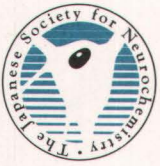


ISSN : 0037-3796



神経化学

Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry
Vol. 36 (No.3), 1997

第40回 日本神経化学会(松山)大会抄録集号

平成 9 年 10 月

抄録目次.....	116
演題抄録	
シンポジウム・テクニカルセミナー演題.....	141
一般演題.....	162
プログラム概要	
シンポジウム・ミニシンポジウム一覧.....	287
日程概要.....	288
編集局便り.....	290
編集後記.....	292
人名索引.....	293
キーワード索引.....	301



神経化学



第40回日本神経化学会抄録集

PROCEEDING OF THE 40th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY

於 松山

平成9年10月22日（水）～ 24日（金）

Vol. 36 (No.3), 1997

日本神経化学会

第40回日本神経化学会松山大会



- ・会期 平成9年10月22日（水）～ 24日（金）
- ・会場 松山市総合コミュニティセンター
〒790 愛媛県松山市湊町7丁目5番地
Tel: 089-921-8222～8225
- ・会期中の会場学会事務局
Tel: 089-943-0270
- ・大会世話人 代表 片岡 喜由（愛媛大学医学部第一生理学教室）
〒790-02 愛媛県温泉郡重信町志津川
Tel: 089-960-5241 Fax: 089-960-5242
E-mail: nsk40@m.ehime-u.ac.jp
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/physiology1/jsn40/>

第40回日本神経化学会実行委員会

世話人

片岡 喜由 愛媛大学医学部第一生理学
溝淵 睦彦 愛媛大学医学部神経精神医学
佐野 輝 愛媛大学医学部神経精神医学
上野 修一 愛媛大学医学部神経精神医学
箕越 靖彦 愛媛大学医学部医化学第一
三谷 章 愛媛大学医学部第一生理学
尾形 直則 愛媛大学医学部整形外科
中村 洋一 愛媛大学医学部第一生理学

学術委員

嶋津 孝 愛媛大学医学部医化学第一
井上 教子 広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学
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
庄盛 敏廉 岡山大学医学部神経内科学
仲田 義啓 広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学
盛政 忠臣 岡山大学医学部神経内科学
山内 卓 徳島大学医学部生化学
山脇 成人 広島大学医学部神経精神医学

☆各抄録には抄録番号・演題番号・ポスター番号（下に詳述）が付いています。

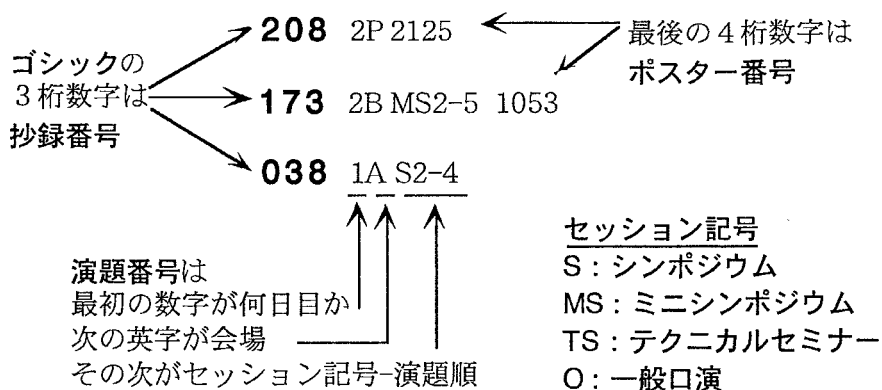
☆この抄録集は各抄録を抄録番号順に掲載しています。
シンポジウム（36題）とテクニカルセミナー（4題）の後に一般演題（249題）が続きます。

☆一般演題はミニシンポジウム（51題，その内35題はポスターも），口演（10題），ポスター（223題）で構成されており，できるだけ内容の近いものが並ぶようにしてあります。

☆カテゴリー分類はしていませんが，巻末のキーワード索引をご利用下さい。

抄録番号・演題番号・ポスター番号について

一般応募演題の一部はミニシンポジウム口演とポスターの両方の発表をすることになりますので，番号が3種類になっています。



抄 録 目 次

シンポジウム・テクニカルセミナー演題

シンポジウム 1 (S1) 「虚血性ニューロン死—基礎から臨床へ」

001 1A S1-1

Plasticity and brain damage induced by ischemic episodes: Mechanisms and relevance to neuroprotection
 Y. Ben-Ari (INSERM, Paris, France)

002 1A S1-2

脳虚血 in vivo モデルの特性と問題点

..... 田村 晃, 中山 比登志, 成田 考而 (帝京大学医学部脳神経外科学教室)

003 1A S1-3

脳虚血モデルにおける transgenic mice の有用性—nitric oxide と apoptosis の観点から—

..... 原 英彰, Michael A. MOSKOWITZ
 (鐘紡・薬品開発第一研究所, ハーバード大学医学部マサチューセッツ総合病院神経内科)

004 1A S1-4

脳虚血による細胞死と応答現象

..... 松本 昌泰^{1,2}, 北川 一夫¹, 堀 正二¹, 柳原 武彦²
 (¹大阪大学医学部第一内科, ²神経内科)

005 1A S1-5

グルタミン酸とそのアナログによる神経細胞死

..... 篠崎 温彦 (財・東京都臨床医学総合研究所薬理研究部門)

006 1A S1-6

虚血動物モデルにおける低脳温の脳保護作用

..... 柳瀬 尚人, 片岡 喜由 (愛媛大学医学部第一生理)

007 1A S1-7

脳塞栓症超急性期の軽微低体温療法

..... 清水 隆雄, 成富 博章, 角田 亘, 柳本 昌子, 衣川 秀一
 (国立循環器病センター内科脳血管部門)



シンポジウム 2 (S2) 「プロスタグランジン関連化合物の神経化学の最前線」

008 1A S2-1

神経細胞におけるアラキドン酸とホスホリパーゼ A₂ の役割

..... 片岡 洋祐¹, 森井 博史^{1,2} (¹大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門,
²科学技術振興事業団・サブフェムトモルバイオ認識プロジェクト)

009 1A S2-2

シクロオキシゲナーゼ 2 : 発熱のブラックボックスを中心として

..... 松村 潔, 曹 春渝¹, 中館 和彦¹ (科学技術振興事業団サブフェムトモル
 バイオ認識プロジェクト, ¹大阪バイオサイエンス研究所第3部門)

010 1A S2-3

プロスタグランジン D 合成酵素 (β -trace) の遺伝子工学

..... 裏出 良博¹, 江口 直美^{2,3}, 金岡 禎秀¹, Carsten T. BEUCKMANN¹, Dmitry Y.
 GERASHCHENKO¹, 早石 修 (¹大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学,
²科学技術振興事業団・さきがけ研究 21, ³京都大学医学部高次脳形態)

011 1A S2-4

プロスタノイド受容体の分子生物学とノックアウトマウス

..... 牛首 文隆, 杉本 寺彦¹, 市川 厚¹, 成宮 周
(京都大学医学部薬理学教室, ¹同・薬学部衛生化学教室)

012 1A S2-5

新規中枢神経系特異的プロスタサイクリン受容体とPET 研究

..... 渡辺 恭良^{1,2}, 鈴木 正昭^{1,3}, 渡辺 由美子^{1,2}, 尾上 浩隆^{1,2}, 野依 良治⁴, Bengt
LANGSTROM^{1,5} (¹科学技術振興事業団バイオ認識プロジェクト, ²大阪バイオサイエンス
研究所神経科学, ³岐阜大 工 応用化学, ⁴名大 理 化学, ⁵ウプサラ大・PET センター)

013 1A S2-6

痛みとプロスタグランジン：アロディニアの発症機構

..... 伊藤 誠二, 南 敏明¹
(関西医科大学医化学教室, ¹大阪医科大学麻酔科学教室)



シンポジウム 3 (S3) 「グリア細胞の分子・細胞生物学」

014 2A S3-1

New perspectives on the physiology and function of glial cells

..... Bruce R. Ransom (Dept of Neurology, Washington University)

シンポジウム

015 2A S3-2

ミクログリア活性化の分子機構

..... 今井 嘉紀, 大澤 圭子, 金澤 裕子, 高坂 新一
(国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部)

016 2A S3-3

ミクログリアと神経細胞障害

..... 中村 洋一, 司 秋生, 柳瀬 尚人, 片岡 喜由 (愛媛大学医学部第一生理学教室)

017 2A S3-4

ミクログリアの脳に対する高親和性と脳特異的遺伝子導入への応用

..... 澤田 誠
(藤田保健衛生大学総医研病態生化学, 科学技術振興事業団さきがけ研究 21)

018 2A S3-5

細胞周期とシグナル伝達によるグリア細胞骨格のリン酸化

..... 稲垣 直之, 稲垣 昌樹 (愛知県がんセンター研究所・生化学部)

019 2A S3-6

グリア細胞の発生・分化機構

..... 馬場 広子, 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)



シンポジウム 4 (S4) 「神経発生：パターン形成から高次機能まで」

020 2B S4-1

神経細胞の分化を制御する Notch 情報伝達系とその構成因子 Deltex

..... 松野 健治^{1,2}, 伊藤 美紀子², 岸 憲幸¹, 松野 康子³,
Spyros Artavanis-Tsakonas³, 岡野 栄之^{1, 2}
(¹大阪大学医学部神経機能解剖学 ²科学技術振興事業団, CREST/JST
³Department of Cell Biology and Biology, HHMI, Yale University)

021 2B S4-2

ゼブラフィッシュにおける脳胞発生への制御～中脳・小脳発生における遺伝子カスケード～

..... 岡本 仁¹, 菊池 裕¹, 巽 良子^{1,2}, 徳本 美佳³, 植村 慶一¹
(慶應大学・医・生理学¹, 北里大学・理・生物科学², 基礎生物学研究所・細胞情報部門³)

022 2B S4-3

神経発生過程における細胞運命決定機構

..... 岡野 栄之 (阪大・医・バイオメディカル・神経解剖学)

023 2B S4-4

拡散性因子による神経回路網形成の制御

..... 村上 富士夫, 白崎 竜一 (大阪大学大学院基礎工学研究科・脳科学講座)

024 2B S4-5

ショウジョウバエ性行動制御の解剖学的基盤

..... 山元 大輔 (科技振・山元行動進化プロジェクト/三菱化学生命研)

025 2B S4-6

神経回路形成と脳高次機能の接点

..... 三品 昌美 (東大院・医・薬理/分子神経生物)



シンポジウム 5 (S5) 「糖鎖と神経疾患」

026 3A S5-1

動物モデルと先天性糖鎖異常 (Animal Models and Inborn Errors of Glycoconjugate Metabolism)

..... 鈴木 邦彦
(Neuroscience Center, Departments of Neurology and Psychiatry,
University of North Carolina School of Medicine)

027 3A S5-2

先天性糖蛋白質糖鎖不全症候群

..... 山下 克子 (佐々木研究所生化学部)

028 3A S5-3

Alzheimer 病: アミロイドβ蛋白と GM1 ganglioside

..... 柳澤 勝彦 (国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部)

029 3A S5-4

「抗糖鎖抗体と免疫性神経疾患」ー免疫性ニューロパチー: 抗糖脂質抗体と臨床型ー

..... 楠 進 (東京大学医学部神経内科)

030 3A S5-5

「抗糖鎖抗体と免疫性神経疾患」ー免疫性ニューロパチー: 病原体と神経との分子相同性

..... 結城 伸泰 (獨協医科大学神経内科)

031 3A S5-6

「抗糖鎖抗体と免疫性神経疾患」ーTarget antigen の神経内局在ー

..... 田井 直 (東京都臨床医学総合研究所腫瘍免疫)



平成9年度神経化学会公開シンポジウム (S6)
「精神神経疾患の分子基盤—パーキンソン病—」

032 1A S6-1

パーキンソン病とは？

.....水野 美邦 (順天堂大学医学部)

033 1A S6-2

パーキンソン病の原因：遺伝性素因

.....近藤 郁子 (愛媛大学医学部衛生学)

034 1A S6-3

パーキンソン病の病因：神経毒仮説の検証

.....直井 信¹, 丸山 和佳子² (¹名古屋工業大学, ²長寿医療センター)

035 1A S6-4

パーキンソン病の病態薬理化学

.....小川 紀雄 (岡山大学医学部神経情報学)

036 1A S6-5

パーキンソン病治療の展望

.....西澤 正豊 (自治医科大学神経内科)

★

テクニカルセミナー

「マイクロダイアリシス」

037 3B TS2-1

透析液と薬物投与方法に関する基礎的な問題点について

.....岡田 元宏 (弘前大学医学部神経精神医学講座)

038 3B TS2-2

脳内でのNO産生を研究する上でのNO_x測定の問題点について

.....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)

「神経培養細胞」

039 3B TS2-3

分散培養法と切片培養法の利点・欠点, 固有の問題点について

.....小倉 明彦, 富永(吉野)恵子 (大阪大学・院理・生物科学)

040 3B TS2-4

温度応答性高分子材料を使用したミクログリアの分離・培養法

.....中嶋 一行, 本田 静世, 石川 正洋, 菊池 明彦¹, 岡野 光夫¹, 高坂 新一
(国立精神神経センター神経研究所, 代謝研究部 ¹東京女子医科大学医用工学研究施設)

一般演題

(ミニシンポジウム演題を含む)

041 1P 1001

アミロイド前駆体蛋白遺伝子導入 MDCK 細胞におけるアミロイド β 蛋白の産生と極性分泌

..... 水野 哲也¹, Christian HAASS², 道川 誠¹, 柳澤 勝彦¹
(¹国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部, ²Central Institute for Mental Health,
Department of Molecular Biology, Germany)

042 1P 1002

カテプシンDによる APPC100 の in vitro 限定分解

.....Golam SADIK, 武田 和也, Shahanara Mst. HOSSAIN, 梶 裕之, 篠田 友孝
(都立大・院・理・化)

043 1P 1003

β アミロイドとイボテン酸共注入によるラット海馬神経細胞に対する影響について

..... 森本 潔, 山田 紀子, 尾田 富一郎, 金子 勲 (三共(株)神経科学研究所)

044 1P 1004

in vitro における NACP/a-synuclein の b/A4 との相互作用と線維化速度への影響

..... 武田 和也, Shahanara HOSSAIN, Golam SADIK, 上田 健治¹, 篠田 友孝
(都立大・院・理・化, ¹都精神研・神経化学)

045 1P 1005

カテプシンDによる NACP の in vitro 限定分解

.....Mst Shahanara HOSSAIN, 武田 和也, Golam SADIK, 篠田 友孝
(都立大・院・理・化)

046 1P 1006

LacSwitch 誘導系を用いた家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物 Presenilin 1 の Neuro 2a 細胞における発現解析

.....川村 勇樹, 須藤 慎治, 西道 隆臣¹, 小山 文隆², 佐藤 慎二³, 駒野 宏人, 柳澤 勝彦
(国立長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部, ¹東京都臨床研 遺伝情報,
²東京大学 医学部 脳研 脳病理, ³東大医科研 ヒトゲノム解析センター)

047 1P 1007

ヒト臓器におけるプレセニリン 1 (PS1) 蛋白質断片の同定

..... 佐原 成彦, 大河内 正康, 亀谷 富由樹, 宇佐美 美穂子, 田中 喜久子,
荒若 繁樹, 山本 明広, 森 啓 (東京都精神医学総合研究所・分子生物)

048 2C O-3

マウスアポ E に対するハムスターモノクローナル抗体およびヒトアポ E に対するラットモノクローナル抗体の作製

..... 藤田 忍, 作田 圭子, 土屋 玲子, 濱中 裕喜
(三菱化学生命科学研究所, プロジェクト 8)

049 1P 1008

アルツハイマー病脳におけるイノシトールモノホスファターゼについて

..... 藤本 貞毅, 谷野 浩子, 墨田 康男, 下濱 俊¹
(京都薬科大学衛生化学教室, ¹京都大学医学部神経内科学教室)

050 1P 1009

神経細胞の老化および痴呆の発症に対する Advanced Glycation End Products (AGE) の影響について

..... 徳武 哲 (都精神研, 分子生物)

051 1B MS1-1

家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリンとA β アミロイド前駆体タンパクとの関連性

..... 亀谷 富由樹, 田中 喜久子, 宇佐美 美穂子, 佐原 成彦, 大河内 正康, 森 啓
(東京都精神医学総合研究所, 分子生物)

052 1B MS1-2 2115

プレセニリン1ミスセンス変異遺伝子によるA β 42 variants 産生の促進

..... 須藤 慎治¹, 川村 勇樹¹, 西道 隆臣², 佐藤 慎二³,
小山 文隆⁴, 駒野 宏人¹, 柳澤 勝彦¹
(¹国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部, ²東京都臨床研遺伝情報,
³東京大学医科学研究所ゲノムセンター, ⁴東京大学医学部脳研病理)

053 1B MS1-3

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

..... 西村 伊三男¹, 植月 太一¹, 岡村 均², 大沢 良之³, 内山 安男³, 吉川 和明¹
(¹阪大 蛋白研 機能制御, ²神戸大 医 2 解, ³阪大 医 1 解)

054 1B MS1-4 2114

アミロイド β タンパクによるL型チャンネルを介したCa²⁺流入増加とフリーラジカルの関与

..... 上田 恵一, 篠原 俊次, 矢上 達郎¹, 朝倉 賢治¹, 川崎 和夫
(塩野義製薬 中枢神経薬研究センター, ¹創薬第二研究所)

055 1B MS1-5 2113

アルツハイマー・ β アミロイド蛋白によるGT1-7細胞内Ca²⁺流入及び神経細胞死

..... 川原 正博, 村本 和世, 小林 和夫, 黒田 洋一郎
(東京都神経科学総合研究所, 神経生化学研究部門)

056 2P 2112

分泌型アミロイド前駆体蛋白の生理活性に關するドメインの探索

..... 大澤 郁朗, 高村 千鶴子, 森本 高子, 石黒 麻利子, 高坂 新一

057 2P 2111

分泌型アミロイド前駆体蛋白質刺激による培養大脳皮質細胞内情報伝達

..... 石黒 麻利子, 大澤 郁朗, 高村 千鶴子, 森本 高子, 高坂 新一
(国立精神・神経センター神経研究所, 代謝研究部)
(国立精神・神経センター神経研究所代謝)

058 2P 2110

ラット大脳皮質神経細胞内Ca²⁺流入に対する緑茶旨み成分テアニンの影響

..... 野澤 歩, 梅澤 邦彦¹, 小林 和夫¹, 川原 正博¹, 村本 和世¹,
水谷 昭弘¹, 角田 隆巳, 黒田 洋一郎¹
(伊藤園中央研究所, ¹東京都神経科学総合研究所)

059 2P 2109

大脳皮質シナプスの電位依存性カルシウムチャンネルとその加齢変化

..... 田中 康一, 安藤 進 (東京都老人総合研究所・生体膜部門)

060 2P 2108

PC12D 細胞においてムスカリン性アセチルコリンレセプター刺激による細胞内Ca²⁺濃度の上昇は, ストア作動性とレセプター作動性の二つの異なるCa²⁺チャンネルの活性化により引き起こされる

..... 郭 非凡, 海老原 達彦, David SAFFEN (東京大学医学部神経生)

061 2P 2107

ニューロプラストーマ cell line における神経特異性カルシウム結合タンパクとN-Myc の発現との相関

..... 山口 知子, 神田 尚俊¹ (東京女子医大・生化学, ¹東京農工大・家畜解剖学)

062 2P 2106

ヒト脳に存在する新しい神経特異カルシウム結合蛋白質(HLP4)のcDNAクローニング

..... 酒井 栄一, 小林 正明, 野口 鉄也, 高松 研 (東邦大学医学部第2生理)

063 2P 2105

アフリカツメガエルの背腹軸形成における IP_3/Ca^{2+} 伝達系の役割

..... 糸 昭苑¹, 武藤 彩¹, 岡野 栄之⁴, 御子柴 克彦^{1,2,3}
 (1) 新技術開発事業団御子柴細胞制御プロジェクト, (2) 東大・医科学研究所・化学,
 (3) 理研(筑波)分子神経生物学, (4) 阪大・医)

064 2P 2104

膜分画に存在する ADP リボシール環状化酵素の薄層クロマトグラフィー (TCL) による測定

..... 東田 陽博, 横山 茂, 橋井 美奈子, 野田 百美 (金沢大学・医・神経物性)

065 2P 2103

嗅覚受容体の培養細胞系での発現

..... 稲木 公一郎, 芳賀 達也, 東原 和成 (東京大学医学部神経生化学)

066 2P 2102

G 蛋白質 α サブユニットの免疫沈降に伴う γ サブユニットの解析

..... 上田 浩, 森下 理香, 仙波 りつ子, 加藤 兼房, 浅野 富子
 (愛知県コロニー・発達障害研究所)

067 2P 2101

G タンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) によるチュプリンのリン酸化

..... 芳賀 和子, 芳賀 達也, 室伏 擴¹ (東大・医・神経生化学, ¹ 東大・理・生化学)

068 2P 2100

ドーパミン D2 受容体の GRK2 によるリン酸化と細胞内移行・変異体による解析

..... 岩田 健^{1,2}, 伊藤 和光², 芳賀 達也²
 (1) 東京医科歯科大学医学部神経精神医学教室, (2) 東京大学医学部神経生化学教室)

069 2P 2099

メタンフェタミン投与後のラット線条体での NO の変化

..... 丸井 幸之助, 柏原 健一, 秋山 一文¹, 庄盛 敏廉
 (岡山大学医学部神経内科学教室, ¹ 岡山大学医学部神経精神医学教室)

070 2P 2098

ドーパミンの N 端欠損ヒトチロシン水酸化酵素 1 型 (hTH1) 変異体に及ぼす影響

..... 太田 明¹, 中島 昭¹, 森 啓至¹, 永津 俊治² (1) 藤田保健衛生大学医学部
 生理学教室, (2) 総合医科学研究所分子遺伝学 II/神経化学)

071 2P 2097

内在性 1BnTIQ 類縁化合物のドーパミン神経系に対する作用

..... 河合 洋, 古武 弥一郎, 牧野 由紀子, 廣部 雅昭, 太田 茂¹
 (東京大学薬学部, ¹ 広島大学医学部総合薬学科)

072 2P 2096

テネシン遺伝子欠失マウスのドーパミン系薬物による行動変化

..... 深間内 文彦, 王 益珺, 俣賀 宣子¹, 日下部 守昭² (東京医歯大・難研
 プロジェクト, ¹ 理研・フロンティア, ² 理研・ライフサイエンス筑波研究センター)

073 2P 2095

PC12 細胞におけるカテコラミンおよびテトラヒドロピオプテリン合成系の調節

..... 坂本 秀生, 藤田 興, 葛谷 博磁 (藤田保健衛生大学 総医研 分子生物)

074 2P 2094

SKF 38393 の線条体内注入により一過性に遊離されるドーパミンの由来について: マイクロダイヤライシス法による検討

..... 富山 勝則, 三枝 禎, 越川 憲明, 小林 雅文 (日本大学歯学部薬理学教室)

075 2P 2093

アデノウイルス・ベクターを用いた GDNF の遺伝子導入

..... 渡部 和彦, 大橋 十也¹, 松本 陽, 木暮 一成, 田沼 直之
 (東京都神経科学総合研究所神経病理, ¹ 東京慈恵会医科大学
 小児科/DNA 医学研究所遺伝子治療)

076 2P 2092

フェンシクリジン誘発 place preference におけるドーパミン作動性神経系の役割

..... 野田 幸裕¹, 鍋島 俊隆¹, 小林 和人², 永津 俊治³
 (¹名古屋大学医学部医療薬学附属病院薬剤部, ²奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育
 研究センター動物分子工学, ³藤田保健衛生大学総合医学研究所分子遺伝学研究部門 II)

077 2P 2091

側坐核ドーパミンニューロン破壊はモチベーションを低下させるか? II. 低動因下累進比率強化スケジュール遂行による検討

..... 堀 耕治, 田中 健一, 和田 尚子, 野村 正彦 (埼玉医科大学第一生理学教室)

078 2P 2090

閉所ストレスによるラットの rebound hyperphagia の増強と前頭前皮質 ドーパミン代謝におよぼすジアセパムの影響

..... 栗岡 政典¹, 切池 信夫¹, 井上 幸紀¹, 岩崎 進一¹, 藤寄 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)

079 2P 2089

マウス線条体ドーパミン濃度とドーパミン受容体およびドーパミントランスポータ活性の関連について

..... 盛政 忠臣, 金行 孝雄¹, 庄盛 敏康
 (岡山大学医学部神経内科学教室, ¹岡山県大保健福祉)

080 2P 2088

脳内在性パーキンソンニズム防御物質 1-methyl-TIQ 生合成酵素の探索研究

..... 山川 貴宏, 太田 茂¹
 (東京大学薬学部薬品代謝化学講座, ¹広島大学医学部総合薬学科社会薬学講座)

081 2P 2087

85kDa 細胞質型ホスホリパーゼ A2 の脳内分布に関する免疫組織化学的研究

..... 森井 博史¹, 片岡 洋祐², 松村 潔², 渡辺 恭良^{1,2}
 (¹科学技術振興事業団サブフェムトモル・バイオ認識プロジェクト,
²大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門)

082 2P 2086

prostaglandin A1 analog による p21^{Waf1/Cip1}/p53 の発現増強と増殖抑制効果: ヒトグリア系細胞株を用いて

..... 谷川 元紀, 中西 真¹, 富永 薫¹, 金子 葉子¹, 池田 恭治¹,
 古田 享史², 鈴木 正昭², 山田 和雄
 (名古屋市立大学脳神経外科, ¹国立長寿医療 研究センター, ²岐阜大学工学部)

083 2P 2085

プロテインキナーゼ C でリン酸化された MARCKS に対する特異抗体の作製

..... 山本 秀幸, 大石 康晴, 宮本 英七 (熊本大学医学部第一薬理学教室)

084 2P 2084

培養ラットアストロサイトカルシニューリンの病態的意義

..... 浅野 省一, 松田 敏夫, 田熊 一敏, 馬場 明道 (大阪大学薬学部薬理学教室)

085 2P 2083

脳内における Ca²⁺/カルモデュリン依存性キナーゼ IIδ サブユニットの特異的発現

..... 竹内 有輔^{1,2}, 山本 秀幸¹, 宮川 太平², 宮本 英七¹
 (熊本大学医学部¹第一薬理学教室, ²神経精神医学教室)

086 2P 2082

PSD へ移行した細胞質カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の性質と PSD タンパク質のリン酸化

..... 吉村 好之, 山内 卓 (徳島大・薬・生化)

087 2P 2081

Acyl-CoAによるラット海馬スライスからのグルタミン酸遊離と長期増強における役割

.....張 勤増, 宮崎 真理, 酒井 久美子, 吉田 敏 (大分医大実験実習機器センター)

088 2P 2080

培養ラット海馬神経細胞における MARCKS の磷酸化反応

.....大光 正男, 福永 浩司, 宮本 英七 (熊本大学医学部薬理学第一教室)

089 2P 2079

ニューロン特異的リン酸化タンパク質(PNP14/ β -シヌクレイン)の発現分布と加齢に伴う発現量の変動

.....平林 敬浩, 中条 茂男, 塩田 清二¹, 中井 康光¹, 中谷 一泰
(昭和大学・薬学部生物化学, ¹医学部第一解剖学)

090 2C MS8-1

CaM キナーゼ II α アイソフォームを発現するハイブリッド細胞の作成およびその性質

.....藤井 望帆, 吉村 好之, 山内 卓 (徳大・薬・生化)

091 2C MS8-2

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)の新しい活性制御機構: CaM キナーゼキナーゼに対する感受性の可逆的変化による活性制御

.....奥野 幸子, 木谷 隆子, 藤澤 仁 (旭川医科大学第一生化学教室)

092 2C MS8-3

海馬のシナプス可塑性における MAP キナーゼの役割

.....福永 浩司, 金堀 瑞穂, 宮本 英七 (熊本大学医学部薬理学第一教室)

093 2C MS8-4 2078

NMDA receptor(NR2B)とセリン・スレオニンキナーゼによるリン酸化依存性に結合する蛋白質の同定

.....高宮 考悟, 乾 誠¹, 山田 康枝¹, 川嶋 望, 孫 傑, 田所 智子, 祖父江 憲治
(大阪大学医学部バイオ神経生化学, ¹山口大学医学部薬理学教室)

094 2P 2077

エタノールによるサブタイプ特異的ムスカリン性アセチルコリン受容体 mRNA の増加

.....王 益珺, 俣賀 宣子¹, 深間内 文彦
(東京医科歯科大・難治疾患研究所・プロジェクト, ¹理化学研究所・フロンティア)

095 2P 2076

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 (VI) : 5-HT_{2A} 受容体と 5-HT₃ 受容体との関連

.....平野 均, 松田 芳人¹, 平田 牧三, 山田 通夫¹
(山口大学保健管理センター, ¹山口大学医学部神経精神医学教室)

096 2P 2075

PC12細胞における cAMP によるニコチン性アセチルコリン受容体の発現抑制: Ras-MAP kinase カスケードとの関係

.....中山 均¹, 山田 雅司², 畠中 寛²
(¹奈良県立医大 薬理学教室, ²大阪大学 蛋白質研究所生合成部門)

097 2P 2074

コリンエステラーゼ阻害薬非存在下における脳内微小透析液中のアセチルコリンの HPLC-ECD による高感度測定

.....芝軒 信次¹, 九穂 泰三¹, 菅原 恵¹, 秦 英代^{1,2}, 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)

098 2P 2073

老齢ラットコリン作動性神経機能に対する当帰芍薬散の影響

.....小松 真紀子, 平松 緑, 譲原 光利¹, 石毛 敦¹, 小松 靖弘¹
(山形県テクノボリス財団生物ラジカル研究所, ¹(株) ツムラ中央研究所)

099 2B MS7-1 2072

分泌性蛋白質 Argos による Ras シグナルの抑制とアポトーシスの誘導に関与する未知の遺伝子群の探索
 田口 明子¹, 澤本 和延^{1,2}, 岡野 栄之^{1,2}
 (1大阪大学医学部神経機能解剖学研究所, 2. 科学技術振興事業団, CREST)

100 2B MS7-2 2071

ラット小脳外顆粒細胞の caspase を介するアポトーシスを IGF-I アナログが抑制する
 田中 正彦, 丸野内 棣 (藤田保健衛生大・総医研・応用細胞学)

101 2B MS7-3 2070

切片培養系におけるマウス小脳顆粒細胞のアポトーシスにおける p53 遺伝子の役割
 稲村 直子, 榎戸 靖, 下家 浩二, 畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所生合成部門)

102 2B MS7-4 2069

ヒトニューロblastoma SH-SY5Y 細胞に対する NO ドナーのアポトーシス惹起と caspase の関与
 菊地 由紀夫, 上原 孝, 野村 靖幸 (北海道大学薬学部薬効学教室)

103 2B MS7-5 2068

小脳顆粒細胞死における Cyclin D1 等の活性化について
 小池 達郎, 鈴木 和彦, 境 和久, 田中 秀逸 (北大・院理・生物科学)

104 2P 2067

カルシウムイオン誘導細胞障害と CPP32 様プロテアーゼの活性化について
 高寺 恒雄, 大屋敷 孝雄 (北陸大学薬学部臨床化学教室)

105 2P 2066

ラットクモ膜下出血 (SAH) 後早期の海馬における bax, bcl-2 および p53 mRNA の発現とアポトーシスの
 関連について 中塚 雅雄^{1,2}, 真砂 敦夫¹, 山田 和雄¹, 滝 英明¹, 原田 重徳¹
 (1名古屋市立大学脳神経外科, 2知多厚生病院脳神経外科)

106 2P 2065

NO によるドーパミン細胞の apoptosis の機構
 丸山 和佳子¹, 南 知予子², 高橋 勤³, 直井 信²
 (1長寿医療センター, 2名古屋工業大学, 3江南女短大)

107 2P 2064

神経細胞死抑制機構としての NGF による活性酸素種産生に対する影響
 山縣 知子, 佐藤 託実, 石川 保幸, 山田 雅司, 畠中 寛

108 1B MS3-3 2063

小脳外顆粒層由来顆粒細胞のアポトーシスに対する神経栄養因子の効果
 境 和久, 小池 達郎 (北大・院理・行動知能学)

109 2P 2062

発達段階特異的オリゴデンドロサイトの大量培養方法の確立とオリゴデンドロサイト細胞系譜
 桜井 洋子¹, 西村 大助^{1,2}, 川戸 佳², 吉村 和法³, 野村 正彦³, 清和 千佳¹,
 武田 康¹, 内藤 弘美¹, 宮木 朋子¹, 阿相 皓晃¹ (1東京都老人総合研究所
 神経生物, 2東京大学大学院・生命物理, 3埼玉医科大・生理)

110 2P 2061

ヒト羊膜細胞における神経系細胞マーカーの発現
 石井 俊^{1,2}, 佐藤 嘉兵², 中村 俊³, 桜川 宣男¹
 (1国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5部 2日本大学生物資源科学部
 応用生物科学科 3国立精神・神経センター神経研究所診断研究部)
 (大阪大学蛋白質研究所生合成部門)

111 1C MS4-2 2060

オリゴデンドロサイトの分化における CGT 遺伝子の転写調節機構
 米増 知子¹, 中平 健祐¹, 奥村 俊一郎^{1,2}, 池中 一裕¹
 (1岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経情報, 2関西医科大学第2外科)

112 1C MS4-4

In vitro と In vivo を組み合わせた免疫法による神経組織の抗原に対するモノクローナル抗体の作製

..... 吉村 和法¹, 桜井 洋子², 西村 大助³, 川戸 佳³, 野村 正彦¹, 阿相 皓晃²
(¹埼玉医科大学第一生理, ²東京都老人総合研究所神経生物, ³東京大学大学院生命物理)

113 1C MS4-5 2059

未成熟オリゴデンドロサイト膜表面分子を認識するモノクローナル抗体(13E6,4F2)について

..... 西村 大助^{1,2}, 桜井 洋子¹, 川戸 佳², 斎藤 治和¹, 吉村 和法¹, 野村 正彦¹,
清和 千佳^{1,3}, 井口 泰 泉³, 阿相 皓晃¹ (¹東京都老人総合研究所神経生物,
²東京大学大学院生命物理, ³横浜市大大学院総合理学, ⁴埼玉医大生理)

114 1P 1108

線条体 NMDA 受容体刺激によるドーパミン放出に対するポリアミンの影響

..... 柴田 護, 福内 靖男, 島津 邦男, 佐々木 貴浩, 荒木 信夫¹, 濱田 潤一²,
太田 晃一³ (慶應義塾大学神経内科, ¹日本鋼管病院内科,
²国立埼玉病院神経内科, ³水戸赤十字病院神経内科)

115 1P 1107

N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターに対するニトロプルシドナトリウムの阻害効果

..... 荻田 喜代一, 米田 幸雄 (摂南大学薬学部薬理学研究室)

116 1P 1106

ラット培養中脳神経細胞におけるグルタミン酸毒性に対するエストロゲンの神経保護作用

..... 澤田 秀幸, 衣斐 督和¹, 木原 武士, 漆谷 真, 下濱 俊, 赤池 昭紀¹,
木村 淳 (京都大学医学部神経内科, ¹京都大学薬学部薬理)

117 1P 1105

ラット神経組織における各種グルタメイトレセプターサブユニットの分布

..... 久保 慶太, 眞部 孝幸, 荻田 喜代一, 米田 幸雄
(摂南大学薬学部薬理学研究室)

118 1P 1104

NMDAチャネル開放に対する遊離鉄イオンの影響

..... 眞部 孝幸, 荻田 喜代一, 米田 幸雄 (摂南大学薬学部薬理学研究室)

119 1P 1103

ラットの脳内ドコサヘキサエン酸(DHA)含量の低下によるグルタミン酸レセプターの変化

..... 田丸 政男¹, 中村 彰², 池本 敦³, 米田 幸雄³, 平田 ゆかり⁴, 松谷 天星丸⁵,
奥山 治美² (¹鈴鹿医療大・医情情報, ²名市大・薬・生物薬品,
³摂南大・薬・薬理, ⁴保健衛生大・医, ⁵川村女学園大)

120 1P 1102

[³H]キスカル酸によるタイプI代謝型グルタミン酸受容体-リガンド間結合解析:グルタミン酸含有ジペプチドのリガンド能

..... 大橋 博, 東(松本) 秀美, 丸山 尚治, 竹内 裕 (万有製薬つくば研究所)

121 1P 1101

'priming'と神経可塑性: F2CCG-Iによる検討

..... 石田 美知子, 斎藤 朋子, 篠崎 温彦
(財・東京都臨床医学総合研究所薬理研究部門)

122 1P 1100

初代培養神経細胞を用いた NS-105 の cAMP 生成系に及ぼす影響

..... 廣内 雅明, 岡 美智子, 伊藤 善規, 辰見 茂, 馬 福海,
鵜飼 洋司郎, 木村 喜代史 (日本新薬創業研究本部)

123 1P 1099

グルタミン酸トランスポーターブロッカー

..... 島本 啓子, 安田 好美, ブルノ・レブラン, 堺谷 政弘, 中嶋 暉躬
(財・サントリー生物有機科学研究)

124 2P 2058

PSD-95 結合蛋白質の同定とラット発育脳における発現の多様性

..... 川嶋 望, 高宮 考悟, 孫 傑, 祖父江 憲治 (大阪大学医学部バイオ神経生)

125 2P 2057

PSD-95 結合蛋白質としての Microtubule associated protein (MAP)1A の解析

..... 孫 傑, 高宮 考悟, 川嶋 望, 田所 智子, 祖父江 憲治
(大阪大学医学部バイオ神経生化学)

126 2P 2056

ラット脳由来 Triton 不溶性, 低比重性膜画分に存在する GPI アンカー型タンパク質群の解析

..... 船津 宣雄, 熊ノ郷 晴子, 前川 昌平 (京都工芸繊維大学大学院機能科学)

127 2P 2055

神経・筋シナプス形成における COMM 蛋白分子の機能解析

..... 千葉 晶, ブライアン・ウオルフ (イリノイ大学細胞分子生物学部)

128 2P 2054

傍腫瘍性神経症候群患者の自己抗体に対する抗原検索

..... 北村 邦男, 金子 厚¹, 渋谷 匡子², 吉村 和法, 坂本 安, 加賀井 和幸¹,
古川 千湖¹, 細川 武¹, 寺田 庄一, 島津 邦男¹, 濱口 勝彦¹, 野村 正彦
(埼玉医科大学・第一生理, ¹神経内科, ²中央測定室)

129 3B MS10-1 2053

6 番染色体短腕マーカーと精神分裂病の相関研究及び毛様体神経栄養因子, セロトニントランスポーター遺伝子多型と精神疾患 小谷 泰教, 中村 雅之, 三神 正昭, 上野 修一, 佐野 輝
(愛媛大学医学部神経精神医学教室)

130 3B MS10-3

拘束ストレスによるラット脳内誘導型一酸化窒素合成 酵素の mRNA 濃度の変化

..... 鈴木 映二¹, 新谷 太¹, 神庭 重信², 浅井 昌弘¹, 中木 敏夫³ (¹慶応義塾大学
医学部精神神経科学教室, ²山梨医科大学精神神経医学講座, ³帝京大学医学部薬理学講座)

131 3B MS10-4 2052

筋萎縮性側索硬化症患者髄液を用いたラット腰髄培養神経細胞における c-fos の発現

..... 真邊 泰宏, 柏原 健一, 城洋 志彦, 庄盛 敏廉
(岡山大学医学部神経内科学教室)

132 2P 2051

spinocerebellar ataxia 6 (SCA6) の分子遺伝学的特徴

..... 松山 善次郎, 川上 秀史, 丸山 博文, 和泉 唯信, 中村 重信
(広島大学医学部第三内科学教室)

133 2P 2050

サイトメガロウイルス感染と IgM 抗 GM2, 抗 GalNAc-GD1a 抗体

..... 田川 由美, 結城 伸泰, 平田 幸一, 田井 直¹
(獨協医科大学神経内科, ¹都臨床研腫瘍免疫)

134 2P 2049

ギラン・バレー症候群の亜型 pharyngeal-cervical-brachial weakness と IgG 抗 GT1a 抗体

..... 古賀 道明¹, 結城 伸泰¹, 有賀 敏夫², 平田 幸一¹
(¹獨協医科大学神経内科, ²エーザイ筑波研究所)

135 2P 2048

Ramsay Hunt 症候群の早期鑑別診断

..... 中城 有喜, 本多 伸光¹, 村上 信五¹, 溝渕 睦彦²
(松山記念病院, ¹愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学, ²神経精神医学)

136 3C MS11-1

ラット線条体の鉄塩投与によるてんかん様発作波の出現と in vivo による組織障害の形成並びに細胞外グルタミン酸の増加について

..... 平松 緑, Honglian SHI¹, 中島 雅央¹, 嘉山 孝正¹
(山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所, ¹山形大学医学部脳神経外科)

137 3C MS11-3

老化促進マウスにおける海馬由来神経刺激因子の免疫組織化学的検討

..... 遠山 育夫¹, 小鹿 幸生², 大村 裕³, 佐々木 和男⁴, 木村 宏¹
 (¹滋賀医科大学分子神経研, ²名古屋市立大学第二内科,
³日本臓器生物活性科学研究所, ⁴富山大学工学部)

138 3C MS11-4

MPTP 投与マウスにおける線条体ドパミン神経の免疫組織化学的な自発的再生

..... 光本 泰秀, 渡部 昭仁, 森 厚詞, 古賀 信幸
 (大塚製薬(株) 徳島新薬第三研究所)

139 2P 2047

EL マウスにおけるアロプリノール急性投与後の脳内SODアイソザイム蛋白量の変化とその抗痙攣作用発現機序

..... 村島 善也, 鈴木 二郎* (東京都精神研, 東邦大学・医・精神医学*)

140 2C O-2

てんかんモデルマウス脳におけるキノリン酸合成酵素の発現

..... 中川 幸則¹, 浅井 広志¹, 森 仁志¹, 鬼頭 純三², 中野 紀和男³
 (¹名大農・生化学制御, ²名大医・動物セ, ³名大・生物分子応答研究セ)

141 2P 2046

ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた, けいれん関連遺伝子の検索

..... 寺田 庄一, 北村 邦男, 吉村 和法, 坂本 安, 渋谷 匡子¹, 野村 正彦
 (埼玉医科大学第一生理学教室, ¹中央測定室)

142 2P 2045

メロシン(ラミニン-2)のモノクローナル抗体および抗ペプチド抗体による痴呆性疾患血清・髄液のイムノブロット解析

..... 田代 謙一郎, 林 要人, 三山 吉夫 (宮崎医科大学精神医学教室)

143 2C O-4

Guillain-Barre 症候群の免疫原: N-グリコリルノイラミン酸を有するGM1

..... 小鷹 昌明, 結城 伸泰, 吉野 英¹, 入江 史敏², 平林 義雄², 平田 幸一
 (獨協医科大学神経内科, ¹国立精神・神経センター国府台病院神経内科,
²理化学研究所国際フロンティア糖細胞情報)

144 2P 2044

Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor と精神分裂病

..... 谷 宗英, 小出 誠司, 中村 嘉宏, 橋本 博史¹, 甲斐 利弘², 山上 榮
 (大阪市立大学医学部神経精神医学教室, ¹浅香山病院, ²大阪市立総合医療センター)

145 2P 2043

C6 ラットグリオーマ細胞におけるジエチルマレイン酸によるストレス応答の促進

..... 岡本 慶子, 伊東 秀記, 加藤 兼房 (愛知県コロニー・研・生化)

146 2P 2042

グリア由来培養細胞におけるセロトニン-2A 受容体を介した細胞内カルシウム動員系に対する熱ストレスの影響

..... 加賀谷 有行, 岡田 亜希子¹, 田原 康孝, 稲垣 正俊, 前正 秀宣, 西田 朗²,
 横田 則夫, 堀口 淳, 仲田 義啓*, 山脇 成人
 (広島大学医学部神経精神医学講座, ¹広島大学医学部薬効解析科学, ²国立呉病院臨床研究部)

147 2P 2041

カイニン酸誘導痙攣ラット脳におけるストレス蛋白質の発現

..... 加藤 兼房, 仙波 りつ子, 竹内 郁夫, 伊東 秀記, 岡本 慶子
 (愛知コロニー・発達障害研究所)

148 2P 2040

ストレス蛋白質のストレス誘導はグルクミンによって促進される

..... 加藤 兼房, 伊東 秀記, 岡本 慶子 (愛知コロニー・発達障害研究所・生化学部)

149 2P 2039

アストログリア(AST)由来の一酸化炭素は神経細胞の低酸素による apoptosis を抑制する

..... 小川 智¹, 藁牟田 直彦², 小澤 健太郎¹, 玉谷 美智男¹, 柳原 武彦²,
遠山 正彌¹ (大阪大学医学部¹解剖学第二教室, ²神経内科)

150 2P 2038

ORP150 (150kDa Oxygen Regulated Protein)の発現は低酸素による細胞死を抑制する

..... 小澤 健太郎¹, 桑原 敬介², 三谷 美智男¹, 堀 正二², 小川 智¹, 遠山 正彌¹
(大阪大学医学部¹解剖学第二教室, ²第一内科)

151 2P 2037

ラット交感神経節細胞における BiP/GRP78 遺伝子の発現調節機構

..... 三井 千珠, 三浦 真紀, 田中 秀逸, 小池 達郎
(北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻行動知能学講座)

152 2P 2036

α B クリスタリンのリン酸化

..... 伊東 秀記¹, 岡本 慶子¹, 中山 洋², 磯辺 俊明², 加藤 兼房²
(¹愛知県コロニー・研・生化, ²都立大・理・化学)

153 2P 2035

H1 受容体を介するセロトニン遊離の抑制機構について: ノックアウトマウスを用いた研究

..... 谷内 一彦, 孫 立智, 櫻井 映子, 渡邊 建彦
(東北大学大学院・医学系研究科・細胞薬理学分野)

154 2P 2034

生後2週齢ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンに対する PACAP の生存維持効果

..... 湯原 亜紀, 阿比留 康弘, 武井 延之¹, 畠中 寛
(大阪大学蛋白質研. 生合成部門, ¹京都工繊大. 応用生物部門)

155 2P 2033

マウス感覚ならびに交感神経節での神経ペプチド発現と, その糖尿病による変化

..... 三五 一憲¹, 影山 晴秋¹, 堀江 秀典², 斉藤 春洋³, 大坂 寿雅¹, 井上 修二¹
(¹国立健康・栄養研究所, 老人健康・栄養部, ²横浜市立大学医学部第一生理, ³同第一内科)

156 2P 2032

ラット後根神経節培養を用いたモネンシン投与に伴うサブスタンス P 免疫活性の抑制効果について

..... 中沢 康至¹, 猪股 裕二^{1,2}, 知久馬 敏幸³, 加藤 武¹
(¹横浜市立大学大学院総合理学研究科分子認識部門, 現在²三菱化学医薬第1研究所,
³昭和薬科大学薬品分析化学)

157 2P 2031

発育期における EL マウス脳のダイノルフィン様免疫活性の変化

..... 甲斐 利弘¹, 大西 博², 小出 誠司³, 片山 雅文³, 橋本 博史²,
中村 嘉宏³, 谷 宗英³, 山上 榮³ (¹大阪市立総合医療センター,
²浅香山病院, ³大阪市立大学医学部神経精神医学教室)

158 2P 2030

早期高齢化マウス(SAM-P8)における脳内 HCNP 遺伝子発現量の検討

..... 松川 則之^{1,2}, 山本 孝之², 継 泰成¹, 小鹿 幸生¹
(¹名古屋市立大学第二内科, ²福祉村病院長寿研)

159 2P 2029

マウス Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) 遺伝子の構造に関する解析

..... 山本 恭平, 橋本 均, 馬場 明道 (大阪大学薬学部薬理学教室)

160 2P 2028

シーラカンス PLP/DM20 遺伝子のクローニング

..... 吉田 弘美, 遠山 陽子, 栗原 正, 小嶋 久子¹, 玉井 洋一¹
(創価大・生命研・神経化学, ¹北里大・医・生化学)

161 2P 2027

末梢神経ミエリン P2 蛋白の種々の脂肪酸に対する結合性の解析

..... 坂本 安, 北村 邦男, 吉村 和法, 長島 直美¹, 竹原 直美¹, 渋谷 匡子¹,
野村 正彦 (埼玉医科大学第1生理学教室, ¹中央測定室)

162 1C MS4-1

ガラクトシルセラミド発現を誘発するラット脳 cDNA のクローニング

..... 小倉 潔, 河野 憲二¹, 田井 直 (東京都臨床医学総合研究所腫瘍免疫研究部門,
¹奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター)

163 1C MS4-3 2026

マウス脳発生初期における Myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現

..... 小糸 寿美, 松田 義宏 (国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部)

164 1P 1098

脊髄神経細胞傷害を増悪させるマイクログリアの制御法に関する研究: ATP による細胞内カルシウムイオン
上昇と TNF α 放出抑制..... 尾形 直則, 森野 忠夫, 奥村 秀雄, 柴田 大法, 中村 洋一¹, 司 秋生¹,
片岡 喜由¹ (愛媛大学医学部整形外科学教室, ¹生理学教室)

165 1P 1097

血清成分によるマイクログリアの TNF α と NO 産生の増強

..... 司 秋生, 中村 洋一, 片岡 喜由 (愛媛大学医学部第一生理学)

166 1P 1096

マイクログリアの活性酸素産生を増強する血清因子の性質

..... 司 秋生, 中村 洋一, 片岡 喜由 (愛媛大学医学部第一生理学)

167 1P 1095

神経細胞死に伴うマイクログリア遺伝子 mrf-1 の発現増加

..... 田中 秀逸, 小池 達郎 (北大・院理・行動知能)

168 1P 1094

神経細胞興奮毒性におけるマイクログリアの関与: Tumor Necrosis Factor- α を介する傷害メカニズムと
その防御の可能性について..... 富永 康浩, 尾形 直則, 奥村 秀雄, 柴田 大法, 中村 洋一¹, 片岡 喜由¹
(愛媛大学医学部整形外科学教室, ¹生理学教室)

169 3C MS11-2 1093

脊髄損傷後に神経組織内に増殖するマイクログリア: 損傷程度による検討とその経時的変化

..... 森野 忠夫, 尾形 直則, 奥村 秀雄, 柴田 大法, 中村 洋一¹, 片岡 喜由¹
(愛媛大学医学部整形外科学教室, ¹生理学教室)

170 3C O-3

ATP 刺激による培養マイクログリアからの Ca²⁺依存性プラスミノーゲン放出..... 井上 和秀, 中嶋 一行¹, 森本 高子¹, 菊池 義明¹, 小泉 修一¹, 高坂 新一¹
(国立衛生研究所・薬理, ¹精神神経研究センター・神経研究所)

171 1P 1092

Putative HLA-DR Associated Proteins (PHAPI and PHAPII) の Isoform の解析

..... 萩原 民雄, 本橋 克利, 竹田 二美代, 竹田 稔 (昭和大学・医・生化学)

172 1P 1091

ラット脳可溶性画分に存在する PHAPI Kinase の解析

..... 本橋 克利, 立野 慶, 田中 隆佳, 萩原 民雄, 竹田 二美代, 竹田 稔
(昭和大学医学部生化学教室)

173 1P 1090

ラット胎児脳に発現する新規な遺伝子に対する cDNA(hfb2)のクローニングと解析

..... 本郷 茂樹, 西中 直也, 山内 康熙, 竹田 稔
(昭和大学医学部生化学教室)

- 174 1P 1089**
 ラット脳の成熟に関わる遺伝子の探索
 山内 康照, 西中 直也, 本郷 茂樹, 竹田 二美代, 竹田 稔
 (昭和大学医学部生化学教室)
- 175 1P 1088**
 中枢神経系に高発現する DNA 組み換え遺伝子 *recA* 様新規遺伝子(MmTRAD)のクローニングと発現
 川端 昌弘, 佐伯 清美 (岡山大学医学部薬理学教室)
- 176 1P 1087**
 アデノウイルスベクターを用いた神経細胞型特異的遺伝子導入法の開発とその応用
 橋本 光広, 御子柴 克彦 (理化学研究所分子神経, 東大医科学研究所化学)
- 177 1P 1086**
 低線量放射線照射に伴う蛋白カルボキシメチル化酵素の遺伝子発現
 土居 孝至, 武田 良平¹, 中城 有喜, 溝淵 睦彦¹
 (松山記念病院, ¹愛媛大学医学部神経精神医学)
- 178 2P 2001**
 EL マウスの神経栄養因子(NGF)について
 木岡 哲郎, 撫井 弘二, 山上 榮 (大阪市立大学神経精神医学教室)
- 179 2P 2002**
 不死化アストロサイトにおけるグリア細胞成長因子(GMF)mRNA 発現調節機構
 森川 将行^{1,2}, 小久保 稔¹, 藤田 佳織¹, 山本 愛美¹,
 浅井 清文¹, 岸本 年史², 加藤 泰治¹
 (¹名市大・医・分子医研・生体制御, ²奈良医大・精神医学)
- 180 2P 2003**
 ラット脊髄後根神経節細胞におけるサブスタンス P 合成に対する神経成長因子およびインターロイキンの
 効果
 井上 敦子, 生駒 弘造, 森岡 徳光, 秀 和泉, 仲田 義啓
 (広島大・医・総合薬・薬効解析)
- 181 2P 2004**
 小脳顆粒細胞の移動速度に対する神経栄養因子 NT-3, BDNF の効果
 田中 聡一^{1,2}, 関野 祐子¹, 林 謙介¹, 白尾 智明¹
 (¹群馬大学医学部行動分析学, ²同神経内科)
- 182 2P 2005**
 マウスマクロファージにおけるニューロトロフィンの発現
 浅見 俊雄, 新田 淳美, 古川 昭栄 (岐阜薬科大学分子生物学教室)
- 183 2P 2006**
 神経伝達物質による培養アストロサイト細胞内 aFGF 量の調節
 網川 秀樹, 新田 淳美, 古川 昭栄 (岐阜薬科大学分子生物学教室)
- 184 3B MS10-2**
 抗精神病薬によって誘導される脳内 NGF(Nerve Growth Factor) mRNA
 尾崎 宜洋, 勝元 栄一, 原田 智行, 撫井 弘二, 山上 榮
 (大阪市立大学医学部神経精神医学教室)
- 185 1B MS3-1 2007**
 培養交感神経細胞における NT3 および GDNF 応答性の調節
 松岡 一郎, 小林 三和子, Thang Siong Heng, 栗原 堅三
 (北海道大学薬学部薬剤学講座)
- 186 1B MS3-2 2008**
 培養ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンに対する BDNF と CNTF の相乗作用
 橋本 有佳, 阿比留 康弘, 沼川 忠広, 畠中 寛
 (大阪大学蛋白質研究所合成部門)

187 1B MS3-4 2009

神経芽細胞腫における GDNF 受容体シグナル伝達

..... 近藤 和博, 菱木 知郎, 高田 尚幸, 磯貝 恵理子, 二村 好憲,
崎山 樹, 中川原 章(千葉県がんセンター研究局生化研究部)

188 1B MS3-5 2010

カイニン酸投与による脳由来神経栄養因子のラット脳における動態

..... 仙波 りつ子, 竹内 郁夫, 伊東 秀記, 加藤 兼房
(愛知県コロニー・発達障害研究所)

189 1P 1010

ラット培養大脳皮質神経細胞における HGF シグナル伝達経路の解析

..... 町出 充, 中村 泰子, 高坂 新一 (国立精神神経センター, 神経研究所代謝研究部)

190 1P 1011

頭部外傷ラットにおけるプロサボシンの空間認知障害および組織学的変化に対する効果

..... 保住 功¹, 平岩 雅男³, 犬塚 貴¹, 米岡 有一郎², 秋山 克彦², 田中 隆一²,
菊川 公紀¹, 中野 亮一¹, 辻 省次¹, J.S. O'BRIEN³ (¹新潟大学脳研究所神経内科,
²新潟大学脳研究所脳神経外科, ³カリフォルニア大学サンディエゴ校神経科学)

191 1P 1012

プロサボシン-レセプターの特徴とその精製

..... 近藤 啓次¹, 伊賀瀬 圭二², 小谷 泰教¹, 佐野 輝¹
(愛媛大学医学部 ¹神経精神医学教室, ²脳神経外科学教室)

192 1P 1013

肝由来神経活性化因子による神経細胞死抑制

..... 堀江 秀典, 酒井 偉久子, 門屋 利彦¹, 稲垣 好昌¹, 野沢 りさ¹
(横浜市大・医・生理, ¹キリンビール医薬探索研究所)

193 1P 1014

神経芽細胞腫培養株におけるレチノイン酸による細胞死の誘導と GDNF, NTN-RET シグナルを介した細胞死抑制機構の解析 高田 尚幸, 磯貝 恵理子, 菱木 知郎, 近藤 和博, 中川原 章
(千葉県がんセンター生化学研究部)

194 1P 1015

ラット神経切断モデルにおける皮下投与 BDNF の保護作用および血中濃度

..... 片山 典子, 石毛 陽子, 岸野 晶祥, 小河 宏城, 龍野 徹, 中山 智加男, 野口 浩
(住友製薬総合研究所)

195 1P 1085

ラット運動神経に対する BDNF の細胞変性抑制, 回復作用および軸索伸張作用

..... 岸野 晶祥, 石毛 陽子, 苫 智子, 中山 智加男
(住友製薬総合研究所分子神経科学 G)

196 1C MS5-4 1084

ニューロトロフィンによる初代培養中枢ニューロンからの神経伝達物質放出

..... 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)

197 1P 1083

虚血性神経細胞死における低酸素誘導蛋白 ORP150 の役割

..... 玉谷 実智夫, 小川 智, 小澤 健太郎, 遠山 正彌 (大阪大・医・第二解剖)

198 2C MS9-1 1082

虚血性神経細胞死における Bcl-2 と ICE ファミリーの役割

..... 玉谷 実智夫, 小川 智, 小澤 健太郎, 遠山 正彌 (大阪大学医学部第二解剖)

199 2C MS9-2 1081

虚血によるスナネズミの遅発性神経細胞死における caspase の関与

..... 水見 敏行, 石崎 泰樹, 室田 誠逸 (東京医科歯科大学細胞機能制御学教室)

200 2C MS9-3 1080

虚血性脳ストレスにおける神経細胞保護作用の分子メカニズム

..... 石岡 憲昭¹, 久原 映子¹, 上野 豊^{1,2}, 小暮 太郎^{1,3}
(東京慈恵会医科大学¹DNA 医学研究所分子細胞生物学研究部門,
²整形外科科学教室, ³脳外科学教室)

201 2C MS9-4 1079

脳虚血による遅発性神経細胞壊死後の海馬 CA1 錐体細胞層痕跡におけるアポリポロタンパク E および β -amyloid 様タンパクの蓄積

..... 石丸 裕久¹, 石川 巧一², 羽賀 誠一³, 東海林 幹夫⁴, 大江 良秀⁵,
羽賀 千恵⁵, 高橋 章¹, 丸山 悠司¹
(群馬大学医学部¹神経精神薬理学ツムラ,⁴神経内科,²群馬大学生体調節研究所分子調節,
東京都精神医学総合研究所³超微形態,⁵神経病理)

202 1P 1078

局所脳虚血急性期における小胞体カルシウム調節動態

..... 傳法 倫久, 福内 靖男, 田中 耕太郎, 白井 俊孝, 永田 栄一郎,
伊東 大介, 鈴木 重明, 二木 啓¹
(慶應義塾大学神経内科, ¹シオノギ製薬中枢神経薬研究センター)

203 1P 1077

秒ネズミ 6 時間脳虚血モデルにおける小胞体カルシウム動態について

..... 永田 栄一郎, 福内 靖男, 田中 耕太郎, 白井 俊孝, 伊東 大介,
鈴木 重明, 傳法 倫久, 二木 啓¹
(慶應義塾大学神経内科, ¹シオノギ製薬中枢神経薬研究センター)

204 1P 1076

発達期橋核ニューロンにおける NMDA 受容体マグネシウムイオン阻害効果の変化: 橋海馬支脚神経細胞壊死との関連

..... 三谷 章, 片岡 喜由 (愛媛大学医学部第一生理)

205 1P 1075

一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死に伴う脳内グリア線維性酸性タンパク (GFAP) の変動

..... 入谷 克己, 藤田 公和, 山内 理充, 小川 和人, 加藤 寿章, 芳本 信子,
平田 ゆかり¹, 山口 幸子, 柴山 健三, 永田 豊
(藤田保健衛生大学医学部生理学教室, ¹同法医学教室)

206 1P 1074

回転培養標本を用いた海馬神経細胞変性の解析

..... 志谷 和紀, 富永 恵子, 小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科)

207 1B MS2-3 1073

スナネズミ一過性前脳虚血後海馬に誘導される遺伝子の探索, ADP-ribosylation factor like-gene, ARF4L の発現

..... 片山 泰一^{1,2}, 今泉 和則^{1,3}, 津田 学^{1,3}, 高木 勉¹, 遠山 正彌²
(¹大阪大学医学部分子脳機構, ²第 2 解剖学教室, ³田辺製薬)

208 2P 2011

デキサメサゾン低酸素による細胞内カルシウムイオンの増加開始時期をスナネズミ海馬スライスで促進する

..... 足立 尚登, 柳瀬 尚人¹, 片岡 喜由¹ (愛媛大学医学部麻酔・蘇生学, ¹生理学)

209 2P 2012

デキサメサゾンは虚血性脱分極の開始時期を早めてスナネズミ海馬の虚血性神経障害を悪化させる

..... 足立尚登 (愛媛大学医学部麻酔・蘇生学)

210 2P 2013

超低タール・ニコチンタバコの体循環および脳循環動態におよぼす影響

..... 五味 慎太郎, 川崎 仁志, 美原 盤¹, 岡安 裕之² (青山学院大学保健管理
センター, ¹脳血管研究所美原記念病院, ²聖路加国際病院神経内科)

211 2P 2014

海馬 CA1 錐体細胞からの BDNF 輸送低下が遅発性神経細胞死に先行する

..... 山崎 靖人¹, 茂野 卓², 古川 美子³, 古川 昭栄⁴
 (¹大鵬薬品工業(株), ²関東労災病院脳外科, ³愛知文教女子短大,
⁴岐阜薬科大分子生物学教室)

212 2P 2015

不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞における血液脳関門特異的形質の誘導

..... 祖父江 和哉¹, 大橋 章雄², 山本 直樹², 勝屋 弘忠¹, 浅井 清文³, 加藤 泰治³
 (¹名市大・医・麻酔蘇生学, ²同・薬・製剤, ³同・分子医研・生体制御)

213 2P 2016

脳血流慢性低灌流ラットの脳内部位特異性はなぜ生じるのか？

..... 田中 健一, 和田 尚子, 近藤 洋一¹, 野村 正彦, 小川 紀雄¹
 (埼玉医科大学 第一生理学, ¹岡山大学 医学部 神経情報学)

214 2P 2017

AP1 結合能上昇の虚血性神経細胞死への関与

..... 倉本 展行, 東 泰孝², 荻田 喜代一, 章 龍¹,
 柳瀬 尚人¹, 三谷 章¹, 片岡 喜由¹, 米田 幸雄
 (摂南大学薬学部薬理学研究室, ¹愛媛大学医学部第一生理学教室,
²現 大阪歯科大学薬理学教室)

215 1P 1072

ヒト羊膜上皮細胞におけるカテコールアミンの合成と分泌能について

..... M. ELWAN, 桜川 宣男 (国立精神・神経センター神経研究所 第5部)

216 1P 1071

ヒト羊膜上皮細胞におけるアセチルコリン代謝の存在について

..... 桜川 宣男, 垣下 浩二, 石井 俊¹, R. THANGAVEL, 大杉 圭子, 三澤 日出巳²
 (国立精神・神経センター神経研究所第5部, ¹日本大学生物資源科学部,
²東京都神経科学総合研究所)

217 1P 1070

大脳樹状突起スパインの細胞骨格に対するモノクローナル抗体の作製とその解析

..... 程 希丹, 林 謙介, 白尾 智明 (群馬大学医学部行動分析)

218 1P 1069

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構成因子の解析

..... 熊ノ郷 晴子, 前川 昌平 (京都工芸繊維大学大学院応用生物)

219 1C MS6-5 1068

ニューロフィラメント欠損ウズラ Quv 胚の神経系におけるニューロフィラメント蛋白

..... 豊島 至, 加藤 一鷹, 菅原 正伯, 和田 千鶴, 正宗 研 (秋田大学医学部第一内科)

220 1C MS6-4 1067

神経再生に伴うニューロフィラメント蛋白の動態変化

..... 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)

221 1P 1066

若齢ラットと老齢ラットニューロフィラメントの PKA によるリン酸化

..... 内田 敦子, 久永 真市¹
 (東京工業大学生命理工学部, ¹東京都立大学理学部生物学科)

222 1P 1065

マウス大脳中隔野及び中脳黒質神経細胞表面抗原特異的モノクローナル抗体

..... 遠藤 真澄^{1,2}, 弘瀬 秀樹³, 崔 得華¹, 中谷 伸一³, 国下 龍英¹, 田平 武¹
 (¹国立精神・神経センター神経研疾病研究第六部, ²国立感染症研究所, ³新田ゼラチン)

223 1P 1064

節前および節後神経切断手術後、白鼠上頸部交感神経節内ニューロン変性の進行に伴う、グリア線維性酸性タンパク(GFAP)の変動

..... 山内 理充, 安藤 正人¹, 加藤 寿章, 藤田 公和, 小川 和人, 坂本 秀夫²,
永田 豊 (藤田保健衛生大学・医学部・生理学Ⅱ教室, ¹愛知学泉大学・
解剖生理学研究室, ²藤田保健衛生大学・総医研・分子生物学)

224 1P 1063

6-アミノニコチン酸アミドによるグリア細胞毒性のメカニズム

..... 馬渡 一浩¹, 本間 啓子¹, 杉谷 加代¹, 高寺 恒雄³, 加藤 聖²
(金沢大・医・¹保健, ²神経情報研, ³北陸大・薬)

225 1P 1062

Nitric oxide による神経細胞障害は細胞内 cGMP 上昇により抑制される

..... 鴻上 繁, 尾形 直則, 奥村 秀雄, 柴田 大法, 中村 洋一¹, 片岡 喜由¹
(愛媛大学医学部整形外科科学教室, ¹生理学教室)

226 1P 1061

ドパミン神経毒 MPP⁺による GH3 細胞の細胞死および EGF による保護作用

..... 吉永 至宏, 村山 俊彦, 野村 靖幸 (北海道大学薬学部薬効学教室)

227 1P 1060

培養神経細胞における H₂O₂ の毒性に対する塩酸 bifemelane の保護効果

..... 飯田 基之, 岩田 恵美, 小川 紀雄 (岡山大医・分子細胞研・神経情報学部門)

228 1P 1059

酸化ストレスに対する小脳顆粒細胞ニューロンの抵抗性とアコニターゼ酵素活性の変化

..... 田淵 明子, 津田 正明¹
(岡山大学薬学部微生物薬品化学教室, ¹富山医科薬科大学薬学部衛生化学研究室)

229 1P 1058

中枢ニューロンの高酸素負荷による細胞死: ヒドロキシラジカルとグルタミン酸の関与

..... 石川 保幸, 西尾 チカ, 沼川 忠広, 畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所生合成部門)

230 1P 1057

活性酸素によるニューロン死と発芽の促進

..... 内田 洋子, 五味 不二也 (東京都老人総合研究所神経病理・超微形態部門)

231 1C O-2

副腎髄質 cyclic ADP-ribose 生合成活性の調節機序

..... 森田 克也, 北山 滋雄, 土肥 敏博 (広島大学歯学部歯科薬理学講座)

232 1C O-3

Delayed Extraction 法を導入した MALDI-TOF MS による脳組織のスフィンゴ糖脂質及び関連脂質の研究

..... 武富 保, 原 厚, 上村 敬一, 倉橋 寿, 杉山 英子
(信州大学医学部加齢適応研究センター加齢生化学)

233 1P 1056

延髄化学受容野への拍動性圧迫による c-fos の発現

..... 市田 竜也¹, 山田 久夫, 桂 昌司²
(滋賀医大・第二解剖, ¹京都府医大・第二内科, ²川崎医大・薬理)

234 2C O-1

Ob-gene プロダクト, レプチン(Lep) の摂食抑制機序

..... 大村 裕¹, 白石 武昌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東海大医生理, ³富山大工生体情報, ⁴新潟大医生理)

235 1P 1055

神経活動によって発現制御される細胞接着因子 Arcadlin の解析

..... 杉浦 弘子, 加藤 宏司¹, 入江 康至², 三木 直正², 山形 要人
(東京都神経研・分子神経生物, ¹山形大・医・第二生理, ²大阪大院・医・情報薬理)

236 1P 1054

ニューロカン N-末端側断片のグリア性神経細胞周囲網への局在

..... 松井 ふみ子¹, 西塚 雅子², 青野 幸子¹, 大平 敦彦¹
(¹愛知県コロニー・発達障害研究所・周生期, ²順天堂大学・医学部・第二解剖)

237 1P 1053

神経系に特徴的なコンドロイチン硫酸プロテオグリカン, NGC, のマウス遺伝子クローニングと小脳発達に伴う発現変動

..... 青野 幸子, 慶野 宏臣, 松井 ふみ子, 大平 敦彦
(愛知県コロニー・発達障害研究所・周生期学部)

238 1P 1052

培養海馬神経細胞のシナプス形成とヘパラン硫酸プロテオグリカン

..... 森田 将史, 小倉 明彦 (大阪大学大学院・理学研究科)

239 1P 1051

¹³C-化合物投与によるラット脳グリア代謝の計測—Ex Vivo ¹³C-NMR スペクトロスコピー法を用いて

..... 金松 知幸, 高原 ひろみ, 塚田 裕三 (創価大学生命科学研究所)

240 1P 1050

¹³C-グルコース投与による高磁場磁気共鳴局所化スペクトロスコピーでの脳内グルタミン酸代謝の無侵襲的計測

..... 塚田 裕三¹, 金松 知幸¹, 小田 正記¹, 高原 ひろみ¹, 岡本 和也²,
(¹創価大学生命科学研究所, ²東芝 RD センター)

241 1P 1049

培養アストロサイトのグルコース代謝に及ぼす glybenclamide の効果

..... 浜井 盟子, 箕越 靖彦, 嶋津 孝 (愛媛大学医学部医化学第一学教室)

242 1P 1048

マウス脳の発達段階におけるグリコーゲン合成酵素の発現

..... 南木 浩二, 馬場 広子, 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)

243 1P 1047

視床下部腹内側核および外側核でのアセチルコリン放出と血糖値の増加

..... 高橋 章, 石丸 裕久, 五十嵐 康, 岸 栄子, 丸山 悠司
(群馬大医学部神経精神薬理学ツムラ)

244 1P 1046

HES1 遺伝子の終脳における機能: ニューロン分化, 細胞死の亢進, およびグリア分化への影響

..... 中村 由紀, 榊原 伸一, 影山 龍一郎¹, 岡野 栄之²
(大阪大, 医, ¹京都大・医, ²科学技術振興事業団 CREST)

245 1P 1045

培養交感神経細胞におけるニューロトロフィン応答性と Shc 遺伝子の発現

..... 小林 三和子¹, 中村 岳史², 森 望³, 松岡 一郎¹, 栗原 堅三¹ (¹北大 薬 薬剤学,
²住友電工バイオメディカル研究所, ³国立長寿医療研究センター遺伝子部門)

246 1P 1044

グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の GABA ニューロン特異的発現制御: トランスジェニックマウスを用いたプロモーターの解析

..... 柳川 右千夫, 小林 隆司, 石井 賢治, 久津輪 瑞代, 田村 眞理
(東北大学加齢医学研究所遺伝子情報研究分野)

247 1P 1043

ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した zif268 遺伝子プロモーターの活性化

..... Julie GENG, 海老原 達彦, 隈原 英子, David SAFFEN
(東京大学医学部神経生化学)

248 1P 1042

PC12D 細胞において NGF 刺激から *zif268* 遺伝子発現に至る経路には MAPK 依存性・非依存性のものが存在する

..... 隈原 英子, Julie GENG, David SAFFEN (東大・医 神経生化)

249 3C O-1

Notch 情報伝達系の構成遺伝子である *deltex* のマウスホモログのクローニングおよび機能解析

..... 岸 憲幸¹, 伊藤 美紀子^{1,2}, 木下 進³, Chi-chung HUI⁴, 岡野 栄之^{1,2}, 松野 健治^{1,2}
(¹阪大・医・神経機能解剖, ²CREST, JST, ³関西学院大学・理・化学・発生生物,
⁴The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada)

250 3C O-2

橋由来大脳皮質軸索化学誘導因子の分子生物学的検索

..... 高見 俊宏, 米田 託成, 高木 宏, 佐藤 真
(大阪市立大学医学部解剖学第一教室)

251 1B MS2-1

ニューロン特異的核蛋白質 *necdin* による E2F 転写活性の抑制

..... 小林 正克, 谷浦 秀夫, 吉川 和明 (大阪大学蛋白質研究所機能制御部門)

252 1B MS2-2

交感神経分化に関わる転写因子 NDF1 の発現と機能

..... 樋口 宗史, 中野 浩一¹, 牛 三勇, 三木 直正
(大阪大学大学院医学系情報薬理, ¹京都府立医大薬理)

253 1B MS2-4 2018

神経系幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 *mouse-Musashi-1* の標的分子

..... 今井 貴雄^{1,2}, 榊原 伸一¹, 岡野 栄之^{1,3}
(¹大阪大学医学部神経機能解剖学, ²大阪大学基礎工学部生物工学,
³科学技術振興事業団)

254 1B MS2-5 2019

マウス脳内 CREB の細胞核局在性およびグルタメイトシグナル応答性

..... 久保 慶太, 眞部 孝幸, 荻田 喜代一, 米田 幸雄
(摂南大学薬学部薬理化学研究室)

255 2P 2020

EL マウス発作後における脳 *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) mRNA 発現におよぼす *c-fos* の転写制御について

..... 勝元 栄一, 尾崎 宜洋, 原田 智行, 撫井 弘二, 山上 榮
(大阪市立大学医学部神経精神医学教室)

256 2P 2021

マウス脳内における *c-Myc* 結合能調節蛋白質存在の可能性

..... 倉本 展行, 荻田 喜代一, 米田 幸雄 (摂南大学薬学部薬理化学研究室)

257 2P 2022

シグマ-1 受容体アゴニストの転写因子に及ぼす影響

..... 山本 秀子¹, 山本 敏文^{1,2}, 松野 聖³, 吉本 有希子⁴, 渡辺 雅幸¹
(¹東京都精神研・精神薬理, ²横浜市大総合理学・分子認識,
³参天製薬, ⁴帝京大学附属溝口病院リハビリテーション科)

258 2P 2023

ヒト *necdin* 遺伝子の構造とニューロン特異的発現

..... 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)

259 2P 2024

ショウジョウバエ *unc-4* ホモログの発現パターンの解析

..... 田淵 克彦¹, 吉川 真悟², 岡部 正隆¹, 岡野 栄之¹ (¹阪大・医学部・
神経機能解剖学, 科技団(CREST), ²筑波大・基礎医・分子神経生物学)

260 2P 2025

グルタメイトシグナルに応答性を示す海馬内蛋白質

..... 眞部 孝幸, 久保 慶太, 倉本 展行, 萩田 喜代一, 米田 幸雄
(摂南大学薬学部薬理学研究室)

261 1P 1041

PC12細胞におけるアセチルコリンとカテコールアミンの開口放出機構の比較

..... 西木 禎一^{1,2}, 関口 真理子¹, 岩崎 聡³, 笠井 陽子¹, 熊倉 鴻之助², 高橋 正身^{1,3}
(¹三菱化学生命科学研, ²上智大・生命研, ³東大院・総合文化)

262 1C MS5-11040

シナーフィンのSNARE複合体への結合

..... 阿部 輝雄, 西須 英雄, 石塚 徹 (新潟大学脳研究所)

263 1C MS5-21039

神経伝達物質放出におけるコンプレキシンの機能

..... 高橋 正身¹, 斧 正一郎¹, 関口 真理子¹, 高橋 聖一²
(¹三菱化学生命科学研究所, ²高知医科大学)

264 1C MS5-3 1038

プロテインキナーゼCによる開口放出の制御

..... 御園生 裕明, 今泉 美佳, 熊倉 鴻之助 (上智大学生命科学研究所神経化学部門)

265 1C MS5-5 1037

開口放出関連蛋白質 HPC-1/Syntaxin1A 遺伝子のWilliams症候群患者染色体における半接合体欠失

..... 中山 高宏^{1,4}, 松岡 瑠美子², 木村 美佐², 浅川 修一³, 広田 沢夫²,
御子柴 克彦¹, 清水 淑子⁵, 清水 信義³, 赤川 公朗¹ (¹杏林大 医 ²生理,
²東京女医 循小, ³慶応大 医 分生, ⁴東大 医科研 化学, ⁵杏林大 保 臨遺伝)

266 1P 1036

シプレエイ電気器官に存在する融合複合体構成蛋白質シナーフィンの解析

..... 石塚 徹, 西須 英雄, 阿部 輝雄 (新潟大・脳研・細胞神経生物学)

267 1P 1035

開口放出機構におけるシナプトタグミンの役割

..... 今泉 美佳¹, 福田 光則^{2,3}, 新延 道夫^{3,4}, 笹川 展幸⁵, 御園生 裕明¹,
御子柴 克彦^{2,3}, 熊倉 鴻之助¹ (¹上智大 生命研, ²理研 ライフサイエンス筑波
分子神経, ³東大 医科研 化学, ⁴阪大 蛋白質, ⁵慶応大 医 薬理)

268 1P 1034

シナプトタグミンIを欠失したPC12細胞での他のアイソフォームの発現

..... 笠井 陽子, 桑原 玲子, 片岡 正和, 高橋 正身 (三菱化学生命科学研究所)

269 1P 1033

L-threo-PDMPはガングリオシド生合成および機能的シナプス形成を促進し、脳虚血ラットにおける記憶保持能を改善する

..... 井ノ口 仁一¹, 水谷 昭弘¹, 神保 雅之¹, 臼杵 靖剛¹, 山岸 究¹, 望月 秀雄¹,
村本 和世², 小林 和夫², 黒田 洋一郎², 岩崎 克典³, 大神 祐輔³, 藤原 道弘³
(¹生化学工業(株)東京研究所, ²東京都神経科学総合研究所・神経生化学研究部門,
³福岡大学薬学部・応用薬理学教室)

270 1P 1032

レチノイン酸による神経細胞分化誘導とGD3合成酵素遺伝子の発現

..... 小山内 たか (都臨床研, 生命情報)

271 1P 1031

マウス神経芽腫細胞の細胞周期に対するスフィンゴ糖脂質の効果

..... 上村 敬一, 武富 保 (信州大学医学部・加齢適応研究センター・加齢生化学)

272 1P 1030

糖蛋白質鎖の化学的糖鎖スクリーニング法の自動化と応用

..... 藤本 一朗, M. KRISHNA, 田中 文啓, 長束 俊治, 長谷 純宏, 池中 一裕
(岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経情報)

273 1C MS6-1

N23K/N27K (orphanin FQ 前駆体遺伝子)による神経突起形成作用

..... 斎藤 祐見子^{1,3}, 丸山 敬², 西道 隆臣¹, 川島 誠一¹
(¹都臨床研遺伝情報, ²岡崎国立生理研神経化学, ³カリフォルニア大アーバイン校)

274 1C MS6-2

ギセリン同種間結合活性による毛様体神経節細胞からの神経突起伸展

..... 平 英一, 薙野 智子, 塚本 康弘¹, 丁 云, 佐久間 貞重¹, 三木 直正
(大阪大学大学院医学系情報薬理, ¹大阪府大獣医病理)

275 1C MS6-3 1029

PC12D 細胞では, NGF による神経突起誘導に MAP キナーゼ活性化は必須でない。

..... 佐野 護, 北島 哲子 (愛知県コロニー研究所)

276 1P 1028

脱分極刺激により誘導される PC12 細胞の神経突起伸長の過程には Ca 依存性の NO 合成酵素の活性化が必要

..... 吉田 克, 中川 裕之, 宮本 茂昭
(九州工業大学情報工学部, 生物化学システム工学教室)

277 1P 1027

神経突起由来微小管の安定性: レーザー光による切断と脱重合過程の解析

..... 倉知 正, 田代 英夫, 小宮 義璋¹, 田代 朋子¹
(理研フォトダイナミクス, ¹群馬大・医)

278 1P 1026

タウプロテインキナーゼ II とリン酸化タウのラット新生仔脳における局在

..... 内田 庸子, 佐藤 道夫, 大沼 純, 石黒 幸一 (三菱化学生命科学研究所)

279 1P 1025

変異型単純ヘルペスウイルスベクターを用いた L1 蛋白の機能解析

..... 中井 陽子, 矢崎 貴仁, 植村 慶一 (慶応義塾大学医学部生理学教室)

280 1P 1024

Sema D/collapsin-1 の肺分枝形成抑制作用

..... 五嶋 良郎, 伊藤 隆明¹, 宇高 直子¹, 前園 雅子, 佐々木 幸生,
谷口 充洋, 北村 均¹, 三須 良實, 藤沢 肇²
(横浜市立大学医学部薬理学教室, ¹病理学教室, ²名古屋大学大学院理学研究科)

281 1P 1023

LANP と adaptin の結合

..... 田岡 万悟, 中山 洋, 荒木 威, 磯辺 俊明 (東京都立大院・理・化)

282 1P 1022

海馬形成におけるカハール・レチウス細胞とリーリンの役割

..... 仲嶋 一範¹, 御子柴 克彦^{1,2}, 宮田 卓樹^{1,2,3}, 工藤 千加子¹, 小川 正晴³
(¹理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター分子神経生物学研究室,
²東京大学医科学研究所化学研究部, ³高知医科大学第二生理学教室)

283 1P 1021

Reeler に似た神経症状を示す自然発症ミュータントマウス, yotari

..... 永田 栄一郎¹, 米島 宏幸², 松本 峰男², 山田 麻紀², 仲嶋 一範³, 田中 耕太郎¹,
福内 靖男¹, 御子柴 克彦^{2,3} (¹慶応義塾大学医学部神経内科, ²東京大学医科学研究所
化学研究部, ³理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター分子神経生物学研究室)

284 1P 1020

小脳発生過程におけるリーリンの発現制御

..... 柴 玲子, 官田 卓樹, 仲嶋 一範, 高橋 聖一, 小川 正晴, 御子柴 克彦
(理化学研分子神経生物学研究室)

285 1P 1019

発育期神経組織のニューレグリンのアイソフォーム

..... 篠田 純, 中尾 純治, 飯塚 幸彦, 鳥羽 陽子, 植村 慶一 (慶應義塾大学医学部生理)

286 1P 1018

ラット脳由来の神経前駆細胞の分化

..... 中山 たかね, 山之端 万里, 塚田 裕三 (創価大学生命科学研究所)

287 1C O-1

中枢神経型ナトリウムポンプ活性の膜電位依存性

..... 原 諭吉, 古川 哲史¹
(東京医歯大・院医・感染分子制御学, ¹難治疾患研・自律生理学)

288 1P 1017

遺伝子導入細胞を用いた神経細胞型 Na ポンプ活性調節機構の解析

..... 井上 順雄, 曾我 智子, 原 諭吉¹, 中山 孝, 加藤 尚彦
(横浜市立大学医学部第一生化学, ¹東京医科歯科大学医学部感染分子制御学)

289 1P 1016

ラット脳内におけるヒスタミン再取り込み機構の存在について

..... 櫻井 映子, 櫻井 栄一¹, 渡邊 建彦, 谷内 一彦
(東北大学大学院・医学系研究科・細胞薬理学分野, ¹東北薬科大学第一薬剤学教室)

001 1A S1-1

Plasticity and brain damage induced by ischemic episodes: Mechanisms and relevance to neuroprotection

Y. Ben-Ari, INSERM, Paris, France

Brief ischemic episodes induce long term changes in synaptic efficacy and a delayed neuronal cell loss that is reminiscent to that which occurs in humans. In this review I shall discuss recent development in our understanding of the events that occur hours - days after the insult and in particular focuss on 2 closely related questions i.e, the role of NMDA receptors in the postischemic events and the mechanisms that underlie neuronal cell loss.

1) Anoxic LTP: a link between memory processes and brain damage. Using hippocampal slices, we discovered a few years ago that anoxo-ischemic episodes generate a LTP of glutamatergic synaptic transmission that shares several features in common with the classical model of memory processes. Indeed, after the episode, the evoked EPSP was persistently enhanced because of a long lasting change in the synaptic efficacy. The induction of this Anoxic LTP required -as tetanic LTP - a depolarisation, the activation of NMDA receptors and a rise in intracellular Ca^{2+} ; however, in contrast to Tetanic LTP, the expression of Anoxic LTP was exclusively mediated by NMDA receptors i.e, AMPA receptors mediated signals were not affected by the procedure. We suggest that one - or more - of the sites that modulate NMDA receptors are activated by anoxo- ischemic episodes but not by a tetanus. Indeed, we reported subsequently that redox agents prevented anoxic LTP and other forms of LTPs that are mediated by persistent changes in NMDA receptor mediated signals but not tetanic LTP. When in fully oxidized configuration, NMDA receptors can still induce persistent changes in AMPA receptor mediated signals but cannot be persistently altered. Thus, it is possible to develop agents that prevent the toxic actions of excessive activations of NMDA receptors .

2) Apoptotic cell death in epilepsy and ischemia. We have tested the hypothesis that part of the neuronal damage that occurs after seizures or ischemic insults is due to an apoptotic mechanism. We found that after kainate seizures, global (4 vessel occlusions) or local ischemic insults (MCO model), there is a substantial apoptotic component; this was identified initially by tunel stains, DNA gels and electron microscopic pictures that reflected a condensation of the chromatin. More recently, we tested the hypothesis that cell death is due to an attempt to reenter to cell cycle division thus inducing a programmed cell death program. We found that the mRNA coding for the Cyclin D1 was activated in the vulnerable regions - CA3 after seizures and CA1 after global ischemic episodes pyramidal neurons. The protein was also labelled with specific antibodies in neurons (but also in glia). These observations are compatible with - although they are not compelling - the hypothesis that indeed a programmed cell death is activated in these pathological conditions.

002 1A S1-2

脳虚血 *in vivo* モデルの特性と問題点

田村 晃、中山比登志、成田考而
(帝京大学医学部脳神経外科学教室)

脳虚血は虚血範囲からは全脳虚血と局所脳虚血に、血流低下の程度からは完全虚血と不完全虚血とに分けられる。全脳虚血は臨床の心停止や窒息のモデルで、脳血流は均一に低下し虚血・低酸素に脆弱な神経細胞が主に傷害される選択的神経細胞死のモデルであり、血管壁の傷害は軽微で強い脳浮腫は起らない。最近ラットの簡便な心停止モデルも開発されているが全身の影響が強く蘇生困難な場合も多い。そこで臨床病態とはやや異なるが主に内頸動脈領域のみを虚血にするラット4血管閉塞モデルや砂ネズミ両側総頸動脈閉塞モデルなどの前脳虚血モデルが開発された。これらのモデルでは脳幹への血流がある程度保たれているので呼吸管理の必要がなく蘇生が容易である。

一方、局所脳虚血モデルは脳梗塞のモデルで閉塞血管の灌流領域が虚血となり中心部は組織壊死となるが、周辺部では血流がある程度保たれ選択的に神経細胞が傷害される (penumbra領域)。血管壁も傷害され強い浮腫が生じ、血流再開に伴い急速に浮腫が進行し破綻出血が起る場合もある。局所脳虚血モデルとしてはネコ・サルの中大脳動脈(MCA)閉塞モデルが一般的であったが、ラットのモデルが開発され多用され最近ではマウスも使われる。頭蓋底部に小孔を開けMCAを閉塞する方法又は頸部頸動脈からnylon threadを挿入し閉塞する方法が行われる。同じMCA閉塞であってもthread modelは梗塞巣が大きく死亡率が高いので再開通が必須で、虚血後の体温上昇、内頸動脈を経由するので内頸動脈の分枝である後大脳動脈領域(海馬など)も直接の影響を受ける等の差がある。

虚血性神経細胞死は血圧・血液ガス(pO_2 , pCO_2 , pH)・血糖等の生理学的パラメーターの変動の影響が大きく、数度の体温(脳温)変化にも影響を受けるので、*in vivo*モデルでは、これらのモニタリングが重要である。また、動物の性・週令・生産業者による違いも見られる。

003 1A S1-3

脳虚血モデルにおける transgenic mice の有用性—nitric oxide と apoptosis の観点から—

原 英彰, Michael A. Moskowitz

(鐘紡・薬品開発第一研究所, ハーバード大学医学部
マサチューセッツ総合病院神経内科)

遺伝子工学の発達によって動物疾患モデルの開発が進み、実験動物並びに諸種のヒトの疾患の病態の解明が進んできた。Neuronal nitric oxide synthase (nNOS), endothelial NOS (eNOS) および interleukin (IL) 1- β converting enzyme (ICE) transgenic mice を用いて、虚血障害による病態の機序解明を試みた。

NOS によって合成される nitric oxide (NO) は多くの生理作用と関連があり、また広範に分布している molecular messenger である。これまでに NOS 阻害薬は中大脳動脈閉塞によって生じる虚血障害を軽減あるいは増悪させるとする相反した結果が報告されていた。nNOS mutant mice は虚血後の梗塞巣を減少させるが、eNOS mutant mice は増悪させることから、nNOS は虚血を悪化させる方向に、eNOS は保護する方向に働くことが明らかになった。このように、transgenic mice は、上記のような相反しているデータを説明するのに有用である。

ICE ファミリー caspase は、ヒトにおいて線虫の遺伝子 ced-3 と相同である。Apoptosis は発達過程、神経学的な疾患あるいは虚血のような急性細胞障害によって哺乳類の細胞に起こる。Transgenic mice は、wild-type littermates (control) と比較して虚血によって生じる梗塞巣、神経症状、IL-1 β の増加及び DNA fragmentation を有意に抑制した。これらの成績は ICE の発現の down-regulation は脳虚血後の有益な治療につながることを示唆している。

結論として、transgenic mice は単一の遺伝子の役割を評価するのに有益な方法である。しかし、遺伝子が制御されたことによる代償機構及び wild-type control との比較において、解釈を誤る可能性があるため、実験データの解釈には注意が必要である。

004 1A S1-4

脳虚血による細胞死と応答現象

松本昌泰^{1,2}、北川一夫¹、堀 正二¹、柳原武彦²
(大阪大学医学部第一内科¹、神経内科²)

虚血は中枢神経系が遭遇する最もポピュラーな複合ストレス（低酸素ストレス、低グルコースストレス、ラジカルストレスなど）であり、その重症度に応じてimmediate early genes (IEGs)の発現を含む様々な細胞応答現象が発現することが明らかとなってきた。なかでも虚血に最も脆弱とされる神経細胞において虚血により誘導される虚血耐性現象の発現やアポトーシス様の神経細胞死である遅発性神経細胞死は、虚血による正と負の神経細胞応答を象徴する事象として注目される。また、虚血は神経細胞以外の各種グリア細胞などの中枢神経系の実質細胞のみならず、血管内皮細胞を含む微小循環系細胞にも様々な応答現象を招来することが判明している。演者らはこれまでに虚血や虚血再灌流により招来される細胞応答現象の分子メカニズムやその病態生理的意義を究明するべく、砂ネズミの一過性脳虚血モデル、特定遺伝子のノックアウトマウスや細胞培養系での虚血モデルを含む各種の虚血病態モデルを用いた研究を実施してきた。

本シンポジウムでは、まず始めにこれらの虚血病態モデルを用いた研究に欠かせない基本的事項を整理するとともに、虚血・再灌流ストレスにより誘導されるストレス蛋白やサイトカインの発現、アポトーシス様神経細胞死に関わると想定されるアポトーシス抑制または実行系遺伝子発現の変化やその他の細胞内情報伝達系（チロシンキナーゼ系など）の動態、さらには遅発性血液脳関門解除現象（delayed BBB opening）などの微小循環系の応答現象などに関する研究結果を紹介する。虚血・再灌流により誘導される虚血耐性現象や神経細胞死を含むこれらの各種の細胞応答現象の理解は、臨床的に脳虚血病態のコントロール戦略を考える上で有用であるのみならず、活発な酸素代謝を行う臓器での生理的条件下における微小環境変化によるストレスへの細胞間クロストークを含む細胞応答現象を考察する上でも欠かせないものと思われる。

005 1A S1-5

グルタミン酸とそのアナログによる神経細胞死

篠崎 温彦

(財・東京都臨床医学総合研究所薬理研究部門)

興奮性アミノ酸による神経細胞死は虚血性ニューロン死とかなりの共通点があることが知られている。他のグルタミン酸受容体サブタイプに比べて、カイニン酸型受容体の役割については依然として不明な点が多い。カイニン酸型受容体アゴニストによる神経細胞死を、グルタミン酸によるものと比較検討した。

カイニン酸を皮下投与すると、顕著な痙攣の後、特に辺縁系の神経細胞に特異的な変性を起こす。ほとんどのラットで肺からの出血を認めた。脳室内投与によってもほぼ同様の結果を得るが、代謝調節型グルタミン酸受容体 Group II のアゴニストを長時間適用することにより痙攣も神経細胞死もかなりの程度抑制された。アクロメリン酸は、カイニン酸の化学構造を包含し、カイニン酸と同様の神経細胞死を起こすものと予想されたが、事実はカイニン酸とは全く異なり、後肢対麻痺を誘発し、脊髓下部に局限した抑制性介在ニューロンの特異的破壊が認められた。辺縁系にはさしたる変化を認めなかった。

グルタミン酸を仔ラットに大量連続投与すると、脊髓運動ニューロンの喪失を伴う神経変性疾患が生じた。発症率は4%程度である。後肢対麻痺がグルタミン酸連日投与5-7日目後に発症し、腹部から後肢にかけての体表面の痛覚がほとんど消失していた。発症ラットの腰髄後根はほぼ正常であるのに、前根が対照に比べて著しく細くなっており、大型の前角細胞を中心とした神経細胞の脱落と、それに伴うグリオーシスが認められた。また、脊髓下部では、ほぼ全域にわたって運動神経細胞が死滅したにもかかわらず、脊髓上部では変性の程度は減弱した。脊髓下部の残存している脊髓前角細胞の大半にニッスル物質の崩壊(クロマトライシス)が認められ、前角内の髄鞘の密度は疎になっていた。グルタミン酸単回投与数時間後には脊髓下部に局限した出血斑が認められ、これが上記変性の原因の一つと考えられた。神経細胞上のグルタミン酸受容体の働きに加え、この出血が生ずる機序について考察を加える。

006 1A S1-6

虚血動物モデルにおける低脳温の脳保護作用

柳瀬 尚人, 片岡 喜由

(愛媛大学医学部第一生理)

脳低温法は、少なくとも動物実験(一過性前脳虚血モデル)においては、虚血ニューロンの蘇生には最も効果的であることが確実である。虚血後に開始する脳低温法のニューロン蘇生効果を決定するのは、虚血侵襲の程度、低温の開始時期、持続時間、低温の程度の4因子である。そこで、我々は、スナネズミ一過性前脳虚血モデルを用い、虚血後の脳低温法のニューロン蘇生効果について詳細に分析した。

虚血処置として、1%ハロセン維持麻酔下で、脳温および直腸温を37~37.5℃に維持し、5分間の両側総頸動脈の血流遮断を行った。脳温測定は、線条体内に刺入固定したトランスミッターによるテレメトリーシステムを用いた。低温処置は、体表面への水散布と環境温度の自動制御により、目的の脳温を維持した。復温は特別な加温処置は行わず、自然回復させた。虚血負荷30日後に、残存する海馬CA1錐体細胞数を計測し、脳蘇生効果を評価した。

虚血再灌流1時間後より32℃の低脳温処置を開始し、12時間後まで持続すると、有意なニューロン蘇生効果が観察され始め、24時間後まで延長すると顕著なニューロン蘇生効果が認められた。低温処置開始時期を次第に送らせ、虚血再灌流24時間後まで同様の低脳温処置を施すと、6時間後からの低脳温処置の開始では、もはやニューロン蘇生効果が観察されなかった。しかし、虚血再灌流6時間後から低脳温処置を開始しても、その持続時間を24時間、48時間と更に延長させると、明らかに残存ニューロン数が増加した。低温の程度としては、わずか1~2℃の低温処置でも約30%のニューロンが生存し、35℃以下では顕著なニューロン蘇生効果が観察された。

虚血ニューロン死の過程には、グリア細胞や血管内皮細胞などニューロン周辺の諸要因が多面的・複雑な機構として絡み合っていることが想定され、低温の蘇生効果は、これらの諸要因に広く非特異的に作用すると考えられている。スナネズミ一過性前脳虚血モデルでは、可逆的な細胞内事象が少なくとも虚血再灌流5時間後まで続いている可能性が示唆された。

007 1A S1-7

脳塞栓症超急性期の軽微低体温療法

清水 隆雄、成富 博章、角田 亘、柳本 昌子、衣川

秀一(国立循環器病センター内科脳血管部門)

軽微低体温の脳保護作用は実験的に証明されているのみならず、近年では重症頭部外傷の治療に臨床応用されている。軽微低体温治療の脳虚血に対する有効性と作用機転を明らかにする目的で脳塞栓症急性期における検討を行った。

急性期に入院し意識障害と片麻痺のある主幹動脈の心原性脳塞栓症8例(年齢16-69歳)を対象とした。超急性期群(症例1-6)では発症6時間以内、急性期群(症例7,8)では発症24,48時間後に低体温治療(脳温33℃)を開始し、それぞれ3-5日間、7-10日間持続の後に復温した。CT検査を反復施行して脳保護作用、血液・脳関門保護作用を検討し、また治療後の転帰を検討した。

超急性期群6例では治療開始前、CT上明らかな異常所見は見られなかった。治療開始後、1例では広範囲な低吸収域が出現したが、他の5例では小さい中範囲の低吸収域が出現したのみであった。明らかな脳浮腫像(圧迫所見)を認めた例は皆無であった。復温後もCT所見は悪化せず、全例が良好な経過をたどって杖歩行または独歩にて退院した。急性期群2例では治療開始前にCT上広範囲な低吸収域と著明な脳浮腫像(正中偏位)が見られた。治療開始後、症例7は急速な脳浮腫消褪を示し、復温後も良好な経過を示して杖歩行で退院した。症例8においても脳浮腫の進行停止が見られたが、治療開始10日目に敗血症を合併したため治療を中止したところ脳浮腫が増悪した。同例は合併症のため発症2カ月後に死亡した。

全例に共通して認められたCT所見の特徴は(1)造影CT上、虚血巣が造影されないこと、(2)出血性変化が殆ど認められないこと、(3)脳浮腫抑制効果が強いことであった。軽微低体温療法は超急性期に開始した場合、神経細胞、血液・脳関門の両者を保護して、強力な治療効果を発揮すると思われる。超急性期を過ぎても比較的早期に開始した場合、血液・脳関門保護により強力な脳浮腫抑制効果が得られる可能性は強い。しかし開始時期の大きな遅れは保護作用減弱と感染等合併症の危険性増大を招くと思われる。

008 1A S2-1

神経細胞におけるアラキドン酸とホスホリパーゼA2の役割

片岡洋祐¹、森井博史^{1,2}⁽¹⁾大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門、⁽²⁾科学技術振興事業団・サブフェモトモルバイオ認識プロジェクト)

ホスホリパーゼA2の活性化による膜脂質からのアラキドン酸遊離は、プロスタグランジン合成経路の初段階として知られている。プロスタグランジン同様、アラキドン酸が神経系において様々な作用をもっていることは古くから示唆されてきた。例えば、種々のチャンネル活性の促進または抑制、NMDA型グルタミン酸レセプター活性の促進、グルタミン酸やドーパミンの放出促進やその再取り込みの促進または抑制、プロテインキナーゼC活性の促進、さらには高頻度刺激後のシナプス後電流の長期増強または長期抑圧現象の誘発促進等である。しかし、これらの報告のほとんどが外から投与したアラキドン酸の作用を観察したものであり、実際の中樞神経活動において、どういった生理条件下でアラキドン酸が遊離され、それがどのような役割を演じているのかは多くが謎に包まれたままである。

今回、中樞神経系でのホスホリパーゼA2の免疫組織化学的検索から、この酵素が神経細胞やグリア細胞に広く分布し、中樞神経系のいたるところでアラキドン酸が合成されることが判明した。さらに生化学的及び電気生理学的手法により明らかとなった、アラキドン酸による興奮性アミノ酸取り込み機構の制御についての最新の知見を報告する。すなわち、グリオーマ細胞株に発現した神経型興奮性アミノ酸取り込み機構を細胞外のアラキドン酸が阻害する一方、細胞内に遊離したアラキドン酸はプロテインキナーゼCの活性化を介して逆に促進した。また、最近発見された小脳プルキンエ細胞における後シナプス性興奮性アミノ酸取り込み機構は、神経活動に依存したホスホリパーゼA2の活性化とそれによる内因性アラキドン酸遊離により促進され、細胞外から投与された外因性アラキドン酸によっても同様に促進された。プルキンエ細胞でのホスホリパーゼA2の活性化は膜の脱分極に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇によること、さらにこのとき放出されたアラキドン酸による興奮性アミノ酸取り込み機構の促進はその後長時間にわたって持続することもあわせて報告する。これらの事実は中樞神経系においてホスホリパーゼA2及びアラキドン酸が情報伝達因子として神経活動の制御に深く関わっていることを示唆している。

009 1A S2-2

シクロオキシゲナーゼ2：発熱のブラックボックスを中心として

松村 潔^{*}、曹 春渝^{**}、中館和彦^{**}

(^{*}科学技術振興事業団サブフェモトモルバイオ認識プロジェクト、^{**}大阪バイオサイエンス研究所第3部門)

プロスタグランジンE₂(PGE₂)は発熱の脳内メディエーターである。発熱時にPGE₂が脳のどこで産生され、どこに作用するかを明らかにすることは、免疫系から神経系への情報伝達機構を明らかにする上で重要である。我々はPGE₂生合成の律速段階となっている酵素、シクロオキシゲナーゼ2(COX-2)に注目して研究を行い、以下の結果を得た。

(1) ラットにおいて細菌内毒素(LPS)腹腔内投与による発熱はCOX-2阻害剤では完全に抑制された。

(2) *In situ* hybridization法により脳内COX-2mRNAの局在を検討した結果、非処置群および対照群(生理食塩水腹腔内投与)では終脳神経細胞の一部にCOX-2mRNAが発現していたが、LPS投与群ではそれに加えて脳血管に新たなCOX-2mRNAの誘導が見られた。(3) 脳血管COX-2mRNAはLPS投与後1時間以内に発現し、2.5時間から4時間でピークに達し、7時間後には消失した。この時間経過は発熱のそれと対応していた。(4) 脳血管COX-2mRNAは発熱の結果二次的に誘導されたものではなかった。

(5) 発熱の程度とCOX-2mRNAを発現した脳血管の数は正の相関を示した。(6) ウレタン麻酔により神経細胞のCOX-2mRNAレベルを低下させた状態でも、LPSにより脳血管COX-2mRNA誘導と発熱が起こった。(7) LPS以外の発熱物質(サイトカイン類)の腹腔内投与、あるいは発熱物質の脳室内投与でも脳血管にCOX-2mRNAが誘導され、発熱が起こった。(8) COX-2mRNAの誘導に対応してCOX-2蛋白が脳血管に発現した。(9) 2重免疫組織化学および免疫電顕法により内皮細胞が脳血管におけるCOX-2発現部位であることが明らかになった。

これらの結果は脳血管に誘導されるCOX-2と発熱の間の密接な関係を示し、脳血管が発熱に関与するPGE₂産生部位であることを強く示唆する。さらに一般化すると、この結果は免疫系の情報が神経系に作用する際に、脳血管内皮細胞が両システム間のインターフェースとして機能していることを示唆する。

010 1A S2-3

プロスタグランジンD合成酵素 (β -Trace) の遺伝子工学

裏出 良博¹、江口 直美^{2,3}、金岡 禎秀¹、
Carsten T. Beuckmann¹、Dmitry Y. Gerashchenko¹、
早石 修¹ ¹大阪バイオサイエンス研究所・
分子行動生物学、²科学技術振興事業団・さきがけ研究21、³京都大学医学部高次脳形態

プロスタグランジン (PG) D_2 は哺乳類の中樞神経系において産生される主要なPGであり、睡眠誘発や痛覚反応の修飾などの多彩な中枢作用を示す。我々は中枢神経系におけるPGD₂の生合成反応を触媒するリポカリン型PGD合成酵素をラット脳より精製し、その免疫組織化学的な細胞局在を調べ、さらにラット・ヒト・マウスの本酵素cDNAと遺伝子のクローニングを行った。本酵素は、進化論的に疎水性生理活性物質の輸送を司る分泌蛋白質で構成されるリポカリン遺伝子ファミリーに属する唯一の酵素蛋白質であり、免疫組織化学およびin situ hybridizationの結果、主としてクモ膜と脈絡叢およびオリゴデンドログリア細胞において産生されることが証明された。さらに、クモ膜や脈絡叢において産生されたPGD合成酵素は、脳脊髄液の主要蛋白質である β -Traceとして分泌されることが判明した。従って、PGD合成酵素およびその反応産物であるPGD₂は脳脊髄液を介して中枢神経系の隅々に輸送され、液性の神経調節因子として中枢神経系の機能維持に関与していると考えられる。本酵素の基質であるPGH₂の合成を司るシクロオキシゲナーゼは膜結合蛋白質であり、水溶液中で容易に分解するPGH₂が脳脊髄液に存在する可能性は低いから、脳脊髄液におけるPGD合成酵素(β -Trace)の生理機能の詳細は不明である。しかし、本酵素が他のリポカリン蛋白質と同程度の親和性(K_d=~80 nM)をもってall-trans- or 9-cis-retinoic acidを結合することから、脳血管バリアー内でのレチノイド輸送蛋白質として機能している可能性がある。現在、本酵素遺伝子ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを用いて、本酵素の機能をPGD₂の生合成酵素および脂溶性生理活性物質の輸送蛋白質としての両面から解析を進めている。

011 1A S2-4

プロスタノイド受容体の分子生物学とノックアウトマウス

牛首文隆、杉本幸彦^{*}、市川厚^{*}、成宮 周 (京都大学医学部薬理学教室、^{*}同・薬学部衛生化学教室)

プロスタノイドはプロスタグランジン(PG)とトリノキサン(TX)より成る生理活性物質である。これらの物質は刺激に応じて産生放出されたのち、標的細胞表面上の各々に特異的な受容体を介して作用を発揮する。これらはPGD、PGE、PGF、PGI、TXAに対する受容体であるDP、EP、FP、IP、TPより成る。また、EPにはEP₁、EP₂、EP₃、EP₄の4種類のサブタイプが存在する。我々は、これら8種類のマウス・プロスタノイド受容体の一次構造を明らかにし、プロスタノイド受容体がG蛋白質と関連し7回膜貫通構造を持つ7ドメイン型受容体に属すること、また部分的に共通のアミノ酸配列を保存しており受容体サブファミリーを形成することを解明した。

さらに、プロスタノイド受容体遺伝子の構造を解析した結果、受容体遺伝子が一般的に3個のエクソンより構成されていることや、その調節領域の構造を解明した。また、TPとEP₃では3'側に位置するエクソンのスプライシングの差によってそのカルボキシル末端のみ構造を異にする複数のアイソフォームが生成するが、これらが共通のリガンド結合特異性を有しながらも、異なった情報伝達経路を持つことを明らかにした。

一方、プロスタノイド受容体のリガンド結合領域を解明するために、IPとDPのキメラ受容体を用いた解析を行った。その結果、IPでは第3膜貫通領域がPGの5員環を認識し、DPでは第6、第7膜貫通領域がPGの α 鎖の二重結合を認識することを見出した。

さらに我々は、生体におけるプロスタノイドの生理的・病態生理的な役割を解明するために受容体欠損マウスを作成した。PGF受容体欠損マウスでは、分娩の欠如を認めた。この原因を詳細に解析し、分娩は黄体の退縮による子宮でのオキシトシン受容体の発現を介して誘発されるが、この黄体退縮にFP受容体が必須なことを解明した。PGI受容体欠損マウスでは、血管内皮障害による血栓形成モデルを用いた解析により、強い血栓傾向が認められた。この結果、PGIが局所の障害に起因する血栓形成において重要な因子であることを明らかにした。さらに、酢酸ライジングやカラゲニン浮腫を用いた解析により、炎症やそれに伴う疼痛においてPGIが重要な役割を果たすことを解明した。現在、他のプロスタノイド受容体欠損マウスの解析を行っており、これらの解析により、プロスタノイドの持つ生体内での役割が解明されることが期待される。

012 1A S2-5

新規中枢神経系特異的プロスタサイクリン受容体とPET研究

渡辺恭良^{1,2}、鈴木正昭^{1,3}、渡辺由美子^{1,2}、尾上浩隆^{1,2}、野依良治⁴、Bengt

Långström^{1,5}

¹科学技術振興事業団・バイオ認識プロジェクト、²大阪バイオサイエンス研究所・神経科学、³岐阜大・工・応用化学、⁴名大・理・化学、⁵ウプサラ大・PETセンター

最近、我々は、中枢神経系 (CNS) に特異的に発現しているプロスタサイクリン (プロスタグランジン I₂) 受容体を見出した (H. Takechi et al., J. Biol. Chem., 271:5901, 1996)。ポジトロンエミッショントモグラフィー (PET) 用分子プローブ開発途上に、このCNS型サブタイプ (I P₂と命名) に特異性の高い化合物15R-16-(m-tolyl)-17,18,19,20-tetra-nor-isocarbacyclin (15R-TIC) (M. Suzukiet al., Angew. Chem., 35:334, 1996) が得られた。この15R-TICとその光学異性体 15S-TIC を ³H 標識し、オートラジオグラフィーにより脳内局在を検討した結果、I P₂は、大脳皮質、ことに、帯状回・梨状葉、海馬の歯状回・CA1・CA3領域、線条体、外側中隔核、視床の脳室周囲諸核・正中核・内側膝状体・外側膝状体、背側蝸牛核に高く、末梢型のI P₁の局在する延髄孤束核や三叉神経脊髄路核には [³H]15R-TIC は殆ど結合しない。また、スキャッチャードプロット解析の結果、 [³H]15R-TIC に対しては、高親和性成分 (K_d < 1 nM) と中親和性成分 (K_d、約 30 nM) の2成分が存在するが、 [³H]15S-TIC では、中親和性成分のみしか見いだせなかった。このI P₂の細胞局在を線条体の細胞種特異的破壊実験にて検討したところ、線条体内の神経細胞に局在することが示唆された。一方、海馬スライスを用いたCA1領域の電気生理実験から、I P₂に比較的亲和性の高い化合物が、興奮性後シナプス電位を増加させることを発見し、このI P₂が何らかの機能的役割を果たしていることがわかった。この15R-TICの¹¹C標識にも成功し、正常アカゲザルを用いてPET研究を行った。標識リガンドのカルボキシ末端のメチルエステルが良く脳に到達し、集積画像では、ラットで得られたインビトロオートラジオグラフィーの結果同様、視床に高い取り込みが見られた。PETでの受容体結合としての特性試験の結果と合わせ報告する。

013 1A S2-6

痛みとプロスタグランジン：アロディニアの発症機構

伊藤 誠二 (関西医科大学医化学教室)、南 敏明 (大阪医科大学麻酔科学教室)

炎症や神経因性疼痛に伴う過敏状態として侵害性刺激に対する感受性の亢進による痛覚過敏反応と非侵害性触覚刺激の痛覚への感覚様式の変化として特徴づけられるアロディニアがあり、その発症機構が注目されている。最近、その発症機構として末梢組織からの入力インパルスの増大と共に、脊髄における反応性の亢進が重要であると考えられている。

非ステロイド性消炎鎮痛剤の作用がプロスタグランジン (PG) の合成阻害であることから、炎症部位での痛みに対するPGの関与がよく知られている。我々は、マウス髄腔内に投与したPGの痛覚に及ぼす影響を詳細に検討して、PGが末梢組織だけでなく、中枢神経系においても痛覚伝達に重要な役割を示すことを明らかにした。PGD₂とPGE₂が侵害性熱刺激に対して痛覚過敏反応、PGE₂とPGF_{2α}が非侵害性触覚刺激に対してアロディニアを誘発することをみだした。これらPGによるアロディニアはグルタミン酸-酸化窒素系が伝達物質として介在することを示した。

最近、我々がウシ脳より単離した17個のアミノ酸からなる新規オピオイドペプチド・ノシセプチンは脊髄後角の第I、II層に多く存在し、髄腔内投与により痛覚過敏反応とアロディニアを誘発することを明らかにした。ノシセプチンによる痛覚過敏反応とアロディニアはグリシンを同時投与することにより抑制された。以上の結果、アロディニアの発症機構には、グルタミン酸を介する興奮性の亢進とグリシンの興奮抑制作用の脱抑制の少なくとも2つの機構が存在することが示唆された。

PGD₂はマウスをはじめ多くの動物種の脳で最も多く産生されるPGとしてよく知られている。PGD₂をPGE₂あるいはノシセプチンと同時に投与すると、いずれのアロディニアの誘発も抑制した。一方、髄腔内投与したPGD₂受容体拮抗薬はそれ自体でアロディニアを誘発し、PGD₂を同時投与するとアロディニアの誘発が抑制された。生理的条件下では触覚刺激は痛みとして感じられないことから、以上の結果は、脊髄レベルにおいてPGD₂がアロディニアの発症に重要な役割をする可能性を示唆している。

014 2A S3-1

New perspectives on the physiology and function of glial cells

Bruce R. Ransom

Professor and Chair, Dept of Neurology,
Washington University

Glial cells occupy half the volume of the brain and outnumber neurons 10 to 1. Although glia can be studied independently from neurons, and vice versa, this reductionist approach will not reveal how the brain works. To understand this, information is needed about how glia and neurons interact with one another across their common extracellular space (ECS). Ions, metabolites and other molecules, including neurotransmitters, can mediate these interactions. Because the ECS is very small, neuronal activity causes increases in extracellular K^+ concentration ($[K^+]_o$) which can disrupt brain function and lead to neuronal damage, if unregulated. Glia, especially astrocytes, help regulate $[K^+]_o$ by net accumulation of this ion, which is then released as $[K^+]_o$ diminishes. A special isoform of the Na^+ pump which is activated by small increases in $[K^+]_o$, helps astrocytes take-up K^+ . The increase in $[K^+]_o$ also acts as an ionic 'signal'. It depolarizes astrocytes, causing an influx of $NaHCO_3$ because of enhanced Na^+/HCO_3^- cotransport. In a feedback-like manner, this leads to extracellular acidification that can reduce neuronal excitability. Astrocytes and neurons can interact metabolically. Astrocytes have very active anaerobic metabolism and export large amounts of lactate to the ECS. This lactate can be taken up by neurons and used as an effective energy substrate; in fact, some neurons may prefer glial lactate for energy production. When glucose is in short supply, astrocytes can breakdown their glycogen stores (neurons contain no glycogen) and continue to provide lactate to neurons via the ECS. New knowledge about glial cells and how they interact with neurons is enhancing our understanding of the pathophysiology of diseases such as epilepsy and stroke.

015 2A S3-2

ミクログリア活性化の分子機構

今井嘉紀、大澤圭子、金澤裕子、高坂新一

(国立精神・神経センター神経研究所

代謝研究部)

ミクログリアは中枢神経系のグリアの一種であるが、その生理的役割は明らかではなかった。近年、活性化されたミクログリアがさまざまな因子を分泌することにより神経保護作用を示すことが明らかにされた。一方、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病などの病態時には細胞障害性を示すという報告もあり、ミクログリア活性化の分子機構の解明が望まれている。

我々は、最近、ミクログリアにのみ特異的に発現しており、細胞の活性化と何らかのかかわりがあると考えられる、新規のカルシウム結合たんぱく質遺伝子 *ibal* (ionized calcium binding adapter molecule 1) を単離した。コードされる Iba1 たんぱく質は分子量約17,000で二つのEFハンド構造を有しているが、EFハンド以外の部分はカルモジュリン等既知のカルシウム結合たんぱく質とは相同性はなかった。また、Iba1 たんぱく質が実際にカルシウム結合能をもつこと、細胞内でセリン残基がリン酸化されていることが明らかとなった。

一方、ラット片側顔面神経切断の系を用い、免疫組織化学的に Iba1 の発現変動について解析を進めた。切断三日後では、切断側の顔面神経核周囲に存在する活性化ミクログリアに一致して、強い Iba1 のシグナルを得た。このシグナルは切断一週間目で頂点に達し、一月目までにゆるやかに減少した。以上の結果は Iba1 たんぱく質がミクログリアの活性化、あるいは細胞の機能調節に何らかの役割を担っていることを示唆している。

016 2A S3-3

ミクログリアと神経細胞障害

中村洋一, 司秋生, 柳瀬尚人, 片岡喜由
(愛媛大学医学部第一生理学教室)

アルツハイマー病や虚血性神経細胞障害において、ミクログリアの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可能性がある。いかなる機構でミクログリアの活性化がおこるのか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を変化させる血清因子を検索した。

PMA 刺激による O_2 -産生は正常ラット血清により濃度依存的に増強され、0.1%の低濃度ではほぼ最大増強がみられた。血清の他に数種類の蛋白質を試した中で、ウシ及びヒト血清アルブミンに同様な効果があった。また血漿由来や精製度の異なるアルブミンを試したがどれも同程度の効果を持っていた。市販最高純度のアルブミンを用いて濃度依存性を測定すると約 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で最大増強が見られ、この増強効果がアルブミンそれ自身の作用であることが示唆される。

NO 産生もラット血清の存在下で大幅に増強され、0.1%血清により LPS に対する EC_{50} が 300 から 1 ng/ml に低下した。同様に TNF α 産生もラット血清の存在下で大幅に増強された。これら 2 つの増強作用は血清をトリプシン処理や熱処理することにより容易に消失し、アルブミンにはこれらの増強作用はなかった。

TNF α は神経細胞死を導くサイトカインであり、 O_2 -は NO と反応し過酸化亜硝酸という細胞毒性のより強い化合物に変化することが知られている。本研究の結果は、中枢神経障害の過程で血液脳関門から漏出する血清成分のうち、アルブミンはミクログリアの O_2 -産生を増強し、アルブミン以外のある成分は NO/TNF α の産生を増強することにより神経細胞障害を増悪している可能性を示唆する。

017 2A S3-4

ミクログリアの脳に対する高親和性と脳特異的遺伝子導入への応用

澤田 誠
(藤田保健衛生大学総医研病態生化学、
科学技術振興事業団さきがけ研究21)

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食食細胞として働くほか、脳内サイトカインネットワークの中心的細胞である。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。しかし最近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の脳に対する高親和性は単に分化生育する環境が異なることによる性質の違いではなく、細胞起源そのものが異なる可能性を示していると考えられる。

さらに精製ミクログリアからウイルス遺伝子などを使わずに不死化細胞株を単離することに成功したので、培養下で外来遺伝子を導入し、これを末梢血管投与して脳に目的遺伝子を発現させることができるようになった。

現在までのところ、細胞を脳循環動脈に注入しても末梢静脈（尾静脈）経由でも脳に細胞移入でき、さらに ex utero での胎児脳への細胞導入が可能であることがわかった。

この方法は脳の構築や機能発現のメカニズムの解明において非常に有力な手段となりうる。それは正常で脳に存在する細胞を坦体に用いること、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ティングできることなどの多くの利点をもち、また、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、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も応用できると考えられる。

018 2A S3-5

細胞周期とシグナル伝達によるグリア細胞骨格のリン酸化

稲垣直之、稲垣昌樹

(愛知県がんセンター研究所・生化学部)

細胞は細胞分裂に際して、また外界からの刺激に反応してその細胞骨格や形態をダイナミックに変化させる。細胞骨格を形成する主要成分としてアクチンフィラメント、微小管、そして中間径フィラメントがあり、グリア細胞の中間径フィラメントはビメンチンとグリア線維酸性蛋白質 (GFAP) から構成される。

我々は、試験管内の実験で、ビメンチンとGFAPが様々なリン酸化酵素によりリン酸化を受けると、電子顕微鏡レベルでフィラメント構造の変化が起こることを示した。さらに、ビメンチンとGFAPの各種リン酸化酵素によるリン酸化部位を同定し、各部位のリン酸化を認識するモノクローナル抗体群を作製した。そしてこれらの抗体群を用いて、細胞内において多彩なリン酸化酵素によってビメンチンやGFAPのリン酸化が起こることが明らかとなった。

細胞分裂前期において、グリア細胞質全域のビメンチンSer55がcdc2キナーゼによってリン酸化された。またこのリン酸化を認識するモノクローナル抗体をもちいて、発生期脳における分裂グリア細胞の分布が明らかとなった。細胞分裂後期においてグリア細胞の分裂溝 (Cleavage furrow) に限局してGFAPのThr7、Ser13とSer34が未知のリン酸化酵素によってリン酸化された。この酵素の同定を行った結果Rho-キナーゼである可能性が示唆された。

グリア細胞表面のプロスタグランジン受容体刺激で発生したカルシウムシグナルにより、カルシウム/カルモデュリン依存性 (CaM) キナーゼIIが活性化されビメンチンSer82がリン酸化された。またカルシウムシグナルとビメンチンリン酸化の細胞内分布は、細胞外刺激の強さや方向によってダイナミックに変化した。

このようなデータからグリア細胞の中間径フィラメントは、細胞周期やシグナル伝達に伴いさまざまなリン酸化酵素により時間的・空間的にダイナミックなリン酸化をうけ、巧妙にその細胞内構築が制御されていると考えられる。

019 2A S3-6

グリア細胞の発生・分化機構

馬場 広子、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)

アストロサイトは中枢神経系の主要なグリア細胞として様々な働きを担っている。これらの中には1) 胎生期脳において神経細胞の移動をガイドする、2) グリコーゲンを貯留し、脳内エネルギー代謝に関与する、3) シナプス近傍に存在し、トランスマッターの取り込みやシナプス伝達効率の調節に関与する血液脳関門を形成する、などの多種多様な機能が知られている。これらの多様性を持つアストロサイトが同一起源の細胞であるのか否かは明らかではない。我々は各々の異なった機能と関連した各種マーカーを用いて、アストロサイトの細胞系譜を明らかにすることを試みている。1) ^3H UDP-galを用いた細胞のラベル。我々は ^3H UDP-galが放射状グリアを含む一部のアストロサイトに取り込まれ、細胞内でグリコーゲンとして蓄積されることを見出し、グリコーゲン貯蔵能を持つアストロサイトの系譜の良い指標となることを見出した。2) 脳特異的グリコーゲン合成酵素 (GS) の発現。GSは分化の早い時期からアストロサイトに発現することを明らかにした。3) グルタミン酸トランスポーターの一種であるGLASTの発現。GLASTは胎生期における大脳アストロサイトおよび生後小脳にみられるバグマングリアに特異的に存在し、グルタミン酸のアップテイク能を持つアストロサイトの検出が可能である。4) GFAPプロモーターの活性化。GFAP蛋白質は成熟したアストロサイトのマーカーとしてよく用いられる。我々はレポーターとしてLacZを用いたGFAPプロモーターの活性化の検討から、GFAPプロモーターの活性化を指標とすることで免疫染色に比較してアストロサイト系譜の細胞を数日間早く同定することが可能なことを明らかにした。これらのいろいろな機能を反映した早いマーカーを組み合わせることによって、アストロサイトにおける多様な機能分化が各々異なる細胞の系譜を反映しているのか、あるいは同じ起源を持つアストロサイトが周囲の環境の違いによって各々異なる機能を獲得するのかを検討しているので報告する。

020 2B S4-1

神経細胞の分化を制御するNotch情報伝達系とその構成因子Deltex

松野健治^{1, 2}、伊藤美紀子²、岸憲幸¹、松野康子³、
Spyros Artavanis-Tsakonas³、岡野栄之^{1, 2}

(1、大阪大学医学部神経機能解剖学 2、科学技術振興事業団、CREST/JST 3、Department of Cell Biology and Biology, HHMI, Yale University)

Notch レセプターを介する情報伝達系 (Notch 情報伝達系) は、細胞間相互作用による細胞運命の決定に関与している。Notch レセプターとそのリガンドはともに単一の細胞膜貫通ドメインを有する膜タンパク質であり、情報伝達には細胞間の接触が必須であると考えられている。Notch 情報伝達系を構成する因子は動物界で広く保存されており、Notch 情報伝達系の神経細胞分化調節への関与が、無脊椎動物から哺乳類まで広く認められる。

ショウジョウバエ *deltex* 遺伝子は Notch 情報伝達系を正に制御しており、その遺伝子産物は、Notch レセプター細胞質ドメインの Ankyrin 様リピートに結合する。*deltex* 遺伝子の機能喪失突然変異では、過剰な外部感覚器の形成、単眼の喪失が起こる。Deltex タンパク質をショウジョウバエの翅で異所性発現すると、翅のパターン形成に異常が起こり、外部感覚器が異所的に形成された。これらの結果は、*deltex* 遺伝子が、翅のパターン形成を介して外部感覚器の配置を制御していることを示唆している。

Notch 情報伝達系はきわめて多面的機能を持ち、Notch 情報伝達系構成因子のほとんどは、神経細胞と非神経細胞の区別なく機能しているらしい。Notch 情報伝達系の未知の構成因子を同定するために、ショウジョウバエ翅の *deltex* 遺伝子の表現型を指標に、遺伝的 modifier スクリーンを行った。得られた modifier 遺伝子の一つは、感覚器母細胞で発現しており、神経細胞分化との関係が示唆された。

021 2B S4-2

ゼブラフィッシュにおける脳胞発生の制御
～中脳・小脳発生における遺伝子カスケード～
岡本 仁¹、菊池 裕¹、巽 良子^{1, 2}、徳本美佳³、植村慶一¹ (慶應大学・医・生理学¹、北里大学・理・生物科学²、基礎生物学研究所・細胞情報部門³)

LIM/ homeodomain 型と総称される転写制御因子群は、発生過程の神経細胞における個性決定の最終段階で、重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。我々は、ゼブラフィッシュ胚の中脳神経系において、眼と視蓋に特異的に発現する *Islet-3* に着目し、その機能解析を行ってきた。*Islet-3* の LIM domain のみを高発現させ、この domain と結合する細胞内の共役因子を吸収することにより、*Islet-3* の機能阻害実験を行った。その結果、中脳・後脳の境界部 (小脳の原基) の形成に必要な *wnt-1*, *engrailed-2*, *pax-2* の発現が境界部でのみ消失し、小脳の原基の欠失が観察された。

今回我々は、*Islet-3* の機能をより明確にするため、*Islet-3* の活性化実験を行った。*Islet-3* の LIM domain に point mutation を導入し homeodomain を常に活性化させると共に、発現時期を制御するため glucocorticoid receptor との融合タンパクとなる遺伝子構成 (*Isl-3(m3)GR*) を作製した。glucocorticoid receptor との融合タンパクは、dexamethasone が結合することにより活性化される。*Isl-3(m3)GR* の mRNA を一細胞期のゼブラフィッシュ胚に微量注入し、体軸形成後 (受精後 10 時間) に dexamethasone を添加した。その結果、注入胚の約 60% において中脳の肥大が観察された。中脳が肥大した胚における遺伝子発現の変化を調べるため、*wnt-1* をプローブにした in situ hybridization を行った。dexamethasone 添加後 4 時間で、*wnt-1* mRNA の発現が全身で上昇し、12 時間後には全身での発現が消失して、中脳での dorsal midline の発現が拡大していた。この結果より、*Islet-3* は *wnt-1* の発現調節に密接に関与していることが明らかとなった。

022 2B S4-3

神経発生過程における細胞運命決定機構
阪大・医・神経解剖学 岡野栄之

近年の研究の進展により、神経発生の初期過程を制御する遺伝子産物の構造と機能が、無脊椎動物と脊椎動物の間で種間を超えて広く保存されていることが明らかになってきている。そのため、我々ヒトの脳・神経系を理解する原型として、より単純な神経系を有し、強力な遺伝学的解析手法を駆使することのできるショウジョウバエや線虫を用いた神経発生を制御する新規遺伝子の探索や機能解析がきわめて注目されている。

我々は、神経発生を制御する新規遺伝子産物を同定する目的で、ショウジョウバエのトランスポゾンであるP-エレメントの挿入変異を行い、神経発生過程に異常を示す新規のミュータントの分離に成功している。これらの責任遺伝子の単離と機能解析の結果から、我々が同定した遺伝子産物は、1.細胞間相互作用を介して細胞の運命決定に関与するもの;2.細胞自律的に働き細胞の運命決定に関与するものの2つに大別することができる。前者の遺伝子産物の例として、EGFモチーフを有し、細胞分化に抑制的に働くArgos遺伝子産物があげられる。Argosは、EGF受容体の活性化およびそれに引き続くRas/MAPKシグナルを抑制し、神経細胞の分化を抑制するとともに、ショウジョウバエ複眼においてプログラム細胞死を正に制御することが明かとなった。後者の遺伝子産物の例として、神経系に強く発現するRNA結合蛋白質であるMusashiがあげられる。ショウジョウバエmusash変異体は、末梢神経系外感覚器の前駆細胞の非対称性分裂に異常を示す。トランスジェニックフライを用いた表現型の回復を指標とした構造機能相関の検討より、この外感覚器の前駆細胞の非対称性分裂は、Musashi蛋白質の標的RNAへの結合に依存していることが明かとなった。musash遺伝子産物の構造と発現パターンは、種間（線虫、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒト）を超えて保存されており、特に脊椎動物の発育期の神経系においては、神経幹細胞/前駆細胞のよいマーカーであり、その非対称性分裂と関連した局在を示す。脊椎動物Musashiの機能解析に関しては、マウスを用いて、KOマウスの作成、トランスジェニックマウスによる異所性発現による個体レベルでの解析と、in vitro selection法による下流標的RNAの同定を行っている。さらに、本シンポジウムでは、我々の同定した新規遺伝子および関連遺伝子の神経高次機能の解析への応用に関しても議論したい。

023 2B S4-4

拡散性因子による神経回路網形成の制御

村上富士夫、白崎竜一

(大阪大学大学院基礎工学研究科・脳科学講座)

脳における神経回路形成の初期過程では、成長円錐は極めて複雑な環境の中をのびてゆく。のびはじめた成長円錐がまずはおこなわなくてはならないのは、左右対称な神経管の中で同側もしくは対側の標的に向かって誤りなく進んで行くことである。最近このような成長円錐ガイドに、拡散性軸索誘引因子と反発因子が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。

我々はコラーゲンゲルを用いた培養系を用いて、ラット胚神経管の腹側正中中部にある底板から放出される拡散性因子の作用によって、小脳の出力細胞である小脳核ニューロンの成長円錐が、その中間ターゲットである腹側正中線部に導かれることを見いだした。また後脳や中脳の翼板に存在する交叉性神経回路を形成する多様なニューロンが、やはり底板から放出される拡散性因子の作用によって正中線に導かれることを見いだした。さらに興味深いことに、底板は拡散性軸索反発活性をも有し、これが底板から遠ざかるように軸索を伸ばすニューロン群に対して反発活性を示し、非交叉性神経回路の形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。その分子機構についても解明が進みつつあり、ラミニン様ドメインを持つ蛋白質ネトリンが、底板の活性を担う分子の一つであることが示された。ネトリンの受容機構についても次第に明らかにされつつある。誘引因子によって正中線までガイドされた成長円錐は拡散性因子の濃度勾配に逆らって伸長を行わなければならない。我々は成長円錐が底板を通過するとき拡散性軸索誘引因子に対する感受性を消失する事を見いだした。

このように脳は誘引性、反発性ガイド因子、そしてこれらの因子に対する反応性の変化などを組み合わせることによって神経回路網形成の制御行われているものと思われる。

024 2B S4-5

ショウジョウバエ性行動制御の解剖学的基盤

山元大輔

(科技振・山元行動進化プロジェクト/三菱化学生命研)

神経生物学の一つの目標は、動物行動の発現メカニズムを、個体、細胞、分子の諸階層を貫く因果性として抽出することである。その方法としてわれわれはフォワード・ジェネティクスを選び、特異的行動異常を引き起こす突然変異体の作出を試みた。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の性行動を対象として 2000 の P 因子挿入系統をスクリーニングし、8 つの突然変異体を分離した。雄が雌に向かって全く性行動をとらず、かわって別の雄に求愛する *satori* (*sat*)、求愛歌のパターンが異常になる *croaker* (*cro*)、雌に激しく求愛するが、滅多に交尾に至ることのない *platonic* (*plt*)、交尾の持続時間が不規則でしかも反復的に交尾をする傾向のある *flickle* (*fic*) と *okina*、交尾終了時に生殖器の連結解除に困難の生ずる *lingerer* (*lig*)、これら 6 系統が雄側に異常のある変異体である。一方、雌が極端に強い拒否行動をとるために交尾が稀にしか成立しない変異体として、*spinster* (*spin*)、*chaste* (*cht*) を分離した。現在これら一連の変異について原因遺伝子のクローニング、発現解析、及び正常型 cDNA の強制発現による変異体表現型の救済 (遺伝子治療) をすすめている。

cDNA の構造解析により、*fru* 座は BTB ドメインと Zn-フィンガーモチーフを持つ転写因子様のタンパク質をコードし、雌特異的転写産物の 5' 側非翻訳領域には、性決定遺伝子産物、Transformer (*Tra*) の結合配列が存在することが分かった。そして *fru* mRNA は、脳の一部の細胞に局在している。たとえば嗅情報の一次処理中枢である触角葉に、*fru* 発現細胞の集塊が認められる。

雄の触角葉の一部に *Tra* 雌型産物を発現させてその部分のみを雌化すると、この雄は雌のみならず雌に対しても求愛するようになることが知られている。*Tra* のこの作用を直接媒介しているのが触角葉内の *fru* 発現細胞である可能性を考え、現在その細胞の同定をめざしている。

これまでショウジョウバエの性は、*Sxl*→*Tra*+*Tra-2*→*Dsx* と流れる遺伝子カスケードにより、一義的に決定されと考えられてきた。確かにほぼ全ての性徴は *Sxl* と *Tra*、*Tra-2* に依存する。しかし *Dsx* については、少なくとも行動とローレンス筋の形成に関する限り、その性決定には寄与しない。この *Dsx* 非依存のプロセスは共に *fru* 変異によって異常の生ずるものである。おそらく性決定カスケードは *Tra* の下流で二手に分かれ、一方は *Dsx*、他方は *Fru* を介して雄化、雌化を導くのであろう。

現在さらに、*sat* のサブレッサー変異を探索することによってシグナル伝達系の解明を試みつつあるので、こうした研究の現状も紹介して、行動遺伝学の展望を論じたい。

025 2B S4-6

神経回路形成と脳高次機能の接点

三品 昌美

(東大院・医・薬理/分子神経生物)

脳は長い生命進化の頂点にあり、ハードとソフトが渾然一体となったシステムである。グルタミン酸受容体は中枢における興奮性シナプス伝達に中心的役割を果たしている。我々は、脳内分布、脳の発達過程での発現、機能特性および活性調節を異にする 4 種類の ϵ サブユニットが、NMDA 型グルタミン酸受容体チャネルの機能的多様性を決定しており、 $\epsilon 1$ と $\epsilon 2$ サブユニットがシナプス可塑性に重要であると推論した。

この作業仮説を検証し、同時に脳・神経系の可塑性および記憶・学習の分子機能を探索していくために、標的遺伝子組換え法を用いてグルタミン酸受容体チャネルの各サブユニットを欠損したマウスを作成した。 $\epsilon 1$ サブユニット欠損マウスでは、海馬におけるシナプス伝達の長期増強が減少し、水迷路学習能力の低下を認めた。 $\epsilon 2$ サブユニット欠損マウスは、哺乳反射が消失し、三叉神経核においてヒゲ知覚神経に対応するバレル構造の形成が認められず、シナプス伝達の長期抑圧が検出されなかった。また、小脳プルキニエ細胞に特異的に発現するグルタミン酸受容体チャネル $\delta 2$ サブユニット欠損マウスは運動失調を示し、平行線維とプルキニエ細胞間のシナプス長期抑圧が欠失していることを明らかにした。さらに、プルキニエ細胞において平行線維シナプス数の減少と登上線維の多重支配が観察されることを見出した。

グルタミン酸受容体サブユニットが、シナプス可塑性とシナプス形成に関与し、両者に共通の分子的基盤となっていることが明らかとなった結果を踏まえ、脳・神経系の形成と記憶・学習の接点について論じたい。

026 3A S5-1

動物モデルと先天性糖鎖異常

鈴木邦彦

ノースカロライナ大学 医学部 神経科学センター

糖鎖はしばしばそれを含んでゐる糖蛋白、糖脂質、ムコ多糖などの生物学的機能に重要な役割をはたしてをり、その先天性代謝異常によっておこる疾患が数多く知られてゐる。ヒトに起こるこれらの遺伝性疾患は稀なので対応した動物モデルが存在する場合には疾患発現機序、治療などの研究に役立ってゐる。しかしヒトの疾患と同様に自然に起こる動物モデルはやはり稀なので最近 homologous recombination と embryonic stem cell を組み合わせた方法によって人工的マウスモデルを作ることが広く行なはれるやうになってゐる ("knockout mouse")。例へばヒトで知られてゐる スフィンゴリピドーシスの殆どすべては既にマウスで人工的に作られた。我々の研究室でも遺伝性の β -galactosidase とスフィンゴリピド活性蛋白欠損症のマウスを作り、ヒトの疾患と極めて似たモデルになることを報告した。これらの既にヒトでの存在が知られてゐる疾患のモデルも重要であるがヒトでは知られてゐない、又はヒトでは起る可能性が殆ど無い疾患を "knockout" マウスで作ることができるのはさらに重要なことではないか、と思はれる。この方法によって遺伝子の機能、他の遺伝子との関連を調べたり、1つ以上の遺伝子を同時に不活性化したりすることが出来る。このアプローチの1つの例として我々の最近の UDP-gal:ceramide galactosyltransferase (CGT) のノックアウトマウスがあげられる。CGT 活性の無いマウスはミエリンに特異的なガラクトセレブロシドを合成できないだけでなく、サイコシン、monogalactosyldiglyceride, 1-alkyl, 2-acyl, monogalactosylglycerol も合成できないのでこれらのガラクトリピドを経なくては作れないすべての脂質、例へば sulfatide, seminolipid, GM4-ganglioside, など、が欠損した状態になる。遺伝性CGT欠損症はヒトでは知られてゐないが、このCGTノックアウトマウスはミエリン形成、ミエリン機能、スフィンゴリピド代謝などの解明に役立ってゐる。

027 3A S5-2

先天性糖蛋白質糖鎖不全症候群

山下克子

(佐々木研究所、生化学部)

先天性糖蛋白質糖鎖不全症候群 Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome (CDGS) は、1980年 Jaeken らによって初めて報告された常染色体劣性遺伝疾患であり、我国で12例、世界では約150例の報告がある。本疾患は精神運動発達遅滞、肝機能障害、小脳虫部形成不全、皮下脂肪異常を特徴とし、生化学的には多くの血清糖蛋白質に等電点の高い(シアル酸含量の少ない)分子種が出現することが特徴である¹⁾。我々はトランスフェリンのN-結合型糖鎖の解析によりCDGS-I型では小胞体におけるオリゴ糖・脂質中間体(LLO)からペプチドへの糖鎖転移低下が起こっていることを見出した²⁾。その後、欠損部位の違いに基づき、CDGS-Iはいくつかのサブグループに分類されることが示唆されて来ている。

一つは ^3H -マンノース代謝標識でLLOの低分子化が観察されると同時にマンノース6-リン酸からマンノース1-リン酸への変換がうまく行かないグループで、Jaeken らは患者線維芽細胞のホスホマンノムターゼ活性が正常細胞の0から数パーセントに低下していることを見出した³⁾。また、ホスホマンノムターゼIIの遺伝子上に2ヶ所の変異を確認し⁴⁾、CDGS-Iaと名付けた。

一方、我々は、CDGS-I患者線維芽細胞ではLLOが正常細胞の約半分しか合成されず生合成系に何らかの異常が示唆された。しかし、LLOの糖鎖は $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ まで完成されていたことから、ドリコール合成以前の欠損である可能性が考えられた。細胞周期に従って、 ^3H メバロン酸で代謝標識した細胞ではS期をピークにデヒドロドリコールは患者で常に蓄積し、ドリコールやLLOが患者では常に健常人より低下していたことから、LLO生合成の低下はデヒドロドリコールからドリコールへの還元反応の低下によることが示唆された⁵⁾。

さらに、CDGS-I患者の末梢神経伝達速度の低下、あるいは小脳虫部低形成等の病態生理との関連について考察を加えたい。

- 1) Jaeken, J et al., Clin. Chim. Acta 144, 245 (1984);
- 2) Yamashita, K. et al., J. Biol. Chem. 268, 5783 (1993);
- 3) Vanschaftingen E. et al., FEBS Lett. 377, 318 (1995);
- 4) Matthijs, G. et al., Nature genetics 16, 88 (1997);
- 5) Ohkura, T. et al. 272, 6868 (1997)

028 3A S5-3

Alzheimer 病：アミロイド β 蛋白と
GM1 ganglioside

柳澤 勝彦

(国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部)

アルツハイマー病脳におけるアミロイド β 蛋白 ($A\beta$)蓄積開始の初期機構を解明することを目的に、アルツハイマー病脳、ダウン症脳ならびに連続剖検により得られた高齢者脳の大脳皮質を実験対象にシヨ糖密度勾配遠心分離を行い、得られた画分を用い $A\beta$ に関する詳細な免疫生化学的検討を行った。神経病理学的にびまん性老人斑を多く示す大脳より得られた軽画分中に、 $A\beta_{42(43)}$ のC末端特異的なモノクローナル抗体により認識される $A\beta$ が、びまん性老人斑と量的に相関して検出された。本 $A\beta$ 分子は $A\beta$ のN末側、中間部に特異的なモノクローナル抗体とは反応しない一方、コレラ毒素と強く反応した。びまん性老人斑を多く含む大脳皮質の膜画分を用い各種抗 $A\beta$ モノクローナル抗体による免疫沈降を試みたところ、 $A\beta$ の最N端を認識する抗体による免疫沈降物中に $A\beta$ の反応性およびコレラ毒素結合性を認めた。以上より、アルツハイマー病の初期において $A\beta$ が GM1 ganglioside と複合体を形成することで蓄積を開始していることが考えられた。GM1 ganglioside 結合型 $A\beta$ は強い自己凝集性を示すことから、アルツハイマー病におけるアミロイド形成の“seed”となっている可能性が考えられた。また本 $A\beta$ 分子は正常対照脳には検出されないこと、 $A\beta$ と GM1 ganglioside の細胞内極性輸送系は生理的には互いに異なることから、アルツハイマー病脳においては細胞外アミロイドの形成に先行して、細胞内膜輸送の異常が生じていることが想像された。家族性アルツハイマー病関連分子のアポリポ蛋白E、プレセニリン蛋白がそれぞれ細胞膜組成上重要なコレステロール代謝、輸送小胞形成に関与している可能性が考えられることより、膜輸送の問題は今後アルツハイマー病研究において重要な課題と考えられる。最近 $A\beta$ と GM1 ganglioside との結合は *in vitro* の実験系で確認され、興味深いことに GM1 ganglioside と結合した $A\beta$ は、その2次構造を変化させるとともに両分子の結合により細胞膜傷害が引き起こされることが示された。

029 3A S5-4

「抗糖鎖抗体と免疫性神経疾患」
ー免疫性ニューロパチー：抗糖脂質抗体と臨床型ー
楠 進

(東京大学医学部神経内科)

免疫性ニューロパチーではしばしば血中に抗糖脂質抗体が上昇し、有用な診断マーカーとして利用されている。その中には特定の臨床型との特異的な対応を示すものがある。またあるものは病態に直接関与している可能性がある。

IgM paraproteinemiaを伴う脱髄性ニューロパチーの多くの例ではIgM M蛋白が抗SGPG抗体活性を示す。SGPGはミエリンに局在し、患者末梢神経ミエリンにはIgMの沈着がみられ、抗体の受身移入により脱髄がみられることなどより、抗SGPG IgM M蛋白は脱髄性ニューロパチーの発症因子であると考えられる。

IgG抗GQ1b抗体は、眼筋麻痺・失調・腱反射消失を三徴とするMiller Fisher症候群と眼筋麻痺を伴うGuillain-Barré症候群(GBS)の急性期血中に特異的にしかもほぼ全例に上昇している。GQ1bは動眼神経・滑車神経・外転神経の髄外部分の傍紋輪部ミエリンに局在し、同部への抗体の結合が眼筋麻痺を引き起こす可能性が考えられる。

抗Gal-C抗体は脱髄活性をもつことが報告されているが、GBSの一部の症例に上昇がみられる。マイコプラズマ肺炎を先行感染とするものに多い。

抗GM1抗体および抗GD1b抗体はGBS、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、multifocal motor neuropathyなど多様な病態で上昇がみられる。それぞれを単独に認識するもの以外に、両者の共有する末端のGal-GalNAc基を認識して両者に反応するものがある。一方抗GD1b抗体にはジシアロシル基を認識してGT1b, GD3, GQ1bなどにも結合するものがあり、それらは失調性感覚性ニューロパチーに伴う。GD1bは免疫組織化学的にヒト末梢神経の傍紋輪部ミエリンと後根神経節細胞に局在しており、前者は抗Gal-GalNAc抗体の、後者は抗ジシアロシル抗体の標的となっている可能性がある。ウサギ後根神経節にもGD1bは局在し、ウサギにGD1bを免疫することにより失調性感覚障害性ニューロパチーが作成される。

抗糖脂質抗体は各糖脂質抗原の局在に対応して免疫性ニューロパチーの障害部位を規定する因子であると考えられる。

030 3A S5-5

免疫性ニューロパチー：病原体と神経との分子相同性

結城 伸泰

(獨協医科大学神経内科)

自己免疫性神経疾患ギラン・バレー症候群、フィッシャー症候群の先行感染の病原体として、下痢症の起因菌 *Campylobacter jejuni* が知られている。演者らは、*C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群患者の急性期の血清中に GM1 ガングリオシドに対する自己抗体を見いだした。ギラン・バレー症候群患者から分離された *C. jejuni* のリボ多糖が、GM1 ガングリオシドと共通する[Gal β 1-3 GalNAc β 1-4 (NeuAc α 2-3) Gal β 1-]構造を有することを明らかにした。また、フィッシャー症候群患者の血清中には抗 GQ1b ガングリオシド抗体がみられるが、フィッシャー症候群患者由来の *C. jejuni* のリボ多糖が GQ1b エピトープを有することを示した。*C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群、フィッシャー症候群の発症機序として、GM1、GQ1b 様リボ多糖を有する *C. jejuni* に感染し、抗 GM1 抗体、抗 GQ1b 抗体が産生され、神経系に存在する GM1、GQ1b エピトープに自己抗体が結合し、ニューロンの機能が障害され、発症に至ると考えられる。

参考文献

Yuki N, et al. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 1993;178:1771-1775.

結城伸泰. *Campylobacter jejuni* と自己免疫性神経疾患：ギラン・バレー症候群およびフィッシャー症候群の発症機序. *日本細菌学雑誌* 1995;50:991-1003.

031 3A S5-6

「抗糖鎖抗体と免疫性神経疾患」

—Target antigen の神経内局在—

田井 直

(東京都臨床医学総合研究所・腫瘍免疫)

脊椎動物の脳神経系組織には、多種、多様な糖脂質が大量に存在する。糖脂質は、主に神経細胞の形質細胞膜の表層に局在し、親水性の糖鎖と疎水性の脂質からなる特有な化学構造を有するところから、細胞と細胞との接着、神経突起の延長、シナプス形成、情報伝達、細胞増殖・分化などさまざまな重要な機能に関わる生理活性物質と考えられている。しかし、今日まで脳組織における糖脂質の局在は、十分に理解されていなかった。それは、糖脂質を特異的に認識するプローブが開発されていなかった理由による。我々は、最近、精製糖脂質やネオ糖脂質を免疫原とする抗糖鎖特異マウス・モノクローナル抗体の作成法の開発に成功した。本方法を用いて、一連の系統的抗糖鎖特異抗体を樹立し、その結合特異性を解析している。これら抗体の応用研究の一環として、正常成熟ラット脳およびその発達過程における糖脂質の免疫組織学的局在を検討したところ、各糖脂質の発現は、細胞層、神経細胞体、神経線維に特異的であり、発達に伴って大きく変化することを見いだした(1、2)。さらに、ラット脳由来の初代培養神経細胞における糖脂質の発現も特異的である結果を得た(3)。上記知見は、各々の糖脂質が各々の機能を担っていることを示唆し、今後、神経細胞に発現される糖脂質の機能解明に向けての重要な基盤となることが期待される。

本研究は都臨床研・腫瘍免疫の研究員(小谷政晴、川島育夫、小沢秀樹、小倉潔各博士)および都神経研の寺島俊雄、永田 功両博士との共同研究である。

【文献】

- (1) Kotani, M., et al., Differential distribution of major gangliosides in the rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies. (1993) *Glycobiology*, 3, 137-146.
- (2) Kotani, M., et al., Developmental changes in the distribution of gangliosides in postnatal rat cerebellum. (1995) *Brain Res.*, 700, 40-58.
- (3) Kawashima, I., et al., Immunocytochemical analysis of gangliosides in rat primary cerebellar cultures using specific monoclonal antibodies. (1996) *Brain Res.*, 732, 75-86.

032 1A S6-1

パーキンソン病とは

水野美邦（順天堂大学脳神経内科）

パーキンソン病とは、中高年に多い原因不明の緩徐進行性の神経疾患の一種で、手足のふるえ、動作緩慢、歩行障害を特徴とする。日本における有病率は、人口10万に対し約100名で、アルツハイマー病について多い変性疾患である。好発年齢は、50台半ば以後から70台前半であるが、発症年齢の幅は広く、20歳から80歳に及ぶ。パーキンソン病は大部分孤発例で遺伝性はないが、約5%程度に家族内発症が知られている。

パーキンソン病は、一側手のふるえに始まることが多いが、足のふるえや、歩行障害で始まることもある。徐々に症状は両側に現れ、動作が緩慢となり、書字など手先の細かい動作が不自由となる。また歩行は小刻みで、上肢をふらなくなり、前屈みの姿勢となり、バランスが悪くなってちょっと押されても転びやすくなる。

これらの症状の原因は、中脳黒質のドーパミンを神経伝達物質とする神経細胞の消失であるが、何故この神経細胞が選択的に障害されるかはよく分かっていない。しかし、これまでの研究により、なんらかの体質の上に、体内で産生されたか或いは外来性に入ってきた黒質に対する毒性物質により、黒質の神経細胞の中でミトコンドリア呼吸障害と活性酸素の生成亢進を生じ、徐々に黒質神経細胞が死んでゆくと考えられている。

黒質神経細胞変性の真の原因はまだ不明であるが、最近家族性におきるパーキンソニズムの研究を通じて新たな展開が期待されている。即ち米国では、4番染色体に連鎖する優性遺伝の家系において原因となる遺伝子が同定され、アルファシヌクレインという蛋白遺伝子の異常であることが報告された。本邦からは、劣性遺伝の家系が6番染色体に連鎖することが報告され、鋭意原因遺伝子の検索が行われている。これら家族性におきるパーキンソニズムの遺伝子解析は、大部分を占める孤発性パーキンソン病の原因研究にも大きなインパクトを与えることが期待されている。

033 1A S6-2

パーキンソン病の原因：遺伝性素因

近藤郁子

（愛媛大学医学部衛生学）

パーキンソン病（PD）は加齢と共に発症頻度の高まる神経難病である。疾患の責任病巣は中脳黒質の神経細胞死にあり、病理所見、生化学的所見から病態に関わる知見は豊富である。治療法の著しい進歩によって、患者の生命予後は改善されたが、運動障害、精神障害、自立神経障害などのために、患者の日常生活には多くの困難を伴い、支援が必要である。

PDの原因研究も様々に試みられ、遺伝解析、環境変異源物質等の解明が行われてきた。PD患者の家系調査では、常染色体性優性遺伝を示す家系や劣性遺伝を示す家系の報告がみられるが、患者の多くは孤発例であり、PDは遺伝的異質性を持つ疾患群である。

最近、優性遺伝性を示す家系の連鎖解析の結果、責任遺伝子が4番染色体長腕q21-q22に位置することが判明し、続いて患者家系で α -synucleinのDNA変異が同定された。今後、病態の解明に重要な要因として注目されている。

常染色体性劣性遺伝を示すPDは40歳以下の若年発症と臨床症状の特徴から、独立したPDの1型をなしている。近親結婚によるホモ接合体で発症した患者の遺伝子解析の結果、本疾患の責任遺伝子は6番染色体の長腕に位置付けられ、責任遺伝子の解明が進められている。

その他の多くの孤発例の発症原因は加齢、遺伝性素因と生活環境因子の絡み合いによる多因子遺伝説が有力である。多因子として、生活環境物質、食事、嗜好品などの環境因子と、それらの生体内での代謝酵素の遺伝的変異、黒質神経細胞のドーパミン代謝に関わる遺伝子変異などが探索されている。白人においては代表的な薬物代謝酵素であるシトクロームP450の1つ、CYP2D6の機能低下がPDの発症危険因子として注目されている。日本人ではミトコンドリアの複合体Iを構成するMnSODの遺伝子変異や、喫煙によって誘導される変因物質の代謝に関わるCYP1A1のDNA変異がPDの危険因子となることが報告された。しかし、これらの遺伝子の発症危険率は2倍程度であることから、今後さらに多くの遺伝性素因が明らかになるであろう。

034 1A S6-3

パーキンソン病の病因：神経毒仮説の検証

直井 信1)、丸山和佳子2)

1)名古屋工業大学、2)長寿医療センター

ヘロイン合成中誤ってつくられた1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)によりパーキンソン病に酷似した病態が惹起された。このことより自然界に存在する、あるいはヒト脳内で生成されるドーパミン神経細胞に特異的な神経毒が原因でパーキンソン病が引き起こされているのではないかとの仮説が脚光をあびることとなった。1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) はドーパミンとアセトアルデヒドとの縮合により生成される。ヒト脳におけるこの生成反応は酵素的であり、(R)-型のsalsolinolのみが脳内には存在する。我々は(R)salsolinolが脳内で酵素的にN-メチル化され、N-methyl(R)salsolinol [NM(R)Sal]が生成されことをin vivo およびin vitroで証明した。さらにNM(R)Salをラット脳線条体に注入することによりパーキンソン病の動物モデルを作成することに成功した。NM(R)Salはヒト脳内の黒質線条体に、その酸化体であるdimethyldihydroxyisouquinolinium ion (DMDHIQ+)は黒質に蓄積していた。NM(R)Salがパーキンソン病の病因に関与しているか否かを検討するため、患者サンプルの分析を行った。NM(R)Salは未治療パーキンソン病患者の髄液で対照に比し有意に増加していた。このことはパーキンソン病患者でNM(R)Salの代謝に関わる酵素に異常がある可能性を示唆している。これら酵素のパーキンソン病患者から採取したリンパ球中における活性を測定したところ、中性に至適pHをもつ(R)salsolinol N-methyltransferase (neutral (R)salsolinol N-methyltransferase, NNMT)の活性がパーキンソン病患者で有意に高値であることが見出された。さらに正常者におけるNNMT活性の分布は一峰性であったが、パーキンソン病患者では二峰性で、NNMT高値を呈する正常とは異なるグループの存在が示唆された。パーキンソン病は環境(外因)と遺伝(内因)双方の多因子による疾患であると考えられている。NNMTはパーキンソン病の内因の一つである可能性がある。

035 1A S6-4

パーキンソン病の病態薬理化学

小川 紀雄

(岡山大学医学部神経情報学)

パーキンソン病 (PD) は病態の基盤となる脳内の生化学的変化が明らかにされており、その変化に応じた理論的な薬物療法が行われている疾患である。今回はその生化学的変化、薬物療法による修飾、さらには治療薬開発の新しい方向性についてまとめる。

1. PDは黒質-線条体系のドーパミン (DA) 神経の変性脱落が主病変ではあるが、その他の多くの神経伝達物質も減少している。DAレセプターの変化についてはさまざまな議論があったが、最近のPETを用いた研究から、未治療患者脳ではD2レセプターはup-regulationされていることが明らかにされている。いわゆるdenervation supersensitivityの状態にあり、levodopaの投与によって下向きの調節を受ける。

2. 実際に現在臨床応用されている治療薬は多種類あるが、中でもlevodopaは症状を最も強く改善する不可欠な治療薬剤である。しかし、長期治療にともなってさまざまな問題症状が発生する。levodopaの長期投与によってD2レセプターはdown-regulationされるなど多くの生化学的変化が生じるので、levodopaの功罪についての生化学的基盤をまとめる。

3. PDの進行の現場ではフリーラジカルが重要な役割を果たしていると考えられている。PD患者脳においてはフリーラジカルを消去する酵素が低下し、フリーラジカルを発生させる鉄の沈着が報告されている。さらに、フリーラジカルの発生はDAの代謝経路の上に存在するので、levodopa投与によってDA濃度が増加すればフリーラジカルの発生が増加し、神経変性が加速される恐れがでてくる。また、実験的にはlevodopa自身が細胞傷害性を示す。

4. 最近ではlevodopaの代わりにできるだけdopamine agonistを使用することが推奨される傾向にあるが、dopamine agonistにはフリーラジカル消去能や神経保護作用があるとの実験的成績が報告されている。

5. 以上の事柄を踏まえて、PDの薬物治療の新しい方向性を論じる。

036 1A S6-5

パーキンソン病治療の展望

西澤 正豊

(自治医科大学神経内科)

パーキンソン病の治療は現在、欠乏したドーパミン、ノルアドレナリンを補充する薬物療法が主体である。血液脳関門を通過し得ないドーパミンに代えて、その前駆体であるL-ドーパを経口投与する方法は当初その劇的な効果からパーキンソン病治療に革命をもたらしたが、まもなくさまざまな副作用を生じることが明らかになった。その後は各種のドーパミン受容体アゴニストも開発されて次々に臨床に応用されるようになり、また、最近では淡室球への外科手術も見直されている。しかし、これらの治療法が対症療法であることに変わりはなく、ドーパミンニューロンの変性が進行して行く過程自体を阻止することはできていない。

そこで、パーキンソン病のより本質的な治療法としては、ドーパミンニューロンの変性を防ぎ、ドーパミン産生を維持させることを目標とすべきであろう。ドーパミンニューロンに対して生存維持・栄養作用をもつ物質は有力な候補となるが、中でも最も期待されているのはGDNFである。現在、脳室内投与による治験が進行中であり、その結果が待たれている。この他、多くの薬剤がドーパミンニューロンに対する保護作用を期待して試用されている。

胎児の中脳神経細胞を移植する方法は、移植された細胞の生着が確認され、有効ではあるが、倫理的問題があり、我が国での実施は困難である。そこで、遺伝子工学的に操作を加えた細胞を移植する方法や神経細胞に直接遺伝子を導入する方法が模索されている。移植に用いる細胞系、ベクター系も、チロシン水酸化酵素や神経栄養因子など導入する遺伝子も、いずれもさまざまな試みがある。ここではわれわれが試みているAAVを用いた遺伝子導入法を紹介しながら、パーキンソン病治療の今後を展望してみたい。

037 3B TS-1

透析液と薬物投与方法に関する基礎的な問題点について

岡田 元宏

(弘前大学医学部神経精神医学講座)

In vivo microdialysis (MD)は、現在、細胞間隙に存在する神経伝達物質回収装置として最も信頼性が高いと考えられている。透析プローブの形状、透析膜の性質、灌流速度は実験条件の規定因子として様々な角度から検討され、現在MDを用いている実験者の中では、最適な条件については一応のコンセンサスが得られている。しかし、透析液としては、人工脳脊髄液(ACSF)、修正リンゲル液(MRS)が主に用いられているが、ACSFとMRSのどちらがより生理的条件を反映しうるのかという議論に加え、ACSF、MRSの組成自体が、各実験者により異なっているのが現状である。本報告では、我々がこれまでに検討した各種透析液の条件(pH, ion level)が測定値に与える影響を紹介する。

(1) Mg^{2+} は Ca^{2+} チャネル及びNMDA受容体阻害薬として、その機能は知られている。細胞外dopamine濃度を指標にした実験では、透析液内の Mg^{2+} 濃度の増加はadenosine (AD)受容体作動薬の機能を亢進し、阻害薬機能を抑制する。

(2) この Mg^{2+} の効果とは逆に、透析液内の Na^+ 濃度増加は、AD受容体作動薬の効果を抑制し、阻害薬の機能を亢進する。これらの結果は、 Mg^{2+} はAD受容体作動薬の受容体結合を亢進し、 Na^+ は逆に作動薬の受容体結合を阻害する可能性を示唆する。

(3) この Mg^{2+} のAD受容体に対する効果は、透析液のpHが6.5以下では確認されず、pH7.4の生理的な条件でのみ観察される。

(4) MDによる局所投与方法として、perfusionとmicroinjectionの二種類が使用されるが、perfusionによる投与方法はプローブの透過性と灌流時間により投与濃度に変化するが、microinjectionは脳実質に損傷を与え、injection直後では十分な神経伝達物質の遊離状態が確認されない。

038 3B TS-2

脳内でのNO産生を研究する上でのNO_x測定の問題点について

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)

脳内における一酸化窒素 (NO) の生理的役割を解明するためには、その産生調節機構を明らかにすることが不可欠であり、種々のNO測定法が考案されている。NOの代謝物であるNO_x (NO₂⁻ and NO₃⁻) はグリース法により測定することが可能であり、これとin vivo brain microdialysis法を組み合わせることにより無麻酔無拘束のラット脳内でのNO産生を測定する試みがなされている。ポリスチレンポリマーを充填した分離カラムを用いることにより脳透析液中のNO₂⁻とNO₃⁻を同時測定することが可能となったので、この方法の特徴と問題点について検討した。

脳透析用プローブ (3 mm) を介したNO₂⁻ およびNO₃⁻ の回収率は30-40%であり、検出限度はそれぞれ0.3 pmolであった。ラット小脳の透析液中のNO₂⁻ およびNO₃⁻ はそれぞれ5.4±0.4 および38.6±2.4 pmol/20 μl/10 minであり、プローブ挿入後7時間は安定して推移した。非選択的NO合成酵素 (NOS) 阻害剤であるNG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) のi.p. 投与あるいはNG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)を脳透析液に添加することにより、NO₂⁻ およびNO₃⁻ は共に有意に減少したが、NOS阻害作用の弱いD-NAMEでは変化しなかった。NOSの基質であるL-arginineはNO₂⁻ およびNO₃⁻を増加させ、さらにL-NAMEの作用を抑制した。グルタミン酸受容体アゴニストであるグルタミン酸およびtrans-(±)-1-amino-(1S,3R)-cyclopentanedicarboxylic acid (ACPD)によりNO₂⁻ およびNO₃⁻ は共に有意に増加したが、NMDAおよびAMPA刺激の場合にはNO₃⁻のみが有意に増加した。一方、高カリウム刺激の場合にはNO₃⁻は変化せず、NO₂⁻のみがカルシウム依存性に増加した。NMDA, AMPA およびACPDによるNO_x量の変化は、それぞれNMDA, non-NMDA およびメタボトロピック型グルタミン酸受容体アンタゴニストにより拮抗された。NaNO₂とNaNO₃のi.p.投与により脳透析液中のNO_xは著明に増加した。

以上の結果より、in vivo brain microdialysisにより得られた脳透析液中のNO_xをNO₂⁻とNO₃⁻に分離して測定する方法は、脳内でのNO産生の研究する上で有用であると考えられるが、末梢組織由来のNO_xについて考慮する必要がある。

039 3B TS-3

分散培養法と切片培養法の利点・欠点、固有の問題点について

小倉明彦、富永(吉野)恵子

(大阪大学・院理・生物科学)

実験的神経生物学研究において、モデル系の重要性は論をまたない。モデル系には細胞の大型性や体制の単純性に着目して無脊椎動物を用いる場合や、条件の制御性に着目して脊椎動物の培養系を用いる場合がある。実際、これらのモデル系を用いてなされた研究が神経生物学の最前線を拓いてきた。しかし一方で、そのモデル系固有の事情が一般化を阻む場合も少なくない。ここでは培養系を用いた場合の利点、欠点、留意点を演者らの資料をもとに考えてみたい。

もっとも扱いやすい培養細胞は株細胞である。神経細胞系としてN115, NG105-15, PC12など、グリア系としてC6などが用いられる。増殖する形質転換(がん)細胞であり、量の獲得や外来遺伝子の導入/選択も容易な半面、「神経分化」のための処理を行う必要があり、これが解析すべき現象に影響を及ぼす。起源となった単一の細胞の性質を継承するため、一般化は難しい。

株細胞の弱点を補う系として初代培養(分散培養)が用いられる。自発的に分化し、電気生理や形態観察など細胞生理学的研究には好都合だが、均一群ではないので、細胞種を特定する方法の併用が必要となる。胚または幼若動物から単離するため、相当時間経過後も未成熟な性質が残る。自発的に回路を形成する場合も多いが本質的に再生系である。

初代培養の弱点を補う目的で脳切片を培養に移す方法がとられる。条件の検討が進み技術的な困難さは減ってきた。出生後約2週間程度まで成熟させて後培養に移せるので回路は保存されるが、投射先を失った細胞は切片内で異所性投射する。位置も保存されるので細胞種の同定は可能だが、細胞形態の観察は標識法を併用しないと難しい。

以上のように培養細胞はそれぞれ固有の事情をもっており、これ一つで万能というような解析系はない。いい古された言だが、あくまで仮説提唱のための「モデル」であることを認識し、生体でのフィードバック検証が欠かせない。

040 3B TS-4

温度応答性高分子材料を使用したミクログリアの分離・培養法

中嶋一行、本田静世、石川正洋、菊池明彦*、
岡野光夫*、高坂新一

(国立精神神経センター神経研究所、代謝研究部；
*東京女子医科大学医用工学研究施設)

ミクログリアは脳の損傷時あるいは疾患時強い反応性を示し、病態や修復・再生過程に大きな影響を与えると推測されるところから、その研究の重要性が認識されつつあり、研究者も増加をたどっている。これまでこの細胞をめぐる諸問題は様々な分野から取り組まれ多くの新知見が得られてきたが、なかでも細胞特性や細胞機能に関する進展は培養系の貢献によるところが大きい。すなわち、周産期の動物脳より初代培養を行い、増殖したミクログリアを高純度に分離・培養できるようになった結果、食食作用、移動能、各種因子に対する応答性、または生理活性産生物質の産生などが次々に明らかにされてきたのである。このように、培養系の使用は一般的に有用であるが、目的によっては困難な問題に出会うことも事実である。たとえば、ミクログリアを一定条件下で培養後サブカルチャーしようとする場合、どのような脱着法がふさわしいか、多くの研究者を悩ませてきた。通常はトリプシンによる浮遊化に頼らざるを得ないが、この方法は細胞傷害性があること、トリプシンの作用により細胞の性質が変化する可能性があること、回収率がよくないことなどが指摘されており、画期的な方法が望まれてきた。

しかし、最近開発された温度感受性的高分子材料(polyisopropylacrylamide)を結合したシャーレがミクログリアの浮遊化に有効であることが判明した。すなわち、37℃で培養しているミクログリアを短時間低温に移すだけで浮遊状態にすることができる。今回、この革新的なシャーレを用いたミクログリアのサブカルチャーについて、幾つかの例をあげその有効性を紹介したい。

041 1P 1001

アミロイド前駆体蛋白遺伝子導入MDCK細胞におけるアミロイド β 蛋白の産生と極性分泌

水野 哲也¹、Christian Haass²、道川 誠¹、柳澤 勝彦¹

(¹国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

²Central Institute for Mental Health, Department of Molecular Biology, Germany)

アミロイド β 蛋白(A β)の細胞内産生、細胞外への分泌機構を解明するため、ヒトアミロイド前駆体蛋白(β APP695)遺伝子(野生型)とC端42アミノ酸を欠失させた β APP695遺伝子(Δ C)をそれぞれ導入したMDCK細胞を用い、細胞外へのA β 極性分泌を検討した。

MDCK細胞をトランスウエルに一層に撒き、頭頂側、側底側に分泌されるA β 40、A β 42を断端特異的A β モノクローナル抗体を用いたEIAにより定量した。野生型において分泌されるA β は90%がA β 40であり、その90%は側底側に分泌された。A β 42は、A β 40に比べ側底側へより強い分泌極性を示した。以上よりA β は分子種により、細胞内産生部位、及び細胞外への分泌経路が異なる可能性が考えられた。C端42アミノ酸を欠失させた Δ Cでは、 β APP細胞内極性輸送の高度の変異が報告されているが、A β は野生型と同様の分泌極性を示した。このことから、少なくともA β の一部は β APP細胞内輸送のsortingに先行して産生されることが示唆された。更に、 Δ Cの頭頂側培地において、A β の中間部を認識する4G8では免疫沈降されるが、N末側を認識するBAN50では免疫沈降されない特異なA β が認められた。本A β 分子は、蟻酸処理によりBAN50で免疫沈降されることから、二次構造が異なっていることが示唆された。

042 1P 1002

カテプシンDによるAPPC100の in vitro 限定分解

Golam Sadik, 武田和也, Shahanara Mst Hossain, 梶 裕之, 篠田友孝

(都立大・院・理・化)

【目的】アルツハイマー病患者脳老人斑アミロイド β /A4は、その前駆体タンパク質APPの限定分解により産生されるが、この反応に関与する酵素の一つ α セクレターゼの本態に関しては諸説がある。最近、その候補の一つとして、カテプシンDが示唆されているが、矛盾する結果となっている。最大の原因は、均一なAPP関連前駆体を大量に作成することが極めて困難な為である。本研究では、先ずAPP関連前駆体として、C100の大量発現系の開発と均一な前駆体の作成を試み、次いでカテプシンDによる限定分解過程の追跡を行った。

【方法】APPC100は、組み換え体として大腸菌を用いる系で発現させ、尿素を含むGPC、RP-HPLCにより精製した。このC100を、種々のpH、酵素：基質比で消化し、経時的に消化物の一部をRP-HPLCで追跡した。ペプチドの同定は、MALDI/TOFMSおよび必要に応じて、アミノ酸配列分析で行った。各種断片のアミロイド線維形成能は、コンゴレッド染色後の偏光像で追跡した。

【結果】本研究において、組換え体APPC100の発現量は1 l中約20 mgであった。RP-HPLCで精製された標品の純度は、N末端分析で95%であった。精製C100を種々のpH、酵素：基質比で消化したところ、pH3.5においては、広範な酵素：基質比下で β /A4(1-42)、 β /A4(1-43)の産生が確認された。

043 1P 1003

βアミロイドとイボテン酸共注入によるラット海馬神経細胞に対する影響について

森本 潔, 山田 紀子, 尾田 富一郎, 金子 勲
(三共(株)神経科学研究所)

老人斑はアルツハイマー病の病理学的特徴の一つで、その主要構成成分であるβアミロイド(Aβ)はアルツハイマー病の原因の一つと考えられている。Aβ 1-40とその部分ペプチドであるAβ 25-35は*in vitro*において神経細胞に対して毒性を示すこと、興奮性アミノ酸によってその毒性が増強されることが報告されているが、*in vivo*における神経変性作用は現在のところ一致した見解が得られていない。我々は*in vivo*におけるAβの神経変性作用を発現させることを目的として、Aβ 25-35またはAβ 1-40を単独、あるいは神経細胞に影響を及ぼさない用量のイボテン酸をAβと同時にラット海馬内に注入し、2週間後ラット海馬における組織化学的および免疫組織化学的变化について検討した。その結果、Aβあるいはイボテン酸の各単独注入では顕著な神経細胞毒性は確認されなかったが、Aβとイボテン酸により相乗的に、注入部から遠く離れた部位まで広範囲にわたって神経細胞の脱落が起こることが確認された。この神経細胞死は一部に核の萎縮およびDNA断片化が認められ、従って一部の神経細胞死はアポトーシス様であることが示唆された。さらに、神経細胞特異的マーカーであるMAP2免疫染色においても、神経細胞の広範囲にわたる脱落が確認された。一方、神経細胞脱落部周辺にはアストロサイト、ミクログリアの浸潤が広範囲に認められたが、Aβの沈着は注入部付近に限られ、その周りの神経細胞死がおきた付近にははっきりとした沈着は認められなかった。このAβとイボテン酸による神経毒性は興奮性アミノ酸アンタゴニストであるMK-801によって完全に抑制された。以上のことから、イボテン酸との相乗効果によりAβの神経変性作用が*in vivo*においても確実に発現することが分かった。Aβは興奮性アミノ酸受容体の感受性をあげ、最終的にはその受容体を介して細胞死を起こすものと考えられる。

044 1P 1004

*in vitro*におけるNACP/α-synucleinのβ/A4との相互作用と線維化速度への影響

武田和也, HOSSAIN, Shahanara, SADIK, Golam, 上田健治*, 篠田友孝

(都立大・院・理・化, *都精神研・神経化学)

【目的】NACP/α-synucleinは、アルツハイマー病(AD)患者脳より単離され、老人斑上の局在を証明されたNAC(non-Aβ component of AD amyloid)の前駆体タンパク質である⁽¹⁾。NACやNACPがβ/A4線維化において何らかの役割を果たすことが予測され、これを明らかにすることはADアミロイド形成の機序解明に重要な情報を与えると考えられる。そこで本研究では、*in vitro*におけるNACPの、β/A4との相互作用および線維化への影響を検討した。

【方法】NACPは、組み換え体として大腸菌を用いた系で発現させ、これを精製して用いた。β/A4はBachem社より化学合成品を購入した。NACPとβ/A4の相互作用は、ELISAプレート上に固定したβ/A4と結合したNACPを、精製したポリクローナル抗体を用いる系で検討した。β/A4の線維化は、インキュベーション後の遠心上清中の残存β/A4を、そのN末端部分を認識するモノクローナル抗体を用いて、ELISA法で追跡した。

【結果】NACPとβ1-40との相互作用は認められたものの、β1-28では認められず、β29-40領域に、NACPとの結合部位が存在することが示唆された。この結果は、Yoshimotoらの報告⁽²⁾を支持している。さらに、インキュベーション後の可溶性β/A4の量は時間の経過により減少した。またNACPを共存させることにより、可溶性β/A4の量が変化し、その線維化速度に変化を生じることが示唆された。現在、NACPの一部領域を欠損させた各種変異体を作製しており、さらに解析を試みている。

(1)K. Ueda et al. "Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993) **90**, 11282-11286

(2) Makoto Yoshimoto, Akihiko Iwai, David Kang, Deborah A. C. Otero, Yu Xia, Tsunao Saitoh (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9141-9145

045 1P 1005

カテプシンDによるNACPの in vitro
限定分解

Hossain, Shahanara Mst, 武田和也, Golam
Sadik, 篠田友孝
(都立大・院・理・化)

【目的】NACPは、アルツハイマー病患者脳
老人斑アミロイドのタンパク構成成分NAC
の前駆体タンパク質で、 β アミロイド形成に
おいて重要な役割を果たすと考えられている
が、詳細はなお明らかにされていない。本研
究では、in vitroにおけるNACPの代謝過
程と $\beta/A4$ との相互作用を検討した。

【方法】NACPは、組み換え体として大腸菌を
用いる系で発現させ、GPC、RP-HPLCで精製し
た。NACP：酵素比を種々変化させて消化し、
一定時間毎に消化物の一部をRP-HPLC、
MALDI/TOFMSで追跡した。各断片
はRP-HPLCで精製したのち、 $\beta/A4$
との相互作用をELISA法で検討した。

【結果】NACPは、pH3.5の緩衝液中
で種々の濃度比のカテプシンDにより、制限
的に分解された。E:S比1:150以下で
は、Ala124-Tyr125一ヶ所のみ切断
され、N末端-Ala124断片が高い収量で
単離された。約3時間後には、Met116C
末端部で二次的消化が起こり、N末端を含む
116残基から成る断片が得られた。これら
は、いずれもNAC構造部の全長を含んでお
り、 $\beta/A4$ の線維化傾向に対する効果は、
NACPと比較して増加傾向がみられた。現
在さらに詳細に追跡中である。

046 1P 1006

LacSwitch誘導系を用いた家族性アルツハ
イマー病原因遺伝子産物 Presenilin 1 の
Neuro 2a 細胞における発現解析

¹川村 勇樹, ²須藤 慎治, ³西道 隆臣, ⁴小山 文隆
⁵佐藤 慎二, ⁶駒野 宏人, ⁷柳澤 勝彦

(¹国立長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部,
²東京都臨床研 遺伝情報, ³東京大学 医学部 脳研
脳病理, ⁴東大医科研 ヒトゲノム解析センター)

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として報
告された Presenilin 1 (PS1) の遺伝子産物である
PS1は6回膜貫通型の蛋白であり、細胞内の小胞
体および、ゴルジ体とその局在が報告されている。
また、家族性アルツハイマー病に関連した PS1 の
変異体を導入した培養細胞については、すでに細
胞外に分泌されるアミロイド β 蛋白(A β 42)の増加
が報告されている。PS1の生理的機能については
明らかではなく、A β 産生において分子レベルで
どのような影響を与えているのか不明である。

我々は、Neuro 2a 細胞に、野生型および変異型
PS1を導入し、大腸菌のラクトースオペロンを利用
した遺伝子発現ベクターにより、その発現の調
節可能な培養細胞系を確立した。培養液中にイソ
プロピル β -D-チオガラクトシド(IPTG)を
添加してPS1の誘導を促した後、その蛋白の発現
を解析するためにN末端を認識する抗体による
western blotを行なった。野生型および、M146L変
異型では、24時間後に約43 kDaの全長PS1の明ら
かな増加が認められ、48時間以後飽和レベルに達
した。一方、30 kDaのN末側フラグメントの増加
は全長PS1に比べて緩やかで、48時間以後さらに
増加する傾向を示した。また、変異型の Δ exon 10
を導入した株において全長PS1の増加は他の2つ
の発現パターンと一致していたが、N末側フラグ
メントの増加は認められず、mouse由来の内在性N末
側フラグメントの減少が認められた。以上、誘導
後の時間経過に伴うPS1の発現を解析した結果、
この蛋白の代謝において、プロテアーゼによるN
末側フラグメント産生が律速段階になっている可
能性が考えられた。

047 1P 1007

ヒト臓器におけるプレセニリン1 (PS1)
蛋白質断片の同定

佐原成彦、大河内正康、亀谷富由樹、宇佐美美穂子、
田中喜久子、荒若繁樹、山本明広、森啓
(東京都精神医学総合研究所・分子生物)

ヒトプレセニリン1 (PS1) は染色体 14q24.3 に局在する早期発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の一つである。この遺伝子は Spe-4 や Sel-12 との構造類似性から、膜輸送や神経初期発生に関与することが考えられているが、その生理的機能は未解決のまま残されている。アミノ酸約 460 個からなる正常の PS1 蛋白質は、膜貫通 (親和性) ドメインを 7 個あるいは 10 個含む膜蛋白モデルが提唱されている。一方で、培養細胞あるいはトランスジェニックマウス脳の解析から PS1 蛋白質はアミノ末端側から約 290 番目付近 (ルーブ領域上流) で切断され、分子量 28kDa であるアミノ末端断片と分子量 18kDa であるカルボキシル末端断片として存在することが明らかにされてきたが、ヒト脳における PS1 蛋白質断片の詳細な分析を示す報告は少ない。そこで我々は、ヒト PS1 各部位に対する抗体を作製し、これをツールとしてヒト各臓器における PS1 の蛋白構造をウエスタンブロットによって解析をおこなった。

すべてのヒト臓器で 28kDa アミノ末端断片と 18kDa カルボキシル末端断片が見出され、その中でも精巣において最も多く PS1 蛋白質断片が発現していた。また、イムノアフィニティーカラムを用いて PS1 蛋白質を精製し、種々の抗体でウエスタンブロットを行ったところ、肺、脾臓、膵臓において分子量 14kDa であるアミノ末端断片を新たに見出した。

これらの結果から、PS1 蛋白質の発現は量的な点ばかりでなく、翻訳後における組織特異的な制御を受けて細胞内代謝されていることが示唆された。

048 2C O-3

マウスアポEに対するハムスターモノクローナル抗体およびヒトアポEに対するラットモノクローナル抗体の作製
藤田 忍、作田 圭子、土屋 玲子、
濱中 裕喜
(三菱化学生命科学研究所、プロジェクト8)

アポリポ蛋白E (アポE) は家族性および孤発性アルツハイマー病の発症に関与することが統計的に明らかになっているが、その機序および脳におけるその生理的役割は未知である。我々はアポE遺伝子をヒト化したマウスを用いてこの問題にアプローチしている。そのためにはマウスにおいてマウスアポEとヒトアポEの動態をそれぞれ解析するのに適した抗体パネルが必要であるので、そのような抗体の作製を行った。マウスアポEのN後半 (EN) とC後半 (EC) に対応するcDNAをRT-PCR法を用いてマウス脳totalRNAより得、pGEX2Tベクターを用いて大腸菌にGST融合タンパク質として発現させたものを精製し、アルメニアンハムスターを免疫した。マウスミエローマ細胞653を用いた通常ハイブリドーマ実験を行い、培養上清を発現大腸菌ライセートおよび正常/アポEノックアウトマウス血清のドットプロットに対してスクリーニングして、抗EN 874B7と877C12を、また抗EC 884F11、886E11などを得た。これらはマウス血清のイムノプロットでアポEへの特異的結合が確認された。またヒトアポE (E3、CHOリコンビナント、三菱化学横浜総合研究所分子医薬研より供与) で免疫したWistarラットを用いた実験からは、ヒトアポEに対するラットモノクローナル抗体861E4および868E5を得た。これらの抗体の特異性および組織化学的応用性について報告する。

049 1P 1008

アルツハイマー病脳におけるイノシトールモノホスファターゼについて

藤本貞毅*, 谷野浩子*, 墨田康男*, 下濱 俊**

(*京都薬科大学衛生化学教室, **京都大学医学部神経内科学教室)

アルツハイマー病 (AD) におけるイノシトールリン脂質代謝系に関与するホスホリパーゼCアイソザイムの異常について報告してきた。今回、inositol trisphosphate 生成後のカスケードに関する知見を得るため、AD 病脳におけるイノシトールモノホスファターゼ (IMPase) の変動の有無を調べた。

年齢、死後剖検までの時間に差を認めないAD群と対照群を対象とした。脳抽出液の105,000 g 上清を試料とした。脳IMPaseの活性は3 mMマグネシウムイオン共存下、myo-inositol 1-phosphate を基質として、酵素反応で遊離した無機リン酸量を測定することにより行った。ウシ脳から精製したIMPaseを抗原として作製した特異抗体を用いてタンパク質レベルを調べた。

ラット脳抽出液をSephadex G-100 カラムにかけて得られた溶出液についてIMPase活性を測定すると、一つの活性ピークのみが認められた。また、この活性分画は、IMPaseの特異抗体で認識される分画と一致した。また、この活性は、リチウムイオンにより有意に阻害された。対照脳とAD病脳についても、ラット脳の場合と同様の結果が得られた。死後変化の有無を調べるため、死後7時間、12時間ならびに24時間後のラット脳について酵素の変動を調べたところ、死後時間の差による酵素活性値ならびにタンパク質レベルに差は認められなかった。

IMPase活性は対照脳に比べて、AD病脳で活性が高い傾向にあるが、その差は有意ではなかった。ここで検出されるIMPase活性は、用いた特異抗体により濃度依存的に消失した。この特異抗体を用いて脳内のIMPaseのタンパク質レベルを測定したところ、AD群と対照群とで有意な差は認められなかった。

以上、イノシトールリン脂質代謝系に関与する酵素群の内、IMPaseについてはAD脳で有意な変動は認められなかった。

050 1P 1009

神経細胞の老化および痴呆の発症に対する

Advanced Glycation End Products (AGE)

の影響について

徳武 哲 (都精神研, 分子生物)

アルツハイマー病の病因物質については、病理的特徴である老人斑に存在する β -アイロイドやプレセニリンが、多くの関心を集め研究が行われている。しかし、老年痴呆はその発症年齢から考えられるように、長期間にわたる体内変異あるいは体外からの影響が関与している可能性が考えられる。

長期的な影響因子の一つとして、最近注目されるようになったのは、還元性の糖類がタンパク質と一連の非酵素反応により結合して生成される複雑な不可逆構造を持った複合体 (Advanced Glycation End Products (AGE)) である。この物質は、糖尿病の変性組織から見つけられたものであるが、アルツハイマー病の神経原線維変化でも見い出されている。

神経原線維変化や老人斑のように、代謝回転が非常に遅い物質では、このような物質が生成される可能性は十分に考えられることであるが、それよりも血中タンパク質より生じたAGEが毛細血管の内皮細胞表面に結合し、さらに取り込まれて、フリーラジカルを含む酸化反応により、内皮細胞の機能が障害されると、血液-脳関門の機能が障害を受け、さらに神経細胞に有害物質が侵入蓄積し、神経細胞の機能や老化に及ぼす影響はさらに重要である。

そこで、血液中のタンパク質からできるAGEが、血液のpHや金属イオン等によりどのような影響を受けるかを調べ、糖尿病と単純な老化でどのような違いがあるのかを検討し、さらにそれらの抗体を用いて、脳の毛細血管やグリア細胞および神経細胞に及ぼす影響の違いを調べることを試みたので、それらの結果について報告する。

051 1B MS1-1

家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリンと A β アミロイド前駆体タンパクとの関連性

亀谷富由樹、田中喜久子、宇佐美美穂子、佐原成彦、大河内正康、森 啓 (東京都精神医学総合研究所、分子生物)

早期発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニリン 1(PS1)は 467 残基のアミノ酸からなる膜タンパク質であることが知られている。トランスジェニックマウスおよび培養細胞等の解析から、この PS-1 の突然変異がアミロイド線維の主成分である A β 42 を増加させることが明らかとなってきた。このことは、PS-1 が A β の前駆体タンパク質(APP)の代謝過程に関与していることを示唆している。そこで本研究では、PS-1 と APP の関連性について培養細胞を用いて解析した。

APP695cDNA を安定的に遺伝子導入した CHO 細胞(CHO₆₉₅)に、リポフェクタミン試薬(GIBCO BRL)を用いて pCMV β および PS1 遺伝子を組み込んだ pCMVPS1 を一過性に導入した。得られた遺伝子導入細胞から、PS1 の N 末抗体 AD3N および APP の C 末抗体 R37 を用いて、PS1 および APP を免疫沈降させた。免疫沈降物は SDS 電気泳動後 PVDF 膜に転写し、PS1 の N 末抗体 PSN2、抗 APP 抗体 22C11、抗 A β 抗体 6E10 および APP の C 末抗体 R37 を用いて解析した。

PS1 導入 CHO₆₉₅ 細胞から AD3N を用いて免疫沈降させた画分には 22C11 による APP の免疫反応は見られず、一方、C 末抗体 R37 を用いて免疫沈降させた画分には PSN2 による PS1 の免疫反応がごく弱く見られた。また、PS1 導入 CHO₆₉₅ 細胞および未導入 CHO₆₉₅ 細胞から得られた APP およびその誘導体を比べてみると α および β 分泌酵素によるプロセシングの割合、切断部位については差は見られなかった。以上のことから CHO₆₉₅ 細胞においては、PS1 と APP が結合して存在する可能性および PS1 が直接 APP の α および β 分泌酵素による切断に関与する可能性は低いと考えられた。現在突然変異をもった PS1 が APP の代謝系に与える影響を解析中である。

052 1B MS1-2 2115

プレセニリン 1 ミスセンス変異遺伝子による A β 42 variants 産生の促進

須藤慎治¹⁾、川村勇樹²⁾、西道隆臣³⁾、佐藤慎二⁴⁾、小山文隆⁵⁾、駒野宏人¹⁾、柳澤勝彦¹⁾

(国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部¹⁾、東京都臨床研遺伝情報²⁾、東京大学医科学研究所ゲノムセンター³⁾、東京大学医学部脳研病理⁴⁾)

家族性アルツハイマー病における主要な原因遺伝子であるプレセニリン 1 (PS1) 遺伝子のミスセンス変異による発症機構の解明を目的に、PS1 の A β 代謝への影響を検討した。

マウス Neuro 2a 細胞に lactose operon を利用した誘導発現システムを用いて PS1 変異遺伝子 (M146L, Δ exon 10) を導入することにより PS1 の発現を制御できる細胞株を樹立した。この細胞に IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) を添加することで PS1 が誘導されることを RT-PCR 法で確認した。この細胞を低血清培地で培養後、培養上清中および細胞内の A β を分子種別 (A β 40, A β 42) に A β の C 末端特異的モノクローナル抗体 (BA27, BC05) を用いた highly sensitive immunoblot 法 (J. Biol. Chem. 271: 22908, 1996) により測定した。

PS1 変異遺伝子の発現を IPTG により誘導すると、培養上清中の A β 42 は immunoblot 上、A β 1-42 に相当する分子種だけでなく、N 末端の欠失した分子種 (A β X-42) の増加を認めた。一方、A β 40 の産生量は不変だった。また、wild type の PS1 を IPTG で誘導しても A β 42 の産生増加は認められなかった。さらに、細胞内の A β 42 に関しても mutant PS1 の誘導により増加が認められた。これらの A β 分子種の産生部位を推定するため、分泌経路の輸送を抑制する薬剤を用いて検討した。その結果、brefeldin A 処理ではすべての A β 分子種の産生が抑制された。一方、monensin 処理では A β 1-40, A β 1-42 の産生は抑制されたが、N 末端の欠失した A β X-40, A β X-42 が細胞内に蓄積した。このことから A β variants が異なった部位で産生されていることが強く示唆される。

以上の結果から、mutant PS1 は異なった部位で産生される A β 42 variants のいずれの産生も増加させることがわかった。

053 1B MS1-3

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

西村伊三男¹, 植月太一², 岡村均³, 大沢良之³, 内山安男³, 吉川和明¹

(¹阪大・蛋白研・機能制御, ²神戸大・医・2解, ³阪大・医・1解)

我々は前回の本学会において、組換えアデノウイルスベクターを用いて、in vivoの中樞神経系細胞におけるAPPの過剰発現により短期間に神経細胞が特異的に変性死滅することを示した。今回は、この神経細胞死がAlzheimer病(AD)の病理変化を反映しているかを検討する目的で、免疫組織化学、電子顕微鏡による観察を中心に解析した。

ヒト全長型APP695発現アデノウイルス 3.7×10⁷ pfu/5μlをラット海馬へ注入し、5日後に灌流固定して以下の免疫組織化学を行った。APP C末端に対するポリクローナル抗体(AC-1)とN末端に対するモノクローナル抗体(P2-1)を用いて二重染色を行ったところ、APPを過剰発現する神経細胞には、核周囲や神経突起内には顆粒状のAPP免疫陽性物質が認められ、細胞体表面にはblebが、神経突起には腫大したvaricosityなどが観察された。また、AC-1とP2-1の免疫活性の細胞内局在は一致していた。この2つの抗体による注入部位周辺の組織のwestern blotでは、いずれにも全長型APPに相当する約110kDaのバンドが検出された。以上の結果より、APPを過剰発現する神経細胞内に全長型APPが多量に存在する早期の段階から、変性を起こしていることが示唆される。

電子顕微鏡による観察では、注入側海馬には萎縮により電子密度の増加した細胞質と核を有する変性神経細胞が認められた。細胞質には増加した遊離リボソーム、ミトコンドリアのクリステの不整、自己食食を示す像などが認められた。核にも萎縮がみられたが、細胞質に比べてその変化は軽度なものであった。これらの変性神経細胞の近傍にはミクログリアが観察された。また変性神経細胞に近接して、樹状突起の腫大やシナプスの消失が確認された。

本研究で示された変性神経細胞と周辺の形態変化は、ADにみられる老人斑周囲の病理像に極めて類似しており、本疾患の神経細胞死の機序を探る有効なアプローチになりうるものと考えられる。

054 1B MS1-4 2114

アミロイドβタンパクによるL型チャネルを介したCa²⁺流入増加とフリーラジカルの関与

上田 恵一、篠原 俊次、矢上 達郎*、朝倉賢治*、川崎 和夫

(塩野義製薬 中枢神経薬研究センター、*創業第二研究所)

アミロイドβタンパク(Aβ)の神経毒作用における電位依存性Ca²⁺チャネル(voltage-sensitive Ca²⁺ channel; VSCC)およびフリーラジカルの関与に注目した。

大脳皮質および海馬神経細胞において、種々のVSCCブロッカーの作用を検討したところ、nimodipineのみがβ(25-35)の細胞毒性を減弱した。AβによるCa²⁺イオン流入の機構を検討するために、海馬錐体細胞を全細胞パッチクランプし、ボルテジクランプ下記録した。その結果、16時間のβ(25-35)曝露細胞のCa²⁺電流密度が対照群のそれと比較して約2倍高いことが判明した。また、生理的条件下における⁴⁵Ca²⁺の取り込みを測定した結果、16時間のβ(25-35)曝露群において、⁴⁵Ca²⁺取り込み量が対照群と比較して約1.6倍高く、これはnimodipineで特異的に抑制された。これらの結果は、β(25-35)曝露によりL型Ca²⁺チャネルを介してCa²⁺流入量が増加することを示している。

次に、β(25-35)による細胞死にフリーラジカルの関与する可能性を検討するため、2',7'-dichlorofluorescein diacetateを用いて細胞内活性酸素レベルの変動を測定した。β(25-35)の処置後12時間および24時間で有意な活性酸素レベルの上昇が認められ、これはラジカルスキャベンジャーのビタミンEで抑止された。

以上の結果は、β(25-35)の神経毒作用にL型VSCCを介したCa²⁺の流入とフリーラジカル発生の両方(あるいはいずれか一方)が関与することを示している。そこで、フリーラジカルがβ(25-35)の引き起こすCa²⁺流入に関与するか否かを検討するために、β(25-35)の増強する⁴⁵Ca²⁺取り込みに対するビタミンEの影響を調べたところ、ビタミンEはβ(25-35)による⁴⁵Ca²⁺の取り込みの増加を抑止することが明らかとなった。一方、VSCCのブロッカーであるnimodipineはβ(25-35)によるフリーラジカルの発生に対して何の作用も示さなかったことから、フリーラジカルの発生はCa²⁺流入には依存しない。以上の結果は、β(25-35)によるCa²⁺流入の増加はフリーラジカルの発生の結果であることを示唆している。

055 1B MS1-5 2113

アルツハイマー・ β アミロイド蛋白による
GT1-7細胞内 Ca^{2+} 流入及び神経細胞死

川原正博、村本和世、小林和夫、黒田洋一郎
(東京都神経科学総合研究所、神経生化学研究部門)

老人斑の主要構成成分であるアルツハイマー・ β アミロイド蛋白は、神経毒性を持ち、アルツハイマー病の発症原因と深い関連があることが示唆されている。その神経毒性のメカニズムは未だ確定されていないが、Arispeらは β アミロイド蛋白(ABP[1-40])が人工脂質二重膜上に侵入してカチオン選択的なイオンチャネルを形成することを報告している。更に、演者らは、神経細胞由来のGT1-7細胞膜においてもABP[1-40]がカチオン選択的なイオンチャネルを形成し、しかも形成されたチャネルはmultilevelであり、亜鉛イオンによって阻害されるなど、その性質が人工脂質二重膜で形成されたものと類似していることを、パッチクランプ法によって明らかにしている(Kawahara M. *et al.*, *Biophysical J.*, 63, 65-75 (1997))。

そこで、 β アミロイド蛋白がGT1-7細胞の細胞内 Ca^{2+} 変動に与える影響を、fura-2による細胞内 Ca^{2+} 同時多点計測システムを用いて検討した。

視床下部神経細胞由来の細胞株であるGT1-7細胞は、常法により経代培養後、trypsin及びDNaseIによりdissociateし、polyethylenimine-laminineコートしたカバーガラス上に無血清Dulbecco's MEM培地を用いて培養した。この培養条件下で、GT1-7細胞はMAP2陽性のprocessを伸展させ、神経細胞様に分化した。培養2~4日後、ABP[1-40] (10 μM)を投与し、細胞内 Ca^{2+} の時間変化を視野内の50~100個の細胞について測定した。その結果、約60%の細胞で投与直後あるいは1分以内に顕著な Ca^{2+} の上昇が観察されたが、全く変化が生じない細胞もあり、細胞間で β アミロイド蛋白に対するaffinityに差があることが示唆された。また、 β 蛋白に感受性をもつ細胞の数は濃度依存的に増加した。更に、WST-1アッセイによりGT1-7細胞に対する細胞毒性を観察したところ、同濃度のABP[1-40]の投与24時間後には、40%の細胞死が観察された。

以上の結果から、神経細胞由来のGT1-7細胞系において β アミロイド蛋白がイオンチャネルの形成、細胞内 Ca^{2+} の異常流入、神経細胞死のいずれをも引き起こすことが明らかになった。これは、 β アミロイド蛋白が長年月の間に細胞膜に侵入してイオンチャネルを形成し、これによって生じるカルシウムを始めとする細胞内外のイオンバランスの異常が、アルツハイマー病で見られる神経細胞の脱落の原因になるのではないかという、いわゆる" β アミロイドチャネル仮説"を強く支持する結果である。

056 2P 2112

分泌型アミロイド前駆体蛋白の生理活性に
関与するドメインの探索

大澤郁朗、高村千鶴子、森本高子、石黒麻利子、高坂新一

(国立精神・神経センター神経研究所 代謝)

我々は、アルツハイマー病で注目を集めている β アミロイド前駆体蛋白(APP)、とりわけその分泌型APP(sAPP)の脳内生理機能を解明することを目的に研究を進め、今までにsAPPがラット大脳皮質組織片培養で神経突起伸展促進活性、およびラット大脳皮質神経芽細胞でDNA合成を指標とした細胞増殖促進活性を持つことを報告してきた。今回、これらの活性に関与するドメインについて検討した。

sAPPのKPIドメインよりもN末端側配列からなるNAPP、およびC末端側配列からなるCAPPの2種類の組換え体を酵母で作製した。そのうち、NAPPのみが神経突起伸展と細胞増殖のいずれも促進し、sAPPと同様に0.3 nMの濃度で有意な活性を示した。さらにsAPPおよびNAPPの活性が、NAPP内配列を認識するモノクローナル抗体22C11で抑制された。そこで22C11エピトープ配列からなるペプチドN16を合成した。また、KPIドメインの直下流にあり、sAPPの活性領域として報告されているRERMS配列を含むペプチドRERMS17を比較のために合成した。N16を大脳皮質組織片に100 nM添加した場合に有意な突起伸展活性と神経芽細胞の増殖促進活性が認められた。しかし、RERMS17については1 μM 以上の濃度でも、いずれの活性も認められなかった。RERMS17についてはラット大脳皮質神経細胞に対する顕著な生存維持効果が認められたが、N16については効果がなかった。

本研究から、sAPPの神経突起伸展促進と神経芽細胞増殖促進に関与するドメインが、KPIドメインよりも上流のN末端領域にあり、22C11エピトープ配列がsAPPの生理活性に重要な役目を担っている可能性が示唆された。一方、神経細胞の生存維持活性はRERMS17では顕著に認められたが、N16にはこの活性はなかった。これらのことから、sAPPは複数の活性領域を持つ多機能蛋白として中枢神経系の発達・維持に関与しているものと考えられる。

057 2P 2111

分泌型アミロイド前駆体蛋白質刺激による
培養大脳皮質細胞内情報伝達石黒 麻利子, 大澤 郁朗, 高村 千鶴子, 森本 高子,
高坂 新一

(国立精神・神経センター神経研究所, 代謝研究部)

分泌型アミロイド前駆体蛋白 (sAPP) は培養ニューロンに対し多様な生物活性を示す事が知られているが sAPP により誘導され、その機能発現に関わる細胞内シグナル伝達系については殆ど明らかにされていない。sAPP695 を介する細胞内シグナル伝達機構を明らかにする為、sAPP695 刺激により活性化される蛋白質キナーゼを *in vitro* protein kinase assay により検索した。

無血清培地で一晚培養したラット胎児大脳皮質細胞を sAPP695 で刺激後、細胞の可溶性画分を調製し *in vitro* protein kinase assay により分析した。その結果 sAPP695 の濃度に依存して約 80, 57 及び 43 kDa の内在性基質タンパク質がリン酸化され、これは 5 nM、10 分間の刺激で最高値に達した。*in vitro* protein kinase assay 後、アルカリ処理により 80-及び 43-kDa タンパク質のリン酸化バンドが消失した事からこれらのタンパク質はセリンやスレオニン残基がリン酸化を受けることが示された。一方、57-kDa タンパク質はアルカリ処理に耐性であり、主にチロシン残基がリン酸化されると考えられる。protein kinase inhibitor に対する感受性から sAPP695 刺激によりリン酸化される 80-及び 43-kDa タンパク質のリン酸化には主に protein kinase C (PKC) が関与する事が明らかとなった。又、ホルボールエステルによる PKC 不活性化が sAPP695 刺激によるこれらのタンパク質のリン酸化を抑制した事から、sAPP695 が細胞内で PKC を活性化することが示された。更に sAPP695 刺激により phospholipase C γ 1 が活性化され、細胞内イノシトール 1,4,5-三リン酸濃度も増加した事から sAPP695 は phosphoinositide-PKC 系の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するものと考えられる。

058 2P 2110

ラット大脳皮質神経細胞内 Ca²⁺流入に対する
緑茶旨み成分テアニンの影響

野澤 歩, 梅澤邦彦*, 小林和夫*, 川原正博*, 村本和世*, 水谷昭弘*, 角田隆巳, 黒田洋一郎* (伊藤園中研, *都神経研)

【目的】緑茶の旨み成分テアニン (Glutamic acid γ -ethyl amid) はグルタミン酸のアナログであり、脳血液関門を通過しうることが報告されている。一方カフェインも緑茶に含まれる成分であるが、*in vivo* においてカフェインによって誘導されたマウスの痙攣をテアニンが抑制したという報告もあり、脳内におけるテアニンの生理作用を調べるため、ラット大脳皮質初代培養神経細胞の細胞内 Ca²⁺流入に及ぼす影響を検討した。

【方法】ラット胎児 (胎齢 18 日) より大脳皮質を摘出し、パバイン処理により dissociate した後、培養を行った。培養 7 日目以降に、この培養神経細胞に Ca²⁺感受性色素 fura-2 を投与し、高感度ビデオカメラを用いる細胞内 Ca²⁺同時多点観察システムによって Ca²⁺濃度変動を観察した。

【結果および考察】培養 7 日目以降に培養神経細胞は、自発的にバースト発火に伴う同期した Ca²⁺オシレーションを示す。テアニンは、100 μ M 添加時にはこのオシレーションの頻度を約 20% 増加させたが、1 mM 添加時には逆に頻度を減少させた。また、この培養神経細胞のバースト発火現象は Mg²⁺存在下で抑制されるが、発火を抑制した培養神経細胞にテアニン 800 μ M を還流投与すると神経細胞内へ一過性の Ca²⁺流入が観察された。この細胞内 Ca²⁺流入は NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである D-APV によって阻害された。更に同条件下でテアニン 50 μ M 及び 200 μ M を還流添加すると、培養神経細胞は Ca²⁺オシレーションを開始した。

ところが、カフェインの投与によってオシレーションの頻度は濃度依存的に増加したが、テアニンの共投与によってカフェインの効果は抑制された。カフェインによる発火頻度の増加を抑制するテアニンが、単独の投与では 50 μ M ~ 200 μ M のオーダーで、むしろ発火頻度を増加させたのは興味深い。

059 2P 2109

大脳皮質シナプスの電位依存性カルシウムチャンネルとその加齢変化

田中康一、安藤 進
(東京都老人総合研究所・生体膜部門)

加齢に伴う脳機能の低下の要因が一つにシナプス機能の異常にあるとする「シナプス老化」の観点から、シナプス機能の加齢変化について神経化学的に検討している。マウスおよびラット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機能の加齢変化を調べた。その結果、老齢においては①脱分極刺激によるACh放出が低下すること、さらに、②ACh放出低下はその合成やシナプス内のレベルの低下によるのではなく、放出のトリガーとなるカルシウムイオン流入低下によることを明らかにした(1)。本研究では、カルシウムイオン流入に関与する大脳皮質シナプスにおける電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)の加齢変化を明らかにする目的でサブタイプの存在比とチャンネル密度の加齢変化について検討した。

L型、N型、P型、Q型の各VDCCに特異的とされる四種のペプチドブロッカーを用いて、各ブロッカーによるカルシウムイオン流入阻害からラットシナプトソームにおけるカルシウムチャンネルサブタイプとその存在比ならびに存在比の加齢変化を調べた。成熟ラットの大脳皮質シナプスのVDCCサブタイプの存在比は、L型チャンネルが24%、N型チャンネルが32%、P型チャンネルが27%、そしてQ型チャンネルが17%であることが分かった。老齢では、P型チャンネルの存在比の顕著な減少と、用いた四種のブロッカーには非感受性チャンネル、即ち、L型、N型、P型、Q型チャンネル以外のサブタイプ存在比の増加が認められた。

¹²⁵Iで標識した ω -conotoxin GVIAと ω -conotoxin MVIICのシナプス膜への結合実験によりVDCC密度の加齢変化を調べた。その結果、Kd値に有意差は認められなかったが、Bmax、すなわち最大結合サイトの顕著な減少が老齢シナプス膜で認められた。このことから、老齢のシナプスにおいては、VDCCの密度が減少していることが示唆された。これらの前シナプスにおける電位依存性カルシウムチャンネルの加齢変化が、カルシウムイオン流入低下とそれに引き続くアセチルコリン放出の低下の要因となることが推察された。

1) Tanaka Y., Hasegawa A. & Ando S., *J. Neurosci.*

Res. (1996) 43:63-70

060 2P 2108

PC12D細胞においてムスカリン性アセチルコリン受容体刺激による細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、ストア作動性とレセプター作動性の二つの異なるCa²⁺チャンネルの活性化により引き起こされる

郭 非凡、海老原 達彦、David Saffen (東京大学医学部神経生化学)

PC12D細胞においてムスカリン性アセチルコリン受容体のm1サブタイプを刺激すると、PKCと細胞外Ca²⁺の流入を介して前初期遺伝子が発現することを以前に報告した。ムスカリン性アセチルコリン受容体がどのようなメカニズムによりCa²⁺の流入を引き起こすのかを調べるために、細胞内のCa²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺の濃度変化による細胞内fura2の蛍光変化を分光蛍光光度計(日本分光)で測定した。この研究により、カルバコール刺激による細胞内へのCa²⁺流入は、二つの異なるチャンネルを介して引き起こされるという証拠が得られた。チャンネル1は、1) ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるカルバコールにより速やかに活性化され、同受容体のアンタゴニストであるアトロピンにより速やかに不活性化される、2) Ba²⁺に対し高い透過性を示すがMn²⁺は透過させない、3) 温度低下に対し比較的非感受性である、4) thapsigargin非感受性である、5) ホルボールエステルにより強く阻害されるものであった。一方、チャンネル2は、1) カルバコールにより徐々に活性化され、アトロピンにより徐々に不活性化される、2) Ba²⁺に対してはわずかな透過性しか示さないが、Mn²⁺に対しては高い透過性を示す、3) 温度低下感受性である、4) thapsigarginにより活性化される、5) ホルボールエステルにより弱い阻害を受けるものであった。これらの結果により、チャンネル1は細胞内Ca²⁺ストアの状態とは相関性を持たない、受容体作動性のCa²⁺チャンネルであり、チャンネル2はストア作動性のCa²⁺チャンネルであることが示唆された。この両方のチャンネルがホルボールエステルにより阻害されたという事実は、ムスカリン性アセチルコリン受容体によるCa²⁺流入がムスカリン性アセチルコリン受容体によるPKCの活性化により制御されるという負のフィードバックが存在することを示唆するものである。

061 2P 2107

ニューロブラストーマCell Lineにおける神経特異性カルシウム結合タンパクとN-Mycの発現との相関

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)

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ィン(CB)およびカルレチニン(CR)は、ニューロブラストーマCell Lineにおいて発現が見られるがその程度が異なっている。細胞の分化の方向性を調節することが知られているレチノイン酸あるいは、TNF- α によるCBおよびCRの発現の調節について検討し、腫瘍の悪化の指標として知られている、N-Mycの発現との相関を検討した。Cell Lineとして、NB-1, TGW, IMR-32およびGOTOについて、とくに、CBおよびCRの発現が多く見られるNB-1については、アポトーシスとの関係を検討した。

増殖期培養細胞系に、1-100ng/mlのTNF- α あるいはレチノイン酸としては生物活性が最も強い9-cis-レチノイン酸を10⁻⁶~8M加えて、48時間培養した。

分子発現の検出は、それぞれのプローブを用いて、ノーザンブロットにより、 α -Tubulinの発現を指標として比較した。アポトーシスの検討は、形態学的には、Hoechst-33342およびPropidium Iodide(PI)染色、あるいは、Annexin-V-Fluos(Boehringer社)染色で検討し、さらにFlow-Cytometryを実施した。

TNF- α はIL-1b, 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ている。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をCBが促進していることが報告されている。一方、ニューロブラストーマCell lineにおいては、TNF- α によってCB, CRの発現は阻害された。また、腫瘍細胞の分化の方向性の指標としてのN-Mycの発現との比較検討は、これら神経細胞のサブセットに特異的に発現しているCBやCRの機能を解明するためのモデル系としての、ニューロブラストーマの導入には意義あるものと思われる。またレチノイン酸については、さまざまな細胞系において分化促進効果が知られているが、NB-1においてはN-Mycの発現を低下させたが、TNF- α にはそのような効果が認められなかった。

062 2P 2106

ヒト脳に存在する新しい神経特異カルシウム結合蛋白質(HLP4)のcDNAクローニング

酒井栄一、小林正明、野口鉄也、高松 研

(東邦大学医学部第2生理)

神経系において、4個のEF-hand構造とN末端ミリスチン酸付加配列を共通構造として持つ、分子量約23kDaのカルシウム結合蛋白質の一群が同定され、神経特異カルシウム結合蛋白質ファミリー(NCBPファミリー)と呼ばれている。我々は、この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、hHippocalcin、hHLP2およびhHLP3を同定している。今回、新たなcDNAクローンを同定し、ヒト脳内での局在の検討および染色体番号決定を行った。

ヒト脳cDNAライブラリーをhHippocalcin cDNAをプローブとして緩やかな選別条件でスクリーニングし、9個の独立したクローンを得た。これらのクローンは、制限酵素切断のパターンから新たな分子種に対応すると考えられ、hHLP4と命名した。最も長く、全蛋白質翻訳領域を含むhHLP4 cDNAは全長1,324bpで、翻訳領域は576bpからなり、191残基のアミノ酸からなる推定分子量22,202Da、等電点4.61の新規蛋白質をコードしていた。hHLP4の一次構造中には、NCBPファミリーに共通する4個のEF-hand構造とN末端ミリスチン酸付加配列の存在が認められた。また、既知のNCBPファミリー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、hHLP4はラットNVP2との間に最も高い相同性を示した。

次に、ヒトの各臓器より調製したmRNAを用いたノーザンブロットの結果、hHLP4 mRNAは脳に特異的な5.2kbの単一バンドとして認められた。そこで、既にヒトで得られていたものも合わせた、4分子種について、脳内各部位より調製したmRNAを用いたノーザンブロットを行った。hHLP4は大脳皮質、海馬、扁桃体に強く発現しており、各分子種ごとに脳内分布が異なっていることが明らかとなった。

さらにヒト/ハムスター体細胞雑種株由来のDNAを用い、PCRにてヒト特異的遺伝子を増幅すること、concordance/discordance解析を行ったところ、hHLP4遺伝子は第17番染色体に存在することが明らかとなった。

063 2P 2105

アフリカツメガエルの背腹軸形成における
IP₃/Ca²⁺伝達系の役割

桑 昭苑¹、武藤 彩¹、岡野 栄之⁴、御子柴 克彦^{1,2,3}
¹新技術開発事業団御子柴細胞制御プロジェクト、²東大・医科学研究所・化学、³理研(筑波)分子神経生物学、⁴阪大・医

細胞内の遊離カルシウムの増加は受精時の卵の活性化において重要な役割を担うことが考えられている。初期胚発生においても、フォスファチジルイノシトール (PI) の代謝回転を阻害する LiCl が、二次胚形成を誘導し、細胞内イノシトール 3 リン酸 (IP₃) の濃度を減少させることが知られており、初期胚発生において重要な役割を担うことが考えられている。

我々は、初期胚の形態形成の分子機構を明らかにする為に、アフリカツメガエルの系を用いて、IP₃ のシグナル伝達系の胚発生における作用機構を詳細に検討するため、アフリカツメガエル IP₃ 受容体に対する特異的阻害活性をもつモノクローナル抗体を単離し、これらの阻害抗体を用いて IP₃ 受容体の初期胚における形態形成の役割を検討した。

アフリカツメガエル IP₃ 受容体 C 末端を抗原とし、モノクローナル抗体を作成した。in vitro のアッセイ系を用いてアフリカツメガエルの初期胚より調製したミクロソーム画分からの IP₃ によるカルシウム放出 (IICR) を指標にスクリーニングし、機能阻害抗体を得た。初期胚で強制発現した mAChR に対するアゴニスト依存的なカルシウム遊離の阻害を指標で assay したところ、これら複数の IP₃R モノクローナル抗体はそれぞれカルシウム遊離の阻害活性の程度が異なることがわかった。これらモノクローナル抗体をアフリカツメガエル初期胚に微小注入したところ、4 細胞期の腹側の割球へ注入により特異的に二次軸が生成された。生成された二次軸は頭部構造を欠く部分的な二次軸であった。in vitro の RT-PCR 法を用いた外植体の解析により、抗体の注入により腹側が背側に運命転換されたことが明らかとなった。同じ抗体量による二次軸誘導能はモノクローナル抗体の IICR の阻害活性に相関していることより、IP₃/Ca²⁺伝達系は腹側化シグナルを伝達することが強く示唆された。

064 2P 2104

膜分画に存在する ADP リボシル環状
化酵素の薄層クロマトグラフィー (TCL)
による測定

東田陽博、横山 茂、橋井美奈子、野田百美
 (金沢大学・医・神経物性)

伝達物質受容体刺激後、セカンドメッセンジャーとして細胞内 Ca が増加する。この増加は、細胞外からの Ca 流入と細胞内イノシトール三リン酸感受性 Ca プールおよびリアノジン感受性 Ca プールからの Ca の動員により生じる。神経細胞でも細胞内 Ca 増加が Ca 動員を生じることは知られている。この Ca 動員をモデュレートする内在物質としてサイクリック ADP リボース (cADPR) が知られている。cADPR は NAD⁺ を基質として、ADP リボシル環状化酵素 (ADP-ribosyl cyclase) により生じる。哺乳動物 ADP-ribosyl cyclase として CD38 や BST-1 が知られているが、それらは細胞外にその活性部位を持つ。従って、それらの酵素とサブストレートとしての細胞内の NAD⁺ や cADPR 産物との関係において矛盾がある。

そこで今回、その疑問に答えるつもりで、神経モデル NG108-15 細胞の膜分画の ADP-ribosyl cyclase を簡単に測る方法を検討した。

100,000 g 沈渣中の粗膜分画を酵素源として、2 μM NAD⁺ と 0.06 μCi [³H] NAD 存在下 0.5-16 分、37℃ インキュベートし、トリクロロ酢酸で反応を停止した後、TCL で分画した。cADPR 中に見出されている [³H] カウントは、時間、NAD 量に依存し増加した。40-60 分間で、19 サンプルまで測定出来た。現在 ADP-ribosyl cyclase の活性をどの程度正確に測定しているかを種々の方法で検討している。

065 2P 2103

嗅覚受容体の培養細胞系での発現

稲木公一郎、芳賀達也、東原和成
(東京大学医学部神経生化学)

匂い物質は、嗅細胞嗅毛膜上で認識され、化学信号が電気信号に変換され中枢神経系に入力される。現在までに、数百種類に及ぶ大ファミリーを形成する嗅細胞特異的なGタンパク質共役受容体が遺伝子クローニングされ、推定上の嗅覚レセプターとされている。哺乳類の嗅覚レセプターの培養細胞での機能的発現の報告はほとんど例がない。その理由は、培養細胞系での嗅覚レセプターの発現が難しかったこと、匂い物質が多種多様にわたっていること、レセプターとの結合アッセイ系が確立されていないなどが主な原因である。我々は、ラット嗅覚レセプターを伸長因子のプロモーター制御下にmyc-tagを付けた形で組み込み、哺乳類由来培養細胞で発現させることに成功した。RT-PCRとWestern blotより転写産物および発現タンパク質の存在を確認した。興味深いことに、嗅覚レセプターのなかには、そのままでは発現せず、アミノ末端領域をムスカリン性アセチルコリンレセプターとのキメラにすることにより発現するものもあった。この結果はアミノ末端領域が嗅覚レセプターの発現の制御に関わっている可能性を示唆している。次に、これらの発現した嗅覚レセプターの匂い応答アッセイを、 Ca^{2+} 濃度の上昇を指標に100種以上の匂い物質を使って試みた。さらに、嗅覚組織特異的なGolf・Gq/iキメラ・Gq/olfキメラなどを共発現させることによってどのGタンパク質とカップリングするかを調べた。

066 2P 2102

G蛋白質 α サブユニットの免疫沈降に伴う γ サブユニットの解析

上田 浩、森下理香、仙波りつ子、加藤兼房、
浅野富子
(愛知県コロニー・発達障害研究所)

三量体GTP結合蛋白質(G蛋白質)は α 、 β 、 γ の3つのサブユニットからなり、 β と γ は常に結合している。各サブユニットには多くの分子種が存在し、 α の各ファミリー間にははっきりした機能の違いが示されているのに対し、 β と γ については、一部の γ に認められているが、その他の分子種には顕著な差がみられていない。私達は γ の分子多様性の生理的意義について研究を進めているが、今回はまず、 α と γ 間に選択的な組み合わせがあるかどうかを検討した。各種 α サブユニット(Go、Gi、Gs、Gq/11)に対する抗体を用いて、ラット脳、C6グリオーマ、Swiss 3T3線維芽細胞の抽出液の免疫沈降を行い、共沈してくる $\beta\gamma$ 複合体の γ の分子種をウエスタンブロットで比較した。既報のように各種 γ の発現は細胞の種類で大きく異なるが、ひとつの細胞または脳内では各 α に伴う γ の種類や比率にほとんど差がみられなかった。免疫沈降を行っている間に $\alpha-\beta\gamma$ 間の交換が起こっている可能性も否定できないが、 α と γ 間には選択性がないのではないかと考えられる。

この結果は、1種類の α に対する抗体で免疫沈降を行えば、その細胞に含まれているすべての γ を共沈させることができることを示している。そこで、ラット脳、PC12、C6細胞中の γ の全分子種を知るために、上記の場合よりやや大きいスケールで免疫沈降した。沈降物を1% コール酸で処理すると、 $\beta\gamma$ が α サブユニット/抗体/protein A 結合 Sepharose ビーズから解離するので、これをTricine/SDS-PAGE後、蛋白染色で観察した。脳では主要な $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 7$ 以外に未同定の易動度の大きい γ がみられた。PC12には $\gamma 3$ と $\gamma 5$ 、C6細胞には $\gamma 5$ と $\gamma 12$ 以外に複数の同定できていない γ が存在した。これらの未同定の γ について解析を進めている。また、脳の発達に伴う γ の顕著な変化が観察された。

067 2P 2101

Gタンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) によるチュブリンのリン酸化

芳賀和子、芳賀達也、*室伏擴

(東大・医・神経生、*東大・理・生)

Gタンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) は基質特異性が厳しく、その基質となりうるのは活性化されたGタンパク質共役受容体にほとんど限られている。GRK2はアゴニスト結合受容体とGタンパク質 $\beta\gamma$ サブユニットによって相乗的に活性化され、これが基質特異性の理由と考えられる。 $\beta\gamma$ サブユニットはGRK2のC末端のプレクストリンホモロジー (PH) 部位に結合する。このC末端に結合する成分を検索中、チュブリンが結合することを偶然見出した。

GRK2のC末端部分を含むグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合蛋白質 (GRK2C-GST) に結合する成分をブタ脳可溶性画分から検索した。分子量55 kDaの成分の結合が見出され、そのN末端のアミノ酸配列を決定したところ、 β チュブリンに一致した。更に、ブタ脳からの精製チュブリンがGRK2C-GSTに結合することが確認された。チュブリンの結合は $\beta\gamma$ サブユニットの結合によって影響されず、両者はGRK2C末端の別々の部位に結合すると考えられる。

精製したチュブリンはGRK2によってリン酸化された。Kmは3 μ Mで、2量体当たり1.2モルのリン酸が取り込まれ、リン酸化部位はチュブリンのC末端部分と推測された。チュブリンのリン酸化反応は、Gタンパク質 $\beta\gamma$ サブユニットとアゴニスト結合m2ムスカリン受容体 (リン酸化部位を欠失させた変異体) によって促進された。タキソール存在下に重合したチュブリンも同様にリン酸化された。リン酸化されたチュブリンは沈殿しやすい傾向を示したが、これが微小管生成によるものか、その他の会合体形成によるものかは現在検討中である。

チュブリンはCa-カルモジュリンキナーゼやsrkなどによってリン酸化されることが報告されているが、その生理的意味は明らかではない。GRK2によるリン酸化の生理的意味も現在不明で、今後の課題である。

068 2P 2100

ドーパミン D2 受容体の GRK2 によるリン酸化と細胞内移行-変異体による解析

岩田 健¹⁾²⁾、伊藤 和光²⁾、芳賀達也²⁾¹⁾東京医科歯科大学医学部神経精神医学教室²⁾東京大学医学部神経生化学教室

ムスカリン m2 受容体や β 2 アドレナリン受容体が Gタンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) によりアゴニスト依存性にリン酸化され、その結果細胞内移行が促進されることが知られている。我々はドーパミン D2 受容体が CHO 細胞でアゴニスト依存性に細胞内移行すること (糸川他、1995)、COS 細胞での D2 受容体の細胞内移行が GRK2 の共発現に依存すること (伊藤他、投稿中) を明らかにしてきた。CHO 細胞には GRK2 が内在性に発現し、COS 細胞に GRK2 を共発現すると D2 受容体のアゴニスト依存性リン酸化が増加する。これらの結果は GRK2 によるリン酸化によって D2 受容体の細胞内移行が起こることを示唆している。この仮説を確かめ、同時にリン酸化部位を同定するため、D2 受容体変異体を作製して細胞内移行実験を行った。

ヒト D2 受容体の第三細胞内ループ内の SSTS (256-259) を AAAAA に変えた変異体を Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech) と PCR 法にて作製した。SSTS 配列は酸性アミノ酸に囲まれ GRK2 によるリン酸化部位であると推測された。野生型と変異型の D2 受容体を CHO または COS 細胞にリポフェクション法で一過性に発現させ、親水性標識化合物 [³H] Sulpride との結合実験をおこなった。細胞表面からの [³H] Sulpride 結合部位の減少を D2 受容体の細胞内移行の指標とした。

ドーパミン刺激により細胞内移行する D2 受容体の割合は、CHO 細胞に発現した野生型で $20.0 \pm 1.7\%$ 、変異体で $7.7 \pm 2.5\%$ 、COS 細胞に単独で発現させた野生型で $10.7 \pm 7.3\%$ 、変異体で $12.0 \pm 1.2\%$ 、GRK2 と共発現した野生型で $29.7 \pm 3.2\%$ 、変異体で $18.9 \pm 2.6\%$ であった。

これらの結果は (1) 第三細胞内ループの SSTS 配列が GRK2 による細胞内移行の促進にとって重要な部位であること、(2) この配列以外の部位の関与もあり得ることを示している。

069 2P 2099

メタンフェタミン投与後のラット線条体でのNOの変化

丸井幸之助, 柏原健一, 秋山一文*, 庄盛敏彦
(岡山大学医学部神経内科学教室,
* 岡山大学医学部神経精神医学教室)

一酸化窒素(NO)は当初血管拡張物質として報告されたが,その後,中枢神経系で神経伝達物質あるいは神経修飾物質としての生理活性が知られるようになった。たとえば,脳虚血時の神経変性過程,パーキンソン病など神経変性疾患の変性過程への関与が示唆されている。我々は反復投与により中枢ドーパミン系に長期持続性の変化を生じることが知られるMAPをラットに投与し,線条体でのNO濃度の変化をin vivo microdialysis法により検討した。

7週齢の雄SDラットの左線条体にペントバルビタール麻酔下にて透析チューブを植え込んだ。36~48時間後,透析チューブを人工髄液にて2 μ l/minの速度で灌流開始した。3時間後より灌流液の回収を始め,20分間隔で4時間連続回収した。回収開始1時間後にMAP 3mg/kgあるいは生食を腹腔内投与した。以後3時間にわたりサンプルを回収した。

NO濃度は代謝産物であるNO₂とNO₃濃度の和(NO_x)で評価した。測定には東京化成工業の自動分析器(Model TCI-NOX 500S)を用いた。得られた値はMAP投与直前値が100%となるよう変換し,統計処理を行った。

MAP3mg/kg投与後の線条体細胞外NO_x濃度の変化にはコントロール群と比べ有意な差は見られなかった。

Di MonteらはMAPの神経毒性発現にNOが介在すると報告した。彼らはMAPは直接グルタミン酸の放出を介して,あるいは間接的にドーパミンの放出を介してNOの産生を誘導するのではないかと推測している。本研究からはMAPが線条体でのNO産生に影響しないことが明らかとなった。

070 2P 2098

ドーパミンのN端欠損ヒトチロシン水酸化酵素1型(hTH1)変異体に及ぼす影響

太田 明¹, 中島 昭¹, 森 啓至¹, 永津 俊治²

(¹ 藤田保健衛生大学医学部生理学教室¹, 総合医科学研究所分子遺伝学Ⅱ/神経化学²)

カテコールアミン生合成系の律速酵素であるhTH1は497個のアミノ酸からなり,その調節部位はN端に存すると考えられている。我々は一連のN端欠損hTH1変異体を大腸菌に発現させ,この調節部位の機能にとりN端より52アミノ酸残基の間に重要な配列が存在することを既に報告している。今回,各変異体の酵素活性をドーパミンと前駆置後測定することにより,この配列を更に詳細に同定しようと試みた。

全長hTH1 cDNAを鋳型にしたPCRによりNdeI部位を5'側転写開始部位、BamHI部位を3'側非翻訳領域に導入しwild-type並びに29、31、33、35、37、38、39、40、44及び49個のアミノ酸を欠失した複数のN端欠損変異体をcodeするNdeI-BamHI断片を作製した。これら断片をpET3cベクターに接続して大腸菌BL21(DE3)にtransfect後、IPTGにより目的の酵素タンパク質の発現を誘導した。酵素検体として菌体破碎上清を用い、ドーパミンと前駆置後の酵素反応によって基質L-チロシンより生成したL-ドーパをHPLC法にて定量してTH活性とし、酵素活性の至適水素イオン濃度に対するドーパミンとの前駆置の影響を検討した。

ドーパミンとの前駆置はwild-typeよりN端側38個のアミノ酸残基欠損変異体に至る迄,その酵素活性を塩基性領域において濃度依存性に抑制したが,その程度は欠損の度合いに反比例していた。更に39個、40個、44個及び49個のアミノ酸残基欠損変異体においては,ドーパミン10 μ Mとの前駆置による酵素活性抑制効果は認められなかった。以上の観察結果より,Gly³⁶-Arg³⁷-Arg³⁸-Gln³⁹-Ser⁴⁰の配列が,N端側に存在する酵素活性調節部位の中で重要な位置を占める可能性が推定された。

071 2P 2097

内在性1BnTIQ類縁化合物のドーパミン神経系に対する作用

河合 洋*、古武 弥一郎*、牧野 由紀子*、廣部 雅昭*、太田 茂**

(*東京大学薬学部、**広島大学医学部総合薬学科)

パーキンソン病発症物質候補の一つと考えられる1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ)の構造を基に、分子内にドーパミン骨格を含む1-(3',4'-dihydroxybenzyl)-TIQ (3',4'DHBnTIQ)、6,7-dihydroxy-1BnTIQ (6,7DHBnTIQ)を分子設計し、その内在性、in vitro、in vivoにおける作用を検討した。

まずGC/SIM法を用いてマウス脳内より検出し、DHBnTIQ類の内在性を示し、次にラット脳の線条体シナプトソームを用いてドーパミンレセプター類に対する親和性、ドーパミントランスポーター(DAT)による神経細胞内への取り込みについて検討した。

1BnTIQ類はD₁、D₂に対してIC₅₀値数μM程度の親和性を示し、1BnTIQと比較すると6,7DHBnTIQでは親和性が上昇し3',4'DHBnTIQでは減少する傾向が認められた。

細胞内への取り込みは、いずれのDHBnTIQについてもDATを介した特異的な取り込みが観察された。両者のK_m、V_{max}を比較すると3',4'DHBnTIQの方が6,7DHBnTIQより取り込まれやすいことが示された。これは3',4'DHBnTIQ分子内のドーパミンの方が、細胞内輸送に有利な立体配置をとりやすいためと思われる。

C57BLマウスを用いてDHBnTIQ類の薬理作用を検討した。両化合物とも急性的に運動量の減少を引き起こし、その活性は6,7DHBnTIQの方が強かった。また、連続投与を行うと、3',4'DHBnTIQによりパーキンソン病様の形態、行動異常が観察され、この化合物が内在性パーキンソン病発症物質候補となり得ることが示唆された。6,7DHBnTIQではそのような作用は認められなかった。

DHBnTIQによる作用は急性、慢性毒性で異なった経路をとると考えられる。急性毒性はドーパミンレセプター阻害によるものであり、パーキンソニズムの発現にはDATを介した細胞内への特異的な取り込みが関与していることが考えられる。

072 2P 2096

テネイシン遺伝子欠失マウスのドーパミン系薬物による行動変化

深間内 文彦*、王 益珩*、俣賀 宣子**、

日下部 守昭***

(*東京医歯大・難研・プロジェクト、**理研・フロンティア、***理研・ライフサイエンス筑波研究センター)

細胞外マトリックス分子であるテネイシンは神経発生後期に大脳皮質や海馬の神経細胞に強く発現し、また小脳顆粒細胞の垂直移動を誘導あるいは修飾していることが明らかにされており、脳のネットワーク形成過程に関連して情動、記憶、学習などの高次神経機能に関与している可能性も高い。テネイシン遺伝子の第2エクソンを標的遺伝子組換えにより欠失させたマウスのなかに、体重増加不良、低妊娠率、サーカディアンリズムの乱れ、新規環境への馴化困難などをはじめとして、終始落着きのない多動性、オープンフィールドにおける回転性の常同運動などの特徴的な行動異常を示す個体が存在することを見出した。行動異常を示すテネイシン遺伝子ノックアウトマウス、対照群としてヘテロマウスおよび野生型マウスについて脳内各部位(大脳皮質、線条体、海馬、小脳)を取り出し、各サンプルの酸性抽出液を処理して電気検出器付高速液体クロマトグラフィーにより、ドーパミンを中心にモノアミン神経伝達物質とその代謝産物を分析測定したところ、ドーパミンに関しては線条体と海馬で代謝回転率が低下していることが確かめられた。今回、ドーパミン受容体アゴニストであるアポモルフィンを腹腔内投与したところ用量依存的に行動量を抑制したが、これは常同行動の出現によるものではなく、テネイシン遺伝子欠失マウスは少なくともアポモルフィンに対して、野生型とは行動上異なる反応様式を示した。さらに、脳内ドーパミンニューロンの一部で共存するペプチドであるコレシストキニン(CCK)のB受容体に対する拮抗薬であるPD135158(0.1 mg/kg, i.p.)は、テネイシン遺伝子ノックアウトマウスの多動を抑制し、線条体におけるドーパミンの代謝回転を増加させた。CCK-A受容体に対する拮抗薬であるlorglumideでは行動の変化は生じなかった。これはCCK-B受容体が線条体のドーパミン神経伝達を介してテネイシン遺伝子ノックアウトマウスの多動性に関与していることを示唆するものである。

073 2P 2095

PC12細胞におけるカテコラミンおよびテトラヒドロピオプテリン合成系の調節

坂本秀生、藤田 興、葛谷博敏

(藤田保健衛生大学 総医研 分子生物)

GTPサイクロヒドロラーゼ I (GTPCH-I) は、GTP からテトラヒドロピオプテリン (BH_4) の *de novo* 生合成系の律速酵素と考えられている。 BH_4 は、カテコラミン、セロトニン合成に関わる芳香族アミノ酸水酸化酵素の補酵素である。またアルギニンから一酸化窒素の生成に必須な因子と考えられている。

PC12細胞にモノアミン酸化酵素(MAO)、カテコラミン α -メチル転移酵素(COMT)の各阻害剤、及びドパミン、NGFを使用してカテコラミンを上昇させ、チロシン水酸化酵素(TH)阻害剤、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)阻害剤を使用してカテコラミン量を低下させ細胞内GTPCH-I 活性、総ピオプテリン量及びカテコラミン量の測定を行った。

MAO-COMT阻害剤混合物添加、NGF添加によるドパミン量はそれぞれ増加し、ドパミン濃度はTH阻害剤添加とAADC阻害剤添加により低下し、ドーパ量はAADC阻害剤添加で上昇した。

GTPCH-I活性及び総ピオプテリン量は、MAO-COMT阻害剤混合物では減少したが、NGFでは増加傾向を示し、ドパミン添加では減少した。TH阻害剤及びAADC阻害剤ではGTPCH-I活性はともに低下したが、総ピオプテリン量は前者では減少し、後者では変化しなかった。

以上のようにMAO-COMT阻害剤とドパミン添加によるドパミンの増加は、GTPCH-I 活性の低下と総ピオプテリン量の減少を引き起こした。NGFによるドパミンの増加では、GTPCH-I活性の上昇と僅かな総ピオプテリン量の増加を来した。TH阻害剤によるドパミンの減少は、GTPCH-I 活性、総ピオプテリン量の低下を引き起こした。AADC阻害剤によるドパミンの減少ではGTPCH-I活性は低下した。

すなわち、THの作用と直接関連の無いドパミン量の増加では、 BH_4 生合成系をdown regulationするが、カテコラミン代謝の変化がTHの作用と比較的関連が大きい場合には、THの BH_4 要求性に依存して、合成系が調節されることを示唆する。

074 2P 2094

SKF 38393 の線条体内注入により一過性に遊離されるドパミンの由来について：マイクロダイアライシス法による検討
富山勝則、三枝禎、越川憲明、小林雅文
(日本大学歯学部薬理学教室)

ドパミン(DA) D_1 レセプターアゴニストの SKF 38393 をラットの線条体背側部に注入すると、注入部位近傍の細胞外液中 DA 量は一過性に著明に増加する。すでに我々は、この増加が Ca^{2+} 非依存性かつ TTX 非感受性であり、不活性体の (-)-SKF 38393 でも活性体の (+)-SKF 38393 でも同様に生じることから D_1 レセプターを介するものではないことを報告した。

そこで今回は、この増加した DA がシナプス小胞由来であるか否かについて、シナプス小胞の DA トランスポーター阻害薬であるレセルピンを前処置することにより検討を加えた。

実験には体重約 250 g の S-D 系雄性ラットを用い、薬物脳内注入用チューブを透析膜の近傍に取り付けた透析プローブを用いて 20 分ごとに HPLC-ECD により細胞外液中の DA 量を測定した。

レセルピンの投与量、前処置時間は Harsing ら(Eur. J. Pharmacol. vol.218, 1992)の報告を参考にし、5 mg/kg を SKF 38393 脳内注入 24 時間前に腹腔投与した。

Basal level の DA 量は SKF 38393 単独投与群で 4.9 pg/sample、レセルピン前処置群で 5.4 pg/sample であったが、レセルピン投与 24 時間後には 0.7 pg/sample に減少した。SKF 38393 (1.5 μ g) 注入 20 分後の DA 量は単独投与群では 98.5 pg/sample に増加し、その後速やかに減少した。これに対して、レセルピン前処置群では 40.3 pg/sample に増加しており、レセルピン前処置により SKF 38393 誘発 DA 増加は、約半分に減少することが認められた。

以上のことから、SKF 38393 により生じた一過性の DA の増加はその約半分がシナプス小胞内に蓄えられていた DA に由来することが示唆された。

075 2P 2093

アデノウイルス・ベクターを用いたGDNFの遺伝子導入

渡部和彦*, 大橋十也**, 松本 陽*, 木暮一成*, 田沼直之*

(*東京都神経科学総合研究所神経病理, **東京慈恵会医科大学小児科/DNA医学研究所遺伝子治療)

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor)は、中脳ドパミン・ニューロンに対して強力な神経栄養活性を有することから、パーキンソン病に対する治療効果に期待が寄せられている。本研究では、GDNFの遺伝子導入による治療の可能性を追究する目的で、GDNF cDNAを含む組換えアデノウイルスを作成し、その発現を検討した。

ヒト脳・培養アストロサイトよりクローニングしたGDNF cDNA (coding region 全長 633 bp) を発現ユニットとして、アデノウイルス・ゲノムから E1A, E1B, E3遺伝子を欠損したウイルスDNAをもつ発現コスミドカセットpAxCawt (東京大学医科研・斉藤泉先生より供与) に組込んだ。このコスミドカセットDNAと親ウイルスDNA-末端蛋白複合体 (TPC) を293細胞に co-transfect し、初代組換えアデノウイルス液を得、さらにウイルス液を293細胞で2回継代し精製ウイルスを得た。

COS-1細胞にこのウイルス液を1-2時間接種し感染させたところ、ヒトGDNF mRNA (RT-PCR) の発現・蛋白の培養上清中への放出 (ELISA) を認め、蛋白量は接種24時間後で5ng/mlに達し、western blotではこの放出GDNF蛋白はnative GDNFと同様グリコシル化されていた。また、内在性にGDNF mRNAを発現しているマウス・シュワン細胞株MS32にウイルスを接種したところ、ヒトGDNF mRNA・蛋白の発現を認める一方、内在性のマウスGDNF発現には影響を与えなかった。新生児ラット脳初代培養系でも、ウイルス接種により安定したヒトGDNF mRNA発現が少なくとも接種4週間後までみられた。同培養系の二重蛍光抗体法では、アストロサイトのほかオリゴデンドロサイトにもGDNFの発現を認め、少なくとも後者のGDNF発現は組換えウイルス接種によるものと考えられた。一方、成熟ラット線条体に精製ウイルスを接種したところ、ヒトGDNF mRNAの接種組織内での発現を認めた。

今回作成したGDNF組換えアデノウイルスは安定したヒトGDNF mRNA・蛋白の発現を誘導した。これらの結果はそのままin vivoにおける治療実験に反映されうると考えられ、現在検索を進めている。

076 2P 2092

フェンシクリジン誘発 place preference におけるドパミン作動性神経系の役割

野田 幸裕*, 鍋島 俊隆*, 小林 和人**, 永津 俊治***

(*名古屋大学医学部医療薬学附属病院薬剤部, **奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター動物分子工学, ***藤田保健衛生大学総合医学研究所分子遺伝学研究部門II)

フェンシクリジン (PCP) は、conditioned place preference (CPP) 法において place aversion (PA) を誘発するが、PCP を連続投与したラットやマウスにおいて、PCP 誘発 PA は place preference (PP) に変化する。この現象は、ヒトにおいて PCP を急性的に投与すると、ほとんどのヒトが嫌悪刺激として感じるが、連用により依存が形成されるという知見と類似している。PCP 誘発 PA の発現機序については、かなり検討されているが、PCP 誘発 PP については、全く検討されていない。ドパミン (DA) 作動性神経系は、依存形成に重要な役割を果たしていることが報告されているので、PCP によって誘発される PP おける DA 作動性神経系の関与について検討した。

動物は、ddY 系雄性マウスおよび tyrosine hydroxylase (TH) 活性を遺伝的に 50 % 以下に低下させたヘテロマウス (+/-) を用いた。CPP 法の装置は、実験者が任意にギロチンで仕切ることのできる黒色の部屋および床面に白色の網を敷いた透明の部屋からなるアクリル製のものを使用した。実験スケジュールは、Kitaichi らの方法 (Eur. J. Pharmacol. 318: 7, 1996) を若干変更して行った。

PCP (10 mg/kg/day s.c.) を 28 日間連続投与したマウスにおいて PCP (8 mg/kg s.c.) は、PP を誘発したが、TH^{-/-} ヘテロマウスに PCP を連続投与しても、PCP は、PP を誘発しなかった。TH 阻害薬の alpha-methyl-para-tyrosine (100 mg/kg i.p.) は、PCP 誘発 PP を用量依存的に抑制した。さらに DA 作動性神経系の神経毒の 6-hydroxydopamine (100 microgram/mouse) によって、PCP 誘発 PP は有意に抑制されたが、ノルアドレナリン作動性神経系の神経毒の DSP-4 (30 mg/kg i.p.) では何ら影響されなかった。一方、methamphetamine (1 mg/kg/day s.c.) を 14 日間連続投与したマウスにおいて PCP (8 mg/kg) は、PA でなく、PP を誘発した。

以上の結果から、PCP 連続投与後に PCP 誘発 PA が、PP に変化した作用機序には、少なくとも一部は、DA 作動性神経系の機能亢進が関与しているものと思われる。

077 2P 2091

側坐核ドーパミンニューロン破壊はモチベーションを低下させるか?

II. 低動因下累進比率強化スケジュール遂行による検討

堀 耕治、田中健一、和田尚子、野村正彦

(埼玉医科大学第一生理学教室)

側坐核は、報酬によるオペラント行動の強化に重要な働きをもつと考えられるドーパミン(DA)系の終末領域である。われわれは、報酬を得るために要求される反応数が累進的に増加していく累進比率(PR)強化スケジュールを用いて側坐核DAの選択的枯渇の効果を検討したが、餌報酬の強化価に変化は見られなかった。ところが最近、いわゆるfree-loadingの行動選択肢を含む選択行動場面を設定してオペラント反応への行動配分を低減させると、側坐核DAの枯渇がオペラント反応の出現頻度をさらに低下させることが報告されている。この事実は、餌強化場面における行動配分に側坐核DAが関与することを示唆するものと解釈された。しかしfree-loadingによって生じた低動因状態では、餌報酬に対する“モチベーション”の反映としてのオペラント行動の出現頻度が側坐核DAの枯渇に敏感に反応するという解釈もなりたつ。この可能性を検討するため、摂食制限を通常よりはるかに緩めた条件下で、PRスケジュール遂行におよぼす側坐核DAの選択的枯渇効果を検討した。

自由摂食時の95%に体重を統制したWistar系ラットに対し、餌ペレットを報酬としてレバー押し反応のPRスケジュール訓練を連日おこなった。行動が安定した時点で、pentobarbital麻酔下で、実験群には6-OHDA (10 mg/ml) を、統制群にはvehicleのみを両側性に (1 ml/side) 側坐核に投与した。処置後3週間のPR訓練の後、側坐核におけるDA, norepinephrine, serotoninの含量をHPLC-ECDにより定量した。

その結果、レバー押し反応を中止するブレイクポイントを処置前後で比較すると、実験群は統制群に比較して有意に低下していた(すなわち実験群は「あきらめが早い」)。しかし実験群のブレイクポイントは徐々に処置前の水準に戻り、処置後2週目、3週目では群間差は見られなかった。このことは、低動因状態下において、側坐核DAの選択的枯渇が餌報酬に対する“モチベーション”を一時的に低下させることを示唆する。

078 2P 2090

閉所ストレスによるラットのrebound hyperphagiaの増強と前頭前皮質ドーパミン代謝におよぼすジアゼパムの影響

栗岡政典¹⁾、切池信夫¹⁾、井上幸紀¹⁾、岩崎進一¹⁾、藤壽泰利^{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

本学会において我々は、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となり、更に閉所条件を加えるとそれが増強されることを見だし、これを過食の動物モデルとして検討を重ねてきた。今回閉所条件下で増強されたrebound hyperphagia時の摂餌行動と前頭前皮質(PFC)ドーパミン(DA)代謝に対するジアゼパム(DZP)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。

前報と同じくラットを22時間のみ絶食させ自由摂餌を行わせた群(A群)、1日2時間の制限給餌を1週間続けた後自由摂餌を行わせた群(B群)、1日2時間の制限給餌を1週間続けた後、閉所条件下にて自由摂餌を行わせた群(C群)に分け、それぞれの群でVehicle, DZP (1.0, 3.0 mg/kg)を腹腔内投与し、2, 4, 24時間後の摂餌量を測定した。更に、Vehicle, DZP 3.0 mg/kgを投与した時の各群におけるPFCでの細胞外液中DA, DOPAC, HVA濃度をマイクロダイアリシス法を用いて測定した。統計学的解析にはrepeated ANOVAを用いた。

DZP 1, 3 mg/kg投与でrebound hyperphagiaは認められたがその閉所条件による増強は認められなかった。また、Vehicle投与群のうちC群においてのみ自由摂餌時のPFCのDA代謝の亢進が認められたが、DZP投与群では自由摂餌時のPFCのDA代謝の変化を認めなかった。以上の結果より、閉所ストレスによるrebound hyperphagiaの増強にPFCでのDA代謝が関与していることとDZPは閉所条件によるrebound hyperphagiaの増強を抑制することが示唆された。

079 2P 2089

マウス線条体ドパミン濃度とドパミンドパミン受容体およびドパミントランスポータ活性の関連について

盛政忠臣、金行孝雄¹⁾、庄盛敏彦岡山大学医学部神経内科学教室、¹⁾岡山県大保健福祉

マウス線条体ドパミン濃度を、12種の系統間で比較したら、最大で、1223pmol/mg protein から最少で、557pmol/mg protein の濃度差があるという結果を得ている。しかしこれらの通常の実験動物には、少なくともドパミンの関与が示唆されるような行動上の特有な差異は観察されない。演者らは、同一母集団から行動遺伝学的に異なる2種類の亜系を10世代以上にわたって分離してきた。これら2種類の亜系の間で、同様な線条体ドパミン濃度の大きな差異が示された。本研究では、このような動物を用いて、神経終末における神経伝達物質代謝の制御機構を明らかにする目的で、線条体におけるドパミン濃度（プール）と受容体および再取り込み機構（トランスポータ）の関連について検討を加えた。

実験動物は、上述の近交系の中から選抜育種によって行動遺伝学的に分離された二つの亜系HA群とLA群である。D1アゴニスト（SKF-3839; 0, 10, 50 mg/kg ip）、D2アゴニスト（bromocriptine; 0, 1.5 mg/kg ip）またはドパミントランスポータ（reuptake）阻害剤（GBR12935; 0, 2, 10 mg/kg ip）を投与後に、マイクロウエーブ処理の後、線条体を採取して、HPLCによりドパミン濃度を測定した。

D1アゴニスト投与の結果LA群においてドパミン濃度の増加が示された。これは、自己抑制性オートレセプター機能が低いことを反映する結果であると考えられた。

D2アゴニスト投与の結果HA群においてドパミン濃度の低下が示された。これは、自己抑制性オートレセプター機能が低いことを反映する結果であると考えられた。

一方、ドパミントランスポータ阻害剤投与による、ドパミン濃度の変化は、いずれの群においても示されなかった。

以上の結果から、線条体ドパミン濃度を制御する因子としては、生理的には、トランスポータ機構よりは自己抑制性オートレセプター機構の関与が大きいことが示唆された。

080 2P 2088

脳内在性パーキンソンニズム防御物質
1-methyl-TIQ生合成酵素の探索研究

山川貴宏*、太田茂**

* 東京大学薬学部薬品代謝化学講座

** 広島大学医学部総合薬学科社会薬学講座

我々はこれまでにテトラヒドロイソキノリン骨格を有する1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (TIQ)、1-methyl-TIQ (1MeTIQ)を内在性物質としてヒト、ネコ、ラット、マウス脳より検出し、そのうち1MeTIQをパーキンソンニズム防御物質として報告している。TIQ類はフェネチルアミン骨格を有する化合物と各種アルデヒド、 α -ケト酸またはその類縁体が閉環縮合して生成すると考えられ、これまでにnorlaudanoline、salsolinolの生合成について研究が行われている。1MeTIQは内在性アミンである2-フェニルエチルアミン (PEA)と炭素2つのユニット (C2 unit)より生合成されると考えられるが、1MeTIQは芳香環に活性置換基を持たないため、閉環には何らかの触媒的な機構が存在すると考えられる。また1MeTIQは生体内では光学活性体として存在しており、1MeTIQの生成に酵素が関与している可能性が考えられる。1MeTIQ生合成酵素はパーキンソン病と何らかの関与があるものと推測され非常に興味深い。そこで1MeTIQがPEAとC2 unitより酵素関与で生合成されるとの作業仮説をたて実験に着手した。

ラット脳ホモジネートを酵素源としてPEAとビルビン酸をインキュベートすると、1MeTIQが生成した。これはGC/MSにより同定した。本酵素活性の細胞内分布を調べたところ、ミトコンドリアーシナプトソーム画分 (P2 fraction)に存在していた。可溶化条件について検討したところ、P2 fractionを0.5% デオキシコール酸ナトリウムで処理することにより可溶化された。現在この可溶化上清をさらに精製している。この酵素はパーキンソンニズム防御物質の生合成を司っていることから、パーキンソン病の発症防御機構解明の一助となると考えられ、非常に興味深いと思われる。

081 2P 2087

85kDa 細胞質型ホスホリパーゼ A2 の脳内分布に関する免疫組織化学的研究

森井 博史¹、片岡 洋祐²、松村 潔²、渡辺 恭良^{1,2}(¹ 科学技術振興事業団サブフェクトモル・パイオ認識プロジェクト、² 大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門)

脂肪酸の一種であるアラキドン酸は、プロスタグランジンなどの生合成の前駆体として知られている。また、従来より虚血などの病態における役割も報告されている。これらに加えて、最近、アラキドン酸による細胞間あるいは、細胞内情報伝達機構の調節作用に関する知見が多く蓄積されつつある。例えば、LTP/LTD, channel 活性, 神経伝達物質の遊離/取り込み活性, protein kinase C 活性などの調節が報告されている。この様な中枢作用を持つアラキドン酸は、85kDa 細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cPLA2) の活性化により産生されることが提案されている。そこで、免疫組織化学的手法を用いて cPLA2 のラット脳内分布を検討した。

cPLA2 は脳全体に広く分布していたが、白質部分にはほとんど染色が見られなかった。大脳皮質では、錐体細胞とその樹状突起に強い染色が見られた。海馬では、錐体細胞層や歯状回が強く染色され、特に CA1 領域では錐体細胞の樹状突起にも陽性所見を得た。また、小脳では、プルキンエ細胞とその樹状突起に強い染色が見られ、顆粒細胞などにも陽性所見を得た。我々は、これまでも小脳初代培養細胞において、プルキンエ細胞をはじめとする神経細胞に cPLA2 が発現していることを見出し出しているが、本結果は、その知見とも一致する。さらに、その他の領域でも種々の神経核などの神経細胞に陽性所見が得られた。しかしながら、グリア細胞に関しては、一部の細胞しか染色されず、通常では、ほとんどの細胞では発現量が非常に低い可能性が考えられる。この様に、cPLA2 は脳全体の神経細胞ならびにグリア細胞に分布していた。このことは、cPLA2 により産生されたアラキドン酸が種々の神経機能の調節に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

082 2P 2086

prostaglandin A1 analog による p21^{Waf1/Cip1/5d1} の発現増強と増殖抑制効果: ヒトグリア系細胞株を用いて谷川元紀、中西 真¹、富永 薫¹、金子葉子¹、池田恭治¹、古田享史²、鈴木正昭²、山田和雄
(名古屋市立大学脳神経外科、国立長寿医療研究センター¹、岐阜大学工学部²)

prostaglandin A1 (PGA1) は p21 の発現を誘導し、それを介する細胞増殖抑制能、in vivo における抗腫瘍効果を示すことが報告されている。この PGA1 は simple enone 構造を持っているが、それに対して cross conjugated dienone 構造を持つ PGA1 の analog を化学合成し、それらの、p21 の発現を介した細胞増殖抑制能を検討した。

ヒトグリオーマ細胞株 A172 を用いて、9 個の PGA1 analog と PGA2, PGJ2, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 の、投与後一定時間における細胞数の計測、FACS により増殖および細胞周期への影響、Northern Blot Analysis, Western Blot Analysis による p21 の発現増強効果を評価した。

各 compound は種々の程度に A172 細胞を G1 期に停止し、またそれに相関して、p21 mRNA (1.1~6.8 倍) および protein の発現増強を認めた。特に著明な効果を示した analog は 15 位の OH 基と 13 位の二重結合を持ち、12 位と 15 位の不斉炭素の絶対配置が、(12S, 15R) または (12R, 15S) であった。

これらの analog は PGA1 の約 6~7 倍の力価を持っていた。さらに、これらは、血液の中で極めて不安定な天然型 PGA1 および PGA2 と比較して生物学的に安定であることが確認されており、臨床応用への可能性が示唆された。また PGJ2 および 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 の A172 細胞に対する効果はあまり強くなく、PGA は、peroxisome proliferator-activated receptor γ を介して作用するとされる PGJ2 および 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 とは異なる経路を介して効果を発現すると考えられた。

083 2P 2085

プロテインキナーゼCで磷酸化された
MARCKS に対する特異抗体の作製

山本秀幸、大石康晴、宮本英七

(熊本大学医学部第一薬理学教室)

Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) は脳および、血管、内分泌組織などに多量に存在し、カルモジュリンやアクチンとの結合蛋白質であることが知られている。MARCKS はプロテインキナーゼC (Cキナーゼ) の良好な基質であるが、両蛋白質との結合は磷酸化反応により阻害される。私達は試験管内で MARCKS の他の部位がサイクリン依存性キナーゼで強く磷酸化されることを報告した¹⁾。今回、細胞内および、組織切片での Cキナーゼによる MARCKS の磷酸化反応を検出する目的で、磷酸化 MARCKS に対する特異抗体を作製した。

Cキナーゼで磷酸化を受ける二箇所の部位を含む磷酸化ペプチドを合成し、家兎に免疫して抗血清を得た。得られた抗血清から、非磷酸化ペプチドと磷酸化ペプチドを結合させた二種類のカラムを用いて磷酸化 MARCKS に対する特異抗体を精製した。精製した特異抗体は ELISA 法では当該磷酸化ペプチドとのみ強く反応し、非磷酸化ペプチドや他の磷酸化部位を含む磷酸化ペプチドとの反応性はほとんど認められなかった。免疫ブロット法ではラット脳より精製した MARCKS を Cキナーゼで磷酸化したときのみ抗体との反応性が認められた。脳や NG108-15 細胞の粗抽出液を用いても抗体は Cキナーゼで磷酸化された MARCKS とのみ反応した。各種培養細胞を用いた検討では NG108-15 細胞や血管平滑筋細胞を PMA で処理したときに、免疫反応性の増加が認められた。血管平滑筋細胞で、免疫組織化学的にも PMA 処理後の磷酸化 MARCKS の増加が確認された。本細胞ではエンドセリンや腫瘍壊死因子 α (TNF α) の添加でも MARCKS の磷酸化が増加した。

これらの結果より、得られた抗体が細胞や組織切片での磷酸化 MARCKS の検出に極めて有用であることが示唆された。

- 1) Yamamoto H. et al. (1995) J. Neurochem. 65, 802-809.

084 2P 2084

培養ラットアストロサイトカルシニューリン
の病態的意義

浅野省一、松田敏夫、田熊一敏、馬場明道

(大阪大学薬学部薬理学教室)

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性セリン/スレオニン蛋白ホスファターゼ、カルシニューリンは、脳に多く存在しており、免疫組織学的研究で、特に神経細胞に局在していることが報告されている。神経系におけるカルシニューリンの役割として、神経伝達物質の遊離や種々の蛋白機能の調節、また脳虚血等の病態発現への関与が多く報告されているが、グリア細胞におけるカルシニューリンの存在並びにその役割は不明である。我々は、培養アストロサイトで Ca^{2+} パラドックス様障害 (低 Ca^{2+} 溶液短時間曝露後に正常溶液で再灌流すると持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加とそれに伴った遅発性細胞死) が起こること、そしてこれが再灌流障害のインビトロモデルとして考えられることを報告している (Eur. J. Neurosci. 8: 951-958, 1996)。また、本アストロサイト再灌流障害に対する種々の薬物の作用を検討し、FK506 の保護作用を見いだした。今回は、培養アストロサイトでのカルシニューリンの存在とその病態的意義について報告する。

実験には、生後1日齢の S.D. 系ラット大脳皮質より調製したアストロサイトを用いた。細胞障害は、MTT アッセイにより、また単一細胞内 Ca^{2+} 濃度は蛍光プローブを用い測定した。FK506 は藤沢薬品工業株式会社よりご提供いただいたものを、その他は市販品を使用した。

FK506 は低濃度 (0.1-10 nM) でアストロサイト Ca^{2+} パラドックス様障害を抑制した。FK506 の作用はラバマイシン (1 μ M) により拮抗された。シクロスポリン A (1 μ M)、デルタメスリン (20 nM) も同様な保護作用を示したが、オカダ酸は抑制作用を示さなかった。FK506 は、再灌流後の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加に影響を与えなかった。ウエスタンブロッティングにより、本培養細胞にカルシニューリンの A 及び B サブユニットの存在が確認された。また、グリア細胞のマーカーである GFAP の抗体とカルシニューリン B サブユニットの抗体を用いた細胞二重染色で、両蛋白が同一細胞に存在していることが示された。

以上カルシニューリン阻害薬を用いた成績、並びに免疫化学的成績は、培養ラットアストロサイトにおけるカルシニューリンの存在と、その病態的意義を示している。

085 2P 2083

脳内における Ca^{2+} /カルモデュリン依存性キナーゼ II δ サブユニットの特異的発現竹内有輔^{*,**}, 山本秀幸^{*}, 宮川太平^{**}, 宮本英七^{*}(熊本大学医学部^{*}第一薬理学教室, ^{**}神経精神医学教室)

Ca^{2+} /カルモデュリン依存性キナーゼ II (CaM キナーゼ II) は、脳内の多様な反応に関与することが示唆されている。CaM キナーゼ II には α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種類のサブユニットの存在が知られている。 α と β サブユニットは神経細胞に主に存在するのに対し、 γ と δ サブユニットは末梢組織にも存在している。今回我々は、 δ サブユニットの脳内での機能を明らかにする目的で本酵素の存在部位を検討した。

δ サブユニットのみに認められるアミノ酸配列由来のペプチドを合成し、家兎に免疫して抗体を作製した。また、脳より 4 種類のサブユニットの cDNA を得た。得られた cDNA を発現ベクターに組み込み NG108-15 細胞に導入した。各々のサブユニットを発現する細胞の粗抽出液を用いた免疫プロットにより、作製した抗体の特異性が確認された。ラット 脳の各部位を用いた免疫プロットでは、小脳、脳幹、視床に δ サブユニットが多量に検出された。小脳と大脳を用いた細胞分画法では、 δ サブユニットは小脳の核分画に多量に認められた。また、ラット 脳の免疫組織染色では、小脳の顆粒細胞層と分子層、橋、オリブ核の細胞に強い染色性が認められた。小脳の顆粒細胞でのみ核が強く染色された。

これらの結果より、 δ サブユニットは脳内の特定の部位に存在することが示唆された。また、小脳の顆粒細胞では核移行シグナルを持つ δ サブユニットの存在が示唆された。

086 2P 2082

PSD へ移行した細胞質カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の性質と PSD タンパク質のリン酸化

吉村 好之、山内 卓 (徳島大・薬・生化学)

カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II

(CaM キナーゼ II) は脳に豊富に存在し、記憶をはじめ多くの神経機能の調節に主要な役割を果たしていると考えられている。一方、シナプス後肥厚 (PSD) はシナプスにおける神経伝達に重要な役割を持つと考えられており、CaM キナーゼ II はその重要な構成蛋白質として存在している。PSD CaM キナーゼ II は大部分不活性型として存在すると言われており、その生理的役割は明らかでない。私達は PSD CaM キナーゼ II の神経伝達における役割を検討中であるが、最近細胞質の CaM キナーゼ II が自己リン酸化により、PSD へ移行することを明らかにしたので、さらに詳細に検討した。その結果、細胞質の CaM キナーゼ II は自己リン酸化された場合のみ、PSD と結合し、その脱リン酸化により PSD から解離し、移行が可逆的であることが明らかになった。PSD に移行した CaM キナーゼ II は Ca^{2+} 非依存性の活性を保持しており、全活性も従来の不活性型の PSD CaM キナーゼ II に比べ 2.6 倍の高い活性であった。PSD への結合は細胞質の CaM キナーゼ II の濃度に依存し、CaM キナーゼ II は 1 mg の PSD 蛋白質当たり最大で約 60 μg 結合した。これは PSD 蛋白質の約 6% に相当した。移行した CaM キナーゼ II は、クマシー染色によって検出された PSD 蛋白質のうち 20 種類以上の蛋白質を Ca^{2+} 非存在下にリン酸化することが二次元電気泳動により明らかになった。

以上の結果から、神経刺激による細胞内への Ca^{2+} の流入に伴い、細胞質の CaM キナーゼ II が PSD に移行し、種々の蛋白質をリン酸化することにより、シナプス後細胞において神経伝達の調節が行われるものと考えられる。

087 2P 2081

Acyl-CoAによるラット海馬スライスからのグルタミン酸遊離と長期増強における役割

張 勤増、宮崎真理、酒井久美子、吉田 敏
(大分県大実験実習機器センター)

海馬シナプスの逆行性伝達物質として、アラキドン酸 (AA) や PAF、NO などが研究されている。AA の場合細胞内の生理的条件下では速やかに CoA エステル化されるので、20:4-CoA などの acyl-CoA の神経伝達およびシナプス長期増強における役割を調べる目的で、海馬スライスでの、acyl-CoA 添加によるグルタミン酸 (Glu) 遊離と、化学的シナプス長期増強状態でのスライス内 acyl-CoA の変動、および化学的長期増強発現の画像化による確認、に関して検討した。

ラットの海馬より約 100 μ m の厚さのスライスを切り出し Culture Insert に載せて、グルタミン酸微小電極 (Sycopel) で Glu 遊離をスライス表面で測定した。海馬の神経細胞に化学的長期増強を発現させる Tetraethylammonium Chloride を含んだ刺激培地 (*Stim*) によって、組織中に増大する acyl-CoA は、Oligonucleotide Purification Cartridge と HPLC で定量的に測定した。さらに、この *Stim* 中で起こる海馬の長期増強を可視化するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光性 Concanavalin A によるスライス組織表面糖鎖の染色性の変動を画像化した。

海馬スライスに 20:4-CoA や 18:2-CoA (1.6 nmol) を加えると、スライスからの Glu の遊離が明瞭に観察できた。遊離脂肪酸として AA を加えた時は 20:4-CoA の時よりも Glu 遊離は少なかった。ドコサヘキサエン酸を取り込ませたスライスでは acyl-CoA による Glu 遊離パターンは異なっていた。一方、海馬スライスにおける acyl-CoA の量は、*Stim* による刺激系では 10 分間 incubation の後、コントロールに比べて有意に増大していた。なかでも、16:0-CoA と 18:1-CoA の増大は顕著であり、20:4-CoA (+18:2-CoA) の増大も有意であった。これは、神経刺激の中で異なる Phospholipase 系が働いている可能性を示唆する。また、この化学的長期増強の系では、*Stim* に置換した後、糖鎖が変動し突起が動く様子を画像化して捉えることが出来た。

以上より、海馬シナプスの化学的長期増強においては acyl-CoA が生成遊離され、それが逆行性に遊離脂肪酸以上に Glu の遊離を促進する可能性を強く示唆する。

088 2P 2080

培養ラット海馬神経細胞における MARCKS の磷酸化反応

大光正男、福永浩司、宮本英七
(熊本大学医学部第一薬理学教室)

N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型グルタミン酸受容体は海馬のシナプス伝達長期増強 (LTP) などのシナプス可塑性の発現に関与している。海馬 CA1 領域における LTP の発現には CaM キナーゼ II とプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化反応が重要である。培養海馬神経細胞を用いて、NMDA 受容体刺激に伴う *in situ* での磷酸化反応、特に、PKC の基質である myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) の磷酸化反応を解析した。

生後 1 日目のラットから培養した海馬神経細胞を、あらかじめ 32 P-無機磷酸でラベルした。10 μ M のグルタミン酸の刺激に伴って、MARCKS の磷酸化反応は持続的に亢進した。この磷酸化反応の上昇は NMDA 受容体、および AMPA 受容体の阻害剤共存下で完全に抑制され、代謝型グルタミン酸受容体の阻害剤はほとんど抑制効果を示さなかった。グルタミン酸受容体のアゴニストを用いて調べると NMDA 処理によって MARCKS の磷酸化反応は最も強く刺激され、その反応は持続的であった。一方、AMPA および代謝型受容体のアゴニストである ACPD 処理によっても磷酸化反応は亢進したが、その反応は一過性であった。NMDA 受容体刺激に伴う MARCKS の磷酸化反応に対する PKC、MAP キナーゼの阻害剤の効果を検討した。予想に反して、PKC 阻害剤、calphostin C ではほとんど抑制効果が見られず、MAP キナーゼの阻害剤、PD 98059 によってほぼ完全に抑制された。蛋白分解酵素処理後ペプチドマップ法で *in situ* における MARCKS の磷酸化部位について調べた。グルタミン酸刺激後に亢進する磷酸化部位は *in vitro* での MAP キナーゼによる磷酸化部位と一致しており、阻害剤を用いて得られた結果を支持した。以前、私達はグルタミン酸受容体刺激に伴う MAP キナーゼの活性化反応について報告している (1)。これらの結果から海馬神経細胞において MARCKS の磷酸化反応はグルタミン酸受容体刺激に伴って持続的に亢進すること、この磷酸化反応の持続には、NMDA 受容体の活性化反応と、続いて起こる MAP キナーゼの活性化反応が関与することが明らかとなった。

(1) Kurino et al., *J. Neurochem.* 65, 1282-1289 (1995)

089 2P 2079

ニューロン特異的リン酸化タンパク質 (PNP14/ β -シヌクレイン)の発現分布と加齢に伴う発現量の変動

平林敬浩*, 中条茂男*, 塩田清二**, 中井康光**, 中谷一泰*

(昭和大学・*薬学部生物化学、**医学部第一解剖学)

我々が見いだした分子量約14,000のニューロン特異的リン酸化タンパク質 PNP14 (Phospho-neuroprotein14/ β -Synuclein)は家族性パーキンソン病への関与が示唆されている α -シヌクレインの相同タンパク質である。本研究ではPNP14、およびそのmRNAのラット脳内における発現分布、ならびに加齢に伴う発現量の変化を、老齢ラット脳を用いて*in situ* ハイブリダイゼーション、およびイムノプロット法で解析した。

PNP14 mRNAの成熟ラット脳における発現を解析した結果、大脳では海馬、梨状皮質、小脳では顆粒層に強くプルキンエ細胞層に弱く発現が認められ、また、嗅球では内顆粒層、僧帽細胞層、糸球状シナプス複合体層に強い発現が見られた。これらの結果と免疫組織化学的に得られた解析結果を比較したところ、海馬、嗅球ではmRNAの発現部位とタンパク質の発現に相関性が見られたが、小脳での本タンパク質の発現はプルキンエ細胞層、顆粒層では見られず、分子層に強い発現が認められ、mRNA発現との間に相違が認められた。分子層に見られる多くの平衡線維はプルキンエ細胞の樹上突起にシナプスを形成していることから、この結果は、PNP14は主に顆粒層で生合成され、軸索輸送により分子層の神経終末に運ばれ機能している可能性が示唆される。

加齢によるPNP14 mRNAの発現様式の変動を5週齢、1年齢、2年齢ラット脳を用いて調べたところ、年齢差による発現部位の変化は認められなかった。また、海馬、小脳において、加齢に伴い減少傾向が見られ、嗅球ではほとんど変化しなかった。同様にイムノプロットで解析したところ、いずれの領域においても減少傾向が認められ、老化への関与が示唆される。

090 2C MS8-1

CaM キナーゼ II α アイソフォームを発現するハイブリッド細胞の作成およびその性質

藤井 望帆、吉村 好之、山内 卓

(徳大・薬・生化)

カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaM キナーゼ II) は神経組織に高濃度で存在し、幅広い基質特異性を有することから、神経伝達物質の合成や放出、遺伝子発現、長期増強といった神経機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。特に、CaM キナーゼ II の α アイソフォームは、シナプス後肥厚では主要構成成分として存在し、海馬において全タンパクの約2%を占めている。

本酵素の機能や神経特異的発現を培養細胞を用いて解析するために、本酵素を発現する細胞株が必要であるが、現在のところ、このような研究に適した細胞株は報告されていない。そこで、大脳細胞と神経芽細胞の融合により、CaM キナーゼ II α アイソフォームを発現するハイブリッド細胞の作成を試みたところ、目的の細胞を分離することに成功した。すなわち、マウスの胎児の大脳細胞と神経芽細胞 (N18TG2) をポリエチレングリコールを用いて融合し、HAT選択をおこなうことによりハイブリッド細胞が得られた。

CaM キナーゼ II 活性とイムノプロットングにより、CaM キナーゼ II を発現する細胞を分離し、そのうち3種のクローンについて単一細胞からクローン化し細胞株を樹立した。得られたハイブリッド細胞は短い突起をもち、CaM キナーゼ II 活性が N18TG2 に比べ2~4倍高く、免疫染色により、ニューロフィラメント陽性、GFAP 陰性であり、基本的な神経細胞の性質を有していることが示唆される。またcAMP 処理により、24時間以内に長い突起が形成された。しかし、NGFやBDNF、NT-3 処理では細胞の形態に変化はみられなかった。

現在、ハイブリッド細胞で発現しているCaM キナーゼ II の性質をより詳しく調べるとともに、脳で発現していることが知られている他の因子についても解析を行っている。

091 2C MS8-2

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)の新しい活性制御機構：

CaMキナーゼキナーゼに対する感受性の可逆
的变化による活性制御

奥野幸子、木谷隆子、藤澤 仁
(旭川医科大学第一生化学教室)

CaMキナーゼIVはCaMキナーゼIIとともに脳に多いカルモデュリン依存性多機能性プロテインキナーゼの1つで、カルシウムイオンによる脳のシグナル伝達に重要な役割を担っている。CaMキナーゼIVはCaMキナーゼカスケードの上流のCaMキナーゼキナーゼによって触媒ドメイン内のThr-196がリン酸化されて活性化されるがこの活性制御機構についてさらに検討した。

ラットのCaMキナーゼIVとCaMキナーゼキナーゼのcDNAを大腸菌および昆虫細胞Sf-9に発現させて得た組換え型酵素を精製して実験に用いた。CaMキナーゼキナーゼによるリン酸化反応の基質にはキナーゼ活性を失わせた変異酵素(K71R)CaMキナーゼIVのcDNAを作製し、Sf-9に発現させて用いた。

CaMキナーゼIVはCaMキナーゼキナーゼとリン酸化条件下でインキュベートするとThr-196がリン酸化されて著明に活性化されるが、CaMキナーゼIVをカルシウム/カルモデュリン存在下に30℃でブレインキュベーションするとブレインキュベーション時間に依存してCaMキナーゼキナーゼによるリン酸化が起こらなくなり、30℃、5分間のブレインキュベーションでリン酸化の程度はもとの10%にまで低下し、同時にCaMキナーゼキナーゼによる活性化も低下した。このCaMキナーゼキナーゼに対する感受性が低下したCaMキナーゼIVにEGTAを加えてカルシウムイオンを除き、マグネシウムイオンを加えてさらにブレインキュベーションを続けるとCaMキナーゼキナーゼによるリン酸化と活性化はもとのレベルにまで回復した。この結果はCaMキナーゼIVがカルシウム/カルモデュリンによってCaMキナーゼキナーゼに対して感受性の低いフォームに可逆的に変換されることを示している。

これはプロテインキナーゼカスケードの下流のプロテインキナーゼが上流のプロテインキナーゼに対する感受性を可逆的に変化させることによる新しい活性制御機構の存在を示すものとして興味深く思われる。

092 2C MS8-3

海馬のシナプス可塑性における MAP キナー
ゼの役割

福永浩司、金堀瑞穂、宮本英七
(熊本大学医学部薬理学第一教室)

細胞外シグナルによって活性化され、MAP キナーゼの主要なメンバーである ERK 1, ERK 2 は中枢神経系に広く発現している。非神経細胞では細胞増殖・分化に関っている。一方、中枢神経系では神経の発達過程でのシナプス可塑性においても重要な役割を果たしていることが示唆されているが作用機構は不明である。私達はこれまでに海馬神経細胞、グリア細胞における MAP キナーゼの活性化機構について調べてきた(J. Neurochem. 65, 1282-1289, 1995)。本研究では海馬神経細胞における脳由来神経栄養因子 (BDNF) 刺激に伴う MAP キナーゼの活性化機構、活性化部位について調べた。さらに、海馬長期増強 (LTP) においても活性化されることを見出したので報告する。

培養 8 日目のラット海馬神経細胞において、BDNF は MAP キナーゼを 10 ng/ml の濃度で最大に活性化した。この活性化反応は MEK 阻害剤である PD 98059 によってほぼ完全に抑制され、プロテインキナーゼCの阻害剤である calphostin C によって部分的に抑制された。磷酸化された活性型 MAP キナーゼを認識する抗体を用いて、MAP キナーゼの活性化部位を検討した。BDNF 刺激に伴って、神経細胞の細胞体および樹状突起で活性型 MAP キナーゼに対する抗体による強い染色性が見られた。この MAP キナーゼの活性化部位は BDNF 受容体である Trk B の抗体による染色部位と一致していた。さらに、BDNF による活性型 MAP キナーゼの染色性の上昇は、PD 98059 処理によって完全に抑制された。次に、³²P-無機磷酸でラベルした海馬神経細胞を用いて、BDNF 受容体刺激後の細胞内磷酸化反応について調べた。synapsin I, MARCKS など主に前シナプスに存在する機能分子の磷酸化反応が亢進した。これらの磷酸化反応も PD 98059 によって有意に抑制された。

海馬 LTP において MAP キナーゼが活性化されること、BDNF の mRNA が誘導されることを考え合わせると、BDNF による MAP キナーゼの活性化反応、続いておこる前シナプスの機能分子の磷酸化反応が海馬シナプス可塑性の調節に関っていると考えられる。

093 2C MS8-4 2078

NMDA receptor(NR2B)とセリン・スレオニンキナーゼによるリン酸化依存性に結合する蛋白質の同定

高宮考悟*, 乾誠**, 山田康枝**, 川嶋望*, 孫傑*, 田所智子*, 祖父江憲治*

(*大阪大学医学部バイオ神経生化学, **山口大学医学部薬理学教室)

NMDA receptorは、シナプス可塑性において主役をなすreceptorであることが知られている。また、Protein kinase A(PKA), Ca^{2+} -calmodulin dependent kinase II(CaMK-II), Protein kinase C(PKC)等のセリン・スレオニンキナーゼも、シナプス後膜においてシナプス可塑性に重要な役割を果たしていると考えられる。さらにNMDA receptorのsubunitのうちNMDA receptor 2B(NR2B)が、CaM-KII, PKCでリン酸化されることが示唆されている。今回我々は、NMDA receptorのセリン・スレオニンキナーゼによるリン酸化の意義を検討するために、NR2Bのcytoplasmic domainをセリン・スレオニンキナーゼによりin vitroでリン酸化し、リン酸化依存性に結合する蛋白質の同定を行った。NR2Bのcytoplasmic domain(1134-1483)とGSTとのfusion proteinを用いてaffinity columnを作製し、上記三種のセリン・スレオニンキナーゼでリン酸化した後、ラット大脳上清よりaffinity columnに結合する蛋白質を得て、SDS-PAGEにより解析した。三者のセリン・スレオニンキナーゼでリン酸化したNR2B cytoplasmic domainには、いずれも分子量約30kDaの蛋白質がリン酸化依存性に結合した。現在この蛋白質の同定と解析を行っている。

094 2P 2077

エタノールによるサブタイプ特異的ムスカリン性アセチルコリン受容体mRNAの増加
王 益珺*, 侯賀 宣子**, 深間内 文彦*

(*東京医科歯科大・難治疾患研究所・プロジェクト、

**理化学研究所・フロンティア)

アルコールが脳に与える影響については言うまでもないが、中枢性ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する細胞内情報伝達系に関わる報告も数多い。今回、我々は神経由来の細胞株であるNCB-20とNG108-15を用いてエタノールのムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプに与える効果について実験を行なった。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、それぞれのサブタイプは組織分布や生化学的特性、そして細胞内情報伝達系に関わるエフェクターシステムも異なっている。一方、NCB-20とNG108-15は共通の親株である神経芽細胞腫N18TG2に由来し、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のみを発現している。エタノール(200mM)を培養細胞に添加し(~72時間)、受容体サブタイプに特異的なcDNAを用いたmRNAの定量的解析、[³H]QNBによる結合実験、細胞内cyclicAMP、イノシトールリン脂質代謝の測定を行なった。

NG108-15では、[³H]QNB結合部位数、m4-ムスカリン性アセチルコリン受容体mRNAの発現は時間依存的に増加したが、細胞内cyclicAMP含量は逆に減少した。NCB-20においても上記とほぼ同様な結果が再現されたが、m1-mAChR mRNAの発現量およびイノシトールリン脂質代謝回転については変化がなかった。これらの両細胞株でm4-ムスカリン性アセチルコリン受容体mRNAの発現量と細胞内cyclicAMP含量が逆相関にあることはm4-ムスカリン性アセチルコリン受容体が、cyclicAMPにより負の制御を受けていることを示唆している。

095 2P 2076

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 (VI) : ACh 分泌における 5-HT_{2A} 受容体と 5-HT₃ 受容体との相互関係

平野 均、松田芳人*、平田牧三、山田通夫*

(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教室)

5-HT による皮質 ACh 分泌の制御機構の解明の一環として、前頭葉 ACh 分泌における 5-HT_{2A} 受容体と 5-HT₃ 受容体の相互関係について、脳微小透析法を用いて検討した。

Wistar 系雄性ラットを使用し、前頭葉への透析プローブ留置術を施行した。2 日後、無麻酔・自由行動下のラット前頭葉に人工脳脊髄液を還流し、透析液中に回収される ACh を 10 分間隔で測定した。5-HT₃ 受容体 antagonist の ICS-205,930 は H₂O に、5-HT₂ 受容体 agonist の DOI と 5-HT_{2A} 受容体 antagonist の ketanserin は saline に、またプローブを介して前頭葉に局所投与(60 分間)した ICS-205,930 と 5-HT₃ 受容体 agonist の 2-Methyl-5HT は脳脊髄液中に溶解した。

ICS-205,930 (s.c.) は一過性に前頭葉 ACh 分泌を増加させたが、対照群と比較して有意差は認められなかった。局所投与した ICS-205,930 も、ACh 基礎分泌値には影響をもたらさなかった。局所投与した 2-Methyl-5HT も、ACh 分泌には影響しなかった。Ketanserin(i.p.) は一過性に ACh 分泌を増加させたが、対照群との比較では有意差は認められなかった。Ketanserin 投与 60 分後に ICS-205,930 を局所投与したが、ketanserin 投与群と比較して有意差は認められなかった。同様の方法で ketanserin 投与後 2-Methyl-5HT を局所投与したが、ACh 分泌には有意な変化は認められなかった。DOI (i.p.) は前頭葉 ACh 分泌を著しく増加させた。DOI 投与 60 分後に ICS-205,930 を局所投与したが、DOI 投与群と比較して有意差は認められなかった。同様の方法で DOI 投与後に 2-Methyl-5HT を局所投与したが、ACh 分泌には有意な変化は認められなかった。

5-HT₃ 受容体 agonist と antagonist は、単独では ACh 分泌に有意な影響をもたらさなかった。さらに、5-HT_{2A} 受容体を刺激したり、遮断した状態においても、これら 5-HT₃ 受容体作動薬は ACh 分泌に影響しなかった。以上から、5-HT₃ 受容体は皮質 ACh 分泌に重要な働きをしていない可能性が示唆された。

096 2P 2075

PC12 細胞における cAMP によるニコチン性アセチルコリン受容体の発現抑制 : Ras-MAP kinase カスケードとの関係

中山 均¹、山田 雅司²、畠中 寛²

(奈良県立医大 薬理学教室¹、大阪大学 蛋白質研究所 生合成部門²)

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は脳や神経節の神経細胞では少なくとも 8 種類の α サブユニットと 3 種類の β サブユニットの遺伝子が発現することが報告されているが、これら神経細胞型 nAChR の遺伝子発現調節に関する研究は最近ようやく活発になり始めたところである。その中で、PC12 細胞では NGF や cAMP による nAChR の発現調節の報告がなされ、分化やシナプス形成との関係で注目される。そこで本研究では PC12 細胞の nAChR $\alpha 3$ サブユニット mRNA に対する NGF と cAMP の影響について、特に Ras-MAP kinase カスケードとの関係に注目して検討した。

用いた PC12 細胞は、PC12 h 及び Cooper 教授から提供していただいた dominant negative Ras を恒常的に発現する cell line (M-M17-26) とそのコントロールの PC12 細胞の 3 種類で、コラーゲンコートしたプレート上で 5% 胎児牛血清と 5% 馬血清を含む DF 培地で培養した。PC12 細胞に含まれる $\alpha 3$ mRNA 量は PC12 細胞の全 RNA をノーザンブロット法で解析した。

PC12 h 細胞及びコントロールの PC12 細胞の $\alpha 3$ -mRNA は CPTcAMP を培地に添加後 1 日目では僅かに減少する程度だが、3 日目では著明に減少した。CPTcAMP は 0.08 mM 程度で最大の発現抑制効果が得られ、この down-regulation は培地に H89 を添加することにより抑制された。また、培地を TIP/DF に変えても同様の CPTcAMP による $\alpha 3$ mRNA 減少結果が得られた。更に、M-M17-26 細胞でも CPTcAMP はコントロールの PC12 細胞と同程度に $\alpha 3$ mRNA を減少させた。一方、いずれの PC12 細胞株でも NGF による $\alpha 3$ -mRNA の down-regulation は見られなかった。これらの結果は CPTcAMP による $\alpha 3$ mRNA の減少は Ras を経ないことを示唆している。

097 2P 2074

コリンエステラーゼ阻害薬非存在下における
脳内微小透析液中のアセチルコリンの
HPLC-ECD による高感度測定

芝軒 信次*・九穂 泰三*・菅原 恵**

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)

従来、HPLC-ECD を用いた細胞外液中のアセチルコリン (ACh) 濃度測定には、測定感度上の問題からコリンエステラーゼ阻害薬 (フィゾスチグミンあるいはネオスチグミン) の存在下でその測定が行われている。しかしながら、その問題点がしばしば指摘されている。そこで、本研究ではより生理的条件下での実験を可能にするために HPLC-ECD を改良し、コリンエステラーゼ阻害薬非存在下におけるラット線条体微小透析液中 ACh 濃度測定を試みた。

固定相には Elcompak AC-GEL (2.1 × 150 mm, 平均粒子サイズ: 4 μm, Eikom) を用い、移動相にはデカンスルホン酸 (300 mg/l) および EDTA・2Na (10 mg/l) 含有 0.05 M リン酸緩衝液を用いた。流速は 0.15 ml/min、カラム温度は 33℃ に設定した。白金電極への印加電位は 450 mV とした。固定化酵素 (acetylcholine esterase and choline oxidase) は固定相の直後に装着した。微小透析用プローブをリング液で灌流 (2 μl/min) することにより得られた透析液と内部標準物質として isopropylhomocholine (IPHC) を混合し、オートインジェクターのサンプルループ内に 20 分毎に直接採取した。

IPHC および ACh の溶出時間は 10.5 および 12 分であった。本測定法による ACh 1 fmole あたりの酸化電流は約 2 pA であり、ACh の検出限界は約 6 fmoles (S/N = 5 : 1) であった。ラット線条体における透析液中 ACh 濃度は 20 分間 (40 μl) あたり 31.3 ± 1.8 fmoles (平均 ± 標準誤差, N=20) であった。透析用プローブを介し、50 mM KCl を適用することにより細胞外液中 ACh 濃度の有意な増加が観察された。一方、テトロドトキシン (1 μM) 適用により有意に低下した。コリンエステラーゼ阻害薬であるフィゾスチグミン (0.03-1.0 mg/kg) を全身 (腹腔内) 投与したところ、用量依存的に細胞外液中 ACh 濃度の増加が観察された。

以上の結果より、本実験で用いた セミマイクロ化した HPLC-ECD によりコリンエステラーゼ阻害薬非存在下における脳内微小透析液中の ACh の測定が可能であり、今後神経化学的研究への応用が期待される。

098 2P 2073

老齢ラットコリン作動性神経機能に対する当
婦芍薬散の影響

小松真紀子、平松緑、譲原光利*、石毛敦*、小松靖弘*
(山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所、* (株)
ツムラ中央研究所)

当婦芍薬散には、コリン作動性神経系の賦活作用のあることが報告されている。アルツハイマー病患者の剖検脳においては、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性が減少していることが見だされていることから、当婦芍薬散はアルツハイマー病への効果が期待されている。今回は成熟ラット及び老齢ラットに当婦芍薬散を 1 ヶ月間経口投与し、ラット脳内のコリン作動性神経系の機能に対する当婦芍薬散の効果について検討した。

雄性 Wistar 系成熟ラット (24 週齢) 及び老齢ラット (103 週齢) に当婦芍薬散 (1g/l) を 1 ヶ月間経口投与した。対照群の成熟ラットと老齢ラットには水を摂取させた。ラットを断頭後氷上にて大脳皮質、海馬、線条体、中脳、橋延髄及び小脳を摘出し、分析開始まで -80℃ に保存した。アセチルコリン合成酵素のコリンアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 活性及びアセチルコリン分解酵素のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性の測定は HPLC 法により行った。ムスカリン結合部位の ³H-QNB 結合能の分析は従来のレセプターアッセイ法により行った。

老齢ラット線条体の CAT 活性は成熟ラットに比べ低下していた。老齢ラットの AChE 活性は成熟ラットに比べて線条体において増加していたが、海馬、中脳及び橋延髄において低下していた。老齢ラットの ³H-QNB 結合能については大脳皮質と線条体において増加していた。当婦芍薬散投与群の老齢ラットにおいては対照群である水投与群に比べ線条体において CAT 活性、AChE 活性及び ³H-QNB 結合能のいずれも増加していることが認められた。成熟ラットにおいては当婦芍薬散投与群では線条体の AChE 活性は増加し、海馬の ³H-QNB 結合能は低下していた。さらに 200 日齢の SD ラットの海馬における CAT 活性及び幼若ラット大脳皮質のニコチンアセチルコリン結合能は当婦芍薬散の投与により増加することが報告されている。また当婦芍薬散により 20 ヶ月齢の Wistar ラット脳の CAT 活性が増加することが認められている。今回我々は老齢ラットのコリン作動性神経の機能を改善することを見出した。今回の実験成績より当婦芍薬散は加齢に伴う痴呆の予防薬となりうる可能性が示唆された。

099 2B MS7-1 2072

分泌性蛋白質 Argos による Ras シグナルの抑制とアポトーシスの誘導に与する未知の遺伝子群の探索

田口明子¹、澤本和延^{1,2}、岡野栄之^{1,2}

1. 大阪大学医学部神経機能解剖学研究所、
2. 科学技術振興事業団, CREST

ショウジョウバエ複眼の発生における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ることが知られている。Argos は EGF モチーフを有する分泌性の蛋白質で、Ras/MAPK シグナルを抑制し、細胞分化を負に制御する。Argos の機能欠損型変異体においては眼原基における細胞死の抑制が起こり、一方過剰発現では細胞死を誘導する。今回我々は、この細胞死のメカニズムを詳細に解析した。Argos の過剰発現によって起こる細胞死は、アポトーシス阻害因子である p35 の共発現あるいは、アポトーシス誘導に必要な *reaper*, *hid*, *grim* の遺伝子量を半減させることによって抑制された。また逆に、Hid の過剰発現によって引き起こされる細胞死は Ras/MAPK シグナルの活性化によって抑制された。従って Argos による細胞死はカスパーゼを介したものであり、Ras/MAPK シグナルはアポトーシスに対して抑制的に機能することが示唆された。

Argos による Ras/MAPK シグナルの抑制とその結果引き起こされるアポトーシス誘導の分子機構は現在のところ不明であり、未知の遺伝子の関与が予想される。これら未知の遺伝子群の同定を目的として、我々は Argos の過剰発現による粗複眼 (*rough eye*) の表現型を増強もしくは抑制するような変異体の遺伝学的検索を行っている。現在、約 180 系統の欠失変異体を検索しており、その中で有意な効果を示す複数の系統を同定した。また、さらに変異原物質である EMS を用いた遺伝子のスクリーニングも進行中であり、その結果についても報告したい。

100 2B MS7-2 2071

ラット小脳外顆粒細胞の caspase を介するアポトーシスを IGF-I アナログが抑制する

田中正彦、丸野内棟

(藤田保健衛生大・総医研・応用細胞学)

我々はこれまでに、ラット新生仔の小脳スライス培養系において *in vivo* に類似した顆粒細胞のアポトーシスが起こることを見出し、これを発達脳における神経細胞死のモデル系として解析を進めてきた。このアポトーシスは、IGF-I 受容体刺激の不足によって、この時期の *in vivo* の小脳で見られるアポトーシスと同様に外顆粒層（増殖期及びその直後の顆粒細胞の存在領域）で特異的に起こるものである。また、阻害剤を用いた実験から、caspase-1 (ICE) 様プロテアーゼを介したアポトーシスである可能性が示されている。そこで、caspase-1 様プロテアーゼの関与に関して更に明らかにするために、その発現と活性をアポトーシス条件と生存条件とで比較検討した。

スライス培養は、既報 (Brain Res. 641: 319-327, 1994) の通り、生後 9 日齢のラットの小脳から作成したスライスを多孔性薄膜上に載せて行う界面培養法をとった。アポトーシスの検出は *in situ* nick end labeling 法により行った。Caspase-1 の発現は RT-PCR 法により、caspase-1 様プロテアーゼの活性は蛍光基質 Z-YVAD-AFC を用いた蛍光アッセイにより行った。

IGF-I アナログ (des (1-3) IGF-I) 無添加条件 (アポトーシス条件) と添加条件 (生存条件) での caspase-1 の発現量を比較したところ、両者に差は認められなかった。一方、caspase-1 様プロテアーゼ活性はアポトーシス条件で増加していた。ここでのアポトーシスは、caspase-1 の発現量ではなく活性化の程度によって制御されている可能性がある。あるいは、caspase-1 以外の caspase-1 様プロテアーゼが重要な役割を果たしている可能性も考えられる。

Caspase ファミリーとしては哺乳類で現在 10 種類が知られており、caspase-1 様、caspase-2 (ICH-1) 様、caspase-3 (CPP32) 様プロテアーゼに分類される。本系におけるアポトーシスは caspase-3 様プロテアーゼ阻害剤によっても抑制されるという結果が得られていることから、現在 caspase-3 様プロテアーゼの発現と活性に関しても解析中であり、これらも併せて報告する予定である。

101 2B MS7-3 2070

切片培養系におけるマウス小脳顆粒細胞の
アポトーシスにおける *p53* 遺伝子の役割

稲村 直子、榎戸 靖、下家 浩二、畠中 寛
(大阪大学蛋白質研究所生合成部門)

脳神経系におけるニューロンのアポトーシスは、非分裂細胞にとって、その死が置き換えがきかないことから重要なものと考えられている。特に、疾患あるいは障害によって生じるアポトーシスは脳神経系における機能に重大な影響を及ぼすものと考えられる。私達は既に、分散培養した小脳顆粒細胞を用いて DNA 鎖切断傷害で生じるアポトーシスに、がん抑制遺伝子 *p53* が関わっていることを明らかにしてきた。今回脳神経系を構成している様々な細胞相互の影響がどのようにニューロン死に関わっているのか明らかにする目的で、より *in vivo* に近い系である切片培養系を用い、さらに研究を進めたので報告する。

生後12日目の *p53* 野生型またはノックアウトマウスの小脳を、正中線に平行に厚さ 400 μ m にスライスし、多孔質膜上で1日間培養後、DNA 鎖切断をもたらし薬剤プレオマイシンを添加し、切片培養下のニューロンに与える影響を調べた。培養後凍結切片を作製し、ニッスル染色、TUNEL 染色、および、抗 *p53*、また *c-Fos* 抗体での免疫組織化学染色を行った。

その結果、*p53* 野生型マウスの小脳で、プレオマイシン添加により、TUNEL 陽性細胞、*p53*、*c-Fos* 抗体陽性細胞の増加がみられた。特に、TUNEL 陽性細胞が、外顆粒層と内顆粒層両方にみられたことに比べて、*p53*、*c-Fos* 抗体陽性細胞は、外顆粒層と内顆粒層の間に多く局在していた。

このことから、プレオマイシン添加によっておこる DNA 鎖切断による小脳顆粒細胞のアポトーシスにおいて、*p53*、*c-Fos* が、アポトーシスを促進する作用を特定の場所で行い、離れた細胞に作用していることが考えられ、現在 *c-Jun* 蛋白質の変動、また *p53* ノックアウトマウスについての解析を進めている。

102 2B MS7-4 2069

ヒトニューロblastoma SH-SY5Y細胞に
対するNOドナーのアポトーシス惹起と
caspaseの関与

菊地 由紀夫、上原 孝、野村 靖幸
(北海道大学薬学部薬効学教室)

我々はこれまでに、一過性脳虚血/再灌流時、ならびに培養ニューロン/グリア細胞系において、グリア細胞由来のNOがアポトーシス様のニューロン死を引き起こすことを報告してきた。今回、NOによるニューロン死惹起機構をさらに解析する目的で、種々のNOドナーを用いて株化神経細胞に対する影響と caspase (ICE like protease)活性について検討し、以下の知見を得た。

実験にはヒトニューロblastoma SH-SY5Y細胞を使用し、NOドナーとしてNOC化合物 (NOC5, NOC7, NOC18)、SNP、SNAP、SIN-1、およびGSNOを用いた。細胞死の判定は、MTT法、DNA断片化、さらに propidium iodide (PI)を用いたFACScanにより解析した。

SH-SY5Y細胞に種々のNOドナーを添加し、24-48時間後にMTT法により生存率を調べたところ、SIN-1、GSNO、NOC5、NOC7は何ら影響を及ぼさなかったが、他のNOドナーは生存率を著しく減少させた。とくに、NOC18は低濃度で著しい作用を示すことがわかった。そこで、NOC18によるニューロン死の特徴について以下、検討した。NOC18は濃度依存的、時間依存的にDNA断片化を引き起こし、オキシヘモグロビンの前処理によってこの効果は減弱した。さらに、NOC18によるDNA断片化は、caspaseのイソ酵素に対する非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBによって濃度依存的に抑制された。このことから、NOC18によるアポトーシス誘導にcaspase経路の関与が示唆された。つぎに、Ac-DEVD-MCAを基質として caspase活性を測定したところ、NOC18はcaspaseを活性化することが明らかとなった。

以上の結果から、NOドナーであるNOC18はアポトーシス様のニューロン死を引き起こすこと、この経路にcaspaseの活性化が関与していることが示された。

103 2B MS7-5 2068

小脳顆粒細胞死におけるCyclin D1等の活性化について

小池達郎、鈴木和彦、境 和久、田中秀逸
(北大・院理・生物科学)

神経細胞は発生過程で大量の細胞死を起こすことが知られ、これがシナプス形成の確立に重要な役割を果たしている。我々はプログラム神経細胞死の分子メカニズムを調べるために、小脳顆粒細胞、分化させたPC12細胞などのモデル培養系を用い細胞死カスケード産物の同定を試みてきた。特に小脳顆粒細胞系では *in vitro* で大量の神経細胞死が起こり、且つBDNFで抑制されることから中枢神経プログラム細胞死モデルとみなされる (Koike, 1991; Suzuki & Koike, 1997など)。さらに、小脳顆粒細胞を高カリウム培地で培養し、成熟した後に、高カリウム及び血清を除いてアポトーシスを誘導する系でも多くの研究がなされている。

生後一週間のラット小脳全体より単離した小脳顆粒細胞を通常のK⁺濃度 (5.4 mM) 下で培養すると、細胞は突起伸長・分化の後 (2-4DIV)、変性を始め、5-6DIVには約半数の細胞が死滅する。この細胞死はタンパク合成及びRNA合成阻害剤などにより抑制される。3 DIVの顆粒細胞を対照として5 DIVに顕著に発現する遺伝子を differential hybridization法により検索の結果、gcd 1-20のうち6遺伝子が顆粒細胞死に伴って活性化されることを認めた。特にgcd-10はノーザンブロット法で3DIVでは発現がみられず、5-6DIVでピークに達し、2.3および1.6kbpの2つの転写産物をコードしていた。gcd-10は顆粒細胞を高カリウム培地後、血清及び高カリウムを除いたアポトーシス系でも顕著に発現が増強した。更に既知の遺伝子の発現に関してもノーザンブロット法により調べた。対照としてはG3PDH (1.3kbp) の発現を調べた。c-fosは全く検出されなかった。c-jun (3.2kbp) は3DIVでもわずかに検出され、5DIVで弱く誘導された。これに対して、cyclin D1 (3.7kbp) は3DIVでは検出されず、4、6DIVで2相性のピークを持ち、顕著に誘導された。抗cyclin D1抗体による免疫組織化学では顆粒細胞とミクログリアに染色性を認め、2相性のピークはこれに由来すると考えられた。cyclin D1 (3.7kbp) の顕著な誘導は本培養条件下での小脳顆粒細胞死に対して重要な役割を持つものと考えられ、この結果は *in vivo* における免疫組織化学的実験と符合すると考えられる。

104 2P 2067

カルシウムイオン誘導細胞障害と CPP32 様プロテアーゼの活性化について

高寺 恒雄、大屋敷 孝雄

(北陸大学薬学部臨床化学教室)

脳虚血やアルツハイマー病において、その病因の一つとして考えられているグルタミン酸やアミロイドβ蛋白は、培養脳細胞の細胞内カルシウムイオンの増大を引き起こす。カルシウムイオンが引き起こす細胞死の機構はまだよくわかっていない。今回、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いて、細胞内カルシウムイオンの増大によって生じる細胞障害への CPP32(caspase-3)様プロテアーゼの関与について調べた。

PC12細胞はポリリジンコートした35mmディッシュに5%準胎仔血清および5%馬血清を含むDMEM/メディウムを用いて培養した。A23187 (カルシウムイオノフォア) およびthapsigargin (小胞体Ca-ATPase阻害剤) 処理をすることによって細胞内カルシウムイオン濃度を増大させた。細胞障害の程度は遊離したLDH活性により、CPP32様活性はペプチド基質Ac-DEVD-AMCを用いた蛍光法により測定した。

A23187は低濃度(100 nM)では核の凝集や断片化とDNAの断片化を伴いアポトーシス様の細胞死を引き起こし、高濃度(2 μM)ではネクローシス様の細胞死を引き起こした。thapsigargin(20 μM)もアポトーシス様の細胞死を示した。神経成長因子(NGF)存在下ではA23187やthapsigarginによるアポトーシス様細胞死が完全に抑制されたが、ネクローシス様細胞死は抑制されなかった。NGFによる抑制効果はタンパク合成阻害剤シクロヘキシミド存在下でも見られた。

A23187やthapsigarginによるアポトーシス様細胞死にはCPP32様活性の増大を伴っていた。NGFはCPP32様活性の増大を抑制した。CPP32様プロテアーゼ阻害剤のAc-DEVD-CHOはA23187やthapsigarginによる細胞死を抑制した。

細胞内カルシウムイオンの増大によって引き起こされるアポトーシス様の細胞障害にCPP32様プロテアーゼの関与が示唆された。

105 2P 2066

ラットクモ膜下出血 (SAH) 後早期の海馬におけるbax, bcl-2およびp53 mRNAの発現とアポトーシスの関連について

中塚 雅雄*/**, 真砂 敦夫*, 山田 和雄*, 滝 英明*, 原田 重徳*

(名古屋市立大学脳神経外科*, 知多厚生病院脳神経外科**)

クモ膜下出血 (SAH) の急性期は、損傷動脈の存在や急激な頭蓋内圧亢進の結果として脳虚血負荷が存在しうる。従来から、脳虚血時にアポトーシスが存在すると指摘されており、SAHにおいてもアポトーシス関連遺伝子の発現が予想されるので検討した。

【方法】Wistar ratの右総頸動脈より4-0ナイロン糸を頭蓋内に挿入、脳血管を内側から突き抜くことによりSAHを作成した。経時的に摘出した脳標本から海馬を含む切片を作成し、hsp70, bax, bcl-2およびp53 mRNAの発現変化をin situ hybridization法を用いて解析した。また、アポトーシスはTUNEL法で評価した。

【結果】SAH後、bax, bcl-2およびp53遺伝子はともに穿刺側の海馬と歯状回に発現した。hsp70は前述の部位の他に穿刺側の大脳皮質と視床にも発現した。この中で、とくに海馬に注目すると、発現様式に各遺伝子で時間・局在に特徴を認めた。baxはCA1ではSAH後12hrで、CA3では6hrでピークを認めるが、bcl-2ではCA1, CA3ともに12hrにピークを認めた。また、p53の発現はCA1では18hrでピークを認めたが、CA3では6hr以後ほぼプラトーになり、24hr以後減弱した。TUNEL法では48時間後の穿刺側海馬CA1のみにTUNEL陽性細胞が認められた。

【考案】CA1とCA3でbax/bcl-2比に差があり、CA1の方で高かったことや、TUNEL法でもCA1にのみapoptotic cellがみられることから、bax/bcl-2の発現に関与したアポトーシス様変化が認められた。すなわち、脳動脈瘤破裂後の海馬の損傷にアポトーシスが関与することが示唆された。また、アポトーシスに至る経路においてp53がbaxの発現を制御している可能性が示唆された。

106 2P 2065

NOによるドーパミン細胞のapoptosisの機構

丸山和佳子1)、南知予子2)、高橋勤3)、直井 信2)

1)長寿医療センター、2)名古屋工業大学、3)江南女短大

NOは多くの生物学的活性をもつ化合物であり、神経細胞に対しては神経保護作用と神経傷害作用の双方を持つ。またNOによる神経傷害の一部はNOとsuperoxide (O₂⁻)の反応生成物であるperoxynitrite (ONOO⁻)を介したものとされているが、明らかな結論は出ていない。今回我々はヒトドーパミン神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞のDNA傷害についてsingle cell gel electrophoresis assay (comet assay)を用い検討した。細胞をNOを化学的に発生させるNOR-4またはONOO⁻を発生させるSIN-1で処理した後、アガロースに包埋し、アルカリ溶液および界面活性剤にて細胞膜を溶解し電気泳動を行った。傷害をうけ、切断されたDNAは泳動され核は彗星様の像を示す。泳動された核DNAの長さを測定することによりDNA傷害を定量的に測定することができた。NOR-4およびSIN-1により有意にDNA傷害が惹起され、それはcycloheximide、acinomycin-Dにより阻害された。また、予め細胞をアガロースに包埋し細胞膜を溶解した後にNOR-4、SIN-4を作用させてもDNA傷害は惹起されなかった。以上の結果より、NOおよびONOO⁻によるDNA傷害にはタンパクやRNA合成が必要であること、またこれらラジカルによる直接的なDNAへの作用ではないことが証明された。以上の結果はNO、ONOO⁻がSH-SY5Y細胞にapoptosisを惹起することを示唆している。抗酸化剤はNOR-4、SIN-1による傷害からDNAを保護し、ラジカル生成がapoptosisに関与していると考えられた。NOR-4によるDNA傷害はsuperoxide dismutase (SOD)により防止され、ONOO⁻の関与が示唆された。deprenylはNOR-4およびSIN-1によるDNA傷害を防止した。deprenylの作用が直接的な抗酸化作用によるのか、あるいはタンパク誘導を介したもののかなかを検討するため、細胞を予めdeprenylで処理した後洗浄し、NOR-4またはSIN-1の作用を検討した。SIN-1によるDNA傷害のみがdeprenylの前処理にて防止され、deprenylには直接の抗酸化作用によらないapoptosis阻害作用があることが考えられた。

107 2P 2064

神経細胞死抑制機構としての NGF による活性酸素種産生に対する影響

山縣知子、佐藤託実、石川保幸、山田雅司、畠中寛
(大阪大学蛋白質研究所合成部門)

活性酸素種 (ROS) は、様々な生理的、病理的神経細胞死の誘導に関わることが知られている。我々は、キサンチン-キサンチン酸化酵素 (XA+XO) により ROS を発生させ細胞死を誘導する系を PC12 細胞を用いて確立した。この死はアポトーシスの形をとり、神経成長因子 (NGF) により抑制されることを見出している。XA+XO 反応はスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) を発生させることが知られており、 $O_2^{\cdot-}$ は速やかにスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により過酸化水素に変換する。この過酸化水素はフェントン反応によりヒドロキシラジカル ($OH^{\cdot}$) へと変化していく。今回我々は、3 種類の ROS 感受性蛍光色素を用いて ROS 量を測定し、ROS 量変動に対する NGF の影響を調べた。用いた蛍光色素は、広く ROS を認識するものとして C-DCDHF-DA、過酸化水素を選択的に認識するものとして Dihydrorhodamine123、 $O_2^{\cdot-}$ に対しては Hydroethidine である。その結果、キサンチン酸化酵素添加に伴いすべての蛍光色素において発色強度の増加が観察された。一方、NGF 処理した PC12 細胞では、C-DCDHF-DA の蛍光強度増加に対する影響は観察されなかったのに対し、Dihydrorhodamine123 の蛍光強度増加においては有意な抑制効果が観察された。それに対し、Hydroethidine の蛍光強度増加において、NGF は増強効果を持つことがわかった。これらのことは、NGF 処理した PC12 細胞においては、XA+XO 反応にともない発生する $O_2^{\cdot-}$ 量は増加するのに対し、過酸化水素の発生量は減少することを示している。すなわち、NGF 処理により $O_2^{\cdot-}$ から過酸化水素への反応の抑制が起こっていることを推測させる。以上の結果は、NGF が活性酸素種産生過程を制御する機能を持つことにより、細胞死抑制効果を発揮している可能性を示している。今後、活性酸素により誘導される細胞死に対し抑制効果を持つことが知られている Bcl-2 等についても、その活性酸素種産生に対する影響を調べ、NGF によるものと比較検討していきたいと考えている。

108 1B MS3-3 2063

小脳外顆粒層由来顆粒細胞のアポトーシスに対する神経栄養因子の効果

境 和久、小池達郎
(北大・院理・行動知能学)

小脳顆粒細胞は、発生過程において、外顆粒層で増殖分化し、グリア細胞を介して移動、内顆粒層にたどり着きシナプス結合を行うと考えられ、それぞれの層でアポトーシスを行うことが知られている。生後一週間のラット小脳全体より単離した小脳顆粒細胞を通常の K⁺ 濃度 (5.4 mM) 下で培養すると、細胞は突起伸長・細胞肥大等の分化の後、変性を始め、培養 8~9 日目には 8 割以上が死滅する。この細胞死はタンパク合成及び RNA 合成阻害剤、脱分極剤、BDNF などにより抑制されるが、NGF にはその効果はなかった。小脳顆粒細胞死はアポトーシスの特徴をもつことから、発生過程における中枢神経細胞のアポトーシス研究の有用なモデルであると考えられている (Suzuki and Koike, 1997 など)。今回、我々は、小脳外顆粒層のみを実体顕微鏡下で単離し、分散して培養後、抗 MAP2 抗体で染色し、神経細胞を同定した。そして、上記の顆粒細胞 mixture による細胞死と比較、検討した。小脳外顆粒層由来顆粒細胞はアポトーシスを起こし、Caspase3 の阻害剤である Ac-DEVD-CHO (50mM) で顕著に抑制された。高カリウム培地 (25mM) は顆粒細胞 mixture における細胞死抑制のように顕著ではなかったが、細胞死を有意に抑制した。神経栄養因子の内 NT-3 に関しては効果を認めなかったが、BDNF は細胞死を促進する傾向があり、さらに詳しい検討をしている。FGF2 も細胞死を抑制しなかった。一方、これに対して NGF は顕著な抑制効果を示した。実際 p75 は外顆粒層にのみ顕著に分布することが知られている。従って、これらの結果の違いは発達段階の違いをより明確に示すものと考えられた。

109 2P 2062

発達段階特異的オリゴデンドロサイトの
大量培養方法の確立とオリゴデンド
ロサイト細胞系譜

東京都老人総合研究所・神経生物¹、東京大学大
学院・生命物理²、埼玉医科大・生理³

桜井洋子¹、西村大助^{1,2}、川戸佳²、吉村和法³、野
村正彦³、清和千佳¹、武田康¹、内藤弘美¹、宮木
朋子¹、阿相皓晃¹

中枢神経系におけるミエリン形成担当細胞であるオリゴデンドロサイトは発生中にさまざまな栄養因子や環境因子の制御を受け、非常に複雑な発育段階をとることが知られている。これまで発育段階特異的なオリゴデンドロサイトを大量に得ることが出来なかったが、今回我々は、オリゴデンドロサイトの細胞周期と分化促進因子、細胞継代培養を組み合わせる方法を用いて、胎生期ラット大脳より、発育段階特異的なオリゴデンドロサイトの大量培養方法を確立し、その培養系でオリゴデンドロサイトの細胞系譜を調べた。発育段階特異的（未成熟型）オリゴデンドロサイトは培養開始35日間後に得られ、オリゴデンドロサイトのマーカーを用いた免疫染色では、糖脂質抗原に対するO4が発現しており、オリゴデンドロサイトのプロジェニター（O-2Aプロジェニター細胞）に発現するA2B5抗原や、成熟型オリゴデンドロサイトに見られる表面分子マーカー分子（GC/O1）やミエリン塩基性タンパク質（MBP）の発現は認められなかった。このような、発育段階特異的オリゴデンドロサイトが成熟型へと分化するためには、タイプ1アストロサイトとの直接接触による共培養が必要で、ニューロンとの直接接触や、アストロ、ニューロンとの間接培養では、成熟型への分化誘導は不可能であった。このことは、成熟型オリゴデンドロサイトへの分化にはタイプ1アストロサイトとの直接接触による細胞間コミュニケーションの関与が必要であることが示唆され、これら細胞間コミュニケーションに関与する糖蛋白、糖脂質、プロテオグリカンなどの複合糖鎖に代表される表面分子は細胞認識とシグナル伝達機構全般に関わる分子が重要であることが考えられるから、これらの分子群の情報の解析とその機構の解明を検討中である。

110 2P 2061

ヒト羊膜細胞における神経系細胞マーカー
の発現

石井 俊^{1,2}、佐藤 嘉兵²、中村 俊³、桜川 宣男¹
（¹国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5
部 ²日本大学生物資源科学部応用生物科学科
³国立精神・神経センター神経研究所診断研究部）

我々は、ヒト羊膜上皮（HAE）細胞において神経幹細胞、ニューロンおよびグリア細胞マーカーの存在を免疫組織染色およびウエスタンブロット法にて確認している。今回、HAE細胞が多能性神経幹細胞としての性質を有している可能性について検討するために、神経系細胞マーカー、主に、オリゴデンドロサイトのマーカーの発現について、mRNAレベルでの解析を行った。

2 継代目のHAE細胞およびヒト羊膜組織よりAGPC法にてtotal RNAを調製し、RT-PCRまたはNorthern hybridizationを行った。

神経上皮細胞マーカーの一つであるvimentinについてRT-PCRを行ったところ、HAE細胞、組織共にヒト成人脳と同様のバンドを検出した。オリゴデンドロサイトのマーカーのCNPase、MBPについて行った結果、northern hybridizationにおいてCNPaseが、そしてRT-PCRにおいてMBPがヒト脳と同様に検出された。また、同じくオリゴデンドロサイトのマーカーであるPLP/DM-20についてRT-PCRを行った結果、HAE細胞においてDM-20に対応するバンドが確認されたがPLPに対応するバンドの増幅は確認されなかった。そこでPCR productのSouthern hybridizationをおこなったところPLPに対応するシグナルが検出された。また同じ方法で組織についてもPLP、DM-20のシグナルが検出された。また、シグナルの強度はPLPよりもDM-20のほうが強いことが確認された。

我々は、HAE細胞が神経系細胞へ分化可能であるかどうか研究してきた。今回、オリゴデンドロサイトマーカーであるCNPaseとMBPについて発現が確認され、PLP/DM-20についてはDM-20のほうが強発現していることが示唆されることから、HAE細胞は胎生期18週前後の脊髄と同様の発現様式を示すことが確認された。今後、他のマーカーについても同様に解析するとともに、これらのマーカー遺伝子の発現意義を検討し、神経系の細胞への分化の可能性について検討していく予定である。

111 1C MS4-2 2060

オリゴデンドロサイトの分化における
CGT 遺伝子の転写調節機構米増知子¹、中平健祐¹、奥村俊一郎^{1,2}、
池田 一裕¹(1:岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経情報
2:関西医科大学第2外科)

UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (CGT) はミエリン鞘に大量に存在する糖脂質である galactocerebroside (GalC) の生合成の最終反応を触媒する酵素である。既に報告したように CGT mRNA はオリゴデンドロサイトにおける有用な分化マーカーのひとつである。

CGT の転写調節機構を調べるためにルシフェラーゼ活性を指標に、プロモーターアッセイを行った。まず C57BL/6 マウスのゲノムライブラリーより第一エクソンの上流に相当するプロモーター領域を単離した。次にこれから様々な領域を切り出し、レポーター遺伝子としてホタルのルシフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクター上に組み込んだ。構築したプラスミド CT1、CT4、CT9 はそれぞれ転写開始部位を基点に -5800 から +50、-710 to +50、-53 to +50 に相当する配列を含んでいる。これらをリポフェクトアミンを用いてオリゴデンドロサイト様の性質をもつ株細胞 CG4 および繊維芽細胞 NIH3T3 細胞に導入し、各細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。CT1、CT4 は CG4 細胞において、発現ベクターのみを導入した場合と比べそれぞれ 5 倍、8 倍以上もの転写活性を示したのに対して、CT9 は 2 倍程度の活性しか示さなかった。NIH3T3 細胞においても、同様の傾向がみられたが、その転写活性はいずれの場合においても CG4 細胞における活性より低いものであった。以上の結果より、-5800 から -710 に相当する領域に転写抑制にかかわるエレメントが、また -710 から -53 に相当する領域に転写促進にかかわるエレメントが存在することが示唆された。CGT 遺伝子の転写調節を解析することは未成熟なオリゴデンドロサイトのミエリン産生細胞への分化のメカニズムにかかわる現象のひとつとして非常に興味深い。

112 1C MS4-4

In vitro と *In vivo* を組み合わせた免疫法
による神経組織の抗原に対するモノクロー
ナル抗体の作製吉村和法¹、桜井洋子²、西村大助³、川戸 佳³、
野村正彦¹、阿相皓晃²¹ 埼玉医科大学・第一生理学、² 東京都老人総合研
究所・神経生物、³ 東京大学大学院・生命物理

1975年にケラーとミルシュタインがモノクローナル抗体作製法を確立して以来すでに20年あまりが経過する。その間に *In vivo* 免疫法によるモノクローナル抗体作製はほぼ完全に確立した。一方 *In vitro* によるモノクローナル抗体作製法には問題点があり、その一つには IgG 抗体が獲得しがたい点である。利点としては細胞などの表面抗原や生体にとって毒性がある物質に対しても抗体が作れる点である。我々は今回、*In vitro* と *In vivo* の免疫、正確には、*In vitro* で抗原に感作した脾細胞を感作後、同系統のマウスに戻すことで、感作したリンパ球をそのマウスの脾臓中で分化・成熟させる試みを行った。

我々は抗原として神経細胞に発現している免疫グロブリンのスーパーファミリーである接着蛋白質 L1 を強制発現させた L 細胞とミエリネーション前の段階にある未成熟オリゴデンドロサイトを用いた。それらの細胞を Balb/c マウスの脾細胞と一緒に1週間培養することで *In vitro* 免疫を行った。その後この脾細胞を同系統のマウスに戻して感作された脾細胞(リンパ球)の分化・成熟を *In vivo* の形で行った。1ヵ月後、免疫マウスの脾臓細胞を取り出してマウスミエローム細胞 NS-1 と融合させ、抗原に陽性なモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを免疫細胞化学的手法を用いてスクリーニングした。

その結果、それらの抗原に陽性なモノクローナル抗体を得られたことから、免疫細胞化学的手法とウエスタンブロット解析によって抗体の特異性を検討したので、報告する。

113 1C MS4-5 2059

未成熟オリゴデンドロサイト膜表面分子を認識するモノクローナル抗体(13E6,4F2)について

東京都老人総合研究所・神経生物¹、東京大学大学院・生命物理²、横浜市立大学・総合理学³、埼玉医大・生理⁴

西村大助^{1,2}、桜井洋子¹、川戸佳²、斎藤治和¹、吉村和法⁴、野村正彦⁴、清和千佳^{1,3}、井口泰泉³、阿相皓晃¹

中枢神経系におけるミエリン形成担当細胞であるオリゴデンドロサイトの発生は脳室層に由来し、生後も側脳室の上皮下層から多量に発生し移動中に分裂を繰り返しながら成熟してくる。オリゴデンドロサイトの成熟・分化の過程は実に厳密な段階を経ながら行われ、これまでにそれぞれの段階特異的表面抗原の発現に従ってその細胞系譜が規定されている。

今日、私たちは、胎生期ラット大脳より発達段階特異的なオリゴデンドロサイトの大量培養法を確立するとともに、オリゴデンドロサイト細胞系譜を明らかにした。(本学会にて桜井らが発表予定)今回得られた発達段階特異的なオリゴデンドロサイトはこれまでの膜糖脂質マーカー抗体ではA2B5⁺、O4⁺が発現しているが、成熟型オリゴデンドロサイトマーカー分子(GC,MBP等)の発現は認められなかった。詳細に検討するために、この発現段階特異的なオリゴデンドロサイトの時期特異的表面抗原を、発達段階特異的な時期にあるオリゴデンドロサイトの可溶性膜画分を用いて、単クローン抗体を作成した。得られた数種の単クローン抗体中のひとつである13E6は、免疫染色で未成熟型オリゴデンドロサイトの細胞体及び突起がよく染まり、ウェスタンブロットで分子量約45kDaに単一のバンドが認められた。一方、4F2は、免疫染色では未成熟型オリゴデンドロサイトの突起がよく染まり、ウェスタンブロットで分子量約90kDaに強いバンドが確認されたことから、13E6と4F2抗体が認識する発達段階特異的なオリゴデンドロサイト膜表面上の認識分子が異なることが考えられ、その性状について検討中である。さらに、これらの単クローン抗体が認識するオリゴデンドロサイト膜表面上の分子は抗体作製の方法上(本学会にて吉村らが発表予定)、発達段階特異的なオリゴデンドロサイトの細胞接着分子種の可能性が高いことが予想されることから、これらの抗体を用いての機能アッセイも進めている。

114 1P 1108

線条体 NMDA 受容体刺激によるドーパミン放出に対するポリアミンの影響

柴田 護、福内靖男、島津邦男、佐々木貴浩(慶應義塾大学神経内科)、荒木信夫(日本鋼管病院内科)、濱田潤一(国立埼玉病院神経内科)、太田晃一(水戸赤十字病院神経内科)

背景:過剰な NMDA 受容体刺激は脳虚血の病態で重要な働きをしていると考えられている。我々は、線条体において NMDA 受容体刺激によりドーパミン放出が促進されることを報告した。NMDA 受容体には polyamine-sensitive site が存在し、ポリアミンによって受容体機能が修飾を受けることが明らかになっている。本研究では NMDA 受容体刺激によるドーパミン放出に対する spermine, spermidine の影響を検討した。対象・方法: Sprague-Dawley ラットの線条体に微小透析プローブを挿入し *in vivo* microdialysis を施行した。第1群には 1 mM NMDA+500 μ M glycine を 80 分間灌流した。第2群、第3群にはさらに spermine を各々 5 mM, 50 mM 加え灌流した。第4群、第5群には NMDA 受容体 polyamine-sensitive site 阻害薬 ifenprodil (10 mg/kg)を前投与した後 1 mM NMDA+500 μ M glycine に spermine をそれぞれ 5 mM, 50 mM 加え灌流した。第6群、第7群には 1 mM NMDA+500 μ M glycine に spermidine を 5 mM, 50 mM 加え灌流した。得られた灌流液中のドーパミン濃度を HPLC/ECD で定量した。結果: ドーパミン濃度は NMDA 受容体刺激により 22.4 $\pm$ 8.0 から 171.2 $\pm$ 67.1 pg/fraction へと上昇した ($p<0.05$, ANOVA)。5 mM spermine の同時投与により NMDA によるドーパミン放出は抑制された ($p<0.05$, t-test)が、ifenprodil で阻害されなかった。50 mM spermine 同時投与では NMDA によるドーパミン放出は増強され ($p<0.05$, t-test)、その作用は ifenprodil で阻害された。5 mM および 50 mM spermidine 同時投与により NMDA によるドーパミン放出は抑制された ($p<0.05$, t-test)。結論: NMDA 受容体刺激性ドーパミン放出に対する spermine の効果は濃度によって作用形式が異なり、50 mM spermine の効果は NMDA 受容体上の polyamine-sensitive site を介すると考えられた。spermidine の効果は、本実験で用いた濃度範囲ではドーパミン放出に対し抑制的であると考えられた。

115 1P 1107

N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターに対するニトロプルシドナトリウムの阻害効果

荻田喜代一、米田幸雄

(摂南大学薬学部薬理学研究室)

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターは、中枢神経系の可塑性形成過程あるいは神経細胞死の発現に重要な役割を演じることは周知の事実である。それらの発現メカニズムにNMDAレセプターの活性化に伴う Ca^{2+} /カルモデュリン依存性の一酸化窒素(NO)発生プロセスが関与する可能性が、種々のNO関連化合物を用いた薬理学的研究から示唆されている。しかしながら、NMDAレセプターに対するNO関連化合物の直接的効果については解析されていないのが現状である。したがって本研究では、 $[\text{^3H}]$ MK-801結合に対する種々のNO関連化合物の効果について検討した。一酸化窒素合成酵素(NOS)基質L-arginineや、基質類似体である N^G -nitro-L-arginineは、 $[\text{^3H}]$ MK-801結合に影響を与えなかった。一方、NOS阻害作用を持つdiphenyliodoniumおよびdiphenyleneiodoniumあるいは種々のカルモデュリンアンタゴニストは、いずれも濃度依存的に $[\text{^3H}]$ MK-801結合を阻害した。さらに、NO発生剤であるニトロプルシドナトリウム(SNP)およびS-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)についても検討したところ、SNPは 10^{-5} M 以上で $[\text{^3H}]$ MK-801結合を阻害したが、SNAPは結合に著変を与えないことが判明した。また、SNPは $[\text{^3H}]$ MK-801結合に対するグルタミン酸の増強曲線を右側に移動させたが、このSNPの効果は還元試薬のジチオスレイトールの添加により消失した。以上の結果より、種々のNO関連化合物はNO産生とは無関係にNMDAレセプターチャネル開放を阻害する可能性が示唆される。最後に、研究の遂行上、ご尽力を頂いた首藤誠修士に感謝致します。

116 1P 1106

ラット培養中脳神経細胞におけるグルタミン酸毒性に対するエストロゲンの神経保護作用

澤田秀幸*、衣斐督和**、木原武士*、

漆谷 真*、下濱 俊*、赤池昭紀**、

木村 淳*

(*京都大学医学部神経内科)

(**京都大学薬学部薬理)

パーキンソン病におけるドーパミンニューロン変性の機序は不明であるが、酸化ストレスが重要な役割を果たしている。グルタミン酸誘発神経毒性は酸化ストレスモデルとなることから、本研究では、中脳の培養神経細胞を用いて、グルタミン酸誘発神経毒性に対するエストロゲンの神経保護作用を検討した。

胎生 16 日齢の胎仔ラット腹側中脳より機械的に単離した細胞を、血清含有培地で 11 日間培養し、その後 4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体および抗 microtubule associated protein 2 (MAP2) 抗体を用いた免疫染色を行った。TH 陽性細胞の生存数の減少によりドーパミンニューロンに対する神経毒性を、MAP2 陽性細胞の生存数の減少により全ニューロンに対する神経毒性を評価した。

1mM グルタミン酸を 10 分間投与することにより、ドーパミンニューロン、非ドーパミンニューロンの両者に対し神経毒性が生じた。あらかじめ 17β -estradiol を 24 時間前投与するとグルタミン酸による神経毒性は有意に拮抗された。 17β -estradiol とグルタミン酸の同時投与では、神経保護作用はみられなかった。また、スーパーオキシドアニオンによる神経毒性にも 17β -estradiol の前投与は神経保護作用を示した。これらの結果は、エストロゲンが中脳神経細胞の酸化ストレスを抑制する可能性を示唆している。

117 1P 1105

ラット神経組織における各種グルタメイト
レセプターサブユニットの分布久保慶太、眞部孝幸、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大学薬学部薬理学研究室)

記憶や学習などに重要な役割を演じているグルタメイトレセプターは、イオノトロピック型とメタボトロピック型に大別され、前者は外因性アゴニストに対する感受性の相違により N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)、DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) および kainic acid (KA) レセプターに分けられる。今回は、これらグルタメイトレセプターサブユニットの神経組織内分布をさらに解明するために、それぞれに特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法で、ラットの脳内各部位、脊髄、松果体、網膜、下垂体および副腎の抗体陽性蛋白質を測定した。

NR1、GluR1、GluR2/3、GluR4 および GluR6/7 の抗体陽性蛋白質は、調べたすべての神経組織において 100,000g 上清には検出されなかった。一方、100,000g 沈査では他の部位と比べて大脳皮質、海馬および線条体に、NMDA 型の NR1 抗体陽性蛋白質がより多く検出された。AMPA 型の GluR1 と GluR2/3 はともに海馬に最も多く存在し、続いて大脳皮質、線条体、小脳、視床下部、中脳、橋・延髄および脊髄の順であった。これに対して、GluR4 では小脳においてのみ極めて強い陽性バンドが観察された。KA 型の GluR6/7 は、他の抗体の場合では陽性プロットが検出されなかった末梢組織の下垂体と副腎でも陽性蛋白質が検出された。この末梢組織内の局在を追究した結果、下垂体では後葉に、副腎では皮質にそれぞれ選択的な局在を示した。また、NMDA を腹腔内投与(100mg/kg)したのち、6 時間後に大脳皮質および海馬を摘出して、NR1 の変化を調べたところ、100,000g 沈査では、どちらの部位でも抗体陽性蛋白質の著明な減少が観察された。しかしながら、同上清では投与にかかわらず抗体陽性蛋白質は検出されなかった。以上の結果から、グルタメイトレセプターの各種サブユニットの中でも、GluR6/7 は末梢組織である下垂体後葉や副腎皮質に選択的に局在する可能性が示唆される。

118 1P 1104

NMDA チャネル開放に対する遊離鉄イオンの影響

眞部孝幸、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大学薬学部薬理学研究室)

鉄イオンは脳虚血時、脳内出血時あるいはパーキンソン病患者の脳内などでは高濃度に存在することが知られており、これらの疾患発症メカニズムにおける鉄イオンの病態生理学的意義は特に興味深い。演者らは、鉄含有化合物であるニトロプルシッドナトリウムとフェロシアン化カリウムがともに、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)チャネル遮断作用を持つ可能性を見いだした。したがって、今回 NMDA レセプターに対する遊離鉄イオンの効果を解明する目的で、NMDA チャネルの指標である $[^3\text{H}](+)\text{-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)}$ 結合に対する第一鉄(II)および第二鉄(III)の影響を解析した。

ラット脳より調製した粗シナプス膜標品を用いて、50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.5)中で 5 nM $[^3\text{H}]$ MK-801 と反応させて結合実験を行った。

塩化第一鉄(II)は、 10^{-5}M 以上の濃度で濃度依存的に $[^3\text{H}]$ MK-801 結合を阻害した。しかしながら、塩化第二鉄(III)はほとんど $[^3\text{H}]$ MK-801 結合を阻害しなかった。塩化第一鉄(II)の $[^3\text{H}]$ MK-801 結合阻害効果は、他の鉄含有化合物の場合と同様に、ポリアミンアゴニストであるスベルミジンの添加により減弱された。また、塩化第一鉄(II)による $[^3\text{H}]$ MK-801 結合阻害効果は、鉄イオンキレーターである α -フェナントロリンおよびデフェロキサミンの添加により、それぞれ濃度依存的に抑制された。一方、他の鉄含有化合物による $[^3\text{H}]$ MK-801 結合阻害効果に対してはこれらの鉄イオンキレーターは著明な影響を与えなかった。さらに、塩化第一鉄(II)で前処理したのち十分に洗浄したシナプス膜標品を用いた場合においても、添加の場合と同様に有意な $[^3\text{H}]$ MK-801 結合の低下が観察された。以上の結果より、遊離二価鉄イオンは NMDA チャネル開放を調節する作用を持つ可能性が示唆される。

なお、本研究を進めるにあたりご協力をいただきました非会員の首藤誠修士に感謝いたします。

119 1P 1103

ラットの脳内ドコサヘキサエン酸(DHA)含量の低下によるグルタミン酸レセプターの変化

田丸政男¹, 中村 彰², 池本 敦², 米田幸雄³, 平田ゆかり⁴, 松谷天星丸⁵, 奥山治美²

(¹鈴鹿医療大・医情情報, ²名市大・薬・生物薬品, ³摂南大・薬・薬理, ⁴保健衛生大・医, ⁵川村女学園大)

リノール酸(18:2n-6)と α -リノレン酸(18:3n-3)は、動物の体内では合成されない必須脂肪酸で、前者(n-6系列)はアラキドン酸(20:4n-6)に、後者はドコサヘキサエン酸(DHA; 22:6n-3)などに代謝され、両系列間での相互変換は行われないとされている。後者のn-3系列脂肪酸欠乏食でラットを飼育すると、脳内DHA量が著しく低下し、学習能力も低下することが報告されている。本研究は、この脳内DHA量の低下に伴う学習能力の低下の成因を生化学的に検索する目的で行った。

実験飼料は、精製飼料にsafflower oil (Saf; 高リノール酸/低 α -リノレン酸含有)またはperilla oil (Per; 低リノール酸/高 α -リノレン酸含有)を何れも5%添加した飼料で、ラットを2世代にわたって飼育した。また、Saf群のF₁は、離乳以後から4.5%のsafflower oilにDHAの前駆物質であるエイコサペンタエン酸(EPA; エパデル)0.5%を添加した実験群も作製した。

成熟F₁ラットの体重及び脳重量は、各群間に大きな差はなかった。Saf群の脳内DHA量は、Per群の約30~40%に低下したが、EPAの添加はこの低下をPer群の約90%以上まで回復させた。グルタミン酸レセプターは、³H]AMPAの結合活性が、大脳皮質、海馬、脳幹部でPer群の約20%の有意な低下を示し、これらの低下は高親和性結合部位での親和性の低下によるものであることが示された。EPAの添加はこれらの結合活性の低下をPer群の値まで回復させた。³H]MK-801及び³H]カイニン酸の結合には、各群間に大きな差は見られなかった。

以上のことから、ラット脳内のDHA量の低下は、海馬及び大脳皮質のAMPA型グルタミン酸レセプターの結合活性を低下させ、この低下がDHA欠乏ラットの学習能力低下の成因の一つである可能性が示唆された。

120 1P 1102

[³H]キスカル酸によるタイプ1代謝型グルタミン酸受容体ーリガンド間結合解析:グルタミン酸含有ジペプチドのリガンド能

大橋 博、東(松本) 秀美、丸山 尚治、竹内 裕
(万有製薬つくば研究所)

グルタミン酸(L-Glu)は興奮性伝達物質として神経系において重要な役割を果たしており、又神経細胞死にも密接に関与する。グルタミン酸受容体は代謝型(mGluR)とイオノトロピック型(NMDA受容体、AMPA受容体、カイニン酸受容体等)に分類される。我々はタイプ1 mGluR (mGluR1a)及びAMPA受容体に高い親和性を有するキスカル酸(QA)のトリチウム標識化合物を合成し、結合解析法の開発を試みた。ヒト小脳由来の λ gt11 cDNAライブラリーからmGluR1a cDNAを単離し、それをバキュロウイルスー昆虫細胞(Sf9)系に発現させた。細胞膜標品に対する³H] QAの結合反応を96穴プレート上で行い、更にガラスフィルタートラップ法により解析した。その結果、QAのmGluR1aに対するK_dは52.6 nMであった。また³H] QAの結合に対するdisplacement実験では、L-QA、L-Glu、t-ACPDが各々0.02、1、4 μ MのIC₅₀を与えた。AMPA及びMCPGは低いpotencyを示した。我々は同様のdisplacement実験により、合成ジペプチドのリガンド能を評価した。Glu-Tyr、Glu-Trp、Met-Gluが20 μ Mにて50%超の結合阻害を与えた。Met-Gluは、ヒトmGluR1aを発現するCHO細胞において、遊離のGluと同様のpotencyでイノシトールリン酸代謝を活性化させたので、アゴニストとして作用することが解かった。Glu残基を含まないジペプチドでは、有意のリガンド能が認められなかった。³H] QAを用いる結合実験法は、AMPA受容体にも適用できることが判明したので、新規リガンド探索のための有用な方法論であると考えられる。

121 1P 1101

‘priming’ と神経可塑性: F2CCG-I による検討

石田美知子、斎藤朋子、篠崎温彦

(財・東京都臨床医学総合研究所薬理研究部門)

F2CCG-I は、2-(carboxycyclopropyl)glycine (CCG) の 3', 3' フッ素化誘導体の一つで、非選択的ではあるが、代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR) の強力なアゴニストである。F2CCG-I の薬理効果は興味深く、一旦、F2CCG-I でラット大脳皮質スライスや新生ラット摘出脊髄標本を処理すると、F2CCG-I を完全に洗浄した後でも、本来何の応答も起こさない極めて低濃度のグルタミン酸や α -アミノピメリン酸により、シナプス伝達が長時間顕著に抑制される。これはいわゆる ‘priming’ 現象である。この現象は既に認知されている如何なるメカニズムによっても説明が困難である。この極めて特徴的な ‘F2CCG-I priming’ は、神経可塑性が短時間に発現した現象とも考えられるので、薬理学的性質並びにグルタミン酸との関連について検討した。

F2CCG-I 適用後の脊髄では、グルタミン酸や α -アミノピメリン酸はシナプス前性に単シナプス反射抑制作用を起こすようになるが、この作用は F2CCG-I の濃度に依存し、グルタミン酸や α -アミノピメリン酸を繰り返し灌流することにより、次第に減弱してゆく。またこの単シナプス反射抑制作用は、mGluR アンタゴニストで抑制され、F2CCG-I と薬理学的に極めて類似した性質であった。しかし F2CCG-I 適用時に mGluR アンタゴニストを存在させても ‘priming’ そのものは抑制されない。グルタミン酸や α -アミノピメリン酸を F2CCG-I と同時に灌流すると ‘priming’ は起こらない。DIDS も ‘priming’ を抑制する。

以上の実験事実から、F2CCG-I がいずれかの部位に付着または取り込まれ、グルタミン酸や α -アミノピメリン酸がそれを解放 (遊離) させるとの仮説をたて、さらにこの現象について、トランスポーターとの関わり、温度依存性、anoxia の影響などを試みた。またこの現象にはグルタミン酸が深く関与しているので、その生理的役割について考察する。

122 1P 1100

初代培養神経細胞を用いた NS-105 の cAMP 生成系に及ぼす影響

廣内雅明、岡美智子、伊藤善規、辰見 茂、馬 福海、
鵜飼洋司郎、木村喜代史

(日本新薬 創薬研究本部)

新規の D-pyroglutaminamide 誘導体である NS-105 は、中枢コリン作動性神経の機能低下に基づく種々の学習・記憶障害モデルにおいて、改善作用を示すことが知られている。今回、NS-105 の作用機序を解明する目的で、マウスの大脳皮質より調製した初代培養神経細胞を用いて、cAMP 生成系に及ぼす影響を検討した。

forskolin 刺激下の cAMP 生成に及ぼす作用を検討したところ、NS-105 は抑制効果を示した。しかしながら、pertussis toxin で前処置した神経細胞を用いた場合では、NS-105 刺激により濃度依存的な cAMP 生成の上昇が認められた。同時に種々の神経伝達物質受容体に作用する薬物の作用を検討したところ、代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR) の作動薬である (1S, 3R)-1-aminocyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid (1S, 3R-ACPD) を用いた場合でも、NS-105 と同様の効果を示した。これらの NS-105 と 1S, 3R-ACPD の cAMP 生成系に対する促進及び抑制作用は、mGluR の拮抗薬である L(+)-2-amino-3-phosphopropionic acid (L-AP3) によっていずれも拮抗された。

さらに、isoproterenol と、NS-105 あるいは 1S, 3R-ACPD をそれぞれ併用したところ、いずれも isoproterenol による cAMP 生成増加はさらに促進された。

以上の結果より、NS-105 の cAMP 生成系に対する促進及び抑制作用は、G 蛋白質連関型受容体を介した作用と考えられ、1S, 3R-ACPD と同様に mGluR を介して作用する可能性が示唆された。

123 1P 1099

グルタミン酸トランスポーターブロッカー

島本 啓子、安田 好美、ブルノ・レブラン、

堺谷 政弘、中嶋 暉躬

(財・サントリー生物有機科学研究所)

グルタミン酸は記憶・学習に関与する重要な神経伝達物質であるが、神経興奮毒性も合わせ持っている。神経伝達を終焉させ、生体内のグルタミン酸濃度を低レベルに維持するためには、グルタミン酸を素早く回収してしまわなければならない。ナトリウム依存性グルタミン酸トランスポーターが、これに重要な役割を果たしている。グルタミン酸トランスポーターとしては、現在までにEAAT1-5の5種類のサブタイプが同定されている。トランスポーターの生理的な役割を調べるためには阻害物質が必須である。しかし、知られている阻害物質のほとんどは基質としてグルタミン酸と競合して取り込まれることで阻害活性を示しており、輸送に伴うイオンの交換を止めることはできない。グルタミン酸の輸送を遮断してしまうブロッカーをもつのはEAAT2とEAAT5のみである。

我々は、ブロッカーを検索するため、トランスポーターの基質として知られる *threo*- β -hydroxyaspartate (THA)の誘導体を5種類合成した。これらはいずれもウシEAAT1 (GLAST type)を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞への $[^{14}\text{C}]$ グルタミン酸の取込を強く阻害した。卵母細胞における電気生理学実験の結果から、これらのうちの2種類では輸送に伴う内向き電流が観測され、基質として働くことにより阻害活性を示していることがわかった。一方、残りの3種類は、 $100\mu\text{M}$ でも内向き電流が全く観測されなかった。しかし、これらの化合物はグルタミン酸($100\mu\text{M}$)が引き起こす内向き電流を著しく減少させ、ブロッカーとして働いていることが明らかになった。中でも最も強い活性を示したDL-*threo*- β -benzoyloxyaspartate (DL-TBzOAsp)は、グルタミン酸の作用曲線を濃度依存的にシフトさせることから、competitive antagonistとして働いていることがわかった。Schild analysisにより求めた K_i 値は $17.2\mu\text{M}$ であった。今までにEAAT1 (GLAST type)に作用するブロッカーは知られておらず、これらの化合物が初めてのブロッカーである。また、COS-1細胞に発現させたヒトEAAT1およびEAAT2についてもDL-TBzOAspは強い取込阻害活性を示し、ブロッカーとして広く有効であることも明らかになった。

124 2P 2058

PSD-95結合蛋白質の同定とラット発育脳における発現の多様性

川嶋望、高宮考悟、孫傑、祖父江憲治

(大阪大学医学部バイオ神経生化学)

postsynaptic density (PSD) は中枢神経系のシナプス後膜に見出される特異的細胞構造であるが、その分子構築や機能についてはまだ充分には解っていない。近年PSDの構成蛋白質の一つとしてPSD-95が同定され、N末側に存在するPDZドメインにおいてNMDAレセプターやカリウムチャンネル等と結合することが報告されている。我々はPSDの分子構築を明らかにする目的で、PSD-95のC末側のSH3ドメインとguanylate kinase(GK)ドメインをbaitとして酵母のtwo-hybrid systemでラット大脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。この結果、694アミノ酸からなる未知の蛋白質を同定した。rapid amplification of cDNA ends (RACE)法によってこの蛋白質には数種類のアイソフォームが存在することを示した。*in vitro* binding assayとtwo-hybrid systemにより、この蛋白質はPSD-95のGKドメインに結合することを明らかにした。ノーザンプロットで組織分布を検討したところ、脳と精巣にのみ発現を認めた。脳には長さの異なる数種のmRNAが存在し、各アイソフォーム特異的な塩基配列をプローブとしてノーザンプロットを行ったところ、これらのmRNAは脳発育過程で異なった発現制御をうけていることを見出した。現在、脳内における局在の詳細について解析中である。

125 2P 2057

PSD-95結合蛋白質としてのMicrotubule-associated protein(MAP) 1Aの解析

孫俤、高宮考悟、川嶋望、田所智子、祖父江憲治
(大阪大学医学部バイオ神経生化学)

PSD-95はpostsynaptic density(PSD)に局在する主要蛋白質で、近年そのN末側のPDZ domainがNMDA receptorやK⁺ channelのC末端と結合することが報告されている。今回我々は、PSDにおける分子構築を明らかにするために、PSD-95C末側に結合する蛋白質の同定を試みた。方法として、PSD-95のC末側とピオチン標識化蛋白質とのfusion proteinを作製し、これをprobeとしてgel overlay assayを行った。その結果、主に分子量130kDaと350kDaの2種類のバンドがPSD-95と結合した。後者のバンドは脳微小管分画に多量に存在し、MAP1Aであることを抗MAP1A抗体により明らかにした。MAP1Aは、脳に特異的に発現しており、大脳発達における発現時期はPSD-95とよく相関していた。さらに大脳細胞下分画により、MAP1AはPSD分画にも存在することを見出した。

126 2P 2056

ラット脳由来 Triton 不溶性、低比重性膜画分に存在する GPI アンカー型タンパク質群の解析

船津宣雄、熊ノ郷晴子、前川昌平
(京都工芸繊維大学大学院機能科学)

神経細胞は細胞膜を介した細胞外との情報のクロストークにより、複雑な回路網を形成し神経系の諸機能を果たす。種々のGPIアンカー型タンパク質が細胞外情報の伝達に関与すると考えられているがその詳細は不明である。昨年度、我々は脳組織からTritonX-100に不溶性で、低比重性を示す細胞膜画分(TIF; Triton Insoluble low density Fraction)を調製し、この画分に三量体型Gタンパク質(Go, Gi), Src型チロシンキナーゼ(Src, Fyn), NAP-22, GAP-43, 細胞骨格タンパク質(チューブリン, アクチン)に加えGPI(glycosylphosphatidylinositol)アンカー型細胞接着タンパク質(NCAM-120, Thy-1)が存在することを報告した。

本研究ではGPIアンカー型タンパク質を介した情報伝達の分子機構を解明することを目的に、PI-PLC(Phosphatidylinositol-specific phospholipase C)を用いてTIFよりGPIアンカー型タンパク質を特異的に可溶化し、その部分アミノ酸配列を分析することでこの画分に存在する主要なGPIアンカー型タンパク質の解析を行った。

2週齢ラット全脳より調製したTIFをPI-PLCで処理することにより、SDS-PAGEでの見かけの分子質量が140 kDa, 45-60 kDa, 25-27 kDaを示すタンパク質が特異的に溶出された。さらにPNGF(Peptide-N-glycosidase F)を用いた脱糖鎖処理により、それらタンパク質群は見かけの分子質量を110, 97, 79, 37, 35, 22-23 kDaへと移動度を変えた。N末端アミノ酸配列の解析から、110 kDaタンパク質はF3/contactin, 79 kDaタンパク質はT-cadherinと同定し、さらにN末端および部分アミノ酸配列の解析から、37kDaおよび35kDaタンパク質は最近その存在が注目されているIgLON family(LAMP, OBCAM, neurotrimin)と高い相関性を持つことがわかった。

127 2P 2055

神経・筋シナプス形成における COMM 蛋白分子の機能解析

千葉晶、プライアン・ウオルフ

(イリノイ大学細胞分子生物学部)

COMM (Commissureless) はユニークなアミノ酸領域を有する膜貫通型の蛋白分子で、キイロショウジョウバエ中枢神経内の正中線グリアに発現することが知られている。我々は COMM 蛋白分子が他に筋細胞全てにおいても発現することを見出した。この発現は神経・筋シナプス形成時に起こり、筋細胞内のミクロゾームに集中する。筋細胞における COMM 蛋白分子の機能解析をミスエクスプレッション実験等を用いてヴィヴオで行った結果、COMM 蛋白分子が細胞膜よりエンドサイトースすることが神経・筋シナプス形成開始の前提となることが分かった。

128 2P 2054

傍腫瘍性神経症候群患者の自己抗体に対する抗原検索

北村邦男、金子厚*、渋谷匡子**、吉村和法、坂本安、加賀井和幸*、古川千湖*、細川武*、寺田庄一、島津邦男*、濱口勝彦*、野村正彦 (埼玉医科大学・第一生理、神経内科*、中央測定室**)

悪性腫瘍に伴う神経徴候の一部は自己免疫的な機序が関与する傍腫瘍性神経症候群として知られ、自己抗体としては抗Yo抗体、抗Hu抗体、抗Ri抗体等が報告されている。我々は縦隔悪性腫瘍で傍腫瘍性神経症候群として診断された患者血清を免疫組織学的方法やウエスタンブロット法にて検索した結果、抗Hu抗体として知られている抗体と同一のものであることを報告した。Hu抗原は細胞内に存在するRNA結合蛋白質と考えられており、この抗原が自己抗体の標的になっているとは考え難い。そこで本患者抗体を使用して Sprague-Dawley ラット脳の lambda gt11 ライブラリー (Clontech) のスクリーニングを行い他の抗原に対する抗体の存在の有無を検討した。その結果約15万のブラークよりHu抗原ではない1つの陽性クローン(Ta1)を得た。このTa1の塩基配列は脳特異的プロテオグリカンとして知られている phosphacan [又は receptor type tyrosine phosphatase(RPTP)-zeta/beta の細胞外ドメイン] の 3205-3765 の配列と完全に一致した。phosphacanが抗原であることを確定するために、pGEX ベクターによるGST融合蛋白質を調製し、そのアミノ酸配列決定によりphosphacanであることを確認した後、トロンビン消化polypeptide (このものについてもアミノ酸配列により確認) を抗原として反応性を検討した。8例の健常人の血清とは全く反応しなかったが患者血清では明らかな反応が認められた。RPTP-zeta/beta は他の接着因子との相互作用により細胞内への伝達を担う重要な因子と考えられているので、RPTP-zeta/betaに対する自己抗体の作用は神経機能障害を引き起こすと考えられる。腫瘍細胞においてRPTP-zeta/betaそのもの、または構造的にそれと似た蛋白質が産生され、この蛋白質に対する抗体が脳内の RPTP-zeta/beta の細胞外領域を標的とするとの機序が推察される。

129 3B MS10-1 2053

6番染色体短腕マーカーと精神分裂病の相関研究及び毛様体神経栄養因子、セロトニントランスポーター遺伝子多型と精神疾患

小谷泰教、中村雅之、三神正昭、上野修一、佐野輝

(愛媛大学医学部 神経精神医学教室)

精神分裂病をはじめとする種々の精神疾患は、従来の臨床遺伝学的研究からその発症に遺伝的要因の関与が指摘されてきた。さらに近年の分子生物学的手法の急速な発展によって精神疾患の原因遺伝子を直接明らかにしようとする試みがなされている。

今回我々は、すでに相関が報告されている6番染色体短腕に存在する各種マーカーと精神分裂病、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 遺伝子多型と各種精神疾患の関係について解析を行った。

また、最近、セロトニントランスポーター遺伝子中に存在する頻度の高い2種類の遺伝子多型 (exon 2 中のVNTR及び転写調節部位中のdeletion/insertion多型) のうち、転写調節部位中のdeletion type (short variant) をもつ者は、神経質の性格や感情病と親和性が高いことが報告されており、我々は精神分裂病を含めた種々の精神疾患の患者群と対照群で比較検討を行った。

精神分裂病、感情障害、恐怖障害、その他の精神疾患及び各疾患における病型分類はICD10の診断基準をもとに行い、それぞれ正常対照群と比較した。研究対象者には、文書によるインフォームドコンセントを得た。

それぞれ、6番染色体短腕に存在する各種マーカーと精神分裂病、CNTF遺伝子多型と各種精神疾患、VNTRと各種精神疾患の間には有意な相関関係は認められなかった。が、セロトニントランスポーター遺伝子転写調節部位中のinsertion type (long variant) をもつ者が精神分裂病患者に、中でもhebephrenic typeの患者多くみられ、正常対照群と比較して有意差を認めた。この結果は、精神分裂病においては、新たな治療薬剤の開発で5HT-2受容体阻害薬が陰性症状にも効果を持つ等の知見が見い出されている。今回の結果は、精神分裂病とセロトニン系の関連を示唆する一連の報告を支持するものである。

130 3B MS10-3

拘束ストレスによるラット脳内誘導型一酸化窒素合成酵素のmRNA濃度の変化

鈴木映二*, 新谷 太*, 神庭重信**, 浅井昌弘*, 中木敏夫***

(*慶応義塾大学医学部精神神経科学教室,**山梨医科大学精神神経医学講座, ***帝京大学医学部薬理学講座)

誘導型一酸化窒素合成酵素(以下iNOSと略す)は、サイトカインや細菌内毒素などの刺激により誘導される主にRNAへの転写の段階によって制御されている酵素である。今回は、拘束ストレスによって、脳内でiNOSが誘導されるかどうかを調べる目的で、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いてmRNAの発現量を検討した。

実験には7~9週齢のSprague-Dawley系雄性ラットを用い、その取り扱いにはHandbook for the Use of Animals in Neuroscience Researchに従った。拘束ストレス開始0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6時間後にエーテル麻酔下にて断頭し、素早く脳を取り出して視床下部、前頭皮質、海馬、脳幹、小脳、に分けた。

取り出した資料から全RNAを抽出・精製し、RT-PCR法を用いて増幅した。PCR産物を電気泳動し、レーザーデンストメトリーにてバンドの濃度を測定することによって定量した。

今回調べたすべての脳部位で、拘束開始前のiNOS mRNAは検出限界以下であった。拘束開始後30~60分前後にピークのある増加を示した。視床下部では拘束ストレス開始360分後も有意な増加が見られた。

今回の実験から、ラットに拘束ストレスをかけた場合、脳内にiNOSが誘導されることが示唆された。

131 3B MS10-4 2052

筋萎縮性側索硬化症患者髄液を用いたラット
腰髄培養神経細胞におけるc-fosの発現真邊泰宏, 柏原健一, 城洋志彦, 庄盛敏康
(岡山大学医学部神経内科学教室)

筋萎縮性側索硬化症(ALS)においてグルタミン酸代謝異常の早期の変化を捉えるため, 最初期遺伝子(immediate-early gene) c-fosに着目した。すなわちALS患者髄液の培養したラット腰髄神経細胞におけるFos蛋白の発現効果を検討した。

生後11日目、体重18~20gのSDラットを用い、ペントバルビタール麻酔下で腰髄を取り出し5mmの切片を作成。切片は多孔質膜上で非動化ウマ血清入りのMEMで培養。開始2日後、培養液にALS、脊髄小脳変性症(SCD)、末梢神経障害(control)患者各6例の髄液50 μ lをMediaに添加、1時間後、4%パラホルムアルデヒド緩衝液で固定。各標本を凍結し10 μ mのクリオスタット切片を作成し、免疫組織化学的にFosの染色を行った。発色にはグルコースオキシダーゼ-DAB-ニックル法を用い、ニュートラルレッドでカウンター染色した。標本を光学顕微鏡にて観察した。

ALS, SCD, control添加全例で、後角I, II層及びIII層においてFos陽性細胞を認めた。Fos陽性細胞数はALS群でSCD群、control群と比較して有意に増加していた($p < 0.05$)。

c-fosは細胞外の刺激を受けセカンドメッセンジャーを介して発現するprotooncogeneで、短い細胞性応答を長期の生体応答に転換する際に働く最初期遺伝子1つである。伝達物質関連刺激、ホルモン刺激、電解質刺激、けいれん発作、虚血、神経損傷などによって脊髄後角あるいは大脳皮質、海馬、歯状回、扁桃、線条体、梨状皮質、小脳にFos蛋白が発現することが報告されてきた。このためFosは刺激に対する細胞側の反応の指標とみなすことができる。

今回、ALS患者髄液によってFos蛋白の増加が後角神経細胞に認められ、本疾患患者髄液中に何らかの神経刺激物質が存在することが示唆された。

132 2P 2051

spinocerebellar ataxia 6 (SCA6)の分子遺伝学的特徴

松山 善次郎, 川上 秀史, 丸山 博文,
和泉 唯信, 中村 重信
(広島大学医学部第三内科学教室)

目的: 優性遺伝形式の脊髄小脳変性症患者の電位依存性カルシウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニット遺伝子(CACNL1A4)のCAG repeatの拡大を検討し、正常対照群との比較、世代間での不安定性およびCAG repeat数と発症年齢との関係などの分子遺伝学的特徴を検討する。

方法: 日本人の独立した39家系60名のSCA6患者および101名の正常対照者の末梢血からDNAを抽出し、RI標識したプライマーを用いてPCR反応を行い、ホルムアミドゲル電気泳動を行い、CACNL1A4のCAG repeat数を決定した。

結果: 正常群では、リピート数は6-17で、患者群では、21-30であった。9組の親子例において、リピート数の拡大を認めたのは1例のみであった。発症年齢とリピート数との間には、負の相関関係が認められた($n=58$, $r=-0.51$, $p=0.0001$)。

結論: CACNL1A4のCAG repeat数の拡大がSCA6の原因遺伝子異常と考えられた。他のpolyglutamine diseaseと比較して、拡大したCAG repeat数は、21-30と最も小さく、世代間の不安定性も少なかった。発症年齢とリピート数との間には、負の相関関係が認められた。

133 2P 2050

サイトメガロウイルス感染とIgM抗GM2,
抗GalNAc-GD1a抗体

田川 由美, 結城 伸泰, 平田 幸一 (獨協医科大学神経内科), 田井 直 (都臨床研腫瘍免疫)

[目的] サイトメガロウイルス (CMV) 感染後 Guillain-Barré症候群 (GBS) の発症機序を解明するため, CMV 感染後 GBS の血清抗糖脂質抗体と CMV が GM2 エピトープを有するか否かを調べた。

[方法] GBS 113 例のうち, 血清 IgM 抗 CMV 抗体が陽性の 9 例の血清を用い, 様々な糖脂質に対する抗体を ELISA で調べた。また, CMV 感染症, CMV 感染後 Fisher 症候群, *Campylobacter jejuni* 感染後 GBS, 健康者の GM2, GalNAc-GD1a に対する血清 IgM 抗体の陽性頻度を CMV 感染後 GBS と比較した。ウシ脳ガングリオシドと精製 GM2, GalNAc-GD1a, assialo-GM1, assialo-GM2, GD2 を薄層クロマトグラフィーで展開し, CMV 感染後 GBS と CMV 感染症の血清で免疫染色した。ヒト CMV (AD 169) の培養上清を遠心してウェスタンブロットし, モノクローナル IgM 抗 GM2 抗体 (GMB28) を用いて免疫染色した。

[結果] CMV 感染後 GBS 血清中には, GM2 と GalNAc-GD1a に対する IgM 抗体が他の糖脂質に対する抗体よりも高頻度にみられたが ($p < 0.05$), IgG クラスの抗糖脂質抗体は検出されなかった。CMV 感染症と CMV 感染後 GBS の間には, GalNAc-GD1a, GM2 に対する血清 IgM 抗体の陽性頻度に有意差はなかった ($p = 0.09$)。薄層クロマトグラフィー免疫染色では, CMV 感染後 GBS と CMV 感染症の両者の血清 IgM が GM2 と GalNAc-GD1a に反応した。また, 免疫ブロットでは, モノクローナル抗 GM2 抗体で強く染まるバンドを得た。

[考察] CMV 感染後 GBS では, GM2, GalNAc-GD1a に対する血清 IgM 抗体価が有意に上昇していた。CMV タンパクが GM2 構造を有することが示唆されたことから, ウイルス感染後 GBS においても, 細菌感染と同様に分子相同性が発症に関与すると考えられた。興味深いことには, *C. jejuni* 腸炎では IgG 抗 GM1 抗体はみられないのに対し, 神経症状のない CMV 感染でも GM2 および GalNAc-GD1a に対する IgM 抗体を有していた。CMV 感染後 GBS においては, 患者の神経血液関門の異常が重要な発症因子であろうと考えられた。

134 2P 2049

ギラン・バレー症候群の亜型
pharyngeal-cervical-brachial
weakness と IgG 抗 GT1a 抗体

古賀道明¹, 結城伸泰¹, 有賀敏夫², 平田幸一¹
(¹ 獨協医科大学神経内科, ² エーザイ筑波研究所)

Pharyngeal-cervical-brachial weakness (PCB) はギラン・バレー症候群 (GBS) の一亜型で, 咽頭部や頸部, 上肢近位部に限局した筋力低下を特徴とする。ボツリヌス中毒やジフテリアとよく似た臨床像を呈するため, しばしば診断に苦慮する。Mizoguchi らが PCB 様の症状を示す患者血清から IgG 抗 GT1a 抗体と IgG 抗 GD1a 抗体を検出したが, 興味深いことにこの IgG 抗 GT1a 抗体は, GBS の亜型フィッシャー症候群 (FS) 患者でみられる抗 GT1a 抗体と異なり, GQ1b とは交差反応しなかった。われわれは, GQ1b と交差反応しない IgG 抗 GT1a 抗体が PCB の発症に関与するのではないかと考え, 検討した。

PCB 1 例, GBS 50 例, FS 15 例より採取した血清中の IgG 抗 GT1a, 抗 GQ1b, 抗 GD1a 抗体価を ELISA で測定した。PCB 症例の血清中には高力価の IgG 抗 GT1a 抗体のみがみられ, この結果は TLC 免疫染色でも確かめられた。FS 11 例でも IgG 抗 GT1a 抗体価が上昇していたが, 吸収試験の結果, PCB 症例で上昇していた IgG 抗 GT1a 抗体は GQ1b で全く吸収されなかったのに対し, FS 症例でみられた IgG 抗 GT1a 抗体は GQ1b で吸収されることがわかった。

今回の検討の結果, GQ1b と交差反応しない IgG 抗 GT1a 抗体が PCB で特異的に上昇している可能性が示唆された。今後は, GT1a のみを認識するモノクローナル抗体を用いてヒト脳神経の免疫染色を行ない, GT1a の局在について検討を行う予定である。

135 2P 2048

Ramsay Hunt症候群の早期鑑別診断

中城有喜、本多伸光*、村上信五*、溝淵睦彦**
 (松山記念病院、*愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学、
 **神経精神医学)

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脳神経障害を伴う。顔面神経麻痺の原因疾患として、Ramsay Hunt症候群とBell麻痺(特発性顔面神経麻痺)がある。Ramsay Hunt症候群は、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の再活性化により生じるが、水疱を伴わないBell麻痺は、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)などの関与が示唆されている。

本研究では、PCRを用いてVZV DNAの検出を行い、三主徴を伴う典型的なRamsay Hunt症候群とBell麻痺、zoster sine herpete(帯状疱疹を伴わないRamsay Hunt症候群)や水疱が遅れて発現するRamsay Hunt症候群の早期鑑別診断を試みた。

対象は、三主徴を伴う典型的なRamsay Hunt症候群12例、zoster sine herpete(帯状疱疹を伴わないRamsay Hunt症候群)6例、水疱が遅れて発現するRamsay Hunt症候群7例とBell麻痺16例である。これら41症例の耳介液、涙液と末梢血単核球から検体を採取し、VZV DNAをPCR増幅した。検出方法に関しては、前学会で報告した。

上記三検体をRamsay Hunt症候群の各病型やBell麻痺と比較検討した。その結果、耳介液での検出率が最も高く、zoster sine herpeteの約70%、水疱が遅れて発現するRamsay Hunt症候群の約80%にVZV DNAが検出され、Bell麻痺では全く検出されなかった。したがって、耳介液での検出が、これらの疾患の早期鑑別診断に有用と考えられた。

136 3C MS11-1

ラット線条体の鉄塩投与によるてんかん様発作波の出現とin vivoによる組織障害の形成並びに細胞外グルタミン酸の増加について

平松 緑, Honglian Shi*, 中島雅央*, 嘉山孝正*
 (山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所,
 *山形大学医学部脳神経外科)

ラットまたはネコの大脳皮質に鉄塩溶液を注入するとてんかん様発作波が出現し、これは外傷性てんかんのモデルとみなされている。本研究においてはラット線条体に鉄塩溶液を注入後、てんかん焦点が形成されるかどうかについて検討した。

ラットをネンブタール麻酔し、線条体に鉄塩溶液を注入後、皮質脳波記録を行なった。組織障害の形成過程は鉄塩溶液を注入後、カルバモイルプロキシルを腹腔内投与し、L-バンドelectron spin resonance - computed tomography(ESR-CT)によりラット頭部のニトロキシドラジカルの画像を観察した。マイクロダイアリス法による線条体細胞外液中のグルタミン酸の変化は無麻酔無拘束下においてニューロケムを用いて検討した。

ラットに鉄塩溶液を注入して1週間後にてんかん様発作波が出現することを脳波記録により認めた。鉄塩溶液を投与して1時間後にカルバモイルプロキシルを腹腔内投与するとニトロキシドラジカルが線条体に出現することをESR-CT画像により認めた。さらに3時間後にはその出現範囲は増大し、注入1週間後にはさらに拡大した。しかし対照として生理食塩水を線条体に注入した場合にはニトロキシドラジカルの分布は線条体に認められなかった。すなわちカルバモイルプロキシルは僅かしか血液脳関門を通過しないので、正常ラットの脳内にはニトロキシドラジカルの分布はESR-CT画像により認められない。すなわち神経細胞膜障害によりカルバモイルプロキシルが浸潤したものと想定される。また鉄塩溶液を投与して1週間後には線条体の細胞外液中にグルタミン酸が増加していることを認め、発作発現にグルタミン酸が関係していることが明らかとなった。

137 3C MS11-3

老化促進マウスにおける海馬由来神経刺激因子の免疫組織化学的検討

遠山育夫¹、小鹿幸生²、大村 裕³、佐々木 和男⁴、
木村 宏¹

(¹滋賀医科大学分子神経研、²名古屋市立大学第二内科、³日本臓器生物活性科学研究所、⁴富山大学工学部)

P8系老化促進マウス(SAMP8)は、加齢とともに学習・記憶障害を示す。最近われわれは、SAMP8の中隔において、コリンアセチル基転移酵素(ChAT; Choline acetyltransferase)の免疫活性が、有意に低下することを見出した。そこで今回、海馬神経細胞で産生され、逆行性に中隔コリン神経のChAT酵素活性を刺激すると考えられている海馬由来神経刺激因子

(HCNP)について、免疫組織化学法で検討した。

9ヶ月齢のSAMP8および対照として学習記憶障害のないR1系マウスを用いた。深麻酔下に左心室から10 mMのリン酸緩衝液で脱血後、0.35%グルタルアルデヒドと4%パラホルムアルデヒドを含む固定液で灌流固定した。脳を摘出後、後固定し、15%蔗糖液中でCryoprotectionを行った後、20 μ mの連続切片を作製し、HCNPの免疫組織化学法に供した。

対照群のR1マウスでは、大脳皮質、線条体、海馬、小脳などにHCNP陽性神経細胞を認めるとともに、中隔、大脳皮質、視床下部などにHCNP陽性線維を観察した。SAMP8では、海馬のHCNP免疫活性が有意に増強していた($p<0.05$)。強拡大で観察すると、多形細胞層(Stratum oriens)から分子層(Stratum moleculare)にかけてのNeuropilが、HCNP抗体によって強陽性に染色されていた。染色強度を画像解析装置にて半定量的に測定し、R1とSAMP8間で比較検討したところ、SAMP8の海馬で有意に上昇していた($p<0.05$)。しかしながら、中隔を含め、その他の脳領域ではR1とSAMP8の間に、明らかな差は認めなかった。

以上の結果から、SAMP8の海馬ではHCNP含有量が増加していることが示唆された。

138 3C MS11-4

MPTP投与マウスにおける線条体ドパミン神経の免疫組織化学的な自発的再生

光本泰秀、渡部昭仁、森厚詞、古賀信幸
(大塚製薬(株)徳島新薬第三研究所)

MPTPで誘起したマウス黒質線条体ドパミン神経路障害はパーキンソン病モデルとしてその病態機構の解明並びに治療薬の薬効評価系として用いられている。今回このMPTPマウスモデルにおいて障害誘起後からの自発的回復について生化学的並びに免疫組織化学的に検討を行った。

パーキンソン病マウスモデルの作製は10週令のC57blマウスを用いて20mg/kgMPTPを2時間間隔で1日に4回、1日間隔で2日間腹腔内に投与した。生化学的評価としては線条体及び中脳におけるドパミン並びにその代謝物をHPLCにより測定した。組織化学的評価は凍結切片(14 μ m)を作製しチロシン水酸化酵素(TH)の免疫染色を行い、中脳黒質でのTH陽性細胞体数をカウント及び線条体におけるTH陽性繊維密度を画像解析により測定した。また線条体組織TH酵素量をイミュノブロットティングにより検出後、イメージングデンシトメーターで定量した。

線条体ドパミン量はMPTP投与後3日目で90.7%、10日目で87.6%、17日目で84.9%、24日目において84.4%各々低下を示した。組織化学的にはMPTP投与後10日目において中脳黒質緻密体のTH陽性細胞体数はコントロールの55.8%で、線条体におけるTH陽性繊維密度の低下が認められた。24日目のTH陽性細胞体数はコントロールの77.6%で中脳黒質の残存神経細胞体におけるTH合成の促進が示唆された。またこの時点での線条体におけるTH陽性繊維密度は10日目に比べ明らかな増加を示した。線条体組織TH量も組織化学的免疫染色性と同様にMPTP投与後10日目から24日目にかけてコントロールの44.4%から76.4%と明らかな増加を示した。

線条体ドパミン量が持続的且つ大幅に低下したMPTPモデルマウスにおいて免疫組織化学的な神経繊維の再生が起きていることが示唆された。このことから組織レベルでの再生が必ずしも神経伝達物質レベルには反映されないものと考えられる。

139 2P 2047

E1マウスにおけるアロプリノール急性投与後の脳内SODアイソザイム蛋白量の変化とその抗痙攣作用発現機序

村島善也, 鈴木二郎*

(東京都精神研, 東邦大学・医・精神医学*)

我々は既に本学会において、てんかん原性を獲得したELマウスのSOD活性が海馬で著しく低下しているのはCu,Zn-SODが、1/10近くに低下しているためであること、アロプリノール投与後、海馬のSOD活性は6時間で約10倍にも上昇するが、このほぼ全てが、Cu,Zn-SODであったことを明らかにし、ELマウスにおけるアロプリノールの痙攣作用の発現には、海馬におけるSODアイソザイムのCu,Zn-SODが、部位特異的に酵素活性誘導されることが関与していることを明らかにした。そこで、これらの活性の変化が実際にCu,Zn-SOD,Mn-SODの蛋白量とどう対応しているかを検討した。

【目的】アロプリノールは一部の小児難治性てんかんに対して有効であり、特に、二次性全般化発作に優れた効果を発揮する。その作用機序についてアロプリノールは O_2^- 産生を伴うキノン酸類物質の阻害剤であることから、フリーラジカルとその消去酵素であるSOD(superoxide dismutase)の関与が示唆されている。そこで遺伝性の二次性全般化てんかんモデルであるELマウスにアロプリノールを経口投与後、経時的に脳内SODアイソザイム蛋白量を定量し、既に報告した活性と比較し、その作用機序について検討した。

【方法】脳内領野試料の作製：生後5週齢より、ほりあげ刺激を与え発作閾値の十分低くなった30週齢EL[s]28匹を用いた。75mg/kgのアロプリノールを経口投与後発作が、コントロールされた6時間後(10匹)と再び発作閾値が回復し、発作を起こすようになった48時間後(9匹)より頭頂皮質、海馬について、ホモジェネートを作成した。対照としては無処置の30週齢ELマウス9匹と、その母系であるDDYマウスを近交系とした30週齢マウス10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。校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)は極めて狭いがグラフに対応する値も、それぞれ、0.0220ng, 0.0141ngと極めて低く、高い感度が得られた。

【結果考察】アロプリノール投与後の頭頂皮質では活性は低下していたのに蛋白量ではMn-SOD、Cu,Zn-SODともに増大していた。海馬では、Cu,Zn-SOD活性は10倍近く上昇していたが、蛋白量では、Mn-SOD Cu,Zn-SODともに低下していた。以上より頭頂皮質でのSOD蛋白誘導は活性を伴わないものであり、海馬でのSOD蛋白の低下はみかけのもので、活性を伴わないSOD様免疫活性を持つ蛋白の低下によると考えられる。Seyfried,TNら(1994)はELマウスでセルロプラスミン代謝酵素の異常を報告しており、このミュータントマウスが銅の代謝異常を有する可能性が考えられる。蛋白量と活性の乖離は不活性型のSODの存在を示唆しており、アロプリノールは活性型により強くはたらくものと考えられる。

140 2C O-2

てんかんモデルマウス脳におけるキノリン酸合成酵素の発現

中川幸則¹、浅井広志¹、森仁志¹、鬼頭純三²、中野紀和男³

(1名大農・生化学制御, 2名大医・動物セ, 3名大・生物分子応答研究セ)

てんかんと呼ばれる慢性の脳障害の主症状は、大脳ニューロンの過剰な興奮に起因するけいれん発作である。しかし、その原因が何であるのか、遺伝的素因があるとすればその実体は何なのかなどはまだ全く解明されていない。したがって、根本的な治療は達成されていないというのが現状である。

これまでに当研究グループは、放り投げ刺激等による前庭神経刺激によりてんかん性けいれん発作を誘発することができるE1マウスを用い、その脳においてグルタミン酸類似物質であり興奮毒性を持つキノリン酸の合成酵素(3HAO; 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase)の活性が著しく高いことを見いだした。3HAOの活性は、E1マウスの脳において正常マウスに比べて著しく高いことがわかったが、肝臓においてはいずれのマウスでも高い値を示し、マウス系統間では差はみられなかった。

今回我々はE1マウスの脳における3HAOの発現様式を解析することを目的として、量的に調製の容易なラット肝臓より3HAOを精製、そしてcDNAをクローニングし、その塩基配列を用いてE1マウスとddYマウスの脳における3HAOの発現を比較した。

クローニングされた3HAO cDNAの塩基配列をもとにプライマーを作製し、E1マウスとddYマウスの脳から得たtotal RNAを用いてRT-PCRを行った。これらの増副産物をSouthern blottingによって解析したところ、3HAOはE1マウスの脳においてddYマウスに比べて明らかに発現量が高いことが確認された。さらに、Northern blottingによりE1、ddY両マウスの肝臓および腎臓を比較した結果、両マウス間に3HAOの発現量は差はみられなかった。以上のことから、E1マウスのてんかん症における3HAO遺伝子の脳特異的発現機構の関与が示唆される。

141 2P 2046

ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた、けいれん関連遺伝子の検索

寺田庄一、北村邦男、吉村和法、坂本安、
渋谷匡子*、野村正彦

(埼玉医科大学第一生理学教室、*中央測定室)

中枢興奮薬であるベンチレンテトラゾール(PTZ)はてんかん様のけいれんや、神経の初代培養細胞においては、Burstingと呼ばれる群放電を引き起こす事がこれまでに、報告されている。我々は、これらの現象過程における神経細胞内の生化学的变化を追及するため、主として二次元電気泳動を用いて解析を行い、初代神経培養細胞にPTZを作用させる事によって発現が増加する蛋白質としてプロサイモシン、パラサイモシンがある事を明らかにしてきた。

今回、神経細胞内のより詳細な生化学的变化を調べるために、ディファレンシャル・ディスプレイ法による検索を行った

ラット17日胚の大脳皮質、初代培養細胞を常法に従い、Eagleの最小基本培地に10%牛胎仔血清、2mM L-グルタミン、0.5%ブドウ糖を添加したもので96時間培養を行った。その後、PTZを最終濃度25mMになるように加え、15分間作用させたもの、ならびにPTZの代わりにPBSを添加したものをコントロールとし、それぞれからmRNA調製した。これらのmRNAを試料として伊藤らの方法(Ito, T. *et al.* FEBS Lett. 351:231-236,1994)に従ってディファレンシャル・ディスプレイを行った。各mRNAを20組のプライマーセットを用いて、RT-PCR増幅の後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動上にて、比較検討を行った。PTZを作用させる事によって発現に変化の見られたバンドは、切り出した後再度PCRによる増幅を行った後、TA-ベクターに組み込み、クローニングした。

その結果、PTZによって再現的に発現が増加または減少したクローンを幾つか得る事ができ、PTZにより減少するものが、Soares senescent fibroblastsライブラリー (Human) 由来のcDNAならびに、Human Ovary IIから得られたcDNAと80%以上の相同性を持つ事が明らかとなった。これら2種の蛋白質の機能は不明であるが、今回の結果から、神経細胞での役割が注目される。

142 2P 2045

メロシン(ラミニン-2)のモノクローナル抗体および抗ペプチド抗体による痴呆性疾患血清・髄液のイムノブロット解析

田代謙一郎、林 要人、三山吉夫
(宮崎医科大学精神医学教室)

メロシン(ラミニン-2)は $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ と $\gamma 1$ 鎖から構成され、筋鞘構築の維持と末梢の髄鞘発生に関連しているdystroglycanのリガンドであることが知られている。最近、ラミニン $\alpha 2$ 鎖の欠損が先天の筋萎縮症(CMD)を引き起こすことが報告され、CMDの確定診断には髄液ラミニン $\alpha 2$ 鎖の免疫学的解析が有用であると報告されている。

一方、マウスEHS肉腫ラミニン(ラミニン-1)抗体を用いた痴呆性疾患の免疫学的解析では臨床的な痴呆重症度とラミニン濃度の間に相関性がなかったという報告がある程度で、メロシンと痴呆性疾患との関連性は不詳である。本研究ではメロシンおよびメロシンペプチドに対する抗体を用いて痴呆性疾患の血清・髄液の免疫学的解析を行い、臨床的診断の有用性を検討した。

痴呆性疾患の血清では脳血管性痴呆(VD)5例、AD6例、ピック病1例、運動神経障害を伴う痴呆(三山型)1例。髄液ではVD8例、アルツハイマー型老年痴呆(SDAT)1例、ピック病1例を用いた。モノクローナル・メロシン抗体はGIBCO BRLより購入し、抗メロシンペプチド抗体としてはラミニン $\alpha 2$ 鎖のペプチドSIKVSVSに対して作成した。

モノクローナル・メロシン抗体はヒトメロシン(ラミニン-2)の80 kDaを認識し、ごく僅かに300 kDaのサイズを認識するが、200 kDaは認識しなかった。抗メロシンペプチド抗体はペプチドSIKVSVSを特異的に認識するが、ウエスタンブロットにおいてヒトメロシンを認識しなかった。

モノクローナル・メロシン抗体は痴呆性疾患の血清では170 kDa、100 kDaおよび95 kDaのサイズを、髄液では300 kDa、170 kDaおよび100 kDaのサイズを認識し、血清では4タイプ(170+100+95 kDa, 170+100 kDa, 170+95 kDa, 170 kDa)、髄液では2タイプ(300+170+100 kDa, 300+170 kDa)に分類された。一方、抗ペプチド抗体は血清と髄液とも2つのサイズ(100 kDa, 95 kDa)を認識し、血清では1タイプ(170+95 kDa)、髄液では2タイプ(170 kDa, none)に分類された。疾患別にみると、VDでは、血清で170 kDa型が80%、髄液では300+170+100 kDa型が70%を占めていた。一方ADでは血清は約70%が170 kDa型であり、VDと同様の傾向を示した。今後さらに症例数を増やして痴呆性疾患と血清・髄液のタイプ別分類を検討中である。

143 2C O-4

Guillain-Barré症候群の免疫原: *N*-グリコリルノイラミン酸を有する GM1

小鷹昌明, 結城伸泰, 吉野 英*, 入江史敏**

平林義雄**, 平田幸一

(獨協医科大学神経内科, *国立精神・神経センター
国府台病院神経内科, **理化学研究所国際フロンティア糖細胞情報)

目的: ウシ脳ガングリオシド注射後に発症した Guillain-Barré症候群 (GBS) 患者が報告されている。GBS の発症機序を明らかにするために, 患者血清免疫グロブリンが反応する新しいウシ脳ガングリオシド分子を同定し, 標的分子, 免疫原としての可能性を検討した。

対象と方法: (1) GBS 176 例から血清を得た。粗ウシ脳ガングリオシドを Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーにて分画し, 26 画分中 13 画分を抗原として用いた。中性とアルカリ性の展開溶媒系を用い TLC で展開し, 免疫染色を行った。(2) ヒト脊髄前角, 後角, 脊髄前根, 後根から脂質を抽出し, イオン交換カラムクロマトグラフィーによりモノシアロ画分を得た。これらの抗原を TLC で展開し, *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を有する GM1 に対する高力価の IgG 抗体陽性患者血清を 1 例選び, 免疫染色を行った。(3) (1) で得られた IgG 抗 GM1 (NeuGc) 抗体の陽性患者血清を 10 例選び, *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を有する GM1, GM2, GD1a による吸収試験を行った。

結果: (1) 第 4 画分に反応する陽性バンドが 31 例で認められ, これらは中性の展開溶媒系において GM1 (NeuAc) と同じ Rf 値を示し, アルカリ性においてやや低い Rf 値を示した。(2) 低い Rf 値に一致するバンドは認められなかった。(3) GM1 (NeuAc) で吸収させた後の抗 GM1 (NeuGc) 抗体は, GM2, GD1a で吸収させたものに比し有意に減少した。

考察: (1) ガングリオシドはシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であり, 代表的なシアル酸分子種は NeuAc と NeuGc である。NeuGc は中性の展開溶媒系において等しい Rf 値をとるが, アルカリ性では *N*-アセチル体よりも低い Rf 値をとることから, 第 4 画分で反応したバンドは GM1 (NeuGc) と考えられた。(2) ヒト脊髄神経組織に GM1 (NeuGc) が発現していることの証明はなされなかった。(3) 抗 GM1 (NeuGc) 抗体は, GM1 (NeuAc) と交差反応を示した。NeuGc はヒトに存在せず NeuGc を有するガングリオシドは, 免疫原性が高いことが知られている。GM1 (NeuGc) を含むウシ脳ガングリオシド注射後に, GM1 (NeuAc) にも交差反応する抗 GM1 (NeuGc) 抗体が産生され, GBS 発症に至ることが推測された。

144 2P 2044

Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor と精神分裂病

谷 宗英*, 小出誠司*, 中村嘉宏*, 橋本博史**, 甲斐利弘***, 山上 榮*

(*大阪市立大学医学部神経精神医学教室, **浅香山病院, ***大阪市立総合医療センター)

精神分裂病の病因に遺伝要因が関与していることが, 明らかにされており, ドーパミン仮説にもとづき, ドーパミン受容体遺伝子を中心に様々な候補遺伝子が検討されてきたが, 未だ一致した結論には至っていない。GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) は 1993 年, Lin らによってクローニングされ, 中枢神経系ドーパミン作動性ニューロンに, 他の神経栄養因子よりも特異的に作用し, パーキンソン病の治療への応用も期待されている。今回我々は, GDNF 遺伝子領域外の約 500kb に位置し, CA repeat を含むマイクロサテライト多型 D5S1964 と精神分裂病との関連研究を行った。

方法: 対象は DSM-IV にて精神分裂病と診断された 74 名と, 健常対照者 86 名である。本研究は大阪市立大学医学部倫理委員会の承認を得て, 被験者には, あらかじめ検査について説明し同意を得た。採血した血液から通常の方法で DNA を抽出し, 合成オリゴヌクレオチドのプライマーを用いて [α - 32 P]d-CTP を加えた PCR 法によって当該部位を増幅した。6% polyacrylamide-bisacrylamide gels (8M urea) にて, 電気泳動を行い, 対立遺伝子を同定した。患者群と対照群をカイ 2 乗検定により比較検討した。

結果: 当該部位は, 8 つの対立遺伝子に分かれた。Overall と個々の Allele について, 両群間でカイ 2 乗検定を用いて比較したところ, 有意な差は認められなかった。

考察: 今回の結果から, この多型を含む遺伝子領域が精神分裂病の病因に関与している可能性は少ないと考えられた。今後はさらに, 性別, 発病年齢, 臨床的特徴などとの相関についても検討していくつもりである。

145 2P 2043

C6ラットグリオーマ細胞におけるジエチルマレイン酸によるストレス応答の促進

○岡本慶子、伊東秀記、加藤兼房
(愛知県コロニー・研・生化)

最近、細胞内での酸化還元過程とストレス応答の関連を示唆する事実がいくつか報告されている。私たちは、細胞内SH基のレベルを低下させるジエチルマレイン酸(DM)の、ストレス応答に及ぼす影響を、C6ラットグリオーマ細胞を用いて、低分子量ストレス蛋白質であるhsp27および α Bクリスタリン(α B)のストレス応答を指標として検討した。

C6細胞は、10%のFCSを含むDMEM液中で培養し、コンフルエント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。細胞の超遠心(125,000 $\times$ g/20 min)上清中のhsp27および α Bをイムノアッセイ法で測定した。hsp70は、ウェスタンブロットにより解析した。

コンフルエント培養のC6細胞中のhsp27および α Bは低濃度であったが、100 μ Mの亜硫酸ナトリウムを1時間作用させ、その後正常の培地に戻して16時間培養を続けると、両蛋白質のレベルは増加した。ストレス負荷時に1mM DMを共存させると、両蛋白質の誘導は著しく促進された。同じ条件下で、hsp70の誘導も促進された。DMは、熱ストレス(42℃/30 min)および、100 μ Mの塩化カドミウムによるhsp27、 α Bおよびhsp70の誘導も促進した。亜硫酸ナトリウムによるhsp27、 α Bおよびhsp70のmRNAの発現は、DMによって促進されていた。しかしながら、DM単独で作用させた場合には、これらの蛋白質の誘導もmRNAの発現の誘導も観察されなかった。熱ショック転写因子(HSF)の熱ショックエレメント(HSE)結合能の活性化をゲルシフトアッセイによって調べると、亜硫酸ナトリウムによるHSE結合能の活性化は、DMによって長時間持続していることがわかった。それと一致して、HSFのリン酸化も持続していた。DM単独で作用させた場合にもHSE結合能の活性化は見られたが、HSFのリン酸化は観察されなかった。細胞内のグルタチオンのレベルは、亜硫酸ナトリウム単独の場合に比べて、DMを共存させた場合に著しく低下していた。

以上のように、ストレス負荷時にグルタチオンのレベルを低下させるとストレス応答は著しく促進されることがわかった。

146 2P 2042

グリア由来培養細胞におけるセロトニン-2A受容体を介した細胞内カルシウム動員系に対する熱ストレスの影響

加賀谷有行、岡田亜希子*、田原康孝、稲垣正俊、前正秀宣、西田朗**、横田則夫、堀口淳、仲田義啓*、山脇成人

(広島大学医学部神経精神医学講座、*広島大学医学部薬効解析科学、**国立呉病院臨床研究部)

セロトニン-2A受容体機能はさまざまな機構で調節を受けていることが知られている。今回、われわれはグリア由来培養細胞を用いて、熱ストレスに対するセロトニン-2A受容体を介した細胞内カルシウム動員系の変化について検討した。

ラットグリア由来C6細胞を培養し、44℃、30分間の熱ストレスを与えた。熱ストレス1、2、3、6、9時間後に細胞から可溶性画分を得て、抗HSP-70抗体によるウェスタン・ブロッティングを行った。また、熱ストレス6時間後の細胞にカルシウム感受性蛍光色素fura-2/AMを負荷し、細胞内カルシウム濃度を測定した。

抗HSP-70抗体により認識される蛋白質が、熱ストレス負荷細胞、非負荷細胞のすべてに認められたが、熱ストレス6、9時間後の細胞のみは、2種類の蛋白質が発現していた。

一方、熱ストレス6時間後の細胞において、10 μ M セロトニン刺激による細胞内カルシウム上昇が熱ストレス処置群で有意に低下していた。

以上の結果から、熱ストレスによりグリア由来培養細胞において熱ショック蛋白質が誘導され、熱ストレスがセロトニン-2A受容体機能を修飾することが示唆された。

147 2P 2041

カイニン酸誘導痙攣ラット脳におけるストレス蛋白質の発現

加藤兼房、仙波りつ子、竹内郁夫、伊東秀記、岡本慶子

(愛知コロニー・発達障害研究所)

カイニン酸投与により痙攣を誘発したラットの中枢神経系各部位におけるhsp27および α Bクリスタリンの発現をイムノアッセイ法と免疫組織化学的に解析したところhsp27が顕著な応答を示したのでその結果を報告する。

生後33日のSD系ラットに10 mg/kgのカイニン酸を腹腔内投与して、痙攣が誘発されたラットについて0、24、48、72、96時間後および10日後の海馬、内嗅皮質、嗅球および小脳のhsp27および α Bクリスタリンをイムノアッセイ法にて測定したところ、カイニン酸投与後48-96時間で極大値(1.5-2 μ g/mg protein)を示す30-50倍の顕著なhsp27の誘導が海馬と内嗅皮質で観察された。10日後でも数百ng/mg proteinの高いレベルであった。海馬におけるhsp27のmRNAレベルも顕著に増加していた。嗅球でも軽度のhsp27の誘導が認められたが、小脳では応答がなかった。

α Bクリスタリンも海馬と内嗅皮質で48時間後に数倍の濃度に上昇していたが、極大値でも50 ng/mg protein以下の低濃度であった。

一方hsp70とhsc70の応答を96時間後の海馬についてウェスタンブロット法で調べたところ、hsp70は明らかに増加していることが分かったが、濃度は低く、僅かに検出できる程度であった。hsc70のレベルは増加していなかった。

96時間後の脳のhsp27の局在を知るために、抗hsp27抗体を用いて、ピブラトーム切片およびパラフィン切片を免疫組織化学的に染色すると、海馬、視床、梨状葉皮質、内嗅皮質、脳梁のグリア細胞およびニューロンが強く染色された。正常対照ラットでは、海馬錐体細胞が染色され、グリア細胞の染色は弱かった。

以上の結果より、hsp27の顕著な発現誘導はカイニン酸誘導発作後に傷害された組織の修復に関与していることが示唆された。

148 2P 2040

ストレス蛋白質のストレス誘導はクルクミンによって促進される

加藤兼房、伊東秀記、岡本慶子

(愛知コロニー・発達障害研究所・生化学部)

カレーの黄色色素成分であるクルクミンは、抗炎症作用、抗酸化作用および抗発癌作用があることが知られている。我々はC6グリオーマ細胞を熱(42°C、30分間)、亜硫酸(100 μ M、60分)あるいはCdCl₂(100 μ M、60分)に曝露する際に、3-10 μ Mのクルクミンが共存すると、その後の細胞内hsp27および α Bクリスタリン濃度の増加が著しく促進されることを見つけた。クルクミンはhsp70のストレス誘導も促進した。しかし、クルクミン単独の曝露ではストレス誘導は認められなかった。

クルクミンによるこれらのストレス蛋白質の増量促進は、それぞれのmRNAレベルの増加が先行した。また、ゲルシフト法により、クルクミンは熱ショック転写因子(HSF)の熱ショックエレメント(HSE)への結合能を長時間持続させることが分かった。クルクミン単独曝露した細胞でもHSFが活性化され、HSE結合活性が観察されたが、HSFのウェスタンブロットにて、活性化されたHSFはリン酸化されていなくて、いわゆる"transcriptionally inert"な不完全な活性型であることが分かった。この不完全に活性化されたHSFも、同時に負荷されたストレスによるHSFの活性化が起こると、リン酸化され、完全な活性型になり、ストレスによって活性化されたHSFとともに相乗的に、転写活性を促進することが示唆された。

クルクミンによるストレス誘導促進はラット肝BRL-3A細胞やマウス線維芽細胞Swiss 3T3でも認められ、細胞種を問わず普遍的な現象であった。

ラットを42°Cのウォーターバスに20分間浸けて熱ストレスを負荷する際に、予めクルクミンを腹腔投与(20 mg/kg体重)しておくと、肝および副腎でのhsp27、 α Bクリスタリンおよびhsp70の誘導が促進された。すなわち、クルクミンは個体レベルでのストレス応答も促進した。

クルクミンはアラキドン酸代謝の強力な阻害活性を持つことが知られている。クルクミンによるストレス誘導促進機構は、すでに報告されているサリチル酸やインドメタシンによる促進機構と同じ機構によることが推測される。

149 2P 2039

アストログリア(AST)由来の一酸化炭素は神経細胞の低酸素による apoptosis を抑制する。

小川 智¹、蘭牟田直彦²、小澤健太郎¹、玉谷実智男¹、柳原武彦²、遠山正彌¹
大阪大学医学部解剖学第2教室¹、同神経内科²

アストログリア(AST)は中枢神経系を構成する細胞群の中で虚血などの環境変化にきわめて強いだけでなく、このような環境下において神経保護機作を発揮する。AST を培養し、低酸素環境に暴露することによって誘導されるストレス蛋白の機能を解析することにより、虚血環境下における AST の役割を知ろうとした。

培養 AST を低酸素環境下に暴露することにより AST 内には分子量約 33 kDa のストレス蛋白が誘導され、このストレス蛋白は正常酸素化にある AST に熱ショック、過酸化水素、コバルトなどの化学刺激を与えることによって誘導されること、また、特異抗体を用いた Western blot、特異 probe を用いた Northern blot により heme oxygenase -1 (HO-1)であることが示された。低酸素による HO-1 の誘導は、低酸素負荷直後より見られ、12 時間で最大、再酸素化後に急激に減少した。また、低酸素による HO-1 message の誘導は cycloheximide の添加によって抑制された。これに反し、70 kDa 熱ショック蛋白(HSP70)の誘導は、再酸素化後のみに見られ、HO-1 の低酸素による誘導が HSP70 のそれとは異なっていることが示された。また、核 run-off アッセイは低酸素暴露によって HO-1 の転写速度が著増することをしめし、HO-1 の誘導が転写レベルで起こっていることを示した。HO-1 は再酸素化に伴い、一酸化炭素(CO)を産生する。一方、培養神経細胞を低酸素環境下で培養するとその apoptosis が加速されるが、5%の CO 存在下で低酸素暴露すると、その細胞死が明らかに抑制され、これに一致して、CO は CBP32 をはじめとする caspase 活性を低下させた。

以上より、低酸素環境によって AST に誘導される HO-1 は CO の発生を介して神経保護機作を発揮していることが示された。

150 2P 2038

ORP150 (150 kDa Oxygen Regulated Protein) の発現は低酸素による細胞死を抑制する。

小澤健太郎¹、桑原敬介²、玉谷実智男¹、堀 正二²、小川 智¹、遠山正彌¹
大阪大学医学部解剖学第2教室¹、同第一内科²、

ORP150 (150 kDa Oxygen regulated protein)は低酸素暴露されたグリア細胞より分離・クローニングされた新規ストレス蛋白で、グリア細胞の多彩な虚血ストレス応答を形づくっていると考えられる。

我々は、ORP150 が低酸素環境に対する細胞のストレス応答にとって重要な役割を担っていることを証明するため、HEK (human embrio kidney)細胞に CMV プロモーターを用い ORP150 のアンチセンスを pCGAS+Neo を用いて導入、Neo 耐性にて選択することによって、ORP150 の antisense stable transformant 株を樹立した。この ORP150 (-)細胞では、野生株に対して ORP150 の正常酸素環境における発現量も明らかに低く、低酸素暴露によって野生株で ORP150 発現量が低酸素暴露後 18-24 時間をピークとして増加するのに対して、その発現量は変化しなかった。この時期に一致して、ORP150(-)株では一気に細胞死が引き起こされ、この細胞死は蛋白合成阻害剤で抑止され、かつ形態学的にも apoptosis としての特徴を有していた。また、ORP150 と同様に小胞体存在するストレス蛋白である GRP94、GRP78/Bip は低酸素によって、野生株と同様に増加した。さらに、ORP150(-)株では、正常酸素下における増殖、砒素や過酸化水素など、小胞体以外を標的とする化学的ストレスに対する抵抗性は、野生株と差を認めなかった。さらに、ORP150 がより遷延した低酸素環境下で機能できるメカニズムを解明するため、ORP150 と GRP78/Bip を含む粗分画を低酸素暴露された HEK 細胞より精製し、これを ATP クロマトグラフィーに供した。ORP150 は GRP78/Bip よりもより高い ATP によってカラムより流出し、他のストレス蛋白に比し ATP 分子に対する親和性が明らかに高く、遷延した低酸素環境など、ATP の低い環境下でも機能できることが示された。

以上より、ORP150 は遷延した低酸素環境下で小胞体機能を保持することによって細胞死を抑制することが示された。

151 2P 2037

ラット交感神経節細胞におけるBiP/GRP78
遺伝子の発現調節機構

三井 千珠、三浦 真紀、田中 秀逸、小池 達郎
(北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻行動知能
学講座)

HSP70ファミリーの一種であり小胞体内に局在するBiP/GRP78は小胞体内カルシウムイオンの枯渇やグルコース飢餓などの小胞体ストレスにより誘導されることが知られている。上頸神経節 (SCG) 細胞を thapsigargin (TG)、 Ca^{2+} ionophore 及び BAPTA-AM などの小胞体内カルシウムストア枯渇をひきおこす薬剤で処理し、BiP mRNA 合成をノーザンブロット法で調べた。500nM TG (6h) 及び $10\mu\text{M}$ Ca^{2+} ionophore (2h) 処理により発現誘導が認められたが、カルシウムイオンの膜透過性キレート剤である BAPTA-AM ($50\mu\text{M}$, 6h) を処理した場合には BiP の活性化が起らなかった。また、NGF 除去により SCG で細胞死を誘導するパラダイムにおいても BiP の活性化は検出されなかった。この条件ではカルシウムイメージング法により小胞体内カルシウムストア枯渇及び細胞質内カルシウムレベル低下が認められた。一方、NGF で交感神経節様に分化させた PC12 細胞において、NGF 除去により神経細胞死を誘導させた場合にこの BiP 遺伝子が特異的に活性化される (Aoki et al. J. Biochem. 121, 122-127, 1997)。これらの結果から、小胞体内カルシウムストア枯渇による BiP 誘導発現には細胞質内カルシウムレベルが関与していると考えられ、SCG 細胞と PC12 細胞における NGF 除去による細胞内カルシウムレベルの応答の差異が BiP 発現の差異を生じている可能性を示唆する。現在、BiP 誘導に関わるカルシウムイオン感受性の細胞質内因子について検討している。

152 2P 2036

 αB クリスタリンのリン酸化

○伊東秀記¹、岡本慶子¹、中山洋²、
磯辺俊明²、加藤兼房¹
(¹愛知県コロニー・研・生化、²都立大・理・化学)

昨年の本大会において、低分子量ストレス蛋白質である αB クリスタリン (αB) は、細胞外からの刺激に応じてリン酸化を受けることを報告した。今回は、さらに、 αB のリン酸化について新しい知見を得たので報告する。

U373MG 細胞は、10% FCS を含む EMEM 液中で培養し、confluent 培養の細胞にそれぞれの薬剤を暴露し、37°C で培養を継続した。細胞は、PBS で洗った後、-80°C で保存した。各皿の細胞は、0.3ml の Tris-HCl (pH7.5) で懸濁し、超音波破碎後、遠心 ($125,000 \times g/20 \text{ min}$) 上清を等電点電気泳動によって分離し、PVDF 膜に転写し抗 αB 抗体によって Western blot を行った。また、一部の実験では、遠心沈殿物を 8M 尿素によって可溶化し、同様に解析した。

confluent 培養の U373MG 細胞を亜硫酸ナトリウム (As)、 H_2O_2 、ソルビトール、NaCl、アニソマイシン、ホルボールエステル (PMA)、あるいはオカダ酸で 90 分間処理すると、可溶性分画の αB のリン酸化が見られた。熱ストレス ($45^\circ\text{C}/30 \text{ min}$) を負荷すると、不溶性分画にリン酸化型 αB が検出された。p38 MAP キナーゼを特異的に阻害する SB202190 は、PMA あるいはオカダ酸以外の刺激による αB のリン酸化を抑制した。MEK を特異的に阻害する PD98059 は、PMA による αB のリン酸化を抑制したが、他の薬剤によるリン酸化を抑制しなかった。U373MG 細胞を大量に培養し、 αB のリン酸化が最も強く起こる PMA とオカダ酸を同時に作用させた後に抗 αB 抗体を用いた免疫沈降法により αB を精製し、 αB のリン酸化部位を LC-MS を用いて調べた。その結果、Ser 19、Ser 45、Ser 59 の 3 カ所がリン酸化されていることがわかった。この結果は、ウジのレンズの αB のリン酸化部位と一致していた。これら 3 カ所のリン酸化 Ser 残基をそれぞれ特異的に認識する抗体を作り、種々の薬剤による細胞内での αB のリン酸化部位を調べたところ、すべてのストレスで、程度の違いはあったが、この 3 カ所のリン酸化が起こることがわかった。特に、As では Ser 59、PMA では Ser 45 のリン酸化が強く起こった。

153 2P 2035

H1 受容体を介するセロトニン遊離の抑制機構について:ノックアウトマウスを用いた研究

谷内一彦, 孫立智, 櫻井映子, 渡邊建彦

(東北大学大学院・医学系研究科・細胞薬理学分野)

我々はヒスタミン H1 受容体欠損マウスにおいて、日内リズムの異常、新規環境における探索行動の減少、攻撃性の減弱などの異常を認めている。このような行動異常の一部はセロトニン系の異常により生じることが脳内モノアミン含量の変化から想定された。本研究は H1 受容体欠損マウスの脳スライスからの遊離実験によりヒスタミン H1 受容体がセロトニン遊離にどのように作用するのか検討した。高カリウム液 (30mM) を用いて、脳切片 (450 μ m) を 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。すなわち全部で合計 225 分間灌流して 5 分ごとにサンプルをとり、HPLC にてモノアミンを測定した。Wild-type (+/+) マウスでは 50 μ M ヒスタミン処置によりセロトニンの遊離は減少したが、ドパミンの遊離は変化しなかった。*-*マウスでは 50 μ M ヒスタミン処置により、ドパミン、セロトニンの遊離とも影響がなかった。このことは H1 神経伝達にはセロトニンの遊離を抑制していることを示唆している。+/+ マウスにおけるヒスタミンのセロトニン遊離抑制はテトロドトキシン (2 μ M) 処置により抑制された。また +/+ マウスを用いて、*d*-, *l*-Chlorpheniramine (2 μ M) によるセロトニン遊離の変化をしらべた。H1 受容体に強く作用する *d*-体では強力にセロトニンの遊離を促進したが、*l*-体ではあまり効果がなかった。また H2 アンタゴニストである *famotidine* (20 μ M) は全くセロトニン遊離には作用がなかった。以前よりヒスタミン H3 受容体を介するセロトニン遊離抑制は報告されていたが、本研究においてはじめてヒスタミンのヒスタミンの H1 受容体を介するセロトニン遊離抑制が明らかになった。

154 2P 2034

生後 2 週齢ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンに対する PACAP の生存維持効果

湯原 亜紀, 阿比留 康弘, 武井 延之*, 畠中 寛

(大阪大学蛋白質研. 生合成部門/

*京都工繊大. 応用生物部門)

脳神経系においてニューロンの分化・生存維持に重要な役割を果たす因子として、蛋白質性の神経栄養因子がよく知られている。一方、近年神経ペプチドである PACAP が神経栄養因子作用を持つことが明らかになりつつある。PACAP は VIP / グルカゴン / セクレチンファミリーの一員で、PACAP レセプターを経由して細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが報告されている。今回、我々は生後 2 週齢ラット初代培養系を用いて、前脳基底野コリン作動性ニューロンに対する PACAP の分化誘導・生存維持作用について解析を行ったので報告する。

生後 11 日齢のラットを既報に従って初代培養し、 $3\sim5 \times 10^5$ cells/cm² でポリエチレンイミンコートした、又はアストロサイトを単層培養した 48well プレート (0.65cm²) 上に分散培養した。培養翌日に培地交換と共に PACAP (human PACAP38) を添加し、3~6 日培養後にアセチルコリン合成酵素 (ChAT) 陽性細胞数、ChAT 活性の測定、及びアセチルコリン分解酵素 (AChE) 染色を行った。

その結果、6 日間の PACAP 処理により ChAT 活性値および ChAT 陽性細胞数が約 1.5~3 倍程度に増加しており PACAP が生存維持効果を持つことが明らかとなった。この PACAP の生存維持効果は濃度依存的であり 100nM で最大であった。またこの効果は PACAP 添加後 3 日目から認められた。一方、AChE 染色した結果、PACAP 添加群ではコリン作動性神経繊維の再生がより顕著であった。

前脳基底野コリン作動性ニューロンは、ラットでは生後 2 週齢にシナプス形成を終了することが知られており、PACAP がシナプス形成期において、生理的な役割を果たす可能性が考えられる。

155 2P 2033

マウス感覚ならびに交感神経節での神経ペプチド発現と、その糖尿病による変化

三五 一憲¹, 影山 晴秋¹, 堀江 秀典²,
斉藤 春洋³, 大坂 寿雅¹, 井上 修二¹

(¹国立健康・栄養研究所, 老人健康・栄養部, ²横浜市立大学医学部第一生理, ³同第一内科)

末梢の感覚ならびに自律神経節には種々の神経ペプチドが存在し、神経機能に重要な役割を果たしている。糖尿病では、これらのペプチドの神経組織での発現や分布が変化し、末梢神経障害の要因となることが示唆されている。我々は、神経ペプチドの感覚ならびに自律神経節での発現を、自然発症糖尿病マウス (NOD (non-obese-diabetic) マウス) を用いて検討した。

尿糖出現後3週以上経過した NOD マウス (血糖値 $>300\text{mg/dl}$) ならびにその正常対照マウス (尿糖陰性、血糖値 $<200\text{mg/dl}$) より、以下の神経節を摘出した。

- 1) 脊髄後根神経節 (Dorsal root ganglia (DRG)) (感覚)
- 2) 迷走神経下神経節 (Nodose ganglia (NG)) (感覚)
- 3) 上頸神経節 (Superior cervical ganglia (SCG)) (交感)

各神経節での Neuropeptide Y (NPY), Galanin, Calcitonin gene-related peptide (CGRP) 及び Cholecystikinin (CCK) の mRNA の発現を、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法や Northern blotting 法を用いて比較検討した。

正常対照群の DRG ならびに NG では、CGRP が他のペプチドより発現が高かったのに対し、SCG では NPY の発現が他よりも高かった。また、糖尿病群では対照群に比し、DRG での CGRP の発現低下とともに NPY, galanin の発現上昇が、また NG では galanin, CCK の発現上昇が認められた。

糖尿病動物の DRG での CGRP 発現低下と、その感覚神経障害への関与は、既に報告されている。しかし、正常では神経節での発現が低いペプチドが、糖尿病に伴ってその発現が上昇するという報告は極めて少なく、これらペプチド発現の上昇もまた、感覚ならびに自律神経障害の発症に関与している可能性が示唆された。

156 2P 2032

ラット後根神経節培養を用いたモネンシン投与に伴うサブスタンス P 免疫活性の抑制効果について

中沢康至*, 猪股裕二**, 知久馬敏幸***, 加藤武*

(*横浜市立大学総合理学研究科分子認識部門, **現在一三菱科学医薬総合研究所, ***昭和薬科大学薬品分析化学)

神経ペプチドの働きは遺伝子発現, 生合成酵素のプロセッシング, あるいは分泌量によって調節されている。今回、痛みに関わるサブスタンス P の遺伝子発現, 生合成の調節を検討する目的で、ラット後根神経節を組織培養し、ゴルジ装置に作用すると云われる薬物を投与した。そしてサブスタンス P の免疫活性 (SP-LI) と beta-PPT mRNA 量の変化を測定して検討した。

ラット腰部後根神経節を2日間培養し、モネンシン (0.01 - 1 μM) を添加24時間後に組織内の SP-LI, beta-PPT mRNA 量を測定した。SP-LI は我々が開発した酵素免疫法により測定した。mRNA の測定は Northern blotting, RT-PCR 法により行った。SP の同定は HPLC-EIA により行った。

後根神経節の培養時間は2日間が最適であった。そして薬物投与1日後に最も顕著な変化が現れた。薬物の投与量は種々検討したところ、24時間が最適であった。HPLC分離後にSPの同定を行ったところ、SPが主成分として存在し、タキキニン的一种ニューロキニン A (NKA) も同様に存在していた。組織培養した後根神経節より total RNA を抽出し、PPT mRNA の DIG-labeled cRNA を用いて Northern blotting analysis を行ったところ充分な感度を得られず、現在 RT-PCR 法により検討している。

SP-LI 量はモネンシン (0.1 μM) 投与に伴い、およそ 1/3 に減少し、NKA-LI は 1/2 に減少した。この減少が細胞内でのプロセッシングの抑制、遺伝子発現の阻害、あるいは細胞死によるか否かを現在検討中である。

157 2P 2031

発育期における EL マウス脳のダイノルフィン様免疫活性の変化

甲斐 利弘¹、大西 博²、小出 誠司³、片山 雅文³、橋本 博史³、中村 嘉宏³、谷 宗英³、山上 榮³

(大阪市立総合医療センター¹、浅香山病院²、大阪市立大学医学部神経精神医学教室³)

遺伝てんかんモデルである EL マウスの痙攣と脳内オピオイド系との関係を明らかにするために、EL とその母系である ddY マウス脳のダイノルフィン様免疫活性 (DN-LI) を各発育時期と脳の部位別で、radioimmunoassay (RIA) を用いて測定した。

EL と ddY マウスを用い、EL には生後 28 日目から、週 1 回の割合で、40 回の放り上げ刺激を行った。EL を前痙攣期 (生後 25 日)、不全発作期 (生後 50 日)、強直間代痙攣期 (生後 150 日) の、痙攣 3 日後の発作間歇期に断頭した。Sidman のアトラスに従い脳を 8 部位に切り出し、2 M 酢酸中で 90℃、10 分間加熱し、氷冷後、Polytron でホモジナイズし、25000×g で 10 分間遠心した。この上清の一部を凍結乾燥し、RIA に用いた。RIA は、Peninsula 社の手引きに従って行った。すなわち、凍結乾燥後の試料を assay buffer に溶解し、抗 DNA 1-8 血清を加え、4℃で 24 時間インキュベートし、¹²⁵I DNA 1-8 を加え、4℃で 24 時間インキュベートした後、抗 IgG 血清を用い、二抗体法で沈澱を分離し、γ-counter で測定した。蛋白定量は Lowry 法に従った。

各発育時期で、EL マウス脳の DN-LI は ddY に比べて各部位とも低下の傾向を示した。生後 25 日では、海馬と扁桃核で EL の DN-LI が ddY に比べて有意に低下した。生後 150 日では、海馬、扁桃核、大脳皮質で EL の DN-LI が ddY に比べて有意に低下した。

EL マウス脳における DN-LI の低下は、既に報告した κ レセプターの up-regulation と対応している。さらに、昨年、κ アゴニストが EL の痙攣を抑制することを報告した。これらのことより、抗痙攣作用を有する内因性 DN A 1-8 の減少が EL マウスの痙攣素因や痙攣発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

158 2P 2030

早期老齢化マウス (SAM-P8) における脳内 HCNP 遺伝子発現量の検討

松川則之¹、山本孝之²、継 泰成¹、小鹿幸生¹
1 名古屋大学第二内科 2 福祉村病院院長寿研

中隔核海馬系のコリン作動性神経は記憶関連系として重要視されている。我々は中隔核コリン作動性神経の ChAT の産生を促進する 11 アミノ酸から成るペプチドを海馬組織より分離、精製し Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) と命名した。その後、HCNP の発現は海馬に最も多いこと、前駆体から HCNP を遊離する酵素の特性、更に HCNP は NMDA 受容体を介し特異的に海馬組織から分泌されることを報告した。一方、SAM-P8 は、記憶・学習能力障害のモデルと考えられ、中隔核海馬系における ChAT 免疫染色性の低下が示され、学習能力障害との関連が示唆されているが、その低下の原因は不明である。今回 SAM-P8 に於ける HCNP の動態について検討したので報告する。

8 ヶ月齢 SAM-P8 と対照として SAM-R1 を用いた。脳内 HCNP 前駆体 mRNA の検討には、マウス HCNP 前駆体 cDNA のうち、259 bp EcoRI-BamHI 断片を用い、ジギンゲン標識 cRNA のプローブを作成した。脳内 ChAT 活性測定には、Rand と Johnson の方法を用い、Ac-CoA と ³H 標識コリンから組織可溶性成分が単位蛋白量当たり産生する ³H-アセチルコリン量を測定した。また、HCNP 関連成分の測定には RIA 法を用いた。

前頭葉、海馬、脳幹、小脳組織より抽出した RNA の Northern blot 解析の結果、SAM-P8、R1 共に 1.2 K-bp の単一 transcript が確認され、SAM-P8 での発現が多い傾向にあった。In situ hybridization では、HCNP 前駆体 mRNA の発現は中枢神経系の種々の部位に認められたが、海馬錐体細胞での発現が最も強かった。SAM に於ける発現量の差異は海馬において最も著明であり、R1 に比し P8 では CA1 領域での発現増加が明瞭であった。各組織に於ける生物化学的検討では、SAM-R1 に比し、P8 では海馬組織の ChAT 活性の低下と HCNP 量の増加が認められたが、両者の前駆体蛋白量には明らかな差を認めなかった。

今回の検討から、SAM-P8 の海馬では ChAT 活性の低下が認められ、この活性低下を補足するために HCNP 前駆体 mRNA の発現増加と HCNP 産生増加が惹起されていると考えられた。しかし、前駆体蛋白量には差がなかったことから、HCNP の NMDA 受容体を介する分泌にも異常がある可能性が示唆される。

159 2P 2029

マウス Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) 遺伝子の構造に関する解析

山本 恭平、橋本 均、馬場 明道

(大阪大学薬学部薬理学教室)

PACAP は、vasoactive intestinal polypeptide (VIP)/growth hormone-releasing hormone (GHRH)/セクレチン/グルカゴンファミリーに属するペプチドホルモンである。我々は PACAP や VIP の作用を分子レベルで解析することを目的とし、PACAP type I 受容体 (PACAP 受容体)、ならびに PACAP type II 受容体 (VIP 受容体) の染色体遺伝子を単離し、それらの構造解析を行ってきた。今回、リガンドであるマウス PACAP の染色体遺伝子を単離し、その構造を解析した。

ラット視床から RT-PCR 法により、PACAP cDNA を単離した。それをプローブに用いて 129/SvJ マウス遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行い、得られたスクローンの塩基配列を解析することによって、PACAP 遺伝子とその 5'-上流および 3'-下流領域についての全塩基配列を決定した。また、マウス脳 poly (A)⁺ RNA から 5'-RACE 法で PACAP cDNA の 5'-領域を単離したところ、3種の異なる 5'-非翻訳領域を持つものが得られた。これらの配列を単離した染色体遺伝子と比較した結果、マウス脳における 3種の splicing variant は、エクソン 1A もしくはエクソン 1B にエクソン 2 の internal acceptor site より下流が続く構造と、エクソン 2 から転写が開始される構造をしており、これらが PACAP 遺伝子から alternative splicing および alternative transcription initiation 機構によって産生されることが明らかとなった。以上のことから、マウス PACAP 遺伝子はエクソン 1A、1B、2 から 5 の 6つのエクソンで構成されることがわかった。さらに、マウス PACAP 遺伝子の 5'-隣接領域には、cAMP responsive element (CRE)、TPA responsive element (TRE) などの転写因子の結合配列が見い出された。一方、マウス PACAP 遺伝子の 5'-上流領域とイントロン 2 に dinucleotide repeat 配列が存在した。PACAP 遺伝子の構造は、GHRH 遺伝子と非常に類似していたことから、これらの遺伝子は共通の祖先遺伝子から遺伝子重複により産生された可能性が示唆された。

160 2P 2028

シーラカンス PLP/DM20 遺伝子のクローニング

吉田弘美、遠山陽子、栗原 正、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)

PLP は両生類以上の脊椎動物中枢神経ミエリンの主要な膜タンパクで、爬虫類以上では alternative splicing で生じる DM20 が少量混在している。硬骨魚総鱗 (そうき) 類は両生類の祖先と考えられ、1938年に生存が確認されたシーラカンス目 (もく) の Latimeria は総鱗亜綱で唯一の現生生物である。Latimeria の脳は SDS-PAGE で哺乳類と同じ位置に泳動する PLP 様タンパクを発現している。抗体に対する反応は弱いと同様のタンパクが Protopterus (肺魚亜綱) にも検出される。しかしながら、昨年 M. Yoshida と D. R. Colman は肺魚で発現しているタンパクが PLP ではなく DM20 であることを明らかにした。彼らはまた、DM20 が魚類の中枢神経ミエリンに普遍的に存在することを示唆した。我々は Latimeria の系統関係を PLP/DM20 のアミノ酸配列の比較から解明する目的で、Latimeria の PLP/DM20 遺伝子のクローニングを進めている。遺伝子の配列から Latimeria で発現しているタンパクが PLP なのか DM20 なのかも推定できると思われる。現在のところ、mRNA が保存された Latimeria の脳組織を得るのは絶望的である。今回我々は、Latimeria の肝組織から調製したゲノム DNA を鋳型に PCR で PLP/DM20 遺伝子の断片を得た。この断片はエクソン 2 からエクソン 3 にわたる約 1 キロベースで、エクソン-イントロン構成の類似性とエクソン部分がコードするアミノ酸配列から判断して PLP/DM20 の遺伝子断片であることは間違いない。この断片はサザンハイブリダイゼーションで Latimeria ゲノムの EcoRI 断片のうち約 13 キロベースのバンドのみを認識した。わかった範囲のアミノ酸配列を哺乳類・鳥類・Xenopus・Protopterus・Polypterus (腕鰭亜綱)・サメ (軟骨魚綱) と比較したところ、Latimeria は Xenopus と他の魚類の中間に位置していた。現在この遺伝子断片を用いて Latimeria のゲノムライブラリーをスクリーニング中である。

161 2P 2027

末梢神経ミエリンP2蛋白の種々の脂肪酸に対する結合性の解析

坂本 安、北村 邦男、吉村 和法、長島 直美*、
竹原 直美*、渋谷 匡子*、野村 正彦
(埼玉医科大学第1生理学教室、*中央測定室)

末梢神経 P2 蛋白は、末梢神経系におけるミエリン膜の重層構造の形成に、内膜同士の接着因子として関与していると考えられている。また、種々の脂肪酸結合蛋白 (FABP) と一次構造上の類似性があり脂肪酸を結合すると考えられるドメインには強い相同性が見られる。我々は、P2 蛋白が種々の脂肪酸—パルミチン酸、オレイン酸、ドコサヘキサエン酸(DHA) とほぼ 1:1 のモル比で特異的に結合することを既に報告したが、今回 P2 蛋白の脂肪酸結合性の特異性に関して更に詳細な検討を加えた。

ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、アラキドン酸、DHA のうちの 3~4 種類を組み合わせた種々の混液を調製し、P2 蛋白に対して 5 倍モル比の各脂肪酸とインキュベートすることによる結合反応を遂行した。この反応液をゲル濾過 HPLC により分離し、P2 蛋白画分を得た。この画分を塩酸性とし P2 蛋白に結合した脂肪酸を遊離させ n-ヘプタン相に抽出した。抽出された各脂肪酸の存在比を液体クロマトグラフィー—質量分析装置(LC-MS)を用いて解析した。

上記の脂肪酸の存在比は、P2 蛋白の脂肪酸に対する結合性の性質を反映していると考えられる。個々の脂肪酸単独での結合実験では、各々 1:1 のモル比で結合するが、数種の脂肪酸混液を用いた実験結果から、P2 蛋白はパルミチン酸、ステアリン酸等の飽和脂肪酸に対して極めて強い結合性を有しているが、ミリスチン酸に対する結合性はほとんど観察されなかった。また、不飽和脂肪酸に対する結合性は、パルミチン酸、ステアリン酸よりも低下するが、 ω 6 系である α -リノレン酸よりも ω 3 系のリノール酸の結合性の方が強く、二重結合の位置等にも左右されることが示唆された。以上のように、P2 蛋白は生体内に普通に見られる脂肪酸に対して広範囲に結合性を有しており、その強弱は、飽和脂肪酸が最も優位であり二重結合の増加に伴って減少する可能性が示唆されたが、14 以上の炭素数を持った脂肪酸に対して結合性を有していると考えられた。

162 1C MS4-1

ガラクトシルセラミド発現を誘発する
ラット脳 cDNA のクローニング

小倉 潔、河野憲二*、田井 直

(東京都臨床医学総合研究所・腫瘍免疫研究部
門、*奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター)

ガラクトシルセラミド (GalCer) はオリゴアンドロサイトやシュワン細胞の分化抗原としてよく知られている。最近、欧米のグループにより GalCer 合成酵素、UDP-galactose: ceramide; galactosyl-transferase (CGT) の cDNA がクローニングされた。続いてこのノックアウト・マウスも作成され、GalCer あるいはサルファチドの神経細胞膜の安定性への関与や運動神経機能との関連が明確に証明されている。しかし、この酵素の発現制御機構は殆ど理解されていないため、今後の残された重要な課題である。

我々の開発した一連の抗糖鎖特異抗体の応用研究の一環として、GalCer 抗体 (AMR20) を用いた直接発現クローニング法により、GalCer 発現を誘発する蛋白質、GalCer Expression Factor-1 (GEF-1) の cDNA をラット脳 cDNA ライブラリーから単離、クローニングした。GEF-1 は、cDNA の解析結果より、704 アミノ酸からなる 78kDa の蛋白質をコードしていたが、すでに報告されている CGT のそれとは相同性が認められなかった。しかし、GEF-1 cDNA をトランスフェクトした COS-7 細胞に GalCer 発現、および GalCer 合成酵素活性の上昇が認められることから、GEF-1 のコードする蛋白質は、GalCer 合成、発現に関与する分子と考えられた。GEF-1 の mRNA は 3.1kb の単一バンドとして検出され、その発現は組織では脳、骨格筋、精巣に強く認められた。GEF-1 cDNA の解析から、GEF-1 推定蛋白質には転写調節因子や情報伝達因子様配列が見いだされたので、GEF-1 蛋白質は転写調節または情報伝達因子としての機能、あるいは双方の機能を有している可能性が示唆された。更に、GEF-1 特異抗体の作成により、この蛋白質は 110kDa の分子量を持ち、チロシンのリン酸化を受けることが判明した。GEF-1 cDNA 安定発現 COS-7 細胞は GalCer の発現と顕著な形態変化を示し、増殖能の低下が認められた。

上記知見は、GEF-1 蛋白質が GalCer の発現制御機構に関わるのみならず、細胞の増殖、形態維持、分化等の重要な機能に関与することを示唆する。

163 1C MS4-3 2026

マウス脳発生初期における Myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現
小糸寿美、松田義宏
(国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部)

Myelin-associated glycoprotein (MAG) はミエリン形成細胞に特異的に発現される細胞接着分子で、ミエリン膜と神経軸索との結合に関わるとされている。また、同タンパク質には選択的スプライシングによって産生される2種のアイソフォーム(L型とS型)の存在が知られており、前者はミエリン形成初期に発現され、軸索との結合刺激を細胞内に伝達して特徴的構造体の形成を促し、後者は成熟期に主成分となり、ミエリン構造の維持に働くという役割の分担が想定されている。この概念を裏付けるべく、我々はこれまでに、マウス脳では生後1-2週にかけてL-MAGのmRNAレベルが著明な一過性の上昇を示すのに対し、S-MAGの発現は成熟期に向けて緩やかに増大するのみであることを観察し、報告してきた。今回は、脳の発生段階のもっと早い時期におけるMAGの発現について検討を試みた。

マウス胎仔或は新生仔の脳から総RNA画分を調製し、RT-PCR法によりMAGmRNAの分析を実施した。両アイソフォームを同時に分別定量するために、選択的スプライシングの対象となるエキソン12を挟むように設定したプライマーを用いて行ったPCRの結果、胎児期から出生期にかけてS-MAG相当遺伝子の有意な発現が認められた。この発現は出生後低下し、L-MAGの発現が活発になるミエリン形成期にはほとんど見られなくなる。一方、胎生期の脳内におけるMAGタンパク質の発現は非常に低レベルで、mRNA量を反映するものではない。そこで、胎仔期のMAG mRNAの構造を検討した。種々のプライマーの組み合わせでRT-PCRを試みたところ、5'末端側で複数のcDNAの増幅が検出された。さらに、シークエンス解析より、翻訳開始点直後でスプライシング異常に基づくと考えられる構造変異が認められた。ノザンブロットティングの結果も、成熟マウス脳のMAGとは異なった位置にバンドが検出され、mRNA構造の相違を裏付けた。これらの結果は、マウス脳の発生過程初期に特殊なMAG遺伝子の発現機構が作動していることを示唆する。また、この時期にはオリゴデンドログリアの大半は極めて未分化な段階にあると推定される。どのような状態の細胞にこの特殊な遺伝子発現が生じるのかについても議論を加えたい。

164 1P 1098

脊髄神経細胞傷害を増悪させるマイクログリアの制御法に関する研究：
ATPによる細胞内カルシウムイオン上昇とTNF- α 放出抑制

尾形直則¹、森野忠夫¹、奥村秀雄¹、柴田大法¹、
中村洋一²、司秋生²、片岡喜由²
(愛媛大学医学部整形外科科学教室¹、生理学教室²)

脊髄が傷害を受けたときには、軸索の断裂や組織の浮腫等の急性期のダメージに引き続いて、傷害後数時間以後に起こってくる遅発性の神経障害過程があり、この一つとして傷害された組織内でのマイクログリアの増殖、活性化が注目されてきている。本研究ではこのマイクログリアの機能を抑制することによって神経を保護する方法を開発する目的で、ラット胎仔の脊髄より採取した培養マイクログリアを用いてその細胞内カルシウムイオン濃度をCa²⁺指示薬 Fura-2を用いたイメージングシステムによって観察するとともに、Lipopolisaccharide (LPS) で刺激したときにマイクログリアから放出される組織傷害性の強いサイトカインであるTNF- α 量をELISA法で測定し、マイクログリア機能抑制の候補物質の効果を評価した。

培養脊髄マイクログリアにATP(100 μ M)を投与すると細胞内Ca²⁺濃度が速やかに増加する。この細胞内Ca²⁺濃度上昇は細胞外液中のCa²⁺を除去した条件下でも同様に観察され、レセプターサブタイプの検討では、P_{2x}レセプターアゴニストでは起こらず、P_{2y}レセプターアゴニストである2-Methylthio-ATP(10 μ M)によって再現された。このことよりATPに対するマイクログリアの反応はP_{2y}レセプターを介してであり、このときのCa²⁺濃度上昇は細胞内のCa²⁺貯蔵よりの動員であると考えられた。また、培養マイクログリアは24時間のLPS暴露により、培養液中に多量のTNF- α を放出するが、この量はLPS暴露時にATPを同時投与することにより著明に抑制された。

これらの結果よりATPがマイクログリアからのTNF- α の放出を抑制し、そのメカニズムとしてP_{2y}レセプターを介する細胞内Ca²⁺濃度上昇が関与していると考えられた。

165 1P 1097

血清成分によるミクログリアの $\text{TNF}\alpha$ と NO 産生の増強

司秋生, 中村洋一, 片岡喜由
(愛媛大学医学部第一生理学教室)

虚血性神経細胞障害において、活性化されたミクログリアが産生する活性酸素(O_2^-)や一酸化窒素(NO), 腫瘍壊死因子(TNF) α 等の神経細胞毒性を持つ物質が二次的な障害の原因になっていると考えられている。しかしながらこのような病理的な状況下でのミクログリアの活性化機構については不明な点が多い。一方、虚血/再灌流の過程で血液脳関門の透過性が増すことが知られており、漏出した血清因子がミクログリアを活性化し神経毒を産生する原因となる可能性がある。以前我々は血清がミクログリアの O_2^- 産生を増強することを見出した。本研究ではミクログリアの NO と $\text{TNF}\alpha$ の産生に対する血清の効果を調べた。

正常ラット血清はリポポリサッカライド(LPS)添加による NO と $\text{TNF}\alpha$ の産生をどちらも大幅に増強した。血清成分を分子篩膜で分画すると、分子量 50 kDa 以上の成分にこの活性があることがわかった。またこの成分は熱感受性で、100℃10 分の処理で完全に失活し、トリプシン処理によっても容易に失活した。一方 O_2^- 産生を増強することが知られているアルブミンには LPS 刺激による NO と $\text{TNF}\alpha$ の産生に効果は無かった。

血清には少なくとも2種類以上のミクログリアの活性化を促す成分が含まれており、それらが脳実質に漏出することが種々の神経障害の増悪の原因となっている可能性が示唆される。

166 1P 1096

ミクログリアの活性酸素産生を増強する血清因子の性質

司秋生, 中村洋一, 片岡喜由
(愛媛大学医学部第一生理学教室)

虚血性神経細胞障害の初期過程でミクログリアの活性化と血液脳関門の破綻がおこることが知られている。昨年度の本学会で我々は培養ミクログリアのホルボール(PMA)刺激による活性酸素(O_2^-)産生が血清因子により増強されることを報告した。この活性化因子がアルブミンであることを示唆するいくつかの結果を得たが、本研究ではさらにその因子の性質について検討した。

ラット正常血清を Superdex-G75 を用いた分子篩クロマトグラフィにより分画すると、分子量約 65kDa の位置に活性ピークが溶出され、この因子がアルブミンそれ自身かアルブミンに強固に結合した小分子であることが示唆された。アルブミンは分子内に多くのジスルフィド結合を持つ強固な分子であることが知られている。ラット正常血清及びウシ血清アルブミン(BSA)を 100℃で 10 分間処理してもほとんど O_2^- 産生増強活性は失われなかった。またトリプシン処理によってもその活性はほぼ変化がなかった。そこで、BSA のトリプシン処理フラグメントにその活性が有るかどうかを検討した。Superdex-G75 の分画で分子量約 9000 と 2000 の溶出位置に2つの活性ピークが検出された。

これらの結果は、虚血/再灌流により傷んだ血液脳関門から漏出したアルブミンあるいはプロテアーゼによるアルブミン分解産物がミクログリアを活性化し、 O_2^- 産生を増強することにより神経細胞障害を増悪している可能性を示唆している。

167 1P 1095

神経細胞死に伴うミクログリア遺伝子 *mrf-1* の発現増加

田中 秀逸, 小池 達郎
(北大・院理・行動知能)

ラット小脳細胞の培養系で、神経細胞の細胞死の時期に発現が増加する遺伝子を探索した。

得られた一つは、117 個のアミノ酸より成る可溶性の蛋白質をコードした 665 bp の mRNA であった。ノーザンブロットによる解析では、その発現は通常の K⁺ 濃度下の小脳細胞培養系で、神経細胞の変性が始まる前 (3 DIV) でも見られた。しかし、4 DIV 以降急激に活性化され 5 DIV でピークに達し、神経細胞の変性が最も進行する時期 (7 DIV) には減少した。リコンビナント蛋白質をつくり抗体を作成し、その発現部位の特定を行った。免疫組織化学的手法による解析では、小脳顆粒細胞の細胞死に反応した蛋白質の増加が、小脳顆粒細胞ではなくミクログリアに認められた。そこで、我々はその遺伝子を *mrf* (microglial response factor)-1 と命名した。

mrf-1 遺伝子の発現増加は、小脳顆粒細胞を高 K⁺ 培地で充分発達させた小脳細胞培養系で、血清を除くと共に通常の濃度に K⁺ を下げることで、またグルタミン酸を処理することによる小脳顆粒細胞の細胞死でも認められた。さらに、ミクログリアにおける MRF-1 蛋白質の合成は、大脳皮質より単離したミクログリアを 5 DIV の小脳顆粒細胞と接触させた状態で培養することでは誘導されたが、その conditioned medium で培養することや、3 DIV の小脳顆粒細胞と接触させて培養すること、酵母の粒子を貪食させることでは誘導されなかった。これらの結果は、MRF-1 蛋白質の合成が、変性神経細胞とミクログリアとの直接の接触、または両者が隣接することにより誘導されることを示唆している。生体内での神経細胞変性に反応した *mrf-1* の発現増加も、アストロサイトが多量に細胞死を起こすといわれる生後 7 日の小脳、および舌下神経切断による切断 7 日後の神経変性部で認められた。

MRF-1 蛋白質は、ミクログリアにおいて、食作用後でなく変性細胞の認識等のより早い段階で働いていると推測される。また、アダルトラットの脳において、休止型 (ramified) のミクログリアにも MRF-1 蛋白質の存在が認められた。MRF-1 蛋白質は、脳の発達段階によって異なる役割を担っていると考えられる。

(この研究は寺崎瑞穂氏、鈴木和彦氏 (ともに行動知能)、渡辺雅彦氏 (北大・医)、刀俣重信氏 (都臨床研) との共同による。)

168 1P 1094

神経細胞興奮毒性におけるミクログリアの関与: Tumor Necrosis Factor- α を介する傷害メカニズムとその防御の可能性について

富永康浩¹、尾形直則¹、奥村秀雄¹、柴田大法¹、中村洋一²、片岡喜由²

(愛媛大学医学部整形外科教室¹、生理学教室²)

ミクログリアは中枢神経内における免疫を司る細胞であり、生理的条件下では Silent な状態であるが、細菌などの侵入を感知すると増殖し、マクロファージ様に分化して、Nitric Oxide や O₂⁻ または TNF- α などのサイトカインを放出して侵入した異物や壊死した細胞を除去する働きがある。本研究ではこのメカニズムを解明するためにラットより培養した脊髄神経細胞とミクログリアを使い、活性化されたミクログリアの神経細胞に与える影響について検討した。神経細胞障害の程度は傷害された細胞より培養液中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性で評価し、ミクログリアから培養液中に放出される TNF- α の量は ELISA 法で測定した。

脊髄ミクログリアをエンドトキシンであるリポ多糖類 (LPS) に 24 時間暴露すると培養液中に TNF- α の放出が観察され、また TNF- α は脊髄培養神経細胞に作用させると著明な神経障害作用を示した。次にミクログリア存在及び非存在下で 24 時間の LPS 暴露による神経細胞傷害を観察したところミクログリアを含む Culture のみで神経細胞傷害が観察された。この結果はミクログリアが TNF- α を介する機構を介して神経細胞障害を増悪させる可能性を示唆している。

LPS により活性化されたミクログリアより放出される TNF- α は膜透過性の cAMP である Dibutyryl cAMP や、細胞内 cAMP 上昇をおこせると言われている薬物である Ibudilast の投与によって著明に抑制された。

今後脊髄神経細胞を保護する方法を開発にあたり、ミクログリアによる神経障害メカニズムに着目し、それを制御していくことが有効であると考えられ、その制御方法の候補として、細胞内 cAMP を上昇させるような薬物が考えられる。

169 3C MS11-2 1093

脊髄損傷後に神経組織内に増殖するマイクログリア：損傷程度による検討とその経時的变化

森野忠夫¹、尾形直則¹、奥村秀雄¹、柴田大法¹、中村洋一²、片岡喜由²
(愛媛大学医学部整形外科教室¹、生理学教室²)

マイクログリアは中枢神経内における免疫を司る細胞で、生理的条件下では、その数も少なく活動性も低い。細菌などの侵入を感知すると、増殖し、マクロファージ様に分化して、攻撃性の強いサイトカインや、NO、O₂⁻などを放出するようになる。近年の研究により、脳の虚血などの病的条件によってもこの免疫機構が活性化され、それが神経細胞障害を増悪させると考えられるようになってきた。本研究では、このようなマイクログリアの増殖が、損傷された脊髄においても起こるか否かを検討するため、ラット脊髄圧迫損傷モデルを用い、様々な程度の損傷を与え、経時的にマイクログリアの数を特殊染色（レクチン染色）により観察した。

脊髄への直接圧迫を行う際、Th11での椎弓切除を行い、20gの重錘にてextraduralに圧迫を行った。正常、椎弓切除のみを行ったラットでは脊髄組織内にマイクログリアは観察されなかったが、脊髄への直接圧迫を5分間続けると、脊髄組織内のマイクログリア増殖が観察され、10分、20分と圧迫時間を延長させるに従い、マイクログリアの増殖は増大した。行動学的観察では、40分までの圧迫では、不全麻痺の状態であった。また、マイクログリア増殖は、脊髄圧迫後12時間あたりより著明に観察されるようになり、48時間にて最大となった。

この脊髄圧迫によるマイクログリア増殖の観察は、軽度の脊髄損傷に対する治療法の開発に際し、有用な動物モデルになると考えられる。

170 3C O-3

ATP刺激による培養マイクログリアからのCa²⁺依存性プラスミノーゲン放出

井上和秀^{*}、中嶋一行^{**}、森本高子^{**}、菊池義明^{*}、小泉修一^{*} および高坂新一^{**} (*国立衛生研究所・薬理, **精神神経研究センター・神経研究所)

ATP受容体がマイクログリアに発現していることは既に知られているがその生理的意義についてはほとんど不明である。また活性化マイクログリアは神経成長因子作用を有するプラスミノーゲンを放出することもよく知られている。しかしながらATPとプラスミノーゲンの関係については全く知られていない。そこで、今回培養マイクログリアを用いて、ATPによるプラスミノーゲン放出作用について検討した。その結果、ATP (100 μM)は10分間の刺激によりプラスミノーゲンを放出した。一方、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸(100 μM)はプラスミノーゲンを放出しなかった。両者ともNOの放出は引き起こさなかった。BAPTA-AM (200 μM)での1時間前処置によりプラスミノーゲン放出はほぼ完全に抑制された。ATPは細胞内カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)の上昇を引き起こしたが、グルタミン酸は引き起こさなかった。ATPによる[Ca²⁺]_i上昇は完全に外液Ca²⁺依存性であった。マイクログリアでの[Ca²⁺]_i上昇について、2-Methylthio ATPは活性を示し、αβ-methylene ATPは不活性であった。

以上の結果から、ATPはATP受容体を介しマイクログリアを刺激し外液Ca²⁺依存性にプラスミノーゲン放出を引き起こすことが明らかとなった。

171 1P 1092

Putative HLA- DR Associated Proteins
(PHAPI and PHAPII) の Isoform の解析萩原民雄、本橋克利、竹田二美代、竹田 稔
(昭和大学・医・生化学)

Putative HLA- DR Associated Proteins (PHAPI and PHAPII) はヒト腫瘍組織適合性抗原 class II 分子である HLA- DR2 α の細胞内ドメイン由来の合成ペプチドをリガンドとした affinity chromatography によりヒト lymphoblastoid B- cell line, H2LCL 細胞で最初に同定されたタンパク質であり、HLA class II 分子にリガンドが結合した後に起こる細胞内現象を制御する細胞内シグナルの産生に関わっていると考えられている。我々はこれまでにこれらのタンパク質が胎生期のラット脳に多量に発現しており、出生後加齢に伴って発現が減少することおよびそれぞれのタンパク質には isotype が存在することを示してきた。今回は主に PHAPII について解析を行い、マウス 7、11、15、17 日胚および成熟マウス脳 cDNA ライブラリーから少なくとも 10 種類の PHAPI isotype の cDNA をクローニングした。PHAPI タンパク質は Leu および塩基性アミノ酸に富む N 末端領域と酸性アミノ酸に富む C 末端領域から成っているが、大部分の isotype の N 末端領域はよく保存されていたが、C 末端領域の酸性アミノ酸リピートの長さが異なっていた。また、N 末端領域内に 20 アミノ酸の欠失を認める isotype や C 末端領域内に核移行シグナルと予想される Lys- Arg- Lys- Arg 配列を持つものとそうでないものが存在した。このことから各 PHAPI isotype が異なる役割を担っていることが予想された。Southern blot 解析から各 PHAPI isotype は single gene から alternative splicing により生じると考えられ、マウス胚においては各 PHAPI isotype の時間的発現パターンは異なっており、おそらく空間的発現パターンも異なるものと予想される。

172 1P 1091

ラット脳可溶性画分に存在する PHAPI
Kinase の解析本橋克利、立野 慶、田中隆佳、萩原民雄、
竹田 二美代、竹田 稔
(昭和大学医学部生化学教室)

Putative HLA- DR Associated Proteins (PHAPI および PHAPII) は、ヒト組織適合性抗原 HLA- DR の細胞内ドメインに結合するタンパク質としてヒト白血病細胞株で最初に見出されたが、その生理機能については不明である。

我々はこれまでこれらがラット胎児脳に多量に発現すること、および数種類の Isoform が存在することを見出してきた。今回脳神経系における PHAPI および PHAPII の生理機能を明らかにする目的で、ヒト PHAPI および PHAPII の cDNA より recombinant protein を調製後、これを ligand とした affinity gel を作成し、それらの標的タンパク質の探索を試みた。

その結果、ラット脳可溶性画分よりそれぞれいくつかの未同定の結合タンパク質を得たが、興味深いことに PHAPII 結合タンパク質中に PHAPI をリン酸化する Protein Kinase 活性を見出した。この Protein Kinase はゲル濾過上の分子量が 350 ~ 500 kDa であり、PHAPI の Ser 残基をリン酸化していた。PHAPII には多数の Isoform が存在するが、この Protein Kinase によりリン酸化されるものとそうでないものが存在していた。現在、この Protein Kinase の精製を行うとともに、PHAPI のリン酸化部位の同定を進めている。

173 1P 1090

ラット胎児脳に発現する新規な遺伝子に対するcDNA(hfb2)のクローニングと解析

本郷 茂樹、西中 直也、山内 康熙、竹田 稔
(昭和大学医学部生化学教室)

我々は胎生後期に発現する遺伝子のなかに神経回路網形成に関わるものがあると考え、ラット胎児脳に特異的な遺伝子の探索を行った。

胎生18日と生後11週のラットの脳よりpoly(A)⁺RNAを調製し、cDNAに変換後、Differential Display法により胎児脳に優勢なcDNAを同定した。該当するcDNA断片を再増幅、クローニングし、塩基配列を決定した。これらの中には既知遺伝子として α -tubulin, thymosin β -4, ribosomal proteins L41, S29, S7, Rho-guanine nucleotide exchange factor, PC-12細胞由来のEST cDNAsが含まれていた。

我々は次によく解析されていないcDNA(hfb2)について検討した。ノーザンブロットによりhfb2のmRNA(2.2kb)は、胎生18日以降発現し増加するが、生後5日では減少し、70日目には殆ど検出されない程度に減少することが確認された。また胎児、成長ラット肝いずれにおいてもhfb2mRNAは検出されなかった。5'RACE法により得られた1.4kbの上流領域は塩基レベルでヒトリンパ様細胞株KG-1のKIA0005遺伝子cDNAと68%、アミノ酸レベルで71%のホモロジーがあった。推定されるhfb2のアミノ酸配列にはKIA0005と同様ATP/GTP結合部位A、ロイシンジッパー、チロシンリン酸化部位モチーフが存在した。しかしhfb2と部分的に高いホモロジーを示すヒトESTcDNAが登録されており、これらはKIA0005とは異なることから、hfb2はヒトKIA0005のホモログではないと考えられる。

hfb2は未知のあるファミリーの一員であるが、脳に発現し神経系の発達に関与する可能性が考えられる。

174 1P 1089

ラット脳の成熟に関わる遺伝子の探索

山内 康熙、西中 直也、本郷 茂樹、
竹田 二美代、竹田 稔
(昭和大学医学部生化学教室)

神経系が確立するためには、出生前後にシナプス形成が行われた後に、その精密化と安定化が必要である。今回、我々はシナプスの安定化と、神経細胞の生存維持に関与する可能性のある遺伝子を分離するために、胎児脳と比較しアダルト脳に多く発現している遺伝子を探索した。生後11週ラットと胎生18日ラット脳からpoly(A)⁺RNAを抽出した後スーパースク립トIIにより一本鎖cDNAにした後、任意プライマーとオリゴdTプライマーによりPCRを行なった。そしてDifferential Display法により、アダルト脳において多く増幅されるcDNAのバンドが多種検出された。再増幅したこれらの断片をクローニングし、塩基配列決定後ホモロジー検索を行った。現在までに9種のcDNA断片をクローニングした。これらの中にはミトコンドリアチトクローム類、small G protein Rabのeffectorであるrabaptin、ユビキノン酸化還元酵素のcDNAが含まれていた。また1種は既知遺伝子とは殆ど相同性がなく、もう1種はよく解析されていないcDNAであった。この2種のcDNAをもとに特異的なプライマーを作成し、生後8週ラット脳ライブラリーを用いてPCRを行った。そしてタンパク質翻訳領域が1137bpの別の新たなcDNAを単離した。このcDNAはヒトRTP(reducing agents and tunicamycin responsive protein)のcDNAに相同性(ヌクレオチドレベルで67%、アミノ酸レベルで52%)をみせた。また、今回我々が取り出したcDNAには、アイソフォームと思われるものが認められた。このように、アダルト脳により多く発現されることが予想されるため、脳の働きに何らかの関係を示す可能性があると考えられる。

175 1P 1088

中枢神経系に高発現するDNA組み換え遺伝子 $recA$ 様新規遺伝子(MmTRAD)のクローニングと発現川端 昌弘、佐伯 清美
(岡山大学医学部薬理学教室)

中枢神経系における体細胞DNA組み換えに関与している可能性のある新規の組み換え関連蛋白遺伝子(MmTRAD)を見出し、解析を行ったのでこれを報告する。

大腸菌RecA蛋白、その酵母ホモログRad51蛋白およびDmc1蛋白はDNAの組み換え・修復において主要な働きを担っていることが知られており、高等動物においてはそれらのホモログがすでにクローニングされている。BlastによりマウスRad51に対する相同性検索を行い、一部相同配列を持ったマウス12.5日胚cDNAライブラリーより得られたESTクローンを見出した。このクローンの全塩基配列を決定したところ、アミノ酸329個の新規蛋白をコードしていることがわかった。RecA様蛋白ファミリーはDomain IとDomain IIから成り、Domain IIには2つのヌクレオチド結合コンセンサスmotif Aおよびmotif Bがある。MmTradとマウスRad51およびマウスDmc1(Lim15)の全長での相同性は26%と23%、Domain Iにおける相同性はどちらも18%、Domain IIにおける相同性は28%と25%であった。さらに、MmTrad蛋白にはmotif Aおよびmotif Bが保存されており、RecA蛋白ファミリーに属する新規蛋白であると考えられた。

次に、MmTRADの各組織におけるmRNAの発現をノザンプロット法により検討した。卵巣、睾丸、胸腺、脾臓などに比べ、脳で特に高い発現が認められた。また、mRNAのサイズは1.7kbと2.6kbの2種類の異なったものが存在していた。

マウスDmc1(Lim15)の発現は睾丸に局限しており、減数分裂のDNA組み換えに関与していることが報告されている。また、マウスRad51の発現は卵巣、睾丸、胸腺、脾臓に高く、脳ではそれらの5分の1程度である。これら既存のRecA蛋白ホモログに比べ、本研究で報告する新規TRAD遺伝子は脳での発現が特に高いという特徴があり、脳においてDNA組み換えあるいは修復に関与している可能性が示唆される。

176 1P 1087

アデノウイルスベクターを用いた神経細胞型特異的遺伝子導入法の開発とその応用

橋本 光広、御子柴 克彦

理化学研究所分子神経、東大医科学研究所化学

脳内における個々の神経細胞は、高次な神経回路網を形成している。神経回路網という高次構造と対応させながら、神経細胞に発現している分子の生体内機能を解析するためには、神経回路網を保持した状態で成熟した神経細胞に効率よく遺伝子を導入し、神経機能を解析する必要がある。成熟した神経細胞への効率良い遺伝子導入法として、アデノウイルスベクターの有用性を検討した。小脳のプルキンエ細胞特異的に発現しているL7/PCP2のプロモーター、オリゴデンドロサイト特異的に発現しているミエリン塩基性蛋白(MBP)のプロモーターそして、グリア細胞特異的に発現しているグリア線維性酸性蛋白(GFAP)のプロモーターの支配下にlacZを発現させるアデノウイルスベクター、それぞれAdexL7-NL-LacZ、AdexMBP-NL-LacZ、AdexGFAP-NL-LacZを作製した。in vitroならびにin vivoにおいてAdexL7-NL-LacZは小脳プルキンエ細胞のみ、AdexMBP-NL-LacZはオリゴデンドロサイト、そしてAdexGFAP-NL-LacZはグリア細胞特異的にlacZを発現させた。このように、in vitroならびにin vivoにおいて非常に高い神経細胞型特異的な遺伝子導入法を、アデノウイルスベクターを用いることにより確立することができた。アデノウイルスベクターを用いた神経細胞への遺伝子導入の応用として、小脳のスライス培養への遺伝子導入と、exultero surgery法を用いたマウス胎児脳への遺伝子導入を試みた。前者は脳の高次機能(神経情報伝達機構、長期抑制等)の解析、後者は神経系の発生・分化機構の解析に大変有用である。現在、アデノウイルスベクターを用いて、神経細胞の高次機能の解析、発生・分化機構の解析、ならびに神経疾患の遺伝子治療の基礎研究を行っている。

177 1P 1086

低線量放射線照射に伴う蛋白カルボキシメチル化酵素の遺伝子発現

土居孝至、武田良平*、中城有喜、溝淵睦彦*
(松山記念病院、*愛媛大学医学部神経精神医学)

蛋白質中の酸性アミノ酸残基に生じるメチル化反応は、メチル基転移酵素 (Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase; PIMT) による可逆反応である。PIMTは広く哺乳類に存在し、主に脳、睾丸と赤血球に活性が高い。本酵素は、一部ラセミ化や脱アミド化を起こした老化蛋白を正常にもどし、その蛋白の蓄積を防ぎ、本来の機能蛋白に修復させる作用を持つ可能性が推定されている。

われわれは、ヒト赤芽球培養細胞、ラット脳や睾丸に特異的なcDNAの単離同定を行うとともに、ヒトの老化現象の一種と考えられる白内障患者のレンズでの本酵素低下も明らかにした。一方、低線量放射線照射による生体細胞の増殖促進や細胞寿命の延長(ホルミシス効果)が生じるが、その機序は明らかではない。本研究では、この機序に老化蛋白を正常蛋白に修復させると推定されるPIMTが関与する可能性を検討するために、放射線照射線維芽細胞での本酵素の遺伝子発現を検討した。

ラット骨格筋から線維芽細胞を遊離増殖させ、培養線維芽細胞に3段階の線量照射(25, 50, 75cGy)を行い、照射後の本酵素遺伝子の発現を比較した。各群1μgのtotal RNAから、逆転写を行いcDNAを作成しPCRの鋳型とした。使用したプライマーセットは2種類で、cDNA上の5'部分と中央部の2箇所に対応する。各cDNAをPCR増幅しゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色とサザンブロット分析を行った。照射後1日目では、照射群(25, 50, 75cGy)と対照群(0cGy)では差は認められなかった。照射後3日目には、50cGyと75cGy照射群で、それぞれ約1.5倍と約2倍に増加していた。5日目には、50cGyでは対照群レベルに復したが、75cGy照射では依然約1.5倍の増加を示した。なお、いずれの時期にもβ-actin遺伝子は、ほぼ一定量発現されていた。この結果から、放射線照射によって本酵素の遺伝子発現が誘導される事が明らかになり、ホルミシス効果に本酵素が関連している可能性が想定された。

178 2P 2001

ELマウスの神経栄養因子 (NGF)について

木岡哲郎、撫井弘二、山上榮
(大阪市立大学神経精神医学教室)

神経栄養因子は、NGF、BDNF、NT-3などファミリー蛋白質をなしており、神経障害における神経組織の再生、修復に関与していると考えられている。NGFは、脳においては、主に海馬、新皮質のコリン作動性ニューロンに存在している。今までに、キンドリングやカイニン酸投与による痙攣発作に続く神経栄養因子の一過性の増加が報告されているが、今回は、人の側頭葉てんかんのモデル動物であるELマウスの固有の痙攣発作によるNGF量の変化、抗NGF抗体の大槽内投与の効果を検討した。

(方法)

ELマウスは4週齢より週1回の放り上げ刺激を加え、痙攣発作を惹き起こしたものをEL(s)として、刺激を加えず痙攣履歴のないものをEL(ns)とした。対照には母系であるddYマウスを使用した。

100日齢のELマウスを発作前と発作直後、0.5、1、1.5、2、3、24時間後に断頭し、脳から皮質、海馬、中隔野、小脳を含む7部位を取り出し、サンドイッチ酵素抗体法によって定量を行った。

また、4週齢より、週1回の放り上げ刺激後にuedaらの方法に従って、大槽内に抗NGF抗体を投与した。

(結果と考察)

ELマウスの痙攣発作によって海馬で1、2、3時間後、45%、57%、59%と増加し、24時間後には発作前の量にもどった。大脳皮質では、2、3時間後に50%、55%と増加し、24時間後には発作前のレベルとなった。外部の刺激だけでなく、遺伝的なてんかん発作でも同様にNGF量が増加することが明らかとなり、発作に伴うシナプスの可塑的变化や再構築に関与する可能性が考えられる。また、抗NGF抗体を投与した群は、対照の正常血清投与群に比較して強直発作をおこす週齢が16.6週となり、有意に延長した。これらの結果は、NGFが痙攣準備性になんらかの関連があることを示唆した。

179 2P 2002

不死化アストロサイトにおけるグリア細胞成長因子 (GMF) mRNA発現調節機構

森川 将行^{1,2}、小久保 稔¹、藤田 佳織¹、
山本 愛美¹、浅井 清文¹、岸本 年史²、
加藤 泰治¹ (¹名市大・医・分子医研・生体制御、
²奈良医大・精神医学)

グリア細胞成長因子 (glia maturation factor; GMF) は、1972年、Lim ちによってブタ脳抽出液より rat glioblast の形態分化を誘導する因子として発見された。その後、この因子はアストロサイトのみならず、シュワン細胞やニューロン、腫瘍細胞などにもそれぞれ特徴的な作用を有することが報告されてきた。最近ではリン酸化されたGMFが、MAP kinaseのうち特に ERK1/ERK2 の活性を抑制することが報告され、新たな展開が生じてきている。現在までラット、ウシ、ヒトの GMF- β cDNA がクローニングされているが、GMF の発現誘導については、まだよく知られていない。今回、SV40 large T-antigen により不死化したアストロサイトを用いて、各種刺激薬による GMF mRNA の発現誘導を調べた。

アストロサイトは、Wistar rat (E17) の大脳皮質より Kato ちの方法に従って調製した。これに simian virus 40 large T-antigen を有する plasmid pSV3-neo を lipofection 法により transfect し、geneticin で選択を行い、いくつかのクローンを得た。その内、形態的に、タイプ1アストロサイトに似ている細胞を実験に使用した (以下 ACT-57細胞と呼ぶ)。この細胞を 100mm petri dish に播種し、数日後に無血清培地 (N-2 supplement 含有 DMEM) に交換した。そして各種刺激薬を加え、6時間後に total RNA を抽出し Northern blot にて評価した。Phorbol ester (TPA) は、GMF mRNA を約2倍増加させたが、dibutyryl-cyclic AMP、carbacol、そしてhydrocortisoneは、影響を与えなかった。その他の神経伝達物質においては、GABAで1.7倍、isoproterenolで1.5倍の増加を認め、わずかながら増加の傾向が、L-glutamic acid で認められた。刺激薬による ACT-57 の形態上の変化は、TPA において著明に認められた。この不死化アストロサイト ACT-57 細胞での結果から、特殊な細胞条件下ではあるが、GMF mRNA の発現誘導が、いくつかの物質の外部からの刺激によって影響を受けていることが示された。そして GMF も他の神経栄養因子と同様に、ニューロンとアストロサイトとの相互作用に関与していることが予想された。

180 2P 2003

ラット脊髄後根神経節細胞におけるサブスタンスP生合成に対する神経成長因子およびインターロイキンの効果

井上 敦子、生駒 弘造、森岡 徳光、秀 和泉、仲田 義啓 (広島大・医・総合薬・薬効解析)

サブスタンスP含有一次知覚神経細胞は、サブスタンスPを生合成、遊離し、痛覚伝達に関与している。今回、ラット脊髄後根神経節培養細胞のサブスタンスP生合成について、3種のニューロトロフィン (NGF、BDNF、NT-3) とインターロイキン1 β (IL-1 β) の効果を検討した。

Wistar系雄性成熟ラットより脊髄後根神経節初代培養細胞を作成した。サブスタンスP量をラジオイムノアッセイ、サブスタンスP前駆体mRNAをリボスクレアーゼプロテクションアッセイで測定した。

NGF非存在下、細胞内サブスタンスP量は培養日数経過につれて減少した。培養5日の細胞内サブスタンスP量と前駆体mRNAは、NGF添加により増加したが、BDNF、NT-3 (各50ng/ml) 添加によっては対照と比べて変化しなかった。NGF 50ng/ml存在下、IL-1 β 10ng/mlを加えると、細胞内サブスタンスP含量は、投与後24時間では減少したが、投与後5日では無処置細胞に比べ有意に増加した。サブスタンスP前駆体mRNA量を測定した結果、IL-1 β 10ng/ml投与5日で有意なmRNA量の増加が観察された。

以上の結果より、脊髄後根神経節のサブスタンスP含有培養細胞において、サブスタンスP生合成はニューロトロフィンのなかでNGFにより特異的に調節されていることが示唆された。また、脊髄後根神経細胞において、IL-1 β は転写を促進することによりサブスタンスP生合成を促進することが示唆され、これが炎症時の痛覚過敏のメカニズムに関わっている可能性が想像される。

181 2P 2004

小脳顆粒細胞の移動速度に対する
神経栄養因子NT-3, BDNFの効果

田中 聡一*, **, 関野 祐子*

林 謙介*, 白尾 智明*

(*群馬大学医学部行動分析学,

**同神経内科)

生後初期の小脳顆粒細胞は、神経栄養因子のNT-3およびBDNFの両者に対する反応性を持ち、また、それぞれのレセプターであるTrkBおよびTrkCの両者を発現することが知られている。そして近年、両者の優位性がこの時期に変化することも明らかにされている。発生期にみられる細胞移動にこれらの神経栄養因子が及ぼす効果を解明する目的で小脳顆粒細胞の凝集塊培養を用いて検討した。

生後2日齢ラットの脳より顆粒細胞を単離し、血清添加培地内で12時間培養して凝集塊を形成させ、ラミニン塗布カバースリップ上にまいた後、20 ng/mlのBDNFあるいはNT-3を加えた培地内で36時間培養した。細胞の移動の様子はタイムラプスビデオ顕微鏡を用いて2分間隔でビデオディスクレコーダーに記録し、0、12、24、30、35hの移動速度をそれぞれ算出した。

各群とも12時間までは約60 μ m/hの速度で移動し、24時間の時点から移動速度を落としていくタイムコースをとった。しかしながら、この24時間の時点での移動速度はコントロール群、BDNF群、NT-3群でそれぞれ44 μ m/h、49 μ m/h、17 μ m/hとNT-3群で有意に低下を示した。

小脳顆粒細胞の移動は神経栄養因子により調節されている可能性があり、今回NT-3が移動速度を低下させることを明らかにした。

182 2P 2005

マウスマクロファージにおけるニューロトロフィンの発現

浅見俊雄、新田淳美、古川昭榮

(岐阜薬科大学分子生物学教室)

神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)はニューロトロフィンファミリーに属する神経栄養因子であり、特定の中枢および末梢神経細胞の分化や生存、機能維持に重要な役割を担っている。また神経系の損傷修復や神経再生にも関与すると考えられているが、直接これを証明する詳細な検討は行われていない。そこで我々はラット脳に凍結損傷を加え経時的にBDNF、NT-3タンパク質の発現を調べたところ損傷部位とその周囲に多数のマクロファージが出現しBDNFやNT-3を発現していることを見出した。そこで本研究ではこの現象を詳細に検討するとともにマウス腹腔由来マクロファージを培養しこれを用いてニューロトロフィンの産生を詳細に検討した。

ペントバルビタール麻酔下の雄性ddYマウス(5週齢)腹腔から採取したマクロファージを 1×10^6 cells/mlの密度で24時間培養し器壁に付着させたのち実験に使用した。ほぼすべての細胞が抗Mac1抗体に対して陽性を示すことから純粋なマクロファージからなる細胞集団であることが判明した。BDNF、NT-3にそれぞれ特異的な抗ペプチド抗体を用いて免疫染色を行ったところ大部分の細胞がいずれの抗体でも陽性であった。またRT-PCR法によってmRNAの発現も確認された。一方、LPS(500 ng/ml)で24時間刺激するとマクロファージの増殖が観察され、BDNF、NT-3免疫活性強度が低下した。一部の細胞は全く免疫活性を示さなかった。

ラット脳の凍結損傷部位ではほとんどのマクロファージに損傷1日後にBDNFやNT-3の免疫交差活性が観察されるが、傷害7日後には免疫交差性を示さない細胞が出現することを我々は最近見出している。培養マクロファージを用いた本研究の結果は、これらのin vivoでの結果と一致している。

以上の結果から免疫応答細胞であるマクロファージがBDNF及びNT-3を発現していること、及び神経が傷害を受けたときに何らかの発現調節機構が存在する可能性が示唆された。現在マクロファージにおける合成、調節機構について詳細な検討を行っているのでこれらの結果もあわせて報告する。

183 2P 2006

神経伝達物質による培養アストロサイト
細胞内aFGF量の調節

絹川秀樹、新田淳美、古川昭栄
(岐阜薬科大学分子生物学教室)

酸性繊維芽細胞成長因子 (acidic fibroblast growth factor: aFGF) は種々の培養中枢ニューロンに対して神経栄養因子効果を示すことが知られている。主に神経系に分布しており、海馬のシナプス伝達効率の長期増強を誘導することから脳の可塑性に関与する可能性もある。しかし生理作用の研究に比べaFGFの産生部位、産生調節機構に関する研究はほとんどなされていないのが現状である。そこで本研究では酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA) を用いて培養アストロサイトにおけるaFGFの産生とその調節について検討した。

アストロサイトは胎生21日齢ラット脳をトリプシンで分散後10%牛胎児血清を含む培養液で培養した。飽和に達した後、新しいシャーレに 10^4 cells/cm²の密度でまき直し、さらに2日間培養後実験に使用した。神経伝達物質を溶解した培養液に置き換え24時間培養した後、細胞を2%牛血清アルブミン、80units/mlのアプロチニンを含む0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.6) に懸濁し、超音波破碎、遠心分離後の上清をEIAに供した。

aFGFは別の方法で培養したニューロン中にも検出されたが、細胞あたりの含量はアストロサイトの方が高かった。アストロサイト中のaFGF量はセロトニンまたはGABA (1~100 μ M) の添加により顕著に減少したが、カルバコールでは変化しなかった。このことから培養アストロサイトのaFGF産生は特定の神経伝達物質による調節を受けると考えられた。すでに我々は成熟ラット脳ではアストロサイトではなくニューロンがaFGF産生の主体であることを明かにしており¹⁾、脳の発達に伴う神経回路網の形成、ひいてはそこから遊離される神経伝達物質がアストロサイトによるaFGF産生を抑制する機構の存在が示唆された。他の神経伝達物質による効果、細胞増殖とaFGF産生の関連についても検討中でありその結果もあわせて報告する。

1) Ishikawa R., Nishikori K., Furukawa S., J. Neurochem., 56, 836-841 (1991)

184 3B MS10-2

抗精神病薬によって誘導される脳内
NGF(Nerve Growth Factor) mRNA

尾崎 宜洋、勝元 栄一、原田 智行、
撫井 弘二、山上 榮
(大阪市立大学医学部神経精神医学教室)

我々は、抗精神病薬の投与によってマウス脳内に、Fos および Jun 関連蛋白質の誘導に引き続いて AP-1 DNA binding activity が高まることを既に報告した。そこで今回は、AP-1・DNA 結合配列を有する遺伝子の中で、神経栄養因子の一つである NGF の誘導について *in situ* hybridization によって検討を加えたので報告する。

抗精神病薬 Haloperidol (HPD, 1mg/kg)、(-)-Sulpiride (SP, 20mg/kg) および選択的 Dopamine D1 antagonist SCH23390 (1mg/kg) をそれぞれ ddY マウスの腹腔内に注射し、2 時間後に直ちに脳を摘出し、凍結した後、12 μ m の脳切片を作成し、4% paraformaldehyde-0.1M phosphate buffer (pH 7.4) で固定し、実験に供した。NGF cRNA probe は、マウス NGF cDNA の exon I の部分を RT-PCR によって作成し、pBluescript SK(-) に挿入後、digoxigenin-UTP を用いてラベリングしたものを使用した。Hybridization 後、発色は nitroblue tetrazolium 塩および 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を含む基質で行った。

HPD および SP 投与したものは、海馬、梨状葉、扁桃核、線条体、側坐核および側脳室中隔核において、3% acetic acid を投与した対照群と比較すると、NGF mRNA の発現は有意に増加した。他方、SCH23390 の投与では、対照群と比較して有意差はなかった。

我々が既に報告した *c-fos* および *c-jun* mRNA に関する RNase protection assay、*in situ* hybridization の結果 および Fos および Jun 関連蛋白質に関する免疫組織学の結果を考え合わせると、HPD および SP の投与によって、投与 30 分後に *c-fos* および *c-jun* mRNA が海馬、梨状葉、扁桃核、線条体、側坐核および側脳室中隔核において対照群と比べて有意に増加し、それに引き続き 2 時間後にこれらの部位で Fos および Jun が有意に増加し、AP-1 DNA binding activity が高まり、NGF mRNA の誘導がなされたのではないかと推測される。また、発現部位が辺縁系を含んでいることから、抗精神病薬の作用の一つとして NGF の発現を介した神経機能の安定と修復、精神症状の安定化に何らかの関関があるのではないかと予測される。

185 1B MS3-1 2007

培養交感神経細胞における NT3 および GDNF 応答性の調節

松岡一郎, 小林三和子, Thang Siong Heng, 栗原堅三
(北海道大学薬学部薬剤学講座)

上頸神経節の交感神経細胞 (SCG ニューロン) は、成熟時においては TrkA 受容体を発現し、そのリガンドである神経成長因子 (NGF) に依存して生存する。しかし、SCG ニューロンの発達過程においては、TrkA の発現に先立って、TrkC 受容体や c-ret 受容体が発現しており、それらのリガンドであるニューロトロフィン-3 (NT3) やグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) は発達過程の SCG ニューロンの生存や機能分化に作用していると考えられる。そこで本研究では、ラット胎児 SCG ニューロンを用いて、種々の分化因子による、NT3 および GDNF 応答性の調節機構を明らかにすることを目的とした。

胎生 17 日目のラット胎児より得られた SCG ニューロンを無血清培地を用いて培養した。種々の神経栄養因子あるいは分化因子存在下で 4 日間培養した後の生存神経細胞数を培養開始時の生細胞数に対して計測すると共に、RNA を抽出して TrkC, c-Ret, GDNFR α の発現レベルを RT-PCR 法により調べた。

すでに報告したように骨形成因子 (BMP2) は、TrkC-mRNA の発現を誘導して NT3 存在下での SCG ニューロンの生存を増大させ (38%→69%)、さらにレチノイン酸 (RA) はこの BMP の効果を増強する。一方 GDNF は単独で、BMP/RA と同程度に TrkC-mRNA の発現を誘導し、NT3 依存的な生存を増大させた (→ 80%)。

ニューロトロフィン (NGF または NT3) 非存在下での GDNF による生存維持効果は低かった (7%)。しかし、RA は、GDNF に対するリガンド認識受容体である GDNFR α の mRNA を誘導するとともに、GDNF 依存的な生存を促進した (→ 42%)。一方、BMP2 は、RA のこの作用をさらに増強させた (→ 86%)。これらの結果は、神経栄養因子応答性の獲得過程にある発達期の SCG ニューロンにおいて、神経栄養因子受容体の発現調節には複数の経路があることを示している。

186 1B MS3-2 2008

培養ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンに対する BDNF と CNTF の相乗作用

橋本 有佳, 阿比留 康弘, 沼川 忠広, 畠中 寛
(大阪大学蛋白質研究所合成部門)

脳神経系では多様な神経栄養因子が発現しており、これらの因子はニューロンに対して相互作用している可能性が考えられる。我々は培養ラット前脳基底野コリン作動性ニューロンを用い、種々の神経栄養因子の作用について解析を行ってきた。今回、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の生存維持・分化誘導作用に対する、毛様体由来神経栄養因子 (CNTF) の増強作用を明らかにしたので報告する。

生後 9-11 日齢のラットを既報に従って初代培養し、 $3-5 \times 10^4$ cells/cm² で、ポリエチレンイミンでコート、又はアストロサイトを単層培養した 48well プレート (0.65cm²) 上に分散培養した。培養翌日に、培地交換と同時に栄養因子を適量添加し、3-6 日培養後にアセチルコリン合成酵素 (ChAT) 陽性細胞数、又は ChAT 活性の測定を行った。

その結果、BDNF によって無添加群の約 6 倍に上昇する ChAT 陽性細胞数は、CNTF を同時添加することによって約 11 倍へと生存が増強された。一方、CNTF 単独では顕著な栄養因子作用を示さなかった。同様に、ChAT 活性では CNTF 同時添加によって BDNF の効果が約 3 倍から約 8 倍へと上昇することが確認できた。抗 MAP 抗体を用いて染色される全ニューロン数においても CNTF による増強作用が観察された。しかし、その作用はコリン作動性ニューロンに対してみられる程、強い効果ではなかった。また、以上のような BDNF を用いて観察される CNTF の増強作用は、NGF、NT-4/5 においても同様であった。

増強作用を引き起こす分子誘導機構として、TrkB の発現上昇が CNTF によって引き起こされている可能性が考えられる。そこで TrkB 発現ニューロンの割合を、抗 MAP2 抗体、抗 TrkB 抗体による二重染色で解析した。無添加群および BDNF、CNTF 添加群全てにおいて約 80 % の細胞が TrkB 陽性を示し、CNTF による発現誘導は認められなかった。

以上の結果より、CNTF によるニューロトロフィン作用の増強は、レセプター下流の細胞内シグナルに作用点を持っている可能性も考えられる。

187 1B MS3-4 2009

神経芽細胞腫における GDNF 受容体シグナル伝達

近藤 和博、菱木 知郎、高田 尚幸、磯貝 恵理子、
二村 好憲、崎山 樹、中川原 章 (千葉県がんセンター
研究局生化学研究部)

グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) はドーパミン作動性ニューロンの生育を維持する神経栄養因子である。最近、GDNF 受容体が GDNFR- α と c-RET よりなる複合体であることが判明した。c-RET の C 末端はスプライシングにより少なくとも 3 種類の異なるアイソフォームが存在することが知られている。受容体を形成するもう一方の蛋白質も GDNFR- α だけではないことがすでに報告されている。われわれは GDNF が神経芽細胞腫細胞株において神経突起の伸展を引き起こすことを見出したので、レセプター複合体とシグナル伝達について解析をおこなった。

GDNF は神経芽細胞腫細胞株 SMS-KCN において神経突起の伸展を引き起こした。この細胞において c-RET は GDNF により 2 分以内に自己リン酸化され、10 ng/ml GDNF でリン酸化の程度は最大限となった。Shc、PLC γ 1 は c-RET の活性化と共にチロシン残基がリン酸化され、シグナル伝達に関与している可能性が示唆された。

GDNF に対する反応性とレセプター複合体を形成している分子の発現について検討したところ、SMS-KCN を含め反応する細胞はいずれも c-RET と GDNFR- α もしくは TrnR2 を発現していることが明らかとなった。しかしながら、レセプター複合体を形成していると思われるのに GDNF に対する反応性が見られない細胞も存在した。

c-RET の C 末端はスプライシングによりアイソフォームが存在することが知られているが、その機能的な差については明らかになっていない。現在、c-RET を発現していない神経芽細胞腫細胞株である CHP134 に c-RET を強制発現させ、GDNF によってどのようなシグナルが伝えられているか、アイソフォーム間の違いについて検討を行なっている。

188 1B MS3-5 2010

カイニン酸投与による脳由来神経栄養因子のラット脳における動態

仙波りつ子、竹内都夫、伊東秀記、加藤兼房
(愛知県コロニー・発達障害研究所)

神経細胞の損傷に伴うニューロトロフィンの動態を調べるため、けいれん誘発物質であるカイニン酸を投与したラットの脳由来神経栄養因子(BDNF)の脳内変化を調べ、神経成長因子(NGF)およびニューロトロフィン-3(NT-3)の変化と比較した。

生後33日齢のSDラット腹腔内に、10mg/kg 体重のカイニン酸を投与し、8箇所の脳部位を調製した。対照群にはPBSを投与した。NGF、BDNFおよびNT-3のタンパク量は、それぞれの高感度酵素免疫測定系により測定した。BDNF発現の量的変化と局在は、ウェスタンブロット、ノーザンブロットおよび免疫組織化学的検索により調べた。

BDNFプロテインの上昇は、カイニン酸投与によって痙攣発作を起こした個体において12-24時間後に最大となり、嗅球で約16倍(8.2 ng/g 湿重量)、海馬で約10倍(61.6 ng/g)および梨状葉皮質(嗅内皮質を含む)で約10倍(19.5 ng/g)であった。一方、中隔野、線条体、視床下部および大脳皮質のBDNFプロテインは、2-4倍に増加していたが、小脳では全く変化がなかった。海馬のNGFプロテインはカイニン酸投与48時間以降に上昇し、NT-3プロテインは24時間後に減少していた。カイニン酸投与ラットの嗅球、海馬および梨状葉皮質では、14 kDaのBDNFプロテインが上昇していた。また、BDNF mRNAも海馬で上昇した。一方、カイニン酸投与によるBDNFプロテインの免疫組織化学的染色の増強は、海馬歯状回の多形細胞層や分子層および錐体細胞層(CA3-CA4)の放射線維層に観察された。

海馬のBDNFプロテインの急激な上昇の意義は、現在のところ明らかではないが、NT-3の減少は、NT-3プロテインの局在するCA3-CA4の錐体細胞がカイニン酸によって損傷を受けるためと思われる。一方、NGFプロテインの増加は神経細胞の損傷に伴って増加するミクログリアによる産生が活性化された結果と考えられ、脳の修復過程に関与するものと思われる。

189 1P 1010

ラット培養大脳皮質神経細胞における
HGFシグナル伝達経路の解析

町出 充, 中村泰子, 高坂新一

(国立精神・神経センター 神経研究所
代謝研究部)

肝細胞増殖因子 (HGF) は中枢神経系の細胞種を含む様々な細胞や組織に対し、増殖因子、分化因子、走化性誘導因子としての活性を有している。即ちPleiotropic factorであるHGFの多様な作用の発現に関しては、受容体であるc-Met下流のシグナル伝達分子の細胞種特異的制御機構を考慮する必要がある。そこでラット胎仔より調製した培養大脳皮質神経細胞を用いてHGFによる細胞内シグナル伝達経路について詳細な検討を行った。

その結果、HGF刺激前の培養大脳皮質神経細胞においてはcPKCに属するPKC α とPKC γ , nPKCに属するPKC ϵ 及びaPKCに属するPKC λ の4分子種が発現していたが、それらの内、HGFのシグナル伝達に関与していたのはPKC α , PKC γ , PKC ϵ の3分子種であることが*in vitro*リン酸化反応と細胞膜移行性から確認された。さらに、これらPKC分子種の活性化は上流のシグナル伝達分子であるPLC γ 1のリン酸化に対応していた。ただしこのときPKC λ に対するシグナル伝達分子であるPI3-kinaseのリン酸化は認められなかった。

以上の結果から、中枢神経系におけるHGFの細胞種特異的生理作用にはこれらPKC分子種の選択的活性化が重要であることが示唆された。

190 1P 1011

頭部外傷ラットにおけるプロサボシンの
空間認知障害および組織学的変化に対する効果保住 功¹、平岩雅男³、犬塚 貴¹、
米岡有一郎²、秋山克彦²、田中 隆一²、
菊川 公紀¹、中野 亮一¹、辻 省次¹、
J.S. O'Brien³

(1、新潟大学脳研究所神経内科)

(2、新潟大学脳研究所脳神経外科)

(3、カリフォルニア大学サンディエゴ校
神経科学)

プロサボシンはスフィンゴ脂質アクチベーター-蛋白質(サボシン)の前駆体蛋白で、神経栄養因子作用があることが認められている。今回、両側大脳皮質および海馬を切断した頭部外傷ラットで、モリスの水迷路試験および組織学的検索を行い、プロサボシンの効果を検討した。

頭部外傷ラットの外傷部位に術後プロサボシンを240ng、3日間投与した。対照として皮膚切開のみ行った偽手術ラット、プロサボシンの代わりにPBSを投与したラットを用いた。3週後に水迷路試験を行い、その後組織学的検索を行った。水迷路試験における通過試験の回数はPBS投与ラットで 3.58 ± 1.92 回、偽手術ラットで 6.00 ± 1.91 回、プロサボシン投与ラットで 5.43 ± 1.40 回と有意な改善を認めた。また組織学的にもプロサボシン投与群では外傷後の空洞形成が小さいなど組織学的改善も認められた。

プロサボシンは頭部外傷ラットに投与し、空間認知機能改善および組織学的改善が認められた。プロサボシンは脳虚血、坐骨神経傷害にもその効果が認めれており、今後ALSなど神経変性疾患モデルでもその治療効果が検討されるべきものと思われる。またこのモデルを使ってプロサボシンの生体内での詳細な作用機序を解明できるものと考えられる。

191 1P 1012

プロサポシン-レセプターの特徴とその精製

近藤 啓次¹、伊賀瀬 圭二²、小谷 泰教¹、
佐野 輝¹ (愛媛大学医学部 神経精神医学教
室¹、脳神経外科学教室²)

サポシンA, B, C, D は各種のリソゾーム水解酵素を活性化する分子量約1万程度の糖蛋白質である。プロサポシンはこれら4種のサポシンをドメインとして持つ前駆体蛋白質である。プロサポシンは多くの分泌液中へと分泌され、特に脳脊髄液中に多く存在している。ラット脳においては、そのほとんどが前駆体プロサポシンの形で存在し、ある種の神経核及びその神経路に存在している。近年、我々はプロサポシンが *in vivo* において虚血性神経細胞死を抑制すること、坐骨神経切除後の再生を促進すること、培養海馬神経細胞において突起進展を促進し、その細胞死を抑制することを明らかにした。さらに、この神経栄養因子活性がプロサポシンのサポシンCドメインのアミノ末端側に限局することを実証してきた。さて、細胞外に分泌されたプロサポシンは、そのレセプターを介して、栄養因子活性が発現すると考えられる。そこで、我々はプロサポシンレセプターを精製、クローニングすることを目的として研究を進めている。今回我々は、BIAcore システムをもちいてプロサポシンレセプターの特性について検討したので報告する。BIAcore システムでは、表面プラズモン効果を利用し分子間相互作用を解析する。

実験は、リコンビナント-マウスサポシンCをリガンドとしてセンサーチップ上に固定し、ラット脳膜画分をTween 20 によって処理したサンプルをアナライトとして分析に用いた。

trypsin または chymotrypsin 処理を行った、膜画分では、センサーチップへの結合は観察されなかった。これら酵素の阻害剤を同時に添加すると、結合が観察された。膜画分に、過量のリコンビナント-マウスサポシンCを加えると、濃度依存性にセンサーチップへの結合が低下した。各種の可溶化剤 (Twitttergent 3-14, Triton X-100, CHAPS, Tween 20) を用いてレセプターの可溶化の条件を検討した。ラット脳-膜画分可溶化画分からプロサポシンレセプターの Kd 値を求め、アフィニティーカラムを使用してレセプターの精製を試みた。

192 1P 1013

肝由来神経活性化因子による神経細胞死抑制
堀江秀典*、酒井偉久生*、門屋利彦**、稲垣好昌**、
野沢りさ**

(横浜市大・医・生理*、キリンビール医薬探索研究所**)

肝由来神経活性化因子(LDNA)は、成熟ラットの神経線維束を伴う脊髄後根神経節(DRG)の神経線維束切断端からの神経突起再生を促進し、その生存維持効果を示した。この事実はLDNAに神経節内の神経節細胞の生存維持作用もあることを示唆している。今回LDNAのこの神経細胞死抑制作用について検討した。

9-10週令のラットより神経線維束を伴ったDRGを摘出し、コラーゲンゲル内に包埋し、無血清培養液地腕培養した。LDNAとしては肝細胞培養上清を限外濾過膜、ゲル濾過法で分離後の活性分画 (10KD-20KD)を用いた。ラットから摘出直後の培養前(0日目)のDRG、培養後3日目と6日目のDRGをそれぞれ取り出しコンパウンド中に入れてから液体窒素中で急速凍結する。凍結試料はクリオスタートで10ミクロン切片とし、100ミクロンごとの隣り合う切片をそれぞれNissl, Giemsa染色した。神経細胞数の計測は1つのDRGサンプルに対し100ミクロンごとの全Giemsa染色切片についておこなった。

0日目、3日目、6日目のそれぞれの切片をNissl染色し、隣り合う切片をGiemsa染色した。各切片でNissl陽性の神経細胞は、Giemsa染色でも青紫に染色されNissl body陽性神経細胞は両染色で一致していた。Giemsa染色は同時に神経節内の変性した神経細胞もEosinで染色した。Giemsa染色により切片中の全神経細胞を染め出すことが出来た。この染色法を用いて培養3日目、6日目のDRG中の全神経細胞数に対するNissl陽性細胞数の割合を求めた。3日目のコントロールではNissl陽性細胞数の平均値は400.5+40.5で全神経細胞数の平均値は953.5+65.5であった。Nissl陽性細胞数/全細胞数は41.8+2.7%(n=4)であった。一方LDNAを作用させた群ではNissl陽性細胞数の平均値455.0+0.0、全神経細胞数の平均値908.5+57.5でその相対値の平均値は50.2+3.1%(n=2)であった。6日目のコントロールでは277.2+12.3, 939.3+40.6でその相対値の平均値は29.5+0.8%(n=8)であった。LDNAを作用させた群では413.2+36.9, 954.2+26.9でその相対値は43.1+2.9%(n=4)であった。以上の結果よりLDNAには培養後のDRGの神経線維切断端からの神経再生促進と再生神経突起の生存維持作用だけでなく神経節内の神経細胞の細胞死の抑制効果のあることも判明した。

193 1P 1014

神経芽細胞腫培養株におけるレチノイン酸による細胞死の誘導と GDNF, NTN-RET シグナルを介した細胞死抑制機構の解析

高田尚幸、磯貝恵理子、菱木知郎、近藤和博、中川原 章

(千葉県がんセンター生化学研究部)

神経芽細胞腫は代表的な小児悪性腫瘍の一つであり、高頻度に自然退縮や分化を起こすことが知られている。我々は前回の報告で GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) が神経芽細胞腫の分化を誘導し、それがレチノイン酸(RA)処理により増強されることを示した。今回、我々は 19 の神経芽細胞腫培養株を用いて GDNF および NTN (Neurturin) の効果を調べ、分化と細胞死のシグナルについて解析した。

19 の培養神経芽細胞腫株のうち 16 株が RA 処理により分化した。GDNF および NTN 処理ではどちらも同じ 4 株が分化し、両者の効果の間に差はなかった。この 4 株はいずれも、上記神経栄養因子のレセプターである GDNFR- α /RET1 または TrnR2/RET2 と c-RET チロシンキナーゼを同時発現していた。

CHP-134 株は RA にて典型的な分化をした後、7 日目で突然細胞死に到った。この細胞は GDNFR- α と TrnR2 の両者を発現していたが、c-RET は発現しておらず、GDNF や NTN 処理により分化しなかった。ところが RA 処理開始後 3 日目から c-RET の発現が誘導され、このとき同時に GDNF または NTN を添加すると RA による致死効果は消失し細胞は長期間分化した状態で生存した。RA および GDNF, NTN 作用下での GDNFR- α と TrnR2 の下流シグナル系の解析では c-RET の磷酸化と Shc の活性化がみとめられ、GDNF および NTN によるシグナルが活性化されていることが示唆された。したがって、CHP-134 では RA により c-RET の発現が誘導され、その結果 GDNF および NTN のシグナルが伝達されるようになったものと思われる。このシグナルは RA による細胞死を抑制しており、GDNF, NTN-RET を介するシグナルは細胞分化をもたらすと同時に細胞生存にも関与していると考えられた。

194 1P 1015

ラット神経切断モデルにおける皮下投与 BDNF の保護作用および血中濃度

片山典子、石毛陽子、岸野晶祥、小河宏城、龍野徹、中山智加男、野口浩 (住友製薬総合研究所)

成体ラットの運動神経変性に対する BDNF の保護効果を調べる目的で、坐骨神経切断あるいは顔面神経切断による脊髄運動神経細胞と脳幹運動神経細胞のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) レベル低下に対する BDNF の効果について検討を行った。

7 週齢の Wistar ラットの左側坐骨神経あるいは顔面神経を切断後に BDNF の皮下投与を開始して、1 週間後に ChAT 免疫活性を調べた。

坐骨神経切断モデルでは隔日に投与を行った (4 回/週)。脊髄運動神経核の一つである RDLN における ChAT レベル低下に対して 5 および 20 mg/kg の投与量では有意な抑制効果を示した。しかし、1 mg/kg の投与量では抑制効果はみられなかった。そして BDNF 最終投与後の血漿中濃度は薬効の強さと相関しており、Cmax 値は 1 mg/kg で 12.7 ng/ml、5 mg/kg では 110 ng/ml であった。さらに神経切断 1 週間後から BDNF を皮下投与した場合にも RDLN における ChAT レベルの低下が抑制された。

顔面神経切断モデルにおいて 1 週間毎日皮下投与を行うと、同様に 5, 20 mg/kg の BDNF により有意な ChAT レベル低下抑制効果が認められた。

以上のように、障害を受けた運動神経に対する BDNF の保護の効果は血漿中濃度レベルと相関して見られることが示された。

195 1P 1085

ラット運動神経に対するBDNFの細胞変性抑制、回復作用および軸索伸展作用

岸野晶祥、石毛陽子、筈智子、中山智加男

(住友製薬総合研究所分子神経科学G)

BDNFの成体動物の運動神経に対する作用についての報告は少ない。本実験では、成体動物における運動神経の細胞死のモデルである神経根引き抜きモデルを用い、成体運動神経細胞に対するBDNFの作用を検討した。

7週令ラットに対し脊髄神経根L4, L5, L6を引き抜き除去した後、浸透圧ポンプを用いBDNFあるいはPBSを髄腔内に持続的に投与した。BDNFは12ug/dayで2週間あるいは4週間投与した。また、投与を遅らせた場合の作用を検討するため、2週間PBS投与し、その後BDNFを2週間投与した。さらに、低用量のBDNFについても検討した。投与終了後、灌流固定し、腰部運動神経核のRDLNを含む連続切片をNissl染色、ChAT免疫染色、AChE活性染色しRDLNに含まれる陽性運動神経細胞体の数をカウントした。その結果、PBS投与群では、いずれの染色陽性細胞とも顕著に減少していたのに対し、BDNFを髄腔内投与したものは、いずれの用量、染色においても、陽性細胞体の減少を顕著に抑制していた。また、BDNF投与群でのみ、前根切断部位において多数の運動神経線維が観察された。これらより、BDNFは成体運動神経細胞に対して細胞死抑制作用、神経伝達物質代謝酵素の低下抑制作用、軸索再伸展促進作用を持つことが示唆された。さらに、変性中の運動神経に対して2週間遅れて投与するとBDNFは、その後の細胞死の進行を抑えるだけでなく、酵素レベルをChAT、AChEとも上昇回復させていた。これは、傷害を受けた運動神経に対し、BDNFは変性に対する保護作用だけでなく変性からの回復作用を持つことを示唆する。

196 1C MS5-4 1084

ニューロトロフィンによる初代培養中枢ニューロンからの神経伝達物質放出

沼川忠広¹、酒井直人¹、武井延之²、島中 寛¹大阪大学蛋白質研究所生合成¹ 京都工芸繊維大学応用生物²

近年、ニューロトロフィンがニューロンに対して分化、生存維持作用のみならずシナプス可塑性に重要な働きを果たしている可能性が高まってきている。そこで我々は、記憶・学習に重要である中枢ニューロンのシナプス可塑性に及ぼすニューロトロフィンの役割を解析する目的で、特に神経伝達物質放出に直接関与している可能性について解析を行ったので報告する。

NGF、BDNF、及びNT-3の作用をラット小脳、大脳皮質、海馬及び線条体の初代培養ニューロンを用いて解析を行った。特に、均一なニューロンが多量に得られる小脳顆粒細胞を主に用いた。神経伝達物質放出測定には、それぞれ9~12日間培養したニューロンを用いて、外液であるKRH (Hepes-buffered Krebs Ringer solution) を1分または3分で交換するパッチ法で行った。神経伝達物質としてグルタミン酸に着目し、その定量には、HPLCおよび蛍光検出器を併用した。また、蛍光色素Fluo-3AMを用いた細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ イメージング測定を共焦点レーザー顕微鏡下で行った。

ニューロトロフィン添加により1分以内で培養ニューロンから一過的なグルタミン酸の放出が観察された。放出は数分で元のレベルに戻り、短時間での神経活動に伴う放出に相当すると思われる。

BDNF及びNT-3による放出はTrkレセプターの特異的阻害剤であるK252aで抑えられた。このことはBDNF及びNT-3による放出がTrkを介したものであることを示唆している。一方で、NGFの場合においては、K252aで阻害されず、高濃度でのみ応答が観察された。小脳顆粒細胞でTrkAの発現がみられないことから低親和性レセプターP75の関与が考えられる。これらニューロトロフィンのもつグルタミン酸放出作用の Ca^{2+} 依存性を解析したところ、細胞外液からカルシウムを除いてもグルタミン酸の放出は低下せず、BAPTA-AMで処理することで放出が抑えられた。また、Thapsigarginにより放出が完全に抑制された。高カリウムによる脱分極刺激では顕著であった細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、ニューロトロフィンでは有意には観察されなかった。以上の結果は、ニューロトロフィンのもつ放出作用が通常の開口放出系とは異なり、細胞内 Ca^{2+} ストアより遊離する比較的低濃度の Ca^{2+} に高い依存性を持つ未知の分泌機構である可能性を示唆している。

197 1P 1083

虚血性神経細胞死における低酸素誘導蛋白 ORP150 の役割

玉谷実智夫、小川智、小澤健太郎、遠山正彌
(大阪大・医・第二解剖)

培養グリア細胞において低酸素負荷により誘導される新規ストレス蛋白 ORP150 の虚血脳における役割について検討した。

ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて免疫組織化学法と in situ hybridization 法にて ORP150 の発現を調べたところ、虚血中心部の神経細胞にタンパクおよび mRNA いずれのレベルにおいても ORP150 の強い発現を認めた。一方、ラット胎児大脳皮質よりの初代培養神経細胞は低酸素暴露による ORP150 の発現上昇を認めなかった。この虚血脳と培養細胞の ORP150 の発現の差の由来はグリア細胞より分泌される何らかの因子によるものではないかと考え、培養神経細胞にラット中大脳動脈閉塞側の脳半球の抽出物を加え、ORP150 の発現を Western blot にて検討した。この抽出物の添加により ORP150 の発現はほぼ 10 倍に増加し、その増加は TNF α の中和抗体の同時添加により抑制された。また、培養神経細胞において TNF α は用量および時間依存的に ORP150 の発現を増加させると共に低酸素による細胞死を抑制した。他の神経栄養因子である insulin-like growth factor, basic fibroblast growth factor, nerve growth factor では ORP150 の誘導を認めなかった。

以上の結果より神経細胞で誘導される ORP150 は虚血性神経細胞死に対する TNF α の保護作用に関与することが示唆された。

198 2C MS9-1 1082

虚血性神経細胞死における Bcl-2 と ICE ファミリーの役割

玉谷実智夫 小川智 小澤健太郎 遠山正彌
(大阪大学医学部第二解剖)

我々は虚血による神経細胞死のメカニズムを解析する目的で、ラット大脳皮質の初代培養神経細胞を用い、低酸素暴露による神経細胞死におけるアポトーシスの関与、さらにアポトーシスを制御する代表的なタンパクである Bcl-2 ファミリーと ICE (Interleukin-1 β converting enzyme) ファミリーの関与につき検討した。

細胞の生存率は培養上清中に遊出した LDH の活性により算出した。アポトーシスは TUNEL 法、蛍光色素による核染色、アガロースゲルによる DNA ladder により評価した。また、Bcl-2 と Bax タンパクレベルを Western blot により評価した。ICE ファミリーに関しては ICE と CPP32 に着目し、これらの活性をそれぞれ YVAD-MCA、DEVD-MCA を基質として測定した。

低酸素負荷により、培養神経細胞は約 12 時間後より核の凝縮、断片化さらにアガロースゲルで DNA laddering pattern が認められた。Bax レベルは低酸素負荷により変化は認めなかったが、Bcl-2 レベルは 6 時間後より低下を認めた。その後、12 時間後に一過性に ICE 活性の上昇の後、CPP32 の活性化を認めた。また、ICE, CPP32 それぞれのインヒビターは低酸素による細胞死を防いだ。

これらの結果、低酸素により低下した Bcl-2 が ICE ファミリーのプロテアーゼを活性化しアポトーシスをひきおこす可能性が示唆された。

また、神経栄養因子である IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) と bFGF (basic fibroblast growth factor) はこの系において細胞保護作用を示すのか、また示すのであれば、上記カスケードのどの部位に作用するかについて検討した。いずれの栄養因子も低酸素による細胞死を防いだ。また、低酸素負荷による CPP32 の活性化と Bcl-2 レベルの低下を抑制した。よって、これらの栄養因子は Bcl-2 レベルを維持することにより神経保護作用を示す可能性が考えられた。

199 2C MS9-2 1081

虚血によるスナネズミの遅発性神経細胞死における caspase の関与

永見 敏行、石崎 泰樹、室田 誠逸

(東京医科歯科大学細胞機能制御学教室)

スナネズミの両側総頸動脈結紮による脳虚血モデルで観察される遅発性神経細胞死は、アポトーシスに類似した形態変化をとることが知られている。本研究では遅発性神経細胞死における caspase の関与を検討した。

エーテル麻酔下、スナネズミ (11 週齢) の両側総頸動脈を 5 分間結紮し、虚血負荷を加えた。血流再開通の直後、又は、12 時間後から、細胞膜透過性で不可逆的な caspase 阻害剤 benzoyloxycarbonyl-Asp-dichlorobenzene (zD) を投与した。いずれの場合も zD は 12 時間ごとに 3 回、片側の海馬実質に注入した。

虚血 4 日後、あるいは 8 日後に麻酔下、断頭屠殺し、凍結切片を作製して海馬 CA1 野の錐体細胞の形態を検討した。虚血後 4 日目では、虚血後ただちに投与を開始した場合、注入側では神経細胞の核凝縮が抑制されたのに対し、薬物投与を虚血後 12 時間から開始した場合、神経細胞の保護効果はほとんど観察されなかった。また、虚血後 8 日目においても、zD 注入側ではほとんどの神経細胞が脱落を免れていた。zD には、内在性のインターロイキン転換酵素を阻害する作用が知られており、従って、zD の神経細胞保護効果が IL-1 β 産生を抑制した結果である可能性が示唆された。そこで、IL-1 β を血流再開通直後から 2 時間おきに 3 回、海馬実質に投与したところ、4 日目に核凝縮を示す細胞数は増加したが、zD の投与によって核凝縮は抑制された。

これらの動物を用いて、受動的回避学習を行ったところ、zD 投与群では、vehicle 投与群に比べて、ステップスルー、ステップダウンのどちらにおいても著しい成績の改善が見られた。

抗 poly-(ADP ribose)-polymerase (PARP) 抗体を用いたウェスタンブロットによって、虚血後 4 日目の海馬背側部より PARP の限定分解が検出された。この限定分解物は zD 投与側からは、ほとんど検出されなかった。

以上の結果より、スナネズミを用いた両側総頸動脈結紮による脳虚血モデルにおいて、虚血後の早い時期に caspase が活性化されること、および、caspase の抑制によって神経細胞の脱落が抑制され、機能が維持されることが示唆された。PARP の限定分解が検出されたことより、さまざまな caspase のうち、CPP32 ないし CPP32 様酵素の関与が特に示唆された。

200 2C MS9-3 1080

虚血性脳ストレスにおける神経細胞保護作用の分子メカニズム

石岡憲昭*, 久原映子*, 上野 豊*, **, 小暮太郎*, ***

(東京慈恵会医科大学*DNA医学研究所分子細胞生物学研究部門、**整形外科科学教室、***脳外科学教室)

免疫抑制剤 FK506 が脳虚血に対して神経細胞の保護作用を示す。そこで、FK506 結合タンパク質 (FKBP) に注目し、この神経細胞保護作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的として虚血脳タンパク質群の動態を解析した。

中大脳動脈閉塞モデル作製法に従ってウィスターラット脳に虚血性ストレスを与え、一定時間後に大脳を摘出した。脳抽出液中の FKBP は Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPIase) 活性として、また抗 FKBP12 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。カルモデュリン (CaM) をリガンドとしたアフィニティカラムを作製し、FK506 存在下、非存在下で脳抽出液のアフィニティクロマトグラフィを行った。

虚血性ストレスにより脳内 PPIase の活性が著明に上昇し、時間経過に伴う減少は見られなかった。一方、HSP70 も同様に増加したが時間経過に伴い減少していった。さらに FK506 投与により PPIase 活性が明らかに阻害された。PPIase はタンパク質のホールディングに関わる酵素であることから、HSP70 の分子シャペロン作用と同様な作用を行っていると考えられたが、以上の結果は、PPIase (FKBP) の作用が HSP70 の作用とは異なることを示唆していた。

CaM-アフィニティクロマトグラフィにより得られたタンパク質群は疎水性クロマトグラフィにより分離した。分離タンパク質のウェスタンブロット法による分析の結果、FK506 存在下において分子量 (MW) 14,000、80,000 及び 100,000 のタンパク質が抗 FKBP12 抗体により検出された。一方リン酸化タンパク質の分析により MW 55,000 及び 78,000 のタンパク質が FK506 存在下でリン酸化されていた。

以上の結果は、免疫抑制剤 FK506 の神経細胞保護作用に FKBP (PPIase) が関与すること、さらに FK506-PPIase の複合体が免疫系同様にカルモデュリン (CaM)-カルシニューリン (CaN) 系に作用することが強く示唆された。また CaM-アフィニティにより得られたリン酸化タンパク質は FK506-FKBP 複合体による CaN のホスファターゼ活性阻害の結果とも考えられ、CaN のターゲットタンパク質の一つである可能性が示唆された。

201 2C MS9-4 1079

脳虚血による遅発性神経細胞壊死後の海馬CA1錐体細胞層痕跡におけるアポリポプロテインEおよび β -amyloid様タンパクの蓄積
石丸裕久¹, 石川巧一², 羽賀誠一³, 東海林幹夫⁴, 大江良秀², 羽賀千恵⁵, 高橋 章¹, 丸山悠司¹
(群馬大学医学部¹神経精神薬理学ツムラ, ⁴神経内科, ²群馬大学生体調節研究所分子調節, 東京都精神医学総合研究所³超微形態, ⁵神経病理)

脳虚血による遅発性神経細胞壊死後の海馬CA1錐体細胞層痕跡に長期間残存するアポリポプロテインE(apoE)免疫反応に着目し, 虚血慢性期の β -amyloid (A β)様タンパクの脳内蓄積について検討した。

砂ネズミ(8週齢)の両側総頸動脈を5分間閉塞し, 血流再開後3ヶ月および6ヶ月目に4%パラホルムアルデヒドにて脳を固定した。20 μ mに薄切後, methenamine-silver(M-S)染色および各種抗体[anti-apoE, A β , β -amyloid precursor protein (APP), GFAP antibodies]による免疫組織化学染色(ABC法)を行った。

虚血後3ヶ月目において, 海馬CA1領域全体にM-S陽性物質が確認され, 可溶性A β の存在が示唆された。6ヶ月目にはapoEおよびA β 免疫反応がCA1錐体細胞層の痕跡に強く認められた。apoEは脳内では主にアストロサイトにより産生されることから, 活性化アストロサイトの分布を調べた。その結果, アストロサイトはこのCA1錐体細胞層の痕跡には存在しないことが明らかとなり, 同部位には神経細胞も消失し存在しないことから, apoEおよびA β 陽性物質は細胞外の蓄積物であると考えられた。また, この蓄積物はA β の前駆体であるAPPの抗体では認識されないことから, これまでに報告されている脳虚血後の細胞内に蓄積するAPPとは異なるものと考えられた。現段階では, このA β 陽性物質がA β そのものか, あるいはA β 配列を含むAPPのフラグメントであるかは不明であるが, アルツハイマー病脳でみられるA β -apoE complex 類似の物質である可能性が示唆された。

近年, ヒトの虚血脳においてもA β の蓄積が報告され, 脳虚血がアルツハイマー病の原因に関与している可能性が示唆されている。本研究は, 齧歯類の脳におけるA β 様タンパク蓄積の可能性を示唆するものであり, 脳虚血モデルはA β およびapoEの脳内蓄積機構の研究に有用であると考えられる。

202 1P 1078

局所脳虚血急性期における小胞体カルシウム調節動態

傳法倫久、福内靖男、田中耕太郎、白井俊孝、永田栄一郎、伊東大介、鈴木重明、二木 啓*
(慶應義塾大学神経内科、*シオノギ製薬中枢神経薬研究センター)

目的: 我々は既に砂ネズミ6時間一側総頸動脈結紮モデルにおいて、イノシトール1,4,5三リン酸(IP₃)受容体(R)のIP₃結合能は、海馬CA1領域で有意に低下することを報告した。今回はラット中大脳動脈閉塞モデルによる局所脳虚血急性期において⁴⁵Ca取り込み能及び放出能の立場より小胞体カルシウム調節動態を調べ、IP₃結合能や局所脳血流(ICBF)との関係につき検討した。方法: Sprague-Dawleyラット4匹(体重約300g)を用い、先端をpoly-L-lysineで処理した口径3-0のナイロン糸を右総頸動脈分岐部より内頸動脈遠位に向け挿入し、中大脳動脈起始部を閉塞した。閉塞5時間の時点で[¹⁴C]iodoantipyrine法により、ICBFを測定、その後凍結脳より連続切片を3組作成した。1組はそのままX線フィルムに感光しICBFオートラジオグラムを得た。次の1組の切片は、4nMの[³H]IP₃でインキュベートし、IP₃結合能を示すオートラジオグラムを得た。残りの1組の切片は、ジギトニンを含むpermeabilization bufferに10分間つけ、⁴⁵Ca²⁺を含むuptake bufferで37°C1時間インキュベートし、オートラジオグラムを得た。小胞体からのカルシウム放出を検討するためにuptake buffer中にIP₃を加えた。画像解析装置で、ICBF値、IP₃結合量、⁴⁵Ca取り込み量、IP₃刺激による⁴⁵Ca放出量を尾状核-被殻レベルで同一関心領域より定量した。成績: (1)生理学的パラメータ: ICBF測定直前の平均動脈圧は105.0 $\pm$ 25.2mmHgであり、血液ガスも正常範囲内にあった。(2)ICBFとIP₃結合量: 尾状核-被殻においてICBFが20ml/100g/min以下の領域(A領域)でIP₃結合量は73.1 $\pm$ 23.9fmol/mg、90ml/100g/min以上の領域(B領域)では70.0 $\pm$ 2.6fmol/mgであった。大脳皮質でA領域が61.0 $\pm$ 15.3fmol/mg、B領域が71.5 $\pm$ 17.3fmol/mgであり、両領域においてIP₃結合能に差はなかった。(3)ICBFと⁴⁵Ca取り込み量: 尾状核-被殻においてA領域では⁴⁵Ca取り込み量が133.0 $\pm$ 36.8pmol/mg、B領域では236.9 $\pm$ 60.7pmol/mgであった。大脳皮質ではA領域が122.5 $\pm$ 45.4pmol/mg、B領域が192.8 $\pm$ 23.0pmol/mgであり、虚血領域で有意に⁴⁵Ca取り込み量が低下していた。(4)ICBFと⁴⁵Ca放出能: IP₃刺激による放出能を同一関心領域の⁴⁵Ca取り込み量に対する放出量の割合で検討したが、尾状核-被殻のA領域では19.3 $\pm$ 14.8%、B領域で39.3 $\pm$ 14.7%、大脳皮質のA領域では17.0 $\pm$ 11.4%、B領域で21.1 $\pm$ 7.4%と、尾状核-被殻の虚血領域で有意に放出能が低下していた。結論: ICBFが20ml/100g/min以下の虚血領域ではCa²⁺-ATPase活性による小胞体へのカルシウム取り込み能は低下していた。また尾状核-被殻でIP₃結合能は保たれていたにもかかわらずIP₃刺激によるCa放出能が障害されていたことより、同部位のIP₃R機能低下が示唆された。

203 1P 1077

砂ネズミ 6 時間脳虚血モデルにおける小胞体カルシウム動態について

永田栄一郎、福内靖男、田中耕太郎、白井俊孝、伊東大介、鈴木重明、傳法倫久、二本 啓*、
(慶應義塾大学神経内科、*シオノギ製薬中枢神経薬研究センター)

脳虚血時のイノシトール 1,4,5 トリリン酸(IP₃)受容体は砂ネズミ 6 時間一側総頸動脈結紮モデルにおいて虚血側海馬 CA1 領域でのみ IP₃ 結合能が低下することを報告したが、今回は虚血時の小胞体機能を検討する目的でこのモデルを用い細胞内小胞体のカルシウム動態を調べた。砂ネズミを用い、右総頸動脈を結紮し 6 時間脳虚血を作成した。結紮 1 時間後に脳虚血症状を示し、McGraw の Stroke Index で 6 点以上の動物を虚血群として用いた。結紮 6 時間後に脳を摘出し、急速凍結後、厚さ 20 μ m の脳切片を作成した。ジギトニンを含む permeabilization buffer に 10 分間つけ、⁴⁵Ca²⁺を含む uptake buffer で 37°C 1 時間インキュベートし、その後 4°C、10 分間洗浄して風乾、LKB フィルムに感光してオートラジオグラムを得た。小胞体よりカルシウム放出を検討するために uptake buffer 中に IP₃、カフェイン、A23187 などを加えた。小胞体への ⁴⁵Ca²⁺の取り込みは虚血側でも非虚血側と同様に認められ左右側間で有意差を認めなかった。また、カフェイン、A23187 に対するカルシウム放出能も左右側間で有意差を認めなかった。しかし、虚血側海馬 CA1 領域でのみ IP₃ カルシウム放出反応が低下していた。この結果より海馬 CA1 領域の IP₃ 受容体機能の低下が明らかとなった。一方、⁴⁵Ca²⁺の取り込み能は正常なことより Ca²⁺-ATPase 活性による小胞体へのカルシウム取り込み能は阻害されていないと考えられた。

204 1P 1076

発達期橋核ニューロンにおけるNMDA受容体マグネシウムイオン阻害効果の変化：橋海馬支脚神経細胞壊死との関連

三谷 章、片岡 喜由
(愛媛大学医学部第一生理)

胎児期(胎生29週以降)から新生児期にかけて脳循環障害を被った小児では橋核および海馬支脚に胎児・新生児期特有の中核ニューロン死(橋海馬支脚神経細胞壊死(pontosubicular neuronal necrosis, PSN))がしばしば認められ、その後観察される脳性麻痺や精神発達遅延の原因のひとつとして考えられている。本研究では、このPSNの発生機序を明らかにする目的で、細胞死が生じる神経細胞に共通して観察される細胞内Ca²⁺の濃度上昇を導くことで知られるNMDA受容体の発達の機能変化を検索した。

1) スライス・パッチクランプ法による橋核NMDA型グルタミン酸受容体の解析：ヒト在胎15週-生後8週頃に相当する生後1-30日のラットから橋核を含む厚さ150 μ mの脳幹スライス標本を作製し、橋核ニューロンにホールセル・パッチクランプを行い、NMDA型グルタミン酸受容体のMg²⁺感受性およびCa²⁺透過性について発達経過を追って検討した。その結果、生後2週頃のラット橋核ニューロンにおいてはMg²⁺による抑制を受けずにCa²⁺の細胞内流入を導くMg²⁺低感受性のCa²⁺透過型NMDA型グルタミン酸受容体が一時的に多く発現していることを示す電流応答が観察された。

2) in vivoでの検討：このMg²⁺低感受性NMDA型グルタミン酸受容体の特異的発現が胎児・新生児橋核のニューロン死発生の原因と成り得るかどうかを検討するために、生後2週頃のラット橋核にNMDAを微量注入した。その結果、生後2週頃のラット橋核においては成熟ラットでは顕著な組織学的変化を発生させない低濃度NMDAによってニューロン死が発生した。

以上の結果は、発達期の橋核ニューロンではMg²⁺低感受性のCa²⁺透過型NMDA受容体が多く発現している時期があり、この時期に脳虚血・低酸素症などの脳循環障害が発生し細胞外グルタミン酸濃度が上昇すると、成熟期には観察されない発達期特有の中核ニューロン死が発生する可能性を示唆している。

205 1P 1075

一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死に伴う脳内グリア線維性酸性タンパク (GFAP)の変動

入谷克己、藤田公和、山内理充、小川和人、加藤寿章、芳本信子、平田ゆかり¹、山口幸子、柴山健三、永田 豊

(藤田保健衛生大学医学部生理学教室)

(¹藤田保健衛生大学医学部法医学教室)

砂ネズミは椎骨動脈の発達が未熟で、両側内頸動脈の血流遮断により、容易に脳虚血を生じさせることが出来るので、脳虚血実験にはよく用いられている。また、アストロサイトは神経細胞損傷後の神経組織の修復に関与しており、GFAPはその細胞骨格タンパクとして重要な役割を担っている。我々は今回、砂ネズミに10分間の脳虚血を負荷・再灌流を行なった後1, 3, 7日目で麻酔下に断頭し、摘出した脳をGlowinski法で7部位に分割した。そして神経変性の進行過程におけるGFAPの変動について検討した。各分割脳組織タンパクをSDS-尿素で可溶化し、一次元PAGEで分離、PVDF膜上にblotting後、抗GFAP抗体で染色し、GFAP陽性バンド像の変動を調べた。脳虚血・再灌流後、分画した脳タンパク染色像は、脳内各部分で非虚血脳のタンパク分離像とほとんど相違は認められなかった。しかし、PVDF膜上に転写してから抗GFAP抗体を用いて免疫染色を行うと、intact GFAPに相当する分子量50 kDaの位置に太い一本のバンドがいずれの脳部位でも明瞭に検出された。しかし、虚血負荷後再灌流の時間経過が長くなるほど、特に海馬領域で、50kDaより低分子の領域にGFAP陽性の数本のバンド(断片化GFAP)が増加して認められた。砂ネズミ脳切片の免疫組織化学的検索で、虚血負荷脳では海馬CA1領域の大型ニューロン層は消失し、その周辺部に抗GFAP抗体陽性に染色された多数の突起をもつアストロサイトの増加が認められた。

我々は既に、運動ニューロンの選択的変性・脱落を生ずるALS患者やMndマウス脊髄内でGFAP分子の断片化が発現することを確認している。今回脳虚血・再灌流実験後に出現したGFAP分子断片が、ニューロン変性過程とどのように関わっているかを追求し、またGFAP分子の断片化を触媒するタンパク分解酵素カルパイン活性化の役割についても、現在検討を進めている。

206 1P 1074

回転培養標本を用いた海馬神経細胞変性の解析
志谷 和紀、富永 恵子、小倉 明彦
(大阪大学大学院理学研究科)

虚血侵襲や低酸素侵襲によって神経細胞は変性して脱落するが、これには侵襲後すぐに変性する即発性のものと状態回復後しばらくしてから起こる遅発性のものの2種類がある。そのうち後者の遅発性の細胞変性については変性過程を連続的に観察する方法がなく十分な情報が得られていない。脳切片培養標本は生体脳に近い神経回路網を保持しており、連続的な形態観察や他の生理学的・薬理学的な手法も適用でき細胞死の機構を検討する上でのすぐれた解析モデル系になると思われる。本実験は海馬の切片培養標本を用いてグルタミン酸と低酸素の刺激による細胞変性を比較検討した。海馬培養細胞は生後8日目の新生仔ラットの海馬切片を回転培養し1週間経過したものをを用いた。まず逐次固定した標本を用いて細胞死を調べたところ、グルタミン酸100 μMで1時間暴露または窒素灌流による低酸素暴露(空气中酸素濃度の20-40%)を行ったところ1時間以内の細胞変性は起こらなかったが暴露後に正常状態に戻し一定時間後の細胞変性を調べるとグルタミン酸100 μM暴露の場合は3-6時間後に細胞の脱落が始まり、24時間後にはCA1領域がかなり欠損した。低酸素暴露の場合は細胞の脱落は9-12時間後に起こり始め、CA1領域がかなり欠損したのは48時間後であった。どちらの場合でも脱落した領域では細胞と細胞核の萎縮がみられた。萎縮した細胞の核内でDNAの断片化が起きているかどうかをTUNEL染色で調べると陽性であった。これらからここでみられる細胞変性はアポトーシス様であることが確認された。

また、細胞変性の様子を位相差顕微鏡または微分干渉顕微鏡でタイムラプスビデオを用いて経時観測したところ、高濃度のグルタミン酸(1 mM)による1時間以内の細胞変性では細胞体積の膨張がみられた。それ以降の細胞体積の縮小を伴う変性についてはその開始時間に注目し現在検討中である。

以上より脳切片の回転培養標本は虚血や低酸素による細胞変性の機構を解析するモデル系になると思われる。

207 1B MS2-3 1073

スナネズミ一過性前脳虚血後海馬に誘導される遺伝子の探索
=ADP-ribosylation factor like-gene, ARF4Lの発現=

片山泰一^{1, *}、今泉和則^{1, *}、津田学^{1, *}、高木勉¹、遠山正彌²

(大阪大学医学部分子脳機構¹、第2解剖学教室²、田辺製薬³)

虚血後に起きる遅発性神経細胞死や虚血耐性などの分子メカニズムを理解する目的でスナネズミ一過性前脳虚血後、海馬に発現誘導する遺伝子を differential display により探索し、ヒト ADP-ribosylation factor 4L (ARF4L) のスナネズミホモログをクローニングした。

ARF4Lの生理的役割は知られていないが、GTP結合部位、ミリストイル化部位、コートマーとの結合モチーフ (KKXX) などを持つことから、小胞体からゴルジ装置、あるいはゴルジ間の小胞輸送に関わっていると考えられる。

一過性前脳虚血後に ARF4LmRNA は海馬歯状回 (DG) 及び CA1 領域のニューロンに発現誘導が見られた。DG においてそのシグナルは5分虚血後3時間より検出され、同6時間をピークに漸減した。一方、このモデルで細胞死が起こることが知られている CA1 領域では ARF4LmRNA は虚血1~2日後にわずかに発現上昇していたが、3日後にはシグナルが消失していた。他の小胞輸送関連遺伝子 ARF1, ARL4 及び β -COP も5分虚血6時間後に発現上昇していた。これは小胞輸送系が虚血ストレス後に海馬ニューロンで活性化されていることを示唆している。

海馬神経細胞の初代培養系では Ca^{2+} イオノフォアやタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドの処理により ARF4LmRNA が発現誘導した。

このことから虚血後の海馬ニューロンでの ARF4LmRNA の発現上昇は細胞内への Ca^{2+} 流入に伴う一過性のタンパク合成障害に起因している可能性が示唆された。

208 2P 2011

デキサメサゾンとは低酸素による細胞内カルシウムイオンの増加開始時期をスナネズミ海馬スライスで促進する

*足立尚登、**柳瀬尚人、**片岡喜由
(愛媛大学医学部麻酔・蘇生学*、生理学**)

カルシウムイオンの細胞膜を通しての移動は虚血による神経障害悪化の重要な要因とされている。糖質コルチコイドは虚血性神経障害を悪化させるので、デキサメサゾンが低酸素状態での細胞内カルシウムイオン濃度の変化に及ぼす効果をスナネズミ海馬スライスで検討した。

海馬スライスで低酸素による細胞内カルシウムイオン濃度の増加を、マイクロフルオロメトリー法で測定し、デキサメサゾン ($120 \mu\text{g/L}$) の細胞内カルシウムイオン蓄積に及ぼす効果を検討した。さらに、無カルシウムイオン状態での作用も検討した。

インヴィトロ低酸素で誘発された細胞内カルシウムイオン濃度増加の開始時期は、デキサメサゾン処置したスライスで20%短縮した。無カルシウムイオン状態では低酸素による細胞内カルシウムイオン濃度の増加が抑制された。デキサメサゾン処置はこの無カルシウムイオン状態での増加を、増加開始時期および増加の程度ともに亢進させた。

糖質コルチコイドによる虚血性神経障害の悪化には、低酸素による細胞内カルシウムイオン濃度の増加開始時期の促進が原因の一つとして示唆される。

209 2P 2012

デキサメサゾン虚血性脱分極の開始時期を早めてスナネズミ海馬の虚血性神経障害を悪化させる

足立尚登

(愛媛大学医学部麻酔・蘇生学)

細胞外電位の変化は、様々なイオンの膜移動をよく反映する。また虚血時のエネルギー欠乏によるイオン輸送障害は、急な脱分極を引き起こす。糖質コルチコイドは広く臨床使用されているので、デキサメサゾンの虚血性脱分極と組織学的変化に及ぼす影響を、スナネズミ海馬で検討した。

一過性前脳虚血(2.5分)で引き起こされる海馬CA1領域の電位変化を、虚血前60分にデキサメサゾン3 μ gを脳室内投与した動物と、生理食塩水を投与した動物で比較した。7日後の海馬CA1領域における錐体細胞の遅発性神経細胞壊死を観察することで、これら動物の組織学的変化を検討した。

デキサメサゾン虚血前投与は、虚血性脱分極の開始時期を23%短縮した。電位変化の程度や脱分極からの回復時間に変化はなかった。デキサメサゾン処置は、海馬CA1領域の錐体細胞を組織学的に悪化させた。

糖質コルチコイドによる虚血性神経障害悪化の原因の一つとして、虚血性脱分極開始時期の短縮が示唆される。

210 2P 2013

超低タール・ニコチンたばこの体循環および脳循環動態におよぼす影響

五味 慎太郎、川崎 仁志、美原 盤*、岡安 裕之*

(青山学院大学保健管理センター、

脳血管研究所美原記念病院*、

聖路加国際病院神経内科*)

我々は既に禁煙指導に用いられているニコチンガム(2mg/個含有)が、脈拍、脳血流速度を増加させ、脳血流に対する影響が体循環に対する影響より大である事を報告した。従来、喫煙の脳循環動態におよぼす影響については様々の報告があり、多くは短期的には脳血流量を増加させるが、長期的には減少させるとしている。一方近年、超低タール・ニコチンたばこの売り上げが増加している。そこで、今回は transcranial Doppler 法(TCD)を用いて超低タール・ニコチンたばこ(ニコチン 0.1mg/本含有)喫煙の体循環・脳循環動態におよぼす影響を検討した。

健常成人喫煙者13名(平均年齢は28.4歳)を対象とした。10時間以上禁煙させた後に、安静仰臥位を10分以上とらせた。次に非観血的に血圧・脈拍を監視しつつTCDにより、中大脳動脈起始部の血流速度(V)および pulsatility index (PI)を超低タール・ニコチンたばこ喫煙前および喫煙中8分まで測定した。

喫煙後、血圧・PIは有意な変化を示さなかった。一方、脈拍は喫煙後増加する傾向を示し、Vは17.8%増加した。血圧・脈拍の変化の程度とV・PIの変化の程度とのそれぞれの関係を検討したが、一定の関係はみられなかった。

超低タール・ニコチンたばこ喫煙により脳血流速度は増加したが、ニコチンガム使用後に観察された様な体循環に及ぼす影響の程度との間に一定の関係を示さなかった。ニコチンガムとの違いは、ニコチン以外の成分等の循環動態に及ぼす影響による可能性が考えられた。

211 2P 2014

海馬 CA1 錐体細胞からの BDNF 輸送低下が
遅発性神経細胞死に先行する山崎靖人¹、茂野卓²、古川美子³、古川昭栄⁴¹ 大鵬薬品工業(株)、² 関東労災病院脳外科、³ 愛知
文教女子短大、⁴ 岐阜薬科大分子生物学教室

脳虚血負荷により脳内の Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA が上昇することが知られているが、蛋白レベルの変化についてはほとんど報告されていない。そこで、我々は BDNF に対する特異ポリクロナル抗体を作製して、ラット一過性前脳虚血後の海馬における BDNF 免疫染色性の変化について検討した。また、BDNF 受容体、TrkB の免疫染色性の変化も比較検討した。

ラット一過性前脳虚血モデルは、pulsinelli らの方法を改良し、F344 ラットに 10 分間の前脳虚血を負荷した。再開通 3, 6, 12, 24 時間および 7 日目に観察した。抗 BDNF 抗体は BDNF 特異ペプチドをウサギに免疫して作製した。また、抗 TrkB 抗体は、Santa Cruz より購入した。免疫組織染色は、パラフォルムアルデヒド固定凍結切片で ABC (avidin-biotin peroxidase complex) 法を用いた。

再開通 3-24 時間では海馬 CA1 錐体細胞に変化は見られなかったが、7 日目には選択的神経細胞死が認められた。正常脳において、抗 BDNF 抗体により CA1-CA3 錐体細胞および歯状回顆粒細胞が濃染し、stratum radiatum は軽度にも染まった。また、抗 TrkB 抗体による染色性は、抗 BDNF 抗体とほぼ同様であったが、特に CA1 stratum radiatum の樹状突起が濃染した。虚血一再開通後早期に、海馬 CA1 領域の錐体細胞層と stratum radiatum 間に染色性に大きな違いが認められた。錐体細胞層において、BDNF と TrkB に対する染色性は両方とも同様に、再開通後 3-12 時間において一過性に上昇した。一方、stratum radiatum においては、TrkB に対する染色性には何ら変化は見られなかったが、BDNF に対する染色性は著しく低下した。

これら染色性の変化から、虚血一再開通後に樹状突起からの BDNF 遊離が抑制され、その後神経細胞からの BDNF の輸送の低下が引き起こされた可能性が考えられる。この CA1 領域での BDNF autocrine 作用の異常が遅発性神経細胞死を招く原因の一つと思われる。

212 2P 2015

不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞における血
液脳関門特異的形質の誘導祖父江和哉¹、大橋章雄²、山本直樹²、勝屋弘忠¹、
浅井清文³、加藤泰治³¹ 名古屋市大・医・麻酔蘇生学、² 同・薬・製剤、³ 同・
分子医研・生体制御

血液脳関門 (B-BB) は脳の恒常性を維持する機構であるが、生体内では B-BB に特異的な形質を誘導する因子は単一ではなく、複数の因子が複雑に関与していると思われる。retinoic acid は様々な細胞において分化を誘導することが知られているが、今回、以前我々が不死化したウシ脳毛細血管内皮細胞を用い、retinoic acid による B-BB 特異的形質の誘導を試みた。

以前ウシ脳より単離した脳毛細血管内皮細胞を SV40 large T-antigen により不死化して得た t-BBEC-117 を用い、1 μ M あるいは 5 μ M all-trans-retinoic acid (3% FCS 添加 DMEM) で刺激し、脳毛細血管内皮細胞に特異的な形質の内、形態・L-glucose 透過性・alkaline phosphatase (ALP) 活性・glucose transporter (GLUT-1) の発現ならびに 2-deoxy-D-glucose 取り込みについて検討した。

形態的には t-BBEC-117 は脳毛細血管内皮細胞に特徴的な紡錘形であるが、retinoic acid 刺激では目立った形態変化はなかった。また、細胞間隙のみを通過する L-glucose の透過性は 1 μ M retinoic acid 刺激により control と比較して約 20% 低下し、さらに同条件下における細胞数に変化はなかったことから、retinoic acid 刺激により細胞間が tight になったと思われる。次に、ALP 活性は脳毛細血管内皮細胞で比較的高いといわれているが、1 μ M retinoic acid 刺激で約 3 倍に、5 μ M retinoic acid 刺激で約 22 倍となった。最後に、glucose の輸送系として脳毛細血管内皮細胞に存在している GLUT-1 について mRNA の発現を RT-PCR で調べたところ、1 μ M retinoic acid 刺激で発現は増強し、さらに 2-deoxy-D-glucose の細胞内への短時間での取り込みも約 1.3 倍となった。

以上の結果から、retinoic acid の分化誘導により、t-BBEC-117 における B-BB 特異的形質の誘導・増強が生じることを確認した。また、今後 t-BBEC-117 は B-BB に関連した研究に使用できる可能性があると思われる。

213 2P 2016

脳血流慢性低灌流ラットの脳内部位
特異性はなぜ生じるのか？

田中健一、和田尚子、近藤洋一*、野村正彦、
小川紀雄*
(埼玉医科大学 第一生理学、*岡山大学 医学部
神経情報学)

脳は虚血負荷に対して弱い臓器であるが、脳内の部位ごとに虚血に対する感受性が異なることも知られている。我々が脳血管性痴呆の病態モデルとして提案している、脳血流慢性低灌流ラットにおいても、脳内情報伝達機能障害が部位によって異なることが明らかになりつつある。そこで、脳血流慢性低灌流負荷に対する脳内部位の感受性の違いを明らかにする目的で、局所脳血流量の測定と免疫組織化学による検討を行なった。慢性低灌流ラットはベントバルビタール (35mg/kg, i.p.) 麻酔下で9週齢のウイスター系雄性ラットの両側総頸動脈を永久結紮することで作成した。局所脳血流量は前頭皮質、海馬、線条体、視床を中心にレーザー血流計を用いて測定した。その結果、両側総頸動脈結紮により、前頭皮質と線条体では約40-50%の低下を示したのに対し、海馬では30%程度の血流低下に止まった。また、視床では、80%以上の血流が維持された。この局所脳血流量の変化は、低灌流負荷12週後の時点においても、その傾向は変わらず、前頭皮質と線条体での血流低下は従来虚血侵襲に対して最も弱いとされていた海馬よりも顕著に認められた。一方、組織学的検討結果から、脳梁などの脳白質と線条体において特徴的な細胞傷害が認められたものの、低灌流負荷時間の長さによる違いは明らかではなかった。また、大脳皮質や海馬においても細胞傷害が認められたが、その出現はまれであり、慢性低灌流ラットにおける特徴的な組織学的変化とは思われなかった。次に線条体で認められた細胞傷害の特徴を明らかにするために、神経細胞、アストロサイト、ミクログリアの特異的マーカーを一次抗体に用いて免疫組織化学を行なったところ、神経細胞死であることが示された。以上の結果より、慢性低灌流負荷による細胞傷害の脳内部位特異性は前頭皮質と線条体の結果からも明らかな様に、局所脳血流量への影響の違いだけでは説明が付かないことが示唆された。

これらの結果を踏まえて、神経細胞死に対する密接な関与が示唆されている活性酸素種についても検討することとした。脳血流慢性低灌流ラットにおける活性酸素種の変化を明らかにするために、過酸化脂質量と代表的な生体内消去系であるSODの活性を指標として評価する。

214 2P 2017

AP1 結合能上昇の虚血性神経細胞死への関与

倉本展行、東 泰孝**、荻田喜代一、章 龍*、
柳瀬尚人*、三谷 章*、片岡喜由*、米田幸雄
(摂南大学薬学部薬理学研究室、*愛媛大学医学部
第一生理学教室、**現 大阪歯科大学薬理学教室)

転写制御因子は遺伝子 DNA 上の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。演者らは、第 39 回本学会において海馬内特定部位における転写制御因子 activator protein 1(AP1)の DNA 結合能が、一過性脳虚血負荷後に著明に上昇することおよび、持続的な AP1 結合能上昇と虚血抵抗性との間には何らかの相関性が存在する可能性を報告した。今回は、AP1 結合能上昇の虚血抵抗性出現メカニズムへの関連性を追求する目的で、虚血耐性獲得後ならびに、神経細胞脱落後の虚血負荷に伴う AP1 結合能の変動について解析した。

虚血負荷は、スナネズミの両側総頸動脈を脳内温度固定下で 2~5 分間結紮することでおこなった。虚血耐性実験の場合、2 分間虚血負荷後血流再開通 48 時間目に、さらに 5 分間虚血を負荷した動物を用いた。また、反復負荷の実験の場合は、5分間虚血負荷後神経細胞が完全に脱落する 14 日目に、再度 5 分間虚血を負荷した動物を用いた。最後の血流再開通各時間後に、脳内各部位から調製した細胞核抽出液中の転写制御因子の DNA 結合能を、ゲルシフトアッセイにより測定した。

耐性獲得動物について、AP1 結合能の変動を海馬内各部位について検討した結果、虚血抵抗性の高い CA3 野、および歯状回だけでなく、本来虚血脆弱性を示す CA1 野においても、持続的な AP1 結合能上昇が観察された。また、反復負荷の場合も、これら 3 部位で持続的な AP1 結合能上昇が認められた。さらに、単回負荷や反復負荷動物、および虚血耐性獲得動物の海馬 CA1 野 AP1 結合能に対する V8 プロテアーゼによる限定分解の効果を解析したところ、いずれの CA1 野 AP1 結合能に対しても同プロテアーゼはそれぞれ異なる影響を与えることが判明した。以上のことより、遅発性神経細胞死の発症メカニズムに特定の機能蛋白質の発現が関与する可能性が示唆される。

215 1P 1072

ヒト羊膜上皮細胞におけるカテコールアミンの合成と分泌能について

M. Elwan, 桜川宣男

(国立精神・神経センター神経研究所 第5部)

ヒト羊膜上皮 (HAE)細胞は同種移植により急性拒絶反応を惹起しない細胞である。最近我々は、この細胞における種々の神経細胞遺伝子の発現を証明した。今回はカテコールアミン(CA)代謝を検討し、その合成と分泌能の存在について報告する。

HAE細胞は既報のごとくに分離、培養した。初代培養細胞を用いて、HPLC-ECDにより分析した。

培養HAE細胞の抽出液にはNE (ノルエピネフリン, DA (ドパミン) 及び DOPAC (3,4 - dihydroxyphenylacetic acid)を検出した。それぞれ1.04±0.02 (DA)、0.97±0.06 (DOPAC)、8.68 ±0.75 (NE) ng/mg prot である。CAの前駆物質であるL-チロシンおよびチロシン水酸化酵素(TH)の補因子であるテトラヒドロバイオプテリンを添加した培養液で培養すると、CAの合成が有為に増加した。これはHAE細胞におけるCAの合成を示唆する。これに対して、THの代謝阻害剤である α -methyl-p-tyrosine で処理すると、16.08 ±0.34 (NE)と1.76 ±0.11 (DA)が8.00 ±0.58 (NE)と0.47±0.02 (DA)に減少した。これもHAE細胞におけるCAの合成を支持する所見である。さらに培養液中のCA量を検出できたが、CAの細胞外への分泌能を示唆する所見である。また50 mM K⁺含有培養液で培養すると、培養液中へ分泌するCA量が増加した。即ち、NEレベルは29.45 ±0.93 nMから40.24±0.81 nM, DAレベルは7.95±0.15 nMから10.93±0.19 nMに上昇した。そしてDAの代謝産物であるDOPACの存在は、DAの代謝酵素を含有していることを強く示唆する。

以上よりHAE細胞がCAを合成し、分泌する能力を持っている所見を提示した。これはP19EC細胞と異なる所見である。このように多能性神経分化能を持ち、同種移植による急性拒絶を惹起せず、CA合成と分泌能を有するヒト羊膜上皮細胞は、パーキンソン病などの神経変性疾患の細胞脳移植療法に有効に使用できる可能性を示している。

216 1P 1071

ヒト羊膜上皮細胞におけるアセチルコリン代謝の存在について

桜川宣男*, 垣下浩二*, 石井俊**, R. Thangavel*, 大杉圭子*, 三澤日出巳*** (*国立精神・神経センター神経研究所第5部, **日本大学生物資源科学部, ***東京都神経科学総合研究所)

ヒト羊膜は胎生8日目に外胚板が2分して形成される。その羊膜上皮(HAE)細胞は、培養系において神経細胞のマーカー遺伝子が発現してくることを報告した。今回我々はアセチルコリン(ACh)の合成と分泌について、検討したので報告する。

HAE細胞は帝王切開分娩により入手した胎盤より、分離して培養した。培養細胞を用いて、AChおよびコリン(Ch)をHPLC-ECDを用いて分析した(Misawa et al.法)。またコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の酵素活性(Flavine et al.法)を測定した。ChAT抗体(1:5, Boehringer)を用いて、免疫組織化学的検討を行った。次にヒト脳ChATのC-terminal peptideに対するウサギポリクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。さらにRT-PCR法にて、ChAT mRNAの発現を調べた。

ChAT抗体を用いた免疫組織染色では、HAE組織および培養細胞ともに陽性に反応する細胞が認められた。培養細胞中のChAT活性は24.9±8.5 pmol/mg/hrであった。細胞内の零時間Ch量は81.0±28.5 pmol/mg proteinであった。同じく零時間ACh量は539.1±48.1 pmol/mg protであった。培養液中へのACh量は経時的に増加し、3時間後では零時間の6倍以上であった。ウエスタンブロットでは、ヒト胎盤ChAT蛋白の分子量である70kDaに一致する主要バンドが検出された。RT-PCRでは対象として用いたヒト脳と一致したChAT mRNAのバンドを検出した。

我々はヒト羊膜細胞が同種移植により急性拒絶反応を起さず、神経細胞系の遺伝子を発現していることを報告してきた。今回は、この細胞にAChの合成と分泌が存在していることを証明した。アルツハイマー病や低酸素性脳症においてコリン作動性ニューロンの喪失或いは減少が見られる。細胞脳移植によるこれらの疾患治療が注目されているが、ヒト羊膜細胞は有望なドナー細胞としての特徴を備えていると考えられる。

217 1P 1070

大脳樹状突起スパインの細胞骨格に対するモノクローナル抗体の作製とその解析

程希丹、林謙介、白尾智明

(群馬大学医学部行動分析学教室)

樹状突起スパインはシナプスの形態的可塑性に重要な役割を果たしていると考えられているが、未だその細胞骨格の全体像が明らかになっていない。本研究では免疫沈降法を用いて、スパイン内の細胞骨格を調整し、それを免疫原としてモノクローナル抗体を作製した。

アクチン結合蛋白ドレブリンは大脳神経細胞樹状突起スパインに局在し、スパインのよいマーカーとして用いることができる。この局在性を利用して、ドレブリン結合細胞骨格複合体としてスパインの細胞骨格を調整した。すなわちヌードマウスから腹水を採取し、Protein A-Sepharose でアフィニティピーズを作製した。次にこれをモルモットあるいはラビット溶出物と反応させ、免疫沈降物を調整した。この標品には既に報告したように、主要蛋白としてはドレブリンの他にミオシン I, I I, V 及びアクチンとゲルソリンが含まれていた。このピーズをマウスに免疫し、その脾臓細胞と myeloma (P3U1) を融合し、Western blotting でスクリーニングした。その結果ミオシン様蛋白と結合する二種類のモノクローナル抗体 MAb G650, MAb Rb131 を作製した。今回は MAb G650 の解析結果について報告する。

MAb G650 は 220 K の蛋白を認識し、それはドレブリン、アクチン複合体中に含まれていた。220 K の蛋白はこの複合体から ATP によって離れることからミオシンであると考えられた。各組織抽出物をウェスタンブロットティングにより解析したところ、MAb G650 に対する抗原は神経組織にのみ存在し、他の非神経組織中には存在しなかった。また各組織から抽出したミオシンのうち、MAb G650 と反応したのは脳のミオシン II だけであった。以上より MAb G650 は神経特異的ミオシン II に対する抗体であると考えられた。

218 1P 1069

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構成因子の解析

熊ノ郷晴子、前川昌平

(京都工芸繊維大学大学院応用生物)

細胞膜における情報伝達は、突起伸長、細胞間接着、シナプス可塑性等、神経ネットワーク形成の基礎的過程である。細胞膜より得られた Triton X-100 に不溶性で低比重の画分 (Triton X-100 insoluble fraction of low density; TIF) に GPI-アンカー型タンパク質の N-CAM-120, Thy-1、神経成長円錐に多く存在する NAP-22, GAP-43、情報伝達に關与する三量体 G タンパク質、細胞骨格タンパク質のアクチン、チューブリンなどが存在しこの画分が情報伝達において重要な領域である可能性について昨年報告した。またアミロイド前駆体タンパクやプリオンタンパクもこの領域に存在することが最近報告された。この画分にはコレステロール等の脂質も多く含まれタンパク質と相互作用している可能性がある。そこで TIF に含まれるタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製すると共に、これら構成因子間の相互作用を知るために、この画分をさらに分画することを試みた。

2 週齢ラット脳より TIF を調製後、分画を 2 種類の方法で行った。一つは各種界面活性剤処理である。TIF に界面活性剤を終濃度 2% になるように加え、氷上に置いたあと遠心した。可溶化の指標として低比重性の有無を検討するために上清を終濃度 0.8M ショ糖になるよう調整し、ショ糖の密度勾配遠心をおこなった。遠心後、低比重の層と 0.8M ショ糖の層を回収し、含まれるタンパク質の解析を行った。他方は各種有機溶媒を用いた抽出である。TIF に等量の有機溶媒を加え攪拌後遠心し、有機溶媒層、中間層、水層、沈殿に分画した。

各種界面活性剤による処理では CHAPS、タウロデオキシコール酸等よりもコール酸が可溶化に有効であることを見出した。各種有機溶媒による抽出ではブタノール処理により Thy-1 に代表される GPI-アンカー型タンパク質や NAP-22, GAP-43 などが水層に回収されることを見出した。これらの処理において NAP-22, Thy-1 と挙動を共にするタンパク質と反応するモノクローナル抗体 6D5 を得た。現在この分子の解析を進めている。

219 1C MS6-5 1068

ニューロフィラメント欠損ウズラQuv胚の神経系におけるニューロフィラメント蛋白

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)

Quvは低分子量ニューロフィラメント蛋白(NF-L)のノンセンス変異によるニューロフィラメント欠損日本産ウズラである。これまで、成体QuvではNF-M, NF-Hもともに欠損していると報告されている。今回は発生途中でのNF-MとNF-Hについて検討した。

孵卵14-15日の胚を用いた。脊髄と筋肉を無固定のまま液体窒素で凍結し、クリオスタットで薄切しABC法で免疫染色した。抗体はウシNFsにたいするモノクローナル抗体を用いた。また、凍結乾燥切片を用い、イムノブロットを検討した。

抗ウシNF抗体は、イムノブロットで正常対照ウズラ神経組織のNF-M, NF-Hと反応し、見かけ上の分子量は、高リン酸化NF-M 160 kDa, 無リン酸化NF-M 130 kDa, 高リン酸化NF-H 170 kDa, 無リン酸化NF-H 130 kDaであった。Quv脊髄凍結乾燥切片のイムノブロットでは、正常対照よりNF-MとNF-Hの低リン酸成分が相対的に増加していたが、総量は減少し、両者の高リン酸成分もわずかにみられた。Quv脊髄と筋肉の免疫組織染色では、リン酸化非依存性抗NF-H抗体でコントロールに比較して脊髄運動ニューロン神経細胞体が強く染まり、脊髄灰白質、白質はわずかに染まり、脊髄根が軽度に染まった。筋肉内末梢神経もわずかに染まった。抗高リン酸NF-H抗体では、コントロールでは染まらない脊髄運動ニューロンが中程度に染まった。これに対し、抗NF-M抗体では細いながら、脊髄白質、末梢神経が抗NF-H抗体より強く反応した。

これらのことは、生体内で、NF-LがなくともNF-MとNF-Hは軸索遠位部に運ばれ、リン酸化し、その場でNF-MとNF-Hは重合しうることを示している。細胞体内にNF-MとNF-Hが多いことは、軸索内輸送の低下を示唆している。

220 1C MS6-4 1067

神経再生に伴うニューロフィラメント蛋白の動態変化

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)

神経細胞では、軸索損傷後1-2日の間に既存細胞骨格の再編成や細胞体における蛋白合成変化が起り、再生軸索の発芽と伸長が開始される。この過程で、ニューロフィラメント(NF)蛋白には大幅な合成抑制とリン酸化状態の変化が起ることが知られている。これまで三種のNFサブユニット蛋白(NF-H[200k], NF-M[160k], NF-L[68k])はほとんど全てが重合状態にあると考えられてきたが、NF-Hについては、正常軸索内でその約20%が可溶性であることを我々は見出し、昨年の本学会でも報告した。今回は、このようなNF-Hの溶解性を中心に、再生に伴うNF蛋白の動態変化や、その軸索内輸送との関連を検討した。

ラット脊髄前角部にL-[³⁵S]メチオニンを注入し、2-4週後に前根および坐骨神経を摘出して、6mmの連続切片とした。損傷群では、摘出1週間前に大腿中央部に凍結損傷を加えた。フォスファターゼ阻害剤を含む1%Triton緩衝液を用いて各切片中の蛋白を可溶性と不溶性に分別後、SDS電気泳動で分離し、NF-H, NF-L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。

正常神経では、NF-H全体の溶解性は細胞体からの距離によらずほぼ一定(20%)である。損傷神経では、損傷後1週間でWaller変性により損傷部位より遠位側のNF蛋白がほぼ完全に消失する。その後、新たに伸長する再生軸索内では、NF-Hの溶解性が高く、そのC-末端側のリン酸化程度は低い。一方、損傷部位より近位側の変化を軸索内輸送途上の標識NF蛋白によって検索すると、NF-Hの溶解性上昇とともに、NF-L量の相対的低下が明らかになった。これらの変化は標識蛋白がより細胞体に近い位置にあるほど大きい。以上の結果から、NFの脱重合のみでなく、NF-Hの選択的脱離によってもNFの構造や安定性が調節されていることが示唆される。

221 1P 1066

若齢ラットと老齢ラットニューロフィラメントのPKAによるリン酸化

内田敦子*, 久永真市** (*東京工業大学生命理工学部, **東京都立大学理学部生物学科)

ニューロフィラメント (NF) は、分子量の異なる H, M, L の 3 つをサブユニットとする神経細胞に特異的な中間径繊維で、軸索細胞骨格の最も主要な構成成分である。NF の合成は細胞体で行われ、1日に1mm 程度の遅い軸索輸送により軸索末端側へと供給されている。しかし、この輸送機構については殆どわかっていないのが現状である。老化に伴い NF の軸索輸送速度が選択的に低下するという報告を基に、老齢ラットと若齢ラットの NF について調べ、昨年の本大会で次のようなことを報告した。老齢ラットの軸索内の NF は密にパッキングされており、単離 NF は長く、また凝集していることを、遠心分離法や電顕観察より明らかにした。今回は、これらの違いの要因を明らかにするために、N 末頭部の A キナーゼによるリン酸化に着目し、解析を行ったので、その結果について報告する。

NF は N 末頭部のリン酸化により重合が制御されている。N 末頭部のリン酸化状態に若齢ラットと老齢ラットで違いがないかどうか、まず軸索内の N 末頭部キナーゼと考えられる A キナーゼと、そのリン酸化部位を脱リン酸化するプロテインフォスファターゼ 2A の量と活性について調べた。しかし、量、活性ともに差は認められなかった。そこで、NF のリン酸化されやすさを精製した A キナーゼを用いて調べた。若齢ラットに比べ老齢ラットではリン酸化される速度が遅かった。老齢ラットの NF を、尿素で一旦脱重合した後再構成すると凝集しなくなる。そのような再構成 NF を同様に A キナーゼでリン酸化したところ、若齢、老齢ともにリン酸化速度は上昇したが、老齢ラットのリン酸化速度は若齢ラットより遅かった。このことから、老齢ラットでの A キナーゼによるリン酸化速度の減少には凝集以外の要因が考えられた。また老齢ラットでは NF-M のリン酸化量が若齢ラットの 1/3 に減少していた。この減少は凝集しているためでも内在性のフォスファターゼによるものでもないことが、再構成した NF やオキサリ酸存在下でのリン酸化実験により示された。若齢と老齢ラットについてサブユニット量を比較したところ、老齢ラットの NF-M の量は若齢ラットの約 2/3 であった。これにより M のリン酸化量低下の理由の 1 つは、蛋白量の減少であることが示された。

222 1P 1065

マウス大脳中隔野及び中脳黒質神経細胞表面抗原特異的モノクローナル抗体

遠藤真澄^{1,2}, 弘瀬秀樹³, 崔 得華¹, 中谷伸一³, 国下龍英¹, 田平 武¹

(¹国立精神・神経センター神経研疾病研究第六部, ²国立感染症研究所, ³新田ゼラチン)

「目的」脳・神経系の高次機能解明の一環として、分化神経細胞の未知の表面抗原に特異的なモノクローナル抗体を作成し、その抗体を利用した神経機能の解析を行う。

「方法」マウス胎児大脳中隔野由来神経細胞株 SN6 を免疫原として、ラット・モノクローナル抗体 Qo50 を作成した。Qo50 抗体をアフィニティカラム等により精製し、抗体特異性を免疫組織化学的に検討した。Qo50 抗体が認識する細胞表面抗原をウエスタンブロット、アフィニティ精製等により解析した。

「結果」マウス胎児中隔野由来神経細胞株 SN6 を特異的に認識するモノクローナル抗体 Qo50 (ラット IgG2a) は、新生 (5 日齢) マウス大脳における中隔野領域、海馬の歯状回領域の神経細胞と同時に、中脳の黒質領域における一部の神経細胞をも特異的に認識した。しかし成熟 (5 ヶ月齢) マウス大脳のいかなる領域の神経細胞、また新生及び成熟マウス脳組織におけるグリア細胞は認識しなかった。ウエスタンブロットにより Qo50 抗体が認識する抗原の検出を試みたが、SDS 変性した SN6 由来抗原に対して反応を示さなかった。そこで SN6 lysate を、Qo50 抗体アフィニティカラムにて精製、2 次元電気泳動により解析した結果、分子量 46kDa、pI 4.5-5 及び分子量 17kDa、pI 3.5-4 の 2 つのスポットが確認できた。

「考察」マウス中隔野由来神経細胞株 SN6 を免疫抗原として得られたモノクローナル抗体 Qo50 は、新生期のマウス脳の限られた部位の神経細胞を特異的に認識し、成熟マウス脳の神経細胞および両者のグリア細胞は認識しない抗体であった。Qo50 抗体が認識する抗原の発現が、神経細胞の機能と分化において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

(ヒューマンサイエンス)

223 1P 1064

節前および節後神経切断手術後、白鼠上頸部交感神経節内ニューロン変性の進行に伴う、グリア線維性酸性タンパク (GFAP) の変動
山内理充、安藤正人*、加藤寿章、藤田公和、小川和人、坂本秀夫**、永田 豊

(藤田保健衛生大学・医学部・生理学Ⅱ教室、*愛知学泉大学・解剖生理学研究室、**藤田保健衛生大学・総医研・分子生物学)

我々は以前から、摘出後も長時間シナプス伝達機能を保持し、高い物質代謝能を有する白鼠上頸部交感神経節 (SCG) を用いて、脱分極刺激などを加えた場合に、SCG 内でシナプス伝達過程に伴う種々の生理・生化学的物質変動を測定してきた。また、節前神経切断 (Den) および節後神経切断 (Axo) 手術を行い、種々の生化学変動を示す SCG 内の局在を細胞レベルで明らかにしてきた。

Den を行って 1 週間後には節前神経線維末端が Waller 変性をおこすが、節後ニューロンは保存される。一方、Axo を行うと節後交感神経細胞体の変性・脱落を来し、反応性にグリア細胞の増殖が著明に認められた。そこでアストログリアに特異的なタンパクのグリア線維性酸性タンパク (GFAP) の変動を免疫抗体法を用いて追究した。

成熟ラットをベントバルビタール麻酔下に、Den および Axo 手術を行い、1,3 および 7 日後にラットを屠殺し、SCG を摘出して、SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写した後、抗 GFAP 抗体で染色し比較した。

GFAP は分子量 50 kDa の位置に一本の明瞭なバンドとして検出された。手術後の SCG 標本では、50 kDa より低分子領域に何本かの GFAP 陽性バンドが検出された。これらの GFAP 断片は、術後日数の経過と共に増殖して認められ、Den-SCG よりも Axo-SCG で増加していた。節後交感神経ニューロンの変性を知る指標として、SCG 内ノルエピネフリン (NE) 含量を測定すると、一週間後で Axo により Intact の 1/2 まで減少した。しかし、SIF 細胞に含まれるドーパミン含量には大きな変動は見られなかった。

これらの結果より、SCG 内では Axo により主として神経細胞体の変性・脱落を来し、グリア細胞が増殖を来す過程が、GFAP の増加と NE の減少という神経化学的測定においても確かめられた。

224 1P 1063

6-アミノニコチン酸アミドによるグリア細胞毒性のメカニズム

馬渡一浩¹⁾、本間啓子¹⁾、杉谷加代¹⁾、高寺恒雄³⁾、加藤聖²⁾ (金沢大・医・保健¹⁾、神経情報研²⁾、北陸大・薬³⁾)

ニコチン酸アミド (NA) の類似化合物である 6-アミノニコチン酸アミド (6AN) は、選択的なグリア毒であることが知られている。我々は、DL- α -アミノアジピン酸のグリア毒性機序については、酸化的ストレスによることを明らかにしてきた。ところが、6AN については毒性機序の詳細については不明である。6AN による細胞死はビタミン E では抑えられず、NA で抑制されることから、毒性機序は酸化的ストレスではなく、代謝系阻害の関与が考えられる。そこで、6AN の毒性機序への糖代謝およびエネルギー代謝の関与を調べるため、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検討した。

C6 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、色素排泄試験または LDH 活性の測定により行った。糖代謝中間体および ATP はそれぞれ酵素法と生物発光法により測定した。

C6 グリオーマ細胞に 6AN (0.2 mM) を添加すると、24 時間後から徐々に細胞の変性がおこり、48 時間後には約 60 % の細胞が死滅した。また、この細胞死は培養開始時に NA (1 mM) を同時添加することで、完全に抑制された。培養開始 16 時間後の糖代謝中間体量を測定したところ、グルコース-6-リン酸 (G6P) 量やフルクトース-6-リン酸 (F6P) 量は、6AN を添加してもコントロール とほぼ同量であった。ところが、6AN を加えるとコントロールの数十倍量の 6-ホスホグルコン酸 (6PG) が細胞内に蓄積していた。また、細胞内 ATP 量が 6AN を加えるとコントロールの 1/10 以下に低下していた。この 6AN による 6PG の増加と ATP の減少は NA の同時添加により抑えられた。さらに、*in vitro* の実験から、6PG がグルコースリン酸イソメラーゼを阻害することがわかった。従って、6AN の細胞毒性機序には解糖系、ペントースリン酸経路および ATP 生成の阻害が関与すると考えられる。グリア選択毒性機構についても、現在検討中である。

225 1P 1062

Nitric Oxide による神経細胞障害は細胞内
cGMP 上昇により抑制される

鴻上 繁¹、尾形直則¹、奥村秀雄¹、柴田大法¹、中
村洋一²、片岡喜由²

(愛媛大学医学部整形外科教室¹、生理学教室²)

中枢神経の外傷や虚血による神経細胞障害時には神経組織への直接傷害に続く2次的神経変性メカニズムとして、細胞外液中のグルタミン酸濃度上昇とともにnitric oxide(以下NO)の生成が注目されている。本研究では、ラット脊髄由来培養神経細胞を用いてNOによる神経細胞死を測定し、神経細胞傷害のメカニズムを検討し、そのモデルを使って細胞内伝達物質であるcyclic nucleotide (cyclicAMP、GMP)の神経細胞死に対する影響を検討した。

胎生14日ラットより初代培養した脊髄神経細胞をNO donorであるsodium nitroprusside (以下SNP)を含む培養液に24時間暴露し、傷害された神経細胞からその培養液中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定し、神経細胞傷害の指標とした。さらにSNP暴露時に細胞内cyclic AMP、GMP濃度を上げるため、細胞膜透過性のあるcyclic nucleotideである8-bromo cyclic AMPまたは8-bromo cyclic GMPをそれぞれ加え、それらの神経保護作用の有無も検討した。

培養神経細胞より放出されたLDH活性は、SNPにより濃度依存性(6.25~100 μ M; EC50=12 μ M)に上昇した。10 μ MのSNPによるLDH放出は100 μ Mの8-bromo cyclic AMPを同時投与することによっては変化することがなかったが100 μ Mの8-bromo cyclic GMPを同時投与すると約30%まで抑制された。この結果は細胞内cyclic GMPを上昇させることにより神経細胞のNOに対する抵抗性が著明に向上することを示唆しており、細胞傷害時にcyclic GMP濃度を上昇させるような操作、例えばphosphodiesterase inhibitorの投与等を行うことによって神経細胞保護をなしうる可能性を示している。

226 1P 1061

ドパミン神経毒MPP⁺によるGH3細胞の細胞
死およびEGFによる保護作用

吉永 至宏、村山 俊彦、野村 靖幸

(北海道大学薬学部薬効学教室)

ドパミン神経毒MPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridinium ion)の細胞内への取り込みおよびその細胞傷害の作用機序を、ラット下垂体由来GH3細胞を用いて検討した。GH3細胞にはラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞と比較して、低レベルであるがチロシン水酸化酵素の蛋白質レベルでの発現が認められた。また、ドパミンを含むカテコールアミンの含有も低濃度ながら認められた。 [³H]MPP⁺のGH3細胞内への取り込みはMPP⁺の濃度依存的に起こり、その取り込みはドパミントランスポーターの阻害薬であるnomifensine (100 μ M)を共存させると約50%抑制された。200 μ M MPP⁺をGH3細胞に処理すると、処理後24時間以降に乳酸脱水素酵素(LDH, lactate dehydrogenase)の細胞外漏出が、さらに、処理後48時間後にはDNAの断片化が認められた。また、50 ng/ml EGF (epidermal growth factor)前処理によりMPP⁺による細胞死は抑制された。しかし、NGF(nerve growth factor)やBDNF(brain-derived neurotrophic factor)前処理ではMPP⁺による細胞死は抑制されなかった。したがって、GH3細胞におけるMPP⁺誘発細胞死の抑制はEGF特異的であることが示された。これらの知見から、GH3細胞において、1) MPP⁺はドパミントランスポーターを介して細胞内に取り込まれ細胞死(アポトーシス)を引き起こすこと、および2) EGFはMPP⁺により誘発される細胞死を抑制することが示された。GH3細胞はMPP⁺により誘発されるドパミン神経の選択的細胞死の機序の解明およびEGFの作用を研究する上での有用なモデル細胞であると考えられる。

227 1P 1060

培養神経細胞における H_2O_2 の毒性に対する塩酸bifemelaneの保護効果

飯田基之, 宮崎育子, 岩田恵美, 小川紀雄
(岡山大学・分子細胞研・神経情報学部門)

われわれは塩酸bifemelaneが虚血後あるいは老化に伴う神経伝達物質, 神経伝達物質レセプターの変化に対する防御・回復効果を有すること, さらには $\cdot OH$ ラジカルを消去する効果があることなどを報告してきた。現在, 神経細胞の変性・破壊に活性酸素種・フリーラジカルが深く関与すると考えられていることより, 塩酸bifemelaneはフリーラジカルを消去することにより神経細胞の破壊を防御している可能性が考えられた。そこでラット・ニューロプラストーマB50細胞を用いて H_2O_2 の神経毒性に対する塩酸bifemelaneの保護効果について検討した。 H_2O_2 添加後の細胞傷害率はLDH-assayにより評価した。

B50細胞培養液に様々な濃度 (f.c. 0, 10, 30, 100, 300 μM , 1, 3, 10 mM) の H_2O_2 を添加し, 24時間インキュベートした後LDH-assayを行った。 H_2O_2 の処置濃度依存的にB50細胞の傷害率は増大し, 100 μM で約50%の細胞傷害率が得られた。

B50細胞を塩酸bifemelane (5 or 10 μM) 入りの10%FCS-DMEMで2日間あらかじめ培養した後, H_2O_2 (75 or 100 μM) を添加した場合, H_2O_2 による細胞毒性は有意に抑制されていた。10 μM 塩酸bifemelane で前処置した場合に H_2O_2 に対する保護効果が最も高いことが分かった。

さらに, 塩酸bifemelaneの過酸化脂質生成抑制効果についてthiobarbituric acid(TBA)法を用いて検討した。B50細胞をbifemelane (10 μM) で2日間前処置することにより, B50細胞の不飽和脂肪酸の自動酸化が未処置群の約54%にまで抑制されることが明らかになった。

以上の結果より, 塩酸bifemelaneの神経細胞保護効果はフリーラジカルを直接捕獲している効果に加えて, 塩酸bifemelane処置により細胞内の抗酸化機構が亢進していることに起因している可能性が考えられた。

228 1P 1059

酸化的ストレスに対する小脳顆粒細胞ニューロンの抵抗性とアコニターゼ酵素活性の変化
田淵 明子¹, 津田 正明²

(¹岡山大学薬学部微生物薬品化学教室, ²富山医科薬科大学薬学部衛生化学研究室)

活性酸素(ROS), および一酸化窒素(NO)の産生増加は, 脳虚血等の神経細胞死に付随した現象の一つである。我々は, 神経細胞死とROS, NOとの関連性を明らかにする目的で, ROS, NOの標的分子となりうる酸化還元(redox)感受性分子に注目してきた。今回は, 鉄-硫黄(Fe-S)クラスターを有するredox感受性酵素, アコニターゼに着目し, 小脳顆粒細胞ニューロンに種々の酸化的ストレスを与えた際の酵素活性の変化を測定した。

小脳顆粒細胞ニューロンの培養系は, 生後8日目のICRマウスより調製した。25 mM KCl, 10 % FCS存在下で4日間培養した後, 5日目に5 mM KCl, あるいは25 mM KClを含む無血清培地に交換し, 3時間後に種々のラジカル産生剤を添加した。そして適時, 細胞抽出液を調製し, アコニターゼの活性測定に用いた。同じ細胞抽出液を乳酸脱水素酵素(LDH)の活性測定に用い, 細胞死の指標とした。

顆粒細胞ニューロンに100 μM H_2O_2 を添加すると, アコニターゼの活性は一過的に減少し, 1時間後には回復した。また, 細胞内スーパーオキシド($O_2^{\cdot -}$)産生剤のPMSやNO供与体のSNAPでは, 時間依存的な減少が認められた。なお, redox非感受性で, Fe-Sクラスターが無いフマラーゼの酵素活性には, ほとんど変化は認められなかった。

また, 上記のような酸化的ストレスによるアコニターゼの活性変化は, 5 mM KClの非脱分極状態 (low K^+)と25 mM KClの脱分極状態 (high K^+)で異なっており, 予想に反してlow K^+ の方が, high K^+ よりもアコニターゼの不活性化が起こりにくく, しかも酸化的ストレスによる細胞障害も低い傾向が認められた。

以上の結果から, アコニターゼは細胞内ROS, NO量のindicatorとみなすことができる。

小脳顆粒細胞ニューロンは, high K^+ で生存が維持され, low K^+ でアポトーシスにより死が誘起される。にもかかわらず, 酸化的ストレスによるアコニターゼの不活性化や細胞障害はlow K^+ の方が抵抗性が高い傾向にあった。これは, 時間的に早い段階ではlow K^+ が緩和なストレスとして細胞に影響し, 虚血耐性と同様の現象が起こっている可能性を示唆するものである。

現在, この現象をさらに明らかにするために, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, heat shock proteins等の発現変化について検討しており, 今後はcytosolicアコニターゼであるiron regulatory proteins (IRPs)のRNA結合活性の変化との関連についても調査していく予定である。

229 1P 1058

中枢ニューロンの高酸素負荷による細胞死
：ヒドロキシラジカルとグルタミン酸の関与
石川 保幸、西尾 チカ、沼川 忠広、畠中 寛
(大阪大学蛋白質研究所生合成部門)

様々な神経疾患や老化、脳虚血などによってニューロンは障害を受けることが知られており、この障害には酸素ラジカルが関与していると考えられている。この障害とラジカルとのメカニズムの解明が早急になされる必要がある。

私達は培養中枢ニューロンをインキュベーターの酸素濃度を50%にする条件、つまり高酸素負荷をかけることにより、酸素ラジカルによってアポトーシスを誘導する *in vitro* の系を用いて、解析を行った。

今回、学習や記憶に重要な役割を果たす海馬を用い、酸素ラジカルによるアポトーシスにおけるグルタミン酸毒性の役割について新たな知見が得られたので報告する。

20日胚ラットから摘出した海馬は既報に従い分散培養し、1.5日後無血清完全合成培地に移し、50%酸素気相下および、コントロールの9%酸素気相のCO₂インキュベーターで培養を続けた。50%酸素気相による死の誘導には新たなRNA及び蛋白質合成が必要であり、高酸素負荷後約12時間目から細胞死を生じる。この海馬ニューロンの細胞死は過剰の酸素によって生じるため、予想通り、カタラーゼと鉄イオンキレート剤の添加によって抑制された。この結果により、生成する活性酸素種の一つである、ヒドロキシラジカルが死に関与することが示唆された。一方、予想外なことに、NMDAレセプターアンタゴニストである、MK-801によってもこの細胞死は顕著に抑制された。

この結果は、酸素ラジカルとグルタミン酸が、なんらかの形でお互いに関与し、それにより、死遺伝子が発現していると考えられる。

230 1P 1057

活性酸素によるニューロン死と発芽の促進
内田洋子, 五味不二也
(東京都老人総合研究所神経病理・超微形態部門)

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減少する成長抑制因子(GIF)には、神経栄養因子活性を抑制する作用のほかに、hydroxyl radicalを消去する作用がある。そこで、GIFが活性酸素のニューロンへの作用(細胞死と発芽促進)を抑えるのかどうかを培養大脳ニューロンを用いて検討した。

(1)GIFによる高濃度酸素下でのニューロン死の抑制:
5日間培養した大脳ニューロンを50%酸素下でさらに48時間培養すると、ニューロン生存率は約40%に減少したが、100nM GIF添加によってニューロン生存率は60%に増加した。Zn-メタロチオネインは50%酸素下でのニューロン生存率を増加させなかった。

(2)培養アストロサイトからのGIFの分泌:アストロサイトの培養上清中のGIF量をELISAで定量したところ、48時間で、細胞内GIFと同程度のGIFがmedium中に存在していた。これに対し、培養上清中のLDH量は細胞内LDH量の約7%であった。

(3)GIF antisense oligonucleotideによる高濃度酸素下での細胞死の促進:アストロサイト上にニューロンを蒔き4日間培養した。Cocultureしたニューロンの生存率は、50%酸素下で24時間培養しても、減少しなかった。Antisense-oligoとしてGIF cDNA 53-78に相当するS-oligonucleotide(20μM)をcocultureに添加したところ、48時間後のGIF量は約1/4に減少していた。そこで、antisense-oligo添加36時間後に、cocultureを50%酸素下でさらに24時間培養したところ、ニューロン生存率は67.4±5%に減少した。

(4)鉄・過酸化水素下での突起形成とGIFによるその抑制:培養開始時より、20nM FeSO₄と50 nM H₂O₂を添加し、12時間後にニューロンからの突起数と突起長を計測したところ、無添加の場合よりもそれぞれが増加していた。GIFを鉄・過酸化水素と同時に添加したところ、ニューロンからの突起数や突起長は、無添加のそれよりも、減少していた。

(5)酸素ラジカルによるニューロン死と発芽に関与する遺伝子探索の試み:酸素ラジカルはニューロンに発芽と細胞死の両方を誘導することから、両者に共通して発現する遺伝子の単離をdifferential display法を用いて試みた。これまでに得られたのは、酸素ラジカルによる発芽の際と高濃度酸素による細胞死の際のcommitment pointで発現が抑制される遺伝子であった。

231 1C O-2

副腎髄質cyclic ADP-ribose生合成活性の調節機構

森田克也, 北山滋雄, 土肥敏博

(広島大学歯学部歯科薬理学講座)

NAD⁺代謝物である cyclic ADP-ribose (cADPR) は強力な Ca²⁺ 動員作用を有し, ryanodine 受容体の新しいメッセンジャーとして機能している可能性が示唆されている。しかし, 刺激に応答した cADPR 生合成やその調節機構は明らかでなく, その生理的役割は不明である。私達は神経細胞刺激-分泌連関における cADPR の生理的関連性について明確にすべく, 培養ウシ副腎クロマフィン細胞を用い, その生合成調節および Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) 機構のメッセンジャーとしての役割について検討を加えた。

cADPR 生合成酵素 (ADP-ribosyl cyclase) 活性は [³H] NAD⁺ および NGD⁺ を基質として用い, [³H] cADPR および cGDPR 産生量から評価した。

Digitonin で膜透過性としたクロマフィン細胞で cADPR は CICR 機構を感作し, 急峻で一過性の Ca²⁺ 遊離を引き起こした。ADP-ribosyl cyclase 活性は膜画分に強く認められた (J. Biol. Chem. in press)。Acetylcholine (ACh) および excess KCl に暴露した細胞から調整したホモジネートで ADP-ribosyl cyclase 活性を測定したところ, cyclase 活性は刺激後短時間で上昇していた。同様の活性上昇は forskolin および 8Br-cAMP 処置した細胞でも認めた。ACh による活性化は 8Br-cAMP による活性化とは異なり Ca²⁺ 流入に依存していた。cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素 (A-kinase) 阻害薬は ACh による活性化を抑制した。私達はすでに ACh がクロマフィン細胞で Ca²⁺ 流入を介して adenylate cyclase を活性化させ, 組織 cAMP 濃度を増加させることを報告してきている (J. Neurochem. 48, 243-247, 1987)。これらの知見を併せ考えると, ADP-ribosyl cyclase は A-kinase により活性化を受けること, ACh は Ca²⁺ による cAMP 産生を介して ADP-ribosyl cyclase を活性化することが示唆される。

以上, 副腎クロマフィン細胞において, 生理的刺激に応答して cADPR 生合成が調節されることを明らかにし, cADPR は CICR 機構の仲介する Ca²⁺ 遊離の内因性調節物質として機能していることを示唆した。

232 1C O-3

Delayed Extraction 法を導入した MALDI-TOF MS による脳組織のスフィンゴ糖脂質及び関連脂質の研究

武富 保, 原 厚, 上村敬一, 倉橋 寿, 杉山英子
(信州大学医学部加齢適応研究センター加齢生化学)

新しい技術が導入された Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) の高感度、高分解能によって pmol オーダーのスフィンゴ糖脂質及び関連脂質の同定が可能になった。この操作法を用いて脳組織、特に白質のみに極微量存在し、その化学構造も決定されて来ている Plasmalocerebroside が結節性硬化遺伝子をもつ遺伝性腎癌動物モデルの Eker rat (癌研実験病理部樋野興夫博士提供) の白質湿重量 100mg 以下から DE MALDI-TOF MS によって同定され、それらの分子種を解明することができた。それらは長鎖塩基と脂肪酸の組合せが d18:1C24:1, d18:1C24, d18:1C24:1h, d18:1C24h である Galactocerebroside に C16, C16:1, C18, C18:1 aldehydes が cyclic acetal linkage で結合していることが明らかとなった。

このような非極性スフィンゴ糖脂質が正常 Eker rat に比して癌化した Eker rat に顕著に増加していることが脳組織の結節性硬化症と関連するかどうかは今後の研究に俟たい。尚、ヒト脳に存在し、興味ある機能を示すことが報告されている Plasmalopsychosine は Eker rat がかなりの Plasmalocerebroside を含有するにもかかわらず見い出すことはできなかった。また、DE MALDI-TOF MS によって容易に同定できる Psychosine やその他リゾスフィンゴ脂質、及び Sphingosine, Ceramide なども見い出すことはできなかった。他方、灰白質に多いガングリオシドのうちジシアロ体までは DE MALDI-TOF MS によって同定できたが、それ以上のポリシアロ体については検討の余地があった。ガングリオシドの分子種数は脂肪酸が C18 と長鎖塩基 d18:1 と d20:1 の組合せで比較的少ない。哺乳動物種差やヒト脳では加齢や機能不全によって Sphingosine の炭素鎖の長さの違いが明らかに認められた。スフィンゴ糖脂質の機能が注目されている今日こそ、微量のスフィンゴ糖脂質の分子種まで明らかにしておくことが重要である。

233 1P 1056

延髄化学受容野への拍動性圧迫によるc-fosの発現

市田 竜也^{1,2}、山田 久夫¹、桂 昌司³(滋賀医大・第二解剖¹、京都府医大・第二内科²、川崎医大・薬理³)

頭側延髄腹外側野 (RVLM) 領域は中枢性血圧調節に重要な役割を演じるが、高分解能MRIおよびMRAを用いた本態性高血圧患者の観察では、走行変異した椎骨脳底動脈系によるこの部位への圧迫が有意に多くみとめられる。またラットの延髄腹側表面にlatex balloonによる拍動性圧迫を加えてその動物モデルとしたところ、この昇圧反応は交感神経活動の昂進を介して生じていることや、c-fos mRNA アンチセンスのRVLMへの注入によりこの昇圧反応が抑制されることなどが判明してきた。

今回の実験では、雄性ラットにウレタン麻酔をおこない、心電図同期下にて延髄腹側表面へ拍動性圧迫を加えた。10分後、血圧および脈拍は有意に増加した。圧迫60分後のRVLM/CVLM領域のc-fos mRNAはNorthern blot法による検索で、有意に増加していた。また圧迫直後または90分後のラット脳切片をc-fos抗体をもちいて免疫染色したところ、同領域にFos含有細胞数が有意に増加していた。二重免疫染色を施行すると、そのFos含有細胞の多くはカテコールアミンニューロンやエンドセリンA受容体をもつニューロンであることが判明した。一方、圧迫刺激をおこなった部位についてあらためて詳細に検討し、エリアを特定した。

以上により、延髄腹側表面への拍動性圧迫は、RVLM/CVLMのカテコールアミンニューロンの興奮を介して血圧上昇をもたらし、同時にc-fosの発現も誘導している。

なお、本研究は京都府医大・第二内科 森本聡、佐々木享、武田和夫、中川雅夫先生との共同研究である。

234 2C O-1

Ob-gene プロダクト、レプチン(Lep) の摂食抑制機序

大村裕¹、白石武昌²、佐々木和男³、新島旭⁴¹日本臓器製薬㈱生物活性科学研、²東海大医生理、³富山大工生体情報、⁴新潟大医生理

摂食により脂肪細胞が放出するLepは脳に働く満腹物質である。神経ペプチドY(NPY)は弓状核(ARN)で産出され室傍核に放出されて摂食を促進する。LepはARNのNPYmRNA活性を低下させる。これが摂食抑制機序の一つと考えらるが、NPYノックアウトマウスでLepは、正常マウスより強く摂食を抑制する。したがってLepの摂食抑制作用は不明である。この作用機序を明らかにした。

中枢性作用機序: 麻酔下ラットを用い、満腹(VMH)と摂食両中枢(LHA)のニューロンに、電気泳動的にLepを作用させた。VMHではブドウ糖受容ニューロン(GRN)の78%が、非受容ニューロンの37%がLepにより活動促進され、抑制ニューロンはなかった。LHAではブドウ糖感受性ニューロン(GSN)39%と非感受性ニューロン48%がLepにより抑制され、促進ニューロンはなかった。GRNとGSNは摂食に関与するニューロン群である。室傍核の小細胞群ニューロンでは12%がLepで促進され、抑制ニューロンはなかった。In vitro脳切片でARNニューロンは 10^{-11} ~ 10^{-10} M Lepで52%が抑制され、その80%はGSNであり、促進ニューロンはなかった。in vitroホールセルパッチクランプ下で、LepによりGRNニューロンは膜コンダクタンス上昇による脱分極を起こす。脱分極の逆転電位は-10-15mvであり、Lepは非選択性にカチオンチャネルを開口することが明らかになった。Lep受容体が異常なZuckerラットでは上述ニューロン群にLepは作用しなかった。

末梢性作用: ブドウ糖を肝門脈(PV)に投与すると摂食抑制が起こる。この作用機序は、PVに終末をもつ求心性迷走神経のブドウ糖感受性ユニットを抑制することによる。麻酔下ラットのPVにLep1~10pg投与すると量反応的にこのユニットが抑制される。

Lepの摂食抑制の作用機序は、したがって中枢性ならびに末梢性の両方によって行われている。

235 1P 1055

神経活動によって発現制御される細胞接着因子 Arcadlin の解析

杉浦弘子、加藤宏司[#]、入江康至^{*}、三木直正^{*}、山形要人(東京都神経研・分子神経生物、[#]山形大・医・第二生理、^{*}大阪大院・医・情報薬理)

神経の可塑性とは、入力刺激によってシナプス伝達効率やシナプス結合の形態学的変化が生じることであり、LTP (Long-Term Potentiation) はこの可塑性の電気生理学的な実験モデルである。LTP は時間的に異なる三相の成分からなり、第一相の維持には NMDA 受容体の開口と Ca^{2+} の流入、第二相はタンパク質の酸化とタンパク合成、第三相は新たな遺伝子発現がそれぞれ必要である。

我々は、海馬の cDNA ライブラリーから subtraction-differential hybridization 法を用いて、シナプス活動によって発現調節される新しい遺伝子 arcadlin を見出した。ラットを電撃痙攣刺激や LTP を生じる高頻度刺激を行ったところ、arcadlin mRNA は海馬顆粒細胞で急速に、そして一過性に誘導された。arcadlin mRNA は、刺激後 30 分で既に誘導され、約 2 時間をピークに 8 時間後も増加していた。また、小脳を除く脳の様々な領域にも発現していたが、他の IEG (Immediate Early Gene) と異なり、発現の生後変化は認められなかった。

塩基配列解析から Arcadlin タンパク質は、細胞外に 6 つのカドヘリンモチーフの繰り返し配列を持つ、分子量約 100 KDa、pI 5.1 のプロトカドヘリン様タンパク質であることが分かった。

そこで arcadlin 遺伝子を L 細胞に stable に発現させ、細胞接着活性を調べたところ、arcadlin を発現した細胞は Ca^{2+} 依存性に Arcadlin 細胞外ドメインタンパク質に結合した。またこの結合は、細胞外ドメインに対する抗体存在下で抑制された。

記憶の長期保持の分子機構として、我々は、シナプス活動によって誘導された遺伝子産物がシナプスに作用し、その結合を強化するメカニズムを考えている。Arcadlin はシナプス活動によって誘導され、 Ca^{2+} 依存性に homophilic に結合することから、この分子の更なる解析によって我々の仮説を分子レベルで証明できると考えている。

236 1P 1054

ニューロカン N-末端側断片のグリア性神経細胞周囲網への局在

松井ふみ子¹、西塚雅子²、青野幸子¹、大平敦彦¹⁽¹愛知県コロニー・発達障害研究所・周生期、²順天堂大学・医学部・第二解剖)

ニューロカンは神経系に特異的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンで、その発現量およびコアタンパク質の切断が発達に伴って変化することが知られている。成熟ラット脳ではニューロカンのコアタンパク質は完全に 2 つに切断され、N-末端側断片 (ニューロカン-N) および C-末端側断片 (ニューロカン-C) が生じる。そこで、これらの 2 つの断片のラット大脳における局在を調べるため、ニューロカン-N を認識するポリクローナル抗体 (PAb-291) およびニューロカン-C を認識するモノクローナル抗体 (MAb-1G2) を用い、免疫組織化学的検討を行った。光顕レベルでの観察では、ニューロカン-N は、大脳全体への均一な分布に加え、一部の神経細胞の周囲への分布が見られた。一方、ニューロカン-C は、大脳全体への均一な分布のみが観察された。成熟脳で見られたニューロカン-N の神経細胞周囲への局在は、生後 14 日のラットの脳では見られず、生後 29 日脳ではごくわずかの細胞で見られた。一方、ニューロカン-C はどの発達段階においても、神経細胞周囲への局在は示さなかった。次に、ニューロカン-N が神経細胞周囲のどのような部位に局在するのかを調べるため、PAb-291 および抗シナプトフィジン抗体を用いた二重染色を行った。その結果、ニューロカン-N はシナプスそのものには存在せず、その近傍に存在することが分かった。さらに、免疫電顕により神経細胞周囲の PAb-291 陽性部位を調べたところ、ニューロカン-N は、神経細胞の細胞体を取り囲むグリア細胞性神経細胞周囲網の細胞質に存在することが明らかとなった。これまで、ニューロカンは細胞外に分泌され、神経接着分子と結合することにより、神経細胞の接着や突起伸長を制御していると考えられていた。しかし、今回の結果から、成熟脳において神経細胞周囲網に局在するニューロカン-N はこれまで考えられていたものとは異なった機能を果たしている可能性が示唆された。また、ニューロカン-N が脳の発達段階の比較的遅い時期に、シナプスの近傍に出現することから、ニューロカン-N が一部の神経細胞の成熟やシナプスの安定化に関与している可能性が考えられる。

237 1P 1053

神経系に特徴的なコンドロイチン硫酸プロテオグリカン, NGC, のマウス遺伝子クローニングと小脳発達に伴う発現変動

青野幸子、慶野宏臣、松井ふみ子、大平敦彦
(愛知県コローニー・発達障害研究所・周生期学部)

本研究室でその遺伝子(ラット)がクローニングされたニューログリカンC (NGC) は、神経系に特徴的に発現している膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。コアタンパクは544個のアミノ酸残基によって構成されており、アミノ末端からコンドロイチン硫酸結合ドメイン、塩基性アミノ酸に富むドメイン、システイン残基に富むドメイン、膜貫通ドメイン、リン酸化可能な部位をもつ細胞内ドメインの5つのドメインよりなる。ラット大脳では発達とともに量が増加し生後20日前後にピークに達する。他のプロテオグリカンと同様、NGCは脳における神経回路形成に重要な働きをしていると思われるが、その機能については現在までのところ明らかとはなっていない。

今回、NGCの発現調節機構を解明することを目的として、マウスNGC cDNAおよびゲノムDNAのクローニングを試みた。cDNAライブラリーは2ヶ月齢マウス脳より調製し、ゲノムについては129マウス由来の市販ゲノムライブラリーを用いた。プローブとしてラットNGCのcDNAを用いた。cDNAについては少なくとも3種のアイソフォームを検出することが出来た。その一つはラットcDNAの塩基配列と90%以上のホモロジーを示した。また、推定アミノ酸配列から、マウスNGCもラットと同様5つの主要ドメインをもつことが示唆された。しかし、検討した10個のクローン全てにおいて、ラット(生後8日齢脳由来)およびヒト(2歳児脳由来)NGC cDNAに共通にみられた部位(15塩基)が欠失していることもわかった。この欠失が種差によるものか、日齢差によるものか現在検討中である。

NGCは生後発達期の神経細胞に比較的強く発現している。今回小脳におけるNGCの分布についてより詳細な検討を行った。発育期および成獣マウス小脳を4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で固定した。小脳では反応生成物はプルキンエ細胞の主樹状突起上に斑点状に存在していた。反応生成物は生後5日頃よりみられ、日齢とともに増加、成獣で最も強く認められた。これより、NGCが登上線維とプルキンエ細胞との間のシナプスに存在することが示唆された。現在、免疫電顕法により検討を行っている。

238 1P 1052

培養海馬神経細胞のシナプス形成とヘパラン硫酸プロテオグリカン

森田将史、小倉明彦
(大阪大学大学院・理学研究科)

神経細胞が正常なシナプス形成を行う際、細胞外マトリクス (ECM) は標的細胞や経由点細胞から放出され栄養因子や誘引因子を係留しており、神経突起はこれを認識して伸長または縮退していくと考えられている。このようにECMがシナプス形成に役割を持つとする考えは、神経筋接合部での除神経後再生の実験から導かれたものであるが、中枢神経系でECMがシナプス形成にどのような役割を果たしているのかよく分かっていない。そこで、ラット海馬の分散培養の系に対して、ECMの主要成分のヘパラン硫酸プロテオグリカンとコンドロイチン硫酸プロテオグリカンをそれぞれ分解するヘパリチナーゼとコンドロイチナーゼを投与することでECMの役割を検討することとした。ラット18日胚から分離後3日または6日の時点で酵素を投与し、生存率、形態、細胞内カルシウム動態の三つの観点から検討した。

まず、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが酵素投与時に存在することを間接蛍光抗体法で確認した。生存率はどの処理においても有意な差はなかった。有意な変化がみられたのは、培養3日後にヘパリチナーゼを処理した場合で、酵素用量依存的に細胞の凝集が起こった(細胞の凝集はボロノイ図解析法で行った)。しかし培養6日後に投与した場合には凝集は起こらなかった。コンドロイチナーゼは培養3日後の投与でも6日後の投与でも凝集を起こさなかった。シナプス形成を、自発的で複数の細胞間で同期した細胞内カルシウムイオン濃度の振動を指標として検討したところ、培養3日後にヘパリチナーゼを投与してさらに3日経過した時点で比較すると、酵素無処理の対照群およびコンドロイチナーゼ処理群にくらべてシナプス形成率が低い傾向がみられた。さらに電位依存性カルシウムチャンネルやグルタミン酸受容体の発現や活性に影響があるかどうか検討を行った。

239 1P 1051

^{13}C -化合物投与によるラット脳グリア代謝の計測 - Ex Vivo ^{13}C -NMR スペクトロスコピー法を用いて -

金松知幸、高原ひろみ、塚田裕三
(創価大学生命科学研究所)

生体脳におけるグリア細胞の代謝的特質を明らかにするため、グリアで特異的に代謝される ^{13}C 標識基質を用いて NMR スペクトロスコピーにより計測を行った。 ^{13}C -化合物をラット尾静脈より投与した後、マイクロウエーブで屠殺し、脳よりアミノ酸分画を抽出し、グルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)、 γ -アミノ酪酸(GABA)への ^{13}C の組み込み位置と、組み込み量の変化を経時的に、測定した。

[2- ^{13}C]-ブドウ糖が解糖系、アセチル-CoA を介して TCA 回路に取り込まれると、Glu、Gln の 5 位、GABA の 1 位へ ^{13}C が組み込まれる。この場合、Gln の ^{13}C 量は Glu の値の約 20% であった([2- ^{13}C]-ブドウ糖投与後 30 分)。 ^{13}C -ブドウ糖が解糖系を経た後、グリア細胞に局在している pyruvate carboxylase を介して、TCA 回路に取り込まれると(anaplerosis ; CO_2 固定)、 ^{13}C は Glu、Gln の 3 位に組み込まれる。Gln 合成酵素もまた、グリアに局在する。この場合、Glu と Gln の ^{13}C 量は等しく、グリアでは神経細胞と異なり、Glu と Gln の代謝プールがほぼ等しいことが示された。また、GABA の 3 位にも ^{13}C の組み込みが認められ anaplerosis を経た Gln、Glu から GABA が合成されていることを示した。一方、酢酸はグリアに優先的に取り込まれ代謝されることが知られている。[2- ^{13}C]-Sodium acetate を投与すると、アセチル-CoA を介して TCA 回路に取り込まれ、Glu と Gln の 4 位へ ^{13}C が組み込まれるが、両アミノ酸の ^{13}C 量はほぼ等しく、やはりグリア特異的代謝パターンを示した。また、2- ^{13}C -GABA も認められ、これはグリアで合成された 4- ^{13}C -Glu に由来している。これらの結果から、グリアで合成された Gln の一部が神経細胞に移行し、シナプス部で Glu を経て GABA に代謝される経路のあることを明らかにした。

240 1P 1050

^{13}C -グルコース投与による高磁場磁気共鳴局所化スペクトロスコピーでの脳内グルタミン酸代謝の無侵襲的計測

塚田裕三¹、金松知幸¹、小田正記¹、高原ひろみ¹、岡本和也²、

(¹創価大学生命科学研究所、²東芝 RD センター)

カニクイザル及びヒト(健康人ボランティア)に [1- ^{13}C]D-グルコース (99 Atom %) を投与して (0.5g -1.0g/kg) 経時的に ^{13}C -MRS により、無侵襲的に脳内グルタミン酸、グルタミンの代謝を計測する技術 (in vivo ^{13}C -MRS) を開発した。計測方法は 1) ^1H デカプリング ^{13}C スペクトロスコピー、2) 局所励起分極移動 ^{13}C スペクトロスコピー、3) 局所励起 ge-HSQC 法である。HSQC 法では ^1H - ^{13}C 相関スペクトル情報から ^1H 観測により高感度で代謝物を良好に分離出来る方法である。今回局所励起 HSQC 法によりサル脳で 8ml、ヒト脳で 37ml の局所化された部位から 4-グルタミン酸、3-グルタミン酸、4-グルタミンのスペクトルを分離して経時的な計測を可能とした。同時に血清中の ^{13}C -グルコースの Fractional Enrichment、血糖値、インスリン値を経時的に測定した。ヒトに経口でブドウ糖を投与すると、血中ブドウ糖の Fractional Enrichment は 60-120 分の間ほぼ一定の値を保ち、脳内には約 30 分後にブドウ糖が出現した。続いて 4-グルタミン酸がまず見え始め約 90 分後に最大値に達し、その後緩やかに減少した。3-グルタミン酸、4-グルタミンも 4-グルタミン酸に遅れて出現し、200 分後まで一定値を維持した。これらの情報から生体脳内の TCA 回路の代謝速度(主としてニューロン)、グルタミンの合成速度(グリア内)を算出する事が出来る。この技術を用いる事により脳の各部位で機能状態に伴う代謝変化や脳障害による代謝異常を計測しうることになった。

本研究は医療福祉機器技術研究開発制度の一環として NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)からの委託により実施した。

241 1P 1049

培養アストロサイトのグルコース代謝に及ぼすglybenclamideの効果

浜井 盟子、箕越 靖彦、嶋津 孝
(愛媛大学医学部医化学第一学教室)

スルフォニルウレアの一種であるglybenclamideは、膵臓からのインスリンの分泌を高めると共に脂肪細胞や骨格筋など末梢組織におけるグルコースの利用を促進する。また、アストロサイトはグリコーゲン顆粒を多量に含有し、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。本研究では、アストロサイトにおけるグルコース利用の調節機構を明らかにする目的で、アストロサイトの初代培養細胞を用いてグルコース代謝に及ぼすglybenclamideの効果を調べた。

胎児令19日のラット脳をトリプシンで処理し、細胞をポリイミンでコーティングしたシャーレ上で培養した。アストロサイト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。培地中のグルコース及び乳酸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、トレイサーとして2-[³H] deoxyglucoseを用い、細胞内に取り込まれる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。

Glybenclamideは濃度に依存してアストロサイトにおけるグルコース消費を増加させ、乳酸産生を亢めた。さらに、グルコースの取り込み速度は、glybenclamideの添加後30分で、約2倍に増加した。これらの実験結果からglybenclamideが、アストロサイトにおけるグルコースの利用を促進する事が明らかとなった。

ところで、グルタミン酸は、アストロサイトの細胞内へのNa⁺イオンの流入を増加することによってNa⁺/K⁺-ATPaseの活性を亢め、その結果グルコースの利用を促進することが知られている。そこでglybenclamideの促進作用にNa⁺/K⁺-ATPaseがどのような役割を果たしているかを検討した。その結果、細胞外のNa⁺イオンがglybenclamideの作用発現に必須であり、またウバインによってNa⁺/K⁺-ATPase活性を阻害するとglybenclamideの作用も消失することが判明した。さらに、glybenclamideがアストロサイトのNa⁺/K⁺-ATPase活性を促進することも確認した。

以上の実験結果からglybenclamideは、グルタミン酸と同様、Na⁺/K⁺-ATPaseの働き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可能性が高い。

242 1P 1048

マウス脳の発達段階におけるグリコーゲン合成酵素の発現

南木 浩二、馬場 広子、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)

胎生期マウス脳においてグリコーゲン顆粒は放射状グリアのマーカーとして知られている。近年、脳特異的グリコーゲン合成酵素(以下、GS)の免疫染色(Inoue, N. et al. 1988)および*in situ* hybridization法(Pellegrini, G. et al. 1996)によってマウスおよびラットの成体脳ではこの酵素が主にアストロサイトに局在し、少量ではあるが神経細胞にも存在することが明らかとなった。今回我々はこのエネルギー源貯蔵に重要な役割を果たすGSが、マウス脳の発達段階においてどのような発現様式をとるのかを明らかにすることを目的として、胎生期から成体までの脳切片および脳初代培養系におけるGS mRNAおよびタンパク質の局在の変化を検討した。

(方法) GS cDNA塩基配列をもとに3'非翻訳領域にプライマーを設定し、生後2日齢マウス脳のtotal RNAからRT-PCR法によって1.2 kb cDNAを得た。これをもとにdigoxigenineラベルをしたcRNAを作製し、*in situ* hybridization用プローブとした。GS特異抗体は熊本大学宮本先生から供与していただいた。これらを用いて胎生12日から成体まで各発達段階の脳パラフィン切片に対して*in situ* hybridizationおよび免疫染色を行った。また、胎生13日齢マウス大脳を用いた脳初代培養系に対して経時的に免疫染色を行い、GS陽性細胞種同定のために各種マーカーとの二重染色も行った。

(結果および考察) GS陽性細胞は*in situ* hybridizationでは胎生12日から、免疫染色では胎生13日から脳室壁近傍で検出され、発達にしたがって次第に皮質へと移動し、成体においては脳の広い領域にわたって分布することが確認された。成体においては特に嗅球、大脳および小脳皮質、延髄の細胞に多く存在した。このことからGSは細胞分化の比較的早い時期から存在し、細胞の移動、分化を終えてもそのまま存在することが示された。脳初代培養細胞における二重染色によってGS陽性細胞は培養初期ではGS⁺/nestin⁺、GS⁺/RC1⁺と存在し、経時的にGS⁺/GFAP⁺、GS⁺/MAP2⁺が増加していくことが確認された。

脳のエネルギー産生はグルコースを利用して行われ、グリコーゲンをエネルギー源として貯蔵する。これらの働きはアストロサイトが行っているが、GS自体はアストロサイト、神経細胞共に発生分化の早い段階から存在することが明らかとなった。

243 1P 1047

視床下部腹内側核および外側核でのアセチルコリン放出と血糖値の増加

高橋 章、石丸 裕久、五十嵐 康、岸 栄子、丸山 悠司

(群馬大医学部神経精神薬理学ツムラ)

視床下部が末梢の糖代謝を調節していることは良く知られている。ここでは、視床下部腹内側核 (VMH) および外側核 (LH) のコリン神経ならびにノルアドレナリン神経系の活動増進と血糖値増加との因果関係を明らかにするため、これら神経核をマイクロダイアリシスのプローブ膜を介して刺激すると同時に、神経核細胞外液中のアセチルコリン (ACh)、コリン及びノルエピネフリン (NE) を解析する手法を用い、血糖値の変動と比較検討した。マイクロダイアリシスは両側の神経核に対し、無麻酔下、フリームービングにて実施し、刺激には高カリウム液 (100 mM)、ネオスチグミン (1 mM)、NE とバジリンを用いた。血液は予め右心耳に留置したカテテルより経時的に行った。

VMH、LH の高カリウム刺激は神経核細胞外液中の ACh、コリンをすみやかに増加させ、血糖値を上昇させた。この ACh、コリン両者の増加は ACh 放出そのものが増加したことを示す。刺激を中止すると ACh、コリンはすぐに刺激前のレベルに戻り、血糖値はしだいに低下した。また、両神経核をネオスチグミンで刺激すると神経核細胞外液中の ACh と血糖値の増加が認められた。高カリウム液での刺激では神経核細胞外液中の NE 濃度の増加が認められたが、VMH、LH を NE (0.1-2 mM) とバジリンで刺激した場合には血糖値の有意な上昇は認められなかった。

これらの結果は VMH 及び LH のコリン神経系あるいはコリン受容神経の活動増進が血糖を増加せしめるものと思われる。その作用は交感神経系を介すると考えられるが、既に報告されている VMH と LH 電気刺激の代謝回転の成績を考慮すると、LH 刺激の作用は主に副腎髄質を介すると思える。

244 1P 1046

HES1 遺伝子の終脳における機能：ニューロン分化、細胞死の亢進、およびグリア分化への影響

中村由紀¹、榊原伸一¹、影山龍一郎²、岡野栄之¹³ (大阪大、医¹、京都大・医²、科学技術振興事業団 CREST³)

HES1 は bHLH 型の転写抑制因子であり、Mash1 や MyoD の転写を抑制することにより、神経分化や筋肉分化を抑制するといわれている。HES1 欠損マウスは神経管閉鎖不全、無脳症といった神経管形成の異常をきたし、胎生期あるいは生直後に死亡する。本実験では HES1 の中枢神経系の発生における機能を検証するため、HES1 欠損マウスの中枢神経系細胞の初代培養およびその免疫組織化学、RT-PCR 等を用いて胎生期 HES1 欠損マウスの中枢神経系の解析を行った。

HES1 欠損マウスの胎生期前脳細胞の初代培養の結果、胎生 10 日におけるネスチン陽性の未分化な神経上皮細胞はほぼ変化がないのに対し (野生型 56.9%、HES1 欠損型 51.2%)、MAP2 陽性のニューロンは著しく増加していた (野生型 9.1%、HES1 欠損型 22.3%)。4 日間培養後では MAP2 陽性細胞構成比にこれほどの差がみられず、何らかの機序でニューロンが排除されていることが推測される。また HES1 欠損マウスでは *in vitro* および *in vivo* で細胞死の亢進が観察された。一方単一細胞の細胞系譜を追うことのできる低密度培養を行うことによりひとつのニューロン産生細胞が生み出すニューロンの数が減少していることが明らかとなった。(野生型 2.9 個、HES1 欠損型 2.1 個)。

HES1 欠損マウスでは胎生期に致死となるため、終脳グリアの発生に関する表現型についての報告がない。今回の実験では、胎生期終脳を用いた RT-PCR では大きな差は検出できなかったが、初代培養系を用いて細胞レベルで検討した結果、胎生 14 日の HES1 欠損マウス終脳を 5 日間培養したものは野生型に比べグリアのマーカーである GFAP を発現する細胞がやや増加していた。

HES1 欠損マウスでは神経上皮細胞の数は変化せず、ニューロンが増加している。一方ニューロン産生細胞の自己再生能は低下していると考えられる。細胞死亢進、グリア分化については現在更なる検討を加えている。

245 1P 1045

培養交感神経細胞におけるニューロトロフィン応答性とShc遺伝子の発現

小林三和子¹, 中村岳史², 森望³, 松岡一郎¹, 栗原堅三¹ (1 北大・薬・薬理学, 2 住友電工バイオメディカル研究所, 3 国立長寿医療研究センター遺伝子部門)

ニューロトロフィン/Trkシグナル伝達においてRas/MAPKに至る経路に関与するアダプター分子Shcは、末梢の交感神経系に強く発現するが、非神経組織における発現も多く、脳における発現はむしろ低い。一方、N-Shcをはじめとする数種のShcホモロジー蛋白質は脳、脊髄など神経組織に特異的に発現している。そこで、異なるニューロトロフィン依存性を持つニューロンにおいてShc分子種の発現が異なるかどうかを、培養交感神経細胞(SCGニューロン)を用いてRT-PCR法により調べた。

すでにわれわれは、NGF依存性のSCGニューロンの初代培養系において、レチノイン酸と骨形成蛋白質(BMP)-2が協同的にTrkAの発現を抑制し、TrkCの発現を誘導することを報告した。TrkAを発現する新生ラットのSCGニューロンは、Shc-, N-Shc-mRNAともに発現していた。一方、BMP-2/レチノイン酸によりNT3依存性となったSCGニューロンにおいては、Shc-mRNAの発現が減少し、N-Shc-mRNAは増加していた。すなわちSCGニューロンがNGF依存性からNT3依存性へ変化するのに伴い、Shcの発現は減少し、N-Shcの発現は増加した。

これらの結果より、TrkAにはShc、TrkCにはN-Shcが共役する可能性が考えられる。すなわち個々のニューロトロフィンは固有のTrk/Shc分子種を介することにより、異なるシグナルを伝達する可能性がある。また、発達過程のSCGニューロンにおいてはTrkCからTrkAへニューロトロフィン受容体の発現が変化することから、神経分化の過程で発現するShc分子種も変化することが予想される。

246 1P 1044

グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子のGABAニューロン特異的発現制御: トランスジェニックマウスを用いたプロモーターの解析

柳川右千夫、小林隆司、石井賢治、久津輪瑞代、田村眞理
(東北大学加齢医学研究所遺伝子情報研究分野)

マウスグルタミン酸脱炭酸酵素 (mGAD65, mGAD67) 遺伝子は、脳ではGABAニューロン特異的に発現している。また、てんかん発作やcAMP、MK801、オキサ酸などの薬物でその発現が変動することが、我々を含めて複数の研究グループから報告されている。これらの発現制御機構を明らかにする目的にて、mGAD65とmGAD67の両遺伝子上流領域をマウスゲノムライブラリーから単離し、プロモーターの構造と機能について検討した。

mGAD65 (約4 kb) とmGAD67 (約10 kb) の上流領域の塩基配列を決定し、転写因子結合可能部位について検索した結果、神経特異的発現に関与するneuron-restrictive-silencer-element (NRSE) やCCAGGAGA配列の存在を認めた。mGAD67プロモーターを含む上流域をLacZ遺伝子に連結した融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成し、プロモーター機能について検討を行った。各臓器のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定したところ、脳で高い活性を認めた。さらに、脳切片を用いてX-gal染色を行った結果、mGAD67遺伝子の発現量の多い領域、即ち、嗅球、嗅結節、梨状皮質、大脳皮質、線条体及び脚内核の各領域の神経細胞に特異的にLacZ遺伝子の発現が観察された。以上のことは、プロモーター領域がmGAD67遺伝子のGABAニューロン特異的発現に寄与していることを示唆している。現在、上記プロモーターがGABAニューロンの発達段階特異的発現にどの程度関与しているかについて上記トランスジェニックマウス胎児を用いて検討を行っている。さらに、mGAD65遺伝子についてもトランスジェニックマウスを作成し、解析を行っている。

247 1P 1043

ムスカリン性アセチルコリン受容体を介したzif268遺伝子プロモーターの活性化

Julie Geng、海老原達彦、隈原英子、David Saffen
(東京大学医学部神経生化学)

Zif268は前初期遺伝子の転写因子で、海馬シナプスにおいて長期増強を引き起こす刺激によりすみやかに誘導される。神経様PC12D細胞において、zif268遺伝子の発現は神経成長因子(NGF)やムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストのカルバコールによってすみやかに誘導される。我々は、zif268遺伝子発現制御を解析するために、zif268遺伝子プロモーターの下流に β ガラクトシダーゼ(β Gal)をリポーターとして組み込んだ発現ベクターを構築し、PC12D細胞に導入した。 β Gal活性は、色素基質であるX-Galで細胞染色することによって定性的に観察し、さらに、化学発光基質であるGalacton-Star(クローンテック社)を使って定量的に測定した。この発現ベクターをトランジェントに導入したときは、NGF刺激によって発現が強く誘導されたが、カルバコール刺激にはほとんど応答しなかった。ところが、この発現ベクターを恒常的にもつPC12D細胞株を樹立したところ、3つの独立したクローン化細胞において、NGF及びカルバコールの刺激に対して強い遺伝子発現誘導が観察された。これらの結果は、カルバコール刺激によるレポーター遺伝子の発現にはベクターが染色体に組み込まれることが必要であるが、NGF刺激の場合は必要がないことを示唆している。この二つの応答の違いは、zif268遺伝子発現制御において二つの異なった機構があることを示唆している。以上の結果は、zif268遺伝子プロモーター活性をレポーター遺伝子をつかって正しく解析するには、染色体に組み込まれることが必須であることを示している。この現象の分子レベルでの機構の解析は今後の研究課題である。

248 1P 1042

PC12D細胞においてNGF刺激からzif268遺伝子発現に至る経路にはMAPK依存性と非依存性のものが存在する

隈原 英子、Julie Geng、David Saffen(東京大学医学部神経生化学)

PC12D細胞をNGF(神経成長因子)で刺激すると、前初期遺伝子であるzif268のmRNAレベルが一過性に上昇し、刺激から45分後にピークを迎える。このとき、MAPKの活性も刺激から1-2分後に上昇を始め、10分後にピークを迎えた後、数時間活性を保つことがわかっている。MAPKは転写因子p62TCFをリン酸化し活性化することにより、転写因子SRFと共に遺伝子のプロモーター上のSRE配列を介し遺伝子発現を引き起こすと考えられている。zif268遺伝子のプロモーター上にも6個のSRE(Serum response element)配列が存在するので、PC12D細胞におけるzif268遺伝子はMAPKの活性化及びSRE配列を介し発現すると考えられる。そこで、PC12D細胞における、NGFによるMAPKの活性化とzif268遺伝子の発現との相関性を調べるために、MAPKを活性化するMAPKKの阻害剤(PD98059)の前処理により、NGF刺激によるMAPKの活性を抑制したときのzif268 mRNAレベルをノザンブロットングにより調べた。

その結果、PD98059の前処理によりNGFによるMAPKの活性は完全に抑制されたが、zif268のmRNAレベルの上昇は完全には抑制されなかった。このことより、PC12D細胞には、NGFの下流にzif268遺伝子発現を誘導するMAPK非依存性の経路も機能することが示唆される。

また、この経路における他のキナーゼの関与を調べるために様々な阻害剤の効果を調べたところ、PI3-kinase阻害剤であるwortmanninをPD98059と共に前処理したとき、NGF刺激によるzif268のmRNAレベルの上昇が大部分抑制されることがわかった。従って、MAPK非依存的にzif268遺伝子を発現させる経路には、PI3-kinaseが関与する可能性が示唆される。

さらに、MAPKの上流で機能することが知られているRasが、この経路においてどのような役割を果たすかを調べるために、dexamethazoneの前処理によりdominant-negative Rasが転写誘導されるPC12D細胞株を確立した。この株を用いた実験では、dexamethazoneの前処理によりdominant-negative Rasを発現させると、NGF刺激によるMAPKの活性化は完全に抑制されたが、zif268 mRNAレベルの上昇は部分的にしか抑制されなかった。従って、この経路はRasにも非依存的であることが示唆される。

一方、PD98059の場合とは異なり、この細胞株をdexamethazoneと同時にwortmanninで前処理したときのNGFによるzif268 mRNAレベルの上昇は、dexamethazoneのみで前処理したときと比べ、ほとんど変化がなかった。

以上のことより、PC12D細胞には、NGF刺激によりMAPK及びRasに非依存的にzif268遺伝子を発現させる経路も存在し、その経路にはwortmannin sensitiveなもの insensitiveなものがあることが示唆される。

249 3C O-1

Notch 情報伝達系の構成遺伝子である *deltex* のマウスホモログのクローニングおよび機能解析

岸 憲幸¹, 伊藤 美紀子^{1,2}, 木下 進³,
Chi-chung Hui⁴, 岡野 栄之^{1,2}, 松野 健治^{1,2}
(1 阪大・医・神経機能解剖, 2 CREST, JST,
3 関西学院大学・理・化学・発生生物, 4 The
Hospital for Sick Children, Toronto, Canada)

Notch 情報伝達系は細胞間相互作用による細胞運命決定を制御し、神経系においては神経細胞の分化制御において重要な役割を果たしている。Notch 情報伝達系の構成因子は、ショウジョウバエや線虫のような無脊椎動物からほ乳類に至るまで保存されている。ショウジョウバエの Notch 情報伝達系の構成因子の1つである *deltex* 遺伝子産物は Notch レセプターの細胞質ドメインにある Ankyrin 様リピートに結合し、情報伝達系を正に制御する因子である。

我々は、ほ乳類における Notch 情報伝達系の解析を目的として、*deltex* 遺伝子のマウスにおけるホモログ (*mdx-1*) をクローン化した。cDNA より予測される蛋白質はショウジョウバエの Deltex 蛋白質と全長にわたる相同性を示した。Notch レセプターの Ankyrin 様リピートに結合する領域と、蛋白質間相互作用に関与していると考えられている Ring Zinc フィンガードメインに特に高い相同性が見られた。またショウジョウバエ Deltex において SH-3 ドメインの結合部位であると考えられているプロリンに富んだ領域が、*mdx-1* 蛋白質にも存在した。これらの結果は、保存されている領域が *deltex* 蛋白質の機能に重要な働きを持ち、これらの領域を介する蛋白質間相互作用がショウジョウバエからほ乳類まで保存されている可能性を示している。in situ ハイブリダイゼーションによる発現パターンの解析の結果、胎生10日のマウス胚の多くの組織で発現していることが明らかとなった。現在、脊椎動物の神経発生における *mdx-1* の機能を検討している。

250 3C O-2

橋由来大脳皮質軸索化学誘導因子の
分子生物学的検索

高見俊宏、米田託成、高木 宏、佐藤 真
(大阪市立大学医学部解剖学第一教室)

神経回路形成機構を分子レベルで解析することを目的とし、皮質脊髄路なかでも皮質橋路を対象とし、この回路形成に関わる因子の検索を試みた。皮質橋路の形成には、橋組織由来因子が重要な働きをすることが報告されている。すなわち、橋より拡散性の因子が分泌され、この因子は(1)大脳皮質軸索に軸索側枝の形成を促進すること(2)大脳皮質軸索(側枝)に対し化学誘導作用を及ぼすこと、が知られている。これらの因子(もしくは関連する因子)の同定、取得を目指し、我々はdifferential display法にて上記の生物学的活性を有する皮質橋路形成期の橋組織に発現し、バイオアッセイにて上記の生物学的活性を示さない同時期の皮質橋路組織に顕著な発現のみられない遺伝子の検索を試みた。現在までにdifferential display法にて99クローン同定し、さらにin situ hybridization法による発現様式解析を援用し、そのうち3クローンを橋由来因子の関連因子候補として解析している。その詳細を報告する。

251 1B MS2-1

ニューロン特異的核蛋白質necdinによる
E2F転写活性の抑制

小林 正克, 谷浦 秀夫, 吉川 和明
(大阪大学蛋白質研究所機能制御部門)

Necdinはニューロンで特異的に発現している核蛋白質であり、分裂性細胞に対して増殖抑制作用をもつ。私達は既に前回の本学会で、necdinは、がん抑制遺伝子産物レチノブラストーマ蛋白質(RB)と同様にアデノウイルスE1A, SV40 large T抗原と結合することを報告した。RBは細胞増殖に重要な転写因子E2Fと結合し、E2Fによって調節を受けるDNAポリメラーゼ α やジヒドロ葉酸還元酵素などのDNA複製や細胞増殖に重要な遺伝子の発現を抑制することが知られている。したがって、今回はnecdinがE2F系を介してニューロンの分裂を抑制する可能性を検討した。

NecdinとE2F1のcDNAをSAOS-2細胞に共導入して、免疫沈降法によって調べたところ、核内でnecdin-E2F複合体が形成されることがわかった。さらに、酵母 two-hybrid系を用い、necdin(全長1~325)の種々の欠失変異体とE2F1との結合を解析したところ、necdinは83~292領域でE2F1と結合することがわかった。また、同系でnecdin(83~325)とE2F1の欠失変異体との結合を解析したところ、necdinはE2F1のRB結合領域を削除したE2F1(55~397)とは結合したが、E2F1の転写活性化領域を削除したE2F1(55~338)とは結合しなかった。これらの実験結果より、necdinはE2F1の転写活性化領域を含むC末端側と結合するものと推定される。このnecdinとE2F1のC末端に特異的な結合は、パキユロウイルスで発現したnecdinとマルトース結合蛋白質に融合したE2F1(319~430)とのin vitro 結合系でも確認できた。次に、necdinのE2F1の転写活性に与える影響を、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ系で検討した。NecdinはSAOS-2細胞でE2F結合配列を介した転写活性を抑制したが、EF1 α 遺伝子やSV40のプロモーターを介する転写には影響がなかった。

これらの結果より、necdinはE2F1の転写活性化領域に結合し、その転写を特異的に抑制することによって細胞周期の進行を抑制するものと推定される。

252 1B MS2-2

交感神経分化に関わる転写因子NDF1の発現
と機能

樋口宗史、中野浩一*、牛三勇、三木直正
(大阪大学大学院医学系情報薬理、*京都府立医大薬理)

(目的) Neural crest由来の交感神経前駆細胞は、ventral pathwayを移動中に交感神経の分化因子(GDNF等)でSympathoadrenal (SA) progenitorに分化し、最終的にはグルココルチコイドでクロマフィン細胞に、神経成長因子(NGF)で交感神経細胞に終末分化する。私達は交感神経のcotransmitterであるNeuropeptide Y(NPY)遺伝子発現が、PC12細胞の神経分化に伴って誘導されること、つまり、NGFで著しく誘導されグルココルチコイドで抑制されることを報告した。さらにこの現象は転写レベルでおこり、NPY遺伝子プロモーター部のNGF反応エレメント(NGFRE)に依存していた。NGFREのAP1結合様部位に結合する26kDaのNDF1はNGF処理で結合活性が増加するので、交感神経の終末分化に何らかの機能を持っていると考えられた。そこでクローニングしたNDF1をPC12細胞に一過性発現することで、NPY遺伝子転写に対する作用を、さらに恒常発現細胞を作成することで、NGFによるPC12細胞の交感神経様細胞への分化に対する作用を調べた。また、In situ hybridization (ISH)により胎生および発育時期における副腎でのNDF1の発現を調べた。

(結果) NDF1の一過性発現によるNPY遺伝子転写活性への影響をCATアッセイで調べると、NDF1はリプレッサーの作用を持っていることが明らかとなった。direct repressionの機構で転写抑制するらしい。PC12細胞には殆ど内在性のNDF1を持たないが、NGF処理で遺伝子発現レベルでNDF1 mRNAが増加する。NDF1のPC12細胞の恒常発現細胞を作成するとNGFによる終末分化が抑制された。ISHによって胎生期、出生直後にはラット副腎におけるNDF1 mRNAの発現が強く、2週以降は発現が弱くなることが解った。

(考察) 以上の結果は、NDF1は生理的には交感神経のNGFによる終末分化を抑制する転写抑制因子として働いていることを示唆する。NGFによるPC12細胞の分化時にNDF1が誘導されるメカニズムはまだ不明だが、分化誘導に対する抑制機構として働いている可能性があると考えられる。

253 1B MS2-4 2018

神経系幹細胞に強く発現するRNA結合蛋白質mouse-Musashi-1の標的分子

今井 貴雄^{1,2}、榊原 伸一¹、岡野 栄之^{1,3}
 (1大阪大学医学部神経機能解剖学、2大阪大学基礎工学部生物工学、3科学技術振興事業団)

mouse-Musashi-1 (m-Msi-1) 蛋白質は、胎生期マウスにおいて神経管の脳室壁周辺部位に存在する神経幹細胞に強く発現している。この蛋白質は、RNA 認識モチーフ (RRM) を2つ有しているRNA結合蛋白質で、mRNAの局在化、輸送といった転写後レベルでの遺伝子制御に関わっているものと推測されている。ショウジョウバエの相同分子は、外感覚器の前駆細胞の非対称性分裂に重要な役割を果たしていることから、我々は、m-Msi-1蛋白質の下流標的遺伝子を同定することにより、哺乳類における初期の神経発生について新しい知見が得られると考えた。その足がかりとして、SELEX法 (Tsai et al., 1991) によって、m-Msi-1蛋白質が結合するRNA配列の同定を行った。その結果、組み換え m-Msi-1蛋白質 (2個のRRMを含む領域とHis tagとの融合蛋白質) との結合を介して指数関数的に濃縮されてきたRNAのほとんどに特定の配列 (G/A) U_nAGU n=2 or 3 (コンセンサス配列) が存在していた。m-Msi-1蛋白質がこれらのRNAに実際に結合するかどうかをゲルシフト法で検証したところ、比較的強い結合であることが明らかとなった ($K_d \sim 10^{-9}$)。このSELEX法で明らかになったm-Msi-1ポリペプチドのRNA結合能であるが、この事実が生体内でのm-Msi-1蛋白質分子の挙動を反映しているものであるかを確かめるために、実在するmRNAの配列を発現部位ごとに分類したデータベース「Body Map」 (Osaka University) により検索したところ、m-Msi-1蛋白質と発現が重複すると推測され、その配列中に上記のコンセンサス配列を有する未知の遺伝子が得られた。また、データベース検索とは別に、m-Msi-1蛋白質発現細胞に発現している既知の蛋白質をコードするmRNAの配列を調べていたところ、mouse-numb, mouseHuBの3' UTRに上記のコンセンサス配列が存在した。それらのmRNAとm-Msi-1蛋白質との間の相互作用を *in vitro* の系で現在、検討しているところであるが、その結果についても併せて報告する予定である。以上のような分子生物学的な解析を端緒として、神経系の細胞におけるRNA結合蛋白質の役割の可能性について論じてみたいと考えている。

254 1B MS2-5 2019

マウス脳内 CREB の細胞核局在性およびグルタメイトシグナル応答性

久保慶太、眞部孝幸、荻田喜代一、米田幸雄
 (摂南大学薬学部薬理学研究室)

転写制御因子は、細胞質のリボソームで合成されたのち、細胞核局在化シグナルなどにより細胞質から細胞核内へ移行して、細胞核内で特定の標的遺伝子の転写活性を調節する。今回は、転写制御因子の細胞核局在化メカニズムを解明する目的で、cyclic AMP による転写活性化に必須な転写制御因子である cyclic AMP response element 結合蛋白質 (CREB) の特異的抗体を作成し、この抗体を用いたウエスタンブロット法で、マウス脳内各部位の細胞質画分および細胞核画分中の抗体陽性蛋白質を測定し、CREB細胞核局在比 (細胞核画分/細胞質画分) を解析した。

ヘモシアニンを結合させた合成 CREB ペプチド (123-136) で免疫したウサギ血清を、同ペプチド固定化アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。市販抗 CREB 抗体では、マウス全脳の細胞質画分および細胞核画分の両方に複数の陽性バンドが検出されたのに対して、本精製抗体の場合は両画分ともに分子量 43kDa の位置にのみ抗体陽性蛋白質が検出された。さらに、CREBプローブを用いたゲルシフトアッセイでは、本精製抗体添加により顕著なスーパーシフトが観察された。この精製抗体陽性蛋白質は、脳内各部位、脊髄、網膜、下垂体および副腎で細胞質画分よりも細胞核画分により多く存在した。細胞核局在比は、橋・延髄と脊髄では他の脳内部位に比べて、極めて低かったが、下垂体と副腎では抗体陽性蛋白質の細胞核局在性が比較的高いことが明らかとなった。一方、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 腹腔内投与2時間後のマウス海馬の細胞核画分では、抗 CREB 抗体陽性蛋白質にはほとんど変化は見られなかったのに対して、カイン酸 (KA) の場合では抗体陽性蛋白質が顕著に増加した。以上の結果から、今回作成した精製抗 CREB 抗体は市販抗体よりも CREB 認識性が高いこと、脳内部位間で CREB の細胞核局在性が異なること、および CREB は KA シグナル応答性を示すことが示唆される。

255 2P 2020

ELマウス発作後における脳glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA発現におよぼすc-fosの転写制御について

勝元 栄一、尾崎 宜洋、原田 智行、撫井 弘二、山上 榮

(大阪市立大学医学部神経精神医学教室)

(初めに)我々は昨年、northern blotによって遺伝性てんかんモデルであるELマウスの放り上げ刺激による固有の発作や発作非感受性のddYマウスのベメグリド注射によって発作を誘発した場合にGFAPおよびc-fos mRNA発現のパターンや蛋白合成阻害剤anisomycinの前投与によるGFAP mRNA発現の低下などを報告した。その結果、GFAP mRNAの転写制御にAP-1が関与している可能性を示唆したが、今回は*in situ* hybridizationにより局所的な相違について検討を加えた。

(方法)摘出した脳より凍結切片をクライオスタットによって作成し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。ジコキシゲニンによって標識したアンチセンスリボプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、アルカリフォスファターゼ標識抗ジコキシゲニン抗体と発色基質BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)とNBT(nitroblue tetrazolium salt)によって発色させた。

(結果)痙攣履歴を有するEL[s]マウスのGFAP mRNA発現は発作18時間後で歯状回に顕著に発現したが、海馬のCA1-3、梨状皮質、大脳皮質にもかなり強い発現がみられた。他方、c-fos mRNA発現は発作30分後での発現パターンは、GFAP mRNAの発現と同じであった。ddYマウスにベメグリドを注射して発作を誘発した時のGFAP mRNA発現のパターンは、歯状回、海馬のCA1-3、梨状皮質、大脳皮質に誘導を認めたが、ELマウスの発作よりその発現量は少なかったが、c-fos mRNAの発現に比べると同様の発現のパターンを示した。

(結語) *gfa* geneは上流にAP-1認識配列を有し、その転写制御にAP-1が関与するという。ELマウスの放り上げによる発作やddYマウスにベメグリドで発作を誘発したときのGFAP mRNAの発現誘導が認められた部位は、c-fos mRNAの部位と同じである。今回の結果もGFAP mRNAの転写制御にAP-1が関与していることを示唆した。

256 2P 2021

マウス脳内における c-Myc 結合能調節蛋白質存在の可能性

倉本展行、荻田喜代一、米田幸雄

(摂南大学薬学部薬理学研究室)

細胞核内転写制御因子の一つであるc-Mycは、核内蛋白質 Max とヘテロダイマーを形成して、2本鎖 DNA 上の特定の塩基配列(Myc 配列)に選択的かつ高親和性に結合し、その標的遺伝子に対する転写促進機能を発揮する。一方、Max は核内蛋白質 Madや Mxi1 とともにヘテロダイマーを形成し、c-Myc/Max 複合体と同一の塩基配列に結合して同複合体による転写促進作用を遮断する。このように、Myc 配列には数多くの蛋白質が親和性を示し、同配列を有する標的遺伝子の転写調節が行われるものと推察される。今回は、このようなMyc結合能に関与する蛋白質の存在を明らかにするため、マウス脳内細胞核抽出液中のMyc結合能の性質を解析した。

Std-ddy雄性マウス全脳ノニデットP-40不溶性画分から、高濃度の塩(400 mM KCl)で抽出して調製した細胞核抽出液中の転写制御因子のDNA結合能を、ゲルシフトアッセイにより測定した。界面活性剤としては、両イオン性界面活性剤である3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)を用いた。このCHAPSを抽出実験では抽出操作時に、添加実験ではゲルシフトアッセイ時にそれぞれ存在させた。

CHAPSを含まない条件で抽出した場合、Myc結合能は、2.5mM以上のMgCl₂添加により濃度依存的に阻害されたが、1% CHAPSを同時に添加するとその阻害能は減弱された。一方、0.1%以上のCHAPSの添加はMgCl₂非添加時のMyc結合能には著変を与えなかったが、10mM MgCl₂添加時の結合は1.0%までCHAPSの濃度依存的に増強された。しかしながら、1%のCHAPSを含む条件下でノニデットP-40不溶性画分を抽出した場合、MgCl₂添加は7.5mMまではMyc結合能を阻害したのに対して、10mMでは逆に結合能の増強が見られた。さらに、抽出時のCHAPS濃度依存的にMgCl₂非添加時の結合は阻害されたが、MgCl₂添加時の結合は逆に増強された。以上の結果から、界面活性剤存在下の抽出によりMyc結合能調節蛋白質が抽出される可能性が示唆される。

257 2P 2022

シグマ-1受容体アゴニストの転写因子に及ぼす影響

山本秀子¹, 山本敏文^{1,2}, 松野聖³, 吉本有希子⁴, 渡辺雅幸¹

(¹東京都精神研・精神薬理、²横浜市大総合理・分子認識、³参天製薬、⁴帝京大学附属溝口病院リハビリテーション科)

シグマ受容体はシグマ-1とシグマ-2のサブタイプが薬理的に提唱されており、最近ではシグマ-3受容体の存在が検討されつつある。シグマ-1受容体はモルモット肝臓及びヒト胎盤由来細胞より、cDNAがクローニングされているが、その細胞内情報伝達機構及び生理的な役割は明らかにされていない。そこで、シグマ-1受容体の細胞内情報伝達系を明らかにすることを目的として、初代培養神経細胞にシグマ-1受容体アゴニストSA4503の核内蛋白質に及ぼす影響について検討した。

初代培養神経細胞は18日令ウィスター系ラット胎児大脳から7日間無血清培養したものを用いた。培養液にシグマ-1受容体アゴニストであるSA4503を加えて30分もしくは120分後に氷冷PBSで細胞を洗浄し、細胞の核を遠心法にて集め、核内蛋白質を抽出した。転写(調節)因子であるcyclic AMP response element binding protein(CREB)、Octamer-1(OCT-1)に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを [³²P]ATPで標識し、ゲルシフトアッセイ後、核蛋白抽出液中の転写因子の変化をBAS3000によって比較検討した。初代培養神経細胞にSA4503を作用させると、CREBに特異的に結合するオリゴヌクレオチドへの核内蛋白質の結合は、37度30分後に濃度依存性に約30%減少したが、37度2時間後ではその変化は消失した。OCT-1に対する結合は、37度30分後に濃度依存性に約60%減少した。その減少はやや回復したものの2時間後でも残存した。

我々はシグマリガンドがシグマ-1受容体に結合後、細胞内に取り込まれ、細胞内情報伝達に関与する可能性を考えている。今回得られた、シグマ-1アゴニストによるCREB及びOCT-1の核内における減少は、シグマ-1受容体が常在転写因子を介して情報伝達をおこなう可能性を示唆している。

258 2P 2023

ヒトnecdin遺伝子の構造とニューロン特異的発現

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)

Necdinはニューロンに特異的に発現している核蛋白質である。私たちは既にマウス染色体necdin遺伝子を単離して分析した結果、遺伝子にはイントロンが存在せず、5'上流領域には分裂終了ニューロンに特異的に発現させる調節エレメントが存在することを報告した。一般に重要な機能を担う領域は動物種を越えてよく保存されていることが知られている。そこで、今回はヒトnecdin遺伝子の単離と構造解析を行い、その発現調節機構を解析した。

cDNAをプローブとしてヒト染色体DNAライブラリーをスクリーニングしたところ、2種の異なった配列に結合することが判明した。塩基配列やプロモーター解析によって、一つは機能性遺伝子、もう一つは偽遺伝子であることが判明した。ヒトの機能性necdin遺伝子にコードされたnecdinはマウスnecdinより4アミノ酸少ない321個のアミノ酸から構成され、その相同性は82%であった。Necdinの機能ドメインと考えられている中央部は特によく保存されていた。次にレチノイン酸処理によってニューロンに分化することが知られているヒト胚性がんNT2細胞を用いてヒトnecdin mRNAの発現を調べた。その結果、NT2細胞がニューロンに分化するとnecdinの発現量が増加した。一方、神経芽細胞腫由来の細胞には発現していないことがわかった。さらにニューロンに分化させたマウス胚性がんP19細胞を用いたプロモーター解析やX-gal組織化学染色によって、ヒトnecdinの発現はニューロンに特異的であることがわかった。さらにヒトnecdin遺伝子のプロモーター領域の欠失変異体を用いた解析を行った。それによると、-1.2k ~ -550には活性を抑制する領域、-178 ~ -33には活性に必須の領域が存在することが明らかになった。この転写活性化に重要な領域にはGCヌクレオチドが豊富に存在し、いわゆるCpG islandを形成していることがわかった。CpG islandをもつプロモーターはメチル化による活性の制御を受ける可能性があり、necdinのニューロン特異的な発現も、この領域のメチル化と脱メチル化により制御されていることが示唆される。

259 2P 2024

ショウジョウバエ *unc-4* ホモログの発現パターンの解析

田淵克彦¹、吉川真悟²、岡部正隆¹、岡野栄之¹

¹：阪大・医学部・神経機能解剖学、科技団 (CREST)

²：筑波大・基礎医・分子神経生物学

線虫の *unc-4* 遺伝子は Paired 類似のホメオドメインを持つ転写因子で、VA 運動神経で発現しその mutant は本来 VA 運動神経に投射する介在神経からのシナプスのインプットが障害され、VA 運動神経と同じ母細胞から分化する VB 運動神経に投射する介在神経からシナプスのインプットを受けるようになる。このことから *unc-4* 遺伝子は、VA 運動神経の個性の獲得を通じ、神経回路網形成の調節に関与していると考えられている。

我々は、胚発生期のショウジョウバエから抽出した RNA を鋳型として RT-PCR を行い、塩基配列が *unc-4* 遺伝子と相同性の高いクローンを得た (*dunc-4* 遺伝子)。*dunc-4* 遺伝子のコードする蛋白質のホメオドメイン内のアミノ酸配列は、Unc-4 と 85% の相同性があった。*in situ* ハイブリダイゼーション法により胚における発現パターンを解析した結果、stage 11 で各体節の、最前列の表皮の細胞と中枢神経系の正中線に隣接する一部の神経細胞で発現が見られ、stage 13 ではより外側の神経細胞でも発現が開始した。stage 16 になると labial sensory organ で発現が見られ、中枢神経系での発現は減弱することが観察された。抗 Engrailed 抗体との 2 重染色により、表皮での発現は *engrailed* 発現細胞に隣接した後列の細胞で、中枢神経系では一部の *dunc-4* 遺伝子発現細胞は、*engrailed* を発現していることが明らかとなった。

260 2P 2025

グルタメイトシグナルに応答性を示す海馬内蛋白質

眞部孝幸、久保慶太、倉本展行、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大学薬学部薬理学研究室)

グルタメイトアゴニストである N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) とカイニン酸 (KA) をマウス腹腔内に投与すると、海馬における抗 c-Fos 抗体および抗 c-Jun 抗体陽性蛋白質の発現が上昇するとともに、細胞核内の転写制御因子 activator protein 1 の DNA 結合能が著明に増強されることが知られている。したがって今回は、一連のグルタメイトシグナル伝達に関与する機能蛋白質の発現を更に詳しく追究する目的で、両アゴニスト投与マウス海馬内の各種抗体陽性蛋白質を二次元電気泳動法で分離後、ウェスタンブロッティング法を用いて一斉分析した。

Std-ddY 系雄性マウスに、NMDA (100 mg/kg) あるいは KA (40 mg/kg) を腹腔内投与し、投与 2 時間後の海馬から Nonidet P-40 不溶性画分を調製して二次元電気泳動用サンプルとした。

NMDA 投与の場合、抗 c-Fos 抗体と抗 c-Jun 抗体ばかりでなく、抗 HSP 72/73 抗体や抗ホスホチロシン抗体陽性蛋白質の発現増加が観察された。KA 投与の場合は、NMDA 投与の場合と同様に、抗 HSP 72/73 抗体、抗 c-Fos 抗体、抗 c-Jun 抗体および抗ホスホチロシン抗体陽性蛋白質の増加が見出されたが、そのシグナルは NMDA 投与の場合よりもさらに強いことが判明した。一方、抗ホスホセリン抗体を用いたウェスタンブロッティングでは、NMDA 投与および KA 投与ともに分子量 45 kDa 付近の蛋白質のセリン残基脱リン酸化が見られたが、KA 投与の場合はさらに 400 kDa 付近の蛋白質のセリン残基脱リン酸化を誘発した。しかしながら、抗 c-Myc 抗体および抗 N-Myc 抗体陽性蛋白質にはいずれも、NMDA 投与および KA 投与に伴う著明な変化は見られなかった。以上の結果より、グルタメイトシグナリングに伴い、海馬内特定蛋白質の誘導とともに、そのセリン残基脱リン酸化あるいはチロシン残基酸化などが誘発されることが確認された。これら応答性蛋白質の早急な精製と単離が望まれる。

261 1P 1041

PC12細胞におけるアセチルコリンとカテコールアミンの開口放出機構の比較

西木禎一^{1,2}, 関口真理子¹, 岩崎聡³, 笠井陽子¹, 熊倉鴻之助², 高橋正身^{1,3} (1三菱化学生命研、2上智大・生命研、3東大院・総合文化)

シナプス伝達を分子レベルで理解するうえで、シナプス小胞の開口放出機構を明らかにすることは重要な問題である。副腎髄質クロマフィン細胞やPC12細胞は、神経伝達物質のひとつであるカテコールアミン (CA) を分泌顆粒に貯蔵し、脱分極刺激に応じて Ca^{2+} 依存性に放出することから、シナプス小胞の開口放出の研究においてモデル細胞として使われてきた。しかし、分泌顆粒は形態学的あるいは生化学的にシナプス小胞とは異なり、両者の開口放出機構が同じなのかどうかについては不明である。PC12細胞は、分泌顆粒とは異なるシナプス小胞様の細胞内小器官にアセチルコリン (ACh) を貯蔵し、開口放出によって分泌する。今回私たちは、再クローニングによって得られたACh合成能の高いPC12-dB3細胞を用い、2種類の分泌小器官の開口放出機構を比較した。

細胞から放出されたAChは逆相クロマトにより分離し、アセチルコリンエステラーゼおよびコリンオキシダーゼを固定化したカラムにかけた後、電気化学検出器 (ECD) を用いて測定した。CAは逆相クロマトで分離後、ECDを用いて測定した。

ジギトニン処理により細胞膜の透過性を高めたPC12-dB3細胞を、 Ca^{2+} を含む溶液に暴露すると有意なAChの放出が観察された。この Ca^{2+} 依存性のAChの放出はMgATPの存在下で増大したことから、AChの開口放出過程においてもCAと同様に、 Ca^{2+} 依存性の膜融合ステップの直前にMgATP依存性のプライミングステップが存在することが示唆された。細胞膜高透過性細胞からのAChの放出は Ca^{2+} 濃度1 μM から見られはじめ100 μM まで濃度依存性に増加した。CAの放出においてもAChと同様の Ca^{2+} 濃度依存性が観察された。またGTP γ S

(100 μM) を細胞外液へ添加すると、 Ca^{2+} 非依存的にAChとCAの両方の放出が引き起こされた。無傷の細胞をホルボールエステルで処理し細胞内のCキナーゼを活性化すると、脱分極刺激に応じて放出されるAChとCAの量が増加した。以上の結果から、シナプス小胞と分泌顆粒の開口放出は基本的には同じ機構で営まれていると考えられる。

262 1C MS5-1 1040

シナーフィンのSNARE複合体への結合

阿部輝雄、西須英雄、石塚 徹

(新潟大学脳研究所)

シナーフィン (別名コンプレキシン) は伝達物質放出機構において中心的役割をはたすと考えられている docking/fusion complex に結合している可溶性蛋白質である。その作用機序を解明する第一歩として、シナーフィンの SNAP 受容体 (SNAREs) への結合の性質を調べた。

グルタチンS-トランスフェラーゼ (GST) とシナーフィン1 (syp1) との融合蛋白質をグルタチオンセファロースに結合させておき、ラット脳膜分画の Triton X-100 抽出物を加えてインキュベートする。Triton X-100 を含む緩衝液で洗浄した後、結合物を SDS で溶出、SDS 電気泳動後、イムノブロットにより解析した。

GST-syp1 は Ca^{2+} 非依存的に SNARE 複合体を結合した。GST のみでは全く結合が見られないので、この結合は特異的であると考えられる。この複合体にはシナプトタグミン、シンタキシン、SNAP-25 および VAMP が含まれていた。しかし、native シナーフィンは検出されないことから、GST-syp1 は 1:1 のモル比で上記の複合体に結合すると考えられる。この結合は His₆- α -SNAP および His₆- β -SNAP によって阻害された。

SNARE 複合体との結合に関与する syp1 のドメインを決定するため syp1 の断片と GST との融合蛋白質を作製し、SNARE 複合体との結合を測定した。その結果、syp1 分子の中央部分が最も重要であり、C 末端側の 2/3 は全長と同様な結合を示した。また、N 末端側の 2/3 も中央部 1/3 に比較して有意に強い結合を示した。これらの結果は、SNARE 複合体への結合には syp1 分子のかなりの部分が必要であることを示唆する。

シンタキシンに対する単クローン抗体 (SPM-1) を用いた免疫沈降では、native シナーフィンは His₆- α -SNAP および His₆- β -SNAP の存在下でも非存在下と全く同様に SNARE 複合体と共沈した。したがって、native シナーフィンは His₆- α -SNAP および His₆- β -SNAP によって置換されない。

われわれのこれまでの知見と合わせて、以上の結果はシナーフィンが SNARE と共に安定した 7S 粒子を形成して作用することを示唆する。

263 1C MS5-2 1039

神経伝達物質放出におけるコンプレキシンの機能

高橋正身¹、斧正一郎¹、関口真理子¹、高橋聖一²
(¹三菱化学生命科学研究所、²高知医科大学)

シナプスでの情報伝達は、シナプス前部から放出される神経伝達物質によって担われている。記憶、学習などの成立に伴い神経回路が機能的に変化していくためには、シナプス伝達の効率が変化することが必要であり、神経伝達物質の放出能を変化させることがその重要な機構の一つとなっている。コンプレキシン(CPX)は分子量約15,000の可溶性タンパク質で、アミノ酸配列が良く似たIおよびIIの2種類のアイソフォームが知られている。3つのグループによってほぼ同時にcDNAクローニングと分子構造の解明がなされたため921タンパク質、あるいはシナーフィンとも呼ばれている。CPXは脳に多く発現しシナプス前部に局在していること、*in vitro*でシンタキシンへの α SNAPの結合を抑制することなどから、神経伝達物質の放出に何らかの重要な役割を果たしていると考えられている。今回我々はシナプス伝達におけるCPXの役割を明らかにするためアメフラシのbuccal ganglionを用いて解析を行った。

シナプス前細胞に抗CPX-II抗体を注入すると一過的にシナプス後電流の大きさが増大した。同量のコントロールのマウスIgGを注入した場合にはシナプス電流の大きさにはなんらの変化も生じなかった。大腸菌で発現させたラットCPX-IIや α SNAPをシナプス前細胞に注入すると、前者ではシナプス後電流の大きさの減少が、後者では増大が引き起こされた。CPX-IIによるシナプス後電流の抑制効果は α SNAPを注入すると打ち消された。以上の結果はCPX-IIがシナプス前終末で α SNAPと拮抗し神経伝達物質放出を抑制的に制御していることを示している。

CPXの細胞内分布を培養したラット海馬神経細胞で調べたところ、神経伝達物質の放出に必須なシナプトタグミンやVAMP-2のシナプス前部への局在化は培養後1週間目で既に起こっているのに対し、CPXの局在化は培養3週目以降でないと引き起こされなかった。培養4週目では75%以上の海馬神経細胞がCPX-IおよびIIを共に発現しているにも関わらず、個々のシナプス前終末ではどちらか片方の抗体にのみ陽性なものが多く認められた。これらの結果は神経細胞はCPXアイソフォームの局在化のパターンを変えることによって、個々のシナプスの機能を互いに独立に変化させている可能性を示唆している。

本研究はフランスCNRSのG. Baux, P. Fossier, N. F. Morel博士らとの共同研究として行われた。

264 1C MS5-3 1038

プロテインキナーゼCによる開口放出の制御

御園生 裕明、今泉 美佳、熊倉 鴻之助
(上智大学 生命科学研究所 神経化学部門)

フォルボルエステルによるプロテインキナーゼC(PKC)の活性化が分泌機能を亢進することは多くの神経分泌細胞で知られているが、そのメカニズムは不明である。本研究ではPKCの活性化による分泌増大の分子メカニズムを明らかにする目的で、高透過性クロマフィン細胞からのカテコールアミン放出に対するフォルボルエステルTPAの作用を検討した。

副腎クロマフィン細胞をジギトニンで処理して細胞膜の透過性を高めた高透過性細胞における研究から、開口放出はMgATP依存性に分泌顆粒を放出可能な状態に準備するプライミング過程と、MgATP非依存性にCa²⁺の流入に伴って準備された顆粒を細胞膜と融合させる過程の、少なくとも2つの素過程からなることが示唆されている。高透過性細胞をMgATPで前処理すると、その後のMgATP非依存性放出が増大する。これはMgATP依存性プライミングの活性を反映している。細胞をTPAで処理することにより、このMgATPのプライミング作用が選択的に増強された。さらにPKC α 、 β 、 γ を選択的に活性化するシメラトキシンによってもプライミングが増強され、PKC α 、 β の特異的阻害剤G β 5976はTPAの効果を抑制した。クロマフィン細胞では主としてPKC α が発現していることから、TPAはPKC α の活性化を介してプライミングを増強し、カテコールアミン放出の増大を引き起こすと考えられる。

我々は以前にプライミング過程が3量体GTP結合タンパク質Goによって抑制的に調節されていることを報告している。またGAP-43はPKCの主要な基質であり、Goを直接活性化することが知られている。そこでTPAの作用に及ぼす抗GAP-43抗体の効果を検討した。抗GAP-43抗体で高透過性細胞を処理することにより、プライミングが増強された。また抗GAP-43抗体の存在下ではTPAは相加的な増強を示さなかった。さらにPKCによるGAP-43のリン酸化を阻害することが知られているカルモデュリンをあらかじめ作用させることにより、TPAの増強作用が打ち消された。以上の結果からTPAによって活性化されるPKCは、GAP-43のリン酸化を介してプライミングを増強することが示唆された。

265 1C MS5-5 1037

開口放出関連蛋白質HPC-1/Syntaxin1A遺伝子のWilliams症候群患者染色体における半接合体欠失

中山高宏^{1,4}、松岡瑠美子²、木村美佐³、浅川修一³、広田浜夫²、御子柴克彦⁴、清水淑子⁵、清水信義³、赤川公朗¹ (杏林大・医・2生理¹、東京女医・循小²、慶応大・医・分生³、東大・医科研・化学⁴、杏林大・保・臨遺伝⁵)

神経細胞膜抗原として発見されたHPC-1/Syntaxin1Aは、現在では、多くの細胞種において細胞内膜輸送系を制御することにより多様な細胞生理現象に関与する分子量35KDaの形質膜結合蛋白質であると考えられている。特に神経細胞では、伝達物質の開口放出並びに神経発芽に関わる、ある種の神経可塑性制御因子として機能していると考えられている。

我々は、このHPC-1/Syntaxin 1A遺伝子とヒトの遺伝子疾患との関連を検索するために、ヒトHPC-1/Syntaxin 1A cDNA及びゲノム遺伝子をクローニングし、染色体FISH解析及びヒト/マウス染色体ハイブリッドパネル解析による染色体遺伝子座位の決定を行った。その結果、ヒト7番染色体長腕11.2領域(7q11.2)にその遺伝子座位が存在していることを解明した。この領域は、妖精様顔貌、大動脈弁上狭窄症などの心疾患、特有の精神症状(cognitive profile)を有するWilliams症候群(WS)患者においてみられる染色体欠失領域に一致していた。WSの原因遺伝子として同領域に座位しているelastin、LIMK1遺伝子が確認されているが、その特有の精神症状を規定している原因遺伝子は、未だ解明されていない。

そこで、WSとの関連を明らかにするため、elastinを含む領域の欠失を認めたWS患者の染色体を用いたFISH解析を試みた。その結果、46例全例についてHPC-1/Syntaxin 1Aの半接合体欠失がみられた。これらの結果より、開口放出関連蛋白HPC-1/Syntaxin 1AがWSの原因遺伝子の1つであり、またWS特有の精神症状を規定している可能性が示唆された。

266 1P 1036

シビレエイ電気器官に存在する融合複合体構成蛋白質シナーフィンの解析

石塚 徹, 西須 英雄, 阿部 輝雄

(新潟大・脳研・細胞神経生物学)

シナーフィン (コンプレキシン) は、融合複合体 (docking/fusion complex) を構成している細胞質蛋白質で、これまでにウシ、ラット、マウス、ヒトでクローニングされている。シナーフィンには、少なくとも2種類のアイソフォームが存在しており、またそれぞれのアイソフォームはこれまで調べられている哺乳類間で完全に保存されている。シナーフィンの構造と機能との関連を明らかにする目的で、日本産シビレエイ *Narke japonica* の電気器官に存在するシナーフィンを追求した。

シビレエイ電気器官から調製したシナプトソーム画分を、哺乳類のシナーフィンを認識するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いてイムノブロットを行うと19-21 kDaの2種類のシナーフィンが検出された。また、ラット脳シナーフィン cDNA をプローブとしてシビレエイ電気葉 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、哺乳類のシナーフィンと非常に高い相同性 (83-93%) を示す3種類のクローン (Nj-synaphin 1a, 1b, 2) を得た。さらに、電気器官シナプトソーム画分の Triton X-100 抽出物を用いて抗シンタキシン1モノクローナル抗体 SPM-1 による免疫沈降を行うと、シンタキシンの他に SNAP-25, VAMP とともにシナーフィンが共沈した。

以上のことから、シナーフィンは魚類から哺乳類まで非常に高度に保存されていること、シビレエイ電気器官に存在する融合複合体は、哺乳類の融合複合体と同様に、シナーフィンを構成成分の一つとして含んでいることが明らかになった。これらのことから、シナーフィンは脊椎動物における神経伝達物質の開口分泌過程で重要な機能を果たしていることが示唆される。

(本研究は東京大学薬学部の鈴木利治、桐野 豊先生との共同研究である。)

267 1P 1035

開口放出機構におけるシナプトタグミンの役割

今泉美佳¹⁾、福田光則^{2,3)}、新延道夫^{3,4)}、
笹川展幸⁵⁾、御園生裕明¹⁾、御子柴克彦^{2,3)}、
熊倉鴻之助¹⁾

1)上智大・生命研、2)理研・ライフサイエンス筑波・分子神経、3)東大・医科研・化学、4)阪大・蛋白研、5)慶応大・医・薬理

シナプス小胞膜タンパク質、シナプトタグミンはC2ドメイン (C2A, C2B) を持ち、開口放出においてCa²⁺センサーの1つとして働くことが推察されているが、生理的な役割は明らかではない。

C2A, C2Bドメインは高い相同性を持つが、それぞれ異なった機能を持っていることが最近見出された。C2AドメインはCa²⁺依存性にリン脂質と結合し、C2BドメインはCa²⁺非依存性にリン脂質と結合する。さらに、C2BドメインにはI₁, 4, IP₅, IP₆などのイノシトールポリリン酸 (inositol polyphosphates: IPS) がCa²⁺非依存性に特異的に結合する(Fukuda et al., 1994)。

我々は、高透過性クロマフィン細胞からの開口放出におけるC2A, C2Bドメインの役割と、IPS結合の生理的意義について検討を行った。この細胞系では、開口放出におけるATP依存性ブライミング過程とCa²⁺依存性フュージョン過程を区別して研究することができ、C2A抗体、C2B抗体およびIPSを用いた解析により、1) C2AドメインへのCa²⁺結合は、Ca²⁺依存性フュージョン過程の促進に働く、2) C2B抗体はCa²⁺依存性放出に影響を及ぼさないが、Ca²⁺非依存性の自発性放出を増加させる、3) IPSはCa²⁺依存性フュージョン過程と自発性放出を阻害するが、C2B抗体処理によりこれらの阻害がみられなくなる、4) IPSの阻害は、高濃度のCa²⁺によっても打ち消される。

これらの結果から、IPSのC2Bドメインへの結合は静止時における自発性フュージョンを抑制しており、Ca²⁺流入によるC2AドメインへのCa²⁺結合によりこのフュージョン抑制が解除されることが示唆された。すなわち、シナプトタグミンへのIPS結合によるフュージョン抑制は、プライムドプールを一定の容量に保持するクランブ機構であり、Ca²⁺はクランブを解除し、フュージョンを進行させると考えられる。

高透過性細胞にCa²⁺刺激を行うと、実際に放出に先立って一過性 (15s以内) のIPS上昇が測定buffer中に観察された。この上昇の一部はCa²⁺刺激によってC2Bドメインから解離したIPSである可能性が推察される。

268 1P 1034

シナプトタグミンIを欠失したPC12細胞での他のアイソフォームの発現

笠井 陽子、桑原 玲子、片岡 正和、高橋 正身
(三菱化学生命科学研究所)

シナプトタグミンは主に中枢および末梢神経系のシナプス小胞膜と前シナプス膜とに局在する糖蛋白で、神経伝達物質の放出に重要な役割を担っていると考えられてきた。最近、ラットでは少なくとも11種のアイソフォームがあり、一部は非神経系組織にも存在することが明かにされた。これらは一箇所の膜貫通ドメインとCキナーゼのC2ドメインに相同な二つのドメインからなる共通のドメイン構造をもっている。

シナプトタグミンの役割を明かにするために、私共はこれまでにシナプトタグミンIを欠失したPC12細胞株を樹立したが、すべての変異株でCa上昇によるカテコールアミンとアセチルコリンの正常な分泌がみられた。その理由として、これらの変異株で他のシナプトタグミンアイソフォームが代役として機能している可能性がある。私共はシナプトタグミンIと相同性の高いアイソフォームであるシナプトタグミンIX、あるいは清野 (千葉大医) のと協同でcDNAクローニングを行ったシナプトタグミンIIIの発現と分布について調べた。

各々、MBP融合シナプトタグミンIXあるいはGST融合シナプトタグミンIIIを用いて抗体を作製し、イムノブロット法により検討した。抗体の活性に差があるので、まず一定量のリコンビナント蛋白を用いたイムノブロットを行い、プロットのシグナルと蛋白量の関係を定量化した。PC12細胞ではもともと、シナプトタグミンIIは発現していないが、シナプトタグミンIXとシナプトタグミンIIIの発現は極めて低レベルで、シナプトタグミンIの1/100程度であった。また、シナプトタグミンIを欠失している株でシナプトタグミンIXやIIIの発現が増強するということは見られなかった。これらのことから、シナプトタグミンI欠失細胞の正常な分泌を他のアイソフォームが担っているとは考えにくい。

一方、シナプトタグミンIXおよびIIIのラット組織内分布あるいは発生に伴う脳内発現の変化を調べた。シナプトタグミンIXの発現は生後2週間で一過性に増加し、その後は低レベルであった。これらの結果から、シナプトタグミンIXはsynaptogenesisに関与している可能性が示唆される。

269 1P 1033

L-threo-PDMPはガングリオシド生合成および機能的シナプス形成を促進し、脳虚血ラットにおける記憶保持能を改善する

井ノ口仁一、水谷昭弘、神保雅之、臼杵靖剛、山岸究、望月秀雄（生化学工業（株）東京研究所）；村本和世、小林和夫、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所・神経生化学研究部門）；岩崎克典、大神祐輔、藤原道弘（福岡大学薬学部・応用薬理学教室）

脳ガングリオシドのシナプス機能における役割を解明するため、ラット大脳皮質由来の神経細胞をL-threo-PDMP (L-PDMP) または D-PDMPで処理し、ガングリオシドの生合成能を変化させた。

グルコシルセラミド合成酵素阻害剤であるD-PDMPで内因性ガングリオシドを枯渇させると、シナプス活動を示す、ニューロン間の同期した自発的細胞内カルシウムイオン濃度変動の振動数が減少した。この抑制効果は、ガングリオシドGQ1bを添加することによって正常化されたが、他のガングリオシドの効果は認められなかった。このことはGQ1bの*de novo*合成が、シナプス機能に必須であることを示唆している。

一方、D-PDMPの立体異性体であるL-PDMPは、ガングリオシド生合成をGM3、GD3、GQ1b合成酵素を活性化することによって促進するとともに、機能的シナプス形成を促進した。さらに、シナプス形成促進効果に比例してp42 MAPキナーゼ活性も促進されたことから、L-PDMPの神経栄養因子様作用が示唆された。

L-PDMPの長期記憶に及ぼす効果を生体内で評価するため、ラットを八方向放射状迷路で2～3週間トレーニングし空間認知記憶を獲得させた後、前脳虚血モデルを作成した。虚血処置24時間後から6日間L-PDMPを腹腔内投与すると、空間認知記憶障害が改善された。以上の結果から、セラミドアナログの神経変性疾患に対する治療効果が期待される。

270 1P 1032

レチノイン酸による神経細胞分化誘導とGD3合成酵素遺伝子の発現

小山内 たか
(都臨床研、生命情報)

当研究室では、ラットGD3合成酵素のcDNAのクローニングに成功し、脳組織における発現が発生段階により影響を受け、神経発生初期に強く発現する事を見出した。本遺伝子の発現とガングリオシドの神経系への分化過程での役割を明らかにする一貫として、レチノイン酸などの刺激によって、神経細胞へと分化する多能性幹細胞 (P19) の系を用いた。この細胞はレチノイン酸により神経細胞へ分化するが、DMSOの存在下では筋細胞に分化し、神経細胞へは分化しない。未分化細胞、未分化細胞にレチノイン酸を添加した凝集塊細胞、レチノイン酸添加の神経分化細胞、未分化細胞にDMSOを添加した凝集塊細胞、DMSO添加の筋細胞群について、ガングリオシドの発現をTLC免疫染色法、FACS法、細胞の組織染色法によって検討した。また、GM3合成酵素(α 2,3-シアル酸転移酵素,SAT-I), GD3合成酵素(α 2,8-シアル酸転移酵素,SAT-II), GT1b合成酵素(α 2,3-シアル酸転移酵素,SAT-IV), GQ1b合成酵素(α 2,8-シアル酸転移酵素,SAT-V)の活性を調べた。GD3合成酵素遺伝子mRNAの発現レベルはノーザンブロット法で解析した。

ガングリオシドの発現で、GD3は凝集塊細胞で、顕著に増加していた。GT1bは実験に用いた全ての細胞で検出された。それに対して、GQ1bはレチノイン酸処理の凝集塊細胞および神経分化細胞のみに検出されたのが、特徴的であった。

レチノイン酸処理によるシアル酸転移酵素活性の変化においては、 α 2,3-シアル酸転移酵素のGM3合成酵素とGT1b合成酵素活性レベルは神経分化細胞で高く、また、 α 2,8-シアル酸転移酵素のGD3合成酵素とGQ1b合成酵素活性レベルは凝集塊細胞で高い傾向を示した。

GD3合成酵素遺伝子mRNAの発現レベルはレチノイン酸処理の凝集塊細胞および神経分化細胞で増加していた。また、GD3合成酵素活性も同様の細胞で上昇し、未分化細胞では低レベルであった。DMSO添加の細胞では、GD3合成酵素活性とそのmRNAの発現は認められなかった。この結果から、GD3合成酵素遺伝子はレチノイン酸による神経分化へコミットした時期に昂進することがわかった。

この研究に対して佐内豊、渡辺由美子両博士（都臨床研、生命情報）の協力を得た。

271 1P 1031

マウス神経芽腫細胞の細胞周期に対するスフィンゴ糖脂質の効果

上村 敬一, 武富 保

(信州大学医学部・加齢適応研究センター・加齢生化学)

マウス神経芽腫細胞にグルコシルセラミド合成酵素阻害剤を添加すると、G0/G1期での細胞周期の停止による増殖抑制が起こる。培地に各種のスフィンゴ糖脂質を添加することにより細胞増殖の回復が起こし得るか、またスフィンゴ糖脂質のみを加えた場合に細胞周期にどのような効果を及ぼすかについて検討した。

マウス神経芽腫細胞 NS-20Y を、糖脂質合成酵素阻害剤 PDMP (1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol)、各種スフィンゴ糖脂質の存在下で24時間培養したのち固定、propidium iodide、抗 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 抗体による染色によりフローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。細胞内 Ca イオン濃度は蛍光色素 Fluo-3 を用いてフローサイトメトリーにより測定した。

対数増殖期の NS-20Y 細胞に 25 μ M D-threo-または 50 μ M DL-threo-PDMP を添加すると、S 期細胞の減少 (約 20%) と G0/G1 期細胞の増加 (約 20%) がみられた。NS-20Y 細胞の主要な中性糖脂質である lactosylceramide、globotetraosylceramide、主要なガングリオシド GM1、GD1a について、PDMP と共に培地に添加 (最終濃度 60 μ M) してその効果をみたところ、期待された細胞増殖の回復は起こらなかった。

一方、スフィンゴ糖脂質を単独で培地に添加した場合、GM1 に明らかな増殖の抑制効果が認められ、対照と比べ、60 μ M GM1 の存在下で S 期細胞の減少 (約 16%) と G0/G1 期細胞の増加 (約 15%) がみられた。Lactosylceramide、globotetraosylceramide、GD1a は細胞周期に全く影響を与えなかった。GM1 からシアル酸を除いた gangliotetraosylceramide、および、調べたその他のスフィンゴ糖脂質 (sulfatide、Gal α 1-3 neolactotetraosylceramide、Forssman glycolipid) にも効果は無かった。

ガングリオシド GM1、GD1a の添加により生じる可能性のある Ca²⁺ の細胞内への流入について検討したが、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は認められず、GM1 の示す細胞周期への効果がどのような機構によるのかは、現在のところ不明である。

272 1P 1030

糖蛋白質糖鎖の化学的糖鎖スクリーニング法の自動化と応用

藤本一朗, M. Krishna、田中文啓、長東俊治、長谷純宏、池田一裕

(岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経情報)

神経系の細胞の成熟化や細胞移動には細胞-細胞間の情報交換が重要な役割をしており、これには細胞表面に多数存在する糖鎖が深く関与していると思われる。我々はこれまでに糖蛋白質糖鎖を脳組織から直接切り出して解析できる系 [化学的糖鎖スクリーニング法] を開発し、脳特異的に発現する新たな糖鎖 (BA1, BA2) を発見している。しかし、現行では 1 検体を解析するのに 1 週間近く時間を要していたため、今回この手法の自動化を試みた。これはアセトン沈殿させた微量 (2mg) の組織から全自動糖鎖切断・精製装置 (GlycoPrep1000, Oxford Glyco Systems) と全自動糖鎖蛍光標識装置 (GlycoTag, TaKaRa) を用いて糖鎖を単離した後、夾雑物をゲル濾過・順相カラム HPLC を用いて除きイオン交換・逆相カラム HPLC で詳細に脳の糖鎖構造を調べる方法である。まず単純な糖蛋白である Taka-amylaseA を用いて検出条件と収率を求めた。その結果、低い収率にも関わらず高い再現性が得られ、神経発生段階の時期特異的な変化を比較するような系では十分に有効であることがわかった。次に脳組織において再現性が保持されるかの検討を行い、生後五日目の同腹のマウス小脳では全く同じ糖鎖の HPLC パターンを示す事を明らかにした。この化学的糖鎖スクリーニング法は従来行われてきたモノクローナル抗体やレクチンを用いて脳特異的糖鎖を発見する方法と異なり、脳組織で存在している全ての糖鎖種を対象として解析できる大きな利点がある。この方法の自動化により、ある特定の細胞群の種々の分化段階において発現する糖鎖を単離し、その構造を決定することが可能となった。各週令のマウス小脳からの単離糖鎖の比較を行ったので報告する。さらに、4%パラホルムアルデヒドで固定した脳標本からも糖鎖が回収でき、解析可能であることも明らかにした。

273 1C MS6-1

N23K/N27K (orphanin FQ 前駆体遺伝子) による神経突起形成作用

斎藤祐見子^{1,3}、丸山 敬²、西道隆臣¹、川島誠一¹
 (1)都臨床研遺伝情報、2)岡崎国立生理研神経化学、
 3)カリフォルニア大アーバイン校)

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 法により、dibutyl cAMP (dbcAMP) による神経分化に伴ってその発現量が一過的に著しく増加する遺伝子 N23K/N27K を cDNA クローニングしてきた。NS20Y 細胞の神経分化過程及びマウス脳神経発生過程を抗 N23K/N27K タンパク質抗体により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。ところが意外なことに、本遺伝子は新規オピオイド orphanin FQ をコードすることが判明した。今回は、本遺伝子の分化における機能を更に明らかにするために、未分化 NS20Y 細胞に N23K/N27K を導入し、その効果を検討した。

N23K, N27K をそれぞれ pcDNA3, pcep4 へ組み込んだコンストラクトを作成し、リン酸カルシウム法により未分化 NS20Y 細胞へ導入後、G418 またはハイグロマイシンで遺伝子導入細胞を選別した。ベクターのみを導入した細胞の形態は未分化細胞と区別がつかないが、N23K, N27K をそれぞれ導入した細胞では dbcAMP による処理なしで神経突起を形成した。遺伝子導入細胞では、N23K/N27K タンパク質はゴルジ体付近と突起先端にドット状に発現し、この局在は dbcAMP による分化時の局在と一致する。細胞に N23K と N27K を同時に発現させると、単独に発現させた場合に比べて約 2 倍長い突起を形成した。この突起形成能は他の神経ペプチド遺伝子には見られない性質であり、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] Saito et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 539. [2] Meunier et al. (1995) *Nature* 377, 532. [3] Reinscheid et al. (1995) *Science* 270, 792. [4] Saito et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 15615. [5] Saito et al. (1997) *J. Neurosci. Res.* in press

274 1C MS6-2

ギセリン同種間結合活性による毛様体神経節細胞からの神経突起伸展

平英一*、薮野智子*、塚本康弘**、丁云*、佐久間貞重**、三木直正* (*大阪大学大学院医学系情報薬理、**大阪府大獣医病理)

ギセリンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着因子であり、ラミニンファミリーに属する神経突起伸展因子 (Neurite outgrowth factor, NOF) に結合する。ギセリン発現細胞を用いた実験等により、ギセリンは同種間結合活性を持つことをも見出している。今回、我々はギセリン発現細胞上でニワトリ毛様体神経節細胞を培養することにより、ギセリンの同種間結合活性により神経突起が伸展するかどうかを検討した。さらに、NOF による突起伸展との形態的差異を検討した。

まず、6 日目胚ニワトリ毛様体神経節細胞表面上にギセリンが発現していることを免疫細胞化学で確認した。ギセリン恒常発現細胞のフィーダーレイヤー上に、6 日目胚毛様体神経節細胞を培養した。対照として用いたマウス線維芽細胞上では突起伸展は見られなかったが、ギセリン発現細胞上では著明な突起伸展が見られ、これはギセリン抗体により特異的に抑制された。突起を持つ細胞数が時間とともに増加し、かつその突起が時間とともに伸長することから、ギセリンは突起伸展の誘導とともに、突起の伸長能も持つと考えられる。

一方、NOF 塗布細胞皿上で培養した神経節細胞からは、複数の突起が伸展し、かつそれぞれの突起は分岐に富んでいる。以上のことより、ギセリンの同種および異種間細胞接着活性が、生体において神経突起の複雑な形態形成過程に関与している可能性が示唆された。

275 1C MS6-3 1029

PC12D細胞では、NGFによる神経突起誘導にMAPキナーゼ活性化は必須でない。

佐野 護、北島 哲子（愛知県コロニー研究所）

神経成長因子(NGF)によるPC12細胞の神経突起伸張誘導現象は、受容体TrkAのチロシン磷酸化に基づくras-raf-MEK-MAPKの連続的活性化とそれに伴う新たな遺伝子発現によるとの仮説が多くの研究結果より、ほぼ認められる現状である。MEKの特異的阻害剤PD98059は、培養液に添加すると、NGFによるMAPKの活性化を阻害し、PC12細胞の神経突起誘導を抑制し、上記仮説の確認として報告されている(Pang et al.1995)。しかし我々の樹立したPC12D細胞では、50 μ M PD98059により、NGFによるMAPK活性化を90%阻害した条件下で、神経突起が誘導された。細胞を阻害剤処理した時のMAPK活性化の抑制を、ウエスタンブロットによる、リン酸化型MAPKの検出、およびMAPKのチロシンリン酸化の程度からも同定した。またNGF処理、数分後細胞周囲にラッフルの形成が見られるが、この形態変化の誘導も、MEK阻害剤の影響はなかった。最近、Klinzら(1996)は、ニワトリ交感神経のNGFによる突起伸張誘導が、PD98059によって阻害されない研究結果を報告している。PC12細胞とPC12D細胞および交感神経などのNGFによる神経突起誘導メカニズムの違いを次のように解釈した。PC12細胞では、NGFによって進行する細胞分化(Initiation)の過程と、神経突起誘導(Elongation)の過程が連続的に起こる。MAPKシグナル伝達系と遺伝子発現制御は、Initiationの過程に必要とされ、PC12D細胞や培養交感神経細胞では、この過程が既に終了していると考えられ、NGFによる神経突起のElongationは全く別のメカニズムの関りが想定される。

PC12D細胞に、ras作用を阻害するmutant ras遺伝子(Ha-ras-Asn17)を遺伝子導入した株を分離したところ、これらの株は、rasを阻害することによって、cAMPによる突起誘導に影響することなく、NGFによる神経突起の誘導のみが阻止された。従って、NGFによる神経突起のElongationの過程は、rasの活性化から、rac-rho-actinなどのMAPKカスケードとは異なるシグナル伝達系により進行する可能性が推察される。

276 1P 1028

脱分極刺激により誘導されるPC12細胞の神経突起伸長の過程にはCa依存性のNO合成酵素の活性化が必要

吉田 克、中川裕之、宮本茂昭

(九州工業大学情報工学部。生物化学システム工学教室)

PC12細胞は神経成長因子(NGF)の作用だけでなくKClによる脱分極刺激を与えても神経突起を伸長することが分かってきた。この形態変化は細胞周期が細胞増殖のphaseから細胞分化のphaseに切り換えられるためによると考えられる。細胞内でこのswitching機能を果たす分子の1つが一酸化窒素(NO)と考えられている。

私達はNOの作用を細胞質のNO合成酵素(NOS)の阻害により生じる形態変化を顕微鏡で観察することにより解析を行った。NOSの阻害は強力な阻害剤の1つであるL-NAMEを使用して行った。NGF処理による神経突起伸長の場合はL-NAMEによる阻害効果は培養24時間後に既に現れ、培養4日目には完全に阻害された。45mM KClの脱分極刺激による突起伸長は2mM L-NAMEで約50%程度阻害され、10mM L-NAMEでは完全に(90%以上)阻害された。NGF処理による神経突起伸長のL-NAMEによる阻害作用は早い時期においては45mM KCl脱分極刺激を加え続けることにより相殺され、培養時間とともに神経突起伸長が回復した。

この細胞は脱分極刺激を加えるとL型のCa-channelが開くことが知られているので、脱分極刺激による神経突起伸長の過程にはCaイオンにより活性化される分子機構が関与することが考えられる。既にCa/calmodulin依存性のkinase IIが関与することが報告されている。他に有力な因子としてCa/calmodulin依存的にNOSを活性化するcalcineurinが関与している可能性が考えられる。

私達は強力なcalcineurin阻害剤として知られるcyclosporin Aを作用させることにより、KClによる脱分極刺激による神経突起伸長がかなり強く抑制されるという結果を得た。これらのことは脱分極刺激による神経突起伸長はNGFの場合と異なる情報伝達過程を経てNOSを活性化することにより行われていることを示している。

277 1P 1027

神経突起由来微小管の安定性：レーザー光による切断と脱重合過程の解析

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)

神経突起には、突起の形成と維持に関与する代謝的に安定な微小管が多数存在することが示されている。本研究では、この安定型微小管の性質と安定化機構を探るために、ビデオコントラスト増強微分干涉顕微鏡を用いて微小管安定性の直接観察を行うとともに、レーザー光による切断を行い、その脱重合過程を解析した。

実験系として生後14日齢ラット後根神経節細胞を用い、無血清培地で6~7日間培養した後、高倍率顕微鏡観察用フローセルに封入し、顕微鏡ステージ上で37℃に保った。フローセル内を0.2% Triton X-100を含む緩衝液で灌流して細胞膜を溶解し、突起内の細胞骨格フィラメントを露出した。これらのフィラメントの一部は細胞外液中で急速に消失したが、1時間後にも多数のものが残存していた。灌流液にタキソール (10μM) を添加しておくことと膜除去後もフィラメント数は変化しないことから、これらは微小管であると示唆されるが、さらに、抗β-チューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法により、タキソール非存在下に30分以上残存するフィラメントについても微小管であることを確認した。この安定型微小管の安定化機構を探るために、顕微鏡にピコ秒パルスレーザー光(波長532nm、出力約10mW)を導入し、試料面で集光して微小管に照射(1/8秒)、切断したところ、ほとんどのものが脱重合を開始した。脱重合には1)一様な速度で脱重合、2)段階的に脱重合、3)途中で脱重合を停止、の3つのタイプが見られた。切断後の脱重合速度は(+)端の方が(-)端に比べて速く、1)のタイプの方が2), 3)よりも速かった。膜除去から切断までの時間に伴い2), 3)タイプのものが増加し、同時に各々の脱重合速度が低下することから、外液中における残存時間が微小管の長軸に沿った領域安定性を反映することが示された。また切断により初めて脱重合を開始することから、安定型微小管の形成には末端の安定化も重要であることが確認された。

278 1P 1026

タウプロテインキナーゼ II とリン酸化タウのラット新生仔脳における局在

内田庸子、佐藤道夫、大沼純、石黒幸一
 (三菱化学生命科学研究所)

タウプロテインキナーゼ II (TPKII) は新生児脳とアルツハイマー病脳におけるタウの高リン酸化に関与している。TPKII はサイクリン依存性キナーゼ 5(Cdk5)とその活性化因子 p23 とのヘテロダイマーである。p23 は新規タンパク質 p34 の C 末端側断片である。TPKII 精製の過程で、p34 は不活性で大きな複合体を形成し、シナプス小胞関連タンパク質と共に存在していた。p34 の細胞内における局在を明らかにして、キナーゼの活性化に果たす p34 の本来の役割を明確にすることを目的とした。

誕生後 0 日(P0)、2 日(P2)、8 日(P8)、5 週(5W)のラット前脳から Gordon-Weeks(1987)の変法で成長円錐画分を単離した。これらを、抗 Cdk5、抗 p34(N または C 末端)、抗リン酸化タウ(PT205)の各抗体を用いて、免疫プロット、酵素抗体法による免疫電顕で解析した。成長円錐画分には Cdk5、p34、p23 とも存在した。免疫電顕で、P0 に見られる糸状足をもつ成長円錐の多くは抗 Cdk5、抗 p34 抗体で染められ、リン酸化タウも限定数の粒子に存在した。P2、P8 と発育につれて、長く伸びた糸状足、シナプス小胞を含む粒子が増え、糸状足の先端、シナプス接合部が濃く染まる。Hutterer ら(1983)の方法でえた粗シナプス小胞画分の 1%トリトン X-100 処理で、Cdk5、p23 はシナプス小胞関連タンパク質と共に可溶化されるが、p34 は少量の Cdk5 と共に沈殿に残る。P8 では、Carlin ら(1980)の方法で精製シナプトソーム画分からえたシナプス後膜肥厚画分に少量の Cdk5、p34、p23 を検出した。TPKII は特定のシナプトソームで機能していると考えられる。そこで、ラット新生仔脳における Cdk5、p34、リン酸化タウの局在を免疫組織化学的に検討した。おもに軸索系の線維路が強く染まり、新皮質では特異的領域に染色が見られ、海馬では、P2、P8 となるにつれて CA3 から CA1、歯状回へ染色が広まっていく。3 種の抗体は常に一致したパターンを示した。電顕では、細胞体と先端樹状突起、他のシナプスとの接合部位に存在することが確認された。TPKII とリン酸化タウは脳の構造構築とシナプス接合に関わっていると考えられる。

279 1P 1025

変異型単純ヘルペスウイルスベクターを用いたL1蛋白の機能解析

中井 陽子, 矢崎 貴仁, 植村 慶一
(慶応義塾大学医学部生理学教室)

神経細胞の再生メカニズムを探る目的で、末梢神経系グリア細胞では発現されているが中枢神経系グリア細胞では発現されていない接着蛋白L1に着目し、その突起伸張効果を検討した。

L1蛋白を強制発現させる手段として、変異型単純ヘルペスウイルスベクターによる外来遺伝子導入を試みた。ヘルペスウイルスベクターは、神経系細胞への親和性が高く、非増殖細胞にも感染可能で、またサイズの大きな外来遺伝子を組み込み可能であるという特性を持ち、そのため、例えばシュワン細胞の様な増殖能の低い神経系細胞へも効率よく外来遺伝子導入を可能にするのではないかと考え、同ベクターを選定した。

本研究では、元来L1蛋白を発現していない繊維芽細胞の一種であるペロ細胞に、ヘルペスウイルスベクターを用いてL1蛋白を強制発現させ、その上に生後4日目のラットより採取した後根神経節細胞を15時間培養し、突起伸張の様子を定量化した。

その結果、L1蛋白を強制発現させたペロ細胞上に培養した後根神経節細胞では、外来遺伝子を導入していないペロ細胞上に培養した後根神経節細胞と比較して約2.5倍の突起伸張効果が見られた。また、L1蛋白以外の蛋白を外来遺伝子として組み込んだヘルペスウイルスベクターを感染させたペロ細胞上でも同様の実験を行ったが、非感染細胞との有意差は見られず、ヘルペスウイルスベクターそのものの影響はないと考えられた。

以上の結果より、L1蛋白が神経細胞の突起伸張に対して重要な機能を有することが示された。

280 1P 1024

Sema D/collapsin-1の肺分枝形成抑制作用

五嶋良郎*, 伊藤隆明**, 宇高直子**, 前園雅子*, 佐々木幸生*, 谷口充洋*, 北村均**, 三須良實*, 藤沢肇*** (横浜市立大学医学部*薬理学教室、**病理学教室、***名古屋大学大学院理学研究科)

セマフォリン (Sema D/collapsin-1) は、神経成長円錐の運動を抑制し軸索の伸展を阻害する反発因子として位置づけられ、神経回路網の形成に重要な役割を担うと考えられる。一方その神経外における広範な存在、ノックアウトマウスの多彩な表現型などから形態形成因子としての、より普遍的な役割が示唆されている。セマフォリンの非神経組織における機能を解明することを目的とし、同分子の器官培養肺における形態形成、増殖、肺内神経の軸索伸張に及ぼす影響について検討した。

胎令12日マウス肺および胎令11日ハムスター肺を摘出し、無血清合成培地で2日間培養を行った。Collapsin-1 (0.4, 2, 10 U/ml) を培地に加え、培地交換を1日毎に行いさらに2日間培養を行った。培養終了1時間前に、チミジンアナログのプロモデオキシウリジン (BrdU) を培地に加えた。位相差顕微鏡下で、培養前および培養終了時の写真を撮影し、肺の分岐数を比較し、形態形成の指標として分枝形成指数を算出した。培養肺は、パラホルムアルデヒドで固定後凍結した。凍結切片を作成し、細胞増殖の指標として、気道上皮末端におけるS期細胞を明らかにするため免疫染色によりBrdU標識率を算出した。肺内神経の同定のため三量体G蛋白質Goαサブユニットの免疫染色を行った。

培養2日後、マウス及びハムスター肺において、Collapsin-1 (10 U/ml) 添加群に、明瞭な分枝形成の抑制と気道の嚢胞状拡張が認められた。一方、気道上皮末端におけるBrdU標識率には対照群との間に差は認められなかった。また、肺門部に出現する神経節細胞およびその神経線維の伸展度にも差は認められなかった。肺においてCollapsin-1は増殖及び細胞分化には影響を及ぼさず、その分岐形成過程を特異的に抑制すると考えられる。

281 1P 1023

LANPとadaptinの結合

田岡万悟、中山洋、荒木威、磯辺俊明
(東京都立大院・理・化)

[目的] Leucine rich Acidic Nuclear Protein (LANP)は小脳の成熟過程で一時的に発現量が増加するタンパク質である⁽¹⁾。LANPはその構造や分布、生後変化のパターンから、出生後の小脳の発達に関わるシグナル伝達機構への関与が示唆されているが、分子レベルでの作用機構の解明には至っていない。そこで、小脳の発達に関わるシグナル伝達機構の中でLANPの役割を明らかにすることを目的として、LANPの結合タンパク質を検索し、解析した。

[方法] LANPをグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として*E.Coli*内で発現させ、親和性及び、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。組織抽出液と混合後、結合タンパク質をGST-LANPごとグルタチオンセファロースに吸着させ、回収した。得られた結合タンパク質はSDS-PAGE後、銀染色法とウェスタンブロッティングにより検出した。また、銀染色後のゲルからタンパク質バンドを切り取り、ゲル内でトリプシン消化し、目的タンパク質を分解物として抽出した。分解物は逆相系HPLCで分離・精製し、一次構造を決定した。

[結果と考察] LANPに特異的に結合するタンパク質として、ラット小脳可溶性画分に主に分子量約90kDaの2種類のタンパク質が認められた。部分アミノ酸配列分析とその相同性解析から、高分子量のタンパク質はalpha adaptinAであり、低分子量のタンパク質はalpha adaptinCとbeta adaptin、構造未知タンパク質の、少なくとも3種類のタンパク質の混合物であることが判明した。ウェスタンブロッティングの結果からも、これらの結合タンパク質が細胞膜由来の被覆小胞タンパク質であるalpha adaptinとbeta adaptinを含んでいることが確認された。一方、非クラスリン被覆性小胞由来であり、beta adaptinと相同性が高いbeta COPや、ゴルジ由来のクラスリン被覆小胞タンパク質であるgamma adaptinは結合タンパク質画分に含まれていなかった。これらの結果から、細胞膜の輸送小胞タンパク質に対するLANPの結合は特異性が高く、エンドサイトーシスへの関与が想定された。また、alpha および beta adaptinとLANPの結合は成熟ラットでも確認され、これらの結合が小脳の形成だけでなく、その維持にも関与していることが予想された。さらに、LANP結合画分に含まれる構造未知タンパク質を解析することで、細胞質におけるLANPを介した情報伝達経路の解明が進むと期待される。

(1)K. Matsuoka et. al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9670-9674.

282 1P 1022

海馬形成におけるカハール・レチウス細胞とリーリンの役割

仲嶋一範¹、御子柴克彦^{1,2}、宮田卓樹^{1,2,3}、
工藤千加子¹、小川正晴³

(¹理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター分子神経生物学研究室、²東京大学医科学研究所化学研究部、³高知医科大学第二生理学教室)

我々は、これまでに正常マウスの脳をリーラーマウスに免疫することによりモノクローナル抗体CR-50を得た。CR-50は、抗原分子の機能を阻害できる中和抗体であることが従来の*in vitro*での解析により明らかになったが、*in vivo*での解析はまだされていない。また最近、リーラーで変異のある遺伝子としてリーリンがクローニングされたが、表現型との関連についての直接的な解析はまだされていない。その後、CR-50とリーリンとの関連を解析した結果、CR-50はリーリン蛋白質そのもののN末端近辺を認識することが明らかになり、リーリンの機能阻害が直接リーラーの表現型の原因になっていると考えられた。

本研究では、海馬をモデルとしてまずリーリンの局在を調べた。免疫組織学的に、リーリン陽性細胞はアンモン角、歯状回ともに最表層に存在していた。詳細な検討を行った結果、これら陽性細胞は大脳新皮質のカハール・レチウス細胞と同等のものであることがわかった。しかしながら、カハール・レチウス細胞のマーカーとして頻用されているカルレチニンには陰性の細胞も含まれていた。更に、CR-50の認識部位が*in vivo*において機能的に重要であるかどうか、そしてリーリンの機能阻害が確かにリーラーの表現型を引き起こすかどうかを調べるため、胎生期脳室内にCR-50を2回注入し、効果を調べた。その結果、確かにリーラー様に変換させることに成功した。以上の結果は、CR-50の認識部位が細胞の移動・配置に決定的に重要な機能を担っていることを示唆している。

283 1P 1021

*Reeler*に似た神経症状を示す自然発症 ミュータントマウス、*yotari*

永田栄一郎¹、米島宏幸²、松本峰男²、山田麻紀²、
仲嶋一範³、田中耕太郎¹、福内靖男¹、御子柴克彦^{2,3}

(1.慶応義塾大学医学部神経内科 2.東京大学医
科学研究所化学研究部 3.理化学研究所ライフサイ
エンス筑波研究センター分子神経生物学研究室)

*Reeler*に表現型の酷似した新規自然発症ミュー
タントマウス、*yotari*を発見した。*Yotari*は常染色体
劣性遺伝形式をとり、生後一週目頃よりの振戦、運
動失調を特徴として四週目までに全て死亡する。肉
眼所見では *reeler*同様、小脳低形成、小脳回の消失
が目立ち、また光顕的には小脳層構造の著しい乱れ、
分子層の退縮、プルキンエ細胞の顆粒細胞層への埋
没等が観察された。また大脳においても皮質構造の
乱れ、海馬においては錐体細胞層の多層化等が認め
られた。しかしながら興味深いことに、*yotari*及び
*reeler*ヘテロ接合体同士の交配では同様の表現型を
示す子孫は得られず、また *yotari* 大脳皮質
Cajal-Retzius 細胞等においては、*reeler*の原因遺伝
子である *reelin* の発現が正常に認められた。さらに
Cdk5, p35 や PAF acetylhydrolase Ib の3つの subunits
に対する抗体を用いた western blotting では、神経
系の形態形成に関わるそれら分子の発現量に異常は
認められなかった。なお抗type1 IP3 受容体抗体
18A10を用いた免疫組織染色では、顆粒細胞層に埋
没した*yotari* プルキンエ細胞において同分子の発現
が認められた。*Yotari*は *reeler*同様、中枢神経系の
細胞移動に障害を持つが、*reeler*とは遺伝子座の異
なるミュータントと判断された。今後中枢神経系の
形態形成を考える上で、*reeler*と絡め合わせた*yotari*
の解析が大きな意義を持つものと期待される。

284 1P 1020

小脳発生過程におけるリーリンの発現 制御

柴 玲子、宮田 卓樹、仲嶋一範、高橋 聖
一、小川 正晴、御子柴 克彦

(理化学研分子神経生物学研究室)

小脳の発生過程において顆粒細胞は、リーラー
マウスで欠損している蛋白質リーリンのN末端を
認識するモノクローナル抗体。CR-50に対し一過
性に免疫陽性を示す。小脳の皮質構造が形成され
る過程で、CR-50陽性の顆粒細胞はプルキンエ細
胞に隣接して存在する。プルキンエ細胞が整列し
た後細胞外に存在するリーリンは、この分子を発
現する顆粒細胞の平行繊維とプルキンエ細胞の樹
状突起との相互作用を介し、成長するプルキンエ
細胞の樹状突起に集合するとかがえられている。
この後顆粒細胞は免疫陰性に変化するが、分離培
養した顆粒細胞は長期培養後でも免疫陽性のまま
である。

プルキンエ細胞が生後の顆粒細胞におけるリー
リンの発現抑制を調節する可能性について調べる
ため、我々は生後20日から30日の間にプルキンエ
細胞が特異的に死滅するミュータントマウス、
*pod*マウスを用いて実験を行った。免疫組織学的
解析において、*pod*マウスでは正常マウスではす
でにリーリンがほとんど発現していない生後30
日の小脳においてより強い免疫陽性反応が観察さ
れた。ノーザンブロット解析でも同様に*pod*マウ
スの小脳でリーリンのmRNAの過剰発現が観察さ
れた。この結果はプルキンエ細胞が顆粒細胞のリー
リンの発現を調節する可能性を示唆する。現在こ
の可能性についてさらに検討するため、生後の顆
粒細胞を分離し、様々な条件下において培養解析
中である。

285 1P 1019

発育期神経組織のニューレグリンの
アイソフォーム

篠田 純、中尾純治、飯塚幸彦、鳥羽陽子、
植村慶一（慶應大学医学部生理）

神経組織の発育期に、ニューレグリン(NRG)は神経細胞に発現し、グリア系細胞の増殖、分化に重要な役割を果たす。既に末梢神経系のミエリン形成前に、軸索との接着の出来ないシュワン細胞にアポトーシスが起るが、このアポトーシスは、NRGの添加により、著明に抑制されることを示した。

発達過程のラット神経組織に発現するNRGのアイソフォームについて、解析を行い次の結果を得た。1) 新生ラット後根神経節、脊髄、脳に発現するNRGのアイソフォームを12種同定したが、そのうち9種は新規のものであった。2) 後根神経節と脊髄におけるNRGの発現量は同程度であり、脳ではより少なかった。NRGの発現パターンは3組織で比較的類似していたが、中枢神経系に特異的なアイソフォームの存在が示唆された。3) いずれの神経組織においても、分泌型に比較して膜貫通型、特に $\beta 1$ タイプのアイソフォームがより強く発現しており、パラクリン分泌とともに、細胞接着型情報伝達機構の存在が示唆された。4) シュワン細胞の増殖期から、ミエリン形成前期、ミエリン形成期に至るまで、後根神経節のNRGアイソフォームの発現はほぼ一定であった。この時期にNRGが安定した発現を示すことにより、幼若シュワン細胞に対して生存因子として作用することが示された。

286 1P 1018

ラット脳由来の神経前駆細胞の分化

中山たかね、山之端万里、塚田裕三
(創価大学 生命科学研究所)

胎生12日ラット脳の細胞懸濁液からフローサイトメトリーにより分取した神経前駆細胞(NPCs)の初代培養において、NeuronおよびGlia細胞の発現時期を調べる目的で、増殖因子bFGFと牛胎仔血清の細胞に与える影響について培養条件を比較し検討した。

培養はDMEM/F12培地にTransferrin(100 μ g/ml), Insulin(25 μ g/ml), Heparin(20 μ g/ml)を含むTIH/DFを基礎培地とした。

フローサイトメトリーにより得られたNPCsはbFGF+TIH/DF培地および1%FBS+TIH/DF培地で一晚培養した。この初期刺激後にそれぞれをTIH/DF培地で培養した細胞は、初期刺激がbFGFでは死滅したが、血清の場合ではNeuron様の突起進展が認められた。そこでbFGFまたは血清を初期刺激として用いた後の細胞をbFGF+TIH/DF, bFGF+1%FBS+TIH/DF, 10%FBS+TIH/DFの3種類の培地でそれぞれ培養し細胞の形態を調べた。bFGF+TIH/DF培地ではNPCsは細胞塊を形成した。培養期間が長期になると細胞塊を中心に突起の短い細胞が放射線状に分散して増殖した。細胞塊を形成した時期に血清を添加すると盛り上がっていた細胞塊がdish表面上に接着して増殖し始め、その上にNeuron様の突起の長い細胞が認められた。血清を含む培地ではbFGF添加時には見られなかった接着性の細胞が増殖した。bFGFを添加した培地では突起の短い細胞は認められたが、突起の長いNeuron様の細胞が認められなかったため、血清刺激によりNeuronが発現するのか、それとも血清を添加した培地で増殖する接着性の細胞による影響のどちらであるかを調べるため接着性細胞をフィーダーとして使い、10%FBSおよびbFGFで刺激した細胞をTIH/DF培地で培養した。いずれもNeuron様の突起進展が認められたため、血清が直接Neuronに影響を与えているのではない事が示唆された。細胞の差別化は蛍光抗体染色法により行った。

また、二次培養および培養法により得たNPCsについても同様の検討を行い比較した。

287 1C O-1

中枢神経型ナトリウムポンプ活性の
膜電位依存性

原 諭吉、古川 哲史*

(東京医歯大・院医・感染分子制御学、*難治疾患研・自律生理学)

Na⁺,K⁺-ATPase $\alpha 3$ サブユニットは脳、脊髄など中枢神経組織のニューロンに発現する触媒サブユニットで、広く分布する $\alpha 1$ サブユニットとは一次構造が異なる。我々は、これらのサブユニットをそれぞれ含む $\alpha 1$ 型と $\alpha 3$ 型 Naポンプの機能的差違について検討してきた。ATPase 反応の動力学的解析から、二種のリン酸化中間体 E1P $\rightleftharpoons$ E2P 平衡の偏りが $\alpha 1$ 型と $\alpha 3$ 型 Naポンプとで異なることを見いだし、この反応ステップが起電性であることから、 $\alpha 3$ 型 Na ポンプ活性が膜脱分極によって活性化されることを予想した。そこで $\alpha 3$ 型および $\alpha 1$ 型 Naポンプをそれぞれ発現する培養細胞を作成し、パッチクランプ法を用い膜電位の影響を調べた。

1) 生理的イオン条件では、 $\alpha 1$ 型 Na ポンプ活性は膜電位の影響をほとんど受けないが、 $\alpha 3$ 型 Na ポンプは静止膜電位付近では活性が低く、脱分極によって活性が増大した。2) 細胞外の Na⁺ に対する親和性が $\alpha 1$ 型 Na ポンプで $K_d=0.52M$ 、 $\alpha 3$ 型 Na ポンプでは $0.15M$ であった。従い 150mM 細胞外 Na⁺ 濃度では、E1P $\rightleftharpoons$ E2P 平衡の偏りに違いを生じることが強く示唆された。3) E1P(Na⁺) $\rightleftharpoons$ E2P+3Na⁺ 変換に伴う細胞膜を越えての電荷移動量から求めた E1P/E2P 比は、リン酸化中間体レベルから求めた E1P/E2P 比と一致した。4) 細胞外 Na⁺ に対する親和性と膜電位との関係から細胞外側にアクセスチャネル (high field access channel) が存在することが示唆された。

これらの結果から、 $\alpha 1$ 型 Na ポンプは細胞内 Na⁺ 濃度の増加によって活性化される。一方 $\alpha 3$ 型 Na ポンプは増加した細胞内 Na⁺ と結合して E1P の状態で留まり、脱分極に伴って E2P に変換し、輸送が起こると予想される。

288 1P 1017

遺伝子導入細胞を用いた神経細胞型 Naポンプ
活性調節機構の解析井上 順雄、曾我 智子、原 諭吉*、中山 孝、
加藤 尚彦 (横浜市立大学医学部第一生化学、
*東京医科歯科大学医学部感染分子制御学)

神経細胞における Naポンプ (Na,K-ATPase) アイソフォームの選択的な活性調節機構を解明する目的で、神経細胞型 ($\alpha 3$ 型) アイソフォームを安定に発現する形質転換細胞を用いて、その Naポンプ活性を種々の条件下で測定した。

BALB/c 3T3細胞に神経細胞型のラット $\alpha 3$ サブユニット cDNA を導入することにより得られた T3-3-3細胞 (Hara et al., FEBS Lett., 238, 27-30, 1988) を用いた。この細胞に本来の $\alpha 1$ サブユニットのほかに $\alpha 3$ サブユニットが存在することを、RT-PCRにより mRNA レベルで、また Western blot 解析によりタンパク質レベルで確認した。さらに、細胞膜分画の Na,K-ATPase 活性を測定し、 $\alpha 1$ 型活性と $\alpha 3$ 型活性を、ジギタリス阻害に対する感受性の違いにより区別して定量した。その結果、 $\alpha 3$ 型 Naポンプの存在量は全体の約 30% であった。

Naポンプ活性は、細胞への ⁴²K⁺ 取り込みを 24穴マルチウエル上で測定して求めた。無刺激の条件下では、この細胞の Naポンプ活性は非常に低値であったが、ナトリウムイオノフォア (monensin) で刺激すると、有意の活性 (13.4 ± 1.5 (nmol/min/mg protein), (n=11)) を示した。全体の Naポンプ活性を、 $\alpha 3$ 型 (Ouabain に対する $K_i \sim 5 \times 10^{-8} M$) 活性と、 $\alpha 1$ 型 (Ouabain に対する $K_i \sim 4 \times 10^{-5} M$) 活性に分けると、 $\alpha 3$ 型 Naポンプ活性は全体の約 30% であり、存在量の割合と同じであった。この結果は、 $\alpha 1$ 型と $\alpha 3$ 型 Naポンプがこの細胞内で同等にイオンを輸送していることを示しており、すでに報告した初代培養神経細胞の結果と異なった。一方、monensin 刺激に先立ち、1 mM dibutyryl cAMP, 100 μM forskolin, または 1 μM PMA で細胞を処理したが、Naポンプ活性はほとんど変化しなかった。培養神経細胞で起こる種々の刺激の後の Naポンプアイソフォームの選択的な活性調節は、この細胞では起こらなかった。

289 1P 1016

ラット脳内におけるヒスタミン再取り込み機構の存在について

櫻井映子, 櫻井栄一*, 渡邊建彦, 谷内一彦

(東北大学大学院・医学系研究科・細胞薬理学分野,

*東北薬科大学第一薬剤学教室)

ヒスタミンの再取り込み機構に関しては, 存在するという説と, 存在しないという両説があり, その存否についてはまだ明らかにされていない. そこで, すでに確立されている他の神経伝達物質の再取り込み実験方法を用いて, ヒスタミンの取り込み機構の存在について検討した.

SD ラット雄 (200~250g) の新鮮な脳ホモジネートより調整した P2 分画を用いて, [^3H]ヒスタミンの取り込み量を測定した.

ラット脳の P2 分画中に含まれる蛋白量に依存して, [^3H]ヒスタミンの結合量は直線的に増加した. この反応に対する温度の影響を経時的に観察したところ, 4℃ではほとんど結合量の増加は見られなかったが, 20℃より 37℃と温度が上昇するにつれ結合量が増加した. 非放射性のヒスタミン存在下における [^3H]ヒスタミンの取り込みを見たところ, [^3H]ヒスタミンの結合量はヒスタミン濃度により 2 相性の反応を示した. このことから, ヒスタミンの取り込み機構には低親和性と高親和性の 2 種類の機構が関与している可能性のあることが示唆された.

ショ糖の濃度勾配を用いて P2 分画をさらに細分画した結果, P2 分画中シナプトソームが含まれる分画の中にヒスタミンの取り込み量が最も多いことがわかった.

上述のヒスタミンの取り込みはヒスタミン H1, H2, H3 受容体リガンドおよびコカイン, GBR12935, フェネルジンなどの薬物による影響を受けず, 三環性の構造を持つ薬物によってのみ抑制された.

ラット前脳 P2 分画へのヒスタミンの取り込み量は $42.33 \pm 2.90 \text{ fmol/mg protein/15min}$ となり, ヒスタミンの取り込み機構の存在が示唆された.

シンポジウム一覧

番号	日時・場所	タイトル	オーガナイザー・座長
S1	第1日午前 A会場	虚血性ニューロン死： 基礎から臨床へ	田村 晃（帝京大・医） 片岡 喜由（愛媛大・医）
S2	第1日午後 A会場	プロスタグランジン関連化合物の 神経化学の最前線	早石 修（大阪バイオサイエンス研） 渡辺 恭良（大阪バイオサイエンス研）
S3	第2日午前 A会場	グリア細胞の分子・細胞生物学	池中 一裕（岡崎生理研） 高坂 新一（精神神経センター神経研）
S4	第2日午前 B会場	神経発生： パターン形成から高次機能まで	岡野 栄之（阪大・医） 岡本 仁（慶大・医）
S5	第3日午前 A会場	糖鎖と神経疾患	鈴木 邦彦（Univ. N.Carolina） 宮武 正（昭和薬大）
S6	第1日夕方 A会場	神経化学会公開シンポジウム 精神神経疾患の分子基盤－パーキンソン病	水野 美邦（順天堂大・医） 西澤 正豊（自治医大）

ミニシンポジウム一覧

番号	日時場所	タイトル	オーガナイザー・座長
MS1	1日目午前 B会場	アルツハイマー病： 鍵分子の挙動と神経細胞死	上田 健治（都精神研） 柳澤 勝彦（長寿研センター）
MS2	1日目午前 B会場	核内情報伝達を手がかりとする 神経機能解明に向けて	米田 幸雄（摂南大・薬） 吉川 和明（阪大・蛋白研）
MS3	1日目午後 B会場	栄養因子による神経機能の多重支配	松岡 一郎（北大・薬） 畠中 寛（阪大・蛋白研）
MS4	1日目午前 C会場	オリゴデンドロサイト/ ミエリンの最前線	阿相 皓晃（都老人研） 馬場 広子（生理研）
MS5	1日目午前 C会場	神経伝達物質放出の制御機構	高橋 正身（三菱生命研） 熊倉 鴻之助（上智大・生命研）
MS6	1日目午後 C会場	神経突起形成の細胞内メカニズム	白尾 智明（群馬大・医） 佐野 護（愛知県コロニー研）
MS7	2日目午後 B会場	アポトーシスのシグナル伝達経路	小池 達郎（北大院・理） 野村 靖幸（北大・薬）
MS8	2日目午前 C会場	可塑性とプロテインキナーゼ	福永 浩司（熊本大・医） 山内 卓（徳島大・薬）
MS9	2日目午前 C会場	虚血による神経細胞死の分子機序	松本 昌泰（阪大・医） 小倉 明彦（阪大・理）
MS10	3日目午前 B会場	精神神経疾患とその関連遺伝子	山脇 成人（広島大・医） 小川 紀雄（岡山大・医）
MS11	3日目午前 C会場	疾患モデル動物の発症・応答機構	光本 泰秀（大塚製薬） 加藤 聖（金沢大・医）

第40回日本神経化学会

		9時	10時	11時	12時
22日 (水)	A会場	S1-脳虚血 (田村 晃, 片岡 喜由)			
	B会場	MS1-アルツハイマー (上田 健治, 柳澤 勝彦)		MS2-核内情報伝達 (米田 幸雄, 吉川 和明)	TS1 ランチョン
	C会場	MS4-オリゴ/ ミエリン (阿相 皓晃, 馬場 広子)		MS5-伝達物質放出 (高橋 正身, 熊倉 鴻之助)	
	P会場	ポスター展示			

23日 (木)	A会場	S3-グリア (池中 一裕, 高坂 新一)			
	B会場	S4-神経発生 (岡野 栄之, 岡本 仁)			
	C会場	MS8-可塑性 (福永 浩司, 山内 卓)		MS9-虚血 (松本 昌泰, 小倉 明彦)	
	P会場	ポスター展示			

24日 (金)	A会場	S5-糖鎖 (鈴木 邦彦, 宮武 正)			
	B会場	MS10-神経疾患 (山脇 成人, 小川 紀男)		TS2 (江頭 亨)	TS3 ランチョンセミナー
	C会場		O3-(箕越 靖彦 溝渕 睦彦)	MS11-疾患モデル (光本 泰秀, 加藤 聖)	
	P会場	優秀ポスター展示			

松山大会日程概要

(オーガナイザー・座長)

13時	14時	15時	16時	17時	18時	19時
S2-プロスタグランジン (早石 修, 渡辺 恭良)			S6-パーキンソン 公開シンポジウム			
TS1 セミナー		MS3-栄養因子 (松岡 一郎, 畠中 寛)				
O1-(井上 順雄 金松 知幸)		MS6-神経突起 (白尾 智明, 佐野 護)				
(第 1 日)			討 論			

評議員会 総 会	特別講演 (柿本 泰男, 藤沢 仁)					
	MS7-アポトーシス (小池 達郎, 野村 靖幸)					
	O2-(盛政 忠臣, 嶋津 孝)					
(第 2 日)			討 論			

<u>ビアパーティ</u>		若 手 懇 親 会
名誉会員証授与 ポスター賞発表		

S1～S6 : シンポジウム

MS1～MS11 : ミニシンポジウム

TS1～TS3 : テクニカルセミナー

O1～O3 : 一般口演

学会掲示板

平成9年度日本生化学会近畿支部シンポジウム

「脳を守るーその分子機構解明への試み」

世話人：畠中 寛（大阪大学蛋白質研究所）

日時：平成9年11月29日（土）

場所：大阪大学銀杏会館

☆ プログラム

10:00~10:40

畠中 寛（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

「中枢神経細胞におけるアポトーシス」

10:40~11:20

三浦正幸（大阪大学医学部バイオメディカル・神経解剖）

「カスパーゼファミリーによる神経系細胞のアポトーシス制御」

11:20~12:00

内山安男（大阪大学医学部・第一解剖）

「リソソームカテプシン群による神経細胞死の制御」

12:00~13:30 昼食

13:30~14:10

垣塚 彰（大阪バイオサイエンス研究所・第4部門）

「Mochado-Joseph 病発症の分子モデル」

14:10~14:50

伊達 勲（岡山大学医学部・脳外科）

「パーキンソン病に対する神経移植療法」

14:50~15:20 コーヒータイム

15:20~16:00

Yves-Alan Barde (Max-Planck Institute for Psychiatry, Dept. Neurobiology, Germany)

「Mechanisms of ligand-mediated cell death in the nervous system」

16:00~16:40

Ronald Lindsay (Regeneron Pharmaceutical Co., Neurobiology, U.S.A.)

「Neuroprotection by neurotrophins (tentative)」

17:00~ 懇親会

大阪大学蛋白質研究所セミナー「記憶学習の分子機構」

日時：1997 年 11 月 18 日（火）／19 日（水）

場所：大阪大学蛋白質研究所講堂

世話人：津本忠治（大阪大・医・バイオ）、畠中 寛（大阪大・蛋白研）

☆プログラム 18 日（火）

13:00～13:05 開会の挨拶 京極好正（大阪大・蛋白研所長）

13:05～13:10 世話人の挨拶 津本忠治（大阪大・医・バイオ）

セッションⅠ 座長：津本忠治

13:10～13:45 畠中 寛（大阪大・蛋白研）

「BDNF による培養中枢ニューロンからのグルタミン酸放出」

13:45～14:20 那波宏之（新潟大・脳研）

「脳シナプス発達の分子生物学的解析」

14:20～14:55 山森哲雄（岡崎研究機構・基生研）

「長期記憶形成の分子機構の研究」

14:55～15:15 コーヒータイム

セッションⅡ 座長：畠中 寛

15:15～15:50 井ノ口馨（三菱化学生命研）

「神経可塑性に伴う遺伝子調節とシナプス強化」

15:50～16:25 平野丈夫（京都大院・理・生物物理）

「小脳シナプス機能の分子機構と運動制御・運動学習」

16:25～16:40 コーヒータイム

セッションⅢ 座長：那波宏之

16:40～17:15 二木宏明（理研・国際フロンティア）

「Fyn 欠失マウスの行動異常」

17:15～17:50 中西重忠（京都大院・医・生体情報）

「グルタミン酸受容体と脳機能」

懇親会 18:00～

19 日（水）

セッションⅣ 座長：澁木克栄

10:00～10:35 今村一之（大阪バイオサイエンス研）

「大脳視覚野の発達可塑性」

10:35～11:10 津本忠治（大阪大・医・バイオ）

「視覚野の可塑性における神経栄養因子の役割」

11:10～11:25 コーヒータイム

セッションⅤ 座長：平野丈夫

11:25～12:00 外山敬介（京都府立医大・第二生理）

「視覚野の可塑性と神経回路発達」

12:00～12:35 澁木克栄（新潟大・脳研）

「大脳聴覚野シナプス可塑性：分子・細胞から個体へ」

12:35～ 昼食

セッションⅥ 座長：二木宏明

14:00～14:35 梶 秀人（鹿児島大・農・獣医）

「マウスにおける匂いの記憶の分子機構」

14:35～15:10 小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

「サル海馬体ニューロンの条件性場所-物体連合課題における場所、物体、および行動に対する応答性」

15:10～15:45 奥野浩行（東京大院・医・第一生理）

「霊長類大脳側頭葉における遺伝子発現調節」

編集後記

日本神経化学会の馴染み深い分厚い大会論文集が姿を消しました。スリムな抄録集を手にした印象はいかがでしょうか。大幅に体裁が変わってしまいましたので抄録集の編集にも戸惑うことが多く、苦心の産物と言わざるをえません。使いやすさ使いにくさ等について忌憚のない御意見をお寄せ下さることを望みます。

演題応募の際に電子データも送って頂きましたが、抄録集の印刷は紙データの写真製版としました。コンピュータやOA機器の進歩と普及に関わらず、特殊記号や上付き下付き文字が必須のわれわれの分野の文字情報を電子データとしてどう統一するかというソフトウェアの開発が遅れているのが問題です。

送っていただいた電子データをもとに、ホームページ上に応募演題の抄録検索閲覧システムを作りましたがお試しになられましたでしょうか。インターネットで見ることのできる文字情報で十分であるというのなら、印刷されたプログラムや抄録集はもはや不要なのかもしれません。また電子データに人名リストとキーワードリストを添付していただきましたので、容易に人名索引やキーワード索引を作ることができました。カテゴリー分類が徹底していないこの抄録集の欠点を補ってくれるものと考えています。

世話人代表 片岡喜由

人名索引

[A]

阿部 輝雄
1C MS5-1 (262) 1040
1P (266) 1036
阿比留 康弘
2P (154) 2034
1B MS3-2 (186) 2008
足立 尚登
2P (208) 2011
2P (209) 2012
赤川 公朗
1C MS5-5 (265) 1037
赤池 昭紀
1P (116) 1106
秋山 克彦
1P (190) 1011
秋山 一文
2P (069) 2099
安藤 正人
1P (223) 1064
安藤 進
2P (059) 2109
青野 幸子
1P (236) 1054
1P (237) 1053
荒木 信夫
1P (114) 1108
荒木 威
1P (281) 1023
荒若 繁樹
1P (047) 1007
有賀 敏夫
2P (134) 2049
浅井 広志
2C O-2 (140)
浅井 清文
2P (179) 2002
2P (212) 2015
中木 敏夫
3B MS10-3 (130)
浅川 修一
1C MS5-5 (265) 1037
朝倉 賢治
1B MS1-4 (054) 2114
浅見 俊雄
2P (182) 2005
浅野 省一
2P (084) 2084
浅野 富子
2P (066) 2102
阿相 皓晃
1C MS4-4 (112)
2P (109) 2062
1C MS4-5 (113) 2059
東 泰孝
2P (214) 2017

[B]

馬場 明道
2P (084) 2084
2P (159) 2029
馬場 広子
2AS3-6 (019)
1P (242) 1048

Ben-Ari, Y
1A S1-1 (001)
Beuckmann, Carsten
1AS2-3 (010)
曹 春渝
1A S2-2 (009)

[C]

程 希丹
1P (217) 1070
千葉 晶
2P (127) 2055
知久馬 敏幸
2P (156) 2032
崔 得華
1P (222) 1065

[D]

傳法 倫久
1P (202) 1078
1P (203) 1077
丁 云
1C MS6-2 (274)
土肥 敏博
1C O-2 (231)
土居 孝至
1P (177) 1086

[E]

海老原 達彦
2P (060) 2108
1P (247) 1043
江口 直美
1A S2-3 (010)
モハメド エルワン
1P (215) 1072
遠藤 真澄
1P (222) 1065
櫻戸 靖
2B MS7-3 (101) 2070

[F]

藤井 望帆
2C MS8-1 (090)
藤本 一朗
1P (272) 1030
藤本 貞毅
1P (049) 1008
藤寄 泰利
2P (078) 2090
藤沢 肇
1P (280) 1024
藤澤 仁
2C MS8-2 (091)
藤田 佳織
2P (179) 2002
藤田 公和
1P (205) 1075
1P (223) 1064
藤田 興
2P (073) 2095
藤田 忍
2C O-3 (048)

藤原 道弘
1P (269) 1033
深間内 文彦
2P (072) 2096
2P (094) 2077
福内 靖男
1P (114) 1108
1P (202) 1078
1P (203) 1077
1P (283) 1021
福田 光則
1P (267) 1035
福永 浩司
2P (088) 2080
2C MS8-3 (092)
船津 宣雄
2P (126) 2056
古川 昭栄
2P (182) 2005
2P (183) 2006
2P (211) 2014
古川 哲史
1C O-1 (287)
古川 美子
2P (211) 2014
古田 享史
2P (082) 2086
二木 啓
1P (202) 1078
1P (203) 1077

[G]

Geng, Julie
1P (247) 1043
1P (248) 1042
Julie Geng
1P (247) 1043
1P (248) 1042
Gerashchenko, Dmitry
1A S2-3 (010)
Golam Sadik
1P (042) 1002
1P (044) 1004
1P (045) 1005
五味 不二也
1P (230) 1057
五味 慎太郎
2P (210) 2013
五嶋 良郎
1P (280) 1024
Guo, Fei-Fan
2P (060) 2108

[H]

Christian Haass
1P (041) 1001
羽賀 千恵
2C MS9-4 (201) 1079
芳賀 和子
2P (067) 2101
羽賀 誠一
2C MS9-4 (201) 1079
芳賀 達也
2P (065) 2103
2P (067) 2101
2P (068) 2100

萩原 民雄
1P (171) 1092
1P (172) 1091
濱田 潤一
1P (114) 1108
濱口 勝彦
2P (128) 2054
浜井 盟子
1P (241) 1049
濱中 裕喜
2C O-3 (048)
原 厚
1C O-3 (232)
原 英彰
1A S1-3 (003)
原 諭吉
1P (288) 1017
1C O-1 (287)
原田 重徳
2P (105) 2066
原田 智行
3B MS10-2 (184)
2P (255) 2020
長谷 純宏
1P (272) 1030
橋井 美奈子
2P (064) 2104
橋本 博史
2P (144) 2044
2P (157) 2031
橋本 均
2P (159) 2029
橋本 光弘
1P (176) 1087
橋本 有佳
1B MS3-2 (186) 2008
秦 英代
2P (097) 2074
畠中 寛
2P (096) 2075
2BMS7-3(101)2070
2P(107)2064
2P(154)2034
1BMS3-2(186)2008
1C MS5-4(196)1084
1P(229) 1058
早石 修
1A S2-3 (010)
林 謙介
2P (181) 2004
1P (217) 1070
林 要人
2P (142) 2045
秀 和泉
2P (180) 2003
東 (松本) 秀美
1P (120) 1102
東田 陽博
2P (064) 2104
樋口 宗史
1B MS2-2 (252)
氷見 敏行
2C MS9-2 (199) 1081
平林 敬浩
2P (089) 2079
平林 義雄
2C O-4 (143)

平岩 雅男
1P (190) 1011
平松 緑
2P (098) 2073
3C MS11-1 (136)
平野 均
2P (095) 2076
平田 幸一
2P (133) 2050
2P (134) 2049
2C O-4 (143)
平田 牧三
2P (095) 2076
平田 ゆかり
1P (119) 1103
1P (205) 1075
廣部 雅昭
2P (071) 2097
弘瀬 秀樹
1P (222) 1065
広田 浜夫
1C MS5-5 (265) 1037
廣内 雅明
1P (122) 1100
久永 真市
1P (221) 1066
菱木 知郎
1B MS3-4 (187) 2009
1P (193) 1014
本間 啓子
1P (224) 1063
本多 伸光
2P (135) 2048
本田 静世
3B TS-4 (040)
本郷 茂樹
1P (173) 1090
1P (174) 1089
堀 耕治
2P (077) 2091
堀 正二
2P (150) 2038
1A S1-4 (004)
堀江 秀典
2P (155) 2033
1P (192) 1013
堀口 淳
2P (146) 2042
細川 武
2P (128) 2054
HOSSAIN, Shahanara
1P (042) 1002
1P (044) 1004
1P (045) 1005
保住 功
1P (190) 1011
Hui, Chi-chung
3C O-1 (249)
二木 啓
1P (203) 1077
1P (202) 1078

[I]

衣斐 督和
1P (116) 1106
市田 竜也
1P (233) 1056

市川 厚
1A S2-4 (011)
伊賀 圭二
1P (191) 1012
井口 泰泉
1C MS4-5 (113) 2059
飯田 基之
1P (227) 1060
飯塚 幸彦
1P (285) 1019
五十嵐 康
1P (243) 1047
池田 恭治
2P (082) 2086
池本 敦
1P (119) 1103
池中 一裕
2A S3-6 (019)
1C MS4-2 (111) 2060
1P (242) 1048
1P (272) 1030
生駒 弘造
2P (180) 2003
今井 貴雄
1B MS2-4 (253) 2018
今井 嘉紀
2A S3-2 (015)
今泉 和則
1B MS2-3 (207) 1073
今泉 美佳
1C MS5-3 (264) 1038
1P (267) 1035
蘭牟田 直彦
2P (149) 2039
稲垣 昌樹
2A S3-5 (018)
稲垣 正俊
2P (146) 2042
稲垣 直之
2A S3-5 (018)
稲垣 好昌
1P (192) 1013
稲木 公一郎
2P (065) 2103
稲村 直子
2B MS7-3 (101) 2070
井ノ口 仁一
1P (269) 1033
猪股 裕二
2P (156) 2032
井上 敦子
2P (180) 2003
井上 和秀
3C O-3 (170)
井上 幸紀
2P (078) 2090
井上 順雄
1P (288) 1017
井上 修二
2P (155) 2033
乾 誠
2C MS8-4 (093) 2078
犬塚 貴
1P (190) 1011
入江 史敏
2C O-4 (143)
入江 康至
1P (235) 1055

入谷 克己
1P (205) 1075
石田 美知子
1P (121) 1101
石毛 敦
2P (098) 2073
石毛 陽子
1P (194) 1015
1P (195) 1085
石黒 幸一
1P (278) 1026
石黒 麻利子
2P (056) 2112
2P (057) 2111
石井 賢治
1P (246) 1044
石井 俊
2P (110) 2061
1P (216) 1071
石川 巧一
2C MS9-4 (201) 1079
石川 紘一
2P (097) 2074
石川 正洋
3B TS-4 (040)
石川 保幸
2P (107) 2064
1P (229) 1058
石丸 裕久
2C MS9-4 (201) 1079
1P (243) 1047
石岡 憲昭
2C MS9-3 (200) 1080
石崎 泰樹
2C MS9-2 (199) 1081
石塚 徹
1C MS5-1 (262) 1040
1P (266) 1036
磯辺 俊明
2P (152) 2036
1P (281) 1023
磯貝 恵理子
1B MS3-4 (187) 2009
1P (193) 1014
伊東 秀記
2P (145) 2043
2P (147) 2041
2P (148) 2040
2P (152) 2036
1B MS3-5 (188) 2010
伊藤 和光
2P (068) 2100
伊藤 美紀子
2B S4-1 (020)
3C O-1 (249)
伊藤 誠二
1A S2-6 (013)
伊藤 隆明
1P (280) 1024
伊東 大介
1P (202) 1078
1P (203) 1077
伊藤 善規
1P (122) 1100
岩崎 克典
1P (269) 1033
岩崎 聡
1P (261) 1041

岩崎 進一
2P (078) 2090
岩田 恵美
1P (227) 1060
岩田 健
2P (068) 2100
和泉 唯信
2P (132) 2051

[J]

神保 雅之
1P (269) 1033

[K]

門屋 利彦
1P (192) 1013
加賀井 和幸
2P (128) 2054
加賀谷 有行
2P (146) 2042
影山 晴秋
2P (155) 2033
影山 龍一郎
1P (244) 1046
甲斐 利弘
2P (144) 2044
2P (157) 2031
梶 裕之
1P (042) 1002
垣下 浩二
1P (216) 1071
角田 隆巳
2P (058) 2110
角田 亘
1A S1-7 (007)
亀谷 富由樹
1P (047) 1007
1B MS1-1 (051)
金堀 瑞穂
2C MS8-3 (092)
金松 知幸
1P (239) 1051
1P (240) 1050
金岡 禧秀
1A S2-3 (010)
金澤 裕子
2A S3-2 (015)
神庭 重信
3B MS10-3 (130)
神田 尚俊
2P (061) 2107
金子 厚
2P (128) 2054
金子 勲
1P (043) 1003
金子 葉子
2P (082) 2086
笠井 陽子
1P (261) 1041
1P (268) 1034
柏原 健一
2P (069) 2099
3B MS10-4 (131) 2052

- 片岡 喜由
1A S1-6 (006)
2A S3-3 (016)
1P (164) 1098
1P (165) 1097
1P (166) 1096
1P (168) 1094
3C MS11-2 (169) 1093
1P (204) 1076
2P (208) 2011
2P (214) 2017
1P (225) 1062
- 片岡 正和
1P (268) 1034
- 片岡 洋祐
1A S2-1 (008)
2P (081) 2087
- 片山 雅文
2P (157) 2031
- 片山 典子
1P (194) 1015
- 片山 泰一
1B MS2-3 (207) 1073
- 加藤 宏司
1P (235) 1055
- 加藤 兼房
2P (066) 2102
2P (145) 2043
2P (147) 2041
2P (148) 2040
2P (152) 2036
1B MS3-5 (188) 2010
- 加藤 一磨
1C MS6-5 (219) 1068
- 加藤 聖
1P (224) 1063
- 加藤 泰治
2P (179) 2002
2P (212) 2015
- 加藤 尚彦
1P (288) 1017
- 加藤 武
2P (156) 2032
- 加藤 寿章
1P (205) 1075
1P (223) 1064
- 仙波 りつ子
2P (066) 2102
2P (147) 2041
1B MS3-5 (188) 2010
- 勝元 栄一
3B MS10-2 (184)
2P (255) 2020
- 桂 昌司
1P (233) 1056
- 勝屋 弘忠
2P (212) 2015
- 川端 昌弘
1P (175) 1088
- 川原 正博
1B MS1-5 (055) 2113
2P (058) 2110
- 河合 洋
2P (071) 2097
- 川上 秀史
2P (132) 2051
- 川村 勇樹
1P (046) 1006
1B MS1-2 (052) 2115
- 川崎 仁志
2P (210) 2013
- 川崎 和夫
1B MS1-4 (054) 2114
- 川嶋 望
2C MS8-4 (093) 2078
2P (124) 2058
2P (125) 2057
- 川島 誠一
1C MS6-1 (273)
- 川戸 佳
2P (109) 2062
1C MS4-4 (112)
1C MS4-5 (113) 2059
- 嘉山 孝正
3C MS11-1 (136)
- 慶野 宏臣
1P (237) 1053
- 木原 武士
1P (116) 1106
- 菊池 明彦
3B TS-4 (040)
菊池 義明
3C O-3 (170)
菊池 裕
2B S4-2 (021)
菊池 由紀夫
2B MS7-4 (102) 2069
- 菊川 公紀
1P (190) 1011
- 木村 宏
3C MS11-3 (137)
- 木村 淳
1P (116) 1106
- 木村 喜代史
1P (122) 1100
- 木村 美佐
1C MS5-5 (265) 1037
- 木下 進
3C O-1 (249)
- 衣川 秀
1A S1-7 (007)
- 絹川 秀樹
2P (183) 2006
- 木岡 哲郎
2P (178) 2001
- 切池 信夫
2P (078) 2090
- 岸 栄子
1P (243) 1047
- 岸 憲幸
3C O-1 (249)
2B S4-1 (020)
- 岸本 年史
2P (179) 2002
- 岸野 晶梓
1P (194) 1015
1P (195) 1085
- 北川 一夫
1A S1-4 (004)
- 北島 哲子
1C MS6-3 (275) 1029
- 北村 均
1P (280) 1024
- 北村 邦男
2P (128) 2054
2P (141) 2046
2P (161) 2027
- 木谷 隆子
2C MS8-2 (091)
- 北山 滋雄
1C O-2 (231)
- 鬼頭 純三
2C O-2 (140)
- 小林 和夫
1B MS1-5 (055) 2113
2P (058) 2110
1P (269) 1033
- 小林 和人
2P (076) 2092
- 小林 正明
2P (062) 2106
- 小林 雅文
2P (074) 2094
- 小林 正克
1B MS2-1 (251)
- 小林 三和子
1B MS3-1 (185) 2007
1P (245) 1045
- 小林 隆司
1P (246) 1044
- 古賀 道明
2P (134) 2049
- 古賀 信幸
3C MS11-4 (138)
- 木暮 一成
2P (075) 2093
- 小暮 太郎
2C MS9-3 (200) 1080
- 鴻上 繁
1P (225) 1062
- 河野 憲二
1C MS4-1 (162)
- 高坂 新一
2A S3-2 (015)
3B TS-4 (040)
2P (056) 2112
2P (057) 2111
3C O-3 (170)
1P (189) 1010
- 小出 誠司
2P (144) 2044
2P (157) 2031
- 小池 達郎
2B MS7-5 (103) 2068
1B MS3-3 (108) 2063
2P (151) 2037
1P (167) 1095
- 小糸 寿美
1C MS4-3 (163) 2026
- 小泉 修一
3C O-3 (170)
- 小嶋 久子
2P (160) 2028
- 古川 千湖
2P (128) 2054
- 小久保 稔
2P (179) 2002
- 駒野 宏人
1P (046) 1006
1B MS1-2 (052) 2115
- 小松 真紀子
2P (098) 2073
- 小松 靖弘
2P (098) 2073
- 小宮 義璋
1C MS6-4 (220) 1067
1P (277) 1027
- 近藤 郁子
1A S6-2 (033)
- 近藤 和博
1B MS3-4 (187) 2009
1P (193) 1014
- 近藤 洋一
2P (213) 2016
- 近藤 啓次
1P (191) 1012
- 越川 憲明
2P (074) 2094
- 古武 弥一郎
2P (071) 2097
- 小谷 泰教
3B MS10-1 (129) 2053
1P (191) 1012
- Menon Krishna
1P (272) 1030
- 久保 慶太
1P (117) 1105
1B MS2-5 (254) 2019
2P (260) 2025
- 九穂 泰三
2P (097) 2074
- 工藤 千加子
1P (282) 1022
- 久原 映子
2C MS9-3 (200) 1080
- 隈原 英子
1P (247) 1043
1P (248) 1042
- 熊倉 鴻之助
1P (261) 1041
1C MS5-3 (264) 1038
1P (267) 1035
- 熊ノ郷 晴子
2P (126) 2056
1P (218) 1069
- 桑 昭苑
2P (063) 2105
- 国下 龍英
1P (222) 1065
- 倉知 正
1P (277) 1027
- 倉橋 寿
1C O-3 (232)
- 倉本 展行
2P (214) 2017
2P (256) 2021
2P (260) 2025
- 栗原 堅三
1B MS3-1 (185) 2007
1P (245) 1045
- 栗原 正
2P (160) 2028
- 栗岡 政典
2P (078) 2090
- 黒田 洋一郎
1B MS1-5 (055) 2113
2P (058) 2110
1P (269) 1033

日下部 守昭
2P (072) 2096
楠 進
3A S5-4 (029)
久津輪 瑞代
1P (246) 1044
桑原 敬介
2P (150) 2038
桑原 玲子
1P (268) 1034
葛谷 博磁
2P (073) 2095

[L]

Bengt Langstrom
1A S2-5 (012)
ブルノ・レブラン
1P (123) 1099

[M]

馬 福海
1P (122) 1100
町出 充
1P (189) 1010
前川 昌平
1P (218) 1069
2P (126) 2056
前園 雅子
1P (280) 1024
牧野 由紀子
2P (071) 2097
眞部 孝幸
1P (117) 1105
1P (118) 1104
1B MS2-5 (254) 2019
2P (260) 2025
真邊 泰宏
3B MS10-4 (131) 2052
丸井 幸之助
2P (069) 2099
丸野内 隼
2B MS7-2 (100) 2071
丸山 博文
2P (132) 2051
丸山 敬
1C MS6-1 (273)
丸山 尚治
1P (120) 1102
丸山 和佳子
2P (106) 2065
1A S6-3 (034)
丸山 悠司
2C MS9-4 (201) 1079
1P (243) 1047
真砂 敦夫
2P (105) 2066
正宗 研
1C MS6-5 (219) 1068
侯賀 宣子
2P (072) 2096
2P (094) 2077
松田 敏夫
2P (084) 2084
松田 義宏
1C MS4-3 (163) 2026

松田 芳人
2P (095) 2076
松井 ふみ子
1P (236) 1054
1P (237) 1053
松川 則之
2P (158) 2030
松本 昌泰
1A S1-4 (004)
松本 峰男
1P (283) 1021
松本 陽
2P (075) 2093
松村 潔
1A S2-2 (009)
2P (081) 2087
松野 聖
2P (257) 2022
松野 健治
2B S4-1 (020)
3C O-1 (249)
松野 康子
2B S4-1 (020)
松岡 一郎
1B MS3-1 (185) 2007
1P (245) 1045
松岡 瑞美子
1C MS5-5 (265) 1037
松谷 天星丸
1P (119) 1103
松山 善次郎
2P (132) 2051
松井 ふみ子
1P (236) 1054
1P (237) 1053
馬渡 一浩
1P (224) 1063
道川 誠
1P (041) 1001
美原 肇
2P (210) 2013
三神 正昭
3B MS10-1 (129) 2053
三木 直正
1P (235) 1055
1B MS2-2 (252)
1C MS6-2 (274)
御子柴 克彦
2P (063) 2105
1P (176) 1087
1C MS5-5 (265) 1037
1P (267) 1035
1P (282) 1022
1P (283) 1021
1P (284) 1020
南 知予子
2P (106) 2065
南 敏明
1A S2-6 (013)
箕越 靖彦
1P (241) 1049
三澤 日出巳
1P (216) 1071
三品 昌美
2B S4-6 (025)
御園生 裕明
1C MS5-3 (264) 1038
1P (267) 1035

三須 良實
1P (280) 1024
三谷 章
1P (204) 1076
2P (214) 2017
三井 千珠
2P (151) 2037
光本 泰秀
3C MS11-4 (138)
三山 吉夫
2P (142) 2045
三浦 真紀
2P (151) 2037
宮川 太平
2P (085) 2083
宮本 朋子
2P (109) 2062
宮本 英七
2P (083) 2085
2P (085) 2083
2P (088) 2080
2C MS8-3 (092)
宮本 茂昭
1P (276) 1028
宮田 卓樹
1P (282) 1022
1P (284) 1020
宮崎 育子
1P (227) 1060
宮崎 真理
2P (087) 2081
溝淵 睦彦
2P (135) 2048
1P (177) 1086
水野 哲也
1P (041) 1001
水野 美邦
1A S6-1 (032)
水谷 昭弘
2P (058) 2110
1P (269) 1033
望月 秀雄
1P (269) 1033
森 厚詞
3C MS11-4 (138)
森 啓
1P (047) 1007
1B MS1-1 (051)
2P (070) 2098
森 仁志
2C O-2 (140)
森 啓至
2P (070) 2098
森 望
1P (245) 1045
森井 博史
1A S2-1 (008)
2P (081) 2087
森川 将行
2P (179) 2002
盛政 忠臣
2P (079) 2089
森本 潔
1P (043) 1003
森本 高子
2P (056) 2112
2P (057) 2111
3C O-3 (170)

森野 忠夫
1P (164) 1098
3C MS11-2 (169) 1093
森岡 徳光
2P (180) 2003
森下 理香
2P (066) 2102
森田 克也
1C O-2 (231)
森田 将史
1P (238) 1052
Moskowitz, M. A.
1A S1-3 (003)
本橋 克利
1P (171) 1092
1P (172) 1091
Mst. Shahanara Hossain
1P (042) 1002
1P (045) 1005
撫井 弘二
2P (178) 2001
3B MS10-2 (184)
2P (255) 2020
村上 富士夫
2B S4-4 (023)
村上 信五
2P (135) 2048
村本 和世
1B MS1-5 (055) 2113
2P (058) 2110
1P (269) 1033
村島 善也
2P (139) 2047
村山 俊彦
1P (226) 1061
室伏 擴
2P (067) 2101
室田 誠逸
2C MS9-2 (199) 1081
武藤 彩
2P (063) 2105

[N]

鍋島 俊隆
3B TS-2 (038)
2P (076) 2092
長島 直美
2P (161) 2027
永田 栄一郎
1P (202) 1078
1P (203) 1077
1P (283) 1021
永田 豊
1P (205) 1075
1P (223) 1064
永津 俊治
2P (070) 2098
2P (076) 2092
薙野 智子
1C MS6-2 (274)
内藤 弘美
2P (109) 2062
中田 祐二
2P (258) 2023
中館 和彦
1A S2-2 (009)

- 中川 裕之
1P (276) 1028
中川 幸則
2C O-2 (140)
中川原 章
1B MS3-4 (187) 2009
1P (193) 1014
中平 健祐
1C MS4-2 (111) 2060
中井 康光
2P (089) 2079
中井 陽子
1P (279) 1025
仲嶋 一範
1P (282) 1022
1P (283) 1021
1P (284) 1020
中嶋 一行
3B TS-4 (040)
3C O-3 (170)
中島 雅央
3C MS11-1 (136)
中嶋 暉躬
1P (123) 1099
中条 茂男
2P (089) 2079
浅井 昌弘
3B MS10-3 (130)
中村 彰
1P (119) 1103
中村 雅之
3B MS10-1 (129) 2053
中村 重信
2P (132) 2051
中村 岳史
1P (245) 1045
中村 泰子
1P (189) 1010
中村 洋一
2A S3-3 (016)
1P (164) 1098
1P (165) 1097
1P (166) 1096
1P (168) 1094
3C MS11-2 (169) 1093
1P (225) 1062
中村 嘉宏
2P (144) 2044
2P (157) 2031
中村 由紀
1P (244) 1046
中村 俊
2P (110) 2061
中西 真
2P (082) 2086
中野 紀和男
2C O-2 (140)
中野 浩一
1B MS2-2 (252)
中野 亮一
1P (190) 1011
中尾 純治
1P (285) 1019
中島 昭
2P (070) 2098
中城 有喜
2P (135) 2048
1P (177) 1086
- 仲田 義啓
2P (146) 2042
2P (180) 2003
中谷 伸一
1P (222) 1065
中塚 雅雄
2P (105) 2066
中谷 一泰
2P (089) 2079
中山 智加男
1P (194) 1015
1P (195) 1085
中山 洋
1P (281) 1023
2P (152) 2036
中山 比登志
1A S1-2 (002)
中山 均
2P (096) 2075
中山 高宏
1C MS5-5 (265) 1037
中山 たかね
1P (286) 1018
中山 孝
1P (288) 1017
中沢 康至
2P (156) 2032
南木 浩二
1P (242) 1048
直井 信
2P (106) 2065
1A S6-3 (034)
成田 考而
1A S1-2 (002)
成富 博章
1A S1-7 (007)
成宮 周
1A S2-4 (011)
長束 俊治
1P (272) 1030
新島 旭
2C O-1 (234)
新延 道夫
1P (267) 1035
二村 好憲
1B MS3-4 (187) 2009
西田 朗
2P (146) 2042
西木 禎一
1P (261) 1041
西村 大助
2P (109) 2062
1C MS4-4 (112)
1C MS4-5 (113) 2059
西村 伊三男
1B MS1-3 (053)
西中 直也
1P (173) 1090
1P (174) 1089
西尾 チカ
1P (229) 1058
西澤 正豊
1A S6-5 (036)
西塚 雅子
1P (236) 1054
新田 淳美
2P (182) 2005
2P (183) 2006
- 牛 三勇
1B MS2-2 (252)
野田 百美
2P (064) 2104
野田 幸裕
2P (076) 2092
野口 浩
1P (194) 1015
野口 鉄也
2P (062) 2106
野村 正彦
2P (077) 2091
2P (109) 2062
1C MS4-4 (112)
1C MS4-5 (113) 2059
2P (128) 2054
2P (141) 2046
2P (161) 2027
2P (213) 2016
野村 靖幸
2B MS7-4 (102) 2069
1P (226) 1061
野依 良治
1A S2-5 (012)
野澤 歩
2P (058) 2110
野沢 りさ
1P (192) 1013
沼川 忠広
1B MS3-2 (186) 2008
1C MS5-4 (196) 1084
1P (229) 1058
- [O]
J.S. O'Brien
1P (190) 1011
小田 正記
1P (240) 1050
尾田 富一郎
1P (043) 1003
小鷹 昌明
2C O-4 (143)
尾形 直則
1P (164) 1098
1P (168) 1094
3C MS11-2 (169) 1093
1P (225) 1062
小川 和人
1P (205) 1075
1P (223) 1064
小川 正晴
1P (282) 1022
1P (284) 1020
小川 紀雄
1A S6-4 (035)
2P (213) 2016
1P (227) 1060
小川 智
2P (149) 2039
2P (150) 2038
1P (197) 1083
2C MS9-1 (198) 1082
萩田 喜代一
1P (115) 1107
1P (117) 1105
1P (118) 1104
2P (214) 2017
- 1B MS2-5 (254) 2019
2P (256) 2021
2P (260) 2025
小河 宏城
1P (194) 1015
小倉 明彦
3B TS-3 (039)
1P (206) 1074
1P (238) 1052
小倉 潔
1C MS4-1 (162)
今泉 美佳
1C MS5-3 (264) 1038
1P (267) 1035
大橋 章雄
2P (212) 2015
大橋 博
1P (120) 1102
大橋 十也
2P (075) 2093
大江 良秀
2C MS9-4 (201) 1079
大神 祐輔
1P (269) 1033
大光 正男
2P (088) 2080
大沼 純
1P (278) 1026
大澤 郁朗
2P (056) 2112
2P (057) 2111
大澤 圭子
2A S3-2 (015)
大杉 圭子
1P (216) 1071
太田 茂
2P (071) 2097
2P (080) 2088
太田 晃一
1P (114) 1108
大屋敷 孝雄
2P (104) 2067
大石 康晴
2P (083) 2085
小鹿 幸生
2P (158) 2030
3C MS11-3 (137)
岡 美智子
1P (122) 1100
岡部 正隆
2P (259) 2024
岡田 亜希子
2P (146) 2042
岡田 元宏
3B TS-1 (037)
岡本 仁
2B S4-2 (021)
岡本 和也
1P (240) 1050
岡本 慶子
2P (145) 2043
2P (147) 2041
2P (148) 2040
2P (152) 2036
岡村 均
1B MS1-3 (053)

岡野 栄之

- 2B S4-1 (020)
2B S4-3 (022)
2P (063) 2105
2B MS7-1(099)2072
1P(244)1046
3C O-1 (249)
1B MS2-4(253)2018
2P (259) 2024
- 岡野 光夫
3B TS-4 (040)
- 岡安 裕之
2P (210) 2013
- 大河内 正康
1P (047) 1007
1B MS1-1 (051)
- 奥村 秀雄
1P (164) 1098
1P (168) 1094
3C MS11-2(169)1093
1P (225) 1062
- 奥村 俊一郎
1C MS4-2 (111) 2060
- 奥野 幸子
2C MS8-2 (091)
- 奥山 治美
1P (119) 1103
- 大村 裕
3C MS11-3 (137)
2C O-1 (234)
- 大西 博
2P (157) 2031
- 斧 正一郎
1C MS5-2 (263) 1039
- 尾上 浩隆
1A S2-5 (012)
- 大平 敏彦
1P (236) 1054
1P (237) 1053
- 大村 裕
3C MS11-3 (137)
2C O-1 (234)
- 大坂 寿雅
2P (155) 2033
- 小山内 たか
1P (270) 1032
- 大沢 良之
1B MS1-3 (053)
- 太田 明
2P (070) 2098
- 小山 文隆
1B MS1-2(052)2115
1P (046) 1006
- 尾崎 宜洋
3B MS10-2 (184)
2P (255) 2020
- 小澤 健太郎
2P (149) 2039
2P (150) 2038
1P (197) 1083
2C MS9-1(198)1082

[R]

Bruce R. Ransom
2A S3-1 (014)

[S]

- SADIK, Golam
1P (042) 1002
1P (044) 1004
1P (045) 1005
- 佐伯 清美
1P (175) 1088
- Saffen, David
2P (060) 2108
1P (247) 1043
1P (248) 1042
- 佐原 成彦
1P (047) 1007
1B MS1-1 (051)
- 西道 隆巨
1P (046) 1006
1B MS1-2(052)2115
1C MS6-1 (273)
- 三枝 慎
2P (074) 2094
- 西須 英雄
1C MS5-1 (262) 1040
1P (266) 1036
- 斎藤 春洋
2P (155) 2033
- 斎藤 祐見子
1C MS6-1 (273)
- 斎藤 浩和
1C MS4-5 (113) 2059
- 斎藤 朋子
1P (121) 1101
- 酒井 栄一
2P (062) 2106
- 酒井 偉久子
1P (192) 1013
- 境 和久
2B MS7-5(103)2068
1B MS3-3(108)2063
- 酒井 久美子
2P (087) 2081
- 酒井 直人
1C MS5-4 (196) 1084
- 堺谷 政弘
1P (123) 1099
- 榊原 伸一
1P (244) 1046
1B MS2-4 (253) 2018
- 坂本 秀生
2P (073) 2095
1P (223) 1064
- 坂本 安
2P (128) 2054
2P (141) 2046
2P (161) 2027
1P (223) 1064
- 崎山 樹
1B MS3-4 (187) 2009
- 佐久間 貞重
1C MS6-2 (274)
- 桜川 宣男
2P (110) 2061
1P (215) 1072
1P (216) 1071
- 櫻井 栄一
1P (289) 1016

櫻井 映子

- 2P (153) 2085
1P (289) 1016
- 桜井 洋子
2P (109) 2062
1C MS4-4 (112)
1C MS4-5 (113) 2059
- 作田 圭子
2C O-3 (048)
- 三五 一憲
2P (155) 2033
- 佐野 輝
3B MS10-1(129)2053
1P(191)1012
- 佐野 護
1C MS6-3 (275) 1029
- 笹川 展
1P (267) 1035
- 佐々木 和男
3C MS11-3 (137)
2C O-1 (234)
- 佐々木 貴浩
1P (114) 1108
- 佐々木 幸生
3C MS11-3 (137)
1P (280) 1024
- 佐藤 嘉兵
2P (110) 2061
- 佐藤 真
3C O-2 (250)
- 佐藤 道夫
1P (278) 1026
- 佐藤 慎二
1P (046) 1006
1B MS1-2(052)2115
- 佐藤 託実
2P (107) 2064
- 澤田 秀幸
1P (116) 1106
- 澤田 誠
2A S3-4 (017)
- 澤本 和延
2B MS7-1 (099) 2072
- 清和 千佳
2P (109) 2062
1C MS4-5(113)2059
- 関口 真理子
1P (261) 1041
1C MS5-2(263) 1039
- 関野 祐子
2P (181) 2004
- 仙波 りつ子
2P (066) 2102
2P (147) 2041
1B MS3-5 (188) 2010
- Shahanara Mst.
HOSSAIN
1P (042) 1002
1P (045) 1005
- 石 紅
3C MS11-1 (136)
- 柴 玲子
1P (284) 1020
- 芝軒 信次
2P (097) 2074
- 柴田 護
1P (114) 1108

柴田 大法

- 1P (164) 1098
1P (168) 1094
3C MS11-2(169)1093
1P (225) 1062
- 柴山 健三
1P (205) 1075
- 渋谷 匡子
2P (128) 2054
2P (141) 2046
2P (161) 2027
- 茂野 卓
2P (211) 2014
- 島本 啓子
1P (123) 1099
- 島津 邦男
2P (128) 2054
1P (114) 1108
- 嶋津 孝
1P (241) 1049
- 清水 信義
1C MS5-5 (265) 1037
- 清水 隆雄
1A S1-7 (007)
- 清水 淑子
1C MS5-5 (265) 1037
- 下濱 俊
1P (116) 1106
1P (049) 1008
- 下家 浩二
2B MS7-3(101)2070
- 篠田 純
1P (285) 1019
- 篠田 友孝
1P (042) 1002
1P (044) 1004
1P (045) 1005
- 篠原 俊次
1B MS1-4 (054) 2114
- 篠崎 温彦
1A S1-5 (005)
1P (121) 1101
- 新谷 太
3B MS10-3 (130)
- 塩田 清二
2P (089) 2079
- 白井 俊孝
1P (203) 1077
1P (202) 1078
- 白石 武昌
2C O-1 (234)
- 白尾 智明
2P (181) 2004
1P (217) 1070
- 白崎 竜一
2B S4-4 (023)
- 城洋 志彦
3B MS10-4 (131) 2052
- 志谷 和紀
1P (206) 1074
- 庄盛 敏藤
2P (069) 2099
2P (079) 2089
3B MS10-4(131)2052
- 東海林 幹夫
2C MS9-4 (201) 1079

- 笠井 陽子
1P (261) 1041
1P (268) 1034
庄盛 敏廉
2P (069) 2099
2P (079) 2089
3B MS10-4(131)2052
司 秋生
2A S3-3 (016)
1P (164) 1098
1P (165) 1097
1P (166) 1096
篠田 友孝
1P (042) 1002
1P (044) 1004
1P (045) 1005
祖父江 和哉
2P (212) 2015
祖父江 憲治
2P (124) 2058
2P (125) 2057
2C MS8-4 (093) 2078
曾我 智子
1P (288) 1017
孫 立智
2P (153) 2035
Spyros Artavanis-
Tsakonias
2B S4-1 (020)
須藤 慎治
1P (046) 1006
1B MS1-2(052)2115
菅原 恵
2P (097) 2074
菅原 正伯
1C MS6-5 (219) 1068
杉本 幸彦
1A S2-4 (011)
杉谷 加代
1P (224) 1063
杉浦 弘子
1P (235) 1055
杉山 英子
1C O-3 (232)
墨田 康男
1P (049) 1008
孫 傑
2P (124) 2058
2P (125) 2057
2C MS8-4 (093) 2078
鈴木 映二
3B MS10-3 (130)
鈴木 二郎
2P (139) 2047
鈴木 和彦
2B MS7-5 (103) 2068
鈴木 邦彦
3A S5-1 (026)
鈴木 正昭
1A S2-5 (012)
2P (082) 2086
鈴木 重明
1P (202) 1078
1P (203) 1077
- [T]
田平 武
1P (222) 1065
田淵 明子
1P (228) 1059
田淵 克彦
2P (259) 2024
田所 智子
2C MS8-4(093)2078
2P (125) 2057
田川 由美
2P (133) 2050
田口 明子
2B MS7-1 (099) 2072
田井 直
3A S5-6 (031)
2P (133) 2050
1C MS4-1 (162)
平 英一
1C MS6-2 (274)
高田 尚幸
1B MS3-4(187)2009
1P(193)1014
高寺 恒雄
2P (104) 2067
1P (224) 1063
高木 宏
3C O-2 (250)
高木 勉
1B MS2-3 (207) 1073
高原 ひろみ
1P (239) 1051
1P (240) 1050
高橋 章
2C MS9-4 (201) 1079
1P(243)1047
高橋 正身
1P (261) 1041
1C MS5-2(263)1039
1P (268) 1034
高橋 聖一
1C MS5-2(263)1039
1P (284) 1020
高橋 勤
2P (106) 2065
高松 研
2P (062) 2106
高見 俊宏
3C O-2 (250)
高宮 考悟
2C MS8-4 (093) 2078
2P (124) 2058
2P (125) 2057
高村 千鶴子
2P (056) 2112
2P (057) 2111
金行 孝雄
2P (079) 2089
竹田 二美代
1P (172) 1091
1P (171) 1092
1P (174) 1089
武田 和也
1P (042) 1002
1P (044) 1004
1P (045) 1005
- 竹田 稔
1P (171) 1092
1P (172) 1091
1P (173) 1090
1P (174) 1089
武田 良平
1P (177) 1086
武田 康
2P (109) 2062
竹原 直美
2P (161) 2027
武井 延之
2P (154) 2034
1C MS5-4(196)1084
武富 保
1C O-3 (232)
1P (271) 1031
竹内 郁夫
2P (147) 2041
1B MS3-5(188)2010
竹内 有輔
2P (085) 2083
竹内 裕
1P (120) 1102
滝 英明
2P (105) 2066
田熊 一敏
2P (084) 2084
玉井 洋一
2P (160) 2028
田丸 政男
1P (119) 1103
玉谷 実智夫
1P (197) 1083
2C MS9-1(198)1082
玉谷 美智男
2P (149) 2039
2P (150) 2038
田村 晃
1A S1-2 (002)
田村 真理
1P (246) 1044
田中 文啓
1P (272) 1030
田中 健一
2P (077) 2091
2P (213) 2016
田中 喜久子
1B MS1-1 (051)
1P (047) 1007
田中 耕太郎
1P (202) 1078
1P (203) 1077
1P (283) 1021
田中 正彦
2P (077) 2091
2B MS7-2 (100) 2071
2P (213) 2016
田中 隆一
1P (190) 1011
田中 聡一
2P (181) 2004
田中 秀逸
2B MS7-5 (103) 2068
2P (151) 2037
1P (167) 1095
田中 隆佳
1P (172) 1091
- 田中 康一
2P (059) 2109
谷 宗英
2P (144) 2044
2P (157) 2031
谷口 充洋
1P (280) 1024
谷川 元紀
2P (082) 2086
谷野 浩子
1P (049) 1008
谷浦 秀夫
1B MS2-1 (251)
2P (258) 2023
田沼 直之
2P (075) 2093
田岡 万悟
1P (281) 1023
田代 英夫
1P (277) 1027
田代 謙一郎
2P (142) 2045
田代 朋子
1C MS6-4(220)1067
1P(277)1027
立野 慶
1P (172) 1091
辰見 茂
1P (122) 1100
龍野 徹
1P (194) 1015
巽 良子
2B S4-2 (021)
田原 康孝
2P (146) 2042
寺田 庄一
2P (141) 2046
2P (128) 2054
Thang Siong Heng
1B MS3-1 (185) 2007
ラムサミ タンガーヴェル
1P (216) 1071
鳥羽 陽子
1P (285) 1019
遠山 正彌
2P(149)2039
2P (150) 2038
1P (197) 1083
2C MS9-1(198)1082
1B MS2-3 (207) 1073
遠山 陽子
2P (160) 2028
徳本 美佳
2B S4-2 (021)
徳武 哲
1P (050) 1009
苦 智子
1P (195) 1085
富永 薫
2P (082) 2086
富永 恵子
3B TS-3 (039)
1P (206) 1074
富永 康浩
1P (168) 1094
富山 勝則
2P (074) 2094

遠山 育夫
3C MS11-3 (137)
東原 和成
2P (065) 2103
豊島 至
1C MS6-5 (219) 1068
土屋 玲子
2C O-3 (048)
津田 学
1B MS2-3 (207) 1073
津田 正明
1P (228) 1059
津田 守弘
1C MS6-4 (220) 1067
継 泰成
2P (158) 2030
辻 省次
1P (190) 1011
塚田 裕三
1P (239) 1051
1P (240) 1050
1P (286) 1018
塚本 康弘
1C MS6-2 (274)

[U]

内田 敦子
1P (221) 1066
内田 庸子
1P (278) 1026
内田 洋子
1P (230) 1057
内山 安男
1B MS1-3 (053)
宇高 直子
1P (280) 1024
上田 浩
2P (066) 2102
上田 恵一
1B MS1-4 (054) 2114
上田 健治
1P (044) 1004
上原 孝
2B MS7-4 (102) 2069
上村 敬一
1C O-3 (232)
1P (271) 1031
植村 慶一
2B S4-2 (021)
1P (279) 1025
1P (285) 1019
上野 修一
3B MS10-1 (129) 2053
上野 豊
2C MS9-3 (200) 1080
植月 太一
1B MS1-3 (053)
2P (258) 2023
鶴飼 洋司郎
1P (122) 1100
梅澤 邦彦
2P (058) 2110
裏出 良博
1A S2-3 (010)
漆谷 真
1P (116) 1106

宇佐美 美穂子
1B MS1-1(051)
1P (047) 1007
牛首 文隆
1A S2-4 (011)
臼杵 靖剛
1P (269) 1033
[W]

和田 千鶴
1C MS6-5 (219) 1068
和田 尚子
2P (077) 2091
2P (213) 2016
王 益珺
2P (072) 2096
2P (094) 2077
渡部 和彦
2P (075) 2093
渡部 昭仁
3C MS11-4 (138)
渡辺 雅幸
2P (257) 2022
渡邊 建彦
2P (153) 2035
1P (289) 1016
渡辺 恭良
2P (081) 2087
1A S2-5 (012)
渡辺 由美子
1A S2-5 (012)
ウオルフ ブライアン
2P (127) 2055

[Y]

矢上 達郎
1B MS1-4 (054) 2114
山田 久夫
1P (233) 1056
山田 和雄
2P (082) 2086
2P (105) 2066
山田 清文
3B TS-2 (038)
山田 麻紀
1P (283) 1021
山田 雅司
2P (096) 2075
2P (107) 2064
山田 通夫
2P (095) 2076
山田 紀子
1P (043) 1003
山田 康枝
2C MS8-4 (093) 2078
山上 榮
2P (078) 2090
2P (144) 2044
2P (157) 2031
2P (178) 2001
3B MS10-2 (184)
2P (255) 2020
山形 要人
1P (235) 1055
山縣 知子
2P (107) 2064
山岸 究
1P (269) 1033
山口 幸子
1P (205) 1075
山口 知子
2P (061) 2107
山川 貴宏
2P (080) 2088
山本 明広
1P (047) 1007
山元 大輔
2B S4-5 (024)
山本 秀子
2P (257) 2022
山本 秀幸
2P (083) 2085
2P (085) 2083
山本 恭平
2P (159) 2029
山本 愛美
2P (179) 2002
山本 直樹
2P (212) 2015
山本 孝之
2P (158) 2030
山本 敏文
2P (257) 2022
山之端 万里
1P (286) 1018
山崎 靖人
2P (211) 2014
山下 克子
3A S5-2 (027)
山内 理充
1P (205) 1075
1P (223) 1064
山内 卓
2P (086) 2082
2C MS8-1 (090)
山内 康熙
1P (173) 1090
1P (174) 1089
山脇 成人
2P (146) 2042
柳川 右千夫
1P (246) 1044
柳原 武彦
1A S1-4 (004)
2P (149) 2039
柳本 昌子
1A S1-7 (007)
柳澤 勝彦
3A S5-3 (028)
1P (041) 1001
1P (046) 1006
1B MS1-2(052)2115
谷内 一彦
2P (153) 2035
1P (289) 1016
柳瀬 尚人
1A S1-6 (006)
2A S3-3 (016)
2P (208) 2011
2P (214) 2017
安田 好美
1P (123) 1099
矢崎 貴仁
1P (279) 1025

横田 則夫
2P (146) 2042
横山 茂
2P (064) 2104
米田 託成
3C O-2 (250)
米田 幸雄
1P (115) 1107
1P (117) 1105
1P (118) 1104
1P (119) 1103
2P (214) 2017
1B MS2-5(254)2019
2P (256) 2021
2P (260) 2025
米増 知子
1C MS4-2 (111) 2060
米岡 有一郎
1P (190) 1011
米島 宏幸
1P (283) 1021
吉田 弘美
2P (160) 2028
吉田 克
1P (276) 1028
吉田 敏
2P (087) 2081
吉川 和明
1B MS1-3 (053)
2P (258) 2023
1B MS2-1 (251)
吉川 真悟
2P (259) 2024
芳本 信子
1P (205) 1075
吉本 有希子
2P (257) 2022
吉村 和法
2P (109) 2062
1C MS4-4 (112)
1C MS4-5(113)2059
2P (128) 2054
2P (141) 2046
2P(161)2027
吉村 好之
2P (086) 2082
2C MS8-1 (090)
吉永 至宏
1P (226) 1061
吉野 英
2C O-4 (143)
湯原 亜紀
2P (154) 2034
結城 伸泰
3A S5-5 (030)
2P (133) 2050
2P (134) 2049
2C O-4 (143)
讓原 光利
2P (098) 2073
[Z]
前正 秀宣
2P (146) 2042
章 龍
2P (214) 2017
張 勤増
2P (087) 2081

キーワード索引

[A]

- α B crystallin
 2P (152) 2036
 abuse
 2P (076) 2092
 acetylcholine
 2P (059) 2109
 2P (060) 2108
 2P (094) 2077
 2P (095) 2076
 2P (096) 2075
 2P (097) 2074
 2P (098) 2073
 1P (216) 1071
 acetylcholine esterase
 2P (098) 2073
 acetylcholine receptor
 2P (060) 2108
 2P (095) 2076
 2P (098) 2073
 2P (096) 2075
 acidic fibroblast growth factor
 2P (183) 2006
 aconitase
 1P (228) 1059
 activation
 2A S3-2 (015)
 activator protein 1
 2P (214) 2017
 active domain
 2P (056) 2112
 Acyl-CoA
 2P (087) 2081
 adaptin
 1P (281) 1023
 adenosine
 3B TS-1 (037)
 adenovirus
 2P (075) 2093
 1P (176) 1087
 adenovirus vector
 1P (176) 1087
 adenylate cyclase
 1P (122) 1100
 ADP-ribosyl cyclase
 2P (064) 2104
 1C O-2 (231)
 adrenal chromaffin cells
 1C O-2 (231)
 adult brain
 1P (174) 1089
 afferent hepatic vagal nerve
 2C O-1 (234)
 age
 1P (050) 1009
 aged rat
 2P (098) 2073
 aging
 2P (059) 2109
 2P (089) 2079
 1P (221) 1066
 albumin
 2A S3-3 (016)
 1P (166) 1096
 allodynia
 1A S2-6 (013)
 allopurinol
 2P (139) 2047
 ALS
 1P (195) 1085
 alternative splicing
 1C MS4-3 (163) 2026
 2P (159) 2029
 Alzheimer's disease
 3A S5-3 (028)
 1P (041) 1001
 1P (043) 1003
 1P (044) 1004
 1P (045) 1005
 1P (046) 1006
 1P (047) 1007
 1P (049) 1008
 1P (050) 1009
 1B MS1-1 (051)
 1B MS1-2 (052) 2115
 1B MS1-3 (053)
 1B MS1-4 (054) 2114
 1B MS1-5 (055) 2113
 2C MS9-4 (201) 1079
 1P (216) 1071
 AMPA receptor
 1P (119) 1103
 6-aminonicotinamide
 1P (224) 1063
 amyloid
 3A S5-3 (028)
 1P (043) 1003
 1P (044) 1004
 1B MS1-1 (051)
 1B MS1-2 (052) 2115
 1B MS1-4 (054) 2114
 2C MS9-4 (201) 1079
 amyloid β-protein
 3A S5-3 (028)
 1P (042) 1002
 1P (043) 1003
 1P (044) 1004
 1B MS1-4 (054) 2114
 1B MS1-5 (055) 2113
 amyloid precursor protein
 1P (041) 1001
 1B MS1-1 (051)
 1B MS1-2 (052) 2115
 1B MS1-3 (053)
 2P (056) 2112
 2P (057) 2111
 2P (057) 2111
 amyloidosis
 1P (042) 1002
 amyotrophic lateral sclerosis
 3B MS10-4 (131) 2052
 analog
 2P (082) 2086
 anaplerosis
 1P (239) 1051
 animal model
 3A S5-1 (026)
 1P (043) 1003
 3C MS11-2 (169) 1093
 anoxic depolarization
 2P (209) 2012
 anti-GT1a antibody
 2P (134) 2049
 antibody
 3A S5-6 (031)
 2C O-3 (048)
 2P (083) 2085
 2P (085) 2083
 2P (109) 2062
 1C MS4-4 (112)
 1C MS4-5 (113) 2059
 2P (133) 2050
 2P (134) 2049
 1C MS4-1 (162)
 1C MS6-5 (219) 1068
 1P (222) 1065
 anticholinesterase inhibitor
 2P (097) 2074
 antiparkinsonism agent
 2P (080) 2088
 AP-1
 3B MS10-2 (184)
 apolipoprotein E
 2C O-3 (048)
 2C MS9-4 (201) 1079
 apomorphine
 2P (072) 2096
 apoptosis
 1A S1-3 (003)
 1A S1-4 (004)
 2B MS7-1 (099) 2072
 2B MS7-2 (100) 2071
 2B MS7-3 (101) 2070
 2B MS7-4 (102) 2069
 2B MS7-5 (103) 2068
 2P (104) 2067
 2P (105) 2066
 2P (106) 2065
 2P (107) 2064
 2C MS9-1 (198) 1082
 1P (226) 1061
 arachidonic acid
 1A S2-1 (008)
 2P (081) 2087
 ARF4L
 1B MS2-3 (207) 1073
 Argos
 2B S4-3 (022)
 2B MS7-1 (099) 2072
 association
 3B MS10-1 (129) 2053
 2P (144) 2044
 astrocyte
 2A S3-1 (014)
 2A S3-6 (019)
 2P (179) 2002
 2P (183) 2006
 1P (241) 1049
 1P (242) 1048
 ataxia
 2P (132) 2051
 1P (283) 1021
 AIP
 1P (164) 1098
 AIP depletion
 1P (224) 1063
 AIP receptors
 3C O-3 (170)
 autoantibody
 3A S5-5 (030)
 2P (128) 2054
 autoimmune
 3A S5-4 (029)
 autophosphorylation
 2P (086) 2082
 axonal guidance
 1P (280) 1024
 axonal sprouting
 1P (195) 1085
 axonal transport
 1C MS6-5 (219) 1068
 1C MS6-4 (220) 1067

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- 1P (221) 1066
axotomy
2A S3-2 (015)
1P (223) 1064
- [B]**
 β -trace
1A S2-3 (010)
barium
2P (060) 2108
basal forebrain
2P (154) 2034
basal forebrain cholinergic neurons
1B MS3-2 (186) 2008
bax
2P (105) 2066
Bcl-2
2P (105) 2066
2C MS9-1 (198) 1082
BDNF
2C MS8-3 (092)
2P (181) 2004
2P (182) 2005
1B MS3-2 (186) 2008
1P (194) 1015
1P (195) 1085
2P (211) 2014
behavior
2P (072) 2096
bHLH
1P (244) 1046
bifemelane hydrochloride
1P (227) 1060
binding assay
1P (115) 1107
1P (120) 1102
binding protein
2P (161) 2027
1P (172) 1091
biosynthesis
2P (080) 2088
BiP/grp78
2P (151) 2037
blocker
1P (123) 1099
blood-brain barrier
1A S1-4 (004)
1A S1-7 (007)
2P (212) 2015
bone morphogenetic protein
1B MS3-1 (185) 2007
bovine brain ganglioside
2C O-4 (143)
brain
3A S5-6 (031)
2C O-3 (048)
1P (049) 1008
3B MS10-3 (130)
2C O-4 (143)
1P (171) 1092
1P (173) 1090
1P (174) 1089
1P (175) 1088
1P (191) 1012
1P (217) 1070
1P (236) 1054
1P (240) 1050
1P (242) 1048
1P (286) 1018
1P (278) 1026
1P (289) 1016
brain damage
1A S1-1 (001)
brain injury
1P (190) 1011
brain ischemia
1A S1-1 (001)
1A S1-4 (004)
1A S1-7 (007)
1P (203) 1077
1B MS2-3 (207) 1073
brain protection
1A S1-7 (007)
brain region specificity
2P (213) 2016
brain-derived neurotrophic factor
1B MS3-5 (188) 2010
branching
3C O-2 (250)
- [C]**
c-Fos
3B MS10-4 (131) 2052
3B MS10-2 (184)
1P (233) 1056
2P (255) 2020
2P (260) 2025
c-jun
2B MS7-5 (103) 2068
3B MS10-2 (184)
c-Myc
2P (256) 2021
c-Ret
1B MS3-4 (187) 2009
C2 domain
1P (267) 1035
C6 glioma cells
2P (148) 2040
Ca2+
2A S3-2 (015)
1B MS1-4 (054) 2114
1B MS1-5 (055) 2113
2P (058) 2110
2P (059) 2109
2P (060) 2108
2P (063) 2105
2P (064) 2104
2P (084) 2084
2P (104) 2067
2P (151) 2037
1P (164) 1098
3C O-3 (170)
1P (203) 1077
2P (208) 2011
Ca2+ mobilization
1C O-2 (231)
Ca2+-imaging
2P (065) 2103
Ca2+-influx
1B MS2-3 (207) 1073
45Ca2+ uptake
1P (202) 1078
cadherin
1P (235) 1055
cADPR
2P (064) 2104
caffeine
1P (203) 1077
CAG repeat
2P (132) 2051
Cajal-Retzius neuron
1P (282) 1022
calcineurin
2P (084) 2084
2C MS9-3 (200) 1080
1P (276) 1028
calcium chelator
2P (151) 2037
calcium oscillation
2P (058) 2110
calcium paradox
2P (084) 2084
calcium store
2P (060) 2108
2P (151) 2037
calcium-binding protein
2P (061) 2107
2P (062) 2106
calmodulin
2P (085) 2083
2C MS9-3 (200) 1080
calmodulin-dependent protein kinase
2C MS8-1 (090)
calmodulin-dependent Protein Kinase II
2P (085) 2083
2P (086) 2082
calpain
1P (223) 1064
cAMP
2P (096) 2075
2P (154) 2034
1P (168) 1094
cAMP-dependent protein kinase
1P (221) 1066
Campylobacter jejuni
3A S5-5 (030)
carbohydrate deficient glycoprotein
syndrome type I
3A S5-2 (027)
caspase
2B MS7-2 (100) 2071
2B MS7-4 (102) 2069
2C MS9-2 (199) 1081
cathepsin D
1P (042) 1002
1P (045) 1005
cDNA cloning
2P (062) 2106
1P (171) 1092
1P (173) 1090
1P (174) 1089
cell adhesion
1P (235) 1055
1C MS6-2 (274)
cell cycle
2A S3-5 (018)
1B MS2-1 (251)
1P (271) 1031
cell death
1A S1-5 (005)
2P (084) 2084
2B MS7-1 (099) 2072
1B MS3-3 (108) 2063
2P (150) 2038
1P (167) 1095
1P (192) 1013
1P (193) 1014
1P (195) 1085
1P (197) 1083
2C MS9-1 (198) 1082
2P (213) 2016
cell polarity
1P (041) 1001
cell signaling
2B S4-1 (020)

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- 3C O-1 (249)
 cell-cell interaction
 2B S4-1 (020)
 3C O-1 (249)
 central nervous system
 1A S2-5 (012)
 2P (259) 2024
 cerebellar granule cells
 1P (228) 1059
 cerebellar granule neuron
 2B MS7-5 (103) 2068
 1B MS3-3 (108) 2063
 cerebellum
 2B MS7-2 (100) 2071
 2P (181) 2004
 1P (237) 1053
 1P (281) 1023
 cerebral blood flow
 1P (202) 1078
 2P (210) 2013
 2P (213) 2016
 cerebral edema
 1A S1-7 (007)
 cerebral ischemia
 1A S1-7 (007)
 1P (202) 1078
 2P (208) 2011
 2P (209) 2012
 cerebrospinal fluid
 1A S2-3 (010)
 3B MS10-4 (131) 2052
 2P (142) 2045
 CGT
 1C MS4-2 (111) 2060
 CHAPS
 2P (256) 2021
 ChAT
 2P (154) 2034
 chemoattractant
 2B S4-4 (023)
 3C O-2 (250)
 chemorepellent
 2B S4-4 (023)
 chimera
 2P (065) 2103
 choline acetyltransferase
 2P (098) 2073
 1B MS3-2 (186) 2008
 1P (216) 1071
 cholinergic neuron
 2P (098) 2073
 3C MS11-3 (137)
 1B MS3-2 (186) 2008
 cholinergic system blood glucose
 1P (243) 1047
 chondroitin sulfate
 1P (236) 1054
 chromaffin cell
 1C O-2 (231)
 1C MS5-3 (264) 1038
 1P (267) 1035
 chromosomal mapping
 2P (062) 2106
 chronic hypoperfusion
 2P (213) 2016
 ciliary neuron
 1C MS6-2 (274)
 cleavage
 1P (047) 1007
 clonal cell culture
 3B TS-3 (039)
 clone cells
 2A S3-4 (017)
 cloning
 2P (062) 2106
 1P (171) 1092
 1P (173) 1090
 1P (174) 1089
 CNPase
 2P (110) 2061
 CNS development
 1P (244) 1046
 CNIF
 3B MS10-1 (129) 2053
 1B MS3-2 (186) 2008
 co-injection
 1P (043) 1003
 coelacanth
 2P (160) 2028
 cognition enhancer
 1P (122) 1100
 collapsin
 1P (280) 1024
 commissural neuron
 2B S4-4 (023)
 commissureless
 2P (127) 2055
 Concanavalin A
 2P (087) 2081
 congenital disorder
 3A S5-2 (027)
 CpG island
 2P (258) 2023
 CPP32
 2P (104) 2067
 CR-50
 1P (282) 1022
 CREB
 1B MS2-5 (254) 2019
 2P (257) 2022
 crystallin
 2P (148) 2040
 2P (152) 2036
 culture
 2P (058) 2110
 2B MS7-3 (101) 2070
 1P (122) 1100
 3B MS10-4 (131) 2052
 2P (156) 2032
 1P (192) 1013
 1P (206) 1074
 1P (244) 1046
 1C MS6-2 (274)
 1P (286) 1018
 1P (284) 1020
 3B TS-3 (039)
 cultured cell
 1B MS1-1 (051)
 curcumin
 2P (148) 2040
 cyclic ADP-ribose
 1C O-2 (231)
 cyclic AMP
 1C O-2 (231)
 cyclic GMP
 2P (149) 2039
 1P (225) 1062
 cyclin D1
 2B MS7-5 (103) 2068
 cyclin-dependent kinases 5
 1P (278) 1026
 cyclooxygenase-2
 1A S2-2 (009)
 cytomegalovirus
 2P (133) 2050
[D]
 deficiency
 1P (119) 1103
 degeneration
 1P (194) 1015
 1P (205) 1075
 1P (206) 1074
 dehydrodolicol reductase
 3A S5-2 (027)
 delayed cell death
 2P (084) 2084
 delayed neuronal death
 2C MS9-2 (199) 1081
 2C MS9-4 (201) 1079
 deltex
 2B S4-1 (020)
 3C O-1 (249)
 dementia
 1P (050) 1009
 2P (142) 2045
 dendrite
 1P (217) 1070
 denervation - axotomy
 1P (223) 1064
 development
 1P (281) 1023
 1P (204) 1076
 1P (244) 1046
 2P (066) 2102
 1P (171) 1092
 development method
 1P (272) 1030
 dexamethasone
 2P (208) 2011
 2P (209) 2012
 diabetic neuropathy
 2P (155) 2033
 dialysis
 2P (074) 2094
 diazepam
 2P (078) 2090
 dibutyl cAMP
 1P (168) 1094
 differential display
 2P (141) 2046
 1P (173) 1090
 1P (174) 1089
 1B MS2-3 (207) 1073
 differentiation
 1B MS2-2 (252)
 1P (286) 1018
 diffusible factor
 3C O-2 (250)
 distribution
 2P (062) 2106
 DM20
 2P (160) 2028
 DNA damage
 2B MS7-3 (101) 2070
 docking/fusion complex
 1C MS5-1 (262) 1040
 1P (266) 1036
 docosaheptaenoic acid
 1P (119) 1103
 dopamine
 1A S6-3 (034)
 3B TS-1 (037)
 2P (068) 2100

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- 2P (070) 2098
 2P (072) 2096
 2P (074) 2094
 2P (077) 2091
 2P (078) 2090
 2P (079) 2089
 2P (106) 2065
 3C MS11-4 (138)
 1P (215) 1072
- dopamine agonist
 1A S6-4 (035)
- dopamine transporter
 2P (071) 2097
- dopaminergic system
 2P (076) 2092
- dorsal root ganglia
 2P (155) 2033
 2P (156) 2032
 2P (180) 2003
 1P (192) 1013
 1P (277) 1027
 1P (279) 1025
 1P (285) 1019
- dorso-ventral(D-V) axis formation
 2P (063) 2105
- down regulation
 1P (117) 1105
- drebrin
 1P (217) 1070
- Drosophila
 2B S4-3 (022)
 2B MS7-1 (099) 2072
 2P (127) 2055
 2P (259) 2024
- dynorphin
 2P (157) 2031
- [E]**
 E2F1
 1B MS2-1 (251)
- EF hand
 2A S3-2 (015)
- El mice
 2C O-2 (140)
- EL mouse
 2P (139) 2047
 2P (157) 2031
 2P (255) 2020
- electric organ
 1P (266) 1036
- electron microscopy
 1B MS1-3 (053)
- embryo
 2P (259) 2024
- embryonic carcinoma cells
 1P (270) 1032
- endocytosis
 2P (127) 2055
- endogenous amine
 2P (071) 2097
- endogenous neurotoxin
 2P (071) 2097
 1A S6-3 (034)
- endothelial
 2P (212) 2015
- endothelial cell
 1A S2-2 (009)
- enzyme immunoassay
 2P (183) 2006
- epidermal growth factor (EGF)
 1P (226) 1061
- epilepsy
 2C O-2 (140)
 2P (157) 2031
 2P (178) 2001
 2P (255) 2020
- ESR-CT
 3C MS11-1 (136)
- estrogen
 1P (116) 1106
- ethanol
 2P (094) 2077
- excitatory amino acid
 1A S1-5 (005)
 1P (043) 1003
- excitatory amino acid transporter
 1A S2-1 (008)
 1P (123) 1099
- exocytosis
 1P (261) 1041
 1C MS5-3 (264) 1038
 1P (267) 1035
- expression
 2B MS7-5 (103) 2068
 1P (120) 1102
 2P (158) 2030
 1P (167) 1095
 1P (173) 1090
 1P (177) 1086
 1P (246) 1044
- external granular layer
 1B MS3-3 (108) 2063
- [F]**
 facial nerve
 1P (194) 1015
- facial nucleus
 1P (194) 1015
- fatty acid
 1C O-3 (232)
- fatty-acid binding protein
 2P (161) 2027
- ferrous ions
 1P (118) 1104
- fetal brain
 1P (173) 1090
- fetal rat brain
 1P (286) 1018
- fever
 1A S2-2 (009)
- FK506
 2P (084) 2084
- 5'-flanking region
 2P (159) 2029
- floor plate
 2B S4-4 (023)
- flow cytometry
 1P (286) 1018
- fluorescence in situ hybridization (FISH)
 1C MS5-5 (265) 1037
- focal cerebral ischemia
 1P (202) 1078
- focal ischemia
 1A S1-2 (002)
 1P (202) 1078
- forebrain
 2C MS8-1 (090)
 2P (154) 2034
 1B MS3-2 (186) 2008
- free radical
 1A S6-4 (035)
 1B MS1-4 (054) 2114
 2P (139) 2047
- 1P (229) 1058
- frontal cortex
 2P (095) 2076
- fura2
 2P (060) 2108
- [G]**
 Gprotein
 2P (065) 2103
 2P (066) 2102
- Gprotein-coupled receptor kinase
 2P (067) 2101
- g-secretase
 1P (042) 1002
- GABA
 1P (239) 1051
- GABAergic neuron
 1P (246) 1044
- galactosylceramide
 1C MS4-1 (162)
- galactosyltransferase
 1C MS4-1 (162)
- ganglioside
 3A S5-3 (028)
 3A S5-4 (029)
 3A S5-5 (030)
 2C O-4 (143)
 1C O-3 (232)
 1P (269) 1033
 1P (270) 1032
 1P (271) 1031
- GAP-43
 1P (218) 1069
 1C MS5-3 (264) 1038
- gas transmitter
 2P (149) 2039
- GD3
 2P (109) 2062
 1C MS4-5 (113) 2059
- GD3 synthase
 1P (270) 1032
- GDNF
 2P (075) 2093
 2P (144) 2044
 1B MS3-1 (185) 2007
 1P (193) 1014
- GDNFR-alpha
 1B MS3-4 (187) 2009
- gel retardation electrophoresis
 2P (214) 2017
 2P (256) 2021
- gene
 2P (160) 2028
- gene expression
 2B MS7-5 (103) 2068
 1P (167) 1095
 1P (177) 1086
- gene mapping
 1C MS5-5 (265) 1037
- gene targeting
 2P (153) 2035
- gene therapy
 1A S6-5 (036)
- gene transfer
 2A S3-4 (017)
 2P (075) 2093
 1C O-1 (287)
- genetic disease
 3A S5-1 (026)
- genetic factors
 1A S6-2 (033)
- genomic organization

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- 2P (159) 2029
- gerbil
1A S1-6 (006)
2C MS9-2 (199) 1081
1P (205) 1075
2P (208) 2011
2P (209) 2012
- GFAP promoter
2A S3-6 (019)
- GH3
1P (226) 1061
- gicerin
1C MS6-2 (274)
- glia
1A S1-4 (004)
2A S3-1 (014)
2A S3-5 (018)
2P (081) 2087
2P (084) 2084
1P (239) 1051
- glia maturation factor
2P (179) 2002
- glial fibrillary acidic protein
2A S3-6 (019)
1P (176) 1087
1P (205) 1075
1P (223) 1064
2P (255) 2020
- glial growth factor
1P (285) 1019
- glioma
2P (082) 2086
2P (148) 2040
- gliotoxicity
1P (224) 1063
- global ischemia
1A S1-2 (002)
- glucoreceptor neurons
2C O-1 (234)
- [2-13C]-glucose
1P (239) 1051
- glucose uptake
1P (241) 1049
- glucose-sensitive neurons
2C O-1 (234)
- glutamate
1A S1-5 (005)
1A S2-6 (013)
1P (116) 1106
1P (119) 1103
3C MS11-1 (136)
1C MS5-4 (196) 1084
1P (240) 1050
- glutamate electrode
2P (087) 2081
- glutamate metabolism
1P (240) 1050
- glutamate receptor
2P (088) 2080
1P (117) 1105
1P (119) 1103
1P (121) 1101
1P (122) 1100
1P (229) 1058
- glutamate signaling
2P (260) 2025
- glutamate transporter
2A S3-6 (019)
1P (123) 1099
- glutamic acid decarboxylase
1P (246) 1044
- glutathione
2P (145) 2043
- glycoconjugate
3A S5-1 (026)
- glycogen synthase
2A S3-6 (019)
1P (242) 1048
- glycolipid
3A S5-4 (029)
3A S5-6 (031)
- N-glycolylneuraminic acid
2C O-4 (143)
- glycosphingolipid
1C O-3 (232)
1P (271) 1031
- GM1 ganglioside
3A S5-3 (028)
2C O-4 (143)
1P (271) 1031
- GPI-anchored protein
2P (126) 2056
1P (218) 1069
- granule cell
2P (085) 2083
2B MS7-2 (100) 2071
1B MS3-3 (108) 2063
1P (167) 1095
2P (181) 2004
1P (228) 1059
1P (284) 1020
- granule neuron
2B MS7-5 (103) 2068
1B MS3-3 (108) 2063
1P (167) 1095
- green tea
2P (058) 2110
- GRK2
2P (068) 2100
- growth cone
1P (278) 1026
- growth inhibitory factor
1P (230) 1057
- GTP
1P (261) 1041
- guanylate kinase domain
2P (124) 2058
- Guillai-Barre syndrome
3A S5-4 (029)
3A S5-5 (030)
2P (133) 2050
2P (134) 2049
2C O-4 (143)
- [H]**
hamster monoclonal antibody
2C O-3 (048)
- HCNP
3C MS11-3 (137)
2P (158) 2030
- heat shock protein
2P (146) 2042
- heme oxygenase
2P (149) 2039
- hemizygous depletion
1C MS5-5 (265) 1037
- heparan sulfate proteoglycan
1P (238) 1052
- hepatocyte growth factor (HGF)
1P (189) 1010
- herpes simplex virus
1P (279) 1025
- HES1
1P (244) 1046
- hipoxia
1P (206) 1074
- hippocampal CA1
2P (211) 2014
- hippocampal
neurostimulating peptide
3C MS11-3 (137)
2P (158) 2030
- hippocampal neuron
3C MS11-3 (137)
1P (222) 1065
1P (238) 1052
- hippocampus
1P (043) 1003
2P (087) 2081
2P (088) 2080
2C MS8-3 (092)
3C MS11-3 (137)
2P (147) 2041
2P (158) 2030
2C MS9-2 (199) 1081
1P (205) 1075
1P (206) 1074
2P (214) 2017
1P (282) 1022
- hippocampus medial septum
3C MS11-3 (137)
- hippocampus slice
2P (087) 2081
1P (206) 1074
- histamine
1P (289) 1016
- histamine H1 receptor
2P (153) 2035
- homeodomain
2P (259) 2024
- HPC-1/Syntaxin 1A
1C MS5-5 (265) 1037
- HPLC
1P (215) 1072
- HPLC-ECD
2P (097) 2074
- hsp27
2P (147) 2041
2P (148) 2040
- hsp70
2P (147) 2041
- 5-HT2A receptors
2P (095) 2076
- 5-HT3 receptors
2P (095) 2076
- human amniotic epithelial cells
2P (110) 2061
1P (215) 1072
1P (216) 1071
- human brain
1P (049) 1008
1P (240) 1050
- hybrid cell
2C MS8-1 (090)
- hydrogen peroxide
1P (227) 1060
- hydroxyaspartate
1P (123) 1099
- hydroxyl free radical
1P (229) 1058
- hypertension
1P (233) 1056
- hypothermia
1A S1-6 (006)

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- hypothermia therapy
1A S1-7 (007)
- hypoxia
2P (150) 2038
1P (197) 1083
2C MS9-1 (198) 1082
- [I]**
- Ibudilast
1P (168) 1094
- ICE
2C MS9-1 (198) 1082
1A S1-3 (003)
- IGF-I
2B MS7-2 (100) 2071
- IgLON
2P (126) 2056
- IgM anti-Gal NAc-GD1a antibody
2P (133) 2050
- IgM anti-GM2 antibody
2P (133) 2050
- immobilization stress
3B MS10-3 (130)
- immortalized astrocyte
2P (179) 2002
- immunoblot analysis
2P (142) 2045
- Immunoblotting
2P (260) 2025
- immunoblotting assay
1B MS2-5 (254) 2019
1P (117) 1105
- immunohistochemistry
3A S5-6 (031)
1B MS1-3 (053)
- immunoprecipitation
2P (066) 2102
- immunoreactivity
2P (156) 2032
1P (284) 1020
- immunostaining
1P (242) 1048
- in situ hybridization
2P (089) 2079
1P (242) 1048
1C MS5-5 (265) 1037
- in vivo ¹³C-MRS
1P (240) 1050
- in vivo microdialysis
3B TS-2 (038)
- inducible nitric oxide synthase (iNOS)
3B MS10-3 (130)
- induction
2P (179) 2002
- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
1P (203) 1077
- inositol monophosphatase
1P (049) 1008
- inositol phosphate
1P (120) 1102
- myo-inositol 1-phosphate
1P (049) 1008
- inositol polyphosphates
1P (267) 1035
- interleukin 1- β converting enzyme (ICE)
1A S1-3 (003)
- interleukin-1 β
2P (180) 2003
- intermediate filament
2A S3-5 (018)
- internal Ca²⁺
3C O-3 (170)
- intracellular calcium
1P (203) 1077
- intracellular signaling
2P (146) 2042
- intracerebral grafting
1P (216) 1071
- ion channel
1B MS1-5 (055) 2113
- ion transport
1P (288) 1017
- IP3 receptor
2P (063) 2105
- IP3 receptor binding
1P (202) 1078
- IP3-induced 45Ca²⁺ release
1P (202) 1078
- IP3/Ca²⁺ signaling
2P (063) 2105
- iron chelators
1P (118) 1104
- iron-induced epileptogenic discharges
3C MS11-1 (136)
- ischemia
1A S1-1 (001)
1A S1-2 (002)
1A S1-3 (003)
1A S1-4 (004)
1A S1-6 (006)
1A S1-7 (007)
2P (150) 2038
1P (166) 1096
1P (197) 1083
2C MS9-2 (199) 1081
2C MS9-3 (200) 1080
2C MS9-4 (201) 1079
1P (202) 1078
1P (203) 1077
1P (206) 1074
1B MS2-3 (207) 1073
2P (208) 2011
2P (209) 2012
2P (211) 2014
2P (214) 2017
1P (269) 1033
- ischemia/reperfusion
1P (205) 1075
- ischemic tolerance
2P (214) 2017
- isotype
1P (171) 1092
- [K]**
- kainate receptor
1A S1-5 (005)
1B MS2-5 (254) 2019
- kainic acid
2P (147) 2041
1B MS3-5 (188) 2010
- knockout mouse
3A S5-1 (026)
2P (153) 2035
- [L]**
- Li
1P (279) 1025
- L1CAM
1C MS4-4 (112)
- L7/PCP2
1P (176) 1087
- laminin-2
2P (142) 2045
- LANP
1P (281) 1023
- laser transection
1P (277) 1027
- lateral hypothalamus
1P (243) 1047
- Latimeria
2P (160) 2028
- leptin(LEP)
2C O-1 (234)
- Leptomeninges
1A S2-3 (010)
- levodopa
1A S6-4 (035)
- α -linolenic acid
1P (119) 1103
- lipid linked oligosaccharides
3A S5-2 (027)
- liquid chromatography-mass spectrometry
2P (161) 2027
- liver
1P (192) 1013
- local cerebral blood flow
1P (202) 1078
- localized ge-HSOC
1P (240) 1050
- long-term potentiation
2P (087) 2081
2C MS8-3 (092)
1P (235) 1055
- low dose X-irradiation
1P (177) 1086
- LPS
2P (182) 2005
- luciferase
1C MS4-2 (111) 2060
- lung
1P (280) 1024
- lymphocyte
1A S6-3 (034)
- [M]**
- macrophage
2P (182) 2005
- magnesium
2P (256) 2021
- major histocompatibility complex
1P (171) 1092
- MAP kinase
2C MS8-3 (092)
1C MS6-3 (275) 1029
- MAP1
2P (125) 2057
- MARCKS
2P (083) 2085
2P (088) 2080
- MBP
1P (176) 1087
- MDCK cell
1P (041) 1001
- mediastinal neoplasm
2P (128) 2054
- membrane binding
1P (118) 1104
- membrane potential
1C O-1 (287)
- memory
1P (269) 1033
- merosin
2P (142) 2045
- mesencephalon

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- 1P (116) 1106
 metabotropic glutamate receptor
 1P (121) 1101
 1P (122) 1100
 methamphetamine
 2P (069) 2099
 N-methyl-D-aspartate receptor
 1P (115) 1107
 1-methyl-TIQ
 2P (080) 2088
 N-methyltransferase
 1A S6-3 (034)
 methodology
 3B TS-3 (039)
 mGluR1a
 1P (120) 1102
 microdialysis
 3B TS-1 (037)
 3B TS-2 (038)
 2P (078) 2090
 2P (097) 2074
 1P (243) 1047
 microglia
 2A S3-2 (015)
 2A S3-3 (016)
 2A S3-4 (017)
 3B TS-4 (040)
 1P (164) 1098
 1P (165) 1097
 1P (166) 1096
 1P (167) 1095
 1P (168) 1094
 3C MS11-2 (169) 1093
 3C O-3 (170)
 microsequencing
 2P (126) 2056
 microtubule stabilization
 1P (277) 1027
 migration
 2P (181) 2004
 mitogen activated protein kinase(MAPK)
 1P (248) 1042
 [3H]MK-801 binding
 1P (118) 1104
 model
 1A S1-2 (002)
 3A S5-1 (026)
 1P (043) 1003
 3C MS11-2 (169) 1093
 molecular mimicry
 2P (133) 2050
 monensin
 2P (156) 2032
 mongolian gerbil
 1P (205) 1075
 monkey
 1P (240) 1050
 1A S2-5 (012)
 monkey brain
 1P (240) 1050
 monoclonal antibody
 3A S5-6 (031)
 2C O-3 (048)
 2P (109) 2062
 1C MS4-4 (112)
 1C MS4-5 (113) 2059
 1C MS4-1 (162)
 1C MS6-5 (219) 1068
 1P (222) 1065
 monosynaptic reflex
 1P (121) 1101
 morphogenesis
 1P (280) 1024
 1P (283) 1021
 Morris water maze task
 1P (190) 1011
 motivation
 2P (076) 2092
 2P (077) 2091
 motor neuron
 1P (195) 1085
 mouse
 1A S1-3 (003)
 3A S5-1 (026)
 2P (079) 2089
 3C MS11-4 (138)
 2P (139) 2047
 2C O-2 (140)
 2P (153) 2035
 2P (157) 2031
 2P (158) 2030
 2P (178) 2001
 1P (222) 1065
 1P (246) 1044
 2P (255) 2020
 1P (283) 1021
 mouse brain
 2C O-3 (048)
 1P (175) 1088
 1P (242) 1048
 mouse brain RT-PCR
 1C MS4-3 (163) 2026
 MPP+
 1P (226) 1061
 MPTP
 3C MS11-4 (138)
 mRNA
 2P (094) 2077
 3B MS10-3 (130)
 2P (156) 2032
 2P (179) 2002
 2P (180) 2003
 mRNA expression
 1P (173) 1090
 Musashi
 2B S4-3 (022)
 muscarine receptor binding
 2P (098) 2073
 muscarinic acetylcholine receptor
 2P (060) 2108
 muscarinic receptor
 2P (060) 2108
 2P (067) 2101
 mutant
 2P (070) 2098
 2P (072) 2096
 mutant mouse
 2P (178) 2001
 1P (283) 1021
 myelin
 2P (161) 2027
 1C MS4-1 (162)
 myelin basic protein
 2P (110) 2061
 myelin-associated glycoprotein
 1C MS4-3 (163) 2026
 myosin
 1P (217) 1070
 [N]
 L-NAME
 1P (276) 1028
 N-Myc
 2P (061) 2107
 N-Shc
 1P (245) 1045
 N-terminus-deleted mutant
 2P (070) 2098
 Na+ pump
 2A S3-1 (014)
 1C O-1 (287)
 Na,K-ATPase
 1C O-1 (287)
 1P (288) 1017
 NACP
 1P (044) 1004
 1P (045) 1005
 NAD+
 2P (064) 2104
 NAP-22
 1P (218) 1069
 Narke japonica
 1P (266) 1036
 NCB 20
 2P (094) 2077
 necdin
 1B MS2-1 (251)
 2P (258) 2023
 neuroglycan C
 1P (237) 1053
 nerve growth factor
 2P (104) 2067
 2P (180) 2003
 1B MS3-5 (188) 2010
 1P (248) 1042
 nerve regeneration
 1C MS6-4 (220) 1067
 netrin
 2B S4-4 (023)
 neural antigens
 1C MS4-4 (112)
 neural cells
 2P (057) 2111
 1P (286) 1018
 neural morphogenesis
 1P (283) 1021
 neural precursor cells
 2P (057) 2111
 1P (286) 1018
 neural stem cell
 1B MS2-4 (253) 2018
 neuregulin
 1P (285) 1019
 neurite
 1C MS6-1 (273)
 1C MS6-2 (274)
 1C MS6-3 (275) 1029
 neurite outgrowth
 2P (056) 2112
 1C MS6-1 (273)
 1P (276) 1028
 Neuro 2a
 1P (046) 1006
 neuroblastoma cell lines
 2P (061) 2107
 neuroblast proliferation
 2P (056) 2112
 neuroblastoma
 1B MS1-2 (052) 2115
 1B MS3-4 (187) 2009
 1P (227) 1060
 neuroblastoma cell
 2C MS8-1 (090)

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- 1P (193) 1014
 1P (271) 1031
 neurocan
 1P (236) 1054
 neurofilament
 1C MS6-5 (219) 1068
 1C MS6-4 (220) 1067
 1P (221) 1066
 neurogenesis
 1P (244) 1046
 neuroleptics
 3B MS10-2 (184)
 neuromuscular
 2P (127) 2055
 neuron
 1A S2-1 (008)
 2B S4-4 (023)
 2P (081) 2087
 2P (098) 2073
 2B MS7-4 (102) 2069
 2B MS7-5 (103) 2068
 1B MS3-3 (108) 2063
 3C MS11-3 (137)
 1P (167) 1095
 1P (189) 1010
 1P (195) 1085
 1P (222) 1065
 1P (225) 1062
 1P (238) 1052
 1P (245) 1045
 1P (246) 1044
 1B MS2-1 (251)
 1B MS2-2 (252)
 1C MS6-2 (274)
 1P (282) 1022
 1B MS3-1 (185) 2007
 1P (288) 1017
 neuron degeneration
 1P (206) 1074
 neuron-specific
 2P (258) 2023
 neuronal cell death
 1A S1-5 (005)
 neuronal death
 1A S1-2 (002)
 1B MS1-5 (055) 2113
 1P (197) 1083
 2C MS9-1 (198) 1082
 2C MS9-2 (199) 1081
 2C MS9-4 (201) 1079
 1P (204) 1076
 2P (213) 2016
 1P (230) 1057
 neuronal degeneration
 1P (205) 1075
 neuronal plasticity
 1P (121) 1101
 neuropathy
 3A S5-4 (029)
 3A S5-5 (030)
 2P (155) 2033
 neuropeptide
 1C MS6-1 (273)
 neuropeptide Y
 1B MS2-2 (252)
 neuropeptides
 2P (155) 2033
 neuroprotection
 1A S1-1 (001)
 1A S6-4 (035)
 1A S1-6 (006)
 1P (116) 1106
 2C MS9-3 (200) 1080
 neurotoxicity
 1P (204) 1076
 neurotoxin
 2P (071) 2097
 1A S6-3 (034)
 neurotransmitter
 2P (183) 2006
 1C MS5-4 (196) 1084
 1C MS5-2 (263) 1039
 neurotrophic factor
 2P (075) 2093
 2P (154) 2034
 2P (178) 2001
 2P (183) 2006
 1B MS3-5 (188) 2010
 1P (190) 1011
 1P (191) 1012
 neurotrophin
 1B MS3-3 (108) 2063
 2P (182) 2005
 1C MS5-4 (196) 1084
 1P (245) 1045
 neurotrophin-3
 2P (181) 2004
 1B MS3-5 (188) 2010
 NG108-15 cells
 2P (064) 2104
 2P (083) 2085
 2P (094) 2077
 NGF
 2P (107) 2064
 2P (178) 2001
 3B MS10-2 (184)
 1B MS2-2 (252)
 1P (248) 1042
 1C MS6-3 (275) 1029
 nicotinic
 2P (096) 2075
 nigral neuron
 1P (222) 1065
 Nissl
 1P (192) 1013
 nitrate
 3B TS-2 (038)
 nitric oxide
 1A S1-3 (003)
 2A S3-3 (016)
 3B TS-2 (038)
 2P (069) 2099
 2B MS7-4 (102) 2069
 2P (106) 2065
 3B MS10-3 (130)
 1P (165) 1097
 1P (225) 1062
 1P (228) 1059
 1P (276) 1028
 nitric oxide synthase
 1A S1-3 (003)
 3B TS-2 (038)
 3B MS10-3 (130)
 nitrite
 3B TS-2 (038)
 nitroxide radicals
 3C MS11-1 (136)
 NMDA
 2C MS8-4 (093) 2078
 1P (115) 1107
 NMDA channel
 1P (118) 1104
 NMDA receptor
 2B S4-6 (025)
 2P (088) 2080
 1P (114) 1108
 1P (115) 1107
 1P (117) 1105
 1P (204) 1076
 1P (229) 1058
 NO release
 3C O-3 (170)
 NO-related compounds
 1P (115) 1107
 nociceptin
 1A S2-6 (013)
 nodose ganglia
 2P (155) 2033
 norepinephrine
 1P (215) 1072
 1P (223) 1064
 Notch
 2B S4-1 (020)
 3C O-1 (249)
 NT-3
 2P (182) 2005
 1B MS3-1 (185) 2007
 NTN
 1P (193) 1014
 nuclear fractions
 2P (260) 2025
 nuclear localization
 1B MS2-5 (254) 2019
 nucleotide sequence
 1P (173) 1090
 1P (174) 1089
 nucleus
 2P (085) 2083
 1P (194) 1015
 1P (204) 1076
 nucleus accumbens
 2P (077) 2091
[O]
 O-2A progenitor
 1C MS4-5 (113) 2059
 2P (109) 2062
 O1
 2P (109) 2062
 1C MS4-5 (113) 2059
 O4
 2P (109) 2062
 1C MS4-5 (113) 2059
 odorant receptor
 2P (065) 2103
 6-OHDA
 2P (077) 2091
 oligodendrocyte
 2P (109) 2062
 1C MS4-2 (111) 2060
 1C MS4-4 (112)
 1C MS4-5 (113) 2059
 organ culture
 2P (156) 2032
 1P (192) 1013
 ORP150
 1P (197) 1083
 oxidative stress
 2P (106) 2065
 1P (116) 1106
 2P (145) 2043
 oxygen toxicity
 1P (229) 1058

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

[P]

P2 fraction
1P (289) 1016
P2 protein
2P (161) 2027
p21
2P (082) 2086
p53
2B MS7-3 (101) 2070
2P (105) 2066
PACAP
2P (154) 2034
2P (159) 2029
paraneoplastic syndrome
2P (128) 2054
Parkinson's disease
1A S6-1 (032)
1A S6-3 (034)
1A S6-4 (035)
1A S6-5 (036)
2P (071) 2097
2P (075) 2093
2P (080) 2088
3C MS11-4 (138)
Patch-clamp
1C O-1 (287)
PC12
2P (104) 2067
1P (268) 1034
PC12 cells
2P (073) 2095
2P (096) 2075
1C MS6-3 (275) 1029
1P (276) 1028
PC12D
1P (248) 1042
PCR
2P (135) 2048
pentylentetrazol
2P (141) 2046
penumbra
1A S1-2 (002)
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
2C MS9-3 (200) 1080
perfusate
3B TS-1 (037)
perineuronal net
1P (236) 1054
peroxynitrite
2P (106) 2065
pharyngeal-cervical-brachial weakness
2P (134) 2049
phencyclidine
2P (076) 2092
L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
1P (269) 1033
phorbol ester
1C MS5-3 (264) 1038
phosphacan
2P (128) 2054
phosphatidyl inositol metabolism
2P (057) 2111
6-phosphogluconate
1P (224) 1063
phospholipase A2
1A S2-1 (008)
2P (081) 2087
phospholipase C γ 1
2P (057) 2111
phosphomannomutase II

3A S5-2 (027)
phosphorylation
2A S3-5 (018)
2P (067) 2101
2P (068) 2100
2P (083) 2085
2P (086) 2082
2P (088) 2080
2P (152) 2036
1P (172) 1091
1C MS6-4 (220) 1067
1P (221) 1066
pituitary
1P (117) 1105
place preference
2P (076) 2092
plasmalocerebroside
1C O-3 (232)
plasminogen release
3C O-3 (170)
plasticity
1A S1-1 (001)
2C MS8-3 (092)
1P (121) 1101
1P (235) 1055
1C MS5-2 (263) 1039
PLP
2P (160) 2028
PNP14
2P (089) 2079
polyisopropylacrylamide
3B TS-4 (040)
polymerase chain reaction
2P (144) 2044
polymorphism
3B MS10-1 (129) 2053
2P (144) 2044
pons
3C O-2 (250)
pontine nucleus
1P (204) 1076
positron emission tomography
1A S2-5 (012)
post transcriptional regulation
1B MS2-4 (253) 2018
postmitotic neuron
2P (258) 2023
1B MS2-1 (251)
postnatal development
2P (066) 2102
postsynaptic densities
2P (086) 2082
preprotachykinin mRNA
2P (180) 2003
presenilin
1B MS1-1 (051)
1B MS1-2 (052) 2115
Presenilin 1
1P (046) 1006
1P (047) 1007
primary culture
3B TS-3 (039)
1P (122) 1100
1P (244) 1046
1P (286) 1018
processing
1P (047) 1007
1C MS6-1 (273)
proliferation
2P (056) 2112
3C MS11-2 (169) 1093

promoter
2A S3-6 (019)
1P (246) 1044
promoter assay
1C MS4-2 (111) 2060
prosaposin
1P (190) 1011
1P (191) 1012
prostaglandin
1A S2-2 (009)
1A S2-4 (011)
1A S2-5 (012)
prostaglandin A1
2P (082) 2086
prostaglandin D synthase
1A S2-3 (010)
prostaglandin D2
1A S2-3 (010)
prostaglandin I2
1A S2-5 (012)
prostaglandins
1A S2-6 (013)
prostanoid receptors
1A S2-4 (011)
protective effect
1P (227) 1060
protein carboxyl methyltransferase
1P (177) 1086
protein kinase
2P (067) 2101
1P (172) 1091
1P (248) 1042
protein kinase C
2P (057) 2111
2P (083) 2085
2P (086) 2082
2C MS8-1 (090)
1P (189) 1010
1P (221) 1066
1P (261) 1041
1C MS5-3 (264) 1038
1P (278) 1026
proteoglycan
1P (236) 1054
1P (237) 1053
1P (238) 1052
proteolipid protein
2P (110) 2061
PSD-95
2P (124) 2058
2P (125) 2057
pulsatile compression
1P (233) 1056
Purkinje cell
1P (176) 1087
1P (284) 1020
pyramidal tract
3C O-2 (250)
[Q]
quail
1C MS6-5 (219) 1068
quinolinic acid
2C O-2 (140)
quisqualic acid
1P (120) 1102
Quv
1C MS6-5 (219) 1068
[R]
Ra
2P (211) 2014

- Rad51
1P (175) 1088
- radiation hormesis
1P (177) 1086
- radioimmunoassay
2P (157) 2031
- Ramsay Hunt syndrome
2P (135) 2048
- ras
2P (096) 2075
2B MS7-1 (099) 2072
1C MS6-3 (275) 1029
- Ras/MAPK signal
2B S4-3 (022)
- rat
2P (069) 2099
2P (098) 2073
3B MS10-4 (131) 2052
3C MS11-2 (169) 1093
2P (180) 2003
1P (233) 1056
1P (227) 1060
- rat brain
3A S5-6 (031)
2C O-3 (048)
1P (049) 1008
1P (236) 1054
1P (278) 1026
1P (286) 1018
1P (289) 1016
- rat dorsal root ganglion
2P (180) 2003
- rat monoclonal antibody
2C O-3 (048)
3A S5-6 (031)
- rat neonatal brain
1P (278) 1026
- rat neuroblastoma
1P (227) 1060
- rat spinal cord
3C MS11-2 (169) 1093
- re-uptake
1P (289) 1016
- reactive oxygen species
1P (230) 1057
- rebound hyperphagia
2P (078) 2090
- RecA
1P (175) 1088
- receptor
1A S1-5 (005)
1A S2-5 (012)
2B S4-6 (025)
2P (060) 2108
2P (063) 2105
2P (065) 2103
2P (067) 2101
2P (068) 2100
2P (079) 2089
2P (088) 2080
2P (096) 2075
2P (098) 2073
1P (119) 1103
1P (114) 1108
1P (117) 1105
1P (191) 1012
1P (121) 1101
1P (122) 1100
2P (153) 2035
1P (202) 1078
1P (203) 1077
- 1P (204) 1076
1P (229) 1058
1B MS2-5 (254) 2019
2P (257) 2022
- receptor binding assay
1P (115) 1107
- receptor-operated calcium channel
2P (060) 2108
- recombinant adenoviral vector
1B MS1-3 (053)
- recombination
1P (175) 1088
- redox
1P (228) 1059
- redox regulation
1P (115) 1107
- reeler
1P (282) 1022
1P (283) 1021
- Reelin
1P (282) 1022
1P (284) 1020
- regeneration
1P (192) 1013
1C MS6-4 (220) 1067
1P (230) 1057
- reinforcement
2P (077) 2091
- reserpine
2P (074) 2094
- retinoic acid
2P (061) 2107
1B MS3-1 (185) 2007
1P (193) 1014
2P (212) 2015
- reverse transcription-polymerase chain reaction
3B MS10-3 (130)
- ring zinc finger
3C O-1 (249)
- RNA-binding protein
2B S4-3 (022)
1B MS2-4 (253) 2018
- ROS
2P (107) 2064
1P (229) 1058
- [S]
SA4503
2P (257) 2022
- SCG
2P (151) 2037
1B MS3-1 (185) 2007
1P (223) 1064
- SCG neuron
1B MS3-1 (185) 2007
- schizophrenia
3B MS10-1 (129) 2053
2P (144) 2044
- Schwann cells
1P (285) 1019
- sciatic nerve
1P (194) 1015
- secretion
1P (268) 1034
- secretory granule
1P (261) 1041
- seizure
2P (141) 2046
2P (157) 2031
2P (178) 2001
1B MS3-5 (188) 2010
- 1P (235) 1055
- semaphorin
1P (280) 1024
- senescence accelerated mouse (P8)
2P (158) 2030
- senile dementia
1P (050) 1009
- septal neuron
1P (222) 1065
- sequestration
2P (068) 2100
- serine/threonine kinase
2C MS8-4 (093) 2078
- serotonin
3B TS-1 (037)
2P (095) 2076
2P (146) 2042
- serotonin release
2P (153) 2035
- serotonin transporter
3B MS10-1 (129) 2053
- serum
1P (165) 1097
1P (166) 1096
- serum factors
2A S3-3 (016)
- Shc
1P (245) 1045
- sialyltransferases
1P (270) 1032
- sigma-1 receptor
2P (257) 2022
- signal transduction
2A S3-5 (018)
1P (189) 1010
2P (257) 2022
- SKF 38393
2P (074) 2094
- slice culture
3B TS-3 (039)
2B MS7-3 (101) 2070
1P (206) 1074
- smoking
2P (210) 2013
- SNARE
1C MS5-1 (262) 1040
- [2-13C]-sodium acetate
1P (239) 1051
- sodium nitroprusside
1P (115) 1107
- sodium pump
1C O-1 (287)
- sodium-potassium ATPase
1P (241) 1049
- space restriction stress
2P (078) 2090
- spermidine
1P (114) 1108
- spermine
1P (114) 1108
- sphingosine
1C O-3 (232)
- spinal cord
1A S2-6 (013)
3C MS11-2 (169) 1093
1P (194) 1015
- spinal cord neuron
1P (225) 1062
- spinal motoneuron
1A S1-5 (005)
- spine

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

- 1P (217) 1070
 spinocerebellar ataxia 6(SCA6)
 2P (132) 2051
 stab wounds
 1P (190) 1011
 store-operated calcium channel
 2P (060) 2108
 stress
 2P (078) 2090
 2P (106) 2065
 1P (116) 1106
 3B MS10-3 (130)
 2P (152) 2036
 stress protein
 1A S1-4 (004)
 2P (145) 2043
 2P (146) 2042
 2P (147) 2041
 2P (148) 2040
 2P (150) 2038
 stress response
 2P (149) 2039
 striatum
 2P (069) 2099
 2P (097) 2074
 1P (114) 1108
 3C MS11-1 (136)
 subarachnoid hemorrhage
 2P (105) 2066
 subculture
 3B TS-4 (040)
 γ subunit
 2P (066) 2102
 substance P
 2P (180) 2003
 2P (156) 2032
 sugar chain
 1P (272) 1030
 sulfonylurea
 1P (241) 1049
 super shift
 1B MS2-5 (254) 2019
 superior cervical ganglia
 2P (155) 2033
 superior cervical sympathetic ganglion
 (SCG)
 1P (223) 1064
 superoxide
 2A S3-3 (016)
 1P (166) 1096
 1P (228) 1059
 superoxide dismutase
 2P (139) 2047
 suppression of food intake
 2C O-1 (234)
 surface plasmon resonance
 1P (191) 1012
 survival factor
 1P (285) 1019
 SV40 T antigen
 2P (179) 2002
 sympathetic neuron
 1P (245) 1045
 1B MS2-2 (252)
 synaphin/complexin
 1C MS5-1 (262) 1040
 1P (266) 1036
 synapse
 2P (079) 2089
 1C MS5-2 (263) 1039
 1P (269) 1033
 1P (278) 1026
 synapse formation
 1P (238) 1052
 synaptic plasticity
 2C MS8-3 (092)
 1P (121) 1101
 1P (235) 1055
 synaptic transmission
 1P (121) 1101
 synaptic vesicle
 1P (261) 1041
 synaptogenesis
 2P (127) 2055
 synaptosomes
 2P (059) 2109
 synaptotagmin
 1P (267) 1035
 1P (268) 1034
 synergistic effect
 1B MS3-2 (186) 2008
 synuclein
 1P (044) 1004
 2P (089) 2079
 systemic hemodynamics
 2P (210) 2013
[T]
 tau protein kinase II
 1P (278) 1026
 tenascin
 2P (072) 2096
 tetrahydrobiopterin
 2P (073) 2095
 theanine
 2P (058) 2110
 thromboxane
 1A S2-4 (011)
 TNF α
 2A S3-3 (016)
 2P (061) 2107
 1P (164) 1098
 1P (168) 1094
 1P (197) 1083
 TP cyclohydrolase I
 2P (073) 2095
 transcranial Doppler sonography
 2P (210) 2013
 transcription
 1B MS2-1 (251)
 1B MS2-2 (252)
 transcription factor
 2P (255) 2020
 2P (256) 2021
 transfection
 1P (288) 1017
 transgenic mouse
 1A S1-3 (003)
 1P (246) 1044
 transient ischemia
 2P (211) 2014
 translocation
 2P (086) 2082
 transmitter release
 1C MS5-1 (262) 1040
 1P (266) 1036
 transporter
 1A S2-1 (008)
 2A S3-6 (019)
 2P (071) 2097
 2P (079) 2089
 1P (123) 1099
 3B MS10-1 (129) 2053
 1B MS2-3 (207) 1073
 treatment
 1A S6-5 (036)
 triton insoluble
 2P (126) 2056
 1P (218) 1069
 Trk
 1P (245) 1045
 TrkB
 2P (211) 2014
 TrkC
 1B MS3-1 (185) 2007
 tubulin
 2P (067) 2101
 tumor necrosis factor-alpha
 1P (165) 1097
 two dimensional electrophoresis
 2P (260) 2025
 two-hybrid system
 2P (124) 2058
 tyrosine hydroxylase
 2P (070) 2098
 3C MS11-4 (138)
 tyrosine phosphatase
 2P (128) 2054
[U]
 [3H]UDP-gal
 2A S3-6 (019)
 ultra low nicotine & tar cigarette
 2P (210) 2013
 unc-4
 2P (259) 2024
 uptake inhibitor
 1P (123) 1099
[V]
 ventral surface of medulla oblongata
 1P (233) 1056
 ventromedial hypothalamus
 1P (243) 1047
 vesicle transporter
 1B MS2-3 (207) 1073
 video-enhanced microscopy
 1P (277) 1027
 vimentin
 2P (110) 2061
 VIP
 2P (159) 2029
 voltage-dependent calcium channels
 2P (059) 2109
 VZV DNA
 2P (135) 2048
[W]
 Williams syndrome
 1C MS5-5 (265) 1037
 Wistar rats
 2P (213) 2016
[Y]
 yotari
 1P (283) 1021
[Z]
 zif268
 1P (248) 1042

() 内ゴシック数字は抄録番号、その後の4桁数字はポスター番号を示す

神経化学 36巻 第3号

平成9年10月3日発行

編集兼発行者 日本神経化学会

代表者 小宮 義璋

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 NTT四国電話帳株式会社