ISSN：0037－3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry

Vol. 35 (No. 3), 1996

第39回日本神経化学会（横浜）大会論文集号

平成 8 年 10 月

目　次

編集委員 134

カテゴリー目次 135
論文目次 136

Review & Preview Lectures ..... 166～171
シンポジウム ..... 172～231
口演・ポスター
1．行動 ..... 232～241
2．精神疾患 ..... 242～261
3．神経疾患 ..... 262～275
4．モデル動物 ..... 276～293
5．脳虚血 ..... 294～321
6．老化 ..... 322～329
7．アルツハイマー病 ..... 330～367
8．ニューロンの分化 ..... 368～391
9．グリア細胞 ..... 392～417
10．細胞死 ..... 418～463
11．神経系栄養因子 ..... 464～511
12．神経伝達物質放出 ..... 512～527
13．神経伝達物質受容体 ..... 528～557
14．NOとNO合成酵素 ..... 558～583
15．成長円錐 ..... 584～605
16．細胞骨格タンパク質 ..... 606～619
17．シグナル伝達 ..... 620～645
18．グリコース代謝 ..... 646～651
19．脳タンパク質 ..... 652～657
20．神経活動と遺伝子発現 ..... 658～673
21．転写因子 ..... 674～689
22．形態形成と遺伝子 ..... 690～703
23．遺伝子導入 ..... 704～707

編集後記 708
人名索引 ..... 709～720

神経化学

第39回 日本神経化学会大会論文集

PROCEEDING OF THE 39th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　横浜

10月2日(水), 10月3日(木), 10月4日(金)

Vol. 35 (No. 3), 1996

日本神経化学会



編 集 委 員

（ＡＢＣ順）

五 嶋 良 郎	（横浜市立大学医学部薬理学）
堀 江 秀 典	（横浜市立大学医学部生理学第一）
井 上 順 雄	（横浜市立大学医学部生化学第一）
加 藤 武	（横浜市立大学大学院総合理学研究科）
川 本 進	（横浜市立大学医学部細菌学）
岸 本 英 爾	（神奈川県立精神医療センターせりがや病院）
中 山 孝	（横浜市立大学医学部生化学第一）
植 田 弘 師	（長崎大学薬学部薬物学）
山 本 敏 文	（横浜市立大学大学院総合理学研究科）
加 藤 尚 彦（代表）	（横浜市立大学医学部生化学第一）

[カテゴリー目次]

		論文番号
L.	Review and Preview Lectures	L1～L3
S1.	In vivo シナプス可塑性による記憶の分子機構研究	S1～S7
S2.	分子精神医学と脳の画像診断	S8～S12
S3.	トリプレットリピートから細胞死	S13～S19
SA.	Nitric oxide synthase (NOS) and action of nitric oxide	S20～S26
SB.	New factors and genes involved in developmental biology of neurons	S27～S31

1.	行動	1～5
2.	精神疾患	6～15
3.	神経疾患	16～22
4.	モデル動物	23～31
5.	脳虚血	32～45
6.	老化	46～49
7.	アルツハイマー病	50～68
8.	ニューロンの分化	69～80
9.	グリア細胞	81～93
10.	細胞死	94～116
11.	神経系栄養因子	117～140
12.	神経伝達物質放出	141～148
13.	神経伝達物質受容体	149～163
14.	ＮＯとＮＯ合成酵素	164～176
15.	成長円錐	177～187
16.	細胞骨格タンパク質	188～194
17.	シグナル伝達	195～207
18.	グルコース代謝	208～210
19.	脳タンパク質	211～213
20.	神経活動と遺伝子発現	214～221
21.	転写因子	222～229
22.	形態形成と遺伝子	230～236
23.	遺伝子導入	237～238

論 文 目 次

Review and Preview Lectures

L1 L-DOPA は内因性神経伝達物質か？ - 線条体を中心に ……166
1CL1 三須良實
(横浜市立大学・医・薬理)

L2 Disease as Dissonance: PET/SPECT Imaging in Communication Disorders……168
2CL2 Henry N. Wagner
(Divisions of Nuclear Medicine and Radiation Health Sciences, Johns Hopkins Medical Institutions)

L3 ショウジョウバエのニューロン・グリア分化決定遺伝子 *gcm* ……170
3CL3 堀田凱樹
(東京大学・大学院・理学系研究科 / 遺伝子実験施設)

シンポジウム

ICS1. In vivoシナプス可塑性による記憶の分子機構研究 (可塑性と記憶)

S1 Overview: 神経化学の対象としての記憶 ……172
1 小幡邦彦
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経化学部門)

S2 海馬長期増強におけるプロテインキナーゼの標的分子 ……174
2 福永浩司、宮本英七
(熊本大学・医学部・第一薬理)

S3 In vivo 海馬の可塑性に伴い発現調節される遺伝子群の探索と機能：長期記憶の分子基盤へのアプローチ……176
3 井ノ口馨[1]、小澤史子[1]、平井啓子[1]、村山明子[1]、斎藤喜人[1]、松尾亮太[1,2]、榊 佳之[2]、加藤明彦[1]
([1]三菱化学生命研、[2]東大・医科研・ヒトゲノム)

S4 In vivo マウス海馬歯状回の長期増強現象 - プロテインキナーゼ C の関与 - ……178
4 松山正剛[1]、Aryeh Routtenberg[2]
([1]神戸大学・医学部・薬理、[2]Northwestern 大学・Cresap 神経科学研究所)

S5 小脳シナプス可塑性と運動：ノックアウトマウスを用いた研究 ……180
5 狩野方伸
(理化学研究所・フロンティア研究システム・シグナル伝達機能)

S6 前庭代償における可塑性関連分子の探索：プロテインフォスファテースを中心に……182
6 木山博資、北原 糺
(大阪大学・医学部・バイオ・神経解剖)

S7 In vivo microdialysis を用いた神経伝達物質放出測定と記憶の研究 ……184
7 加藤 武[1]、丹波 修[2]、山本勝信[3]
([1]横浜市大・総合理学、[2]NTT 基礎研、[3]BASJ)

2CS2. 分子精神医学と脳の画像診断

S8 精神機能と分子機構 ……186
1 西川 徹、梶井 靖、海野麻未、橋本隆紀、戸田重誠、高橋勝宣
(国立精神・神経センター・神経研究所・疾病研究第三部)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

S9 2 精神神経疾患と臨床・分子遺伝学 ……188
米田 博
(大阪医科大学・神経精神医学教室)

S10 3 分子精神医学の問題点 - トリヌクレオチドリピート増幅疾患の観点から - ……190
大原浩市
(浜松医科大学・精神神経医学教室)

S11 4 MRS, fMRI と神経化学 ……192
成瀬昭二[1,2]、古谷誠一[1]、田中忠蔵[3]
([1]京都府立医科大学・放射線科、[2]脳神経外科、[3]明治鍼灸大学・脳神経外科)

S12 5 精神神経疾患と画像診断 ……194
岸本英爾
(神奈川県立精神医療センター・せりがや病院)

3CS3. トリプレットリピートから細胞死

S13 1 トリプレットリピートから細胞死 Overview ……196
辻 省次
(新潟大学・脳研究所・神経内科)

S14 2 高比活性 CAG 反復配列プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによるヒトゲノム中の増大した CAG 反復配列の同定法 ……198
三瓶一弘、五十嵐修一、江口郁代、辻 省次
(新潟大学・脳研究所・神経内科)

S15 3 伸張トリヌクレオチドはどのように形成されてきたか ……200
山田正夫
(国立小児病院・小児医療研究センター・遺伝)

S16 4 球脊髄性筋萎縮症のアンドロゲン受容体遺伝子異常と病態形成 ……202
祖父江 元、道勇 学、田中章景
(名古屋大学・医学部・神経内科)

S17 5 筋緊張性ジストロフィーとミオトニンキナーゼ ……204
石浦章一[1]、笹川 昇[1]、斎藤直人[1]、小池 恒[1]、渡辺知司[2]、下川雅丈[3]、臼杵扶佐子[4]、丸山 敬[5]、反町洋之[1]、鈴木紘一[1]
([1]東京大学・分生研、[2]虎ノ門病院、[3]武蔵野赤十字病院、[4]国立水俣病研究センター、[5]国立生理研)

S18 6 CAG リピート病はポリグルタミン病か ……206
貫名信行
(東京大学・神経内科)

S19 7 Machado-Joseph 病発症機構の分子モデル ……207
垣塚 彰
(京都大学・医学研究科・高次脳科学・神経・細胞薬理)

2ASA. Nitric Oxide Synthase (NOS) and Action of Nitric Oxide

S20 1 Neuronal Nitric Oxide: Biosynthesis and Actions at the Synapse ……208
David S. Bredt
(Dept. Physiol., Sch. Med., Univ. California, San Francisco)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

S21 2 Oligomerization of Nitric Oxide Synthase (NOS) - - Interisoformal Structure-activity Analysis of NOS ····210
Yasuo Watanabe, Hiroyoshi Hidaka
(Department of Pharmacology, Nagoya University School of Medicine)

S22 3 Regulation of iNOS Gene in Neural Cells and Its Role in Cell Death····212
Hiroyasu Esumi, Tsutomu Ogura, Yukiko Kurashima
(Invest. Treat. Div., Natl. Cancer Center Res. Inst., East)

S23 4 Neuronal Apoptosis by Glial iNOS/NO After Brain Ischemia ····214
Yasuyuki Nomura, Takashi Uehara, Tadashi Nishiya, Tomohiro Miyasaka
(Dept. Pharmacol., Fac. Pharm. Sci., Hokkaido Univ.)

S24 5 Induction of Neuronal NOS in Purkinje Cells ····216
Masayuki Ikeda
(Department of Physiological Chemistry, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University)

S25 6 Expression of Nitric Oxide Synthase (NOS) in Developing and Differentiating Rat Cerebellum····218
Takahiko Kato, Nobuo Inoue, Takashi Nakayama
(Dept. Biochem. I, Yokohama City Univ. Sch. Med.)

S26 7 Nitric Oxide Synthase-mediated Formation of Bioactive 6 - Nitronorepinephrine Identified in Mammalian Brain ····220
Toshio Nakaki[1], Futoshi Shintani[2], Shigenobu Kanba[2], Eiji Suzuki[2], Nobuyuki Sasakawa[3], Masahiro Asai[2]
([1]Dept. Pharmacol., Sch. Med., Teikyo Univ., [2]Dept. Neuro-psychiat., and [3]Pharmacol., Sch. Med., Keio Univ.)

2CSB. New Factors and Genes Involved in Developmental Biology of Neurons

S27 1 LIF, a Cytokine at the Neuroimmune Interface ····222
Paul H. Patterson
(Biology Div., California Institute of Technology, Pasadena)

S28 2 Functional Analyses of Neuronal Genes in Zebrafish ····224
Naomasa Miki, Cheol-Hee Kim, Che-Hui Kuo, Eiichi Taira, Osamu Muraoka, Hidekazu Tanaka
(Department of Pharmacology, Osaka University School of Medicine)

S29 3 Neural Restrictive Silencer and Its Binding Factor in Neuronal Terminal Differentiation and Neural-Specific Gene Regulation ····226
Nozomu Mori[1], Takuya Kojima[1,2], Yoshihisa Naruse[1,2], Sumie Muraoka[1]
([1]Laboratory of Inheritance and Variation, PRESTO, JRDC, [2]Dept. Bioscience, NAIST)

S30 4 Cell Polarity and Asymmetric Division of Neural Stem Cells ····228
Fumio Matsuzaki
(Dept. Mol. Genetics, National Institute of Neuroscience)

S31 5 Apoptosis-Inhibitory Factors, AIF-20 and AIF-22, and Its Signal Transduction ····230
Nobuyuki Fukushima[1], Hiroshi Ueda[2]
([1]Dept. of Pharmacol., Yokohama City Univ. Sch. of Med., [2]Dept. of Pharmacol., Fac. of Pharmaceutical Sci., Nagasaki Univ.)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

1. 行　動

1　制限給餌後のラットの rebound hyperphagia に閉所条件を加えた時の摂餌行動と扁桃体ドパミ
2E50　ン・セロトニン代謝 ……232
井上幸紀[1]、切池信夫[1]、栗岡政典[1]、岩崎進一[1]、藤嵜泰利[1,2]、山上　榮[1]
([1]大阪市立大・医・神経精神医学教室、[2]吉村病院)

2　ラットの rebound hyperphagia に閉所ストレスを加えた時の摂餌行動と線条体ドパミン代謝と
2E51　それに及ぼすハロペリドールの影響 ……234
栗岡政典[1]、切池信夫[1]、井上幸紀[1]、藤嵜泰利[1,2]、岩崎進一[1]、山上　榮[1]
([1]大阪市立大・医・神経精神医学教室、[2]吉村病院)

3　側坐核ドーパミンニューロン破壊はモティベーションを低下させるか？
2E52　I. 塁進比率強化スケジュールによる検討 ……236
堀　耕治、田中健一、和田尚子、野村正彦
(埼玉医大・第一生理)

4　片側側坐核 D_1、D_2 受容体刺激による turning behaviour の発現と線条体 dopamine 遊離の変化:
3Dp3　shell と core の役割の違い ……238
北村牧子[1]、吉田幸弘[2]、越川憲明[1]、小林雅文[1]
([1]日本大学・歯学部・薬理学教室、[2]歯科麻酔学教室)

5　ヒスタミン H_1 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおける行動異常とセロトニン遊離亢進に
3Dp4　ついて ……240
谷内一彦[1]、孫　立智[1]、新村　核[1]、井上　勲[2]、渡辺　武[2]、渡邉建彦[1]
([1]東北大学・医学部・第一薬理、[2]九州大学・生体防御医学)

2. 精神疾患

6　精神分裂病患者赤血球における膜リン脂質に関する研究 ……242
1Ba2　……中島　央[1]、安川節子[1]、中林　潤[1]、上田啓司[2]、高松淳一[3]、宮川太平[1]
([1]熊本大学・医学部・神経精神科、[2]宮崎県立富養園、[3]国立療養所菊地病院)

7　精神分裂病者から得られた Epstein-Barr Virus 転換Bリンパ球における cAMP 応答性の検討
1E16　……244
夏苅直己[1]、R.J. Wyatt[2]、J.M. Masserano[2]
([1]浜松医大・第二生化学、[2]NIMH Neuroscience Center)

8　悪性症候群の病態に基づいた動物モデルの開発と TRE 及び CRE への結合能の変化 ……246
1E17　谷井久志[1]、谷口典男[1]、浅沼幹人[2]、小川紀雄[2]、西村　健[3]、武田雅俊[1]
([1]大阪大学・医学部・精神医学教室、[3]甲子園大学・栄養学部、
[2]岡山大学・医学部・分子細胞医学研究施設・神経情報学部門)

注）上段, 論文番号；　下段, 演題番号

9 抗精神病薬の投与によって誘導されるFosおよびJun関連蛋白質の形態学的変化……248
1E18 尾崎宜洋[1]、勝元栄一[1]、横谷 昇[2]、撫井弘二[1]、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]同・附属刀根山結核研究所)

10 Sulpiride慢性処置によるラット前頭葉皮質初代培養細胞におけるNMDA誘発性Ca^{2+}流入
1E19 増強作用……250
林 輝男[1]、加賀谷有行[2]、小山田孝裕[2]、竹林 実[2]、横田則夫[2]、西田 朗[3]、
清水雅美[3]、山脇成人[2]
([1]広島静養院、[2]広島大学・医学部・神経精神医学講座、[3]国立呉病院・臨床研究部)

11 ラット脳下垂体ドパミンD2受容体およびG蛋白質αサブユニットに対する新規抗精神病薬
1E20 aripiprazole (OPC-14597) の影響……252
瀬戸真由美[1]、井上敦子[1]、菊地哲朗[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)

12 EHOC-1遺伝子のalternative splicingおよび組織発現……254
1Ba3 上野修一[1]、中村雅之[1]、佐野 輝[1]、田邉敬貴[1]、K. Yamakawa[2]、R. Korenberg[2]
([1]愛媛大学・医学部・神経精神、[2]UCLA・Cedars-Sainai医学センター・医学遺伝学)

13 培養神経細胞におけるアミノ酸刺激性細胞内Ca^{2+}上昇に対する抗うつ薬の抑制効果……256
1E21 竹林 実[1,2]、加賀谷有行[1]、林 輝男[1,3]、稲垣正俊[1]、田原康孝[1]、横田則夫[1]、
津久江一郎[2]、山脇成人[1]
([1]広島大学・医学部・神経精神医学講座、[2]瀬野川病院、[3]広島静養院)

14 新規抗うつ薬YM992の生化学的検討……258
1E22 畠中健一、山口時男
(山之内製薬株式会社・創薬研究本部)

15 ラット大脳皮質における慢性リチウム投与によるプロテインキナーゼCとGAP-43のリン
1Ba4 酸化の変化……260
長田賢一、貴家康男、菩提寺伸人、浅倉幹雄
(聖マリアンナ医科大学・神経精神科学教室)

3. 神経疾患

16 バイオセンサーを使用したニューロパチー患者血清のスクリーニング……262
1E23 北村邦男[1]、細川 武[2]、坂本 安[1]、寺田庄一[1]、吉村和法[1]、野村正彦[1]
([1]埼玉医大・第一生理、[2]神経内科)

17 Ramsay Hunt症候群患者の末梢血単核球、涙液からの水痘・帯状疱疹ウイルスの検出……264
1Ba1 中城有喜[1]、村上信五[2]、本多伸光[2]、土居孝至[1]、溝渕睦彦[1]、柳原尚明[2]
([1]愛媛大学・医学部・神経精神医学教室、[2]耳鼻咽喉科学教室)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

18 マウス初期発育ステージにおける脳内 HGPRT 活性とドーパミン量の変化及び *in situ*
1E24 hybridization による HGPRT とチロシンハイドロキシラーゼの発現変化 ……266
毛利英雄[1]、町田光世[1]、池田和正[1]、佐藤嘉兵[1]、中川滋木[2]
([1]日本大学・生物資源科学部・応用生物、[2]医学部・生化学)

19 神経細胞に特異的な RNA 結合蛋白質 (Hu) を認識する自己抗体の解析……268
1E25 吉村和法[1]、金子 厚[2]、酒井宏一郎[3]、池田正明[1]、田中嘉代子[4]、山室 裕[5]、
坂本 安[1]、北村邦男[1]、野村正彦[1]
([1]埼玉医大・第一生理、[2]神経内科、[4]中央電顕室、[3]金沢医大・神経内科、
[5]日本大学・生物資源科学部・動物資源科学科)

20 メタンフェタミン反復投与のラット脳シナプス蛋白質 mRNA に及ぼす影響 ……270
1E26 中原辰雄[2]、本藤久雄[1]、中村 薫[1]、堤 哲之[1]、橋本喜次郎[1]、河村幸佐[1]、松本 孝[1]、
平野 誠[1]、内村英幸[1]
([1]国立肥前療養所・情動行動障害センター・臨床研究部・生化学研究室、
[2]九州大学・理学部・化学教室)

21 Methamphetamine投与による calmodulin mRNA の変化 ……272
1E27 清水義雄、秋山一文、黒田重利
(岡山大学・医学部・神経精神医学教室)

22 Cyclosporin A 投与によるラット iminodipropionitrile 誘発ジスキネジアの増悪と転写因子
1E28 AP-1, CREB の関与 ……274
飯田享子、岩田恵美、西林佐紀子、浅沼幹人、近藤洋一、飯田基之、小川紀雄
(岡山大学・医学部・分子細胞医学研究施設・神経情報学部門)

4. モデル動物

23 EL マウスにおける脳内 SOD アイソザイム蛋白量の発作履歴及び発達過程における変化…276
1Ba5 ……村島善也[1]、鈴木二郎[2]
([1]東京都精神研・神経生理、[2]東邦大学・医・精神医学)

24 EL マウスの成長に伴う痙攣準備性の獲得と脳 mRNA 翻訳活性について……278
1E29 中西亜紀[1]、撫井弘二[2]、黒田陽子[2]、古塚大介[2]、横谷 昇[2]、木岡哲郎[2]、山上 榮[1,2]
([1]大阪市立大・医・老年科・神経内科、[2]神経精神科)

25 ELマウス発作後の脳 glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現と GFAP および *c-fos* 発現
1E30 への anisomycin の影響 ……280
勝元栄一[1]、尾崎宜洋[1]、横谷 昇[2]、撫井弘二[1]、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]同・附属刀根山結核研究所・分子制御部門)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

26 ELマウスに対するオピオイドκアゴニストの抗痙攣作用について……282
1E31 甲斐利弘[1]、大西 博[2]、小出誠司[2]、片山雅文[2]、橋本博史[2]、中村嘉宏[2]、谷 宗英[2]、山上 榮[2]
([1]大阪市立総合医療センター、[2]大阪市立大学・医学部・神経精神医学教室)

27 ペンチレンテトラゾール誘発痙攣によるマウス脳 Ca^{2+}/calmodulin dependent protein
1E32 kinase II活性の変化 ……284
古塚大介[1]、木岡哲郎[1]、勝元栄一[1]、横谷 昇[2]、尾崎宣洋[1]、撫井弘二[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]医学部附属刀根山結核研究所)

28 6-hydroxydopamine線条体内注入ラットの線条体と黒質における生化学的ならびに組織化学
1E33 的な経時的変化 ……286
松浦弘治、近藤洋一、Marvin Gómez-Vargas、小川紀雄
(岡山大学・神経情報学部門)

29 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデル (Mnd) マウス脊髄組織内の運動ニューロン変性に関連した
1E34 酵素活性値の発育に伴う変動 ……288
柴山健三[1]、藤田公和[1]、加藤寿章[1]、山内理充[1]、皿井正子[2]、入谷克己[1]、芳本信子[1]、
高橋久英[3]、永田 豊[1]
([1]藤田保健衛生大学・医学部・生理、[2]リハビリテーション医学、[3]実験動物)

30 運動ニューロン変性疾患モデル (*Mnd*) マウス脊髄内グリア線維性酸性タンパク (GFAP) の
1Ba6 発育に伴う変動 ……290
藤田公和[1]、山内理充[1]、加藤寿章[1]、入谷克己[1]、安藤正人[2]、永田 豊[1]、高橋久英[3]、
本多虔夫[4]
([1]藤田保健衛生大学・医学部・生理、[3]実験動物センター、[2]愛知学泉大学・解剖生理、
[4]横浜市立市民病院)

31 麻酔ラット後肢へのピンチ刺激による脳脊髄液中の神経化学物質濃度の変化の検討 ……292
1E35 和田博夫[1]、井藤英喜[2]、佐藤昭夫[3]
([1]東京大・老年病学、[2]都老人医療センター、[3]都老人総合研究所)

5. 脳虚血

32 脳虚血抵抗性とAP1結合活性の関連性 ……294
3Da1 倉本展行[1]、東 泰孝[1]、荻田喜代一[1]、米田幸雄[1]、章 龍[2]、柳瀬尚人[2]、三谷 章[2]、
片岡喜由[2]
([1]摂南大・薬・薬理、[2]愛媛大・医・第一生理)

33 ラット海馬遅発性神経細胞死における Bcl-2 関連遺伝子産物の関与 ……296
2E41 白石哲也[1]、川口正二郎[2]、戸田啓介[2]、田渕和雄[2]、大川 功[3]、尾崎 覚[3]、田島鉄弥[3]
([1]白石共立病院・脳神経外科、[2]佐賀医科大学・脳神経外科、
[3]エーザイ株式会社薬物応用研究部薬物評価室)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

34 砂ネズミ脳における FK506 結合蛋白の分布とリガンド結合様式に関する研究 ……298
3Da2 野崎博之、福内靖男、田中耕太郎、白井俊孝、永田栄一郎、近藤太郎、小山 聡、傳法倫久
（慶應義塾大学・神経内科）

35 一過性前脳虚血後に砂ネズミ海馬で誘導される遺伝子の探索 ＝ Zn トランスポーター ZnT-1
3Da3 の発現 ＝ ……300
津田 学[1]、今泉和則[1]、片山泰一[1]、北川一夫[2]、和中明生[3]、遠山正彌[4]、高木 勉[1]
（[1]大阪大・医・分子脳（田辺）、[2]第一内科、[4]第二解剖、[3]福島医大・細胞科学）

36 一過性脳虚血後の海馬神経細胞におけるドレブリンの変化……302
2E42 猿木信裕[1]、関野祐子[2]、白尾智明[2]
（[1]群馬大学医学部・麻酔蘇生学、[2]行動分析学）

37 C57BL / 6マウス一過性脳虚血モデルにおける海馬 CA 3 の神経細胞死に伴う ferritin の変化
3Da4 -免疫組織化学的検討-……304
近藤洋一、浅沼幹人、西林佐紀子、岩田恵美、松浦弘治、Marvin Gómez-Vargas、
飯田基之、小川紀雄
（岡山大・医・分子細胞医学研・神経情報学部門）

38 脳虚血後の神経細胞障害に伴う鉄処理システムの活性化 ……306
2E43 石丸裕久[1]、石川巧一[2]、大江良秀[2]、高橋 章[1]、丸山悠司[1]
（[1]群馬大学・医学部・神経精神薬理ツムラ、[2]群馬大学生体調節研・分子調節）

39 ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける海馬特異的セリンプロテアーゼ (neuropsin) mRNAの
2E44 発現変化について ……308
真砂敦夫、山田和雄、岩田 明
（名古屋市立大学・医学部・脳神経外科）

40 PACAPによる遅発性神経細胞死抑制効果について - 分子神経科学的研究 - ……310
3Da5 水島秀勝[1]、本間秀樹[1]、土肥謙二[1]、松本 清[1]、塩田清二[2]、中井康光[2]、有村 章[3]
（[1]昭和大学・脳神経外科、[2]同・第一解剖、[3]チューレン大学・日米生物医学研究所）

41 新規脳血管障害急性期／頭部外傷治療薬 TAK - 218 の中枢神経におけるナトリウムイオン
2E45 流入抑制作用 ……312
上田康子、岩間斗史、橋本忠俊、深津考司、大川滋紀、永井康雄
（武田薬品工業株式会社・創薬第一研究所）

42 新規脳血管障害急性期／頭部外傷治療薬 TAK - 218 のドーパミン異常遊離抑制作用の作用
2E46 機序 ……314
白崎仁美[1]、栗原悦雄[2]、岩間斗史[1]、深津考司[1]、大川滋紀[1]、永井康雄[1]、橋本忠俊[1]
（[1]武田薬品工業(株)・創薬第一研究所、[2]経営企画部）

注）上段, 論文番号； 下段, 演題番号

43 前脳血流慢性低灌流負荷のラット脳内神経系に及ぼす影響……316
3Dp1 田中健一[1]、和田尚子[1]、小川紀雄[2]、野村正彦[1]
([1]埼玉医科大学・第一生理学、[2]岡山大学・医学部・神経情報学)

44 虚血脳と非虚血脳における低酸素の影響……318
2E47 宮本 修[1,2]、板野俊文[1]、根木哲朗[2]、畠瀬 修[3]、岡田泰志[4]、村上哲英[5]、Roland N. Auer[6]
([1]香川医科大学・生物学、[2]基礎スポーツ医学、[3]生理学、[4]香川大学・保健体育、
[5]倉敷芸術科学大学・生理学、[6]カルガリー大学・病理学)

45 虚血性脳障害の発生、進展における細胞接着因子の関与 - ICAM1 ノックアウトマウスを
3Da6 用いた検討-……320
北川一夫[1]、馬渕卓真[1]、八木田佳樹[1]、柳原武彦[2]、松本昌泰[1,2]
([1]大阪大学・第一内科、[2]神経内科)

6. 老 化

46 脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP) 大脳皮質における Ca^{2+} / Calmodulin 感受性
1E51 アデニル酸シクラーゼ活性の変化……322
八田愼一[1]、富樫廣子[2]、吉岡充弘[2]、斎藤秀哉[2]、斎藤利和[3]、大鹿英世[1]
([1]札幌医科大学・医学部・薬理講座、[3]保健医療学部・作業療法、
[2]北海道大学・医学部・薬理学第一講座)

47 2、3 の B型 MAO 阻害剤の慢性投与による老齢マウスの脳内の生化学的老化マーカーの
1E52 変動……324
江頭 亨、高山房子、山中康光
(大分医科大学・薬理学教室)

48 老化促進モデルマウス (SAMP8) の加齢に伴う頭部フリーラジカル並びに脳内神経伝達物質の
2Ba6 変化に対する性差の違いについて……326
小松真紀子[1]、平松 緑[1]、植田勇人[2]
([1]山形県テクノポリス財団・生物ラジカル研究所、[2]宮崎医科大学・精神科)

49 脳シナプスにおけるアセチルコリン放出とカルシウムイオン流入の加齢に伴う異常 ……328
3Bp4 田中康一、安藤 進
(東京都老人総合研究所・生体膜部門)

7. アルツハイマー病

50 分泌型βアミロイド前駆体蛋白によるラット神経幹細胞の DNA 合成促進 ……330
1Cp1 大澤郁朗、高村千鶴子、高坂新一
(国立精神・神経センター・神経研究所・代謝研究部)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

51 アルツハイマー・βアミロイド蛋白質のGT1-7細胞膜におけるイオンチャネル形成 ……332
1E41 川原正博[1]、黒田洋一郎[1]、Nelson Arispe[2]、 Edwardo Rojas[2]
([1]東京都神経科学総合研究所・神経生化学、[2]米国・NIH・NIDDK)

52 β-アミロイド蛋白脳室内持続的注入ラットの海馬CA1におけるニコチンに対する反応性
1E42 および長期増強形成能の低下 ……334
伊東亜紀雄[1]、赤池 忠[2]、曾我部正博[2]、新田淳美[3]、飯田竜一[1,4]、鍋島俊隆[1]
([1]名古屋大学・医学部・医療薬学・附属病院薬剤部、[2]第2生理、
[3]岐阜薬科大学・分子生物学、[4]日本生物化学センター)

53 ヒト血小板においてアミロイドβ蛋白(Aβ)はホスホリパーゼC系を介して細胞内Ca^{2+}を
1E43 増加させる ……336
石川博基[1]、小澤寛樹[1]、齋藤利和[1]、山本 恵[1]、竹村晴夫[2]、井本憲志[2]、大鹿英世[2]、高畑直彦[1]
([1]札幌医科大学・医学部・神経精神医学講座、[2]薬理学講座)

54 Aβ(25-35)はCキナーゼを介してミクログリア走化作用の脱感受性を起こす ……338
1Cp2 中井真通、谷口泰造、川又敏男、橋本健志、寺島 明、北条香織、保田 稔、前田 潔、
田中千賀子
(兵庫県立高齢者脳機能研究センター)

55 D型アミノ酸含有βアミロイドタンパクのアルツハイマー病発症における役割について …340
1Cp3 金子 勲、山田紀子、久保武一、尾田富一郎
(三共(株) 神経科学研究所)

56 NG108-15細胞のamyloidβ蛋白産生に対するprolyl endopeptidaseの関与 ……342
1Cp4 篠田雅彦[1,2]、砥出勝雄[2]、大沢郁朗[1]、高坂新一[1]
([1]国立精神神経センター神経研・代謝、[2]日本たばこ産業医薬総研・生物研)

57 組換えアデノウイルスを利用したラット脳へのAPP遺伝子導入 ……344
1Cp5 西村伊三男[1]、植月太一[1]、齋藤 泉[2]、岡村 均[3]、吉川和明[1]
([1]大阪大・蛋白研・機能制御、[2]東京大・医科研・遺伝子解析、[3]神戸大・医・2解)

58 クロロキンミオパチーにおけるnonneural tauの動態 ……346
1Cp6 小山文隆、井原康夫
(東京大学・医学部・脳研脳病理)

59 早発型家族性アルツハイマー病の病因遺伝子プレセニリンI(PS1)の変異と代謝 ……348
1Cp7 高島明彦、Marc Mercken、高橋浩士、村山美由紀、安武かおり
(三菱化学生命科学研究所)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

60 アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン1蛋白(PS-1)の同定 ……350
1E44 宇佐美美穂子、佐原成彦、亀谷富由樹、大河内正康、山本明広、田中喜久子、森 啓
(東京都精神医学総合研究所・分子生物学研究部門)

61 Presenilin 1 突然変異を持つ家族性アルツハイマー病患者の線維芽細胞の変化について ……352
1E45 工藤 喬、宮前康之、柏木雄次郎、森原剛史、武田雅俊
(大阪大学・医学部・精神医学教室)

62 複数のリン酸化依存性モノクローナル抗体を用いたアルツハイマー病脳中のリン酸化タウの
1E46 定量 ……354
以倉康充[1]、工藤 喬[1]、Inge Grundke-Iqbal[2]、Khalid Iqbal[2]、武田雅俊[1]
([1]大阪大学・医学部・精神医学教室、[2]New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities)

63 アルツハイマー病の診断マーカーとしての脳脊髄液中のタウ蛋白上昇について ……356
1E47 森原剛史、工藤 喬、以倉康充、柏木雄次郎、中村 祐、谷口典男、西村 健、武田雅俊
(大阪大学・医学部・精神医学教室)

64 Alzheimer 神経原線維変化内新規抗原の検索 ……358
1Cp8 吉田裕孝[1]、渡辺 淳[1,2]、井原康夫[1]
([1]東京大学・医学部・脳研究施設・脳病理学部門、[2]東京理科大学・理工学部・応用生物科学科)

65 脳血管性痴呆と孤発生 Alzheimer 病に関する遺伝子の多型分析 ……360
1E48 武田良平[1]、溝渕睦彦[1]、中城有喜[2]、土居孝至[2]、田邉敬貴[1]
([1]愛媛大学・医学部・神経精神医学教室、[2]松山記念病院)

66 ラット培養中枢神経細胞に対するアポリポ蛋白Eの作用:アイソフォーム特異性の検討
1E49 ……362
道川 誠、福山隆一、柳澤勝彦
(国立長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部)

67 トランスフェリンの多型性とアルツハイマー病 ……364
1Cp9 行方和彦[1]、今川正樹[2]、小山文隆[1]、井原康夫[1]
([1]東京大学・医学部・脳研病理、[2]兵庫県立尼崎病院・精神科)

68 アルツハイマー型痴呆脳におけるアデニル酸シクラーゼ I 型、II 型および V/VI 型の量的変化
1E50 について ……366
山本 恵[1]、小澤寛樹[1]、八田慎一[2]、橋本恵理[1]、齋藤利和[3]、大鹿英世[2]、高畑直彦[1]
([1]札幌医科大学・神経精神講座、[2]同・薬理学講座、[3]同・医療学部作業療法学科)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

8. ニューロンの分化

69 生後脳において顆粒細胞層に特異的に発現する新規 zinc finger 遺伝子 *gcz* のクローニング
1E1 ……368
松本和政[1]、遠山正彌[2]、塩坂貞夫[1]
([1]奈良先端科学技術大学院大学・細胞構造、[2]大阪大学・医・第2解剖)

70 神経分化過程で一過的に誘導される新規神経ペプチド遺伝子 *N23K / N27K*……370
1Aa1 斎藤祐見子[1]、川野 仁[2]、丸山 敬[1,3]、川村光毅[2]、西道隆臣[1]、川島誠一[1]
([1]東京都臨床研・遺伝情報、[2]慶応大・医・解剖、[3]国立生理研・神経化学)

71 分化発達するラット小脳における Glucose Transporter (GLUT) 1と3の発現……372
1Aa2 百木忠久[2]、中山 孝[1]、井上順雄[1]、佐藤 忍[2]、関原久彦[2]、加藤尚彦[1]
([1]横浜市大・医・生化I、[2]内科III)

72 ニューロン特異的核蛋白質 necdin の機能解析 ……374
1Aa3 河原康一[1]、植月太一[1]、斎藤 泉[2]、吉川和明[1]
([1]大阪大学・蛋白・機能制御、[2]東京大・医科研・遺伝子解析)

73 ニューロン特異的核蛋白質 necdin に結合する蛋白質の解析 ……376
1E2 谷口直子、谷浦秀夫、吉川和明
(大阪大学・蛋白研・機能制御部門)

74 ニューロン特異的核蛋白質ネクジンと DNA がんウィルス遺伝子産物の相互作用 ……378
1Aa4 谷浦秀夫、谷口直子、吉川和明
(大阪大学・蛋白研・機能制御)

75 胎仔脳神経管由来の細胞のフローサイトメトリーによる解析 ……380
1E3 山之端万里、中山たかね、相馬健子、塚田裕三
(創価大学・生命科学研究所)

76 胚性腫瘍細胞（P19）の神経分化プログラミング過程におけるアポトーシスの抑制と
1Aa5 PTP ε ……382
丸山悦子、矢倉英隆
(東京都神経科学総合研究所・微生物・免疫)

77 プロテインホスファターゼによる胚性腫瘍細胞の神経分化の制御 ……384
1E4 笹原洋二、小林孝安、柳川右千夫、田村眞理
(東北大学・加齢研・遺伝子情報)

注）上段, 論文番号； 下段, 演題番号

78 P19マウス胚性癌細胞の神経系細胞分化における体細胞DNA組換え活性の増加 ……386
1Aa6 川端昌弘、中矢直樹、西堀正洋、佐伯清美
(岡山大学・医学部・薬理学)

79 サル大脳皮質培養細胞によるニューロン回路網の形成 ……388
1E5 開地泰介[1]、吉川泰弘[2]、村本和世[1]、川原正博[1]、小林和夫[1]、黒田洋一郎[1]
([1]東京都神経科学総合研究所・神経生化学部門、
[2]国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター)

80 マウス神経芽腫細胞の細胞周期に対する糖脂質合成酵素阻害剤とスフィンゴ脂質の効果
1E6 ……390
上村敬一、武富 保
(信州大・医・加齢適応研究センター・加齢生化学)

9. グリア細胞

81 グリア細胞の分化に関与するsubstance P受容体の発現と機能 ……392
2E14 武田泰生[1]、野津智美[1]、川野 仁[2]、川村光毅[2]、阿相皓晃[3]、植村慶一[1]
([1]慶應義塾大学・医学部・生理、[2]解剖、[3]東京都老人研・細胞生物)

82 損傷モデルにおけるO-2A progenitor cellからtype 2 astrocyteへの分化について ……394
2E15 村上健一[1,2]、阿相皓晃[3]、河瀬 斌[2]、植村慶一[1]
([1]慶應義塾大学・医学部・生理、[2]同・脳神経外科、[3]東京都老人研・細胞生物)

83 ミエリンプロテオリピド蛋白質断片はオリゴデンドロサイトの分化を促進する ……396
2E16 山田真久、Anna Ivanova、山口宜秀、池中一裕
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経情報部門)

84 末梢神経系神経細胞に発現するglial growth factorの新しいアイソフォームの同定 ……398
2E17 篠田 純[1]、中尾純治[1]、矢崎貴仁[1]、河瀬 斌[2]、植村慶一[1]
([1]慶應義塾大学・医学部・生理学教室、[2]脳神経外科)

85 p53欠損マウス脳初代培養細胞からのミクログリア様細胞株の樹立 ……400
3Ap1 大澤圭子、今井嘉紀、中嶋一行、高坂新一
(国立精神神経センター・神経研・代謝)

86 ウシ脳毛細血管内皮細胞のimmortalization - In vitro血液脳関門モデルへの適用をめざして-
2E18 ……402
祖父江和哉[1]、小谷野貴文[2]、大橋章雄[2]、鶴岡伸夫[3]、森川将行[4]、浅井清文[5]、加藤泰治[5]
([1]名市大・医・麻酔蘇生学、[2]同・薬・製剤、[5]同・医・分子医研・生体制御、
[3]サントリー・生物医研、[4]奈良県医大・精神医学)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

87 Neuron-astrocyte 共培養系での Neuronal Ca^{2+} oscillation に対する gap-junction 阻害剤の効果
2E19 ……404
藤田佳織[1]、中西圭子[2]、植木孝俊[3]、浅井清文[1]、加藤泰治[1]
([1]名市大・医・分子医研・生体制御、[2]愛知県コロニー・生理、
[3]国立精神神経センター・代謝部門)

88 マトリックスメタロプロテイナーゼ抑制因子(TIMP-2)のグリオーマ細胞に対する細胞移動・
3Ap2 浸潤抑制効果 ……406
矢崎貴仁[1]、星 道生[2]、Samuel D. Rabkin[3]、 Robert L. Martuza[3]、植村慶一[1]
([1]慶應義塾大学・医学部・生理、[2]脳神経外科、[3]Molecular Neurosurgery Lab.,
Georgetown Univ. Med. Ctr.)

89 マイクログリアのグルココルチコイドおよびミネラルコルチコイドレセプター ……408
3Ap3 藤田弘子[1]、田中潤也[2]、松田正司[1]、阪中雅広[1]、前田信治[2]
([2]愛媛大学・医学部・第二生理学教室、[1]第二解剖学教室)

90 初代培養オリゴデンドロサイトのミエリン関連糖タンパク質(MAG)の発現に対するニューロ
2E20 ンの役割 ……410
松田義宏、小糸寿美、山元 弘
(国立精神・神経センター・神経研・免疫)

91 末梢神経ミエリンP2蛋白の脂質結合能に関する検討 ……412
2E21 坂本 安[1]、北村邦男[1]、吉村和法[1]、長島直美[2]、竹原直美[2]、野村正彦[1]
([1]埼玉医科大学・第一生理、[2]中央測定室)

92 ミエリンタンパクの分子進化 ……414
2E22 栗原 正[1]、吉田弘美[1]、佐久間充弘[1]、小嶋久子[2]、玉井洋一[2]
([1]創価大・生命研・神経化学、[2]北里大・医・生化学)

93 ニワトリおよびウシガエル 2', 3' - 環状ヌクレオチド 3' -フォスフォジエステラーゼのcDNAク
2E23 ローニング ……416
吉田弘美[1]、栗原 正[1]、佐久間充弘[1]、遠山陽子[1]、小嶋久子[2]、玉井洋一[2]
([1]創価大・生命研・神経化学、[2]北里大・医・生化学)

10. 細胞死

94 神経細胞のプログラム細胞死の際に発現誘導する遺伝子DP5の単離と機能解析 ……418
2Da1 今泉和則[1,2]、津田 学[1,2]、片山泰一[1,2]、高木 勉[1]、和中明生[4]、遠山正弥[3]
([1]阪大・医・分子脳、[2]田辺製薬、[3]阪大・医・第二解剖、[4]福島医大・細胞科学)

95 中枢ニューロンアポトーシスにおける癌抑制遺伝子 *p53* の役割 ……420
1E53 榎戸 靖[1]、荒木敏行[1]、稲村直子[1]、田中亀代次[2]、相澤慎一[3]、畠中 寛[1]
([1]大阪大・蛋白研、[2]大阪大・細工セ、[3]熊本大・医・遺伝発生医学研)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

96 p53 遺伝子に依存的な中枢神経幹細胞のアポトーシス ……422
2Da2 久恒辰博[1,2]、Ronald D.G.McKay[2]、上野川修一[1]
([1]東大院・応用生命化学、[2]Lab. Mol. Biol., NINDS, NIH)

97 温熱刺激によるグリオーマ細胞周期の変化と p21Cdk インヒビターの発現 ……424
1E54 布施孝久[1]、山田和雄[1]、浅井清文[2]、加藤泰治[1]、中西 真[3]
([1]名市大・医・脳外、[2]同・分子医学研・生体制御、[3]国立長寿研)

98 プログラム神経細胞死における小胞体内ストレス蛋白質 BiP/GRP78 の発現 ……426
1E55 田中秀逸、信川貴子、小池達郎
(北大院・理・行動知能学)

99 プログラム神経細胞死制御機構における小胞体シグナリングの役割 ……428
2Da3 小池達郎、田中秀逸
(北大院・理・行動知能学)

100 アストログリア (AST) の培養系を用いた新規小胞輸送関連蛋白 (RA410) のクローニングと
1Da3 その虚血脳における発現 ……430
松尾徳幸[1,5]、小川 智[2]、和中明生[4]、松山知弘[3]、高木 勉[2]、遠山正弥[1]
([1]大阪大学・医学部・第2解剖学教室、[2]同・分子脳機構(田辺)、
[3]兵庫医科大学・第五内科、[4]福島県立医科大学、[5]大日本製薬)

101 再酸素化に伴うアストログリア (AST) での HSP70 の発現のメカニズムとその機能の解析
1Da4 ……432
小川 智[1]、藺牟田直彦[2]、上田周一[2]、柳原武彦[2]、遠山正彌[1]
([1]大阪大学・医学部・第二解剖学教室、[2]同・神経内科学教室)

102 海馬スライス培養モデルにおける虚血性ニューロン死、および HSP 発現の検討 ……434
2Da4 -antisense oligonucleotideをもちいて-
榊 孝之、甲村英二、湯口貴導、埜中正博、伊藤 守、山下俊英、藤中俊之、早川 徹
(大阪大学・医学部・脳神経外科)

103 ラット小脳外顆粒細胞のアポトーシスへの interleukin-1β converting enzyme ファミリーの
1E56 関与 ……436
田中正彦[1]、澤田 誠[2]、三浦正幸[3]、丸野内 棣[1]
([1]藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・応用細胞学研究部門、
[2]病態生化学研究部門、[3]筑波大学・基礎医学系・分子神経生物学)

104 神経芽細胞腫の自然退縮と ICE ファミリーシステインプロテアーゼ：その発現と細胞内局在
2Da5 について ……438
中川原 章[1]、中村洋子[1]、日和佐隆樹[1]、池田 均[2]、杭田慶介[3]、崎山 樹[1]
([1]千葉県がんセ・生化学、[2]群馬小児医療セ・外科、[3]都臨床研・免疫)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

105 小脳顆粒細胞の生存維持とカルシウム応答遺伝子群の発現制御 ……440
2Da6 津田正明、佐野訓明、田渕明子
（岡山大学・薬学部・微生物薬品化学）

106 ベラトリジンによるアポトーシス及びネクローシス様細胞死の促進 ……442
1E57 小田 毅[3]、二宮孝文[2]、田中秀逸[1]、小池達郎[1]
（[1]北大院・理・行動知能学、[2]札幌医大・解剖学、[3]現 電力中研）

107 ドーパミン神経毒1(*R*),2(*N*) - dimethyl - 6,7 - dihydroxy - 1,2,3,4 - tetrahydroisoquinoline
1Da5 によるアポトーシスの惹起 ……444
丸山和佳子[1]、高橋 勤[2]、直井 信[3]
（[1]中部病院長寿医療研究センター、[2]江南女子短期大学、[3]名古屋工業大学）

108 初代培養中脳ニューロン／グリアにおける6-OHDAおよびH_2O_2の毒性に対するBDNFの
1E58 影響 ……446
岩田恵美、浅沼幹人、西林佐紀子、近藤洋一、Marvin Gómez-Vargas、小川紀雄
（岡山大・医・分子細胞研・神経情報学部門）

109 ラット中脳培養ニューロンにおけるドーパミンD_2受容体刺激薬によるグルタミン酸誘発
1Da6 神経細胞死の抑制効果 ……448
澤田秀幸[1]、下濱 俊[1]、木村 淳[1]、河村貴央[2]、赤池昭紀[2]
（[1]京都大学・医学部・神経内科、[2]薬学部・薬理）

110 海馬細胞培養系におけるグルタミン酸トランスポーター阻害剤の興奮毒性増強作用、及び、
1E59 同条件下のラジカルスカベンジャーによる神経細胞保護効果 ……450
氷見敏行、池田正行、室田誠逸
（東京医科歯科大学・大学院・細胞機能制御）

111 新規シグマ$_1$受容体アゴニストSA４５０３のラット初代培養神経細胞における低酸素／
1E60 低グルコース毒性に対する保護作用 ……452
中澤美奈子、松野 聖
（参天製薬・開発研究本部・薬理研究グループ）

112 グリア毒(DL-α-アミノアジピン酸と6-アミノニコチン酸アミド）の細胞毒性機序の比較
1Da2 検討 ……454
馬渡一浩[1]、本間啓子[1]、安井裕子[2]、石田外樹[2]、滝沢 昇[2]、加藤 聖[2]
（[1]金沢大・医・保健検査、[2]医・神経情報研・伝達）

113 培養アストロサイトにおける低温効果 ……456
1E61 宮崎博文、中村洋一、司 秋生、片岡喜由
（愛媛大学・医学部・生理学教室第一）

注）上段，論文番号； 下段，演題番号

114 培養ミクログリア活性化に対する低温効果：増殖および一酸化窒素・活性酸素産生の抑制
1E62 ……458
司 秋生、中村洋一、片岡喜由
(愛媛大学・医学部・生理学教室第一)

115 ラット血清による培養ミクログリアの活性酸素産生増強 ……460
1Da1
司 秋生、中村洋一、片岡喜由
(愛媛大学・医学部・生理学教室第一)

116 OK - MCs (OK - 432 - activated mononuclear cells) の抗脳腫瘍効果における
1E63 Fas ligand / Fas 系の関与 ……462
川口正二郎[1]、白石哲也[2]、戸田啓介[1]、田渕和雄[1]
([1]佐賀医科大学・脳神経外科、[2]白石共立病院)

11. 神経系栄養因子

117 マウス体性感覚野バレルニューロンにおける BDNF, TrkB mRNA の発現と頬髭毛嚢の焼勺
1Ap1 によるその選択的発現制御……464
S.D. Tryambak、水野恭伸、河野朋子、中村 俊
(国立精神・神経センター・神経研究所・診断研究部)

118 脳由来神経栄養因子：ラット脳における加齢変化と局在 ……466
1Ap2
仙波りつ子[1]、竹内郁夫[1]、仙波禮治[2]、加藤兼房[1]
([1]愛知県コロニー・研究所、[2]三重大・医)

119 PC12D細胞からのNGF依存性神経突起誘導に対するトリコスタチン A の特異的阻害作用
1Ap3 ……468
佐野 護、北島哲子
(愛知コロニー研究所・形態学)

120 培養幼鶏後根神経節神経細胞からのニューロトロフィン依存性神経突起誘導 ……470
1Ap4
北島哲子、佐野 護
(愛知コロニー研究所・形態学)

121 Neurotrophin/ Trk から Ras/MAPK へのシグナル伝達を媒介する神経特異的アダプター分子
1Ap5 (N - Shc) の単離……472
中村岳史[1]、森 望[2]
([1]住友電気工業・バイオ研、[2]新技術事業団・遺伝と変化)

122 TrkB発現PC 12 細胞における、NGF と BDNF による神経栄養因子作用の比較……474
1E7
中谷篤史[1]、山田雅司[1]、池内俊彦[1]、中山 均[2]、畠中 寛[1]
([1]大阪大学・蛋白質研究所・生合成、[2]奈良県立医科大学・薬理)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

123 BDNFによる初代培養ニューロンからの神経伝達物質放出 ……476
1E8 沼川忠広[1]、酒井直人[1]、武井延之[2]、畠中 寛[1]
([1]大阪大学・蛋白質研究所・生合成、[2]京都工芸繊維大学・応用生物学科・細胞生物)

124 BDNFによる培養海馬ニューロンの細胞内カルシウム制御 ……478
1Ap6 酒井直人[1,2]、山田雅司[1]、沼川忠広[1]、中谷篤史[1]、武井延之[3]、小倉明彦[4]、畠中 寛[1]
([1]大阪大・蛋白研、[2]浜松医大・脳外、[3]京都工繊大・繊維・応用生物、[4]大阪大・院・理・生科)

125 グルココルチコイドにより誘発される培養ラット海馬神経細胞死に対するBDNFの保護効果
1Ap7 ……480
新田淳美、片岡弘臣、斉藤和裕、古川昭栄
(岐阜薬科大学・分子生物学教室)

126 高カリウム刺激によってアストロサイトから分泌される神経栄養因子活性……482
1E9 阿比留康弘[1]、西尾チカ[1]、仙波りつ子[2]、畠中 寛[1]
([1]大阪大学・蛋白質研究所・生合成、[2]愛知県コロニー研究所)

127 抗HCNP抗体によるラット末梢自律神経系の免疫電顕的検討 ……484
1E10 片田栄一、三竹重久、小鹿幸生
(名古屋市立大学・第二内科)

128 マウスにおける海馬由来神経刺激因子の遺伝子発現量の検討 ……486
1E11 松川則之[1,2]、小鹿幸生[1]、片田栄一[1]、岡田秀親[3]、東藤直樹[4]、山本孝之[2]、上田龍三[1]
([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・生体高子、[4]住友製薬総合研究所・創業第三研究所)

129 Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP) Processing Enzymeの精製 ……488
1E12 大塚康史、小鹿幸生
(名古屋市立大学・医学部・第二内科)

130 Deacetylated Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (free HCNP) のNMDA受容
1Ap8 体刺激を介する分泌 ……490
小鹿幸生、継 泰城、大塚康史
(名古屋市立大学・医学部・第二内科)

131 培養シュワン細胞におけるGDNFの発現調節……492
3Aa1 渡部和彦[1]、田中順一[1]、本田英比古[2]、豊原敬三[2]、酒井 紀[2]
([1]東京慈恵会医科大学・神経病理、[2]内科第2)

132 Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) による神経芽細胞腫の分化誘導とc-Retチロシ
3Aa2 ンキナーゼのシグナル伝達について ……494
菱木知郎、近藤和博、二村好憲、一宮慎吾、崎山 樹、中川原 章
(千葉県がんセ・生化学)

注) 上段, 論文番号 ; 下段, 演題番号

133 新規肝由来神経活性化因子による迷走神経線維束切断端からの神経再生促進作用 ……496
1Ap9 堀江秀典[1]、斉藤春洋[2]、築地 淳[2]、佐藤真由美[3]、酒井偉久子[1]、門屋利彦[4]、稲垣好昌[4]、野沢りさ[4]
([1]横浜市大・医・生理、[2]第一内科、[3]眼科、[4]キリンビール医薬探索研究所)

134 培養アストロサイトにおける成長抑制因子の発現調節 ……498
3Aa3 内田洋子
(都老人研・神経病理)

135 コロニー刺激因子および上皮増殖因子の培養神経細胞に対する保護効果 ……500
1E13 彭 輝[1]、田中潤也[2]、藤田弘子[1]、阪中雅広[1]、前田信治[2]
([2]愛媛大学・医学部・第二生理学教室、[1]第二解剖学教室)

136 ニューロトロフィンによるラット培養ミクログリアの機能調節 ……502
3Aa4 菊地義明、中嶋一行、本田静世、石川正洋、高坂新一
(国立精神・神経センター・神経研究所・代謝研究部)

137 aFGFと視床下部-下垂体-副腎系および交感神経系の関連……504
3Aa5 大村 裕[1]、松本逸郎[2]、佐々木和男[3]、新島 旭[4]
([1]日本臓器製薬(株)・生物活性科学研、[2]長崎大学・医、[3]富山大学・工、[4]新潟大学・医)

138 前脳基底部における酸性線維芽細胞成長因子の分布-ラットおよびヒト剖検脳における検討-
3Aa6 ……506
遠山育夫[1]、相見良成[1]、安原 治[1]、郭 力達[1]、鹿毛眞人[1]、PL McGeer[2]、木村 宏[1]
([1]滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター、[2]British Columbia大学・精神科)

139 培養シュワン細胞におけるLIF-mRNAの発現調節機構の解析 ……508
1E14 中根麻子、松岡一郎、栗原堅三
(北海道大学・薬・薬剤学)

140 カイニン酸傷害脳に対する estrogen の影響 ……510
1E15 新郷明子、鬼頭昭三、仙波純一、三好理絵
(放送大学・教養学部)

12. 神経伝達物質放出

141 Ca^{2+} に依存したシンタキシンとSNAPとの相互作用 ……512
3Bp1 川崎雅一[1]、西木禎一[1]、熊倉鴻之助[1]、高橋正身[2]
([1]上智大・生命研・神経化学、[2]三菱化学生命研)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

142 クロマフィン細胞の開口放出素過程とSNAP-25 / VAMP-2複合体 ……514
2E33 御園生裕明[1]、西木禎一[2]、関口真理子[2]、高橋正身[2]、鎌田洋一[3]、小崎俊司[3]、今泉美佳[1]、熊倉鴻之助[1]
([1]上智大学・生命科学研究所・神経化学、[2]三菱化学生命科学研究所、[3]大阪府立大学・農学部・獣医学科)

143 伝達物質放出の融合複合体構成成分シナーフィン ……516
3Bp2 石塚 徹[1]、西須英雄[1]、熊西敏郎[2]、阿部輝雄[1]
([1]新潟大学・脳研究所・細胞神経生物学、[2]分子神経病理)

144 開口放出機構におけるアクチン・ネットワークとアクチン-ミオシン相互作用の役割 ……518
2E34 村上 猛、今泉美佳、御園生裕明、川崎雅一、若井 豪、熊倉鴻之助
(上智大学・生命科学研究所・神経化学部門)

145 Proline Directed Protein Kinase によるシナプシンIのリン酸化とその生理的機能に及ぼす影響
2E35 ……520
松原 守[1]、楠畑 雅[2]、千谷晃一[1]、谷口寿章[1]
([1]藤田保健衛生大・総医研・医高分子、[2]現、ニッピバイオマトリックス研究所)

146 ラット線条体における Dopamine 遊離に対するNタイプおよびP/Qタイプ電位依存型Ca^{2+}
2E36 channel の関与……522
小笹貴史、西沢幸夫
(エーザイ株式会社・筑波研究所)

147 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(V):5-HT_{1A}受容体の役割
3Bp3 ……524
平野 均[1]、平田牧三[1]、山田通夫[2]、松田芳人[2]
([1]山口大学・保健管理センター、[2]同・医学部・神経精神医学講座)

148 ラット海馬細胞外液中のGABA濃度測定 -興奮性アミノ酸によるGABA遊離作用 ……526
2E37 菅原 恵[1]、芝軒信次[1]、秦 英代[2]、石川紘一[1]
([1]日本大学・医学部・薬理、[2]民生科学協会・総合研)

13. 神経伝達物質受容体

149 ムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプ特異的発現に関与する分化誘導因子 ……528
2E24 深間内文彦、王 益珺、俣賀宣子
(東京医歯大・難研・プロジェクト)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

150 受容体-イオンチャネルカップリングはストレプトゾトシンの処理で NAD^+ 量の減少した
3Ba1 神経腫瘍 NG108-15 細胞で抑制される ……530
野田百美[1,2]、東田陽博[1]
([1]金沢大・医・神経情報研、[2]九大・医・生理)

151 PC12D 細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) による Ca^{2+} 流入調節
2E25 ……532
海老原達彦、David Saffen
(東京大学・医学部・脳研究施設・生化学部門)

152 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内移行 ……534
2E26 津賀浩史[1,2]、本間健資[1]、奥野恵理子[2]、亀山仁彦[2]、芳賀達也[2]
([1]労働省産業医学総合研究所・職業病研究部、[2]東京大学・医学部・脳研究施設・脳生化学部門)

153 G タンパク質共役受容体キナーゼのカルモジュリンと S100 タンパク質による Ca^{2+} 依存性
2E27 阻害 ……536
芳賀和子、芳賀達也
(東京大学・医学部・脳研究施設・生化学部門)

154 脳における G 蛋白質 γ サブユニット γ3と γ12の局在と加齢による濃度変化……538
2E28 森下理香[1]、佐賀信介[2]、稲垣俊明[3]、加藤兼房[1]、浅野富子[1]
([1]愛知県コロニー・研・生化、[2]形態、[3]名古屋市厚生院)

155 D1 ドーパミン受容体と結合するアデニル酸シクラーゼの同定 ……540
3Ba2 木村和弘、岡田尚子、森松正美、斉藤昌之
(北海道大学・大学院・獣医学研究科・生化学教室)

156 ホスファターゼインヒビター DARPP-32によるドーパミンD2受容体細胞内移行の促進
2E29 ……542
伊藤和光、芳賀達也
(東京大学・医学部・脳研究施設・生化学部門)

157 マウスドーパミン D_4 受容体の遺伝子構造と mRNA 組織分布 ……544
3Ba3 鈴木竜世[1]、小林和人[1,2]、永津俊治[1]
([1]藤田保健衛生大・総医研、[2]奈良先端大・遺伝子教育研究センター)

158 ドパミン作用薬の D2 受容体ファミリーに及ぼす作用の検討……546
2E30 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・創薬研究本部)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

159 グルココルチコイドによるラット大脳皮質アストロサイト　セロトニン7受容体発現の低下
2E31 ……548
清水雅美[1]、西田　朗[1]、前正秀宣[1,2]、山脇成人[2]
([1]国立呉病院・臨床研究部、[2]広島大・神経精神)

160 マイクロダイアリーシス法を用いた $GABA_B$ 受容体／cAMP 系の検討 ……550
3Ba4
橋本恒一、栗山欣弥
(京都府立医科大学・薬理)

161 初代培養神経細胞における σ-1受容体を介したσリガンドの細胞内移行 ……552
2E32
山本秀子[1]、中里篤郎[2]、鷺　直樹[1]、山本敏文[1,3]、茶木茂之[2]、奥山　茂[2]
([1]東京都精神研・精神薬理、[2]大正製薬創薬研・創薬第一研、[3]横浜市大・総合理学)

162 ペプチド受容体のキメラによるリガンド結合領域に関する検討 ……554
3Ba5
橋本　均、小川暢也、山本恭平、萩原七美、松田敏夫、馬場明道
(大阪大・薬・薬理)

163 海馬初代培養神経細胞の Ca^{2+} - oscillation に対する ATP の抑制作用 ……556
3Ba6
小泉修一、井上和秀
(国立衛試・薬理)

14. NOとNO合成酵素

164 培養小脳顆粒細胞の発達に伴う一酸化窒素合成酵素の発現……558
2E6
井上順雄、曽我智子、中山　孝、加藤尚彦
(横浜市立大学・医学部・第一生化学)

165 エタノールはNOSニューロンによるNO産生に影響しない ……560
2E7
池田正行[1]、小宮山徳太郎[2]、佐藤郁子[1]、氷見敏行[1]、室田誠逸[1]
([1]東京医科歯科大学大学院・細胞機能、[2]国立精神神経センター・武蔵病院)

166 ラット脳グリア細胞におけるinducible NOS (iNOS) 誘導に対する endothelin (ET)の作用
2Ba1 ……562
小田温子[1]、村山俊彦[1]、佐々木幸生[2]、岡田敏一[2]、野村靖幸[1]
([1]北大・薬・薬効、[2]日本チバガイギー国際科学研究所)

167 ラット小脳での一酸化窒素 (NO) 産生におけるグリア細胞の役割 ……564
2Ba2
山田清文、鍋島俊隆
(名古屋大学・医学部・医療薬学・附属病院薬剤部)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

168 オリゴデンドロサイトにおける一酸化窒素依存性の cGMP 産生 ……566
2E8 田中潤也[1]、Marjanne Markerink-van Ittersum[2]、H. W. M. Steinbusch[2]、Jan de Vente[2]
([1]愛媛大学・医学部・第二生理学、[2]European Graduate School for Neuroscience, Univ. of Maastricht, Dept. of Psychiatry and Neuropsychology)

169 カイニン酸誘発けいれん時のラット海馬における一酸化窒素（NO）の放出 ……568
2E9 柏原健一[1]、坂井研一[1]、庄盛敏廉[1]、秋山一文[2]
([1]岡山大学・神経内科、[2]神経精神科)

170 局所脳虚血ラットにおける NO 合成酵素 (NOS) の経時的変化と NOS 産生細胞の同定 ……570
2Ba5 本間秀樹[1]、水島秀勝[1]、土肥謙二[1]、荒井好範[1]、松本 清[1]、塩田清二[2]、中井康光[2]
([1]昭和大学・医学部・脳神経外科、[2]同・第一解剖学)

171 鉄イオンによる神経細胞障害とNO関連薬物の効果 ……572
2E10 今野大三、奈良圭之輔、大野 稔、山崎由香子、木内祐二、小口勝司
(昭和大・医・第一薬理)

172 NO を介する神経細胞死の過程で起こる転写因子 AP-1 の消失について ……574
2Ba3 田渕明子、津田正明
(岡山大学・薬学部)

173 PC12細胞におけるS-ニトロソシステインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇 ……576
2Ba4 長沼朋佳、村山俊彦、野村靖幸
(北海道大学・薬学部・薬効学講座)

174 ムスカリン性アセチルコリンレセプター結合能に対する NO ラジカルの影響 ……578
2E11 Marvin Gómez-Vargas、西林佐紀子、浅沼幹人、岩田恵美、近藤洋一、小川紀雄
(岡山大学・医学部・分子細胞医学研究施設・神経情報学部門)

175 Dopamine agonist のNOラジカル消去能 ……580
2E12 西林佐紀子[1]、浅沼幹人[1]、河野雅弘[2]、近藤洋一[1]、岩田恵美[1]、Marvin Gómez-Vargas[1]、小川紀雄[1]
([1]岡山大学・医学部・分子細胞医学研究施設・神経情報学部門、[2]日本電子株式会社)

176 カルバコール刺激依存性抗酸化酵素活性変動に対する一酸化窒素の関与とその細胞局在 …582
2E13 山内理充[1]、安藤正人[2]、藤田公和[1]、柴山健三[1]、芳本信子[1]、永田 豊[1]
([1]藤田保健衛生大学・医・生理、[2]愛知学泉大学・解剖・生理)

注）上段, 論文番号； 下段, 演題番号

15. 成長円錐

177 新規な成長円錐蛋白質の解析 ……584
2E53 阿部貴子[1]、田中洋史[1]、山国 徹[2]、桑野良三[1]
([1]新潟大学・遺伝子実験施設、[2]三菱化学生命科学研究所・脳神経科学部)

178 ラット脳由来非イオン性界面活性剤不溶性低比重画分中のタンパクの解析……586
2E54 熊ノ郷晴子、前川昌平
(京都工芸繊維大学・繊維学部・応用生物学科)

179 ヒト神経芽細胞腫IMR32細胞の神経突起伸長に伴う膜タンパク質の変動とリン酸化 ……588
2E55 石岡憲昭[1]、久原映子[1]、小暮太郎[1,2]
([1]慈恵医大・DNA医研・分子細胞生物、[2]脳神経外科)

180 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII過剰発現細胞の神経突起形成における H-7 の
1Bp4 効果 ……590
吉村好之、野村知彦、山内 卓
(徳島大学・薬学部・生化学)

181 Eph 受容体型チロシンキナーゼ Cek8 とリガンド ELF-1, RAGS による運動ニューロン神経
2E56 突起成長阻害 ……592
太田訓正、岩政浩子、田中英明
(熊本大学・医学研究科・神経分化学)

182 ニワトリ視蓋反発因子の細胞内情報伝達機構の解析 ……594
2E57 中山 孝[1]、五嶋良郎[2]、加藤尚彦[1]、三須良實[2]
([1]横浜市立大学・医学部・第一生化学講座、[2]薬理学講座)

183 成長円錐におけるL型及びN型カルシウムチャネル ……596
2E58 大林克巳[1,2]、福良治彦[1]、井上 洋[2]、小宮義璋[1]、五十嵐道弘[1]
([1]群馬大・医・分子病態学教室、[2]脳神経外科学教室)

184 成長円錐における $GABA_A$ 受容体を介する情報伝達系 ……598
2E59 福良治彦[1,2]、五十嵐道弘[1]、小宮義璋[1]
([1]群馬大学・医学部・分子病態学教室、[2]麻酔・蘇生学教室)

185 成長円錐における SNARE 複合体の性質 ……600
2E60 五十嵐道弘、小宮義璋
(群馬大・医・分子病態学)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

186 小脳求心性投射形成の初期過程 - 一次前庭神経の伸長路選択と標的認識 - ……602
2E61 遠藤利朗、白崎竜一、村上富士夫
(大阪大学・基礎工学部・生物工学科)

187 ニワトリ網膜の発生・分化における細胞接着因子 Gicerin の発現 ……604
2E62 李 炳生、平 英一、樋口宗史、三木直正
(大阪大学・医学部・第一薬理)

16. 細胞骨格タンパク質

188 脱リン酸に伴う微小管結合蛋白タウの活性変化：重合核形成能の選択的低下 ……606
1E64 藤村維子[1]、倉知 正[1]、田代英夫[1]、小宮義璋[2]、田代朋子[2]
([1]理研・フォトダイナミクス、[2]群馬大・医・分子病態)

189 微小管結合蛋白質 MAP1B (microtubule-associated protein 1B) の *in vivo* でのリン酸化とその
1E65 発生段階での変化 ……608
山内英美子[1]、村本和世[2]、黒田洋一郎[2]、谷口寿章[1]
([1]藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・医高分子、[2]東京都神経研・神経生化)

190 神経細胞内及び、サイクリン依存性蛋白質燐酸化酵素による微小管付随蛋白質 2 の燐酸化
1Dp1 反応 ……610
山本秀幸[1]、久永真市[2]、岸本健雄[2]、宮本英七[1]
([1]熊本大学・医学部・第一薬理、[2]東京工業大学・生命理工)

191 末梢神経軸索の可溶性ニューロフィラメント・Hサブユニット ……612
1E66 津田守弘[1,2]、田代朋子[1]、小宮義璋[1]
([1]群馬大・医・分子病態、[2]同・口腔外科)

192 若齢ラットと老齢ラットのニューロフィラメントの違いについて ……614
1Dp2 久永真市、岸本健雄
(東京工業大学・生命理工学部)

193 Effects of Ginkgo biloba extract (Gbe) on axonal transport of sciatic nerve in diabetic
1E67 rats with reference to pathological alteration ……616
金 振萬、荒記俊一、横山和仁
(東京大学・医学部・公衆衛生学教室)

194 IDPN による軸索腫大におけるキネシンの集積 ……618
1E68 豊島 至、加藤一麿、菅原正伯、和田千鶴、正宗 研
(秋田大学・医学部・第一内科)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

17. シグナル伝達

195 低分子量ストレス蛋白質のリン酸化 ……620
1Bp1 伊東秀記、岡本慶子、加藤兼房
(愛知県コロニー・研究所・生化)

196 Dexamethasone による C6 細胞中のαB クリスタリンの誘導……622
1E36 岡本慶子、伊東秀記、加藤兼房
(愛知県コロニー・研究所・生化)

197 C6 グリオーマ細胞におけるαB クリスタリンの蓄積 ……624
1Bp2 加藤兼房[1]、伊東秀記[1]、岡本慶子[1]、佐賀信介[2]
([1]愛知県コロニー・研・生化、[2]形態)

198 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼβアイソフォームの精製と性質 ……626
1Bp3 奥野幸子、木谷隆子、藤澤 仁
(旭川医科大学・第一生化学)

199 標的タンパク質に対する14-3-3タンパク質の結合部位……628
1Bp5 市村 徹[1]、伊藤美津樹[1]、板垣千春[1]、堀米恒好[1]、小俣三郎[1]、新開史子[2]、瀬田和夫[2]、儀辺俊明[2]
([1]新潟大学・理学部・化学、[2]東京都立大学・理学部・生物化学)

200 ラット大脳皮質におけるホスホリパーゼ C の多様性と調節機構 ……630
1E37 宮本 篤、大鹿英世
(札幌医大・医・薬理)

201 ニューロブラストーマ Cell Line におけるカルシウム結合タンパクの TNF-α による発現の
1E38 調節 ……632
山口知子[1]、神田尚俊[2]
([1]東京女子医大・生化学、[2]東京農工大・家畜解剖学)

202 ウアバインによる培養アストロサイト Na, K-ATPase アイソフォームα 1、β 1 の選択的誘導
1Bp6 ……634
松田敏夫、細井理恵、橋本 均、浅野省一、馬場明道
(大阪大・薬・薬理)

203 プロテインカイネース C によるグリシントランスポーター1b の機能調節 ……636
1Bp7 佐藤康二
(大阪大学・医学部・バイオ研・神経解剖)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

204 カテコールアミン代謝酵素阻害剤の脳内GTP cyclohydrolase I 活性に及ぼす影響 ……638
1E39 坂本秀生[1]、藤田 興[1]、池亀 守[2]、葛谷博磁[1]
([1]藤田保健衛生大学・総医研・分子生物、[2]藤田保健衛生大学短期大学・生体機能代行装置学)

205 トリプトファン水酸化酵素の誘導とその細胞内信号変換の解析：プロテアソーム阻害剤による
1Bp8 誘導の阻止について ……640
小島雅代、飯田芳子、大黒一哉、長谷川宏幸
(帝京科大・理工・バイオサイエンス)

206 レチノイン酸刺激による白鼠上頸交感神経節内組織トランスグルタミナーゼの誘導 ……642
1Bp9 安藤正人[1,2]、山内理充[1]、藤田公和[1]、宮崎めぐみ[2]、永田 豊[1]
([1]藤田保健衛生大・医・生理、[2]愛知学泉大・解剖生理)

207 マウス神経芽細胞腫N1E-115におけるリポポリサッカライド刺激後のテトラヒドロビオプテ
1E40 リン生合成の変化について……644
吉田 聡[1]、太田 明[2]、永津俊治[1,2]
([1]藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・分子遺伝学研究部門II神経化学、
[2]難病治療共同研究部門)

18. グルコース代謝

208 アストロサイトのグルコース代謝に及ぼすインスリンとグルタミン酸の調節作用 ……646
2E48 浜井盟子、箕越靖彦、嶋津 孝
(愛媛大学・医・医化学第一)

209 視床下部腹内側核 - 交感神経系による肝グリコーゲンの分解とグルコースの生成 : in vivo
2E49 microdialysis による検討 ……648
高橋 章、石丸裕久、五十嵐 康、岸 栄子、丸山悠司
(群馬大学・医学部・神経精神薬理学(ツムラ))

210 脳内ブドウ糖・グルタミン酸代謝へのインスリンの効果 - [1-^{13}C] - ブドウ糖投与での ex vivo
3Dp2 ^{13}C - MRSによる検討 - ……650
金松知幸、高原ひろみ、塚田裕三
(創価大学・生命科学研究所)

19. 脳タンパク質

211 脳タンパク質の多次元 HPLC-ESI/MSによる分子解剖 ……652
2Aa6 瀬田和夫[1,2]、礒辺俊明[1]、中山 洋[1]、新開史子[1]、山口美保子[2]、金井みち子[2]、
徐 紅[2]、奥山典生[1]
([1]東京都立大学・理学部・化学科生物化学、[2]サーモクエスト)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

212 質量分析法による小脳2次元電気泳動マップ上のスポットの翻訳後修飾の解析 ……654
2E4 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[3]、磯辺俊明[1]
([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)

213 Putative HLA-DR Associated Proteins (PHAP I and PHAP II) の結合蛋白質の探索……656
2E5 立野 慶、田中隆佳、萩原民雄、竹田二美代、竹田 稔
(昭和大学・医・第一生化学)

20. 神経活動と遺伝子発現

214 活性型 Fyn の脳内発現によるけいれん発作とチロシンリン酸化の亢進 ……658
1Dp3 児島伸彦、石橋英俊、小幡邦彦
(生理学研究所・神経化学)

215 新規セリンプロテアーゼ、ニューロプシンの活性化機構の解明と生体内基質の探索 ……660
1Dp4 清水千草[1,2]、加藤 武[2]、松本和政[1]、吉田成孝[1]、塩坂貞夫[1]
([1]奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・細胞構造、
[2]横浜市立大学・総合理学研究科・分子認識)

216 神経活動によって発現制御される遺伝子 arc とその遺伝子産物 ……662
1Dp5 山形要人[1]、杉浦弘子[1]、入江康至[2]、三木直正[2]
([1]東京都神経研・分子神経生物、[2]大阪大・医・第一薬理)

217 ラット海馬における HPC-1/syntaxin-1A 遺伝子発現のカイニン酸による抑制作用 ……664
1Dp6 藤野一郎、藤原智徳、赤川公朗
(杏林大学・医・第二生理)

218 中枢神経系における浸透圧変化に対する防御機構の重要性と浸透圧制御に関わる遺伝子 …666
1Dp7 山下俊英[1]、島田昌一[2]、高木 勉[1]、早川 徹[3]、遠山正彌[2]
([1]大阪大学・医学部・分子脳機構、[2]第二解剖、[3]脳神経外科)

219 脳の発達に伴うニューレキシンのスプライシングパターン変化の解析 ……668
1E69 野村隆則、吉田 明、吉岡 亨
(早稲田大学・人科・分子神経生物)

220 ヒト necdin ゲノム遺伝子の構造解析 ……670
1E70 中田祐二、谷浦秀夫、植月太一、吉川和明
(大阪大学・蛋白質研究所・蛋白質機能制御部門)

注) 上段, 論文番号; 下段, 演題番号

221 ヒト脳に存在する Hippocalcin 類似蛋白質 (hHLP3) の cDNA クローニング ……672
1E71 小林正明、斎藤茂治、野口鉄也、高松 研
(東邦大学・医学部・第2生理)

21. 転写因子

222 Neuro D ファミリーに属する新しい神経特異的 bHLH 蛋白 cDNA の単離と解析 ……674
2Aa1 安波道郎[1]、鈴木和夫[1]、永井康雄[2]、萩原正敏[2]、丸山博文[3]、川上秀史[3]、大久保博晶[1]
([1]熊本大学・医・遺伝発生研、[2]名古屋大学・医・解剖学第三、[3]広島大学・医・第三内科)

223 マウスType 1 inositol 1, 4, 5 - triphosphate receptor (IP_3R1) の発現に関与する脳特異的 bHLH
2E1 蛋白質の解析 ……676
小西慶幸[1]、小林恭士[1]、牧野泰孝[1]、古市貞一[2]、御子柴克彦[2]、田村隆明[1]
([1]千葉大学・理・生物、[2]東京大学・医科研・化学)

224 脳可溶性画分における転写制御因子 DNA 結合能 ……678
2Aa2 東 泰孝、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

225 異なるプロテインモチーフを持つ転写制御因子間におけるクロストークの可能性 ……680
2E2 東 泰孝、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

226 1本鎖CRE結合蛋白質 (ssCRE-BP) とその DNA 結合活性を増加させる因子について
2Aa3 ……682
丁 云[1]、大杉 武[2]、都 銀珠[1]、郭 哲輝[1]、三木直正[1]
([1]大阪大・医・第一薬理、[2]日本ベーリンガー川西医薬研)

227 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 CREB リン酸化におけるカルモ
2E3 ジュリンキナーゼIIの役割 ……684
石毛久美子、伊藤芳久、福田英臣
(日本大・薬・薬理)

228 E2F1 の強制発現によって誘発される成熟神経細胞の DNA 合成及びアポトーシスについて
2Aa4 ……686
須田喜久夫[1]、宮嶋雅一[2]、佐藤 潔[2]
([1]済生会川口総合病院・脳神経外科、[2]順天堂大学・脳神経外科
)

229 神経選択的サイレンサー結合因子 NRSF の神経細胞特異的バリアントの構造と機能 ……688
2Aa5 鳴瀬善久[1,3]、小島拓哉[1,3]、武井延之[2]、森 望[3]
([1]奈良先端大・バイオ、[2]京都工繊大・応用生物、[3]新技術事業団・遺伝と変化)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

22. 形態形成と遺伝子

230 ジーントラップ法で得られたGT3-11,12系統マウスの解析 ……690
3Cp1 宮下哲典[1,2]、伊藤康宏[1]、桑野良三[1]
([1]新潟大・遺伝子実験施設、[2]同・自然科学・生体機能)

231 神経回路形成期初期の脳に一過性に発現する新規遺伝子の探索 ……692
2E38 佐久間充弘、吉田弘美、服部和枝、栗原 正
(創価大・生命研・神経化学)

232 神経前駆細胞に発現する *elav* / HuC Homologue ……694
3Cp2 金 哲熙、村岡 修、植嶋栄未子、田中秀和、三木直正
(大阪大学・医学部・第一薬理)

233 ショウジョウバエ複眼形成における分泌性蛋白質 Argos の役割：Ras / MAPKカスケードを介
3Cp3 した細胞分化の制御とアポトーシスの誘導……696
澤本和延[1,2]、田口明子[1]、山田知春[1]、岡野栄之[1,2]
([1]筑波大・基礎医・分子神経、[2]筑波大・TARAセンター)

234 眼と小脳の発生におけるゼブラフィッシュ Islet - 3 の機能解析 ……698
3Cp4 菊池 裕[1]、徳元美佳[2]、堀田凱樹[3]、植村慶一[1]、岡本 仁[1]
([1]慶大・医・生理、[2]基礎生物学研究所、[3]東大・物理)

235 LIM／ホメオドメイン転写因子 LH-2A, B と前脳の領域特異化 ……700
2E39 坪川達也、植村慶一、岡本 仁
(慶応義塾大学・医学部・生理学教室)

236 ニワトリ胚運動ニューロンの特異的筋肉支配に関わる candidate 遺伝子の単離と発現解析
2E40 ……702
調 恒明[1]、木村芳滋[2]、松尾哲孝[1]、竹下正純[1]、田中英明[2]
([1]大分医大・生化、[2]熊大・医・神経分化)

23. 遺伝子導入

237 単離ミクログリアおよび株化ミクログリアを用いた脳選択的遺伝子導入法……704
1Dp8 澤田 誠[1]、永津俊治[1,2]
([1]藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・病態生化学、[2]神経化学)

238 ヒト羊膜細胞における多能性神経幹細胞マーカーの発現とその Lac Z 遺伝子導入細胞のラット
1Dp9 脳移植実験……706
桜川宣男[1]、Ramasamy Thangavel [1]、石井 俊[1]、池田久美子[1]、屋田 修[2]、荻野郁子[2]
([1]国立精神・神経センター・神経研究所・第5部、[2]順天堂大学・医学部・脳神経外科)

注) 上段, 論文番号； 下段, 演題番号

L1 L-DOPAは内因性神経伝達物質か？ — 線条体を中心に

1CL 1

三須良實
（横浜市立大学・医・薬理）

〔要約〕

ラット線条体において、DOPA は伝達物質様に遊離される。DOPA は dopamine (DA) の前駆体であるのみならず、それ自体 DA 遊離を促進するシナプス前 β-受容体、シナプス後 D_2 受容体に対する内因性伝達効率増強物質であり、またパーキンソン病モデルにおいて ACh 遊離を抑制する。一方、DOPA はそれ自体の作用により glutamate の基礎遊離を増大し、パーキンソン病モデルにおける同応答は nM 濃度の DOPA に対して著明な増感を示す。DOPA は線条体においてこのようなタイプの内因性神経活性物質である。

1960 年代から、DOPA は DA の前駆体にすぎず、抗パーキンソン病効果はドーパ脱炭酸酵素 (AADC) による DA への転換・補充によるとされてきた。1986 年以来 (1)、我々は「DOPA は内因性神経伝達物質である」との作業仮設を提起しその検証を進めてきた (2-5)。DOPA 伝達物質説はいわゆる古典的概念の合成・存在・遊離・代謝・取込機構・応答等の基準を満たしつつある。免疫組織化学的に DOPA を最終産物として含む神経が存在する (6)。DOPA は in vitro, in vivo 両系において、伝達物質様に遊離される (7, 8)。DOPA は、AADC による DA への転換を介さずに、それ自体が諸種のシナプス前・後の応答を生じ、応答はすべて各種受容体と共通して立体特異性を示し、多くが競合的拮抗薬の DOPA metyl ester (DOPA ester) (9) により拮抗される。DOPA は孤束核に終末する圧受容器第一次求心性感覚神経をはじめ下位脳幹部血圧制御に関わる神経伝達物質の可能性が高い (10, 11)。本講演では DOPA の線条体における内因性神経活性物質としての役割をパーキンソン病における可能な主作用、副作用に関連させて概説する。

ラット線条体表面潅流切片において、内因性 DOPA は高 K^+ により脱分極依存性、Ca^{2+}-依存性に、電場刺激により TTX-感受性、Ca^{2+}-依存性に遊離される。Ca^{2+}-依存性部位は第一義的に DOPA の遊離課程にある、何故なら高 K^+ による DOPA、DA 遊離、チロシン水酸化酵素 (TH) 活性同時測定系において、時間的に、DOPA 遊離は脱分極時に、TH 活性亢進は脱分極終了後に見られるからである。線条体において DOPA を最終産物として含む神経は現在見い出されていない。DA 遊離が著明に K^+ 濃度 (10-30 mM) と刺激頻度 (0.5-5 Hz) に依存するのに対し、DOPA 遊離は K^+ 15 mM、刺激頻度 2 Hz においてピークとなり頭打ちを示す。この事実は DOPA が主に DA 性神経の DA 含有小胞

以外の、あるコンパートメントから遊離される事を示唆している。意識下線条体微量透析系の基礎的 DOPA 遊離は TTX-感受性、Ca^{2+}-依存性であり、TH 阻害 (α-methyl-*p*-tyrosine, α-MPT, 200 mg/kg, i.p.) により著減、一方 AADC 阻害により著増する。

切片において、DOPA 30 nM はシナプス前 β-受容体を介して DA 遊離を促進する。同応答は AADC 阻害下 (99.6% 抑制) にも見られる。DOPA ester 単独投与は緊張性機能を示す。無作用の pM 濃度の DOPAは β-作動薬の isoproterenol の 同受容体作動活性を増強する。意識下、中枢性 AADC 阻害下に、無作用濃度の DOPA (30 mg/kg, i.p.) は、微量透析により同時記録した DA に転換しない時間範囲内において、D_2-作動薬の quinpirole (0.1-1 mg/kg, s.c.) の自発運動量増加を 3-4 倍に増強する。6-hydroxydopamine (6-OHDA, i.c.v.) 処置は無作用濃度を 10 mg/kg に低下、増感を示し、この濃度の DOPA は同様に同作動薬の自発運動量を増強する。さらに、quinpirole (3 mg/kg) は自発運動量増加と同時にシナプス前 D_2 自己受容体を介して DOPA、DA 遊離を抑制する。 AADC 阻害は同作動薬の DOPA 遊離抑制を著増に転換、 DA 遊離抑制の修飾無しに、同自発運動量増加を増強する一方、TH 阻害薬 α-MPT の低用量 3 mg/kg i.p. 処置は、同 DOPA 遊離抑制程度をさらに強め、 DA 遊離抑制の修飾無しに、同自発運動量増加を抑制する。 DOPA はシナプス後 D_2 受容体の内因性増強物質である。さらに、プローブを介して潅流した nM 濃度の DOPA は内側前脳束 6-OHDA 処置パーキンソン病モデルにおいて透析液中 ACh 遊離を抑制し、この抑制は $D_{2,3}$ 拮抗薬の sulpiride により拮抗されず、同用量の DA は無作用である。 ACh 遊離抑制は非モデルでは見られないので一種の増感現象といえる。DOPA の DA 前駆体としての性格と上述のそれ自体の 3 種の作用は相補的にパーキンソン病の治療効果に関与しうると考えられる。一方、切片において (12)、DOPA は glutamate の基礎的遊離を AADC 阻害下にも増大する。プローブを介して潅流した nM 濃度の DOPA は用量依存性、Ca^{2+}-依存性, TTX-感受性に線条体内 glutamate 性神経からの遊離を増大し、同用量の DA は無作用である。 6-OHDA i.c.v. 処置は著明な増感を示した。この glutamate 遊離作用は DOPA の慢性投与時に発現する不随意運動等の神経興奮性副作用に関与しうる。DOPA は線条体においてこのようなタイプの内因性神経活性物質である。DOPA 認識部位は高親和性、低密度の性格を示している。

[文献] 1) Goshima Y et al., *Br. J. Pharmacol.* 89, 229-234, 1986; 2) Misu Y and Goshima Y, *TiPS* 14, 119-123, 1993; 3) Misu Y et al., *Adv. Pharmacol.* 32, 427-459, 1995; 4) Misu Y et al., *Neurosci. Res.* 23, 147-158, 1995; 5) Misu Y et al., *Progr. Neurobiol.* In press, 1996; 6) Tison et al., *Brain Res.* 497, 260-270, 1989; 7) Goshima et al., *J. Neurochem.* 50, 1725-1730, 1988; 8) Nakamura et al., *J. Neurochem.* 58, 270-275, 1992; 9) Goshima et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258, 466-471, 1991; 10) Yue J-L et al., *Neuroscience* 62, 145-161, 1994; 11) Yue J-L et al., *Neuroscience* 67, 95-106, 1995; 12) Goshima et al., *Brain Res.* 617, 167-170, 1993.

L2 Disease as Dissonance: PET/SPECT Imaging in Communication Disorders

2CL 2

Henry N. Wagner. JR. M.D.
(Divisions of Nuclear Medicine and Radiation Health Sciences, Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, Maryland 21205-2179)

[要約]

Since the first imaging of dopamine receptors in 1983, there has been a steady increase in the studies of the dopaminergic system in living human beings and experimental animals. We can assess the synthesis of dopamine with fluorine-18 L- dopa, the secretion of dopamine from the presynaptic neurons measured by its effect on postsynaptic receptors, the metabolism of dopamine by the monoamine oxidase enzyme system, the re-uptake of unbound dopamine by the presynaptic dopamine transporter with re-incorporation of dopamine into the vesicles of the presynaptic neuron.

Patients with idiopathic Parkinson's disease have a deficiency of the dopaminergic pre-synaptic neurons. This same approach to molecular diagnosis can also be applied to patients with other diseases, including cognitive disorders, emotional disorders, and many others.

Patients with idiopathic Parkinson's disease have normal D1 and D2 dopamine receptors; in striatonigral degeneration, there is degeneration of postsynaptic dopaminergic neurons. In the earliest stage of Parkinson's disease, there are major

deficiencies in pre-synaptic neurons, examined by injection of radiotracers that are accumulated by the pre-synaptic dopamine transporter.

L3 3CL 3 ショウジョウバエのニューロン・グリア分化決定遺伝子 *gcm*

堀田凱樹（東京大学・大学院理学系研究科／遺伝子実験施設）

{要約}

ニューロンとグリアとが同一の前駆細胞に由来するという説がRamon y Cajalによって唱えられて以来、一つの母細胞由来の子孫の中に両者が混在することが断片的に示されてはいるが完全な証明はまだ行われていない。われわれはショウジョウバエの神経系の形態異常や回路網異常をおこす突然変異を探索する過程で*glial cells missing (gcm)*と名づけた遺伝子を発見した。この遺伝子の突然変異では、すべてのグリアがニューロンとなり、一方すべての神経芽細胞で*gcm*を強制発現させるとすべてのニューロンがグリアとなる。すなわち、ニューロンとグリアの前駆細胞は等価 (equivalent) であり、*gcm*遺伝子がそのいずれに分化するかを決定する2進法的マスタースイッチとして働いているのである。本講演では、*gcm*突然変異体の症状の詳細な解析から結論される神経系構築や回路網形成におけるグリアの役割について論じ、また*gcm*遺伝子産物がDNA結合能を持つ転写調節因子であるという最近のデータと、ヒトやマウスにも同じ構造の遺伝子があり神経系で働いているらしいという最近の研究結果について報告したい。

ニューロンとグリアの特異性と多様性は既に出生前にほぼ形成されていることはよく知られている。出生後に環境の影響によって一部の神経回路に変化がおこる可塑的な側面もあるが、それは胎生（胚）期の回路網形成のドラマに比べればその修飾に過ぎない。外界の影響も経験もなしにニューロンとグリアの“個性的な”分化とその結果としての神経回路網の正確な形成を実現するには設計図がなくてはならず、それは遺伝情報の中にあるとしか考えられない。われわれの発見したショウジョウバエの遺伝子*glial cells missing (gcm)*は、その第一段階のニューロンとグリアとの分化の分岐スイッチとして働く遺伝子である。その遺伝子解析によって、ニューロンとグリアが同じ前駆細胞の子孫であることが示されるばかりでなく、神経回路形成などにおけるグリアの役割などについても多くの興味深い結論を得ることができる。

（1）ショウジョウバエ胚神経系の形成

ショウジョウバエ胚は（ヒトと同様に）体節構造をしており、体節の片側（半体節と呼ぶ）約30個の神経芽細胞から生じる。その過程では*Notch*と*Delta*という遺伝子と一群のneurogenic genes群が重要であることが知られている。30個の神経芽細胞はその位置と分化順序とによって個別に番号づけされている。これまでに約20個の遺伝子についてその発現の有無が個々の神経芽細胞についてカタログされているが、その結果だけを見てもすべての神経芽細胞がユニークな遺伝子の組合せを発現していることが分る。各神経芽細胞は幹細胞として不等分裂しながらニューロンを生み出す。その細胞系譜の一部はかなり詳しく解析されており、その特定の段階でグリア細胞が形成される。胚神経系が完成したとき、半体節あたり約300個の神経細胞と約30個のグリア細胞があり、それらのうち初期に分化する細胞はすべてidentified cellsとして番号づけされており、個々の遺伝子発現パターンの解析が進行中である(1)。

（2）脳神経系の細胞分化 —— ニューロンとグリアの分化

われわれはトランスポゾン挿入突然変異法（エンハンサートラップ法）により、ショウジョウバエ神経系のグリア細胞の分化の最初の段階でごく短時間発現する遺伝子*gcm (glia cells missing)*を発見した

(2, 3)。 その欠損突然変異ではすべてのグリアがニューロンとなって軸索を伸ばすようになる。また遺伝子導入法によってすべての神経芽細胞でこの遺伝子を強制発現させるとほぼすべてのニューロンがグリア細胞型の遺伝子発現をするようになった。したがって *gcm* はニューロンとグリア間の分化運命を決定する binary switch 遺伝子である。クローニングした結果、この遺伝子は明確な核移行シグナルを持っているが既知の遺伝子とのホモロジーはなかった。さらに興味深いことには、*gcm* 突然変異によって本来グリアとなるべきなのにニューロン化した細胞は体節ごとに繰返して個々にユニークなパターンで軸索を伸ばした。これは、神経細胞の個性と多様性を規定する遺伝子セットと同じものがグリアの個性と多様性をも規定しているという興味深い可能性を示唆している。

（3）軸索走行路の形成

gcm 突然変異の中枢神経系の各ニューロンの軸索走行路の解析から、われわれはグリア細胞の役割についても興味深い知見を得た。初期に分化するいわゆる pioneer neuron はグリアの存在しない環境でも正しく軸索路を発見できるが、それに続いて分化する一般のニューロンの軸索は多くの場合正しい路を発見できないのである。したがって、pioneer neuron がまず経路を示し、グリアが「道路舗装」をしてハイウェイを完成すると、後続の軸索がその上を渡るという経過をたどるらしい。その道路標識となるグリアも上述のように個性と特異性を持っているから、グリアとニューロン間の相互認識によって各軸索が正しい経路を見出していくのであろうが、その標識分子についてはまだそのごく一部が明らかにされているに過ぎない(4)。

（4）*gcm* 遺伝子産物タンパク質 (GCM) は８塩基のターゲットを正確に認識する。

大腸菌に合成させた GCM の DNA 結合特性を解析した結果、そのN末部分に特異性の高い DNA 認識結合部位（gcm モチーフ）が存在し、[5' (A/G)CCCGCAT 3'] の８塩基列を認識して結合することが分った。しかもこの配列が *gcm* の標的遺伝子と考えられる *repo* 遺伝子の上流に 11 個存在する。この結果から、GCM は転写調節因子であると結論された(5)。また、同じような重要なスイッチ遺伝子がヒトなどでも働いている可能性を追及する目的で、われわれは現在マウスなどでのホモログ遺伝子の探索を行っている。これまでの結果から、マウスには複数の gcm モチーフを持つ遺伝子が存在し、そのうちの一つは胎生期の脳で強く発現していることが明かとなっている。

参考文献

1) 細谷俊彦・堀田凱樹：中枢神経系における細胞運命の決定機構：実験医学 14(4):38-44(1996).

2) Hosoya,T., Takizawa,K., Nitta,K., and Hotta,Y.： *glial cells missing*: A binary switch between neuronal and glial determination in Drosophila, *Cell* 82(1995):1025-1036.

3) 細谷俊彦・秋山康子・滝沢一永・新田浩史・堀田凱樹：ニューロン・グリア間の分化決定スイッチ *glial cells missing*, 実験医学 増刊「発生・神経研究の最前線 '96-'97」上野直人ら編 14(8):134-140 (1996).

4) Chiba,A., Snow,P., Keshishian and Hotta,Y.：FasciclinIII as a synaptic target recognition molecule in *Drosophila*, *Nature* 374:166-168 (1995).

5) Akiyama,Y., Hosoya,P., Poole,A. and Hotta,Y.：Gcm-motif; A novel DNA binding motif conserved in *Drosophila* and mammals, （投稿中）

S1 神経化学の対象としての記憶

1CS1-1

小幡 邦彦
岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経化学部門

〔要約〕
シンポジウム「in vivo シナプスの可塑性による記憶の分子機構研究」の序論として、記憶を分子機構として研究する際の視点、限界につき私見を述べる。

われわれに浴びせられる「脳の高次機能が神経化学、神経生物学でわかるのか」という質問に応えるには、はっきりした視点、展望を持っている必要がある。学習・記憶ーシナプス可塑性ー長期増強という図式でIntroductionが始まる論文が多いが、しらべた分子が確かに長期増強に影響するとしても、それが記憶のメカニズムに関わるのだという結論では同意は得られないであろう。脳は物質で構成されるが、それが情報、分子、エネルギーの側面から表出されており、神経化学の守備範囲は第二の面にあるので、それを見据えることが重要であると考えられる（近年、第三の面を血流、酸素消費、糖代謝でとらえる非侵襲的計測・イメージングもきわめて有効な手段であることが明らかになった）。

心理学の定義によれば、広義の記憶は「経験の影響の残存」であり（狭義には「経験を再現する機能」）、学習は「経験による、比較的永続的な行動の変容」であるから、その基盤がシナプス可塑性ということはできる(1)。しかし常識的に記憶とは、その分類でいわれているようにエピソード記憶と意味記憶、この両方を合わせた陳述記憶（宣言的記憶）とこれに対する手続き的記憶のようなものである。一回の経験が短いビデオのように覚え込まれるエピソード記憶などは、関連する神経回路の分子的変化があるにしても、現在の神経化学的方法では扱えないであろう。一方、訓練や学習のような反復を要する手続きの記憶はまさにシナプス可塑性の積み重ねと考えることができる。

ここで重視したいのは記憶に影響する精神的活動状態や脳機能レベルの研究である。これには覚醒レベル・意識・意欲、興味・気分、疲労・パニック、他の感覚入力・身体状況、引き起こされる感情・背景にある感情などがある。ベータ遮断薬は強い感情変化をともなうエピソードの長期記憶を障害するというヒトでの研究がある(2)。またラット、マウスのMorris水迷路学習は位置関係の記憶で一種の陳述記憶とみなされ、動物の位置で発火する場所ニューロンが海馬に存在することも確かであるが、側壁をあくまでもよじ登ろうという執着心、泳いだ後の疲労感・嫌悪感、好奇心などが関係するようにみえる。水迷路学習が障害される遺伝子ノックアウト

マウスの報告が少なくないが、直接の記憶障害によるのではなく、恐怖心など情動の異常にもとづく場合もあると考えられる(3)。すなわちこれらの脳機能レベルの調節機構は関連する脳部位や神経伝達物質系などの解析によって解明が期待できる。とくに遺伝子ノックアウトマウスの作成・解析は選択的作用を持つ薬物による実験と合わせることによりきわめて有効な手段となる。

これらに関連して、演者らのカイニン酸誘発けいれん後のラットにおける短期的および長期的変化についての実験結果を示す。すなわち海馬ＣＡ１錐体細胞の細胞死と水迷路学習の障害と回復、ソマトスタチンおよびグルタミン酸脱炭酸酵素の異所性発現の経過を述べ、その意義を考察する。

文献

1 市川伸一ら(1994): 記憶と学習、岩波講座認知科学5、東京、岩波書店.

2 Cahill L,Prins B, Weber M, McGaugh JL(1994): Nature 371:702-704.

3 Miyakawa T, Yagi T, Kagiyama A, Niki H(1996): Mol Brain Res 37;145-150.

S2 海馬長期増強におけるプロテインキナーゼの標的分子

1CS1-2

福永浩司，宮本英七
（熊本大学・医学部・第一薬理）

〔要約〕
私達はこれまでに，LTP 誘発後に CaM キナーゼⅡの Ca^{2+}非依存性活性と全活性が上昇すること，本酵素のシナプス前，後部での基質である synapsin I と微小管付随蛋白質 2 (MAP2) の *in situ* での燐酸化反応が持続的に亢進することを確認した。さらに，LTP 発現後，1 時間においてプロテインホスファターゼ 1 (PrP-1) の阻害因子である inhibitor 1 の燐酸化反応が有意に上昇することを見いだした。この時，プロテインホスファターゼ活性が有意に減少していた。inhibitor 1 は cAMP 依存性キナーゼの基質である。これらの結果は，海馬 LTP において cAMP 依存性キナーゼが活性化されること，inhibitor 1 の燐酸化反応を介して，プロテインホスファターゼ活性が持続的に抑制されることを示唆している。その結果，LTP 誘発後，シナプス前，後部での燐酸化反応の亢進は持続し，プロテインキナーゼの活性化反応が LTP の維持にも関与すると考えられる。

〔目的〕

海馬 CA1 領域の長期増強 (LTP) の発現は NMDA 受容体依存性であり，シナプス後部におけるカルモデュリン (CaM) キナーゼⅡ，プロテインキナーゼC (PKC) の活性化反応が必須である。さらに，LTP の維持機構には cAMP 依存性キナーゼも関与すると考えられている。私達は海馬 LTP におけるこれらのプロテインキナーゼの標的分子を検索して，LTP の分子機構について追究した。

〔実験方法〕

海馬切片の作成と LTP 誘発の刺激条件は既報の方法 (1) に従った。あらかじめ，^{32}P-燐酸で海馬切片をラベルした後，両側性にシータ波パターンの高頻度刺激を行った。CA1 錐体細胞層をパンチアウトして凍結保存した。synapsin I，MAP2，inhibitor 1 の *in situ* の燐酸化反応は特異抗体にて免疫沈降した後，分析した。また，非標識の海馬切片を用いて，LTP 誘発後にプロテインホスファターゼの活性を測定した。calyculin A 感受性プロテインホスファターゼ，Mg 依存性プロテインホスファターゼ活性は自己燐酸化した CaM キナーゼⅡを，カルシニューリン活性は燐酸化カゼインを基質として測定した。

〔結果と考察〕

海馬 CA1 LTP では CaM キナーゼⅡの Ca^{2+}非依存性活性のみならず，全活性が持続的に上昇している(1)。さらに，LTP 誘発後，1 時間において CaM キナーゼⅡの内因性基質である synapsin I，MAP2 の燐酸化反応も有意に亢進していた（図 1）(2)。これらの反応は NMDA 阻害剤，AP5 の投与で完全に消失する。海馬 CA1 LTP では CaM キナーゼⅡ以外に PKC，casein kinase II の酵素活性が持続的に亢進すること，PKC の基質である neuromodulin の燐酸化反応が上昇することが知られている。これらの現象は，逆にプロテインホスファターゼの活性が低下しても起こりうる。PrP-1 の阻害因子である inhibitor 1 は cAMP 依存性キナーゼによって燐酸化され，PrP-1 を低濃度で阻害する。私達は，*in situ* における inhibitor 1 の燐

酸化反応について調べた。LTP 誘発後，1時間において inhibitor 1 の燐酸化反応はコントロールに比べて，有意に上昇していた。inhibitor 1 は *in vitro* において cAMP 依存性キナーゼの基質であること，cAMP 依存性キナーゼの阻害剤は LTP の維持を阻害することが知られている。私達の結果は cAMP 依存性キナーゼ活性が海馬 LTP において亢進することを示している。

次に，LTP を誘発した CA1 領域でのプロテインホスファターゼの活性を *in vitro* で測定した。私達は以前に，CaM キナーゼⅡの自己燐酸化部位の脱燐酸化反応には calyculin A で阻害される PrP-1, PrP-2A と Mg 依存性である PrP-2C が関与することを報告した (3)。一方，カルシニューリンは脱燐酸化反応には関与しない。海馬 CA1 の組織抽出液を用いて，プロテインホスファターゼの活性を測定すると，全活性の約 66 % は caluculin A あるいは okadaic acid によって阻害され，残りの約 33 % は EDTA で完全に抑制された。LTP 誘発後，1時間においてプロテインホスファターゼの活性を測定すると，Mg 依存性プロテインホスファターゼ，PrP-2C の活性は変化せず，calyculin A 感受性プロテインホスファターゼの活性が有意に減少した。一方，カルシニューリンの活性も変化を示さなかった。calyculin A 感受性プロテインホスファターゼの活性低下は，NMDA 受容体阻害剤である AP5 で LTP の発現を阻害すると，消失した。これらのプロテインホスファターゼの活性低下のメカニズムのひとつして，inhibitor 1 の燐酸化反応が考えられる。

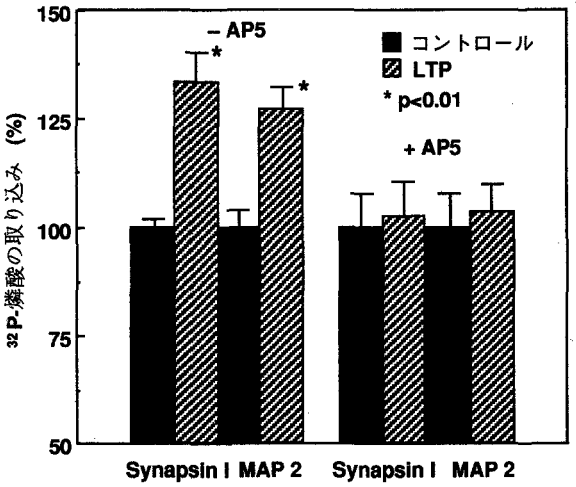


図1　LTP 誘発後の synapsin I，MAP2 の燐酸化反応の亢進

Lisman, Malenka, Tsumoto らはカルシニューリンによる inhibitor 1 の脱燐酸化反応が長期抑圧 (LTD) の発現に関与するという仮説を提唱している。私達は，inhibitor 1 の燐酸化反応，続いておこるプロテインホスファターゼの活性低下も LTP の発現に関与すると考えている。今後は，inhibitor 1 の燐酸化反応がシナプス前部，後部のどちらで主に起こり，プロテインホスファターゼの活性低下と CaM キナーゼⅡの持続的活性化反応が LTP の発現に関与する NMDA 受容体，AMPA 受容体の機能調節にどのように関与するのか追究する。

〔参考文献〕

1. Fukunaga, K. et al., J. Biol. Chem. 26 8, 7863-7867 (1993); 2. Fukunaga, K. et al., J. Biol. Chem. 270 , 6119-6124 (1995); 3. Fukunaga, K. et al., J. Biol. Chem. 268 , 144-137 (1993)

S3 In vivo 海馬の可塑性に伴い発現調節される遺伝子群の探索と機能：1CS1-3 長期記憶の分子基盤へのアプローチ

井ノ口馨[1]・小澤史子[1]・平井啓子[1]・村山明子[1]・斎藤喜人[1]・松尾亮太[1,2]・榊佳之[2]・加藤明彦[1]

([1]三菱化学生命研、[2]東大医科研・ヒトゲノム)

〔 要約 〕

In vivo の海馬の神経活動や可塑性に伴い発現調節される遺伝子群をRT-PCRを応用した Differential display 法 (1) で網羅的に探索した。海馬全体では、神経活動により調節される遺伝子の数は 200-300 程度、長期増強 (LTP) に伴い調節される遺伝子は 100 程度と予想された。これらの遺伝子の発現の経時変化には種々のパターンがあり、LTP の維持、更には長期記憶を支える分子群の働きに複雑な階層性があることが示唆された。

[目的] 長期記憶の形成には、神経回路網の特定のシナプスの伝達効率の変化のみならず、シナプス結合の安定化・シナプスの分枝さらには、回路のつなぎ替えが必要であると考えられる。分子レベルで見ると、短期記憶と異なり長期記憶の成立は遺伝子の発現に依存する (2)。しかし、記憶のモデル系として最もよく研究されている海馬の LTP でさえ、細胞内の分子機構として明らかになっているのはタンパク質のリン酸化反応までであり、長期記憶の成立に不可欠と思われる誘導遺伝子群、更にはシナプス結合の安定化や新生における発現遺伝子産物の働きについては、ほとんど何もわかっていない。長期記憶を分子レベルで理解するためには、記憶の形成時に誘導され記憶の保持に関わる遺伝子群を同定し、機能を明らかにする必要がある。我々は、短期記憶から長期記憶への変換機構を分子レベルで明らかにする第一歩として、これらの遺伝子群の探索を行なった。

[方法] mRNA differential display 法 (1) を用い、1、海馬の神経活動（痙攣）や、2、LTP に伴い発現調節される遺伝子群を網羅的に探索した。

[結果・考察] 1、ペンチレンテトラゾールあるいはカイニン酸投与で痙攣が誘発されたラットの海馬から経時的に調製した RNA を、104 組のプライマーセットを用いて RT-PCR で増幅した。海馬で発現している mRNA 分子種の約 20-30 % に相当する約 15000 本のシグナルを電気泳動上に表示した。これらのうち、海馬の神経活動にともない mRNA 量が変化する遺伝子は、変化の度合いの大きいものが 16 種、小さいもの（2 ～数倍）が 50 種前後認められた。誘導の度合いの大きい mRNA 16 種は、その発現調節がタンパク合成非依存的である最初期遺伝子（9種類）と依存的である後期遺伝子群（7種類）にわかれた。cDNA の部分構造の解析より、10 種類は未知の遺伝子 (Ag2, Ti3 など) であると思われた。残りの 6 種類は、activin βA (3, 4) や BDNF 等のリガンドタンパク質 、krox-20 などの転写因子 (5)、そして 細胞接着因子などであった。

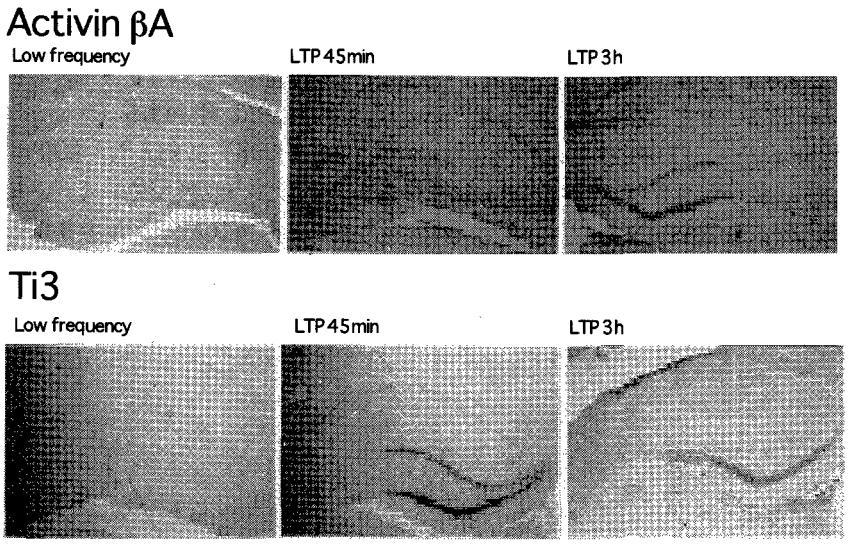
ウレタン麻酔下のラットで、400 Hz, 2000 パルス (400 Hz, 1 秒のテタヌス刺激を 2 分間隔で 5 回) の高頻度刺激を貫通繊維に与えると海馬歯状回において長時間（10時間以上）持続する LTP を引き起こした。上記 16 種の遺伝子のうち少なくとも 8 種類は、このテタヌス刺激による LTP にともない mRNA の発現が大きく誘導されることが、Northern blot, in situ hybridization, RT-PCR などで確認された。mRNA 誘導の経時変化は、LTP 誘発後直ちに増加するが 3 時間後にはコントロールレベルに戻るもの (Ag2, krox-20, BDNF など)、LTP 誘発後直ちに増加し 3 時間は増加が持続するもの (Ti3 など)、誘導が遅いもの (activin βA など) などに分類された（図 1 ）。興味深いことに未知の遺伝子

には、PC12 細胞で NGF 処理によるニューライトの伸長に伴い発現誘導されるものがあった。

2、次に我々は、長期記憶の形成に関わる遺伝子群の全体像を明らかにする目的で、海馬の LTP に伴い発現調節される遺伝子群の網羅的探索を行なった。In vivo で歯状回の LTP を誘発した海馬から経時的に調製した RNA を、460 組のプライマーセットを用い RT-PCR で増幅した。海馬で発現している mRNA 分子種の 90% 以上に相当すると思われる約 70000 本のシグナルを電気泳動上に表示した。このうち約 100 本のシグナルについて大きな発現変化を見出した。コントロール、LTP 誘発後 45 分、3 時間の 3 つの状態での発現量の変化を分類すると、a) 45 分で一過的に発現が上昇するもの（初期遺伝子群）、b) 45 分、3 時間の両方で上昇するもの、c) 3 時間でのみ上昇するもの（後期遺伝子群）、および d) LTP 誘発後発現量の減少するもの、が多くを占めたが、その他の変化パターンを示すものも見出された。今後これら遺伝子群の機能と LTP の持続の関係、更には記憶の固定化における遺伝子産物の役割の解明を通じて、長期記憶の分子機構の一端に迫ることができるものと期待される。

(1) Liang, P. and Pardee, A.B., Science, 257: 967-971 (1992). (2) Davis, H. P. and Squire, L. R. Psychol. Bull., 96: 518-559 (1984). (3) Inokuchi, K., Kato, A., Hirai, K., Hishinuma, F., Inoue, M. and Ozawa, F. FEBS Lett., 382: 48-52 (1996). (4) Andreasson, K. and Worley, P.F. Neuroscience, 69: 781-196 (1995). (5) Inokuchi, K., Murayama, A. and Ozawa, F. Biochem. Biophys. Res. Commu., 221: 430-436 (1996).

図 1、歯状回の LTP に伴う mRNA の誘導。



S4 In vivoマウス海馬歯状回の長期増強現象 ーブロテインキナーゼCの関与ー

1CS1-4

松山 正剛、Aryeh Routtenberg*
（神戸大学医学部・薬理、*Northwestern大学・Cresap神経科学研究所）

〔 要約 〕
in vivoマウス海馬歯状回顆粒細胞から長時間安定した長期増強現象（以後、LTP）を計測する方法を確立し、プロテインキナーゼC（以後、PKC）活性の正常なC57BL/6マウスと比較するとPKC活性、特に、PKC分子種のγ-PKCの低いDBA/2マウスでは短期増強の長期増強へ転換、あるいは、長期増強の維持が障害されていることが明かになった。

［緒言］
従来、LTPは、ラットでは、in vivoとin vitroの研究によって調べられていたが、マウスでは、依然、in vitroでの研究が主流である。近年、盛んになってきたミュータントマウスの開発により、in vivoマウスでのLTPの研究の必要性がましてきている。DBA/2マウスがC57BL/6マウスに比較して記憶学習機能と海馬でのPKC活性において有意に低下していることは既に報告されており、記憶学習機能におけるPKC、特に、γ-PKCの重要性が示唆されている(3,5,6,9)。また、記憶学習機能とLTPの関連も強く示唆されている(4)。よって、我々は、C57BL/6マウスとDBA/2マウスにおいてPKCと関連したLTPの相違を検討した。

［実験方法］
マウスをウレタン麻酔（1.2 g/kg, i.p.)後、ステレオ装置（マウスは37度のマット上で保温）に固定し、頭蓋を開頭後、ガラス電極（先端の直径は5 - 10 μm）は歯状回顆粒細胞の細胞体層（bregmaより約2.0 mm後方、mid-lineより約1.5 mm外側、脳表面より1.5 - 2.0 mmの深さ）に、刺激電極（ニクロム線の直径は154μm）は頭蓋表面より60度の角度で貫通線維（lambdaより約0.5mm前方、mid-lineより約2.5 mm外側、脳表面より1.5 - 2.0 mmの深さ）に刺入し、低頻度(0.1 Hz)の電気刺激（試験刺激）を行ない、顆粒細胞の細胞体層からの反応（試験反応）を得、安定した後、実験を開始した。電気刺激は最大スパイクの1/3 ~ 1/5のサイズのスパイクが得られる電圧に固定し、また、高頻度電気刺激（以後、HFS）時の電圧は、最大スパイクが得られる最小の電圧にした。HFS後は、直ちに元の試験刺激に戻し、試験反応の推移をpopulation excitatory postsynaptic potential (pop-EPSP)とpopulation spike potential (pop-spike)によって観察した。

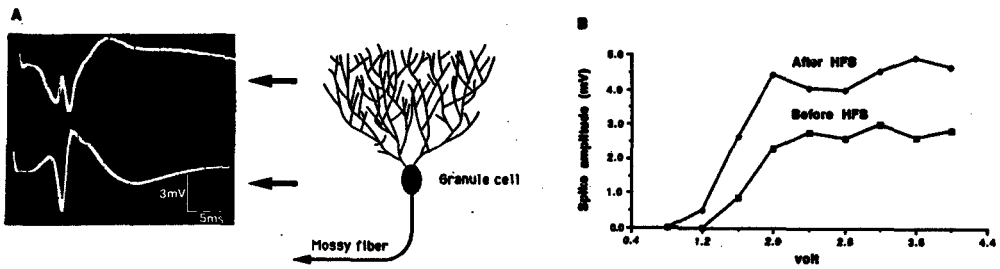


図1. A: 貫通線維の試験刺激によるマウス歯状回顆粒細胞の樹状突起層（上段）と細胞体層（下段）からの試験反応。B: HFS前と30分後の刺激電圧(volt)とスパイク電位の振幅(mV)の関係。

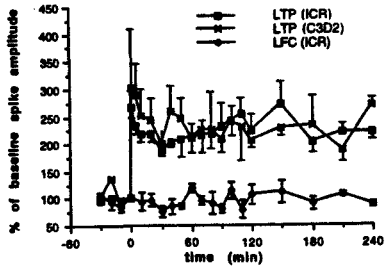


図2. In vivoマウスからのLTP［ICR: albino ICRマウス(n = 4), C3D2: B6D2F1 X B6C3F1 hybridマウス(n = 2)］。コントロールとして、albino ICRマウス(n = 4)にLFC（低頻度刺激）を適用。

［結果及び考察］

従来のin vivoマウスでのHFSによる増強反応は不安定、あるいは、短時間しか持続しないといわれていた(1, 8)。今回、ウレタン麻酔量の減少とHFSの減弱を行なった結果、顆粒細胞の樹状突起層と細胞体層から図1Aに示すような波形を得、また、図1Bに示すようなHFSによるI/O curveの増強反応が得られた。図2に示すように、Albino ICRマウスとC3D2マウスにおいては、HFS(3 trains of 400 Hz, eight 0.4 ms pulses/train)後に増強したpop-spike amplitudeとpop-EPSP slopeが4時間、安定して認められた。また、Albino ICRマウスにおいて、同様の増強反応が12時間持続した(7)。よって、in vivoマウスにおいて、長時間安定したLTPが得られることが示された。

C57BL/6マウスとDBA/2マウスにおいて、HFS後4時間のpop-spike amplitude(%, means ± SEM)を比較検討した。比較的強いHFS (3 trains of 400 Hz, eight 0.4 ms pulses/train) では、C57BL/6マウス(227.0 ± 17.4, n = 6)とDBA/2マウス共(232.4 ± 31.1, n = 8)に有意差の無いLTPが観察された。しかし、比較的弱いHFS (1 train of 400 Hz, eight 0.4 ms pulses/train) では、C57BL/6 マウス(226.4 ± 28.9, n = 8) は3 trains HFSの場合と比較して有意差の無いLTPが観察されたが、DBA/2マウス(118.4 ± 10.4, n = 8) は一過性の増強反応を示したがHFS後1時間以内にはHFS前のレベルへ衰退した。この結果は、比較的強いHFSではDBA/2マウスのような低PKC活性でも、十分にLTPは維持されるが、比較的弱いHFSでは維持されないことを示している(表1)。以上より、短期増強の長期増強へ転換、あるいは、LTPの維持へのPKC、特に、γ-PKCの海馬でのLTPの維持機構への関与が強く示唆される。

表1　C57BL/6マウスとDBA/2マウスにおける海馬PKCと歯状回LTP

	PKC activity (a)		γ-PKC (b)	LTP (c)
	Particulate	Cytosol		
C57BL/6	363 ± 42.3*	1472 ± 241	295 ± 32**	226.4 ± 28.9*
DBA/2	225 ± 30	1595 ± 270	200 ± 20	118.4 ± 10.4

(a) Spec. act. pmol/min/mg protein.(ref.9) (b) γ-PKCのウエスタン法による解析。海馬でのγ-PKCの膜結合成分が脳全体量と比較して%として示されている。(ref.3) (c) % of baseline spike amplitude. HFS: 1 train of 400 Hz, eight 0.4 ms pulses/train. (means ± SEM, n = 5 - 13, * $p < 0.01$, ** $P < 0.05$)

［文献］

1) Bliss TVP and Gardner-Medwin AR J. Physiol. (Lond.) 350: 15p (1984). 2) Bliss TVP and Collingridge GL Nature 361: 31-39 (1993). 3) Bowers BJ et al. J. Neurochem. 64: 2737-2746 (1995). 4) Castro et al. Nature 342: 545-548 (1989). 5) Fordyce DE and Wehner JM Brain Res. 619: 111-119 (1993). 6) Linden DJ and Routtenberg A Brain Res. Rev. 14: 279-296 (1989). 7) Namgung U et al. Brain Res. 689: 85-92 (1995). 8) Payne K et al. Exp. Neurol. 75: 134-148 (1982). 9) Wehner JM et al. Brain Res. 523: 181-187 (1990).

S5 小脳シナプス可塑性と運動：ノックアウトマウスを用いた研究

1 CS1-5

狩野方伸

（理化学研究所・フロンティア研究システム・シグナル伝達機能）

〔 要約 〕

練習の繰り返しにより運動が上達するのには小脳のはたらきが必要である。小脳の神経回路に運動を上手にスムーズに行うためのプログラムを保持するしくみがあり、繰返し練習によりこのようなプログラムがしだいに形成されると考えられている。小脳皮質プルキンエ細胞への興奮性入力には平行線維と登上線維からの２種類がある。この両入力を組み合わせ刺激すると、平行線維の興奮性シナプスの伝わりやすさ（伝達効率）が長期間にわたって抑圧されることがわかり、長期抑圧(long-term depression 、LTD)と命名された。最近、特定の機能分子を欠損したノックアウトマウスが作り出され、細胞レベルの解析と行動学的解析とを組み合わせて、LTDと運動との関連を調べることが可能になった。私たちは代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)欠損マウスとγ型プロテインキナーゼ(PKCγ)欠損マウスを用いて、小脳が関与する運動学習のパラダイムの代表例であるまばたき反射の古典的条件づけと小脳LTDとの関連を調べた(文献1,3)。正常マウスに比べてmGluR1欠損マウスではまばたき反射の古典的条件づけが障害されており、十分学習した後でも条件反応の大きさが有意に低下していた。小脳スライスを作製し、プルキンエ細胞から whole cell recording をおこなって調べると、登上線維シナプスおよび平行線維シナプスの基本的性質はほぼ正常であったが、LTDは欠如していた(文献1)。これに対し、PKCγ欠損マウスではまばたき反射の古典的条件づけは障害されておらず、登上線維シナプスおよび平行線維シナプスの基本的性質および、LTDは正常であった(文献3)。これらの結果は小脳LTDがまばたき反射の古典的条件づけに代表される運動学習に必要であることを示唆する。

私たちはさらに、mGluR1欠損マウスおよびPKCγ欠損マウスでは成熟動物でも多数のプルキンエ細胞が2本以上の登上線維による多重支配を受けることを見いだした（正常マウスではほとんどの成熟動物のプルキンエ細胞は１本の登上線維による支配を受ける）(文献2)。マウスを回転するローラーの上に乗せ、上にとどまっている時間を計測すると(rotorod test)、mGluR1欠損マウス、PKCγ欠損マウスともに正常マウスに比べ成績が有意に低下していた(文献1,3)。これはノックアウトマウスで運動協調(motor coordination) が傷害されていることを意味する。

これ以外に、小脳機能に異常を示すノックアウトマウスとしてδ2型グルタミン酸受容体(GluRδ2)欠損マウス(文献4)およびglial fibrillary acidic protein (GFAP)欠損マウス(文献5)が報告されている。mGluR1欠損マウスおよびGFAP欠損マウスでは、LTDが欠如しており、まばたき反射の条件づけが障害されていた(Table 1)。また、GluRδ2欠損マウス、PKCγ欠損マウスおよびmGluR1欠損マウスでは多数のプルキンエ細胞が2本以上の登上線維による多重支配を受けており、運動協調の障害がみられた(Table 1)。これらの結果から、運動要素の学習(discrete motor learning)には小脳皮質の長期抑圧(LTD）が必要であり、おのおのの運動要素をうまく協調させて複雑な運動をスムーズに行う（運動協調；motor coordination）ためには、1対1の登上線維－プルキンエ細胞シナプス結合の正常な発達が必要であるということが示唆される(文献3、Table 1)。

Table 1. Summary of motor symptoms and cerebellar synaptic abnormalities.

Mutant mice	Motor coordination	Eyeblink conditioning	登上線維支配	LTD	文献
mGluR1	**Impaired**	**Impaired**	**Multiple**	**Impaired**	1
PKCγ	**Impaired**	Normal (facilitated)	**Multiple**	Normal	2,3
GluRδ2	**Impaired**	Not tested	**Multiple**	**Impaired**	4
GFAP	Normal	**Impaired**	Normal	**Impaired**	5

（文献3より改変）

参考文献

1. Aiba, A., Kano, M., Chen, C., Stanton, M. E., Fox, G., Herrup, K., Zwingman, T. A., and Tonegawa, S. (1994). Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. Cell 79, 377-388.

2. Kano, M., Hashimoto, K., Chen, C., Abeliovich, A., Aiba, A., Kurihara, H., Watanabe, M., Inoue, Y. and Tonegawa, S.(1995) Impaired synapse elimination during cerebellar development in PKCγ mutant mice. Cell, 83: 1223-1231.

3. Chen, C., Kano, M., Chen, L., Bao, S., Kim, J.J., Hashimoto, K., Thompson, R.F., and Tonegawa, S.(1995) Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKCγ mutant mice.Cell, 83: 1233-1242.

4. Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S., and Mishina, M. (1995). Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluRδ2 mutant mice. Cell 81, 245-252.

5. Shibuki, K., Gomi, H., Chen, L., Bao, S., Kim, J.J., Wakatsuki, T., Fujisaki, T., Fujimoto, K., Katoh, A., Ikeda, T., Chen, C., Thompson, R.F., and Itohara, S. (1996). Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. Neuron 16, 589-599.

S6 1CS1-6 前庭代償における可塑性関連分子の探索：プロテインフォスファテースを中心に

木山 博資、北原 糺
（大阪大学医学部・バイオ・神経解剖）

〔 要約 〕
片側内耳破壊後に見られる前庭不全を代償する前庭代償機構の分子的なメカニズムを明らかにするために、小脳片葉において前庭代償過程に発現する可塑性関連遺伝子をDifferential Display-PCR(DD-PCR)法によって検索した。片側内耳破壊2日後、破壊側、健常側、非破壊動物の3群の小脳片葉を取り出し、RNAを抽出した。1種のランダムプライマー(10mer)を用いPCRを行い、非破壊片葉に比べ破壊側や健常側片葉で著しい増加の見られたPCR産物を回収した。プライマーの種類を換えることによって、幾つもの候補遺伝子が得られた。ノザンブロット法やin situハイブリダイゼイション法により発現の上昇が確認されたものの塩基配列を決定すると、神経可塑性に関連することがスライス実験などで証明されているプロテインフォスファテースPP2Aβが得られた。PP2Aβのインヒビターであるオカダ酸を片葉に持続注入すると、前庭代償の指標となる眼振の回復は有意に遷延した。本結果は、分子レベル、行動レベルでPP2Aβが前庭の可塑性に関与していることを示したと考えられる。さらに本方法は前庭可塑性機構解明への有効なアプローチであると考えられる。

（緒言）
片側内耳損傷により生じる前庭系のアンバランスは中枢神経系の可塑性により代償される。この可塑性が生じる場が前庭神経核や片葉をはじめとする前庭小脳である。我々は前庭代償の分子レベルでのメカニズムを解明するために、前庭小脳や前庭神経核における前庭代償過程でのcFosの発現を指標に、NMDAの関与やNOの関与を検討してきた（Kitahara et al, 1995, 1996)。しかし、この前庭神経系の可塑性による代償の分子メカニズムを理解するには、さらに広範に関連分子を同定してゆく必要がある。そこで、内耳損傷による前庭代償過程に発現が亢進する分子群を検出するために、最近vivoでの応用において良好な結果をもたらしているDifferential Dispaly-PCR(DD-PCR)法を用いて、前庭小脳の片葉における前庭代償関連遺伝子の検出を試みた(Kiryu et al 1995, Morita et al, 1996)。

（方法）
ラット片側内耳をアルコールを用いて破壊し(labyrinthectomy)、2日後に破壊側の小脳片葉と健常側の小脳片葉を摘出した。また別に内耳破壊を行なっていない正常の動物より小脳片葉を取り出した。これら3群の片葉組織よりそれぞれRNAを抽出し、RT-PCRを行った。プライマーには、ランダムな塩基配列を有する10merを1種のみ用いた。PCR産物を電気泳動にてゲル上に展開し、3群間での産物量の差を比較した。正常片葉に比べ破壊側及び健常側で発現が上昇しているPCR産物をゲル上から回収し、ノザンブロット法、in situハイブリダイゼイション法を行い、発現の上昇を確認し、さらに塩基配列の決定を行った。この様な一連のスクリーニングを異なるプライマーを用いて繰り返すことにより、前庭代償過程に発現が亢進する遺伝子群の検索を行った。

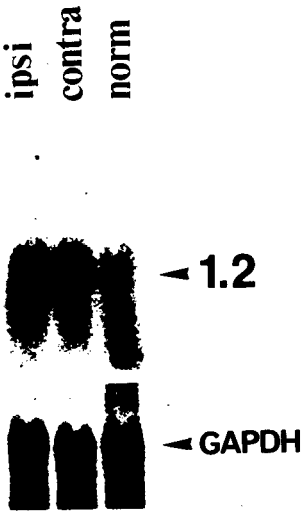
（結果・考察）
小脳片葉は他の小脳組織と離れているため、単離が極めて容易であり、比較群間で組織がかなり均一なため、生体組織を用いたDD-PCR法には極めて適した組織である。

DD-PCR法で得られたバンドはばらつきが少なくほとんどが同一の太さを有しており、候補遺伝子断片の検出が容易であった（Fig.1　矢印）。破壊側と健常側間で違いのあるバンドはほとんど得られなかったが、これは、この系は交叉性の投射が極めて多いためであると考えられる。非破壊動物の片葉に比べ損傷側と健常側で有意に発現が上昇しているPCR産物をプローブとし、ノザンブロットとin situハイブリダイゼイション法で確認した（Fig. 2）。さらに、塩基配列の決定を行ったところ、一つの候補はプロテインフォスファテースPP2Aβであることが明らかになった。また、in situ ハイブリダイゼイション法によりPP2Aβ mRNAはプルキンエ細胞に発現していることが明らかになった。フォスファテースPP2AがLTDなどの可塑性現象に関与していることは、既にスライスを用いた実験で示されており、今回の試みが期待通り可塑性関連分子をターゲットできたことが明らかになった。次に、今回得られたフォスファテースが実際に前庭代償にいかに関わっているかを、行動の面から検討するため、PP2Aのインヒビターであるオカダ酸を片側の小脳片葉に持続注入行った。その結果、投与量依存的に、前庭代償の指標となる眼振の回復が遷延された。このことから、フォスファテースPP2Aβは前庭代償可塑性において何らかの役割を担っていることが示された。

Fig.1　Differential Display



Fig. 2　PP2Aβ mRNA発現



（文献）

Kitahara T, Takeda N, Saika T, Kubo T, Kiyama H (1995) Effects of MK801 on Fos expression in the rat brainstem after unilateral labyrinthectomy. *Brain Res.* 700: 182-190.

Kitahara T, Takeda N, Kubo T, Kiyama H (1996) Role of the flocculus for the development of vestibular compensation: immunohistochemical studies with retrograde tracing and flocculectomy using Fos expression as a marker in the rat brainstem. *Neuroscience* in press

Kiryu S, Yao GL, Morita N, Kato H, Kiyama H (1995) Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. *J. Neurosci.* 15: 7872-7878.

Morita N, Kiryu S, Kiyama H (1996) p53 independent cyclin G expression in a group of matur neurons and its enhanced expression during nerve regeneration. *J. Neurosci.* 16: in press

S7 1CS1-7 in vivo microdialysisを用いた神経伝達物質放出測定と記憶の研究

加藤 武，丹羽 修*，山本勝信**
（横浜市大・総合理学，*NTT基礎研，**BASJ）

〔 要約 〕
in vivo microdialysis を用いてラット大脳皮質内ドーパミン，セロトニンそして神経ペプチドのＣＣＫの放出を測定した．NMDA投与によりCCK-LIが著しく増加し，ドーパミン，セロトニンも増加した．この作用はドーパミン受容体D1拮抗剤SCH23390によって抑制された．また海馬におけるアセチルコリン(ACh)放出をin vivo microdialysis法により高感度に測定した．Os-HRP-polymer電極を用いると，ACh分解酵素阻害剤を灌流することなくbasalレベルが測定できた．この条件を用いてNMDA受容体の作用薬，拮抗薬の影響を検討し，海馬内でのACh神経と記憶との関係について討論した．

記憶の機構を解明するため，LTP, LTDを伴った神経の可塑性が研究されている．記憶に関わる神経伝達物質としてグルタミン酸がある．記憶障害，痴呆症で見られるように，大脳皮質，海馬など大脳辺縁系のAChや，GABA, ドーパミン，セロトニンそして神経ペプチドなども記憶機構に深く関わっている．

本実験では前頭皮質のコレシストキニン(CCK)と海馬のAChがNMDAによって調節されるか否かことを検討した．脳内ACh放出の測定は従来ACh分解酵素阻害剤を用いて行われてきたが，今回はHellerら（１９９２）が開発したOs-HRP-polymer電極を用いてAChを高感度に測定し，ACh分解酵素阻害剤を用いることなく海馬内のACh放出を測定した．

方法：動物は250-350 gのラットを用い，麻酔下で前頭皮質あるいは腹側海馬にI型の透析プローブを挿入し，１日後にRiger溶液(pH 7.0)を灌流した．前頭皮質は5 ul/minの速度で灌流し，透析液をCCK，ドーパミン，セロトニンの測定に用いた．海馬の灌流は1.25 ul/minで灌流し，透析液の一部をACh測定に用いた．

CCKの測定：CCK C末端認識抗体をCRB(England)より購入し，透析液50 ul, buffer 50 ul, HRP-CCK solution 100 ul, diluted antiserum 100 ulを4 ·C ４８時間反応させ，第二抗体を加えて抗原抗体複合体を集めた．沈殿物にOPD, H_2O_2を加え，酵素反応生成物は比色法により定量した．検出感度は0.12 pg/tubeであった．

ドーパミン，セロトニンの測定：透析液20 ulをHPLC-ECDにより測定した．

AChの測定：Katoら(1996)の方法により測定した．分離カラムにはイオン交換樹脂(1x530 mm), 酵素反応カラムにはChO/AChEを固定化したカラム(1x50 mm)，流速80 ul/min, 検出用電極Os-HRP-polymerは0 mV/Ag/AgClで分離測定した．検出感度は4 fmol (3>SN)であった．

結果：

前頭皮質CCK放出：10 mM NMDAを灌流液を介して投与すると，CCK-LI 0.3 pg/50 ulが31 pgに増加し(Fig. 1)，ドーパミンも4倍ほど増加した．1 mM SCH23390, D1 antagonist, との灌流により，NMDA誘導性CCK-LI放出は抑制されたが，10^{-7} M scopolamine, muscarinic receptor antagonist, との灌流によっては影響されなかった．

腹側海馬ACh放出：ACh分解酵素阻害剤を用いない場合,透析液中のbasalレベルは10^{-9} M (10 fmol/10 ul)であった．10^{-4} M NMDAを灌流するとAChレベルは抑制される傾向があり(Fig. 2)，10^{-5} M MK801, NMDA antagonist, の灌流によりAChは増加傾向を示した．

考察：　神経ペプチドのCCKは記憶を改善する生理作用が知られている．今回，大脳皮質内CCKがNMDAによって調節されることを明らかにした．アルツハイマー型痴呆症で知られるように，大細胞基底核(Mynert)から大脳皮質へのACh神経が記憶と深く関わっており，CCK神経とACh神経との相互作用を検討することにより記憶の機構を更に明確にすることができる．

中隔ー海馬の神経回路網と記憶との関係にはACh神経が深く関わっている．内側中隔野に投与したNMDA, カイニン酸は腹側海馬のACh放出を増加させることがマイクロダイアリシス法によって確かめられている(Moor et al., 1994)．今回，海馬内にNMDA receptor agonist, antagonistを投与した所，海馬内のACh放出が変化した．このNMDA receptorの作用は海馬ー外側中隔野を介した間接回路によって変化したか，あるいは海馬内で直接作用したかは明らかでない．これまでNMDAと神経可塑性について多くの研究がなされたが，記憶に重要なACh放出とNMDA受容体との関係を明らかにすることも大変重要である．またACh神経とGABA神経などとの相互作用を検討し，AChと記憶との関係も明らかになるであろう．

文献　T. Kato, J.K. Liu, K. Yamamoto, P.G. Osborne, O. Niwa, J. Chromatogr. B, (in press).
E. Moor, P. deBoer, H.J. Beldhuis, B.H. Westerink, Brain Res. 648, 32(1994).
M. Vreeke, R. Maidan, A. Heller, Anal. Chem. 64, 3084(1992).

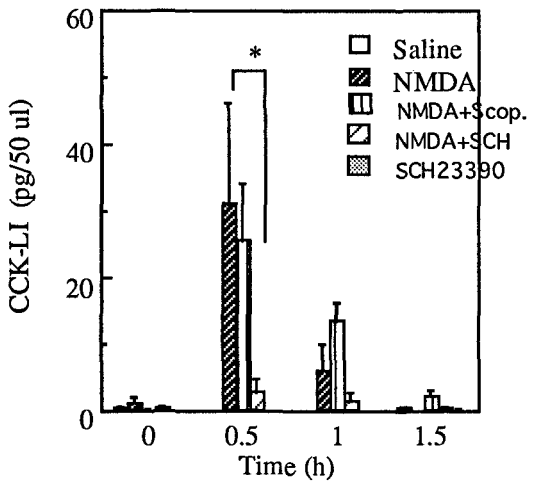


Fig. 1. Effect of NMDA on CCK-LI level in rat frontal cortex

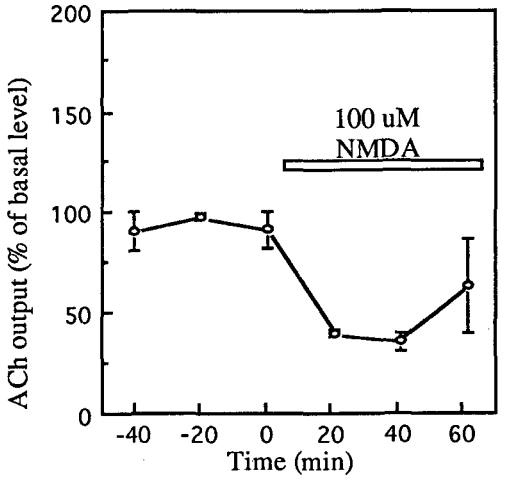


Fig. 2. Effect of NMDA on ACh level in rat ventral hippocampus

S8 精神機能と分子機構

2CS2-1

西川 徹、梶井 靖、海野麻未、橋本隆紀、戸田重誠、高橋勝宣
(国立精神・神経センター・神経研究所・疾病研究第三部)

〔 要約 〕

精神分裂病(分裂病)の発症と再燃の分子機構にアプローチするため、分裂病様の幻覚・妄想状態を引き起こすmethamphetamine(MAP)およびcocaineが引き起こす脳の遺伝子発現の生後発達を検討した。これらの中枢刺激薬投与を投与したラットの脳で誘導されるc-fos遺伝子の脳内分布は、生後発達に伴って変化し、生後3週頃に成熟期のパターンに近づいた。c-fos遺伝子発現の生後変化は、大脳新皮質と線状体において著しいのに対して、梨状葉皮質、線状体以外の皮質下の組織などでは目立たなかった。c-fosの発現は脳の神経活動の変化を反映することや、分裂病の再燃のモデルと考えられている中枢刺激薬による行動感作は生後3週以降に成立することなどから、これらの結果は、MAPあるいはcocaineの行動感作に関係する神経回路が大脳新皮質や線状体に存在し、生後3週頃に成熟する可能性を示唆している。そこで、大脳新皮質および線状体において、行動感作に特異的な因子を明らかにする目的で、 RNA arbitrarily primed PCR(RAP-PCR)法を用い、MAPに応答し発達依存的に発現が変化するc-fos以外の遺伝子群を検索中である。

Amphetamine、methamphetamine(MAP)、cocaineなどの中枢刺激薬を乱用すると、精神分裂病(分裂病)と酷似した幻覚・妄想状態が出現し、断薬しても長期にわたって分裂病様症状が再燃し易い状態が続く。実験動物においても、これらの薬物が異常行動を起こす作用は反復投与によって増強する。このような感受性亢進現象は、行動感作(behavioral sensitization)または逆耐性現象とよばれ、分裂病の再発のモデルと考えられている。また、ラットにおいては行動感作は一定の生後発達段階までは成立しないことから、分裂病が思春期以降に発症するようになる神経機構を検討するモデルとしても注目される。そこで、分裂病の発症と再発の分子機構の手がかりを得る目的で、MAPまたはcocaineによってラットの脳で誘導される遺伝子発現の発達に伴う変化を観察した。

実験方法

1．c-fos遺伝子発現の解析

中枢刺激薬投与ラットの脳におけるc-fos遺伝子の発現は、抗cFos抗体を用いた免疫組織化学法により遺伝子産物c-Fos様免疫反応を調べるとともに、in situハイブリダイゼイションあるいはノーザンブロット分析を使ってmRNAを検出することにより検討した。

2．RNA arbitrarily primed PCR(RAP-PCR)法

薬物投与60分後にラットより脳を取り出し、大脳新皮質および線条体を分割採取して、-80℃で凍結保存した。各組織からグアニジンチオシアン酸／フェノール法によってtotal RNAを調製し、ランダムヘキサマーでプライミングして1st strand cDNAを合成した。このcDNAをテンプレートとして、12merからなるarbitrary primerを用いてPCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルア

ミド電気泳動で分離し、サイバーグリーンI(Molecular Probe)で染色した後、フルオロイメージャーSI(Molecular Dynamics)で解析してフィンガープリントを得た。

3．クローニングおよびRT-PCR

変性ポリアクリルアミドゲルから抽出したcDNA断片を再増幅し、pCRIIベクター(Invitrogen)にAT法を用いてクローニングした。各クローンの塩基配列を決定後、それに基づいて各クローンに特異的プライマーを合成し、定量的条件下でRT-PCRを行った。

結果

1．MAPおよびcocaine投与後に誘導されるc-fos遺伝子発現の生後発達に伴う変化

成熟期(生後56日令)のラットにおいては、MAPまたはcocaineの急性投与後に、脳の広い範囲でc-fos mRNAおよびc-Fos様免疫反応が発現した。生理的食塩水を投与した対照群では、c-fosの誘導ははるかに弱く、c-fosを発現する細胞の分布も異なっていた。生後8日の新生仔ラットでも、MAPおよびcocaineによってc-fosの発現が認められたが、その脳内分布パターンは、次のように成熟期と著しい差異が認められた：i)大脳新皮質におけるc-fos発現は、成熟期になるとIIからVI層に認められるのに対して、幼若期ではVI層の深部に限局している、ii)線条体において、成熟期には内側優位にc-fos発現細胞が分布するが、幼若期では線条体全体にパッチ状に発現している、iii)ただし、梨状葉皮質や、嗅結節・中隔をはじめとする線状体以外の皮質下の組織においては、発現パターンの差は目立たない。中枢刺激薬誘導性c-fosの脳内分布は、発達に伴って次第に変化し、生後21から23日頃に成熟期と同様のパターンになった。ノーザンブロット分析では、大脳新皮質でMAPによって誘導されるc-fos mRNA量が、生後8日には低いが発達にともなって次第に増加し、生後3週ころまでに成熟期のレベルに近づくことがわかった。

2．発達依存的な発現変化を示すMAP応答性遺伝子群の検索

MAPを投与した生後8日令および50日令の動物の大脳新皮質と線状体から得られたサンプルで、RNAフィンガープリントを比較したところ、双方の部位とも幼若期と成熟期のあいだで著明な差異が認められた。現在、この結果にもとづき、発達に伴ってMAP投与後の発現が変化する遺伝子群の解析を進めており、いくつかのクローンについては、脳内分布および発現量の変化などを明らかにした。

考察

脳におけるc-fosは、神経活動の変化に依存的して誘導されると考えられている。したがって、c-fosが誘導される細胞の、大脳新皮質や線状体における分布の生後変化は、MAPやcocaineによる刺激後の脳内情報処理を行う神経回路の発達過程を反映している可能性がある。このようなc-fos発現細胞の分布が成熟期のパターンに移行する時期は、MAPおよびcocaineが引き起こす行動感作が成立し始める時期とほぼ同一であることから、行動感作に関係する情報処理機構が少なくとも大脳新皮質および線状体に存在し、生後3週頃に機能を獲得すると推測される。RAP-PCR法では、これらの脳部位においてMAPに対する応答性が発達段階に依存する遺伝子群が検出され、行動感作との関連が注目される。

S9 精神神経疾患と臨床・分子遺伝学

2CS2-2

米田博
（大阪医科大学神経精神医学教室）

〔要約〕

精神分裂病、感情障害（躁うつ病）、非定型精神病などの内因性精神病は、従来から行われてきた家系研究、双生児研究、養子研究などから、その発症に遺伝要因の関与が指摘されてきた。すなわち、発症の家族内集積性がみられ、一卵性双生児の一致率が高く、生物学的近親者と発端者群との高い発症の相関などが報告されている。そこで近年急速に進展している分子遺伝学的な手法によって、原因遺伝子を同定する試みが盛んに行われている。しかしながら、内因性精神病をはじめとする精神疾患は、生化学的な原因が明らかではないために、まず既知のDNAマーカーを用いた連鎖 (linkage) や相関 (association) の解析から、原因遺伝子の染色体上の位置をおおまかに決定し、次に原因遺伝子のクローニングを行う、いわゆる positional cloning が主な研究手法となっている。そこでここでは、我々の研究結果も含めてこれまでに行われてきた内因性精神病の分子遺伝学的な研究を中心に、アルコール症も含めてまとめてみたい。

感情障害

感情障害の連鎖研究は、従来より古典的な遺伝標識すなわち血液型、組織適合抗原（HLA）などを用いた研究が行われてきた。このうちX染色体上の color blindness およびXg血液型との連鎖研究は、感情障害が女性に多いこと、親子発症例で父親・息子の組み合わせが少ないことなどから、X染色体優性遺伝形式が提唱されていたこともあって精力的に行われ、これらのマーカーとの連鎖が報告されている。

DNAマーカーを用いた研究では、まずEgelandら(1987)が11p15領域付近にあるINS、HRAS1との連鎖を報告したが、その後多くの追試が行われたもののこのような連鎖は見られず、さらにKelsoeら(1989)が、Egelandと同じ症例の追跡調査を症例を増やして行い解析したところ、連鎖はみられなかったとしている。11番染色体以外のDNAマーカーを用いた連鎖研究としては、古典的な遺伝標識で注目を集めていたX染色体上のマーカーによるものがある。Mendlewiczら(1987)は血液凝固因子IX (Xq27)との連鎖を報告した。また、X染色体とY染色体の相同部である偽常染色体領域 (pseudoautosomal region) において、我々はDXYS20との有意な相関を明らかにした。さらに、同胞対法（sibpair method）でコルチコトロピンレセプター遺伝子やGTP結合蛋白のαサブユニット遺伝子を含む18番染色体のセントロメア領域に、いくつかの家系で有意な連鎖を認めるとの報告もある。その他、21番染色体の長腕21q22.3の領域で連鎖を認めたとする報告やチロシン水酸化酵素（TH）遺伝子との相関も報告されている。

我々は、抗うつ剤の作用部位であるセロトニン受容体のうち、セロトニン1A受容体遺伝子 (5q11.2-13) の塩基配列を調査した結果新たにLeu16/Pro16の変異を見出し、この変異が感情障害と有意な相関を示すことを明らかにした。このように、薬理学的な知見をもとにした神経伝達物質の受容体や関連酵素を候補遺伝子とした相関研究が盛んに行われており、serotonin transporter gene などいくつか有意な報告もある。しかしながらこれらを否定する報告も多く、感情障害の分子遺伝学的な研究では、未だ一定した見解が得られていないのが現状である。

精神分裂病

精神分裂病は、感情障害と同様に従来の臨床遺伝学的研究からその発症に遺伝要因が深く関与していると考えられる。ＤＮＡマーカーを用いた連鎖研究は、1988年Bassettらによる５番染色体長腕(5 q 11.2-13.3)の部分トリソミーと精神分裂病との共分離の症例報告を契機として行われるようになった。まずSherringtonら(1988)が５番染色体上の2つのＤＮＡマーカー（Ｄ５Ｓ39，Ｄ５Ｓ76）との連鎖解析から、精神分裂病の病的遺伝子がこれら２つのＤＮＡマーカーの間にあると結論づけた。しかしながら、Kennedyら(1988)、St.Clairら(1989)をはじめとして多くの追試が行われたもののこのような連鎖はほとんどの研究で否定された。

５番染色体以外のＤＮＡマーカーを用いた研究としてはAchauerら(1991)が２番染色体2ｐ13-15との連鎖を報告し、ドーパミン仮説からドーパミンD2、D4遺伝子のある11番染色体が調査され、Diehlら(1991)はPBGDとの相関を報告したものの、Moisesら、DiehlらはPBGD、DRD2との連鎖はなかったとしている。

Ｘ染色体については、Ｘ染色体とＹ染色体の相同部である偽常染色体領域が精神分裂病に関与するという仮説が提唱されており、Collingeら(1991)は同胞対法によってDXYS14との連鎖を報告している。しかし我々は同領域のマーカーDXYS17、DXYS20、DXYS28、MIC2との相関を調査し、有意な相関は見られなかった。

その他F13A1，D6S260 (6pter-p22)との連鎖、22番染色体のマーカーとの弱い連鎖が見られたとの報告もある。

一方、神経伝達物質受容体遺伝子マーカーとの相関研究も盛んに行われており、Arinamiら（1994）が、ドーパミンＤ2レセプター（DRD2）の変異を報告し、一部の精神分裂病で正常対照群と比較して有意にこの変異型を持つことが多いと報告しており、我々は、セロトニン２Ａレセプター遺伝子との間の有意な相関を報告している。

アルコール症

DNAマーカーを用いたアルコール症の研究としては、連鎖研究よりむしろ相関研究の報告が多く、Blumら(1990)は脳試料より得たDNAの分析から、アルコール症の77%にDRD2遺伝子のAl-alleleの存在が認められ、この値は正常対照群に比較して有意に高く、アルコール症の病的遺伝子がDRD2遺伝子(11q22-23)の近傍にあることを示唆した。その後、Comingsら(1991)が同様にDRD2遺伝子との相関を報告したがBolosら(1990)、Gelernterら(1991)はこれに否定的な報告をしている。しかしArinamiら(1993)は重症度と関係があると報告し、またNobleら(1994)もアルコール症患者を重症度で分類しDRD2遺伝子との相関を調査した結果、重症の患者では有意な相関を認めたと報告している。また我々はアルコール症を発症時期により2群に分類し、早期発症群とDRD2との有意な相関を報告した。その他樋口ら(1996)は、DRD2のser/cys変異との相関を明らかにしている。

以上の如く、精神神経疾患の分子遺伝学的研究から、各疾患について多くの候補領域が報告されているものの、否定する報告も多く一致した結果は得られていない。このような不一致を引き起こす要因としては、各疾患の診断の問題、多因子遺伝と考えられるこれらの疾患の研究手法、遺伝的異種性などが考えられる。今後これらの要因を考慮した研究を行う必要がある。

S10 分子精神医学の問題点
2CS2-3 -トリヌクレオチドリピート増幅疾患の観点から-

大原浩市
（浜松医科大学精神神経医学教室）

〔 要約 〕

精神医学領域の疾患で、成因のわかっているものはほとんどなく、診断に役立つ検査（血液、尿、画像など）もないのが現状である。患者との面談、行動の観察などから得た、いくつかの特徴的な症状を備えたものに対して、診断を「暫定的に」下している。したがって、たとえば、「腹痛」の原因がさまざまであるように、現在、われわれが分類している精神疾患は、単一の疾患というよりも、同じ様な症状を呈する、背景の異なる複数の疾患群と考えるほうが妥当である。このことが、近年、精神疾患に対する分子生物学的な研究が精力的に行われているわりに、進展が遅い理由の一つであろう。

従来、精神疾患は、大きく3つに分類されていた。すなわち、環境、ストレスなどに対する反応としての心因性疾患、明らかな外的要因なしに発病し、いまだ明確な病因は不明であるが、生物学的基盤が存在することが想定される内因性疾患、精神症状の背後に脳の器質病変や脳に侵襲を及ぼす身体的病因を確認できる外因性疾患である。

内因性疾患には、精神分裂病、気分障害（うつ病、躁うつ病）などが分類されている。家系、双生児、養子研究などから、内因性疾患は発病に遺伝素因の関係が深いことが想定されている。たとえば、精神分裂病の一般人口における罹病危険率は、約1％であるが、精神分裂病患者をとりまく血族の罹病危険率は、おおよそ、親が3%、同胞が10%、子供が13%、孫が5%である。一卵性双生児の一致率は50％であるが、二卵性双生児の一致率は10％である。精神分裂病の60～85％は遺伝が関与しているという説があるが、伝播機序についてはわかっていない。

1991年以来、メンデルの法則では説明のつかなかった遺伝性神経疾患の病因が、3つのDNAを一つの単位とした繰り返し（trinucleotide repeat）の増幅によるものであることがわかってきた。同一家系内の罹患者では、世代がさがるにつれてtrinucleotide repeat数が増加する。また、家系内で罹患していないものの trinucleotide repeat 数は正常範囲内である。臨床的な特徴は、anticipation（経代的に、発症年齢が若くなり、症状が重篤になる）、imprinting（親の性別により、子供の症状がかわる）が指摘されている。これらの疾患のうちいくつかは、精神症状を呈することが知られている。 CAG が増幅する1型と、非 CAG が増幅する2型に分類される。1型には、球脊髄性筋萎縮症、

Huntington 病、脊髄小脳変性症（SCA1、DRPLA、MJD）などが含まれる。これらの疾患の症状は主に神経症状に限局する。病因遺伝子の翻訳領域内にある、グルタミンをコードするCAGが増幅する。CAG繰り返し数は、健常者では6～39回であるのに対して、発病者では40～120回と増幅する。通常、重症者は父方由来の遺伝である。2型には、Fragile X 症候群A型（CGG）、同E型(GCC)、同F型(GCC)、筋緊張性ジストロフィー(CTG)、Friedreich 運動失調(GAA)などが含まれ、非翻訳領域にあるtrinucleotide repeatが増幅する。1型に比べて、多くの系が障害を受ける。trinucleotide repeat数は、健常者ではおおむね50回以下であるが、患者群では60～200回、多いものでは2000回を超える。母方由来の者の方が重症といわれている。

精神分裂病家系でanticipationが存在することは、Morel(1857)、Mott(1910,1911)らが指摘していたが、Penrose (1948)が、その現象は臨床的なバイアスによる、みせかけのanticipationであることを提唱して以来、ながらく、この話題は無視されていた。主なバイアスとは、若年発症だと生産性が劣るので遅発発症の親を選びやすい、親が発症している子供の症状はとらえられやすい、短期間の調査では、発症間隔の短い、子供（早発）/親（遅発）を選びやすい、などである。しかしながら、同様にanticipationの存在が議論されていた遺伝性神経疾患の病因が、各々該当する遺伝子内のtrinucleotide repeat数の異常な増幅に因るものであることがわかってから、ふたたび、精神分裂病家系のanticipation現象が脚光をあびてきている（Bassett (1994)）。その後、われわれのものも含めていくつかの報告がなされている。これらの報告の注目すべき点は、経代的に発症年齢は若年化するが、症状が重篤化することは確認されていない。また、父方、母方遺伝の差異も認められていないことである。

実際に、精神分裂病者でtrinucleotide repeatが増幅しているか調べる試みもなされてきている。O'Donovan et al. (1995)、Morris et al. (1995)らがRepeat Expansion Detectionの手技を用いて、精神分裂病者（遺伝負因は考慮していない）が健常者よりもCAG repeat数が増幅している可能性を指摘している。しかしながら、約7割のものがCAG repeat数が34回以内の範囲に含まれている。個別の遺伝子を検討したものでは増幅を認めていない(Lesch et al., 1994; Sasaki et al., 1996)。われわれも、精神分裂病家系で、脳内に発現しているものや、最近、連鎖研究で注目されている第6染色体上にあるCAG repeatを検討しているが、増幅は認めていない（投稿中）。

学会当日は、これらの点を考慮して、分子精神医学の問題点を通覧してゆきたい。

S11 MRS, fMRIと神経化学

2CS2-4

成瀬昭二[1,2]、古谷誠一[1]、田中忠蔵[3]
京都府立医科大学 放射線科[1], 脳神経外科[2]; 明治鍼灸大学 脳神経外科[3]

〔 要約 〕

磁気共鳴画像(MRI)は、断層画像診断法として卓越しているのみならず、生体の代謝、循環、機能などを非侵襲的に解析することも可能である。即ち、(1)内在性の代謝物質の非侵襲的な検出とその分布の画像化（磁気共鳴スペクトロスコピー (MR Spectroscopy :MRS)）、(2)脳の活動部位の画像化(Functional MRI: fMRI) (3)脳組織内の水分子の拡散の画像化（拡散強調画像法）、(4)脳の血管床や血流量の画像化（脳潅流画像）、(5)超高速測定によるreal timeの動画像、などが可能となりつつある。本会ではそのうちMRSとfMRIの現状と展望について述べる。

1．Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)と化学シフト画像法(CSI)

医学では、^{31}P, ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{23}Naなどが対象核種になるが、ヒト用装置では、^{31}Pと^{1}Hとが用いられている。MRSの最大の特徴は、組織中の内在性代謝物質を非侵襲的に測定できることである。身体の限局した一つの領域からスペクトルを得るsingle voxel法と、同時に多くの領域からスペクトルを得て（multi-voxel法）、内在性代謝物質の分布を画像化する方法（代謝画像）とがある。後者はchemical shift imaging(CSI)法と呼ばれている。

^{31}P-MRSでは、ATP; クレアチンリン酸 (PCr);リン酸ジエステル類(PDE); 無機リン(Pi);リン酸モノエステル類(PME); 糖リン酸（fructose-1,6-phosphateなど）、が測定される。ATP, PCr, Pi, 糖リン酸はエネルギー代謝に関連した物質、PDE, PMEはリン脂質代謝に関連した物質である。また、Piの化学シフト値から細胞内のpHが算出できる。脳の病態でこれら代謝物質の含有量と分布が変る。例えば、脳腫瘍では、正常脳と比べてPMEのピークが高く、PCrは殆ど認められず、NTP(ATPを含むヌクレオシド三リン酸)も相対的に高い。PMEはリン脂質の前駆体で，新生児～乳児の脳や、脱髄変性疾患、髄鞘形成不全症、アルツハイマー病でも変化している。

^{1}H-MRSでは N-acetylaspartate (NAA), Creatine (Cr), Choline (Cho), Inositol (Ino)などが検出される。また、乳酸(Lac)やGlutamine/Glutamate (Glu)も測定される場合がある。

NAAは神経細胞に特異的に含まれている物質で、種々の疾患（脳腫瘍、脳梗塞、精神発達遅滞、老人性痴呆症）で低下または消失している。そのため、NAAは神経細胞活動や可塑性の評価を行えると期待されている。Choは細胞膜代謝の前駆物質で、脳腫瘍では相対的な増加が認められている。また、乳酸は嫌気性代謝の産物で、脳梗塞・脳腫瘍などで増加が見られる。

図1に脳腫瘍（膠芽腫）の^{1}H-CSIを示す。多数のvoxelからスペクトルとCho, Cr, NAAの脳内の分布が画像化される。腫瘍部では、NAAの低下、Choの増高、乳酸が認められた。一般的に腫瘍ではChoの増高とNAAの低下が認められ、乳酸の産生と腫瘍の悪性度とに関連がある。さらに、脳腫瘍に特異的な物質が検出される場合があり、腫瘍特異性の解明の手段になると考えられた。

2．Functional MRI (fMRI)

従来の脳機能画像法（PET, 脳磁図、脳波など）では、放射線被爆の問題や装置の高額化・特殊性、空間分解能が悪い、断層画像が得られない、MRIの併用なしでは位置の決定ができない、など

の大きな問題があり、繰り返し行う脳機能の測定には限界があった。それに対し、fMRIは、これらの問題点を一挙に解決しうる大きな特徴を有しているため大きな期待がかかっている。

MRIで脳機能を画像化する方法は多くあるが、現在用いられているfMRIは、脳の賦活にて局所の脳血流増加に伴う、ヘモグロビン(Hb)の酸素化の違い（Oxy-HbとDeoxy-Hb）によるMRI信号強度の変化を捉えたもので、blood oxygenation level dependent (BOLD) contrast法と呼ばれている。測定には、高速スキャン法（Gradient echo(GRE)法）や超高速スキャン法（Echo Planar Imaging (EPI)法）が用いられている。時間分解能はGRE法で10～20秒、EPI法で0.1秒位、空間分解能はGRE法で1x1x5mm位、EPI法で2x2x5mm位である。装置性能の向上にて臨床装置でのEPI測定が増加してきている。

脳機能評価には、賦活前後の差分画像や統計処理による活性部位の画像化と活性部位の信号強度の時間的変化が用いられる。賦活方法には、光刺激、手足指の運動、等の比較的単純な賦活から、最近では、想像の反応、言語などのより高次の脳機能画像が得られるようになってきている。

図２に通常の臨床用1.5 T装置で得られた運動賦活の結果を示す。拇指と他の指との開閉を1秒に1回のリズムで10秒間行ない、同じ時間休息するという賦活と休息の作業をくり返して行った。10秒間の指の運動中、１秒毎に0.1秒間で測定を行った。運動と休止を10回繰り返し、cross correlation thresholding法にて有意の信号上昇部分を原画像に重ね合わせた。10秒間の前半の数秒間で信号強度が順次増加する（5-7%位）様子が観察できている。また、補足運動野の活性化は不規則的でより複雑な負荷で顕著に認められている。その部位の信号強度は増加していた。現在までに、運動、光、言語（聞き取り・発語）、想像、病態、などの応用で有用な自験所見を得ている。

fMRIの問題点として、メカニズムに関しては、依然としてBOLD以外にinflow効果などの他の要因もも関与しているという見解がある。この場合、高信号部位は実際に活性化されている脳組織よりも下流域にあると考えられる。また、後頭蓋窩や全頭蓋底付近の測定の困難さ、得た信号の処理法や解析法の問題、など多くの検討項目が残されている。しかし、fMRIは脳の非侵襲的機能検査法として大きな可能性を秘めており、今後脳科学の領域で広く用いられると考えられる。

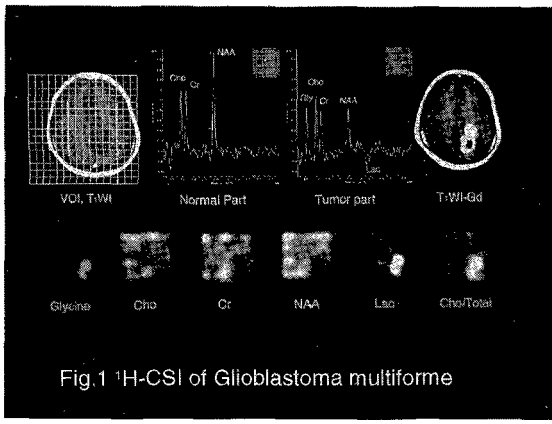


Fig.1 ^{1}H-CSI of Glioblastoma multiforme

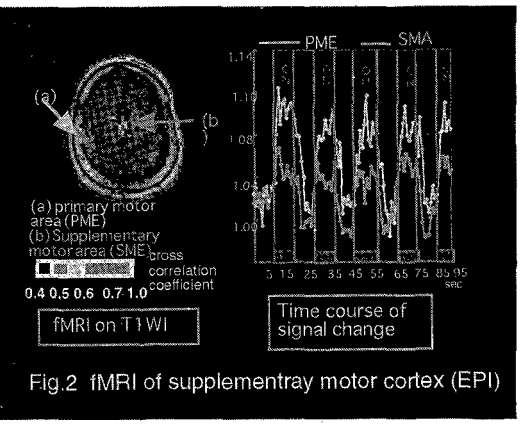


Fig.2 fMRI of supplementray motor cortex (EPI)

S12 精神神経疾患と画像診断

2CS2-5

岸本英爾
神奈川県立精神医療センター せりがや病院

〔 要約 〕

1985年UCLAのPhelpsはポジトロンCTを用いて、物を見ている時は後頭葉、聞いている時は側頭葉、考えている時は前頭葉、記憶している時は海馬、右指を動かしている時は左の運動野皮質・補足野が働いている事を示し、脳はそれぞれ部位を用い、(精神)機能を分担している事を実証したことは良く知られている．最近はこれらの脳機能の詳しい研究がさらに進み、LondonのZekiは同じ見る事でも、色彩を見ている場所は後頭葉内側部、動きを見ているのは後頭葉外側であると報告している．顔の表情を読み取っている脳部位は前頭葉皮質44野上部であり、麻原彰光とか、橋本首相の顔を即座に認知する脳部位は37野である等が分かってきている．情動との関連ではNIMHのGeorgeにより、人の悲しみの時には辺縁系、前部帯状回、視床下部の活動が増加している事が報告されている．また例えばバラ、チューリップ、サクラと聞いて花等とカテゴリー分類する時に働く脳部位は前部帯状回、前頭葉皮質47野であることも分かってきている．

人の心（精神）は人類史の上で、長い間それを科学的に立証することは充分にできなかった．そのために人の心（精神）について多くの誤った考えがもたらされ、例えば精神疾患についての偏見や誤解を生み出してきた．神経化学の発達により精神遅滞が、脳波学の発展により、てんかんが身体的疾病として認識されて行ったように、画像診断の進歩により、精神分裂病やそううつ病と言った精神疾患にも科学の光が当てられ、その身体的背景が分かり始めている．例えば幻の声・幻聴は人々に驚きをもたらすが、刑部の研究によれば幻聴の時には脳の言語野の中枢に異常が起こっており、言語野の中枢であるために、他の人には聞こえない幻声が本人には聞こえてくるのである．急性期精神分裂病で見られる幻覚・妄想状態では脳の内側の帯状回や視床と言った脳部位の脳血流量、脳酸素消費量が正常の２倍近くにも増加している事が分かってきた．外界からの情報を制御する中枢の部位が幻覚・妄想状態では異常に過敏となっているのである．精神分裂病には緊張病と言って、異常

な興奮やその反対の無動・無言となる混迷状態を示す事があるが、佐藤はこの混迷状態の時には脳の上部頭頂葉が機能していない事を報告している．一方慢性期精神分裂病者ではサルから人類に進化した時に急速に体積を増やした10野,38野,39,40野が充分に機能していない．精神分裂病はその患者が示す幻覚・妄想などのために、一般の人々に恐れを与える訳であるが、以上述べてきたように、精神分裂病者の脳機能には様々な変化が生じているのである．うつ病では前頭葉機能の低下が言われているが、最近の報告では篇桃核や辺縁系の活動が増加していることも分かって来ている．

最近^{31}Pや^{1}H-MRS(Magnetic Resonance Spectroscopy)の普及によって生きた人の脳から直接化学的情報を得る方法が臨床で行える様になってきた．1991年^{31}P-MRSでPittsburghのPettegrewは薬物未投与の精神分裂病者でphosphomonoesterが減少し、sphosphodiestersが増加している事を報告した．一方私共は^{1}H-MRSで、薬物未投与の精神分裂病者を調べNAA(N-acetyl aspartate)やCho(choline-containing compounds)が減少している事を見い出した．このNAAとChoの相互の関係を見ると、精神分裂病者では正常対照者との間に隔たりを示しているのみでなく、精神分裂病者ではNAAとChoは相互に相関（r=0.781)しつつ減少しており、高い有為差(p<0.003)を示していた．一方正常対照者ではこのような事は見られなかった．NAAは高等な動物の脳に出現し、その高等な脳機能の維持に必要な物質である事が推定されている．ヒト脳の発達で見ても、この物質が20歳前後まで増加し続ける事を見てもその事が裏付けられる．最近BurriはNAAは脳発達時脂質膜の生成に関与していると報告しており、Fulhamは神経の切断によって抹消側のNAAは減少すると報告している．一方Choが減少している事も興味深い事実である．^{1}H-MRSでみられるChoのピークの背景構成物質は、圧倒的に濃度の高いphosphatidylcholine, sphingomyelineであるとされ、cholineそのもの、またacetylcholineは濃度が相対的に低くその形成に関与しないとされている．これらのphosphatidylcholine,sphingomyelineも膜を構成する重要成分である事が知られている。こうした事からすると、精神分裂病では膜そのものに問題が生じている事も推定させる．この事より精神分裂病ではニューロンネットワークに障害が生じ、精神分裂病の連合障害を生じているのかも知れない．当日は神経科学の画像診断の進歩を示し、今後の方向を論じたい．

S13 シンポジウム「トリプレットリピートから細胞死」

3CS3-1 Overview

辻 省次
(新潟大学 脳研究所 神経内科)

〔要約〕

最近，CAGリピートなどの3塩基反復配列の伸長が，ヒトの神経系を侵す疾患で続々と見いだされており注目されている。これらの疾患においては，従来のメンデル遺伝学では説明しがたい現象，すなわち世代を経るに従い発症年齢が若年化する表現促進現象，発症している親の性によって伝えられる疾患の重症度が異なる，同一家系内においても臨床重症度が異なる，などの現象が観察され臨床遺伝学的な観点から興味が持たれている。また，このような3塩基反復配列の伸長がどのような機序によって神経細胞などの障害を引き起こすのか，という点でも注目を集めている。

1. トリプレットリピート病とは

現在までに見いだされた3塩基反復配列伸長による疾患については，3塩基反復配列の存在部位に基づいて整理するのが理解しやすい。すなわち，①5'側の非翻訳領域に存在する3塩基反復配列の伸長による疾患として脆弱X症候群，②3'側の非翻訳領域に存在する3塩基反復配列の伸長による疾患として筋緊張性ジストロフィー，③翻訳領域に存在する3塩基反復配列の伸長による疾患として，球脊髄性筋萎縮症，ハンチントン病，歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA), Machado-Joseph 病，④最近見いだされたものでイントロン内に存在する3塩基反復配列の伸長による疾患としてFriedreich失調症，などがある。

これらの疾患の病因遺伝子においては，正常者は40 repeat以内と一定の範囲に分布し，この範囲の中では繰り返し数に著しい多型性が見られることが多い。この3塩基反復配列数が増大することにより，それぞれの疾患に固有の臨床像を呈するようになる。これらの遺伝子の生理的機能については，球脊髄性筋萎縮症についてアンドロゲン受容体であることがわかっている以外は，他の遺伝子についてその生理的機能は未解明である。

脆弱X症候群，Friedreich失調症では，3塩基反復配列の伸長の結果，遺伝子発現が著しく低下する，すなわち，loss of functionがその原因であろうと考えられている。筋緊張性ジストロフィーについては，CTG repeatの増大がどのような機序で (loss of functionあるいはgain of function?) 発症するかまだよく解明されていない。これに対して，翻訳領域に存在する3塩基反復配列の増大に関しては，CAG repeatがポリグルタミンをコードしていると考えられ，現在のところ，異常に増大したポリグルタミンの存在が神経系の細胞に対して何らかのtoxicな作用を有しているのではないかと考えられている。

2. トリプレットリピートはなぜ不安定であるのか

トリプレットリピートは減数分裂，体細胞分裂において，不安定性を示す，すなわちそのリピート数の増減が生じることが知られている。CAG repeat 病の場合には，共通して，paternal transmissionにおいて，そのCAG repeat数が増大しやすいという傾向があり，精子の作られる過程 (spermatogenesis)で特にCAG repeatのの不安定性が強いということを示唆している。

体細胞分裂における不安定性についても，剖検組織の解析から体細胞モザイクが存在することが示されているが，このような中枢神経系における体細胞モザイクが神経変性過程とどのように関連するのかという点が最も興味ある点であり，今後さらに検討を要する。

3. トリプレットリピートの増大によりなぜ神経細胞の変性が生じるのか？

CAGリピートは，ポリグルタミンをコードしていると考えられているが，CAGリピートの増大が生じたときに，どのような機序で，中枢神経系の中でも特定の神経細胞の変性，細胞死が生じるのかという点が最も興味のある点である。最近の研究では，CAGリピート病の場合，その変異遺伝子の遺伝子発現はmRNA，タンパクレベルで見て，特に大きな変化はないことが分かってきている。従って，増大したポリグルタミンを有する変異タンパクが存在することがdominant-negativeに神経細胞を障害するという機構が考えられている。垣塚らは，増大したCAGリピートを発現させた場合にのみ強い細胞傷害性がみられることを報告しており，この考え方を支持するものである。また，*C. elegans*のprogrammed cell deathの際に重要な役割を果たしているcysteine protease death-gene product (CED-3) のヒトのcounterpartであるapopainがhuntingtinのプロセッシングに関与するとの説が出され，垣塚らの増大ポリグルタミンの細胞傷害説とあわせて，ポリグルタミンを含む部分のプロセッシング産物が神経細胞の傷害機構に密接に関与する可能性があり興味深い点である。一方，最近になり，huntingtin associated protein 1 (HAP1), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenaseなど，polyglutamineに結合するタンパクの存在がいくつか見いだされて注目されている。

以上のように，ポリグルタミンの細胞傷害機構についてはさまざまな説が提唱されている。トリプレットリピート病においては，変性する神経細胞の分布がそれぞれの神経疾患に固有のものであるという点が重要であり，今までに提出された仮説は，この部分にまで踏み込んだものはなく，このような点を含めて今後検討を行う必要に迫られている。

S14 3CS3-2 高比活性ＣＡＧ反復配列プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによるヒトゲノム中の増大したＣＡＧ反復配列の同定法

三瓶 一弘、五十嵐 修一、江口 郁代、辻 省次
（新潟大学脳研究所 神経内科）

〔 要約 〕
近年、CAG反復配列などの３塩基反復配列の増大が、遺伝性神経筋疾患に共通する遺伝子変異として注目されており、このような増大したCAG反復配列をゲノムＤＮＡを用いたサザンハイブリダイゼーション法により、直接同定できればきわめて有用であると思われる．現在まで我々は、$(CAG)_{55}$の3'末端に[α^{32}P]ATPをテイリングラベルしたものを用いて、ゲノムDNAのサザンブロットにハイブリダイゼーションさせることにより，筋緊張性ジストロフィー患者の(CAG/CTG)反復配列の増大部の直接同定法を開発した[1]が本法はハンチントン病や、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)などの100リピート以下の増大CAG反復配列を検出するには感度が不十分であった．そこで検出感度をさらに向上させるために$(CAG)_{55}$リピートを含むより比活性の高いプローブの作成を試み、ハイブリダイゼーションの条件を調整した．
そのプローブを用いて、サザンブハイブリダイゼーション法により、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)患者に認められるような健常者の２倍程度に増大したCAG反復配列の同定を可能とした。本法は、CAG反復配列の染色体上の位置や、近傍の塩基配列などの情報を必要とせず、増大したCAG反復配列を直接同定することができるため、CAG反復配列の増大によって引き起こされる他の遺伝性神経筋疾患の原因遺伝子の同定に有用であると思われる．

［実験方法］

1. (CAG)55リピートを含む一本鎖DNAプローブの作成
DRPLA患者の$(CAG)_{55}$リピートを含むプラスミド(p-2093)を鋳型として、一方の5'末端をビオチン化したプライマー (5'-CAC CAC CAG CAA CAG CAA CA-3', 5'-biotin-GGC CCA G AG T TT CCG T GA T G-3')を用いて[α-^{32}P]dATP存在下にPCRをおこなった．その後PCR産物をストレプトアビジン化された磁気ビーズにて一本鎖とし、標識されたCAGストランドのみを上清として回収した。

2. 35リピート以上のCAG反復配列のみがシグナルとして同定できるようなハイブリダイゼーションの至適条件の決定
ヒトアンドロゲンレセプター遺伝子中のCAGリピート（$(CAG)_n$ n=9, 23, 43, 51 9, 23は正常人、43,51はKAS患者）を含むプラ スミドを *Hinc*-II, *Dde*-Iで切断し、各々50pgずつ(CAGとしては10pg) 電気泳動しニトロセルロース膜にトランスファーし、さまざまな stringency の条件のもとにハイブリダイゼーションを施行した。

3. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)患者への応用
DRPLA遺伝子中のCAGリピートが既知の健常人($(CAG)_n$ n=15, 20, 35),および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)患者 ($(CAG)_n$ n=56, 66, 79)のゲノムDNA(15 μg)を *Pst*-Iで切断したのちにサザンブロットを作成し、ハイブリダイゼーションをおこなっ

た.

[結果]

ヒトアンドロゲンレセプター遺伝子中のCAGリピートを用いておこなったサザンハイブリダイゼーションでは、$(CAG)_{43}$と$(CAG)_{51}$が強いシグナルを示し、$(CAG)_{22}$ではごくわずかにシグナルが認められた。このことから、病的に増大したCAGリピートのみが同定できることが判明した.

歯状核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)患者のゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーションでも、$(CAG)_{56}$以上を含む*Pst*-I処理断片がよく認識され、35リピートではごくわずかに、また20リピート以下ではほとんど シグナルを認めなかった.

[考察]

これまで、3塩基反復配列の増大が原因遺伝子変異でありうる疾患としては常染色優性遺伝でかつ表現促進現象が認められる疾患があげられ、遺伝性脊髄小脳変性症の他にそううつ病[2]や精神分裂病[3]の一部にも表現促進現象が認められるという報告がなされている. さらに最近、常染色体劣性遺伝病であるフリードライヒ失調症がイントロン中のGAAリピートの増大によるということが判明し[4]、3塩基反復配列の増大という遺伝子変異のもつ意味がより重要さを帯びてきている. このような点からも、染色体上の位置や、近傍の塩基配列などの情報を必要とせずに増大したCAG反復配列を直接同定することができる本法は3塩基反復配列の増大によって引き起こされる他の遺伝性神経筋疾患の原因遺伝子の同定に非常に有用であると思われる。

REFERENCES

1. Sanpei, K. *et al.* BBRC, 212, 341-346 (1995).
2. McInnis, M.G. *et al. Am. J. Hum. Genet.*, 53, 385-390 (1993).
3. Basset, A.S. *et al. Am. J. Hum. Genet.*, 54,864-870 (1998).
4. Campuzano, V. *et al. Science,* 271, 1423-1427 (1996).

S15 伸張トリヌクレオチドはどのように形成されてきたか

3CS3-3

山田 正夫
（国立小児病院小児医療研究センター 遺伝）

〔要約〕

トリプレットリピートの伸張は近年の疾患責任遺伝子の研究で明らかにされた新しいタイプの変異であり、これまでに神経関連の9疾患で見出されている。我々のグループは、常染色体優性遺伝様式を示す神経変性疾患である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(Dentatorubral and Pallidoluysian Atrophy; DRPLA)について、患者家系における連鎖解析を進め、可能性の高い領域で候補遺伝子アプローチによってCAGリピートの伸張を見いだした。新潟大学辻教授のグループも同時に同様の報告をした。我々のグループは引き続き、DRPLAの責任遺伝子のcDNAとゲノム構造を明らかとし、染色体上の位置を決定し、進化におけるDRPLAリピートの伸張過程を明らかにしてきた。このシンポジウムではDRPLAのCAGリピートを中心とし、他のリピートとも比較しながら、トリプレットリピートが進化の過程でどのようにして形成され、それが疾患を生じるまでに伸張してきたかについて総説したい。

中間数の存在

DRPLAリピートの繰り返し数は、正常人日本人集団で7-23回であり、高度な多型を示す。一方49-75回に伸張すると発症する。日本人のDRPLA患者では表現促進現象が著しく、疾患遺伝子が父親から伝達されると平均8回の伸張し、発症年齢が20-30才低下する。疾患が父親から伝達されると3代目は10代あるいはそれ以下で発症し、もはや子孫を残すことはほとんど無い。しかし、DRPLA患者は日本に約200-500人存在し、消滅傾向にあるとは考えられない。正常日本人集団に約1%の割合で、26-35回程度のリピートを持つ染色体が存在し、それらは多くの場合、その回数のリピートを伝えるが、時に疾患を生じるほどの伸張リピートを伝えると考えられる。こうした中間数のリピートが疾患の予備プールとなっている。

創始者染色体

DRPLAリピート周辺にDNA多型を見出し、それらのマーカーによってハプロタイプを決定し、染色体を区別することができた。2つの対立遺伝子を示す2種類のマーカーによって3種類を区別できた。この内、A1-B1ハプロタイプは約17回のリピー

トを伴い、日本・韓国・中国人で約半数を占める。A1-B2 ハプロタイプは約 15 回のリピートを伴い、欧米人で 66%を占める。A2-B2 ハプロタイプは約 10 回のリピートを伴い、アフリカ人で 77%を占める。サルやネズミのゲノムは A2-B2 ハプロタイプに相当し、ほ乳類の進化の過程で A2-B2 から A1-B2 へ、さらには A1-B1 ハプロタイプが生成され、またリピートの繰り返しが段階を追って伸張してきたことが判った。日本人および少数ながら存在する欧米人の DRPLA 患者は全て A1-B1 ハプロタイプであり、創始者染色体が存在することが明らかとなった。恐らく古代アジア人に、A1-B1 ハプロタイプを持つ染色体に 17 回からさらに２０回程度、さらには中間数にまで伸張した染色体が形成されたのであろう。その子孫のうちのある人が日本に定着し、さらにその子孫に、ついには疾患レベルにまで伸張したリピートが形成された。

ハウリバー病

DRPLA におけるリピート伸張の報告の後、アフリカ起源で米国ノースキャロライナ地方に在住する家系で見られるハウリバー病も DRPLA リピートの伸張によることを、Duke 大学の Burke や Vance 博士らが明らかにした。また欧米でハンチントン舞踏病と臨床診断されながら伸張 HD リピートを持たない患者を検索して、少数ながら欧米人集団にも DRPLA 家系が存在することが報告された。いくつかの欧米人 DRPLA 患者やハウリバー病患者には、若年発症する日本人 DRPLA 患者の典型的な症状であるミオクローヌス癲癇がみられなく、また前者には大脳皮質下部白質で脱髄が顕著に見られるが後者には見られない、など病態が若干異なることが報告されている。これらの家系では、世代間で病気が伝達されたときに伸張リピートが一層伸張する程度が小さいなど、分子病理学的にも異なることが示された。日本人の DRPLA と、欧米人あるいはハウリバー病のリピートと比較することは、伸張リピートの不安定性を追求する鍵となる可能性がある。

ミクロサテライトの変異

疾患とは別に、ヒトゲノムには 2-5 塩基対からなる反復配列、ミクロサテライトは多数存在して、多くの場合、高度の多型性を示して、ゲノム解析のマーカーとして使用されている。また腫瘍でミクロサテライトの不安定性から、家族性非ポリープ型大腸癌の家系では DNA 修復酵素の欠損が同定された。こうした分野の研究成果も紹介し、リピートの安定性、不安定性を総合的に考えたい。

S16 3CS3-4 球脊髄性筋萎縮症のアンドロゲン受容体遺伝子異常と病態形成

祖父江 元、道勇 学、田中 章景
(名古屋大学医学部神経内科)

[要約]

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲン受容体(AR)の第一エクソン内のCAG繰り返し配列((CAG)n)が正常の約2倍に異常延長することが原因であることが明らかにされている。しかしこの(CAG)nの延長がどのようにして病態を発現するのかは依然として不明である。本研究ではこの異常ARが標的遺伝子の転写活性を変異させていることを明らかにした。また(CAG)nの異常延長したARは、ARの転写調節過程のうち最初のステップであるAR-AREの結合のaffinityを変化させていることを明らかにした。これらの結果は異常ARを介する転写調節の変異が病態に深く関与していることを示唆している。

[はじめに]

SBMAは性染色体劣性の遺伝形式をとり、成人期発症で舌、顔面、四肢の筋萎縮症、筋力低下が緩徐に進行するlower moter neuron diseaseである。本症の特徴は早期より舌の萎縮と顔面、舌を中心とした筋群の著明なcontraction fasciculation、そして女性化乳房や陰萎など軽度の男性性腺機能異常を伴っていることである。FischbeckらのグループによりAR遺伝子の第一エクソン内の(CAG)nの異常延長が明らかにされ,これが本症の病因と考えられているが、この変異が本症の病態をどのように形成するのかは明らかにされていない。本報告ではSBMAにおけるAR遺伝子異常と臨床徴候との関連、および本症の病態との関連について概説し、さらにこの異常ARを介する転写調節について検討を行った。

[SBMAにおけるAR遺伝子異常と臨床徴候]

SBMAにおけるAR遺伝子のmutationはこれまで報告されているパターンとは異なり、第一エクソン内コーディング部位にあるグルタミンのコドン、即ちCAGの繰り返し配列が正常の約2倍に異常延長しているというもので、ハンチントン病やジョセフ病などを含むCAGリピート病の先駆けとなった。我々が検索した本邦のSBMA113例、正常153例におけるAR遺伝子のCAG繰り返し数は、正常では14-32、SBMAでは40-55で両者の分布に重なりが見られず、従ってこのAR遺伝子のCAG expansionはSBMAに特異的である。またAR遺伝子のCAG expansionと本症の臨床徴候の相関を検討では、筋力低下の発症年齢や重症度との間に明らかな相関が見られており、このことは、AR遺伝子のCAG expansionがSBMAの病態を規定する重要な因子のひとつであるといえる。

［SBMAにおける異常ARの転写活性調節］

我々はこのAR遺伝子のCAG expansionが本症の病態発現機序にどのように関わっているかを解明するため、本症におけるARの機能である転写調節について検討を行っている。ARは、リガンドであるアンドロゲンと結合することにより核内へ移行し、標的遺伝子と結合してその転写活性因子として働く。我々は抗AR抗体によるWestern blottingを行い、SBMA患者の剖検組織および陰嚢皮膚由来培養線維芽細胞の両方においてAR蛋白の発現が見られ、しかもそのサイズは正常に比べて大きく、CAG expansionによる異常延長したポリグルタミン構造を有する異常ARが発現していることを確認した。このポリグルタミン構造の異常延長がARの転写活性能に与える影響を検討するため、ＳＢＭＡ患者および正常対照者の陰嚢皮膚由来培養線維芽細胞においてアンドロゲン投与下で誘導される種々の標的分子の遺伝子発現についてNorthern blot analysisを用いて検討した。その内、epidermal growth factor familyに属するtrophic moleculeであるamphiregulin、およびAR自身のmRNAレベルがSBMAにおいて明らかに変異している結果が得られた。このことは異常ARを介する転写活性が本症において明らかに変異していることを示している。このようなSBMAにおけるAR機能が変異する機序をさらに解明するため、ARを介する転写調節の第一段階であるDNAへの結合性をgel-shift assayを用いて検討した。その結果、本症由来のARとARの特異的認識DNA配列(ARE)の複合量が正常対照に比べ増加していた。このことは本症においてARのDNA結合性が高まっている可能性を示唆する結果と考えられる。しかもこのARのDNA結合性はCAG繰り返し数、即ちポリグルタミン構造の異常延長度と相関していたことは興味深い。ポリグルタミンは構造上、極性を持ったβ-sheet構造をとり他の分子との相互作用に関与することが推察されている。現在CAGリピート病では原因遺伝子産物とinteractする蛋白の検索が精力的に行われているが、本研究の結果はポリグルタミン構造の異常延長は蛋白のみではなく、DNAとの結合性にも変異を与えている可能性が考えられた。このDナとの結合性の変異が本症の病態と関連している可能性は十分考えられる。この異常アンドロゲン受容体における転写調節系の変異の解明はSBMAの病態解析のみでなく、本症の治療法の開発につながる重要なステップであると考えている。

S17 筋緊張性ジストロフィーとミオトニンキナーゼ

3CS3-5

石浦章一、笹川昇、斎藤直人、小池恒、渡辺知司*、
下川雅丈**、臼杵扶佐子***、丸山敬****、反町洋之、鈴木紘一
(東京大学分生研、*虎ノ門病院、**武蔵野赤十字病院、
国立水俣病研究センター、*国立生理研)

〔 要約 〕

筋緊張性ジストロフィー (Myotonic Dystrophy, DM) は、常染色体優性遺伝形式をとる筋疾患で、その原因遺伝子は第19染色体長腕に存在することが明らかになり、ミオトニンキナーゼ (myotonin protein kinase, MtPK) と呼ばれるプロテインキナーゼ様のタンパク質をコードしていることが報告された。この遺伝子の 3'- 非翻訳領域には、トリプレット CTG がくり返し挿入されており、正常では人によって5個から30個であるが、DM 患者ではリピート数が50以上、患者によっては数千にも伸長していることもわかっている。我々は、本症並びに他のトリプレットリピート病の発症原因を分子生物学的に明らかにするため、CTGリピート数を変化させた改変 cDNAを人工的に作り、その後、培養細胞に導入するという手法により、実験モデル系を確立することを試みた[1,2]。

[実験方法]

まず、ヒトMtPKの全長cDNAをクローニングした[1]。得られたMtPKのN末端にはサイモポエチン類似の構造が見られ、C末端には今まで報告のない新しいドメインが認められた。そこで、このC末端のペプチドに対する抗血清を作製し、免疫組織科学的に筋肉内の局在を検討した。次に、人工的にCTGリピート数を0、5、46に変化させたクローン[2]、並びにプロテインキナーゼドメインのみを含む小さなクローンを数個作製し、これらのcDNAクローンをCOS細胞にトランジェントに発現させた。MtPKの生理作用の検討には、MtPKを過剰発現している細胞で何が起こるかを検討することが必要である。この目的で我々は、株化された筋細胞C2C12にMtPKの全長cDNA (CTGリピート数が5と46のもの) を導入し、stable にMtPKを発現している細胞株を得ることに成功した[3]。

[結果と考察]

MtPKの局在を光学顕微鏡及び細胞分画法で検討したところ、MtPKは筋小胞体に局在することが明らかとなった。また、骨格筋の小胞体画分から同蛋白質の分離にも成功した。しかし、リン酸化酵素活性は顕著には見られなかった。ウエスタンブロッティングでは、理論分子量7万のところにMtPKタンパク質の発現が確認された[4]。次に、リピート数を変えたcDNAを用いて、転写・翻訳の効率を検討したところ、in vitroの転写効率には有意な変化は認められなかったが、翻訳されるMtPK蛋白質の量は、リピート数が46個のものでは0のものに比べて60%に減少していた。この事実は、リピートの増大

が翻訳を抑制していることを示唆していた。この翻訳抑制効果はCOS細胞に特異的であり、ラットL6培養細胞では認められなかった。また、MtPKのC末端を欠失させた2つの変異体（DMN437、DMN259）を同様にCOS細胞に発現させたところ、ヒストンをリン酸化するキナーゼ活性は低下して0になった。この結果より、MtPKのC末端領域（260-726）は活性に必須であることが明らかになった。また、MtPKの活性中心は一般のリン酸化酵素の活性中心とは異なることがわかっており、これを一般型に変化させたクローンも作製したが、リン酸化活性には変化が認められなかった。

次に、細胞に導入したMtPKについて、興味ある生理的変化が認められた。特に、C2C12細胞にCTG46を導入したものでは、ベクターのみのものやCTG5を導入したものに比べて、血清除去後の筋分化（ミオシン、nNOS）が遅れることを確認した。これは、DM患者での筋細胞の分化の遅れに対応しているものと考えられた[3-6]。

次に、MtPK（CTG46）を導入したC2C12細胞においてイオン環境に変化が認められるかどうかを検討した。whole cellパッチクランプの手法を用いて、細胞内KCl、細胞外NaClの条件の下で調べたところ、MtPK導入細胞では膜電位の脱分極側で開くチャンネルが活性化されるという結果が得られた。このチャンネルは、その電流特性からClチャンネルであると予想された。また、細胞内Cl濃度にも有意な変化が認められた。これらの事実は、MtPKの発現がイオン環境に影響を与えることを示唆するものであった。

［参考文献］

1．Sasagawa, N. et al.: Expression of a novel human myotonin kinase (MtPK) cDNA clone which encodes a protein with a thymopoietin-like domain in COS cells. *FEBS Lett.* 351: 22-26, 1994.

2．Sasagawa, N. et al.: Effect of artificial CTG repeat expansion on the expression of myotonin protein kinase in COS-1 cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1315, 112-116, 1996.

3．Usuki, F. et al.: Differentiation suppression in C2C12 myogenic cell line transfected by human MtPK with expanded trinucleotide repeat. *(submitted)*

4．Koga, R. et al.: Decreased myotonin-protein kinase in the skeletal and cardiac muscles in myotonic dystrophy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 202, 577-585, 1994.

5．Usuki, F.et al.: Up-regulation of dystrophin mRNA by dibutyryl cAMP in C2C12 muscle cells. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 210, 654-659, 1995.

6．Sorimachi, H.et al.: Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A associates with connectin through a p94-specific sequence IS2. *J.Biol.Chem.* 270, 31158-31162, 1995.

S18 CAGリピート病はポリグルタミン病か

3CS3-6

貫名信行
（東京大学神経内科）

〔 要約 〕

SBMA, Huntington病、DRPLA、SCA1、MJDなどはトリプレットリピート病と呼ばれる近年注目されている疾患群のなかでもCAGの伸長を認める遺伝性神経疾患である。CAGリピート病が他のトリプレットリピート病（筋緊張性ジストロフィー、Fragile X、Friedreich失調症）と異なるのはCAGのリピートがコーディング領域に存在することである。我々はCAGリピート病がCAGが翻訳されたグルタミン鎖の伸長した遺伝子産物が存在し、これが疾患発症につながっているのかどうかを検討するために、まずHuntington病、DRPLAについて遺伝子産物の同定を試みた。

遺伝子のシークエンスから想定されるアミノ酸配列の一部に対する合成ペプチドを作成し、これに対する抗体を作成し、遺伝子産物の同定を行った。Huntington病においては350kDaの、DRPLAにおいては190kDaの遺伝子産物を同定し、それぞれの疾患患者のリンパ芽球、脳において異常遺伝子産物の発現を認めた。このことからこれらの疾患が伸長したポリグルタミン鎖を介した発症機序を持つ可能性が確認された。しかし異常遺伝子産物の発現は量においては正常遺伝子産物と大差なく、また分布においても病変部位の特異性と関連した発現は認められなかった。

そこでこれらの遺伝子産物が正常な機能として何を行っているのか、あるいは異常な機能を生じているのかを検討するためにこれらの遺伝子産物に結合するタンパクの同定を試みた。Huntington病遺伝子産物についてはその分布から細胞骨格との関連を予想し、微小管分画に遺伝子産物が存在することを確認した。このことからHuntington遺伝子産物が軸索輸送などに関与している可能性が示唆される。

DRPLA遺伝子産物についてはtwo-hybrid systemを用いて相互作用するタンパクのクローニングを試みている。現在のところC端をbaitとした場合に結合するタンパクのクローニングに成功しているが既知の遺伝子とのホモロジーが無く、その機能は不明である。

これらの遺伝子が伸長したポリグルタミン鎖のために発症につながるとすればポリグルタミン鎖の伸長に関連した結合の差を認めることが必要と考えられるが現段階ではこのようなタンパクの同定には至っておらず、今後の検討が必要である。

S19 Machado-Joseph病発症機構の分子モデル

3CS3-7

垣塚　彰
（京都大学医学研究科高次脳科学　神経・細胞薬理）

〔 要約 〕

近年、脊髄球性筋萎縮症（Spinobulbar Muscular Atrophy :SMBA)、ハンチントン舞踏病（Huntington Disease : HD)、脊髄小脳変性症二型 (Spinocerebellar Ataxia type 2 : SCA2)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(Dentatoruburopallidoluysian atrophy : DRPLA)、マシャドー・ジョゼフ病 (Machado-Joseph Disease : MJD)の原因遺伝子が次々と同定された。これらのの原因遺伝子は、全く異なる遺伝子であったが、患者の遺伝子では、全てCAG の繰り返し数が正常人に比べ異常に多いことが明らかとなった。また、CAG リピートの数と発症年齢、臨床的重症度との間に相関関係が認められた。一方、これらの遺伝性神経変性疾患は、疾患ごとに特有の神経症状を示すが、多くの共通する性質を有している。例えば、ほとんどの疾患が優性遺伝すること、発症が中年以降に起こること、病理像として神経細胞の変性脱落を示すこと、世代を経るごとに発症年齢が早くなり症状の増悪化（アンティシペイション）が見られることがあげられる。このことは、一見すると全く異なる疾患単位である個々の遺伝性神経変性疾患に共通の発症機構が存在する可能性を示していおり、その遺伝子レベルでの実体がCAG リピートの延長であると考えられた。

我々は、CTG リピートをもつ合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、CAG リピートを含むcDNA クローンのスクリーニングを行い、ヒト脳cDNA ライブラリーから未報告のCAG リピートを含むクローンを分離し、染色体マッピングと患者DNAに対するPCRから、そのうちのMJD1と名付けた遺伝子がマシャドー・ジョゼフ病(MJD)の原因遺伝子であることを明らかにした。続いて、延長したCAGリピートから翻訳されるポリグルタミンリピートを細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ること、マウスの小脳プルキンエ細胞にターゲット発現させると生後４週より顕著な小脳失調を呈すことを明らかにした。このマウスの小脳は非常に萎縮しており正常の８分の１ほどの大きさであり、ターゲットとしたプルキンエ細胞はほとんどみうけられず、分子層、顆粒細胞層にも２次性と考えられる顕著な萎縮を認めた。この状態は小脳萎縮の末期像に極めて似通った状態である。以上の結果は、延長したポリグルタミンリピートそのものが神経細胞死と変性を引き起こすことを示しており、CAG伸長を伴う遺伝性神経変性症の共通の起因物質であることを示唆している。

ポリグルタミンは、その構造を予測するとベータシート構造をとると考えられる。このようなベータシート構造をとる別の蛋白質、βA4とPrP^{sc}は、それぞれアルツハイマー病と狂牛病（クロイツフェルト・ヤコブ病: CJD）の原因と考えられており、MJDと同様神経細胞死をその病理像としている。以上のことは、全く関連のない疾患と考えられているアルツハイマー病や狂牛病(CJD)までもがMJDと共通な発症の分子機構を有している可能性を示しており、MJDの分子機構の解析から得られる知見は、痴呆はもとより神経細胞死を引き起こす多くのの病気の本体解明と予防・治療に対し計り知れない貢献をすることが期待できる。

S20 Neuronal Nitric Oxide: Biosynthesis and Actions at the Synapse

2ASA-1 David S. Bredt
(Dept. Physiol., Sch. Med., Univ. California, San Francisco, Calfiornia)

〔 要約 〕

Endogenous nitric oxide (NO) mediates diverse functions in synaptic transmission and plasticity. In addition to its actions as a physiological messenger molecule, NO also participates in some forms of excitotoxic injury, including stroke and certain neurodegenerative processes (Bredt,1996; Dawson et al., 1992; Garthwaite and Boulton, 1995) . NO synthase (NOS) is a calmodulin-dependent enzyme that is regulated by the steep gradients of Ca2+ encountered in the vicinity of open Ca2+ channels. In brain, NOS is functionally coupled to Ca2+ influx through N-methyl-D-aspartate (NMDA) type glutamate receptors, while other Ca2+ pools are poorly linked to NOS. Inhibition of NOS mitigates the NMDA receptor-mediated excitotoxic brain injury associated with cerebral ischemia. A fundamental understanding of NO actions in brain requires characterization of the functional connection of NOS with NMDA receptors.

To identify the link between NMDA receptor activity and NO biosynthesis, our laboratory has initiated a program of cell biological studies of NOS disposition in brain. This work demonstrates that neuronal NOS (nNOS) is concentrated at synaptic junctions in brain. We find that the N-terminus of nNOS interacts with an abundant postsynaptic density-95 protein (PSD-95). nNOS and PSD-95 are coexpressed in numerous neuronal populations, and a PSD-95 / nNOS complex can be specifically immunoprecipitated from cerebellar synaptosomes (Brenman et al., 1995; Brenman et al., 1996) . Others have independently determined that PSD-95 clusters NMDA receptors at central synapses (Kim et al., 1995; Kornau etal., 1995) . Specific protein complexes containing NOS, PSD-95 and NMDA receptors have been identified in brain.

Efficient coupling of NMDA receptors to nNOS is therefore mediated by this macromolecular complex. A schematic depicting these interactions is shown below.

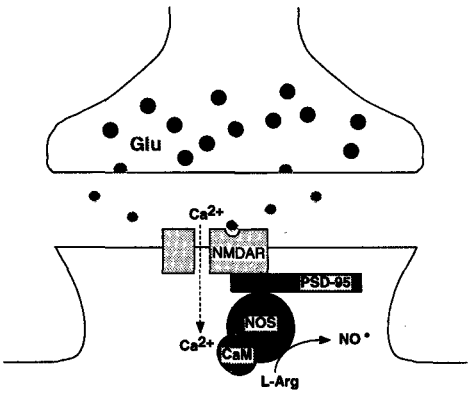


Figure 1. Coupling of NMDA receptor activity to NO biosynthesis in synaptic spines.

Association of NMDA receptors and NOS with PSD-95 protein affords efficient signal transduction at the the synapse. Abbreviations: CaM, calmodulin; Glu, glutamate; L-Arg, L-arginine.

In related work, we find that NO is synthesized in skeletal muscle by an alternatively spliced nNOSμ (Silvagno et al., 1996) , which is localized to sarcolemma of fast twitch fibers (Kobzik et al., 1994) . Synthesis of NO in active muscle opposes contractile force. We show that nNOS partitions with skeletal muscle membranes due to association of nNOS with dystrophin (Brenman et al., 1995) , the protein mutated in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Syntrophin a component of the dystrophin complex interacts with an N-terminal domain of nNOS. mdx mice, and humans with DMD, evince a selective loss of nNOS protein and catalytic activity from muscle membranes demonstrating a novel role for dystrophin in localizing a signaling enzyme to the myocyte sarcolemma. Aberrant regulation of nNOS may contribute to preferential degeneration of fast twitch muscle fibers in DMD. In many patients with Becker's muscular dystrophy, nNOS is the only protein of the dystrophin complex that is deregulated (Chao et al., 1996).

References

1) Bredt, D. S. (1996). Targeting nitric oxide to its targets. Proc Soc Exp Biol Med 211, 41-8.; 2) Brenman, J. E., Chao, D., S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D., S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent fromskeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell 82, 743-752.; 3) Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., and Bredt, D. S. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the synaptic density protein PSD-95 and a-1 syntrophin mediated by PDZ motifs. Cell 84, 757-767.; 4) Chao, D. S., Gorospe, R. M., Brenman, J. E., Rafael, J. A., Peters, M. F., Froehner, S. C., Hoffman, E. P., Chamberlain, J. S., and Bredt, D. S. (1996). Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker Muscular Dystrophy. Journal of Experimental Medicine (in press).; 5) Dawson, T. M., Dawson, V. L., and Snyder, S. H. (1992). A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide [see comments]. Ann Neurol 32, 297-311.; 6) Garthwaite, J., and Boulton, C. L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. Annu Rev Physiol 57, 683-706. ; 7) Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., N., J. Y., and Sheng, M. (1995). Clustering of Shaker-type K+ channels by direct interaction with the PSD-95/SAP90 family of membrane-associated guanylate kinases. Nautre 378, 85-88.; 8) Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S., and Stamler, J. S. (1994). Nitric Oxide in Skeletal Muscle. Nature 372, 546-548.; 9) Kornau, H.-C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., and Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. Science 269, 1737-1740.; 10) Silvagno, F., Xia, H., and Bredt, D. S. (1996). Neuronal nitric oxide synthase-m, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. Jounal of Biological Chemistry 271, 11204-11208.

S21 Oligomerization of Nitric Oxide Synthase (NOS)-

2 ASA-2 Interisoformal Structure-activity Analyses of NOS

Yasuo Watanabe, and Hiroyoshi Hidaka

(Department of Pharmacology, Nagoya University School of Medicine)

〔要約〕 Biochemical characterization of nitric oxide synthase (NOS) has demonstrated a unique complexity with the native protein being a homodimer (1-3). To cast light on its structure-enzyme activity relationship, inactive nNOS, showing dimerization but not calmodulin (CaM) binding ability, and active nNOS were expressed separately (homomeric enzymes) or co-expressed (heteromeric enzymes) using the baculovirus/Sf9 cell expression system. Ca2+/CaM dependent activation of heteromeric nNOS was diminished. This was not the case when active nNOS and inactive nNOS were combined in vitro., indicating that nNOS oligomerization occurs intracellularly to form an active enzyme. Furthermore, inactive nNOS also showed similar effects on enzyme activity when it was co-expressed with inducible nitric oxide synthase (iNOS). Co-immunoprecipitation studies of co-expressing Sf9 cells demonstrated that nNOS-iNOS oligomerization also occurs intracellularly, thus indicating that inter-isoformal regulation of the two isoforms might be involved in control of neurone function.

EXPERIMENTAL PROCEDURES -cDNA Construction and Mutagenesis- The inactive nNOS mutant cDNAs were ligated into pVLnNOS and transfected into insect Sf9 cells. Cell Culture and Selection of Recombinant Baculovirus- Expression in Sf9 cells and purification of expressed wild-type or mutant nNOS on 2'-5'-ADP-Sepharose were performed. NOS Enzymatic Assays- NOS activity was assayed in purified enzyme or cell lysates by measuring the conversion of L-[3H] arginine to L-[3H] citrulline . CaM Overlay-Wild-type and mutant nNOS were resolved on 7. 5 % SDS-PAGE and then electrophoretically transferred onto PVDF membranes. Biotinylated-CaM was used for detection of NOS-CaM interaction.

RESULTS AND DISCUSSION -The purified inactive nNOS exhibited the same apparent molecular mass (160 kDa) on SDS-PAGE and showed the same immunoreactivity with anti-nNOS antibody as the wild-type enzyme (Fig. 1). The CaM-binding of the mutant was significantly decreased as determined by the CaM gel overlay technique (Fig.1). The inactive nNOS showed a severe loss in NOS activity (Fig. 2). The inactive nNOS demonstrated a similar dimerization ability as the wild-type enzyme (data not shown). Expression of wild-type nNOS resulted in substantial NOS activity, but when the wild-type nNOS was co-expressed with inactive nNOS, NOS enzyme activity was diminished, documenting a dominant negative effect of this mutant due to dimerization with wild-type nNOS (Fig. 3A). When the NOS enzyme activity was determined after combining the lysates of wild-type and inactive nNOS expressing Sf9 cells, no attenuation was seen. These data indicate that the loss of NOS enzyme activity observed with co-expression was due to intracellular oligomerization of wild-type and inactive nNOS.

To determine the possibility of inter-isoformal NOS regulation, wild-type iNOS was co-expressed with inactive nNOS in Sf9 cells followed by measurement NOS enzyme activity using cell lysates (fig. 3 B). Interestingly, similar effects of the inactive nNOS on wild-type iNOS were observed as shown in Fig. 3 B. Co-immunoprecipitation studies of co-expressing Sf9 cells demonstrated that nNOS-iNOS oligomerization also occurs intracellularly (data not shown). Recently, it had been demonstrated that nNOS and iNOS can be detected in glioma and meduloblastoma cells . Our finding that nNOS-iNOS oligomerization occurs intracellularly is consistent with the co-localization of nNOS and iNOS and offers important clues to understanding of the role of these isoforms as molecular transducers in neuronal function. In this context, vectors containing inactive nNOS cDNA might be useful as inhibitors for introduction into cell for elimination of nNOS or iNOS enzyme activity.

REFERENCES: 1) Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H. P., and Mayer, B. (1995). EMBO J., 14, 3687-3695; 2) Cho, H. J., Martin, E., Xie, Q. W., Sassa, S., and Nathan, C. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 11514-11518; 3) Lee, C. M., Robinson, L. J., and Michel, T. (1995). J. Biol. Chem., 270, 27403-27406

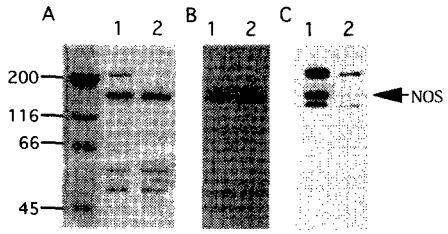


Fig. 1 Coomassie (A), Western blot (B), and CaM overlay (C) analyses of purified nNOS mutants. 1,Wild-type; 2, Inactive nNOS

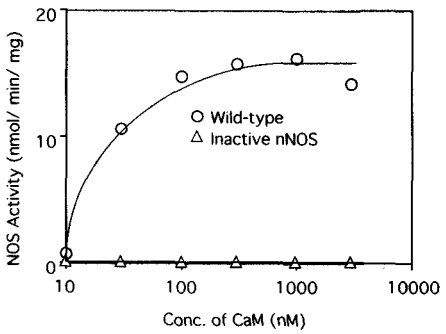


Fig. 2 Ca2+/CaM activation of wild-type and mutant nNOS. NOS assays were performed in the presence of 1 mM CaCl2 and the indicated concentrations of CaM. Equivalent amounts (100 nM) of wild-type enzyme (o), and triple (Δ) mutants were used. Data are means of duplicate determinations from two experiments.

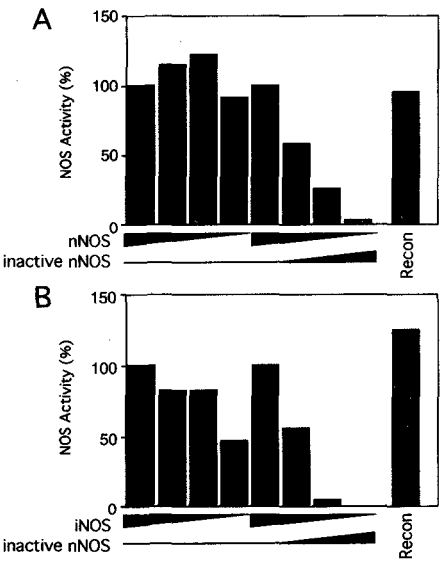


Fig. 3 Intracellular heteromeric oligomerization of NOSs. Ca2+/CaM stimulated NOS activity was assayed using lysates of Sf9 cells. The effects of co-expression of wild-type nNOS (A), wild-type iNOS (B) with triple mutant nNOS were analyzed.

S22 2ASA-3 Regulation of iNOS Gene in Neural Cells and Its Role in Cell Death

Hiroyasu. Esumi, Tsutomu. Ogura, Yukiko. Kurashima
(Invest. Treat. Div., Natl. Cancer Center Res. Inst., East, Kashiwa-shi, Chiba)

〔要約〕

In human neuroblastoma cells, NB-39-nu, iNOS was found to be induced by a combination of IFN-γ and TNF-α. TNF-R1 is expressed consititutively in this cell line, TNF-α alone treatment was not effective to induce iNOS although it was effective for NFκB activation. In this cell line, IFN-γ alone also induce small amount of iNOS mRNA. TNF-R2 and TNF-α expressions were remarkably stimulated by IFN-γ treatment. When TNF-R2 was overexpressed by transfection of functional TNF-R2 gene into NB-39-nu, treatment with TNF-α alone was enough to induce iNOS expression in this cell line and IFN-γ was not necessary in TNFR2 overexpressing NB-39-nu. In addition, the results also, suggest that TNF-α and TNF-R2 are key but NFκB activation is not enough for induction of iNOS. Antimicrotubule agents, vincristine, vinblastine, vinorelbine and paclitaxel were found to induce iNOS when they were combined with IFN-γ. All these anti-cancer drugs are known to cause neuralgia. Because excess production of NO in neuron are supposed to cause neural cell death, iNOS induction in neural cells might be related to neuralgia. Although iNOS induction by IFN-γ and TNF-α was completely blocked by 10nM dexamethasone, iNOS induction by IFN-γ and vincristine was not inhibited at all up to even much higher concentration of dexamethasone. These data suggest a new pathway of iNOS induction possibly associated with microtubule. Because iNOS is know to produce a large amount of NO, iNOS induction is suspected to be hazardous to neural cells. However, iNOS induction in NB-39-nu cell was not toxic. Moreover, when NO was added exogenously apoptosis induced by some anti cancer drugs was markedly reduced. Similar cytoprotective effect caused by NO addition against apoptosis was also observed in non-neuronal cells. All these data might suggest that iNOS induction is principally cytoprotective reaction.

In neural cells, only constitutive nitric oxide synthase (NOS) has been considered to be present. Inducible NOS is once expressed, it produces a large amount of nitric oxide which might be deleterious to neural cells. Recently, however, we found that iNOS is induced in human neuroblastoma cell lines, NB-39-nu and TGW-1, by cytokine treatment. When NB-39-nu cells were treated with

100 unit/ml of IFN-γ and μg/ml TNF-α iNOS mRNA was observed at 24 to 48 hr on northern blot. TNF-α alone was not effective and only weak induction was observed in IFN-γ alone treated cells. E. coli lipopolysaccharhide and IL-1β showed no effects. NB-39-nu cells express TNFR1 constitutively and TNF-α treatment alone was enough to activate NFκB activity in this cell line but not sufficient for iNOS induction. IFN-γ treatment stimulate markedly TNF-α synthesis and TNFR2 expression. Interestingly, when TNFR2 was overexpressed in NB-39-nu cells, TNF-α treatment alone was found to be enough to induce iNOS. These observations suggest that NFκB activation is not sufficient and interferon response element might not be required for iNOS induction. This is sharp contrast to the absolute requirement of IRF-1 for iNOS induction in mouse macrophage.

We recently found that iNOS is induced in NB-39-nu cells by treatment with paclitaxel, vincristine, vinblastine and vinorelbine when combined with IFN-γ. These findings are particularly interesting because above antimicrotubule anti-cancer drugs often cause neuralgia. In terms of iNOS induction, these compounds are also interesting. iNOS induction by IFN-γ and TNF-α can be blocked completely with 10nM dexamethasone but only half of iNOS induction by IFN-γ and paclitaxel and none of iNOS induction by IFN-γ and vincristine can be inhibited by even high dose of dexamethasone. These are strong indications that there is a new signal transduction pathway of iNOS induction. It could be suspected that this new pathway might be associated with microtubule system because above drugs all either stabilizes or destabilizes microtubule.

Enzymatic activity of cNOS can be fine tuned by intracellular Ca^{++} concentration but that of iNOS are not regulated by Ca^{++}. Therefore, it is believed that once iNOS is expressed large amount of nitric oxide is produced. Actually large amount of nitrate and nitrite could be detected in many experimental inflammation systems. Moreover pleiotropic chemical reactivity of nitric oxide has been regarded as the reason its cytotoxic effect. However, when iNOS was induced in NB-39-nu cell by IFN-γ and TNF-α cells did not readily die. In addition, we found that that apoptosis of NB-39-nu induced by vincristine can be protected by exogenous nitric oxide. Similar protection against apoptosis were also observed in human hepatoma cell line, Hep G2 cell. *In vivo* neurotoxicity caused by paclitaxel administration in rats was exacerbated by NOS inhibitor and glucocorticoid treatment of rats. These findings suggest that NO production is principally devoted to cytoprotective reaction although under some condition it could be deleterious.

S23 2ASA-4 Neuronal Apoptosis by Glial iNOS/NO After Brain Ischemia

Yasuyuki Nomura, Takashi Uehara, Tadashi Nishiya and Tomohiro Miyasaka
(Dept. Pharmacol., Fac. Pharm. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo)

[Summary]

We observed that a transient cerebral ischemia by an occlusion of 4 vessels of carotid arteries results in neuronal apoptosis and the induction of iNOS in CA1 regions of rat hippocampus at 3-5 days after the occlusion. To elucidate the involvement of NO generated by iNOS in neuronal apoptosis and the mechanism, we investigated iNOS expression and influences of a NO donor (sodium nitroprusside, SNP) on neuronal death.

We first examined whether lipopolysaccharide (LPS) induces NOS in glial cells cultured from neonatal rat brain. NOS activities were detected by LPS treatment at 10 μg/ml for 6-72 hrs. The LPS-induced activities were abolished by cycloheximide, actinomycin D or dexamethasone. Furthermore the induction was inhibited by herbimycin A but was not by KT-5720, staurosporin, W-7 or FK-506. At 5-7 hrs following LPS stimulation, 130-kDa proteins were detected with anti-rat liver iNOS antibody. It is suggested that LPS induces the expression of 130-kDa iNOS through an activation of protein tyrosine kinase. Then we analyzed LPS/IFN γ -induced iNOS expression using C6 glioma cells. Herbimycin A suppressed : 1) LPS/IFN γ -induced iNOS expression, 2) LPS-activated NF-κB and 3) IFN γ -activated JAK 2, suggesting that herbimycin A suppresses the iNOS induction by inhibition of NF-κB activation by LPS and tyrosine-phosphorylation of JAK2 by IFN γ (Fig.1).

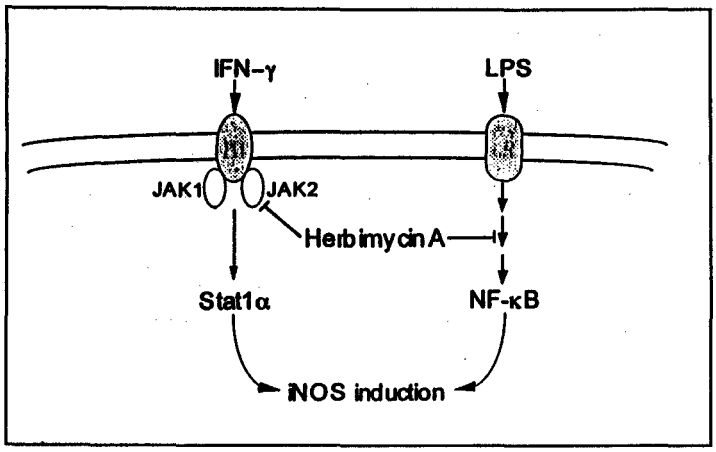


Fig.1
The intarcellular mechanism of LPS/IFN γ - induced iNOS induction in C6 cells.

We found that LPS caused DNA fragmentation in only NG108-15 cells but not in astrocytes in the coculture system of the two cell types, indicating that iNOS/NO induces apoptosis of neurons but not glial cells. SNP caused NO_2^- accumulation in the reaction medium and leakage of lactate dehydrogenease (LDH) from NG108-15 cells. SNP increased radioisotopic labeled glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in the presence of [^{32}P]NAD and inhibited the enzyme activity. In addition, SNP elicited chromosomal condensation, fragmentation of nuclei and internucleosomal DNA fragmentation in NG108-15 cells. Taken together, the NO-induced neuronal apoptosis is partly due to NO-induced modification of GAPDH, perhaps by stimulating the binding of NAD to GAPDH. The mechanism of GAPDH involvement in NO-induced neuronal apoptosis will be discussed (Fig.2).

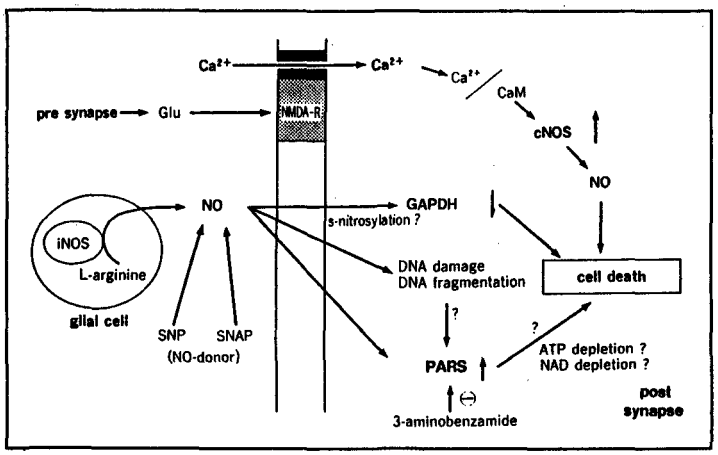


Fig.2
The possible mechanism of neuronal apoptosis by NO generated by iNOS in glial cells. GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, PARS : poly (ADP-ribose) synthase

[References]

1) Nomura, Y. & Kitamura, Y. : Neurosci. Res. 18:103-107, 1993.

2) Nishiya, T., Uehara, T. & Nomura, Y. : FEBS Lett. 371 : 333-336, 1995.

3) Kitamura, Y., Arima, T., Imaizumi, R., Sato, T. & Nomura, Y : Europ. J. Pharmacol. 289 : 299-304, 1995.

4) Kitamura, Y., Imaizumi, R., Kitayama, Y., Esumi, H. & Nomura, Y. : J. Neurosci. Res. 43 : 235-245, 1996.

S24 Induction of neuronal NOS in Purkinje cells

2ASA-5

Masayuki Ikeda
(Department of Physiological Chemistry, Graduate School,
Tokyo Medical and Dental University)

〔要約〕

To study the effects of chemical injury on the cerebellar nitric oxide synthase (NOS), we administered methylmercury chloride subcutaneously to mice, 10mg/kg/day for 9 days. In the methylmercury-treated cerebellum, Purkinje cells were positive both for NADPH-diaphorase and for neuronal NOS. Calcium-dependent NOS activity was increased to 160% of the controls. The present study suggests the ability of Purkinje cells to produce NO through the expression of neuronal NOS.

In the paradigm of long term depression (1), Purkinje cells are a possible source of NO but they are negative for NO synthase (NOS) protein and mRNA (2) under normal conditions. Induction of NOS in Purkinje cells by some stimulation would explain the discrepancy. With methylmercury (MeHg) as a chemical stimulant to Purkinje cells (3), we sought histological and biochemical evidence that Purkinje cells can produce NO.

Adult male ddY mice (28-30 g) received MeHg as a subcutaneous dose of 10 mg/kg once a day for 9 days. Some mice received MK-801 (1mg/kg) intraperitoneally at the same time of MeHg administration. Control mice received only the vehicle. On the day after the last injection, we killed the mice and examined the cerebellum by NADPH-diaphorase staining, NOS-immunohistochemistry and an assay of the NOS activity (4).

In the sections from the MeHg-treated mice, Purkinje cells were positive both for NADPH-diaphorase and for neuronal NOS while they were negative in the control sections. We observed no inducible NOS-positive cells either in the control or in the MeHg-treated mice. Fig. 1 shows that the NOS activity in the MeHg-treated mice was increased to 160% of the controls in the cerebellum but not in other regions. Fig. 2 shows that the increased NOS activity in the MeHg-treated cerebellum was calcium dependent. Fig. 3 shows that MK-801 enhanced the increase in NOS activity to 180% of the controls. MeHg treatment did not change cerebellar protein kinase C immunoreactivities (5) (Table 1).

Recent studies showed that neuronal NOS or NADPH-diaphorase is induced in some neurons (6). The induction of neuronal NOS in Purkinje cells could explain the source of NO in long term depression (1). The effect of MK-801 suggests that the NMDA receptor inhibits the induction of neuronal NOS. In MeHg neurotoxicity, NO from Purkinje cells may disrupt the synaptic transmission or be even toxic to the granule cells.

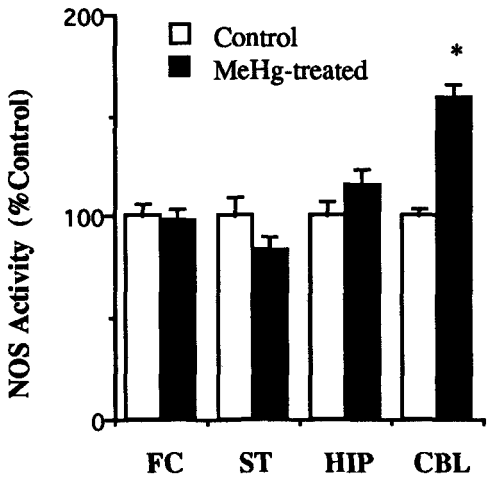


Fig. 1 NOS activity in various brain regions. of the control (n=8) and the methylmercury (MeHg)-treated mice (n=8). * P<0.01. FC= frontal cortex, ST= striatum, HIP= hippocampus, CBL= cerebellum. NOS activity was measured as previously described (ref. 4).

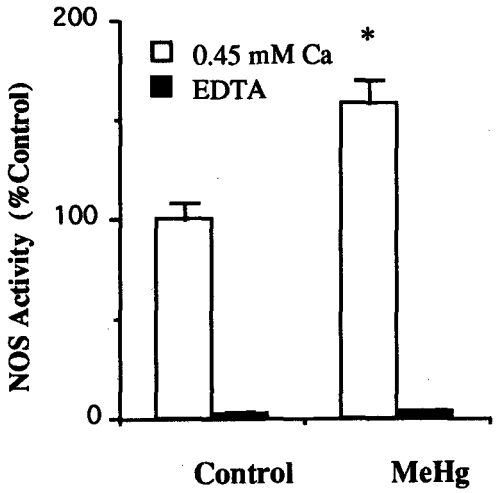


Fig.2. Cerebellar NOS activity of the control (n=8) and the MeHg-treated mice (n=8). The activity was measured in the presence of 0.45 mM $CaCl_2$ or 1mM EDTA. * P<0.01 by Student's t-test.

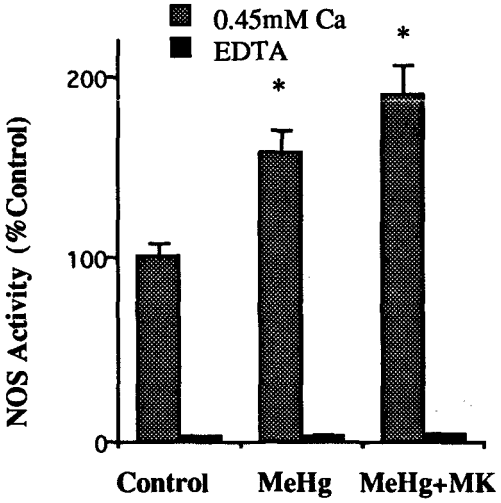


Table.1 Cerebellar PKC immunoreactivities in MeHg-treated mice

	Cytosol	Particulate
PKC(α)	101 ± 8	101 ± 12
PKC(β)	116 ± 17	98 ± 11
PKC(γ)	107 ± 7	90 ± 18

Data are expressed as % control value±S. E. M. for 8 MeHg-treated mice. PKC immunoreactivities were measured with Western blot as previously described (ref. 5)

Fig. 3 Effect of MK-801 on the increase in NOS activity by MeHg. NOS activity was measured with and without calcium. *P<0.05 compared with the controls by one-way ANOVA followed by Dunnett's t-test.

1. Shibuki, K., and Okada, D. (1991) Nature 349, 326-328
2. Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., et al. (1991) Neuron 7, 615-624
3. Leyshon-Sorland, K., Jasani, B., and Morgan, A. J. (1994) Histochem J 26, 161-169
4. Himi, T., Ikeda, M., Sato, I., Yuasa, T., and Murota, S. (1996) Brain Res 718, 189-192
5. Komachi, H., Yanagisawa, K., Shirasaki, Y., and Miyatake, T. (1994) Brain Res 634, 127-130
6. Saxon, D. W., and Beitz, A. J. (1996) Neuroscience 72, 157-165

S25 2ASA-6 Expression of Nitric Oxide Synthase (NOS) in Developing and Differentiating Rat Cerebellum

Takahiko Kato, Nobuo Inoue and Takashi Nakayama
(Dept. Biochem. I, Yokohama City Univ. Sch. Med.)

〔要約〕
In order to investigate the differentiation and maturation process of external granule cells in the postnatal development of rat cerebellum, NOS activities and its isoforms were analyzed in the developing layers. NOS activities were increased in the molecular and internal granular layers during development and the activity was detected in the external granular layer (*EGL*). Our micro-Wester blot showed neuronal NOS (*n*NOS) and endothelial NOS (eNOS) in *EGL* and nNOS mRNA also proved to be in *EGL*. Intraperitoneally administered N^G-nitro-*L*-arginine inhibited NOS activity *in vivo* and disturbed the layer formation in developing cerebellum; thus NO seemed to support the differentiation and maturation of granule cells.

Nitric oxide synthase (NOS) shows widespread distribution among general tissue cells and is highly concentrated in the cerebellar granular layer (2). The cerebellar granule cells differentiate postnatally and the cerebellar layers develop accordingly (1). Thus, to investigate the differentiation process of these cerebellar neurons, we determined NOS activities in the developing cerebellar layers, using our microassay method, and identified NOS isoforms in the germinal external granular layer.

Materials and Methods

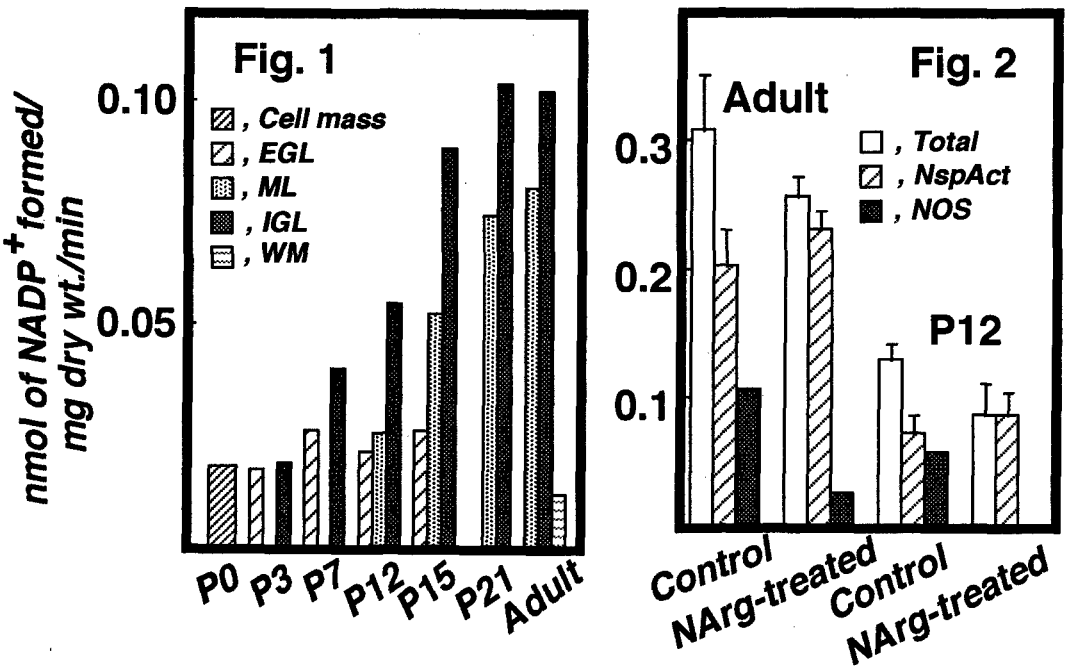
[Freeze-dried samples] Freeze-dried sections were prepared from cerebella of postnatal day 0 (P0) through P21 and adult (6 weeks of age) rats and the layer samples were dissected out from the sections under microscope. After weighing, the dried samples were directly subjected to assays (3).

[N^G-nitro-L-arginine (NArg) treatment] NArg was intraperitoneally injected at 50 mg/kg of body wt. into adult and P3 rats for 4 and 10 successive days, respectively.

[Assay methods] A microassay method was developed (5) by determining NADP+ formed in NOS reaction after 4,000-fold amplification of NADP+ in terms of an enzymatic amplification reaction, NADP cycling (3). A micro-Western blot was devised to analyze 1.7-3.8 μg dry wt. of layer samples, using a micro-slab gel (1x37x47 mm). The proteins were separated in the range of 15-20 mm and immuno-stained using horseradish peroxidase reaction. Thirty six cycles of RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) with ^{32}P-labelled primers (4) was used to amplify and determine mRNA extracted from 1.2 μg of dried layer samples.

Results and Discussion

[NOS activities] The NOS activity was calculated as a deference of the average values between the presence (***Total***) and absence (***NspAct***) of NArg in the assay mixture (5); thus no SEM is shown



[Fig. 1] NOS activities in all layers of developing cerebella. The ages of rats are given on the abscissa and *NOS* activity on the ordinate. The layers were not completely formed yet in P0 cerebellum and the activity was assayed in the cell mass of cerebellar slices from which white matter was eliminated. *EGL*, external granular layer; *ML*, molecular layer; *IGL*, internal granular layer; *WM*, white matter.
[Fig. 2] NOS activities in control and NArg-treated rats. ***NOS*** activity (on the ordinate)■ = *average* ***Total*** *activity* □ - *average* ***NspAct*** ▨; and the bar indicates the average activity of 7-9 samples (2-3 samples form each of 3 rats) with the vertical line for SEM.

for NOS activity (Fgis. 1 and 2). The activities increased in *ML* and *IGL* during differentiation and maturation of granule cells from P7 to P21. NOS activity was detected in *EGL* (germinal layer).

[NOS isoforms in EGL] Our **micro-Western blot** visualized several stained bands in all layer samples examined and both nNOS (160 kDa) and eNOS (140 kDa) isoforms were obviously detected in P12 *EGL*, compared with the positive controls for nNOS and eNOS. But inducible NOS isoform could not be detected in all layers. The immuno-staining intensities seemed to propor-tionally correspond to enzymatic activities in all layers. **RT-PCR** also demonstrated nNOS mRNA in P12 *EGL*. The signal intensity was 6-fold stronger in *IGL* than in *EGL* of P12 cerebellum. These findings suggest that nNOS is contained in the external granule cells.

[Effect of NArg injection] NOS activities were inhibited by intraperitoneal injection of NArg in adult and P12 rats (Fig. 2). No morphological change occurred in adult cerebellum, but the layer formation was seriously disturbed in the developing cerebellum. This signifies that NO supports the differentiation and maturation of granule cells.

References: 1) Altman J (1972) J Comp Neurol 145: 353-398; 2) Bredt DS et al (1990) *Nature* 347: 768-770; 3) Lowry OH, Passonneau JV (1972) A Flexible System of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York and London ; 4) Ogura T, et al (1993) *Biochem. Bio-phys. Res. Commun.* 193:1014-1022; 5) Wang W, et al (1995) *Anal Biochem* 227: 274-280

S26 Nitric oxide synthase-mediated formation of bioactive 2ASA-7 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain

Toshio Nakaki*, Futoshi Shintani**, Shigenobu Kanba**, Eiji Suzuki**, Nobuyuki Sasakawa*** and Masahiro Asai**
(*Dept. Pharmacol., Sch. Med., Teikyo Univ., and Dept. **Neuro-psychiat. and ***Pharmacol., Sch. Med., Keio Univ., Tokyo, Japan)

Norepinephrine (NE) and nitric oxide ($NO^{\cdot}$) function as neurotransmitters in the nervous system. We now report the identification of 6-nitronorepinephrine (6-nitroNE) in the mammalian brain (1). Nitric oxide synthase (NOS) participates in the formation of 6-nitroNE. This novel catechomamine inhibits the activity of catechol-*O*-methyltransferase (COMT), as well as NE transport into rat synaptosomes. Our results suggest that $NO^{\cdot}$ reacts with NE *in vivo*, and that the resultant 6-nitroNE has distinct biological activities which modulate synaptic transmissions.

NE is a catecholamine which functions as a neurotransmitter in the nervous system. $NO^{\cdot}$ is also thought to function as a neurotransmitter. We found that NE levels detected by microdialysis of the rat hypothalamic paraventricular nucleus were diminished by perfusion of a solution containing $NO^{\cdot}$. We hypothesized that NE and $NO^{\cdot}$ or $NO^{\cdot}$-related molecules may interact. In fact, nitration of NE at position 6 has been shown to occur *in vitro*. However, there have been no reports to date showing that 6-nitroNE exists *in vivo*. Therefore, we attempted to measure 6-nitroNE in the mammalian brain, and then asked whether nitric oxide synthase is involved in the amine formation. Moreover, we tested some biological activities of the amine.

Catechol-containing molecules were extracted from 100 porcine brains and separated by high performance liquid chromatography with electrochemical detection (2). The presence of 6-nitroNE was then detected using a UV detection method, mass spectrometry and NMR spectroscopy. The structural analysis was performed by Dr. Takeshi Kinoshita, Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co. Ltd.

Next, we tested whether NOS is involved in the formation of 6-nitroNE in the brain. 6-NitroNE levels, as measured by high performance liquid chromatography-electrochemical detection in rat brains minus the olfactory bulbs, fell following intraperitoneal injection of N^G-nitro-L-arginine methyl ester (200 mg/kg), but not N^G-nitro-D-arginine methyl ester. This decrease was reversed by coadministration of 800 mg/kg of L-arginine hydrochloride, but not the D-isomer. These results suggest that NOS is involved in the formation of 6-nitroNE.

Third, we examined whether 6-nitroNE exerts biological effects. At up to 100 μM this catecholamine did not displace the binding of α_1, α_2, or β adrenergic receptor ligand. The activity of monoamine oxidase was unaffected. However, transport of 8 nM [^{3}H]L-NE into rat brain synaptosomes prepared from frontal and occipital cortices was inhibited by 6-

nitroNE with an IC_{50} of 31 μM. 6-NitroNE inhibited the activity of COMT with an IC_{50} of 7.5 μM.

To examine the effects of 6-nitroNE on central noradrenergic neurotransmission *in vivo*, we conducted a microdialysis experiment to determine the contents of NE and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in the rat paraventricular nucleus, where both NOS-containing neurons and noradrenergic neurons exist. Significant elevations of NE and decreases in 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol were observed during the perfusion of 6-nitroNE, and both were dose-dependent. The inhibition by 6-nitroNE of both COMT activities and the reuptake of NE into presynaptic neurons may account for the above results.

In addition, intraperitoneal administration of N^G-nitro-L-arginine methyl ester to rats resulted in decreased NE as well as increased 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in paraventricular nucleus dialysates. These changes were reversed by coadministration of L-arginine. Two explanations are possible for the results of N^G-nitro-L-arginine methyl ester. First, $NO^{\bullet}$ by itself facilitates neurotransmitter release and inhibits catecholamine reuptake into synaptosome. Second, the inhibition of NOS activity might diminish the amounts of endogenous 6-nitroNE which inhibited NE reuptake and COMT activities in the paraventricular nucleus *in vivo*.

NOS-containing and NE-containing neurons coexist in both the locus coeruleus and the paraventricular nucleus, but the two are apparently never found in a single neuron. This suggests that 6-nitroNE may be synthesized *via* an interaction between NE and $NO^{\bullet}$ released from different neurons. It is still an open question whether endogenous 6-nitroNE inhibits catecholamine reuptake and COMT activities. We propose that 6-nitroNE is a potential signal molecule linking the actions of NE and $NO^{\bullet}$.

References

1. Shintani F, Nakaki T, Kanba S, Sato, K., Yagi, G., Shiozawa, M., Aiso, S., Kato, R. and Asai, M. Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotropic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. *J. Neurosci.* 1995; 15:1961-1970.
2. Shintani F, Kinoshita T, Kanba S, Ishikawa, T., Suzuki, E., Sasakawa, N., Kato, R., Asai, M. and Nakaki, T. Bioactive 6-norepinephrine identified in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:13561-13565.

S27 LIF, A CYTOKINE AT THE NEUROIMMUNE INTERFACE

2CSB-1 Paul H. Patterson
(Biology Div., California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125)

〔要約〕

Leukemia inhibitory factor (LIF) belongs to the neuropoietic cytokine family, which also includes CNTF, OSM, GPA, CT-1, IL-6 and IL-11. We and others have shown that LIF is a key agent in the neuronal response to injury. We now find that this cytokine also coordinates the inflammatory response in neural injury.

LIF mRNA levels increase dramatically after damage to peripheral nerve and ganglia, primarily in glial cells, and several neuropeptides are induced in the injured neurons. Analysis of LIF$^-$ knockout mice revealed that this neuropeptide induction requires LIF. In addition, we now find that the nature of the immune response in injured nerves is altered in the absence of LIF. Macrophage and neutrophil invasion is much reduced in the LIF$^-$ mice, indicating a pro-inflammatory role for LIF in this system.

To test whether LIF regulates neurogenic inflammation, we have studied its role in adjuvant-mediated inflammation (in collaboration with C. Woolf). Intraplantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA) produces an inflammatory response characterized by local sensory hypersensitivity and a rapid up-regulation of IL-1b and NGF, followed by substance P and CGRP in sensory neurons. CFA also enhances LIF mRNA levels in the footpad. CFA injection in LIF$^-$ mice results in a significant increase in inflammatory edema over that seen in wild type mice. Moreover, peak IL-1 levels in wild type mice are lower and return to baseline faster than in mutant mice. In addition, intraplantar injection of LIF results in a decrease in IL-1 protein, consistent with a down regulation of the inflammatory response. These results

provide evidence for an anti-inflammatory role for LIF during peripheral imflammation.

LIF is also induced by injury to the normal, adult rat cortex, where its expression is localized to astrocytes surrounding, but not in, the wound area. Given its induction in glial cells upon injury, its requirement for neuronal response to injury, and the altered inflammatory response in LIF$^-$ knockout mice, it is likely that LIF is a key coordinator at the neuroimmune interface.

Patterson, PH and Nawa, H *Cell* 72: 123 (1993)
Rao, MS, et al. *Neuron* 11: 1175 (1993)
Banner, LR and Patterson, PH *PNAS* 91: 7109 (1994)
Patterson, PH *PNAS* 91: 7833 (1994)
http://www.cco.caltech/~phplab/phplab.html

S28 Functional Analyses of Neuronal Genes in Zebrafish

2CSB-2 Naomasa Miki, Cheol-Hee Kim, Che-Hui Kuo, Eiichi Taira, Osamu Muraoka and Hidekazu Tanaka (Department of Pharmacology, Osaka University School of Medicine, Osaka 565)

〔要約〕Zebrafish as an animal model provides several advantages for analyzing new genes involved in the vertebrate neural development. Hundreds of eggs can be produced daily from a small number of adult fish and the rapid development of the transparent embryos makes it possible to identify many cell types in one day after fertilization. We will present some experimental data on *in vivo* analyses of neuronal genes by using zebrafish system. 1) *In vivo* determination of a promoter region of a neuron specific gene, necdin. 2) Functional analysis of a cell adhesion molecule, gicerin. 3) Analyses of neurogenic genes, Notch and HuC.

Our first aim is to use this rapid and convenient zebrafish system to investigate the potential roles of some neuronal genes during the development by monitoring their expression in the well-defined zebrafish nervous system.

1) Necdin (1) is found by Yoshikawa's group in the Protein Institute, Osaka University and a neuron specific nuclear protein (37kDa) whose expression is observed only in postmitotic cells, but the physiological function is unknown. We examined cis-elements required for neuron specific expression of necdin by injecting plasmids carrying a series of upstream sequences of the necdin gene fused to lacZ and the promoter activity was analyzed by the whole mount immunochemical method (2). We determined an 87 bp cis-acting element responsible for neuron specific expression .

2) The gicerin (3, 4), a novel cell adhesion molecule which belongs to the immunoglobulin superfamily, is expressed temporally and spatially in the developing chick nervous system. Gicerin has both homophilic and heterophilic binding activities. We have generated transient transgenic fish by injecting DNA constructs under control of the mouse neurofilament gene promoter. Gicerin

expressing neurons exhibited a fasciculation formation with neighboring gicerin-positive axons, which may be partly due to homophilic cell adhesion activity of gicerin (5).

3) We are interested in the neurogenesis in zebrafish embryo and focused on Notch and HuC genes. Lateral inhibition mediated by the Notch pathway has been shown to play an important role in the *Drosophila* nervous system. Due to lateral inhibition only a single cell in each proneural cluster eventually delaminates and differentiates as a neuroblast while the rest adopt an epidermal fate (6). Recently, Notch homologues have been identified in various vertebrates, but little is known about the mechanisms underlying cell fate decision in vertebrates. We have isolated several cDNA clones that encode zebrafish Notch homologues. Among them, Notch-3 (N3) is suggested to involve in the neurogenesis including the formation of neural plate, when examined by the whole mount in situ hybridization technique and RNA injection experiments. Lastly, ELAV is a neural-specific RNA binding protein which is found in *Drosophila* (7) and known to be a pan-neural marker. We isolated zebrafish *elav* /HuC homologue (zHuC) and examined its expression patterns in the stage of neural determination. zHuC was first expressed in the neuronal precursors in the neural plate just after gastrulation and persisted its high expression in the developing neurons in zebrafish. Thus it is suggested that HuC, like *elav* in *Drosophila*, is one of the earliest known neuronal markers in zebrafish.

1. Uetsuki,T., Takagi,K., Sugiura,H. and Yoshikawa,K. J.Biol.Chem., 271,918-24, 1996. 2. Kuo,C-H, Uetsuki,T., Kim,C-H., Li,B-S., Taira,E., Higuchi,H., Okamoto-H, Yoshikawa-K,and Miki-N. Biochem.Biophys.Res.Comm., 211, 438-446, 1995.

3. Taira-E, Takaha-N, Taniura-H, Kim-CH, and Miki-N. Neuron, 12, 861-872, 1994.

4. Taira-E, Nagino-T, Taniura-H, Takaha-N, Kim-CH, Kuo-CH, Li-BS, Higuchi-H, and Miki-N. J.Biol.Chem., 270, 28681-28687, 1995. 5. Kim-CH, Taira-E, Kuo-CH, Li-BS, Okamoto-H, Nakahira-K, Ikenaka-K, Higuchi-H, and Miki- N. Neurochem. Res., 21, 231-237, 1996. 6. Artavanis-Tsakonas-S, Matsuno-K, and Fortini-ME. Science, 268, 225-232, 1995. 7. Yao,K-M., Samson,M-L., Reeves,R. and White,K., J.Neurobiol., 24, 723-739, 1993.

S29 2CSB-3 Neural Restrictive Silencer and Its Binding Factor in Neuronal Terminal Differentiation and Neural-Specific Gene Regulation

N. Mori*, T. Kojima*†, Y. Naruse*†, and S. Muraoka*
(*Laboratory of Inheritance and Variation, PRESTO, JRDC, Keihanna Plaza SL1F, Hikaridai 1-7, Seika-cho, Kyoto 619-02, and †Dept. Bioscience, NAIST, Takayama-cho 8916-5, Ikoma, Nara 630-01)

〔要約〕

Neural restrictive silencer (NRS) is a 21-bp-long cell type-specific transcriptional silencer element that is found in more than 30 neural-specific genes. NRS represses transcription in non-neuronal cells, thereby allowing gene expression only in neurons. The sequence-specific DNA binding protein that recognize NRS (NRSF, also named REST) is expressed essentially in undifferentiated neuronal precursors and non-neuronal cells and functions as a transcriptional repressor. NRSF/REST represents the first example of a vertebrate silencer factor that potentially regulates a large battery of neuron-specific genes, and therefore may function as a general negative regulator of neuronal terminal differentiation.

Positive and Negative Regulators of Neural Development and Neuronal Differentiation

Accumulative evidence indicates that neural development and subsequent neuronal differentiation are controlled by both positive and negative transcriptional regulators (1). For example, proneural genes such as AS-C and Mash-1 as well as differentiation genes such as NeuroD are positive regulators of neural development, while Hairy, E(spl) and HES-1 are negative regulators (2). In addition recent experiments as to neuronal versus glial differentiation switch suggest that gcm is a negative regulator of glial differentiation (3). While the gcm gene product is not fully characterized and it does not fall into known classes of transcription factors, the mammalian factors, Mash-1, NeuroD and HES-1 contain a well characterized DNA-binding motif, the *helix-loop-helix* structure (HLH). These HLH-containing transcription factors have been shown to play essential roles in neural development in mammals. For example, mice lacking the HES-1 gene had severe defects in fusing neural tubes, therefore were unable to form brain and became embryonic lethal (4). Mash-1 knockout mice had defects in developing sympathetic ganglia, and did not produce cells positive for neuronal markers such as SCG10, peripherin and neuron specific enolase (5). Thus HES-1 and Mash-1 functions are essential in early stages of neural development. Similarly, NeuroD plays essential roles in neuronal differentiation a little later stages in embryo. When NeuroD is overexpressed in Xenopus embryo, cells positive for various neuronal markers appeared in abdomen (6). Thus NeuroD is a positive regulator of neuronal differentiation. However, the NeuroD-driven cells are not fully mature neurons; it seems that there are other factors that are important for neuronal terminal differentiation. Recent experiments in our laboratory and others suggest that a novel transcriptional repressor with Zn-finger motifs that binds to a cell-selective silencer in various neuron-specific genes may play an important role in the later stages of neural development, specifically during the terminal differentiation of neurons (7).

Neural-Restrictive Silencer (NRS) as a General Transcriptional Determinant of Neuronal Specific Gene Expression

The expression of a battery of neuron-specific genes is regulated by a 21-bp sequence functioning as a silencer in non-neuronal cells. This neural-restrictive silencer (NRS) element was found initially in the genes encoding SCG10 (an NGF-inducible neuronal growth-associated protein) (8,9) and sodium channel type II (10). A search in the current data base (GenBank, release 91.0) using the 21-bp NRS core sequence as a probe revealed that more than 30 neuron-specific genes contain related sequences of the NRS. The genes containing NRS included neuronal growth-associated proteins, neurotrophins, neurotransmitter synthetases, receptors, ion channels, cell adhesion proteins, and molecules involved in synaptic functions, all of which relate to mature neuronal function. The collective NRS in these neural specific genes could be classified into two subclasses: conserved (<6/21 mismatches) and degenerated NRSs (>7/21 mismatches). Conserved NRSs were seen in genes of cholinergic as well as glutamatargic systems, while degenerative NRSs were in genes of monoaminergic systems. The database search also revealed several genes that are found in outside the nervous system, e.g. the skeletal muscle type ryanodine receptor gene (RyR1). Interestingly, however, recent evidence indicates that a brain-specific transcript is synthesized from the RyR1 gene. This suggests that NRS in the RyR1 gene and possiblly other non-neuronal genes may be functional in neural-specific alternative transcription.

Neural-Restrictive Silencer Factor (NRSF/REST) is a General Negative Regulator of Neuronal Differentiation

We have identified a sequence-specific protein that binds NRS in nuclear extracts of non-neuronal cells of human, mouse and rat, but not in those of neuronal cells. We then cloned cDNAs and genes encoding the NRS-binding factor (NRSF/REST) in mouse and human. The human NRSF/REST gene was constituted by at least five exons spanning over 30 kb. The encoded protein NRSF/REST is a 120 kD protein that is composed of several domains including eight Zn-finger motifs, two putative nuclear targeting signals, a novel repetitive sequence, and a C-terminally located single Zn-finger sequence. Transfection experiments with partial deletion constructs revealed that the eight Zn-finger containing domain determines its specificity of NRS-binding, and the N-terminal domain is critical for transcriptional silencing. The mRNA encoding NRSF/REST is expressed in undifferentiated neuronal precursors and non-neuronal cells including glia, however, an alternatively spliced mRNA was expressed in certain neuronal cells. The nucleotide sequence of the neural-specific isoform predicted a truncated product which contains only five Zn-fingers which does not have full-capacity to bind NRS. Regulatory mechanisms of the expression of splicing variants and roles of those variants will be discussed in the context of neural-specific gene regulation and neural development.

[References]

(1) P. Simpson, Neuron 15, 739-742 (1995)
(2) Kageyama, R, et al., Crit. Rev. Neurobiol. 9, 177-188 (1995)
(3) Anderson, D. J. Neuron 15, 1219-1222 (1995); Hosoya, T. et al., Cell 82, 1025-1036 (1995); Jones, B.W. et al., Cell 82, 1013-1023 (1995)
(4) Ishibashi, M. et al Genes Dev. 9, 3136-3148 (1995)
(5) Sommer, L. et al., Neuron 15, 1245-1258 (1995)
(6) Lee, J.E. et al. Science 268, 836-844 (1995)
(7) Schoenherr, C. J. and Anderson, D. J., Science 267, 1360-1363 (1995); Chong, J. A. et al., Cell 80, 949-957 (1995)
(8) Stein, R et al., Neuron 1, 463-476 (1988); Okazaki et al., Genomics 18, 360-373 (1993); Himi et al., Neuroscience 60, 907-926 (1994); Sugiura and Mori, Dev. Brain Res. 90, 73-91 (1995)
(9) N. Mori et al. Neuron 4, 583-594 (1990); N. Mori et al., Neuron 9, 45-54 (1992)
(10) R. A. Maue et al., Neuron 4, 223-231 (1990); S. D. Kraner et al., Neuron 9, 37-44 (1992)

S30 Cell Polarity and Asymmetric Division of Neural Stem Cells

2CSB-4

Fumio Matsuzaki
(Dept. Mol. Genetics, National Institute of Neuroscience, Kodaira, Tokyo, Japan)

〔要約〕 In *Drosophila*, the transcription factor Prospero is required for normal neurogenesis. Prospero synthesized in neural stem cells is asymmetrically partitioned to secondary precursor cells during cell divisions, representing asymmetric segregation of transcription factors as a novel mechanism for establishing asymmetry in gene expression between sibling cells. The ability to localize Prospero during mitosis is characteristic of all epithelial cells as well. The apicobasal polarity in epithelia defines an invariant axis of asymmetric protein localization in neural stem cells, and the division axis determines symmetric or asymmetric divisions in reference to the polarity.

During development of multicellular organisms, asymmetric cell division producing two distinct cells is a fundamental process to generate cell diversity. In the central nervous system of *Drosophila* embryos, a limited number of neural stem cells are born from specific regions of the ectodermal epithelia, and divide asymmetrically to generate a series of intermediate precursor cells, each of which is cleaved in a pair of neurons or glia. The transcription factor Prospero is required for correct gene expression in neurogenesis. Although the *prospero* gene is transcribed in all neural stem cells, its translation products had been observed only in the nuclei of secondary neural precursors. We have found that the Prospero protein is asymmetrically segregated to secondary precursor cells from neural stem cells during their divisions. Prospero synthesized in neural stem cells is retained in the cytoplasm. At mitosis, it is exclusively partitioned into secondary precursor cells where *prospero* activity is required for normal gene expression. This asymmetric segregation of Prospero is due to its subcellular localization in mitotic neural stem cells, that is dependent of the cell cycle.

We have identified a small region in Prospero, " asymmetry domain", that is responsible for this event. This domain must recognize a polarity present in mitotic neural stem cells, thereby localizing Prospero at one side of the cell cortex. In addition, stem cells in the endoderm segregate Prospero asymmetrically into a sister cells as well, suggesting common mechanisms acting in unequal partition of factors during development. Where and how asymmetric protein segregation occurs during *Drosophila* development? To address these questions, we have ubiquitously expressed the fusion protein of Prospero and β-galactosidase as a marker for asymmetric protein segregation. The Prospero marker is localized to the basal-lateral cortex at every mitosis of epithelial cells in the ectoderm as well as in the endoderm, being excluded from the apical cell cortex. Mesodermal cells do not localize the marker. Thus, the ability to localize the Prospero marker during mitosis is characteristic of epithelial cells as well as stem cells of epithelial origin.

The invariant orientation of the Prospero localization in epithelia leads to the prediction that cell divisions parallel to the apicol-basal axis partition the marker asymmetrically into a daughter cell. The division axis in epithelia is orthogonal or parallel to the apical-basal axis depending on the location of cells in embryos. In fact, the marker is asymmetrically segregated into one of two daughter cells of divisions which are parallel to the apicobasal axis. In contrast, those cells that divide perpendicularly to the polarity partition the marker equally into two daughter cells. These suggest that the division axis is controlled in reference to the apical-basal polarity to determine symmetric and asymmetric cell divisions.

Our approach thus reveals that the cell polarity in epithelia defines the orientation for the subcellular localization of Prospero, which is to localize asymmetrically during divisions of neural stem cells. This strongly suggest that the stem cells do not acquire but inherit this activity when they are committed in epithelia. In addition, our findings unveils a basic logic underlying asymmetric divisions of neural stem cells; the apicobasal polarity of parental epithelial cells provides an invariant axis for asymmetric protein localization, which orients the mitotic spindle along this axis ensuring asymmetric division of neural stem cells.

S31 2CSB-5 APOPTOSIS-INHIBITORY FACTORS, AIF-20 AND AIF-22, AND ITS SIGNAL TRANSDUCTION

Nobuyuki Fukushima[1], Hiroshi Ueda[2]
[1]Dept. of Pharmacol., Yokohama City Univ. Sch. of Med.,
[2]Dept. of Phamacol., Fac. of Pharmaceutical Sci. Nagasaki Univ.

〔要約〕 The cell death in low-density culture of the cortex of rat embryos under serum-free conditions was characterized to be apoptosis, and was suppressed by the addition of conditioned medium from high-density cultures. We purified such apoptosis-inhibitory factors (AIFs), AIF-20 and AIF-22 of molecular weight of 20 and 22 kDa on SDS-PAGE, both which activated protein kinase C. Such apoptosis-inhibitory activity was specific for rat cortical neurons, but not for dorsal root ganglion neurons or PC12 pheochromocytoma cells. Furthermore, various known (neuro)trophic factors had no effects in the present culture system under the serum-free condition. These findings suggest that both AIF-20 and AIF-22 are novel autocrine or paracrine type of trophic factors for cortical neurons acting through protein kinase C mechanisms.

Acidic and basic fibroblast growth factors (FGFs) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) have been demonstrated to possess trophic activities for cortical neurons in culture and implied in the autocrine mechanisms for neuronal survival during development (1). However, the survival activities of these FGFs are incomplete, and markedly differ in different cortical regions (2). Furthermore, the expression of both FGFs in cortical neurons are very low during the embryonic period (3). On the other hand, the population of neurons remain unchanged in mice targeted BDNF or trkB receptor gene (4). These findings suggest the presence of other trophic molecules involved in the survival of cortical neurons, particularly during the development. In the present study, we focused on such a density-dependent survival (5) of cortical neurons of rat embryos in primary culture under the serum-free condition. Here we report the identification of apoptosis-inhibitory factors (AIFs), its signal transduction, and the genes possibly related in high-density- or AIF-induced survival.

Materials and Methods

Cell cultures; Cerebral cortex from 17-day fetal Wistar rats was dissociated with trypsin. After neutralizing with soybean trypsin inhibitor and centrifugation, the resuspended cells in D/F medium (DMEM:Ham's F12=1:1) were seeded onto the plate coated with poly-DL-ornithine at various densities, and cultured at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Dorsal root ganglion (DRG) neurons from 17-day fetal Wistar rats were prepared as described (6) and cultured under serum-free conditions. PC12 cells were cultured under serum-free conditions, as described (7).

Survival assay; *Neurofilament (NF) staining*. Cells were stained for NF with anti-NF by an indirect peroxidase method. The number of NF-positive cells was counted in five fields per well. In some cases, cells were stained for nuclei with propidium iodide (PI) and for NF with anti-NF by an indirect fluorescence method, and examined in a laser confocal microscope. *Alamar blue*. Alamar blue™, a redox indicator, was also used for survival assay. Alamar blue was added to the cortical cultures at 10% (v/v) and incubated at 37 °C for 3 hr. Absorbance of culture supernatants were measured at dual wavelength of 595 nm and 570 nm.

DNA fragmentation; The fragmented DNA was electrophoresed in 1.5 % agarose, blotted onto nylon membrane and hybridized with ^{32}P-labeled probe derived from rat genomic DNAs.

Purification of AIF; In the DEAE chromatography, concentrated CMs were applied to a DEAE-3SW HPLC column, preequilibrated with 20 mM Tris-Cl (pH7.5) at a flow rate of 1 ml/min. The materials bound to the column were eluted with a linear gradient of 0 - 1 M NaCl in 30 ml of 20 mM Tris-Cl (pH 7.5). The active fractions eluted from the above step were applied to gel permeation HPLC columns (TSK-Gel SW2000XL plus TSK-Gel SW3000XL column) equilibrated with 20 mM phosphate-Na (pH 6.8) containing 0.8 M NaCl at a flow rate of 0.8 ml/min. The active

fractions were applied again to the gel permeation column under the same conditions as above-mentioned. The active fraction from the rechromatography was applied to SDS-PAGE, and AIFs were extracted from the slices, corresponding to 20 and 22 kDa.

Differential display; RNAs were extracted from cells in low- or high-density cultures 3hr after seeding, and subjected to reverse transcriptase-coupled polymerase chain reaction (RT-PCR), using ^{35}S-dATP, according to the manufacturer's protocol (Gene Hunter).

Northern blotting; Total RNAs were electrophoresed in agarose/formaldehyde gel, blotted onto nylon membranes, and hybridized with ^{32}P-labeled probe generated by linear amplification PCR.

Results and Discussion

When cortical cells were seeded at low-density (1 x 10^5 cells/cm^2), the neuronal survival ratio (the ratio of NF-positive cells to total attached cells at 1 hr) markedly decreased to 7.8% during the culture for 24 hr. Nuclear fragmentation and DNA-laddering were detected as early as 3 hr after seeding. These findings indicate that the cell death was characterized to be apoptosis. The marked cell death was observed during 1 - 3 hr after seeding, suggesting that the apoptosis was triggered between 0 and 1 hr. The inhibition of apoptosis by high-density (5 x 10^5 cells/cm^2) was significant during the period of 1 - 6 hr, but not 6 - 24 hr. The addition of conditioned medium (CM) from high-density cultures during entire culture period increased the survival ratio to 52% in low-density cultures, equivalent to that (49%) in high-density cultures. The inhibitory effects of CM was marked during the period of 1 - 6 hr, but not 6 - 24 hr, similar to that of high-density. Such survival effects were also observed when culture medium was replaced with fresh CM-free medium at 1 hr after seeding, or when the plate was coated previously with CM. These findings suggest that AIFs in the CM inhibit apoptosis mechanisms occurred critically during the period of 0 - 1 hr (critical period) after seeding and contribute to the neuronal survival seen under the high-density conditions.

We attempted to purify AIFs. The active fractions were obtained at 0.5 - 0.7 M NaCl on DEAE-chrmotography. When these fractions were subjected to a gel permeation chromatography, the survival activity was detected only in the fractions of approximately 45 kDa. The active materials were rechromatographed on a gel permeation column and the active peak were found to contain two major protein bands of 20 and 22 kDa on SDS-PAGE. When the gel extracts on SDS-PAGE were assayed for neuronal survival, the survival activity corresponded to these bands. The concentration of AIF-20 and AIF-22 to show half-maximal stimulation were 27 and 30 ng/cm^2.

Among various drugs affecting intracellular signaling, BAPTA-AM (cytosolic Ca^{2+} chelator), thapsigargin (Ca^{2+} depletor), U73122 (phospholipase C/PLC inhibitor), calphostin C (protein kinase C/PKC inhibitor) and herbimycin A (tyrosine kinase/TK inhibitor) inhibited the survival effects of CM. U73122 and calphostin C showed a marked inhibition on neuronal survival induced by AIF-20 and AIF-22 only by the addition during the critical period for AIF-actions, while herbimycin A showed no effects by this treatment. These observation suggest that AIF-20 and AIF-22 exert survival actions through PLC-PKC mechanisms, but not the TK-mediated ones.

AIF-20 and AIF-22 were less active on DRG neurons or PC12 cells in serum-free cultures. On the other hand, BDNF or FGFs at 100 ng/ml was effective on DRG neurons or PC12 cells, respectively, whereas less effective on cortical neurons under serum-free conditions. Thus, both AIF-20 and AIF-22 might be novel trophic factors for cortical neurons.

Actinomycin D or cycloheximide suppressed the neuronal survival in high-density or AIF-supplemented cultures, indicating the involvement of gene expression in AIF- or high-density-mediated neuronal survival. We attempted to clone the genes related in such mechanisms using differential display method. The gene expression of only 5 subclone among 40 ones were confirmed to be higher in high-density cultures than in low-density ones in Northern blot analyses. Finally, 9 independent clones were obtained from cDNA library constructed using poly(A) RNA of high-density cultures. The expression of some clones were temporally increased or maintained both in high-density and in AIF-supplemented cultures during 0 - 6 hr, while decreased in low-density ones. Such expression corresponded with the neuronal survival in each culture. Thus, these genes might be involved in the neuronal survival at downstream to AIF.

1) Korsching S, (1993) J Neurosci. 13: 2739. 2) Walicke PA, (1988) J Neurosci. 8: 2618. 3) Kuzis K et al., (1995) J Comp Neurol 358: 142. 4) Snider WD, (1994) Cell 77: 627. 5) Manthorpe et al., (1983) Brain Res 267: 57. 6) McCarthy KD, Partlow LM, (1976) Brain Res 114: 391. 7) Rukenstein A et al., (1991) J Neurosci 11: 2552.

1 2E50 制限給餌後のラットの rebound hyperphagia に閉所条件を加えた時の摂餌行動と扁桃体ドパミン・セロトニン代謝

井上 幸紀[1)]、切池 信夫[1)]、栗岡 政典[1)]、岩崎 進一[1)]、藤嵜 泰利[1) 2)]、山上 榮[1)]
1）大阪市立大・医・神経精神医学教室 2）吉村病院

〔 要約 〕 ラットに1日2時間の時間制限給餌を7日間加えた後自由摂餌に戻したときに生じる rebound hyperphagia と、それに閉所条件を加たときの摂餌行動と扁桃体ドパミン、セロトニン代謝について検討を加えた。制限給餌後に生じた rebound hyperphagia 時の摂餌量は、22時間絶食後の摂餌量に比し有意に増加し、これに閉所条件を加えると摂餌量はさらに増加した。絶食後の摂餌、rebound hyperphagia, およびそれに閉所条件を加えて摂餌させた時の扁桃体細胞外液中 DA, DOPAC, および HVA 濃度に有意な差は認めなかった。5-HT 濃度は22 時間絶食後の摂餌により基礎値に比し低下したが、rebound hyperphagia およびそれに閉所条件を加えたときの摂餌では有意な変化を示さなかった。5-HIAA 濃度にはいずれの条件下でも有意な差を認めなかった。今回の結果より、扁桃体ドパミンは rebound hyperphagia 及びその閉所条件による増強作用には関与していないものと考えられた。しかし、扁桃体の5-HT は閉所条件の有無にかかわらず rebound hyperphagia に関与している可能性が示唆された。

（はじめに） 我々は、ラットに1日2時間の時間制限給餌を7日間繰り返した後自由摂餌を再開すると rebound hyperphagia となること、そしてこれに閉所条件を加えるとさらに rebound hyperphagia が増強されることを報告してきた[2)3)4)5)6)]。扁桃体は、情報が自分に価値があるかないかのみを即時に判断する部位と考えられている。また、感覚器からの入力を受け、前頭葉皮質とも連絡を有し、この部位のドパミン（DA）はストレスに関与しているとも考えられている[1)]。そこで今回我々は、rebound hyperphagia 及び、これに閉所条件を加えたときの扁桃体における DA 及びセロトニン（5-HT）代謝についてマイクロダイアリシス法を用いて検討を加えた。

（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[5)]。すなわち、Wistar系雌性ラット（12週齢、180-210 g、n=24）に chloral hydrate 麻酔下で Paxinos and Watoson の図譜[7)]に従い guide cannula を扁桃体（AP -2.8mm、L +3.4mm、V -7.5mm from Bregma and dura surface) に挿入し、固定した。ラットを8時- 20時を暗期とする明暗恒常条件下で個別の飼育用アクリルケージ（300 x 300 x 350 mm)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2群には、1日のうち11時から2時間のみ摂餌させる時間制限給餌を7日間にわたって加え、8日目から自由に摂餌させた。測定前日の夜に膜長2 mm のＩ字型透析プローブ（A-I-12-02 Eicom)を挿入し、測定日の10時から11時までの 3,4- dihydroxyphenilacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA), および 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) 濃度をそれぞれの基礎値として前報と同様に測定した[5)]。Dopamine (DA), Serotonin (5-HT) 濃度の測定には別の測定系を用いた（Table 1）。対照群は22時間絶食させた後、閉所条件を加えないで摂餌をさせた（A群）。時間制限給餌をおこなった2群のうち1群は11時より自由に摂餌をさせ（B群)、他の1群は11時に前報[6)]の100 x 150 x 100ｍｍのステンレスグリッドのケージに移し閉所条件を加えてから摂餌をさせた(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, 5-HT, および 5-HIAA 濃度変化の統計学的解析には実験条件と時間を二因子とする二元配置分散分析を行い、有意な差を認めた場合、各時間において一元配置分散分析を行った後、二群の比較に Scheffe's test を用いた。摂餌量の検定には t-test を用いた。

（結果および考察） 自由摂餌開始後の2時間の摂餌量はA 群 5.8 ± 0.6 g, B群 8.8 ± 1.6 g, C群 10.1 ± 0.8 g であり、A 群に比し B,C 群ともに有意に増加し、rebound hyperphagia を認た。また、rebound hyperphagia は閉所条件によりさらに増強した。これはこれまでの報告と一致していた[2)3)4)5)6)]。

扁桃体細胞外液中 DA, DOPAC,および HVA 濃度は、すべての群で摂餌による基礎値からの有意な

変化を認めず、3群間の有意な差も認めなかった(Fig.1)。扁桃体細胞外液中 5-HT 濃度は、基礎値に比しA群で摂餌により有意に低下し、B,C群に比しても有意な差を認めた。B,C群では摂餌による5-HT 濃度の基礎値からの有意な変化を認めなかった。5-HIAA 濃度はすべての群で摂餌による基礎値から有意な変化を認めず、群間の有意な差も認めなかった(Fig. 2)。

扁桃体のDA代謝はストレスに関与しているといわれているが、扁桃体の5-HT 代謝とストレスの関係は不明である。今回の実験では DA, DOPAC, および HVA 濃度はC群とA群で有意な差を認めず、以上の結果より、扁桃体ドパミンは rebound hyperphagia 及びその閉所条件による増強作用には関与していないものと考えられた。しかし、扁桃体の5-HT は閉所条件の有無にかかわらずrebound hyperphagia に関与している可能性が示唆された。

（謝辞）　本研究の一部は平成7年度文部省科学研究費（No. 07770797）の援助を受けた。

Table 1　HPLC System for DA and 5-HT

Apparatus

Electrochemical detector: ECD-100 (Eicom)

Electrode: WE-3G (Eicom)

Column

Eicompak CA-5ODS (Eicom)

Mobile phase

80%　0.1M リン酸緩衝液 PH6.0

20%　メタノール

500 mg/l　オクタンスルホン酸ソーダ

50 mg/l　EDTA

Sampling time　30min x 1.0μl/min

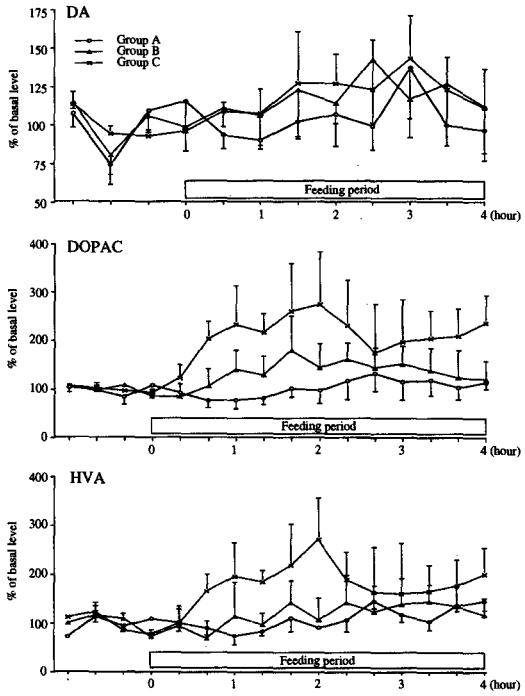


Fig. 1　Changes in extracellular DA, DOPAC, and HVA levels in the rat amygdala during 4 hours of feeding under (C) or not under (B) space restriction during rebound hyperphagia following the time restricted feeding schedule, and 4 hours of feeding following 22 hours of food deprivation (A).

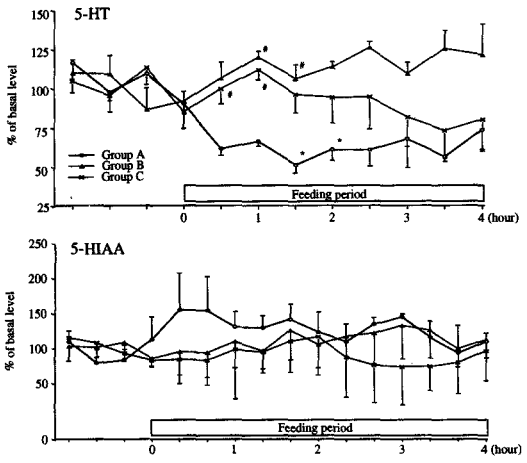


Fig. 2　Changes in extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the rat amygdala during 4 hours of feeding under (C) or not under (B) space restriction during rebound hyperphagia following the time restricted feeding schedule, and 4 hours of feeding following 22 hours of food deprivation (A).
* p<0.05; compared with basal levels.　# p<0.05; compared with Group A

（参考文献）　1) Davis M. et al. (1994) Brain Res. 664, 207-210　2) 藤嵜泰利他 (1995) 神経化学 34, 66-67　3)藤嵜泰利他 (1994) 神経化学33, 406-407　4) 井上幸紀他 (1995) 神経化学34, 64-65　5) 井上幸紀他 (1990) 神経化学29, 256-257　6) 奥野正景他 (1992) 神経化学31, 442-443　7) Paxinos G and Watson C (1986) The Rat Brain, Academic Press.

2 ラットの rebound hyperphagia に閉所ストレスを加えた時の摂餌行動と
2E51 線条体 ドパミン代謝とそれに及ぼすハロペリドールの影響

栗岡政典[1)]、切池信夫[1)]、井上幸紀[1)]、藤嵜泰利[1、2)]、岩崎進一[1)]、山上 榮[1)]
1）大阪市立大・医・神経精神医学教室 2）吉村病院

〔要約〕 ラットに1日2時間の時間制限給餌を7日間加えた後、自由摂餌に戻した後に生じるrebound hyperphagia に閉所条件を加えた時の摂餌行動と線条体（STR）のdopamine(DA)代謝及び、ハロペリドール(HPD)のそれらに対する影響について検討を加えた。22時間の絶食後の摂餌（A群）に比し、ラットの時間制限給餌により生じるrebound hyperphagia の摂餌量（B群）は157%まで増加した。これに閉所ストレスを加える（C群）と、摂餌量は189%まで増加した。細胞外液中DA, DOPAC, HVA濃度においてC群はA群に比し有意に上昇した。各条件において、HPDを0.08, 0.4, 2.0mg/kg量で腹腔内投与すると、0.08mg/kgにおいてはVehicleを投与した時と摂餌量に有意な変化は認めず、0.4mg/kgにおいては各条件下で摂餌量の減少を認めたが、rebound hyperphagiaは観察され、閉所ストレスによるその増強も認めた。2.0mg/kgにおいては各条件下で摂餌量の減少を認め、かつrebound hyperphagiaも観察されなかった。0.4mg/kg投与した各条件下では、細胞外液中DA, DOPAC, HVA濃度は全て有意に上昇した。閉所ストレスにより rebound hyperphagiaは増強され、このときSTRのDA代謝が亢進した。しかしHPDは閉所ストレスのrebound hyperphagia増強に影響を与えなかったという今回の結果より、閉所ストレスによる rebound hyperphagiaの増強作用にSTRのDAが関与し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更にrebound hyperphagia が増強されることを見いだし、これを過食の動物モデルとして検討を重ねてきた[1) 2) 3) 4) 5) 6)]。今回閉所条件下におけるrebound hyperphagia時の摂餌行動と線条体（STR）ドパミン（DA）代謝に対するハロペリドール（HPD）の影響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 実験動物及びマイクロダイアリシス法における外科的処置は前報と同様である[3)]。すなわち、Wistar系雌性ラット（12週齢、180−210g）にchloral hydrate麻酔下でPaxinos and Watson[7)]の図譜に従いguide canulaを線条体（AP+0.5mm、L+3.0mm、V-3.5mm from Bregma and dura surface）に挿入し、固定した。ラットを8時ー20時を暗期とする明暗恒温条件下で個別のアクリルケージ（300×300×350mm）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2群には、1日のうち11時から2時間のみ摂餌させる時間制限給餌を7日間施行し、8日目から自由に摂餌させた。測定日（8日目）に膜長3mmの I 字型透析プローブを挿入しDA、3,4- dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC）、homovanillic acid（HVA）濃度が安定してからの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、22時間絶食させた後、閉所条件を加えないで自由に摂餌させた群（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させた（B群）。他の1群は摂餌前に既報[6)]の100×150×100mm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、自由に摂餌させた（C群）。 更にこれらの各条件下で、Vehicle, HPD（0.08, 0.4, 2.0mg/kg）を腹腔内投与し、摂餌量の変化を観察した。そして、このうち摂餌量が減少し、かつrebound hyperphagiaがみられた0.4mg/kg の濃度において、DA代謝の変化をマイクロダイアリシス法にて調べた。実験期間中、水分摂取は自由に行わせた。

結果および考察 自由摂餌開始後の摂餌量はA群に比べB群は157%、C群は189%と、ともに有意に増加しておりrebound hyperphagiaが確認された。更にC群ではB群に比べても増加しておりrebound hyperphagiaが閉所条件により増強された。STRにおける細胞外液中DA, DOPAC, HVA濃度はC群がA群, B群に比

し有意に上昇した（Fig.1）。HPD 0.08mg/kgを投与した場合、投与しなかった場合に比し各群で摂餌量に差は認めず、この投与量では、rebound hyperphagiaに影響を与えず、また閉所ストレスによるrebound hyperphagiaの増強作用にも影響を及ぼさなかった。HPD 0.4mg/kgを投与した場合、各群において摂餌量は有意に減少したが rebound hyperphagiaは認め、閉所ストレスによるその増強も認めた。HPD2.0mg/kgを投与した場合においては各群において摂餌量は有意に減少しrebound hyperphagiaも認めなかった（Table.1）。HPD 0.4mg/kgを投与した場合の DA, DOPAC, HVA濃度はいずれの群においても基礎値より有意な上昇を認めた。3群間の比較では、C群のDA がA群, B群に比し有意に上昇していたが、DOPAC, HVAは群間に有意な差は認めなかった。閉所ストレスにより rebound hyperphagiaは増強され、このときSTRのDA代謝が亢進した。しかしHPDの閉所ストレスのrebound hyperphagia増強には影響を与えなかったという今回の結果より、閉所ストレスによるrebound hyperphagiaの増強にSTRのDAが関与しないことが示唆された。

Table 1 Food intake (g)

1 Vehicle

group	2hours	4hours	24hours
A	2.51±0.18	4.48±0.48	10.53±0.57
B	5.31±0.22*	7.59±0.10*	13.57±0.74*
C	6.48±0.43*	7.86±0.52*	16.40±1.05*

2 Haloperidole 0.08 mg/kg i.p.

group	2hours	4hours	24hours
A	3.27±0.44	4.73±0.25	11.50±0.32
B	6.51±0.34 *	8.03±0.57 *	13.21±0.67
C	6.36±0.61 *	10.23±0.72 *	15.66±0.68*

3 Haloperidole 0.4 mg/kg i.p.

group	2hours	4hours	24hours
A	1.08±0.50	1.85±0.71	9.64±0.30
B	1.90±0.60	4.67±0.80*	12.37±0.47*
C	2.61±0.74	5.93±1.13*	16.37±1.36*

* $p<0.05$; compared with A group　　Mean±S.E.M

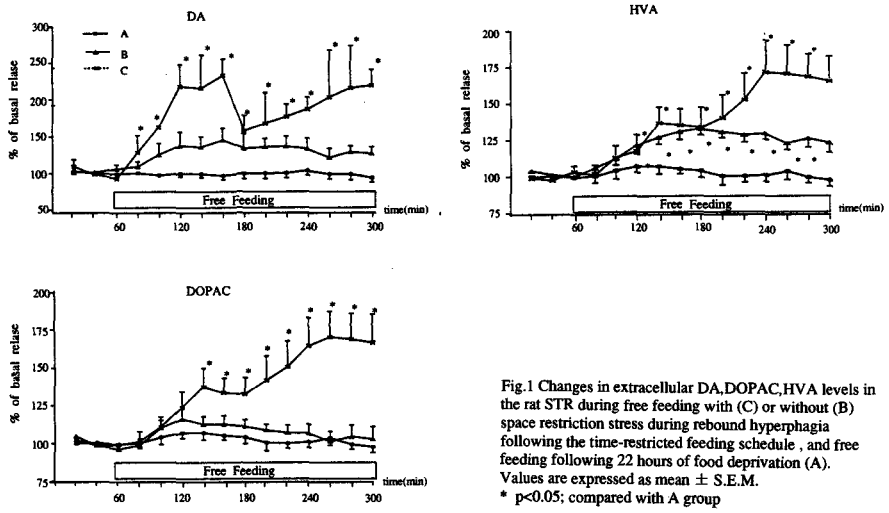


Fig.1 Changes in extracellular DA,DOPAC,HVA levels in the rat STR during free feeding with (C) or without (B) space restriction stress during rebound hyperphagia following the time-restricted feeding schedule , and free feeding following 22 hours of food deprivation (A). Values are expressed as mean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

参考文献

1）藤嵜泰利他（1994）神経化学 33, 406-407. 2）藤嵜泰利他（1995）神経化学 34, 66-67. 3）井上幸紀他（1990）神経化学 29, 256-257. 4）井上幸紀他（1995）神経化学 34, 64-65. 5）伊藤英樹他（1993）神経化学 32, 484-485. 6）奥野正景他（1992）神経化学 31, 442-443 . 7）Paxinos G and Watson C（1986）The Rat Brain, Academic Press.

3 2E52 側坐核ドーパミンニューロン破壊はモティベーションを低下させるか？ Ⅰ．累進比率強化スケジュールによる検討

堀 耕治、田中健一、和田尚子、野村正彦
(埼玉医大・第一生理)

〔 要約 〕

累進比率強化スケジュールを用い、ラット側坐核に6-hydroxydopamine (6-OHDA) を投与することによって、モティベーションに対する側坐核ドーパミン (DA) 系破壊の効果を検討した。6-OHDAを投与されたラットは、ブレークポイントをはじめとする複数の行動指標において、投与前後の比較・統制群との比較の双方で、なんら有意な変化を示さなかった。このことは、側坐核に限局したDA系への干渉が、餌を報酬とする単純なレバー押し事態においては、モティベーションに大きな変化をもたらさないとする報告を支持する。

DA神経系は報酬によるオペラント行動の強化に重要な働きをしていると考えられている (4, 6)。とくに側坐核 (nucleus accumbens) はDA終末領域として重要であり、強化過程への密接な関与を示唆する報告がある (2)。しかし一方で、側坐核DAの選択的枯渇はオペラント行動の反応頻度には大きな影響を及ぼさないとする報告もある (3, 5)。本研究では、報酬刺激の強化価を測定する行動系として標準的に使用される累進比率 (Progressive Ratio; PR) 強化スケジュールを用い、種々の指標から6-OHDA投与による側坐核DAニューロン破壊の効果を検討した。

[方法]

自由摂食時の85%に体重を統制したWistar系ラット (実験開始時12週齢) に対し、強化刺激 (報酬) として餌ペレットを用いて、レバー押し反応のＰＲスケジュール訓練をおこなった。ＰＲスケジュールとは、1回の報酬を得るために要求される反応数が、報酬ごとに累進的に増加していく強化スケジュールである。本実験では要求反応数の初期値・増分ともに5とした。毎日の訓練セッションは初期値から始まり、5分間無反応となった時点で終了した。各セッションで完了した最後の要求反応数 (ブレークポイント) を指標とする行動安定基準を満たした当日、pentobarbital麻酔下で、実験群 (n＝5) には6-OHDA (10μg/μl) を、統制群 (n＝5) にはvehicleのみを両側性に (1 μl/side) 側坐核に投与した。ＰＲ訓練は投与の2日後に再開し、安定基準を満たすまで継続した。投与の3週間後にラットを断頭し、側坐核におけるdopamine (DA)、norepinephrine (NE)、serotonin (5-HT) の含量をHPLC-ECDにて定量した。統計的検定の有意水準は5％とした。

[結果と考察]

安定時のＰＲ遂行の典型例として、代表的な2匹の累積記録をFig. 1に示す。強化後の休止期間 (postreinforcement pause; PRP) を除き、ほぼ一定の反応率でレバーを押すが、要求反応数が増加するにつれて長いPRPが出現するようになり、ついには反応をやめてしまう。このようなパターンはほとんどのラットで共通していた。Fig. 2はブレークーポイント、PRP、継続反応率 (running rate: PRPを除外した、単位時間当たりの反応数) の3つの指標について、処置後の値を処置前の値の相対値として示したものである。群間比較において6-OHDAの効果はいずれの指標でも見られなかった。また群内における投与前後の比較でも有意な変化はなかった。Fig. 3は側坐核におけるDA、NE、5-HTの含量を群間で比較したものである。6-OHDA群のDAのみが有意に減少していた。以上の結果は、餌を報酬とする単純なレバー押し事態においては、側坐核に限局したDA系の破壊はモティベーションに大きな変化をもたらさないとする報告 (3, 5) を支持する。しかしある種の選択行動場面では側坐核DA系が行動の配分に関与することが指摘されており (1)、選択的な行動活性に関連するモティベーションについ

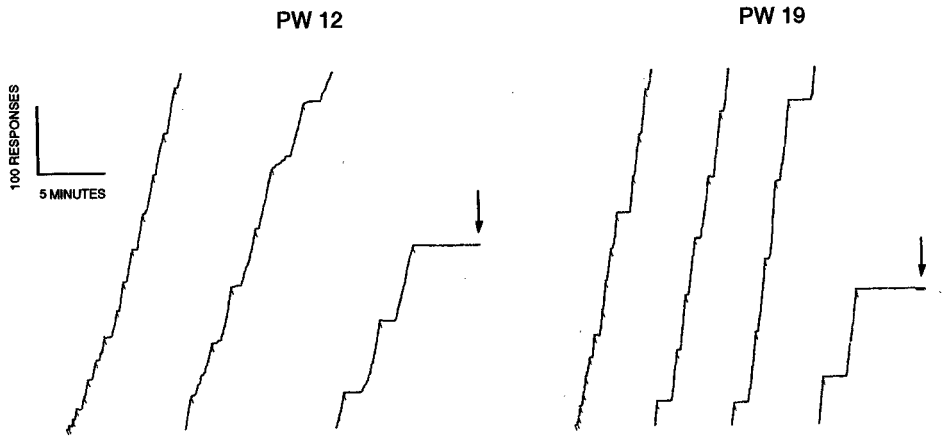


Fig. 1 Sample cumulative records from the final performance of two rats on a progressive ratio schedule. The pips represent food pellet presentations. The break point is defined as the maximum ratio completed before 5 min of no responding (represented by the arrows).

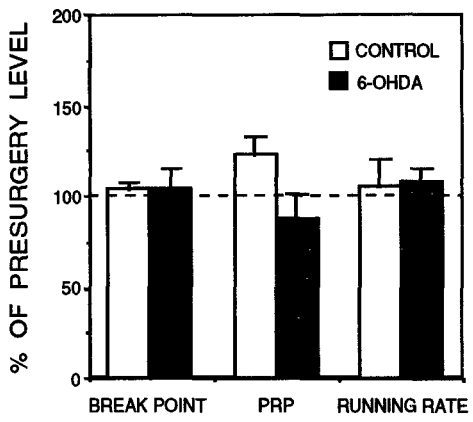


Fig. 2 Changes in break point, postreinforcement pause (PRP), and running rate. Data are expressed as the percentage of presurgery asymptotic levels (represented by the dashed line). There were no significant differences between groups.

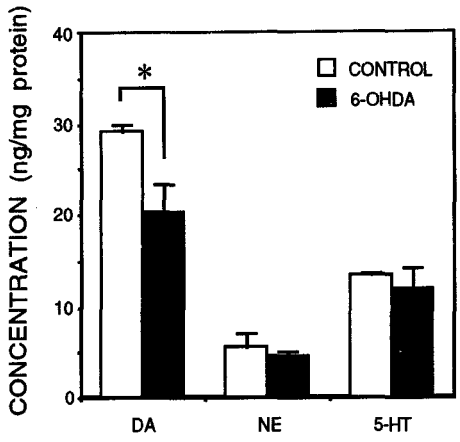


Fig. 3 Effects of 6-OHDA on the concentration of dopamine (DA), norepinephrine (NE), and serotonin (5-HT) in nucleus accumbens. *p < .05

てさらに検討を必要とする。

[文献]

1. Cousins, M. & Salamone, J.D. (1994) Pharmacol. Biochem. Behav., 49, 85-91.
2. Hernandez, L. & Hoebel, B.G. (1988) Physiol. Behav., 44, 599-606.
3. McCullough, L.D. et al. (1993) Pharmacol. Biochem. Behav., 46, 581-586.
4. Pettit, H.O. & Justice, J.B., Jr. (1989) Pharmacol. Biochem. Behav., 34, 899-904.
5. Salamone, J.D. et al. (1995) Pharmacol. Biochem. Behav., 50, 437-443.
6. Wise, R.A. (1982) Behav. Brain Sci., 5, 39-87.

4 片側側坐核 D_1，D_2受容体刺激による turning behaviour の発現と線条体 3Dp3 dopamine 遊離の変化: shell と core の役割の違い

北村牧子，吉田幸弘*，越川憲明，小林雅文
（日本大学歯学部薬理学教室，* 歯科麻酔学教室）

〔 要約 〕

側坐核 D_1，D_2受容体刺激によって起こる turning behaviour と線条体 dopamine （DA）遊離の変化における shell と core の役割について検討を行った。片側の側坐核 shell に SKF 38393 と quinpirole を併用注入することによって，非注入側への turning behaviour が著名に発現したが，core への注入ではその発現は少なかった。Shell への注入で発現した turning behaviour は SCH 323390 または *l*-sulpiride の shell への前投与でそれぞれ拮抗された。SKF 38393 と quinpirole を片側の shell に注入することにより，注入側の線条体腹外側部 DA 遊離は促進されたが，反対側では逆に抑制された。Core への注入では同側の線条体腹外側部 DA 遊離のみが促進され，反対側では変化が認められなかった。以上の結果より，側坐核の shell と core は少なくとも turning behaviour の発現と線条体 DA 遊離において異なった役割を果たしていることが明かとなった。

演者らは，ラットの片側側坐核ドパミン D_1，D_2受容体を共に刺激すると，刺激側とは反対方向へ回転する turning behaviour が発現し，同時に線条体 DA 遊離の左右的不均衡が生ずることを報告した (1)。側坐核は形態学的に少なくとも shell と core とに分けられ，それぞれが別の投射系を持つことが知られている (2, 3) ことから，近年，これらの部位の機能的役割の違いが注目されている。そこで，今回演者らは，側坐核 D_1，D_2受容体刺激によって発現する turning behaviour と線条体 DA 遊離の変化における shell と core の役割の違いについて検討を行った。

[方法]

Wistar 系雄性ラット（約 250 g）を用い，pentobarbital（50 mg/kg i.p.）麻酔下で，Paxinos & Watson のアトラスに従い薬物注入用ガイドカニューレを片側の側坐核 shell（A: 10.6mm，L: 0.5mm，V: 8.0 mm；図1A）または core（A: 10.6 mm，L: 1.2 mm，V: 7.0mm；図1B）に植立した。また，ダイアリシスプローブ用のガイドカニューレは側坐核と同側あるいは反対側の線条体腹外側部（A: 8.6 mm，L: 4.0 mm，V: 3.5 mm；図1C）にそれぞれ植立した。手術 5-7 日後にガイドカニューレを通じて，片側の shell または core に SKF 38393 と quinpirole を併用注入し，非注入側へ向かう 360° の turning behaviour を 5 分毎に 120 分間カウントした。SCH 23390，*l*-sulpiride の注入はアゴニスト注入の 10 分前に行った。薬液の注入量は 0.5 μl とし，40 秒間かけて注入した。線条体腹外側部の DA 遊離の測定には，直管型プローブ（Eicom: 透析膜長 2 mm）を用い，カルシウム濃度を 1.2 mM に調整した Ringer 液を 2 μl/min で灌流した。回収された DA は，25 分毎に HPLC-ECD（Eicom）にて定量し，DA 量が安定した時点（約 4 h 後）で薬物を注入した。各時点の値は注入直前 3 回の DA 量の平均値に対する百分率で示した。使用動物数は1群 6-10 匹とした。

[結果および考察]

片側の側坐核 shell に D_1 受容体アゴニストの SKF 38393 (5 μg) と D_2 受容体アゴニストの quinpirole (10 μg)とを併用注入することによって，非注入側へ向かって回転する turning behaviour が著名に発現したが，core への併用注入ではその発現は少なかった (図 2)。また，それぞれのアゴニストを単独で shell または core へ注入しても，saline の場合と同様に truning behaviour はほとんど発現しなかった。さらに，shell への注入で発現した turning behaviour は D_1受容体アンタゴニストの SCH 323390（0.5 μg）と D_2受容体アンタゴニストの *l*-sulpiride（25 ng）をそれぞれ shell へ前投与することによって拮抗された。これらの結果より，側坐核 DA 刺激誘発 turning behaviour には shell における D_1，D_2受容体が重要な役割を果たしていることが明かとなった。

Turning behaviour の発現機構については，側坐核が関与する locomotion component と線条体が関与する postural asymmetry の二つが必要であるとする two-component 仮説が提唱されている。演者らは既に，片側側坐核 D_1，D_2受容体刺激によって線条体腹外側部の DA 遊離に左右的不均衡が生じ，それによって turning の方向が決定されることを報告している (1, 4)。そこで，この線条体腹外側部 DA 遊離機構において shell と core が異なった役割を果たしているか否かを検討した。その結果，SKF 38393 と quinpirole を片側の shell に併用注入することにより，同側の線条体腹外側部 DA 遊離は促進されたが，反対側では逆に抑制された (図 3A)。一方，core への注入では同側の線条体腹外側部 DA 遊離のみが促進され，反対側ではほとんど変化は認められなかった (図 3B)。この結果は，著明な turning behaviour を発現する shell への注入では，DA 遊離の左右的不均衡も大きいことを示しており，turning の方向の決定に shell の D_1, D_2受容体刺激が重要であることを示唆するものである。この側坐核刺激によって起こる線条体腹外側部 DA 遊離の変化に関与する可能性のある投射路は，Zahm ら (2, 3) の形態学的な研究から，shell－A_8－線条体腹外側部，および core －A_9－線条体腹外側部であることが推測される。反対側への投射に関する形態学的な研究は少ないが，本実験で認められた反対側の線条体腹外側部 DA 遊離に及ぼす効果が shell と core とで異なるという結果は，反対側への投射系にも違いのあることを示唆するものである。

[文献]

(1) Koshikawa et al., (1996) Eur. J. Pharmacol. in press. (2) Zahm and Heimer, (1990) J. Comp. Neurol. 302, 437-446. (3) Zahm and Heimer, (1993) J. Comp. Neurol. 327, 220-232. (4) Koshikawa, (1994) Rev. Neurosci. 5, 331-346

図1A

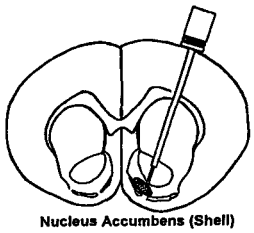


図1B

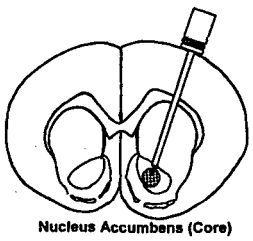


図1C

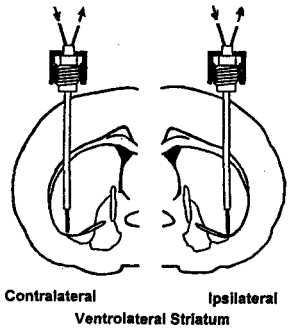


図2

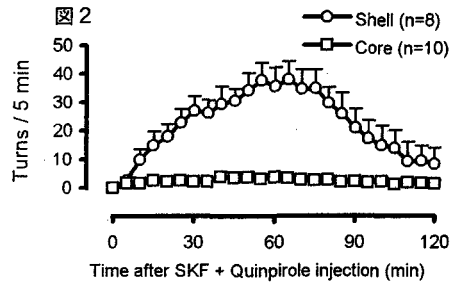


図3A Shell

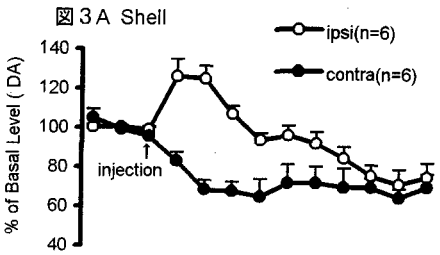
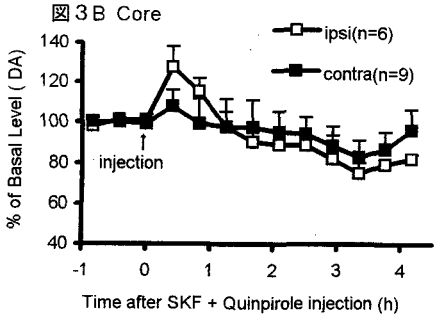


図3B Core



5 3Dp4 ヒスタミン H_1 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおける行動異常とセロトニン遊離亢進について

谷内一彦、孫立智、新村核、井上勲*、渡辺武*、渡邉建彦
（東北大学医学部第一薬理、*九州大学・生体防御医学）

〔要約〕我々はH1受容体の中枢での役割を明らかにするために、H1受容体遺伝子の相同組み替えによるH1受容体ノックアウトマウスを作成し、行動薬理学的な解析をおこない、さらに脳内モノアミン含量と遊離を測定した。3分ごとの自発運動量と立ち上がりの回数を30分間測定したところ、-/-マウスは自発運動量と立ち上がり回数ともに有意に+/+より少なかった。Elevated T-maze testでは-/-マウスは壁のあるT迷路に移るまでの潜時が有意に長かった。ストレスのある環境下では-/-マウスの動きは有意に減少した。Resident-Intruder Aggression testにおいて-/-マウスは+/+より有意に攻撃性が低下していた。受動回避試験、Rotarod試験、明暗分布試験では+/+マウスと-/-マウスはほとんど差がなかった。脳内モノアミン含量の測定では、-/-マウスの大脳皮質・海馬においてドパミンとその代謝物の増加、セロトニン代謝回転率の亢進を認め、さらに遊離試験において-/-マウスはセロトニンの遊離が亢進していた。

［はじめに］

中枢神経系においてヒスタミンは神経伝達物質として、睡眠・覚醒、自発運動量、食欲の制御、情動、体温調節、神経内分泌などに密接に関係している。このようなヒスタミンの作用は3種類のH1、H2、H3受容体を介しておこることが知られている。3種類のヒスタミン受容体のうちH1受容体はもっともよくその性質が研究されている。我々はH1受容体の中枢での役割を明らかにするために、H1受容体遺伝子の相同組み替えによるH1受容体ノックアウトマウスを作成し、1）［^{3}H］ピリラミンと［^{3}H］ドキセピンのマウス脳への結合を調べ、2）行動薬理学的な解析をおこない、さらに3）脳内モノアミン含量の測定および遊離を測定した。

［実験方法］

1）［^{3}H］ピリラミンと［^{3}H］ドキセピンのマウス脳への結合

既知の方法により+/+と-/-マウス脳の膜分画を作製し、［^{3}H］ピリラミン（Amersham）と［^{3}H］ドキセピン（［^{3}H］CH_3Iを用いて合成）の結合を調べた。さらに［^{3}H］ピリラミンを用いて受容体オートラジオグラフィーをおこなった。

2）行動薬理学的解析

BTA-1を用いて3分ごとの自発運動量と立ち上がりの回数をオープンフィールドにて30分間測定した。さらに受動回避試験、Rotarod試験、Elevated T-maze test、Resident-Intruder Aggression test、明暗分布試験で+/+マウスを対照としてと-/-マウスの行動を評価し比較した。

3）カテコールアミン測定

脳を細分して酸抽出したサンプルにてHPLC-ECD法により、脳内モノアミン含量の測定をおこなった。さらに脳切片を用いたモノアミンの遊離を測定した。30mMのhigh Kを用いて30分間刺激し（S1）、45分後にもう一度30分間刺激し（S2）、S2/S1の比にて遊離を測定した。

［結果］

1）［^{3}H］ピリラミンと［^{3}H］ドキセピンのマウス脳への結合

+/+マウスの脳への［^{3}H］ピリラミン(Amersham)の結合はsingle bindingで、-/-マウスの脳への特異的結合はほとんど消失した。+/+マウスの脳への［^{3}H］ドキセピンの結合は高親和性と低親和性結合の2-site bindingで、-/-マウスの脳への結合は高親和性結合のみが消失した。さらに［^{3}H］ピリラミンを用いて受容体オートラジオグラフィーでは、+/-の結合量は+/+の約半分で、-/-では結合量がほとんど消失した。マウス脳でのＨ１受容体は、大脳、小脳、扁桃体、視床下部に多くの特異的な分布があった。

2）行動薬理学的解析

ＢＴＡ－１を用いて３分ごとの自発運動量と立ち上がりの回数を３０分間測定したところ、-/-マウスは自発運動量と立ち上がり回数ともに有意に+/+より少なかった。 Elevated T-maze test では-/-マウスは壁のあるＴ迷路に移るまでの潜時が有意に長かった。新規環境下で-/-マウスの動き有意に減少し、ストレスに対して異常に反応する。Resident-Intruder Aggression testにおいて-/-マウスは+/+より有意に攻撃性が低下していた。受動回避試験、Rotarod試験、明暗分布試験では+/+マウスと-/-マウスはほとんど差がなかった。H1ノック・アウトマウスで得られた知見は薬理学的方法で得られてきたH1受容体の役割に関する研究成果とかなり一致している。

3）脳内モノアミン測定・スライスにおけるモノアミン遊離

行動に異常が見られたために、脳内モノアミン含量を測定したところ、-/-マウスにおいてドパミン、DOPAC、HVAの有意な増加、セロトニン代謝回転（HIAA/5-HT）の増加が大脳皮質、海馬にて観察された。脳スライスによるカテコールアミン・セロトニン遊離試験においもセロトニンの遊離亢進が認められ、-/-マウスにおいてセロトニン・ニューロンの活性化がおこっていることが推察された。

［まとめ］

-/-マウスにおいて表１に示すような特異的行動異常を現在認めている。即ち、日内リズムの異常、新規環境における探索行動の減少、攻撃性の減弱である。またH1受容体を介する神経伝達が阻害されることにより、他のアミン系にも異常が認められるようになり、-/-マウスにてセロトニン遊離の増加が認められている。セロトニンニューロンの神経伝達の増加は攻撃性を減少させることが知られており、-/-マウスの行動異常の一部はこのような他のニューロン系を介して起きていると推察される。

表1. ヒスタミンH1受容体遺伝子ノックアウト・マウスの特徴

野生型との違い	予想されるヒスタミンＨ１受容体の生理的意義
新規環境における探索行動の減少	情動・意欲
昼間における移所連動の増加	概日リズムの維持
夜間における移所連動の減少	覚醒アミン
侵入者への攻撃の低下	攻撃性・ストレス・意欲
痙攣持続時間の延長	痙攣抑止
排便、排尿回数の減少	情動・ストレス
高架式迷路試験での潜時の延長	学習、動機づけ、意欲
セロトニン遊離亢進	セロトニン神経の抑制

6 精神分裂病患者赤血球における膜リン脂質に関する研究

1Ba2

中島 央、安川節子、中林 潤、上田啓司*、高松淳一**、宮川太平
熊本大学医学部神経精神科、宮崎県立富養園*、国立療養所菊地病院**

〔要約〕
未服薬精神分裂病患者を対象に、赤血球膜リン脂質クラス組成、分子種組成分析し、正常対照群との比較検討をおこない、(1)赤血球膜リン脂質クラス組成で、有意のホスファチジルコリン（PC）の低下（$p<0.05$）、スフィンゴミエリン（SM）の増加（$p<0.01$）、PC/SM 比の低下、(2)ジアシル型PCの分子種組成で、有意の不飽和脂肪酸を含む分子種（16:0/20:4,16:0/18:2,18:1/18:2）の低下（$p<0.01$）、不飽和脂肪酸を含まない分子種（16:0/16:0,16:0/18:0）の増加（$p<0.001$）、(3)PC組成比およびPC/SM 比と、不飽和脂肪酸を含む分子種組成比との間の正の相関傾向、不飽和脂肪酸を含まない分子種組成比との間の負の相関傾向、をそれぞれみいだした。このような変化は、赤血球膜の動的構造に変化を与え、変形能の低下などを通して微小循環障害の面から分裂病の病態生理に関与している可能性があり、赤血球膜が全身の形質膜を反映しているとするならば、神経細胞膜機能に何らかの変調をきたすものと考えられる。

[はじめに]

近年、精神分裂病の病態で、細胞膜機能の異常が注目されている。一方、細胞膜構成リン脂質は、膜の動的機能を維持する上で重要な役割を持つ。これまでに、分裂病患者赤血球膜、血小板、死後脳において、リン脂質クラス組成の異常、脂質構成脂肪酸組成の異常が報告されている[1, 2, 3, 4]。今回我々は、未服薬の患者赤血球膜をモデルとして、膜リン脂質クラス組成に加えて、側鎖脂肪酸による分子種組成も併せて検討し、分裂病の病態生理への関与について考察を加えた。

[対象と方法]

未服薬分裂病群（男性10名、女性10名、平均25.3±8.3歳）、正常対照群（男性10名、女性10名、平均26.2±3.1歳）を対象に、肘静脈から採血、洗浄赤血球（50%-Ht）を作製し、クロロホルム、イソプロパノールにて膜脂質を抽出した。抽出脂質は薄層クロマトグラフィー（TLC）にて分離、スポットをかきとり灰化後リンを定量し、各リン脂質（PC; phosphatidylcholine, PS; phosphatidylserine, PE; phosphatidylethanolamine, SM; sphingomyelin）のモル比を算出し、クラス組成とした。抽出脂質は一方で分取用TLC にて分離し、PCを抽出、phspholipase C反応、ベンゾイル誘導体化後、TLC にて、サブクラス分離、ジアシル型を分取し分子種分析の試料とした。試料は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分析し、分子種組成を得た。

[結果]

リン脂質クラス組成の結果をTable 1 に示す。分裂病群でPCの低下、SM の増加、PC/SM 比の低下を有意に認めた（student T-test）。ジアシル型 PC の分子種分析では（Table 2)、16:0/20:4、18:1/18:2、16:0/18:2 の分子種の減少、16:0/16:0、18:0/16:0 の分子種の増加を有意に認めた。PC、PC/SM 比と分子種組成との相関をとると（Table 3）、18:2、20:4 といった不飽和脂肪酸を含む分子種と正の相関をとり、不飽和脂肪酸を含まない分子種と負の相関をとる傾向があった。

[考察]

未服薬分裂病群で、上記のように赤血球膜リン脂質クラス組成および構成脂肪酸組成の異常を認め、これは

従来の報告と一致する。さらに本報告では、分子種分析により、両者の間に関連性をみいだすことができた。具体的には、PC組成の減少は、不飽和脂肪酸を含む分子種組成の減少、不飽和脂肪酸を含まない分子種組成の増加を伴うことが確認された。従ってこの背景には、その変化の特徴から、膜に対する過酸化ストレスなど何らかの膜障害機序が関与している可能性がある。PC/SM比の減少、および不飽和脂肪酸の減少、飽和脂肪酸の増加は膜の流動性を低下させ、rigidity を高め[5]、膜機能の異常をもたらすと考えられる。既に我々は分裂病患者赤血球で変形能の低下を報告しており[6]、この異常が、最近いわれているような分裂病患者における微小循環障害[7]に直接つながっている可能性がある。最近、MRSを用いた検索で、分裂病患者脳内でのリン脂質代謝異常が報告されている[8]。このことを考えあわせると、このような所見は、赤血球膜だけではなく脳内でも存在し、膜の動的機能の異常を通じて、神経細胞機能に大きな影響をおよぼしている可能性もある。

[文献]

1. Hitzemann R et al (1984) J psychiat Res 18, 319-26 2. Keshavan MS et al (1993) Psychiat Res 49, 89-95 3. Fischer S et al (1992) Biochem Pharmacol 44, 317-23 4. Horrobin DF et al (1991) Biol Psychiatry 30, 795-805 5. 鎌田哲郎ら(1991) 臨床病理 特91, 59-73 6. Nakashima H et al, in press 7. Takei M (1989) Biol Psychiatry 25, 110-114 8. Keshavan M et al (1990) Psychiatry: A world perspective - Vol 2, 156-159

リン脂質クラス	対照	分裂病	p
SM (%)	26.0±1.6	27.5±2.0	p<0.05
PC (%)	29.1±1.9	27.5±2.2	p<0.05
PS (%)	15.3±1.3	15.7±1.4	
PE (%)	29.6±1.0	29.2±1.1	
PC/SM	1.13±0.14	1.01±0.14	p<0.01
PC/PE	0.98±0.09	0.94±0.09	

Table 1; 膜リン脂質クラス組成 mean (%)±SD

分子種	PC	PC/SM
16:0/20:5	0.12	0.03
16:0/22:6	0.26	0.33
18:1/20:4	0.47 *	0.40 *
16:0/20:4	0.44 *	0.39
18:1/18:2	0.44 *	0.30
18:0/22:6	0.48 *	0.54 *
16:0/18:2	0.46 *	0.42 *
16:0/20:3	-0.22	0.00
18:0/20:4	0.51 *	0.39
18:1/18:1	0.36	0.18
16:0/18:1 +18:0/18:2	0.05	-0.08
16:0/16:0	-0.55 *	-0.45 *
18:0/18:1	-0.13	-0.23
18:0/16:0	-0.58 *	-0.55 *

Table 3; 各分子種との相関係数

分子種	対照	分裂病	p
18:2/20:4	0.16±0.05	0.15±0.11	
16:0/20:5	1.09±0.69	0.88±0.63	
16:0/22:6	4.31±0.60	3.61±1.11	
18:1/22:5	0.29±0.05	0.24±0.13	
18:1/20:4	0.90±0.18	0.69±0.41	
16:0/20:4	5.24±0.70	4.09±1.57	p<0.05
18:0/22:5	0.63±0.23	0.47±0.30	
18:1/18:2	2.49±0.36	1.81±0.57	p<0.01
18:0/22:6	0.99±0.11	0.88±0.28	
16:0/18:2	28.73±2.15	24.57±3.91	p<0.01
16:0/20:3	2.88±0.24	4.15±2.75	
18:0/20:4	2.97±0.28	2.66±0.85	
18:1/18:1	1.32±0.13	1.19±0.52	
16:0/18:1 +18:0/18:2	33.11±1.16	34.13±2.64	
16:0/16:0	6.18±1.01	10.86±4.73	p<0.01
20:0/20:4	0.37±0.05	0.43±0.25	
18:0/18:1	5.29±0.53	4.89±1.38	
18:0/16:0	1.98±0.34	3.04±1.43	p<0.05

Table 2; diacyl-PC 分子種組成 mean (%)±SD

7 1E16 精神分裂病者から得られた Epstein-Barr Virus 転換 Bリンパ球におけるcAMP 応答性の検討

夏 苅 直 己、R.J. Wyatt*, J.M.Masserano*
（浜松医大第二生化学、*NIMH Neuroscience Center）

〔 要約 〕

Epstein-Barr Virus 転換ヒトBリンパ球において、cAMPの応答性を情報伝達路の各ステップで検討し、これを精神分裂病者および正常者から得た細胞系で比較した。アデニル酸シクラーゼを活性化するフォルスコリン刺激に対するcAMP の応答性は、分裂病者から得た細胞系では正常者群に較べて有意に昂進していた。レセプター（イソプロテレノール、プロスタグランジンE1）刺激、G蛋白質刺激（コレラ毒素）では、有意さは認められなかった。プロテインキナーゼC(PKC)の活性化剤であるフォルボールエステルPMAで細胞を前処理したところ、各レベルの刺激ともシクラーゼ活性は高まっていた。このうち、（フォルスコリン＋PMA）刺激においてのみ、分裂病群でcAMP生成の有意な昂進を認めた。さらに、リンパ球表面マーカー（CDマーカー）の発現の割合を調べたところ、cAMPの応答性はCDマーカーのうちのいくつかの活性化指標と相関している可能性が示された。

精神分裂病において、cAMP生成系を中心とした情報伝達系の異常を示唆する報告が少なからずある。分裂病死後脳尾状核におけるドーパミンD1刺激時のアデニル酸シクラーゼ活性の昂進 (1)、分裂病死後脳海馬における ^{3}H-フォルスコリン結合の促進(2), 左側頭葉の ^{3}H-cAMP 結合の上昇 (3)、抑制性G蛋白質の減少(4) 等々である。また、リンパ球の^{3}H-スピペロン結合は中枢のそれを反映するとする見解もある(5)。今回我々は、Epstein-Barr Virus 転換ヒトBリンパ球を用いてcAMP の応答性を検討し、これを精神分裂病者から得た細胞系と正常者から得た細胞系とで比較した。PKCの影響やリンパ球CDマーカー発現との関連も検討したので報告する。

[方法]

精神分裂病群(n=9, 36.9±3.1 yo, 3 males & 6 females)、および、正常者群(n=8, 30.0±3.0 yo, 3 males & 5 females) から得たリンパ球を、Epstein-Barr Virus で不死化させた培養細胞系を用いた。フォルボールエステルPMA(10nM)の存在、非存在下で細胞を37 ℃ ,1 時間前処理し、10 μMイソプロテレノール、10 μMプロスタグランジンE1、10 μg/mlコレラ毒素、20 μM フォルスコリンで細胞を5分間（レセプター）ないし 20分間（FK & CT）インキュベート後、細胞内cAMPレベルをラジオイムノアッセイ法で測定した(6)。24種のリンパ球CDマーカーはフローサイトメトリー法で測定した。

[結果]

PMAの有無における、イソプロテレノール、PGE1、コレラ毒素、フォルスコリン刺激に対するcAMPの応答性を図1に示した。各レベルの刺激ともアデニル酸シクラーゼ活性はPMA前処理によって高まった。この反応性を正常者群と分裂病群で比較したところ、フォルスコリン刺激および（フォルスコリン＋PMA）刺激においてのみ、分裂病群で有意なcAMP生成の昂進を認めた（ANOVA, $p<0.05$ Turkey post hoc test）（図2)。多変量重回帰分析の結果、フォルスコリン刺激時の log cAMP レベルはリンパ球表面マーカーのうち、いくつかの活性化の指標が発現する割合(%CD)の一次関数として、次のように表示された。

1000 Log[cAMP]= -9.71(%CD38)-4.03(%CD11c)-18.3(%CD25)-6(%CD69)
+25.8(%HLA-DR)+8.03(%CD22)+5.37(%CD71)-78.2　　式(1)

ここに、相関係数 R=1.00 ($p<0.01$, n=10: 分裂病 n=5, 正常者 n=5) である。

[考察]

フォルスコリン刺激時のcAMP生成が精神分裂病において昂進していることは、アデニル酸シクラーゼの発現ないし活性がこの疾患において高まっていることを示唆している。本結果を含めて、精神分裂病の情報伝達系についてのこれまでの報告は、cAMP生成系の昂進を示唆するものが多い (1-5)。精神分裂病では、脳のある特定の部位で cAMPの反応性が高まっている可能性がある。PKC存在下では、さらにcAMP産生は増すと考えられる。現在まで8種のアデニル酸シクラーゼと多くのPKCアイソザイムが報告されている。中枢と抹消組織とでは、これらのアイソフォームの組み合わせとcAMP系への作用は異なると推察されるが、詳細は明らかではない。式(1)において、cAMPレベルに最も大きな有意差を与える因子は HLA-DRとCD22 (B リンパ球 cell adhesion molecule)である。この他、CD25 (IL-2), CD71 (transferrin receptor) も分裂病との関連が示唆されている。こうしたリンパ球の活性化因子と情報伝達系との関連は、分裂病の自己免疫説、ウイルス感染説との関連を考える上で興味深い。

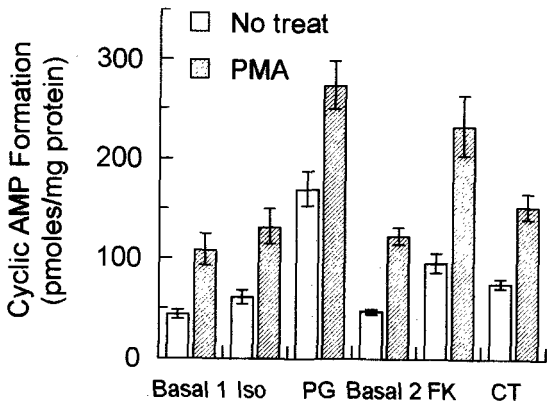


図1 さまざまな刺激に対するcAMPの応答
PMA処理後、Isoproterenol(Iso), PGE1(PG), forskolin(FK), chorela toxin(CT)でインキュベートした。薬品の効果はすべて有意。
$p<0.01$ dependent t-test n=13-17 cell lines

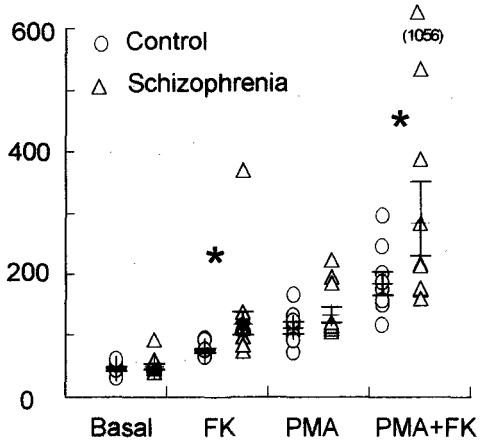


図2 分裂病群と正常群におけるフォルスコリン刺激によるcAMPの応答とPMAの効果 *: $p<0.05$ Turkey post hoc test

[文献]

1) Memo M, Kleinman JE, Hanbauer I (1983) Science 221: 1304-1307.
2) Kerwin RW, Beats BC (1990) Neurosci Lett 118: 164-168.
3) Nishino N, Kitamura N *et al.*(1993) Brain Res 615: 41-49.
4) Okada F, Crow TJ, Roberts GW (1991) J Neural Trans Gen Sect 84: 147-153.
5) Bondy B, Ackenheil M (1987) J Psychiat Res 21: 521-529.
6) Natsukari N, Kulaga H, Baker I, Wyatt RJ, Masserano JM (1996) Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 20: 99-108.

8 1E17 悪性症候群の病態に基づいた動物モデルの開発とＴＲＥ及びＣＲＥへの結合能の変化

谷井久志、谷口典男、浅沼幹人*、小川紀雄*、西村　健**、武田雅俊
大阪大学医学部精神医学教室、**甲子園大学栄養学部
*岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門

〔 要約 〕

我々は悪性症候群発症における併用薬剤や環境因子の関与に注目し、高温下での動物実験を試みた。ハロペリドールとアトロピン（抗コリン作用薬）を投与した上で、高温暴露（35℃）を行ったＮＺＷラビットにおいて、高体温・血清ＣＰＫ上昇・筋電図における振幅の増加を認めた。また、悪性症候群の代表的治療薬であるダントロレンを投与したところ、体温上昇・血清ＣＰＫ上昇・筋電図による振幅の増加のいずれについても、容量依存的に抑制された。

更に、この実験系において中枢神経細胞の核蛋白を抽出し、ＥＭＳＡ(Electrophoretic Mobility-Shift Assay)を用い、転写制御因子関連蛋白の動態についての検討も行った。今回は、AP-1とDNAの結合性を示すＴＲＥオリゴヌクレオチドプローブやＣＲＥプローブに対する結合性を検討した。悪性症候群の病態を呈した実験動物脳の視床下部および線条体において、ＴＲＥやＣＲＥに対する結合性が増加していることが認められ、ダントロレンを投与した場合にはこの結合性の増加が抑制されていた。これらの結果は、悪性症候群においては、中枢神経系（特に視床下部と線条体）における抗精神病薬の（ドーパミン遮断作用など）薬理作用が増強していることを示唆すると共に、ダントロレンが中枢性にも薬理作用を有することで、悪性症候群の病態を改善している可能性があることを示している。

抗精神病薬の治療中に稀に生じ、致死的な副作用として知られる悪性症候群は、高体温と共に錐体外路症状を伴う全身性の筋強剛、ＣＰＫ上昇、頻脈・不安定な高血圧などの自律神経失調症状を特徴とする。悪性症候群は遺伝性が認められず、同一薬剤を異なる病期に再投与した場合の再発も少ない。そのためその病態は不明な点が多く、動物モデルの開発はこの疾患の病態を理解するために重要である。悪性症候群発症の危険因子の中には、精神的興奮・疲弊状態・脱水などの個体の条件や、高環境温などの環境因子が含まれる。実験計画としては、臨床的に観察される病態を実験動物において再現することを目標とした。まず、悪性症候群患者の臨床的観察から、特徴的な生物学的パラメータを抽出した。神経遮断薬の使用、高体温、血清ＣＰＫ値の上昇、筋強剛などの錐体外路症状である。これらを満足するような実験動物の作成を試みた。また、悪性症候群は解熱剤が無効、末梢の血流・皮膚温度の上昇などの特徴がある。この点で、悪性症候群が体温のセットポイントの変化のない Forced Hyperthermiaの一種であると考えられる。そこで、Heat Stressを動物に与える実験系を考案した。

〔実験方法〕

実験動物：雄性のＮＺＷラビット（体重2.5-4.5Kg）を用いた。

体温変化、血清ＣＰＫ、筋電図の測定：体温変化についてはラビットの直腸内に留置した銅・コンスタンタン熱電対のプローブによるデジタル温度計にて測定した。ラビット耳静脈からの採血により血清ＣＰＫ値をＮＡＤＰＨ－ＵＶ法にて定量した。また、筋電図計の電極を大腿二頭筋に装着し、筋電図を記録することにより筋強剛の評価を行った。

投与薬剤：常温下（24℃）において、ハロペリドール:HPD(1mg/kg)投与した。その上でアトロピンなど各種薬剤を併用投与するとともに、対照コントロールとしてハロペリドール溶液のSolvent(0.2ml/kg)を用いた。

高温暴露：新生児用インキュベータ（35℃に加温）を用いた。暴露直前にHPD(1mg/kg)を投与した。また、アトロピンなど各種薬剤の併用投与も行った。

図１．本モデル動物における筋電図変化
薬剤投与（高温暴露）１５分前（Ａ）、
１時間後（Ｂ）、３時間後（Ｃ）

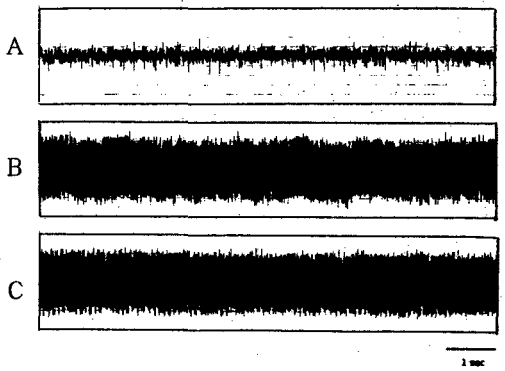
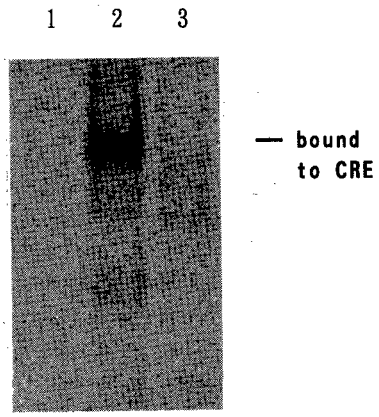


図２．線条体におけるCRE結合活性の変化
(1:Control, 2:Exp, 3:Exp+Dan)



ＥＭＳＡ：ラビット脳の（視索前野を含む）視床下部内側部、外側部、線条体、（黒質を含む）中脳腹側部から神経細胞核蛋白をSchreiberらの方法(1)により抽出した。AP-1•DNA結合性を示すＴＲＥオリゴヌクレオチドプローブやＣＲＥプローブに対する結合性を検討した。細胞核抽出液を標識ＤＮＡプローブと室温で２０分間反応させた後、ＤＮＡ-蛋白複合体と遊離プローブを４％ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、泳動後にゲルを乾燥させた。ゲルの放射能活性をオートラジオグラフィー法で検出した。

〔結果〕

常温下（24℃）：HPD(1mg/kg)を投与したラビットでは、同一容量のSolvent(0.2ml/kg)投与に比較して有為なＣＰＫ上昇が得られた。体温変化は見られなかった。

高温下（35℃）：HPD(1mg/kg)投与で、平均2.3℃の体温上昇および、有意なＣＰＫ上昇が認められた。抗コリン作用薬のアトロピンを投与した場合、容量に応じた有意な体温上昇が認められたが、ＣＰＫの上昇はなかった。HPD（1mg/kg）とアトロピン（0.4mg/kg）を併用投与した場合は、体温上昇およびＣＰＫ上昇が顕著に認められた。また筋電図において顕著な振幅増加が認められ、筋強剛の存在が示された(3)（図１）。

悪性症候群の病態を示す実験動物脳の視床下部および線条体において、ＴＲＥやＣＲＥに対する結合性が増加していることが認められ、ダントロレンを投与した場合にはこの結合性の増加が抑制されていた。一例として、線条体におけるＣＲＥ結合活性の変化を図２に示す（Exp:悪性症候群の病態を示す実験動物、Dan:ダントロレン）。

〔考察〕

最近クロザピン投与時の悪性症候群が報告されており、抗コリン作用の関与が推定されている(4)。また悪性症候群の危険因子としての高環境温も指摘されている(2)。本研究においては、ハロペリドール投与下で、抗コリン薬および高温負荷が互いに相互作用して、体温上昇・ＣＰＫ上昇・筋電図上での振幅増加が増強していることが示された。このことは、悪性症候群の発症において、併用薬剤や環境条件が関与している事を示唆している。

ＥＭＳＡの結果は、悪性症候群の病態においては、中枢神経系における抗精神病薬の薬理作用が増強していることを示唆している。視床下部に対する作用が体温上昇に、線条体に対する作用が筋強剛やＣＰＫ上昇につながることが推測される。また、ダントロレンが中枢神経系にも薬理作用を有することで、悪性症候群の病態を改善している可能性があることをも示している。

〔文献〕

(1) Schreiber, E., et al. (1989) Nucleic Acids Res 17, 6419
(2) Shalev, A., et al. (1988) Am J Psychiatry 145, 110-111
(3) Wand, P., et al. (1973) Eur J Pharmacology 24, 189-193
(4) Nemecek, D., et al. (1993) Am J Psychiatry 150, 1561

9 1E18 抗精神病薬の投与によって誘導されるFosおよびJun関連蛋白質の形態学的変化

尾崎 宜洋、勝元 栄一、横谷 昇*、撫井 弘二、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]
Haloperidol (HP)、(-)-Sulpiride (SP)、選択的D1 receptor作動薬SKF38393および選択的D1 receptor遮断薬SCH23390の投与によってマウス脳内において脳内転写因子AP-1のDNAへの結合能が高まることを示し、Western blotting法によりHP、SPおよびSKF38393によって誘導されるAP-1とSCH23390によって誘導されるAP-1との間には、構成成分に違いがあるのではと推測した(2)。さらに我々は、これら4種類の薬物を投与したときのマウス脳内におけるFosおよびJun関連蛋白質の違いを免疫組織学的に検討したところ、HP、SPおよびSKF38393においては、Fos、Fos B、fra-1、Junおよび JunDが発現し、SCH23390においては、Fos B、fra-1およびJunDが発現することを見いだした。また、これらの抗体と核蛋白抽出液を反応させた後AP-1のDNA結合能を調べるとFos、fra-1およびJunに関してはDNAの結合部位に関与していることが示唆され、Fos BおよびJunDについては結合部位に関与していないことが推測された。

[目的]
脳内転写因子Activator protein 1 (AP-1)は、FosおよびJun関連蛋白質から構成されている(1)。我々は、HP、SP、SCH23390およびSKF38393をマウスに投与したとき、脳内においてFos関連蛋白質(Fos, Fos B, fra-1およびfra-2)、Jun関連蛋白質(Jun, Jun Bおよび JunD)がどのように発現しているか免疫組織学的に検討し、さらにこれら関連蛋白質とDNA結合部位との位置関係についてsuper gel retardation assay法にて検討したので報告する。

[方法]
1 免疫組織化学
HP (1 mg/kg)、SP (20 mg/kg)、SCH23390 (1 mg/kg)およびSKF38393 (1 mg/kg)をそれぞれddYマウスの腹腔内に注射し、2時間後に十分エーテル麻酔した後、脳を直ちに取り出しOCTコンパウンドにて包埋した後シランコーティングしたスライドガラスに張り付け、4 %paraformaldehyde−0.1M phosphate buffer (pH 7.4)中で20分間浸漬し固定した。0.01M phosphate buffer saline (pH 7.4)にて洗浄し、Fosおよび Jun関連蛋白質に対する抗体を1次抗体として48時間反応させた後、ABC法を行い、DABにて発色させた。
2 Super gel retardation assay
投与2時間後にddYマウス脳内よりSchreiber(3)らの方法により抽出した核蛋白抽出液(5 μg蛋白質)に1 μg poly(dI-dC)、5mM $MgCl_2$、2.5mM EDTA、2.5mM DTT、250mM NaClおよび20% グリセロールを含む50mMTris-HCl buffer(pH 7.5) 4 μlおよび2 μgのFosおよびJun関連蛋白質に対する抗体を加え、4℃で24時間反応させた後、AP-1 probe (5`-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3`)($1x10^4$ cpm)を加え常温で20分間反応させた。4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(150 V、2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。

[結果]
1) Fos: HPおよびSPの注射によって、それぞれ対照群と比較して、海馬(Fig.3)、側坐核、梨状葉、線状体、扁桃核および側脳室中隔核において免疫陽性細胞数の増加が見られた。SKF38393の注射では、側坐核、梨状葉、線状体および側脳室中隔核においてHPやSP同様の免疫陽性細胞数の増加が見られ、さらに海馬のCA2およびCA3領域と扁桃核においてはHPとSPよりも免疫陽性細胞数の増加が見られた。SCH23390の注射によっては、対照群と比較しても有意な差はなかった。2) Fos B: 4種類の薬物ともに対照群と比較して、海馬(Fig.4)、側坐核、梨状葉、線状体、扁桃核および側脳室中隔核において免疫陽性細胞数の増加が見られた。3) fra-1およびJun: HP、SPおよびSKF38393の注射によって、fra-1とJunともにFos同様の領域で免疫陽性細胞数の増加が見られた。SCH23390の注射では、fra-1についてはFos同様の領域で免疫陽性細胞の増加が見られたが、Junについては対照群と比較して有意差はなかった。4) Jun D: 4種類の薬物ともに対照群と比較して、海馬、側坐核、梨状葉、線状体、扁桃核および側脳室中隔核において免疫陽性細胞数の増加が見られた。Super gel retardation assayの結果より、HP、SPおよびSKF38393の注射後精製した核蛋白抽出液に、抗Fos、fra-1およびJun抗体

を加えたときには、AP-1 の DNA 結合を示すバンドは認められず、抗 FosB および JunD 抗体を加えたときには移動度の異なるバンドが認められた(Fig.1)。SCH23390 の注射後では、抗 Fos および Jun 抗体を加えたときには、これら抗体を加えない場合と同様のバンドが見られ、抗 fra-1 抗体を加えたときは、バンドが見られなかった。また、抗 FosB および JunD 抗体を加えたときは、移動度の異なるバンドが見られた(Fig.2)。

［考察］

HP、SP および SKF38393 の注射によって、Fos、FosB、fra-1、Jun および JunD の誘導が起こり、さらにそれらが AP-1 を構成し DNA に結合したものと推測される。また、gel retardation assay の結果より、Fos、fra-1 および Jun は DNA の結合部位に関与し、FosB および JunD は関与しないことが推測できる。発現部位については、海馬などが辺縁系に当たることより、抗精神病薬の作用部位および作用の違いが推定できるのではと考えられる。他方、SCH23390 の結果より Dopamine D1 receptor と D2 receptor とでは発現蛋白質の相違があることから、誘導される遺伝子も異なるのではないかと推測される。



Fig.1　1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Fig.1 Autoradiogram of the AP-1 DNA binding activity in ddY mouse brain injected with haloperidol(1mg/kg). (Lane 1,3,5,7 and 9 : nuclear extract without antibody. Lane 2,4,6,8 and 10 : nuclear extract with antibody. 2: Fos, 4: FosB,6: fra-1, 8:Jun and 10: JunD)

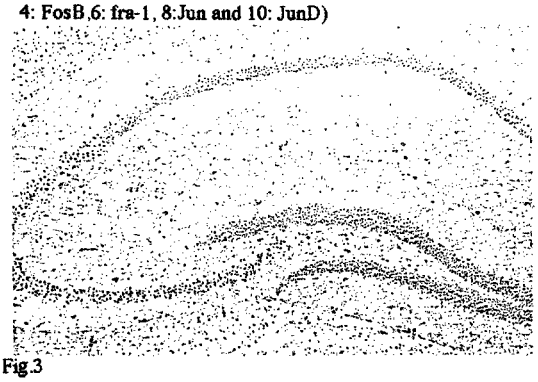


Fig.3

Fig.3 Photomicrographs showing the effect of haloperidol (1mg/kg) on the expression of Fos in the hippocampus.



Fig.2　1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Fig.2 Autoradiogram of the AP-1 DNA binding activity in ddY mouse brain injected with SCH23390(1mg/kg). (Lane 1,3,5,7 and 9 : nuclear extract without antibody. Lane 2,4,6,8 and 10 : nuclear extract with antibody. 2:Fos, 4: FosB,6: fra-1, 8:Jun and 10: JunD)

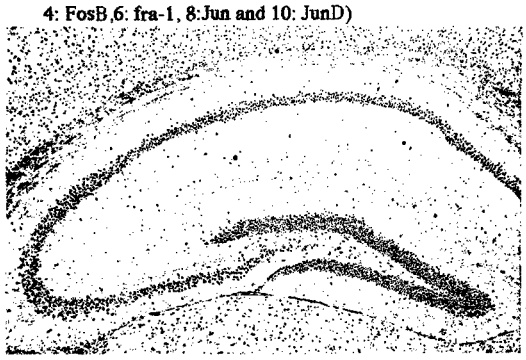


Fig.4

Fig.4 Photomicrographs showing the effect of SCH23390 (1mg/kg) on the expression of FosB in the hippocampus.

[文献]

(1) Freyd G. et al. (1990) Nature 334876-879.

(2) Ozaki T. et al. (1995) European Neuropsychopharmacology Supple. 3, 328.

(3) Schreiber E. et al. (1989) Nucleic Acids Research 17, 6419.

10 1E19 Sulpiride慢性処置によるラット前頭葉皮質初代培養細胞におけるNMDA誘発性Ca^{2+}流入増強作用

林輝男、*加賀谷有行、*小山田孝裕、*竹林実、*横田則夫、**西田朗、**清水雅美、*山脇成人
広島静養院、*広島大学医学部神経精神医学講座、**国立呉病院臨床研究部

〔 要約 〕

NMDA受容体機能に対する選択的ドーパミンD_2受容体拮抗薬であるsulprideの慢性処置の影響を、ラット前頭葉皮質初代培養細胞を用いて検討した。NMDA受容体機能はNMDA刺激による細胞内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)変化を、単一細胞レベルで測定することで評価した。Sulpiride処置は3日、0.1 μM以上で有意にNMDA誘発性$[Ca^{2+}]_i$上昇を増強した。Sulprideのこの効果はD2受容体親和性を持たない光学異性体R(+)-sulprideでは認めなかった。また、この増強効果はH-7, H-89の慢性処置で消失した。SigmaリガンドのDTG(0.01 μM)はそれ自体はNMDA誘発性$[Ca^{2+}]_i$上昇に影響しなかったが、sulprideの増強効果をさらに強めた。これらの結果から、sulprideの増強効果はドーパミンD_2、cAMP、A kinaseを介して生じており、sigma受容体がこの系を調節する可能性が示唆された。

＜目的＞
精神分裂病において、前頭葉皮質の機能低下が存在することが指摘されている。NMDA受容体に連結するチャンネルを遮断するPCPがヒトにおいて幻覚妄想、自閉などの分裂病類似の症状を誘発することや、死後脳を用いた検討から前頭葉皮質におけるNMDA受容対機能低下が推測されている。われわれは、精神分裂病の治療薬であるドーパミン受容体遮断薬のNMDA受容体機能に対する影響をラット前頭葉皮質初代培養神経細胞を用いて検討してきた(1-2)。急性処置ではhaloperidolがμMレベルでsigma受容体を介してチャンネル機能に抑制的に作用することを報告した(1)。さらに、慢性処置ではhaloperidolは影響しないものの、選択的ドーパミン2受容体拮抗薬であるsulprideがNMDA誘発性反応を増強することを確認している(2)。本検討はこのsulprideによる増強効果のメカニズム、およびsigma 受容体リガンドであるDTGの影響について検討した。

＜方法＞
細胞培養： 妊娠18日のWistarラットからエーテル麻酔科で胎児を取り出した。胎児の前頭葉皮質を実体顕微鏡下で摘出し、0.25% trypsin、0.02% DNaseによる酵素処置を37度で20分間行った。処置後、細胞をあらかじめ単層培養してあったアストロサイト上で7日間培養した。培養液には5% FCS、5% horse serumを含むDMEMを用いた。各薬物の慢性処置は目的の濃度になるよう培養液に溶解し、2日に1回全量を交換した。
単一細胞内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)の測定： 培養後細胞を、balanced salt solution (BSS: NaCl 130, KCl 5.4, $CaCl_2$ 1.8, glucose 5.5, HEPES 20, mM)で洗浄後、5 μM fura2-AMを含むBSSにて60分処置した。処置後さらにBSSで細胞を洗浄した後、倒立蛍光顕微鏡に連結した画像解析装置Argus50にて単一細胞内Ca^{2+}濃度の測定を継時的に行った。

＜結果＞
NMDAは濃度に依存して$[Ca^{2+}]_i$を上昇させ(EC_{50}=30.8 μM)、この反応は細胞外Ca^{2+}除去、AP-5 (100 μM)、MK-801 (10 μM)で完全に抑制された。以下の実験において、NMDA刺激は100 μM、1分間で行った。Sulprideの慢性処置（5日間）は濃度に依存しNMDA誘発性$[Ca^{2+}]_i$上昇を増強し、0.1 μM以上で有意な増強を示した。一方、haloperidol (0.01-10 μM)による慢性処置ではNMDA誘発性$[Ca^{2+}]_i$上昇は影響されなかった（図1）。Sulpiride (1 μM)による慢性処置は、3日以上で有意にNMDA誘発性$[Ca^{2+}]_i$上昇を増強した。以下の実験ではsulpiride慢性処置は1 μM、5日間で行った。ドーパミンD_2遮断作用を持つsulprideの光学異性体S(-)-sulpiride (1 μM、5日間) は同様な増強効果を示したが、ドーパミンD2遮断作用の非常に弱いR(+)-sulpiride (1

μM、5日間) による増強効果はm認めなかった。Protein kinase inhibitorであるH-7、およびA kinase (PKA) inhibitorであるH-89の慢性処置 (1μM、3日間) はsulpirideによる増強効果を消失させた（図2）。一方、DTGの慢性処置 (0.1 μM、5日間)はそれ自体はNMDA誘発性[Ca^{2+}]i上昇に影響しなかったが、sulpirideによる増強効果をさらに増強した。このDTGによる効果はhaloperidol (0.1 μM) により消失した（図3）。

＜考察＞

本検討の結果から、sulpirideはD2受容体遮断作用によりNMDA受容体機能を増強させることが推測される。D2受容体はアデニレートサイクラーゼとcouplingしcAMP産生を調節すること、本検討でPKA inhibitorがこの増強効果を消失させたことから、sulpirideによるNMDA受容体機能増強作用はD2受容体、cAMP、PKAを介すると考えられる。さらに、DTGがこの作用を増強することから、sigma 受容体がこの系を調節する可能性が推測される。Haloperidolによってsulpirideと同様な増強効果が認められなかったことは、haloperidolがsigma受容体に高い親和性を持っていることと関連しているかもしれない。

(1) Hayashi T., et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 275: 207-214, 1995.
(2) Hayashi T., et al. Eur. Neuropsychopharmacol. 6 (suppl. 3): 46, 1996.

図1

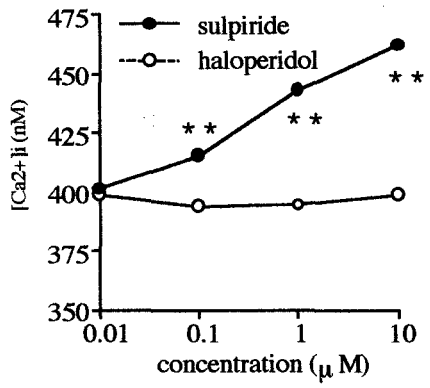


図2

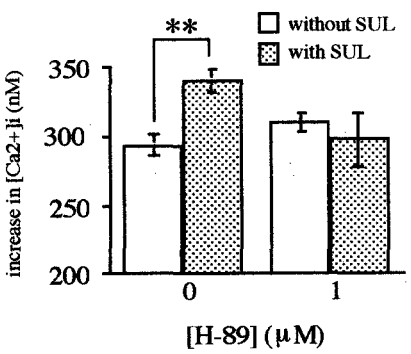
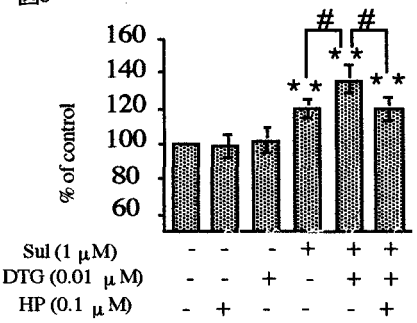


図3



#p<0.05, **p<0.01

11 1E20 ラット脳下垂体ドパミンD2受容体およびG蛋白質αサブユニットに対する新規抗精神病薬aripiprazole(OPC-14597)の影響

瀬戸真由美、井上敦子、菊地哲朗*、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 〕

ラット脳下垂体におけるドパミンD2受容体および抑制性G蛋白質αサブユニットに対する新規抗精神病薬aripiprazole(OPC-14597)の単回および慢性投与による影響を検討し、定型抗精神病薬であるhaloperidolについての結果と比較した。単回投与においてaripiprazoleはhaloperidolと同様にD2受容体mRNA量を増加させた。一方、慢性投与においてはaripiprazoleはD2受容体量、D2受容体mRNA量ともに減少させたが、haloperidolは増加させた。さらに、aripiprazole慢性投与は、haloperidol慢性投与と同様にGiαmRNA量を増加させた。以上の結果から、慢性投与においてaripiprazoleは脳下垂体のD2受容体に対してhaloperidolとは異なる作用を示すことが明らかとなった。

(序)

抗精神病薬はD2受容体を遮断することにより、その治療効果を発揮しているが、同時に錐体外路系副作用、高プロラクチン血症などの内分泌副作用を引き起こすと考えられている。Aripiprazole (OPC-14597)は従来の薬とは異なり、臨床上、血中プロラクチン濃度を上昇させない[1]、またラットにおいても血中プロラクチン濃度を上昇させる作用は弱い[2]ことが観察されている。プロラクチンは脳下垂体から分泌されるホルモンであり、その分泌は視床下部から遊離されるドパミンが脳下垂体のD2受容体に作用することによって抑制的に制御されている[3]。そこで今回、aripiprazoleの脳下垂体D2受容体に対する作用を知る目的で、aripiprazole投与によるラット脳下垂体D2受容体変化について検討した。さらにD2受容体と連関している抑制性Gタンパクのm RNA変化についても検討し、haloperidolについての結果と比較した。

(方法)

1.薬物投与

Wistar系雄性ラットにaripiprazole 24mg/kg または haloperidol 2mg/kgを経口投与した。慢性投与においては、各薬物を1日1回、3週間経口投与した。

2.D2受容体結合実験

3週間慢性投与終了後3日目に摘出した脳下垂体から膜標本を作成した。D2受容体結合量は[^{3}H]-spiperone結合量を指標とした。非特異的結合量は 2μM (+)-butaclamol存在下で求めた。

3.mRNA定量 (RNase protection assay)

3週間慢性投与終了後あるいは単回投与終了後6時間後に摘出した脳下垂体からtotal RNAを抽出した。脳下垂体 total RNAを各 ^{32}P-cRNA probe と45℃で12時間ハイブリダイズさせた後、RNaseで処置し、4%PAGEを行った。各バンドはBAS2000バイオイメージングアナライザーで解析した。

(結果および考察)

Aripiprazole、haloperidol単回投与ともD2受容体mRNA量を増加させた(Fig.1)。一方、haloperidol慢性投与はD2受容体アップレギュレーションを引き起こしたが、aripiprazole慢性投与はD2受容体ダウンレギュレーションを引き起こした(Fig.2)。また、両薬物慢性投与のD2受容体mRNA量に与える

影響について検討した結果、受容体結合活性変化と同様、haloperidolはmRNA量を増加させ、aripiprazoleはmRNA量を減少させた(Fig.3)。したがって、両薬物慢性投与によるD2受容体の変化はmRNA量の変化によるものであることが示された。さらに、Giαに対する両薬物慢性投与の影響を調べた結果、aripiprazole、haloperidol両薬物ともGiαmRNA量を増加させた(Fig.4)。以上の結果から、aripiprazoleとhaloperidolのプロラクチン遊離に対する作用の相違は、脳下垂体のGi蛋白質に及ぼす変化が関与するのではなく、両薬物の脳下垂体D2受容体に対する作用の相違を反映していると考えられる。

(謝辞)

G蛋白質cDNAを供与いただいた、東京工業大学生命理工学部伊東広先生に感謝いたします。

(参考文献)

1.Toru, M. et al., Neuropsychopharmacology 10 (suppl. Part1), 122S (1994)

2.Inoue, T. et al., JPET 277, 137-143 (1996)

3.Ben-Jonathan, N., Endocr. Rev. 6, 564-589 (1985)

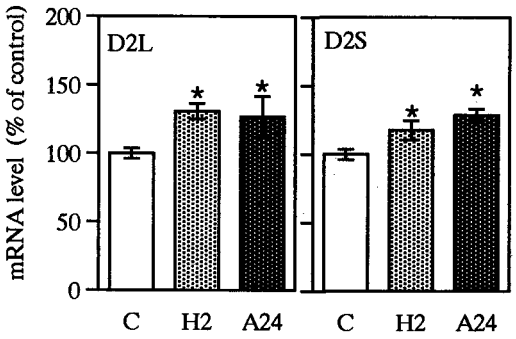


Fig.1 Effects of single treatment with antipsychotic drugs on D2 mRNA levels in rat pituitaries.

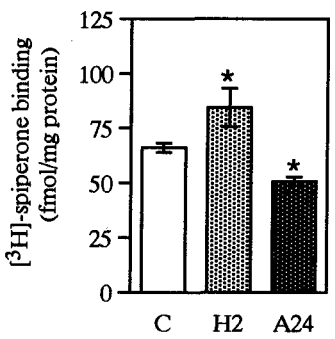


Fig.2 Effects of chronic treatments with antipsychotic drugs on [^{3}H]-spiperone binding in rat pituitaries.

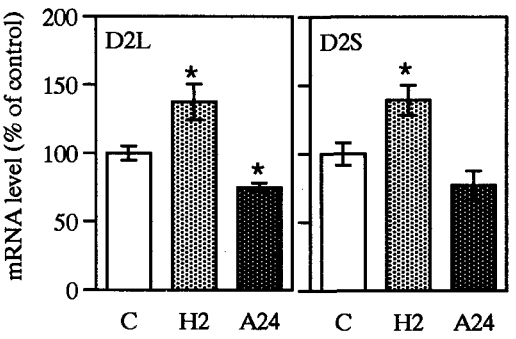


Fig.3 Effects of chronic treatments with antipsychotic drugs on D2 mRNA levels in rat pituitaries.

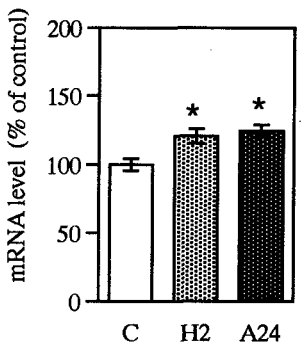


Fig.4 Effects of chronic treatments with antipsychotic drugs on Giα 2 mRNA levels in rat pituitaries.

12 EHOC-1遺伝子のalternative splicingおよび組織発現

1Ba3

上野 修一、中村 雅之、佐野 輝、田邉 敬貴、K. Yamakawa*、R. Korenberg*
（愛媛大学医学部・神経精神 UCLA・Cedars-Sainai医学センター・医学遺伝学*）

〔 要約 〕

EHOC-1（Epilepsy, HOloprosencephaly, Candidate-1）は21番染色体長腕に位置する膜貫通型たんぱく質をコードする23以上のexonからなる遺伝子で、躁うつ病との連鎖が報告されている領域に存在する。この遺伝子はほとんどすべての組織で発現しているが、その発現は脳に豊富である。今回、そのcDNAの構造を白血球で調べたところ、数種のalternative splicingを認めた。すなわち、exon 4前半部、7、14&15がspliced outされたcDNAを検出した。ヒトでの組織別にその発現を調べたところ、各組織間でalternative splicingに差が認められた。なかでも大脳皮質ではほかの神経組織と比較してexon 7がsplice outされた型が発現しており、alternative splicingによってEHOC-1遺伝子産物が特に神経系で多様性を持たせていることが考えられた。

躁うつ病は、精神障害の中でも遺伝負因の高い疾患であり、これまでいくつかの座位との連鎖が報告されている[1-5]。中でも最近、躁うつ病が21番染色体長腕にあるPFKL部位との連鎖が相次いで報告されており[1,5]、躁うつ病の病因遺伝子が、この近傍に存在する可能性がある。最近、21q22.3近傍に存在するEHOC-1（Epilepsy, HOloprosencephaly, Candidate-1）遺伝子cDNAがクローニングされその構造が報告された[6]。この遺伝子はPFKL部位よりわずか150 kb以内に位置しており、かつ、その構造は膜貫通型たんぱく質と考えられ、sodium channelと相同性を持った配列を含んでいることから、躁うつ病病因遺伝子の一つである可能性がある。今回、我々は、ヒト各組織からRT-PCR法を用いてcDNAを作成し、EHOC-1の構造および遺伝子発現について調べたので報告する。

【方法】

1）EHOC-1 cDNAの配列の確認：白血球中のtotal RNA分画をAGPC法を用いて回収し、RT-PCR法によりcDNAを作成した。T-vectorに組み込んでクローニングした後、EHOC-1 cDNAに特異的なプライマーを作成し、その遺伝子配列を確認した。ヒト剖検組織から同様の方法を用いてcDNAを作成した。

2）遺伝子配列を調べ、alternative splicingの存在したexon 4前半部、7、14&15のそれぞれの発現をPCR法を用いて各ヒト剖検組織cDNAで検討した。

【結果及び考察】

EHOC-1は、各組織で発現しており、白血球においても発現していることを確認した。EHOC-1の23以上に渡るexonのうち、exon 4前半部、7、14&15の各exonが、spliced outされている型のRNAが発現していることを数名のヒト白血球cDNAの配列解析で確認した（Fig. 1）。躁うつ病患者を含めた白血球の遺伝子解析では、患者及び正常対象者間でのalternative splicingに差は認めなかった。それぞれのalternative splicingが、各組織でどのように起こっているかを確認するために各組織からcDNAを作成し、定性的にPCR法を用いてその発現を調べ、以下の結果を得た（Fig. 2）。exon 4前半部の解析では、各組織間での差はほとんど無く、大脳皮質でそのsplice outが無かった。exon 14, 15については、小脳白質及び肺でsplice outが無かった。一方、exon 7では大脳皮質、消化管、白血球でのみsplice outしたものが確認された。exon 4前半部及びexon 14, 15ではそのalternative splicingによってframe shiftを起こし、たんぱく質構造が大きく変化するため、splice outされたmRNAが、たんぱく質として転写され機能しているよりも、mRNA自身が転写または翻訳の調節を行なっている可能性がある。一方、exon 7

のalternative splicingに関しては、この領域が、膜貫通部分の一部をコードしており、また、splice outにより全体のたんぱく質構造は保たれていることから、組織でのEHOC-1遺伝子産物に多様性を持たせるために行なわれている可能性がある。EHOC-1遺伝子が神経組織で多量に発現していること、神経組織でalternative splicingの多様性が存在していることは、神経系でEHOC-1が重要な機能を持つことを示唆している。

Fig. 1　EHOC-1のcDNAの構造　23以上のexonからなっており、exon numberを数字で示す。濃い点で囲んだ部分は、非翻訳領域、薄い点で囲んだ部分はalternative splicingを受ける領域を示す。cDNAのそれぞれのexonの有無は矢印で示すprimerを用いてPCRを行ない確認した。a: exon 4の前半部、b: exon 7、c: exon 14&15を示す。

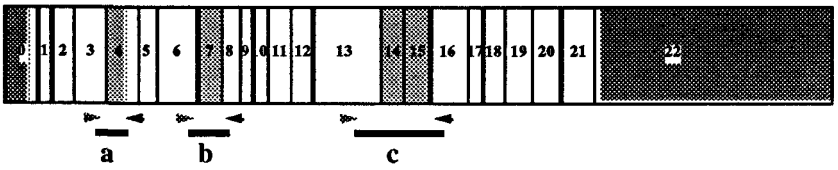
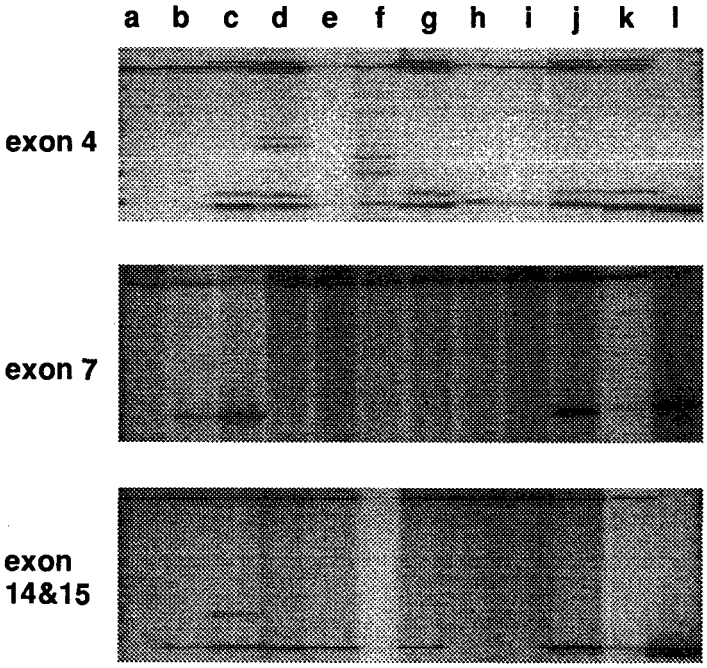


Fig. 2　各exonのalternative splicing　a: positive control (+ exon)、b: 大脳皮質（頭頂葉）、c: 大脳皮質（側頭葉）、d: 大脳白質、e: 被殻、f: 海馬、g: 小脳皮質、h: 小脳白質、i: 肺、j: 消化管、k: 白血球、l: positive control (- exon)



【参考文献】

1)Straub et al. Nature Genet. 8:291-296、2)Blackwood et al. Nature Genet. 12:427-430, 1996、3)Ginns et al. Nature Genet. 12:431-435, 1996、4)Freimer et al. Nature Genet. 12:436-441, 1996、5)Detera-Wadleigh et al. Am. J. Hum. Genet. 58:1279-1285, 1996、6)Yamakawa et al. Hum. Mol. Genet. 4:709-716, 1995、

13 1E21 培養神経細胞におけるアミノ酸刺激性細胞内Ca^{2+}上昇に対する抗うつ薬の抑制効果

竹林 実[1,2]、加賀谷有行[1]、林 輝男[1,3]、稲垣正俊[1]、田原康孝[1]、横田則夫[1]、津久江一郎[2]、山脇成人[1]
（広島大学医学部神経精神医学講座[1] 瀬野川病院[2] 広島静養院[3]）

〔 要約 〕

感情障害において神経細胞内Ca^{2+}調節系が重要な役割を演じていることが知られている。またわれわれはすでにアミノ酸の細胞内Ca^{2+}調節系への影響を報告している。今回は代表的な抑制性および興奮性アミノ酸であるGABA・NMDAによる細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$）変化への抗うつ薬の影響を検討した。イミプラミン、クロミプラミン、デシプラミン、アモキサピン、マプロチリンはGABA・NMDA刺激性$[Ca^{2+}]i$上昇反応をともに抑制した。GABAによる$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対する抗うつ薬の抑制効果とNMDAの$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対する抑制効果は抗うつ薬の種類において高い相関があった。今回の結果と以前の他の刺激による$[Ca^{2+}]i$上昇反応の抗うつ薬の抑制効果の報告（2）とあわせて考えると、抗うつ薬が共通して神経細胞内のCa^{2+}伝達系へ抑制的に作用する可能性が示唆された。

［はじめに］感情障害において血小板内のCa^{2+}動員系の上昇が関与しているとの報告がわれわれを含めたいくつかの施設でなされてきた（1）。また、培養神経細胞において高K^+やノルアドレナリン刺激による細胞内Ca^{2+}動員系の上昇を抗うつ薬が抑制する結果も報告されている（2）。従って、細胞内Ca^{2+}調節系は感情障害において重要な役割を果たしていると考えられる。

近年、感情障害治療において抑制性アミノ酸GABAの関連薬物である抗てんかん薬が用いられたり、抗うつ薬が興奮性アミノ酸の一つであるNMDA受容体の調節部位へ作用するという報告もあり、感情障害の病態においてモノアミンだけでなくアミノ酸との関連も指摘されている。またわれわれは初代培養神経細胞においてGABAによる$[Ca^{2+}]i$上昇は電位依存性Ca^{2+}チャンネルを介している可能性を報告している（3）。今回、主要な抑制性および興奮性アミノ酸であるGABAとNMDAの細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$）上昇に対する抗うつ薬の効果を検討した。

［方法］妊娠18日目のWistar系ラットからエーテル麻酔下で胎児をとりだし、大脳皮質組織を切離した。37℃20分間酵素処置を行い細胞を分離した後、アストロサイトの存在するプレート上で5%FCSと5%HSを含むDMEMを用いて10%CO2、37℃の条件下で4-7日間培養した神経細胞を使用した。その後、Ca^{2+}蛍光指示薬である5μMFura-2AMを25℃60分間負荷した。次に1.8mMCa^{2+}を含むBalanced Salt Solution(BSS)を1.5ml/minで灌流しながら倒立顕微鏡に連結した画像解析装置を用いて単一細胞における$[Ca^{2+}]i$測定を行った。NMDAおよびGABAによる30秒間刺激により$[Ca^{2+}]i$が上昇することを確認した後、連続刺激を行った。2度目の刺激5分前から薬物を前処置し、これらの薬物存在下で刺激を行い2回の反応の比から薬物の効果を検討した。

［結果］GABA（50μM）により約130nMの$[Ca^{2+}]i$上昇反応が観察され、25分後に2度目の刺激をすると同様の反応が見られた（図1a）。三環系抗うつ薬であるイミプラミンは1μMから有意にGABAによる$[Ca^{2+}]i$反応に対し抑制効果を示しはじめ、30μMでは69%まで抑制した（図1b）。30μMの抗うつ薬による抑制効果は、マプロチリン・アモキサン・デシプラミン・イミプラミン・クロミプラミンの順であり、それぞれ33%、43%、57%、69%、78%に抑制した。低濃度（10μM）と高濃度（10mM）のGABAによる$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対して30μMイミプラミンは同程度の抑制効果（46%、52%）を示した。NMDA(30μM)においては約250nMの$[Ca^{2+}]i$上昇反応が観察され、10分後に2度目の刺激をすると同様の反応が見られた。（図1c）。イミプラミンは

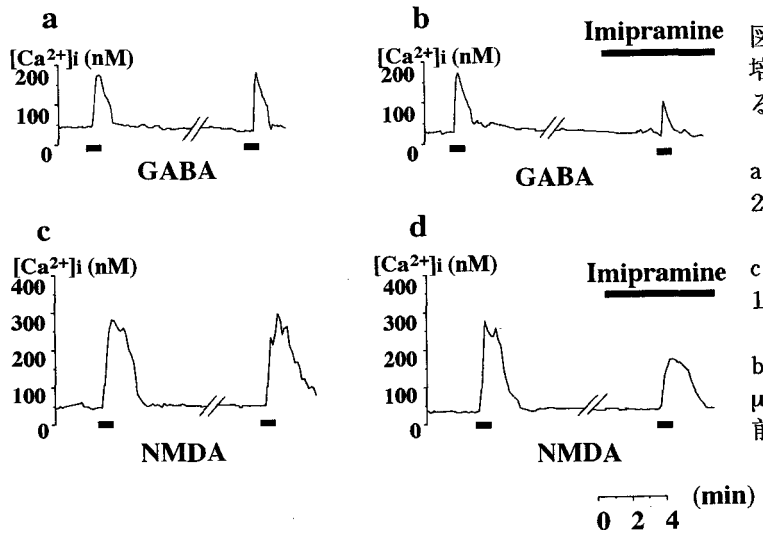


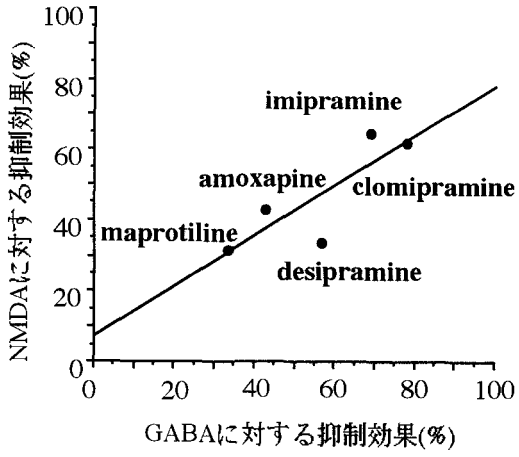
図1.
培養神経細胞における$[Ca^{2+}]i$変化

a,b;GABA(50μM)を25分間隔で2回刺激

c,d;NMDA(30μM)を10分間隔で2回刺激

b,d;Imipramine(30μM)を2回目刺激5分前より処置

図2
各種抗うつ薬のGABAおよびNMDA刺激性$[Ca^{2+}]i$反応に対する抑制効果



0.1μMから有意にNMDAによる$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対し抑制効果を示しはじめ、30μMでは65%に抑制した（図1d）。種々の抗うつ薬のGABAおよびNMDAの$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対する抑制効果の相関係数は0.83であり、強い相関を認めた（図2）。

［考察］GABAおよびNMDA刺激性$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対してイミプラミンは濃度依存性および非拮抗的に抑制した。各種抗うつ薬も同様に抑制効果を示した。種々の抗うつ薬のGABAおよびNMDAの$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対する抑制効果は強い相関を認めたこと、培養神経細胞においてGABAによる$[Ca^{2+}]i$上昇反応は電位依存性Ca^{2+}チャンネルを介している可能性があることから（3）、今回の抗うつ薬のアミノ酸刺激性$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対する抑制効果は電位依存性Ca^{2+}チャンネルを介した作用であると推測された。今までの報告でも、種々の刺激による$[Ca^{2+}]i$上昇反応に対して抗うつ薬は抑制効果を示しており、今回のアミノ酸刺激に対する結果と一致していた。従って、抗うつ薬が共通して神経細胞内のCa^{2+}伝達系へ抑制的に作用する可能性が示唆された。

［文献］
（1）Okamoto Y., Kagaya A. et al. Life Sci. (1995)56:327-332.
（2）Shimizu M., Nishida A. et al. Eur. J. Pharmacol.(1994)268:65-71.
（3）Takebayashi M., Kagaya A. et al. Eur. J. Pharmacol.(1996)297:137-143.

14 新規抗うつ薬 YM992 の生化学的検討

1E22

畠中健一、山口時男

（山之内製薬株式会社、創薬研究本部）

〔 要約 〕

YM992((S)-2-[[(7-fluoro-4-indanyl)oxy]methyl]morpholine monohydrochloride)は選択的セロトニン(5-HT)再取り込み阻害作用及び 5-HT_{2A}受容体拮抗作用を有する新規の化合物である(1)。YM992 及び fluoxetine 単回投与(10 mg/kg ip, 30 mg/kg ip)によるラット frontal cortex における細胞外 5-HT レベルの変化を *in vivo* マイクロダイアリシス法により測定した結果、YM992 は用量依存的に細胞外 5-HT レベルを増加させた(3 倍(10 mg/kg ip), 5 倍(30 mg/kg ip))。fluoxetine も 10 mg/kg ip で細胞外 5-HT レベルを 2-3 倍に増加させたが、高用量(30 mg/kg ip)ではそれ以上の増加は認められなかった。ラット大脳皮質シナプトソームを用いた[^{3}H]5-HT release 実験より、YM992 は 0.01 μM より有意な 5-HT release 促進作用を示し 0. 1 μM でその作用は最大に達した。よって、YM992 単回投与による著明な細胞外 5-HT レベルの増加には、5-HT 再取り込み阻害作用に加えて 5-HT release 作用が寄与していることが推察された。また、post-synapse において 5-HT_{2A}受容体は 5-HT_{1A}受容体を抑制性に制御しており、5-HT_{2A}受容体の遮断により 5-HT_{1A}受容体を介した反応が増強されることが報告されている(2)。従って、frontal cortex において著明に細胞外 5-HT レベルを増加させ、かつ 5-HT_{2A}拮抗作用を有する YM992 は、post-synaptic 5-HT_{1A}受容体を介した神経伝達を効率良く促進すると考えられ、既存の選択的 5-HT 再取り込み阻害薬(SSRIs)と比べて作用の強い新規の抗うつ薬となりうる可能性が示唆された。

【緒言】

うつ病の本態は未だ不明であるが 5-HT 神経系の異常が病態に深く関与していることが示唆されている。現在、fluoxetine に代表される SSRIs が抗うつ薬として欧米で繁用されている。それらはシナプス間隙の 5-HT レベルを増やし post-synaptic 5-HT_{1A}受容体を介する神経伝達を促進することによって抗うつ効果を発揮すると考えられているが、有効率や効果発現が遅い点などでまだ改善の余地があるといえる。YM992 は選択的 5-HT 再取り込み阻害作用に加え 5-HT_{2A}受容体拮抗作用を併せもつことにより、SSRIs に比べ有効率が高く効果発現の速い抗うつ薬を指向した新規の化合物である。今回、我々は YM992 の *in vivo* 及び *in vitro* でのラット大脳皮質における 5-HT release に対する効果を検討し SSRIs との比較を行ったので報告する。

【実験方法】

1) *in vivo* microdialysis

実験には Wistar 系雄性ラット(250-380 g, SLC)を用いた。ネンブタール(50 mg/kg)麻酔下、脳定位固定装置を用いて frontal cortex へガイドカニューレ(AG-4, Eicom)を固定しダミーカニューレ(AD-4, Eicom)を挿入した。5 日以上経過後、ダミーカニューレを外してマイクロダイアリシス用透析プローブ(A-I-4-03, Eicom)を挿入し、無麻酔無拘束下、リンゲル液を 2 μl/min の流速で潅流した。潅流液はオートインジェクターで 20 分毎に HPLC にインジェクションした。HPLC は、逆相 ODS カラム(CA-5ODS, Eicom)を用い検出器には電気化学検出器(ECD-200, ECD-300, Eicom)を用いた。basal 5-HT 量が安定した後薬物(YM992, fluoxetine)を腹腔内投与し 5-HT 量を経時的に測定した。結果は薬物投与前の basal 値(20 分毎の連続した 3 fraction の平均値)に対する割合で示した。

2) *in vitro* [^{3}H]5-HT release from rat cerebral cortex synaptosome

実験には Wistar 系雄性ラット(140-200 g, SLC)を用いた。定法により cerebral cortex からシナプトソームを調製した。[^{3}H]5-HT(50 nM)を含む Krebs buffer 中で 37 ℃、10 分間インキュベーションして[^{3}H]5-HT をシナプトソーム内に取り込ませ、遠心後 2 回 wash したものを[^{3}H]5-HT loaded synaptosome とした。[^{3}H]5-HT loaded synaptosome(100 μl)を薬物を含む反応液(100 μM pargyline を含む)(900 μl)に添加後、37 ℃, 3 分間インキュベーションした後 10,000 rpm, 1 分間遠心し、上清に

遊離された[^{3}H]5-HT の放射活性を測定した。結果は薬物非存在下での上清に遊離された[^{3}H]5-HT の放射活性を 100 %としてそれに対する割合で示した。

【結果】

YM992(10, 30 mg/kg ip)は、用量依存的にラット frontal cortex の細胞外 5-HT レベルを増加させた (Fig. 1)。Fluoxetine(10 mg/kg ip)も 5-HT レベルを 2-3 倍に増加させたが、それ以上の増加は高用量の fluoxetine(30 mg/kg ip)では認められなかった(Fig. 2)。ラット大脳皮質シナプトソームを用いた [^{3}H]5-HT release 実験の結果は Fig. 3 に示した。5-HT releaser である p-chloroamphetamine(PCA)は用量に依存した[^{3}H]5-HT release 促進作用を示した(230 %)。YM992 も 0.01 μM より有意な[^{3}H]5-HT release 促進作用を示したが、0. 1 μM でその作用は最大に達した(140 %)。。一方、fuoxetine は 10 μM という高用量においてのみ[^{3}H]5-HT release 促進作用を示し、citalopram は無作用であった。

【考察】

YM992 は単回投与によりラット frontal cortex における細胞外 5-HT 増加作用を示し、その作用は fluoxetine, citalopram と比較して強力であった。その強力な作用には、YM992 の 5-HT release 促進作用が関与していることが推察された。ただし、その 5-HT release 促進作用は PCA とは質的に異なっていると予想される。選択的 5-HT 再取り込み阻害作用、5-HT$_{2A}$ 受容体拮抗作用及び 5-HT release 促進作用を有する YM992 は従来の SSRIs と比べて post-synaptic 5-HT$_{1A}$ 受容体を介する神経伝達を強力に促進し、作用の強い新規の抗うつ薬となる可能性を有すると考えられる。

【参照文献】

(1)Hatanaka K. et al., (1996) *Neuropharmacology* (in press)
(2)Ashby C. R. et al., (1994) *Synapse* **17**: 173-181.

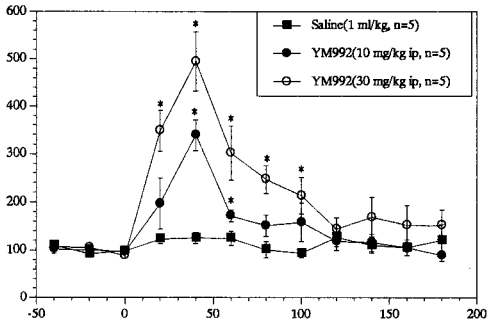


Fig. 1 Effect of YM992 on the extracellular 5-HT in the rat frontal cortex.

* p< 0.05 vs. saline

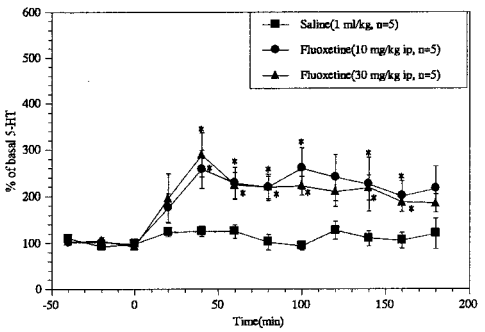


Fig. 2 Effect of fluoxetine on the extracellular 5-HT in the rat frontal cortex.

* p<0.05 vs. saline

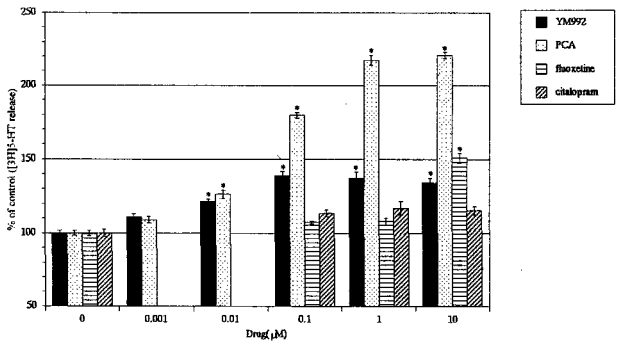


Fig. 3 Effect of YM992 on the [3H]5-HT release from rat cerebral cortex synaptosome

* p<0.001

15 1Ba4 ラット大脳皮質における慢性リチウム投与によるプロテインキナーゼCとGAP-43のリン酸化の変化

長田 賢一、貴家 康男、菩提寺 伸人、朝倉 幹雄
聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室

〔要約〕

3 mM リチウムをラットに 5 週間皮下投与した大脳皮質のＰＫＣの分布を各サブタイプに対するモノクロナール抗体を用いたイムノブロットで測定した。ε-PKC のみが膜成分で増加し、細胞質成分で減少していた。リチウム長期投与後の内在性蛋白質のリン酸化の変化は、43 Kのペプチドのリン酸化が、明らかに対照群と比較してリチウム投与後増加していた。そこで、リチウム投与後のGAP-43 をイムノブッロト用い測定した。膜成分でGAP-43 (43 K) が対照群と比較して有意に 45 %増加していた。Phosphoserine 抗体を用いた免疫沈降法で測定したリン酸化された GAP-43 は 52 %増加しており、リン酸化されなかった GAP-43 は逆に、50 %減少していた。さらに、GAP-43 のリン酸化反応速度を比較したが、リチウム投与後の変化は認められなっかた。従って、GAP-43 の蛋白量の変化がリチウム長期投与後認められたと考えられた。

躁うつ病の治療においてリチウムは効果的であり、さらに躁うつ病の予防効果を有する重要な治療薬である。現在まで多くの研究がなされているが、リチウムの薬理作用と躁うつ病への薬理効果との関連は不明の点が多い。リチウムはイノシトールリン脂質系を抑制し脳内のイノシトールリン脂質濃度を減少させる。現在では、リチウムはイノソトールリン脂質系に多様で複雑な作用をしていることが判明し、特にセカンドメッセンジャーであるプロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）に及ぼす影響が研究され始めたが、現在は研究者により報告が異なっている。そこで、我々は 3 mM リチウムをラットに 5 週間皮下投与した大脳皮質のＰＫＣの分布を各サブタイプに対するモノクロナール抗体を用いたイムノブロットで調査し、さらにＰＫＣによりリン酸化される基質蛋白質について検討を加えた。

〔方 法〕

Wistar系雄性ラット (150-250 g) に3 mM LiCl を5 週間一日二回皮下投与した。平均血中リチウム濃度は 0.781 ± 0.401 mmol/l であり、リチウム濃度は治療域内であった。大脳皮質を 20 mM Tris・H Cl buffer [pH 7.5], 0.32 M Sucrose, 200 mg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 % Glycerol, 0.5 mM EGTA, 2 mM EDTA を用いてホモジナイズした。ホモジネートは Manji らの方法に準じて粗シナプトソームを作成し、ＰＫＣを活性化させる phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu)を添加し、ＰＫＣを活性化させ、膜成分と細胞質成分を超遠心により分離した。さらに、各成分を DEAE クロマトグラフィーを施行後、SDS 電気泳動し各ＰＫＣのサブタイプの抗体を用いイムノブッロトを施行した。

次にＰＫＣによる内在性蛋白質のリン酸化がリチウム長期投与後どのように変化しているかを検討した。膜分に [γ-^{32}P] ATP, PDBu, Ca^{2+} を添加し、リチウム投与群と対照群のリン酸化を比較検討した。

〔結　果〕

α, β, γ, δ-ＰＫＣの分布は、リチウム長期投与後変化は認められなかった。しかし、ε-ＰＫＣは、リチウム投与後に細胞質成分では減少し、膜成分で増加していた。

リチウム長期投与後の内在性蛋白質のリン酸化の変化は、43Ｋのペプチドのリン酸化が、明らかに対照群と比較してリチウム投与後増加していた。その他のバンドはリチウム投与後変化は認められなかった。

リチウム長期投与後、GAP-43を用いたイムノブッロトの結果では、膜成分でGAP-43 (43K) が対照群と比較して有意に 45％増加していた。Phosphoserine抗体を用いた免疫沈降法によりリン酸化されたGAP-43を測定した結果、リチウム長期投与後、同様に有意に、52 ％増加していた。また、Phosphoserine抗体を用いた免疫沈降後、沈査を取り除いた上清をさらにGAP-43抗体により免疫沈降し、リン酸化されなかったGAP-43を測定した。リチウム長期投与後、膜成分においてリン酸化されなかったGAP-43は有意に50%減少していた。次に、in vitroでのGAP-43のリン酸化反応速度を測定した。粗シナプトゾームにPDBuを添加し、ＰＫＣを活性化し、GAP-43をリン酸化させた後、Phosphoserine抗体を用いた免疫沈降法により、リン酸化されたGAP-43を測定した。リチウム投与後、GAP-43のリン酸化は、どの反応時間においても対照群と比較して50 %増加しており、GAP-43のリン酸化の増加はGAP-43の蛋白量の増加によるものと考えられた。

〔考　察〕

リチウム長期投与後、43Ｋの内在性蛋白質のリン酸化が増加していた。この43Ｋのペプチドは GAP-43と考えられた。GAP-43はプレシナプスに存在し神経細胞の可塑性に関与し、さらに、Long-Term Potensiation, 神経伝達物質の放出を調節する重要な蛋白質である。

リチウム長期投与はε-ＰＫＣが活性化され、細胞質から膜へ移行し、移行したε-ＰＫＣがGAP-43をリン酸化したと考えられる。GAP-43はカルモジュリンと結合しているが、リン酸化されるとカルモジュリンを放出し、放出されたカルモジュリンは、さらにカルモジュリンキナーゼを活性化させる。G蛋白であるG_0はリン酸化されたGAP-43により抑制され、G_iは活性化されたＰＫＣにより抑制されることが既に報告されている。さらに、GAP-43がリン酸化されるとPIPをPIP$_2$に変換するPIPキナーゼが抑制されることで、イノシトールリン脂質系を抑制することが報告されている。

従って、現在まで、リチウム長期投与後に報告されていた、G蛋白の抑制作用やイノシトールリン脂質系の減少は、GAP-43のリン酸化によって説明することができる。

また、Wangらが海馬スライスの実験で、potasium刺激によるセロトニン、ノルアドレナリンの分泌がリチウム処理後増加していたと報告している。この事も、GAP-43がリン酸化されるとセロトニン、ノルアドレナリンの分泌が促進されることで、説明ができる。

リチウムのMood stabilizerとしての作用としては、リチウム長期投与後、膜リン脂質成分の構成変化が生じ、それに伴い、ε-ＰＫＣが膜へ移行し活性化される。さらに、GAP-43がリン酸化されるとプレシナプスからのノルアドレナリン、セロトニンなどの神経伝達物質の分泌が促進された状態が持続し、神経伝達物質の蓄積が減少し、過剰な刺激が伝達されなくなる事が考えられる。

16 1E23 バイオセンサーを使用したニューロパチー患者血清のスクリーニング

北村邦男、細川武*、坂本安、寺田庄一、吉村和法、野村正彦
(埼玉医大・第一生理、*神経内科)

〔要約〕 慢性免疫性多発神経炎 (CIMP) の患者のうちM蛋白 (IgM) を伴う症例では、HNK-1 エピトープとして知られている硫酸化グルクロン酸に対する糖鎖抗体が血清中に存在する。今回 CIMP 患者血清の簡便かつ迅速なスクリーニング法を開発する目的で、ウシ末梢神経ミエリンの P0 蛋白質から硫酸化グルクロン酸を含有する糖ペプチド (GP5) および含有していない糖ペプチド (GP4) を精製し、これらを ligand としてバイオセンサーを用いる方法を検討した。その結果、GP5 に対する患者抗体の安定的な結合は認められなかったが、健常人血清と比較すると解離過程における明らかな違いが観察された。従って、本方法は CIMP 患者血清の簡便かつ迅速なスクリーニングに有効であると考えられた。

末梢神経ミエリンの糖蛋白質であるP0蛋白質とPAS-II/PMP-22 蛋白質の糖鎖上には HNK-1 エピトープとして知られている硫酸化グルクロン酸が存在する。慢性免疫性多発神経炎 (CIMP) の患者のうちM蛋白 (IgM) を伴う症例では、P0 蛋白質、PAS-II/PMP-22 蛋白質、MAG (myelin-associated glycoprotein)、ある種の酸性糖脂質等が含有する硫酸化グルクロン酸糖鎖に対する抗体が患者血清中に検出されている。硫酸化グルクロン酸を含有するオリゴ糖あるいは糖ペプチドは極めて可溶性が高いため、ELISA プレートやメンブレン上に抗原として固定化することが出来ず、そのため Western blot 法が患者血清のスクリーニング法として採用されている。しかしながら、Western blot 法は操作が繁雑であり、また時間もかかる等の欠点がある。今回 P0 蛋白質由来の糖ペプチドを ligand とし、バイオセンサー(Pharmacia BIAcore 2000) を用いて CIMP 患者血清の硫酸化グルクロン酸に対する反応性を調べ、スクリーニング法としての実用化の可能性を検討した。

[実験方法]

糖ペプチドの精製：ウシ末梢神経ミエリンを希酸抽出により塩基性蛋白質を除去した後クロロホルム：メタノール (2:1) で脱脂した(1)。この酸不溶性蛋白質画分を *streptomyces griseus* プロテアーゼで消化し、Asahi GS310 を用いて糖ペプチド画分を得た。糖ペプチド画分はイオン交換 HPLC (Shodex IEC DEAE-825, 0 M - 0.2 M NaCl/60 min, 1ml/min) で分画し、GP4 及び GP5 糖ペプチドを精製した。

ピリジルアミノ化糖の精製とneoglycolipidの作製：P0蛋白質由来のピリジルアミノ (PA) 化オリゴ糖は、上記の糖ペプチド画分を glycopeptidase A 消化した後、2-アミノピリジンを用いて蛍光標識し、HPLC にて精製した。精製した (PA) 化オリゴ糖は endoglycosidase-H で消化した後、Mizuochi らの方法に従い Phosphatidylethanolamine dipalmitoyl と共有結合させ neoglycolipid を作製した(2)。

neoglycolipid の薄層クロマトグラフィー (TLC) と抗体染色：各 neoglycolipid は c hloroform-methanol-water (105:100:28) で TLC を行った後、50 倍希釈した血清と反応させ酵素抗体法 (DAB 発色) にて検出した。

バイオセンサーによる反応性の検討：精製した GP4 および G P5 糖ペプチドを各々センサーチップ (Pharmacia CM5) のLane 3 及び Lane 4 にアミンカップリング法にて固定化した。患者及び健常人血清を HBS buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20, pH 7.4) にて5 倍希釈した後、2 μl/min の流速にて20 μlを注入した。試料注入後の洗浄は HBS buffer を使用した。

[結果と考察]

ウシ末梢神経 P0 蛋白質及び脱糖鎖処理したP0蛋白質を用いた Western blot 法により、明らかに P0 蛋白質糖鎖を認識する抗体が存在することが明らかとなっている M 蛋白 (IgM) を伴う慢性免疫性多発神経炎 (CIMP) の 2 例について neoglycolipid による方法とバイオセンサーを用いた方法の検討を行った。neoglycolipid を TLC 展開したものでは患者血清は明らかに G P5 と反応し、GP3 及び GP4 とは反応しなかった (図 2)。GP3, GP4, GP5 の構造上の違いは非還元末端にあるが、GP5 は硫酸化グルクロン酸が結合、GP4 はシアル酸が結合、GP3 は両者とも結合していない (図 1)。従って、本患者血清には硫酸化グルクロン酸を認識する糖鎖抗体が存在すると考えられる。Western blot 法ではしばしば判定が困難な場合があるが、本方法では明瞭な判定が可能であった。しかしながら、TLC 法では血清の使用量が多く (少なくとも 100 μl) また操作が繁雑である等の欠点があった。この問題点は neoglycolipid の TLC 上へのスポット後の検出が可能であれば解決可能と考えられたが、スポット法では GP3 や G P4 もやや染色される傾向があり、明瞭な判定は不可能であった (図3)。Neoglycolipid-TLC plate は再利用出来ないため、次にバイオセンサーにを用いる方法を検討した。しかしながら、血清注入後 buffer による洗浄を行うと

response 値（センサーチップ上への結合量を示す）はものとレベルに戻ってしまい患者抗体の安定的な結合は観察されなかった。ところが、buffer 洗浄過程を観察すると健常人（図4-A-Fc 4）と患者血清（図4-B-Fc 4）では明らかな差異が認められた。また、患者血清の場合において、GP5 結合 lane (Fc 4) のなだらかな減少パターンと比較するとGP4 結合 lane (Fc 3) や ligand の結合していない lane (Fc 1 及び Fc 2) の減少パターンは急速であった。従って、このなだらかな減少パターンは患者抗体が極めて弱い結合ながら GP5 に特異的に結合していることを示すものと考えられた。今回の実験では response 値の上昇が観察で来なかったが、これは使用した糖ペプチドが硫酸やグルクロン酸を含有する強酸性のものであるため、センサーチップ上のカルボキシメチルデキストランマトリックスへの侵入が阻害され、その結果結合された糖ペプチド量が極めて少なかったためと考えられる。従って、糖ペプチドのセンサーチップ上への固定化法の改良が残された課題と考えられるが、今回観察された解離過程のパターンに注目することにより患者血清のスクリーニングが可能であり、使用血清量は10 µl 程度、分析時間 15分 程度、自動分析が可能である等の長所を備えた有効な方法と考えられる。

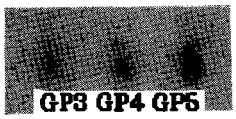
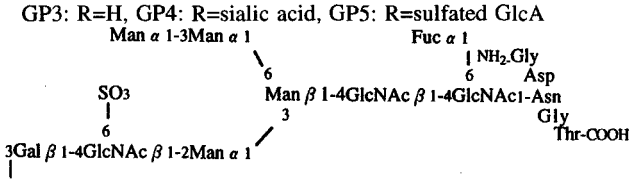


図1。P0蛋白質由来の糖ペプチドの構造

GP3: R=H, GP4: R=sialic acid, GP5: R=sulfated GlcA



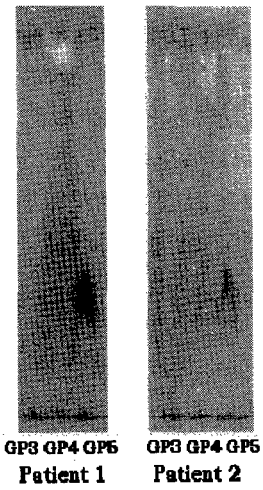
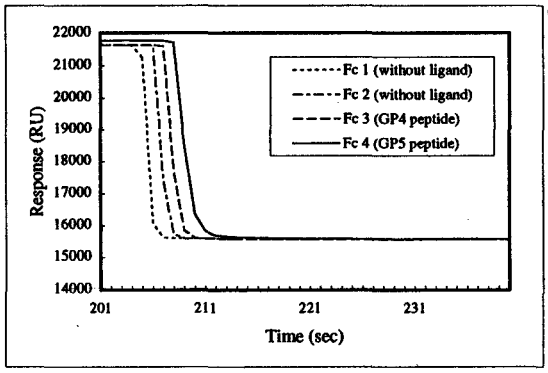


図3。TLC上にスポットした neoglycolipid と患者血清との反応

neoglycolipid (10 pmole) をスポット後、酵素抗体法にて発色（DAB法）

図2。TLC展開後の neoglycolipid と患者血清（2 例）との反応

各レーン200 pmoleのneoglycolipidを添加し、展開後酵素抗体法にて発色



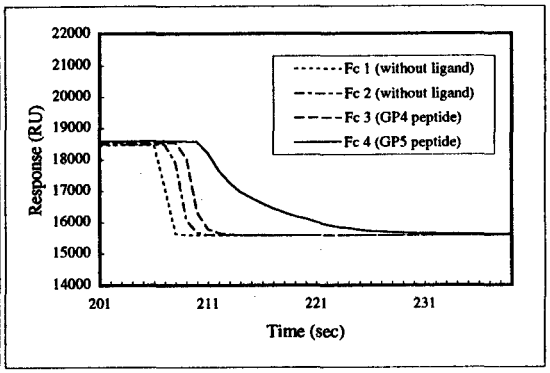


図4。健常人及び患者血清のセンサーグラム

左図：5倍希釈健常人血清 20 µl 注入，　右図：5 倍希釈患者（図3 の患者 2 ）血清 20 µl 注入

lane 1 (Fc 1) 及び lane 2 (Fc 2) は ligand なし。lane 3 (Fc 3) 及び lane 4 (Fc 4) にはそれぞれ GP4 糖ペプチド及び GP5 糖ペプチドを ligand として固定化

各 lane は直列に配置され、lane 1 から lane 4へと注入された試料が流れる。

RU; resonance units

[文献] (1) 北村ら(1994) 神経化学、33, 438-439

(2) Mizuochi,T. et al. (1989) J. Biol. Chem., 264, 13834-13839

17 1Ba1 Ramsay Hunt 症候群患者の末梢血単核球、涙液からの水痘・帯状疱疹ウイルスの検出

中城有喜、村上信五*、本多伸光*、土居孝至、溝渕睦彦、柳原尚明*
（愛媛大学医学部神経精神医学教室、*愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室）

〔 要約 〕
水痘・帯状疱疹ウイルス（Varicella-Zoster virus :VZV）の初感染は小児期に起こり、水痘を引き起こす。感染したVZVは、主に神経節に潜伏感染し、宿主の細胞性免疫の低下により再活性化し、帯状疱疹を引き起こす。帯状疱疹が耳介、外耳道に生じ、第７、８脳神経障害を伴う疾患をRamsay Hunt症候群と呼ばれる。今回Ramsay Hunt症候群患者の耳介水疱液、末梢血単核球、髄液、涙液など臨床検体からDNAを抽出し、PCRを用いてウイルスDNAを増幅した。その結果、耳介水疱液の全て、末梢血単核球では50％、髄液では18％、涙液では92％と高頻度にVZV DNAが検出された。このことから、Ramsay Hunt症候群においてVZVは、第７、8脳神経領域に留まらず、全身に伝搬していると考えられた。

［はじめに］
Ramsay Hunt症候群は、1）外耳道、耳介周辺部の帯状疱疹、2）顔面神経麻痺、3）耳鳴り、難聴、めまいの三主徴により特徴づけられ、帯状疱疹の他に第7、8神経障害を伴う。本疾患の原因は水痘・帯状疱疹ウイルス（Varicella-Zoster virus :VZV）の抗体価の上昇、耳介水疱からのウイルスの検出により、VZVであると同定されている[1]。一方、水疱を伴わない顔面神経麻痺はBell麻痺と呼ばれ、その原因は主にHerpes simplex virus type-1(HSV-1)であることをわれわれは報告した[2]。本研究は、PCR を用い、VZV感染のひとつであるRamsay Hunt症候群を対象に、耳介水疱、末梢血単核球、髄液、涙などの臨床検体からVZV DNAを検出することにより、その感染部位と臨床的意義について検討するとともに、本疾患の臨床診断に役立てることを目的とした。

［対象と方法］
対象は13から83歳までのRamsay Hunt症候群33症例(男性17名、女性16名)である。診断は耳介の水疱、顔面神経麻痺、難聴、めまいなどの臨床症状と血清における急性期と回復期のVZV抗体価(補体結合反応)の上昇を指標に行った。22から75歳の健常者25例とRamsay Hunt症候群と同様に顔面神経麻痺を呈したBell麻痺患者15例、および神経変性疾患と脳炎患者など32例を対照とした。上記症例から耳介水疱液、末梢血単核球、髄液、涙液を採取した。採取した検体の数は、耳介水疱液はRamsay Hunt症候群12例、末梢血単核球はRamsay Hunt症候群12例、対照群23例（健常者14例、Bell麻痺患者9例）、髄液はRamsay Hunt症候群11例、対照群32例、涙液はRamsay Hunt症候群13例、対照群27例（健常者12例、Bell麻痺患者15例）である。すべての患者を含む対象者に説明と同意を得て、検体を採取した。検体については採取後直ちに-80℃で保存した。検体をプロテアーゼKで処理した後、フェノール／クロロホルムを加え除蛋白し、クロロホルム、エタノールでDNAを抽出した。PCRに用いた合成プライマーは、VZVgene29の一部に相当

する塩基配列で、センスプライマー；5'-TACGGGTCTTGCCGGAGCTGGTAT-3'、アンチセンス；5'-AATGCCGT GACCACCAAGTATAAT-3'である。増幅条件は既報の方法[3]に従い、95℃,80秒、52℃,90秒、73℃, 1秒を1サイクルとし35回増幅した。PCR産物をゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色した。サザンブロット分析は、VZVgene29に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ；5'- ACTCACTACCAGTCATTTCT-3'を^{32}Pで末端標識し用いた。標準とするVZV DNAは、弱毒性水痘ウイルス（岡株）から製剤したものを用いた。

［結果と考察］

PCR産物をゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色した。各種検体における検出結果を表１にまとめた。対象としたRamsay Hunt症候群患者では、耳介水疱液12検体すべてから、末梢血単核球12検体中の6例(50%)に、髄液からは11例中2例(18%)、涙液では13検体中12例(92%)からVZV DNAが検出された。このことから、Ramsay Hunt症候群においてVZVは、第７、8脳神経領域に留まらず、全身に伝搬していると考えられた。また、図1に示したようにRamsay Hunt症候群では麻痺側に強いバンドを認められ、健常者では涙液12検体中4例(33%)から弱いバンドが検出された。一方、Bell麻痺患者15例の涙液からVZV DNAは検出されなかった。したがって、涙液からの検出結果は、帯状疱疹を伴わない、あるいは遅発性に発現するRamsay Hunt症候群とBell麻痺の早期鑑別診断になりうる可能性が示唆された。

[文献] 1) Aitken, R. S. et al. (1933) Lancet. 1; 19-22.
2) Murakami, S. et al. (1996) Ann. Intern. Med. 124; 27-30.
3) Mizobuchi, M. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5; 476-484.

表1 検出結果のまとめ

	末梢血中の単核球	髄液	涙液
Ramsay Hunt 症候群	6/12	2/11	12/13
対照群			
健常者	1/14	NA	4/12
Bell麻痺	0/9	NA	0/15
その他	NA	0/32	NA

NA; not available

図1 涙液の検出結果

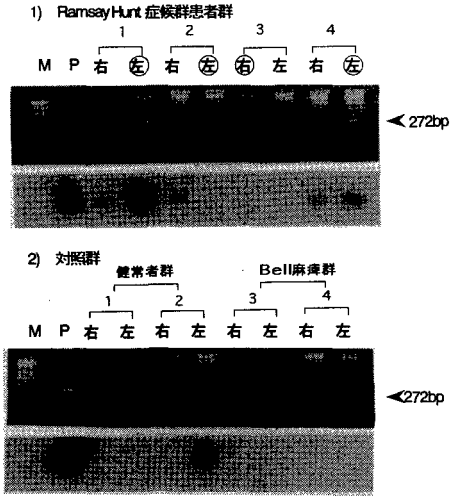


図１　上段がエチジウムブロマイド染色、
下段がサザンブロット染色の結果を示す。
1) Ramsay Hunt 症候群患者群
涙液を左右両側から採取し麻痺側を丸で囲んでいる。
エチジウムブロマイド染色で、症例1,4から、
サザンブロット分析では症例2からも検出されている。
症例1,4では健側からも検出されているが、麻痺側に強いバンドを認める。
2) 症例1,2が健常者群、症例3,4がBell麻痺患者群を示す。
症例2でエチジウムブロマイド染色では不明瞭であるが、サザンブロット分析で弱いバンドを認める。

18 1E24 マウス初期発育ステージにおける脳内HGPRT活性とドーパミン量の変化及び *in situ* hybridization によるHGPRTとチロシンハイドロキシラーゼの発現変化-

毛利英雄、町田光世、池田和正、佐藤嘉兵、中川滋木*
（日本大学生物資源科学部・応用生物、*医学部・生化学）

〔 要約 〕
マウスの脳初期発育ステージにおける脳内のHypoxanthine guanine phosphribosyltransferase (HGPRT)活性及びドーパミン（DA）含量の変化を大脳皮質、海馬、線条体、小脳の各部位について検討した。さらにHGPRT及びTyrosine hydroxylase（TH）の発現を *in situ* hybridization により比較した。海馬では発育に伴いHGPRT活性は増加、DA含量は減少、HGPRTmRNA及びTHmRNAともに生後２日目より顆粒層に局在した。線条体ではHGPRT活性は増加、DA含量は急激な増加を示したが、HGPRTmRNAは、発育段階を通して線条体全域が弱染され、THmRNAに関しても急激な局在性の変化は見られなかった。マウス脳の初期発育ステージにおいては海馬と線条体においてHGPRTとDAの機能上の関連性を示唆する結果となった。Lesch-Nyhan 症の原因が海馬もしくは線条体に由来する可能性が示唆された。

【目的】Lesch-Nyhan症候群では、HGPRTの遺伝的完全欠損により脳内DA量の減少が起こることが知られている。また、Lesch-Nyhan症が小児期に重篤な神経症状を発症する事とHGPRT⁻のマウスで生後６週目より有為に脳内DA量の減少が起こる[1]という報告から小児期での脳の分化が脳内の異常と関係のあることが示唆されている。しかしながらHGPRTとDAはの代謝上の関係は、全く知られていない。我々は、昨年までに免疫組織染色によりHGPRT及びDAが、初期発育ステージのマウス脳内において機能上の関連性を持つことを示唆した[2]。今回、この両物質の脳内での関係をさらに明らかにする事を目的として、初期発育ステージでのマウス脳内のDA及びHGPRT含有量の変化を測定し、さらにマウス脳内のHGPRT及び DAの生合成の律速段階酵素であるTHの発現部位の発育変化について検討を加えた。

【方法】ddYマウスの生後２、４、７、14、21、28日目の脳を取り出し、大脳皮質、海馬、線条体、小脳の４部位を切り出してドーパミンの含有量の変化をHPLC-ECDを用いて測定した。また、生後1週から5週までの各発育ステージにおける上記脳４部位を取り出し、HPLC微量アッセイ法によりHGPRT活性を測定した。ATCC社より購入したpHPT5及びpHGTH4についてマウス脳内mRNAに対する特異性をnorthern blotting により確認した。マウスの生後２、４、７、14、21、28日目の脳を４％パラフォルムアルデヒドで固定後、矢状断脳組織パラフィン切片を作成した。各切片についてDIGラベルしたpHPT5及びpHGTH4をプローブとして用いて *in situ* hybridization によりHGPRT及びTHの発現部位を検討した。

【結果】マウス脳内のHGPRT活性は、線条体及び海馬において発育にしたがって増加したが、大脳皮質及び小脳では生後１週からほぼ一定値を推移した（Fig. １）。一方、DA含量は海馬では発育に伴い減少傾向がみられ、逆に大脳皮質では発育とともに増加した（Fig. ２）。小脳は、調べられた部位の中で最もDA含量が低く、発育を通して低値を推移した。一方、線条体では、個体差も少なく、発育に伴って漸次DA含量が増加した（Fig. ３）。生後２日目の線条体のDA含量は、調べられた４部位のうち最も高く、発育に伴って著しく増加した。HGPRTmRNAは生後２日目から海馬の顆粒細胞に局在し、以後発育ステージを通して同部位に存在した（Fig. ４）。小脳におけるHGPRTmRNAは、発育段階を通してプルキンエ細胞に局在した（Fig. ４）。線条体は全域に中染し、プルキンエ細胞は、強染した。THmRNAの局在性の検討の結果、発育を通して、小脳のプルキンエ細胞が弱染し、海馬においては顆粒細胞が強染した（Fig. ５）。線条体は発育に伴い、ほぼ全域の染色性が増加した。

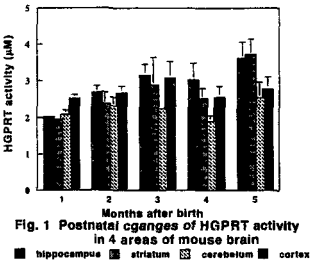


Fig. 1 Postnatal cganges of HGPRT activity in 4 areas of mouse brain

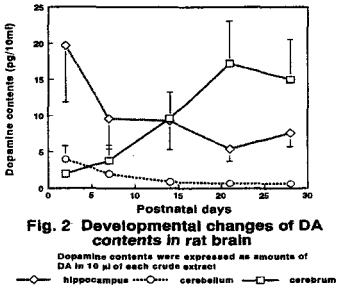


Fig. 2 Developmental changes of DA contents in rat brain

Dopamine contents were expressed as amounts of DA in 10 μl of each crude extract

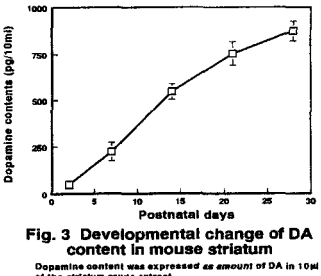


Fig. 3 Developmental change of DA content in mouse striatum

Dopamine content was expressed as amount of DA in 10μl of the striatum crude extract.

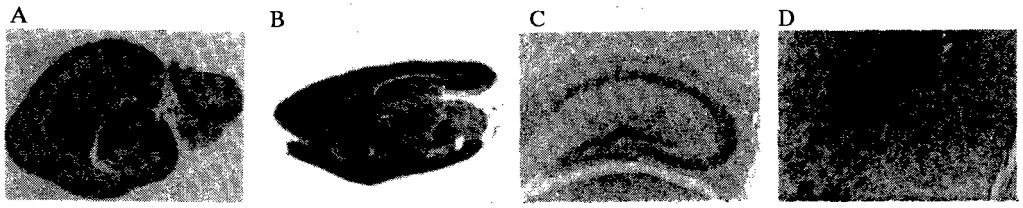


Fig. 4 Expression of HGPRT mRNA in initial growing stage of mouse brain.
A: postnatal days (PD) 4; B: PD 21; C: hippocampus on PD 7; D: cerebellum on PD 21.

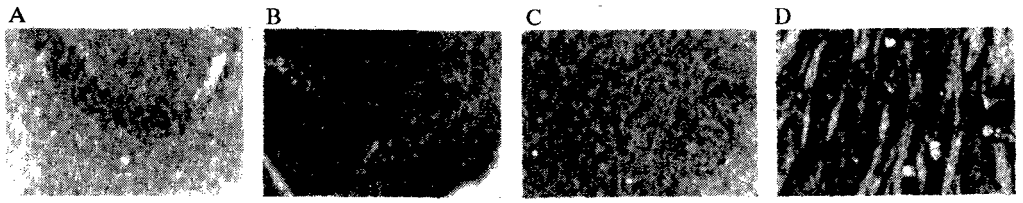


Fig. 5 Expression of TH mRNA in initial growing stage of mouse brain.
A: hippocampus on PD 14; B: cerebellum on PD 21; C: striatum on PD 2; D: stratum on PD 28.

【考察】マウス脳の海馬及び線条体では、発育に伴ってHGPRT量が増加していく事によりHGPRT欠損による障害は発育にパラレルに生じる可能性を示している。Lesch-Nyhan症の剖検患者の脳内でDAの減少が報告されてから[1]、この事が本症の神経症状の直接的な原因として注目されている。本実験では、DA量の変化とHGPRTの増加には線条体で相関性が、海馬で逆相関性が見られた。部位によりDA量とHGPRT量の変化は様々であり、それぞれの部位でこれらの物質の機能が異なる事を示唆している。HGPRT蛋白質は、発育初期には海馬にあまり存在していない事が報告されいる[3]。一方、本実験から得られたように海馬には、発育ステージ初期からHGPRTmRNAが局在しており、この時期に急速にHGPRTの合成がなされる可能性を示している。この領域ではDA量が発育に伴い減少して行く事からHGPRT欠損では、脳全体の分化のバランスをくずす一要因として海馬が重要であると考えられる。また、発育ステージを通してマウス脳内の同一部位にHGPRTとTHの発現が見られる事は、両酵素が重要な機能上の関連性を持つ事を示唆している。

【文献】

1．Lloyd KG, Hornnykiewicz O, Davidson L, Shannak K, Farley I, Goldstein M, Shibuya M, Kelley WN, Fox IH: Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome. N Engl. J. Med. 1981; **305**: 1106-1111.

2．マウス発育に伴う脳内ドーパミン局在性の変化 神経化学 1994; **33**: 442-443.

3．Ikeda K, Iida T, Nakagawa S: Postnatal expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in the mouse brain. Enzyme and Protein 1993; **47**: 65-72.

19 神経細胞に特異的なRNA結合蛋白質 (Hu)を認識する自己抗体の解析

1E25

吉村和法[1]、金子厚[2]、酒井宏一郎[3]、池田正明[1]、田中嘉代子[4]、山室 裕[5]、坂本 安[1]、北村邦男[1]、野村正彦[1] (埼玉医大・第一生理[1]、神経内科[2]、中央電顕室[4]、金沢医大・神経内科[3]、日本大学・生物資源科学部・動物資源科学科[5])

〔要約〕我々は縦隔悪性腫瘍で傍腫瘍性神経症候群を伴う患者血清中に自己抗体を見い出し、抗Ta抗体と名付けた。ラットおよび組み換えHu蛋白質を用いたウエスタンブロット分析およびラットを用いた免疫組織化学の結果、抗Ta抗体は分子量39－44 kDaのHu抗原を認識した。その抗原は神経細胞の突起の一部と細胞体、および核に存在することが示され、特に海馬や小脳では神経細胞の機能あるいは種類に対応して抗Ta抗体の抗原の発現量は不均一であることが免疫組織化学の結果から示唆された。またHu抗原のRNA結合領域の合成ペプチドを用いたELISAより抗Ta抗体のエピトープはRNA結合領域のもっとも保存的なアミノ酸配列を含むことが明らかになった。さらに検索したすべての動物種で抗Ta抗体との免疫反応性が観察されたので、抗体Taは,RNA結合蛋白質（Hu抗原）の機能上、非常に重要と考えられるアミノ酸配列をエピトープとしていることが示唆された。

（はじめに） 傍腫瘍性神経症候群は腫瘍に関連して起こる神経機能の異常であるが、神経組織への腫瘍の直接的侵潤や転移はない。現在までに、いくつかの異なる抗神経細胞自己抗体が傍腫瘍性神経症候群あるいは神経系への「遠隔効果」を受けた患者の血清中で同定されている[1]。それら自己抗体の抗原をコードするいくつかのcDNAクローンが単離され、その塩基配列が決定された[2,3,4]。しかし、それら抗原の機能はほとんど知られていない。それゆえ、その機能を明らかにするために、昨年の本学会で、われわれは抗Ta抗原の分布と局在について報告したが、この研究では、さらに実験を進め、抗Ta抗体の抗原の本体を明らかにし、そのエピトープについて解析を行ったので報告する。

(実験方法) 試薬は特別に記載されてない場合は既法[5]と同じものを使用した。動物については、ラットは雄あるいは雌の胎仔から１６週齢までのウイスターラットを用い、サル、ウサギ、マウス、ウズラ、コイ、カエル、イモリは成熟個体を用いた。抗Ta抗体の粗精製、さまざまな組織の調整、脳由来タンパク質の定量および免疫組織化学はすでに報告したように行った[5]。 タンパク質の定量はBio-Radタンパク定量キットを用いて行った。ウエスタンブロット解析もまた既法の方法に従った[5]。ple20とβガラクトシダーゼの融合タンパク質はple20 cDNA[4]をpBluescript vectorにin frameで組み込んだプラスミドをXL1-blueにトランスフォームし、常法に従ってIPTGによって蛋白質誘導を行った。そしてその溶菌したものを用いて、ウエスタンブロットに使用した。一次抗体として、抗Ta抗体 (40mg/ml)、ポリクローナル抗Hu抗体(ブロッキング溶液で２５０倍に希釈して使用した）、モノクローナル抗HuD抗体(ブロッキング溶液に溶かし5 mg/mlで使用した） (16A11)[6] あるいは正常ヒトIgG (40 mg/ml; Cappel)を使用した。２次抗体としてhorseradish peroxidase結合ヤギ抗ヒトIgG (Sigma)あるいは抗マウスIgG (Cappel)を使用した。

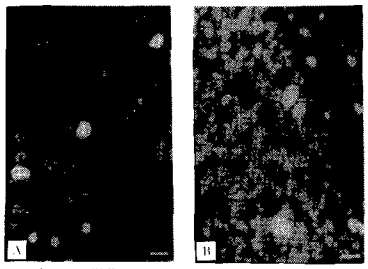
ペプチドとその合成. ペプチドP1 (Leu-Ile-Val-Asn-Tyr-Leu-Pro-Gln)とP2 (Arg-Gly-Val-Gly-Phe-Ile-Arg-Phe-Asp-Lys-Arg)はBio-Synthesis (Lewisville, TX, USA)に合成依頼し、購入したものを実験に使用した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ペプチドP1とP2のELISAは既法の方法[7]で行った。 ペプチドのプレートへのコートはプレート(Pirce,)に添付されたプロトコールにしたがって行った。コントロールは正常血清を使用して検体の生の吸光度から正常血清の値を差し引いた値を検体の真の吸光度とした。吸光度の測定は 405 nm でDynatech MR5000 (Dynatech)を用いて行った。

（結果および考察） 成熟ラット脳の免疫組織化学の結果、抗Ta抗体は神経細胞の突起の一部と細胞体それに仁をのぞく核を認識した（図１）。しかし、その染色性は大きく２種に大別された。すなわち、海馬や小脳では神経細胞のタイプや活動状態に応じて抗Ta抗原の発現量に大きく２つの違いがある可能性が示唆された（図１）。抗Ta、ポリクローナル抗Hu抗体、モノクローナル抗Hu抗体16A11[6]を用いたラット脳のウエスタンブロットの結果から、これらの抗体は分子量39から44kDaのタンパク質を認識し（図２）、抗Ta抗体の認識する主な４つの抗原のすべてをポリクローナル抗Hu抗体は認識し、またモノクローナル抗Hu抗体16A11はそれらの内、３つを認識すること（図２の矢印１、２、４）が示唆された。さらにHu抗原の一部をコードしているple20の融合タンパク質[4]が抗Ta抗体で認識されたので(図３)、抗Ta抗体はHu抗原を認識することが明らかになった。またHu抗原のRNA結合領域で保存的なアミノ酸配列に相当するペプチドP1およびP2が抗Ta抗体と反応したので、抗Ta抗体の抗原のエピトープの２つはすくなくともP1とP2であることが示唆された。またヒトやラット以外の他の動物種との免疫組織化学的分析の結果、本抗Ta抗体は、調べられたいずれの種の神経細胞とも交差反応性を示すので、すくなくともHu抗原の機能上、非常に重要と考えられるアミノ酸配列、すなわちRNA結合領域の保存的なアミノ酸配列を認識している可能性が示唆された。

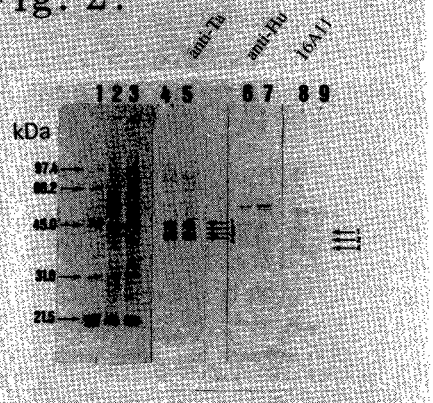
（文献）
1) Posner JB and Furneaux H M. In: Immunologic in Neurologic and Psychiatric Disease:Raven Press, 1990:187-219.
2) Szabo A, Dalmau J et al. Cell 67, 325-333 (1991).
3) Levine TD, Gao F et al. Mol Cell Biol 13, 3494-3504 (1993).
4) Sakai K, Gofuku M et al. Biochem Biophys Res Commun 199, 1200-1208 (1994).
5) Yoshimura K, Astushi K et al. Bull. Japan. Neurochem. Soc. 34, 232-234 (1995).
6) Marusich MF, Furneaux HM et al. J Neurobiol 25, 143-155 (1994).
7) Yoshimura K, Negishi T et al. Neurosci Res 25, 41-49 (1996).

Fig. 1.



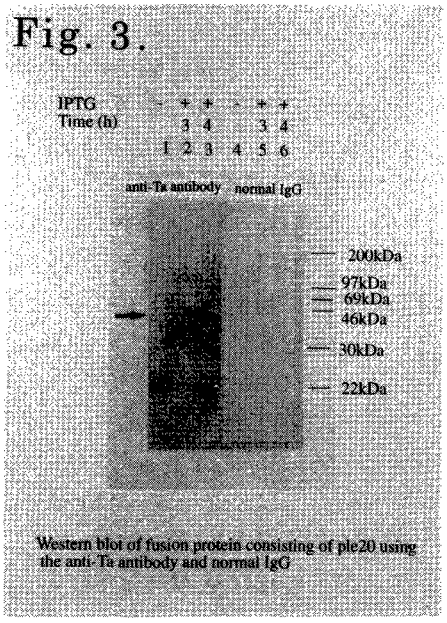
Immunofluorescence staining of hippocampus and cerebellum from a 12 weeks old rat. The anti-Ta antibody recognized parts of processes, cell body, and nuclei of a neuron in hippocampus and cerebellum (Fig. 1). Arrows show purkinje cells. Scale bar for all panels is 20 um.

Fig. 2.



Western blot analysis of rat cerebrum and cerebellum by anti-Ta antibody (lanes 4 and 5), polyclonal anti-Hu (lanes 6 and 7), and monoclonal anti-HuD, 16A11 (lanes 8 and 9), which recognize also HuC/ple21 and Hel-N1. Rat cerebrum and cerebellum were prepared according to materials and methods. Lanes 2, 4, 6, and 8: cerebrum ; lanes 3, 5, 7, and 9: cerebellum. Lanes 1, 2, and 3: coomassie blue staining. Lane 1: molecular weight markers.

Fig. 3.



Western blot of fusion protein consisting of ple20 using the anti-Ta antibody and normal IgG

20 1E26 メタンフェタミン反復投与のラット脳シナプス蛋白質mRNAに及ぼす影響

中原辰雄*、本藤久雄、中村薫、堤哲之、橋本喜次郎、河村幸佐、松本孝、平野誠、内村英幸（国立肥前療養所・情動行動障害センター・臨床研究部・生化学研究室、 *九州大学・理学部・化学教室）

〔 要約 〕

ラット脳シナプトタグミンとシナプトブレビンmRNAレベルに対するメタンフェタミン反復投与（5 mg/kg/day, 1 4日間）の影響を1日および1 4日間の断薬後に検討した。シナプトタグミンとシナプトブレビンのmRNAレベルは共に前頭前野で最も高く、海馬、黒質、側坐核、線条体、腹側被蓋野の順序であった。メタンフェタミンを反復投与した断薬1日群のシナプトタグミンmRNAレベルは前頭前野においてのみ有意に増加し、この効果は断薬1 4日後に消失した。シナプトブレビンのmRNAレベルにも同じ傾向が見られたが有意な変化は認められなかった。メタンフェタミン逆耐性は断薬後も長期間持続すること、線条体や側坐核でシナプス蛋白質mRNAの持続的な変化は認められないことなどから、シナプス蛋白質の誘導は逆耐性の形成に関与しないと考えられる。

[目的]

動物にメタンフェタミンを投与すると、常同行動、自発運動量の増大などの異常行動が発現するが、これらの行動は反復投与によって増強され、いわゆるメタンフェタミン逆耐性が形成される。逆耐性状態では、線条体や側坐核からのメタンフェタミンによるドーパミン放出が異常に亢進することは確認されているが、メタンフェタミン反復投与後のドーパミンニューロン異常に関する分子機構は明らかでない。本研究では、逆耐性現象へのシナプス前調節機構の関与を調べるために、シナプス小胞蛋白質であるシナプトタグミンとシナプトブレビンのmRNAレベルに対するメタンフェタミン反復投与の影響を検討した。

[方法]

Wistar系雄性ラットにメタンフェタミン（5 mg/kg）あるいは生理食塩水を一日一回1 4日間腹腔内投与し、1日および1 4日間の断薬後に断頭した。前頭前野、側坐核、線条体、海馬、黒質、腹側被蓋野のRNAをAGPC法により抽出した。オリゴdTをプライマーとしてRNAを逆転写し、シナプトタグミンI: 5'-CATCGGAGAGTTCAAAGTTCCTAT-3', 5'-GACTCGTTGTAGTAGGGGTTGAGTC-3'、シナプトブレビン(VAMP-2): 5'-CTGCACCTCCT CCAAATCTTAC-3', 5'-ATGATGATGATGAGGATGATGG-3'のプライマーを用い、β-アクチンmRNAを内部標準としてシナプス小胞蛋白質mRNAを定量した(1)。PCRは、10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTP, 2% DMSO, 0.5 U Taq polymerase, 0.025 μM β-アクチンプライマー, 0.5 μM シナプトタグミンあるいはシナプトブレビンプライマー, 25 ng 逆転写RNAを含む20 μlの溶液で21サイクル行なった（94℃/45 sec, 54℃/45 sec, 72℃/75 sec）。

[結果]

シナプトタグミンとシナプトブレビンのmRNAは全ての部位で確認され、18 - 24サイクルおよび6 - 30 ngのRNAの範囲でほぼ直線的に増加した。β一アクチンに相対的なシナプ

トタグミンとシナプトブレビンのmRNA量は共に前頭前野で最も高く、海馬、黒質、側坐核、線条体、腹側被蓋野の順序であった。全脳部位でシナプトタグミンとシナプトブレビンのmRNAレベルの間には相関関係が認められ、シナプトブレビンmRNAはシナプトタグミンmRNAより約1.6倍の高い値を示した。

メタンフェタミン反復投与は断薬1日群(M1群)の前頭前野におけるシナプトタグミンmRNAレベルを有意に増加し(24%, $p < 0.05$, Sheffe's F-test,)、断薬14日(M14群)にはこの効果は消失した。断薬1日群(M1群)の前頭前野におけるシナプトブレビンmRNAレベルにも同じ傾向が見られたが有意な変化は認められなかった(ANOVA, $F(3,28) = 1.75$, $p = 0.18$)。前頭前野以外の部位におけるmRNAレベルにはメタンフェタミン投与による変化は見られなかった。

[考察]

シナプトタグミンは神経伝達物質のCa^{2+}依存性開口放出に、シナプトブレビンは小胞のシナプス前膜へのドッキングに関与すると考えられている。シナプトタグミンmRNAレベルは前頭前野や海馬で高く、これらの部位のシナプス密度を反映している。またPCRの増幅率が同じであるなら、シナプトタグミンとシナプトブレビンmRNAの存在比は1:1あるいは2:1となるであろう。

中脳一皮質ドーパミン神経系はメタンフェタミンによって賦活されるので、前頭前野におけるシナプトタグミンmRNAの増加はメタンフェタミンによるドーパミン放出が異常に亢進した結果、後シナプス神経細胞のシナプス小胞を増加させたものと推定される。メタンフェタミンによる常同行動および自発運動量の増大は各々黒質一線条体、腹側被蓋野一側坐核ドーパミン神経系と密接な関連が知られている。しかし、これらの部位では、シナプス小胞蛋白質 mRNA へのメタンフェタミンの影響は認められず、シナプス蛋白質の発現はメタンフェタミン逆耐性現象の形成に関与しないことが示唆された。

[文献]

1) Dukas,K., Sarfati,P., Vaysse, N. and Pradayrol, L. (1993) Anal. Biochem. 215, 66-72.

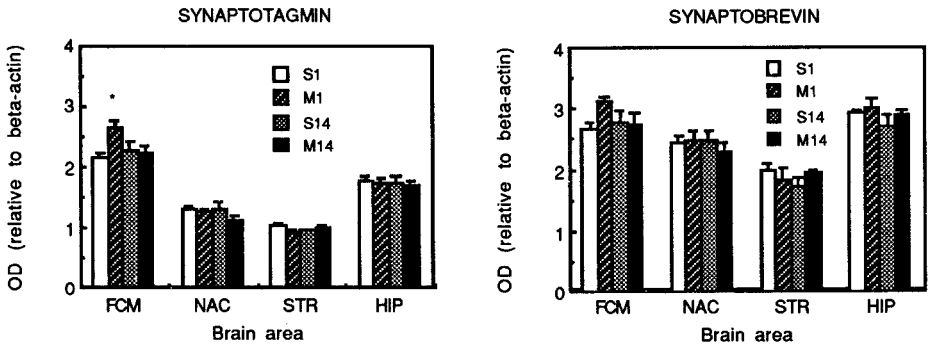


図1．ラット脳シナプトタグミンとシナプトブレビンmRNAレベルに対するメタンフェタミン反復投与の影響．ラットにメタンフェタミン（5mg/kg）あるいは生理食塩水を一日一回14日間腹腔内投与し、1日（M1群、S1群）および14日間（M14群、S14群）の断薬後に断頭した。前頭前野（FCM）、側坐核（NAC）、線条体（STR）、海馬（HIP）のmRNAレベルをRT-PCR法により分析した．* $P < 0.05$ ($n = 8$) Sheffe's F-test

21 Methamphetamine投与によるcalmodulin mRNAの変化

1E27 清水義雄、秋山一文、黒田重利
（岡山大学医学部神経精神医学教室）

（要約）
ラットにMAP (4mg/kg, i.p.)または生理食塩水(以下生食水)を1日1回連続14日間投与し、最終投与から4週間の断薬期間をおきMAP (4mg/kg, i.p.)または生食水をチャレンジして6時間後に断頭し(MM, MS, SM, SS 各群n=8)、脳内のcalmodulin(以下CaM) mRNAの変化を3種類のmRNA (CaM I, CaM II, CaM III)に特異的なoligonucleotide probeを用いてin situ hybridizationによって検討した。線条体, 側坐核においてはMAP急性投与では変化はなく、MAP慢性投与後4週間の休薬期間をおいた定常状態でCaM mRNAの低下が認められた。黒質緻密層, 腹側被蓋野ではCaM I mRNAはMM群で、CaM III mRNAはSM群とMM群で有意な低下を示し、CaM II mRNAは変化を示さなかった。MAP慢性投与後にCaM mRNAに変化が見られたことは、MAPによる長期的な行動変化にCaMが関わっている可能性を示唆していると考えられる。

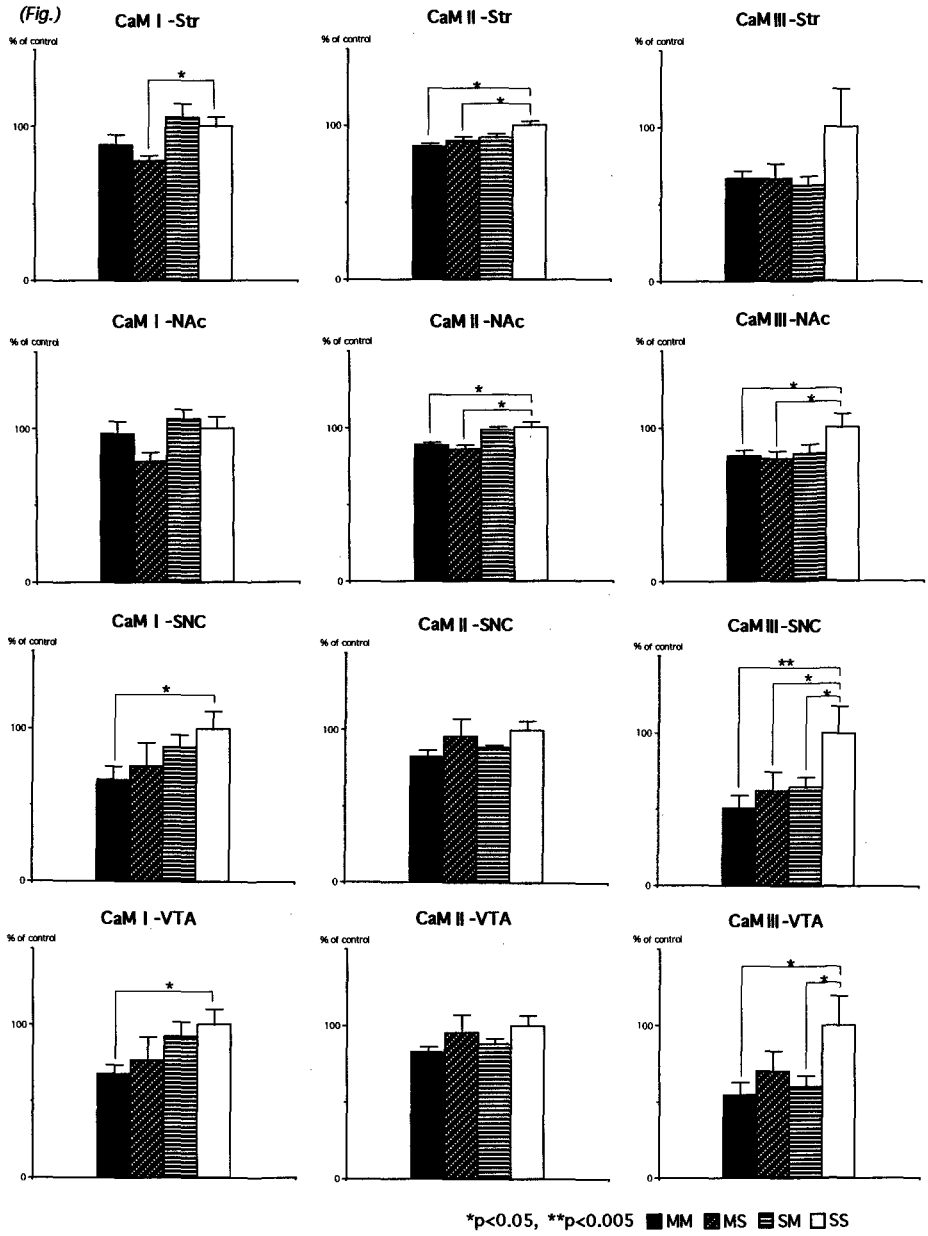
（はじめに）
CaMは普遍的に存在するカルシウム結合蛋白で、Ca^{2+}-CaMがCa^{2+}依存性酵素に結合すると、その酵素に立体的な構造変化が引き起こされ酵素の活性化が起こる。例えばadenylate cyclaseやNO synthaseなどの重要な酵素もCaMによってその酵素活性が調節されていることが知られている。Gnegyら[1]は、amphetamine慢性投与後の定常状態において線条体と側坐核でCaM蛋白が増加していたと報告し、amphetamineによるbehavioral sensitizationにCaMが関与していることを示唆しているが、CaM mRNAの変化についてはこれまで検討されていない。今回我々はMAP投与によるCaM mRNAの変化をIn situ hybridizationを用いて測定した。

（方法）
要約に記載した各群は、MM群(MAPを慢性投与してMAPをチャレンジ), MS群(MAPを慢性投与して生食水をチャレンジ), SM群(生食水を慢性投与してMAPをチャレンジ), SS(生食水を慢性投与して生食水をチャレンジ)である。脳を取り出しドライアイス粉で凍結した後、10μmの切片を作成した。Gannonらの報告[2]に基づきCaM蛋白をコードする3種類のmRNA (CaM I, CaM II, CaM III)に特異的な配列をoligonucleotide probeとして、3'端を[^{35}S]dATPで標識しIn situ hybridization に用いた。probeの特異性は50倍の非標識probeを加えたcompetition studyで確認した。各群すべての個体に対する切片及び段階的に希釈した[^{35}S]dATPを含むスタンダードを同一のフィルムにexposeさせた。線条体(Str), 側坐核(NAc), 黒質緻密層(SNC), 腹側被蓋野(VTA)の各部位から読み取ったoptical densityをdpm/mg tissueに変換して、SS群を100%としてその他の群をSS群と比較し%で表示した。post hoc test (Fisher's PSLD)を用いたone-way ANOVAで統計解析した。

（結果と考察） *(Fig.)*
ドパミン神経細胞の投射領域であるStr, NAcにおいては、SM群では変化を認めなかった。これはこれらの部位ではMAP急性投与の影響をCaM mRNAが受けないことを意味するが、MAP慢性投与後断薬期間をおいた定常状態(MS群)においては、StrではCaM I, CaM II、NAcではCaM II, CaM IIIのCaM mRNAが有意に低下した。ドパミン含有神経細胞領域であるSNC, VTAでは、CaM I mRNAはMM群で、CaM III mRNAはSM群, MM群で有意な低下を示したが、CaM II mRNAは変化を示さなかった。

Gnegyら[1]は、escalating dose paradigmを用いたamphetamine慢性投与後4週間の断薬期間をおいた定常状態において線条体では細胞膜と細胞質で、側坐核では細胞膜でCaM蛋白が増加していたと報告しているが、今回のmRNAレベルにおける研究では、MAP慢性投与後4週間の断薬期間をおいた定常状態において線

条体と側坐核でCaM mRNAが低下したという逆の結果が得られた。しかし急性投与では変化がないが、慢性投与後4週間たってはじめて変化が認められたという点では一致している。CaMがその酵素活性の調節をしているadenylate cyclaseやNO synthaseとbehavioral sensitizationとの関連はすでに報告されている[3,4]。今後SNC, VTAといったドパミン含有神経細胞領域を含めてCaM蛋白レベルの再検討を行う必要がある。



(文献)
1) ME Gnegy et al, Brain Res 562 (1991) 6-12
2) MN Gannon et al, Mol Brain Res 22 (1994) 186-192
3) H Patrick et al, J Pharmacol Exp Ther 255 (1990) 197-203
4) T Abekawa et al, Brain Res 666 (1994) 147-150

22 1E28 Cyclosporin A投与によるラットiminodipropionitrile誘発ジスキネジアの増悪と転写因子AP-1, CREBの関与

飯田享子，岩田恵美，西林佐紀子，浅沼幹人，近藤洋一，飯田基之，小川紀雄
（岡山大学医学部・分子細胞医学研究施設・神経情報学部門）

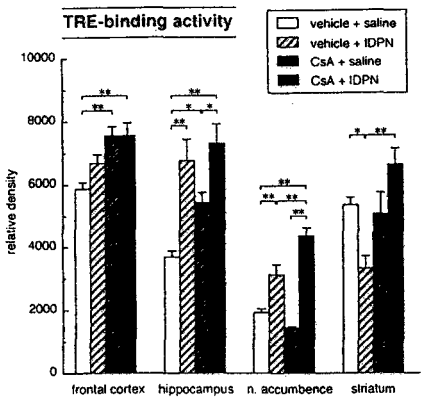
〔 要約 〕

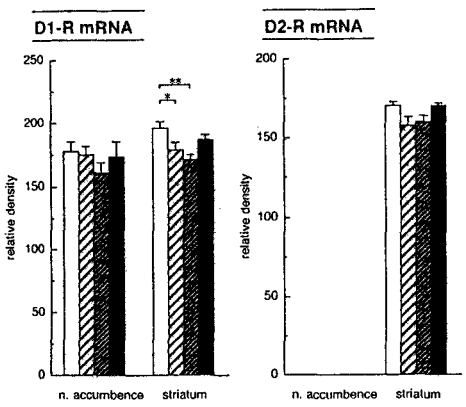
Iminodipropionitrile (IDPN)誘発ジスキネジアラットにおける脳内ドーパミン(DA)系の異常が報告されている．今回このモデルへの免疫抑制剤cyclosporin A (CsA)の同時投与の効果を明らかにし，IDPNおよびCsA投与が転写因子AP-1, CREBのDNA結合活性に与える影響，さらにD1-receptor (R), D2-R mRNA, CsAの結合蛋白であるcyclophilin (CyP) mRNAの変化について検討した．IDPN誘発頚部ジスキネジアはCsA同時投与により著明に増悪した．線条体のAP-1, CREBのDNA結合活性，D1-R mRNAはIDPN単独投与群で減少し，IDPN+CsA同時投与により対照群レベルにまで増加した．CsAはAP-1, CREBのTRE, CRE結合を活性化し，D1-RなどのDA系諸因子の発現を変化させジスキネジアを増悪させること，これら転写因子活性の変化がジスキネジアの発現に関与している可能性が示唆された．

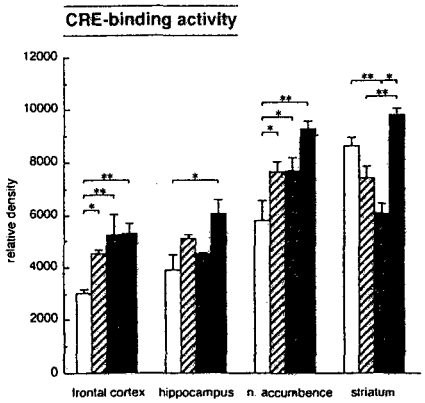
［目的］ ラットiminodipropionitrile (IDPN)誘発ジスキネジアは永続的であり，覚醒中にのみみられ，ストレスで増悪するなど，ヒトの特発性ジスキネジアに類似した動物モデルである(1)．IDPN投与ラット脳における生化学的変化についてはセロトニン系，ドーパミン(DA)系，アミノ酸系の異常などが報告されている．我々も，IDPN投与ラット側坐核，間脳でのDA神経が活性化していること，ジスキネジアがDA-receptor作用薬により調節をうけること，側坐核，線条体でのD1-receptor (D1-R)が減少していること，線条体でのDA代謝回転の亢進，D1, D2-Rの減少とそれらのmRNAの変化がジスキネジア運動の変化と平行していることなどを報告した(2,3)．近年，我々は一過性脳虚血やけいれん発作での脳機能障害過程に，免疫抑制剤cyclosporin A (CsA)が影響を及ぼしていることを明らかにした(4,5)．D1-R遺伝子のenhancer領域には転写因子AP-1, cAMP response element binding protein (CREB)の結合elementであるTRE, CREが存在しており， D2-R遺伝子のenhancer領域にはTREが存在している(6,7)．今回，IDPN誘発ジスキネジアへの免疫抑制剤の効果を明らかにし，IDPNおよびCsA投与が脳内AP-1, CREBのDNA結合活性に与える影響，さらにD1, D2-R mRNA, CsAの結合蛋白であるcyclophilin (CyP) mRNAの変化について検討した．

［方法］ 7週齢雄性SD系ラットにIDPN (100 mg/kg)を1日1回，7日間腹腔内投与した．CsA (5 mg/kg)は毎回のIDPN投与の1時間前に皮下投与した．IDPNおよびCsAの対照としてそれぞれsaline, vehicleを投与した．最終投与3週後にhead twitchingの頻度・重症度を観察した後に，断頭屠殺し脳組織から核抽出液を調製し，CREおよびTREを含む[α-^{32}P]dCTP標識2本鎖DNA probeと反応させるelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)にてAP-1, CREBのDNA結合活性を解析した．また，D1, D2-R, CyP mRNAはそれぞれに相補的な配列を有する[^{32}P]標識oligoprobeを用いたNorthern blot analysisで解析した．

［結果］ IDPN誘発頚部ジスキネジア(head twitching)はCsAの同時投与により発現時期が早まり，頻度は45.67±1.96 回/minから90.33±8.52 回/minと有意に増悪し重症化した．EMSAでは，AP-1のTRE結合活性はIDPN単独投与群の側坐核，海馬において増加したが，線条体では逆に減少した(図1上)．これに対して，IDPNとCsAを連日投与した群では側坐核，線条体のTRE結合活性がIDPN単独投与群に比して有意に増加していた．他の部位においてもこのCsAによる増加傾向は認められた．CsA単独投与群ではTRE結合活性は前頭皮質，海馬で増加した．CREBのCRE結合活性もTRE結合活性と同様の変化を呈した(図1下)．IDPN投与によりおもに前頭皮質，側坐核で増加し，線条体で減少した．また，すべての部位でIDPN+CsA投与によりCRE結合活性はIDPN群よりも増加した．線条体のD1-R mRNAは，AP-1, CREBのDNA結合活性と同様にIDPN単独投与群で有意に減少し，IDPN+CsA投与により対照群レベルにまで増加する傾向が認められ，また，CsAのみの連日投与により有意に減少した(図2上)．線条体のD2-R，側坐核のD1-R mRNAには各群間で有意な変化は認められなかった(図2上)．さらに，線条体のCyP mRNAはIDPNの投与により著明に減少していたが，CsAの同時投与により増加する傾向がみられた．CsAのみを連投した場合にも対照群に比して有意に減少した(図2下)．







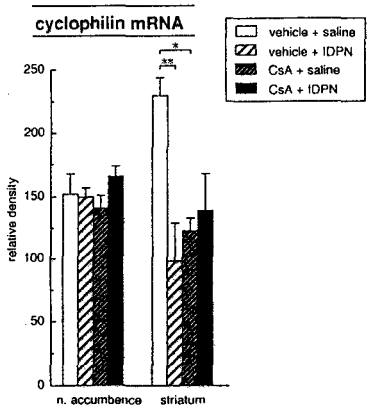


図1. IDPN誘発ジスキネジアラットにおけるCsA投与の脳内TRE, CRE結合活性への影響
*p<0.05, **p<0.01

図2. IDPN/CsA投与による側坐核，線条体でのD1-R, D2-R, CyP mRNAの変化
*p<0.05, **p<0.01

［考察］ 線条体でのAP-1, CREBのDNA結合活性，D1-R mRNAはIDPN単独投与群で減少し，IDPN+CsA同時投与により対照群レベルあるいはそれ以上にまで増加した(図1,2)．また，IDPN+CsA連日投与群でのAP-1, CREBのDNA結合活性の増加は側坐核においても認められた(図1)．さらに，IDPN単独投与群の線条体でCyP mRNAが著減したことは，ジスキネジアにおいてCyPが増加していることに対する代償的な変化とも考えられる．これらの結果から，ジスキネジアモデルの線条体ではCsAは反応性の亢進あるいは増加したレセプター蛋白CyPへの結合を介して，直接あるいは二次的にAP-1やCREBのリン酸化の増大や核内移行の促進をもたらし，これらの転写因子のDNA結合活性を増加させたと考えられる．これらの転写因子特にCREBの活性の増大により結合elementであるTRE, CREを有するD1-R mRNAの発現が高まったと考えられる．IDPN+CsA投与群の線条体，側坐核ではDA含量が増加しており(8)，tyrosine hydroxylase (TH)遺伝子の上流域にもTRE, CREが存在することから(9)，このCsAのDA含量増加作用の一部にはAP-1やCREBの活性増加によるTH mRNAの発現亢進が関与しているのかもしれない．以上より，CsAはAP-1, CREBのTRE, CRE結合を活性化し，D1-RやTH mRNAなどDA系諸因子の発現を変化させジスキネジアを増悪させること，ならびにこれらの転写因子の活性の変化がジスキネジアの発現に関与している可能性が示唆された．

［文献］ 1. Ogawa, N. et al. (1991) Brain Res., 556: 271-279. 2. Ogawa, N. et al. (1990) Eur. Neurol., 30 (suppl. 1): 31-40. 3. Hirata, H. et al. (1993) Brain Res., 604: 197-204. 4. Ogawa, N. et al. (1993) Neurosci. Lett., 152: 173-176. 5. Asanuma, M. et al. (1995) Mol. Brain Res., 33: 29-36. 6. Zhou, Q.-Y. et al. (1992) J. Neurochem., 29: 1875-1883. 7. Minowa, T. et al. (1992) Biochemistry, 31: 8389-8396. 8. 岩田恵美他 (1994) 神経化学, 33: 426-427. 9. Cambi, F. et al. (1989) J. Neurochem., 53: 1656-1659.

23 ＥＬマウスにおける脳内ＳＯＤアイソザイム 1Ba5 蛋白量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*
（東京都精神研・神経生理、*東邦大学・医・精神医学）

〔要約〕

発作履歴の有無という観点から、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いる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)の代表的アイソザアイムであるMn-SODとCu,Zn-SODの蛋白量を ELISAｼｽﾃﾑ (Amersham Life Science)を用いて測定した。本学会にて昨年発表した各アイソザイム活性の変化を裏付ける結果が得られた。

[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、昨年発表した各SODアイソザイム活性の発達生化学的変化について、Mn-SODとCu,Zn-SODの蛋白量を測定することで、その意義を検討した。

[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6匹計30匹を用いた。**ＳＯＤアイソザイム蛋白量の測定法**：市販のELISAｼｽﾃﾑによった。較正曲線で直線性の得られる範囲（Mn-SODでは0-2.00ng/Assay、Cu,Zn-SODでは0-1.25ng/Assay）は極めて狭いがﾌﾞﾗﾝｸに対応する値も、それぞれ、0.0220ng, 0.0141ng と極めて低く、高い感度が得られた。

[結果] EL[s]の頭頂皮質については、てんかん原性の確立した30週齢以降、Cu,Zn-SOD蛋白量の有為な上昇を認めた。一方EL[s]の海馬については、発作閾値の低下し始める10週齢以降、Cu,Zn-SOD蛋白量の有為な低下が認められた。EL[ns]群の Cu,Zn-SOD蛋白量の変化については、EL[s]と同様の傾向を示したが、対照のDDYと比べて有為な差は認められなかった。Mn-SOD蛋白量については、EL[s]の海馬で有意に低下していたが、発達過程による変化は認められなかった。

[考察] ELﾏｳｽのSOD蛋白量で特に顕著な変化を示したのは海馬と頭頂皮質のCu,Zn-SOD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[4]。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。

Fig.1 Developmental changes of SOD isoenzyme contents in the parietal cortex of EL[s],EL[ns](Fig.2) and DDY(Fig.3). Fig.4 Developmental changes of SOD isoenzyme contents in the hippocampus of EL[s], EL[ns](Fig.5) and DDY(Fig.6) Hatched bars indicate contents of Mn-SOD and open bars indicate those of Cu,Zn-SOD. T's on bars mean S.E.M. Number of animals used for each data are six.

［文献］ 1.Murashima,Y.L., Kasamo,K. and Suzuki,J. (1992) Neurosciences 18, 63-
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.Pellmar,T.C. et al(1991)Neuroscience 44(2), 353-359

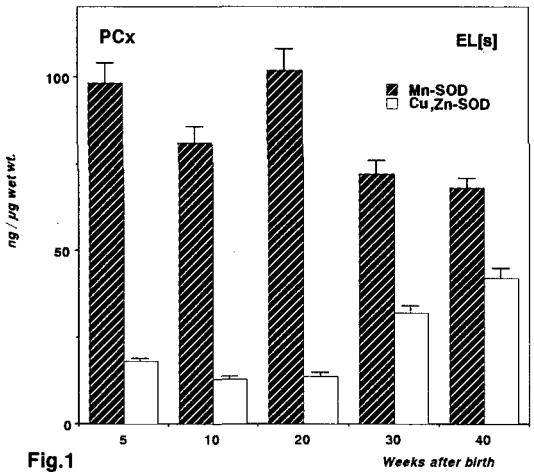


Fig.1

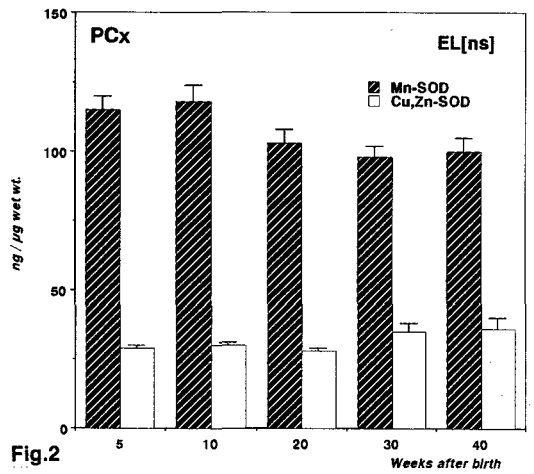


Fig.2

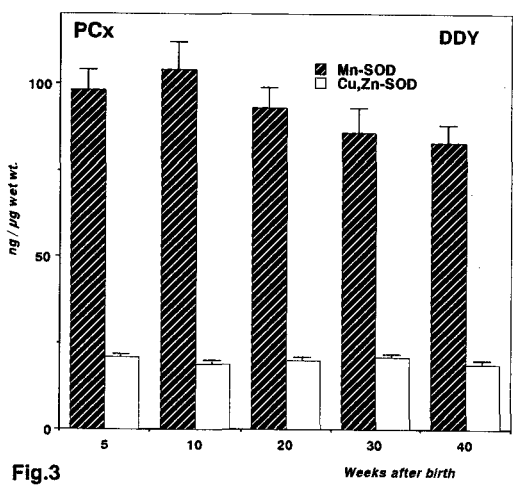


Fig.3

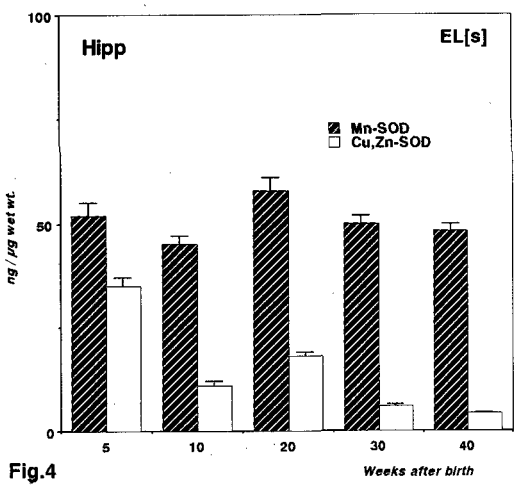


Fig.4

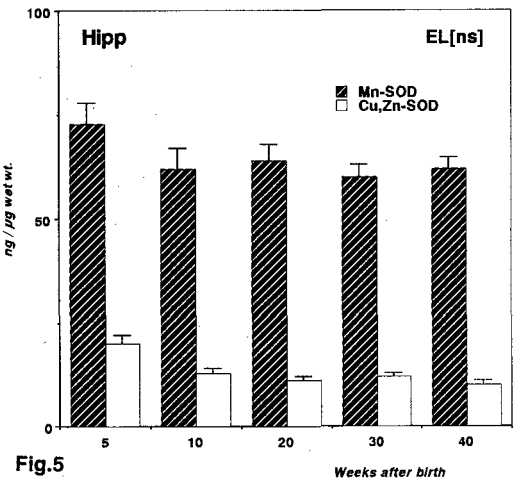


Fig.5

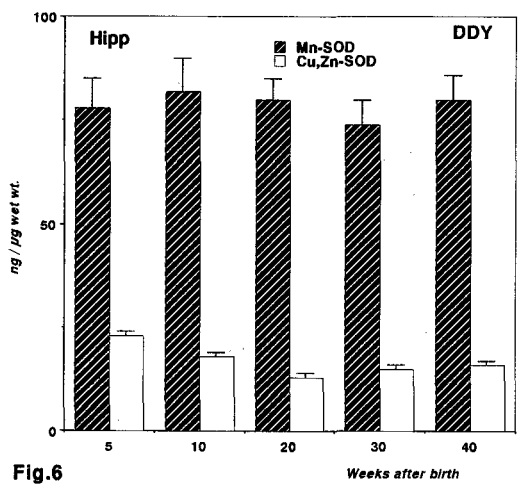


Fig.6

24 1E29 ELマウスの成長に伴う痙攣準備性の獲得と脳mRNA翻訳活性について

[1]中西亜紀、[2]撫井弘二、[2]黒田陽子、[2]古塚大介、[2]横谷 昇、[2]木岡哲郎、[1,2]山上 榮
(大阪市立大・医・[1]老年科・神経内科、[2]神経精神科)

〔要約〕

遺伝性癲癇モデルマウスであるELマウスと、その母系であるddYマウスを用いて、in vitroの系において、成長に伴う脳mRNA翻訳活性の変化を比較検討した。ddYマウスでは、成長過程において翻訳活性に大きな変化は認められなかったが、ELマウスでは生後28日までと比較し生後56日目から翻訳活性は有意に低下した。また、生後56日目、100日目におけるELマウスの翻訳活性は、ddYマウスと比較して有意な低下を認めた。EL[s]マウスとEL[ns]マウスの間では特に差は認められなかった。ELマウスでは、痙攣準備性が獲得される時期と一致して翻訳活性の低下が認められ、翻訳活性の低下がELマウスにおいて癲癇の症状発現と関わりを持つ可能性が示唆された。

[序言]近年、遺伝性疾患の原因遺伝子が次々と解明されてきているが、遺伝子異常の存在がいかに病態をもたらすのかは、依然大きな謎であり最も興味をもたれるところである。疾患によりその病態発現時期は異なり、個体の誕生からは大きな時間的ずれが存在する。遺伝情報発現の様々なレベルでの時間的・空間的制御が明らかにされつつあるが、依然不明な点が多い。

遺伝的癲癇モデルマウスであるELマウスは、放り上げ刺激を加えることで、生後50日前後から痙攣発作をおこしてくる。すでに我々は生後100日目の脳mRNAの翻訳活性の異常を指摘してきたが(3)、ELマウスの成長過程における翻訳活性低下発現時期について、痙攣準備性の獲得時期との関連を検討したので報告する。

[方法]実験には、生後14日目、21日目、28日目のELマウスと、生後28日より週1回の放り上げ刺激を与えた生後56日目および75日頃より強直間代痙攣を起こした100日目のEL[s]マウス、生後28日以降も放り上げ刺激を加えず、痙攣履歴のない生後56日目、100日目のEL[ns]マウス、および生後14、21、28、56、100日目の母系マウスである発作非感受性ddYマウスを用いた。マウス全脳から既報(1)に従いpolysomal poly(A)$^+$mRNAを調製した。mRNAを[^{35}S]-methionineを含むrabbit reticulocyte lysateの系に加え、合成蛋白質への[^{35}S]-methionineの取り込みについて翻訳活性を比較した。

[結果]ddY、EL[s]、EL[ns]の3群マウスの成長に伴う脳mRNA翻訳活性の経時的変化をFig.1に示す。ddYマウスでは、生後14、21、28、56、100日目のいずれの脳mRNA翻訳活性でも有意な差が認められなかった。一方ELマウスでは、生後14日目と比較して、21、28日目では翻訳活性は上昇傾向を示し、21、28日目と比較して56、100日目で有意な低下を示した。Fig.2に示したEL28日目とEL[ns]100日目の翻訳産物のSDS-PAGEでは、主たるbandの出現に差はなかったが、より強く発現するbandが異なっていた。また、Table.1にddY、EL[s]、EL[ns]3群における翻訳活性を示す。ddYマウスと比較してELマウスでは56、100日で翻訳活性の有意な低下を認めた。ELマウスにおける56、100日目の翻訳活性は、EL[s]、EL[ns]の間では有意差が認められず、放り上げ刺激、痙攣履歴の有無には関係がなかった。

[考察]既に、ELマウス脳mRNAのin vitroにおける翻訳活性の低下を報告してきているが、

その中で、生後100日目のマウスでの活性の低下が特定の蛋白の合成異常ではないことを示してきた(3)。加えたmRNAの量が一定であること、翻訳系にrabbit reticulocyte lysateを用いたことより、翻訳活性の低下が、mRNA自体による差異に基づく可能性が示唆される。翻訳活性の全般的な低下には、mRNA自身の5' cap構造、3' untranslated regionの関与する、何か調節的な役割の異常が推測され、我々も、ELマウスにおいて、翻訳過程の異常にpoly(A)鎖が関与する可能性を報告した(2,4)。ELマウスでは、生後56日目に脳mRNAの翻訳活性が全般に低下することが明かとなったことから、この頃mRNAに変化が起こり、また成長の時期により特に発現される蛋白質のパターンが異なることから、その時期に特に発現が必要な遺伝子へ大きな影響を及ぼし、疾患の発症、即ち痙攣準備性の獲得に至る可能性が考えられるかもしれない。

Table. 1

mouse/days	14	21	28	56	100
ddY	47.7±3.03	40.2±1.29	52.8±4.23	46.2±4.93	56.3±2.50
EL[s]				20.1±1.33*1,*2	28.1±3.28*1,*2
EL[ns]	44.9±4.27	64.4±2.92	64.3±3.08	31.9±2.05*1,*2	34.6±1.93*1,*2

mean cpm/μg mRNA±S.E.

$p<0.01$

*1 compared with the same aged ddY mouse

*2 compared with the 21 and 28 days EL mice

Fig.1

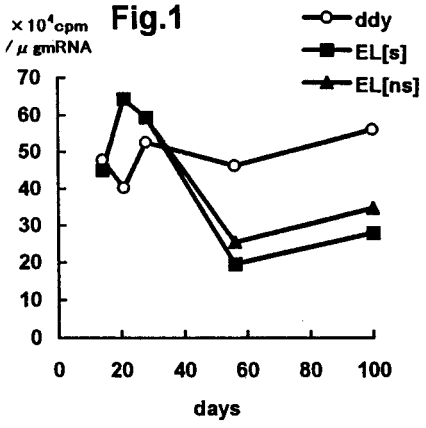
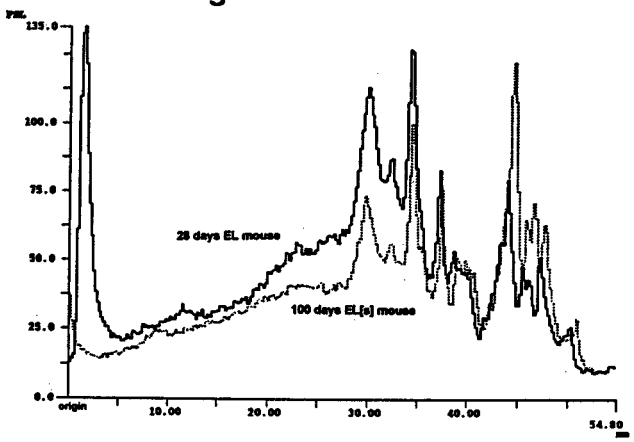


Fig.2



[参考文献]

(1)Mui, K. et.al. (1989) Jpn. J. Psychiatr. Neurol., 43, 573-574

(2)Mui, K. et. al. (1992) Jpn. J. Psychiatr. Neurol., 46, 529-530

(3)Nakanishi, A. et. al. (1991) J. Neurochem., 57(suppl), 71

(4)Nakanishi, A. et. al. (1995) Neurochemical Research, 20(3), 3

25 1E30 ELマウス発作後の脳 glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現とGFAPおよびc-*fos*発現へのanisomycinの影響

勝元 栄一、尾崎 宜洋、横谷 昇*、撫井 弘二、古塚 大介、山上 榮
(大阪市立大学医学部神経精神医学教室、*同附属刀根山結核研究所分子制御部門)

〔要約〕
遺伝性てんかんモデルのELマウスにおける発作後の脳GFAP mRNA発現と蛋白合成阻害剤anisomycinの前投与による発作後のGFAP mRNAおよびc-*fos* mRNA発現の変化について検討した。GFAP mRNAの発現は発作後4時間より誘導が認められ、18時間にピークに達し、72時間後には消失したが、120および144時間後に再度誘導がみられる二相性の変化を示した。また、anisomycinの前投与によってGFAP mRNAは二相性の発現であったが、明らかに発現量は低下した。ddYマウスに対してペメグリドで発作を誘発すると、GFAP mRNAの発現はELの場合より少なかった。これらのことより、gfa geneの転写制御にAP-1が関与する可能性が示唆された。ELマウス脳におけるc-*fos* mRNAの発現は、anisomycinの前投与によって延長することが示され、AP-1によるautoregulationの障害によるものと考えられた。

(はじめに) glial fibrillary acidic protein (GFAP) は反応性アストロサイトのマーカーであり、電気ショックやpentylenetetrazolのけいれん発作やキンドリングの誘発発作において脳で発現することが報告[9]されている。また、蛋白合成阻害剤はキンドリングの形成を抑制し[1]、てんかん発作に関与する[10]ことも知られている。今回我々は遺伝性てんかんモデルであるELマウスを用いて、発作後のGFAP mRNAの発現や蛋白合成阻害剤を前投与した後、発作を誘発した時のGFAP mRNAやc-*fos* mRNAの発現について検討を加えた。

(方法) 生後4週齢より毎週放り上げ刺激を与え、発作感受性を獲得した20～25週齢のEL[s]マウスと発作非感受性のddYマウスを用いた。EL[s]マウスには放り上げ刺激を、ddYマウスには16 mg/kg体重のペメグリドを腹腔内に注射して発作を誘発した。また、蛋白合成阻害剤anisomycinは50 mg/kg体重を放り上げ刺激30分前に皮下注射した[2]。発作後経時的に摘出したマウス全脳よりsingle step法でtotal RNAを抽出した。total RNA20 μgをアガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。ランダムプライマー法によりmouse gfa gene cDNAを[^{32}P]-dCTPでラベルしたものを用いてハイブリダイゼーションを行い、GFAP mRNA発現を調べた。

(結果) Fig. 1にGFAP mRNAの発現を示した。EL[s]マウスに放り上げを加えて発作を誘発すると、発作後12時間より発現がみられ、18時間でピークとなり、その後は減少し、72時間には認められなくなったが、120時間に再び発現し、144時間でも認められた(Fig. 1 (a))。放り上げ刺激の30分前にanisomycin 50 mg/kg体重を皮下注射し、放り上げ刺激で発作を誘発した(Fig. 1 (b))。その時のGFAP mRNAの発現は蛋白合成阻害剤を投与しない時と同様に二相性であったが、18時間でピークとなった。しかし、発現量はFig. 1 (a)に比べると少なく、その前後の発現は認められなかった。次いで72から120時間にかけても発現が認められたが、これもFig. 1 (a)に比べると少なかった。ELマウスの母系で発作感受性を持たないddYマウスにペメグリド16 mg/kg体重を腹腔内投与して発作を誘発し、GFAP mRNAの発現を示したのがFig. 1 (c)である。発作12時間より発現を認め、24時間にピークとなり、48時間まで発現が認められたがFig. 1 (a)に比べてGFAP mRNAの発現は少なかった。その後96と120時間にも僅かに発現を認めた。

我々はEL[s]マウスに放り上げ刺激を加え、発作を誘発した時のc-*fos* mRNAの経時的な発現について報告[4]したが (Fig. 2 (a))、発作後15分に発現を認め、30分にピークとなり、60分まで発現は持続し、2時間で消失した。anisomycinを前投与した時のc-*fos* mRNAの発現 (Fig. 2 (b)) は発作後15分で上昇し、30分でピークとなるのは同様であったが、2時間まで持続し、4時間にも僅かに発現を認め、明らかにc-*fos* mRNAの発現が延長した。

（考察）ELマウスの放り上げ刺激による発作の場合でも、電気ショック、pentylenetetrazolの投与やキンドリングと同様にGFAP mRNAの発現を認めた。この経時的変化はStewardらの報告[8]と同様に二相性の発現を示した。また、その発現はanisomycinの前投与によって抑制された。Masoodら[6]はhuman gfa geneが上流にAP-1認識配列を有し、AP-1による転写制御を受けている可能性を示唆したが、ここでの結果はanisomycin投与によって、発作後のc-*fos*などAP-1の翻訳が阻害され、そのため、GFAP mRNAの発現が抑制されたのではないかと推測される。c-*fos* mRNAとFos蛋白質の発現は、EL[s]の放り上げによる発作の場合が、ddYマウスにペメグリドを投与したものより時間が延長し、量的にも多いことを報告している[4,5]。このことはddYマウスにおいてGFAP mRNAの発現はEL[s]の放り上げの場合より発現量が少なかったことが、AP-1による転写制御を受けることを示唆している。蛋白合成阻害剤の前投与によってc-*fos* mRNAの発現が延長したが、Greenbergら[3]やMorelloら[7]の報告のようにAP-1によるautoregulationの障害によるものと考えられた。

mouse gfa gene cDNAを譲渡して頂いた慶応大学医学部脳外科　戸田　正博博士の御厚意に深謝する。

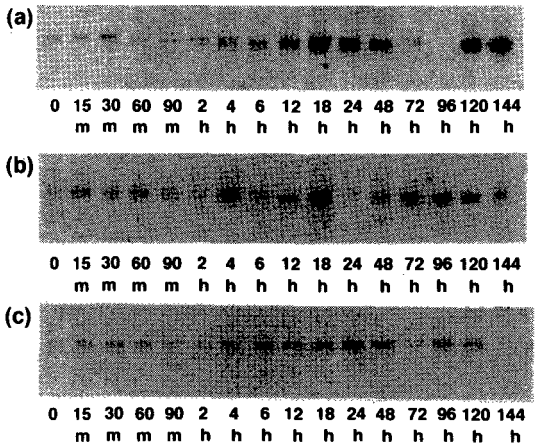


Fig. 1　GFAP mRNA expression after seizures. (a): tossed-up induced seizures in EL[s] mice, (b): tossed-up induced seizures in EL[s] mice after an administration of anisomycin, (c): bemegride induced seizures in ddY mice.

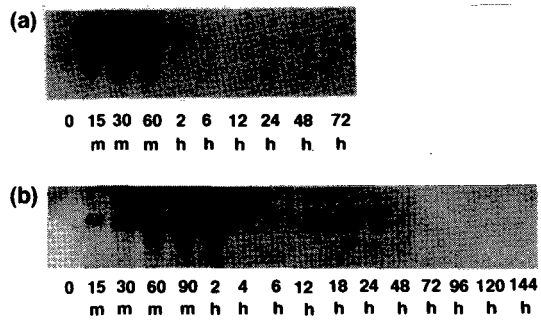


Fig. 2　The c-*fos* mRNA expression after seizures in EL[s] mice. (a): tossed-up induced seizures, (b): tossed-up induced seizures in EL[s] mice after administration of anisomycin.

（文献）

1. Cain, D. P., et al. (1980) Exp. Neurol. 68, 409-419
2. Flood, J. F., et al. (1973) Physiol. Behav. 10, 555-562
3. Greenberg, M. E., et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6, 1050—1057
4. 勝元　栄一ら (1992) 神経化学 30, 452-453
5. 勝元　栄一ら (1993) 神経化学 31, 66-67
6. Masood, K., et al. (1993) J. Neurochem. 61, 160-166
7. Morello, D., et al. (1990) Oncogene 5, 1511-1519
8. Steward, O., et al. (1990) J. Neurosci. 10, 2373-2384
9. Torre, E. R., et al. (1993) Brain Res. 631,256-264
10. Williaams,M. B., et al. (1994) Exp. Neurol. 129, 169-173

26 1E31 ELマウスに対するオピオイドκアゴニストの抗痙攣作用について

甲斐 利弘、大西 博*、小出 誠司*、片山 雅文*、
橋本 博史*、中村 嘉宏*、谷 宗英*、山上 榮*
(大阪市立総合医療センター、大阪市立大学医学部神経精神医学教室*)

〔要約〕
痙攣と脳内ダイノルフィン系の関係を明らかにするために、ELマウスに、オピオイドκアゴニストのdynorphin A 1-8、nalbuphine、U-50488を皮下注射と大槽内投与法で投与し、痙攣に対する影響を検討した。オピオイドκアゴニストは用量依存性にELマウスに対して抗痙攣作用を示し、アンタゴニストのnaloxoneによって拮抗された。これらの結果は、ダイノルフィン系に属するオピオイドペプチドがオピオイドκレセプターを介して痙攣発作を抑制することを示唆する。

〔緒言〕
オピオイドペプチドは、多彩な生理作用を有するが、オピオイドκアゴニストは痙攣に対しては、促進的[1]あるいは抑制的[2-4]であるという相反する報告がみられる。我々はこれまで、ダイノルフィンが選択的に結合するκレセプターが、発作間歇期のELマウス脳で、ddYに比べてup-regulateする[5]ことを報告した。今回、ELマウスの痙攣と脳内ダイノルフィン系の関係をさらに明らかにするために、オピオイドκアゴニストのdynorphin A 1-8、nalbuphine、U-50488をELマウスに投与し、痙攣に対する影響を検討した。

〔方法〕
1) 実験動物：強直間代痙攣期（生後150日）のELマウスについて、痙攣発作7日後の放り上げ刺激前に以下の薬物を投与した。
2) 使用薬物：オピオイドκアゴニストとして、dynorphin A 1-8、nalbuphine、U-50488を使用した。また、オピオイドアンタゴニストとして、naloxoneを使用した。
3) 薬物投与と放り上げ：上述したオピオイドκアゴニストを皮下注射、あるいはUedaらの方法[6]に従い、大槽内に投与した。皮下投与では、投与45分後、大槽内投与では、投与15分後に放り上げ刺激を加え、痙攣に対する効果を検討した。大槽内投与では、投与用量が10 μlになるように調整した。対照群として薬物に代えて生理食塩水を投与した。また、オピオイドアゴニストに加え、アンタゴニストとしてnaloxone (2 mg/kg, s.c.)を放り上げ刺激の10分前に皮下に投与した。
4) 痙攣発作の評価：痙攣頻度(incidence)は上述した使用薬物の各群について、痙攣が出現した個体数を、薬物を投与した個体数で除したものを百分率で表した。有意差検定は対照群との間で行った。抗痙攣作用の用量依存性の検定は、単回帰分析を行った。また、naloxoneの投与によって、対照群に比べて痙攣を抑制した有意の差異がなくなった場合を、「抗痙攣作用が拮抗された」とした。

〔結果〕

オピオイドアゴニストの dynorphin A 1-8、nalbuphine、U-50488 はすべて、皮下注射と大槽内投与の両方で、用量依存性に抗痙攣作用を示した。また、この抗痙攣作用は naloxone で拮抗された(Table 1-6)。

〔考察〕

本実験においてオピオイドκアゴニストが用量依存性に EL マウスに対して抗痙攣作用を示し、アンタゴニストの naloxone によって拮抗されたことは、ダイノルフィン系に属するオピオイドペプチドがオピオイドκレセプターを介して痙攣発作を抑制することを示唆する。これらの結果は EL マウス脳でのオピオイドκレセプター密度の増加[5]に対応しており、痙攣に対して抑制的に作用する脳内ダイノルフィン系の機能低下が EL マウスの痙攣発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

〔文献〕

1) Snead Ⅲ, O. C. et al. (1982) Neuropharmacology 21, 1137-1144　2) Garant, D. S. et al. (1985) J. Pharmacol. Exp. Ther. 234, 45-48　3) Lee, R. J. et al. (1984) Neuropharmacology 23, 517-524　4) Tortella, F. C. et al. (1986) J. Pharmacol. Exp. Ther. 237, 49-53　5) 甲斐利弘ほか (1992) 神経化学 30, 454-455　6) Ueda, H. et al. (1979) Eur. J. Pharmacol. 56, 265-268

Table 1. Effects of dynorphin A 1-8 administered by subcutaneous injection

Dose(mg/kg)	Control	0.1	5	10	20	40
Incidence(%)	93.5	100.0	77.8	77.8	77.8	90.0

Table 2. Effects of nalbuphine administered by subcutaneous injection

Dose(mg/kg)	Control	0.1	1	5	50	80	100	100+NLX
Incidence(%)	93.5	90.0	88.9	77.8	75.0	60.0[a]	55.6[a]	100.0

Table 3. Effects of U-50488 administered by subcutaneous injection

Dose(mg/kg)	Control	0.1	1	5	10	20	40	20+NLX
Incidence(%)	93.5	100.0	90.0	80.0	77.8	60.0[a]	77.8	88.9

Table 4. Effects of dynorphin A 1-8 administered by intracisternal injection

Dose(μg/animal)	Control	0.1	1	4	20	50	200	50+NLX
Incidence(%)	92.3	100.0	88.9	87.5	60.0[a]	25.0[b]	55.6[a]	100.0

Table 5. Effects of nalbuphine administered by intracisternal injection

Dose(μg/animal)	Control	1	4	20	40	100	150	40+NLX
Incidence(%)	92.3	100.0	77.8	50.0[a]	25.0[b]	70.0	66.7	100.0

Table 6. Effects of U-50488 administered by intracisternal injection

Dose(μg/animal)	Control	0.1	1	4	50	100	200	100+NLX
Incidence(%)	92.3	100.0	88.9	77.8	66.7	55.6[a]	77.8	100.0

NLX : naloxone 2 mg/kg, s. c.

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.001$; compared with controls

27 1E32 ペンチレンテトラゾール誘発痙攣によるマウス脳 Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase II 活性の変化

古塚大介[1]、木岡哲郎[1]、勝元栄一[1]、横谷昇[2]、尾崎宣洋[1]、撫井弘二[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、大脳皮質および海馬より細胞質画分と膜画分とを調製し、Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase II (以下CaMKII) 活性を測定した。大脳皮質および海馬の膜画分のCaMKII活性が痙攣後10分で有意に亢進したが、細胞質画分では両部位とも有意な変化は見られなかった。

以上の結果から、PTZ誘発痙攣後の細胞内変化を引き起こすCa^{2+}シグナル伝達はCaMKIIによる膜タンパク質のリン酸化を介していることが示唆された。

はじめに

痙攣という病態下では細胞内に様々な生化学的変化が起こり、そのなかには痙攣の維持や終焉に関与した変化が存在する。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、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ることを証明し、このことからElマウスの海馬における CaMKII の基質特異性変化を示唆した(1)。またPKCについてもPTZ誘発痙攣によりPKCの膜から細胞質へのtranslocation が起こるとともに、PKC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を示唆した(2)。

本研究では、脳に豊富に存在し、Ca^{2+}をsecond messenger とし、細胞内のシグナル伝達に重要な役割を果し、脳の機能に深く関与しているCaMKIIについて、PTZ誘発てんかんでの大脳皮質および海馬の膜および細胞質画分の活性を測定し、痙攣という病態下におけるCaMKII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 CaMKII 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) 大脳皮質および海馬を摘出し、1mM PMSF, 10μM leupeptin, 10μM pepstatinA , 10nM calyculin A を含む 20mM Tris-HCl, pH7.4 溶液で homogenize し、1,000*g* 10分間遠心後、その上清を100,000*g*で1時間遠心し、上清を細胞質画分、沈渣を膜画分とした。

3) CaMKII活性は両画分について5mM $MgCl_2$, 0.01% Tween 20, 50mM [γ-^{32}P] ATP(Amersham)を含む35mM Tris buffer (pH7.5)中で 20 mg/ml Syntide 2 substrate peptide (PLARTLSVAGLPGKK) (GIBCO BRL)を基質としてCa^{2+}/calmodulin 依存性リン酸化

によって測定した。

結果

1） 大脳皮質の CaMKII 活性におよぼす PTZ 誘発痙攣の影響

痙攣後10分で大脳皮質の膜画分のCaMKII活性が対照、強直痙攣期に比べ有意に亢進していたが、細胞質画分では有意な差は認められなかった(Fig.1)。

2） 海馬の CaMKII 活性におよぼす PTZ 誘発痙攣の影響

痙攣後10分で海馬の膜画分のCaMKII活性が対照、強直痙攣期に比べ有意に亢進していたが、細胞質画分では有意な差は認められなかった(Fig.2)。

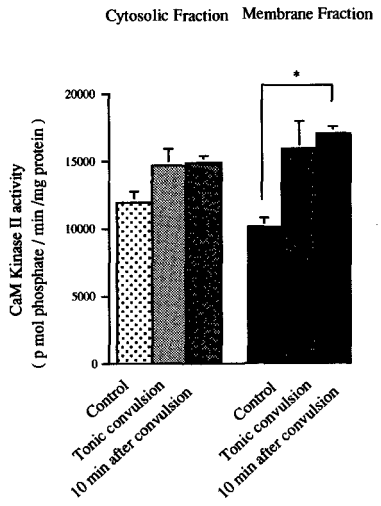


Fig. 1 Effect of PTZ-induced convulsin on cortical CaMKII activity
* p<0.05, Data are mean + SE (bars).

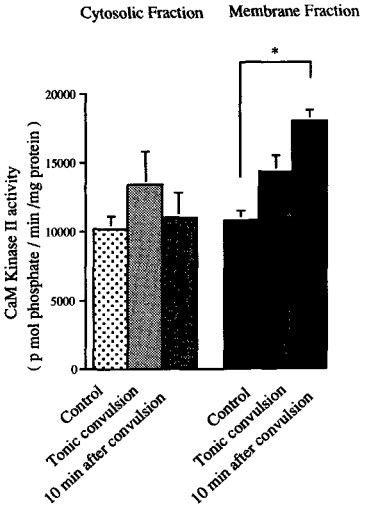


Fig. 2 Effect of PTZ-induced convulsin on hippocampal CaMKII activity
* p<0.05, Data are mean + SE (bars).

考察

今回、PTZ 誘発痙攣で大脳皮質、海馬の細胞膜のCaMKII活性の亢進が観察された。このことより、PTZ誘発痙攣でのCa^{2+}シグナル伝達はCaMKIIによる膜タンパク質のリン酸化を介して痙攣後の細胞内変化を引き起こすことが示唆された。今後CaMKII活性の亢進のメカニズムについてはtranslocation (3) などの可能性をさらに検討する必要があると思われた。

文献

1 古塚大介 他 (1990) *大阪てんかん研究会雑誌*, **1**, 31-37

2 古塚大介 他 (1995) *神経化学*、**34**, 178-179

3 Bronstein,J.M., et al. (1989) *Brain Res.*, **495**, 83-88

28 1E33 6-hydroxydopamine線条体内注入ラットの線条体と黒質における生化学的ならびに組織化学的な経時的変化

○松浦弘治, 近藤洋一, Marvin Gomez, 小川紀雄
岡山大学神経情報学部門

〔 要約 〕

Parkinson病の緩やかな変性のモデルとしての6-OHDA線条体内注入ラットモデルでの黒質-線条体系の経時的変化を, 線条体と黒質でのdopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA)値と 黒質ドーパミンニューロン, グリアの組織化学的染色法を用いて検討した。線条体 DA, DOPAC, HVAは1, 4週間目とも対照群に比べ6-OHDA投与群にて有意に低下し, 1, 4週間目の変化には差異がみられなかった。黒質 DAは4週間目で低下がみられた。黒質TH染色は2週後から注入側の染色の明らかな低下がみられた。黒質GFAP染色は8週間後まで全く変化はみられなかった。レクチン(GSA I-B_4)染色では3日目から注入側の明らかな増強がみられ,これは4週間目まで続いた。これらの結果から6-OHDA線条体内注入ラットは緩やかな変性を示すことが明らかとなり, 従来のモデルと比較して, よりParkinson病の病態に近いモデルだと考えられた。

Parkinson病は緩余進行性の疾患である。疾患モデルとしては黒質や黒質-線条体路への6-OHDA直接注入ラットが広く使われているが, 黒質-線条体系の障害が急性のため, よりParkinson病に近い病態を示す疾患モデルが必要とされてきた。この要求に見合うものとして, 6-OHDA (20μg/10μl) 線条体内注入ラットモデルを作製して, 経時的な病勢の進行がみられるか否かを検討した。

[実験方法]

体重280ー320gの雄性SDラットの右線条体内に6-hydroxydopamine (6-OHDA, 20μg/10μl) (対照群には0.01% アスコルビン酸含有生理食塩水 ; SA 10μl) を投与し, 1, 4 週後にマイクロウェーブ(9 kW, 1.2 s)で屠殺後, 左右線条体, 黒質の dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA)を高速液体クロマトグラフィーにて測定した (各群 n=6)。線条体, 黒質組織は各々1000μl, 250μl の 0.2N 過塩素酸を加えてホモジネートした後,遠心 (3,000 g , 10分間)し上清をMilliporeフィルター(0.45 μm pores) にてろ過してHPLC system に直接注入した。 DA, DOPAC, HVA値の変化は, 注入側 (R) /対側 (L)の比として表わした。

組織化学染色は線条体注入 1, 3日後, 1, 2, 4, 8週後 (n=2-4)に黒質のTH染色, GFAP染色,レクチン(GSA I-B_4)染色を行ない各々黒質ドーパミンニューロン,アストロサイト,ミクログリア の経時的変化をみた。また, 線条体のTH染色も行なった。

[結果]

1) 線条体に関し, DA, DOPAC, HVAは1, 4週間目とも対照群と比べ6-OHDA投与群にて有意に低下していた (Table 1; $p<0.01$)。 1週間目と4週間目との間には有意な差はみられなかった。黒質に関しては, 4週間後に DAの有意な低下がみられた($p<0.05$)。

2) 線条体TH染色は, 1日後から注入側の明らかな染色性の低下がみられた。黒質TH染色では, 1週後までは左右差はみられず, 2週後から注入側の染色の明らかな低下がみられた。GFAP染色は, 8週間目も含め左右差はみられなかった。レクチン(GSA I-B_4)染色では1日目には変化はみられず, 3日目に注入側の明らかな増強がみられ,これは4週間目まで漸減しながら続き, 8週間目には左右差は見られなくなった。

[考察]

Parkinson病は緩余進行性の疾患である。6-OHDA線条体内注入ラットは, 黒質や黒質-線条体路への

6-OHDA直接注入モデルと比べ，変性が逆行性に生じることと黒質ニューロンへの急性の障害がないことから，よりParkinson病に近い病態を示すことが期待されている。
これまでの報告では，線条体 DA, DOPAC, HVAは1週間目から4週間目にかけて改善するとされているが，今回の我々の検討ではそのような傾向は見られなかった。組織化学的には線条体TH染色は，1日後から注入側の明らかな低下がみられたが黒質TH染色では2週後から注入側の染色の明らかな低下がみられた。これは逆行性の緩やかな変性を示している。黒質-線条体路への6-OHDA直接注入モデルではGFAP染色の増強がみられるにもかかわらず，今回の線条体内注入モデルではGFAP陽性アストロサイトの変化が8週間たってもみられず，これは障害が緩やかで弱いためだと考えられる。ミクログリアの変化(レクチン染色)が3日後という早期にピークがあり4週間目まで持続することは，黒質ニューロンの変性や障害からの防御にミクログリアが関与していることを示唆している。以上の結果から緩余進行性のParkinson病疾患モデルとして6-OHDA線条体内注入ラットは有用であると考えられた。

文献

1) Jones, B.E. et al. A continuous striatal infusion of 6-hydroxydopamine produces a terminal axotomy and delayed behavioral effects. Brain Res. 709 (1996) 275-284
2) Berger, K. et al. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. Brain Res. Bull. 26 (1991) 301-307
3) Ichitani, Y. et al. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. Exp. Neurol. 130 (2) (1994) 269-78

Table 1. The effects of intrastriatal 6-OHDA injection on the striatal and the nigral concentrations of DA, DOPAC, and HVA. Data are expressed as mean (± S.E.M.) ratio in injected side (R) to that in the contralateral side (L). The nigral concentrations of HVA can not be detected.

		DA(R/L)	DOPAC(R/L)	HVA(R/L)
Striatum				
(1W)	SA	0.94 ± 0.05	1.05 ± 0.09	1.14 ± 0.07
	6-OHDA	0.32 ± 0.07[a]	0.41 ± 0.10[a]	0.44 ± 0.09[a]
(4W)	SA	1.15 ± 0.12	0.90 ± 0.06	0.96 ± 0.06
	6-OHDA	0.23 ± 0.05[b]	0.26 ± 0.03[b]	0.37 ± 0.07[b]
Substantia nigra				
(1W)	SA	0.91±0.04	0.8±0.08	
	6-OHDA	0.79±0.08	0.76±0.07	
(4W)	SA	1.04±0.1	0.97±0.14	
	6-OHDA	0.56±0.1[c]	0.97±0.13	

Significant differences between the group were evaluated using the Mann-Whitney *U* test.
[a]$p < 0.01$ vs SA (1W) group; [b]$p < 0.01$, [c]$p < 0.05$ vs SA (4W) group

29 1E34 筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデル(Mnd)マウス脊髄組織内の運動ニューロン変性に関連した酵素活性値の発育に伴う変動

柴山健三, 藤田公和, 加藤寿章, 山内理充, 皿井正子*入谷克己, 芳本信子, 高橋久英**
永田 豊（藤田保健衛生大学 医学部 生理 *リハビリテーション医学 **実験動物）

〔要約〕

発育後期から進行性運動麻痺を発症する筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデル動物のMndマウスの脊髄内に含まれるニューロンの変性に関与すると考えられる諸酵素活性を測定し、運動ニューロンの変性過程との関連を考察した。(1)好気的エネルギー産生系の複合酵素IVのチトクローム酸化酵素(CO)活性は、Mndマウス脊髄中では、その発育前半期からゆるやかに低下する傾向が示された。(2)組織内で発生して細胞に傷害を与える活性酸素基(O_2^-)を消去するスーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)活性は、Mnd脊髄内では、その発育前半期で対照マウスより高値であったが、後半期には徐々に低下していく傾向が示された。(3)細胞変性の標識酵素の一つであるトランスグルタミナーゼ(TG)活性は、Mnd脊髄内ではその発育前半期に次第に増大し、5ケ月齢で最大に達したが、それ以後は低下していった。 このような測定結果から、運動ニューロン変性が進行するMndマウス脊髄内では、発育前半期から好気的エネルギー産生系の障害に対応してSOD活性が高まるが、発育後半期にはニューロンの変性，脱落が進行するためにこれら酵素活性が低下して運動麻痺症状が発現するものと考えられた。

＜目的＞筋萎縮性側索硬化(ALS)は、中年以後に発症する脳および脊髄内の運動ニューロンが選択的に変性，脱落し数年以内に死に至る神経難病の一つである。近年、ALSの神経組織内に過剰に発生して細胞傷害を起こす活性酸素基(O_2^-)を、積極的に消去するsuperoxide dismutase(SOD)活性低下が認められた[1]。また、SOD(Cu/Zn-SOD)遺伝子を移入したtransgenic mouseは、ALSとよく類似した脊髄内運動ニューロンの変性，四肢運動異常(跛行)等を示すことが報告された[2]。このような実験成績は、SOD活性の低下によって消去O_2^-が選択的に脊髄内運動ニューロンを傷害して、ALS類似の運動障害が発生する可能性が強く示唆された。ALSモデル動物のmotor neuron degeneration(Mnd)マウスは、生後5ケ月齢頃から後肢の麻痺が出現し、次第に前肢へと進行してほぼ10ケ月齢で死亡するミュータントである。われわれは、Mndマウスから脊髄を摘出して、その組織内のSOD活性，ミトコンドリア電子伝達系複合酵素IV(チトクローム酸化酵素，CO)，およびニューロン変性の指標酵素の組織トランスグルタミナーゼ(TG)の各酵素活性を測定し、対応する各月齢の対照マウスの脊髄の各酵素活性値と比較検討した。

＜実験材料および実験方法＞生後1, 3, 5, 7および9ケ月齢のMndマウスおよび対応する月齢の対照マウス(C57BL/6J)をウレタン麻酔(ip)後、脊髄組織を摘出し、生化学的分析まで-80度に凍結保存した。それぞれの脊髄組織のSOD活性の測定は、McCord and Fridovichの方法[3]に基づくSOD測定キット(SOD-525, Bioxytech, France)用いて比色定量した。CO活性の測定は、Whartonの方法[4]に基づく比色定量法によった。またTG活性はLorandの方法により^{3}H-プトレスチンが組織蛋白分画にincorporateされる放射活性量より定量した。また、脊髄の組織切片を作製してHEおよびKlüver-Barrera法で染色後、鏡見してニューロンの変性状態の形態的観察をおこなった。

＜実験結果と考察＞ 1)CO活性値の変動：Mnd脊髄中のCO活性値は生後1ケ月齢より5ケ 月齢まで次第に低下するが、以後その低いレベルに保たれた。このことはMndマウス脊髄組織中では発育早期から細胞内ミトコンドリアのエネルギー産生系関連酵素がO_2^-などにより傷害を受ける結果、CO活性低下として認められるものと考えられる。2)SOD活性値の変動：Mndマウスの脊髄組織の

SOD活性は5ヶ月齢までは対照ﾏｳｽ脊髄よりも高値が認められたが、7-9ヶ月齢では次第に低下した。これは遺伝的変異種のMndﾏｳｽでは既に発育前期から発生異常するO_2^-による組織傷害から保護するためにSOD活性が上昇するものと思われる。しかし、5ヶ月齢以降運動ﾆｭｰﾛﾝ変性,脱落が進行するとSOD活性低下するものと考えられた。3)<u>TG活性の変動</u>:組織TGはCa^{2+}依存性にﾀﾝﾊﾟｸのｸﾞﾙﾀﾐﾝ残基と他のﾎﾟﾘｱﾐﾝ等との架橋反応を促進して細胞質流動性を低下させて細胞死を来す細胞変性の標識酵素である。Mndﾏｳｽ脊髄内のTG活性は、発育前半期では次第に活性が増大して生後5ヶ月齢で最大値に達し、以後次第に活性減少が続くのが示された。これは、Mndﾏｳｽでは運動麻痺が発現する以前から既にTG活性化がおこり、徐々にﾆｭｰﾛﾝの変性が進行する5ヶ月齢以降では運動ﾆｭｰﾛﾝの変性,脱落するためにTG活性値の減少が認められたと理解された。4)<u>形態学的観察</u>:対照ﾏｳｽ脊髄の腰髄横断面では、灰白質内に大型のﾆｭｰﾛﾝ細胞体が多数認められた。しかし、7-9ヶ月齢のMndﾏｳｽ脊髄では灰白質内にﾆｭｰﾛﾝ数が減少して疎らになり、細胞質内に色素沈着がみられた。また、灰白質から白質にかけて小型の細胞核(おそらくﾐｸﾛｸﾞﾘｱ)の著しい増加が認められた。以上の生化学的および形態学的所見から、Mndﾏｳｽの脊髄内でみられるﾆｭｰﾛﾝ傷害は運動麻痺が発症する以前の発育前半期から始まり、発育後半期にはﾆｭｰﾛﾝの変性,脱落が生じて四肢麻痺を発症することが強く示唆された。

＜文献＞

1)Rosen, D. R., et. cl(1993) Nature 362:59-62.

2)Gurney, M. E., et. cl(1994) Science 264: 1772-1775.

3)McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) J. Biol. Chem 244:6049-6055.

4)Wharton, D. C. (1967) Methods Enzymol 10: 245-250.

5)Lorand, L. (1972) Anal. Biochem 50:623-631.

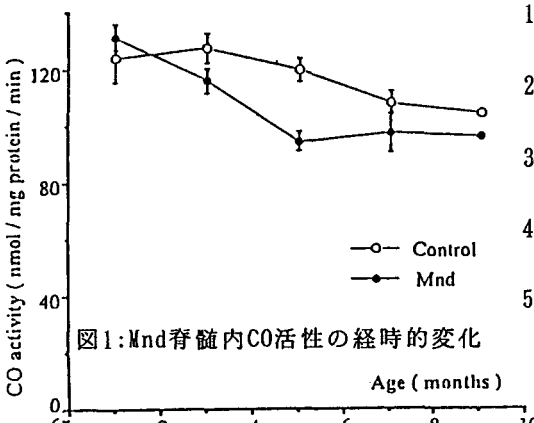


図1:Mnd脊髄内CO活性の経時的変化

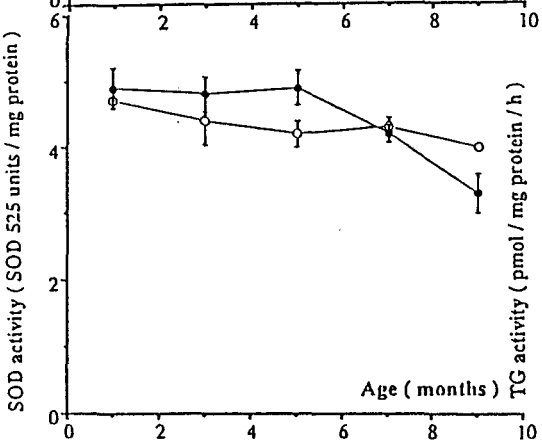


図2:Mnd脊髄内SOD活性の経時的変化

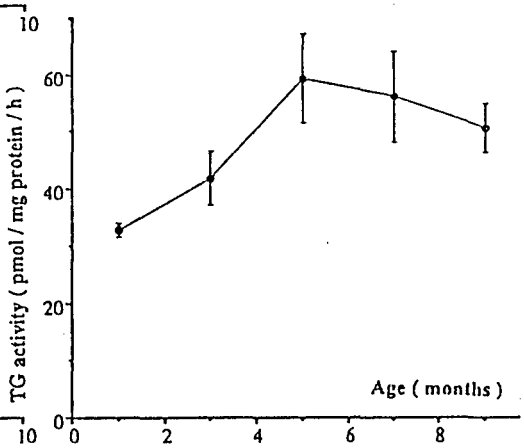


図3, Mnd脊髄内TG活性の経時的変化

30 1Ba6 運動ニューロン変性疾患モデル（Mnd）マウス脊髄内グリア線維性酸性タンパク（GFAP）の発育に伴う変動

藤田公和・山内理充・加藤寿章・入谷克己・安藤正人[1)]・永田 豊・高橋久英[2)]・本多虔夫[3)]

（藤田保健衛生大学・医学部・生理、[2)]実験動物センター、[1)]愛知学泉大学・解剖生理、[3)]横浜市立市民病院）

［要約］ 運動神経変性疾患モデル(*Mnd*)マウスと対照マウス(C57BL/6J)を生後1,3,5,7,9ヶ月齢で麻酔下に断頭し、脊髄組織を摘出した。この脊髄標本からSDS可溶性タンパクを抽出し、一次元および二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりタンパク分画を行なった。そしてこの泳動ゲルからタンパクをPVDF膜に転写した後、*Mnd* マウスに特徴的なタンパクスポットを切り取り、プロテインシークエンサーでアミノ酸配列を決定した。さらにタンパクを転写したPVDF膜を抗GFAPA抗体を用いて免疫染色した。*Mnd*マウス脊髄の二次元電気泳動像では、pI5.6から6.0付近の酸性領域で、分子量50kDから35kD付近までの複数のタンパクスポットが出現した。このスポットは生後3ヶ月以降の*Mnd*マウスに共通して出現することが確認されたが、対照マウスの脊髄タンパク分画には、いずれの月齢でもこのようなスポットは認められなかった。アミノ酸配列の解析の結果、このスポットはマウスのGFAPのN末端から29ないし56残基目で切断され、頭部を欠落した異常なGFAPであることが確認された。さらに抗GFAP抗体に反応する数個の低分子GFAPの出現することが示された。従って、*Mnd*マウス脊髄では生後3ヶ月頃より、アストログリアの細胞骨格タンパクであるGFAPが何らかの原因でプロテアーゼの加水分解を受けた結果、その頭部が切断された異常な低分子GFAPの蓄積されることが明らかになった。

［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。この神経疾患のモデル動物である*Mnd*(Motor neuron degeneration) mouseは染色体8に変異が局在する遺伝的変異を持ち、生後７ヶ月前後から主として後肢の運動麻痺が発現し、その後徐々に上肢まで運動麻痺が進行し、9～10ヶ月齢で死に至ることがよく知られている[(1)]。本研究では、*Mnd*マウスの脊髄組織より抽出、可溶化したタンパクをポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE）にかけて展開分画し、*Mnd*マウスに特徴的に観察されるタンパク分画の検出・同定を試みた。そして今回は特にグリア線維性酸性タンパク(GFAP)の変動について、その免疫抗体による染色プロフィールを含めて*Mnd*マウスの月齢による運動麻痺の出現と関連づけながら検討した。

［実験材料と方法］

（１）*Mnd*マウスの脊髄組織： *Mnd*マウスは米国Jackson研究所から購入し、本学実験動物センターで飼育、繁殖させた。このマウスを生後1,3,5,7,9ヶ月齢で運動異常を観察した後、ウレタン麻酔下に断頭し、脊髄組織を摘出した。また、対照マウス(C57BL/6J)も*Mnd*マウスと同じ月齢で脊髄を摘出し、同様の分析を行なって比較検討した。

（２）脊髄の組織染色： 生後1,3,5,7,9ヶ月齢のマウスを麻酔後、10%フォルマリン緩衝液で環流固定し、脊髄組織を全長にわたって摘出した。そしてパラフィン包埋した後脊髄横断切片標本を作製し、通常のH-E、K-B染色およびGFAP抗体による免疫組織化学的染色を行った。

（３）脊髄組織の電気泳動： 脊髄組織（約10mg w.w）をSDSとβ-mercaptoethanolを含むbufferに懸濁して、微小ガラスガラスホモゲナイザーで磨細、可溶化した。これをStone and Hammerschlag (1981)の方法[(2)]に従ってSDS-PAGEで展開した。

（４）アミノ酸配列の決定： （２）で展開後Coomassie blueで染色し、正常と異なる特徴的なタンパクスポットについて観察した。さらに泳動ゲルからタンパクをPVDF膜に転写した後、特徴的な部分について切り取り、プロテインシークエンサーでそのアミノ酸配列を決定した。

（５）抗GFAP抗体による免疫染色： SDS-PAGE展開で得られたタンパクをPVDF膜に転写して、それを抗GFAPA抗体を用いて免疫染色し、発育に伴うGFAPのバンドの変動を調べた。

［結果と考察］

（１）脊髄タンパクの二次元PAGE展開像： 発育各期でマウス脊髄組織タンパクのPAGE展開像で、*Mnd*ではpI5.6から6.0付近の酸性領域、分子量35～50kD付近にCoomassie blueで染色される数個のタ

ンパクスポットが検出されたが、対照動物の展開像には認められなかった。このスポットをそれぞれPVDF膜に転写後、アミノ酸シークエンスを調べた結果、GFAP分子の頭部ドメインが29ないし56番目で除去された分子であることが判明した。またこれらのタンパクスポットの大きさは、生後5ヶ月齢以後、次第に濃く染色されることが示された。

（２）脊髄タンパクの一次元PAGE展開像とGFAP免疫染色像：　*Mnd*脊髄タンパクを一次元電気泳動スラブゲル上に展開し、PVDF膜に転写後、GFAP抗体で染色すると、intact GFAPのバンド（50kD付近）は対照を含めて全ての発育期の標本で観察された。それより低分子のGFAP抗体で染色される数本のバンドはマウスの発育が進むにつれて増大し、運動麻痺の発症が始まる5ヶ月齢以後に極大になり、以後そのレベルに維持された。

（３）脊髄横断組織切片の染色標本像：　*Mnd*脊髄標本では、運動麻痺が著明な7～9ヶ月齢で灰白質内ニューロン細胞体の変性脱落が著明で、また小型の細胞（おそらくミクログリア）が顕著に増加して認められた。

今回の検索で、*Mnd*マウス脊髄内ではニューロン変性の進行に伴って、GFAPの異常分子がマウスの四肢麻痺の発症に先行して増加することが確認された。GFAPはCa^{2+}依存性proteinase（カルパイン）の分解を受けやすく[3]、マウスでは免疫染色によって47kDから28kの間に複数のバンドとして認められることが知られている[4]。またO'reillyらは、弧発性ALS患者脊髄ではGFAP染色されるアストロサイト突起が減少することを報告している[5]。アストロサイトは神経組織内のフリーラジカルやグルタミン酸毒性に対する一つの重要な防御機構であると考えられている。そのため今回の実験結果から、GFAPの異常が運動ニューロンの変性過程に密接に関連している可能性が示唆された。

[文献](1)Messer, A. et al. (1987)J. Neurogenet. 4. 201-213. (2)Stone and Hammerschlag(1981) Cell. Mol. Neurobiol. 1. 3-17. (3)Bigbee, W. J. et al(1983)J. Neurochem. 40. 460-467. (4)Dearmond, J. S. et al. (1983)Brain Res. 262. 275-282. (5)O'reilly, S. A. et al. (1995). Exp. Neurol. 131. 203-210.

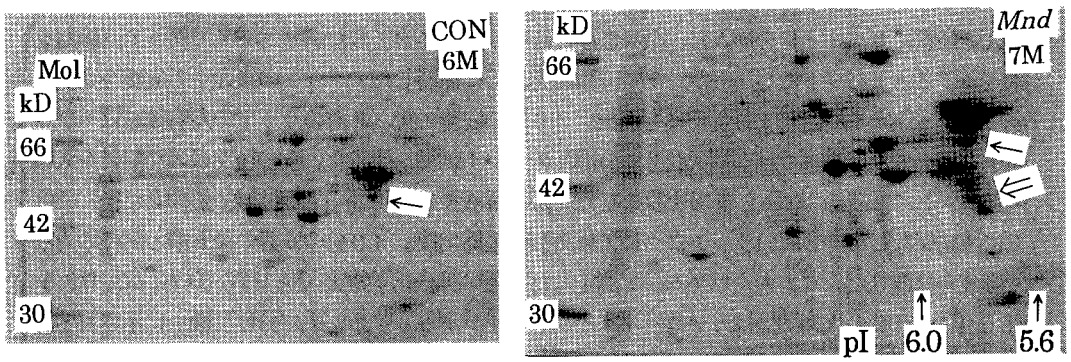
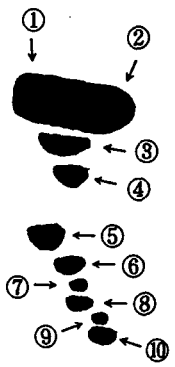


図１．対照(CON；6ヶ月齢)および*Mnd*マウス（7ヶ月齢）脊髄の二次元電気泳動像；
← は正常GFAP（推定）　⇐ は異常なGFAP群



① Tubulin α
② Tubulin β
③ ATP synthase
④ GFAP with full amino acid residue (no-signal)
⑤ GFAP devoid of initial 29 amino acid residue
⑥ GFAP devoid of initial 56 amino acid residue
⑦ GFAP devoid of initial 29 amino acid residue
⑧ GFAP devoid of initial 56 amino acid residue
⑨ GFAP devoid of initial 29 amino acid residue
⑩ GFAP devoid of initial 56 amino acid residue

図２．*Mnd*マウス脊髄で認められた特徴的なタンパクスポットの解析；図１．*Mnd*マウスの矢印部分のタンパクスポットをPVDF膜に転写した後アミノ酸シークエンサーで解析した。

31 麻酔ラット後肢へのピンチ刺激による 1E35 脳脊髄液中の神経化学物質濃度の変化の検討

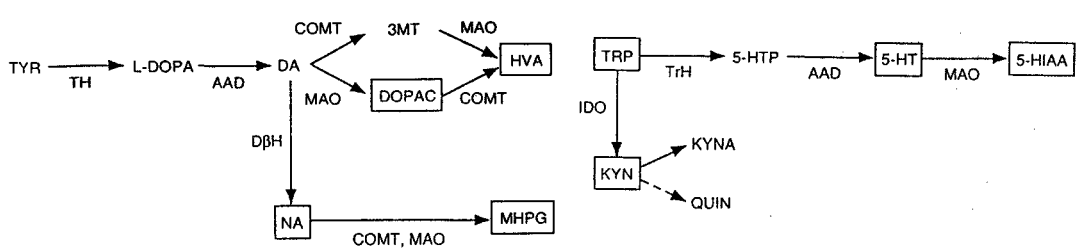
和田博夫, 井藤英喜[1], 佐藤昭夫[2]
(東京大・老年病学, 都老人医療センター[1], 都老人総合研究所[2])

〔要約〕 麻酔ラットの脳内青斑核やラッフェ核への電気刺激や皮膚のピンチ刺激により、脳内細胞外液中のノルアドレナリン、セロトニン濃度が増加することがマイクロダイアリシス法を用いた研究で示されている(1,2)。今回、ピンチ刺激を麻酔ラット後肢に加えた際に脳脊髄液中の神経化学物質(NA, MHPG, DOPAC, HVA, TRP, 5-HT, 5-HIAA, KYN)濃度がどのように変化するかを検討し、ノルアドレナリン系とセロトニン系の活性化、ドーパミン系の不活性化が示唆されたので報告する(4)。

〔目的〕麻酔ラット後肢にピンチ刺激を加えた際の脳脊髄液中の神経化学物質濃度をニューロケム(多種目神経化学物質測定装置)を用いて測定し、脳内細胞外液中と同様にノルアドレナリンやセロトニンの増加があるかどうかを検討する。

〔対象と方法〕Wistar系雄性ラット計12匹(月齢4－7箇月, 体重310-420g)を対象とし、ピンチ刺激を加えるラット6匹(P群)と刺激を加えない対照ラット6匹(C群)に分類した。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1.2%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。サーモメーターで直腸温を測定し、ヒートパッドとヒートランプで直腸温を37℃に保持した。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。30分の安静の後、P群のラットの左右後肢にペアン鉗子を用いて5分間ずつ計6回(計30分間)のピンチ刺激を加えた。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。C群のラットについては脊髄硬膜露出後、30分の安静の後P群と同様の方法で髄液を採取した。「ニューロケム」で測定した8種の神経化学物質(NA, MHPG, DOPAC, HVA, TRP, 5-HT, 5-HIAA, KYN)の代謝関係はカテコールアミン系とインドールアミン系に分けて図1に示される。測定結果は平均値±標準誤差で表示した。統計的有意性の判定にはStudentのt検定を使用した。

図1：神経化学物質の代謝関係図



[略号の説明]

TYR, tyrosine; DA, dopamine; DOPAC, dihydroxyphenyl acetic acid; HVA, homovanillic acid; NA, noradrenaline MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenyl-glycol; TRP, tryptophan; 5-HTP, 5-hydroxytryptophan; 5-HT, 5-hydroxytryptamine(serotonin); 5-HIAA, 5-hydroxy-indole-3-acetic acid; KYN, kynurenine; KYNA, kynurenic acid; QUIN, quinolonic acid; TH, tyrosine hydroxylase; AAD, L-aromatic amino acid decarboxylase; COMT, catechol-O-methyl transferase; MAO, monoamine oxydase; DβH, dopamine-β- hydroxylase; TrH, tryptophan hydroxylase; IDO, indoleamine-dioxygenase.

〔結果と考察〕ピンチ刺激群（P）と対照群（C）の髄液中の8種の神経化学物質濃度(ng/ml) を表1と図2に示した。(*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001)

	P(ng/ml)	C(ng/ml)
①NA	9.09±1.77 **	3.75±0.90
②MHPG	38.6±17.2 **	9.87±2.30
③DOPAC	2.43±0.41	3.00±0.67
④HVA	6.26±2.34 *	11.8±3.8
⑤TRP	79.5±12.0 **	50.2±10.6
⑥5-HT	1.46±0.37 ***	0.27±0.07
⑦5-HIAA	34.5±4.4	39.8±10.7
⑧KYN	35.0±8.4	32.9±2.2

表1：神経化学物質濃度の測定結果

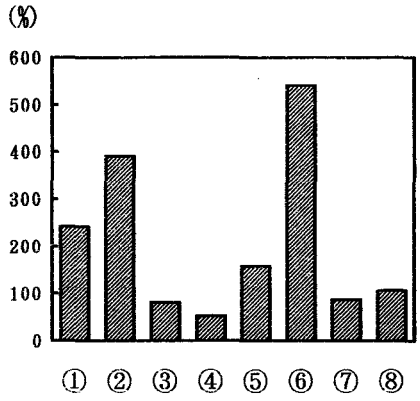


図2：C群を100%としたときのP群の値

(1) ピンチ刺激によりNAが約200%, MHPG が約400%上昇したことから、脳内ノルアドレナリン系が活性化されたことが示唆された。

(2) ピンチ刺激により5-HTが約550%上昇したことから、脳および脊髄のセロトニン系が活性化されたことが示唆された。ピンチ痛覚刺激により中枢から脊髄への下行性抑制系が活性化されたことも示唆される。

(3) ピンチ刺激によりDOPAC, HVA が低下したことからはドーパミン系の代謝が抑制されたことが示唆される。

(4) 文献的にはピンチ刺激でカタレプシーが誘発される際にはTRP から5-HTP への変換酵素であるトリプトファン水酸化酵素(TrH) 活性が亢進すると報告されている(3) が、今回の実験においても同様の酵素活性が亢進している可能性がある。

〔結論〕麻酔ラット後肢へのピンチ刺激により脳脊髄中のモノアミン系の神経化学物質濃度が同時に変化することが明らかになり、代謝関連酵素活性が変化していることも示唆された(4) 。

〔文献〕(1) Sato A. and Sato Y.:Neuroscience Res 14, 242-274(1992).

(2) Adachi T. et al.:Biogenic Amines 1, 41-44(1990).

(3) Kulikov A.V. et al:Pharm. Biochem. Behav. 50, 431-435(1995).

(4) Wada H. et al:Biomedical Res in submission(1996).

32 脳虚血抵抗性とAP1結合活性の関連性

3Da1

倉本展行、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 〕スナネズミ脳内の虚血負荷に伴う転写制御因子Activator protein 1(AP1)のDNA結合能の変動をゲル移動度シフトアッセイにより検索した。海馬CA1野は虚血負荷後1および3時間で著明なAP1結合能の上昇が観察されたが、この増強は6時間以後には完全に消失した。一方、CA3野および歯状回では、虚血負荷後1時間では有意な増強が認められ、その増強は虚血負荷後18時間まで持続した。虚血負荷時の脳内温度の低下により虚血抵抗性を獲得させた場合、虚血負荷に伴うCA1野のAP1結合能の増強は負荷後少なくとも9時間まで延長することが判明した。以上の結果より、虚血抵抗性とAP1結合能の長期的上昇の間には関連性が存在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、Fosファミリー蛋白質やJunファミリー蛋白質などから構成されるAP1は、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、AP1結合能は脳虚血負荷により海馬で選択的に増強されることが知られている(5)。しかしながら、虚血負荷に伴うAP1結合能の上昇が神経細胞死の惹起に関連するのか、あるいは細胞死の保護に関連するのかは不明である。したがって、本研究では海馬内特定部位のAP1結合能の虚血負荷後の経時的変化を追跡した。さらに、虚血負荷時の脳内温度を低下させることにより海馬CA1野における遅発性神経細胞死が保護できるが、この虚血抵抗性獲得時の虚血負荷によるAP1結合能の変動について解析した。

〔実験方法〕

脳虚血負荷：虚血負荷はスナネズミの両側総頸動脈を5分間結紮することにより行った(2)。また、脳内温度は虚血負荷時およびその前後20分間所定の温度に調節した。再開通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)と放射性プローブ(20 fmol、1-12×10^5 cpm)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（80V定電圧、氷中、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〕

海馬内特定部位におけるAP1結合能の虚血負荷後の経時的変化を解析したところ、CA1野では虚血負荷後1時間および3時間で対照群に比べて2-3倍の増強が見られた。しかしながら、その増強は負荷後6時間で完全に消失し、その後72時間まで変化は認められなかった。それに対して、CA3野および歯状回では負荷後1時間から18時間までの持続的なAP1結合能の上昇が見られた(図1)。また、CA3野および歯状回でも負荷後24時間以後では対

照群と比べて有意な変化は認められなかった。次いで、虚血負荷7日後のCA1野の神経細胞死に対する脳内温度の影響を検討したところ、37℃以上の場合には神経細胞は完全に脱落したが、脳内温度を33℃以下に低下させた場合には神経細胞の脱落は全く認められなかった。この両条件下でCA1野のAP1結合能を測定したところ、脳内温度37℃では負荷後1および3時間で結合能の増強が見られたが、6時間以後では対照群と比べて有意な変化は認められなかった。それに対して、虚血抵抗性を獲得した脳内温度31℃の場合には負荷後9時間までAP1結合能の増強が観察された(図2)。また、抗c-Fos抗体を用いたスーパーシフト法により、脳内温度37℃より31℃の場合の方が多くのc-Fos蛋白質がAP1結合に関与することが判明した。

図1. 脳虚血負荷に伴うAP1結合能の経時的変化

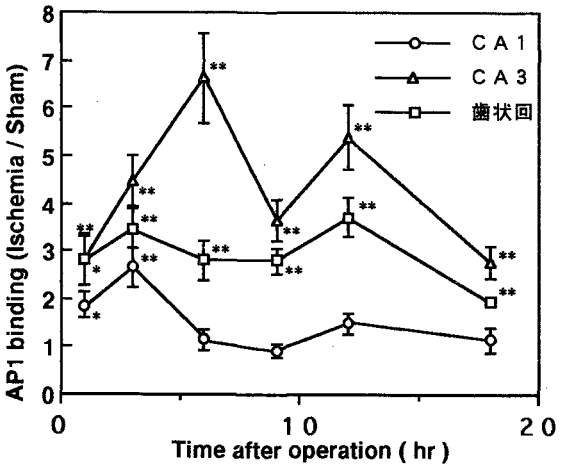
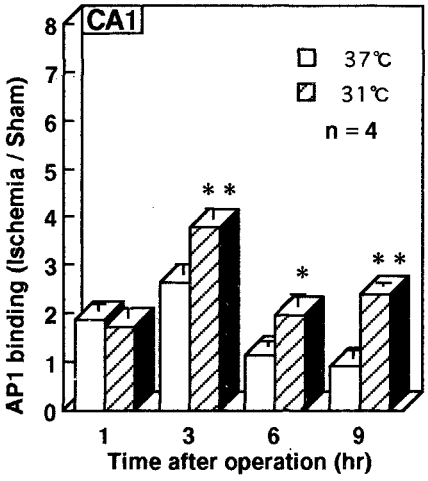


図2. 脳内温度低下の効果



〔考察〕

脳虚血負荷後のAP1結合能の増強は、虚血脆弱性を示すCA1野では一過性であるのに対して、虚血抵抗性を示すCA3野および歯状回では長期的であった。さらに、脳内温度低下により虚血抵抗性が獲得された場合には、AP1結合能の虚血負荷による上昇が延長することが明らかとなった。これらの事実は、虚血負荷に伴うAP1結合能の長期的上昇と虚血抵抗性の間に関連性が存在する可能性を示すものである。本研究で示されたAP1結合能の長期的な上昇現象が虚血抵抗性獲得の結果であるかあるいは虚血抵抗性獲得に関与する蛋白質の転写を促進するのかについては現時点では明確ではないので、今後の詳細なる解析が必要であろう。

〔謝辞〕

筆者らは非会員の井上恵児学士(現 丸石製薬中央研究所)のご協力に感謝します。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金基盤研究C(08672545)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.

33 2E41 ラット海馬遅発性神経細胞死における Bcl-2関連遺伝子産物の関与

白石哲也[1)]、川口正二郎[2)]、戸田啓介[2)]、田渕和雄[2)]、大川 功[3)]、尾崎 覚[3)]、田島鉄弥[3)]
1) 白石共立病院脳神経外科、2) 佐賀医科大学脳神経外科、
3) エーザイ株式会社薬物応用研究部薬物評価室

〔 要約 〕 一過性前脳虚血後のラット海馬CA1領域の神経細胞死にBcl-2関連遺伝子産物がどの様に関与しているか検討した。細胞死をきたした神経細胞核内の断片化DNAをTUNEL法にて確認した。Bcl-2は海馬神経細胞に恒常的に軽度発現されているが、虚血後早期にCA1領域のみ消失し、その結果アポトーシスが惹起されやすくなっているものと考えられた。一方 Bcl-xは残存神経細胞に発現し、アポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

【目的】我々はこれまでに一過性前脳虚血後の砂ネズミ海馬CA1に起こる遅発性神経細胞死にアポトーシスの機序が関与していることを示してきた[1)]。しかしアポトーシスに到る過程でどの様な遺伝子産物が関与しているのか明らかではない。今回ラット遅発性海馬CA1神経細胞死にBcl-2関連遺伝子産物が関与しているか否かを検討した。

【方法】Wistar系雄性ラットを用いて、Pulsinelliらの方法を改良した4-vessel occulusion modelを作製した。エーテル麻酔下にて両側椎骨動脈を永久閉塞して7日後に、両側総頸動脈を15分間閉塞し、再開通後1日、2日、4日目に脳を潅流固定した。脳を摘出し、海馬を含む部位の切片を作製した。Proteinase Kにて前処理後terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)を添加し、DNAの3'-OH断片をdigoxigenin化dUTPにて標識した。さらにperoxidase標識抗digoxigenin抗体を反応させ、DABで発色させた[2)]。高倍率下で陽性染色核の全核数に対する割合(apoptotic index)を算出した。さらにmicrowaveにより抗原賦活化処理した切片に対して、Bcl-2[3)], Bcl-x[4)]およびBax[5)]に対する抗体を用いてLSAB法にて免疫組織化学染色を行った。

【結果】Shamのapoptotic index (AI) は0%であったが、虚血処理ラットのDay 1ではAIが約10%、Day 2では 約70%でありDay 4では約90%と増加した。陽性染色核の大部分は濃縮しており、CA1領域に限局していた。Bcl-2はShamではCA1とCA4に神経細胞の細胞質に同程度弱く染色された。処置ラットのDay 1ではCA1のみ染色性が低下したが、残存神経細胞は染色されていた。これに反してBcl-xはShamでは染色されなかったが、Day 1ではCA1の一部の神経細胞の細胞質に顆粒状に染色され、Day 2およびDay 4では残存神経細胞に強く染色された。Baxはいずれのグループでも染色されなかった。

【考察】ラット脳虚血モデルにおいても遅発性神経細胞死をきたした細胞核の断片化DNAを検出することができた。今回の結果よりBcl-2は海馬神経細胞に恒常的に軽度発現されているが、虚血後早期にCA1領域のみ消失し、その結果アポトーシスが惹起されやすくなっているものと考えられた。一方 Bcl-xは残存神経細胞に発現し、アポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

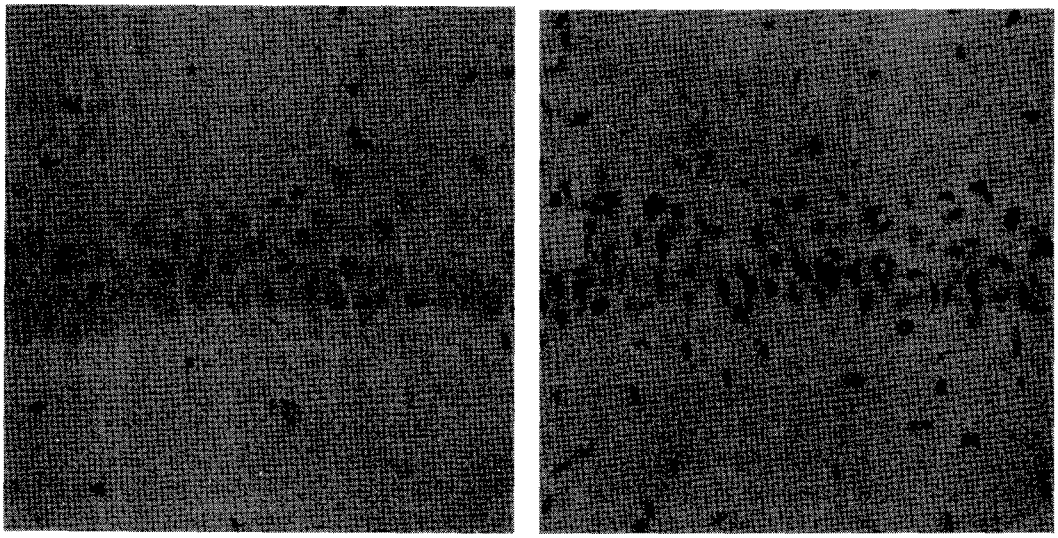


Fig. 1 Rat hippocampal CA1 pyramidal neurons stained by TUNEL (x400)
Left : Day1, *Right* : Day 4

	Sham		Day 1		Day 2		Day 4	
	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3
Apoptotic index	0	0	9.2	0	68.2	0	93.5	0
Bcl-2α	+	+	±	++	±	++	±	++
Bcl-xL	−	−	+	+	+	+	+	+
Bax	−	−	−	−	−	−	−	−

Table 1 Summary of immunohistochemical staining with antibodies against Bcl-2 gene family products.
- : negative, ± : weakly positive, + : positive, ++ : markedly positive

【文献】(1) Kihara S., et al. (1994) Neurosci Lett 175, 133 : (2) Nakagawa S., et al. (1995) Virchows Archiv 427, 175 : (3) Tsujimoto Y., et al. (1985) Science 228, 1440 : (4) Boise L. H., et al. (1993) Cell 74, 597 : (5) Oltvai Z.N., et al. (1993) Cell 74, 609

34 3Da2 砂ネズミ脳におけるFK506結合蛋白の分布とリガンド結合様式に関する研究

野崎博之，福内靖男，田中耕太郎，白井俊孝，永田栄一郎，近藤太郎，小山 聡，傳法倫久
（慶應義塾大学神経内科）

〔要約〕 FK506結合蛋白(FK506 binding protein: FKBP)の脳内分布の定量化と，そのリガンド結合様式を明らかにするために，[^{3}H]dihydro-FK506を用いたオートラジオグラムを砂ネズミの脳より作成した．その結果FK506特異的結合部位は脳内に広範に分布しており，FKBPsが脳内各領域に広く分布しているものと考えられた．またScatchard解析の結果，いずれの領域でもtwo-componentの結合様式をとり，少なくとも２種類のFKBPが脳内に存在しているものと考えられた．今回の結果を基礎としてFK506結合能の立場より脳虚血時の脳内FKBP動態について解析を行う予定である．

【目的】 FK506 は FKBPs と結合し，T 細胞の calcineurin を抑制する免疫抑制剤である[1]．一方，FKBPs が脳内にも存在し，特に海馬・視床に多く分布していることが明らかとなっている[2]．最近 FK506 が培養脳細胞における NMDA 受容体を介した glutamate neurotoxicity を抑制する作用の報告され[3,4]，神経細胞に対する保護作用が注目されている．さらに FK506 に脳虚血に対する保護作用が報告されているが[5,6]，その作用機序については不明が点も多い．今後中枢神経系の FK506 の作用を明らかにするためには，中枢神経系における FKBPs の分布を定量化することは重要と考えられる．そこで今回脳虚血モデルに繁用される砂ネズミ脳において，[^{3}H]dihydro-FK506 を用いたオートラジオグラムによって FKBPs の脳内分布の定量化と，そのリガンド結合様式を明らかにした．

【方法】実験には体重70～90gの砂ネズミ６匹を用いた．覚醒状態下に断頭し脳を摘出，フレオン22により急速凍結した．-20℃に冷却したクリオスタットにて厚さ20 μmの連続脳切片を作製し，ゼラチンでコートしたスライドガラスに固定した．脳切片標本は，室温のbuffer (50 mM HEPES(pH 7.4), 2 mg/ml bovine serum albumin, 0.02 % Tween-20)に5% ethanolを加えた溶液で60分間preincubationを行った．次にこのbufferに0.2～100nMの[^{3}H]dihydro-FK506 (specific activity=100.0 Ci/mmol: NEN Research Products/Du Pont) を加えた組成の溶液中において，25℃で60分間incubateした．また非特異的結合量測定のため，bufferに1 nMの[^{3}H]dihydro-FK506 ならびに未標識の1 μM FK506を加えた溶液中で60分間incubateした．その後，４℃のbuffer中で５分間の洗浄を２回繰り返し，最後に４℃の精製水で洗浄し，直ちに冷風にて乾燥した．これらの標本は，[^{3}H]標準線源とともにUltrofilmに２週間感光し，オートラジオグラムを作成した[2,7]．

次にScatchard解析を行うため，同様の方法で総結合量測定のため0.2～100nMの[^{3}H]dihydro-FK506でlabelingを行った．また非特異的結合量の測定のため，0.2～100nMの[^{3}H]dihydro-FK506 ならびに未標識のそれぞれの1000倍量のFK506を加えlabelingを行った．

得られたオートラジオグラムは画像解析装置により部位ごとに定量化し，[^{3}H]dihydro-FK506 総結合量から非特異的結合量を減じて特異的結合量とし，Scatchard解析を行った．

【結果】

(1) FK506結合量

[^{3}H]dihydro-FK506 1nM使用時の脳内FK506特異的結合量を表１に示した．海馬CA1をはじめとして脳内各領域で明らかなFK506結合能が確認された．

(2) Scatchard解析

表１：[^{3}H]dihydro-FK506 1 nM使用時のFK506結合量(fmol/mg)

	right	left
frontoparietal cortex (motor area)	63.5± 8.1	63.2± 7.6
frontoparietal cortex (sensory area)	61.7± 7.0	60.8± 6.8
temporal cortex (auditory area)	64.1± 6.3	62.8± 7.0
caudate-putamen	69.4± 3.1	67.7± 2.5
thalamus (medial nuclei)	53.2± 6.3	53.0± 6.7
thalamus (lateral nuclei)	48.2± 4.3	48.8± 4.7
hippocampus CA1	76.6± 6.3	77.3± 5.4
hippocampus CA3	65.3±10.8	66.2± 9.8

(mean±SD)

図１に示すように脳内各領域で，いずれもFK506結合はtwo-componentの様式を示した．右尾状核・被殻，右前頭頭頂葉（運動領野），海馬CA1におけるhigh affinity成分の解離定数(Kd)はそれぞれ1.0, 0.7, 0.6 nMで，最大結合量(Bmax)はそれぞれ144.7, 111.7, 119.8 fmol/mgであった．またlow affinityの成分ではKdはそれぞれ26.6, 30.8, 23.4 nMで，Bmaxはそれぞれ209.4, 275.2, 305.2 fmol/mgであった．

【考察】 Dawsonら[2,7]の検討ではラットの脳においてFK506結合はtwo-componentの様式を示し，Kdはhigh affinity成分0.6nM，low affinity成分30nMとしている．今回の砂ネズミにおける検討でもほぼ同程度の値を示しており，本方法で，脳内のFKBPs分布を定量化可能と考えられた．しかしFKBPにはいくつかの分子量をもつ亜型が知られており，今回明らかとなったtwo-componentの結合様式との関連については，今後の検討が必要と考えられる．また中枢神経系におけるFK506の脳虚血保護作用の解明には，脳虚血時のFKBPs動態を明らかにする必要があり，今後脳血流量の変化とともにFKBPsの脳虚血時の動態を今回用いたオートラジオグラフ法等を用い検討する予定である．

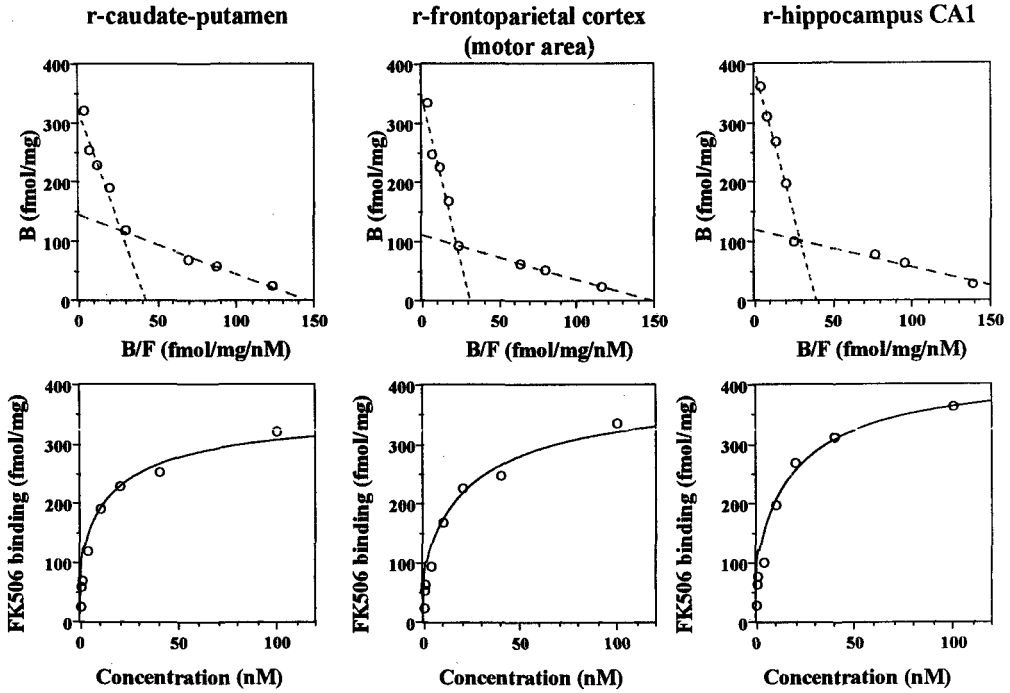


図１：FK506結合実験解析結果．上段はScatchard解析，下段は特異的結合量曲線．Scatchard解析の結果，いずれの領域でもtwo-componentによる結合であることが示唆された．B:Bound, F:FreeのFK506を示す．

【文献】

1）Clipstone NA, Crabtree GR: Nature 357: 695-697, 1992
2）Steiner JP, Dawson TM, et al.: Nature 358: 584-587, 1992
3）Liu J, Albers MW, et al.: Biochem 31: 3896-3901, 1992
4）Dawson TM, Steiner JP, et al.: Proc Natl Acad Sci USA 90: 9808-9812, 1993
5）Sharkey J, Butcher SP: Nature 371: 336-339, 1994.
6）Ide T, Morikawa E, et al.: Neurosci Lett 204: 157-160, 1996
7）Dawson TM, Steiner JP, et al.: Neurosci 62: 569-580, 1994

35
3Da3

一過性前脳虚血後に砂ネズミ海馬で誘導される遺伝子の探索 =Znトランスポーター ZnT-1 の発現=

津田 学、今泉和則、片山泰一、北川一夫[1]、和中明生[2]、遠山正彌[3]、高木 勉
（大阪大・医・分子脳（田辺）、第一内科[1]、第二解剖[3]、福島医大・細胞科学[2]）

〔 要約 〕

一過性前脳虚血により海馬で誘導される遺伝子として亜鉛トランスポーター ZnT-1 を単離した。in situ ハイブリダイゼーションにより、発現誘導の経時変化を調べたところ、ZnT-1 は遅発性神経細胞死を起こす海馬ＣＡ１錐体細胞層にのみ、虚血後12時間から細胞が死滅するまでの間、発現が認められた。また、初代培養神経細胞において、AMPA による脱分極刺激により Zn を細胞内に蓄積させたとき、ZnT-1 の発現が上昇した。ZnT-1 は細胞内から Zn を放出することが知られているので、虚血後に見られた ZnT-1 の発現上昇は流入した Zn を細胞外に排出するためのものと考えられた。

［目的］

一過性前脳虚血（５分虚血）を砂ネズミに負荷すると、海馬ＣＡ１錐体細胞が数日後に変性する事が知られている（遅発性神経細胞死）。また、予め軽度の虚血（２分虚血）を与えておくと、本来致死的な虚血に対し耐性となる現象が存在する。これらの現象がどのような分子メカニズムで起こっているのかを理解することは、虚血性脳血管障害の病態理解を深めるとともに、新しい治療法を確立する上で重要であると考えられる。そこで、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、５分虚血あるいは２分虚血後に海馬で誘導される遺伝子のスクリーニングを行った。

［方法］

軽エーテル麻酔下に砂ネズミ両側総頸動脈を剥離し、２分間あるいは５分間クリップすることにより一過性前脳虚血を負荷した砂ネズミ、及びコントロールとして偽手術を施した砂ネズミを１０匹ずつ作製した。虚血24時間後に海馬を取り出し、それぞれのグループごとに１０匹分の海馬をまとめて totalRNA を調製し、ディファレンシャル・ディスプレイを行った。虚血後に発現量が上昇していると考えられる遺伝子を回収し、塩基配列の決定、ノーザン解析及び in situ ハイブリダイゼーションを行った。また、得られた遺伝子のコーディング領域を取得するため、砂ネズミ脳ｃＤＮＡライブラリーを作製しスクリーニングを行った。神経細胞死の確認は、ＡＢＣ法を用いたＭＡＰ２染色で行った。

胎生17日齢ラットの大脳皮質神経細胞初代培養系に、Zn 300μM, AMPA 50μM, 及び Zn+AMPA を加え、15分間暴露した後、ＴＳＱ染色とノーザン解析を行った。

［結果及び考察］

３種の遺伝子(P17, P28, P41)が、ノーザン解析により５分虚血後に発現上昇することが確認され、塩基配列からセリンプロテアーゼインヒビター SPI-3 (P17) 及び未知遺伝子 (P28, P41) であった。SPI-3 に関してはすでに報告した[1]。P28 は 3'-ノンコーディング領域と考えられたので、ライブラリースクリーニングを行ったところ、コーディング領域の一部が得られ、ラット　亜鉛トランスポーター ZnT-1[2] とアミノ酸レベルで９０％以上の相同性が認められた。したがって、P28は砂ネズミ ZnT-1 と考えられた。

in situ ハイブリダイゼーションの結果、ZnT-1 mRNA の発現は、５分虚血１２時間後海馬ＣＡ１錐体細胞に認められ、虚血２日後に最大となった（図１）。その後、細胞の死滅に対応してZnT-1 の発現は消失した。興味深いことに、海馬ＣＡ３、大脳皮質などの神経細胞死を生じない領域では、遺伝子発現は認められなかった。また、２分虚血後、あるいは２分虚血２４時間後に５分虚血を与えた場合も、ZnT-1 の発現誘導は認められなかった。したがって、 ZnT-1 mRNA は、遅発性神経細胞死を起こす細胞のみに誘導されることが明らかとなった。

初代培養神経細胞に Zn と AMPA を同時に暴露すると、Zn が細胞内に蓄積することが知られている[3]が、この場合において ZnT-1 の発現上昇が見られた。最近、一過性脳虚血後に海馬ＣＡ１錐体細胞で Zn が蓄積していることが報告された[4]。今回観察された ZnT-1 の発現上昇は、虚血後に流入した Zn を排出するためのものと推定された。

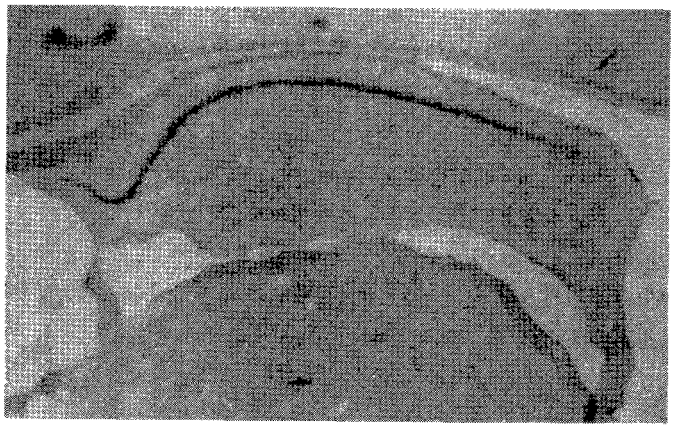


図１　５分虚血２日後における ZnT-1 mRNA の発現

［文献］

(1) M. Tsuda et al. Mol. Brain Res. 35(1996) 314-318
(2) R. D. Palmiter et al. EMBO J. 14(1995) 639-649
(3) J. H. Weiss et al. Neuron 10(1993) 43-49
(4) J-Y. Koh et al. Science 272(1996) 1013-1016

36 2E42 一過性脳虚血後の海馬神経細胞におけるドレブリンの変化

猿木信裕、関野祐子*、白尾智明*
（群馬大学医学部麻酔・蘇生学、行動分析学*）

〔要約〕
ラットを用いて20分間の一過性脳虚血後のシナプス前部の変化をシナプトフィジン、シナプス後部のspineの変化をドレブリン、樹状突起の変化をMAP2に着目して解析した。免疫組織学的検討で、脳虚血7日後、海馬CA1領域においてはドレブリンおよびMAP2の免疫染色性が消失していた。一方CA3領域のstratum lucidumにおいてはドレブリンの免疫染色性が増加していた。ウェスタンブロッティング法により虚血直後、4時間後、7日後の海馬、大脳皮質における各蛋白質の経時的変化を定量的に解析した。ドレブリン、MAP2とも海馬において4時間後、7日後に有意に低下したが、シナプトフィジンには有意な変化はなかった。神経細胞シナプス後部のspineおよび樹状突起蛋白は脳虚血後早期に変化があらわれることがわかった。またCA3領域のドレブリンの免疫染色性が増加していたことから、残存している神経細胞の細胞骨格蛋白の生合成に変化をきたしている可能性が示唆された。

（序） 一過性脳虚血後に海馬CA1領域におきる現象は遅発性神経細胞死として知られている。主に樹状突起のshaftに存在するMAP2は虚血侵襲に弱く、遅発性神経細胞死に先だちその崩壊が始まることが免疫組織学的に報告されている(1)。アクチン結合蛋白の一つであるドレブリンAは樹状突起のspineに限局することが免疫電顕で確認されている(2)ので虚血後の中枢神経シナプスの変化を鋭敏に捕らえうるのではないかと考え、シナプス後部のspineの変化としてドレブリン(3)、樹状突起全体の変化としてMAP2に着目して一過性脳虚血後の神経シナプスの変化について解析した。対照としてシナプス前部のシナプス小胞に存在するシナプトフィジン(4)についても解析した。

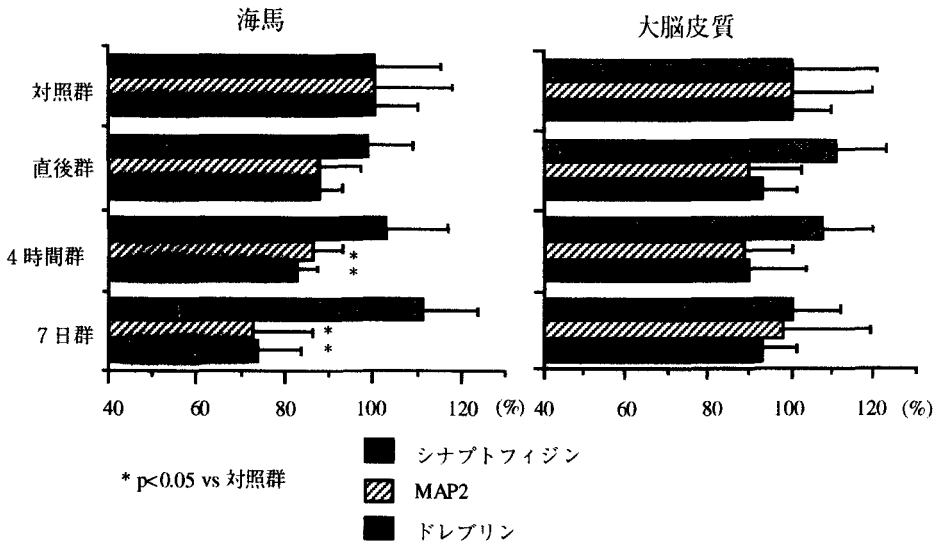
（実験方法） 10～11週のWistar系雄性ラット（280～340g）を用いた。Smithら(5)の方法に準じ、ハロセン麻酔下に両側総頚動脈を脳動脈瘤クリップで遮断後、脱血により平均血圧を50mmHgに下げ、20分間の前脳虚血を作成した。ラットをコントロール群（n=5）と3つの虚血群にわけた。脳虚血後、直後群（n=5）は直ちに断頭し、4時間群（n=5）7日群（n=5）は脱血した血液を返血しそれぞれ4時間後、7日後に断頭した。ドレブリン、MAP2、シナプトフィジンの変化ををウェスタンブロッティング法(6)により分析し、ECL法(7)を用いて、発光量をデンシトメーターで読み込み定量した。また、コントロールおよび脳虚血7日後のラット脳を4%パラホルムアルデヒドで灌流固定またはmicrowave固定後（各3匹）、12 μ mの切片を作成し、FITCを用いて免疫蛍光染色をした。

（結果および考察） **免疫組織化学：**ドレブリン、MAP2とも脳虚血7日目にはCA1領域において免疫染色性が消失していた。神経細胞が残存しているCA3領域ではドレブリンの染色性に変化が見られ、stratum lucidumにおいて染色性が増加していた。しかし、MAP2ではCA3領域の染色性の変化は認められなかった。シナプトフィジンは脳虚血7日後においCA1領域で染色性が増加していた。

ウェスタンブロッティング法による解析：結果は図1に示すごとく、ドレブリンはコントロールと比

較し、脳虚血4時間後83±5（%）、7日後74±10（%）と有意に低下した。MAP2も4時間後86±7（%）、7日後73±13（%）と有意に低下した。大脳皮質では両蛋白とも低下傾向を示すが有意な変化ではなかった。シナプトフィジンは海馬、大脳皮質とも増加傾向にあるが有意な変化ではなかった。今回、脳虚血4時間後、7日後のラット海馬においてドレブリン、MAP2の崩壊がおきていることがウェスタンブロッティング法により確認された。一方シナプトフィジンは増加傾向にあるものの有意な変化ではなかった。シナプス後部の樹状突起のspineに限局するドレブリンと樹状突起に分布するMAP2の両者が脳虚血後早い時期に低下したことから、海馬神経細胞の変化はシナプス後部から直ちに樹状突起に広がり、細胞骨格蛋白の崩壊とともにやがて神経細胞死がおこるものと推測された。

図1



参考文献

1) Kitagawa K et al (1989) Neuroscience 31, 401-411

2) Hayashi K et al (1995) IBRO World Congress of Neurosci Abstr. 4,140

3) Shirao T (1985) J Neurochem 44,1210-1216

4) Obata K et al (1986) Brain Res 375, 37-48

5) Smith MJ et al (1984) Acta Neurol Scand 69, 385-401

6) Shirao T et al (1986) Develop Brain Res 29, 233-244

7) Vargas C et al (1993) Anal Biochem 209, 323-326

37 C57BL/6マウス一過性脳虚血モデルにおける海馬CA3の 3Da4 神経細胞死に伴うferritinの変化 — 免疫組織化学的検討 —

近藤洋一，浅沼幹人，西林佐紀子，岩田恵美，松浦弘治，Marvin Gómez，飯田基之，小川紀雄
（岡山大医・分子細胞医学研・神経情報学部門）

〔 要約 〕

C57BL/6マウスの両側総頚動脈閉塞による一過性脳虚血モデルを作製し，組織傷害の分布を免疫組織化学的に検討した．虚血再灌流7日後に線条体および海馬CA3錐体細胞層に限局して神経細胞死を認め，これらの部位でmicrotubule associated protein 2 (MAP2)染色性の低下とGFAP陽性astrocyteの増加がみられた．正常マウスの海馬CA3領域にはstratum radiatumにferritin染色陽性microgliaが多く存在していたが，虚血マウスではこれが消失ないし減弱し，錐体細胞層の傷害部位に移行していた．虚血再灌流時には大量のフリーラジカルが発生するが，脳内の鉄はこれを助長し神経細胞に傷害的に働くことが知られている．鉄の貯蔵蛋白であるferritinは虚血再灌流時に鉄イオンを放出してフリーラジカルを発生させることでCA3錐体細胞を選択的に傷害していることが示唆された．

脳は鉄を多量に含む臓器であり，神経細胞の活動には鉄が活発に利用されている．しかし，ひとたび脳内の鉄代謝が破綻すると，鉄はtoxicな遊離状態になりフリーラジカルの発生を介して神経細胞に傷害的に働く(1)．われわれはラットの一過性脳虚血においても鉄代謝が破綻し脳内に過剰な鉄沈着が生じることを報告したが(2)，傷害的に働く鉄の起源などまだ不明な点が多い．一過性脳虚血モデルはラットや砂ネズミですでに確立されているが，マウスを用いた脳虚血モデルの研究は少ない．今回われわれは虚血病変の再現性がよいと報告のあるC57BL/6マウス(3)を用いて一過性脳虚血モデルを作製し組織傷害の程度と分布，および鉄結合蛋白(ferritin, transferrin)の変化を免疫組織化学的に検討した．

【方法】

8週齢の雄性C57BL/6マウス(Charles River Japan, Inc.)の両側総頚動脈をKetamine麻酔下に剥離し，動脈瘤クリップを用いて血流を遮断，20分間の前脳虚血を負荷した後にクリップを除去し血流を再開した．術中および再灌流後1時間は体温を約37°Cに維持した．虚血再灌流7日後，マウスをpentobarbital麻酔下に左心室より4% paraformaldehyde/ 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)にて灌流固定し，得られた脳から厚さ20 μmの冠状断凍結切片を作製し，ABC法にて免疫染色を行った．一次抗体には抗MAP2，抗GFAP，抗ferritin，抗transferrin抗体を用いた．

【結果と考察】

虚血負荷7日後のマウスの海馬ではCA1錐体細胞は全く正常であり，CA3の錐体細胞に限局して神経細胞死がみられた (Fig. 1)．線条体には広範に神経細胞死を認めた．MAP2免疫染色でも海馬CA3錐体細胞の脱落が確認され (Fig. 2)，これに一致してGFAP-陽性astrocyteが増加しており，CA3領域で選択的な神経細胞死が起こっていることが明らかであった．ラットや砂ネズミでは一般に海馬のCA1錐体細胞が虚血に対して脆弱であることが知られているが，C57BL/6マウスでは虚血に対する易感受性部位の海馬内分布が異なっているようである．

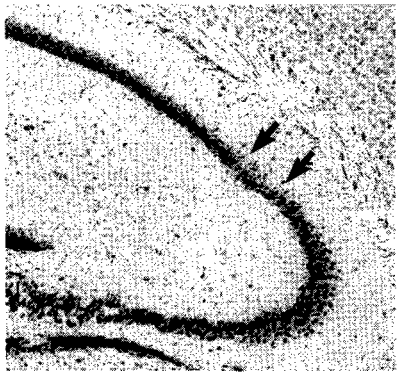


Figure 1: 海馬CA3錐体細胞の神経細胞死 (矢印), (Nissl染色)

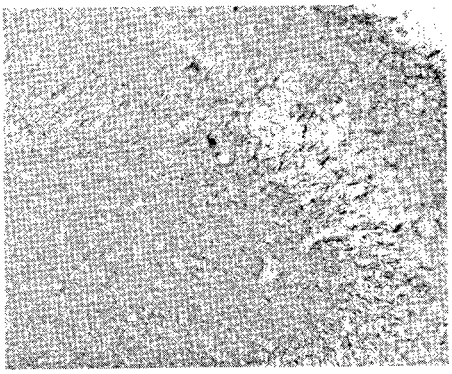


Figure 2: 海馬CA3領域のMAP2免疫染色.

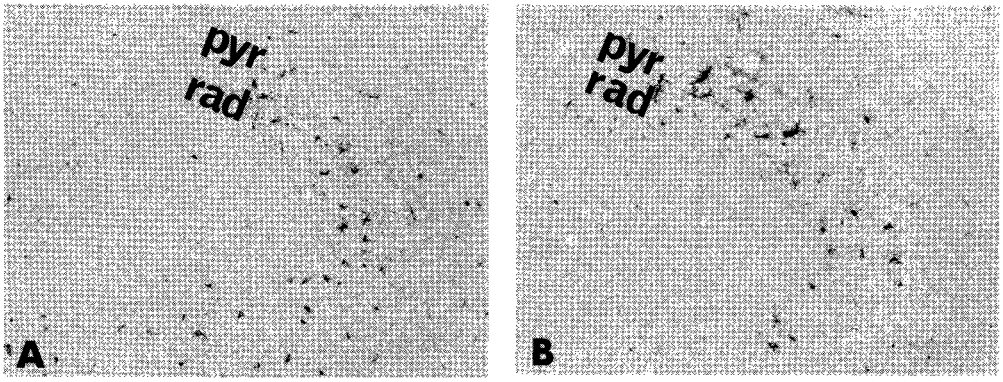


Figure 3: 海馬CA3領域のferritin免疫染色. A: 偽手術マウス, B: 虚血負荷マウス. rad: stratum radiatum, pyr: stratum pyramidale.

ferritin免疫染色では正常マウスのCA3領域からCA4領域にかけて, 錐体細胞層のすぐ内側のstratum radiatumにferrtin陽性の細胞を認めmicrogliaの形態を示していた. このferritin陽性microgliaはCA3領域に最も多く分布していた (Fig. 3A). 一方虚血マウスではCA3のstratum radiatumのferritin陽性microgliaは消失ないし減弱し, 代わって神経細胞死を生じている錐体細胞層に分布していた (Fig. 3B). 虚血再灌流の際には脳組織から大量の鉄イオンが放出され, これがフリーラジカル発生の要因となっている (4). 鉄貯蔵蛋白であるferritinはsuperoxide存在下に鉄を遊離するが (5), 虚血再灌流時の脳は大量のsuperoxideを発生することから, このときferritinは鉄の提供源になると考えられる. ferritin陽性細胞を近傍に有するCA3錐体細胞が選択的に細胞死を生じたことはferritinから遊離する鉄に起因するものかもしれない. 虚血後ferritin陽性microgliaがCA3のstratum radiatumから消え錐体細胞層に出現したことについては, 遊走能を持つといわれるmicrogliaが移動したのか, それとも鉄の遊離に伴ってferritinの発現様式が変化したのかは未だ明らかでなく, さらに検討を要する.

【文献】

(1) Watson BD et al., J Neurochem, 42:268-274, 1984.
(2) Kondo Y et al. J Cereb Blood Flow Metab, 15: 216-226, 1995.
(3) 寺島豊秋 他, 脳循環代謝, 7:157, 1995.
(4) Krause GS et al., Ann Emerg Med, 16:1200-1205, 1987.
(5) 吉田敏彦 他, 日本神経学会, 308, 1995

38 脳虚血後の神経細胞障害に伴う鉄処理システムの活性化

2E43

石丸 裕久，石川 巧一*，大江 良秀*，高橋 章，丸山 悠司
（群馬大学医学部・神経精神薬理ツムラ，*群馬大学生体調節研・分子調節）

〔 要約 〕

脳虚血後の海馬における鉄代謝関連タンパク［transferrin (Trf) および ferritin (Fer)］の変化を免疫組織化学的に観察することにより，神経細胞死とこれらのタンパクおよび鉄との関係について検討した．5分間の一過性脳虚血後4日目の萎縮した錐体細胞に著明なTrfの蓄積が認められた．この蓄積は虚血後7日および14日目の細胞壊死に伴い消失した．一方，虚血後4日目の萎縮した錐体細胞はFer陰性であったが，7日および14日目においては多くのastrocyte様Fer陽性細胞およびFer陽性macrophageがみられた．今回の結果は，虚血後脳内において細胞障害に伴うTrfの動員およびグリア細胞による鉄処理システムが活性化されることを示唆している．

近年，アルツハイマー病を含む神経変性疾患の患者の脳内における鉄代謝の異常および鉄沈着が報告された[1]．鉄は脳内でヒドロキシルラジカルを発生することから，過剰の鉄は神経細胞に対して障害的に働くと考えられている．したがって，鉄代謝関連タンパクの動態が神経細胞障害過程に関与している可能性がある．そこで今回は，神経細胞死と鉄代謝関連タンパクおよび鉄との関わりを知る目的で，神経細胞死のなかでも特に脳虚血により誘発される遅発性神経細胞壊死に着目し，虚血後の海馬におけるtransferrin (Trf) および ferritin (Fer)の経時的変化を免疫組織化学的に観察した．本研究では，脳虚血後の海馬で鉄代謝関連タンパクの分布が神経細胞障害に伴い著しく変化することを明らかにした．

【方法】 Mongolian gerbil (50-70 g)を用い，ハロタン麻酔下で両側総頸動脈を露出後，無麻酔，保温下で5分間の脳虚血操作を施した．虚血前(Control)および虚血後1，4，7および14日目に，4％パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い，20μmの凍結切片を作製し，ヘマトキシリン染色および抗Trf抗体，抗Fer抗体(Zymed Laboratories)を用いた免疫組織化学染色（ABC法）を行った．抗原の可視化にはDAB発色基質を用いた．抗Trf抗体はラット脳軟膜細胞培養液中より単離したTrfを抗原として，ウサギに投与（免疫化）し作製した（抗血清）．抗体の特異性はgerbil CSFをSDS-PAGEにより分離後，Immunoblotting法で確認した（Fig. 1）．

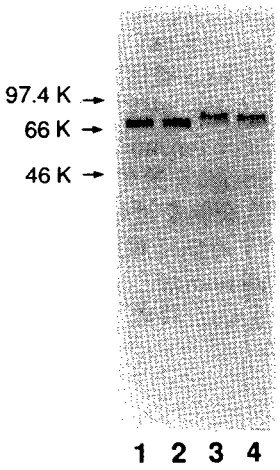


Fig. 1 Immunoblotting analysis of gerbil CSF using anti-transferrin antibody (lanes 3 and 4). Lanes 1 and 2: authentic human transferrin

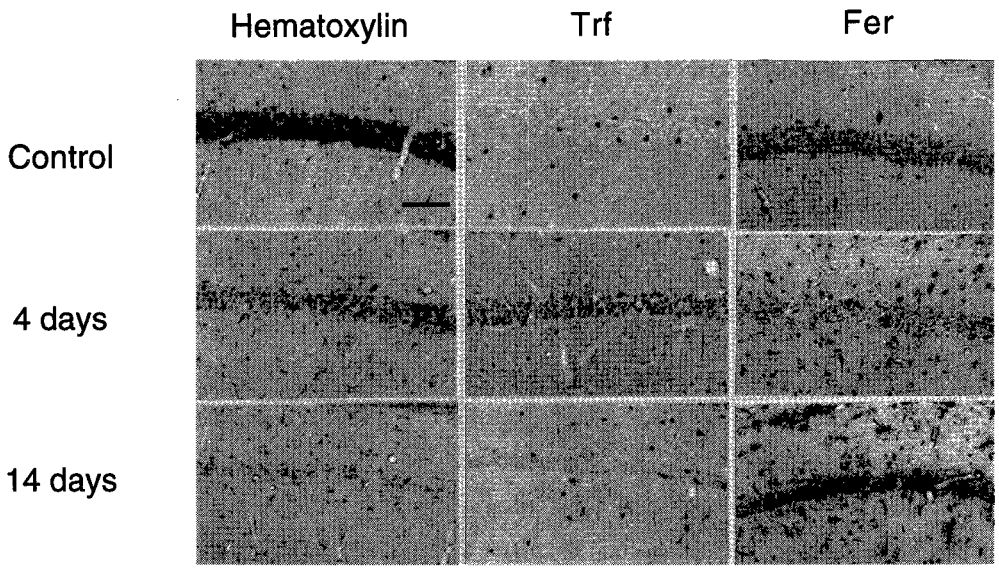


Fig. 2 Hematoxylin stainings and immunohistochemical stainings for transferrin and ferritin in the CA1 subfield in gerbil. py, pyramidal cell layer. Bar = 100 μm.

【結果と考察】 Fig. 2 にヘマトキシリン染色および免疫組織化学染色の結果を示す．海馬CA1錐体細胞は虚血後４日目までに萎縮，14日目までに壊死に至るいわゆる遅発性神経細胞壊死が認められた．虚血後４日目には，萎縮した錐体細胞に著明なTrfの蓄積が確認され，同時に錐体細胞内のFer免疫反応性は低下した．この事実は細胞内における鉄貯蔵の異常，すなわちFerからの鉄の遊離および放出を示唆している．よって，Trfの蓄積はこの過剰な遊離鉄に対応して動員された結果であり，細胞障害に伴うTrf鉄処理システムの活性化の結果であると考えられた．この時点では，oligodendrocyteにおけるTrfの免疫反応が低下していることから，萎縮細胞に動員されたTrfはoligodendrocyteに由来する可能性が強く示唆された．

一方，虚血後14日目には，astrocyte様Fer陽性細胞とFer陽性macrophageの著明な増加が海馬CA1領域全体で認められた．脳障害時にはastrocyteにおけるTrfレセプター（TrfR）の発現がすでに報告されている[2]ことから，astrocyteはTrf/TrfRを介して鉄を取り込み，Ferとして貯蔵していることが推定された．さらにmacrophageは直接的な食作用により鉄を取り込み，同じくFerとして貯蔵していると考えられた．

本研究により，脳虚血後の細胞障害進行過程には少なくとも二段階にわたる鉄処理システム(1. Trfの障害細胞への動員，2. macrophageによる直接的な食作用)が活性化され，これらの脳内の迅速な鉄処理システムが壊死細胞に近接する生存細胞を遊離鉄による二次的障害から保護している可能性が示唆された．

【文献】

1. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P et al. J Neurochem 63, 793-807 (1994).
2. Orita T, Akimura T, Nishizaki T et al. Acta Neuropathol Berlin 79, 686-688 (1990)

39 2E44 ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける海馬特異的セリンプロテアーゼ (neuropsin) mRNAの発現変化について

真砂敦夫，山田和雄，岩田 明
（名古屋市立大学 医学部 脳神経外科）

〔 要約 〕
ラット局所脳虚血モデルにおいて，海馬特異的セリンプロテアーゼ(neuropsin) mRNAの経時的発現変化をimmediate early genesやhsp70 mRNAの発現と対比しながら，in situ hybridization法を用いて検討した．Neuropsin mRNAは，sham control群では両側海馬CA1-CA3に発現がみられた．虚血再灌流後6～24時間目に虚血側CA1では，neuropsin mRNAの発現低下およびc-jun，zif/268，hsp70 mRNAの著明な 発現亢進を認めた．72時間後には，これらのmRNAはsham control群と同等レベルまで復帰した．Neuropsin mRNAのdown regulationが，ラット中大脳動脈閉塞後の海馬におけるneuronal viabilityなど，何らかの役割を有することが示唆された．

【目的】セリンプロテアーゼをはじめとするプロテアーゼはcell migration，神経突起伸展やシナプス形成など多彩な機構に関わる物質である．海馬特異的なセリンプロテアーゼ(neuropsin)は，mouseでlong-term potentiationを誘発したときに，そのmRNAの発現が増加することから，海馬の可塑的変化に関係していると考えられている物質である(1)．今回我々は，ラット中大脳動脈閉塞後の海馬におけるneuropsin mRNAの動態を，immediate early genes (IEGs)やhsp70 mRNAの変動とあわせて検討した．

【方法】雄Wistar rat (200～250g)を用い，フローセン麻酔下，小泉らの方法に従い糸付き栓子で右中大脳動脈起始部を閉塞し，２時間後に再灌流させた．再灌流後1，3，6，24，48，72時間目（各 n=3～5）に脳を摘出し，海馬領域の前額断凍結脳切片を作成した．右頚動脈を露出したのみで，栓子を送り込まなかったものをsham control群とした．Mouse neuropsin cDNA（奈良先端科学技術大学院大学 塩坂教授より供与）から合成したcRNA およびc-jun，zif/268，hsp70に相補的なoligonucleotideを^{35}Sで標識したものをprobeとし，in situ hybridization法でmRNAの発現変化を観察した．フィルムオートラジオグラフィー上でのoptical density (OD)値をdensitometerで計測し，sham control群と比較しmRNAの発現量を解析した．

【結果】sham control群では，neuropsin mRNAは海馬CA1-CA3に限局した発現を認めた．虚血再灌流後6～24時間目にかけて患側CA1領域では，control群と比較し約40～60%のOD値低下が認めたが，72時間目にはOD値はcontrol群と同等レベルまで復帰した(図1, 2)．虚血側CA1領域においてc-junは1～6時間目，zif/268は1～3時間目(図1, 2)，hsp70は3～24時間目にかけて著明な発現亢進を認めた(図1, 3)．

【考察】ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて，同側海馬のneuropsin mRNA発現が一過性に低下することを示した．IEGsやhsp 70の動態から考えると，海馬の血流低下や浮腫の波及，神経線維連絡の異常など

の影響が及んでいることが想像され(2), neuronal viabilityを左右する因子としてもneuropsinのdown regulationが何らかの役割を有していることが示唆された．同じセリンプロテアーゼのtissue plasminogen activator (tPA)は，microgliaを介して神経細胞障害性に働くという報告もあり(3)，今後はプロテアーゼインヒビター活性とのバランスも含めた相互関連を明らかにする必要があると思われる．

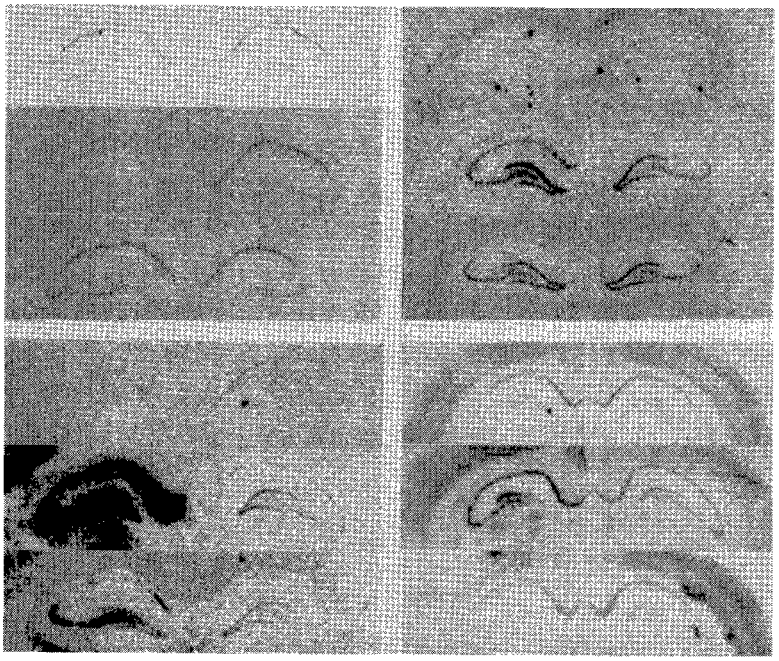


図1
film autoradiography

neuropsin	c-jun
sham	sham
24 h	3 h
72 h	72 h
hsp70	**zif/268**
sham	sham
3 h	3 h
72 h	72 h

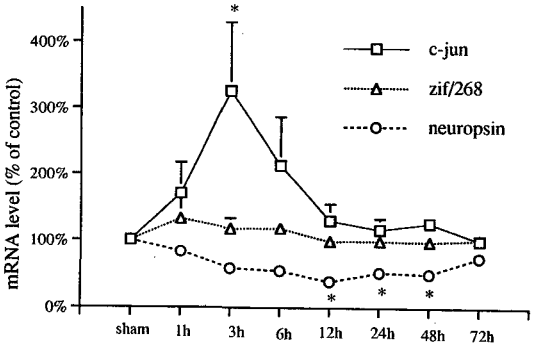


図2 虚血側海馬CA1でのneuropsin, c-junおよびzif/268 mRNAの経時的変化．* p<0.05

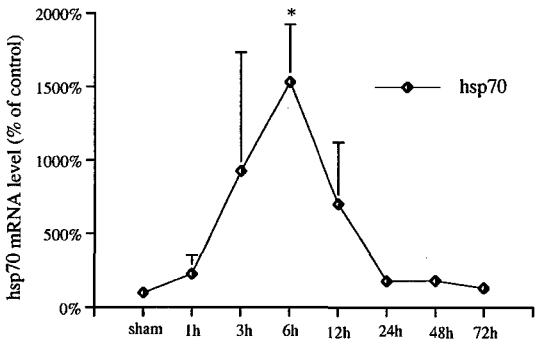


図3 虚血側海馬CA1でのhsp70 mRNAの経時的変化．* p<0.05

【文献】

1) Chen, Z.L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H. and Shiosaka, S. (1995) J. Neurosci. 15, 5088-5097.

2) Kinouchi, H., Sharp, F.R., Chan, P.H., Koitinaho, J., Sagar, S.M. and Yoshimoto, T. (1994) J. Cereb. Blood Flow Metab. 14, 808-817.

3) Tsirka, S.E., Gualandris, A., Amaral, D.G. and Strickland, S. (1995) Nature 377, 340-344.

40 PACAPによる遅発性神経細胞死抑制効果について
3Da5 －分子神経科学的研究－

水島秀勝、本間秀樹、土肥謙二、松本 清、塩田清二＊、中井康光＊、
有村 章＊＊
昭和大学脳神経外科、同第一解剖＊、チューレン大学日米生物医学研究所＊＊

〔 要約 〕
海馬の神経細胞死を極微量のPACAP が防止することがin vitroの実験で明らかにされているが、in vivo の細胞死抑制効果についての実験は行われていない。そこで実験的脳虚血ラットを用いて、細胞死抑制効果とその機序を機能形態学的に調べた。４血管閉塞モデルでは、海馬ＣＡ１領域に限局して遅発性神経細胞死が虚血後３日以降に出現し、PACAP の持続的脳室内投与により神経細胞死は有意に抑制された。PACAP レセプターmRNAの遺伝子発現は、虚血１～２日でＣＡ１領域の錐体細胞と神経膠細胞に限局して強く見られた。さらに虚血３～４日でこのレセプタータンパクの免疫染色性の増加が神経膠細胞に特に顕著に見られた。
以上の結果からPACAP は脳虚血による神経細胞死の抑制効果を持ち、その効果は神経細胞のみならず神経膠細胞を介して行われている可能性があることがin vivo の実験から示唆された。

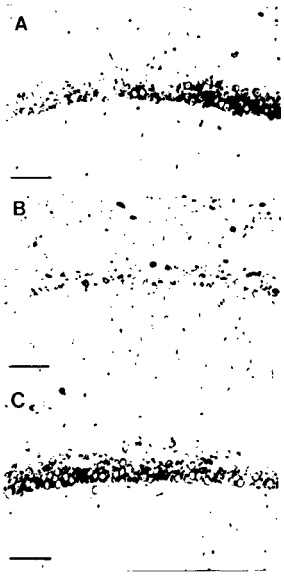
［目的］PACAP(Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) は、グルカゴン／セクレチン／VIP ファミリーに属する新しい神経ペプチドの１つである[1]。in vitroの実験では、ｇｐ１２０による神経細胞死を抑制し、さらに神経膠細胞の増殖を促進させることが明らかになっている[2]。今回、我々はPACAP による神経細胞死抑制とそのメカニズムを解明すべく、実験的脳虚血ラットを用いたin vivo の系で、組織化学法並びに遺伝子組織化学法を用いて観察を行った。

［方法］ＳＤ系成熟雄ラットを用い、Pulsinelliの方法[3] に基づき４血管（椎骨動脈、総頚動脈）を１５分間閉塞した。すなわちケタラール(10mg/kg) で基礎麻酔を行い左右の椎骨動脈を電気凝固し、翌朝再度ケタラールで麻酔を行い、左右の頚動脈を１５分間杉田クリップでクリッピングした後ラットをケージに戻した。脳虚血後、１，２，３，４，５，７日目に脳を摘出し、海馬領域のPACAP レセプターの発現をin situ ハイブリダイゼーション法と抗レセプター抗体による免疫組織化学法を用いて経時的に観察した。またPACAP による脳虚血後の神経細胞死抑制効果を調べるために、２２Ｇのカニューレを右側脳室に挿入し、虚血直後から１週間、１ｐｍｏｌ／ｈの速度で浸透圧ポンプを用いて持続注入し、海馬切片をクレシルバイオレットで染色して細胞計測を行った。

［結果］正常群のPACAP レセプターのmRNAは、海馬の歯状回の顆粒細胞層に強く発現し、アンモン角の錐体細胞層に中等度発現してみられた[4]。またレセプタータンパクの発現は、歯状回の顆粒細胞層に強く見られるが、錐体細胞層では殆ど見られなかった。一方、脳虚血群では、海馬ＣＡ１領域に限局して遅発性神経細胞死が３日以降顕著に見られた。脳虚血１～２日で、PACAP レセプターmRNAの遺伝子発現がＣＡ１領域の錐体細胞と神経膠細胞に強く発現した。さらに虚血３～４日で、このレセプタータンパクの免疫染色性の増加が神経膠細胞（ＧＦＡＰ免疫陽性）に特に顕著に見られた(Fig. 2)。またPACAP の脳室内持続投与では、

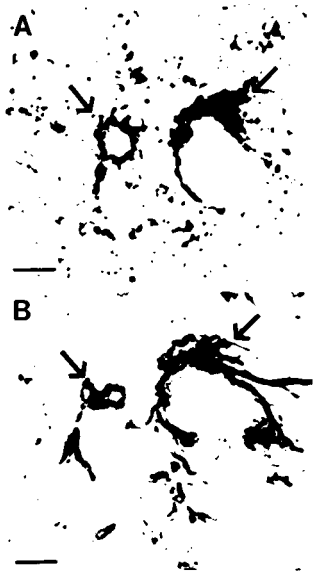
著明な神経細胞死の抑制効果のあることをcresyl violet 及びMA-2染色で確認した(Fig. 1) 。またその神経細胞死は、１ｐｍｏｌ／ｈで有意に抑制されることも分かった(Fig. 3) 。

［考察、結論］PACAP は、神経細胞死の抑制効果をもち、その効果は、神経細胞に対する直接作用と神経膠細胞を介する作用の２つの可能性のあることがin vitroの実験観察から示唆されており[2)]、今回のin vivo の実験観察結果は、これを支持するものと考えられる。PACAP は血液脳関門（ＢＢＢ）を通過しやすいことから、静脈内投与法でも神経細胞死抑制効果の見られることを我々は見ており、将来的に虚血性脳血管障害の治療薬として用いられることも可能である。



Ｆｉｇ. 1

A: Intact rats
B: 7 days after ischemia
Note severe damage to the CA1 pyramidal cell
C: 7 days after ischemia in PACAP-treated rats. PACAP prevents CA1 neural cell death



Ｆｉｇ. 2

Arrows indicate the co-existance of PACAP-R(A) and GFAP(B) in the same cells.

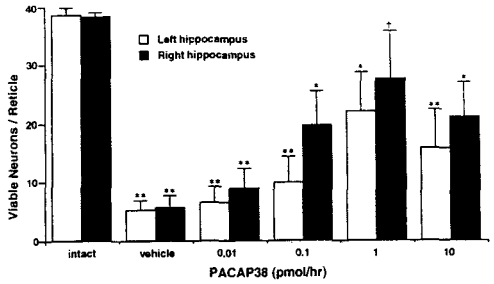


Fig. 2 Effect of infusion of PACAP38 into the right lateral ventricle on ischemic-induced neuronal cell death in the hippocampal CA1 in rats.
Viable neurons per reticle (220 μm) 7 days after ischemia induced by 4-VO for 15 min.

Ｆｉｇ. 3

［文献］

1. A. Arimura, Regulatory Peptides, 37, 287-303, (1992)
2. A. Arimura, A. Somogyrari-Vigh, C. Weill, R. C. Fiora, I. Tatsuno, V. Bay, D. E. Brenneman, Ann N. Y. Acad. Sci., 739, 228-243, (1995)
3. W. A. Pulsinelli, J. B. Brierley, Stroke, 10, 267-272, (1979)
4. S. Shioda, Y. Shuto, A. Somogyrari-Vigh, G. Legradi, H. Onda, A. Arimura, Soc. Neurosci. Abst. 20, 516, (1994)

41 2E45 新規脳血管障害急性期／頭部外傷治療薬 TAK-218 の中枢神経におけるナトリウムイオン流入抑制作用

上田康子 岩間斗史 橋本忠俊 深津考司 大川滋紀 永井康雄
(武田薬品工業株式会社 創薬第一研究所)

〔 要約 〕
新規脳血管障害急性期／頭部外傷治療薬 TAK-218 の細胞内ナトリウム (Na^+) イオン (以下$[Na^+]_i$と記す) 動態に対する影響を検討した。ラット小脳顆粒細胞初代培養系において TAK-218 は veratridine による$[Na^+]_i$の上昇に対して濃度依存的な抑制作用を示した (IC_{50}値; 0.66 μM)。この抑制作用は細胞外液中のカルシウム (Ca^{2+}) イオンの有無に関わらず認められ、ouabain 前処置によっても阻害されなかった。また、TAK-218 はラット前脳における[^{3}H]-batrachotoxin ([^{3}H]BTX) の受容体結合を選択的に阻害した (IC_{50}値; 1.4 μM)。さらに、TAK-218 はラット小脳顆粒細胞において veratridine 誘発細胞死に対し保護作用を示した。以上の成績から TAK-218 は Na^+チャンネルの modulation sites のうち site 2 に選択的に作用して Na^+イオンの細胞内への流入を抑制し、過剰な$[Na^+]_i$の流入による神経細胞死を保護することが示唆された。

[目的]

虚血性あるいは外傷性の神経損傷により、損傷部位の神経細胞体あるいは神経線維内に Na^+イオンの貯留が認められる[1,2]。この Na^+イオンの貯留は浮腫の生成やあるいは dopamine、glutamate 等多くの神経伝達物質の transporter を介した異常遊離を惹起し[3]、また、Na^+/Ca^{2+} exchanger 等による Ca^{2+}イオンの流入を促進し[4,5] 細胞障害を引き起こすことが知られている。新規化合物 TAK-218 ((S)-2,3-dihydro-2,4,6,7-tetramethyl-2-[(4-phenyl-1-piperidinyl) methyl]-5-benzofuranamine dihydrochloride) は、中枢神経の虚血性あるいは外傷性障害治療薬として新たに合成された。今回、この TAK-218 の細胞内 Na^+イオン動態ならびに Na^+チャンネルに対する影響を検討する目的で、初代培養神経細胞における veratridine 誘発 Na^+イオン流入に対する作用及びラット前脳シナプトゾーム膜標本における[^{3}H]saxitoxin ([^{3}H]STX) および[^{3}H]BTX 結合に対する親和性を調べ、これらに基づく細胞死に対する影響を検討した。

[実験方法]

小脳顆粒細胞初代培養系は生後 8 日齢の SD 系ラットより調製し、10%牛胎仔血清を含む Basal Medium Eagle(BME)中で 13～15 日間培養後用いた。**$[Na^+]_i$の測定**にはカバーグラスに接着させた小脳顆粒細胞を用い、Na^+感受性蛍光色素 SBFI-AM(2 μM)を 37℃で 1 時間負荷した。2 波長 (340 および 380nm) の励起光により生じた SBFI-Na^+錯体の蛍光 (505nm) の強度比を測定した。**ナトリウムチャンネル結合実験**は SD 系雄性ラット(7 - 8 週齢)の前脳粗シナプス膜標本を用いた。結合実験は被検薬と[^{3}H]STX あるいは[^{3}H]BTX (いずれも最終濃度 2 nM) および膜標本を加え、37 ℃でそれぞれ 30 分間あるいは 45 分間反応させた。非特異的の測定には[^{3}H]STX binding の場合 1μM の TTX を、[^{3}H]BTX binding の場合 200 μM の aconitine あるいは veratridine をそれぞれ用いた。反応は Whatman GF/C フィルターで吸引ろ過して終了し、フィルター上の放射活性を測定した。**Veratridine 誘発細胞毒性の検討**には 24 well のプレートに 3.5×10^5 個/cm^2 の密度で播種した小脳顆粒細胞を用いた。Veratridine を 2 時間添加した後、培養上清中の LDH を測定することにより、細胞障害の程度を検討した。

[結果と考察]

Veratridine 刺激による$[Na^+]_i$上昇に対する作用；小脳顆粒細胞において veratridine は$[Na^+]_i$の急速な上昇とそれに引き続く持続をもたらした。TAK-218 は単独では$[Na^+]_i$に影響を及ぼさず、veratridine 刺激$[Na^+]_i$上昇に対し著明な抑制作用を示した (図１)。特に veratridine 10 μM による$[Na^+]_i$上昇に対し、TAK-218 は濃度依存的な抑制作用を示し、その IC_{50}値は 0.66μM であった (表１)。この TAK-218 の抑制作用は 2mM EGTA の存在、非存在に関らず同程度認められ、ouabain (10μM) 存在下でも影響を受けなかった。以上のことから TAK-218 は Na^+チャンネルを介した Na^+イオン流入を抑制することが示唆された。

ナトリウムチャンネルに対する作用；ラット前脳粗シナプス膜標本への[^{3}H]STX および[^{3}H]BTX 結合に対する TAK-218 の作用を検討した結果、[^{3}H]BTX 結合を選択的に阻害した (IC_{50}値; 1.4 μM)。この[^{3}H]BTX 結合に対する TAK-218 の阻害作用は局所麻酔薬の lidocaine や procaine より 30～50 倍強力であった (表２)。

TAK-218 の[^{3}H]BTX 結合に対する阻害様式の検討を行った結果、Na^+チャンネルの site 2 に対して競合的に阻害することが示唆された。

Veratridine 誘発細胞毒性に対する保護作用;ラット小脳顆粒細胞において TAK-218 (10μM を 10 分前より添加) は 10μM veratridine の 2 時間処置による細胞死に対し保護作用を示した (図2)。また TTX にも同様の作用が認められた。このことから、veratridine による Na^+イオンの持続流入が引き起こす細胞死を TAK-218 は保護することが示唆された。

以上の成績から TAK-218 は Na^+チャンネルの site 2 に選択的に作用して Na^+イオン流入を抑制し、細胞死を保護することが示された。この作用は TAK-218 の中枢神経障害保護作用につながる作用機序のひとつと考えられる。

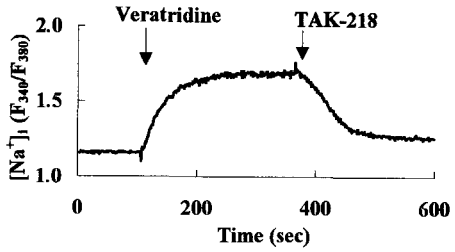


図1　Veratridine(10μM)誘発細胞ナトリウムイオン流入に対する TAK-218(10μM)の作用

表1 Veratridine(10μM)誘発細胞内ナトリウムイオン流入に対する抑制作用

Compound	IC_{50} [μM]
TAK-218	0.66
Tetrodotoxin	0.003
Lidocaine	62
Procaine	160

表2 ナトリウムチャンネルのsite 1およびsite 2に対する親和性

Compound	IC_{50} [μM]	
	[^{3}H] STX (site 1)	[^{3}H] BTX (site 2)
TAK-218	-	1.4
Tetrodotoxin	0.023	-
Lidocaine	-	42
Procaine	-	71

-; no affinity

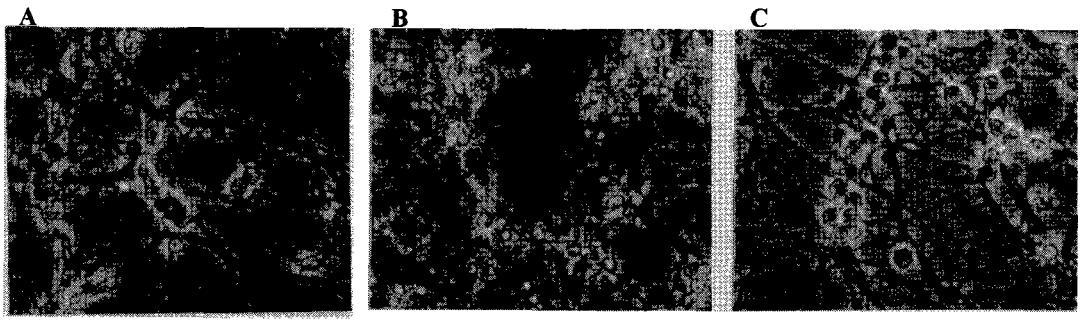


図2　ラット小脳顆粒細胞における veratridine 誘発神経細胞死
A: コントロール, **B**: veratridine 10μM, **C**: veratridine 10μM + TAK-218 10μM

[参考文献]

(1) De Boer, J. et al. (1989) *Stroke*, 20, 1377 - 1382. (2)Taylor, C. P. (1993) *Trends Neurosci.* 11, 455 - 460. (3) Levi, G. and Raiteri, M. (1993) *Trends. Neurosci.* 16, 415 - 419. (4) Kiedrowski, L. et al. (1994) *Neuron.* 12, 295 - 300. (5) Kiedrowski, L. et al. (1994) *Mol. Pharmacol.* 45, 1050 - 1054.

42 2E46 新規脳血管障害急性期／頭部外傷治療薬 TAK-218 のドーパミン異常遊離抑制作用の作用機序

白崎仁美、栗原悦雄*、岩間斗史、深津考司、大川滋紀、永井康雄、橋本忠俊
（武田薬品工業 (株)・創薬第一研究所、*経営企画部）

〔 要約 〕

新規脳血管障害急性期／頭部外傷治療薬 TAK-218 ((S)-2,3-dihydro-2,4,6,7-tetramethyl-2-[(4-phenyl-1-piperidinyl)methyl]-5-benzofuranamine dihydrochloride)のドーパミン (DA) 異常遊離抑制作用の機序について検討した。TAK-218 (3 μM)は高 K^+(50 mM)刺激によるラット線条体粗 P2 画分からの[^{3}H]DA 遊離にほとんど影響を及ぼさなかった。一方、veratridine (10 μM)および azide (3 mM)刺激による[^{3}H]DA 遊離に対し、TAK-218 は Ca^{2+} 非依存的な抑制作用を示した。Tetrodotoxin および lidocaine は、いずれも veratridine 刺激による[^{3}H]DA 遊離に対し抑制作用を示したが、azide 刺激による[^{3}H]DA 遊離に対してはわずかな抑制作用しか示さなかった。さらに、TAK-218 は[^{3}H]GBR-12935 のラット線条体膜に対する結合を抑制した。以上の成績より、TAK-218 は DA のシナプス伝達を抑制することなく、トランスポーターの逆作動による DA の異常遊離 (carrier-mediated release) を抑制することが示唆されるとともに、DA の異常遊離による脳損傷の拡大を TAK-218 が抑制する可能性が示唆された。

〔目的〕

新規脳血管障害急性期／頭部外傷治療薬 TAK-218 は、methamphetamine によるマウスの自発運動亢進を抑制するとともに、ラットにおいて一過性脳虚血後の DA の代謝回転速度の上昇を抑制することが知られており、DA の異常遊離抑制作用が TAK-218 の作用機序のひとつとして提唱されている。神経伝達物質の遊離は、神経終末のシナプス小胞から Ca^{2+}依存的に放出されるもの (exocytosis) と、細胞質内から Na^+依存的 Ca^{2+}非依存的にトランスポーターを介して放出されるもの (carrier-mediated release) とに大別される (1, 2)。今回、我々は、種々の化学的刺激によるラット線条体粗 P2 画分からの[^{3}H]DA 遊離実験により、TAK-218 の DA 異常遊離抑制作用にどのようなメカニズムが関与しているのかを検討した。

〔実験方法〕

[^{3}H]DA 取り込みおよび遊離実験は、10 週齢の Wistar 系雄性ラットの線条体より得た粗 P2 画分を Krebs-Ringer 緩衝液中に懸濁し用いた。取り込み実験では、粗 P2 画分を[^{3}H]DA とともに 37℃で 5 分間インキュベートした。反応は GF/B フィルター下で減圧ろ過して停止し、フィルター上の放射活性を測定した。遊離実験では、[^{3}H]DA を取り込ませた粗 P2 画分を緩衝液で洗浄し、遊離刺激剤、被験薬物とともに 37℃でインキュベートした。反応は氷冷によって停止し、遠心分離後、上清および沈渣中の放射活性を測定した。Ca^{2+}非存在下での実験では緩衝液より $CaCl_2$ を除き、EGTA 5 mM を添加して行った。高 K^+刺激の場合は等量の NaCl と置き換えて KCl の最終濃度を 50 mM とした。[^{3}H]DA 遊離量は全取り込み量に対する刺激時の遊離量として% Efflux で表した。[^{3}H]GBR-12935 結合実験は、10 週齢の Wistar 系雄性ラットの線条体膜標本を 50 mM Tris-HCl 緩衝液中に懸濁して用いた。被験薬物および[^{3}H]GBR-12935 とともに 4℃で 60 分間インキュベートした。反応は GF/B フィルター下で減圧ろ過して停止し、フィルター上の放射活性を測定した。

〔結果〕

高 K^+刺激による[^{3}H]DA 遊離に対し、TAK-218 は Ca^{2+}の有無に関らずほとんど抑制作用を示さなかった (図 1)。一方、veratridine 刺激による[^{3}H]DA 遊離に対し、TAK-218 は Ca^{2+}非依存的な抑制作用を示し (図 1)、Ca^{2+}非存在下での IC_{50}値は 1.9 ± 0.4 μM (表 1) であった。また、Ca^{2+}非存在下における azide 刺激による[^{3}H]DA 遊離に対しても TAK-218 は用量依存的な抑制作用を示した (図 2)。Nomifensine は Ca^{2+}非存在下における veratridine (表 1) および azide (図 2) 刺激による[^{3}H]DA 遊離に対して抑制作用を示した。一方、tetrodotoxin および lidocaine は veratridine 刺激による[^{3}H]DA 遊離に対しては抑制作用を示した (表 1) ものの、azide 刺激による[^{3}H]DA 遊離に対してはわずかな抑制作用しか示さなかった (図 2)。TAK-218 はラット線条体膜に対

する[^{3}H]GBR-12935 結合を 1.8 ± 0.2 μM の IC_{50} 値で抑制した。また、TAK-218 はラット線条体粗 P2 画分への[^{3}H]DA 取り込みを 7.3 ± 0.6 μM の IC_{50} 値で抑制した。

〔考察〕

TAK-218 は高 K^+ 刺激および veratridine 刺激による Ca^{2+} 依存的な exocytosis を介した[^{3}H]DA 遊離に対してはほとんど影響せず、veratridine 刺激および azide 刺激による Ca^{2+} 非依存的なトランスポーターを介した[^{3}H]DA 遊離に対して抑制作用を示した。また、TAK-218 は[^{3}H]GBR-12935 結合阻害作用を示すことから、DA トランスポーターに対する親和性も認められた。TAK-218 には Na^+ チャンネル阻害作用も認められており、veratridine 刺激による[^{3}H]DA 遊離抑制作用にトランスポーター抑制および Na^+ チャンネル阻害の両作用の関与が考えられる。一方、azide 刺激による[^{3}H]DA 遊離抑制作用においては Na^+ チャンネル阻害作用の関与はわずかであり、主にトランスポーターの働きを抑制した結果であろうと考えられる。以上、TAK-218 は DA のシナプス伝達を抑制することなく、細胞内外の Na^+ 勾配の低下時に起こる、トランスポーターの逆作動による DA の異常遊離を抑制することが示唆された。ラットにおける脳虚血による DA 代謝回転亢進、およびマウスにおける methamphetamine による自発運動亢進に対する TAK-218 の抑制作用には、この機序が関与していると考えられる。また、今回の成績は、TAK-218 が脳虚血時、DA 異常遊離による脳損傷の拡大を抑制する可能性を示すものである。

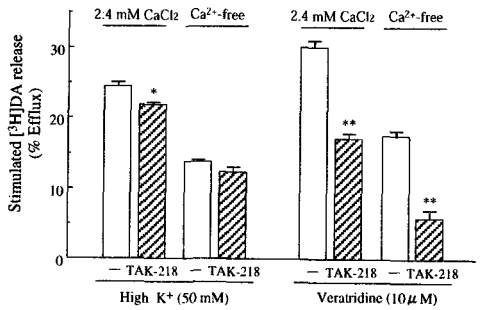


図1　高 K^+ および veratridine 刺激による[^{3}H]DA 遊離に及ぼす TAK-218 (3 μM)の作用
Mean ± S.E. (n=3-4), *P<0.05, **P<0.01 vs コントロール

表1　Ca^{2+} 非存在下における veratridine 刺激による[^{3}H]DA 遊離に及ぼす各種薬物の作用

	IC_{50} (μM)
TAK-218	1.9 ± 0.4
ent-TAK-218	>10
rac-TAK-218	2.1 ± 0.5
Nomifensine	1.2 ± 0.3
Tetrodotoxin	0.012 ± 0.002
Lidocaine	47 ± 4

ent-TAK-218 ; TAK-218 の対掌体
rac-TAK-218 ; TAK-218 のラセミ体
Mean ± S.E. (n=3-6)

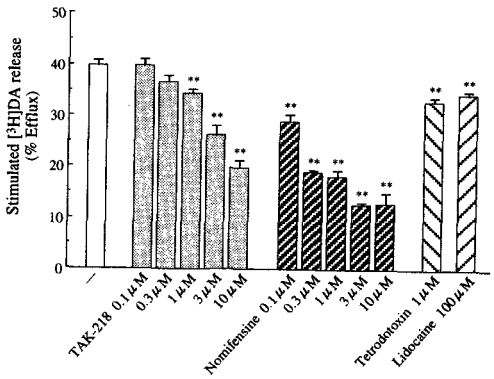


図2　Ca^{2+} 非存在下における azide 刺激による[^{3}H]DA 遊離に及ぼす各種薬物の作用
Mean ± S.E. (n=3-9), **P<0.01 vs コントロール

〔参考文献〕

(1) Levi, G. and Raiteri, M. (1993) Trends Neurosci. 16, 415-419. (2) Raiteri, M., Cerrito, F., Cervoni, A. M. and Levi, G. (1979) J.Pharmacol. Exp. Ther. 208, 195-202.

43 前脳血流慢性低灌流負荷のラット脳内神経系に及ぼす影響

3Dp1

田中健一，和田尚子，小川紀雄*，野村正彦
（埼玉医科大学・第一生理学，*岡山大学 医学部・神経情報学）

〔 要約 〕

脳血管性痴呆の病態モデルとして我々が提案している前脳血流慢性低灌流ラットは，低灌流負荷6週後の時点において，脳内モノアミン作動性神経系（MA系）の活性低下を示すことが示唆された．この結果は，以前報告したムスカリン受容体結合能の結果と一致することから，MA系においても慢性的な機能障害を示す可能性が示された．また，前頭皮質でより強い影響が認められたことから，局所脳血流量の差が大きく反映することが推察された．

［目的］

臨床病態を考慮すると，脳血管性痴呆は起因となる脳血管障害が発症した後の慢性期における病態が，より重要であることが明らかとなってきた．しかも，明らかな再発作が認められなくても，不完全な脳虚血状態が長期にわたり継続することで，痴呆症状を示した症例も報告されつつある（3）．したがって，脳血管性痴呆の病態モデルは，従来の一過性で極短時間の脳虚血負荷によるものではなく，治療薬や予防方法を考える上でも，より臨床症状にもとづくモデルの開発が望まれている．我々はすでに，不完全な脳虚血状態を呈する前脳血流慢性低灌流ラットが，慢性期において学習記憶障害を示すことを明らかにするとともに，知的機能に関係が深いとされる，脳内ムスカリン受容体結合能の低下を引き起こすことから，脳血管性痴呆の病態モデルとして適切であることを報告してきた（5）．しかし，前脳血流慢性低灌流ラットが示すこれらの障害のメカニズムの詳細はまだ分かっていない．特に，組織学的検討で海馬における細胞傷害について相反する報告がなされるなど（2,5,6），部位特異性なども含めて，明らかでないことが多い．本研究では，学習記憶などの脳高次機能に関与するコリン（ACh系）・ノルアドレナリン（NA系）・ドーパミン（DA系）・セロトニン（5-HT系）作動性神経系に対する慢性低灌流負荷の影響を検討するとともに，脳内各部位の局所脳血流量を測定し，神経系の機能変化と血流量の関連についても考察を加えた．

［方法］

1．実験動物：Wistar系雄性ラット（日本クレア／9週齢）240-260gを用い、ペントバルビタール（35 mg/kg）麻酔下、両側総頚動脈を露出して絹糸にて結紮した後、皮膚を結合した（低灌流群）。偽手術群は、両側総頚動脈結紮を除いて、低灌流群とすべて同じ条件下で行なった（5）。

2．脳内神経系の評価：各神経系の評価は，ACh系では，合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）の活性を指標とした．NA・DA・5-HT系については，モノアミン（MA）含量（ノルエピネフリン：NE，ドーパミン：DA，セロトニン：5-HT）の変化を用いた．ChAT活性およびMA含量の測定には，低灌流負荷3・6・12週後の時点で，取り出した前頭皮質・海馬・線条体を使用した。ChAT活性の測定には[^{3}H]-acetyl CoAを基質として用いた．（4）。また，MA含量は，HPLC-ECD法により測定した．なお、蛋白定量はBradford法にて行なった。

3．局所脳血流量の測定：低灌流負荷前に予め，脳血流測定用のプローブを前頭皮質及び海馬CA1野に埋め込み，両側総頚動脈結紮を行ない，局所脳血流量をレーザードップラー法にて測定した（1）．

［結果］

脳内ACh系の指標であるChAT活性は，低灌流負荷3週後の前頭皮質において，統計学的有意差は認められなかったものの，低灌流群で顕著な活性低下を示した（Fig.1）．この活性低下は，負荷6週の時点では、偽手術群と同レベルに回復した．また，海馬と線条体のChAT活性については，どの時点においても，明らかな差は認められなかった

（Fig.1）．MA含量の検討では，部位により異なる変化を示した．特に，前頭皮質では，低灌流負荷3週後の時点における5-HT含量が，低灌流群で有意な増加を示したのに対し，6週後の時点では，逆に，有意な低下を示した（Table 1）．この傾向は，前頭皮質のDA含量，海馬のNE含量でも認められた（Table 1）．また，低灌流負荷6週後の時点における低灌流群の含量低下傾向は，海馬のDA含量を除いて，今回検討したすべての指標で認められた（Table 1）．

一方，予備検討の結果，両側総頚動脈結紮30分後の時点での局所脳血流量は，低灌流群では偽手術群に比べ，前頭皮質において50%程度まで低下するのに対し，海馬CA1野では75%程度の血流量を維持していることが認められた（data not shown）．

［考察］

低灌流群のChAT活性が，負荷3週後の前頭皮質において，偽手術群に比べ低い値を示し，6週後には偽手術群と同じレベルに回復したことは，脳内ACh系のシナプス前部は，低灌流負荷に対応して変化することが示唆された．このChAT活性の変化は，以前報告したムスカリン受容体結合能が3週後ではなく，低灌流負荷6週以降において，低灌流群で顕著に低下したことと比べると，大きく異なり，シナプス前後での変化に差異が見られる．一方，MA含量は，低灌流負荷3・6週後のみの結果ではあるが，負荷6週後で，海馬のDA含量以外はいずれも低下傾向を示したことから，脳内NA・DA・5-HT系については，むしろ慢性期に強い影響を受ける可能性が示された．ACh系のようにシナプスの前後について検討する必要はあるものの，慢性期における低灌流負荷の影響は，ACh系よりもMA系，特に，5-HT系に強く発現する可能性が推定された．

また，今回の検討では，前頭皮質で他の2部位に比べて強い影響が認められたことから，今後の検討が必要ではあるものの，局所脳血流量の予備検討結果を考え併せると，血流量の差が脳内神経系へ及ぼす影響は大きいことが示唆された．

［文献］

1. 鹿嶋 進 他, (1996) 医器学 66, 307-313.
2. Ni, J.W. et al, (1994) Brain. Res. 653, 231-236.
3. Rogers, R.L. et al, (1986) Neurology 36, 1-6.
4. Tanaka, K. et al, (1994) Neurobiol. Aging 15, 721-725.
5. Tanaka, K. et al, Brain Res. in press.
6. Wakita, H. et al, (1994) Acta. Neuropathol. 87, 484-492.

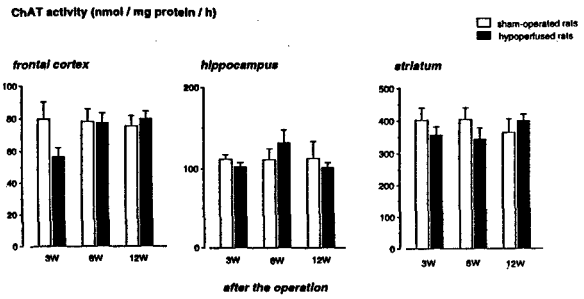


Fig. 1
ChAT activities in the rat brain at three time points after the operation. Values are mean±SEM.

Table 1
Monoamine concentrations (ng / mg protein) in rat brain at 3 and 6 weeks after the operation

	3 weeks		6 weeks	
	sham-operation	hypoperfusion	sham-operation	hypoperfusion
frontal cortex				
norephinephrine	2.546±0.790	1.789±0.335	2.578±0.202	1.659±0.217
dopamine	3.172±0.956	5.735±0.791	3.339±0.861	3.041±0.789
serotonin	3.367±0.191	4.661±0.317**	3.463±0.277	2.759±0.117*
hippocampus				
norephinephrine	3.026±0.257	3.236±0.293	3.305±0.335	2.096±0.571
dopamine	0.444±0.146	0.557±0.192	0.446±0.101	0.534±0.322
serotonin	4.145±0.690	4.075±0.431	4.156±0.423	3.188±0.452
striatum				
norephinephrine	1.115±0.294	1.246±0.348	1.409±0.951	1.336±0.571
dopamine	73.360±17.749	62.023±4.850	75.390±5.084	54.295±2.913
serotonin	5.866±1.281	4.745±0.595	5.729±1.019	4.027±0.349

Values are the mean ± SEM. ** P < 0.01, * P < 0.05 vs each sham-operation controls.

44 虚血脳と非虚血脳における低酸素の影響

2E47

宮本 修[1,2]、板野俊文[1]、根木哲朗[2]、畠瀬修[3]、岡田泰志[4]、村上哲英[5]、Roland N Auer[6]
(香川医科大学・[1]生物学・[2]基礎スポーツ医学・[3]生理学、[4]香川大学・保健体育、[5]倉敷芸術科学大学・生理学、[6]カルガリー大学・病理学)

〔要約〕本実験の目的は、低酸素が虚血脳と非虚血脳に対して、どのような影響を与えるかを調べることである。人工呼吸器を装着したラットの吸入酸素濃度を下げることにより、動脈血酸素分圧（paO2）を25 mmHgまで低下させた。虚血は片側の総頚動脈の結紮と低血圧により導入した。ラットを低酸素のみのグループ、低酸素と虚血を組み合わせたグループ、虚血のみのグループに分け実験を行い、組織学的検討および脳血流を測定した。低酸素のみのグループにおいては、神経細胞死は全くみられなかった。一方、低酸素と虚血を組み合わせたグループにおいては、すべてのラットに神経細胞死がみられ、その脳障害の程度は動脈血圧とpaO_2の程度に依存しており、また、虚血のみの場合に比べて有意に大きかった。低酸素のみのグループの脳血流は、脳の各部位において65 ml/100g/min 以上は保たれていた。以上のことより、脳血流が保たれていれば、低酸素のみでは神経細胞は障害されないが、虚血が存在する場合は、その脳障害の程度が低酸素により増悪されることが示された。

［目的］ 脳虚血が神経細胞死をひきおこすことは、従来より良く知られていることであるが、低酸素のみで同様に細胞死が生じるであろうか。虚血と低酸素とでは、脳血流という点でその病態が異なっている。すなわち、生体において、血圧が維持されているならば、低酸素状態では脳血流は保たれているか、あるいは、むしろ増加しているが（1,2）、虚血では脳血流は低下している。従って、低酸素のみの状態においては、エネルギー源であるグルコースは供給され続け、乳酸やH^+イオンなどの老廃物は組織より除去され続ける。硫化物を用いた組織低酸素実験では、神経細胞死が生じるか否かは組織低酸素の程度ではなく、投与時の血圧降下の程度に依存していた（3）。本実験では、in vivo の系において、低酸素のみで脳障害が生じるか否かを調べると共に、虚血脳と非虚血脳における酸素濃度の影響を検討した。

［方法］ i）組織学的検討： 雄のラット（Wister, 体重250-350g）を、低酸素のみ、低酸素と虚血、虚血のみの3つのグループに分けた。ラットをハロセン麻酔下に挿管し（4％ ハロセン、60 % N_2O、40 % O_2）、人工呼吸器にて呼吸管理した。血圧は尾動脈よりモニターし、また血糖、血液ガス分析を適宜行った。直腸温は温熱ブランケットにより37 ℃にコントロールした。低酸素は、吸入酸素濃度を低下させることで導入し、動脈血酸素分圧（paO_2）が 25 mmHg になるように、酸素と笑気ガスの比率を変化させた。低酸素により血圧が降下するが、平均動脈血圧（MABP）が30 mmHgになったところで吸入酸素濃度をコントロールし、血圧 30 mmHg を15分間保った。低酸素実験後、100 % 酸素ガスを吸入させ自発呼吸が出現した時点で抜管した。虚血と低酸素を組み合わせたグループでは、右側の総頚動脈を結紮した後、低酸素を導入した。さらにこのグループでは、MABPとpaO_2を変化させたサブグループを作製した。すなわち低酸素導入時点のpaO_2を25 mmHg に一定にして、MABPを30, 40, 50, 60, 70 mmHg の各レベルで15分間保った。さらに別のグループでは、血圧レベルを30 mmHg に一定にして、低酸素のレベルをpaO_2を35, 45, >100 mmHg と変化させた。paO_2 >100 mmHg のグループは虚血のみのグループとした。血圧を所定のレベルにコントロールするために、必要であれば頚静脈より脱血した。手術一週間後に、ハロセン麻酔下に灌流固定し、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色にて組織学的検討を行った。脳細胞障害の程度は、梗塞巣の体積を対側半球の体積で除して、その比率として表した。さらに、海馬についてはCA1領域の死んだ錐体細胞の数を、正常CA1 の錐体細胞数で除して、その比率を求めた。

ii）脳血流（CBF）： 低酸素のみのグループ（paO_2 35 mmHg, MABP 30 mmHg）、低酸素と虚血を組み合わせたグループ（paO_2 35 mmHg, MABP 30 mmHg, 右総頚動脈結紮）、虚血のみのグループ（paO_2 > 100 mmHg, MABP 30 mmHg, 右総頚動脈結紮）、正常コントロール（paO_2 >100 mmHg, MABP >100 mmHg）の各グループに対して、Sakuradaらの方法（4）を用い、CBFを測定した。すなわち、ラットをハロセン麻酔下に挿管し、低酸素を導入した。血圧が30 mmHg になった時点で10分間保ち、

^{14}C-Iodoantipyrine 50μCiを1分間で静注し、動脈血のサンプリングを行った。静注開始後1分間してすばやく脳を取り出し、凍結切片を作製し、オートラジオグラフィーを行った。Sakuradaの式によりCBFを計算した。

［結果］　低酸素のみでは神経細胞死は、脳の各部位においてまったくみられなかった。それに対して、低酸素と虚血を組み合わせたグループではすべてのラットの大脳皮質、海馬、線状体において細胞死がみられた。この脳障害の程度は血圧と低酸素のレベルに依存していた。梗塞巣の体積比は、paO2 25 mmHgと一定にした場合、MABP 70, 60, 50, 40, 30 mmHg の各グループにおいて、それぞれ 0, 8.2, 12.1, 12.0, 16.7, 30.0 % であった。また、MABP 30 mmHg と一定にした群では、paO_2>100（虚血のみのグループ）, 45, 35, 25 mm Hg の各グループにおいて、それぞれ1.6, 18.7, 11.4, 30.0 %であった。海馬CA1の錐体細胞の障害についても同様な傾向であった。CBFについては、低酸素のみのグループでは脳の各部位において65 ml/100g/min 以上を保っていた。低酸素と虚血を組み合わせたグループにおいては、虚血のみの場合よりも血流が低い傾向がみられた。

［考察］　虚血が生じなければ、低酸素状態では血流は保たれている。そのために脳組織にエネルギー源が供給され、代謝産物が組織中より除去され続ける。また、低酸素中の嫌気性解糖系の亢進により、ATPはある程度供給されている（5）。さらに、グルコースが供給されていれば、低酸素状態においてもアストロサイトによるグルタメイトの取り込みが維持され続ける（6）。以上の理由により、in vivoの系においては、低酸素のみでは神経細胞死が生じなかったと考えられる。しかし、虚血が存在する場合には、低酸素は虚血による脳障害を増悪する。この一つの原因として、エネルギー源が供給されない状態で低酸素になると、組織中に乳酸やH+イオンが蓄積し組織の酸性化を促進することが考えられる。低酸素時の脳血流は、血圧が30 mmHg であっても65 ml/100g/min 以上の血流は維持されており、この程度の血流が維持されていれば、低酸素状態であっても神経細胞死は生じないと考えられる。

［参考文献］ 1)Ginsberg MD. et al. (1976) Stroke 7, 132-134 2)Kogure K. et al. (1970) Am. J. Physiol. 219, 1393-1396 3)Baldelli RJ. et al. (1993) J. Appl. Physiol. 75, 1348-1353 4)Sakurada, O. et al. (1978) Am. J. Physiol. 3(1), H59-H66 5)Duffy TE. et al. (1972) J. Neurochem. 19, 959-977 6)Swanson RA. (1992) Neurosci. Lett. 147, 143-146

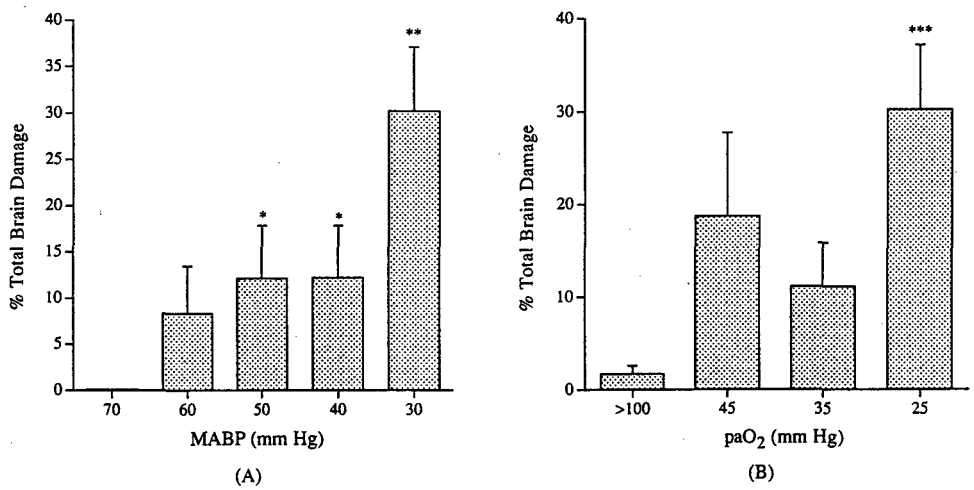


Fig 1. Percentage of total brain damage (necrosis + atrophy) in rat brain. Necrotic volumes and hemispheric volumes are calculated by integrating the coronal planar areas in the anteroposterior dimension. Atrophy is calculated by subtracting the ipsilateral from the contralateral hemisphere. The total brain damage is obtained by adding the sum of tissue loss due to necrosis to that due to atrophy. The volume of tissue loss is compared to the contralateral hemispheric volume to give the percentage of volume damaged. The data represent the mean ± standard error and were evaluated using the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ vs. MABP 70 mm Hg group, *** $p = 0.0001$ vs. $paO_2 >$ 100 mm Hg group. A: Percentage of total tissue loss at graded levels of MABP with fixed $paO_2 = 25$ mm Hg. B: Percentage of total tissue loss at graded level of paO_2 with fixed MABP = 30 mm Hg. Total brain damage increased with reduction of MABP (A) and paO_2 (B).

45 3Da6 虚血性脳障害の発生、進展における細胞接着因子の関与 ーICAM1ノックアウトマウスを用いた検討ー

北川 一夫[1]、馬渕 卓真[1]、八木田 佳樹[1]、柳原 武彦[2]、松本 昌泰[1,2]
([1]大阪大学第一内科、[2]神経内科)

〔 要約 〕

虚血性脳障害の発生、進展の増悪因子として病巣局所への白血球の集積が注目されている。細胞接着因子ICAM1 は血管内皮表面に発現され、炎症部位への白血球、特に好中球の接着、遊走に関与するとされている。本研究では局所脳虚血、局所脳虚血再灌流、一過性前脳虚血モデルの3つの異なる病態を有する脳虚血モデルを用いて、脳梗塞、選択的神経細胞死の発生へのICAM1の関与をノックアウトマウスを用いて検討した。脳梗塞サイズは永久閉塞例では虚血辺縁部で、一時閉塞例では大脳皮質全域においてICAM1 ノックアウトマウスではwildマウスより縮小していた。しかし一過性前脳虚血後に海馬、線条体で発生する神経細胞死の程度は両群間で差がみられなかった。以上の結果からICAM1の局所脳虚血モデル(永久閉塞、一過性閉塞共)での脳梗塞巣進展への寄与がノックアウトマウスを用いた検討から示されたが、選択的神経細胞死へのICAM1 の関与は少ないと考えられた。

近年、脳虚血、再灌流にともない白血球が病巣に集積し、脳病変の増悪因子として注目されている[1]。白血球の局所炎症部位への集積にセレクチン、インターロイキン8と共に最も深く関与するとされているものが細胞接着因子ICAM1 である[2]。脳虚血モデルにおいてもICAM1に対する中和抗体を投与すると脳梗塞サイズが縮小すると報告されている[3]。本研究はICAM1を生体から全く欠損させた状態で脳虚血を作製し、ICAM1の欠如により虚血による脳病変サイズは縮小するか?縮小するとすればどのような虚血病態(局所脳虚血、局所脳虚血ー再灌流、一過性前脳虚血モデル)においてであるか?について検討した。

<**方法**>:ICAM1ノックアウトマウス[4]をいったんC57BL/6マウスとバッククロスし、得られたヘテロ体同士を再交配し、生まれたwildとノックアウト(k/o)をPCRにより選別し実験に供した。脳虚血の作製はハロセン吸入麻酔下に行った。

①中大脳動脈永久閉塞モデル:マウス(k/o, wild各12匹ずつ)を側臥位に固定し、左外眼角と外耳孔の間に皮膚切開を行い、側頭骨頭蓋底部に到達し、電気ドリルで小骨窓をあけ、左中大脳動脈を電気凝固により永久閉塞した。

②中大脳動脈一過性閉塞モデル:マウス(k/O, wild各6匹ずつ)の頸部皮膚を正中切開し、右総頸、外頸、内頸動脈を剥離後、頸動脈分岐部より6-0ナイロン糸を内頸動脈内へ挿入し約10mm程進めて右中大脳動脈起始部を30分間閉塞した後ナイロン糸を引き抜き血流を再開通した。

③一過性前脳虚血モデル:マウスの両側総頸動脈を剥離、クリップにて15分間閉塞した後再開通した。クリップによる閉塞中、閉塞前に比べ脳血流量が10%以下に低下したもの(k/o, wild各6匹ずつ)を実験に供した。

④生理学パラメーターのモニター:ハロセン麻酔中は大腿動脈にポリエチレンチューブを挿入し血圧を観血的に測定した。また体温、頭蓋骨表面温度をモニター、維持した。脳血流の評価は、中大脳動脈灌流領域の中心部(大泉門より3.5mm外側)と中大脳動脈灌流領域の辺縁部(大泉門より1.5mm外側)の頭蓋骨表面にレーザードプラープローブを装着し測定した。

⑤脳虚血病変の評価:中大脳動脈閉塞例では永久閉塞、一過性閉塞例とも48時間後に断頭屠殺

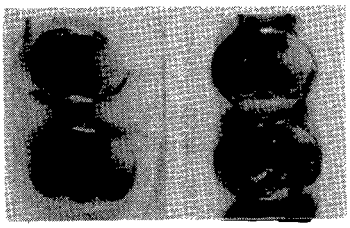
した。虚血病変の評価はTTC染色(前頭極から1,3,5,7㎜尾側のスライス)とパラフィン切片による組織学的評価(前頭極から1㎜毎のスライス)にて行い、脳梗塞サイズを算出し、wild群とk/o群で比較した。一過性前脳虚血モデルでは7日後に断頭屠殺し、パラフィン切片を作製し組織学的に線条体と海馬での神経細胞死の程度を評価した。

<結果>：中大脳動脈閉塞による脳血流低下率は永久閉塞、一過性閉塞例とも虚血中心部で虚血前値の10-20%、虚血辺縁部で40-50%でk/o群、wild群間に差を認めなかった。一過性閉塞例ではナイロン糸引き抜き後血流がすみやかに回復した。一過性前脳虚血モデルでの脳血流低下率も虚血前値の5-8%でk/o群、wild群間に差を認めなかった。血圧、体温、頭蓋骨表面温の値も両群間で差を認めなかった。中大脳動脈永久閉塞による脳梗塞サイズはTTC染色では前頭極から尾側へ3 ㎜ (15.4 $㎜^2$ vs 10.5 $㎜^2$)と5 ㎜(7.8 $㎜^2$ vs 4.5 $㎜^2$)のスライスでk/o群でwild群に比し有意に縮小していた。またパラフィン切片による組織学的評価でも前頭極から尾側へ 5 ㎜ (5.8 $㎜^2$ vs 2.6 $㎜^2$)と6 ㎜(1.9 $㎜^2$ vs 0.1 $㎜^2$)のスライスでk/o群でwild群に比し有意に縮小していた。k/o例ではwild例に比べ大脳皮質の虚血辺縁部で脳病変が縮小していた。中大脳動脈一過性閉塞による脳病変サイズは前頭極から2㎜(6.0 $㎜^2$ vs 2.6 $㎜^2$), 3 ㎜(7.5 $㎜^2$ vs 3.3 $㎜^2$), 4 ㎜(8.2 $㎜^2$ vs 2.3 $㎜^2$)いずれのスライスでもk/o群でwild群に比し縮小していた。線条体ではwild、k/o例ともに病変が観察されたが、大脳皮質での脳病変の発生はwild例でみられるのに対しk/o例ではほとんど観察されなかった。両側総頸動脈15分間閉塞による一過性前脳虚血モデルではwild、k/o例とも海馬、線条体で選択的神経細胞死が発生し、その程度に差はみられなかった。

<考察>：本研究から局所脳虚血、局所脳虚血再灌流に伴って大脳皮質で発生する脳梗塞に対しICAM1欠損による病変縮小効果が観察された。この結果は、Kellyら[5]、Sorianoら[6]によるICAM1ノックアウトマウスでの一過性中大脳動脈閉塞、再灌流に伴う脳病変サイズの縮小効果に関する報告とほぼ一致するものの、本研究は線条体での虚血性脳病変の発生にはICAM1の関与が少ないことを明らかにした。Kellyら[5]、Sorianoら[6]は脳病変の評価にTTC 染色のみを用いており、線条体で発生する神経細胞死の評価が十分でなかったと考えられる。選択的神経細胞死に対しICAM1 欠損による保護効果が観察されないのは一過性両側総頸動脈閉塞後の線条体、海馬での今回の結果からも支持される。また中大脳動脈永久閉塞モデルにおいてもICAM1ノックアウトマウスでは虚血辺縁部での脳病変サイズの縮小効果が観察された。局所脳虚血後には虚血辺縁部で微小循環障害が発生し、梗塞サイズが拡大する事が考えられているが、ICAM1を介した白血球の血管内凝集がこの過程に関与する事が示唆された。

<文献>

1. Barone FC et al., J Neurosci Res 29:336,1991
2. Ward PA, J Clin Invest 95;1425,1995
3. Zhang RL et al., Neurology 44;1747,1994
4. Sligh JE et al., Proc Natl Acad Sci 90:8529,1993
5. Kelly KJ et al., J Clin Invest 97:1956,1996
6. Soriano SG et al., Ann Neurol 39:618,1996



WILD **K/O**

図：左中大脳動脈永久閉塞モデルにおけるICAM1 K/Oマウスにみられる脳梗塞縮小効果。
Wild、ICAM1ノックアウト (K/O) の左中大脳動脈を電気凝固により永久閉塞し48時間後に脳梗塞サイズをTTC染色にて評価した。

46 1E51 脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHRSP)大脳皮質におけるCa^{2+}/Calmodulin感受性アデニル酸シクラーゼ活性の変化

八田愼一[1)]、富樫廣子[2)]、吉岡充弘[2)]、斎藤秀哉[2)]、齋藤利和[3)]、大鹿英世[1)]
(札幌医科大学[1)]医学部薬理講座・[3)]保健医療学部作業療法、[2)]北海道大学医学部薬理学第一講座)

〔要約〕 痴呆とcAMP細胞情報伝達系の関連性について検討する目的で、脳血管性痴呆モデルラットとして特徴づけられている脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用い、大脳皮質アデニル酸シクラーゼ(AC)細胞情報伝達系の変化について解析した。8週齢のSHRSPでのAC基礎活性、Forskolin、GppNHp、Ca^{2+}/Calmodulin刺激性AC活性は、対照に用いた同週齢のWistar-Kyoto系ラットと差はみられなかった。一方、25週齢では、AC基礎活性、Forskolin、GppNHp刺激性AC活性で両群間の差は認められなかったが、SHRSPのCa^{2+}/Calmodulin刺激性AC活性は対照と比較して有意な減弱が観察された。これらの結果から、記憶・学習障害が観察されるSHRSP (25週齢)で、中枢神経系 Ca^{2+}/Calmodulin 感受性 AC (AC1) の機能低下の生じていることが示唆され、AC1-cAMP系と記憶との関連性が推測された。

【目的】 従来から、老人性痴呆(Alzheimer型痴呆、脳血管性痴呆)に伴う記憶障害とアセチルコリン神経系との関連性が指摘されている。一方、近年、cAMP情報伝達系、特にアデニル酸シクラーゼ(AC)のIsoformであるCa^{2+}/Calmodulin感受性AC-Type 1 (AC1)の記憶・学習への関与が示唆されており(1)、痴呆に伴う記憶障害にAC1-cAMP系の変化が関連している可能性が考えられる。そこで、本研究は、脳血管性痴呆モデルラットとして特徴づけられている脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)(2)を用い、AC1-cAMP情報伝達系の変化について大脳皮質を用いて検討した。

【方法】 実験には、血圧および行動薬理的な変化がまだ顕著ではない8週齢と、その変化が顕著となる25週齢の雄性SHRSP(2)を、また対照には同週齢の雄性Wistar-Kyoto (WKY)系ラットを使用した。各群のラットより大脳皮質膜分画を調製し、種々の刺激 (Ca^{2+}/Calmodulin、Forskolin、GppNHp)によるアデニル酸シクラーゼ活性の変化について測定した(3)。また、G蛋白質の変化について、G蛋白質αサブユニットのimmunoblottingおよびGTP Photoaffinity labeling ([^{32}P]P^3-(4-azidoanilido)-P^4-5'-GTP; [^{32}P]AAGTP)を行い解析した(4)。

【結果】 8週齢のSHRSP大脳皮質膜標品でのForskolin (100 μM)、GppNHp (10^{-8}～10^{-4} M)刺激性(Fig. 1A)ならびにAC基礎活性は、対照に用いた8週齢のWKYと比較して差はなかった。さらに、Calmodulin (3 μM) 存在下での Ca^{2+}(10^{-8}～10^{-4} M) 刺激性 AC活性においてもその差は認められなかった(Fig. 1B)。一方、25週齢のSHRSPでは、Forskolin、GppNHp刺激性AC活性 (Fig. 2A)および AC基礎活性で、WKY との違いはみられなかったが、Ca^{2+}/Calmodulin 刺激性 AC活性で有意な減弱が認められた (Fig. 2B)。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は、G蛋白質サブユニット(αs、αi、αo、αq)量ならびに 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(結果未提示)。

【考察】 近年、cAMP生成酵素であるAC分子種には 8種類の亜型の存在していることが報告されている。そのなかで Ca^{2+}/Calmodulin感受性ACであるAC1の記憶・学習機能への関与が示唆されている(1)。AC1の活性化によって生成したcAMPは cAMP-responsive element を介して、後期長期増強 (Late-LTP)に関与している蛋白質の合成を促進し、その結果、Late-LTP が生じ記憶保持が行われると考えられている。従って、AC1の蛋白発現や機能での変化が起これば、cAMPより下流の情報伝達が抑制され、結果として記憶障害の生じる可能性が考えられる。このことは、実験的に、①ショウジョウバエのcAMP生成系欠損突然変異種での学習・記憶障害(5)、②AC1欠

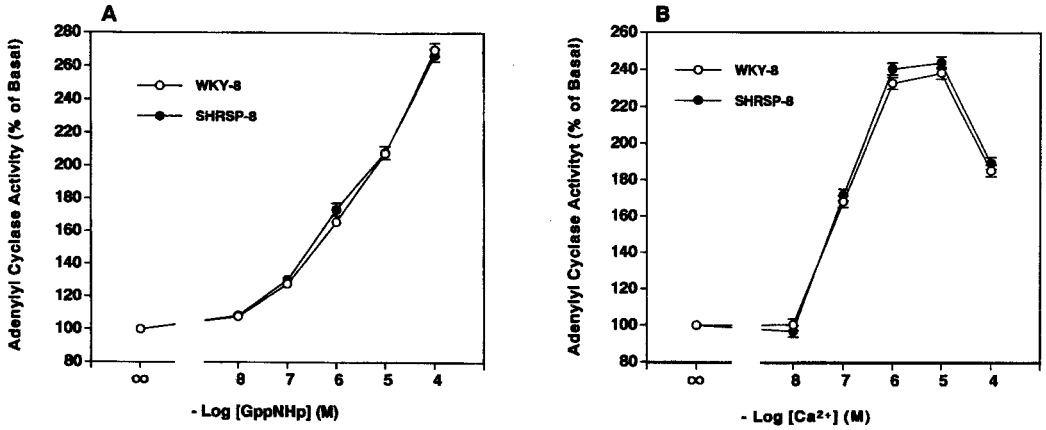


FIG. 1 GppNHp-stimulated (A) and Ca^{2+}/calmodulin-stimulated (B) adenylyl cyclase activity in cerebral cortex membrnaes from 8-week-old Wistar-Kyoto (WKY) and stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) rats.

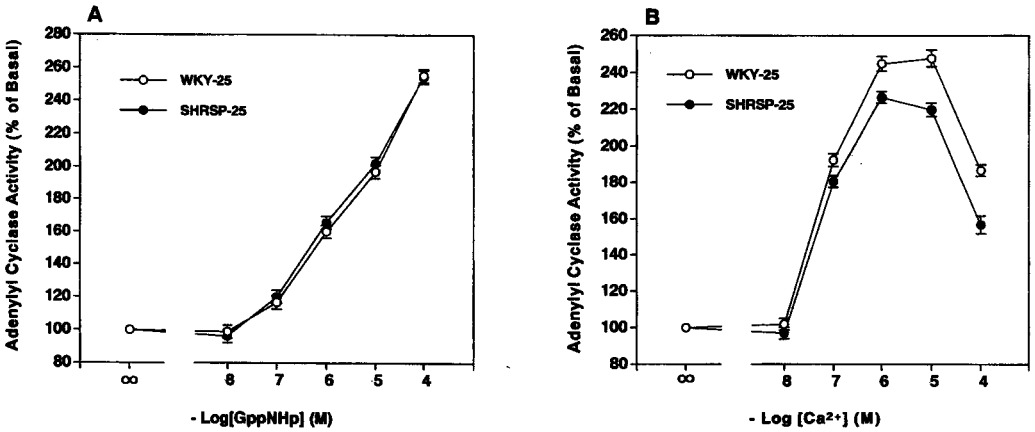


Fig. 2 GppNHp-stimulated (A) and Ca^{2+}/calmodulin-stimulated (B) adenylyl cyclase activity in cerebral cortex membrnaes from 25-week-old Wistar-Kyoto (WKY) and stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) rats.

損ミュータントマウスでのcAMP生成障害と空間記憶障害(6)、などの結果によって示されている。しかし、痴呆のような疾病状態で、記憶障害とAC1－cAMP系機能の変化との関連については明らかではない。今回の結果から、脳血管性痴呆モデルラットと考えられている25週齢のSHRSPで、大脳皮質ではあるが、Ca^{2+}/Calmodulin 感受性AC機能の選択的な減弱が認められた。このことはSHRSPで報告されている記憶・学習における行動薬理学的異常とAC1機能の変化が関連している可能性を示唆するものと考えられた。今後、記憶により密接な関係をもつ海馬でのAC1機能の変化について検討を加えたい。

【文献】(1) Mons N. and Cooper D.M.F. Trends Neurosci. 18, 536−542, 1995 . (2) Togashi H. *et al.* Stroke 27, 520−526, 1996. (3) Hatta S. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5439−5443, 1986 (4) Hatta S. *et al.* J. Neurochem. 63, 1104−1110, 1994. (5) Levin L.R. *et al.* Cell 68, 479−489, 1992. (6) Wu Z.−L. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 220−224, 1995.

47 1E52 2、3のB型MAO阻害剤の慢性投与による老齢マウスの脳内の生化学的老化マーカーの変動

江頭 亨、高山房子、山中康光
大分医科大学 薬理学教室

〔要約〕2、3のMAO-B阻害剤投与による寿命延長の作用機序を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, pargylineおよびRo.19-6327を6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、それぞれ低値および高値を示すが、これら薬物の慢性投与でMAO-A活性の増加とMAO-B活性の低下が見られた。老齢マウス脳の脂質過酸化物の増加に対してこれら薬物は抑制効果を示した。一方、これら3種のMAO-B阻害剤の慢性投与で、脳のMn-SODおよびCu,Zn-SODの有意な活性増加が認められた。MAO-B阻害剤による寿命延長作用の機序として、慢性投与による老齢マウス脳のMAO-B活性の低下とMAO-A活性の増加、脂質過酸化の抑制およびSOD活性の増加が関わっているものと思われる。

Deprenylは Knollら[1]によりMAO-B阻害剤として報告されて以来、抗うつ薬および抗パーキンソン薬としての可能性が検討されている。また、最近このdeprenylには寿命延長効果があるとの報告[2]からそ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、昨年の本学会で、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発表した。その結果、MAO-B阻害剤特異性が示唆されたので、今回、2、3のMAO-B阻害剤を用いて、老齢マウスに慢性投与し、生化学的老化マーカーの変動を検討した。

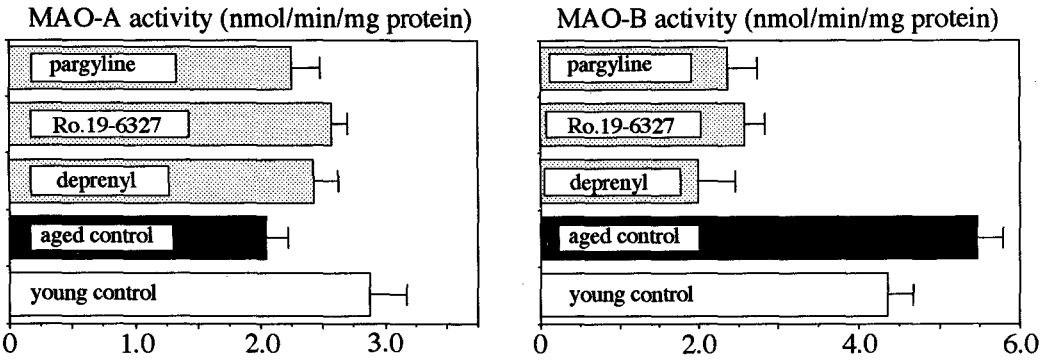
〔実験方法〕

12ヶ月齢の雄性マウスにMAO-B阻害剤であるdeprenyl (1.0mg/kg/day), pargyline (2.0mg/kg/day)およびRo.19-6327 (10mg/kg/day)を6ヶ月間経口投与した。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]-ß-PEAを基質としてradioisotope法で測定した[3]。脂質過酸化量：脳および血漿の脂質過酸化量は*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活性の検討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-Bの阻害剤であるdeprenyl, pargylineおよびRo.19-6327を慢性投与したところ、いずれも有意な活性低下を示した。一方、MAO-A活性はこれらMAO-Bの阻害剤投与で、対照老齢マウスに比較して有意な活性増加がみられた（図）。

(2) 脂質過酸化物：脳ホモジェネイトの800xg上清および血漿を用いて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著明に増加していた。この老齢マウスにMAO-Bの阻害剤を慢性投与したところ、脂質過酸化物は有意に減少した。一方、血漿の脂質過酸化物は若年マウスに比べ老齢マウスで低下したが、MAO-Bの阻害剤投与では、この血漿中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 3 種のMAO-B の阻害剤を慢性投与したところ、いずれのMAO-B の阻害剤投与群でも脳中の Cu,Zn-SODおよびMn-SOD活性の有意な増加が見られた。一方、血漿中の Cu,Zn-SOD活性は deprenyl投与群でのみ、有意な増加が見られた。

〔考察〕 2、3 のMAO-B阻害剤投与でマウスの寿命が延長したが、その寿命延長の作用機序の一つとして、脳の老化の抑制が考えられる。今回、3 種MAO-B阻害剤の慢性投与により老化で増加していた MAO-B活性を著明に抑制した。このMAO-B活性を抑制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、MAO-B阻害剤 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。しかし、MAO-A活性はこれら 3 種の MAO-B阻害剤慢性投与で、活性の増加が見られた。これは、ただ単なるMAO-B活性減少を補うためのMAO-A活性の増加であるか、または、何か意味ある増加であるかもしれない。一方、老化につれ MAO-B活性が増加するが、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、3 種のMAO-B阻害剤を投与したところ、老齢マウスの脳の脂質過酸化を抑制した。しかし、この 3 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、この 3 種のMAO-B阻害剤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の、薬物の慢性投与で間接的に脂質過酸化を抑制したものと思われる。また、これらMAO-B阻害剤の慢性投与で脳および血漿中の 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、MAO-B阻害剤 による寿命延長効果の一因として、抗酸化酵素であるSOD含量増加も考えられる。

〔参考文献〕 (1) Knoll, J. et al. (1972) Adv. Biochem. Psychopharmac. 5: 393-408. (2) Knoll, J. (1988) Mech. Ageing. Dev. 46: 234-262. (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.

48 2Ba6 老化促進モデルマウス (SAMP8) の加齢に伴う頭部フリーラジカル並びに脳内神経伝達物質の変化に対する性差の違いについて

小松真紀子、平松緑、植田勇人*
(山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所、*宮崎医科大学精神科)

〔 要約 〕

老化とフリーラジカル説が提唱されて以来[1]、老化とフリーラジカルの関係を示唆する多くの知見が集積されてきている。老化のモデルとして老化促進モデルマウス (senescence accelerated mice, SAM) を用い、スピンラベル剤であるcarbamoyl-PROXYLを投与後、頭部のニトロキシドラジカルの変化を生きたままで加齢に従い測定した。その結果、マウス体内のフリーラジカルが加齢と共に増加することが示唆された。さらに、3ヶ月齢のSAMP8に当帰芍薬散 (TJ-23) を3ヶ月投与し、脳内の神経伝達物測定した。その結果、線条体において雌雄ともに細胞死に関係するグルタミン酸の減少を認めた。さらに雌群においては抑制性の神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸、アラニン、グリシンを増加させ情動に関与するノルエピネフリンを低下させた。以上の実験成績より、老化にフリーラジカルが関係していることが支持され、TJ-23は老化に伴って発症し、フリーラジカルが関与する神経性諸疾患、特に女性のアルツハイマー病や老人性痴呆に有効であることが示唆された。

緒言

竹田ら[2]により開発された老化促進モデルマウス (senescence accelerated mice, SAM) は、正常な成長過程の後に4-6ヶ月齢頃より老化が現れ、急速かつ不可逆的に進行し、寿命は約1年である。SAMP8は、加齢に伴って学習、記憶障害が特徴的に認められ、近年このSAMを用いて老化とフリーラジカルの関係が検討されている。今回はこのSAMP8にスピンラベル剤である3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolineyloxy (carmaboyl-PROXYL) を腹腔内に投与し、in vivoでのマウス頭部のニトロキシドラジカルの経時的変化を加齢に従いL-band電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて測定した。さらに、抗痴呆薬として期待されている[3][4][5]当帰芍薬散 (TJ-23) を3ヶ齢の雌雄SAMP8に3ヶ月投与し、脳内の神経伝達物質及びその代謝産物をCoulochem Elecrtode Array System (Neurochem) を用いて検討した。

方法

1. 実験動物

京都大学胸部疾患研究所より供与され当研究所で飼育した老化促進モデルマウス (SAMP8) の1、3、6、9、12ヶ月齢の雌雄群を使用した。

2. ニトロキシドラジカルの変化

ネンブタール麻酔下でマウスをホルダーにセットし、耳がレゾネータの中央にくるようにホルダーをセットした。次いで0.2Mのcarbamoyl-PROXYLを腹腔内投与し、マウス頭部のニトロキシドラジカルの変化を1時間測定した。ESR装置は、日本電子製JES-RE3Xを使用し、magnetic fieldを25±5mT、modulationを1、responseをrapidとした。

3. 神経伝達物質及びその代謝産物の測定

3ヶ齢の雌雄SAMP8にTJ-23 (4g/l) を3ヶ月投与し、大脳皮質、海馬、線条体を摘出した。これらの組織を0.1Mの過塩素酸でhomogenizeして0.45μmのフィルターでろ過し、ろ過液中のアミン、アミノ酸をNeurochemを用いて測定した。モノアミン測定は、リン酸／クエン酸bufferを移動層とし、12種類の印加電圧を使用した。アミノ酸測定は、リン酸bufferを移動層とし、o-フタルアルデヒド反応によるプレカラム誘導法を用い、4種類の印加電圧を使用した。モノアミンは、norepinephrine (NE)、3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol (MHPG)、dopamine (DA)、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanilic acid (HVA)、5-

hydroxyindole-3-acetic acid (5HIAA)、serotonin (5HT) について、アミノ酸は glutamic acid (GLU)、glutamine (GLN)、glycine (GLY)、taurine (TAU)、alanine (ALA)、γ-aminobutyric acid (GABA) について測定した。

結果

SAMP8 に carbamoyl-PROXYL を投与すると、ニトロキシドラジカルの3本のシグナルが観察された。中央のシグナルの高さを測定し、半減期を計算した。雄群においては、6ヶ月齢が最も長い半減期を示した。雌群においては、3ヶ月齢と12ヶ月齢との間に有意差が認められ、加齢に従って半減期が増加する傾向が認められた。生後1～12ヶ月齢を一緒にして雌雄群を比較すると、ニトロキシドラジカルの半減期は雄群に比べ雌群の方が有意に遅延した。

SAMP8 線条体中のアミン、アミノ酸の測定においては TJ-23 を投与した雄群ではコントロールに比べ、DOPAC、HVA、5HIAA 及び GLU、GLN、GLY の低下が認められた。雌群においては、TJ-23 の投与により MHPG、HVA、5HIAA と GLU の低下、及び GLY、GABA、ALA の上昇が認められた。

考察

SAMP8 は学習、記憶障害が特徴的に見られることから老化の中枢についての研究がなされている。例えば、加齢に伴い肝臓での SOD 活性の増加、脳と肝臓において過酸化脂質の増加とグルタチオンの減少が認められている[6]。また、ddY マウスと比較すると、脳の SOD 活性及び肝臓の過酸化脂質量の増加、肝臓のグルタチオンの低下が報告されている[6]。今回は、この SAMP8 を用いて老化にフリーラジカルが関与していることを明らかにするために検討を行った。

In vivo の実験成績から、体内には加齢と共にフリーラジカルが多く発生していること、加齢に伴って抗酸化作用が低下していることが示唆された。また、雌雄群を比較した結果、雌群と雄群とにおいてはフリーラジカル発生系や抗酸化系に違いのあること想定された。さらに、TJ-23 を投与した後、神経伝達物質とその代謝産物を測定した結果、線条体においては、てんかん、脳虚血、アルツハイマー病に関係して細胞死の原因となるグルタミン酸量を雌雄群とも減少させた。さきに我々は、TJ-23 にフリーラジカル消去作用、過酸化脂質抑制効果のあることを認めたが[7]、今回はさらに、雌雄両群においてグルタミン酸量を低下させること、雌群線条体においては抑制性の神経伝達物質である GABA、アラニン、グリシンを増加させ、情動に関与するノルエピネフリンを低下させることを認めた。以上諸知見より、老化にフリーラジカルが関係していることを支持し、TJ-23 は老化に伴い発症し、フリーラジカルが関与する脳疾患のうち特に女性のアルツハイマー病や老人性痴呆に有効であることが示唆された。

文献

1) D. Harman, Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol., 11 : 298-300, 1956.
2) T.Takeda, M. Hosokawa and K. Higuchi, Senescence-accelerated mouse (SAM) : a novel murine model of accelerated senescence. J. Am. Geriatr. Soc., 39 : 911-919, 1991.
3) M. Fujiwara, The effect of Toki-shakuyaku-san on experimental memory disturbance. Ipn. J. Neuropsychopharm., 12 : 217-278, 1990. (in Japanese)
4) N. Hagino and T. Koyama, Stimulation of nicotine acetylcholine receptor synthesis in the brain by Toki-shakuyaku-san (TJ-23) . In : Recent Advances in the Pharmacology of KAMPO (Japanese Herbal) Medicine, (E. Hosoya and Y. Yamamura eds) , pp 144-149, Excerpta Medica. Tokyo, 1988.
5) K. Takakura, M. Fujiwara and N. Shitara, The effect of Toki-shakuyaku-san on the learning and memory disturbance of rat : study of the pharmacological therapy of dimentia, 41-46, 1990.
6) J. Liu and A. Mori, Age associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM) : a comparison with ddY mice, Mech. Aging Dev., 71 : 23-30, 1993.
7) Y. Ueda, M. Komatsu and M. Hiramatsu, Free radical scavenging activity of the Japanese herbal medicine, Toki-shakuyaku-san. Neurosciences, 21 : 75-79, 1995.

49 3Bp4 脳シナプスにおけるアセチルコリン放出とカルシウムイオン流入の加齢に伴う異常

田中康一、安藤 進
東京都老人総合研究所、生体膜部門

〔 要約 〕

大脳皮質コリン作動性シナプス機能の加齢変化をC57BL/6マウスより調製したシナプトソームを用いて検討した。コリンアセチル転移酵素(ChAT)活性、アセチルコリン(ACh)合成量に加齢変化は認められなかった。しかし、高カリウム刺激によるACh放出は老齢動物で有意に低下していた。シナプトソーム内のAChベルに加齢変化はなく、放出されるAChの全AChに対する割合(% release)が低下していたことから、老齢動物においては伝達物質放出機構に何らかの異常があることが示唆された。高カリウム刺激によるシナプトソームへのカルシウムイオン(Ca^{2+})流入量をFura-2を用いて測定したところ、老齢ではカルシウムイオンの流入が低下していた。これらの結果から、老齢シナプスにおいては電位依存性カルシウムチャネルからのCa^{2+}の流入低下がACh 放出の低下を招いている可能性が示された。

高齢者にみられる記憶能力や学習能力の低下は、コリン作動性神経系の機能低下によるところが大きいと考えられている(1,2)。コリン作動性神経の機能としてコリン作動性ニューロンの数、アセチルコリン含量、アセチルコリンの合成と放出、およびアセチルコリンの受容体などの加齢変化が調べられている(3)。しかしながら、それらについて一定の結果が得られているとはいい難く、加齢によるコリン作動性神経系の変化とそれに伴う脳機能低下の要因は未だ明かにされていない現状である。我々は、脳機能の加齢低下の要因の一つがシナプス機能の異常にあるとする「シナプス老化」の観点に立ちシナプス機能の加齢変化について神経化学的に検討している。本研究ではマウスの大脳皮質から得たシナプトソームを用いて、コリン作動性シナプスにおけるACh合成と放出、さらにACh放出とCa^{2+}流入との関係を検討した。

方 法

シナプトソームの調製：若齢から老齢のC57Bl/6マウスを用いた。それらの大脳皮質からFicoll密度勾配遠心法(4)によりシナプトソームを調製した。

アセチルコリン合成速度の測定：エゼリンを含むKrebs-Ringer液にシナプトソームを懸濁し、37℃で30分間インキュベートした。反応を過塩素酸添加によって停止し、既知量のエチルホモコリンを内部標準として加え遠心した。その上清中のアセチルコリン量をHPLC-ECDシステムで定量して合成速度を調べた。

アセチルコリン放出量の測定：シナプトソームを37℃、30分間インキュベート後、氷冷して反応を停止した。Krebs-Ringer液でシナプトソームを洗浄した後、再び同緩衝液に懸濁した。脱分極刺激として高濃度カリウムを含むKrebs-Ringer液を加え最終カリウム濃度を50mMに調整した。37℃、5分間のインキュベーション中に上清に放出されたアセチルコリン量をHPLC-ECDで測定した。

シナプトソーム内カルシウムイオン濃度の測定：カルシウムイオン感受性蛍光指示薬のFura-2アセオトキシメチル誘導体と牛血清アルブミンを含むKrebs-Ringer液中でシナプトソームにFura-2を封入した。カルシウムイオン濃度は、蛍光分光光度計(RF-1500、島津製作所）を用い、335nmと375nmの励起光による510nmの蛍光の強度比から計算した(5)。

結果と考察

従来、ACh合成の減少やChAT活性の低下が老齢脳の特徴的な神経化学マーカーとされてきたが(3,6)、我々は異なる結果を得ている。すなわち、若齢から老齢に至る5つの月齢群で神経終末におけるACh合成量には加齢変化を認めないこと、アセチルコリン合成酵素のコリン-アセチル転移酵素活性にも加齢による有意の変化はないことを明らかにした(7)。一方、老齢脳のシナプスではAChの放出能が低下していることを見出した。図1に50mMカリウムの脱分極刺激による大脳シナプスからのアセチルコリンの放出活性を示す。若齢および成熟マウスではアセチルコリン放出に変化がないが，老齢期において有意なアセチルコリン放出活性の低下が認められた。シナプトソーム内のACh量は加齢による減少は認められないが、高カリウム刺激で放出されるAChの総ACh対する割合(% release)が有意に低下していた。このことから、老齢シナプスでの放出低下は、AChの合成、供給の減少に依るのではなく、放出機構の障害によることが示唆された。

高カリウムによる脱分極刺激下にみられるシナプトソーム内Ca^{2+}濃度の増加を図2に示す。老齢マウスシナプトソームでは50mMのカリウム刺激によって82nMまでの増加が認められた。これは，成熟マウスの113nMの増加に比べ著しく低い値であった。一方，刺激を加えない時，すなわち，静止期におけるCa^{2+}濃度には加齢変化は認められなかった。成熟と老齢シナプトソームにおける高カリウム刺激によるACh放出量とCa^{2+}流入量をプロットすると正のの相関が認められた(7)。

以上の結果から、老齢脳のコリン作動性神経伝達障害はシナプスにおけるアセチルコリン放出の低下によるものであり、その根底にはカルシウムイオン流入を低下させるカルシウムイオンチャネルの異常のあることが推察された。今後、電位依存性カルシウムチャネルのサブタイプのシナプスにおける分布とその加齢変化について検討したい。

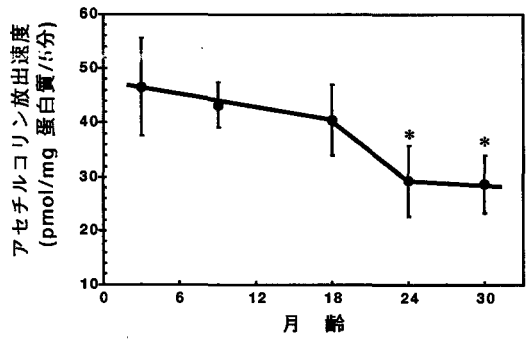


図1. 脱分極刺激によるマウス大脳皮質シナプトソームからのアセチルコリン放出の加齢変化
*, P<0.01 as compared to 3-month-old mice

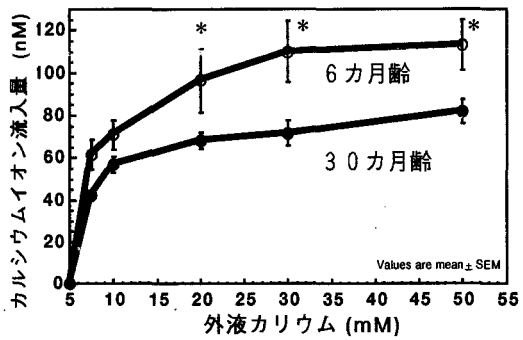


図2. 脱分極刺激によるマウス大脳皮質シナプトソームへのカルシウムイオン流入の加齢変化
*, P<0.05 : adult vs aged, two-tailed Studen's t-test

文 献

1) Gage FH, Chen KS, Buzsaki J, Armstrong D (1989) *Neurobiol. Aging*, 9, 645-655
2) Hasselmo ME and Bower JM (1993) *Trends Neurosci.*, 16, 218-222
3) Decker,M.W. (1987) *Brain Res. Rev.*, 12, 423-438
4) Booth RFG and Clark JB, (1978) *Biochem.J.*,176, 365-370
5) Grynkiewicz G, Ponie M, Tsien RW (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 392-398
6) Gibson GE and Peterson C (1981) *J. Neurochem.* 37, 978-984
7) Tanaka Y and Ando S (1996) *J. Neurosci. Res.* 43, 63-70

50 分泌型βアミロイド前駆体蛋白によるラット神経幹細胞のDNA合成促進

1Cp1

大澤郁朗 高村千鶴子 高坂新一
(国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部)

【要約】中枢神経系の発達におけるβアミロイド前駆体蛋白 (APP) の役割を解明することを目的に、胎生13日令ラット神経幹細胞培養系を用いて分泌型APPの刺激によるDNA合成促進効果をbromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを指標に測定した。分泌型APPによる刺激5時間後には顕著なDNA合成の促進がみられ、その効果は10 ng/ml (約0.15 nM) で有意であった。さらに分泌型APPのN末端領域の添加によっても同様のDNA合成促進効果が認められた。以上の結果は、分泌型APPが神経幹細胞の細胞分裂を制御する因子である可能性を示唆している。また、その活性に必要なドメインはN末端側にあるものと考えられる。

【緒言】βアミロイドはアルツハイマー病患者の老人斑に蓄積することから、病因との関連で注目を集め研究が進められてきた。その前駆体として知られるAPPは正常脳内で広範に発現しているが、その生理的機能については未だ明確とはなっていない。APPはマウス (1) 及びラット (2) の中枢神経系の発達に伴いその発現が増加することが知られている。また、培養系においても神経細胞の分化に伴ってその発現が増加することが観察された (3-5)。こうした知見は、APPが中枢神経系の発達に重要な役割を担っている可能性を示唆している。そこで、我々は中枢神経系の発達初期におけるAPPの役割を解明すべく、分泌型APPの添加に伴う胎生期ラット大脳皮質細胞合成促進効果について検討した。

【実験方法】ラット胎生13日の大脳皮質をinsulin 5 μg/ml、transferrin 5 μg/ml、putrescine 100 μM及びselenium 5 ng/mlを含むMEM中でパスツール・ピペットを用いておよそ50細胞を含むクラスターとなるように細断した。このクラスターをpoly-L-lysineでコートした48 wellのプレートに1 wellあたり約1.5 x 10^5個となるようにまき、12時間培養した後、酵母で作製した組換え分泌型APP695 (sAPP695) を添加した (文献6参照)。さらに所定時間培養後に10 μMとなるようにBrdUを添加し、2時間細胞をラベルした後に固定、既報に従ってBrdU陽性細胞を検出した (7)。細胞の同定には各種抗体を用いて免疫染色を常法に従って行なった。

【結果】培養開始12時間後のクラスターに含まれる細胞は主としてnestin陽性細胞であり、一部にMAP2陽性細胞が含まれていた。Fibronectin陽性細胞はほとんど認められなかった。この時点でBrdUで2時間パルス・ラベルすると、クラスターの約10 %程度の細胞がこれを取り込んだ。

このクラスターにsAPP695を終濃度 100 ng/ml 添加した。添加後3時間目にBrdUを添加し、さらに2時間培養して細胞をラベルした場合にBrdUの顕著な取り込み促進が認められた (図1)。その効果は濃度依存的で、10 ng/mlで有意であった (図2)。また、bFGFについても同様のDNA合成促進効果が認め

られた（図1、2）。このsAPP695のDNA合成促進効果はN末端領域を認識するモノクローナル抗体22C11で抑制された。さらに分泌型APPのKPIドメインよりもN末端側を含むペプチド（NAPP）はBrdUの取り込みを促進したが、C末端側を含むペプチド（CAPP）には効果が認められなかった（図3）。

これらの結果から、分泌型APPには神経幹細胞のDNA合成促進活性があり、また、その活性ドメインはN末端側領域に存在するものと考えられた。

【考察】　本研究において、分泌型APPが神経幹細胞に直接作用し、DNA合成を促進する活性を持つことを示唆する結果が得られた。神経幹細胞にたいする増殖促進効果が報告されているbFGF（7）についても同様のDNA合成促進効果が認められたが、分泌型APPとの加算効果は認められなかった（data not shown）。従って、分泌型APPとbFGFが同一の細胞群に作用しているものと考えられる。

さらにDNA合成促進に必要なドメインがcysteine richな構造を有するN末端側領域にある可能性が示唆された。N末端側領域にはラット大脳皮質培養組織片の神経突起伸展促進効果もあることから（8）、この領域に未知のAPP受容体と結合して生理活性をもたらす配列が存在するもの予測される。今後、APPの中枢神経系発達過程における役割を明確にするには、APP受容体の探索が不可欠である。

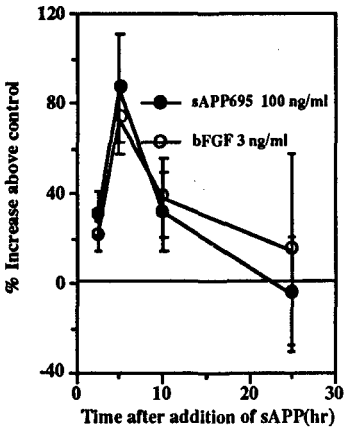


図1.クラスター内でBrdUラベルされた細胞の比率の経時変化：表示時間の2時間前にBrdUを添加

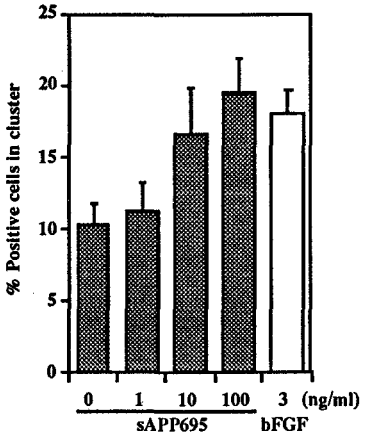


図2.BrdUでラベルされた細胞の比率に対する分泌型APPの濃度依存性：sAPP添加3時間後から2時間ラベル

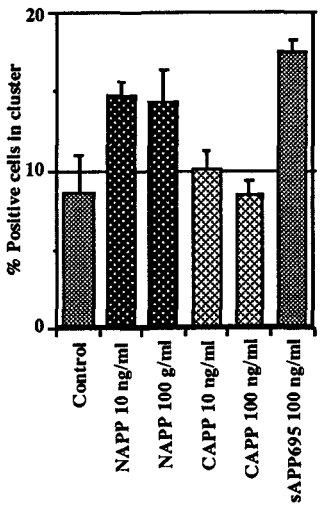


図3.BrdUでラベルされた細胞の比率に対するNAPPとCAPPの添加効果：表示蛋白添加3時間後から2時間ラベル

【文献】 1）Salbaum, J.M. and Ruddle, F.H. (1994) J. Exp. Zool. 269, 116-127. 2）Ohta, M. et al. Dev. Brain Res. 75, 151-161. 3）König, G. et al. (1990) FEMS Lett. 269, 305-310. 4）Fukuchi, K. et al. (1992) J. Neurochem. 58, 1863-1873. 5）Hung, A.Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9439-9443. 6）Ohsawa, I. et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 213, 52-58. 7）Ghosh, A and Greenberg, M.E. (1995) Neuron 15, 89-103. 8）Ohsawa, I. et al. manuscript in preparation.

51 1E41 アルツハイマー・βアミロイド蛋白質のGT1-7細胞膜におけるイオンチャネル形成

川原正博、黒田洋一郎、Nelson ARISPE*, Edwardo ROJAS*
（東京都神経科学総合研究所、神経生化学、*米国、NIH, NIDDK）

〔要約〕アルツハイマー・βアミロイド蛋白質の神経毒性は、アルツイハイマー病脳で見られる神経細胞の脱落と深い関連があることが示唆されている。神経毒性の生化学的メカニズムは未だ不明であるが、最近、βアミロイド蛋白が巨大なカチオン選択的イオンチャネルを形成することが、人工脂質二重膜を用いた研究から明らかになっている。そこで筆者らは、視床下部神経細胞由来のGT1-7細胞を用いて、βアミロイド蛋白質によるイオンチャネルの流入をパッチクランプ法により検討した。その結果、βアミロイド蛋白はGT1-7細胞の細胞膜上でもイオンチャネルを形成し、形成されたイオンチャネルは亜鉛イオンによって阻害されるなど、人工脂質二重膜上と同様の性質を持っていることが判明した。従って、βアミロイド蛋白によって生じるイオンバランスの異常が、神経細胞死の原因である可能性が強く示唆された。

【序論】アルツハイマー・βアミロイド蛋白質の神経毒性が報告されて以来、アルツハイマー病脳で見られる神経細胞の脱落、ひいてはアルツハイマー病の発症機序に深く関連するのではないかと考えられてきた。最近、Arispeらは人工脂質二重膜リポソーム上で、βアミロイド蛋白質(β1-40)が巨大なカチオン選択的イオンチャネルを形成する事を見出し、カルシウムを始めとする細胞内イオンバランスの異常が細胞死の原因なのではないかという、いわゆるカルシウム仮説を提唱している[1]。そこで、実際の神経細胞膜上でのβアミロイド蛋白のイオンチャネル形成を、パッチクランプ法により解析した。神経細胞のモデルとして、GnRH放出能などの神経細胞由来の性質を保持し、既に内在性のイオンチャネルの性質が充分解析されている、視床下部神経細胞由来のGT1-7細胞を用いた。さらに、βアミロイド蛋白のGT1-7細胞に対する神経毒性や膜上での沈着などをも検討した。

【方法】βアミロイド蛋白質(β1-40) はBachem F.A.G.社より購入し、1 mg/mlの濃度で蒸留水に溶解し保存した。GT1-7細胞は、培養液（Dulbecco's MEM+Hank's F-12(1:1), 10% Fetal calf serum）を用いて常法により経代培養し[2]、Trypsin-EDTA溶液によりdissociateした後、35mmの培養皿に$4x10^4/cm_2$の濃度にて培養した。培養1-2日後、培養液をBSS溶液（CsCl;141mM,$CaCl_2$;0.5mM,$MgCl_2$;0.5mM,EGTA;1mM,Glucose;5mM,HEPES;5mM, pH7.4）に換えて、電気生理実験を行った。Single channel recordingでは、pipet内液をbathと同じ組成にしてinside-out法によりmembrane patchを形成させ、内在性のイオンチャネルの影響がないことを確認するために±10～±40mVに電圧を変化させて3-10分間放置し、その後、bath溶液にβアミロイド溶液を終濃度20μg/ml(4.7μM)で添加してチャネル形成を観察した。測定はpatch clamp amplifier (Axopatch-1D) を用い、シグナルはPCM/VCRにより磁気テープに記録した。さらに、pipet内にβアミロイド蛋白質を添加した場合の影響も観察した。細胞毒性はWST-1法によって観察し、細胞は4% paraformaldehydeにより固定後、抗βアミロイド蛋白抗体及び抗MAP2抗体（Bohringer）による免疫組織化学を行った。

【結果及び考察】GT1-7細胞の細胞膜上でinside outによりpatchを形成した後、βアミロイド添加の5-40分の後にイオンチャネルの形成が観察された。Voltage-clampにより電圧を変化させるとmulti-levelな、Cs^+イオンを通すチャネルが形成されていることが明らかとなり、さらにbath溶液にZn^{2+} ($ZnSO_4$) 2 50μMを添加することによってチャネルは大幅に阻害された（図１）。また、Znのキレーターであるo-phenanthroline 1 mMの投与によってZnによる抑制は回復した。

βアミロイドをpipet溶液内に添加してinside-out patchを形成させた場合にも、同様に5-10分後にチャネルの形成が観察され、Znによる阻害効果、及びo-phenanthrolineによる回復も観察された。GT1-7細胞の膜上で形成されたチャネルの性質は、人工二重膜リポソーム上で形成されたチャネルと同様であった[3]。

また、βアミロイド蛋白を投与3日後に固定し、抗βアミロイド蛋白抗体により染色したところ、GT1-7細胞の細胞膜表面上にβアミロイド蛋白が沈着していることも明らかになった（図2）。さらに、GT1-7細胞に対するβアミロイド蛋白の神経毒性もWST-1アッセイにより確認された。

これらの結果から、βアミロイド蛋白が人工脂質二重膜のみならず、神経細胞の細胞膜上でもイオンチャネルを形成することが明らかになった。最近の報告ではβアミロイド蛋白のみならず、APPのC末断片もイオンチャネルを形成するなどの報告もあり[4]、アミロイド関連蛋白によって引き起こされるイオンバランスの異常がアルツハイマー病の発症機序と関連している可能性が強いと考えられる。また、亜鉛イオンによるチャネル阻害効果は脳内に多量に蓄積し、神経細胞の興奮と共に放出される亜鉛の生理的役割を示唆するものである。

謝辞　GT1-7細胞を恵与頂きましたNIH、NICHDのDr. D.J.Spergel、抗βアミロイド抗体を恵与頂きました東京都精神研、森　啓先生に深謝いたします。

参考文献

1)Arispe,N., Rojas,E., Pollard,H., *Proc.Natl.Acad.Sci.*,**90**, 10573-10577 (1993). 2)Spergel, D.J., Catt, KJ, Rojas, E, *Neuroendocrinology*, **63**,101-111(1996). 3)Arispe,N, Pollard,H.B., Rojas,E. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **93**,1710-1715(1996). 4)Fraser,S.P., Suh,Y.-H., Chong,Y.H., Djamgoz,M.B.A. *J.Neurochem.*, **66**,2034-2040 (1996).

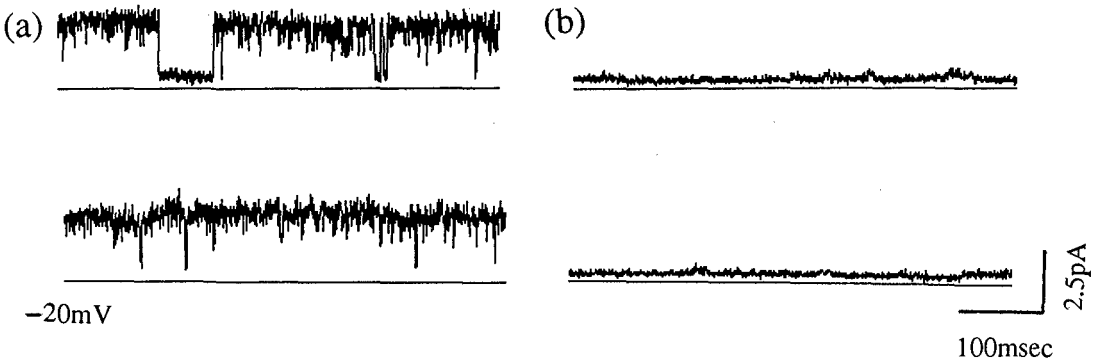


図 1 (a) βアミロイドをbathに投与後のチャネル電流 (b) Zn^{2+} (250μM) をbathに添加後

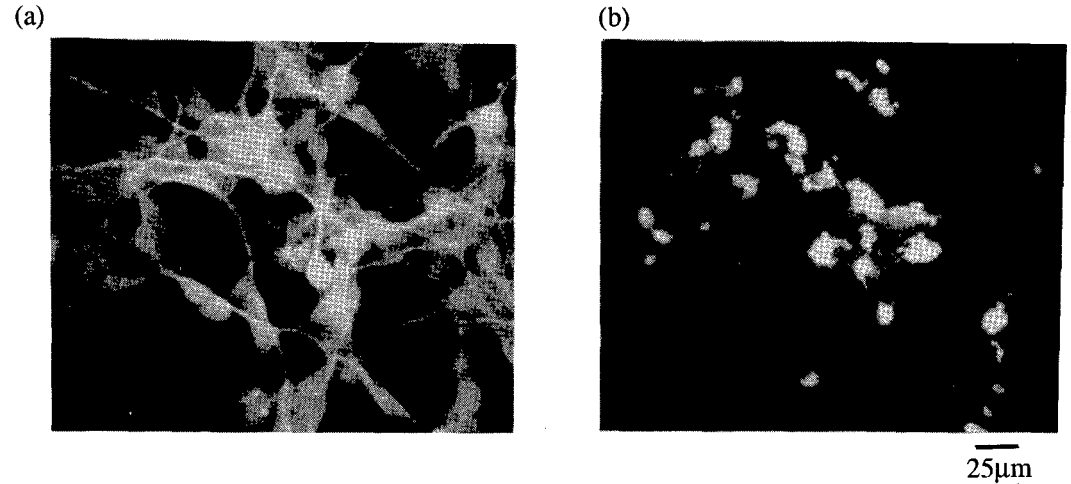


図 2　抗MAP2抗体 ((a)Texas Red) 及び抗βアミロイド抗体 ((b)FITC) による二重染色. ドット状のβアミロイドの沈着が細胞表面上に観察される

52 1E42 β-アミロイド蛋白脳室内持続的注入ラットの海馬CA1におけるニコチンに対する反応性および長期増強形成能の低下

*伊東亜紀雄、**赤池 忠、**曾我部正博、#新田淳美、*,$飯田竜一、*鍋島俊隆
(*名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部、**第2生理、#岐阜薬科大学・分子生物学、$日本生物化学センター)

〔要約〕

アルツハイマー型痴呆は重篤な認知障害を引き起こす神経変性性の疾患であるが、その治療法は確立されていない。その背景には、同症を的確に反映するモデル動物が存在しないことが挙げられる。我々は、β-アミロイド蛋白を脳室内に持続的注入したラットにおいて1) 学習・記憶能の障害、2) ACh合成酵素活性の低下、3) ニコチン刺激によるアセチルコリンおよびドパミン遊離の低下という結果を得ており、β-アミロイド蛋白を脳室内に持続的注入したラットがアルツハイマー型痴呆のモデル動物として有用である可能性を報告している。本研究では、このβ-アミロイド蛋白持続的注入ラットの海馬切片を用いてニコチンに対する反応性および学習・記憶の電気生理学的メカニズムと考えられいる長期増強形成能について検討した。

その結果、対照群の海馬CA1錐体細胞層ではニコチン潅流により集合電位が減弱するが、β-アミロイド蛋白注入群においてはその程度が減少していた。また、高頻度刺激により対照群では集合電位が約2倍程度に増強したのに対し、β-アミロイド蛋白注入群では約1.2倍程度の増強しか認められなかった。

これらのことから、β-アミロイド蛋白持続的注入ラットにおいては、神経伝達物質の遊離の調節機能を有するニコチン性受容体を介するシグナル伝達過程の機能障害により神経伝達物質の遊離が阻害されることが示唆される。また、この神経伝達物質の遊離の低下は長期増強形成能を低下させ学習・記憶を障害することが推察される。

アルツハイマー型痴呆 (AD) は、重篤な認知障害を示す神経変性性の疾患であるが、その発症機序は明らかではなく、治療方法も確立されていないのが現状である。現在、治療薬の開発においては、発症の初期からコリン作動性神経系に障害が認められることから、コリン作動性神経を化学的、物理的に損傷したり、薬物投与により学習・記憶障害を惹起したモデル動物が利用されているが、これらのモデルではADの病理学的変化を伴っておらず、病理学的変化と行動障害の両者を的確に示すより病態に近いモデル動物の開発が望まれている。

我々は、老人斑の数が多い患者が重篤な痴呆症状を示すことから、老人斑の主要構成成分であるβ-アミロイド蛋白 (Aß) をラット脳室内に持続的注入することにより、Aßの沈着が起こり、学習・記憶能およびコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性が低下することを見い出した[1, 2]。また、これらの動物においてはニコチン刺激によるアセチルコリンおよびドパミンの遊離促進作用が低下していることも報告している[3]。これらのことから、Aß持続的注入動物は、ADの病態を反映したモデル動物として有用であり、その学習・記憶障害の原因の一つに神経伝達物質遊離の低下が考えられる。今回我々は、このAß持続的注入ラットの海馬スライスを用い、CA1錐体細胞層におけるニコチンに対する反応性および学習・記憶の神経基盤と考えられている長期増強 (LTP) の形成能について電気生理学的手法 (細胞外記録法) により検討した。

【実験方法】実験には、Wistar系雄性ラットを用い、我々がすでに報告している方法によりAß (1-40、300 pmol/day) を脳室内に注入した[1, 2]。注入開始10あるいは11日後に脳を摘出し、厚さ約400 μmのスライスを作成した。スライスを直ちに標準液 (128 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM $MgSO_4$, 1.24 mM KH_2PO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 10.4 mM glucose, 2.4 mM $CaCl_2$; 95% O_2と5% CO_2にて飽和) 中に戻し室温で1時間以上安置し回復させた後、顕微鏡下で電位記録を行った。記録中は絶えず標準液を流速約2 ml/minで潅流した。刺激は常法に従い、シェーファー側枝に加えた。刺激頻度は1発当り100 μsec

の刺激を30 sec間隔で行った。電位記録は、標準液を充たしたガラスのパッチピペットを用い、海馬CA1錐体細胞層にて行った。測定した電位をX－Yレコーダーに描出して集合電位（PS）の大きさを測定し、これを神経活動の指標とした。刺激強度は最大反応の約半分の大きさのPSが得られる強さとした。ニコチンは標準液中に50 μMの濃度になるように添加し10分間の潅流の後、元の標準液を潅流した。高頻度刺激には100 Hzの刺激を1秒間与えた。

【実験結果】ニコチンの潅流前10分間のPSの大きさの平均値を1としてニコチン刺激によるPSの変化の割合を比較した。ニコチンを添加することにより対照群においてPSの著しい減弱が認められた。またこの反応はニコチン性受容体ブロッカーであるメカミラミンの同時潅流により抑制された。Aß注入群においてもPSの若干の低下が観察されたもののその程度は対照群に比較して有意に小さいものであった（Fig. 1）。

Fig. 2に示すように対照群では100 Hz、1秒間の高頻度刺激直後にはPSの顕著な増強が観察されたが、徐々にその増強の程度は小さくなっていった。しかし、約2倍程度の増強を維持しておりLTPの形成が認められた。一方、Aß注入群においても高頻度刺激直後にはPSの増強が観察されたが、5分後にはテタヌス刺激前のPSとほとんど変わらない大きさまで小さくなっていった。

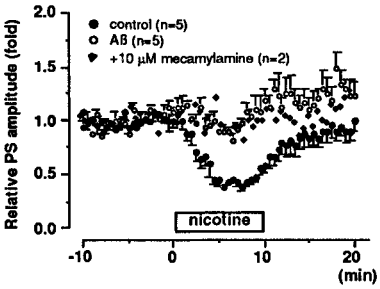


Fig. 1 Effects of nicotine (50 μM) on the PS amplitude in the hippocampal CA1 pyramidal cells of the control and Aß-infused rats. Each value represents mean±SEM.

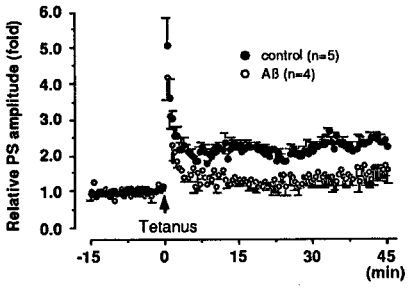


Fig. 2 Enhancement of PS amplitude after tetanic stimulation in the hippocampal CA1 pyramidal cells of the control and Aß-infused rats. Each value represents mean±SEM.

【考察】我々は、Aßを脳室内に持続的に注入することによりADのモデル動物が作製できるのではないかと考え検討を続けてきた。その結果、すでに報告しているように、Aßを注入することにより学習・記憶障害が誘発され、海馬においてACh合成酵素活性の低下が認められた[1, 2]。また、ニコチンによる神経伝達物質遊離作用が低下していた[3]。

今回のAß注入ラットの海馬におけるニコチンに対する反応性の低下は以前のin vivo dialysisによる結果と一致しており、Aß注入ラットではニコチン性受容体を介するシグナル伝達過程が障害されていることが推察される。また、Aß注入ラットにおいては記憶の神経基盤と考えられるLTPの形成も障害されており、記憶の成立が困難であることが考えられる。神経終末に存在するニコチン性受容体は神経伝達物質の遊離を調節していること[6]およびこれらの結果から、神経細胞が活性化されなければいけない条件下でAß注入ラットにおいては神経伝達物質の遊離が障害され、LTPが形成されにくく、学習・記憶能の低下が誘発されるのではないかと推察される。さらに詳細な検討が必要であるが、Aßの持続的注入がADモデル動物作製に有効であり、このモデル動物がAD治療薬開発の手がかりになるのではないかと思われる。

【参考文献】

[1] Nitta A. et al.: ß-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci. Lett.* **170**, 63 (1994)

[2] Nabeshima T. and Nitta A.: ß-Amyloid protein-induced memory impairment and neuronal dysfunction animal model. *Tohoku J. Med.* **174**, 241 (1994)

[3] Itoh A. et al.: Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in ß-amyloid protein-infused rats. *J. Neurochem.* **66**, 1113 (1996)

53 1E43 ヒト血小板においてアミロイドβ蛋白（Aβ）はホスホリパーゼC系を介して細胞内Ca^{2+}を増加させる

石川 博基、小澤 寛樹、齋藤 利和、山本 恵、竹村 晴夫*、
井本 憲志*、大鹿 英世*、高畑 直彦
札幌医科大学、医学部、神経精神医学講座、薬理学講座*

〔要約〕 Amyloidβ蛋白(Aβ)はAlzheimer 病の老人斑の主要構成蛋白質であり、Alzheimer 病の疾病病理過程において重要な役割をもつと考えられている（1）。近年、数種類の細胞において、Aβの神経毒性が判明してからAlzheimer 病における神経細胞死へのAβの関与が示唆され、その機序に細胞内Ca^{2+}動態異常が考えられているが、その詳細は不明である（1）。

血小板はしばしばneuronの末梢モデルとして考えられており、幾つか神経精神疾患において中枢機能を反映する細胞内Ca^{2+}動員の指標として研究されている。また血小板において、APP(amylopid precussor protein)が産生、貯蔵、遊離されていることが知られており、血小板がAPPのtransporterとしての役割をもつ可能性が示唆されている（2）。

そこで、本研究ではAlzheimer 病の生物学的マーカー開発のための基礎検討として血小板におけるAβの細胞内Ca^{2+}動員に対する影響を検討した。その結果、ヒト血小板ではAβはホスホリパーゼイノシトールC(PLC)ーイノシトール三リン酸(IP3)系を活性化させることによりCa^{2+}を動員するとが示唆された。

〔実験方法〕

本研究の主旨を説明し、同意を得た健常成人(男性)の前腕静脈より9mlの血液を採取た。Acid Citrate Dextrose 1mlとPlastic Tube内で転倒混和し遠心によりPlatelet-rich Plasma(PRP)を作成した。3μM fura-2/AMを加えた後、37℃,15分間のインキュベートし、さらに遠心して血小板沈渣を得、Krebs-Ringer HEPES 緩衝液を加えて血小板を浮遊させ測定試料とした。

血小板内Ca^{2+}濃度測定には日本分光CAF-100または日立F-2000螢光分光光度計を用い、励起波長340および380nm,螢光波長500nmの条件にて行った。測定試料を37℃で1分間程度予備加温し、その間に静止時Ca^{2+}濃度(Basal)を計測した。その後合成アミロイドβ蛋白(Aβ)，Thrombin等を添加した。IP3の測定に関しては、血小板調整は菅沼ら（3）の方法に従い、AmershamのIP3 assay systemにより定量した。なお本研究は札幌医科大学倫理委員会の承認を得ている。

〔結果〕

①ヒト血小板において、Aβ fragment 25-35は細胞内Ca^{2+}($[Ca^{2+}]$ i) を増加させた。上昇した後 $[Ca^{2+}]$ iは減少したが、なお高いレベルを維持した (Fig.1)。この血小板での反応はAβ25-35 の濃度2.5-25μMで用量依存的であった。

②Aβfragment25-35,1-40,10-20,31-35,1-28及び12-28の内、 $[Ca^{2+}]$ iを増加させるのはAβ fragment25-35及び1-40であった。Aβ1-40では、Aβ25-35に比べて高い濃度(25μM)が必要であった。

③細胞外Ca^{2+}除去液において、Aβにより上昇した $[Ca^{2+}]$ iは静止レベルに減少したが、その後のthrombin添加による $[Ca^{2+}]$ iはthrombin単独のものよるものに比して減少した。同じ条件下で、thrombin前処置後、Aβを添加しても $[Ca^{2+}]$ iは増加しなかった (Fig.2)。

④U73122(PLC阻害薬) の前処置により、thrombin及びAβは $[Ca^{2+}]$ iを増加させなかった。

⑤thrombin及びAβはIP3を増加させた(Fig.3)。

〔考察〕

Alzheimer 病の病理にAβおよびCa^{2+}の代謝は注目されている。mouseのニューロンやAlzheimer 病患者リンパ球に対して本実験よりも低濃度のAβをpreincubation後にligandを加えることにより $[Ca^{2+}]$ i の上昇反応や培養細胞でのAβによる直接の $[Ca^{2+}]$ i の上昇する等の報告がある（1）。今回、Aβ25-35,1-40添加により、ヒト血小板において $[Ca^{2+}]$ i の上昇反応がみられた。この $[Ca^{2+}]$ i

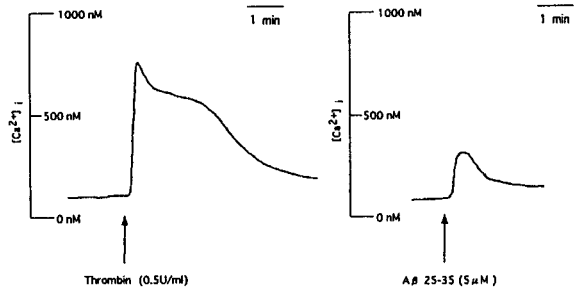
は細胞外液Ca^{2+}非存在下でも上昇したが持続レベルは消失した。このことから［Ca^{2+}］ｉが細胞外からの流入と細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からの遊離の結果、上昇するものと考えられる。またPLC阻害薬で反応が消失し、Aβがthrombinと同程度IP3を増加した。以上よりヒト血小板においてアミロイドβ蛋白（Aβ）はPLCを活性化し、IP3を増加させることによりCa^{2}を動員すると考えられた。

〔文献〕

(1) Selkoe. D (1994) Ann. Rev. Neurosci., 17, 489-517. (2) Chen. M et. al. (1995) B. B. R. C. 213, 96-103. (3) 菅沼ら、新生化学実験講座４、脂質II, pp139 (1991)

Effects of Thrombin and Aβ 25-35 on Ca^{2+} mobilization in human platelets

Fig. 1



・Left: The change in $[Ca^{2+}]$ i caused by Thrombin at 0.5U/ml
・Right: The change in $[Ca^{2+}]$ i caused by Aβ25-35 at 5μM

Fig. 2 Effects of Thrombin and Aβ 25-35 on Ca^{2+} mobilization in Ca^{2+} free medium

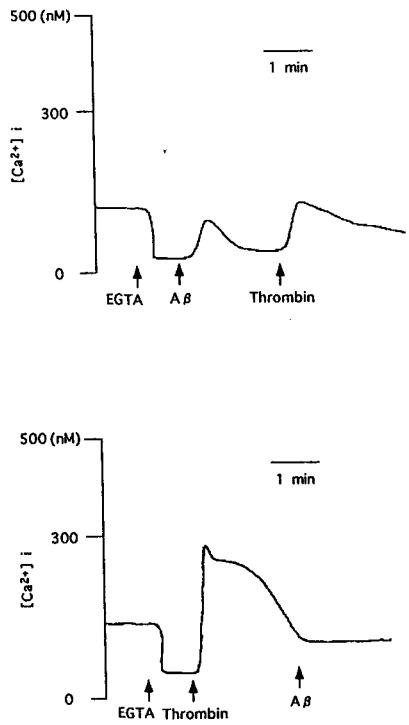
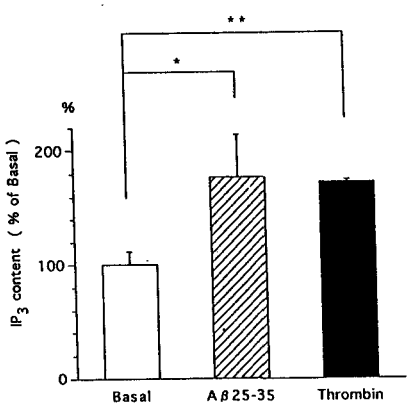


Fig.3

Effects of Aβ 25-35 and Thrombin on IP_3 formation



54 1Cp2 Aβ(25-35) はCキナーゼを介してミクログリア走化作用の脱感受性を起こす

中井真通、谷口泰造、川又敏男，橋本健志，寺島 明，北条香織，保田 稔，前田 潔、田中千賀子
(兵庫県立高齢者脳機能研究センター)

〔 要約 〕

アルツハイマー病は脳内に神経原繊維や老人斑が多く認められる事を特徴とする痴呆疾患である．この老人斑周囲や老人斑のコアにはアミロイドβ蛋白やアポEを含むミクログリアが多数認められている．また老人斑の主な構成成分である39–43個のアミノ酸からなるアミロイドβ蛋白は，神経毒性，アポトーシスやタウ蛋白のリン酸化に関与しているのみならず，in vitroにおいてミクログリアや単核球の走化作用を刺激し，TNF-αやNOの産生を亢進する事が知られている．これらのことからミクログリアがアルツハイマー病の神経変性にに何らかの形で関与しているのではないかと考えられている．今回私どもはAβ(25-35)（以下Aβと略す）によるミクログリアの走化性抑制の機序をラット初代培養ミクログリアを用いて検討し，AβがCキナーゼを介して走化作用にたいする脱感受性を引き起こすこと明らかにした．

（方法）

胎生20日Wistarラット脳を摘出し，細切した後DNase-1及びトリプシンにて処理を行い，10%FCSを含むDMEM:F-12 1:1培地にて2週間培養した．ミクログリアの分離は以下のように行った．培養フラスコをロータリーシェーカー上で30分間250rpm振とうし，懸濁液中の細胞をプラスチック皿上に再度付着させ、接着性の弱い細胞を洗い流し、95%以上の抗CD-11b陽性細胞を得た、走化性の測定はNeuroprobe社のケモタキシスチャンバーを用い，ロアーチャンバーにサンプルを，5ミクロン孔径のメンブレンを隔ててアッパーチャンバーに$1x10^6$cells/mlのミクログリアを入れ，4時間インキュベートした．脱感受性を調べる場合には，ミクログリアを前もって20分間試薬とインキュベートした．メンブレンの孔を移動した細胞はケモタクシス指数(CI)にて表示した．

（結果）

ミクログリアの走化性は100pM-10nMのAβによって濃度依存性に亢進し，100nM, 1μMでは刺激作用が減弱するというベル型パターンを示した．Aβのこの作用がニューロキニン受容体を介しているか否かを検討するためにNK-1,2,3各受容体のアゴニストであるSubstance P, GR64349, Senktideにたいするミクログリアの走化性を検討した．Substance P,GR64349及び Senktide は100pMから100nMの濃度ではミクログリアの走化性刺激作用を認めなかった．従ってAβはニューロキニン受容体を介さずにミクログリアの走化性を亢進させる経路があると考えられた．

一般にペプチド受容体はアゴニスト脱感受性が生じやすいので，もしこの経路が受容体を介するのであればAβによりアゴニスト脱感受性が起こる可能性がある．そこでAβによりミクログリア走化作用の脱感受性が起こるか否かを検討した．1nMのAβはミクログリアの走化性を123%亢進させた．しかし，1nM, 10nMのAβを20分間前処置したミクログリアの1nMのAβによる走化性の亢進は，それぞれ64%, 15%にとどまった(Fig.1)．この事実はAβがミクログリア膜へ結合することによりアゴニスト脱感受性を

生じたためと考えられる．神経伝達物質の受容体の脱感受性はそのレセプターに特異的，あるいは非特異的なプロテインキナーゼによるリン酸化が関与すると言われている．そこでミクログリア走化性亢進に関しAβによるアゴニスト脱感受性がCキナーゼ系を介するか否かを検討した．10nM,100nMの濃度の12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) で前処置したミクログリアはAβ前処置の脱感受性と同じようにAβによる走化性を著明に抑制した(Fig.2)．さらにこの1nMのAβによる脱感受性は10^{-8}Mの濃度のstaurosporineにより抑制することができ(Fig.3)，10nMのTPAによる脱感受性も10^{-8}Mの濃度のstaurosporineにより抑制することができた．またprotein kinase C inhibitory peptideによっても1nMのAβによる脱感受性の出現が抑制された．

（考察）

以上のことからAβはニューロキニン受容体以外の受容体を介してミクログリアの走化性を亢進させている可能性が示唆されるとともに，AβはCキナーゼ系を介してミクログリアの走化性の脱感受性を起こしていることが示された．

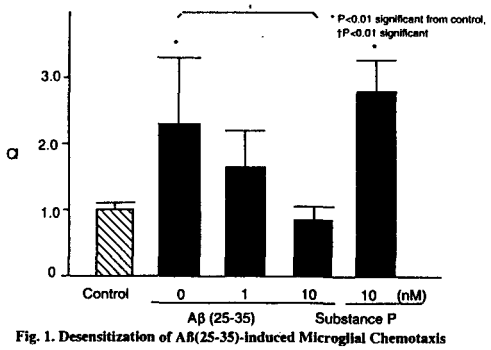


Fig. 1. Desensitization of Aß(25-35)-induced Microglial Chemotaxis

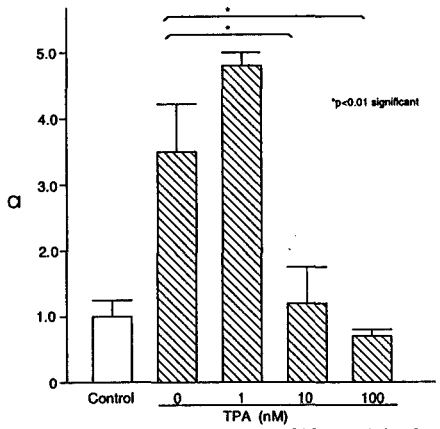


Fig.2. Heterologous Desensitization of Aß(25-35)-induced Microglial Chemotaxis by TPA

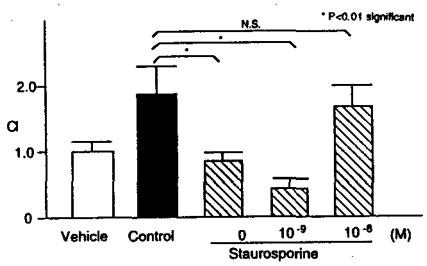


Fig.3. Effect of Staurosporine on Homologous Desensitization of Microglial Chemotaxis by Aß(25-35)

55 1Cp3 D型アミノ酸含有βアミロイドタンパクのアルツハイマー病発症における役割について

金子 勲、山田紀子、久保武一、尾田富一郎
(三共(株) 神経科学研究所)

〔要約〕

アルツハイマー病脳で蓄積するラセミ化βアミロイドのアルツハイマー病発症における役割について検討した。その結果、[D-Ser^{26}]ß1-40は、ß1-40と異なり、ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱMTT還元能低下活性がなく、また可溶性であった。しかし、[D-Ser^{26}]ß1-40はｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝ様分解酵素とｱﾐﾉﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞにより、神経変性作用の強く、且つ分解酵素に抵抗性の[D-Ser^{26}]β 25-35が生じ、蓄積することが分かった。このことは、老人斑に蓄積したβアミロイドが加齢とともにラセミ化され、その一部が可溶性になり老人斑より漏出し、さらに蛋白質分解酵素の作用を受けて、より神経変性作用の強いD型アミノ酸含有βアミロイドが生成され、それが海馬神経細胞等の感受性の高い神経細胞を選択的に変性させることを示唆する。

序文： アルツハイマー病(AD)は、まずβアミロイドが蓄積(老人斑)し、次いで神経原線維変化・神経脱落が起こる。βアミロイドによるin vitro及びin vivoでの神経細胞変性作用等及びＦＡＤの遺伝子解析結果は、βアミロイドがアルツハイマー病発症の主要な原因の一つである可能性を強く示唆する。しかし、そのｱﾐﾛｲﾄﾞ仮説に対して、1) 老人斑が存在するにも関わらず、周囲の神経細胞が変性しない症例が存在する、2) βアミロイドが蓄積したのち、十数年たってから神経変性が起こること等いくつかの矛盾点が指摘されている。我々は上記の矛盾点及びアルツハイマー病発症メカニズムに対して、βアミロイドのラセミ化の観点から研究を進めた結果、いくつかの興味ある知見を得たので報告する。

方法: D型アミノ酸含有各種βアミロイドはＦ－ｍｏｃ法で合成し、その一部は岩城硝子(株)に合成依頼した。ラット胎仔海馬神経細胞、PC12細胞、HeLa細胞の培養は前報の方法に基づいた(1)。ｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝ及びｱﾐﾉﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞ処理断片はＣ１８逆相ＨＰＬＣで分離・精製し、アミノ酸組成分析及びLC-MASS, FABMASSを用いて同定した。ラット胎仔海馬神経細胞、PC12細胞、HeLa細胞の培養は前報の方法に基づいた(1)。ＡＴＰ定量法、MTT還元能法及びＬＤＨ法は常法に従った。

結果・考察： βアミロイド(β 1-40、β 1-42)の蓄積はその生合成系と分解系のバランスに依存すると考えられる。しかし、通常のADでは、正常人に比べβアミロイドの生合成量が特に高いという報告はなされておらず、このことはADではβアミロイドの分解系に異常(低下)があることを示唆する。一般に、蛋白質はendoproteaseで切断後、exo-peptidaseにより分解される。そこで、通常のβアミロイド(β 1-40;L型アミノ酸からなる)にｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝあるいはｶﾃﾌﾟｼﾝGを添加したところ、β 21-35など数種のペプチド断片が得られ、さらにｱﾐﾉﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞM処理によりアミノ酸にまで分解することが確認された。この時、β構造を取ると切断されにくく、またｱﾐﾉﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞMのみでは殆ど切断されなかった。ｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝ及びｶﾃﾌﾟｼﾝGの阻害物質であるｱﾝﾁｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝが老人斑に存在することを考慮すると、以上の実験結果は、ｱﾝﾁｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝがβアミロイドの蓄積に関与している可能性を示唆する。

さて、アルツハイマー病患者脳内のβアミロイドは、AspとSerが5-10%がラセミ化してD型アミノ酸に変換していることが報告されている。このようなラセミ化はβアミロイドの蓄積後から開始し、熱平衡反応より、長時間(加齢)かけて進行する。そこで、D-Ser或いはD-Aspを含有する各種βアミ

ロイドを合成し、その活性（ＭＴＴ還元能の抑制、神経変性作用）について調べた（図１）．その結果、[D-Ser^{8}]ß1-40, [D-Asp^{1}]ß1-40 及び [D-Asp^{23}]β 1-40 はＬ型β 1-40 とほぼ同等の強い活性を示した．　一方、[D-Ser^{26}]ß1-40 は全く活性を示さず、また、β 1-40 等とは異なり、培地（MEM or PBS)への溶解性が高かった．　以上の結果は、[D-Ser^{8}]ß1-40, [D-Asp^{1}]ß1-40, [D-Asp^{23}]β 1-40 が老人斑より溶出することが可能ならば、周辺及び遠隔部位の神経細胞に障害を与えることができることを示す．しかし、たとえ神経細胞変性作用の強いＤ型アミノ酸含有βアミロイドが老人斑に存在しても、それが不溶化して老人斑に局在する限り、神経細胞に接触できず障害を与えることが困難である．　上述の活性の強いＤ型アミノ酸含有βアミロイドは何れもβ 1-40 と同様に難溶性であった．　そこで、活性は弱いが、その後代謝されて神経変性作用の強いβアミロイドに変換するものが老人斑から遊離するのではないかと考えた．我々は、以前に、脳内分解酵素活性に抵抗性の[D-Ser^{26}] ß25-35 が強い MTT 還元能抑制活性を示し、海馬神経細胞に障害を与えることを示した（1）．　そこで、可溶性の高い[D-Ser^{26}]β 1-40 をｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝ 或は ｶﾃﾌﾟｼﾝ Ｇ で処理し、さらに脳内に多量に存在するｱﾐﾉﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞ を添加した．その結果、ｷﾓﾄﾘﾌﾟｼﾝ，ｶﾃﾌﾟｼﾝ Ｇにより、[D-Ser^{26}]β 20-35, [D-Ser^{26}]β 21-35 等が生成され、さらにｱﾐﾉﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞにより、神経変性作用の強い [D-Ser^{26}]β 25-35 が生じ、蓄積することが確認された（図 2）．ｱﾐﾉﾍﾟﾌﾟﾁﾀﾞｰｾﾞは２６位の Ser がD型であるため、２５位以降を切断できない．一方、β 1-40 を同様に処理した時にはβ 25-35 等は切断され蓄積しなかった．以上の実験結果は、老人斑に蓄積したβアミロイドは加齢とともにラセミ化され、その一部が可溶性になり老人斑より漏出し、さらに蛋白質分解酵素の作用を受けて、より低分子で且つ神経変性作用の強い分解酵素抵抗性のＤ型アミノ酸含有βアミロイド(例えば上述の[D-Ser^{26}]β 25-35 など) が生成される可能性を示唆する（図2）．そのようなＤ型アミノ酸含有βアミロイドが、ミトコンドリアのＡＴＰ産生系を抑制し、海馬神経細胞等の感受性の高い神経細胞を選択的に変性させるものと考えられる．

今後は、アルツハイマー病脳の病理標本を用いてさらに検討したい．

参考文献　１）I. Kaneko et al　J. Neurochemistry, **65,** 2585-2593 (1995)

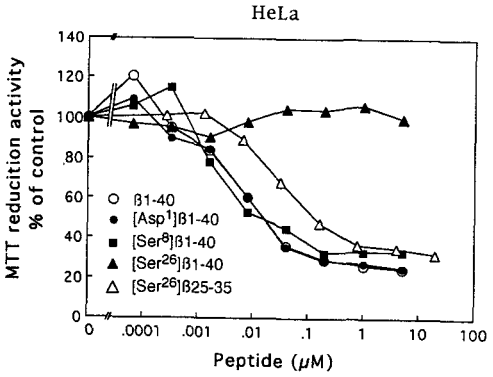


図　1.

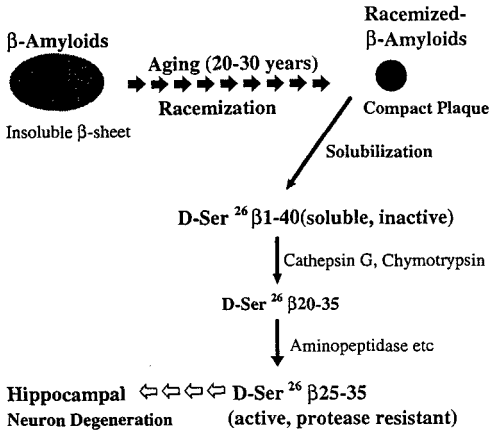


図　2.

56 1Cp4 NG108-15 細胞の amyloid β蛋白産生に対する prolyl endopeptidase の関与

篠田 雅彦[1,2]、砥出 勝雄[2]、大沢 郁朗[1]、高坂 新一[1]

([1]国立精神神経センター神経研・代謝、[2]日本たばこ産業医薬総研・生物研)

〔 要約 〕

Amyloid β protein (Aβ) 産生に対する prolyl endopeptidase (PEP) の作用について、NG108-15 細胞を用いて検討した。Aβの C 端側及び N 端側のアミノ酸配列を基に合成された基質を用いた検討から、精製 PEP は C 端側に相当する合成基質を用量依存的に分解した。NG108-15 細胞から medium 中へ放出される Aβ量は、PEP 阻害剤 JTP-4819 の用量及び処理時間依存的に減少した。また、NG108-15 細胞の C 端側分解活性に対し、JTP-4819 は用量依存的な抑制を示し、この作用は、Aβ放出に対する抑制作用と parallel であった。一方本剤は、Aβの前駆体蛋白である amyloid precursor protein (APP) の産生レベルには影響を与えなかった。これらの結果から、APPからのAβ放出にはその分解酵素としてPEP が関与していること、また、JTP-4819はこの活性を抑制することにより、Aβの放出を抑制する可能性が示唆された。

Alzheimer 病(AD) 脳において認められる amyloid の主成分は分子量 4 K の Aβであること、また、このAβ は前駆体蛋白 APP から産生されることが知られている。また、このAβの神経毒性についての報告が数多くなされ、AD 発症の原因物質としての可能性が議論されている。

PEP は proline だけでなく alanine の C端側も切断することが示されている (1)。さらに、Aβがその C端 alanine 残基で APP から切断される過程に PEP が関与する可能性も示唆されている (2)。このような背景から本研究では、neuron 様に分化することが知られている NG108-15 (neuroblastoma×glioma) 細胞を用い、APP のプロセッシングに対する PEP の関与について検討した。なお、PEP阻害剤として (S)-2-[[(S)-2-(hydroxyacetyl)-1-pyrrolidinyl]carbonyl]-N-(phenylmethyl)-1-pyrrolidine-carboxamide (JTP-4819) を用いた。本剤は、ラット脳を用いた検討より、特異的かつ強力な PEP 阻害活性を有することが示されている化合物である (3)。

[方法]

NG108-15 細胞の培養は、medium として DMEM に fetal bovine serum を 5 %の濃度で添加したものを用い、37℃、10 % CO_2、90 % air の条件下にて行った。

PEP 活性、AβのN 端側及びC 端側に対する分解酵素活性 (β- 及び γ-secretase 活性) は、石浦らの方法 (2) に準じて行った。すなわち、それぞれ合成基質である 7-(succinyl-Ile-Ala)-4-methylcoumarinamide (Suc-Ile-Ala-MCA) 及び Z-Val-Lys-Met-MCA を用い、JTP-4819 (0～10^{-7} M)、cell lysate と共に37℃にて incubate した後、その蛍光強度を測定した。

NG108-15 細胞から放出された分泌型 APP ($APP^{s}s$) 及び Aβ は、細胞を血清非存在下で 16 時間培養した後に medium 中に存在するレベルを、それぞれの特異抗体を用いたWestern blotting にて検出した。JTP-4819 は、その処理時間による影響を検討する実験では血清除去と同時またはその 10 時間後に、それ以外の実験では血清除去と同時に medium 中に添加した。

[結果，考察]

精製 PEP を用いて、Aβの N 端側に相当するZ-Val-Lys-Met-MCA 及び C 端側に相当するSuc-Ile-Ala-MCA のdegradation に対する作用について検討した。PEP は Suc-Ile-Ala-MCA を用量依存的に分解したが、Z-Val-Lys-Met-MCA は分解しなかった。NG108-15 細胞の cell lysate 中 PEP 活性は、assay mixture 中に添加した JTP-4819 により用量依存的に抑制され、その IC50 は 0.6 nM であった。Serum free での培養により、medium 中に放出される分子量 90 ～ 110 kDa のAPP^{s}s、約 4 kDa のAβはいずれも増加した。なお、細胞数に変化は認められず、形態的な変化も見られなかった。

この培養条件を用いてJTP-4819 添加の効果について検討した。Serum free にすることにより増加したAβは、JTP-4819 の用量依存的に減少し 10^{-8} M 以上の濃度で消失した (Fig.1)。またこの band は、予めAβ標品と incubate した抗Aβ抗体で処理した場合には認められなかった。

JTP-4819 を添加し培養した細胞の cell lysate を用い、Suc-Ile-Ala-MCA に対する cleavage について検討した。その結果 JTP-4819 は cell lysate のPEP 活性に対し用量依存的な抑制を示した。この抑制作用は、Aβ band のdensity 減少とよく相関した (Fig.2)。さらに JTP-4819 の処理時間に依存したAβの band の消失も観察された。一方、JTP-4819 は APP^{s}s の放出量には影響しなかった。

以上、APP からの Aβ遊離に関し、PEP がAβのC 端側の processing に関与している可能性、また、PEP 阻害剤 JTP-4819 によりAβの遊離量を抑制し得ることが示唆された。

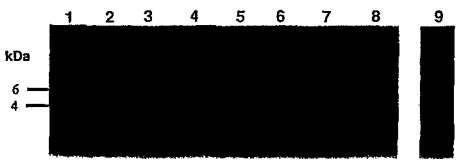


Fig. 1 Effect of JTP-4819 on Aß level in the medium of NG108-15 cells (Dose dependency). Lane 1: Control, Lane 2: No addition, Lane 3: JTP-4819 10^{-11}M, Lane 4: JTP-4819 10^{-10}M, Lane 5: JTP-4819 10^{-9} M, Lane 6: JTP-4819 10^{-8}M, Lane 7: JTP-4819 10^{-7}M, Lane 8: Standard Aβ, Lanes 2 ～ 7: Serum free for 16 hr. Lane 9: Pre-adsorption of anti-Aβ antibody.

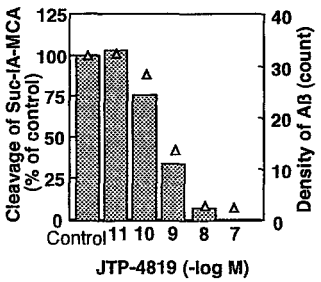


Fig.2 Relationship of cleavage of Suc-IA-MCA (triangle), and Aß density (hatched column). Cleaving activity was measured 16 hr after the drug addition. Basal activity was 1810 nUnit/mg protein.

[参考文献]

(1) Yoshimoto, T., Fischl, M., Orlowski, M., and Walter, R., (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3708-3716

(2) Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata, K., and Sugita, H., (1990) *FEBS Lett.* 260, 131-134

(3) Toide, K., Iwamoto, Y., Fujiwara, T., and Abe, H., (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 1370-1378

[謝辞]

NG108-15 細胞を御供与頂いた金沢大学医学部東田教授に深謝致します。

57 組換えアデノウイルスを利用したラット脳へのAPP遺伝子導入

1Cp5

西村伊三男，植月太一，齋藤 泉[1]，岡村 均[2]，吉川和明
（大阪大・蛋白研・機能制御，[1]東京大・医科研・遺伝子解析，[2]神戸大・医・2解）

〔 要約 〕
アミロイド蛋白質前駆体 (APP695)を発現するアデノウイルスベクターを作製し，ラット脳に遺伝子導入した。ウイルス液を直接脳内に注入して5日後に固定し，免疫組織化学的に検討した。海馬のアデノウイルス注入部位周辺では，神経細胞および神経膠細胞が強いAPP免疫活性を示した。前者の中には変性像を示すものが存在し，後者では形態変化は明らかではなかった。同側のperirhinal cortexにおいても，核周囲に顆粒状のAPP免疫陽性物質の蓄積している神経細胞が観察された。しかし注入部位の神経細胞に比較すると，その免疫活性は低く変性像も認められなかった。In vivoにおける神経細胞内でのAPPの過剰発現に伴って，神経細胞の変性が起こることが示された。

Alzheimer病の大脳では，変性神経細胞とともにアミロイド線維の沈着がみられる。このアミロイド線維の構成成分であるβ/A4蛋白質あるいはその前駆体APPと，神経細胞死との関連については未だ結論をみるには至っていない。我々はこれまでに，全長型APP cDNAを導入した胚性ガン細胞 (P19細胞)をレチノイン酸処理によって神経細胞に分化させたところ，APPを過剰発現している神経細胞は変性死滅し，細胞内にはアミロイド形成能を持つAPPのC末端断片が膜結合型として存在することを見出している(1)。したがって，神経細胞におけるAPPまたはその代謝産物の過剰な蓄積そのものが，神経細胞を変性させるものと推測した (2)。そこで本研究では，このin vitroでの結果をin vivoの実験系で証明する目的で，分裂終了後神経細胞にも遺伝子導入が可能なアデノウイルスベクターを利用して，APPの過剰発現系による脳内の病理学的変化を観察した。

[方法] 組換えアデノウイルスの作製 (3)：コスミドベクターpAxCAwtのCAGプロモーターの下流にLacZあるいはヒト全長型APP695 cDNAを挿入したものと，アデノウイルスゲノム両端に共有結合した末端蛋白を保持したゲノムDNA(DNA-TPC)とを293細胞に共導入して，相同組換えによりβ-galactosidase (β-gal)またはAPPを発現するアデノウイルスベクター(AxCA*LacZ*; 3.8×10^{10} pfu/ml, AxCA*APP*; 2.2×10^{10} pfu/ml)を得た。AxCA*APP*のラット脳内への注入：10週齢Wistar系雄性ラットをペントバルビタール麻酔下で脳定位固定装置に固定し，ウイルス液10 μl (AxCA*APP*; 5.9×10^{7} pfu, AxCA*LacZ*; 2.5×10^{7} pfu)をPaxinos and Watsonの図譜に従い左側の海馬へ注入した。X-gal組織化学染色：5日後に4%パラホルムアルデヒドで固定し，凍結脳切片を作製した。β-gal発現細胞をX-gal染色により確認し，これをAPPの発現部位の目安として以下に述べる免疫組織化学反応を行う切片を選択した。免疫組織化学：上述の脳切片を，0.1 % Triton-X含有リン酸緩衝食塩水にて希釈した抗APP抗体 (C末端ペプチド抗体)と反応させた後，ABC法あるいは蛍光抗体法にて可視化した。AxCA*LacZ*のみの注入：脳内の細胞へのウイルスの感染自体の影響を検討する目的で，上記と同じウイルス量の精製AxCA*LacZ* 10 μl (8.4×10^{7} pfu)を海馬に注入し，抗β-gal抗体との免疫組織化学反応を行った。

[結果と考察] 海馬の注入部位の周辺では神経細胞と多数の神経膠細胞にAPP免疫活性を認めた。神経細胞では不規則な形態をしているものが多く，なかには表面に球状の小体の存在するものや，不規則な形態をした突起を持つものが観察された。これらのAPP免疫陽性変性細胞は，CA3領域の錐体神経細胞層などにも散在し，さらに神経細胞に特異的な核蛋白質NeuNとで二重染色されるものが存在することより，神経細胞であることが確認されている。なおAxCA*LacZ*のみを注入した対照実験において変性神経細胞は認められず，アデノウイルスの神経細胞への感染自体が細胞変性に影響した可能性は低いものと考えられる。一方，APP免疫陽性神経膠細胞での形態変化は明らかではなかった。このほか同側のperirhinal cortexにおいても，多数のAPP免疫陽性神経細胞が認められた。Perirhinal cortexには直接あるいはtrans-synapticに同側の海馬に投射している神経細胞が存在し，その神経終末より逆行性にアデノウイル

スが感染して，同部位に APP が発現したものと推測される。これらの神経細胞での免疫活性は注入部位周辺の神経細胞に比較すると低く，形態変化も明らかではなかった。核周囲には顆粒状の APP 免疫陽性物質が認められた。Perirhinal cortex の神経細胞のようにある一定のレベルで APP が過剰発現した場合，APP の分解経路としてのリソソームに APP やその代謝産物が過剰に蓄積しそれが核周囲に顆粒状の免疫陽性物質として観察され，さらに注入部位周辺で高い APP 免疫活性を示した神経細胞のような場合には，APP がある閾値をこえて過剰に発現しリソソームでの代謝障害が生じて変性したもの推定される。

今回，アデノウイルスベクターによる遺伝子導入系により，in vivo での中枢神経系細胞における APP の過剰発現に伴って，短期間の間に神経細胞の変性が起こることが示された。APP あるいはその代謝産物の過剰な蓄積自体の神経毒性を論じるには，アミロイド沈着の有無，修復過程などを含めた経時的な組織変化，電子顕微鏡による変性神経細胞内の観察など，今後の詳細な検討が必要であろう。

[参考文献]

1. Yoshikawa K., Aizawa, T. and Hayashi, Y. (1992) *Nature* **359**, 64-67.

2. Yoshikawa K. (1995) In *Pathobiology of Alzheimer's disease* (eds Alison Goate and Frank Ashall). pp.145-165. Academic Press

3. Miyake S., Makimura M., Kanegae Y., Harada S., Sato Y., Takamori K., Tokuda C. and Saito I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1320-1324.

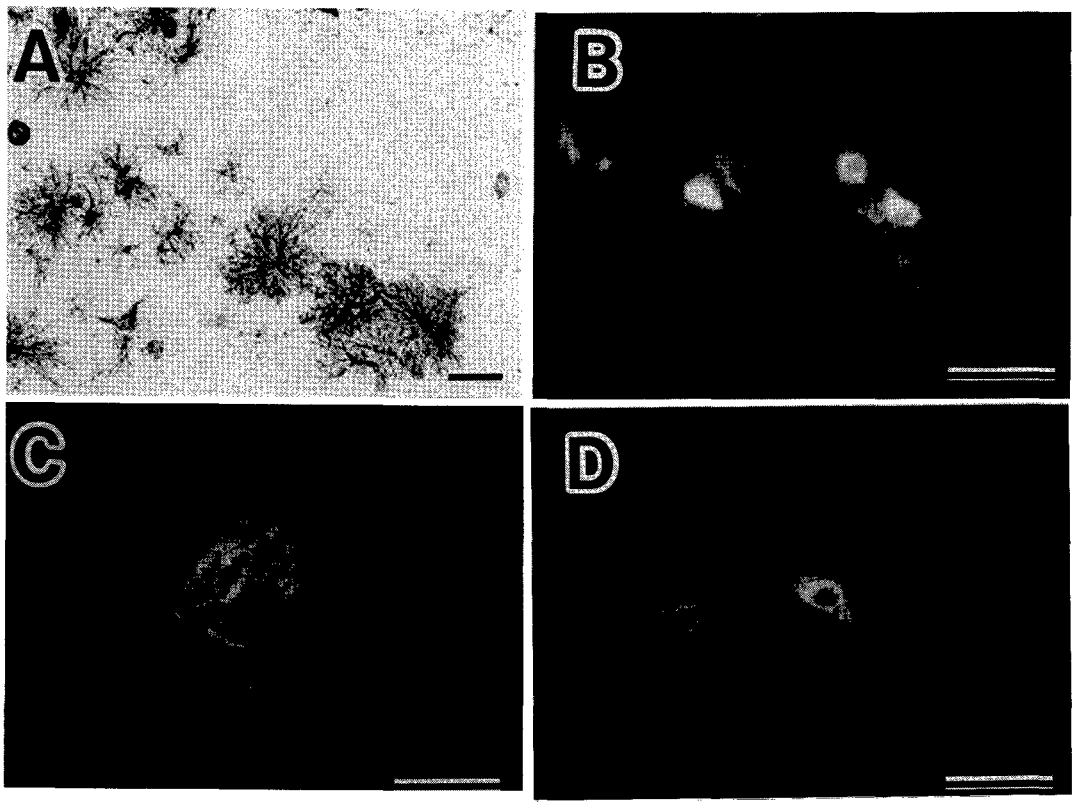


図 組換えアデノウイルスにより APP695 cDNA を導入したラット脳の APP 免疫組織化学染色。A は ABC 法で，B-D は FITC により可視化した。**A.** 海馬の注入部位周辺の神経膠細胞。形態変化は明らかでない。**B.** CA3 錐体神経細胞層にみられた強い免疫活性を示す変性神経細胞。**C.** 注入部位周辺にみられた変性神経細胞。その表面には球状の小体がみられ，突起の起始部も不規則な形態をしている。**D.** perirhinal corex にみられた多数の免疫陽性神経細胞。免疫活性は B，C に比較して低く，その形態も保たれている。核周囲に顆粒状の免疫陽性物質が認められる。　Scale bars =50 μ m (A, B, D), 20 μ m (C)

58 クロロキンミオパチーにおける nonneural tau の動態

1Cp6

小山文隆, 井原 康夫
(東京大学医学部脳研脳病理)

[要約]クロロキンミオパチー(chloroquine myopathy; CM) では、 PHF の主要構成成分である tau 免疫原性の蓄積が報告されている。微小管結合タンパク質の一つである tau はこれまで神経系に特異的なタンパク質と考えられてきたが、神経系以外にも正常筋組織を始め、非神経組織に広く発現していることが最近明らかになった。そこで、CM作製のタイムコースと tau の発現量、修飾について検討した。Tau mRNA レベルは、クロロキン投与 28 日頃に一過的に上昇し、その後定常レベルに戻った。他方、tau のタンパクレベルは遅れて増加し、約 56 日にピークとなった。Tau の分子種は投与前には末梢神経型の big tau のみであったが、CM 処理後は、 量的には少ないが、中枢神経型の small tau が出現した。クロロキンは lysosomotrophic agent であることから、CM における tau の蓄積は、クロロキンが lysosome でのタンパク分解を阻害した結果生じたものと考えられる。すなわち、以上の結果は筋細胞においては tau は lysosome で分解されることを示唆している。

[目的] Inclusion body myositis (IBM) は中年以降に発症する炎症性筋疾患として知られている。筋細胞内に二種類の線維構造物が蓄積し、アルツハイマー病でみられる β-amyloid およびPHF に形態及び免疫原生が類似している[1,2]。IBMの原因は現在に至るまで不明だが、 lysosomeの異常を伴っている。Lysosomotrophic agent のクロロキンをラットに連続投与すると、IBMに近い病変を作ることが知られていた。このクロロキンミオパチー (chloroquine myopathy; CM) においても β タンパク質の前駆体 (APP) および tau が蓄積することが最近明らかになった[3,4]。他方、微小管結合タンパク質 tau はこれまで神経系特異的タンパク質と考えられてきたが、神経系以外にも正常筋組織を始め広く発現していることが明らかとなった[5]。筋細胞では big tau が発現しており、 small tau はほとんど認められない。IBM の biopsy sample ではその検索は限られるが、CMは実験的作製が可能であるので、この系を用いれば tau の詳細な動態の解析が可能である。本研究では、 CMでの tau 発現量の変化を mRNA とタンパク質レベルより調べ、CMの筋細胞の変性過程における tau の蓄積の意義を理解しようとした。

[方法] Wistar ラットの腹腔内にリン酸クロロキン(50 mg / kg)を連続投与し、CM を作製した。Total RNA を調製し、逆転写酵素で cDNA を合成した。プライマーを^{32}P で標識し、cDNAを鋳型としてPCRを行った。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で放射能強度を測定した。タンパク質の解析は、CM 組織一定量をホモジナイズし、 100^{o}C 5分熱処理し、 熱耐性画分を得た。Western blot を行なった後、tau の特異抗体と反応させ、 ECLシステムで検出した。

[結果] クロロキンの連続投与によりtau mRNAレベルは28日頃一過的に上昇し、その後定常レベルに戻った。他方、tauのタンパク量は約56日をピークに遅れて増加した(図1)。発現しているtauの分子種は、クロロキン投与前にはbig tau (exon 4Aを有する)のみだが、クロロキン処理後は、量的には少ないが、small tau (exon 4Aを有さない)が出現した(図1)。

[考察] CM後期では、tau mRNAレベルの上昇がないにもかかわらず、tauの蓄積が認められた。クロロキンはlysosomotrophic agentとして知られており、tauの蓄積はlysosomeにおけるタンパク分解が阻害されたため生じたと考えられる。すなわち、筋細胞ではtauはlysosomeで代謝される可能性が高い。

本研究は顧 擁軍(現上海医科大学), 村上信行(国立精神神経センター)、埜中征哉(同左)各氏との共同研究である。

[文献]

1) Askanas et al. *Am. J. Pathol.* 141, 31-36 (1992).
2) Askanas et al. *Am. J. Pathol.* 144, 1777-187 (1994).
3) Tsuzuki et al. *Neurosci. Lett.* 182, 151-154 (1994).
4) Murakami et al. *Muscle Nerve* 18, 123-125 (1995;).
5) Gu et al. *J. Neurochem. in press* (1996).

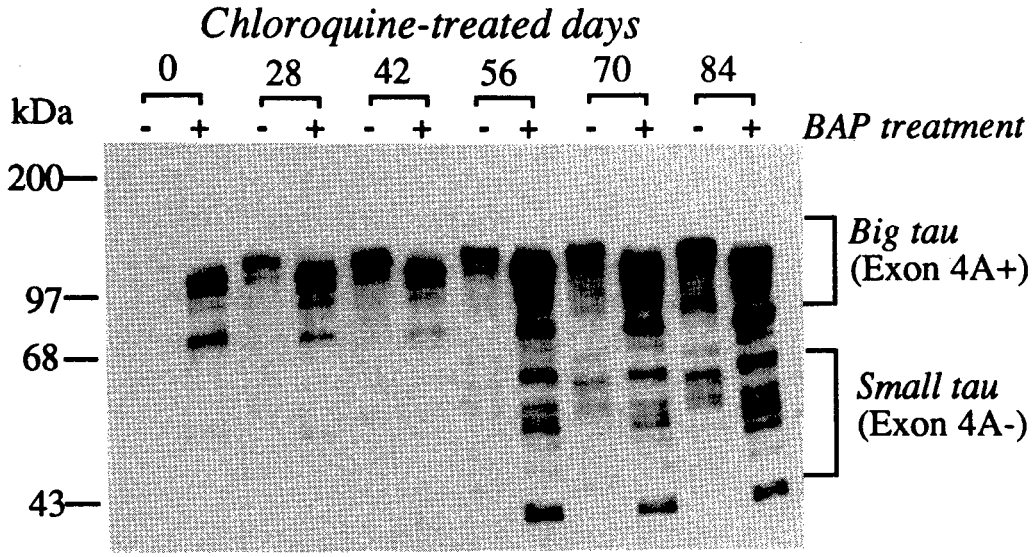


Fig. 1. Analysis of tau in CM tissues. Heat-stable supernatants were run on 10% SDS-polyacrylamide gels. Separated proteins were transferred onto Immobilon, and probed with a monoclonal antibody, tau 1. The samples were either untreated (-) or treated (+) with bacterial alkaline phosphatase (BAP).

59 1Cp7 早発型家族性アルツハイマー病の病因遺伝子プレセニリン I(PS1)の変異と代謝

高島明彦、 Marc Mercken、高橋浩士、村山美由紀、安武かおり
（三菱化学生命科学研究所）

〔 要約 〕
早発型家族性アルツハイマー病の病因遺伝子として第１４番染色体上にある新規遺伝子PS1に対するモノクローナル抗体７種類作成した。これらの抗体はPS1 N末部位の異なる３領域をそれぞれ認識した。これらの抗体はヒト脳抽出液およびヒト由来の株細胞抽出液で４７ｋＤと２８ｋＤの蛋白を特異的に認識した。PC12細胞へのPS1遺伝子の一過性発現により４７ｋＤの蛋白は全長のPS1に相当し２８ｋＤの蛋白は全長PS1由来の代謝産物であることが明らかになった。更に早発型家族性アルツハイマー病でみられるPS1のミスセンス変異はこの代謝に影響を与えることが示された。

緒言

第１４番染色体上にある新規遺伝子PS1のミスセンス変異が早発型家族性アルツハイマー病の発症に関係することが昨年明らかにされた。cDNAから推定される蛋白は４６７個のアミノ酸からなり７つの膜貫通ドメインを持つ膜蛋白であると考えられている（図１）。これまでにこの遺伝子のミスセンス変異は２２カ所報告されている。本研究で我々はヒトPS1に対する特異抗体を作成し細胞にPS1遺伝子を一過性に発現しミスセンス変異が与える影響を調べた。

方法

抗体作成：ヒトPS1（２１－５９アミノ酸）の部分に相当する合成ペプチドを抗原にして独立した７個のハイブリドーマからモノクローナル抗体MKAD3.1-MKAD3.7を得た。ポリクローナル抗体はPS1（２９９－３１３アミノ酸）及び（４５３－４６７アミノ酸）部位の合成ペプチドを兎に免疫しそれぞれの部位に対する抗体PS1-M及びPS1-Cを得た。
DNAコンストラクト：PS1 cDNAはヒト脳由来のcDNAライブラリーからPCR法によってPS1 cDNAを得た。シークエンスの結果このクローンはエクソン３番のVRSQの配列を欠いていた。ミスセンス変異を有するPS 1 cDNAはPCR-based site-directed mutagenesis法によって得られた。これらのcDNAはCMVプロモーターの下流につなげられトランスフェクションに用いられた。トランスフェクションはリポフェクトアミンを用いて行った。

結果と考察

ヒトPS1（２１－５９アミノ酸）の部分に相当する合成ペプチドを抗原にして独立した７個のハイブリドーマからモノクローナル抗体MKAD3.1-MKAD3.7を得た。エピトープマッピングによりこれらの抗体はPS1 N末部位の異なる３領域をそれぞれ認識した。これらの抗体を用いてヒト株細胞SH-SYから調製した細胞抽出液をウェスタンブロットによって解析した。

これらの抗体で認識される蛋白は４７ｋＤと２８ｋＤの蛋白質であった（図２）。MKAD3.3の認識部位はラットとヒトで異なるため、ラット由来の株細胞 PC12 の細胞抽出液では内在性の PS1 と反応しなかった。この細胞にヒト PS1 cDNA を強制発現すると MKAD3.3 は４７ｋＤと２８ｋＤの蛋白を認識した。この抗体で免疫沈降された 47kD は PS1-M 及び PS1-C と反応するが２８ｋＤとは反応しなかった。これらのことから４７ＫＤの蛋白質は全長 PS1 であり２８ｋＤの蛋白はｃ－末及び loop の領域を持たない全長 PS1 由来の代謝産物であることが示された。早発型家族性アルツハイマー病でみられる PS1 の変異を持つ cDNA を遺伝子導入すると、この２８ｋＤへの代謝が抑制された（図３）。即ち早発型家族性アルツハイマー病でみられる PS1 の変異は PS1 の代謝に影響を与える事が明らかになった。このことから PS1 の異なる代謝がアルツハイマー病発症の引き金になることが示唆された。

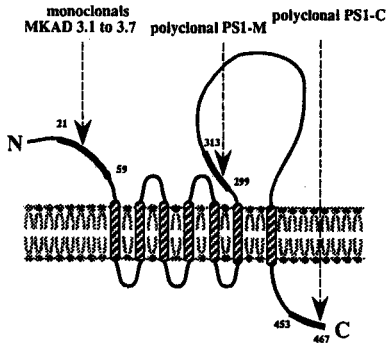


図１　PS1 の構造と抗体認識部位

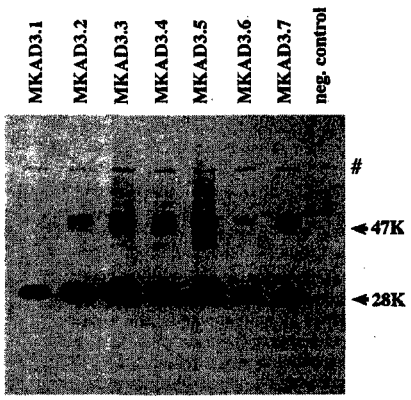


図２　SH-SY 細胞における PS1

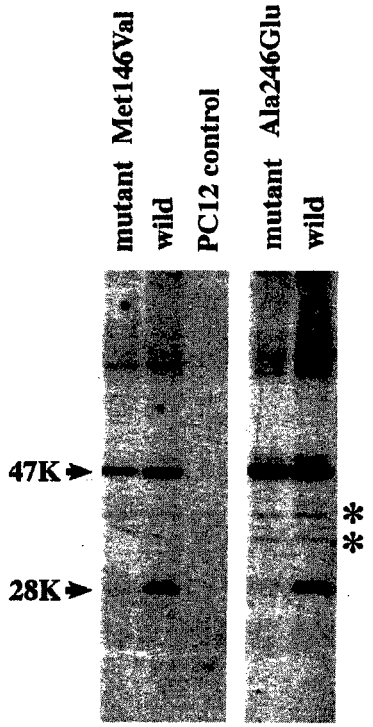


図３　ヒト PS1 の PC12 細胞での強制発現

60 アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン1蛋白(PS-1)の同定

1E44

○宇佐美美穂子，佐原成彦，亀谷富由樹，大河内正康，山本明広，
田中喜久子，森 啓
（東京都精神医学総合研究所・分子生物学研究部門）

[要約] PS-1 cDNAを用いてPS-1の*in vitro* translation産物及びPS-1を一過性に過剰発現させたCOS細胞を用いてプレセニリン1(PS-1)蛋白の性質について検討した．そのためにPS-1の予想されるアミノ酸配列に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を作成した．

in vitro translation産物及びCOS細胞ライセートで43KDaの分子量の一致する全長型PS-1を同定した．一方COS細胞ライセートでは20KDaのPS-1のN端側分解産物のスメアバンドを多量に認めた．この結果は 健常脳中での結果と類似しており，この蛋白の生体内での機能の解明にPS-1蛋白を過剰に発現させた培養細胞系は有用であると考えられる．

[緒言] 昨年，家族性アルツハイマー病(FAD)の３番目及び，４番目の遺伝子座が同定された．これらはプレセニリン1(PS-1)及びプレセニリン2(PS-2)と命名された．これら二つの蛋白はそのアミノ酸配列が多くの領域で一致しており，そのことは，これらの機能が似通っていることを示唆している．これらの遺伝子に突然変異のある家系はFADの全家系の７０％以上であるといわれ，これらの事実はPS蛋白が弧発性も含めたAD全体で共通する病理過程に極めて重要な役割を果たしている事を示している．以上の点でPS-1蛋白の機能や役割について検討することは重要であると考えられる．

[方法] 1）ヒト脳・白血球cDNAライブラリーよりクローニングしてきたPS-1 cDNAを材料に網状赤血球系の*in vitro* translation法（プロメガ社，WI）を用いて，^{35}Sラベルした合成蛋白を作成した．

2）PS-1 cDNAを発現ベクターのpEF-BOSにサブクローニングしCOS細胞にトランスフェクションさせ，PS-1蛋白を発現する系を作成した．

3）PS-1のN端領域，ループ領域及びC末端部分の３つの異なる領域の合成ペプチドを作成し，それぞれに対するポリクローナル(AD3N, AD3L, AD3C)及びモノクローナル抗体(PSN1, PSN2, PSN3)を作成した．抗体はPS-1蛋白を免疫沈降させ，Western blot法で認識することで選択した．

[結果及び考察] ^{35}SラベルしたPS-1 *in vitro*産物を3つの領域に対する抗体で免疫沈降したところ，43KDaの共通のバンドが認められた（図1a）．

PS-1蛋白を過剰発現させたCOS細胞ライセートについて３つの領域に対する抗体で免疫沈降法を実施した後，Western blot法で検討した．その結果３つの領域に共通の43KDaのバンドが認められた．またN端部分に対する抗体での免疫沈降で，N端部分の抗体にだけ反応する20KDaのスメアバンドが多量に認められた．これらの結果は全ての抗体で一致した（図1b）．

健常脳について，そのTriton X-100可溶性分画で同様に検討したところ，45KDa，および26KDaのバンドが，N端部分の抗体により認識された．これらのバンドは分子量がCOS細胞の系と若干異なったが，これらは現在のところ解明されていないPS-1のpost-translational modificationの存在を示唆していると考えられる（図2）．

これらの結果より，合成PS-1ポリペプチドは電気泳動上43KDaを示し，培養細胞中に多量に発現させたPS-1蛋白でもその全長型の分子量に変化のないことが示された．

一方，生体内でのPS-1蛋白はその大部分がプロセシングを受けフラグメント化してい

ることが明らかとなった．このCOS細胞を用いた結果は，健常脳内で同定されたPS-1蛋白の結果と類似しており，この発現系はPS-1の生体内での機能や挙動について検討するのに有用であると考えられる．

[参考文献] 1) Sherrington-R; Rogaev-E; et al Nature. (1995) 375: 754-60, 2) Levy-Lahad-E; Wasco-W; et-al Science. (1995) 269: 973-7, 3) Sahara-N; Yahagi-Y et al FEBS lett. (1996) 381: 7-11

図 1

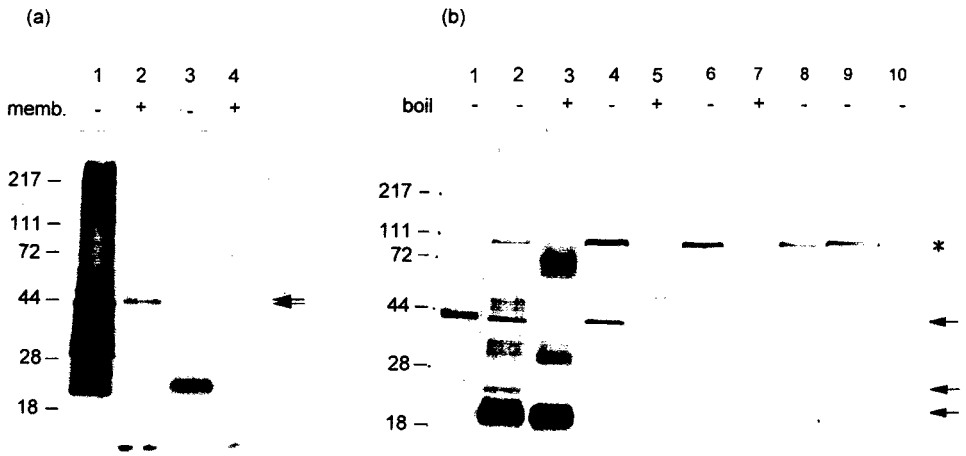
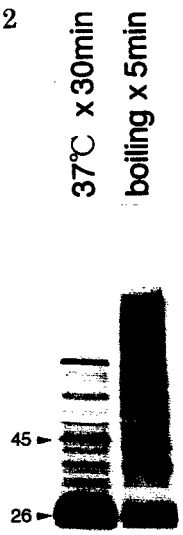


図 2



PSN1

図 1. (a) プレセニリン 1 の *in vitro* 産物（^{35}S Met ラベル）
lane 1:ミクロソーム膜非存在下における PS-1-467 *in vitro* 産物
lane 2:ミクロソーム膜存在下における PS-1-467 *in vitro* 産物
lane 3: lane 1 に対する mock 実験（ベクターのみ）
lane 4: lane 2 に対する mock 実験（ベクターのみ）
(b) プレセニリン 1 の COS 細胞発現産物
lane 1:PS-1-467 *in vitro* 産物（^{35}S Met ラベル）
lane 2/3:プレセニリン 1 を強制発現させた COS 細胞の AD3N 抗体による免疫沈降サンプル
lane 4/5: AD3L 抗体による免疫沈降サンプル
lane 6/7: AD3C 抗体による免疫沈降サンプル
lane 8: lane 2 に対する mock 実験（ベクターのみ）
lane 9: lane 4 に対する mock 実験（ベクターのみ）
lane 10: lane 6 に対する mock 実験（ベクターのみ）
注）lane 3,5,7 は SDS サンプルバッファー添加後 5 分間 boil した．それ以外は 37℃30 分反応した後，電気泳動を行った．
注）lane2-10 は AD3N 抗体にて免疫染色を行った．

図 2. 健常人脳におけるプレセニリン 1 蛋白の同定

61 1E45 Presenilin 1 突然変異を持つ家族性アルツハイマー病患者の線維芽細胞の変化について

工藤 喬、宮前康之、柏木雄次郎、森原剛史、武田雅俊
（大阪大学医学部精神医学教室）

〔要約〕
若年発症家族性アルツハイマー病の約70%の原因遺伝子とされるpresenilin 1（PS1）に対するポリクロナル抗体を作成し、PS1の突然変異が確認されている2家系（OS-2、OS-3）より採取した線維芽細胞におけるPS1の蛋白レベルの変化について免疫組織学的或いはウエスタン法を用いて検討した。免疫組織学的検討では、突然変異を有する線維芽細胞と正常或いは弧発例の細胞との間にPS1の分布に差は認められず、細胞膜及びendoplasmic reticulumに局在する事が認められた。ウエスタン法による検討では、OS-2家系においてPS1のN端に対する抗体によって認識される38kDaのペプチドが消失し、PS1の突然変異によりN端が何らかの修飾を受けることが示唆された。

［目的］
若年発症家族性アルツハイマー病の約70%の原因遺伝子として14番染色体にあるpresenilin 1（PS1）が昨年クローニングされた。これまでに、次々と新しい突然変異が追加され、20数種類の変異が知られている。従って、PS1は家族性アルツハイマー病ひいては弧発性アルツハイマー病の病態に深く関与していることが推察される。しかし、PS1のアミノ酸配列より予想される構造は7回膜を貫通する蛋白という以外、この生理的機能や局在については未だ不明であり、突然変異がこの蛋白発現にどのような影響を及ぼすのかも不明である。今回我々はPS1に突然変異を有する家族性アルツハイマー病を経験し、患者より皮膚線維芽細胞を採取し、それらの蛋白レベルでの異常について、作成したポリクロナル抗体を用いて免疫化学的に検討した。

［方法］
ポリクロナル抗PS1抗体の作成：PS1のN末端14残基にシステインをつけたMTELPAPLSYFQNAS及びC末端14残基にシステインをつけたQPFMDQLAFHQFYISといったsynthetic peptideを作成し、それぞれ1mgを1mgのImject Maleimide Activated Keyhole Limpet Hemocyanin（Pierce社製）2時間室温で反応させた。生理食塩水に対し1晩透析した後、2mlに生理食塩水で調整した。等量のimcomplete Freund's adjuvantを加え、エマルジョンを作成し、2mlずつニュージーランドラビットの背部皮下に数カ所注入した。初回免疫以後、4週・6週・8週後にcomplete adjuvantを用いて追加免疫をし、毎回採決して血清中の抗体価をELISAを用いて測定した。十分に抗体価が上昇したことを確認し、大量採血を行いpentobarbitalにて安楽死させた。得られた抗血清はSulfoLink Kit（Pierce社製）を用いてAffinity Purificationを行った。得られた抗体の免疫反応性を検討するため、ラットのbrain homogenateを100,000 xgで遠心し、得られたpelletを0.5 % TritonX-100で処理し、SDS-PAGEに供した後、抗血清を用いてウエスタン法を行った。
線維芽細胞の採取及び処理：患者及び家族に本実験の目的・意義を説明し同意を得た後、大腿内側より皮膚を採取し、10 % FCS含有DMEM培地で培養し、conflentになったところでトリプシン処理を行いlysateを作成した。1部の細胞は免疫組織化学用にスライドガラスに再播種し、1晩放置した後、acid methanol（10 % 酢酸、70 % メタノール）で固定した。lysateは上記brain homogenateと同様にTritonX-100で処理した。OS-2家系（213Ile→Tyr）の2患者、OS-3家系（96Val→Phe）の1患者、弧発例の5患者、正常対象者5名より検体を採取し検討した。
線維芽細胞におけるPS1の局在の検討：固定した線維芽細胞を用いて、第1抗体には抗PS1抗体及び抗ビメンチン抗体、第2抗体にはローダミンラベル抗ウサギIgG抗体及びFITCラベ

ル抗マウスIgG抗体を用いて、２重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
線維芽細胞の抗PS1抗体陽性ペプチドの変化の検討：線維芽細胞lysateより得られたTritonX-100 extractをSDS-PAGEに供した後、抗PS1抗体を用いてウエスタン法を行い、抗体に陽性なペプチドの変化において検討した。

［結果・考察］

ラット脳TritonX-100 extractに対し、N末端の抗PS1抗体（PS1N）は66 kDa、54 kDa、47 kDa、42 kDaの４バンドが認められ、一方C末端の抗体（PS1C）では47 kDa、44 kDaの２バンドが認められた。47 kDaはPS1N及びPS1Cの染色に一致して認められ、PS1のfull lengthであることが示唆される。（図１）

共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学的検討から、線維芽細胞においてPS1は細胞膜及びendoplasmic reticulumに局在し、細胞骨格蛋白であるビメンチンと一部局在がオーバーラップする事が観察された。これら局在様式は、突然変異を持った患者、弧発例、及び正常対照者間で差が認められなかった。また、PS1NとPS1Cの染色性の差も各群で差が認められなかった。

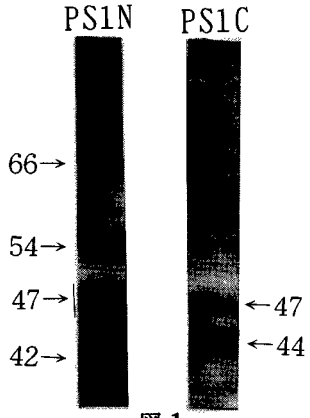


図１
ラット脳TritonX-100 extractのPS1N、PS1Cによるウエスタンブロット

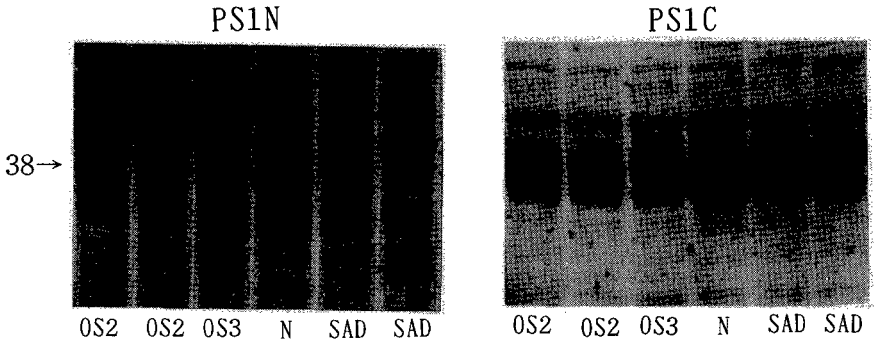


図２
線維芽細胞TritonX-100 extractのPS1N、PS1C によるウエスタンブロット

各線維芽細胞より得られたTritonX-100 extractをPS1Nを用いたウエスタン法にて検討すると、数本のバンドが認識された。OS-2家系より得られた２検体で、38 kDaのペプチドが消失していることが観察された。PS1Cを用いたウエスタン法でも数本のバンドが確認されたが、突然変異を持つ患者、弧発例、及び正常対象者の間に大きな差は認められなかったPS1N染色で認められた38 kDaのペプチドはPS1Cの染色で認められた。（図２）OS-2家系の38 kDaに対応するバンドはPS1Nでは消失していたが、PS1Cによる染色では認められ、OS-2家系ではPS1のN末端が何らかの修飾を受けていることが示唆された。

PS1の生理的機能及びアルツハイマー病の病態への関与については今のところ不明である。OS-2家系はPS1の213IleがTyrに変異しており、それが蛋白レベルでのPS1のN末端の修飾に影響していると示唆され、この蛋白のプロセッシングに影響を及ぼし発症機序に何らかの影響を与えると考えられる。

62 1E46 複数のリン酸化依存性モノクローナル抗体を用いたアルツハイマー病脳中の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
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，PHF-1，M4および12E8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15例のアルツハイマー病(AD)患者、10例の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法により測定した。その結果、リン酸化タウはTau-1および12E8で認識される部位に多く存在し、M4およびPHF-1で認識される部位には少量が認められた。

[目的]

AD脳中の神経原線維変化の微細構造であるpaired helical filaments(PHF)の主要な構成蛋白は、異常ないし過剰にリン酸化されたタウであることが知られている。リン酸化タウは微小管の安定化作用を失うことが*in vitro*では確かめられており、微小管構造の崩壊から軸索輸送の障害－神経細胞死という一連の過程が、ADの重要な病態である神経細胞の脱落のモデルとして想定され、タウのリン酸化の機序を解明することを目的とした研究がこれまでなされてきた。

ヒト成人タウのリン酸化部位はこれまで21ヶ所存在することが報告されているが、より病態に密接に関係する部位、微小管への結合の調節により関係する部位を明らかにすることに研究の焦点が当てられている。我々は各部位のリン酸化の程度には差異が想定するとの仮定のもとに、これまでTau-1(脱リン酸化されたSer^{199}/Ser^{202}を認識)およびPHF-1(リン酸化されたSer^{396}/Ser^{404})のリン酸化依存性モノクローナル抗体を用いて、AD脳ホモジネート・上清中のリン酸化タウ量を測定し報告してきた。今回はこれに加えM4(リン酸化されたThr^{231})、12E8(リン酸化されたSer^{262})を用い、前回までの結果と併せて比較検討した。

[方法]

15例のAD剖検脳、10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(20%W/V)およびその100,000×*g*，4℃，10分遠沈上清を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ずつ滴下した。また、標準物質として精製した非PHF化リン酸化タウ(AD P-tau)、3 repeat recombinant human tau、リン酸化されたSer^{396}/Ser^{404}を含む合成ペプチドを抗体に応じて使い分け、0.5-15ngの範囲でブロットした。

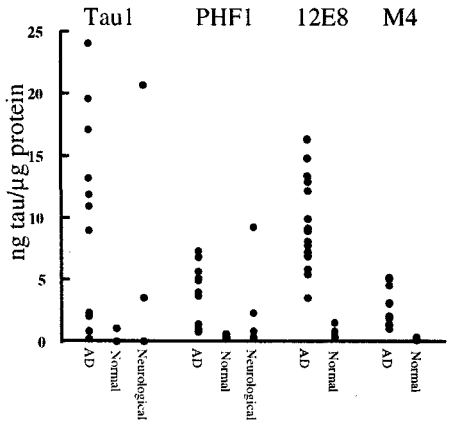
Tau-1でblotするニトロセルロース膜を室温で30分間乾燥後、150mlの3%(wt/vol)Bovine Serum Albumin(BSA)-TBS-0.1%NaN3にて室温で1時間Blockingし、100mlのTBSにて10分間、2回洗浄した。脱リン酸化のため15mlのAlkaline Phosphatase(226U/ml;Boehringer Mannheim)，Phosphatase Inhibitors，100mM Tris(pH 8.0)にて37℃、18時間incubateした。他の抗体は脱リン酸化を要しないのでこの過程は行わなかった。

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、Tau-1(1:25,000)、PHF-1(1:250)、M4(1:500)および12E8(1:250，Athena Neurosciencesより提供)にて室温で16時間incubateした。

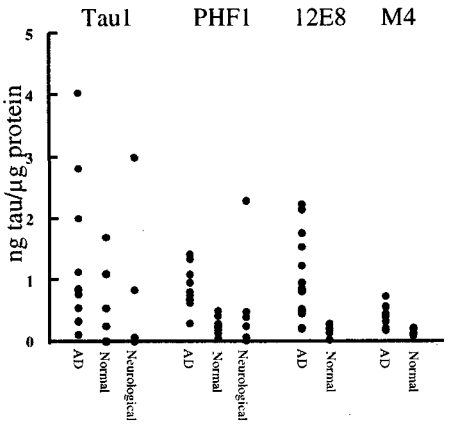
200mlのTBS-0.05%Tween-20で10分間、4回洗浄後、0.05μg/mlの^{125}I標識抗マウスIgG抗体(Amersham)を15ml加え、室温で2時間incubateした。十分な洗浄の後、Imaging Analyzer (Fuji

Co.Ltd.)にてRadioactivityを測定した。

[結果]



ホモジネート中のリン酸化タウ量



上清中のリン酸化タウ量

antibody	epitope	homogenate	supernatant
Tau1	Ser199/Ser202	10.1 ± 8.1	1.3 ± 1.2
PHF1	p-Ser396/p-Ser404	3.8 ± 2.4	0.9 ± 0.3
12E8	p-Ser262/p-Ser356	*9.5 ± 3.7	*1.0 ± 0.6
M4	p-Thr231	*2.9 ± 1.6	*0.4 ± 0.2

Tau-1は正常タウを認識する抗体であるため、脱リン酸化後と前の差をリン酸化タウ量として算出した。標準物質としてTau-1はrecombinant tauを、PHF-1はsynthetic peptideを用いているが、12E8とM4については(*)AD P-tauを用いたため、数値はこれらの部位が100%リン酸化されていると仮定した場合のものである。

[考察]

神経細胞内のタウのリン酸化の機構はいまだ不明である。これまでの研究からリン酸化タウは微小管の脱重合を起こすことが知られており、AD脳での神経細胞の変性を明らかにするためには正常タウからPHFタウへの変化の過程を明らかにすることが必要である。タウは複数のリン酸化部位をもち、どの部位がPHF形成に重要であるかは数々の報告があるが明らかにされていない。我々の作業仮説は、全ての部位が均等にリン酸化されているとは考えにくく、より高度にリン酸化された部位はよりPHF形成に影響を持つのではないかというものである。

今回の結果では、Ser^{199}/Ser^{202}はThr^{231}やSer^{396}/Ser^{404}に比べ有意に高くリン酸化されており、Ser^{262}/Ser^{356}とはほぼ同じ程度にリン酸化されていた。この傾向は上清よりホモジネートで明らかにみられた。Ser^{262}は最近の報告では微小管結合領域の中に存在するリン酸化部位として注目されており、また生検脳を用いた研究から正常タウにはみられないPHFタウに特異的なリン酸化部位とされるが、リン酸化タウ量としてはSer^{199}/Ser^{202}と変わらず、この部位の重要性については今後の研究を待つ必要がある。

63 1E47 アルツハイマー病の診断マーカーとしての脳脊髄液中のタウ蛋白上昇について

森原 剛史、工藤 喬、以倉 康充、柏木雄次郎、中村 祐、谷口 典男、西村 健、武田 雅俊
大阪大学医学部精神医学教室

〔 要約 〕

アルツハイマー病の生化学的診断マーカーとして脳脊髄液中のタウ蛋白の有用性を評価するとともに、脳脊髄液中のタウ蛋白上昇の機序や関与する因子などについて検討した。

まず、生前の腰椎穿刺によって得た髄液の検討の結果、アルツハイマー病群では脳脊髄液中タウ蛋白濃度は有意に上昇していることは確認されたものの、アルツハイマー病以外の変性痴呆疾患でも脳脊髄液中のタウ蛋白濃度が上昇することが示された。したがって、脳脊髄液中のタウ蛋白濃度はアルツハイマー病の生物学的診断マーカーとして一定の条件付きながら有用であると考えられた。

つぎに、腰椎、小脳延髄槽、脳室の各部位の死後の脳脊髄液を検討した。これらのタウ蛋白濃度は死後極早期をのぞき、部位に関係なく生前の腰椎穿刺により採取したものに比べ10倍以上高値であった。タウ蛋白の死後変化による上昇を疾患群により比較したが、有意差は認められなかった。さらに、同一個体の脳組織中のタウ蛋白量と比較したが、有意な相関はみられなかった。

同一個体で時間経過を追って検討すると、髄液中の総蛋白、ニューロフィラメント-H（High-molecular-weight neurofilament ：NF-H）の死後変化に伴う濃度の上昇に比べタウ蛋白の上昇は著しかった。

これらの結果より、アルツハイマー病における脳脊髄液中タウ蛋白の上昇には脳組織からの何らかの漏出に起因する部分があると推測される。

[方法]

研究の方法と目的とを患者及びその家族に十分説明し、文書にて同意の得られた痴呆患者と健常対象者群とについて、腰椎穿刺により脳脊髄液を採取した。痴呆群をアルツハイマー病群(n=12)とアルツハイマー病以外の変性性痴呆群(n=4 ， ピック病、進行性核上麻痺、前頭葉型痴呆）と非変性性痴呆群(N=3，脳血管性痴呆、進行麻痺、うつ病性仮性痴呆）と健常対象群(n=13)に分けて検討した。採取した脳脊髄液はPIERCE社BCAkitを用いて蛋白量を定量するとともに、タウ蛋白濃度をInnogeneticsの社ELISA法により定量した。

また、腰椎、小脳延髄槽、脳室の各部位より採取した死後脳脊髄液および、Netherland Brain Bankより提供を受けた病理学的確定診断のついた個体の脳室内脳脊髄液と脳組織（アルツハイマー病群 n=9, 健常対象群 n=6, 神経疾患対象群 n=6）について検討した。脳脊髄液は同様にタウ蛋白、総蛋白量を定量した。またELISA系を用い脳脊髄液中NF-Hを定量した。一方、脳組織はタウ蛋白の定量を同様のELISA法で行うとともに、アルカリフォスファターゼ処理と組み合わせた、Tau-1抗体を用いたradioimmuno-slot-blot assayにより非リン酸化および総タウ量についても測定した。

[結果と考察]

図 1. に生前の腰椎穿刺によって得た髄液のタウ蛋白濃度を示す。アルツハイマー病および変性性疾

患群の髄液タウ蛋白濃度は平均415pg/mlと非変性性痴呆群の214pg/ml、健常対象者群の133pg/mlにくらべ高値であった。健常者群の平均値プラス2SDをカットオフ値とするとアルツハイマー病および変性性疾患群の陽性率は100%であるのに対し、非変性性痴呆群は25%、健常対象者群は0%となった。アルツハイマー病群では脳脊髄液中タウ蛋白濃度は有意に上昇していることは確認されたものの、アルツハイマー病以外の変性痴呆疾患でも脳脊髄液中のタウ蛋白濃度が上昇しているため、これらの判別は困難であった。髄液中の蛋白量による補正は感度も特異性も改善しなかった。

つぎに死後の検体の検討を行った。髄液中のタウ蛋白濃度は死後極早期をのぞき、腰椎、小脳延髄槽、脳室の各部位に関係なく生前の腰椎穿刺により採取したものに比べ10倍以上高値であった。タウ蛋白の死後変化による上昇を疾患群（図2）、死後経過時間により比較したが、有意差や相関関係は認められなかった。さらに、同一個体の脳組織中のリン酸化、非リン酸化および総タウ蛋白量を測定した。アルツハイマー病群でタウ蛋白、特にリン酸化タウ蛋白が高値であることが示されたが、髄液中のタウ蛋白量とは有意な相関はみられなかった。

同一個体で連続的に髄液を得ることができた3ケースについてタウ蛋白量、総蛋白量とNF-H量を測定した(図 3.)。同じ期間に、総蛋白量とNF-H量の上昇がはっきりしないのに対しタウ蛋白量の上昇は5倍から30倍と著しいことが観察された。これらのことから少なくとも、死後変化においてはタウ蛋白は逸脱しやすい性質を持っていると推測される。一方、タウ蛋白量上昇という死後変化が起こる開始時間は各個体によって異なっていた。このことは、死後経過時間にしたがって死後髄液中タウの上昇の度合いが個体間で一定しない原因の一つと考えられた。

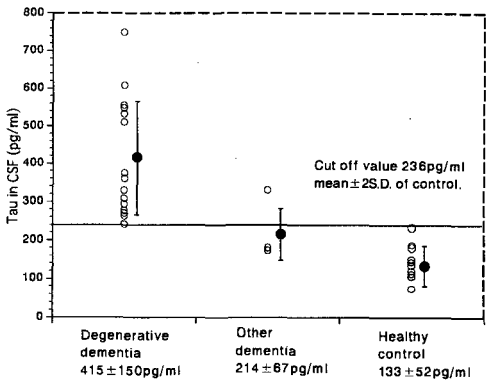


図1. Antemortem tau levels in CSF

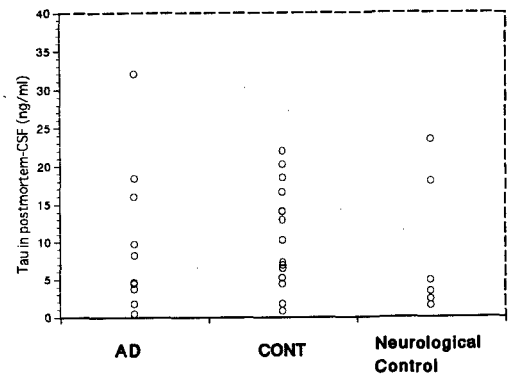


図2. Postmortem tau levels in CSF

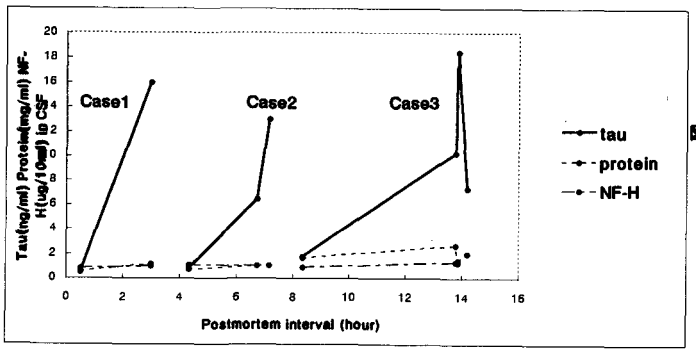


図3. The course of postmortem change in tau protein level

64 Alzheimer神経原線維変化内新規抗原の検索

1Cp8

吉田裕孝[1]、渡辺 淳[1,2]、井原康夫[1]

([1]東京大学医学部脳研究施設脳病理学部門、[2]東京理科大学理工学部応用生物科学科)

〔 要約 〕

paired helical filaments (PHF)は、アルツハイマー病 (AD) を特徴づける神経原線維変化 (neurofibrillary tangle; NFT) の構成単位であり、微小管結合タンパク質tauを主要構成成分としている。AD脳から調製されたSarkosyl不溶性画分を平衡密度勾配遠心法により分画すると、tauのprocessing状態によってPHFが分画され、full-length tau (PHF-tauあるいはA68) を含むPHF画分は、より高い密度に分画された。full-length tauから成るPHFは、形成初期のPHFと考えられる。そこで、われわれは、PHF形成時の神経細胞内環境についての知見を得るため、このPHF画分を免疫原として、モノクローナル抗体を作製した。免疫組織化学的にNFTおよびcurly fiberを染色するクローンをscreeningした結果、ADおよびヒト健常者脳可溶性画分中に、SDS電気泳動上、分子量約65kDaのタンパク質を認識する抗体を産生するクローン3F4が得られた。上記の分子量65kDaのタンパクは3F4により免疫沈降されたが、PHFの構成成分であるtauは免疫沈降されなかった。以上の所見は、3F4の抗原が非tau分子であり、これがPHF内に存在することを示唆するものと考えられた。つぎに、immunoaffinity chromatographyにより、3F4抗原を精製し、AP1消化して得られた主要なペプチドのN末端アミノ酸配列を決定したところ、これらはすべてこれまでに報告されているPHF抗原とは異なるアミノ酸配列をもつことがわかった。

[はじめに]

PHFは神経原線維変化 (NFT; neurofibrillary tangle) の構成単位であり、その形成とAD脳における神経細胞死とは密接に関係することが示されているが[1]、形成機序および高度な不溶化の機構については全く不明である。PHFの成分として、これまでにtauおよびubiquitinがタンパク化学的に同定されているが、タンパク化学的に検出されない、まだ未知の成分が存在する可能は充分にある。

本研究では、PHFの分画を試み、このうち形成初期と思われるfull-length tauを主成分とするPHF画分を得て、これに対する抗体を作製し、この抗体が認識する抗原の同定を行った。

[材料および方法]

免疫原の調製

AD脳皮質より調製したSarkosyl-PHFをTS (Tris-saline; 150mM NaCl / 50 mM Tris-HCl, pH 7.6) に懸濁後、最終密度が1.30mg/mlとなるようにCsClを添加、溶解後、365,000 x g、2℃、3時間の遠心を行った。遠心後、低密度画分より分画し、得られた画分はTSにて希釈し、543,000 x g、2℃、30分の遠心の沈渣として回収した。full-length tauを多く含むPHF画分は、密度1.29～1.34mg/mlの画分に回収され、これを抗原として用いた。

モノクローナル抗体の作成とscreening

balb/cマウスのfootpadに抗原(10μg/footpad)を免疫し、2回の追加免疫後に、膝窩リンパ節より調製した細胞とmyeloma cellをpolyethylenglycolを用いて融合させhybridomaを作製した。Screeningは1Mショ糖を含むTS不溶性画分に回収されるNFTの染色性で行った。抗原は、ADおよびヒト健常者脳抽出物を用いたimmnoblotおよび免疫沈降法により検索した。

抗原の精製とその同定

抗原は、抗体をリガンドとして用いたimmunoaffinity chromatographyにより精製した。精製画分をSDS電気泳動しPVDF膜に転写後、同抗体と反応するバンドの部分を切りだし細切した。これに50mM Tris-HCl (pH9.0)を加え、酵素／基質 (重量比) 1/50にてAP1 (*Achromobacter lyticus* protease 1) 消化した。遊離したペプチドを逆相HPLC (Select B column; Merck) にて展開し、ペプチドを分離した[2]。主要なピークに含まれるペプチドのN末端アミノ酸配列は473A protein sequencer (Applied Biosystems) により決定し、その分子量はMALDI-TOF-MS (PerSeptive) により測定した。

[結果と考察]

(1) Sarkosyl-PHFをCsCl密度勾配遠心により分画した画分は、tauの最N末端を認識するAlz50[3]、tauのSer-202およびThr-205のリン酸化を認識するAT8[4]、Ser-396のリン酸化を認識するC5を用いて、immunoblot法により解析した[5]。本研究に用いた遠心条件下では、1.2～1.4mg/mlの密度勾配が形成

され、PHFは1.2～1.35mg/mlの密度範囲に回収された。AT8およびC5は上記の範囲のPHFに陽性であったのに対して、Alz50は1.29～1.34mg/mlのより高密度域のPHFを認識することが確認された。したがって、1.29～1.34mg/mlの範囲に回収されるPHFは、full-length tauをより多く含み、processingをあまり受けていないtauからなるPHFであると考えられた。

（2）full-length tauを多く含むPHF画分を免疫原としてモノクローナル抗体の作製を試みた。得られたクローンは単離NFTを用いてscreeningを行い、ADおよびヒト健常者脳抽出物を用いて、これらが認識する分子の検索を行った。得られたクローンのうち3F4は、immunoblotの結果、ヒト脳可溶性画分中に分子量65kDa付近のタンパク質を認識した。上記の分子量65kDaのタンパクは3F4により免疫沈降されたが、PHFの構成成分であるtauはこれにより免疫沈降されなかった。つぎに、3F4抗原の同定を試みた。まず、ヒト脳可溶性画分から本抗原をimmunoaffinity chromatographyにより精製し、SDS電気泳動後、PVDF膜に転写し、immunoblot法により同抗体によって認識されるバンドのを細切した。API処理により膜より遊離したペプチドを逆相HPLCにて分離し、得られた画分のうち、大きなシグナルをもつ6つの画分に含まれるペプチドのアミノ酸配列の決定を行った。その結果、それらはすべてこれまでに報告されているPHF抗原とは異なるアミノ酸配列をもつことがわかった。以上の結果から、3F4抗原は、非tau分子である新規のPHF内抗原であることを示唆するものと考えられた。

[参考文献]
1）Arriagada P. et al. (1992) *Neurology* 42, 631-639.
2）Fernandez J. et al. (1992) *Anal. Biochem.* 201, 255-264.
3）Goedert M. et al. (1991) *Neurosci. lett.* 126, 149-154.
4）Goedert M. et al (1995) *Neurosci. lett.* 189, 167-169.
5）Hasegawa M. et al. (1993) *J. Neurochem.* 60, 2068-2077.

図1

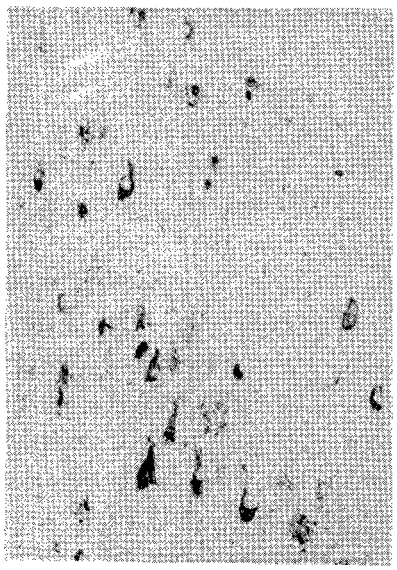


図2

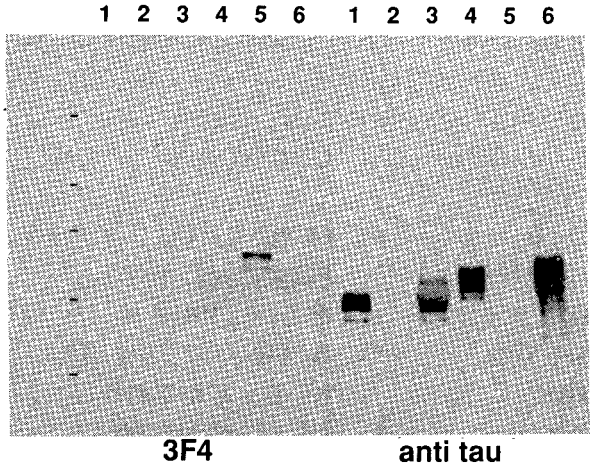


図1　AD脳（ホルマリン固定、パラフィン包埋）切片の3F4による染色（ABC法）。

図2　3F4および抗タウ抗体によるimmunoblot。
生後1日齢ラット脳およびヒト成人脳TS可溶性画分を用いて、3F4あるいは抗タウ抗体により免疫沈降させた画分をSDS電気泳動後、PVDF膜に転写し、3F4（A）および抗タウ抗体（B）によりimmunoblotしたもの。lane 1、4; 免疫沈降に用いた試料、lane 2、5; 3F4により免疫沈降した画分、lane 3、6; 抗タウ抗体により免疫沈降した画分。lane 1-3は生後1日齢ラット脳より、lane 4-6はヒト成人脳より調製した画分。図の横のバーは分子量マーカーを示し、上から201、110、70、43、30kDa。

65 脳血管性痴呆と孤発性Alzheimer病に関する遺伝子の多型分析

1E48

武田良平、溝渕睦彦、中城有喜*、土居孝至*、田邉敬貴
（愛媛大学医学部神経精神医学教室 *松山記念病院）

〔 要約 〕
近年、Alzheimer病(AD)の発症に関与する遺伝子が同定されつつあるが、なかでもApolipoprotein E(Apo E)は、孤発性ADの発症危険因子として注目されている。今回われわれは、日本における代表的痴呆疾患である脳血管性痴呆(VD: 40症例)と孤発性AD(42症例)の患者を対象に、Apo E、Apolipoprotein B(Apo B)、Angiotensin-converting enzyme(ACE)とAngiotensinogen (AGT)遺伝子6部位の多型分析を行い、遺伝的発症危険因子を検討した。対照群に比しVDは、Apo Eのε4型とApo Bエクソン26のC->T置換が有意に高く、一方ADではApo Eのε4型のみ高頻度であった。したがって、Apo Eのε4型のみでなくApo Bエクソン26のC->T置換もVDの発症危険因子である可能性が示唆された。

[目的]
高齢化社会が進むにしたがい、痴呆を主症状とした疾患が重要視されている。日本では、VDとADが痴呆疾患の大部分を占め、発症因子の同定と予防は医学研究上重要な課題である。最近、ADの発症に関与する遺伝子が解明されつつあり、家族性ADのみならず遺伝性の乏しいと考えられていた孤発性ADでも遺伝子の関与が明らかになっている。一方、VDは高コレステロール血症や高血圧症などが発症の危険因子として提唱されているが関連遺伝子の分析は少ない。今回、高コレステロール血症や高血圧症に関係しているApolipoprotein、ACEやAGTの遺伝子多型を分析し、VDやADの危険因子を解析した。

[方法]
愛媛県内の病院に通院または入院しているVD患者、AD患者と痴呆症状のない健常者らを対照群とし、研究調査に対し十分な説明と同意を得た者を対象とした。経験豊富な臨床家医の診察とCTあるいはMRIを用いた画像診断をもとに、DSM-Ⅳを基準にして診断を行なった。VD患者は40症例（男性20名、女性20名、平均年齢76歳）、AD患者は42症例（男性11名、女性31名、平均年齢76歳）、対照群59名（男性28名、女性31名、平均年齢70歳）である。血液(10ml)からDNA extractor WB kit (Wako)を用いDNAを抽出し、Apo E, Apo B, ACE, AGT遺伝子の一部をPCR増幅した。なお、Apo E遺伝子多型分析には、既報のプライマーに準じたものを用いた[1]。Apo Bは、図1に示した3ケ所を分析した。エクソン1(図1-1)は、5'-CAGCTGGCGATGGACCCG-3'と5'-CCCTGGCGCCCGCCAGCA-3'で、エクソン26(図1-2)と5'部分(図1-3)は既報のプライマーを用いた[2]。ACEは、5'-AGACCACTCCCATCCT TTCT-3'と5'-GGCCATCACATTCGTCAGAT-3'で、AGTは5'-CCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCT -3と5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC -3'のプライマーをそれぞれ用いた。増幅条件や試薬は既報の方法[3]を用いた。それぞれのPCR産物をHha I(Apo E)、Xba I(Apo B; exon26)、Msp I(Apo B; 5'部分)とAsp I(AGT)の制限酵素で37C、2時間反応させ分解断片を1.5-6%アガロースゲル電気泳動で分離し、遺伝子多型を分析した。

[結果と考察]

表1に分析結果をまとめた。各三群のApo E遺伝子型は、2/3, 3/3, 2/4, 3/4, 4/4でそれぞれの頻度(%)は対照群では6.7, 81.7, 1.6, 10, 0%であり、ADでは0, 47.6, 0, 42.9, 9.5%、VDは12.5, 50, 2.5, 27.5, 7.5%であった。ε4のアリル頻度は、対照群に比べADは5.2倍、VDで3.5倍と有意に高く、両疾患の明らかな発症危険因子(オッズ比：AD; 8.3, VD; 4.1)と考えられる。Apo Bは、エクソン26のC->T置換がVDで対照群の5倍と有意に高く(オッズ比： VD; 7.2)VD発症の危険因子となる可能性が示唆された。この置換よるVD発症の作用機序は明らかではないが、血中LDLコレステロールやApo B蛋白が上昇するという報告がある[2]。Apo Bの他の2ケ所は、3群で差はなかった。また、図1のC->T(-265)の置換は、表2に示したように現在までの報告と異なり[2,4]、T型アリルは全く存在しなかった。なお、ACEとAGTに関しては三群間で有意の差を認めなかった。

[文献]

1. J. E. Hixson . et al. (1990) J. Lipid Res. 31; 545-548.
2. R. Peacock . et al. (1992) Atherosclerosis. 92; 151-164.
3. M. Mizobuchi. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5; 476-484.
4. E. Boerwinkle. et al. (1990) Atherosclerosis. 81; 225-232.

表1、VD, ADと対照群の遺伝子多型頻度

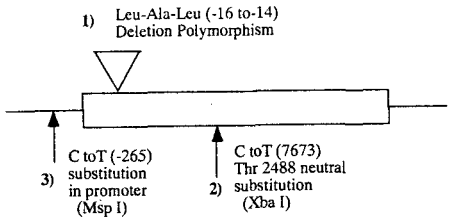
Gene	Allele	Vascular dementia (n=40) frequencies	OR	Alzheimer disease (n=42) frequencies	OR	Controls (n=59) frequencies
Apo E						
	ε2	0.08		0.00		0.04
	ε3	0.71	4.1**	0.69	8.3**	0.90
	ε4	0.21	(1.5-11.3)	0.31	(3.1-22.5)	0.06
Apo B						
1)	I	0.77	2.4	0.76	1.5	0.76
	D	0.23	(0.4-15.0)	0.24	(0.2-11.1)	0.24
2)	C	0.90	7.2*	0.96	2.2	0.98
	T	0.10	(1.4-36.2)	0.04	(0.3-13.5)	0.02
ACE	I	0.62	1.4	0.59	2.0	0.57
	D	0.38	(0.4-4.4)	0.41	(0.8-5.3)	0.43
AGT	C	0.76	1.5	0.82	1.1	0.82
	T	0.24	(0.6-3.4)	0.18	(0.5-2.5)	0.18

I; Insersion, D; Deletion,
C; deoxycytidylate,
T; deoxythymidylate.
OR; odds ratio,
カッコ内は、信頼区間を示す
* P<0.05 ** p<0.01

表2、日本人のApo B遺伝子のC->T(-265)置換

Genotype	This study Japanease (n=121)	Peacock et al [2] Swedish (n=77)	Boerwinkle [4] et al (n=78)
CC	100	78	92
CT	0	19	8
TT	0	3	0

図1、Apo B遺伝子の多型分析部位



66 1E49 ラット培養中枢神経細胞に対するアポリポ蛋白Eの作用: アイソフォーム特異性の検討

道川 誠、福山隆一、柳澤勝彦
(国立長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部)

〔 要約 〕

アポリポ蛋白E (ApoE) のallele ε4の発現がアルツハイマー病発症の主要な危険因子であることが明らかにされた(1)。しかし、その表現型であるApoE4のアルツハイマー病発症に関わる分子機構は不明である。ApoE4-特異的な効果を細胞レベルで明らかにするため、我々はラット大脳皮質および海馬神経細胞を無血清培地で培養し、ApoEのアイソフォーム特異的な効果を検討した。 その結果、コレステロールの *de novo* 合成系を抑制した培養系においてApoE4投与神経細胞の神経細胞死の増加が認められた。以上の結果、ApoE4の神経細胞に対するアイソフォーム特異的効果は神経細胞の細胞外コレステロールへの依存が高まった状態において、明らかになることが示唆された。

[実験方法]

I. 神経細胞培養

胎生期18日目のラット胎仔の大脳皮質および海馬を取り出し、トリプシン処理を経てパスツールピペットで単離させpoly-D-lysineでコートしたプラスチックカバースリップ上に培養した。細胞密度は Falcon の6 well dish に 25,000/well とし、well のなかに置かれたプラスチックカバースリップ (径22mm)上に細胞を接着させた。培養後6時間で DMEM/F12+N2の無血清培地に切り替え、家兎β-VLDL (cholesterol 50～500μg/ml)、リコンビナントhuman ApoE3 (25μg/ml)および E4(25μg/ml)、compactin (10～1000nM)等を添加した。ApoE3 および E4 は β-VLDL と投与前に23° Cで30分間インキュベートし、E3、E4-enriched β-VLDLとして使用した。

II. コレステロール*de novo*合成量の測定

上記 I によって分離した神経細胞を poly-D-lysineをコートした径 6cm のdishに密度 1 x 10^5/cm^2で培養し、3日目に compactinを300nMの濃度で添加した。翌朝18時間後に [^{14}C]-acetateを2μCi/dishで添加し、1時間のインキュベーションを経て洗浄後、細胞を掻き取りcell lysetをFolch buffer中に混和させた。脂質を有機溶媒相に抽出後TLCでコレステロールを分離、シンチレーションカウンターで定量した。

[結果]

I. 培養細胞におけるコレステロール合成に対してcompactinは100nM、500nM投与でそれぞれ対照群に比し46、44%に抑制された (図1)。

II. 海馬および大脳皮質神経細胞培養の位相差顕微鏡写真(図2) に示すとおり、培養24時間から48時間後にはβ-VLDL+compactin+ApoE4投与群でのみ明らかな神経細胞死の増加が認められた。全体の細胞に対する神経細胞死の割合はコントロール群が20%であるのに対しβ-VLDL+compactin+ApoE4投与群では43%を呈した。

[考察]

ApoEのアイソフォーム特異的な神経細胞生物学的効果に関しては既にNathanらにより報告されている(2,3)。今回の結果はApoE4の効果が *de novo*のコレステロール合成系を抑制することによって、細胞外コレステロールへの依存度が高まった状態で明らかになることを示唆している。コレステロールの*de novo*合成は老化脳(4)や神経損傷(5)において低下することを考えると、今回の実験結果はアルツハイマー病におけるApoE4の役割を検討する上で興味深い。

[文献]

1. Strittmatter W.J. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 1977-1981 (1993)
2. Nathan B.P. et al., Science 264, 850-852 (1994)
3. Natha n B.P. et al., J. Cell Biol. 270, 19791-19799 (1995)
4. Fukuyama R. and Yanagisawa K., Soc. Neurosci. Abst. 22, in press (1996)
5. Goodrum J.F., J. Neurosci. 54, 1709-1715 (1990)

図1

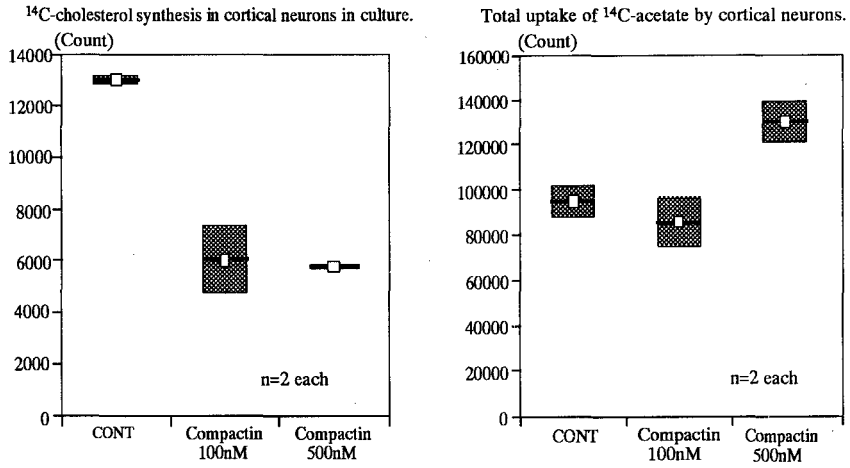
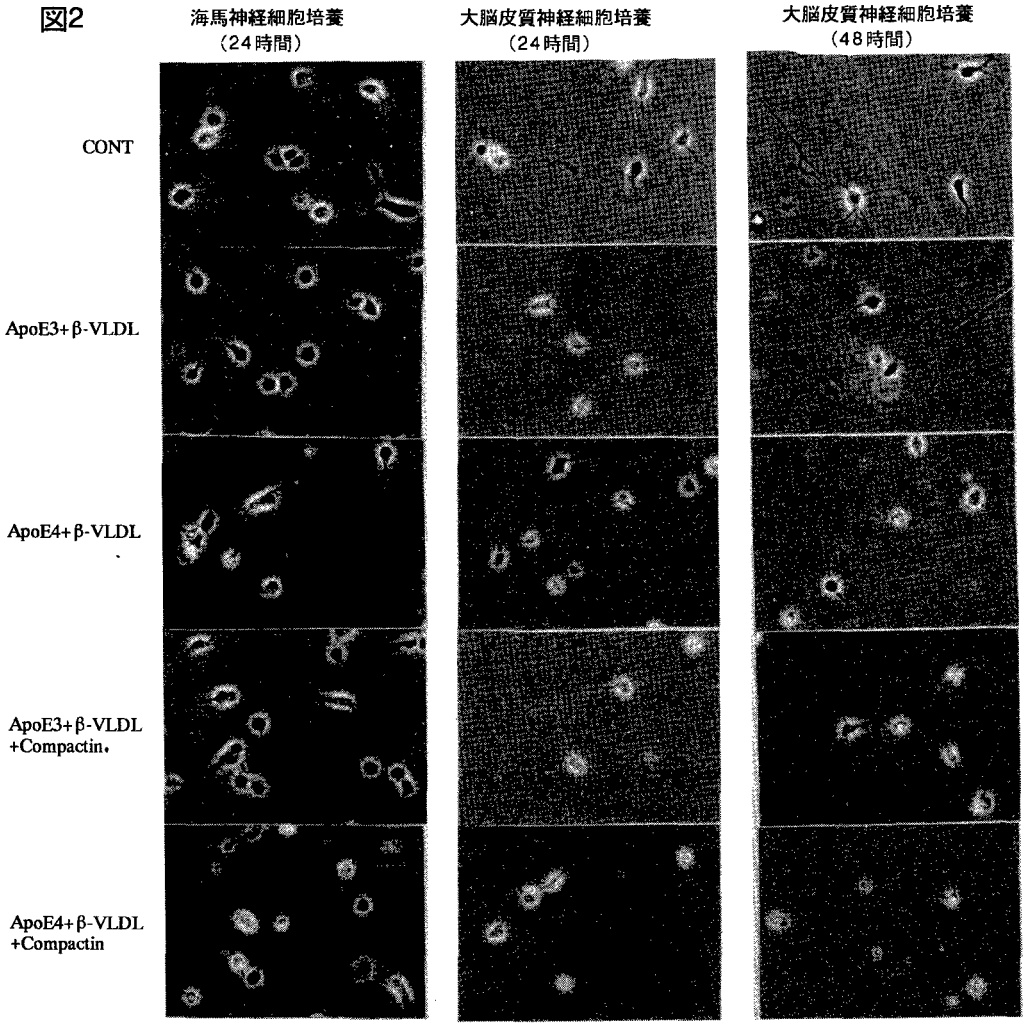


図2



Six hours after plating, cultures were exposed to the following reagents for 24hr or 48hr:
None(CONT), 25μg/ml ApoE3 and ApoE4, β-VLDL(cholesterol 50μg/ml) and 300nM compactin.

67 トランスフェリンの多型性とアルツハイマー病

1Cp9

行方 和彦[1]、今川 正樹[2]、小山 文隆[1]、井原 康夫[1]
([1]東京大学医学部脳研病理、[2]兵庫県立尼崎病院 精神科)

〔 要約 〕

生体内で鉄を運搬するトランスフェリン (Tf) には等電点の違いで分けられる多型性がある。C1とC2と呼ばれる2つの型がほとんどを占め、日本人における頻度はそれぞれ0.765、0.227である。われわれはアルツハイマー病 (AD) 患者 (60歳以上発症例) および非AD患者から得た血清を用いて、両群におけるTf型の頻度を比較した。C2の頻度は非AD群では0.227であったが、AD群では0.284であった。この両群間における頻度の差を統計的に検討するために、C2キャリアーと非C2キャリアーに分けてχ^2検定を行ったところ3%以下の危険率で有意差が認められた。すなわち、late-onset AD群ではC2キャリアーの割合が非AD群よりも有意に高かった。これはTfが、α 1-antichymotrypsin (ACT) やvery low density lipoprotein (VLDL) receptor と同様に、弱いながらもADのリスクファクターとして働くことを示すものである。

〔 目的 〕

ADの主要病変の一つの老人斑にトランスフェリン (Tf) が沈着することが知られている[(1)]。また治療において鉄剤の投与が有効であることが最近報告されている[(2)]。したがって生体内で鉄を運搬する機能を有するタンパクであるTfがAD発症に関与する可能性が示唆される。Tf には等電点電気泳動で分類が可能な多型が知られており、B、C、D型に大別される。これらはさらに細かく分類され、CにおいてはC1-C13までの13個の型が存在する[(3)]。主要な型はC1とC2で、日本人における頻度は、C1が0.765、C2が0.227である[(4)]。両者の頻度の合計は9割以上を占める。本研究の目的はAD群におけるTf の多型を調べ、それが非AD群と異なるかどうか、ADのリスクファクターとなりうるかどうかを明らかにすることである。

〔 実験方法 〕

1. 患者 : 60歳以降に発症した(late-onset) 弧発性のAD患者を対象にした。対照群には年齢層の一致した非AD患者を用いた。ADの臨床診断はNINCDS-ADRDAに基づいて行った。

2. 等電点電気泳動 : Tfの表現多型の決定はKishiらの報告に従い、等電点電気泳動およびイムノブロット法で行った[(5)]。

3. 統計解析 : χ^2検定を行った。

〔 結果 〕

われわれの非AD群ではTf多型の頻度はC1が0.773、C2が0.227であり、Shibataらの日本人のデータ[(6)]に近かった。これに対し、AD群ではC1が0.708、C2が0.284であった (Table1)。このことからAD群ではC2の頻度が非AD群よりも高いことがわかった。多

型頻度の差を統計的に解析するため、C2キャリアーと 非C2キャリアー に分類し、両群を比較した。AD群ではC2キャリアーの割合が51.7%であった。他方、非AD群では39.0%であった(Table 2)。χ^2検定の結果、両者間に危険率3%以下で有意差が認められた。つまり、AD群ではC2のキャリアーの割合が非AD群に比べて有意に高かった。

〔 考察 〕

AD脳内老人斑へのTfの沈着、ADの治療における鉄剤の有効性からAD発症においてTfが関与する可能性が考えられた。すでに、Rensburgらは南アフリカの20人のAD患者でTf多型性を解析し、C2キャリアーが65%(n=13)あり、非AD群よりもC2の頻度が有意に高いとされた[5]。しかし当研究は例数が非常に少なく、その結論が信頼できるかどうか不明であった。本研究は充分な例数を分析することによって、late-onset AD群ではC2キャリアーの割合が非AD群よりも有意に高いことを示した。したがって、C2は弱いながらもlate-onset ADのリスクファクターとして考えることが出来る。その機序は現在のところ全く不明だが、C1とC2との間には何らかの機能的な差異が存在し、それがAD発症のリスクを拡大しているものと考えられる。

〔 文献 〕

1. Connor, J.R. et al. J. Neurosci. Res. 31, 75-83 (1992).
2. Imagawa, M. et al. Lancet 340, 671 (1992).
3. Kamboth, M.I. et al. Hum.Hered. 37, 65-81 (1987).
4. Shibata, K. et al. Jpn. J. Hum. Genet. 28, 17-27 (1983)
5. Kishi, K. et al. Forensic Sci. Int. 45, 225-229 (1990).
6. Van Rensburg et al. NeuroReport 4, 1269-1271 (1993).

Table 1. AD患者群と非 AD群における C1 とC2 の頻度

	AD患者群 (n=118)	非AD群 (n=264)	Sibata et al.[4] (n=342)
C1	0.708	0.773	0.765
C2	0.284	0.227	0.227

Table 2. AD患者と非 ADにおける C2 キャリアー

	AD患者群 n=118	非AD患者群 n=264
C2キャリアー	52 % (61)	39 % (103)
非C2キャリアー	48 % (57)	61 % (161)

非AD (264検体) とAD患者 (118検体) をそれぞれC2キャリアーと非C2キャリアーに分類した。χ^2検定の結果、χ^2 値は5.35 危険率 p値は0.02 となり有意差が認められた。

68 1E50 アルツハイマー型痴呆脳におけるアデニル酸シクラーゼI型、II型およびV/VI型の量的変化について

山本 恵、小澤 寛樹、八田 慎一*、橋本 恵理、齋藤 利和**、大鹿 英世*、
高畑 直彦
(札幌医科大学神経精神講座、*同大学薬理学講座、**同大学医療学部作業療法学科)

〔要約〕
アルツハイマー型痴呆(DAT)死後脳において、ヒトのアデニル酸シクラーゼ(AC)I型、II型およびV/VI型各サブタイプ(AC-I, AC-II, AC-V/VI)と相補的な塩基配列に対するポリクローナル抗体を用いて免疫反応性の変化を検討した。各抗体の性質はその認識部位と相補的配列をもつペプタイドを用いたPreabsorption、動物種による差、組織分布及びVI型を強制発現させた培養細胞でのブロッティングにより確認した。DAT死後脳では神経組織に特異的に分布するAC-I, AC-IIの免疫反応性の有意な減少がみられた。広範囲な組織分布を示すAC-V/VIについては増加傾向を認めた。以上より神経組織に特異的なACサブタイプがDATにおいて疾病病理学的に重要な役割をもつ可能性が示唆された。

〔目的〕これまでにDAT死後脳において促進性G蛋白質(Gs)の機能の低下によりcAMP産生が低下すること(1,2)、抑制性G蛋白質(Gi)機能は保たれていること(3)、また各G蛋白質の免疫反応性には変化がないこと(4)などが報告されている。したがってこれらのG蛋白質-AC機能の変化はAC自身の変化を反映している可能性がある。そこで今回、mRNAレベルで8種類のサブタイプが見つかっているACの中で、脳に特異的に存在するAC-IおよびAC-IIと広範囲の組織分布を示すAC-V/VIについて、米国サンタ・クルズ社のポリクローナル抗体を用い、ウェスタンブロッティングを行い、その免疫反応性の変化について検討すると同時にサブタイプ間の差についても比較した。

〔実験方法〕対象としては臨床及び病理組織学的にDATと診断された群と、年令、死後経過時間をマッチさせた精神神経疾患の既往のない対照群の死後脳を用い、大脳皮質頭頂葉の膜標本を作成した。対照群の1例を用いてイムノブロッティングを行い、デンシトメーターの計測値はAC-Iで1-50ug, AC-II及びAC-V/VIで1-100ugの範囲内で蛋白質量に比例した。よって本研究では膜標本量を、AC-Iで20ug、AC-IIおよびAC-V/VIでは50ugに決定した。これらの蛋白質量を含む各膜標本を4-12% SDSポリアクリルアミドゲルにて蛋白質電気泳動後、Towbinらの方法によりニトロセルロース膜に転写した。この膜を3%BSAを加えたTBS-T buffer[10mM Tris-HCl(pH7.5), 500mM NaCl, 0.1% Tween 20] 中で1時間ブロッキングした後、1000倍に希釈したACサブタイプに対するそれぞれの抗体を用いて1時間インキュベートした。その後AC-Iの検出では2500倍、AC-II及びAC-V/VIの検出では1000倍に希釈した第二次抗体(anti-rabbit Ig HRP-linked F(ab')2)を用いて1時間インキュベートした。検出システムにはECL(Amersham)法を使用した。免疫反応性はレーザー・デンシテメーターにて解析し、測定値の標準化にはヒト大脳皮質膜標本(human brain standard)を用いた。また実際の死後脳における検索の前に、使用した抗体の性質を各抗体の認識部位と相補的配列をもつペプタイドを用いたPreabsorption(1000倍希釈した一次抗体溶液1mlあたり0.01-1ugのペプタイドを加え、4℃にて一晩インキュベートした後、抗体と相補的ペプタイドが反応して形成された免疫複合体を室温にて3000回転、30分の遠心により沈降させ、得られた上清を一次抗体溶液として使用)、動物種による差、組織分布及びVI型を強制発現させた培養細胞でのブロッティングを行うことにより確認した。

〔結果〕
①Preabsorptionではペプタイドが十分量存在する場合、通常のブロッティングで得られるバンドが完全に消え(Fig. 1)、またこの免疫反応性の減少は用量依存的であった。
②ラットではPreabsorptionを行わないときでもバンドがみられず、I型の抗体がヒトのAC-Iに固有の塩基配列を認識していることが確認された(Fig. 1)。
③ヒトの組織において、AC-I及びAC-IIは脳に特異的に分布することが確認された。

④AC-V/VIについては、ヒト及びラットにおいて期待される分子量範囲に単独のバンドを認め、またAC-VIを強制発現させたHEK293細胞の膜標本で同様の範囲に顕著なバンドを認めることから確認された。
⑤実際の死後脳での検討では、DAT群で対照群に比べ、AC-I及びAC-IIはそれぞれ約40%、約50%と有意な免疫反応性の減少を認めた。AC-V/VIについては有意差は認めないものの増加傾向がみられた（Fig. 2,3）。

〔考察〕従来の報告からcAMPは学習及び記憶のメカニズムの中で重要な役割を持つと考えられているが、ヒトを含めたほ乳類の高次脳機能における詳細な意義については不明な点が多い。しかしcAMPはその情報伝達の下流にあるcAMP response element binding protein (CREB) などを通じて転写調節を行い、シナプスの可塑性ということに寄与している。最近、AC-IやCREBなどのKnock-outマウスが作成されこれらの実験動物において海馬におけるLTP（長期増強）が障害されるということが言われており、また同時に空間認知力も障害されるという報告がある。現在、DAT脳ではcAMP産生の低下が一致した見解として認められており、神経組織に特異的なサブタイプであるAC-I, AC-IIの有意な減少をDAT群において認めた今回の結果はこのことを蛋白分子レベルから支持するものであり、ACがDATの疾病病理に重要な役割をもつ可能性が示唆された。

〔文献〕

(1)Ohm, T.G., Bohl, J. and Lemmer, B. (1991) Brain Research, 540, 229-236.
(2)Cowburn, R.F., O'Neill, C., Ravid, R. and Alafuzoff, I. (1992) J. Neurochem. 58, 1409-1419.
(3)Cowburn, R.F., O'Neill, C., Ravid, R. et al. (1992) Neuroscience Letter 141, 16-30.
(4)McLaughlin, M., Ross, B.M., Milligan, G. et al. (1991) J. Neurochem. 57, 9-14.

本実験に用いた死後脳はWuerzburg大学（独）より、またAC-VI強制発現HEK293細胞はColorado大学（米）より提供されたものである。

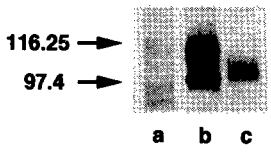


Fig. 1. Immunoblot analysis of AC-I. a:human (preabsorption), b:human (normal blot), c:ratcortex. Molecular weight (kDa) markers are indicated at left margin of the figure.

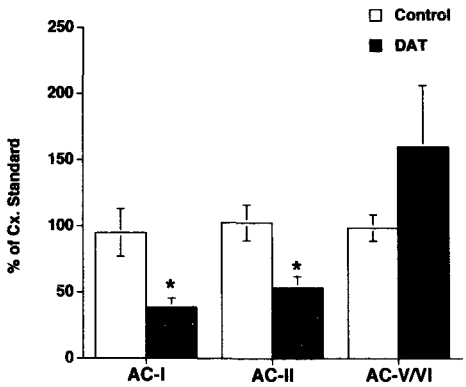


Fig. 3. Results of densitometric analysis of immunoreactivities of AC-I, AC-II and AC-V/VI
*:P<0.05

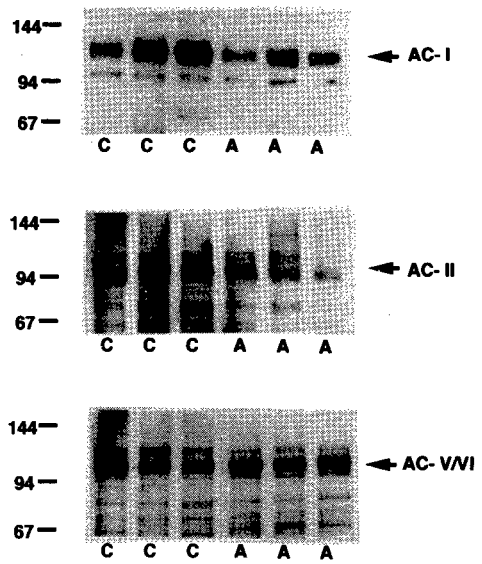


Fig. 2. Representative immunoblots of AC-I, AC-II and AC-V/VI. C:control, A:DAT. Molecular weight (kDa) markers are indicated at left margin of the figure.

69 1E1 生後脳において顆粒細胞層に特異的に発現する新規 zinc finger 遺伝子 *gcz* のクローニング

松本 和政、遠山 正彌*、塩坂 貞夫
奈良先端科学技術大学院大学・細胞構造、*大阪大学・医・第2解剖

〔 要約 〕
神経細胞分化の多様性及び特異性を制御する分子機構を理解する上で、特定の神経細胞系譜に特異的な発現を示す遺伝子、特に転写調節因子の解析は重要である。我々は生直マウス脳 cDNA ライブラリーより生後脳において領域特異的な発現を示す新規遺伝子 *gcz* を単離した。*gcz* は zinc finger モチーフを含む52アミノ酸から成る独特のリピート構造を有しており、生後脳ではその強い発現が小脳の顆粒細胞層に、弱い発現は嗅球及び海馬歯状回の顆粒細胞層に限局していた。以上の領域では胎生期から成熟期に至るまで一貫して *gcz* が発現していることから、*gcz* は顆粒細胞の発生分化及びその細胞系譜の維持に関わる可能性が考えられる。

[序論]

脊椎動物の中枢神経系は極めて多様な神経細胞から構成され、それぞれの神経細胞が形態、生理、伝達物質、シナプス結合などのその細胞に固有の特徴を有している。こうした神経細胞分化の著しい多様性は遺伝子レベルで規定されている可能性が考えられる。ショウジョウバエや線虫などの無脊椎動物では、神経細胞の特異性の決定に際しスイッチとして働く遺伝子が存在することが明らかにされているが、脊椎動物神経細胞の特異性獲得を制御する分子機構は未だ不明の点が多い。

このような神経細胞分化の特異性を理解する上で、特定の神経細胞系譜に特異的に発現する遺伝子の解析は重要なアプローチの1つであると考えられる。我々はそのような遺伝子を探索する過程で、生後脳において顆粒細胞系譜に特異的に発現する新規遺伝子断片（*gcz*; granule cell layer-specific zinc finger gene と命名）を単離することに成功した[1]ので、塩基配列ならびに発生過程における発現パターンの詳細な解析を試みた。

[方法]

1. *gcz* のクローニング及び塩基配列の決定：^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドをプローブとして生直マウス脳 cDNA ライブラリー（Stratagene 社）をスクリーニングすることにより、*gcz* オリジナルクローンを得た。ついでこのオリジナルクローンをプローブとして同様のライブラリーをスクリーニングすることにより、*gcz* の全長 cDNA の単離を試みた。得られたクローンの塩基配列はダイデオキシターミネーター法により解析した。

2. ノザンブロッティング：成熟マウスの各種臓器及び様々な発生段階でのマウス脳から AGPC 法により total RNA を抽出し、各々 20μg の RNA を泳動分離した後、ナイロン膜に転写した。プローブとしては放射能ラベルした *gcz* オリジナルクローンを用い、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は常法に従った。

3. in situ hybridization 法：*gcz* オリジナルクローンをテンプレートとして、^{35}S で標識したアンチセンス及びセンス cRNA プローブを作製した。胎生期マウス脳の矢状断切片及び生後マウス脳の水平断切片において常法通りハイブリダイゼーションを行い、乳剤オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。

[結果および考察]

gcz オリジナルクローンの塩基配列を解析した結果、この遺伝子断片は既知遺伝子とはホモロジーがなく、オープンリーディングフレームの中程に位置しており、335アミノ酸をコードしていると考えられた。このアミノ酸配列には2箇所の zinc finger モチー

フが存在していたが、以下の2点のような他のzinc finger蛋白質にはみられない独特の特徴を有していた。1) *gcz*の2箇所のzinc fingerモチーフは約150アミノ酸から成るプロリンリッチな領域で連結されて飛び石状に存在しており、2) zinc fingerモチーフを含む52アミノ酸から成る2箇所の領域はそのうちの50アミノ酸が同一という極めて相同性の高い繰り返し領域であった（図1）。この繰り返し領域はzinc finger蛋白質には全くみられない配列であり、新たな機能ドメインである可能性も考えられる。

ノザンブロットによる解析の結果、*gcz* mRNAは7.5kbと4.1kbの2本のバンドとして検出され、alternative splicingが生じている可能性が示唆された。成熟マウス各臓器のなかでは脳にのみ発現が観察され、脳では発生を通じて一貫して発現しているものの、周生期に特に強い発現が観察された。

次に我々はin situ hybridization法により各発生段階でのマウス脳における*gcz*の詳細な発現部位を検討した。胎生期では終脳胞、中脳、小脳原基にその発現が観察されたが、小脳原基では胎生後期に形成される外顆粒細胞層に限局した発現を示した。生後脳では前脳、中脳での強い発現は消失し、小脳顆粒細胞層にのみ強いシグナルが観察された（図2）。また、弱い発現は嗅球及び海馬歯状回の顆粒細胞層に認められた。

gczは小脳顆粒細胞系譜に発生を通じて一貫して強く発現していることから、小脳顆粒細胞の発生分化及びその細胞系譜の維持に関わる可能性が考えられる。生後脳の小脳顆粒細胞には、*zic*[2], *En2*[3], *oct-1*[4]などの転写調節因子群が発現しており、これらの因子の相互作用が小脳顆粒細胞系譜の規定に関わると考えられているが、*gcz*もこれら転写調節因子カスケードの一助を為す可能性がある。嗅球や海馬歯状回の顆粒細胞に弱い発現が観察されることを考え合わせると、*gcz*は形態、シナプス結合、発生時期などこれら顆粒細胞群に共通した特徴を規定する因子であることが示唆される。

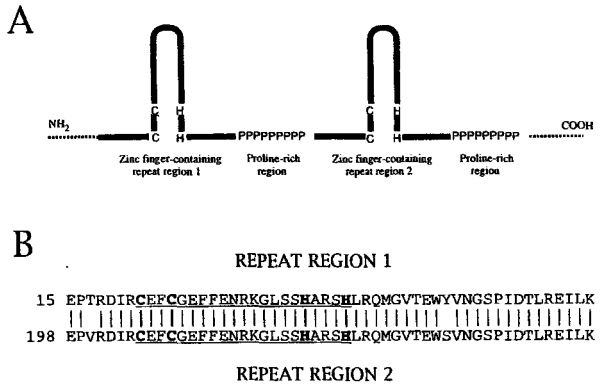


図1
A. *gcz*の1次構造の模式図
B. zinc fingerモチーフを含む2箇所の繰り返し領域のアミノ酸配列のアライメント

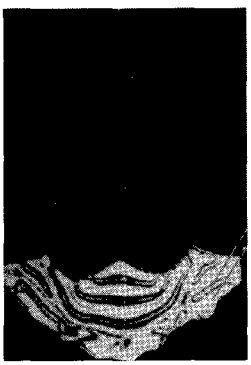


図2
生後10日齢マウス脳における*gcz* mRNAの発現部位

[参照文献]

1. Ishii N., Matsumoto K., Wanaka A., and Tohyama M. in preparation.
2. Aruga J., Yokota N., Hashimoto M., Furuichi T., Fukuda M., and Mikoshiba K. *J. Neurochem.* 63 (1994) 1880-1890.
3. Davis C.A. and Joyner A.L. *Genes Dev.* 2 (1988) 1736-1744.
4. He X., Treacy M.N., Simmons D.M., and Ingraham H.A. *Nature* 340 (1989) 35-42.

70 神経分化過程で一過的に誘導される新規神経ペプチド遺伝子 *N23K/N27K*

1Aa1

斎藤祐見子[1] 川野仁[2] 丸山敬[1、3] 川村光毅[2] 西道隆臣[1] 川島誠一[1]
1 東京都臨床研・遺伝情報 2 慶応大・医・解剖 3 国立生理研・神経化学

〔 要約 〕

我々はマウス NS20Y 細胞からサブトラクション／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、しかし一過的に増加する遺伝子 *N27K* と *N23K* を cDNA クローニングしてきた。マウスにおいて *N23K/N27K* mRNA は脳・脊髄にのみ検出でき、脳発生過程での発現が一過的である。驚いたことに本タンパク質中にはごく最近単離された新規のオピオイド系神経ペプチド nociceptin/orphanin FQ を含むことが判明した。*N23K* タンパク質、*N27K* タンパク質それぞれに対する特異抗体を用いることにより、NS20Y 細胞の神経分化過程及びマウス神経発生過程を免疫組織化学で検討したところ、分化とともにその局在はダイナミックな変動を示した。これらのことから *N23K/N27K* タンパク質は成体と神経発生期とでは別の作用を持つ dual な機能分子であることが考えられる。

マウス NS20Y 細胞は天野らにより脳腫瘍 C1300 からクローニングされた cell line であり、dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP)によりコリナージックな性質を持つ神経細胞へと分化する(1)。このため神経分化機構の研究に適した培養モデル系と考えられる。そこで、我々は神経分化に関連した遺伝子を NS20Y 細胞からサブトラクション/プラスマイナス法を用いることにより探索してきた。これらのうち、神経分化の過程でその mRNA の発現が一過性に増加する遺伝子 *N23K/N27K* を得た。ごく最近、我々とは全く異なったアプローチにより新規神経ペプチド nociceptin/orphanin FQ が発見され(2,3)、意外なことに我々が新規神経分化関連遺伝子として単離した *N23K/N27K* はそのペプチドをコードする遺伝子であることが判明した (4,5)。今回それぞれの特異抗体を作成することにより *N23K/N27K* タンパク質の局在の変動を in vivo, in vitro の神経分化過程で検討したので報告する。

（方法）サブトラクション/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、ラムダ ZAP システムにより cDNA ライブラリーを作成後、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、サブトラクター(Invitrogen)によりサブトラクションライブラリーを作成した。このライブラリーからプラスマイナス法と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。*N27K* の５末側への延長は RACE 法及び *N27K* の５末側特異プライマーからのライブラリー作成・スクリーニングにより行った。**抗体の作成** *N23K* タンパク質と *N27K* タンパク質それぞれのC末端の１５推定アミノ酸に対するペプチド抗体を作成し、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。**ウエスタンブロット** NS20Y 細胞、マウス脳の抽出液を 12.5%または 15%ポリアクリルアミド SDS ゲルにて分離後、PVDF 膜にブロットし、免疫反応後アルカリフォスファターゼ法または ECL 法にて発色した。**免疫組織化学** NS20Y 細胞はパラホルム

アルムデヒド固定後、0.05% TritonX-100 にて膜を可溶化し、常法により蛍光免疫染色した。エーテル麻酔下に ICR マウスよりとりだした胎児は、氷冷ブアン固定後、パラフィン包埋して５μm 切片を作製した。免疫染色は DAB を基質として行った。

（結果及び考察）1. サブトラクション/プラスマイナス法により分化に関連した神経系特異的遺伝子 *N27K* と *N23K* を cDNA クローニングした。 *N23K* は *N27K* に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。*N23K* と *N27K* が指令するタンパク質はアミノ酸数 187,212 個で、1-185 個までは共通で、両者の違いはＣ末端にある。両者の推定アミノ酸中には、ごく最近発見された新規オピオイド系神経ペプチド nociceptin/orphanin FQ を含む。**2.** 抗体作成によりタンパク質としての動態を検討した。*N23K/N27K* がコードするタンパク質はウエスタンブロット上でそれぞれ 23kDa, 27kDa である。その 23/27kDa タンパク質は、未分化 NS20Y 細胞ではほとんど検出できないが、dbcAMP 添加後 12 時間で出現し始め、48 時間で最大になり、120 時間で減少する。この時間経過は mRNA の場合と一致する。どの段階においても processing form と見られる低分子量のバンドは検出できない。**3.**抗体により NS20Y 細胞を免疫染色したところ、*N23K,N27K* タンパク質はともに突起伸長に伴い突起先端にドット状に局在するが（図１）、ネットワーク形成時には非常に減少する。**4.**マウス神経発生過程では陽性反応は胎生期 12 日より神経管周辺に存在する幼弱なニューロンに出現し、新生仔期には中枢神経系のほぼすべてのニューロンが陽性を示す。一方、成熟マウスでは陽性反応は特定のニューロンに限られる。以上の結果から、*N23K/N27K* が発生過程を通じて異なる働きをする dual な機能分子である可能性が示された。神経分化過程におけるこのような動態は従来の神経ペプチド前駆体の概念を越えるものであり、本分子はオピオイドファミリーの中でも特異な位置に属することが考えられる。

（文献）1. Amano,T., Richelson,E., Nirenbeg,M. PNAS 69, 258 (1972) **2.** Meunier,JC., Mollereau,C., Toll,L., et al. Nature 377, 532 (1995) **3.** Reinscheid,RK., Nothacker,H., Bourson,A., et al. Science 270, 792 (1995) **4.** Saito,Y., Maruyama, K., Saido,TC., et al. BBRC 217, 539 (1995) **5.** Saito,Y., Kawano,H., Maruyama,K., et al. J.Biol.Chem., 271, 15615 (1996)

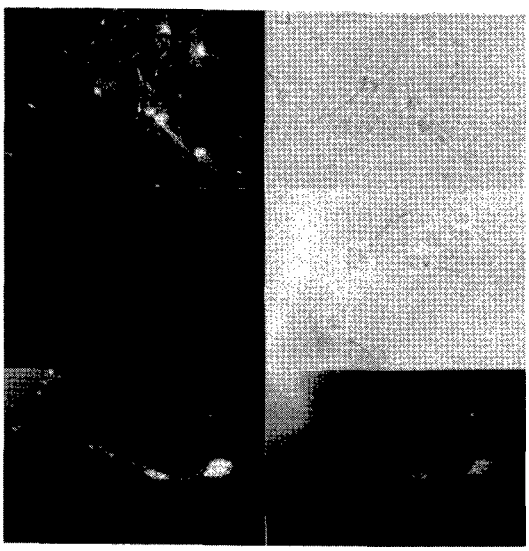


Fig.1 DbcAMP 処理をした NS20Y 細胞における *N27K* protein の局在

NS20Y 細胞を 1mM dbcAMP で 48 時間処理後、各抗体により蛍光免疫染色を行った。 **(上段)**.抗 *N27K* タンパク質抗体
左側： 免疫染色像　右側：位相差像
（中段）抗 N27K タンパク質抗体を相当するペプチドで吸収して免疫染色を行ったところ、上段で見られるような染色像は完全に消失する。**（下段）**同視野二重染色像を示す。左側：抗 *N27K* タンパク質抗体　右側：抗 secretogranin I 抗体　*N27K* タンパク質 の局在は secretgranin I の局在とオーバーラップする。

71 1Aa2 分化発達するラット小脳における Glucose Transporter (GLUT) 1と3の発現

百木忠久*，中山孝，井上順雄，佐藤忍*，関原久彦*，加藤尚彦
（横浜市大・医・生化I，*内科III）

〔要約〕

ラット小脳は出生後発達し，主な構成神経細胞である顆粒細胞が分化成熟する．その過程を明らかにするため，新たにMicro-Western blot法を工夫して，発達する小脳のGLUTのisoforms (GLUT1とGLUT3)の放射免疫定量を行った．小脳HomogenateのGLUT1（45 kDa, astroglia特異的；55 kDa, 血管内皮細胞特異的）は，共にP7からP21迄増加してほぼadultの半量に達し，GLUT3（45 kDa, 神経細胞特異的）はP7より急速に増加しP21でほぼAdultの値に達した．GLUT3は樹状突起と軸索に富む分子層でP7以後急激に増加し，GLUT1 (45 kDa) は分子層と顆粒細胞体から成る(内)顆粒層で，P7以後adultまで漸増した．GLUT1(55 kDa)は白質を含む各層で殆ど変わらず，外顆粒層では分化萎縮するP7まで，全てのGLUTが減少した．

細胞内へのグルコース取り込み機構として，ラット中枢神経系ではGLUTのisoformsの内，GLUT1 (45 kDa) が脳血液関門を形成するアストログリアに，GLUT1 (55 kDa) が毛細血管内皮細胞に(6)，GLUT3 (45 kDa) が神経細胞に特異的に発現している(5)ことが知られている．ラット小脳は出生後発達し，主な構成神経細胞である顆粒細胞が分化成熟する(1)ので，その過程を発達する小脳を試料としてGLUTを調べて明らかにすることを目的とした．

実験方法 ［組織試料］出生直後P0から21日齢P21，および成熟ラット（6週齢）の10%小脳Homogenateを調製した．さらに成熟および発達するP0～P21小脳の外顆粒層（神経芽細胞層），分子層，(内)顆粒層，白質層の凍結乾燥切片を調製し，高感度水晶糸バランスで秤量して，そのまま試料（0.13～4.95 μg乾燥重量）とした(3)．［Micro-Western Blot法］1x37x47 mmの小型モールド(4)を用いて，3% アクリルアミド濃縮ゲル（1x37x12 mm）中にmicrowell (1x1x8 mm) を作り，DNase処理した試料（層切片，0.5～12.5 μg乾燥重量；Homogenate，1-4 μg蛋白質）をLaemmliのlysis buffer (2)に溶解して加えた．10% アクリルアミド分離ゲル（1X37x35 mm) 中で40分・30 mm電気泳動して蛋白質を分離した後，PVDF膜にblotした．分離蛋白とGLUT1(472-492)抗体及びGLUT3(474-493)抗体を反応させた後，^{125}I-蛋白質Aを結合させ，Fuji BAS2000 Bio-Image Analyzerを用いて蛋白量を測定した．標準には大脳microsome分画0.25-4.0 μg蛋白質を用い，この直線範囲内で測定した．

結果及び考察 GLUT1には45kDaと55kDaの二つのバンドが見られ（図1），GLUT3は単一バンドを示した．小脳HomogenateではGLUT1は45kDa，55kDa共にP0からP7まで減少し，その後は増加してP21でほぼadult (6Ws)の半量に達した（図2）．これに対しGLUT3量はP0よりP7まで低値で，P7より急速に増加し，P21でほぼadultの値に達した．顆粒細胞体から成る内顆粒層と，その軸索とPurkinje細胞の樹状

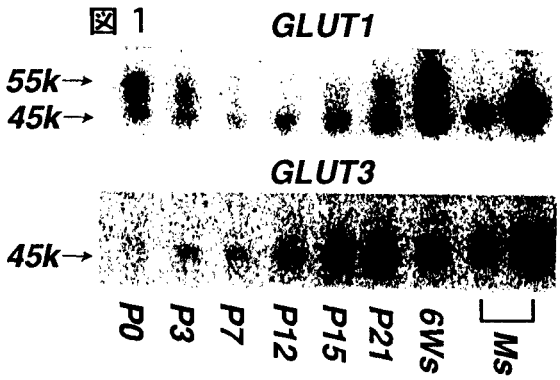
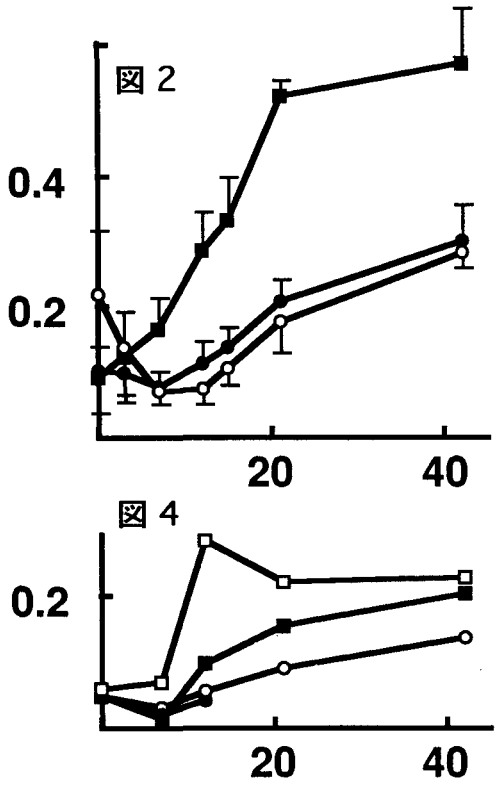
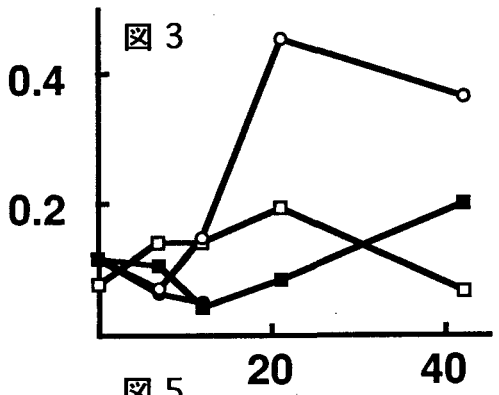
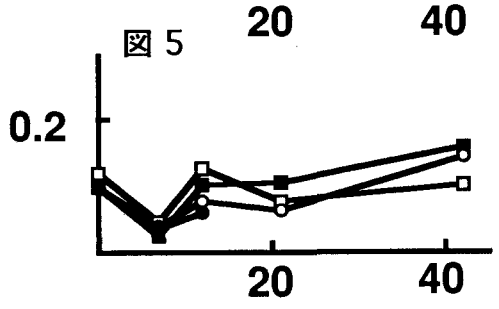


図 1．小脳Homogenate の Micro Immunoblot の例　図の下に日 (P0-21)・週 (6Ws) 齢を示す．GLUT1, 1.0 μg 蛋白; GLUT3, 4.0 μg 蛋白．Ms (0.25-4.0 μg 蛋白) は標準のラット (6Ws)大脳 microsome 分画のシグナルを示す．図 2. 小脳Homogenate のGLUT1 (●, 45kDa; ○, 55kDa) と GLUT3 (■, 45kDa) の出生後変化．　小脳各層の出生後変化．図3, GLUT3；図4, GLUT1 (45kDa)；図 5, GLUT1 (55kDa); ●, 外顆粒層 ○, 分子層; ■, (内) 顆粒層; □, 白質．横軸に出生後日齢を，縦軸に大脳 microsome 分画 1 μg 蛋白のシグナルを 1 として目盛り，GLUT1 とGLUT3の乾燥重量 1 μg 当たりの 相対的発現量を示す．図 2 の縦線は試料 3-5個の SD を示し，図 3-5 （試料数 4-8）では図を見易くする為 SD を省略．







突起を含む分子層では，P7 から P21 にかけて顆粒細胞の分化成熟に伴って GLUT3 が急激に増加し（図３），シナプスと回路網の形成に多量のエネルギー生成が必要であることを示している．GLUT1 (45 kDa)は P12 から adult 迄分子層と内顆粒層で漸増し（図４），成熟に伴う脳血液関門の発達を示唆している．GULT1 (55 kDa)は各層で殆ど変らず（図５），分化成熟中に血管系は一定密度に保たれ，また外顆粒細胞層は GLUT を失って行くと考えられる (図３-５).

［文献］ 1) Altman,J (1972) J Comp Neur, 145: 353-398, 399-464, 465-514;2) Laemmli, UK (1970) Nature, 227:680-685; 3) Lowry,OH and Passoneau,JV (1972) A Flexible System of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York and London; 4) Manabe, T et al (1984) Anal Biochem, 143: 39-45; 5) Nagamatsu, S et al (1993) FEBS Lett 334: 289-295; 6) Vannucci,SJ et al (1994) J Neurochem 62: 240-246.

72 ニューロン特異的核蛋白質 necdin の機能解析

1Aa3

河原 康一、 植月 太一、 斎藤 泉[1]、吉川 和明
(大阪大学・蛋白・機能制御, [1]東京大・医科研・遺伝子解析)

〔 要約 〕ニューロン特異的核蛋白質necdinは細胞増殖抑制作用を持つ。necdin の細胞内での機能を詳細に検討するため、NIH3T3細胞へnecdin遺伝子を導入しstable transformantを作製した。その作製にあたって我々は、アデノウイルスを用いたCre/loxP系による発現誘導制御システムを用いた。細胞株にCre発現アデノウイルスを感染させると殆ど全ての細胞で発現が誘導された。Necdin 遺伝子を発現誘導し細胞数を算定すると、対照に比べて増殖が抑制されていることを見いだした。また核へのBrdUの取り込みを検討すると、対照に比べて著しく低下していた。これらの結果からnecdinはS期移行を抑制して細胞増殖抑制作用を持つことが示唆された。

Necdin は分化直後のニューロンに特異的に発現する核蛋白質である。またnecdin cDNA をNIH3T3細胞にlac repressor-operator expression systemを用いて強制発現させると細胞増殖が強く抑制される (1) 。今回我々は、necdinの機能をさらに詳しく検討するため、Cre/loxP系による発現誘導制御システムを用いた stable transformantを単離し、解析を行った。このシステムはCre組換え酵素を発現するアデノウイルスと、それによって発現が誘導されるstable transformantを組み合わせたものである。誘導前の目的遺伝子産物の発現が極めて少なく、誘導後は強力なCAGプロモーターから目的遺伝子を高発現させることが可能でる。さらにCre組換え酵素発現ウイルスのm.o.i.を上げることによって100%の細胞で目的遺伝子の発現を同時に制御しうるシステムである。こうした特徴により、necdinの機能をより明白に解析できると考えて実験を行った。

方法) ベクターの構築とstable transformant の単離

ベクターとしてCAGプロモーター下流へ両端にloxP配列をもつネオマイシン耐性遺伝子とSV40 poly(A) 配列を組み込まれたプラスミドを用いた。さらにその下流に発現遺伝子としてlacZもしくは、necdin cDNA を挿入したプラスミドを作製した。

これらのプラスミドはリポフェクタミンを用いてNIH3T3細胞に遺伝子導入した。Cre組換え酵素による誘導前にはネオマイシン耐性遺伝子のみが発現しているため、G418を用いてネオマイシン耐性の細胞を選択した (2) 。

発現誘導

発現誘導には核移行シグナル付きCre組換え酵素発現アデノウイルスを塩化セシウムのステップグラジエント超遠心によって精製した標品を用いた。発現誘導ウイルスを感染させ、目的遺伝子の発現を抗体を用いて免疫組織化学及びウェスタンブロットにより確認した。

Necdin 機能の解析

得られたstable transformant にCre組換え酵素発現ウイルスを感染させ発現誘導を行った後、一定時間毎に顕微鏡下で細胞数を数えた。さらに同様の発現誘導を行った後、一定時間毎に 10 μmol/ml BrdU を含む牛胎児血清添加DMEM培地で一時間培養し、抗 BrdU 抗体によりBrdUの染色体への取り込みを検討した。

(結果と考察)

単離されたstable transformant へCre組換え酵素発現ウイルスを感染させ、感染によって目的の遺伝子が発現しているか免疫組織化学で抗体を用いて調べた。その結果、β-galactosidase、necdinを発現する二種の細胞株について、ほぼ100%の細胞で発現が確認された。一方、Cre組換え酵素発現ウイルスを感染させない細胞については、全く発現が確認されなかった。また8時間目までには、necdinの発現が誘導されていることを確認した (図1) 。これらのことから、アデノウイルスを用いたCre/loxP 系

による発現誘導制御システムにより、誘導前の発現が全く見られないのに対し、誘導後は高発現されることが示された。

次にこの細胞株を用いて細胞の増殖性を検討するため、細胞内にnecdin 、β-galactosidase を発現させ、Cre組換え酵素発現アデノウイルス感染後の経過時間と細胞数の関係を調べた。一定の細胞数で培養したそれぞれの細胞株にウイルスを感染させ一定の時間毎に細胞数を算定した。β-galactosidaseを発現させた細胞や非感染細胞では対数増殖を示したが、necdinを発現させた細胞では細胞数の増加が著しく低下した（図2）。さらに同様の発現誘導を行った後 BrdUの取り込みによりDNA合成活性を検討した。その結果 necdin を発現させた細胞において、BrdUを取り込む細胞数が感染後の経過時間とともに低下していくことが明らかになった。一方、β-galactosidaseを発現させた細胞株や非感染細胞では、BrdUが感染後の経過時間に関係なく、一定の割合の細胞で取り込まれていることが示された(図3)。以上の結果より、増殖性の細胞において細胞内でnecdinを発現させると速やかにS期への移行が妨げられることが示唆された。necdinがpostmitotic なニューロンで発現していることと、今回得られた S期への移行の抑制とを考えあわせると、神経細胞の最も特徴的な性質である分裂の完全終了にnecdinが直接関与している可能性が示された。

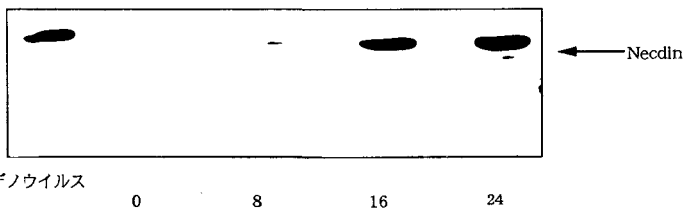


図1 Necdin transformantによるCre組換え酵素発現アデノウイルス感染後の経過時間とnecdin遺伝子の発現
左端のレーンは、necdin cDNAをtransfectionしたCOS-1細胞より調製

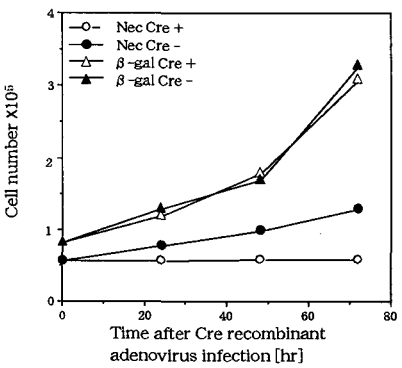


図2 Necdinおよびβ-galactosidase stable transformantによるCre組換え酵素発現アデノウイルス感染後の経過時間と細胞数の比較。

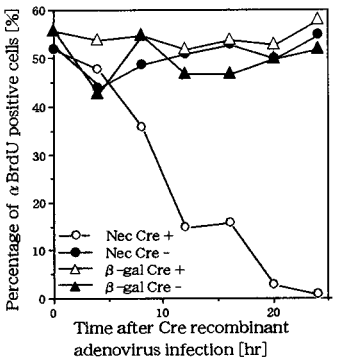


図3 Necdinおよびβ-galactosidase stable transformantによるCre組換え酵素発現アデノウイルス感染後の経過時間とBrdUの取り込み。

（参考文献）
1.Hayashi, Y., Matuyama, K., Takagi, K., Sugiura, H. and Yoshikawa.,K., Biochem.Biophys. Res.Commun.213:317-324(1995)
2.鐘ヶ江裕美、李光、出口裕、佐藤友美、斎藤泉 、蛋白質 核酸 酵素、 40(70) : 43-49(1995)

73 ニューロン特異的核蛋白質necdinに結合する蛋白質の解析

1E2

谷口 直子、 谷浦 秀夫、 吉川 和明
(大阪大学蛋白研・機能制御部門)

〔要約〕Necdinはニューロン特異的に発現している約45kDaの核蛋白質である。そのcDNAクローンはニューロンへの分化誘導を行ったP19細胞のcDNAライブラリーから得られた。本研究では、生理的なnecdin結合蛋白質がニューロンあるいはその発生過程で発現しているかをTwo-Hybrid法を用いたスクリーニングで検討した。レチノイン酸処理したP19細胞のcDNAライブラリーから1種類の陽性コロニーを、ラット脳cDNAライブラリーから陽性コロニーを1種得た。得られた2種のクローンの一次構造から、既に報告されているNEFA及びnucleobindinであることが判明した。これらの蛋白質はHelix-Loop-HelixとLeucine-zipperを含むDNA結合蛋白質であり、これらの蛋白質とnecdinの複合体がニューロン分化時における細胞周期に関連した遺伝子転写の制御機構に関与している可能性がある。

P19細胞はマウスのEC(胚性がん)由来の細胞株で、レチノイン酸処理によりニューロンに分化し、in vivoでの神経系細胞発生をよく反映している。我々はP19細胞がニューロン分化する際に特異的に発現するmRNAを解析し、新規の遺伝子necdin cDNAをクローニングした(1)。Necdin cDNAをNIH3T3細胞に導入して強制発現させると細胞増殖が強く抑制される(2)。necdinの塩基性アミノ酸領域とそれに続くhydrophobic heptad repeat (7アミノ酸ごとのLeucine[Isoleucine]残基の繰り返し配列)を含む領域(Fig.1)がlargeT抗原との結合に必要であることも明らかになった(谷浦発表予定)。Oncoproteinであるlarge T抗原が結合するpRbやp53のように、necdinにも特異的な結合蛋白質がニューロンあるいはその発生過程で内在的に存在することが示唆される。したがって、この細胞内結合蛋白質の探索を行った。

[方法]

酵母Two-Hybrid 法 目的の蛋白質のcDNAを GAL4 DNA binding domain 配列をコードするベクター(pGBT9)あるいは、GAL4 activation domain 配列をコードするベクター(pGAD424) にクローニングした。LiAc法により調整したSFY526 competent cells を両プラスミド (~0.5 μg)で transformさせた。トランスフォーマントは、Leucine,Tryptophanを欠いた培地で選択した。二種の蛋白質の相互作用の判定は、X-Gal を用いてβ-galactosidase assayを行った。 pGBT9-necdin (102-325)を用いて、pGAD424ベクターに組み込まれたラット脳cDNAライブラリー(CLONTECH)とレチノイン酸処理をしたP19細胞から作製した cDNAライブラリーをスクリーニングした。β-galactosidase陽性コロニーから回収したcDNAはdideoxynucleotide chain termination法により DNA シークエンスを行った。

[結果と考察]

Necdin結合蛋白質のスクリーニング Necdinはニューロン特異的にその初期発生段階から発現していることから、まずレチノイン酸処理したP19細胞のcDNAライブラリーから、Two-Hybrid法による蛋白質間の結合活性を指標にスクリーニングした。pGBT9-necdin (102-325)を用いて約10^5個のコロニーをスクリーニングし、2種類の陽性コロニーを得た。その内の得られたcDNA ; nbp 1 (necdin binding protein 1)のDNA配列と予想されるアミノ酸配列をFig.2に示した。ホモロジー検索の結果、DNA配列では human NEFA cDNA (639-1260bp)と85%の、またアミノ酸配列ではhuman NEFA(213-420)と87%の相同性があり(6)、nbp 1はマウスNEFAと推測された。またラット脳 cDNAライブラリーからも同様にしてnecdinと結合活性を示すcDNAクローンが一つ取られた。得られたcDNAのDNA配列からそのクローンはhumanNEFAと高い相同性のあるラットnucleobindinであることが明らかになった(7)。Two-Hybrid法によりnbp 1,nbp 2 両クローンともp53やpRbとは結合活性を有さず、necdinに特異的に結合する蛋白質をコードしていることが明らかになった。Fig.3AにhumanNEFAの構造を模式図で示した。NEFAとnucleobindinには共に、basic(A)/Helix-Loop-Helix(B1)/acidic(C)/Helix-Loop-Helix(B2)/6回のhydrophobic heptad repeat (Leucine-zipper) (D) 構造が存在する。Helix-Loop-Helix構造もDNA結合や蛋白質同士の結合に重要であることが知られている。Human NEFAとnbp 1の予想されるアミノ酸配列の比較すると、得られたnbp 1 cDNA クローンはこれらの構造(B1,C,B2,D)を含んでいる領域である。

そこでHelix-Loop-Helix構造を削ったpGAD424-Δnbp1(114-208) を調製しnecdinとの結合能を調べてみた。Fig.3Bに示すようにhydrophobic heptad repeat構造(D)のみでは necdin 結合能はなかった。これらの蛋白質は転写因子に特徴的な構造をとるため、necdinと結合することによって細胞周期に関わる遺伝子の転写制御に働いている可能性もある。現在、nbp 1 (マウス NEFA)の全長 cDNAのクローニングによりその構造と機能ドメインの同定を行っている。Necdinとその結合蛋白質との相互作用は、necdinのニューロン分化における生理的機能を知る上で重要な知見を与えてくれると期待される。

[文献]

1. Maruyama, K., Usami, M., Aizawa, T. and Yoshikawa, K. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 178: 291-296.
2. Hayashi, Y., Matsuyama, K., Takagi, K., Sugiura, H. and Yoshikawa, K. (1995) Biochem. Biophy. Res. Commun. 213: 317-324.
3. Hu, Q., Dyson, N. and Harlow, E. (1990) EMBO J. 9: 1147-1155.
4. Kaelin, W. G., Ewen, M. E. and Livingston, D. M. (1990) Mol. Cell. Biol., 10: 3761-3769.
5. Manfredi, J. J. and Prives, C. (1994) Biochimica Biophysica Acta, 1198: 65-83.
6. Barnikol-Watanabe, S., Groβ, N., Gotz, H., Henkel, T., Karabinos, A., Kratzin, H., Barnikol, H. U. and Hilschmann, N. (1994) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 375: 497-512.
7. Wendel, M., Sommarin, Y., Bergman, T. and Heinegard, D. (1995) J. Biol. Chem.. 270: 6125-6133.

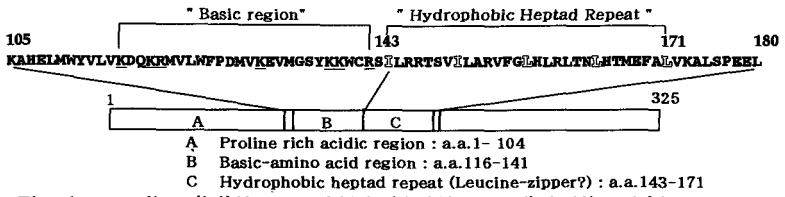


Fig. 1. Necdinの塩基性アミノ酸領域（塩基性アミノ酸は下線で示す）と hydrophobic heptad repeat 領域（疎水性アミノ酸を太字で示す）を模式図で示す。

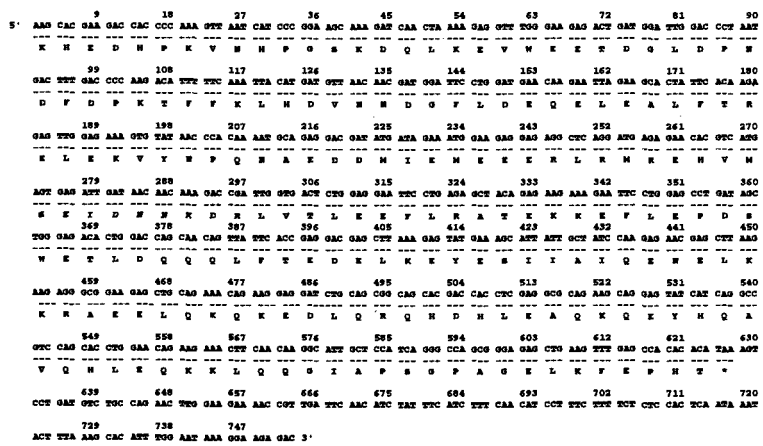


Fig. 2. nbp1 cDNAのDNA配列と予想されるアミノ酸配列

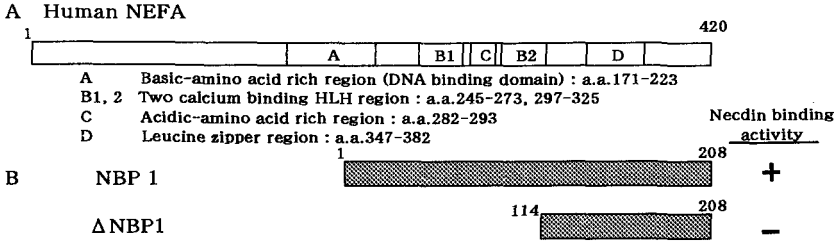


Fig. 3. nbp1 (1-208) あるいはΔnbp1 (114-208)とNecdin (102-325)との結合
A. Human NEFAの構造の模式図。B. nbp1 (1-208)およびΔnbp1 (114-208)のNecdin結合能をTwo-Hybrid法で調べた。結合は酵母SFY526を用いてβ-galactosidase assayで検出した。

74 1Aa4 ニューロン特異的核蛋白質ネクジンとDNAがんウィルス遺伝子産物の相互作用

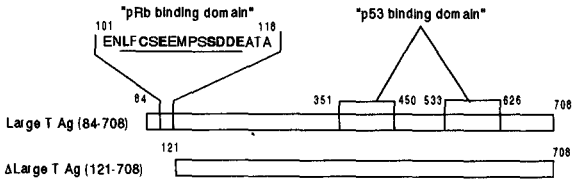
谷浦 秀夫、谷口 直子、吉川 和明
（大阪大学蛋白研、機能制御）

〔要約〕 ネクジンは、postmitoticニューロンに特異的に発現している約45kDaの核蛋白質である。発現誘導ベクターを用いてネクジンを増殖期のNIH3T3細胞に異所性に発現すると増殖が完全に停止する。このネクジンの作用機序を明らかにするためDNAがんウィルス由来のoncoproteinである SV40 largeT抗原、adenovirus E1Aとの結合を調べた。酵母Two Hybrid法 および in vitro binding系においてネクジンはlargeT抗原およびE1Aと結合することがわかった。このpRbとの類似性からpRb(-)SAOS-2細胞を用いてcolony formation assayを行うと、pRbと同様にネクジンには強い増殖抑制効果が見られた。これらのことからネクジンはpRb類似の機構で細胞の増殖抑制に働く蛋白質であることが推察された。

ニューロンは分化に伴って細胞分裂を非可逆的に停止するが、その分子機構は全くわかっていない。ネクジンはマウス胚性がんP19細胞のsubtraction cDNA libraryより見いだされた325個のアミノ酸からなる蛋白質で、postmitoticニューロンの核に特異的に発現している(1,3)。異所性に発現させたネクジンが細胞増殖を抑制することからネクジンはその機構に関わる有力候補と考えられる(2)。細胞周期を調節し増殖を抑制する核蛋白質としてpRb、p53が挙げられるが、これらには共通してDNAウィルス由来のoncoprotein SV40 largeT抗原が結合する。今回ネクジンの作用機構を明らかにするためこれらDNAウィルス由来のoncoproteinとの結合を調べた。

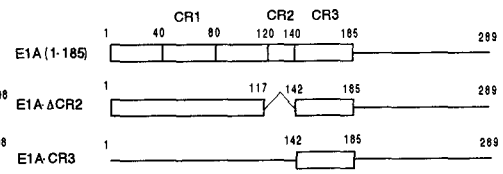
[方法] ネクジンとlarge T抗原あるいはE1Aとの結合は酵母Two Hybrid法とin vitro binding系で行った。Two Hybrid法ではネクジンをGAL4 DNA binding domainとの、またlarge T抗原あるいはE1AをGAL4 activation domainとのhybrid蛋白質として酵母SFY526内で発現させ、reporter gene lacZの転写活性で両者の結合を見た。In vitro binding系ではMBP-largeT抗原あるいはMBP-E1Aを大腸菌で発現させamylose resinに固定した。In vitro translationで合成したネクジンとresinを混合して結合蛋白質を解析した。SAOS-2細胞を用いたcolony formation assayはtransfection後約2週間G418で選択し、グリスタルバイオレットでコロニーを染色した。

[結果と考察] 酵母Two Hybrid法およびMBP (maltose binding protein)融合蛋白質を用いたin vitro binding系においてネクジンはlarge T抗原と結合し、かつその結合にはpRb結合ドメインが必須であることがわかった（図1）。pRbにはadenovirus E1Aが結合することがわかっているが、ネクジンのlarge T抗原結合性の類似から次にE1Aとの結合を同様のアッセイ系を用いて調べた。ネクジンは、pRbと同様にE1Aと結合したがlarge T抗原のpRb結合ドメインと相同性のある部位CR2を削ったΔE1Aとも弱いながら結合しその領域要求性に違いが見られた（図2）。SAOS-2細胞はpRb (-)でpRbに対して強い増殖抑制効果が見られる細胞である。SAOS-2細胞にネクジンを発現させcolony formation assayを行うと著しくコロニー形成が抑制されることがわかった。ネクジンはニューロンに特異的に発現している。したがってネクジンはpRb、p53とは独立した機構でニューロンの分裂終止に関与している可能性が示唆される。



pGBT9 insert	pGAD424 insert	β-galactosidase activity
pRb (379-928)	Large T Ag (84-708)	+++
pRb (379-928)	ΔLarge T Ag (121-708)	-
p53 (72-390)	Large T Ag (84-708)	+++
p53 (72-390)	ΔLarge T Ag (121-708)	++
Necdin (83-325)	Large T Ag (84-708)	+++
Necdin (83-325)	ΔLarge T Ag (121-708)	-

図1. Two Hybrid法によるネクジンとlarge T抗原の結合



pGBT9 insert	pGAD424 insert	β-galactosidase activity
pRb (379-928)	E1A (1-185)	+++
pRb (379-928)	E1A-ΔCR2	-
pRb (379-928)	E1A-CR3	-
p53 (72-390)	E1A (1-185)	-
Necdin (83-325)	E1A (1-185)	++
Necdin (83-325)	E1A-ΔCR2	+
Necdin (83-325)	E1A-CR3	-

図2. Two Hybrid法によるネクジンとE1Aの結合

[文献]
1.Maruyama, K., Usami, M., Aizawa, T. and Yoshikawa, K. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 291-296.
2.Hayashi, Y., Matsuyama, K., Takagi, K., Sugiura, H. and Yoshikawa, K. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 213, 317-324.
3.Uetsuki, T., Takagi, K., Sugiura, H. and Yoshikawa, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 918-924.

75 胎仔脳神経管由来の細胞のフローサイトメトリーによる解析

1E3

山之端万里、中山たかね、相馬健子、塚田裕三
(創価大学・生命科学研究所)

〔 要約 〕

前脳から中脳を含む胎仔脳を細胞懸濁液とし、細胞のサイズと内部構造の差異をパラメーターとする光散乱光を用いるフローサイトメトリーにて詳細に解析すると、3つのクラスターに分類できた。Nestin 陽性の神経前駆細胞 (NPC)の領域は全体の細胞数の40-50%を占めているが (region E)、細胞サイズがやや大きく、また接着性で fibroblastsとは明らかに異なる細胞が認められる領域 は11.4% (region G)、またfibroblasts を含むが別の接着性の細胞が認められる領域は 8.9% (region F) であった。細胞分化には細胞間相互作用および栄養因子との影響が重要であることが考えられたので、今回それぞれの領域から細胞を分離しその形態および性質について検討した。

[緒言]

胎仔脳の神経管から分離した神経前駆細胞 (NPC) は初代培養では aggregate しながら増殖することを特徴としており、培養を継続すると大きな細胞塊を形成し、それらを構成する細胞はニューロン、グリアへ分化することが判っている[1-2]。また、前駆細胞の増殖分化はepigenetic effectsが重要であることが示されている[3-4]。発生初期の神経管を構成する細胞は均一の神経上皮細胞が大部分を占めているが、最近、初代培養系でtype の異なる2種類の前駆細胞の存在が認められ、それぞれクローニングして調べた結果、増殖分化能について両者は異なる性質を持つことが示唆された[5]。これによると前駆細胞の形態は従来のaggregate cells とは異なり、dish へ接着する性質を保持しているとしている。今回、FCM にて分取した接着性の細胞について調べた。また、region E と G から分離した培養3日目の aggregated cells をtrypsin 処理して単細胞懸濁液をsubculture すると分離から6日目で種々の形態を示す細胞の（胎性１８日目）出現を認めた。

[実験方法]

1）細胞の調整：SDラット胎仔（E12）の終脳と中脳を含む胎仔脳を 0.1％trypsin にて60 分間インキュベートした後、 0.04% DNase および trypsin inhibitorで５分間静置しDF 培地で洗浄後、transferrin, insulin および heparin (TIH) を含むDF培地 （TIH-DF） でピペッティングして単一細胞の懸濁液とした。

2) ソーティング：フローサイトメーターは488nmで15 mW 出力のアルゴンレザーおよび、100μmのフローセルを装着したEPICSで行った （COULTER） 。送液ラインは70% エタノールにて予め滅菌し、シース液は滅菌ろ過したPBSを用いた。細胞懸濁液中の細胞の解析とソーティング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 scattering analysis により行い、ソーティングの至適条件は細胞の回収率、生存率および純度を検討して設定した。実際の測定では、Data rate を500 - 2000 cells/sec とし、ワークステイションのディスプレイ上で表示した細胞 は、予試験にて検討したサイトグラムからその位置を設定した。ソーティングでは３つのソート範囲を決め、適宜変えて細胞を採取した。

3）細胞培養：無菌的に分取した細胞は遠心後、TIH-DFに種々の因子 （NGF,EGF,aFGF,bFGF） を添加した無血清培地で3.5 cm dish 或いは 24-well plate にて37℃、5% CO_2下で３日培養した。また、長期の培養では培地交換は5-8日ごとに行った。region E および G に認められる aggregated cells は培養３日目にそれぞれ回収しtrypsin 処理後、3.5 cm dish にて再培養した。細胞増殖の測定は alamar blue assay にて570 および 600nmの吸光度から行った。

4）顕微鏡観察：走査型電子顕微鏡、位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡にて、分取あるいは培養した細胞の形態および細胞抗原 （Nestin, NF, GFAP, Pan-cadherin, basic FGF-Receptor） の解析を行った。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。

［結果と考察］

Fig. 1 は胎仔脳の細胞懸濁液をFCM にて解析した結果を示した。サイトグラムは約50,000個の細胞を積算して表示し、横軸は90° 縦軸は0° の散乱光を64 x 64 channel にてデュアルパラメーターとして示した。また、横軸は細胞内部の構造の差異を、縦軸は細胞の大きさの違いを示している。region E から分取した細胞はNPCであることを既に報告した[6]。Basic FGF を含むTIH-DF培地にて region G からの細胞を培養するとaggregate するものとdish へ接着する細胞が認められ、接着した細胞は増殖能は弱く分散型であった。また、 region Fではdish へ接着する細胞が多く、これらの細胞は region G で認められた細胞と比較すると増殖能は強く、fibroblast-like cellsを除くと2 種類に分類された。これらは形態および特異抗体で陽性かどうかを基準に差別化した。Table 1 は各 region における占有率を示した。Fig.2 は region E および F における典型的な増殖性の aggregated cells および adherent cells を示した。前駆細胞からニューロン、グリアへの分化には epigenetic effects としてNGF[4], EGF[7]等の報告があり実験条件の違いを考慮しても、前駆細胞の多様性を示唆していることから、さらに検討したい。

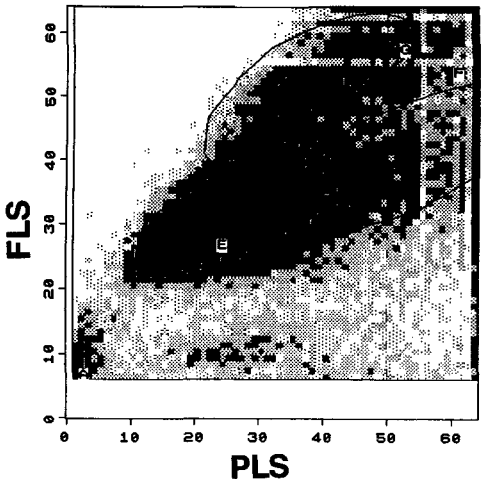


Fig.1 Typical cytogram of the cell suspensions
FLS: Foward light scatter (0°angle),
PLS: Perpendicular light scatter (90°angle).

Table 1 Rate of occupation on the cytogram

Regions	Rate of Occupation (%)
E	49.4±1.5
F	11.4±1.0
G	8.9±1.2

Data from five experiments are expressed as mean±SD



Fig.2 Microscopic observations of the nestin-positive cells sorted from region E and F
Phase contrast microscopy. Region E (left) and region F (right). Bar:25μm

［文 献］

1. M Murphy, J Drago, and PF Bartlett. (1990) J Neurosci Res. 25, 463-475
2. H Kitani, R Shiurba, T Sakakura and Y Tomooka (1991) In vitro cell Dev. Biol 27A:615-624
3. R Anchan and T Reh. (1991) Neuron. 6, 923-936
4. E Cattaneo and Ron McKay. (1990) Nature. 347, 762-765
5. T.J.Kilpartrick and PF Bartlett. (1993) Neuron. 10, 255-265
6. 山之端万里, 村田康子, 塚田裕三. (1995) 神経化学. 34, 280-281
7. BA Reynolds, W Tetzlaff, and S Weiss (1992) J Neurosci. 12, 4565-4574

76 1Aa5 胚性腫瘍細胞（Ｐ１９）の神経分化プログラミング過程におけるアポトーシスの抑制とＰＴＰε

丸山 悦子 矢倉 英隆
東京都神経科学総合研究所 微生物・免疫

〔 要約 〕 P19 細胞のチロシンホスファターゼ (PTP) 活性はレチノイン酸 (RA) による神経系分化誘導期の細胞凝集体で最も高かった。また、膜結合型であるＰＴＰε の発現が神経系分化のこの時期において著しく誘導されていた。内胚葉系、筋肉系細胞への分化過程にある凝集体はすべて著しい DNA の断片化がおきていたが、 PTPε の誘導が見られる神経系分化細胞凝集体はその断片化が抑制されていた。PTPε は cdc2(PSTAIRE) 抗体によって免疫沈降された。この結果は PTPε 結合蛋白の中に細胞周期を制御している分子が存在している可能性を示唆し、神経分化へのプログラミング機構における PTPε の役割を考える上で重要である。

目的 これまで神経分化の解明のために、特異的に誘導される mRNA の研究がなされ、主として転写因子を中心に解析されてきた。しかし分裂能を失い、かつ突起伸展という神経のプログラミングがいつ、どのようにインプットされるのかについての機序は全くわからない。P19 細胞はそれぞれの薬剤によって神経系、内胚葉系、筋肉系細胞へと分化し得る多分化能細胞であり、RA の存在かつ凝集体形成によって神経の特徴を表す。我々はすでにこのモデル系を用いて PTPε が神経分化特異的に発現誘導されることを見いだした(1)。そこで、PTPε 高発現期に何が起きているかを比較研究した結果、他の分化誘導で起きているアポトーシスが神経分化では抑制されていることを見いだした。post-mitotic になるための cell-cycle の逸脱に アポトーシス関連蛋白や PTPε がどのように関与しているのかを明らかにするために、PTPε 結合蛋白の解析を行った。

方法 P19 細胞の培養は McBurney 等の方法によった(2)。5×10^{-7} M の RA 存在下で 4 日間懸濁培養して、凝集体を形成させ、リプレイト後、数日間単層培養した。分裂能は cytosine β-D-arabinofuranoside を添加して観察した。PTP 活性は p-nitrophenyl phosphate を基質として Na_3VO_4 添加をブランク とした。PTPε 標品はトリトン x-100 とオクチルグルコシドによって可溶化し、遠心して得た。PTPε の抗体は N-末端合成ペプチド (3) をウサギに免疫して得た。DNA の断片化は電気泳動法と DPA 法によった(4)。cdc2 抗体は SC-53 (Santa Cruz) を用いた。

結果と考察 P19 のモデル系で PTP 活性は神経分化プログラミング期で最も高かった (4d aggregates-RA= 0.54 nmol/mi/mg protein, 4d aggregateas+RA= 2.00, 4d aggregates+DMSO= 0.90)。このことはある PTP が神経分化の情報伝達で何らかの役割をしている可能性を示す。我々は PTPε が神経分化で特異的に誘導されることを見いだした(1)。PTPε は P2 画分に局在し、還元下 SDS-PAGE で80 kD、非還元下で 130 kD を示し、その発現は他分化時と比べ神経分化プログラミング期で著しく高かった(Fig. 1)。凝集体のリプレイト後、RA の存在した凝集体では多くの細胞は非分裂性となり神経突起を伸展させ、RA 非存在ではすべて分裂性の細胞に分化し、かつ突起は見られなかった。PTPε の発現は RA 存在、凝集 4 日で最も高く、神経突起伸展期には消失した。また RA 存在かつ凝集体形成なしでは PTPε は誘導されなかった (Fig. 2)。PTPε が高発現される RA 存在下凝集体では何が起きているのかを検索したところ、凝集体形成期には DNA の断片化がおき、RA 存在下では電気泳動法 (Fig. 3) と DPA 法 (Table 1)で有意に減少している

ことを見いだした。この時期には神経の分裂能喪失のプログラミングが行われている可能性がある。PTP ε 結合蛋白の中にこの情報の担い手があるかもしれない。結合蛋白を解析した結果、PTP ε 共沈物中には cdc2 関連蛋白が、また cdc2 抗体共沈物には PTP ε があった(Fig. 4)。これらの結果は、PTP εが細胞周期を制御している分子と結合することによって神経分化へのプログラミングに関与している可能性を示唆している。

References 1. 丸山悦子ら、 生化学 67, 571 (1995) 2. M.W. McBurney et al., Nature 299, 165 (1982) 3. N. X. Krueger et al., EMBO J. 91, 3241 (1990) 4. K. Burton, Methods in Enzymol. 106, 163 (1968).

Fig. 1 Induction of PTP ε during neuron differentiation

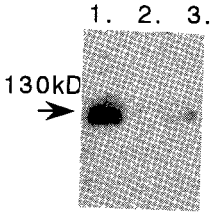


Fig. 2 Specific induction of PTP ε in 4d aggregates with RA

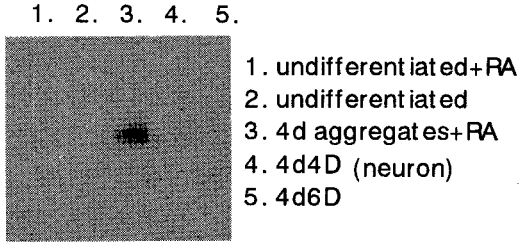


Fig. 3 Rescue of DNA fragmentation in RA aggregates

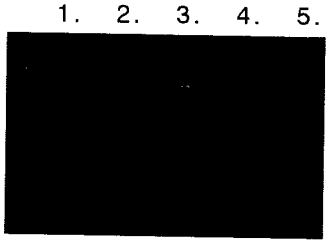
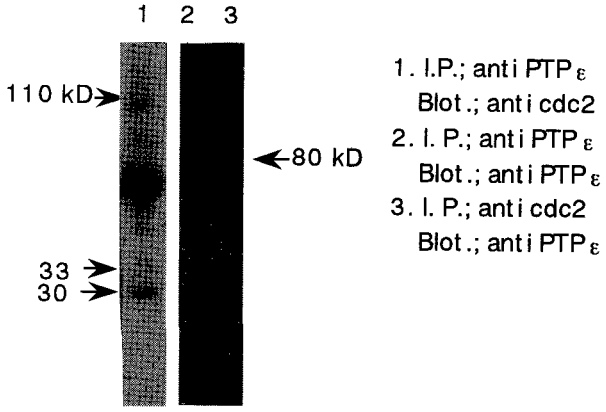


Table 1 DNA fragmentation by DPA assay

undifferentiated	1.9 ± 0.2 %
undifferentiated+RA	1.6 ± 0.2
4 d aggregates+RA	4.1 ± 0.3
4 d aggregates-RA	11.3 ± 2.1
4 d aggregates-DMSO	14.5 ± 6.5

Fig. 4 Western blotting of immunoprecipitates with PTP ε and cdc2 antibodies



77 1E4 プロテインホスファターゼによる胚性腫瘍細胞の神経分化の制御

笹原 洋二、小林 孝安、柳川 右千夫、田村 眞理
（東北大学加齢研・遺伝子情報）

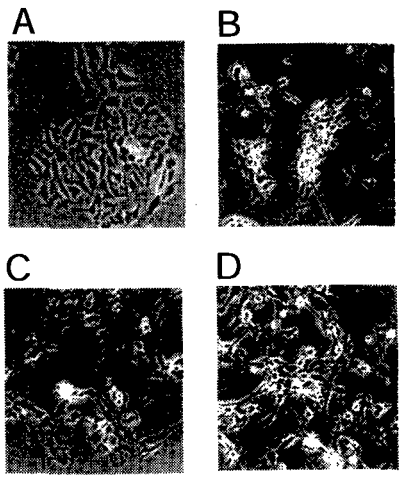
〔 要約 〕
P19細胞（マウス胚性腫瘍細胞）は、初期細胞凝集塊形成及びレチノイン酸処理により神経・グリア細胞へ分化し、神経分化の培養モデル系として重要である。今回我々は、この過程における、セリン／トレオニンホスファターゼ（PP）の発現と特異的阻害剤の効果につき検討した。その結果、PP2A及び2Bは、分化に伴った有意な発現量及び活性上昇がみられ、これらの発現誘導時に低濃度オカダ酸処理することにより、神経突起伸展及び神経分化マーカーとしてのニューロフィラメントL鎖（NF-L）の発現誘導が抑制されたが、PP2Bの特異的阻害剤では不変であった。このNF-L発現に対するオカダ酸の効果は、NF-LmRNAの不安定化に起因すると考えられた。又、オカダ酸存在下での細胞粗抽出液にて、PP2A活性のみの阻害がみられ、他のPP活性は不変であったことからも、特にPP2Aが、P19細胞の神経分化の制御因子の１つとして重要な役割を果たす事が示唆された。

［実験方法］
P19細胞は、10^{-6}Mレチノイン酸存在下で４日間懸濁培養して細胞凝集塊（embryoid body）を形成させ、更に２日間単層培養を行った。ノーザン及びウエスタン解析は、各PP分子種、NF-Lに特異的なcDNAプローブ及び抗体を用いて行い、細胞粗抽出液中のPP活性はリン酸化ヒストン、カゼイン、ミオシン短鎖を基質として測定した。PP阻害剤として10nM オカダ酸（OA）、50nM タウトマイシン、1μg/ml シクロスポリンA（CsA）及び100ng/ml FK506を培地に添加し、形態変化、NF-L発現量への影響及び細胞粗抽出液中PP活性への阻害効果を検討した。又、OA存在下でのNF-L遺伝子転写レベルを核Run-on assayにより、その不安定化をActinomycin D処理により検討した。

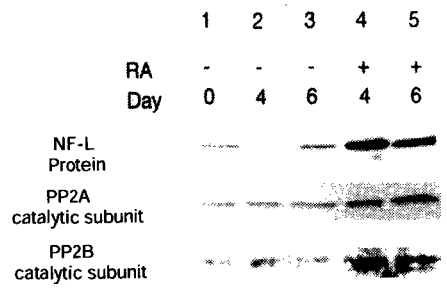
［結果］
NF-Lはレチノイン酸存在下での神経分化過程でのみ発現が誘導され、それと平行して、PP2A及びPP2Bの発現量、活性の有意な上昇がみられた（図２）が、PP1及びPP2C活性に変動はみられなっかた。OA全過程添加により、神経突起伸展及びNFL発現は著明に抑制され、タウトマイシンにても同様の結果で、その効果はPP2A発現上昇時のみの添加でもみられたが、PP2B阻害剤であるCsA、FK506では不変であった（図１、３）。又、OA存在下での細胞粗抽出液中活性では、PP2Aのみの阻害がみられ、他のPP活性は不変であることから、OAの標的がPP2Aであることが強く示唆された。このOAによるNF-LmRNA発現抑制は、OAがNF-L遺伝子の転写レベルを抑制することによるのではなく、OAによってNF-LmRNA（3.5kb 及び2.3kb）が不安定化されるこよによると考えられた。

［考察］

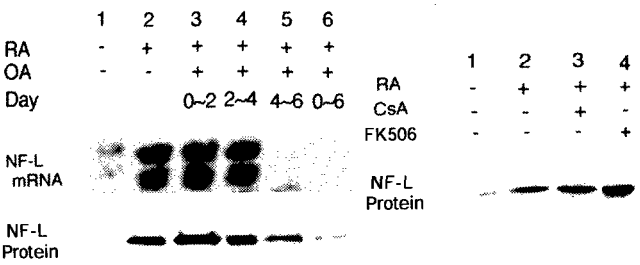
これらより、特にPP2AがP19細胞の神経分化の制御因子となることが考えられる。現在までPP2AがNF-L蛋白質のN末側を脱リン酸化し、NF重合を安定化するという報告（2）があるが、今回の結果より、その発現量の制御にも重要な役割を果たすと推測された。Schwartzらは、P19細胞を用いて、NF-LmRNA安定化に、3’非翻訳領域が重要としており（3）、何らかの内因性蛋白質のPP2Aによる脱リン酸化がここに関与する可能性がある。又、受容体型チロシンホスファターゼαの高発現が、pp60$^{c\text{-}src}$の活性化を介してP19細胞の神経分化を促進するという報告（4）もあり、今回のPP発現上昇とこのシグナル伝達系との関係についても検討中である。



（図1）PP阻害剤によるP19細胞の形態変化
A 未分化P19細胞
B 神経分化後P19細胞
C オカダ酸（+）、分化後
D シクロスポリンA（+）、分化後



（図2）神経分化過程におけるNF-L,PP2A及び2Bの発現上昇（ウエスタン解析）



（図3）NF-L発現に対するPP阻害剤の効果

［文献］

1. Sasahara, Y. et al. J. Biol. Chem. in press.
2. Sacher, M. G. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 18480-18484
3. Schwartz, M. L. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 26364-26369
4. den Hertog, J. et al. (1993) EMBO J. 12, 3789-3798

78 1Aa6 P19マウス胚性癌細胞の神経系細胞分化における体細胞DNA組換え活性の増加

川端 昌弘、中矢 直樹、西堀 正洋、佐伯 清美
(岡山大学・医学部・薬理学)

〔要約〕

神経細胞の分化において体細胞DNA組換えが起こるかどうかを検討するために、組換えが起きると大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼが発現するレポーター遺伝子をP19マウス胚性癌細胞に導入し、レチノイン酸による神経系細胞への分化誘導を行ったところ、レチノイン酸のみ及びレチノイン酸存在下で細胞凝集させる処理でβ-ガラクトシダーゼ活性が発現する細胞が著しく増加した。免疫細胞学的検討により神経上皮細胞、神経細胞、アストロサイトにβ-ガラクトシダーゼ活性が出現することが確認された。 発現したβ-ガラクトシダーゼの mRNA 5'-末端の一次構造を調べたところ、4種類の異なったmRNAを見出すことができた。神経系細胞の分化において体細胞DNA組換えが起きている可能性が示唆された。

免疫系では、Bリンパ球における免疫グロブリンのV(D)J組換え、クラススイッチ、およびTリンパ球におけるT細胞受容体のV(D)J組換えが体細胞DNA組換えとして生理的に重要な役割を果たしていることがよく知られている。免疫系と中枢神経系とに共通な多くのサイトカインとその受容体、細胞表面マーカー、構成の複雑さ、記憶容量の巨大さ、膨大な数のプログラム細胞死、V(D)J組換えの活性化因子RAG-1や免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーが中枢神経系にも存在すること等、表面的な類似性ゆえに、中枢神経系の発達や機能においても体細胞DNA組換えが生理的に重要な働きをしているのではないかと推測されている。神経系の分化モデルとしてしばしば用いられるP19マウス胚性癌細胞に、DNA組換えが起きると大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼが発現するレポーター遺伝子を導入し、レチノイン酸による神経系細胞への分化誘導を行い、神経細胞の分化において体細胞DNA組換えが起こるかどうかを検討したのでこれを報告する。

＜方法＞

免疫グロブリンκ鎖のV(D)J組換えシグナル配列を利用して、DNA組換えが起きると大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼが発現するように設計されたレポーター遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を加えて、P19マウス胚性癌細胞にリン酸カルシウム法を用いて導入し、G418でクローンニングを行った。クローンニングした細胞を 0.5 μM レチノイン酸を含むαMEM培養液中バクテリア用皿で細胞凝集状態で(RA+AG) 4日間培養した後、再分散してpoly-L-lysineコートした細胞培養用皿で一夜培養し、2%ホルムアルデヒド-0.2%グルタルアルデヒドで4℃、5分固定後、X-galを基質として含む反応液(pH 7.4)中37℃で4-16時間反応させ、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼの組織化学的検出を行った。無処理ではβ-ガラクトシダーゼ陽性細胞(青色)が殆どなく、 RA+AG 4日処理で著しく陽性細胞が増加するクローン(P19REC09)を以下の実験に用いた。レチノイン酸のみ(RA)の処理では 0.5 μMレチノイン酸を含むαMEM培養液中poly-L-lysineコートした細胞培養用皿で培養し、細胞凝集(AG)のみの処理ではレチノイン酸を含まないαMEM培養液中バクテリア用皿で培養した。またジメチルスルホキシド(DMSO)のみの処理では1%DMSOを含むαMEM培養液中poly-L-lysineコートした組織培養用シャーレで培養し、DMSO+AGの処理では1%DMSOを含むαMEM培養液中バクテリア用皿で培養した。総細胞数にたいする陽性細胞の数は顕微鏡下一定面積あたりの陽性細胞の数を3カ所カウントし、同数播種した別のシャーレで面積あたりの総細胞数を求めて算出した。免疫細胞化学による細胞の同定には一次抗体として抗ネスチン、抗ニューロフィラメント(200kD)、抗GFAP抗体、二次抗体としてビオチン化抗マウスIgG抗体、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン、アルカリホスファターゼ基質としてHNPPを用いた。統計処理はOne-way AVOVAを用いて行った。また発現したβ-ガラクトシダーゼのmRNA 5'-末端の一次構造解析には、LacZ特異的プライマーを用いて逆転写反応を行った後、5'-末端をRACE法を用いて増幅し、さらにネスティッドPCRで5'-末端を増幅した後、λZIPLoxファージライブラリーを作成し、LacZ特異的プローブでスクリーニングを行った。得られたクローンをプラスミドに変換した後、シークエンス解析を行った。

＜結果と考察＞

無処理のP19REC09においては β-ガラクトシダーゼ陽性細胞は10^5細胞あたり0.8±0.05(mean±SEM, n=3)個であったのに対し、レチノイン酸処理２、４および７日ではそれぞれ201.7±24.2、534.9±15.9、149.0±8.1といずれも有意な増加 ($p < 0.05$) を認めた。レチノイン酸+細胞凝集処理２、４および７日ではそれぞれ102.2±18.2、194.8±18.3、19.2±2.3と２および４日で有意な増加を認めた。細胞凝集処理２、４および７日ではそれぞれ14.3±0.23、30.8±5.1、23.9±5.3、DMSO処理２、４および７日ではそれぞれ35.7±7.7、10.5±1.4、8.4±2.9、DMSO+細胞凝集処理２、４および７日ではそれぞれ21.8±1.4、23.1±2.1、29.0±5.7といずれも有意な増加は認められなかった。免疫細胞化学による細胞の同定より、神経上皮細胞、神経細胞、アストロサイトのいずれにも β-ガラクトシダーゼ陽性細胞が存在することが確認された。また、レチノイン酸処理４日およびレチノイン酸+細胞凝集処理４日を行った細胞より得たβ-ガラクトシダーゼmRNAの5'-末端の核酸配列の解析より、４つの異なったクローンを得た。１つはβ-ガラクトシダーゼのN末端を完全に含むと考えられる配列で、残りの３つはN末端を一部欠いた配列であった。前者および後者のうちの２つは5'端がグアニンであり、キャップ構造を反映して本来LacZには存在しない塩基が付加されていたため、得られた配列は β-ガラクトシダーゼmRNAの5'-末端に由来している配列であると考えられ、神経系細胞の分化に体細胞DNA組換えが関与している可能性が示唆された。

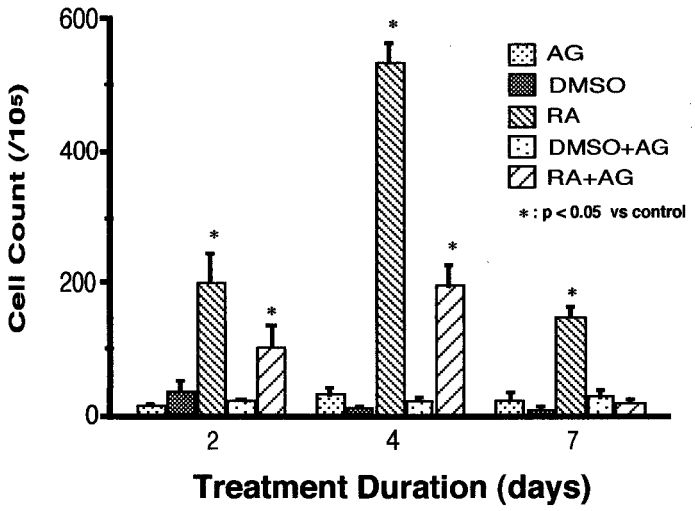


Fig. 1　各種の分化誘導処理における β-ガラクトシダーゼ活性陽性細胞数

＜謝辞＞

本研究に用いたレポーター遺伝子pκZ1を快く御提供いただいた坂野仁先生および松岡雅雄先生に、また終始勇気づけるアドバイスをいただいた秋山公祐先生に深謝いたします。

＜参考文献＞

1. Matsuoka M *et al.*, Science 254, 81-86 (1991)
2. Kawaichi M *et al.*, J Biol Chem 266, 18387-18394 (1991)

79 サル大脳皮質培養細胞によるニューロン回路網の形成

1E5

開地泰介、吉川泰弘*、村本和世、川原正博、小林和夫、黒田洋一郎
東京都神経科学総合研究所・神経生化学部門
*国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター

〔要約〕カニクイザル大脳皮質細胞の培養を試み、in vitroにおけるニューロン回路網を形成させることに成功した。これまでに我々はラット大脳皮質細胞の初代培養ニューロン系を用いて、多数のシナプスを形成させ、細胞内Ca^{2+}の同時多点観察法によりシナプス形成を簡便にアッセイする系をつくってきた。サルの場合も培養、アッセイはラットの方法に準じたもので、異なる点は、細胞の採取と培養を行う施設が違ったため、また胎齢日数が確認されているサルの胎児から頻回に細胞採取を行うのが困難なため、一度、凍結させた細胞を解凍し、培養したことである。ヒトにより近縁な動物材料を用いた研究が必要となる神経・精神疾患を解析する目的で、サル大脳皮質ニューロンの培養は有用であると考えられる。

中枢神経回路網の構造をin vitroで解析するために、これまでに我々はラット大脳皮質細胞の初代培養ニューロン系を用いて、多数のシナプスを形成させ[1]、細胞内Ca^{2+}の同時多点観察法[2]によりシナプス形成を簡便にアッセイする系をつくった[3)4)]。しかし、脳の老化及びそれに伴うアルツハイマー病、精神分裂病、躁鬱病などの神経・精神疾患の解明には、ヒトにより近縁な動物材料を用いた研究が必要となる。そこで、霊長類の神経細胞培養系を確立する目的で、アジア産マカカ属に分類されるカニクイザル胎児の大脳皮質細胞の初代培養を試み、形成されたシナプス数と相関を示す上記細胞内Ca^{2+}同時多点観察を行ったところ、培養20日前後で細胞内Ca^{2+}の自発的周期性同期発火を確認した。

［実験方法］

カニクイザル胎児（胎齢81、100、109）より脳を摘出し、大脳皮質部分を数mm角に細断した後、DMSO(10%inBSS)溶液に入れてセラム・チューブごと液体窒素上で徐々に凍結し、液体窒素中に保存した。培養開始時に37℃で急速融解し、Dulbecco's MEM (DMEM) で洗浄、遠心し、パパイン酵素処理により細胞をばらばらにした後polyethlenimine　コートしたカバーガラス上にて、培養液としてDMEMに5% horse serum, 5% new born calf serumを添加したものを用いて、培養を行った。培養20日目に、培養細胞にfura-2を負荷した後、既に報告された方法[2]により蛍光ビデオモニター装置[5]による細胞内Ca^{2+}濃度変化の観察を行った。

［実験結果及び考察］

培養20日において、胎齢81日、100日の細胞で細胞内Ca^{2+}の自発的周期性同期発火を確認した（図2）。しかし胎齢109日の細胞では、培養20日において同様なCa^{2+}濃度変動は観察されなかった。カニクイザルの出産は胎齢160～170日で、胎齢109日では、培養開始時の細胞浮遊液内にニューロンやグリアの伸展した突起と思われる多数の組織片が混在し、形態的にも脳の形成をほぼ終え、細胞の成熟は進み、培養が難しい状態であったと考えられる。今回のカニクイザル大脳皮質培養では、細胞の採取と培養を行う施設が異なったため、また胎齢日数が確認されているサルの胎児から頻回に細胞採取を行うのが困難なため、凍結細胞を用いた。凍結解凍による細胞への障害が大きいためと思われるが、ラットの非凍結細胞による培養と比べ、現在までのところ、細胞内Ca^{2+}の自発的周期性同期発火頻度は低かった。細胞凍結保存法を用いたサル大脳皮質培養ニューロンが多数のシナプスを形成し、回路網の電気活動が確認されたことは、in vitroにおける霊長類ニューロン回路網の細胞レベルでの解析が可能であることを示している。

［文献］

1) Muramoto, K. et al., Proceedings of Japan Academy, 64. SerB, 319-322 (1988)
2) Ogura, A.et al., Neuroscience Letters, 78, 69-74 (1987).
3) Kuroda, Y.et al., Neuroscience Letters, 135, 255-258 (1992).
4) Muramoto,K. et al., Neuroscience Letters, 163, 163-165 (1993).
5) Kudo, Y.and Ogura, A., Brit. J. Pharmacol., 89, 191-198 (1986).

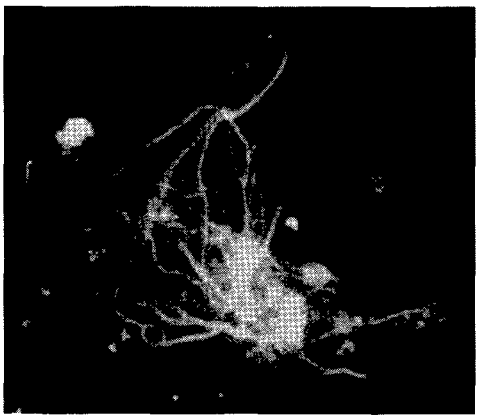


図1：MAP2に対する免疫組織化学
胎齢81日の細胞を培養27日後に固定した。

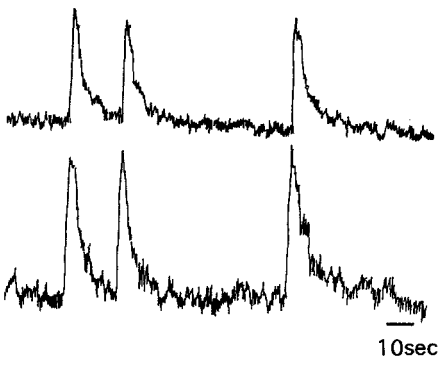


図2：2細胞の細胞内Ca^{2+}
自発的同期生発火

80 1E6 マウス神経芽腫細胞の細胞周期に対する糖脂質合成酵素阻害剤とスフィンゴ脂質の効果

上村敬一、武富 保
(信州大・医・加齢適応研究センター・加齢生化学)

〔 要約 〕
培養マウス神経芽腫細胞 NS-20Y の細胞周期に対して、グルコシルセラミド合成酵素阻害剤 PDMP (1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) および種々のスフィンゴ脂質が及ぼす効果をフローサイトメトリーにより検討した。PDMP (50 μM, 24 h) の添加により S 期細胞の減少と G0/G1期細胞の増加が明らかに認められた。一方、スフィンゴシン、スフィンガニン、スフィンゴシン-1-リン酸では、細胞周期に変化はみられず、短鎖セラミド (N-acetyl-D-sphingosine, N-hexanoyl-D-sphingosine)、スフィンゴシルホスホコリンも影響を与えなかった。この結果から、PDMP による増殖の抑制はセラミド、スフィンゴシンなどの増加によって起こるとは考えにくく、スフィンゴ糖脂質の減少が重要である可能性が示唆された。

近年、スフィンゴシンやセラミド、およびそれらの誘導体の細胞内機能が次第に明らかにされ、細胞増殖、分化に際して重要な働きをしていることが知られている。これまで我々はマウス神経芽腫細胞の神経突起伸展が、グルコシルセラミド合成酵素阻害剤 PDMP の存在下で強く抑制され、これはスフィンゴシンによるカルモジュリンに依存した経路の阻害の結果であることを報告した (1-3)。PDMP は細胞のスフィンゴ糖脂質含量を著しく減少させるとともに、マウス神経芽腫細胞 NS-20Y 細胞の増殖を抑制したが (1)、この時蓄積してくるセラミドやスフィンゴシンには細胞の種類によってアポトーシスを誘導する作用があることが知られている。今回、PDMP および種々のスフィンゴ脂質が NS-20Y 細胞の細胞周期に及ぼす影響について検討した。

[実験方法]

マウス神経芽腫細胞 NS-20Y (9×10^4 個) を Petri dish (9 cm^2) に播種し24時間培養した後、DL-threo-PDMP あるいはスフィンゴシン誘導体を添加して。さらに24時間培養した。細胞を67%メタノールで固定、RNase A (100 units/ml) と propidium iodide (50 μg/ml) で処理、染色した後、FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリーによる DNA 含量の測定、細胞周期解析を行った。D-erythro-sphingosine, D-erythro-sphinganine はそれぞれ pig spinal cord のgalactosylceramide, sphingomyelin より調製した (4)。Sphingosine-1-phosphate は sphingosylphosphocholine (Sigma) を phospholipase D で処理して調製した (5)。

[結果および考察]

対数増殖期のNS-20Y 細胞に対してPDMP (50 μM, 24 h)を添加すると、 S 期細胞の減少と G0/G1期細胞の増加が明らかに認められた(Table 1)。一方、スフィンゴシン、スフィンガニン、スフィンゴシン-1-リン酸では、細胞周期に変化はみられず、短鎖セラミド (N-acetyl-

D-sphingosine, N-hexanoyl-D-sphingosine)、スフィンゴシルホスホコリンも影響を与えなかった。また、DNA 含量の解析パターンではアポトーシスは認められなかった。これらの結果から、PDMP による増殖の抑制はG0/G1期での細胞周期の停止によるものであり、これはセラミド、スフィンゴシンなどの増加によって起こるとは考えにくく、スフィンゴ糖脂質の減少が重要ではないかと考えられた。細胞の形態については、無血清条件下での神経突起伸展(50～60%)と比べてわずかであったが、PDMPの添加により神経突起の有意な伸展がみられた(Table 2)。これに対してスフィンゴシン、短鎖セラミドは神経突起の伸展を起こさせなかった。

[文献]

(1) Uemura, K., Sugiyama, E. and Taketomi, T. (1991) J. Biochem. 110:96-102
(2) Uemura, K., Hara, A. and Taketomi, T. (1993) J. Biochem. 114:610-614
(3) Uemura, K. and Taketomi, T. (1995) J. Biochem. 118:371-375
(4) Hara, A. and Taketomi, T (1986) J. Biochem. 100:415-423
(5) Van Veldhoven, P.P., Fogelsong, R.J. and Bell, R.M. (1989) J. Lipid Res. 30:611-616

Table 1 Effect of PDMP and sphingolipids on the NS-20Y cell cycle

Addition	μM	% of total cells		
		G0/G1	S	G2/M
None	-	41.9 ± 1.35	47.1 ± 1.35	10.9 ± 1.66
PDMP	50	59.5 ± 0.14 *	29.7 ± 0.47 *	10.8 ± 0.36
D-erythro-sphingosine	5	41.1 ± 0.77	49.1 ± 0.86	9.8 ± 0.49
D-erythro-sphinganine	5	42.8 ± 0.81	45.8 ± 0.37	11.4 ± 0.11
Sphingosine-1-phosphate	5	42.0 ± 0.53	47.8 ± 0.83	10.3 ± 0.72
Sphingosylphosphocholine	5	42.2 ± 0.29	47.9 ± 0.28	10.0 ± 0.31
N-acetyl-D-sphingosine	5	42.2 ± 0.81	47.5 ± 0.46	10.4 ± 0.60
N-hexanoyl-D-sphingosine	5	41.3 ± 0.99	46.8 ± 1.04	12.0 ± 0.62

* $p < 0.001$ vs. control (None)

Table 2 Effect of PDMP on cell morphology

PDMP (μM)		% Cells with neurites		
First 24 h	Second 24 h	NS-20Y	Neuro2a	N1E-115
0	0	1.5 ± 0.9	33.9 ± 3.9	31.4 ± 2.5
0	40	4.7 ± 0.8 *	29.6 ± 2.9	37.8 ± 6.8
40	40	9.0 ± 2.8 *	32.1 ± 8.9	35.6 ± 1.3

* $P < 0.02$ vs. control (no PDMP)

81 グリア細胞の分化に関与する substance P 受容体の発現と機能

2E14

武田泰生、野津智美、川野仁[1]、川村光毅[1]、阿相皓晃[2]、植村慶一

慶應義塾大学医学部生理、[1]解剖、[2]東京都老人研細胞生物

〔 要約 〕 サブスタンスP（SP）は痛覚第一次神経の主要な伝達物質として同定されている他、免疫-炎症反応、平滑筋収縮等の多岐にわたって機能する神経ペプチドである。最近、SPをリガンドとした受容体結合実験から神経系発生過程においてオリゴデンドロサイトの前駆細胞であるO2A細胞にSP受容体が発現している可能性が示され[1)]、グリア系細胞系譜に関するSP受容体の関与が示唆された。我々はこれまでにSP受容体遺伝子のクローニング（武田）及びその抗体作製（川野）を行い、受容体の分布と機能の解析を行ってきた。本研究では初代培養系を用いて神経系発生過程でのグリア細胞におけるSP受容体の発現様式と細胞系譜に及ぼすSPの影響について検討した。その結果、1）SP受容体はO2A細胞に強く発現すること、O2A細胞からオリゴデンドロサイトへの分化に伴いその発現が急速に減少し消失すること、一方、O2A細胞から2型アストロサイトへの分化ではSP受容体の発現は存続することを明らかにした。2）新生仔ラットの大脳皮質から調製したグリア細胞の初代培養系でグリア細胞系譜に対するSPの影響を検討した結果、血清含有又は無血清培地いずれの培養条件下でもSPはオリゴデンドロサイトへの分化誘導を有意に抑制した。以上の結果から、O2A系グリア細胞の分裂増殖-分化誘導機構にSP受容体の発現が機能的に関与している可能性が示された。

【目的】

中枢神経系細胞の発生は神経管の神経上皮からの多能性幹細胞の出現により開始する。グリア細胞系譜はこの多能性幹細胞から分化誘導されるオリゴデンドロサイト-2型アストロサイト前駆細胞 (O2A) の出現に始まり、分裂増殖を繰返しながら中枢神経のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OL) へ分化していく。近年、O2AからOLへの分化誘導は様々な活性因子により複雑に調節されていることが明らかにされた。最近、中枢神経系の発生過程や損傷時において現れるある種のグリア系細胞にサブスタンスP（SP）受容体が一過性に発現することが報告され[2, 3)]、活性因子群のみならず、グリア細胞系譜における神経ペプチドの関与も示唆されてきた。しかしその詳細な機構は明らかではない。培養下では、O2Aは条件によりOL或は2型アストロサイト(AS) のいずれかへ分化する。2型ASは損傷時に見られる反応性ASと形態及び性質において類似性が認められることから、反応性ASである可能性も示されている。本研究は、グリア細胞系列の発生及び分化機構におけるSP受容体の機能解析を目的とし、中枢神経系の発生過程や損傷時に発現する種々のグリア細胞におけるSP受容体の発現、O2A-OL分化機構におけるSPの影響について検討した。

【方法】

グリア細胞の培養：新生仔ラットから採取した大脳皮質を pore size 100 μ m、続いて40 μ mのステンレス製メッシュにて細胞を分散し、0.05% DNase I 含有液で2回洗浄後、poly-D-lysine (PDL) コートしたフラスコ上で培養を開始した。2日後、回収した細胞の1 x 10^4 個/ml をPDLコートしたカバーガラス上に播き、更に4日又は10日間培養した後、これらの細胞を免疫染色に用いた。一方、グリア細胞系列の分化におけるSPの影響に関しては、培養開始後、細胞を2日毎に2回再プレートし神経細胞を完全に除去した後、カバーガラス上で更に一日培養した。これらの細胞を4グループに分けて、各々以下の条件［1）SPを含む10% FBS含有培地、2）SPを含まない10% FBS含有培地、3）SPを含む無血清（CDM）培地、及び4）SPを含まないCDM培地］で更に2日、4日及び7日間培養し、経日的にA2B5陽性細胞とO4陽性細胞数を計測した。SP含有培地には100nMのSPを毎日添加した。

免疫組織化学的染色：一定期間培養した細胞はperiodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定後、各グリア細胞のマーカー物質に対する抗体を用いて細胞種を同定すると共に、抗SP受容体抗体を用いて各種グリア細胞におけるSP受容体の発現を調べた。SP受容体及びGFAPの免疫染色は、細胞をPLP固定後、更に5%酢酸/95%エタノールにて強固定した後に行った。

【結果】

グリア細胞におけるサブスタンスP受容体の発現：培養6日目及び12日目の細胞を、グリア細胞系譜の各分化段階における各々のマーカー物質に対するモノクローナル抗体とラットSP受容体に対するポリクローナル抗体を用いて、蛍光二重免疫染色を行い、グリア細胞の分化過程におけるSP受容体の発現の特異

性を検討した。各々の抗体を用いた免疫染色の結果を表1に示した。A2B5はO2A及び2型AS、中間系フィラメントであるGFAPは1型及び2型AS、O4は未成熟なOL、O1及びGCは更に分化が進行したOLに各々発現するマーカー物質である。抗SP受容体による染色の結果、O2Aに特に強く反応し、2型AS、未熟なOLはO2Aに比し弱いが陽性反応が観察された。一方、1型AS及び成熟したOLには抗SP受容体抗体による免疫反応は認められなかった（表1）。

O2A系グリア細胞の分化機構に対するSPの影響：各条件下で培養した4グループにおける細胞を抗A2B5及びO4抗体で染色し、経日的にA2B5陽性細胞数とO4陽性細胞数を計測した。10%FBS含有培地及びCDM培地のいずれの培養条件下においても、A2B5陽性細胞とO4陽性細胞の総和数に対するSPの影響は見られなかった。両陽性細胞総和に対するO4陽性細胞数の割合は、両培養液において、SP^-群と比較してSP添加群では有意に減少した（表2）。

【考察】

培養系において採取したO2Aは10%FBS含有培養下で2型ASへ分化し、一方、CDM培養条件下ではOLへ分化する。最近、SP受容体が発生過程で脊髄のフロアプレートに存在するグリア系細胞に一過性に発現し、SP刺激による受容体の活性化がこれら細胞からの神経成長因子の分泌を促し、知覚二次神経細胞の突起伸展に大きく関与していることが報告された[2]。一方、視神経損傷時に現れる反応性ASにもSP受容体が発現することが知られており[3]、グリア細胞系譜におけるSPの関与が注目されてきた。本研究において、大脳皮質由来のO2AにはSP受容体が発現しており、2型AS或はOLへの分化誘導が進むにつれSP受容体の発現が急速に減少することを明らかにした。またSP受容体の活性化はO2AのOLへの分化を抑制すると共に2型ASへの分化誘導が促進されることを示し、O2A系グリア細胞系列の分化誘導機構にSPが関与する可能性を指摘した。現在、生体内でのO2AにおけるSP受容体の発現を調べると共に、O2Aの純粋培養系の確立を目指し、OL並びに2型ASへの分化機構を検討している。特に、O2Aから2型ASへの分化誘導に関するSP受容体の機能解析は、中枢神経系の損傷時に見られる反応性ASによる組織の線維化や瘢根化を検討する糸口となることを期待している。

cell type	SPR	A2B5	GFAP	O4	O1
O2A progenitor	++	++	−	−	−
preoligodendrocyte	+	±	−	++	+
oligodendrocyte	−	−	−	++	++
type-2 astrocyte	+	+	+	−	−
type-1 astrocyte	−	−	++	−	−

表1．グリア系細胞系列におけるサブスタンスP受容体と各種マーカー物質の発現様式

培養液の種類	SP +/-	[O4細胞数/A2B5+O4細胞数]x100 2日後	4日後
10%FBS含有培地	SP -	57.1±10.0	54.8±6.4
	SP +	39.9±5.4*	38.5±5.6**
CDM培地	SP -	58.7±4.9	54.1±1.8
	SP +	37.2±4.0**	45.8±3.7**

表2．O2A前駆細胞の分化に対するサブスタンスPの影響
*p<0.05、**p<0.01、同培養条件下でのSP-に対する有意差.

【文献】

1) Marriott, D.R. and Wilkin, G.P., J. Neurochem., 61:826-834 (1993). 2) Felipe, C.D., et al., Science 267:299-902, (1995). 3) Mantyh, P.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5193-5197 (1989).

82 2E15 損傷モデルにおける O-2A progenitor cell から type 2 astrocyte への分化について

村上健一[1.2]、阿相皓晃[3]、河瀬斌[2]、植村慶一[1]

[1]慶應義塾大学医学部 生理、[2]同 脳神経外科、[3]東京都老人研 細胞生物

〔要約〕 グリア細胞の分化の研究から、in vitroではO-2A progenitor cell は無血清培地中でoligodendrocyteに、CNTF添加培地ではtype 2 astrocyteへ分化する。これに対してin vivoでは大脳へ移植したO-2A progenitor cellは全てoligodendrocyteへ分化し、type 2 astrocyteへは分化しないとする報告があり[1]、type 2 astrocyteの存在及び機能については未だ不明な点が多い。一方、type 2 astrocyteへ分化を誘導するCNTFはtype 1 astrocyteの細胞質に存在するが、type 1 astrocyteが損傷された時にのみ細胞外へ放出されると考えられている。我々はin vivoでは損傷を受けたtype 1 astrocyteから放出されるCNTFを介してO-2A progenitor cellからtype 2 astrocyte への分化が誘導され、これが外傷後にreactive astrocyteの出現する原因の一つであると推測した。これを確かめるため、in vivoの実験系では多くの因子群が複雑に作用するため、今回はin vitroの外傷モデルであるscratch wound model[2] を用いて、type 1 astrocyteとO-2A progenitor cellが共存する系に損傷を加えた際のO-2A progenitor cellの分化について検討した。

時間経過と共に損傷近傍部では免疫組織学的にO-2A progenitor cellからtype 2 astrocyteへの分化の増加が認められた。さらに免疫組織学的にはO-2A progenitor cellの特徴を示すが、形態学的にはtype 2 astrocyteへの分化の方向にある細胞の増加も認められた。外傷時にO-2A progenitor cellからtype 2 astrocyteへの分化が誘導され、これがreactive astrocyteとして機能する可能性が示された。

【目的】

O-2A progenitor cell からtype 2 astrocyteへの分化はin vitroではCNTFを添加することによって誘導されるが、in vivoではO-2A progenitor cellはtype 2 astrocyteへは分化しないという報告があり、その存在及び機能については未だ不明な点が多い。一方、CNTFはtype 1 astrocyteに存在するが、signal peptideを持たないためtype 1 astrocyteが損傷された時にのみ細胞外へ放出されると考えられている。我々は損傷されたtype 1 astrocyteから放出されるCNTFによりO-2A progenitor cellがtype 2 astrocyteへ分化しreactive astrocyteとして機能するという可能性について検討するために、scratch wound modelを用いて、type 1 astrocyteとO-2A progenitor cellが共存する系に損傷を加えた際のO-2A progenitor cellの分化について検討した。

【方法】

新生仔ラットから採取した大脳を pore size 100 μ m、続いて40 μ mのステンレス製メッシュにて細胞を分散し、0.05% DNase I 含有液で3回洗浄後、DMEM/10%NBSで培養を開始した。4日後、回収した細胞をPDLコートしたカバーガラス上に5 x 10^4 個 播き、更に2日間培養した。これをpipette tipの先端で細胞を掻爬することで損傷部分を作成し、その後に培地を無血清培地（B-S medium）へ変更した。その後は経日的にA2B5抗体と抗GFAP抗体及び抗galactocerebroside抗体と抗GFAP抗体で免疫二重染色を行い、O-2A lineage cells（O-2A progenitor cell、type 2 astrocyte、oligodendrocyte）のうちでO-2A progenitor cellの占める比率を検討すると共にO-2A progenitor cellの突起の長さを計測した。損傷直後より1個のO-2A progenitor cellに着目し、その形態の変化を経時的にビデオを用いて追跡した。

以下、損傷近傍部は掻爬した辺縁より500 μ m以内、遠位部は1000 μ m以遠とした。

【結果】

今回の実験系では損傷を加える前の時点で培養系の全細胞数の80%がtype1 astrocyteで20%がO-2A lineage cellsであった。損傷後、損傷近傍部では時間経過と共にtype 2 astrocyteの割合が増大した。その一方で遠位部とコントロールではtype 2 astrocyteの割合に変化は認められなかった（図1）。O-2A progenitor cellの突起の長さは、損傷近傍部において時間経過と共に伸展を認め、免疫染色上はO-2A progenitor cellの特徴を保持しながら形態学的にはtype 2 astrocyteへ分化しつつあることが示された（図2）。次に損傷近傍部の1個のO-2A progenitor cellを経時的に観察したところ、徐々に突起を伸ばすと共に太くなり、さらに核周囲に細胞質が出現し、type 2 astrocyteへと変化した（図3）。

【考察】

O-2A progenitor cellは無血清培地ではtype 2 astrocyteへは分化しないと報告されており、今回の実験でもコントロールではtype 2 astrocyteの増加は認められなかった。さらにtype 2 astrocyteは増殖能を持たないため増加したtype 2 astrocyteは全て分化したものと考えられた。以上から、機械的損傷を受けたtype 1 astrocyteがCNTFなどの活性因子を放出し、これがO-2A progenitor cellからtype 2 astrocyteへの分化を誘導すると結論された。さらに今回の実験でtype 2 astrocyteが増加した範囲は、外傷後に出現するreactive astrocyteの分布と類似しており、分化したtype 2 astrocyteがreactive astrocyteとして機能する可能性が示唆された。

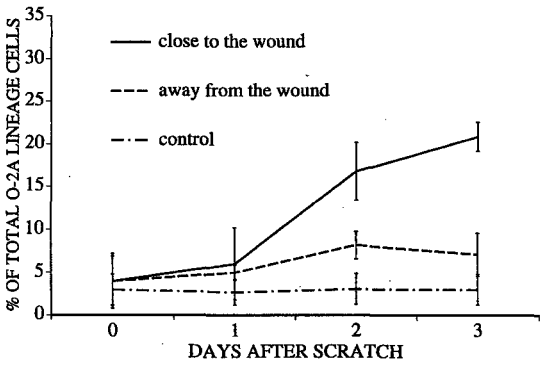


図1． 損傷後のO-2A lineage cellsに占めるtype 2 astrocyteの割合の経時的変化

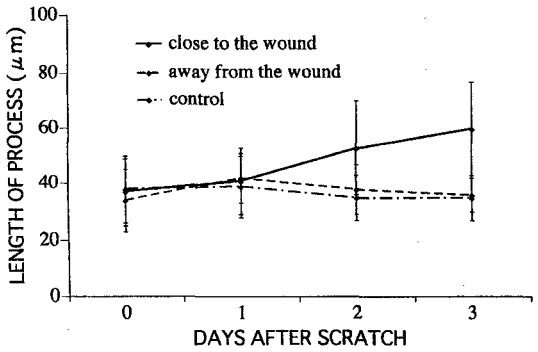
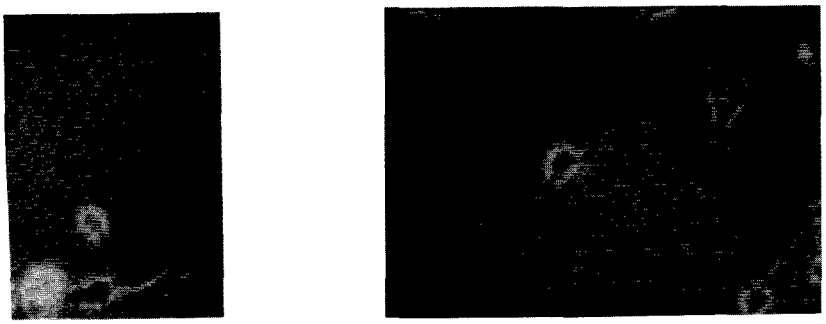


図2． O-2A progenitor cellの最長の突起の長さの経時的変化



A 損傷当日　　B 損傷後2日目

図3． 損傷近傍O-2A progenitor cellの経時的変化

【文献】

1) Araceli, E. M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 50-54 (1993)
2) Evelyn, S. T. et al. Neuron 2, 1541-45 (1989)

83 2E16 ミエリンプロテオリピド蛋白質断片はオリゴデンドロサイトの分化を促進する

山田 真久、○Anna Ivanova、山口 宣秀、池中 一裕
(岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経情報部門)

[要約]

PLP及びPLP遺伝子のオルタナティブスプライス産物であるDM-20は、中枢神経系のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的に発現し、ミエリンの膜構造の安定化に寄与していると考えられていた。しかし、PLP遺伝子に突然変異を持つジンピーマウスでは、ミエリン形成期以前にオリゴデンドロサイトが幼弱なまま分化異常を起こし変性脱落してしまうことが知られている。さらにこのジンピーオリゴデンドロサイトは、正常アストロサイトの培養上清に含まれる液性因子により延命することが報告された（1）。我々は、グリア細胞分化時期にPLP遺伝子が、オリゴデンドロサイトの生存維持又は分化促進に機能していることを示唆してきた（2、3）。本研究において我々は、ジンピーマウスにおいて欠損しているPLPペプチド断片が、in vitroにおいて正常オリゴデンドロサイトに対して増殖作用を持つことを明らかにした。

[実験方法]

1）**グリア初代培養** 胎生17日目のICRマウス大脳をトリプシン処理によって細胞を分散し、$3x10^5$cells/cm^2密度で培養した。3日間10%FBS/DMEM中で培養した後、濃縮培養上清や精製PLPさらにAA3抗体をO3/N4完全合成培地に転換すると同時に培養系に添加し更に4日間培養した。オリゴデンドロサイトの染色は、GalCを特異的に認識するO1抗体を用いて生染色した。

2）**レトロウイルスベクターを用いて作製したPLP強制発現細胞培養上清の部分精製** PLP又はDM-20強制発現細胞の作製と濃縮培養上清の作製は中尾ら(参考文献(3)の実験方法に従った。

3）**AA3抗体の精製及び活性阻害実験** AA3およびAH7-2a抗体産生細胞はShriver CenterのLees博士から供与された。抗体産生細胞の培養上清から硫安分画によってIgG画分を得、リン酸緩衝液にて透析したものを使用した。AA3及びAH7-2a抗体をG-proteinに結合させたカラムに30μg/mlPLP及びDM-20濃縮培養上清サンプルを吸着させ、溶出させたものを培養系に添加した。対照実験として非免疫ラットIgGを用いた。

4）**PLPの精製** 雄ddYの脳から得たP2/P3膜画分をTX-100を用いてPLPとDM-20を可溶化しイオン交換カラムやヘパリンカラム等を用いて分離して精製した（投稿中）。

5）**PLPペプチド添加実験** PLPペプチド、209-217、215-232、264-276(C-terminal)は、Shriver CenterのLees博士から供与された。

[結果]

我々はPLPまたはDM-20を産生している細胞の培養上清にはオリゴデンドロサイトの分化を促進させる物質が放出されていることを見出した(3)。また、本活性はPLPのC端を認識するAA3抗体により中和されること、さらに精製PLPを添加することによってもオリゴデンドロサイトの分化が促進されることを昨年度報告した。今回、PLPの活性部位を同定したので報告する。PLP/DM-20産生細胞の濃縮培養上清とともに抗PLP抗体(AA3抗体：PLPのC末端を認識する)を添加すると、以前報告したように、AA3抗体によってGalC陽性細胞数の増加が阻害される。しかし、他の抗PLP抗体(AH7-2a抗体：PLPの209-217アミノ酸残基を認識する)では、活性が阻害されなかった(図1、図2)。このことより、このGalC陽性細胞数を増加させる活性は、PLPの断片が直接オリゴデンドロサイトの増加促進活性を担っていることが考えられた。そこでPLP又は、DM-20分子自身の活性の有無を調べるために、精製PLP, DM-20を培養系に添加したところ、オリゴデンドロサイト数が増加した。更に、PLPペプチドを培養系に添加したところ、215-232のペプチドのみGalC陽性細胞を増加させる活性があった。従って、215-232アミノ酸残基に活性中心を持ちC-terminalまでを含むペプチドが培養上清中に放出され、GalC陽

性細胞の活性を増加させていることが示唆された(図3)。

[考察]

本実験において、我々は、GlaC陽性細胞を増加させる液性因子活性がPLP断片による作用であることを明らかにした。このPLP断片部分(215-232アミノ酸残基に活性中心を持ちC-terminalを含む)はジンピーPLP遺伝子において突然変異により欠損している部分に当たる。更に、ジンピータイプのPLP及びDM-20強制発現細胞の培養上清中に正常オリゴデンドロサイトに対する増加活性を持たないことから(4), このPLP断片が液性因子活性の本体であると考えられる。現在、生体内及びオリゴデンドロサイト純粋培養系において、PLPペプチド断片の生理的作用について検討を進めているところである。

参考文献

1) Bartlett WP et al(1992) Glia 1, 253-259.
2) Ikenaka K et al(1992) Neurochem 58, 2248-2252.
3) Nakao J et al(1995) J Neurochem 64, 2396-2403.
4) Yamada et al(1995) Dev Neurosci 17, 199 (Abst).
5) Knapp et al(1995) Dev. Neurosci 17, 197(Abst).

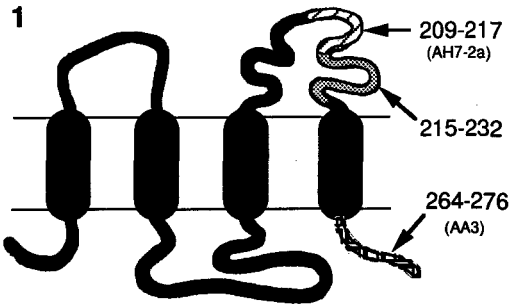


Fig.1 Schematic diagram of position of synthetic PLP peptides.

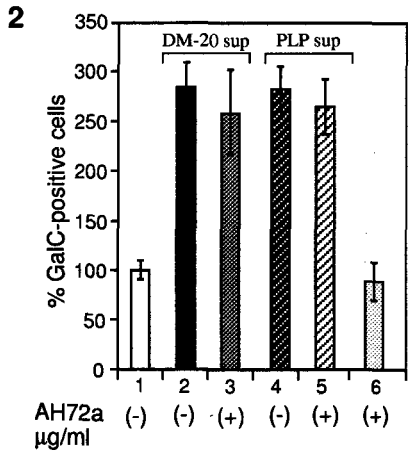


Fig. 2 Treatment of enriched supernatants from PLP/DM-20-producing NIH3T3 cells with anti-PLP monoclonal antibody AH7-2a has no effect on its activity to increase number of oligodendrocytes in culture. Lane 1, 30mg/ml enriched supernatant from NIH3T3 cells containing pDL+ retrovirus without cDNA inserts; Lanes 2,3 30mg/ml enriched supernatant from NIH3T3 cells producing DM-20; Lanes 4,5 30 mg/ml enriched supernatant from NIH3T3 cells producing PLP; Lanes 3,5,6 30mg/ml enriched supernatants from NIH3T3 cells producing PLP/ DM-20 + 40mg/ml AH7-2a antibody; Mean value (with S.D.) from triplicated experiments are shown.

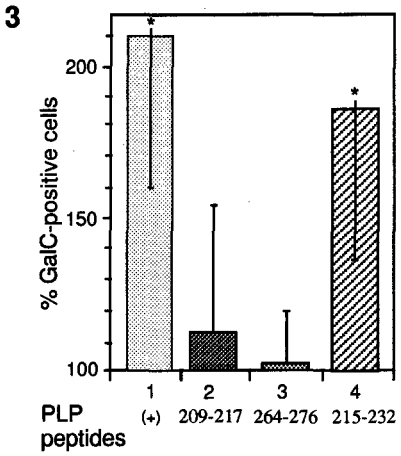


Fig. 3 Effect of synthetic PLP peptides to the number of Gal-C-positive cells in culture. PLP peptides were added to the mixed glial cell culture in final concentration 1ng/ml (stock solutions contained 10 mg/ml peptides in 15mM HCl). After 4 days in the serum-free chemically defined medum cells were immunostained for Gal-C. Number of the Gal-C positive cells treated with appropriate amount of solvent was taken as 100%. Lane 1, partially purified PLP 2 00pg/ml; Lane 2, PLP 209-217; Lane 3, PLP 26 4-276; Lane 4, PLP 215-232; Only the PLP 215-232 synthetic peptide increased the number of Gal-C positive cells in culture. Mean value (with S.D.) from triplicated experiments are shown.

84 末梢神経系神経細胞に発現するglial growth factorの新しいアイソフォームの同定

2E17

篠田 純、中尾純治、矢崎貴仁、*河瀬 斌、植村慶一

慶應義塾大学・医学部・生理学教室、*脳神経外科、

〔 要約 〕

末梢神経系の発育過程において、実際に*in vivo*でシュワン細胞の分化と増殖を調節しているglial growth factor(以下GGF)のアイソフォームを明らかにするために、生後1日目ラット脊髄後根神経節組織（以下DRG)を用い、RT-PCR法によりGGFの解析を行った。その結果、新しいGGFのアイソフォームを数種類同定し、これらが*in vivo*でシュワン細胞の増殖に機能している可能性を示した。リボプローブマッピング法により、個体の成長に伴うGGFmRNAの発現量の変化を検討した結果、生後約1週間はGGFmRNAの発現量はほぼ一定しており、このパターンとin vivoでのシュワン細胞の増殖率の変化のパターン（文献1)が異なることから、シュワン細胞の増殖を抑制的にコントロールする因子の存在が示唆された。RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends）法によるGGFmRNAの3'末端の構造の解析の結果、レセプター結合部位であるEGF様ドメインを含まないアイソフォームがDRGに発現することが明らかになり、このタイプのアイソフォームが、シュワン細胞の増殖を抑制的にコントロールしている可能性が示された。

[目的] GGFは、主として中枢および末梢神経細胞に発現する成長因子である。この因子は、末梢神経系のミエリン形成細胞であるシュワン細胞の増殖を*in vitro*で促進する作用を有しており、末梢神経系の発生・発育過程において、*in vivo*でシュワン細胞の分化と増殖の両方を調節している重要な因子であると考えられている。構造的には分子内に免疫グロブリン様ドメイン・EGF様ドメインを有する膜貫通型あるいは分泌型蛋白であり、最低13個のエクソンの可変スプライスにより複数のアイソフォームが生成される。最近、ヒトやラットの中枢神経系および腫瘍細胞株に発現するGGFのアイソフォームが多種類明らかにされてきた。しかしながら末梢神経系に関しては、実際に*in vivo*で発現するアイソフォームの構造や成長に伴う発現の変化など、詳細に検討されていない点が未だ多い。そこで著者らはこの点を明らかにするために、末梢神経系神経細胞としてDRGを用い、これをRT-PCR法等を用いて解析した。

[方法] 出生後1日目のウィスターラットの両側頚髄及び胸髄後根神経節組織を摘出し、グアニジン酸チオシアネート法によりtotal RNAを抽出した。そしてランダムプライマーと逆転写酵素を用いて、RNA10ugよりcDNAを作成し、PCR法(PCR-1および2、各々33サイクル)を行った。この際、エクソン1(=kringleドメイン：センス)、エクソン2（センス）、およびエクソン11(=細胞内ドメイン：アンチセンス）に特異的なプライマーを用いた(図1)。PCRの生成物は3.5%ポリアクリルアミドゲルにて泳動・分離し、これをナイロン膜に転写し、3種類のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、その構造を解析した。また、これらのクローンのうち数種類は、サブクローニングした後にジデオキシ法により塩基配列を決定した。さらに、個体の成長に伴うGGFmRNA発現の変化を、出生後各時期のDRGより抽出したtotal RNA20ugと、clone#2より作成したRNAプローブを用いて、リボプローブマッピング法により解析した。GGFmRNAの3'末端の構造の解析には、3'-RACE法を用いた。

[結果および考察] RT-PCR法による解析の結果、DRGに発現するGGFのアイソフォームのクローンが4種類得られた(#1～#4；図2)。#1は、既知のNDFβ1のcDNAの一部を増幅しているものと考えられる。#2,#3および#4の3種類は、現在までに報告されていない新しいアイソフォームであった。#2は、ARIA(acetylcholine receptor inducing activity)と類似しているが、エクソン3の上流で構造が異なっていた。#3と#4は、共にクリングル構造をコードするエクソン1を含むが、同時に細胞内ドメインも含んでいた(図3)。GGFは、他の因子と比較して最も強いシュワン細胞増殖能を有するが、DRGにおいては、既知のものとは異なる多種類のGGFのアイソフォームがシュワン細胞の増殖を調節している可能性が示された。リボプローブマッピング法の結果、出生後約1週間の間は、GGFの発現に著明な低下はなく、ほぼ一定していることが明らかになった(図4)。中尾らによると、in vivoでのシュワン細胞の増殖率は、

出生後１日目に最大になり、以降急速に低下する(文献１)。これらの結果は、出生後２日目以降に、シュワン細胞の増殖を抑制的にコントロールする因子の発現が増大することを示唆する。今回、RACE法の結果、レセプター結合部位であるEGF様ドメインを有さず、その代わりに既存のものとは異なる92個のアミノ酸配列をコードするアイソフォーム(=クローン#5；図3)がDRGに発現することが明らかになった。レセプター結合部位を含まないアイソフォームが過剰に発現することにより、本来のアイソフォームの作用に拮抗する可能性もあると考えられ、このEGF様モチーフを有さないアイソフォームが、in vivoでGGFに拮抗してシュワン細胞の増殖を抑制的にコントロールしている可能性が示された。

参考文献

1) 中尾純治 他、神経化学34：246-247, 1995 .

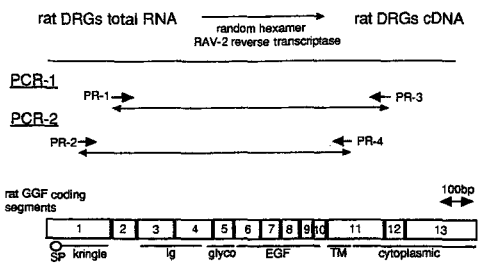


図１．RT-PCR法のプライマーの設定

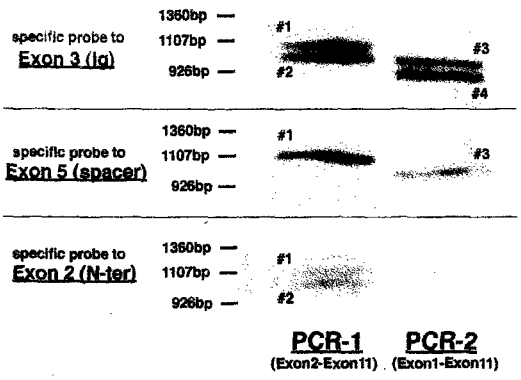


図２．サザンハイブリダイゼーション

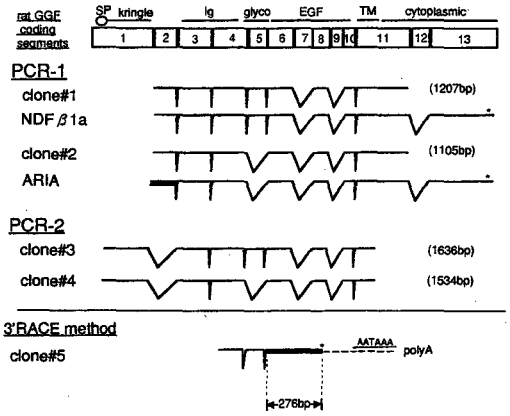


図３．得られたGGFクローンの構造

クローン#5は、3'RACE法により明らかになった、GGFアイソフォームの構造の一部を示す。
エクソン５の下流に、EGF様ドメインとは異なるアミノ酸配列(92個)をコードする領域を有する。

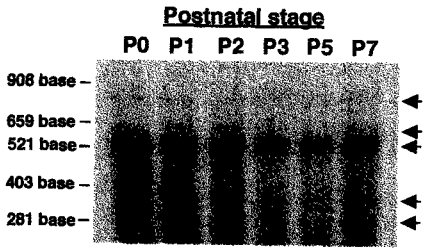


図４．DRGにおけるGGFmRNAの発現の経日的変化
（リボプローブマッピング法）
矢印は、プロテクトされたバンドを示す。

85 3Ap1 p53欠損マウス脳初代培養細胞からのミクログリア様細胞株の樹立

大澤 圭子、今井 嘉紀、中嶋一行、高坂 新一
(国立精神神経センター・神経研・代謝)

[要約]

我々は、生後1日目のp53欠損マウス脳初代培養から、アストロサイト培養上清依存性に生存、増殖するミクログリア様細胞株(MG5)を得た。このMG5細胞は高い非特異的エステラーゼ活性と貪食能を示し、Mac-1抗原を発現していた。また、MG5細胞は、LPS刺激に反応してNOを産生し、その反応性は野生型マウスの初代培養ミクログリアと同程度であった。さらに、ミクログリアに対する増殖作用が報告されているM-CSF、GM-CSF及びIL-3は、MG5細胞の増殖を刺激した。以上の結果から、MG5細胞は、初代培養ミクログリアと同様の性質を保持している細胞株であることが示され、ミクログリアの機能を解析する上で有用であると考えられる。

[目的]

ミクログリアは単なる貪食細胞としてだけではなく、種々のサイトカインや増殖因子を産生し、脳の発生、発達や損傷、病態時に重要な役割を担うと考えられている。しかしながら、ミクログリアの機能を詳細に解明するには大量の細胞が必要となり、初代培養では限界があった。我々は、以前、形質転換遺伝子であるSV40T抗原を導入することにより不死化細胞を得たが(1)、いくつかのミクログリア特異的な性質を失っており、より野生型に近い細胞株が望まれた。

最近、癌抑制遺伝子産物p53が、細胞周期や細胞死に関与する重要な機能分子であることが明らかにされ、また、p53欠損マウス由来の種々の細胞が、培養下で容易に不死化する傾向が報告された(2、3)。そこで、我々は、p53欠損マウス脳初代培養から、より野生型に近い性質を保ったミクログリア細胞株の樹立を試みた。

[方法]

細胞株の取得:生後1日目のp53欠損マウス脳初代培養から、振盪法によりミクログリアを分離し、アストロサイトの培養上清存在下で継代培養を行い、不死化した細胞を得た。これらをさらに限界希釈法によりクローン化し、細胞株MG5を得た。

細胞の同定:非特異的エステラーゼ活性は固定したMG5細胞にα-ナフチル酪酸を基質として添加し細胞の染色性を調べた。貪食能は、培養細胞にFITC結合ラテックスビーズを添加した後、蛍光顕微鏡下で観察した。細胞種特異的マーカーの発現は、蛍光免疫染色法によって調べた。

NO産生能:MG5細胞、または、野生型マウス由来初代培養ミクログリアを48ウェルプレートに播種し、培養上清をアストロサイト培養上清に交換後、LPSを添加した。24時間培養後、各ウェルの培養上清5μlに含まれるNO量を、エイコム酸化窒素分析システムを用い、亜硝酸窒素と硝酸窒素をカラムで分離し比色法で定量した。

細胞増殖能の測定:MG5細胞を48ウェルプレートに1.5x10⁴/ウェルの密度で播種し、24時間後に上清を

10%FCS-DMEMに交換した。M-CSF、GM-CSFまたはIL-3を添加した後、生存細胞数を顕微鏡下で数えた。

[結果と考察]

生後1日目のp53欠損マウス脳初代培養から分離したミクログリアを、アストロサイト培養上清存在下で継代維持し、さらにこれのクローン化を試みたところ、20日目に単細胞由来のコロニーを形成する細胞MG5が得られた。この細胞株は、培養デイッシュにトリプシン耐性の強い接着性を示したが、パスツールピペットでPBSを吹き付けることにより回収され、継代及び凍結保存することが可能であった。MG5細胞は、アストロサイトの培養上清下約2日間のdoubling timeで増殖し、すでに1年以上の培養が継続されている。MG5細胞は初代培養ミクログリアと同様に、アメボイド型、ラミファイド型、球状、及び棒状のいろいろな形態を示した（図1）。MG5細胞は、強い非特異的エステラーゼ活性を保持し、ラテックスビーズに対して強い貪食能も示した。また、マクロファージ、ミクログリアに特異的なマーカーであるMac-1が陽性であったが（図2）、アストロサイト特異的なGFAPは陰性であった。MG5細胞と野生型マウス由来ミクログリアの酸性フォスファターゼ活性、5'ーヌクレオチド活性を比較したところ、同程度の活性を示した。さらに、LPS刺激に対しても、野生型と同様のNO産生放出反応を示した（図3）。ミクログリア増殖因子として既に報告されているM-CSF、GM-CSFまたはIL-3に対する反応性を調べたところ、MG5細胞はM-CSF（50U/ml）に依存した強い増殖性を示し、GM-CSF（50ng/ml）とIL-3（100U/ml）に対しても弱い増殖性を示した。以上の結果から、MG5細胞は、野生型ミクログリアの性質をよく保持したミクログリア由来の細胞株であり、ミクログリアの生理機能を解明する上で大変有用であると考えられる。

[参考文献]

1) Hosaka, Y. et al. (1992) Neurosci. Lett. 141, 139-142
2) Tsukada, T. et al. (1993) Oncogene 8, 3313-3322
3) Yahanda, A.M. et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 4249-4259



図1. MG5細胞の形態

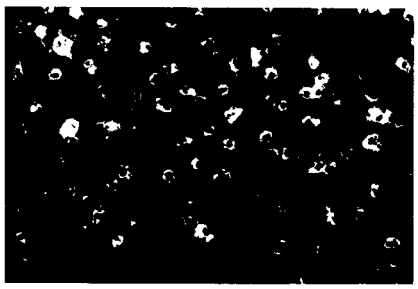


図2. MG5細胞のMac-1染色像

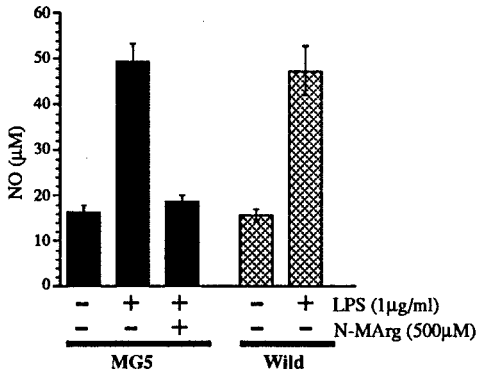


図3. LPS刺激によるNO産生
(N-MArg ; N^G-monomethylarginine)

86 ウシ脳毛細血管内皮細胞のimmortalization

2E18 -In vitro 血液脳関門モデルへの適用をめざして-

祖父江 和哉、小谷野 貴文[1]、大橋 章雄[1]、鶴岡 伸夫[2]、森川 将行[3]、浅井 清文[4]、加藤 泰治[4]
(名市大・医・麻酔蘇生学、[1]同・薬・製剤、[4]同・医・分子医研・生体制御、
[2]サントリー・生物医研、[3]奈良県医大・精神医学)

〔 要約 〕血液脳関門 (B-BB) は脳の機能、恒常性を維持する機構である。様々な病態に伴う中枢神経障害の発生機構解明や神経栄養因子あるいは中枢神経疾患治療薬の脳への移行を知るために、*in vitro* B-BBモデルの必要性を感じ、我々はウシ脳毛細血管内皮細胞 (BBEC) とアストロサイトとを共培養することにより、*in vivo*のB-BB構造と機能とを再現できる「 *in vitro* B-BBモデルの開発」を試みてきた[Isobe I et al. Neurochem.Int., 28:523-533, 1996]。その結果、BBECはアストロサイトと距離を置いて共培養してもL-glucose (細胞間隙のみ通過する) の透過性が低下することを確認した。しかし、この*in vitro* B-BBモデルの実用化にあたり、BBECの単離の難しさが大きな障害となる。そこで、ウシ脳より調製したBBECをSV40 large T antigenによりtransformし、immortalizationを試みた。得られた42クローンのうちt-BBEC-117は血管内皮細胞に特異的といわれている紡錘状の形態、DiI-acetylated-low density lipoprotein (DiI-Ac-LDL) の取り込み、multidrug resistance (mdr) mRNAの発現などの形質を保持しており、*in vitro* B-BBモデルへ適用できる可能性があると思われた。

＜実験方法＞ (A) *in vitro* B-BBモデルと透過実験：調製したウシ脳毛細血管内皮細胞 (BBEC) あるいはウシ大動脈内皮細胞 (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ウエルプレート上 (システム1) ないしはSnapwellの裏面 (システム2) に共培養した。内皮細胞がコンフルエントになった後、[^{14}C]L-glucoseを用い透過実験を行った。(B) BBECのimmortalization (Fig.2)：ウシ脳より既報の方法[1]に従いBBECを単離し、初代培養細胞を得た。pSV3-neoをリン酸カルシウム共沈法によりtransformし、geneticin sulfate 400μg/mlを加えたDMEMを用い、遺伝子導入細胞の選択を行った。9日後、限界希釈法によりsingle cell isolationを施行した。(C) 血管内皮細胞に特異的形質の確認：1) DiI-acetylated-low density lipoprotein (DiI-Ac-LDL) の取り込み；得られたクローンのうちt-BBEC-117、BBEC、ラットfibroblastについて行った。2well Chamber Slide (Nunc) に1x10^{5}個/well播種し、24時間培養後DiI-Ac-LDL 10μg/mlを添加し、37° Cで1時間反応させた。4% paraformaldehydeにて固定後、蛍光顕微鏡で観察した。 2) Alkaline phosphatase活性：各クローンについて1x10^{6}個を0.1% Triton X-100 500μlで懸濁し、遠心した上清50μlを反応に使用した。10mM *p*-nitrophenylphosphateを基質として室温で1時間反応させた後、405nmの吸光度を測定した。活性値は生成された*p*-nitrophenol濃度をmMで表示した。なお、タンパク濃度はBradford試薬 (Bio-Rad) を用いて測定した。 3) Multidrug resistance (mdr) mRNAの発現：t-BBEC-117とBBECからAcid Guanidinium -Phenol-Chloroform法によりtotal RNAを調製し、human MDR1 mRNAのsequenceに基づき設計したprimerを用い、reverse transcription-PCR (RT-PCR) を行った。

＜結果＞ L-glucoseの透過性は、BAECについてシステム1では変化はなくシステム2にすると初めて低下した。また、BBECについては両システム共に透過性の低下を確認した (Fig.1)。

Single cell isolation施行後得られた42クローンのうちBBECに似た形態を取るクローンを4種類得た。4クローンのうちt-BBEC-117はALP活性が2.8±0.2mM/hr/proteinで他の3クローンに比べ約2～3倍の活性を示した。また、t-BBEC-117のDiI-Ac-LDLの取り込みはBBECと比較してやや低下していた。なお、ラットfibroblastでは取り込みはほとんど確認できなかった。さらに、BBEC、t-BBEC-117ともにRT-PCRにより約300bpのPCRproductが確認できた (Fig.3)。

＜考察＞ 脳の機能、恒常性を維持する機構であるB-BBの機能発現にアストロサイトが何らかの影響を与えているとする報告は多い[2][3]。我々もその立場から、BBECあるいはBAECとラットアストロサイトとを共培養することにより、*in vitro* B-BBモデルの作成を試みてきた[1]。ところが、BBECを大量に単離、継代培養することは容易ではなく、この*in vitro* B-BBモデルを薬物透過性等の実験に応用する際に障害と

なる。BAECは比較的継代培養が容易ではあるが、Fig.3に示すようにBAECとアストロサイトとを膜をはさんで共培養したシステム2にするとはじめてL-glucose（細胞間隙のみ通過する）の透過性が低下する。ところが、BBECはシステム1においても透過性が低下し、技術的にも容易であり、モデルの実用化に適していることがわかった。従って、この脳毛細血管内皮細胞の安定供給を目指して、BBECのImmortalizationを試みた。4クローンに脳毛細血管内皮細胞に特徴的である紡錘状の形態が認められ、そのうちt-BBEC-117は、血管内皮細胞で高値をとるといわれるALP活性が他のクローンに比べ高値であた。また、血管内皮細胞の特異的形質の1つであるLDLレセプターについては、DiI-Ac-LDLの取り込みを確認できた。さらに、脳毛細血管内皮細胞に特異的に発現しているmdr mRNAの発現をRT-PCRで同定した。以上の結果よりt-BBEC-117は、脳毛細血管内皮細胞としての形質を維持した継代可能な細胞株であることがわかった。現在、t-BBEC-117を用いた*in vitro* B-BBモデルにおけるL-glucoseの透過性を検討中であり、透過性の低下が認められれば、t-BBEC-117の適用の可能性があると思われる。

＜文献＞ [1] Isobe, I. et al.（1996）Neurochem.Int., 28:523-533. [2] Janzer, R. et al.（1987）Nature, 325: 258-257. [3] Dehouck, M.-P.（1990）J.Neurochem., 54:1798-1801

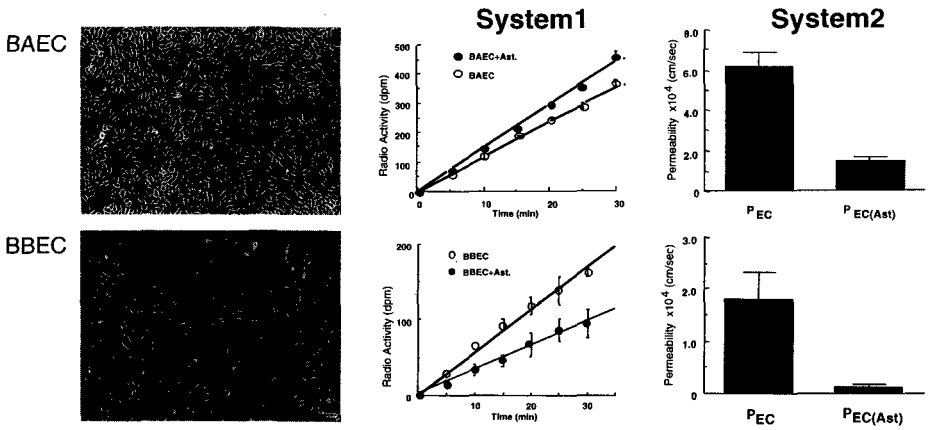


Fig.1 BAECとBBECのアストロサイトとの共培養による透過性の変化

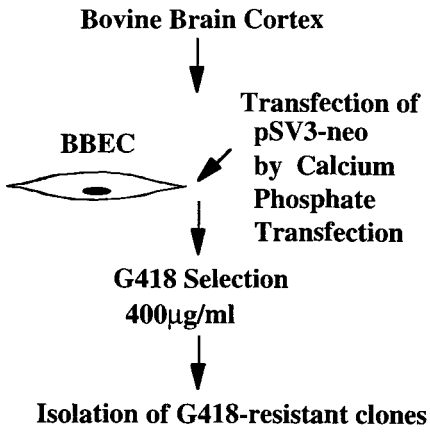


Fig.2 procedure of BBEC immortalization



Fig.3 mdr expression in t-BBEC-117

87 2E19 Neuron-astrocyte共培養系でのNeuronal Ca^{2+} oscillationに対するgap-junction阻害剤の効果

藤田 佳織、中西 圭子*、植木 孝俊§、浅井 清文、加藤 泰治
（名市大・医・分子医研・生体制御、*愛知県コロニー・生理、
§国立精神神経センター・代謝部門）

〔要約〕 我々は3種類のgap-junction阻止剤(octanol、halothane、lindane:γ-hexachlorocyclohexane)を用いて、neuron-astrocyte共培養系に存在するgap-junction(GJ)を阻止し、astrocyteがGJを介してneuron内Ca^{2+}の変動に及ぼす影響を検討した。Octanolは濃度依存的にCa^{2+}の変動の波高と振動数を低下させ、1mMの濃度で完全にCa^{2+}の変動を抑制した。また、halothaneも同様に濃度依存的にCa^{2+}の変動 の波高と振動数を低下させ、4mMの濃度で完全にCa^{2+}の変動を抑制した。一方、lindaneはneuron内[Ca^{2+}]iを濃度依存的に上昇させるとともに、Ca^{2+}の変動 の波高も上昇させた。しかし、振動数はほとんど変化しなかった。今回用いた3種のgap-junction阻止剤には副次的な薬理作用が知られている。OctanolはIP_3によるCa^{2+}の放出を抑制し、halothaneはIP_3の合成を抑制する。またlindaneはIP_3の合成を高めることによりCa^{2+}の放出を促進する。今回の実験結果を薬物の副次的作用もあわせて考察すると、1、GJを阻止したneuron-astrocyte共培養系において、neuronで観察される細胞内Ca^{2+}の周期的変化 の波高にはIP_3が強く関与している。2、neuron-astrocyte間のGJを阻止しても、その振動数はneuron内[IP_3]が保たれる限りは変化がなかった。3、neuron内Ca^{2+}の周期的変動にはneuron間のGJ(電気シナプス)の関与は少ないことが示唆された。

（実験方法）

1、Astrocyte培養:Wister rat胎児(胎生18日)の大脳皮質より、Katoらの方法で調整したastrocyteを20% FCS含有l-DMEM内で初代培養した[1]。継代2代目のastrocyteを8-well Flexiperm slideで覆った、コラーゲンコートしたカバーグラス(Matsunami Glass;20mm×60 mm)上に播種した。

2、Neuron培養(astrocyte-neuron co-culture):Wister rat胎児(胎生18日)の大脳皮質よりNakanishiらの方法でneuronをastrocyteがmono layerになっていることを確認した後、カバーグラス上に培養した[2]。培養液にはhigh-glucose DMEM(h-DMEM)に10% horse serum、1mM sodium pyruvate, 50 U/ml penicillin G, 25 μg/ml streptomycin sulfate ,1.2 mg/ml NaHCO3を用いて2×10^5 cell/wellとなるようにneuronを播種した。培養は7% CO2,37℃に環境を維持し、mediumは3-4日毎に半量づつ交換した。

3、Optical monitoring of excitatory synaptic activity: neuronの同期しておこる[Ca2+]iの変化の測定は10 mM fura-2 acetoxymethylester(fura-2 AM ; Molecular Probe)を用いたNakanishiらの方法を一部改変して行なった。蛍光像はHamamatsu SITカメラ(C-2400)で測定し、340nm/360nm比率で[Ca2+]iの濃度は測定した。チャンバーは37℃に暖めたBSSを1 ml/minで環流し、チャンバー外も37℃で暖めた。

4、薬物投与:octanol、halothaneはBSSに添加し、十分に撹拌した。またlindaneは1% BSA(bovine serum albmin) 0.2% DMSO を添加したBSSに溶解した。astrocyte-neuron共培養を開始してから10日と17日経過したneuronを測定した。

（結果）100μMから1mMのoctanolは、neuron間で同期した[Ca^{2+}]i変化 の 波高と振動数を濃度依存的に低下させた。1mMの濃度において[Ca^{2+}]iの自発的な変動は完全に停止した。しかし、薬物投与測定終了後の洗浄を行うと自発的な[Ca^{2+}]iの変動 は回復した。halothaneも同様に300μMから4mMの濃度において[Ca^{2+}]i変化 の波高と振動数を濃度依存的に低下させた。4mMの濃度において[Ca^{2+}]iの自発的な変動 は完全に停止し、洗浄により自発的な[Ca^{2+}]iの変化 は回復した。lindaneは[Ca^{2+}]i変化 の波高を100nMから1μMの濃度で濃度依存的に上昇させた。しかし、振動数はほとんど変化しなかった。いずれの薬物も、投与により同期するneuron数には変化を与えなかった。

（考察）neuron-astrocyte間(N-A GJ)、astrocyte間(A-A GJ)およびneuron間(N-N GJ)に存在するGJを阻止したneuron-astrocyte共培養系において、octanolがneuronの自発的[Ca^{2+}]i変化 の波高を濃度依存的に低下させた理由は、おそらくIP_3によるCa^{2+}の放出が阻止されたためであろう。同様にhalothaneではIP_3の合成が抑制され

た結果と考えられる[3]。また、同じGJ阻止作用のあるlindaneは、IP_3の合成を促進し、細胞内Ca^{2+}プールからCa^{2+}を放出させることにより[4]、$[Ca^{2+}]$i変化 の波高を高めたと思われる。これらの結果は、IP_3がneuronの自発的な$[Ca^{2+}]$i変化 の波高に大きく関与していることを示唆している。

一方、$[Ca^{2+}]$i変化の振動数も、octanolやhalothaneによりあたかも$[IP_3]$の低下を反映するように濃度依存的に低下したが、lindaneでは振動数は変わらなかった。このlindaneの効果は、N-A GJが塞がれastrocyteからのIP_3およびCa^{2+}の補給が断たれても、neuron内のIP_3合成が亢進し一定の$[IP_3]$が維持されていれば、振動数には変化なくneuronの自発的$[Ca^{2+}]$iの変化 は持続することを意味している。さらに、N-N GJつまり電気シナプスは、neuronの自発的$[Ca^{2+}]$i変化 には関与が少ないことを示唆している。

黒田らは、$[Ca^{2+}]$iの振動数とシナプス数に相関関係があることを報告し[5]、われわれもin vitroのシナプス形成の過程では、シナプス形成とともに振動数が上昇することを報告しastrocyteの存在がシナプス形成過程に重要な役割を果すことを示した[2]。しかし、今回のように十分なシナプス形成が完成した系におけるneuronの自発的$[Ca^{2+}]$i変化 に対しては、GJを介したastrocyteの直接的な関与は証明できなかった。ただ、長期的なN-G GJ阻止による影響については今後の検討の余地を残している。

（文献）1) Kato et al.*Biophys.Acta*,579,1979,216-227 2) Nakanishi et al.*Brain Res*,659,1994,169-178 3) Deutsh et al. *Am.J.Physiol.*, 269, 1995,(gastrointest. Liver Pysiol.32),G779-G788 4) Criswell et al. *Toxicol.Appl.Pharmcol.*,130, 1995,280-293 5) Kuroda et al. *Neurochem.Int.*,14, 1989, 309-319

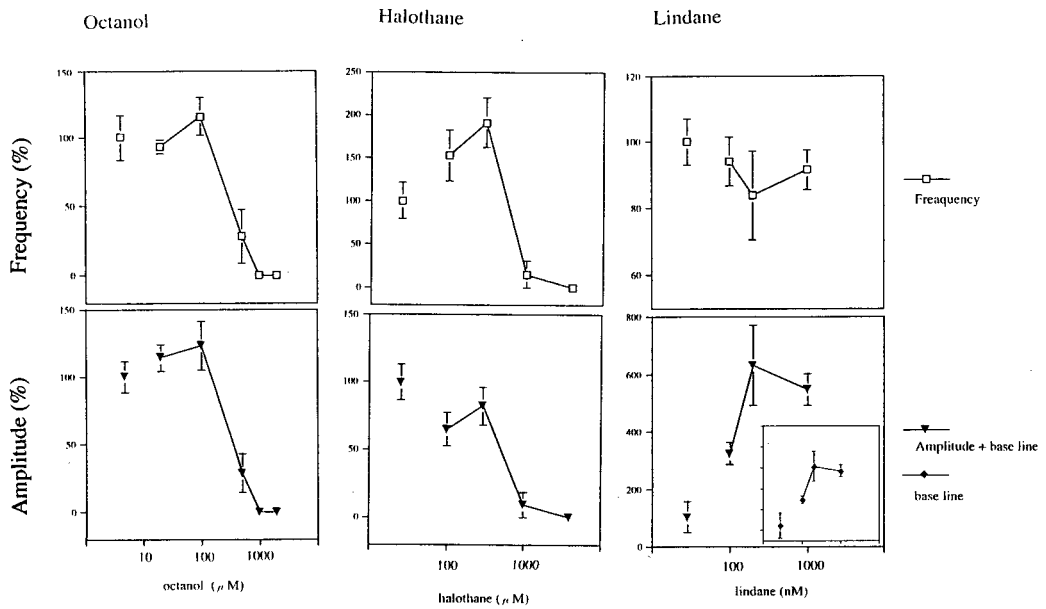


Fig 1. Ca^{2+} oscillationに対するgap-junction阻止剤の効果

88 3Ap2 マトリックスメタロプロテイナーゼ抑制因子(TIMP-2)のグリオーマ細胞に対する細胞移動・浸潤抑制効果

矢崎貴仁、星 道生*、Samuel D. Rabkin**、Robert L. Martuza**、植村慶一
(慶應義塾大学医学部・生理、*脳神経外科、**Molecular Neurosurgery Lab., Georgetown Univ. Med. Ctr.)

〔要約〕

ヒト神経膠芽腫株化細胞U-87MGを用い、細胞外マトリックスを分解し悪性腫瘍細胞の浸潤転移促進に関わるマトリックスメタロプロテイナーゼ(Matrix Metalloproteinases, MMPs)活性を抑制するTissue Inhibitor of Metalloproteinase-2(TIMP-2)の、細胞移動・組織浸潤に対する機能につき解析を行った。はじめにU-87MG細胞の培養上清(CM)を用いて初代培養ヒト血管内皮細胞を培養し、初代培養アストロサイトCMおよびメディウムのみのコントロールと比較することにより、U-87MG細胞におけるMatrix Metalloproteinase-2(MMP-2)活性を確認した。次に培養用プレートにMatrigelがコーティングされたMatrigel chamberを用い、上層にU-87 MG細胞を培養後TIMP-2の製剤であるBB-94を添加し、細胞移動能の変化を検討した。TIMP-2によりMMP-2を抑制することにより、U-87MGの細胞移動能は著明に抑制され、MMP-2がU-87MGの細胞移動・組織浸潤を促進していることが示唆された。

[目 的]

悪性腫瘍細胞はその周辺組織を破壊しながら浸潤増殖、転移する。悪性腫瘍細胞が浸潤・転移する際に物理的障壁となる細胞外マトリックスの構成成分の分解に関わるのがマトリックスメタロプロテイナーゼ(Matrix metalloproteinases, MMPs)である。一般に浸潤性が強く転移能が高い癌細胞では、細胞外マトリックス分解に関わるMMPsの産生亢進がみられ、神経系における代表的な悪性腫瘍であるグリオーマにおいても、MMP-2の産生亢進が報告されている(1)。Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)はこれらのマトリックスメタロプロテイナーゼの活性を阻害する特異的インヒビターである。TIMPsは、癌細胞による細胞外マトリックス分解を抑制することにより、癌細胞の浸潤・転移を抑制する作用が期待される。今回、TIMP-2のin vitroにおけるグリオーマ細胞移動・組織浸潤に対する作用につき検討を行った。さらに、腫瘍特異的細胞障害活性を有する変異型単純ヘルペスウイルスと併用した場合の効果についても検討を行った。

[方 法]

[1] U-87MG、初代培養アストロサイトにおける培養3日目の培養上清(condition medium, CM)を回収し、常法により初代培養を行ったヒト神経系血管内皮細胞の培養液を各々のCMで置換し、ラジオアイソトープを用いてcollagenaseIV(MMP-2)活性を定量した。[2] これまでに報告してきた腫瘍特異的に細胞障害性を発揮する変異型単純ヘルペスウイルス1型(HSV-G207)(2, 3) につき、in vitroにおけるU-87 MG細胞に対する細胞障害活性を検討した。[3] Matrigel chamberを用い、上層に1X10^{5}個のU-87MG細胞を培養し3時間後、TIMP-2製剤のBB-94を0.1mg/ml添加し、48時間後下層に移動した細胞数を定量した。コントロールとして何も添加しないもの、HSV-G207をMOI=0.1で感染させたもの、BB-94とHSV-G207両者を同時に添加感染させたものにつき検討を行った。

[結 果]

Fig.1に示したように、U-87MG細胞のCMは血管内皮細胞のcollagenase IV活性を有意に上昇させ、U-87MG細胞におけるMMP-2の産生亢進を促す因子を分泌することが示された。Fig.2にHSV-G207のU-87MG細胞に対する細胞障害活性を示す。HSV-G207は感染後5日以内にすべての細胞を死滅させ、U-87MG細胞はHSV-G207に対して高い感受性を有することが示された。Fig.3に示したMatrigel chamberを用いた実験の結果、TIMP-2製剤であるBB-94を添加した場合、48時間後における下層への移動細胞数は何も加えないコントロールに比べ約20%に減少した。HSV-G207単独で感染させた場合は約40%、両者を同時に行った場合は約1%に減少した。

[考　察]

本研究の結果、TIMP-2によりMMP-2活性を抑制することにより、ヒト神経膠芽腫U-87MG細胞の細胞移動能・浸潤能は有意に抑制されることが示された。神経系においては、悪性グリオーマ細胞の高い組織浸潤能が患者の予後を悪化させており、TIMP-2の浸潤抑制作用は新しい治療アプローチとして期待される。また、腫瘍特異的に細胞障害活性を発揮する変異型単純ヘルペスウイルスと併用した場合、TIMP-2は細胞移動・浸潤能は抑制するが細胞増殖・ウイルスに対する感受性には変化を与えないことから、TIMP-2によって細胞移動能を抑制し腫瘍細胞を狭小部位に封じ込めた上でウイルスを感染させれば、両者の相乗効果により効率の高い治療法を確立できる可能性が期待できる。

[文　献]

(1) Nakano A. et al. J. Neurosurg. 83: 298-307, 1995
(2) Mineta T. et al. Nature Med.1: 938-943, 1995
(3) Yazaki T. et al. Cancer Res.55: 4752-4756, 1995

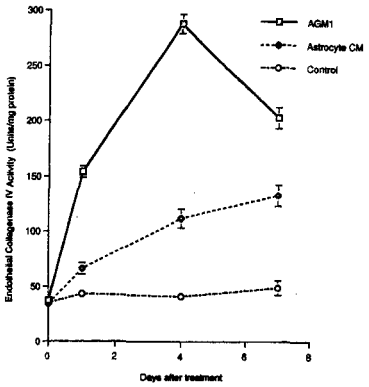


Fig.1 Effects of conditioned medium of U87-MG

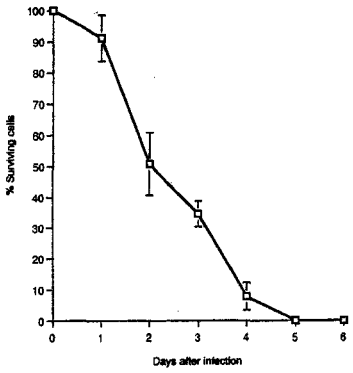


Fig.2 Cytopathic efficacy of HSV-G207 *in vitro*

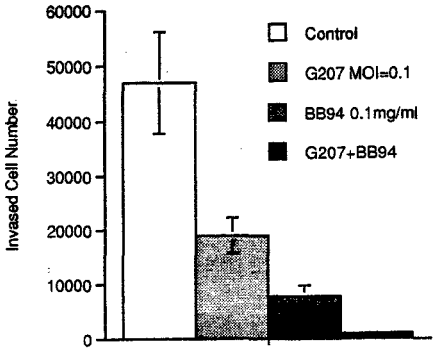


Fig.3 Invasion assay using Matrigel chamber *in vitro*

89 マイクログリアのグルココルチコイドおよびミネラルコルチコイドレセプター

3Ap3

藤田弘子、田中潤也*、松田正司、阪中雅広、前田信治*
（愛媛大学医学部第二生理学教室・第二解剖教室）

〔 要約 〕

ラット培養マイクログリアが、グルココルチコイドレセプター(GR)およびミネラルコルチコイドレセプター(MR)を発現していることを見い出した。副腎皮質ステロイドはGRを介して、光学顕微鏡レベルでの培養マイクログリアの形態変化を誘導した。電子顕微鏡による観察では、グルココルチコイドはペルオキシゾームまたはライソゾームの著しい減少を引き起こすことがわかった、ミネラルコルチコイドにはこの効果はなかった。グルココルチコイドはマイクログリアの増殖を抑制したが、ミネラルコルチコイドは抑制しなかった。一酸化窒素の産生および酸性フォスファターゼ活性に対し、GRは抑制に、MRは逆に活性化を伝達した。これらの結果は、副腎皮質ステロイドの脳内の標的の一つがマイクログリアであり、GRおよびMRを介してマイクログリアの機能抑制または活性化を引き起こしている可能性を強く示唆するものである。

[緒言]

副腎皮質ステロイドに対するレセプターは、脳内では特に海馬・辺縁系の神経細胞に豊富に発現しており[1,2]、ストレス時の神経内分泌反応や精神活動の日内変動に関与していると考えられている。最近培養アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトにもGRの発現があることが報告されてきており[3]、ステロイドの脳に対する作用が一部これらのグリアを介している可能性を示唆している。しかし、マイクログリアに副腎皮質ステロイドレセプターの発現が否かどうかについてはこれまで報告がない。今回我々は、この点について検討を行った。

[実験材料と方法]

マイクログリアの培養：マイクログリアは、ラット新生仔前脳細胞をネットを用いて分散した後、ポリリジンコートしたフラスコ中で11-14日間培養したものより分離した[4]。**[^{3}H]標識コルチコステロンを用いた結合実験**：DMEM（蛋白不含）中にて維持したマイクログリアの培養液中に20nM以下の標識コルチコステロンを加え、取り込み量をみた。500倍量の非標識コルチコステロン存在下での取り込み量を非特異的結合とした。MRの測定には、標識コルチコステロンの250倍量の合成純グルココルチコイドであるRU28362(Roussel UCLAF, Franceより供与)存在化での取り込み量とした。GRは、総特異結合量から特異的ミネラルコルチコイド結合量を差し引いたものとした。**イムノブロット**：プラスチックシャーレ上に培養したマイクログリアをSDS,TritonX100にて溶かし、電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写、抗グルココルチコイド抗体にて染色した。**電子顕微鏡**：酢酸ウラニルと鉛による電子染色を行い常法通り行った。**酸性フォスファターゼ活性測定**：p-ニトロフェノールを基質として、生成するニトロフェノールの吸光度を測定した。**光学顕微鏡レベルの形態計測**：イメージアナライザーにより細胞面積または細胞周囲長を計測した。**細胞増殖の測定**：Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)を免疫組織化学的に検出し、顕微鏡下で陽性細胞数を計測した。**一酸化窒素産生の測定**：インターフェロンγとLPSにより誘導されるiNOS活性を培養上清中に蓄積する亜硝酸イオンの濃度をGriess試薬により測定した。

[結果と考察]

[^{3}H]コルチコステロンが10nM程度存在時に、ほぼ飽和する結合サイトが存在することを見い出した（図1）。純グルココルチコイドを同時に添加すると、結合量は1/3ないし1/4程度になり、この結合がMRに由来するものと考えられた。スキャッチャード解析から、GRとMRのBmaxとKdはそれぞれ、73fmol/mg protein; 5.0nMおよび15fmol/mg protein; 0.8nMであった。Kd値は、ラット海馬について従来報告されている値とほぼ同じであった[5]。グルココルチコイドレセプターの存在は、イムノブロットによっても確認した。グルココルチコイドおよびアルドステロン・プロゲステロンは血清存在下で培養されるマイクログリアの細胞体を収縮させた（図2）。また、細胞増殖の抑制はグルココルチコイド作用の強いものでのみ観察された。これらの効果は抗グルココルチコイド剤RU38486により完全にブロックされた。

従って、増殖抑制と光学顕微鏡レベルの形態への影響はGRを介するものと考えられた。一方、電子顕微鏡レベルでは、アルドステロンが細胞内のライソゾームまたはペルオキシソームを増加させたのに対し、グルココルチコイドはこれらを著しく減少させた。また、アルドステロンとコルチコステロンは10nM以下の低濃度でNO産生を軽度活性化し、高濃度では抑制した（図3）。以上の結果より、MRはむしろマイクログリアの活性化を、GRは全般的な抑制を伝達するものと考えられた。

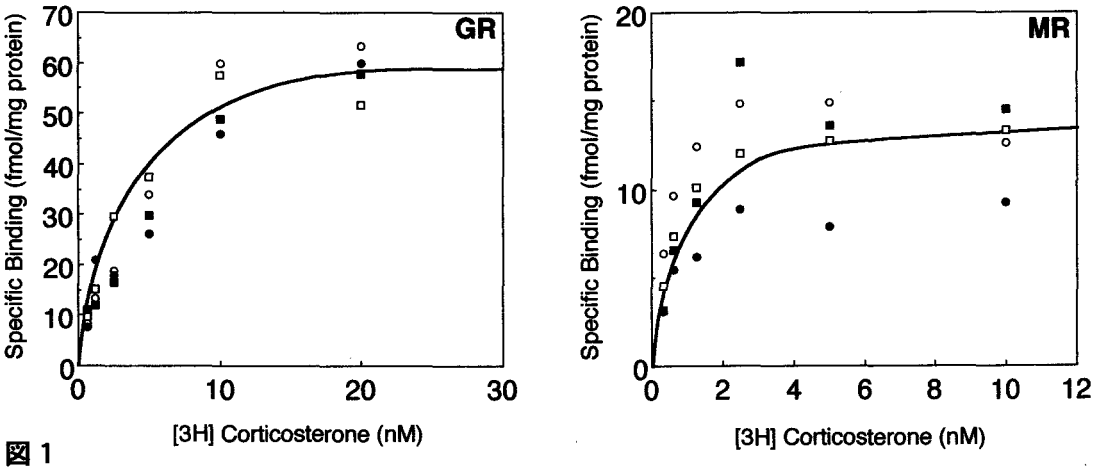


図1

結合飽和曲線。GR、MRはそれぞれグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドレセプターに関する解析結果を示す。(n=4)。

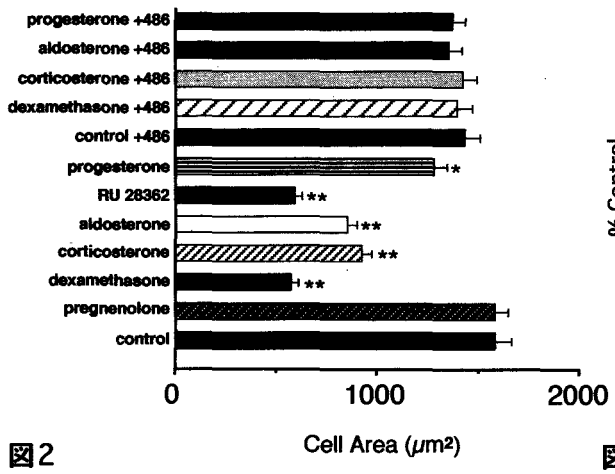


図2

3%血清存在下で培養したマイクログリアの細胞面積に対するステロイドの影響。486は抗グルココルチコイド剤RU38486を示す。レセプターレベルで競合阻害するこの拮抗剤により、ステロイドの形態への影響はブロックされる。*p<0.001, **p<0.0001(vs.control)

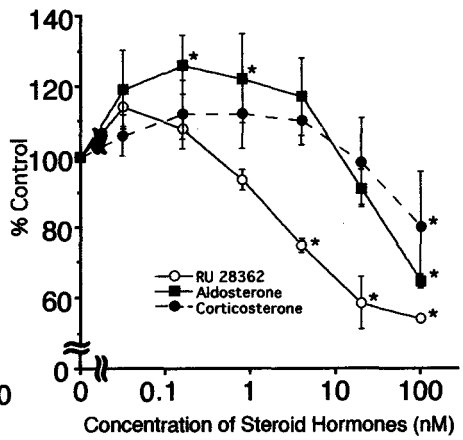


図3

NO産生に対するステロイドの濃度依存性の影響。コルチコステロンとアルドステロンは10nM以下の低濃度では活性化するが、高濃度になると抑制効果を示す。ミネラルコルチコイド作用のない、RU28386では、抑制効果のみがみられる。
*** p<0.05 (vs.control)**

[参考文献]
[1] Arriza, J.L. et al. (1988) Neuron, 1:887-900. [2] Cintra, A. et al. (1992) Neuroscience, 62:843-897. [3] Vielkind, U. et al. (1990) J. Neurosci. Res., 27:360-373. [4] Tanaka, J. and Maeda, N. (1996) Exp. Neurol., 137:367-375. [5] Reul, J.M.H.M. and De Kloet, E.R. (1985) Endocrinology, 117:2505-2511.

90 2E20 初代培養オリゴデンドロサイトのミエリン関連糖タンパク質(MAG)の発現に対するニューロンの役割

松田義宏、小糸寿美、山元 弘
(国立精神・神経センター・神経研・免疫)

〔 要約 〕
ミエリン関連糖タンパク質(MAG)は分化・成熟したオリゴデンドロサイトで発現され、ミエリン形成における細胞間接着因子として重要な役割を担うとされている。本研究では、MAGの発現調節に対するニューロンの寄与を、初代培養オリゴデンドロサイトに胚性癌細胞P19由来のニューロンを作用させることによって検討した。その結果、ミエリン形成期に選択的な増量を示すことが知られているMAGのL型アイソフォームの発現がニューロンの膜成分の作用下に特異的に誘導されることを見出した。また、このときに発現するL-MAGがチロシン残基のリン酸化を受けていることも認めた。

ミエリンの形成機序の詳細は未だ明らかでない。ミエリン関連糖タンパク質(MAG)は、有髄線維の軸索周囲に局在し、ミエリン膜と神経軸索の間の直接の接着に関与すると考えられている[1]。さらに、同タンパク質のL型アイソフォームはミエリン形成期に一致する時期に著明な発現増大を示すことが知られ[2]、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。ところが、初代培養オリゴデンドロサイトでは、培養を継続しても緩やかな分化傾向と低いレベルのMAGの発現を示すのみで、ミエリン形成期に対応するMAG遺伝子の特徴的な発現誘導が観察されない。このことは、in vivoではミエリン形成に際して、オリゴデンドロサイトが何らかの環境要因の影響下にMAGの発現を増強することを示唆する。我々はこれまでに、RT-PCR法を利用して、ニューロンとオリゴデンドロサイトの共培養下にMAGmRNAレベルが著明に上昇することを見出し、この発現誘導には両細胞の接触が必要であることを明らかにしてきた[3]。本研究ではさらに、MAGの発現促進がニューロンの細胞膜成分の投与でも認められることを示し、また、抗MAG抗体を用いた免疫沈降法により、MAGの発現増大を蛋白質レベルでも検討した。

[方法]

(1) 初代培養オリゴデンドロサイト：新生マウスの大脳皮質部をトリプシン処理によって分散し、ポリ-L-リジン被覆した培養皿に2 x 10^5 cells/cm^2の細胞密度で加えた。最初は10% FCSを含むDMEM中、2日後からは無血清培地(F12/DMEM[1:1])中で培養することにより、オリゴデンドロサイトに富む細胞標品を得た。

(2) 胚性癌細胞(EC)P19由来ニューロン：マウス胚性癌細胞P19を0.7 mMレチノイン酸存在下に4日間凝集培養してニューロンへの分化を誘導した後、トリプシン処理によって分散し、ポリ-L-リジン被覆した培養皿に1 x 10^5 cells/cm^2の細胞密度で加えた。

(3) RT-PCR法：培養細胞から総RNA画分を抽出し、逆転写反応によってcDNAを調製した後、MAGの2種のアイソフォーム(L-MAGとS-MAG)を同時に分別定量できるように設定したプライマーを用いてPCRを行い、増幅したDNAを電気泳動後、デンシトメトリーによって定量した[4]。

(4) 免疫沈降法：培養細胞を0.5%NP40-PBSで可溶化し、ウサギ抗MAG抗血清及びProtein G-Sepharoseを加えてMAGを不溶化した。沈降物をSDS-PAGE(7.5%ゲル)により分画した後、抗MAG抗体、抗ホスホチロシン抗体を用いるウェスタンブロッティングを行った。

[結果]

ニューロンとオリゴデンドロサイトの共培養によるMAGmRNAの発現量の変化を図1に示す。オリゴデンドロサイト上にEC細胞P19由来のニューロンを直接添加し、接触条件下に4日間培養を継続した場合には著明なMAGの発現促進が観察されたのに対して、メンブランフィルターで隔離された二重培養槽を用い、ニューロンと接触できない条件下に同期間、共培養を実施したオリゴデンドロサイトでは有意なMAGの発現変化は認められなかった。このことは、MAGの発現誘導要因として、ニューロンが放出する液性因子ではなく、細胞間の接触が必要であることを

示唆する。

P19細胞由来のニューロンを4-5日間、単独で培養し、十分に成熟した形態となったところで収集して、凍結融解法によって細胞を破砕した。遠心によって分離した膜画分と可溶性画分をそれぞれ、初代培養オリゴデンドロサイト上に添加し、2日後にMAGmRNA量を調べたところ、図2に示すように、膜成分を与えられたオリゴデンドロサイトにのみL-MAGの著しい発現増大が見られた。このことより、ニューロン細胞膜内にL-MAGの発現を誘導する分子が存在することが示唆され、細胞間接触の重要性が裏付けられた。

MAGの発現誘導ををタンパク質レベルで検討するために、抗MAG抗体を用いた免疫沈降法とウェスタンブロッティングを試みた。その結果、MAGレベルの増大が確認されると共に、そのチロシン残基がリン酸化を受けていることも観察された。

[考察]

MAGのL型アイソフォームはin vivoでミエリン形成期に一致した発現を示すことから、ミエリン形成の初発段階に重要な役割を担うことが予想されているが、この発現増大はオリゴデンドロサイトとニューロンとの接触に基づく刺激入力によって誘導されることが明らかになった。このことから、脳の発達過程において、軸索へのオリゴデンドロサイト膜の接触を受けてL-MAGが作られ、生じたL-MAGの作用によって細胞間の接着がさらに強固なものとなり、ミエリンの形成に発展していくという機序が想定される。

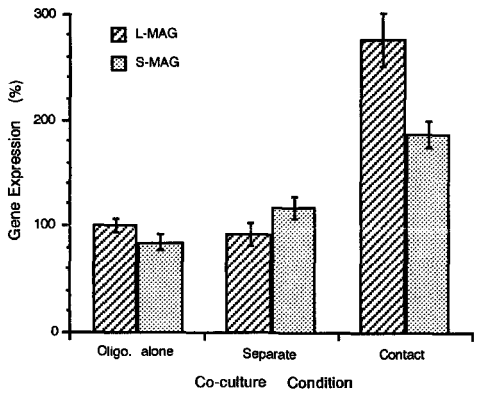


図1．ニューロン-オリゴデンドロサイト共培養によるMAGmRNAの発現誘導。初代培養オリゴデンドロサイトにP19細胞由来のニューロンを直接添加した場合(contact)と二重培養槽を用いて非接触下に共培養した場合(separate)について、4日間培養後、RT-PCR法によりMAGmRNAを定量した。

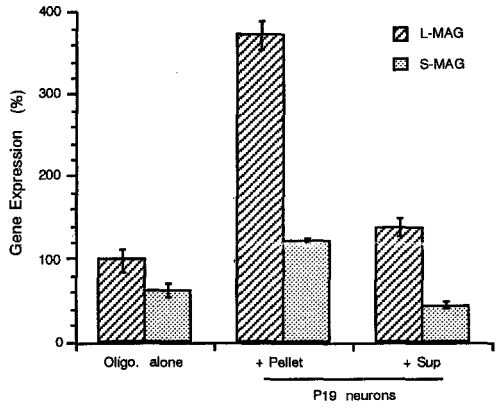


図2．MAGの発現に対するニューロン細胞成分の作用。P19細胞由来のニューロンを凍結融解処理によって破砕した後、膜成分と可溶性成分に分画し、初代培養オリゴデンドロサイトに加えた。2日後、細胞を回収し、MAGmRNAを定量した。

[文献]

1) Sternberger, N. H. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1510-1514
2) Inuzuka, T. et al. (1991) Brain Res. 562, 173-175
3) 松田他 (1995) 生化学 67, 764
4) 松田他 (1994) 神経化学 32, 592-593

91 末梢神経ミエリン P2 蛋白の脂質結合能に関する検討

2E21 坂本 安、北村邦男、吉村和法、長島直美*、竹原直美*、野村正彦
（埼玉医科大学第１生理・*中央測定室）

〔 要約 〕

我々は末梢神経ミエリンに存在する P2 蛋白の構造と機能解析を続けており、ウシ、ヒト、サルの一次構造に関して報告している。結果としてウシ P2 蛋白のN-末端側 33 残基について、Cellular retinol binding protein (CRBP)、Cellular retinoic acid binding protein (CRABP)と約 50 ～ 60 %の類似性が見られ、ラット肝臓の脂質結合性蛋白である Z 蛋白との全一次構造上の類似性が 27 %であったことから【1, 2, 3】、レチノイド、オレイン酸との結合性に関して検討し本学会で既に報告した。しかしながら、 P2 蛋白の生理的役割に関してはまだ不明な点が多く、昨年より分析方法を高感度化し種々の脂質との結合性を測定した結果、ウシ、サル P2 蛋白がオレイン酸を代表とする脂肪酸をほぼ、 1 : 1 のモル比で結合することが明らかとなった。したがって、脂肪酸と結合しミエリンの重層構造の構築に関与することが P2 蛋白の機能の候補として考えられた。今回、検出方法を液体クロマトグラフィー-質量分析系 (LC-MS)を用いて高感度化すると共に脂質との結合性に関してさらに検討を加えた。

〔目的〕

P2 蛋白蛋白の機能として考えられる、脂肪酸結合能に関して詳細に検討するために、飽和脂肪酸（パルミチン酸）、不飽和脂肪酸（オレイン酸）、フォスフォリピド（フォスファチジルコリン）との結合性を検討した。さらに分析方法の高感度化と Non-RI 化するために LC-MS を用いた検出方法を開発し、ドコサヘキサエン酸 docosahexanoic acid〔22:6n-3〕(DHA) との結合性に関して検討を加えた。

〔実験方法〕

（アイソトープを用いた結合能測定）

ウシ P2 蛋白は既報の方法【4】によって精製した。 P2 蛋白 1nmol を 25mM KCl、5mM $MgCl_2$ を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で 5nmol の [1-14C]Oleic acid、 [1-14C]Palmitic acid、Phospatidylcholine L α -1-palmitoy,-2-[1-14C]oleoyl の存在下でアルゴン封入し、 4 時間インキュベートした。この反応液を Tosoh G3000SW XL カラムを用いたゲル濾過 HPLC により溶離した。溶出液として 300mM KCl を含む Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)を用いた。 P2 蛋白に結合した各脂質の比活性と蛋白量を同時測定するために UV 検出器と Radio analyzer (Aloka RLC-701) をタンデムに接続した。

（LC-MS を用いたDHAの結合能測定）

LC としてファルマシアスマートシステムを JEOL AX505 H 質量分析計にヒューズドカピラリーを介して接続し、カラムは野村化学 Develosil ODS-5, 0.5ID X 150 mm を用いた。溶出液を、Solvent A : 0.1% TFA, 1% Glycerol / H_2O 、Solvent B : 0.1% TFA, 1% Glycerol / acetonitrile :isopropanol = 2 : 1 とし、流速 4ul/min 、Solvent B の初期値は 95% とした。サンプルインジェクションの５分後から Solvent B を１５分間で 95% から 100 % まで上昇させるグラジェントを用いて DHA 10 pmol をMS イオン源へ溶出導入した。Flit-FAB モードで導入されたサンプルをイオン化し、m/z = 328 の負イオンについて Single ion monitering (SIM) 測定を行った。

上記の方法(4)に従い P2 蛋白 100 pmol と DHA 500 pmol をインキュベート後、反応液をゲル濾過 HPLC により溶出し P2 蛋白画分を分取した。この画分に 6N HCl 100 ul を加え、500 ul のヘキサンで２度抽出しヘキサン層を合わせて直ちに窒素フラッシュによる風乾を行った。さらに遠心エバポレーターを用いて充分乾燥した後 Solvent A : Solvent B = 4 : 1 の溶液に溶解し、SIM 分析試料とした。

[結果と考察]

P2 蛋白とオレイン酸の結合能の測定結果を Fig. 1 に示した。４つ試料の測定結果の平均値から P2 蛋白とオレイン酸はモル比で 1 : 0.91 の結合量であった。従って、１モルの P2 蛋白は１モルのオレイン酸を結合すると考えられた。一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とリン脂質であるフォスファチジルコリンとの結合能測定結果を Fig. 2 に示した。この実験結果から、 P2 蛋白とパルミチン酸の結合能は 1 : 0.59 とオレイン酸より若干低い値を示した。また、リン脂質であるホスファチジルコリンとの結合性はほとんど観察されなかった。これらの結果から、結合性に対する２重結合、フリーのカルボン酸の有無の関与に関して注目された。したがって、２重結合を多く含む脂肪酸である DHA、Eicosapentanoic acid (EPA) 等との結合性に関して興味がもたれた。しかしながら、今後結合能実験を続行するために、測定試料の微量化は重用な課題の一つであり、LC-MS を用いた SIM 測定による脂質検出の高感度化について検討した。Fig. 3B に示すように DHA は、1 pmol 程度から分析可能なピーク面積を示し、10 pmol で充分信頼できるピーク面積を与えた。今回、実験精度の低下をおさえるために 10 pmol での検出を遂行した。 Fig. 3A に示すようにP2 蛋白 100 pmol に対して結合し

た DHA を実験方法に従って抽出しその 1/10 量について SIM 測定を行った。二つの試料の分析結果の平均値として DHA は、 P2 蛋白に対して 1 : 1.2 のモル比で検出されたことから DHA もまた P2 蛋白と 1 : 1 で結合し得ることが示唆された。DHA は、中枢神経系、特に網膜に豊富に見出され、視神経の発達に重用であることが知られている。また、脳の発達に不可欠であると考えられており、その多くは、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン等の細胞膜リン脂質の構成成分として存在する【5, 6】。しかしながら、P2 蛋白は今回の実験からフリーの脂肪酸に強い結合性を示す点で興味深く、脂肪酸のキャリアーとして機能することが予測される。今後、LC-MS による SIM 定量法に内部標準物質を用いることを検討中であり、定量精度を上げると共に他の脂肪酸、脂質との結合実験を遂行する予定である。

〔文献〕

1) Crabb, J. W. and Saari, J.C. (1981) FEBS Lett. 130, 15-18
2) Eriksson, V., Sundelin, J., Rask, L. and Peterson, P. A. (1981) FEBS Leet. 139, 70-72
3) Takahashi, K., Odani, S. and Ono, T. (1982) B. B. R. C. 106, 1099-1105
4) Kitamura, K., Yamanaka, T. and Uyemura, K. (1975) B. B. A. 379, 582-589
5) Yeh Y. Y., Gehman M. F. and Yeh S. M. (1993) 35, 218-226
6) Wang. N. and Anderson R. E. (1993) Biochemistry 32, 13703-13709

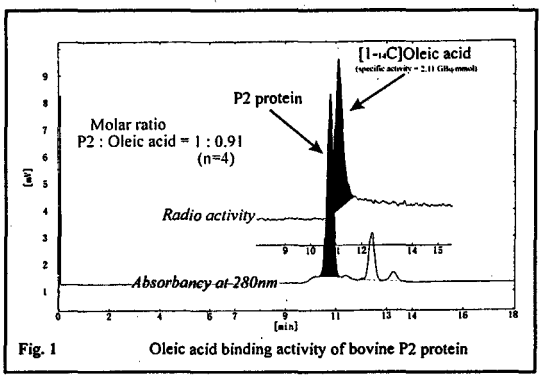


Fig. 1 Oleic acid binding activity of bovine P2 protein

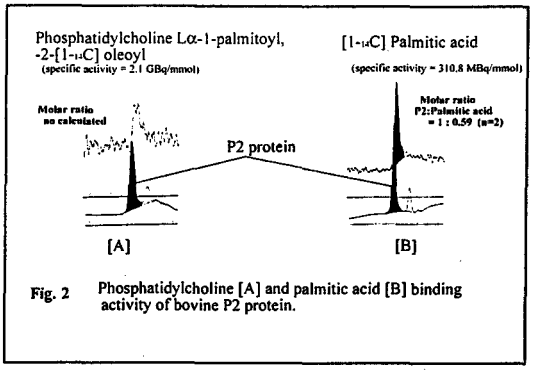


Fig. 2 Phosphatidylcholine [A] and palmitic acid [B] binding activity of bovine P2 protein.

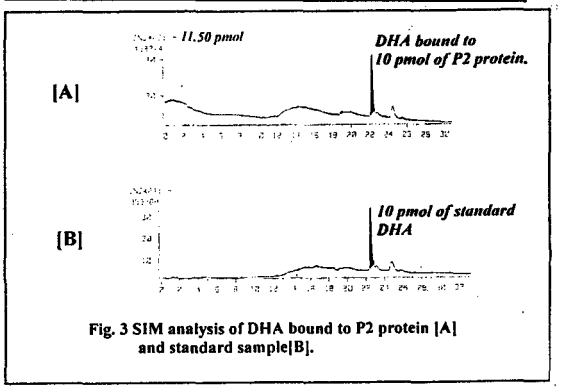


Fig. 3 SIM analysis of DHA bound to P2 protein [A] and standard sample[B].

92 ミエリンタンパクの分子進化

2E22

栗原 正、吉田弘美、佐久間充弘、小嶋久子*、玉井洋一*
（創価大・生命研・神経化学、* 北里大・医・生化学）

〔 要約 〕

脊椎動物の3つのミエリンタンパク（PLP、MBPおよびCNP）は爬虫類の分岐以前には（3億年前以前には）現在より速く進化していた。脊椎動物はMBPおよびCNP遺伝子を無顎類の分岐以後に（4億5千万年前以降に）、またPLP遺伝子を条鰭類の分岐以後に（4億年前以降に）獲得したとされる。我々は、これらのミエリンタンパクがそれぞれ遺伝子獲得直後には非常に速く進化していたこと、また進化速度がそれから次第に減少していったことを推論した。

「分子進化時計」の提唱以来、アミノ酸置換数で表わしたそれぞれのタンパクの進化速度は長い進化時間を通してほぼ一定であることを示す成績が蓄積してきた[1)]。あるタンパクの機能はそのタンパクの受け入れ可能な変化を制限する。かくして機能的制約（functional constraint）がそのタンパクの進化速度を制御する[1)]。事実、機能的制約から解放された偽遺伝子は速く進化する[2)]。我々はここに、脊椎動物の3つのミエリンタンパク（PLP、MBPおよびCNP）が爬虫類の分岐以前には（3億年前以前には）現在より速く進化していたことを報告する。

［方法］

アミノ酸配列は主にDDBJ/EMBL/GenBankデータベースのDNA配列を翻訳して用いたほか、哺乳類以外のCNPについては我々の未発表データ（吉田弘美ほか、未発表）を用いた。アミノ酸サイト当たりのアミノ酸置換数はKimura[1)]の経験式$K = -\log_e(1 - p - 0.2p^2)$（$p$はアミノ酸の違いの割合）により算出した。ギャップの配列は計算から除外した。MBPは同じアイソフォーム間で、CNPはCNP1の配列を比較した。

［結果］

図1はミエリンタンパクの変化（アミノ酸置換数）を脊椎動物各綱の分岐後の時間に対してプロットしたものである。今までに算定された他のタンパクと違い、3つのミエリンタンパクは爬虫類の分岐以前には（3億年前以前には）現在より速く進化していたことがわかる。このことは、現在進化速度がきわめて低いPLPで最もはっきりしている。脊椎動物はMBPおよびCNP遺伝子を無顎類の分岐以後に（4億5千万年前以降に）、またPLP遺伝子を条鰭類actinopterygiiの分岐以後に（4億年前以降に）獲得したとされる。我々は、これらのミエリンタンパクがそれぞれ遺伝子獲得直後には非常に速く進化していたこと、また進化速度がそれから次第に減少していったことを推論した。

［考察］

ミエリンタンパクが初めて脊椎動物に現れたとき、これらのタンパクの機能は確立していず、それゆえ機能的制約が弱く、非常に速い進化が可能であった。その後、機能の確立とともに、機能的制約が次第に増加し、進化速度が低下していったと考えた。当初正の淘汰が働いていた可能性があり、現在さらに検討中である。

硬骨魚類の中で、条鰭類（大部分が真骨魚類、すなわち現在のごく普通の魚）にはPLPがない。PLPはP0タンパクで置き換えられている。しかし、硬骨魚類の総鰭類（シーラカンス）には哺乳類PLPの抗体と反応する同じ大きさのタンパクがある[3]。また、シーラカンスの脳には他の硬骨魚類にくらべ10倍のCNP活性がある[4]。したがってシーラカンスは他の硬骨魚類より四肢動物に近いと考えられる。シーラカンスのミエリンタンパクがどの程度四肢動物に近いのか興味が持たれるが、配列はまだ解明されていない。

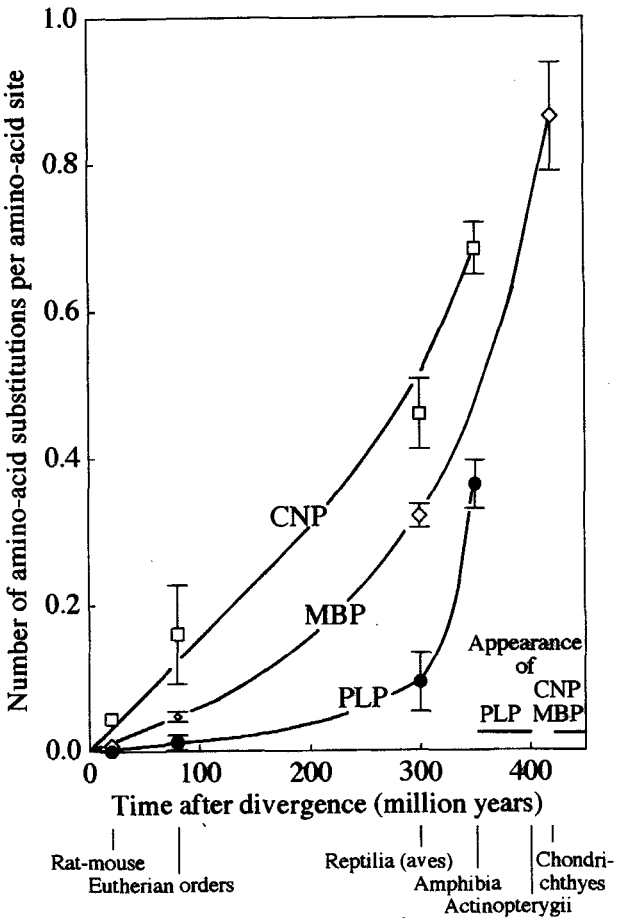


図1　ミエリンタンパクの変化（アミノ酸置換数）
平均値 ±2xSD

［文献］

1）Kimura, M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983)

2）Miyata, T. & Yasunaga, T. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 450-453 (1981); Li, W.-H., Gojobori, T. & Nei, M. *Nature* 292, 237-239 (1981)

3）Waehneldt, T.V. & Malotka, J. *J. Neurochem.* 52, 1941-1943 (1989)

4）Tamai, Y., Kojima, H. & Abe, K. *Comp. Biochem. Physiol.* 83, 295-299 (1986)

93 2E23 ニワトリおよびウシガエル2',3'-環状ヌクレオチド3'-フォスフォジエステラーゼのcDNAクローニング

吉田弘美、栗原 正、佐久間充弘、遠山陽子、小嶋久子*、玉井洋一*
(創価大・生命研・神経化学、*北里大・医・生化学)

〔要約〕
ニワトリおよびウシガエル2',3'-環状ヌクレオチド3'-フォスフォジエステラーゼのcDNAをクローニングし、cDNAの配列からタンパクのアミノ酸配列を決定した。また、ウェスタンブロット解析により、ニワトリおよびウシガエルの脳に存在するアイソフォームを同定した。アミノ酸配列の比較は、よく保存されている部位を明らかにするとともに、配列全体としては脊椎動物の進化の過程でかなりはげしく変化していくことを示した。

2',3'-環状ヌクレオチド3'-フォスフォジエステラーゼ（CNP）は魚類以上の脊椎動物の神経系に見出だされ、ミエリン形成細胞に特異的に発現している。両生類は魚類に比べCNP活性が著しく高く[1]、魚類の中では四肢動物への移行型と想像されるシーラカンスにCNP活性が高い[2]。したがって、魚類から四肢動物への進化を考える上で、CNPとその遺伝子の系統発生的相関は大変興味深い。ところが、CNPのcDNAまたは遺伝子のクローニングは哺乳類以外では行われていない。そこで我々は、進化の段階が異なるいくつかの脊椎動物でCNPのcDNAクローニングを行なうことにした。今回はニワトリ（鳥類）およびウシガエル（両生類）CNPのcDNAクローニング、アミノ酸配列、ウェスタンブロット解析の結果を報告する。

[方法]

PCRのプライマーは28マーのデジェネレートプライマーで、5'端にTCクランプとEcoRIサイトを含む。参考にした配列は哺乳類CNPのC端175アミノ酸残基である。ウエスタンブロット解析は前報[3]に従った。用いた抗体はウシCNPのエラスターゼ断片に対する抗体とCNP2の特異配列に対する抗体である[3]。

[結果および考察]

哺乳類CNPのアミノ酸配列を参考に各種プライマーを合成し、ニワトリ（鳥類）、ウシガエル（両生類）、コイ（魚類）の脳RNAからRT-PCRでCNPのcDNA断片が生じるかどうか試験した。その結果、プライマーS2とA3の組み合わせでニワトリのcDNA断片370 bpが、プライマーS1とA1の組み合わせでウシガエルのcDNA断片370 bpが得られた。しかしながらコイはcDNA断片が得られなかった。ニワトリ

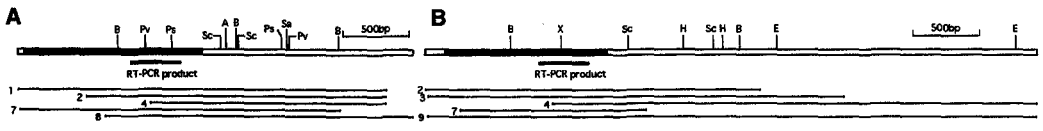


図1 ニワトリcDNA（A）とウシガエルcDNA（B） 黒塗り部分は翻訳領域

とウシガエルについてはcDNA断片をプローブにそれぞれの脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。そしてニワトリからはCNP2型のCNPをコードするcDNA（図1A）が、ウシガエルからはCNP1型のCNPをコードするcDNA（図1B）がクローニングされ、cDNAの配列からそれぞれのCNPのアミノ酸配列が決定された。ウエスタンブロットでは、ニワトリの脳にはメジャーバンドとその直下にマイナーバンドがあり（図2）、メジャーバンドはCNP2の特異配列に対する抗体と反応した。ニワトリのメジャーバンドがCNP2とすると、ニワトリにはCNP1に相当するバンドはない。一方、ウシガエルの脳には1種類のアイソフォームしか存在しない（図2）。このバンドはCNP2の特異配列に対する抗体と反応しない。以上のように、ニワトリの脳では主にCNP2が、ウシガエルの脳ではCNP1だけが発現している。哺乳類の脳には、調べた限りではすべて、CNP1とCNP2の2種のアイソフォームが存在する。ニワトリやウシガエルではなぜ片方しか発現してないのか不明である。今回明らかになったニワトリとウシガエルを含め、現在わかっている6種の脊椎動物のアミノ酸配列を比較した。最もよく保存されている領域はATP結合部位と仮定されるGLPGSGKSTを中心にした13残基であった（図3）。この配列がCNPタンパクの機能上重要であることが示唆される。全体のアミノ酸配列の比較では、哺乳類3種間で83-90%のアミノ酸が同一なのに対し、ニワトリと哺乳類の間では65%、ウシガエルと哺乳類あるいはウシガエルとニワトリの間では52-53%のアミノ酸が同一であるにすぎなかった。すなわち、CNP分子は脊椎動物の系統発生を反映してかなりはげしく変化していく。CNP分子は脊椎動物の進化の指標として有用と思われる。

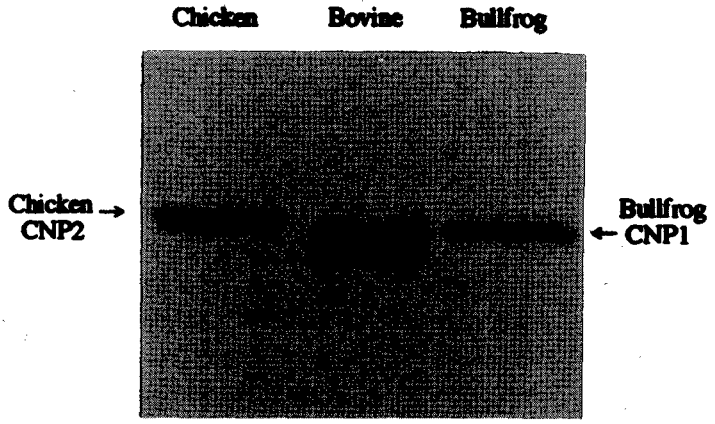


図2　ウェスタンブロット解析

```
                Amino terminus of CNP1                                                                  CNP1 CNP2
Human     MSSSGAKDKPE-LQ-FPFLQDEDTVATLLECKTLFILRGLPGSGKSTLARVIVDKYRDGTKMVSADAYKITPGARGAFSEEYKRLDEDLAAYCRRRDIRILVL  101  121
Bovine    **********-**-*******E*****Q*********************F***************S*********S******Q*******C*-***F*V***  100  120
Rat       **********-**-*************H*********************L**E**HN***********I**S*AD************G**-*****V***  100  120
Mouse     *******E***-**-*************H*********************L*LE**H***********I**S*AD***A*********G**-*****V***  100  120
Chicken   **AQA**ER*DS*-R****D**E*I***R*S**F*************************QA*QER****C*VIA*EN*****AV*SGVP***GKV****VE**-K**VSVI**                 120
Bullfrog  ***QAS**QL*G-*KP*L*V*DH**V*VR*S*V*VI*************************KD*EL**KETSRLF***Q*E*K*VI*SSSGGD*TK**DE*TTCFE**EANLVI*  102
```

図3　アミノ酸配列の比較（部分）　*はヒトと同じ配列

［文献］

1）Kurihara, T. & Tsukada, Y. *J. Neurochem.* 14, 1167-1174 (1967)

2）Tamai, Y., Kojima, H. & Abe, K. *Comp. Biochem. Physiol.* 83, 295-299 (1986)

3）Kurihara, T. et al. *Neurosci. Lett.* 138, 49-52 (1992)

94 神経細胞のプログラム細胞死の際に発現誘導する遺伝子ＤＰ５の単離と機能解析

2Da1 今泉和則[1,2]、津田 学[1,2]、片山泰一[1,2]、高木 勉[1]、和中明生[4]、遠山正弥[3]
（阪大・医・分子脳[1]、田辺製薬[2]、阪大・医・第二解剖[3]、福島医大・細胞科学[4]）

〔 要約 〕
神経細胞のプログラム細胞死（ＰＣＤ）の分子メカニズムを解明する目的で、ラット上頸神経節（ＳＣＧ）神経細胞の培養上清からＮＧＦを除去することによって誘発されるＰＣＤの際に発現誘導する遺伝子をディファレンシャル・ディスプレイ（ＤＤ）によりスクリーニングした。その結果、細胞死誘導時のみに発現する新規遺伝子１クローン（ＤＰ５）を取得した。この遺伝子産物は９２コのアミノ酸から構成され、既存のタンパク質との相同性は認められなかった。ＤＰ５ｍＲＮＡの発現はＮＧＦ除去後５時間目から誘導され、１５時間目をピークとした。一方、ＤＰ５遺伝子産物はＮＧＦ除去後２４時間目に発現がみられた。ＰＣＤの阻害剤であるシクロヘキシミドや高k^+処理によりＤＰ５の発現抑制がみられたことから、本遺伝子発現は新たなタンパク合成を必要とし、細胞死プログラムによって制御されていることが示唆された。また、マイクロインジェクション法によりＳＣＧ神経細胞にＤＰ５を過剰発現させると、大多数の細胞がＴＵＮＥＬ染色陽性のＤＮＡ断片化を伴うアポトーシスにより死滅した。

［目 的］
中枢神経系ではその発生過程において、生産された神経細胞の半数以上が死滅する。この細胞死は標的由来の神経栄養因子を獲得できなかったことにより起こるＰＣＤであることが示唆されている（１）。最近、種々のin vitroモデル系を用いて細胞死に関連する遺伝子がいくつか見いだされてきたが（２，３）、これら遺伝子のＰＣＤにおける役割については明らかにされていない。そこで今回我々は神経細胞のＰＣＤの分子メカニズムの一端を解析する目的で交感神経節神経細胞の初代培養系からＮＧＦを除去することにより誘発される細胞死の際に発現誘導する遺伝子の単離を試みた。

［材料および方法］
１．神経細胞培養：生直ラットの上頸神経節を摘出し、既報（４）に従って５－７日間ＮＧＦ存在下で培養した。細胞死の誘導はＮＧＦを含まない培養液に交換すると共に、抗ＮＧＦ抗体を１μｇ／ｍｌの濃度で添加することによって行った。
２．遺伝子スクリーニング：ＤＤをLiang and Pardee（５）の方法に従って行った。スクリーニングには約１００種類のランダムプライマーを用いた。
３．ｃＤＮＡライブラリースクリーニング、シーケンシング、ノーザンおよびウェスタンブロッティング：常法に従った。
４．ＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ発現量の定量化：コントロール実験から特異的プライマーにより増幅されるＰＣＲ産物が対数的に増加するサイクルを決定し、そのサイクルでＰＣＲを行って得られたバンドの濃さをイメージアナライザーで定量した。
５．抗体の作製：バキュロウイルスを用いて発現させたリコンビナントＧＳＴ融合タンパクを免疫原として抗体を作製した。
６．マイクロインジェクション：ヒトＥＦ１αのプロモーター直下に目的の遺伝子をクローニングした発現プラスミドを培養ＳＣＧ神経細胞の核内に微量注入した。

［結果および考察］

ＤＤ法により細胞死誘導時のみに特異的に発現するクローンＤＰ５を見い出した。５.５ｋｂｐの全長ｃＤＮＡの解析の結果、本遺伝子は９２コのアミノ酸からなるポリペプタイドをコードする新規遺伝子であることが明らかとなった。データベース検索からＤＰ５ポリペプタイドは既存のタンパク質とはホモロジーはなく、しかも既知の機能モチーフも含んでいなかった。リコンビナントＧＳＴ－ＤＰ５を抗原として作製した抗体は、ＮＧＦ除去後２４時間のＳＣＧ神経細胞に特異的な約１０ｋＤのバンドを検出した。ＤＰ５ｍＲＮＡは細胞死誘導後５時間目から発現が見られ本実験系のコミットメントポイントである１５時間目にピークを示した（図１）。細胞死抑制剤であるシクロヘキシミド、ＫＣｌ、ｃＡＭＰのアナログＣＰＴｃＡＭＰあるいはＩＣＥインヒビターを加え細胞死をブロックした場合、ＤＰ５の発現はいずれも激減した。本遺伝子のコーディング領域を含む約１.５ｋｂｐのｃＤＮＡを発現プラスミドにクローニングし、ＮＧＦ存在下で培養したＳＣＧ神経細胞の核内に微量注入したところ、注入後６時間目から大多数の細胞が細胞体の萎縮、細胞膜のブレッビング、核の濃縮等のアポトーシス様変化を呈し死滅した（図２）。これら細胞の核はＴＵＮＥＬ陽性反応を示し、ＤＮＡ断片化を伴っていた。

以上の結果から、ＤＰ５は細胞死プログラムを構成するタンパクのひとつであり、しかもそのもの自身に細胞死誘導能をもつことが示唆された。また本遺伝子は中枢神経系に特異的に発現しており、神経細胞のＰＣＤには免疫系とは異なった細胞死カスケードの存在が予想された。

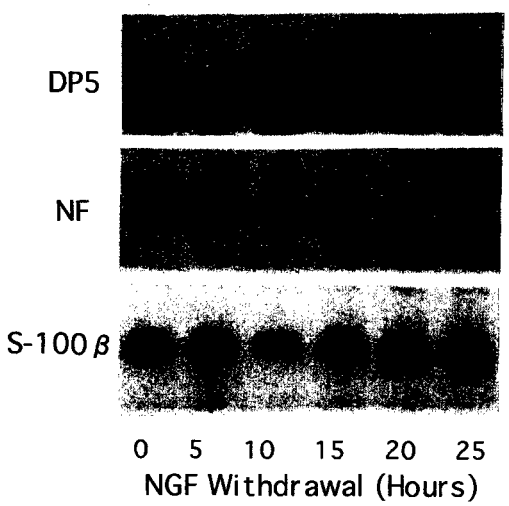


図１　ＲＴ－ＰＣＲによるＤＰ５の発現変化の解析

ＮＧＦ除去後の各ポイントで全ＲＮＡを抽出後、ＤＰ５（２５サイクル）、ニューロフィラメント（ＮＦ、２３サイクル）およびＳ－100β（２５サイクル）の特異的プライマーを用いて^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ存在下でＲＴ－ＰＣＲを行った。

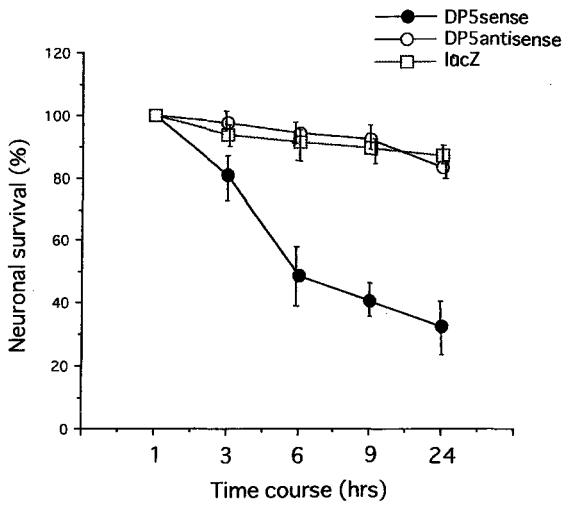


図２　ＤＰ５の過剰発現による神経細胞死

コーディング領域を含む約１.５ｋｂｐのＤＰ５ｃＤＮＡ（ｓｅｎｓｅ）をＮＧＦ存在下に培養したＳＣＧ神経細胞の核内に注入した後、生存細胞数を経時的にカウントした。ＤＰ５ａｎｔｉｓｅｎｓｅ、ＬａｃＺ遺伝子を過剰発現させた細胞をコントロールとした。

［文献］

(1) Korsching,S (1993). J.Neurosci.13,2739-2748. (2) Freeman,R.S.et al.(1994). Neuron 12,343--355. (3) Estus,S.et al.(1995). J.Cell Biol.127,1717-1726 (4) Ham,J.et al.(1995). Neuron 14,927-939. (5) Liang,P.and Pardee,A.B.(1992). Science 257,967-971.

95 1E53 中枢ニューロンアポトーシスにおける癌抑制遺伝子 *p53* の役割

榎戸 靖[1]、荒木敏行[1]、稲村直子[1]、田中亀代次[2]、相澤慎一[3]、畠中 寛[1]
([1]大阪大・蛋白研、[2]大阪大・細工セ、[3]熊本大・医・遺伝発生医学研)

〔要約〕

癌抑制遺伝子 *p53* の中枢神経系における働きについて、DNA ダメージによって誘導されるポストマイトーティックな中枢ニューロン死への関与を検討した。生後 15～16 日齢の正常 (*p53+/+*) およびジーンターゲティングにより *p53* 遺伝子を破壊した *p53* 欠損 (*p53-/-*) マウスの小脳ニューロンを培養下に置き、それぞれの遺伝子型を持つニューロンの DNA ダメージに対する感受性の違いおよびニューロン死と細胞周期との関係について調べた。その結果、種々の DNA ダメージに対し、正常マウスのニューロンは培養 24～72 時間で顕著なニューロン死が見られるのに対し、*p53-/-* ニューロンはγ線やエトポシド、ブレオマイシンによるニューロン死に対して高い抵抗性を示した。また、ニューロン死の過程で DNA 合成ならびに細胞周期の S 期への移行は観察されなかった。

[序論]

脳・神経系におけるニューロン死の問題は、形態形成のみならず成熟したニューロンの長期生存能力および様々な神経機能障害の機構解明を考えるうえでも極めて重要なものである。現在までニューロン死の多くは、アポトーシスと呼ばれる能動的な細胞内自殺メカニズムを介して誘導されていることが知られているが、これら神経系のアポトーシスに関して、とりわけポストマイトーティックな中枢ニューロンにおいては、アポトーシスの誘導に直接関与する遺伝子の同定も含めた分子レベルでの解析はほとんど進んでいない状況にある。本研究では癌抑制遺伝子 *p53* の中枢神経系における働きについて、特にニューロンの高次機能および長期生存能力を保証するうえで必要不可欠なゲノムの安定化の問題に注目し、DNA ダメージによって誘導されるポストマイトーティックな中枢ニューロン死への関与を検討した。また、ニューロン死と細胞周期との関連についてブロモデオキシウリジン染色ならびにフローサイトメーターを用いた解析を合わせて行った[(1)]。

[方法]

生後 15～16 日齢マウス小脳ニューロンの初代培養は、既報に従って行った[(2)(3)(4)]。パパイン消化によって分散した細胞はポリエチレンイミンコートした 48 穴 (0.66 cm^2) カルチャープレートまたは 4 穴 (1 cm^2) フレキシパームをのせたカバーガラス上で 2～5 日間培養した。細胞の生存は MTT アッセイまたはプレート内の MAP2 陽性細胞数をカウントして求めた。アポトーシスの判定は Hoechst 33258 による蛍光染色と TUNEL 法を用いて行った。細胞内 DNA 合成ならびに細胞周期の変化はそれぞれ細胞を 5-ブロモデオキシウリジンラベルした後、抗ブロモデオキシウリジンと MAP2 抗体で二重染色するかあるいはヨウ化プロピディウムでラベルした後フローサイトメーターで細胞内の DNA 含量の変化を測定して調べた。用いたマウスの遺伝子型は既報に従いマウスの尾から抽出したゲノム DNA を PCR 法を用いて判別した[(5)]。

[結果と考察]

まず始めに、γ線照射に対する感受性について検討したところ、*p53+/+* ニューロンでは、1 Gy を越える照射により、照射 24 時間後より顕著なニューロン死が観察された (図 1)。このニューロン死は形態学的および生化学的特徴からアポトーシスであることが示された。一方、*p53-/-* ニューロンではこの様なニューロン死はほとんど観察されず、30 Gy のγ線照射 48 時間後においても約 90% のニューロンは正常な形態を保持したまま生存している様子が観察された。さらに種々の DNA-damaging agent の効

果を検討したところ、*p53-/-*ニューロンではブレオマイシンやエトポシド等の DNA 鎖切断によるニューロン死は抑えられたが、DNA アルキル化や DNA 架橋による傷害では正常ニューロンとの間で差は見られなかった。また、シトシンアラビノシド (ara C) によるニューロン死も抑制された[2]。次に脱分極刺激除去によるニューロン死について調べたところ、*p53* の関与は見られなかった。最後にニューロン死と細胞周期との関連について、ブロモデオキシウリジンによる免疫染色とフローサイトメトリーを用いた解析を行ったところ、*p53+/+*、*p53-/-*ニューロンともに、アポトーシスの過程において細胞周期の変動および DNA 合成は観察されなかった[1]。

以上の結果は、ポストマイトーティックな中枢ニューロンのアポトーシス関連遺伝子として *p53* 遺伝子の関与を明らかにしただけでなく、その生理的役割として DNA 傷害を受けたニューロンを除去することによる中枢神経系のゲノム安定化への関与を示唆した点で重要である。現在、ニューロンに対する DNA ダメージの要因として酸素ラジカルが重要な役割を演じていることが予想され、様々な神経障害への関与が知られる酸素ラジカルを介したニューロン死と *p53* 遺伝子との関係を調べるうえで有効な実験系となることが予想される[6]。

[文献]

(1) Enokido, Y., Araki, T., Tanaka, K., Aizawa, S. and Hatanaka, H. *Eur. J. Neurosci.*, (1996) in press.

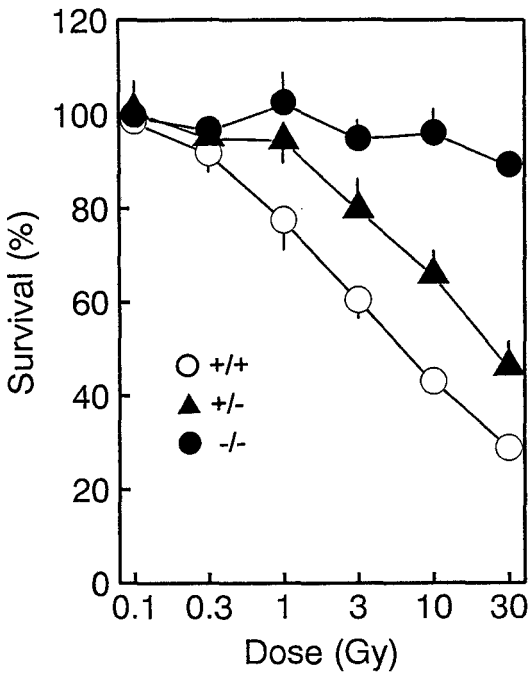
(2) Enokido, Y., Araki, T., Aizawa, S. and and Hatanaka,H. *Neurosci. Lett.*, **203** (1996) 1-4.

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

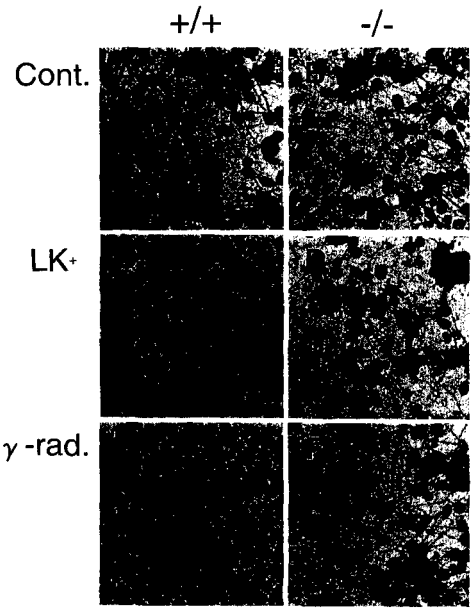
(4) Kubo,T., Nonomura,T., Enokido, Y. and Hatanaka,H. *Dev. Brain Res.*, **85** (1995) 249-258.

(5) Tsukada, et al., *Oncogene*, **8** (1993) 3313-3322.

(6) Yamada, M., Enokido, Y., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H. *Eur. J. Neurosci.*, **7** (1995)2130-2138.



(図1) 生後 15 日齢マウス小脳ニューロンのγ線照射 48 時間後の生存率。生存は MTT アッセイで測定した。



(図2) γ線 (γ -rad) および低濃度カリウム刺激 (LK) によるニューロン死と *p53* との関係。γ線照射した *p53-/-* ニューロン (F) は TUNEL 法で染色されない。

96 p53遺伝子に依存的な中枢神経幹細胞のアポトーシス

2Da2

久恒辰博[12]、Ronald D. G. McKay[2]、上野川修一[1]
([1]東大院・応用生命化学、[2]Lab. Mol. Biol., NINDS, NIH)

[要約] p53遺伝子は細胞周期抑制能および細胞死誘導能を有しており、ガン抑制遺伝子として機能している。発達中の前脳において、顕著なp53のmRNAの発現が認められており、中枢神経系の発生と分化にp53遺伝子が何らかの関与をしていることが推定される。本研究においては、神経幹細胞の初代培養系を用いて、p53ノックアウトおよびワイルドタイプマウスの神経幹細胞の特性を比較した。その結果、p53ノックアウトの場合、ワイルドタイプにおいて非常に顕著な神経幹細胞のアポトーシスが完全に消失し、分化も遅延していることが明らかとなった。このp53ノックアウト神経幹細胞の優れた増殖性を利用し、さらに制御可能なガン遺伝子(Myc-ER)を導入して多能性神経幹細胞株(MSP-1)が樹立された。このMSP-1細胞にp53遺伝子を導入した結果、アポトーシスが誘導されることが示された。本研究により、インビトロ系において中枢神経幹細胞にp53遺伝子に依存的にアポトーシスが誘導されることが示された。

[緒言] 近年、中枢神経幹細胞の存在が成熟マウスにおいても確認され、神経変性疾患に対する臨床的な応用が期待されている。McKayらは、ガン遺伝子を導入して神経幹細胞株を作成し、この細胞を脳内に移植することにより変性した中枢神経系を修復する研究を長年行ってきている。この中で、神経幹細胞のインビトロ系での増殖を阻害する内在遺伝子の存在が指摘されていた。p53遺伝子は細胞周期調節機能および細胞死誘導機能を介して細胞の増殖を阻害する活性を有している。発達中の中枢神経系において顕著なp53のmRNAの発現が認められており、p53遺伝子が神経幹細胞の増殖あるいは分化に対して調節的な役割を果たしている可能性が高い。本研究において、p53遺伝子に依存的な神経幹細胞のアポトーシスが立証され、p53ノックアウトの胎児前脳から非常に増殖性の良い多能性神経幹細胞株を樹立することに成功した。これらの結果は、将来的な脳移植の可能性を高めるために貢献するものと期待される。

[実験材料と方法] 神経幹細胞の増殖および分化に対するp53遺伝子の影響を神経幹細胞の初代培養系を用いて解析した。胎生14日(p53ノックアウト/ワイルドタイプ)マウスの発達中の前脳を顕微鏡下でとりだし、ピペッティング操作により細胞を調整し、これを4日間前培養した。この細胞を回収し、神経幹細胞として用いた。この細胞はbFGFの存在下では自己再生能を有し、bFGFの除去により直ちに分化を開始する。

[結果と考察] 神経幹細胞の増殖に対するp53遺伝子の影響を観察した。神経幹細胞の細胞数はp53ノックアウトマウスの場合に順調に増大するが、ワイルドタイプマウスの場合は時間経過とともに逆に減少することが観察された。図1に細胞培養器の単位面積あたりの細胞数の変化、および生細胞と死細胞の比率を示す。ワイルドタイプの培養においては死細胞の比率が時間経過とともに増加することが示された。そして、この細胞死はアポトーシスの形態をとることが確認された。これらの結果から、p53遺伝子座は神経幹細胞のアポートシスの誘導に関与していることが示された。つぎに、神経幹細胞の分化に対するp53遺伝子の影響を解析し

た。ワイルドタイプに比べp53ノックアウトの場合は、ニューロンおよびグリア細胞への分化が遅延することが観察された。

p53遺伝子が欠損した神経幹細胞は培養中に自然に起こるアポトーシスを回避できるため、p53ノックアウト神経幹細胞を用いた不死化細胞株の樹立が期待された。p53ノックアウトあるいはワイルドタイプの神経幹細胞を限界希釈し、コロニーの出現頻度を比較した。その結果、p53ノックアウトの場合のみ相当数のコロニーが観察された。しかしこれらのコロニーはbFGFにより増殖させる最中に自然発生的に分化が誘導され、この方法では不死化神経幹細胞株は得られなかった。そこで、分化を阻害する目的でp53ノックアウトマウスの神経幹細胞に制御可能なガン遺伝子（Myc-ER）を導入し、増殖条件において対数的な細胞増殖を繰り返し、分化条件においてニューロンおよびグリア細胞へと終末分化を遂げる多能性神経幹細胞株（MSP-1）を樹立した。この細胞は培養中に起こる細胞死の頻度が極端に低く、非常に取り扱いが容易である。この細胞を用いて、p53遺伝子の導入により神経幹細胞にアポトーシスが誘導されることが示された。図2に神経幹細胞の増殖、分化、細胞死とp53, bFGF, Mycの関係を模式的に表す。

インビトロ系での実験結果から、p53遺伝子に依存的な神経幹細胞のアポトーシスの存在が明らかとなった。発達中の前脳におけるアポトーシスの頻度をp53ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスで比較した。しかしながら、両群においてもアポトーシスの頻度は低く有為な差異は認められなかった。この領域において、顕著なp53mRNAの発現が確認されてはいるが、p53蛋白質は非常に不安定であり、この蛋白質が活性化状態として機能していないことが推定された。逆にインビトロ系では、特異的なシグナルによりp53蛋白質が活性化状態にあることが推測される。現在このシグナルの特定を急いでいる。

前脳領域において、神経幹細胞はX線の照射に対する感受性が極端に高く、低レベルのX線照射によっても特異的な細胞の脱落が観察されている。この際の細胞死はおそらくp53遺伝子に依存的なアポートシスによるものと考えられる。さらに母体に対する様々なストレス（体温の上昇、公害物質による環境ストレス、電磁波、心理的ストレス）がp53遺伝子に依存的なアポトーシスを誘起し、結果的に胎児の大脳の発達に悪影響を及ぼすことも懸念される。一般的に、p53遺伝子に依存的なアポトーシスは放射能照射の場合にのみ認められるが、中枢神経系においてはこの神経幹細胞の場合に加え、てんかんモデルにおいてもp53遺伝子に依存的にニューロナルアポトーシスが誘導されることが示されている。中枢神経系は、p53遺伝子に依存的なアポトーシスに対して非常に感受性が高いことが想定され、ほかの神経変性疾患（アルツハイマー病、プリオン病、パーキンソン病、ハンチントン病など）においても、p53遺伝子に依存的なニューロナルアポトーシスの関与が考えられる。

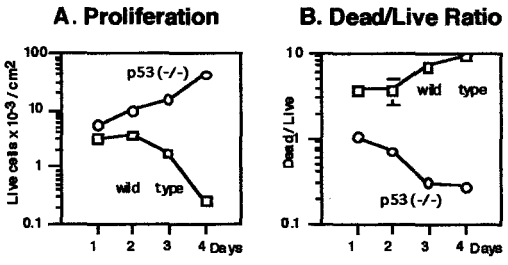


図1. p53 (-/-) 神経幹細胞の顕著な増殖性(A)と細胞死（アポトーシス）の消失(B)

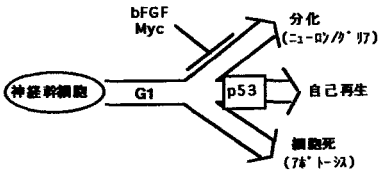


図2. 神経幹細胞に及ぼすp53遺伝子産物の影響（モデル）

97 1E54 温熱刺激によるグリオーマ細胞周期の変化とp21Cdkインヒビターの発現

布施孝久、山田和雄、*浅井清文、加藤泰治、**中西真
(名市大・医・脳外、*同・分子医学研・生体制御、**国立長寿研)

〔要約〕

グリオーマ細胞は温度変化や低酸素などの環境ストレスに反応し、熱ショック(ストレス)蛋白が発現することが知られている(1)。また温熱刺激により細胞周期の変化が認められ、熱ショック蛋白hsp70の発現は細胞周期にも関連している(2)。最近、温熱刺激によりp53の発現が報告された(3)。そこで温熱刺激における細胞周期の変化に、p53の下流でG1期の細胞周期停止に作用するとされるp21Cdkインヒビター(4)がどのように関与しているかについて蛋白およびmRNAについて検討した。wild-typeのp53をもつA172グリオーマ細胞では温熱刺激後3時間をピークとしたp21mRNAの発現がみられ、蛋白レベルでも発現増強が認められた。このときの細胞周期をフローサイトメトリーにより検討すると、G1期で細胞周期が止まることが示された。これらから温熱刺激における細胞周期の変化にはp21Cdkインヒビターが関与していることが示唆された。また、mutant-typeのp53をもつT98Gグリオーマ細胞及びLi-Fraumeni細胞では両方の細胞とも温熱刺激後早期にp21mRNAの発現がみられ、さらにこの発現は蛋白合成阻害剤cycloheximideで抑制されなかった。これらの事実より、p21Cdkインヒビターは温熱刺激の際にはp53非依存的な発現も伴うimmediate-early response geneと考えられた(5)。

【実験方法】

1) 細胞株及び温熱刺激:p53がwild-typeであるA172グリオーマ細胞、mutant-typeであるT98Gグリオーマ細胞及びコントロールとしてLi-Fraumeni症候群の繊維芽細胞を用いて、44度のwater bathによる15分間の温熱刺激を行い、その後37度で一定時間培養を継続した。

2) ウエスタンブロット:A172グリオーマ細胞から抽出した蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲルに泳動したのち、ニトロセルロース膜に転写した。p21及びhsp70蛋白に対する抗体を用いて蛋白発現を経時的に検出した。

3) ノーザンブロット:A172、T98G、MDAH041細胞からそれぞれtotalRNAを抽出し、ホルムアルデヒドゲルに泳動したのちナイロン膜に転写した。p21Cdkインヒビターのc DNA probeを [^{32}P] dCTPによりラベルしハイブリダイゼーションを行った。

4) 各細胞の細胞周期変化はflow cytometryを用いて解析した。

5) p21mRNA発現時に蛋白合成が関与するか否かの検討のために蛋白合成阻害剤 cycloheximide (CHX) (20mg/ml)を用いて、温熱刺激を行った。その際、コントロール としてCHX刺激だけを行った場合も検討した。

【結果及び考察】

温熱刺激によりhsp70蛋白は全ての細胞で発現増強が認められ、温熱によるストレスが各細胞に同

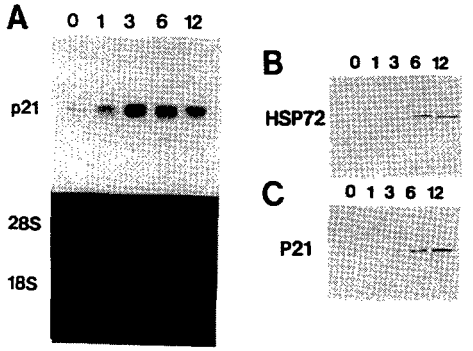
様に負荷されたことが示された。

A172細胞は、温熱刺激により細胞周期はG1期に停止するとともにp21蛋白質、p21mRNAの発現が増強されることが示された（図1）。これらの結果から、A172細胞の温熱刺激による細胞周期の変化にはp21蛋白が関与している可能性が示唆された。

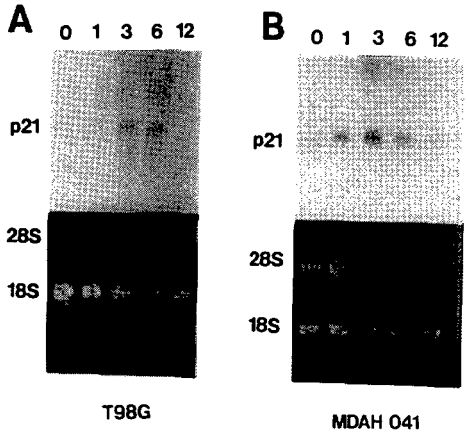
一方、p21mRNAの発現増強がmutant-typeのp53をもつ細胞株(T98G, MDAH041)でも認められたことは、温熱刺激ではp53非依存性にもP21が発現すると推察された（図2）。

また、p21mRNAの発現が温熱刺激後3時間でピークに達し、CHXにより発現が抑えられなかったことは、p21がimmediate-early response geneであることを示唆した。さらにCHX刺激だけでも軽度のp21mRNAの発現が認められたことから、p21が未知の不安定な抑制を受けている可能性が示された（図3）。

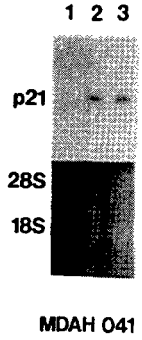
【図1】



【図2】



【図3】



【図説】

図1：A;A172細胞における温熱刺激後のp21mRNAの発現（0, 1, 3, 6, 12時間）B, C;HSP72及びp21蛋白の発現。

図2：A;T98G及びB;MDAH041細胞における温熱刺激後のp21mRNAの発現。

図3：MDAH041細胞におけるCHX存在下のp21mRNAの発現。レーン1；コントロール。2；CHXのみ。3；CHX+温熱刺激。

【参考文献】 1) Andrews, G.K., Harding,M.A.,Calvet,J.P.and Adamson,E.D. (1987) Mol. Cell Biol.7, 3452-3458. 2) 布施孝久(1991) 脳と神経43, 843-850. 3)Matumoto,H ,Shimura,M., Omatsu,T., Okaichi,K., Majima,H. and Ohnishi,T. (1994) cancer letters 87, 39-46. 4) Nakanishi,M., Robetorye, R.S., Adami, G.R., Pereira-Smith, O.M.and Smith, J.R. (1995) EMBO J.14, 555-563. 5) Fuse, T., Yamada, K., Asai, K., Kato,T. and Nakanishi, M. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun.. in press

98 1E55 プログラム神経細胞死における小胞体内ストレス蛋白質 BiP/GRP78 の発現

田中 秀逸、信川 貴子、小池 達郎
（北大院理行動知能学）

〔要約〕
神経成長因子(NGF)存在下で充分に交感神経様細胞に分化させたPC12細胞は、NGF除去に伴い細胞死を起こす。この細胞死に伴い、ヒートショック蛋白質の一種で小胞体に特異的に存在するBiP/GRP78の発現が増加する。このストレス蛋白質BiPの増加が、末梢神経初代培養系の上頚神経節(SCG)細胞のNGF除去による細胞死においても、中枢神経初代培養系の小脳顆粒細胞の分化過程で起こる細胞死においても、ノーザンブロッティング法により確認された。また、細胞内カルシウムのキレート剤であるBAPTA-AM処理により引き起こされる培養SCG細胞の細胞死の際も、BiPの発現増加が認められた。NGF除去によるSCG細胞の細胞死に伴うBiPの発現増加は、神経細胞死の過程で細胞内のカルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)の低下が起こる時間とほぼ一致した。BiPの発現は、細胞をCalcium Ionophore A23187やThapsigarginにより処理することによっても増強される事が知られている。このことは、神経細胞のプログラム細胞死に伴い$[Ca^{2+}]_i$の低下が起こるが、これは小胞体内のCa^{2+}濃度の減少にもつながり、小胞体ー核シグナル伝達系を修飾していると考えられる。

〔目的〕
発生過程におこる神経細胞死は、神経栄養因子の限定的供給による競合過程の結果であると考えられている。最近種々の系において、この細胞死が積極的な過程からなり、アポトーシス的な細胞死であることが明かにされた。生体内で起こる栄養因子欠乏による神経細胞の死は、末梢神経系SCGから得られた神経細胞が培養液からNGFを除去したときに起こす細胞死で(6)、また、中枢神経系小脳より単離した顆粒細胞が分裂停止後4～5日で起こす細胞死で模倣できる(5)。青木らは、NGF存在下で培養することで交感神経様に分化させたPC12細胞において、NGF除去後に起こる細胞死の過程で発現の増加する遺伝子を探索した結果、細胞死に伴いストレス蛋白質BiP/GRP78の発現増加が起こることを見出した(1)。また、BiPは小胞体に特異的に存在するHSP70ファミリーの蛋白質の1つで、シャペロン蛋白質としての働きを持ち、合成された分泌性蛋白質の放出や小胞体ー核シグナル伝達に重要な役割を担っていることが知られている。今回、この細胞死に伴うBiPの活性化が、中枢・末梢両神経系の初代培養系でも起きることを確認した。さらに、神経細胞死における、このBiPの発現増加の機構と役割について検討した。

〔実験方法〕
SCG細胞は、生後1日のラットのSCGからコラーゲナーゼ処理により取り、コラーゲンコートしたプレート にまき、10%牛胎児血清、50 ng/ml NGFを含むEMEMで培養した。Non-neuronal cellsはフルオロデオキシウリジンを培地に加えることにより除いた(4)。NGF除去は、0.5%のマウスNGFに対する抗体を用いて行なった。小脳顆粒細胞は、生後7日のラットからディスパーゼを用いて単離し、ポリ-L-リジンコートしたプレートにまき、10%非動化牛胎児血清を含む5.4 mMカリウムのEMEMで培養した(5)。細胞の生死の判別は、0.2%トリパンブルー処理で染色される細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、顕微鏡下で直接算出することにより行った。ノーザンブロティングは、各々の処理をした培養細胞からグアニジンチオシアネート法を用いて抽出したtotal RNA (10～20 μg/lane)を用いて行い、50%ホルムアミド存在下・42°Cで12時間以上ハイブリダイズさせた(5)。プローブは、各々のラットmRNAに対するcDNAをプラスミドより抽出し、Klenow Fragmentで^{32}P標識して用いた。BiPには、完全長(約2.4 Kbp)に相当するプローブを用いた。対照にはrat HSP70またはG3PDHを用いた。解析は、BAS 2000 (フジフィルム)を用いて行った。$[Ca^{2+}]_i$はfura-2-AMを蛍光プローブとしてアルガス50(浜松)を用いて測定した(4)。

〔結果と考察〕
青木らは、交感神経様に分化したPC12細胞でのNGF除去後の細胞死において、NGF除去後16時間以

降にBiP/GRP78及びGRP94の発現増加が起こることを報告している(1)。さらに、発現量の増加は他のHSPファミリィーであるHSP90, 70, 27には見られず、小胞体に局在するストレス蛋白質が特異的に活性化することを明らかにした(1)。培養SCG細胞はNGF除去後、位相差顕微鏡による観察では、24時間には変性を始め、36時間には細胞体の萎縮・突起の崩壊を起こし、細胞死に至る。BiPの発現増加が見られるのは、NGF除去10数時間頃からであり、total RNAあたり対照の数倍になることがノーザンブロッティングにより確認された。他のヒートショック蛋白質であるHSP70やハウスキーピング遺伝子の1つであるG3PDHの発現量は、total RNAあたりでは細胞死の過程で変化しなかった。BiPの活性化は抗BiP抗体を用いた免疫組織化学的手法によっても確認された。蛋白質合成阻害剤サイクロヘキシミドに対して調べられたこの細胞死のコミットメントタイムは、NGF除去後18時間前後であることが知られており、それに先行してストレス蛋白質のうちBiPが特異的に活性化されることがわかる。この神経細胞死に伴うBiP mRNAの増加は、ラットの小脳顆粒細胞の培養系でも確かめられた(図1)。生後7日のラット小脳から単離した顆粒細胞は、通常のカリウム濃度(5.4 mM)下では、培養4日(DIV5)で変性を始め6日(DIV7)にはほぼ死滅する。BiP発現増加のピークはDIV6の細胞から得られたRNAに対して確認され、DIV3の細胞の値の1.7～2.2倍であった(図1A)。また、この顆粒細胞の細胞死は高カリウム濃度(25 mM)下では完全に抑えられる。高カリウム培地で培養した細胞(DIV8)は、通常のカリウム培地に移すことで細胞死が誘導されるが、この細胞死においてもBiPの発現増加が認められた(図1B, 培地交換後10時間で対照の2.4培)。小脳顆粒細胞の培養系の場合、混入している非神経細胞が恒常的にBiPを発現していた(図1B)。そこで、total RNAの回収量から非神経細胞の分を差し引いて考えると、実際の神経細胞での増加は約5倍になると見積もられた。また、細胞内カルシウムのキレート剤であるBAPTA-AM処理により引き起こされる培養SCG細胞の細胞死の際も(3)、BiPの発現増加が認められた; 50 μM BAPTA-AM 15時間処理の時対照の1.4倍。NGF除去によるSCG細胞の細胞死に伴うBiPの発現増加は、神経細胞死の過程で細胞内のカルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)の低下が起こる時間とほぼ一致した(図2)。BiPの発現は、細胞をCalcium Ionophore A23187やThapsigarginにより処理することによっても増強される事が知られている(2)。これらの結果は、神経細胞のプログラム細胞死に伴い$[Ca^{2+}]_i$の低下が起こるが、これは小胞体内のCa^{2+}濃度の減少にもつながり、$[Ca^{2+}]_i$が小胞体－核シグナル伝達系を修飾することで細胞死の進行を調節していることを示唆すると考えられた。

〔参考文献〕

1. Aoki, Nakano, Koike *et al.* (投稿中). 2. Pahl and Baeuerle (1995) *EMBO. J.* **14,** 2580-2588. 3. 小池, 中山, 小田, 田中. (1995) *神経化学.* **34,** 242-243. 4. Koike and Tanaka (1991) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **88,** 3892-3896. 5. Suzuki and Koike (in press) *Mol. Chemical Neuropathol.* 6. Martin *et al.* (1988) *J. Cell Biol.* **106,** 829-844.

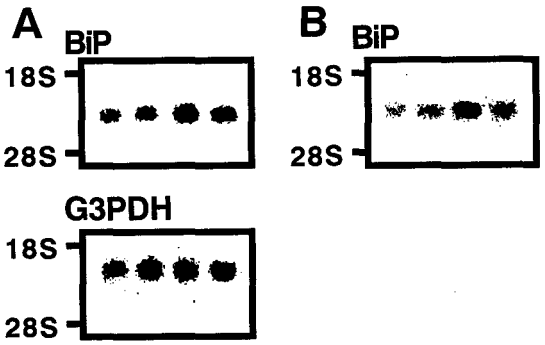


図1. 小脳顆粒細胞の細胞死に伴うBiPの発現量増加. 各々の細胞から抽出したtotal RNA (20 mg/lane)に対し^{32}Pラベルした BiPまたはG3PDH cDNAを用いてノーザンブロティングを行った. A: (左から)各DIV3, 5, 6, 7での発現量変化. B: (左から)高K^+除去後0, 3, 10時間と非神経細胞での発現量変化. 細胞は全てDIV8. 細胞死との相関については本文参照.

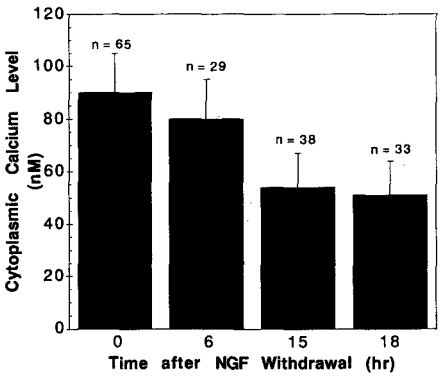


図2. SCG細胞でのNGF除去に伴う$[Ca^{2+}]_i$の低下. NGF除去後の時間経過(横軸)に従い、Fura-2-AMを用いて$[Ca^{2+}]_i$を測定した. Ave ± SD. nは細胞数.

99 プログラム神経細胞死制御機構における小胞体シグナリングの役割

2Da3

小池達郎、田中秀逸
(北大院理行動知能学)

〔 要約 〕
NGF除去による神経細胞死では小胞体に存在するBiP/GRP78が顕著に活性化されることから、プログラム神経細胞死制御機構における小胞体シグナリングの役割を検討することが必要になった。ThapsigarginやBAPTA-AM処理などの小胞体のカルシウム貯蔵を枯渇させるパラダイムはBiP/GRP78を活性化し、分泌性タンパク質のゴルジへの輸送を阻害して、タンパク質合成を有効に阻害した。NGF除去による神経細胞死でも同様な機構が存在すると推定された。

シナプス結合形成時に顕著に起こる神経細胞の脱落は、タンパク質合成・RNA合成を必要とし、アポトーシスの形態を経ることが明らかになった。一方、我々は求心性シナプス前細胞からの刺激、即ち神経細胞膜の脱分極とそれに続くイオンの流入、特にCa^{2+}の流入が神経細胞の生存機能維持・神経細胞死の制御に大きな役割を担っていると考え、神経細胞の生存への栄養因子要求性と細胞内カルシウム濃度との関係について、"Ca^{2+}セットポイント仮説"を提唱した。更に、プログラム神経細胞死機構を調べるために、分化させたPC12細胞などのモデル系を用い、種々の法などで細胞死カスケード産物の同定を試みてきた。その結果、神経成長因子除去による神経細胞死では小胞体に存在するBiP/GRP78が顕著に活性化されることを見いだした（1、4）。従って、プログラム神経細胞死制御機構における小胞体シグナリングの役割を検討する必要がある。BiP/GRP78の活性化は①それ自身が細胞死を促進している、②1つの応答形態で、小胞体の異常状態へのアラームである、③タンパク合成能の低下などによる細胞の保護作用であり、シナプス結合・細胞間相互作用の遮断などを意味している可能性がある。

[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（5）によった。

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。

タンパク合成及びレクチンへの結合性：24well plateにまいた上頸神経節細胞を種々の薬物で処理した後に、TRAN^{35}S-LABEL (ICN) 24 μCi/well を加え、4時間培養した。PBS 洗浄後、10%TCA 不溶性画分をフィルターに回収し、カウントを測った（4点測定して平均をとった）。糖タンパク量の定量は同様にラベルした細胞を1%NP-40で可溶化し、WGA (Wheat Germ Agglutinin)-agarose column (Pharmacia) に結合させ、洗浄後、N-acetyl-D-glucosamineで溶出した画分をカウントした。

細胞内Ca^{2+}イオンの定量：細胞内Ca^{2+}の測定はfura-2-AM標識による蛍光画像解析装置により行った(5)。

[実験結果及び考察]

BAPTA-AM、Thapsigargin（TG）、Ca2+イオノフォア処理などのBiP/GRP78を活性化するパラダイム（1、5）は、小胞体のカルシウム貯蔵を欠乏させることを共通のメカニズムとしている。Ca^{2+} ATP-aseの特異的阻害剤であるThapsigargin (TG) の処理（100-500nM）で細胞内カルシウムレベルは一過性に上昇したが、PC12細胞とは異なり、上頸神経節細胞では持続しない。更に、TG処理自身は1 μMでも上頸神経節細胞の細胞死を誘発しないので、BiP/GRP78の活性化そのものが細胞死を起こさない可能性が高い。しかしながら、BAPTA処理（50 μM）は*c-fos*の活性化、クロマチンの凝縮を伴ったアポ

トーシスを誘導する。この点でＮＧＦ除去による細胞死のカスケードと共通である。従って、BAPTA処理では、小胞体内貯蔵レベルではなく、細胞質のカルシウムレベルが低下することにより細胞死が起こると理解すると説明できる。一方、TG処理はNGF除去後の細胞死を遅延し、カルシウムによる効果とされる（3）。この効果はカルシウムセットポイント仮説にあわないので、我々はむしろ、タンパク合成の抑制による効果ではないかと考えた。実際、タンパク合成が Cycloheximide（1μM）によって75%抑制される条件で、TG, BAPTA処理によってそれぞれ７０%、５０%抑制される（図１）。これは小胞体カルシウム貯蔵の枯渇がゴルジ装置への輸送を阻害し、分泌タンパクや細胞表層の糖タンパク質の生合成を抑制することによる（２）。実際、WGA 結合性の糖タンパク量を調べると、TG処理により、30 %に低下する。このように、タンパク合成能の低下は細胞の保護作用（４）とも、分泌性タンパク質合成の抑制は細胞死カスケードの１つであるとも解釈できる。細胞死制御と細胞内輸送系との関連を、更に調べている。

図1

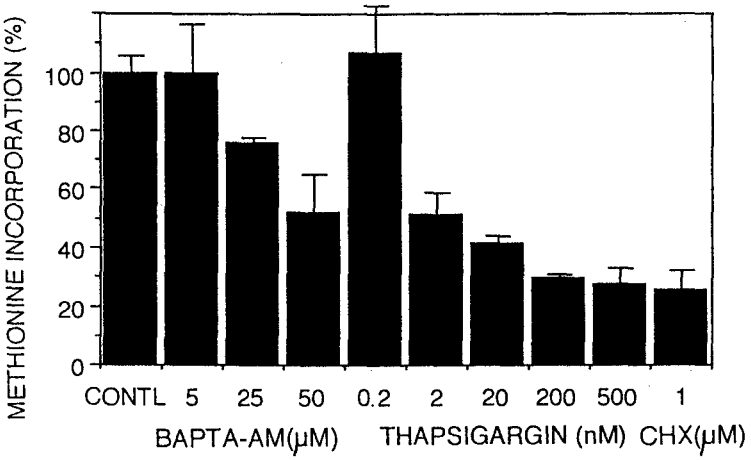


図2

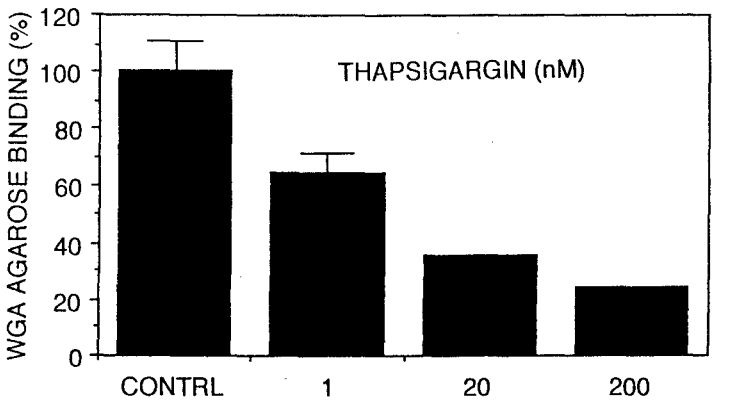


図１（上）．BAPTA-AM, Thapsigargin, Cycloheximideによるタンパク合成の阻害(詳細は方法参照)。
図２（下）．Thapsigarginによる糖タンパク質合成の阻害（詳細は方法に記載）。

参考文献

1. Aoki, T., Koike, T. et al. submitted
2. Bromstrom, C.O. and Bromstrom, M.A. (1990) Ann. Rev. Physiol. 52: 577-590.
3. Lampe.P., et al. (1995) J. Neurobiol. 26: 205-212.
4. Mailhos, C., Howard, M.K., and Latchman, D.S. (1994) J. Neurochem. 63: 519-523.
5. 田中秀逸、信川貴子、小池達郎 (1996) 神経化学 submitted
6. Tanaka, S and Koike, T. (1995) Develop. Biol. 168 : 166-178.

100 アストログリア(AST)の培養系を用いた新規小胞輸送関連蛋白(RA410)のクローニングとその虚血脳における発現

1Da3

松尾徳幸[1,5]，小川 智[2]，和中明生[4]，松山知弘[3]，高木 勉[2]，遠山正弥[1]
大阪大学医学部第2解剖学教室[1]，同分子脳機構(田辺)[2]，
兵庫医科大学第五内科[3]，福島県立医科大学[4]，大日本製薬[5]

〔 要約 〕

アストログリア(AST)の虚血ストレスに対する負荷応答を検討するため，低酸素暴露した後，再酸素化直後に誘導される遺伝子のクローニングをDifferential Display法(DD)を用いて試みた。RA410は再酸素化直後に誘導される遺伝群の一つであり，遺伝子配列より予想されたアミノ酸配列より，新規の小胞輸送関連因子であり，ASTの蛋白分泌に関わっている可能性が示唆された。培養ASTを用いたNorthern blottingで、この遺伝子のmRNAは再酸素化後15分以内に誘導され，1時間以内に最大となり，その後漸減した。再酸素化によるこの遺伝子の発現は，あらかじめASTにcycloheximideを添加することによって抑制されなかったが，NADPH oxidaseの阻害剤であるDiphenyl iodonium (DPI)は再酸素化後のASTよりのO_2^-の産生とRA410の誘導を抑制し，RA410が再酸素化後にNADPH oxidaseによって発生するO_2^-で直接誘導される遺伝子群の一つである事を示した。RA410の合成ペプチドに対する抗体は再酸素化後のASTで分子量約70 kDaのバンドを認識，細胞分画を用いたWestern blottingおよびASTの免疫染色でRA140がゴルジ装置分画に存在することが示された。また、RA410のantisense oligonucleotideを加える事により，ASTより産生されるIL-6がゴルジ分画に留まることが示された。ラット脳虚血モデルを用いた検討でも，RA410のグリア細胞における発現が確認された。

(緒言) 中枢神経系において最も虚血に強いとされるASTのストレス応答は，脳虚血の病態生理を理解する上で極めて重要である。培養ASTを低酸素した後，再酸素化するとcycloheximideに対する感受性が亢進する事実は，再酸素化時にASTに誘導される蛋白がその好気的環境への再適応に重要であることを示唆する[1]。我々は，ASTの培養系を用いて，再酸素化直後に誘導されるRNA splicing factor (RA301)に続き，小胞蛋白輸送に関連すると考えられる新規遺伝子RA410のクローニングを行った。

(方法及び結果)

新生ラット脳よりASTを分離培養し，第2代まで継代培養し以下の実験に供した。ASTを24時間低酸素環境に暴露した後，再酸素化し，再酸素化直前，及び再酸素化1時間後にRNAを抽出，既報の方法[2]に従って逆転写し、DDを行った。DDによってえられたpositive band (RA410)をもちいて再酸素化より得られたASTのcDNA libraryをスクリーニングし，RA410の全長をコードするcDNAを得た。RA410はアミノ酸621個からなる推定分子量約70 kDaの蛋白で，酵母における小胞体・ゴルジ装置間の輸送蛋白であるSly1pと最も高いホモロジーを呈し，他に酵母のSec1p，Vps45p，さらにはラットのn-Sec1，ヒトのβ-COPなどの小胞関連蛋白とも相同性のあるdomainを有し，新規の小胞輸送関連蛋白である事が示唆された(図1)。ASTを低酸素暴露し，再酸素化RNAを抽出，RA410のcDNAをプローブとしてNorthern blottingを行うと，RA410のmessageは再酸素化後15分で誘導が見えられ，30-60分で極大となり，以後漸減した、また、再

酸素化直前にcycloheximide (10 mM)を与えることにより蛋白新生を抑制するとRA410のmessageはむしろ増加した。また、再酸素化後ASTが産生するO_2^-をcytochrome c法によって計測すると，NADPH oxidaseの阻害剤であるDPI (50 μM)は再酸素化時のASTよりのO_2^-の産生を完全に抑制するともにRA410の遺伝子発現も抑制した。RA410のアミノ酸配列をもとに合成ペプチドを作成，これを家兎に免役することによって得られた抗RA410抗体は，Western blottingにて分子量約70 kDaの蛋白を検出，その誘導は再酸素化後1時間より検出され，4時間で最大となった。再酸素化後4時間のASTを超遠心法およびショ糖濃度勾配法で分離，Western blottingを行うと，RA410はGolgi分画に主に検出され，また、細胞の免疫組織像でもRA410の細胞内分布はwheat germ agglutininによる染色と同様のパターンとなり，RA410がGolgi分画にあることを示唆した。RA410のASTにおける機能を解析するため，RA410のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成，再酸素化後のASTでのRA410発現を抑えうる事を確認した後，アンチセンスオリゴヌクレオチドを再酸素化直前にASTに加えると，再酸素化によってASTより培養上清中に産生されるInterleukin-6 (IL-6)の活性が抑制された。またこの条件下でショ糖濃度勾配で分離された各分画を抗IL-6抗体を用いたWestern blottingを行うと，アンチセンスオリゴヌクレオチドによってRA410の発現が抑制されたAST内では，IL-6抗原がGgolgi分画に留まっていることが確認された。また、ラット中大脳動脈の一時血行遮断によって引き起こされた実験的脳虚血モデルでもRA410の発現がグリア細胞を中心に認められ，実際の脳虚血でも，RA410が発現していることが示された。

(結語)

DD法により，ASTにおける再酸素化後に誘導されるimmediate early geneの一つであるRA410のクローニングを行った。RA410は再酸素化後のグリア細胞の神経保護機作の発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

RA410 (rat)	253	LVLVDRNIDLATPLHHTWTYQALVHDV	279
Sly1p (yeast)	261	LIILDRNIDFASMFSHSWIYQCMVFDI	287
Sec1p (yeast)	247	LIITDRTLDPFAPILHDFSYQAMAYDL	273
Vps45p (yeast)	227	LLILDRNTDPITPLLQPWTYQSMINEY	253
Vps33p(yeast)	274	LIILERNTDPITPLLTQLTYAGILDDL	300
n-Sec1 (rat)	230	LLILDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDL	256
Rop (D. melanogaster)	241	LLILDRGFDCVSPLLHELTLQAMAYDL	267
Unc-18 (C. elegans)	310	LIIIDRGYDAITPLLHELTLQAMCYDL	336
β-COP (human)	300	LIVLDRGFDCVSPLLHELTLQAMAYDL	326
Consensus		LLILDRNIDQATPLLHELTYQAMAYDL	
		ILV GF IS W F LVF V	
		VVI T L I I	

図1: RA410のアミノ酸配列(一部)と他の小胞輸送関連蛋白とのコンセンサス配列を示す。

参考文献

1) Hori O., et al. J. Neurochem. 1994, 62; 1489-1495

2) Matsuo N., et al. J. Biol. Chem. 1995, 270; 28216-28222

101 再酸素化に伴うアストログリア(AST)でのHSP70の発現のメカニズムとその機能の解析

1Da4

大阪大学医学部第2解剖学教室[1)]，同神経内科学教室[2)]
小川 智[1]，藺牟田直彦[2]，上田周一[2]，柳原武彦[2]，遠山正彌[1]

〔要約〕
脳虚血におけるHSP70 (70 kDa Heat shock protein)誘導のメカニズムを検討するため、HSP70のプロモーターを用いたreporter遺伝子を作成、培養アストログリア(AST)へのtransfectionを試みた。マウス由来のHSP70プロモーター遺伝子とluciferase遺伝子より、HSP reporterをlipofection法を用いて新生ラット由来のASTのprimary cultureに導入した。ASTを低酸素・再酸素化することによって、蛋白新生の増加とともにHSP promoter活性は上昇した。その活性は細胞内のエネルギー代謝への負荷(ADP/ATP)に対して指数関数的に増加した。HSP promoterの活性化は，低酸素環境下にあるASTに解糖阻害剤であるIAA (Iodo acetic acid)を加えてエネルギー負荷を増大させることによっても同様に引き起こされたが，ADP/ATP>50%となった時点でluciferase活性とゲルシフト法によって評価されたHeat shock element (HES)の活性化と解離，この時点で転写と翻訳が解離する可能性が示された。また、cycloheximideは再酸素化時の蛋白合成を抑えることによって再酸素化時のエネルギー負荷を改善，HSEの活性化も抑制した。一方，低酸素下にあるASTを酸処理して蛋白変性を起こさせても，HSP promoter活性の増加は見られなかった。更に、再酸素化時に誘導されるHSP70はribosome分画にあることが示されたが，再酸素化直前にquercetinを与えることによってHSP70の誘導を抑制すると，再酸素化時のribosomeの二量体が形成されなかった。以上より，ASTで再酸素化時に誘導されるHSP70は，細胞内のエネルギー負荷によって誘導され，ribosomeの形態の保持に重要な役割を担っていることが示された。

(緒言) 脳虚血における70 kDa熱ショック蛋白(HSP)の誘導は虚血に対する細胞のストレス応答の存在を示唆するが、その誘導のメカニズム、誘導されたHSPの機能は不明である。我々は、これを検討するため、HSP70のプロモーターを用いたreporter遺伝子を作成、ASTへのtransfectionを試みた。

(方法及び結果) マウス由来のHSP70プロモーター遺伝子とluciferase遺伝子より、HSP reporter遺伝子を作成、lipofection法を用いて新生ラット由来のASTのprimary cultureに導入した。HSP promoter活性はLuciferaseの活性と3H-leucinのTCA不溶分画への取り込みとの比で評価した。ASTを低酸素暴露した後再酸素化するすと、再酸素化直後に見られる蛋白新生の増加とともに，HSP promoter活性は上昇、再酸素化後4-6時間で極大(500-1000倍)となり、その時期は細胞内のADP/ATP比の極大となる時点と一致した。一方、HSP promoterの活性は、再酸素化だけでなく、低酸素環境下にあるASTにiodo acetic acid(IAA)などの解糖代謝阻害剤を与えることによっても、ADP/ATP比に対し指数関数的に上昇したが、puropionic acidやamiorideなどの蛋白変性剤ではその上昇は見られなかった。Cycloheximide(10 μg/ml)は再酸素化時の蛋白新生を抑制することによって，エネルギー代謝を一時的に改善するとともに、HSEの活性化も抑制し，再酸素化に伴う蛋白新生の増加がASTでのエネルギー負荷の増大を引き起こし、HSP promoterの

活性化を促すことが示唆された。また、Heat shock element (HSE)を用いたゲルシフトアッセイは、低酸素・再酸素化によってHSEが活性化されることを示したが、低酸素下でIAAを与えることによってもHSEの活性化が認められた。低酸素下でIAAに長期暴露する事によって、細胞内エネルギー代謝の負荷を増大させると、ADP/ATP比が50%以上となった時点で、ゲルシフトアッセイでHSEの活性化を認めるものの、luciferase活性の増加にいたらず、この閾値で転写活性と翻訳との解離がおこることが示された。また、再酸素化したASTをNP-40 (1%)にて可溶化し，ショ糖勾配中で超遠心し各分画をHSP70抗体を用いたDot blotに供すると，HSP70は主にribosomeの二量体分画に存在することが示されたが，再酸素化直前にquercetinを加えることによってHSP70の発現を抑えると，ribosomeの二量体が検出されなかった。

(結語)　再酸素化時にASTに発現されるHSPは、細胞内のエネルギー代謝の負荷を環境因子として誘導され、発現されたHSPはribosomeの機能維持に関与している可能性が示された。

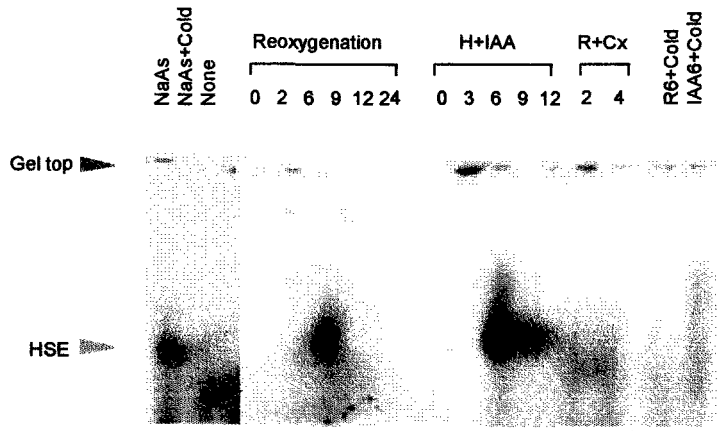


図1(上)　Heat shock Element (HSE)を用いたゲルシフトアッセイ。ASTを砒素で処理(NaAs)，低酸素・再酸素化(Reoxy)，または，低酸素環境下でIAAを加え，各時点で核蛋白を抽出，^{32}Pでラベルされた HSEとincubateした後，PAGEにて展開，auto radiogramとした。また再酸素化直前にCycloheximideを加え，6時間後に同様の処理を行った(R+Cx)。アッセイの特異性の確認のためラベルされていないHSEを100倍量加え，同様にauto radiogramとした(+Cold)。

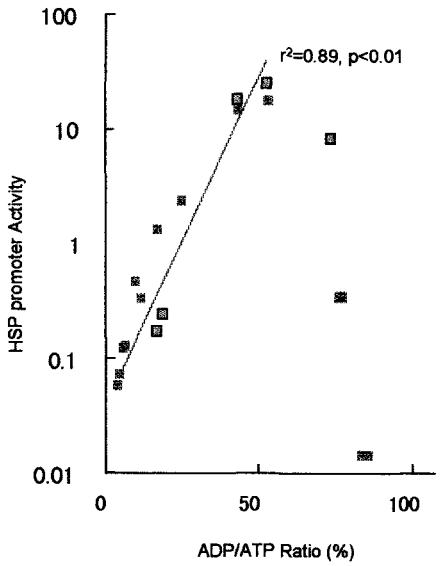


図2(左)　細胞内エネルギー代謝の負荷とHSP promoter活性。低酸素・再酸素化，および低酸素下にあるASTにIAAを加えることによって，細胞内エネルギー代謝に負荷を引き起こし，各時点でのHSP promoter活性をluciferase活性と^{3}H-leucineのTCA不溶分画への取り込みによって評価した。

102 2Da4 海馬スライス培養モデルにおける虚血性ニューロン死、およびHSP発現の検討 -antisense oligonucleotideをもちいて-

榊孝之、甲村英二、湯口貴導、埜中正博、伊藤守、山下俊英、藤中俊之、早川徹
（大阪大学医学部脳神経外科）

〔 要約 〕

海馬長期培養モデルにおける選択的ニューロン死、および Heat shock protein (HSP) 発現の関連について検討した。培養スライスに対する虚血負荷は、均一でもあるにもかかわらず、その後の反応は部位により異なることが示された。またストレスマーカーであるHSP蛋白をantisense oligonucleotide を用いて抑制することにより、部位特異的に CA3 のみが傷害されることが明らかとなった。本実験系は、神経回路網を有した再現性のよい均一なモデルであり、脳保護機構の解明に有用であると考えられた。

目的：海馬における虚血時の選択的ニューロン死、遅発性神経細胞死がこれまで報告されてきた。しかし、in vitro model において、スライスによる急性期の検討は行われているが、長期培養による検討は少ない。今回、海馬スライスの長期培養モデルにおける選択的ニューロン死、および HSP の関連について検討した。

方法：生後５日齢ラットより海馬スライスを作成、界面培養法により2-3週維持し（１）、1mM KCN、 2mM 2-deoxyglucose を５分間負荷することにより疑似虚血負荷を加えた。6、12、24ｈ後における HSP70 mRNA、HSP72 protein の発現を in situ hybridization、免疫組織化学法を用いて検討した。また、propidium iodide 染色や Tubulin mRNA を用いて虚血負荷４日後の神経細胞における細胞死を評価した。さらに、HSP antisense（２）、control oligonucleotide を虚血負荷後に medium に加え、HSP の発現と神経細胞保護との関連性について検討を行った。各群において非虚血負荷を control とした。

結果：実験条件下で良好な海馬の形態を維持してスライス培養が可能であった。5分の虚血負荷では、control と比較して、有意な神経細胞の脱落を認めなかった。非虚血負荷群においてはHSP mRNA、HSP protein の発現を認めなかったが、虚血負荷を加えたスライスでは、6時間後に CA1 、CA3 に強い HSP mRNA のシグナル、１日後に同部位に蛋白発現を強く認めた。（図１、２）また、 HSP antisense を虚血負荷後 medium に加えると、HSP蛋白の発現は抑制され（図２）、CA3 のみに有意に神経細胞の脱落を認めた。（図３）

考察：培養スライスに対する虚血負荷は、均一であるにもかかわらず、その後の反応は部位により異なることが示された。また今回の実験条件下ではHSP蛋白発現を antisense oligomer を用いて抑制することにより、部位特異性に CA3 のみが傷害されることがわかった。本実験系は、神経回路網を有した再現性のよい均一なモデルであり、脳保護機構の解明に有用と考えられた。

参考文献

（１）Stoppini, L., Buchs, PA., Muller, D. (1991) Jouranl of Neuroscience methods 37:173-182

（２）Trautinger, F., Kindas-Mugge, I., Barlan, B., et al. (1995) J Invest Dermatol 105:160-162

Fig.1 HSP70 mRNA; 6h after exposure to 5min ischemia

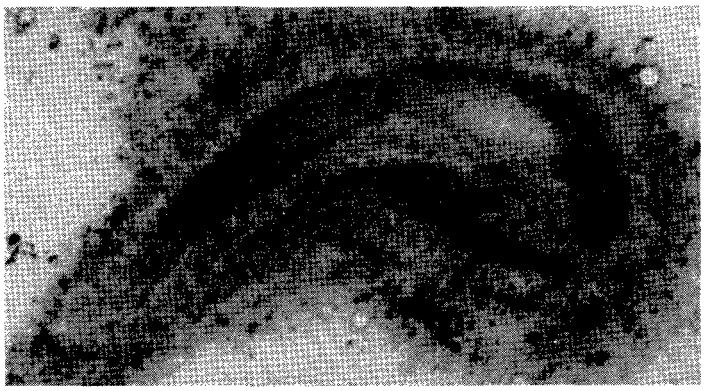
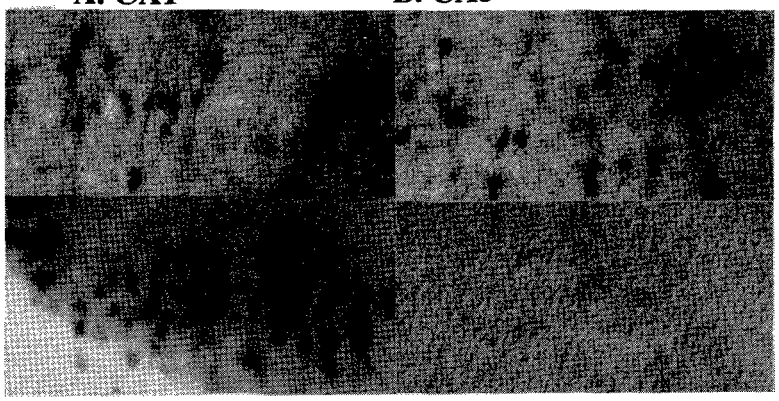


Fig2 HSP72 protein; 24h after exposure to 5min ischemia

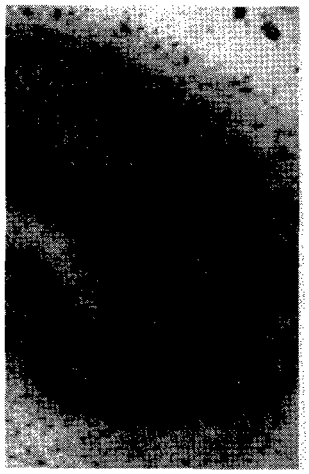
A. CA1 **B. CA3**

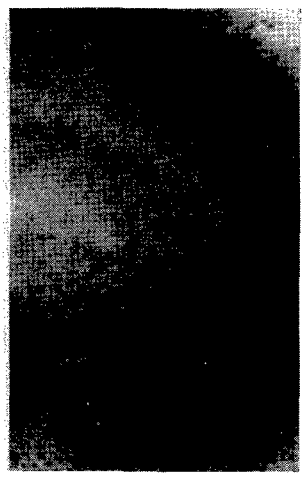


C. CA3 (control oligomer) **D. CA3 (antisense oligomer)**

Fig.3 tubulin mRNA 4days after exposure to 5min ischemia with/without antisense oligomer (CA3)

control oligomer





antisense oligomer

103
1E56

ラット小脳外顆粒細胞のアポトーシスへの interleukin-1β converting enzyme ファミリーの関与

田中正彦[1]、澤田 誠[2]、三浦正幸[3]、丸野内棣[1]
[1]藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・応用細胞学研究部門、[2]病態生化学研究部門、
[3]筑波大学・基礎医学系・分子神経生物学

〔 要約 〕 ラット小脳のスライス培養系で起こる外顆粒細胞のアポトーシスをモデル系として、発生途上の神経で起こるこの神経細胞死に interleukin-1β-converting enzyme (ICE) ファミリーが関与するかどうかを調べた。この培養系で起こることが確認されている外顆粒細胞の insulin 依存性アポトーシスが、ICE ファミリー阻害剤である Ac-YVAD-CHO によって強く、Ac-DEVD-CHO によって弱く抑制された。Z-Asp-CH_2 は、有為な効果を示さなかった。更に、insulin 非存在下でアポトーシスを起こす外顆粒細胞は、postmitotic and premigratory state の外顆粒細胞のマーカーである TAG-1 を発現していなかった。一方、 proliferative cell nuclear antigen (PCNA) の発現が、一部のアポトーシス細胞で見られた。また、insulin-like growth factor-I (IGF-I) のアナログである des (1-3) IGF-I が、insulin に比較して低濃度でこのアポトーシスを抑制した。以上の結果より、発生途上の小脳顆粒細胞は TAG-1 陽性型に分化する以前に IGF-I 依存性のアポトーシスを起こし、このアポトーシスには ICE 様プロテアーゼが関与することが示唆された。

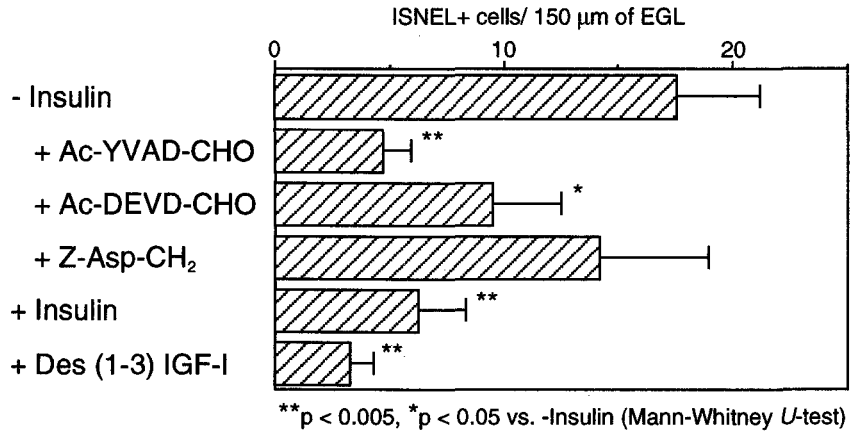
【目的】我々はこれまでに、ラット新生仔の小脳を用いて、その生後発生の過程を in vitro でよく再現するスライス培養系を開発してきた。In vivo の小脳の外顆粒層には、増殖期の顆粒細胞と postmitotic state に入った顆粒細胞とが存在し、後者はまもなく内側へと移動して内顆粒層を形成する。我々のスライス培養系においても、小脳の層構造が維持されている上、insulin を添加した条件下では、顆粒細胞が in vivo とよく対応した形で増殖・移動・分化することが確認されている[1]。そのためこの系は、in vitro においても顆粒細胞の発生段階を明確に特定できる系として有用なモデル系である。更にこの系では、培地中に insulin を添加しない条件で、外顆粒層の顆粒細胞が DNA 断片化を伴う細胞死（アポトーシス）を起こすことが見出されている[2]。そこで今回、線虫を始めとする系でアポトーシスの実行に関与することが知られている ICE/CED-3 ファミリー[3]が哺乳類脳の発生過程で起こる神経細胞のアポトーシスにも関与するかを知るために、この培養系における外顆粒細胞の insulin 依存性アポトーシスが ICE ファミリー阻害剤で抑制されるかどうかを調べた。更に、アポトーシスを起こす顆粒細胞のより詳細な発生段階や、in vivo において insulin の代わりに作用すると思われる IGF-I のアナログである des (1-3) IGF-I のアポトーシス抑制効果についても調べ、in vivo における小脳形成とここで見られた神経細胞死との対応関係を考察した。

【方法】スライス培養[1]：生後 9 日齢のラット新生仔から小脳を摘出し、厚さ約 600 μm のスライスを作成し、培地上に浮かせた多孔性薄膜 (Nuclepore membrane) の上に載せて培養した。培地には、馬血清 (15%) を添加している。

In situ nick end labeling (ISNEL)[2]：培養スライスをパラフィン切片にし、proteinase K、terminal deoxynucleotidyl transferase と biotin-14-dATP を含む反応液、peroxidase-conjugated streptoavidin、3-amino-9-ethylcarbazole を順次反応させて、DNA fragmentation を起こしたアポトーシス細胞を染色した。

ISNEL と抗 TAG-1 抗体染色又は抗 PCNA 抗体染色との二重染色：培養スライスを凍結切片（抗 TAG-1 抗体染色用）又はパラフィン切片（抗 PCNA 抗体染色用）にし、rhodamine 又は Cy3 標識二次抗体を用いた抗体染色を施した後、Cy2-conjugated streptoavidin を用いた ISNEL を行った。

【結果と考察】1．ICE ファミリー阻害剤の効果：Insulin を添加しない培地に ICE ファミリー阻害剤である Ac-YVAD-CHO (10 μM)、Ac-DEVD-CHO (10 μM) 又は Z-Asp-CH_2 (10 or 100 μg/ml) を添加



図．Insulin 無添加条件、insulin 無添加で Ac-YVAD-CHO (10 μM)、Ac-DEVD-CHO (10 μM) 又は Z-Asp-CH_2 (10 μg/ml) を加えた条件、insulin (5 μg/ml) 添加条件及び des (1-3) IGF-I (0.2 μg/ml) 添加条件で 3 日間培養したスライスを薄切して ISNEL で染色し、外顆粒層 150 μm 中の染色細胞を計数した。

して培養を行った。この系における外顆粒細胞のアポトーシスは培養 3 日後にピークに達することが確認されているので、この時点でのアポトーシスを ISNEL によって検出した（図）。Ac-YVAD-CHO がこのアポトーシスを強く抑制し、小脳顆粒細胞のこのアポトーシスの実行に ICE 様プロテアーゼが関与していることが示された。Ac-DEVD-CHO は弱い効果を示し、Z-Asp-CH_2 は有為な効果を示さなかった。これは、複数存在することが知られている ICE ファミリー分子に対する各阻害剤の特異性を反映した結果であると考えられる。

2．ISNEL と抗 TAG-1 抗体染色又は抗 PCNA 抗体染色との二重染色：アポトーシスを起こす細胞の発生段階をより詳細に特定するため、上記の二重蛍光染色を行った。TAG-1 は、postmitotic and premigratory state の顆粒細胞のマーカーである[4]。その結果、insulin 非存在下で見られる ISNEL 陽性細胞は TAG-1 を発現していなかった。一方、PCNA の発現が一部の ISNEL 陽性細胞で見られた。ここでのアポトーシスは、増殖状態の顆粒細胞か、あるいは postmitotic になった直後で TAG-1 を発現する前の分化段階の顆粒細胞で起こるものであることが示された。

3．des (1-3) IGF-I の効果：この培養系において insulin 添加条件で用いている生理的濃度を超える insulin は、IGF-I 受容体を介して働いていると考えられる。とすれば、上記のようなアポトーシスは生理的濃度の IGF-I 依存性も示すはずである。そこで、insulin の代わりに des (1-3) IGF-I を添加して培養を行い、外顆粒細胞のアポトーシスが抑制されるかどうかを調べた。Des (1-3) IGF-I は IGF-I の N 末の 3 アミノ酸を欠くもので、IGF binding proteins (IGFBPs) との結合性が低いために、培地中に添加している馬血清に由来する IGFBPs に阻害されることなく IGF-I の効果を調べることができる。その結果、insulin (5 μg/ml) に比較して低濃度の des (1-3) IGF-I (0.2 μg/ml) が、外顆粒細胞のアポトーシスを抑制した（図）。このことは、上記のようなアポトーシスが in vivo においては IGF-I によって防がれ得ることを示している[5),6)]。

以上の結果より、発生途上の小脳顆粒細胞は TAG-1 陽性型に分化する以前に IGF-I 依存性のアポトーシスを起こし、このアポトーシスには ICE 様プロテアーゼが関与することが示唆された。

【謝辞】抗 TAG-1 抗体を供与して下さいました筑波大医学部の山本三幸博士に深謝致します。

【文献】1) Tanaka, M. et al. (1994) Brain Res. 641: 319. 2) Tanaka, M. et al. (1995) Neurosci. Lett. 199: 37. 3) 三浦 (1996) 神経進歩 40: 236. 4) Yamamoto, M. et al. (1986) J. Neurosci. 6: 3576. 5) Jung, Y.-K. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 5112. 6) Tanaka, M. et al. (1996) Soc. Neurosci. Abstr. (in press).

104 2Da5 神経芽細胞腫の自然退縮とICEファミリーシステインプロテアーゼ：その発現と細胞内局在について

中川原 章、中村洋子、日和佐隆樹、池田 均*、杭田慶介**、崎山 樹
（千葉県がんセ・生化学、*群馬小児医療セ・外科、**都臨床研・免疫）

〔 要約 〕

神経芽細胞腫は小児に発生する代表的な腫瘍であり、神経堤に由来する交感副腎神経系前駆細胞から発生する。本腫瘍は臨床的に非常に特徴ある病像を示すことが多く、1歳以上で発症する腫瘍は予後が極めて不良であるのに対し、1歳未満で発症する腫瘍は高頻度に分化、成熟したり腫瘍の自然退縮を起こし、患児の予後は極めて良好である。最近の研究により、この腫瘍細胞の自然退縮は developmentally programmed cell death（アポトーシス）であることが明らかになってきた。

これまで我々は、本腫瘍の生物学的特性が神経栄養因子とその受容体の発現および機能により強く制御されていることを明らかにしてきた。すなわち、（1）予後良好な腫瘍は TRK-A を高発現し、nerve growth factor (NGF) に生存と分化を依存している。一方、（2）N-myc がん遺伝子の増幅した悪性度の高い腫瘍では TRK-A は down-regulate され、逆に TRK-B の発現は相対的に高く、リガンドである brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と neurotrophin-4 (NT-4) を自ら分泌して、autocrine/paracrine 様に自らの生存、分化、さらには浸潤、転移を促進している。

本研究では、神経芽細胞腫の自然退縮すなわちアポトーシスの *in vivo* における細胞内分子機構を明らかにするために、細胞死関連遺伝子とくに ICE/ced3 ファミリーシステインプロテアーゼの役割について解析した。

材料と方法：

－80℃に保存した神経芽細胞腫手術摘出標本および神経芽細胞腫細胞株から total RNA を抽出し、Northern 解析に使用した。また、新鮮腫瘍組織から腫瘍細胞画分を分離し、さらにNonidet P-40及び遠心法により、細胞質と核画分に分け、ICE、CPP32、Ich-1、Ras の Western 解析を行った。免疫組織化学にはパラフィン包埋した腫瘍組織切片を使用した。

アポトーシスによる DNA 断片化の同定には TUNEL 法を用いた。また、ICE あるいは CPP32 と TUNEL の二重染色には、FITC 標識ヤギ抗家兎 IgG 抗体を使用した。

結果：

（1）神経芽細胞腫における ICE、CPP32、Ich-1、TRK-A の発現

５０例の神経芽細胞腫組織での mRNA 発現を調べたところ、ICE、CPP32 および TRK-A は、予後良好病期群（I, II, IV-S 期）において、予後不良病期群（III, IV 期）よりも有意に高く発現していた（共に $p<0.05$）。とくに、ICE と TRK-A は病期間で非常によく似た発現パターンを示し、両者とも N-myc 増幅により down-regulate されていた。

ほかの細胞死関連遺伝子である Bcl-2、Bcl-X、Bax は、いずれも発現レベルに有意差が認められなかった。

（2）ICE、CPP32、Ich-1 の細胞内局在

ICE、CPP32、Ich-1 の免疫組織化学を行ったところ、分化や自然退縮傾向を有する予後良好病期群腫瘍では、ICE、CPP32 はともに核に濃染する傾向が強く見られた。一方、予後不良病期群腫瘍、とくに N-myc の増幅した腫瘍では、全体に染色が弱く、細胞内局在に明らかな傾向が見られなかった。しかし、分化成熟した良性の神経節腫では、ICE、CPP32 ともに巨大な神経節腫細胞の細胞質のみに強い陽性所見が見られた。ちなみに、Ich-1 の染色パターンは腫瘍サブセット間で違いは見られなかった。

次に、新鮮腫瘍組織より分離した腫瘍細胞と神経芽細胞腫細胞株から、細胞質成分と核成分を分離し、単一バンドが得られる抗 CPP32 単クローン抗体を用いて Western 解析を行ったところ、予後良好病期群腫瘍組織では核分画に明らかな CPP32 の局在が認められたが、予後不良病期腫瘍と培養細胞株では、CPP32 は細胞質にのみ存在していた。

（3）TUNEL 法と ICE または CPP32 の二重蛍光染色

アポトーシスによる自然退縮中の腫瘍組織を用いて、断片化 DNA を同定する TUNEL 法と ICE または CPP32 の同時染色を行った。その結果、TUNEL 陽性の断片化した核に ICE または CPP32 が同時に存在する所見が得られた。

考察：

神経芽細胞腫における分化と自然退縮は NGF/TRK-A のシグナル伝達によって制御されており、これは正常交感神経細胞の発生発達過程で起こる分化と細胞死の分子機構と極めてよく類似している。今回の我々の解析から、*in vivo* 神経芽細胞腫では、ICE と CPP32 の発現パターンは TRK-A のそれとよく一致しており、ICE および CPP32 は NGF 欠乏による neuronal cell death に伴って発現誘導されていることが示唆された。また両者は、apoptotic process に入っている腫瘍細胞では一部が細胞質から核へ移行していることが明らかとなり、神経芽細胞腫の自然退縮の細胞内分子機構において重要な役割を果たしていることが示唆された。

105
2Da6

小脳顆粒細胞の生存維持とカルシウム応答遺伝子群の発現制御

津田正明、佐野訓明、田渕明子
(岡山大学・薬学部・微生物薬品化学)

【要約】
小脳顆粒細胞ニューロンの初代培養系においては、25mMKCl存在下で細胞の生存活性は高く保たれるが、5mMKClにすると細胞のアポートーシスが誘起される。実際に、25mMから5mMにKCl濃度を下げると細胞死が起こるが、この時、Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)のmRNA発現レベルも急激に減少する。しかし、再び25mMKClに戻すと細胞死は抑制され、BDNFmRNAの発現も急速に回復する。この細胞死抑制は、電位依存性カルシウムチャンネル(Voltage-dependent calcium channels; VDCCs)からのCa^{2+}流入に依存しており、かつ*de novo*蛋白質合成に依存的であった。しかし、添加BDNFによる細胞死抑制は部分的であった。他の遺伝子の発現変化を調べた所、c-*fos*, *fos*-B以外にSuperoxide dismutase(SOD)やSecretogranin II(SgII)遺伝子がup-regulationを受けることが明らかとなった。一方、c-*jun*やneurotrophin-3(NT-3)遺伝子は逆にdown-regulationを受けた。このように、VDCCsからのCa^{2+}流入によって誘起されるカルシウムシグナルで、発現レベルが影響を受ける一連の遺伝子群が存在するらしい。私たちは、これら遺伝子群を便宜的にカルシウム応答遺伝子群(Calcium-responsive genes; CaRGs)と呼んでいる。このCaRGsの発現で、例えば、グルタミン酸毒性への抵抗性も増強されるようだ。

最近、転写制御因子CREBのノックアウトマウスやトランスジェニックショウジョウバエなどの機能欠損型変異動物個体を用いて、長期記憶過程には遺伝子発現レベルの関与が必須であることが明らかにされている(1,2)。しかし、遺伝子発現レベルが実際にどのような具体的な機構によって記憶・学習に関わっているかなどについては、全く未知である。このことを明らかにするには、シナプス入力によって惹起される神経活動で、どのような遺伝子がどのような制御系を介して発現されるかについて、細胞レベルで検討する必要がある。一方、小脳顆粒細胞ニューロンでは、膜の脱分極によって誘起されるカルシウム流入で神経活動が起こるが、それによって神経細胞の生存維持活性の高まることが知られている。そして、これには種々の遺伝子の発現変化が伴っていることが予想された。そこで、カルシウムシグナルでコントロールされる神経細胞の生存維持活性と関連遺伝子群の発現に注目し、神経活動と遺伝子発現との関係について一連の検討を行った。その結果、カルシウム応答遺伝子群の存在が明らかとなった(3)。

【方法】
出生後一週目のICRマウス小脳より、小脳顆粒細胞ニューロンの初代培養系を調製した。25mMKCl存在下で4日間培養した後、5mMKCl(又は、それ以外の濃度)を含むDMEM培地に交換し24時間培養を続けた。この時点で、細胞の生存・維持活性を測定するために、培地中へ放出された乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase; LDH)活性を測定し、細胞中のLDH活性も含めた全LDH活性に占める割合を算出した（LDHアッセイ)。また、細胞質RNAを抽出しノザンブロットハイブリダイゼーションによる解析を行った。再脱分極は、5mMKCl存在下での24時間の培養後、再び25mMになるようにKClを加え、培養を継続した。そして、適時サンプルを調製し、LDHアッセイおよびノザンブロットハイブリダイゼーションによる解析を行った。

【結果】
25mMKClから5mMKClにすると、LDH活性の培地中への放出が高まると同時に、c-*fos*mRNAばかりでなく、BDNFmRNAの発現レベルの急激な減少が認められた。海馬初代神経細胞培養系における解析から、BDNF遺伝子の発現誘導には*de novo*蛋白質合成は必要ないことが明らかとなった。また、BDNFmRNAの半減期は2時間程度で、c-*fos*mRNAと同様に短かった。

KCl濃度を5mMから25mMにして再脱分極を行うと、LDH活性の放出が抑えられ神経細胞死の抑制が認められた。この時、BDNFmRNA合成の急激な増加も認められた。この神経細胞死抑制は、ニカルジピン投与で阻害され、シクロヘキシミド投与でも阻害された。また、培地中へのBDNF添加は、部分的にしか細胞死を抑制しなかった。他の遺伝子の発現変化を調べた所、5mMから25mMKClで、Superoxide dismutase(SOD)、Secretogranin II(SgII)遺伝子はup-regulationを、逆に、c-*jun*とNeurotrophin-3(NT-3)遺伝子はdown-regulationを受けた。このdown-regulationはニカルジピン投与で阻害された。なお、発現変化を示す他の遺伝子を、Differential display法で検索中である。また、5mMKCl存在下で培養した細胞は100μMのグルタミン酸添加で細胞死を起こしたが、25mMKCl存在下の細胞では細胞死はより高い濃度のグルタミン酸でしか認められなかった。

【考察】

5mMKCl存在下でアポトーシスの過程にある細胞は、膜の脱分極で引き起こされる細胞内へのCa^{2+}流入でその細胞死が抑制されることが明らかとなった。また、この細胞の生存・死に対応してBDNF遺伝子の発現が変化することがわかった。しかし、脱分極による細胞の生存活性化は、BDNF単独の効果と言うよりは、カルシウムシグナルによって発現変化を受ける一連の遺伝子群（便宜的に、カルシウム応答遺伝子群と呼ぶ）の協調的な遺伝子発現変化による可能性が強い(3)。このような細胞内状況は、グルタミン酸毒性に対する抵抗性をも付与しているようである。また、BDNF とNT-3遺伝子は、同じカルシウムシグナルで、全く逆の制御を受けることが明らかとなった。今後、カルシウム応答遺伝子群をさらに検索するとともに、その発現制御機構を明らかにし、カルシウムシグナルによって誘起される神経細胞の応答性を解明したい。

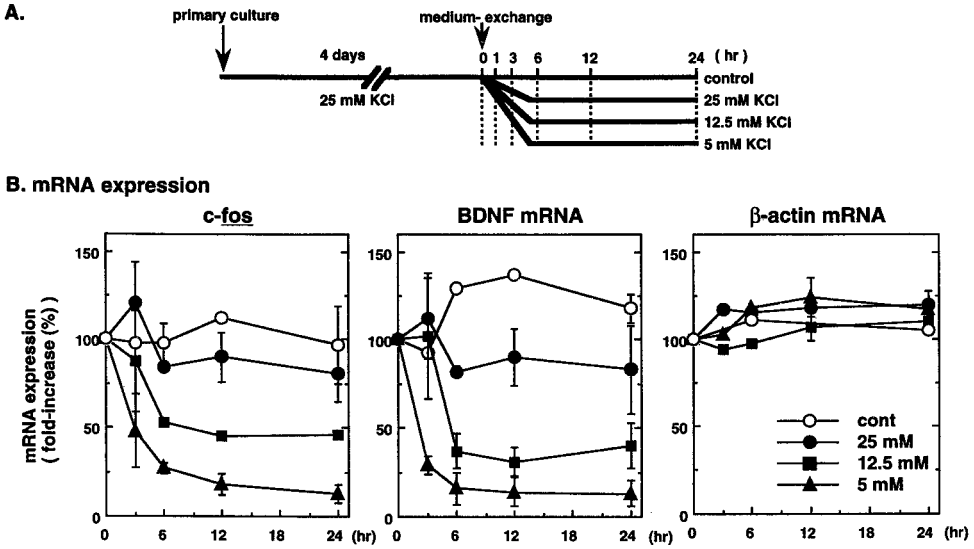


図1. c-*fos*とBDNF遺伝子発現レベルに与えるKCl濃度の効果　ノザンハイブリダイゼーションの結果を、培地交換時の値を100%ととして定量的に示した。

【文献】

1. Yin, J. C. P., wallach, J. S., vecchio, M. D., wilder, E. L., Zhou, H., Quinn, W. G. and Tully, T. (1994) Cell 79, 49-58.
2. Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioff, D., Schutz, G. and Silva, A. J. (1994) Cell 79, 59-68.
3. Tsuda, M. (1996) Neurochem. Int., in press.

106 ベラトリジンによるアポトーシス及びネクローシス様細胞死の促進

1E57

小田 毅*、二宮孝文*、田中秀逸、小池達郎
(北大院理行動知能学、*札幌医大解剖学、*現 電力中研)

〔要約〕
ベラトリジンは用量依存的に上頸神経節細胞死を誘発した。電子顕微鏡による観察などから、細胞体の収縮、染色体の断片化を含むアポトーシス様機構とネクローシス様機構が共存していた。活性酸素の中和剤を処理するとベラトリジン毒性の約50%は抑制された。更に、ベラトリジンによって染色体の構造変化が観察され、核と細胞質両方に作用することが判った。ベラトリジン毒性は細胞外液のNa^+イオンに依存したが、Ca^{2+}イオンには依存しなかった。しかし、BAPTAにより細胞内Ca^{2+}イオン濃度をキレートすると細胞体の収縮は抑制され、アポトーシス様機構は起こらなかった。

昨年度本大会において、NGF 存在下1週間培養したラット上頸神経節細胞をベラトリジン (VERA) で処理すると、用量依存的に毒性を示し、40 μMでは約80%の細胞が死滅したことを報告した（1）。その際、濃度を10 μM以下に抑えてVERA作用の特異性即ち、膜電位依存性Na+チャンネルへの作用が保たれる範囲で実験すると、VERAの毒性は細胞外液のCa^{2+}イオンではなく、Na^+イオンの流入に依存していた。そこで、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。今回、電子顕微鏡観察などにより検討した結果、VERAはアポトーシス様及びネクローシス様細胞死を共に促進することを見いだし、そのメカニズムを考察した。

[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（2）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。

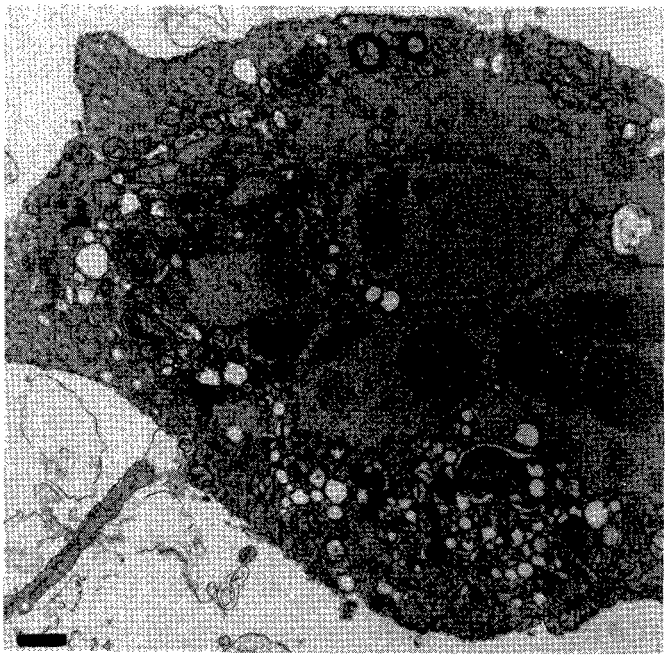
染色体観察・アポトーシス検出法：細胞を4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定後、ヘキスト3258（1 μg/ml）で15分染色、PBS(-)で洗浄後、染色体の凝縮の有無を蛍光顕微鏡（UV）で観察した。Apoptag法はoncor社のキットを用い、反応時間を1.5時間にした以外プロトコールどうりに行った。

電子顕微鏡観察：35mm dishの細胞を2.5%グルタルアルデヒドで固定後、ヘキスト3258（1 μg/ml）で15分染色した。DNA断片化を示す細胞の位置をマークした後、1%オスミウムテトラオキシドで固定、エポン包埋し、電子顕微鏡観察した。

[実験結果及び考察]

NGF 存在下1週間培養したラット上頸神経節細胞を10 μM VERAで16-18時間処理した後、電子顕微鏡観察すると、細胞質が萎縮し、暗調となり、核が断片化し、クロマチンが凝縮している像が見られた（図1）。細胞質には明調小胞（clear vesicle）が形成され、inward blebbingが起こっていることを示唆している。又、リソゾーム系が活性化された為のautophagic vacuoles も多数見いだされた。一方、ミトコンドリアの形態は良く保持されていた。ヘキスト3258染色によりDNA断片化を示す細胞は電顕観察により、このような形態を示すので、アポトーシスであると考えられる。一方、ヘキスト3258染色によりDNA断片化を示さない細胞では、正常なものや細胞質が明調で細胞内小器官、

とくにr-ERの消失、膨化が見られるネクローシスと思われる細胞死も見いだされた。この結果、両者のメカニズムが併存していることが示唆された。VERA毒性に活性酸素が関与するかを調べるために、スピントラップ剤であるPOBN (α-(4-pyridyl-1-oxide)-N-t-butyl-nitrone)の効果を調べた。図2に示すように70mM POBNは毒性を約50%抑制した。同様に5mM TMPO (tetramethylpyrroline-N-oxide) でも弱い抑制効果を認めた (約20%) 。一方、核への作用を調べるために、VERAを投与後、ヘキスト3258染色によりクロマチンの構造変化を経時的に追った。処理後2-3時間で、クロマチンはパッチ状になった。この状態ではApop-tagでは染まらず、切断は起こっていない。パッチ状から凝縮、断片化へと移行すると考えた。ところで、VERAの毒性には細胞外液のCa^{2+}イオンではなく、Na^{+}イオンの流入に依存していた。Na^{+}イオンの流入による細胞体の収縮は、それ自身では毒性のない25-40μM BAPTA-AMで細胞を処理すると、完全に阻止され、その結果アポトーシス様機構は抑制された。この結果、パッチ状から凝縮、断片化への移行には細胞体の収縮が必要であり、この収縮には細胞内カルシウムが必要であると推定された。結論として、VERAは細胞質にも核にも作用があると示唆される。



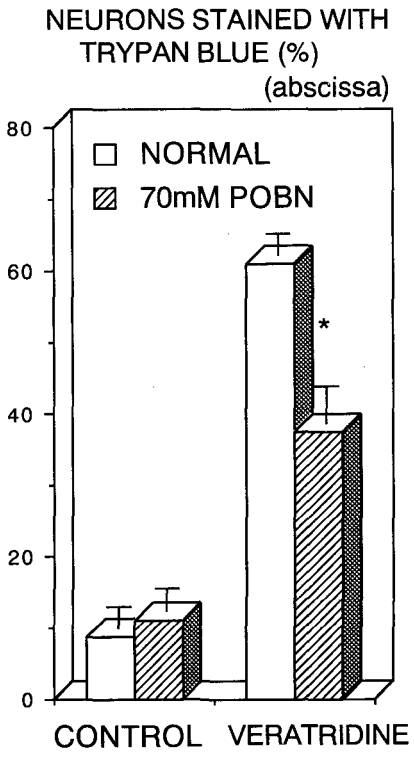


図1 (左) . ベラトリジン毒性による上頸神経節細胞死のアポトーシス様形態(バーは0.5μm)。
図2 (右) . ベラトリジンによる神経細胞毒性に対するスピントラップ剤の効果 (ラット上頸神経節細胞を対照及び70mM POBN存在化で10μM VERAを24時間処理した後、トリパンブルー染色細胞を3well分各々200以上測定した平均値(mean±SE)、* p＜0.05 vs. VERA)

参考文献

1. 小池達郎、中山恒、小田毅、田中秀逸 (1995) 神経化学 34 (2) ：242—243.
2. Tanaka, S and Koike, T. (1995) Develop. Biol. 168 : 166-178.

107 1Da5 ドーパミン神経毒1(*R*),2(*N*)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolineによるアポトーシスの惹起

丸山和佳子[1)]、高橋勤[2)]、直井信[3)]
1)中部病院長寿医療研究センター、2)江南女子短期大学、3)名古屋工業大

[要約]
ヒト脳内でドーパミンから酵素的に生成される1(*R*), 2(*N*)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline [*N*-methyl-(*R*)salsolinol, *N*M(*R*)Sal]はドーパミンに特異的な神経毒である。この*N*M(*R*)Salによるドーパミンニューロンの細胞死の機序をヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用い検討した。アポトーシスに伴うDNAの傷害をsingle cell gel electrophoresis (COMET assay)により測定した。*N*M(*R*)Salとそれに関連するカテコールイソキノリンを検討したところ、*N*MSalの(*R*)体のみが、強いDNAの傷害を惹起した。このDNA傷害はタンパク合成の阻害剤cycloheximideにより防止され、アポトーシス的な細胞死の機構が働いていることが示唆された。また抗酸化剤とラジカルスカベンジャーが細胞のDNA傷害を減少させたことから、酸化ストレスがこのDNA傷害に至る反応を開始させている可能性があると考えられた。パーキンソン病における黒質のドーパミン細胞の脱落にはアポトーシスが関与しているとされており、*N*M(*R*)Salはパーキンソン病の病因に関与している可能性がある。

[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) 類をラット線条体に投与したところ、(*R*)型の*N*MSal によってのみ無動、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脱落とドーパミンとノルアドレナリン濃度の減少が認められた[1]。しかし黒質にはネクローシスに相当する組織反応が認められず、アポトーシス等の細胞死の機構が関与していることが示唆された。この為ヒトドーパミン系神経芽細胞腫由来のSH-SY5Y 細胞を用い、細胞のDNA損傷をCOMET assayにより定量的に測定する。またDNA傷害を惹起する一連の細胞内反応に関わる酸化的ストレスと傷害との関連を検討する。上記の結果からパーキンソン病での黒質ドーパミン細胞の選択的な細胞死の機構を考察する。

[方法]
SH-SY5Y 細胞とカテコールイソキノリンを３７° C、３時間反応させた後、Singhらの方法[2]によりDNA損傷を定量した。損傷をうけ、分断化されたDNAは球状のDNA本体から尾状に電気泳動され、その長さ(COMET length)を測定した。また各細胞におけるCOMET lengthの分布を検討した。COMET length ４５μm以上の長さのDNA泳動像を傷害（＋）の細胞と定義し、DNA損傷の有無を定量した。

[結果および考察]
図１に*N*M(*R*)SalによるDNA傷害による典型的なCOMET像を示す。*N*M(*R*)Salの光学異性体*N*M(S)Sal、代謝前駆体1-methyl-DHTIQ (salsolinol, Sal) の (*R*), (*S*)体、また*N*MSalの酸化体1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-isoquinolinium ion によるCOMET lengthの影響を検討した。図２のヒストグラムに示す様に*N*MSalのみがDNA損傷を惹起したが、(*R*)体によるDNA損傷の頻度と程度（COMET length)は有意に(*S*)体より高度であった。
タンパク合成酵素阻害剤であるcycloheximide は DNA傷害を有意に低下させた。また、抗酸化剤であるGSH やラジカルスカベンジャーであるcatalase もやはりDNA傷害を予防した。deprenyl やsemicarbazideのDNA傷害予防作用については、これら薬剤のラジカル消去作用によるものと考えられた。superoxide dismutase はDNA傷害を予防しなかった。

我々は最近ヒト脳内に存在するSalが(*R*)型のみであり、これが脳内でドパミンより酵素的に合成されることを見い出した[3]。また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 SH-SY5Y 細胞に取り込まれ、蓄積されることを報告している。NM(*R*)Salは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[4]。 以上の結果はドーパミン由来のイソキノリン類が、ドーパミン神経に対する特異的に蓄積しアポトーシスを惹起しることが、パーキンソン病の病因である可能性を示唆している。

[文献]
[1] M. Naoi, et al. Brain Res., 709; 285-295 (1996) [2] N. P. Singh, et al. Exp. Cell Res. 175; 184-191(1988) [3] M. Naoi, et al. Neurosci. Lett. in press (1996) [4] W. Maruyama, et al., J. Neurochem., 64; 2635-2643 (1995)

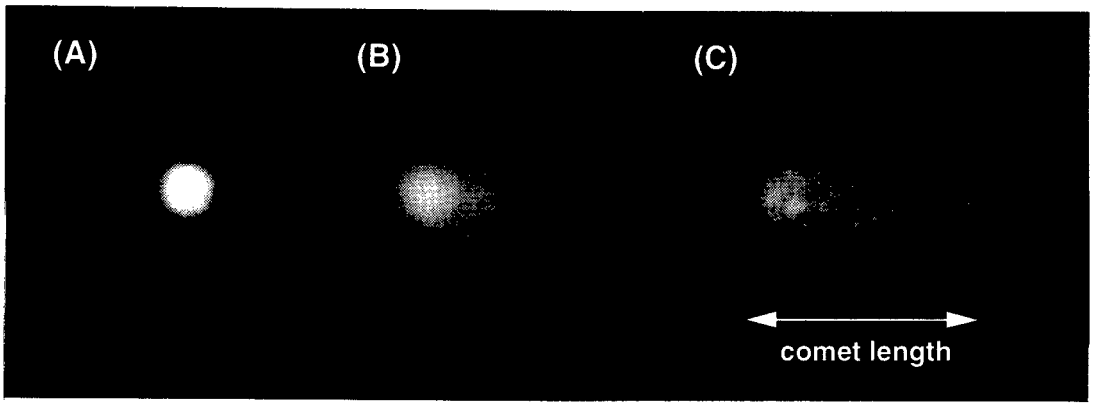


図 1 NM(R)Sal によるSH-SY5Y 細胞のDNA 損傷。
(A) control (B) mildly damaged cell (C) severelly damaged cell

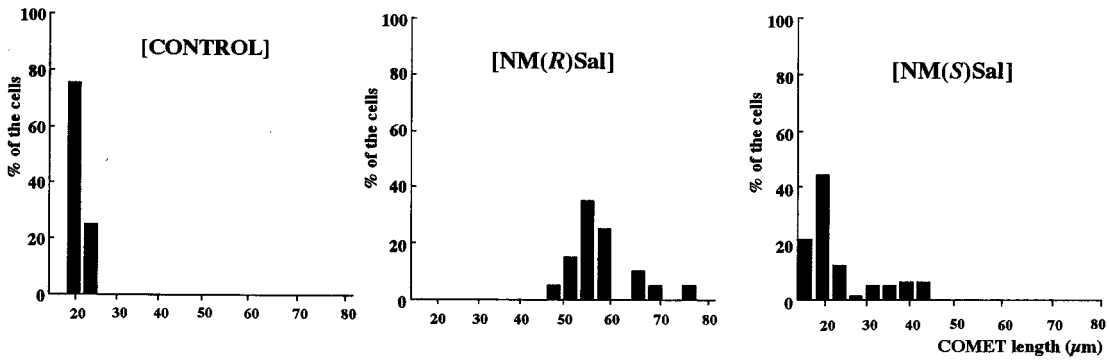


図 2 NM(R)Sal およびNM(S)Sal 処理 (3時間 1mM) によるDNA損傷。
各COMET length を呈する細胞の比率をヒストグラムで表示している。

108 1E58 初代培養中脳ニューロン/グリアにおける 6-OHDAおよびH2O2の毒性に対するBDNFの影響

岩田恵美，浅沼幹人，西林佐紀子，近藤洋一，Marvin Gómez-Vargas，小川紀雄
（岡山大医・分子細胞研・神経情報学部門）

【要約】6-OHDAまたはH2O2の毒性に対するBDNFの影響について，初代培養ラット中脳ニューロン/グリア細胞を用いて検討した．6-OHDAまたはH2O2単独処置によるAP-1およびCREBのDNA結合活性は，ニューロンでは細胞生存率の低下に伴い減少するのに対し，グリア細胞では増加していた．またグリア細胞においては，BDNF前処置によるDNA結合活性への影響が，6-OHDAを添加した群とH2O2-を添加した群では異なっていた．これらの結果より，6-OHDAやH2O2といった酸化的ストレスに対する応答がニューロンとグリア細胞の間で異なっていること，さらにグリア細胞においては，6-OHDA-とH2O2とでは作用様式が異なっているために，BDNFの影響が異なって現れた可能性が考えられた．

【目的】パーキンソン病におけるドーパミン神経障害過程において，活性酸素種およびフリーラジカルによる酸化的ストレスが深く関与すると考えられている[1,2]．また，パーキンソン病モデルに繁用される 6-hydroxydopamine (6-OHDA)は，活性酸素種を生成，あるいはそれ自身がフリーラジカルとなり神経障害をきたすと考えられている[3]．一方，BDNFは末梢および中枢神経系のニューロンに広範に作用するが，特に中脳ドーパミン含有ニューロンに作用する栄養因子としてパーキンソン病との関連が注目されている．BDNFはTH陽性細胞の生存および成長促進作用を持ち，さらに，カテコールアミン細胞に対する特異的な細胞毒であるMPP+に対し，NGFやFGFよりも強い効果を示すことなどが報告されている[4,5]．また最近，AP-1やNF-κBといった転写制御因子のDNA結合活性が，活性酸素種あるいは抗酸化剤などにより影響されることが示されている[6]．われわれは，ドーパミン神経系における酸化的ストレスの転写制御因子に及ぼす影響と，それに対するBDNFの効果について明らかにする目的で，あらかじめBDNFを処置したラット初代培養中脳ニューロン/グリア細胞に6-OHDA, H2O2を添加し，AP-1およびCREBのDNA結合活性の変化を検討した．

【実験方法】（1）中脳ニューロン/グリア細胞の培養：中脳は15日目の胎児ラットの脳より切り出し，培養に用いた．10% FCS-DMEM培地の入った直径35mmのdishに 1-2 x 10^6cell/dishとなるように細胞をまき，37℃, 5% CO2/95% airのCO2 incubator内で培養した．神経細胞は，24時間以内に2mM cytosin arabinofuranoside入りの培地に替え，培養5-7日目に実験に用いた．グリア細胞は，引き続き 10% FCS-DMEM培地で培養を続け，1週間後に継代し実験に用いた．

（2）薬剤処置：H2O2 (125, 250, 500 μM) または6-OHDA (75, 150, 300 μM) を添加して，2および6時間後にトリパンブルー染色により細胞生存率を調べた．また核抽出液は，刺激2時間後にSchreiberらの方法で抽出した．BDNF(100ng/ml)はH2O2 または6-OHDA処置の24時間前に培地に添加した．

（3）Electrophoretic mobility-shift assay (EMSA)：転写制御因子AP-1およびCREBのDNA結合活性の変化は，[^{32}P]dCTPで標識したそれぞれの結合element (TRE, CRE)を含む2本鎖DNA probeと核抽出液を20-℃, 15分間反応させ，4% acrylamide gelで電気泳動させるEMSAにより解析した．

【結果および考察】ニューロンおよびグリア細胞で，6-OHDAあるいはH2O2の添加6時間後の細胞生存率は，ともに薬剤の濃度依存的に低下した．しかし，グリア細胞はニューロンに比べて6-OHDAや

H_2O_2に対する抵抗性が高く，特にH_2O_2に対しては高濃度においてもかなりの生存率が認められた．また，グリア細胞では高濃度の6-OHDAあるいはH_2O_2の添加により転写制御因子のDNA結合活性は無処置細胞に比べて増加した．特にグリア細胞を6-OHDA(300μM, 2h)で刺激した場合，細胞生存率は無処置細胞の約15%しかないが，DNA結合活性は無処置細胞の約250%と顕著に増大していた．グリア細胞では酸化的ストレスに対してimmediate early genes の発現が惹起され，転写制御因子の結合活性が高まると考えられた．一方，ニューロンでは薬剤の濃度依存的にDNA結合活性は減少しており，トリパンブルーを用いた細胞計数の結果より，このDNA結合活性の減少は生存細胞数の減少を反映していると思われた．これらのことより，ニューロンとグリア細胞では6-OHDAやH_2O_2といった酸化的ストレスに対する応答が異なっており，グリア細胞でのDNA結合活性の増加は細胞の防御反応を誘導していると考えられた．次に，細胞生存率を約50-60%に低下させる濃度の6-OHDAあるいはH_2O_2に対する，BDNF(100ng/ml)前処置(24h)の影響の検討を行ったが，細胞生存率のレベルで保護効果はみられなかった．しかし，EMSAによる解析の結果，ニューロンでは，6-OHDAまたはH_2O_2単独刺激によるDNA結合活性の減少はBDNF前処置によりコントロールレベルまで戻ることが明らかになった(Fig.1)．さらに，グリア細胞で同様の解析を行った結果，6-OHDA単独刺激によるDNA結合活性の増加はBDNF前処置により抑えられる傾向にあった．一方，H_2O_2単独刺激によるDNA結合活性の増加に対しては，BDNFはさらに増大させる傾向にあった(Fig.2)．このことより，グリア細胞において，6-OHDAとH_2O_2の細胞傷害経路は異なっており，そのためBDNFのDNA結合活性に対する効果が異なっている可能性が考えられた．さらにBDNFによる効果が細胞の機能亢進によるものなのか，BDNF自身のラジカル消去能によるものなのかをESR spectrometer を用いて検討する予定である．

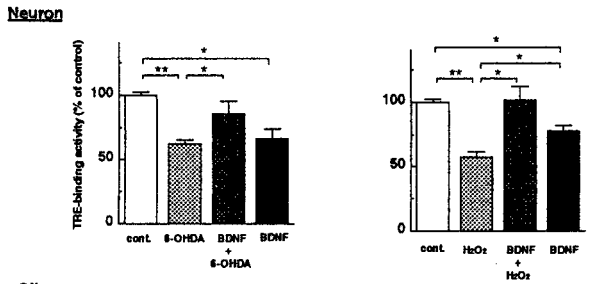


Fig.1.
6-OHDAまたはH_2O_2を添加した初代培養ラット中脳ニューロンにおけるBDNF前処置のTRE結合活性への影響

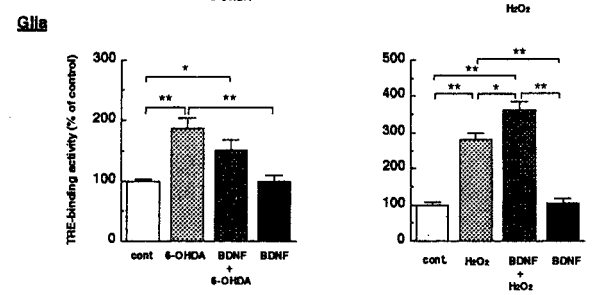


Fig.2.
6-OHDAまたはH_2O_2を添加した初代培養ラット中脳グリア細胞におけるBDNF前処置のTRE結合活性への影響

【文献】 1. Adams, J.D. and Odunze, I.N. (1991) Free Radical Biol. Med. 10 : 161-169.
2. Cohen, G. (1986) Adv. Neurol. 45 : 119-125.
3. Heikkila, R.E. and Cohen, G. (1972) Mol Pharmacol. 8 : 241-248.
4. Hyman, C., Hofer, M. et al. (1991) Nature. 350 : 230-232.
5. Spina,M.B., Squinto,S.P. et al. (1992) J. Neurochem. 59 : 99-106.
6. Meyer, M., Schreck, R. and Baeuerle, P.A. (1993) EMBO J. 12 : 2005-2015.

109 1Da6

ラット中脳培養ニューロンにおけるドーパミンD2受容体刺激薬によるグルタミン酸誘発神経細胞死の抑制効果

澤田秀幸、下濱 俊、木村淳、河村貴央*、赤池昭紀*
(京都大学医学部・神経内科、*薬学部・薬理)

[要約] グルタミン酸は神経伝達物質の一つで、過剰量の刺激では、細胞内カルシウム流入を介して、神経細胞死をもたらす。著者らは、これまでに、ラット腹側中脳培養ニューロンにおけるグルタミン酸誘発神経細胞死の機序を検討したきた。神経伝達物質の一部は、神経細胞保護作用を持つことが報告されている。中脳ドーパミンニューロンには、シナプス前ドーパミン受容体が存在することから、本研究では、グルタミン酸誘発神経細胞死に対するドーパミン刺激薬の保護効果を検討した。グルタミン酸 1mM、10 分間の暴露により、ドーパミンニューロン、非ドーパミンニューロンともに生存率が有意に低下したが、グルタミン酸暴露前の 24 時間、D2 刺激薬として、bromocriptine および quinpirole を投与すると、ドーパミンニューロン、非ドーパミンニューロンともに、グルタミン酸による生存率の低下が、有意に抑制され、保護効果がみられた。グルタミン酸毒性に対する保護効果は、D2 刺激薬の濃度と暴露時間とに依存し、グルタミン酸と同時投与した場合は、保護効果はみられなかった。また、bromocriptine の保護効果は D2 受容体遮断薬を同時投与すると有意に拮抗された。これらの所見は、グルタミン酸投与前の D2 受容体刺激がグルタミン酸誘発神経細胞死を抑制することを示している。

[実験方法]

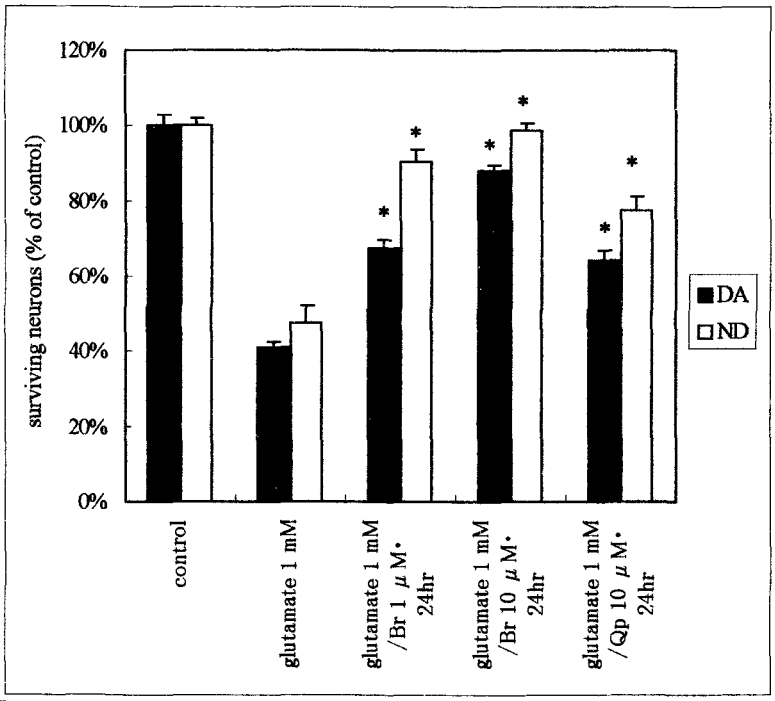
胎生 16 日齢のラット腹側中脳より機械的に単離したニューロンを、あらかじめ polyethyleneimine を塗布した coverslip 上で培養した。培養 8 日目に 10 分間のグルタミン酸(Glu)暴露を行い、神経細胞死を起こさせた。Glu 処置前 24 時間に D2 刺激薬として bromocriptine 1 ないし 10 μ M、および quinpirole 10 μ M を前投与し、Glu 誘発神経細胞死に対する影響を検討した。また、bromocriptine と D2 受容体遮断薬(domperidone 5 μ M)を同時投与した場合の Glu 誘発神経細胞死に対する影響を検討した。いずれの実験も、Glu 暴露後は薬物不含培地で培養し、培養 11 日目に 4% paraformaldehyde で固定後、抗 tyrosine hydroxylase 抗体、抗 microtubule associated protein 2 抗体を用いて免疫染色を行い、前者をドーパミンニューロンの、後者を全ニューロンの指標とし、それぞれの生存数を求めた。対照実験群に対する各処置群のニューロン生存率の低下を神経毒性の指標とした。各処置群の生存率を分散分析と Newmans Keuls 法による多重比較により検定し、危険率 5%以下のものを有意差とした。

実験に用いた動物の取り扱いは、「 *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* 」のガイドラインにしたがった。

[結果]

Glu 1mM・10 分間投与によりドーパミン(DA)ニューロン、非ドーパミン(ND)ニューロンの生存率は有意に低下した。bromocriptine (1 μ M および 10 μ M) を 24 時間前投与したものでは、濃度依存的にグルタミン酸誘発細胞死が抑制された。同様に、quinpirole 10 μ M を 24 時間前投与したものでも、有意に Glu 誘発神経細胞死が抑制された (図) 。

domperidone を bromocritptine と同時に前投与したものでは、Glu 誘発神経細胞死に対する保護効果が有意に拮抗された。また、bromocritptine あるいは quinpirole をグルタミン酸と同時に投与した場合は、いずれも保護作用はみられなかった。bromocriptine の前投与時間を変えて、グルタミン酸誘発神経細胞死対する保護効果の変化を調べると、前処置 8 時間以上で有意な効果がみられた。bromocriptine、quinpirole とも単独で 24 時間投与したものでは、対照群との間に細胞生存数に有意差はみられなかった。



Br: bromocriptine, Qp: quinpirole, DA: dopaminergic neuron, ND: non-dopaminergic neuron * $p<0.001$ compared to glutamate 1mM alone by one-way ANOVA and Kewmans Keuls test

[考察]

Glu 投与前 24 時間 bromocriptine を投与すると Glu 毒性が抑制された。bromocriptine は D2 刺激薬としての作用に加えて、free radical 除去能を有することが知られている(Ogawa et al.,1994; Yoshikawa et al., 1994)。しかし、quinpirole の前投与も Glu 神経毒性を抑制すること、D2 受容体遮断薬により bromocriptine の抑制効果が拮抗されたことから、直接 radical scavenger として作用しているのではなく、bromocriptine は D2 受容体刺激を介して Glu 毒性を抑制していると考えられる。また、Glu との同時投与では毒性を抑制しないことから、D2 受容体刺激は間接的に Glu 毒性を抑制していると考えられる。ラット中脳では，D2 受容体は DA ニューロンのシナプス前膜に限局している（ Meador-Woodruff et al., 1991）ことから、D2 受容体刺激を受けた DA ニューロンが、DA ニューロン、非 DA ニューロンへの Glu 毒性を抑制する因子を分泌産生する可能性がある。

文献

Meador-Woodruff JH, Mansour A, Healy DJ, Kuehn R, Zhou Q. Bunzow JR, Akil H, Civelli O, Watson Jr SJ. (1991): Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. Neuropsychopharm 5: 231-242.

Ogawa N, Tanaka K, Asanuma M, Kawai M, Masumizu T, Kohno M, Mori A. (1994): Bromocriptine protects mice against 6-hydroxydopamine and scavenges hydroxyl free radicals in vitro. Brain Res 657: 207-213.

Yoshikawa T, Minamiyama Y, Naito Y, Kondo M. (1994): Antioxidant properties of bromocriptine, a dopamine agonist. J. Neurochem. 62: 1034-1038.

110 海馬細胞培養系におけるグルタミン酸トランスポーター阻害剤の興奮毒性増強作用，及び，同条件下のラジカルスカベンジャーによる神経細胞保護効果

1E59

氷見敏行，池田正行，室田誠逸
（東京医科歯科大学・大学院・細胞機能制御）

〔要約〕 中枢神経系において，興奮毒性を誘導する細胞外グルタミン酸の濃度の上昇は，シナプス前細胞からのグルタミン酸の放出よりも，アストロサイトによるグルタミン酸再吸収の障害が重要であると示唆されている (1)．本研究では，海馬由来の神経-グリア共存培養系を用いて，アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの特異的阻害剤 L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-PDC) (2) によるグルタミン酸興奮毒性に対する影響を検討した．グルタミン酸処理 (100mM 5 分間) によって，処理後 24 時間以内に誘導される神経細胞の細胞死は，t-PDC (200 mM 24 時間) 共存によって 1.4 倍に増加した．この興奮毒性の増大はグルタミン酸受容体阻害剤 MK-801 (10, 100 μM) および NBQX (10, 100 μM) によって軽減されなかった．さらに，興奮毒性の発現・増強に NO をはじめとするラジカルの関与が示唆されているので (3)，t-PDC 存在下の興奮毒性発現について，種々のラジカルの関与を検討したところ，N-acetylcysteine (NAC, 100 μM) は，単独ではほとんど効果が見られなかったものの，MK-801 および NBQX と併用することにより，著しい神経保護作用を示した．反対に，一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害剤は t-PDC 存在，非存在に関わらず，神経細胞保護効果を示さなかった．以上の結果より，アストロサイトによるグルタミン酸再吸収機構の障害が興奮毒性を増強すること，興奮毒性の増強には NO 以外のラジカル種が関与していることが証明された．

実験方法：妊娠 18 日目のウィスター/ST 系ラットをエーテル麻酔下，断頭屠殺し，胎児より海馬を摘出した．トリプシンを用いて分散した後，あらかじめポリリジンでコーティングしておいた 48 穴マルチウエルプレート上で 40 - 60 万cells/cm^2 の細胞密度で培養を開始した．培養は 37℃，5 % CO_2 環境下，10 % ウシ胎児血清および araC (10 μM) を含む高グルコース DMEM 中で行い，培養開始から 12 - 14 日目に薬物処理を行った．このとき全細胞数中 20 - 30 % 程度のアストロサイトを認めた．薬物処理は培養細胞をグルタミン酸 100 mM で 5 分間処理し，グルタミン酸を洗い流した後，それぞれの薬物を含む培養液中でさらに 24 時間培養した．死細胞をトリパンブルーで染色し，全神経細胞数に対する死んでいる神経細胞数の割合を求め，神経毒性の指標とした．神経細胞は，位相差顕微鏡下，形態的に同定した．統計的考察は，一元分散分析あるいは Kruskal-Wallis 検定を行った後，Dunnet の多重比較法により統計的有意差検定を行った．

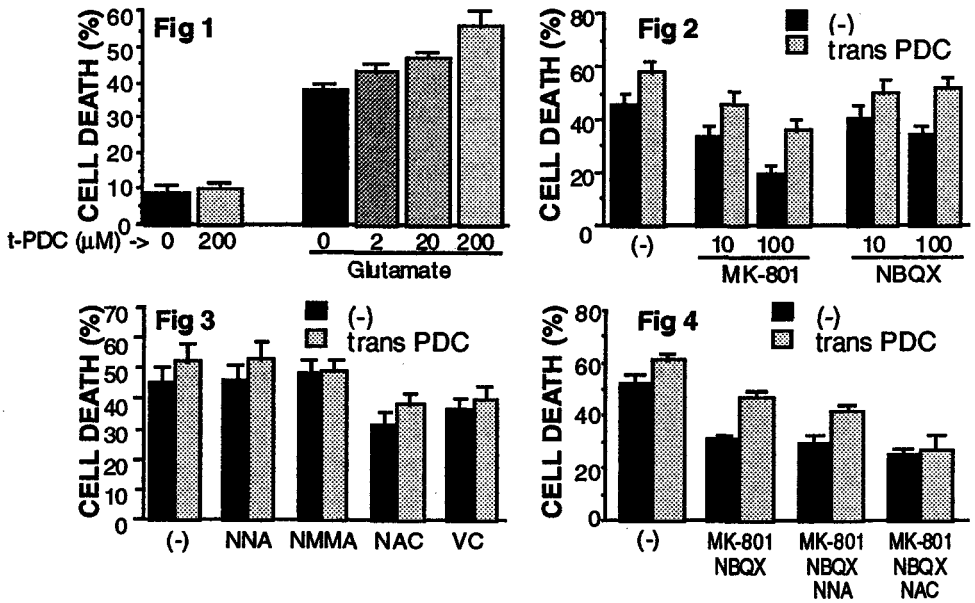
結果：1. t-PDC は，グルタミン酸の神経毒性を増強した (Fig. 1)． t-PDC は，グルタミン酸の神経毒性を濃度依存性に増強した．すなわち，t-PDC 2mM, 20mM, 200mM の存在下では，全神経細胞数中の死細胞の割合が t-PDC 非存在下の場合のそれぞれ 1.1, 1.2, 1.5 倍となった．一方グルタミン酸処理なしの場合，t-PDC 200 mM 単独処理は神経毒性を示さなかった．

2. t-PDC によるグルタミン酸神経毒性の増強は，グルタミン酸受容体拮抗薬によって抑制されなかった (Fig. 2)． MK-801 (100 μM) はグルタミン酸毒性を t-PDC 非存在下では 57 % (glutamate only, 46 %; glutamate + MK-801, 20 %) 軽減したのに対し，t-PDC 存在下では 38 % (glutamate only, 58 %; glutamate + MK-801, 36 %) 軽減したにすぎなかった．同様に，NBQX (100 mM) は t-PDC 非存在下では 26 % (glutamate only, 46 %; glutamate + NBQX, 34 %) 軽減したのに対し，t-PDC 存在下では 10 % (glutamate + t-PDC, 58 %; glutamate + t-PDC + NBQX 52

%) 軽減したにすぎなかった.

3. ラジカルスカベンジャーおよび NOS 阻害剤は t-PDC の存在・非存在によらず単独ではグルタミン酸の神経毒性を抑制しなかった (Fig. 3). NAC (100 μM) と ascorbate (VC, 1 mM) には, t-PDC 存在及び非存在下, グルタミン酸の神経毒性を 10 - 20 % 抑制する傾向が見られたが, 有意差は認められなかった. また, N-nitro-L-arginine (NNA, 500 mM) と N-monomethyl-L-arginine (NMMA, 500 mM) は t-PDC の存在の有無に関わらずグルタミン酸の神経毒性に影響を与えなかった.

4. t-PDC 存在下, グルタミン酸の神経毒性に対する MK-801 と NBQX の神経保護作用を NAC は増強したが, NNA は増強しなかった (Fig. 4). t-PDC非存在下では, MK-801 と NBQX の併用によって, 神経毒性は, 40 % (glutamate only, 52 %; glutamate + MK-801 + NBQX, 31 %) 軽減されたが, この場合 NNA, NAC をさらに共存させても神経毒性に変化はなかった. t-PDC 存在下では, MK-801 と NBQX の併用によって, 神経毒性は 21 % (glutamate + t-PDC, 61 %; glutamate + t-PDC + MK-801 + NBQX, 47 %) の軽減のみであったが, さらに NAC を添加することによって 56 % (glutamate + t-PDC, 61 %; glutamate + t-PDC + MK-801 + NBQX + NAC, 27 %) の軽減が認められた. これは t-PDC が存在しない場合と同程度の神経細胞の生存を維持したことになる. なお, NNA には MK-801 と NBQX の神経保護作用を増強させる作用は観察されなかった.



考察：単独ではほとんど効果のなかった NAC が MK-801 や NBQX の神経保護効果を増強したことから, t-PDC によるグルタミン酸の神経毒性の増強作用には, ラジカルの生成を介した反応であることが予測される. また, NOS 阻害剤が神経保護効果を示さなかった事実より, 興奮毒性の発現・増強には NO 以外のラジカルが関与していると結論する.

謝辞：本研究は川野小児医学奨学財団の助成による.

References 1. Nicholls, D., and Attwell, D. (1990) Trend. Pharmacol. Sci. **11**, 462-468.
2. Robinson, M. B., Djali, S., and Buchhaalter, R. (1993) J. Neurochem., **61**, 2099-2103.
3. Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., and Bockaert, J. (1993) Nature, **364**, 535-537.

111 新規シグマ$_1$受容体アゴニストSA4503のラット初代培養神経細胞における低酸素/低グルコース毒性に対する保護作用

1E60

中澤 美奈子、松野 聖

(参天製薬・開発研究本部・薬理研究グループ)

〔 要約 〕 ラット初代培養神経細胞を低酸素/低グルコース条件下で培養すると、神経突起が消失し細胞死に至る。この細胞死に対してシグマ受容体リガンドが抑制作用を示すことが報告されているので、今回我々は新規シグマ$_1$受容体アゴニストであるSA4503の低酸素/低グルコース毒性に対する保護作用を検討した。まず通常条件下でラット初代培養神経細胞に対するSA4503の影響を検討したが、SA4503は100 μMの濃度においても何ら作用は認められなかった。次に、ラット初代培養神経細胞を低酸素/低グルコース条件下で培養すると、6時間後からLDH漏出が認められ、細胞障害が誘発されるが、SA4503は同時添加によりこの低酸素/低グルコース負荷による細胞障害を濃度依存的に抑制した。また、この抑制作用は選択的シグマ$_1$受容体アンタゴニストのNE-100を添加することによって消失した。以上の結果から、SA4503はシグマ$_1$受容体を介して細胞障害抑制作用を有することが明らかとなった。

[緒言] 新規シグマ$_1$受容体リガンドであるSA4503 (1-(3,4-dimethoxyphenethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine dihydrochloride)はシグマ$_1$受容体に選択的にアゴニストとして結合することがこれまでの我々の研究で明らかとなっている(1)。また、我々は、SA4503がシグマ$_1$受容体を介してラット脳内アセチルコリン遊離を促進すること、動物モデルにおいては抗健忘症作用ならびに抗うつ作用を発現することもすでに報告している(2,3,4)。これまでにシグマ受容体を介した新しい薬理作用として神経細胞障害に対する保護作用が報告されているので(5)、今回我々は、選択的シグマ$_1$受容体アゴニストであるSA4503についてその保護作用を検討した。

[実験方法] 胎生21日目のWistar系ラット胎児全脳より初代培養神経細胞を調製した。培養7日目の神経細胞の培地をグルコースを含まない培地に交換し、薬物を処理してから5分後に95% N_2-5 % CO_2を満たしたチャンバーに入れて37 ℃、24時間インキュベートした(低酸素/低グルコース負荷)。さらに培地にグルコースを加えて通常の培養条件とし、CO_2インキュベーター中で24時間培養した後、細胞障害の指標としてLDH漏出を測定した。データは通常条件における薬物の作用を差し引いて、低酸素/低グルコース負荷時のコントロール群のLDH漏出に対する割合(%)を細胞毒性として表した。

[結果・考察] ラット初代培養神経細胞を24時間低酸素/低グルコース条件下で培養することによる細胞毒性に対して、SA4503 (0.001 -10 μM)は濃度依存的な保護作用を示した(Fig. 1)。一方、選択的シグマ$_1$受容体アゴニストである(+)-pentazocineにも同様の保護作用が認められたが、その作用は

SA4503 よりも弱かった。また、SA4503 の保護作用は、選択的シグマ$_1$受容体アンタゴニストの NE-100 (0.1 μM)の同時添加によって消失した(Fig. 2)。以上の結果より、SA4503 は初代培養神経細胞を低酸素/低グルコース条件下にすることによる毒性に対して保護作用を有することが明らかとなり、また NE-100 によってその保護作用が拮抗されたことから、この保護作用はシグマ$_1$受容体を介した作用であることが推定された。

[参考文献]

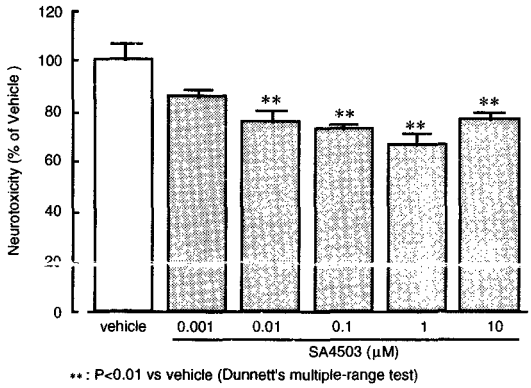
(1) Matsuno, K. et al., *Eur. J. Pharmacol.* (1996) 306, 271-279.

(2) Kobayashi, T. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press.

(3) Senda, T. et al., Eur. *J. Pharmacol.* in press.

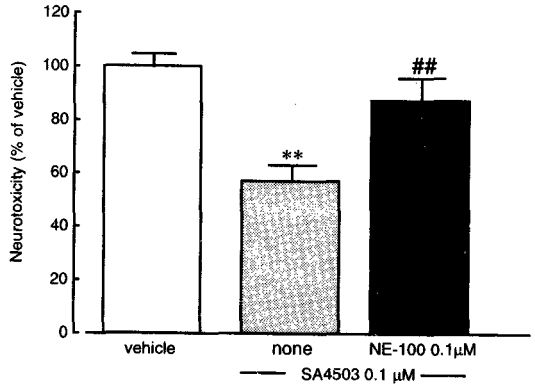
(4) Matsuno, K. et al., *Eur. J. Pharmacol.* in press.

(5) Lockhart, B. P. et al., *Brain Res.* (1995) 675, 110-120.



**: P<0.01 vs vehicle (Dunnett's multiple-range test)

Fig. 1 SA4503のラット初代培養神経細胞における低酸素/低グルコース毒性に対する保護作用



**: P<0.01 vs vehicle, ##: P<0.01 vs SA4503 0.1 μM (Student's t-test)

Fig. 2 ラット初代培養神経細胞におけるSA4503の低酸素/低グルコース毒性保護作用に対するNE-100の作用

112 1Da2 グリア毒（DL-α-アミノアジピン酸と6-アミノニコチン酸アミド）の細胞毒性機序の比較検討

馬渡一浩[1]，本間啓子[1]，安井裕子[2]，石田外樹[2]，滝沢 昇[2]，加藤 聖[2]
（金沢大・医・保健検査[1]， 医・神経情報研伝達[2]）

〔要約〕グリア毒として知られている DL-α-アミノアジピン酸（DL-α-AAA）と6-アミノニコチン酸アミド（6-AN）の毒性機序における活性酸素の関与を探る目的で，C6グリオーマ細胞を用いて比較検討した。DL-α-AAAによる細胞毒性では，細胞内グルタチオン（GSH）濃度の低下と細胞内活性酸素種（ROS）の蓄積が認められ，抗酸化剤で細胞死が有意に抑制された。他方，6-ANの場合には細胞内GSH濃度の中等度の低下は見られたが，細胞内ROSの増加はなく，抗酸化剤による細胞死抑制効果も認められなかった。さらに，ニコチン酸アミド添加により細胞死が抑制された。以上の結果から，DL-α-AAAの細胞毒性は，グルタミン酸と同様にシスチン／グルタミン酸交換輸送系（xc⁻系）を介したGSHの枯渇による酸化的ストレスと考えられたが，6-ANの場合は酸化的ストレス以外の機序が関与していることが示唆された。

〔序〕 グルタミン酸アナログであるDL-α-AAAおよびニコチン酸アナログである6-ANは，中枢神経系における選択的なグリア細胞毒性を示すことが知られている（1，2）。しかし，その障害に関する細胞内機序は全く不明である。DL-α-AAAは，グルタミン酸との構造類似性から，シスチン／グルタミン酸交換輸送系を介してシスチン取り込みの阻害，グルタチオン（GSH）の低下に基づく細胞内酸化的ストレスによる細胞障害が予想される。他方，6-ANは，細胞内で6-アミノ-ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドリン酸（6-アミノ-NADP）に代謝されると言われているため（3），NADPH供給の低下をもたらし（4，5），GSH-GSHペルオキシダーゼ系において酸化的ストレスを発生させることが予想される。そこで，両トキシンの細胞障害への活性酸素の関与を探る目的で，グリア細胞のモデル系であるC6グリオーマ細胞を用いて，活性酸素の産生系および消去系の諸活性を測定し，比較検討した。

〔方法〕 C6グリオーマ細胞はDMEM培地（10%牛胎児血清含有）で培養した。細胞死の判定は，トリパンブルー排泄試験またはメディウム中のLDH活性の測定にて行った。活性酸素の蓄積は 2,7-dichlorofluorescin diacetate（DCFH-DA）を用いるBondyらの方法（6）により，一定時間に産生される2,7-dichlorofluorescein を測定することにより評価した。また，細胞内GSHの測定は既報に従った（7）。細胞死抑制物質のスクリーニングは，ニコチン酸アミドに加えて，抗酸化剤やラジカルスカベンジャーとしてカタラーゼ，tetramethyl-pyrroline N-oxide（TMPO），α-phenyl-N-t-butylnitron (PBN) をDL-α-AAAまたは6-ANと同時添加し行った。

〔結果〕 C6グリオーマ細胞にDL-α-AAA（10 mM）を添加すると14～16時間から徐々に細胞の変性がおこり，48時間後には約80%の細胞は死滅した（図1）。一方，6-AN（1 mM）を添加した場合には，24時間後から細胞死が見られ，48時間後には約60%の細胞が死滅した（図1）。細胞内GSH濃度は，DL-α-AAA，6-AN共に添加4時間より低下傾向が認められ，8時間後にはDL-α-AAAでは約1/10以下に，6-ANでは約1/3に低下した（図2）。活性酸素種（ROS）の

細胞内蓄積については，6-ANではコントロールと同程度であったが，DL-α-AAAでは約２倍に増加した。次に，DL-α-AAAにビタミンＥを添加したところ，細胞死が有意に抑制された。また，6-ANとニコチン酸アミドを添加した場合には細胞死が有意に抑制されたが，ビタミンＥ，カタラーゼやO_2^-などのトラップ剤では有意な細胞死抑制効果は認められなかった（図３）。

〔考察〕　DL-α-AAAによるＣ６グリオーマの細胞死では，細胞内ＧＳＨの顕著な低下と細胞内ＲＯＳの蓄積が認められた。また，抗酸化剤であるビタミンEにより有意に細胞死が抑制された。他方，6-ANの場合には細胞内ＧＳＨの中程度の減少は見られたが，細胞内ＲＯＳの発生や活性酸素種のスカベンジャーや抗酸化剤による細胞死抑制は認められなかったが，ニコチン酸アミドでは有意に抑制された。以上の結果から，DL-α-ＡＡＡによる細胞毒性は，グルタミン酸と同様に(5)，x_c^-系を介したシスチン取り込みの阻害，細胞内ＧＳＨの減少，ＲＯＳ消去能力の低下，その結果引き起こされる酸化的ストレスによると考えられた。他方，6-ANのグリア毒性は酸化的ストレス以外の機構が示唆された。

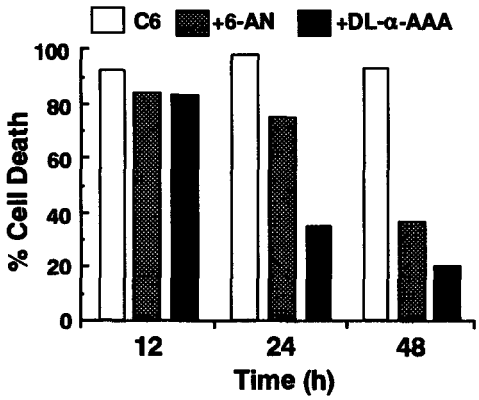


図１．DL-α-AAAと6-ANによる細胞死

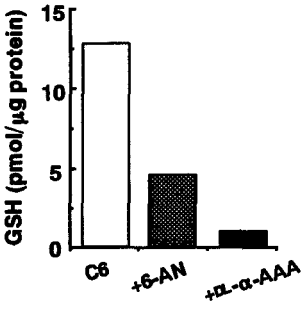


図２．細胞内GSH量
（８時間後）

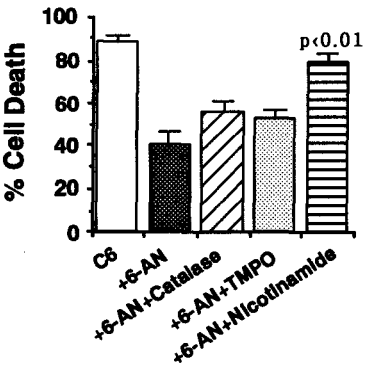


図３．6-ANによる細胞死への種々の薬物の効果
（48時間後）

〔文献〕

1. Olney, J.W., Ho, O.L., and Rhee, V. (1971) *Exp. Brain Res*. **14**, 61-76.
2. Politis, M. J. (1989) *J. Neurol. Sci*. **92**, 71-79.
3. Raivio, K.O., Lazar, C.S., Krumholz,H.R., and Becker, M.A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **678**, 51-57.
4. Aw, T.Y., and Rhoads, C.A. (1994) *J. Clin. Invest*. **94**, 2426-2434.
5. Krum, J.M. (1995) *Mol. Chem. Neuropathol*. **26**, 79-94.
6. Bondy, S. C., and Lee, D. K. (1993) *Brain Res*. **610**, 229-233.
7. Kato, S., Negishi, K., Mawatari, K., and Kuo, C. -H. (1992) *Neuroscience* **48**, 903-914.
8. Mawatari, K., Yasui, Y., Sugitani, K., Takadera, T., and Kato, S. (1996) *Neuroscience* **73**, 201-208.

113 1E61 培養アストロサイトにおける低温効果

宮崎博文，中村洋一，司秋生，片岡喜由
（愛媛大学医学部生理学教室第一）

〔 要約 〕

虚血神経細胞障害がどのような機構で虚血後低脳温により保護されるのかを解明する目的で，培養アストロサイトに30℃の低温処理を24時間施し，その後のグルタミン酸取り込み活性および増殖活性に及ぼす影響を検討した。培養アストロサイトを30℃のCO_2インキュベーターで24時間培養した後37℃でグルタミン酸取り込み活性を測定すると，37℃で培養した場合に比べ，およそ50%の活性増強がみられた。30℃で24時間培養後に[^{3}H]チミヂンを加え，その後12時間の37℃での放射活性取り込みで評価した細胞増殖能は，37℃で培養した場合とほとんど変化がなかった。これらの結果はミクログリアの各種活性や増殖能が低温により著しく抑制される事実と対照的であり，虚血後低脳温による神経細胞障害軽減の作用機構解明の一端となりうる。

シナプスに放出された興奮性アミノ酸は主としてアストロサイトにある能動輸送系により処理されシナプス伝達が終結するとされている。よく知られているように，虚血神経細胞障害にはグルタミン酸の興奮毒性が深く関与しており，グルタミン酸アンタゴニストの神経保護効果が虚血再灌流後の投与によっても観察されることは，虚血再灌流後におけるアストロサイトのグルタミン酸取り込み活性の増減によっても，神経細胞障害の程度が左右される可能性を示唆している。一方，一過性脳虚血動物モデルにおいて，低脳温により神経細胞死が効果的に保護されることが知られており，注目すべきことに，低脳温化を虚血再灌流後に開始してもその効果がみられることが最近報告された。本研究ではこの低脳温による神経細胞障害保護の機構解明の目的で，培養アストロサイトを用い，そのグルタミン酸取り込み活性および増殖能について低温処理の効果を検討した。

［ 方法 ］

アストロサイトの培養：ラット19日胎仔の大脳皮質あるいは海馬から調製した細胞を，10%牛胎仔血清を含むDMEMにより培養した。培養1週間目にトリプシン処理により細胞をまき変え，神経細胞を除去し，さらに96well あるいは24wellのプレートにて約1週間培養し実験に用いた。但し，増殖活性の測定にはまき変え後2–3日のコンフルエントになる前の細胞を用いた。グルタミン酸取り込み活性：細胞をHepes緩衝クレブスリンガー液(HKR)でプレインキュベーションした後，5μMの[^{3}H]グルタミン酸を含むHKRに3－5分間反応させ，洗浄後細胞内放射活性から，取り込み速度を定量した。増殖能：細胞を[^{3}H]チミジンを含む反応液で12時間培養し，その間に取り込まれた放射活性をセルハーベスタおよびプレートシンチレーションカウンターにて測定し，増殖能を評価した。

[結果]

培養アストロサイトのグルタミン酸取り込み活性は，30℃で26時間培養し30℃で活性測定した場合には，37℃で行う通常の培養・活性測定（対照）と比較して，約70％に減少した。しかしながら，前もって24時間30℃で培養したあと，37℃で2時間温度を上げるという処理を施すと，37℃で温度を一定に保っていた細胞（対照）と比較して，およそ50％増強された(Fig.1)。

コンフルエントになる前の培養アストロサイトを用い，その細胞増殖能に対する低温効果を検討した。30℃で24時間培養後に[^{3}H]チミヂンを加え，その後12時間の37℃での放射活性取り込みで評価した細胞増殖能は，37℃で培養した場合と比較してほとんど変化がなかった。

[考察]

アストロサイトを正常より数℃低い30℃で24時間培養すると，グルタミン酸取り込み活性が増強され，その増殖能はほとんど変化がなかった。これらの結果は低温化によりミクログリアのO_2^-やNOの放出が激減するとともに細胞増殖能も大幅に減少する事実と対照的である。動物虚血モデルでみられる低脳温による神経細胞保護の作用機構に，アストロサイトやミクログリアのインビトロでのこれらの結果が関与している可能性がある。インビボでも低脳温化により，神経細胞にとって不利なミクログリアの活性化や増殖が抑制され，また神経細胞にとって有利なアストロサイトのグルタミン酸取り込み活性は増強されるという両者の作用で神経細胞障害が軽減されるのかもしれない。

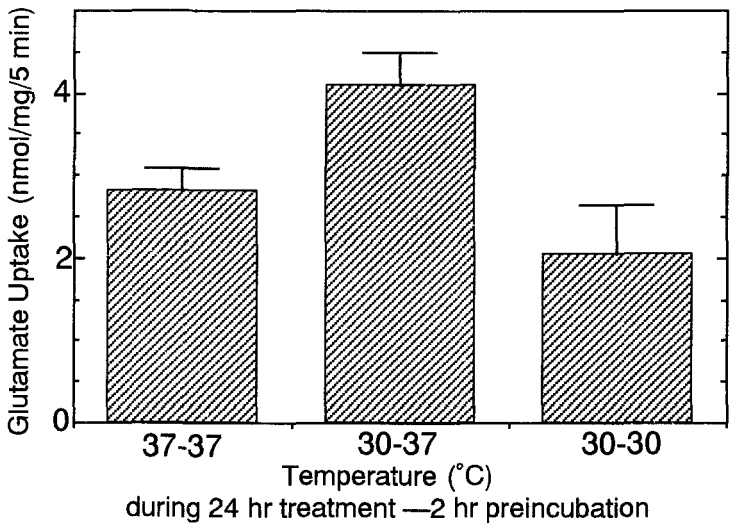


Fig. 1: Effect of hypothermic treatment on glutamate uptake of astrocytes.
Cultured hippocampal astrocytes were treated for 24 hr with two temperatures at 37 °C and 30°C, then preincubated for 2 hr at either 37°C or 30°C. Subsequent measurement of glutamate uptake was carried out at the temperature of preincubation.

114 1E62 培養ミクログリア活性化に対する低温効果：増殖および一酸化窒素・活性酸素産生の抑制

司 秋生，中村 洋一，片岡 喜由
（愛媛大学医学部生理学教室第一）

〔 要約 〕

虚血神経細胞障害がどのような機構で虚血後低脳温により保護されるのかを解明する目的で，細胞障害の増悪の原因になると考えられているミクログリア活性化に対する低温の効果を，培養ミクログリアを用いて検討した。活性酸素(O_2^-)産生能は，30℃では37℃の場合の約25%に低下していた。また，一酸化窒素の産生能は同様に約25%に低下していた。さらに，[^{3}H]チミジン取り込み活性により測定した細胞増殖能は約15%に低下しており，アストロサイトや線維芽細胞における阻害程度に比して著しかった。これらの結果はミクログリアの活性化が高度に温度依存的であり，細胞障害に対する低温保護作用にミクログリア活性化の抑制が関与している可能性が示唆される。

一過性脳虚血により死に至る海馬CA1錐体細胞の周囲には，虚血解除後1時間以内に，既にミクログリアの活性化が始まっており，形態的には正常な神経細胞が観察される1-2日後に甚だしい増殖と活性化が観察される。このことはミクログリア活性化が神経細胞障害の結果ではなく，その原因となっていることを示唆している。脳に存在する細胞の中で最も活性酸素(O_2^-)産生能が高いのはミクログリアであり，アストロサイトやミクログリアには誘導型のNO合成酵素(iNOS)が存在する。最近O_2^-とNOで形成される過酸化亜硝酸(peroxynitrite)が著しい細胞毒性を持つことが報告され，これらの化学種が神経細胞に致命的影響を与えている可能性が高い。一方，一過性脳虚血動物モデルにおいて，低脳温により神経細胞死が効果的に保護されることが知られており，注目すべきことに，低脳温化を虚血再灌流後に開始してもその効果がみられることも最近報告された。我々はこの低脳温による細胞障害防禦の作用機構を明らかにする目的で，培養ミクログリアを用いてその活性化程度に対する低温の効果を調べた。

［ 方法 ］

ミクログリアの培養：ラット新生仔全脳細胞を2–4週間培養し，形成された単層細胞の上に現れる球形の小型細胞を振盪および遠心により集め96-wellプレートに二次培養し用いた。O_2^-産生：培養液に添加したアセチル化チトクロームcの550 nmにおける吸光度変化を測定し，その還元速度から産生されたO_2^-を定量した。NO 産生：不安定なNOに代えてNO_2をDAN試薬を用いた蛍光測定により定量した。増殖能：細胞を[^{3}H]チミジンを含む反応液で12時間培養し，その間に取り込まれた放射活性をセルハーベスタおよびプレートシンチレーションカウンターにて測定し，増殖能を評価した。

[結果および考察]

培養ミクログリアに0.1 μMのPMAを添加した場合にみられるO_2^-産生速度は，30℃では37℃の場合の約25%に低下していた(Table 1)。LPSの添加により，ミクログリアではiNOSが誘導され，NOを産生する。培地中に蓄積されたNO_2の濃度を36時間後に測定したNO産生活性は，7℃の低温化で約25%に低下していた(Table 2)。

その細胞毒性が注目されている過酸化亜硝酸はNOとO_2^-から合成されるが，その合成速度は両者の濃度積に依存するはずであり，低温化によりそれぞれの活性が25%に低下した場合，過酸化亜硝酸の産生速度は数%の程度にまで減少することになる。

[^{3}H]チミジンの取り込みで評価した培養ミクログリアの増殖能は7℃の低温化により14%にまで低下した。一方ラット大脳皮質アストロサイトでは低温化による増殖能の阻害は殆どみられず，ラット脳硬膜由来の線維芽細胞の場合は約60%に低下したに過ぎなかった(Table 3)。他の細胞種に比し，ミクログリアの細胞活動の代謝回転は著しく温度依存性が高いことが示唆される。

[結論]

低温化により，ミクログリアからの毒性物質放出が激減するとともに，細胞増殖能も大幅に減少した。動物虚血モデルでみられる低脳温による神経細胞保護の作用機構に，ミクログリアの活性化の抑制が関与している可能性がある。

Table 1: Low temperature effect on O_2^- production from cultured microglia

addition	ΔmAU/h		inhibition (%)
	37°C	30°C	
0.1 μM PMA	2.25 ± 0.76	0.57 ± 0.96	75

Table 2: Low temperature effect on NO production from cultured microglia

addition	NO_2 (μM)		inhibition (%)
	37°C	30°C	
1 μg/ml LPS	8.95 ± 0.77	2.21 ± 0.04	75

Table 3: Low temperature effect on proliferation of microglia, astrocytes, and fibroblasts

cell	[^{3}H]thymidine uptake: 30°C against 37°C (%)
microglia	13.6 ± 7.4
astrocytes	101.2 ± 21.7
fibroblasts	55.4 ± 13.5

115 ラット血清による培養ミクログリアの活性酸素産生増強

1Da1

司 秋生，中村 洋一，片岡 喜由
（愛媛大学医学部生理学教室第一）

〔 要約 〕

一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死において，ミクログリアの増殖・活性化が関与していることや，虚血・再灌流の過程で，血液脳関門が破れいくつかの血液因子が漏出することを示唆する報告がある。我々は培養ミクログリアの種々の活性を調節する薬剤を検索していく際に，正常血清に O_2^- 産生を増強する因子が含まれていることに気がついた。0.1%の低濃度のラット正常血清を添加することによりPMA 誘発性 O_2^- 産生活性は約2倍に増強される。いくつかの検討の結果，その因子(Superoxide Production Augment Factor; SPAF)は耐熱性の分子量5万以上の高分子である可能性が高いが，蛋白結合能の高い小分子である可能性も残されている。

一過性脳虚血により起こる遅延性神経細胞死の過程の詳細は未だ不明である。死に至る神経細胞周囲には，虚血解除後1時間以内にミクログリアの活性化が始まっており，形態的には正常な神経細胞が観察される1-2日後では甚だしい増殖と活性化が観察される。またミクログリアは脳に存在する細胞の中で最も活性酸素(O_2^-)産生能が高く，ミクログリアの増殖・活性化が神経細胞障害の結果ではなく，その原因となっていることを示唆している。一方，再灌流の過程で血液脳関門が破綻し，アルブミンやグロブリンが漏出することも知られており，漏れ出したある種の血液成分がミクログリアの増殖・活性化を誘導している可能性がある。我々は培養ミクログリアを用いて，その O_2^- 産生活性がラット正常血清により大幅に増加することを見出し，その活性化因子の性質について検討した。

[方法]

ミクログリアの培養：ラット新生仔全脳細胞を10%ウシ胎児血清を含むDMEMにて2–4週間培養し，形成された単層細胞の上に現れる球形の小型細胞を振盪および遠心により集め，浮遊細胞培養用の96-well プレートに4000/well の濃度でまいた。1時間後に洗浄を行い，接着する細胞だけをさらに1日間培養し，実験に用いた。O_2^- 産生活性の測定：実験開始30分前に培養液をHepes緩衝クレブスリンガー液に置き換え，10分前に60 μMアセチル化チトクロームcを添加した。通常0.1 μM PMA (phorbol miristrate acetate)を添加して O_2^- 産生測定を開始した。550 nmにおける吸光度変化をプレートリーダー(コロナ社MTP32)を用い，時間を追って測定し，その還元速度を O_2^- 産生活性とした。結果の表示はmAU/hrとしたが，1 mAU/hrはおよそ0.17 μM O_2^-/hrに相当する。

[結果]

PMA を添加しない場合は殆ど O_2^- の産生はみられなかったが，0.1 μM PMA を添加すると 4–5 mAU/hrの速度で O_2^- を産生した。この O_2^- 産生速度はフィルター（0.22 μm ポア）滅菌した正常ラット血清の添加により約2倍に増加した(Fig. 1)。この増強作用は濃度依存的であり，0.1%という低

濃度でもほぼ最大増強作用がみられた(Fig. 1)。またpolymyxin Bを加えてもその効果は変化せず，lipopolysaccharideそれ自身を加えてもO_2^-産生増強がみられなかった。

ラット血清のどの様な成分がこの効果を示すのかを検討するために，血清を限外ろ過フィルター（クラボウ，Centricut U-50)で分子量5万以上と以下に分画した。5万以下の分画にはO_2^-産生増強効果はなく，5万以上の分画はその効果が倍加した。ラット血清を56℃で30分あるいは100℃で5分間熱処理し，凝集蛋白をフィルター（0.22 μm ポア）除去した場合，O_2^-産生増強効果はほとんど薄れなかった。しかしながら，90℃で2時間熱処理するとその効果は半減した。

[考察]

正常ラット血清はPMA誘発性O_2^-産生を増強する因子(Superoxide Production Augment Factor; SPAF)を含むことが明らかとなった。SPAFは限外ろ過フィルターによる分画では分子量5万以上の高分子であるが，熱耐性が高い。しかしながら，蛋白結合能の高い小分子である可能性も残されている。脳虚血・再灌流の過程で血液脳関門が破れ，血中に存在するSPAFが漏出することにより，ミクログリアは大量の活性酸素を放出する可能性がある。一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死において，ミクログリアの関与がどれほどのものか今後十分に検討する必要がある。

[文献]

1) Morioka, et al. (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab., 11: 966-973.

2) Karibe, H., et al. (1995) Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. J. Cereb. Blood Flow Metab. 14: 620-627

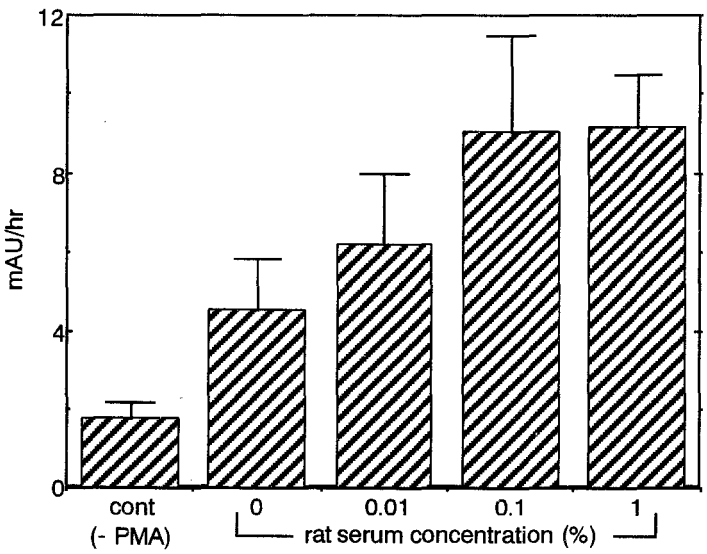


Fig. 1: Effect of rat serum on PMA-stimulated superoxide production by microglia. O_2^- production induced by the addition of 0.1 μM PMA was measured in the presence of 60 μM acetyl-cyt c and various concentrations of normal rat serum in Hepes-buffered Krebs-Ringer solution.

116 1E63 OK-MCs (OK-432-activated mononuclear cells) の抗脳腫瘍効果におけるFas ligand/Fas 系の関与

川口正二郎[1]、白石哲也[2]、戸田啓介[1]、田渕和雄[1]
([1]佐賀医科大学脳神経外科、[2]白石共立病院)

〔 要約 〕OK-MCs は末梢血単核球を OK-432 で刺激することにより得られる細胞群であり、その構成は NK 細胞やT リンパ球を中心としている。我々は悪性グリオーマに対してOK-MC を用いた養子免疫療法を行いその有用性を確認している。昨年、本会においてRT-PCR を用いて健常人及び担癌患者の OK-MCs におけるFas ligand mRNA の発現を検索し報告した。今回、さらにOK-MCsのヒト培養グリオーマ細胞T98Gに対する抗腫瘍効果における Fas ligand/Fas 系の関与を検討する目的で、抗Fas モノクローナルIgG抗体(ZB4)を用いてFas/Fas ligand の結合を阻害した結果、殺細胞効果が有意に抑制された。このことから OK-MC の抗腫瘍効果の一部に Fas ligand/Fas 系が関与していることが示された。

【方法】1) OK-MCs の抗脳腫瘍効果を解析するため、Fas を強く発現しているT98G細胞に対する殺細胞効果について検討した。$1X10^5$ 個のT98G 細胞とEffector/Target (E/T) ratio が10、40、100となるようにOK-MCs を調製し72時間混合培養を行った。24時間、48時間、72時間後に生細胞をトリパンブルーにて染別し、細胞増殖曲線を作成した。2) $1X10^5$ 個のT98G 細胞をあらかじめ抗 Fas モノクローナルIgG抗体(500ng/ml)であるZB4(MBL)で1時間処理してFas ligand のFas への結合を阻害した後、OK-MCsをE/T ratio 40 で作用させ、その殺細胞効果を細胞増殖曲線を作成し検討した。3) 2) と同様にT98G細胞を処理した後にFas発現細胞に対してアポトーシス誘導能を有する抗Fas モノクローナルIgM抗体を100ng/ml の濃度で作用させ殺細胞効果の変化を細胞増殖曲線により検討した。【結果】1) OK-MCs の抗脳腫瘍効果は用量・時間依存的に増強した。(Fig.1A) 2) OK-MCs の殺細胞効果は ZB4前処置により部分的に抑制された。(Fig.1B) 3) ZB4により抗Fas モノクローナルIgM抗体によるアポトーシス誘導は24時間までほぼ完全に抑制されるが、その後の生細胞数は緩やかに減少した。 (Fig.1C)

【考察】最近、細胞性免疫においてFas ligand/Fas系が重要な役割を果たしていることが 報告されている。CTLは標的細胞のMHC抗原を認識しFas ligand を発現する。そのFas ligand が標的細胞表面のFasと結合することによりアポトーシスを誘導するとされている。OK-MCs はFas を発現しているT98Gにアポトーシスを誘導する能力を有しているが、今回、ZB4を用いた実験によりOK-MCsの殺細胞効果が抑制されたことで、OK-MCsのT98Gに対する殺細胞効果にFas ligand/Fas系が関与していることが示された。

[文献] (1)Hanabuchi S, et al.(1994),Proc Natl Acad Sci USA 91,4930 (2)白石哲也、他.(1995)Cytometry Res.5,83 (3)Takahashi T,et al.(1994)Int. immunol. 6,1567 (4)戸田啓介、他.(1995)神経免疫研究 8,295 (5)田渕和雄、他.(1996)日本臨床 54,1926

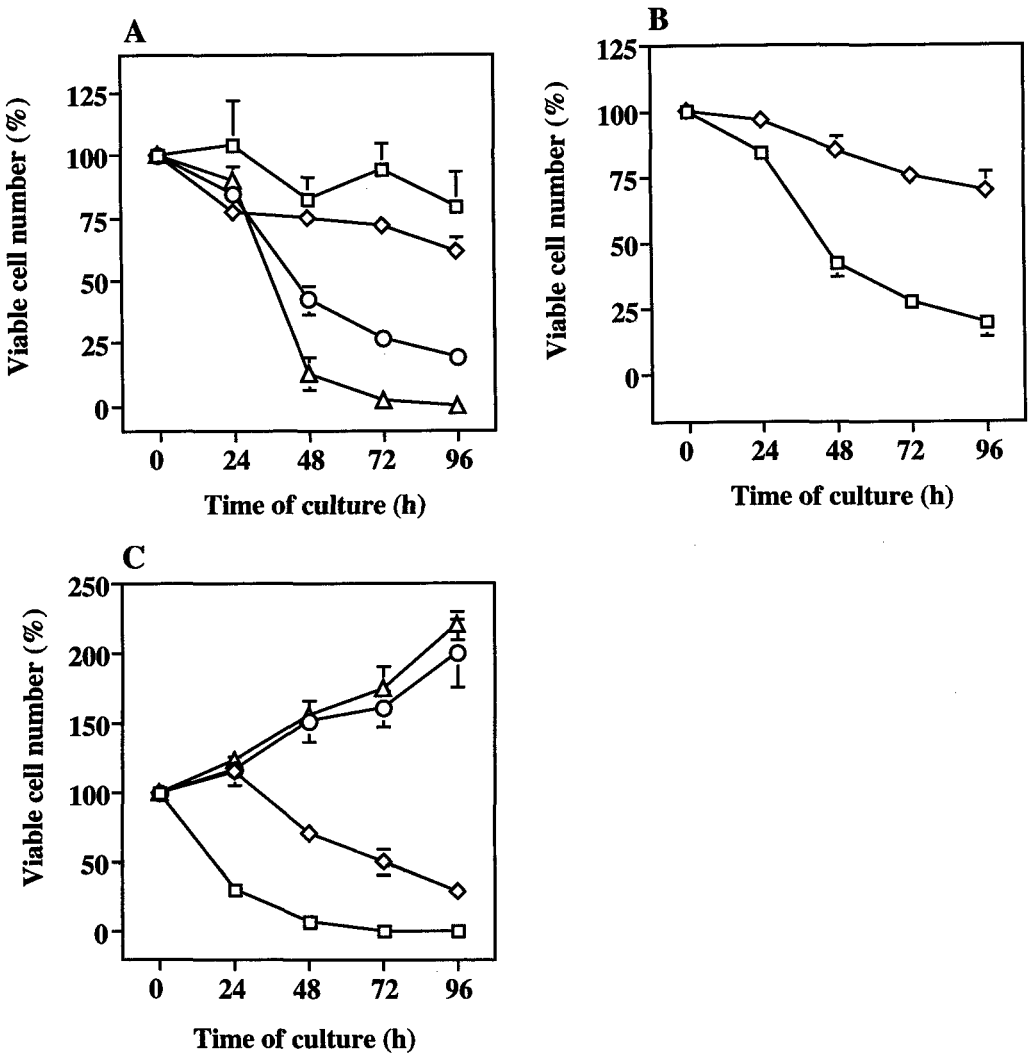


Fig. 1.

Cytocidal activity of OK-MCs against Fas expressing T98G cells.

A. The T98G cells are mixed with various numbers of OK-MCs and incubated up to 72 h. ◇ :OK-MCs, $1x10^6$ (E/T ratio=10), ○:OK-MCs, $4x10^6$ (E/T ratio=40), △ :OK-MCs, $1x10^7$ (E/T ratio=100), □ :PBMCs, $4x10^6$. The number of viable cells decreases in a dose- and time-dependent manner.

B. The viable cell number of T98G treated with OK-MCs (□ , $4x10^6$, E/T ratio=40) decreases in a time-dependent manner, whereas the treatment with ZB4 (◇) causes partial inhibition of cytocidal activity of OK-MCs. The activity is expressed as the mean of triplicate experiments.

C. T98G cells are cultured with either anti-Fas IgM (100 ng/ml, □), ZB4 (500 ng/ml, ○) or both (◇). When treated with Fas mAb (IgM), the number of viable cells is significantly decreased in a time-dependent manner. The cytocidal activity induced by Fas mAb (IgM) is blocked by the pretreatment of T98G with ZB4 antibody. The treatment of ZB4 antibody alone shows no growth inhibitory effects on T98G as compared with non-treatment control(△).

117 1Ap1 マウス体性感覚野バレルニューロンにおけるBDNF, TrkB mRNAの発現と頬髭毛嚢の焼勺によるその選択的発現制御

Singh D.Tryambak、水野恭伸、河野朋子、中村俊
(国立精神・神経センター、神経研究所、診断研究部)

〔 要約 〕

マウス頬髭からの感覚入力は脳幹、視床の神経核を経て反対側の大脳皮質バレルに投射している。バレルはその形態が解剖学的に容易に視覚化できること、形態形成およびバレルニューロンの可塑性が末梢からの感覚入力の有無に依存しているなどの点で、中枢神経細胞の可塑性を研究する上で多くの利点を持っている。我々は、ニューロトロフィンがバレルニューロンの可塑性にも重要な役割を果たしている可能性を検討する目的でその発現をin situ hybridizationにより調べた。その結果、生後7日目までにバレルのside領域のニューロンにおいてBDNFとTrkBが発現していたが、hollow領域ではほとんど発現がみられなかった。BDNFの発現はTrkBに比べ低く、またTrkBの発現はバレルのパターンがcytochrome oxidase染色法で検出可能となる生後4日目以降に認められた。頬髭のC列を生後1日目に焼勺し、出生後の形態的可塑性の臨界期である7日目にバレルのin situ hybridizationを行なったところバレルのC列内部を区分けしているside領域においてBDNFおよびTrkBの発現が顕著に低下していた。一方、C列に臨接しているB、D列ではBDNFの細胞あたりの発現量が増加し、TrkBのそれは変化していなかった。さらに、頬髭のA, C, E列を生後1日目に焼勺し、7日目にバレルIV層から抽出したRNAを用いて定量的RT-PCRを行ない、BDNF、NT-3の発現が顕著に増加しているがその受容体の発現量は変化していないことを確認した。以上の結果はBDNFがバレルの形態的可塑性に関与している可能性を示唆している。

[方法]

出生後24時間以内のICRマウスをエーテル麻酔し、右頬の髭毛嚢のC列を焼勺した。7日目に麻酔、断頭後、脳を取り出し皮質部分を切り取り圧延した(Strominger & Woolsey,1987)。この皮質を凍結したのち、in situ hybridization用には18ミクロン、cytochrome oxidase染色用には40ミクロンの切片をそれぞれ作製した。in situ hybridizationはdigoxigenin標識した特異riboプローブを用い、ベーリンガーのマニュアルにしたがって発色した。RT-PCRはcytochrome oxidaseで染色した切片から調製したRNAを鋳型として行ない、異なるRNA試料のcDNA量の標準化にはベーターアクチンの発現量をもちいた。RT-PCRの産物は次のとうりである。BDNF(198-820), NT-3(561-1087), catalytic TrkB(2422-2679), non-catalytic TrkB(998-1431), TrkC (1929-2180)。

[結果及び考察]

バレルの形態的臨界期である生後7日目の大脳皮質をもちいてin situ hybridizationをおこなった。BDNF, catalytic TrkB, non-catalytic TrkBのセンスプローブはシグナルを与えずアンチセンスプローブのみがバレルの

縁を染め出した。すなわちバレルのニッスル染色は個々のバレルの縁を染め出し、cytochrome oxidase染色はその内部を染め出すが、これらのプローブはいずれもニッスル染色の染色像に酷似した染色パターンを示した。放射性riboプローブを用いても同様なパターンが得られた。生後1日目に頬髭の毛嚢を焼勺するとこれに対応するバレル領域が縮小し、隣接する健常なバレル領域が拡張することが知られている。このバレルの形態変化に伴うBDNF, TrkBの発現をin situ hybridizationで調べたところ焼勺した毛嚢に対応したバレル領域の内部のバレルを区分けしている部分で発現の低下が認められた（図1）。ニコンのBrain Image Mapping Systemによって顕微鏡下で取り込んだin situ hybridizationの染色像を、マック上でNIH Image(ver 1.60, written by Wayne Rasband at the U.S. NIH)をもちいて定量化した結果を表1に示す。この表からBDNF, TrkBがバレルのside領域に発現し、hollow領域にはほとんど発現していないこと、毛嚢の焼勺により対応するバレルの内部で発現の著しい低下が生じていること、一方、これに隣接する領域ではBDNFの発現が増加していることが明らかである。さらに、生後1日目にA, C, Eの各列の右頬髭毛嚢を焼勺し7日目にバレル領域特異的なRNAを調製し定量的RT-PCRを行なった（図2）。この結果は、焼勺に伴いBDNF, NT-3の発現が顕著に増加し、一方TrkB, TrkCの発現はほとんど変化しないことを示している。以上の二つの異なる解析方法から得られた結果は、バレルの形態的可塑性にニューロトロフィンが関与している可能性を示唆している。

図1 頬髭毛嚢の焼勺によるBDNF, TrkB mRNAの発現の低下



左；TrkB(TK+)

中央；TrkB(Tk+,-)

右；BDNF

図2 RT-PCRの結果

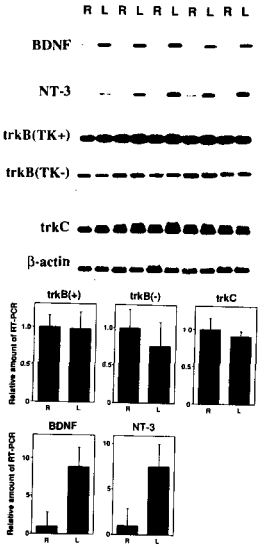


表1 in situ hybridizationの結果の要約

代表的な染色像を画像解析により定量化し、各領域の面積に対するシグナルのピクセル数の比を表示した。

		row B		row C		row D	
		cautery		cautery		cautery	
		-	+	-	+	-	+
side	TrkB(TK+)	0.29	0.30	0.29	0.31	0.30	0.31
	TrkB(TK+,-)	0.24	0.27	0.19	0.29	0.15	0.23
	BDNF	0.33	0.28	0.24	0.31	0.30	0.22
division	TrkB(TK+)	0.33	0.39	0.29	N.D.	0.27	0.24
	TrkB(TK+,-)	0.49	0.48	0.46	N.D.	0.48	0.44
	BDNF	0.29	0.55	0.26	N.D.	0.32	0.44
hollow	TrkB(TK+)	0.12	0.12	0.10	0.12	0.11	0.11
	TrkB(TK+,-)	0.05	0.05	0.05	0.08	0.08	0.03
	BDNF	0.12	0.12	0.13	0.12	0.11	0.10

118 脳由来神経栄養因子:ラット脳における加齢変化と局在

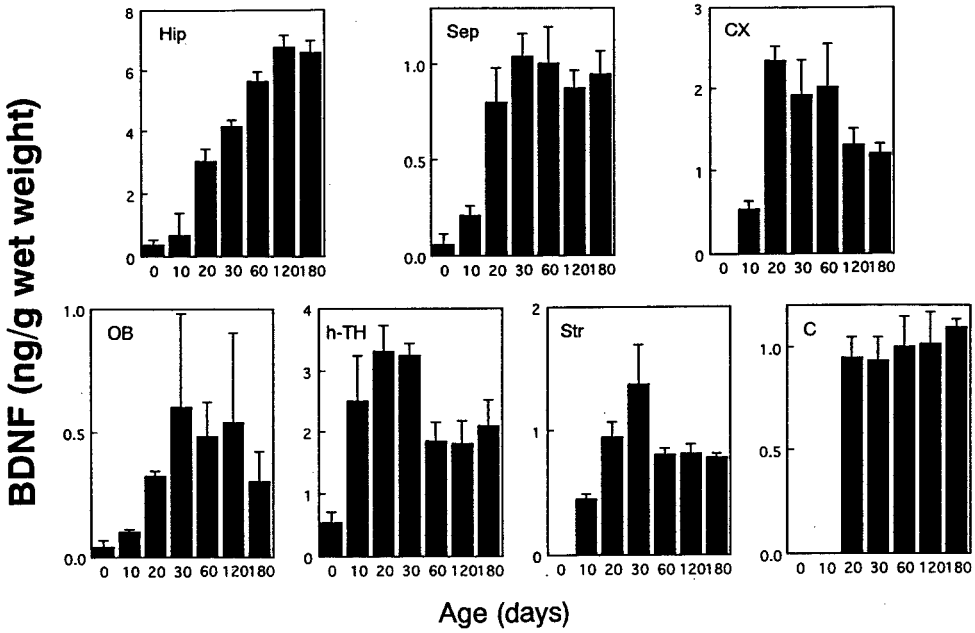
1Ap2 仙波りつ子、竹内郁夫、仙波禮治[1]、加藤兼房
(愛知県コロニー・研究所、[1]三重大・医)

〔要約〕私達は、組み換えヒト脳由来神経栄養因子（rhBDNF）およびそのC-末端9個のペプチド抗体を調整し、酵素免疫測定系を確立した。この系の測定限界は3 pgであり、神経成長因子（NGF）やニューロトロフィン-3（NT-3）とはまったく交差しなかった。生後30日齢の雄ラット脳のBDNF含量は、海馬でもっとも高く（5.41 ng/g 湿重量）、視床下部で4.28 ng/g、その他の脳の部位では1 ng/g前後であった。脳以外の部位では下垂体が 3.89 ng/g 、膵臓で 0.65 ng/g、胸腺で0.21 ng/g、肝臓で 0.06 ng/gであった。BDNFは脳の生後発達に伴いいずれの部位でも増加した。私たちの酵素免疫測定系に反応する海馬、視床下部および小脳のプロテインの分子サイズは、rhBDNF の分子サイズ（14 kDa ）とほぼ同じであったが、doubletであった。BDNFプロテインは、海馬の顆粒細胞および錐体細胞、さらに視床下部腹内側核の神経細胞の核に局在した。海馬のBDNFmRNA量に比して、BDNFプロテインの含量は意外に低かった。また、細胞核に局在する事実は意外であった。しかしながら、私達が今回確立した系で測定しているBDNFは、分子量 14 kDaで、少なくともrhBDNFと一致していた。

脳由来神経栄養因子（BDNF）は、脳においてコリン作動性、アドレナリン作動性およびGABA作動性の神経細胞の生存維持に作用する神経成長因子ファミリーの一つである(1)。BDNFmRNAは脳に広く分布することが知られているが、脳におけるBDNFプロテインを測定することはこれまで困難であった。今回、私たちは、BDNFの高感度酵素免疫測定系を確立し、ラット脳におけるBDNFプロテインの脳内分布とその加齢変化、および細胞局在について検討したので報告する。

[実験方法] 酵素免疫測定系の確立：BDNFおよびそのC-末端の9個のペプチドに対する抗体の調製および精製は既報に従った(2)。BDNFのプロテイン含量は、通常、BDNFに対する抗体とガラクトシダーゼを標識したペプチド抗体(3)を用いてサンドイッチ型酵素免疫測定系により測定した。BDNFの抽出：プロテアーゼ阻害剤存在下、組織を10容の2Mグアニジン塩酸を含む0.1 Mりん酸緩衝液（pH 7.2）でホモゲナイズし、46,000 gで30分遠心し、上清をBDNFの測定に供した。BDNFのWestern blotting：海馬（1 g）、視床下部（0.5 g）および小脳（1 g）から上記の方法でBDNFを抽出し、既報に従ってSDS-PAGE用のBDNFプロテインを調製した(2)。10-20%のグラジエントゲルで泳動後、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。免疫組織化学：脳をSchmechel液で固定し、パラフィン包埋後8μmの切片として使用した。切片をTUFで処理後、BDNF抗体を用いて、ABC法により検出した。

[結果および考察] 8種類のBDNF抗体を作製したが、このうち3種類が酵素免疫測定系に使用可能であった。これらの抗体はWestern blot 上でNGFおよびNT-3とはまったく交差しなかった。私達の確立した酵素免疫測定系は、3 pg以上のBDNFを検出できたが、NGFおよびNT-3とは1 ngでも反応しなかった。組織のBDNFは2Mのグアニジン塩酸存在下でのみ可溶化されることから、BDNFが細胞顆粒と結合していることが推定された。生後30日齢のラット脳のBDNF含量はグラム湿重量当たり、海馬で 5.41 ng、視床下部で 4.28 ng、大脳皮質、中隔野、嗅球、小脳およ



Developmental changes in levels of BDNF in various regions of the rat brain.

び線条体でそれぞれ 1.35 ng, 1.68 ng, 0.95 ng, 1.25 ng, 1.41 ng であった。ラット脳のBDNFmRNA含量が、海馬で高いという報告(4)とBDNFプロテインが海馬でもっとも高いという結果は一致するが、BDNFmRNAがNGFやNT-3のmRNAに比して数十倍高いという報告(4)とは一致しなかった。大脳皮質のBDNFmRNAは海馬同様かなり高値を示すにもかかわらず、BDNFプロテインはさほど高くなかった。また、既報の脳のBDNFプロテイン含量ともかなり異なっていた(5-6)。一方、下垂体のBDNF含量は 3.89 ng/g と意外に高かったが、末梢組織では、膵臓（0.65 ng/g）、胸腺（0.21 ng/g）および肝臓（0.06 ng/g）でのみ検出され、そのレベルはBDNFmRNA同様きわめて低かった。BDNFは脳の生後発達に伴い増加した（図）が、嗅球や大脳皮質のように生後30日齢を過ぎるとやや低値を示す部位もあった。BDNFは成獣で神経細胞の維持に作用するといわれるが、この点では矛盾しないと思われる。私達の確立した酵素免疫測定系に反応する海馬、視床下部および小脳のプロテインを Western blotting で検索したところ、rhBDNFの分子サイズに相当する 14 kDa 付近にdoublet のバンドが得られた。これらの物質は酵素免疫測定系での測定値と量的に一致した。脳におけるBDNFプロテインの局在を免疫組織化学で調べたところ、海馬歯状回の顆粒細胞にもっとも多く検出された。さらに海馬の錐体細胞層の神経細胞および視床下部腹内側核の神経細胞にもみられた。BDNFはいずれの神経細胞でも細胞核に顆粒状に局在していた。BDNFの細胞内局在についてはきわめて意外な結果であったが、BDNFが核に分布しているという事実は興味あるところである。以上、今回の結果は、BDNFmRNAのレベルと一致しない点があるが、私達の測定しいるプロテインは、少なくともrhBDNFと同じ分子サイズを持つタンパクであることを示している。

[文献] (1) Lindsay R.M. (1993) Neurotrophic factors, pp.257-284. (2) Katoh-Semba et al.(1996) J. Neurochem., 66, 330-337. (3) Katoh-Semba et al. (1989) J. Neurochem., 52, 1559-1565. (4) Hofer et al. (1990) EMBO J. 9, 2459-2464. (5) Nawa et al. (1995) Eur. J. Neurosci., 7, 1527-1535. (6) Radka et al. (1996) Brain Res., 709, 122-130.

119 1Ap3 PC12D細胞からのNGF依存性神経突起誘導に対するトリコスタチンAの特異的阻害作用

佐野 護、北島 哲子
（愛知コロニー研究所、形態学）

[要約] トリコスタチンA(TSA)は、PC12D細胞からのNGFによる神経突起誘導を阻害するが、dbcAMP,staurosporineによる誘導を阻害しなかった。NGFによるラッフル形成、MAPキナーゼ活性化は阻害しない。既にNGFにより伸展しつつある突起をlag time後阻害した。この阻害作用は、RNA,蛋白合成阻害剤により除去された。PC12D細胞からのNGFによる神経突起誘導には、蛋白質の新たな合成が必要でないことを同時に示した。

トリコスタチンA(TSA)は、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害する抗生物質で、線維芽細胞では、細胞分化を促進したが、PC12細胞では、NGF, ras 依存性の細胞分化を阻害すること、それは初期応答遺伝子発現に対する効果である可能性が報告されている(1,2)。PC12細胞からのNGF依存性神経突起誘導のシグナル伝達は、ras-MAPK cascadeとそれによって励起される遺伝子発現調節とする仮説が受入られている。しかし、培養知覚、交感神経やPC12D細胞などでは、NGFによる神経突起誘導は、RNA合成阻害剤存在下で起こる。PC12D細胞では、NGFを処理した細胞局所に突起が誘導される(3)。遺伝子発現を介さないPC12D細胞の突起誘導に対するTSAの効果について検討した。

[実験方法]

アクチンの蛍光染色は、ローダミンファロイジンを用いた。MAPキナーゼの活性は、免疫沈降した酵素によるミエリン塩基性蛋白の燐酸化活性を測定した(4)。蛋白合成活性は、メチオニン／システイン除去メディウムに[^{35}S]トランを加え培養した細胞のTCA沈殿の放射能を測定した

[結果および考察]

PC12D細胞は、NGF、dbcAMP、sutaurosporineなどの刺激により、5時間で突起伸展が観察出来る(5)。NGFによる突起誘導は、50ng/mlのTSAにより阻害されたが、dbcAMP, sutaurosporineによる誘導作用は、400ng/mlのTSAでも効果が認められなかった（図1）。NGF刺激により既に伸びつつある突起に対しては、TSAの阻害は、数時間を経て効果が現れ、伸びた突起の萎縮が観察された(図2)。PC12D細胞は、NGF処理数分後、アクチンの劇的な局在変化を伴ってラッフルが形成されるが、高濃度、長時間のTSA処理もこれを阻害しなかった。また、NGF処理、数分後に見られるMAPキナーゼの活性化も、TSA添加状態で阻害が見られなかった。従って、TSAは、NGF刺激のシグナル伝達を少なくとも、これら初期過程に於ては、阻害していないことが解った。RNA合成阻害剤のアクチノマイシンD, コルディセピンや、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドなどを、TSAとNGFを添加する前に加えておくと、TSAによる突起誘導阻害は認められなかった。それぞれの阻害剤の濃度を変えたところ、濃度依存的にTSAの作用を除去する事が示された(図3)。10μg/mlのシクロヘキシミドがほぼ完全にTSAの阻害効果を除去し

たが、この時、[35S]のアミノ酸の蛋白への取り込みを調べることにより、この濃度のシクロヘキシミドは約98%、蛋白合成を阻害する事が示された。この結果は、TSAによるNGF依存性の突起伸展阻害作用が、RNA, 蛋白質合成を介して起こっている事を示している。同時に、この実験系では、NGFによる神経突起誘導が、RNAだけでなく蛋白質合成をも必要としないことが明確に示された。 TSAによりもたらされたRNAおよびそれに基ずく蛋白合成の変化した細胞内環境が、NGFからの細胞内シグナル伝達による突起伸展を、比較的後期段階で阻害するものと考えられる。Twiss & Shooter(1995)は、primed PC12細胞に於て、NGFによる突起誘導は、RNA合成を必要としないが、蛋白質の合成を必要とすると結論しているが(6)、我々の結果はその可能性を否定した。

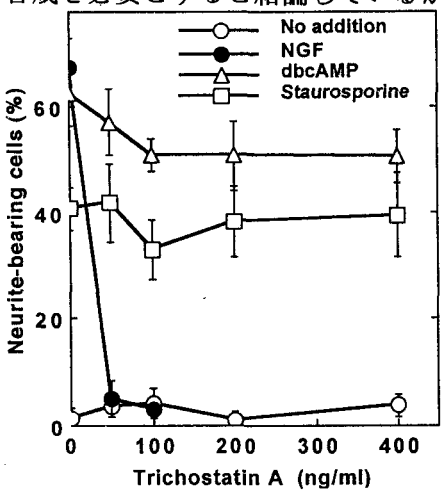


図1、PC12D細胞の神経突起誘導に対するTSAの効果。各濃度のTSAを添加30分後、NGF(50ng/ml), dbcAMP(1mM), staurosporine(40nM)を加え、24h培養。

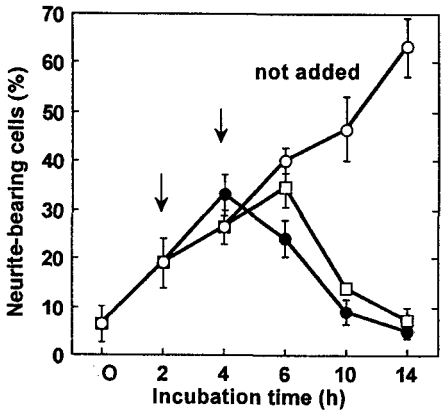


図2、TSAを途中添加した場合の効果。50ng/ml NGFを加え培養後、2h(●) 4h(□)後100ng/mlのTSAを添加した。

[文献] **(1)**Yoshida et al.(1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 17174. **(2)** Futamura et al.(1995) *Oncogene,* 10, 1119. **(3)** Sano and Iwanaga (1994) *Brain Res.,* 656, 210. **(4)** Sano et al.(1995) *Brain Res.*, 688, 213. **(5)** Sano et al.(1994) *Brain Res..,*639, 115. **(6)** Twiss & Shooter (1995) *J. Neurochem.,* 64, 550.

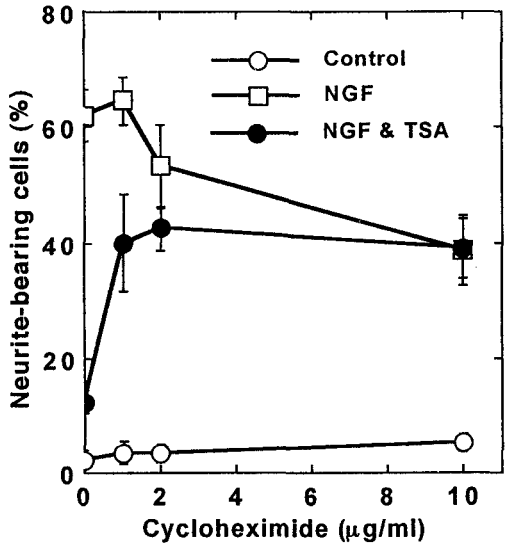


図3、TSAによる突起誘導阻害作用に対するシクロヘキシミドの効果。シクロヘキシミドを添加30分後、200ng/mlのTSA(○)、50ng/mlのNGF(□) NGF+TSA(●)、を加え5時間後 固定。

120 1Ap4 培養幼鶏後根神経節神経細胞からのニューロトロフィン依存性神経突起誘導

北島 哲子、佐野 護
(愛知コロニー研究所、形態学)

[要約] 幼鶏後根神経節からの培養神経細胞からのBDNF、NT3、NGFによる神経突起誘導は、シクロヘキシミド存在下で短時間に起こり、同条件で[^{35}S]アミノ酸の取り込みが99%阻害されていることより、ニューロトロフィン(NT) による神経突起の誘導過程には、新たな蛋白質の合成が必要でないことを示した。またこの神経細胞は、固有のTrk受容体の存在が報告されているが、複数のNT に反応し神経突起が伸展する可能性について検討した。

後根神経節からのNGFによって誘導される神経突起の再生は、RNA合成阻害剤の影響は受けないが、蛋白合成阻害剤により阻害されることが認められている(1)。PC12細胞からのNGFによる突起伸展誘導では、RNA合成が要求されるが、primed PC12細胞の場合は、RNA合成は必要ではないが、やはり蛋白合成が要求されると報告されている(2)。PC12細胞を用いた研究では、NGFのシグナルが、MAPKカスケードから遺伝子制御を経て細胞分化を誘導する点が特に注目されているが、我々は、PC12D細胞を用いて、突起伸展にMAPKの活性化は必ずしも必要でないこと、NGFによる突起誘導は、局所反応であり、蛋白合成は、必要とされない点を指摘した(3-5) 。今回培養後根神経節神経細胞からの神経突起誘導について、NGF、BDNF、NT3の効果とその蛋白質合成依存性の有無について検討した。後根神経節神経細胞には、それぞれ固有のTrkA, TrkB, TrkCを有する細胞が存在するとの報告があるが、一方、発生に伴い変化する可能性も指摘されている(6,7)。同一神経細胞が2種のニューロトロフィンに反応するか否かを検討した。

[実験方法]

幼鶏後根神経節をトリプシン処理し、培養皿への付着 (1,5h X 2回) により線維芽細胞などを除去した神経細胞を、ラミニンコートしたディシュまたはカバースリップに培養した。固定後、ニューロフィラメントを免疫蛍光染色し、神経突起の長さを測定した。蛋白合成活性は、メチオニン／システイン除去メデイウムに[^{35}S]トランを加え培養後、細胞抽出液のTCA沈殿の放射能測定とSDS-PAGEのオートラディオグラフィーを行った。

[結果および考察]

ニワトリ8日目胚よりの後根神経節神経細胞は、NGF、BDNF、NT3を50 ng/ml 加えると対照に比べ長い神経突起の伸展が観察される（図１）。NGFが最も効果が顕著であるが、NT3, BDNF も明確な効果が認められる。この突起伸展誘導に対してRNA合成阻害剤アクチノマイシンDは、全く阻害を示さなかったが、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドを加えると24時間後の観察では、強い阻害効果が見られ、過去の報告と一致する。しかし、数時間後では、やや細く、ニューロフィラメントの染色性は弱いが長さはあまり変わらない突起が観察された（図１）。突起伸展用の培養と同様に、シクロヘキシミ

ド添加30分後に、[^{35}S]トランを加え3時間培養した時、蛋白合成は99%阻害されていた（図2）。従って、新たな蛋白質の合成が完全に遮断された状態で、各NTにより、若干の阻害は見られるものの、長い神経突起が誘導される事が明確に示された。後根神経節神経細胞にBDNF、NT3、NGFの1種類の NT を添加しても多くの細胞が神経突起を伸ばし、1つの細胞が複数の NT に反応している可能性が推察された。BDNF又はNT3と24時間培養後、異なったNTと置き換えると明らかな神経突起の維持と伸展が確認された。これも複数のNTに反応する神経細胞の存在する可能性を示唆している。ラットの後根神経節神経細胞では、TrkA, TrkB, TrkC のmRNAの分布で見ると、互いに局在の分離した傾向が強く、NT 支配が独立している可能性が報告されているが(7)、必ずしもそうではないと思われる。求心性線維と遠心性線維の存在、投射する組織による特異性、時期による変化などまだ複雑な要因が関わっていると想像される。

[文献] (1) Greene, L.A. (1980) Ann. Rev. Neurosci., 3, 353-402. (2) Twiss, J.L., and Shooter, E.M. (1985) J. Neurochem., 64, 550-557. (3) Sano, M., and Iwanaga, M. (1994) Brain Res., 210-214. (4) Sano,M.et al.(1995) Brain Res., 688, 213-215. (5) Sano, M., and Iwanaga, M. (1996) Brain Res., in press. (6) Lindsay, R.M. (1985) Develop. Biol., 112, 319-328. (7) Wright, D.E., and Snider, W.D. (1995) J. Comp. Neurol., 351, 329-338.

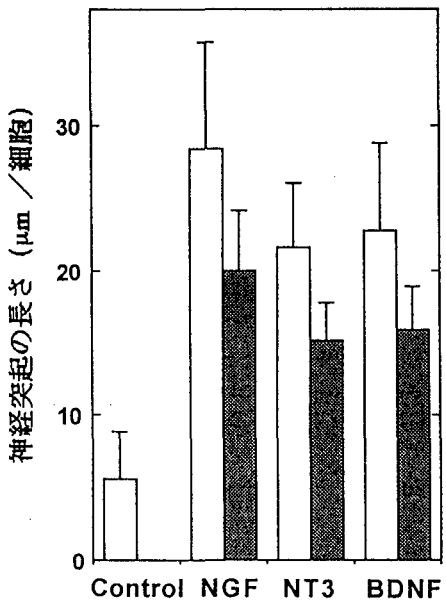


図1、ニューロトロフィンによる神経細胞の突起誘導とシクロヘキシミド。
3時間後の突起の長さを測定、NGF, BDNF, NT3は50ng/mlを添加、黒いカラムは10μg/ml のシクロヘキシミド存在下。長さは20-30の細胞を含む5視野の平均値。

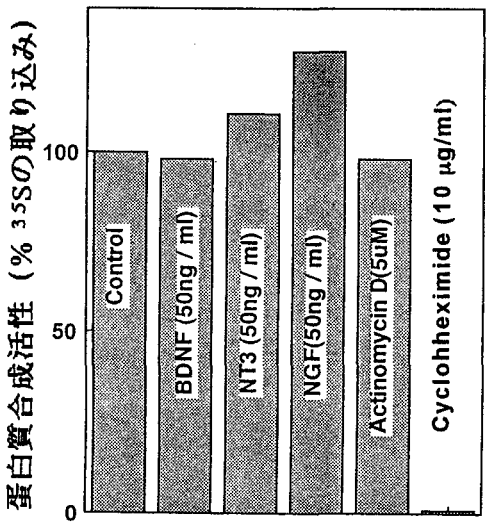


図2、蛋白合成活性に対するニューロトロフィン、シクロヘキシミドなどの効果。
阻害剤、NGF、BDNF、NT3を加え、30分後、[^{35}S]アミノ酸を加え、3時間培養後の単位蛋白あたりの取り込み。

121 1Ap5 Neurotrophin/TrkからRas/MAPKへのシグナル伝達を媒介する神経特異的アダプター分子 (N-Shc) の単離

中村岳史、森望*
(住友電気工業・バイオ研、*新技術事業団・遺伝と変化)

〔要約〕

リン酸化チロシン結合ドメインをN端とC端の双方に持つShc蛋白質は、多くの細胞でリン酸化チロシンを媒介した外部からの信号伝達に関与するのと同様、神経系の細胞においても、PC12細胞を用いた実験結果等からneurotrophinやEGFなどの成長因子からRas/MAPKへのの情報伝達に関与していることが示されてきた。また最近になって、カルシウムレベルの上昇によるRas/MAPKの活性化、及び三量体G蛋白質を介したRas/MAPKの活性化にもShcが関与していることを示唆するデータが報告されている。しかしながら、その組織分布を調べてみると、ほぼubiquitousに発現しているShcのmRNAは、脳に限ってほとんど発現していない。このことはShcと機能的に重複し神経細胞で十分量発現している因子の存在を暗示する。われわれは、その候補と考えられるShcファミリーの新規メンバーをコードする神経特異的遺伝子 (N-Shc) を単離した。このN-Shc蛋白質は、蛋白質全体にわたってShcと構造上の特徴を共有し、EGF及びBDNFの刺激によってそれぞれのレセプターチロシンキナーゼとの結合、チロシン残基のリン酸化、Grb2との結合を示す。これらのデータから、従来、神経細胞内でShcによって行われていると考えられていたneurotrophin及びEGF等からRas / MAPKへのシグナル経路の媒介は、新たに見出されたN-Shc蛋白質によって担われていると考えられる。

[結果]

ヒトN-Shc遺伝子の単離　われわれは、脳において局所的に発現している遺伝子を得ることを目的としてヒト大脳皮質由来の均一化cDNAライブラリーに含まれるクローンの解析を行っている。このライブラリーから選んだ100個の未知のクローンについてRNAドットブロット法を行い、数種の神経特異的クローンを得た。そのクローンのひとつがShcに顕著なホモロジーを示したので、蛋白質コード領域全体を含むクローンを取り直して全配列を決定したところ、この遺伝子がコードする蛋白質は、N端とC端のそれぞれにリン酸化チロシン結合ドメインPTB及びSH2を持つという構造上の特徴をShcと共有することがわかった (図1)。われわれはこの蛋白質をShcファミリーの神経特異的なメンバーという意味で、N-Shc (neuronal Shc) と呼ぶことにした。N-Shc遺伝子は2つのATGを使い分けることにより、64kDaと52kDaの2つのisoformsをコードしている。

Shcは、2つのリン酸化チロシン結合ドメインを介して、活性化されたレセプター型チロシンキナーゼのリン酸化チロシンに結合した後、そのチロシンキナーゼにより^{317}Yのリン酸化を受けて、SH2ドメインを持つGrb2と結合する (Grb2はRas活性化因子SOSと定常的に複合体を形成している)。この一連の反応により細胞膜近くにShc/Grb2/SOS複合体が形成され、Rasの活性化が起きると考えられている。以上の反応でShcが果たす役割にとって必要な構造上の特徴 (2つのリン酸化チロシン結合ドメインと、リン酸化を受けるチロシン残基) はN-Shcにも保存されてお

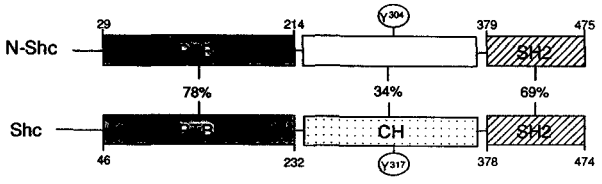


図1　N-ShcとShcの構造上の比較
各ドメイン間のホモロジーを間に数字で示した。

り、したがってN-Shcもまた、チロシンリン酸化系によるRasの活性化経路上に存在することが期待される。

N-Shcの組織分布及び脳内での分布　ShcとN-ShcのmRNAレベルを16種類の組織でNorthern blotにより検討したところ、Shc mRNAが脳以外の全ての組織で検出されたのに対し、N-Shc mRNAは脳でのみ検出された。さらにN-Shc mRNAの脳内での分布についてNorthern blotにより検討したところ、大脳皮質、海馬、小脳扁桃、尾状核では高い発現が見られ、視床下核、視床、被殻、脳梁、視床下部、黒質、小脳では低レベルであった。また、脊髄ではN-Shcの発現は見られなかった。Shcについては脊髄で低レベルの発現が見られるほかは、CNSでの発現は見られなかった。ラット切片を用いたin situ hybridizationによっても基本的にこれと一致する結果が得られ、基本的には「N-Shc=neuronal」「Shc=non-neuronal」という対照的な発現パターンであることがわかった。このことから、多くの神経細胞においては、TrkやEGFR等のレセプター型チロシンキナーゼとGrb2/SOS複合体との間のアダプター分子としての役割を、Shcの代わりにN-Shcが果たしていることが考えられる。

BDNFシグナル経路へのN-Shcの関与　そこで、神経栄養因子のうち、CNSで中心的に働くBDNFのシグナル経路について、実際にN-Shcがアダプター分子として働きうるかどうかを見てみた。T7ペプチドをN端に付けたN-Shcを発現するプラスミドと、TrkBの発現プラスミドをNIH3T3細胞に同時導入し、BDNFで5分処理したものと未処理のものとを並べて抗T7ペプチド抗体で免疫沈降を行い、その沈降物に対して抗リン酸化チロシン抗体、抗Trk抗体、抗Grb2抗体でそれぞれImmunoblottingを行った。その結果、BDNFでの刺激に応答して、活性化TrkBレセプター、チロシンリン酸化N-Shc、Grb2の複合体が形成されることが明らかになり、BDNFシグナル経路においてN-Shcがアダプター分子として働きうることを示すことができた。同様の実験により、EGFシグナル経路についても、N-Shcがアダプター分子として働きうることがわかった。

[考察]

N-Shcとnuerotrophin signaling　Trkチロシンキナーゼの基質として、Shc、ホスホリパーゼC、PI3キナーゼの3つが知られているが、その中でShcが特に大きな役割を果たしていることがTrkAに突然変異を入れた実験からわかっている。しかしながら、Shc自体は脳ではほとんど発現していないので、CNSにおける神経栄養因子のシグナル伝達は、神経系で発現しているShcファミリーの他のメンバー（神経特異的なN-Shc、及び脳を含む数種類の組織で出ているSCK）により媒介されていると考えられる。さらに、脳内でのShcの発現は大脳皮質と海馬において特に高く、TrkBの発現パターンと良く一致していることから、BDNFシグナル経路においては、N-Shcが中心的な働きをしているのではないかと考えられる。

神経系での他のシグナル伝達経路におけるN-Shcの関与の可能性　最近になって、カルシウムレベルの上昇によるRas/MAPKの活性化にもShcが関与していることを示唆するデータが報告されている。この場合、Shcをリン酸化するチロシンキナーゼの候補としてSrcファミリー、PYK2、EGFRが挙げられているが、それらがリン酸化するとされているShc中のチロシン残基はN-Shcでも保存されていることから、CNSでのカルシウムレベルの上昇によるRas/MAPKの活性化についてもN-Shcが関与している可能性がある。同様にShcの関与が示唆されている三量体G蛋白質を介したRas/MAPKの活性化にもN-Shcが関与し得る可能性まで含めると、N-Shcは、神経細胞での外部からのシグナル伝達の主要な経路の全てに関わってくる可能性があり、それらシグナル経路のクロストークの機構を理解するためにも、N-ShcとSCKという神経系で発現しているShcファミリーの役割を解明することは非常に重要であると考えられる。

122 1E7 TrkB 発現 PC12 細胞における、NGF と BDNF による神経栄養因子作用の比較

中谷篤史、山田雅司、池内俊彦、中山均※、畠中寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成、※奈良県立医科大学・薬理）

〔 要約 〕
脳由来神経栄養因子（BDNF）のレセプターである TrkB を安定に発現する PC12 細胞（TrkB-PC12 細胞）を作成し、この細胞を用いて、神経成長因子（NGF）と BDNF による神経細胞様分化誘導効果及びアポトーシスの抑制効果等について検討した。TrkB-PC12 細胞において、BDNF 添加によって NGF 添加の時と同様に神経突起の伸展がみられた。この神経突起の伸展は、NGF 添加の時に比べ BDNF 添加の時の方がはるかに速いことが観察された。しかし、神経細胞様分化の指標であるアセチルコリンエステラーゼ（AChE）の活性上昇は、BDNF 添加によっても観察されたが、その活性上昇は NGF 添加時と同様か、それ以下しか見られなかった。次に血清除去や高酸素負荷によって引き起こされるアポトーシスに対する抑制効果を調べたところ、NGF 添加時と同様に、BDNF 添加においても抑制効果がみられた。

神経栄養因子の代表的な存在である NGF とそのファミリーに属する BDNF は、同様にファミリーを形成している TrkA、TrkB レセプター型チロシンキナーゼとそれぞれ特異的に結合することにより、その機能を発揮している。最近、小島らはTrkA、TrkB を共に発現しているラット前脳基底野コリン作動性ニューロンにおいて、NGF は TrkA の mRNA レベルを上昇させるが、BDNF は上昇させないという結果を報告している(1)。このことは、NGF と BDNF は、相同性の高いレセプターを介して働くことが分かっているが、全く同じ機能を有しているわけではなく、異なる機能を持っていることを示唆している。そこで我々は、TrkA を発現しており、NGF によって神経細胞様に分化することが知られている PC12 細胞に TrkB を強制発現させ、NGF と BDNF の機能の違いを研究するためのモデル細胞を作成した。

[実験方法]
ラット *trkB* cDNA の全長を発現ベクターである pAGE123 に挿入し、リポフェクトアミンを用いた方法で、PC12 細胞の亜株である PC12h 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞は、まずネオマイシンを用いて単離し、更に BDNF による突起進展効果を指標にして、TrkB を安定に発現する細胞を得た。PC12 細胞の培養は、既報の通りに行った(2)。以下の実験においては、PC12 細胞はコラーゲンコートまたはポリエチレンイミンコートしたプレート上に$1\text{-}4\times10^4$cells/cm^{2}の密度にまいて用いた。AChE 活性の測定には、細胞を TIP/DMEM に培地交換すると同時に NGF または BDNF（どちらの場合も 50ng/ml）を添加し、一定期間培養した後、細胞抽出液においてアセチルチオコリンを基質とした酵素反応を行わせ、生じたチオコリンをエドマン試薬を用いて定量した。細胞死の抑制効果は20%及び50%の酸素気相下または、血清を除いた培地中で NGF、BDNF を添加し、一定期間培養後に MTT 法を用いて生存細胞数を定量した。

[結果と考察]
TrkB を安定に発現する PC12 細胞として、二つクローン（tB3-7、tB7-8）を単離することに成功した（図１）。両クローンともに NGF 添加の時と同様に BDNF 添加の時にも神経突起の伸展がみられたが、NGF を添加したときはほぼ全ての細胞が突起を伸展するのに３日程かかったに対し、BDNF 添加の場合は１日でほぼ全ての細胞が突起を伸展した。次に、PC12h 細胞において神経細胞様に分化するに伴い活性が上昇することが知られている AChE の活性を測定した。５日目において、tB3-7 が NGF 添加によって無添加の場合の約５倍に活性が上昇するのに対し、BDNF 添加の場

合は約４倍に上昇することが観察された。tB7-8 に関しても、NGF 添加の場合は無添加の場合に比べ約３倍に活性が上昇し、BDNF 添加では約２倍に上昇することが観察された。PC12 細胞は無血清培地や、高酸素気相下で培養すると、アポトーシスと呼ばれる細胞死を起こすことが知られている。そこで、これらのアポトーシスに対する抑制効果を調べた。まず血清除去により、生存細胞の割合は tB3-7 で約20%になったのに対し、NGF によって90%の細胞が生存維持することができた（図２A）。それに対して BDNF 添加によっては、約50%の細胞が生存を維持することができた。また、NGF と BDNF を同時に添加した場合でも相加的な効果はみられなかった。tB7-8 に関しても同様の結果が得られた（図２B）。さらに50%酸素気相下における高酸素負荷によるアポトーシスも、NGF と BDNF ともに抑制することが観察された。これらの結果からは、NGF と BDNF の作用の質的な違いはみられなかったが、量的な違いがみられたことは興味深い。現在、先述のような前脳基底野コリン作動性ニューロンにおける現象がこの細胞においても当てはまるのか、また NGF による PC12 細胞の分化にともない発現が誘導されることが知られているニコチン性アセチルコリンレセプターのサブユニットの構成に違いがないか等を、ノーザンハイブリダイゼーションにより解析している。

図１

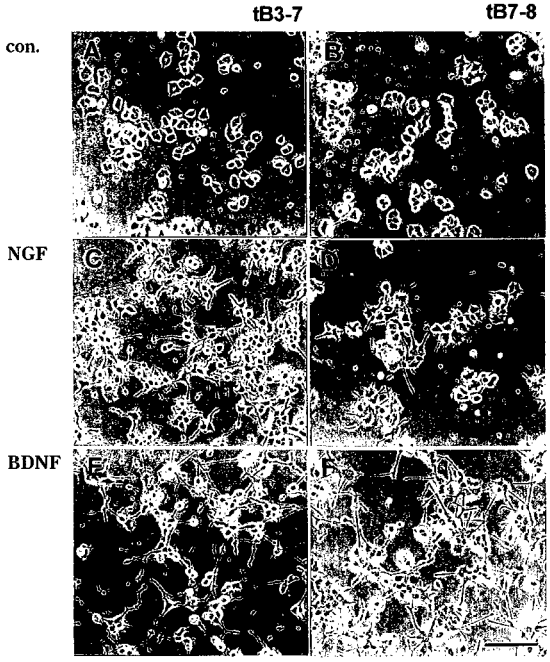


図２

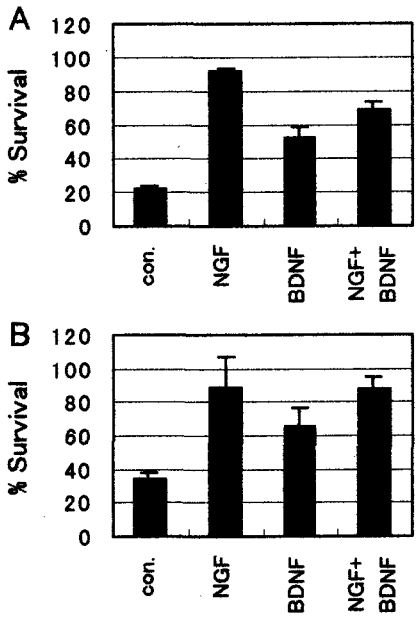


図１、tB3-7、tb7-8 両細胞の NGF、BDNF による神経突起進展
ファクター添加後３日間培養した。tB3-7(A, C, E)、tB7-8(B, D, F)、control(A, B)、NGF(50ng/ml) 添加(C, D)、BDNF(50ng/ml) 添加(E, F)。

図２、血清除去によるアポトーシスの NGF、BDNFの抑制効果
血清除去後６日間培養した後の生存細胞数を MTT 法により定量化し、生存細胞の割合を表したもの。tB3-7(A)、tB7-8(B)

文献

(1)Kojima, M. et al. (1995) *J. Neurosci. Res.* 42, 775-783
(2)畠中寛 (1990) 神経生化学マニュアル, 羊土社, p106-110

123 BDNFによる初代培養ニューロンからの神経伝達物質放出

1E8

沼川忠広、酒井直人、武井延之*、畠中 寛
（大阪大学蛋白質研究所 生合成、*京都工芸繊維大学 応用生物学科細胞生物）

〔要約〕
初代培養したラット小脳、大脳皮質、海馬および線条体のニューロンからの脳由来神経栄養因子（BDNF）による神経伝達物質放出の解析を行った。BDNFの添加により、アスパラギン酸、グルタミン酸の放出が起きた。これらアミノ酸の放出は、BDNFの添加後1分ほどで確認できた。BDNFにより引き起こされる放出は細胞外液のカルシウムに依存せず、細胞内のカルシウムに依存していた。BDNFで放出されるアミノ酸は他に数種類みられたが、これらのアミノ酸が神経伝達物質としての性質を持つかどうか不明である。以上の結果は、BDNFが長期の神経栄養因子的作用のみならず、神経伝達物質の放出といった短時間での効果を持つ可能性を示唆している。

〔目的〕
ニューロトロフィンなど神経栄養因子は、ニューロンにおいて主に分化、生存維持の効果を持つことが知られており、発生過程においてみられる正確なニューロン間ネットワークを形成するうえで重要な役割を果たしていると考えられている。最近、それらの機能に加え、ニューロトロフィンは神経伝達に対して短時間での調節作用を持っていることが明らかにされつつある[3,4]。そこで、ニューロトロフィンのひとつ、BDNFが神経伝達物質の放出に直接関与する可能性についてラットの初代培養ニューロンを用いて解析をした。

〔方法〕
胎仔20日目のラット海馬および大脳皮質ニューロンの初代培養は既報に従って行った[1,2]。ラット脳より切り出したそれぞれの部位をL-15培地中に集め、パパイン処理によって消化した後、5％準胎仔牛血清、5％馬血清を含むDF培地（DME：F12 = 1:1）で培養した。翌日 minimum essential medium（MEM）培地に換え、7日間培養を行った。小脳、および線条体の場合生後9日齢のラットより切り出し、同様に培養した。伝達物質放出量の測定は、1分あるいは3分間隔で外液（KRH: Hepes-buffered Krebs Ringer Solution）を交換するバッチ法で行った。高カリウム（50 mM）、BDNF等はKRHに予め添加したものを用い、サンプルは0.22 μMのフィルターを通し、細胞等を除去した後、O-Phthalaldehydeで誘導体化し、HPLC蛍光法あるいはHPLC電気化学法で定量した。

〔結果及び考察〕
ラット脳初代培養ニューロンにBDNFを添加すると1分程で興奮性のアミノ酸であるアスパラギン酸及びグルタミン酸の細胞外液への放出が観察された。この現象は、実験に用いた大脳皮質、海馬、線条体および小脳顆粒細胞全てにおいてみられた。放出されるアスパラギン酸及びグルタミン酸の量は数倍に上昇し、同時に行った高カリウムによる脱分極刺激の際にも同じアミノ酸の上昇がみられた。また放出の特徴として高カリウム刺激の場合と異なり、数回の刺激で緩やかに、持続的な上昇をみせた。さらに、BDNFによるアミノ酸放出はK-252aで制御されたことから、TrkBレセプターを介した反応であると考えられた。これらのアミノ酸の放出は、細胞外液に含まれるカルシウムを除いてもほとんど影響を受けず、一方で細胞内のカルシウムをBAPTA-AMでキレートするとアミノ酸の放出

が抑えられる傾向がみられた。

小脳顆粒細胞においてBDNFは顕著な生存維持効果を持ち、海馬においてBDNFの同様の効果はみられないといわれている。しかし今回の実験ではアミノ酸の放出という点で双方の部位で同じような結果が得られた。このことに加え、アミノ酸の放出が確認されるまでの時間を考えると、神経伝達物質の放出機構が、分化、生存維持の場合とは異なり、遺伝子の発現を伴わない細胞内シグナルを経ていることを示唆していると思われる。

また、アスパラギン酸、グルタミン酸以外にも数種のアミノ酸の放出が観察された。それらのアミノ酸は、それぞれの脳部位において異なる放出分布をみせた。このことは脳の各部位において性質の異なる細胞の分布を反映していると思われる。これらのアミノ酸が神経伝達物質としての働きをしているかどうかは不明である。

〔文献〕

1) 榎戸　靖、久保武一、市川真澄、畠中　寛、神経化学 (1993)**32** 186-187.

2)Hatanaka, H. and Tsukui, H., (1986) *Dev. Brain Res.*, **20** 47-56.

3) 武井延之、神経化学 (1996) **35** 26-33.

4)H.Thoenen, *Science* (1995)**270** 593-598.

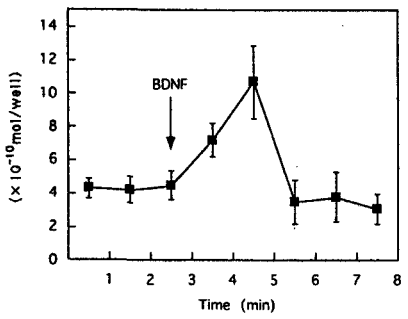


図1 大脳皮質でのBDNF添加によるグルタミン酸の放出
BDNFは最終濃度 50 ng/ml で用いた。

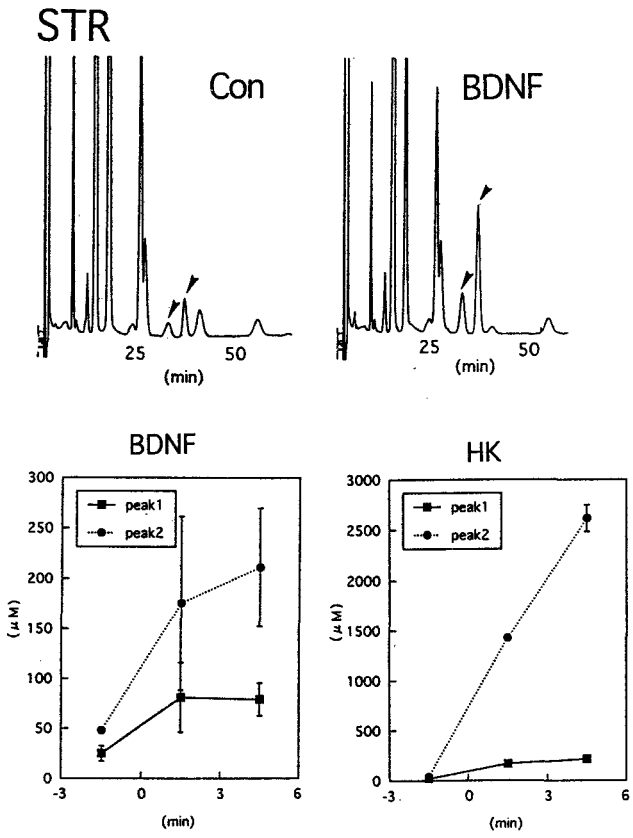


図2 線条体でのBDNF添加により放出のみられるアミノ酸
放出上昇のみられたものを矢印で示した。(上図)
下図は矢印で示したアミノ酸を左からそれぞれPeak1,2とし、BDNFおよび高カリウム刺激を与えた場合の3分ごとの定量結果。左端の点がそれぞれのcontrol.

124 BDNFによる培養海馬ニューロンの細胞内カルシウム制御

1Ap6

酒井直人[1,2]、山田雅司[1]、沼川忠広[1]、中谷篤史[1]、武井延之[3]、小倉明彦[4]、畠中 寛[1]
([1]大阪大. 蛋白研、[2]浜松医大. 脳外、[3]京都工繊大. 繊維. 応用生物、[4]大阪大. 院. 理. 生科)

〔要約〕ラット培養海馬ニューロンにカルシウム指示薬(Fluo3)を負荷し、脳由来神経栄養因子(BDNF)の細胞内カルシウムに与える短期的作用をコンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて解析した。21日間前後の長期培養をしたニューロンでは、BDNFによる細胞内カルシウムの上昇が施行した実験の33.3%に観察されたのに対し、9-10日間培養したニューロンでは、3.3%にしか観察されなかった。しかし、9-10日間培養したニューロンの中で自発的カルシウムオシレーションを呈しているニューロン群にBDNFを投与すると、施行した実験の83.3%においてオシレーションの頻度の増加と細胞内カルシウムの上昇を観察した。tetrodotoxin(TTX)を前処理しオシレーションを消失させた状態では、BDNFによる細胞内カルシウムの変動は観察されなかった。以上の結果から、BDNFは培養海馬ニューロンの細胞内カルシウムを膜電位の変化に関連した機構で調節することが考えられた。

BDNFが海馬ニューロンにおいて短期的にシナプス伝達を増強するという報告がなされ[(1)(2)]、従来BDNFの生理作用として考えられていたニューロンの成長、分化、生存維持作用に加えて、神経伝達への直接的関与が考えられるようになった[(3)(4)]。今回我々は、神経伝達に際し重要な細胞内カルシウムの変動に与えるBDNFの短期的作用を、ラット培養海馬ニューロンにカルシウム指示薬(Fluo3)を負荷し、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、既報のBDNFによる海馬ニューロンの一過性の細胞内カルシウム上昇[(5)]とは若干異なる知見を得たので報告する。

〔方法〕胎生19日齢ラットの海馬ニューロンは既報に従って培養し[(6)]、2.0-4.0×10^5cells/cm^2でpolyethyleneimineでコートしたカバーグラス上にFlexipermを用いてまいた。細胞内カルシウム測定の際の基本塩溶液(BSS)は既報のものを用いた[(7)]。このBSSにFluo3-AM10μMを懸濁して負荷用溶液とし、培地をこれに置換し37℃で30分間静置した後、負荷用溶液を除去しBSSに置換し室温（24℃）にて実験を行った。コンフォーカルレーザー顕微鏡(Nikon, RCM8000)下に明らかにニューロンと判別できるものを対象に2-4秒間隔で蛍光画像を取得した。BDNFは100ng/mlとなるようにマイクロピペットを用いてBSSに投与した。得られた画像はカルシウム濃度解析ソフトでレシオ画像に変換して解析した。

〔結果と考察〕図1は、21日間培養したニューロンにBDNFを添加した際の細胞内カルシウムの上昇を観察したものである。21日間前後の長期培養を行ったニューロンを用いた実験の33.3%（5／15）に同様のことを観察した。一方、9-10日間培養したニューロンではBDNFによる細胞内カルシウムの上昇は30回施行した実験で1回観察されたのみであった（3.3%）。この時期のニューロンがBDNFに応答していることは、BDNF添加5分後のp140^{trk}のリン酸化（図2）、2時間後のc-fosの発現上昇（図3）で確認した。抗TrkB抗体による免疫染色でも約80%のニューロンが陽性所見を呈した。また、KCl, gulutamate, carbacholに対して、これらのニューロンは明らかな細胞内カルシウムの上昇を示した。培養海馬ニューロンでは1週間以上培養すると自発的なカルシウムオシレーションが観察され、複数個のニューロンに同調したオシレーションが観察される場合にはニューロン間に機能的なシナプスが形成されていることが報告されている。[(8)]。図4に、このようなカルシウムオシレーションの見られるニューロン群にBDNFを投与した実験を示す。BDNF投与後3分間にわたってオシレーションの頻度が増加し、細胞内カルシウムの上昇が観察された。同様の結果が施行した実験の83.3%（10／12）にみられた。TTXを前処理してオシレーションを抑制した場合、BDNFによる細胞内カルシウムの変動は観察されなかった（0／6）。以上の結果から、BDNFによる細胞内カルシウムの上昇は、TrkBのリン酸化→PLCγの活性化→IP3の形成→細胞内貯蔵カルシウムの放出、のプロセス以外に膜電位の変化に関連した機構で調節されていることが考えられた。長期培養したニューロンにBDNFによる細胞内カルシウムの上昇が観察されやすいことも、これらのニューロンの膜電位が短期培養のものに比して変化しやすいためと考えて

いる。現在、この点についてさらに検討を加えるとともに、BDNFによる細胞内カルシウムの上昇によって放出が促進されることが予想される神経伝達物質の測定、シナプス関連蛋白のリン酸化についても検討中である。さらに、TrkBを強制発現させたPC12細胞を用いたBDNFによる細胞内カルシウムの変動を解析することを計画している。

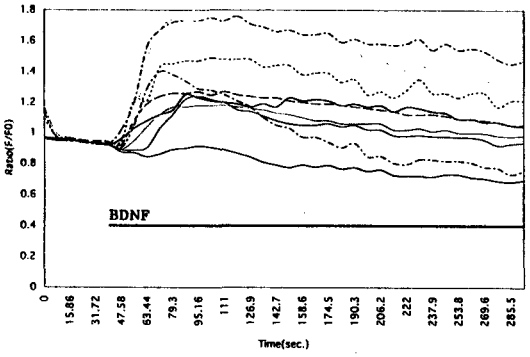


図1：21日間培養したニューロンにおけるBDNF(100ng/ml)投与による細胞内カルシウムの上昇。

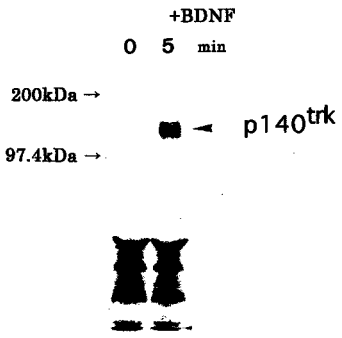


図2：BDNF(100ng/ml)投与5分後のp140^{trk}のリン酸化。

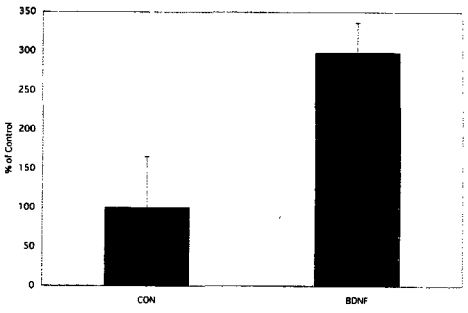


図3：BDNF(100ng/ml)投与2時間後のc-fos陽性細胞の増加。

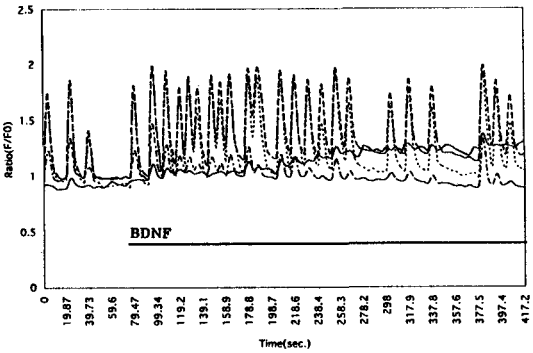


図4：9日間培養したニューロンにみられた自発的カルシウムオシレーション。BDNF(100ng/ml)投与後、オシレーションの増強がみられる。

〔文献〕

(1) Kang, H., Schuman, E.M.: Science, 267: 1658-1662, 1995
(2) Levine, E.S., Dreyfus, C.F., Black, I.B., Plummer, M.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 8074-8077, 1995
(3) 武井延之：神経化学, 35: 26-33, 1996
(4)Thoenen,H.: Science, 270: 293-298, 1995
(5) Berninger, B., Garcia, D.E., Inagaki, N., Hahnel, C., Lindholm, D.: NeuroReport, 4: 1303-1306, 1993
(6) 畠中寛、津久井弘子：神経生化学マニュアル、129-135、羊土社、1990
(7) 小倉明彦、工藤佳久：細胞内カルシウム実験プロトコール、131-135、羊土社、1996
(8) Ogura, A., Iijima, T., Amano, T., Kudo, Y.: Neurosci. Lett., 78: 69-74, 1987

125 1Ap7 グルココルチコイドにより誘発される培養ラット海馬神経細胞死に対するBDNFの保護効果

○新田淳美、片岡弘臣、斉藤和裕、古川昭栄
（岐阜薬科大学・分子生物学教室）

〔 要約 〕
培養下のラット海馬ニューロンを血清存在下で24時間培養した後、無血清培地中でグルココルチコイドの１つであるコルチコステロンを作用させると神経細胞死が誘発された。この時の脳由来栄養因子(brain derived-neurotrophic factor ; BDNF)の発現について免疫組織化学染色、PCR法および酵素免疫測定(Enzyme immunoassay; EIA) 法で検討したところ蛋白およびmRNAとも発現量がコントロールに比べて減少していた。また、コルチコステロン添加時にBDNFを同時に添加すると神経細胞死が防がれた。また、無血清培地に交換した後、４日間培養したニューロンにコルチコステロンを作用させても神経細胞死は観察されず、BDNFの発現量に変化もなかった。さらに、^{3}H- コルチコステロンを用いて培養ニューロンに対するコルチコステロンの結合能を検討した。血清存在下から無血清培地に交換直後のニューロンはコルチコステロンに対する結合能を有していたが、無血清培地交換４日後のニューロンは結合能がなかった。これらの結果から、コルチコステロンは、血清除去直後のニューロンに対して細胞死を誘発し、さらに、BDNFの合成調節メカニズムにも関与していることが示唆された。

［目的］グルココルチコイドは生体がストレスに暴露された時に急激に血中濃度が上昇し、生体にさまざまな変化をもたらすことが知られている。最近、グルココルチコイドが脳神経細胞に対しても影響を及ぼすことが報告されている(１)。一方、脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF)は、ニューロトロフィンファミリーの１つであるが（２）、生理作用や合成メカニズムについてはよく分かっていない。我々は、グルココルチコイドの１つであるコルチコステロンを連続的に末梢投与したラット脳では海馬や大脳皮質でBDNFの発現量が減少し、特に免疫組織染色の結果から神経細胞核での発現量が減少することを見いだしている。本研究では、グルココルチコイドの神経機能におよぼす影響を解明するために培養ラット海馬神経細胞に対するコルチコステロンの影響とBDNFとの関連について検討した。
［実験方法］細胞培養；胎生１８日のラット海馬を取りだし、トリプシン処理により分散した後、0.1×10^{5}、0.3×10^{5}および1.0×10^{5} cells/cm^{2}の細胞密度にて10%血清(ウマ血清5%およびウシ準胎児血清5%) を含む培地で培養を開始した(３)。24時間後に無血清培地に交換し、その直後にコルチコステロン (0、0.01、0.1、1.0 μM)を添加した場合と４日間無血清培地で培養後、コルチコステロンを添加した場合で添加24時間後に生存神経細胞数を顕微鏡下で計数した。また、コルチコステロンによって誘発される神経細胞死に対するBDNFの効果を検討する実験の際は、コルチコステロンとBDNF(50、100 および 500 ng/ml)を同時に添加した。
免疫組織化学染色；コルチコステロン添加24時間後に培養上清を除去し、2%パラホルムアルデヒドで固定後、古川らの方法 (４) でBDNFの染色を行った。
酵素免疫測定法 (EIA法)；リン酸緩衝生理食塩水で溶解したヒト組み換えBDNF32.5mgを等容量のFreund's complete adjuvant をよく混合乳濁させ、成鶏に２週間間隔で５回免疫し、最後の免疫から１週間後に採血して抗血清を得た。この抗血清からaffinity精製をして抗BDNF抗体を得た。EIAの操作手順は当研究室で開発した神経成長因子のEIA法に従った(５)。
PCR法；培養海馬神経細胞から常法でmRNAを精製し、RT-PCRのサンプルとした。センスプライマーを5'- GGAATTCGAGTGATGACCATCCTTTTCCTT- AC- 3'、アンチセンスプライマーを5'- GTGACTGGTAATTTTCCCCTTCTATCCCTAGGC-3'としてPCR反応を行った。
神経細胞のコルチコステロンの結合能の測定；血清除去直後とさらに４日間培養後の神経細胞に対するコ

ルチコステロンの結合能の検討を行った(6, 7)。培養海馬神経細胞に[1, 2, 6, 7-^{3}H (N)]- コルチコステロン (0.1μM)を添加し、4時間培養した後、神経細胞に結合したコルチコステロン量を放射活性から計算した。非特異的結合量は、非標識コルチコステロン (100 mM)と[1, 2, 6, 7-^{3}H (N)]- コルチコステロン(0.1μM)を同時添加した場合の放射活性から計算した。

[実験結果]0.1x10^5、0.3x10^{5}および1.0x10^5 cells/cm^{2}の細胞密度で培養を開始した神経細胞に血清除去と同時にコルチコステロンを24時間作用させたところ、0.3x10^5 cells/cm^{2}の細胞密度で培養を開始した場合にコントロールと比べてコルチコステロン添加による生存神経細胞数の有意な減少が観察された(Fig.1)。しかし、血清除去4日後の神経細胞では生存神経細胞数にコントロールと比べて変化は観察されなかった。また、コルチコステロンによって誘発された神経細胞死はBDNF(50、100、500 ng/ml)を同時投与することによって抑制された(Fig.2)。 培養神経細胞では、免疫染色、EIAおよびPCR法のいずれの方法で検討した場合もBDNFが発現していたが、血清除去と同時にコルチコステロンを24時間作用させた時、mRNAおよび蛋白レベルでBDNFの発現の減少が観察された。一方、血清除去4日後の神経細胞にコルチコステロンを作用させても免疫染色で検討するとBDNFの発現量に変化は観察されなかった。また、血清除去直後の神経細胞はコルチコステロンに対して結合能を有していたが、血清除去4日後では結合能を有していなかった。

[考察]本研究からコルチコステロンは培養神経細胞に対して、細胞密度や血清除去後の日数など、一定の条件下で細胞死をひきおこすことを明らかにした。すなわち、血清を除去して日数が経過すると、神経細胞からコルチコステロンの受容体が消失し、応答性を失うためと考えられる。また、コルチコステロンを添加した神経細胞にはBDNFの発現の減少が観察されることやBDNFを同時添加すると神経細胞死が防げることから、コルチコステロンがBDNFの合成または代謝機構に何らかの影響をおよぼし神経細胞死が引き起こされている可能性が考えられる。

[参考文献]

1) Scully, J. L. and Otten, U. (1995) J. Steroid Biochem. Biol. *52,* 391-401
2) 古川美子、古川昭栄、林 恭三 (1996) 生化学 *68,* 14-30
3) Nakajima, M., Furukawa, S., Hayashi, K., Yamada, A., Kawashima, T. and Hayashi, Y. (1993) Dev. Brain Res. *73,* 17-23
4) 古川昭栄、杉原裕志、古川美子 (1994) 神経化学 *33*、670−671
5) Furukawa, S., Kamo, I., Furukawa, Y., Akazawa, S., Satoyoshi, E., Itoh, K. and Hayashi, K. (1983) J. Neurochem. *40,* 734-744
6) Kontula, K., Andersson, L. C., Paavonen, G., Myllyla, Teerenhovi, L. and Vuopio, P. (1980) Int. J. Cancer, *26,* 177-183
7) Vedder, H., Weib, I., Holsboer, F. and Reul, J. M. H. M. (1993) Brain Res. *605,* 18-2

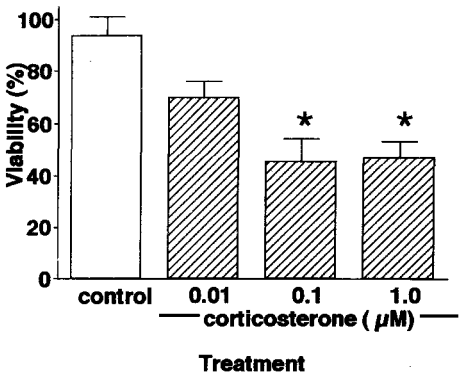


Fig. 1 Effects of corticosterone on the survival of hippocampal neurons. *P <0.05 vs control

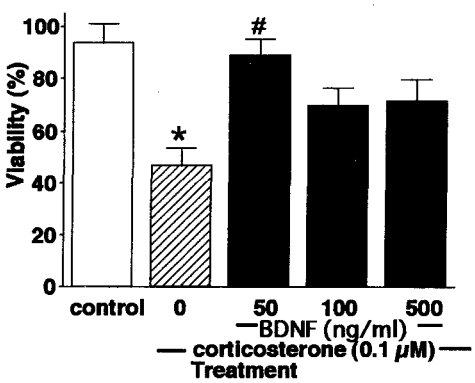


Fig. 2. Effects of BDNF on neuronal cell death induced by corticosterone. *P<0.05 vs control, #P<0.05 vs corticosterone alone.

126 1E9 高カリウム刺激によってアストロサイトから分泌される神経栄養因子活性

阿比留 康弘*、西尾 チカ*、仙波 りつ子**、畠中 寛*
(*大阪大学蛋白質研究所・生合成、**愛知県コロニー研究所)

〔要約〕
高カリウム(HK)培地で培養したアストロサイトの条件培地(astrocyte conditioned medium ; ACM)中に含まれる神経栄養因子活性について解析した。神経栄養因子活性は、生後2週齢ラット前脳基底野ニューロンの培養系を用いて調べた。その結果、HK-ACM添加群において対照群よりも高いアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性が観察された。この効果は、熱処理することによって失われた。また、低カリウム(LK)の通常培地から得られたLK-ACMにおいても弱いChAT活性の増加がみられた。HK-ACM添加時に起こるChAT活性の増加は、抗NGF抗体によって抑えられたが、抗BDNF抗体では抑制されなかった。これらの結果は、高カリウム刺激によって、アストロサイトからNGFが分泌されることを示唆している。

[序論]
アストロサイトの生理的役割の一つとして、神経活動によって細胞外間隙に放出されたカリウムイオンを除去してカリウム濃度を一定に保つ働き(potassium buffering)が知られている。この働きは、より活発に活動しているニューロンの周囲に存在するアストロサイトでは、より活発に行われていると考えられる。我々は、アストロサイトがこの際に何らかの神経栄養因子を放出し、活動度の高いニューロンの生存や分化を優先的に促進する可能性を考えた。今回我々は、アストロサイトを高カリウム培地で培養し、その条件培地中に神経栄養因子活性が含まれているかどうか調べたので報告する。

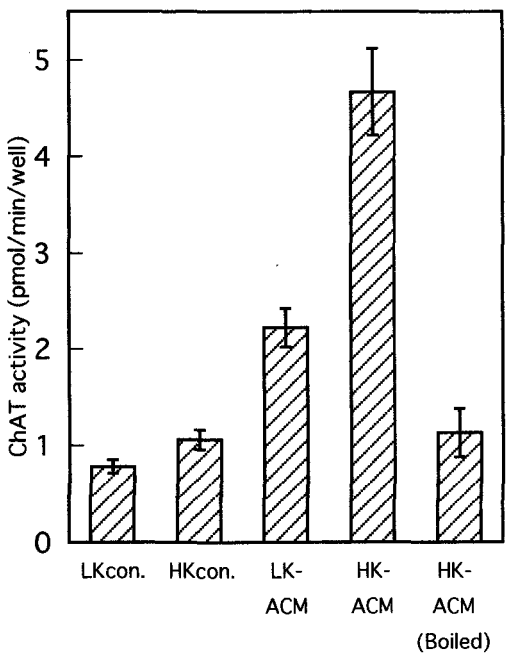
[方法]
ACMの調製:胎生20日齢ラット大脳皮質および海馬からのアストロサイトの培養は、既報に従って行い[1]、80 cm^{2}フラスコにコンフレントになるまで培養した。PBSでwash後、40 mM KClを含む高カリウムDF培地(HK)、あるいは4 mM KClを含む通常のDF培地(LK)を10 ml加えて培養した。5日後にACMを回収した後、遠心によってdebrisを除去し、-20℃で保存した。また、アストロサイト無しのフラスコで同様の操作を行い、これを対照群として用いた。
神経栄養因子活性の測定:神経栄養因子活性は、神経成長因子(NGF)および脳由来神経栄養因子(BDNF)による生存維持効果が報告されている、生後2週齢ラット前脳基底野および線条体ニューロンのChAT活性を指標にした。[1][3][4]。生後2週齢ラット前脳基底野および線条体ニューロンの初代培養は、既報に従って行った[1][2][3][4]。得られた生細胞を3～5×10^5 cells／cm^{2}の割合でポリエチレンイミンでコートした48穴プレート(0.65 cm^2)にまいた。培養翌日に、無血清TIP／DF培地とACMとを1:1の割合で混合した培地に培地交換し、3～6日後にChAT活性の測定を行った[1]。

[結果と考察]
図1において、生後2週齢ラット前脳基底野ニューロンの初代培養系における、HK-ACMおよびLK-ACMの効果について調べた。対照群として、アストロサイトの無い状態で同様の操作を行って得られた高カリウム培地(HKcon)および通常培地(LKcon)を用いている。その結果、HK-ACM添加群では対照群に比べChAT活性の著しい増加が観察された。LK-ACM添加によってもChAT活性の増加が観察されたが、

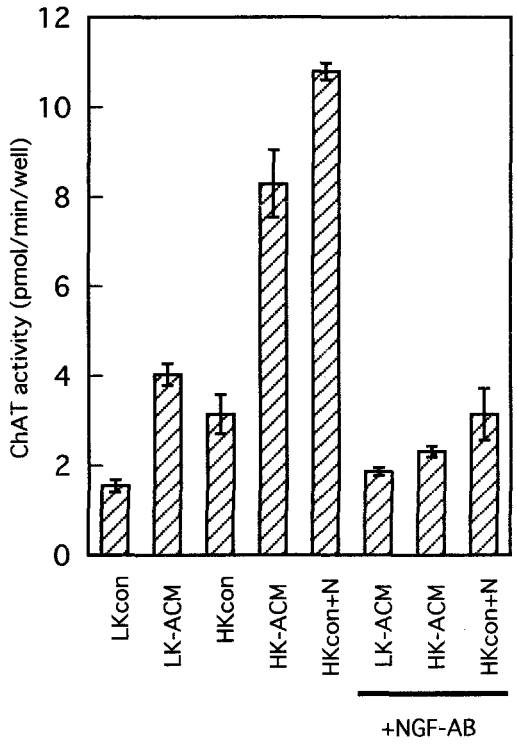
この増加は HK-ACM の場合に比べて弱いものだった。HK-ACM 中の活性は 10 分間煮沸処理することにより失活した。これらの結果は、ChAT 活性を上昇させるような蛋白質性の因子がアストロサイトから ACM 中に分泌されており、この分泌は HK の場合に特に著しく起こることを示唆している。

アストロサイトは、NGF や BDNF を産生する能力があることが知られている。そこで、HK-ACM および LK-ACM による ChAT 活性の増加が、NGF を介して発揮される可能性について検討するために、抗 NGF 抗体を用いた中和実験を行った（図２）。その結果、HK-ACM および LK-ACM 添加時に起こる ChAT 活性の増加が、抗 NGF 抗体によって抑えられることがわかった。また、図には示していないが、BDNF の効果を中和する抗 BDNF 抗血清を用いた実験から、HK-ACM による ChAT 活性の増加は BDNF を介しているわけではないことが示唆された。以上の結果は、高カリウム刺激によってアストロサイトから NGF が分泌されることを示唆している。現在、NGF や BDNF 以外の因子の存在についても検討中である。

[文献]
(1) Hatanaka,H., Tsukui,H. and Nihonmatsu,I. *Dev. Brain Res.*, **39** (1988) 85-95.
(2) Nakamura,M., Nishio,C., Nonomura,T. and Hatanaka,H. *Dev. Brain Res.*, **81** (1994) 218-229.
(3) Nonomura,T., Nishio,C., Lindsay,R.M. and Hatanaka,H. *Brain Res.*, **683** (1995) 129-139.
(4) Abiru,Y., Nishio,C. and Hatanaka,H. *Dev. Brain Res.*, **91** (1996) 260-267.



（図１）生後２週齢ラット前脳基底野ニューロンの ChAT 活性に対する LK- および HK-ACM の作用。ACM を添加して３日後に ChAT 活性を測定した。



（図２） ACM による ChAT 活性の増加に対する抗 NGF 抗体の作用。N は 100ng/ml NGF を、NGF-AB は 1.4 μ g/ml 抗 NGF 抗体を示している。ACM を添加して３日後に ChAT 活性を測定した。

127 抗ＨＣＮＰ抗体によるラット末梢自律神経系の免疫電顕的検討

1E10

片田栄一、 三竹重久、 小鹿幸生

（名古屋市立大学 第二内科）

〔 要約 〕

ラット培養中隔核のアセチルコリン産生を促進するHippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide（ＨＣＮＰ）を抗原として作成したポリクローナル抗体を用いた免疫電顕法により、１１日齢ラットの末梢自律神経系（上頚神経節、十二指腸の粘膜下神経叢および筋間神経叢と血管壁）における免疫陽性部位の電顕的局在について検討した。上頚神経節ではsmall granule containing cellの細胞質内小胞、神経終末におけるシナプス小胞に、また、十二指腸の粘膜下神経叢ではganglionに接する神経終末におけるシナプス小胞に、筋間神経叢では平滑筋細胞に接する神経終末におけるシナプス小胞に、血管壁においては、神経終末のシナプス小胞に免疫陽性部位を認めた。

［はじめに］

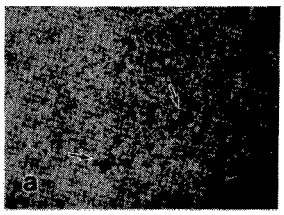
我々は中隔核培養細胞の分化を促進する因子として１１個のアミノ酸から成るペプチドを同定し、Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP)と命名した（１）。これまでにＨＣＮＰのラット中枢神経系および一般臓器における分布を免疫組織化学的手法を用いて報告した（２、３）。さらに、抗ＨＣＮＰ抗体を用いてラット末梢神経系を組織学的に検索し、交感神経節、三叉神経節、後根神経節、十二指腸の粘膜下および筋間神経叢、諸臓器の血管壁などに免疫陽性部位があることを報告した（４）。今回は免疫電顕法により末梢自律神経系における免疫陽性部位の超微形態的局在について検討したので報告する。

［対象および方法］

抗ＨＣＮＰ抗体の作製：合成ＨＣＮＰをヘモシアニンに結合させたものを抗原として家兎を免疫し、得られた血清から抗ＨＣＮＰ抗体をaffinity purifyした。免疫電顕：Wistar rat（11日齢、雄）をネンブタール麻酔下で、4%パラホルムアルデヒドと0.1%グルタールアルデヒド混合液で灌流し、上頚神経節、十二指腸を50μmに薄切し、同混合液で５時間さらに浸漬固定した。その後、0.1%TritonX-100で処理してから免疫染色を行った。２次抗体はＳＡＢキット（ニチレイ）を用いた。ＤＡＢで発色後、1%オスミウムで再固定し脱水後にエポン樹脂に包埋した。光顕で免疫反応陽性部位を同定し、超薄切電顕試料を作成した。無染色、あるいは電子染色（酢酸ウラニール、鉛）した試料をＪEM-1200EXで観察した。

［結果］

抗ＨＣＮＰ抗体による光顕的免疫組織所見を図１に示す。各組織の免疫反応陽性部位の免疫電顕所見は以下の通りであった。上頚神経節では、small granule containing cellの細胞質内小胞と神経終末のシナプス小胞に、また、十二指腸の粘膜下神経叢ではganglionに接する神経終末におけるシナプス小胞に、筋間神経叢では平滑筋細胞に接する神経終末におけるシナプス小胞に、血管壁においては、神経終末のシナプス小胞に免疫陽性部位を認めた（図２）。



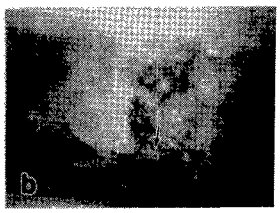




図１．　a. 上頚神経節　　b. 十二指腸（粘膜下神経叢）　　c．十二指腸（血管壁）
×２００　　×１００　　×１００

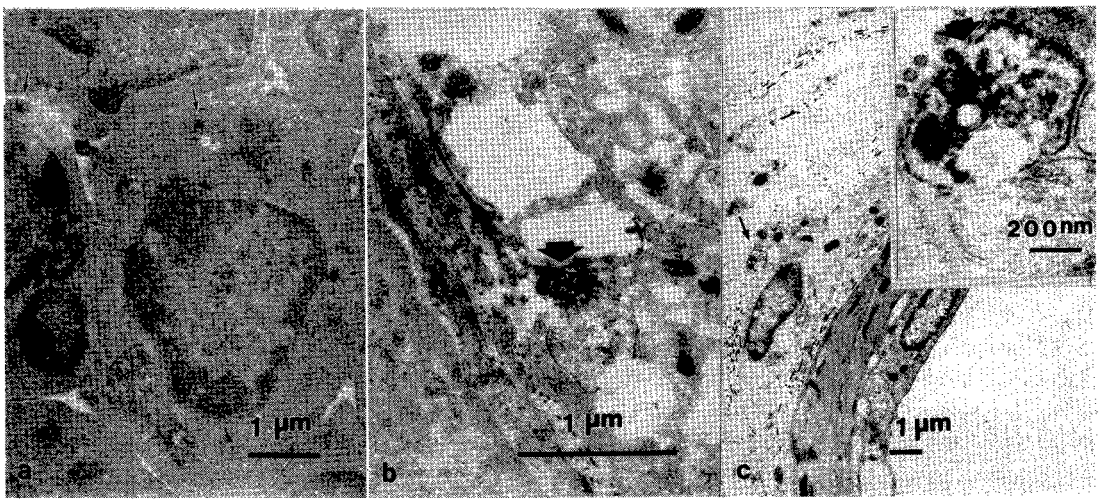


図２．a. 上頚神経節　　b．十二指腸（粘膜下神経叢）　　c．十二指腸（血管壁）
矢印はsmall granule-containing cellの細胞質内小胞　　矢印は神経終末のシナプス小胞　　矢印は神経終末のシナプス小胞

［考案］

以上の結果から、ＨＣＮＰ類似体は交感および副交感神経の節前および節後神経終末のシナプス小胞にも局在し、分泌しneuromodulatorとして作用している可能性が示唆された。しかしＨＣＮＰ自身か、その前駆体蛋白（５）のシナプス小胞への集族かについては明らかでなく今後の検討が必要と考えられる。

［文献］

(1). Ojika, K. et al. (1992) Brain Res. 572, 164-171
(2). Mitake, S. et al. (1996) Brain Res. 706, 57-70
(3). Katada, E. et al. (1996) Histochem Cell Biol 105, 43-51
(4). 片田栄一　他 (1994) 神経化学 33, 462-463
(5). Tohdoh, N. et al. (1995) Mol. Brain Res. 30, 381-384

128 マウスにおける海馬由来神経刺激因子の遺伝子発現量の検討

1E11

松川則之[1、2]、小鹿幸生[1]、片田栄一[1]、岡田秀親[3]、東藤直樹[4]、山本孝之[2]、上田龍三[1]
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)のマウス型前駆体cDNAをWhole brain cDNA library(Balb c)よりクローニングした。これを用いたマウス脳内HCNP遺伝子発現量を検討したところ、大脳皮質、嗅内野、梨状葉、海馬の神経細胞および小脳プルキンエ細胞に強い発現を認めた。

＜はじめに＞

HCNPは、ラット中隔核組織培養系において、アセチルコリン合成促進する新規ペプチドとして、小鹿らにより、10－12日令ラット海馬より単離・精製された(1)(2)。その構造は、Acetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu-OHの11アミノ酸よりなり(2)、特異的酵素により(3)、21kDaの前駆体タンパク(4)からプロセスされペプチドとして遊離する。今回我々は、ラット型HCNP前駆体遺伝子(4)をもとにマウス型HCNP前駆体cDNAをクローニングし、Northern blot analysis / Non-isotopic in situ hybridization により脳内遺伝子発現量を検討した。

＜方法＞

ラット前駆体cDNA(650bp EcoRI-PstI fragment)を用い、マウスWhole brain cDNA ライブラリーUni-ZAP™ XR Vecttor (Stratagene, LA Jolla, CA) をスクリーニングした。DNAは、特異的オリゴプライマー、一本鎖および二本鎖DNAを用いてA.L.Fシークエンスシステム(Farmacia, LKB)にて両方向ともに塩基配列を決定した。6週令のマウス(Balb c)より、大脳(前頭葉)、海馬、線条体、小脳および脳幹の各部位よりtotalRNAをTRIZOL(Life Tech, Japan)を用いて分離した。また、同令マウス脳を4%パラフォルムアルデヒド固定しパラフィン包埋後,10 μm に薄切しIn situ hybridization に用いた。Northern blot analysis, In situ hybridization ともに、プローブとして、DIGラベルしたアンチセンスRNA(ECORI-BamHI 250bp fragment)を使用した。コントロールとして、センスRNAプローブおよび競合阻害を行った。

＜結果＞

マウス型HCNP前駆体cDNAは約1.2kbpより成り(図1),ラット型・人型cDNAと各々75.2%, 66.3%の相同性を認め、それより予測される前駆体蛋白は186アミノ酸より成りそのN末端に位置する11アミノ酸はラットのHCNPと全く同じであった（図2）。Northern blot analysis では、各部位において同程度に発現量を認めた（図3）。In situ hybridization では、大脳皮質、嗅内野皮質、梨状葉皮質、海馬CA1,CA3, CA4の神経細胞および小脳プルキンエ細胞に強い発現を認めた。グリア細胞には、発現はほとんど認められなかった（図4）。

＜考察＞

マウス型HCNPは、ラットのそれと同じであり、脳内遺伝子発現の分布もほぼ同様の結果が得られた(5)。細胞分布としては、神経細胞が主体でありグリア細胞には非常に弱いことが確認された。海馬錐体細胞層において一部の細胞に、より強い発現が認められた。また、海馬神経細胞に発現が強く中隔核において弱い点およびこれまでの我々の知見から、中隔核ー海馬のコリン作動性ニューロンにおいては、HCNPが中隔核神経細胞で産生されるのでなく、海馬神経細胞より逆行性に、中隔核でのアセチルコリンの産生能を促進させている可能性が支持された。今後、in vivo での機能解析が待たれる。

50

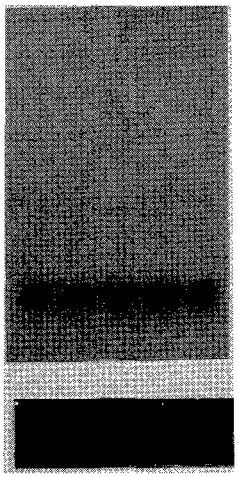
GAATTCGGCACGAGCAACTCTCCATCGCCATGGCCGCCGACATCAGCCAG
TGGGCCGGGCCCTTGTGCTTGCAGGAGGTGGACGAGCCGCCCCAGCACGC
CCTGCGGGTCGACTACGCCGGGGTGACGGTGGACGAGCTGGGCAAAGTGC
TAACGCCCACCCAGGTTATGAACAGGCCCAGCAGCATTTCATGGGACGGC
CTTGATCCTGGGAAACTCTACACCCTGGTCCTCACAGACCCCGATGCTCC
CAGCAGGAAGGATCCCAAATTCAGGGAGTGGCACCACTTCCTGGTGGTCA
ACATGAAGGGTAATGACATTAGCAGTGGCACTGTCCTCTCAGATTATGTG
GGCTCCGGGCCTCCCAGTGGCACAGGTCTCCACCGCTATGTCTGGCTGGT
GTACGAGCAGGAACAGCCGCTGAGCTGCGACGAGCCCATTCTCAGCAACA
AGTCTGGAGACAATCGCGGCAAGTTCAAGGTGGAGACCTTCCGCAAGAAG
TATAACCTGGGAGCCCCGGTGGCGGGCACGTGCTACCAAGCCGAGTGGGA
TGACTATGTGCCCAAGCTGTACGAGCAGCTGTCAGGGAAGTAGGGGTGCT

28S

18S

HCNP

28S



a b c d e

図1：マウス型HCNP前駆体cDNAシークエンス
(Open reading frameのみ掲載)

図3：HCNP前駆体mRNA発現量
totalRNA 20 μg/lane
a;前頭葉 b;海馬 c;線状体
d;小脳 e;脳幹

ラット
マウス

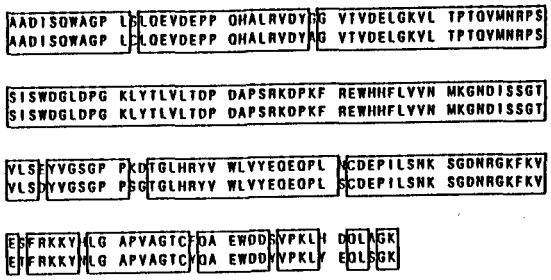
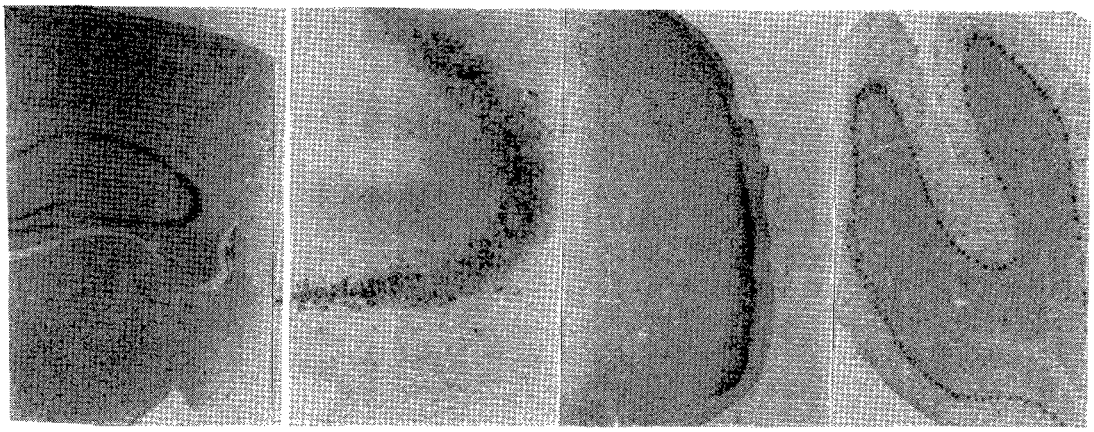


図2：HCNP前駆体蛋白のラット、マウス間の相同性



a b c d

図4：In situ hybridization a) 海馬×15 b) 海馬(CA3)×37.5 c) 梨状葉及び基底核×15
d) 小脳×22.5

＜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) Otsuka, Y. et,al.,(1996), Neurochem Res. 21, 367-376. 4) Tohdoh, N. et al., (1995) Mol. Brain. Res. 30, 381-384 5) Taiji, M. et,al., (1996), J. Neurosci. Res. in press.

129 1E12 Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP) Processing Enzyme の精製

大塚 康史、小鹿 幸生
(名古屋市立大学 医学部 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し(1)、前回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(2)が、今回はさらにイオン交換カラム(DEAE, pH7.6)で精製し、最終精製率は9147.3倍、活性回収率は6%であった。SDS-PAGEでは、80kDaのバンドに酵素活性を認めた。このバンドをchymotrypsinとtrypsinにて限定分解、逆相系HPLCにて分離し各peakをアミノ酸分析したところ、9個の部分アミノ酸配列が判明した。

[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(3)、約21kDaの前駆体蛋白のN末端に位置する(4)。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(5)、HCNPは細胞内でプロセシングされると考えられる。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(1)、本酵素活性の部分精製を試みた(2)。今回は、さらに精製を進め、SDS-PAGEにて確認した後、ChymotrypsinとTrypsinにて限定分解し部分アミノ酸配列を検討した。

[対象および方法]
1) 11日齢Wistar rat (355匹)の海馬組織片を摘出した。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。
2) HCNPプロセシング酵素の活性の測定は、先に述べた方法に従い行った(2)。
3) 蛋白量の測定はBradford法に従い、BSAを標準として行った。
4) 精製は以下の順序にて行った。Step1から4は、先に報告したとおりである(2)。
[Step1]硫安分画：(AS20-50)。
[Step2]ゲル濾過クロマトグラフィー：Protein Pak 300
[Step3]イオン交換クロマトグラフィー：Protein Pak DEAE 5PW(pH6.0)
[Step4]疎水クロマトグラフィー：Protein Pak G-Butyl
[Step5]イオン交換クロマトグラフィー：Step 4の活性画分をcentricon SR3(amicon)にて約10倍に濃縮し、Protein Pak DEAE 5PW(Waters)を用い、A液:3mM KCl、1mM EDTA、1mM DTTを含む20mM Tricine-NaOH緩衝液pH7.6およびB液:A液＋0.5M NaCl緩衝液pH7.6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。
5) Step 5の活性画分をcentricon SR3にて約10倍に濃縮し、1レーンあたり2.2μg蛋白を10% polyacrylamide gel (7×8cm, 0.75mm厚)にて計6レーン電気泳動した。両端のレーンは、0.025% Coomassie brilliant blueにて染色、10%酢酸で脱色した。検出されたバンドに合わせて中央のgelを切り出した後細切し、上記の基質とともに反応させ酵素活性を調べた。
6) 酵素活性を認めたバンドを切り出し、chymotrypsinおよびtrypsin(Boehringer)1.25μgとともに、各々100μlのbuffer(10mM $CaCl_2$を含む100mM Tris-HCl, pH7.8および100mM Tris-HCl, pH8.5)内で室温にて12時間反応後、さらに同量のchymotrypsin、

trypsinを加え12時間反応後、0.1%TFAにて反応を停止した。反応産物は、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、分離されるpeak毎採取しアミノ酸分析装置(ABI 477A/12A, Applied Biosystems)にて分析した。

[結果]

Step 4までの部分精製では、先に報告したように(2) 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。今回さらにpH7.6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。Na^+ 250-313mMの画分に酵素活性を認め、蛋白量は0.11mg、酵素活性は4,600単位であり、最終精製率は9147.3倍、活性回収率は6%であった。この酵素活性画分のSDS-PAGEでは、80kDaのバンドにのみ酵素活性を認めた。このバンドは、chymotrypsinおよびtrypsinの限定分解後、逆相系HPLCにてそれぞれ8および3個の明らかなpeakを認め、アミノ酸分析にて全部で9個の部分アミノ酸配列が判明した。

表1 HCNP processing enzyme の精製

	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 (pH6.0)	90	28.95	131,450	34.8	161
Protein Pak G-Butyl	25	2.13	53,450	472.0	65
Protein Pak DEAE (pH7.6)	5	0.11	4,600	9147.3	6

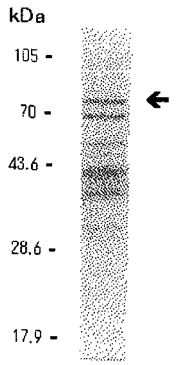


表2 判明した9個の部分アミノ酸配列

VNGEEAVPG
KNENAASF
NKPGVYTK
VFEPGVY
GTSYPDV
FPLFYLE
SGVGIV
QTVSAV
GLTPY

図 最終精製段階のSDS-PAGE
80kDaのバンドに酵素活性を認めた(←)。

[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9147倍まで精製し、SDS-PAGEにて単一バンドにその酵素活性を認めた。さらにchymotrypsinとtrypsinによる限定分解により9個の部分アミノ酸配列が判明した。今後、その構造や作用機序を明らかにしていく予定である。

[文献]

(1)Otsuka, Y., et al. (1996) Neurochem. Res. 21, 369-376 (2)大塚康史 他. (1995) 神経化学. 34(2), 284-285 (3)Ojika, K., et al. (1992) Brain Res. 572, 164-171 (4)Tohdoh, N., et al. (1995) Mol. Brain. Res. 30, 381-384 (5)Ojika, K., et al. (1995) Brain Res. 701, 19-27

130 1Ap8 Deacetylated Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (free HCNP)のNMDA受容体刺激を介する分泌

小鹿幸生、継泰城、大塚康史
(名古屋市立大学 医学部 第二内科)

〔 要約 〕胎齢１７日のラット脳海馬を細片した組織培養系を用いて、海馬組織からのHCNP関連成分の上清への分泌をRIA又はRIAとHPLCを組み合わせた測定系で検討した。培養系に各種transmitterや受容体のagonistおよびantagonistを添加して検討した所、ionotrophic NMDA受容体刺激によるカルシュウム流入に伴って海馬組織からfree HCNPの分泌が認められた。

〔緒言〕 HCNPは培養中隔核コリン作動性神経の分化を促進するN末端がアセチル化された新規ペプチドである(1)(2)。アセチル基を除いたHCNP (free HCNP)もラット組織に存在し(3)、より活性が強いことが知られている(1)。また、HCNPは21 KDの前駆体蛋白のN末端に位置し(4)、特異的processing酵素により前駆体蛋白からcleaveされる(5)。更にHCNP前駆体mRNAの発現は神経細胞に認め、海馬CA3錐体細胞に最も強いことが知られている(6)。今回我々は海馬組織からのHCNPの分泌について培養系を用いて検討したので報告する。

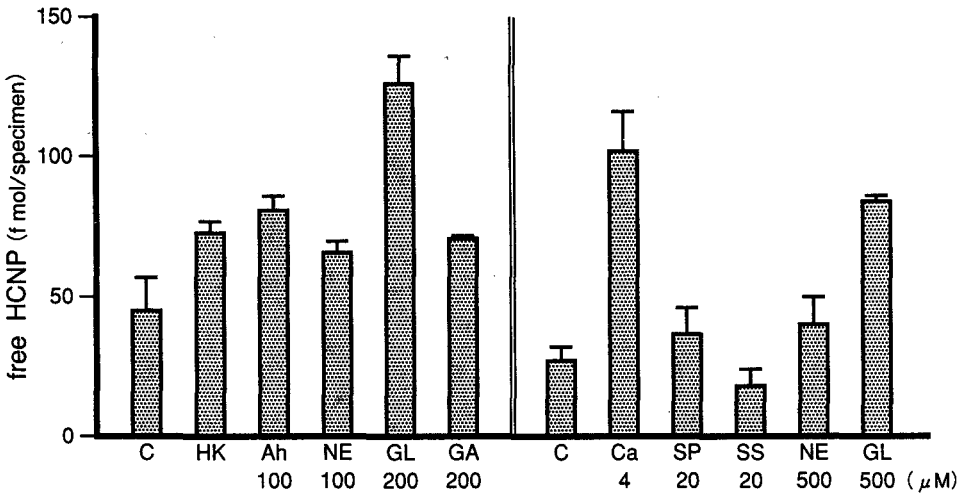
〔方法および結果〕 胎齢17日のWistarラット脳から海馬組織を摘出、細片後 poli-L-Lysineおよび poly-L-Ornithineを塗布した35mm plastic dishesに植え付け、4%のFCSを含むN2培養液で培養した。培養組織をカルシュウムを除去した氷冷Tyrode液(20 mM MES含有、pH7.0)で洗浄後、37℃のTyrode液1mlに各種薬物を添加してincubationを行った。Tyrode液中に分泌されたHCNP関連成分の定量と同定は既報告(3)によるRIAまたはHPLCとRIAを組み合わせた方法に従って実施し、分泌量は培養組織片当たりのanti-HCNP抗体反応産物量fmol/specimenで現わした。

予備実験の結果1)Tyrode液のみよる対照(C)でもHCNP関連成分の非特異的分泌が認められる。2)agonist添加によるHCNP関連成分の特異的分泌は培養３日、６日目では微量であるが、９日目で著明に増大する。3)９日目の培養組織におけるHCNP関連成分の分泌は１５分以上のincubationでは非特異的分泌が増大する。4)非特異的および特異的分泌は共に水素イオン濃度依存性でpH7.0で最大となることが判明したので、測定条件を培養９日目、incubation時間１０分、Tyrode液のpHを7.0とし以下の実験を行った。

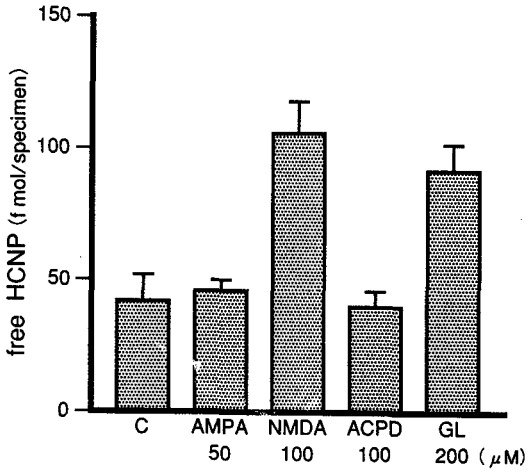
Tyrode液に各種薬物を添加しHCNP関連成分の分泌量をRIA法で測定した所、グルタミン酸(GL)、カルシュムイオノホア(Ca)にて有意な分泌増加($P<0.01$)が認められ、アセチルコリン(Ah)でもその傾向が窺われた($P<0.02$)。しかし、高カリュウム(HK; 55mM)、ノルエピネフリン(NE)、GABA(GA)、サブスタンスＰ(SP)、ソマトスタチン(SS)などでは明らかな増大を認めなっかた（図Ａ）。このグルタミン酸刺激による増大がグルタミン酸受容体の何れを介するかを知る目的で、そのagonistとantagonistを用い検討した。NMDA添加により有意($P<0.01$)な増加が認められたが、AMPAおよびt-ACPD(ACPD)添加では対照と差を認めなっかた(図Ｂ)。また、グルタミン酸添加による分泌増加はAVPで抑制されたが、CNQXでは抑制されなかた(図Ｃ)。分泌されたHCNP関連成分を同定する目的でincubation上清をSep-Pak C18を用い部分精製後、HPLCで分離、各画分をRIAにて測定した。anti-HCNP抗体で反応する成分はfree HCNPと同じ保持時間の画分に含まれていたが、他の画分には検出れなっかた。

〔考察〕 以上の結果から、HCNP関連成分の海馬組織からの分泌は、細胞内へのカルシュムイオンの流入、特にionotrophic NMDA受容体を介するカルシュウム流入に伴って増大するこ

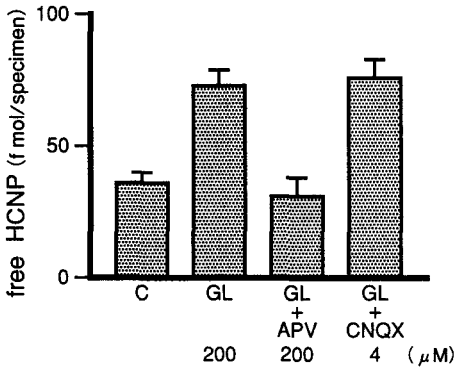
とが示唆された。また、分泌されたHCNP関連成分は生体内活性型のfree HCNPであることが確認された。これらの事実はfree HCNPが生体内で海馬神経細胞のLTP活動に伴って分泌され、逆行性に中隔核からのコリン作動性神経に作用してコリンアセチルトランスフェラーゼ産性を誘導(2)していることを示唆するものと考えられる。



図A：各種transmitterおよびカルシュウムイオノホアの培養海馬組織HCNP分泌に及ぼす影響



図B：グルタミン酸受容体agonistの影響



図C：グルタミン酸受容体antagonistの影響

〔文献〕 (1) Ojika, K. et al, Brain Res. 572: 164-171, 1992, (2) Ojika, K. et al, Dev. Brain Res. 79: 1-9, 1994, (3) Ojika, K. et al, Brain Res. 701: 19-27, 1995, (4) Tohdoh, N. et al, Mol. Brain Res. 30: 381-384, 1995, (5) Otsuka, Y. et al, Neurochemi. Res. 21: 369-376, 1996, (6) Taiji, M. et al, J. Neurosci. Res. 1996 in press

131 培養シュワン細胞におけるGDNFの発現調節

3Aa1

渡部和彦，田中順一，本田英比古*，豊原敬三*，酒井 紀*
（東京慈恵会医科大学・神経病理，*内科第２）

〔 要約 〕

シュワン細胞におけるglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の発現・調節につき，マウス培養系を用いて検討した．RT-PCRによる解析では，生後4-6週齢ICR (CD1)マウス後根神経節組織および同培養短期・長期，不死化 (MS1, IMS32) シュワン細胞株のいずれにおいてもGDNF mRNA の発現を認めた．GDNF mRNAの定量としてcompetitive RT-PCRを行い，また培養上清中のGDNF蛋白量をELISA にて測定した．IMS32細胞におけるGDNF mRNAおよび蛋白発現は，forskolin, staurosporine により減弱し，phorbor 12-myristate 13-acetate (TPA), A23187 により増強した．以上から，シュワン細胞におけるGDNF mRNAおよび蛋白の発現は，protein kinase A, C の双方を介して制御されていると考えられた．

［はじめに］ GDNFはグリア細胞株B49から同定された神経栄養因子であり，中脳ドパミン・ニューロン[1]，脊髄前角運動ニューロン[2]のほか，ノルアドレナリン作動性ニューロン[3]，感覚・自律神経系ニューロン[4]に対しても神経栄養活性を有することが知られている．また，GDNFノックアウト・マウスでは，腎臓・腸管神経系の無形成とともに，感覚・自律神経系の形成不全も報告されている[5]．一方，GDNF mRNAは，培養下ではアストロサイトおよびシュワン細胞が発現している[2,6]．本研究では，培養マウス・シュワン細胞におけるGDNF mRNAおよび蛋白の発現・調節について検討した．

［材料と方法］ 生後4-6週齢ICR (CD-1) マウス後根神経節および同マウス培養短期・長期[7]，不死化 (MS1[8], IMS32[6]) シュワン細胞株からtotal RNAを抽出し，reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) によりGDNF mRNA transcriptsの発現を検討した．薬剤によるGDNF mRNA発現調節をみるために，IMS32細胞を各種薬剤存在下で培養後，total RNAを抽出した．GDNF mRNAの定量として，マウスGDNF cDNA (640 bp)[6] から制限酵素(*Hae* III)切断により160 bp (144-305) 欠失したdeleted cDNA クローンを得，これよりcRNAを合成して，RNA逆転写時にinternal controlとしてRNA sampleに一定量添加し，同一プライマー・セットによるcompetitive RT-PCR (CRT-PCR)を行った．CRT-PCR産物を電気泳動・写真撮影後，densitometric scanを行い定量した．また，培養上清中のGDNF蛋白量をELISA kit (Promega) にて測定した．

［結果と考察］ RT-PCRでは，後根神経節組織および同培養短期・長期，不死化 (MS1, IMS32) シュワン細胞株のいずれにおいてもGDNF mRNA transcriptsの発現を認めた[9]．このGDNF mRNA transcriptsにはpeptide coding region が633 base, 555 base の２種があり，後者はalternative splicing formと考えられ，その発現は前者の1/10程度であった．CRT-PCRによる解析 (Fig. 1.) では，培養短期・長期，不死化 (MS1, IMS32) シュワン細胞におけるGDNF(633) mRNA発現量は，5%牛胎仔血清存在下で，それぞれ 0.9±0.2, 3.5±1.3, 1.5±0.4, 14±3.3 attomole GDNF(633) mRNA/μg total RNAであった．IMS32細胞におけるGDNF(633) mRNA 発現は，dibutyryl cyclic AMP (1 mM), forskolin (10 μM), staurosporine (SS) (100 nM), H7 (20 μM)およびcalphostin C (1 μM) により減弱し，phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) (100 nM), A23187 (1 μM)およびionomycin (1 μM)により増強した (Fig. 2.).

Fig. 1. Quantitative analysis of GDNF mRNA by CRT-PCR.

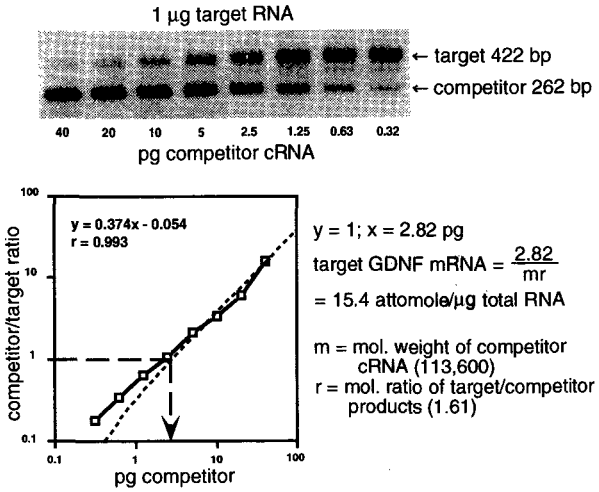


Fig. 2. CRT-PCR for GDNF mRNA in IMS32 cells.

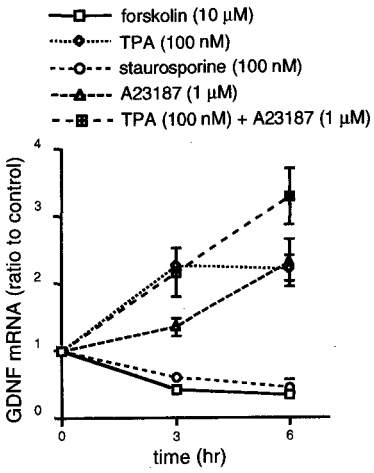


Fig. 3. Half life of GDNF mRNA in IMS32 cells.

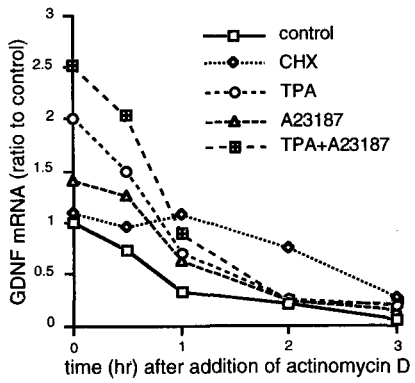
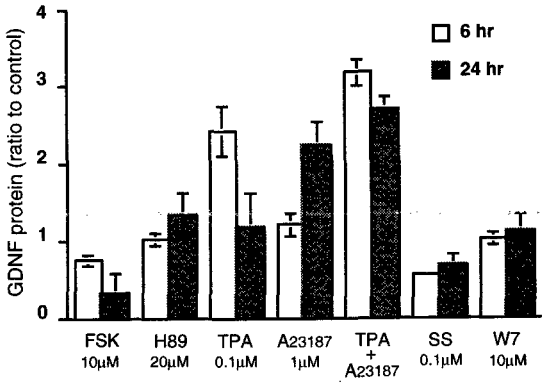


Fig. 4. GDNF ELISA for IMS32 conditioned media.



さらに，これら薬剤を負荷したのち，培養上清をとり，ELISAを行ったところ，GDNF蛋白の産生分泌もCRT-PCRと同様の傾向を認めた (Fig. 4.)．一方，actinomycin Dを負荷後，経時的に処理し，GDNF mRNAの半減期を算出したところ，約0.8時間であった．この半減期はcycloheximide (CHX) の前負荷によって約2.5時間に延長したが，TPA, A23187の前負荷では変化なかった (Fig. 3.)．このことから，TPA, A23187はGDNF mRNA の転写効率を増強し，その半減期には影響を与えないと推測された．以上から，GDNF mRNA および蛋白は培養マウス・シュワン細胞において早いturn overで発現されており，その発現はprotein kinase A, protein kinase C を介して制御されていると考えられた．

［文献］ 1) Lin L-FH, et al. (1993) Science 260:1130-2. 2) Henderson CE, et al. (1994) Science 266:1062-4. 3) Arenas E, et al. (1995) Neuron 15:1465-73. 4) Buj-Bello A, et al. (1995) Neuron 15:821-8. 5) Moore MW, et al. (1996) Nature 382:76-9. 6) Watabe K, et al. (1995) J Neurosci Res 41:279-90. 7) Watabe K, et al. (1994) J Neurosci Res 39:525-34. 8) Watabe K, et al. (1990) J Neuropathol Exp Neurol 49:455-67. 9) Watabe K, et al. (1995) Dev Neurosci 17:195-6.

132 3Aa2 Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) による神経芽細胞腫の分化誘導とc-Retチロシンキナーゼのシグナル伝達について

菱木知郎、近藤和博、二村好憲、一宮慎吾、崎山 樹、中川原 章
(千葉県がんセ・生化学)

〔 要約 〕

神経芽細胞腫は小児の代表的な悪性固形腫瘍であり、神経堤に由来する交感副腎神経系前駆細胞から発生する。これまで我々は、受容体型チロシンキナーゼの本腫瘍における役割に注目し、ニューロトロフィン（NGF, BDNF, NT-3, NT-4）とその受容体（TRK-A, TRK-B, TRK-C, $p75^{LNTR}$）の発現と機能について系統的な解析を行い、TRK-Aのシグナリングが本腫瘍の増殖、分化、細胞死の調節に大きな役割を果たしていることを明らかにしてきた。一方、c-Ret受容体型チロシンキナーゼは、ほとんどの神経芽細胞腫において病期や悪性度とは無関係に発現していることを報告したが、その機能や意義についてはこれまで不明であった。

神経芽細胞腫の一部は、*in vivo* において分化あるいは細胞死を高頻度に起こす。このような腫瘍の間質には多くのシュワン細胞が存在することから、我々は、腫瘍細胞とシュワン細胞との間に何らかのクロストークが存在し得ると仮定し、神経芽細胞腫初代培養細胞および培養細胞株を用いて glial-cell derived neurotrophic factor (GDNF) の効果について検討した。その結果、多くの初代培養細胞がGDNFに反応して分化すること、その反応はレチノイン酸により著しく促進されること、さらに、GDNFに反応する細胞株をGDNF処理するとc-Retのリン酸化は極めて弱いものの、c-Fosの誘導が起こることを見い出したので報告する。

材料と方法：

32例の神経芽細胞腫から得られた新鮮手術摘出標本を用いて腫瘍細胞分画を調製し、type I collagen-coated dishにて初代培養を行った。症例の内訳は、I期15例、II期3例、IV-S期1例、III期3例、IV期10例（うち4例がN-myc増幅）であった。また、22種類の神経芽細胞腫培養細胞株を本実験に使用した。細胞の処理は100 ng/ml rhGDNF、100 ng/ml NGF、5 μM retinoic acid (all-trans) で行った。組織または培養細胞からのRNAの調製はChomczynski-Sacchiの方法で行い、Northern blotに用いた。c-Retのリン酸化は免疫沈降法とWestern解析、および^{32}Pラベリング法を用いた。

結果：

（1）神経芽細胞腫初代培養細胞のGDNFによる分化誘導とレチノイン酸による増強効果

32例の神経芽細胞腫初代培養細胞のうち26例（81%）がGDNFに反応して神経突起を伸展した。腫瘍を非遠隔転移群（A群：I, II, IV-S, III期）と遠隔転移群（B群：IV期）に分けると、A群の方がB群よりもGDNF処理に対してより強く反応した。また、レチノイン酸は単独でも多くのサンプルで分化を誘導したが、A群腫瘍ではGDNFによる分化を著しく増強した（22例中19例、86%）。それに対し、B群腫瘍では、10例中5例でレチノイン酸による分化促進効果が全く見られなかった。一方、NGFによる分化は、これまでに我々が報告したように、A群の22例中21例（95%）で強く誘導され、B群での誘導は弱かった。現在、同一サンプルにおけるc-RetおよびGDNFR-αの発現について検索中である。

（2）神経芽細胞腫培養細胞株におけるGDNFによる分化誘導とc-Retの活性化

22の神経芽細胞腫細胞株についてGDNFの効果を検討したところ、3つの細胞株が明らかな反応を示し、分化が誘導された。また、この分化誘導は5μMレチノイン酸処理により促進された。21の神経芽細胞腫細胞株についてc-Retの発現を調べたところ、11細胞株に高い発現が見られ、10の細胞株では発現が低かった。興味深いことに、GDNFに反応した3つの細胞株のうち2つは必ずしもc-Retの発現は高くなかった。

次に、GDNFに反応する細胞株を用いてc-Retのリン酸化を調べたところ、その程度は非常に低かった。しかし、c-Fosの誘導は明らかに起こっており、しかもレチノイン酸処理によってより強く誘導された。

考察：

我々は以前、神経芽細胞腫においてc-Ret proto-oncogeneが高頻度に発現し、それは病期とは無関係であることを報告した。一方、今回のGDNFの本腫瘍細胞における分化誘導の研究は、上述のように、全く異なる観点から研究を進めていたが、本研究の遂行中にGDNFのレセプターのひとつがc-Retであることが報告され、意外な展開となった。今回の結果から、神経芽細胞腫の初代培養細胞の多くがGDNFに反応し、分化が誘導されたが、予後良好な腫瘍の方が強く反応する傾向が見られた。また、レチノイン酸のGDNFによる分化誘導の促進効果は予後のよい腫瘍で非常に強く見られた。現在、同一サンプルでc-RetおよびGDNFR-αの発現について検討しており、その結果が興味深い。神経芽細胞腫細胞株を用いた検討からは、多くの問題点が提起された。まず、初代培養細胞の多くがGDNFに反応して分化したのに対し、培養細胞株の多くは反応せず、その反応性はc-Ret mRNAの発現量とは一致しなかった。さらに、GDNFに反応する細胞株においてc-Retのリン酸化を検討したが、誘導されたリン酸化は非常に微弱であった。しかしながら、c-Fosの誘導は明らかに起こっており、しかもレチノイン酸処理によって促進されていた。現在、神経芽細胞腫におけるGDNFの分化誘導の機構を知るために、c-Retを含めたシグナル伝達機構について解析中である。

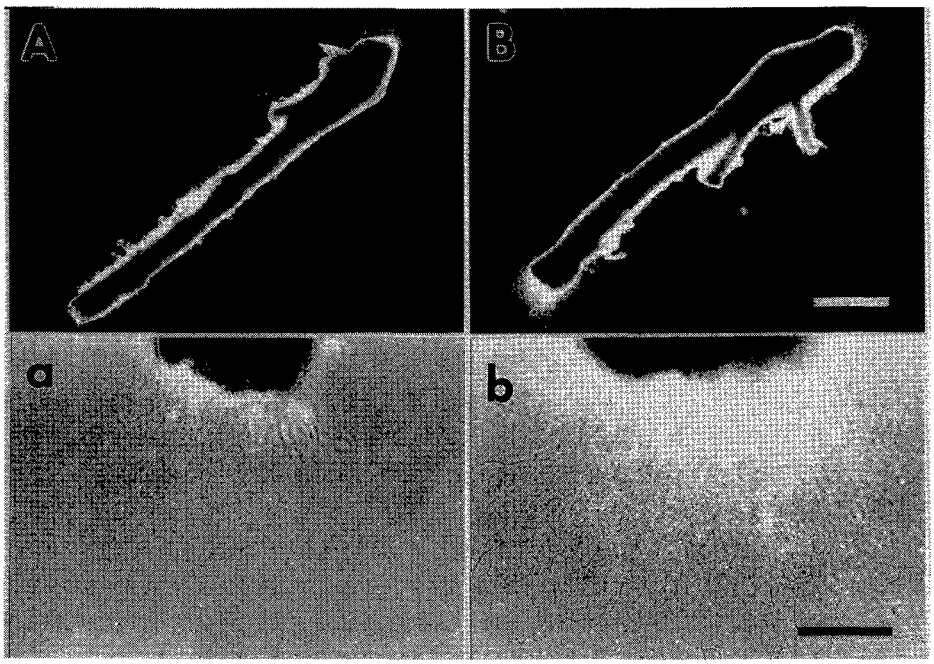
133 1Ap9 新規肝由来神経活性化因子による迷走神経線維束切断端からの神経再生促進作用

堀江秀典[1]、斉藤春洋[2]、築地 淳[2]、佐藤真由美[3]、酒井偉久子[1]、門屋利彦[4]、稲垣好昌[4]、野沢りさ[4]
([1]横浜市大・医・生理、[2]第一内科、[3]眼科、[4]キリンビール医薬探索研究所)

〔要約〕
肝由来神経活性化因子（LDNA）が脊髄後根神経節の神経線維束切断端からの神経再生促進することが明らかにされた。このLDNAの迷走神経線維束切断端からの神経再生に対する効果を検討した。成熟ラットより迷走神経線維束を伴った下神経節を摘出しコラーゲンゲル内で器官培養をおこなった。この神経組織にLDNAを作用させたところ、迷走神経線維束切断端からの神経再生が促進された。LDNAは迷走神経の再生促進因子でもあることが明らかとなった。肝臓内に確認されている迷走神経線維の末梢枝の多くは下神経節内からの感覚神経線維であると考えられており、しかも肝再生時に迷走神経が重要な役割を担っていると指摘されている。肝再生時に肝由来神経活性化因子が分泌され迷走神経再生を促進し、肝再生を増強させている可能性が示唆される。

（目的）
成熟ラットの培養肝細胞培養上清を神経線維束を伴った脊髄後根神経節に作用させると神経線維束切断端からの神経突起再生を促進しその生存維持機能を示した（文１）。ゲル濾過法により上清を分離したところ活性は１０ＫＤ－２０ＫＤのフラクションに見られた。作用機序などよりこの因子は既知因子とは異なる新規の因子と考えられている（文２）。このLDNAが肝臓機能と密接に関係する迷走神経線維における神経再生促進効果を示すかどうかを明らかにし、肝機能と迷走神経との関わり合いについて究明していく。
（方法）
９－１０週齢のWistar ratから迷走神経線維束を伴った左右の下神経節を摘出する。左、右のそれぞれの神経組織を低温下のコラーゲン溶液中に入れ、３７℃に加温しコラーゲンをゲル化する（文３）。無血清培養液中で器官培養を行い活性因子非添加群（図A)と添加群（図B)とを比較検討した。測定は延髄側の中枢線維束切断端及び臓器側の末梢線維束切断端からの再生神経突起数を計測しておこなった。また神経線維束を切除した下神経節をコラーゲナーゼ・トリプシン処理し、単離してポリリジンコートしたディシュ上で無血清培養を行う。８－９週齢の成熟ラットより酵素灌流法にて単離した肝細胞を無血清下で培養し、その培養上清をゲル濾過法にて神経再生促進活性画分を神経線維束を伴った脊髄後根神経節でアッセイし分離した。１０ＫＤ－２０ＫＤの画分に活性が見られた。この画分を上清レベルの１０倍濃度でLDNAとして下神経節の器官培養系、単離神経細胞に対して適用し神経再生に対する効果を検討した。
（結果と考察）
中枢側の神経線維束は下神経節の中心部より約1ｍｍの位置で切断し、末梢側の線維束は２ｍｍから１４ｍｍの間で切断した７対について比較検討した。培養後２４時間以内に中枢側切断端から神経突起再生が観察された。末梢側切断端からもその

長さに関係なく２４時間以内に再生神経突起が観察されたが、再生神経突起数は長さが長くなるに従い減少していった。LDNAの神経再生に対する効果を図Aのコントロールと図BのLDNA添加した例について培養後３日目、５日目、７日目、１４日目について比較検討を行った。神経突起数は５００μm以上の長さの神経突起数を計測した。中枢側ではコントロールでは４本（３日目）、７本（５日目）、２０本（７日目）、２３本（１４日目）であるのに対し、LDNAを作用させた場合それぞれ２９本、７６本、７８本、１０６本であった。末梢側では、コントロールでは、１１本、１６本（図a）、２４本、１１本であるのに対し、LDNAを作用させると８３本、１４０本（図b)、１７９本、２１６本であった。このようにLDNAの作用によって中枢側、末梢側それぞれの切断端からの神経突起再生が促進されることが判明した。同様の効果は他の６例についても見られた。このようにLDNAは迷走神経神経線維束切断端からの著明な神経再生促進効果を示した。LDNAの分離した神経細胞に対する神経突起再生促進効果が確認されないことから、迷走神経を構成するシュワン細胞などを刺激して神経再生促進作用を発現するものと考えられる。



（図）迷走神経線維束を伴う下神経節からの神経再生。A,a：コントロール、B,b：LDNAを加える。a,bは末梢端からの神経突起再生。白いバーは0.5mm，黒いバーは0.1mm。

（文献）

1. Horie,H. et al.: NeuroReport 2, 521-524, 1991.
2. Horie,H., Kadoya,T., et al.: Society for Neuroscience, Abst.21: 34, 1995.
3. Horie,H. and Takano,M. :Tiss. Cul. Res. Commun. 13, 171-178, 1994.

134 培養アストロサイトにおける成長抑制因子の発現調節

3Aa3

内田洋子
(都老人研神経病理)

〔 要約 〕

アストロサイトにおける成長抑制因子(GIF)の発現調節機構を明かにする目的で、IL-1β、bFGF、EGFがGIF発現を誘導もしくは抑制するかどうか、培養アストロサイトを用い、Sandwich ELISAとNorthern blotによって検討した。GIF発現の誘導や抑制は、アストロサイトの分裂増殖やneuroglial interactionとは無関係であった。そして、bFGFとEGFはそれぞれGIF発現を誘導したが、IL-1βは蛋白発現とmRNA発現とで異なった変化を引き起こした。このdiscrepancyは、2相性のGIFmRNA発現調節がされていることに起因すると思われる。

成長抑制因子(GIF)は、神経栄養因子の作用を抑制する蛋白として同定されたが、その後、ヒドロキシラジカルを消去する作用があり、高濃度酸素曝露やsolubleβ1-42毒性から部分的にニューロンを保護することがわかった。また、免疫組織化学的研究から、アルツハイマー病だけではなく、種々の変性疾患の病変部で、ニューロンの脱落と相関して、GIFが減少することもわかっている。そこで、どのような物質が、アストロサイトでのGIF発現を誘導または抑制するのかを培養系を用いて検討した。

[方法]

アストロサイトの培養：2日令のラット大脳からアストロサイト分画を得、10%FBS/MEMで2日間培養し、浮遊細胞を除いた。さらに7日間培養後、150rpmで2時間振とうして浮遊細胞を除き、付着した細胞をトリプシン処理し、subcultureした。その後、細胞がconfluentになった時点でさらに2回subcultureし、培養22日目(22DIV)のconfluentな細胞を実験に使用した。

Sandwich ELISA：ヒトGIFを抗原として作製した単一クローン抗体A9C2(ラットGIFも認識)を固相抗体として用いた。合成ペプチド(ラットGIF51-61)に対する抗体を作製し、IgG分画からFab'を調製し、HRPラベルして、標識抗体として用いた。ラットGIFは、脳抽出液を酸処理し、ゲル濾過、逆相HPLCで精製した。

Northern blot：培養アストロサイトから、mRNAを調製し、ラットGIFcDNAの56-75および360-379をprimerとしてRT-PCRを行い、325bpのcDNA断片を得た。このcDNA断片をpGEM3Zに導入した。これを鋳型にして、GIFcDNAの3'-non-coding regionをPCRで増幅し、得られたcDNA断片をprobeとして用いた。

[結果]

(1) GIF蛋白は静止期と増殖期とで変化しない。

共に24DIVのアストロサイトで、subculture後7日間培養してconfluentになった細胞と、subculture後2日目の増殖中の細胞とで、GIF蛋白量に差はなかった。

(2) GIF蛋白は、アストロサイトをニューロンとcocultureしても変化しない。

Confluent astrocyte 上でE17日令のラット大脳ニューロンを7日間培養した場合と、単独でアストロサイトを培養した場合とで、GIF量に差はなかった。

(3) bFGFとEGFは、添加48時間後に、細胞内GIF蛋白とGIF mRNAを増加させた。

(4) IL-1βは、添加48時間後に、GIF蛋白を増加させたが、GIF mRNAを減少させた。(図1、2)

(5) IL-1βおよびEGF添加によるGIF mRNAの経時変化

IL-1βまたはEGFを添加し、4、8、16、24時間後に細胞を集め、GIF mRNA を定量したところ、IL-1β添加では、4時間後には一旦mRNAが増加し、8時間以降、徐々に減少したのに対し、EGF添加では、mRNAは徐々に増加していった。

[考察]

以上の結果から、以下のことが示唆された。(1)GIF発現の誘導や抑制は、アストロサイトの分裂増殖やneuroglial interactionとは無関係におこっている、(2)アストロサイトでのGIF発現は、cytokineやgrowth factorにより調節されており、bFGFやEGF はGIF発現を誘導する、(3) IL-1βによるGIF発現調節については、蛋白発現とmRNA発現との間にdiscrepancyが認められ、このdiscrepancyは、IL-1βが一過性にmRNAを誘導した後、抑制するという、2相性のmRNA発現調節をすることに起因すると思われる。

[文献]

(1) Uchida Y et al: Neuron, 7: 337-347 (1991)、 (2) Kobayashi H et al: Mol Brain Res, 19: 188-194 (1993)、 (3)内田ら: 神経化学, 33: 184-185 (1994)、
(4) Uchida Y: Biol Signals, 3: 211-215 (1994)

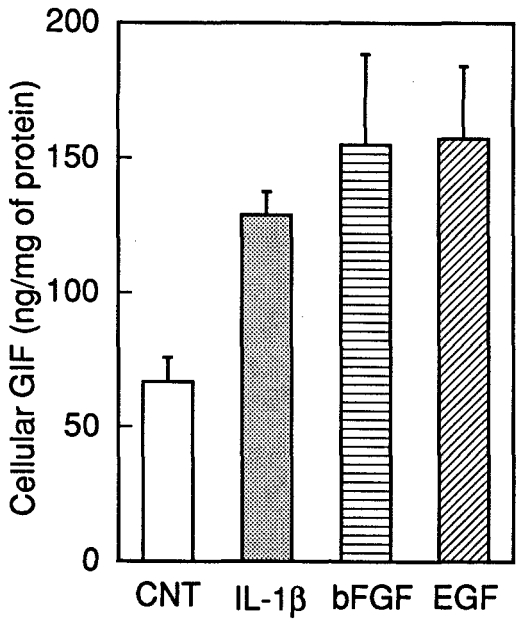


図1. IL-1β、bFGF、EGF添加48時間後の培養アストロサイト中のGIF蛋白

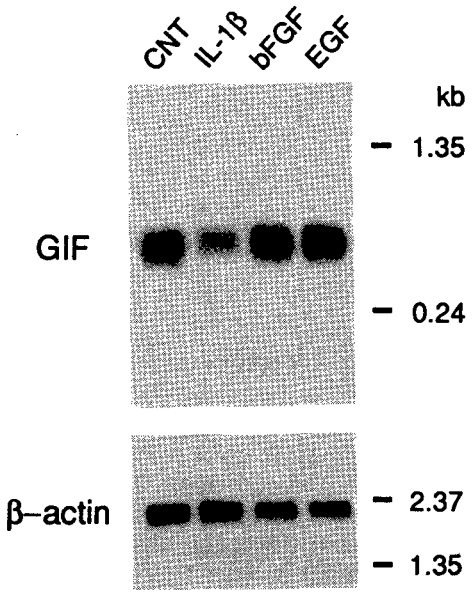


図2. IL-1β、bFGF、EGF添加48時間後のGIF mRNA

135 コロニー刺激因子および上皮増殖因子の培養神経細胞に対する保護効果

1E13

彭 輝、田中潤也*、藤田弘子、阪中雅広、前田信治*
（愛媛大学医学部第二生理学教室*・第二解剖学教室）

〔 要約 〕
ラット胎仔大脳皮質より分離培養した神経細胞に塩化第二鉄とアスコルビン酸を投与し、ヒドロキシラジカルによる傷害を与えた際、顆粒球/マクロファージ-コロニー刺激因子(GMCSF)、マクロファージ-コロニー刺激因子(MCSF)、インターロイキン3(IL3)および上皮増殖因子(EGF)が神経細胞の生存に与える影響について検討した。神経細胞保護効果は、同一細胞数をまいたウエルにヒドロキシラジカルを発生させ細胞傷害を与えた後、蛋白質サンプルを調製、電気泳動し、神経特異蛋白質MAP2の残存量をウエスタンブロットで決定することにより判定した。EGFの保護作用は特に著明であり、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)と同程度の効果を示した。GMCSF、MCSF、IL3の作用は、EGFに劣るものの、毛様体神経栄養因子(CNTF)と同程度の保護効果を認めた。今回の細胞保護効果をウエスタンブロットにより定量的に検討する方法は、従来の形態学的計測法に比べ、客観性に優れ、また簡便であった。

[緒言]
神経系においては、神経栄養因子様活性を有する物質が神経細胞の生存維持、突起伸長促進に関与している。また、脳虚血やや変性疾患による神経障害の際には、さらに多種の神経栄養因子様活性物質が主にグリア細胞より放出されて、神経細胞の生存維持やアストロサイトの増殖、マイクログリアの活性化に働いているものと考えられる[1]。今回我々は、ラジカルによる傷害を培養神経細胞に与えた際に、コロニー刺激因子（GMCSF、MCSF、IL3）およびEGFの神経細胞保護作用について検討した。

[実験材料と方法]
サイトカインと成長因子類：GMCSF、IL3、MCSFはマウス、EGF、bFGFはヒト組み換え体を使用した。**神経細胞の培養と鉄イオンによる細胞傷害**：ラット妊娠17日齢胎仔大脳皮質より神経細胞を分離、ポリリジンコートした24 wellプレートにて、10%牛胎児血清を含むDMEM中で24時間培養した。各wellには同数の細胞をまいた。その後、培養液半量を2nMのサイトカインまたは成長因子ならびにプロゲステロン、インスリン、トランスフェリン等を含む無血清培地に置き換えた。計72時間培養後、10μMの塩化第二鉄と1 mMのアスコルビン酸を培地中に添加し、4時間インキュベートし、ヒドロキシラジカルを発生させ神経細胞に傷害を与えた。**ウエスタンブロット**：細胞傷害を与えたあと、Laemmliのサンプル溶液中で細胞を溶解、サンプルを電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。抗MAP2抗体およびアルカリフォスファターゼ標識第二抗体によりMAP2のバンドを免疫染色し、その量をデンシトメーターを用いて定量した。[2]。**形態観察**：細胞傷害後、細胞を固定し位相差顕微鏡により観察または写真撮影をおこなった。

[結果と考察]
虚血性または外傷性脳傷害の際、フリーラジカルが発生し、神経細胞傷害を生じるとされている[3]。ラジカルの細胞傷害作用に対し、種々のサイトカインまたは成長因子が神経細胞保護作用を発揮するかどうかについて、検討をおこなった。図1は、本研究結果を形態学的に示したものである。対照（図1A）に比べ、塩化第二鉄とアスコルビン酸投与時（図1B）には生存する神経細胞が著しく減少することを示している。しかし、GMCSF（図1C）または、EGF（図1D）存在下では生存している細胞数および神経突起の数が明らかに増加していた。従来このような形態学的観察から細胞保護効果を推し量る方法がしばしば行われてきた[4,5]。我々は、より客観性と定量性に優れた方法として、well中の細胞を溶解後MAP2のウエスタンブロットを行い、各種サイトカイン、成長因子の神経細胞保護効果を比較検討した。図2は代表的なウエスタンブロットの結果を示す。デンシトメトリーにてバンドの濃さおよび面積を測定し、5回の実験より図3のグラフを得た。その結果、bFGFとEGFの保護効果は著しく高く、鉄イオンとアスコルビン酸を投与しない対照と有意差のないレベルまで細胞を維持していた。GMCSF、MCSF、IL3はbFGF、EGFには劣るものの、神経細胞保護効果が広く認められているCNTFと同程度の保

護作用を示した。今回の結果は、脳虚血等の際発生するフリーラジカルに対し、アストロサイトまたはマイクログリアにより産生される因子が神経細胞保護作用を発揮することを示している。EGFの生理的意義については今後の検討が必要である。

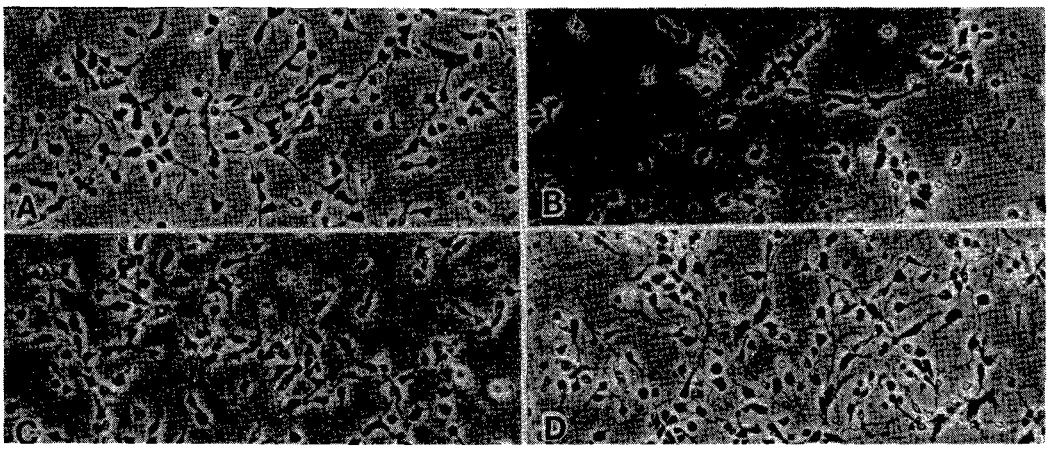


図1
塩化第二鉄とアスコルビン酸による神経細胞障害とGMCSFおよびEGFによる保護効果を位相差顕微鏡写真により示したもの。Aは対照、突起を伸長した多数の大脳皮質ニューロンがみられる。Bは、サイトカインや成長因子非存在下に細胞障害を与えたもの。ほとんどの細胞が死滅している。C、Dはそれぞれ、1nMのGMCSF、EGF存在下に細胞障害を与えたもの。多くのニューロンが生存している。

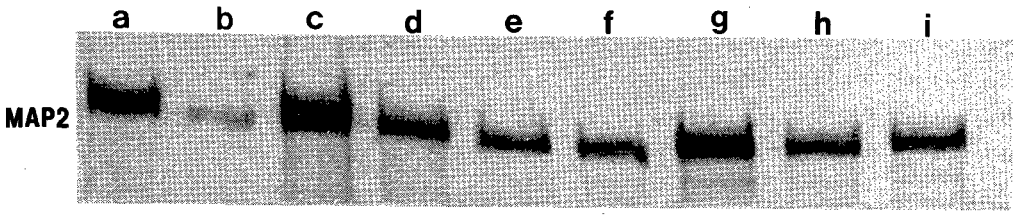


図2
サイトカイン・成長因子類の神経細胞保護効果を示すMAP2のウエスタンブロットの典型例。レーンa、b、c、d、e、f、g、hは、正常対照、サイトカイン等非存在下で細胞障害を与えた結果、bFGF、GMCSF、MCSF、IL3、EGF、CNTF存在下で細胞障害を与えた結果をそれぞれ示す。

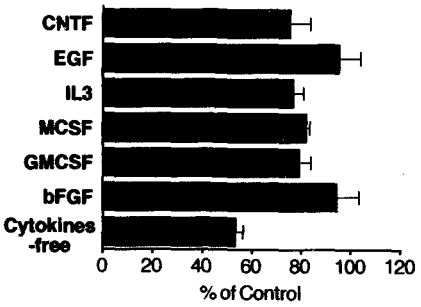


図3
ウエスタンブロットにより得た、MAP2のバンドをデンシトメーターにより解析し、正常対照との比較を行ったもの。データは平均±標準誤差（n＝5）。サイトカインまたは成長因子類存在下でのMAP2残存量は、これらを含まないもの（Cytokines-free)比べ有意に多かった（$p<0.01$; ANOVA, Fischer's PLSD)。

[参考文献]

[1] Lindvall, O. et al. (1994) Trends Neurosci., 17:490-496. [2] Tanaka, J. and Sobue, K. (1994) J. Neurosci., 14:1038-1052. [3] Cao, W. et al. (1988) Neurosci. Lett., 88:233-238. [4] Zhang, Y. et al., (1993) J. Cereb. Blood Flow Met.ab., 13:378-388. [5] Kotani, Y. et al. (1996) J. Neurochem., 66:2197-2200.

136 ニューロトロフィンによるラット培養ミクログリアの機能調節

3Aa4

菊地 義明、中嶋 一行、本田 静世、石川 正洋、高坂 新一
(国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部)

〔 要約 〕

ミクログリアの脳内における活性化の調節に関与する候補因子のひとつとしてニューロトロフィン(NGF, BDNF, NT-3, NT-4)を取り上げ、その作用を検討した。ニューロトロフィンは、ミクログリアの産生するプラスミノーゲン(PGn)およびウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーター(uPA)の産生量を顕著に促進する活性を示した。ミクログリアがこれらの特異的レセプターを発現している可能性を検討するため、RT-PCRによる解析を行った結果、trkA, trkB, trkCおよびp75 mRNAの発現が認められた。また免疫細胞化学的検討においても、ミクログリアに各々のレセプターの発現が見られた。これらのことは、ミクログリアの活性化において、ニューロトロフィンが重要な役割を担っていることを示唆するものと考えられる。

ミクログリアは、脳が損傷を受けたり疾患に陥った場合、反応性に活性化し、神経栄養因子や細胞障害性因子など様々な生理活性物質を産生し、周囲のニューロン、グリア細胞の活動に大きな影響を与え得ると考えられる(1)。ミクログリアの産生する因子については報告がなされているが、ミクログリアの活性化に関する情報は少ないのが現状である。そこで我々は、このようなミクログリアの機能を解明する目的で生理的なミクログリア活性化調節因子の探索を行っており、そのひとつとして、ニューロトロフィンを取り上げた。ニューロトロフィンは、ニューロンで産生されているほかグリア細胞でも産生されているが、それらのグリア細胞に対する作用は不明であった。今回は、ニューロトロフィンのミクログリアへの作用を検討したので報告する。

[方法]

ミクログリアの培養とPGnおよびuPAの検出

ミクログリアは、ラット新生仔脳より既報(2)の方法に従い、12well plateに約2X10^{5}個/wellの密度で細胞を播種した。無血清のDMEM培地で十分洗浄しウエル当たり1mlの同培地で培養した。各濃度のニューロトロフィンで24時間刺激後、培地中のPGnおよびuPAを測定した。 PGnはWestern Blotting、uPAはzymographyにより検討した。

RT-PCRによるtrkファミリー発現の検討

AGPC法により抽出した全RNAよりcDNAを合成し、常法に従いPCRを用いてtrkファミリーmRNAの発現を検討した。得られたPCR産物は、蛍光イメージアナライザーで解析し、制限酵素処理・PCR-Southern blotting・DNAシークエンスを検討することにより確認した。

免疫細胞化学的検討

TrkA, TrkB, TrkCのペプチドに対する抗体はSanta Cruz社より購入した。培養ミクログリアをカバースリップ上に播き、3.7% フォルマリンで固定後、0.5% のNP40で処理し、常法に従い免疫染色を行った。

[結果]

ラット新生仔脳の初代培養系より分離・培養したミクログリアをNGFで24時間刺激すると、培養上清中のPGnおよびuPAの産生が促進された(図1)。他のニューロトロフィン(BDNF, NT-3, NT-4)も同様の活性を示した。また、これらの産生は培養時間(12, 24, 36 時間)にも依存性であった。このニューロト

ロフィンが示す反応はTGFβやCNTFでは見られなかった。また分泌性物質のみならず、ミクログリアの特徴的な酵素の一つである酸フォスファターゼ活性にも影響を与えた。これらの結果から、培養ミクログリアにおいて、ニューロトロフィンの特異的レセプターを発現している可能性が強く示唆された。そこで、まずRT-PCRを用い、培養ミクログリアがTrkファミリーのmRNAを発現しているかについて検討した。その結果、高親和性受容体(TrkA, TrkB, TrkC)および低親和性受容体p75の発現が確認された(図2)。trkB mRNAについては、Full length formのみでなく２種類のTruncated formも発現していた。次に各Trkが蛋白質レベルで培養ミクログリアに発現しているかどうか免疫細胞化学的に検討した。その結果、各Trkレセプターをミクログリア細胞膜上に確認した。

[考察]

従来ニューロトロフィンは、様々な中枢および末梢ニューロンに対する作用が検討され、分化・生存維持への関与が明らかにされている。しかし、これまでニューロトロフィンのグリア細胞に対する作用はあまり知られていない。今回ミクログリアに対し分泌性物質であるPGnやuPAの産生に与える影響を検討したところ、0-100ng/mlの刺激で数倍その産生を促進することを示した。また細胞内酵素である酸フォスファターゼ活性は、刺激により上昇する傾向を示した。このようなニューロトロフィンのミクログリアに対する作用はこれまで知られていなかったものであり、ミクログリア活性化の調節因子の一つになりうると推測された。この可能性は、ミクログリアがTrkA, TrkB, TrkC, およびp75を発現していることからも支持された。以上の培養ミクログリアを使用した結果から、ある状況下においては、ミクログリアがTrksの発現を増加し、周囲(ニューロン、アストロサイト)または自己の産生するニューロトロフィンに反応し、細胞の代謝系、分泌物質の産生を調節すると推測される。

[文献]

(1)Nakajima, K. and Kohsaka, S. Neurosci. Res. 17, 187-203(1993)

(2)Nakajima, K., Hamanoue, M., Simojo, M. et al. : Biomd. Res., 10 (S3) , 411-423(1989)

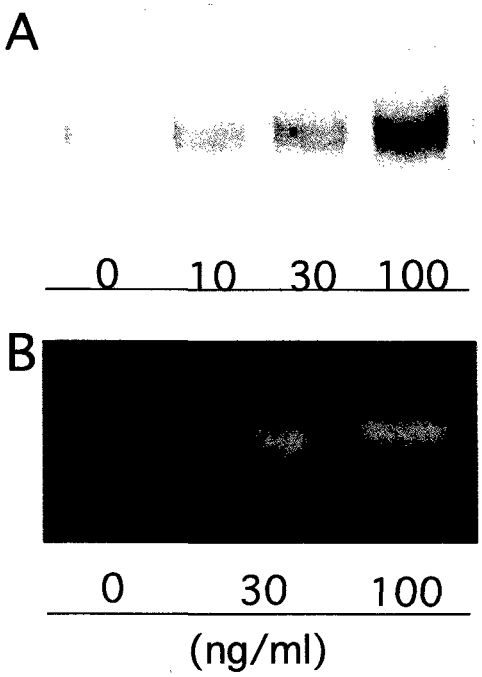


図1. NGFのPGnおよびuPAへの影響
A : PGn (Western blotting), B: uPA (zymography)

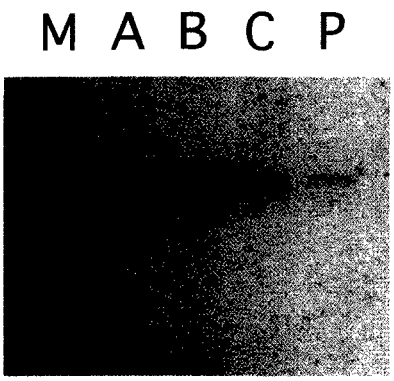


図２. ミクログリアにおけるtrks mRNA の発現
(RT-PCR)
M : Marker, A:trkA, B:trkB, C:trkC, P:p75

137 aFGFと視床下部－下垂体－副腎系および交感神経系の関連

3Aa5

大村 裕[1]， 松本逸郎[2]， 佐々木和男[3]， 新島 旭[4]

（日本臓器製薬㈱生物活性科学研[1]，長崎大学医[2]，富山大学工[3]，新潟大学医[4]）

ラットにaFGFをicv投与すると量反応的に血中コルチコステロン(CS)およびアドレナリン(Ad)が増加する。icv 投与でのCS及びAd増加は室傍核に作用してCRF 放出によるが、iv投与での増加は血液脳関門を欠く下垂体に作用してACTH放出による。iv投与によるAd放出は、肝門脈の求心性迷走神経終末に作用して、反射的に交感神経を活動させることによる。また脾臓、褐色脂肪組織などへの交感神経も活性化される。こうしてaFGFは視床下部－下垂体－副腎系および交感神経系を活性化し、免疫、エネルギー代謝などに関与する。

〔緒言〕摂食で上衣細胞から放出のaFGFはCSF中に0.7pMから15分後0.7nM，45分で7.5nMと増加し、摂食中枢で摂食抑制し海馬で学習・記憶を促進する。aFGFはまた室傍核ニューロンが取り込むのでaFGFと視床下部－下垂体－副腎系と交感神経系との関係につき検討した。

〔方法〕血漿CSとAd測定にはウィスター系雄性ラット(約-350g)を用い、第3脳室と右心房内に留置したカニューレを通しaFGFは脳室内あるいは静注で投与した。肝臓、副腎、脾臓など交感神経活動はウレタン麻酔下で調べた。

〔結果〕1-10ng aFGF icv 投与(0.23-2.3nM，CSF300μlとして)で1時間後にCSは10μg/100 mlからそれぞれ23および28μg/100ml に、Adは1.4 および1.8ng/mlに用量－反応的に増加した。同量のiv投与(6.3-63pM,血液11mlとして)で両者はicv 投与の0.5および0.7倍増加した。抗CRF 抗体のicv 前投与で、CS増加はａFGF icv 投与で有意に62%の、iv投与で有意でない30%の抑制であった。同様にAd増加は、aFGF icv投与で約20%の、iv投与で約60%の減少であった。室傍核CRF ニューロン60個中60%はaFGFで活動上昇し、13%は抑制されたので同ニューロンの大部分はaFGFによりCRFを放出すると考えられる（図1）。aFGF iv 投与で副腎交感神経活動は増加するが求心性迷走神経肝臓枝の切断でこれは抑制される（図2）。Ad増加もこの切断で40%に減少する。aFGFのiv投与で血中ACTHは図3のように著明に増加し、CSも増加するのでaFGFは下垂体を活性化している。

〔考察〕icv 投与aFGFや図4に示す上衣細胞から遊離したaFGFは中枢性に室傍核に作用しCRF 放出→下垂体ACTH分泌→CS放出となる。また室傍核の活動上昇は交感神経活動を上昇させる。一方図5のようにiv投与aFGFは下垂体に作用→ACTH分泌→CS分泌に働き、肝門脈に入って求心性迷走神経活動を促進させこれが孤束核に働きこれから交感神経系(IML) を活動させる。これにより副腎のAd分泌促進、脾臓NK細胞活性抑制、褐色脂肪組織熱産生促進となる。またAdによる生体エネルギー代謝促進が起こる。こうしてaFGFは多彩な生理作用を発揮する。

図1.ラット室傍核スライス標本。
A:aFGFの灌流液中への投与によりCRF ニューロンの活動上昇。 B: 別のニューロン。活動上昇後の一時的抑制。

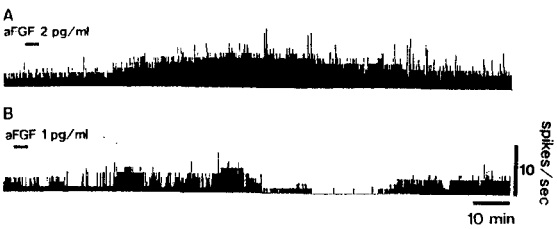


図2.遠心性副腎交感神経活動、in vivo 標本aFGF iv 投与で活動上昇（上）。肝迷走神経切断でこの効果は消失（下）。

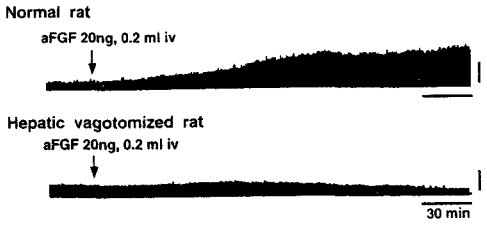


図3.10ng aFGF iv投与による血中ACTH（■）、CS（●）増加。□、リンガー液投与。

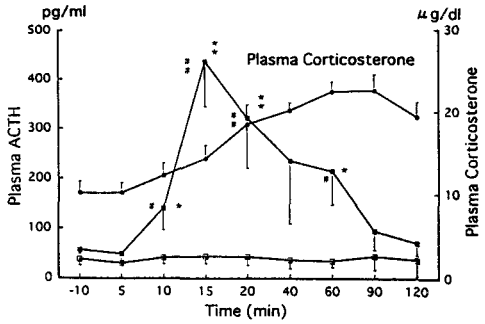


図4.icv aFGF投与の室傍核－下垂体－副腎系及び交感神経系への効果。摂食中枢(LHA)に作用して摂食抑制。海馬(Hippocampus) 及び内側中隔(Med. Septum) に作用して学習・記憶促進。図では上衣細胞から放出されたaFGFの作用としている。

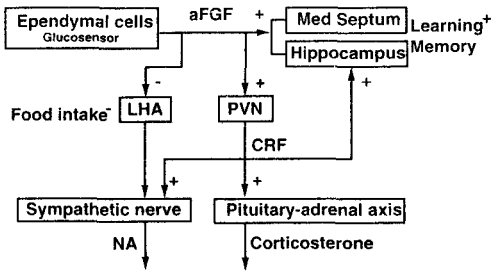
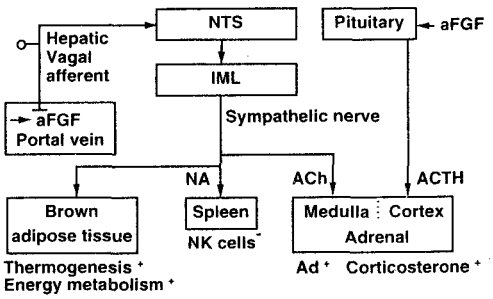


図5 iv投与aFGFの下垂体－副腎系および交感神経系への効果。aFGFは血液脳関門のない下垂体に作用してACTHを分泌。また、門脈にある求心性迷走神経終末に作用→孤束核(NTS) →交感神経下位中枢(IML、中間外側細胞柱）に作用して交感神経を活動させる。



138 前脳基底部における酸性線維芽細胞成長因子の分布 ーラットおよびヒト剖検脳における検討ー

3Aa6

遠山育夫、相見良成、安原治、郭力達、鹿毛眞人、PL McGeer*、木村宏
（滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター；*British Columbia大学精神科）

〔要約〕
ラットおよびヒト剖検脳を用いて、前脳基底部における酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）陽性ニューロンの分布を免疫組織化学法で検討した。ラット脳およびヒト剖検脳いずれにおいても、中隔、ブローカの対角帯および無名質にaFGF陽性ニューロンを多数観察した。aFGF陽性ニューロンは、ブローカの対角帯の水平腕から無名質にかけて比較的高密度に分布していた。コリンアセチル基転移酵素（ChAT）との免疫二重染色により、これらの領域では、多くのコリン神経にaFGFが共存していることが明らかになった。

前脳基底部から大脳皮質・海馬に神経投射するコリン神経は、学習や記憶の神経回路網として知られ、アルツハイマー病で強く障害される。我々は、これまでアルツハイマー患者剖検脳の大脳皮質で、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）が著増することを見出し報告してきた（1, 2)。しかしながら、前脳基底部におけるaFGFについては、これまで詳細な検討はなされていない。そこで本研究では、ラット脳およびヒト剖検脳を用いて、前脳基底部におけるaFGFの分布について検討した。

[方法]

Wistar系雄性ラット（250-300 g）およびカナダ国ブリティッシュコロンビア大学から供与を受けた神経系に障害のない患者４例（年齢：65 ± 8.9歳、男性２例、女性２例）の剖検脳について検索した。ラットは深麻酔下に生食加燐酸緩衝液で脱血後、4%パラホルムアルデヒドと0.35%のグルタールアルデヒドを含む固定液で灌流固定し、脳を摘出した。ヒト脳は、剖検時に中隔、無名質等を含む領域を切り出し、４８時間浸潤固定した。15%蔗糖加燐酸緩衝液に２日以上浸漬後、クリオスッタトで20 μmの連続切片を作製し、aFGFの免疫組織化学に供した。一部の切片は、既報の方法に従って（3）、コリンアセチル基転移酵素（ChAT；AB143、ケミコン社）との免疫二重染色を行った。aFGFの抗体は、ウサギポリクローナル抗体（R521；滋賀医大)およびマウスモノクローナル（AF114、和光純薬; clone 676、滋賀医大）を用いた。抗体の作製方法および特異性についてはすでに報告されているので省略する（4、５）。

[結果と考察]

ラットにおける分布図を図１に、免疫染色の結果を図２に示した。ラット脳およびヒト剖検脳いずれにおいても、中隔、ブローカの対角帯および無名質にaFGF陽性ニューロンを多数観察した（図１、図２)。aFGF陽性ニューロンは、ブローカの対角帯の水平腕から無名質にかけて比較的高密度に分布していた（図１）。コリンアセチル基転移酵素（ChAT）との免疫二重染色により、これらの領域では、多くのコリン神経にaFGFが共存していることが明らかになった。

最近、老化促進マウスにおいてaFGFが前脳基底部のコリン神経に対し、栄養因子様作用を示すことが報告された（6)。ラットおよびヒト脳の前脳基底部のコリン神経にaFGFが共存していることから、aFGFはautocrineあるいはparacrineなどのメカニズムによって、前脳基底部のコリン神経の機能維持に重要な役割を果たしていることが推測される。

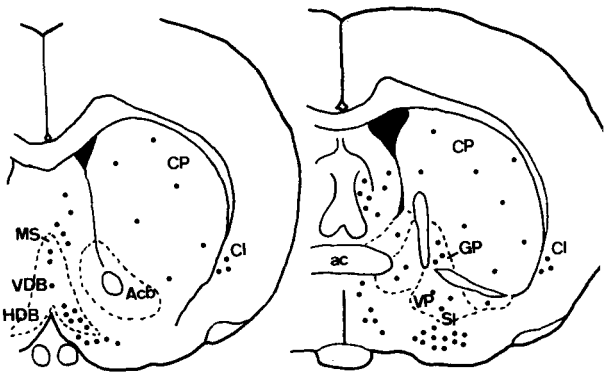


図1．ラット脳におけるaFGF陽性ニューロン
ac: anterior commissure
Acb: Accumbens
Cl: Claustrum, CP: Caudate putamen
GP: Globus pallidus
HDB, VDB: Diagonal band of Broca, horizontal limb, ventral limb
MS: Medial septal nucleus
SI: Substantia innominata
VP: Ventral pallidum

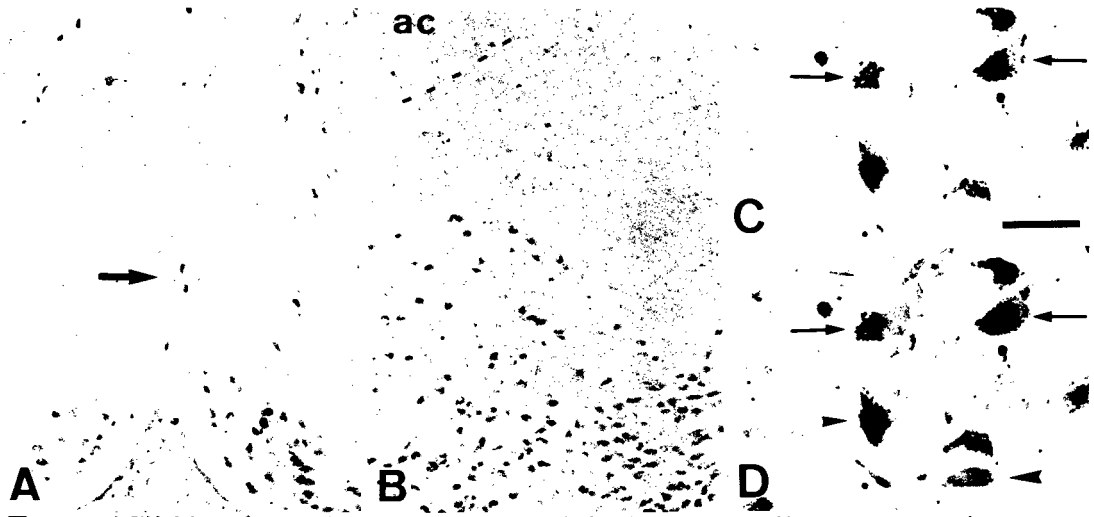


図2．ラット脳(A)およびヒト剖検脳(B-D)におけるaFGF免疫染色。A: aFGF陽性ニューロンは、ブローカの対角帯の水平腕に比べ垂直腕（矢印）で、数、免疫活性ともに減弱している。B: ヒト剖検脳マイネルト核におけるaFGF免疫染色。acは、前交連。C: ヒト剖検脳マイネルト核におけるaFGF陽性ニューロンの拡大写真。aFGFは細胞質内に顆粒状に存在している。D: Cと同一切片をChATで二重染色。aFGFは紫、ChATは茶色に染色されているが、白黒写真上ではaFGFは顆粒状に、ChATは瀰漫性染色として認められる。矢印は、aFGFとChATで二重染色されている。矢頭大は、ChAT単染色の、矢頭小は、aFGF単染色のニューロン。(学会では、カラー写真を提示）。Bar = 125 μm in A, 250 μm in B, and 50 μm in C and D。

[文献]

1) I Tooyama, H Akiyama et al., Nurosci Lett 121: 155-158, 1991.
2) O Yasuhara, I Tooyama et al., Dementia 2: 64-70, 1991.
3) I Tooyama, H Abe et al.: Proc Natl Acad Sci 90: 9635-9639, 1993.
4) I Tooyama, Y Hara et al.: Neuroscience 40: 769-779, 1991.
5) Y Ichimori et al.: Biochem Biophys Res Comm 175: 291-287, 1991.
6) Y Oomura et al.: The SAM Model of Senescence (eds by T Takeda), Elsevier, 1994, p415-417.

139 培養シュワン細胞におけるLIF-mRNAの発現調節機構の解析

1E14

中根 麻子、松岡 一郎、栗原 堅三
(北海道大学・薬・薬剤学)

〔要約〕

シュワン細胞におけるTGF-β1の白血病阻害因子(leukemia inhibitory factor; LIF)発現誘導作用に対する、神経細胞との共培養の効果を検討した。ラット新生児由来の培養シュワン細胞に、TGF-β1(1 ng/ml、4.5 hr)を作用させるとLIF-mRNA発現レベルは5−7倍に上昇した。シュワン細胞と後根神経節由来の知覚神経細胞(DRGニューロン)との共培養を行ったところ、TGF-β1によるLIF-mRNA発現誘導は、共培養の日数(2-7日)に依存して抑制された。また、共培養中にアスコルビン酸を作用させると、TGF-β1によるLIF発現誘導はさらに抑制された。これらの結果から、シュワン細胞におけるLIF-mRNAの発現能は、ミエリン形成に関連した神経細胞との相互作用により、抑制性の調節を受けることが示唆された。

[目的]

末梢神経系のグリア細胞であるシュワン細胞は、神経細胞に種々の神経栄養因子を供給して、神経の分化成熟、生存維持等に重要な役割を果たす。末梢神経の傷害時には、これらの神経栄養因子の発現レベルが変動することから、傷害修復、神経再生におけるシュワン細胞の役割が示唆されている(1,2,3)。最近、坐骨神経や後根神経節において、傷害によりLIFの発現が誘導されることが報告された(4)。LIFは神経系においては、コリン作動性分化因子として知られ、また知覚神経や運動神経細胞の分化成熟や生存維持に作用する多機能なニューロカインであるが、その発現組織・細胞や発現調節の機構については不明の点が多い。これまでに我々は、末梢神経傷害時に増加する種々の因子の作用を検討し、TGF-β1が、培養下のシュワン細胞に対して顕著なLIF-mRNA誘導能をもつことを明らかにした。本研究では、末梢神経の傷害・再生時のモデルとして、シュワン細胞とDRGニューロンとの共培養系を用いて、神経細胞がシュワン細胞のLIF発現能に与える影響を検討した。

[方法]

シュワン細胞の単離:既報(2)に従って、生後2−3日目のラットの坐骨神経より、ほぼ純粋な培養シュワン細胞を得た。DRGニューロンの単離とシュワン細胞との共培養:定法(5)に従って、胎生17日目のラット後根神経節より細胞を単離し、35 mm培養皿あたり、35−40個の神経節に相当する細胞を加えて、40 ng/ml マウスβNGF、10%ウシ胎仔血清を含むMEM培地を用いて培養を開始した。Ara-C処理によりシュワン細胞を含む非神経細胞を除き、6日後にほぼ純粋なDRGニューロンを得た。共培養としては、このDRGニューロンに、上の方法で得たシュワン細胞(0.4×10^6 cells / dish)を加え、2日-7日培養したものを用いた。mRNA定量:各種因子による刺激後、細胞から全RNAを抽出し、ノーザンブロッティング法およびRT-PCR法を用いてLIF-mRNA量を定量比較した。

[結果及び考察]

DRGニューロンとの共培養を開始して2日目のシュワン細胞は、シュワン細胞のみの単独培

養と比較して、非刺激時、TGF-β1 刺激時の LIF-mRNA 発現レベルはあまり変化しなかった。しかし、共培養開始後 7 日目においては(図 1.)、TGF-β1 刺激による LIF 発現はシュワン細胞単独培養に比べて顕著に減少した。また、ミエリン形成を促進することが知られる(6)アスコルビン酸(50 μg/ml) を共培養開始時より添加しておいた場合には、TGF-β1 の LIF 誘導作用はさらに抑制された。これらの結果から、シュワン細胞は、神経細胞との接触、あるいは神経細胞からの液性因子等の作用により、LIF-mRNA の発現能に対して抑制性の調節を受けることが示された。さらにアスコルビン酸の抑制促進効果は、ミエリン形成が LIF 発現抑制に関与することを強く示唆している。

末梢神経傷害時に神経細胞と正常な相互作用を失ったシュワン細胞は、傷害因子と考えられる TGF-β1 の作用により LIF を発現する。この LIF は、神経に対して生存維持あるいは再生促進等の作用を示すと考えられる。その後、神経の再生が進みシュワン細胞と神経細胞の相互作用が回復することによって、LIF 発現は抑制され、その役割を終えると考えられる。

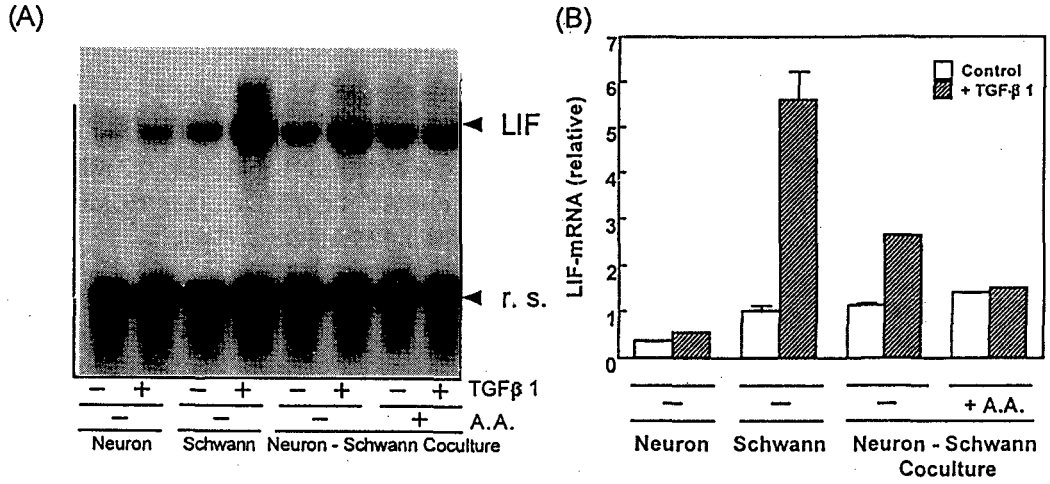


図 1. LIF-mRNA 発現における TGF-β1 の作用

DRG ニューロン、シュワン細胞、および DRG ニューロンーシュワン細胞共培養系を± 50 μg/ml Ascorbic Acid (+A.A.)存在下で 7 日間培養し、1 ng/ml TGF-β1 で 4.5 hr 刺激した。全 RNA 抽出後、ノーザンブロッティングをおこない(A)、定量化した(B)。

[参考文献]

(1) Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C. and Thoenen, H. (1987) *J. Cell Biol.* 104, 1623-1031

(2) Matsuoka, I., Meyer, M., and Thoenen, H. (1991) *J. Neurosci.* 11, 3165-3177

(3) Meyer, M., Matsuoka, I., Wetmore,C., Olson, L. and Thoenen, H. (1992) *J. Cell Biol.* 119, 45-54

(4) Banner, L. R. and Patterson, P. H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7109-7113

(5)福田 潤. (1990) 神経生化学マニュアル(実験医学別冊), 111-123

(6) Eldridge, C. F., Bunge, M. B., Bunge, R. P. and Wood, P. M. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 1023-1034

140 1E15 カイニン酸傷害脳に対するestrogenの影響

○新郷明子、鬼頭昭三、仙波純一、三好理絵
（放送大学・教養学部）

〔要約〕

in vitro 実験系で estrogen が低濃度では neuron survival を上昇させるという我々の実験結果をもとにして、カイニン酸をラットに全身投与して脳の神経細胞傷害を起こさせた場合に、estrogen 受容体にみられる変化を観察した。さらに、カイニン酸投与ラットに estrogen を併用投与した場合に estrogen が神経傷害保護または修復作用を発揮し得るか否かについて、神経栄養因子、ことに IGF-1 に焦点をあてて検討した。

その結果、カイニン酸投与後に大脳皮質前頭葉・海馬 CA3 領域などを中心として、estrogen受容体の量的増加が見られることを免疫組織化学的染色、*in situ* hybridization によって確認した。さらに、近年脳内においてもその存在意義が注目されている IGF-1 mRNA の発現はカイニン酸投与ラットの海馬・大脳皮質で増強されたが、予め estrogen を投与することによって抑制される傾向を示した。

実験方法

1) estrogen 受容体の免疫組織化学的観察

Wistar 系雄性ラット（180g）にカイニン酸 12mg/kg を腹腔内注射した後、24、72 時間目に断頭した。全脳を摘出後、急速凍結、その後厚さ 8μm の凍結切片を作製した。control には等量の PBS を腹腔内注射して同様に切片を作製した。免疫組織化学的染色の一次抗体には抗 estrogen 受容体抗体（モノクロナール抗体）を用い、PAP 法にて観察した。

2) *in situ* hybridization

免疫組織化学的染色用と同様に処理したラット全脳から 8μm の凍結切片を作製した。切片は 4 % paraformaldehyde 固定の後、fluorescein - labelled DNA probe を用いて hybridize させ、detection には NBT/BCIP 基質を用いた。Probe DNA は、MCF-7 cell line より 作製した cDNA library から PCR 法にて cloning した estrogen 受容体 cDNA を用いた。

3) IGF-1 mRNA の解析

Wistar 系雄性ラット（190 - 210g）に β - estrogen 3 - benzoate 500μg/kg を皮下注射し、24 時間後にカイニン酸 12mg/kg を腹腔内注射し、3日後に断頭、海馬及び大脳皮質を摘出したものを用いた。 total RNA は guanidium thiocyanate -phenol - cholroform 法によって抽出、15μg の各 total RNA を nylon membrane 上に dot - blotting し、horseradish peroxidase (HRP) - labelled specific cDNA probe と overnight で hibridize させ、Hyperfilm - MP (Amersham U.K.) に expose した。この結果をカイニン酸単独投与群との間で比較した。

結果

免疫組織化学的検討について、カイニン酸非投与群では estrogen 受容体様免疫活性 は視床下部および海馬、扁桃体を含む辺縁系を中心として観察され、他の大脳皮質には見られず、従来の知見と一致した。カイニン酸注射72時間後に観察した群では estrogen 受容体様免疫活性は prefrontal area、orbital surface などを中心として前頭葉に観察され、motor area、somatosensory area、parieto - occipital region などには見られなかった。カイニン酸注射後24時間の群は72時間の群に比して大脳皮質前頭葉部での免疫活性の出現は軽度で、海馬・扁桃体における免疫活性の分布はカイニン酸投与群と非投与群の間で差は見られなかった。海馬においては免疫組織化学的にはカイニン酸投与群と非投与群の間で estrogen 受容体様免疫活性の分布に差

を認めず、ほぼ同程度に観察された。*in situ* hybridization では、海馬の CA3 領域において estrogen 受容体 mRNA の著明な発現を認め、カイニン酸投与群では非投与群に比して豊富にその mRNA の出現が見られた。

カイニン酸の単独投与群では非処置群に比べて IGF-1 mRNA 発現の上昇が見られた。その一方、estrogen の単独投与群における IGF-1 mRNA 発現は顕著ではなかった。カイニン酸投与に先立って estrogen を皮下注射した場合には カイニン酸の単独投与の場合よりも IGF-1 mRNA の発現の抑制が見られた。

考察

estrogen 受容体は、周生期には大脳、小脳を含め脳内の neuron 及び glia に広く分布し、神経細胞の分化・神経突起の伸長による神経回路網の形成に役割を演じた後、急速に消失して視床下部・辺縁系などに限局することが知られている。これは estrogen が遺伝子を介して 神経栄養因子 neurotrophic factor の mRNA の発現を誘導する作用によるものと推定される。このような神経栄養因子 mRNA の inducer または neuroprotector としての estrogen の機能は成熟後も時宜に応じて発揮されることが考えられる。

本実験では、カイニン酸の全身投与により前頭葉部および辺縁系を中心として estrogen 受容体の出現が見られたが、他の部位では非投与群との間に差がなかった。周生期に見られるような皮質全体にわたる estrogen 受容体の出現がカイニン酸全身投与によることでは見られなかった点については、全身投与に伴うカイニン酸の働き方に部位差があるためと推定されるが、このことはカイニン酸の脳室内投与・局所注入などの結果と比較検討することが必要と思われる。周生期における estrogen 受容体の分布も前脳前野を中心としてみられ、運動領よりも後部の皮質では前部に比して受容体の分布が少ないことが知られているので、我々の結果は質的にはこれと一致しているものと考えられる。

本研究の結果を通して、カイニン酸投与に伴う neuron 傷害が成熟ラットでは見られない大脳皮質部位での estrogen 受容体出現を促し、また IGF-1 mRNA 発現を誘導させた。しかしながら、IGF-1 mRNA 発現に関しては、予め estrogen を投与したカイニン酸 投与群では抑制される傾向にあることを認めた。従来、脳の実験的阻血性変化に対しては傷害の程度に応じて IGF-I mRNA の発現が誘導されることが報告されているが、本実験でもカイニン酸単独でこのような結果を示した。この点についてはカイニン酸の用量依存性の問題も含めて再検討を要する。

estrogen 単独では顕著に影響を及ぼさないものの、予め投与することよってカイニン酸による IGF-1 mRNA の誘導に影響を与えているという事実は estrogen が neuroprotective に働き、カイニン酸投与に伴う修復機構としての IGF-1 mRNA 発現の必要性に抑制をかけていると考える。

カイニン酸投与後の neuron 傷害がより進んだ段階で estrogen を投与することにより、IGF-1 mRNA 発現にどのような影響を与えるのかをさらに検討する必要がある。

参考文献

*G. Sperk et al., Kainic acid injured seizures : neurochemical and histopathological changes. Neuroscience, 10, 1301-1315, 1983

*C. Dominique et al., Estrogen and insulin synergism in neurite growth enhancement *in vitro* : mediation of steroid effects by interactions with growth factors? Develop. Brain Res., 41, 87-100, 1988

*H. Werner et al., Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor 1 receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7451-7455, 1989

*A. Shingo et al., Studies on estrogen and neuroplasticity from viewpoint of kainic acid-induced estrogen receptor expression. Jpn. J. Pharmacol., 70, Supplement I, 1996, in press

141 Ca^{2+}に依存したシンタキシンとＳＮＡＰとの相互作用

3Bp1

川崎雅一、西木禎一、熊倉鴻之助、*高橋正身
（上智大・生命研・神経化学、*三菱化学生命研）

〔 要約 〕

神経伝達物質の放出はCa^{2+}によって制御されているが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。今回、Ca^{2+}に依存したシナプスタンパク質間の相互作用を明らかにする目的で、リコンビナントタンパク質を用いた結合実験や特異抗体による免疫沈降法などを用いて、シンタキシンと他のシナプスタンパク質との相互作用を調べた。その結果、SNAPがシンタキシンとCa^{2+}依存的に結合することが明らかとなった。この結果は、開口放出機構のCa^{2+}依存的な過程にSNAPとシンタキシンとの相互作用が関与している可能性を示唆している。

［序文］

神経伝達物質はシナプス前終末からシナプス小胞の開口放出により遊離され、この機構を分子レベルで明らかにすることは、シナプス伝達ばかりでなく、脳の高次的機能を解明する上においても非常に重要である。近年の研究から、シナプス小胞の開口放出は、細胞内での小胞輸送と多くの共通性があることが明らかとなった。すなわち、両者はともにNSF（N-ethylmaleimide sensitive fusion protein）やSNAP（soluble NSF attachment protein）とよばれる細胞質タンパク質が膜に存在するSNAREと総称されるタンパク質と結合して20S複合体を形成することが必要があると考えられている。シナプスでのSNAREタンパク質として、シンタキシン、SNAP-25（synaptosomal assosiated protein of 25kDa）、VAMP-2が同定されている[1]。シンタキシンは、シナプス前膜に多く発現している分子量約35,000の膜タンパク質で、SNAPと結合するばかりでなく、神経伝達物質の放出を制御しているN型Caチャネルや、シナプス小胞タンパク質であるシナプトタグミンとも結合することが知られている[2,3]。シンタキシンを特異的に切断するC型ボツリヌス毒素や抗シンタキシン抗体によって神経伝達物質の放出が抑制されることから、シンタキシンは、Ca^{2+}依存的な開口放出の機構において中心的な役割を果たしていると考えられる[4,5]。

神経伝達物質の放出は、細胞内に流入したCa^{2+}により引き起こされることが知られており、Ca^{2+}に依存したシナプスタンパク質間の相互作用を明らかにすることは、きわめて重要である。今回、開口放出におけるCa^{2+}依存性ステップの分子機構を明らかにするため、シンタキシンのリコンビナントタンパクを用いた結合実験およびモノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験によって、Ca^{2+}に依存したシンタキシンと他のシナプスタンパク質との結合の変化を調べた。

［方法］

抗シンタキシンモノクローナル抗体（9A7）は、部分精製したラットシンタキシンを抗原として作成した。抗VAMP-2ペプチド抗体、抗SNAP-25モノクローナル抗体（BR05）、抗シナプトタグミンモノクローナル抗体（1D12）はすでに報告した方法で作成した[6]。抗SNAP抗体は、ラットSNAPの部分ペプチドを抗原として新たに作製した。リコンビナントシンタキシンは、pGEXベクターを用いてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）とのフュージョンタンパクとして大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースに固定化した。ラット大脳P2画分を1% Triton X-100を用いて可溶化したのち、GST-シンタキシンと反応させ、結合したタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とイムノブロッティング法により解析した。また、可溶化したタンパク質を抗シンタキシン抗体、抗シナプトタグミン抗体を用いて免疫沈降し、共沈してくるタンパク質を解析した。

［結果及び考察］

GST-シンタキシンには、SNAP-25、VAMP-2、シナプトタグミン、SNAP、Munc-18が特異的に結合した。GST-シンタキシンへのSNAPとシナプトタグミンの結合はCa^{2+}依存的で、Ca^{2+}存在下（1mM）では非存在下（2mM,EGTA）に比べ、結合量はそれぞれ1.6倍、2.3倍に増加した。それに対してSNAP-25、VAMP-2の結合にはCa^{2+}依存性は認められなかった。Ca^{2+}以外の2価カチオンでは、Sr^{2+}とBa^{2+}（1mM）で結合が増加したが、その効果はCa^{2+}より小さく、Mg^{2+}（2mM）では結合量は変化しなかった（図1）。抗シンタキシン抗体を用いて免疫沈降した場合にも、共沈するSNAP、シナプトタグミンの量はCa^{2+}存在下で大きく増加した。

シンタキシンとシナプトタグミンとはCa^{2+}依存的に結合することがすでに示されている[7]。また、SNAPのアイソフォームのひとつであるβ-SNAPがシナプトタグミンの細胞質部分に結合すると報告されている[8]。しかし、抗シナプトタグミン抗体で免疫沈降をおこなった場合、今回用いた条件下ではSNAPの共沈はまったく見られなかった。したがって、Ca^{2+}依存的なシンタキシンとSNAPとの結合は、シナプトタグミンを介していないと考えられる。SNAREタンパク質とSNAP/NSFによる20S複合体形成はCa^{2+}に依存しないことが既に報告されている[9]。今回得られた結果は、シンタキシンとSNAPとの相互作用が20S複合体形成に加えて、Ca^{2+}に依存した開口放出の他のステップにも関わっていることを示唆している。

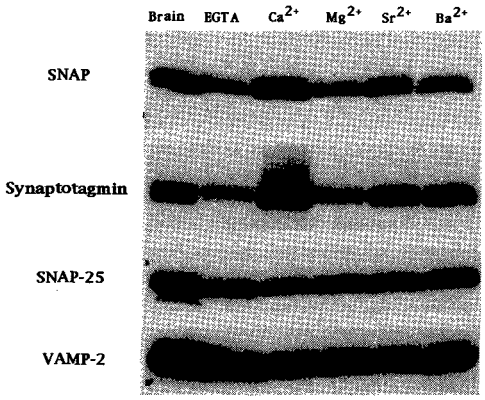


図1. GST-シンタキシンに対するシナプスタンパク質の結合

［文献］

(1) Sollner, T. et al. (1993) Nature 362, 318-323
(2) Bennett, M. K. et al. (1992) Science 257, 255-259
(3) Bennet, M. K. et al. (1993) Cell 74, 863-873
(4) Yoshida, A. et al. (1992) J.Biol.Chem. 267, 24925-24928
(5) Blasi, J. et al. (1993) EMBO. J. 12, 4821-4828
(6) Shimazaki, Y. et al. (1996) J.Biol.Chem 271, 14548-14553
(7) Li, C. et al. (1995) Nature 375, 594-599
(8) Schiavo, G. et al. (1995) Nature 378, 733-736
(9) McMahon, H. T. et al. (1995) J.Biol.Chem. 270, 2213-2217

142 2E33 クロマフィン細胞の開口放出素過程とSNAP-25/VAMP-2複合体

御園生 裕明[1)]、西木 禎一[2)]、関口 真理子[2)]、高橋 正身[2)]、鎌田 洋一[3)]、小崎 俊司[3)]、今泉 美佳[1)]、熊倉 鴻之助[1)]
上智大学生命科学研究所 神経化学[1)]、三菱化学生命科学研究所[2)]、大阪府立大学農学部 獣医学科[3)]

〔 要約 〕

副腎髄質クロマフィン細胞はCa^{2+}依存性の開口放出によりカテコールアミン（CA）を放出する。この開口放出には神経細胞と同様に、いわゆるSNAREタンパク質が関与すると考えられている。クロマフィン細胞を界面活性剤で処理することによって細胞膜の透過性を高めた高透過性細胞を用いた研究から、開口放出は分泌顆粒を開口可能な状態にするATP依存性の過程（プライミング）と、Ca^{2+}の流入に伴って顆粒と細胞膜を融合させる過程に区別できることが示唆されている。本研究ではATP依存性プライミング過程の分子メカニズムを明らかにする目的で、ボツリヌス毒素を用いて実験を行った。ボツリヌスE型毒素はZn^{2+}依存性のプロテアーゼで、SNAP-25を特異的に切断し、神経伝達物質の放出を阻害することが知られている。高透過性細胞にE型毒素を作用させるとSNAP-25が切断され、MgATP非依存性のCa^{2+}依存性カテコールアミン放出が阻害された。毒素処理前に細胞をMgATPで前処理するとSNAP-25の切断量がほぼ2倍に増大し、SNAP-25の毒素に対する感受性が増大していることが明らかになった。また免疫沈降実験を行った結果、抗VAMP-2抗体で免疫沈降するとVAMP-2と共にSNAP-25が共沈したが、MgATP処理した細胞では共沈するSNAP-25の量が減少した。この結果からATP依存性プライミング過程にともなって、複合体を形成していたSNAP-25とVAMP-2が解離すること、また解離したこれらのタンパク質がプライミング以降のCa^{2+}依存性の融合の過程にも重要であることが示唆された。

[目的]

神経伝達物質は分泌顆粒と細胞膜が融合する開口放出によって細胞外に放出される。この開口放出の分子メカニズムについては、SNARE仮説が受け入れられている。この仮説では細胞質のタンパク質NSF、SNAPsとSNAPのレセプタータンパク質（SNAREタンパク質）syntaxin、SNAP-25、VAMP-2間の複合体の形成と解離が顆粒と細胞膜のドッキングとそのあとに続く膜の融合に重要であるとされている(1)。しかしこの仮説はリコンビナントタンパク質などを用いたIn vitroの実験結果から導かれたものであり、実際にこれらのタンパク質が細胞内でどのように働いているのかは不明である。一方高透過性細胞における研究から開口放出はMgATP依存性に顆粒を開口可能な状態に準備するプライミング過程とCa^{2+}依存性に顆粒と細胞膜を融合させる融合過程の少なくとも2つの素過程に区別できることが明らかにされている(2)。我々はこの2つの素過程の間にSNAREタンパク質とその複合体がどのように変化するのかを明らかにする目的で、高透過性細胞におけるSNAP-25のボツリヌスE型毒素に対する感受性の変化を検討し、免疫沈降実験によりSNARE複合体の状態を調べた。

[実験方法]

クロマフィン細胞は牛副腎髄質から調整し、10%牛胎児血清を含む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(3)。以下の処理は37°Cで行った。細胞をCa^{2+}-free Locke's溶液で洗浄し、20 μM digitoninを加えたNaGEP（140 mM Na-glutamate, 5 mM glucose, 5 mM EGTA, 20 mM PIPES, pH 6.8)で4分間処理し、高透過性細胞を調整した。この処理は5 mM MgATPの存在下、非存在下で行った。つぎに100 nM E型毒素を含むNaGEPに置き換え毒素処理を行った。Ca^{2+} 100 μMを含むNaGEP（MgATP非存在下）で30秒間刺激し、上清中のCA量をHPLC-ECD法により測定定量した。細胞はSDS-PAGEサンプルバッファーで可溶化し、SDS-PAGEで分離、イムノブ

ロットでSNAREタンパク質を検出した。免疫沈降実験は、細胞をMgATP存在下、非存在下で高透過性化した後、0.5% Triton X-100を含むNaGEPで可溶化し、抗VAMP-2抗体を用いて免疫沈降した。沈降したタンパク質は上記の方法で検出した。

[結果および考察]

高透過性細胞をあらかじめMgATPで処理すると、Ca^{2+}依存性カテコールアミン放出は大きく増大する。図1に示すように高透過性細胞にボツリヌス毒素を作用させると、切断によりSNAP-25が約25%減少し、フラグメントが出現した。あらかじめMgATPで処理した細胞を毒素で処理すると、SNAP-25の減少が著しくなり、フラグメントの量が大きく増大した。このときMgATPによって毒素のプロテアーゼ活性は影響を受けていなかったので、この結果はMgATP処理によってSNAP-25が毒素によって切れやすくなったことを表しており、その原因としてはSNAP-25のコンフォメーション変化が考えられる。この変化がどのような変化に起因するものかを明らかにするために免疫沈降実験を行った（図2）。高透過性細胞をTriton X-100によって可溶化し抗VAMP-2抗体で免疫沈降すると、SNAP-25が共沈した。つぎに、あらかじめMgATPで処理した細胞を可溶化し免疫沈降したところ、共沈するSNAP-25の量が減少した。この結果とSNAP-25の毒素に対する感受性の変化から、MgATP依存性のプライミングに伴って、細胞内で複合体を形成していたSNAP-25とVAMP-2が解離することが示唆された。またボツリヌスE型毒素はMgATPに依存しないCa^{2+}のみで引き起こされるCA放出を阻害した。このことから毒素がプライミング以降の融合の過程を阻害することが明らかになり、プライミングに伴ってVAMP-2から解離したSNAP-25がCa^{2+}依存性の融合の過程にも重要であることが示唆された。今回の免疫沈降では、syntaxinは共沈してこなかった。シナプトソームを可溶化して同じ抗VAMP-2抗体で免疫沈降するとsyntaxinが共沈することから、クロマフィン細胞でのLarge dence-cored vesicleの開口放出においてはSNARE複合体の構成がシナプトゾームで得られたものとは異なる可能性が示唆された。

（本研究の一部は文部省科学研究費補助金（御園生）の補助を受けて行われた。）

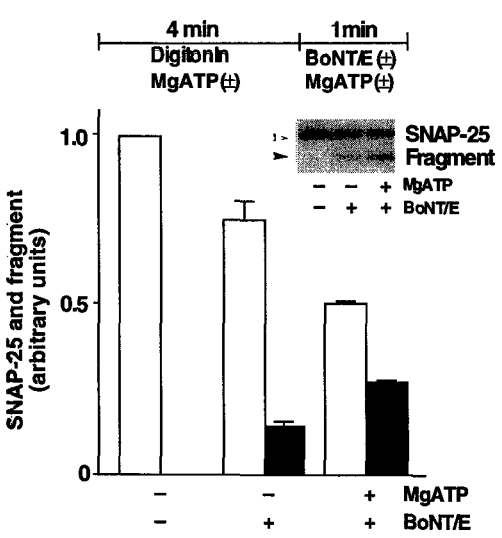


図1　SNAP-25の毒素による切断量の変化

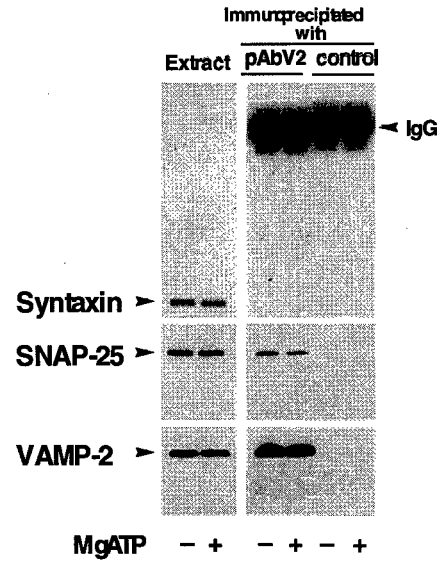


図2　SNARE複合体の解離

1. Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. And Rothman, J. E. (1993) Cell, 75, 409-418.
2. Bittner, M. A. And Holz, R. W. (1992) J. Biol. Chem., 267, 16219-16225.
3. Kumakura, K., Sasaki, K., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Misonou, H., Nakamura, S., Matsuda, Y. and Nonomura, Y. (1994) J. Neurosci., 14, 7695-7703.

143 伝達物質放出の融合複合体構成成分シナーフィン

3Bp2

石塚 徹、西須英雄、熊西敏郎*、阿部輝雄
(新潟大学脳研究所細胞神経生物学、*分子神経病理)

〔 要約 〕

シナーフィン (synaphin) は我々が伝達物質放出に関与する蛋白質複合体 (融合複合体) の構成成分として見いだした細胞質蛋白質である。ラット脳では一次構造が84%一致する2種類のシナーフィン (synaphin 1,2) が存在し、それらのmRNAの脳内分布が有意に異なることから、両蛋白質は異なった生理的意義を持つものと思われる。密度勾配遠心の結果からシナーフィンはシナプトタグミン、シンタキシン、SNAP-25、VAMP/synaptobrevinとともに7S粒子に存在することが明らかになった。

我々はすでにN型Caチャネルを免疫沈降させる単クローン抗体を用いたイムノアフィニティー・クロマトグラフィーによって融合複合体の存在を報告した (1,2)。シナーフィンは我々が融合複合体の新たな成分として同定し、そのcDNAをウシ脳のcDNAライブラリーからクローニングしたものである (2,3)。この蛋白質はきわめて親水性で、細胞下分画の結果からその大部分は細胞質に存在することがわかった。今回ラット脳のシナーフィンについてさらに詳しい解析を行ったので、報告する。

「実験方法」

ウシ脳シナーフィンcDNAクローン (3) の蛋白質をコードする部分全体をプローブとして、ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングして、2種の互いによく似た蛋白質をコードするcDNAをそれぞれ複数個得た。この2種のcDNAに特異的なヌクレオチド配列 (50mer) を^{35}Sあるいは^{32}Pで標識し、それぞれラット脳切片のin situ hybridization、各組織のmRNAのnorthern blotを行った。脳LP2分画Triton X-100抽出物のグリセロール(10-35%)密度勾配遠心はPevsnerらの方法 (4) にしたがった。

「結果と考察」

ウシ脳シナーフィン1をプローブとして2種の類似した蛋白質をコードするcDNAが得られた。これらの蛋白質のアミノ酸配列をウシ脳シナーフィン1と比較すると、一つは全く同一で、他の一つは84%一致した (図1)。これらの蛋白質をそれぞれラットシナーフィン1、2と命名した。シナーフィン1 、2の一次構造はウシのシナーフィンとほぼ同時に報告された921Lあるいはコンプレキシン II、および921Sあるいはコンプレキシン I (5,6) とそれぞれ完全に一致した。シナーフィン1、2のcDNAに特異的な配列を用いたnorthern blotではそれぞれ4.8 kb 、2.4 kbのバンドが脳に圧倒的に強く検出された。脳以外ではともに精巣に弱い反応がみられた。これらの結果はシナーフィンに対する抗体を用いたラット各組織のイムノブロットの知見 (3) とよく一致している。

脳LP2分画のTriton X-100抽出物を密度勾配遠心後、得られた各フラクションを単クローン抗体SPM-1（シンタキシン1を認識）、SPM-2（SNAP-25およびrab3Aを認識）あるいは12C5（シナーフィン1,2を認識）で免疫沈降し、イムノブロットで解析すると、7S付近にシナプトタグミン、シンタキシン1、SNAP-25、VAMP/synaptobrevin-2のピークとほぼ一致してシナーフィンのピークがみられたことから（図2）、シナーフィンが7S粒子を構成していることが示された。

northern blotと同一のプローブを使って行ったラット脳切片でのin situ hybridizationではシナーフィン1、2のmRNAは有意に異なった分布を示した。たとえば、前者は海馬のCA2、CA3、歯状回等に多いのに対し、後者はこれらの領域には少ない。視床には後者は存在するが、前者はほとんどない。シナーフィン1、2のmRNAの脳内分布のこのような差異は両蛋白質の生理的意義の違いを示唆する。

```
RAT synaphin 1 : MDFVMKQALGGATKDMGKMLGGEEEKDPDAQKKEEERQEALRQQEEERKAKHARMEAERE
                 * ******************** ******* *********** ******* * ******
RAT synaphin 2 : MEFVMKQALGGATKDMGKMLGGDEEKDPDAAKKEEERQEALRQAEEERKAKYAKMEAERE

KVRQQIRDKYGLKKKEEKEAEEKAALEQPCEGSLTRPKKAIPAGCGDEEEEEEESILDTVLKYLPGPLQDMFKK
  ** ****** ***** ***  ** *   ************ ***** *** ******* *************
VMRQGIRDKYGIKKKEEREAEAQAAMEANSEGSLTRPKKAIPPGCGDEPEEEDESILDTVIKYLPGPLQDMFKK
```

図1　ラット脳シナーフィンの一次構造

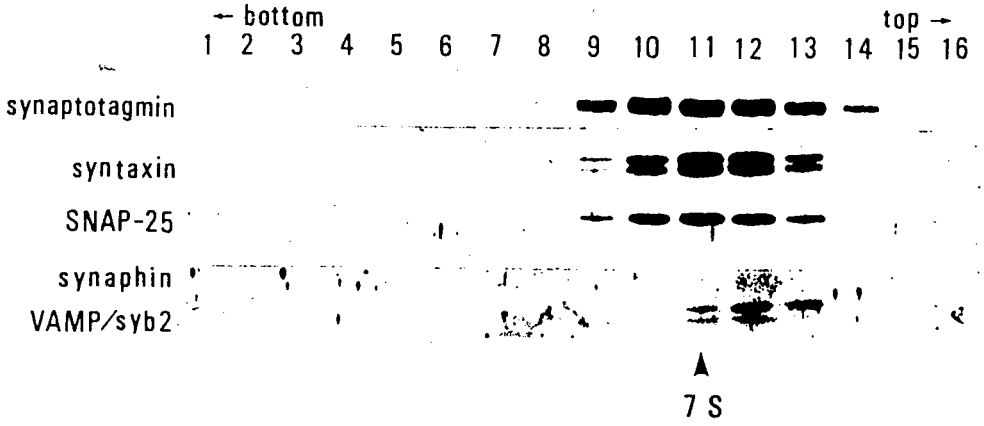


図2　LP2分画Triton X-100抽出物の密度勾配遠心。　得られたフラクションをSPM-1によって免疫沈降後、各蛋白質に対する抗体を用いたイムノブロットで検出。

「文　献」

(1) Saisu, H. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 59-66 (1991)
(2) Horikawa, H. P. M. et al.: FEBS Lett. 330, 236-240 (1993)
(3) Ishizuka, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 213, 1107-1114 (1995)
(4) Pevsner, J., Hsu , S. -C. and Scheller, R. H.: Neuron 13, 353-361 (1994)
(5) Takahashi, S. et al.: FEBS Lett. 368, 455-460 (1995)
(6) McMahon, H. T. et al.: Cell 83, 111-119 (1995)

144 2E34 開口放出機構におけるアクチン・ネットワークとアクチンーミオシン相互作用の役割

村上 猛、今泉 美佳、御園生 裕明、川崎 雅一、若井 豪、熊倉 鴻之助
（上智大学 生命科学研究所 神経化学部門）

〔 要約 〕
開口放出機構におけるアクチンーミオシン相互作用の役割を明確にするために、クロマフィン細胞を用いて、アクチンフィラメントをモノマーに解離させアクチンーミオシン相互作用を選択的に阻害する物質Mycalolide B (MLB)と、アクチンフィラメントを短い断片とするがアクチンーミオシン相互作用は阻害しない物質Cytochalasin D (CD) の、カテコールアミン放出機能に及ぼす影響を検討した。MLBで処理した細胞では濃度依存的に細胞膜直下のアクチンフィラメントの切断と消失が観察されたが、CD処理細胞ではアクチンフィラメントの顕著な消失はなかった。リアルタイムモニタリング法で放出機能を測定したところ、MLB処理細胞では繰り返し刺激に対する放出応答の急激な減衰と、持続的刺激に対する放出応答の短縮が観察されたが、 CD処理細胞では影響が見られなかった。これらの結果から、分泌顆粒の供給過程においてアクチンーミオシン相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。

［はじめに］クロマフィン細胞ではカテコールアミンが開口放出によって分泌される。界面活性剤で高透過性化したクロマフィン細胞からの開口放出の過程は、分泌顆粒を放出可能な状態に準備するATP依存性の過程（プライミング）と、放出可能な状態になっている分泌顆粒がATP非依存性にカルシウムによって細胞膜と融合する開口過程の少なくとも2つの過程から構成されていることが明らかになっている。一方、開口放出機構における細胞骨格系蛋白質アクチンの役割については、以前から分泌顆粒が膜への接近を妨げるバリアーとなっているという仮説[1]が提唱されている。我々は先にWortmanninを用いて、ミオシン軽鎖キナーゼを阻害しアクチンーミオシン相互作用を阻害することにより、神経伝達物質の放出が抑えられ、特にプライミング過程が阻害されることを明らかにして、アクチンがバリアー以外の役割を果たしていることを示した[2]。今回、開口放出におけるアクチンーミオシン相互作用の役割をより明確にするために、Fーアクチンに作用して、アクチンーミオシン相互作用を選択的に阻害するMLB[3]とFーアクチンを切断するがアクチンーミオシン相互作用は阻害しないCD、それぞれが開口放出機能に及ぼす影響を比較検討した。

［方法］
ウシの副腎髄質から単離培養したクロマフィン細胞はカバーガラス上に単層培養または浮遊培養した[2]。組織化学実験：カバーガラス上に培養した細胞を Locke's 溶液で前処理した後、パラホルムアルデヒド固定（3%,60分)を行なった。固定後にTriton X-100処理(0.1%, 5分)をして、PBSで洗浄した。この後、0.33 μ M Rhodamine Phalloidinでアクチン染色(60分)を行ない、封入剤(50% glycerin, 25% 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541nm)を用いて観察した。細胞に薬物処理を行なうときには前処理中に薬物を加えた。薬物処理時間はMLBは60分、CDは30分とした。

リアルタイムモニタリング法：カテコールアミン放出を既報[4]のリアルタイムモニタリング法により測定した。アセチルコリン(ACh) 100 μ M で5分間刺激して持続的刺激に対する応答を、また、500 μ M ACh 50 μ l で30秒ごとに刺激して繰り返し刺激に対する応答を観察した。薬物の処理は前述と同様に行なった。

［結果と考察］MLB で処理した細胞では MLB の濃度に依存して細胞膜直下のアクチン・ネットワークの切断と、消失が観察された（図1）。リアルタイムモニタリング法を用いた実験では ACh による持続的刺激に対する放出応答と、繰り返し刺激に対する放出応答に濃度依存的な減衰が観察された（図2）。CD で処理した細胞では濃度依存的にアクチン・ネットワークの切断が観察されたが、顕著な消失は観察されなかった（図1）。また、MLB とは対照的に、CD は放出応答にほとんど影響を与えなかった（図2）。今回の実験から、アクチン・ネットワークが切断されてもアクチンーミオシン相互作用が阻害されている状態では持続的な神経伝達物質放出が障害されることが明らかとなり、分泌顆粒の供給過程においてアクチンーミオシン相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆される。



図1 MLB, CD処理における
アクチンフィラメントの変化
(Rhodamine Phalloidin染色)

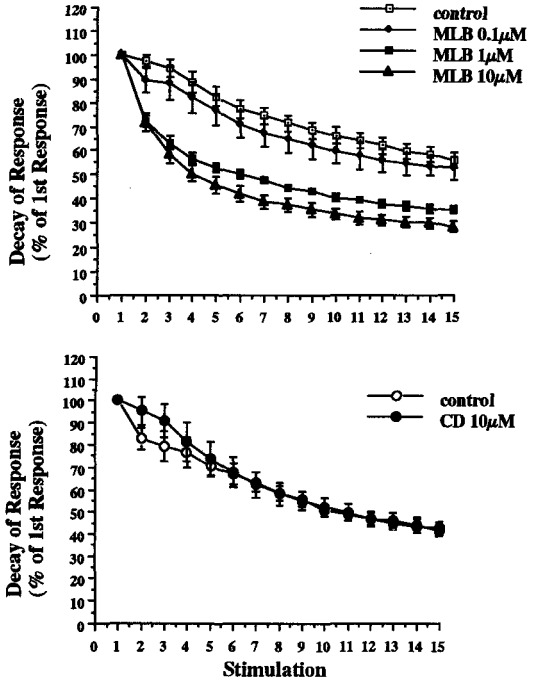


図2 MLB,CD処理細胞のACh繰り返し刺激に対するカテコールアミン放出量の変化
（リアルタイムモニタリング法）

1) Aunis, D., & Bader, M.-F. (1988) J. Exp. Biol., 139, 253-266.

2) Kumakura, K., Sasaki, K., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Misonou, H.,Nakamura, S., Matsuda, Y., and Nonomura, Y., (1994) J. Neurosci., 14, 7695-7703

3) Saito, S., Watabe, S., Ozaki, H., Fusetani, N., and Karaki, H., (1994) J. Biol. Chem., 269, 29710-29714

4) Kumakura, K., Ohara, M., and Sato, GP., (1986) J. Neurochem.,46, 1851-1858

145 2E35 Proline Directed Protein Kinaseによるシナプシン I のリン酸化とその生理的機能に及ぼす影響

松原 守、楠畑 雅*、千谷晃一、谷口寿章
(藤田保健衛生大、総医研、医高分子 *現、ニッピバイオマトリックス研究所)

[要約]
シナプシンIは神経終末において、アクチンやシナプス小胞膜、チューブリン、カルモジュリンと結合し、これらの相互作用は、CaMキナーゼII、Aキナーゼによるリン酸化によって調節されている(1)。我々は既に、生体内におけるシナプシンIのリン酸化を詳細に知る目的で、ウシ脳より精製したシナプシンIをプロテアーゼで処理し、キャピラリーHPLCをエレクトロスプレー質量分析計に直結したLC/MS法を用いて解析した結果を報告した(2、3)。その結果、CaMキナーゼIIによる既知のリン酸化部位であるSer605以外に、未知のリン酸化部位としてSer553を同定した。このセリンは直後にプロリンが存在したことから、シナプシンIがin vivoでMAPキナーゼなどのいわゆるプロリン指向性キナーゼの基質である可能性が示唆された。今回、生体内でこのリン酸化部位をリン酸化するキナーゼを同定するために、脳に多く発現しているプロリン指向性キナーゼを用い、シナプシンIをin vitroでリン酸化した。その結果、シナプシンIは、MAPキナーゼおよびCdk5によってリン酸化され、MAPキナーゼによるリン酸化は、シナプシンIによるF-アクチンのbundling活性を阻害することを見出した。以上の結果は、MAPキナーゼなどのプロリン指向性キナーゼが生体内においてシナプシンIのリン酸化を通じて神経伝達物質放出の制御に深く関わっていることを示唆している。

[実験方法]
シナプシンIはウシ脳膜画分より常法により精製した(4)。MAPキナーゼは、ウシ脳よりDrewesらの方法に準じて精製した(5)。MAPキナーゼおよびCdk5、GSK3βによるin vitroのリン酸化反応はそれぞれ至適条件下で行い、SDS-PAGEとオートラジオグラフィーで解析した。リン酸化部位の同定はLC/MS法を用いた方法によった(6)。シナプシンIのF-アクチンのbundling活性は光散乱及び低速遠心実験で解析し(7)、チューブリンとの結合は、超遠心実験で調べた(8)。

[結果]
生体内でシナプシンIの未知のリン酸化部位をリン酸化するキナーゼを同定するために、脳において多く発現している代表的な3つのプロリン指向性キナーゼであるMAPキナーゼおよびCdk5、GSK3βを用いin vitroにおけるリン酸化について解析した(図1)。その結果、GSK3βでは有意なリン酸化は見られなかったが、MAPキナーゼでは1分子当たりリン酸3個分、Cdk5では1個分のリン酸が導入されることが分かった。MAPキナーゼによるシナプシンIのリン酸化部位はN末端側のSer62、Ser67及び未知のリン酸化部位に近いSer551であり、Cdk5によるリン酸化部位はSer551、Ser553であった。これらキナーゼのリン酸化による生理的機能への影響について調べるために、MAPキナーゼ及びCdk5でリン酸化したシナプシンIのF-アクチンのbundling活性に及ぼす効果について検討した。F-アクチンとの共沈を低速遠心実験で調べたところ、リン酸化していないシナプシンIとCdk5でリン酸化したシナプシンIでは、アクチンとシナプシンが共沈するのに対し、MAPキナーゼでリン酸化したシナプシンIでは、アクチンのbundling活性は阻害さ

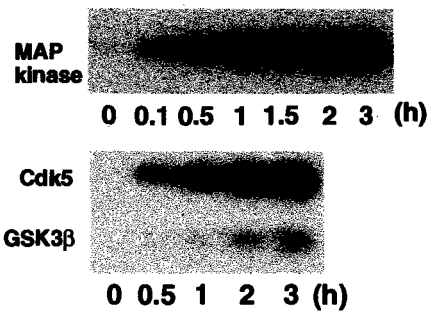


図1　シナプシンⅠのプロリン指向性キナーゼによるリン酸化（オートラジオグラフィーの結果）

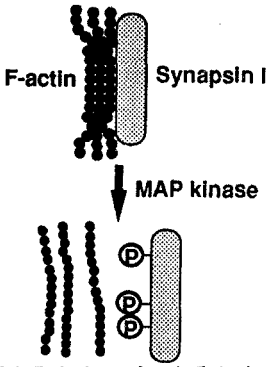


図2　ＭＡＰキナーゼによるシナプシンⅠのリン酸化とＦ－アクチンbundling活性の阻害

れ、共沈しなかった。このＭＡＰキナーゼによるリン酸化のアクチンへのbundling活性の阻害は、光散乱実験でも明らかであった。一方、チューブリンとの結合に対する、これらキナーゼのリン酸化による影響は見られなかった。

[考察]

本研究結果より、従来、ＣａＭキナーゼIIやＡキナーゼの基質であると知られていたシナプシンⅠが、ＭＡＰキナーゼなどのいわゆるプロリン指向性キナーゼの基質でもあることが明らかとなった。実際に、これらキナーゼのうちＭＡＰキナーゼは、in vitro においてシナプシンⅠを特異的に３箇所リン酸化した。また、このリン酸化によって、シナプシンⅠのアクチンbundling活性は阻害されることが明らかとなり、生理的な機能の調節にも深くかかわっていることが示唆された（図２）。大脳皮質ニューロンやＰＣ１２細胞において、ＢＤＮＦやＮＧＦがそれぞれ、ＭＡＰキナーゼを活性化し、シナプシンⅠをリン酸化するという最近の報告（９）もあわせると、生体内においてＭＡＰキナーゼなどのプロリン指向性キナーゼによるシナプシンⅠのリン酸化が、神経伝達物質放出の制御あるいはやシナプス可塑性の調節に深く関わっていることが示唆される。

[謝辞]

Cdk5ならびにGSK3βを御恵与下さいました、三菱化学生命科学研究所の石黒幸一博士及び内田庸子博士に感謝します。

[文献]

(1) Valtorta, F., *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267,** 7195-7198.
(2) 谷口寿章ら (1994) 神経化学 **33,** 362-363.
(3) Matsubara, M., *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* in press.
(4) Schiebler, W.,*et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* **261,** 8383-8390.
(5) Drewes, G., *et al.* (1992) EMBO J. **11,** 2131-2138.
(6) Taniguchi, H.,*et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* **269,** 18299-18203.
(7) Bahler, M.,*et al.* (1987) *Nature* **326,** 704-707.
(8) Baines, A. J.,*et al.* (1986) *Nature* **319,** 145-147.
(9) Jovanovic, J. N.,*et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93,** 3679-3683.

146 2E36 ラット線条体における Dopamine 遊離に対する N タイプおよび P/Q タイプ電位依存型 Ca^{2+} channel の関与

小笹 貴史、西沢 幸夫
（エーザイ株式会社、筑波研究所）

〔 要約 〕
In vivo での神経伝達物質遊離に対する電位依存型 Ca^{2+} channel (VDCC) のサブタイプの役割を明らかにするために、マイクロダイアリシス法を用い無麻酔無拘束下のラット線条体での dopamine (DA) 遊離に対する N タイプおよび P/Q タイプ選択的 VDCC 阻害剤の効果を検討した。自発的 DA 遊離は N タイプ選択的阻害剤（ω-conotoxin GVIA (CTX GVIA)）と P/Q タイプ選択的阻害剤（ω-agatoxin IVA (Aga IVA), ω-agatoxin TK (Aga TK)）でほぼ同様に約 50 % まで抑制され、CTX GVIA と Aga TK を併用した場合には約 90 % まで抑制された。一方、100 mM KCl 刺激誘発 DA 遊離は、CTX GVIA では拮抗されず、Aga IVA で著明に抑制された。以上の結果より、ラット線条体での生理的条件下での DA 遊離に対しては、N タイプおよび P/Q タイプ VDCC がほぼ均等に独立して関与しており、高 KCl 刺激による持続的脱分極条件での DA 遊離に対しては P/Q タイプ VDCC が優位に関与していることが示された。

シナプス前神経終末に存在する VDCC を介しての Ca^{2+} の流入は神経伝達物質の遊離に重要な役割を果たしている。VDCC は、その電気生理学的および薬理学的性質から L, N, P, Q, T, R タイプなどに分類される(1, 2)。これらのうちでアミン系あるいはアミノ酸系神経伝達物質の遊離に深く関与していると考えられているのは、N, P, Q タイプ である(3, 4)。神経伝達物質遊離と VDCC のサブタイプとの関係については、主に *in vitro* で研究が進められており、*in vivo* での検討はあまり多くない。また、特定の神経伝達物質に対して自発的遊離と高 KCl 誘発の遊離に対する VDCC のサブタイプの関与について比較検討した報告は、我々の知る限りまだない。本実験では、N タイプ VDCC に選択性の高い阻害剤 である CTX GVIA および P/Q タイプ VDCC に選択性の高い阻害剤である AgaIVA および AgaTK を用い、ラット線条体での自発的 DA 遊離および高 KCl 刺激 DA 遊離に対する N タイプおよび P/Q タイプ VDCC の関与について比較検討した。

【 方法 】

Microdialysis probe の植え込み手術 Wistar 系雄性ラット (262 - 372 g) をネンブタール注射液 50 mg/kg, i.p. で麻酔し、線条体内 (A: 2.0, L: 2.5, V: 6.5 mm) に microdialysis probe (EICOM, BDP-I-4-03) を直接植え込んだ。手術後 1 ないし 2 日間の回復期間をおき実験に用いた。

自発的 DA 遊離試験 Probe を Krebs-Henseleit bicarbonate buffer を用い 2 μl/min の流速で灌流し、20 分毎にサンプリングした。灌流開始 1 時間後からサンプリングを開始した。プレ値として 3 本のサンプルを回収した後、薬物を含む灌流液に切り替え 2 時間灌流し、再び薬物を含まない灌流液に戻し、さらに 2 時間の灌流を行った。

高 KCl 誘発 DA 遊離 Probe を Ringer 液を用い 2 μl/min の流速で灌流し、20 分毎にサンプリングした。灌流開始 1 時間後からサンプリングを開始した。KCl 刺激では、灌流液を 100 mM KCl を含む Ringer 液に 7 分間切り替えた。刺激は二回行い、二回目の刺激の 1 時間前より灌流液を阻害剤を含む Ringer 液に切り替えた。結果は、一回目の刺激による DA 遊離量と二回目の刺激による DA 遊離量の比率（S2/S1）で表した。

Dopamine の測定 回収したサンプル中の DA 濃度は HPLC-ECD システムを用いて測定した。

【 結果および考察 】

まず始めに、自発的 DA 遊離に対する効果を検討した。CTX GVIA は、0.001 ～ 10 μM の濃度範囲で濃度依存的に自発的 DA 遊離を抑制したが、0.01 μM 以上での最大の抑制率は 50-60 % で頭打ちであった。Aga TK および AgaIVA も同様に、それぞれ 0.01 ～ 10 μM および 0.1 ～ 10 μM の濃度範囲で

濃度依存的な抑制作用を示したが、最大の抑制率はいずれも約 50 % で頭打ちであった。この結果は Kato ら (5) および Ooboshi ら (6) の報告と一致する。Kato らは 0.1 および 1 μM を、Ooboshi らは 10 および 100 μM の CTX GVI を灌流液中に適用しているが、いずれの報告のいずれの濃度においても CTX GVIA はラット線条体での自発的 DA 遊離をほぼ 50 % までしか阻害していない。これらの結果は、ラット線条体での自発的 DA 遊離の約半分は N タイプ VDCC を介しての Ca^{2+} の流入に基づいていることを示している。CTX GVIA 1 μM および AgaIVA 1 μM はいずれも単独では、自発的 DA 遊離を最大で約 50 % までしか抑制しなかったが、併用した場合には抑制率は最大で約 90 % に達した (Fig. 1)。ラット線条体での生理的条件下での DA 遊離に対しては、N タイプのほかに P/Q タイプ VDCC が N タイプとは独立して関与していることが示された。

次に、100 mM KCl 刺激誘発 DA 遊離に対する効果を検討した。CTX GVIA を 1 および 10 μM 適用した場合には、高 KCl 誘発 DA 遊離の有意な抑制は認められなかった。一方、AgaIVA 1 および 10 μM では、高 KCl 誘発 DA 遊離は用量依存的に減少し、高濃度では DA 遊離を約 80 % 抑制した (Fig. 2)。この結果は、ラット線条体スライスからの 50 mM KCl 誘発 [^{3}H]DA 遊離を検討した Kimura らの結果 (3) とよく一致していた。

以上の結果より、ラット線条体での生理的条件下での DA 遊離に対しては、N タイプおよび P/Q タイプ VDCC がほぼ均等に独立して関与しており、高 KCl 刺激による持続的脱分極条件での DA 遊離に対しては P/Q タイプ VDCC が優位に関与していることが示された。遊離条件の違いにより、関与する VDCC のサブタイプの割合が異なる可能性が示唆された。

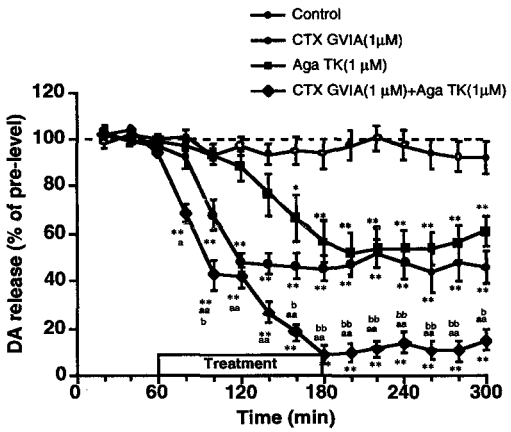


Fig.1 Effect of combined treatment with CTX GVIA and Aga TK on the extracellular DA level in the striatum of rats.
*, **: p < 0.05, 0.01 vs. Control, a, aa: p < 0.05, 0.01 vs. Aga TK, b, bb: p < 0.05, 0.01 vs. CTX GVIA (Tukey's multiple comparison). n = 6.

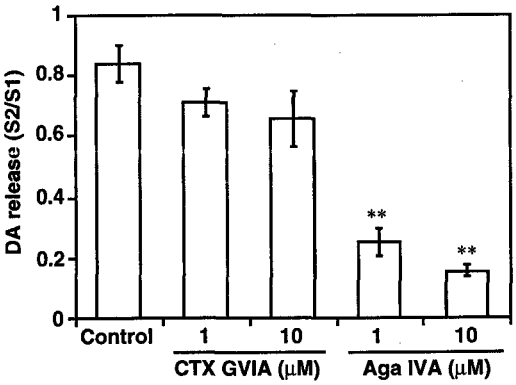


Fig. 2 Effects of CTX GVIA and Aga IVA on 100 mM KCl-evoked DA release in the striatum of rats.
**: p < 0.01 vs. Control (Dunnett's multiple comparison). n = 5.

【参考文献】

1. Randall, A. and Tsien, W. (1995) J. Neurosci. 15(4) 2995-3012
2. Varadi, G., Mori, Y., Mikala, G. and Schwartz, A. (1995) Trends Pharmacol. Sci. 16 43-49
3. Kimura, M., Yamanishi, Y., Hanad, T., Kagaya, T., Kuwada, M., Watanabe, T., Katayama, K. and Nishizawa, Y. (1995) Neuroscience 66(3) 609-615
4. Turner, T. J., Adams, M. E. and Dunlap, K. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 9518-9522
5. Kato, T., Otsu, Y., Furune, Y. and Yamamoto., T. (1992) Neurochem. Int. 21(1) 99-107
6. Ooboshi, H., Sadoshima, S., Yao, H., Nakahara, T., Uchimura, H. and Fujishima, M. (1992) J. Neurochem. 58 298-303

147 3Bp3 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（V）：5-HT_{1A}受容体の役割

平野 均、平田牧三、山田通夫*、松田芳人*
(山口大学保健管理センター、*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分泌を測定した。皮下投与した8-Hydroxy-DPAT(8-OH-DPAT:0.1mg/kg)は、ACh分泌に有意な影響を及ぼさなかった。背側縫線核(RD)に投与したfluoxetine(1 μM,60分間)は、ACh基礎分泌値を有意に低下させた。一方、8-OH-DPAT(100nM,10 μM,各60分間)の前頭葉への投与では、ACh分泌値には有意な影響は認められなかった。しかし、fenfluramine(10mg/kg,s.c.)投与40分後に8-OH-DPAT(10 μM,60分間)を局所投与したところ、前頭葉ACh分泌はより著しく増加した。5-Methoxy-O-DMT(5-MeO-DMT:2.5mg/kg,i.p.)は、一過性にACh分泌を増加させた。以上の結果から、縫線核および前頭葉に存在する5-HT_{1A}受容体は皮質ACh分泌に対してそれぞれ抑制的におよび促進的に関与すること、さらに5-HT_{2A}受容体活動の亢進に伴い5-HT_{1A}受容体機能も向上し、その結果5-HT_{1A}受容体を介するACh分泌促進作用も増大する可能性が示唆された。

【目的】
我々は、5-HT分泌促進薬のfenfluramineにより前頭葉ACh分泌が増加すること、そのfenfluramineによる増加作用が5-HT_{2A}受容体antagonistのketanserinによって遮断されることから、『5-HTは5-HT_{2A}受容体を介して皮質ACh分泌を促進し、その作用部位の一つはACh神経終末部である』ことを報告した(2,4)。しかし、fenfluramineの作用は5-HT_{1A}受容体にも強い親和性をもつ5-$HT_{2/1}$受容体antagonistのmethysergideでは抑制されなかった(3)。また、5-HT_2受容体agonistのDOIによって引き起こされるラットのhead shakeが5-HT_{1A}受容体agonistの8-OH-DPATによって抑制されたという報告があり(1)、「5-HT_{2A}受容体と5-HT_{1A}受容体は相互に影響しあい、皮質ACh分泌に関与している」可能性が考えられた。そこで、今回はACh分泌における5-HT_{1A}受容体の関与を解明していくと共に、ACh分泌における5-HT_{2A}受容体と5-HT_{1A}受容体の相互関係についても明らかにしていくことを目的とした。

【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(5)、pentobarbital(40-60mg/kg,i.p.)麻酔下で前頭葉に透析プローブを留置した(AP:+2.7mm,DV:-2.5mm)。RDには透析プローブを垂直から35度の角度で挿入した(AP:-7.8,DV:-6.4)。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：1.5mMのKリン酸緩衝液中にNaCl 125mM,KCl 3.0mM,$CaCl_2$ 1.3mM,$MgCl_2$ 1.0mM,$NaHCO_3$ 23mMを含み、pHは7.4に調整)を5 μl/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。薬物投与前6検体のACh値の平均を基礎分泌値とし、値は総てその相対値で表示し、また統計学的検討に用いた。8-OH-DPAT はH_2Oに、fenfluramine・5-MeO-DMTはsalineに、また局所投与した8-OH-DPAT・fluoxetineは人工脳脊髄液中(pHを7.4に調整)に溶解した。

【結果】
8-OH-DPAT(0.1mg/kg,s.c.)は一過性に前頭葉ACh分泌を増加させたが、対照群（H_2O,s.c.)との比較では有意差は認められなかった(図1)。RDに選択的5-HT再取込み阻害薬のfluoxetine(1 μM)を5 μl/minの流速で60分間投与したところ、ACh基礎分泌値は有意に低下した(図2)。8-OH-DPAT(100nM,10 μM)を透析プローブを介して前頭葉に60分間投与したが、ACh分泌には有意な影響はもたらされなかった(図3)。しかし、fenfluramine(10mg/kg,i.p.)投与30分後から開始した8-OH-DPAT(10 μM,60分間)の局所投与により、ACh分泌はさらに増加した(図4)。5-HT_{2A}受容体に比較して5-HT_{1A}受容体により強い親和性を示す5-MeO-DMT(2.5mg/kg,i.p.)は前頭葉ACh分泌を著しく増加させたが、その効果は短時間で消失した(図5)。

【考察】
5-HT_{1A}受容体は自己受容体として背側および正中縫線核に豊富に存在すると共に、シナプス後受容体として皮質にも存在している(6)。前頭葉ACh分泌は、皮下投与した8-OH-DPATによっては有意な影響を受けなかったが、RDに投与したfluoxetineによっては著しく低下したことから、5-HTはRD上の5-HT_{1A}自

已受容体を介してACh分泌を抑制する可能性が示唆された。一方、前頭葉に投与した8-OH-DPATは、ACh基礎分泌値に有意な変化をもたらさなかった。しかし、fenfluramineによりACh分泌が著しく増加している最中に8-OH-DPATを前頭葉に投与したところ、ACh分泌はより一層増加した。fenfluramineによるACh分泌増加作用は5-HT_{2A}受容体antagonistのketanserinにより遮断されることから(3,4)、皮質に存在するシナプス後5-HT_{1A}受容体機能は5-HT_{2A}受容体活動の亢進に伴い向上する可能性が示唆された。この仮説は、8-OH-DPATによってではなく、5-HT_{1A}受容体と5-HT_{2A}受容体の双方に親和性を持つ5-MeO-DMTによってACh分泌が増加したことからも支持されると思われる。

【参考文献】

(1) Darmani, N., Martin, B.R., Pandey, U. and Glennon, R.A. (1990) *Biochem.Behav.* 36: 901-906. (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) Hirano, H., Day, J. and Fibiger, H.C. (1995) *J.Neurochem.* 65: 1139-1145. (5) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) 2nd ed, Academic Press, London. (6) Zifa, E. and Fillion, G. (1992) *Pharmacol.Rev.* 44: 401-458.

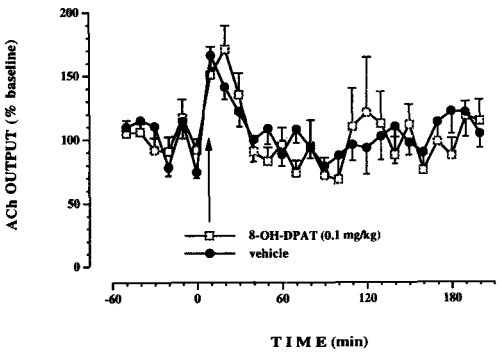


Fig. 1: Effects of 8-OH-DPAT (0.1 mg/kg, s.c., n=7) on ACh release in the rat frontal cortex. Points and vertical bars represent mean + S.E.M. in all figures.

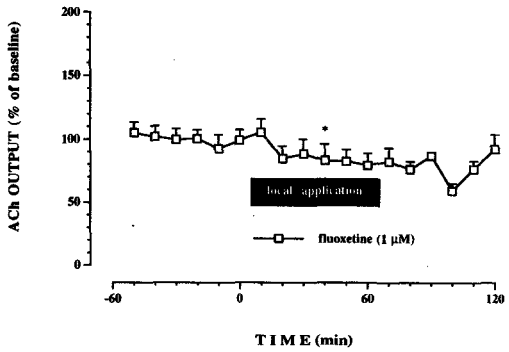


Fig. 2: Effects of fluoxetine (1 μM for 60 min, n=4) on basal ACh output in the rat frontal cortex. *p<0.05 (ANOVA followed by Fisher PLSD).

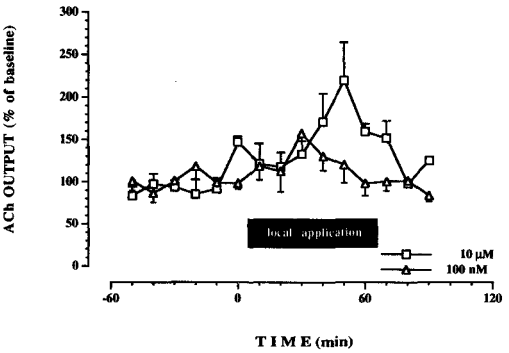


Fig. 3: Effects of 8-OH-DPAT (100 nM, 10 μM for 60 min, n=7) on cortical ACh concentrations.

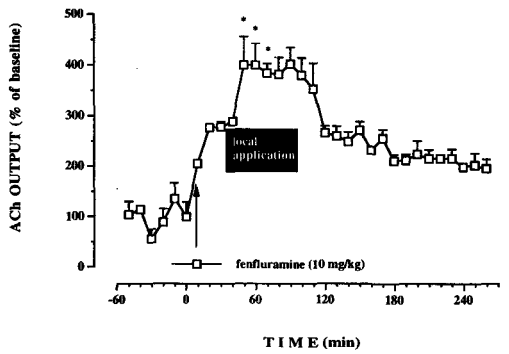


Fig. 4: Effects of 8-OH-DPAT (10 μM for 60 min, n=4) on the fenfluramine-induced increase in cortical ACh release. 8-OH-DPAT was applied 40 min after administration of fenfluramine (10 mg/kg, i.p.). *p<0.05 (ANOVA followed by Fisher PLSD).

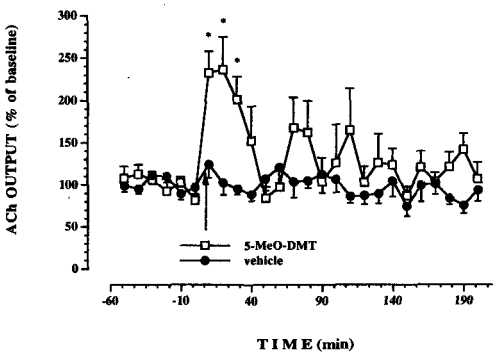


Fig. 5: Effects of 5-Methoxy-O-DMT (5-MeO-DMT, 2.5 mg/kg, n=7) on ACh release in the rat frontal cortex. *p<0.05 (ANOVA followed by Student's T-test).

148 2E37 ラット海馬細胞外液中のGABA濃度測定 - 興奮性アミノ酸によるGABA遊離作用

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〕

電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて、ラット海馬における微小透析液中の γ-aminobutyric acid (GABA) 濃度を測定した。細胞外 GABA 濃度は高カリウム (50 mM or 100 mM) あるいは GABA の再取り込み阻害剤である nipecotic acid (0.5 mM) のプローブを介した局所適用により著明に上昇した。また、興奮性アミノ酸受容体興奮薬の一つである N-methyl-D-aspartic acid (NMDA; 0.3-3 mM) の適用によっても GABA の用量依存的な増加が観察された。NMDA (1 mM) による GABA 増加作用は NMDA 受容体遮断薬 (AP-5: 1 mM) あるいは 非-NMDA 受容体遮断薬 (DNQX: 0.1 mM) により減弱された。以上の結果は、本実験で測定された GABA が神経性のものであること、および NMDA 誘発 GABA 遊離は NMDA 受容体のみでなく非-NMDA 受容体の活性化を介して引き起こされていることが示唆された。

HPLC-ECD は脳内透析法による細胞外液中の種々の神経伝達物質（モノアミン類、アミノ酸類など）の測定に繁用されている。これまで我々もこの手法を用いて脳内神経伝達物質遊離調節における興奮性アミノ酸受容体の関与について実験を行っている (2-4)。しかしながら、GABA は他のアミノ酸と異なり、その細胞外濃度が低濃度であるためにその同時測定が困難である。本実験においては脳内 GABA 遊離調節における興奮性アミノ酸受容体の役割を明らかにする目的で、脳内透析法と HPLC-ECD を組み合わせた方法を用いて海馬細胞外 GABA 濃度のみを測定し、その神経化学的特性および GABA 遊離におよぼす興奮性アミノ酸（とくに、NMDA）の作用を検討した。

[実験方法]

実験には Wistar 系雄性ラット（体重 300-350 g）を用いた。ペントバルビタール麻酔下、透析プローブ用ガイドカニューレ (Eicom) を海馬（bregma より後方 5.0 mm、側方 3.5 mm、深さ

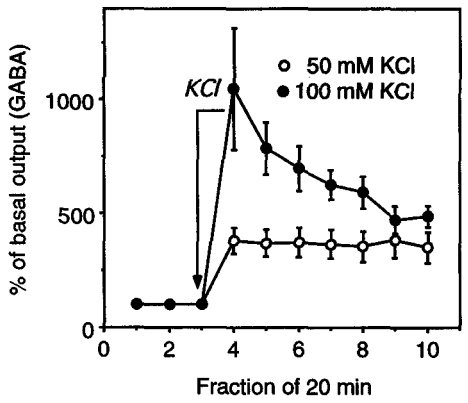


図-1. 海馬細胞外 GABA 濃度のおよぼす高カリウムの影響
高カリウム溶液は 4 番目のフラクションより、プローブを介して持続適用した。

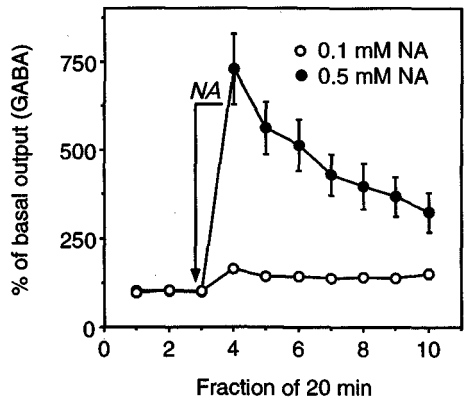


図-2. 海馬細胞外 GABA 濃度のおよぼす nipecotic acid (NA) の影響
NA 溶液は 4 番目のフラクションより、プローブを介して持続適用した。

2.7 mm）に植え込んだ。術後 5 日間以上経過後、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。灌流開始 3 時間後より20 分毎に灌流液を採取し、o-フタルアルデヒドと縮合反応させた後、HPLC-ECD により測定した。HPLC の固定相には Eicom MA-ODS (Eicom) を用い、移動相には 50% メタノール含有 0.05 M リン酸緩衝液 (pH3.25) を使用した。印加電位は 500 mV とし、カラム温度は 30℃に保った。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。

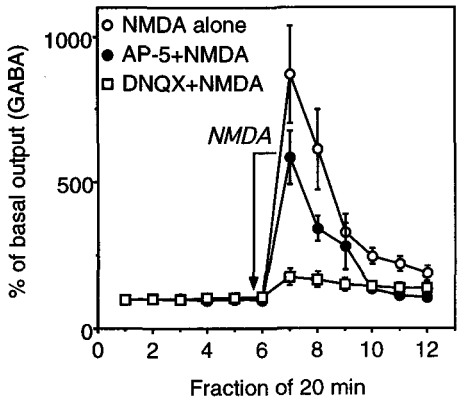


図-3. グルタミン酸受容体遮断薬（AP-5 あるいは DNQX）存在下あるいは非存在下における NMDA 持続適用による細胞外 GABA 濃度の変動
NMDA (1 mM) は 4 番目のフラクションより、プローブを介して持続適用した。AP-5 (1 mM) および DNQX (0.1 mM)は NMDA 適用 60 分前より灌流液中に加えた。

[実験結果および考察]

本実験に用いた脳内透析法 – HPLC-ECD の測定条件下で細胞外 GABA の検出が可能であった。高カリウム (50 mM) 溶液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 GABA 濃度の有意な増加が観察された。100 mM KCl 溶液灌流下ではさらに顕著な GABA 遊離が認められた（図-1)。GABA の神経終末への取り込み阻害薬である nipecotic acid (0.1 mM) の灌流液への添加により、軽度な細胞外 GABA 濃度の増加が観察された。0.5 mM nipecotic acid においては GABA 濃度は著明に上昇した（図-2)。これらの結果より、本実験で検出された細胞外液中の GABA は神経由来のものであることを示している。他の神経伝達物質を引き起こすことが知られている興奮性アミノ酸 (1-4) の一つである NMDA (1 mM) をプローブを介して、海馬内に局所適用したところ、有意且つ著明な細胞外 GABA 濃度の増加が認められた（図-3)。この NMDA 誘発 GABA 増加作用は、NMDA 受容体拮抗薬である AP-5 (1 mM) 存在下において、有意に抑制された。一方、この NMDA の作用は非-NMDA 受容体拮抗薬である DNQX (1 mM) においても強く抑制された。このような NMDA 誘発 GABA 遊離作用は、NMDA によるドパミン遊離作用と類似し、NMDA によるタウリン遊離作用とは異なる (3,4) と考えられる。すなわち、NMDA 局所適用による GABA 遊離は NMDA 受容体を介する直接作用と非-NMDA 受容体を介する間接作用（おそらく、内因性グルタミン酸遊離を介する）によって引き起こされる可能性が示唆された。また、海馬細胞外 GABA 濃度調節に NMDA 受容体および非-NMDA 受容体の活性化による機構が存在すると思われる。このことは、非-NMDA 受容体の興奮薬である AMPA (1 mM) あるいはカイニン酸 (1 mM) の局所適用によっても、有意な GABA 濃度の上昇が認められたことによりも示唆された。しかしながら、NMDA 誘発 GABA 遊離作用機構の解明に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か否かを含めさらに詳細な検討が必要である。

[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) Shibanok, S., Sugahara, M. and Ishikawa, K. (1996) Int. Acad. Drug Res. 11, 145-150

149 2E24 ムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプ特異的発現に関与する分化誘導因子

深間内 文彦、王益珺、俣賀 宣子
(東京医歯大・難研・プロジェクト)

〔 要約 〕

神経由来細胞株であるNCB-20とNG108-15を用いて、酪酸ナトリウムとジブチリルcAMPのムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプmRNAの発現に対する作用について検討した。NCB-20は、ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプのうち、m1とm4を発現しており、NG108-15はm4のみを発現していた。酪酸ナトリウムは、NG108-15のm4とNCB-20のm4のmRNAレベルを有意に増加させた。一方、ジブチリルcAMPは、NCB-20におけるm1とm4およびNG108-15のm4のmRNAのレベルを減少させ、これら2種類の分化誘導因子は、NCB-20とNG108-15において発現しているアセチルコリン受容体サブタイプの転写とmRNAの安定性に重要な影響を与えることが示唆された。

ムスカリン性アセチルコリン受容体は現在まで5種類のサブタイプ (m1-m5)の遺伝子構造が明らかにされており、神経系でのそれぞれの生理的機能に関する研究が進んでいる。ところで、NCB-20とNG108-15は共通の親株である神経芽細胞腫N18TG2に由来するが、我々は以前、これらの細胞株を用いて、酪酸ナトリウムとジブチリルcAMPによるムスカリン性アセチルコリン受容体の結合部位とセカンドメッセンジャー系の変化、および神経繊維の形態学的特徴について報告した。今回の実験では、同様な系で受容体サブタイプに特異的なcDNAを用いてmRNAの定量的解析を行なった。

[実験方法]

細胞培養: 細胞は、10% fetal calf serum、penicillin (100U/ml)、streptomycin (100 μg/ml)、0.1 mM hypoxanthine、 0.4 μM aminopterin、 16 μM thymidineを含む high-glucose DMEM培地を用い、8%CO_2、37℃の条件下で培養した。酪酸ナトリウムとジブチリルcAMPは各々1 mMを用いた。

mRNAの検出: 反応培地を除去後、既報(1)に従いRNAを抽出し、ノーザンブロット法によりmRNAを検出した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)をコントロールとして用い統計学的処理を行なった。

[結果および考察]

ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ特異的なcDNAプローブ(2)を用いて、ノーザンブロット法を試みたところ、NCB-20はm1とm4-mRNAを発現しており、NG108-15はm4-mRNAのみを発現していた。酪酸ナトリウム(1 mM)をNCB-20に作用させると時間依存的にm1-mRNAを増加させた。しかしながら、m4-mRNAには変化がなかった(Fig.1)。この時間経過の中ではGAPDH

の発現は一定であった。酪酸ナトリウムによる作用とは対照的に、ジブチリルcAMP(1mM)はNCB-20におけるm1とm4-mRNAの発現を抑制したが、m4-mRNAの減少の程度はm1に比較して、より大きなものであった(Fig.2)。m4のみを発現しているNG108-15においてもジブチリルcAMPはm4-mRNAを有意に減少させた。また、NCB-20におけるm4-mRNAの結果に一致して、酪酸ナトリウムはNG108-15のm4-mRNAには影響を与えなかった(Fig.3)。さらに、NG108-15をジブチリルcAMPで72時間処理するとムスカリン性アセチルコリンの結合部位数が約40%減少することを確認した。

以上のように酪酸ナトリウムは選択的にNCB-20のm1-mRNAを増加させ、NCB-20の酪酸ナトリウムによるムスカリン性アセチルコリン結合部位数の増加とホスファチジルイノシトールリン脂質代謝の亢進の少なくとも一部はm1-mRNAの増加によるものであると考えられる。NCB-20におけるジブチリルcAMPによるムスカリン性アセチルコリン結合部位数のdown-regulationは、m1とm4-mRNAの減少と関連があるが、この点については、アセチルコリン受容体の、あるサブタイプの転写の効率やmRNAの安定性がcAMPの抑制的制御の下にあることを示唆している。特にm4受容体遺伝子では、細胞特異的なプロモーター活性とリプレッサーエレメントの存在が明らかにされている。さらに、酪酸ナトリウムやジブチリルcAMPによる顕著な細胞の形態上の変化はこれらの薬物によるサブタイプ特異的な発現パターンの変化と密接な関わりがあるものと思われる(3)。

[文献]

1)F.Fukamauchi et al. *FEBS Lett.* 348:263-267 (1994).

2)F.Fukamauchi et al. *Mol. Pharmacol.* 44:940-949 (1993).

3)F.Fukamauchi et al. *Neurosci. Lett.* (in press) (1996).

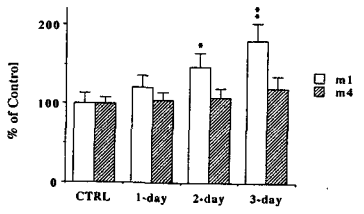


Fig. 1

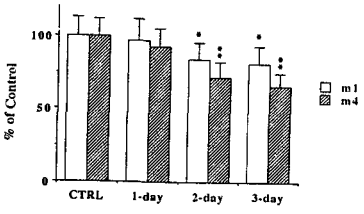


Fig. 2

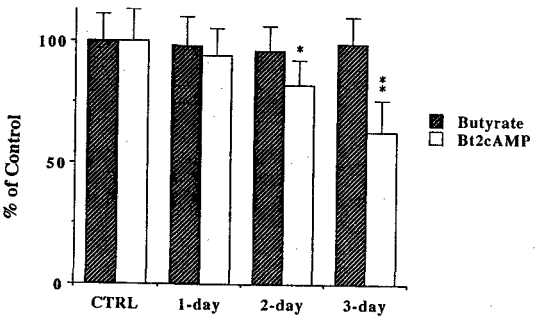


Fig. 3

150 3Ba1 受容体ーイオンチャネルカップリングはストレプトゾトシンの処理でNAD$^+$量の減少した神経腫瘍NG108-15細胞で抑制される

野田百美[1,2]、東田陽博[1]
([1]金沢大・医・神経情報研、[2]九大・医・生理)

〔 要約 〕

NG108-15細胞に発現している各種の受容体からMカリウムチャネルへの信号伝達経路をNAD$^+$代謝の面から研究した。NG108-15細胞へのATP、ブラジキニン、アンギオテンシン、エンドセリンやアセチルコリン(ACh)の添加は、37〜51%のM電流の抑制を生じた。5 mMのストレプトゾトシン(STR)は細胞内NAD$^+$量を約50ー60%減少させ、そのような状態ではそれぞれのアゴニストによるM電流抑制は有意に減少した。以上の結は、異なる受容体によるMチャネル抑制がNAD$^+$代謝の関与する共通の信号伝達経路により生じていることを示唆する。

神経節細胞で、アセチルコリン(ACh)はスローな興奮性シナプス後電位を生じ、それは膜電位依存性の不活性型Kチャネルである M電流の抑制により生じる。節後細胞のムスカリン受容体 (mAChR)から、M電流抑制に至る信号伝達経路については今だ定説がない。我々はNAD$^+$代謝とM電流抑制が関係するという予測のもとに、膵臓β細胞を死滅させ、実験的糖尿病を発生することが知られているストレプトゾトシン(STR) を使って(1)、この問題にアプローチした。

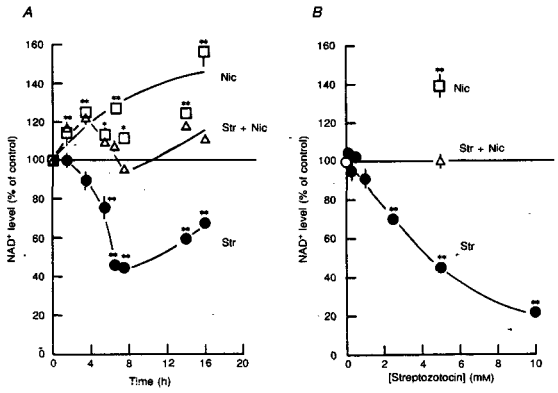
【 方法 】 m1 サブタイプmAChR cDNA をトランスフェクトしたNG108-15細胞のクローン NGPM1-27 を実験に用いた。測定用にはジブチリールcAMPで分化した細胞を用いた。NAD$^+$の定量はNisselbaum とGreen の方法によった(2)。膜電流はパッチクランプ法を用いた(3)。

【 結果 】 NGPM1-27 細胞を1ー10 mMのSTR 存在下で、4ー5 時間培養すると、細胞内NAD$^+$量 (4.34 ± 0.7 nmol/10^6 cells; n = 7; mean ± SEM) が40ー60 %減少し、約10時間ほど持続した (図1)。一方、2ー5 mM のニコチナマイド (NIC) を単独で加えるとNAD$^+$ レベルは40ー50%上昇し、NICとSTR と同時に添加するとNAD$^+$ レベルの変化は減少した。

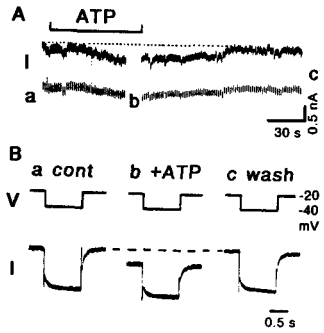
ナトリウムとカルシウムチャネルの活性、ACh によるイノシトール1,4,5 三リン酸産生能、m4 受容体刺激によるアデニレートシクラーゼ活性抑制等については、STR 処理と非処理細胞間に差は認められなかった。また、Mカリウム電流の大きさも変わらなかった (図2)。ATP (図2と3)、ブラジキニン、アンギオテンシン、エンドセリンやAChを添加し、それぞれのアゴニストが生じるM電流抑制率を測定した。抑制率は非処理細胞で、それぞれ37ー57%であり、STR 処理細胞では7ー19%のみであった (表1)。

【考察】　NG108-15細胞の発現する異なる受容体からM電流抑制への信号伝達経路が、STRによるNAD$^+$減少により、blockされることが示された。NAD$^+$そのもの、あるいは代謝産物の、"サイクリックADPリボース"等が、それに関与することが考えられる（4、5）。

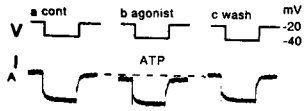
【図1】　STRによるNGPM1-27細胞内NAD$^+$減少の時間経過(A)と濃度依存曲線(B)　(*P<0.01,**P<0.001)



【図2】　NGPM1-27細胞で生じる、ATPによる内向き電流(A)とM電流抑制(B)



【図3】　STR処理細胞でのATPによるM電流抑制の減少



【表1】　STR処理、非処理NGPM1-27細胞での各種アゴニストによるM電流抑制率の比較
(* P < 0.001 and ** P < 0.01)

	Percentage inhibition of M-current (*n*)	
Agonist	Control	Streptozotocin
ATP	41 ± 3.1 (14)	9.1 ± 5.5** (10)
Bradykinin	43 ± 6.1 (9)	19 ± 6.2* (6)
Angiotensin II	37 ± 3.6 (11)	7.0 ± 4.7** (4)
Endothelin 1	37 ± 5.3 (5)	15 ± 4.6* (8)
ACh	57 ± 4.8 (6)	17 ± 9.8* (5)

【文献】

1) Yamamoto, H., Uchigata, Y. & Okamoto, H. (1981). Nature 294: 284-286.
2) Nisselbaum, J. S. & Green, S. (1969). Analyt. Biochem. 27: 212-217.
3) Higashida, H., Brown, D. A. (1986). Nature 323: 333-335.
4) Higashida, H., Robbins, J., Egorova, A., Noda, M.,Taketo, M., Ishizaka, N., Takasawa, S., Okamoto, H. & Brown, D. A. (1995). J. Physiol. 482: 317-323.
5) Higashida, H., Egorova, A., Hoshi, N. & Noda, M. (1996). FEBS Lett. 379: 236-238.

151 PC12D細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体 2E25 (mAChR)によるCa^{2+}流入調節

海老原 達彦、David Saffen
東京大学医学部脳研究施設、生化学部門

〔 **要約** 〕1) PC12D細胞において、mAChR活性化によって引き起こされる細胞内へのCa^{2+}流入は、細胞内のCa^{2+}ストアが空になることに引き続くcapacitative Ca^{2+} entryによる。いわゆる"receptor operated channel" が機能した証拠は得られなかった。 2) mAChR活性化によって、電位依存性Ca^{2+}チャネル(主としてLチャネル)が抑制される。この抑制は、m1-mAChRを介したPKC活性化に引き続いておこると考えられ、ホルボールエステル投与によっても見られる。

[目的] PC12細胞の亜株であるPC12D細胞は、神経成長因子(NGF)によって、PC12より速やかに神経様に分化する(1)。以前我々が示したことは、以下のようにまとめられる。PC12D細胞がm1, m4サブタイプのmAChRを持ち、m1受容体のみがmAChRアゴニスト刺激による前初期遺伝子zif268の発現に関与する。m1受容体を介したPKC活性化とCa^{2+}の細胞外からの流入の双方がzif268遺伝子発現を起こし、二つの遺伝子発現経路は互いに部分的に独立している。Ca^{2+}によるzif268の発現の際、細胞内Ca^{2+}ストアからの放出だけでは不充分である(2)。

本研究の目的は、PC12D細胞におけるmAChR活性化によるCa^{2+}流入機構の解明である。

[方法] PC12D細胞を、(3)の方法に従ってpH7.4のKrebs-Ringer-HEPESバッファーに懸濁し、Fura-2/AMを加える(18℃で行う)。蛍光測定は、日本分光の蛍光分析装置(FP-770)を用いて行い、22℃のquartz cuvette中で沈澱しないようにPC12Dを懸濁し続けた。340または360 nm の光で励起された蛍光を510 nmで読みとった。

[結果と考察] Fig1.に、細胞外Ca^{2+}存在下、非存在下のカルバコール刺激に引き続くPC12D細胞の細胞内Ca^{2+}の動向を示す。図より、初期の細胞内Ca^{2+}上昇は細胞内Ca^{2+}ストアからの放出によるもので、引き続くプラトー相は、細胞外からの流入によると考えられる。PC12Dにthapsigargin(滑面小胞体Ca^{2+}ポンプの特異的阻害剤)を投与すると細胞内Ca^{2+}ストアのCa^{2+}が空になり、持続的にCa^{2+}が細胞外から流入する。thapsigarginによって起こる流入は、Ca^{2+}ストアが空になると生ずる未知のシグナルが引き起こすと考えられる"capacitative entry"である。更に調べた結果、カルバコールはthapsigarginと同じCa^{2+}ストアを空にし、その作用がカルバコール存在下で続くこと、アンタゴニストのアトロピンの投与でストアが再充填されることが分かった。アトロピンによるmAChR抑制は、細胞内Ca^{2+}を元のレベルに戻す(Fig2a)。つまりCa^{2+}ストア再充填と細胞内Ca^{2+}のレベルが元に戻ることは、相関している。様々な細胞で、thapsigargin処理でMn^{2+}が細胞外からの流入が促進されることが知られている(Fura-2蛍光のquenchとして観察される)。このMn^{2+}流入が、細胞外Ca^{2+}濃度増加で抑制されることから、Mn^{2+}もCa^{2+}チャネルを通って細胞内に入るものと考えられる。更にmAChR

を介したi) プラトー相のCa^{2+}レベル ii) Mn^{2+}流入が、thapsigarginによるものと等価であり、加算されることもないことが分かった(Fig3, Fig4)。このことからmAChR及びthapsigarginを介したCa^{2+}上昇は、Ca^{2+}流入について、共通のメカニズム：capacitative entryによって起こると考えられる。2)PC12D細胞ではmAChR活性化によって、電位依存性Ca^{2+}チャネル(主としてLチャネル)を介するCa^{2+}流入が強い抑制を受ける。この抑制は、thapsigarginでは見られない。ホルボールエステル単独投与でも同様に抑制が見られることから、電位依存性チャネルの抑制はmAChRを介してPKCが活性化された結果と考えられる。

(1) Katoh-Semba, et al. (1987) J. Neuroscience Research 17, 36-44.
(2) Ebihara, T. and Saffen, D. (1996) submitted for publication
(3) Zacchetti, D. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 20152-20158

Fig. 1

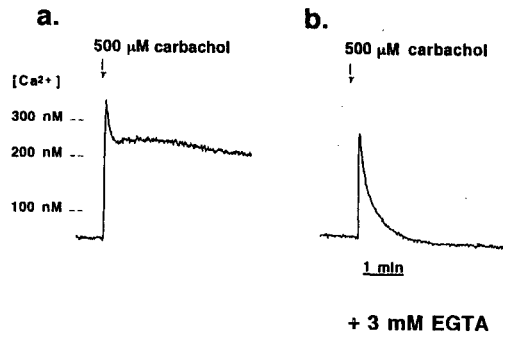


Fig. 2

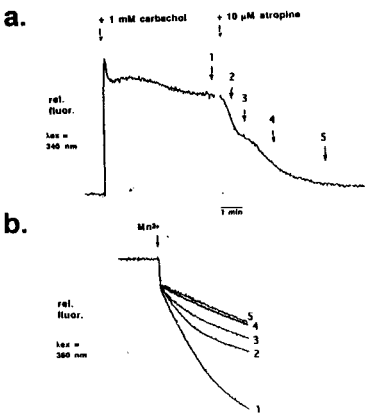


Fig. 3

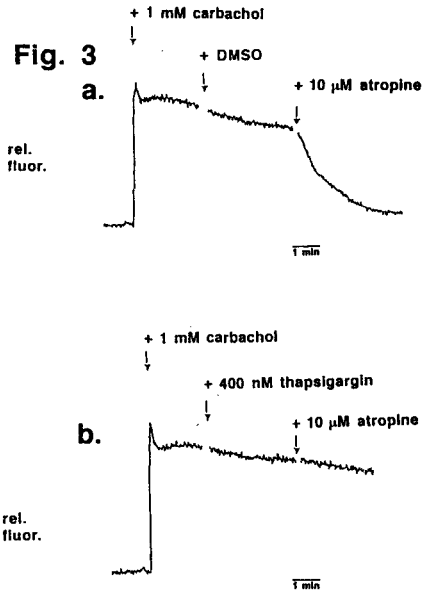
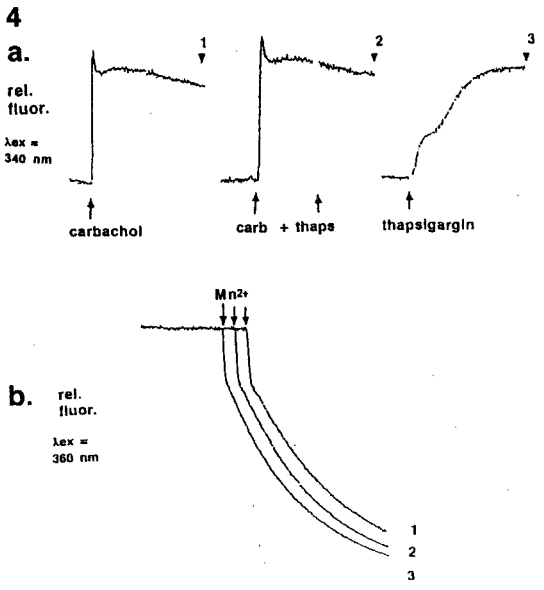


Fig. 4



152 2E26 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内移行

津賀 浩史[1,2]、本間健資[1]、奥野 恵理子[2]、亀山 仁彦[2]、芳賀 達也[2]
([1]労働省産業医学総合研究所職業病研究部、[2]東京大学医学部脳研究施設脳生化学部門)

【要約】
COS-7細胞に一過性に発現させたヒトムスカリン受容体m1-m5サブタイプ(Hm1-Hm5受容体)の細胞内移行は、Gタンパク質共役受容体キナーゼ2(GRK2)の共発現により促進された。GRK2のドミナントネガティブ変異体DN-GRK2の共発現により、Hm2とHm4受容体の細胞内移行は阻害されたが、Hm3とHm5受容体の細胞内移行は影響を受けず、Hm1受容体の細胞内移行は促進された。BHK-21細胞に発現させたHm2の細胞内移行はGRK5の共発現によって促進されたが、Hm3受容体の細胞内移行は促進されなかった。GRKでのリン酸化による細胞内移行の促進は、多くの受容体に当てはまる現象と推測される。

G蛋白質共役受容体をアゴニストに曝し続けると作用が減弱する。この脱感受性という現象には受容体のリン酸化が関与していると推測される。G蛋白質共役受容体キナーゼ(G-protein coupled r eceptor k inase、GRK)はG蛋白質共役受容体をアゴニスト依存性にリン酸化する酵素で、受容体の同種脱感受性に関与すると考えられている(1,2)。我々は、COS-7細胞に発現させたブタm2受容体のアゴニスト依存性リン酸化と細胞内移行がGRK2共発現により促進され、DN-GRK2共発現によって阻害されることを報告した(3)。本研究では、他のムスカリン受容体サブタイプの細胞内移行について、GRK2および他のGRK共発現の影響を調べた。

【方法】Hm1-Hm5受容体を一過性に発現させたCOS-7細胞またはBHK-21細胞について、カルバミルコリン刺激による[^{3}H]NMS(N-methylscopolamine)結合活性の細胞表面からの消失によって細胞内移行を定量化した(3)。各サブタイプについてGRK2、5、6およびDN-GRK2を同時に発現させ、その影響を調べた。

【結果】COS-7細胞に発現させたHm2及びHm4受容体の細胞内移行は、GRK2共発現によりカルバミルコリン作用濃度(EC_{50})が低下し、細胞内移行する受容体の割合が増加した。DN-GRK2共発現によって、Hm2受容体でEC_{50}の上昇、Hm4受容体ではEC_{50}の上昇ならびに細胞内移行する受容体量の減少が見られた(表1)。Hm1、Hm3、Hm5受容体の細胞内移行の割合は、10^{-3}Mカルバミルコリン刺激で10-25%とm2、m4受容体に比べて低かったが、GRK共発現によってHm5>Hm3>Hm1の順で増大した。DN-GRK2共発現の影響はHm3とHm5受容体では見られなかったがHm1受容体では若干の促進が見られた(表1)。GRK5とGRK6のCOS-7細胞での共発現は受容体各サブタイプの細胞内移行に影響を与えなかった。BHK-21細胞ではHm2とHm3受容体の細胞内移行は起こりにくかったがGRK2共発現によって促進された。Hm2受容体ではGRK5の共発現によっても細胞内移行が促進されたがHm3受容体は影響を受けなかった。GRK6共発現はどちらの受容体の細胞内移行も促進しなかった(表2)。

【考察】Hm2-Hm5受容体の細胞内移行はGRK2によるリン酸化によって促進されると考えられる。Hm2とHm4受容体はCOS-7細胞内在性キナーゼ、Hm2は更にGRK５によっても細胞内移行が促進される。我々はドーパミンD2受容体の細胞内移行もGRK2とGRK５によって促進されることを見出している。Caron達はβアドレナリン受容体の細胞内移行

がGRK2によるリン酸化によって促進されるとの結果を発表している(4)。Gタンパク質共役受容体のGRKによるリン酸化と細胞内移行促進の関係は、多くの受容体に当てはまると考えられる。ただし、その程度及び関係するキナーゼの種類は受容体によって異なると推測される。

Refference: 1. Lefkowitz, R. J. (1993) *Cell* 74, 409-412
2. Haga, T., Haga, K., and Kameyama, K. (1994) . *J. Neurochem.* 63, 400-412,
3. Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H., and Nagao, T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 32522-32527
4. Ferguson, S. S. G., Ménard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colapietro, A.-M., and Caron, M. G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24782-24789

表1、COS-7細胞におけるヒトムスカリン受容体の細胞内移行
(1 mM Carbamylcholine 2時間刺激)

	Hm2受容体		Hm4受容体	
	細胞内移行(%)	EC50(μM)	細胞内移行(%)	EC50(μM)
control	46.1±5.7 (7)	2.1	49.4±2.5 (3)	9.0
GRK2	58.1±5.7 (6)	0.34	61.2±7.3 (6)	1.6
DN-GRK2	45.4±3.4 (4)	4.6	27.3±6.6 (3)	16
GRK5	49.9±1.7 (3)	1.3	45.8±2.6 (3)	9.0
GRK6	53.3±4.2 (3)	1.8	45.7±6.7 (3)	7.3

	Hm1受容体	Hm3受容体	Hm5受容体
		細胞内移行(%)	
control	10.4±5.0 (7)	21.6±5.6 (3)	23.8±2.6 (3)
GRK2	30.9±5.1 (7)	33.5±2.4 (3)	50.7±5.2 (3)
DN-GRK2	24.7±2.0 (5)	12.5±6.5 (4)	23.4±6.6 (5)
GRK5	1.63±3.3 (3)	19.3±2.9 (3)	24.1±4.9 (3)
GRK6	7.73±4.5 (3)	20.4±3.7 (3)	22.3±2.4 (3)

表2、BHK-21細胞におけるHm2、Hm3受容体の細胞内移行
(1 mM Carbamylcholine 2時間刺激)

	Hm2受容体		Hm3受容体	
	細胞内移行(%)	EC50(μM)	細胞内移行(%)	EC50(μM)
control	25.6±1.9	3.4	16.0±1.4	29
GRK2	39.4±3.2	0.21	34.8±3.4	4.5
GRK5	30.8±2.9	3.5	10.4±2.0	83
GRK6	25.5±7.1	3.1	11.2±4.1	58

153 2E27 Gタンパク質共役受容体キナーゼのカルモジュリンとS100タンパク質によるCa^{2+}依存性阻害

芳賀和子、芳賀達也（東京大学医学部脳研究施設生化学部門）

〔要約〕Gタンパク質共役受容体キナーゼGRK2（＝βアドレナリン受容体キナーゼ＝βARK1）によるムスカリン性アセチルコリン受容体m２サブタイプ（m2受容体）およびロドプシンのアゴニストあるいは光依存性リン酸化がカルモジュリンまたはS100タンパク質によってCa^{2+}依存性に阻害された。Gタンパク質βγサブユニットによる GRK2活性化曲線は、Ca^{2+}-カルモジュリン添加で βγの高濃度側にシフトした。m2受容体の第3細胞内リン酸化部位を含む融合タンパク質I3-GSTのGRK2によるリン酸化は、Ca^{2+}-カルモジュリン添加で影響を受けなかった。しかし、リン酸化部位を欠損させたムスカリン受容体変異種（I3-del m2）によるI3-GSTリン酸化のアゴニスト依存性促進は、Ca^{2+}-カルモジュリンによって阻害された。これらの結果から、Ca^{2+}-カルモジュリンはGRK2の触媒部位には直接作用せず、アゴニスト結合受容体とGタンパク質βγサブユニットによるGRK2の活性化を阻害すると結論した。

ロドプシンキナーゼ（GRK1）によるロドプシンの光依存性リン酸化はs-modulin（またはrecoverin）によってCa^{2+}依存性に阻害され、この阻害によって光応答の順応性が説明されることが知られている(4,5)。S-modulinはEFハンドを３つ持つCa結合タンパク質である。脳内にもs-modulin類似のEFハンドを３つ持つCa結合タンパク質が同定されているが、その役割は明らかではない。GRK2がCa結合タンパク質によって阻害される可能性を調べたところ、EFハンドを４つ持つカルモジュリンあるいは２つ持つS100タンパク質によって阻害されることを見出した。

［**方法**］m2受容体、I3-del m2変異体 (a m2 receptor mutant that lacks a central part of the third intracellular loop including phosphorylation sites) 、GRK2はバキュロウイルスSf9細胞系を用いて発現させ、精製した(3)。I3-GST(Glutathione S-transferase fusion protein containing a peptide including phosphorylation sites in the third intracellular loop of m2 receptors) は大腸菌に発現させ、精製した。カルモジュリンとS100タンパク質はブタ脳から精製し、質量分析計(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry)により同定した（都立大磯辺俊明博士の好意による）。リン酸化は既報に従って測定した(1)。

［**結果**］GRK2はGタンパク質βγサブユニットとアゴニスト結合受容体によって相乗的に活性化されることが知られている(1-3)。図１は、m2受容体もしくはロドプシンのGRK2によるリン酸化に対するβγサブユニット濃度の影響を、Ca^{2+}カルモジュリンあるいはCa^{2+}S100有無の条件で見たものである。Ca^{2+}カルモジュリンあるいはCa^{2+}S100によるリン酸化の抑制はβγサブユニット存在しないときにも見られ、また活性化曲線がCa^{2+}カルモジュリンあるいはCa^{2+}S100によって右側にシフトした。これは、βγサブユニットとCa^{2+}カルモジュリンあるいはCa^{2+}S100が拮抗的に働くことを示唆している。図２はI3-GSTのリン酸化に対するCa^{2+}カルモジュリンの影響を示す。I3-GST単独のリン酸化は影響を受けないが、I3-del m2によるアゴニスト依存性活性化はCa^{2+}-カルモジュリンによって阻害された。

［**考察**］カルモジュリンによるGRK2の阻害が*In Vivo*でも観察され、生理的意味を持つか否かは今後の課題である。m2受容体はGi/Goに共役しCaチャネルを抑制するので、光刺激によるのと同様にアゴニスト刺激で細胞内Caが減少する。明順応と同様な調節機構が可能性として考えられる。

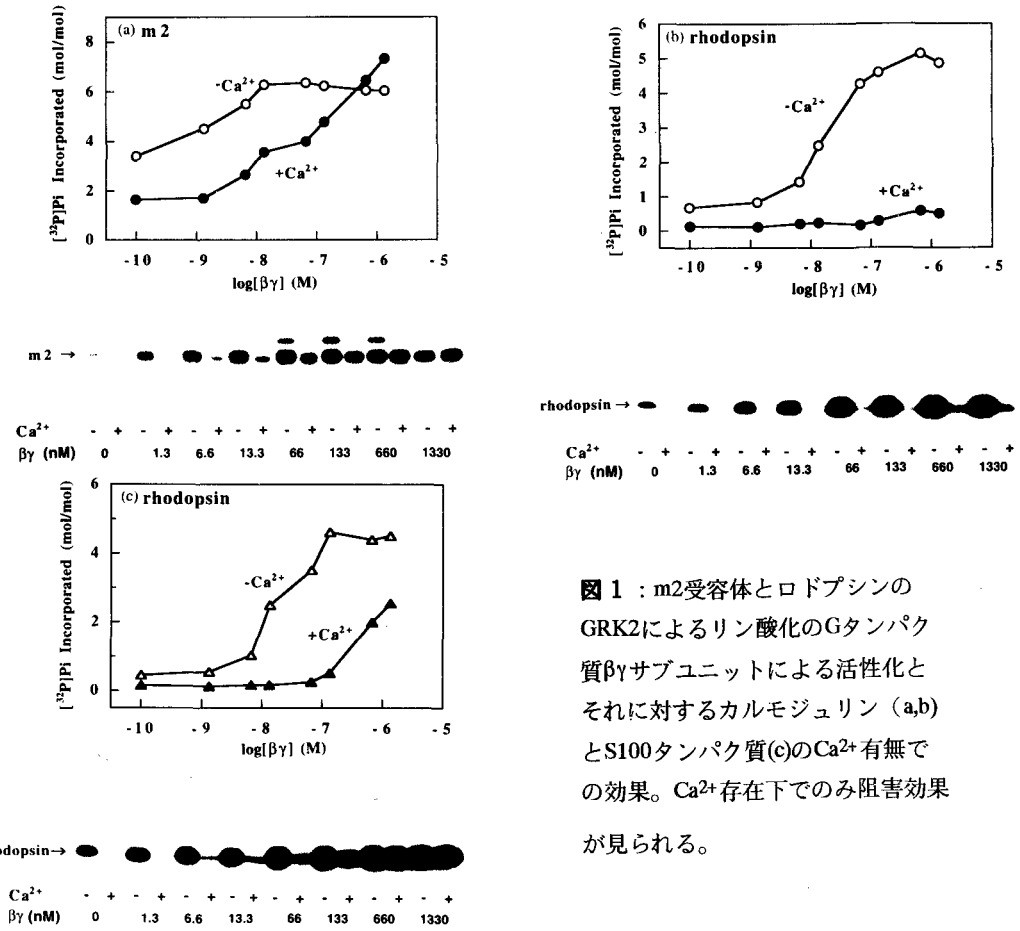


図 1 ：m2受容体とロドプシンのGRK2によるリン酸化のGタンパク質βγサブユニットによる活性化とそれに対するカルモジュリン（a,b）とS100タンパク質(c)のCa^{2+}有無での効果。Ca^{2+}存在下でのみ阻害効果が見られる。

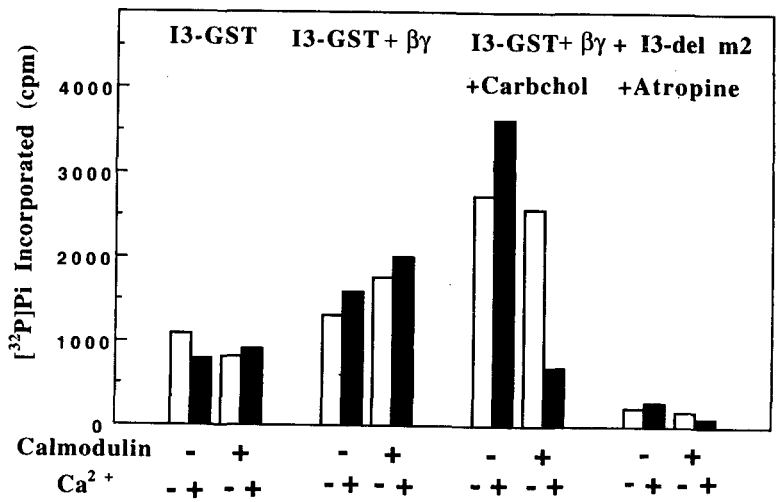


図 2 ：I3-GSTのGRK2によるリン酸化に対するカルモジュリンの効果。I3-del m2受容体存在下でのカルバミルコリンによる活性化のみが阻害される。

References: (1) Haga, K., Kameyama, K., & Haga, T. (1994) *J. Biol. Chem. 269*, 12594-12599. (2) Haga, T., Haga, K., & Kameyama, K. (1994) *J. Neurochem. 63*, 400-412. (3) Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Moro, O., & Sadée W. (1994) *Eur. J. Biochem.226* 267-27. (4) Kawamura, S. (1993) *Nature 362*, 855-857. (5) Kawamura, S., Hisatomi, O., Kayada, S., Tokunaga, F., & Kuo, C.-H. (1993) J. Biol. Chem.*268*, 14579-14582.

154 2E28 脳におけるG蛋白質γサブユニットγ3とγ12の局在と加齢による濃度変化

森下理香、佐賀信介*、稲垣俊明**、加藤兼房、浅野富子
（愛知県コロニー・研・生化、*形態、**名古屋市厚生院）

G蛋白質γサブユニットγ3とγ12の脳内における局在を検討した。ラットの生後発達に伴いこれら2種類のγの脳内濃度は上昇した。一方、ヒト脳内γ3濃度は加齢により有意に低下したのに対し、γ12はわずかに増加した。この傾向は老年痴呆の有無とは関連がみられなかった。ヒト脳を免疫組織学的に検索すると、γ3はニューロピルに、γ12は一部のグリア細胞に存在した。老化脳の海馬体では、錐体細胞が減少したCA1野と海馬台にγ12強陽性のグリア細胞が多く観察された。このようなγ12陽性細胞の出現はカイニン酸で処理したラット海馬においても観察され、γ12が反応性アストロサイトに発現していることを示唆した。培養細胞においてγ3はPC12細胞にγ12はC6やGA-1グリオーマ細胞に存在した。以上の結果からγ3は神経細胞にγ12はグリア細胞に発現していると結論できる。

G蛋白質はα、β、γの3つのサブユニットから構成されており、各サブユニットとも一次構造の異なる複数の分子種が存在する(1)。γサブユニットはこれまでに11種類が報告されており、脳には少なくとも5種類のγ（γ2、γ3、γ5、γ7、γ12）が存在するが(2, 3)、それらに機能的差異があるのか明らかでない。今回、特異抗体が免疫組織化学的染色に応用できたγ3とγ12の脳内局在について検討したところ、異なる局在を示し、両者の異なる機能を示唆する結果を得た。

[方法]

γ3およびγ12の抗体は、N末端アミノ酸配列に一致したペプチドでウサギを免疫し、得られた抗血清をアフィニティ精製した(2, 3)。ヒト脳は剖検により得られた死後脳を用いた。ラットのカイニン酸処理は7.5mg/kg腹腔内投与で行い、投与後6日目にエーテル麻酔下で海馬を摘出した。イムノブロットはラットおよびヒト脳のコール酸抽出液をSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写、発色は化学発光で行った。免疫組織化学は各抗体を用いて酵素抗体間接法で行った。

[結果]

ラット脳内におけるγ3とγ12の分布を調べると脳のどの部位にも存在した。ラットの生後発達に伴い、γ3とγ12の脳内濃度はどちらも顕著に上昇し、GFAPの濃度変化とも並行していた（図1）。次に加齢によるγ3とγ12の脳内濃度変化をヒト大脳皮質の2ヶ所（前頭葉の上前頭回、側頭葉の海馬傍回）の部位について調べた。老化脳（80歳以上）において、γ3は両部位で有意に減少したのに対し、γ12は側頭葉において増加する傾向がみられた。これらγの濃度変化は老年痴呆の有無とは関連がみられないので、加齢によるものと考えられる。ヒトの脳を免疫組織化学染色すると、抗γ3ではニューロピルが染色され、抗γ12では一部のグリア細胞とみられる細胞が染色された。老化脳の海馬体では、錐体細胞の減少が

みられ、CA1野と海馬台にGFAPやビメンチンとともにγ12強陽性の細胞が多く観察された。カイニン酸を投与したラットの海馬でも同様に、錐体細胞の減少とともに反応性アストロサイトが出現するが、やはりγ3の減少とCA1野にγ12陽性細胞が観察された。これらの結果から、γ12は反応性アストロサイトに強く発現していることが明らかになった。さらに、培養細胞中では、γ3はPC12細胞のみに、γ12はC6とGA-1グリオーマ細胞に多く存在しており、上記のγ3とγ12の脳内の局在と一致していた。

[考察]

γ3は脳に特異的に存在することはすでに報告されていたが、今回の結果より神経細胞に局在していることが判明した。生後発達に伴うγ3の増加はシナプス形成と一致し、老化脳でのγ3の減少は神経細胞の減少によるものと考えられる。一方、γ12はほとんどの組織に分布しているγであるが、脳内においては一部のグリアとみられる細胞に局在しており、とくに反応性アストロサイトに強く発現していた。γ12の生後発達に伴う増加はアストロサイトの成熟に対応しているのではないかと推察される。このような2種類のγサブユニットの局在の違いは、両γの機能的差異を示しているものと考えられる。ニューロピルに存在するγ3は神経伝達に関与することが予想されるが、グリア細胞でのγ12の機能は不明である。

[文献]

1) Neer, E. J. (1995) Cell 80, 249-257.

2) Asano, T., et al. (1995) J. Neurochem. 64, 1261-1273.

3) Morishita, R., et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 29469-29475.

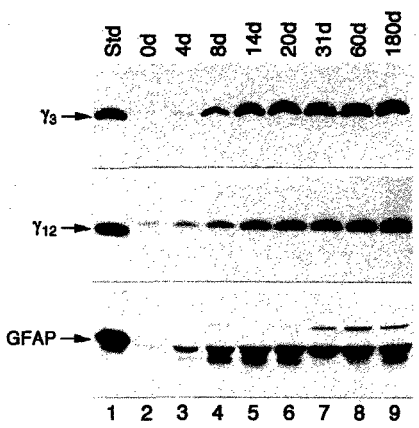


図1　ラットの生後発達に伴うγ3、γ12およびGFAPの脳内濃度変化

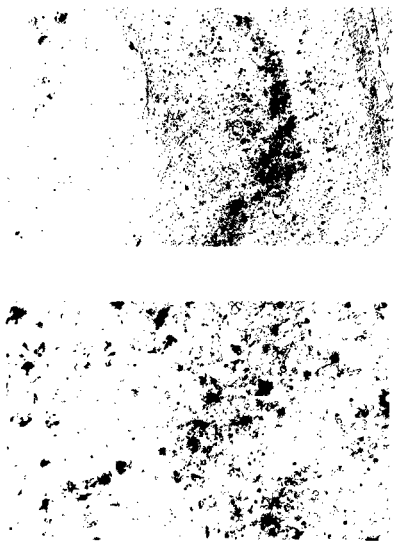


図2　ヒト老化脳の海馬におけるγ12の免疫組織化学染色
（上）x 7.5　（下）x 38

155 D1ドーパミン受容体と結合するアデニル酸シクラーゼの同定

3Ba2

木村和弘、岡田尚子、森松正美、斉藤昌之
(北海道大学・大学院 獣医学研究科・生化学教室)

〔要約 Human neuroblastoma cell line, SK-N-MC 細胞に発現するD1ドーパミン受容体 (DR) とカップルするアデニル酸シクラーゼ (AC) の同定を試みた。Forskolinに対する応答からこの細胞にはprotein kinase A (PKA) とCa2+によって抑制されるType 5または6ACが発現すると考えられた。このType 5または6AC活性をforskolinの前処置で抑制した場合、D1-agonist によるcAMPの蓄積は50%以上抑制されたが、β-agonist によるcAMPの蓄積は阻害されなかった。また、イヌType 6ACと92.7%のホモロジーを示すACが存在することがRT-PCR法によって確認された。これらの結果から、D1 DRはType 5または6ACとカップルし、種々の刺激で起こるPKAの活性化やCa2+の流入によってこのAC活性の抑制が起きた場合、その情報が減弱する可能性が示された。一方β adrenergic receptor (βAR) のシグナルはそのような調節を受けないと考えられる。

[目的] ドーパミンは神経伝達物質の一つであり、記憶、認識や情動といった種々の高次神経機能に関与している。ドーパミンのシグナルはDR、三量体Gタンパクを介してACを活性化あるいは抑制して細胞内 cAMP濃度を変化させることにより伝達されている。この内D1 DRの情報伝達系は受容体の脱感作(1)、Gsαの発現調節(2)、Goαとの結合(3)などで調節されるが、ACレベルの調節については明らかではない。ACには現在10種類のサブタイプが存在し、全てのACサブタイプはforskolin、GタンパクのGsαサブユニットによって活性化される。しかしACの各サブタイプは組織分布が異なるだけでなく、制御様式にも違いがある(4)。例えば、Type1、3、8ACはCa2+-カルモデュリンによって活性化されるのに対しType 5と6ACはCa2+によって抑制される。また、AC5と6はPKAによって特異的に抑制される。従って、ドーパミンシグナルはDRが共役するACのサブタイプによって修飾される可能性がある。本研究ではACを活性化するD1 DRとカップルするACサブタイプの同定を試みた。

[方法] D1 DRとβARを発現するSK-N-MC細胞はRPMI1640, 10%FCS存在下で培養後、ほぼconfluentな状態で実験に用いた。細胞をforskolin、isoproterenol, dopamine, SKF R-38393 (D1 agonist), H89 (PKA inhibitor)などで処理し、24時間後に細胞を洗い、phosphodiesterase inhibitor存在下で新たな刺激によって産生されるcAMP量をRIA法で測定した。A23187 (calcium ionophore)は新たな刺激と同時に加えた。また細胞より膜画分を調整した場合は、刺激に応答して[α-32P]ATPから産生されるcAMPを測定した。PKAのcatalytic subunitで膜画分のリン酸化は文献1に従ったが、ドーパミン非存在下で行った。細胞に発現するACサブタイプは既に報告されているACのシークエンスに保存されている領域をプライマーとしてRT-PCRをおこない、クローニング後その配列を比較した。

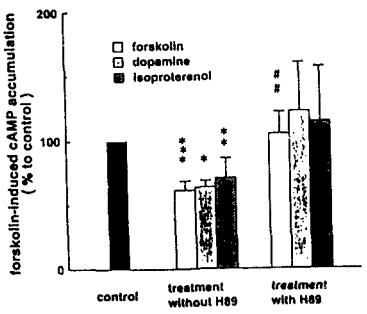
［結果・考察］細胞内cAMP濃度を上昇させる薬物で細胞を24時間前処置をしたところ、forskolinによるcAMP生成は約30％減少し、この減少は前処置にH89を加えると消失した(Fig.1)。ForskolinによるcAMP生成はA23187 を共存させると約30％減少し、また膜画分をPKAのcatalytic subunitでリン酸化するとforskolinによるAC活性は約40％減少した。このことから、この細胞にType 5または6ACが存在すると考えられた。D1-agonist によるcAMPの蓄積はforskolin, isoproterenol, SKF R-38393 のいずれの前処理によっても抑制されるが、 forskolinとisoproterenolによる抑制はH89で回復するものの、D1 agonistによる抑制は解除されなかった(Fig.2)。D1 agonistによる抑制は受容体レベルで起こっていると考えられる(1)。一方、β-agonist によるAC活性の抑制はforskolin, D1 agonistでは起こらず、isoproterenolでのみ見られた（Fig.3)。つまり、Type 5または6AC活性を抑制した条件下ではD1-agonist によるcAMPの蓄積は50％以上抑制されたが、β-agonist によるAC活性は阻害されなかった。さらにA23187 をドーパミンと同時に添加するとドーパミン によるcAMPの蓄積は約70％抑制された。以上の結果より、D1 DRはType 5または6ACと優位にカップルし、一方βARはそれ以外のACに主に結合すると考えられる。

次に、SK−N−MC細胞に発現するACmRNAをRT-PCRで増幅し、cDNAをシークエンスしたところ、3種類のACが検出され、ひとつはhuman Type7 ACと相同であった。human ACシークエンスは現在までType1,2,7 ACしか報告されていないため、他のACの同定はできないが、イヌType 6 ACおよびラットType3 ACにホモロジーの高いクローンが得られ、おそらくイヌType 6 ACにホモロジーの高いACにDRはカップルすると考えられる。ラット、マウスにおいてDRが密に分布する線条体にはType 5 ACが豊富に存在すること(4,5), forskolinの前処置によって抑制されるACが存在すること(6)から*in vivo*においてもD1 DRの活性化はType 5または6ACを刺激しその情報を伝達し、他のcAMPやCa^{2+}を増加させるシグナルによって抑制されうることが示唆された。

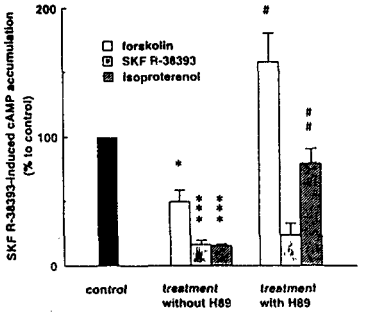
［文献］

1. Zhou, X.-M., et al. (1991) Mole. Cell. Neurosci. 2, 464-472.
2. Sidhu, A and Kimura. K (1996) manuscript in preparation
3. Kimura, K., et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14672-14678.
4. Cooper, D.M.F., et al. (1995) Nature 374, 421-424.
5. Glatt, C.E. and Snyder, S.H. (1993) Nature 361, 536-538.
6. Ofori, S., et al. (1993) J. Pharmacol. Exp. Ther. 266, 350-357.

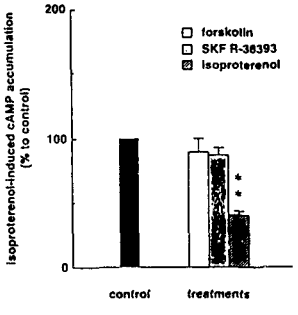
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



156 2E29 ホスファターゼインヒビターDARPP-32によるドーパミンD２受容体細胞内移行の促進

伊藤和光、芳賀達也
（東京大学、医学部、脳研究施設生化学部門）

【要約】COS-7細胞にドーパミンD２受容体とDARPP-32 (*d*opamine- and cAMP-*r*egulated *p*hospho*p*rotein (Mr = 32000), phosphatase 1 inhibitor) を一過性に共発現させると、アゴニスト依存性細胞内移行がみられた。この細胞内移行は、カベオーラを介する細胞内移行を阻害することが知られているフィリピンの処理により阻害された。カベオーラの経路を介したD２受容体の細胞内移行は、クラスリン依存性経路とは異なった制御を受けていることが示唆された。

【目的】細胞膜上には直径50～90nmで丸底フラスコ形の非被覆ピット構造があり、カベオーラと呼ばれる。その機能として、最近エンドサイトーシスや情報伝達との関与が示唆されている。我々は、Gタンパク質共役受容体の機能調節におけるカベオーラの役割を探るために、ドーパミンD２受容体のアゴニスト依存性細胞内移行がカベオーラの経路を介するという仮説を検証した。

【方法】ヒトD２受容体の第三細胞内ループが短いアイソフォーム(D2S) とDARPP-32をCOS-7細胞に一過性に共発現させた。DARPP-32は、ドーパミンやcAMPによって制御され、cAMP依存性タンパク質キナーゼ(PKA)によりリン酸化されるとフォスファターゼ１のインヒビターとして機能するタンパク質である（文献１）。D2SとDARPP-32を発現したCOS-7細胞をドーパミンで刺激した後、親水性で細胞膜不透過と考えられる［^{3}H］sulpiride を用いて細胞表面から消失する受容体量を測定した（文献２）。また、コンカナバリンA処理後のショ糖密度勾配遠心で、細胞膜画分と小胞画分を分離し、両画分の受容体量を［^{3}H］spiperone 結合活性により測定した。なお、DARPP-32をコードするcDNAは牛の尾状核よりRT-PCR 法でクローニングした。また、PKAによるリン酸化部位に点変異を加えた変異体（DARPP-32-T34A）は、Transformer™ site-directed mutagenesis kit (Clontech 社) を用いて作製した。

【結果】（１）D２受容体のみを発現させた細胞をアゴニスト刺激しても［^{3}H］sulpiride 結合活性の細胞表面からの消失は、殆ど見られなかった（4%以内）。また［^{3}H］spiperone 結合活性の細胞膜画分から細胞内小胞画分への移行もみられなかった。（２）DARPP-32を共発現した細胞では、20%の［^{3}H］sulpiride結合活性が細胞表面からアゴニスト刺激により消失した（EC_{50} = 2.09×10-6 M, $t_{1/2}$ = 50 min）。これは［^{3}H］spiperone 結合活性の細胞膜画分から細胞内小胞画分への移行によっても確認された。DARPP-32-T34A の共発現では変化が見られなかった。（３）カベオーラの経路を特異的に阻害することが知られているフィリピン（文献３） 5 μg/ml の処理により、アゴニスト依存性細胞内移行が阻害された。

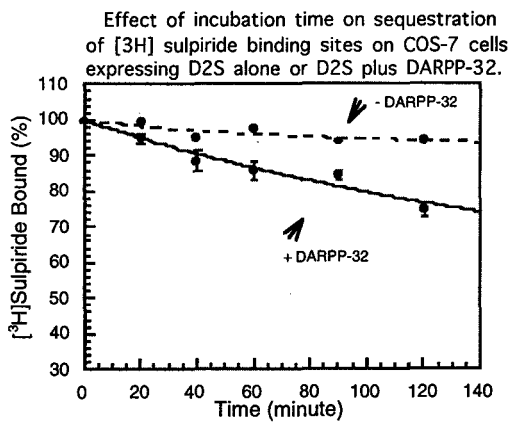
【結論】ドーパミンD２受容体の細胞内移行は、DARPP-32を共発現した場合、カベオーラの

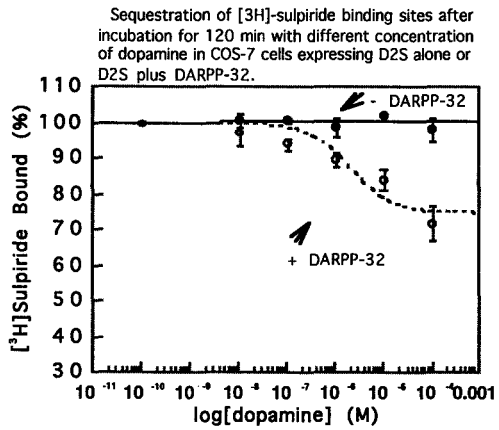
経路を介することが示唆された。我々はすでに、１）Ｇ蛋白質共役受容体キナーゼ(GRK)２と５の共発現によってドーパミンＤ２受容体のアゴニスト依存性細胞内移行が促進されること、２）この細胞内移行がクラスリン依存性経路を阻害する高浸透圧の処理によって、阻害されることを示している（文献４）。二つの経路は、EC_{50} が約１０倍、$t_{1/2}$ が約２倍異なる。これらの結果より、カベオーラの経路を介したドーパミンＤ２受容体の細胞内移行は、クラスリン依存性経路とは異なった制御を受けていることが推測される。

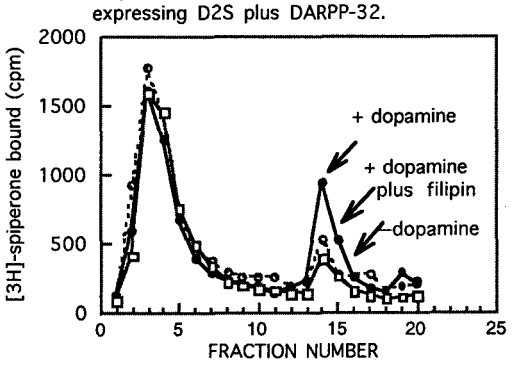
【文献】 1.Hemmings H. C. Jr., Greengard P., Tung H. Y. L., and Cohen P. (1984) Nature 310. 503-505
2. Itokawa M., Toru M., Ito K., et al. (1996) Mol. Pharmacol. 49, 560-566
3. Schnizer J. E., Oh P., Pinney E., and Allard J. (1994) J. Cell Biol. 127, 1217-1232
4. Ito K. and Haga T. (1996) Soc. Neurosci. Abst. (in press)

Table 1. Dual pathways are differentially regulated in COS-7 cells.

	Clathrin-coated vesicles	Caveolae
regulator	GRK	DARPP-32
inhibitor	hypertonic treatment	filipin
marker	clathrin	caveolin
EC_{50}	2.15×10^{-7} M	2.09×10^{-6} M
decrease	47 %(GRK2)	20%
$t_{1/2}$	25 min	50 min







157 マウスドーパミン D_4 受容体の遺伝子構造と mRNA 組織分布

3Ba3

[1]鈴木竜世、[1,2]小林和人、[1]永津俊治
([1]藤田保健衛生大・総医研、[2]奈良先端大・遺伝子教育研究センター)

〔要約〕

我々はプラークハイブリダイゼーションによってゲノムDNAライブラリーからマウス D_4 受容体の遺伝子を単離し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて脳内及び末梢組織における D_4 受容体の組織分布を検索するとともに、他の種の組織分布とを比較検討した。マウスドーパミン D_4 mRNA は脳内においては、小脳に最も発現量が高く、視床、前頭葉、線条体がそれに続いていた。末梢組織においては、眼球に非常に高レベルの PCR 産物が検出され、ついで精巣と副腎にも高レベルの PCR 産物が検出された。一方、ラットで D_4 レセプターの発現が知られている心臓には対応する mRNA の発現は検出されなかった。

[目的] ドーパミン受容体は7つの膜貫通領域を含む特徴的な構造を持ち、グアニンヌクレオチド結合蛋白質と共役した受容体ファミリーに属し、最近の分子生物学的研究から、少なくとも D_1～D_5 までの5種類のサブタイプに分類されている。個々のドーパミン受容体は運動、感情や神経内分泌の調節等多彩な生理学的機能に関与している。D_4 受容体は D_2 ファミリーに属し、ヒトを含む霊長類には遺伝子多型性が認められている(1)。D_4 受容体の結合数が精神分裂病患者の死後脳において著明に増加していること、また、非定型抗精神薬であるクロザピンの D_4 受容体に対する高い親和性が示唆されていることから、本受容体の結合数あるいは親和性の変化は精神・神経疾患の発病と関連することが推察されている。本研究において、我々はマウス D_4 受容体の遺伝子を単離し、RT-PCR 法を用いて脳内及び末梢組織に渡って広範に D_4 受容体 mRNA の組織分布を検索した。

[方法] ラットの D_4 受容体配列 (2) を基にしたプライマーを用い、マウスのゲノム DNA を鋳型とした PCR 法によって、マウスの D_4 受容体遺伝子の第3エクソン内の一部分からなる DNA 断片 (プローブA) を増幅した。[α-^{32}P] dCTP でラベルしたプローブAを用いて、プラークハイブリダイゼーション法によりλ FixII 129/SV マウスゲノムライブラリー(Stratagene) をスクリーニングした。プローブAでハイブリダイズした適当な DNA 断片を pUC 119 ベクターにサブクローニングし、マウス D_4 受容体をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。D_4 受容体の組織分布を解析する為に、全 RNA を C57BL/6J マウスの種々の組織から抽出し、oligo (dT) プライマーを用いて逆転写反応を行った。PCR 増幅反応にはオリゴヌクレオチドプライマー の D_4R-A、D_4R-B を使用した(Fig.1 参照)。PCR 産物は 4% ヌシーブアガロースゲル (FMC BioProducts) で電気泳動をした後、ナイロンメンブレンに転写した。同じプライマーセットを用いて増幅した DNA 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。オートラジオグラムは BAS 1000 image analyzer (Fuji Film) を用いて解析した。

[結果と考察] D_4 受容体遺伝子を単離するために、プローブAを用いてゲノム DNA ライブラリー (約 10^6 組換え体ファージ) をスクリーニングし、4つの陽性クローンを得た。プローブAでハイブリダイズした *Bam*HI-*Bam*HI 断片をプラスミドベクターにサブクローニングし、D_4 受容体遺伝子の塩基配列 を決定した(Fig.1)。スプライス・ドナー及びアクセプター部位の塩基配列は GT-AG 則に従っていた。マウスの D_4 受容体は 387 アミノ酸からなり、推定分子量は 41,468 であった。マウスの D_4 受容体はラットの D_4 受容体配列、及びヒト $D_{4.2}$ 受容体配列と各々 95 % と 76 % のホモロジーを示した。また、マウスにおいては霊長類で認められている細胞内第3ループ内の繰り返し配列は見られなかった。

マウス D_4 受容体 mRNA の分布を検索するために、近交系マウスの様々な組織から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR 法を行った (Fig.3)。D_4R-A と D_4R-B プライマーを用いた増幅反応によって、マウス D_4 mRNA の 195bp cDNA 断片が検出された。脳の幾つかの領域において興味深い D_4 mRNA の発現が見られ、脳内では小脳で発現レベルが一番高かった。それぞれのバンドの放射活性の強度を計測し、脳の各部位の

バンドを小脳のバンドと比較したときの相対的比率は、およそ 4.6 %（視床下部）～ 21.3 %（視床）の間であった。一方、末梢組織においては非常に高いレベルの D_4 mRNA の発現が眼球、副腎、精巣に見られ、小脳と比較してそれぞれの D_4 受容体バンドは約 1.8, 1.1, 1.2 倍の強度を持っていた。

これまでに報告された生物種（ヒト、ラット、サル）の D_4 受容体 の分布を比較すると、我々が得た脳内の D_4 mRNA 分布は、ヒトの脳での報告 (3) に最も類似していた。ラットやサルとでは幾つかの相違があり、特に小脳に於ては、マウスでは高レベルの発現があるのに対し、ラット(2)とサル (1) の組織には殆ど発現が見られていない。 また、末梢組織においては、心臓と副腎の D_4 受容体分布に大きな種差が存在することが認められた。ラットの心臓には脳の 20 倍もの D_4 mRNA が、副腎には mRNA は殆ど検出されないことが他のグループによって報告されている(2)。しかしながら、ヒトの心臓には RT-PCR 法で D_4 mRNA は全く観察されず(3)、副腎皮質にはオートラジオグラフィーにより D_4 様の結合部位の存在が報告されている (4)。RT-PCR 法を用いた我々の解析では、マウスの心臓には D_4 mRNA は殆ど検出されず、一方、副腎には非常に多量の D_4 mRNA が認められた。マウス末梢臓器における D_4 mRNA の分布もヒトで得られたものと類似していた。

Fig.1

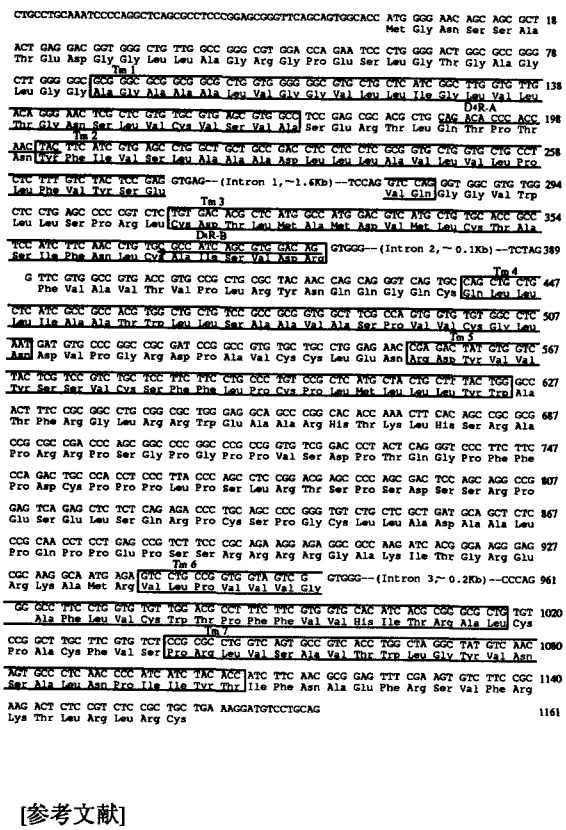


Fig.2

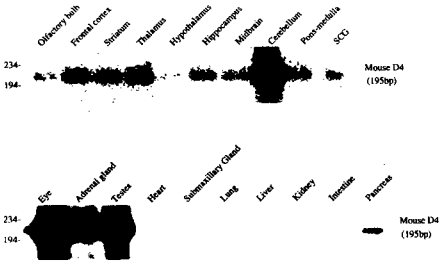


Fig.1　マウスドーパミン D_4 受容体をコードする遺伝子の塩基とアミノ酸配列

D_4 遺伝子の塩基は推定される開始コドンから番号をつけた。矢印は D_4 mRNA の解析のために RT-PCR で使用したプライマーの位置と方向を示した。

7 つの膜貫通領域（Tm1-7)は四角で囲った。

Fig.2　マウスドーパミン D_4 受容体 mRNA の組織分布

マウスのいくつかの組織より抽出された全 RNA は、oligo (dT) プライマーを用いて逆転写反応を行った後 D_4R-A と D_4R-B プライマー (Fig.1) でPCR 法にて増幅した。PCR 産物は 4% ヌシーブゲルで電気泳動を行いナイロンメンブレンに転写した。メンブレンはマウス D_4 cDNA に相当する DNA 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。PCR 産物の予想されるサイズは 195bp であった。

[参考文献]

(1) Van Tol, H.H.M., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B., and Civelli, O., Nature, 350 (1991) 610-614. (2) O'Malley, K.L., Harmon, S., Tang, L., and Todd, R.D., New Biol., 4 (1992) 137-146. (3) Matsumoto, M., Hidaka, K., Tada, S., Tasaki, Y., and Yamaguchi, T., Mol. Brain Res., 29 (1995) 157-162. (4) Amenta, F., Chiandussi, L., Mancini, M., Ricci, A., Schena, M., and Veglio, F., Eur. J. Endocrinol., 131 (1994) 91-96.

158 2E30 ドパミン作用薬のD２受容体ファミリーに及ぼす作用の検討

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 創薬研究本部）

〔 要約 〕

ヒトのドパミンD２受容体ファミリー（D２，D３，D４受容体サブタイプ）に及ぼすドパミン作用薬の影響について、受容体-G蛋白-効果器複合体の視点より検討した。各受容体サブタイプをCHO細胞に発現させ、３種類のアゴニストと２種類のアンタゴニストについて、受容体への直接作用を結合実験による親和性を指標として、G蛋白へ及ぼす作用をlow-Km GTPase活性を指標として、効果器へ及ぼす作用をadenylate cyclase活性を指標として、作用薬の効力を比較検討した。内在性リガンドのドパミンは、各受容体サブタイプで異なった効力を示した。またドパミン作用薬の効力は、３種類の実験系において、必ずしも同じ値を示さなかった。quinpiroleは、受容体結合実験および low-Km GTPase 実験ではD３受容体に最も強い効力を認めたが、adenylate cyclase 実験ではD３受容体への選択性は示されなかった。したがって、ドパミン作用薬のD２受容体ファミリーに及ぼす作用は、指標とした実験系によって、その効力が異なって観測される事が明らかとなった。

【緒言】 D２，D３，D４受容体サブタイプより構成されるD２受容体ファミリーは、アゴニスト刺激による誘発反応として、adenylate cyclase(ＡＣase)活性の抑制作用、アラキドン酸遊離の促進作用、K^+ channel 電流の増強作用などが共役する情報伝達系として報告されている(1,2)。しかしながら、これら種々のアゴニスト誘発反応には、定性的あるいは定量的に、受容体サブタイプおよび宿主細胞種に依存した多様性が認められている。そこで本研究では、ヒトD２受容体ファミリーの各受容体サブタイプをCHO細胞に発現させ、受容体-G蛋白-効果器複合体の視点より、ドパミン作用薬の受容体サブタイプに対する作用について検討した。

【実験方法】 実験方法は、既報に従った(3)。クローニングしたヒトD２L，D３，D４.７遺伝子をCHO細胞に導入し、単クローン化細胞株を作製した。受容体結合実験は、各受容体サブタイプを発現させたCHO細胞より調製した膜標品への[^{3}H]nemonapride 結合によった。low-Km GTPase活性は、CHO細胞膜標品において、[γ-^{32}P]GTPから遊離されるPi量を指標として測定した。ＡＣase活性は、intact CHO細胞において、10 μM forskolin存在下で産生されるcyclic AMP量を指標として測定した。low-Km GTPase 実験とＡＣase 実験におけるアンタゴニストの評価は、アンタゴニストによるドパミンの用量作用曲線の右方シフトより効力（K_B値）を算出する事によった。

【結果と考察】 受容体結合実験，low-Km GTPase 実験，ＡＣase 実験におけるアゴニストの効力を表１に、アンタゴニストの効力を表２に示す。内在性リガンドであるドパミンが示したpotencyおよびefficacyは、いずれの実験系においても、受容体サブタイプで異なった効力値であった。D２受容体ファミリーの各受容体サブタイプは、その脳内分布に多様性が存在する事が知られている。したがって、脳内分布およびドパミン効力の多様性に基づき、各受容体サブタイプはそれぞれ異なった生理機能を司っていると考えられる。

今回検討した３種類のアゴニストおよび２種類のアンタゴニストの potency は、受容体-G蛋白-効果器複合体の視点より選択した３種類の実験系において、同一の効力を示さなかった。こ

の差は、特にアゴニストにおいて顕著であった。一般的にD３受容体選択的アゴニストとして位置付けられている quinpirole は、受容体結合実験および low-Km GTPase 実験においてD３受容体に最も強い potency が認められたが、ＡＣase 実験においてはD３受容体への選択性が示されなかった。さらに、ドパミン作用薬の potency の絶対値についても、３種類の実験系で異なった効力値が認められ、これもアゴニストにおいて顕著であった。

本研究より、ドパミン作用薬がD２受容体ファミリーに及ぼす作用は、指標とする実験系によって、その効力が異なって観測される事が明らかとなった。したがって、ドパミン作用薬の in vivo 薬理作用に関して、単一の実験系より得られた in vitro プロファイルに基づいて考察する事は、必ずしも妥当でないと考えられる。また、ＣＨＯ細胞には複数種のＧ蛋白サブユニットが発現しており、少なくともD２受容体に関しては、Ｇ蛋白サブユニット種に対して preference が存在する（G_{i2} に高親和性である）事が報告されている(4)。今回の low-Km GTPase 実験では、ドパミンによる low-Km GTPase 活性の最大亢進率が、受容体サブタイプで異なっていた。したがって、直接的な証拠はないが、それぞれの受容体サブタイプがＧ蛋白サブユニット種へ異なった preference を有する事が、ドパミン作用薬の効力が実験系によって多様性を示す一因となっている可能性が考えられる。

【文献】 1. Lajiness ME, Chio CL and Huff RM., *Clin. Neuropharmacol.*, **18**, S25-S33 (1995)
2. Werner P, Hussy N, Buell G *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **49**, 656-661 (1996)
3. Hidaka K, Tada S, Matsumoto M *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 1625-1632 (1996)
4. Senogles SE, Spiegel AM, Padrell E *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 4507-4514 (1990)

表１ ドパミン作動薬のＤ２受容体ファミリーに及ぼす作用

Assays / Agonists		D2	D3	D4
Receptor Binding				
Dopamine	Ki high (nM)	39.2	1.94	9.16
	Ki low (nM)	1520	50.1	942
Apomorphine	Ki high (nM)	1.80	3.17	1.25
	Ki low (nM)	27.8	31.8	16.8
Quinpirole	Ki high (nM)	42.6	0.616	6.14
	Ki low (nM)	1910	29.4	144
low-Km GTPase				
Dopamine	E_{max} (%)	121	48.6	56.6
	EC_{50} (nM)	297	45.8	117
Apomorphine	E_{max} (%)	105	41.8	38.9
	EC_{50} (nM)	8.85	9.22	5.30
Quinpirole	E_{max} (%)	111	45.0	44.8
	EC_{50} (nM)	171	31.1	63.4
Adenylate cyclase				
Dopamine	I_{max} (%)	91.7	42.2	73.2
	IC_{50} (nM)	4.15	2.84	30.0
Apomorphine	I_{max} (%)	93.1	38.1	58.1
	IC_{50} (nM)	0.336	5.09	1.72
Quinpirole	I_{max} (%)	87.9	50.4	65.4
	IC_{50} (nM)	3.12	3.71	20.0

表２ ドパミン拮抗薬のＤ２受容体ファミリーに及ぼす作用

Assays / Antagonists		D2	D3	D4
Receptor Binding				
Nemonapride	Kd (nM)	0.017	0.053	0.214
Haloperidol	Ki (nM)	0.450	1.52	2.08
low-Km GTPase				
Nemonapride	K_B (nM)	0.372	1.28	2.03
Haloperidol	K_B (nM)	0.844	4.53	23.5
Adenylate cyclase				
Nemonapride	K_B (nM)	0.482	1.66	4.50
Haloperidol	K_B (nM)	0.433	1.27	42.9

159 グルココルチコイドによるラット大脳皮質アストロサイト セロトニン7受容体発現の低下

2E31 清水雅美[1)]、西田 朗[1)]、前正秀宣[1) 2)]、山脇成人[2)]
([1)] 国立呉病院臨床研究部、[2)] 広島大神経精神)

ラット大脳皮質アストロサイトにおいて、セロトニン(5-HT)$_7$受容体を介するcAMP生成上昇および5-HT$_7$受容体mRNA発現におよぼすdexamethasone (DMS)慢性処置の効果を検討した。5-HT(10 μM)刺激によるcAMP生成は、DMS処置により濃度かつ時間依存性に低下した。また、DMS処置は5-HT$_7$ mRNA発現を用量依存性に低下させた。しかし、isoproterenolおよびforskolin刺激によるcAMP生成は、DMS処置により変化しなかった。以上の結果から、DMS慢性処置は、5-HT$_7$受容体発現を抑制することにより、5-HT$_7$受容体を介するcAMP生成を低下させることが解った。

[目的]

5-HT$_7$受容体は、Gsタンパク質に連関しアデニル酸シクラーゼを活性化する5-HT受容体サブタイプとして、最近クローニングされた。中枢に高発現しており、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$_7$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(1,2,4)。しかしながら、その機能や薬理学的特性に関しては未解明な点が多い。我々はこれまでに、ラット大脳皮質アストロサイトにおいて、5-HT$_7$受容体の発現をPT-PCR法により確認し、また5-HT刺激によりcAMP生成が促進すること、このcAMP生成は5-HT$_7$受容体の非選択的antagonistにより抑制されることを報告した。さらに、この5-HT刺激によるcAMP生成が抗うつ薬の慢性処置により増強することを認め、抗うつ薬の薬理機序に5-HT$_7$受容体の変化が関与する可能性を示唆した(3)。一方、うつ病において、HPA系の亢進が存在する可能性が提示され、さまざまな受容体に対するグルココルチコイドの調節作用に関して検討が重ねられている。そこで本研究では、5-HT$_7$受容体に対するグルココルチコイドの作用について検討するため、アストロサイトを用いDMS慢性処置の影響について調べた。

[方法]

cAMP determination 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DMSを加え慢性処置した。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。

RT-PCR RNAはアストロサイトよりISOGEN (Nippon Gene)を用い採取した。RT反応の後、0.1 μMのprimers: 5'-GATCTTCGGCCACTTCTTCTGCAACGTCTT-3'および5'-TGGGAACTTGTGTTTGGCTGCACTCTTCCT-3'の存在下、95°C for 70 sec; 64 °C for 60 sec; 72 °C for 60 sec for 27 cyclesの条件でPCR増幅反応を行った。

[成績]

1) 5-HT刺激によるcAMP生成におよぼすDMS慢性処置の効果

アストロサイトにDMS(0.01-100 nM)を14から72時間処置したところ、5-HT (10 μM)刺激性のcAMP生成は、DMSの濃度かつ処置時間依存性に低下した(Fig. 1)。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。5-HT刺激性のcAMP生成は、DMSの共存下では10 μMの濃度でも影響されなかった。

2) Isoproterenolおよびforskolin刺激によるcAMP生成におよぼすDMS慢性処置の効果

Isoproterenol(10 μM)およびforskolin(1 μM)によるcAMP生成は、DMS(100 nM, 72 h)慢性処置により変化しなかった。

3) 5-HT$_7$ mRNA発現におよぼすDMS慢性処置の効果

アストロサイトにDMS(1-100 nM)を48時間処置したところ、5-HT $_7$mRNA発現量の濃度依存性の低下を認めた(Fig. 2)。

[考察]

ラット大脳皮質アストロサイトにおいて、DMSの慢性処置は5-HT$_7$受容体mRNAの発現を抑制し、5-HT刺激により惹起されるcAMP生成を低下させることが解った。この効果は急性のDMS処置では認められなかった。また、β受容体刺激によるcAMP生成およびforskolinによるcAMP生成はDMS処置により変化しなかった。このことは、DMSの作用が5-HT$_7$受容体に特異的であり、またアデニル酸シクラーゼおよびGsタンパク質に対しては影響しないことを示す。以上の結果は、グルココルチコイドがアストロサイトにおいて5-HT$_7$受容体発現を調節する可能性を示唆する。グルココルチコイドはストレス負荷時やうつ病において、血中高値を示すことが知られている。5-HT$_7$受容体を介するcAMP生成が抗うつ薬の慢性処置で増強するという我々の以前の結果と考え合わせると、グルココルチコイドと抗うつ薬の作用が相反することは、5-HT$_7$受容体の変化がうつ病の機序に関連する可能性を示唆するものであり、興味深い。

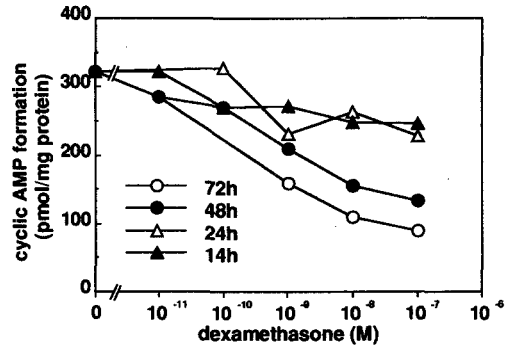


Figure 1 Effects of dexamethasone treatment on 10 μM 5-HT-induced cAMP formation in astrocytes

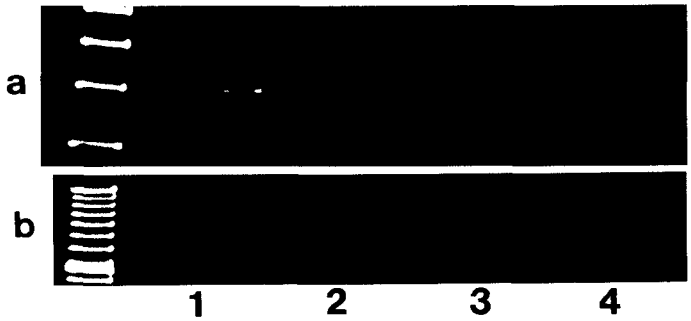


Figure 2 Effects of dexamethasone treatment on expression of 5-HT7 receptor mRNA in astrocytes

PCR products made from 5-HT7 mRNA (a) and G3PDH mRNA (b). Lane 1; control, lane 2; DMS 1 nM, lane 3; DMS 10 nM and lane 4; DMS 100 nM for 48 h.

[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) Shimizu M. et al. (in press), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 4) Tsou A. (1994), *J Neurochem.* 63, 456-464.

160 マイクロダイアリーシス法を用いたGABAB受容体／cAMP系の検討

3Ba4

橋本恒一，栗山欣弥
（京都府立医科大学・薬理）

〔 **要約** 〕GABAB受容体と抑制的に共軛するcAMP生成系について，マイクロダイアリーシス法を用いて線条体からのcAMP effluxを測定することにより検討した．線条体からのcAMPのeffluxは，β-受容体作動薬であるイソプロテレノール(ISP:5mM,10mM)およびアデニレートシクラーゼ(AC)の活性化薬であるフォルスコリン(FOR:1～100μM)の環流液への添加により用量依存的に増加した．GABAB受容体の作動薬であるバクロフェン(BAC)はFOR(10μM)誘発性のcAMP effluxを用量依存的に抑制した．さらに他のGABAB受容体作動薬SKF97541およびGABAも同様にFOR(10μM)誘発性のcAMP effluxを抑制した．このBACによる抑制効果は，GABAB受容体拮抗薬であるCGP 54626Aの添加により消失した．またISP(5mM)誘発性のcAMP effluxの上昇はBACの前処置により有意に増加した．以上の結果より，この線条体におけるマイクロダイアリーシス法は，GABAB受容体関連の薬物のin vivoにおける評価に有用であると考えられる．

マイクロダイアリーシス法は，従来よりin vivoにおける各種神経伝達物質の放出の測定方法として開発され，脳障害モデル等におけるin vivoでの神経伝達物質の遊離を測定しうる有用な方法として用いられてきた．近年促進性のGTP結合蛋白と共軛する受容体を介したcAMP産生系のin vivoにおける評価方法として用いられているが，抑制性のGTP結合蛋白を介したcAMP産生抑制に関しては報告がみられない．そこで本研究では，抑制性のGTP結合蛋白と共軛したGABAB受容体刺激に伴うcAMP産生抑制について検討した．

［実験方法］

Wistar系雄性ラット(280～350g)をペントバルビタール麻酔下に線条体にガイドカニューレを装着した．24時間後マイクロダイアリーシスプルーベ（A-I-8-03,EICOM社）を挿入し，無麻酔無拘束下で2.0μl/minの速度でRinger液を環流した．環流開始後2時間目からサンプリングを開始し，20分間隔で環流液を採取した．FORおよびISPは環流液に溶解し，環流開始後4時間目から20分間処置した．GABAB受容体関連の薬物は，FORおよびISP環流前および環流中80分間処置した．環流開始後2時間目からの3フラクションの値を平均したものをcAMPの基礎放出量(100%)とし，薬物の効果は薬物誘発性のcAMP放出量を基礎放出量で割ったものを% of basalとして表した．環流液中のcAMP量の測定は，Amersham社製の[^{125}I]cAMP RIA キットを用いて行った．

［結果］

FOR(1～100μM)の環流液中への添加は，用量依存的なcAMP effluxの増加をを誘発した．10μM FOR誘発性のcAMP efflux上昇作用に対しGABAB受容体作動薬のBAC(0.1～5.0mM)の前処置は，最大で約50%の抑制作用を示した．さらに他のGABAB受容体作動薬である

SKF 97541(100μM)およびGABA(50μM)も同様にFOR誘発性のcAMP efflux を抑制した(Fig.1). このBACによるcAMPの抑制効果は, GABAB受容体拮抗薬CGP54626A(100μM)の同時添加により消失した(Fig.2). BAC(5mM)の前処置はISP(5mM)誘発性のcAMP生成をさらに増加させた.

[考察]

脳内GABAB受容体はAC抑制系と共軛し, cAMPの産生を抑制することがin vitroの実験により報告されている(1). 一方, マイクロダイアリーシス法を用いた細胞内情報伝達系に関しては, β-受容体(2),ドーパミン受容体,(3),セロトニン1A受容体(4)刺激に伴うcAMP放出の増加が報告されているのみで, cAMP抑制系については報告が認められないことからGABA B受容体/cAMP抑制系について検討を行ったところ, in vitroの場合と同様にFOR刺激に伴うcAMP effluxをGABAB受容体作動薬のBAC, SKF97541およびGABAは有意に抑制した. このBACよるcAMP efflux の抑制作用はGABAB拮抗薬のCGP 54626Aにより消失した. このことはin vivoにおいてもGABAB受容体がACを抑制していることを示したものである. さらに, in vitroで認められるβ-受容体とGABAB受容体の促進的な共軛機構(5)に関しても検討を行ったところ, BACの前処置によりβ-受容体の機能が亢進する事が観察された. 以上の結果より, マイクロダイアリーシス法を用いたこの実験系は, GABAB受容体関連化合物のin vivoにおける評価に有用であると考えられる.

文献(1)Wojcik J.W. and Neff(1984) Mol. Pharmacol.,25,24-28.

(2)Stone E.A. and John S.M.(1990) J.Neurochem.,55,1942-1949.

(3)Santiago M. and Westerink B.H.C.(1990) J.Neurochem.,55,169-174.

(4) Sijbesma H.et al., (1991) Neuropharmacol.,30,967-975

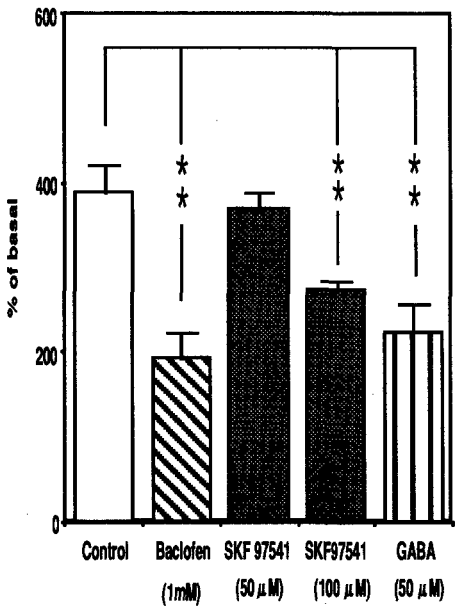


Fig. 1 Effect of baclofen, SKF 97541 and GABA on forskolin-induced cAMP efflux from striatum.

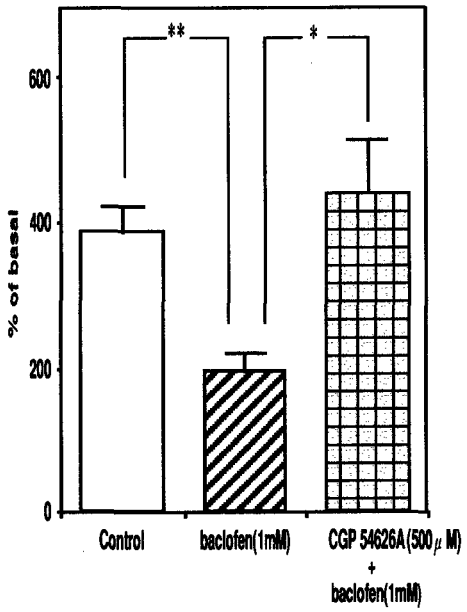


Fig.2 Effect of CGP 54626A on baclofen-induced suppression of cAMP efflux from striatum.

161 初代培養神経細胞におけるσ-1受容体を介したσリガンドの細胞内移行

2E32

山本秀子[1]、中里篤郎[2]、鷲直樹[1]、山本敏文[1,3]、茶木茂之[2]、奥山茂[2]
([1]東京都精神研・精神薬理、[2]大正製薬創薬研・創薬第一研、[3]横浜市大・総合理学)

［要約］前回σ-1選択的リガンドである[3H]NE-100及び[3H](+)pentazocineを用いて、σリガンドが初代培養神経細胞のσ-1受容体に結合して細胞内に取り込まれる可能性について報告した(1)。今回の薬理学的検討から、37℃での取り込みはcalmodulinに依存した機構を介していることが明らかとなった。同じくσ-1選択的リガンドである[3H]azidoNE-100を培養細胞に取り込ませて光分解したところ、2種類の蛋白質が標識された。そのうち約29Kの分子量を持つ分子への標識は経時的に増加し、haloperidol存在下では濃度依存性に消失した。このことはσリガンドがσ-1 受容体と結合することによって細胞に取り込まれる機構(receptor-mediated internalization)が存在することが示唆している。

[目的] 代表的な抗精神病薬が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、σ受容体に関心が向けられている。σ-1受容体の精製は小脳より報告されているが(2)、作動薬、拮抗薬の分類、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未だ不明確であり、基礎的な研究が必要である。前回の報告よりσ-1 リガンドのinternalizationにσ-1受容体が関与していることが示唆された(1)。そこで、我々は選択的σ-1リガンドであるNE-100 (3)の細胞内取り込みを制御する因子について検討すると共に、光照射により分解して近傍の蛋白質に結合するazidoNE-100を用いて初代培養神経細胞のσ-1受容体の性質を明らかにすることを試みた。

[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)によりトリプシン処理後、lens paperを通して単細胞化した後、polyethyleneimineコートした96wellまたは6wellplateに蒔き無血清培養することにより、gliaが5%以下の培養神経細胞を得た。

結合実験： 細胞は37℃のDMEMで2回洗浄後、薬物を含むDMEMを加えてCO_2 incubatorで30分間inubation後、[3H]NE-100(約40,000 counts /well)を加えて、37℃のCO_2 incubatorで所定の時間incuationした。氷冷Ca^{2+},Mg^{2+}-free phosphate buffered saline(PBS)で3回洗浄後、さらに酸性高濃度塩溶液（0.5M NaCl, pH 2.5)で 2回洗浄することにより細胞表面に結合した [3H]NE-100を除去し、細胞に取り込まれた[3H]NE-100を測定した。100μM haloperidol存在下での [3H]NE-100の結合を非特異的結合とした。

光標識：培養細胞をDMEM中で[3H]azidoNE-100 (200nM)と37 ℃、CO_2 incubatorでinubation後、PBSと酸性高濃度塩溶液で 洗浄し、365nmで20分間照射した。[3H]azidoNE-100の光分解後、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、IPプレートによる読みとりを経て、MCIDにより[3H] 標識された物質の分子量を算出した。

[結果] 初代培養神経細胞をendoytosis nhibitorであるphenylarsine oxide、W-7、mastoparan、calmidazolium及びML-9存在下で[3H]NE-100と共に4℃でincubationすると、酸性高濃度塩溶液洗浄後に残る[3H]NE-100結合量には変化はみられなかったが、37℃でincubationした場合には残存する[3H]NE-100結合量は薬物の濃度に依存して抑制された (Fig.1,data not shown on ML-9)。その他の薬物（Forskolin, dibutyryl cAMP, phorbor ester, herbimycin A, AG 494, genistein, KN-62, H-7, cytochalasin D, okadaic acid, cyclosporin A, brefeldin A, nocoazole, sodium orthovanadate)は[3H]NE-100の37℃における細胞内取り込みには影響しなかった。また、H-89は4℃及び37℃でincubationした場合にも細胞への[3H]NE-100取り込みを濃度依存性に抑制した。H-89はラット大脳皮質膜分画を用いた[3H]NE-100結合実験によりσ受容体に親和性を有することが

明らかになった(IC50; 2.125 ± 0.353μM, n=4)。

次に初代培養細胞を37℃で[3H] azidoNE-100とincubation後、酸性高濃度塩溶液で洗浄し、光標識したところ、約29及び47-55Kの分子量を持つ物質が標識された (Fig.2A)。標識は37℃でのincubationの時間に比例して増加し、haloperidol存在下では濃度依存性に消失した (Fig.2B)。

[考察] 前回、初代培養神経細胞を用いてσ受容体の結合特性を検討した結果、37℃におけるσ-1リガンドのendocytosisが示唆され、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internalizationが誘発される機構(receptor-meiated endocytosis)による可能性があることを報告した。本研究では[3H]azidoNE-100を用いたphotoaffinity labelにより、細胞内においてhaloperidol-sensitiveに2種類の蛋白質が標識された。この結果は従来報告されているσ受容体の分子量、25-29K及び50-70Kとも一致しており、σリガンドが神経細胞上のσ-1 受容体に結合して細胞内に取り込まれる機構の存在を支持している。

このσリガンドの取り込みを薬理学的に検討すると、37℃での取り込みはcalmodulin阻害剤であるW-7及びcalmidazolium によって阻害され、calmodulinが取り込みのいずれかのstepに関与していることは明らかである。またmastoparanがσリガンドの取り込みを抑制したことは、mastoparanはcoated pit assembly と coated vesicle buddingを抑制すると報告されている(5)ので、この取り込みがclathrin-coated pitsを介している可能性を示唆している。さらにcalmodulinがclathrin light chain に結合する(6)ことを考慮するとσリガンドの取り込みがcalmodulin阻害剤によって阻害されたことは、この取り込みがclathrin-coated pitsを介したspecific receptor-ligand complexの取り込みである可能性を強く示唆している。

[参考文献]1)山本ら、神経化学34(1995)126. 2) Shuster et al. Brain Res., 670(1995)14. 3) Okuyama et al. Life Sci., 53(1993)PL285.; 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) Carter et al. J. Cell Biol., 120 (1993)37.
6) Brodsky et al. Trends Biochem. Sci., 16 (1991) 208-213.

図1 NE-100の細胞内取り込みに及ぼす薬物の影響

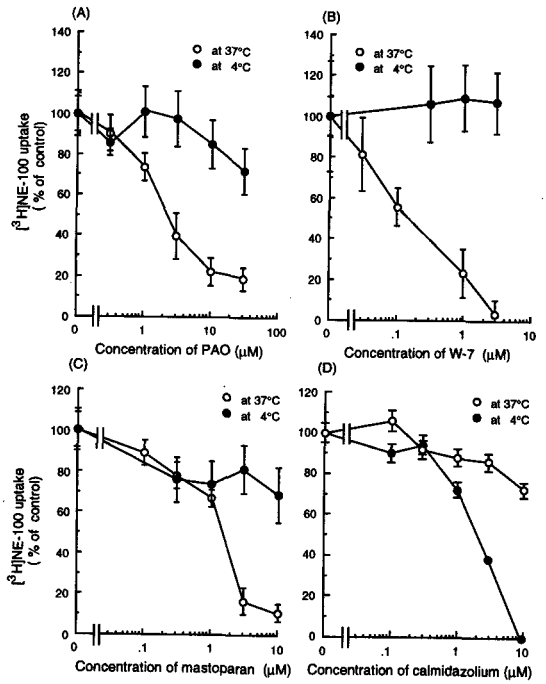
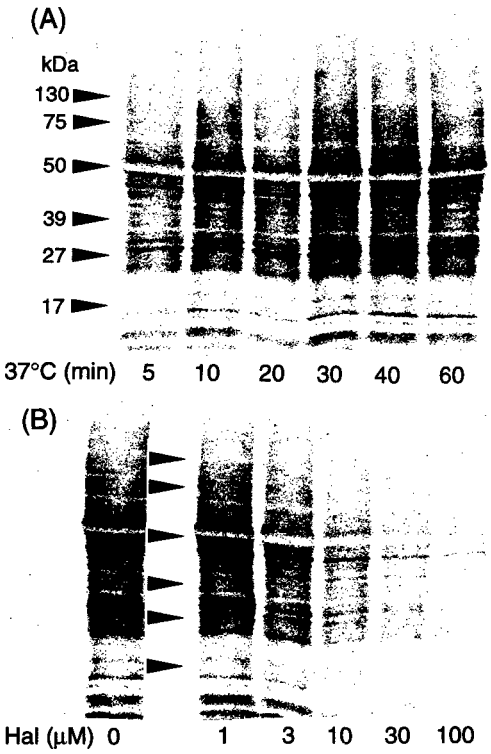


図2 σ-受容体のphotoaffinity labeling (A) 37°Cにおける経時変化 (B) Haloperidolによる濃度依存性の阻害



162 ペプチド受容体のキメラによるリガンド結合領域に関する検討

3Ba5

橋本 均、小川暢也、山本恭平、萩原七美、松田敏夫、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔 要約 〕

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 、vasoactive intestinal polypeptide (VIP)およびsecretin受容体ファミリーのリガンド結合の選択性を決定する領域を明らかにすることを目的とし、それらのキメラ受容体を作製し、哺乳動物細胞の発現系を用いて機能を解析した。キメラ受容体は、各受容体のエクソンを単位としてそれぞれの対応する領域で入れ換えた構造とし、リコンビナントPCR法によって作製した。

その結果、これらの受容体ファミリーのリガンド結合は、N末細胞外領域付近が重要な機能を果たすこと、また細胞外ループもリガンド結合に関与することが明らかになった。さらに受容体のリガンドの結合と細胞内情報伝達系の活性化に関与する領域が異なる可能性があることが示唆された。

我々は、これまでにラットPACAP受容体cDNAを単離し、その構造を解析した。またNorthernおよびin situ hybridizationの結果、PACAP受容体は脳と副腎髄質に特異的に存在し、特定の種類の神経細胞やグリア細胞に強く発現していることが明らかとなった。一方、COS細胞の発現系を用いて解析した結果、PACAP受容体はPACAPのみに高親和性であり、VIPには低親和性であったが、secretinは結合しなかった。これに対してVIP受容体はPACAP、VIPの両方に高親和性であり、secretinに対しては低親和性であった。またsecretin受容体は、secretinに高親和性、PACAPとVIPに低親和性であることが明らかになった。我々はまた、マウスPACAP受容体の染色体遺伝子を単離し、その構造解析を行なった。その結果、PACAP受容体は18個のエクソンに分割されており、各エクソンは概ね、シグナル配列、N末細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞外・内ループなど受容体の機能的なサブドメインに対応していることが明らかになった。本研究はペプチド受容体のリガンド結合に関与する領域について明らかにし、PACAP受容体やVIP受容体のサブタイプに特異的な新規リガンドを得るための知見とすることを目的とし、受容体のキメラを用いた解析を行なった。キメラ受容体cDNAの作製には、exon swapping法を用いることにした。

〔実験方法〕

ラットPACAP受容体、secretin受容体の各cDNAを用い、２回のPCRによるリコンビナントPCR法によってキメラ受容体のcDNAを作製した。DNA配列の解析により正しい配列であることを確認した後、cDNAインサートおよび哺乳動物細胞の発現ベクターpEF-BOS上の適当な制限酵素サイトを用いて、キメラ受容体cDNAの発現ベクターを作製した。得られたcDNAをDEAE-dextran法によってCOS7細胞に発現させ、細胞膜画分に対する[^{125}I]PACAP-27結合と細胞内cAMP産生量を測定した。

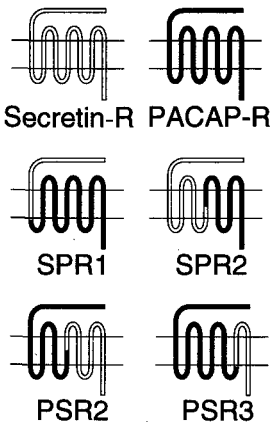
〔結果および考察〕

PACAP受容体のN末側をsecretin受容体に置き換えた受容体SPR2は、受容体の機能が損なわれていた。この理由として、受容体の構造が変化して、細胞膜上に十分発現されなかった可能性が考えられるが、抗体等を用いた検討が必要である。それ以外の受容体については野生型受容体との比較から、受容体としての機能を保持しているものと考えられた。PACAP受容体のN末細胞外領域をsecretin受容体に置き換えたSPR1においては、PACAPに対する親和性が大きく低下するとともに、secretinに対する親和性が増大していた。しかし、野生型secretin受容体に比べてその親和性は低く、他の細胞外ループも結合に関与することが示唆された。PSR2はPACAPには高親和性であったが、secretinに対しては結合能はほとんどなかった。しかしcAMPの産生に関しては、弱いながらもsecretinによる活性化が認められた。このことは、secretinに対してリガンドの結合よりも受容体の活性化に関与する領域が存在することを示唆するものであると考えられた。

Functional properties of the chimeric receptors

Receptor	Binding IC_{50} (nM)		cAMP EC_{50} (nM)	
	PACAP	secretin	PACAP	secretin
PACAP-R	N.D.	N.D.	0.49	N.S.
SPR1	4.9	19	12	500
SPR2	1.4	>1000	69	>1000
PSR2	0.10	>1000	0.71	500
PSR3	0.16	>1000	0.50	N.S.
Secretin-R	N.D.	N.D.	130	1.6

N.D.: not determined; N.S.: not stimulated



〔文献〕

1. Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
   Hashimoto, H., Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K. and Nagata, S.
   Neuron **11**, 333-342 (1993)
2. Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor
   Aino, H., Hashimoto, H., Ogawa, N., Nishino, A., Yamamoto, K., Nogi. H., Nagata, S. and Baba, A.
   Gene **164**, 301-304 (1995)
3. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: An in situ hybridization study
   Hashimoto, H., Nogi, H., Mori, K., Ohishi, H., Shigemoto, R., Yamamoto, K., Matsuda, T., Mizuno, N., Nagata, S. and Baba, A.
   J. Comp. Neurol. (1996) in press

163 3Ba6 海馬初代培養神経細胞の Ca^{2+}-oscillation に対するATPの抑制作用

小泉 修一、 井上 和秀
(国立衛試・薬理)

〔 要約 〕
海馬初代培養神経細胞における，自発的なカルシウム振動（Ca^{2+}-oscillation）に対するATPの作用を検討した。このCa^{2+}-oscillationは，細胞外Ca^{2+}除去及びテトロドトキシン添加，さらに種々のグルタミン酸拮抗薬で消失したことから，主にグルタミン酸による神経伝達により誘発されていることが示唆された。ATP刺激により，シナプス後細胞上のCa^{2+}透過性チャネル型ATP受容体を介する一過性の細胞内Ca^{2+}濃度（[Ca]i)上昇を呈した細胞も存在したが(1)，ほとんどの細胞でこのCa^{2+}-oscillationは消失した。ATPの代謝物adenosineは抑制性の神経伝達物質としてよく知られ，実際A1受容体を介して，このCa^{2+}-oscillationを抑制した。従って，ATPによる抑制作用は，代謝産物adenosineの作用に起因している可能性も考えられる。しかし，十分量のadenosine非選択的拮抗薬aminophylline及びA1受容体拮抗薬8-cyclophenyltheophylline(8-CPT)存在下でも，ATPの抑制作用は観察された。また，難水解性のATPアナログであるATPγSも強い抑制作用を示したことから，ATPによる抑制作用発現にはP2受容体が深く関係していることが強く示唆された。またATPはシナプス後細胞のグルタミン酸感受性には影響を与えなかった。以上，海馬神経前シナプスに抑制性ＡＴＰ受容体が存在しグルタミン酸の放出を抑制性に制御していることが示唆された。

ATPが脳でも神経伝達を担っていることを示唆する知見が相次いでいる。海馬では，電気刺激によりATPが放出されており（2），ATP添加により[Ca]iが上昇し(1)，ATPによる神経伝達(3)が行われている。また，ATP受容体cDNAも数種類クローニングされ，in situのハイブリダイゼイションにより，海馬におけるP2受容体mRNAの発現も明らかにされた(4)。本研究は，この海馬の初代培養神経細胞を用い，以前報告した興奮性P2受容体(1)に加え，抑制性P2受容体が存在すること及びその抑制様式を明らかにすることを目的とした。

［実験方法］ 海馬初代神経細胞培養法(3)及びfura-2蛍光法による[Ca]iの測定法(5)は既報に従った。

［結果及び考察］ ATPによるCa^{2+}-oscillationの抑制は，非選択的adenosine受容体拮抗薬aminophylline(100μM)及びadenosineA1受容体拮抗薬8-CPT (100 μM)存在下でも認められた（Fig.1a,b)。これらadenosine受容体拮抗薬の濃度は，adenosine(10μM)による作用を完全に抑制し得る濃度である。従って，これらATPによる抑制作用の少なくとも一部はadenosine受容体でなく，P2受容体を介する作用であることが示唆された。ATP及びそのアナログの作用強度を比較すると，2-methylthioATP>ATP>ATPγS>UTP>α,β-methyleneATPの順であった(Fig.2)。また，ATPの抑制作用はATP受容体拮抗薬suramin(100μM)に非感受性であった。チャネル型ATP受容体のうち，P2X4及びP2X6は海馬に多く発現している受容体であり，suramin非感受性である(4)。この性質と，ATPアナログ類の作用強度から受容体亜型を考察すると，この抑制性P2受容体は，チャネル型であれば，P2X4もしくはP2X6，G-タンパク共役型であれば新しいタイプのP2Y受容体と考えられる。シナプス後細胞のグルタミン酸応答に対するATPの影響を検討した。ATPはグルタミン酸応答に対して，全く影響を与えなかった(Fig.3)。また，ATPは，自発性グルタミン酸放出量を抑制した（Ohara-Imaizumi & Inoue, 未発表データ）。従って，ATPはシナプス前細胞の抑制性P2受容体に作用し，グルタミン酸放出を抑制することにより，海馬のCa^{2+}-oscillationを抑制していることが強く示唆された。

［文献］ (1) Inoue et al., Neuroreport, 6, 437-440, 1995. (2) Wieraszko, et al., Brain Res. 485, 244-250, 1989. (3) Inoue K, et al., *Neurosci. Lett. 134, 215-218, 1992.* (4) Collo et al., 16, 2495-2507, 1996. (5) Koizumi S, et al., Br.J.Pharmacol., 115, 1502-1508, 1995.

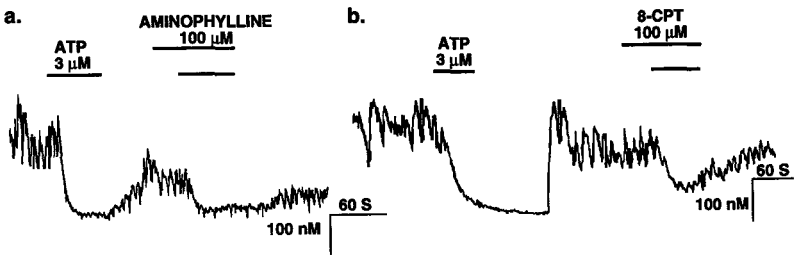


Fig.1. The effects of aminophylline (100μM) (a) and 8-CPT (100μM) (b) on the ATP-induced inhibition. Aminophylline and 8-CPT were applied to the cells 30 s before and during ATP-application.

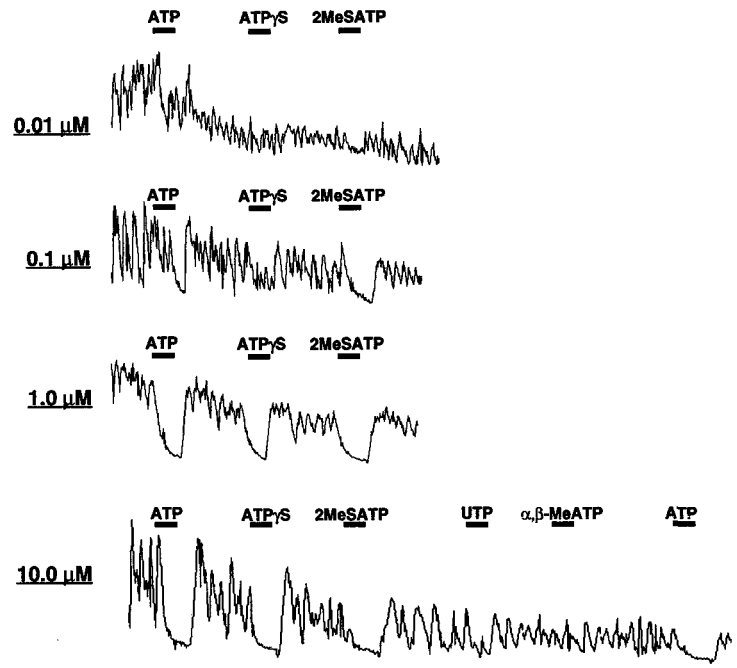


Fig.2. Comparison of ATP and its analogues to inhibit the Ca^{2+}-oscillation in the hippocampal neurons. Compounds were applied to the cells for 30 s at a concentration shown in the left side of each trace. Horizontal and vertical bars show 30 s and 100 nM, respectively. At least, three such experiments were performed.

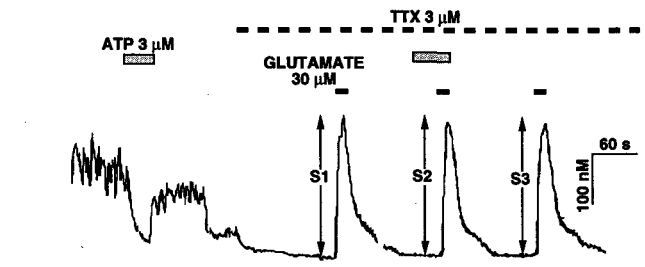


Fig. 3. The effects of ATP on the Ca^{2+} responses to glutamate in the hippocampal neurons. a. At first, ATP (3 mM) was applied to the cells for 60 s to the cell to confirm the existence of the ATP-induced inhibition. Next, TTX (3 mM) was applied to the cells to inhibit synaptic communications and to suppress the Ca^{2+}-oscillation. Then glutamate (30 mM) was applied to the cells three times for 15 s separated by 120 s. The first, the second and third Ca^{2+} responses to glutamate were defined as S1, S2 and S3, respectively. ATP (3 mM) was applied to the cells 30 s before and during the second ATP application.

164 培養小脳顆粒細胞の発達に伴う一酸化窒素合成酵素の発現

2E6

井上 順雄，曽我 智子，中山 孝，加藤 尚彦
（横浜市立大学，医学部，第一生化学）

〔 要約 〕

ラットの初代培養小脳顆粒細胞の一酸化窒素合成酵素（NOS）活性は，培養によって細胞が発達するのに伴って増加した．培養１４日目の細胞の活性は培養１日目の活性と比較して，蛋白質量当たりおよびディッシュ当たり，それぞれ約７倍，約２０倍であった．神経型NOSアイソフォーム（nNOS）のmRNAの定量的RT-PCR法を確立した．培養細胞のnNOSのmRNA量は培養に伴い増加し，培養１日目から８日目で，total RNA量当たりのmRNA量は約３倍になった．

神経系においてNO（一酸化窒素）は多彩な機能に関係し，小脳の顆粒細胞には一酸化窒素合成酵素（NOS）［特に神経型NOSアイソフォーム：nNOS］が高濃度に存在することが，免疫組織化学的研究や組織切片の活性測定により報告されている(1,2)．これまで我々は，NOS活性の微量定量法を開発し(3)，発達分化する小脳各層のNOS活性を測定し，NOが神経芽細胞の分裂と分化に何らかの役割を果たしている可能性を示した(4)．今回は，ラット小脳由来の初代培養顆粒細胞の発達に伴うNOS発現の変化を，NOS活性およびnNOSのmRNA量を測定して解析した．

［実験方法］

小脳顆粒細胞の培養は，生後８日目のSDラットの小脳から単離細胞を得て，poly-D-Lysコートしたディッシュ上にまき，５％準胎児牛血清と５％馬血清を含むBME（25 mM KCl存在）中で行った(5)．NOS活性の測定は，細胞および小脳のhomogenateを用いて，反応液［15 μM NADPH, 100 μM arginine, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1.25 mM $CaCl_2$, 1 μg/ml calmodulin, 3 mM nicotinamide, 0.1 mM PMSF, 10 μg/ml antipain, pepstatin A, leupeptinを含む100 mM PIPES-NaOH緩衝液, pH 7.0］中において，25℃で30分間行った．生成したNADP+をアルカリ処理により蛍光物質に変換して定量した．反応液に100 μMニトロアルギニン（NArg）を添加することにより阻害される活性をNOS活性とした(3)．nNOSのmRNAの定量は，細胞および小脳からAGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) 法で調製したtotal RNAをRT-PCRで増幅して行った．RT-PCRの際にマウス小脳のtotal RNAを内部標準として用いた．ラットnNOSに特異的なプライマーとしては，マウスnNOSのプライマーとして用いられたS3とAS3 (6) に相当するsense 5'-TTCAACTACATCTGTAACCA-3'とanti-sense 5'-TCTGCAGCGGTATTCATTCTC-3'（AS3のCをTに変えたもの）を用いた．anti-senseプライマーの5'-末端を^{32}Pで標識し，生成物をアガロースゲル電気泳動で分離後，BAS2000で定量した．ラット，マウスともに693bpの生成物を与えたが，*Bam* HI処理により，ラットの生成物は523bpと170bpに切断されるのに対して，マウスは切断されず，両者は区別して定量された．

［実験結果と考察］

初代培養小脳顆粒細胞のNOS活性は，細胞の培養とともに増加した（図１）．培養１日目から１４

日目までで，単位蛋白質量当たりおよびディッシュ当たりのNOS活性は，それぞれ約7倍，約20倍になったが，培養細胞を単離した生後8日目の小脳の活性（0.047 (nmol of $NADP^+$ formed/min /mg protein)）に比較して低値であった．nNOSのmRNAの定量的RT-PCR法を検討するために，種々の量の成熟ラット小脳のtotal RNAに一定量の成熟マウス小脳のtotal RNAを加えてRT-PCRを行い，ラットの生成物とマウスの生成物を定量した．添加ラットRNAの量とラットの生成物とマウスの生成物の比との間に良い直線性が得られ（図2），この直線の傾きからラットのnNOSのmRNA量をマウス小脳total RNA量［Arbitrary Unit：ngマウス小脳total RNA］に換算した．成熟ラット小脳では，0.214 (unit/ng RNA)であった．この方法を用いて，培養顆粒細胞のnNOSのmRNA量を定量し，培養によってmRNA量が増加することを明らかにした（図3）．培養7日間で，単位RNA量当たりおよびディッシュ当たりのmRNA量は，それぞれ約3倍になったが，生後8日目の小脳の値（0.021 unit/ng RNA）に比較して低値であった．結果には示さないが，Western blot解析により細胞のnNOS蛋白質が培養と共に増加することも明らかにした．また，小脳のNOS活性とnNOSのmRNA量は生後の発達と共にどちらも増加することを明らかにした．以上の結果は，生後の小脳内顆粒層のNOS活性の増加(4)に対応しており，顆粒細胞はin vitroでもin vivoと同様に，細胞の発達に伴ってnNOSを発現することが明らかになった．

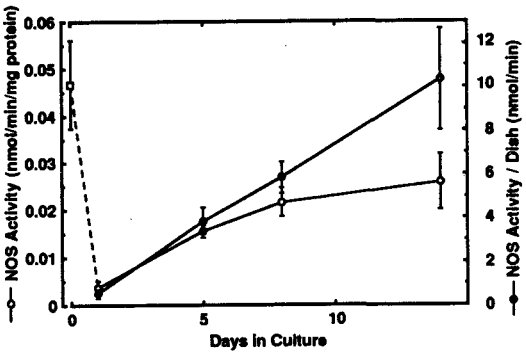


図1．ラット小脳顆粒細胞の発達に伴うNOS活性の変化
□; 8日齢小脳, ○; 小脳顆粒細胞の蛋白質当たりの活性
●; 小脳顆粒細胞のディッシュ当たりの活性

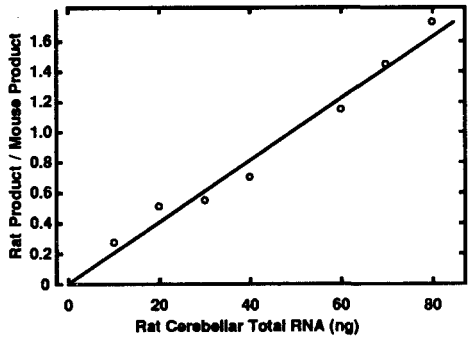


図2．ラットRNA量とRT-PCR生成物量比の関係
ラット小脳total RNA (10～80 ng)に，内部標準としてマウス小脳total RNA (10 ng)を添加しRT-PCRを行い，それぞれの生成物量の比（○）を求めた．

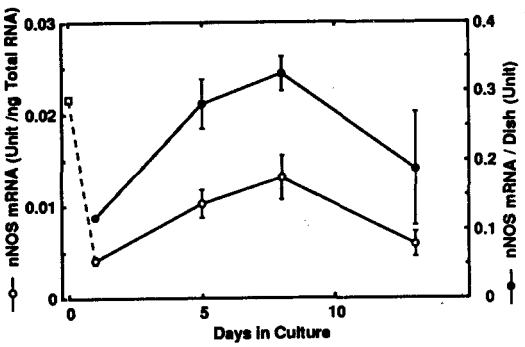


図3．ラット小脳顆粒細胞の発達に伴うnNOSのmRNA量の変化
□; 8日齢小脳, ○; 小脳顆粒細胞のtotal RNA当たりの量
●; 小脳顆粒細胞のディッシュ当たりの量

［文献］

1. Bredt, D.S., Hwang, P.M. and Snyder, S.H. (1990) Nature 347, 768-770.
2. Salter, M., Knowles, R.G. and Moncada, S. (1991) FEBS Lett. 291, 145-149.
3. Wang, W., Inoue, N., Nakayama, T., Ishi, M. and Kata, T. (1995) Anal. Biochem. 227, 274-280.
4. 王偉，井上順雄，中山孝，加藤尚彦，石井當男 (1994) 神経化学, 33, 594-595.
5. 井上順雄，曽我智子，中山孝，加藤尚彦 (1994) 神経化学, 33, 498-499.
6. Ogura, T., Yokoyama, T., Fujisawa, H., Kurashima, Y. and Esumi, H. (1993) Biochem. Biiophys. Res. Comm. 193, 1014-1022.

165 エタノールはNOSニューロンによるNO産生に影響しない

2E7

池田正行，小宮山徳太郎*，佐藤郁子，氷見敏行，室田誠逸
東京医科歯科大学大学院 細胞機能，
*国立精神神経センター 武蔵病院

〔 要約 〕

従来の報告では，NOの産生やその効果に対し，エタノールが影響を与える可能性が示唆されている．我々は，エタノールが NOSニューロンに及ぼす影響を，in vitroとin vivoの両面で検討した．200 mMのエタノール存在下でも，初代培養の小脳顆粒細胞による NO産生，同培養細胞中の NADPH-diaphorase陽性細胞数，小脳ホモジネートの NOS活性，のいずれも対照と差がなかった．エタノールを急性(3g/kg)あるいは慢性投与したマウスの脳各部位の NOS活性にも，対照との差はなかった．以上より，エタノールは，NOSニューロンへの直接作用以外の機序でNOの効果の発現に影響を与えると考えられる．

研究の背景

脳に対するエタノールの効果の発現に NOが関与している可能性がある．というのは，次のような報告があるからだ．エタノールの急性投与により，小脳の cGMP量が低下する(1)．エタノールは神経型のNO合成酵素 (NOS) の活性化に必要なNMDA受容体を通るイオンの流れを抑制する (2)．エタノールは視床下部でのNOの作用を減弱する (3)．しかし，エタノールがNOSニューロンによるNO産生を直接変化させるかどうかはわかっていない．この点を明らかにするために，われわれは， in vitroあるいはin vivoのエタノール暴露が，NOSニューロンによるNO産生にどう影響するかを検討した．

対象と方法

1．小脳顆粒細胞の初代培養系へのエタノールの暴露と NO産生量の測定

小脳顆粒細胞の採取は既報の方法で行った (4)．得られた細胞を7日間培養した．培養細胞を10-200 mMのエタノールに15分間暴露したあと，NOの代謝産物である上清中の亜硝酸イオンを，オゾンとの化学発光を利用し， Sievers Model 270B NO analyzerで測定した．暴露後の細胞のNADPH-diaphorase染色も行った．

2．NOS活性測定に対するエタノールの影響

マウス大脳皮質のホモジネートを用いて， 10-200 mMのエタノールの共存下で，既報の方法(5)を使ってNOS活性を測定した．

3．マウスへの急性，慢性エタノール投与と脳各部位の NOS活性測定

10-12週令のC57BL/6Jマウス(Charles River)を用いた．急性投与実験ではエタノール3g/kg（対象群は同容量の生食）を腹腔内投与し， 30分後に断頭し，大脳皮質，線条体，海馬，小脳を切り出し，それぞれの部位につき，既報の方法 (5)でNOS活性を測定した．慢性投与実験は，小宮山の方法 (6)に従い，前処置として 10-14日かけて体重を18-19gまで減少させた後，3.5日間エタノールを摂取させた．最終投与後 6時間で断頭し，同様にNOS活性を測定した．エタノール投与群では液体飼料 30 cal% ethanol sucrose (1.0 cal/ml)を，対照群及び離脱期には sucrose (1.0 cal/ml)を用いた．

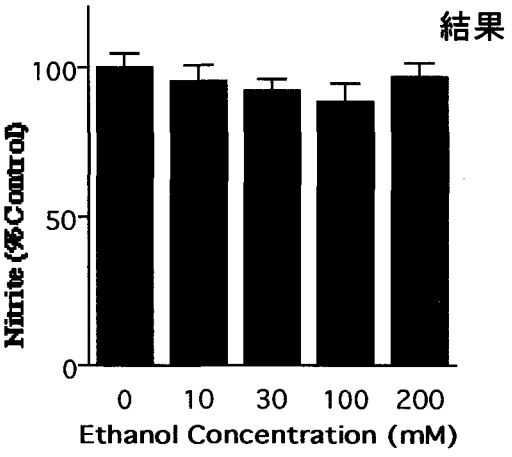


図1. 培養小脳顆粒細胞のNO産生に対するエタノールの影響. 200 mMのエタノールに15分暴露してもNO産生は変化しない. NO産生は上清中の亜硝酸イオンとして測定した.

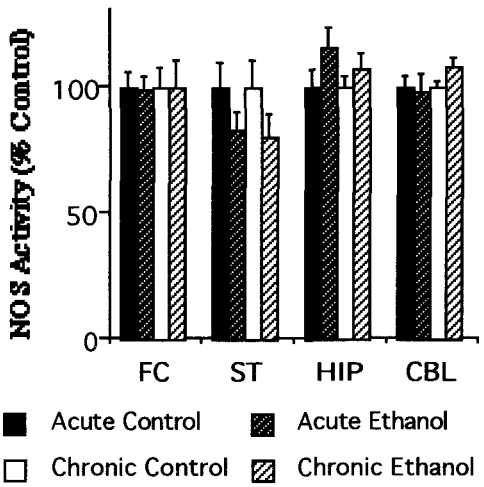


図2. 急性あるいは慢性エタノール投与後のマウスの脳各部位のNOS活性. どちらの群でも, いずれの部位でも対照との差はなかった. 各群とも n=6. FC= frontal cortex, ST=striatum, HIP= hippocampus, CBL= cerebellum.

表1. 試験管内のNOS活性assay mixtureに加えたエタノールの影響. 200 mMのエタノール存在下でもNOS活性測定には影響しない. 数値は % 対照平均±S.E.M.

Ethanol (mM)	NOS activity (%control)
0	100±8
10	91±8
30	95±5
100	93±11
200	97±6

表2. 培養小脳顆粒細胞のNO産生に対するエタノールの影響. 200 mMのエタノールに15分暴露してもNADPH-diaphorase陽性細胞数は変化しない.

Ethanol (mM)	Cell Count (/ Field)
0	310±20
10	247±17
30	257±19
100	224±25

考察：今回の検討で, in vitroでもin vivoでも, エタノールはNOSニューロンによるNOSの産生に直接影響しないことがわかった. エタノールが NOの効果を修飾するのは, NOSニューロンによるNOの産生への直接の効果ではなく, NOの標的や, NOの代謝などを通して, 間接的に影響しているのだろう.

文献

1. Redos, J. D., Catravas, G. N., and Hunt, W. A. (1976) Science 193, 58-9
2. Simson, P. E., Criswell, H. E., Johnson, K. B., Hicks, R. E., and Breese, G. R. (1991) J Pharmacol Exp Ther 257, 225-31
3. Canteros, G., Rettori, V., Franchi, A., et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 3416-3420
4. Sato, I., Kim, Y., Himi, T., and Murota, S. (1995) Neurosci Lett 184, 145-148
5. Ikeda, M., Morita, I., Murota, S., et al. (1993) Neurosci Lett 155, 148-150
6. 小宮山徳太郎. (1974) アルコール研究 12, 1-15

166 2Ba1 ラット脳グリア細胞における inducible NOS (iNOS) 誘導に対する endothelin (ET) の作用

小田温子[1]、村山俊彦[1]、佐々木幸生[2]、岡田敏一[2]、野村靖幸[1]
([1]北大・薬・薬効、[2]日本チバガイギー国際科学研究所)

[要約]
1) ラット混合グリア細胞において、lipopolysaccharide (LPS) は単独で iNOS タンパク質の発現を誘導し NO_2^- 蓄積量を増加させた。
2) 1) の LPS による iNOS タンパク質の発現誘導や NO_2^- 蓄積は、ET や phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で長時間前処理することにより、増強された。
3) LPS は TNF-α 産生を引き起こした。この TNF-α 産生作用も、ET や PMA で長時間前処理することにより、増強された。
4) 2) や 3) における ET の増強作用は、ET_B 受容体を介していることが示唆された。

[目的]

脳虚血時にはグリア細胞において誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現が顕著に増加することが知られており、産生された NO が神経細胞死に関与することが示唆されている (Nomura and Kitamura, 1993; Kitamura et al., 1996)。一方、新しい脳内ペプチドである ET の発現もまた虚血時に、特にグリア細胞において誘導されることが報告されているが (Patel, 1996)、ET と iNOS 及び NO との関連は不明である。そこで今回我々は、iNOS 発現を誘導することが知られている LPS を用いて、iNOS 発現における ET の影響を検討した。

[方法]

ラット脳混合グリア細胞の初代培養; 生後 1 日以内の新生期 Wistar 系ラット全脳を、トリプシン、DNase 処理により分散させ、DMEM / 10% FCS 中、37 ℃、5% CO_2-95% air 条件下で 12 日間静置した。その後、5 mM EDTA を含む DMEM で細胞を懸濁し、7 日間培養して混合グリア細胞 (アストロサイト; 90% 以上、ミクログリア; 7%) を得た。

NO_2^- 蓄積量測定; 培養液中の NO_2^- 蓄積量は Griess 反応に基づき、540 nm における吸光度を測定した。

抗 iNOS 抗体による Western blotting; 各種薬物で刺激した混合グリア細胞から可溶性画分を得て、抗 iNOS 抗体による Western blotting を行った。

TNF-α 産生量測定; 培養液中の TNF-α 産生量は、ELIZA kit を用いて測定した。

[結果]

ラット混合グリア細胞を LPS 存在下で、24 時間、37 ℃ でインキュベートしたところ濃度依存的に NO_2^- 蓄積量が増加した (図 1)。この LPS による NO_2^- 蓄積は、ET-3 (100 nM) や Protein kinase C の活性化剤である PMA (100 nM) で24 時間前処理することにより、さらに増加した。また、ET-1 も ET-3 と同程度、LPS による NO_2^- 蓄積作用を増強した (データ未提示)。そこで次に、iNOS 蛋白質の発現について検討を行った。LPS で 24 時間、37 ℃ で処理することにより、その可溶性画分において、iNOS タンパク質の発現誘導が認められた (図 2、lane 2-4)。この LPS による iNOS タンパク質の発現誘導は、100 nM ET-3 や100 nM PMA で 24 時間前処理することにより、さらに増強していた (図 2、lane 6-8、lane 10-12)。また、100 nM ET-1 でも、100 nM ET-3 と同

様の増強効果が認められ、これらのETの増強作用は、ET_B受容体のアンタゴニスト（BQ788）を処理することで遮断された（データ未提示）。ET-1、ET-3、PMAを単独処理した場合にはiNOSの発現誘導は認められなかった。

LPSはグリア細胞において、TNF-αの産生を誘導することが報告されている (Sawada et al., 1989)。そこで、TNF-α産生に対するETやPMAの効果についても検討したところ、LPSは単独で、TNF-α産生を引き起こした。このLPSによるTNF-α産生は、100 nM ET-3や100 nM PMAで24時間前処理することにより、さらに増強した。

[考察]

今回我々は、混合グリア細胞において、LPSによるiNOSタンパク質の発現及びTNF-αの産生が、ETで長時間前処理することにより増強されることを明らかにした。PMAでも同様の現象が観察されることから、Protein kinase Cの関与が考えられる。また、TNF-αは他のサイトカインと共にiNOSの発現を誘導することが知られており、ETによるTNF-αの発現の増強がiNOSの発現を誘導する可能性が考えられる。このETのiNOSの発現の増強作用は、ET受容体サブタイプのうち特にET_Bを介していることが示唆された。したがって、グリア細胞におけるET_B受容体を介したiNOSの発現の増強が虚血時における神経細胞死を増悪させる可能性が示唆される。

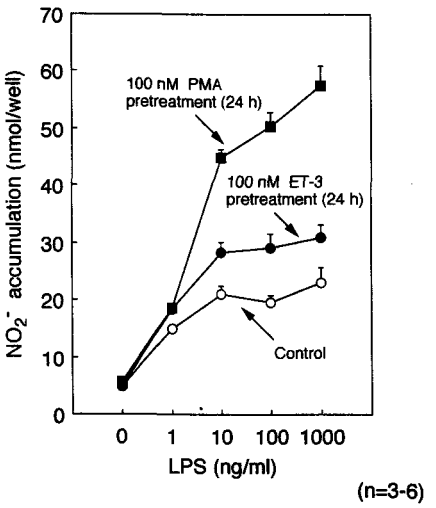
[文献]

Kitamura, Y., Imaizumi, R., Kitayama, Y., Esumi, H., and Nomura, Y. (1996) *J. Neurosci. Res.* 43, 235-245

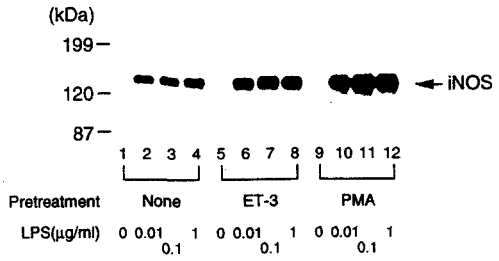
Nomura, Y. and Kitamura, Y. (1993) *Neurosci. Res.* 18, 103-107

Patel, T. R. (1996) *CNS Drugs* 5 (4) 293-310

Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., and Marunouchi, T. (1989) *Brain Res.* 491, 394-397



(図1) LPSによるNO_2^-蓄積に対するETとPMAの影響



(図2) LPSによるiNOSタンパク質発現誘導に対するETとPMAの影響

167 2Ba2 ラット小脳での一酸化窒素（ＮＯ）産生におけるグリア細胞の役割

山田清文、鍋島俊隆
（名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部）

〔 要約 〕

In vivo brain microdialysis 法により得られた脳透析液中の一酸化窒素代謝物 (NOx^-) を測定することにより、ラット小脳での一酸化窒素 (NO) 産生におけるグリア細胞の役割について検討した。脳透析液中の NOx^- は NO 合成酵素阻害剤 L-NAME により減少し、L-arginine (L-Arg) により増加した。NMDA, AMPA および ACPD を透析プローブを介してラット小脳に直接注入すると NOx^- は用量依存的に増加した。グリア細胞毒の fluorocitrate (FC, 1 mM) を 2 時間注入すると NOx^- は 2 倍以上に増加し、その作用は注入終了後 2 時間以上持続した。L-NAME を前投与したラットでは FC による NOx^- の増加は抑制された。以上の結果より、ラット小脳においてイオノトロピックおよびメタボトロピック型グルタミン酸受容体の刺激により NO の産生が増加すること、およびグリア細胞が NO 産生に抑制的な役割を果たしていることが示唆された。

［目的］

ガス状の細胞間情報伝達物質である NO が学習記憶などの脳機能に重要であることが明らかとなりつつある（１－３）。しかし、in vivo における NO 産生の調節機序には不明な点が残されている。先に、我々は in vivo brain microdialysis 法により得られた脳透析液中の NOx^- を測定することにより、in vivo における NO 産生を測定することが可能であることを報告している（４）。本研究では、この方法を用いてラット小脳での NO 産生に対するグルタミン酸受容体アゴニストの作用とグリア細胞の役割について検討した。

［方法］

動物は Wistar 系雄性ラット (体重 350-400 g) を用いた。ペントバルビタール麻酔下に小脳にガイドカニューレを埋め込み、３日後に透析プローブを挿入し実験を開始した。リンゲル液を 2 μl/min の速度で 2 時間以上潅流した後、１０分毎に透析液を採取した。NO_2^- および NO_3^- をエイコム社製の酸化窒素分析システムを用いて定量し、その合計を NOx^- とした。

［結果および考察］

ラット小脳の透析液中の NO_2^- および NO_3^- 量はそれぞれ 5.2 ± 0.4 および 38.6 ± 2.4 pmol/20 μl であった。脳透析液中の NOx^- は NO 合成酵素阻害剤 L-NAME (25-100 mg/kg, i.p.) により減少したが、阻害剤作用の弱い D-NAME (100 mg/kg, i.p.) では変化しなかった。L-Arg により NOx^- は増加し、L-NAME と併用するとその作用は消失した (Fig. 1)。NMDA, AMPA および ACPDを透析プローブを介してラット小脳に直接注入すると NOx^- は用量依存的に増加した (Fig. 2)。グリア細胞毒の FC (1

mM) を透析プローブを介して2時間注入すると、NOx^- はコントロールの2倍以上に増加し、注入終了後2時間まで有意な高値を示した。L-NAME を前投与したラットでは FC による NOx^- の増加は抑制された (Fig. 3)。以上の結果より、ラット小脳においてイオノトロピックおよびメタボトロピック型グルタミン酸受容体の刺激により NO の産生が増加すること、およびグリア細胞が NO の産生に抑制的な役割を果たしていることが示唆された。

［文献］

1. Bredt D.S. and Snyder S.H. (1992) *Neuron* **8,** 3-11.
2. Yamada et al. (1995) *Br. J. Pharmacol.* **115,** 852-858.
3. Yamada et al. (1996) *Neuroscience* in press.
4. Yamada and Nabeshima (1996) *Neurosci. Res.* (Suppl) **20,** S66.

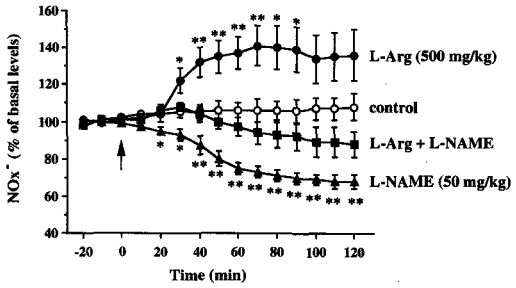


Fig. 1 Effects of L-NAME and L-Arg on the NOx^- levels in the dialysate of the cerebellum. *P<0.05, **P<0.01 vs control.

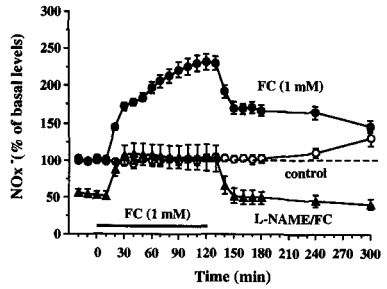


Fig. 3 Effects of FC on the NOx^- levels in the dialysate of the cerebellum.

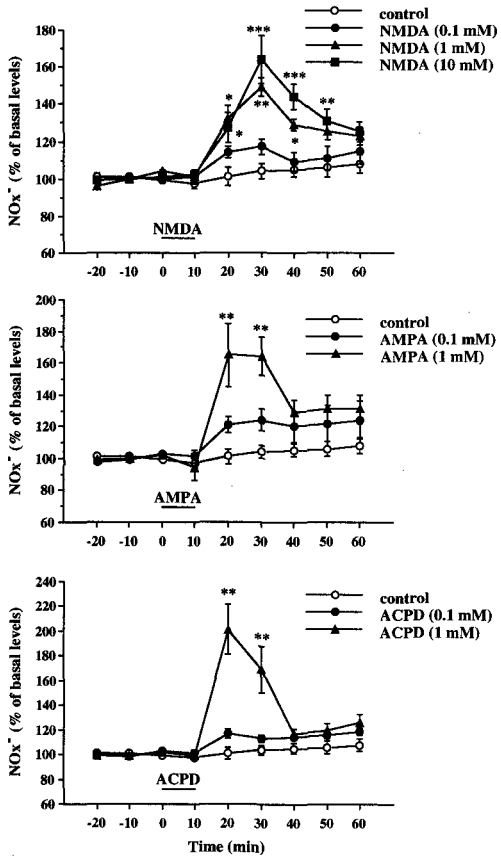


Fig 2. Effect of direct infusion of NMDA, AMPA and ACPD into the cerebellum through a dialysis probe on the NOx^- levels in the dialysate of the cerebellum. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control.

168 オリゴデンドロサイトにおける一酸化窒素依存性のcGMP産生

2E8

田中潤也*、Marjanne Markerink-van Ittersum、Harry W.M. Steinbusch、Jan de Vente
(愛媛大学医学部第二生理学*・European Graduate School for Neuroscience, Univ. of Maastricht, Dept. of Psychiatry and Neuropsychology)

〔要約〕
ラット脳スライスを、フォスフォジエステラーゼ阻害剤存在下でインキュベートした後、固定薄切して抗cGMP抗体による間接蛍光抗体法を行い、中枢神経系におけるcGMP産生細胞の検索を行った。可溶性および膜分画のグアニル酸シクラーゼを活性化するために、それぞれ一酸化窒素(NO)を放出するニトロプルシッドナトリウムまたは心房性ナトリウム利尿ペプチド関連ペプチド(ANF)をインキュベート時に添加することも行った。その結果、成熟脳においてANFに反応してcGMPを産生するのは主にアストロサイトであり、NOに反応するのは神経突起であった。ミエリン形成以前の未熟な脳ではこの二種の細胞に加え、オリゴデンドロサイトがNOに反応してcGMPを産生することを見い出した。

[緒言]
GTPよりcGMPを合成するグアニル酸シクラーゼには、細胞質に存在するsGCと、細胞膜にナトリウム利尿ペプチドのレセプターとして存在するpGCがある。sGCは一酸化窒素(NO)によって活性化され、pGCはナトリウム利尿ペプチドによって活性化される。中枢神経系にも、この二種のグアニル酸シクラーゼが存在することが知られており、sGCはおもに神経細胞に、pGCはおもにアストロサイトに存在することがcGMP抗体を用いた免疫組織化学で明らかにされてきた[1]。今回我々は、ラット脳オリゴデンドロサイトが生後1週から4週の期間のみ、NOに依存してcGMPを産生しうることを見い出したので報告する。

[実験材料と方法]
1）組織切片の作成：1、2、3、4及び10週齢のラットを断頭後、速やかに髄膜を除去し、tissue chopperを用いて300μm厚の前頭断スライスを作成した。スライスを1mMイソブチルメチルキサンチン（IBMX;フォスフォジエステラーゼ阻害剤）を含むクレブス重炭酸緩衝液中に移し、37℃、95%酸素5%二酸化炭素気流中で30分間インキュベートした。内因性NO産生阻害には、100μMのL-NAMEを用いた。その後pGCおよびsGC活性化するために100nMのANFまたは100μMのSNPを加え、さらに10分間インキュベートした。その後パラフォルムアルデヒドで固定、クリオスタットで10μm厚の切片を作成、間接蛍光抗体法によりcGMPを検出した[2]。
2）抗体：cGMP抗体は、アルブミンにコンジュゲートしたcGMPを抗原として羊に免疫して得たポリクローナル抗体である[3]。オリゴデンドロサイトの同定にはウサギ抗ゲルゾリン抗体（祖父江憲治教授<大阪大学・医・神経生化学>より供与）[4]、アストロサイトの同定には、ウサギ抗GFAP抗体（シグマ）を使用した。また、神経型NOSに対するウサギポリクローナル抗体を用いた検討も行った。

[結果と考察]
生後1週から4週までのラット脳スライスを、SNPとIBMX存在下においてインキュベートすると、神経突起のほか、主に白質に存在する少数の突起を有する丸い細胞が抗cGMP抗体により染め出される（図1）。この細胞は抗ゲルゾリン抗体に対して陽性であり、オリゴデンドロサイトであると考えられた。生後2週までのラットでは、SNPを添加しないIBMXのみ存在下でのインキュベートによりcGMP陽性細胞を見い出すことができたが、NOSの阻害剤であるL-NAME存在下では、これらの陽性細胞は消失した（図2）。一方、ANFによる刺激では、アストロサイトがcGMP抗体に陽性となったが、オリゴデンドロサイトは陽性とはならなかった（図3）。従って、幼若脳のオリゴデンドロサイトはNOによって活性化されるsGCを発現しているが、ANFによって活性化されるpGCは発現しないと考えられる。また、sGCの活性は生後1週より検出でき、生後2週にピークを迎え、生後4週以降は今回の方法ではまったく検出できなくなった。ラット前脳において、ミエリン形成は生後2週より始まり、生後4週にピークとなり、生後8週までにほぼ完成する[5]。オリゴデンドロサイトにおけるsGCの発現は、ミエリン形成に先行していることがわかる。これらの知見は、構成的に発現するNOS(neuronal/endothelial NOS)によって産生されるNOが、ミエリン形成促進のためのシグナルとして作用する可能性を示唆するものである。

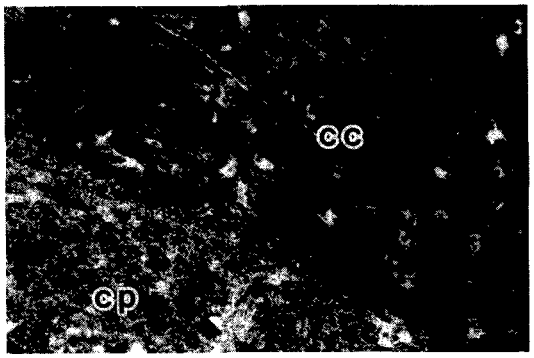


図1
生後2週ラット前脳スライスを、SNPで刺激し、抗cGMP抗体で染色したもの。基底核(cp)の豊富な神経線維のほか、脳梁(cc)の小型の丸い細胞が多数cGMP陽性である。

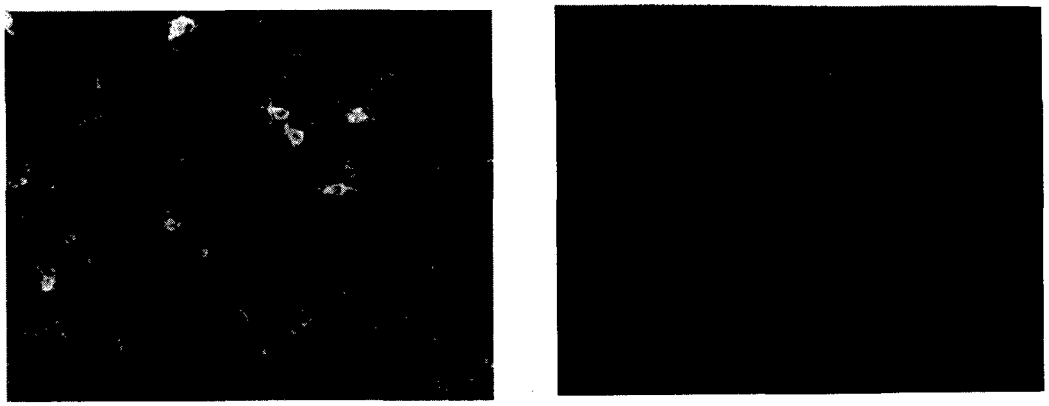


図2
[A] 生後1週ラット、頭頂葉最下層脳梁付近に存在するcGMP陽性のオリゴデンドロサイト。生後1週では、SNP刺激なしでもIBMX存在下でのインキュベートにより一部のオリゴデンドロサイトはcGMP陽性となる。[B] 同様の部位であるが、L-NAME存在下でのインキュベートにより陽性細胞は完全に消失する。

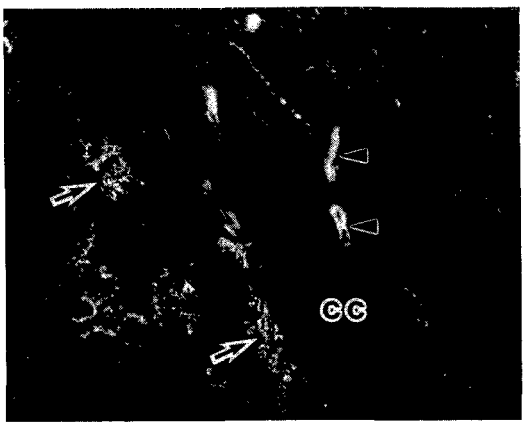


図3
生後2週ラット前脳。ANF刺激により、一部のアストロサイト（矢印）と血管内皮（矢尻）がcGMP陽性となる。脳梁(cc)には多数のオリゴデンドロサイトが存在するが、ANF刺激にはまったく反応しない。

[参考文献]

[1] De Vente, J. and Steinbusch, H.W.M. (1992) Acta Histochem., 92:13-38.
[2] De Vente, J., Young, H..M. and Steinbusch, H.W.M. (1996) Meth. Neurosci. 31:68-79.
[3] De Vente, J., Steinbusch, H.W.M. and Schipper, J. (1987) Neuroscience 22:361-373.
[4] Tanaka, J. and Sobue, K. (1994) J. Neurosci. 14:1038-1052.
[5] Jacobson, S. (1963) J. Comp. Neurol. 121:5-29.

169 2E9 カイニン酸誘発けいれん時のラット海馬における一酸化窒素（NO）の放出

柏原健一、坂井研一、庄盛敏廉、秋山一文*
（岡山大学神経内科、*岡山大学神経精神科）

〔要約〕 カイニン酸によるけいれん誘発時のラット海馬における一酸化窒素(NO)の放出動態を調べる目的で本研究を行った。すなわちSD系雄性ラットの片側海馬に透析チューブを埋め込んで人工髄液で潅流し、カイニン酸 10 mg/kg 投与前後での海馬におけるNOの細胞外濃度を in vivo microdialysis 法により調べた。NO量はその代謝産物であるNO_2, NO_3の濃度として検出した。その結果、カイニン酸投与時には1時間以内にNO産生が著しく増加し、その後も増加状態が持続した。この増加はけいれんの出現よりも早期であった。カイニン酸誘発けいれんでは発作発現に先行してNO放出が増加することが明らかとなった。

近年、血管弛緩因子として発見された一酸化窒素（NO）が中枢神経系でも非定型な神経情報伝達因子として作用することが知られるようになり、中枢神経系の疾患の病態への関与に興味が持たれている。最も研究されているのは脳虚血時の神経細胞死におけるNOの役割であるが、てんかんにおいても発作時にNOが放出され、中枢神経系の可塑的変化に関与している可能性がある。本研究ではカイニン酸誘発けいれんに伴うNOの変化を in vivo microdialysis 法を用い無麻酔下のラットの海馬で検討した。

[方法] SD系雄性ラットの左側海馬にペントバルビタール麻酔下（50 mg/kg)、脳定位装置を用い透析チューブを挿入固定した。透析チューブにはエチレンビニルアルコール製の血漿交換用透析膜(molecular weight cut off 75,000）をU字型に曲げ、先端の1 mm を除きエポキシ樹脂で固めて使用した。挿入部位は Pellegrino らの図譜に従い、その先端が bregma より後方 2 mm、左側方 1.5 mm、硬膜下 3.5 mm になるよう設定した。手術から36～48時間後、インフージョンポンプを用いて透析チューブを人工髄液 (Na^+ 140 mM, K^+ 3.35 mM, Ca^{2+} 1.26 mM, Cl^- 151 mM, PH 6.5)で潅流した（2 μl／分）。開始3時間後から20分おきに潅流液を採取した。採取開始1時間後、Vehicle (n = 4) ないしカイニン酸 10 mg/kg (n = 7)を腹腔内投与し、約4時間にわたり潅流液を回収するとともにけいれん等の行動上の変化を観察した。行動上の変化の評価にはSperkら(1983)の尺度を用いた（0；正常、1；中等度の wet dog shake、四肢、頭部の部分けいれんが稀に生じる、2；頻繁なwet dog shake、頻繁な部分けいれん、3；頻繁な wet dog shake、立ち上がり、流涎をともなうけいれん、4；持続的な全身けいれんがあり、立ち上がりののち背から倒れる、5；全身の強直間代けいれん、4時間以内の死）。回収したサンプルは－80℃に保存。採取後3日以内に一酸化窒素代謝産物（NOx; NO_2+NO_3）濃度を測定した。測定にはフローインジェクションメトリー（TCI-NOX1000；東京化成）を用いた。

[結果] カイニン酸 10 mg/kg 投与時の行動評価尺度の経時変化を図1に示した。投与120分後にピーク値に達し、以後約2時間持続、その後異常行動は減少した。同時期に潅流した人工髄液中のNOxの変化は図2に示した。薬物投与前値を100%として表示してある。図からカイニン酸投与後NOxは1時間以内に急速に増加、以後も約3時間にわたり増加した状態が持続した。この増加はvehicle 投与群に比べ有意であった($F = 34.67$, $p < 0.01$; two-way ANOVA)。また、増加は行動評価尺度のピークに先行した。

[考察] けいれんに伴うNOの変化をin vivo microdialysis で検討した報告はみられず、NO活性を反映するとされるcGMPの定量やNOSを免疫組織学的に調べた研究が学会で報告されている。本研究ではin vivo microdialysis 法を用いてけいれん前後のラット海馬を潅流、微量のNOxが測定できる装置を用いることで回収された人工髄液中のNOxを測定、NO産生変化の指標とした。この方法の利点は無麻酔下で脳内で産生されたNOの変化が経時的に

捉えられる点である。実験の結果、カイニン酸を投与するとNOxの放出は速やかに増加した。この増加は行動上の変化に先行していた。以上からカイニン酸誘発けいれん発現に伴い海馬でＮＯの放出が増加することが明らかとなった。このように放出されたＮＯには３つの意義が考えられる。すなわち（１）血管壁で産生されたもので、脳血管の拡張を介して脳内エネルギー消費増加に応じた循環血液量を保つ方向に作用する、（２）神経伝達因子として放出され、刺激伝達に介在する、（３）カイニン酸により直接、あるいはグルタミン酸放出を介してグルタミン酸受容体を刺激することで過剰に放出され、ラジカル生成を経て神経細胞障害を生じる、である。ＮＯ合成阻害下でカイニン酸誘発けいれんを導く実験ではけいれん閾値の低下が報告され、ＮＯによる必要に応じた脳血流の増加が阻害されるためと考えられている(Penix et al, 1994)。今回の実験で放出が増加したＮＯが主としてどの経路で作用しているかは不明である。今後の課題と考える。

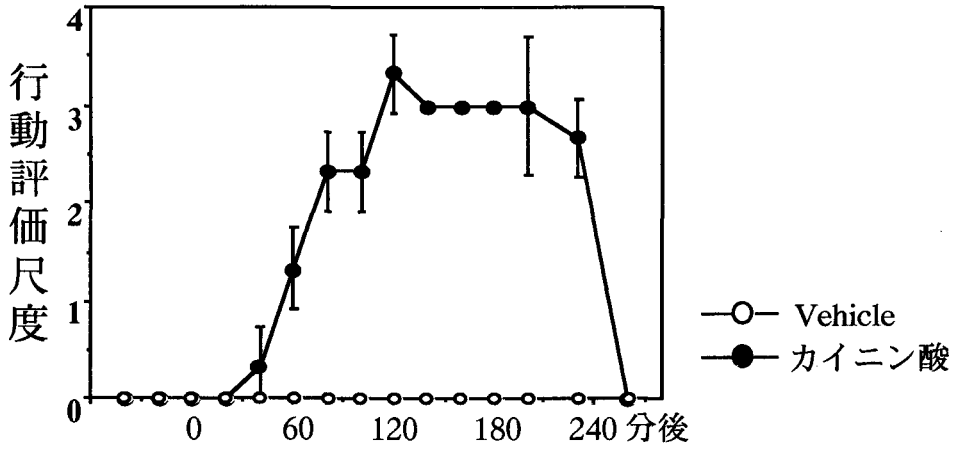


図１　カイニン酸投与時行動の経時変化

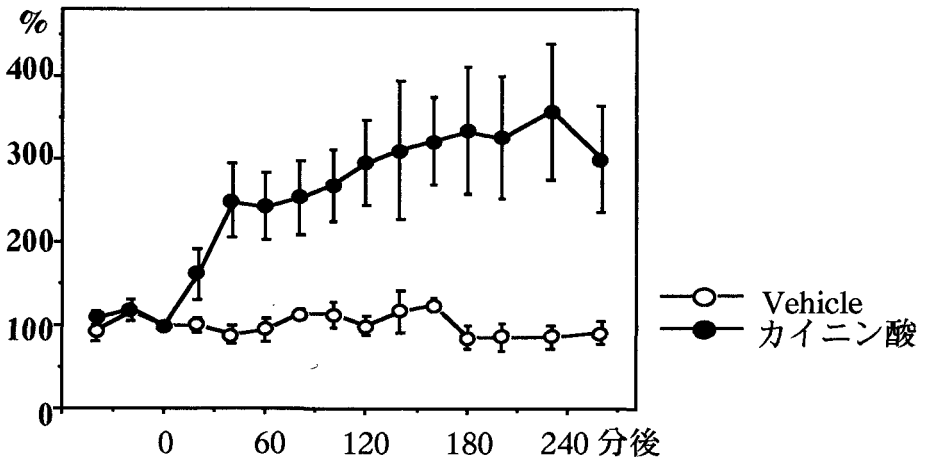


図２　カイニン酸投与時の海馬細胞外ＮＯxの経時変化

[参考文献]

Penix LP, Davis W, Subramaniam S. Inhibition of NO synthease increases the severity of kainic acid-induced seizures in rodents. Epilspsy research 18: 177-184, 1994.

Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. Neuroscience 10: 1301-1315, 1983.

170 2Ba5 局所脳虚血ラットにおけるNO合成酵素(NOS)の経時的変化とNOS産生細胞の同定

○本間秀樹[1]、水島秀勝[1]、土肥謙二[1]、荒井好範[1]
松本 清[1]、塩田清二[2]、中井康光[2]
(昭和大学医学部脳神経外科[1] 同第一解剖学[2])

〔要約〕脳虚血におけるnitric oxide(NO)の関わりを解明するため、中大脳動脈閉塞モデルラットの大脳皮質を用いてNO合成酵素(NOS)各アイソフォームの免疫組織化学を行い、経時変化を観察した。また、NO産生細胞を同定する目的で各細胞に特異的な抗体で染色し、細胞同定も行った。更に虚血前後のNOガス及び脳血流量測定も行いNOSの免疫染色性の変化と比較検討した。脳血流量は虚血直後25%に低下し、そのまま経過した。NOガスは虚血直後に上昇し始め、2分でピークを認めた。一方brain NOS(bNOS)陽性神経細胞数は5分でピークを認め、60分では虚血前と同レベルに減少した。endothelial NOS(eNOS)の免疫陽性反応も5分でピークを認め、血管内皮とアストロサイトが陽性となった。inducible NOS(iNOS)は、2-4日で陽性となり、梗塞巣周囲のアストロサイト、血管内皮、マクロファージ/マイクログリアがiNOS産生細胞と思われた。bNOS及びeNOSの免疫染色性のピークは虚血直後のNOガスのピークと一致しており、急性期の血管拡張に寄与していると考えられ、一方iNOSからのNO放出は亜急性期の神経障害に関わると推測された。

【目的】脳虚血に伴いnitric oxide(NO)が大量に放出することが知られている。またこのNOは、神経保護的にも神経障害的にも働くともいわれている。NOは不安定なガスであり、これを測定することは困難で、生体において長期の変化を観察することは更に困難である。そこで我々は、NO合成酵素(NOS)の免疫染色性の経時的変化を観察することで、虚血におけるNOの関わりを間接的に解明することと、NOを産生する細胞を同定することを目的として実験した。

【方法】SD系成熟雄ラット(250-350g)を用い、全身麻酔下で右中大脳動脈を凝固閉塞した。虚血5、10、30、60、240分、1、2、4、7日後に灌流固定し凍結切片を作成後、NOS抗体(抗bNOS抗体、抗eNOS抗体、抗iNOS抗体)を用いて免疫染色を行った。またNOS産生細胞を同定するため隣接切片上でアストロサイト、マクロファージ、マイクログリアに対するそれぞれの抗体(GFAP, MAC387, CD11b)を用いて免疫染色を行った。一方頭頂側頭皮質の脳表における虚血前後のNOガス及び脳血流量の測定も行い、免疫染色の経時変化と比較検討した。

【結果】bNOS陽性神経細胞は対照群でも皮質全層にわたりみられるが、虚血後その数は増加し始め、虚血5分でピークとなった(図1A)。その後減少し、虚血60分では対照群とほぼ同様のレベルとなった(図1B)。eNOS免疫陽性反応は対照群では殆どみられなかったが、虚血5分で血管内皮及びアストロサイトに強くみられた(図2A)。その後免陽性反応は減弱したが、虚血4日目の虚血巣周囲に拡がるアストロサイトにも陽性反応がみられた(図2B)。一方iNOS免疫陽性反応は。、虚血2日目で虚血巣周囲に拡がるアストロサイトに出現した。虚血4日目では梗塞巣周囲の血管内皮細胞、アストロサイト、マクロファージ/マイクログリアと思われる細胞にiNOS免疫陽性反応がみられた(図3A,B)。更に隣接切片法を用いて観察した結果、iNOS陽性細胞の領域に一致してGFAP、MAC387、CD11b陽性細胞がみられた。

【結論】bNOSとeNOSでは虚血5分で免疫染色性のピークがみられたことから、虚血直後のNO産生にはbNOSとeNOSが関与していることが示唆された。一方iNOSが虚血2-4日で免疫反応陽性となったことから、iNOSは遅発性のNO産生に関与し、血管内皮細胞やアストロサイト、マクロファージ/マイクログリアがiNOSを産生している可能性が示唆された。

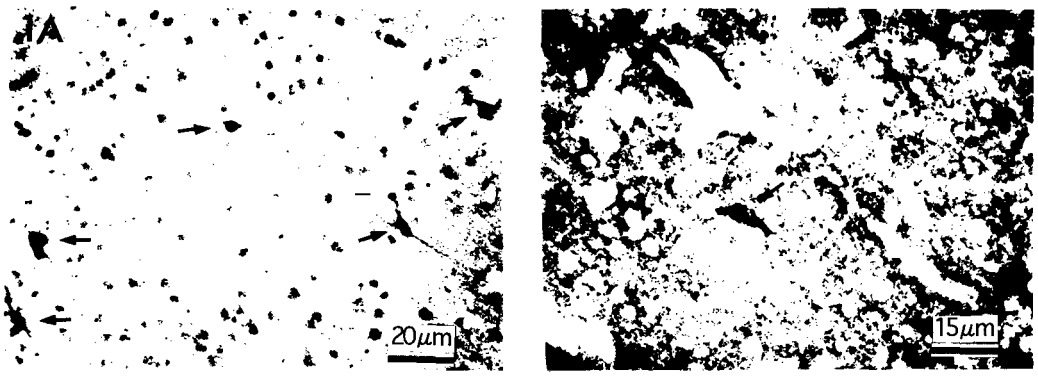


図1 bNOS 免疫組織化学

bNOS陽性ニューロン(矢印)の数は虚血後5分で増加するが(1A)、60分後には基礎値に戻る(1B).

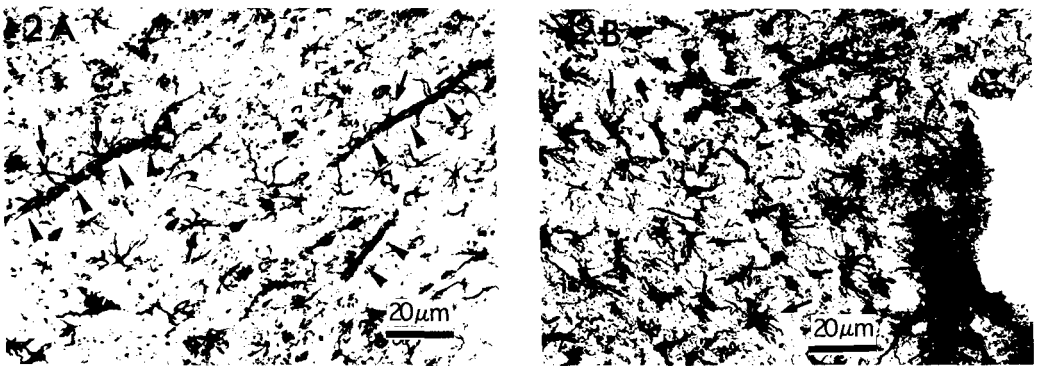


図2 eNOS 免疫組織化学

eNOS免疫活性は、虚血後5分の血管内皮(矢頭)及びアストロサイト(矢印)にみられ(2A)、また虚血4日後の虚血巣周囲に存在するアストロサイト(矢印)にもみられる(2B)。

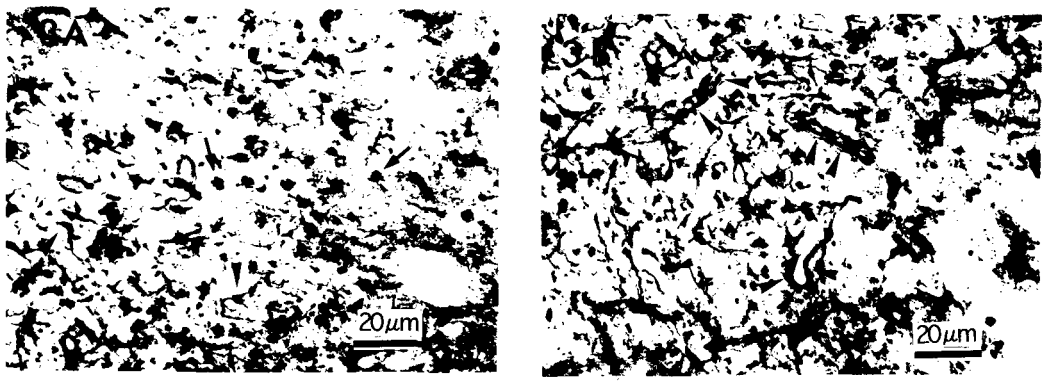


図3 iNOS 免疫組織化学

iNOS免疫活性は、虚血4日後の虚血巣周囲に存在するアストロサイト(矢頭)やマイクログリア/マクロファージ(矢印)(3A)、血管内皮(矢頭)にもみられた(3B)。

171 鉄イオンによる神経細胞障害とNO関連薬物の効果

2E10

今野 大三、奈良 圭之輔、大野 稔、山崎 由香子、
木内 祐二、小口 勝司
(昭和大・医・第一薬理)

〔 要約 〕

鉄イオン による神経細胞障害の機序と一酸化窒素 (NO) の影響を明らかにするため Fe^{2+}およびNO関連薬物の神経細胞死と脂質過酸化に対する効果を検討した。培地への Fe^{2+}添加は濃度依存的にPC12細胞の生細胞数と[^{3}H]thymidineの取り込み能を減少させ、培地中のTBA反応物質量を著明に増加させた。MCLA (O_2^- scavenger) は Fe^{2+}による細胞死および脂質過酸化の増加を有意に抑制した。一方、NOドナー (NOR-4, NOC-18, SNAP) は濃度依存的なPC12細胞の細胞死を引き起こしたがFe^{2+}誘発細胞障害に対してNOR-4, NOC-18は防御的に作用した。大脳皮質ホモジネートにおいてもFe^{2+}添加による濃度依存的な脂質過酸化とNOドナーによるその抑制が認められた。以上より、Fe^{2+}による神経細胞障害はスーパーオキシド (O_2^-) を介した脂質過酸化が関与している可能性が示唆され、NOはFe^{2+}の細胞障害に対しては拮抗作用を示す可能性が示唆された。

[目的]

最近、脳出血後の神経細胞障害やパーキンソン病 (PD) の病因の一つとして活性酸素、フリーラジカルの関与が数多く報告されている[1]。出血の局所では崩壊した赤血球より鉄イオンが放出され、PDの黒質では鉄の過剰な蓄積が報告[2]されていることより、その酸化的障害の進展に鉄が深く関与していると推測される。一方、これらの病巣にはNOを産生するマクロファージなどが集族することが知られているが、NO の鉄の作用に対する効果は十分に検討されていない。そこで我々は、神経細胞に対する鉄イオンの作用機序とNOの及ぼす効果を細胞障害作用と脂質過酸化作用を指標に検討を行った。

[方法]

PC12細胞は10%HS、5%FBSを含むRPMI1640培地で培養した。24時間後に$FeCl_2$と各種薬物を単独または同時添加し、48時間培養後、細胞生存率をMTT法で測定した。12時間培養後の培地中の脂質過酸化量はTBA反応物質量として求め、DNA合成能の指標として薬物添加24時間後に[^{3}H]thymidine (0.2 μCi/ml) を加え3時間培養し、核内に取り込まれた放射活性を測定した。一方、ラット脳ホモジネートは5週齢SD系雄性ラットの大脳皮質にKrebs-Ringer液 (pH7.4) を加え、ホモジナイズして調整した。このホモジネートに薬物を添加し、37℃、60分間インキュベーションし直ちにTBA反応物質量を測定した。

[結果]

1. 培地への0.1-2 mM Fe^{2+}添加により濃度依存的な細胞数の現象 (48時間後, Fig.1)、[^{3}H]thymidine取り込みの抑制 (24時間後) およびTBA反応物質量の増加が認められた。これらの作用はいずれもdeferoxamine 同時添加により拮抗された。MCLA (O_2^- scavenger) は1 mM Fe^{2+}による細胞死および脂質過酸化の増加を有意に抑制した。一方、mannitol ($^{\cdot}OH$ scavenger) およびcatalaseはいずれも明らかな抑制作用を示さなかった。

2. 0.1-1.0 mM NOR-4, NOC-18, SNAPは単独ではいずれも濃度依存的に細胞死を引き起こしたが、1 mM Fe^{2+}添加による細胞死に対してNOR-4, NOC-18は拮抗作用を示した。また、NOC-18, SNAPは1 mM Fe^{2+}によるTBA反応物質量の増加を抑制したが (Fig. 2)、単独では脂質過酸化に影響を与えなかった。

3. 0.1-2 mM Fe^{2+}添加後のインキュベーションにより脳ホモジネートのTBA反応物質量も濃度依存的に増加したが、この増加はNOドナー同時添加時には有意に抑制された。

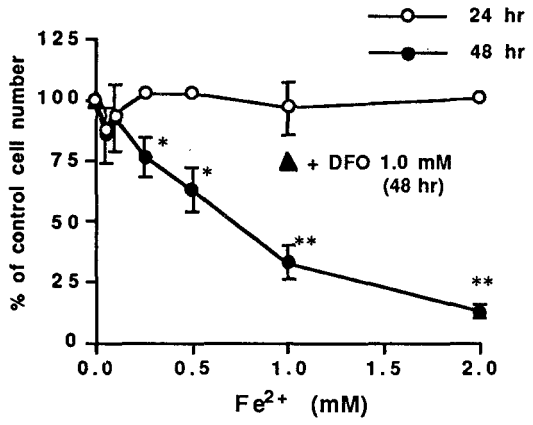


Fig. 1 Fe^{2+}-induced Cytotoxicity in PC12

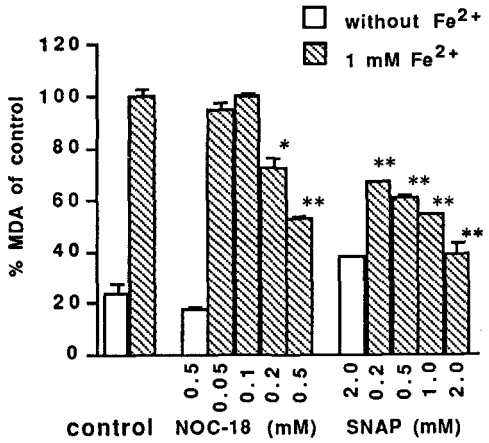


Fig. 2 Effect of NO Donors on TBA-RS Accumulation in Cultured Medium

Mean ± SE (n=3), *p<0.05, **p<0.01

[考察]

Fe^{2+}によるPC12細胞の細胞死と脂質過酸化はMCLAで拮抗されmannitol、catalaseで影響されなかったことより、Fe^{2+}による細胞障害には$O_2^{\cdot-}$が関与することが示唆された。Fe^{2+}存在下ではFenton反応により産生される$^{\cdot}OH$よりもむしろ$O_2^{\cdot-}$との直接反応で生成される反応性の高いferryl ion $[Fe^{IV}=O]^{2+}$が主要なradical種となる可能性が報告されており[3]、我々の結果はこれを支持するものと思われる。一方、NOドナーは単独ではPC12細胞の細胞死を引き起こしたが、Fe^{2+}による細胞死と脂質過酸化を抑制したことより、NOはFe^{2+}の細胞障害作用に対しては拮抗作用を示す可能性が示された。以上よりNOはPC12細胞に対して単独では毒性を、Fe^{2+}存在下では防御的に作用することが示唆され、脳出血部やPDの黒質ではむしろ障害の進展を抑制している可能性も考えられる。

[文献]

1) Sengstock, G.J., et al. (1992) *Brain Res. Bull.*, 28, 645-649.

2) Sofic, E., et al. (1991) *J. Neurochem.*, 56, 978-982.

3) Yamazaki, I. and Piette, L. H. (1990) *J. Biol. chem.*, 15, 13589-13594.

172 NOを介する神経細胞死の過程で起こる転写因子AP-1の消失について

2Ba3

田渕 明子、津田 正明
(岡山大学・薬学部)

【要約】 グルタミン酸レセプターの活性化は、c-Fosを含むAP-1の誘導[1]、ならびにNOの産生増加[2]を引き起こすが、脳虚血等の病的状態では神経細胞死を誘起する[3]。マウス小脳顆粒細胞をNMDA(N-methyl-D-aspartate)やカイニン酸で刺激するとAP-1DNA結合活性が上昇する[4]。この上昇は、NO供与体のニトロプルシッド前投与で抑制された。この時、c-*fos* mRNAの発現レベルには変化がなく、核内のc-Fos タンパク質が消失していることが明らかとなった。しかし、このAP-1消失は全タンパク質の合成阻害によらず、またcGMPに依存しない。このことは、AP-1消失が転写後に起こっていることを示している。さらにニトロプルシッド投与で起こる神経細胞死は、NOスカベンジャーのcarboxy-PTIOやスーパーオキシドスカベンジャーのSOD、カタラーゼにより抑制されることが明らかとなり、パーオキシナイトライトが関与する可能性が考えられた。この結果と対応して、SODとカタラーゼは、前述のAP-1消失も抑制した。以上の結果から、NOと活性酸素を介した神経細胞死の初期段階においてAP-1消失が関与することが示唆された。

【目的】 脳虚血等の病的状態では、グルタミン酸レセプターの異常活性化による活性酸素や一酸化窒素(NO)の産生増加[3]、ならびにAP-1の長期的誘導[5]、あるいは消失[6]が認められる。NOにより種々の細胞内分子が修飾を受けるが、これらの現象がNO誘導性の神経細胞死に応答する機構は明らかではない。神経細胞死の誘導過程で起こる細胞内反応について明らかにすることは、NO誘導性神経細胞死の機構を知るうえで重要である。特に我々は、酸化還元(redox)に感受性で、細胞死誘起過程で発現されるc-Fosを含む転写因子AP-1の発現に着目し、活性酸素とNOによって誘導される神経細胞死との関連をマウス小脳顆粒細胞の初代培養系を用いて解析した。

【方法】 出生後一週間目のマウス(ICR)から小脳顆粒細胞の初代培養系を調製し、25mMKCl、60μg/mlカナマイシン、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中で、6-7日培養し、以下の実験に用いた。培地をLocke's 溶液 (5 mM HEPES pH 7.4, 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM $NaHCO_3$, 2.3 mM $CaCl_2$, 5.6 mM glucose)に交換し、1時間後にNMDA、カイニン酸を100 μMで加えた。その1時間後に細胞質RNA、核抽出液を調整し、ノザン法、ゲルシフト法にそれぞれ用いた。また、ウェスタン法によりc-Fosタンパク質を検出した。細胞内へのCa^{2+}の取り込みは、1 μCi $^{45}CaCl_2$をLocke's溶液に加え、アゴニスト投与後10分間の取り込み量で測定した。全タンパク質合成は、^{35}S-メチオニンのタンパク質分画への取り込みにより測定した。神経細胞死は、乳酸脱水素酵素(LDH)の培地中への放出量で評価し、薬剤刺激後、1、4時間で調製した試料を用いた。なおニトロプルシッドは、アゴニストを加える10分前に加えた。

【結果】 NMDA、カイニン酸投与で引き起こされるAP-1DNA結合活性の上昇は、ニトロプルシッドにより抑制される。しかし、カイニン酸型グルタミン酸レセプターを介して誘起される$^{45}Ca^{2+}$の取り込み、ならびにc-*fos*mRNAの発現レベルに対しては変化を与えず、c-Fosタンパク質を減少させた。またニトロプルシッドは、^{35}S-メチオニンのタンパク質への取り込みには、ほとんど影響を及ぼさなかった。一方、NMDA型レセプターを介する$^{45}Ca^{2+}$の取り込み、ならびにc-*fos* mRNAの発現レベルはニトロプルシッドによって顕著に抑制されるが、これはニトロプルシッドのフェロシアナイド部位によるNMDA型レセプターの不活性化によると考えられる。

ニトロプルシッド投与後、4時間で顕著なLDHの放出が濃度依存的に認められた。しかし、このLDHの放出は、100 units/mlのSODをニトロプルシッド投与10分前に前処理すると抑制された。また、NOスカベンジャーである50 μM carboxy-PTIOを前処理によっても抑制された。さらに、この実験結果と対応して、SODとカタラーゼはニトロプルシッドによるAP-1消失を抑制した。

【考察】 ニトロプルシッドが、カイニン酸型グルタミン酸レセプターを介して誘起されるc-*fos* mRNAの発現には影響せず、c-Fosタンパク質を減少させることは、AP-1が転写後制御によって消失することを示している。また、SOD、カタラーゼのような抗酸化酵素が、ニトロプルシッドによるLDH放出と

AP-1消失の双方を抑制し、またcarboxy-PTIOがLDH放出を抑制したことは、この神経細胞死が誘起される過程で活性酸素類を介してAP-1消失が起こること、即ちパーオキシナイトライトが関与する可能性を支持している。

AP-1は、酸化還元(redox)感受性の転写因子であり、DNA結合領域に存在するシステイン残基が重要な役割を果たしている。我々は、NOがAP-1DNA結合活性を制御する可能性を*in vitro*無細胞系で示しており[7]、redox制御がAP-1転写後消失の一因となっていることが挙げられる。一方、細胞死誘発過程では、ある種のタンパク質分解酵素が活性化されるため、AP-1のタンパク質分解が寄与する可能性もまた考えられる。

脳虚血で起こる神経細胞死の過程において、c-*fos* mRNAが誘導されるが、そのmRNAの増加は認められてもc-Fosタンパク質が検出されない場合が報告されている[8]。したがって、今回報告したAP-1の消失が、虚血性脳障害で起こるNO誘導性神経細胞死の一つの指標になる可能性が考えられる。

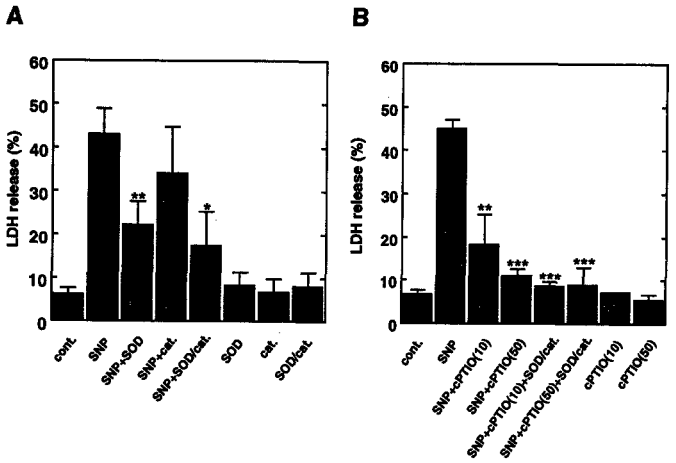


図1. ニトロプルシッドによる細胞死誘導と、SOD・NOスカベンジャーによる細胞死抑制効果。

ニトロプルシッドを加えて4時間後、培地中へのLDH放出を測定した。なお、SOD・カタラーゼ(cat.)、carboxy-PTIO(cPTIO, 10 or 50 μM))は、ニトロプルシッドを加える10分前に加えた。

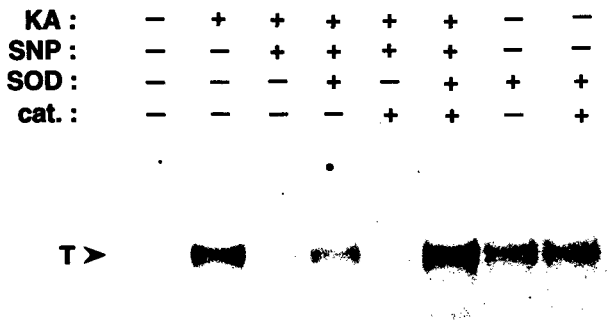


図2. ニトロプルシッドによるAP-1DNA結合活性の抑制と、SOD・カタラーゼによる回復。

ニトロプルシッド(SNP)とカイニン酸(KA)を加え、1時間後に核抽出液を調整し、ゲルシフト法を行った。なお、SOD・カタラーゼ(cat.)は、ニトロプルシッドを加える10分前に加えた。

【文献】

1. Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1992) J. Neurochem. 59, 2067-2075
2. Novelli, A., Nicoletti, J. T., Wroblewski, T., Alho, H., Costa, E. and Guidotti, A. (1987) J. Neurosci. 7, 40-47
3. Beckman, J. S. (1991) J. Dev. Physiol. 15, 53-59
4. Ohtani, K., Sakurai, H., Oh, E., Iwata, E., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1994) J. Neurochem. 65, 605-614
5. Dragnow, M. and Preston, K. (1995) Brain Res. Rev. 21, 1-28
6. Kiessling, M., Stumm, G., Xie, Y., Herdegen, T., Aguzzi, A., Bravo, R. and Gass, P. (1993) J. Cereb. Blood Flow Metab. 22, 914-924
7. Tabuchi, A., Sano, K., Oh, E., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1994) FEBS Lett. 351, 123-127

173 2Ba4 PC12細胞におけるS-ニトロソシステインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇

長沼 朋佳、村山 俊彦、野村 靖幸
（北海道大学 薬学部 薬効学講座）

[要約]

1）SNC（S-nitroso-cysteine）は、細胞外Ca^{2+}非依存的に細胞内遊離Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)を上昇させた。

2）SNC投与後にカルバコール、ATPγSを投与しても、カルバコール, ATPγSによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇はみられたが、カフェインによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇は観察されなくなった。

3）SNCと同様の持続的な$[Ca^{2+}]_i$の上昇が、NEM (N-ethylmaleimide) によっても見られ、いずれの作用もDTT (dithithreitol) によって抑制された。

[緒言]

一酸化窒素(NO)は、生体内で様々な働きを持っていることが知られている。NOは、生体内でS-nitrosothiol (RSNO)の形でも存在することが知られており、比較的安定なNO供与体となる。また、NOが$[Ca^{2+}]_i$変化に影響を与えるという報告も存在しており、NOがryanodine感受性プールを介してCa^{2+}放出を促進させるという報告[1]と、抑制するという報告[2]が存在する。 そこで今回我々は、PC12細胞の$[Ca^{2+}]_i$に対するNO供与体の効果を検討し、以下に述べる新知見を得た。

[実験方法]

PC12細胞を常法に従い培養し、sub-confluent状態にある細胞を実験用いた。このPC12細胞を、0.67 μM Fura 2-AMを含むTyrode HEPES buffer (pH=7.4)で37 ℃、２０分 インキュベートし、Fura 2-AMを取り込ませた。洗浄後、遊離細胞を調製し、4,000 rpm. 30秒で遠心分離操作を行い、1mM$CaCl_2$存在下及び非存在下でbufferに懸濁し、実験に用いた。実際の測定には、F-2000型分光蛍光光度計を用い、これまでの報告に準じて$[Ca^{2+}]_i$の変化を測定した[3)、4)]。

[結果]

1）SNCは、細胞外1 mM $CaCl_2$存在下及び非存在下において、持続的に$[Ca^{2+}]_i$の上昇を引き起こした。

2）細胞外Ca^{2+}非存在下で、SNC投与後にカフェインを投与したとき、カフェインによるCa^{2+}-induced Ca^{2+} release (CICR) チャネルを介した細胞内プールからのCa^{2+}動員は起こらなくなった。（図１）

3）しかし、細胞外Ca^{2+}非存在下で、SNC投与後にカルバコールを投与したとき、カルバコールによるIP_3チャネルを介した細胞内プールからのCa^{2+}動員は起こった。

4）また、細胞外Ca^{2+}存在下で、SNC投与後にATPγSを投与したとき、ATPγSによる電位非依存性チャネルを介した、細胞外からのCa^{2+}動員も起こった。

5）蛋白のSH基に結合するNEMをPC12細胞に作用させると、SNCと同様に細胞外Ca^{2+}非依存的に$[Ca^{2+}]_i$の上昇が見られた。

6）SNCの作用も、NEMの作用もDTTを加えると抑制された。（図2）

7）他のNO化合物であるSNP (sodium nitroprusside)，NOラジカルを放出させるNOC-18 (1-hydroxy-2-oxo-3,3-bis-2-aminoethyl-1-triazene),$ONOO^-$を放出させるSIN-1(3-morpholinosydnonimine),SNAP(S-nitroso-N-acetylpenicillamine),亜硝酸ナトリウム($NaNO_2$)、硝酸ナトリウム($NaNO_3$)は全て、PC12細胞の$[Ca^{2+}]_i$に何の影響も及ぼさなかった。

[考察]

SNCによる$[Ca^{2+}]_i$上昇作用は、細胞外Ca^{2+}非依存的であることから、細胞内Ca^{2+}プールからの動員であることが示唆された。細胞内Ca^{2+}プールからのCa^{2+}動員には、IP_3チャネル及びCICRチャネルを介した経路が存在するが、SNC投与後にカフェインを投与したとき、カフェインの作用が見られなくなったことから、SNCは細胞膜上のチャネルや、IP_3チャネルではなく、CICRチャネルに特異的に作用し、Ca^{2+}動員を起こしていることが示唆された。また、SNCによるCa^{2+}動員はNEMに類似していることから、SNCは、CICRチャネルのカフェイン感受性部位もしくはそれに近い部位のSH基を修飾することによってCICRチャネルからのCa^{2+}動員を行うことが示唆された。

[参考文献]

1) Oda et. al., Archiv. Biochem. Biophys. 133 001-007 (1996)

2) Murayama et. al., Jpn. J. Pharmacol. 69 43-51 (1995)

3) Willmott et. al., FEBS Lett. 371 99-104 (1995)

4) Meszaros et. al., FEBS Lett. 380 49-52 (1996)

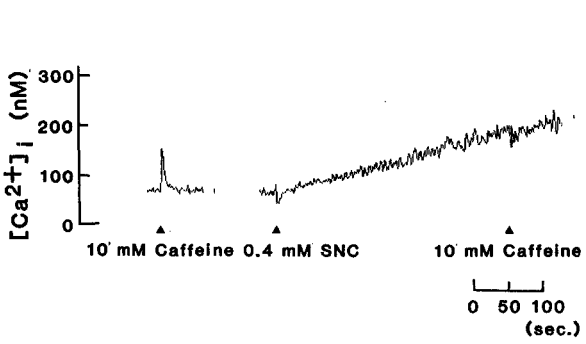


図1　カフェインによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇と、SNC刺激後におけるカフェインの作用の消失

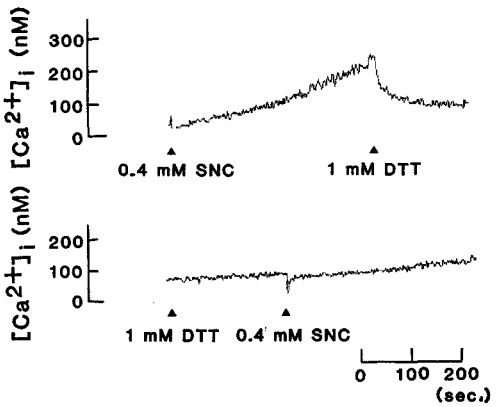


図2　DTTによるSNCの$[Ca^{2+}]_i$上昇作用の抑制

174 2E11 ムスカリン性アセチルコリンレセプター結合能に対するNOラジカルの影響

Marvin Gómez-Vargas, 西林佐紀子, 浅沼幹人, 岩田恵美, 近藤洋一, 小川紀雄
(岡山大学医学部・分子細胞医学研究施設・神経情報学部門)

〔 要約 〕

最近，大脳皮質NO合成酵素(NOS)陽性神経細胞の約10%がムスカリン性アセチルコリンレセプター(mACh-R)を含有していることが報告されている．スナネズミ前頭皮質レセプター標品とmACh-Rのantagonistである[^{3}H]-quinuclidinyl benzilateを用いたradiorabeled receptor assay系に・NOラジカル donerであるNOC7を添加し，その効果について検討した．Saturation assayでNOC7を同時添加したところ，10 μM, 100 μM, 1 mM NOC7においてKd値は有意に減少した．さらに，atropineあるいはcarbacholによるdisplacement curveに対してNOC7は全く影響しなかったことより，・NOはallostericに作用してレセプターの親和性を増強する可能性が示された．また，SH保護剤や不可逆的SH基アルキル化剤を用いた実験より，・NOはmACh-R蛋白のSH基に作用してレセプターの親和性を増強させていることが明らかになった．以上より脳内では・NOはmACh-R含有神経細胞に共存しているNOSより産生され，mACh-Rを介する神経情報伝達機構を高めるneuromodulatorとして働いている可能性が示唆された．

［目的］ 一酸化窒素ラジカル(・NO)は神経系において神経障害性に作用するだけでなく，神経伝達物質系に対してはglutamate, acetylcholine, dopamineの放出を促進するなどneuromodulatorとして働いている(1,2)．NO合成酵素(NOS)を有する大脳皮質神経細胞の約10%がムスカリン性アセチルコリンレセプター(mACh-R)を含有していることが報告されており(3)，mACh-Rを介する神経伝達系と・NOとの何らかの連関が示唆されている．そこで，・NOの脳内mACh-Rにおよぼす機能的影響について明らかにする目的で，スナネズミ前脳レセプター標品とmACh-Rのantagonistである[^{3}H]-quinuclidinyl benzilate (QNB)を用いたradiorabeled receptor assay (RRA)系にNO donerである3-(2-hydroxy-1-methylethyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-propanamide (NOC7)を添加し，その効果について検討した．

［方法］ スナネズミ前脳をTris-HCl (pH 7.6)でhomogenateし150 vol.に調整した粗膜分画をレセプター標品としてRRA実験に供し，B･Fの分離はフィルター法(Whatman GF/B)で行った．Saturation assayでは，レセプター標品と0.16-2.66 nM [^{3}H]-QNBおよび一定量の(0, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM) NOC7を25℃で2時間反応させた．非特異的結合は1 μM atropine存在下での放射能量とした．また，agonist carbacholあるいはantagonist atropineによるdisplacement assayと，GTP添加効果におよぼすNOC7の影響を調べるために，レセプター標品，100 μM NOC7あるいは100 μM GppNHpを25℃で10分間反応させ，atropine (0-1 μM)あるいはcarbachol (0-1 mM)と一定量 (1 nM)の [^{3}H]-QNBを25℃で2時間反応させた．NOC7のSH基への影響に関する検討では，レセプター標品をSH基保護剤dithiothreitol (DTT; 10 μM, 1 mM)あるいは不可逆的SH基アルキル化剤N-ethylmaleimide (NEM; 20 μM, 2 mM)と反応させ，遠沈，再懸濁後10 μM NOC7と反応させ，さらに遠沈，再懸濁後0.16-2.66 nM [^{3}H]-QNBによるsaturation assayに供した．

表1 NOC7 のQNB結合活性に及ぼす影響

Kd (nM)	
NOC7 (-)	0.196 ± 0.009
NOC7 1 μM	0.204 ± 0.002
NOC7 10 μM	0.151 ± 0.013*
NOC7 100 μM	0.144 ± 0.012*
NOC7 1 mM	0.153 ± 0.007*
Bmax (pmol/mg protein)	
NOC7 (-)	2.405 ± 0.026
NOC7 1 μM	2.449 ± 0.002
NOC7 10 μM	2.318 ± 0.042
NOC7 100 μM	2.332 ± 0.043
NOC7 1 mM	2.254 ± 0.016*

*p<0.05 vs. NOC7(-)

表2 Thiol-reagent のQNB結合親和性に及ぼす影響

	Kd (nM)
buffer /NOC7 (-)	0.081 ± 0.006
buffer /NOC7 (+)	0.056 ± 0.005*
DTT 10 μM /NOC7 (-)	0.073 ± 0.005
DTT 10 μM /NOC7 (+)	0.051 ± 0.004**,+
DTT 1 mM /NOC7 (-)	0.062 ± 0.007
DTT 1 mM /NOC7 (+)	0.058 ± 0.005
NEM 20 μM /NOC7 (-)	0.066 ± 0.007
NEM 20 μM /NOC7 (+)	0.101 ± 0.009*,++
NEM 2 mM /NOC7 (-)	0.061 ± 0.013
NEM 2 mM /NOC7 (+)	0.051 ± 0.004*

*p<0.05, **p<0.01 vs. buffer /NOC7(-), +p<0.05, ++p<0.01 vs. NOC7(-) group at same thiol-reagent concentration

[結果および考察]　段階希釈したNOC7 (0-1 mM)自身は[^{3}H]-QNB結合活性をdisplaceしなかった．したがって，NOC7自身はmACh-Rにligandとして作用しないと考えられる．Saturation assayでNOC7を同時添加したところ，10 μM, 100 μM, 1 mM NOC7においてKd値は有意に減少した(表1)．Bmax値は1 mM NOC7でわずかに低下したものの1-100 μMでは不変であった．レセプターをNOC7と反応させ，その後2回遠沈，再懸濁を繰り返してNOC7を洗い流した標品においても，Kd値は減少していたことから，この親和性増強効果はNOC7より発生した·NOに基づくものと考えられる．実際に，同じ反応系において·NOが発生していることはESR法により確認された．さらに，atropineあるいはcarbacholによるdisplacement curveに対してNOC7は全く影響しなかった．これらより，·NOはallostericに作用してレセプターの親和性を増強する可能性が示された．さらにcarbacholでのdisplacementに対するGppNHp-による抑制効果(GTP effect)にもNOC7は影響しなかったことから，G-protein coupling systemへの影響ではないと考えられる．

·NOはSH基を介してnitrosothiolあるいは金属nitrosyl complexを形成し，H_2O_2による神経毒性を減弱すること(4)，·NO donerであるsodium nitroprussideは，NMDA-Rのredox modulatory siteのSH基を酸化してレセプター複合体の構造を変化させ，Caの細胞内流入を抑制することで神経保護的に働くこと(5,6)が報告されている．そこで，·NOのmACh-R蛋白のSH基に対する影響について検討するために，あらかじめDTTあるいはNEMで処置したレセプターにNOC7を添加し，[^{3}H]-QNB結合の親和性の変化を測定した．Thiol-reagentで処置していない場合，NOC7を反応させると親和性は前述の結果と同様に有意に増加した(表2)．不可逆的thiol-blockerであるNEM処置単独ではKd値に有意な変化は認められなかった．高濃度のDTT (1 mM)処置は単独でもQNB結合の親和性を増加させる傾向が認められた．しかし，DTTはNOC7の親和性増強効果に影響せず相加・相乗効果はみられなかった．これに対して，20 μM NEM処置後にNOC7を反応させると逆にKd値は上昇し親和性は低下した．これらの結果より，·NOはmACh-R蛋白のSH基に作用してレセプターの親和性を増強させていることが明らかになった．したがって，生理的条件下では·NOは脳内mACh-R含有神経細胞に共存しているNOSより産生され，mACh-Rを介する神経情報伝達機構を高めるneuromodulatorとして働いている可能性が示唆された．

[文献] 1. Prast, H., Philippu, A. (1992) Eur. J. Pharmacol. 216: 139-140. 2. Zhu, X.Z., Luo, L.-G. (1992) J. Neurochem. 59: 932-935. 3. Moro, V. et al. (1995) Neuroscience 69: 797-805. 4. Wink, D.A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9813-9817. 5. Lipton, S.A. et al. (1993) Nature 364: 626-632. 6. Lei, S.Z. et al. (1992) Neuron 8: 1087-1099.

175 Dopamine agonistのNOラジカル消去能

2E12

西林佐紀子，浅沼幹人，河野雅弘*，近藤洋一，岩田恵美，Marvin Gómez-Vargas，小川紀雄
(岡山大学医学部・分子細胞医学研究施設・神経情報学部門，*日本電子株式会社)

〔要約〕 パーキンソン病治療薬であるdopamine receptor agonistのpergolide mesylate (pergolide)とbromocriptine mesylate (bromocriptine)の一酸化窒素ラジカル(·NO)消去能についてelectron spin resonance spectrometer (ESR)を用いて検討した．NO donorとNO捕捉剤を組み合わせて，*in vitro* において薬剤の·NO消去活性を測定できる系を確立し，その系を用い，pergolideとbromocriptineに·NO消去能があることを明らかにした．既報の動物実験で明らかにされているpergolideまたはbromocriptineの神経保護作用の少なくとも一部にこれら薬剤の·NO消去活性が関与している可能性が示唆される．

［目的］

Dopamine receptor agonistであるpergolideとbromocriptineはパーキンソン病患者の症状を改善するだけでなくlevodopaの長期服用の際に認められる様々な問題を軽減するが，病気の進行を防いでくれる可能性のある薬剤だと推定されている．パーキンソン病の発症・進行にはフリーラジカルが関与していることが数多く報告され，フリーラジカルの中でも強い細胞毒性を持つを持つ·OHはbromocriptineにより濃度依存的に消去できることはすでに報告されている(1)．近年，フリーラジカルの一種，一酸化窒素ラジカル(·NO)とパーキンソン病との関連が報告されたが，パーキンソン病患者の脳脊髄液中のNO_2^-あるいはNO_3^{2-}を測定した結果，パーキンソン病ではNO代謝物が増加したという報告と減少したという報告に分かれた(2, 3)．また，·NOとsuperoxideラジカルとが反応して生ずるperoxynitriteは非常に酸化力が強く細胞毒性があると言われている(4)．

今回われわれはNO donorとNO捕捉剤を組み合わせて，薬剤の·NO消去活性を定量できる*in vitro* の測定系を確立するとともに，その測定系に麦角アルカロイド系dopamine agonistであるpergolideとbromocriptineを添加し，それらのNOラジカル消去能を検討した．

［方法］

2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-Tetramethylimidazoline -1-Oxyl 3-Oxide, Sodium Salt (Carboxy-PTIO)は自分自身が有機ラジカルのため特有のシグナル（1:2:3:2:1の5つのピーク)としてESRで検出することが可能である．Carboxy-PTIOは，·NOと反応し，反応した量だけCarboxy-PTIが生成される．Carboxy-PTIのシグナルはCarboxy-PTIOのシグナルと区別することができるので，ESR上のシグナルの変化から，反応した·NO量を求めることができる．NOラジカルの発生源としてはNOドナーであるNOC7を用いた．NOC7はアルカリ性で安定なためNaOHで溶解するが，これを中性条件下に入れると直ちにNOラジカルを放出し始める．Carboxy-PTIOが·NOと反応して生成されるCarboxy-PTIのintensityを内部標準のMnOマーカーのintensityで割り算した値を用い定量した．

Carboxy-PTIO (5 μM)とNOC7 (5 μM)を試験管内で反応させ，·NOの生成曲線を求めた．この系の中に，pergolide (10 nM-1mM)とbromocriptine (10 nM-1mM)を0.5% methylcellulroseに懸濁させて添加し，一定時間後に室温でESRにより測定した．

［結果および考察］

初めに，われわれの用いた実験系での·NOの生成曲線を調べた．NOC7と薬剤の溶媒である0.5% methylcellurose を30分間室温でpreincubationし，その後，·NO捕捉剤であるCarboxy-PTIOを添加したところ，·NOは10分後から観察され，90分後にはプラトーに達した(Fig. 1)．このpreincubationの反応時，反応液のpHは既に中性であることは確認した．

次にpergolideまたはbromocriptineとNOC7を先に30分間試験管内で反応させ，さらにCarboxy-PTIOを添加し90分後に測定した．·NOはpergolideまたはbromocriptineの濃度依存的に消去されていたが，pergolideの方がbromocriptineよりも強い·NO消去能を示した(Fig. 2, 3)．なお，pergolideはCarboxy-PTIO自身への何の影響も与えなかったが，333 μM以上の高濃度のbromocriptineはCarboxy-PTIO自身のシグナルをそれぞれ75%，65%に減少させていた．以上の成績より，pergolide またはbromocriptineは·NO消去によってperoxynitrate生成を減少させ，実験的に明らかにされているこれらのdopaminergic agonistの神経保護作用の少なくとも一部に薬剤自身が持つ·NO消去活性が関与している可能性が示唆される．

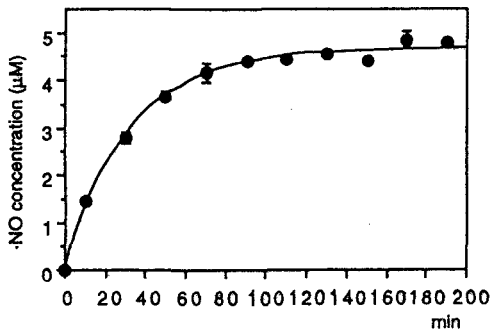


Fig.1 ·NO生成曲線

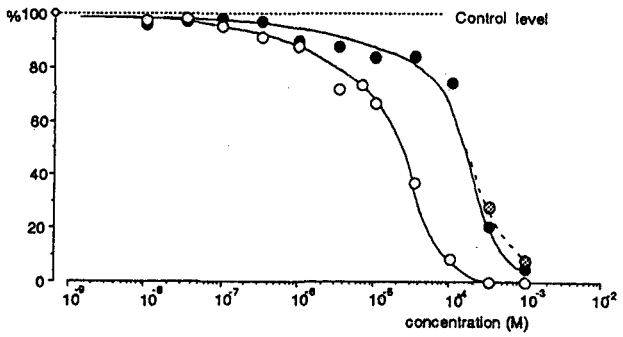


Fig. 3 pergolideとbromocriptineの ·NO消去活性
○=pergolide, ●=bromocriptine
▨=333 μMと1 mMのbromocriptineはcarboxy-PTIO自身と反応したため，反応した量を勘案して補正した·NO消去活性の値を示す．

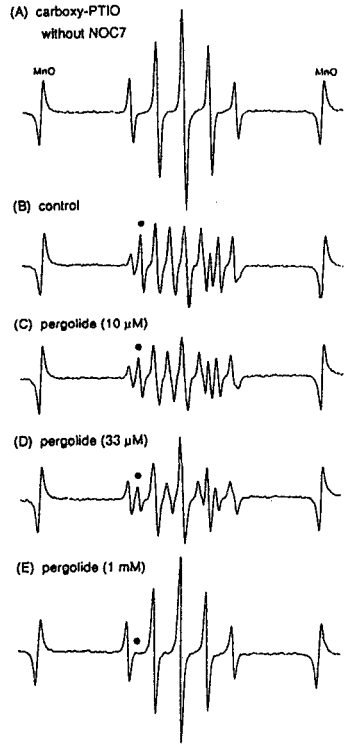


Fig.2 pergolideの·NO消去様式
(A) carboxy-PTIO (5 μM)のみ
(B) control: NOC7 (5 μM)添加
(C) (B)+pergolide (10 μM)
(D) (B)+pergolde (33 μM)
(E) (B)+pergolde (1 mM)
図中の·はモニターしたcarboxy-PTIを示す．

［参考文献］
1. Ogawa, N. et al. (1994) Brain Res. 657, 207-213
2. Qureshi, G.A. et al. (1995) NeuroReport 6, 1642-1644
3. Kuiper, M.A. et al. (1994) J. Neurol. Sci. 121, 46-49
4. Beckman, J.S. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1620-1624

176 2E13 カルバコール刺激依存性抗酸化酵素活性変動に対する一酸化窒素の関与とその細胞局在

山内理充、安藤正人*、藤田公和、柴山健三、芳本信子、永田 豊
(藤田保健衛生大学・医・生理、*愛知学泉大・解剖・生理)

【要約】生体から摘出後も適当な環境下でシナプス伝達機能を保つ白鼠上頚部交感神経節(SCG)を好気的条件でインキュベートしながら、カルバコール(Carb : 0.1 mM)を作用させて刺激した時に、SCG内で発生する活性酸素基(O_2^-)を消去するスーパーオキサイド・ディスムターゼ(SOD)、O_2^-の消去によって発生したH_2O_2を消去するグルタチオン過酸化酵素(GSHPx)、カタラーゼ(CAT)およびミトコンドリア内好気的エネルギー産生系上のチトクローム酸化酵素(CO)の各酵素活性の変動を測定した。
(1) SCG内SOD活性はCarb添加刺激後30分以上経過すると著明(150%)に増加し、そのレベルを持続した。またGSHPxも同様な変動を示したが、CATについては変動がみられなかった。CO活性はCarb添加直後より低下し始め、30分後からは65%の値に達し以後そのレベルに保たれた。
(2) Carb刺激で増加したSCG内SODとGSHPx活性は、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤のNG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)添加により抑制された。また、CO活性値の低下も回復傾向を示した。
(3) Carb刺激によるSCG内SOD、GSHPx活性の増大とCO活性低下は、節前神経切断(Den)1週間後神経末端は変性するが節後ニューロンは保存されるSCGで明らかに認められた。しかし節後神経切断(Axo)1週間後ニューロンが変性・脱落したSCG標本では、Carb刺激によるこれらの酵素活性の変動は全く消失した。
以上の実験結果から、Carb刺激によるSCG内SOD、GSHPxおよびCO活性の変動には、刺激後急速に発生するNOによる情報伝達系が関与しているが、これらの酵素活性の変動は主として節後ニューロン内で進行する反応と理解された。

【序】 SCGはコリン作動性節前線維が交感神経節後ニューロンとシナプス結合している比較的単純な構成をもつ神経組織である。われわれは既にmuscarinic agonistのCarb刺激によって、環状GMPやトランスグルタミナーゼ活性が急激に増大する変動を認め、シナプス伝達時の生化学的背景を探り、報告してきた。今回はCarb刺激後に生ずる抗酸化酵素活性とエネルギー産生系に対する細胞内情報伝達系の関与と、反応の細胞局在を調べた。

【実験材料および方法】
体重200 g前後のWistar系雌ラット腹腔内にウレタン(1.5 g/kg体重)を注射して麻酔後、両側頚部よりSCGを摘出し、生理溶液中で37℃で好気的にインキュベーションした。Carb(0.1 mM)添加後経時的にSCGを取り出して、SOD(McCord J.M. and Fridovich I.の方法)、GSHPx(Lawrence R.A. and Burk R.F.の方法)、CAT(Hugo A.の方法)およびCO(Darley U.の方法)でそれぞれの酵素活性を定量した。また、Denervation(Den, 節前線維切断)およびAxotomy(Axo, 節後線維切断)後1週間経過して摘出したSCGは、それぞれ節前神経末端変性(節後ニューロンは保存)および節後ニューロン変性と反応性グリア成分の増殖を来した状態であった。

【実験結果と考察】
① Carb刺激後SCG内COとSOD活性の変動(図1):生理溶液中にCarb(0.1 mM)を添加してインキュベートすると、SCG内CO活性は急激に低下を始めて30分後には添加前の約65%になり以後その値が保たれた。一方、SCG内SOD活性はCarb刺激後わずかに増加したが30分後には急激に上昇し、以後その高値が持続した。これはCarbによるコリン作動性神経伝達に随伴してSCG内ニューロンでエネルギ

一産生系が敏感に影響をうけて CO 活性が低下し、発生した活性酸素基（O_2^-）を消去して細胞傷害から保護する SOD が少し遅れて活性化されることが推察された。

② Carb 刺激依存性 CO 活性低下におよぼす L-NMMA と神経切断の効果（図 2）：Carb 刺激により 65% にまで低下した SCG 内 CO 活性は、NO 合成酵素の特異的阻害剤の L-NMMA (0.05 mM)添加によってほぼ刺激前の値にまで回復した。Den-SCG では Carb 刺激によって CO 活性低下が認められたが Axo-SCG では Carb 刺激効果は全くみられなかった。したがって、神経伝達刺激に敏感に反応して好気的エネルギー産生系が影響をうけるが、この過程に NO がニューロンの細胞内情報伝達系として密接に関与している可能性が示唆された。

③ Carb 刺激依存性 SOD 活性増加におよぼす L-NMMA と神経切断の効果（図 3）：Carb 刺激によって増大した SCG 内 SOD 活性は、L-NMMA 添加によってほぼ刺激前の値にまで低下したが、NO 合成酵素の基質であるアルギニンを過剰に添加すると再び SOD 活性の上昇がみられた。Den-SCG では、Carb 依存性 SOD 活性化が明らかに認められたが、Axo-SCG では、SOD 活性は全く刺激に反応性を示さなかった。このような実験結果から、シナプス伝達刺激により発生した細胞傷害性の O_2^- を消去して保護作用をもつ SOD の増加は、やはり NO 分子による細胞内情報伝達系を介する経路に由来することが考えられる。

以上の実験結果から、SCG 内コリン作動性シナプス伝達過程で、好気的エネルギー産生系上の複合酵素 (CO)活性が刺激直後より敏感に反応して低下し、その時に急激に発生する細胞傷害性活性酸素基(O_2^-)を処理する SOD 活性がやや時間をおいて活性増加を来たし、細胞機能障害を保護するように作用していることが考えられた。そして、これらの酵素の機能は SCG 内のグリアではなくニューロン細胞体内で活発に活動していると推察される。

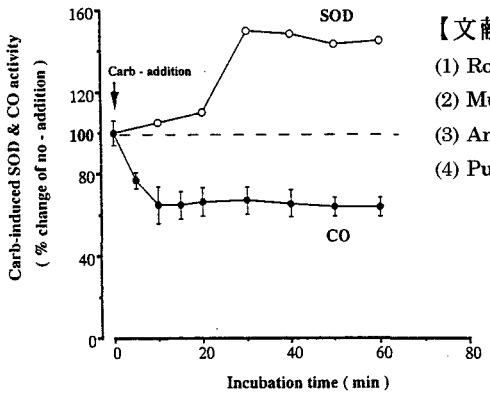


図 1：Carb 刺激後 SCG 内 CO および SOD 活性の経時的変動

【文献】

(1) Rosen, D. R. et al. (1993) Nature 362. 59-62.
(2) Mutisya, E. M. et al. (1994) J. Neurochem. 63. 2179-2184.
(3) Ando, M. et al. (1995) Neurosci. Res. 21. 267-272.
(4) Pulsinelli, W. (1995) Sci. Am. Sci. Med. 2. 16-25.

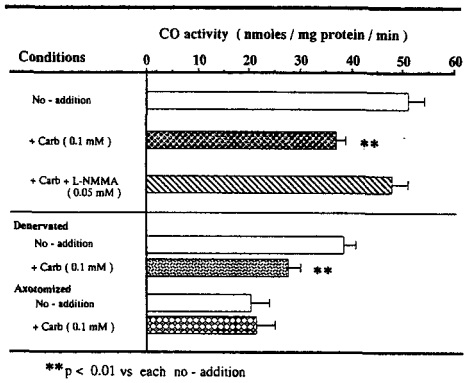


図 2：Carb 刺激に対する SCG 内 CO 活性の変動

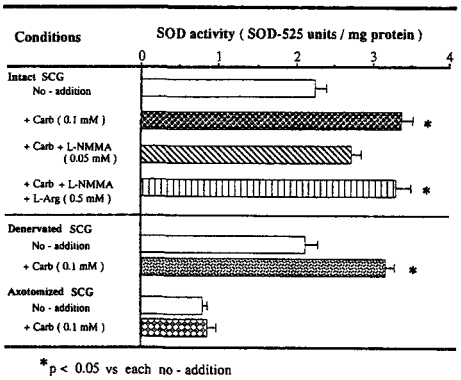


図 3：Carb 刺激に対する SCG 内 SOD 活性の変動

177 新規な成長円錐蛋白質の解析

2E53

阿部貴子[1]、田中洋史[1]、山国徹[2]、桑野良三[1]
（新潟大学遺伝子実験施設[1]、三菱化学生命科学研究所脳神経科学部[2]）

〔 要約 〕

マウス新生仔脳から得た成長円錐膜分画中に、未知の蛋白質を見い出した。この蛋白質の部分アミノ酸配列をもとにペプチド抗体を作製し培養神経細胞を免疫染色したところ、成長円錐及び神経突起に陽性であった。この蛋白質は成体脳膜分画では検出されず、PC12細胞をNGF処理すると発現量が増加した。これらのことから、この蛋白質は発生期における神経突起伸長に関与している可能性が示唆された。

神経成長円錐を構成する蛋白質を分離、解析することは、神経回路形成の分子機構と回路の維持の生理機能を明らかにする上で重要であると思われる。我々は成長円錐膜分画に含まれる蛋白質をレクチンアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動を組み合わせて分離し、既に115種類の部分アミノ酸配列を解析した。データベースで検索したところ、成長円錐に存在することが既に報告されている複数の蛋白質を同定することができ、更に未知の蛋白質を見い出したので抗体を作製し解析した。

[実験方法]

蛋白質の分離・同定：マウス新生仔脳ホモジェネートをショ糖密度勾配遠心法(1)により分離し、成長円錐標品（A分画）を得た（図1a）。標品の純度は電子顕微鏡での観察により検定した。A分画特異的な蛋白質を抽出する対照としてC分画（図1a）を選び、両分画から膜分画を調製した。これらをそれぞれ可溶化した後レクチンカラムにかけ、反応成分は溶出後2D-PAGEで分離した。素通り成分はDEAE-5PWカラムにかけHPLCにより溶出し、各フラクションを更にSDS-PAGEで分離した。2D-PAGE及びSDS-PAGEの結果をA、C分画間で比較し、A分画特異的または優先的に認められた蛋白質について既報(2)に従い部分アミノ酸配列を解析した。得られた配列はデータベースで検索した。

抗体：得られた部分アミノ酸配列をもとにペプチドを合成し、KLHと結合させ家兎に免疫した。抗血清はCNBr活性化セファロースに抗原を固定化したカラムでアフィニティー精製した。

細胞：神経幹細胞は既報(3)に従い胎生10.5日マウス頭部より調製した。ラミニンコートしたカバーグラス上で培養し、2日毎に免疫染色を行った。PC12細胞はコラーゲンコートしたシャーレ上で培養し、NGF処理(20～50 ng/ml)及び非処理後5日の細胞をイムノブロットに用いた。

[結果と考察]

電子顕微鏡による観察から、A分画に成長円錐成分(growth cone particle)が濃縮されていることが確認され、C分画ではgrowth cone particleは観察されなかった(図1b)。

A分画特異的または優先的に含まれていた蛋白質の部分アミノ酸配列を解析しデータベースで検索したところ、成長円錐に存在することが既に報告されているGAP-43、gp93、NAP-22、L1、MARCKS、M6を同定することができた。

A分画中に見い出した未知の蛋白質に対する抗体（抗23-45k-10抗体）を用いてイムノブロットを行ったところ、この蛋白質はA分画優先的に存在していることが確認された（図2）。また、成体脳膜分画ではバンドが認められなかった（図2）。

培養神経幹細胞を抗23-45k-10抗体で免疫染色したところ、成長円錐及び神経突起に陽性で

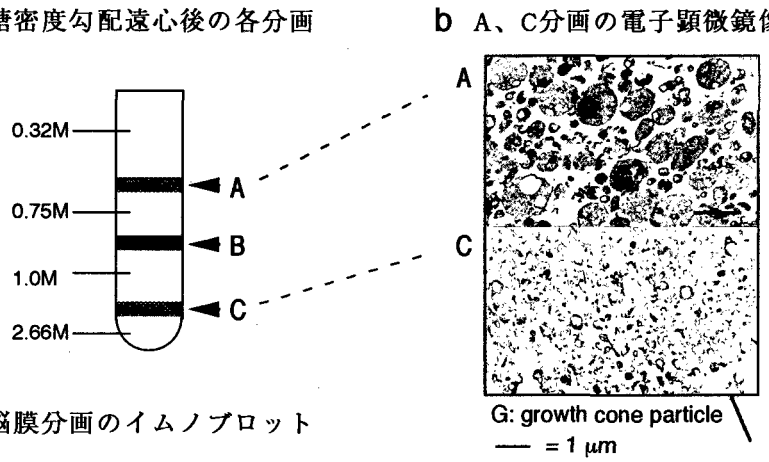
あった。染色は培養後6日前後で最も強く、その後徐々に弱くなった。幹細胞を抗GFAP抗体で染色したところ培養8日頃から陽性細胞が出現し、*in vivo*と同様な経時的分化を遂げることが確認された。

PC12細胞をNGF処理し突起伸長を誘導すると抗23-45k-10抗体で認識される蛋白質の発現が増加した（図3）。また、NGF処理によるPGP9.5の増加、シナプトフィシンの減少が認められ（図3）、これらは既報(4, 5)と一致するものであった。

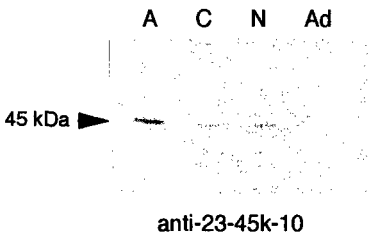
以上のことから、成長円錐膜分画中に存在し抗23-45k-10抗体と反応する蛋白質は、発生期における神経突起伸長に関与している可能性が示唆された。

[謝辞]
電子顕微鏡による観察を行っていただき、また抗PGP9.5抗体を供与いただいた岩永敏彦博士（北大・獣医・解剖）に深く感謝します。

【図1】

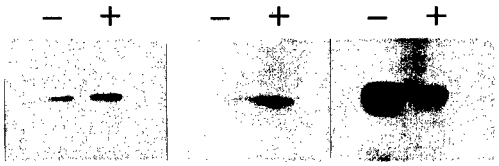


【図2】 脳膜分画のイムノブロット



A: A膜分画, C: C膜分画
N: 新生仔脳膜分画, Ad: 成体脳膜分画

【図3】 PC12細胞のイムノブロット



− : NGF非処理 +: NGF処理

[文献]
1) K. H. Pfenninger, L. Ellis, M. P. Johnson, L. B. Friedman and S. Somlo, Cell, 35 (1983) 573.
2) T. K. Abe, S. Odani and R. Kuwano, Chromatography, 16 (1995) 39.
3) 友岡康弘, 実験医学12 (1994) 72.
4) N. H. Lee, K. G. Weinstock, E. F. Kirkness, J. A. Earle-Hughes, R. A. Fuldner, S. Marmaros, A. Glodek, J. D. Gocayne, M. D. Adams, A. R. Kerlavage, C. M. Fraser and J. C. Venter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 (1995) 8303.
5) J. H. Tao-Cheng, A. Dosemeci, J. P. Bressler, M. W. Brightman and D. L. Simpson, J. Neurosci. Res.,42 (1995) 323.

178 ラット脳由来非イオン性界面活性剤不溶性低比重画分中の 2E54 タンパクの解析

熊ノ郷晴子、前川昌平
(京都工芸繊維大学・繊維学部・応用生物学科)

〔 要約 〕

NAP-22は神経成長円錐膜画分から発見されたタンパク質(1)でCa^{2+}依存性カルモジュリン結合能をもつ。今回、NAP-22の細胞内機能を知るために生化学的分画を行い、非イオン性界面活性剤不溶性低比重画分にNAP-22が多く含まれることを見い出した。また、この画分の主要タンパク質として三量体Gタンパク質Goのα、βサブユニットを同定した。この画分をフォスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC (PI-PLC)で処理し、分子量が120k、50-60k、22kのグリコフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカータンパク質が遊離することを見た。これらのうち、分子量120k、22kのものはそれぞれ抗N-CAM、抗Thy-1抗体と反応したが、分子量50-60kのものは未知のタンパクであると考えられる。

【序論】

NAP-22は神経細胞に多く存在する分子量22kのミリスチル化酸性タンパク質であり(1)(2)、その物理化学的性質、Ca^{2+}依存性カルモジュリン結合活性、C-キナーゼによるリン酸化(3)など、細胞内情報伝達因子と考えられているGAP-43(neuromodulin)やMARCKS(myristoylated alanine-rich C kinase substrate)と類似した性質をもつが、その機能については不明である。そこで今回、NAP-22の機能を知るために、このタンパクを含む画分を調製し、その画分中に含まれるタンパクの同定、NAP-22との関係について検討した。

【方法】

1 非イオン性界面活性剤不溶性低比重画分(TIF)の調製(図1)：ラット(std:wister/ST, 2週齢)から脳を摘出し、最終濃度が0.8M sucrose、1% Triton X-100になるように2.4M sucrose/TME(10mM Tris-HCl (pH7.8)、1mM $MgCl_2$、1mM EGTA、1mM PMSF)、20% Triton X-100を加え、懸濁した。TMEを少量重層した後、6時間遠心し、軽い画分(A1)を回収した。A1を1% Triton X-100/TMEに希釈し、1時間遠心し、沈殿を回収した。これを0.8M NaCl/TMEで懸濁し、氷上に20分間置いた。その後1時間遠心し、沈殿を回収した。1M sucrose/TMEを加え懸濁し、これの上に0.3-0.8M sucrose/TMEを置き、12時間遠心した。sucrose濃度に従って分画し、タンパク量の多い低比重画分をとり、TMEで希釈し1時間遠心し沈殿を回収した。この沈殿をTMEに希釈した。これを非イオン性界面活性剤不溶性低比重画分(TIF)とした。

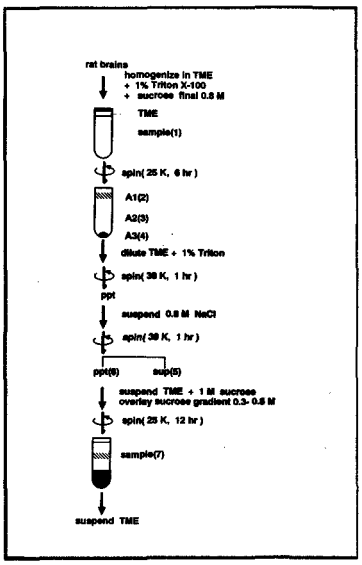


図1 TIFの調製

2　部分アミノ酸配列の決定：TIFを電気泳動後、目的タンパクをゲル片より溶出し、キモトリプシン消化を行った。断片化したペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) LC6A system (shimadzu) によって分離し、ABI Model 476A Protein Sequencer を用いて部分アミノ酸配列を同定した。

3　免疫組織化学的解析：ラット(3週齢)小脳をホルマリン 固定し、作製した抗体を１次抗体として用い、peroxidase 標識２次抗体と diaminobenzidine で免疫染色を行った。

【結果】

TIFの調製において、主に分子量120k, 42k, 38k, 33kのタンパクがNAP-22と挙動を共にした。そのうち分子量 38k, 33kのタンパクは部分アミノ酸配列より各々三量体Gタンパク質 Go のα、βサブユニットであると同定した(図2)。更に western blotting により GAP-43、チロシンキナーゼの src ,fyn、他のＧタンパク質なども含まれていることがわかった。また、TIF を PI-PLC で処理すると分子量が 120k、50-60k、22k の GPIアンカータンパク質が可溶化することがわかった。これらのうち、分子量 120k、22k のものを抗体との反応性よりそれぞれ N-CAM、Thy-1 と同定した。TIF を抗原にしモノクローン抗体作製を行い、分子量 50kの GPIアンカータンパク質に対する抗体を得た。この抗体を用いて免疫組織化学的解析を行うと小脳においては分子層の線維が強く染色された。

【考察】

他の細胞系での解析により非イオン性界面活性剤不溶性低比重画分にはコレステロール、スフィンゴ脂質の集積が見られることが知られている(4)。このことから脳において上述のタンパク群はコレステロールやスフィンゴ脂質とともに特殊な膜領域を形成し、情報伝達に関与している可能性がある。この画分を抗原にし未知のタンパク質の一つだと考えられる 50k の GPIアンカータンパク質に対する抗体を得た。現在、この画分に含まれるタンパク質間の関係、未知のタンパクの同定および解析を行っている。

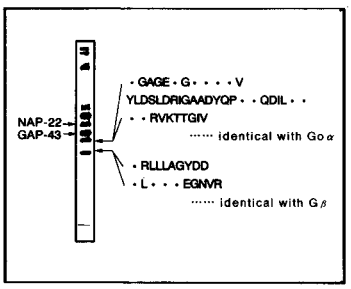


図2 TIF の主要タンパク質 38k,33kの部分アミノ酸配列

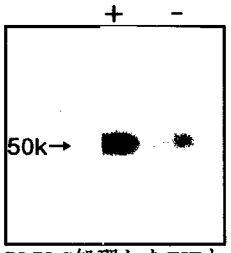


図3 PI-PLC処理したTIFと作製した抗体との反応
TIFをPI-PLCで処理し、遠心後の上清を抗体と反応させた。
＋：PI-PLC処理
－：PI-PLC無処理

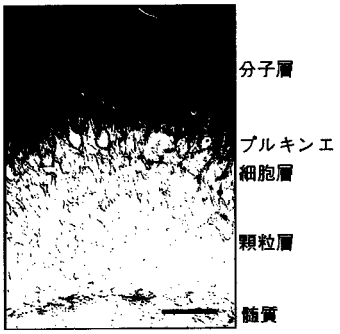


図4 小脳での 50kGPIアンカータンパクの分布
バーは 0.5mm

【文献】

1.Maekawa ,S., Maekawa, M., Hattori, S., and Nakamura, S. (1993) J. Biol. Chem. 268 13703-13709

2.Maekawa, S.,Matuura, Y.,and Nakamura, S. (1994) Biochem. Biophys. Acta 1218 119-122

3.Maekawa, S.,Murofushi, H.,and Nakamura, S. (1994) J. Biol. Chem. 269 19462-19465

4.Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992) Cell 68 533-544

179 2E55 ヒト神経芽細胞腫IMR32細胞の神経突起伸長に伴う膜タンパク質の変動とリン酸化

石岡憲昭[1]、久原映子[1]、小暮太郎[1,2]
（慈恵医大DNA医研・分子細胞生物[1]、脳神経外科[2]）

〔要約〕

本来、動物細胞の増殖を促進する因子として市販されているダイゴGF21（Wako, Japan）を用いてヒト神経芽細胞腫由来の細胞IMR32を培養したところ、増殖率は通常培養に比べ低く、クラスターを形成した。さらにクラスターごとに無数の神経突起を特徴的に伸長した。この現象を神経系細胞の分化誘導の一つのモデルと考え、細胞膜タンパク質の変動とリン酸化について二次元電気泳動法及びウエスタンブロッティング法により分析した。タンパク質の変動は、等電点(pI)8.5-11、分子量(MW)25K-90Kの領域、pI6.5-9.5、MW10K-20Kの領域に集中していた。特に、形態変化を起こしたIMR32では、pI8.5-11、MW29K-45Kの範囲に存在するタンパク質群の減少、消失が著しく、一方、pI6.5-9.5、MW10K-20Kの低分子領域に少なくとも15個のタンパク質スポットが新たに出現していた。リン酸化を示すタンパク質スポットは、pI9.0-11、MW25K-70Kの強塩基性領域に集中し、11個の特徴的タンパク質を同定した。この内7個のタンパク質スポットが抗リン酸化チロシン抗体に対して反応していた。

【はじめに】中枢神経系のタンパク質をCon AやWGAなどのレクチンに対する結合性と神経系培養細胞の形態変化を指標に分離分析してきた[1,2,3,4,5]。その過程で、ヒト神経芽細胞腫由来の細胞IMR32が動物細胞増殖促進因子（ダイゴGF21）により特徴的に神経突起を伸長することを見出した。我々は、この現象を神経回路網形成における神経系細胞の分化誘導の一つのモデルと考え、細胞膜タンパク質の変動とリン酸化について二次元電気泳動法及びウエスタンブロッティング法により分離分析した。

【実験方法】*（1）神経芽細胞腫IMR32細胞の培養条件と細胞膜タンパク質の抽出*：ヒト神経芽細胞腫由来のIMR32細胞は、通常培地（RPMI1640培地、10%FBS）とFBSにかえて10%GF21を添加した培地でそれぞれ培養し、約1週間後に形態変化を観察した。GF21（Wako, Japan）は、成牛血清から硫安分画によりIgGなどの高分子量タンパク質を除いた成分にインスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウムを加え、細胞増殖因子として市販されているものである。それぞれの細胞数を計測後、低張処理、遠心分離にて得られた分画を膜画分とした。膜画分は、1%CHAPS、8M尿素を含む50mMトリス塩酸緩衝液で可溶化し、膜タンパク質を得た。*（2）二次元電気泳動とウエスタンブロッティング*：二次元電気泳動(2DE)法は、既報(3,4,5)の方法に従い、銀染色法により検出した。リン酸化タンパク質は、抗リン酸化タンパク質（ZYMED Lab., USA.）、抗リン酸化チロシン抗体（Transduction Lab., USA.）等を用いたウエスタンブロッティング法[5]により同定した。

【結果と考察】（1）GF21よる培養と増殖率：IMR32細胞にGF21を用いた場合、通常のFBSを用いた培養の場合と著しい相異を示した。図1にFBSを用いた通常培養とGF21を用いた場合の約一週間後の変化を示した。GF21を用いた培養では、クラスターを形成し、クラスター間での著しい突起伸長など明らかな形態変化がみられた。一方、通常培養では一週間で約10倍に増殖するが、GF21では約3倍程度であった。このことは、本来増殖因子として作用するGF21が、IMR32細胞に対しては増殖作用よりもむしろ突起伸長因子として作用するものと思われた。（2）膜タンパク質の2DE分析：pI8.5-11、MW25K-90Kの領域、pI6.5-9.5、MW10K-20Kの領域で著しい変化が見られた（図2中の囲み）。形態変化を起こしたIMR32（図2B）では、図2A中の番号1、5、6の減少、2の増加及び3、4、8の消失が観察された。一方、pI6.5-9.5、MW10K-20Kの低分子領域

に少なくとも15個のタンパク質スポットが新たに出現していた。単に高分子量タンパク質の分解が低分子量タンパク質の出現になったとも考えられるが、中性付近から酸性領域では、ほとんどタンパク質スポットの差異が見られなかったことから、この変化は形態変化に対して特徴的、特異的変化であると考えられた。（3）リン酸化タンパク質の分析：細胞応答の反映としての形態変化を考え、リン酸化タンパク質の分析を行った。膜タンパク質の分析結果と同様に、リン酸化を示すタンパク質は、pI9.0-11、MW25K-70Kの強塩基性領域に集中し（図3）、GF21培養のIMR32細胞では11個の特徴的タンパク質を同定した（図3B,D)。この内番号1、2、5、6は、pI及びMW値から図2A中の番号と共通のタンパク質と推定した。抗リン酸化チロシン抗体に対して反応するタンパク質として番号2以外に7個のスポットを検出したが（図3D中a-g）、通常培養の膜タンパク質では番号2及びb、f、g以外ほとんど検出されなかった（図3C)ことから、チロシンのリン酸化は、形態変化に特徴的反応であると考えられた。

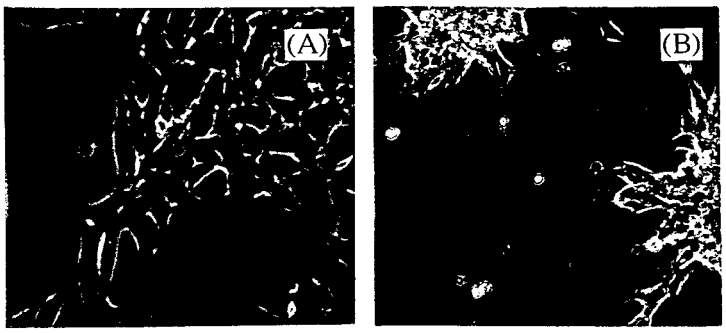


図1. 通常培養(A)GF21培養(B)の細胞形態

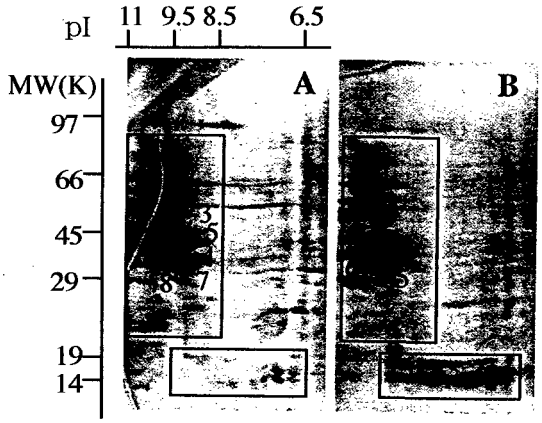


図2. 膜タンパク質の2DE分析(A)通常培養(B)GF21培養

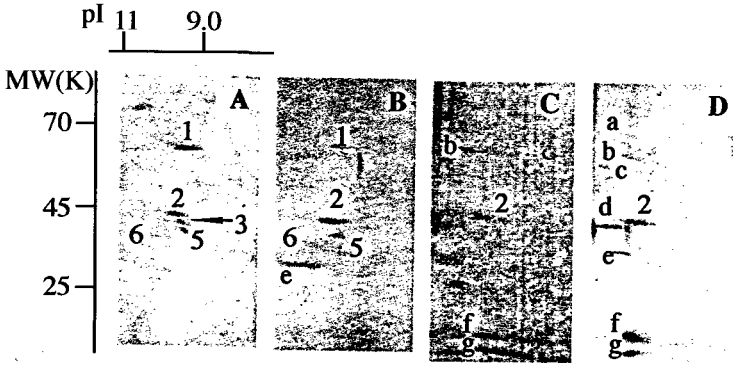


図3. リン酸化タンパク質(A,B)とリン酸化チロシンの分析(C,D)
A,C: 通常培養
B,D: GF21培養

【文献】
1. Ishioka N., *et. al.* Neurochem. Res. 1990; 15:475-481.
2. Ishioka N., *et. al.* Neurochem. Res. 1992; 17:1011-1014.
3. 石岡憲昭、他. 神経化学 1994; 33: 458-459.
4. 石岡憲昭、他. 神経化学 1995; 34: 276-277.
5. Ishioka N., *et. al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994; 199: 1174-1180.

180 1Bp4 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII過剰発現細胞の神経突起形成におけるH-7の効果

吉村 好之、野村 知彦、山内 卓
(徳島大学・薬学部・生化学)

〔要約〕

Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII(キナーゼII)の機能を明らかにするために、培養神経芽細胞(Nb2a)にキナーゼIIαおよびβアイソフォームcDNAを導入し、酵素を安定に発現する細胞を得た。キナーゼII発現細胞では突起伸長と運動性が高まり、特にβクローンはαクローンに比べて大きな形態変化を起こした。この傾向はPKC阻害剤であるH-7処理によってさらに拡大した。二次元電気泳動により、神経突起伸長にともない、キナーゼIIのいくつかの基質タンパク質のリン酸化量が増加することが明らかとなった。

Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII(キナーゼII)は脳神経系に多量に存在し、シナプス伝達や可塑性などに重要な役割を果たすと考えられている[1)]。私達は発現系を用いてキナーゼIIが神経突起の伸展や運動性に関与することを明らかにした[2)]。本研究では、キナーゼIIβアイソフォームの発現細胞も調製し、αおよびβアイソフォームの作用を比較するとともに、PKC阻害剤であるH-7処理によりキナーゼIIの突起伸長作用が増強されることが明らかとなった。

[実験方法]

キナーゼIIαおよびβcDNAをpEF-321発現ベクターに挿入し、pEF-neoとともに培養神経芽細胞(Nb2a)に導入し酵素を過剰発現する細胞を得た。突起伸展率は、細胞体径を越える長さの突起を有する細胞数の割合で示した。H-7は継代時に培地に加えた。細胞に[^{32}P]リン酸を加え2時間培養した後継代を行い、一定時間ごとにリン酸化タンパク質を2次元電気泳動により分離し、イメージングアナライザーにより解析した。

[実験結果と考察]

cDNA導入によりキナーゼIIαおよびβアイソフォームを過剰に発現する細胞を得た。酵素活性はコントロールに比べて2倍から5倍高く、αは主に細胞質画分に、βは主に顆粒画分に存在した。cDNA導入細胞で発現したキナーゼIIの酵素学的性質は、ラット大脳から精製した酵素とほぼ同じであった。

キナーゼIIの過剰発現細胞ではαとβいずれの細胞でも突起伸長と運動性が高まり、キナーゼIIが神経突起伸長と運動性に関与することが確認された。また、βクローンはαクローンに比べて大きな形態変化を起こすことから、αとβの発現細胞では突起形成

能に違いがあることが明らかとなり、形態変化を引き起こすためにはキナーゼIIの細胞内分布も重要であると考えられる。

キナーゼIIの過剰発現細胞の形態は、PKC阻害剤であるH-7処理によってさらに大きく変化した。図1に示すように、25 μM H-7を処置した細胞では、継代後2時間以内の早い時期に、キナーゼIIの突起伸長作用が増強され、細胞は急速に突起を伸ばした。βクローンはαクローンに比べ長い突起を伸ばした。H-7の濃度が50 μM、75 μMと高くなるにしたがって、コントロール細胞でも突起をもつ割合が高くなり、キナーゼIIの過剰発現細胞との差が小さくなった。また、H-7の作用時間が長くなるとコントロールとの差が小さくなった。25 μM H-7処置により、βクローンでは継代後2時間に48%の細胞が突起をもち、その後、その割合はあまり変化しないことから、キナーゼIIが突起伸長の初期変化に関与するものと考えられる。このことは、キナーゼII活性とPKC活性が神経細胞の分化と増殖の方向の決定に関与することを示唆している。

H-7による神経突起伸長の促進にともないキナーゼIIによりリン酸化されるタンパク質を2次元電気泳動によって解析した。その結果、βクローンにおいてはコントロールにくらべ15種類以上のキナーゼII基質のリン酸化レベルが高くなることが明らかとなった。リン酸化レベルは1時間まで増加しその後徐々に減少した。これらの結果はキナーゼIIのいくつかの基質が細胞の形態変化に重要な役割をはたすことを示唆している。神経突起伸長にともないリン酸化される基質タンパク質を同定し、リン酸化による調節を明らかにすることが、キナーゼIIの機能を理解するために役立つと考えられる。

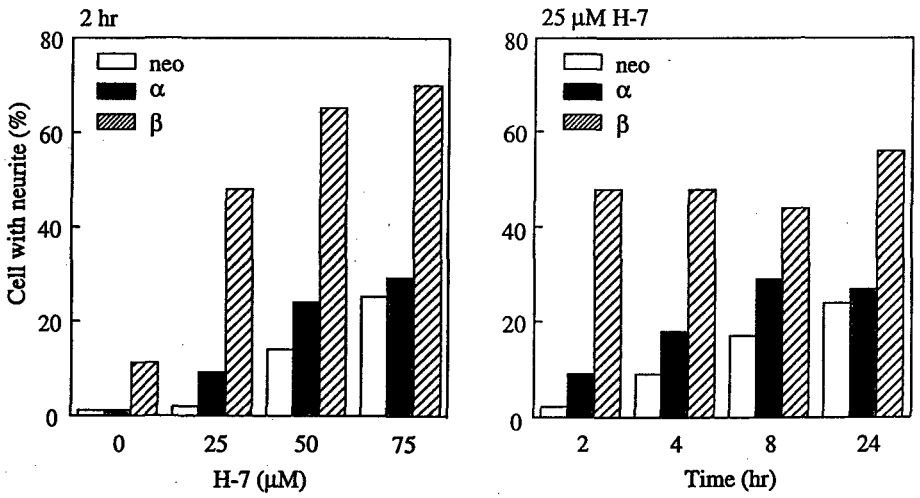


図1。キナーゼIIの過剰発現細胞の神経突起伸長に対するH-7の効果

[文献]

1. Hanson, P. I., Shulman, H. (1992) Ann. Rev. Biochem. 61, 559-601

2. Goshima, Y., Ohsako, S., Yamauchi, T. (1993) J. Neurosci. 13, 559-567

181 2E56 Eph受容体型チロシンキナーゼCek8とリガンドELF-1, RAGSによる運動ニューロン神経突起成長阻害

太田訓正、岩政浩子、田中英明
（熊本大学・医学研究科・神経分化学）

〔要約〕
パンニング法により精製した運動ニューロンからRT-PCRによりチロシンキナーゼcDNAをクローニングし、in situ hybridizationスクリーニングにより受容体型チロシンキナーゼCek (chick embryonic kinase) 8が四肢筋を支配する運動ニューロンに特異的に発現されていることを既に報告した(1)。そのリガンドであるELF-1、RAGS、受容体Cek 4, 7の脊髄、肢における発現解析とリガンドがCek8をリン酸化し、Cek8 (+) 運動ニューロンの神経突起成長を阻害することを報告する。

［目的］
近年、発生現象の多くがリガンドとその受容体を介したシグナル伝達の言葉で語られるようになってきている。我々はこれまで未知の運動ニューロンの分化過程に関与する因子を探索するため、運動ニューロンに特異的に発現する受容体型チロシンキナーゼをクローニングした(2)。その中でEphサブクラスに属するCek 8が四肢筋を支配する運動ニューロンのサブタイプに発現することを見出した(1)。Eph受容体のリガンドであるRAGS (repulsive axonal guidance signal)、ELF-1は培養網膜神経節細胞の神経突起成長を阻害し、網膜ー視蓋投射の選択性を決めているchemoaffinityを担うと考えられる有力な候補分子である(3)。我々はRAGS、ELF-1と受容体Cek 4,7の発現分布(4)とリガンドのCek 8 (+) 運動ニューロンに対する作用を解析した(5)。

［方法］
a) RAGS、ELF-1、Cek 4、7のcDNAからDig標識RNAプローブを作製し、日齢（E）4ー7ニワトリ胚腕部(B)、胸部(T)、腰部(L)の凍結切片(10 μm)でin situ hybridizationを行った(1)。

b) ヒト腎由来293細胞を使用してCek 8を発現する細胞株293-Cek 8を作製し、RAGS、ELF-1をCOS細胞に一過性に発現させた。RAGS、ELF-1とヒト抗体Fc領域のキメラ蛋白をCOS細胞により産生し、培養液上清からプロテインGカラムにより精製した。1）293-Cek 8をCOS-RAGS, -ELF-1、またはRAGS-Fc, ELF-1-Fc ± 抗Fc抗体と反応させ、抗Cek 8抗体による免疫沈降後、SDS-PAGE、抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットによりCek 8のリン酸化を調べた。2）ポリLリジン、ラミニンを塗布した96穴プレートにRAGS-Fc, ELF-1-Fc ± 抗Fc抗体をスポット状に吸着させ、運動ニューロンの神経突起成長作用に対する影響を調べた。運動ニューロンは抗SC1抗体によるパンニング法により精製し(6)、DMEM/Ham F12に10%HSと5% chick embryo extractを添加した培養液中で培養した。

［結果］

a) リガンド RAGS、ELF-1 は肢に発現し、さらに運動ニューロンにも発現されていた。受容体 Cek 4 は体幹筋を支配する運動ニューロンと一部の四肢筋を支配する運動ニューロンに発現され、Cek 7 は運動ニューロンには発現されていなかった。

b) Cek 8 の自己リン酸化は COS-ELF-1, COS-RAGS, ELF-1-Fc + 抗 Fc 抗体, RAGS-Fc + 抗 Fc 抗体によって誘導され、コントロールの COS 細胞や ELF-1-Fc, RAGS-Fc、抗 Fc 抗体によっては誘導されなかった。したがって、Cek 8 を活性化するためにはリガンドは細胞膜上に存在するか、抗 Fc 抗体により凝集した状態が必要であることが明らかになった。

c) ポリLリジンとラミニンを塗布した基質の上では 5E ニワトリ胚運動ニューロンは長い神経突起を伸ばすが、Cek 8 の自己リン酸化が生じる条件下ではその突起成長が著しく抑制された。Eph ファミリーのリガンドと受容体はクロストークが盛んであるが、この時期には Cek 4 の発現が見られないため、Cek 8 を介した反応と考える。

［考察］

RAGS、ELF-1 は網膜神経節細胞の神経突起成長を阻害し、視蓋において前後軸に沿った濃度勾配を持つことから、視蓋の部位に対応する位置情報を提供していると考えられている。運動ニューロンも同様に神経突起成長が阻害されることから、運動ニューロンの選択的な軸索成長に寄与している可能性が考えられるが、肢内での分布はあまり明確ではない。一方、リガンド、受容体の両方が運動ニューロンに発現されることは、脊髄内での樹上突起が自分自身の上に成長するのを阻害し、脊髄内に広がることを促進している可能性もあると考える。

図1．精製した運動ニューロンからの神経突起。コントロール(A), 阻害された例(B).

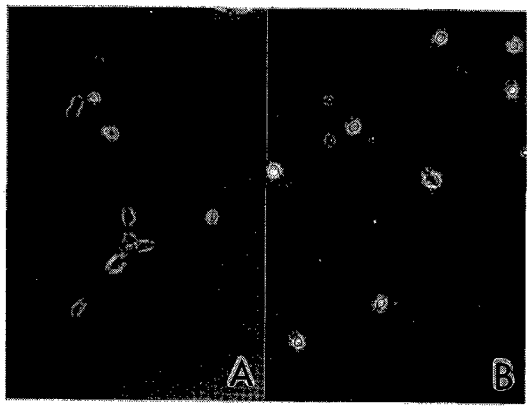
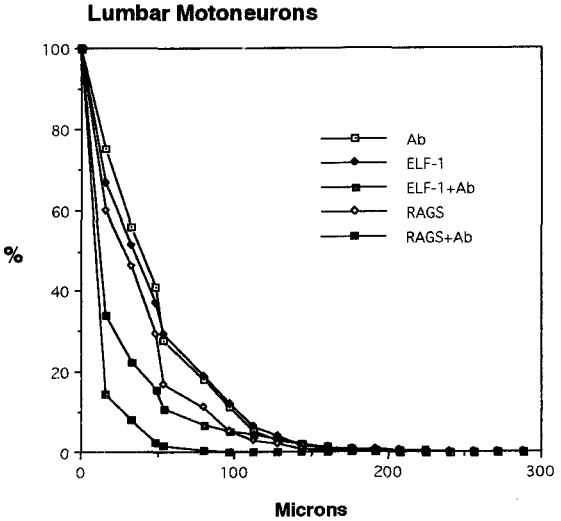


図2．神経突起の長さのまとめ



［文献］

1. Ohta, K. et al. (1996) Mech. Dev. 54, 59-69. **2.** Nakamura, M. et al.(1996) Mol. Brain Res. 39, 1-11. **3.** Drescher, U. et al. (1995) Cell 82, 359-370. **4.** Iwamasa, H. et al. (1996) submitted. **5.** Ohta, K. et al. (1996) submitted. **6.** Bloch-Gallego, E. et al. (1991) Development 111, 221-232.

182 ニワトリ視蓋反発因子の細胞内情報伝達機構の解析

2E57

中山 孝、五嶋 良郎*、加藤 尚彦、三須 良實*

横浜市立大学医学部第一生化学講座、*薬理学講座

〔要約〕
視神経軸索の成長円錐の伸展・停止・退縮に関わる細胞内情報伝達系につき検討した。鼻側網膜節細胞の標的領域である鶏胚尾側視蓋膜標品及びMastoparanは耳側網膜視神経成長円錐を濃度依存性に退縮させた。同作用はいずれも百日咳毒素処置により阻害された。尾側視蓋膜標品はINDO-1標識視神経成長円錐の Ca^{2+} 濃度に対し影響を与えなかった。Staurosporin, Wortomannin, Okadaic acidは各々単独で成長円錐の退縮を生じた。一方Nifedipine, Ryanodine単独では作用を示さなかった。

神経系の回路網形成は軸索先端の成長円錐が正確に周囲の手がかりとなる分子を認識し、標的器官に達することにより行われる。成長円錐の伸展を促進する因子として拡散性の神経栄養因子また非拡散性の細胞接着因子が同定されてきた。近年それに加え成長円錐の伸展を停止・退縮させる反発因子の役割が注目されつつある。Semaphorin familyに属する反発因子Collapsin (1)、及びMyelin蛋白NI-35 (2)はいずれも成長円錐の退縮応答を惹き起こし、同反応は百日咳毒素PTXにより阻害される(3, 4)。一方鶏胚尾側視蓋膜標品より同定された反発因子RAGSタンパク質はEph subtypeに属する受容体型Tyrosine kinaseのLigand familyと相同性を示す(5)。しかし種々の反発因子のシグナル伝達機構は、それらの受容体の同定を含め依然未知である。本研究においては成長円錐の退縮シグナルにどのような情報伝達系が関与し得るかを、初代培養鶏胚網膜を用いた阻害実験などを行ない検討した。

［実験方法］
孵卵6～7日目の鶏胚より網膜を取りだし初代培養を行なった。Laminを基質とし、DMEM:F12/N_2 suppl.を用い培養した。視蓋膜分画調製はBonhoefferらの方法に準じた(5)。培養1日目の網膜片に膜分画および阻害剤を加え1時間培養した後固定し結果を判定した。Collapse assay は既法に従った(4)。Ca^{2+} の測定は1 μ MのINDO 1-AMを培養液中に加えて成長円錐内に取り込ませ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて解析した。

［結果・考察］
1．尾側視蓋膜分画による視神経成長円錐の退縮。
尾側視蓋膜分画は濃度依存性に選択的に耳側視神経成長円錐の退縮反応を惹き起こした(図1)。同応答はPTX (200 ng/ml, 2 hr)前処置により阻害された(図2)。PTX感受性の退縮はMastoparan (3 μM)によっても惹き起こされた。これらの知見は鶏胚尾側視蓋膜標品に含まれる因子は三量体G蛋白質を介して成長円錐の退縮を惹き起こすことを示す。

2．Staurosporin (0.3 - 30 nM)と Wortomannin (0.3 - 300 nM) は単独で成長円錐を退縮させた。一方 Okadaic acid (0.1 - 100 nM) によっても顕著な成長円錐の退縮が認められた。これらの結果はある特定のタンパク質のリン酸化および脱リン酸化反応が成長円錐の伸展・停止に関与している可能性を示す。

3．F-actin の脱重合剤、 Cytochalasin (1 μM) は成長円錐の Filopodia の動きを完全に停止させた。微小管の重合阻害剤, Nocodazole (1 μM) は作用を示さず、一方脱重合の阻害剤、Taxol (0.5 μM) は成長円錐を退縮させた。この結果は微小管の安定化が 成長円錐の動きの基礎をなす Actin の重合・脱重合サイクルに影響を及ぼすことを示唆する。

4．L型 Ca^{2+} Channel Blocker の Nifedipine (0.1 - 10 μM) あるいは Opener の Bay K (0.1 - 10 μM) は成長円錐に対し作用がなく、また細胞内からの Ca^{2+} 動員阻害剤、 Ryanodine (0.5 - 50 μM) も作用を示さなかった。

5．一方視蓋膜分画あるいは Okadaic acid (1 nM) による成長円錐の退縮応答は Ca^{2+} の上昇を伴わない事が INDO 1 を用いた Ca^{2+} の蛍光測定から明らかとなった。同知見は 視蓋膜分画退縮因子がCa^{2+} を介さない機構により成長円錐の退縮、および軸索の伸展・停止を制御することを示唆する。

図 1

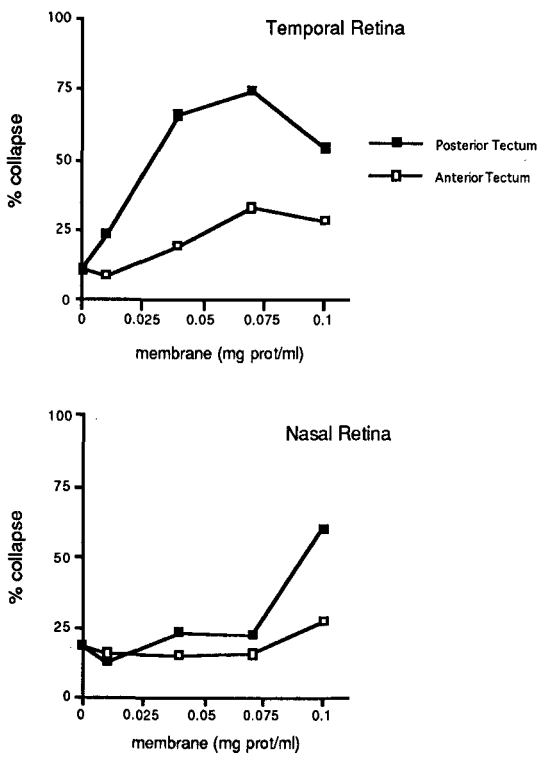
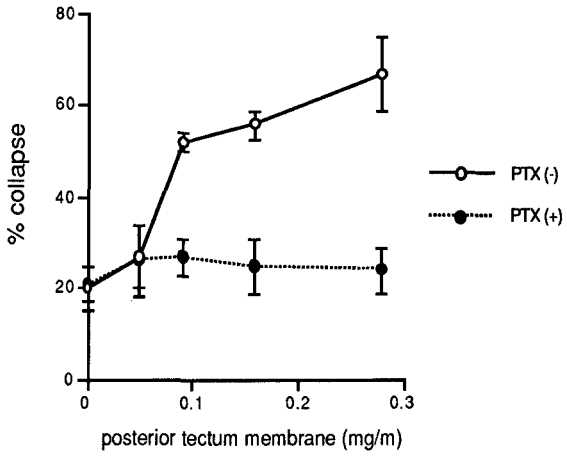


図 2



[文献]

1) Luo Y. et al., Cell 75, 217-227 (1993)
2) Caroni P. and Schwab M.E. J Cell Biol 106, 1281-1288 (1988)
3) Igarashi M. Et al., Science 259, 77-79 (1993)
4) Goshima Y. et al., Nature 376, 509-514 (1995)
5) Drescher U. et al., Cell 82, 359-370 (1995)

183 成長円錐におけるL型及びN型カルシウムチャネル

2E58

大林 克巳[1,2]、福良 治彦[1]、井上 洋[2]、小宮 義璋[1]、五十嵐 道弘[1]
(群馬大・医 [1]分子病態学教室、 [2]脳神経外科学教室)

〔 要約 〕

幼若ウィスターSTラット前脳より成長円錐及び膜画分を採取した。成長円錐膜において、[^{3}H]PN200-110、ω-[^{125}I]conotoxin GVIAのリガンドを用いてL型及びN型カルシウムチャネルに対する特異的結合をbinding assay により測定した。L型カルシウムチャネルは胎生期ラットにおいて成長円錐膜に多く存在し、生後約1週位まで漸減し、N型カルシウムチャネルは胎生期には少なく成長とともに漸増していくことが見出された。そこで、L型カルシウムチャネルが多く存在する胎生17日に、単離成長円錐をL型agonist のBay K 8644により刺激し、L型カルシウムチャネルを介したCa^{2+}の流入及び、Ca^{2+}依存性蛋白燐酸化の変化を調べた。その結果、Ca^{2+}の流入及びCa^{2+}依存性燐酸化がともに確認された。

【緒言】

成長円錐はシナプス形成前の成長期の神経突起先端に、運動性に富んだ特殊構造としてみられ、突起の伸展や正しいシナプス標的の認識などに重要な役割を果たしている。この成長円錐の挙動に、細胞内のカルシウム濃度変化の関与が示唆されている[1)2)]。成熟シナプス終末におけるカルシウム濃度の制御は主にN型カルシウムチャネルであるが、今回、我々は単離した成長円錐においてカルシウム濃度の制御におけるL型カルシウムチャネルの重要性[3)]を考え、そのリガンドを用いてbinding assay により定量を行った。さらに胎生期成長円錐におけるL型カルシウムチャネルを介した$[Ca^{2+}]_i$の変化、Ca^{2+}依存性蛋白燐酸化の変化を調べた。

【方法】

胎生 17日、20日、出生後2日、5日、7日のウィスターSTラットより前脳を集め、Pfenningerらの方法により成長円錐(GCP: growth cone particle) 及びその他の画分を採取し、各々の膜画分(GCM: growth cone membrane, PNM: perinuclear membrane)を採取した[4)]。各々の日齢にて、[^{3}H]PN200-110、ω-[^{125}I]conotoxin GVIAを使ってL型及びN型カルシウムチャネル結合部位のbinding assay[5)6)] を行った。さらに、L型カルシウムチャネルの機能を実際に確認するために、胎生17日に採取したGCP 内にFura 2/AM を取り込ませ、2波長測定によりカルシウム流入量の変化を経時的に測定し、L 型agonist であるBay K 8644を投与した時のカルシウム流入量の変化を調べた。また、情報伝達系へのL型カルシウムチャネルの関与をみるために、[^{32}P]orthophosphateをGCPに取り込ませ、Bay K 8644 を投与し、Ca^{2+}依存性蛋白燐酸化の変化をオートラジオグラフィー、BAS2000 system (富士フィルム) を用いて調べた[7)]。

【結果】

[^{3}H]PN200-110及びω-[^{125}I]conotoxin GVIAの特異的結合部位は、GCM において前者は胎生17日にBmax値が0.716 pmol/mg proteinとなり多く存在したが、生後7日では0.341 と漸減した。PNM においてはBmaxは著明な変化はみられなかった(Fig. 1)。後者は胎生期においてBmax値が0.316と少なく、生後7日で0.873と漸増した(Fig. 2)。Bay K 8644 (30 μM) の投与により$[Ca^{2+}]_i$の上昇がみられた。Bay K 8644 とverapamil (30 μM)の投与では、$[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制された

(Fig. 3)。Bay K 8644 の投与により、45 kDa及び、80 kDa蛋白(GAP-43、MARCKS蛋白)のCa^{2+}依存性燐酸化が増強された。

【考察】

L型チャネルが胎生期または出生直後に成長円錐に濃縮され、その活性化が成長円錐の$[Ca^{2+}]_i$の上昇と蛋白燐酸化の促進を引き起こすことが今回の結果から明らかになった。この時期は成長円錐の運動が活発な時期にあたり、種々の成長円錐機能に重要とされるGAP-43の燐酸化が促進されることから、L型チャネルは成長円錐の情報伝達系に深く関与することが示唆された[7]。一方、シナプス前終末での伝達物質放出に関係が深いN型は、成長円錐期よりもシナプス形成期(以降)に軸索終末に集積すると考えられ、成長円錐から成熟シナプス前終末への機能的変化にその集積が関与する可能性を示唆している。

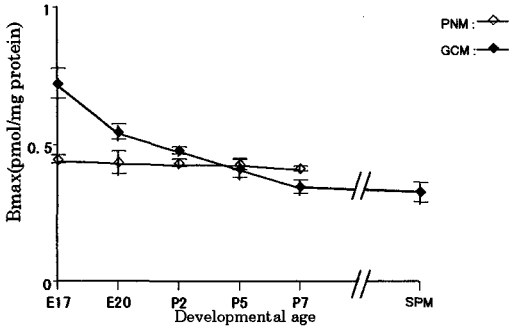


Fig. 1. Developmental changes of Bmax values for [^{3}H]PN200-110.

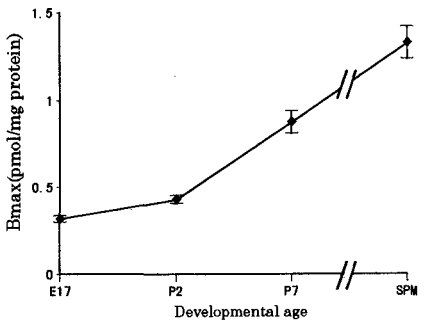


Fig. 2. Developmental changes of Bmax values for ω-[^{125}I]conotoxin GVIA in GCM.

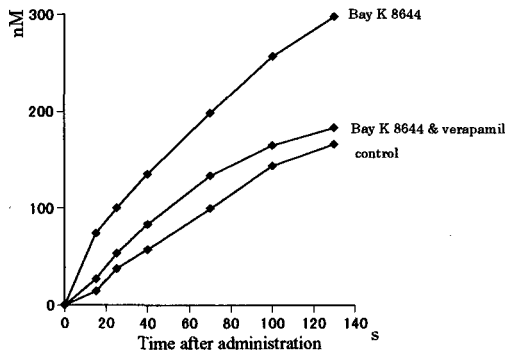


Fig. 3. Changes of $[Ca^{2+}]_i$ after administraiton of agents in GCP.

【文献】

1) Amato A, Al-Mohanna FA, Bolsover S (1996) Dev Brain Res 92: 101-110

2) Birch BD, Eng DL, Kocsis JD (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89: 7978-82

3) Zimprich F, Bolsover S (1996) Eur J Neurosci 8: 467-475

4) Igarashi M et al (1990) Dev Brain Res 51: 1-9

5) Vigers AJ, Pfenninger KH (1991) Dev Brain Res 60: 197-203

6) Wagner JA, Snowman AM, Biswas A, Olivera BM, Snyder SH (1988) J Neurosci 8: 3354-59

7) Fukura H, Komiya Y, Igarashi M (1996) J Neurochem 67 (in press)

184 成長円錐におけるGABA$_A$受容体を介する情報伝達系

2E59

福良 治彦*‡、五十嵐 道弘*、小宮 義璋*
(群馬大学医学部*分子病態学教室、‡麻酔・蘇生学教室)

〔要約〕成長円錐の挙動に神経伝達物質などが作用を及ぼすことが知られている。今回われわれはGABA$_A$受容体複合体が特に成長円錐に多く存在していて、その刺激によってCl-流出→L-type Ca^{2+} channelを介しての$[Ca^{2+}]_i$の上昇→Ca^{2+}依存性燐酸化の促進という応答が生ずることを明らかにした。よって、GABAは成長円錐内の情報伝達系に影響を与え軸索の伸長、ひいては神経回路網の形成に影響を与えることが示唆された。

成長円錐は軸索の伸長、伸長経路の決定、正しいシナプスの形成に重要な役割を果たす神経突起先端に形成される構造物である。成長円錐は様々な物質(神経伝達物質、接着分子等)に対して反応性を有する。神経伝達物質の中でGABAはその受容体と共に発生早期より中枢神経系に発現することが知られており、神経伝達物質の中で神経の成長発育に対して影響を与えることが考えられる。ラット大脳皮質ニューロンにおいて生後7日目まではGABA投与によって過分極でなく、脱分極を生じることが知られており神経系の発達に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。[1]しかし、GABAの成長円錐に対しての作用ははっきりしていなかった。そこで我々は、成長円錐におけるGABA$_A$受容体を介した情報伝達系を検討した。[2]

【実験方法】 胎生17日(E17)から生後7日目(P7)までのWinster STラットを断頭後、前脳を集め、Pfenningerらの方法[3]に基づき単離成長円錐(GCPs)及びその他の画分を採取した。また、Ellisらの方法[4]を用い低張処理によって各々の膜画分を採取し、[^{3}H]muscimolと[^{3}H]diazepamを使ってGABA$_A$結合部位とbenzodiazepine結合部位のbinding assayを行った。GABA及びそのmodulators、Ca^{2+} channel blockersによる単離成長円錐$[Ca^{2+}]_i$の変化はFura2/AMを、$[Cl^-]_i$の変化はMQAE(N-(6-Methoxyquinolyl) acetoethyl ester)を用いたフルオロメトリーにて測定した。情報伝達系への影響をみるために[^{32}P]無機燐酸をGCPsに取り込ませCa^{2+}依存性蛋白燐酸化の変化をオートラジオグラフィ、BAS2000 systemを用いて調べた。また、GABA$_A$受容体のサブユニット(α_1、α_2、α_3、α_5、$\beta_{2/3}$)の成長に伴う変化をimmunobloting及びdensitometryにて測定した。

【結果】 [^{3}H]muscimol及び[^{3}H]diazepamの特異的結合部位は、他の分画と比較して成長円錐膜(GCM)により多く存在していた。GCMの中の[^{3}H]muscimol結合部位のB_{max}値はE17からP2まで増加して、その後減少していった。この間、K_d値に有意な変化はなかった。一方、[^{3}H]diazepam結合部位には有意なB_{max}値やK_d値の変化はみられなかった。GABA(100 μM)はcontrolに比し$[Ca^{2+}]_i$を1.4倍に増加させた。この値はphenobarbital(100 μM)やpropofol(1 μM)を追加すると、更に増加した。GABA及び、phenobarbitalによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇は、verapamilやpicrotoxinによって阻害された。$[Cl^-]_i$はGABA(100 μM)にて減少した(Fig. 1)。この変化はpicrotoxinでは阻害されたがverapamilでは影響を受けなかった。GABA(100 μM、500 μM)投与とCa^{2+}依存性蛋白燐酸化は約45 kDa、約80 kDa(それぞれGAP-43、MARCKS蛋白と同定)が強く燐酸化された。これらの蛋白は燐酸化に伴い膜画分から細胞質へと移行した。Propofolを併用す

ると燐酸化の比率は増加し(Fig. 2)、この変化はpicrotoxin、verapamilによって抑制された。GABA$_A$受容体各subunitは成長に伴いα_1とα_5、$\beta_{2/3}$が増加、α_2とα_3が減少という変化を示した(Fig. 3)。

【考察】 今回の結果からGABA$_A$受容体複合体はGCMに多く存在していることが明らかになった。今回の阻害剤を使った実験からGABA$_A$受容体複合体の活性化がまず、Cl$^-$ channelを通してのCl$^-$流出を生じ、その結果として膜の脱分極が起こり、L-type Ca^{2+} channelを介して$[Ca^{2+}]_i$の上昇をきたしたと考えられる。その結果、Ca^{2+}依存性燐酸化が促進され、成長円錐内の情報伝達系に影響を与えると考えられる。成長円錐における情報伝達機序においては、α-isoformsの置換があるにもかかわらず、α-subunits依存性の有意な修飾は認められなかった。

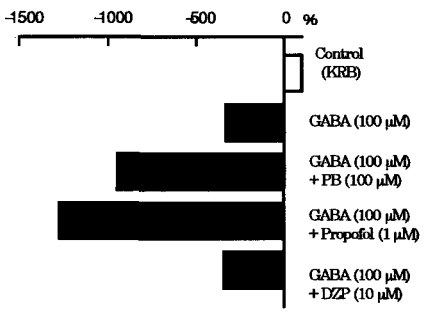


Fig. 1 GABA$_A$受容体ligandsによる成長円錐$[Cl^-]_i$への影響

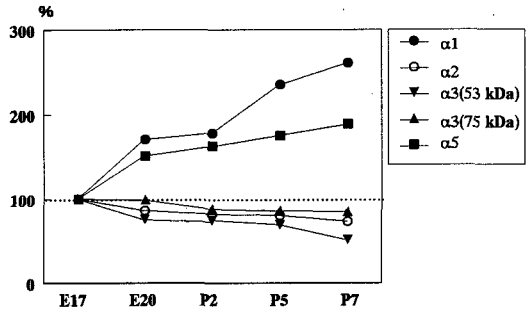


Fig. 3 成長に伴う成長円錐膜GABA$_A$受容体α subunitsの変化

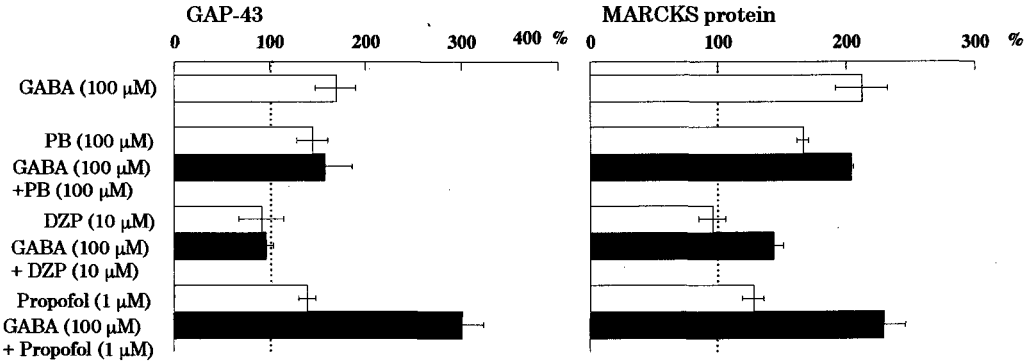


Fig. 2 GABAによるCa^{2+}依存性燐酸化の促進とその修飾

【文献】

1)Cherubini E., Gaiarsa J.L., Ben-Ari Y.: Trends Neurosci 14: 515-519, 1991.

2)Fukura H., Komiya Y., Igarashi M.: J. Neurochem. 67: (in press)

3)Pfenninger K.H., Ellis L., Johnson M.P., Friedman L.B., Somlo S.: Cell 35: 573-584, 1983.

4) Ellis L., Katz F., Pfenninger K.H.: J. Cell Biol. 101: 1977-1987, 1985.

185 2E60 成長円錐における SNARE 複合体の性質

五十嵐 道弘、小宮 義璋
(群馬大・医・分子病態学)

〔 要約 〕成長円錐は、シナプス前終末の前駆体と考えられる。成長円錐においてもシナプス前終末同様、SNARE 機構が作動することを生化学的に証明するため、SNARE 複合体の成分である syntaxin, SNAP-25, VAMP の局在を調べた。成長円錐でもSNARE 複合体 (80 kDa) が検出されたが、シナプトソームのそれの1/10程度であった。成長円錐小胞画分でも、小胞にはSNARE 複合体を中核とする7S複合体の形成が認められたが、成長円錐小胞では外因性のNSF, α-SNAP及びMg^{2+}-ATPγSを加えても、さらに大きな複合体(20S complex)の形成が見られず、シナプス小胞とは異なっていた。この外、シナプス終末で証明されているSNARE 複合体形成の調節機序のいくつかが成長円錐には存在しないことが示され、成長円錐はSNARE 機構を使用しているものの、シナプス終末とは調節機序が異なることが示唆された。

成長円錐はシナプス前終末の前駆体と考えられ、標的認識後に次第に成熟して、シナプス前終末に変化すると考えられる。しかしこの変化の分子的基盤はほとんど解明されていない。われわれは種々のシナプス前終末特異蛋白が幼若な段階から成長円錐に存在していることを見いだして本学会等で報告した(1,2)。 今回は、シナプス小胞が形質膜に融合するために重要なSNARE 複合体(3) が成長円錐にも存在すること、その調節機構が成熟シナプスとはいくつかの点で異なっていることを見いだしたので報告する(2)。

【方法】成長円錐の単離は生後２日目のラット前脳より細胞分画法で行った(4)。 成長円錐画分を低張処理し、成長円錐小胞画分を調製した。この画分を2% Triton X-100 を含む緩衝液で処理して膜蛋白を可溶化し、10-35% glycerol の連続密度勾配上に重層して超遠心後、 1 ml ずつ分画した(5)。架橋剤DSSを用いて、synaptophysin-VAMPの複合体形成実験を成長円錐で行った(6)。

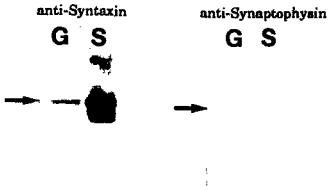
【結果】SNARE 複合体を形成するsyntaxin, SNAP-25, VAMP は軸索基幹部を含むC画分より成長円錐画分に濃縮され、成長円錐でも80 kDaの複合体が検出された(7; 図１)。 しかし、シナプトソームのそれの1/10程度であった。成長円錐小胞画分でも、小胞にはSNARE 複合体を中核とする7S複合体の形成が認められたが、成長円錐小胞では外因性のNSF, α-SNAP及び Mg^{2+}-ATPγSを加えても、さらに大きな複合体(20S complex)の形成が見られず、シナプス小胞とは異なっていた(5; 図２)。Synaptotagmin はシナプス終末ではCa^{2+}センサーの役割を示唆されており(3)、成熟脳では免疫沈降法で他のSNARE 複合体成分と共に沈降するが、成長円錐画分ではsynaptotagminの沈降が認められなかった。また、シナプトソームではsynaptophysin は架橋剤の存在下でVAMPと結合して58 kDaの複合体を形成することが報告されている(6)。 成長円錐で同様の実験を行ったが、架橋剤の有無によらず、このような複合体は形成されなかった（図３）。

【考察】成長円錐はシナプス前終末の前駆体と見なしうるので、SNARE 機構の成長円錐への集積を調べたところ、成長円錐はシナプス小胞が存在しなくてもSNARE 複合体を有していることが確認された。既にわれわれは、この SNARE複合体が、膜面積の拡大に基づく突起の伸長(8) という成長円錐固有の機能に利用されていることを示唆する結果を得た(9)。 今回の結果は、①成長円錐においてもシナプス終末と同様、syntaxin, SNAP-25, VAMP から成る80 kDaのSNARE 複合体が形成されているが、②この複合体の形成及び解離を調節する分子機構が、成長円錐においてはシナプス終末（あるいはゴルジ装置）とはかなり異なっていることを示唆している。成長円錐は、SNARE 複合体の調節因子を成熟シナプス型の因子に置き換えることによって、伝達物質の効率的な放出機序を獲得することが推測される。

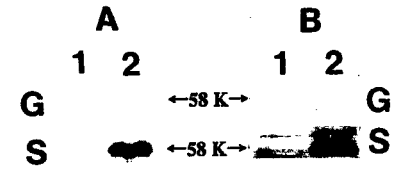
本研究の一部は、多賀谷 光男 博士（東京薬大・生命科学）との共同研究である。抗体を供与していただいた高橋 正身 博士（三菱生命研）に深謝する。

【文献】

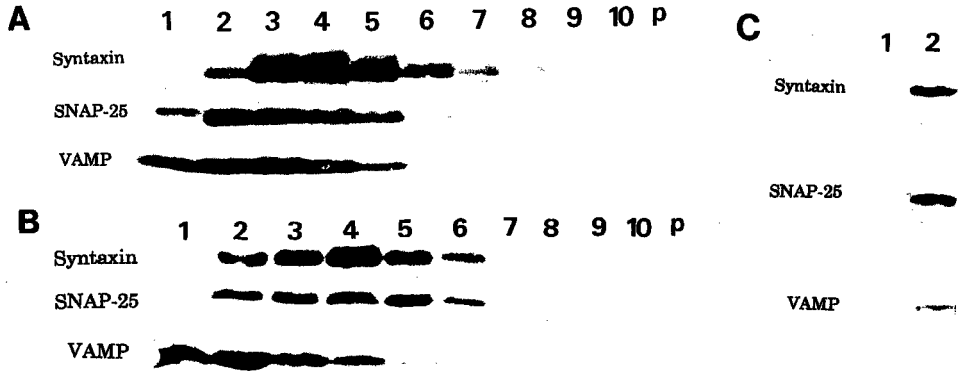
1) 五十嵐 道弘、小宮 義璋 (1994) 神経化学 33: 604-605.
2) Igarashi M, Tagaya M, Komiya Y (1996) (submitted)
3) Calakos N, Scheller RH (1996) Physiol Rev **76**: 1-30.
4) Taylor J, Gordon-Weeks PR (1989) J Neurochem **53**: 834-843.
5) Pevsner J, Hsu S-C, Braun JEA, Calakos N, Ting AE, Bennett MK, Scheller RH (1994) Neuron **13**: 353-364.
6) Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R (1995) EMBO J **14**: 224-231.
7) Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Sudhof TC, Niemann H (1994) EMBO J **13**: 5051-5061.
8) Catsicas S, Grenningloh G, Pich EM (1994) Trends Neurosci 17: 368-373.
9) Igarashi M, Kozaki S, Terakawa S, Kawano S, Ide C, Komiya Y (1996) J Cell Biol **134**: 205-215.



（図1）80 kDa 複合体（矢印）の存在
(G: 成長円錐； S: シナプトソーム)
synaptophysin はnegative control を表す。



（図3）成長円錐(G)とシナプトソーム(S)における
58 kDa 複合体 (A: VAMP抗体; B: synaptophysin抗体)
1: DSS (-) 2: DSS (+)



（図2）SNARE 複合体の性質
A: 成長円錐の各蛋白の分画
B: 成長円錐に外因性のNSF, α-SNAP を加えた後の分画
C: シナプス小胞における20S 複合体の形成
(外因性のNSF, α-SNAP を加える前(1)と後(2))

186 小脳求心性投射形成の初期過程 ――次前庭神経の伸長路選択と標的認識－

2E61

遠藤利朗、白崎竜一、村上富士夫
(大阪大学基礎工学部生物工学科)

〔 要約 〕

一次前庭線維の伸長路選択、標的認識の初期過程を、小脳への投射線維を中心に、ラット胎仔後脳の二次元展開標本を用いて、一次前庭線維の特異的マーカーである抗F84.1 モノクローナル抗体、及び蛍光色素 DiIで標識して解析した。その結果、小脳原基内では、一次前庭小脳線維が 背側正中部から尾側端にわたる領域に投射しているパターンが観察された。また、脳幹では、腹側に向かってバックブランチが形成される様子が観察された。この結果から、一次前庭線維の特異的標的認識のメカニズムについて考察した。

目的 脳の中の特異的で定型的な神経回路網が形成されるためには、発生過程での軸索の特異的標的認識メカニズムが重要である。本研究では、特異的標的認識メカニズムについて研究するためのモデル系として、一次前庭小脳投射の形成過程に着目した。前庭神経の一次入力線維は、頭部の空間的な位置や運動に関する情報を中枢に伝達するものであり、前庭小脳系の一部として重要な役割を果たしている。この入力は、小脳求心性投射線維のなかでも最も早い時期に小脳原基に到達することが知られているが (1) 、その時期には、最終的な標的細胞である顆粒細胞はまだ生まれてきていないと考えられている (2) 。このような時間的なずれがある場合に、最終的に成体に見られるような特異的神経結合が形成されるまでの過程と、そのメカニズムは非常に興味深い。しかし、一次前庭小脳投射の発達過程とそのメカニズムについては、現在のところほとんど不明である。そこで本研究では、一次前庭小脳線維を中心に、一次前庭線維の発達の初期過程を、ラット後脳の二次元展開標本 (3) を用いて解析した。

方法 実験には、胎生12日目 (E12) から16日目のウィスターラット胎仔を用いた。親ラットは、ペントバルビタールナトリウムを腹腔内注射して麻酔し、開腹して子宮を摘出後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により安楽死させた。ハンクス平衡塩類溶液中で胎仔を子宮から取り出して断頭、頭部の背側正中線を切開し、後脳の神経管組織のみを取り出し、二次元に展開して標本とした。標本作製の際、第8脳神経節を取り除かないよう注意した。標本は4%パラホルムアルデヒド溶液で浸漬固定した。前庭神経一次入力線維は、これを特異的に標識できる抗 F84.1 モノクローナル抗体 (4) 、及び蛍光色素 DiI によって標識した。抗体染色はABC法を用い、DABで発色させた。DiI は、鋭いタングステンニードルを用いて、微小な結晶を第8脳神経節または小脳板に注入した。

結果 E12-16 の後脳二次元展開標本を用いて、抗 F84.1 モノクローナル抗体による抗体染色を行なったところ、第8脳神経節から脳幹に入る免疫 陽性線維として、脳幹に入ってすぐに直角に方向転換して上行するもの、及び下行するもの、加えて E12-13 では上記の線維よりもやや腹側で直角方向転換して下行するものが観察された。上行線維は E12 で既に小脳板 (小脳原基) に達しており、下行線維も上行線維と同程度の距離を伸長していた。また E15-16 では、上、下行の分岐点から上行側約150μm、下行側約300μmの範囲で、腹側に向かって伸びている分枝様の線維が観察された。E12-13 の小脳板内では、比較的少数の線維が背側正中部 (RP) に向かって伸長しているようであったが、E14 以降、小脳板に入ってくる線維の数が増えるにつれて投射領域が徐々に小脳板の尾側の方へ拡大していく様子が観察された。つまり全体として見ると線維の小脳板への侵入部位を中心とする扇形の投射パターンを形成していた。

DiI を第8脳神経節に注入して順行性に線維を標識した結果、抗 F84.1 モノクローナル抗体 による染色の結果と一致する線維の発達が観察された。E15 において、DiI を小脳板に注入したところ、第8脳神経節に細胞体が逆行性標識された。このとき、脳幹に入ってすぐに方向転換して下行する線維、及び腹側に向かう分枝様線維も標識されたが、E14 で同様の注入行なった場合には、腹側に向かう分枝様線維は標識されなかった。

考察　以上の結果から、前庭神経の一次投射は、少なくとも一部については、一次前庭線維が脳幹に入ると分枝して上行枝と下行枝に分かれ、脳幹でさらに側枝を出すという初期過程を経て形成されると考えられる。脳幹での側枝は、上行枝、下行枝がいったん側枝の標的領域を通過した後、バックワードブランチングが生じて形成されると考えられる。この結果は、過去の知見（5）と一致する。

一次前庭小脳線維が小脳原基に到達する時期には、その最終的な標的細胞である顆粒細胞はまだ生まれてきていないと考えられている（2）。このことと、小脳板内で見られた投射パターンを考え合わせると、一次前庭小脳線維が、小脳板の RP から尾側端にわたる領域を、一時的な標的領域として認識しているのではないかと考えられる。



図　E15 の第8脳神経節にDiI を注入した。蛍光像（上）と同視野の明視野像（下）。

参考文献

(1) Ashwell, K. W. S. and Zhang, L. L. (1992) *Acta. Anat.* 145, 17-23.

(2) Altman, J. and Bayer, S. A. (1978) *J. Comp. Neurol.* 179, 23-48.

(3) Shirasaki, R., Tamada, A., Katsumata, R. and Murakami, F. (1995) *Neuron* 14, 961-972.

(4) Prince, J. T., Nishiyama, A., Heary, P. A., Beasley, L. and Stallcup, W. B. (1992) *Dev. Brain Res.* 68, 193-201.

(5) Morris, R. J., Beech, J. N. and Heizmann, C. W. (1988) *Neuroscience*27, 571-596.

187 ニワトリ網膜の発生・分化における細胞接着因子Gicerinの発現

2E62

○ 李炳生、平英一、樋口宗史、三木直正

(大阪大学医学部第一薬理)

[要約]

網膜組織は、網膜神経上皮前駆体細胞の増殖、細胞移動、そして神経突起の伸展などの過程を経て発生・分化する。この網膜分化過程に細胞－細胞間相互作用や細胞－細胞外マトツクス相互作用が、重要な役割を持っていることが知られている。今回、我々はニワトリ網膜の発生初期におけるGicerinとNOF（神経突起伸展因子）の発現を調べた。5日目胚網膜では、GicerinとNOFが視神経層と神経節細胞層と網膜神経上皮前駆体細胞において発現が見られた。Gicerin抗体を5日目胚網膜移植片培養に加えると、突起伸展が完全に抑えられた。Gicerin抗体は5日目胚網膜から単離初代培養細胞のNOFへの結合を完全に抑制した。以上の結果より、Gicerinはニワトリ網膜の形成に重要な役割をしていることが示唆された。また、Gicerinの細胞内ドメインと結合する蛋白質を見出すために、GSTとの融合蛋白を作製した。

[目的]

網膜は最も研究されている神経組織の一つである。網膜組織は網膜神経上皮前駆体細胞から発生するが、その初期の段階から、cadherinやN-CAMなどの細胞接着因子の発現がみられる。すなわち、網膜分化過程において、細胞－細胞間相互作用や細胞－細胞間マトリツクス相互作用が重要な役割を持っていると考えられる。当研究室では、ニワトリ砂嚢平滑筋の抽出液から神経突起伸展因子（Neurite Outgrowth Factor, NOF）を精製した。さらに同じ砂嚢筋膜分画からNOF受容体を精製し、その一次構造を明らかにし、 Gicerinと名付けた。今回、網膜の発生初期におけるgicerinとNOFの発現を調べると共に、Gicerin の細胞内ドメインと結合する蛋白質を調べるためにGST－細胞内ドメインの融合蛋白質を作製した。

[方法]

3から18日目ニワトリ胚を用いた。免疫組織化学：組織切片（厚さ10μm)はクリオスタットで作製し、ゼラチン塗布したスライドグラス上に固定した後、既報の方法による間接蛍光抗体法で免疫組織化学を行った。ウェスタンブロット法：組織からの蛋白質の抽出は従来の方法に従った。蛋白質濃度の定量はBSA方法を用いた。抽出物は7.5%SDS-PAGEで分離後、従来の方法によりイムノブロットを行った。網膜細胞のNOFへの結合：網膜の単離初代培養細胞浮遊液ををBSA、NOF、ラミニンをスポット状に塗布した培養皿上で培養した。20分後PBS（－）で洗浄し、パラホルムアルデヒド固定を行った。結合活性は顕微鏡下でスポットへ接着している細胞数を調べた。GST融合蛋白質：Gicerinの細胞内ドメインの21個 アミノ酸を pGEX-2T Vector のBam H1 とEco R1 部位内に挿入して、Gluthathione Sepharose 4B culom より精製した。

[結果および考察]

発生初期の網膜におけるgicerinおよびNOFの発現の部位および経時変化を調べるために、Whole-mount、組織切片および初代培養細胞を用いて、免疫組織化学を行った。Whole-mountで、3日目胚網膜においてgicerinが発現していることが確認された。5日目胚網膜切片では、gicerinとNOFが視神経層、神経節細胞層と網膜神経上皮前駆体細胞において発現していた。ノーザンブロット法とウエスタンブロット法で、網膜におけるgicerinおよびNOFの経時的変化を調べてみると、gicerinとNOFは発生初期に強く発現し、8日目胚の網膜でピークに達し、以降は急速に減少し、18日目胚ではほとんど消失した。以上の結果より、gicerinの発現が網膜の発生のごく初期において発現しており、網膜細胞の分化や網膜の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、GST-C末gicerin融合蛋白を作製し、gicerin抗体にウエスタンブロットにより、目的の融合蛋白質ができていることを確認した。この融合蛋白を用いて、細胞内ドメインに結合する蛋白質を見出すことにより、gicerinの細胞内情報伝達機構の解析を行う予定である。

[文献]

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

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

3) Rutishauser U, Acheson A, Hall A. K. Mann D. M. and Sunshine J., Science 240: 53-57, 1988.

4) Taira E, Takaha N, Taniura H, Kim C-H, Miki N., .Neuron 12: 861-872,1994.

5) Taira,E., Nagino, T., Taniura,H., Takaha, N., Kim,C-H., C-H.Kuo, Li, B-S., Higuchi,H., and Miki,N., J. Biol. Chem, 270, 28581-28687, 1995.

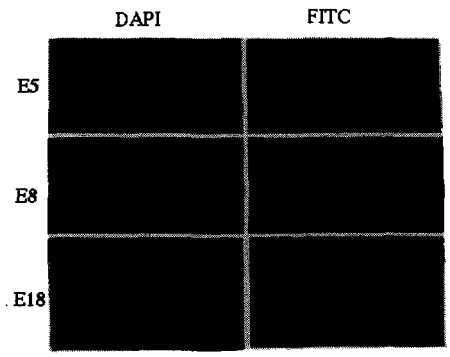


Figure 1. Immunofluorescent staining of chicken embryonic retinas. Thin sections (15 μ m) of embryonic retinas were fixed and stained with antiserum against gicerin. 5-day (A,B), 8-day (C,D) and 18-day (E,F). A,C,E were stained with DAPI and B,D,F were stained with FITC.

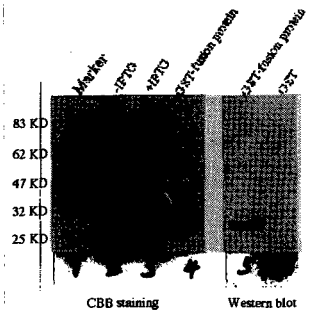


Figure 2. Western blot analysis of GST fusion protein with an intracellular domain. Lane1-4 is CBB staining and lane5-6 is western blot . lane1, uninduced cell proteins; lane 2, IPTG-induced cell proteins; lane3, purified GST -fusion protein. Lane5, purified -fusion protein; lane 6, GST protein.

188 1E64 脱リン酸に伴う微小管結合蛋白タウの活性変化：重合核形成能の選択的低下

藤村維子、倉知 正、田代英夫、小宮義璋*、田代朋子*
（理研フォトダイナミクス、*群馬大・医・分子病態）

〔要約〕 軸索の主要な微小管結合蛋白であるタウは、微小管重合の核形成、微小管の伸長、束化など、多面的な機能を示す。タウがそのリン酸化状態によってどのように活性制御されるかを明らかにするために、これらの機能を個別に解析する方法を考案し、ウシ正常脳から直接単離したタウ(N-tau)とこれを脱リン酸したもの(DP-tau)、および微小管由来のタウ(MT-tau)を比較した。

1. ビデオコントラスト増強微分干渉(VEC-DIC)顕微鏡を用いて、生理的濃度(15μM)のチューブリンと三種のタウから生成する微小管の長さと数密度を測定したところ、長さはタウの種類や濃度によらずほぼ一定であるが、数密度には有意差がみられた。1.5μMタウ、反応時間10分で比較すると、N-tauによって形成される微小管数100に対し、DP-tauでは44、MT-tauでは22であった。
2. 既存微小管に対する結合力は、N-tauとDP-tauで変わらないが、MT-tauはこれらより強い。

以上の結果、脱リン酸によってタウの重合核形成能が選択的に低下すること、微小管結合力と重合核形成能とは必ずしも並行しないことなどが明らかになった。

神経特異的微小管結合蛋白タウは、主として軸索に存在し、軸索微小管の安定化に関与すると考えられている。mRNA splicingやリン酸化を主体とする翻訳後修飾により、タウには多数のアイソフォームが生じるが(1)、その分子構成は発現部位や年齢によって変化する。アルツハイマー病脳に蓄積するPHFの主成分が高度にリン酸化されたタウであることからも、タウの機能とリン酸化との関連が注目されている(2)。今回我々は、VEC-DIC顕微鏡を用いて、in vitro微小管重合におけるタウの機能を多面的に解析する方法を考案し、正常タウの重合核形成能が脱リン酸によって選択的に低下することを見い出した。

［**方法**］ウシ脳タウは、調製途中の脱リン酸を抑えるため、阻害剤(50mM NaF, 30mMpyrophosphate, 50mM β-glycerophosphate）を抽出液に加え、硫安分画、熱処理、過塩素酸処理により精製した(3)。得られたタウ(N-tau)の一部はアルカリフォスファターゼで処理し、リン酸化依存性抗体(4)によるブロッティングおよび二次元電気泳動で脱リン酸を確認した(DP-tau)。温度依存重合ー脱重合によって得たウシ脳微小管から、チューブリンおよび微小管結合タウ(MT-tau)を調製した。

各種タウとチューブリンを反応させ、VEC-DICでリアルタイム観察するとともに、1%グルタルアルデヒド固定して生成微小管の長さと数密度を測定した。 一方、一定量のタウに対し各種濃度のタクソール安定化微小管を加え、ELISAで結合タウ量を測定して、微小管に対する各種タウの結合力を求めた(5)。

［**結果と考察**］図1, a-cに生理的濃度のチューブリン(15μM)とN-tauによって生成する微小管の未固定像を示す。チューブリンのみでは重合しないが(a)、タウを1.5μM加えると多数の微小管を生じる(b)。タウ濃度を3μMに上げると微小管の束化(bundling)が起こる(c)。このようなリアルタイム観察は強力であるが、溶液中のブラウン運動や微小管自体のダイナミクスのため定量的計測が困難である。従って、微小管の長さと数密度の解析は、(d)のような固定像で行った。また、bundlingの起こらない条件（タウ1.5μM以下）に限定した。微小管１本１本の観察が可能なこの方法では、従来の濁度法の1/10以下の微量反応液(10-20μl)ではるかに多くの情報を得ることができる。

N-tau、DP-tau、MT-tauの三種のタウを用いたチューブリン重合の時間およびタウ濃度依存性を図2a, bに示す。微小管の平均長さはタウの種類や濃度によらず、約2μm/分の一定速度で増加する。一方、微

小管数にはタウの種類や濃度により有意差が見られ、N-tauの場合を100として、1.5μMタウ、反応時間10分で比較すると、DP-tauでは44、MT-tauでは22であった。微小管数は重合核形成能を反映しており、脱リン酸によって重合核形成活性が選択的に低下することが明らかとなった。

更に、既存微小管に対するタウのK_Dを比較したところ、N-tauとDP-tauはともに1.2 x 10^{-6} Mと変わらず、MT-tauは0.5 x 10^{-6}Mとより強い結合力を示した。

このように微小管結合能と重合核形成能は必ずしも並行せず、タウの活性を一つの側面のみから論ずる危険性を示唆している。また、MT-tauはその微小管結合によって選別されており、重合促進の面では弱く、生体内の状態を反映するとは限らないことがわかった。中心体のような微小管形成構造のない軸索では、タウの重合核形能が重要な意味を持つものと考えられる。

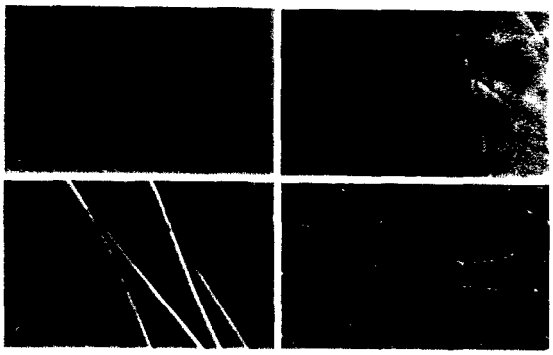


図.1: VEC-DIC顕微鏡によるin vitro微小管重合の観察。

37°C、30分(a,b)または60分(c)の反応時間後にVEC-DIC顕微鏡でみられる微小管のリアルタイム像をa-cに示す。
(a)15μMチューブリンのみ
(b)15μMチューブリン + 1.5μM N-tau
(c)15μMチューブリン + 3μM N-tau
(d) bと同様の反応後、固定した像

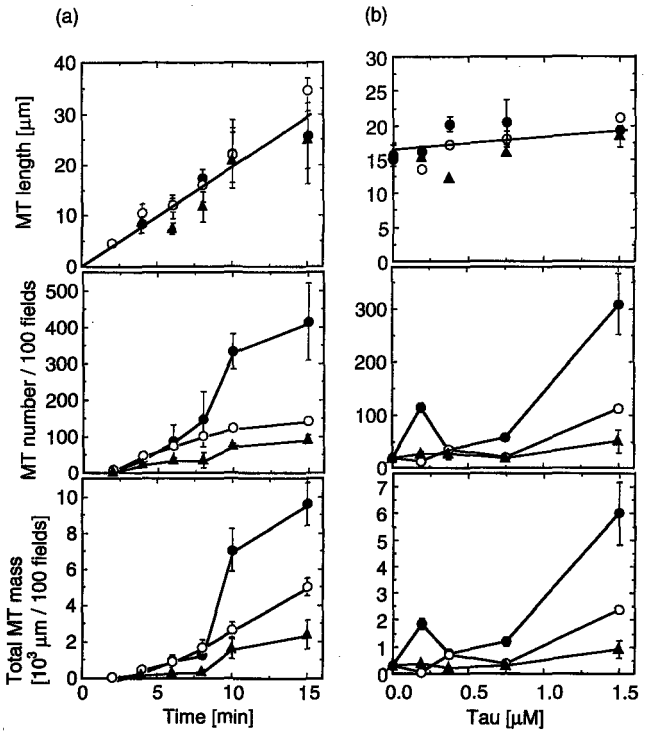


図.2:三種のタウによる微小管重合の(a)時間および(b)タウ濃度依存性。
(a)15μMチューブリンとN-tau(●)、DP-tau(○)、MT-tau(▲)各1.5μMから形成される微小管の長さ(上段)、数密度(中段)、総量(下段:長さx数密度)を示す。長さは、各々50本の微小管の平均値を、数密度は35x26μmの視野を100画面積算した値で表わしている。

(b)15μMチューブリンと各濃度のN-tau(●)、DP-tau(○)、MT-tau(▲)を10分間加温して形成される微小管の長さ(上段)、数密度(中段)、総量(下段)を示す。

文献:1)Goedert M. et al. (1991) TINS, 14, 193-199. 2)Goedert M. (1993) TINS, 16, 460-465. 3)Lindwall G. & Cole R.D.(1984) J.Biol.Chem., 259, 5301-5305. 4)Ono T.et al.(1995) Neurochem. Int., 26, 205-215. 5)Goode B.L. & Feinstein S.C. (1994) J.Cell Biol., 124, 769-782.

189 1E65 微小管結合蛋白質MAP1B(microtubule-associated protein 1B)の*in vivo*でのリン酸化とその発生段階での変化

山内英美子、村本和世*、黒田洋一郎*、谷口寿章
(藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・医高分子、*東京都神経研・神経生化)

[要約]
微小管結合蛋白質MAP1Bは、従来から神経突起の伸長における役割が示唆されており、それにはカゼインキナーゼIIによるリン酸化が重要だと考えられてきた。本研究では、発生段階を追ってラット脳よりMAP1Bを精製し、キャピラリー高速液体クロマトグラフ(HPLC)にエレクトロスプレー質量分析計を直結したLC/MS法を用いて、リン酸化部位を解析した。その結果、未知のリン酸化部位を含む多くのリン酸化ペプチドが見出された。胎生18日の段階で既にその大部分はリン酸化されていたが、生後7日までの間に数カ所の部位が特異的に脱リン酸化されることが明らかとなった。このことから、MAP1Bの発現量が増大する時期にほとんどの*in vivo*のリン酸化部位はリン酸化を受け、シナプス形成が活発に起こる時期に部位特異的に脱リン酸化を受けると考えられた。

[目的]
MAP1Bは、神経突起伸長に重要な役割をしていると考えられている蛋白質である。既に大脳皮質ニューロンの初代培養系で、シナプス形成に伴い顕著にリン酸化され、プロテインキナーゼ阻害剤によりシナプス形成が阻害されるとそのリン酸化も阻害される蛋白質としてMAP1Bが同定されている(1)。シナプス形成に伴うMAP1Bのリン酸化の変動を追うことで、MAP1Bの生理機能、リン酸化によるその制御機構を明らかにする目的で、本研究ではMAP1Bの*in vivo*でのリン酸化を含む翻訳後修飾の変化を、発生段階を追って解析した。

[方法]
MAP1Bの精製は、Pedrottiらの方法(2)を少し変更して行った。各発生段階のラット脳可溶性画分からイオン交換カラムResourceQ、MonoSを用いて精製した。精製したMAP1Bはリジルエンドプロテアーゼで処理し、得られたペプチドをキャピラリーHPLCにエレクトロスプレー質量分析計を直結したLC/MS法で解析した(3)。逆相HPLCで分離したペプチドは、質量分析計で直接その質量を測定し、cDNAのシークエンスから推定されるアミノ酸配列と比較することで同定した。リン酸化ペプチドはリン酸化されていないペプチドより80Da大きいこと、及びタンデムマス法によるシークエンスの直接解析より同定した。

[結果]
P7のラット脳より精製したMAP1Bのリジルエンドプロテアーゼ処理物は、14個のリン酸化ペプ

チドを含み、それらのうちのいくつかは複数箇所リン酸化されていることが見出された（図1）。多くのリン酸化部位は微小管結合部位よりC末に集中していた。また、発生段階を追ってラット脳より精製したMAP1Bを解析した結果、C末に近い2個のペプチドがP0からP7の間でそのリン酸化が特異的に減少することが見出された。これらのペプチドはその機能がまだ明らかとなっていないC末の特徴的なリピート領域に位置していた。

［考察］

MAP1Bはこれまで粗MAPs画分を用いた*in vitro*の実験から、カゼインキナーゼIIによってはリン酸化されるが、Aキナーゼ、Cキナーゼ、カルモジュリンキナーゼIIではほとんどリン酸化されないと報告されている（4）。本研究の結果、MAP1Bが*in vivo*で非常に多くの部位でリン酸化されていること、さらに大部分のリン酸化部位がMAPキナーゼやサイクリン依存性キナーゼなどのいわゆるプロリン指向性プロテインキナーゼによることが明らかとなった。またP0からP7というシナプス形成が活発に起こっている時期に、C末に近い数カ所の部位で、特異的な脱リン酸化が起こっていることは、ホスファターゼによる部位特異的脱リン酸化が重要であることを示している。このことから複数のプロテインキナーゼと、プロテインホスファターゼがMAP1Bの機能調節に関わっていることが明らかとなった。

［文献］

1. Muramoto, K., Taniguchi, H., Kawahara, M., Kobayashi, K., Nonomura, Y., and Kuroda, Y. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1467-1473.

2. Pedrotti, B., and Islam, K. (1995) *Cell. Motil. Cytoskel.* **30**, 301-309.

3. Taniguchi, H., Manenti, S., Suzuki, M., and Titani, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **265**, 6944-6948.

4. Diaz-Nido, J., Serrano, L., Mendez, E., and Avila, J. (1988) *J.Cell Biol.* **106**, 2057-2065.

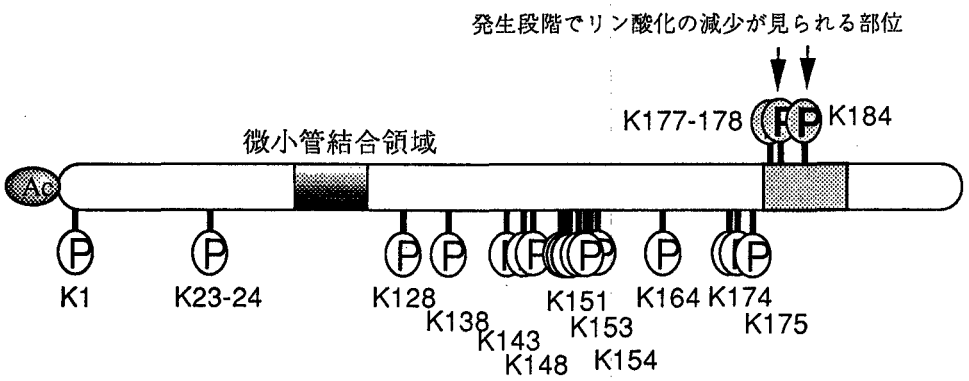


図1.MAP1Bの*in vivo*のリン酸化部位

190 1Dp1 神経細胞内及び、サイクリン依存性蛋白質燐酸化酵素による微小管付随蛋白質2の燐酸化反応

山本秀幸、久永真市*、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〕

サイクリン依存性蛋白質燐酸化酵素5 (cdk5) は脳に多量に存在するcdc2キナーゼ類似酵素でありニューロフィラメントやタウの燐酸化反応に関与していることが示唆されている。今回、神経細胞内での微小管付随蛋白質2 (MAP2) の燐酸化反応を明らかにする目的で、cdk5とcdc2キナーゼによる燐酸化反応を検討した。牛脳から精製した高分子量のMAP2 (MAP2A/B) 及び、生後1日目のラット脳から得られたMAP2Cは両酵素で強く燐酸化を受けた。MAP2A/BとMAP2Cの燐酸化部位は類似していた。MAP2A/BとMAP2Cに共通に存在する部位の中でMAP2Bの1541番目のセリン残基 (セリン1541) を含む合成ペプチドを合成した。合成ペプチドは両酵素で燐酸化を受けた。また、MAP2A/Bの燐酸化ペプチドマップとの比較により本部位が主な燐酸化部位の一つであることが示唆された。さらにマウス小脳の初代培養細胞内でのMAP2の燐酸化ペプチドマップと、cdc2キナーゼ及びcdk5によるin vitroでの燐酸化ペプチドマップとの比較により、細胞内でのMAP2の燐酸化反応への両酵素の関与が示唆された。

MAP2A/Bは成熟した脳に多量に存在し、可逆的な燐酸化反応と脱燐酸化反応によりその機能が調節されていることが示唆されている (1)。MAP2Cは胎児脳に存在する低分子量のMAP2であり、培養神経細胞内で、燐酸化を受けていることが知られている (1)。一方、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報告されている (2)。cdc2キナーゼの類似酵素であるcdk5が成熟脳の細胞質より分離精製された (3, 4)。本酵素は神経細胞内で、ニューロフィラメントやタウの燐酸化反応に関与することが報告された (3, 4)。今回、両酵素によるMAP2の燐酸化反応について検討した。

〔方法〕

ラット脳より、Ca^{2+}/カルモデュリン依存性蛋白質燐酸化酵素II (CaMキナーゼII) (5)、蛋白質燐酸化酵素C (Cキナーゼ) (6)、cyclic AMP依存性蛋白質燐酸化酵素 (Aキナーゼ) (5) を精製した。牛脳よりMAP2A/B (5)、豚脳よりcdk5 (6)、ヒトデ卵母細胞よりcdc2キナーゼ (6) を精製した。燐酸化反応 (5)、マウス小脳の初代培養(8)は既報の方法によりおこなった。

〔結果及び考察〕

MAP2A/BのcdcキナーゼとcdkによるMAP2A/Bはcdc2キナーゼとcdk5により強く燐酸化を受けた。一次元燐酸化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。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。

MAP2CのcdcキナーゼとcdkによるMAP2C: 生後1日目のラット脳の細胞上清分画を100℃で3分間処理後、遠心し、熱安定性蛋白質を分離した。熱安定生蛋白質をcdc2キナーゼとcdk5で燐酸化した後、MAP2に対する単クローン抗体で免疫沈降を行なうと、MAP2A/Bと同様にMAP2Cが強く燐酸化を受けた。MAP2A/BとMAP2Cの一次元燐酸化ペプチドマップは類似していた。両酵素はMAP2A/BとMAP2Cのセリンとスレオニン残基を燐酸化した。

MAP2B のセリン1541 の cdc2 キナーゼと cdk5 による燐酸化反応: MAP2B のセリン1541 をふくむペプチド (MAP2 ペプチド1) を合成した。MAP2 ペプチド1 は調べた酵素の中で cdc2 キナーゼと cdk5 によってのみ強く燐酸化を受けた (表1)。また、タウの両酵素による燐酸化部位の中で、セリン202 と 205、セリン231 と 235 を含むペプチドを合成した。MAP2 ペプチド1 はタウ由来のペプチドに比べて強く燐酸化を受けた (表1)。さらに、MAP2A/B と MAP2 ペプチド1 の二次元燐酸化ペプチドマップの比較によりセリン1541 が cdc2 キナーゼによる主な燐酸化部位の一つであることが示唆された。

神経細胞内での MAP2 の燐酸化部位の検討: 神経細胞内での MAP2 の燐酸化部位を検討する目的で小脳の初代培養細胞系を確立した。細胞を ^{32}P-正燐酸でラベルした後、MAP2 に対する単クローン抗体で免疫沈降を行ない、MAP2A/B と MAP2C の燐酸化を確認した。それぞれのバンドをゲルから切り取り燐酸化ペプチドマップを行なった。MAP2A/B と MAP2C は同様のパターンを示した。どちらの MAP2 もセリンとスレオニンが燐酸化を受けていた。さらに、燐酸化ペプチドマップは cdc2 キナーゼや cdk5 による燐酸化ペプチドマップと類似していた。

表1. 種々の蛋白質燐酸化酵素によるタウ由来ペプチドと MAP2 ペプチド1 の燐酸化反応

合成ペプチド	燐酸化反応 (pmol)				
	cdc2	cdk5	CaM キナーゼII	Cキナーゼ	Aキナーゼ
GYSSPGSPGTPG (tau196-207)	26.2	7.8	0	0	0
VVRTPPKSPSSAK (tau228-240)	41.1	26.7	0	0	0
VSDGVIKSPEKR (MAP2 ペプチド1)	160.2	26.3	4.8	1.4	1.5

合成ペプチド (320μM) をそれぞれの蛋白質燐酸化酵素 (100nM) で30分間燐酸化した。燐酸化反応は AG1-X8 カラムを用いて測定した。合成ペプチドのアミノ酸配列を一字記号で示した。

これらの結果より 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 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。今回、これらの部位の中でセリン1541 が強く燐酸化を受けることが示唆された。さらに、培養神経細胞内での MAP2 の燐酸化部位との比較により両酵素が細胞内でも MAP2 を燐酸化していることが示唆された。今後、セリン1541 に対する燐酸化特異抗体を用いて、MAP2 の細胞内、及び生体内での燐酸化反応を検討していく予定である。

〔文献〕

1) 山本秀幸　日薬理誌 107, 9-19 (1996).
2) Okano H.J., Pfaff D.W. and Gibbs R.B. J. Neurosci. 13, 2930-2938 (1993).
3) Lew J., Beaudette K., Litwin C.M.E. and Wang J.H. J. Biol. Chem. 267, 13383-13390 (1992).
4) Ishiguro K., Takamatsu M., Tomizawa K., Omori A., Takahashi M., Arioka M., Uchida T. and Imahori K. J. Biol. Chem. 267, 10897-10901 (1992).
5) Yamamoto H., Fukunaga K., Goto S., Tanaka E. and Miyamoto E. J. Neurochem. 44, 759-768 (1985)
6) Yamamoto H., Arakane F., Ono T., Tashima K., Okumura E., Yamada K., Hisanaga S., Fukunaga K., Kishimoto T. and Miyamoto E. J. Neurochem. 65, 802-809 (1995).
7) Yamamoto H., Maeda N., Niinobe M., Miyamoto E. and Mikoshiba K. J. Neurochem. 53, 917-923 (1989).

191 末梢神経軸索の可溶性ニューロフィラメント・Hサブユニット

1E66

津田守弘[1,2]、田代朋子[1]、小宮義璋[1]

([1]群馬大・医・分子病態、[2]同口腔外科)

〔要約〕 生体内のリン酸化状態を保つことに留意して、正常末梢神経における全NF蛋白および軸索内輸送途上のNF蛋白の溶解性を調べ、以下の結果を得た。

1. フォスファターゼ阻害剤を含む抽出液を用いると、NF-Hの約20%が1% Triton可溶性画分に再現的に回収された。阻害剤無添加の場合、可溶性NF-Hは少なく、ホモジェネートを35°Cで加温すると不溶性画分への移行がみられた。一方、NF-L(68k)では何れの場合もそのほとんどが不溶性であった。
2. 可溶性NF-Hと不溶性NF-Hで、C末端側のリン酸化状態に大きな差は認められなかった。
3. 全NF-Hでは、細胞体からの距離による溶解性の差はみられなかったが、軸索輸送途上の標識NF-Hでは、細胞体近位部および移動の先端部で可溶性NF-Hの比率が高かった。

ニューロフィラメント(NF)は、軸索径の維持などの構造的役割を担うきわめて安定度の高いポリマーであるが、近年、他の中間径フィラメント同様、N末端側の少数部位のリン酸化によって脱重合する可能性が示されている(1, 2)。一方、NFの三種のサブユニット蛋白H (200k)、M (160k)、L (68k)のうち、HとMのC末端側には、多数のリン酸化部位を持つ長い延長鎖が付加されており、この部分のリン酸化は、NF同士あるいはNFと微小管などの相互作用を調節すると考えられている(1)。このように、NFの構造および機能はそのリン酸化状態によって変動すると考えられるが、NFの調製にあたっては組織中のフォスファターゼ(3)に充分な注意が払われなかったきらいがある。今回、我々はこの点に注意して、正常末梢神経におけるNF蛋白の溶解性およびその軸索内輸送との関連を検討した。

［方法］NF蛋白の溶解性に対するフォスファターゼ阻害剤の影響：9週齢ラット前根を凍結破砕した後、フォスファターゼ阻害剤(50mM NaF, 30mMpyrophosphate, 50mM β-glycerophosphate) を含むものと含まないものの二種類の1% Triton X-100緩衝液で各々ホモジェナイズした。これを35°C、0-60分加温した後、100,000g、1時間の遠心により、可溶性画分(S)と不溶性画分(P)に分別した。各画分中の蛋白はSDS電気泳動で分離し、NF-HのC末端側リン酸化状態を識別する抗体SMI-31（リン酸化型）、SMI-32（脱リン酸化型）および抗NF-L抗体(NR4)を用いたイムノブロットにより定量した。

NFのin vitroリン酸化：1μMオカダ酸を含む1% Triton緩衝液を用いて調製した不溶性画分に、1μMオカダ酸存在下、cAMP依存性蛋白リン酸化酵素 catalytic subunit (60U/ml)を35°C、0-60分作用させた(4)。

軸索内輸送実験：7週齢ラット脊髄前角部にL-[^{35}S]メチオニンを注入し、2または4週後に前根および坐骨神経を摘出して、6mmの連続切片とする(5)。各切片をフォスファターゼ阻害剤を含むTriton緩衝液を用いて分別後、SDS電気泳動で分離し、NF-Hの放射活性を定量するとともにイムノブロットを行った。

［結果と考察］図1に示すように、フォスファターゼ阻害剤を添加しておくと、NF-Hの約20%が1%Triton可溶性画分に再現的に回収される。阻害剤を加えない場合は、可溶性NF-H量は1/2以下に低下し、更に、ホモジェネートを35°Cで加温すると全く消失した。一方、NF-Lでは、何れの場合も、可溶性のものは約0.5%しか検出されなかった。C末端側のリン酸化状態を識別する二種類の抗体に対する反応性に関して、可溶性NF-Hと不溶性NF-Hで差がみられない（図2)ことから、この部分のリン酸化は溶解性と直接関連しないと考えられる。

cAMP依存性リン酸化酵素によるin vitroリン酸化の結果、不溶性NF蛋白の一部が溶解した

が、この場合は、H、M、Lが何れも同程度に可溶化され、NFが脱重合したものと考えられる。

イムノブロットで検出される全NF-Hについては、細胞体からの距離による溶解性の差はみられない（図3;棒グラフ)。これに対して、軸索輸送途上の標識NF-Hでは、可溶性NF-Hの比率が細胞体近位部および移動の先端部(leading edge)で高く、輸送のピークで低かった(図3)。

このような未重合の可溶性NF-Hは、正常神経に一定の割合で存在するが、調製途中の脱リン酸によって不溶化するために、これまでほとんど検出されなかったと考えられる。

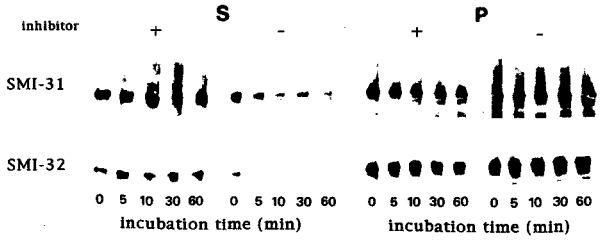


図.1: NF蛋白の溶解性に対するフォスファターゼの影響。　前根をフォスファターゼ阻害剤添加(+)、または無添加(-)の1% Triton 抽出液でホモジェナイズし、35°C、0-60分加温した後、可溶性 (S) および不溶性 (P) 画分に分別した。各画分のNF-Hは抗NF-H抗体(SMI-31、32)で検出した。

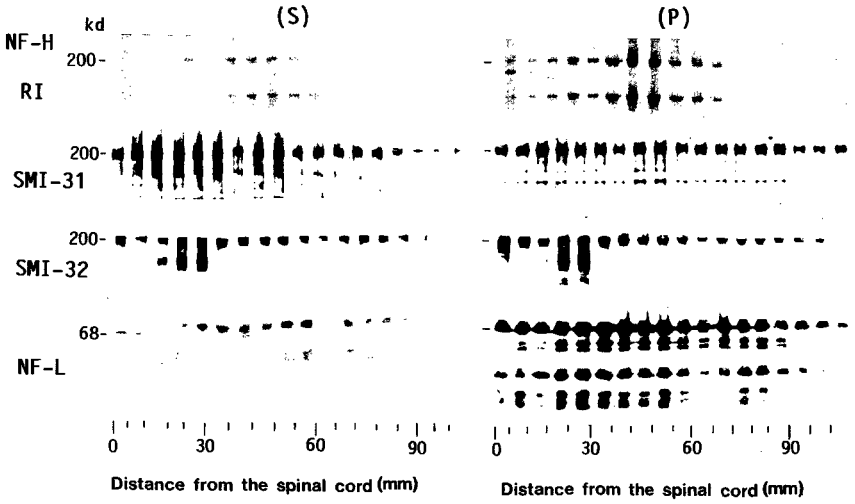


図.2: 細胞体からの距離とNF-Hの溶解性.

RI: BAS2000で検出した標識NF-H (標識3週間後)

SMI-31: 高リン酸化型NF-Hに対する抗体で検出

SMI-32: 低リン酸化型NF-Hに対する抗体で検出

NF-L: 抗NF-L抗体で検出

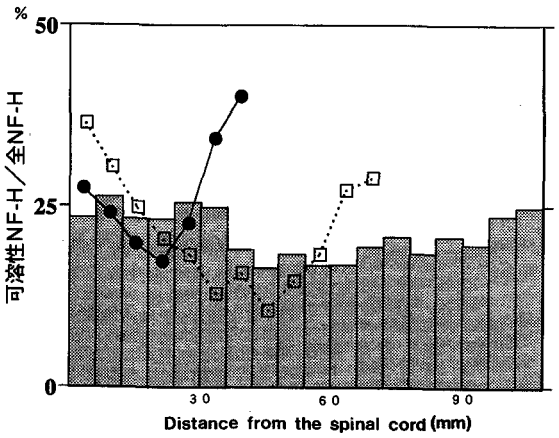


図.3: 細胞体からの距離による標識NF-Hの溶解性変化.
標識2週後（—●—）および4週後（‥◇‥）に軸索内を輸送されている標識NF-Hの溶解性。 全NF-Hの溶解性を棒グラフで示す。

文献：
1) Nixon R.A. & Sihag R.K. (1991) TINS, 14, 501-506
2) Giasson B.I. et al. (1996) J. Neurochem., 66, 1207-1213
3) Saito et al. (1995) Biochemistry, 34, 7376-7384
4) Hisanaga et al. (1994) Molec. Biol. Cell, 5, 161-172
5) Tashiro et al. (1994) J. Neurochem., 63, 291-300

192 1Dp2 若齢ラットと老齢ラットのニューロフィラメントの違いについて

久永真市、 岸本健雄
(東京工業大学・生命理工学部)

[要約]
ニューロフィラメント(NF)は神経軸索の最も主要な細胞骨格構造である。NFは遅い軸索流によって細胞体より供給されているが、その詳しい機構については解っていない。老化に伴いNFの輸送速度が減少するという報告に基づき、老齢ラットと若齢ラットのNF蛋白の性質を比較検討してみた。その結果、老齢ラットのNFは、若齢ラットに比べて凝集しており、また、若干のリン酸化とサブユニット組成に差が見られた。リン酸化による違いが、NF間の相互作用を強くし、その結果輸送速度が遅くなるという可能性が考えられた。

[目的]
ニューロフィラメント(NF)は神経細胞に特異的な中間径繊維であり、NF-L、NF-M, NF-Hの三つのサブユニットから構成されている。NFは軸索の主要細胞骨格成分であり、軸索内へは0.5～2mm／日の遅い軸索流によって細胞体より供給されている。しかし、その詳しい輸送機構についてはまだよく解っていないのが現状である。NFの輸送が障害を受けると、NFが軸索内に蓄積するようになる。ALS等の運動神経細胞疾患では、NFの軸索内蓄積がみられることが多く、原因の一つと考えられている。NFの軸索内蓄積の仕組みを明らかにするためには、NFの軸索輸送機構そのものを解明しなければならない。田代と小宮は老齢ラットでNFの輸送速度が選択的に遅くなっていることを1991年に報告している。輸送速度低下の極端な例が停止であると考えることができる。輸送速度の低下した老齢ラットのNFを若齢ラットのNFと比較することによって、輸送について何らかの知見が得られると考え、老齢および若齢ラットのNFの形態的および生化学的性質について調べたのでその結果について報告する。

[方法]
電子顕微鏡観察；若齢ラット（５～９週）と老齢ラット（50～90週）を１％グルタールアルデヒドと３％パラホルムアルデヒドを含む固定液で還流し、座骨神経および脊髄を摘出した。オスミウムで後固定した後、エポン樹脂に包埋し、通常の方法で超薄切片を作製した。切片はクエン酸鉛と酢酸ウランで染色した後、電子顕微鏡観察を行った。単離NFは1.5%酢酸ウランによるネガティブ染色または低角度回転蒸着法により電顕観察を行った。
NFの単離；ラット脊髄を0.1M Pipes, pH 6.9, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA中でホモゲナイズし、遠心後、Sepharose 4Bによるゲル濾過により調製した。

[結果]
座骨神経および脊髄の神経軸索の断面の超薄切片観察では、老齢ラットの方がNFが密になっていた。単位面積当たりのＮＦの密度を測定してみたところ、老齢ラットでは若齢ラットに比べて、数倍多いNFを含んでいた（図１）。
若齢および老齢ラットの脊髄からNFを単離して、その性質を調べた。まず、脊髄ホ

モジェネートを様々な遠心速度で分離し、NFの沈殿のし易さを比較した。若年ラットのNFの大部分は沈殿するのに40,000xg、３０分の遠心が必要であったのに対して、老齢ラットのNFの多くは18,000xg、３０分の遠心で沈殿した。NFをネガティブ染色して、電顕観察すると、老齢ラットのNFの方が長く、より凝集している傾向が観察された。

サブユニット組成比やリン酸化程度の違いを全NF蛋白について調べてみたが、若齢と老齢ラット差はみられなかった。しかし、75,000xg、30分の上清に得られるNFでは、若齢ラットに比べ、老齢ラットではリン酸化型NF-Hと脱リン酸化型NF-Mが増加し、脱リン酸化型NF-Hが減少している傾向が観察された（図２）。

＜考察＞

老齢ラットと若齢ラットのNFのを比較したところ、老齢ラットNFは凝集している傾向が見られた。また、超遠心の上清に回収されるNFについては、老齢ラットの方が、リン酸化型NF-Hと脱リン酸化型のNF-Mを多く含んでいた。脊髄の全NF蛋白ではサブユニット組成比やリン酸化に差がなかったことを考えると、沈殿のNFではリン酸化NF-Hと脱リン酸化NF-Mが僅かに減少していることになる。NFは重合体であり、このような一部のリン酸化状態の違いがNF間の相互作用を強くしている可能性は充分考えられる。その結果生ずるNFの凝集性が輸送速度を減少させているのではないかと推測される。

参考文献

Tashiro, T., and Komiya, Y. (1991) J. Neurosci. Res., 30, 192-200.

図１

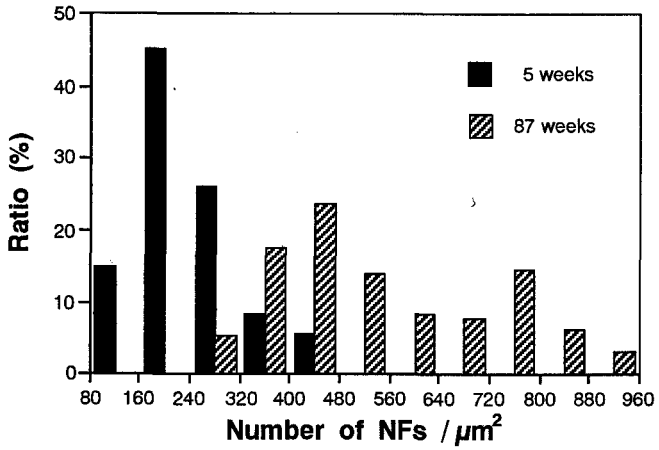


図２



図１　若齢および老齢ラット座骨神経軸索内のNFの密度

図２　超遠心上清に回収されるNFサブユニットの量とリン酸化。レーン１～３は若齢ラット（５週）のNFを濃度を変えて、レーン４は６０週の老齢ラットのNFを、それぞれに特異的に反応する抗体でブロッティングしたもの。

193 1E67 Effects of Ginkgo biloba extract(Gbe) on axonal transport of sciatic nerve in diabetic rats with reference to pathological alteration

Jin Man Kim, Shunichi Araki, Kazuhito Yokoyama
Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Tokyo.

[INTRODUCTION]
For the maintenance of neural function and morphology, it is essential to deliver the related macromolecules from the cell body to terminal by axonal transport system, which is composed of fast and slow axonal transport. Slow axonal transport conveys the cytoskeletal and associated proteins of the axoplasm at a velocity of 1-5mm/day. In diabetic neuropathy, evidence has been given that slow axonal transport is reduced with atrophy and degeneration of axons and decrease in conduction velocity(1,2). Also, ischemic conduction failure and deteorioration of metabolic capacity of axons by endoneurial oxygen deficit were observed in diabetic neuropathy(3,4,5). Ginkgo biloba extract(Gbe) has been known to promote microvascular circulation and cell potection by free radical scavenging(6). Purpose of the present study is to examine whether Gbe can protect or not the slow transport and morphology of motor axons of sciatic nerve from pathological alteration in the diabetes induced by streptozotocin(STZ) in rats.

[MATERIALS AND METHODS]
Eight-week-old male Wistar rats weighing 300-330g were divided into three groups (6 rats for each). The first group(diabetic rats) were given a single injection of STZ(60mg/kg, b.w., i.p.) in 0.01M cold citrate buffer(pH 4) at a concentration of 12mg/ml to induce diabetes mellitus at the start of experiment. The second group (treated rats) were given STZ in the same manner and then were treated with Gbe (0.1%) in drinking water from 1 week later. The third group(control rats) recived only cold citrate buffer as vehicle solution instead of STZ. At 4 week of experiment, L-[^{35}S] methionine was injected into the ventral horn of the spinal cord via a partial laminectomy at L_3 to L_5 by glass capillary injection method under the sodium pentobarbital anesthesia in the rats of three groups. All rats were sacrificed at 18 day after injection of L-[^{35}S] methionine. Bloods were collected for the biochemical assay. Nerves were dissected out rapidly from the ventral root to sciatic nerve and cut into 6 mm consecutive segments on an ice cold plastic plate, and kept frozen at -80℃ until the next step. Transverse sections of some nerves, stained with 1% toluidine blue, were examined by light microscopy. Each nerve segment was homogenized in 250μl of a medium containing 2.3%(w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS), 5%(v/v) 2-mercaptoethanol, 10%(w/v) glycerol and 6.25 mM Tris-HCl, pH 6.8. The homogenate was centrifuged(15,000 g, 15 min.). Each aliquot (40μl) in the clear supernant was subjected to 10% SDS-PAGE for the separation of proteins and subsequent fluorography. The radioactivity associated with axonal proteins was calculated by bio-imaging analyzer(BAS 2000, Fuji Photo Film Co.,Ltd.) and transport velocity was assessed according to the method described by Yokoyama and Araki(7). T-test and nonparametric method(Wilcoxon rank sum test) were used for statistical analyses.

[RESULTS]
Control rats showed a mean body weight gain of about 200g over the 6.5 weeks. Diabetic rats had only 10g weight gain, wheras treated rats gained about 120g more than diabetic rats(Fig.1). In serum glucose, diabetic rats showed a high increase of 300mg/dl and control rats showed an slight increase of 30mg/dl within normal range, whilst the amount of increase in treated rats were about 180mg/ml(Fig.2). Mean weight of liver and kidney in diabetic rats were significantly lower than in control rats, wheras treated rats showed no difference from control rats(Table 1).

Triglyceride, total cholesterol and total protein in diabetic rats were statistically higher than in control rats. On the contrary, in treated rat, only triglyceride was increased as compared to control rats(Table 1). Fig. 3 exemplifies the fluorographs made from SDS-PAGE gels, indicating radiolabeled proteins(68kd neurofilament subunit, tubulin and actin) of slow axonal transport in each group. Mean velocity of slow axonal transport in diabetic rats was significantly slower than in control rats; treated rats showed a mild decrease, compared with severe decrease of diabetic rats. The differences among control, treated and diabetic rats were significant at $p<0.05$(Table 2). In microscopic changes, there was obvious atrophy with dense cytoplasm and degeneration of axons in the diabetic rats (Fig. 4).

[DISCUSSION]

Diabetic rats showed severe loss of body, liver and kidney weight; Gbe treated diabetic rats were considerably closer to the level of control rats. Similarly, serum glucose in treated rats was significantly lower than diabetic rats, though the value was still higher than from the controls. Mean velocity of slow axonal transport in treated rats was intermediate between diabetic and control rats. Morphologically, treated rats showed a milder alteration in axons as compared to the diabetic rats respectively. It suggests that slow axonal transport and morphology of sciatic motor axons may be protected from diabetic changes by Gbe.

[REFERENCES]

(1) Noda K. et al.(1990) Diabetes, 39, 608
(2) Sidenius, P., and Jakobsen, J.(1982) Diabetes, 31, 689-693
(3) Low, P. A.(1987) Muscle and Nerve, 10, 121-128
(4) Yasuda H., and Dyck P. J.(1987) Neurology, 37, 20-28
(5) Newrick P.G. et al(1986) British Medical Journal, 293, 1053-1054
(6) Kleijnen J., Knipschild P.(1992) The Lancet, 340, 1136-1139
(7) Yokoyama K., and Araki S.(1992) Environmental Research, 59, 440-446

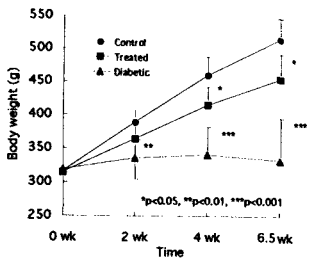


Fig. 1 The change of body weight in each group

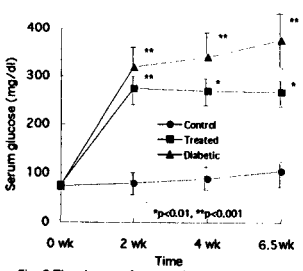


Fig. 2 The change of serum glucose in each group

Table 1. Organ weight and serum biochemical values

	Control rats (N=6)	Diabetic rats (N=6)	Treated rats (N=6)
Weight (g)			
Liver	22.5 ± 1.8	14.5 ± 2.3***	20.6 ± 2.2
Kidney	4.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3***	3.9 ± 0.3
Serum (mg/dl)			
Total protein(g/dl)	6.2 ± 0.6	7.2 ± 1.0*	6.1 ± 0.7
Total cholesterol	78 ± 19	149 ± 38**	117 ± 35
Triglyceride	44 ± 16	128 ± 36***	105 ± 19**

Significantly different from control rats at *p<0.05, **p<0.01 and **p<0.001(T-test)

Table 2. Mean velocity of slow axonal transport

	Control rats (N=5)	Treated rats (N=5)	Diabetic rats (N=5)
Vmean (mm/day)			
Total proteins	1.83(1.39-2.21)*	1.44(1.02-1.95)*,#	1.12(0.75-1.64)#
68kd N.f. subunit	1.68(1.12-2.02)	1.30(0.90-1.91)	1.05(0.82-1.55)
Tubulin	1.97(1.46-2.33)*	1.58(1.16-2.08)*,#	1.21(0.98-1.69)#
Actin	2.08(1.58-2.39)*	1.62(1.24-2.01)*,#	1.26(1.02-1.75)#

*p<0.05, difference between control and treated rats (Wilcoxon rank sum test)
#p<0.05, difference between treated and diabetic rats (Wilcoxon rank sum test)

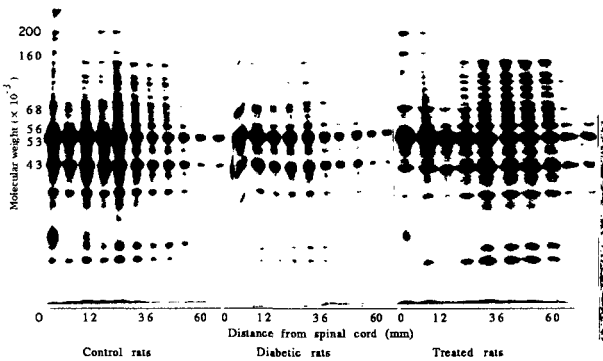


Fig. 3 Fluorographic distribution of slow axonal transport in the motor sciatic nerve
Neurofilament (triplet with m.w. of 200kd, 160kd and 68kd),
tubulin (m.w. of 56k and 53k), and actin(m.w. of 43k)

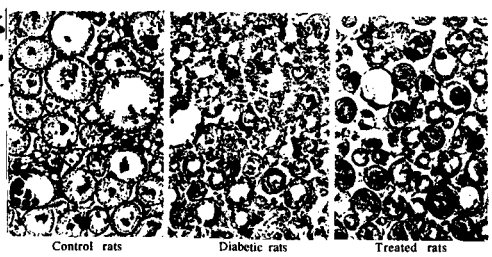


Fig. 4 Light photomicrogrphs of transverse section of sciatic nerve
Degeneration of axons(arrow) and fibers with dense cytoplasm(triangle)

194 IDPNによる軸索腫大におけるキネシンの集積

1E68

豊島至、加藤一麿、菅原正伯、和田千鶴、正宗研
(秋田大学医学部第一内科)

〔 要約 〕

キネシンは、順行性軸索輸送に関与する主要な分子モーターのひとつで、ヒトの運動ニューロン疾患 (MND) の脊髄軸索腫大にニューロフィラメントとともに蓄積している。MNDに類似した軸索腫大をきたすβ,β'-iminodipropionitrile (IDPN) 中毒をニワトリで作成し、キネシンの分布について検討した。腫大軸索は抗高リン酸化ニューロフィラメントタンパク抗体で同定した。その結果、ニワトリではIDPNが0.5 ml/kg で脊髄に軸索腫大をきたすことが明らかになった。脊髄前角内、前索、前根にみられる腫大軸索は、抗鶏胚キネシンモノクローナル抗体と反応した。IDPNによる軸索腫大内には、MNDにおけると同様キネシンが蓄積する事が示され、ニューロフィラメントタンパクとともに、キネシンの輸送が障害されていることが示唆された。

[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し、キネシンは、順行性軸索輸送に与る主要な分子モーターのひとつである。ヒト運動ニューロン疾患 (MND) 脊髄において、これまで、高燐酸ニューロフィラメントタンパクとともにキネシンが軸索腫大に蓄積することを報告した（1）。β,β'-iminodipropionitrile (IDPN) 中毒では、ヒトMNDと類似した軸索腫大の見られることが知られているが（2）、これをニワトリで作成し、キネシンの分布について検討した。

[方法]

ニワトリは孵化後一週から、IDPNを0.5 ml/kg を１回/週で２－３回腹腔内投与し、断頭後無固定のまま、脊髄と脊髄神経節を取り出し、液体窒素で急速凍結した。クリオスタットで８ミクロン厚に薄切後、１０分間冷アセトンで固定し、免疫染色した。抗キネシンモノクロナル抗体は鶏胚キネシンに対するものを用いた（3）。染色はABC法によった。軸索腫大は抗高リン酸化ニューロフィラメントタンパク (NF-H) 抗体で同定した（4）。

[結果]

IDPN1.5 ml/kg ではヒヨコは12時間以内に死亡し、病変を示さなかった。0.5 ml/kg の間歇投与でヒヨコは体重増加が減退し、頭部の姿勢異常と転倒を示すようになった。脊髄前角内、前索、前根で運動ニューロンの軸索が腫大し、ソーセージ様に見え、抗高燐酸化ニューロフィラメントタンパク抗体で強く染色された（図１a, b）。この軸索腫大は、抗キネシンモノクロナル抗体CKHC６で強く染色された（図１d, e）。脊髄神経節でも同様であった（図１c, f）。

[考察]

MND脊髄における軸索腫大に高燐酸化ニューロフィラメントタンパクが見い出されることは、ニューロフィラメントタンパクの輸送障害によると考えられる。最近のトランスジェニックマウス実験では、野性型ニューロフィラメントタンパクの過剰発現のみで軸索腫大がおこることが知られた。

この軸索腫大内にキネシンが見い出されることは、キネシン自身の輸送が一次的に障害されていることを示唆している様に思われる。今回用いた抗キネシン抗体は、イムノブロット上はニューロフィラメントタンパクと反応しない。また、キネシンに対するイムノアフィニテイーカラムでの精製分画にはニューロフィラメントタンパクは検出されないので（未発表データ）、ニューロフィラメントタンパクとキネシンの直接の相互作用は否定的である。微小管との関連は興味深いが今後の課題である。

［参考文献］

1) 豊島至他、神経化学31: 562-563, 1992

2) Chou, S. M., Hartmann, H.A, Acta Neuropathol Berl, 4: 590-603, 1965

3) Toyoshima, I. et al., J Cell Biol, 118: 1121-1131, 1992

4) Toyoshima, I. et al., J Neurol Sci, 89: 269-277, 1989

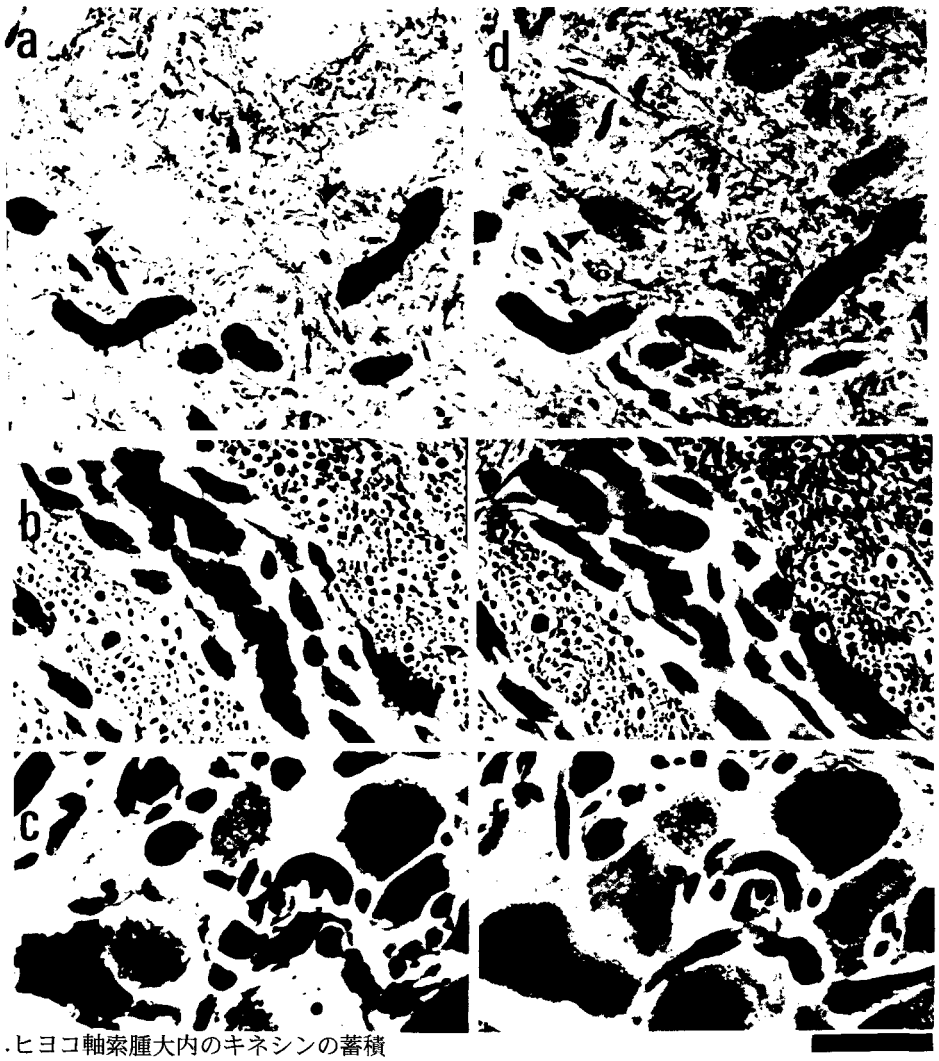


図１.ヒヨコ軸索腫大内のキネシンの蓄積

a, d: 脊髄前角、b, e: 脊髄前索、c, f: 脊髄神経節、　矢頭: 運動ニューロン細胞体

a, b, c: 高燐酸化 NF-H 抗体、d, e, f: 抗キネシン抗体による免疫染色

195 低分子量ストレス蛋白質のリン酸化

1Bp1

伊東秀記、岡本慶子、加藤兼房
(愛知県コロニー・研・生化)

〔 要約 〕

U373 MG ヒトグリオーマ細胞を亜砒酸ナトリウム (As) や $CdCl_2$ などの化学ストレスに曝したり、ホルボールエステル (PMA) やオカダ酸を加えると、濃度および作用時間依存的に、より酸性側に等電点をもったαBクリスタリン（以下αB）が現れ、オカダ酸とPMAを同時に作用させた場合は3本のバンドが現れた。放射性リン酸で標識した細胞を用いてこれらがリン酸化されたαBであることを確認した。すなわち、αBは各種ストレスによってリン酸化され、少なくとも三つのリン酸化部位があることが示唆された。As によるリン酸化は dithiothreitol (DTT) によって抑制されたのに対し、PMAによるリン酸化は staurosporine (STP) によって阻害された。PMAを一晩作用させ脱感作した細胞でも As によるリン酸化は認められたがPMAは無効であった。また、無血清で培養した細胞に血清(FCS) を添加すると十数分でリン酸化αBが出現した。この血清によるリン酸化は、DTT および STP の影響は余り受けなかった。以上の結果より、αBは種々のストレスによって、異なるシグナル伝達系を経て、しかも異なるprotien kinase によってリン酸化されることが示唆された。

いわゆるαクリスタリンドメインを共有する高等動物のαクリスタリン低分子量hspは、hsp27、αAクリスタリンおよびαBクリスタリン、と我々の発見したp20 の 4 種類が存在する。このうちhsp27は種々のストレスや薬物によりリン酸化されることが知られている。我々はこのhsp27のリン酸化が重合型より解離型への変換を伴うことも報告してきた(1)。αクリスタリンとくにαA は自己リン酸化活性があると報告されている(2)。また、p20 は血管平滑筋の弛緩に伴ってリン酸化されることが最近明らかになった(3)。今回は、αBとhsp27を恒常的に発現しているU373 MG 細胞を用いて、αBのリン酸化がhsp27 と同じように起こることを見つけたのでその現象を hsp27 のリン酸化と比較しながら紹介する。

【実験方法】

U373 MG 細胞は10% FCS を含むEMEM 液中 (5 ml/dish) で培養し、confluent 培養の細胞にそれぞれの薬剤を暴露し、37℃で培養を継続した。細胞は PBS で洗ってから、各dishごと -20℃ で保存した。各 dish の細胞は0.3ml の PBS で suspend し、sonicate 後、遠心 (150,000x g/20 min) 上清中のαB を等電点電気泳動し、転写後抗αB抗体とペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG 抗体を使って、ペルオキシダーゼ活性を化学発光法によりX-ray film 上に可視化した。

【結果と考察】

confluent 培養の U373 MG 細胞を200 μM As, 200 nM OA あるいは 1 μM のPMA に曝露すると30-60分で酸性側に等電点をもつαBが発現増量してきた（図1, 2）。OA と PMA を同時に加えて90 分間培養した細胞では、合計3本の新たなバンドが見られた （図3）。^{32}P正リン酸を取り込ませた細胞を同様に処理し、粗抽出液中のαBを抗体とprotein A 結合セファロースで回収し、これを電気泳動後、autoradiography と Western blot を行った結果より（図4）、これらのバンドはいずれもリン酸化されたαBであることが判明した。As によるリン酸化は還元剤であるDTT が共存すると抑制されたが、PMAの長期投与による脱感作あるいは staurosporine によってブロックされなかった。しかし、PMAによるリン酸化は脱感作あるいは100 nM staurosporine の存在下で阻害された（図5）。無血清培地で一晩培養した細胞に、血清(FCS) を加えると、短時間にαBのリン酸化がみられ、このリン酸

化は DTT および staurosporine の影響を受けなかった。IL-1 α も僅かではあるがリン酸化を促進した。レンズ α B は protein kinase A でリン酸化されると報告されている(2). しかし、forskolin, cholera toxin, Bt$_2$cAMP など protein kinase A の活性化剤ではリン酸化は殆ど促進されなかった（図2）。ラットを42℃の湯槽に20分間浸けると、心筋、横隔膜でリン酸化された α B が増量していた（図6）。α B は、hsp27 と異なり、リン酸化されても解離しなかった。以上の結果より、α B は種々のストレスによって異なるシグナル伝達系を経て、しかも異なる protein kinase によってリン酸化されることが示唆された。しかしその生理的意義は不明である。また α B のリン酸化が促進される上記の条件下では、hsp27 のリン酸化も促進される。hsp27 kinase すなわち MAPKAP kinase 2 (5) が α B もリン酸化するという報告はない。何種類のまたどのような protein kinase が、α B 自身の kinase 作用を含め、α B のリン酸化に関与しているかは、今後の研究課題である。

【文献】

1) Kato, K., et al. (1994) J. Biol. Chem., 269, 11274-11278

2) Kantorow, M., et al. (1995) J. Biol. Chem., 270, 17215-17220

3) Beall, A., et al. (1996) in abstracts of *Molecular Chaperones & The Heat Shock Responses* pp. 29, Cold Spring Harbor Lab.

4) Stokoe, D., et al. (1992) FEBS Lett., 313,307-313

図1

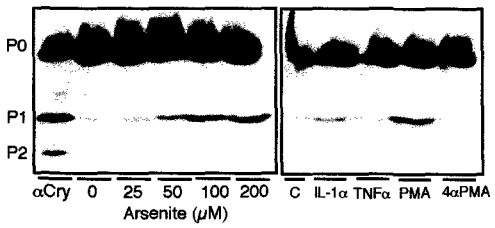
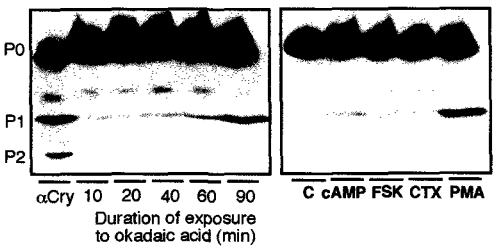


図2



図中の略語

Cry: purified lens α crystallin, IL-1α: interleukin-1α, TNFα: tumor necrosis factor α, PMA: phorbol ester, OA: okadaic acid, FSK: forskolin, CTX: cholera toxin, As: arsenite, DTT: dithiothreitol, STP: staurosporine
P0: 無リン酸 α B, P1: 1リン酸 α B, P2: 2リン酸 α B, P3: 3リン酸 α B

図3

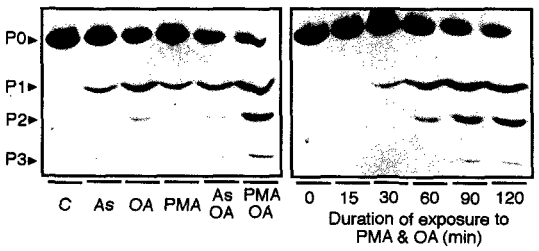


図4

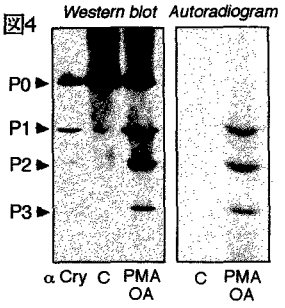


図5

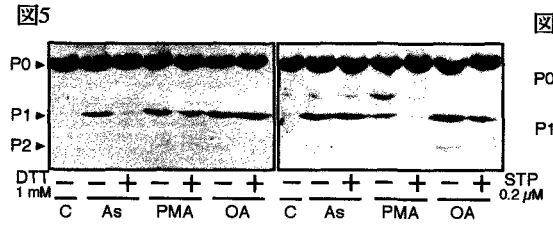
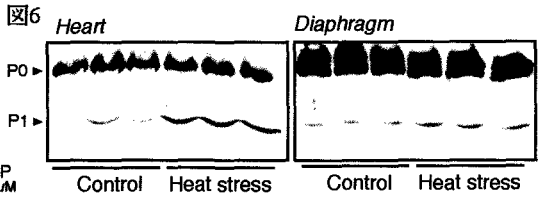


図6



196 DexamethasoneによるC6細胞中のαBクリスタリンの誘導

1E36

岡本慶子、伊東秀記、加藤兼房
(愛知県コロニー・研・生化)

〔要約〕

増殖中のC6グリオーマ細胞にglucocorticoidであるdexamethasone (DXM)) を添加すると、細胞中のαBクリスタリン（以下αB）が添加数時間後より増加し始め十数時間後に対照細胞の10倍以上の濃度に達した。DXMによるαBの増加は、αBのmRNAの発現増加を伴い、転写活性の促進によると思われた。DXMの効果は、1 ng/mlの微量で現れ、用量依存的に、1・3 μg/mlで最大を示した。DXMによるαBの合成誘導は、colchicineによる誘導と同様に、dithithreitol (DTT) などの還元剤では抑制されなかったが、staurosporineによって阻止された。また、colchicineと相乗的にαBの誘導を促進した。以上の結果より、DXMによるαBの合成誘導機構は、cochicineによる誘導機構と一部共通する部分があると思われた。

神経変性疾患、とくに脳白質の異常(leukodystrophy)ではαBの発現蓄積がおもにグリア細胞でみられる。また、αBが多発性硬化症(multiple sclerosis)の自己抗原としての可能性を指摘する報告もある(1)。一方、ストレス蛋白質であるαBの選択的誘導、すなわちhsp27やhsp70の誘導を伴わない誘導条件が報告されている。高塩濃度環境への曝露(2),および長期間のDXMへの曝露(3)、および微小管脱重合剤による誘導である(4)。今回、我々はC6細胞にDXMを作用させたところ、十数時間の短期間でαBが誘導されてくることをみつけ、この機構を解析し、他の誘導機構と比較検討したのでその結果を報告する。

【実験方法】

C6細胞は10% FCSを含むDMEM液中(2 ml/dish)で培養し、70-80% confluent培養の細胞にそれぞれの薬剤を暴露し、37℃で培養を継続した。細胞はPBSで洗ってから、各dishごと-20℃で保存した。各dishの細胞は0.3 mlのPBSでsuspendし、sonicate後、遠心(150,000x g/20 min)上清中のαBをイムノアッセイ法(4)で測定し、結果はμg or ng/mg proteinで表した。Northern blot法によるmRNAの解析は、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、αBのcDNA probeとhybridizeした(4)。

【結果】

増殖培養中のC6細胞のαBは10-50 ng/mgとかなりの濃度であるが、これに1 μMのDXMを加えて培養を続けると、15-25時間で0.3・0.5 μg/mg proteinの高濃度になった（図1A）。DXMの効果は用量依存的で、1 ng/mlの低濃度でもαBの蓄積増加がみられた（図1B）。このDXMによる合成促進効果は無血清培地で培養した場合もみられた（図1C）。

αBの増加はそのmRNAの増量が先行した（図2）、しかし、熱ショック転写因子のDNA結合活性の増加はなかった。DXMによるαBの誘導は、亜砒酸ナトリウムやプロスタグランジンJ_2による誘導と異なり、DTTでは抑制されなかったが（図3A）、colchicine, colcemidによる誘導と同じように、低濃度のstaurosporineによって抑制された（図4A）。また、colchicine, colcemidによる誘導を抑制するtaxolによって部分的に抑制を受ける（図3B）ことから、colchicineによる誘導機構とDXMによるαBの誘導機構は一部共通なところがある

ことが示唆された。一方、DXMによるαBの誘導はcolchicine と相乗的に現れた（図4B）。

【考察】

NIH 3T3 細胞を1 μM (0.4 μg/ml) のDXMに曝露すると、2日目頃よりαBが検出され、以降増え続け、2週間後には可溶性蛋白質の1%を占めるほどになる。しかし、*ras* ongogeneで transform した NIH 3T3 細胞では、誘導が早く起こると同時に24時間前後をピークに以後は減少することが報告されている(3)。今回のC6細胞での結果は後者の transform した細胞の応答に類似していた。

Fig. 1.

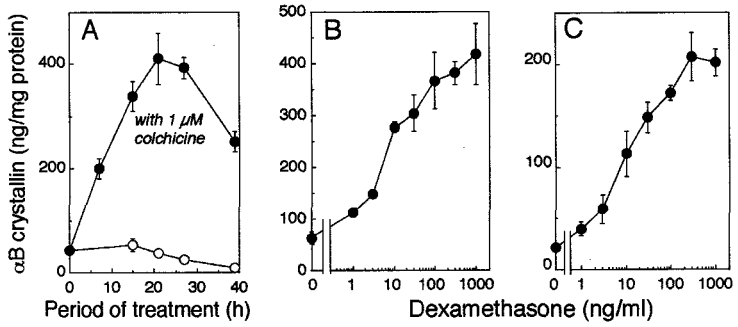


Fig. 2.

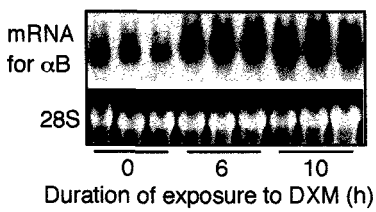


Fig. 3.

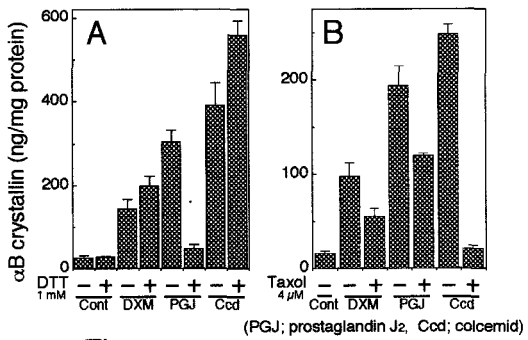
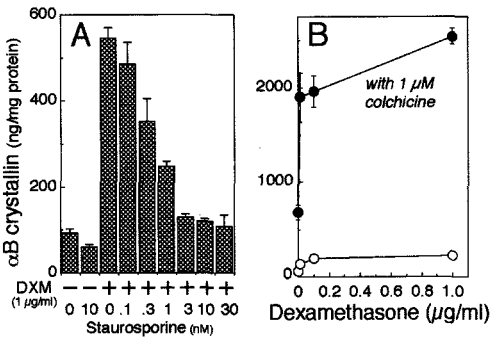


Fig. 4.



【文献】

1) Van Noort, J.M. et al. (1995) Nature, 375, 798-801
2) Dasgupta, S., et al. (1992) Exp. Eye Res., 54, 461-470
3) Aoyama, A., et al. (1993) Mol. Cell. Biol., 13, 1824-1835
4) Kato, K., et al., (1996) Bull. Jap. Soc. Neurochem., in this volume.

197 C6グリオーマ細胞におけるαBクリスタリンの蓄積

1Bp2

加藤兼房[1]、伊東秀記[1]、岡本慶子[1]、佐賀信介[2]
(愛知県コロニー・研・[1]生化、[2]形態)

〔要約〕
増殖中のC6グリオーマ細胞をコルヒチンなどの微小管脱重合促進剤に暴露すると、細胞中のαBクリスタリン(以下αB)が約10時間後より増加し始め24-48時間後に1 μg/mg protein以上の濃度に達することを報告してきた。今回は以下の点を明らかにした。1) αBの増加は、その遺伝子の転写活性の増加によると同時に、αBのmRNAの安定化にも起因していることが判明した。2) 細胞中のαBは脱重合したチュブリンとともに細胞辺縁部に局在する傾向があり、αBが薬剤と結合したチュブリンにシャペロンとして作用していることが示唆された。

アレキサンダー病は、脳のグリア細胞にαBが異常蓄積する先天異常疾患である。しかしその原因は不明である。我々は低分子量ストレス蛋白質、hsp27およびαBのストレス誘導を修飾する因子について検索を進めてきた(1-2)。その過程で、C6グリオーマ細胞を細胞分裂M期の阻害剤であるコルヒチンなどに暴露すると、αBが選択的に(hsp27およびhsp70は不変)増加してくることを最近見つけた。αBの増量機構とその特徴を解析し、αBの機能を示唆する結果を得たので報告する。

【実験方法】
C6細胞は10% FCSを含むDMEM液中(2 ml/dish)で培養し、70-80% confluent培養の細胞にそれぞれの薬剤を暴露し、37℃で培養を継続した。細胞はPBSで洗ってから、各dishごと-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(150,000x g/20 min)上清中のαBをイムノアッセイ法(3)で測定し、結果はμg or ng /mg proteinで表した。Northern blot法によるmRNAの解析は、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、αBのcDNA probeとhybridizeした(1-2)。nuclear run-off transcription assayは定法に従って行った。

【結果】
増殖培養中のC6細胞のαBは10-50 ng/mgとかなりの濃度であるが、これに1 μMのコルヒチンを加えて培養を続けると、24-48時間で約1 μg/mg proteinの高濃度になった。コルセミド、nocodazoleおよびvinblastineなど微小管の脱重合を促進する細胞周期M期阻害剤は同じような効果があった(図1)。αBの増加はそのmRNAの増量が先行し(図2A)、nuclear run-off assayの結果転写活性が増加していることが分かった(図2B)。また、actinomycin Dで転写をブロックした後のαB mRNAの減少がコルセミド処理細胞で少ないことから(図3)、mRNAの安定化も寄与していると思われる。αBの誘導はS期阻害剤で見られず(図1)、また、同じM期阻害剤でも、微小管を安定化させて分裂を抑制するtaxolは無効であるばかりか、コルヒチンなどによる効果を抑制した(図4)。微小管脱重合促進剤によるαBの誘導は10 nMの低濃度のstaurosporineが共存すると完全に阻止された(図5)。

αBおよびチュブリンのコルヒチン添加後の細胞内局在を蛍光抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、両免疫活性ともに細胞辺縁部に同じように局在する像が頻繁に認められた。

コルヒチンによるαBの合成誘導はラットBRL肝細胞でも観察された。

【考察】

上記の結果から、微小管の脱重合が促進される際に、staurosporine に感受性の高い、おそらくprotein kinase の活性化を介して、αB合成が促進されるが推測される。しかし、いかなるprotein kinase が関与しているかは不明である。また、コルヒチン暴露初期の段階に顕著に見られるαBとチュブリンの colocalization は、薬剤と結合したチュブリンを認識して、選択的にαBが結合している可能性もあり、αBのシャペロンとしての機能の一面が現れているかも知れない。

【文献】

1) Kato, K., et al. (1996) J. Neurochem., 66, 946-950
2) Ito, H., et al. (1996) J. Cell. Physiol., 166, 332-339
3) Kato, K., et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta, 1074, 201-208

Fig. 1

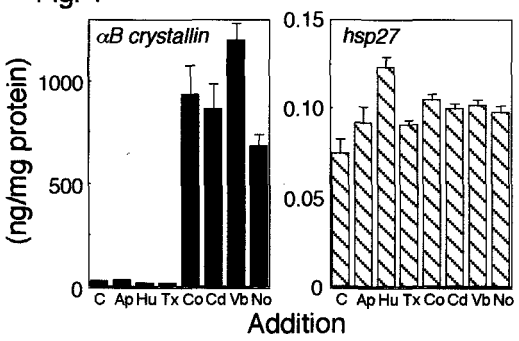


Fig. 2.

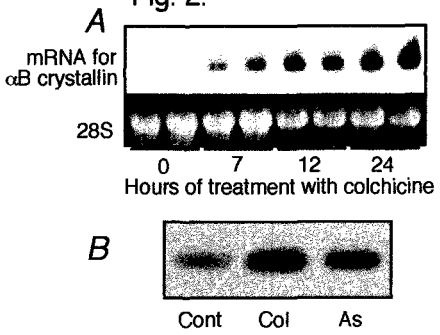


Fig. 3.

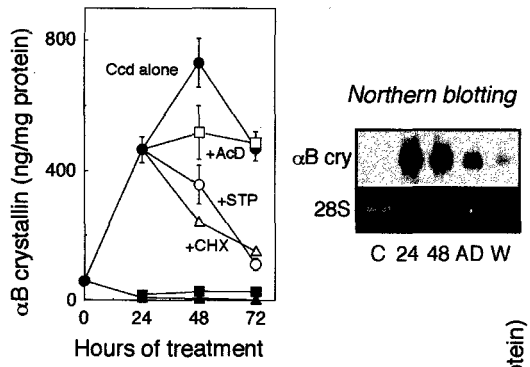


Fig. 4.

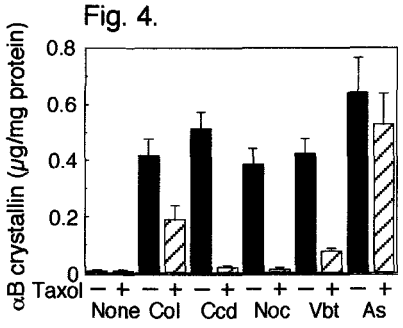
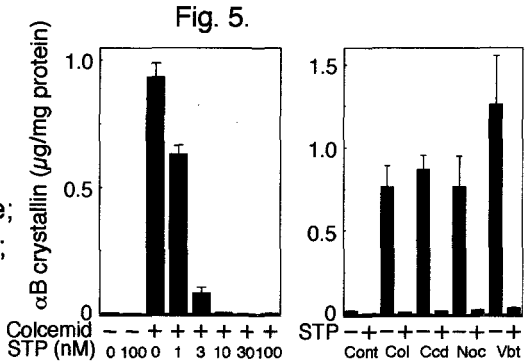


Fig. 5.



Abbreviations

Ap, aphidicolin; Hu, hydroxyurea; Tx, taxol; Co and Col, colchicine; Cd and Ccd, colcemid; Vb and Vbt, vinblastine; No and Noc, nocodazole; As, arsenite; AD and AcD, actinomycin D; STP, staurosporine; CHX, cycloheximide

198 1Bp3 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼβアイソフォームの精製と性質

奥野幸子、木谷隆子、藤澤 仁
（旭川医科大学・第一生化学）

〔要約〕
カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅣ（CaMキナーゼⅣ）とカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅠ（CaMキナーゼⅠ）をリン酸化して活性化するCaMキナーゼキナーゼのアイソフォーム（CaMキナーゼキナーゼβ）をラットの小脳から精製し、その性質を調べてαアイソフォームと比較した。

CaMキナーゼⅣは脳に多く分布する基質特異性の広い多機能性プロテインキナーゼの一つで、カルシウムイオンによる脳の情報伝達機構に重要な役割を担っていると考えられている。最近、我々はCaMキナーゼⅣをリン酸化して活性化する新しいカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ、CaMキナーゼキナーゼが脳に存在することを見い出し[1]、ラットの大脳皮質からCaMキナーゼキナーゼを精製し[2]、cDNAクローニングを行った[3]。ノザンブロット、ウエスタンブロット、免疫滴定などの結果から脳のCaMキナーゼキナーゼには、ラットの大脳皮質から精製しクローン化した酵素（CaMキナーゼキナーゼα）の他にもアイソフォームが存在することが示唆された[3]。そこでラットの小脳を用いてCaMキナーゼキナーゼアイソフォームの精製を試みた。

〔実験方法〕

CaMキナーゼキナーゼの活性測定：40 mM Hepes (pH7.4), 5 mM 酢酸マグネシウム, 0.2 mM〔γ - ^{32}P〕ATP, 0.1 mM EGTA, 0.2 mM 塩化カルシウム, 2 μM カルモデュリン, 2 mM DTT, 40 μM ペプチドγを含む反応液50 μl中に大腸菌で発現させた不活性な組換え型CaMキナーゼⅣ 2 μgとCaMキナーゼキナーゼを加えて30℃で1分間インキュベートし、CaMキナーゼキナーゼで活性化されたCaMキナーゼⅣの活性をペプチドγを基質にして測定した。

昆虫細胞で発現した組換え型CaMキナーゼⅣ、Ⅰの活性化：50 mM Mops (pH7.0), 5 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM DTT, 0.2 mM 塩化カルシウム, 1 μM カルモデュリン, 0.1 mM ATPを含む反応液中に組換え型CaMキナーゼⅣまたはⅠ (15 μg/ml) とCaMキナーゼキナーゼαまたはβ (0.4 μg/ml) を加えて30℃で10分間活性化した後、CaMキナーゼⅣまたはⅠの活性をシンタイド-2を基質にして測定した。

CaMキナーゼⅠおよびCaMキナーゼⅣの組換え型酵素の調製：ラットの大脳皮質のcDNAライブラリーからオリゴDNAプローブを用いてスクリーニングして得たCaMキナーゼⅠのcDNAとラットの小脳のライブラリーから得たCaMキナーゼⅣのcDNAクローン[1]を導入してCaMキナーゼⅠ、Ⅳの組換え型酵素を大腸菌および昆虫細胞、Sf 9で発現させた。この培養液からDE 52イオン交換クロマト、カルモデュリンアフィニティークロマトを用いてCaMキナーゼⅠ、Ⅳを精製した[1,4]。

〔結果と考察〕

免疫滴定の結果からラットの小脳にはCaMキナーゼキナーゼのアイソフォームの含量が高いと推定されたので、大腸菌で発現させた活性の無いCaMキナーゼⅣの活性化を指標にしながら、ラットの小脳からCaMキナーゼキナーゼアイソフォームの精製を試みた。DE52イオン交換クロマト、カルモデュリンセファロースやブルーセファロースのアフィニティークロマト、ゲル濾過等を用いた結果、アイソフォーム（CaMキナーゼキナーゼβ）が約5000倍精製され、800匹のラットの小脳(206g)から37μgの酵素標品が得られた。大腸菌で発現した不活性なCaMキナーゼⅣを活性化する活性で調べると酵素の比活性はCaMキナーゼキナーゼαより、2−3倍高かった。また、精製したCaMキナーゼキナーゼβの分子量はSDS−PAGEで調べるとCaMキナーゼキナーゼαよりわずかに大きく、67 kDaの位置にダブレットのバンドとして検出された。CaMキナーゼキナーゼαの抗体とは反応せず、CaMキナーゼキナーゼ活性でCaMキナーゼキナーゼαの100倍量のβアイソフォームを用いてウエスタンブロットを行ってもCaMキナーゼキナーゼのバンドは検出されなかった。CaMキナーゼキナーゼαはCaMキナーゼⅣをリン酸化して活性化するばかりでなく、CaMキナーゼⅠも同様にリン酸化して活性化することが明らかになっている。そこでβアイソフォームもCaMキナーゼⅠを活性化するかどうかを調べた。図は昆虫細胞で発現したCaMキナーゼⅠとCaMキナーゼⅣをそれぞれ過剰量のCaMキナーゼキナーゼαまたはβとリン酸化条件下でインキュベートした後、CaMキナーゼⅠとⅣの活性を測定した結果を示している。CaMキナーゼキナーゼαとβはCaMキナーゼⅠとⅣ双方を同等に活性化すること、およびCaMキナーゼキナーゼαとβの双方を加えて活性化してもCaMキナーゼⅠとⅣの活性はいずれか一方のCaMキナーゼキナーゼで活性化した場合の活性と変わらないことなどが明らかになり、CaMキナーゼキナーゼαとβは同じ部位をリン酸化してCaMキナーゼⅣとⅠを活性化していると考えられる。

〔文献〕

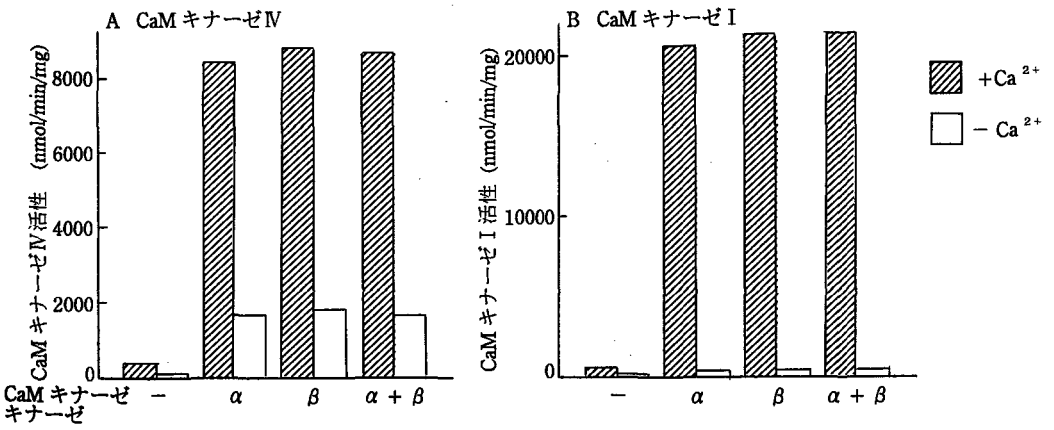
(1) Okuno, S. and Fujisawa, H. (1993) J. Biochem. 114, 167−170

(2) Okuno, S., Kitani, T. and Fujisawa, H. (1994) J. Biochem. 116, 923−930

(3) Okuno, S., Kitani, T. and Fujisawa, H. (1996) J. Biochem. 119, 1176−1181

(4) Kitani, T., Okuno, S. and Fujisawa, H. (1995) J. Biochem. 117, 1070−1075

図1　CaMキナーゼキナーゼα、βによるCaMキナーゼⅣ、Ⅰの活性化



199 標的タンパク質に対する 14-3-3 タンパク質の結合部位

1Bp5

市村 徹、伊藤 美津樹、板垣 千春、堀米 恒好、小俣 三郎、
新開 史子*、瀬田 和夫*、礒辺 俊明*
（新潟大学理学部化学、*東京都立大学理学部生物化学）

〔 要約 〕
大腸菌で発現した14-3-3タンパク質（η鎖）とその変異体を用いて、Raf-1とBcrがん関連遺伝子産物に対する14-3-3の結合部位を解析した。グルタチオンS転移酵素（GST）との融合タンパク質として発現したη鎖またはその変異体と、バキュロウィルス一昆虫細胞で発現したRaf-1またはBcr（1－412）の複合体形成の有無を解析したところ、全長のη鎖、およびη鎖の171-213の構造領域（box-1）を含む変異体のみがこれらのキナーゼと特異的に結合した。box-1領域は、Ca^{2+}／カルモデュリン依存性タンパク質キナーゼII（PKII）でリン酸化されたトリプトファン水酸化酵素（TPH）に対する特異的な結合部位であることが明らかにされている（Ichimura, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28515-28518, 1995）。さらに、GST-ηあるいはbox-1のみを欠損したGST-η（Δbox-1）をラット脳幹抽出液に加えたのち、カルモデュリン存在下でリン酸化処理して生じた複合体の分析から、14-3-3のbox-1領域は、TPH、Raf-1、Bcrをはじめとする多くの標的タンパク質に対する共通の結合部位となっていると推定した。

14-3-3は、酵母からヒトにいたる動植物界に広く分布し、タンパク質のリン酸化反応に依存した細胞内情報伝達系での機能が推定されるタンパク質ファミリーである［2］。このファミリーは、多くの標的酵素・タンパク質と複合体を形成するが、その標的にはRasの上流，下流に位置するがん関連遺伝子や、cdc25ホスファターゼ、イノシトールリン酸3－キナーゼなど、受容体チロシンキナーゼから核に至る情報伝達系の中枢に位置する一連の分子が含まれる。また、Ca^{2+}シグナルに依存して、チロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素、あるいはアクチンの活性を調節することで、モノアミンの合成と分泌を調節している可能性も指摘されている。14-3-3ファミリーは、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化反応に依存した情報伝達系のコーディネーター分子として、細胞応答にかかわる標的分子をリン酸化シグナルに応じて結合し、活性のシグナル伝達複合体を組織化することで、細胞の増殖と分化、細胞周期、細胞の運動や形態変化、あるいは細胞機能にかかわる多彩なシグナルを調節していると推定される。本研究では、14-3-3が関わる細胞内シグナリングの分子機構を理解する目的で、Rasの上流，下流に位置するがん関連遺伝子であるRaf-1とBcrに対する14-3-3の結合部位の同定を試みた。

［材料と方法］

η鎖とその変異体は、既報の方法［1］でGSTとの融合タンパク質として発現した。発現した蛋白質は、グルタチオンセファロースアフィニティークロマトグラフィーとDEAE-5PWイオン交換HPLCで精製した。Raf-1とBcrの第1エキソンコード領域（1－412）は、バキュロウィルス一昆虫細胞（Sf21）で発現した。GST融合タンパク質とRaf-1またはBcrの複合体は、グルタチオンセファロースビーズを加えて沈降して洗浄後、SDSを含む緩衝液に溶解してSDS電気泳動一ブロッティングしたのち、Raf-1またはBcr抗体を用いて化学発光法で検出した。

［結果と考察］

本研究で使用した14-3-3η鎖およびその変異体の構造と、それぞれの標品について行った

Raf-1 とBcr への結合実験の結果をまとめて図1に示した。大腸菌で発現したGST-η鎖は、バキュロウィルス一昆虫細胞系で発現したRaf-1 およびBcr（1-412）と特異的に結合したが、171 以降のC末端領域を欠損した変異体η（1-170）や171-213 のみを欠損した変異体η（Δ171-213；Δbox-1）では結合が認められなかった。一方167-213 のみをからなる変異体η（167-213）がこれらのキナーゼと結合することから、η鎖の171-213 の領域（box-1 と命名）がRaf-1 とBcr に対する共通の結合部位になっていると推定した。box-1 は、PKII でリン酸化されたTPH に対する結合部位でもあることが明らかにされており［1］、その構造は動物から酵母にいたる14-3-3 分子種で高度に保存されている（図2）。また、14-3-3 は、9個のα-ヘリックスからなるサブユニットの2量体で、分子内部に溝をもつ特徴的なグローブ構造をもっているが、box-1 領域はグローブの先端付近の第7－8ヘリックスに位置している［3］。

一方、GST-η あるいはbox-1 のみを欠損したGST-η（Δbox-1）をラット脳幹抽出液に加えたのち、［γ-^{32}P］ATP、カルモデュリン存在下でリン酸化処理して生じた複合体をグルタチオンセファロースで回収し、電気泳動／ラジオオートグラフィー法で分析すると、GST-η に特異的な多くのリン酸化タンパク質が検出された。

以上の結果から、14-3-3 のbox-1 領域は、TPH、Raf-1、Bcr をはじめとする多くの標的タンパク質に対する共通の結合部位になっていると推定した。

［文献］

［1］Ichimura, T. *et. al.* (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 28515-28518.

［2］新開史子、市村徹、礒辺俊明（1996）*蛋白質核酸酵素* 41、313-326.

［3］Liu, D. *et. al.* (1995) *Nature* **376**, 191-194；Xiao, B. *et. al.* (1995) *Nature* **376**, 188-191.

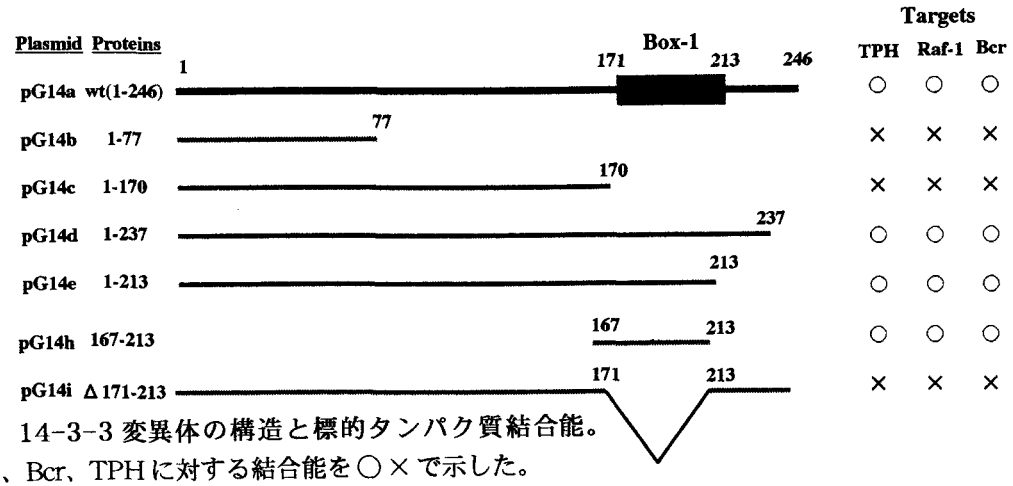


図1．14-3-3 変異体の構造と標的タンパク質結合能。
Raf-1、Bcr、TPH に対する結合能を○×で示した。

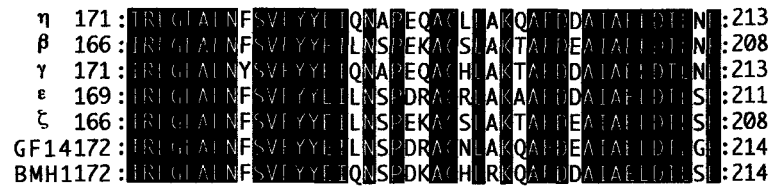


図2．Raf-1、Bcr、TPH に対する14-3-3 の結合部位（box-1）のアミノ酸配列
哺乳類、植物、酵母のサブユニットで保存されているアミノ酸を白抜きで示した。

200 ラット大脳皮質におけるホスホリパーゼCの多様性と調節機構

1E37

宮本 篤、大鹿英世
（札幌医大・医・薬理）

〔要約〕
細胞情報伝達系におけるホスホリパーゼC(PLC)の活性化機構を検討する目的で、ラット大脳皮質膜標品を用いGTP非水解性アナログによるイノシトール三リン酸産生(IP_3)の変化とPLC分子種との関連を検討した。GTPγSは高用量(100μM)によりIP_3産生を促進（４３％）させたが、低用量(10nM)によりIP_3産生を逆に抑制（３１％）した。またGTPγSの高・低用量によるIP_3産生の促進・抑制の両作用は、100μM GDPβSにより阻止された。大脳皮質膜標品には、分子量152 kDaのPLC-β_1と分子量145 kDaのPLC-γ_1蛋白質の豊富な発現が検出された。以上の結果より、GTP非水解性アナログ(GTPγS)は用量によりPLC活性を制御すると考えられ、大脳皮質膜においてG蛋白質を介したPLC活性の二重（促進および抑制）調節機構が存在している可能性が示唆された。

〔緒言〕各種細胞外刺激がイノシトールリン脂質代謝を促進することが明らかとなり、PLCの情報変換酵素としての役割が確立している(1)。PLCには分子多様性が存在し、それらの組織分布や構造の違いからPLC分子種は各々異なった機構で活性化され異なった生理作用を媒介するものと考えられている。PLC活性化機構には、アデニル酸シクラーゼ系との類似性から１）百日咳毒素感受性G蛋白質が関与する経路、２）百日咳毒素非感受性G蛋白質が関与する経路、３）三量体G蛋白質が関与しない経路が存在すること、４）細胞増殖因子受容体チロシンキナーゼによるPLC活性化経路が証明されていることから、その活性化経路の多様性が指摘されている。またPLC活性化機構は、アデニル酸シクラーゼ系との類似性から異なるG蛋白質経路により、その活性が二重調節（促進・抑制）されている可能性が指摘されている(2,3)。本研究ではこの点を明らかにするため、ラット大脳皮質膜標品におけるPLC活性化の調節機構について検討を加えた。

〔実験方法〕実験には、雄性Wistar系ラット（４～６カ月齢）を使用した。動物を断頭屠殺後すみやかに脳を摘出し、大脳皮質を氷上で分割したのち大脳皮質膜分画を既報の方法(4)で調製した。イノシトール1,4,5三リン酸(IP_3)の測定：大脳皮質膜標品におけるIP_3の定量は既報(5)に従いD-myo-IP_3[^{3}H]assay systemにより行った。PLCアイソザイムの検出：既報(6)に従い大脳皮質膜標品におけるPLCアイソザイム(PLC-β_1, PLC-γ_1, PLC-δ_1)の蛋白質発現程度を特異抗体を用いウエスタンブロッティング法で検討した。化学発光法により検出後、レーザーデンシトメーターで解析した。

〔結果と考察〕IP_3[^{3}H]assay systemにより、大脳皮質膜標品でのPLC活性化を反映するIP_3産生を定量したところ、非刺激時において400-500 pmol/mg proteinの範囲で高値を示し、また５分間のインキュベーション下で不変であった。これまでPLC活性測定は、[^{3}H]inositolを前標識したスライスや[^{3}H]inositolを標識した膜標品での解析や、また膜標品と外来性[^{3}H]phosphoinositide substratesでの解析などが行われている(7)。本実験により、大脳皮質膜標品でのIP_3定量が可能

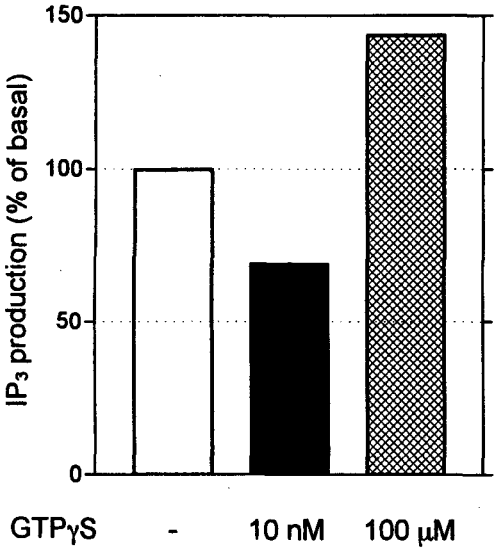


図1　GTPγS（10nM, 100μM）刺激によるIP_3産生の変化（2分間の非刺激時の値を100%で表示し、代表的一例を示す）

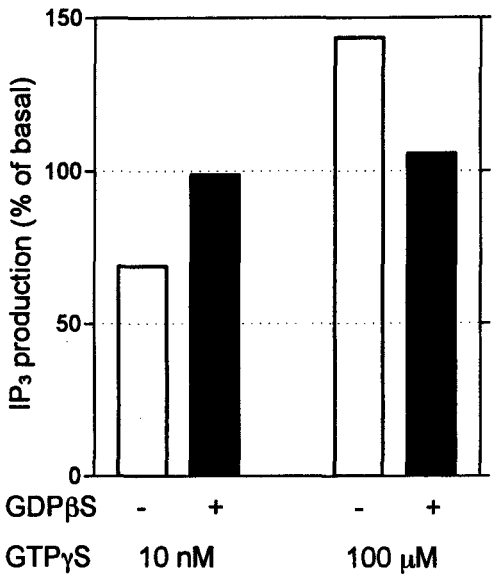


図2　GDPβS（100μM）非存在下・存在下におけるGTPγS（10nM, 100μM）刺激の効果（代表的一例を示す）

であることが確認された。そこで大脳皮質膜におけるPLC活性化のG蛋白質による制御を知る目的で、GTPアナログによるIP_3産生の変化を検討した。GTP非水解性アナログとしてのGTPγSの2分間の刺激は、高用量(100μM)でIP_3産生を促進（43%）させたが、反対に低用量(10nM)でIP_3産生を抑制（31%）した（図1）。またGTPγSの高・低用量によるIP_3産生の促進・抑制の両作用は、100μM GDPβSにより阻止された（図2）。大脳皮質膜標品には、分子量152 kDaの$PLC\text{-}\beta_1$と分子量145 kDaの$PLC\text{-}\gamma_1$蛋白質の豊富な発現が検出された。以上の知見より、GTP非水解性アナログ(GTPγS)は用量によりPLC活性を制御すると考えられ、大脳皮質膜においてG蛋白質を介したPLC活性の二重（促進および抑制）調節機構が存在している可能性が示唆された。したがって、PLC活性化における促進性・抑制性G蛋白質(αおよびβγ)サブユニットおよびこれらG蛋白質との連関におけるPLC分子種の解析が今後の課題である。

〔謝辞〕本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(06670121, 07457022, 08838021)の援助の下に行われた。

〔文献〕(1) Irvine, R. (1996) Nature, 380, 581-583. (2) Litosch, I. (1989) Biochem. J., 261, 245-251. (3) Linden, J. and Delahunty, T.M. (1989) TiPS, 10, 114-120. (4) Miyamoto, A., Araiso, T., Koyama, T. and Ohshika, H. (1990) J. Neurochem., 55, 70-75. (5) Miyamoto, A., Villalobos-Molina, R., Kowatch, M.A. and Roth, G.S. (1992) Am. J. Physiol., 262, C1181-C1188. (6) Miyamoto, A., Kawana, S., Kimura, H. and Ohshika, H. (1994) Eur. J. Pharmacol., 266, 147-154. (7) Claro, E., Sarri, E. and Picatoste F. (1995) Methods in Molecular Biology, Vol. 41: Signal Transduction Protocols, pp177-188, Humana Press.

201 1E38 ニューロブラストーマCell Lineにおけるカルシウム結合タンパクのTNF-αによる発現の調節

山口 知子，神田 尚俊*
(東京女子医大・生化学，*東京農工大・家畜解剖学)

〔 要約 〕

神経細胞サブセットに固有に発現しているカルシウム結合タンパクのカルビンデイン(CB)およびカルレチニン(CR)の機能解析のために，ニューロブラストーマCell Lineにおける発現を検索し，かつ培養液中に添加したTNF-αによる発現の調節について検討した。Cell Lineによって明らかな発現の差が認められ，CBはTGWで，またCRはNB-1 でGOTOあるいはIMR-32よりはるかに多くの発現が認められた。また、これらの発現はTNF-αの添加によって調節を受けていることが明らかとなった。CB やCRはPalvalbuminと共にニューロンのサブセットでの局在が知られており，これらのカルシウム結合タンパクは腫瘍細胞の分化の方向性あるいは腫瘍の起源の指標になる可能性が示唆された。

TNF-αはIL-1β,IL-6 などと共に、炎症性サイトカインとして、細胞浸潤作用をもつことが知られているが、多くの細胞表面に発現しているTNF受容体がクローニングされ、細胞表面ドメインはNGF受容体のスーパーファミリーであることが示された(1)。TNF-αはミクログリア,アストロサイトにおいて産生が認められ、損傷ニューロンや細胞侵襲にたいする防御作用が、カルシウム結合タンパクのCBの発現を促進していることが報告されている(2)。

一方、ニューロブラストーマCell Lineの悪性度の指標にはN-Mycの発現過多との相関が指摘されており、NB-1やTGWに比べて、GOTOやIMR-32ではN-Mycが過剰に発現されている(3)。これらのCell Lineにおけるカルシウム結合タンパクの発現とそれらの発現調節機序を検索することによって、いまだ明らかとされていない、ニューロンのサブセットによって発現の異なるCBやCRの機能の解明のための実験系としてニューロブラストーマの導入を試みた。

[実験方法]

培養方法：MEMに10%FBSを添加した培溶液により、３７℃5%CO_2インキュベーター中で培養した。細胞が接着し十分増殖した時点でTNF-α(PeproTech)を1ng/ml,10ng/ml, 100ng/ml培養液中に加え、さら に4-10日間培養して細胞を集めた。

ノーザンブロット：細胞約１０$^{8-9}$ケから全RNAをIsogen(ニッポンジーン)法によって抽出し、RNA約７－１０mg/laneで泳動し、Hybond-N(アマシャム)に転写して、P^{32}-α-dCTP でラベルしたプローブを用いて、m-RNAのシグナルをフイルム（Kodak BioMax）に感光させ、デンシトメトリーにて測定した。CB のプローブはATCCより購入した1.3kbp、またCRはDr.Marc Parmentierから提供を受けた250bpのプローブを用いた。

細胞数・細胞染色：生存細胞数はトリパンブルー染色により、また細胞染色はカルノア固定により、ギ

ムザ染色した。

[結果・考察]

表1に示されているように，α-Tubulinの発現量当りのCBおよびCRの発現量はニューロブラストーマのCell lineによって，かなり異なている。β-Actin をmRNAのコントロール発現量としなかったのは，比較的調節因子によって発現は変動しないとはいえ，β-ActinはTNF-αによって影響を受けることが知られていることによる。ニューロブラストーマのCell line では，N-Myc のOverexpressionのみられる，GOTOあるいはIMR-32におけるCBおよびCRの発現はあるものの，少ない，一方，CBやCRはNB-1やTGWでよく発現しており，CBはTGWで、またCRはNB-1で最も高い発現が認められた。白血病Cell lineのNamaluwaでもこれらカルシウム結合タンパクの発現が認められたが，正常白血球では発現されていない。

EXPRESSION OF CALCIUM BINDING PROTEINS IN NEUROBLASTOMA CELL LINES

	Expression level / α-Tubulin	
	CALBINDIN	CALRETININ
NB-1	☆☆☆☆	★★★★★
TGW	☆☆☆☆☆☆☆	★★
IMR-32	☆	★
GOTO	☆	★
Namaluwa	☆☆	★★
WBC	—	—

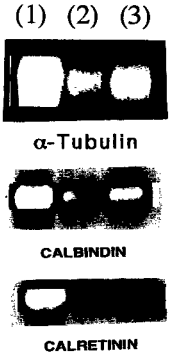


Figure 1. Northern blot patterns of calcium binding proteins and α-tubulin in the cultured NB-1. Cells were cultured in the absence (1) and presence of TNF-α at 1 ng/ml (2) and 10 ng/ml (3) for 7 days after growth were attained . 7-10 μg total RNA/ lane were applied.

図1にはNB-1におけるCBやCRの発現をTNF-α，1 ng/ml(2) および 10 ng/ml(3)で培養した細胞を対照(1)と比較した。NB-1のTNF-αによるCell viablity は100 ng/ml で4日間培養しても，トリパンブルーによる染色では生存細胞数は80%と，よく保たれていたが，CBやCRの発現はかなり減少していた。アストログリア細胞にはTNF-aの高親和性受容体があり、正常細胞ではほとんど発現していないCBがTNF-αによって8倍も増加するという報告がある(3)。TNF-αのミクログリアにおける産生はIL-1やINF-γを介していると言われているが，ニューロブラストーマのように，分化の方向性をコントロールできるといわれている腫瘍細胞についてはどのような抗腫瘍細胞の機構が働いているか興味がもたれる。従来発現の少ないニューロブラストーマCell lineのGOTOやIMR-32ではTNF-αがカルシウム結合タンパクの発現を促進する方向性に作用するとすれば，これらのCell lineでの発現の量ではなく，腫瘍細胞の増殖と分化をどのようにコントロールしているか，他のオンコジーンとの発現の相関を調べることによって，これらカルシウム結合タンパクの神経細胞での発現の方向性がニューロンの特性を決める可能性があるものと思われる。

[文献]

(1) Mallett S, Barcley AN (1991) Immunol Today 12: 220-223
(2) Cheng B, Christakos S, Mattson M (1994) Neuron 12: 139-153
(3) Kohl N, Gee CE, Alt FW (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81: 4940-4944

202 1Bp6 ウアバインによる培養アストロサイトNa,K-ATPaseアイソフォームα1、β1の選択的誘導

松田敏夫、細井理恵、橋本 均、浅野省一、馬場明道
(大阪大・薬・薬理)

〔要約〕
アストロサイトNa,K-ATPaseの機能的なサブユニットアイソフォーム構成を明らかにすることを目的とし、ウアバインによる本酵素活性阻害によるNa,K-ATPase誘導についてサブユニットアイソフォームレベルで検討した。培養ラットアストロサイトをMEM培地でウアバインとインキュベートし、各アイソフォームmRNAをRT-PCR法で測定した。ウアバイン添加6-48時間でα1、β1 mRNAは増加したが、α2、β2は逆に減少傾向を示した。同様な成績は、ウエスタンブロッティング解析でも認められた。ウアバインのα1 mRNA増加作用は、テトロドトキシン、BAPTA-AM、FK506で抑制された。また、モネンシンはウアバインと同様な作用を示した。これらの成績は、ウアバインによるup-regulationにおいてα1/β1サブユニット構成が機能していること、またその機構に細胞内Na^+、Ca^{2+}、カルシニューリン等が関与していることを示唆する。

我々は、アストロサイトNa,K-ATPaseの細胞増殖における役割について検討し、本細胞にα1、α2アイソフォームが存在していること、IGF-I受容体活性化により前者が選択的に誘導されることを、そしてこの現象が細胞増殖に関連していることを報告している(1,2)。Na,K-ATPaseはα、βサブユニットから成るヘテロダイマー酵素で、アストロサイトの本酵素サブユニットにはそれぞれ二つのアイソフォーム(α1、α2、β1、β2)が存在している。しかしながら、それらのアイソフォームの機能的な構成は不明である。一方、多くの細胞系において、本酵素活性の長期阻害により本酵素のup-regulationが起こることが知られている。本研究では、アストロサイトNa,K-ATPaseの機能的サブユニットアイソフォームを解析する目的で、ウアバインによる本酵素up-regulationについて検討した。また、その機構にカルシニューリンが関与している可能性について報告する。

〔実験方法〕
培養ラットアストロサイトの調整(1)、RT-PCRによるmRNAの定量(3)、ウエスタンブロッティング(1)は既報に準じて行った。

〔結果および考察〕
ウアバイン処置によりα1、β1 mRNA量は増加したが、α2、β2 mRNA量は逆に減少した(図1)。ウアバインの作用は0.5-1.0 mMで見られた。低K^+溶液でのインキュベーションもウアバインと同様にα1 mRNA増加作用を示した(図2)。すなわち、アストロサイトにおいてもNa,K-ATPase活性の長期阻害による本酵素のup-regulationが示された。α1 mRNAは血清の存在によっても増加したが、ウアバインの作用は血清の存在、非存在下で見られ、血清とは異なる作用機序によるものと考えられた。ウアバインのアイソフォーム選択的な作用は、蛋白レベルでも認められた。

ウアバインによるα1 mRNA増加作用は、細胞内Na^+の増加を抑制するテトロドトキシン(100 μM)により消失した。また、Na^+イオノフォアであるモネンシン(20 μM)はウアバインと同様にα1 mRNA

増加作用を示した。これらの成績は、本up-regulationに細胞内Na^+が関与していることを示唆しており、この点は他の細胞での報告(4)と一致している。ウアバインのα1 mRNA増加作用は外液Ca^{2+}非存在下でも認められたが、BAPTA-AM(30 μM)で細胞内Ca^{2+}をキレートすると消失した。プロテインキナーゼC阻害薬H-7(100 μM)、チロシンキナーゼ阻害薬ゲニステイン(40 μM)は、ウアバインの作用に影響を与えなかったが、カルシニューリンを阻害する免疫抑制薬FK506(1 nM)はウアバインの作用を抑制した。以上の成績は、ウアバインによるアストロサイトNa,K-ATPase誘導における細胞内Ca^{2+}/プロテインホスファターゼ系の関与を示唆する。

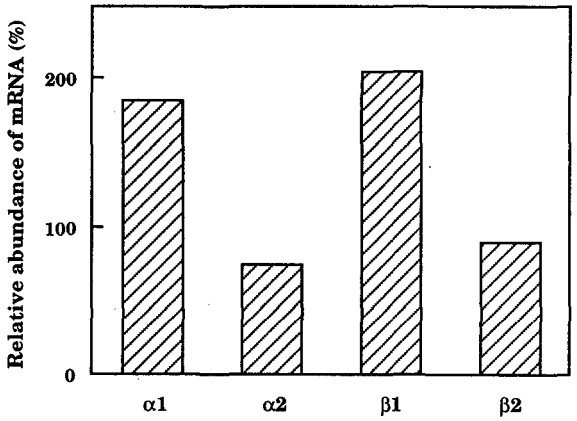


図1. ウアバインのNa,K-ATPaseサブユニットアイソフォームmRNAに対する作用
1 mMウアバイン12時間処置
(2-4例の平均)

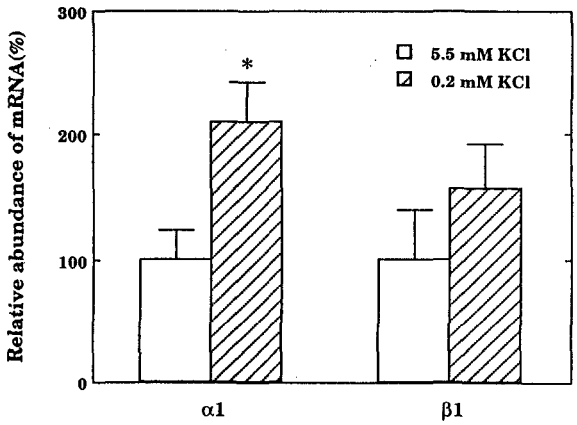


図2. 外液K^+のアストロサイトNa,K-ATPase mRNA量に対する作用
(平均±S.E., n=3-6, *p<0.05)

〔文献〕

1. Matsuda T., Murata Y., Kawamura N., Hayashi M., Tamada K., Takuma K., Maeda S. and Baba A. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 175-182 (1993).
2. Matsuda T., Murata Y., Tanaka K., Hosoi R., Hayashi M., Tamada K., Takuma K. and Baba A. *J. Neurochem.* 66, 511-516 (1996).
3. Kondo K., Hashimoto H., Kitanaka J., Sawada M., Suzumura A., Marunouchi T. and Baba A. *Neurosci. Lett.* 188, 140-142 (1995).
4. Yamamoto K., Ikeda U., Okada K., Saito T., Kawakami K. and Shimada K. *Cardiovas. Res.* 28, 957-962 (1994).

203 1Bp7 プロテインカイネースCによるグリシントランスポーター1bの機能調節

佐藤 康二
(大阪大学医学部・バイオ研・神経解剖)

〔 要約 〕
Human embryonic kidney cell (HEK-298 cell)にマウスグリシントランスポーター1bを発現させ、それをprotein kinase Cのactivatorであるphorbol ester (PMA)で処理すると、グリシントランスポーター1bを介したグリシン取り込みが減少した。この減少は、主にVmaxの低下によるものであった。さらに直接にグリシントランスポーター1b蛋白がリン酸化されている可能性を考えて、protein kinase Cの潜在的リン酸化部位5箇所をpoint mutation法により全て消去したが、その効果は抑制されなかった。このことは、グリシントランスポーター1bは、間接的にprotein kinase Cによって調節を受けていることを示唆している。

〔目的〕
グリシンは，中枢神経系に於いて，グリシン受容体を介した抑制系伝達物質としての役割と、NMDA受容体のコアゴニストとしての役割、そして代謝系においても重要な役割をもっている。グリシントランスポーター1の分布様式は、NMDA受容体のそれと類似しており（1）、シナプス間隙のグリシン濃度を調節することによりNMDA受容体の機能を制御していると考えられている。そこで、HEK-298 cellにマウスグリシントランスポーター1bを発現させ、protein kinase C の activatorであるphorbol ester (PMA; 4α-phorbol 12,13-didecanoate)を用い、グリシントランスポーター1がprotein kinase Cにより制御されている可能性について検討を加えた。
〔実験方法〕
マウスグリシントランスポーター1b cDNAをmammalian expression vectorであるpRC/CMV vector (Invitrogen) にsubcloningし、Human embryonic kidney cell (HEK-298 cells; ATCC)にChen-Okayama法（2）を用いてtransfectした。グリシン取り込み実験は、^{3}H-glycine (Amersham)とトランスポートバッファー(120mM NaCl, 2mM KCl, 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 10mM HEPES, pH7.5）を用いて行った。point mutautionは、oligonucleotide-directed mutagenesis (Bio-Rad Mutanesesis Kit)を用いて行った。
〔結果〕
グリシントランスポーター1bを発現したHEK-298 cellは、コントロールより4-6倍高いグリシン取り込みを示した。またその取り込みは、グリシントランスポーター1の特異的阻害剤であるサルコシン（1mM）によって完全に抑制された（FIG.1）。次にprotein kinase Cのactivatorである PMA のグリシン取り込みに対する影響を検討した。PMAを培養液中に加え、前処理することにより、グリシントランスポーター1b特異的グリシン取り込みは、時間、及濃度依存的に減少し、100nM PMAの1時間処理により最大効果を得た。又この効果は、 protein kinase Cのinhibitorであるstaurosporine (500nM),H7 (500nM) にて完全に抑制された（FIG.2）。Eadie-Hofstee解析によって、この減少は、Vmax値の変化によるものであることが明らかとなった（FIG.3）。更に、この蛋白が、直接にリン酸化を受けている可能性を検討するために、潜在的リン酸化部位5箇所（T19,T276, S239,T590, and S625）をpoint mutaution法によりalanineに変異させた。しかし、いずれのmutationもこの効果を抑制できず、更に同時に5箇所を変異させたmutationを用いても同様の結果であった（TABLE 1）。

〔考察〕

以上の結果よりHEK-298 cellに発現しているグリシントランスポーター1bがprotein kinase Cによって制御されていることが明らかとなり、in vivoでもこのトランスポーターがprotein kinase Cによって制御を受けている可能性が示唆された。また、mutationを用いた検討より、その機序は、蛋白の直接のリン酸化を介するものではなく間接的なものと考えられた。

〔文献〕

(1) Adams, R.H., et al., J. Neurosci. 15 (1995) 2524-2532.
(2) Chen C. and Okayama H., Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2751.

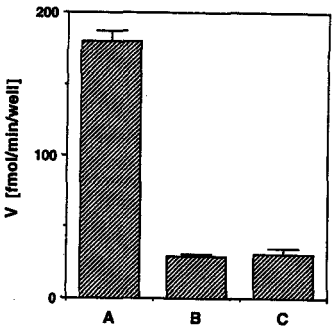


FIG.1. [^{3}H]Glycine uptake into HEK 293 cells. Cells transfected with pGLYT1b (A, C) or pCIS (B) were incubated with 50 n*M* [^{3}H]glycine in the absence (A, B) or presence (C) of 1 m*M* sarcosine. [^{3}H]Glycine uptake was determined after 12 min.

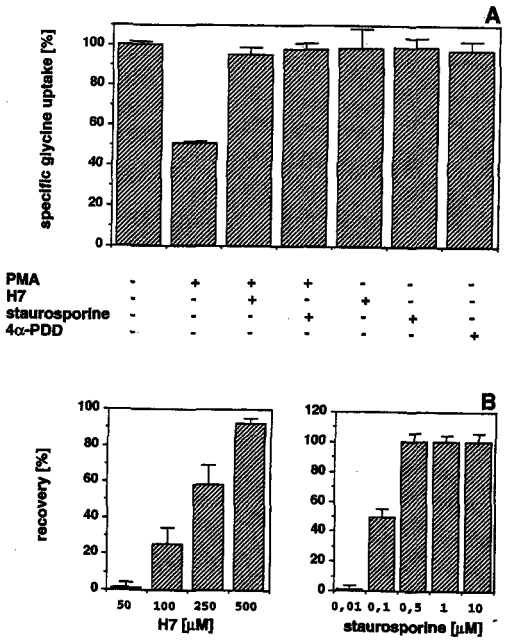


FIG.2. Effects of PKC inhibitors on PMA-modulated [^{3}H]glycine uptake. **A:** Cells were incubated in the presence or absence of H7 (500 μM) or staurosporine (10 μM) for 1 h. Thereafter, 100 n*M* PMA, or 4α-PDD, was added for another hour when indicated, and the specific uptake of [^{3}H]glycine was determined. **B:** Dose–response relationship of staurosporine and H7 on PMA modulation of glycine uptake. Cells were incubated at various concentrations of the kinase inhibitors. PMA treatment (1 h) and [^{3}H]glycine uptake were performed as in A.

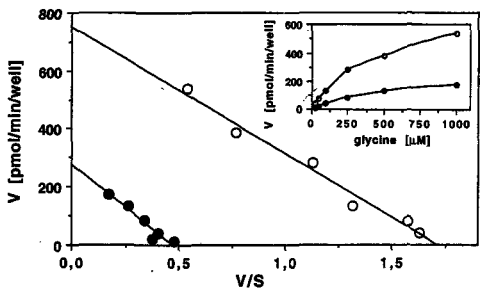


FIG.3 . Inhibition of [^{3}H]glycine uptake by PMA. Saturation characteristics were determined by the addition of unlabeled glycine to 50 n*M* [^{3}H]glycine using both PMA-treated (●) and untreated cells (○). Transport kinetic values were calculated using the Eadie–Hofstee transformation. K_m and V_{max} values obtained in this particular experiment were 439 μM and 751 pmol/min/well (control cells) and 585 μM and 275 pmol/min/well (PMA treated cells). **Inset:** The respective saturation curves.

TABLE 1. *Effect of PMA on [^{3}H]glycine uptake mediated by wild-type and mutant GLYT1b proteins*

cDNA transfected	[^{3}H]Glycine uptake (%)
pGLYT1b	43.5 ± 9 (8)
pGM1	45.8 ± 20 (2)
pGM2	42.0 ± 6 (2)
pGM3	43.4 ± 7 (2)
pGM4	46.5 (1)
pGM1–4	47.4 ± 2 (3)
pGM1–5	55.4 ± 3 (2)

HEK 293 cells were transfected with wild-type or mutant GLYT1b cDNAs, and [^{3}H]glycine transport was determined in control and PMA-treated parallel cultures as detailed in Materials and Methods. All experiments represent quadruplicate determinations of n experiments with the respective standard deviations.

204 1E39 カテコールアミン代謝酵素阻害剤の脳内GTP cyclohydrolase I 活性に及ぼす影響

坂本秀生、藤田 興、池亀 守*、葛谷博磁
(藤田保健衛生大学 総医研 分子生物 *藤田保健衛生大学短期大学 生体機能代行装置学)

〔要約〕 カテコールアミン(CA)の低下はBiopterin(BT)の上昇を、またCAの上昇はBTの低下を引き起こすであろうとの考えを基礎に、雄ウイスター系ラットにα-methyl p-tyrosine (α-MPT)、Fusaric acid (FA)、及びRo 16-6491 (Ro) を投与し、脳のGTP cyclohydrolase I (GCH) 活性およびBT量、Neopterin (NP) 量を測定した。小脳におけるBT量は、全ての阻害剤による結果がこの考えを支持する変化を示した。また線条体ではBT量は、α-MPTにより上昇、FAにより低下した。線条体ではドーパミンニューロンが発達しており、この変化もこの考えを支持した。CA 代謝の変化は、GCH活性よりもBT量への影響が大であった。大脳では殆ど変化は認められなく、その他の部位においても大きな変化は認められなかった。

[目的] GCHはguanosine triphosphate (GTP) から7,8-dihydroneopterin triphosphateを生成する酵素で、tetrahydrobiopterin (BTH_4) 生合成の第一段階の反応を触媒する律速酵素である。BTH_4はチロシン水酸化酵素 (TH) 、フェニルアラニン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素などの補酵素(1)で、カテコールアミン及びセロトニン生合成に重要な物質で、またarginineからの一酸化窒素 (NO) 生合成にも必須な因子でもある。NOは神経伝達物質以外にも免疫系やアポトーシス等、広範に研究されている。本研究では、TH 阻害剤、ドーパミン β-水酸化酵素 (DBH) 阻害剤、およびモノアミン酸化酵素 (MAO) 阻害剤をラットに投与し、脳内のGCH活性、NP量及びBT量の変化を測定し、CA 代謝とBTH_4の生合成との関連を検討する。

[方法] TH 阻害剤はα-MPTを使用し、300 mg/kgを腹腔内注射2時間後に、DBH 阻害剤はFAを使用し、100 mg/kgを腹腔内注射30分後に、MAO 阻害剤はRoを使用し、30 mg/kgを腹腔内注射2時間後に、それぞれ断頭屠殺して脳(大脳皮質、中・間脳、小脳、橋・延髄、線条体、海馬)を摘出した。7週令の雄ウイスター系ラットを、1群7匹を実験に用い、最大値と最低値を除外した5例の平均値を求めた。

臓器は5倍量の50 mM KPB / 1 mM EDTA/0.2 mM PMSF, pH7.0でホモジナイズ後、その12,000 g上清を試料とした。GCH活性は、Sawadaら(2)、及びHatakeyamaら(3)の方法に準じた。即ち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て脱リン酸化後、生成する酸化型NPをHPLC (移動相；10 mM NaPB/1 mM EDTA,

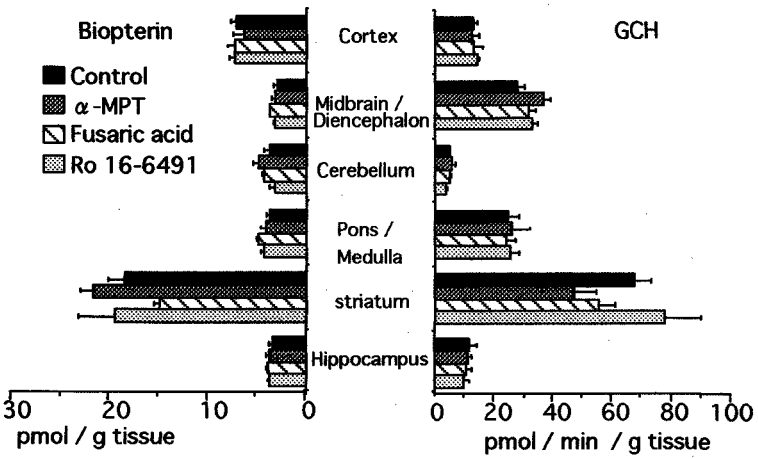


図1 カテコールアミン代謝酵素阻害剤による、脳のGCH活性とBiopterin量の変化

GCH活性はGTPを基質とし生成するNPを、BTは酸化型に転換させた後、HPLCで分析した。

表1　カテコールアミン代謝酵素阻害剤による、脳のGCH活性とBiopterin量の変化率

図1に示された結果を、対照の値を100とした場合の相対値

Tissue		Inhibitor		
		α-MPT	Fusaric acid	Ro 16-6491
Cortex	GCH	94.4 ±20.1	97.8 ±24.0	106.5 ±5.8
	Biopterin	92.3 ±13.2	104.0 ±10.2	105.8 ±5.6
Midbrain / Diencephalon	GCH	129.8 ±8.4	112.6 ±7.6	116.7 ±6.9
	Biopterin	107.8 ±6.4	124.6 ±1.6	108.8 ±3.9
Cerebellum	GCH	116.1 ±11.0	91.7 ±24.1	76.4 ±4.2
	Biopterin	131.8 ±9.2	117.2 ±3.4	87.7 ±11.2
Pons / Medulla	GCH	103.8 ±24.6	97.4 ±11.8	101.0 ±14.4
	Biopterin	111.2 ±10.8	127.2 ±5.4	116.3 ±3.9
Striatum	GCH	70.1 ±14.8	81.5 ±10.0	115.2 ±15.2
	Biopterin	116.9 ±5.6	80.2 ±3.0	104.2 ±19.4
Hippocampus	GCH	93.1 ±14.0	89.5 ±16.3	85.6 ±15.5
	Biopterin	106.8 ±8.9	115.4 ±2.4	108.5 ±4.3

pH 7.0, カラム；DEVELO-SIL-ODS, K-5／野村化学、トライローター／日本分光）で分離し、350 nmで励起し450nmでの蛍光を測定した。BT量、NP量は、酵素反応を行わずに酸化剤を入れ、酸化型にしたのち同条件のHPLCで測定を行った。タンパク質はLowry法により測定した。

[結果]　図1に大脳皮質、中・間脳、小脳、橋・延髄、線条体、海馬の単位組織重量当たりのGCH活性（pmol/min/g wet tissue）及びBT量(pmol/g wet tissue)を示した。表1に対照の値を100とした場合の相対値を示した。脳においては線条体での活性が最高で、小脳での活性が最低であった。BT量も線条体での濃度が最高であったが、小脳ではGCH活性の場合とは少し異なり中・間脳、橋・延髄、海馬での濃度と同じ程度であった。GCH活性とBT量との間には相関は認められなかった。

阻害剤によるGCH活性に及ぼす影響は、中・間脳においてTH 阻害剤及びMAO 阻害剤により上昇傾向を示し、小脳でMAO 阻害剤、線条体においてTH 阻害剤及びDBH 阻害剤により低下が認められた。

BT量に及ぼす影響は、小脳においてTH 阻害剤およびDBH 阻害剤により上昇、MAO 阻害剤により低下の傾向が認められた。橋・延髄ではDBH阻害剤および MAO阻害剤により上昇傾向が認められた。線条体では、TH 阻害剤により上昇、DBH 阻害剤により低下傾向が認められた。その他に、中・間脳および海馬でDBH 阻害剤により上昇傾向を示した。大脳では、GCH活性およびBT量のいずれも殆ど変化が認められなかった。NPは全ての部位において検出できなかった。

表1においては一標準偏差値を考慮して90−110を超えた場合を、原則的に低下あるいは上昇とした。

[考察] TH 阻害剤によりCA量の低下が考えられ、したがってGCH活性およびBT量の上昇が考えられ、中・間脳でのGCH活性の上昇、小脳、線条体でのBT量の上昇という現象で認められる。しかし線条体のGCH活性は反対に低下した。MAO 阻害剤によってはCA量の増加が考えられ、したがってGCH活性およびBT量の低下が考えられ、小脳におけるGCH活性およびBT量の低下という現象で認められる。しかし中・間脳および橋・延髄においては反対にGCH活性およびBT量の上昇という矛盾も認められる。DBH阻害剤によってはドーパミンの上昇とノルエピネフリンとエピネフリンの低下が考えられ、GCH活性およびBT量の上昇と低下が相殺された結果が観察されると推察され、より複雑な変化が予想される。GCH活性は線条体での低下が観察されたのみである。BT量は大脳以外の全ての部位で変化し、線条体でのみ低下し、大脳以外の全ての部位で上昇傾向を示した。線条体ではドーパミンニューロンが発達しており、ドーパミンの上昇による影響と解釈できる。

これまでに述べた考えと矛盾する結果（中・間脳でのMAO阻害剤によるGCH活性の上昇、線条体でのTH阻害剤によるGCH活性の低下等）もある。影響の少ない部位においては、分布するニューロンの種類・量・機能や薬剤に対する感受性の相違等が考えられる。

またBT量の変化する部位の方が、GCH活性が変化する部位より多い。このことは、脳におけるNT量とBT量の相関は必ずしも高くないとの報告(4)及び、THの補酵素はBTH4である事と関係しているかも知れない。

文献　(1) T. Nagatsu et al., JBC. 239 (1964) 2910-2917. (2) M.Sawada et al., Anal.Biochem.154 (1986) 361-366. (3) K.Hatakeyama et al., JBC .264No,36 (1989) 2166-2164. (4) M.Sawada, Pteridines. 6 (1995) 190-193.

205 1Bp8 トリプトファン水酸化酵素の誘導とその細胞内信号変換の解析：プロテアソーム阻害剤による誘導の阻止について

小島雅代，飯田芳子，大黒一哉，長谷川宏幸
（帝京科大・理工・バイオサイエンス）

〔要約〕

RBL2H3細胞(ラット，basophilic leukemia cell line)はIgE(anti-DNP mouse IgE)存在下で培養し抗原であるDNP-BSAを与えると，約2時間後にトリプトファン水酸化酵素の活性の上昇が観察された。また，抗原刺激に代えて，細胞内カルシウム濃度を上昇させる試薬をRBL細胞に与えも，酵素活性は著しく上昇した。この活性の上昇は，合成量の促進による酵素タンパク質の増加によって起こることが本実験より示された。この合成の促進はプロテアソームを阻害するとされるいくつかの試薬によって抑制されるた。また，これらの阻害剤によって，NF-κBにたいする阻害因子I-κBの分解が阻害され留事から，転写因子のNF-κBの関与が示唆された。

はじめに

RBL2H3細胞は，自らセロトニンを合成して分泌顆粒に蓄え，免疫刺激に応答して顆粒放出を行うなど好塩基球および肥満細胞の細胞特性のいくつかを残している樹立細胞株である[1]。我々は，この細胞を末梢性のセロトニン分泌／合成細胞のモデルとして用い，セロトニン生合成経路の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素の細胞内における活性調節機構を研究してきた。本細胞では，この酵素のレベルはATP依存性のタンパク分解（半減時間，15-60分）によって制限されており，その活性は微弱である[2]。従来，セロトニン産生能の増加に関しては，脳で14-3-3タンパク存在下にトリプトファン水酸化酵素のリン酸化が1.8-2.5倍の比活性上昇をもたらすことが知られている[3]。RBL2H3細胞において細胞刺激は，顆粒放出後の回復過程をも促進する可能性があり，このことを念頭において細胞刺激後にトリプトファン水酸化酵素の活性の変化を追跡した結果，細胞レベルでのタンパク質の新規合成による著しい活性上昇機構の存在を初めて観察した。この増加にはプロテアソームの細胞内信号変換過程への関与が示唆された。

材料，方法

培養細胞：RBL2H3細胞は，10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養した。Western blotには抗トリプトファン水酸化酵素抗体または抗IκB抗体を一次抗体として用いた。免疫沈降実験には，これらの抗体を一次抗体として用いた。酵素活性の測定：培養下の細胞をPBS(-)で洗浄し，凍結融解により細胞を破壊した後，Fe^{2+}（50 μM）とDTT（15 mM）による活性化処理を行い，至適条件をあたえる基質溶液を加えて酵素反応を行わせた。

実験結果

1）IgE存在下(0.2 μg/ml)にRBL細胞を培養し，DNP-BSA(0.1 μg/ml)を与えると，約2時間後に酵素活性が上昇し始め，その後4時間で初期値の7倍程度に達した。IgE受容体は細胞内カルシウム濃度を上昇させることが知られているが，細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こすことで知られるいくつかの薬剤，すなわち，A23187(0.08 μM)，thapsigargin(3 μM)，tBuBHQ(10 μM)は2時間のラグタイムの後，数時間上昇という同様のタイムコースを示し，15-25倍に達する活性の上昇を示した（図1）。Western blotによりこのいずれにおいても，酵素活性の上昇はタンパク質量の増加をともなうものであった。この活性上昇はタンパク分解速度の低下によって引き起こされる可能性があったが，活性上昇中のタンパク分解の程

度（半減時間）を測定した結果，分解速度の減少は見られなかった。一方，この活性の上昇はアクチノマイシンDによって阻止されることから新規のmRNAの合成が必要であることを示唆している。

2）プロテアソームおよびカルパインの阻害剤として知られる4種類の合成ペプチド類似体(MG115；10 μM，カルパインインヒビターI；10 μM，カルパインインヒビターII；100 μM，PSI；1.5 μM)の活性上昇にたいする効果を検討した結果，いずれもA23187による活性の上昇を阻止した。このことは，細胞内信号変換カスケードのいずれかの段階でカルパインまたは26Sプロテアソームによるタンパク質分解過程が促進方向に関与することを示している[4]。A23187による刺激に応じて，NF-κBの結合タンパクである IκBの消失が観察される事から，カルシウム濃度上昇からトリプトファン水酸化酵素遺伝子の発現に至る細胞内信号変換過程には，IκB-NF-κB系が介在することが示唆される。タンパク分解酵素阻害剤のMG115存在下に，A23187を作用させた場合には活性の上昇は阻止されるが（図2），このとき，IκBは消失せず，IκBタンパク質の重リン酸化のみが観察された。

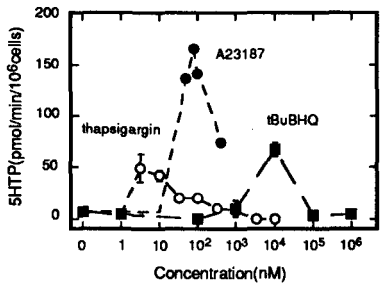


図1 RBL細胞における細胞内カルシウム上昇試薬のトリプトファン水酸化酵素の活性に対する効果：
細胞は図中に示した試薬存在下，6時間培養した。A23187 0.08 μM(●)，thapsigergin 3 μM(○)，tBuBHQ 10 μM(■)で活性が最大になる。

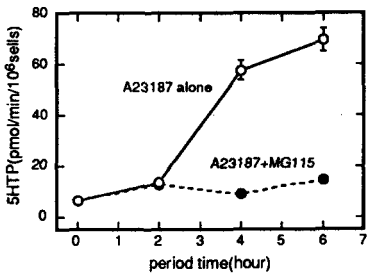


図2 トリプトファン水酸化酵素のカルシウムによる活性上昇におけるタンパク分解酵素阻害剤の効果：
A23187 0.1 μM(○)または，A23187とMG115 10 μM(●)存在下に培養を行った。タンパク分解酵素阻害剤によりカルシウムによる活性上昇は抑制された。

考察

肥満細胞では，免疫刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇が顆粒放出を引き起こすと同時に，トリプトファン水酸化酵素の合成も促進させることが分かった。この活性上昇は，プロテアソームに阻害効果のある試薬によって抑制されることから，細胞内信号変換過程にIκB-NF-κB系が介在することが示唆された。NF-κBの結合する配列はトリプトファン水酸化酵素の遺伝子には見つかっていないが，NF-κBによるmRNAの新規の合成は，カルシウムによる活性の上昇に必要であることが本実験により示された。RBL細胞でのカルシウムの誘導する酵素タンパクの増加におけるシグナル伝達経路の解明は，肥満細胞だけでなく，神経細胞での酵素タンパクの合成経路を明らかにするための重要な手がかりとなるであろう。

文献

1. Kulczycki, A., Jr.; Isersky, C.; Metzger, H. *J. Exp. Med.* 1974 , *139* , 600-16.
2. Hasegawa, H.; Kojima, M.; Oguro, K.; Nakanishi, N. *FEBS Letters* 1995 , *368*, 151-154.
3. Isobe, T.; Ichimura, T.; Sunaya, T.; Okuyama, T.; Takahashi, N.; Kuwano, R.; Takahashi, Y. *J Mol Biol* 1991 , *217* , 125-32.
4. Palombella, V. J.; Rando, O. J.; Goldberg, A. L.; Maniatis, T. *Cell* 1994 , *78*, 773-785.

206 1Bp9 レチノイン酸刺激による白鼠上頸交感神経節内組織トランスグルタミナーゼの誘導

安藤 正人[1,2]・山内 理充[1]・藤田 公和[1]・宮崎めぐみ[2]・永田 豊[1]
([1]藤田保健衛生大・医・生理、[2]愛知学泉大・解剖生理)

[要約] ①コリン作動性の節前神経末端が交感性ニューロンとシナプス結合をする白鼠上頸交感神経節(SCG)を摘出後、牛血清を含む DMEM溶液中でインキュベーションを行う時、レチノイン酸(RA, 50nM)を添加して刺激すると、細胞内可溶性タンパクの架橋反応を促進する Ca^{2+}依存性組織(typeII) transglutaminase(TGase)は、2時間以降から有意な活性上昇が見られ3時間では約3.2倍に達した。RAの異性体の 13-cis-RA (50nM)添加後 3時間でTGase活性は約1.7倍に、またretinal (50nM)添加では約1.5倍に増大する効果がそれぞれ認められた。つまり、これらretinoidsの内RA刺激がSCG内TGaseの活性化に最も有効であった。②RA刺激依存性SCG内TGase の活性増大現象は、actinomycin D(1.0μg/ml)あるいはcycloheximide (10μg/ml)添加によって何れも完全に消失した。また、RA刺激で上昇する節内TGaseの活性化は酵素反応の動力学的解析により、TGaseの見かけのKm値には全く影響を与えずVmax値のみ著明に上昇(約3.3倍) することに起因した現象であった。故に、RA刺激で比較的長時間を要するSCG内TGase の活性化現象は、TGaseのmRNA転写活性の上昇に引き続きde novo の酵素タンパク合成が亢進した結果であることが判明した。 ③予めSCG標本の節前神経線維のdenervationを行い、節前神経末端のWaller変性を生じさせた標本(一週間経過後)、あるいは神経節の節後線維のaxotomyを施行して節内交感性ニューロンの逆行性変性・脱落と非神経細胞成分のグリア細胞の増殖を来たした SCG標本(一週間経過後)では、RA刺激依存性の節内TGase活性の亢進効果は共に殆ど認められなかった。 以上の実験成績から、RAは中枢神経系内で記憶形成やその保持を支えるコリン作動性シナプス伝達能を促進する物質代謝系の調節因子の一つとして積極的に作動し得る可能性が示唆された。

[序] Friedrich らは、シナプス電位の長期増強 (long-term potentiation, LTP)現象が持続している白鼠海馬組織内では細胞質内の至適なCa^{2+}濃度に依存して、可溶性タンパクの架橋反応を促進する酵素の組織(type II) transglutaminase(TGase) が有意に活性化されることを報告している。つまり、LTPに伴う興奮伝達過程で、 神経伝達物質を含むシナプス小胞がシナプス間隙内に遊離される。この際、前シナプスに局在するTGase が活性化されて末端開口部からの内容物の流出を阻止し、さらに分泌された小胞膜の形態的安定化が調節されていると理解されている(3)。一方、レチノイン酸(RA)は、ヒト由来の神経芽腫瘍細胞株の培養液中に添加して作用させると、細胞体からの神経突起の伸展を増大させることから、形態的分化を積極的に促進する生理活性因子の一つとして知られている(7)。 そこで今回は、コリン作動性の節前神経末端が交感性ニューロンとの間に豊富にシナプス結合を持つ上頸交感神経節 (SCG) を成熟ラットより摘出して、 in vitro でインキュベーションを行う時、RAを作用させるとSCG内TGase活性がどのように変動するのか測定した。また、SCGの節前神経切断手術(denervation)を行い節前線維末端のWaller変性を生じさせた標本、あるいは節後神経軸索を切断(axotomy) して節後交感性ニューロンの変性・脱落と周辺グリア細胞の反応性増殖を生じさせた 標本にRAを作用させた時の節内TGase活性の変動を非手術標本の成績と比較して、酵素変動の細胞levelでの局在性を検索した。以上の検討から、コリン作動性シナプス伝達能を支える物質代謝系の調節因子としてRAが積極的に作用している可能性が示唆された。

[実験材料および方法] ①Wistar系成熟白鼠を用い、pentobarbital麻酔下に、既報(1)に従い一側のSCGの節前線維を切断(denervation)し、反対側神経節の節後神経軸索を頭蓋内に入る直前で切断(axotomy)した。術後一週間経過した白鼠より、urethane麻酔下に両側のSCGを摘出し、以下のインキュベーション実験に供した。②牛血清を含むDMEM溶液中に retinoidsを添加した条件でインキュベート(6)したSCG組織内TGase活性値は、Lorandらの方法(4)に従って測定した。

[実験成績および考察] ①RA刺激によるSCG内TGaseの酵素誘導とその調節機序:図1に示すように、摘出SCG標本を含むDMEM溶液(牛血清含有)中にRA(50nM) を添加してインキュベーションを開始すると、刺激後2時間以降から神経節内TGase活性の有意な増大効果が示されて、3時間後では約3.2倍に達した。同様に、RA分子構造のall-trans型からcis型に変換した異性体の 13-cis-RA(50nM)の添加条件(3時間)では約1.7倍の節内TGase活性の上昇が示された。またretinal(50nM)添加では約1.5倍のSCG内TGase活性化効果が見られた。 つまり、これらretinoidsの添加ではRA刺激がSCG内TGaseの活性化に最も有効であった。このRA刺激依存性SCG内TGase の活性増大現象は、核内でのmRNAへの転写過程を阻害するactinomycin D(1.0μg/ml)、あるいはタンパク合成阻害剤のcycloheximide(10μg/ml)の添加によって何れの条件下でも完全に消失した(図2)。 また、酵素反応

の動力学的解析を行うと、RA刺激で上昇する節内TGase活性はTGase酵素分子の見かけのKm値には全く影響を与えずVmax値のみ著明に上昇(約3.3倍)させる効果が認められた。 既に、RA分子は細胞核に分布するsteroid／thyroid hormone を認識する superfamily 受容体の一つであるRA受容体(RAR) と選択的かつ特異的に結合することが明らかにされている(5)。 また、Chioccaら(2)はmacrophageの培養液中にRAを添加すると、刺激後1時間から培養細胞内TGaseを規定する遺伝子発現と連動するmRNA levelが有意に増大することを証明している。従って、今回のRA刺激で比較的長時間を要するSCG内TGaseの活性化現象は、de novo 酵素誘導が TGase の mRNA転写活性の上昇に引き続きタンパク合成が亢進した結果である可能性が強く示唆された。

②RA刺激依存性のSCG組織TGase酵素誘導の細胞局在性: Pedersenら(6)は、RAをマウス脳由来のcell line(SN56)に作用させると、細胞内choline acetyltransferase (ChAT)活性値やChAT mRNA levelの上昇など、RAはコリン作動性の生化学的表現特性を増大することを報告している。 そこで、RA刺激依存性のSCG内TGase酵素誘導の細胞局在を検索した。 予めSCG標本の節前神経線維のdenervationを行い節前神経末端のWaller変性を生じさせた標本(一週間経過後)、 あるいは神経節の節後線維のaxotomy を施行して節内交感性ニューロンの逆行性変性・脱落と非神経細胞成分のグリア細胞の増殖を来たしたSCG標本(一週間経過後)では、RA刺激依存性の節内TGase活性の亢進効果は何れの場合も消失するのが示された(図3)。つまり、SCG内のコリン作動性シナプスがRA依存性TGase活性化を生じる主要な部位であることが示唆された。

以上の実験成績から、RAは記憶形成やその保持を支えるコリン作動性シナプス伝達能を促進する機能的物質代謝系の調節因子の一つとして積極的に作用する可能性が示唆された。

[謝辞] 本研究の一部は、平成７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. (1994) Brain Res. 650:283-288 (2)Chiocca et al. (1988)J. Biol. Chem. 263:11584-11589 (3)Friedrich et al. (1991) Neuroscience 43:331-334 (4)Lorand et al. (1972) Anal. Biochem. 50:623-631 (5)Mangelsdorf et al. (1990) Nature 345:224-229 (6)Pedersen et al. (1995) J. Neurochem. 65:50-58 (7)Shea et al.(1985) Dev. Brain Res. 21:307-314.

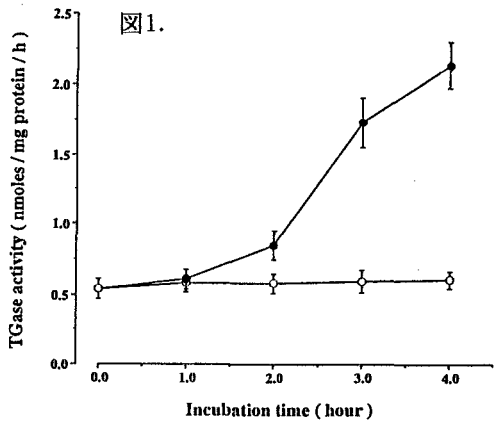
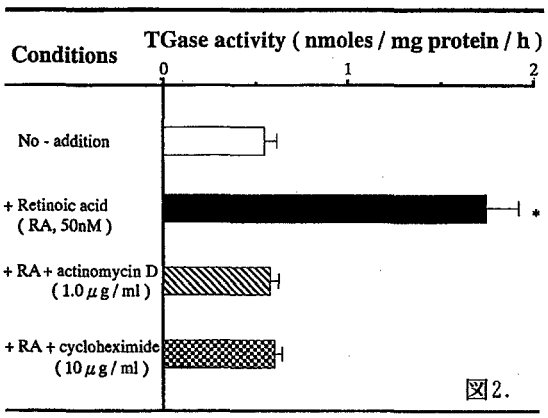
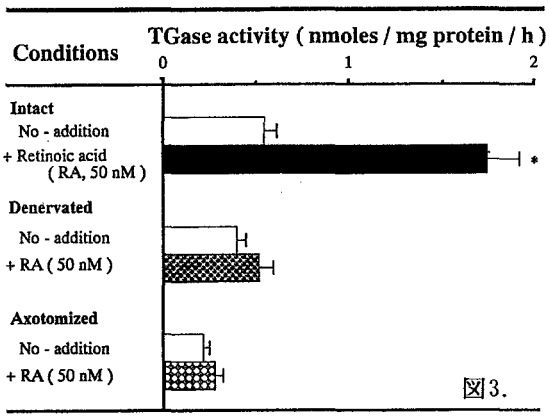


図1. レチノイン酸刺激依存性の摘出SCG内TGase活性化の経時変化(●)
(○:対照値、各値は5例以上の平均値とSD)

図2. レチノイン酸(RA) 刺激依存性の摘出SCG内TGase活性化におよぼすactinomycin Dあるいはcycloheximide添加の効果
(各値は5例以上の平均値とSD、*p＜0.001)

図3. レチノイン酸(RA) 刺激依存性の摘出SCG内TGase活性化 におよぼす節前線維の切断あるいは節後線維切断手術の影響
(各値は5例以上の平均値とSD、*p＜0.001)





207 1E40 マウス神経芽細胞腫N1E-115におけるリポポリサッカライド刺激後のテトラヒドロビオプテリン生合成の変化について

吉田 聡[1]、太田 明[2]、永津俊治[1,2]
藤田保健衛生大学総合医科学研究所[1]分子遺伝学研究部門II神経化学
[2]難病治療共同研究部門

〔要約〕 我々は、マウス神経芽細胞腫N1E-115をリポポリサッカライド (LPS) にて刺激することによりGTPシクロヒドロラーゼI (GTPCH-I) 活性が上昇し、細胞内及び培養上清中のテトラヒドロビオプテリン (BH_4) 含有量が増加することを明らかにした。LPS受容体及び細胞内情報伝達系としてマクロファージ(Mφ)においてはLPS結合蛋白 (LBP) とCD14の関与が指摘されているが、今回のN1E-115についての検討ではLBP及びCD14の関与しない経路が存在する可能性が示唆された。またチロシンキナーゼ (TK) 阻害剤とG蛋白阻害剤を用いた検討では、いずれもLPSによるBH_4含有量の増加が有意に抑制された。この結果から、LPSが賦活化する細胞内情報伝達系にTKとG蛋白の両者が関与していることが示された。

[目的] グラム陰性桿菌による敗血症の際には、菌体より放出されるLPSにより中枢神経系においても脳浮腫を始めとする多彩な臨床症状が出現するが、これらの症状の一部は一酸化窒素 (NO) の過剰産生によるとされている。そこで我々は、NO合成酵素 (NOS) の補酵素BH_4を多く含有し、かつカテコールアミン産生能を有するマウス神経芽細胞腫N1E-115細胞をLPSにて刺激し、その結果生じる細胞内BH_4含有量の増加とBH_4 *de novo* 合成系の律速酵素GTPCH-I活性の上昇を観察し、更にTKとG蛋白の阻害剤を用いることによりLPSの作用機序につき検討を加えた。また、同時に培養上清中のBH_4含有量とNOの代謝産物NO_2とNO_3を測定することによってLPSのNO生合成への影響についても検討した。

[方法] N1E-115細胞は5%ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEMで、10% CO_2存在下で継代培養された。confluencyに達したN1E-115を一旦FCS不含DMEMに交換して24時間培養し、次にLPS及び他の薬剤を添加したFCS不含DMEMに交換して細胞を刺激し、細胞内BH_4含有量とGTPCH-I活性につき以下の検討を行った。(1) 経時的変化、(2) LPS濃度依存性、(3) FCSの効果、(4) GTPCH-IのV_{max}とK_mの測定、(5) TK阻害剤の効果、(6) G蛋白阻害剤の効果、(7) 培養上清中のBH_4含有量とNO代謝物の測定。BH_4濃度は文献 [1]、GTPCH-I活性は文献 [2]、そして培養上清中のNO代謝物含有量は文献 [3] に準拠して測定された。

[結果] (1)細胞内BH_4含有量とGTPCH-I活性は共にLPS投与後3時間から対照に比し有意に上昇し ($P<0.01$)、24時間後に最大となった ($P<0.001$)。従って以下のデータはすべてLPS投与後24時間のものである。(2) FCS添加群、非添加群共に細胞内BH_4含有量とGTPCH-I活性はいずれもLPS濃度に依存して増加が認められたが、その傾向はFCS添加群でより著明であった。(3) LPS刺激によりGTPCH-IのV_{max}は有意に増大したが、K_mは変化しなかった。(4) 受容体型TK阻害剤エルブスタチン (Erb) 並びに非受容体型TK阻害剤ハービマーシン-A (H-A)両者は、LPS刺激による細胞内BH_4含有量とGTPCH-I活性の上昇のいずれも有意に抑制した(Figure 1)。(5) G蛋白阻害剤オキサノシン (Oxa) は、LPSによる細胞内BH_4含有量の増加を有意に抑制したが (Figure 1A)、グアノシンの同時投与により、この抑制は部分解除された (Figure 1)。またOxaはH-Aによる細胞内BH_4含有量抑制を部分解除した。(6) Oxa単独ではGTPCH-I活性に何ら影響を及ぼさなかったが、ErbまたはH-Aとの同時投与により、これらTK阻害剤のGTPCH-I活性阻害作用を抑制した (Figure 1B)。(7) 培養上清中のBH_4含有量は細胞内とほぼ平行した変化を示したが、NO_2並びにNO_3はLPS刺激によっては全く影響されなかった。

[考察] LPSはLBPと結合した形で流血中を運ばれ細胞表面のCD14と結合することによって細胞内TK活性を賦活化し、その結果1 ng/ml以下の低濃度のLPSが様々な細胞内応答を引き起こすことがMφにおいて証明されている。しかるに、N1E-115においては、FCS存在下にても10 ng/ml以上の濃度のLPSで始めて細胞内BH_4含有量やGTPCH-I活性の上昇が惹起されることより、上記Mφとは異なり、CD14を介さない細胞内情報伝達系がLPSにより駆動されている可能性が示唆される。このLPSによりN1E-115細胞に誘導される情報伝達系は、Mφと同様TKの関与するものであるが、今回の我々の実験より受容体型及び非受容体型TK両者がBH_4生合成系に関与することが始めて示された。加えて、LPS刺激が細胞内BH_4含有量の増加に至る道筋にG蛋白の関与する系が介在している可能性も示唆された。以上の所見から、LPSによってリン酸化される蛋白質をN1E-115細胞において同定することが今後の課題であり、その意味でGTPCH-I自身が脱分極によりリン酸化されるという最近の知見 [4] は、極めて示唆に富んでいる。他方、LPS刺激によりNO代謝物が全く変化しなかったことより、N1E-115細胞においてはinducible NOSが活性化されていない或いは十分量が存在していないという可能性も否定できないが、N1E-115細胞内BH_4含有量がconstitutive NOSの二量体形成を安定化させるのに十分量存在している可能性が示唆された。

本研究は梅澤一夫教授（慶応大学理工学部）との共同研究である。

[謝辞] N1E-115細胞を提供して下さいました金沢大学東田陽博教授に深謝致します。

[文献] [1] Fukushima T and Nixon JC (1980) Anal. Biochem. 102 , 176. [2] Sawada M et al. (1986) Anal. Biochem. 154 , 361. [3] Green LC et al. (1982) Anal. Biochem. 126 , 131. [4] Imazumi K et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 , 1409.

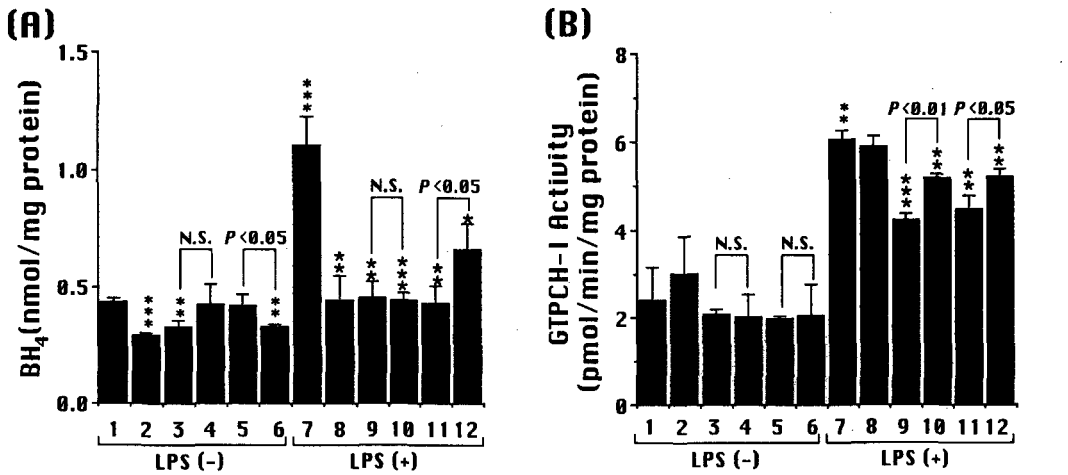


Figure 1. Synergistic effects of oxanosine and erbstatin or herbimycin-A on intracellular BH_4 contents (panel A) and GTPCH-I activity (panel B) in N1E-115 cells. The data are shown in column (mean) with the bar indicating S.D. from three independent experiments. Concentrations of the chemicals are LPS 1 μg/ml; oxanosine 0.3 μg/ml; erbstatin 0.3 μg/ml; herbimycin-A 0.03 μg/ml. BH_4 contents; nmol/mg protein. GTPCH-I activity is expressed as the amount of enzymatically formed neopterin (pmol/min/mg protein). 1, control; 2, oxanosine; 3, erbstatin; 4, oxanosine + erbstatin; 5, herbimycin-A; 6, oxanosine + herbimycin-A; 7, LPS; 8, LPS + oxanosine; 9, LPS + erbstatin; 10, LPS + oxanosine + erbstatin; 11, LPS + herbimycin-A; 12, LPS + oxanosine + herbimycin-A. Asterisks indicate statistically significant difference: $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ (compared with "control"); $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ (compareed with "LPS")

208 2E48 アストロサイトのグルコース代謝に及ぼすインスリンとグルタミン酸の調節作用

浜井 盟子、箕越 靖彦、嶋津 孝
(愛媛大学・医・医化学第一)

〔 要約 〕

インスリンとグルタミン酸が、アストロサイトにおけるグルコース代謝にどのような調節作用を及ぼすかを初代培養細胞を用いて検討した。両作用因子とも、グルコースの取り込み、乳酸産生及びグリコーゲン合成を促進した。しかし、インスリンの作用がphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)の特異的阻害剤であるwortmanninによって抑えられるに対して、グルタミン酸の作用は抑制されなかった。しかも、両作用因子の効果は相加的であった。これらの実験結果は、インスリンがPI3-Kの作用を介してアストロサイトにおけるグルコースの利用を促進するのに対し、グルタミン酸は、インスリンとは異なった細胞内情報伝達機構を介してその作用を発現することを示唆する。

[目的]

中枢神経系におけるエネルギー代謝は、末梢から脳血液関門を通過して供給される酸素とグルコースによって支えられている。アストロサイトは、中枢神経系においてグリコーゲン顆粒を多量に有する唯一の細胞であり、グルコース代謝の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。今回、インスリンと、代表的な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が、アスロトサイトでのグルコース代謝にどのような調節作用を及ぼしているかを調べると共に、両作用因子の細胞内情報伝達機構について検討した。

[実験方法]

胎児令19日のラット脳からトリプシンによって細胞を調整し、ポリイミンでコーテイングしたシャーレ上で培養した。培養液は10%FCSを含むDMEMを用いた。グリア細胞の割合を高めるため、培養細胞を一度別のシャーレに植え換え、細胞がコンフルエントに達した後、実験に使用した。この操作によって、95%以上のアストロサイト初代培養細胞を得ることができた。培地中のグルコース並びに乳酸濃度は、酵素法によって測定した。グルコースの取り込み速度は、トレーサーとして2-[^{3}H]deoxyglucoseを用い、20分間に細胞内に取り込まれたラジオアイソトープの放射活性を測定することによって算出した。グリコーゲン量は、細胞内のグリコーゲンを塩酸で加水分解した後、グルコース量として定量した。グリコーゲンの合成速度は、培地中に[^{14}C]glucoseを添加して、3時間後、グリコーゲンに取り込まれた放射活性を測定する事によって算出した。

[結果]

インスリンとグルタミン酸は、共に用量依存的にアストロサイトにおけるグルコースの取り込みを促進した。両作用因子は、培地中の乳酸濃度及び細胞内のグリコーゲン含量も増加させた。[^{14}C]glucoseを用いてグルコースからのグリコーゲン合成速度を調べたところ、インスリンとグルタミン酸は共に、グルコースからのグリコーゲン合成速度を約2倍に亢進させた(Fig. 1と2)。

グリコーゲン合成に及ぼすインスリンとグルタミン酸の促進作用が、どのような細胞内情報伝達機構を介しているかを明らかにするため、PI3-Kの特異的阻害剤であるwortmanninの効果を調べた。インスリンによるグリコーゲン合成の促進作用は、末梢組織の場合と同様にwortmanninの添加によってほぼ完全に阻害された。しかし、グルタミン酸の促進作用は若干低下するのみであった(Fig. 1)。さらに、インスリンとグルタミン酸を同時に作用させ、アストロサイトのグリコーゲン合成活性に及

ぼす影響を調べたところ、その作用は相加的であり、対照と比べて約４倍に亢進した(Fig. 2)。

[考察]

アストロサイトは、神経細胞から分泌されたグルタミン酸を取り込み、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の不活性化に関わっていることが知られている。またアストロサイトは、グリコーゲン顆粒を有し、中枢神経系におけるグルコース代謝の調節に重要な役割を果たしている。最近、グルタミン酸が、トランスポーターを介してアストロサイトに取り込まれた後、アストロサイトでのグルコースの利用を促進することが報告された(1)。しかし、細胞内に取り込まれたグルタミン酸が、どのような細胞内情報伝達機構を介してグルコース代謝を活性化するかは、全く明らかにされていない。

一方、インスリンは、末梢組織においてグルコース代謝の調節に関与する代表的なホルモンであり、細胞内での作用伝達機構が最もよく研究されている。インスリンは、インスリン受容体のチロシンをリン酸化した後、IRS-1 を介して PI3-K を活性化し、GLUT4 グルコース輸送体の細胞膜へのトランスロケーションを刺激することによってグルコースの利用を促進するとともに、グリコーゲン合成を亢進させる。近年、インスリンは、末梢組織と同じくアストロサイトでのグルコースの利用も促進することが明らかとなった(2)。しかし、アストロサイトにはGLUT4が存在せず、グルコースの利用を促進する分子機構について不明な点が多い。

そこで本研究では、アストロサイトでのグルコース代謝に及ぼすインスリンとグルタミン酸の制御機構を明らかにする目的で、PI3-K の特異的阻害剤である wortmannin の効果を調べた。その結果、インスリンの作用は wortmannin によって抑制されたが、グルタミン酸の作用はほとんど阻害されなかった。しかも、インスリンとグルタミン酸の作用は相加的であることが判明した。これらの実験結果から、インスリンは、末梢組織への作用と同じく、PI3-K の働きを通じてグルコースの利用を促進するが、グルタミン酸はインスリンとは全く異なる伝達機構を介してグルコースの利用を高めることが示唆される。最近我々は、ノルエピネフリンが細胞膜上のグルコース輸送担体を活性化して末梢組織でのグルコースの利用を促進することを見出し、インスリンとは異なったグルコースの利用促進機構の存在を明らかにした(3)。中枢神経系においても、グルコース代謝の活性化に多様な調節機構が関わっていることは、本研究結果からも明らかであり、今後、グルタミン酸の作用を中心にアストロサイトにおける細胞内情報伝達機構を分子レベルで明らかにして行く予定である。

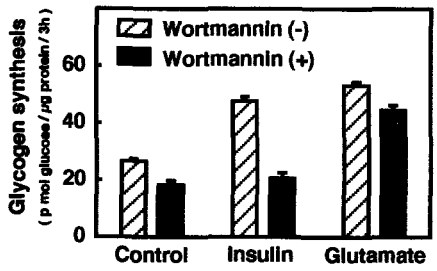


Fig. 1. Effect of wortmannin on incorporation of [U-^{14}C]-glucose into glycogen.

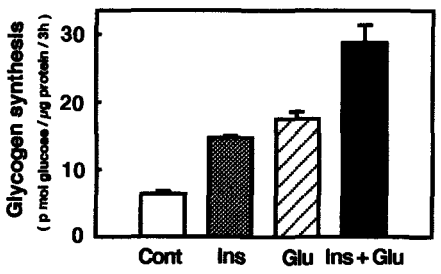


Fig. 2. Additive effect of insulin and glutamate on the incorporation of [U-^{14}C]-glucose into glycogen. Cont : control, Ins : insulin (1μM), Glu : Glutamate (1mM)

[文献]

(1) Pellerin, L. and Magistretti, P.J. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91 : 10625-10629
(2) Clark, D.W., et al. (1984) J Biol Chem 259 : 11672-11675
(3) Shimizu, Y. et al. (1996) Biochem J 314 : 485-490

209 2E49 視床下部腹内側核 - 交感神経系による肝グリコーゲンの分解とグルコースの生成：in vivo microdialysis による検討

高橋 章、 石丸 裕久、 五十嵐 康、 岸 栄子、 丸山 悠司

群馬大学医学部、神経精神薬理学（ツムラ）

〔 要約 〕

視床下部腹内側核 (VMH) 並びに肝神経電気刺激の肝グリコーゲン分解に対する効果を、麻酔下に in vivo microdialysis の手法を用い、肝 の daialyzate 中のグルコース、ノルエピネフリン (NE) の変化を解析するとともに血中のグルコース濃度を測定することにより検討した。 VMHの刺激は肝からのグルコース output と NE の outflow を増加させ血糖値を上昇させた。 また、肝神経の刺激でも同様の効果が得られた。 肝神経刺激のグルコース output、 NE outflow と血糖に対する作用は、副腎と膵臓を摘除しても失われなかった。 この刺激によるグルコース output と 血糖値の増加は α-antagonist の Phentolamine あるいは phospholipase A2 の阻害剤である Quinacline によって減弱した。 この結果は、肝神経刺激によるグリコーゲン分解の亢進が α-adrenergic 作用を介し eicosanoids が関与することを示している。 またこれらの成績から、 VMH - 交感神経系が肝のグルコース代謝を直接的に調節することが明確にされたとともに、ここで用いた手法が従来よりも生理的に近い条件下で肝の代謝を解析するのに有効かつ簡便な方法であることが示された。

視床下部が自律神経の中枢として代謝の調節に深く関わっていることはよく知られている。 視床下部の中でも腹内側核 (VMH) は交感神経系の中枢と考えられる神経核であり、この代謝調節に重要な役割を果たしている (1)。 肝のグリコーゲンの分解もこの調節下にある (1)。 また、肝に分布する交感神経の刺激が肝グリコーゲン分解を促進してグルコースの生成を高めることが肝の灌流実験などから明らかにされている。我々は、 VMH－交感神経の肝のグリコーゲン分解とグルコースの生成に及ぼす作用をより鮮明かつ直接的に示すため、in vivo microdialysis の手法を用い、肝に microdialysis の probe を挿入、留置して、VMH 並びに肝神経を刺激し、肝からのグルコース output と肝を支配する交感神経の活動を、dialyzate 中のグルコース、NE の濃度から解析した。

[方法]

雄性 Wistar rat を用い pentobarbital 麻酔をして採血用の心臓カテーテル を挿入後、開腹下、肝の左葉に 2本の microdialysis probe、透析膜長 10 mm、直径 0.5 mm (CMA 20, Carnegie Medicine) を挿入、留置し、それぞれ Ringer solution を 2μl/min にて送液し、dialyzate 中のグルコース、NE の basal level が安定するのを待ち、2時間後に10分ごとの sampling を開始し、VMH あるいは肝神経を刺激した。 また、副腎と膵摘除は、肝に probe を挿入する直前に実施した。 VMH には一週前に双極の電極を挿入しておき、50 Hz, 10 V, 持続時間 0.3 ms の矩形波パルスにて 1分毎 20秒間の刺激を 10分間行った。 肝神経の刺激は開腹後、プラチナ線の双極電極を肝動脈周囲にかけ 20 Hz, 20 V, 持続時間 2ms の矩形波パルス 1分毎 20秒間の刺激を 10分間行った。 Dialyzate 中の NE は HPLC-ECD システム (2)、Dialyzate 及び血漿中のグルコースはグルコースoxidase 法にて測定した。

[結果と考察]

VMH の刺激は血漿中のグルコース、dialyzate 中の グルコースとNE 濃度を増加させた (Fig. 1)。 NE outflow の増加は VMH の刺激によって直ちに増加し、刺激中の dialyzate (10 min) で最も高い値が得られ、刺激直後より減少した。 Dialyzate グルコースは 10 - 20 min の間で peak に達し、しだいに減少した。 Dialyzate グルコース及び NE の basal level は 0.307 ± 0.024 mg/ml, 2.38 ± 0.45 pmol/25μl dialyzateであった。

肝神経の刺激でもほぼ同様な結果が得られ、血漿及び dialyzate グルコースと NE 増加の peak 値は、それぞれ、1.112 ± 0.047 mg/ml (10 min), 0.221 ± 0.011mg/ml (20 min), 0.461±

0.058 pmol/25μl dialyzate (10min)であった。 副腎及び膵摘除をした場合には、程度が異なるものの Fig. 2 に示すように肝神経刺激によるそれぞれについての増加が認められた。副腎及び膵摘除では dialyzate NE の basal level が 2.5 倍にも高くなっていた。 これは、糖の恒常性維持での自律神経系による一種の代償作用と考えられる (3)。
この神経刺激の血漿及び dialyzate 中のグルコースの増加は Phentolamine , Quinacline の投与によって減弱した。しかし、dialyzate NE の増加は Quinacline の投与によっては変化せず、Phentolamine の投与では刺激による 増加は大きくなった。

これらの結果は VMH-交感神経系がその支配神経を介し、肝のグリコーゲン分解とグルコース生成を促進することを直接的に立証するものである。 また、ここで用いた系は、従来の人工灌流液を用いる灌流系に比して、より生理的条件に近く、肝など臓器での代謝の解析に簡便な実験系である。

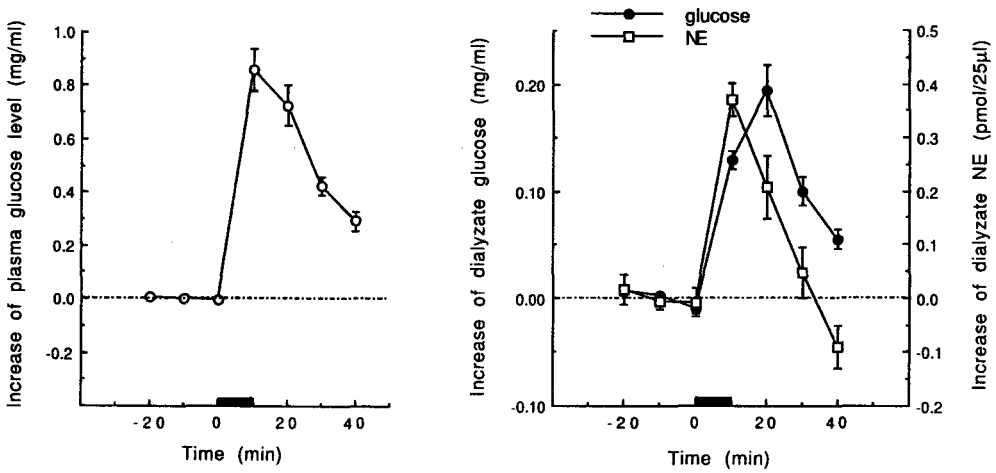


Fig. 1 Effects of VMH stimulation in intact rats.

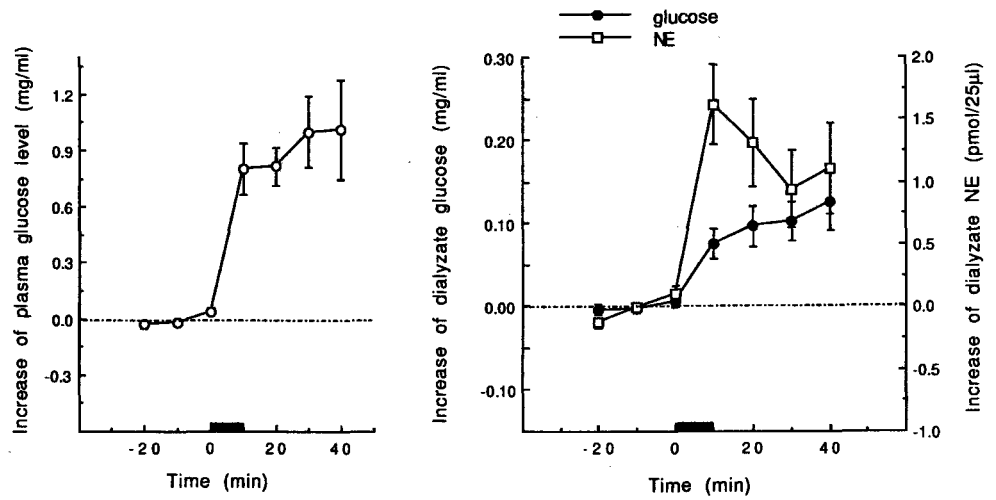


Fig. 2 Effects of hepatic nerve stimulation in pancreatectomized- and adrenalectomized rats.

[文献]

1) T. Shimazu, Neuronal control of intermediate metabolism, S.L.Lightman, and B.J.Everitt .(Eds), 304-330, Oxford, Blackwell (1986)
2) A. Takahashi, H. Ishimaru, Y. Ikarashi, E. Kishi, Y. Maruyama, Brain Res. 665, 13-17 (1994)
3) A.Takahashi, Y. Ikarashi, H. Ishimaru, Y. Maruyama, Life Sciences 53, 1567-1572 (1993)

210 3Dp2 脳内ブドウ糖・グルタミン酸代謝へのインスリンの効果 －[1-^{13}C]-ブドウ糖投与での ex vivo ^{13}C-MRS による検討－

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] ^{13}C-ブドウ糖由来の ^{13}C が、脳内遊離アミノ酸、特にグルタミン酸へ組み込まれる過程へのインスリンの効果についてラットを用いて検討した。ラットにケタミン麻酔下で、^{13}C-ブドウ糖を静脈内投与(1g/kg) し、血糖値の経時変化を調べると、無麻酔の場合に比べ、投与後のいずれの時点でも高値を示した。血中インスリン濃度は、ブドウ糖投与後、無麻酔では15分後に約 3倍に増加していたが、麻酔下では、ブドウ糖投与後 30分までは全く変化が認められず、60分後で 1.6倍に増加していた。このことから、ケタミン麻酔がインスリン分泌を抑制し、血糖低下を抑制したものと考えられた。無麻酔、麻酔の両群で、マイクロウエーブ処理した脳より、除タンパク分画を得、MRS 分析したところ、脳抽出分画に含まれる ^{13}C-ブドウ糖量は、血中ブドウ糖量に比例して、麻酔群では、無麻酔群より高値を示していた。しかし、脳内遊離グルタミン酸への ^{13}C の組み込み量は、麻酔群で、ブドウ糖投与後のいずれの時点でも、無麻酔群に比べ減少していた。そこで、麻酔群にインスリンを投与したところ、ブドウ糖投与後 7.5, 15, 30 分で脳内グルタミン酸への ^{13}C の組み込み量は増加した。無麻酔のラットにインスリンを投与した場合も、グルタミン酸への ^{13}C の組み込み量が増加した。これらの結果より、インスリンは脳内で、ブドウ糖からの TCA 回路を介したグルタミン酸への組み込み速度を増大していることが明らかとなった。

[はじめに] ケタミン麻酔によって血糖値が上昇すること[1]、ペントバルビタール麻酔によってラットで血液脳関門を介してのブドウ糖輸送が減少すること[2] 等が知られている。一方、血液脳関門部での毛細管内皮細胞にブドウ糖輸送担体 GluT 1 が存在し、促進拡散によってブドウ糖が脳細胞外液に移行すること、脳の細胞には GluT 3 が存在していること[3] も知られている。また、脳組織はインスリン非依存性であると考えられてきたが、培養系神経細胞、グリア細胞又は内皮細胞にインスリンレセプターが存在する[4] との報告もある。一方、^{13}C でラベルされたブドウ糖を静脈内投与した後、経時的にラット脳内遊離アミノ酸への ^{13}C の組み込み量を NMR にて測定することによって、血中ブドウ糖からアミノ酸が合成される速度を知ることができる。そこで、^{13}C-ブドウ糖由来の ^{13}C が、脳内遊離アミノ酸へ組み込まれる速度に与えるインスリンの効果について ex vivo ^{13}C-MRS 法により検討した。

[方法] Sprague Dawley 系の生後 6 週令の雄ラットを前日午後5時より絶食にし、翌日午後1時より実験を開始した。ラットを、1) [1-^{13}C]ブドウ糖のみ投与、2) [1-^{13}C]ブドウ糖投与前 30分に麻酔薬(体重 1kg 当たり 37.5mg のケタミンと5mg のキシラジン)を筋注投与、3) [1-^{13}C]ブドウ糖投与前 30分に麻酔薬とインスリン(ヒューマリン R 注, U-100; シオノギ製薬)を 10U/kg 皮下投与、4) 無麻酔下で[1-^{13}C]ブドウ糖投与前 30分にインスリンを投与、の4群に分けた。それぞれの群に尾静脈から体重 1kg 当たり 1g の [1-^{13}C]ブドウ糖を投与した後、7.5, 15, 30, 60 分後に、心採血を 1ml 行い、その直後にラットの頭部にマイクロウエーブを照射し瞬時に脳を固定した。その後、脳よりアミノ酸分画を抽出し、MRS 分析を、昨年報告した方法[5,6] に従い行った。血糖値は、血漿を用いグルコース CII テストワコー(和光純薬工業社製)で、血中インスリン濃度は、血清を用いグラザイムインスリン；EIA テスト(同社製)で、それぞれ測定した。

[結果および考察] 無麻酔群、麻酔群のラットに 1g/kg のブドウ糖を静注したときの血糖値及び血中インスリン濃度の経時変化を(図-1)に示した。無麻酔群では、ブドウ糖投与に伴い血中インスリン濃度が上昇し、ブドウ糖投与後 15分では、投与前に比べ 3倍 (12.99 μU/ml)に上昇していた。血糖値はブドウ糖投与後 7.5分で 400mg/dl を示し、その後急速に低下し、60分後には投与前の値に戻った。麻酔群では、ブドウ糖投与に伴う血中インスリン濃度の変化は、30分後までは上昇は見られず、60分後に 1.6倍に増加するにとどまった。一方、血糖値はブドウ糖投与後 7.5分で 481mg/dl を示し、徐々に低下し、60分後でも 302mg/dl を維持した。血中ブドウ糖中に含まれる[1-^{13}C]ブドウ糖の濃度 (fractional enrichment; F.E.) の経時変化は、無麻酔、麻酔両群とも同様で、^{13}C-ブドウ糖 投与後 7.5分(78%)から 15分(68%)にかけてやや減少し、その後はほぼ一定の値を示していた(60分後で60%)。麻酔群の F.E. の値は、経時変化のどの時点においても無麻酔群の値より高い(約 1.1倍)傾向を示した。脳

抽出液中に含まれる ^{13}C-ブドウ糖量は、血糖値に対応して、麻酔群において経時変化のどの時点でも、無麻酔群より高値を示していた(表-1)。一方、脳内遊離グルタミン酸の 4位への ^{13}C の組み込み量の経時変化を見ると、麻酔群では、無麻酔群に比べ、7.5, 15分後で約 70%、30分後で約 80%であった。そこで、無麻酔、麻酔の両群にインスリンを投与し、脳内遊離アミノ酸への ^{13}C の組み込み量の変化を検討した(表-1)。ブドウ糖の 1位にラベルされた ^{13}C は、脳の細胞内で解糖系、TCA 回路を経て α-ケトグルタル酸(α-kg)よりグルタミン酸の 4位へ組み込まれ、ついで 4位ラベルのグルタミン、2位ラベルのGABA が合成される。α-kg が TCA 回路を一巡すると、2位と 3位がラベルされたオキザロ酢酸になり、それから、2位、3位ラベルのアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミンが合成される。麻酔下にインスリンを投与すると、血糖値の変化は無麻酔下にインスリンを投与した場合とほぼ等しく、脳内遊離アミノ酸への ^{13}C の組み込み量も、著しく回復した(表-1)。

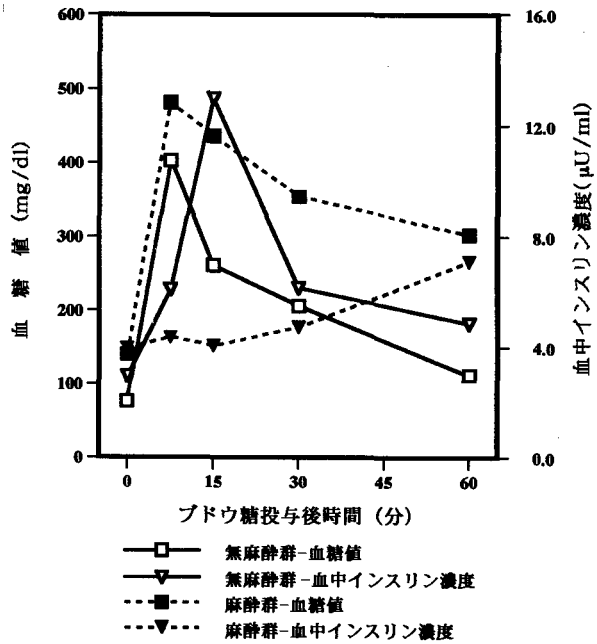


図-1：無麻酔群、麻酔群の[1- ^{13}C]-ブドウ糖静注後の血糖値及び血中イスリン濃度の経時変化

以上の結果より、1) ケタミン麻酔によってインスリンの分泌が抑制され、血糖値が上昇するが、脳内遊離アミノ酸への ^{13}C の組み込み量は減少する、2) 脳においても、インスリンによってブドウ糖からの脳内遊離アミノ酸合成の速度が上昇すること、が明らかとなった。

ケタミン麻酔によって、脳内 ^{13}C ブドウ糖量は増加しているにもかかわらず、遊離アミノ酸への ^{13}C の組み込みが減少しており、それらが、インスリン投与によって回復していること、また、^{13}C NMR で測定されるブドウ糖は脳細胞外液中のものであり、細胞内ブドウ糖量はゼロに等しいと考えられる[7]ことから、インスリンはグルタミン酸代謝の大きなプールをもつ神経細胞に主に作用して代謝促進をしているものと考えられた。

表-1：各実験群における[1-^{13}C]-ブドウ糖投与後の脳内遊離アミノ酸への ^{13}C の組み込み量の経時変化

時間(分)	7.5				15				30			
			インシュリン投与				インシュリン投与				インシュリン投与	
	無麻酔	麻酔	無麻酔	麻酔	無麻酔	麻酔	無麻酔	麻酔	無麻酔	麻酔	無麻酔	麻酔
GABA-2	4.39	2.26	3.44	4.09	5.20	4.48	6.82	9.66	10.83	10.36	7.32	9.68
Gln-3	1.65	0.72	0.81	1.02	4.11	2.26	3.74	8.18	8.35	3.42	13.16	14.42
Gln-4	7.94	4.36	9.31	12.96	14.06	9.01	18.54	20.42	18.13	14.53	25.99	26.88
Gln-2	2.90	1.08	1.89	3.85	6.08	3.46	7.05	12.91	12.88	5.00	18.96	17.64
Glu-3	10.70	2.25	10.96	11.59	24.59	11.95	26.71	31.37	43.79	25.73	44.51	50.07
Glu-4	47.83	35.82	55.52	66.15	61.50	44.23	81.16	92.77	76.66	63.16	74.93	84.45
Glu-2	11.51	3.51	9.17	10.36	22.79	11.46	27.82	33.57	39.55	24.06	48.26	43.68
Asp-3	6.12	3.91	7.02	6.65	9.66	6.43	12.24	19.08	14.54	11.98	23.27	26.15
Asp-2	6.03	3.99	5.57	6.24	8.77	5.95	10.13	15.53	13.74	11.45	21.16	22.56
β-Glc-1	39.53	45.26	29.20	36.44	42.24	54.32	19.44	6.63	18.56	23.70	2.33	3.76

Glu: グルタミン酸、Glu: グルタミン、Asp: アスパラギン酸、β-Glc-1: β-ブドウ糖、-2、-3、-4 は各位炭素

[文献] 1) R. J. Fragen et al. (1986) Advances in Anesthesia 13, 2) A. Gjedde et al. (1980) J Neurochem 35, 1382-1387. 3) D. A. Pelligrino et al. (1992) J Cereb Blood Flow Metab 12, 887-899. 4) D. G. Baskin (1987) Ann Rev Physiol 49, 335-347. 5) 金松知幸他 (1995) 神経化学 34, 92-93. 6) 金松知幸他 (1995) ^{13}C 医学 6, 20-21. 7) R. Gruetter et al. (1996) J Cereb Blood Flow Metab 16, 427-438.

211 脳タンパク質の多次元HPLC-ESI/MSによる分子解剖

2Aa6

瀬田和夫[1,2]、礒辺俊明[1]、中山洋[1]、新開史子[1]、山口美保子[2]、
金井みち子[2]、徐紅[2]、奥山典生[1]
([1]東京都立大学理学部化学科生物化学、[2]サーモクエスト)

〔 要約 〕

我々は短時間に複雑なタンパク質組成をもつ脳試料を効率よく分離すると同時に、各タンパク質の精密な分子量測定から翻訳後修飾を含む配列分析、さらにはデータベース検索により各タンパク質の同定などを行う事ができる総合的な分析システムの構築をめざしている。そのために、まずタンパク質を高分解能で分離できる多次元ＨＰＬＣ法を確立し、さらにその検出器としてエレクトロスプレイイオン化/イオントラップ型質量分析計（ESI/ITMS）をオンライン結合したシステムを使用して、ラットやウシ脳の可溶性画分の多種多様なタンパク質のマッピングと各タンパク質の高精度分子量測定、翻訳後修飾を含む配列分析、さらにはデータベース検索を利用した各タンパク質の同定など脳タンパク質の分子解剖を行った。

[方法]

図１に示すように、ＨＰＬＣとしては４種類の異なる分離モードのＨＰＬＣカラムをカラムスウィッチングおよびタンデムカラム方式で連結した。ここで、Column Ａは陰イオン交換HPLCカラム，Column Ｂはトラップ用C8逆相系カラム，Column Ｃはガードカラム，最後にColumn Ｄとして分析用C18逆相系カラムである。この多次元ＨＰＬＣタンデムカラムシステムの検出器として、図１に示したように、エレクトロスプレーイオン化イオントラップ型質量分析計(ＬＣＱ，Finnigan MAT)を使用した。このＨＰＬＣ-ESI/ITMSシステムにウシあるいはラット脳の可溶性画分を直接注入し、オンライン２次元ＨＰＬＣによる脳タンパク質の分離と同時に、ESI/MSシステムによる各タンパク質の検出、同定、解析等を行った。

[結果と考察]

図２上段には陰イオン交換ＨＰＬＣにおけるウシ脳のクロマトグラムを示し、図２下段には陰イオン交換ＨＰＬＣによって分離された各ピークをそれぞれタンデム逆相カラムにより更に多次元的に分離して得られたタンパク質の分子量表を示した。この結果は脳タンパク質が高分離能分離されると同時に各タンパク質の翻訳後修飾を含む精密な分子量とその不均一性が測定できる事を示している。図２下段表に示すように、ラット脳の可溶性画分のタンパク質は約２００種類が検出された。例えば図３に示すように、中性タンパク領域に溶出し逆相ＨＰＬＣで分離された分子量17,199のタンパク質はスタスミンと推定された。ｃＤＮＡから求めたスタスミンの分子量は17,288であるが、イニシャルMetはなくさらにＮ末端Alaはアセチル化されている事がわかり、そのアミノ酸配列としての分子量は17,199である。したがって、上記のＨＰＬＣ-ＭＳシステムによって得られたスタスミンの分子量測定値は正確である。さらに、図４に示すように、このインタクトなスタスミンのほかに、分子量がそれぞれ17,278と17,357の２種のスタスミン同種が認められる。それぞれの分子量差はいずれも79であり、この値は翻訳後修飾によるリン酸化に特有なものである事から、スタスミンには１個リン酸化されたものと、２個リン酸化さてたものの計３種ある事が確認された。このようにして多次元ＨＰＬＣによって分離された各タンパク質は、トリプシンなどの消化酵素により

限定分解した後、ＨＰＬＣ-ＭＳによるペプチドマッピングとＬＣ-ＭＳ/ＭＳによる配列分析、各配列からの各種のデータベース所蔵ライブラリーにあるタンパク質との配列照合を行う事ができる。そのため、分離されたタンパク質が既知かあるいは未知であるかを判定できる。本法はポストゲノムとしてのタンパク質の構造解析に有用な分析法と考えられる。

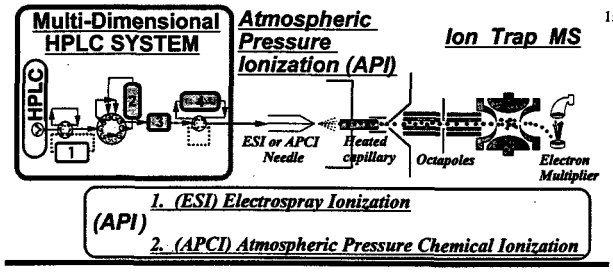
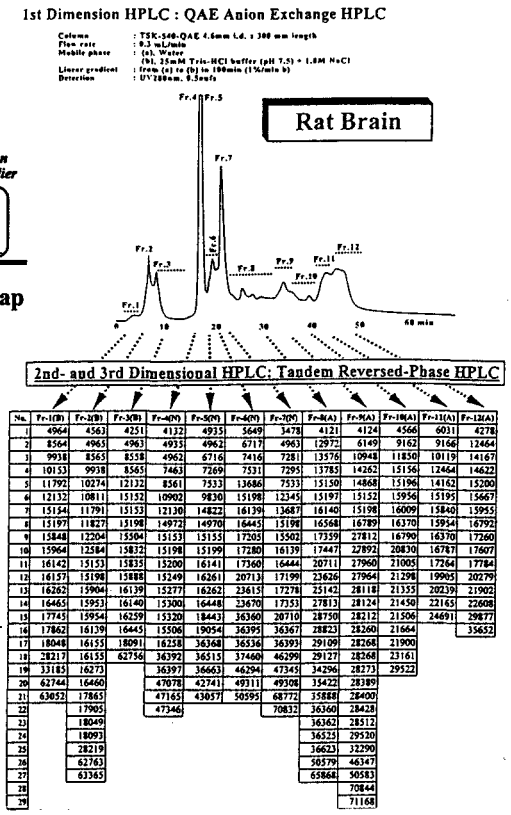


Figure 1. Schematic diagram of the HPLC-API / Ion Trap Mass Spectrometer (LCQ™) system



No.	Fr-1(B)	Fr-2(B)	Fr-3(B)	Fr-4(N)	Fr-5(N)	Fr-6(N)	Fr-7(N)	Fr-8(A)	Fr-9(A)	Fr-10(A)	Fr-11(A)	Fr-12(A)
1	4964	4563	4251	4132	4935	5649	3478	4121	4124	4566	6031	4278
2	8564	4965	4963	4935	4962	6717	4963	12972	6149	9162	9166	12464
3	9938	8565	8558	4962	6716	7416	7281	13576	10948	11850	10119	14167
4	10153	9938	8565	7463	7269	7531	7295	13785	14262	15156	12464	14622
5	11792	10274	12132	8561	7533	13686	7533	15150	14868	15196	14162	15200
6	12132	10811	15152	10902	9830	15198	12345	15197	15152	15956	15195	15667
7	15154	11791	15153	12130	14822	16139	13687	16140	15198	16009	15840	15955
8	15197	11827	15198	14972	14970	16445	15198	16568	16789	16370	15954	16792
9	15848	12204	15504	15153	15155	17205	15502	17359	27812	16790	16370	17260
10	15964	12584	15832	15198	15199	17280	16139	17447	27892	20830	16787	17607
11	16142	15153	15835	15200	16141	17360	16444	20711	27960	21005	17264	17784
12	16157	15198	15888	15249	16261	20713	17199	23626	27964	21298	19905	20279
13	16262	15904	16139	15277	16262	23615	17278	25142	28118	21355	20259	21902
14	16465	15953	16140	15300	16448	23670	17353	27813	28124	21450	22165	22608
15	17745	15954	16259	15320	18643	36360	20710	28750	28212	21506	24691	29877
16	17862	16139	16445	15506	19054	36395	36367	28823	28260	21664		35652
17	18048	16155	18091	16258	36368	36536	36393	29109	28268	21900		
18	28217	16155	62756	36392	36515	37460	46299	29127	28268	23161		
19	33185	16273		36397	36663	46294	47345	34296	28273	29522		
20	62744	16460		47078	42741	49311	49308	35422	28389			
21	63052	17865		47165	43057	50595	68772	35888	28400			
22		17905		47346			70832	36360	28428			
23		18049						36362	28512			
24		18093						36525	29520			
25		28219						36623	32290			
26		62763						50579	46347			
27		63365						65868	50583			
28									70844			
29									71168			

Fig.2 A chromatogram of QAE anion-exchange HPLC of a rat brain extract, and a table of molecular weights of brain proteins in every fractions.

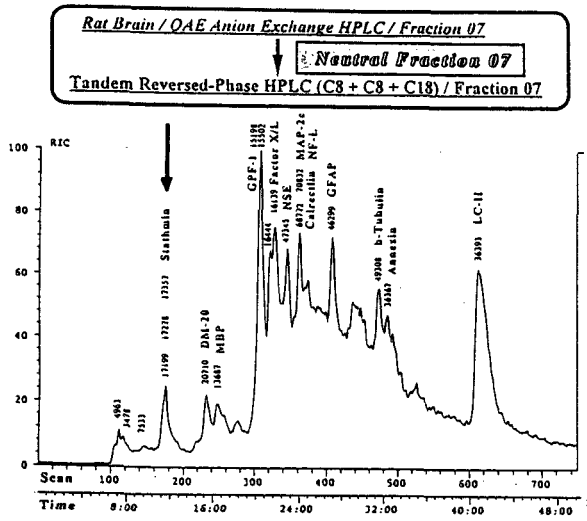


Fig.3 A chromatogram of a neutral fraction (Fraction number 7) obtained from the QAE anion-exchange HPLC of a rat brain extract.

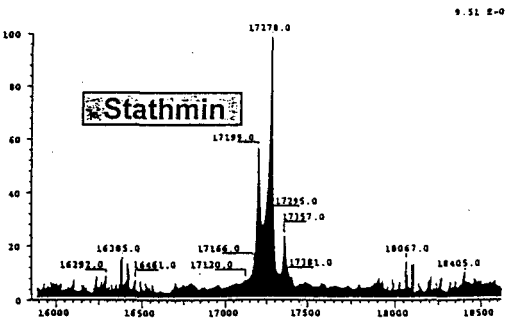


Fig.4 A deconvoluted ESI/MS spectrum of the stathmin peak in Fig.3.
The spectrum suggests that stathmin is phosphorylated at 2 positions in the sequence.

212 2E4 質量分析法による小脳2次元電気泳動マップ上のスポットの翻訳後修飾の解析

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[3]、礒辺俊明[1]
([1]東京都立大学理学部, [2]協和発酵東京研究所, [3]フィニガンMAT)

〔要約〕
微量タンパク質のための一次構造解析法として構築した複合化質量分析システムを、電気泳動法で分離したタンパク質スポットの翻訳後修飾の解析に適用した。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で脱塩、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システムおよびMALDI/TOFMSで分子量を測定し、ペプチドマスデータベースと照合することでスポットを同定した。MSによるペプチドマッピングとMS/MSによる部分一次構造決定により容易に翻訳後修飾の種類と位置の同定が可能であった。本法は従来困難であった2次元ゲル上のタンパク質の翻訳後修飾を含む一般的な一次構造解析法として有用である。

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おり，その解析が「ポストゲノム」の生命科学の研究に不可欠と考えられる。2次元電気泳動法は高分解能で細胞の構成タンパク質を概観できるため、放射能ラベルしたリガンドを細胞に取り込ませたのちにその構成タンパク質を分析することで、種々の刺激に対する細胞の応答、例えば細胞内情報伝達系のタンパク質のリン酸化などを解析するための有力な手段となっている。また、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では、多くのタンパク質が複数のスポットに分離されており、多くの場合その原因はタンパク質の翻訳後修飾に起因すると考えられている。このように、2次元電気泳動法では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，従来の分析法ではその構造解析は困難であった。キャピラリーHPLCとエレクトロスプレーイオン化(ESI)／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システムやMALDI/TOFMSは、pmolレベルのタンパク質・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[1]。私たちはこれらの質量分析法が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、ゲルからのタンパク質の抽出法、試料の前処理法および高感度分析のためのイオン化の条件を検討し、複合化質量分析システムを構築した[2]。本研究ではこのシステムを「ラット小脳タンパク質マップ」上のタンパク質の翻訳後修飾の解析に適用した。

［方法］ラット小脳タンパク質を8M尿素で可溶化し、2次元電気泳動法[3]で分離したのち銅染色法で染色し、目的のスポットを切り抜いた。このスポットからタンパク質を振盪抽出し、Phenyl 5PW RP (4.0 mm i.d. x 10 mm) 逆相HPLCで精製した。これを濃縮あるいは中和したのち、直接またはリジルエンドペプチダーゼで消化して、キャピラリーC18カラム (0.25 mm i.d. x 100 mm) HPLC-ESI/TSQMSまたはMALDI/TOFMSで分析した。

［結果と考察］発育にともなうラット小脳の2次元電気泳動像を比較し、成熟過程で一過的に発現が極大となるスポットを約16種類検出した[4]。例えば、酸性・低分子領域には、ほぼ同様の発現パターンを示す分子量18kDaで、等電点が異なる3種類のスポット（A: 塩基性スポット; pI 5.5。B：中性スポット; pI 5.2。C: 酸性スポット; pI 5.0）が検出された。これらのスポットをそれぞれゲルから抽出して、MALDI/TOFMSによって分子量を測定した（図1）。スポットの分子量はそれぞれA; 17,203, B; 17,282, C; 17,355であり、この分子量と等電点の差からリン酸化修飾の可能性が示唆された。そこで、各スポットをリジルエンドペプチダーゼで消化し、生じたペプチド混合物を直接MALDI/TOFMSでマッピングした（図2）。マスマップ法の結果、これらのスポットはすべて細胞内シグナル伝達系での「リレー分子」として注目されるスタスミンと同定できた。上記の結果とスタスミンのアミノ酸配列からこれらのスポットは、A; 非リン酸化分子、B; 1リン酸化分子、C; 2リン酸化分子であり、リン酸化ペプチド

はB; L4 およびC; L4, L3 と推定され、実際にキャピラリーHPLC-MS/MS分析によりそれぞれのリン酸化部位が同定できた(図3)。このように、この方法ではゲル電気泳動からの数 pmol 程度の試料により、高精度の分子量測定、ペプチドマッピングおよび数種類のペプチドの翻訳後修飾をふくめた一次構造解析が可能であることから、シグナル伝達系の解析など、遺伝子からは解析できない生合成後のタンパク質の翻訳後修飾の解析に有用と結論した。

［文献］

[1] 中山洋、瀬田和夫、礒辺俊明 (1996) *生化学* 68 (印刷中)

[2] Nakayama, et al., (1996) *J. Chromatogr.*, 730, 279-287.

[3] Nakayama, H. & Okuyama, T. (1991) *Bioimage* 1, 41-46.

[4] 内田和久ら (1995) *神経化学* 34, 24-25.

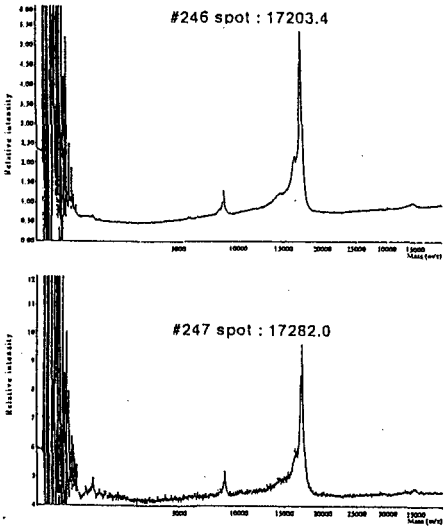


図1 MALDI/TOFMSによるスポットA (#246) とB (#247) の分子量測定。

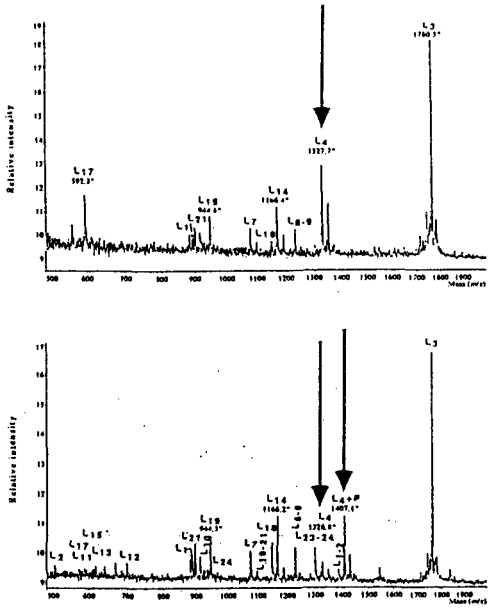


図2 MALDI/TOFMSによるスポットA (#246) とB (#247) のペプチドマッピング。

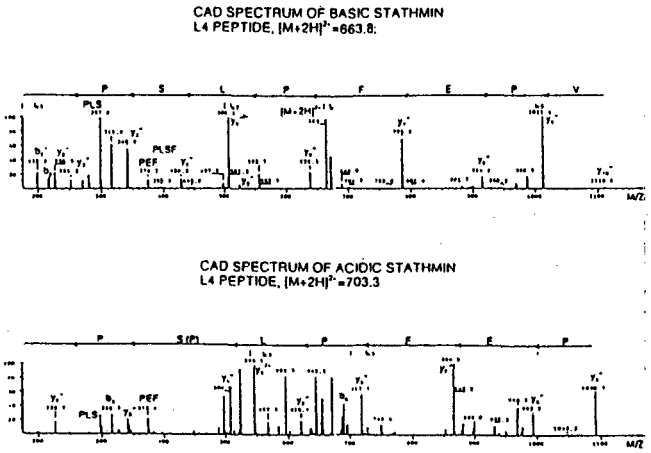


図3 HPLC-MS/MSによるスポットA (#246) とB (#247) のL4ペプチド・リン酸化部位の同定。

213 2E5 Putative HLA-DR Associated Proteins (PHAPI and PHAPⅡ) の結合蛋白質の探索

立野 慶、田中 隆佳、萩原 民雄、竹田二美代、竹田 稔
（昭和大学・医・第一生化学）

〔 要約 〕

我々はこれまで脳神経系の発生・分化に関わる蛋白質／遺伝子を解析する目的で、胎児期に優位に発現する蛋白質の単離同定を行い、ヒト白血球に見いだされた主要組織適合性抗原HLA-DRの細胞内ドメインに結合すると予想される蛋白質PHAP ⅠおよびPHAP Ⅱのホモローグがラット胎児脳サイトゾール画分に多量に発現していることを報告してきた。今回は神経系におけるPHAP ⅠおよびPHAP Ⅱの生理機能を調べるため、これらと相互作用する蛋白質の探索を行なった。大腸菌で発現させたPHAP ⅠおよびPHAP Ⅱをリガンドとしたaffinity columnを作成し、ラット胎児脳サイトゾール画分を試料として結合蛋白質を探索した結果、それぞれ数種類の蛋白質が確認でき、それらのうちのいくつかは共通していた。現在のところ、これらの蛋白質が何であるかは不明であるが、細胞内においてPHAP ⅠおよびPHAP Ⅱと他の蛋白質が相互作用する可能性が考えられ、単離同定を進めている。

（緒言）

ヒト主要組織適合性抗原HLA-DRは免疫系細胞という特殊な細胞において個体特異性に関わる重要な蛋白質である。最近では免疫系細胞と神経系細胞の機能的な類似性が話題になるが、我々はこのHLA-DRの細胞内ドメインに結合する蛋白質としてヒト白血球に見いだされたPHAP ⅠおよびPHAP Ⅱのホモローグがラット胎児脳に多量に発現していることを見いだした。すでに明らかにされているPHAP ⅠおよびPHAP Ⅱの一次構造は他の既知蛋白質に対して顕著なホモロジーが見られず、その生理機能は不明である。我々はPHAP ⅠおよびPHAP ⅡがHLA-DRと結合する際には何らかの制御を受けるはずであろうし、また、PHAP ⅠおよびPHAP Ⅱが最終的な効果反応を生み出すのではなく、さらに第３の分子と相互作用するのではないかと考え、その分子の探索を試みた。

（方法）

ヒトlymphoma細胞株Rajiから調製したpoly A$^+$ RNAを用いて、RT-PCR法によりヒトPHAP ⅠおよびPHAP Ⅱ cDNA（772 bpおよび856 bp）を得た。これらをGlutathione S-Transferase（GST）遺伝子融合ベクターpGEX -4Tのmultiple cloning siteに組み込んだplasmid pGEX／HS PHAP Ⅰおよびp GEX／HS PHAP Ⅱを構築した（Fig. 1）。これらのplasmidをそれぞれ大腸菌DH5 αにtransfectし、常法によりIPTGにて蛋白質合成を誘導した。得られた菌体をPBS中でsonicationにより破砕し、GST-PHAP ⅠおよびGST-PHAP Ⅱ融合蛋白質を含むextractを得た。このextractをGlutathione Sepharose 4B columnに通すことにより、GlutathioneにGST-PHAP ⅠおよびGST-PHAP Ⅱが結合した形のaffinity columnを作成した。胎生18日目のWistar系ラットの胎児脳より調製したサイトゾール画分をこのaffinity columnにかけ、PBSで洗浄後、1M NaClを含むPBSで結合蛋白質を溶出させた。溶出蛋白質はSDS-PAGE後、銀染色で確認した。

（結果と考察）

ヒトおよびラットのPHAP IおよびPHAP IIの分子量はそれぞれSDS-PAGE上、35 kDaおよび40 kDaであり、また、GSTは26 kDaである。構築した発現ベクターpGEX／HS PHAP Iおよびp GEX／HS PHAP IIからIPTG誘導により新たに発現した蛋白質の分子量はそれぞれ61 kDaおよび66 kDaで、構築したplasmidのopen reading frameから予想される分子量と一致しており、抗GST抗体を用いたイムノブロットでも融合蛋白質が確認できた。これらの融合蛋白質をリガンドとしたaffinity columnにより、ラットのサイトゾール画分からPHAP IおよびPHAP II結合蛋白質と予想される複数の蛋白質を検出できた。PHAP I結合蛋白質はSDS-PAGE上の分子量が24、32、33、34、85および100 kDa付近の計6種類で、PHAP IIの場合はPHAP Iに共通する6種に21および28 kDaの2種を加えた計8種類であった（Fig.2）。また、生後1年のラット脳サイトゾール画分を用いて同様な検索を行ったが、胎児脳で見られたような蛋白質は検出できなかった。PHAP IおよびPHAP IIの結合蛋白質を別な角度から解析するため、胎児脳サイトゾール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で分画した後、各フラクションをWestern blottingし、^{32}Pでラベルされ たPHAP IおよびPHAP IIをリガンドとしたoverlay assayを行ったところ、affinity columnで得られたものと同様な分子量の蛋白質が検出された。現在、これらの蛋白質の単離と一次構造解析を進めているが、affinity columnおよびoverlay assayの結果は、胎児脳のサイトゾール画分にPHAP IおよびPHAP IIに相互作用を持つ蛋白質が存在することを示唆しており、PHAP IおよびPHAP IIの生理機能を明らかにする手掛かりとなると考えている。

Fig.1（下図）

発現プラスミドの構築と実験の概略

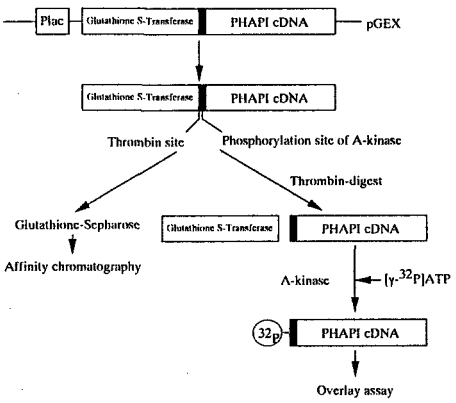
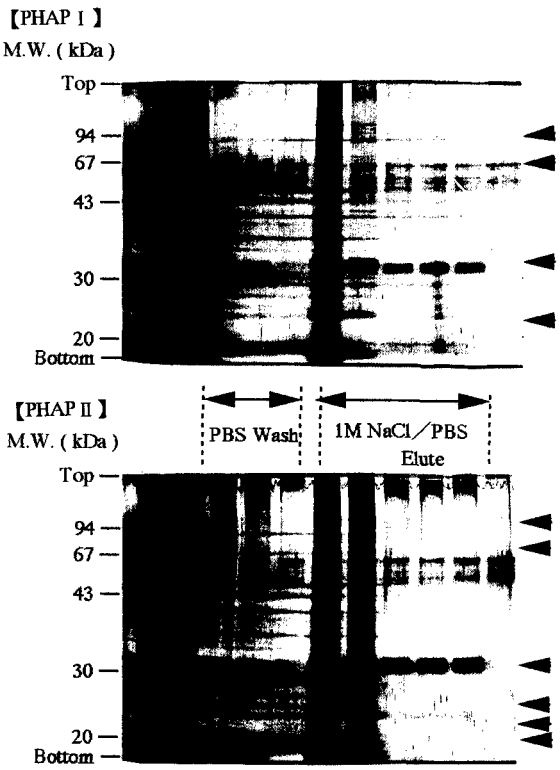


Fig.2（右図）

溶出されたPHAP IおよびPHAP IIの結合蛋白質の電気泳動像



214 活性型Fynの脳内発現によるけいれん発作とチロシンリン酸化の亢進

1Dp3

児島伸彦、石橋英俊、小幡邦彦
(生理学研究所・神経化学)

〔 要約 〕
カルモジュリンキナーゼIIαサブユニットのプロモーターの制御下に活性型Fynを発現するトランスジェニックマウスでは生後3週以降の死亡率が高く、その死因は自発性てんかん発作によるものと考えられる。これらの動物ではペンチレンテトラゾル (PTZ) による強直性けいれん閾値が野生型、正常型Fyn発現マウスやFynノックアウトマウスに比べ有意に低下していた。したがってFynの活性調節が機能的に脳内の興奮一抑制のバランスを保つために重要であることが示唆された。Fynのニューロンにおける基質を探る目的でトランスジェニックマウス脳においてチロシンリン酸化タンパク質を調べたところ複数のタンパク質 (PY190、185、120、110および100) でそのリン酸化の亢進が認められた。それらのうちPY190は可溶性タンパク質であり他はFynと同様膜結合タンパク質であった。

FynはSrcファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼであり、免疫系細胞と同様に神経組織において多く存在する。ジーンターゲティングによって作成されたFynノックアウトマウスでは脳の構築、シナプス可塑性さらには空間学習における障害が報告されており (1) 、Fynが脳内で重要な機能分子としてはたらいていることが考えられるが、Fynの脳内での情報伝達経路はほとんど解明されていない。脳内とりわけ成熟ニューロンにおけるFynの役割を知るために、カルモジュリンキナーゼIIαサブユニットのプロモーターによってFyn cDNAあるいはその活性型変異cDNA (Y531をFに置換) を発現するトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスではカルモジュリンキナーゼIIαサブユニットmRNA (2) と同様に生後2〜3週令以降の前脳ニューロンにおいてFynトランスジーンの発現が認められるが、それによる形態学的異常は見い出されていない。活性型Fyn発現マウスでは3週令以降で自発性てんかん発作を引き起こしやすく死亡率が高いことが観察され、Fynの活性調節が脳の興奮性に重要であることが示唆された。

〔実験方法〕

動物: 正常型および活性型Fyn発現マウスの各系統 (fyn8、85およびfyn(Y531F)27、78) は兄妹交配によって継代した。トランスジーン特異的配列をプライマーとしたPCRによりトランスジーンを検出した。またFynノックアウトマウスはSoriano博士から供与されたヘテロ接合体 (3) を兄妹交配によって継代した。遺伝子型はFyn遺伝子および挿入neo遺伝子のプライマーを用いたPCRによって行った。

PTZけいれん誘発テスト: 6-10週令雄マウスの尾静脈に1% PTZを一定流速 (0.1ml/min) で注入した。けいれん発作の時間経過を観察、記録し体重あたりの投与量を算出した。

ウェスタンブロット解析: マウス前脳から調製したタンパク質標品をSDS—ポリアクリルアミド電気泳動によって分離しニトロセルロース膜に転写した。抗リン酸化チロシン抗体 (PT66、Sigma) 、引き続きHRP標識二次抗体と反応させた後、ECL (Amersham) によって陽性バンドを検出した。

細胞下分画法: マウス前脳から定法 (4) に従って各画分を調製した。

〔結果および考察〕

活性型Fyn発現マウスでは3週令以降の死亡率が高く (50-100%) 、自発的にてんかん様発作を頻発する。この発作の形態は電撃けいれんやPTZけいれんと類似している。これらのマウスではけいれん閾値が低いことが予想されたのでPTZを持続的に静脈注射して個体ごとのけいれん閾値を調べた。初期けいれん (twitch) を誘発するのに有効な薬物投与量はマウス系統間でほとんど変わらなかったが、強直性けいれんを引き起こす量は活性型Fyn発現マウスでは野生型と比べて有意に低いことがわかった (図1) 。一方正常型Fyn発現マウスやFynノックアウトマウスでは野生型との差が認められなかった。以上

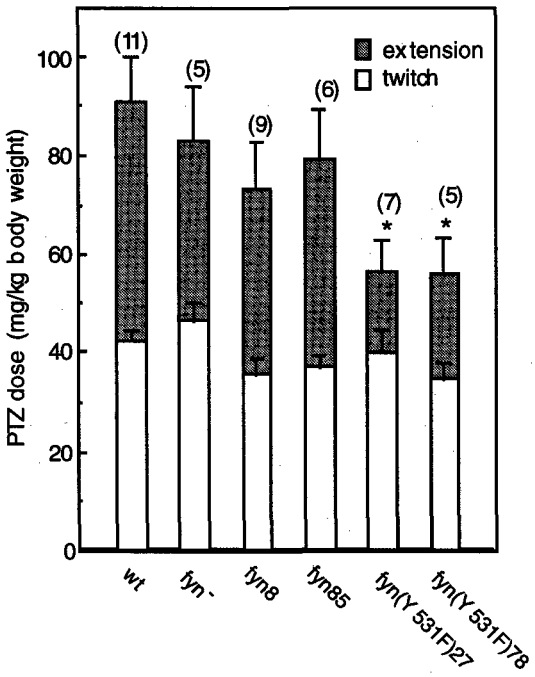


図1　けいれん誘発に必要なPTZ投与量.
( ) 内の数字は個体数を示す. *: $p<0.05$.

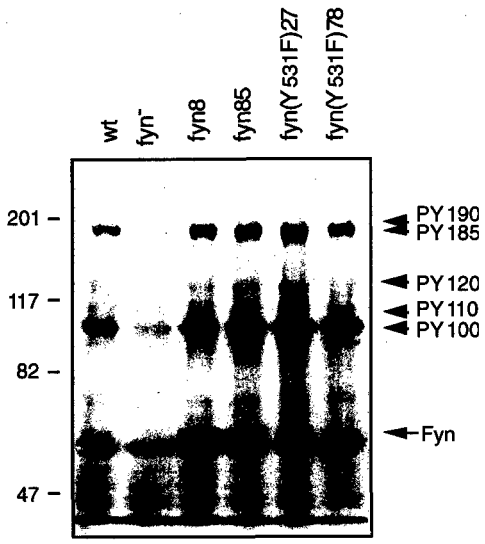


図2　Fyn発現マウス前脳における
チロシンリン酸化変化.

の結果はFyn活性の調節機構が脳の興奮と抑制のバランスを保つのに重要であることを示唆している。歯状回苔状線維の出芽、GABA作働性ニューロンの分布を含めた組織学的異常は少なくとも光学顕微鏡レベルでは見い出されなかった。したがって活性型Fyn発現によるてんかんの発症原因は形態学的異常によるものではなくニューロンの興奮性の機能的変化にあると考えている。

Fynのニューロンにおける情報伝達経路は現時点でほとんど解明されていない。Fynのニューロン内での基質を検索する目的でトランスジェニックマウス前脳でのタンパク質のチロシンリン酸化の変化を調べたところ複数のタンパク質（PY190、185、120、110および100）のリン酸化が正常型、活性型いずれのトランスジェニックマウスにおいても同様に亢進していることが明らかになった(図2)。細胞下分画法によって分画した各画分におけるこれらの分布はPY190が可溶性画分に回収される以外はすべて膜画分に回収された。特にPY110は後シナプス膜肥厚部（PSD）画分に多く分布したが他はFyn同様ミエリン膜画分、シナプス膜画分、ミトコンドリア膜画分に広く分布した。膜での存在様式を知るためにシナプス膜画分からの可溶化を試みた。いずれもpH変化、Ca^{2+}キレート処理、塩濃度変化によっては膜から溶出しなかった。界面活性剤処理（1% TritonX-100、1%デオキシコール酸、1% CHAPS、1% n-オクチルグルコシド、2% SDS）では、PY100および120はFynと同様に1%デオキシコール酸処理でほとんど可溶化され、PY185、110は2% SDS処理でのみ可溶化された。自発性てんかん発作を引き起こさない正常型Fyn発現マウスでもリン酸化が亢進していることはそのリン酸化の亢進自体が直接てんかん発症の原因ではないことを意味するが、Fynノックアウトマウス脳でのリン酸化は逆に減弱していることからこれらのタンパク質は中枢ニューロンにおけるFynの基質である可能性が高く、てんかんとの関連を探るためにもタンパク質の単離、同定が今後必要であろう。

〔文献〕

1. Grant, S.G.N. et al. (1992) Science 258, 1903-1910. 2. Sugiura, H. and Yamauchi, T. (1992) Brain Res. 593, 97-104. 3. Stein, P.L., Lee, H.-M., Rich, S. and Soriano, P. (1992) Cell 70, 741-750. 4. Carlin, R.K., Grab, D.J. and Siekevitz, P. (1980) J. Cell Biol. 86, 831-843.

215 新規セリンプロテアーゼ、ニューロプシンの活性化機構の解明と生体内基質の探索

1Dp4

清水 千草[1,2]、加藤 武[2]、松本 和彦[1]、吉田 成孝[1]、塩坂 貞夫[1]
(1.奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科、細胞構造、2.横浜市立大学、総合理学研究科、分子認識)

[要約] Chenらは記憶・学習や情動機能を司っていると考えられる海馬CA1からCA3領域と扁桃体に特異的に存在するセリンプロテアーゼを見い出だし、ニューロプシンと命名した(1、2、3)。キンドリング刺激を与えたモデルマウスにおいて、海馬CA1及びCA3領域のmRNAが増加することから、神経の可塑性にニューロプシンが深く関与していると考えた(1)。本研究では、ニューロプシン蛋白質をSf21細胞及びHigh5細胞を用いたバキュロウイルス発現系により、リコンビナント蛋白質の作製及び精製を行い、各種合成基質を用いてプロテアーゼ活性を検討した。その結果、High5細胞により作製したリコンビナント蛋白質(mNP/Hi5)は、強い酵素活性を示したが、Sf21細胞により作製したリコンビナント蛋白質(mNP/Sf21)は不活性であった。mNP/Sf21はリシルエンドペプチダーゼによる限定分解により強い酵素活性を示した。これらの結果より、不活性型ニューロプシンがプロセシングをうけ、活性型ニューロプシンへの変換する機構が考えられた。また、mNP/Hi5がコラーゲン等の細胞外マトリックスやフィブリン等を溶解することをザイモグラフィーにより確認した。

活性型ニューロプシン蛋白質が細胞外マトリックスを溶解することにより、細胞の遊走、神経突起伸展及びシナプスの可塑性等に関与することが示唆された。

[方法] 1)ニューロプシンリコンビナント蛋白質作製及び精製

ニューロプシンmRNAの全長を含むNP3cDNAをトランスファーベクターpVL1392に挿入し作製したバキュロウイルスをSf21細胞及びHigh5細胞に感染させた。ニューロプシンリコンビナント蛋白質は培養上清中に分泌され、陽イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

2)ニューロプシンリコンビナント蛋白質の活性化

mNP/Sf21をセファロースゲルにカップリングさせたリシルエンドペプチダーゼ(アクモバクタープロテアーゼI)により30℃で15分、30分、60分間処理を行った。酵素活性はトロンビンに対する基質Boc-Val-Pro-Arg-MCA、Boc-Asp-Pro-Arg-MCA及びカリクレインに対する基質Pro-Phe-Arg-MCAを用いて測定を行った。

3)ザイモグラフィー

0.1%コラーゲンI又は0.2%フィブリンを含むゲルを用いてニューロプシンの電気泳動を行った。SDSを除去後、37℃、12時間インキュベーションし、クーマシー染色を行った。

[結果及び考察]

mNP/Hi5と比較してmNP/Sf21はほとんど酵素活性を示さなかった(図)。アミノ酸シークエンスを行った結果、mNP/Hi5はN末端にIle-Leu-Gluを認めたが、mNP/Sf21のN末端は修飾されており、明らかに出来なかった。またリシルエンドペプチダーゼにより活性化したmNP/Sf21はmNP/Hi5と同じN末端のアミノ酸配列を有し、ほぼ同様のKm及びVmaxを認めた(表)。ニューロプシンcDNA塩基配列からN末端に疎水性の高いシグナル配列を持つことが予想された。これらのことよりプレプロ蛋白質として生合成されたニューロプシンはシグナル配列が除去されて、mNP/Sf21様のプロ蛋白質となり、リシルエンドペプチダーゼ様酵素によって限定分解をされ、mNP/Hi5と同様の活性型酵素に変換されると考えられる。

ニューロプシンの生体内における機能を解明するために、ザイモグラフィーを行った結果、活性型ニューロプシンはコラーゲンIを分解した。また、プラスノーゲン非共存下と比較してプラスノーゲン共存下の方がフィブリンをよく分解した。これらのことから、ニューロプシンはプラス

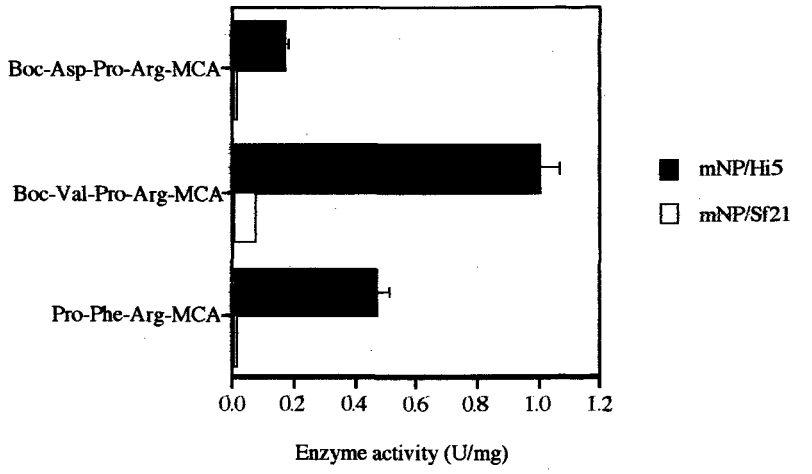
ミノーゲン、フィブリンいずれにも活性を有していた。

ニューロプシンはプロ蛋白質から活性型蛋白質への制御機構があると推察され、また、活性型ニューロプシン蛋白質が細胞外マトリックスを溶解することにより、細胞の遊走、神経突起伸展及びシナプスの可塑性等に関与することが示唆された。

[文献]

1. Chen et.al. (1995) *J.Neurosci.*, 15, 5088-5097
2. Suzuki et.al. (1995) *Neurosci.Res.23,345-351*
3. Okabe et.al. (1996) *Brain Res.* in press

図



表

Substarate	Boc-Asp-Pro-Arg-MCA		Boc-Val-Pro-Arg-MCA	
kinetics	Km(μM)	Vmax(U/mg)	Km(μM)	Vmax(U/mg)
ActivatedmNP/Sf21	398	0.6	403	3.5
mNP/Hi5	393	0.58	453	4.3

216 神経活動によって発現制御される遺伝子 arc とその遺伝子産物

1Dp5

山形要人、杉浦弘子、入江康至*、三木直正*、
（東京都神経研・分子神経生物、* 大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕
LTP の中・後期相が蛋白合成阻害薬、転写阻害剤でそれぞれ減弱することから、神経活動に伴い、新しい蛋白合成・遺伝子発現が生じ、LTP が長期的に維持されると考えられる。そこでシナプス活動によって発現調節される遺伝子産物がLTPを維持する分子群と考え、これらを海馬から単離した。多数の遺伝子が誘導されるが、今回は特徴的な発現様式を示す新しい遺伝子 arc について報告する。arc mRNA は電撃痙攣刺激、貫通枝高頻度刺激による顆粒細胞 LTP、NMDA 受容体のチャンネルブロッカー MK801投与、コカイン投与などによって発現量が急速に変化した。一次構造上は膜の裏打ち蛋白質 Spectrin と低い相同性（19.2%）が認められ、その mRNA ・蛋白質は細胞体だけでなく、樹状突起にも誘導された。また遺伝子産物がカルモジュリンキナーゼ II によってリン酸化され、F-アクチンと共沈することなどから、神経活動に応じた樹状突起での細胞骨格の調節に関与している可能性が考えられた。

シナプスの可塑性は、LTP (Long-term potentiation)や LTD (Long-term depression) で代表される伝達効率の変化だけでなく、シナプス結合の形態学的変化も伴う。脳においては、電気生理現象と形態学的変化は一連の反応とも言え、それを裏付ける証拠として、LTP の中期相が蛋白合成阻害薬、後期相は転写阻害剤で減弱することが挙げられる。つまり、神経活動に伴い、新しい蛋白合成・遺伝子発現が生じ、これがシナプスの形態学的変化を惹起し、LTP が長期的に維持されると考えられる。そこで、神経活動によって発現調節される遺伝子群をクローニングするため、ラットに強い電撃痙攣刺激を与え、短期記憶中枢の海馬で急速に誘導される遺伝子群 (Immediate Early Gene, IEG) を単離した（1-6）。海馬はてんかん焦点にもなり易く、電気ショックに最も反応する。ここから単離された遺伝子は脳の後期発達においても発現調節されており、神経活動による神経回路網の再構築を担う分子群と考えられる。多数の遺伝子が誘導されるが、今回は特徴的な発現様式を示す新しい IEG arc について報告する。

［方法］

ラットを電撃痙攣刺激し、4 時間後の海馬から cDNA ライブラリーを作製し、Subtraction - Differential hybridization によって、電気ショックによって誘導される遺伝子を単離した。DNA sequence、ノーザンブロット解析、in situ hybridization、ウエスタンブロット解析、免疫組織化学なども既報の通り行った（7）。

［結果・考察］

シナプス活動によって調節される他の遺伝子を解析するため、ラットを電撃痙攣刺激（MECS）し、その 4 時間後の海馬から、subtraction、differential hybridization によって、急速に誘導される新しい IEGsを見出だした。一昨年の本学会では cox-2 (シクロオキシゲナーゼ 2）がシナプス活動によって調節されていることを示したが、今回は別の新しい IEG arc (activity and developmentally regulated gene associated with cytoskelton) を報告する。

arc mRNAは、Maximal electro-convulsive shock (MECS)によって海馬および大脳皮質で急速に誘導され，８～16時間でほぼ basal level に戻る。NMDA-receptor antagonist（channel blocker）のMK801は basal level の発現をさらに抑制することから、arc の発現調節にNMDA-receptorが関与していることが考えられる。また，貫通枝の高頻度刺激による顆粒細胞での LTP 形成の際にも arc mRNA の誘導が認められる。

arc 遺伝子発現の最も特徴的な点は mRNA が molecular layer（樹状突起）にも誘導されることである（図）。これは他の immediate early gene の発現パターンとは明らかに異なる。このような特徴的発現様式は，他に MAP2 のmRNAでも見られるが，いずれもシナプス可塑性に重要な役割を担っていると考えられる。Arc 蛋白質も，電気ショックやコカイン（10mg/kg）の急性投与によって、それぞれ海馬、線条体で誘導される（8）。さらに mRNA と同様、Arc 蛋白質も歯状回顆粒細胞の molecular layer に誘導される。このように特徴的な発現様式を示すArc だが、一次構造上は膜の裏打ち蛋白質 Spectrin と低い相同性（19.2%）が認められるだけである。生化学的にはカルモジュリンキナーゼIIによってリン酸化され，F-アクチンと共沈することなどから、リン酸化による細胞骨格の調節に関与している可能性が考えられる。いずれにしても、このような特異な発現様式を示す Immediate Early Gene は初めてであり、遺伝子産物が直接 "effector" として可塑性に関与している可能性が高い。その意味で、相互作用する蛋白質の同定も重要で、現在酵母の two hybrid system を用いて，標的蛋白質の解析も進行中である。

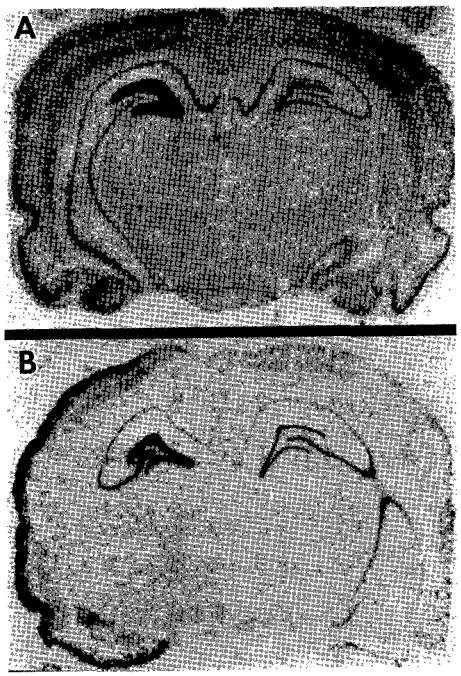


図　海馬分子層での arc mRNA の誘導（*in situ* hybridization）
A：右，無処置；左，MECS 4 時間後の arc mRNA の発現。海馬を通る冠状断。B：右，無処置；左，MECS 4 時間後の cox-2 mRNA の発現。海馬分子層でも arc mRNA の誘導が認められる。

［文献］

1) Yamagata, K. et al.: Neuron, 11: 371-386, 1993.
2) Yamagata, K. et al.: J. Biol. Chem. 269, 16333-16339, 1994.
3) Yamagata, K. et al : Learning & Memory, 1: 140-152, 1994.
4) Lyford,G.L., Yamagata,K. et al.: Neuron, 14 : 433-445, 1995
5) 山形要人、生体の科学、45: 139-144, 1994.
6) 入江康至　杉浦弘子　山形要人、細胞 28, 78-83, 1996.
7) Yamagata, K. et al. : Neuron, 2, 469-476, 1990.
8) Fosnaugh, J.S., Ratan,R.V., Yamagata, K. et al.: J. Neurochem, 64, 2377-2380, 1995.

217 1Dp6 ラット海馬におけるHPC-1/syntaxin-1A遺伝子発現のカイニン酸による抑制作用

藤野一郎、藤原智徳、赤川公朗
（杏林大学・医・第二生理）

〔要約〕カイニン酸をラットに投与し、海馬におけるHPC-1/syntaxin-1Aの発現に対する効果をmRNAのレベルで検討した。Northern blot hybridizationの結果、海馬におけるHPC-1/syntaxin-1A mRNA量がカイニン酸投与後3時間で減少し、その後回復することが明らかとなった。またin situ hybridizationの結果から、CA1からCA4の錐体細胞でmRNA発現量が一過性に減少することが明らかとなった。以上の結果から、グルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸により、海馬におけるHPC-1/syntaxin-1Aの発現が一過性に減少することが明らかとなり、神経細胞におけるHPC-1/syntaxin-1Aの発現が神経細胞への刺激に反応して、mRNAのレベルで変化する可能性が示唆された。

[目的] HPC-1/syntakin-1Aはシナプスにおける開口放出に関与する形質膜蛋白質である。哺乳類HPC-1/syntaxin-1AmRNAの3'非翻訳領域には、mRNAの不安定化に関与すると考えられる配列が存在する（1）。このシグナル配列は最初期遺伝子等の、刺激により早い時間経過で遺伝子発現が誘導される遺伝子のmRNAに存在することが知られている（2）。そのためHPC-1/syntaxin-1Aの発現が神経細胞に対する刺激により、早い時間経過で誘導される可能性が考えられた。そこで神経細胞におけるc-fos等の遺伝子の発現を誘導することが知られているカイニン酸をラットに投与し、海馬におけるHPC-1/syntaxin-1Aの発現に対する効果をmRNAのレベルで検討した。

[材料と方法] Wisterラット(200-250g)にカイニン酸を10mg/kg体重で腹腔内投与した。全ての実験においてカイニン酸非投与ラットをコントロール動物とした。Northern blot hybridization： カイニン酸投与後1、3、8、18時間後にラットをエーテルで麻酔し、摘出した海馬より常法に従いtotal RNAを抽出し、^{32}P-dCTPラベルしたHPC-1/syntaxin-1A cDNAプローブを用いてNorthern blot hybridizationを行った。結果はBAS2000により測定し、定量化した。RT-PCR解析：ラット脳より海馬を摘出し、KrebsRinger液中でロータリースライサーによりスライス(500μm)を作製した。スライスは直ちにドライアイスで凍結し、実体顕微鏡下でCA領域と歯状回を分離した。組織片よりtotal RNAを抽出し、RT-PCRを行った。house keeping geneであるラットelongation factor1α（3）のRT-PCRを行いコントロールとした。増幅産物はSouthern blot hybridizationにより定量した。in situ hybridizationとdensitometric解析：ラット脳の凍結切片を作製し、digoxigeninでラベルしたラットアンチセンスRNAプローブを用い、常法に従いin situ hybridizationを行った。アルカリフォスファターゼ基質による発色反応後、光学顕微鏡画像を画像解析装置に取り込み発色強度を数値化し、各領域における細胞あたりの平均値を測定した。

[結果と考察] Northern blot hybridization により海馬全体における HPC-1/syntaxin-1A mRNA 量がカイニン酸投与後3時間から8時間にかけて減少し、その後もとのレベルまで回復することが明らかとなった（Fig.1）。この一過性の減少がCA領域と歯状回の何れの領域の神経細胞に由来するかを明らかにするため、海馬CA領域と歯状回を分離してRNAを抽出しRT-PCRを行った。その結果、CA領域でのHPC-1/syntaxin-1A mRNA量が有意に減少していたが、歯状回では有意な変化はみられなかった。コントロールとしてのelongation factor1αのmRNA量は、何れの領域においても有意な変動を認めなかった。in situ hybridizationから個々の神経細胞あたりのmRNA発現量をdensitometricに解析したところ、CA領域の個々の錐体細胞でのmRNA発現量が8時間で減少し、その後の回復することが明らかとなった（Table.1）。以上の結果から、グルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸により、海馬におけるHPC-1/syntaxin-1Aの発現が一過性に減少することが明らかとなり、神経細胞におけるHPC-1/syntaxin-1Aの発現が神経細胞への刺激に反応して、mRNAのレベルで変化する可能性が示唆された。

[文献] （1）Inoue, A., Obata, K. and Akagawa, K. (1992) J. Biol. Chem. 267: 10613-10619（2）Sachs, A.B. (1993) Cell 74: 413-421（3）Bessho, Y., Nawa, H. and Nakanishi, S. (1994) Neuron 12: 87-95

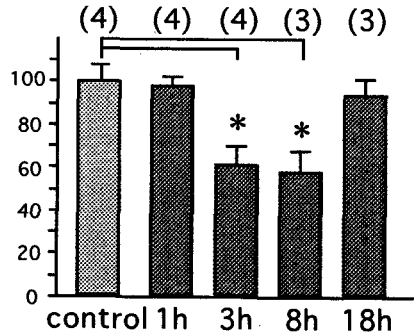


Fig. 1. HPC-1/syntaxin-1A mRNA expression in rat total hippocampal RNA after kainate injection.
The values represent mean±S.E.M. of % radioactivity.
(N) represents number of animals examined. *p<0.05.

Table 1. Relative density of HPC-1/syntaxin-1A hybridization in each hippocampal neuron

	contorol	8hr	18hr
CA1	36.1±7.1 (128)	25.8±6.1 (123)	35.1±6.9 (204)
CA3-4	35.9±5.7 (162)	31.8±6.2 (150)	41.6±7.1 (213)
DG	36.0±5.7 (248)	37.1±7.5 (295)	33.0±5.5 (406)

mean±SD, (n)=number of cells calculated
In area CA1, hybridization density significantly decreased 8 hours after kainate injection (p<0.0001 vs control, t test), and it recovered after 18 hours (p=0.204), whereas in area DG, kainate did not significantly affect the expression after 8 hours (p=0.06).

218 1Dp7 中枢神経系における浸透圧変化に対する防御機構の重要性と浸透圧制御に関わる遺伝子

山下俊英、島田昌一、高木勉、早川徹、遠山正彌
（大阪大学医学部・分子脳機構、第二解剖、脳神経外科）

脳虚血、外傷などの病態発生時、病巣周囲の浸透圧上昇が見られることが知られている。浸透圧上昇により局所に水の集積がおこると、脳浮腫が増悪する。私たちはこれまでosmolyte transporterに注目しこの遺伝子誘導が脳虚血、外傷などの病態発生時、広範囲かつ長期間にわたり認められることを報告してきた。細胞外の浸透圧が病態発生にともなって上昇すると、最初に細胞内の電解質濃度が高値となり平衡を保つが、この状態が長く続くと細胞内の蛋白、核酸の高次構造を傷害する可能性がある。そこでosmolytetransporterによりオスモライトを細胞内に輸送し、細胞内の電解質濃度を正常化させることで高浸透圧に対処する。このように中枢神経系において浸透圧制御は非常に重要な意味を持つ。しかし神経細胞・ｸﾞﾘｱ細胞における浸透圧変化時の防御機構についてはごく一部しか解明されておらず、これについて十分に理解することが脳浮腫などのの病態理解に不可欠と考えられる。浸透圧変化時の防御機構に関わる転写因子、トランスポーター関連蛋白、またほかの因子などについて解明していくことで、防御機構の全体像が明らかになっていくものと考えられる。今回、アストロサイトの初代倍養系を用いて、NaClにより300mOsmから500mOsmへの浸透圧変化を加え、1.5時間および48時間後、またその後に正常浸透圧に戻し2時間後に観察し、differential display法等を用いて誘導あるいは抑制のかかる遺伝子を探索した。浸透圧変化により発現変化を見せる遺伝子が複数得られた。一つ目はMAPkinase cascadeに関わるras類似のG蛋白であるrap1b、二つ目はenergy metabolismに関わるATP/ADP carrier proteinとcytochrome C oxidase 6B subunit、そして浸透圧調節に直接関わると考えられる新規のトランスポーターである。これはアストロサイトの培養系において高浸透圧負荷後1.5時間で誘導がかかり48時間後では非常に強い抑制がかかった。これよりオリゴペプチドもアミノ酸と同様にオスモライトとして浸透圧制御に関わっている可能性が示唆された。塩基配列および機能解析よりペプチドトランスポーター遺伝子ファミリーに属する遺伝子と考えられ、その局在は海馬、大脳皮質など、神経系に限局していた。神経系特異的ペプチドトランスポーターは現在まで報告がない。

（実験方法） アストロサイトの初代培養系を用いて、NaClにより300mOsmから500mOsmへの浸透圧変化を加え、1.5時間および48時間後、またその後に正常浸透圧に戻し2時間後にRNAを抽出した。random primerを用いたcDNAに対するPCRにより、differential display法を行った。4系で差の認められるバンドを切り出しサブクローニングし、さらにnorthernblotで真に誘導あるいは抑制のかかる遺伝子を確認した。これが未知の遺伝子の場合はスクリーニングによりクローニングへと進んだ。またvivoにおける浸透圧変化のモデルとしてWistar ratに4Mの食塩水を体重100gあたり0.8ml腹腔内に注入しやはり 1.5時間後に、in situ hybridizationで観察した。

（結果） 浸透圧変化により発現変化を見せる遺伝子が複数得られた。一つ目はMAPkinase cascadeに関わるras類似のG蛋白であるrap1b、二つ目はenergymetabolismに関わるATP/ADP

carrier proteinとcytochrome C oxidase 6B subunit、そして浸透圧調節に直接関わると考えられる新規のトランスポーターである。

rap1はvitroの系において高浸透圧負荷後1.5時間で誘導が見られた。これはvivoの高張Na負荷モデルでも大脳皮質、paraventricularnucleusに強い誘導が見られる。誘導はグリアのみならずニューロンにもみられ、神経系細胞に共通の反応であると考えられた。ミトコンドリア内膜に存在し、cytosolへのATPの供給を行う蛋白であるATP/ADP carrier proteinはアストロサイトの系において高浸透圧負荷後急性期に誘導が見られた。vivoの高張Na負荷モデルでもやはり大脳皮質のグリアおよびニューロンに誘導が見られた。さらに電子伝達系の cytochrome oxidase 6B subunit mRNAは、慢性期において誘導がみられた。

未知の遺伝子として得られたクローンはアストロサイトの培養系において高浸透圧負荷後1.5時間で誘導がかかり48時間後では非常に強い抑制がかかった。塩基配列は植物のhistidinetransporter、yeastのpeptide transporterなどに相同性があり、哺乳類では小腸および腎臓で発見されたpeptide transporterに一部弱い相同性がみられ、ペプチドトランスポーター遺伝子ファミリーに属する遺伝子と考えられた。ラットの各臓器における局在をnorthernblotで解析した結果、脳および眼に比較的豊富に存在しているが、他の臓器にはほとんどバンドはみられなかった。大脳における局在をinsitu hybridizationで解析した結果、海馬、大脳皮質などにsignalがみられた。オリゴペプチドもアミノ酸と同様にオスモライトとして浸透圧制御に関わっている可能性がある。

(考察) rap1はras類似の物質で、単独でMAP kinase cascadeに対し促進的に働くことも、また拮抗的に働くことも知られている。高浸透圧によりMAP kinase cascadeを通じてさまざまな遺伝子変化が誘導されるといわれているが、この系にrap1が関わっていると考えられる。またosmolyte transporterが有効に働くためにはエネルギーが必要となることなどから考え、oxidativemetabolismに関わる遺伝子群の誘導が見られるのは妥当であると考えられる。脳虚血などエネルギーの欠乏した部位ではosmoticstressに対する防御機構が十分に働かない可能性がある。

また今回新たにクローニングした遺伝子は神経系特異的ペプチドトランスポーターと考えられるが、このトランスポーター遺伝子ファミリーに共通の性質はプロトンdependentにpeptideやhistidineを細胞内に取り込むシステムである。アシドーシスにおいてトランスポーター活性が高まるという特徴より、細胞外アシドーシスを引き起こす脳虚血などの病態時に重要な役割を担っている可能性がある。このmRNAは上記のような遺伝子変化をみせることより、オリゴペプチドもアミノ酸と同様にオスモライトとして浸透圧制御に関わっている可能性がある。そして浸透圧調節に直接関わると考えられるものは、従来いわれていたosmolytetransporter以外にも存在し、多段階多方面からの調節機構が浸透圧制御に必要であることが推察された。

differentialdisplay法は浸透圧制御機構を解明していく有効な手段であると考えられる。

219 脳の発達に伴うニューレキシンのスプライシングパターン変化の解析

1E69

野村隆則、吉田 明、吉岡 亨
早稲田大学・人科・分子神経生物

〔 要約 〕

ニューレキシン（NRX）にはスプライシングの結果、非常に多種類のmRNAが存在することが報告されている。本研究では、このスプライシングが何らかの制御を受けているか否かの検討を行った。我々は、αNRXⅠのスプライシングサイト1に着目して、その両端にPCR用プライマーを設定し、RT-PCR法によりスプライシング産物の発現を検出した。まず、PC12細胞におけるNGF処理の影響を検討したところ、2週間のNGF処理により未処理時には確認できなかった、約230bpの増幅産物が検出された。ラット脳を用いて同様のRT-PCR解析を行ったところ、生後5日の海馬及び小脳で、NGF処理PC12細胞と同様のパターンを示したのに対し、生後8週令ではNGF未処理のPC12細胞と同様のパターンを示した。以上の結果は、ニューレキシンのスプライシングパターンが、脳の発達や外部刺激に伴って制御されていることを示している。

【緒言】

NRXは神経のシナプス部位に特異的に発現している膜貫通タンパク質であり、3つの遺伝子（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）が同定されており、それぞれが2カ所のプロモータから2種類の転写産物（α、β）を発現する1)。いずれもタンパク質のアミノ末端領域が細胞外に露出しており、アグリンやラミニンAと相同なアミノ酸配列を持つ。βNRXのあるスプライシング産物に対しては、シナプスに存在する特異的な結合タンパク質ニューロライジンの存在がすでに報告されており2)、NRXは細胞間の接着や相互作用に関わっていることが予想されている。この細胞外ドメインはスプライシングの結果、非常に多様なタンパク質が発現していると推定されており3)、神経細胞間のシナプス結合の認識等に何らかの役割を果たしていることが期待されている。しかしながら、このような多様性を持ったスプライシングがどのように制御されているのかについては殆ど研究されていない。今回我々は、PC12細胞でのNGF刺激に応じたスプライシングの変化、及びラット脳の発達に応じたスプライシングの変化の検討を行った。

【方法】

（1）PC12細胞のNGF処理：PC12細胞（G11株）を60mmディッシュで培養し、2～4週間NGF（100ng/ml）処理をおこなった。細胞は7日ごとに継代した。（2）mRNAの調製：Guanidine Thiocyanateを含む溶液でRNAを抽出後、oligo(dT)columnを用いて精製。（3）RT-PCRによる解析：mRNAからランダムプライマーを用いてcDNAを作製した。cDNAをラットαNRXⅠのスプライシングサイト1の両側に2種類ずつのプライマー（計4種類）を設定し、PCRした後に未変性アクリルアミド電気泳動により増幅DNA断片を確認した。

【結果】

（1）NGF処理による新たなスプライシング産物の出現：PC12細胞でのNRXスプライシング産物の発現パターンをRT-PCRを用いて解析したところ、約70bp～2kb前後の間に約20種類の特異的増幅産物

がエチジウムブロマイド染色により確認された。この結果は、クローン細胞であるPC12細胞においても、複数のスプライシング産物が発現していることを示している（図1、レーン1、3）。次に、2週間のNGF処理後に同様の解析を行ったところ、未処理細胞では見られなかった約230bpのPCR増幅産物が確認された（図1、レーン2、4）。（2）ラット脳の発達に伴うスプライシングパターンの変化：生後5日令と生後8週令のラット海馬及び小脳のNRXのスプライシングパターンをRT-PCR法により検討した。その結果、生後5日令ではPC12細胞においてNGF処理を行ったときに観察された、約230bpの増幅産物が観察されたが、生後8週令ではNGF未処理のPC12細胞と同様のパターンを示し、約230bpの増幅産物は観察されなかった（図2）。

【考察】

NRXはその細胞間相互作用に関わっていると考えられている細胞外領域が、スプライシングの結果、非常に多様性に富んでいると予想されている。このスプライシングのパターンが、脳神経系の発達過程や何らかの刺激に応じて変化するか否かを明らかにすることは、NRX役割を考える上で非常に重要である。本研究の実験結果から、PC12細胞においてはNGF処理により分化を誘導した際に、それまで見られなかったスプライシング産物が発現していることが示された。一方、神経系でシナプス結合等の発達が盛んな生後初期において、NGF処理PC12細胞と同様なスプライシング産物が発現していると言う実験結果は、神経回路網の形成時にある特異的なスプライシング産物が何らかの関わりを持っていることを予想させるものである。現在この約230bpのPCR増幅断片をクローニングし塩基配列を決定することにより、どの様なスプライシングがこの時期特異的に起きているかを検討しているところである。

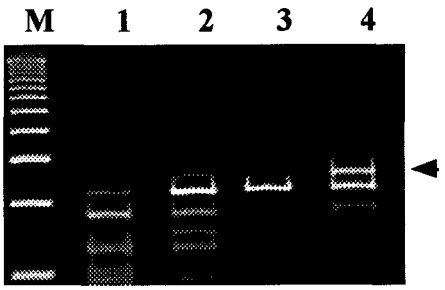


図1　PC12細胞のNGF処理に伴うスプライシングパターンの変化:
1: PC12 (G11) NGF未処理
2: PC12 (G11) NGF 2 週間処理
3: PC12 (B3) NGF未処理
4: PC12 (B3) NGF 2 週間処理

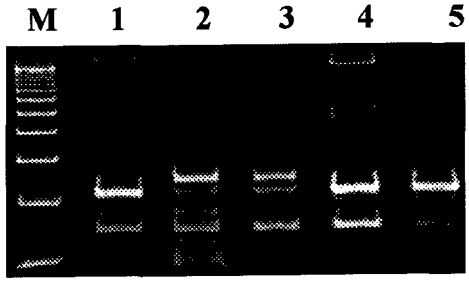


図2　ラット発達過程におけるスプライシングパターンの変化
1: PC12 (G11) NGF未処理
2: ラット(P5)の海馬
3: ラット(P5)の小脳
4: ラット(P56)の海馬
5: ラット(P56)の小脳

【文献】1）Ushkaryov, Y. A., et al., Science 257,50-56 (1992).
2）Ullrich, K., et al., Neuron.14.497-507 (1995).
3）Ichtchenko, K., et al., Cell.81.435-443 (1995).

220 ヒトnecdinゲノム遺伝子の構造解析

1E70

中田 祐二、谷浦 秀夫、植月 太一、吉川 和明
(大阪大学蛋白質研究所・蛋白質機能制御部門)

〔 要約 〕

necdin 遺伝子の構造と発現様式が動物種間で保存されているか調べるため、ヒトnecdinゲノム遺伝子の単離を行った。マウスnecdinゲノム遺伝子とのプロモーター領域の遺伝子配列の比較を行ったところ、転写開始部位付近の配列およびG+C-rich領域は保存されていたがXRE(xenobiotic response element)モチーフでは2塩基に違いがあることがわかった。このことにより、ヒトとマウスで転写調節に違いがある可能性が考えられる。また、塩基性アミノ酸領域とhydrophobic heptad repeat (7アミノ酸おきのLeucineまたはIsoleucine残基の繰り返し配列)の領域は保存されていた。ホモロジー検索を行ったところMAGE 1とアミノ酸レベルで約30%の相同性があることがわかった。MAGEファミリー遺伝子は腫瘍細胞と生殖細胞のみに発現し、necdinは神経細胞に特異的に発現しているが、これらの遺伝子は共通の祖先遺伝子から分かれたものと推定される。

マウスnecdinは325個のアミノ酸から成る神経分化特異的核蛋白質で、そのcDNAはレチノイン酸で神経分化させたP19細胞(マウス胚性腫瘍細胞)のcDNAライブラリーからクローン化された(1)。またnecdin cDNAをNIH3T3細胞に遺伝子導入してnecdin蛋白質を強制発現させると細胞増殖が強く抑制され細胞周期が停止状態になる(2)。necdin mRNA の分布はニューロンに特異的に発現しており、ゲノムnecdinクローンの5'上流域を用いたプロモーター解析でもP19細胞から分化した神経細胞で特異的な活性があることが示されている(3)。そのプロモーター活性を示す領域にはTATAボックスやCAATボックスはないがXREモチーフがあることがわかっている。一般に蛋白質の機能に重要な領域のアミノ酸配列はよく保存されていることが知られている。そこで、necdin遺伝子の配列が動物種を越えて保存されているかを検討するためヒトnecdinゲノム遺伝子の構造決定を行った。

[方法]ヒトnecdin cDNAをプローブとしてヒトゲノムライブラリー(末梢白血球由来DNAライブラリー)をプラークハイブリッド法を用いてスクリーニングを行い、クローンを単離した。このDNAを適当な制限酵素処理を行ってpBluescriptにサブクローニングを行い塩基配列を決定した。

[結果と考察]プロモーター領域の遺伝子配列解析の結果、マウスnecdinと同様にTATA, CAATボックスがないことがわかった(図1)。マウスゲノム遺伝子を用いたプロモーター解析の結果からXREモチーフとG+C-rich region が分化神経細胞に特異的な発現を制御する上で重要であることがわかっている(3)。ヒトnecdin遺伝子でもG+C-rich領域は保存されていたが、XREモチーフでは2ヶ所で塩基配列が異なっていた(A➡G,T➡G) (図1)。この2ヶ所の変異によってXREモチーフとG+C-rich領域の協調的転写制御が保持されているかは現在解析中である。一方、転写開始部位付近の配列はよく保存されていた。次に、コーディング領域の解析では、マウスnecdinとヒトnecdinのアミノ酸レベルでの相同性は約76%であることがわかった。necdinのN末端部にはtransactivation domainと考えられる領域が存在するがヒトとマウスでの相同性は低くかった (図2)。また、necdinの機能に重要と考えられるbasic-hydrophobic heptad repeatの領域は良く保存されていた (図3)。次に、このヒトnecdin遺伝子と他の遺伝子の相同性を調べたところ、ヒトMAGE 1(4)とアミノ酸レベルで27%の相同性があった (図4)。同一部位の配列をマウスnecdin遺伝子とヒトMAGE1遺伝子の間で比較すると32%の相同性があった。MAGE遺伝子は色素細胞腫で発現し、細胞溶解能をもつTリンパ球によって認識される抗原として同定されたものである。MAGEファミリーの遺伝子は腫瘍細胞と生殖細胞のみに発現し、正常の体細胞には発現していない。分化した神経細胞に特異的に発現しているnecdin遺伝子はMAGEファミリー遺伝子と共通の祖先遺伝子から分かれた可能性があり、両者の機能と分子進化を考える上で興味深い。

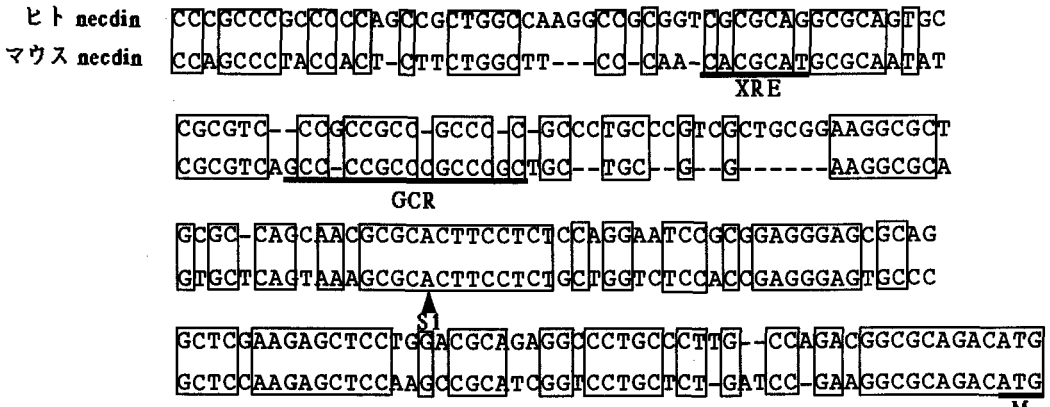


図1　ヒトnecdinとマウスnecdinのプロモーター領域の比較　一致したアミノ酸を囲んだ
XRE, xenobiotic response element　S1, transcription initiation site
GCR, G+C-rich region　M, translation start codon

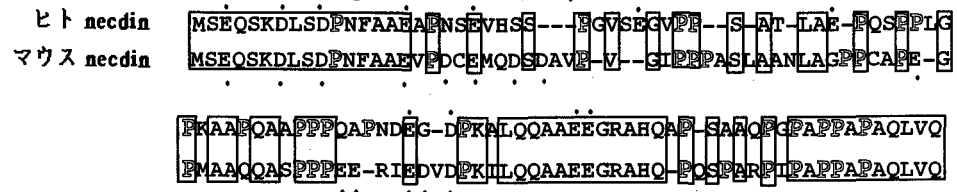


図2　N末端部位のProline rich acidic regionの比較　一致したアミノ酸を囲んだ　・, 酸性アミノ酸

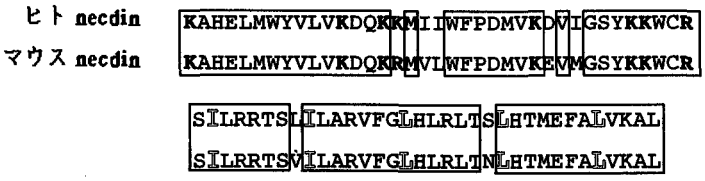
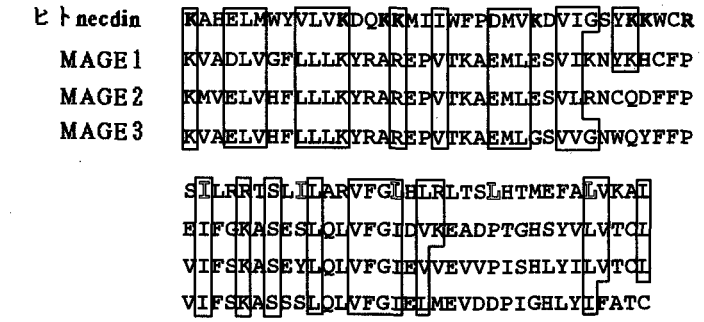


図3　basic-hydorophobic heptad repeat領域の比較　一致したアミノ酸を囲んだ



太文字　塩基性アミノ酸領域　**斜文字** hydorophobic heptad repeat

図4　basic-hydorophobic heptad repeat領域とMAGE 1, 2, 3の比較　一致したアミノ酸と同族性があるアミノ酸を囲んだ

[参考文献]

1. Maruyama, K.,Usami, M.,Aizawa, T. and Yoshikawa, K. (1991)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 178: 291-296.
2. Hayashi, Y.,Matuyama, K.,Takagi, K.,Sugiura, H. and Yoshikawa, K. (1995)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 213: 317-324.
3. Uetsuki, T.,Takagi, K.,Sugiura, H.,Yoshikawa, K. (1996) J.Biol.Chem., 271: 918-924.
4. Van-der-Bruggen, P.,Traversari, C.,Chomez, P.,Lurquin, C.,De-Plaen, E.,
Van-den Eynde, B., Knuth, A.,Boon, T. (1991) Science 254: 1643-7.

221 1E71 ヒト脳に存在する Hippocalcin 類似蛋白質（ hHLP3 ）の cDNA クローニング

小林正明、斎藤茂治、野口鉄也、高松 研
（東邦大学・医学部・第２生理）

〔 要約 〕

ヒト脳 cDNA ライブラリーより６種類の Hippocalcin 類似蛋白質（hHLP1~6）の cDNA クローンを単離し、これらのうちhHLP3 について全塩基配列を決定した。hHLP3 cDNA は 576 bp の蛋白質翻訳領域を持ち、191残基のアミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。予想アミノ酸配列の解析から、hHLP3は４個の EF-hand 様構造とアミノ末端のミリスチン酸付加の共通配列を持ち、23 kDa 神経特異的カルシウム結合蛋白質ファミリー（ P23k ファミリー)に属することが明らかとなった。また、ヒトの各臓器および脳内各部位ごとのノーザンブロットを行った結果、hHLP3は脳に特異的で、特に大脳皮質を中心に存在することが明らかとなった。

〔 緒言 〕

近年、分子量約 23 kDa、４個の EF-hand 様構造と N 末端のミリスチン酸付加配列を持つ、細胞内カルシウム結合蛋白質が、網膜視細胞[1)~3)]および中枢神経系の投射型神経細胞[4)~6)]より相ついで同定された。これらの蛋白質は、一次構造上極めて高い相同性を示していることから、神経系特異的なカルシウム結合蛋白質ファミリー（ P23k ファミリー ）を形成していると考えられる。網膜視細胞に存在する visinin, recoverin および S-modulin は、明暗順応に際してロドプシンのリン酸化をカルシウム依存性に制御することで光情報の伝達効率を調節している[3),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。いずれも生理機能については明らかにされていないが、各々が存在している神経細胞内で、神経細胞に特異的な共通の機構により情報伝達の調節に関与していると考えられる。我々は，P23k ファミリーに属する分子種と精神神経疾患との関連を追求する目的で、ヒト脳に存在する分子種の解析を行い、これまでに hHippocalcin[8)]および hHLP2[9)] を同定している。今回、新たな cDNA クローンを同定し、ヒト脳内での局在について検討した。

〔 実験方法 〕

１） cDNA クローニング：ヒト脳 cDNA ライブラリー（ Clontech Labs. USA ）を、ラット Hippocalcin cDNA をプローブとして low stringency condition でスクリーニングした。

２）ノーザンブロット：ヒト各臓器および脳内各部位ごとのノーザンブロットパネル（ BIOS. USA ）を用い，hHLP3 cDNA (542 bp ~ 642 bp, Fig. 1.) をプローブとした。

〔 結果と考察 〕

ヒト脳 cDNA ライブラリーをラット Hippocalcin cDNA をプローブとして low stringency condition でスクリーニングし、８個の独立したクローンを得た。これらのクローンは、制限酵素部位のパターンから６種類の cDNA に対応すると考えられ、hHLP1～6 と命名した。これらのうち、hHLP3 について全塩基配列を決定した。hHLP3 cDNA は全長 943 bp で、全蛋白質翻訳領域を含んでいた。翻訳領域は 576 塩基対からなり、191 残基のアミノ酸からなる推定分子量 22,135 dalton、等電点 5.10 のポリペプチドをコードしていた（ Fig. 1)。hHLP3 の一次構造中には、P23k ファミリーの蛋白質に共通する４個の EF-hand 様構造と N 末端のミリスチン酸付加配列の存在が認められた。また、既知のラット P23k ファミリーの蛋白質との塩基配列およびアミノ酸配列の相同性を比較解析したところ、hHLP3は rNVP1 との間に最も高い相同性を示した (Fig. 2)。また、ヒトの各臓器および脳内各部位から調製した mRNA (各 2μg) を用いたノーザンブロットの結果、hHLP3 mRNA は、2 kb の単一バンドとして認められ、脳に特異的で、特に大脳皮質を中心に存在しいることが明らかとなった (Fig. 3)。

```
-139                                                    GAATTCCAAAAAGAGAGCG
-120  AGAGAGAACCACACACAGAGACGGCTTAAGCGTTTACCCGAATTAAATATATATTTTTAA
 -60  AAAGAACTGTTGAGTTTTATCATTTTCGTTAAGTGACCGTGCGCAGCTGGTAACTGCAGG
   1  ATGGGGAAGCAGAATAGCAAACTGGCCCCTGAAGTGATGGAGGACCTGGTGAAGAGCACA
      M  G  K  O  N  S  K  L  A  P  E  V  M  E  D  L  V  K  S  T    20
  61  GAGTTTAATGAGCATGAACTCAAGCAGTGGTACAAAGGATTTCTCAAGGACTGTCCAAGT
      E  F  N  E  H  E  L  K  Q  W  Y  K  G  F  L  K  D  C  P  S    40
 121  GGGAGGCTAAATGTGCACCAATTTCAGCAGCTCTATGTGAAGTTCTTTCCTTATGGAGAC
      G  R  L  N  L  E  E  F  Q  Q  L  Y  V  K  F  F  P  Y  G  D    60
 181  GCCTCCAAGTTTGCCCAGCATGCCTTCCGAACCTTCGACAAGAATGGGGACGGCACCATT
      A  S  K  F  A  Q  H  A  F  R  T  F  D  K  N  G  D  G  T  I    80
 241  GACTTCCGAGAGTTCATCTGCGCTCTGTCCATCACCTCCAGGGGCAGCTTTGAGCAGAAG
      D  F  R  E  F  I  C  A  L  S  I  T  S  R  G  S  F  E  Q  K   100
 301  CTGAACTGGGCCTTCAATATGTATGACCTGGATGGTGATGGCAAGATCACCCGAGTGGAG
      L  N  W  A  F  N  M  Y  D  L  D  G  D  G  K  I  T  R  V  E   120
 361  ATGCTGGAGATCATCGAGGCTATCTACAAAATGGTAGGCACTGTGATCATGATGAAAAAG
      M  L  E  I  I  E  A  I  Y  K  M  V  G  T  V  I  M  M  K  K   140
 421  AATGAGGATGGCCTGACGCCTGAGCAGCGAGTAGACAAGATTTTCAGCAAGAAGGATAAG
      N  E  D  G  L  Y  P  E  Q  R  V  D  K  I  F  S  K  K  D  K   160
 481  AACAAAGATGACCAGATTACACTGGATGAATTCAAAGAAGCTGCAAAGAGCGACCCTTCC
      N  K  D  D  Q  I  T  L  D  E  F  K  E  A  A  K  S  D  P  S   180
 541  ATTGTATTACTTCTGCAGTGCGACATGCAGAAATGAGCTGATGTCAATGCTATGGACTGC
      I  V  L  L  L  Q  C  D  I  Q  K  *                          191
 601  ACAAAAGTCTCAATGTTCCATTCAGTCTGCAGCTATTCACACACACACACACACACACAC
 661  ACACACACACACACACACACACACACAAATATTGCTTGGACTACCTATAAATGGACTTGC
 721  TTCTTGTGTTTGAAACACTCGTGTGCATGAGAATGTCATTTGCTAATGAATTTTAAAAGC
 781  ATATATAAAACAAAACAGGAATTC
```

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the human HLP3 cDNA clone. The nucleotide and deduced amino acid sequences are numbered beginning with the first nucleotide of the translational initiation codon (left side) and the initiator methionin (right side), respectively. Four putative calcium-*binding* domains of the EF-hand structure are underlined. * indicates termination codon.

human \ rat	rNVP1	rNVP2	rNVP3	rHippocalcin
hHLP3	**98% / 91%**	87% / 81%	66% / 72%	66% / 70%
hHLP2	67% / 73%	65% / 74%	**97% / 92%**	94% / 87%
hHippocalcin	66% / 72%	66% / 72%	93% / 86%	**100% / 92%**

Table 1. The nucleotide and amino acid identities between human and rat members of the p23k family. Left column : nucleotide identity, right column : amino acid identity.

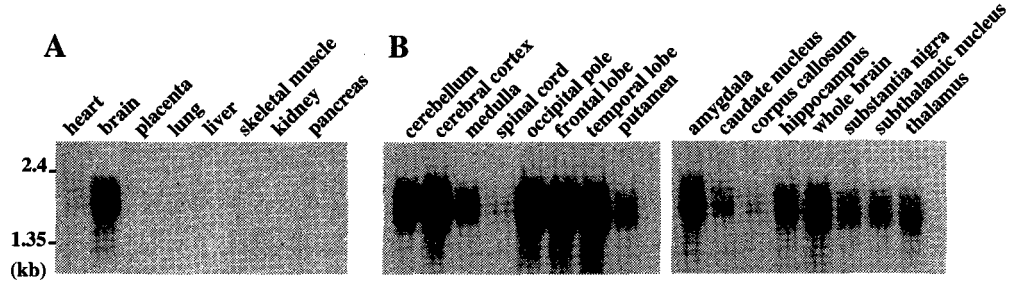


Fig. 2. Northern blot analysis of the human HLP3 mRNA in the various human tissues (A) and various human brain regions (B).

[参考文献] : 1) Yamagata K. et al. (1990) Neuron 2, 469-476 2) Dizhoor A.M. et al. (1991) Science 251, 915-918 3) Kawamura S. and Murakami M. (1991) Nature 349, 420-423 4) Okazaki K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 185, 147-153 5) Kuno T. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 1219-1225 6) Kobayashi M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 511-517 7) Kawamura S. (1993) Nature 362, 855-857 8) Takamatsu K. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 606-611 9) Kobayashi M. et al. (1994) Biochim. Biophys. Acta. 1222, 515-518

222 2Aa1 NeuroDファミリーに属する新しい神経特異的bHLH蛋白cDNAの単離と解析

安波道郎[1]、鈴木和夫[1]、永井康雄[2]、萩原正敏[2]、丸山博文[3]、川上秀史[3]、大久保博晶[1]
([1]熊本大学・医・遺伝発生研、[2]名古屋大学・医・解剖学第三、[3]広島大学・医・第三内科)

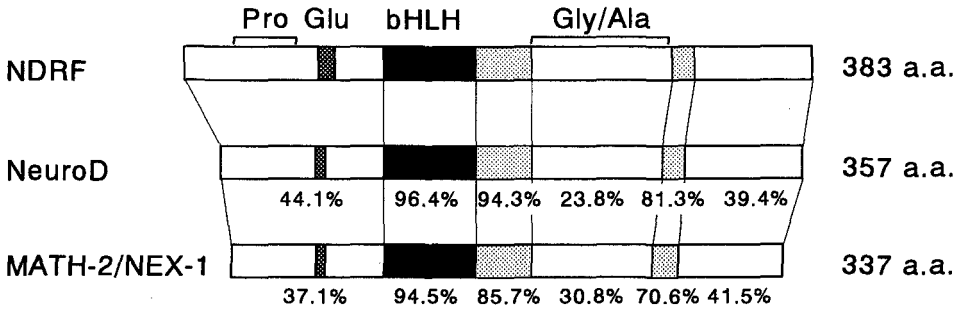
〔 **要約** 〕最近、発生途上の脊椎動物神経系に発現するbasic helix-loop-helix(bHLH)型転写因子としてNeuroD およびMATH-2/NEX-1のcDNAが単離され、脊椎動物の神経の発生分化に関わる新たなbHLH蛋白の存在が明らかになりつつある。今回、我々は新たなマウスbHLH蛋白NDRF (NeuroD-related factor)のクローンを単離した。その383残基のアミノ酸配列はNeuroDおよび、MATH-2/NEX-1とそれぞれ53.4%、52.2%の相同性を示した。NDRFmRNAの発現は胎生12日以降の脳に検出され、また成体の脳では、海馬、歯状回、小脳に局在していた。構造および発現分布の特徴から、NDRFはNeuroDファミリーの新しいメンバーであり、神経発生や可塑性に関与する可能性が示唆された。

[目的] bHLH蛋白は、筋肉や神経の発生分化に深く関与すると考えられている。例えばMyoDファミリーに属するbHLH蛋白群は、筋細胞に特異的な遺伝子発現を活性化する一方、それぞれに特徴的な構造と発現のパターンを示し筋細胞の増殖と分化の制御に重要な役割を果たすことが知られている。最近、マウスおよびアフリカツメガエルから単離された新しいbHLH蛋白 NeuroDはアフリカツメガエル胚の予定表皮細胞を神経細胞へ転化させうることから、神経の終末分化に重要な役割を演ずることが強く示唆された(1)。また膵β細胞のインスリン遺伝子の転写を活性化するBETA2、および小脳に特異的なbHLH蛋白BHF1はNeuroDの各々ハムスター、ラットのホモログであることが明らかとなった(2,3)。一方、脳特異的なbHLH蛋白MATH-2/NEX-1 (4,5)もNeuroDと高い相同性を示し、これらがファミリーを形成すると考えられた。従ってMyoDファミリーにおけると同様に神経系においてもNeuroDファミリーに属する複数のメンバーが存在し、神経細胞の発生分化に関与する可能性が強く示唆されたので、本研究では新たな神経特異的なbHLH蛋白cDNAの単離と解析を行なった。

[方法] ラットのNeuroD/BHF1cDNAプローブを用いて胎生14日マウスcDNAライブラリーをスクリーニングし新たなbHLH蛋白のcDNAを単離した(6)。その結果得られたクローンのうちの1個は、NeuroDと相同性を示す新たな配列を含んでおり、その全塩基配列を決定しそれにコードされるアミノ酸配列を推定した。さらに発現分布をノーザンブロット法およびin situハイブリダイゼーション法により解析した。

[結果] 単離したcDNAクローンは383アミノ酸残基の蛋白をコードしており、その配列は既知のbHLH蛋白と有意の相同性を示した。中でも、NeuroDと53.4%、MATH-2/NEX-1と52.2%と高い相同性を示し（NeuroDとMATH-2/NEX-1間では51.7%）、我々はこの蛋白をNDRFと命名した。NDRFのbHLH領域の配列は、NeuroDと96.4%、MATH-2/NEX-1と94.5%相同であるが（図）、他のbHLH蛋白との間では61%以下の相同性しか認めないことから、NDRF、NeuroD、MATH-2/NEX-1は同一のサブファミリーを形成すると考えられた。bHLH領域以外にも三者に共通して

(i)N末側の連続したGlu残基を含む酸性アミノ酸に富む領域、(ii)bHLH領域の直後の高い相同性とleucine zipper様の構造を有する領域、(iii)C末側の短い相同性を示す領域を認めた。一方、NDRFに固有の特徴として(i)N末側のProに富む部分、(ii)中央部のGly/Alaに富む部分を認めた。



（図）NeuroDファミリー蛋白の構造比較

NDRF mRNAの発現はノーザンブロット法でマウスの胎生12日以降の脳に検出され、周産期に増加し、生後も持続していた。従ってNDRF mRNAの出現時期はMATH-2/NEX-1と一致し、胎生9日から発現するNeuroDより遅かった。成体の脳でのNDRFの発現は小脳に顕著で、次いで大脳/間脳にも検出され、その発現の部域差は小脳特異的なNeuroDおよび大脳特異的なMATH-2/NEX-1とは異なっていた。また、脳以外の成体の諸臓器には検出されなかった。さらに詳細なNDRFの発現分布をin situハイブリダイゼーション法により調べた結果、胎生14.5日の脳では大脳皮質、海馬、中脳、小脳にシグナルを認め、成体の脳では海馬錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層、小脳のPurkinje細胞など神経可塑性に関わる領域に強いシグナルを認めた。これらの領域はMATH-2/NEX-1の発現領域と一部重複するが、MATH-2/NEX-1の発現が検出されない歯状回や小脳のPurkinje細胞を含む点が異なっていた。

[考察] NDRFは、NeuroDファミリーの中で保存された構造と固有の構造を持ち、また発現分布も他のNeuroDファミリーのメンバーと重複しながらも異なることから、神経の発生分化や可塑性の発現において共通の機能と共に独自の役割を果たすことが示唆される。またこれらNeuroDファミリーのメンバーは神経細胞の一部のみに分布することから、さらに新たなNeuroDファミリーの蛋白や新たな神経特異的bHLH蛋白のサブファミリーが存在し、遺伝子の発現調節を介して神経の多様性発現に関わっている可能性が予想される。

[文献]

1. Lee, J. E. *et al.* (1995) *Science* **268**, 836-844.
2. Naya, F. J. *et al.*(1995) *Genes Dev.* **9**, 1009-1019.
3. Kawakami, H. *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 199-204.
4. Shimizu, C. *et al.* (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 239-248.
5. Bartholoma, A and Nave, K.-A. (1994) *Mech. Dev.* **48**, 217-228
6. Yasunami, M. *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 754-758.

223 2E1 マウスType1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R1) の発現に関与する脳特異的bHLH蛋白質の解析

小西 慶幸[1]、小林 恭士[1]、牧野 泰孝[1]、古市 貞一[2]、御子柴 克彦[2]、田村 隆明[1]
([1]千葉大学・理・生物、[2]東京大学・医科研・化学)

〔要約〕
我々はマウス脳由来の核抽出液を用いたin vitro転写実験によりType1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R1) 遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、脳特異的に発現するdHLHタンパク質がこの遺伝子の発現を活性化する事が示唆された。結合の特異性、発現時期などからこの因子は、新規のdHLHタンパク質と考えられる。

〔緒言〕
Type1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R1) は、神経系で特に強く発現する$InsP_3$受容体であり、小脳のプルキンエ細胞、海馬などに豊富に存在することから、Ca^{2+}代謝を介して神経分化及び記憶などの高次神経活動において重要な役割を担っていると考えられている (1, 2) 。さらに、最近になってIP_3R1を欠損したマウスにおいてんかん様の発作が観察されたことから、この遺伝子と神経疾患の関係も注目されてきている (3) 。最近、トランスジェニックマウスを用いた実験によりこの遺伝子のプロモーターのうち、-528～+169の領域がプルキンエ細胞特異的な発現を制御しうることが示された (4) 。本研究では、この領域をさらに詳細に解析し、IP_3R1遺伝子の組織特異的な発現を調節する因子の同定を目的とした。プロモーター解析を行う上で、適した培養細胞が得られていないことから、マウス脳由来の核抽出液を用いた無細胞系転写 (5) による解析を試みた。

〔方法〕
1. in vitro転写解析 IP_3R1遺伝子のプロモーター (-524～+165) を上流と下流から削り、各ミュータントの転写活性をマウス全脳、小脳、大脳、ラット肝臓から調製した核抽出液を用いた変法S1マッピングにより解析した。
2. CATアッセイ in vitro転写で用いた各プロモーターをCATベクターに組み込み、IP_3R1を発現するNG108-15細胞 (6) と殆ど発現しないMDCK2細胞にトランスフェクトしCAT活性を測定した。
3. フットプリントアッセイ IP_3R1遺伝子のプロモーターのうち脳特異的な転写活性化能を持つと思われる領域(-398～-295)を末端標識し、マウス全脳核抽出液を用いDNaseIフットプリントアッセイを行った。

〔結果〕
まず、小脳など各組織から得た抽出液中でIP_3R1を転写させたところ、特異的な転写が起こることが示された。欠失解析の結果、小脳では上流(-524)から126bpを削ると、大きな活性の上昇がみられ、さらに96bp削るとほとんど活性がなくなった。肝臓の核抽出液を用いた同様の実験ではこれほど顕著な差がみられず、この部分(-398～-295)が、脳特異的な転写因子の標的部位の一つであることが強く示唆された。また、これと同様の結果はNG108-15細胞を用いたCAT解析によっても得られた。この領域に結合する因子

を検出するために脳核抽出液を用いてフットプリント解析を行ったところ、-392から-331の部分に核内因子が結合する事が明らかになった。この領域は、筋分化に関与するMyoDや神経分化に関与するNeuroDなどのbasic Helix-Loop-Helix (bHLH) タンパク質の認識配列であるE-boxを含むことから、IP_3R1発現制御においても重要な役割を持つ領域と考えBox-Iと呼ぶことにした。ゲルシフト解析の結果から、脳特異的なbHLHタンパク質がBox-Iに結合することが示された。また、Box-Iの内部欠損変異体は小脳核抽出液中で肝臓に比べ有意に転写活性の減少が見られるたことや、無細胞転写系にBox-Iの配列を持つDNAをコンペティターとして加えると転写活性が減少することから、脳核抽出液中においてBox-I結合因子がIP_3R1遺伝子の転写活性化に関与することが強く示唆された。Box-I結合因子は親のマウスやラットの脳には豊富に存在するが、他の組織（肝臓、脾臓、精巣）には発現が見られなかった。胎児期では異なる因子の結合が見られ、このことは生後10日前後に見られるIP_3R1の発現量の著しい増加と相関するのではないかと考えられる。また、ゲルシフト解析において様々なコア配列を持つE-boxへの結合の特異性を調べたところ、この因子はNeuroDファミリーの一つであり神経分化や生後の脳において神経細胞の維持に関与すると考えられているMATH-2 (7) とは異なった結合の特異性を示し新規のbHLH因子ではないかと考えられた。

〔考察〕

現在までにMASHやNeuroDファミリーをはじめ、神経分化に関与すると考えられるいくつかのbHLHタンパク質がクローニングされているが、これらの因子がどの遺伝子の転写を調節し、神経分化が行われるかということは殆ど明らかになっていない。本研究で脳特異的なbHLHタンパク質が生後の脳においてIP_3R1遺伝子のプロモーターを標的とし、転写活性化に関与する事が示唆された。今後、この因子の同定、及びIP_3R1遺伝子のプロモーターの他の領域について研究を進めることで神経分化に伴うIP_3R1発現調節機構が明らかになると考えられる。

〔参考文献〕

1 Berridge, M. J. (1993) Nature 361, 315-325

2 Furuichi,T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guenet, J.-L., and Mikoshiba, K., (1993) Recept. Channels. 1, 11-24

3 Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., Takano, H., Minewa,O., Kuno, J., Sakakibara, S., Yamada, M., Yoneshima, H., Miyawaki, A., Fukuuchi, Y., Furuichi, T., Okano, H., Mikoshiba, K., and Noda, T. (1996) Nature 379, 168-171

4 Furutama, D., Shimoda, K., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Furuichi, T., and Mikoshiba,K., (1996) J. Neurochem. 66, 1793-1801

5 Tamura, T., Ohya, Y., Miura, M., Aoyama, A., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (1989) Technique, 1, 33-36

6 Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989) Nature 342, 32-38

7 Shimizu, C., Akazawa, C., Nakanishi, S., and Kageyama, R., (1995) Eur. J. Biochem. 229, 239-248 (1995)

224 脳可溶性画分における転写制御因子DNA結合能

2Aa2

東 泰孝、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔 要約 〕

マウス全脳の可溶性画分を用いて、ロイシンジッパー型転写制御因子Activator protein 1(AP1)のDNA結合能をゲル移動度シフトアッセイにより検討した。全脳可溶性画分中にはAP1結合能が検出されたが、反応温度25°Cの場合には単一の放射性バンドのみが見い出されたのに対して、反応温度2°Cの場合はその他にゲル上での移動度の異なる新しい放射性バンドが検出された。反応温度2°Cの場合は、NaClおよびKClの添加は200 mMまで濃度依存的に両方のAP1結合能を著明に増強させたが、$MgCl_2$は移動度の異なる2種類のAP1結合能に対して著変を与えなかった。以上の結果より、核内蛋白質であるAP1のDNA結合能が可溶性画分に見出されること、および可溶性画分のAP1結合能は細胞核抽出液中のAP1結合能とは異なる性質を有することが明かとなった。

転写制御因子は、細胞核内において遺伝子DNA上のエンハンサー領域やプロモーター領域に見い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DNAからmRNAへの転写活性を調節すると理解される。すなわち、転写制御因子はリボゾーム上で生合成されたのち、細胞質から細胞核内へ移行してその特殊な機能的役割を演じるが、細胞質および細胞核内における蛋白質修飾や蛋白質－蛋白質相互作用を介して、核内移行能やDNA結合能等が調節を受けると推察される。しかしながら、細胞質内における転写制御因子の挙動や細胞核内移行プロセスについては不明な点が多いのが現状である。したがって、本研究ではマウス脳可溶性画分を用いて、転写制御因子のDNA結合能をゲル移動度シフトアッセイにより検討した。

〔実験方法〕

可溶性画分の調製：Std-ddY系雄性マウス(25-35 g)全脳を10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 10 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphateおよび1 μg/ml各種蛋白分解酵素阻害剤(APMSF, leupeptin, antipain, benzamidine)を含む10 mM HEPES-NaOH緩衝液(pH 7.9)でホモジナイズした。このホモジネートを0.6% Nonidet P-40で可溶化後、20,000g、5分間遠心分離した上清を可溶性画分として、使用時まで-80°Cで凍結保存した。

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(1)。

ゲル移動度シフトアッセイ：可溶性画分(10 μg蛋白質)、1 μg poly(dI-dC)、放射性プローブ(20 fmol、1-2×10^5 cpm)、150 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 mM DTT、5 mM NaF, 5 mM β-glycerophosphate、10% グリセロールおよび各種蛋白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2°Cまたは25°C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(2)。

〔実験結果〕

マウス全脳可溶性画分中にはAP1プローブ結合能が検出されたが、反応温度を25°Cから2°Cに低下させると、25°Cの場合に検出された放射性バンド以外にも、ゲル上での移動度の異なる新しい放射性バンドが1本出現した(図1)。反応温度2°Cの場合は、NaClおよびKClを添加すると、ともに200mMまで濃度依存的に移動度の異なる2種類のAP1結合能をいずれも著明に増強させることが判明した。この結合増強作用はNaClよりもKClの方がわずかに強力であった。一方、25°C反応の場合にはAP1結合能は一価陽イオン添加に伴う著明な影響を受けなかった。次に、二価陽イオンの効果を検討した結果、反応温度にかかわらず$MgCl_2$はAP1結合能を阻害することが明かとなった(図2)。反応温度25°Cの場合は、非放射性のAP1およびcAMP response element binding protein(CREB)プローブの添加に伴いAP1結合は濃度依存的に阻害された。一方、反応温度2°Cの場合にのみ出現する移動度の速い放射性バンドは、非放射性AP1プローブの添加では結合能が抑制されるのに対して、非放射性CREBプローブ添加ではほとんど著明な影響を受けなかった。

図1. 一価陽イオン添加の影響

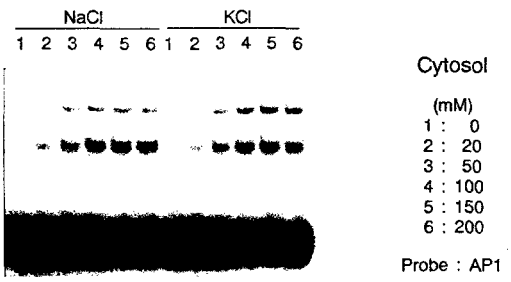
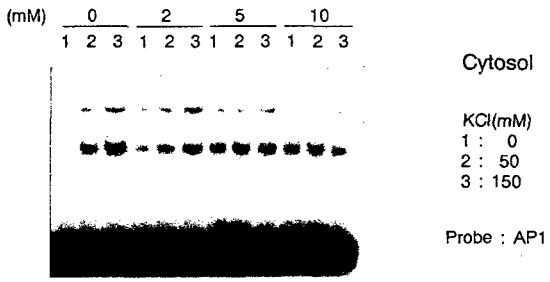


図2. $MgCl_2$添加の影響



〔考察〕

本研究において、マウス全脳可溶性画分に転写制御因子AP1のDNA結合能が検出されることが明かとなった。このAP1結合能はNa^+、K^+あるいはMg^{2+}により調節を受けるので、転写制御因子AP1は細胞質中でも細胞核内の場合と同様に二量体形成能を有するものと推察される(3)。しかしながら、イオン要求性や反応温度依存性などの相違を考慮すると、細胞質内と細胞核内のAP1二量体が同一ではない可能性も否定できない。一方、細胞質から細胞核内への移行を考えると、細胞質内では単量体と二量体の間に平衡状態が成立する必然性が要求されるものと思われる。さらに、反応温度低下がゲル移動度の異なる新しい結合蛋白質出現という質的な変化を誘発することは極めて興味深い現象であり、今後この新規に出現するDNA結合蛋白質の特性と同定についてさらに詳細なる解析を進めていきたい。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金国際学術研究(08044326)の援助の下に行われた。

〔文献〕

1. Azuma, Y., Ogita, K. and Yoneda, Y. (1996) *Neurochem. Int.* in press.
2. Azuma, Y., Ogita, K. and Yoneda, Y. (1996) *Neurochem. Int.* in press.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1995) *J. Neurochem.* 64, 1431–1439.

225 異なるプロテインモチーフを持つ転写制御因子間におけるクロストークの可能性

2E2

東 泰孝、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔 要約 〕異なるプロテインモチーフを有する転写制御因子間のクロストーク現象出現の有無を探索する目的で、合成グルココルチコイド(GC)であるTriamcinolone acetonide(TA)投与に伴う各種転写制御因子DNA結合能の変動を解析した。まず、脳と副腎の細胞核抽出液を用いて競合実験を比較したところ、ロイシンジッパー型転写制御因子の一つであるActivatorprotein1(AP1)結合能は、脳の場合とは異なり副腎では非放射性AP1およびcAMP response element binding protein(CREB)プローブの添加によりほぼ同等度に濃度依存的に阻害された。しかしながら、各種抗体を用いたスーパーシフト実験の結果は各プローブの有用性を支持した。TA投与2時間後のAP1結合能は、下垂体と副腎では著明な減少が観察されたのに対して、脳の場合はいずれの部位でもTA投与に伴う有意な変動は認められなかった。以上の結果より、少なくとも下垂体や副腎などの末梢性興奮性組織では、亜鉛フィンガー型転写制御因子とロイシンジッパー型転写制御因子間に負のクロストーク現象が存在する可能性が示唆される。

GC受容体は少なくとも三つのドメイン、すなわち、1)リガンド結合ドメイン、2)DNA結合ドメイン、および3)転写調節ドメインから構成される亜鉛フィンガー型転写制御因子の一つである(1)。副腎皮質ホルモンであるGCは細胞膜を容易に透過して細胞内に進入したのち、細胞質中に存在するGC受容体と結合して同受容体の活性化を招来する。活性化されたGC/受容体複合体は、細胞核内に移行後遺伝子DNA上の特定の塩基配列を認識して、自ら標的遺伝子の転写活性を調節する能力を有するだけでなく、GC受容体はc-Junやc-Fosあるいは CREBなど他の転写制御因子のDNA結合能に対しても制御活性を示す。したがって、本研究ではロイシンジッパー型転写制御因子と亜鉛フィンガー型転写制御因子間のクロストーク現象を解明する目的で、合成GCであるTAを投与した動物を用いて、脳、下垂体および副腎内の各種ロイシンジッパー型転写制御因子のDNA結合能を検討した。

〔実験方法〕

薬物投与：Std-ddY系雄性マウス(25-35 g)にTA(50 mg/kg)を皮下投与したのち、経時的に動物を断頭致死させた。また、対照動物にはDMSOを皮下投与した。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(2)。ゲル移動度シフトアッセイ：マウス各部位から調製した核抽出液(1-3 μg蛋白質)、1 μg poly(dI-dC)、放射性プローブ(20 fmol、1-2×10^5 cpm)、200 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 mM DTT、5 mM NaF, 5 mM β-glycerophosphate、10% グリセロールおよび各種蛋白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(3)。

〔結果〕

未処置マウスの副腎から調製した細胞核抽出液を用いて競合実験を行ったところ、AP1結合能は非放射性のAP1およびCREBプローブの添加により濃度依存的に阻害されたが、脳の場合とは異なり両者の阻害力に明確な

相違は認められなかった。しかしながら、抗c-Jun抗体の添加は著明にAP1結合能を阻害したのに対して、CREB結合は抗c-Jun抗体添加による影響を受けなかった。一方、抗CREB抗体は両プローブ結合能に対して著明な影響を与えなかった。また、神経節遮断薬であるHexamethonium(5 mg/kg, i.p.)を投与しても、投与2時間後の時点では副腎内AP1結合能には著明な変動は観察されなかった(表1)。このような条件下でTA投与を行ったところ、投与2時間後における副腎ではTA投与に伴うAP1結合能の著明な減少が認められたが、この変化は投与7時間後には消失した(表2)。一方、下垂体でもTA投与は投与2時間後のAP1結合能を著明に低下させるのに対して、脳内各部位のAP1結合能はTA投与に伴う著明な変動を受けないことが明かとなった。さらに、視床下部について投与1時間目以降5日後まで、TA投与の影響について検討を行ったが、いずれの測定時間でもAP1結合能に明確な変化は認められなかった。

表1. 副腎内AP1結合に対するHexamethonium投与の影響

	Saline	Hexamethonium
Adrenal	100.0± 9.2	109.7± 5.5

Hexamethonium(5 mg/kg, i.p., 2 hr)

表2. TA投与に伴うAP1結合能の変動

	Vehicle	TA
Hypothalamus	100.0± 6.2	92.0± 7.0
Adrenal	100.0± 6.8	43.0± 6.9**
Pituitary	100.0±11.5	43.5±13.2*

TA(50 mg/kg, s.c., 2 hr) *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the value obtained in control

〔考察〕

少なくとも下垂体と副腎では、亜鉛フィンガー型転写制御因子であるGC受容体の活性化は、ロイシンジッパー型転写制御因子であるAP1のDNA結合能を著明に低下させるので、この低下が両転写制御因子間の負のクロストークに由来する可能性が示唆される。これらの実験的事実は、下垂体と副腎においてはGC受容体が自身の標的遺伝子の*de novo*合成に対する転写レベルでの調節だけでなく、他の転写制御因子の転写活性変動を通じて、細胞の基本的な機能と構造の維持に極めて重要な生理学的な意義を持つ可能性を支持するものである。これに対して、脳内ではいずれの条件下でもTA投与に伴うAP1結合能変化が観察されなかったので、クロストーク現象の出現には部位特異性が存在するものと推察される。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金基礎研究C(08672545)の援助の下に行われた。

〔文献〕

1. Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985) *Nature* 318, 635–641.
2. Azuma, Y., Ogita, K. and Yoneda, Y. (1996) *Neurochem. Int.* in press.
3. Azuma, Y., Ogita, K. and Yoneda, Y. (1996) *Neurochem. Int.* in press.

226 2Aa3 1本鎖CRE結合蛋白質(ssCRE-BP)とそのDNA結合活性を増加させる因子について

丁 云、大杉 武*、都 銀珠、郭 哲輝、三木直正

(大阪大・医・第一薬理、 *日本ベーリンガー川西医薬研)

〔要約〕

慢性モルヒネ投与により、 1本鎖cyclic AMP response element (CRE)と特異的に結合する核蛋白質(ssCRE-BP)のDNA結合活性が抑制されることを見出している(1)。この1本鎖CRE結合蛋白質は、321アミノ酸残基からなり、N-末端側にはグリシンを多く含み、C-末端側にはグルタミン、グルタミン酸多く含む構造をしている。今回は、ssCRE-BPの性質及び機能を解析するために、グルタチオン-S-トランスフェラゼー(GST)との融合蛋白質を作製した。この融合蛋白質は、内在性ssCRE-BPと同様に、1本鎖CREと高いアフィニテイで結合するが、2本鎖CREとの結合は弱かった。ssCRE-BP の欠損変異蛋白質をつくり、 DNAとの結合に必要なドメインの決定を行った。このDNA結合ドメインは、アミノ酸残基50番目から215番目に存在すると考えられた。GST-ssCRE-BPは、内在性の精製したssCRE-BPと同様に、単独では、DNAとの結合が弱いが、カゼインやDNAアフィニテイーカラムの素通り分画を添加することにより、DNA結合能が著明に増大したことから、カゼイン様内在性活性化因子 (activator) が存在することが示唆された。この活性化因子は約66kDaで、熱安定性、トリプシン感受性の蛋白質であった。この活性化因子がモルヒネによって影響を受けることが考えられるので、現在、この因子について検討を行っている。

[方法]

(1) ssCRE-BP のcDNAの発現ベクター pGEX-2T への組み込み： ssCRE-BP のcDNA を AvaII と EcoRI で切り出し、5'末端側に、合成 BamHI-AvaII アダプターをつけ、 pGEX-2T 発現ベクターに挿入した。各欠損変異型組み替え蛋白質はpGEX-2T-ssCRE-BP を制限酵素で欠損させた後、あるいは polymerase chain reaction(PCR) により欠損 cDNA フラグメントを作製し、 pGEX-2T にサブクローニングした。

(2) 組み替え蛋白質の精製 ： 各組み替え蛋白質を大腸菌で発現させ、ハーベストした大腸菌をバッファー A (20mM HEPES(PH 7.6), 100mM NaCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT and 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluroide) 中で超音波破砕後、 10,000g 10分間遠心し、その上清を Glutathione-Sepharose 4B アフィニテイーカラムにかけ、融合蛋白質を精製した。

(3) ゲルシフトアッセイ :既報に準じて行った(1)。

[結果及び考察]

(1) ssCRE-BPとDNAとの結合ドメインを決定するために、組み替え蛋白質合成法により、野

目的の蛋白質は Glutathione Sepharose 4Bカラムクロマトグラフィーにより精製した。各種の蛋白質はSDS-PAGE上で分子サイズから予想される位置に認められた。ssCRE-BPまたはその欠損変異型蛋白質とDNAとの結合はゲルシフドアッセイを用い検討した。ssCRE-BPのN-末端側のグリシン多い部分を欠損したもの(N50)、C-末端側のグルタミン、グルタミン酸多い部分を欠損したもの(C228)、あるいは両側を欠損したもの (50-215, 50-228)は、ssCRE-BPのDNA結合能に影響しなかった。しかし、欠損蛋白質(50-215)をさらにN-末端側(165-215)あるいはC-末端側(50-165)を欠損したところ、両方ともDNAとの結合能を失った。C-末端側のグルタミン、グルタミン酸の多い部分は多くの転写因子に共通して見られるが、この部分を含む欠損蛋白質(N215)はDNAと結合しなかった。以上の結果より、ssCRE-BPとDNAとの結合に必要なドメインは、50番目アミノ酸残基から215番目アミノ酸残基にわたる部分に存在すると考えられる。

（２） 精製したssCRE-BPとGST-ssCRE-BPは、単特ではDNAとの結合活性は弱かった。しかし、カゼインや内在性活性化因子 (activator) により、DNA結合能が著明に増大した。この内在性活性化因子は、約 66kDaで、熱安定性、トリプシン感受性の蛋白質であった。

（３） モルヒネ慢性投与群のマウス小脳のssCRE-BPのmRNA量や蛋白質量は対照群と有意な差はみられなかったが、内在性のssCRE-BPの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抑制されることが示唆された （2)。

[文献]

(1) Osugi,T.et al., (1994) Mol.Brain Res.,21,256-262.

(2) Osugi,T.et al., (1996) FEBS Lett. in press.

図１、 ssCRE-BP のDNA結合ドメインと activator/casein 結合ドメインの解析

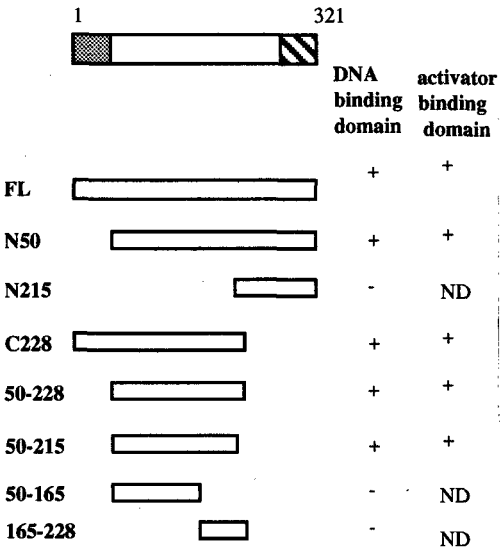
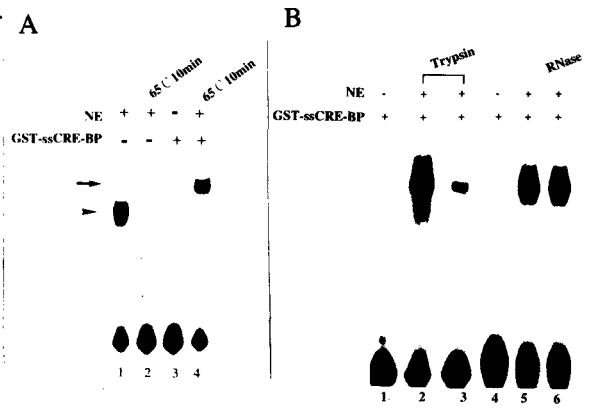


図２、内在性活性化因子の性質。
A,65℃, 10分処理
B, トリプシン処理



227 2E3 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CREBリン酸化におけるカルモジュリンキナーゼIIの役割

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結合活性に対する各種転写調節因子の抗体の影響およびカルモジュリンキナーゼII阻害薬の効果を検討した。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、カルモジュリンキナーゼIIの阻害薬である1-[*N*, *O*-bis(1, 5-isoquinolinesulfonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4-phenyl-piperazine (KN-62)または、2-[*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-*N*-(4-chlorocinnamyl)-*N*-methylbenzylamine (KN-93)(いずれも10 μM)の前処置により、両DNA結合活性の上昇は抑制された。両DNA結合活性に対する各種転写調節因子の抗体の影響を調べたところCRE結合活性はCRE binding protein (CREB)抗体によるスーパーシフトとリン酸化CREB (P-CREB)抗体によるバンドの消失が認められた。以上より、GHBによるCREおよびAP-1 DNA結合活性の上昇には、カルモジュリンキナーゼIIが重要な役割を演じていることおよびCRE結合活性の上昇にはCREBのリン酸化が関与していることが示唆された。

〔目的〕 GHBは、γ-アミノ酪酸(GABA)の代謝産物であり、外因性に投与するとてんかん欠神様発作症状を誘発させることが哺乳類や齧歯類で示されている(1)。我々は、GHB誘発欠神発作モデルマウスを用い欠神様発作発現にともなって脳内のCREおよびAP-1 DNA結合活性が上昇することを明らかにした(2)。また、我々は、GHBの作用をマウス小脳顆粒細胞初代培養系において調べ、GHBが$GABA_B$受容体を介してCREおよびAP-1 DNA結合活性を上昇させること、およびこれらDNA結合活性の上昇には、細胞内貯蔵部位からのCa^{2+}遊離による細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が重要な役割を果たしていることをすでに報告している(3、4)。しかしながら、細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が両DNA結合活性上昇にどのように関連するのかについては不明なままであった。そこで、GHBによるCREおよびAP-1 DNA結合活性上昇における細胞内セカンドメッセンジャーの役割をより明らかにする目的で、GHBによるCREおよびAP-1 DNA結合活性に対するカルモジュリンキナーゼII阻害薬の効果およびDNA結合活性に対する各種転写調節因子の抗体の影響についてゲルシフト法により検討した。

〔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(4)。^{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。

〔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、カルモジュリンキナーゼIIの阻害薬であるKN-93 (10 μM)で細

胞を前処置するとGHBよる両DNA結合活性の上昇は認められなくなった(図 1)。KN−93はコントロールのバンド(GHB −)には影響を及ぼさなかった。また、図には示していないがKN−62(10 μM)によってもKN−93と同様の結果を得た。次に各種転写調節因子の抗体の影響を調べたところ、CRE結合活性は、CREB抗体で完全にスーパーシフトし、P−CREB抗体によりバンドが消失した。一方、AP−1 DNA結合活性は、c−Fos、c−Jun抗体によりバンドが消失した。また、CREB抗体によっても一部スーパーシフトが認められた。

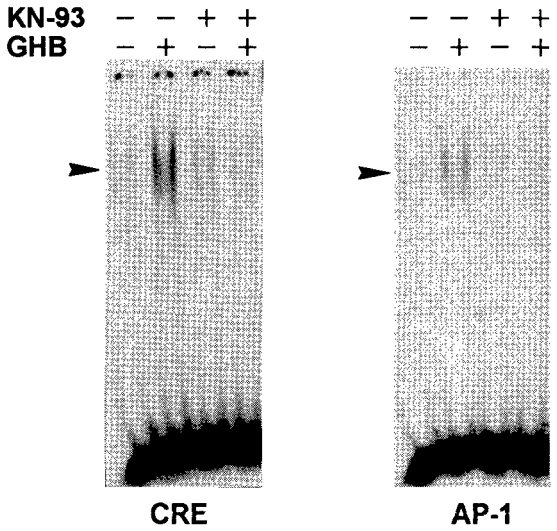


図 1 GHBによるCREおよびAP−1 DNA結合活性上昇に対するKN−93の阻害作用
細胞を10 μM KN−93またはLocke液で5分間前処置した後、1 mM GHBに60分間暴露した。その後核抽出液を調製し、ゲルシフトアッセイを行った。

〔考察〕 我々は、マウス小脳顆粒細胞初代培養系においてGHBが細胞内貯蔵部位からCa^{2+}を放出させ、細胞内Ca^{2+}濃度が一過性に上昇することを明らかにしているが(3、4)、この結果と本実験結果を考えあわせると、GHBにより放出されたCa^{2+}は少なくともその一部がカルモジュリンに作用し、その結果カルモジュリンキナーゼIIを介してCREBをリン酸化するものと推察される。P−CREBが転写を促進しているか否かについては現在検討中である。

〔文献〕 1 Snead III, O.C. (1991) Neuropharmacology 30, 161−167
2 Ishige, K., Aizawa, M., Ito, Y., and Fukuda, H. (1996) Neuropharmacology 35, 45−55
3 石毛久美子, 伊藤芳久, 福田英臣 (1995) 神経化学 34, 208−209
4 Ito, Y., Ishige, K., Zaitsu, E., Anzai, K., and Fukuda, H. (1995) J. Neurochem. 65, 75−83

228 2Aa4 E2F1の強制発現によって誘発される成熟神経細胞のDNA合成及びアポトーシスについて

須田喜久夫[1]、宮嶋雅一[2]、佐藤 潔[2]
（済生会川口総合病院 脳神経外科[1]、順天堂大学 脳神経外科[2]）

〔要約〕
生後6日目のマウスの小脳顆粒細胞にG1からS期への移行に関与するE2F1transcription factorをlipofectin法を用いてtransfectionすると、免疫組織化学染色の結果、約44%のE2F1陽性神経細胞がBrdU positiveであった。transfection後最初の3日間においてそのBrdU陽性神経細胞が認められたが、細胞数の増加及びmitosisの所見は認められなかった。G2-M期への進行にとって必須なサイクリンB (cyc B)及びcell division cycle 2 (cdc 2)、また、アポトーシスの抑制因子であるBcl-2を各々E2F1とco-transfectionしても同様の結果が得られたことより、E2F1の強制発現によって得られた神経細胞のDNA合成能は不完全であり、分裂前にアポトーシスに至る可能性が強く示唆された。

【目的】前年度の本研究会において、我々は生後6日目のマウスの小脳顆粒細胞を用いたin vitroの実験系及び成体ラットの頭頂葉皮質を用いたin vivoの実験系において、transfectionによるE2F1の強制発現が分化し終えた神経細胞をG0期からS期へと導き、DNA合成を促すことを明らかにしたが、mitosisの所見を確認することはできなかった[1]。今回我々は、上述したcycB及びcdc 2のcDNA、また、Bcl-2のcDNAを各々E2F1cDNAとともにcotransfectionすることによって、これらのS期に移行した神経細胞が分裂するか否かを経時的に免疫細胞化学染色を用いて検索した。

【方法】生後6日マウスの小脳顆粒細胞を6日間培養した後、lipofectin法を用いて、pRc/CMV E2F1あるいはE2F1とretinoblastoma(Rb)蛋白との複合体より E2F1を遊離させ、活性化させると考えられているアデノウイルスE1AcDNAsを各々単独で、また、cyc B, cdc 2, Bcl-2 cDNAとともに無血清培地下にtransfectionした。transfection終了直後、24、48時間後にBrdU 10 μMを投与し、各々24時間培養した後細胞を固定。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て、transfectionされた神経細胞のDNA合成の有無を検討した。また、mouse anti-BrdU MAb, mouse anti-β-tubulin IIIを一次抗体に用いた二重染色にて、経時的にBrdU陽性神経細胞数及びmitosis出現の有無を検索した。

【結果】1）三重染色の結果(n=15)、transfection後24時間ではE2F1あるいはE1A陽性神経細胞のBrdU陽性率は各々44%, 36%であった。E2F1及びE1A陰性神経細胞においてはBrdU陽性細胞は認められず、また、control及びvectorのみをtransfectionした群においてはE2F1, E1A陽性神経細胞及びBrdU陽性神経細胞は認められなかった。2）上記の結果を踏まえ、経時的検索においては二重染色にて検討した。transfection後最初の3日間においてBrdU陽性の神経細胞数はE2F1及びE1A投与群の間に有意差はなく、また、各時間帯においても統計学的有意差は認められず、mitosisの所見も認められなかった(n=3) (Table.1)。3）cyc B, cdc 2, Bcl-2とco-transfectionした経時的検索(n=3)において、transfection後24-48hrにおいては、E2F1+E1A及びE2F1+Bcl-2投与群で、48-72hrにおいては、E2F1+E1A及びE1A+Bcl-2投与群でBrdU陽性神経細胞数が他の群に比し多い傾向にあったが、統計学的有意差は認められず、mitosisの像も確認できなかった(Table.2)。

【考察】1）E2F1あるいはE1Aの強制発現によってDNA合成が誘発された神経細胞は、経時的検索においてtransfection後の最初の3日間でBrdU陽性神経細胞が増加していないこと、また、mitosisが確認できなかったことより、G2-M 期に移行するのに必要なDNA量が得られていないことが推察された。2）cyc B, cdc 2をco-transfectionしても同様な結果であった。以上の結果及びTable.1におけるvectorのみをtransfectionした群に比し，total細胞数が約2%減少していたことより，BrdU陽性神経細胞においては分裂前にアポトーシスが生じた可能性が示唆された。3）また，Bcl-2投与によりアポトーシスの抑制効果が期待されたが、BrdU陽性の神経細胞数に著変が認められなかったことより、神経細胞においては、Bcl-2では抑制できないアポトーシスの機構が存在する可能性も示唆された。

【結論】Johnson(1993)[2], Kowalik(1995)[3] らはquiescent fibroblastsにおけるE2F1の強制発現がDNA合成そしてアポトーシスへと誘導することを明らかにした。本研究においてもE2F1の強制発現によって得られた神経細胞のDNA合成能は不完全であり、分裂前にアポトーシスに至る可能性が強く示唆された。

【文献】

1) Suda K. et al.: DNA synthesis is induced in adult neurons after expression of E2F1 and E1A. Neuro Report 5: 1749-1751, 1994.

2) Johnson DG. et al.: Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. Nature 365: 349-352, 1993.

3) Kowalik TF. et al.: E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. J. Virol 69: 2491-2500, 1995.

(Table 1)
Effect of expression of different cDNAs on BrdU incorporation in differentiated cerebellar neurons *in vitro*
(time course study) (n=3)

Transfection construct	Number of BrdU positive neurons / mm³		
	0-24hr	24-48 hr	48-72 hr
Control	0	0	0
pRc CMV	0	0	0
pRc E2F1	6.4±3.2	2.3±1.8	0.5±0.9
pRc E1A^{13S}	4.2±4.0	3.3±3.8	1.8±1.3

(Table 2)
Effect of expression of different cDNAs on BrdU incorporation in differentiated cerebellar neurons *in vitro*
(time course study) (n=3)

co-transfection construct	Number of BrdU positive neurons / mm³		
	0-24hr	24-48 hr	48-72 hr
E2F1+ E1A^{13S}	5.0±1.0	6.5 ±4.5	6.0±1.0
E2F1+cyc B	3.0±1.0	1.5±1.2	2.0±1.4
E2F1+cdc 2	2.5±0.5	2.0±1.0	3.5±0.5
E2F1+bcl-2	3.0±2.0	8.5±1.4	1.5±1.3
E1A^{13S}+bcl-2	4.5±1.5	2.5±1.5	5.5±1.5

229 2Aa5 神経選択的サイレンサー結合因子 NRSF の神経細胞特異的バリアントの構造と機能

鳴瀬 善久[1,3]、小島 拓哉[1,3]、武井 延之[2]、森 望[3]
([1]奈良先端大・バイオ、[2]京都工繊大・応用生物、[3]新技術事業団・遺伝と変化)

〔 要約 〕
神経特異的遺伝子の多くは神経選択的サイレンサー (NRS) によって、その神経細胞特異的発現が決定づけられる。その NRS に特異的に結合する転写抑制因子 NRSF の作用機作を明らかにする為に、各種組織、細胞におけるNRSFのファミリー及び構造バリアントの検索を行った。その結果、神経特異的遺伝子、SCG10 を発現していない非神経系細胞株と組織においてNRSF mRNA の強い発現がみられた。一方、SCG10 を発現する神経系細胞株においてもNRSFあるいはその一部をコードしうる mRNA の低レベルの発現が認められた。さらに、NRSF mRNA は脳においても発現していた。ヒト、マウス及びラットの神経芽細胞株、ラット後根神経節、ラット胎児大脳皮質 について、さらに詳しく調べたところ、既知の NRSF 以外に神経細胞だけに発現される splicing variants の存在を見出した。この神経特異的バリアントは従来の NRSF の N 末ドメインと5つの Zn フィンガーのみをもつものであった。以上のことから、NRSF mRNA は神経細胞でも発現しているが、神経細胞では variants isoform が従来の NRSF と競合して神経特異的遺伝子の抑制を解除している可能性が示唆される。

NRSF (Neural restrictive silencer factor)は、神経選択的サイレンサー NRS (Neural restrictive silencer) (1,2) に結合し、神経細胞以外の細胞で SCG10、type Ⅱ sodium channel やsynapsin Ⅰ など他の神経特異的な遺伝子の発現を制御する転写抑制因子である。ヒトの NRSF (REST とも呼ばれる)は、1097 アミノ酸からなり、mRNAで約8 kb 、 N末近傍に Zn フィンガーを8つ、C 末端に1つもっている。また、中央部には塩基性アミノ酸に富む領域、プロリンに富む領域が存在している(3,4)。DNA結合ドメインと考えられるZn フィンガーは、ショウジョウバエのリプレッサー蛋白質 Kruppel Type(C2H2 type) の特徴をもつ。我々はすでにNRSF の遺伝子解析により、NRSF コード領域は3つのエクソンから構成され、DNA結合領域の Zn フィンガードメインはそのエクソンに分割していることを明らかにしてきた (5) 。本研究では、NRSFの神経特異的遺伝子のサイレンサーの制御機構について明らかにする為に、NRSFのファミリー又は構造バリアントの存在の可能性について検討した。

[方法]

1) NRSF のファミリー又は構造バリアントの検索：human NRSF cDNA 2Kb (Zinc finger を8つ含む) をプローブにして マウス精巣 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。DNAのシークエンスは、dideoxy terminator cycle sequencing 法を用いた。

2) 神経系細胞株、非神経系細胞株、ラット組織における NRSF の発現：神経系細胞株、非神経系細胞株、ラットの各組織より調製した RNAを用い RT-PCR 法により NRSF 、SCG10 mRNA の発現を調べた。

3) ラット後根神経節、大脳皮質及び大脳皮質初代培養神経細胞におけるNRSF neuronal variant の発現：ラット後根神経節、大脳皮質、大脳皮質初代培養ニューロン 及び 初代培養アストロサイトより調製した RNA を用い、RT-PCR 法により NRSF およびバリアント mRNA の発現を調べた。

[結果と考察]

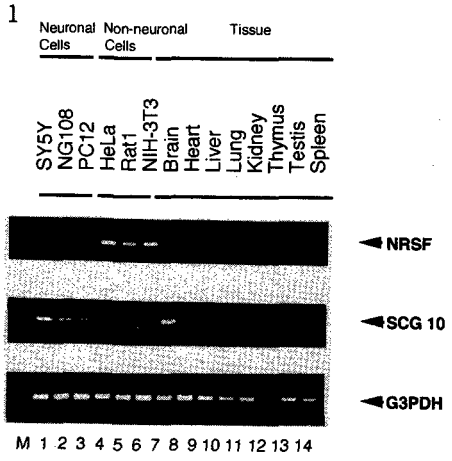
マウス精巣 cDNA ライブラリーより、3つの NRSF cDNA クローンを得た。これらはマウス NRSFの部分クローンであることが示唆された。さらに神経系細胞株、非神経系細胞株、ラットの各組織を用いRT-PCR 法により NRSF 、SCG10 mRNA の発現を調べた結果、SCG10 を発現していない非神経系細胞株と組織においてNRSFの強い発現がみられた (図1) 。しかし一方、神経系細胞株 (SY5Y、SMS-KCN、Neuro2a、NG108-15、PC12 等)においてもNRSFの低レベルの発現が認められた。NRSF

mRNA は脳においても発現していた。これは主としてグリア細胞によるものと考えられるため、グリア細胞株 (C6)を調べたところ高発現であった。

一方、RT-PCR のサイクル数を上げるとヒトの神経芽細胞株 (SY5Y) においては 目的のNRSFのバンドの上に約 50 bp 大きいバンドが検出された (図2) 。そこで、他のヒト神経芽細胞株 (SMS-KCN)を調べたところ同様のバンドが検出された。この SY5Y と SMS-KCN のバンドをシークエンスしたところ 5 番目の Zn フィンガー と6 番目の Zn フィンガー の間に 50 bp あるいは 4 bp のみの配列が挿入されていた。このことから、ヒトの神経芽細胞株においては NRSF の variants が存在していることが示唆された。また、マウス神経芽細胞株 (Neuro2a、NG108-15)、およびラットの副腎髄質褐色細胞腫由来の細胞株 (PC12)と、ラット後根神経節、大脳皮質初代培養神経細胞について同様に調べたところ、human neuronal variants とは異なるサイズの複数のバンドが検出された。その主なものをシークエンスしたところ16 bp の配列が挿入されていることが明らかになった。これら、ヒトにおける 4 bp または 50 bp 挿入バリアント、あるいはマウス、ラットにおける16 bp 挿入バリアントは、いずれも挿入配列中、あるいはそれに起因するフレームシフトの結果、TGA または TAA ターミネーションコドンをもつことになった。従って、調べた限りの神経特異的バリアントはN末ドメインと 5 個の Zn フィンガーのみをもつ truncated forms をコードすることが判明した。

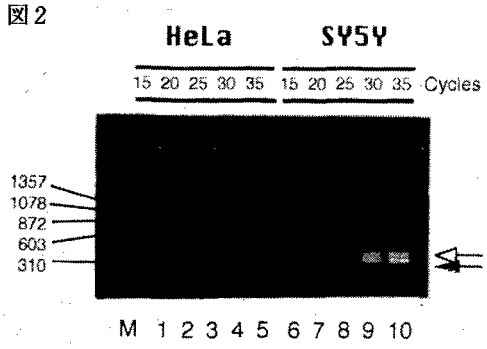
一方、NRSFのサイレンシングドメインを決定するために NRSF deletion constructs を用いて CAT-assay を行った結果、N末ドメインにサイレンシング活性があることが示唆された。 neuronal variant ではサイレンシング活性は非常に弱かった。以上のことから、NRSF の variant isoforms が神経細胞で従来の NRSF と競合して神経特異的遺伝子の抑制を解除している可能性が示唆された。

図1



RT-PCR法による神経系細胞株、非神経系細胞株、ラット組織におけるNRSF、SCG10 mRNAの発現。

図2



SY5Y神経系細胞における神経特異的バリアントの同定。RT-PCR 法によりサイクル数を増やすと、SY5Yには HeLa細胞では見られないバンド (白矢印) が出現した。これは従来の NRSF mRNA (黒矢印)よりも50 bp 長いものである。

[参考文献]

1. Mori, N. et al. (1992) Neuron 9, 45-54
2. Kraner, S. D et al. (1992) Neuron 9, 37-44
3. Schoenherr, C. J. and Anderson, D. J. (1995) Science 267, 1360-1363
4. Chong, J. A. et al. (1995) Cell 80, 949-957
5. 小島 拓哉、鳴瀬 善久、森 望 (1996) 生化学・分子生物学会合同年会要旨

230 ジーントラップ法で得られたGT3-11,12系統マウスの解析

3Cp1

宮下哲典[1,2]、伊藤康宏[1]、桑野良三[1]

1- 新潟大・遺伝子実験施設、2- 同・自然科学・生体機能

〔 要約 〕

マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cells ; ES細胞) を用いたジーントラップ法により、2系統のトラップマウス、" GT3-11、12 "を樹立した。

GT3-11系統マウスにおけるトラップ遺伝子の発現は、胚発生初期(胎齢3.5日)から中期(胎齢14.5日)にかけて、神経系、心臓、眼及び表皮において一部の細胞で観察された。

GT3-12系統マウスでは、GT3-11系統マウスとは対照的に発生中期 (胎齢10.5日) から後期 (胎齢18.5日) にかけて神経系の組織だけでなく、膵臓、肝臓を除くほぼ全ての組織でトラップ遺伝子の発現が観られた。

[はじめに]

ジーントラップ法は哺乳類の発生に関与する未知の遺伝子を同定し,その働きを調べる効率の良い方法として1989年に A.Gossler らによって初めて報告された(1)。それ以来いくつかの研究室でジーントラップ法を用いた研究成果が報告され、その有用性が示されてきた(2,3,4,5)。なかでも神経管の形成に関わる遺伝子、*jumonji (jmj)* をトラップした竹内らの報告は興味深い(5)。

中枢神経系の器官形成や神経機能の維持に関与すると思われる遺伝子の解析を目的としてジーントラップ法を行い、神経系の組織でトラップ遺伝子の発現が観られる2系統のトラップマウス " GT3-11, 12 " を樹立できたので報告する。

[実験方法]

1）ジーントラップベクター " p*Sneo*IN*lacZ*A "の構造

ジーントラップベクターは挿入先の遺伝子のプロモーターに依存して機能するように、プロモーターを付けていない。E-カドヘリンのSA (splice acceptor) の後に薬剤耐性遺伝子 *neo* をつなげ、IRES(internal ribosomal entry site)、NLS(nuclear localization signal)を介してレポーター遺伝子 *lacZ* を連結してある(図1)。このベクターの特徴は、１本のmRNAからIRESを挟んだ２つのタンパクが翻訳されることにある。

2）ES細胞のスクリーニングと in vitro 分化

ジーントラップベクター は *Not* I で直鎖にしてから、エレクトロポレーション法でES細胞に導入した。次にジーントラップベクターが挿入され、G418耐性であったES細胞コロニーのうちX-gal染色で陽性を示したコロニーを選抜した。さらに目的にかなったES細胞クローンを絞り込むために、各クローンを次のように*in vitro* で分化させた。それぞれのES細胞クローンを、培養開始後4日間はLIF(leukemia inhibitory factor) の入ったES培養液で、後の16日間はLIFを除いた培養液で浮遊培養して胚様体を形成させた。その後ゼラチンでコートしたディッシュで培養を続けた。X-gal染色で染まると同時に神経系の細胞で優先的に発現の見られるタンパク に対する抗体で陽性を示したES細胞クローンを選抜した(図2)。

3)トラップ遺伝子の発現時期、パターン：キメラマウスとヘテロマウス

2)で選抜されたES細胞をC57BL/6系統マウスの胚盤胞 (3.5日胚) に注入し、キメラ胚を作出して胎齢14.5日でトラップされた遺伝子の発現パターンを観察した。次にキメラマウスとC57BL/6マウスとの交配により、ES細胞由来のマウスを作出し、ヘテロマウスでトラップ遺伝子の発現時期、パターンを観察した。

[結果・考察]

ジーントラップベクターの導入を受けて、*neo* 耐性と*lacZ* 発現を共に示したES細胞クローンを10系統得た。それらを*in vitro* で分化させたところ各胚様体は自発的に分化し様々な形態をとった。神経系の細胞で優先的な発現をするタンパク(NFP 150KD、MAP2、GFAP、Nestin) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色で陽性を示した細胞で、トラップ遺伝子が同時に発現していたのはGT3-8、11、12の3系統であった。 *in vitro* での結果が *in vivo* で反映されるかどうかを確かめるために、各系統でキメラ胚を作出し胎齢14.5日の胚をX-gal染色したところ、3系統すべてに神経系の組織で青染が確認された。このことから、ジーントラップ法で得られたES細胞クローンのうち、目的の組織でトラップ遺伝子が発現されるクローンを *in vitro* 分化を併用することによって、濃縮できることが裏付けられた(6)。

GT3-11、12系統のES細胞は生殖系列の細胞に寄与し、ジーントラップ系統マウスとして樹立できた。そこで、ヘテロ胚のいろいろな時期でトラップ遺伝子の発現部位、パターンをX-gal染色で観察したところ、どちらも神経系の組織でトラップ遺伝子の発現が確認できた。GT3-11系統マウスでは、発生初期(胎齢3.5日)から中期(胎齢14.5日)にかけて、神経系だけでなく心臓、眼、表皮で局所的に発現が観られた。主に外胚葉性の組織で発現が観られるのは興味深い。また神経系の細胞と心臓でトラップ遺伝子の発現があるので、neuregulin やそのレセプターである erbB2 や erbB3 との関連も考えられる。一方、GT3-12系統マウスでは発生中期(胎齢10.5日)から後期(胎齢18.5日)にかけ神経系の組織だけでなく肝臓、膵臓を除くほぼすべての組織で発現が観られた。

以上のことから、GT3-11、12系統でトラップされた遺伝子は、少なくとも神経系の組織で発現されなんらかの機能を担っていることが示唆される。

[謝辞] E-カドヘリンのcDNAを供与して下さった京都大学の竹市雅俊先生に感謝いたします。



図1

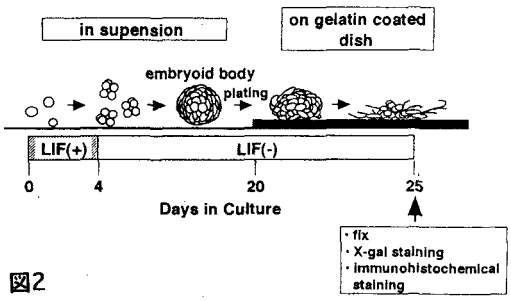


図2

[文献]

(1)A.Gossler et al. Science 244 ; 463-465(1989) (2) G Friedrich et al. Genes & Development 5;1513-1523(1991) (3) J. DeGregori et al. Genes & Development 8;265-276(1994) (4) Zhi Chen et al. Genes & Development 8;2293-2301(1994) (5) T. Takeuchi et al. Genes & Development 9;1211-1222(1995) (6) M. Shirai et al. Zoological Science 13: 277-283 (1996)

231 神経回路形成期初期の脳に一過性に発現する新規遺伝子の探索

2E38

佐久間充弘、吉田弘美、服部和枝、栗原 正
(創価大・生命研・神経化学)

〔 要約 〕
胎生16日齢（E16）のマウス前脳由来一本鎖アンチセンスcDNAと生後７日齢（Ｐ７）のマウス前脳由来ビオチン化poly (A)+ RNAとのサブトラクティブハイブリダイゼーションおよびディファレンシャルスクリーニングによりＰ７の前脳に比べE16で優位な遺伝子発現を示すcDNAクローンを選別した。多くのクローンには既知の遺伝子との相同性が認められるcDNAが含まれていたが、全く未知のcDNAおよびシーケンス以外の情報が得られていないcDNAも見出された。これらのcDNAの遺伝子発現がＰ７やアダルトの前脳に比べE16の前脳で顕著であることがスロットブロット解析で確認された。

神経芽細胞の移動や定着、分化そして神経軸索の伸展などに基づく初期の神経回路の形成は神経細胞の活動性には依存せず、様々な遺伝子の発現調節によって制御される。この時期に一過性に発現する遺伝子を探索し、その機能を解析する事は初期の神経回路形成の分子機構を解明する手がかりをもたらすと思われる。我々は初期の神経回路の形成が活発に行われるマウス胎生後期、特にE16の前脳に一過性に発現する遺伝子をサブトラクティブハイブリダイゼーションおよびディファレンシャルスクリーニングの併用により選択することを試みた。今回、E16マウス前脳に優位に発現する新規遺伝子を数個単離したので報告する。

〔方法〕
妊娠16日目のICRマウスから胎仔を取り出し、前脳部分を摘出した。AGPC法により総RNAを抽出後、Oligotex-dT30処理により poly (A)+ RNAを得、ラムダZAPIIをベクターとして一方向性のE16マウス前脳cDNAライブラリーを構築した。このcDNAライブラリーにR408ヘルパーファージを感染させ一本鎖アンチセンスcDNAを調製した。二本鎖DNAの混入を極力排除する目的でヨウ化カリウムによる平衡密度勾配遠心法により一本鎖cDNAを精製した。一方、Ｐ７のマウスの前脳由来のpoly (A)+ RNAも同様に調製し、フォトプローブビオチンによりビオチン化した。サブトラクションはE16マウス前脳一本鎖アンチセンスcDNAとＰ７マウス前脳ビオチン化poly (A)+ RNAの大過剰量とをハイブリダイズさせて行った。両者に共通する分子および未反応のRNAはストレプトアビジンとフェノール処理により除去した。このハイブリダイズの段階は二度繰り返した。最終的に残存する一本鎖cDNAを二本鎖へと変換し、トランスフォーメーションを行いサブトラクティドcDNAクローンとして得た。各cDNAクローンから調製したプラスミドでドットブロットフィルターを二

組作製し、E16ならびにＰ７マウス前脳のpoly (A)+RNAを鋳型として作成したcDNAプローブで遺伝子の発現量を比較した。E16の前脳で優位な遺伝子発現を示すcDNAクローンを選別し、総RNAを用いたスロットブロットによる時期特異性の検討と部分シークエンスの解読・ホモロジーの解析を行った。

〔結果・考察〕

E16マウス前脳一本鎖アンチセンスcDNAとＰ７マウス前脳ビオチン化poly (A)+RNAとのサブトラクションにより1400個のサブトラクティドcDNAクローンが得られた。ディファレンシャルスクリーニング法によりＰ７の前脳に比べE16に優位な遺伝子発現を示すcDNAクローンを79個にまで選別し、5’末端のシーケンスの解読とホモロジーの解析を行った。あるクローンには、胎仔期の脳に高い発現を示す遺伝子で菱脳の分節構造との関連が示唆されているneuronatin-2 (1)。細胞周期の制御に関わる遺伝子で胎仔の多様な臓器に発現するCDK-4 (2)。DNA結合タンパクで胎仔脳、胸腺、性腺で発現するSox-4 (3)など既知の遺伝子と相同性が認められるcDNAが含まれていた。一方、全く未知のcDNAおよびシーケンス以外の情報が得られていないcDNAと類似の配列を含むクローンも見出された。これらのcDNAの遺伝子発現の時期特異性をスロットブロットで解析すると（図１）、いずれもE16の前脳で最も発現が強く、Ｐ７やアダルトの前脳では弱いことが確認された。現在、得られた遺伝子発現の時期・組織特異性の検討と併せて全長cDNAのクローニングを進めている。

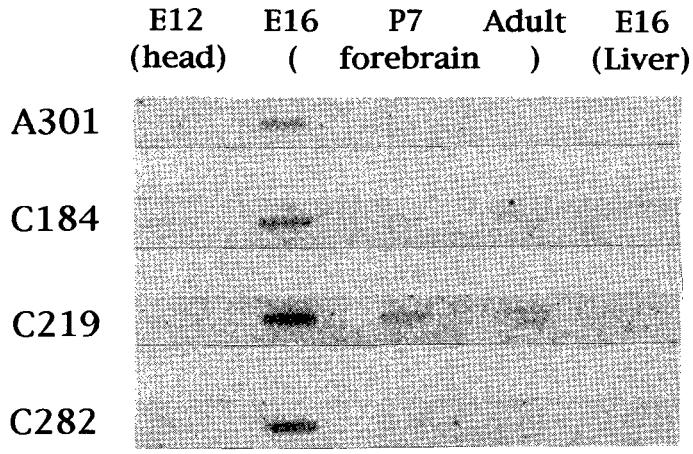


図1　RNAスロットブロット法による遺伝子発現の時期特異性

参考論文

1) J. Wijnholds, et. al., Dev. Biol., 171, 73-84 (1995)
2) F. S. Cho, et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 191, 860-865 (1993)
3) M. van de Wetering, et. al., EMBO J., 12, 3847-3854 (1993)

232 神経前駆細胞に発現する *elav* /HuC Homologue

3Cp2

金 哲熙、村岡 修、植嶋栄未子、田中秀和、三木直正

(大阪大学・医学部・第一薬理)

〔 要約 〕

*elav*は *Drosophila*から見出された神経特異的RNA結合蛋白であり、全ての神経細胞において、その分化直後から持続的に発現するため、神経細胞のマーカーとして用いられている。脊椎動物においても HuD, HuC/ple21, Hel-N1などが *elav*ファミリーとして同定され、神経特異的に発現することと知られている。しかし、これらの発現と神経細胞の運命決定との関係については明らかになっていない。我々は human HuCと89%の相同性を持つ zebrafish *elav*/HuC homologue (zHuC)をクローニングし、原腸形成直後、神経板中に存在する神経前駆細胞で最も早期に発現され、それ以後も高レベルの発現が持続することを見出した。zHuCは *Drosophila*の *elav*と同様、zebrafishにおいても神経細胞の運命決定のマーカーになりうると考えた。さらに、他の脊椎動物においてもその可能性が推測される。

＜緒言＞

神経発達障害を持つ表現型から同定された *Drosophila*の *elav* は神経系の発生と維持に関わっており、中枢及び末梢神経系で post-mitotic以降全ての発達段階における神経細胞でその発現が見られ、神経分化のマーカーとして用いられている。我々は新しい動物系である zebrafish の初期神経系形成を研究する(1, 2)に当たり、*elav*ファミリーが *Drosophila*と同様に神経分化マーカーになるのではないかと考えた。本研究では 脊椎動物の*elav*ファミリーの一つである zebrafish *elav*/HuC homologue (zHuC)を単離し、whole-mount *in situ* hybridization 法を用いて、初期発生における遺伝子発現部位及び時期を検討したのでその結果を報告する。

＜方法＞

1) cDNAクローニング: 既知の partial cDNA sequenceを基にRT-PCRで得られた fragment を probeとして用いた。受精後18-20時間目の zebrafish cDNAライブラリーを plaque hybridizationによりスクリーニングし、cDNAの全長を得た。
2) Whole-mount *in situ* hybridization: 発生過程の神経系における遺伝子発現部位を検討した。パラフォルムアミド固定した胚を DIG-labeled antisense RNA probeで hybridizationさせ、AP-coupled anti-DIG antibodyで検出した。

＜結果と考察＞

スクリーニングの結果、8 x 10^5の組換えクローンから 28個の陽性プラークを得た。そのうち 3.2kbと 2.2kbの二つのクローンの塩基配列を決定し、358個のアミノ酸をコードしていることが明らかになった。Coding regionの塩基配列を他の*elav*ファミリーと比較すると、非常に高い相同性を持つことがわかり、特に human HuC/ple21とは 89%もの高い相同性を持っていたので zebrafish *elav*/HuC homologue (zHuC)と命名した。zHuCの蛋白構造は *elav*と同様に、三つの RRM (RNA recognition motif)を持っている(3)。特に別のcloneからは、human HuD遺伝子の alternative splicingによるもの(4)と

非常によく似た部位の in-frame deletionが確認され、zHuCmexと名付けた。whole-mount *in situ* hybridization法により、受精後11時間目胚にすでに zHuCの発現が見られた (Fig. 1)。この時期は神経管形成前の時期であり、この段階での神経細胞の運命決定についての詳細はまだ知られてない。他の神経特異的マーカーを用いて、神経板での zHuC陽性細胞は数時間後、一次感覚神経や運動神経細胞になることが明らかになった。よって、この zHuC陽性細胞は神経前駆細胞であると考えられた。神経前駆細胞での zHuCの発現はその後にも高レベルが維持され、神経細胞として運命が決められたほとんどの細胞において発現がみられた。32時間目胚においては脳や spinal cord など全ての CNSとcranial gangliaを含め、retinal ganglionにもその発現が認められた。*elav*/Huファミリーは *Drosophila*から humanまで非常に高い相同性を持つので、このような発現様式はマウスなど他の動物でも同様であると推測される。現在、*elav*ファミリーはRNA結合蛋白であることと、神経発生に関係があることが分かっているが、機能的役割についてはまだ詳しく解明されてない。最近、培養細胞を用いた系で、このファミリーが細胞増殖因子である *c-myc*, *c-fos*, GM-CSFや helix-loop-helix転写因子Id mRNAの 3'-UTRに結合することが報告されており、神経細胞の post-mitotic機構における働きが提案されている(4)。

今後は、zHuCの神経細胞運命決定においての役割を、neurogenic遺伝子であるNotchファミリーとの関係の上で検討することと共に、zHuC遺伝子 promoterをクローニングし神経系の機能解析に応用したい。

＜文献＞

(1) 金　哲熙、他 （1994）神経化学 33巻, 84-85頁.
(2) Kim, C. -H. et al. (1996) Neurochem. Res. 21, 231-237.
(3) Yao, K. -M. (1993) J. Neurobiol. 24, 723-739.
(4) Liu, J. et al. (1995) Neurology 45, 544-550.

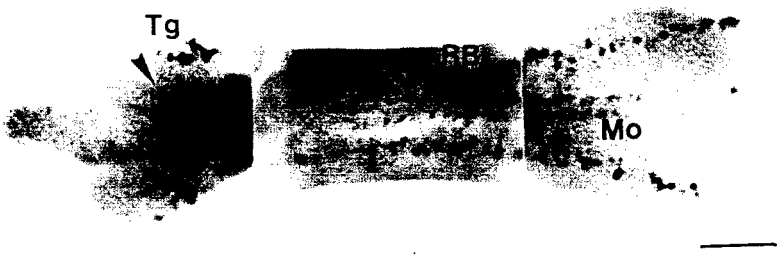


FIG.1. Localization of HuC transcripts in early zebrafish embryos. Dorsal view of the 4-somite stage embryo showing the very early expression of HuC in neuronal precursor cells when the neural plate is still broad. High level of expression are seen in trigeminal ganglion neuron (Tg), Rohon-Beard neuron (RB), and motoneuron (Mo) precursors. These cells were first detected in a scattered pattern and some of them in the anterior region later aggregated into the trigeminal ganglia which were detected only as clusters by other known neuronal markers. Positive signals are also seen in the brain region (arrowhead). Scale bar, 100 μm.

233 3Cp3 ショウジョウバエ複眼形成における分泌性蛋白質Argosの役割：Ras/MAPKカスケードを介した細胞分化の制御とアポトーシスの誘導

澤本和延[1,2] 田口明子[1] 山田知春[1] 岡野栄之[1,2]
([1]筑波大・基礎医・分子神経、[2]筑波大・TARAセンター)

〔 要約 〕

ArgosはEGFモチーフを有する分泌性の蛋白質であり、ショウジョウバエの発生過程において細胞分化抑制因子として機能している。Argosの作用機構を明らかにすることを目的として、Argosを異所的に過剰発現するトランスジェニックフライの表現型を抑圧または増強する変異のスクリーニングを行った。その結果、MAPKK及びMAPKをコードする遺伝子の活性化変異が、Argosの過剰発現により生じる複眼の形態異常を有意に抑圧することが明らかになった。さらに、機能欠損型の*argos*変異により生じる異常は、RAS、RAFまたはMAPKKをコードする遺伝子の量を半減させることにより、有意に抑圧された。以上の結果より、ArgosはRas/MAPKカスケードの上流でシグナル伝達を抑制することにより細胞分化を制御しているものと考えられた。さらに、ICE様プロテアーゼの阻害剤であるp35を過剰発現することによりArgosの過剰発現の効果が抑圧されたことから、Argosの過剰発現によるRas/MAPK系のシグナル伝達の低下がICE様分子を介したアポトーシスを引き起こすものと考えられた。

［緒言］ 神経系の発生過程におけるニューロンの分化誘導および生存は、多くの場合、細胞外のシグナルに依存していることが知られている。ショウジョウバエの複眼形成は、このような細胞間相互作用を介したニューロンの分化誘導機構を、動物個体を用いて遺伝学的に解析することのできる優れたモデル系である。複眼の光受容細胞の分化は、Ras/MAPKカスケードを介したシグナル伝達によって誘導され、分化できなかった細胞はアポトーシスによって除去される。*argos*は、EGFモチーフを有する分泌性の蛋白質をコードしており、その機能欠損型変異は光受容細胞をはじめとする様々な細胞の過形成を引き起こす（1、2、3、4）。一方、*argos*の過剰発現は細胞分化を抑制し、アポトーシスを誘導する（5）。我々は、*argos*遺伝子産物の作用機構を明らかにすることを目的として、*argos*の過剰発現により生じる表現型を抑圧または増強する変異のスクリーニングを行った。また、*argos*遺伝子産物によるアポトーシス誘導メカニズムを解明することを目的として、既知のアポトーシス関連遺伝子の変異との遺伝学的相互作用について検討を行ったので、あわせて報告する。

［方法］ ショウジョウバエは常法に従って飼育・交配した。2齢幼虫期から羽化するまでの間、37°C 1時間・25°C 5時間の条件で繰返し熱ショックを与えた。成虫の頭を2%パラホルムアルデヒド／2%グルタルアルデヒドで固定、脱水し、エポン包埋後、切片を作製し観察した。また、脱水、凍結乾燥、コーティングの後、走査型電子顕微鏡で複眼の表面を観察した。

［結果と考察］ Argosが関与するシグナルカスケードを明らかにするために、複眼の形態異常を示す様々な既知の変異体と*hs-argos*（5）を交配し、生じるF1に三齢幼虫期より繰返し熱ショックを与えた。*hs-argos*に熱ショックを与えた場合には、光受容細胞などの様々な細胞の数の減少により、複眼の著しい形態異常を引き起こす。様々な変異体との交配から生じた成虫の複眼を走査電顕で観察したところ、MAPKKをコードする遺伝子の活性化型変異*Dsor1*Su1（6）と、MAPKをコードする遺伝子の活性化型変異*rl*Su23（6）がArgosの過剰発現により生じる複眼の形態異常を有意に抑圧することが明らかになった。複眼の切片を作製し観察

したところ、*Dsor1*Su1 ; *hs-argos*及び*rl*Su23 ; *hs-argos*の複眼では、光受容細胞の数は、ほぼ正常であった。従ってArgosは、MAPKK及びMAPKと共通のシグナルカスケードで抑制的に機能しているものと考えられた。ArgosとMAPKカスケードの遺伝学的上下関係を明らかにするために、*argos*のnull変異(*argos*^{257})と、*Ras1*、*D-raf*または*Dsor1*の機能欠損型変異の二重変異体を作製し解析した。*argos*^{257}ホモ接合体の複眼においては、多くの個眼において過剰な光受容細胞が観察された。一方、*argos*^{257}と、*Ras1*、*D-raf*または*Dsor1*の機能欠損型変異の二重変異体においては、個眼当たりの過剰な光受容細胞の数が有意に減少することが明らかになった（図１）。これらの結果より、Argosは、細胞外よりRas/MAPKカスケードのシグナル伝達を抑制することにより細胞分化を制御しているものと考えられた。最近、SchweitzerらによりArgosが培養細胞系におけるEGFリセプターの活性化を阻害するという報告がなされた（７）。Argosの作用機構としては２つの可能性が考えられる。第一にArgosはEGFモチーフを有する分泌性蛋白質であることから、EGFリセプターに結合し、TGF-α（Spitz）の結合を阻害するという可能性がある。第二に、Argosと未知のリセプターが結合することによって細胞内からRas/MAPKカスケードに働きかけ、シグナル伝達を阻害するという可能性も考えられる。

Argosの過剰発現が細胞死を引き起こすことが知られている。この細胞死の機構を明らかにするために、ICE/ced-3ファミリーのプロテアーゼ阻害剤であるp35の効果を調べた。p35を発生過程の複眼で発現するトランスジェニックフライ(*GMR-p35*)を*hs-argos*と交配し、生じるF1の発生過程に熱ショックを与え、羽化した成虫の複眼を解析したところ、*hs-argos*の表現型はp35によって有意に抑圧されることが明らかになった。従って、Argosの過剰発現による細胞死は、ICE/ced-3様のプロテアーゼを介したアポトーシスによるものであると考えられる。

［文献］

(1) Freeman, M.et al. (1992). *Cell* 69, 963-975.

(2) Kretzschmar, D. et al. (1992). *EMBO J.* 11, 2531-2539.

(3) Okano, H. et al. (1992). *Differentiation* 52, 1-11.

(4) 岡野栄之、他. (1993). *神経化学* 32, 162-163.

(5) Sawamoto, K. et al. (1994). *Dev. Biol.* 164, 267-276.

(6) Tsuda, L. et al. (1993). *Cell* 72, 407-414.

(7) Schweitzer, R. et al. (1995). *Nature* 376, 699-702.

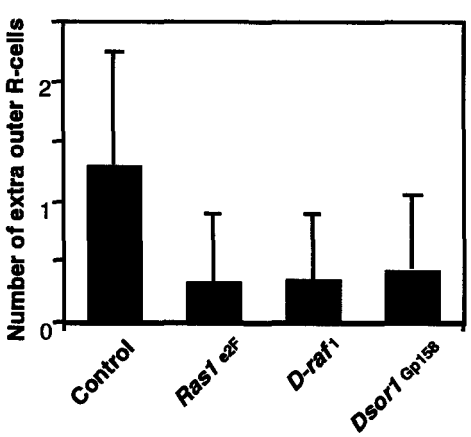


図1．*argos*のnull変異体の表現型は、RAS、RAF、及びMAPKKの遺伝子量に依存する。

個眼中の過剰な周辺視細胞（Ｒ１－Ｒ６）の数の平均値と標準偏差を算出しｸﾞﾗﾌに示した。

Control: *argos*^{257}/*argos*^{257}

Ras1^{e2F}: *argos*^{257} *Ras1*^{e2F}/*argos*^{257}

D-raf^{1}: *Draf*^{1}/+ ; *argos*^{257}/*argos*^{257}

Dsor1^{Gp158}: *Dsor1*^{Gp158}/+ ; *argos*^{257}/*argos*^{257}

234 眼と小脳の発生におけるゼブラフィッシュIslet-3の機能解析

3Cp4

菊池 裕[1]、徳元美佳[2]、堀田凱樹[3]、植村慶一[1]、岡本 仁[1]
(1.慶大・医・生理、2.基礎生物学研究所、3.東大・物理)

〔 **要約** 〕 我々はこれまでに、LIM/homeodomain蛋白群と総称される一群の転写因子群に着目し、ゼブラフィッシュ胚における神経系の部域や細胞の特異化における役割を解析してきた。胚発生において、LIM domainのみを過剰発現させ、LIM/homeodomain蛋白の機能を特異的に阻害するという独自の技術を用いることにより、LIM/homeodomain蛋白群の一つのIslet-3 (1) が、未同定の他の因子と複合体を形成することによって、眼の分化と、視蓋に起因し小脳の形成を促進する作用の発現を制御していることを明らかにした。この結果は、Islet-3が発現する部域ごとにパートナーを変えて複合体を形成し、その複合体の組み合わせが細胞の運命を指定するコード（code, 指定番号）として働いている可能性を示唆している。

〔緒言〕

神経細胞の個性（identity）は、細胞体の位置と形、樹状突起の形状、軸索の走行、軸索が支配する細胞の種類、などの様々な要素によって規定される。これらの神経細胞の個性は、神経細胞が生まれると同時に、一度に決まってしまうのではなく、誕生後しばらくの間に多段的に決定されることが明らかになっている。最近、発生過程の神経細胞における個性決定の最終段階で、LIM/homeodomain蛋白群が重要な役割を果たしていることが強く示唆されるようになってきた。現在までに見いだされているLIM/homeodomain蛋白の*in vitro*での機能解析の結果、この蛋白のなかでのLIMドメインの役割について次の様なモデルが提唱されている (2,3,4)。即ち、LIMドメインは、通常homeodomainのターゲットDNAへの結合を阻害しているが、特定の共役因子がこの部位に結合することにより阻害が解除され、homeodomainのターゲットDNAへの結合が可能となる (Fig. 1)。我々は、このモデルに従い、ゼブラフィッシュ胚の中枢神経系で眼と視蓋に特異的に発現するIslet-3 (Fig. 2) のLIMドメインのみを過剰発現させ、内因性Islet-3が共役因子との機能的複合体を形成する過程を競合的に阻害することにより、発生過程での内因性Islet-3の機能を抑制する実験を行なった。

〔実験方法〕

Islet-3 cDNAのLIMドメインをコードする部分のみをPCRでクローニングし、mRNAを合成して一細胞期のゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションした（mRNAの濃度は0.5 μg/μl）。*in situ* hybridizationは、DIGラベルしたRNA probeを用いて行なった。

〔結果及び考察〕

Islet-3のLIMドメインを過剰発現する胚では、本来Islet-3を発現する眼が欠損するという特異的な異常が観察された (Fig. 3)。さらに、Islet-3が発現する視蓋に隣接する中脳・後脳境界部の小脳原基のみが欠損するという著しく特異な異常が観察された (Fig. 3)。この結果より中脳視蓋部が、小脳原基である中脳・後脳境界部に対して分化を誘導する作用を持っており、Islet-3は眼の分化のみならず、この誘導作用の発現をも制御していることが強く示唆された。Islet-3は発現する部域ごとにパートナーを変えて複合体を形成し、その複合体の組み合わせが細胞の運命を指定するコードとして働いている可能性が考えられる。

〔文献〕

(1) Tokumoto, M. *et al. Dev. Biol.* 171, 578-589 (1995) (2) Sánchez-García, I. *et al. EMBO J.* 12, 4243-4250

(1993) (3) German, M. S. *et al. Genes Deve.* 6, 2165-2176 (1992) (4) Taira, M. *et al. Nature* 372, 677-679 (1994)

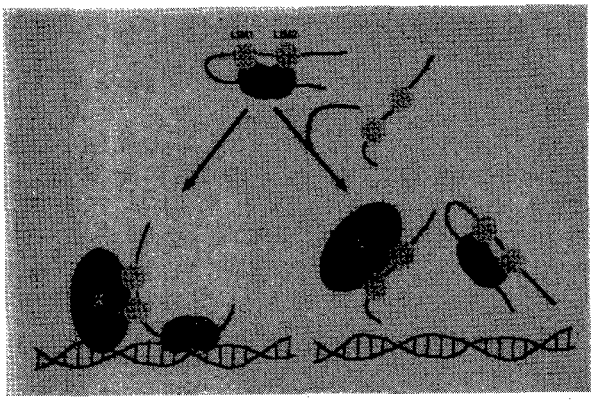


Fig. 1 LIM/homeodomain蛋白の活性化機序と、機能特異的遺伝子の探索
（上）不活性な状態でのLIM領域とhomeo領域との関係
（左下）LIM領域に共役蛋白（X）が結合すると、homeo領域はDNAに結合する。
（右下）LIM領域のみを過剰発現すると、共役因子が枯渇され、
LIM/homeodomainは活性化されない。

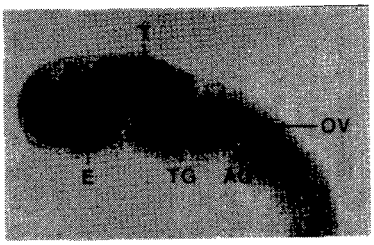


Fig. 2 受精後24時間の胚での、Islet-3 mRNAの発現
中枢神経系の中では、眼（E）と中脳部の視蓋原基（T）のみで発現している。

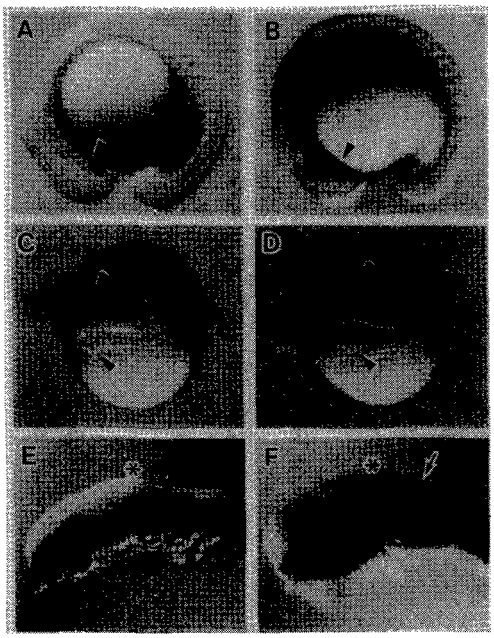


Fig. 3 Islet-3のLIM領域を過剰発現させた胚における眼と小脳原基の特異的欠損
Islet-3のLIM領域をコードするmRNAを1細胞期に注入された胚（A：側面から視た受精後15時間目の胚、C：背面から視た受精後15時間目の胚、E：側面から視た受精後24時間目の胚）では、正常胚（B：側面から視た受精後15時間目の胚、D：背面から視た受精後15時間目の胚、F：側面から視た受精後24時間目の胚）と較べて、眼（A、B、C、Dの矢尻）と、中脳・後脳境界部の小脳原基（E、Fの矢印）が欠損している。視蓋（E、Fの星印）は、LIMを過剰発現する胚でも形成されている。E、Fの胚は、正常では中脳・後脳境界部と視柄（optic stalk）に特異的に発現するpax2をプローブにin situ hybridizationを行っている。

235 2E39 LIM/ホメオドメイン転写因子LH-2A,Bと前脳の領域特異化

坪川達也、植村慶一、岡本仁
（慶応義塾大学・医学部・生理学教室）

LIM/ホメオドメイン転写因子は、神経系の特定の細胞群に発現し、神経領域や神経細胞の特異性決定機構へ関与すると考えられている[1]。我々はLIM/ホメオドメイン転写因子の1つ*LH-2*遺伝子に注目し、ゼブラフィッシュで3種類の*LH-2*遺伝子を同定し、そのうちのLH-2AとLH-2Bが神経系形成過程の比較的早い時期（受精後10時間）に前脳に領域特異的に発現することを見い出した[2]。本研究では、LH-2A,Bの神経系の領域特異化における役割をの解析を目的として、これらの遺伝子のmRNAを受精卵へ微量注入し、異所的発現実験を行うことにより、発生初期におけるLH-2A,Bの機能を推定した。*LH-2A,B* mRNAの異所的発現を行うと、胚の神経板が腹側に拡大し、特に前脳領域が相対的に拡大し、体節の腹側への拡大も観察され、胚全体が前方化、背側化した。発生初期の胚の体軸決定過程において前方部と背側部は、同じプロセスによって決定されることが知られている[3]。そのため、本来脳の最も前方に発現する*LH-2A,B*が、発生初期より胚全体に存在することで、胚の領域特異性の決定に影響を与え、全体が前方化、そして背側化した可能性が考えられる。

[実験方法]

*LH-2A,B*各遺伝子をmRNA作製ベクターpCS2+にサブクローニングした後、mMESSAGE mMACHINE mRNA synthesis kit（SP6）（Ambion）を用いて、各遺伝子のmRNAを合成した。これらのmRNAをゼブラフィッシュ受精卵の一細胞期にガラスキャピラリーを用いて微量注入した。注入した胚は固定した後、whole-mount in situ hybridizationを行った。

[結果]

LH-2A mRNAを注入された受精後11時間の胚は、正常な胚と比較して頭部領域が著しく拡大しており、*LH-2A*過剰発現の神経系への影響が示唆された（図1A,B）。更に正常胚の体節は背側に限局されているが、注入された胚の体節は、卵黄嚢のほぼ全周に渡るほど、腹側に拡大していた。このことは胚全体が前方化のみならず、背側化したことを示唆している。そこで、*LH-2A* mRNAの注入によるbody planへの影響を検討するため、体の前背側部に限局して発現する転写因子*otx2*遺伝子の発現を調べた。*LH-2A* mRNAを注入された胚では受精後9時間において*otx2*の発現領域は正常な胚に比べて明らかに腹側方向に拡大していた（図1C,D）。*LH-2A* mRNAを注入された胚で、神経系における拡大した領域を同定するため、正常胚では前脳胞、後脳胞に発現する*pax-6*、後脳の第3、5菱脳節に発現する*krox20*の発現パターンを調べて見た（図2A,B）。*LH-2A* mRNAを注入された胚では、正常と比較して、*pax-6*を発現する前脳領域と*krox20*の発現領域が著明に拡大し、それより尾方の脊髄領域が大幅に縮小した。*pax-6*、*krox20*の発現パターンから、神経板そのものが

側方に拡大していることが分かった。より多量の*LH-2A* mRNAを注入した胚では*krox-20*の発現も消え、大きく拡大した*pax-6*の発現のみが観察された(図略)。*LH-2B*でも全く同様の結果が得られた(図略)。

[考察]

正常な発生過程で、神経板は胚の最も背側に生じ、そのすぐ側方に体節が生じる。*LH-2A,B* mRNAを注入された胚では、神経が側方に拡大し、その側方に生じた体節も腹側まで拡大していた。このことは、発生過程で胚の体全体が背側化されたものと理解ができる。

*LH-2A,B*の生理機能と*LH-2A,B*の背側化の活性の関連について、次の2つの可能性が考えられる。第一は、*LH-2A,B*が直接、前脳領域の特異性を司っている可能性である。発生初期の胚の体軸決定過程において前方部と背側部は、同じプロセスによって決定されることが知られている[4 1]。そのため、本来脳の最も前方に発現する*LH-2A,B*が、発生初期より胚全体に存在することで、胚の領域特異性の決定に影響を与え、全体が前方化、そして背側化した可能性が考えられる。第二は、*LH-2A,B*が胚の背側化に関与する分泌性因子の発現を促進した可能性である。

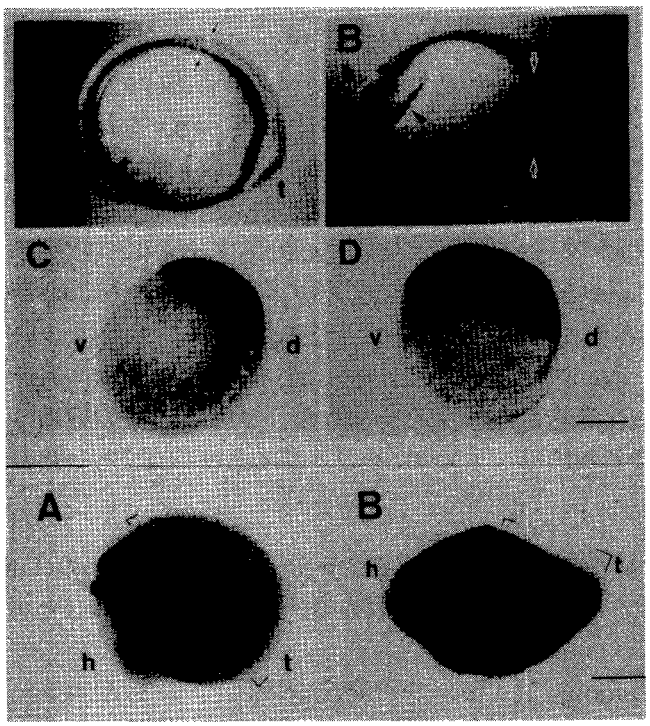
以上をまとめると、LH-2A,Bの異所的発現による胚の背側化は、LH-2A,Bの前脳の領域特異性に決定に関連する機能の影響によるものと考えられる。

[参考文献]

1)Tokumoto, M. et al. Dev. Biol. 171, 578-589(1995)

2)Tsubokawa, T. et al.Japanese Jounal of Physiology,45, S 243[1995]

3) Kao K.R., Elinson R.P. Dev-Biol 127: 64-77[1988]



第1図 *LH-2A* mRNA注入実験
側面より観察(A、Bでは前方は図の左、背側は図の上、C、Dでは前方が図の上、背側が図の右)。
Scale bar=191 μm

A:分節期初期(受精後12時間)の正常胚。矢印の間で示される体節が胚の背側にのみ見られる。
B:同時期の*LH-2A* mRNA注入胚
矢印の間で示される体節が腹側まで拡大している。頭部(h)も正常胚に較べて側方に拡大している。(矢頭)

C:原腸胚期(受精後9時間)の正常胚の*otx2* mRNAの発現
otx2 mRNAの発現が体の前背側部に限局している。
D:同時期の*LH-2A* mRNA注入胚の*otx2* mRNAの発現
otx2 mRNAの発現部位が腹側に拡大している。

d:dorsal side h:head t:tail v:vetral side

第2図 *LH-2A* mRNA注入実験による*pax6,krox20* mRNAの発現の変化
側面より観察(前方は図の左、背側は図の上)
分節期(受精後15時間)
Scale bar=191 μm

A:正常胚
赤い*pax6* mRNAの発現部位が前脳領域に見られ、青い*krox20* mRNAの発現部位が第3,5菱脳節に見られた。
B:*LH-2A* mRNA注入胚
前脳領域の*pax6*の発現部位と第3,5菱脳節の*krox20*の発現部位が側方に拡大していた。
それより後方の脊髄領域(括弧に挟まれた領域)が正常胚に比較して短かった。

h:head t:tail

236 2E40 ニワトリ胚運動ニューロンの特異的筋肉支配に関わるcandidate遺伝子の単離と発現解析

調恒明[1]、木村芳滋[2]、松尾哲孝[1]、竹下正純[1]、田中英明[2]
[1]大分医大生化、[2]熊大医神経分化

〔要約〕我々は、運動ニューロンの分化、及び特異的神経支配の分子機構を解明することを目的として、ニワトリ胚脊髄の運動ニューロンが標的筋肉に軸索を延ばす時期に、腰部運動ニューロン特異的に発現するcDNAの探索を行った。その結果、四肢を支配する運動ニューロン(Lateral motor column, LMC)に限局して発現する新規膜分子をコードするcDNAを単離した。

[目的] ニワトリ胚脊髄運動ニューロンは、胚発生3日目(3E)から6Eにその標的筋肉に向かって軸索を伸長し、シナプス形成を行う。運動ニューロンは軸索を伸長し始めるときには既に多数のサブグループに分化し、それぞれの標的筋肉を見つけだす能力を獲得していると考えられている(1)。我々は、運動ニューロンの分化と、特異的神経支配に関わる機能分子を単離、解析することを目的として、ニワトリ胚脊髄の腰部運動ニューロンに特異的に発現するcDNAの探索を行った。4Eのニワトリ胚の脊髄と、精製した頸部、胸部、および腰部運動ニューロンから得たRNAについてdifferential display法を行い、腰部運動ニューロンに発現し胸部運動ニューロンには発現していないcDNAを同定した。

[方法] 4日目ニワトリ胚から、頸部、胸部、腰部の3つに分けて脊髄を単離し、ここから運動ニューロン特異的膜分子SC1に対するモノクローナル抗体(2)によるパンニング法により、運動ニューロンを精製し、total RNAを調製した。また、脊髄全体からもRNAを調製した。それぞれのRNAについて、3'側にG, C, or Aをもつ3種類の5'-CCCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTG, C, or A-3'（3' anchor primer）を用いてcDNAを合成することにより3つのプールとした。個々のcDNAプールについて、^{32}Pで末端ラベルした3'-anchor primerと30種類の22mer前後の5'側arbitrary primerを用いて、differential displayを行った(3, 4)。発現量の異なる17個のバンドについてcDNAライブラリーをスクリーニングし、in situ hybridizationを行い、運動ニューロンに発現するcDNAを探索した。得られたクローンのうち、1つは四肢の運動ニューロンにのみ特異的に発現する新規膜分子（X37）をコードするcDNAであった。

[結果]

1. X37 cDNAの構造：ニワトリ5日目胚cDNAライブラリーから、約5.5 kbのcDNAを得た。配列決定の結果、543アミノ酸からなる新規の膜分子をコードすることが明らかとなった。
2. X37の発現：*in situ* hybridization法により、その発現を検討した。運動ニューロ

ンの軸索はE3で脊髄から出て、E6に標的筋肉に到達する事が知られている。X37の発現は、4E,6Eでは四肢を支配する運動ニューロン（Lateral motor column, LMC）全体に見られるが、体幹を支配する運動ニューロン（Medial motor column, MMC）には全く発現していなかった。E10ではLMCの一部に限局し、それ以降での発現は見られなかった。またこれまでの解析では、運動ニューロン以外の組織における発現は検出されなかった。これらの結果からこの分子は、運動ニューロンが特異的に標的筋肉を支配する過程にかかわると考えられる。

[文献]
(1) Lance-Jones, C. and Landmesser, T. Proc. R. Soc. Lond. B 214: 19-52, 1981
(2) Tanaka, H. et al. Neuron 7: 535-545, 1991
(3) Liang, P. and Pardee, A. B. Science 257: 967-971, 1992
(4) Ito, T. et al. FEBS Lett 351: 231-236, 1994

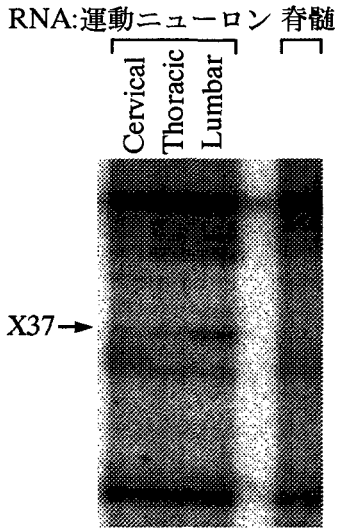


図1　Differential display

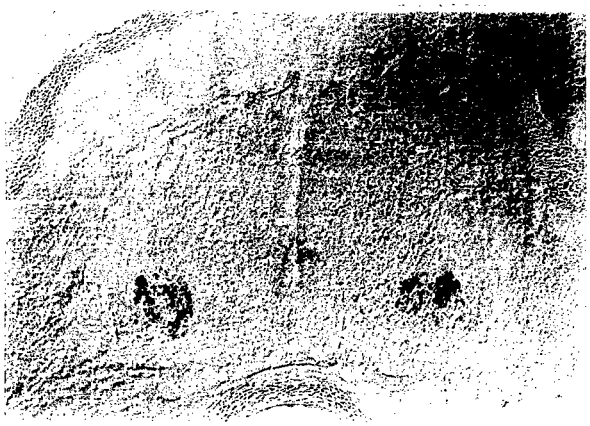


図2　in situ hybridization of lumbar spinal cord of 7E chick embryo

図1　ニワトリ4日目胚の運動ニューロン及び脊髄のRNAのdifferential display。頸部、胸部、腰部運動ニューロン及び脊髄からRNAを調製し、differential displayを行ない、発現量の異なるバンドを切り出した。

図2　ニワトリ7日目胚腰部脊髄の*in situ* hybridization。左右の脊髄前角の運動ニューロンのプールのうち、後肢を支配するLateral motor columnだけが染色され、体幹を支配するMedial motor columnの運動ニューロンは染色されなかった。ここには示さないが、前肢部分の運動ニューロンは染色されたが、頸部、胸部脊髄の運動ニューロン（体幹部を支配する）はシグナルを与えなかった。また4日目胚においても、基本的には同様の発現パターンを示した。

237 単離ミクログリアおよび株化ミクログリアを用いた脳選択的遺伝子導入法

1Dp8

澤田 誠[1]、 永津 俊治[1,2]

[1]藤田保健衛生大学総合医科学研究所病態生化学、[2]神経化学

〔 要約 〕

我々はミクログリアがマクロファージとは異なり脳に特異的な親和性をもつことを見い出した。そこで単離したマクロファージとミクログリアをラット末梢動脈に注入して脳への選択的配向性があるかどうかについて比較した。蛍光色素を用いて標識したミクログリアを注入した場合には脳には多くの蛍光細胞が見られたが、肝臓にはわずかしか見られなかった。これに対しマクロファージを注入した場合には正常脳にはほとんど蛍光細胞が見られないが肝臓には多くの蛍光細胞が見られた。つぎに我々が確立したミクログリアの細胞株にlacZ発現ベクターを導入したものをラット血流中に注入して脳に選択的に遺伝子を発現させることができるかどうかを検討した。lacZ発現細胞を注入したラット脳切片でβ-galactosidaseの活性が検出できた。以上の結果からミクログリアはマクロファージとは異なり脳に特異的な親和性をもった細胞であること、この親和性を利用すれば末梢血流中から特定物質や遺伝子を脳に特異的に導入できることがわかった。

脳は血液脳関門が存在するため、末梢からの物質や細胞の浸潤がほとんどなく、薬物や遺伝子導入が困難である。実際に正常脳ではT細胞やマクロファージなどの免疫細胞の浸潤はほとんどみられない。ところで、我々は脳に特異的なマクロファージと考えられているミクログリアを研究する過程で高純度精製のミクログリアを得ることに成功しその性質を調べた結果、ミクログリアはマクロファージとは異なり脳に特異的な親和性をもつことを見い出した。そこで今回は単離したマクロファージとミクログリアをラット末梢動脈に注入して脳への選択的配向性があるかどうかについて比較した。また、最近我々が確立したミクログリアの細胞株に外来遺伝子を導入したものをラット血流中に注入して脳に選択的に遺伝子を発現させることができるかどうかを検討した。

[方法]

細胞の調製と注入：既報のとおり精製したFisher rat由来マクロファージとミクログリア(1)をプラスチックシャーレに接着させた状態で貪食細胞染色液で調製した蛍光色素PKH26(2)を10%血清を含む培地に1：1で混合して37°Cで15分間染色したのち回収し、2x10^6 cellsを5週齢同系ラット腋下動脈に注入した(2)。注入後48時間、経時的実験ではさらに注入後1、2および3週間で麻酔下生理食塩水で環流し、各臓器を摘出、OCT液中で凍結した。

ミクログリア細胞株の分離：ラットおよびマウスミクログリアを10%ウシ血清5μg/mlウシインシュリン、0.2%グルコースを含むMEM 培地で生育し、種々の増殖因子で刺激した後分裂直後の細胞を回収して限界希釈法によりそれぞれラットは1クローン、マウスは8クローン分離した。

遺伝子の導入：大腸菌由来lacZ遺伝子発現ベクターpEFGeoをDOTAPリピッド(Boehringer-Mannheim)と混合し、終濃度1μg/mlで血清を含む培地で調製したものを精製したマクロファージとミクログリアおよび株化ミクログリアに添加して16時間処理したのち、通常の培地でさらに48時間培養し、上記のように蛍光染色して実験に用いた。

凍結切片での注入細胞の同定：連続したおよそ5ミクロンの3枚の凍結切片をそれぞれ蛍光顕微鏡による観察、Xgalを用いたβ-galactosidaseの活性染色、化学発光法によるβ-galactosidase活性の定量に用いた。活性測定は切片を0.5% TritonX100を含む細胞溶解液で溶解してGalacto Light (Boehringer-Mannheim)を用いて行った。

[結果]

1. 単離したミクログリアおよびマクロファージを貪食細胞に特異的な蛍光色素で標識し、ラット動脈に注入してその組織配向性を組織切片を作成して調べた。その結果、マクロファージを注入した場合、正常脳にはほとんど蛍光細胞が見られないが肝臓には多くの蛍光細胞が見られた。一方ミクログリアを注入した場合には正常脳には多くの蛍光細胞が見られたが、肝臓にはわずかしか見られなかった。
2. 大腸菌由来遺伝子lacZ発現ベクターを導入した単離ミクログリアおよび株化ミクログリアを注入したラット脳切片をXgalを基質にして活性染色を行ったところ、lacZ陽性細胞の存在が確認できた。
3. 2と同様の切片でのβ-galactosidase活性を化学発光法で定量したところ、大腸菌由来遺伝子lacZ発現ベクターを導入した単離ミクログリアおよび株化ミクログリアを注入したラット脳切片では遺伝子を導入しない細胞を注入したものよりはるかに高い活性が検出できた。

[考察]

ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか、中枢神経系サイトカインネットワークの中心的な細胞である(3)。また最近では学習や記憶といった高次の脳機能の発現にも不可欠であることが示され、脳に特異的な役割を持った特殊化した細胞であると考えられている。現在までのところミクログリアの起源は周産期に脳内に侵入した単球が特殊化して分化すると考えられている。しかし今回我々は脳に対する親和性や浸潤できるか否かについてマクロファージとミクログリアが決定的に異なることを示した。さらに両者を識別する方法で染色してその分布を調べたところ、ミクログリアが発生の早い段階から脳内に存在することを示した。したがってミクログリアは骨髄で分化成熟する単球由来ではなく、脳に特異的な親和性を持った細胞群が発生の初期に脳内に侵入し、脳の形態形成や記憶学習といった高次機能まで調節するようになると考えられる。

脳への選択的物質移送のシステムの開発には国内外の多くの研究者が取り組んでいる。動物個体レベルでの脳内への遺伝子導入についてはアデノウイルスベクター法が考案され、神経細胞特異的に遺伝子を導入できると報告されている。またレトロウイルスベクターを用いる方法も作成され、肝臓や血液細胞などでは成功している。しかし脳は血液脳関門が存在するため末梢からの投与では脳に特異的に導入することができず、したがって手術によって脳に直接注入する以外に方法がなかった。一方、手術などの侵害的な手技を伴わない方法としてリポソームを利用する方法があり、リポソームの構成要素を変えることによって脳に比較的入りやすいものが開発された。しかしこの方法でも脳への取り込みは注入量の1%程度で、脳に特異的であるとはいいがたい。これに対して、株化ミクログリアを用いる方法は正常で脳に存在する細胞を担体に用いること、この細胞は脳以外の臓器にあまり親和性をもたないこと、継代培養ができるため遺伝子導入したクローンが分離できること、血管内注入により脳にターゲッティングできることなどの多くの利点をもち、独創的かつ有用な方法であると考えられる。また、このシステムはトランスジェニック動物作成の手法と異なり、脳特異的にしかも個体形成後または正常発生の途中から遺伝子を導入してその作用を調べることができるため、トランスジェニック動物で問題となる発生当初からの遺伝子発現による補償や致死作用がなく、まったく新しい手法で、これまで解析が困難であった遺伝子の作用の解析にも有用であると考えられる。さらに、疾患遺伝子を補償するような遺伝子操作を加えた株化ミクログリアを血管内に注入することによって脳をターゲットした遺伝子治療に応用できると考えられる。

[謝辞] 本研究にあたり細胞の動脈注入および組織切片作成において藤田保健衛生大学医学部脳神経外科今井文博博士と鈴木弘美さんに協力していただきました。

[文献]

1. **Sawada, M.**, Suzumura, A., Yamamoto, H., Marunouchi, T. Brain Res. 509, 119-124, 1990
2. Ishihara, S., **Sawada, M.**, et al. Exp. Neurol., 124, 219-230,1993.
3. **Sawada, M.**, Suzumura, A. and Marunouchi, T. Int. J. Dev. Neurosci., 13, 253-264, 1995

238 1Dp9 ヒト羊膜細胞における多能性神経幹細胞マーカーの発現とそのLac Z遺伝子導入細胞のラット脳移植実験

桜川宣男[1], Ramasamy Thangavel[1], 石井 俊[1], 池田久美子[1], 屋田 修[2], 荻野郁子[2]
([1]国立精神・神経センター神経研究所第5部, [2]順天堂大学医学部脳神経外科)

〔要約〕
ヒト羊膜(HAE)細胞における多能性神経幹細胞マーカーおよびニューロン・グリア細胞マーカーについて、免疫組織染色で検討した。培養細胞においてnestin, vimentin, RC1, A2B5の抗体に強い陽性反応が認められた。またグリア細胞マーカーに対しても陽性であるが、ニューロンマーカーに対しては、培養初期には反応が弱く、継代細胞において陽性率が増す傾向にあった。培養細胞のニューロン・グリア細胞マーカーの二重染色では,大多数の細胞では,ニューロン・グリア細胞マーカーの同時発現が見られた。しかしグリア細胞マーカーのみ発現している細胞も散見された。Lac Z遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスに感染させたHAE細胞をラット線条体に定位的脳移植した。1週間後の還流固定標本では、青染される移植細胞の存在が確認された。HAE細胞が多能性神経幹細胞である可能性が示唆され,その細胞脳移植にても生着細胞が確認できたことは、神経変性疾患,代謝異常症などに対する細胞脳移植療法あるいは遺伝子治療にこのヒト羊膜細胞が有効に利用できると考える。

[目 的]

移植には主要組織適合抗原 ClassⅠの適合性が問題となるが、HAE細胞にはこの ClassⅠは微弱に発現しているが ClassⅡは全く発現していないので他家移植に適した細胞である[1,2]。HAE細胞は受精後8日目に外胚板が二分して形成されるため,種々の細胞や器官に分化する能力を持つと予想される。我々は,培養HAE細胞が神経幹細胞およびニューロン・グリア細胞マーカーを発現していることを報告した[3]。またヒト羊膜組織(in vivo)において神経幹細胞とグリア細胞マーカーが発現しており、培養系においてニューロンマーカーも発現してくることを見い出した[4]。今回はニューロン・グリア細胞マーカーの同時発現について検討し、Lac Z遺伝子発現する組換えアデノウイルスに感染させた本細胞をラットに定位的脳移植したので、短期間実験の結果を報告する。

[実 験 方 法]

帝王切開時に胎盤を入手して、羊膜組織を分離をした。スパーテルにてコラーゲン層を剥離してから、トリプシン(0.125%)処理した。細胞は、24穴プレートにミクロカバーグラスを敷いて培養した (RPMI 1640, 5% CO_2, 37℃)。また免疫組織染色に使用したMouse MoAb(IgG)は, NF, MAP2, MAP2kinase, MAP5, anti-βtubulin, GFAP, CNP, vimentin, A2B5およびRC1 (Dr.Yamamoto, Shriver Center, 提供)。Rabbit PolyAb(IgG)は, nestin(Dr.Nguyan, NIH, 提供), neuron specific enolase, Gal C, MBPおよびGFAPを使用した。また mouse MoAb(IgM) としてO4を用いた。

免疫組織染色は、間接法とABC法で行った。間接法に用いた二次抗体は、FITC標識 anti-mouse IgG or anti-rabbit IgGおよびrhodamine標識 anti-mouse or anti-rabbit IgGを使用して、二重染色も行った。ABC法の概略は、4% paraformaldehydeで室温10分固定してから、5% 正常ヤギ血清,3% BSA/PBCにより1時間室温でブロッキングを行った。つぎに一次抗体を1時間室温で処理し、次にビオチン化抗マウ

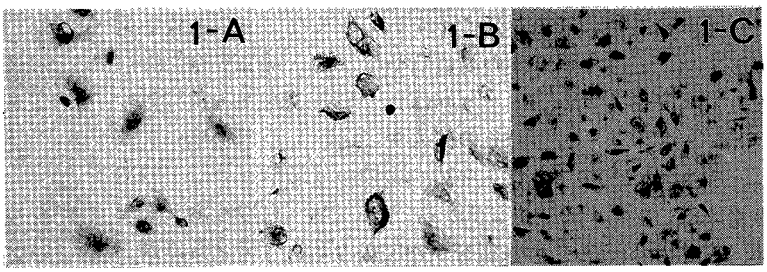
スIgG、抗ウサギIgGまたは抗マウスを室温1時間処理。そしてHRP標識ストレプトアビジンで1時間処理してから、ヘマトキシリンで核染色した。Oligodendrocyteの免疫染色は、ブロッキング，一次抗体処理、4% paraformaldehyde固定、一次抗体処理、以後は同上の順序で行った。Lac Z遺伝子を組み込んだ組換えｱﾃﾞﾉｳｲﾙｽ(AxCALacZ;斎藤泉博士提供) 液をMOI(multiplicity of infection) 20に調整してHAE細胞に感染させた。2日後に細胞サスペンジョン[約5X10^5/5μl PBS(-)]を、定位的にウイスターラット(250-300g) の線条体内に移植した。1週間後に、還流固定標本を用いてX-gal 染色を行った。

[結果と考察]

培養HAE細胞において nestin, RC1, vimentinの抗体に対して強い免疫反応を示した(図1-A,-B,-C). これらの抗原はradial glia において特異的に発現するとされ、それらを発現した細胞が多能性幹細胞としての分化能を示すとの報告がある(Nakafuku et al. 1995)。またほとんどのニューロン、グリア細胞マーカーの抗体に対して陽性反応を示したことより、本細胞も同様な多能性幹細胞である可能性が強く示唆される。また多能性神経幹細胞からニューロン、グリアへの分化あるいは Glia cell missing 遺伝子の存在が注目をあびている。そこでニューロンとグリア細胞マーカーの二重染色を行ったが，大部分の細胞では両細胞マーカーが発現しているが，グリアマーカーのみ発現している細胞も少数認められた。ヒト羊膜組織(in vivo)では、多能性神経幹細胞マーカーおよびグリア細胞マーカーがすでに発現していることより、培養系におけるニューロンへの分化が推測される。現在自己複製能について検索中である。AxCALac ZをHAE細胞にMOI 20で感染させ，2日後にX-gal染色で確認したところ，90% 以上の細胞が染色された。このAxCALac Z感染細胞を感染2日後にラット線条体に定位的に移植し，1週間後の標本につきX-gal染色を行ったところ，移植細胞が染色された(図2)。最近、組換えアデノウイルスで遺伝子導入したヒト胎児脳由来プロゲニター細胞が、神経変性症に対するex vivo 遺伝子治療法として有望な手段であると報告された(Sabate et al. 1995). しかるにヒト羊膜細胞は倫理的に問題が少なく、他家移植可能な幹細胞として、広く臨床応用が期待できると考える。

[文 献]

1)Sakuragawa N,et al. Brain & Dev 14:7-11,1992. 2)Sakuragawa N, et al. Cell Transplantation 4:343-346,1995. 3)Sakuragawa N,et al. Neuroscience letters 209:9-12,1996. 4)Sakuragawa N, et al. 46th Annual Meeting Am Soc Hum Genet, Oct 29,1996 San Francisco, Submitted.



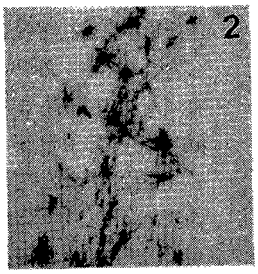


Fig. 1. HAE cells revealed strong immunoreactivities to nestin (1-A) and RC1 (1-B) and vimentin(1-C), which are neural stem cell markers. Fig. 2. One week after grafting of HAE cells to rat brain, inplanted surviving cells expressed strongly β-galactosidase.

編集後記

前プログラム号（Vol. 35, No.2）の編集後記にも記しました様に、本年度から「神経化学」論文集号は、学会主催者の編集委員会が編集することになりました。この論文集号では、テーマ別に論文を分類して「論文番号」と呼ぶ通し番号を付け、その順番に論文を配列しました。同時に発表会場と時間を考慮して付けた「演題番号」を、論文番号の下に示してあります。したがって論文集は一冊の「本」の様に読むことも出来ますし、論文集から目的の論文が発表される時間と会場を、簡単に知ることができます。更に Lecture や Symposium の演題についても抄録を載せましたので、それらの内容や関連論文を知ることが出来ます。

この論文集を作るに当たり、特に審査システムを完全に機能させることは、不可能であると感じました。今回与えられた期間は、論文の受付締切からプログラム印刷までの３５日、論文集印刷までは４１日でした。この間お盆を挟んでいましたので、論文の修正の結果を受け取る為には、著者への電話など過重な労力を強いられました。審査員の方々は熱心に、種々な学問的レベルで審査して下さるので、それに答えて論文発表者に完全な修正をお願いするには、更に１ヵ月以上の期間が必要です。この為に必要な時間と労力は、本論文の作成に使ったほうがずっと有意義と思います。審査員の努力に出来るだけ答えるため、今回は審査コメントを直接著者とその演題の座長にお送りし、発表時の議論を活性化するのに役立つように致しました。審査システムについても、とうに将来計画委員会や理事会で議論する段階に来ていると考えます。また論文集にご覧の様に、今回はシンポジウムの演者にも抄録を書いて頂きましたが、アメリカ人も含めてその何人かには、１頁の原稿しか書いて頂けませんでした。 Organizer 達も２頁を要請するのが「心苦しい」との理由で、それ以上の催促を諦めました。この「論文集」は "priority" を取る論文集の意味を失ってから久しく、「抄録集」としての意義を生かすのなら、今の２頁は誰が見ても長過ぎます。この問題も我々の将来のため、早々に検討してもらいたいと存じます。

（世話人代表　加藤　尚彦）

人　名　索　引

ABC順、番号は［論文番号］、ｾｯｼｮﾝ・演題番号を表します

(A)

Aryeh Routtenberg …… ［S4］ 1CS1-4
阿部貴子 …… ［177］ 2E53
阿部輝雄 …… ［143］ 3Bp2
阿比留康弘 …… ［126］ 1E9
相見良成 …… ［138］ 3Aa6
相澤慎一 …… ［95］ 1E53
赤川公朗 …… ［217］ 1Dp6
赤池昭紀 …… ［109］ 1Da6
赤池　忠 …… ［52］ 1E42
秋山一文 …… ［21］ 1E27・［169］ 2E9
安藤正人 …… ［30］ 1Ba6・［176］ 2E13
［206］ 1Bp9
安藤　進 …… ［49］ 3Bp4
荒井好範 …… ［170］ 2Ba5
荒記俊一 …… ［193］ 1E67
荒木敏行 …… ［95］ 1E53
有村　章 …… ［40］ 3Da5
Arispe, Nelson …… ［51］ 1E41
浅井清文 …… ［86］ 2E18・［87］ 2E19
［97］ 1E54
浅井昌弘 …… ［S26］ 2ASA-7
浅倉幹雄 …… ［15］ 1Ba4
浅野省一 …… ［202］ 1Bp6
浅野富子 …… ［154］ 2E28
浅沼幹人 …… ［8］ 1E17・［22］ 1E28
［37］ 3Da4・［108］ 1E58・［174］ 2E1
［175］ 2E12
阿相皓晃 …… ［81］ 2E14・［82］ 2E15
Auer, Roland N. …… ［44］ 2E47
東　泰孝 …… ［32］ 3Da1・［224］ 2Aa2
［225］ 2E2

(B)

馬場明道 …… ［162］ 3Ba5・［202］ 1Bp6
菩提寺伸人 …… ［15］ 1Ba4
Bredt, David S. …… ［S20］ 2ASA-1

(C)

茶木茂之 …… ［161］ 2E32

(D)

de Vente, J. …… ［168］ 2E8
傳法倫久 …… ［34］ 3Da2
丁　云 …… ［226］ 2Aa3
都　銀珠 …… ［226］ 2Aa3
土肥謙二 …… ［40］ 3Da5・［170］ 2Ba5
土居孝至 …… ［17］ 1Ba1・［65］ 1E48
道勇　学 …… ［S16］ 3CS3-4

(E)

海老原達彦 …… ［151］ 2E25
江頭　亨 …… ［47］ 1E52
江口郁代 …… ［S14］ 3CS3-2
遠藤利朗 …… ［186］ 2E61
榎戸　靖 …… ［95］ 1E53
江角浩安 …… ［S22］ 2ASA-3

(F)

藤村維子 …… ［188］ 1E64
藤中俊之 …… ［102］ 2Da4
藤野一郎 …… ［217］ 1Dp6
藤嵜泰利 …… ［1］ 2E50・［2］ 2E51
藤澤　仁 …… ［198］ 1Bp3
藤田弘子 …… ［135］ 1E13・［89］ 3Ap3
藤田佳織 …… ［87］ 2E19
藤田公和 …… ［29］ 1E34・［30］ 1Ba6
［176］ 2E13・［206］ 1Bp9
藤田　興 …… ［204］ 1E39
藤原智徳 …… ［217］ 1Dp6
深間内文彦 …… ［149］ 2E24
深津考司 …… ［41］ 2E45・［42］ 2E46
福田英臣 …… ［227］ 2E3
福永浩司 …… ［S2］ 1CS1-2
福良治彦 …… ［183］ 2E58・［184］ 2E59
福嶋伸之 …… ［S31］ 2CSB-5
福内靖男 …… ［34］ 3Da2
福山隆一 …… ［66］ 1E49
古市貞一 …… ［223］ 2E1
古川昭栄 …… ［125］ 1Ap7
古塚大介 …… ［9］ 1E18・［24］ 1E29
［25］ 1E30・［27］ 1E32

古谷誠一 …… [S11] 2CS2-4
布施孝久 …… [97] 1E54

(G)

Gómez-Vargas, Marvin …… [28] 1E33 [37] 3Da4・[108] 1E58・[174] 2E11 [175] 2E12
五嶋良郎 …… [182] 2E57
Grundke-Iqbal, Inge …… [62] 1E46
郭 力達 …… [138] 3Aa6

(H)

芳賀和子 …… [153] 2E27
芳賀達也 …… [152] 2E26・[153] 2E27 [156] 2E29
萩原七美 …… [162] 3Ba5
萩原正敏 …… [222] 2Aa1
萩原民雄 …… [213] 2E5
浜井盟子 …… [208] 2E48
長谷川宏幸 …… [205] 1Bp8
橋本恵理 …… [68] 1E50
橋本博史 …… [26] 1E31
橋本 均 …… [162] 3Ba5・[202] 1Bp6
橋本喜次郎 …… [20] 1E26
橋本忠俊 …… [41] 2E45・[42] 2E46
橋本隆紀 …… [S8] 2CS2-1
橋本健志 …… [54] 1Cp2
橋本恒一 …… [160] 3Ba4
秦 英代 …… [148] 2E37
畠中 寛 …… [95] 1E53・[122] 1E7 [123] 1E8・[124] 1Ap6・[126] 1E9
畠中健一 …… [14] 1E22
畠瀬 修 …… [44] 2E47
八田愼一 …… [46] 1E51・[68] 1E50
服部和枝 …… [231] 2E38
早川 徹 …… [102] 2Da4・[218] 1Dp7
林 輝男 …… [10] 1E19・[13] 1E21
日高弘義 …… [S21] 2 ASA-2
日高和幸 …… [158] 2E30
東田陽博 …… [150] 3Ba1
樋口宗史 …… [187] 2E62
氷見敏行 …… [110] 1E59・[165] 2E7
平井啓子 …… [S3] 1CS1-3
平松 緑 …… [48] 2Ba6
平野 均 …… [147] 3Bp3
平野 誠 …… [20] 1E26
平田牧三 …… [147] 3Bp3
久永真市 …… [190] 1Dp1・[192] 1Dp2
久恒辰博 …… [96] 2Da2
菱木知郎 …… [132] 3Aa2
日和佐隆樹 …… [104] 2Da5
本間啓子 …… [112] 1Da2
本田英比古 …… [131] 3Aa1
本多虔夫 …… [30] 1Ba6
本多伸光 …… [17] 1Ba1
本田静世 …… [136] 3Aa4
本藤久雄 …… [20] 1E26
本間秀樹 …… [40] 3Da5・[170] 2Ba5
本間健資 …… [152] 2E26
堀 耕治 …… [3] 2E52
堀江秀典 …… [133] 1Ap9
堀米恒好 …… [199] 1Bp5
星 道生 …… [88] 3Ap2
細井理恵 …… [202] 1Bp6
細川 武 …… [16] 1E23
堀田凱樹 …… [L3] 3CL3・[234] 3Cp4
北条香織 …… [54] 1Cp2

(I)

市村 徹 …… [199] 1Bp5
五十嵐修一 …… [S14] 3CS3-2
五十嵐道弘 …… [183] 2E58・[184] 2E59 [185] 2E60
井原康夫 …… [58] 1Cp6・[64] 1Cp8 [67] 1Cp9
飯田享子 …… [22] 1E28
飯田基之 …… [22] 1E28・[37] 3Da4
飯田竜一 …… [52] 1E42
飯田芳子 …… [205] 1Bp8
五十嵐 康 …… [209] 2E49
池田 均 …… [104] 2Da5
池田和正 …… [18] 1E24
池田久美子 …… [238] 1Dp9
池田正明 …… [19] 1E25
池田正行 …… [S24] 2ASA-5・[110] 1E59 [165] 2E7
池亀 守 …… [204] 1E39

池中一裕 …… [83] 2E16
池内俊彦 …… [122] 1E7
以倉康充 …… [62] 1E46・[63] 1E47
今川正樹 …… [67] 1Cp9
今井嘉紀 …… [85] 3Ap1
今泉和則 …… [35] 3Da3・[94] 2Da1
今泉美佳 …… [142] 2E33・[144] 2E34
井本憲志 …… [53] 1E43
藺牟田直彦 …… [101] 1Da4
稲垣正俊 …… [13] 1E21
稲垣俊明 …… [154] 2E28
稲垣好昌 …… [133] 1Ap9
稲村直子 …… [95] 1E53
井ノ口馨 …… [S3] 1CS1-3
井上敦子 …… [11] 1E20
井上　洋 …… [183] 2E58
井上　勲 …… [5] 3Dp4
井上和秀 …… [163] 3Ba6
井上幸紀 …… [1] 2E50・[2] 2E51
井上順雄 …… [S25] 2ASA-6・[71] 1Aa2
[164] 2E6
Iqbal, Khalid …… [62] 1E46
入江康至 …… [216] 1Dp5
入谷克己 …… [29] 1E34・[30] 1Ba6
石橋英俊 …… [214] 1Dp3
石毛久美子 …… [227] 2E3
石井　俊 …… [238] 1Dp9
石川博基 …… [53] 1E43
石川紘一 …… [148] 2E37
石川巧一 …… [38] 2E43
石川正洋 …… [136] 3Aa4
石丸裕久 …… [38] 2E43・[209] 2E49
石岡憲昭 …… [179] 2E55
石田外樹 …… [112] 1Da2
石浦章一 …… [S17] 3CS3-5
石塚　徹 …… [143] 3Bp2
磯辺俊明 …… [199] 1Bp5・[211] 2Aa6
[212] 2E4
板垣千春 …… [199] 1Bp5
板野俊文 …… [44] 2E47
一宮慎吾 …… [132] 3Aa2
伊東亜紀雄 …… [52] 1E42
井藤英喜 …… [31] 1E35
伊東秀記 …… [195] 1Bp1・[196] 1E36
[197] 1Bp2
伊藤和光 …… [156] 2E29
伊藤　守 …… [102] 2Da4
伊藤康宏 …… [230] 3Cp1
伊藤芳久 …… [227] 2E3
伊藤美津樹 …… [199] 1Bp5
Ivanova, Anna …… [83] 2E16
岩間斗史 …… [41] 2E45・[42] 2E46
岩政浩子 …… [181] 2E56
岩崎進一 …… [1] 2E50・[2] 2E51
岩田　明 …… [39] 2E44
岩田恵美 …… [22] 1E28・[37] 3Da4
[108] 1E58・[174] 2E11
[175] 2E12

(J)

徐　紅 …… [211] 2Aa6

(K)

門屋利彦 …… [133] 1Ap9
加賀谷有行 …… [10] 1E19・[13] 1E21
鹿毛眞人 …… [138] 3Aa6
甲斐利弘 …… [26] 1E31
開地泰介 …… [79] 1E5
梶井　靖 …… [S8] 2CS2-1
垣塚　彰 …… [S19] 3CS3-7
鎌田洋一 …… [142] 2E33
亀谷富由樹 …… [60] 1E44
亀山仁彦 …… [152] 2E26
上野川修一 …… [96] 2Da2
神庭重信 …… [S26] 2ASA-7
金井みち子 …… [211] 2Aa6・[212] 2E4
金松知幸 …… [210] 3Dp2
神田尚俊 …… [201] 1E38
金子　厚 …… [19] 1E25
金子　勲 …… [55] 1Cp3
狩野方伸 …… [S5] 1 CS1-5
柏原健一 …… [169] 2E9
柏木雄次郎 …… [61] 1E45・[63] 1E47
片田栄一 …… [127] 1E10・[128] 1E11
片岡弘臣 …… [125] 1Ap7

片岡喜由 …… [32] 3Da1・[113] 1E61 [114] 1E62・[115] 1Da1
片山雅文 …… [26] 1E31
片山泰一 …… [35] 3Da3・[94] 2Da1
加藤明彦 …… [S3] 1CS1-3
加藤兼房 …… [118] 1Ap2・[154] 2E28 [195] 1Bp1・[196] 1E36・[197] 1Bp2
加藤一麿 …… [194] 1E68
加藤 聖 …… [112] 1Da2
加藤泰治 …… [86] 2E18・[87] 2E19 [97] 1E54
加藤尚彦 …… [S25] 2ASA-6・[71] 1Aa2 [164] 2E6・[182] 2E57
加藤 武 …… [S7] 1CS1-7・[215] 1Dp4
加藤寿章 …… [29] 1E34・[30] 1Ba6
勝元栄一 …… [9] 1E18・[25] 1E30 [27] 1E32
川端昌弘 …… [78] 1Aa6
川口正二郎 …… [33] 2E41・[116] 1E63
河原康一 …… [72] 1Aa3
川原正博 …… [51] 1E41・[79] 1E5
川上秀史 …… [222] 2Aa1
川又敏男 …… [54] 1Cp2
川村光毅 …… [70] 1Aa1・[81] 2E14
河村幸佐 …… [20] 1E26
河村貴央 …… [109] 1Da6
川野 仁 …… [70] 1Aa1・[81] 2E14
川崎雅一 …… [141] 3Bp1・[144] 2E34
河瀬 斌 …… [82] 2E15・[84] 2E17
川島誠一 …… [70] 1Aa1
菊地哲朗 …… [11] 1E20
菊池 裕 …… [234] 3Cp4
菊地義明 …… [136] 3Aa4
金 哲熙 …… [S28] 2CSB-2・[232] 3Cp2
金 振萬 …… [193] 1E67
木村 宏 …… [138] 3Aa6
木村 淳 …… [109] 1Da6
木村和弘 …… [155] 3Ba2
木村芳滋 …… [236] 2E40
木岡哲郎 …… [24] 1E29・[27] 1E32
切池信夫 …… [1] 2E50・[2] 2E51
岸 栄子 …… [209] 2E49
岸本英爾 …… [S12] 2CS2-5
岸本健雄 …… [190] 1Dp1・[192] 1Dp2
北川一夫 …… [35] 3Da3・[45] 3Da6
北原 糺 …… [S6] 1CS1-6
北島哲子 …… [119] 1Ap3・[120] 1Ap4
北村邦男 …… [16] 1E23・[19] 1E25 [91] 2E21
北村牧子 …… [4] 3Dp3
木谷隆子 …… [198] 1Bp3
鬼頭昭三 …… [140] 1E15
木内祐二 …… [171] 2E10
木山博資 …… [S6] 1CS1-6
小林和夫 …… [79] 1E5
小林和人 …… [157] 3Ba3
小林正明 …… [221] 1E71
小林雅文 …… [4] 3Dp3
小林孝安 …… [77] 1E4
小林恭士 …… [223] 2E1
小暮太郎 …… [179] 2E55
甲村英二 …… [102] 2Da4
河野雅弘 …… [175] 2E12
河野朋子 …… [117] 1Ap1
高坂新一 …… [50] 1Cp1・[56] 1Cp4 [85] 3Ap1・[136] 3Aa4
小出誠司 …… [26] 1E31
小池 恒 …… [S17] 3CS3-5
小池達郎 …… [98] 1E55・[99] 2Da3 [106] 1E57
小糸寿美 …… [90] 2E20
小泉修一 …… [163] 3Ba6
小鵜久子 …… [92] 2E22・[93] 2E23
小島雅代 …… [205] 1Bp8
児島伸彦 …… [214] 1Dp3
小島拓哉 …… [S29] 2CSB-3・[229] 2Aa5
小松真紀子 …… [48] 2Ba6
小宮義璋 …… [183] 2E58・[184] 2E59 [185] 2E60・[188] 1E64・[191] 1E66
小宮山徳太郎 …… [165] 2E7
近藤太郎 …… [34] 3Da2
近藤洋一 …… [22] 1E28・[28] 1E33 [37] 3Da4・[108] 1E58・[174] 2E11 [175] 2E12

近藤和博 …… [132] 3Aa2
小西慶幸 …… [223] 2E1
今野大三 …… [171] 2E10
Korenberg, R. …… [12] 1Ba3
小笹貴史 …… [146] 2E36
越川憲明 …… [4] 3Dp3
小山　聡 …… [34] 3Da2
小谷野貴文 …… [86] 2E18
小崎俊司 …… [142] 2E33
久保武一 …… [55] 1Cp3
工藤　喬 …… [61] 1E45・[62] 1E46
[63] 1E47
久原映子 …… [179] 2E55
杭田慶介 …… [104] 2Da5
熊倉鴻之助 …… [141] 3Bp1・[142] 2E33
[144] 2E34
熊西敏郎 …… [143] 3Bp2
熊ノ郷晴子 …… [178] 2E54
郭　哲輝 …… [S28] 2CSB-2・[226] 2Aa3
倉知　正 …… [188] 1E64
倉本展行 …… [32] 3Da1
蔵島由紀子 …… [S22] 2ASA-3
栗原悦雄 …… [42] 2E46
栗原堅三 …… [139] 1E14
栗原　正 …… [92] 2E22・[93] 2E23
[231] 2E38
栗岡政典 …… [1] 2E50・[2] 2E51
栗山欣弥 …… [160] 3Ba4
黒田重利 …… [21] 1E27
黒田洋一郎 …… [51] 1E41・[79] 1E5
[189] 1E65
黒田陽子 …… [24] 1E29
楠畑　雅 …… [145] 2E35
桑野良三 …… [177] 2E53・[230] 3Cp1
葛谷博磁 …… [204] 1E39

(L)

李　炳生 …… [187] 2E62

(M)

馬渕卓真 …… [45] 3Da6
町田光世 …… [18] 1E24
前田　潔 …… [54] 1Cp2
前田信治 …… [89] 3Ap3・[135] 1E13
前川昌平 …… [178] 2E54
牧野泰孝 …… [223] 2E1
Markerink-van Ittersum, Marjanne [168] 2E8
Martuza, Robert L. …… [88] 3Ap2
丸野内　棣 …… [103] 1E56
丸山悦子 …… [76] 1Aa5
丸山博文 …… [222] 2Aa1
丸山　敬 …… [S17] 3CS3-5・[70] 1Aa1
丸山和佳子 …… [107] 1Da5
丸山悠司 …… [38] 2E43・[209] 2E49
真砂敦夫 …… [39] 2E44
正宗　研 …… [194] 1E68
Masserano, J.M …… [7] 1E16
俣賀宣子 …… [149] 2E24
松原　守 …… [145] 2E35
松田正司 …… [89] 3Ap3
松田敏夫 …… [162] 3Ba5・[202] 1Bp6
松田義宏 …… [90] 2E20
松田芳人 …… [147] 3Bp3
松川則之 …… [128] 1E11
松本逸郎 …… [137] 3Aa5
松本和政 …… [69] 1E1・[215] 1Dp4
松本　清 …… [40] 3Da5・[170] 2Ba5
松本昌泰 …… [45] 3Da6
松本光之 …… [158] 2E30
松本　孝 …… [20] 1E26
松野　聖 …… [111] 1E60
松尾哲孝 …… [236] 2E40
松尾徳幸 …… [100] 1Da3
松尾亮太 …… [S3] 1CS1-3
松岡一郎 …… [139] 1E14
松浦弘治 …… [28] 1E33・[37] 3Da4
松山正剛 …… [S4] 1CS1-4
松山知弘 …… [100] 1Da3
松崎文雄 …… [S30] 2CSB-4
馬渡一浩 …… [112] 1Da2
McGeer, PL …… [138] 3Aa6
McKay, Ronald D.G …… [96] 2Da2
Mercken, Marc …… [59] 1Cp7
道川　誠 …… [66] 1E49
三木直正 …… [S28] 2CSB-2・[187] 2E62
[216] 1Dp5・[226] 2Aa3・[232] 3Cp2

御子柴克彦 …… [223] 2E1
箕越靖彦 …… [208] 2E48
御園生裕明 …… [142] 2E33・[144] 2E34
三須良實 …… [L1] 1CL1・[182] 2E57
三竹重久 …… [127] 1E10
三谷 章 …… [32] 3Da1
三浦正幸 …… [103] 1E56
宮嶋雅一 …… [228] 2Aa4
宮川太平 …… [6] 1Ba2
宮前康之 …… [61] 1E45
宮本 篤 …… [200] 1E37
宮本英七 …… [S2] 1CS1-2・[190] 1Dp1
宮本 修 …… [44] 2E47
宮坂智宏 …… [S23] 2ASA-4
宮下哲典 …… [230] 3Cp1
宮崎博文 …… [113] 1E61
宮崎めぐみ …… [206] 1Bp9
三好理絵 …… [140] 1E15
溝渕睦彦 …… [17] 1Ba1・[65] 1E48
水野恭伸 …… [117] 1Ap1
水島秀勝 …… [40] 3Da5・[170] 2Ba5
毛利英雄 …… [18] 1E24
百木忠久 …… [71] 1Aa2
森 啓 …… [60] 1E44
森 望 …… [S29] 2CSB-3・[121] 1Ap5
[229] 2Aa5
森原剛史 …… [61] 1E45・[63] 1E47
森川将行 …… [86] 2E18
森松正美 …… [155] 3Ba2
森下理香 …… [154] 2E28
撫井弘二 …… [9] 1E18・[24] 1E29
[25] 1E30・[27] 1E32
村上富士夫 …… [186] 2E61
村上健一 …… [82] 2E15
村上信五 …… [17] 1Ba1
村上 猛 …… [144] 2E34
村上哲英 …… [44] 2E47
村本和世 …… [79] 1E5・[189] 1E65
村岡 修 …… [S28] 2CSB-2・[232] 3Cp2
村岡純枝 …… [S29] 2CSB-3
村島善也 …… [23] 1Ba5
村山明子 …… [S3] 1CS1-3
村山美由紀 …… [59] 1Cp7
村山俊彦 …… [166] 2Ba1・[173] 2Ba4
室田誠逸 …… [110] 1E59・[165] 2E7
(N)
鍋島俊隆 …… [52] 1E42・[167] 2Ba2
永井康雄 …… [41] 2E45・[42] 2E46
永井康雄 …… [222] 2Aa1
長沼朋佳 …… [173] 2Ba4
長島直美 …… [91] 2E21
永田栄一郎 …… [34] 3Da2
永田 豊 …… [29] 1E34・[30] 1Ba6
[176] 2E13・[206] 1Bp9
永津俊治 …… [157] 3Ba3・[207] 1E40
[237] 1Dp8
中林 潤 …… [6] 1Ba2
中田祐二 …… [220] 1E70
中川滋木 …… [18] 1E24
中川原 章 …… [104] 2Da5・[132] 3Aa2
中原辰雄 …… [20] 1E26
中木敏夫 …… [S26] 2ASA-7
中井真通 …… [54] 1Cp2
中井康光 …… [40] 3Da5・[170] 2Ba5
中嶋一行 …… [85] 3Ap1・[136] 3Aa4
中村 薫 …… [20] 1E26
中村雅之 …… [12] 1Ba3
中村 俊 …… [117] 1Ap1
中村岳史 …… [121] 1Ap5
中村洋子 …… [104] 2Da5
中村洋一 …… [113] 1E61・[114] 1E62
[115] 1Da1
中村嘉宏 …… [26] 1E31
中村 祐 …… [63] 1E47
中根麻子 …… [139] 1E14
中西亜紀 …… [24] 1E29・[27] 1E32
中西圭子 …… [87] 2E19
中西 真 …… [97] 1E54
中尾純治 …… [84] 2E17
中島 央 …… [6] 1Ba2
中城有喜 …… [17] 1Ba1・[65] 1E48
仲田義啓 …… [11] 1E20
中谷篤史 …… [122] 1E7・[124] 1Ap6
中矢直樹 …… [78] 1Aa6

中山　洋 …… [211] 2Aa6・[212] 2E4
中山　均 …… [122] 1E7
中山たかね …… [75] 1E3
中山　孝 …… [S25] 2ASA-6・[71] 1Aa2
[164] 2E6・[182] 2E57
中里篤郎 …… [161] 2E32
中澤美奈子 …… [111] 1E60
行方和彦 …… [67] 1Cp9
直井　信 …… [107] 1Da5
奈良圭之輔 …… [171] 2E10
成瀬昭二 …… [S11] 2CS2-4
鳴瀬善久 …… [S29] 2CSB-3・[229] 2Aa5
夏苅直己 …… [7] 1E16
根木哲朗 …… [44] 2E47
新島　旭 …… [137] 3Aa5
新村　核 …… [5] 3Dp4
二村好憲 …… [132] 3Aa2
二宮孝文 …… [106] 1E57
西林佐紀子 …… [22] 1E28・[37] 3Da4
[108] 1E58・[174] 2E11・[175] 2E12
西堀正洋 …… [78] 1Aa6
西田　朗 …… [10] 1E19・[159] 2E31
西川　徹 …… [S8] 2CS2-1
西木禎一 …… [141] 3Bp1・[142] 2E33
西村伊三男 …… [57] 1Cp5
西村　健 …… [8] 1E17
西村　健 …… [63] 1E47
西尾チカ …… [126] 1E9
西屋　禎 …… [S23] 2ASA-4
西沢幸夫 …… [146] 2E36
新田淳美 …… [52] 1E42・[125] 1Ap7
丹羽　修 …… [S7] 1CS1-7
信川貴子 …… [98] 1E55
野田百美 …… [150] 3Ba1
野口鉄也 …… [221] 1E71
野村正彦 …… [3] 2E52・[16] 1E23
[19] 1E25・[43] 3Dp1・[91] 2E21
野村隆則 …… [219] 1E69
野村知彦 …… [180] 1Bp4
野村靖幸　[S23] 2ASA-4・[166] 2Ba1
[173] 2Ba4
埜中正博 …… [102] 2Da4
野津智美 …… [81] 2E14
野崎博之 …… [34] 3Da2
野沢りさ …… [133] 1Ap9
貫名信之 …… [S18] 3CS3-6
沼川忠広 …… [123] 1E8・[124] 1Ap6

(O)

小幡邦彦 …… [S1] 1CS1-1・[214] 1Dp3
小田温子 …… [166] 2Ba1
小田　毅 …… [106] 1E57
尾田富一郎 …… [55] 1Cp3
小川暢也 …… [162] 3Ba5
小川紀雄 …… [8] 1E17・[22] 1E28
[28] 1E33・[37] 3Da4・[43] 3Dp1
[108] 1E58・[174] 2E11・[175] 2E12
小川　智 …… [100] 1Da3・[101] 1Da4
荻野郁子 …… [238] 1Dp9
荻田喜代一 …… [32] 3Da1・[224] 2Aa2
[225] 2E2
小口勝司 …… [171] 2E10
小倉明彦 …… [124] 1Ap6
小倉　勤 …… [S22] 2ASA-3
大黒一哉 …… [205] 1Bp8
大原浩市 …… [S10] 2CS23
大橋章雄 …… [86] 2E18
大林克巳 …… [183] 2E58
大川　功 …… [33] 2E41
大川滋紀 …… [41] 2E45・[42] 2E46
大久保博晶 …… [222] 2Aa1
大村　裕 …… [137] 3Aa5
大澤郁朗 …… [50] 1Cp1・[56] 1Cp4
大澤圭子 …… [85] 3Ap1
大鹿英世 …… [46] 1E51・[53] 1E43
[68] 1E50・[200] 1E37
太田訓正 …… [181] 2E56
小鹿幸生 …… [127] 1E10・[128] 1E11
[129] 1E12・[130] 1Ap8
岡田秀親 …… [128] 1E11
岡田尚子 …… [155] 3Ba2
岡田敏一 …… [166] 2Ba1
岡田泰志 …… [44] 2E47
岡本　仁 …… [234] 3Cp4・[235] 2E39

岡本慶子 …… [195] 1Bp1・[196] 1E36
[197] 1Bp2
岡村 均 …… [57] 1Cp5
岡野栄之 …… [233] 3Cp3
大河内正康 …… [60] 1E44
屋田 修 …… [238] 1Dp9
奥野恵理子 …… [152] 2E26
奥野幸子 …… [198] 1Bp3
奥山 茂 …… [161] 2E32
奥山典生 …… [211] 2Aa6
小俣三郎 …… [199] 1Bp5
大西 博 …… [26] 1E31
大江良秀 …… [38] 2E43
大野 稔 …… [171] 2E10
長田賢一 …… [15] 1Ba4
大杉 武 …… [226] 2Aa3
太田 明 …… [207] 1E40
大塚康史 …… [129] 1E12・[130] 1Ap8
小山文隆 …… [58] 1Cp6・[67] 1Cp9
小山田孝裕 …… [10] 1E19
尾崎 覚 …… [33] 2E41
尾崎宜洋 …… [9] 1E18・[25] 1E30
[27] 1E32
小澤史子 …… [S3] 1CS1-3
小澤寛樹 …… [53] 1E43・[68] 1E50

(P)

Paul H.Patterson …… [S27] 2CSB-1
彭 輝 …… [135] 1E13

(R)

Rabkin, Samuel D. …… [88] 3Ap2
Rojas, Edwardo …… [51] 1E41

(S)

佐伯清美 …… [78] 1Aa6
Saffen, David …… [151] 2E25
佐賀信介 …… [154] 2E28・[197] 1Bp2
鷲 直樹 …… [161] 2E32
佐原成彦 …… [60] 1E44
西道隆臣 …… [70] 1Aa1
西須英雄 …… [143] 3Bp2
斉藤春洋 …… [133] 1Ap9
斎藤秀哉 …… [46] 1E51
斎藤 泉 …… [57] 1Cp5・[72] 1Aa3
斉藤昌之 …… [155] 3Ba2
斎藤直人 …… [S17] 3CS3-5
斎藤利和 …… [46] 1E51・[68] 1E50
齋藤利和 …… [53] 1E43
斎藤祐見子 …… [70] 1Aa1
斎藤喜人 …… [S3] 1CS1-3
斉藤和裕 …… [125] 1Ap7
斎藤茂治 …… [221] 1E71
酒井偉久子 …… [133] 1Ap9
坂井研一 …… [169] 2E9
酒井宏一郎 …… [19] 1E25
酒井直人 …… [123] 1E8・[124] 1Ap6
酒井 紀 …… [131] 3Aa1
榊 孝之 …… [102] 2Da4
榊 佳之 …… [S3] 1CS1-3
坂本秀生 …… [204] 1E39
坂本 安 …… [16] 1E23・[19] 1E25
[91] 2E21
阪中雅広 …… [89] 3Ap3・[135] 1E13
崎山 樹 …… [104] 2Da5・[132] 3Aa2
佐久間充弘 …… [92] 2E22・[93] 2E23
[231] 2E38
桜川宣男 …… [238] 1Dp9
佐野 輝 …… [12] 1Ba3
佐野訓明 …… [105] 2Da6
佐野 護 …… [119] 1Ap3・[120] 1Ap4
三瓶一弘 …… [S14] 3CS3-2
皿井正子 …… [29] 1E34
猿木信裕 …… [36] 2E42
笹川 昇 …… [S17] 3CS3-5
笹原洋二 …… [77] 1E4
笹川展幸 …… [S26] 2ASA-7
佐々木和男 …… [137] 3Aa5
佐々木幸生 …… [166] 2Ba1
貴家康男 …… [15] 1Ba4
佐藤昭夫 …… [31] 1E35
佐藤 潔 …… [228] 2Aa4
佐藤康二 …… [203] 1Bp7
佐藤真由美 …… [133] 1Ap9
佐藤 忍 …… [71] 1Aa2
佐藤嘉兵 …… [18] 1E24
佐藤郁子 …… [165] 2E7

澤田秀幸 …… [109] 1Da6
澤田　誠 …… [103] 1E56・[237] 1Dp8
澤本和延 …… [233] 3Cp3
関口真理子 …… [142] 2E33
関原久彦 …… [71] 1Aa2
関野祐子 …… [36] 2E42
仙波純一 …… [140] 1E15
仙波禮治 …… [118] 1Ap2
仙波りつ子 …… [118] 1Ap2・[126] 1E9
瀬田和夫 …… [199] 1Bp5・[211] 2Aa6
[212] 2E4
瀬戸真由美 …… [11] 1E20
芝軒信次 …… [148] 2E37
柴山健三 …… [29] 1E34・[176] 2E13
島田昌一 …… [218] 1Dp7
鳩津　孝 …… [208] 2E48
清水千草 …… [215] 1Dp4
清水雅美 …… [10] 1E19・[159] 2E31
清水義雄 …… [21] 1E27
下濱　俊 …… [109] 1Da6
下川雅丈 …… [S17] 3CS3-5
新郷明子 …… [140] 1E15
新開史子 …… [199] 1Bp5・[211] 2Aa6
篠田　純 …… [84] 2E17
篠田雅彦 …… [56] 1Cp4
新谷　太 …… [S26] 2ASA-7
塩田清二 …… [40] 3Da5・[170] 2Ba5
塩坂貞夫 …… [69] 1E1・[215] 1Dp4
調　恒明 …… [236] 2E40
白井俊孝 …… [34] 3Da2
白石哲也 …… [33] 2E41・[116] 1E63
白尾智明 …… [36] 2E42
白崎仁美 …… [42] 2E46
白崎竜一 …… [186] 2E61
庄盛敏廉 …… [169] 2E9
司　秋生 …… [113] 1E61・[114] 1E62
[115] 1Da1
祖父江　元 …… [S16] 3CS3-4
祖父江和哉 …… [86] 2E18
曽我智子 …… [164] 2E6
曾我部正博 …… [52] 1E42
相馬健子 …… [75] 1E3
孫　立智 …… [5] 3Dp4
反町洋之 …… [S17] 3CS3-5
Steinbusch, H. W. M. …… [168] 2E8
須田喜久夫 …… [228] 2Aa4
菅原　恵 …… [148] 2E37
菅原正伯 …… [194] 1E68
杉浦弘子 …… [216] 1Dp5
鈴木映二 …… [S26] 2ASA-7
鈴木二郎 …… [23] 1Ba5
鈴木和夫 …… [222] 2Aa1
鈴木紘一 …… [S17] 3CS3-5
鈴木竜世 …… [157] 3Ba3

(T)

田渕明子 …… [105] 2Da6・[172] 2Ba3
田渕和雄 …… [33] 2E41・[116] 1E63
多田祥子 …… [158] 2E30
田口明子 …… [233] 3Cp3
平　英一 …… [S28] 2CSB-2・[187] 2E62
田島鉄弥 …… [33] 2E41
高木　勉 …… [35] 3Da3・[94] 2Da1
[100] 1Da3・[218] 1Dp7
高原ひろみ …… [210] 3Dp2
高橋　章 …… [38] 2E43・[209] 2E49
高橋浩士 …… [59] 1Cp7
高橋久英 …… [29] 1E34・[30] 1Ba6
高橋勝宣 …… [S8] 2CS2-1
高橋正身 …… [141] 3Bp1・[142] 2E33
高橋　勤 …… [107] 1Da5
高畑直彦 …… [53] 1E43・[68] 1E50
高松淳一 …… [6] 1Ba2
高松　研 …… [221] 1E71
高村千鶴子 …… [50] 1Cp1
高島明彦 …… [59] 1Cp7
高山房子 …… [47] 1E52
竹林　実 …… [10] 1E19・[13] 1E21
竹田二美代 …… [213] 2E5
武田雅俊 …… [8] 1E17・[61] 1E45
[62] 1E46・[63] 1E47
竹田　稔 …… [213] 2E5
武田良平 …… [65] 1E48
武田泰生 …… [81] 2E14
竹原直美 …… [91] 2E21

武井延之 …… [123] 1E8・[124] 1Ap6
[229] 2Aa5
竹村晴夫 …… [53] 1E43
竹下正純 …… [236] 2E40
武富 保 …… [80] 1E6
竹内郁夫 …… [118] 1Ap2
滝沢 昇 …… [112] 1Da2
玉井洋一 …… [92] 2E22・[93] 2E23
田村眞理 …… [77] 1E4
田村隆明 …… [223] 2E1
田邉敬貴 …… [12] 1Ba3・[65] 1E48
田中忠蔵 …… [S11] 2CS2-4
田中千賀子 …… [54] 1Cp2
田中章景 …… [S16] 3CS3-4
田中英明 …… [181] 2E56・[236] 2E40
田中秀和 …… [S28] 2CSB-2・[232] 3Cp2
田中洋史 …… [177] 2E53
田中順一 …… [131] 3Aa1
田中潤也 …… [89] 3Ap3・[135] 1E13
[168] 2E8
田中嘉代子 …… [19] 1E25
田中健一 …… [3] 2E52・[43] 3Dp1
田中喜久子 …… [60] 1E44
田中亀代次 …… [95] 1E53
田中耕太郎 …… [34] 3Da2

田中正彦 …… [103] 1E56
田中秀逸 …… [98] 1E55・[99] 2Da3
[106] 1E57
田中隆佳 …… [213] 2E5
田中康一 …… [49] 3Bp4
谷 宗英 …… [26] 1E31
谷口寿章 …… [145] 2E35・[189] 1E65
谷口直子 …… [73] 1E2・[74] 1Aa4
谷口典男 …… [8] 1E17・[63] 1E47
谷口泰造 …… [54] 1Cp2
谷井久志 …… [8] 1E17
谷浦秀夫 …… [73] 1E2・[74] 1Aa4
[220] 1E70
田岡万悟 …… [212] 2E4
田代英夫 …… [188] 1E64
田代朋子 …… [188] 1E64・[191] 1E66
立野 慶 …… [213] 2E5
田原康孝 …… [13] 1E21
寺田庄一 …… [16] 1E23
寺島 明 …… [54] 1Cp2
Thangavel, Ramasamy …… [238] 1Dp9
千谷晃一 …… [145] 2E35
戸田啓介 …… [33] 2E41・[116] 1E63
戸田重誠 …… [S8] 2CS2-1
富樫廣子 …… [46] 1E51
東藤直樹 …… [128] 1E11
遠山正彌 …… [35] 3Da3・[69] 1E1
[94] 2Da1・[100] 1Da3
[101] 1Da4・[218] 1Dp7
遠山陽子 …… [93] 2E23
砥出勝雄 …… [56] 1Cp4
徳元美佳 …… [234] 3Cp4
遠山育夫 …… [138] 3Aa6
豊原敬三 …… [131] 3Aa1
豊島 至 …… [194] 1E68
Tryambak, S.D. …… [117] 1Ap1
辻 省次 …… [S13] 3CS3-1・[S14] 3CS3-2
坪川達也 …… [235] 2E39
津田 学 …… [35] 3Da3・[94] 2Da1
津田正明 …… [105] 2Da6・[172] 2Ba3
津田守弘 …… [191] 1E66
津賀浩史 …… [152] 2E26
継 泰城 …… [130] 1Ap8
塚田裕三 …… [75] 1E3・[210] 3Dp2
築地 淳 …… [133] 1Ap9
津久江一郎 …… [13] 1E21
鶴岡伸夫 …… [86] 2E18
堤 哲之 …… [20] 1E26

(U)

内田和久 …… [212] 2E4
内田洋子 …… [134] 3Aa3
内村英幸 …… [20] 1E26
植田弘師 …… [S31] 2CSB-5
上田周一 …… [101] 1Da4
上田啓司 …… [6] 1Ba2
上田龍三 …… [128] 1E11
上田康子 …… [41] 2E45
植田勇人 …… [48] 2Ba6

上原孝 …… [S23] 2ASA-4
植木孝俊 …… [87] 2E19
上村敬一 …… [80] 1E6
上野修一 …… [12] 1Ba3
植鳩栄未子 …… [232] 3Cp2
植月太一 …… [57] 1Cp5・[72] 1Aa3
[220] 1E70
海野麻未 …… [S8] 2CS2-1
宇佐美美穂子 …… [60] 1E44
臼杵扶佐子 …… [S17] 3CS3-5
植村慶一 …… [81] 2E14・[82] 2E15
[84] 2E17・[88] 3Ap2・[234] 3Cp4
[235] 2E39

(W)

Wagner, Henry N. …… [L2] 2CL2
和田千鶴 …… [194] 1E68
和田博夫 …… [31] 1E35
和田尚子 …… [3] 2E52・[43] 3Dp1
若井 豪 …… [144] 2E34
和中明生 …… [35] 3Da3・[94] 2Da1
[100] 1Da3
王 益珺 …… [149] 2E24
渡部和彦 …… [131] 3Aa1
渡辺 淳 …… [64] 1Cp8
渡邉建彦 …… [5] 3Dp4
渡辺 武 …… [5] 3Dp4
渡辺知司 …… [S17] 3CS3-5
渡辺泰男 …… [S21] 2 ASA-2
Wyatt, R.J. …… [7] 1E16

(Y)

八木田佳樹 …… [45] 3Da6
矢倉英隆 …… [76] 1Aa5
山田知春 …… [233] 3Cp3
山田和雄 …… [39] 2E44・[97] 1E54
山田清文 …… [167] 2Ba2
山田真久 …… [83] 2E16
山田正夫 …… [S15] 3CS3-3
山田雅司 …… [122] 1E7・[124] 1Ap6
山田通夫 …… [147] 3Bp3
山田紀子 …… [55] 1Cp3
山上 榮 …… [1] 2E50・[2] 2E51
[9] 1E18・[24] 1E29・[25] 1E30
[26] 1E31・[27] 1E32
山形要人 …… [216] 1Dp5
山口美保子 …… [211] 2Aa6
山口時男 …… [14] 1E22・[158] 2E30
山口知子 …… [201] 1E38
山口宜秀 …… [83] 2E16
Yamakawa, K. …… [12] 1Ba3
山国 徹 …… [177] 2E53
山本明広 …… [60] 1E44
山本秀子 …… [161] 2E32
山本秀幸 …… [190] 1Dp1
山元 弘 …… [90] 2E20
山本勝信 …… [S7] 1CS1-7
山本恭平 …… [162] 3Ba5
山本 恵 …… [53] 1E43・[68] 1E50
山本孝之 …… [128] 1E11
山本敏文 …… [161] 2E32
山室 裕 …… [19] 1E25
山中康光 …… [47] 1E52
山之端万里 …… [75] 1E3
山下俊英 …… [102] 2Da4・[218] 1Dp7
山内英美子 …… [189] 1E65
山内理充 …… [29] 1E34・[30] 1Ba6
[176] 2E13・[206] 1Bp9
山内 卓 …… [180] 1Bp4
山脇成人 …… [10] 1E19・[13] 1E21
[159] 2E31
山崎由香子 …… [171] 2E10
柳川右千夫 …… [77] 1E4
柳原尚明 …… [17] 1Ba1
柳原武彦 …… [45] 3Da6・[101] 1Da4
柳澤勝彦 …… [66] 1E49
谷内一彦 …… [5] 3Dp4
柳瀬尚人 …… [32] 3Da1
保田 稔 …… [54] 1Cp2
安川節子 …… [6] 1Ba2
安原 治 …… [138] 3Aa6
安井裕子 …… [112] 1Da2
安波道郎 …… [222] 2Aa1
安武かおり …… [59] 1Cp7

矢崎貴仁…… [84] 2E17・ [88] 3Ap2
横田則夫…… [10] 1E19・ [13] 1E21
横谷 昇 …… [9] 1E18・ [25] 1E30
[27] 1E32
横谷 昇…… [24] 1E29
横山和仁 …… [193] 1E67
米田 博 …… [S9] 2CS2-2
米田幸雄 …… [32] 3Da1・ [224] 2Aa2
[225] 2E2
吉田 明 …… [219] 1E69
吉田弘美…… [92] 2E22・ [93] 2E23
[231] 2E38
吉田裕孝…… [64] 1Cp8
吉田 聡 …… [207] 1E40
吉田成孝 …… [215] 1Dp4
吉田幸弘 …… [4] 3Dp3
吉川和明…… [57] 1Cp5・ [72] 1Aa3
[73] 1E2・ [74] 1Aa4・ [220] 1E70
吉川泰弘 …… [79] 1E5
芳本信子 …… [29] 1E34・ [176] 2E13
吉村和法…… [16] 1E23・ [19] 1E25
[91] 2E21
吉村好之 …… [180] 1Bp4
吉岡充弘…… [46] 1E51
吉岡 亨 …… [219] 1E69
湯口貴導 …… [102] 2Da4

(Z)

前正秀宣 …… [159] 2E31
章 龍 …… [32] 3Da1

神経化学　　35巻　第3号

平成8年9月5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 パシフィック・コンベンション サービス