検出できなかったが、IL-10処理をしたミクログリアではIL-6受容体やCD14の発現が減少し、またLPS依存的に増大するIL-2受容体の発現が抑制された(図1)。IL-10の抑制作用はIL-4受容体ではみられなかった。

[結論]

IL-10は免疫系でサイトカイン産生を抑制する因子として報告されていたが、中枢神経系ではその作用はサイトカイン産生の抑制に加えて受容体の発現の抑制による二重の効果があることが、今回の結果から初めて明らかになった。さらに受容体の発現抑制には特異性があり、抑制されるものとされないものがあることも判った。TGFβはサイトカイン産生を抑制するが受容体の発現には関与せず、またIL-4サイトカインの作用にはあまり影響しないことも明らかになった。さらにCD14の発現低下もIL-10によって起こるが、休止状態にあると考えられているramified ミクログリアはCD14陰性であるので、IL-10がミクログリアの休止状態を維持する役割を持っている可能性が考えられる。

[引用文献]

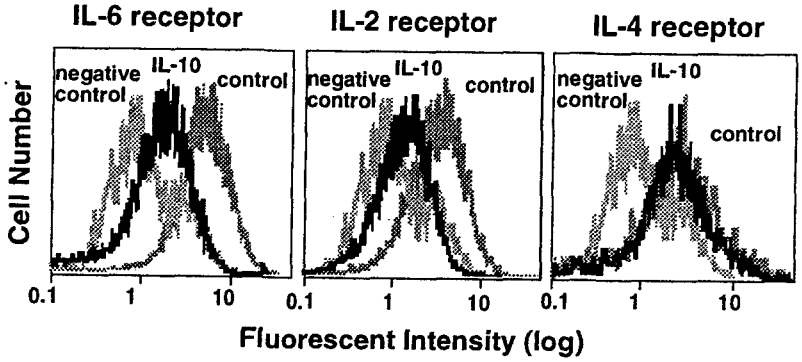
1. Sawada, M., Suzumura, A. et al. (1995) Int. J. Dev. Neurosci. in press.
2. Sawada, M., Itoh, Y. et al. (1993) Neurosci. Lett. 160, 131-134.
3. Suzumura, A. Sawada, M. et al. (1993) J. Immunol. 151, 2150-2158.
4. Suzumura, A. Sawada, M. et al. (1994) J Neuroimmunol. 53, 209-218.
5. Mizuno, T., Sawada, M. et al., (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 1907-1915.
6. Sawada, M., Suzumura, A. et al. (1990) Brain Res. 509, 119-124.

表1　抑制性サイトカインのミクログリアに対する作用

	TGF β	IL-10	IL4
IFN-γdependent MHC antigen expression	↓	↓	↓
LPS-activated			
cytokine production	↓	↓	→
biochemical activity	↓	→	↑
growth	↓	→	↑

↓ decrease. ↑ , increase. → , no change.

図1　IL-10によるサイトカイン受容体の発現抑制



136 培養神経細胞における上皮増殖因子 (EGF) のリン酸化シグナル解析

山田 雅司、榎戸 靖、池内 俊彦、畠中 寛

(大阪大学・蛋白質研究所・生合成部門)

〔要約〕上皮増殖因子 (EGF) のリン酸化シグナルの解析を、PC12 細胞の亜株である PC12h-R 細胞 (5) および培養大脳皮質ニューロンを用いて行った。PC12h-R 細胞は、EGF に応答して神経細胞様に分化することを我々は既に示している (6)。PC12h-R 細胞では、EGF による EGF レセプター、SHC および MAP キナーゼのチロシンリン酸化および MAP キナーゼの活性化が、EGF による分化応答を示さない PC12h 細胞と比べ顕著に持続していた。また、培養大脳皮質ニューロンにおいても EGF による EGF レセプターのチロシンリン酸化および MAP キナーゼの活性化が、PC12h-R 細胞と同様に顕著に持続していた (7)。これらのことから、EGF によるリン酸化シグナルの持続が、EGF の栄養因子作用機構の重要な特徴であることが考えられる。

EGF は、種々の細胞に対して細胞増殖促進の作用を示すことが知られている。副腎髄質クロム親和性細胞腫由来の PC12 細胞も EGF に対して増殖促進の応答を示す。以前、我々は PC12 細胞の亜株である PC12h-R 細胞が EGF に応答して神経細胞様に分化することを報告した (3)。一方、中枢神経系においては、EGF が大脳皮質ニューロンに対して神経栄養因子作用を持つことが示されている。我々は、昨年度本大会で EGF が高酸素負荷による培養大脳皮質ニューロンのアポトーシスを防ぐことを報告した (4)。今回、EGF の神経栄養因子作用機構の解明を目的として PC12h-R 細胞および培養大脳皮質ニューロンにおけるリン酸化シグナルの解析および比較を行ったので報告する。

〔実験方法〕

PC12h-R 細胞の培養は既報通り行った (2)。細胞はコラーゲンコートした6 cm シャーレにまき、2日間培養をした後、EGF による細胞内タンパク質のチロシンリン酸化解析を行った。

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 (1)。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6穴プレートに5×105細胞/cm2の密度でまいた。翌日1μM AraC を含む TIP/MEM に換え、2日間培養を行った後、EGF による EGF レセプターのチロシンリン酸化解析を行った。

細胞内タンパク質および EGF レセプターのチロシンリン酸化検出は、それぞれ細胞抽出液と抗 EGF レセプター抗体 (UBI 社) 免疫沈降物を抗ホスホチロシン抗体 (UBI 社) を用いたウエスタンブロット解析により行った。

〔結果と考察〕

図1に示すように PC12h および PC12h-R の両細胞において、EGF による EGF レセプター、SHC および MAP キナーゼのチロシンリン酸化が観察された。これらのタンパク質のチロシンリン酸化は、5分以内に最大に達した後、そのレベルは時間経過に伴い徐々に低下した。PC12h 細胞では、これらのリン酸化レベルは、1時間以内にほぼコントロールレベルにまで戻るのに対し、PC12h-R細胞では、3時間後においてもそれらのリン酸化は観察され、顕著に持続していることがわかった。さらにこれを確認するために、両細胞において EGF による MAP キナーゼの活性化の経時変化をミエリン塩基性タンパク質を基質に用いたゲル内リン酸化法により調べた。その結果、PC12h-R 細胞では PC12h 細胞と比べ顕著に持続することがわかった。図2に培養大脳皮質ニューロンと PC12h 細胞について EGF による EGF レセプターのチ

ロシンリン酸化の経時変化を調べた結果を示す。両細胞において、EGF レセプターのチロシンリン酸化がEGF添加後5分以内に最大に達することがわかった。その後、PC12h細胞では、そのリン酸化は1時間以内にコントロールレベルにまで戻るのに対し、大脳皮質ニューロンにおいては3時間後においても観察された。このことから、大脳皮質ニューロンでは PC12h-R 細胞と同様に EGF による EGF レセプターのチロシンリン酸化が持続することがわかった。さらに、大脳皮質ニューロンにおけるMAPキナーゼの活性化は、PC12h-R 細胞の時と同様、顕著に持続していた。

以上の結果から、EGFによる細胞内シグナルの持続が、EGFの栄養因子作用発現において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。EGFによるシグナルの持続機構の解析は、EGFによる神経栄養因子作用の機構解明につながると思われる。また、PC12h-R細胞は、大脳皮質ニューロンと非常に似たリン酸化シグナルの持続性を示すことから、こうした今後の解析において良いモデルになると考えられる。

図1.

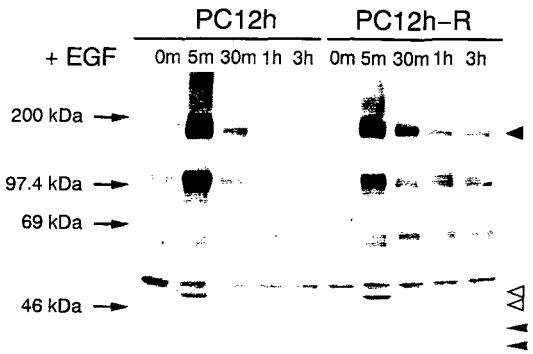


図2.

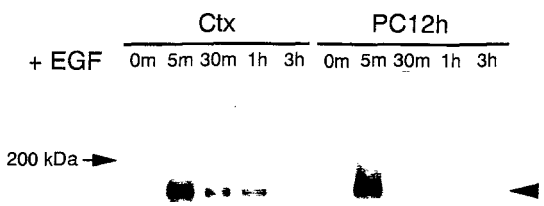


図 1. PC12h および PC12h-R 細胞における EGF による細胞内タンパク質チロシンリン酸化の経時変化。 100 ng/ml EGF 添加前および添加後5分、30分、1時間、3時間に得た抽出液を抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロッティング解析にかけた。180 kDa タンパク質は EGF レセプター (◀)、52 および 46 kDa タンパク質は SHC (◁)、44 および 42 kDa タンパク質は MAP カイネース (◄) であると考えられる。

図 2. EGF レセプターのチロシンリン酸化の経時変化。 培養大脳皮質ニューロン (Ctx) および PC12h 細胞 (PC12h) において、100 ng/ml EGF 添加前および添加後 5分、30分、1時間、3時間より得た抽出液より抗 EGF レセプター抗体を用いて免疫沈降を行った。次に、その沈降物を抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

〔文 献〕

(1) Hatanaka, H. and Tsukui, H. (1986) Dev. Brain Res. 30, 47–56.
(2) 畠中 寛 (1990) 神経生化学マニュアル, 羊土社, 106–110.
(3) 山田雅司、池内俊彦、畠中 寛 (1993) 神経化学 32, 134–135.
(4) 山田雅司、榎戸靖、池内俊彦、畠中 寛 (1994) 神経化学 33, 444–445.
(5) Yamada, M. et al. (1994) Brain Res. 661, 137–146.
(6) Yamada, M. et al. Exp. Cell Res. in press.
(7) Yamada, M. et al. submitted.

137 クリングル構造を持つ神経栄養因子

浜之上　誠、竹本　なぎさ、松本　邦夫*、中村　敏一*、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、*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〕

肝細胞成長因子(HGF）がラット大脳皮質組織片に対する突起伸展活性や中脳細胞に対する栄養活性を持つことは昨年の本学会において報告したが、今回は末梢においてこのHGFの受容体として知られるc-metの神経系における動態について解析を行った。その結果、大脳皮質組織片のHGF刺激により速やかにc-metのリン酸化が確認され、中枢神経系においてもc-metがHGFの受容体として機能していることが考えられた。しかしこのクリングル構造を持つHGFとよく似ており、同様の栄養活性を持つプラスミノーゲン（PGn）ではこのc-metリン酸化は検出できなかった。このことからPGnに対してはc-met以外の受容体の存在が考えられた。

我々はこれまで培養ミクログリアの培養上清が神経細胞の生存維持や突起伸展などの神経栄養活性を持っていること、また更にこの栄養活性の一部はPGnに由来することを報告し解析を続けてきた(1)。PGnは本来線溶系に機能しているプラスミンの前駆体であり、その特徴的な構造としてクリングル構造を持つことが知られている。このPGnの作用機序解明の一助として、末梢においてその作用機序が解明されつつあり、かつそのアミノ酸配列がPGnと非常に高い相同性を示すHGFに注目し解析を行った。HGFは末梢においてモルフォーゲン、モトーゲン、マイトーゲンとしてその機能が知られている、クリングル構造を持つ蛋白質であるが、神経系ではHGFの発現は認められているものの、その機能についてはこれまで報告はなかった(2,3)。そこで培養系を用いてその機能を解析したところ、HGFがラット培養大脳皮質組織片に対する突起伸展活性を持つこと、また培養中脳細胞のチロシン水酸化酵素陽性細胞の成熟、生存維持そしてドーパミンの取り込み能促進活性など、中枢神経細胞に対し栄養活性を示すことを初めて明らかにした（昨年度本学会）。今回はこのHGFの作用機序として知られる、プロトオンコジーンのc-metの自己リン酸化誘導などを検討した。

「実験方法及び結果」

c-metリン酸化の検討：胎生17日令のラットより調整した大脳皮質組織片を3nM HGFにて10分間刺激し可溶化した。WGA又はc-metに対するモノクローナル抗体でc-metを濃縮した後、リン酸化チロシンに対する抗体でウェスタンブロットを行った。その結果コントロール群(C)に比べHGF添加群(H)で還元下145kDa、非還元下190kDaのc-met

のリン酸化が検出された（Fig.1）。

A431細胞におけるリン酸化蛋白の検討：c-metを発現することが知られているA431細胞を100nM PGn又は1nM HGFで10分間刺激した後可溶化し、WGAにてc-metなどを含む画分を精製した。これに対しリン酸化チロシンに対する抗体でウェスタンブロットを行った結果、コントロール群(C)に比べHGF添加群(H)でc-metのリン酸化が確認できたがPGn添加群(P)ではc-metリン酸化は確認されなかった。しかし分子量約200kDa、47kDaといったリン酸化蛋白はHGF刺激、PGn刺激どちらの場合も観察された（Fig.2）。

「考察」

クリングル構造やアミノ酸配列がPGnと非常によく似ているHGFが、神経栄養活性を持ち、中枢神経系においてもc-metをリン酸化することが今回明らかになった。このことからPGnもHGF受容体のc-metを介して神経栄養活性を発現している可能性も考えられたことから、c-metを高発現しているA431細胞を用いて検討したところ、HGF添加時に見られるc-metのリン酸化はPGn添加時には認められなかった。このことからc-metはPGnのレセプターとしては機能していないことが示された。しかしHGF添加、PGn添加いずれの場合でもリン酸化を受ける蛋白質は酷似しており細胞内のシグナルについては同様の経路を通っている可能性が考えられた。現在はこのPGnのシグナル伝達系路について更なる検討を加えている。

「文献」

1) Nagata, K., et al. (1993). Dev. Brain Res. 75, 31-37.

2) DeFrances, M.C., et al. (1992). Development 116, 387-395.

3) Tashiro, K., et. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3200-3204.

Figure 1.

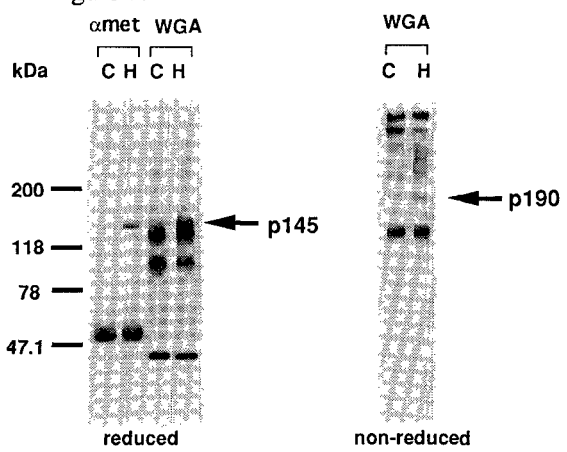
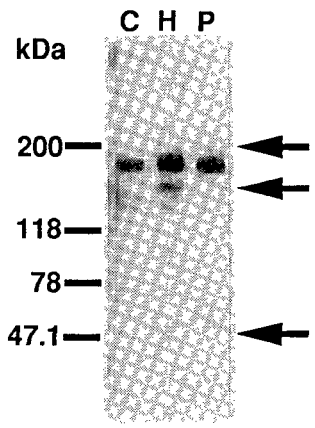


Figure 2.



138 脳ファシンの解析：アクチン線維結合・束化能に及ぼすドレブリンの影響

佐々木洋、*林謙介、*白尾智明、石川良樹、小浜一弘
（群馬大学医学部・薬理、　同・*行動分析）

〔要約〕 我々は以前、脳の発生初期に大量に発現する胎児型ドレブリンを精製し、その生化学的解析を行った(1)。この精製過程において、やはり発生初期に大量に発現する54kDの蛋白質を検出したが、この蛋白質が脳ファシンであることが判明したので、これを精製し、生化学的解析を行った。ファシンはアクチン線維にストイキオメトリー1:3、解離定数 1 x 10^{-6} Mで結合した。この結合はドレブリンによって強く阻害を受けた。またファシンはアクチンを束化するが、この束化作用もドレブリンによって阻害された。ファシンは成長円錐のフィロポディアに局在しており、その発現量は成体では胎児の1/3まで減少していた。これらの結果から、ファシンは神経突起伸長時のフィロポディアのオーガニゼイションに関与しており、ドレブリンはそれを制御していると想像される。

[序] ファシンはアクチン線維を束化する分子量57kDの蛋白質として、ウニ卵から発見された(2)。最近遺伝子クローニングが行われ(3)、その予想アミノ酸配列がHeLa細胞55kDアクチン束化蛋白質の部分アミノ酸(4)と一致したことから、高等動物にも存在することが明らかになった。ファシンは培養細胞のフィロポディアに局在していることから、細胞の運動性に重要な役割を担っていると想像されている。なお前川らによってブタ脳から精製された53kDアクチン束化蛋白質(5)はその生化学的性質から脳ファシンである可能性が高い。

ドレブリンは神経細胞発生時に大量に発現する蛋白質で、アクチン線維に結合し、トロポミオシン、α-アクチニンをアクチン線維から追い出す作用を持っていることから、神経細胞の形成過程でアクチン線維構造を制御する蛋白質と考えられる(1)。本研究では、ファシンの活性に対するドレブリンの影響を調べることによって、これらの蛋白質が神経細胞形成過程で果たす役割を探る試みを行った。

[方法] ファシンは山代らの方法(4)で生後７日のラット脳から、ドレブリンは石川らの方法(1)で、新生児の脳からそれぞれ精製した。抗ファシン抗体は松村から入手した。アクチン線維結合能は超遠心法(1)で、アクチン線維束化能は低速遠心法(6)、電子顕微鏡法で測定した。

[結果] ファシンのアクチン線維結合能に対するドレブリンの効果：ファシンのアクチン結合能をアクチン線維との共沈実験で調べたところ、図1A, 白丸のような結果となった。ストイキオメトリーは1:3-2、解離定数は1 x 10^{-6} Mであった。ところが1.9μMのドレブリンが存在すると、この結合は黒丸で示すように抑えられた。そこでファシンの濃度を1.5μMに固定し、ドレブリンの量を増やしていったところ、アクチン線維に結合するファシンの量は減少した（図1B）。これらの結果から、ドレブリンはファシンのアクチン線維結合能を阻害することがわかった。

ファシンのアクチン線維束化能に対するドレブリンの効果：ファシンのアクチン線維束化能に対するドレブリンの効果を、アクチン線維単独では沈殿しないが、大きな束を形成したときは沈殿するという低速条件で遠心を行い測定した（図2)。ドレブリン非存在下では55%のアクチンが沈殿するのに対し、0.8μMのドレブリン存在下では14%のアクチンしか沈殿しなかった。このことは、ファシンのアクチン線維束化能をドレブリンが阻害する事を示している。以上の結果は電子顕微鏡でも確認された。

ファシンの成長円錐での局在及び発生段階の発現量の定量：PC12細胞でのファシンの局在を蛍光抗体法で調べたところ、ファシンはフィロポディア部位に局在していた。また各発生段階のファシン発現量をスロット・ブロット法で調べ、デンシトメーターで定量したところ、E18で0.3μMで、発生が進むにつれて徐々に減少し、成体では0.1μMとなっていた。

[考察] フィロポディアは細胞移動を先導する役割を担っているが、そのダイナミックな動きの分子メカニズムは殆どわかっていない。ファシンはフィロポディアに存在が確認されている唯一のアクチン束化蛋白質であり、フィロポディアのアクチン線維束構造の中核をなす蛋白質と想像される。今回の我々の結果は、成長円錐においても、ファシンがアクチンの束化を介してフィロポディア構造を構築し、その制御をドレブリンが行っているという可能性を示唆している。

[文献]

1. Ishikawa, R., Hayashi, K., Shirao, T., Xue, Y., Takagi, T., Sasaki, Y., and Kohama, K. (1994) **J. Biol. Chem. 269**, 29928-29933
2. Kane, R. E. (1975) **J. Cell Biol. 66**, 305-315
3. Bryan, J., Edwards, R., Matsudaira, P., Otto, J., and Wulfkuhle, J. (1993) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90**, 9115-9119
4. Yamashiro-Matsumura, S., and Matsumura, F. (1985) **J. Biol. Chem. 260**, 5087-5097
5. Maekawa, S., Endo, S., and Sakai, H. (1983) **J. Biochem. 94**, 1329-1337
6. Ishikawa, R., Okagaki, T., and Kohama, K. (1992) **J. Muscle Res. Cell Motil. 13**, 321-328

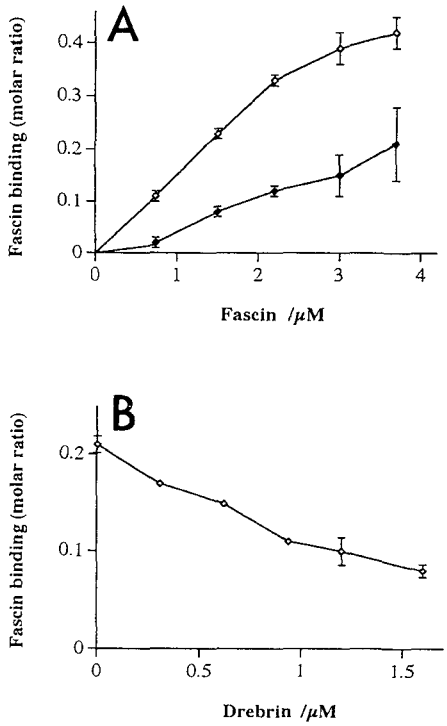


図1 ファシンのアクチン結合能に対するドレブリンの阻害効果。A. (○)ドレブリン非存在下のファシンのアクチン結合パターン;(●)1.9μMドレブリン存在下。B.ファシン濃度一定下、ドレブリン濃度を変化させた時のファシンのアクチン結合パターン。

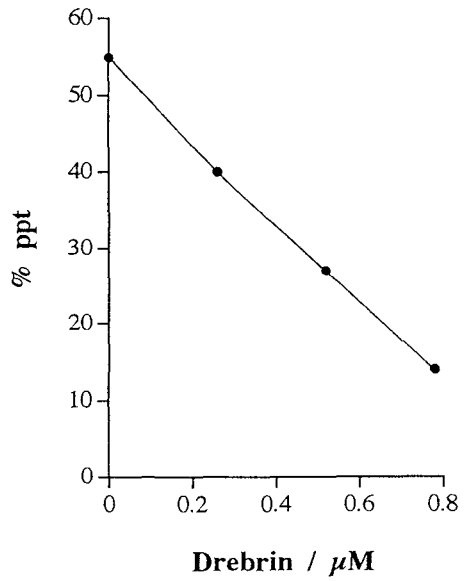


図2 ファシンのアクチン束化能に対するドレブリンの阻害効果。様々な濃度のドレブリン存在下でファシンのアクチン線維束形成量（低速遠心で沈殿したアクチン量）を測定した。

139 アクチン結合蛋白ドレブリンAによる細胞骨格および細胞接着の変化

池田圭朗[1),2)]、白尾智明[3)]、戸谷重雄[2)]、植村慶一[1)]
慶應義塾大学・医・生理[1)]、脳神経外科[2)]、群馬大学・医・行動分析[3)]

〔要約〕

Cd^{2+}によってドレブリン発現が誘導される形質転換L細胞系を確立し、アクチン線維の形態、ビンキュリンの細胞内局在および発現量を検討した。ドレブリン発現に伴って、ストレスファイバーはドレブリンと局在の一致した網目状のアクチン線維に変化した。更に、免疫染色でビンキュリン抗体に対する免疫反応性が増加して接着斑がより明確に同定され、同時にウェスタンブロッティングでビンキュリン発現量の増加が確認された。さらに、ドレブリン発現細胞ではアクチンの脱重合剤cytochalasin Dに対して接着斑が安定化している所見が得られた。ドレブリンがアクチン線維の形態変化および細胞ー細胞外基質間接着に関与している可能性が示唆された。

［目的および方法］ ドレブリンは神経組織の発生過程で特異的に発現するアクチン結合蛋白であり、ヒト及びラットではドレブリンE（幼若型）からドレブリンA（成熟型）へアイソフォームが変化する。ドレブリンAはある程度以上成熟した中枢神経系にのみ存在する[3),4)]。一方、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞ではドレブリンが接着斑部に強く発現していることが明かになっており、細胞接着との関係が示唆されている[1)]。我々は、既に、Cd^{2+}によってドレブリンが誘導発現される形質転換L細胞(MTI-5)と、誘導発現されない形質転換L細胞(MTI-11)を確立しているが[2)]、今回、これらの細胞について、アクチン線維の形態、ビンキュリンの細胞内局在および発現量、をそれぞれ免疫組織化学染色およびウエスタンブロットをもちいて解析し、ドレブリンが細胞ー細胞外基質間接着に及ぼす影響について検討した。

［結果］ MTI-5 は$CdSO_4$ 非添加時でもドレブリンを少量発現しているが、1.0, 2.5 μM と濃度の上昇に伴ってドレブリン発現量が増加した(Fig.1)。免疫染色において、コントロール培地 のMTI-5はドレブリンをきわめて少量発現しており、よく発達したストレスファイバーを認めたが、$CdSO_4$ 2.5μM 添加後は網目状のアクチン線維に変化し、ドレブリンと局在が一致していた。そして、ドレブリン発現量の比較的少ない細胞では網目が細かく、発現量の多い細胞では網目が大きくなる傾向が認められた(Fig.2)。一方、抗ビンキュリン抗体を使ったウエスタンブロットでビンキュリン発現量は$CdSO_4$ 添加前にはドレブリン陰性クローン MTI-11と同等の発現量であったが、$CdSO_4$ 1.0μM、2.5 μM添加時には有意に増加した(Fig.3)。次に、$CdSO_4$ 添加後に cytochalasin D (5.0μg/ml) を添加した場合には、MTI-11 ではアクチン線維からcytoplasmic poolへの変化と同時にretraction process の形成が観察され(Fig.4)、ビンキュリン染色で接着斑の同定が不可能であった(Fig.5)。これに対し、MTI-5 では、cytoplasmic poolの形成は認めたが、retraction processは形成せず(Fig.4)、接着斑の同定が可能であった(Fig.5)。

［考察］ MTI-5ではドレブリン発現に伴って、ストレスファイバーから網目状のアクチン線維へ変化したが、MTI-11 では変化を認めなかったので、ドレブリン発現がアクチン線維の形態変化をもたらしたと考えられる。MTI-5 のビンキュリン発現量はドレブリン発現に伴って増加し、ドレブリン発現がビンキュリン発現に影響を与えていることが示唆された。MTI-5 にドレブリンを誘導発現させてから cytochalasin D を添加した場合には網目状のアクチン線維からcytoplasmic poolへの変化は観察されたが、retraction process は形成せず、cytoplasmic poolを作ると同時にretraction processを形成したコントロールMTI-11 と対照的であった。このとき、ドレブリン発現MTI-5のほうがMTI-11 に比べビンキュリン染色の免疫反応性が高く、ドレブリン発現による接着斑の状態変化が形態変化の相違を生じた可能性を示唆している。この cytochalasin D に対する接着斑の安定化は、接着斑の中心となる構成成分であるF-アクチンの重合状態が変化した可能性と、ビンキュリン、テーリンといった細胞接着関連蛋白に影響を与え、間接的に安定化作用を示すようになったという可能性が考えられる。今後、mRNA レベルでのビンキュリン発現、その他の接着斑関連蛋白の発現等を明らかにして、さらにドレブリンの細胞接着への影響を解析していく必要がある。

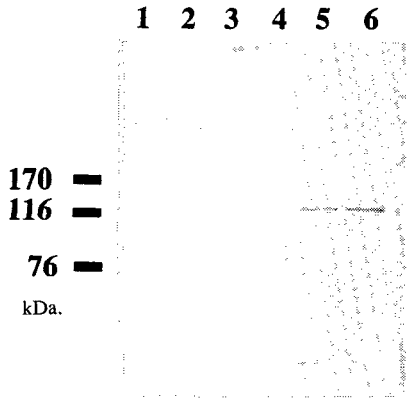


Fig. 1. Western blotting using MAb M2F6. MTI-11 cells without treatment (1), treated with 1.0 μM $CdSO_4$ for 24 hours (2), 2.5 μM (3), MTI-5 cells without treatment (4), treated with 1.0 μM $CdSO_4$ for 24 hours (5), 2.5 μM (6).

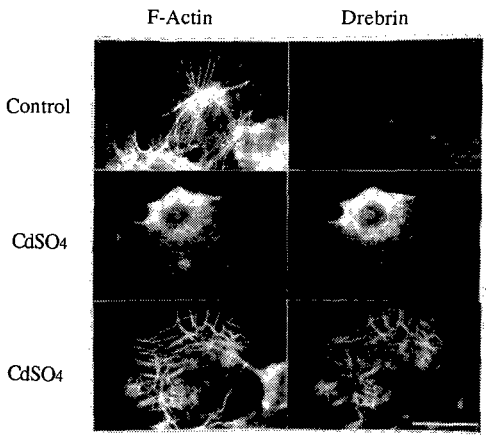


Fig. 2. Changing of actin cytoskeleton in MTI-5 cells caused by drebrin expression.
Bar:20 μm

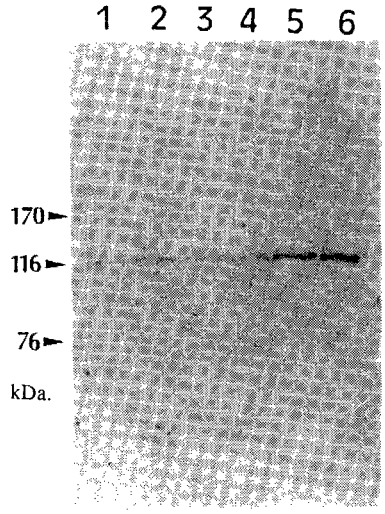


Fig. 3.Western blotting using anti-vinculin MAb. MTI-11 cells without treatment (1), treated with 1.0 μM $CdSO_4$ for 24 hours (2), 2.5 μM (3), MTI-5 cells without treatment (4), treated with 1.0 μM $CdSO_4$ for 24 hours (5), 2.5 μM (6).

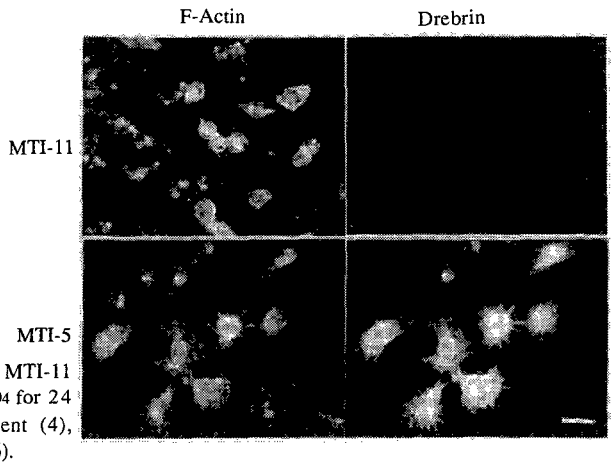


Fig. 4. Changes of actin cytoskeleton and cell morphology in MTI-5 cells expressing drebrin and MTI-11 cells caused by cytochalasin D
Bar:20 μm

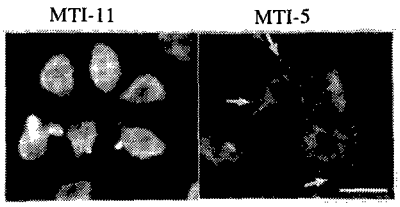


Fig. 5. Vinculin staining after cytochalasin D treatment Bar:20 μm

〔文献〕

1) Asada,H.,Uyemura,K.,Shirao,T.(1994) J.Neurosci.Res. 38 : 149-159
2) 池田圭朗,浅田英穂,Peter A Kaub,戸谷重雄,植村慶一,白尾智明 (1992) 神経組織の成長再生移植 4 : 30-31
3) Shirao,T.(1995) J. Biochem. 117 : 231-236
4) Shirao,T. and Obata,K.(1985) J.Neurochem. 44 : 1210-1216

140 開口放出機構におけるアクチン・ネットワークの役割

今泉　美佳、御園生　裕明、池田　顕、熊倉　鴻之助
（上智大学・生命科学研究所・神経化学）

〔要約〕　開口放出機構における細胞骨格系蛋白質の役割を明確にする目的で、ジギトニン処理によって調製した高透過性クロマフィン細胞を用いて開口放出中のアクチン・ネットワークの変動を観察し、カテコールアミン(CA)放出実験結果との関連を考察した。Control細胞では、ジギトニン処理前に固定すると、細胞膜直下にリング状に濃いアクチン層が観察された。アクチン層はジギトニン処理後も変化が見られなかったが、Ca^{2+}刺激後ではアクチン層の切断、欠落が観察された。一方、開口放出機構のうち、顆粒を放出可能な状態にするプライミング過程に必須であるミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の特異的阻害剤Wortmannin(WT)を用いて細胞を前処理すると、細胞膜直下のアクチン層の切断、消失が観察され、その後ジギトニン処理、Ca^{2+}刺激を行っても変化が見られなかった。CA放出実験ではWTは前処理およびジギトニン処理中の放出には影響を及ぼさず、Ca^{2+}依存性放出だけを阻害している。従って、Control細胞では、従来提唱されているアクチン・バリヤー説で説明できるが、WT処理細胞では説明できず、アクチンまたはミオシン等の細胞骨格系蛋白質がバリヤーとしてのアクチン・ネットワークを作ること以外に開口放出のプライミングを可能にさせる重要な役割を果たすことが考察された。

開口放出の分子機構についてはこの数年の間に、急速な研究の展開が見られている。我々は最近、副腎髄質クロマフィン細胞を用いた実験により、開口放出機構のうち、顆粒を放出可能な状態にするプライミング過程にMLCKが必須であることを明らかにしている(1)。従って、その基質であるミオシン及びアクチンをはじめとする細胞骨格系蛋白質が開口放出に重要な役割を持っていることが強く示唆される。そこで本研究では開口放出における細胞骨格系蛋白質の役割を明確にする目的で、高透過性クロマフィン細胞を用いた組織化学的実験により、開口放出中のアクチン・ネットワークの変動を観察し、放出実験結果との関連を考察した。

［実験方法］

クロマフィン細胞は牛副腎髄質から調製し、10%牛胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium中で単層培養し、培養４～１０日の細胞を実験に用いた(1)。

高透過性細胞の調製およびCA放出実験：37℃の条件下で、まず培養液をLocke's溶液に置き換えて30分間preincubationを行った後、Ca^{2+} free Locke's液で洗浄、ジギトニンbuffer（20 μM digitonin, 140mM Na glutamate, 20mM PIPES, 5mM glucose, 5mM EGTA, pH6.8）で４分間ジギトニン処理を行い、高透過性細胞を調製した。次に、Ca^{2+}-EGTA Buffer（140mM Na glutamate, 20mM PIPES, 5mM glucose, 5mM EGTA, 5mM ATP, 5mM MgSO4, 遊離Ca^{2+}濃度 10 μM, pH6.8）に置き換え、6分間Ca^{2+}刺激を行った。細胞にWT処理を行う場合は、preincubation時よりWTを加え、WT存在下で実験を行った。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。

固定標本によるアクチン染色およびアクチン・ネットワークの観察：カバーガラス上に培養した細胞に前述と同様の操作を行い、preincubation後、ジギトニン処理後、Ca^{2+}刺激後の３時点でそれぞれホルマリン固定（3.7%, 10min）を行った。PBSで洗浄後、0.33 μM Rhodamine Phalloidin(Molecular Probe社)でアクチンを染色（60 min）を行った後、封入剤（50% glycerin, 2.5% DABCO/ PBS）を用いて標本を作成した。共焦点レーザー蛍光顕微鏡MRC-600（BIORAD:アルゴンレーザー光源、励起波長514nm）を用いて観察を行った。

［結果および考察］

図１に示すように高透過性クロマフィン細胞からのCA放出実験では、MLCKの特異的阻害剤WTによりCa^{2+}依存性CA放出が阻害された。WTはpreincubation中の自発性放出、およびジギトニン処理中の放出に

は何等影響を与えず、Ca^{2+}依存性放出だけを阻害している。このときのアクチン・ネットワークの変動は図2のように観察された。Control細胞ではpreincubation後に固定すると、細胞膜直下にリング状の濃いアクチン層が観察された。このアクチン層はジギトニン処理後もほとんど変化が見られなかったが、Ca^{2+}刺激後ではアクチン層の切断、欠落が見られた。一方、WT存在下でpreincubationを行うと、明視野で観察する限りは全く変化は見られなかったが、蛍光像では細胞膜直下のアクチン層の切断，消失が観察された。このアクチン層の状態はジギトニン処理後でも変化を見せず、Ca^{2+}刺激を行うとやや染まりは薄くなったが、ほとんど変化が観察されなかった。

開口放出におけるアクチンに関するこれまでの報告によると、クロマフィン細胞の形質膜直下には膜と並行に走るアクチンネットワークが遍在しており(2)、このネットワークは顆粒が膜へ接近することを妨げるバリヤーとなっているという、いわゆるバリヤー仮説がAunisら(3)によって提唱されている。また、Trifaroら(4)は細胞内Ca^{2+}濃度上昇に伴ってアクチン切断タンパク質がCa^{2+}依存性にアクチン繊維を切断し、バリヤーがなくなったところから開口放出が起こることを明らかにしている。本研究の高透過性細胞でのControl実験の結果はこれらの知見とよく一致している。一方、細胞にWT処理を行うとアクチン－ミオシン相互作用が阻害されることが予想されるので、アクチン層の崩壊はその結果を反映していると考察できる。しかし、バリヤー説に立てばWTがCA放出を阻害することとは矛盾する。CA放出の場合、WT処理細胞はアクチン・ネットワークが崩れているにもかかわらず、Ca^{2+}依存性CA放出が阻害されている。さらに、前述のように我々は、WTによる阻害は開口という最終段階ではなく顆粒を放出可能にするプライミング過程であることを確認している。従って本研究で観察されたアクチン・ネットワークの変化と、MLCK阻害がプライミング過程を阻害することを矛盾なく説明するためには、バリヤー説では説明できず、アクチンまたはミオシン等の細胞骨格系蛋白質がバリヤーとしてのネットワークを作ること以外にプライミングを可能にさせる重要な役割を果たすことが考えられる。今後さらに解析を進め、この点を明確にすることが重要であると思われる。（本研究の一部は文部省科学研究費補助金（今泉および熊倉）、エッソ女性のための研究奨励金、林女性自然科学者研究助成金、日本科学協会笹川科学研究助成金の補助を受けた。）

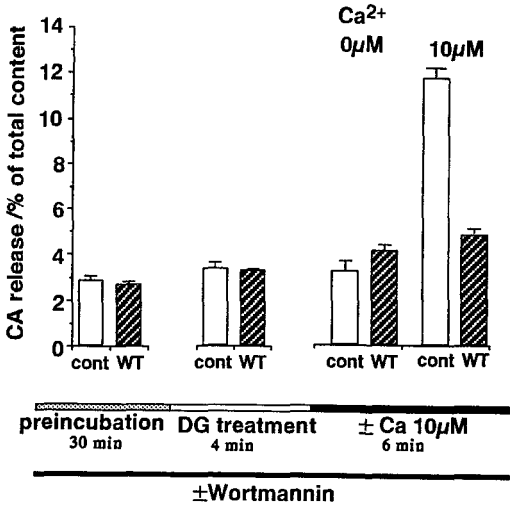


図1. Ca^{2+}依存性CA放出に及ぼすWTの阻害作用

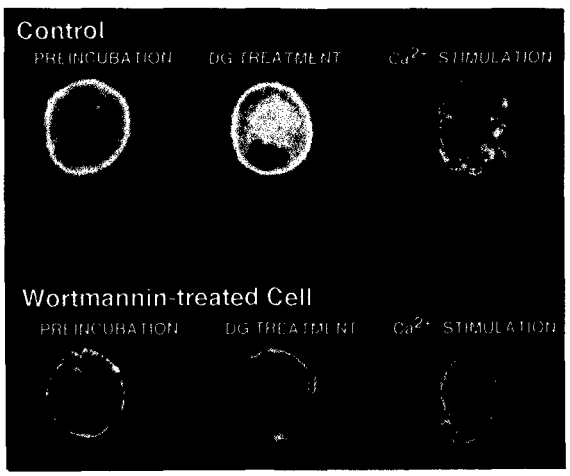


図2. 開口放出中のアクチン・ネットワークの変動

［文献］ 1. Kumakura, K., Sasaki, K., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Misonou, H., Nakamura, S., Matsuda, Y., and Nonomura, Y. (1994) J. Neurosci., 14, 7695-7703
2. Nakata,T. & Hirokawa, N. (1992) J. Neurosci., 12, 2186-2197.
3. Aunis,D., & Bader,M.-F. (1988) J. Exp. Biol., 139, 253-266.
4. Trifaro, J.M., Vitale, M.L., Rodriguez Del Caxtillo, A. (1993) J.physiol., 87,89-106.

141 バナジン酸によるアストロサイト細胞骨格アクチンの再構成

小山　豊・馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕
血清非存在下、0.5 mM dibutyryl cAMP(DBcAMP)による処置は、培養アストロサイトに細胞質の退行を伴う形態変化およびstress fiberとfocal adhesionの消失をおこした。DBcAMPにより形態変化した細胞に対して、1 mM オルソバナジン酸(Na_3VO_4)の添加は、細胞質の拡張とstress fiber、focal adhesionの再形成を起こした。Na_3VO_4は、5μM サイトカラシンB、50μM ML-9、20μM W-7により形態変化した細胞にも、stress fiberの形成を促進させた。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)の細胞質への注入は、アストロサイトのstress fiberを消失させた。C3酵素を注入された細胞に対して、Na_3VO_4は、stress fiber形成を起こさなかった。これらのことは、Na_3VO_4による、アストロサイト細胞骨格アクチン再構成には、低分子量Gタンパクであるrhoが関与することを示す。

細胞骨格アクチンの再構成は、細胞の形態、分裂、接着、cytosisなど多くの機能に関わる。アストロサイトにおいて、細胞内cAMPの増加は、アクチンの脱重合を起こしグリア突起形成を促すことが知られている(1)。これに対し我々は、エンドセリンが、培養アストロサイトのアクチン重合を起こし、グリア突起形成を抑制することを示しているが(3)、その細胞内機構は明かでない。近年、細胞外刺激による細胞骨格アクチンの重合に、タンパクチロシンリン酸化の関与が示唆されている(2.5)。今回、アストロサイトのアクチン再構成におけるチロシンリン酸化の関与について、チロシンフォスファターゼ阻害作用を持つバナジン酸を用いた検討を行った。

【実験方法】

1. 培養アストロサイトの調製：アストロサイトは1-2日令のWistar系ラット大脳より既報の方法で調製した(4)。
2. 細胞骨格アクチンおよびfocal adhesionの観察：薬物処置は、20 mM HEPES/NaOH pH7.4, 0.1% BSAを加えた無血清Eagle培地中で行った。薬物処置後、細胞を3 %パラホルムアルデホドで固定した。細胞骨格アクチンの観察は、rhodamine-phalloidinによる蛍光染色、focal adhesionの形成は抗vinculin抗体を用いた間接蛍光染色で行った。
3. 培養アストロサイトへのマイクロインジェクション：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 pH7.4, 120 mM KCl)で20μg/mlとし、注入された細胞の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、培養アストロサイトへと注入した。　薬物処置後、細胞を固定し、rhodamine-phalliodinおよび FITC-抗マウスIgG抗体による二重染色を行った。細胞質中にFITC蛍光を発する細胞のみ、stress fiber形成を観察した。

【結果】

Rhodamine-phalliodinおよびvinculin染色は、ラット大脳由来1型アストロサイトにおいて、stress fiberが主な細胞骨格アクチンであること、および、その先端にはfocal adhesionが形成されていることを示した。無血清培地中での、0.5 mMDBcAMPによる処置は、培養アストロサイトに細胞質の退行を伴う形態変化(stellation)を起こした。アストロサイトのstellationと共に、stress fiberおよびfocal adhesionが消失した(Fig.1A)。DBcAMP処置された細胞に対して1 mM Na_3VO_4の添加は、アストロサイトの細胞質の拡張、stress fiberおよびfocal adhesionの再形成を起こした(Fig.1B)。アクチン重合阻害薬であるサイトカラシンB(CB)も、アストロサイトのstellationおよびstress fiber消失を起こした(Fig.1C)。Na_3VO_4の添加は、CB処置に対してもstress fiberを形成させた(Fig.1D)。ミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬であるML-9、カルモジュリン

阻害薬W-7によるstellationもNa_3VO_4の添加で反転した。アストロサイトへのマウスIgGの注入後も、多くの細胞(91%)はstress fiberを有したが,20μg/mlのC3酵素注入は、アストロサイトのstellationとstress fiberの消失を起こした(Table 1)。C3酵素を注入された細胞に対して、Na_3VO_4はstress fiber形成を起こさなかった(Table 1)。

【考察】

今回の検討で、チロシンフォスファターゼ阻害作用を持つNa_3VO_4が、DBcAMPにより形態変化した培養アストロサイトのstress fiber形成を促進することが示された。このことは、アストロサイトのアクチン再構成にタンパクチロシンリン酸化が関与することを示す。またNa_3VO_4は、CB、ML-9、W-7のアクチン脱重合も反転させたが、C3酵素の作用は抑制しなかった。C3酵素は低分子量Gタンパクであるrhoを特異的に不活性化する。このことはNa_3VO_4によるアクチン重合がrhoを介したものであることを示す。

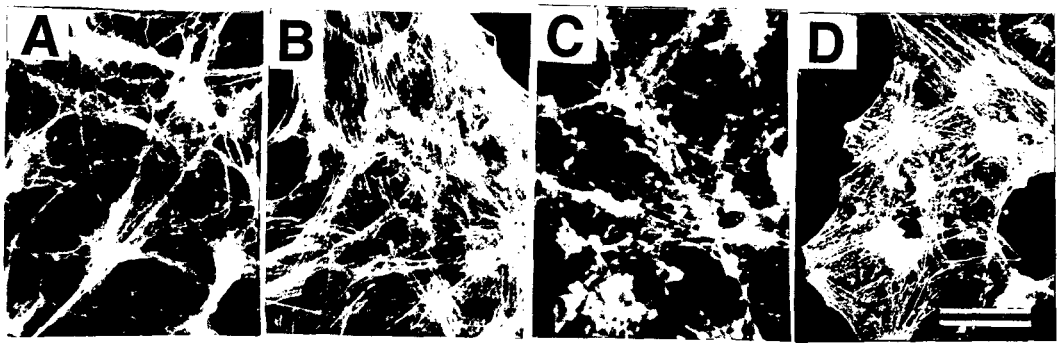


Fig. 1. Na_3VO_4によるアストロサイトのstress fiber形成：(A)：0.5 mM DBcAMP処置120分、(B):DBcAMP処置後Na_3VO_4添加60分、(C)：5μM CB処置60分、(D):CB処置後Na_3VO_4添加60分　Bar=50μm

Table. 1. C3酵素注入細胞に対するNa_3VO_4の作用

細胞数		全細胞	stress fiber	stellate型
Na_3VO_4添加前	対照	191	175	15
	C3酵素注入	280	3	252
Na_3VO_4添加後	対照	209	183	26
	C3酵素注入	258	4	228

アストロサイトは、C3酵素注入後1 mMNa_3VO_4で60分間処置した。Stress fiberおよびstellationを起こした細胞数を示した。マーカータンパクのみ注入したものを対照とした。

【引用文献】

1.Baorto D.M., Mellado W. and Shelanski M.L. (1992) J.Cell Biol. **117**:357-367.
2.Burridge K., Turner C.E. and Romer L.H. (1992) J.Cell Biol. **119**:893-903.
3.Koyama Y. and Baba A. (1994) Neuroscience **61**:1007-1016.
4.Koyama Y., Ishibashi T., Hayata K. and Baba A. (1993) Brain Res. **600**:81-88.
5.Ridley A.J. and Hall A. (1994) EMBO J. **13**:2600-2610.

142

ラットアストロサイトの細胞骨格に対するガングリオシドの作用

伊藤　仁一、磯部　真理
（名古屋市立大学医学部・生化学Ⅰ）

〔要約〕

培養ラットアストロサイトよりマイクロフィラメント画分（MF）とグリアフィラメント画分（GF）を脱重合抽出し、再構成系においてMFとGFの重合に対するガングリオシドの作用を検討した。ガングリオシドGM1、GM2、GM3はすべてMFとGFの重合を抑制した。GM1、GM2およびGM3はそれぞれ 3.2 μg/200 μl、2.8 μg/200 μl、そして 5.6 μg/200 μl の濃度で 7.5 μg/200 μl のMFの重合を1／2に抑制した。また 3.3 μg/200 μl、3.5 μg/200 μl、7.4 μg/200 μl の濃度でそれぞれ 7.5 μg/200 μl のGFの重合を1／2に抑制し、GM1とGM2はGM3に比べてMFやGFの重合抑制作用が強いことが示唆された。一方、GD1aやGT1bのMF重合の1／2抑制濃度（IC50）は、それぞれ 2.2 μg/200 μl、1.2 μg/200 μlで、GF重合に対するIC50はそれぞれ 2.7 μg/200 μl および 1.7 μg/200 μl であった。同様にGD3のMF重合に対するIC50は 3.9 μg/200 μl、またGF重合に対するIC50は 4.0 μg/200 μl でGM3のそれに比べて強い重合抑制活性を示した。これらの知見は、ガングリオシドはシアル酸が増加するに従ってMFやGFの重合抑制作用が強くなることを示唆した。アシアロGM1はMFやGFの重合に対する抑制作用が認められず、さらにGM1のGF重合抑制作用を dose-dependent に抑制した。

ガングリオシドは細胞膜に分布しシアル酸を含む糖鎖部分は細胞外側に位置するため、 in vivo において細胞骨格と相互作用しがたい位置関係に有るといえる。しかしながら、GM2やGM3などのガングリオシドは細胞膜のみならず細胞質にも存在し、しかも中間径フィラメントと結合して colocalize することが報告されている。アストロサイトにもまた各種ガングリオシドが分布し、 Asou らはGM3が主要ガングリオシドであり、他にGD3やGD1aが存在することを報告している。また彼らはアストロサイトにはGM1を認めていないが、他の研究者でその存在を認めているものもある。

わたしたちはこれまでシアル酸をもつ合成糖脂質であるシアロシルコレステロール（SC）により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）とグリアフィラメント画分（GF）の重合が強く抑制され、これはSCがそれぞれアクチンおよびビメンチンに直接作用してMFおよびGFの重合を抑制するものであることを報告した 1－3）。今回、SCと同様にシアル酸を有する各種糖脂質のMFおよびGFの重合に対する影響を検討したところ各種ガングリオシドがMFとGFの重合を抑制することを見いだしたので報告する。

（実験方法）

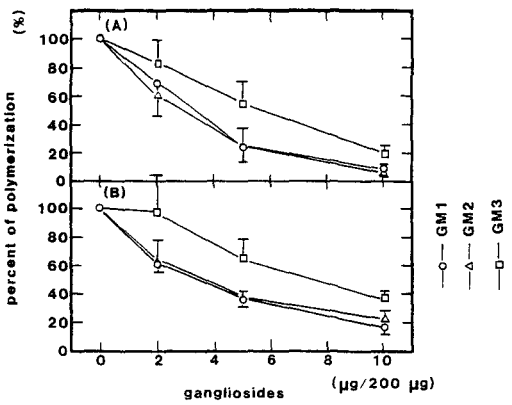
1．ラットアストロサイトの培養：胎性16日目のラット胎児大脳より髄膜を除去し、 0.1% トリプシンで処理した後、これを 20% FCS/DMEM にて1週間の一次培養および二次培養を経てアストロサイトを得、実験に供した。

2．マイクロフィラメントおよびグリアフィラメントの脱重合抽出と再構成：既に報告したように培養アストロサイトを 0.15% Triton で処理して得られた粗細胞骨格画分より、MF抽出バッファーおよびGF抽出バッファーで脱重合抽出してそれぞれMFとGFを得た。再構成は，各種ガングリオシド存在下でMFには 100 mM KCl と 10 mM $MgCl_2$ で、またGFには 150 mM NaCl と 10 mM $MgCl_2$ をそれぞれ添加し、37℃1時間重合させ、 100,000 x g、 1時間の遠心で沈殿画分を再構成フィラメントとして回収した。

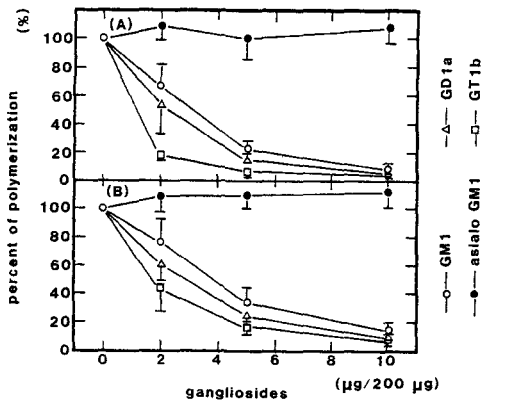
（結果および考察）

7.5 μg/200 μl 濃度のＭＦおよびＧＦに対し、ＧＭ１とＧＭ２は濃度依存的にほぼ同定度の重合阻害活性を示し、ＭＦ重合の１／２抑制濃度（ＩＣ５０）がそれぞれ 3.2 および 2.8 μg/200 μl であった。またＧＭ１、ＧＭ２は共に 10 μg/200 μl の濃度でＭＦの重合を９０％以上抑制した（図１）。一方ＧＦ重合に対するＧＭ１、ＧＭ２のＩＣ５０はそれぞれ 3.3 および 3.5 μg/200 μl で 10 μg/200 μl の濃度では共にＧＦ重合を約８０％抑制したにとどまった。ＧＭ３は 2μg/200 μl の濃度ではＭＦおよびＧＦの重合をほとんど抑制せず、ＭＦおよびＧＦ重合に対するＩＣ５０はそれぞれ 5.6 および 7.4 μg/200 μl でＧＭ１やＧＭ２の約１／２の重合阻害活性であった。またアシアロＧＭ１はＭＦおよびＧＦの重合を全く抑制せず（図２）、これらのガングリオシドにおいてシアル酸がＭＦやＧＦの重合抑制作用に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。各種濃度のシアル酸存在下においてもアシアロＧＭ１はＭＦやＧＦの重合を抑制しなかったことから、シアル酸はガングリオシド糖鎖構造に共有結合したもののみがＭＦやＧＦの重合に作用するものと考えられる。

ガングリオシドにおけるシアル酸がＭＦやＧＦ重合抑制に重要な役割を果たすならば、ＧＤ１やＧＴ１はＧＭ１に比べより強い抑制作用を示すことが予想された。ＧＤ１ａやＧＴ１ｂを用いて同様の実験をおこなったところ、ＭＦ重合の１／２抑制濃度（ＩＣ５０）は、それぞれ 2.2 μg/200 μl、1.2 μg/200 μlで、ＧＦ重合に対するＩＣ５０はそれぞれ 2.7 μg/200 μl および 1.7 μg/200 μl でＧＭ１に比べ、ＧＤ１やＧＴ１は著しく重合抑制活性が上昇した（図２）。同様にＧＤ３のＭＦ重合に対するＩＣ５０は 3.9 μg/200 μl、またＧＦ重合に対するＩＣ５０は 4.0 μg/200 μl で、ＧＭ３に比べＭＦやＧＦの重合に対する抑制活性は大きく上昇した。このようにガングリオシドはシアル酸が増加するに従ってＭＦやＧＦの重合抑制作用が強くなることが示唆された。アシアロＧＭ１はＭＦやＧＦの重合に対する抑制作用を示さないのみならず、ＧＭ１のＭＦやＧＦに対する重合抑制作用を dose- dependent に抑制した。



（図１）　ガングリオシドＧＭ１、ＧＭ２、ＧＭ３によるＭＦ重合（Ａ）およびＧＦ重合（Ｂ）の抑制



（図２）　ガングリオシドＧＤ１ａ、ＧＴ１ｂ、アシアロＧＭ１のＭＦ重合（Ａ）およびＧＦ重合（Ｂ）に及ぼす影響

（文献）

1) J.Ito et al., J. Neurochem., 61, 80-84, 1993
2) J.Ito et al., J. Neurochem., 62, 235-239, 1994
3) J.Ito et al., Neurochem. Int., in press.

143 分裂病患者死後脳左上側頭回における細胞骨格蛋白 fodrin の非対称性変化

北村　登*、西野　直樹、梶本　康雄、白井　豊、楊　常青、
小牟禮　修、橋本　健志**、白川　治
(*神鋼病院・精神科、**兵庫県立高齢者脳機能センター、神戸大学医学部・精神神経科)

〔要約〕

分裂病患者及び正常対照者死後脳の上側頭回 (Brodmann's area 22)より調製した粗膜標品をSDS-PAGEを用いて蛋白分画した。その結果、150kDa 蛋白が分裂病群 (n=11) の左上側頭回では正常対照群 (n=12) に比べ約50%有意に増加していた。150 kDa 蛋白をゲルより抽出し2次元電気泳動を行なうと、両群ともさらに等電点がpH7～6及びpH6～5 の蛋白スポットに分離された。対照例より精製した二つの蛋白のアミノ酸分析を行なうと、それぞれヒトfodrin α subunit のN末端側より後半及び前半部分のアミノ酸配列と一致した。fodrin α subunit はSDS - PAGE上240 kDaの細胞骨格蛋白で、calpain I により150 kDa蛋白に限定分解される。以上より、分裂病患者脳左上側頭回では fodrin α subunit の分解が亢進していることが示唆された。

[目的]

分裂病患者脳の形態学的研究では、側頭葉皮質、海馬及び海馬傍回の組織サイズの減少が指摘されている(1)。とりわけ、左上側頭回の形態学的異常は、分裂病患者の思考障害との間に対応関係があると報告されている(2)。本研究では、分裂病患者脳上側頭回において何らかの神経機能特異的蛋白が非対称性に変化している可能性を考え、当該蛋白の同定を試みた。

[実験方法]

対象：分裂病群はDSM-III-Rで診断された11例 (男7例、女4例)、正常対象群は12例 (男7例、女5例)で、平均年齢及び死後剖検時間について両群間に統計学的有意差はなかった。

標品調製：左右の上側頭回皮質組織を EDTA, 2-mercaptoethanol、leupeptine, PMSFを含む Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)でホモジナイズ後遠沈し(48,000 g)、得られた沈渣を粗膜標品とした。

電気泳動：SDS-PAGEはLaemmli の方法に従い6%ポリアクリルアミドゲル (PAG)を用いた。CNBrを用いた化学的蛋白分解後の蛋白分画には15% PAGを用いた。等電点電気泳動には5%ampholytes (pH 6～8 : pH 3.5 ～10 = 1 : 9)を含む5% PAGを用いた。

蛋白抽出：ゲル中の標的蛋白を切り出し、SDS, ammonium bicarbonate、2-mercaptoethanol, NaN_3 を含む 抽出液で24時間、暗所、室温で振盪した。濃縮は限外濾過で行なった。

アミノ酸配列の解析：ゲル上で精製した標的蛋白を抽出、濃縮後、150mM CNBrを含む 70 % ギ酸と24時間、暗所、室温で反応させた。アセトン沈殿で回収した蛋白をSDS- PAGEで分画し、PVDF膜に転写後、気相アミノ酸分析器でアミノ酸配列を解析した。

[結果]

分裂病患者脳左上側頭回における150kDa蛋白の増加：SDS-PAGEによる蛋白分画の結果、150kDa蛋白バンドは分裂病群左上側頭回で正常対照群同側及び分裂病群右側に比べ有意に増

加していた (Fig. 1)。

150kDa蛋白の2次元電気泳動：150kDa蛋白バンドをさらに分離するために、同部位より抽出した蛋白を2次元電気泳動した。その結果、150kDa蛋白は両群とも等電点がpH 7～6 (P-1)及びpH 6～5 (P-2) の二つの蛋白スポットに分離された。

P-1及びP-2蛋白のアミノ酸配列：正常対照例の上側頭回よりP-1及びP-2蛋白を精製、回収した。CNBrによる化学的分解の結果、両蛋白とも様々な分子サイズの蛋白バンドが認められた。PVDF膜に転写後、P-1及びP-2蛋白からのいくつかの蛋白バンドを対象にアミノ酸配列を解析した。その結果、P-1蛋白からの蛋白バンドはヒトfodrin α subunit (3)のN末端側より後半部分に、P-2蛋白からの蛋白バンドは前半部分のアミノ酸配列と一致した。以上より、分裂病群左上側頭回で増加していた150kDa蛋白は、fodrin α subunit の分解産物であることが判明した。

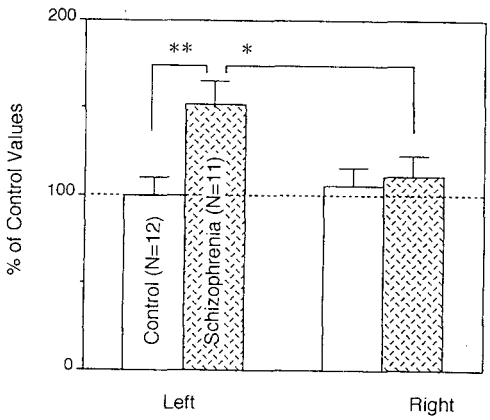


Fig. 1. 上側頭回におけるfodrin α subunit 分解産物（150 kDa 蛋白）の比較定量
分裂病群及び正常対照群死後脳左右上側頭回皮質組織から得られた膜標品をＳＤＳ電気泳動により分画後、Coomassie Brilliant Blue R250にて染色し、densitometerによって正常対照群左側を１００％として比較定量を行なった。
$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Student's t test, two-tailed)

[考察]

fodrinはα及びβ subunitよりなる細胞骨格蛋白であり(4)、神経細胞では、分化や成長、イオンチャンネルや神経伝達物質受容体の制御、輸送、神経線維の修復など様々な機能が推定されている。fodrin α subunit はSDS-PAGE上240kDaの蛋白で、Ca^{2+}依存性にcalpain Ⅰによって150kDa蛋白に限定分解される。ラット海馬切片ではNMDAによるfodrin α subunitの限定分解が認められ(5)、また、ラット小脳培養細胞ではこの限定分解はNMDA受容体特異的であると報告されている(6)。分裂病群左上側頭回におけるfodrin α subunitの分解産物の増加は、同部位でのNMDA受容体を介するグルタミン酸神経伝達亢進を示唆している。

[文献]

(1) Bogerts, B., (1993) Schizophrenia Bull., 19, 431 - 445.
(2) Shenton, M.E., Kikinis, R., Jolesz, F.A., Pollak, S.D., LeMay, M., Wible, C.G., Hokama, H., Martin, J., Metcalf, D., Coleman, M. and McCarley, R.W., (1992) N. Eng. J. Med., 327, 604 - 612.
(3) Moon, R.T. and McMahon, P., (1990) J. Biol. Chem., 265, 4427 - 4433.
(4) Dhermy, D., (1991) Biol. Cell, 71, 249 - 254.
(5) Seubert, P., Larson, J., Oliver, M., Jung, M.W., Baudry, M. and Lynch, G., (1988) Brain Res., 460, 189 194.
(6) Di Stasi, A.M.M., Gallo, V., Ceccarini, M. and Petrucci, T.C., (1991) Neuron, 6, 445 - 454.

144 プロリン指向性蛋白質燐酸化酵素によるMARCKSとMAP2の燐酸化反応

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cyclin-dependent protein kinase 5（cdk5）はプロリン指向性蛋白質燐酸化酵素の範疇に属し、種々の細胞で、細胞骨格蛋白質の燐酸化反応に関与している。今回、神経細胞における両酵素の生理機能を明らかにする目的でmyristoylated alanine-rich C kinase substrate（MARCKS）と微小管付随蛋白質2（MAP2）の燐酸化反応について検討した。ラット脳より精製したMARCKSは両酵素で強く燐酸化を受け、cdc2キナーゼとcdk5によりMARCKSの1モル当たりそれぞれ1.4モル及び0.6モルの燐酸が取り込まれた。二次元ペプチドマップ法により、cdc2キナーゼとcdk5による燐酸化部位はprotein kinase C（PKC）による燐酸化部位とは異なることが明らかとなった。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cdk5による燐酸化反応は本結合を増強した。さらに、牛脳から精製したMAP2は両酵素により強く燐酸化を受けた。cdc2キナーゼとcdk5によりMAP2の1モル当たりそれぞれ、12.6モル及び2.9モルの燐酸が取り込まれた。これらの結果はMARCKSやMAP2の機能がcdc2キナーゼやcdk5により調節されてい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、成熟脳の細胞質より分離精製されたcdk5（2）あるいはtau protein kinase II（3）は同一の酵素であり、cdc2キナーゼと類似の酵素であることが明らかとなった。今回、両酵素の神経細胞での生理機能を明らかにする目的で、MARCKSとMAP2の燐酸化反応について検討した。

〔方法〕

ラット脳より、MARCKS（4）、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）（5）、PKC（6）、蛋白質脱燐酸化酵素2Aのホロ酵素（PrP2Ah）（7）、牛脳よりMAP2（7）と蛋白質脱燐酸化酵素2Aの触媒サブユニット（PrP2Ac）（7）を、豚脳よりcdk5（3）を、ヒトデ卵母細胞よりcdc2キナーゼ（8）を精製した。燐酸化反応（4）、脱燐酸化反応（4）は既報の方法により、^{125}I-カルモデュリンとの架橋実験はGraffらの方法（9）によりおこなった。

〔結果及び考察〕

MARCKSのcdc2キナーゼとcdk5による燐酸化反応: 精製したMARCKSはcdc2キナーゼとcdk5により強く燐酸化を受けた。MARCKSの1モル当たりそれぞれ、1.7、1.4、0.6モルの燐酸が取り込まれた（表1）。cdc2キナーゼとcdk5によるMARCKSの燐酸化反応と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で異なったパターンを示した。b）PKCはMARCKSのセリン残基のみを燐酸化した。cdc2キナーゼとcdk5はMARCKSのセリンとスレオニンの両残基を燐酸化した。c）PKCによるMARCKSの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cdk5によるMARCKSの燐酸化反応は約30％しか抑制されなかった。d）PKCにより燐酸化されたMARCKSはPrP2AhとPrP2Acで強く脱燐酸化された。cdc2キナーゼとcdk5により燐酸化されたMARCKSはPrP2Ahでのみわずかに脱燐酸化された。e）MARCKSとカル

モデュリンとの結合は、PKC による燐酸化反応によりコントロールの約 35 %に抑制された。cdc2 キナーゼと cdk5 による燐酸化反応により本結合は約 130 %に増強された。

表1．PKC、cdc2 キナーゼ、cdk5 により MARCKS に取り込まれた燐酸量

	Phosphorylation (pmol)	MARCKS Phosphorylation (%)	MARCKS に取り込まれた燐酸量 (mol/mol)
PKC	28.4 ±2.0	77.8	1.7 ± 0.1
cdc2 キナーゼ	21.2 ± 0.5	83.3	1.4 ± 0.1
cdk5	9.0 ± 0.5	88.3	0.6 ± 0.1

MARCKS標品（0.5 μg）をそれぞれ 100 nM の蛋白質燐酸化酵素を用いて 30 分間燐酸化した。Phosphorylation（pmol）は phosphocellulose paper を用いて測定した MARCKS 標品に取り込まれた燐酸量を示す。MARCKS 標品中の MARCKS に取り込まれた燐酸の割合（MARCKS phosphorylation（%））は同様に燐酸化した MARCKS を SDS-PAGE 後、バイオイメージアナライザーにより検出した。MARCKS 標品中の他の蛋白質の混入量は約 20 %であり、それぞれの値から MARCKS に取り込まれた燐酸量（mol/mol）を算出した。

MAP2 の cdc2 キナーゼと cdk5 による燐酸化反応: 精製した MAP2 は cdc2 キナーゼと cdk5 により強く燐酸化を受けた。cdc2 キナーゼと cdk5 による 90 分間の燐酸化反応により、MAP2 の 1 モル当たりそれぞれ、12.6 モル及び、2.9 モルの燐酸が取り込まれた。V8 プロテアーゼによる一次元ペプチドマップ法により、両酵素は CaM キナーゼⅡとは異なる部位を燐酸化することが明らかとなった。また、cdk5 は cdc2 キナーゼで燐酸化される部位の一部を燐酸化した。両酵素とも MAP2 のセリンとスレオニンの両残基を燐酸化した。

これらの結果より MARCKS と MAP2 が cdc2 キナーゼと cdk5 の良好な基質であることが明らかとなった。両酵素が燐酸化するセリン、プロリン配列とスレオニン、プロリン配列は MARCKS ではカルモデュリンやアクチンとの結合部位の近傍に認められる。また両配列は MAP2 ではチューブリンとの結合部位の近傍に複数箇所存在する。したがって、両酵素は MARCKS や MAP2 の燐酸化を介して、細胞骨格全体の機能を調節している可能性が考えられる。今後、両酵素による MARCKS と MAP2 の燐酸化部位を明らかにし、細胞内での該当部位の燐酸化反応を詳細に検討する予定である。

〔文献〕

1) Okano H.J., Pfaff D.W. and Gibbs R.B. *J. Neurosci.* **13**, 2930-2938 (1993).
2) Lew J., Beaudette K., Litwin C.M.E. and Wang J.H. *J. Biol. Chem.* **267**, 13383-13390 (1992).
3) Ishiguro K., Takamatsu M., Tomizawa K., Omori A., Takahashi M., Arioka M., Uchida T. and Imahori K. *J. Biol. Chem.* **267**, 10897-10901 (1992).
4) Yamamoto H., Arakane F., Ono T., Tashima K., Okumura E., Yamada K., Hisanaga S., Fukunaga K., Kishimoto T. and Miyamoto E. *J. Neurochem.* in press.
5) Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K. and Miyamoto E. *J. Neurochem.* **39**, 1607-1617 (1982).
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) Hisanaga S., Ishiguro K., Uchida T., Okumura E., Okano T. and Kishimoto T. *J. Biol. Chem.* **268**, 15056-15060 (1993).
9) Graff J.M., Young T.N., Johnson J.D. and Blackshear P.J. *J. Biol. Chem.* **264**, 21818-21823 (1989).

145 ラットグリオーマC6細胞における容量性Ca^{2+}流入について

竹村晴夫、井本憲志、坂野晶司、八田慎一、大鹿英世
札幌医科大学医学部薬理学教室

〔要約〕
神経細胞における細胞内Ca^{2+}貯蔵部位と連関するCa^{2+}流入（容量性Ca^{2+}流入）について、ラットグリオーマC6細胞を用いて検討した。小胞体 Ca^{2+}-ATPase阻害薬 thapsigargin (TG) による持続的な細胞内Ca^{2+}濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇は受容体作動性Ca^{2+}流入の阻害薬であるtetrandrine (TET)により消失した。百日咳毒素(IAP)、フォーボルエステル、チロシンキナーゼ阻害薬及び細胞骨格阻害薬をそれぞれ前処置しても、TGによる$[Ca^{2+}]_i$は影響を受けなかった。C6細胞にも容量性Ca^{2+}流入が存在するが、その活性化機構にはIAP感受性のG蛋白質、プロテインキナーゼC(C-kinase)、チロシンキナーゼ及び細胞骨格は関与しないものと思われる。

【目的】神経細胞には膜電位依存性Ca^{2+}チャネル(VOC)及び受容体作動性Ca^{2+}チャネル(ROC)が存在するが、前者に比べて後者の活性化機構は良くわかっていない。我々は非興奮性の耳下腺細胞の細胞内Ca^{2+}貯蔵部位へのCa^{2+}の再充填過程を検討することにより、貯蔵部位のCa^{2+}の減少が細胞外液からのCa^{2+}の流入を促進することを見出し容量性Ca^{2+}流入を提唱し(1)、さらに、この容量性Ca^{2+}流入の解析には小胞体 Ca^{2+}-ATPase阻害薬のTGが良いツールであることを報告した(2)。現在、容量性Ca^{2+}流入は種々の細胞で認められて来ており、神経細胞においても確認されているが、どのような機序で貯蔵部位のCa^{2+}の減少がCa^{2+}の流入を促進するかはわかっていない。そこで、VOCが存在しないラットグリオーマC6細胞を用いて、容量性Ca^{2+}流入の作用機序について検討した。

【方法】C6細胞は国立衛生試験所細胞バンクより提供を受け、15%ウマ血清及び2.5%ウシ胎児血清を含むHam's F10液にて培養した。$[Ca^{2+}]i$は、fura-2/AM (5 μM)を37℃で45分間負荷した細胞をPucks溶液にてフラスコより剥離し、細胞浮遊液としてその蛍光を測定することにより、既に報告した方法に基づいて行った(3)。

【結果及び考察】我々は先にPC12及びNG108-15細胞の浮遊液を用いた$[Ca^{2+}]_i$の実験からTGに感受する細胞内Ca^{2+}貯蔵部位が容量性Ca^{2+}流入に重要であることを報告したが(3)、これらの細胞にはVOCとROCが存在するので系を簡単にするため、今回、ROCしか存在しないC6細胞を用いた。C6には種々の薬物受容体が存在するが、容量性Ca^{2+}流入の解析に良いツールである小胞体Ca^{2+}-ATPase阻害薬のTGをCa^{2+}動員薬物として用いた。図1に TG (100 nM) による$[Ca^{2+}]_i$の変化を示したが、一過性の$[Ca^{2+}]_i$の上昇とそれに続く持続的上昇が認められた。この持続はROCを阻害するTET (100 μM)により消失した。従って、C6においても、ROCに容量性Ca^{2+}流入が関与するものと考えられる。

そこで、容量性Ca^{2+}流入の活性化機構の候補について実験した。先ず、IAPに感受するG蛋白質が容量性Ca^{2+}流入に関与することが肝細胞で報告されている(4)ので、IAP (500 ng/ml)を24時間処置したC6細胞を用いてCa^{2+}動員薬物による$[Ca^{2+}]_i$を測定したが、無処置のC6細胞でのものとTGの応答に変化はなかった。好中球ではC-kinaseが関与するので(5)、そのactivatorであるフォーボルエステル(PMA)及び阻害薬であるstaurosporineをそれぞれ1 μMという高濃度で5分間前処置してもTGによるCa^{2+}の流入に影響を及ぼさなかった。チロシンキナーゼが容量性Ca^{2+}流入に関与する証拠が増えて来ているので(6)、その阻害薬である genistein (10 μM)を5分間前処置したC6細胞を用いたが、TGによるCa^{2+}の流入は変化しなかった。最後に、細胞骨格との関連性(6)について検討するため、その阻害薬であるcytochalasin D (10 μM) 及びcolchicine (10 μM)を2時間前処置したC6細胞を用いたが、Ca^{2+}動員薬物による$[Ca^{2+}]i$の上昇は影響を受けなかった。

以上のことから、C6細胞には容量性Ca^{2+}流入が存在するが、その活性化機構としてIAP感受性のG蛋白質、C-kinase、チロシンキナーゼ及び細胞骨格は関与しないものと考えられる。

【文献】

1. Takemura, H. and Putney, J. W., Jr. (1989) *Biochem. J.* 258, 409-412
2. Takemura, H. *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 12266-12271
3. Takemura, H. *et al.* (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 1518-1526
4. Berven, L. A. and Barritt, G. J. (1994) *FEBS Lett.* 346, 235-240
5. Montero, M. *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 13055-13061
6. Putney, J. W., Jr. and Bird, G. S. J. (1993) *Endocr. Rev.* 14, 610-631

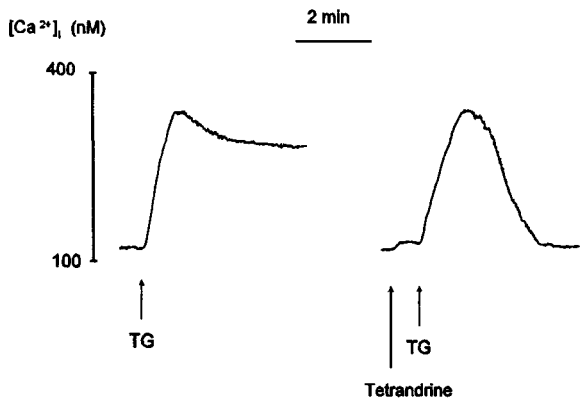


図1 TGによる$[Ca^{2+}]i$の変化とTETの効果

人名索引 （ＡＢＣ順，番号は演題番号を表します）

（A）

阿部廣巳……56
赤川公朗……35
秋山一文……53・83
安藤正人……57・71・88
青木和子……7・8・9・10・11
荒金太……144
荒川義弘……93
浅井清文……74
浅野省一……49・124
浅野富子……58・59
東泰孝……117

（B）

馬場明道……49・124・141

（C）

陳大志……42
Chenak JM……101
千原和夫……56
千谷晃一……71
Crystal RG……101

（D）

Dekker－Ohno京子……88
Diamond I……74
丁云……98
土居孝至……73
堂前純子……106

（E）

江頭亨……20
遠藤英俊……43
遠藤光敏……92
遠藤泰……50・79
榎戸靖……126・136

（F）

Fibiger HC……45
藤嵜泰利……24・25
藤澤仁……34
藤代博……78
藤田公和……57・71・88
藤田興……103
藤原智徳……35
深田有理子……27
深間内文彦……133
福田英臣……96
福田裕恭……64・68
福光秀文……125
福永浩司……144
福山幸三……40・112
古川昭栄……125
古川美子……125
古塚大介……69・81・84

（G）

Goldstein M……86
Gordon AS……74
後藤峰弘……43
Grundke－Iqbal I……22
顧擁軍……18

（H）

萩原民雄……7・8・9・10・11
濱堯夫……1
浜田直之……47
濱口勝彦……108
浜村貴史……53
浜之上誠……137
浜上尚也……50・79
韓大健……70
花井一光……27
原田信広……106
長谷川かおり……58・59・60
橋本均……124
橋本健志……143
橋本喜次郎……77
秦英代……51
畠中寛……126・136
畠瀬修……122
羽藤直人……73
八田愼一……61・145
早川徹……97
林謙介……29・138
林健蔵……17
林正浩……17
日高和幸……66
平藤雅彦……79
平井俊策……29
平野均……45・46
平野誠……77
平田ゆかり……89
広津辰美……40
久永真市……19・116・144
本間啓子……121
本多虔夫……71
本藤久雄……77
本庄英雄……17
堀誠治……33
堀米恒好……65
干場純治……80
細川武……108

（I）

井端泰彦……52・56
市村徹……65
家後壽……27
井口昭久……43
井原康夫……18
飯田昌孝……123
伊苅弘之……43・101
池田圭朗……139
池田顯……36・140
池亀守……103
池内俊彦……136
以倉康充……22・23・120
今井貴雄……91
今井祐二……97
今泉美佳……36・140
井本憲志……145
稲熊裕……58・59・60

Ingendoh A …… 105
Ingram DK …… 101
井上敦子 …… 32
井上和秀 …… 31
井上幸紀 …… 24・25
井上崇文 …… 112
Iqbal K …… 22
石毛久美子 …… 96
石原武士 …… 83
石井晃 …… 74
石川紘一 …… 51
石川良樹 …… 138
石岡憲昭 …… 130
磯部一郎 …… 28
磯部真理 …… 142
礒辺俊明 … 4・65・104・105
板野俊文 …… 122
井藤英喜 …… 12
伊藤英樹 …… 24・25
伊東秀記 …… 58・59・60
伊藤仁一 …… 142
伊藤美津樹 …… 65
伊藤芳久 …… 96
岩佐朱美 …… 1

（K）

貝淵弘三 …… 3
梶裕之 …… 65
梶本康雄 …… 76・143
柿木達也 …… 87
亀下勇 …… 34
金井みち子 …… 104・105
金松知幸 …… 26・38
金山巌 …… 21
金澤美穂 …… 133
金子厚 …… 108
兼子幸一 …… 67・78
金子忠広 …… 3
金行孝雄 …… 80
柏原健一 …… 83
柏木知宏 …… 17
柏木雄次郎 …… 23
片岡喜由 …… 117
加藤久子 …… 26
加藤兼房 … 58・59・60・127
加藤一麿 …… 30
加藤聖 …… 121
加藤修一 …… 101
加藤泰治 …… 28
勝元栄一 …… 69・81・84
桂昌司 …… 42・90
川上秀史 …… 72・119
河村幸佐 …… 77
川村光毅 …… 115
川村将弘 …… 33
川島育夫 …… 107
川島誠一 …… 5
河田光博 …… 109
菊地哲朗 …… 32
金哲熙 …… 100
木村宏 …… 27
木岡哲郎 …… 81
切池信夫 …… 24・25
岸本健雄 …… 19・116・144
北村邦男 …… 39・108
北村登 …… 76・143
鬼頭昭三 …… 133
木内祐二 …… 44
小林正明 …… 99
小林雅文 …… 48
小林三和子 …… 128
小林聡 …… 29
小浜一弘 …… 138
小池達郎 …… 113・114
小糸寿美 …… 131
小泉修一 …… 31
小島正己 …… 126
甲村英二 …… 97
小牟禮修 …… 143
近藤啓次 …… 129
高坂新一 …… 111・137
越川憲明 …… 48
小谷泰教 …… 129
小山豊 …… 141
小澤修 …… 58・59
Kreutzberg GW …… 111
久保武一 …… 126
工藤喬 … 21・22・23・120
熊倉鴻之助 …… 36・140
国広沖之 …… 65
國井修一 …… 88
郭哲輝 …… 100
Kuo H …… 101
倉石博 …… 7・8・9・10・11
栗原堅三 …… 128
倉橋寿 …… 37
栗岡政典 …… 24・25
栗山欣弥 …… 42・90
黒田重利 …… 53
黒田陽子 …… 81
黒木淳 …… 93
黒木貴夫 …… 99
車地暁生 …… 67・78
車谷隆宏 …… 120
九島洋一 …… 35
楠戸正子 …… 57
葛谷博磁 …… 103

（L）

李愛軍 …… 27
章龍 …… 117

（M）

前田潔 …… 87
牧野俊彦 …… 118
丸野内棣 …… 135
丸山博文 …… 72
丸山敬 …… 5
丸山和佳子 …… 85
政田哲也 …… 122
正宗研 …… 30
Mastrangeli A …… 101
増山善明 …… 86
俣賀宣子 …… 133
松田正司 …… 129
松田敏夫 …… 49・124

松田義宏……131
松井秀樹……122
松井太衛……71
松居徹……118
松川則之……13
松本清……123
松本邦夫……137
松本真知子……79
松本光之……66
松本孝……77
松尾徳幸……97
松岡一郎……128
松谷天星丸……89
松山善次郎……72
馬渡一浩……121
Meldolesi J……16
三木直正……98・100
三木新也……32
御子柴克彦……91
南勝……50・79
峯田寿裕……40
御園生裕明……36・140
三谷章……117
三浦理絵……133
宮川太平……19
三宅正治……1
宮本英七……19・63・144
宮内達雄……118
宮崎唯雄……6
溝淵睦彦……73
溝口克弘……47
森啓……14
盛政忠臣……80
森本昌史……109
森田規之……109
森田誠治……32
諸治隆嗣……54
村上信五……73
村上哲英……122
村瀬真一……115
村島善也……82
村田康子……132
村山俊彦……41
武藤厚……118
（N）
名畑博之……118
鍋島俊隆……75
長藤寿昭……118
長森健……47
長尾省吾……122
永田功……107
永田豊……57・71・88・89
永津俊治……103
中福雅人……3
中川康史……3
中原辰雄……77
中井真通……87
中嶋一行……111・137
中村薫……77
中村重信……72・119
中村俊……3
中村敏一……137
中村祐……15・23
中西亜紀……81
中尾純治……115
中城有喜……73
仲田義啓……32
中山洋……4・104・105
中山恒……113・114
直井信……85
楢原正則……1
新川久義……15・21
西田朗……64・68
西垣裕……7・8・9・10・11
西村健……15・21・22・23・120
西野直樹……76・143
信川貴子……114
野田幸裕……75
野口鉄也……99
野村恭一……39
野村正彦……39・108
野村靖幸……27・41
野々村健……126
（O）
小田毅……113
小川正晴……91
小川智……97
小川隆志……50
荻田喜代一……62・70・102・117
小口勝司……44
小鹿幸生……13・134
岡田秀親……13
岡田弘二……17
岡本仁……100
岡村均……52・56
岡野栄之……91
大熊誠太郎……42・90
奥野正景……24・25
奥山典生……104・105
奥山茂……55
小俣三郎……65
大村裕……27
小野常彦……19・63
折茂肇……12
大鹿英世……61・145
大杉武……98
大塚康史……134
小山文隆……18
尾崎宜洋……69・81・84
小澤寛樹……61
（P）
Papazafiri P……16
Podini P……16
（R）
Reddington M……111
Roth GS……101
（S）
佐原成彦……14
斎藤秀哉……79
斎藤浩……64・68
斎藤尚亮……76
斎藤茂治……99
斎藤優……99

斎藤利和……61
斉藤祐見子……5
坂上宏……123
酒井紀……33
榊原伸一……91
坂本秀生……103
坂本安……39
阪中雅広……129
坂野晶司……145
佐野輝……129
佐野訓明……95
佐々木和男……27
佐々木洋……138
佐藤潔……2・110
佐藤昭夫……12
佐藤淳子……130
佐藤圭子……83
佐藤壮一……41
佐藤督忠……7・8・9・10・11
佐藤陽一……44
澤田誠……135
仙波純一……133
仙波りつ子……127
瀬田和夫……104・105
芝軒信次……51
渋谷匡子……39
重吉康史……56
清水博喜……93
清水雅美……64・68
清水義雄……53
新開史子……4
篠田純……115
篠田友孝……4・104
白井豊……76・143
白石哲也……40・112
白川治……76・143
白尾智明……29・138・139
小路武彦……53
庄盛敏廉……80・83
須田喜久夫……2・110
菅原正伯……30
菅原恵……51
杉山昌一……118
鈴木二郎……82
鈴木祐介……43
錫村明生……135

（T）

田渕和雄……40・112
多田祥子……66
田井直……107
田島稔久……43
高木勉……97
高原ひろみ……26・38
高橋勤……85
高畑直彦……61
高松研……99
高内茂……87
竹田二美代……7・8・9・10
武田雅俊……15・21・22・23・120
竹田稔……7・8・9・10・11・123
武田良平……73
武田泰生……6
竹本なぎさ……137
竹村晴夫……145
武富保……37
田熊一敞……49・124
玉飼博之……50
田丸政男……88・89
田中千賀子……87
田中秀和……100
田中順一……33
田中正敏……47
田中亮……106
田中佐知子……44
田中聡一……29
田中秀逸……113
田中隆彦……47
田岡万悟……104
田島和周……19・63
立峚延族……57
寺田庄一……39
東田道久……94
戸田啓介……40・112
東藤直樹……13
富樫広子……79
徳田雅明……122
富田克……47
富山勝則……48
融道男……67・78
戸谷重雄……139
遠山育夫……27
遠山正彌……97
豊島至……30
土田晃敬……44
津田和志……86
津田正明……95
塚田裕三……26・38・132
堤哲之……77

（U）

内田和久……4・104
内田諭希……32
内村英幸……77
内山順二……65
上村敬一……37
植村慶一……6・115・139
植村研一……92
上野修一……129
植月太一……100
卜部諭……17
宇佐美美穂子……14

（W）

和田千鶴……30
和田博夫……12
和中明生……97
渡辺明子……78
渡辺裕司……94
渡部和彦……33
渡部正行……61
渡辺貴夫……28

（Y）

山田清文……75
山田雅司……136
山田通夫……45・46

山　田　佐登留 …… 78
山　上　　榮…24・25・69・81・84
山　口　和　彦 …… 35
山　口　知　子 …… 16
山　口　時　男 …… 66
山　口　　徹 …… 87
山　本　秀　子 …… 54・55
山　本　秀　幸 …… 19・63・144
山　元　　弘 …… 131
山　本　敏　文 …… 54・55
山　室　　裕 …… 108
山　西　嘉　晴 …… 93
山之端　万　里 …… 132
山　下　拓　史 …… 119
山　下　俊　英 …… 97
山　脇　成　人 …… 64・68
柳　原　尚　明 …… 73
柳　瀬　尚　人 …… 117
楊　　常　青 …… 76・143
保　田　　稔 …… 87
安　井　裕　子 …… 121
横　尾　秀　康 …… 47
横　谷　　昇 …… 69・81・84
横　山　ちひろ …… 52
米　田　幸　雄 … 62・70・102・117
吉　田　真　美 …… 47
吉　田　武　美 …… 44
吉　井　春　夫 …… 27
吉　川　和　明 …… 100
吉　村　和　法 …… 39・108
吉　村　敬　一 …… 24

（Z）

Zhang L …… 101
張　　玉　祥 …… 119

神経化学　34巻　第2号

平成7年6月15日発行
編集兼発行者　日本神経化学会
代表者　宮本　英七
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　株式会社 清真印刷