

ISSN : 0037-3796



神経化学

Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry

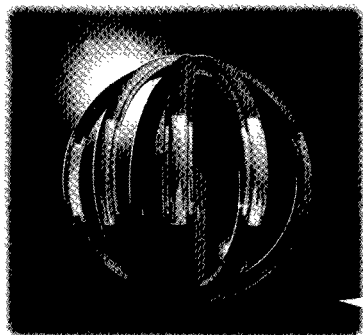
Vol. 39 (No. 3), 2000

第43回 日本神経化学会（金沢）大会抄録集号

平成 12 年 10 月

制限酵素処理もLigaseも もういらない！

クローニングの手法が変わりました。



GATEWAY™ Cloning System

え〜っ！

思ったよりずっと簡単なんだ。

⇒ 多検体処理 に便利！ 価格もお手ごろだし。



クローニング効率がいいねえ〜。

⇒ フレーム合わせもラクチンだし…

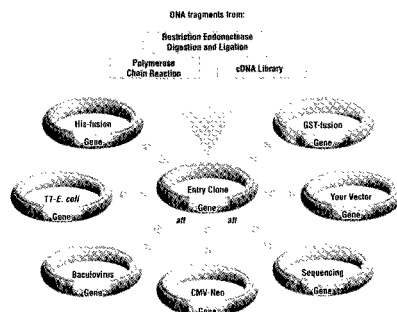
ホント早くて便利！

⇒ これならどんどんクローニング
ができるね。

**ご使用いただいた先生方からのお言葉です。
多くの先生方よりご好評をいただいております。



ワールドスタンダード
最新の
クローニングシステム
GATEWAY



●GATEWAY テクノロジーに関する情報をホームページでご覧いただけます。 <http://www.lifetech.com/gateway>

●GATEWAY についてのセミナーも行います。

ご希望の方はハイテックビジネスユニットまでお問い合わせ下さい。

Tel:03-3663-8143 Fax:03-3663-8242

The consideration paid for this product grants a limited license with a paid up royalty to use the product pursuant to the terms set in the accompanying limited label license.

製造元

LIFE  TECHNOLOGIES.

Essential Technologies for the Science of Life™

輸入総発売元

ライフテック オリエンタル株式会社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町2-35-4 日本橋浜町パークビル

営業企画部

TEL (03) 3663-8143

FAX (03) 3663-8242

大坂営業所

TEL (06) 6339-8165

FAX (06) 6339-8138

つくば駐在事務所

TEL (0298) 55-8900

FAX (0298) 55-8905



第43回日本神経化学会 抄 録 集



- 会 期 平成 12 年 10 月 18 日 (水)、19 日 (木)、20 日 (金)
- 会 場 金沢市観光会館・中央公民館
〒 920-0993 金沢市下本多町 6-27
TEL: 076-220-2501
- 大会長 東田 陽博
(金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学講座)
- 事務局 第 43 回日本神経化学会大会事務局
金沢大学大学院医学研究科分子情報医学系独立専攻
細胞遺伝子学講座内
〒 920-8640 石川県金沢市宝町 13 番 1 号
Tel: 076-265-2455 Fax: 076-234-4236
E-mail: biogen@med.kanazawa-u.ac.jp
ホームページ
<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med2/37/43JSN/>

目次

■ 第 43 回日本神経化学会大会実行委員、助言委員、プログラム委員	161
■ 学会会場案内	162
学会会場への交通	
金沢市観光会館・中央公民館案内図	
■ 発表要領	166
■ 日本神経化学会からのお知らせ	168
■ 大会日程概要	169
■ プログラム	172
■ 演題抄録	228
特別講演 (L1 ~ L3)	
教育講演 (L4)	
日本神経化学会奨励賞選考シンポジウム	
合同公開シンポジウム (S1)	
シンポジウム (S2 ~ S13)	
ワーキンググループセミナー (S14)	
わくわく生意気コロキウム (S15)	
一般演題 (口演)	
一般演題 (ポスター)	
■ 謝辞	380
■ 編集後記	381
■ 人名索引	382
■ キーワード索引	388

第 43 回日本神経化学会大会実行委員

小川 智 (金沢大学医学部第三解剖学)	菅原 清 (金沢大学・院・医・分子神経情報学)
加藤 聖 (金沢大学・院・医・分子神経情報学)	橋井美奈子 (金沢大学・院・医・細胞遺伝子学)
狩野 方伸 (金沢大学医学部第二生理学)	星 直人 (金沢大学・院・医・細胞遺伝子学)
辻 彰 (金沢大学薬学部薬効動態学)	松川 通 (金沢大学・院・医・分子神経情報学)
東田 陽博 (金沢大学・院・医・細胞遺伝子学)	横山 茂 (金沢大学・院・医・細胞遺伝子学)
米田 幸雄 (金沢大学薬学部薬効動態学)	

第 43 回日本神経化学会大会助言委員

越野 好文 (金沢大学医学部神経精神医学)	山田 正仁 (金沢大学医学部神経内科学)
山下 純宏 (金沢大学医学部脳神経外科学)	

第 43 回日本神経化学会大会プログラム委員 (敬称略)

浅野 富子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部)	額田 敏秀 (東京都精神医学総合研究所神経化学部門)
阿部 輝雄 (新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野)	野田 百美 (九州大学大学院薬学研究科病態生理)
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)	野村 正彦 (埼玉医科大学第一生理学)
井上 和秀 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)	野村 靖幸 (北海道大学大学院薬学研究科医療薬学専攻)
植村 慶一 (慶應義塾大学医学部生理学)	芳賀 達也 (東京大学医学系研究科神経医学専攻基礎神経学講座神経生化学)
小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻)	畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所蛋白質合成部門)
加藤 兼房 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部)	林 要喜知 (旭川医科大学生命科学教室)
加藤 泰治 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門)	樋口 宗史 (新潟大学医学部薬理学講座)
加藤 尚彦 (横浜市立大学医学部生化学第一講座)	福井 裕行 (徳島大学薬学部薬物学教室)
熊倉鴻之助 (上智大学生命科学研究科神経化学部門)	古川 昭栄 (岐阜薬科大学分子生物学)
高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部)	御子柴克彦 (東京大学医学研究所脳神経発生・分化分野)
小宮 義璋 (群馬大学医学部分子病態学)	宮本 英七 (熊本大学医学部第一薬理学)
佐野 護 (京都府立医科大学薬物学教室)	山内 卓 (徳島大学薬学部生化学)
仙波りつ子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所周生期)	山形 要人 (財東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所神経薬理)
高橋 正身 ((株)三菱化学生命科学研究所)	山脇 成人 (広島大学医学部神経精神医学)
東田 道久 (富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験)	吉川 和明 (大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能制御部門)
遠山 正彌 (大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座)	渡辺 建彦 (東北大学大学院医学系研究科細胞薬理分野)
永津 俊治 (藤田保健衛生大学総合医学研究所)	渡辺 義文 (山口大学医学部神経精神医学講座)
中村 洋一 (金沢大学薬学部薬効動態学講座薬物学教室)	
那波 宏之 (新潟大学脳研究所基礎神経科学部門)	

(E-mail にて議案をお送りしご検討いただきました。)

学会場への交通

● 航空機利用の場合（到着：小松空港）

東京	約 1 時間 (11 便 / 1 日)
札幌	約 1 時間 30 分 (1 便 / 1 日)
仙台	約 1 時間 10 分 (1 便 / 1 日)
広島	約 1 時間 10 分 (2 便 / 1 日)
出雲	約 1 時間 05 分 (1 便 / 1 日)
福岡	約 1 時間 15 分 (3 便 / 1 日)
沖縄	約 2 時間 10 分 (1 便 / 1 日)

* 小松空港～金沢市内は発着・到着に合わせて連絡バスがあります。

● JR 利用の場合（JR 金沢駅までの便）

東京より（越後湯沢経由）	3 時間 43 分 (10 便 / 1 日)
（米原経由）	4 時間 19 分 (15 便 / 1 日)
大阪より	2 時間 29 分 (23 便 / 1 日)
名古屋より（米原経由）	2 時間 23 分 (8 便 / 1 日)
関西国際空港より（京都経由）	3 時間 23 分 (11 便 / 1 日)

● 金沢駅から金沢市観光会館まで

バス利用

北陸鉄道バス 金沢駅東口から約 25 分

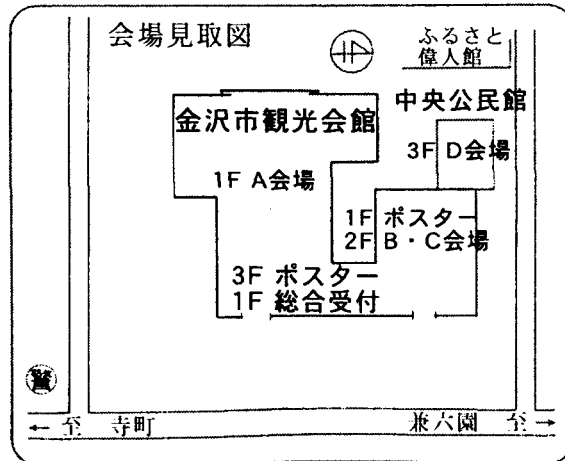
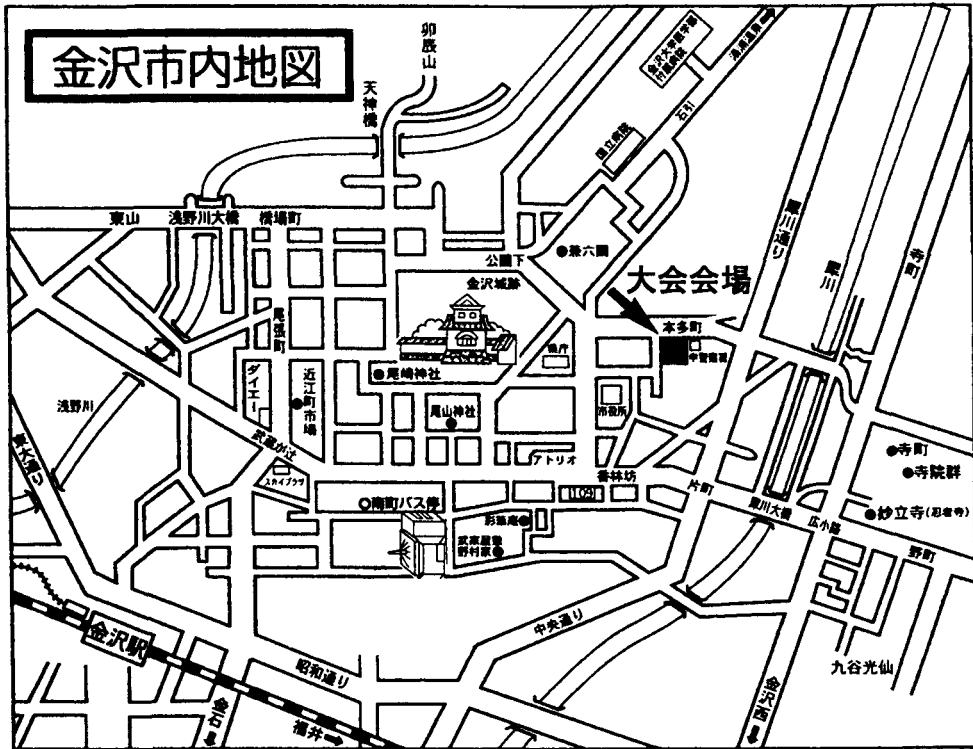
路線番号 18 番（花里線）笠舞 2 丁目経由「金沢学院大学」行き
本多町下車（観光会館の道路の向い側に停車します）

その他いろいろの路線を利用し、香林坊にて下車： 徒歩 10 分

タクシー

金沢駅東口から約 15 分（約 1,200 円）

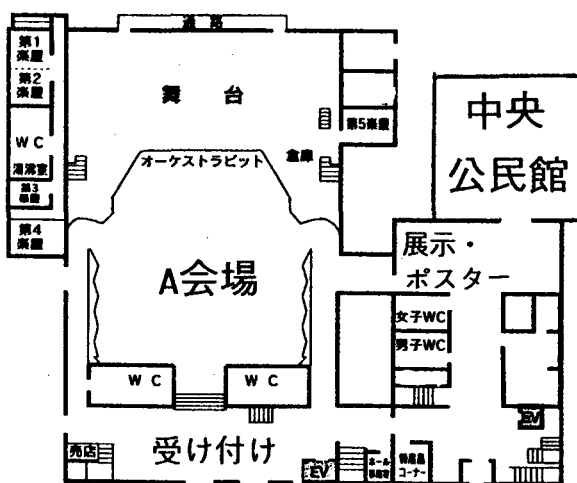
● 会場周辺図



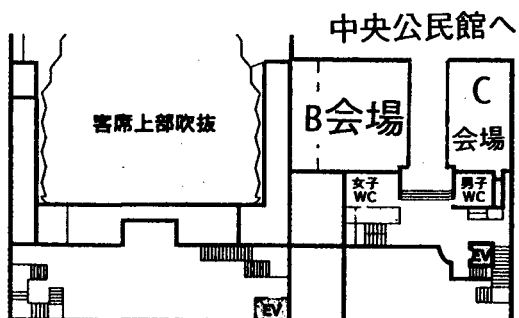
学会場案内図

■ 金沢市観光会館

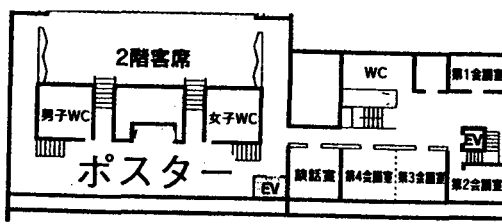
1 階



2 階

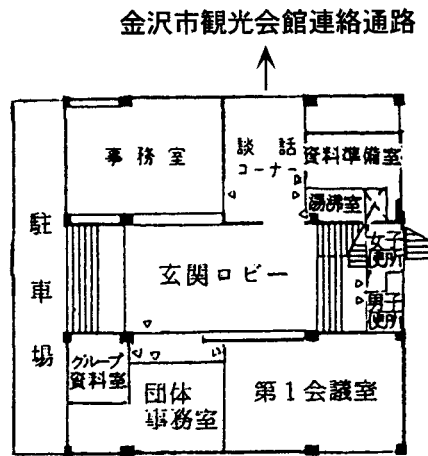


3 階

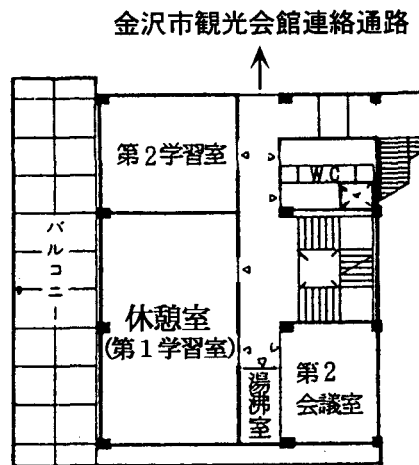


■ 中央公民館

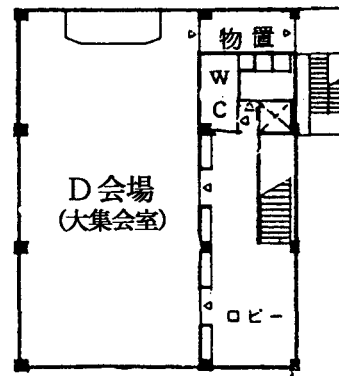
1階



2階



3階



発表要領

1. A 会場発表の演者の方へ

- 1) 金沢大会では A 会場のみスライド発表を行います。(A 会場でのすべての発表)
- 2) 原則として 35mm のプロジェクターを 1 台使用します。
- 3) スライド受付は A 会場 1 階入口のスライド受付にて行います。必ず発表されるセッションの開始時間 20 分前までにスライドをスライド受付に提出してください。
- 4) スライドは所定のスライドホルダーに入れ提出し、ご自身で試写を行った上で係にお渡しください。その際にスライド預り証をお渡しいたします。講演終了後に預り証と引き替えにスライドをスライド受付にてお受け取りください。
- 5) 発表者は発表 20 分前には必ず次演者席にお着きください。
- 6) 講演時間は一般口演が発表時間 10 分、討論時間 10 分です。講演時間の厳守をお願い致します。尚、一般口演以外の発表形式は各セッションによって発表時間が異なります。各司会、オーガナイザーにお問合せください。

2. B, C, D 会場発表の演者の方へ

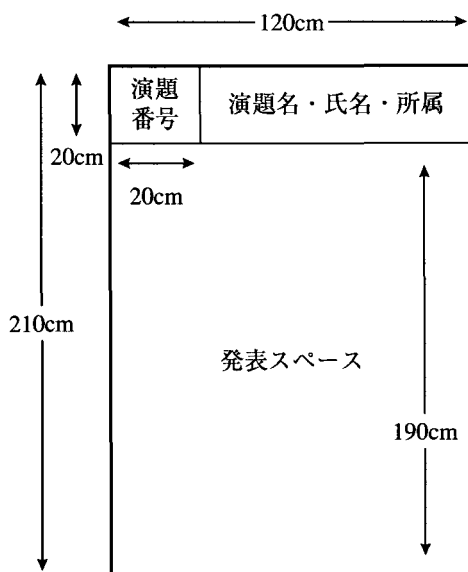
- 1) B, C, D 会場は **OHP** のみを使用しての発表となります。(シンポジウムも含む)
- 2) B, C, D 会場では、発表用 OHP は発表まで発表者がお持ちください。ただし、シンポジウム、一般演題共に、発表時に OHP の補助を必要とする方は、その旨、進行係に申し出てください。進行係の者が補助します。
- 3) 発表者は発表 20 分前には必ず次演者席にお着きください。
- 4) 講演時間は一般口演が発表時間 10 分、討論時間 10 分です。講演時間の厳守をお願い致します。尚、一般口演以外の発表形式は各セッションによって発表時間が異なります。各司会、オーガナイザーにお問合せください。

3. 司会者、座長の方へ

- 1) 担当される各セッションの開始 20 分前までには各会場入りし、次座長席にお着きください。
- 2) 時間厳守に留意していただき運営してください。
- 3) シンポジウムでは最後に必ずまとめの時間をとって、フロアーを交えて討論を行ってください。

4. ポスター発表の方へ

● ポスターの展示要領



- 1) 発表内容は上記の展示スペースに収まるようにしてください。
- 2) パネル左上の演題番号は大会事務局が作成致します。演題名、所属、氏名は各自で20cm×100cmの大きさのものを用意してください。
- 3) 日本語の理解が難しい参加者の為に、英語の要約をつけたり、英語での図の説明をつけるなどのご配慮もお願いいたします。
- 4) パネル自体には直接図や文字を書いたり、糊付けしたりはできません。
- 5) 掲示用の押しピンは大会事務局にてご用意いたします。

● ポスター発表・討論

- 1) ポスター展示会場は金沢市観光会館 1 階展示室と 3 階ロビーです。各掲示場所については当日ご確認ください。
- 2) ポスター発表は 18 日、19 日のいずれかになります。優秀ポスター発表は 20 日にも掲示をお願いします。
- 3) ポスター討論は 18 日、19 日の両日とも午後 12 時から 14 時まで設定してあります。発表者は必ず自分のポスター前に待機してください。尚、20 日の優秀ポスターは掲示のみになります。
- 4) ポスターは 18 日、19 日両日とも午前 9 時から 10 時までの間に所定の場所に掲示をしてください。撤去は午後 7 時までに完了してください。20 日の優秀ポスター掲示は午前 9 時から 10 時までに掲示していただき、午後 3 時までには撤去を完了してください。撤去されないポスターは事務局にて撤収させていただきますが、郵送などによる返送はいたしかねますのでご了承ください。

日本神経化学会からのお知らせ

1. 総 会

日時： 10月20日（金）12:00-13:00

場所： A会場（金沢市観光会館 1階大ホール）

平成12年度総会議題（案）

1. 理事長報告
2. 庶務報告
3. 出版・広報報告
4. プログラム編成報告
5. 委員会報告
6. 平成12年度奨励賞選考結果報告
7. 平成11年度決算の件
8. 平成13年度予算の件
9. 評議員選任の件
10. 理事改選の件
11. 次期大会の件
12. その他

2. 評議員会

日時： 10月17日（火） 17:00-19:00

場所： B会場（金沢市観光会館 2階）

評議員会議題（案）

「日本神経化学会の問題点と将来像」

優秀ポスター賞について

ポスター発表の中から「これは良い」と思うポスターを参加者全員に選んでいただきます。優秀ポスターの定義は投票者の基準にお任せします。

[ルール]

1. 投票券は登録した参加者にネームプレートと同時に配付します。
2. 17日の評議員会に参加した評議員には追加投票券（3枚）を配ります。
3. 第1日目、第2日目のポスターのポスター番号をそれぞれ2名まで選び、無記名投票して下さい。
4. 第1日目、第2日目の得票数の上位からそれぞれ5～8演題（top 10%）を優秀ポスターとして選定します。
5. 優秀ポスターに選ばれた発表者を懇親会席上で表彰します。
6. 優秀ポスターに選ばれた人は第3日目のポスター会場に再掲示してください。（第3日目に参加できない人は大会で代行し、掲示の後、返送します。）

第1日目 10月18日(水) 日程表

	A会場 観光会館 大ホール スライド	B会場 観光会館 2F OHP	C会場 観光会館 2F OHP	D会場 公民館 3F OHP	ポスター 観光会館 1F&3F	他
9:00	シンポジウム S2 岡野・中福	シンポジウム S3 芳賀	シンポジウム S4 横山	シンポジウム S5 高坂・井上	掲示 1P01 ~ 1P81	機器・書籍展示
10:00	神経発生分子・細胞メカニズム	コリン作動性神経の神経生物学：最近の話題	バイオインフォマティクス	ATP受容体の脳内生理機能		
11:00						
12:00						シンポジウム企画委員会
13:00					討論	
14:00	奨励賞選考シンポジウム	口演 1B1400 ~ 1B1620	口演 1C1400 ~ 1C1620	口演 1D1400 ~ 1D1620		
15:00						
16:00						奨励賞選考委員会
17:00	公開・合同シンポジウム S1 植田・山脇					
18:00						理事会
19:00					撤去	
20:00						
21:00						

第2日目 10月19日(木) 日程表

	A会場 観光会館 大ホール スライド	B会場 観光会館 2F OHP	C会場 観光会館 2F OHP	D会場 公民館 3F OHP	ポスター 観光会館 1F&3F	他
9:00	シンポジウム S6 小川・遠山 脳虚血	シンポジウム S7 阿部・高橋 シナプス機能と ホスファチジル イノシトール代 謝	シンポジウム S8 木山・加藤 中枢神経軸索再 生の分子機構	シンポジウム S9 池中 現在のグリア細 胞系譜でその多 様性を説明でき るか?	掲示 2P01 ~ 2P74	機器・書籍展示
10:00						
11:00						
12:00						
13:00	教育講演 大野博司 L4				討論	
14:00	WGS 軸索の形 成と維持 S14 久永・武田	懇親会準備		わくわく生意気 コロキウム (米田道場) S15 中村・松岡		
15:00						
16:00	特別講演 D. Stern L1					
17:00	特別講演 C. Klee L2	懇親会 ・ 奨励賞表彰式 ・ 優秀ポスター賞表彰式				撤去
18:00	特別講演 永津俊治 L3					
19:00						
20:00						
21:00						

第3日目 10月20日(金) 日程表

	A会場 観光会館 大ホール スライド	B会場 観光会館 2F OHP	C会場 観光会館 2F OHP	D会場 公民館 3F OHP	ポスター 観光会館 1F	他
9:00	シンポジウム S10 五嶋・平	シンポジウム S11 井ノ口・狩野	シンポジウム S12 樋口・仙波	シンポジウム S13 野田・中西	掲示 優秀ポスター	機器・書籍展示
10:00	細胞接着による 生理機能の制御 とその異常	選択的シナプス 強化・除去の分 子機構	食欲の分子制御	脳のホメオスタ シスとミクログ リアの機能		
11:00						
12:00						
13:00	総会					
14:00	口演 3A1300～ 3A1520	口演 3B1300～ 3B1540	口演 3C1300～ 3C1540	口演 3D1300～ 3D1520		
15:00					撤去	
16:00						
17:00						懇親テニス会
18:00						
19:00						
20:00						
21:00						

特別講演

特別講演**10月19日（木）16:00 - 17:00****A 会場**

司会：小川 智（金沢大学医学部第3解剖）

- L1 **Cell-associated targets of amyloid-beta peptide (A β): the role of RAGE and ABAD as cofactors for A β -induced cell stress.**

Shi Du YAN¹, Satoshi OGAWA², Ann SCHMIDT M.¹, °David STERN M.¹¹Department of Physiology Cellular Biophysics, Columbia University, ²Department of Neuroanatomy Kanazawa University School of Medicine**10月19日（木）17:00 - 18:00****A 会場**

司会：三木 直正（大阪大学大学院医学系研究科）

- L2 **Calcineurin: A Protein Phosphatase under the Control of Ca²⁺ and Reactive Oxygen Species**

°Claude Klee¹, Xutong Wang¹, Hao Ren¹, Manik Ghosh¹, Alexandre Samouilov², Jay Zweier²¹Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, ²The Johns Hopkins University**10月19日（木）18:00 - 19:00****A 会場**

司会：加藤 泰治（名古屋市立大学医学部）

- L3 **パーキンソン病の神経化学的解明**

°永津 俊治

藤田保衛大・総医研・分子遺伝

教育講演・奨励賞選考シンポジウム

教育講演

10月19日（木）13：00 - 14：00

A会場

司会：小宮 義璋（群馬大学医学部）

L4 細胞内蛋白輸送と細胞極性
 °大野 博司
 金沢大学がん研究所分子薬理部門

日本神経化学会 奨励賞選考シンポジウム

司会：池中 一裕（国立生理学研究所）

10月18日（水）14：00 - 16：00

A会場

シンポジスト

山形 要人	（東京都神経科学総合研究所）
中嶋 一範	（東京慈恵会医科大学DNA医学研究所）
平 英一	（大阪大学大学院医学系研究科）
丸山和佳子	（国立療養所中部病院長寿医療研究センター）

公開シンポジウム**公開シンポジウム****10月18日（水）17：00 - 19：30****S1 日本生物学的精神医学会合同企画シンポジウム
「神経ステロイド—その脳機能調節作用と分子基盤」****A 会場**

司会： 植田 弘師（長崎大学薬学部分子薬理学）
山脇 成人（広島大学医学部神経精神医学）

- S1 本シンポジウムのねらい
°山脇 成人
広島大学医学部神経精神医学
- S2 神経ステロイドとストレス疾患
°鍋島 俊隆, 野田 幸裕
名古屋大学大学院医学研究科医療薬学・附属病院薬剤部
- S3 神経ステロイドの生合成と生理作用
°名和田 新
九州大学大学院医学研究院病態制御内科学
- S4 脳海馬における神経ステロイドの合成と急性作用
°川戸 佳
東京大学大学院総合文科研究科広域科学専攻
- S5 神経ステロイドの新しい受容体
°植田 弘師, 吉田 明
長崎大学薬学部分子薬理学研究室
- S6 精神疾患における神経ステロイド
°三國 雅彦
群馬大学医学部神経精神医学教室

シンポジウム

シンポジウム

10月18日（水）9：00 - 12：00

S2 神経発生の分子・細胞メカニズム

(A 会場)

司会： 岡野 栄之（大阪大学大学院医学系研究科神経機能解剖学）
 中福 雅人（東京大学大学院医学系研究科神経生物学）

- S7 脳の発生・再生と神経幹細胞
 °中福 雅人
 東京大学大学院医学系研究科神経生物学教室
- S8 神経幹細胞の同定法の確立と分化制御機構
 °岡野 栄之¹, 川口 綾乃¹, 澤本 和延¹, 島崎 琢也¹, 宮田 卓樹²
¹大阪大学大学院医学系研究科・神経機能解剖学, ²理研BSI・細胞培養
- S9 脳のパターンニングと神経分化における Pax6 遺伝子の役割
 °大隅 典子
 东北大学大学院医学系研究科器官構築学分野
- S10 サイトカインによる胎生期マウス中枢神経系の細胞系譜制御
 中島 欽一^{1,2}, 柳澤 亮^{1,2}, 滝沢 琢己^{1,2}, 落合 和^{1,2}, °田賀 哲也^{1,2}
¹東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞生物学, ²熊本大学発生医学研究センター転写制御
- S11 哺乳類大脳皮質形成機構
 °小川 正晴
 理研・脳セ

シンポジウム

10月18日(水) 9:00 - 12:00

S3 コリン作動性神経の神経生物学：最近の話題

(B 会場)

司会：芳賀 達也（東京大学大学院医学系研究科神経生化学）

- S12 高親和性コリン取り込みとアセチルコリン合成
°奥田 隆志, 芳賀 達也
東京大学大学院医学系研究科神経生化学
- S13 ムスカリン性アセチルコリン受容体のノックアウトマウス
°松井 稔¹, 本村 大輔¹, 唐澤 博史¹, 藤川 徹², 蔣 健², 小宮 百合子¹, 高橋 信一¹, 武藤 誠 M.¹
¹東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室, ²萬有製薬つくば研究所
- S14 大脳皮質におけるアセチルコリンによる制御作用
°木村 文隆
大阪大学大学院医学研究科バイオメディカルセンター神経生理
- S15 アセチルコリン作動性ニューロンと睡眠
°小山 純正, 香山 雪彦
福島県立医科大学生理学第二講座
- S16 アルツハイマー病治療薬塩酸ドネペジルの神経化学的特性および臨床効果
°小笹 貴史¹, 小倉 博雄¹, 山西 嘉晴²
¹エーザイ株式会社 筑波研究所, ²Eisai London Research Laboratories

10月18日(水) 9:00 - 12:00

S4 バイオインフォマティクス

(C 会場)

司会：横山 茂（金沢大学大学院医学系研究科細胞遺伝子学）

- S17 生体分子ネットワーク解析とバイオインフォマティクス
°五斗 進
京都大学化学研究所

シンポジウム

- S18 蛋白質間相互作用の網羅的解析とバイオインフォマティクス
 °伊藤 隆司
 金沢大学がん研究所遺伝子染色体構築研究分野
- S19 大きい蛋白質をコードするヒト脳長鎖 cDNA の包括的解析
 °中山 学, 長瀬 隆弘, 菊野 玲子, 小原 収
 かずさDNA研究所ヒト遺伝子研究部
- S20 From Genes to Dynamic Molecular Networks
 °Roland Somogyi, Alan Ableson, Max Kotlyar, Steve Misener, Hai Pham, Evan Steeg
 Molecular Mining Corporation

10月18日（水）9：00 - 12：00

S5 ATP 受容体の脳内生理機能

（D 会場）

司会： 高坂 新一（国立精神神経センター神経研究所）
 井上 和秀（国立医薬品食品衛生研究所）

- S21 ATP 受容体の脳内生理機能：オーバービュー
 °井上 和秀
 国立医薬品食品衛生研究所
- S22 ミクログリアにおける ATP 誘発性ラフリング形成とケモタキシス
 °本田 静世, 佐々木 洋, 金澤 裕子, 大澤 圭子, 今井 嘉紀, 高坂 新一
 国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部
- S23 ATP によるミクログリアからの TNF- α 遊離機構
 °秀 和泉, 鈴木 智久, 井上 敦子, 仲田 義啓
 広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学
- S24 ATP 受容体の脳内生理機能と Ca^{2+} 動態
 °小泉 修一, 井上 和秀
 国立衛研・薬理
- S25 ATP 受容体の脳虚血に対する防御作用
 °西崎 知之
 神戸大学医学部第一生理

シンポジウム

S26 ATP 受容体による脳幹内シナプス伝達の制御

°加藤 総夫

東京慈恵会医科大学・医・薬理2

10月19日(木) 9:00 - 12:00

S6 脳虚血

(A 会場)

司会: 小川 智 (金沢大学医学部第3解剖)

遠山 正彌 (大阪大学大学院医学系研究科機能形態学)

S27 低酸素・虚血ストレスにより誘導される新規ユビキチン様蛋白 SUP のクローニング及び機能解析

°堀 修^{1,3}, 山口 淳^{2,3}, 北尾 康子¹, 遠山 正彌^{2,3}, 小川 智^{1,3}

¹金沢大学医学部医学科神経解剖(解剖学第3)講座, ²大阪大学・院・医・機能形態学講座, ³CREST, JST

S28 小胞体機能の制御による虚血性神経細胞死の抑制

°玉谷 実智夫^{1,6}, 松山 知弘², 山口 淳^{1,6}, 塚本 吉胤³, 谷口 学^{2,5}, 柳 秀樹⁴, 小川 智⁵, 遠山 正彌^{1,6}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座, ²兵庫医科大学第五内科, ³国立循環器病センター病理部, ⁴HSP研究所, ⁵金沢大学第三解剖学講座, ⁶科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業

S29 新規シナプス蛋白, mint family, の脳内局在と虚血後の発現変化

°松山 知弘, 岡本 昌也, 中島 八束, 西村 裕之, 杉田 實

兵庫医科大学第五内科

S30 霊長類に特異的な虚血性神経細胞死

°山嶋 哲盛

金沢大学医学部脳神経外科学, SPSBS

S31 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構

°中別府 雄作

九州大学生体防御医学研究所生化学部門, 科学技術振興事業団・戦略的基礎研究推進事業

S32 脳虚血とトランスポーター

°山田 和雄

名古屋市立大学医学部脳神経外科

シンポジウム

10月19日（木）9：00 - 12：00

S7 シナプス機能とホスファチジルイノシトール代謝
(B 会場)

司会： 阿部 輝雄（新潟大学脳研究所）
高橋 正身（三菱化学生命科学研究所）

- S33 シナプス機能とホスファチジルイノシトール代謝：序論
°阿部 輝雄
新潟大学脳研究所
- S34 細胞膜リン脂質代謝と細胞運動
°金保 安則¹, 本田 晶^{1,2}, 野上 真宏^{1,2}, 宮崎 秀幸^{1,2}, 山崎 正和^{1,2}
¹東京都臨床医学総合研究所薬理研究部門, ²東京工業大学生命理工学研究科
- S35 神経伝達物質放出に関与するホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ
°有岡 学¹, KLENCHIN Vadim A.², 柴崎 芳一³, MARTIN Thomas F.², 北本 勝ひこ¹
¹東大院・農生科・応生工, ²University of Wisconsin-Madison, ³東大・医・糖尿病代謝内科
- S36 Phosphatidylinositol metabolism and synaptic vesicle recycling
°Yasuo NEMOTO
RIKEN Brain Science Institute
- S37 イノシトールリン酸と cADP-ribose による Ca²⁺ 動員
°橋井 美奈子, 東田 陽博
金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学

10月19日（木）9：00 - 12：00

S8 中枢神経軸索再生の分子機構
(C 会場)

司会： 木山 博資（旭川医科大学解剖学第一）
加藤 聖（金沢大学大学院医学研究科分子神経情報学講座）

- S38 再生軸索伸展の分子基盤
°木山 博資, 田辺 勝久
旭川医科大学解剖学第一

シンポジウム

- S39 Rho-ファミリーによる神経細胞の形態制御
°貝淵 弘三
名古屋大学大学院医学研究科細胞情報薬理学講座
- S40 Central nervous system trauma and the immune system: repair and protection
°Michal SCHWARTZ
Department of Neurobiology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
- S41 金魚視神経再生における細胞・分子機序
°加藤 聖, 松川 通, 劉 中武, 杉谷 加代, DEVADAS Malini
金沢大学大学院医学研究科分子神経情報学講座

10月19日(木) 9:00 - 12:00

S9 現在のグリア細胞系譜でその多様性を説明できるか?

(D 会場)

司会: 池中 一裕 (生理研神経情報)

- S42 グリア細胞の機能と起源の多様性
°池中 一裕
生理研・神経情報
- S43 グリア細胞系譜と機能形態の多様性
°藤田 哲也
ルイ・パストゥール医学研究センター
- S44 ミクログリアの多様性とその細胞系譜
°澤田 誠^{1,2}, 小野 健治^{1,3}
¹藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療共同研究部門, ²科学技術振興事業団さきがけ21, ³名古屋市立大学薬学部
- S45 ニワトリ胚の中樞神経系を用いたオリゴデンドロサイトの出現様式の解析
°小野 勝彦
島根医科大学解剖学講座第2
- S46 アミノ酸合成・輸送系からみたグリアの多様性
°渡辺 雅彦
北大院・医・生体構造解析学分野

シンポジウム

10月20日（金）9：00 - 12：00

S10 細胞接着による生理機能の制御とその異常 — ダウン症からガン転移機構まで —

（A会場）

司会： 五嶋 良郎（横浜市立大学医学部薬理学）
平 英一（大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学）

- S47 膜結合型セマフォリンとその機能
°木村 徹¹, 菊地 薫¹, 林 剛史², 中村 史雄², 佐々木 幸生², 五嶋 良郎^{2,3}
¹住友製薬総合研究センター, ²横浜市立大学医学部薬理, ³CREST JST
- S48 神経接着分子 L1 による軸索伸長の制御機構
°上口 裕之
理化学研究所脳科学総合研究センター発生・分化研究グループ
- S49 NAP: 新しい細胞間接着機構
°萬代 研二¹, 中西 宏之¹, 溝口 明², 三好 淳³, 高井 義美¹
¹大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学・分子生物学, ²京都大学大学院医学研究科生体構造医学機能微細形態学, ³大阪府立成人病センター研究所
- S50 シナプス活動依存的に発現調節される神経接着分子 Arcadlin
°山形 要人¹, 安田 新¹, 杉浦 弘子¹, 田中 秀和², 三木 直正²
¹都神経研・神経薬理, ²阪大院・医・情報薬理
- S51 ニューロブシンと神経機能
°吉田 成孝
奈良先端科学技術大学院大学細胞構造
- S52 細胞接着因子としての gmp46/CAR の発現と機能解析
°桑野 良三, 本田 岳夫, 堀田 優子, 小堺 郁夫, 斉藤 宏, 阿部 貴子
新潟大学遺伝子実験施設
- S53 Glioma の細胞運動における RAGE-Amphoterin の役割と腫瘍抑制への応用
°田口 明彦¹, 藤堂 謙一¹, 渡邊 学¹, Stern David², Schmid Ann Marie²
¹国立大阪南病院, ²コロンビア大学

シンポジウム

- S54 Functions of gicerin in the developing and adult nervous system
°Eiichi Taira¹, Shigeki Okumura¹, Keiko Kohama¹, Yasuhiro Tsukamoto², Naomasa Miki¹
¹Department of Pharmacology, Osaka University, ²Department of Veterinary Anatomy, Osaka Prefectural University

- S55 ダウン症精神遅滞候補遺伝子 DSCAM の解析
°山川 和弘, Kishan Lal AGARWALA
理研・脳センター・神経遺伝

10月20日(金) 9:00 - 12:00

S11 選択的シナプス強化・除去の分子機構 (B会場)

司会: 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所)
狩野 方伸 (金沢大学医学部第二生理学)

- S56 遺伝子産物のシナプス選択的な機能発現の機構
°井ノ口 馨
三菱化学生命科学研究所
- S57 発達期小脳シナプスの選択的除去機構
°橋本 浩一, 狩野 方伸
金沢大学医学部生理学第二講座
- S58 海馬シナプス伝達可塑性の分子機構
°真鍋 俊也
神戸大学医学部生理学第一講座
- S59 神経シナプス足場蛋白質 S-SCAM による分子集積機構
°畑 裕
東医歯大・大学院・病態代謝解析学
- S60 PDZ 領域を持つアクチン結合蛋白質 Neurabin I および I-Afadin のシナプスにおける微細局在と機能
°溝口 明
京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座
- S61 開口放出を介した選択的シナプス可塑性の機構
°高橋 正身
三菱化学生命科学研究所

シンポジウム

10月20日（金）9：00 - 12：00

S12 食欲調節の分子制御

（C 会場）

司会： 樋口 宗史（新潟大学医学部薬理学講座）
仙波 恵美子（和歌山県立医科大学解剖学）

- S62 レプチンにより誘導される新規遺伝子群の探索
°森川 吉博, 上山 栄子, 久岡 朋子, 岩本 武史, 仙波 恵美子
和歌山県立医科大学第二解剖学
- S63 視床下部レプチン作用とヒスタミン神経の役割
°坂田 利家, 吉松 博信, 正木 孝幸
大分医科大学医学部内科学第一講座
- S64 オレキシンによるエネルギーホメオスターシスの制御
°桜井 武, 原 淳子, 山中 章弘, 後藤 勝年
筑波大学基礎医学系薬理
- S65 Novel neuropeptides implicated in the control of food intake
°Masamitsu NAKAZATO
Third Department of Internal Medicine, Miyazaki Medical College
- S66 ボンベシン受容体と摂食
°和田 圭司, 山田 一之, 和田 恵津子
国立精神・神経センター神経研究所
- S67 摂食に関わる Neuropeptide Y 遺伝子発現制御
°樋口 宗史, 村岡 修, 山口 剛, 貝津 雅稔, 三富 明夫
新潟大学医学部薬理学講座

シンポジウム

10月20日（金）9：00 - 12：00

S13 脳のホメオスタシスとミクログリアの機能
（D 会場）

司会： 野田 百美（九州大学大学院薬学研究院病態生理学分野）
中西 博（九州大学大学院歯学研究院口腔機能分子科学）

- S68 脳のホメオスタシスとミクログリア：Overview
°錫村 明生
市立四日市病院 神経内科
- S69 グルタミン酸を介した神経－ミクログリア連関
°野田 百美
九州大学・大学院・薬学研究院・病態生理学分野
- S70 ミクログリアの抗原提示機能におけるカテプシン E の役割
°中西 博, 西奥 剛, 山本 健二
九州大学大学院歯学研究院口腔機能分子科学
- S71 ミクログリアにおけるアミロイドベータ蛋白のシグナル伝達系
°中井 真通, 長谷川 浩史, 田中 千賀子
兵庫県立高齢者脳機能研究センター
- S72 神経－ミクログリア相互作用における脳内ケモカイン類の役割
°南 雅文, 佐藤 公道
京大院・薬・生体機能
- S73 ミクログリアの数と活性を決める因子
°田中 潤也¹, 徳 和子¹, 前田 信治¹, 阪中 雅広²
¹愛媛大・医・生理, ²愛媛大・医・二解剖
- S74 脳障害時におけるミクログリアでのヘムオキシゲナーゼ-1 誘導
°北村 佳久
京都薬科大学病態生理学
- S75 ミクログリアのプロトンチャネルと pH ホメオスターシス
°久野 みゆき, 森畑 宏一
大市大・院・医・分子細胞生理

シンポジウム

10月19日（木）14：00 - 15：50

S14 ワーキンググループセミナー

「軸索の形成と維持 — ニューロフィラメントの生理と病態 —」

(A 会場)

司会： 久永 真市（東京都立大学理学研究科生物科学専攻）
 武田 雅俊（大阪大学大学院医学系研究科精神医学）

- S76 ニューロフィラメントのサブユニット構成と軸索内輸送
 °田代 朋子
 青山学院大学理工学部化学科
- S77 Slow Axonal Transport of Neurofilaments
 °Anthony BROWN
 Department of Biological Sciences, Ohio University
- S78 ニューロフィラメントの重合制御と細胞骨格の可塑性
 °中村 祐, 武田 雅俊
 大阪大学大学院・医学系研究科・神経機能医学講座（精神医学）
- S79 プロリン指向性キナーゼとニューロフィラメントのリン酸化
 °久永 真市
 東京都立大学理学研究科生物科学専攻
- S80 ニューロフィラメントの異常を伴う疾患 — 筋萎縮性側索硬化症を中心として
 °佐々木 彰一
 東京女子医科大学脳神経センター神経内科

シンポジウム

10月19日(木) 14:00 - 15:50

S15 わくわく生意気コロキュウム

(D 会場)

オーガナイザー: 米田 幸雄 (金沢大学薬学部薬効動態学)

司会: 中村 洋一 (金沢大学薬学部薬効動態学)

松岡 一郎 (北海道大学大学院薬学研究科生体分子薬学)

- S81** グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) の酵素免疫測定法 (EIA) の確立とラット脳発達過程における発現変化
°新田 淳美, 堀 琢也, 古川 美子, 古川 昭栄
岐阜薬大・薬・分子生物
- S82** L-Ser は小脳プルキンエ細胞の生存と分化を促進するバグマングリア由来の栄養因子である
°古屋 茂樹¹, 田端 俊英², 三苦 純也³, 山田 恵子⁴, 山崎 美和子⁴, 渡辺 雅彦⁴, 狩野 方伸², 平林 義雄¹
¹理化学研究所脳科学総合研究センター神経回路メカニズム研究グループ, ²金沢大学医学部第2生理学教室, CREST 科学技術振興事業団, ³Glycobiology Program, The Burnham Institute, ⁴北海道大学医学部生体構造解析学
- S83** 活性化 Akt は p53 による神経細胞死を抑制する
°山口 淳¹, 玉谷 実智夫¹, 松崎 秀夫¹, 濤川 一彦², 木山 博資², 満田 憲昭¹, 遠山 正彌¹
¹大阪大学医学部機能形態学講座, CREST, JST, ²旭川医科大学第一解剖
- S84** エリスロポエチン受容体を介した神経伝達物質放出の阻害と虚血性神経細胞死の抑制
°川上 政勝^{1,2}, 関口 真理子², 二本松 伊都子², 小崎 俊司³, 高橋 正身^{1,2}
¹東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻, ²三菱化学生命科学研究所, ³大阪府立大学

一般演題（口演）

口演（B 会場）

10 月 18 日（水）14：00 - 16：40

プログラム細胞死

14：00 - 15：20 小池 達郎（北海道大学大学院理学研究科）
 畠中 寛（大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門）

1B1400 小胞体を起源とする細胞死メカニズムの解析

°片山 泰一^{1,2,3}, 人見 淳一^{1,3}, 今泉 和則^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学（解剖学第2）, ²田辺製薬(株) 創薬研究所, ³CREST科学技術庁

1B1420 シスタチン C の酸素ストレスによる神経細胞死抑制効果

°西山 啓次, 西尾 チカ, 山田 雅司, 畠中 寛
 大阪大学蛋白質研究所生合成部門

1B1440 脊髄神経節ニューロンのアポトーシスにおける APP 断片の蓄積

°桑子 賢一郎, 西村 伊三男, 二宮 貢士, 吉川 和明
 阪大・蛋白研・機能制御

1B1500 活性酸素によるニューロン死とミトコンドリア呼吸鎖活性の低下

°五味 不二也¹, 内田 洋子²

¹都老人研超微形態部門, ²都老人研神経病理部門

15：20 - 16：40 高寺 恒雄（北陸大学薬学部臨床化学）
 谷浦 秀夫（大阪大学蛋白質研究所）

1B1520 NR2B 選択的 NMDA 受容体アンタゴニストによるアポトーシスの誘導

°坂本 ゆかり, 高寺 恒雄, 大屋敷 孝雄
 北陸大学薬学部臨床化学

一般演題 (口演)

1B1540 PKC は PC12 細胞の覚醒剤誘導細胞死を抑制する

°上村 公一, 吉田 謙一
東大院・医・法医

1B1600 NAIP suppression of the cell death requires a 4 alpha-helix BIR domain

Erin YOSHIDA N¹, Harumi SAKAI¹, Asako OTOMO¹, °Joh-E IKEDA²

¹NeuroGenes, ICORP/Japan Science and Technology Corporation, ²Department of Molecular Neuroscience, Institute of Medical Sciences, Tokai University

1B1620 コルヒチンによる上頸神経節細胞のアポトーシスにおけるカスパーゼ非依存的過程

°木下 雅之¹, 二宮 孝文², 小池 達郎¹

¹北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻, ²札幌医科大学医学部解剖学講座

口演 (C 会場)

10 月 18 日 (水) 14 : 00 - 15 : 20

細胞分化・ニューロン・グリア

14 : 00 - 15 : 20 和田 圭司 (国立精神神経センター)

松岡 一郎 (北海道大学大学院薬学研究科)

1C1400 BMP とレチノイン酸によって誘導される神経特異的新規遺伝子のプロモーター解析

°中谷 俊幸¹, 荒井 直亮¹, 川野 裕美¹, 小林 三和子¹, 松本 健一², 有賀 寛芳², 松岡 一郎¹

¹北海道大学大学院薬学研究科神経科学分野, ²北海道大学大学院薬学研究科分子生物学分野

1C1420 HLH 型転写因子によるオリゴデンドロサイト発生分化の調節

°鹿川 哲史¹, 斉藤 哲一郎², 和田 圭樹¹, 中平 英子¹, 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部門, ²京都大学再生医学研究所再生統御学研究部門

一般演題（口演）

1C1440 ラット前脳由来の Neurospheres の増殖と分化における発生初期での FGF および EGF 応答性について

°中山 たかね, 山之端 万里
創価大学生命科学研究所

1C1500 神経突起伸長における BDNF の関与

°本郷 茂樹, 大木 武, 中田 規之, 竹田 稔
昭和大学・医・生化

口演（C 会場）

10 月 18 日（水）15 : 20 - 16 : 40

突起伸展・回路網形成

15 : 20 - 16 : 40

..... 武田 雅俊（大阪大学大学院神経機能医学講座）
山内 卓（徳島大学薬学部生化学）

1C1520 膜型セマフォリン分子、Sema4D - plexin シグナル伝達

°稲垣 忍, 藤岡 しほ, 増田 健太
大阪大学医学部保健学科神経生物学研究グループ

1C1540 中枢神経系細胞, CAD, の分化におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の誘導と突起伸展への関与

°土内 瞳, 祖川 由美, 山内 卓
徳島大学大学院薬学研究科生化学研究室

1C1600 生地黄中の神経突起伸展促進物質の単離と作用の検討

°東田 千尋, バスネット プルソタム, 小松 かつ子
富山医科薬科大学和漢薬研究所薬効解析センター

一般演題 (口演)**1C1620 無インスリン培地におけるラット大脳皮質初代神経培養細胞の神経突起形成への Rho-kinase の寄与**

°松本 均彦, 中村 祐, 柏木 雄次郎, 福所 英理子, 山森 秀長, 武田 雅俊
大阪大学大学院医学系研究科 生体統合医学・神経機能医学講座

口演 (D 会場)**10 月 18 日 (水) 14 : 00 - 16 : 40****受容体・輸送体・神経伝達物質・修飾物質**

14 : 00 - 15 : 20 高松 研 (東邦大学医学部二生理学)
渡邊 康裕 (防衛医科大学校薬理学)

1D1400 NG108-15 細胞中に存在するイノシトールリン脂質代謝に共役しない 5-HT_{2C} 受容体様 mRNA の構造

°東田 道久¹, 野村 靖幸², 東田 陽博³, 渡辺 裕司¹

¹富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験, ²北海道大学大学院薬学研究科薬理学分野, ³金沢大学大学院医学研究科分子情報医学細胞遺伝学講座

1D1420 Fluoxetine によるパーキンソン病モデルラット線条体での外来性 L-DOPA 由来ドーパミン放出減少効果

°大和 博^{1,2}, 神成 一哉^{1,2}, 沈 活¹, 須田 俊宏², 松永 宗雄¹

¹弘前大学医学部脳研神経統御部門, ²弘前大学医学部第3内科

1D1440 線条体特異的に発現する新規 G protein-coupled receptor 遺伝子 *Gpr88* の単離

°水島 和幸^{1,2}, 榊 佳之², 伊藤 隆司¹

¹金沢大学がん研究所遺伝子染色体構築分野, ²東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター構造解析

一般演題（口演）

1D1500 海馬スライスを用いた代謝型グルタミン酸受容体刺激による ERK 応答の解析

°小林 正明, 近島 博道, 高松 研
東邦大学医学部生理学第2講座

15:20 - 16:40

..... 米田 幸雄（金沢大学薬学部薬効動態学）
室田 誠逸（東京医歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学分野）

1D1520 ラット前頭前野皮質のモノアミン遊離における NMDA 受容体サブユニット NR2B の関与

°梶畑 俊雄¹, 川原 健^{1,2}, 黒木 俊秀¹, 田代 信維¹, 中原 辰雄³
¹九州大学大学院医学系研究科精神病態医学, ²福岡県立太宰府病院, ³九州大学理学部化学科

1D1540 ラット松果体特異的に発現している Na⁺ 依存性グルタミン酸輸送体 (GLT-1) ホモログのクロニング

°八代 聖基¹, 金井 好克², 森山 芳則¹
¹岡山大学 薬学部 生理化学教室, ²杏林大学 医学部 薬理学教室

1D1600 興奮性グルタミン酸トランスポーター EAAT-1 発現制御における CREB の関与

°池田 正行¹, 氷見 敏行², 室田 誠逸²
¹国立犀潟病院臨床研究部, ²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能

1D1620 大脳皮質シナプトソーム分画における [³H]D-セリンの取り込みと放出の解析

°山本 直樹¹, 富田 麗¹, 海野 麻未¹, 金田 小幸¹, 川口 直恵¹, 岩間 久行^{1,2}, 土田 英人¹, 西川 徹^{1,2}
¹国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部, ²東京医科歯科大学大学院精神行動医科学

一般演題 (口演)

口演 (A 会場)

10月20日 (金) 13:00 - 15:40

痴呆・アルツハイマー病

13:00 - 14:20 …… 今泉 和則 (大阪大学大学院医学系研究科機能形態学)
加藤 武 (横浜市立大学大学院総合理学研究科分子認識部門)

3A1300 PC12D 細胞に安定的に導入したヒトプレセニリン 1 および突然変異プレセニリンの作用

°亀谷 富由樹¹, 田中 喜久子¹, 宇佐美 美穂子¹, 丸山 敬¹, 森 啓²¹東京都精神医学総合研究所分子生物研究部門, ²大阪市立大学医学部老年医学研究部門

3A1320 変異プレセニリン 1 による小胞体ストレスセンサーの活性化障害

°本田 章子^{1,2,3}, 片山 泰一^{1,2,3}, 森 和俊⁴, 今泉 和則^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}¹阪大院・医・機能形態, ²田辺製薬 (株) 創薬研究所, ³CREST・JST, ⁴京大院・生命科学

3A1340 Wnt シグナル伝達系における変異プレセニリン 1 の抑制作用

°川村 勇樹^{1,2}, 菊池 章³, 高田 律子⁴, 高田 慎治^{4,5}, 芝本 さゆみ⁶, 柳澤 勝彦¹, 駒野 宏人¹¹国立長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部, ²科技団・科学技術特別研究員, ³広島大・医・生化一, ⁴科技団・ERATO・近藤誘導分化プロジェクト, ⁵京大・理・分子発生物学研究センター, ⁶摂南大・薬・生化

3A1400 beta-secretase の Alzheimer's disease と連結するか?: ラット Cortex における MK-801 の影響

°AHMED Md.Mahiuddin¹, 知久間 敏幸², RAHMAN Md.Khalilur³, 加藤 武¹¹横浜市大・院・総合理学, ²昭和薬大・薬品分析, ³ダッカ大・生化学

14:20 - 15:40 …………… 柳澤 勝彦 (国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部)
吉川 和明 (大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能制御部門)

3A1420 免疫化学的手法によるアルツハイマー病患者脳での D-Ser26β25-35(40) 様抗原の検出

°久保 武一, 熊谷 善弘, 金子 勲

三共株式会社第三生物研究所

一般演題（口演）

3A1440 ラット脳室内への β -アミロイド蛋白の持続注入により誘発される誘導型一酸化窒素合成酵素の発現とニコチン誘発性アセチルコリン遊離の障害

°TRAN Manh Hung, 山田 清文, OLARIU Ana, REN Xiu Hai, 鍋島 俊隆
名古屋大学大学院医学研究科医療薬学

3A1500 FTDP-17 脳における野生型、変異型タウの解析

°宮坂 知宏^{1,2}, 森島 真帆¹, 長嶋 和郎², RAVID Rivka³, VAN SWIETEN John C.⁴, 井原 康夫^{1,5}
¹ 東京大学医学部神経病理学, ² 北海道大学医学部分子細胞病理学, ³ Netherlands Brain Bank, ⁴ Department of Neurology, Erasmus University, ⁵ CREST, JST

3A1520 14-3-3 regulates phosphorylation of tau proteins.

°MITSUKO HASHIGUCHI¹, KAZUYA SOBUE², HEMANT PAUDEL K³, TOSHIO HASHIGUCHI¹

¹ Department of Physiology, Tokyo Medical University, ² Department of Anesthesiology, Nagoya City University, ³ Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University

口演（B 会場）

10 月 20 日（金）13:00 - 16:00

栄養因子

13:00 - 14:20 仙波 りつ子（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）
古川 昭栄（岐阜薬科大学分子生物学）

3B1300 リルゾール投与による脳内 BDNF 合成の誘導と海馬歯状回における細胞分裂促進

°仙波 りつ子^{1,2}, 山田 敦子^{1,2,3}, 浅野 富子¹, 上田 浩¹, 森下 理香¹, 竹内 郁夫¹, 稲熊 裕¹, 加藤 兼房¹

¹ 愛知県コロニー研究所, ² CREST 科学技術振興事業団, ³ 鳥取大学医学部神経生物

一般演題 (口演)

3B1320 イムノフィリンリガンドによる BDNF 産生誘導作用と神経保護効果

°西岡 博史, 新田 淳美, 古川 昭栄

岐阜薬大・薬・分子生物

3B1340 神経芽細胞腫における BDNF mRNA の発現°青山 峰芳¹, 浅井 清文², 穴倉 朋胤³, 河本 竹正³, 宮地 泰士¹, 横井 誉¹, 三浦 裕², 加藤 泰治², 中川原 章³¹名古屋市立大学 小児科, ²名古屋市立大学 分子医学研究所生体制御, ³千葉県立がんセンター 生化学部**3B1400 培養ラット海馬および視床下部神経細胞に対するエストロゲンの作用機構**

°柏原 めぐみ, 西尾 チカ, 畠中 寛

大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門

14:20 - 16:00 津田 正明 (富山医科薬科大学薬学部分子神経生物)
濱 登希子 (三菱化学生命科学研究所)**3B1420 BDNF 遺伝子発現を制御する 4 つのプロモーター活性化の相違と Ca²⁺ 応答性転写調節領域の解析**

°田淵 明子, 天野 賢示, 津田 正明

富山医薬大・薬・分子神経生物

3B1440 カルシウム依存的な PACAP 遺伝子の発現誘導と神経細胞死抑制効果

°津田 正明, 中坪 純, 田淵 明子

富山医薬大・薬・分子神経生物

3B1500 脳に特異的な新規蛋白質である 40kDaBINP 受容体の cDNA クローニングとその性質

°濱 登希子, 丸山 六三, 岩島 牧夫, 奈良 清光

三菱化学生命研

3B1520 ラットの Glia Maturation Factor- γ (rGMFG) の cDNA のクローニングとその組織分布°横井 誉^{1,2}, 浅井 清文², 立木 秀樹^{1,2}, 三浦 裕², 山本 愛美², 井上 雄一郎², 河合 洋子³, 多田 豊曠³, 森山 昭彦⁴, 加藤 泰治²¹名古屋市立大学医学部小児科学教室, ²名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門, ³名古屋市立大学看護学部, ⁴名古屋市立大学自然科学研究教育センター

一般演題（口演）

3B1540 酸化型ガレクチン-1を起点とした末梢神経再生へ向けてのカスケード

°堀江 秀典¹, 門屋 利彦², 樋川 直司¹, 三五 一憲³, 竹下 歌織¹, 浅輪 玲子¹, 廣井 智子¹, 佐藤 真奈美¹, 石川 義弘¹

¹横浜市大医学部第一生理, ²キリンビール医薬探索研究所, ³東京都神経科学総合研究所発生形態

口演（C会場）

10月20日（金）13:00 - 16:00

情報伝達・変換・修飾

13:00 - 14:20 野村 靖幸（北海道大学大学院薬学研究科）
土肥 敏博（広島大学歯学部歯科薬理学講座）

3C1300 アゴニスト刺激性血小板内カルシウム濃度増加反応における PKC 及びカルモジュリンの調節機構に関する検討

°鈴木 克治, 秋本 達之, 佐々木 由紀, 久住 一郎, 小山 司
北海道大学大学院医学研究科/神経機能学講座精神医学

3C1320 副腎クロマフィン細胞における cyclic ADP-ribose の分泌における役割

°森田 克也, 北山 滋雄, 土肥 敏博
広島大・歯・薬理

3C1340 アネキシンIのG蛋白質 α サブユニットとの結合及びGTPase活性調節

°相馬 仁¹, CREUZ Carl E², MCINTIRE William E², GARRISON James C², 大川 浩子³, 黒木 由夫¹

¹札幌医科大学医学部生化学第一講座, ²Department of Pharmacology, University of Virginia, ³札幌医科大学保健医療学部作業療法学科

一般演題 (口演)

3C1400 ラット初代培養アストロサイトにおける ATP 受容体刺激による iNOS 誘導増強機構について -PKC および AP-1 の関与-

°向井 由幸¹, 村山 俊彦², 大熊 康修¹, 野村 靖幸¹

¹北大・薬・薬理, ²千葉大・薬・薬品化学

14:20 - 16:00 山本 秀幸 (熊本大学医学部一薬理学)

遠山 正彌 (大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座)

3C1420 Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II によるインスリン分泌の調節

°山本 秀幸¹, 田淵 博孝^{1,2}, 松本 和也², 福永 浩司¹, 平岡 秀仁³, 佐々木 泰治³, 七里 元亮², 宮本 英七¹

¹熊本大・医・一薬理, ²熊本大・医・代謝内科, ³旭化成

3C1440 高酸素負荷によるラット脳ホスホリパーゼ C- $\delta 1$ レベルの上昇

°藤本 貞毅¹, 谷野 浩子¹, 楠田 敏博¹, 岸本 あずさ¹, 尾方 英俊¹, 岡村 将平¹, 下濱 俊²

¹京都薬科大学衛生化学教室, ²京都大学医学部神経内科学教室

3C1500 海馬ニューロンにおけるエストロゲンの IGF-1 mRNA 発現誘導のメカニズム

°新郷 明子 S., 鬼頭 昭三

兵庫大学附属研究所

3C1520 αCaMKII mRNA の樹状突起への局在を決定するシス領域の検索

°森 泰丈^{1,3}, 今泉 和則^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座, ²田辺製薬 (株), ³科学技術振興事業団

3C1540 NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇に対する遊離 Fe^{2+} の阻害効果

°中道 範隆², 大野 博司², 倉本 展行³, 高柳 雅子¹, 中村 洋一¹, 米田 幸雄¹

¹金沢大・薬・薬物, ²金沢大・がん研・分子薬理, ³金沢大・薬・微生物

一般演題（口演）

口演（D 会場）

10 月 20 日（金）13:00 - 15:40

変性疾患・疾患モデル

13:00 - 14:20

…………… 小川 紀雄（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門）
光本 泰秀（大塚製薬（株）医薬第二研究所神経変性疾患グループ）

3D1300 MPTP induced chronic hemi-parkinsonism model in Goettingen/CSK miniature pig
°Kyuichiro Onoe^{1,3}, Hitoshi Osuga², Fumihito Yoshii³, Yukito Shinohara³, Joh Ikeda -E²
¹JST/ICORP Canada Int's Research Program, NeuroGenes Project, ²Department of Molecular Neuroscience, Institute of Medical Sciences, Tokai University, ³Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Tokai University School of medicine

3D1320 ヒト脳内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinol によるドパミン神経の細胞死の機序
°丸山 和佳子¹, 赤尾 幸博², 直井 信³
¹長寿医療研究センター老化機構研究部生化学代謝研究室, ²岐阜国際バイオ研究所, ³応用生化学研究所脳科学研究部

3D1340 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) によるラット線条体のミトコンドリア機能障害
°中井 正三, 森 厚詞, 渡部 昭仁, 光本 泰秀
大塚製薬（株）医薬第二研究所・神経変性疾患グループ

3D1400 チューブリンは NACP/ α -synuclein 線維形成の seed となる：Parkinson 病病理形成における意義
°上田 健治¹, アリム M. アブドゥル M.¹, ホセイン シャハナラ MST.¹, 泉山 洋子², 有馬 邦正²
¹東京都精神医学総合研究所神経化学研究部門, ²東京都精神医学総合研究所超微形態研究部門

一般演題 (口演)

14:20 - 15:40 直井 信 (応用生化学研究所脳科学研究部門)
玉井 郁巳 (金沢大学薬学部薬効動態学)

3D1420 ミトコンドリア DNA を欠失した神経系の rho-0 細胞は細胞の起源により異なる代謝的適応を示し、酸化ストレスに脆弱であり、アポトーシスあるいはネクローシスによる細胞死を示す
°中瀬 泰然, 福山 隆一, 鳥羽 裕恵, 才脇 卓也, 伏木 信次
京都府立医科大学附属脳血管系老化研究センター病態病理学

3D1440 V-1 タンパク質による一酸化窒素 (NO) 毒性からの保護効果とテトラヒドロbiopterin (BH4) の関与
°湯山 耕平¹, 山本 秀子², 山国 徹³, 宗 時栄³, 加藤 武¹, 山本 敏文¹
¹横浜市大・総合理・分子認識, ²東京都精神研・精神薬理, ³三菱化学生命研

3D1500 ドパミンの核内への直接移行と集積に関する検討
°浅沼 幹人, 宮崎 育子, 田中 健一, 小川 紀雄
岡山大学医学部神経情報学部門

3D1520 伸張ポリグルタミン鎖は TATA 結合蛋白随伴因子 (TAF130) との結合を介し, CREB 転写活性化を阻害する
°下畑 享良¹, 中島 利博², 山田 光則³, 内田 千晴⁴, 小野寺 理¹, 成瀬 聡¹, 佐藤 俊哉¹, 木村 哲也¹, 野崎 兼吉¹, 小宅 睦郎¹, 高橋 均³, 辻 省次¹
¹新潟大学脳研究所神経内科, ²筑波大学医学部応用生物化学, ³新潟大学脳研究所病理, ⁴浜松医科大学学生化学

一般演題 (ポスター)

ポスター会場
10月18日(水)

イオンチャンネル・興奮膜

- 1P-01 新しい分子生物学的アプローチによる痛覚伝達機構の解析
 °奥瀬 賢司, WOOD John N.
 ロンドン大学生物学科
- 1P-02 膜電位依存性カリウムチャンネルの構成サブユニット (Kv1.1, Kv1.2) のラット一次感覚ニューロンにおける発現局在
 °横山 茂¹, 長谷川 光広², 申 然淑¹, 山下 純宏², 東田 陽博¹
¹金沢大学大学院医学研究科分子情報系独立専攻細胞遺伝子学, ²金沢大学医学部脳神経外科学
- 1P-03 副腎髄質クロマフィン細胞におけるエンドセリン刺激時のカルシウム流入経路: ストア作動性カルシウムチャンネルの関与について
 °李 憲¹, 張 曉峰², 岩室 康司², 三輪 聡一²
¹岐阜大学医学部生理学第一講座, ²京都大学大学院医学研究科循環生理学
- 1P-04 Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms: molecular structures and functional characterization
 °Lei Zhang, David Saffen
 Department of Neurochemistry, Faculty of Medicine, University of Tokyo
- 1P-05 PSD-95 による NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体の機能制御
 °山田 康枝¹, 岩本 敬², 祖父江 憲治³, 乾 誠¹
¹山口大学医学部薬理学講座, ²山口大学医学部神経精神医学講座, ³大阪大学医学部神経生化学講座

一般演題 (ポスター)**1P-06 受容体刺激による KCNQ2/KCNQ3 チャンネル抑制の分子機構の解析**

°星 直人, 張 家生, 横山 茂, 東田 陽博
金沢大院・医・細胞遺伝子

神経伝達物質・修飾物質**1P-07 坐骨神経結紮ラットの後根神経節における、サブスタンス P とそのプロセシング酵素のアロディニアに伴う変化**

°土田 健¹, 知久馬 敏幸², 矢嶋 隆一³, 加藤 武¹
¹横浜市立大学大学院総合理学研究科, ²昭和薬科大学薬品分析, ³特殊免疫研究所

1P-08 ビオプテリン生合成酵素遺伝子の組織特異的発現調節領域の解析

°大江 瑞恵, 澤田 浩秀, 西井 一宏, 永津 俊治, 一瀬 宏
藤田保健衛生大学・総医研

1P-09 高張刺激により誘導される開口放出過程の解析

°大西 浩史¹, 山森 早織¹, 平田 加奈子¹, 近藤 俊三¹, 笠井 陽子¹, 小崎 俊司², 高橋 正身¹
¹三菱化学生命科学研究科, ²大阪府立大学大学院農学生命科学研究科

1P-10 カテコールアミン分泌能の低下した PC12 細胞株の解析

°笠井 陽子, 板倉 誠, 桑原 玲子, 平田 加奈子, 近藤 俊三, 高橋 正身
三菱化学生命科学研究科

1P-11 受容体 subunit からみた海馬ニューロンに対する nicotine の作用

°鬼頭 昭三, 新郷 明子 S.
兵庫大学附属研究所

一般演題（ポスター）

- 1P-12 マウス脳における [3H] スペルミジンの細胞核内輸送
 °荒町 勝英¹, 倉本 展行², 中村 洋一¹, 米田 幸雄¹
¹金沢大・薬・薬物, ²金沢大・薬・微生物
- 1P-13 マウス青斑核における GTP cyclohydrolase I の発現は LPS 投与により増加する
 °金子 葉子¹, 池本 桂子², 森 啓至¹, 中島 昭¹, 太田 明¹
¹藤田保健衛生大学医学部生理学I, ²藤田保健衛生大学医学部解剖学II

受容体・輸送体

- 1P-14 エストロゲン受容体刺激はキノリン酸によるラット海馬神経細胞死を抑止する
 °黒木 康富, 諫田 泰成, 水野 勝重, 西尾 昌洋, 渡辺 康裕
 防衛医大・薬理
- 1P-15 グループ 1 型メタボトロピックグルタメイトレセプターの局在
 °檜井 栄一, 中村 洋一, 米田 幸雄
 金沢大学薬学部薬物学研究室
- 1P-16 海馬由来神経刺激ペプチド (HCNP) 受容体の同定とその性質－第 2 報
 °森下 学, 大塚 康史, 松川 則之, 上田 龍三, 小鹿 幸生
 名古屋市立大学医学部第二内科
- 1P-17 ノシセプチン受容体と Gi2 α サブユニットの融合タンパク質をモデルとしたリガンドスクリーニング系の開発
 °武田 茂樹¹, 岡田 知明², 岡村 理子¹, 芳賀 達也^{1,2}, 南野 直人³
¹東大・医・神経生化学, ²CREST, ³国立循環器病センター

一般演題 (ポスター)

- 1P-18 ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2, M4 サブタイプの細胞内移行
°吉田 典弘, 岩田 健, 芳賀 達也
東京大学大学院医学系研究科神経生化学
- 1P-19 絶食および甲状腺ホルモンによる中枢 NPY 受容体サブクラス遺伝子発現への影響
°山口 剛, 貝津 雅稔, 長谷川 歩未, 樋口 宗史
新潟大学医学部薬理学教室
- 1P-20 シグマ-1 受容体リガンドの神経細胞への取り込みには複数の経路が存在する。
°山本 秀子¹, 山本 敏文^{1,2}, 鷲 直樹¹, 高橋 真司³, 堀込 和利³, 唐沢 淳一³, 奥山 茂⁴, 額田 敏秀⁵, 曾良 一郎¹
¹ (財) 東京都精神研・精神薬理, ²横浜市大院・総合理学, ³三井製薬, ⁴大正製薬, ⁵ (財) 東京都精神研・神経化学
- 1P-21 神経細胞の Na ポンプアイソフォームの活性制御における細胞外 K⁺ と細胞内 Na⁺ の関与
°井上 順雄, 曾我 智子, 加藤 尚彦
横浜市大・医・一生化
- 1P-22 血液脳関門における Aquaporin-4 の発現とウシ Aquaporin-4 cDNA のクローニング
°祖父江 和哉¹, 山本 直樹², 米田 和広², 藤田 義人¹, 稲垣 雅昭¹, 津田 喬子¹, 三浦 裕², 浅井 清文², 勝屋 弘忠¹, 加藤 泰治²
¹名古屋市立大学医学部麻酔・蘇生学, ²名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門
- 1P-23 アストロサイトにおける Aquaporin-4 発現調節機構
°山本 直樹¹, 米田 和広¹, 祖父江 和哉², 藤田 義人², 稲垣 雅昭², 三浦 裕¹, 浅井 清文¹, 加藤 泰治¹
¹名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門, ²名古屋市立大学医学部麻酔・蘇生学
- 1P-24 サンドイッチ型酵素免疫測定法を用いた AMPA 型グルタミン酸受容体複合体形成機構の解析
°茨木 京子, 那波 宏之
新潟大学脳研究所分子神経生物学

一般演題（ポスター）

- 1P-25 高親和性コリントランスポーター遺伝子のプロモーター解析
 °岡村 理子, 奥田 隆志, 芳賀 達也
 東京大学大学院医学系研究科神経生化学
- 1P-26 Cloning of a novel brain-specific cDNA homologous to mitochondria tricarboxylate carrier
 °Shin-ichi MIYAKE^{1,5}, Michio TAMATANI^{1,5}, Noriaki MITSUDA^{1,5}, Manabu TANIGUCHI^{1,5},
 Osamu HORI², Yoshikuni KAWAI³, Emiko SENBA³, Kohji SATO⁴, Masaya TOHYAMA^{1,5}
¹Department of Anatomy and Neuroscience, Osaka University Medical School, ²Department of
 Neuroanatomy Kanazawa University Medical School, ³Department of Anatomy Wakayama
 Medical College, ⁴Department of Anatomy Hamamatsu Medical college, ⁵CREST Japan Science and
 Technology
- 1P-27 ラット脳における Xenobiotic responsive elements への結合蛋白質の検出
 °馬場 勝弘, 中村 洋一, 米田 幸雄
 金沢大・薬・薬物

シナプス

- 1P-28 発達期ラット脳由来の syntaxin 1A 結合蛋白質
 °五十嵐 道弘^{1,3}, 大山 晃弘^{1,2}, 小宮 義璋¹
¹群馬大学医学部分子病態学, ²群馬大学医学部麻酔・蘇生学, ³新潟大学医学部生化学第二
- 1P-29 シンタキシン N 末領域の機能の解析: 制御開口放出の抑制とシナプトタグミン結合における
 シンタキシン 1A (HPC-1) とシンタキシン 2 の比較
 °藤野 一郎, 赤川 公朗
 杏林大・医・二生理
- 1P-30 神経伝達物質放出における PI 3-キナーゼの役割
 °板倉 誠¹, 大西 浩史¹, 網野 真也², 関口 真理子¹, 山森 早織¹, 片岡 正和¹, 高橋 正身¹
¹三菱化学生命研, ²東大院・総合文化

一般演題 (ポスター)

- 1P-31** Ca 結合タンパク質フリクエニンのシナプス伝達への効果
°陳 小良, 東田 陽博, 横山 茂
金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学講座
- 1P-32** シナプス形質膜に存在する神経特異的エノラーゼ (NSE) の解析
°永沢 秀子¹, 上田 祐司¹, 大藪 友利子¹, 堀 均¹, 大倉 多美子², 阿相 皓晃³, 植村 慶一⁴
¹徳島大・工・生物工, ²慶応大・先端研, ³都老人研・細胞生物, ⁴慶応大・医・生理
- 1P-33** アグリン、レクチン、ラミニンによる AChR 凝集のシグナル機構の解析
°重本 和宏¹, 久保 幸穂², 中村 洋一³, 丸山 直記²
¹愛媛大学医学部衛生学, ²東京都老人総合研究所分子病理, ³金沢大学薬学部薬物学教室

情報伝達・変換・修飾

- 1P-34** 成熟マウス脳海馬への 5-bromo-2'-deoxyuridine 取り込みに対する NMDA レセプター活性化の影響
°北山 友也, 米山 雅紀, 中村 洋一, 米田 幸雄
金沢大学薬学部薬物学研究室
- 1P-35** Kainate と NMDA で誘導した神経細胞死における Cdk5 活性化サブユニット p35 の分解様式の違い
°魏 范研, 斎藤 太郎, 久永 真市
東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻
- 1P-36** 初代培養海馬神経細胞における NMDA 短期暴露による AP1 DNA 結合上昇
°平居 貴生¹, 丸山 裕子¹, 倉本 展行², 中村 洋一¹, 米田 幸雄¹
¹金沢大学薬学部薬物学, ²金沢大学薬学部微生物学

一般演題 (ポスター)

- 1P-37 C6 グリオーマ細胞における酸化ストレス惹起 GDNF 発現と NF- κ B 活性化機構
 °木綿 しのぶ, 大熊 康修, 西屋 禎, 宮崎 浩之, 上原 孝, 野村 靖幸
 北大院・薬・薬理
- 1P-38 Cdk5 活性化サブユニット p35 のカルパインによる限定分解～分解部位とリン酸化による分解制御の解析～
 °藤田 悠一, 斎藤 太郎, 久永 真市
 東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻
- 1P-39 ラット脳および培養海馬神経細胞における CaM キナーゼ分子の発現とリン酸化反応
 °笠原 二郎, 上江洲 章吉, 福永 浩司, 宮本 英七
 熊本大学医学部薬理学第一講座
- 1P-40 シナプスの形成に関するフォスファチジルイノシトール 4-リン酸化酵素の役割
 °申 然淑, 東田 陽博
 金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学講座
- 1P-41 交感神経興奮によるラット心室心筋内でのサイクリック ADP リボース形成の上昇
 °張 家生¹, 東田 陽博¹, 横山 茂¹, 野田 百美²
¹金沢大学大学院・医・細胞遺伝子学, ²九州大学大学院・薬・病態生理学

軸索輸送・細胞運動・細胞骨格

- 1P-42 副腎髄質クロマフィン細胞における分泌顆粒運動の実画像解析
 °今泉 美佳, 大久保 晋吾, 林 光紀, 保坂 早苗, 笹川 展幸, 熊倉 鴻之助
 上智大学生命科学研究所

一般演題 (ポスター)

- 1P-43 単離ニューロフィラメントによる高次架橋構造の *in vitro* 形成
°倉知 正¹, Leterrier Jean-Francois², 小宮 義璋³, 内田 敦子^{4,5}, 田代 朋子⁵
¹群馬大学医学部分子病態学教室, ²ボワティエ大学細間相互作用研究施設, ³群馬大学医学部分子病態学教室, ⁴東京都立大学理学部生物学科, ⁵青山学院大学理工学部化学科
- 1P-44 ニューロフィラメント-H E-segment の GSK3 β による特異的リン酸化
°佐々木 孝寛¹, 田岡 万悟², 石黒 幸一³, 内田 敦子¹, 斎藤 太郎¹, 磯辺 俊明², 久永 真市¹
¹東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻, ²東京都立大学大学院理学研究科化学専攻, ³三菱化学生命科学研究所
- 1P-45 ラット坐骨神経における puromycin-sensitive aminopeptidase の軸索内輸送
°山本 賢¹, 矢嶋 隆一², 知久馬 敏幸³, 平野 久⁴, 山本 好男⁵, 西 克治⁵, 大久保 岩男⁶, 加藤 武¹
¹横浜市大・院・総合理学, ²特殊免疫研, ³昭和薬大・薬品分析, ⁴横浜市大・木原生研, ⁵滋賀医大・法医, ⁶滋賀医大・二生化
- 1P-46 アルミニウムのパルス曝露による *in vivo* 系での軸索輸送障害
°柏木 雄次郎, 福所 英里子, 中村 祐, 松本 均彦, 武田 雅俊
大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学・精神医学
- 1P-47 老化ラットで選択的に見られる NF-M の合成量低下と軸索輸送速度の減少
°内田 敦子^{1,2}, 田代 朋子², 小宮 義璋³, 久永 真市¹
¹東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻, ²青山学院大学理工学部化学科, ³群馬大学医学部分子病態学教室
- 1P-48 ミクログリアの膜ラフリング形成におけるシグナル伝達と Iba1 の機能解析
°金澤 裕子, 今井 嘉紀, 大澤 圭子, 佐々木 洋, 上田 睦明, 高坂 新一
国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部
- 1P-49 PC12D 細胞神経突起内におけるペルオキシソームの局在性と運動性に関する解析
°石川 哲也¹, 川井 千景¹, 佐野 護², 湊川 洋介¹
¹川崎医大・医・生一, ²京都府医大・医・生物

一般演題（ポスター）

ニューロン・グリア

- 1P-50 変異 SOD-1 と野生型 SOD-1 の培養細胞内凝集体における共存
 °豊島 至¹, 菅原 正伯¹, 和田 千鶴¹, 小出 隆司², 中野 亮一²
¹秋田大学医学部第一内科, ²新潟大学脳研究所神経内科
- 1P-51 システインプロテアーゼインヒビターによるアストロサイトの分化誘導機構の解明
 °長谷川 明子¹, 岩崎 靖乃¹, 山田 真久², 小川 正晴², 池中 一裕¹
¹岡崎国立共同研究機構・生理学研究, ²理化学研究所脳科学総合研究センター細胞培養技術開発チーム
- 1P-52 Expression patterns of gliosis-specific transcription factor, OASIS and Proteoglycan Core Protein genes in the CNS glial scar
 °Ken ISEKI^{1,2}, Takuya NIKAIDO¹, Tetsuji MORI¹, Seita HAGINO¹, Junko TAKEDA¹, Yuxiang ZHANG^{1,2}, Hiromi TAKAKI¹, Mayumi TAKEUCHI¹, Sachihiko YOKOYA¹, Masahiro MURAKAWA², Akio WANAKA¹
¹Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University, ²Department of Anesthesiology, School of Medicine, Fukushima Medical University
- 1P-53 Transcriptional activity of gliosis-specific transcription factor, OASIS, that belong to the CREB/ATF family
 °Takuya NIKAIDO^{1,2}, Ken ISEKI¹, Tetsuji MORI¹, Seita HAGINO^{1,2}, Junko TAKEDA¹, Yuxiang ZHANG¹, Hiromi TAKAKI¹, Mayumi TAKEUCHI¹, Sachihiko YOKOYA¹, Shin-ichi KIKUCHI², Akio WANAKA¹
¹Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University, ²Department of Orthopedic Surgery, Fukushima Medical University
- 1P-54 P2Y receptor を介するマイクログリア機能抑制；Receptor subtype に関して
 °尾形 直則, 森野 忠夫, 竹葉 淳, 田口 康智, 堀内 秀樹, 山本 晴康
 愛媛大学医学部整形外科

一般演題 (ポスター)

- 1P-55 ラット顔面神経核由来ミクログリアのグルタミン酸トランスポーターについて
°中嶋 一行^{1,2}, 本田 静世², 遠山 陽子¹, 栗原 正¹, 高坂 新一²
¹創価大学・生命科学研究所, ²国立精神・神経センター、神経研究所、代謝研究部
- 1P-56 ミクログリアには beta2 アドレナリン受容体に加え beta1 アドレナリン受容体も発現している
°田中 謙二^{1,2}, 浅井 昌弘², 鈴木 弘美¹, 小野 健治^{1,4}, 澤田 誠^{1,3}
¹藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病共同研究部門, ²慶應義塾大学大学院医学研究科神経精神医学分野, ³さきがけ21 科学技術振興事業団, ⁴名古屋市立大学薬学研究科
- 1P-57 ミクログリア細胞死における caspase-1 ならびに caspase-3 の役割
°氷見 敏行, 森田 育夫, 室田 誠逸
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能
- 1P-58 オリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体 4F2 の抗原の性質と同定
霜田 靖¹, 吉村 和法^{1,2}, °小林 淳子¹, 桜井 洋子¹, 堂前 直³, 瀧尾 擴士³, 野村 正彦², 阿相 皓晃¹
¹都老人研神経生物学部門, ²埼玉医科大学医学部生理学, ³理研生体分子解析室
- 1P-59 オリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体 12F7 の抗原の性質
°霜田 靖¹, 吉村 和法^{1,2}, 藤牧 香代², 小林 淳子¹, 桜井 洋子¹, 野村 正彦², 阿相 皓晃¹
¹都老人研神経生物学部門, ²埼玉医科大学医学部生理学
- 1P-60 中枢神経系におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞発生の起源
°中平 英子, 鹿川 哲史, 和田 圭樹, 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
- 1P-61 Twitcher マウス由来培養シュワン細胞株の樹立
沈 勁松¹, °渡部 和彦³, 大橋 十也^{1,2}, 衛藤 義勝^{1,2}
¹慈恵医大DNA医学研遺伝子治療, ²慈恵医大小児科, ³都神経研分子神経病理

一般演題（ポスター）

- 1P-62 培養ミクログリア活性化のプロテインキナーゼによる制御
 °中村 洋一, 米田 幸雄
 金沢大・薬・薬理

ミエリン

- 1P-63 PASII/PMP22 タンパクは CLAUDIN SUPERFAMILY に属するか？
 °植村 慶一^{1,3}, 武田 泰生², 韓 春錫¹, 北村 邦男³
¹慶應義塾大学医学部生理学, ²東京都老人総合研究所, ³埼玉医科大学生理学
- 1P-64 有髄軸索上の電位依存性 Na⁺および K⁺ channel 局在におけるスルファチドの重要性
 °石橋 智子^{1,2}, 池中 一祐¹, 平原 幸恵³, 本家 孝一⁴, 西野 仁雄², 馬場 広子²
¹生理学研究所神経情報部門, ²名古屋市立大学医学部第二生理, ³大阪府立母子保健総合医療センター研究所, ⁴大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学 生化学・分子生物学講座
- 1P-65 ミエリン DM20 のアミノ酸配列を使った系統解析では現生魚類の中で肺魚が四足動物に最も近縁である
 °遠山 陽子¹, 一宮 智美¹, 吉田 弘美¹, 曹 纓², 長谷川 政美², 小嶋 久子³, 玉井 洋一³, 栗原 正¹
¹創価大・生命科学研究, ²統計数理研, ³北里大・医・生化学
- 1P-66 末梢神経ミエリン糖蛋白質糖鎖の加齢による変化
 °北村 邦男, 関 剣虹, 坂本 安, 野村 正彦
 埼玉医科大学第一生理

一般演題 (ポスター)神経免疫

- 1P-67 The paraneoplastic neurological syndrome antigen-specific cytotoxic T lymphocytes may not be a primary cause of the autoimmune neuronal degeneration in mice.
°Junko Takeda^{1,2}, Yukio Sato², Tetsuji Mori¹, Takuya Nikaido¹, Ken Iseki¹, Seita Hagino¹, Yuxiang Zhang¹, Hiromi Takaki¹, Mayumi Takeuchi¹, Sachihiko Yokoya¹, Akio Wanaka¹
¹Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University School of Medicine, ²Department of Internal Medicine II, Fukushima Medical University School of Medicine

パターン形成

- 1P-68 Histological Analysis of Mice Lacking LIM Homeobox Transcription Factor, L3/Lhx8
°Tetsuji MORI, Yuxiang ZHANG, Hiromi TAKAKI, Mayumi TAKEUCHI, Takuya NIKAIIDO, Ken ISEKI, Seita HAGINO, Junko TAKEDA, Sachihiko YOKOYA, Akio WANAKA
Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University

細胞分化

- 1P-69 P19 神経細胞分化における長鎖の Lewis X エピトープ糖脂質の発現
°小山内 たか¹, Chai Wengang², 田島 陽一³, 霜田 靖⁴, 佐内 豊³, Yuen Chun-Ting²
¹都臨床研、生命情報, ²英国医学研究機構, ³都臨床研、生命情報, ⁴都老人研、神経生物

一般演題（ポスター）

- 1P-70 Identification of Forssman glycolipid in the brain of Brn1/2 deficient and wild type mouse fetus
 °Tamotsu TAKETOMI¹, Yoshinobu SUGITANI², Tetsuo NODA², Hiroya HIDAKA³, Minoru TOZUKA³, Tetsuo NAKABAYASHI³, Tsutomu KATSUYAMA³
¹Shinshu Clinical Lipid Reaserch Institute, ²Cancer Institute, Dept. of Cellular Biology, ³Shinshu Univ.Sch.Med.Central Clinical Lab.

- 1P-71 ニューロンにおける necdin 結合蛋白質の同定と解析
 °谷浦 秀夫¹, 谷口 直子¹, 高山 千利², 新延 道夫¹, 吉川 和明¹
¹阪大・蛋白研・機能制御, ²北大院・医・解剖

突起伸展・回路網形成

- 1P-72 Ashwagandha 成分 withanolide A と withanoside VI による神経突起伸展作用
 °久保山 友晴¹, 東田 千尋¹, 趙 静², 服部 征雄², 小松 かつ子¹
¹富山医科薬科大学和漢薬研究所附属薬効解析センター, ²富山医科薬科大学和漢薬研究所薬物代謝工学部門
- 1P-73 発達中のマウス小脳で特異的に発現する遺伝子の解析
 °古市 貞一, 中村 浩, 鏡 良弘, 佐藤 明
 理化学研究所脳科学総合研究センター分子神経形成研究チーム
- 1P-74 初代培養下神経細胞の自発的発火頻度の変化における抑制性シナプスの役割
 °根岸 隆之¹, 石井 寿幸¹, 河村 晴次¹, 吉川 泰弘¹, 黒田 洋一郎²
¹東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室, ²都立神経研究所・神経生化学

一般演題 (ポスター)栄養因子

- 1P-75 培養ニワトリ胚 DRG neuron に対する抗ガン剤の細胞毒性とラディシコール、ゲルダナマイシンによるその抑止効果
°佐野 護
京都府立医科大学生物学
- 1P-76 PC12 細胞の分化における低親和性受容体 p75^{NTR} の役割
°伊藤 久則, 野元 裕, 古川 昭栄
岐阜薬大・薬・分子生物
- 1P-77 6-OHDA 投与ラットのドパミンニューロン変性に及ぼすインスリン様成長因子-1(IGF-1) の効果
°柏原 健一, 真邊 泰宏, 割田 仁, 村上 哲郎, 阿部 康二
岡山大学医学部神経内科
- 1P-78 培養海馬ニューロンにおける synaptic bouton の数を BDNF は増大させる。
°安達 直樹¹, 沼川 忠広^{1,2}, 松本 知也¹, 横幕 大作¹, 畠中 寛¹
¹阪大院 蛋白研 蛋白質生合成部門, ²日本学術振興会特別研究員
- 1P-79 中脳黒質ニューロンに対する BDNF の栄養因子作用における細胞質型チロシンホスファターゼ Shp-2 の役割
°高井 里美, 山田 雅司, 小清水 久嗣, 荒木 敏行, 畠中 寛
大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門
- 1P-80 培養マウス小脳顆粒細胞の細胞生存因子
°下永 友和, 藤川 直人, 冨永 恵子, 小倉 明彦
大阪大学大学院理学研究科生物科学

一般演題（ポスター）

- 1P-81 NGF 依存的に活性化される BDNF レセプター「Trk A / Trk B キメラ」を用いた、Trk B シグナリングの in vitro 解析
 °佐藤 洋助¹, 小島 正己^{1,2}, 鈴木 健二³, 山田 雅司¹, 畠中 寛¹
¹大阪大学蛋白質研究所蛋白質合成部門, ²大阪工業技術研究所有機機能材料部脳神経工学ラボラトリー, ³杏林大学医学部衛生学公衆衛生学教室

ポスター会場
 10 月 19 日（木）

細胞接着因子

- 2P-01 Gicerin is involved in the formation of microvilli
 °Shigeki OKUMURA¹, Keiko KOHAMA¹, Yasuhiro TSUKAMOTO², Hidekazu TANAKA¹, Naomasa MIKI¹, Eiichi TAIRA¹
¹Department of Pharmacology 1, Osaka University School of Medicine, ²Department of Veterinary Anatomy, College of Agriculture, Osaka Prefecture University
- 2P-02 GPI-アンカー型神経接着分子 NB-3 の遺伝子欠損マウスの解析
 °武田 泰生¹, 赤阪 啓子¹, 李 順姫¹, 小林 悟¹, 浅野 雅秀², 須藤 カツ子², 岩倉 洋一郎², 川野 仁³, 渡辺 和忠¹
¹東京都老人総合研究所細胞認識部門, ²東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター, ³東京都神経科学総合研究所解剖発生学研究部門
- 2P-03 The recruitment mechanism of de novo synthesized cadherin into the activated synaptic loci
 °Hidekazu Tanaka¹, Takahiro Fujimoto¹, Hong Shi¹, Eiichi Taira¹, Hiroko Sugiura², Kanato Yamagata², Naomasa Miki¹
¹Department of Pharmacology, Osaka University School of Medicine, ²Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

一般演題 (ポスター)

- 2P-04 Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity
°Hidekazu TANAKA¹, David COLMAN R.²
¹Department of Pharmacology, Osaka University School of Medicine, ²Department of Molecular Biology, Mount Sinai School of Medicine
- 2P-05 神経系に特異的なプロテオグリカン、NGC、のコンドロイチン硫酸鎖結合部位の同定
°青野 幸子, 時田 義人, 山内 忍, 周尾 卓也, 松井 ふみ子, 慶野 宏臣, 川島 祥子, 大平 敦彦
愛知コロニー研・周生期学部

再生・移植

- 2P-06 成体ラットの神経細胞新生部位に選択的に局在する G 蛋白質
°浅野 富子¹, 森下 理香¹, 上田 浩¹, 篠原 春夫², 河村 則子¹, 仙波 りつ子¹, 岸川 正大¹, 加藤 兼房¹
¹愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所, ²三重大学医学部解剖学
- 2P-07 成熟ラット後根神経節細胞の接着ならびに神経突起再生に対するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、phosphacan と neurocan の作用
°三五 一憲¹, 大平 敦彦², 安食 京子¹, 渡嘉敷 晶子¹, 川野 仁¹
¹東京都神経科学総合研究所発生形態部門, ²愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所周生期学

可塑性

- 2P-08 神経可塑性に関わるシアル酸転移酵素遺伝子の発現 -ST3Gal IV mRNA 発現上昇について-
°町田 敦紀, 俵 佳江, 岡 卓也, 岡部 明仁, 塩坂 貞夫, 加藤 啓子
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞生物学専攻

一般演題 (ポスター)

- 2P-09 グルタミン酸受容体サブユニットとそのアンカータンパク質のシナプス後部内局在
 °鈴木 龍雄¹, 高木 博¹, 伊藤 仁一², 清水 秀夫³, 斎藤 文典¹
¹信州大・医・加齢研・神経可塑性, ²名古屋市大・医・第一生化, ³名古屋市大・医・共同研
- 2P-10 培養中枢ニューロンにおける神経伝達物質放出の estrogen による増強作用
 °横幕 大作¹, 沼川 忠広^{1,2}, 安達 直樹¹, 松本 知也¹, 西尾 チカ¹, 畠中 寛¹
¹大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門, ²日本学術振興会特別研究員
- 2P-11 ニューロブシンに対する 2 種の特異的インヒビターの解析
 °秋貞 盛人¹, 蒲地 智寛¹, Bird Phillip², 岡 卓也¹, 堂前 直³, 瀧尾 擴士³, 岸 忠明¹, 三宅 義雅⁴, 山本 和彦⁵, 松本 和政¹, 塩坂 貞夫¹, 加藤 啓子¹
¹奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞生物学専攻, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, ³理化学研究所, ⁴近畿大学薬学部, ⁵近畿大学医学部生化学2
- 2P-12 神経可塑性関連セリンプロテアーゼ ニューロブシンの分泌機構について
 °岡 卓也, 加藤 啓子, 秋貞 盛人, 塩坂 貞夫
 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

プログラム細胞死

- 2P-13 Mechanism of neuroprotective effects of immunophilin ligands against cell death
 °Ken-ichi TANAKA, Naoko FUJITA, Masato ASANUMA, Norio OGAWA
 Department of Neuroscience, Okayama University Medical School
- 2P-14 E2F1 強制発現によるニューロンアポトーシス誘導機構の解析
 °植月 太一, 西村 伊三男, 原 とも子, 谷浦 秀夫, 吉川 和明
 阪大・蛋白研・機能制御

一般演題 (ポスター)**2P-15 マウス胎生期の神経形成における SEK1 のはたらき**°丸岡 弘規¹, 榎戸 靖¹, 山岸 覚¹, 仁科 博史², 畠中 寛¹¹大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門, ²東京大学大学院薬学系研究科生理化学**2P-16 The relationship between the inhibitor of apoptosis protein NAIP and cell cycle elements in a rat focal ischemia model.**°Hitoshi OSUGA¹, Raouf FETNI², Sachiko OSUGA³, Antoine HAKIM M³, David PARK S³, Joh-E IKEDA¹¹Department of Molecular Neuroscience, The Institute of Medical Sciences, Tokai University,²NeuroGenes, International Cooperative Research Project, Japan Science and Technology Corporation, ³Neuroscience Research Institute, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada**2P-17 高カリウム、血清除去による小脳顆粒細胞死における VDUP1 遺伝子の発現上昇**

°斉藤 達哉, 田中 秀逸, 小池 達郎

北海道大学 理学研究科 生物科学専攻 行動知能学講座

2P-18 NO による神経細胞死における BDNF の細胞死促進にはリン酸化 Bcl-2 が関与している。

°石川 保幸, 池内 俊彦, 畠中 寛

大阪大学蛋白質研究所

2P-19 Na⁺-Ca²⁺exchanger サブタイプの発達と過剰イオン流入による神経毒性

°小池 達郎, 益本 将司

北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻

一般演題 (ポスター)

学習・記憶

- 2P-20 恐怖条件付けラットの海馬および扁桃核に発現する一酸化合成酵素 (NOS) の定量的解析
 °加藤 尚彦, 小坂田 健一, 佐藤 光, 阿部 一樹, 井上 順雄, 中山 孝
 横浜市立大学医学部生化学第一講座

神経内分泌

- 2P-21 グルタミン酸作動性内分泌細胞の発見
 °森山 芳則¹, 山田 浩司¹, 林 美都子¹, 大塚 正人¹, 八代 聖基¹, 石尾 将吾¹, 中塚 修一¹, 木下 美香¹, 山本 章嗣²
¹岡山大学・薬・生理化学, ²関西医科大学・医・第一生理
- 2P-22 甲状腺ホルモンによる摂食ペプチド Neuropeptide Y 遺伝子発現の変化
 °貝津 雅稔, 山口 剛, 長谷川 歩未, 樋口 宗史
 新潟大学医学部薬理学講座
- 2P-23 Leptin による NPY 遺伝子プロモーターの活性制御機構の解析
 °村岡 修, 許 波, 弦巻 立, 樋口 宗史
 新潟大学医学部薬理学

一般演題 (ポスター)老化**2P-24 ラット脳スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の加齢による変化**°江頭 亨¹, 高山 房子², 山中 康光³, 酒井 久美子⁴¹大分医大・医・薬理, ²大分医大・医・薬理, ³大分医大・医・薬理, ⁴大分医大・医・実験実習機器セ脳血流・代謝**2P-25 片側性内頸動脈 MPTP 投与によるサル脳グルタミン酸代謝の変化—非侵襲的 ¹³C-MRS による研究—**°金松 知幸¹, 南部 篤², 大槻 泰介³, 小田 正記¹, 高田 昌彦², 徳野 博信², 渡邊 英宏⁴, 岡本 和也⁴, 梅田 匡朗⁴, 塚田 裕三¹¹創価大学生命科学研究所, ²東京都神経科学総合研究所, ³国立精神・神経センター武蔵病院脳外科,⁴(株) 東芝医用機器・システム開発センター**2P-26 ¹³C-NMR スペクトロスコピーによる非侵襲的ヒト脳内グルコース代謝動態の解析—[1-¹³C]-glucose 経口投与による測定—**°松本 暁子¹, 大槻 泰介¹, 金松 知幸², 岡本 和也³, 渡邊 英宏³, 梅田 匡朗³, 塚田 裕三²¹国立精神・神経センター, ²創価大学生命科学研究所, ³(株) 東芝 医用機器・システム開発センター**2P-27 Apolipoprotein A-I によるコレステロール搬出に関するアストロサイト細胞内反応**

°伊藤 仁一, 長安 祐子, 横山 信治

名市大・医・一生化

2P-28 acidic FGF により分化誘導されたラットアストロサイトーマ GA-1 のコレステロール放出に関する apolipoprotein A-I 反応性の変化

°張 力勇, 伊藤 仁一, 横山 信治

名市大・医・一生化

一般演題 (ポスター)

疾患モデル

2P-29 恐怖条件付けストレスにおける 3β -hydroxysteroid dehydrogenase の関与

°野崎 歩^{1,2}, 野田 幸裕¹, 永井 拓¹, 原 明², 鍋島 俊隆¹
¹名古屋大学大学院医学研究科医療薬学, ²岐阜薬科大学学生化学

2P-30 胎児性アルコール症候群モデルラット脳の糖鎖発現

°川島 麗^{1,3}, 中村 和生^{1,3}, 李 洪珍³, 斎藤 真希², 田口 雅之², 斎藤 克², 玉井 洋一^{1,4}, 小嶋 久子^{1,3}
¹北里大院・分子病態医化学, ²北里大・医・産婦人科学, ³北里大・医・生化, ⁴人間総合科学大学

2P-31 Caspases are involved in hypoxia/ischemia-induced death of oligodendrocytes.

°Mamoru SHIBATA^{1,2}, Shin HISAHARA², Hideaki HARA³, Takemori YAMAWAKI⁴, Yasuo FUKUUCHI¹, Junying YUAN⁵, Hideyuki OKANO², Masayuki MIURA²
¹Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, ²Division of Neuroanatomy, Department of Neuroscience, Osaka University Graduate School of Medicine, ³Nara Research and Development Center, Santen Pharmaceutical Co. Ltd., ⁴Division of Cerebral Circulation Research, National Cardiovascular Center Research Institute, ⁵Department of Cell Biology, Harvard Medical School

2P-32 ラット軽度脊髄損傷モデルにおける感覚異常の検討

°森野 忠夫, 堀内 秀樹, 尾形 直則, 竹葉 淳, 山本 晴康
 愛媛大学医学部整形外科

2P-33 ストレスによる脳内ヒスタミン含量の変化

°櫻井 映子¹, 遠藤 雅俊¹, 揚 志博², 渡邊 建彦¹, 谷内 一彦¹
¹東北大学大学院医学系研究科・薬理, ²サントリー基礎研

一般演題 (ポスター)変性疾患

- 2P-34 Effects of levodopa combined with dopa decarboxylase inhibitor on dopaminergic dysfunction in the 6-OHDA-lesioned mouse striatum
°Naoko FUJITA, Ken-ichi TANAKA, Norio OGAWA
Department of Neuroscience, Okayama University Medical School

- 2P-35 Propargylamine 類による神経細胞のアポトーシス防御の機序
°直井 信¹, 丸山 和佳子², 赤尾 幸博³, 高橋 勤⁴
¹応用生化学研究所脳科学研究部, ²国療長寿医療研究センター老化機構研究部生化学代謝研究室, ³岐阜国際バイオ研究所, ⁴愛知江南短大

- 2P-36 ヒトニューロblastomaにおける MPP⁺誘発細胞障害とミトコンドリア機能異常
°森 厚詞, 中井 正三, 光本 泰秀
大塚製薬 (株) 医薬第二研究所・神経変性疾患グループ

筋疾患

- 2P-37 機能不全骨格筋における α B クリスタリンのリン酸化
°加藤 兼房, 稲熊 裕, 伊東 秀記, 亀井 慶子, 岩本 郁子
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部

- 2P-38 骨格筋変性過程における, HCNP 前駆体蛋白の経時的発現。
°鈴木 日子¹, 松川 則之¹, 藤森 修², 上田 龍三¹, 小鹿 幸生¹
¹名古屋市立大学医学部第二内科, ²名古屋市立大学医学部第二解剖学

一般演題（ポスター）

虚血

- 2P-39 中大脳動脈皮質枝閉塞後のニューロピリン 1、2 及びセマフォリン III mRNA の発現変化
 °藤田 弘子¹, 張 波², 阪中 雅広¹
¹愛媛大学解剖学第二, ²愛媛大学生理学第一
- 2P-40 局所脳虚血・再灌流時の ERK signal cascade の役割
 °小堺 有史, 福内 靖男, 田中 耕太郎, 野川 茂, 伊東 大介, 鈴木 重明, 傳法 倫久
 慶應義塾大学医学部神経内科
- 2P-41 VEGF は Akt、ERK の活性化を介して神経保護効果を示す
 °松崎 秀夫^{1,3}, 玉谷 実智夫^{1,3}, 満田 憲昭^{1,3}, 涛川 一彦², 木山 博資², 三宅 進一^{1,3}, 山口 淳^{1,3}, 遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座, ²旭川医科大学医学部第一解剖学講座, ³科学技術振興事業団
- 2P-42 局所脳虚血・再灌流時の CREB リン酸化、Bcl-2 発現と組織損傷の関係
 °田中 耕太郎, 福内 靖男, 野川 茂, 伊東 大介, 鈴木 重明, 傳法 倫久, 小堺 有史
 慶應義塾大学医学部神経内科
- 2P-43 GRP94(94kDa Glucose-Regulated Protein) は虚血性神経細胞死を抑制する
 °板東 良雄^{1,2}, 玉谷 実智夫^{1,2}, 谷口 学^{1,2}, 河西 克介¹, 遠山 正彌^{1,2}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座(第2解剖), ²科学技術振興財団
- 2P-44 脳虚血再灌流負荷後に投与した17β-estradiolによる海馬組織内caspase-3活性化の抑制効果
 °藤田 公和¹, 山内 理充², 加藤 寿章¹, 柴山 健三¹, 芳本 信子³, 永田 豊¹, 宮地 栄一¹
¹藤田保健大・医・生理学教室, ²愛知学泉短期大学, ³名古屋文理短期大学

一般演題 (ポスター)**2P-45 脳虚血によるミクログリアの神経細胞における遊走能と保護作用**°鈴木 弘美^{1,2}, 今井 文博², 澤田 誠^{1,3}¹藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・難病治療共同研究部門, ²藤田保健衛生大学・医学部・脳神経外科, ³科学技術振興事業団さきがけ21外傷**2P-46 モルモット蝸牛における音響刺激による転写制御因子の変動**°荻田 喜代一¹, 松延 毅², 小川 郁², SCHACHT Jochen³¹摂南大学薬学部薬理学研究室, ²慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室, ³ミシガン大学クレスギ聴覚研究所痴呆・アルツハイマー病**2P-47 NMDA、MK-801 投与によるラット大脳皮質脳微小透析内アセチルコリン、コリンへの影響**°小嶋 哲史¹, 中沢 康至¹, 永井 康雄², 知久馬 敏幸³, 加藤 武¹¹横浜市大・院・総合理学, ²ビーエフ研, ³昭和薬大・薬品分析**2P-48 アルツハイマー型初期症状を誘発する MK-801 体性投与のラット脳内コレスチトキニン神経に与える影響**°粕谷 知之¹, 大山 佳悟¹, 武田 克道², 知久馬 敏幸³, 加藤 武¹¹横浜市大・院・総合理学, ²ダイナボット, ³昭和薬大・薬品分析**2P-49 細胞内コレステロール量依存的タウ蛋白リン酸化調節の検討**°道川 誠¹, 范 企文¹, 澤村 直哉¹, 愈 瑋², 千田 隆夫², 柳澤 勝彦¹¹国立長寿医療研究センター, ²名古屋大学第一解剖学教室

一般演題（ポスター）

- 2P-50 孤発性アルツハイマー病脳にみられるプレセニリン-2 スプライシング異常 — スプライシング制御因子の同定を目指して —
 °眞部 孝幸^{1,3}, 今泉 和則^{1,2,3}, 佐藤 直也^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学教室, ²田辺製薬株式会社創薬研究所, ³科学技術振興事業団
- 2P-51 ニューロン内カスパーゼ3 活性化に関与する APP ドメインの解析
 °西村 伊三男, 桑子 賢一郎, 原 とも子, 植月 太一, 吉川 和明
 阪大・蛋白研・機能制御
- 2P-52 アルツハイマー病患者脳脊髄液中の Abeta40、Abeta42、apoE および GFAP の測定と APOE の2つの遺伝子多型 (e2/e3/e4 および -491A/T) について
 °福山 隆一¹, 水野 俊樹², 水野 哲也³, 柳澤 勝彦³, 伊豆本 種野¹, 畑中 弘樹¹, 中島 健次², 伏木 信次¹
¹京都府立医科大学付属脳血管系老化研究センター病態病理, ²京都府立医科大学付属脳血管系老化研究センター神経内科学, ³国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部
- 2P-53 凝集した Amyloid β -protein は神経細胞におけるコレステロール代謝に大きな影響を及ぼす
 °キョウ 建生, 澤村 直哉, 范 企文, 柳澤 勝彦, 道川 誠
 国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部
- 2P-54 propentofylline による β -amyloid protein 毒性からの神経細胞保護作用における cAMP の役割
 °郡山 恵樹, 千葉 賢三, 毛利 哲郎
 北陸大・薬 生物活性教室
- 2P-55 老齢犬脳におけるアミロイド β 蛋白、APP、Bcl2、Bax に関する免疫組織化学的検討 — 年令、痴呆評点との相関
 °伊藤 龍生¹, 佐藤 隆夫¹, 林 義之¹, 玉井 良尚², 橋本 重夫¹
¹近畿大学医学部第二病理学, ²近畿大学医学部第三内科

一般演題 (ポスター)

- 2P-56 アルツハイマー病患者脳由来タウタンパク質のアスパラギン結合型糖鎖構造
°佐藤 雄治¹, WANG Jian-Zhi², 内藤 康秀³, GRUNDKE-IQBAL Inge², IQBAL Khalid², 遠藤 玉夫¹
¹ 東京都老人総合研究所糖鎖生物学部門, ²New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, ³北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科
- 2P-57 組換えアデノウイルスを用いたラット脳内 APP 遺伝子導入によるカスパーゼ3 活性化と炎症反応誘導
°升村 誠¹, 秦 龍二^{1,3}, 西村 伊三男², 植月 太一², 澤田 徹¹, 吉川 和明²
¹ビーエフ研究所, ²阪大・蛋白研・機能制御, ³愛媛大・医・二解剖
- 2P-58 Apolipoprotein E4 は p44/p42 MAP kinase 系の活性化により CREB のリン酸化を行う
°大久保 信孝^{1,2}, 満田 憲昭^{1,2}, 玉谷 美智夫^{1,2}, 山口 淳^{1,2}, 李 永敦^{1,2}, 遠山 正彌^{1,2}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座(A-2), ²CREST, JST
- 2P-59 非ステロイド性消炎鎮痛薬は NO による神経細胞死を抑制する
°宮崎 育子, 浅沼 幹人, 小川 紀雄
岡山大学医学部神経情報学部門
- 2P-60 神経細胞に対する終末糖化反応生成物 (AGEs) の細胞障害に関する研究
°竹内 正義¹, 鈴木 貴子¹, 大窪 忠利², 山崎 眞津美³, 杉江 智則¹, 柳瀬 由紀子¹, 亀田 幸彦¹, 牧田 善二⁴
¹北陸大学薬学部生化学教室, ²救急薬品工業株式会社, ³北陸大学薬学部生物活性教室, ⁴久留米大学医学部内分泌代謝内科
- 2P-61 PS1 ミスセンス変異を有するノックインマウス胎児の神経発達に対するアルミニウムの影響
°福所 英里子, 柏木 雄次郎, 中村 祐, 中野 有香, 松本 均彦, 工藤 喬, 武田 雅俊
大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学専攻神経機能医学講座精神医学
- 2P-62 ニーマンピック病 C 型 モデルマウスにおけるタウ蛋白のリン酸化の検討
°澤村 直哉, キョウ 建生, 柳澤 勝彦, 道川 誠
国立中部病院長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

一般演題（ポスター）

薬物依存・精神薬理

- 2P-63 ラット脳におけるコンプレキシン遺伝子発現に対するハロペリドール長期投与の影響
 °中原 辰雄¹, 本村 啓介², 植木 裕司², 橋本 喜次郎², 後藤 玲央¹, 中根 博², 堤 哲之², 本藤 久雄², 黒木 俊秀³, 平野 誠², 内村 英幸²
¹九州大学大学院理学研究院化学部門, ²国立肥前療養所情動行動障害センター臨床研究部, ³九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野
- 2P-64 ラット大脳皮質におけるメタンフェタミン急性投与による遺伝子発現の変化: Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法による解析
 °窪田 恭彦¹, 倉増 敦朗², 渡邊 建彦², 佐藤 光源¹, 伊藤 千裕¹
¹東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野, ²東北大学大学院医学系研究科細胞薬理学分野
- 2P-65 メタンフェタミンによるドーパミン遊離に対するトリヘキシフェニデルの抑制効果について
 °霜里 和朗¹, 長尾 憲樹², 渡辺 悟¹, 北山 滋雄³
¹川崎医科大学薬理学教室, ²川崎医療福祉大学健康体育学科, ³広島大学歯学部歯科薬理学講座
- 2P-66 マイクロアレイ法による抗うつ薬慢性投与誘導遺伝子の探索
 °西田 朗¹, 久岡 一恵¹, 前正 秀宣^{1,2}, 岡本 泰昌², 森信 繁², 山脇 成人²
¹国立呉病院臨床研究部精神神経科学研究室, ²広島大学医学部神経精神医学教室
- 2P-67 エタノールによるアネキシン IV の発現変化
 °橋本 恵理¹, 大川 浩子², 相馬 仁³, 黒木 由夫³, 小澤 寛樹¹, 齋藤 利和¹
¹札幌医科大学医学部神経精神医学講座, ²札幌医科大学保健医療学部作業療法学科, ³札幌医科大学医学部生化学第一講座

一般演題 (ポスター)中毒症

- 2P-68 ソマン類似物質 bis(pinacoyl methyl)phosphonate (BPMP) の
培養ラットアストロサイトに対する影響
°磯部 一郎, 前野 善孝, 長尾 正崇, 岩佐 峰雄, 小山 宏義, 中村 昌美, 大瀧 純, 杉原 樹梨
名古屋市立大学医学部法医学講座

てんかん

- 2P-69 Release of amino acids from hippocampal synaptosomes of kindled rats
°Kazuhihsa MAEDA, Hideaki MITANI, Sin-ichi YOSHIOKA, Takefusa NAGAMI, Ryuzo KAWAHARA
Department of Neuropsychiatry, Faculty of Medicine, Tottori University
- 2P-70 てんかん原性確立過程において eNOS は必要か
°村島 善也 L.¹, 吉井 光信¹, 鈴木 二郎²
¹東京都精神医学総合研究所神経生理研究部門, ²東邦大学医学部精神医学

感染症

- 2P-71 Alzheimer's disease-related gene expression in human cell lines following infection with
Mycobacterium leprae
°Masumi ENDOH
Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

一般演題（ポスター）

その他

- 2P-72 ストレス負荷に伴う副腎内 AP1 DNA 結合能上昇に対する NMDA レセプターの関与
°藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 中村 洋一, 米田 幸雄
金沢大学薬学部薬物学研究室
- 2P-73 Effect of antidepressants on expression of dopamine receptor mRNA
°Jun MIURA, Teruaki TANAKA, Kensuke KAMEDA, Ichiro KUSUMI, Tsukasa KOYAMA
Department of Psychiatry, Hokkaido University
- 2P-74 脳及び胸腺に特異的に発現する p38MAPK α の新規スプライス産物の同定と解析
°日下 永子, 石川 保幸, 池内 俊彦, 畠中 寛
大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門

L1

Cell-associated targets of amyloid-beta peptide (A β): the role of RAGE and ABAD as cofactors for A β -induced cell stress.

Shi Du Yan¹, Satoshi Ogawa², Ann Marie Schmidt¹, and David Stern¹.

¹Department of Physiology and Cellular Biophysics, Columbia University, New York, USA, and

²Department of Neuroanatomy, Kanazawa University Medical School, Kanazawa, Japan.

Recent studies have emphasized a pathogenic role for A β in the pathogenesis of cellular dysfunction underlying Alzheimer's disease (AD). However, mechanisms through which low concentrations of A β , relevant to early stages of AD when cellular damage is likely to be reversible, disturb cellular properties require further study. We have identified two cellular cofactors for A β which interact with amyloidogenic peptide in the nanomolar range and magnify A β -induced cell stress: the signal transduction receptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), and the endoplasmic reticulum-associated enzyme ABAD (A β ; binding alcohol dehydrogenase). RAGE is a member of the immunoglobulin superfamily of cell surface molecules which engages ligands, such as β sheet fibrils, via its V-domain. Interaction of RAGE-bearing cells with A β fibrils has different outcomes, depending on the cell type; for example, cultured neurons display evidence of cell stress (NF- κ B activation) followed by events associated with programmed cell death (increased caspase-3-like activity, DNA fragmentation) whereas microglia become activated (nuclear translocation of NF- κ B and expression of cytokines). Double transgenic mice overexpressing a mutant form of human APP (providing an A β -rich environment) and wild-type RAGE, both under control of the PDGF B-chain promoter displayed magnified cell stress (expression of macrophage-colony stimulating factor, Interleukin 6, NF- κ B activation) which is likely to evolve into cytotoxicity (diminished synaptophysin and MAP2 immunoreactivity, increased activated caspase-3 antigen). ABAD is a member of the short-chain dehydrogenase reductase family with multiple substrates including beta-hydroxybutyrate. In the absence of A β , ABAD is a component of the host response to metabolic stress; cells overexpressing ABAD incubated in medium in which β -hydroxybutyrate is the principal energy source display enhanced energy charge and survival. Similarly, transgenic mice overexpressing ABAD in neu-

rons display increased levels of ATP in the brain and a smaller infarct volume following induction of transient middle cerebral artery occlusion. However, in the presence of A β , the properties of ABAD are permuted and it becomes a pathogenic factor augmenting amyloid cytotoxicity. Cultured cells overexpressing ABAD and APP display enhanced generation of reactive oxygen species, and enter a pathway leading to programmed cell death. Double transgenic mice overexpressing mutant human APP and wild-type ABAD under control of the PDGF B-chain promoter show accelerated expression of 4-hydroxynonenal epitopes and heme oxygenase type 1 by 4 months of age. In addition, evidence of cytotoxic result of such cell stress is suggested by the decrease in synaptophysin and MAP2 immunoreactivity based on semiquantitative analysis hippocampus and cerebral cortex, respectively. We hypothesize that ABAD engages nascent A β in the endoplasmic reticulum, and promotes A β -induced stress at the early times, ultimately magnifying cytotoxicity. Taken together, these data emphasize the importance of further analyzing the contribution of RAGE and ABAD to A β -induced cell stress with the goal of determining whether antagonizing the interaction of A β with these cellular targets will provide new approaches to preventing cellular dysfunction in AD.

L2

Calcineurin: A Protein Phosphatase under the Control of Ca^{2+} and Reactive Oxygen Species

°Claude Klee¹, Xutong Wang¹, Hao Ren¹, Manik Ghosh¹, Alexandre Samouilov², Jay Zweier²

¹Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, ²The Johns Hopkins University

Calcineurin, the only protein phosphatase under the control of calmodulin, is a major calmodulin-binding protein in brain where it modulates a wide range of cellular responses to Ca^{2+} -mobilizing signals. The calcium regulation of calcineurin is mediated by two structurally similar but functionally distinct Ca^{2+} -regulated proteins, calcineurin B and calmodulin. Calcineurin B, tightly associated, with the catalytic subunit, is required for activity. Binding of calmodulin to calcineurin is accompanied by displacement of an inhibitory domain, exposure of the catalytic center, and more than 100-fold increase of the V_{max} of the enzyme. The cooperative, Ca^{2+} -dependent activation of calcineurin by calmodulin allows its rapid responses to narrow Ca^{2+} transients. In crude extracts, calcineurin is also subject to a time- and temperature-dependent inactivation upon exposure to calmodulin. The enzyme is protected against inactivation by the presence of an autoinhibitory peptide and by superoxide dismutase but not by catalase. The inactivation is readily reversed by treatment with ascorbate. Purified calcineurin that contains 0.9 mol of iron and 0.8 mol of zinc per mol of enzyme with an electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum, characteristic of an $\text{Fe}^{3+}/\text{Zn}^{2+}$ enzyme, is inactive. Activation to the high specific activity of the crude enzyme requires treatment with ascorbate, under anaerobic conditions, and is accompanied by the disappearance of the characteristic $\text{Fe}^{3+}/\text{Zn}^{2+}$ EPR signal at $g=4.3$, indicating that one mol of Fe^{2+} at the active site is required for the protein phosphatase activity of calcineurin. The displacement of the autoinhibitory domain induced by Ca^{2+} /calmodulin exposes Fe^{2+} in the catalytic center to oxidative damage by the superoxide anion. In hippocampal neurons the subsequent inactivation of calcineurin has been implicated in the sustained phosphorylation of the transcription factor, CREB, upon prolonged exposure to Ca^{2+} [Bitto et al. Cell 87: 1203-1214 (1996)]. Thus, the involvement of the redox state of iron in the regulation of calcineurin activity provides a mechanism to couple Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation to the redox state of the cell.

L3

パーキンソン病の神経化学的解明

°永津 俊治

藤田保衛大・総医研・分子遺伝

パーキンソン病 (Parkinson's disease, PD) は高齢者に多発する運動障害の神経変性疾患である。黒質線条体ドーパミン(DA)神経が未知の原因で細胞死をおこし線条体で神経伝達物質 DA が減少して発症する。PD の病変は黒質線条体 DA ニューロンの選択的細胞死が主であるが、ノルエピネフリン系やエピネフリン系にも異常がある (Nagatsu, Adv Neurol 60, 165, 1993)。PD の黒質線条体 DA 神経細胞死は、素因遺伝子に環境因子(神経毒など)が加わって起こる。遺伝性線条体 DA 欠乏症に: (1) 常染色体優性遺伝 Hereditary progressive dystonia (HPD), DOPA responsive dystonia (AD-DRD, 瀬川病): tyrosine hydroxylase (TH) の補酵素 tetrahydrobiopterin の合成酵素 GTP cyclohydrolase *IGCH1* 遺伝子変異 (Ichinose et al, Nature Genet 8, 236, 1994); (2) 常染色体劣性遺伝 DRD (AR-DRD): TH 遺伝子変異 (Ludecke et al, Human Genet 95, 123, 1995); (3) 常染色体優性遺伝 PD (AD-PD): *alpha-synuclein* 遺伝子変異 (Polymeropoulos et al, Science 276, 2045, 1997); (4) 常染色体劣性遺伝若年性パーキンソンニズム (Juvenile parkinsonism, AR-JP): 原因遺伝子は *parkin* (Kitada et al, Nature 392, 605, 1998) で *parkin* 蛋白は ubiquitin-protein ligase (Shimura et al, Nature Genet, 25, 302, 2000) がある。AD-PD・AR-JP は神経細胞死が起こるが HPD/DRD はおこらない。PD 死後脳黒質線条体と脳脊髄液に、また PD 動物モデルの黒質線条体に、TNF-alpha や IL-1beta などの proinflammatory cytokines, TNF-alpha receptor R1, soluble Fas, bcl-2, caspases 1 and 3 などの apoptosis 関連蛋白が増加し、BDNF や NGF などの神経栄養因子 (neurotrophins) が減少する (Nagatsu et al, J Neural Transm, in press, 2000)。6OHDA-PD ラットの線条体における TNF-alpha の増加は immunophylin 結合薬 FK506 で阻止される (Mogi et al, Neurosci Lett, in press, 2000)。これらの成績は PD における黒質線条体 DA 神経細胞死は apoptosis である可能性を示唆する。遺伝子治療と ES 細胞由来の DA ニューロンの移植による神経保護・再生は有望な PD の治療法である (厚生省厚生科学研究費脳科学研究事業 (T.N.) の支援による)。

L4

細胞内蛋白輸送と細胞極性

°大野 博司

金沢大がん研究所分子薬理部門

細胞内には種々のオルガネラが存在し、細胞が正常に機能するためには個々の細胞が合成する何万種類にもおよぶ蛋白質のそれぞれが、その局在すべきオルガネラに正しく輸送される必要がある。このような輸送は、輸送小胞と呼ばれる脂質膜で包まれた球状構造が1つのオルガネラ膜から産生され、別のオルガネラ膜と融合することにより行われる。輸送小胞の産生は、小胞の被覆蛋白質が細胞質からオルガネラ膜上に付着することによって始まる。

演者らは、ゴルジ体以降の後期分泌系およびエンドサイトーシスにおける膜貫通蛋白質の選別輸送の分子機構を中心に研究を進めてきた。これらの系では主に、クラスリンおよびAP複合体と呼ばれる蛋白複合体が小胞の被覆を形成する。そして運ばれる蛋白質の細胞質領域に存在する、短い特定のアミノ酸配列からなる選別シグナルがこれらの被覆と相互作用することで、膜蛋白質は選択的に形成中の輸送小胞に取り込まれる。

最も研究の進んだ選別シグナルのひとつであるチロシン・シグナルは、AP複合体の μ 鎖と結合することにより機能する。チロシン・シグナルは細胞表面からのエンドサイトーシス、リソソームやトランスゴルジ網への局在、さらには上皮細胞における側基底面細胞膜への選別輸送など、複数の細胞内輸送経路において作用するが、その受容体であるAP複合体も分子ファミリーを形成しており、チロシン・シグナルが関与するそれぞれの経路に固有のAP複合体が存在すると考えられる。演者らは最近、上皮細胞特異的に発現する新たなAP複合体 μ 鎖、 $\mu 1B$ を単離し、これが上皮細胞における側基底面細胞膜への蛋白質の選別輸送に機能することを示した。

本講演では、蛋白質選別輸送におけるAP複合体と輸送シグナルの役割を、演者らの結果を含めて概説したい。

S1

本シンポジウムのねらい

°山脇 成人
 広島大学医学部神経精神医学

抄録無し

S2

神経ステロイドとストレス疾患

°鍋島 俊隆, 野田 幸裕
 名古屋大学大学院医学研究科医療薬学・附属病院薬剤部

臨床においてうつや不安状態と神経ステロイドの血漿中レベルが相関すること、動物にストレスを負荷すると神経ステロイドの脳内含量が変動することから、神経ステロイドはうつ病や不安神経症などのストレス関連疾患に関与していることが考えられている。本発表では、不安神経症やうつ病などのストレス疾患動物モデルに対する神経ステロイドの作用について最近の知見を紹介する。GABA_A 受容体に作用する神経ステロイドは、抗不安薬と同様、抗不安作用を有するが、GABA_A 受容体に対してアロステリックに抑制的な作用を示す神経ステロイドの効果は、一致しておらず、抗不安あるいは不安惹起作用を示す。一方、神経ステロイドは最近になり抗ストレス作用などの薬理作用に関与しているシグマ₁ 受容体にも作用することが見出され、内在性のシグマ受容体リガンドとして注目されている。シグマ₁ 受容体に作用する神経ステロイドは、シグマ₁ 受容体作動薬や抗うつ薬と同様に、抗うつ薬のスクリーニングに繁用されている強制水泳試験法において抗うつ作用を示し、この作用は選択的なシグマ₁ 受容体拮抗薬により拮抗される。また、抗不安薬や抗うつ薬に抵抗性を示す恐怖条件付けストレス (CFS) 反応を神経ステロイドのデハイドロエピアンドロステロン (DHEA) 硫酸塩 (DHEAS) は緩解し、この緩解作用もシグマ₁ 受容体拮抗薬によって拮抗される。興味深いことに、CFS 反応を呈したマウスの血清中 DHEAS 含量は非ストレス動物と比較して有意に減少しており、これは、臨床において、うつ病患者の血漿中 DHEA 含量の減少が観察されたことと一致している。また、抗うつ薬に対して治療抵抗性を示す難治性うつ病患者に DHEAS を投与するとうつ症状が改善することが報告されていることから、CFS 反応の発現機序と難治性うつ病の発症機序が類似している可能性が考えられる。以上の結果より神経ステロイドは、従来の抗不安薬や抗うつ薬とは異なり治療抵抗性のうつ病にも有効な作用スペクトルの広いストレス疾患治療薬となりうる可能性が示唆される。

S3

神経ステロイドの生合成と生理作用

°名和田 新

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学

神経ステロイド (neurosteroid) である DHEA-S の生体調節機能について、末梢臓器における作用機構と生理作用を中心に紹介し、中枢神経における今後の展望について述べる。

1981 年 Baulieu らはプレグネノロン, DHEA, およびその硫酸塩が脳内に高濃度に存在し、脳内で cholesterol より生合成され、副腎や性腺とは無関係に存在することを証明し、これらをニューロステロイドと命名した。以後、中枢神経、末梢神経におけるステロイド合成の研究が進み、副腎、性腺における古典的ステロイド合成とは異なる合成系が同定されつつある。

これらニューロステロイドは中枢神経、末梢神経の発生分化と発達において、局在が異なっていることが指摘され、行動、記憶以外にニューロトランミッターの合成、分泌、神経細胞の増殖、発育において多彩な作用が示唆されている。

一方、DHEA(S) はその 90% 以上が副腎に由来する C19-steroid であり、副腎アンドロゲンと呼称される。DHEA(S) はもっとも高濃度に血中に存在するステロイドホルモンである。最近その生合成分泌調節機構および生理作用の詳細が明らかにされ、高齢化社会において老化制御、および生活習慣病の予防の観点より急速に注目され始めている。

DHEA(S) のアンドロゲン作用はきわめて弱い。副腎における DHEA(S) の合成は cholesterol を基質として 17 α -hydroxylase, 17,20lyase により、DHEA が合成され、sulfokinase により DHEA(S) が合成される。17 α -hydroxylase と 17,20lyase はまったく同一の cytochrome P450 17 α により触媒される。

臨床上血中 cortisol と DHEA(S) は解離する現象が観察される。生命の維持に必須の血中 cortisol は男女とも生涯、一定の血中濃度を維持するが、血中 DHEA(S) は思春期に急速に増加し、以後加齢とともに直線的に著減する。

DHEA(S) の生理作用については、最近急速に解明され始め、動物実験、in vitro の実験で、免疫賦活作用、抗糖尿病作用、抗骨粗鬆症作用、抗動脈硬化作用、抗肥満作用、中枢神経作用が明らかにされている。

DHEA の直接作用としての核内レセプターを介した標的遺伝子を介する作用と、DHEA の間接作用として末梢での testosterone, estradiol への転換である。

S4

脳海馬における神経ステロイドの合成と急性作用

°川戸 佳

東京大学大学院総合文科研究科広域科学専攻

神経ステロイドは、第 4 世代の情報伝達物質である。記憶学習の中枢海馬スライスにおいて、チトクロム P450_{scc}・アドレノドキシシ+アドレノドキシシ還元酵素・硫酸抱合酵素などが同一の錐体神経細胞層に存在することを発見した。神経ステロイドであるプレグネノロンや硫酸プレグネノロンの合成は海馬で行われ、NMDA 刺激によって、NMDA 型グルタミン酸受容体から流入する Ca²⁺ が StAR を含むステロイド合成系を駆動して、合成される。一方、硫酸プレグネノロンは急性に海馬神経細胞に作用して、NMDA 受容体を介する Ca 流入を増強することがデジタル顕微 Ca イメージング法でわかる。この結果、ラット脳海馬の錐体細胞は、神経伝達に合わせて、神経ステロイドを合成しており、更に神経ステロイドは局所メディエーターとして NMDA 受容体に働き、シナプス伝達増強を行っているのではないかと推察される。硫酸プレグネノロンを灌流しておくことにより、海馬の長期増強がかかりやすくなることも発見した。ちなみに硫酸プレグネノロンを海馬に注入するとマウスの記憶学習が改善される。

S5

神経ステロイドの新しい受容体

°植田 弘師, 吉田 明

長崎大学薬学部分子薬理学研究室

ステロイド類は神経系に対し多様な作用を持つことが広く知られている。特に神経系で産生され作用するいわゆる神経ステロイドの存在が見いだされ、神経の発達や、健忘、不安等の高次の精神神経機能、更に痴呆や老化に対する作用について興味を持たれている。ステロイドホルモンの作用点としては、核内受容体を介する転写制御がよく知られているが、細胞膜にも別の受容体が存在することが示唆されている。この細胞膜受容体としては、 $GABA_A$ 及び $NMDA$ 受容体等の他に、まだ同定されていないシグマ受容体が一つの候補と考えられてきた。シグマ作用薬に神経ステロイドと同様な精神薬理学的作用があることも報告されている。本研究では、これまで $[^3S]GTP\gamma S$ の結合量を指標に、 G 蛋白質連関型シグマ受容体がシナプス膜標品に存在することを報告してきたが、今回この受容体が神経ステロイド受容体でもあることが示唆される結果を得た。デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体 (DHEAS) 等いくつかの神経ステロイドはシグマ作用薬と同様にシナプス膜の G 蛋白質を活性化し、この活性は百日咳毒素 (PTX) 処理により消失した。再構成実験からこの神経ステロイド受容体は G_{i1} と機能的に関連するが、 G_{oA} とは関連しないことが示された。更に、この DHEAS の作用が別の神経ステロイドであるプロゲステロンやシグマ拮抗薬 NE-100 により遮断され、またシグマ作用薬であるペンタゾシンによる G 蛋白質活性化もプロゲステロン、NE-100 により抑制されたことから、神経ステロイド受容体とシグマ受容体は共通の G 蛋白質連関型受容体であることが示唆された。次に、マウス足蹠皮下へのシグマ作用薬 SA-4503 投与で疼痛応答が観察され、この応答にも G_{i1} が関与することが示された。この系で DHEAS は低用量でヒスタミン遊離を介する PTX 非感受性の疼痛応答を、より高用量でヒスタミン拮抗薬では遮断されず NE-100 で遮断される PTX 感受性の疼痛応答を示すことが観察された。以上の結果から、神経ステロイド受容体は少なくとも神経に存在する $NS1/\sigma$ 型と肥満細胞に存在する $NS2$ 型の 2 種類が存在する事が示唆された。

S6

精神疾患における神経ステロイド

°三國 雅彦

群馬大学医学部神経精神医学教室

本シンポジウムでは神経ステロイドの脳内での生合成、その受容体と生理機能に関する興味深い演題が発表される。しかしながら、記憶学習の促進機序、薬物やアルコールなどの物質乱用における依存形成への神経ステロイドの関与が動物実験では明らかとなりつつあるにもかかわらず、精神科臨床のデータの発表が無いのははなはだ残念である。この小論ではうつ病研究領域に絞って神経ステロイドの臨床研究の発展に何が必要となっているかを検討してみたい。

うつ病患者の 65% にグルココルチコイド受容体を介する視床下部-下垂体-副腎皮質系のフィードバック機能の低下が明らかにされているばかりか、抗うつ薬の作用機序の一つが、海馬のグルココルチコイド受容体の発現量の増加作用であり、このフィードバック系の機能亢進を是正することが明らかにされつつあるので、神経ステロイド生合成に対する抗うつ薬の効果も当然に考えられる。実際、動物実験ではアロテトラハイドロデオキシコルチコステロン (アロ THDOC) が各種抗うつ薬の反復投与で増加することが報告され、ごく少数例の臨床成績でも髄液中のアロ THDOC 濃度の増加とハミルトンうつ病評価尺度の改善率とが相関したという報告がなされている。今後、これらの研究を進展させるためには、多数の臨床サンプルを測定することができるよう、アロ THDOC やアロプレグネロンなどの神経ステロイド測定法の簡便化が必要である。また、アロ THDOC の受容体の画像化による脳機能評価法の確立も待たれている。

一方、幼弱期の母仔分離ストレスにより仔ラットは成熟後のストレス負荷に対し視床下部-下垂体-副腎皮質系機能が亢進することが知られているが、興味深いことに、母仔分離ストレス負荷中にアロ THDOC を同時に投与すると、この成熟後のストレス脆弱性形成が防止されることが報告されており、その分子機序の解明が待たれている。うつ病では 15 歳以前の心理的な外傷が危険因子と言われているので、この神経系の発達期に神経ステロイドを増加させることのできる薬物療法並びに教育的訓練や心理療法はなにかが明らかにされると、脳科学の基盤に基づいた教育科学の更なる発展に寄与できると期待される。

S7

脳の発生・再生と神経幹細胞

°中福 雅人

東京大学大学院医学系研究科神経生物学教室

ヒトを含む哺乳動物の発生過程においては、ニューロン、グリアの共通の起源細胞として、神経幹細胞が重要な役割を担っている。神経幹細胞はその自己複製能により増殖を繰り返し、またその多分化能により多様な細胞群へと分化する能力を持つ細胞である。さらに最近になって、成熟個体脳神経系の一部の領域にも神経幹細胞が残存し、持続的なニューロン新生に関与していることが様々な研究により明らかにされている。このような特異な性質を有する神経幹細胞の研究は、神経発生の分子・細胞メカニズムの理解に貢献するのみならず、神経変性疾患をはじめとする様々な病態における脳の再生・修復療法の開発の可能性を大きく広げるものとして、現在大きな注目を集めている。しかしながら、現時点では神経幹細胞そのものに関する基礎的な知見、あるいはその臨床応用に向けた研究は、未だ限られたものに留まっている。本講演では、神経幹細胞の増殖・分化を制御する分子機構について、bHLH 型転写因子群、Notch シグナル伝達系の機能を中心に議論する。また、神経幹細胞を用いた脳の再生医学についても、現時点での問題点を整理し、その将来を展望する。

S8

神経幹細胞の同定法の確立と分化制御機構

°岡野 栄之¹, 川口 綾乃¹, 澤本 和延¹, 島崎 琢也¹, 宮田 卓樹²¹大阪大学大学院医学系研究科・神経機能解剖学, ²理研 BSI・細胞培養

神経幹細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する多くの細胞系譜へ分化できるという多分化能と、自己複製能を有する神経系の未分化な細胞であり、neurosphere 法により、培養下において未分化状態で増殖させることができる。この特異な性質のため、同細胞は神経発生の基礎的な研究の対象であるばかりでなく、再生医学的な観点からも大いに注目を集める存在になってきている。しかしながら、(1) 神経幹細胞の prospective な同定と分離法、(2) in vivo repopulation assay が欠如するため、神経系の stem cell biology は、造血系に比べてはるかに遅れをとってきた。本セミナーでは、この二点を克服するために我々が開発してきた方法論と、神経幹細胞の自己複製能と分化の制御に関する研究成果を紹介するとともに、将来的な再生医療への応用の可能性につき論じてみたい。

脳のパターンニングと神経分化における Pax6 遺伝子の役割

°大隅 典子

東北大学大学院医学系研究科器官構築学分野

脳の高次機能が営まれるためには複雑で正確な神経回路が形成されねばならない。そのためには、発生過程で多種類のニューロンが決まった数だけ産生され、決まった場所に配置されることが前提条件として必要である。このような初期のニューロンの分化および配置と回路形成は脳のパターンニングを基盤としていることが明らかになりつつある。すなわち、ごく単純な構造をしている初期の神経板あるいは神経管が、特異的に発現する分泌因子、転写因子、細胞表面因子などの協調的な働きにより、前後軸・背腹軸に沿って順次区画化・領域化されていき、多種類のニューロンが決まった位置に決まった数だけ分化し、それらは初期のパターンニングをガイドとして最終的な位置に移動するとともに、標的に対して正確な軸索投射を行うのである。脳の領域特異的に発現する遺伝子の中で転写因子をコードする Pax6 遺伝子は大まかに言って前脳の背側、および菱脳・脊髄の腹側に発現する。Pax6 遺伝子はもともとはショウジョウバエの paired 遺伝子のホモログの1つとして同定され、眼の発生に深く関わるものが広く知られているが、脳神経発生のいろいろな局面でも重要な役割を果たしている。私たちは現在、エレクトロポレーションによる培養胎児脳に対する新規遺伝子導入法を含む実験発生学的手法と分子形態学的手法を駆使することにより、哺乳類脳のパターンニングと神経分化における Pax6 遺伝子カスケードに迫ろうとしている。本講演では (1) 初期のパターンニングである前脳・中脳区画化において、領域特異的転写因子 Pax6 と細胞接着因子 cadherin6 が神経上皮細胞の移動の制限に関わること、(2) 同様に終脳における背側および腹側コンパートメント (将来の大脳新皮質および基底核領域に相当) 維持に Pax6 と Rcadherin および cadherin6 の排他的な発現が関係すること、および (3) 神経管腹側パターンニングと神経細胞サブタイプ分化に対する Pax6 の役割について紹介したい。

サイトカインによる胎生期マウス中枢神経系の細胞系譜制御

中島 欽一^{1,2}, 柳澤 亮^{1,2}, 滝沢 琢己^{1,2}, 落合 和^{1,2}, °田賀 哲也^{1,2}

¹東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞生物学, ²熊本大学発生医学研究センター転写制御

中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどの細胞は神経幹細胞から分化成熟するが、それら細胞系譜の分化制御はサイトカインなど様々な細胞外来性の因子からのシグナルにより担われる。膜蛋白 gp130 を信号伝達に必須の受容体コンポーネントとして共有する IL-6 ファミリーサイトカインは、gp130 の細胞内領域に会合するチロシンキナーゼの活性化が引き金となり、転写因子 STAT3 の活性化を代表とする細胞内シグナル伝達経路が開始させる。BMP ファミリーのサイトカインのシグナルは受容体型セリン/スレオニンキナーゼにより細胞内に伝達され、転写因子 Smad1, -5, -8 の活性化に至る。それぞれのファミリーの一員 LIF と BMP2 が胎生期マウス神経上皮細胞培養系に相乗的に作用しアストロサイトへの分化を誘導した。アストロサイトのマーカー蛋白 GFAP の遺伝子プロモーターの LIF と BMP2 による相乗的活性化に STAT3 と Smad 群の双方が必須であった。STAT3 と Smad1 の直接的な会合は観察されなかったが転写補助因子 p300 を媒介とした複合体形成が証明された。p300 をマウス神経上皮細胞に強制発現させると LIF と BMP2 による相乗的な GFAP 遺伝子プロモーター活性化が増強され、逆に変異型 p300 の強制発現によりそれが阻害された。これらのことから2つのサイトカインシグナルの p300 を介した核内クロストークの機能が証明された。その後の解析で、BMP2 をマウス神経上皮細胞に短時間パルス添加すると negative helix-loop-helix (HLH) 蛋白 Hes5, Id1, Id3 の発現誘導を介して MAP2 陽性ニューロンの出現を抑制させることが示された。神経上皮細胞に BMP2 をパルス添加して洗い去ったのちに LIF を添加するとアストロサイトが出現することなどを総合的に考慮すると、BMP2 は negative HLH 蛋白の発現を介して、ニューロンへの細胞系譜に向かうことが運命付けられた細胞の分化の進行を阻害し、それらを未分化状態に留めるよりもむしろグリア系の細胞系譜に運命付けを転換させることが推察された。

S11

哺乳類大脳皮質形成機構

°小川 正晴
理研・脳セ

哺乳類の大脳皮質では、クラスの異なる投射ニューロンが外表面に並行して層状に配列している。このような規則的なニューロンの配列を基盤に、大脳における層特異的な神経回路網が形成される。この皮質ニューロンによる規則的な組織構築は、特定のクラスのニューロンが特定される時間帯に脳室壁に誕生し、ついでこの部から軟膜側へと移動し、最後に特定の層に位置づけられる過程を通して形成される。自然発症突然変異マウスリーラー (reeler) の大脳皮質では、すべての皮質ニューロンが野生型のものと同じ場所で、同じ時間帯に誕生するが、最終的な空間位置が異常になる。ここ数年の間に、リーラーの原因遺伝子 (Reln)、その翻訳産物リーリン (Reelin) の一次構造が明らかにされ、ついでリーリンの標的細胞でこれに応答する細胞内因子 Dab1 が明らかにされた。この場合、Reelin は皮質に最初に現れるニューロンである Cajal-Retzius 細胞で特異的に産生され細胞外へと分泌される、一方、Dab1 は cortical plate neurons、将来の投射ニューロンを構成する、に発現する。さらに、予想もされなかったことに、リポタンパク質の受容体である apoER2 (apolipoprotein E receptor 2) および VLDLR (very low density lipoprotein receptor) が、リーリンの受容体であることが示された。また Fyn との結合活性から単離された新規カドヘリン様分子の CNRs (Cadherin-related neuronal receptor) もリーリン受容体であることが判明した。リーラーマウスの皮質構造、リーリンの作用を阻害する抗体を用いた実験例、Dab1 欠損マウスの皮質構造、各リーリン受容体の in situ の例などを示して、皮質ニューロンの空間配置に関わるリーリンシグナル伝達系について紹介してみる。

S12

高親和性コリン取り込みとアセチルコリン合成

°奥田 隆志, 芳賀 達也
東京大学大学院医学系研究科神経生化学

アセチルコリンは脳において記憶、学習などの高次機能に重要な役割を果たしている。アセチルコリンはコリンとアセチル CoA から合成されるが合成の律速段階はコリンアセチルトランスフェラーゼ活性ではなくコリン取り込みと考えられている。約 30 年前から、コリン作動性神経には Na^+ 依存性的高親和性コリン取り込み機構が存在しヘミコリニウム-3 によって特異的に阻害されることが知られていた。コリンは神経細胞では生合成されないため細胞外のコリンがシナプス前部に存在する高親和性コリントランスポーターによって細胞内に取り込まれアセチルコリン合成に利用される。90 年代に入って主要な神経伝達物質のトランスポーターのほとんどがクローニングされてきたがコリントランスポーターの分子実体は不明のままであった。最近、我々は線虫、ラットおよびヒトの高親和性コリントランスポーター (CHT1) をクローニングすることに成功した。CHT1 は神経伝達物質トランスポーターではなく Na^+ 依存性グルコーストランスポーターのファミリーに属していることが明らかになった。CHT1 はコリン作動性神経に局限して発現しており、古くから想定されていた高親和性コリン取り込みの機能特性をもっていることが分かった。CHT1 はアセチルコリン合成の調節機構を明らかにする上で重要な分子であると考えられる。本シンポジウムでは高親和性コリントランスポーター CHT1 の機能調節機構およびアセチルコリン合成との関係について最近の研究結果を紹介し、アセチルコリン合成の調節機構を考えたい。

ムスカリン性アセチルコリン受容体のノックアウトマウス

°松井 稔¹, 本村 大輔¹, 唐澤 博史¹, 藤川 徹², 蔭健², 小宮 百合子¹, 高橋 信一¹, 武藤 誠 M.¹
¹東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室, ²萬有製薬つくば研究所

ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) は、5つのサブタイプ (M_{1-5}) よりなり、その分布やシグナル伝達機構は異なっている。ムスカリン性リガンドのサブタイプ特異性は充分なものではないため、薬理的な機能解析には限界があった。そこで、私たちは別のアプローチとして、これらの受容体のノックアウトマウスを作出し、その表現型を解析した。これらのマウスのうち、 M_3 KO マウスでは、複数の異常が明らかであった (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 印刷中)。まず、離乳時より成長障害が観察された。瞳孔は軽度で散瞳していたが、対光反射は弱く残っていた。非選択的な mAChR の刺激時の唾液分泌量は、検出限界以下のレベルまで減少していた。利尿筋の収縮障害に相応して排尿障害に伴う膀胱の拡大が見られたが、これはオスに顕著で、排尿におけるコリン性支配機構には性差があることが示唆された。一方、消化管機能や生殖能力には明らかな異常を認めておらず、代償機構の存在が考えられた。また、 M_1 , M_2 , M_4 及び M_5 KO マウスが他施設より報告されているが、これらは外見的には正常である。 M_1 KO マウスについては、ハミルトンらが、痙攣や、交感神経節での M カレントが起きにくいことを報告している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 13311)。 M_2 KO マウスについては、ゴメザらが中枢性ムスカリン作動薬による振戦、体温下降、鎮痛の発生に障害のあることを示している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1692)。 M_4 KO マウスについては、ゴメザらが、ドパミン D1 受容体の作動薬による運動亢進が促進していることを報告している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 10483)。 M_5 KO マウスについては、イエオマンスらが、唾液分泌がわずかに減少していることを学会発表している。これまでの多くの薬理的知見によれば、レム睡眠、学習、記憶、認知などの様々な脳機能に mAChR が深く関わっているため、今後これらの機能についてさらに調べていく価値があると考えられる。

大脳皮質におけるアセチルコリンによる制御作用

°木村 文隆
 大阪大学大学院医学研究科バイオメディカルセンター神経生理

大脳皮質は前脳基底部よりアセチルコリン (ACh) 含有線維の投射を受けるが、皮質内情報処理に対する ACh の作用機序については不明な点が多い。培養細胞を用いた実験より我々は、ACh がほぼすべての EPSP と IPSP を、それぞれ $m4$, $m1$ 受容体を介してシナプス前性に抑制する事を示した。さらに、皮質内興奮伝播に対する ACh の作用を検討する目的で、皮質切片標本を用いて光学的計測を行った。その結果、ACh は皮質内由来の興奮に対しては広範に抑制するものの、上行性線維 (視床) 由来の興奮に対しては抑制が弱い事を示唆する結果を得た。また、この抑制もムスカリニック受容体 (mACh) を介するものであった。一方、視床由来の上行性線維終末には、ニコチニック受容体 (nACh) が局在し、その活性化は伝達物質の放出を促進するという可能性が考えられている。これらを総合すると、ACh は皮質内において、皮質内由来入力を mACh を介して抑制すると同時に、視床由来の上行性線維入力を nACh を介して促進するという、いわば入力をその由来によって制御している可能性が考えられる。その結果、皮質細胞は ACh 存在下では、非存在下に比較して視床由来の影響が、より優性になることが予測される。

S15

アセチルコリン作動性ニューロンと睡眠

°小山 純正, 香山 雪彦

福島県立医科大学生理学第二講座

中脳後部から橋にかけての領域 (外背側被蓋核: LDT, 脚橋被蓋核: PPT) に存在するアセチルコリン作動性ニューロンには、覚醒時にはほとんど発火せず、レム睡眠の時に特異的に活動の上昇するもの (PS-on ニューロン) や、レム睡眠と覚醒時に高い活動を維持するもの (WP ニューロン) など、いくつかのタイプが存在する。また、この部位には、同じような活動パターンを示す非アセチルコリン作動性ニューロンも存在する。一方、LDT を挟むような形で、セロトニンおよびノルアドレナリン作動性ニューロンが、視床下部後部にはヒスタミン作動性ニューロンが存在する。これらのモノアミン作動性ニューロンは、PS-on ニューロンとは逆に、覚醒時に高い活動が維持されるが、レム睡眠時には全く活動が停止してしまう (PS-off ニューロン)。これらのニューロン群の相互作用によって睡眠 (レム睡眠) の発現が調節されると考えられている。我々は、無麻酔のネコやラットを用い、睡眠の調節に関連すると思われる、PS-on、WP、PS-off ニューロン等に様々の神経伝達物質を投与し、これらのニューロンがどのような神経性入力を受けているかを調べてきた。その結果、

- (1) アセチルコリン作動性 PS-on ニューロンは、グルタミン酸により、非アセチルコリン作動性 PS-on ニューロンは、アセチルコリンによって興奮する。
- (2) これらの PS-on ニューロンは、ノルアドレナリンおよび GABA の抑制を受ける。
- (3) WP ニューロンは、ヒスタミン、ノルアドレナリン、グルタミン酸の興奮を受ける。
- (4) モノアミン作動性ニューロンのうち、ノルアドレナリン作動性ニューロンはアセチルコリンによって興奮し、セロトニン作動性ニューロンは抑制される。などの点が明らかになった。

以上の結果から、アセチルコリン作動性ニューロンを中心として、レム睡眠の調節機構について考えてみたい。

S16

アルツハイマー病治療薬塩酸ドネペジルの神経化学的特性および臨床効果

°小笹 貴史¹, 小倉 博雄¹, 山西 嘉晴²¹エーザイ株式会社 筑波研究所, ²Eisai London Research Laboratories

アルツハイマー病患者では、脳内のコリン作動性神経の著しい機能低下が認められ、このことが、この疾患の主症状である知的機能の障害の直接的原因であると考えられてきた。コリンエステラーゼ阻害剤は、神経終末から遊離されたアセチルコリンの分解を阻害することによりコリン作動性神経の機能を賦活することから、アルツハイマー病患者の知的機能の障害に有効であろうと考えられていた。しかし、従来のコリンエステラーゼ阻害剤では、薬物動態学的欠点や副作用のために十分な薬效を確認するに至らなかった。塩酸ドネペジルはアルツハイマー病治療薬として開発された新規コリンエステラーゼ阻害剤である。塩酸ドネペジルは、神経に局在し神経活動と深い関わりを持つアセチルコリンエステラーゼを選択的かつ強力に阻害する。塩酸ドネペジルによるアセチルコリンエステラーゼの阻害は可逆的で非競合的である。塩酸ドネペジルは脳内のコリンエステラーゼを強力に阻害するが、末梢組織、特に心臓、小腸中に含まれるコリンエステラーゼをほとんど阻害しない。塩酸ドネペジルは経口投与により十分量が脳内に移行し、脳内薬物濃度に応じて脳内コリンエステラーゼを阻害する。塩酸ドネペジルは脳内コリンエステラーゼ阻害作用に基づいて大脳皮質ならびに海馬の細胞外アセチルコリンレベルを持続的に上昇させる。このような生化学的作用に基づき、塩酸ドネペジルは種々の学習記憶障害モデルで改善作用を示す。塩酸ドネペジルの薬理学的特性は、アルツハイマー病治療薬としてのコリンエステラーゼ阻害剤の理想像に近いものである。塩酸ドネペジルの臨床での有用性は、軽度および中等度のアルツハイマー病患者を対象として日米欧で実施された二重盲験試験において立証された。理想に近い薬理作用を有する塩酸ドネペジルの出現により、アルツハイマー病患者の知的機能の障害に脳内コリン作動性神経の機能低下が深く関与していることがより明確なものとなったと考えられる。

S17

生体分子ネットワーク解析とバイオインフォマティクス

°五斗 進

京都大学化学研究所

ポストゲノム解析として、遺伝子の網羅的な機能解析やネットワークの解析が注目を浴びてきている。これらの新しい解析には、新しいタイプの実験技術に加え、計算機で様々な生物情報を解析するバイオインフォマティクスの新たな展開が必要である。ゲノムの機能解析やネットワーク解析時代のバイオインフォマティクスには、ホモロジー検索をはじめとする配列相同性に基づいた従来の様々な手法に加え、ゲノム上での遺伝子の位置情報や同じ機能を持つ遺伝子群を複数の生物種間で比較したり、遺伝子やタンパク質の発現パターンから機能や制御ネットワークを推定する手法などが必要となってきている。

我々の研究室でも、ポストゲノム時代のデータベース構築、そのデータを用いた解析手法の開発を研究課題としている。特に、個々の分子の配列や構造情報を中心とした従来の生物情報データベースだけでなく、分子間相互作用や反応のパスウェイをデータベース化することの重要性に着目し、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) プロジェクトを立ち上げた。KEGG では遺伝子のデータベースとともに反応パスウェイ・制御パスウェイのデータベースを構築してきた。現在、これに DNA マイクロアレイによる発現プロファイルや酵母 2 ハイブリッド系によるタンパク質間相互作用のデータベースを統合し、反応パスウェイも含む様々なタイプのネットワークを比較・解析するためのシステムを構築している。

発表では、KEGG のデータベースを中心に分子ネットワークのデータベースとそれを用いた解析手法について紹介したい。

S18

蛋白質間相互作用の網羅的解析とバイオインフォマティクス

°伊藤 隆司

金沢大学がん研究所遺伝子染色体構築研究分野

ヒトゲノムのドラフトシーケンスに象徴されるように、現代はまさにポストシーケンスの時代である。既に代表的な基軸モデル生物ではその基本設計図ともいえるべきゲノムに記載されている「部品」の全容が明らかにされ、全部品間の「回路図」を描くことが最重要課題となっている。その際に最も有効なアプローチとして Expression profiling による遺伝子発現制御ネットワークの解析と並んで注目されているのが、蛋白質間相互作用の系統的解析による蛋白質ネットワークの解明である。我々は、出芽酵母ゲノムがコードする 6000 の ORF を対象に、可能な全ての組み合わせでの相互作用を 2 ハイブリッドシステムを用いて検討するプロジェクトを進めて来た (Ito et al., Proc Natl Acad Sci USA 97, 1143-1147, 2000)。既にこの「総当たり戦」プロジェクトはそのデータ収集をほぼ終了し、3000 種類以上の相互作用情報を含む世界最大のデータセットが得られる見通しとなっている。そこで現在、我々はバイオインフォマティクスの研究者と共同でこのデータを中心に既知の相互作用データも統合した蛋白質間相互作用データベースの構築に取り組んでいる。これらのデータの十分な活用の鍵を握っているのはまさにバイオインフォマティクスである。我々は現在、1) 個々の相互作用の生物学的確からしさの客観的評価、2) 相互作用情報の統合による複雑なネットワークの抽出、3) 「ドメイン X はモチーフ Y を認識する」というような他の種でも成立する普遍的な相互作用ルールの発見、等々を目標にいくつかの試みを始めている。本シンポジウムではこれらの現状を紹介しながら、ゲノム機能解析におけるバイオインフォマティクスの役割を考えてみたい。

S19

大きい蛋白質をコードするヒト脳長鎖 cDNA の包括的解析

°中山 学, 長瀬 隆弘, 菊野 玲子, 小原 収
かずさDNA研究所ヒト遺伝子研究部

神経系の発生、脳の機能や神経疾患に「大きな蛋白質」が重要な役割をはたす例が数多く知られている。かずさDNA研究所では、「大きな蛋白質」に注目し、それらをコードするヒト脳由来の長鎖 cDNA 配列の包括的解析を行っている。我々は、網羅的に長鎖 cDNA 解析を行うことにより従来のアプローチでは見出すことができなかったような遺伝子の存在を明らかにすることを目指して、主に2つの方向から塩基配列の決定を進めている。1つ目のアプローチは、長鎖 cDNA を無作為に選り塩基配列を順次決定していくことである。既に1500種類の新規遺伝子の配列決定を行った結果として（平均長が5kbpであるので、7.5Mbpを超える。）、公的なデータベースに登録されている4kbp以上のヒト cDNA 配列の半数近くが我々の同定したもので占められている。現在までに得られた結果をまとめると1) 大きい蛋白質の予測される機能は、細胞間相互作用／シグナル伝達機能、細胞骨格／モーター機能、転写制御／核酸構造制御に分類できる。2) 相同性の低さのために存在が明らかではなかったパラログ、オルソログを効率良く単離することができた。3) 部分配列で比べても全くホモロジーのない「大きな蛋白質」が多数見つかった。別のアプローチとして、特定のモチーフを含む新規蛋白質をコードする遺伝子を系統的に探索するためにモチーフトラップ法を開発した。この方法により細胞接着や受容体とリガンド結合などの細胞外の蛋白質相互作用に深く関与すると考えられている EGF 様モチーフを複数個持つことを指標にして、9種類の新規遺伝子を同定した。その中の1つである MEGF1 は、2個の EGF 様モチーフだけではなく34個のカドヘリンモチーフを持つ約480kDaの巨大な膜蛋白質であり、その mRNA は小脳の顆粒細胞で特異的に発現する。MEGF1 蛋白質は、小脳の分子層で（平行線維の直径とはほぼ同じ位の長さの）巨大な細胞外ドメインを突き出し、平行線維を束化する機能を持つことが考えられる。この蛋白質を例に、大きい蛋白質が持つ特殊な機能に関して討論すると同時にかずさDNA研究所の cDNA プロジェクトの将来の方向性を紹介する。

S20

From Genes to Dynamic Molecular Networks

°Roland Somogyi, Alan Ableson, Max Kotlyar, Steve Misener, Hai Pham, Evan Steeg
Molecular Mining Corporation

In-depth understanding of molecular networks promises much needed insight into complex diseases, novel drug targets, and integration of diagnostics with treatments for individualized therapies. Recent progress in molecular biology, measurement technologies and computational performance is making it possible to systematically investigate these regulatory networks. On the one hand, high-throughput methods are providing us with global gene activity profiles characterizing the output of genetic networks. On the other hand, the challenge now lies in applying advanced data mining and modeling methods for discovering novel functional connections between genes and their integration into pathways and networks. While clustering co-expression profiles may aid in the exploration of shared regulatory inputs and functional pathways, we must take the next step of identifying direct causal relationships, i.e. who is regulating whom and how. There are several approaches to this problem of network reverse engineering, ranging from discrete, to continuous linear and non-linear models. Opportunities are now arising for taking a major leap forward in data mining for the discovery of highly valuable predictive relationships, in silico exploration of global behavior in network models, and systematic experimental design to provide the biological facts for network inference.

S21

ATP 受容体の脳内生理機能：オーバービュー

°井上 和秀
国立医薬品食品衛生研究所

ATP受容体はイオンチャネル内蔵型P2X群とG蛋白共役型P2Y群に分類され脳内にも広く分布することが知られている。最近になって脳内においてどのような機能を担っているかが次第に明らかになりつつある。特にATPが、ミクログリアにおいては既知のメカニズムとは異なる情報伝達系を介してMAPK活性制御、ラッフル形成やサイトカイン放出などの著明な生理反応を引き起こすこと、海馬神経系では強力な抑制作用と虚血状態からの機能回復促進作用を示すことなどが明らかになった。これらはシナプス回路網の機能制御・維持と障害からの回復にATP受容体が深く関与する可能性を示唆しており、今後の研究の進展が待たれる。そこで、今回のシンポジウムでは、これらの研究を第一線で鋭意進められている方々をお招きし、本シンポジウムの趣旨に添ったご発表をいただく。それらの簡単な紹介とそれを取り巻く国内外の研究の現状をまとめ、シンポジウムに参加された皆様のご興味をいっそう喚起し、シンポジウムの主旨をご理解いただくためのオーバービューをする。

S22

ミクログリアにおけるATP誘発性ラッフル形成とケモタキシス

°本田 静世, 佐々木 洋, 金澤 裕子, 大澤 圭子, 今井 嘉紀, 高坂 新一
国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

細胞外に放出されたATPが中枢神経系において、神経細胞のみならず、グリア細胞の機能調節も行いうることが、近年明らかになりつつある。脳内の免疫系において重要な役割を担っていることが知られているミクログリアにおいても、P2レセプターの発現とともにATPによるいくつかの作用が知られている。我々もこれまでに、ATPがミクログリアにおいてプラスミノーゲンの放出を促進し、その効果はP2X₇レセプターを介している事を報告してきた。

ミクログリアは様々な神経疾患や脳の傷害に应答して活性化型ミクログリアとなり、その性質を変化させることが知られているが、その際の初期の応答として、脳内の病変や傷害部位へのミクログリアの集積が知られている。今回、我々はこのミクログリアの走化性を誘導する因子としてATPに注目し、その効果をラット初代培養ミクログリアを用いて検討した。

細胞外に添加されたATPやADPはミクログリアにおいてラッフル形成を促進し、併せてケモタキシスを誘導することが明らかとなった。ATPやADPによるラッフル形成は、細胞外のカルシウムを除去しても阻害されず、又いくつかのP2レセプターに対するアンタゴニストとして知られるsuraminやPPADSによる前処理によっても阻害されなかったが、百日咳毒素の前処理によって完全に抑制された。以上のことから、ATPやADPによるミクログリアのラッフル形成にはGi/o共役型のP2Yレセプターの関与が示唆された。また、細胞内のシグナル伝達分子として、ラッフル形成や細胞の運動に関与することが知られている単量体G蛋白であるRacの活性化を、細胞免疫染色とブルダウン法によって調べたところ、ATPやADPはミクログリアにおいてRacの活性を促進することが明らかとなった。Gi/o共役型のP2YレセプターからRacの活性化に至るシグナル伝達に関しては現在不明である。

S23

ATP によるミクログリアからの TNF- α 遊離機構

°秀 和泉, 鈴木 智久, 井上 敦子, 仲田 義啓
広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学

ミクログリアは炎症や脳虚血時に活性化され種々のサイトカインを産生放出する。そのうち、TNF- α は強力な起炎性をもち脳組織破壊を引き起こすとともに、オリゴデンドロサイトにアポトーシスを誘導する。一方、TNF- α は NF- κ B の活性化を介して神経保護作用も発揮する。このような TNF- α の多彩な生理的役割は現在急速に解明されつつあるが、産生細胞からの TNF- α 遊離の制御機構についてはほとんど知られていない。ATP はエネルギー源として細胞に高濃度存在し脳傷害時に細胞質から漏出する。また、脳異常興奮時には神経からも大量に放出される。細胞外に放出された ATP は近傍に存在するミクログリア表面の ATP 受容体に結合する。ミクログリアには少なくとも G 蛋白質共役型 P2Y₂ とイオンチャネル内蔵型 P2X₇ の ATP 受容体の存在が明らかにされている。そこで私達はミクログリアからの TNF- α 遊離に対する ATP の効果を検討し、ATP が TNF- α 遊離促進作用をもつことを見出したので報告する。

ミクログリアはラット新生児大脳より初代培養した。ミクログリアに ATP を作用させると顕著な TNF- α 遊離を引き起こされた。これまでに、ATP は LPS による priming を受けたミクログリアから IL-1 β 放出を惹起することが示されている。それに対し ATP による TNF- α 遊離は priming を必要とせず、ATP 単独で TNF- α の遺伝子転写、蛋白産生および細胞外への放出を引き起こした。TNF- α 遊離は高濃度 (1 mM) の ATP により引き起こされ、高濃度 Mg²⁺ 存在下で減少し、これらは ATP⁴⁻ により活性化される P2X₇ 受容体の性質を反映するものと思われた。さらに P2X₇ 特異的アゴニストである 2', 3' -O-(4-benzoylbenzoyl)-adenosine 5' -triphosphate によっても TNF- α 遊離が引き起こされた。P2X₇ は約 900 Da までの分子を通過させる pore を形成するが、pore 形成と TNF- α 遊離には相関は認められなかった。また、ATP による TNF- α 遊離は MEK 阻害薬 (U-0126) および p38 阻害薬 (SB203580) により阻害されたが、PKC 阻害薬による抑制は認められなかった。従って、ATP による P2 (おそらく P2X₇) 受容体活性化は ERK および p38MAPK 活性化を介して TNF- α 遊離を引き起こすこと、またこのカスケードには PKC は関与しない可能性が示された。その他 P2 受容体を介した一連のシグナルの役割についても併せて報告する。

S24

ATP 受容体の脳内生理機能と Ca²⁺ 動態

°小泉 修一, 井上 和秀
国立衛研・薬理

ATP は、中枢神経-グリア細胞間の情報を媒介する液性細胞間情報伝達物質として注目を集めている。海馬初代培養神経細胞では、glutamate の神経伝達による自発的な Ca²⁺ oscillation 及び内向き電流が観察されるが、これは ATP 刺激により抑制される。この ATP による抑制作用は、glutamate 神経終末に存在する P2Y 型受容体を介し、N- もしくは P/Q- 型電位依存性カルシウムチャネルが抑制され、glutamate 放出が抑制されることに起因していた。一方海馬初代培養アストロサイトでは、ATP 刺激により、P2Y 型受容体を介した、inositol-1,4,5-trisphosphate 産生による Ca²⁺ 遊離及びそれに続く容量性 Ca²⁺ 流入の二相性の変化を呈する細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇が認められた。アストロサイトから ATP が放出されることが報告されているが、前述した [Ca²⁺]_i 上昇は、機械刺激を与えたアストロサイト周辺部の細胞で観察され、これは ATP 拮抗薬で消失した。従って、機械刺激により ATP が放出され、この内因性 ATP によってもアストロサイトの二相性 [Ca²⁺]_i 変化が再現されることが明らかとなった。機械刺激により放出された ATP により惹起された [Ca²⁺]_i 上昇は、Ca²⁺ wave となって少なくとも 250 μ m 離れた細胞にまで到達した。神経及びグリア細胞が共存する培養細胞で、アストロサイトに機械刺激を与えると、アストロサイト間に Ca²⁺ wave が伝播して行った。この Ca²⁺ wave が神経細胞に到達した時、神経細胞で観察されていた Ca²⁺ oscillation は抑制された。つまり、アストロサイトから放出された内因性 ATP が、神経活動を制御したのである。これらの知見は、ATP が in situ でも、神経細胞間、グリア細胞間さらには神経-グリア細胞間の情報伝達を担う重要な液性因子であることを強く示唆するものである。

S25

ATP 受容体の脳虚血に対する防御作用

°西崎 知之

神戸大学医学部第一生理

海馬神経伝達に対する ATP の効果を調べるため、モット海馬切片において貫通枝を電気刺激し顆粒細胞層から集合電位 (PS) を記録した。ATP は濃度依存性 (0.1 μ M-1 mM)、かつ可逆的 PS 抑制作用を示した (100 μ M 以上で完全消失)。この ATP 作用は選択的 GABAA 受容体阻害剤、ピククリンで抑制された。また、ATP と類似した抑制作用が P2 受容体アゴニスト (a,b-methyleneATP>2-methylthioATP>>>UTP $\approx$ b,g-methyleneATP) でも認められ、a,b-methyleneATP の作用は P2 受容体アンタゴニストであるスラミン、PPADS で抑制された。脳虚血障害に対する ATP の効果を調べるため、20 分間の無酸素・無グルコース処理後の PS 回復を調べた。コントロール群では処理後 1 時間で基準値の 30% しか PS が回復しなかったのに対し、ATP 投与群では 80% にまで回復した。ADP、AMP でも PS 回復が認められたが、ATP よりもその作用は弱く、アデノシンはコントロールと差がなかった。以上の結果は、ATP が P2X 受容体を介した GABA 神経伝達を増強することにより脳虚血障害を軽減する、ことを示唆している。

S26

ATP 受容体による脳幹内シナプス伝達の制御

°加藤 総夫

東京慈恵会医科大学・医・薬理2

脳虚血・低酸素などの病的状態下における細胞外 ATP 濃度の変動は、代謝産物アデノシンとともに、脳幹に局在する呼吸・循環制御神経機構などの「生命維持」ネットワークに直接影響を及ぼして、さまざまな呼吸・自律応答をひき起す。延髄背側の孤束核には、アデノシン・トランスポーター、 A_1 受容体タンパクおよびリガンド結合部位、P2X₂、P2X₄ および P2X₆ 受容体の mRNA、P2X₂ および P2X₃ 受容体サブユニット、ならびに、ATP 受容体リガンド結合部位が高密度に発現しており、細胞外プリンをメディエーターとした中枢性自律応答において中心的役割を果たしていると予想される。我々は、ATP 受容体群が孤束核内の興奮性および抑制性シナプス伝達を制御するという仮説を立て、スライス標本で、小型孤束核内在性ニューロンの興奮性シナプス後電流および大型出力系ニューロンの抑制性シナプス後電流をパッチクランプ法で記録し、ATP ならびに関連受容体活性化の影響を検証してきた。その結果、(1) 入力ゲイン制御、(2) 内因性 tonus 維持、および、(3) 他神経構造への出力形成の三相を、シナプス前後に発現するそれぞれ異なるプリン受容体群が特異的に制御している事実を見い出した。これらの制御には、ATP からアデノシンへのダイナミックな変換や、シナプス前 P2X 受容体活性化による直接的グルタミン酸放出などのさまざまな分子機構が関与している。これらの P2X 受容体体系による孤束核内シナプス伝達の制御が、脳脊髄液プリン濃度の上昇を検出して諸種自律出力系神経機構の最適化応答をひき起す主要な情報転換機構である可能性について述べる。

S27

低酸素・虚血ストレスにより誘導される新規ユビキチン様蛋白 SUP のクローニング及び機能解析

堀 修^{1,3}, 山口 淳^{2,3}, 北尾 康子¹, 遠山 正彌^{2,3}, 小川 智^{1,3}

¹金沢大学医学部医学科神経解剖 (解剖学第3) 講座,

²大阪大学・院・医・機能形態学講座, ³CREST, JST

中枢神経系構成細胞のうち、アストロサイトは極めて虚血に強く、虚血後の組織修復、あるいは組織障害に深く関わっていると考えられる。アストロサイトの低酸素ストレスへの応答を解明するため、培養ラットアストロサイトを用いて differential display を行い、低酸素ストレスにて誘導される新規ユビキチン様蛋白 SUP (Stress-associated Ubiquitin-like Protein) をクローニングした。SUP は、391 アミノ酸からなる蛋白で、N 末端にユビキチン様ドメインを、やや C 末端よりに、疎水性領域を有していた。SUP の発現は、低酸素以外でも、いわゆる小胞体ストレスあるいは脳虚血モデルにおいて誘導された。形態学的及び生化学的検討から、SUP はストレス下の細胞において主にゴルジ装置及び小胞体に局在していると考えられた。deletion mutant を用いた解析から、SUP は膜蛋白であることが確認され、また、そのユビキチン様ドメインは、SUP の安定性に関与していることが示唆された。アデノウイルスを用いて、SUP の anti-sense cDNA を Hela 細胞あるいは培養アストロサイトに導入すると、低酸素下及び低酸素再酸素化における VEGF あるいは IL-6 の細胞外分泌は抑制され、また、長時間の低酸素ストレスに対し、アストロサイトの生存率は低下した。これらのことより、SUP は、ゴルジ装置及び小胞体膜に局在する新規ユビキチン様蛋白で、直接あるいは間接的にストレス下における蛋白分泌に係わり、ストレス応答に重要な役割を担っている事が示唆された。

S28

小胞体機能の制御による虚血性神経細胞死の抑制

玉谷 実智夫^{1,6}, 松山 知弘², 山口 淳^{1,6}, 塚本 吉胤³, 谷口 学^{2,5}, 柳 秀樹⁴, 小川 智⁵, 遠山 正彌^{1,6}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座, ²兵庫医科大学第五内科, ³国立循環器病センター病理部, ⁴HSP 研究所, ⁵金沢大学第三解剖学講座, ⁶科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業

脳虚血による神経細胞死は脳細胞への血流の途絶という単純な原因で発生するが、その要因として興奮性アミノ酸の神経毒性、細胞内カルシウム濃度の上昇、酸素及びグルコースの枯渇、フリーラジカルの産生等が報告され、実際の虚血性神経細胞死においてはこれらの要因が複雑にからみあっていると考えられる。また、従来、脳虚血の際に認められる神経細胞死はネクロシスの形態をとると考えられてきたが、最近では penumbra においてアポトーシスを示す報告があいついでなされている。アポトーシスを介する細胞死は精密に制御された遺伝子の転写を介して起こり、その制御に関わる重要な遺伝子が次々とクローニングされ個々の役割が解析されてきた。しかしながら、虚血による神経細胞死において、いかなるシグナル伝達のネットワークを作っているかは明らかでない。

一般に細胞の生存に危機的な環境変化が起こると細胞機能を保護するためストレスタンパク質と総称されるタンパク質が合成される。脳虚血巣においては熱ショックタンパク質に代表されるストレスタンパク質が発現している事実が報告され、虚血負荷に対する脳細胞のストレス応答の存在が明らかになってきた。脳細胞群の中でアストロサイトは中枢神経系を構成する細胞群のなかで、極めて虚血に強いだけでなく、虚血後の組織修復に重要な役割を担っている。培養系においてもアストロサイトは低酸素暴露に対し耐性を示し、この時 78kDa Glucose regulated protein (GRP78), GRP94 に加え最近クローニングされた 150 kDa Oxygen-regulated protein (ORP150) 等のストレスタンパクが誘導される。我々はこの ORP150 の発現を HEK 細胞においてアンチセンスにより抑制することにより低酸素暴露によるアポトーシスを亢進させることを認めており、虚血巣での神経細胞の生存において小胞体に局在するこのストレス蛋白が重要な役割を果たしていると推測される。本シンポジウムでは虚血性神経細胞死における小胞体ストレス蛋白 ORP150 の役割に関して、遺伝子導入および発生工学的手法を用いた最近の我々の知見を中心に考察したい。

S29

新規シナプス蛋白, mint family, の脳内局在と虚血後の発現変化

°松山 知弘, 岡本 昌也, 中島 八束, 西村 裕之, 杉田 實

兵庫医科大学第五内科

神経伝達物質放出に関するシナプス小胞輸送機構はシナプス小胞の細胞膜への docking, priming, fusion/exocytosis, endocytosis など幾つかのステップで構成されている。Exocytosis には多くの機能蛋白が関与する。Mint (munc18-1 interacting protein) は小胞輸送蛋白である munc18-1/syntaxin1 と複合体を形成する新規の adaptor protein としてクローニングされ (Okamoto and Sudhof, J Biol Chem, 1997)、シナプス小胞の fusion/exocytosis への関与が示唆されている。Mint には mint1-3 の 3 つの isoform があり、mint1 と mint2 は神経特異的である。このうち、mint1 は一方で CASK/velis/mint1 複合体を形成し、受容体蛋白の細胞膜への sorting への関与も報告されている。このようなシナプス小胞蛋白は蛋白/蛋白相互作用を介して神経伝達機構に重要な役割を担っているが、その脳内局在や脳虚血時の神経伝達障害における意義は不明である。我々はまず mint1 と mint2 の脳内局在と微細局在を決定した。免疫組織化学と in situ hybridization の検討からは mint1 の前シナプス終末の active zone における局在と、mint1 と mint2 の脳内分布の差を明かした。すなわち、mint1 は大脳辺縁系やカテコラミン産生細胞に発現が強く、mint2 は脳全領域ではほぼ均一に発現していた。さらに、虚血後変化をマウスの一過性前脳虚血モデルを用いて検討すると、虚血後海馬 mossy fiber の mint1 染色性は一過性に低下し、その後染色性の亢進を認めたが、mint2 は虚血前は mossy fiber に認めず、虚血後 CA3 で染色性の亢進をみた。以上の所見は海馬遅発性神経細胞死の過程に生じる小胞輸送機構の破綻を示唆する。脳虚血後の神経伝達機能異常のメカニズムのひとつとして小胞輸送蛋白機能変化が考えられる。

S30

霊長類に特異的な虚血性神経細胞死

°山嶋 哲盛

金沢大学医学部脳神経外科学, SPSBS

高齢化社会において増加が予想される種々の脳疾患の根本原因である「神経細胞死」の病態解明と治療法開発に関しては、従来主としてげっ歯類を対象として数多くの研究がなされている。しかし、そのメカニズムに関しては現在なお不明な点が多く、画期的な治療法や神経細胞保護の具体的な方策はない。ヒトの脳を守るストラテジーを開発する事を詳細目標とし、演者のグループは従来 250 頭のサルを用いてプロジェクトを推進してきた。即ち、(1) げっ歯類の研究で得られた分子・遺伝子レベルでの最新の成果を還元しつつ、(2) 分子生物学関係のみならず PET や MRI 等の最新機器をも駆使して神経細胞死のメカニズムと診断法を検索し、(3) ヒトの病気の予防と治療に直接役立つ成果を得た。具体的には、サルを用いて全身麻酔下で 20 分間全脳完全虚血モデルを作製し、実験後 5 日目に完成する海馬 CA1 ニューロンの遅発性神経細胞死に関する多角的な解析を行った。その結果、死につつあるニューロンにおけるシステインプロテアーゼの動態に関しては、カルシウムによって活性化されたカルパインがリソソーム膜を分解する為、カテプシン B、L がリソソーム外に放出されることを発見した。また、特異的インヒビターの治療効果に関しては、CA-074 や E-64c、ピタミン B6 (塩酸ピリドキサル) 等のカテプシン・インヒビターが虚血性神経細胞死を抑制することを発見し、演者はカルパイン-カテプシン仮説を提唱した。(参考総説論文: Yamashita T: Prog. in Neurobiol. 62: 273-295, 2000)。霊長類の虚血性神経細胞死は光顕的には好酸性の凝固壊死を呈し、電顕的には膜の損傷を示すがアポトーシス小体は皆無である。即ち、形態学的にはアポトーシスではなくネクロシスの像を呈する。にも拘わらず、ミトコンドリア因子の放出やカスパーゼ 3 の高発現と活性化、および CAD の胞体から核内への移動等が観察されることより、サルにおいてもアポトーシス・カスケードが動いていると思われる。本シンポジウムでは、げっ歯類のデータを勘案しつつ霊長類に特異的な虚血性神経細胞死の病態と治療法について言及する。

S31

活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構

°中別府 雄作

九州大学生体防御医学研究所生化学部門, 科学技術振興事業団・戦略的基礎研究推進事業

個体発生において神経前駆細胞は胎生期から出生直後にかけて分裂増殖するが、神経細胞に分化し神経回路網を構築すると分裂能を失う。神経細胞はその個体の生涯を通して生存し機能する必要があるが、分裂能を欠くため加齢に伴う障害により変性脱落する運命にある。そのため成人においても神経前駆細胞からの新たな神経細胞の供給など神経回路網を保持する機構が幾重にも用意されていると考えられる。

神経伝達物質の放出など神経細胞の機能を保持するために必要な大量のエネルギーのほとんどは、ミトコンドリアでの酸素呼吸により供給されている。ところが、酸素呼吸では反応性の高い活性酸素が常時発生するため、神経細胞はその活動を維持する上で活性酸素による酸化障害の危機に常に曝されている。

我々は、これまで「DNAの酸化障害とその防御機構」について研究を進め、生物は酸化されたDNAを修復する機構とそのヌクレオチド前駆体の酸化体を分解、排除する機構を備え、活性酸素による酸化障害の危機に対抗していることを明らかにした。神経細胞の核DNAは複製されないことから、その生存と機能保持には核ゲノム情報の維持が必須であり、さらに神経細胞の機能保持にはミトコンドリアDNAの維持も重要である。我々は、「DNAの酸化障害」が神経細胞の寿命を決定する主要因の1つであると考えている。アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳では酸化塩基「8-オキシグアニン」の蓄積が明らかにされており、「DNAの酸化障害に対する防御機構」の異常がこのような神経変性疾患の危険因子となっている可能性が高い。

このような考えに基づき、我々はヒト細胞から酸化DNA損傷の修復に関わる3つの酵素、酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 (*MTH1* 遺伝子産物)、2-ヒドロキシアデニン/アデニンDNAグリコシラーゼ (*MYH* 遺伝子産物)、8-オキシグアニンDNAグリコシラーゼ (*OGG1* 遺伝子産物)を同定し、その機能や発現の調節機構の解析を進めている。これら3つの遺伝子産物の機能と細胞内局在の調節、さらにヒト神経変性疾患での発現の変動など、最近のデータについて紹介したい。

S32

脳虚血とトランスポーター

°山田 和雄

名古屋市立大学医学部脳神経外科

脳虚血にともない神経細胞とアストロサイトは種々のストレスを受ける。ここでは脳浮腫発生と関連の深い2つのチャンネル・トランスポーターに注目し、虚血後の神経細胞死との関連を検討した。

(1) アクアポリン: 水チャンネルであるアクアポリンの1、3、4、5、8型について、脳虚血時のmRNA発現を解析した。その結果、4型が虚血周囲の反応性アストログリアで特異的に発現亢進し、蛋白レベルでも増加を確認した。1型については脈絡叢で発現していたが、虚血に伴う変化はみられなかった。また3、5、8型の脳内発現は見られなかった。4型の虚血周囲での特異的発現は虚血数日後にみられ、虚血性浮腫の広がりとも一致していたので、虚血性浮腫の修復に働いていることが推定された。そこで虚血性ストレスを与えず、細胞外浮腫のみをきたす凍結脳損傷モデルで再度4型の発現をみると、浮腫の伸展範囲に一致して損傷の数日後に発現のピークをみとめた。これらの事実からアクアポリン4型は虚血性脳浮腫の修復に働き、浮腫の伸展を防止することで神経細胞死を防止していることが示唆された。

(2) ミオイノシトール・トランスポーター (SMIT): 神経細胞に存在するオスモライト・トランスポーターのひとつで、細胞外浸透圧の上昇に伴って細胞膜での発現が亢進し、細胞内浸透圧の恒常性を保つことが知られている。ここでは細胞外浸透圧の恒常性を乱すラットクモ膜下出血モデルでSMIT mRNAと蛋白の発現を解析し、虚血の程度を示すhsp70 mRNA発現と対比した。その結果、出血6時間後に海馬や大脳皮質の神経細胞はhsp70 mRNAの発現が最も強くなり、この時期に虚血の影響を強く受けるが、SMITのmRNA発現はhsp70発現から数時間遅れて同じ部位に発現が見られた。したがって、脳虚血においても浸透圧ストレスが虚血部位で起こり、SMITはこれを修復するために発現することが示唆された。このモデルではネクロシスは起こらずアポトーシスのみが海馬にみられる。浸透圧環境の修復機構がネクロシスの防止に関連しているのかもしれない。

シナプス機能とホスファチジルイノシトール代謝：序論

°阿部 輝雄

新潟大学脳研究所

過去7年程の間に、シナプスにおける神経伝達物質放出の分子機構に関する研究は急速に展開し、SNAP 受容体(SNARE)が放出において中心的役割をはたしており、その他いくつかの蛋白質が関与していることが明らかになった。カルシウムの流入によって惹起される、これらの分子間の相互作用カスケードが放出を導くと考えられるが、その相互作用の詳細は不明である。シナプス小胞はエキソサイトーシスによってその内部の神経伝達物質を放出した後、エンドサイトーシスによって神経終末内部に取り込まれ、いくつかの段階を経て再び放出に利用される。このシナプス小胞サイクルは多くの段階で制御を受けていると予想され、これらの制御は脳高次機能の基をなすシナプス可塑性において重要な役割をはたしているものと思われる。ホスファチジルイノシトールの代謝産物はセカンドメッセンジャーとして、また標的蛋白質との結合を通じて、多彩な機能をはたしていることが明らかになってきている。当然、シナプス機能においても重要な役割を担っていることが予想されるが、それに関する知見は乏しい。しかし、最近の研究によってシナプス小胞サイクルをはじめとする神経終末の機能にホスファチジルイノシトール代謝が関与することが示唆されている。このシンポジウムではホスファチジルイノシトール代謝の、細胞運動からシナプス小胞サイクルにいたるまでの過程における関与を中心に、この分野で積極的に研究を進めておられる方々の講演とそれに基づく討論を行い、今後を展望する。

細胞膜リン脂質代謝と細胞運動

°金保 安則¹, 本田 晶^{1,2}, 野上 真宏^{1,2}, 宮崎 秀幸^{1,2}, 山崎 正和^{1,2}

¹東京都臨床医学総合研究所薬理研究部門, ²東京工業大学生命理工学研究科

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) はホスファチジルイノシトール 4-リン酸のイノシトール環 5 位をリン酸化してホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP2) を産生するリン脂質キナーゼであり、現在までに 3 つの PIP5K アイソザイム (α , β , γ) がクローニングされている。PIP5K はそれが産生する PIP2 を介して種々の細胞内シグナル伝達やアクチン細胞骨格の制御に関与していると考えられているが、その活性制御機構や詳細な生理機能については解明されるべく多くの問題点が残されている。PIP5K の活性制御機構については、低分子量 G 蛋白質の RhoA や Rac1 が活性化因子である可能性が報告されているが、その詳細は不明である。我々は、リコンビナント PIP5K α を用いた再構成系を利用してウシ大脳細胞質から GTP γ S 依存的な PIP5K α 活性化因子を精製し、その本体が RhoA や Rac1 とは異なる低分子量 G 蛋白質の ARF であることを明らかにした。さらに、HeLa 細胞に一過的に発現させた ARF と PIP5K α は EGF 刺激により形成されるラッフル膜へ移行し、ドミナントネガティブ ARF 変異体は EGF によるラッフル膜形成を完全に阻害することを見いだした。これらの結果から、PIP5K α は ARF により直接活性化され、このシグナル伝達経路はラッフル膜形成にカップルしていることが示唆される。発生過程における神経回路網形成は神経突起の先端に位置する成長円錐が誘因・反発因子を認識して正しい経路やターゲットを選ぶことにより進行する。成長円錐には細胞運動に重要なフィロポディアやラメリポディア (ラッフル膜) が形成されており、これらの膜形態は神経突起の伸長に重要である。これらのことと上記の結果を考え合わせると、PIP5K が神経突起の伸長に関与している可能性が十分考えられる。我々は、PIP5K が神経突起形成に関与している予備的知見を得ており、神経突起形成における PIP5K の役割についても議論したい。

S35

神経伝達物質放出に関与するホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ

°有岡 学¹, KLENCHIN Vadim A.², 柴崎 芳一³,MARTIN Thomas F.², 北本 勝彦¹¹東大院・農生科・応生工, ²University of Wisconsin-Madison, ³東大・医・糖尿病代謝内科

PC12 細胞は脱分極刺激等による Ca^{2+} の細胞内流入にตอบสนองして有芯小胞からノルエピネフリン (NE) を開口放出するが、この機構は様々な点でシナプス終末における神経伝達物質放出機構と類似している。我々は細胞膜を部分的に破壊した PC12 cell ghost を用いた *in vitro* での開口放出再構成実験系を利用し、その分子機構の解析を行っている。NE の放出は ATP、 Ca^{2+} および細胞質を必要とするが、それらは異なる段階に必要とされ、このうち ATP と細胞質を要求する段階をプライミング、 Ca^{2+} と細胞質を要求する段階をトリガリングと呼ぶ。プライミングは NE 放出に必須ではないが、トリガリング反応における Ca^{2+} 依存性の開口放出の効率を著しく上昇させる。

これまで細胞質画分のゲルろ過解析から、プライミングに必要な細胞質因子として、PEP (Priming in Exocytosis Proteins) 1, 2, 3 の3つの画分が見出されている。このうち PEP2 は未知であるが、PEP1 が I 型ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PIP) 5-キナーゼを含む ~500 kDa のタンパク質複合体であること、PEP3 がホスファチジルイノシトール輸送タンパク質 (PITP) であることが明らかにされている。I 型 PIP5-キナーゼには α 、 β 、 γ の3つのアイソザイムが知られているが、このうち γ は脳に豊富に存在し、またその挙動がプライミング活性と最もよく相関することが知られている。そこで γ をバキュロウイルス発現系を用いて His タグ付き蛋白として発現させ、精製タンパク質を用いて分泌アッセイを行った。その結果、明瞭なプライミング活性が認められ、またその効果は PITP と相乗的であった。 γ を抗原として抗体を作製したところ、この抗体はウエスタンブロットにおいて α とは反応性が低く、 γ を特異的に認識した。この抗体をラット脳より調製した PEP1 を含む画分を用いたプライミング反応系に加えたところ、プライミングを顕著に阻害した。以上の結果より、 γ が PEP1 によるプライミング反応において中心的な役割を果たすことが示唆された。本シンポジウムでは、これらの結果と併せて PIP5-キナーゼ γ の細胞膜への局在化についても議論したい。

S36

Phosphatidylinositol metabolism and synaptic vesicle recycling

°Yasuo NEMOTO

RIKEN Brain Science Institute

To preserve synaptic transmission over long periods, synaptic vesicles have to be recycled in nerve terminals with high efficiency and specificity. We have recently identified synaptotagmin 1, and its interacting protein, endophilin 1, as putative regulators of synaptic vesicle recycling by clathrin-mediated endocytosis in nerve terminals. It has been shown that synaptotagmin 1 is a major phosphoinositide phosphatase in brain and that endophilin 1 is a lysophosphatidic acid acyltransferase involved in lipid remodeling in nerve terminals.

To test the role of synaptotagmin 1 in synaptic vesicle trafficking, we generated synaptotagmin 1 deficient mice. Synaptotagmin 1 deficient neurons accumulate clathrin-coated vesicles in nerve terminals and display enhanced synaptic depression during prolonged high frequency stimulation followed by delayed recovery. We further tested the acute effect of disruption of synaptotagmin 1 and endophilin 1 function by microinjection into the lamprey reticulospinal synapse. Anti-synaptotagmin 1 antibodies or a peptide that inhibits the endophilin 1-mediated recruitment of synaptotagmin 1 to the membrane produced a stimulus-dependent depletion of synaptic vesicles and accumulation of clathrin-coated vesicles. By contrast, injection of anti-endophilin antibodies resulted in an arrest of clathrin-mediated endocytosis at early stages and accumulation of shallow coated pits without constricted necks.

Thus, synaptotagmin 1 is required for an uncoating of clathrin coated vesicles to generate synaptic vesicles in nerve terminals. Endophilin 1 plays a critical role in change of membrane curvature during coated pit invagination possibly through conversion of lysophosphatidic acid to phosphatidic acid, as well as in regulation of coated-vesicle uncoating by synaptotagmin 1.

S37

イノシトールリン酸と cADP-ribose による Ca^{2+} 動員

°橋井 美奈子, 東田 陽博

金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学

ニューロンのシナプス伝達が行われるためには、膜電位作動性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入につづいて、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の関与が考えられている。今回、この CICR にリアノジン受容体がどのように有効に働き、神経細胞内 Ca^{2+} を上昇させるのか、特に最近セカンドメッセンジャーとして注目を集めている、サイクリック ADP リボース (cADPR) に焦点をあてて調べた。

方法は NG108-15 神経腫瘍細胞を用い、パッチクランプ下で fura-2 による Ca^{2+} 濃度測定を行った。cADPR 注入それ自体は静止膜電位付近 (-40mV) において Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こさなかったが、-30mV より脱分極側にしたときの Ca^{2+} 上昇を優位に増強させた。この細胞内 Ca^{2+} 上昇は cADPR 前駆体の β -NAD⁺ 注入でも再現でき、8-bromo-cADPR 注入、リアノジン投与、FK506 前投与により抑制された。ついで、持続的な脱分極により誘発される、ニフェジピン感受性 Ca^{2+} 流入を Mn^{2+} クエンチにより調べた。この脱分極性 Ca^{2+} 流入は cADPR 注入群、および β -NAD⁺ 注入群で有意に増加をみると、リアノジン添加により抑制された。

これらの結果より、cADPR は脱分極により誘発される細胞内 Ca^{2+} 増加、および L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入の両方を増強することが示唆された。cADPR は直接アゴニストとしてリアノジン受容体上で Ca^{2+} 遊離増強をもたらす (正方向性シグナル) と共に、間接アゴニストとして L 型 Ca^{2+} チャンネルにも作用する (逆方向性シグナル) ことが想定される。

一方、非興奮性の v-ki-ras 変異線維芽細胞においては、持続性細胞内 Ca^{2+} 流入が見られることを報告し、これは、神経細胞とは逆に -20 mV より過分極側で起こり、イノシトール 4 リン酸を介したレセプター作動性 Ca^{2+} チャンネルの関与を想定した。このように興奮性、非興奮性細胞では異なるメカニズムにより細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がおこることを報告する。

S38

再生軸索伸展の分子基盤

°木山 博資, 田辺 勝久

旭川医科大学解剖学第一

損傷を受けた神経が再生し機能修復を行うには、損傷神経の生存、軸索の伸展・再投射が正しく行われなければならない。このような一連の修復過程において、神経の生存にかかるメカニズムと軸索伸展にかかるメカニズムは異なると思われる。そこで、軸索再生 (伸展) という現象に着目し、軸索再生のメカニズムのひとつとして、我々の損傷神経再生関連遺伝子探索の系で得られた、Rho ファミリーに属する TC10 の軸索再生における役割を中心に紹介する。TC10 は神経発生過程ではほとんど発現が見られず、さらに成熟神経系においても他の Rho ファミリーメンバーに比べきわめて発現量が少ない。しかし、運動神経の障害により TC10 の発現は著しく増加する。また、神経系の培養細胞 (PC12 や NIE) に発現させると成長円錐様の突起が出現する。さらに、後根神経節にアデノウイルスを用いて遺伝子を過剰発現させると、明らかな軸索の伸展促進が認められた。以上のことは、発生と再生では異なる軸索伸展因子が作動している可能性を示唆しており、神経軸索再生のメカニズムの解明には、発生の側からのアプローチだけでなく、再生の側からのアプローチもきわめて重要であると考えられる。以上、我々のデータを紹介するとともに、最近まで明らかになってきた本領域の研究動向についても紹介し、本シンポジウムの全体のイントロダクションを行いたい。

S39

Rho-ファミリーによる神経細胞の形態制御

°貝淵 弘三

名古屋大学大学院医学研究科細胞情報薬理学講座

神経細胞はその分化成熟の過程で、minor processes と呼ばれる共通の突起から通常一本の軸索と複数の樹状突起を伸展して極性を形成する。軸索はその先端の成長円錐が種々のガイダンス因子に反応して誘導され脳内の正しい位置へと投射される。一方、樹状突起は多数分岐して、軸索の神経終末とシナプスを形成する。一方、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーは、細胞骨格や細胞接着を介して神経細胞の形態を制御していると考えられている。私共は既に Rho の標的蛋白質として、Rho- キナーゼやミオシンホスファターゼの myosin-binding subunit (MBS) を同定している。また、Rho- キナーゼがミオシン軽鎖を直接リン酸化すると共に MBS をリン酸化してミオシンホスファターゼ活性を抑制して、ミオシンを活性化することを見出している。Rho- キナーゼがアデューシンや ERM ファミリー蛋白質 (ezrin, radixin, moesin) などの細胞骨格調節蛋白質を特異的にリン酸化して活性化することも明らかにしている。さらに、我々は Rho キナーゼが lysophosphatidic acid (LPA)-Rho の下流で成長円錐の退縮を引き起こすことを見出した。この退縮反応は一部ミオシンのリン酸化を介すると考えられるが、これに加えて我々は Rho キナーゼの新規脳内基質蛋白質として collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) を同定した。CRMP-2 は発生時期の神経細胞に一過性に発現する蛋白質である。神経細胞を LPA で刺激すると、成長円錐の退縮に先行して CRMP-2 が Rho キナーゼによりリン酸化された。CRMP-2 の Rho キナーゼによるリン酸化も成長円錐の退縮に重要な役割を担う可能性が高い。ごく最近、我々は CRMP-2 が軸索/樹状突起の運命決定に重要な役割を果たすことを見出した。本シンポジウムでは、Rho- ファミリーによる神経回路の形成機構を紹介すると共に、CRMP-2 による神経細胞の形態形成および極性形成についての知見を提供する。

S40

Central nervous system trauma and the immune system: repair and protection

°Michal SCHWARTZ

Department of Neurobiology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

Central nervous system (CNS) injury can cause permanent paralysis because of the lack of neurogenesis, the poor ability of the damaged nerves to regenerate, and the spread of damage to initially undamaged nerves. We hope to elucidate the mechanisms underlying the spread of damage and the failure of repair, and to find ways of overcoming them. We found that the injured-CNS needs immune system assistance for its protection and repair, provided by active macrophages (for tissue repair) and by T cells (for protection from the spread of damage). We found that in the CNS, protective T cells also are directed against self-antigens expressed in the damaged CNS. Our findings contradict the belief that immune activity in the CNS is detrimental. The "immune-privileged" CNS may only have a limited ability to benefit from the immune system. We have shown, at the molecular, cellular, behavioral, physiological, morphological, and anatomical levels, that boosting of the macrophage response and of the T cell response directed against self myelin-associated peptides promotes repair and protection, respectively, of the injured optic nerve or spinal cord of the adult rat. In both cases, axonal injury not only resulted in self-destructive degeneration, but also awakened mechanisms of self-repair and self-protection, involving the innate (macrophage) and adaptive (T cell) immune system responses. The ability to self-repair and protect and override the spread of injury will determine the fate of the nerve. Normally both processes are too weak or too short-lived to overcome CNS injury; but we have shown that they can be boosted. Therefore, beneficial inflammation and autoimmunity after CNS trauma may have clinical implications for the treatment of CNS degenerative diseases.

S41

金魚視神経再生における細胞・分子機序

°加藤 聖, 松川 通, 劉 中武, 杉谷 加代, DEVADAS Malini

金沢大学大学院医学研究科分子神経情報学講座

哺乳類とは異なり、金魚の網膜神経節細胞は、視神経を切断してもアポトーシスに陥ることなく生存し、かつ軸索である視神経は約1カ月で再生する。コンピュータ画像処理技術を用いて、片側および両側視神経切断後の視覚依存性行動の回復を経時的に追跡した所、正常側への体軸の傾きや回転行動は2週から1カ月で回復した。他方、複数個体による追尾行動は3～4カ月と回復が遅れた。今回この行動学的再生における細胞・分子レベルでの理解を目指して、視神経再生時の細胞・分子変化を検索した。細胞学的変化としては、視神経切断後、網膜神経節細胞は2週から肥大化し核小体が明瞭に観察できた。これらの変化は視神経切断後2カ月で最大となり4カ月で回復した。また、視蓋でのマイクログリア細胞の浸潤活性化も同様な時間経過をたどった。生化学的および組織化学的に、トランスグルタミナーゼおよび、一酸化窒素合成酵素活性を追跡した所、トランスグルタミナーゼ活性は視神経切断後1週前後で最大活性を、一酸化窒素合成酵素は1カ月で最大変化を示した。次に、遺伝子クローニング技術により、2つの酵素遺伝子トランスグルタミナーゼとNa,K-ATPアーゼが視神経切断後、5～10日にかけて網膜および視蓋において3～7倍と発現が著明に増加し、1カ月ではほぼ正常に復した。これら両酵素は再生視神経の発芽伸長に重要な役割を演じているのではないかと推定された。本シンポジウムでは、金魚視神経再生に関与する、これら新規および既存分子の局在や機能について比較検討を行う。

S42

グリア細胞の機能と起源の多様性

°池中 一裕

生理研・神経情報

アストロサイトの特徴は非常に薄い膜状の構造でいろいろな細胞の表面を覆うことであり、各種イオンチャネル、トランスポーターを発現して盛んに物質のやりとりを行っている。また、アストロサイトどうしはギャップジャンクションでつながっており、イオンなどの空間的な緩衝作用がある。このような特徴を生かしてアストロサイトは1) 脳血管関門の形成。2) 神経細胞へのエネルギー補給。3) 神経興奮伝導により放出されるイオン（カリウムイオン等）の除去。4) シナプス間隙に放出された神経伝達物質の除去。5) シナプス機能やその可塑性の調節。6) 各種サイトカインや神経成長因子の放出による脳機能の維持、といった重要な機能を有することが知られてきた。アストロサイトには以上のように多くの機能があるが、それでは一つのアストロサイトがその全ての機能を保有しているのだろうか。アストロサイトの同定は多くの場合GFAPの発現を指標としている。しかし、アストロサイトにもGFAPを発現していないものも存在するし、GFAPを産生している細胞が全て同じ種類の細胞であるとは限らない。まず、形態的にもアストロサイトは protoplasmic astrocyte と fibrous astrocyte の2種類あり、前者は灰白質に、後者は白質に多い。これら細胞種は同じ細胞が存在部位の違いによりその形態を変えるのか、別々の系譜の細胞なのか明らかではない。中枢ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイト（OL）にしても細い軸索にミエリン形成するものと太い軸索に行うものとは形態的な差を認めている。また、近年成人脳にもNG2抗体で染められるOL前駆細胞が大量に存在することが明らかとなっており、このものの発生様式と機能が論ぜられている。このようにグリアは多様性に富んでいるが、現在のグリア細胞系譜は明らかに単純化され過ぎていてこの多様性の産生機序を説明できないように思われる。本シンポジウムではグリアの細胞系譜を再検証し、どのようにして多様なグリア細胞が産生されるか考える。

S43

グリア細胞系譜と機能形態の多様性

°藤田 哲也

ルイ・バストゥール医学研究センター

すべてのグリア細胞はマトリックス細胞から、ニューロン産生の第Ⅱ期に引き続き、中枢神経系細胞分化の第Ⅲ期に、順に造りだされるものであるから、アストロはアストロ、オリゴはオリゴ、ミクログリアはミクログリアとして中枢神経系全体で共通する性質をもつのは自然なことであると考えられる。しかし、彼等に先だって作り出されるニューロンが、脳脊髄の各局所で、異なった分化をするように決定されていることから考えて、グリアにおいても局所的な特殊性が与えられているのは、理論的にも、当然であると推察される。その極端な例が、網膜のミュラー細胞であろう。脳内の各部でのグリアの多様性は、これと比べて程度は少ないように見えるが、脳の機能を考えると、その局在の差は無視できない。

第二のものはマトリックス細胞の各サブクローンが第Ⅰ期、第Ⅱ期、第Ⅲ期（この中でもアストロ、オリゴ、ミクロを分化するⅢ-1、Ⅲ-2、Ⅲ-3が区別される）を経過するさいに、その時間的な継続が場所によって著しく異なっていることから生じる多様性である。ひどい場合にはそのステージがほとんどスキップされる。例えば、RapheではⅡ期がほとんど省略されて、上皮とアストロとの中間的な特徴をもつEpendymal tanycyteの状態にとどまる細胞が多い。Rapheのすぐ横では、Ⅰ期からⅢ-3へ直接スキップすることによってミクログリア産生を専らとするようにみえるセクターが出現したり、さらにその近傍では、Ⅲ-2へ直接スキップすることによってオリゴ産生を専らとするようにみえるセクターが出現することも知られている。側脳室でも、量的質的にグリア産生に大きな差があることは周知の事実である。

第三の多様性は、環境の変化によってグリア細胞の示す可塑性によって出現するものである。神経病理学で記載される多くの変化はこの多様性に属する。ミクログリアが脳の病的状態に応じて示す多彩な変化は、細胞系譜を考える多くのひとを困惑させてきた。

今回は、これらの多様性について論じるが、私にとって特に興味のある成体脳内ミクログリアの幹細胞性変化に関連した多様性について少し時間を割きたいと考えている。

S44

ミクログリアの多様性とその細胞系譜

°澤田 誠^{1,2}, 小野 健治^{1,3}

¹藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療共同研究部門, ²科学技術振興事業団さがけ21, ³名古屋市立大学薬学部

ミクログリアはマクローファージ様の中枢神経系細胞で、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか、脳内サイトカインネットワークの中心的な細胞である。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、脳に特化した細胞であると考えられている。このような多機能のミクログリアには複数のサブタイプが存在することが想像されるが、我々はマウス脳一時培養から表面抗原の発現が異なる、少なくとも2つの性質の異なるミクログリアを分離することに成功した。これらの培養下で同定したミクログリアは脳内に存在する事が確認できたほか、脳内では異なった分布パターンをとること、さらに培養下では刺激に対する応答が異なることからおそらく生体内で異なった役割を担っていると考えられる。一方、これまで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きた。しかし最近の我々の研究からマクローファージ欠損マウス脳に正常とほぼ同数のミクログリアが存在することやミクログリアが骨髄で造血が起こるより早い発生の段階から脳内に存在すること、および脳に対する親和性や脳に浸潤できるか否かについてマクローファージとミクログリアが決定的に異なることなどが明らかとなり、ミクログリアは骨髄で分化したマクローファージとは異なる細胞起源をもつと考えられるようになった。そこで、今回我々はGFP発現骨髄キメラを作製し、GFP陽性細胞の生体内分布とその性質を解析してミクログリアと比較したところ、GFP陽性細胞は末梢臓器だけでなく脳実質に存在するものの、脳浸潤細胞の細胞表面の性質は多臓器に浸潤した細胞と異なり、ミクログリアに類似した性質を示すことがわかった。さらにSAGE法の変法により遺伝子発現のパターン分析から、マクローファージには発現しないがミクログリアと多能性骨髄前駆細胞に共通に発現する遺伝子を複数同定することができた。したがって、ミクログリアは単球-マクローファージに比べ多能性骨髄前駆細胞により類似性を持つと考えられる。

S45

ニワトリ胚の中樞神経系を用いたオリゴデンドロサイトの出現様式の解析

°小野 勝彦

島根医科大学解剖学講座第2

オリゴデンドロサイト(OL)の細胞系譜に対する様々なマーカーがこの20年の間に見いだされ、培養系および組織内での発生様式が調べられている。このようなマーカーのひとつである単クローン抗体O4は、ニワトリ胚の中樞神経系(CNS)内において、脳室層に位置するOLの前駆細胞から成熟したOLまで、多様な発達段階のものを免疫組織化学的に標識する。OLの系譜の発生・発達様式をより詳細に解析するためには、O4に加えて成熟したOLのマーカーを用いたり、個々の細胞の詳細な形態や細胞動態(移動や増殖)を調べることにより、多様な発達段階を区別することが必要である。例えば、脳室層に位置するO4陽性(O4+)細胞は、脳室面に線毛をもち軟膜表面に向かって長い突起を伸ばして、放射状グリアの形態を示す。これに対して、脳室層からはなれて脳実質に入ったO4+細胞は、単極型もしくは非対称な双極型となり、突起の先端には成長円錐がしばしばみられ、移動細胞としての特徴を持つ。発進が進むと、陽性細胞の細胞体は円形となり複数の細く短い突起を伸ばすようになる。O4+細胞が脳室層から移動することは、脳室層の細胞を遺伝子マーカーの導入や蛍光色素DiIで標識し、これを経時的に調べることにより明らかにされている。また、プロモデオキシウリジンの取り込みを指標としてO4+細胞の増殖能を調べた結果、脳室層内での増殖は低頻度であるのに対し、脳室層からはなれて移動を終えるまでの段階で活発に分裂することが示された。したがって、O4+細胞は前駆細胞の特徴をもったまま白質まで移動するものと考えられる。移動を終えて分裂能がなくなるころから、成熟したOLのマーカーであるガラクトセレブロシドやミエリン塩基性タンパクを発現するようになり、さらに神経線維にそった長い突起を伸ばして髄鞘形成を始める。以上の結果から、(1)脳室層に由来するOL前駆細胞は、増殖しながら移動して脳実質内に分布を拡げ、(2)機能する部位に到達した後に増殖を終了し、(3)分化したOLのマーカーを発現し髄鞘形成を始める、というOL系譜の細胞の発達過程が明らかにされた。

S46

アミノ酸合成・輸送系からみたグリアの多様性

°渡辺 雅彦

北大院・医・生体構造解析学分野

放射状グリアは、中枢神経の発達期に存在する長い放射状突起を有するグリア細胞で、ニューロン移動をガイドする機能が知られている。また、我々は、移動後のニューロン細胞体より伸展する樹状突起も、放射状突起に沿って軟膜方向へ伸長していく像を小脳皮質や大脳皮質において観察している。さらに、初代培養神経細胞やスライスを用いた実験から、ニューロンの移動や樹状突起伸展にはグルタミン酸受容体の活性化やセリンを介する栄養効果が重要であることが指摘されている。アミノ酸を介するニューロン分化の分子細胞機構を明らかにする目的で、グルタミン酸トランスポーターやセリン合成酵素の発現をマウス脳において検討してきた。その結果、これらの分子は発生段階において放射状グリアに高いレベルで発現し、成熟段階では星状膠細胞を中心としたグリア細胞に発現している事実を突きとめた。しかも、成熟グリアにおける発現量は、同一グリア種であっても脳の部位に応じて大きく異なり、また神経損傷に反応して大きく変動する。これらの事実から、生理活性アミノ酸の輸送や供給によるニューロン・グリア間の機能的相互連関を基盤として、放射状グリア細胞が分化ニューロンの細胞移動や樹状突起成長を促進し軟膜方向へと導く構造的要素となったり、星状膠細胞が個々のニューロンの代謝や伝達機能を調節する構造的要素になることができるものと、我々は考えている。

S47

膜結合型セマフォリンとその機能

°木村 徹¹, 菊地 薫¹, 林 剛史², 中村 史雄², 佐々木 幸生², 五嶋 良郎^{2,3}

¹住友製薬総合研究センター, ²横浜市立大学医学部薬理, ³CREST JST

Semaphorin は細胞外に Sema ドメインと呼ばれる共通のドメイン構造を持つ遺伝子ファミリーである。分泌型と膜結合型のものがあり、多くのメンバーは発生期における神経の軸索ガイダンスあるいは軸索の束形成に関係している事が知られている。最近になって一部の Semaphorin に対して Neuropilin ファミリーや Plexin ファミリーの遺伝子が受容体のコンポーネントとして機能していることが明らかにされた。面白い事に Plexin も Sema ドメイン様構造を有し、Semaphorin-Plexin スーパーファミリーを形成している。即ち、Semaphorin の機能発現には細胞間の Sema ドメイン相互作用が重要な働きをしていることになる。我々はすでに Sema6B、Sema6C、Sema4F の 3 種の膜結合型 Semaphorin 遺伝子のクローニングを報告した。中でも Sema4F は成体の中枢神経系で広く強い発現が認められる一方、胎生期には視神経の軸索周辺部や網膜神経、脊髄運動神経といったごく限定された領域で発現しており、他の Semaphorin と大きく異なる特徴がある。Sema4F を強制発現させた COS 細胞の膜画分には網膜神経節神経の成長円錐を退縮させる活性が有り、Sema6F も他の Semaphorin と同様に成長円錐退縮活性を持ち軸索ガイダンスに関係している可能性が示唆される。また、Sema4F 遺伝子を染色体上にマッピングしたところ、ヒト Sema4F は、2p13 の網膜神経の変性を伴う遺伝疾患である Alstrom シンドロームの原因領域と報告されている場所にマップされる。一方、マウスでは染色体 6 番にマップされ、遺伝子クローニングの結果、2つのマイクロサテライトマーカー D6Mit70 と D6Mit189 を有する BAC クローン上に存在していた。この領域はマウスの運動神経変性症 2(mnd2) の原因遺伝子があると考えられている場所と一致した。現在、Sema4F を中心に、その機能および疾患との関係について研究を進めている。

S48

神経接着分子 L1 による軸索伸長の制御機構

°上口 裕之

理化学研究所脳科学総合研究センター発生・分化研究グループ

免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経接着分子 L1 は、軸索伸長過程に重要な役割を担っており、ヒトおよびマウス L1 の遺伝子変異は脳梁・錐体路低形成の原因となることが知られている。軸索成長円錐に発現する L1 は、周囲環境に存在するリガンドとの接着および細胞内シグナル伝達・細胞骨格との相互作用により、軸索伸長を促進する。成長円錐内部においてアクチン線維は後方へ移動しており、細胞接着分子とアクチン線維との結合が成長円錐の前方移動すなわち軸索伸長を制御すると一般的に考えられている。このような成長円錐の移動過程において、細胞接着分子は成長円錐表面を後方へ移動するが、その後の細胞接着分子の動態に関しては不明な点が多い。そこで、L1 依存性軸索伸長過程における成長円錐内外の L1 の分子動態を解析した。L1 は蛋白質ソーティングに関与するクラスリンアダプター AP-2 と直接結合し、L1 細胞内領域に AP-2 結合部位を同定した。L1 と AP-2 の結合の部位特異的制御により、L1 は成長円錐後部でクラスリンを介した経路によりエンドサイトーシスされることが明らかとなった。エンドサイトーシスされた L1 の局在変化を解析したところ、L1 は微小管依存性小胞輸送により成長円錐後部から先端部へと到達し、その細胞膜へ再挿入されることが示された。成長円錐先端部へ再挿入された L1 は、おそらくはアクチン後方移動との結合により、成長円錐表面を後方へ移動した。このように、L1 は成長円錐内外をあたかもキャタピラ様に運動することにより、成長円錐を前方へ推進する。L1 非依存性伸長過程にある軸索の成長円錐では、エンドサイトーシスされた L1 は成長円錐先端部へは輸送されず、成長円錐後部細胞膜へ再挿入された。このように、L1 細胞内輸送と L1 依存性軸索伸長との関連性も明らかとなった。成長円錐が前方へ移動するためには、その先端部と周囲環境との強固な接着および成長円錐後部の脱接着が必要である。成長円錐後部から先端部への細胞接着分子のリサイクリングにより、このような前後方向の細胞接着の極性が形成・維持されるものと推察する。

NAP: 新しい細胞間接着機構

°萬代 研二¹, 中西 宏之¹, 溝口 明², 三好 淳³, 高井 義美¹

¹大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学・分子生物学, ²京都大学大学院医学研究科生体構造医学機能微細形態学, ³大阪府立成人病センター研究所

私共は、細胞が運動し接着が形成される際、低分子量 G 蛋白質の Rho ファミリーと Rab ファミリーが協調的に作用していることを明らかにしている。細胞運動と細胞間接着形成における低分子量 G 蛋白質の制御機構を解明する過程で、私共はカドヘリン-カテニン系とは異なる新しい細胞間接着機構を発見し、NAP と命名し報告している。NAP 系は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する蛋白質ネクチン、ネクチンとアクチンフィラメントに結合する蛋白質アファディン、アファディンとビンキュリンに結合する蛋白質ボンシンよりなる。これら三つの蛋白質は、臓器普遍的に発現し、細胞内ではカドヘリンをベースとするアドヘレンスジャンクション (AJ) に存在するが、ボンシンのみインテグリンをベースとする細胞-マトリックス間接着結合にも存在する。ネクチンはアファディンを介してアクチン細胞骨格に連結される。ネクチンとカドヘリンは少なくともアファディンと α -カテニン含む分子連関によって協調的に相互作用する。ネクチンは、この分子連関を介してカドヘリンをネクチンの存在する細胞間接着にリクルートする機能を有している。さらに、アファディン遺伝子を破壊したマウスの解析により、NAP 系が上皮細胞におけるカドヘリン-カテニン系を含む AJ の形成を制御していることが明らかにされている。また、NAP 系はシナプス結合形成においても重要な機能を果たしていると考えられる。本シンポジウムでは、上皮細胞、神経細胞における NAP 系による接着の制御機構について私共の知見を紹介し、議論したい。

シナプス活動依存的に発現調節される神経接着分子 Arcadlin

°山形 要人¹, 安田 新¹, 杉浦 弘子¹, 田中 秀和², 三木 直正²

¹都神経研・神経薬理, ²阪大院・医・情報薬理

けいれん発作が持続すると、海馬歯状回顆粒細胞の最深層に位置する神経幹細胞が分裂し、分裂した幹細胞が顆粒細胞へ分化する。そして、その顆粒細胞の軸索が terminal sprouting を起こし、他の顆粒細胞あるいは CA3 ニューロンに異所性シナプスを形成する。我々は、けいれん発作が持続することによって顆粒細胞内で生じる構造変化を分子レベルで明らかにするため、電撃けいれん刺激によって海馬で誘導される遺伝子群を differential cloning を用いて単離した。今回は、異所性シナプス形成に直接関与すると考えられる新しい神経接着分子 Arcadlin について報告する。arcadlin mRNA は、電撃痙攣やカイニン酸投与によって、海馬、特に歯状回顆粒細胞で急速に、そして一過性に誘導された。また、海馬以外でも、嗅内皮質・大脳皮質・扁桃体・梨状葉・嗅球でも誘導されたが、小脳では発現が認められなかった。塩基配列から、Arcadlin の細胞外領域は 6 つのカドヘリンモチーフを持ち、protocadherin-8 との相同性が認められたが、細胞内領域は alternate splicing のために両者の配列は完全に異なっていた。細胞内領域は他の cadherin の細胞内とも異なるので、特殊な情報伝達系と couple する可能性もある。また、L 細胞に発現させた Arcadlin は、Ca²⁺ 依存性に同種結合し、さらに特異抗体を用いた二重染色から、Arcadlin が synaptophysin と共存することが明らかになった。以上の結果から、Arcadlin は、けいれん発作によって海馬、特に顆粒細胞で合成された後、シナプスへ運ばれ、そこで Ca²⁺ 依存性に同種結合することによって、顆粒細胞シナプスの再構築に関与していると考えられた。

S51

ニューロブシンと神経機能

°吉田 成孝

奈良先端科学技術大学院大学細胞構造

神経可塑性におけるシナプス変化は、学習記憶の際などに見られる様に数年もしくはそれ以上の長期にわたる変化であることも多い。このようなシナプス変化の基盤としてリン酸化などの生化学的変化のみでなく、形態変化を伴うと考えることが長期的な変化を説明するのに合致していると考えられる。実際に神経可塑性に構造変化を伴うという報告は電子顕微鏡による観察の他、共焦点レーザー顕微鏡や、多光子レーザー顕微鏡による観察などで最近多く見られるようになった。このようなシナプス形態変化が生じる際には細胞外マトリックスや細胞接着因子をはじめとする細胞外環境の調節が必要であり、そのような因子として、プロテアーゼが重要な機能を果たしていると考えられる。神経可塑性に富む海馬において特にこのような因子が重要であると考えられたので、私たちはマウス海馬よりセリンプロテアーゼの単離を行った。その結果、新たなセリンプロテアーゼ cDNA を見出し、ニューロブシンと名づけた。ニューロブシンはトリプシン型のセリンプロテアーゼで海馬の錐体細胞をはじめとする大脳辺縁系の神経細胞に特異的に発現していた。海馬 Schaffer 側枝での長期増強におけるニューロブシンの作用を検討したところ、1-5nM の濃度で長期増強を促進すること、また、抗ニューロブシン抗体投与により、長期増強が抑制されることが明らかとなった。さらに、マウスに電気刺激を行ってキンドリングを生じさせた。この際、ニューロブシン発現が増強された。また、キンドリング誘発の過程で脳室内にニューロブシン抗体を投与することにより、キンドリングの進行を遅延させることができた。そこで、ニューロブシンが細胞外マトリックスや接着因子を切断する能力があるかどうかを検討した結果、L1 やカドヘリンなどを選択的に切断する活性があることがわかった。また、ニューロブシン遺伝子ノックアウト動物 (NPKO) を作成し、組織学的、行動学的検討を行った結果、NPKO では海馬 CA1 領域のシナプスの数の有意な減少と、それに起因すると思われる学習能の低下が認められた。故に、ニューロブシンは細胞外マトリックス、接着因子等の調節を行うことにより、シナプス可塑性を担っているものと考えられる。

S52

細胞接着因子としての gmp46/CAR の発現と機能解析

°桑野 良三, 本田 岳夫, 堀田 優子, 小堺 郁夫, 斉藤 宏, 阿部 貴子

新潟大学遺伝子実験施設

神経回路の形成は、脳の部位と時期によってまちまちであるが、神経成長円錐は時空を超えて同じ分子基盤に基づくと仮定し、成長円錐構成蛋白を系統的に分離・精製した。得られた 130 種類のペプチドについて部分アミノ酸配列を決定し、データベース検索し、新規の蛋白について解析を行った。その中の 1 つ gmp46 (Growth cone Membrane Protein, 46kDa) は、V ドメイン、C ドメインを 1 個ずつ持つ神経系には珍しいタイプのイムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白であることが分かった。そのころ、ヒトの Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) の cDNA クローニングが報告され、gmp46 は CAR のマウスホモログであることが分かった。しかし、ウイルスレセプターとしてでなく生体内での gmp46/CAR 本来の機能は不明であった。そこで、細胞の外側と内側のドメインに対して作製したペプチド抗体および cDNA を用いて発現と機能解析を試みた。

gmp46/CAR の mRNA、蛋白とも胎児期初期から新生児期の脳、神経系に強く発現し、成体期には消失していた。免疫組織学的に調べてみると、成体脳においても Subventricular Zone、Rostral Migratory Stream 及び Dentate Gyrus の一部の細胞に発現している結果を得た。培養細胞に gmp46/CAR cDNA を強制発現させた実験から、細胞接着活性を有することが分かった。次に gmp46 / CAR の細胞内局在を調べる為に、胎齢 15 日マウス海馬から極性を維持した神経細胞の培養を行い、gmp46 / CAR の細胞内局在を免疫染色によって調べた。成長円錐から精製された膜蛋白であったが、軸索、樹状突起の先端を含め細胞全体に分布していた。培養開始後一週目に、一部の神経細胞の神経突起と神経突起が接触している場所に gmp46/CAR の局在が観察された。これらのことから、生体において gmp46/CAR はおそらく接着因子として初期の回路形成に必要とされるが、回路の完成と共に消失する分子であると考えている。

Glioma の細胞運動における RAGE-Amphoterin の役割と腫瘍抑制への応用

°田口 明彦¹, 藤堂 謙一¹, 渡邊 学¹, Stern David², Schmid Ann Marie²

¹国立大阪南病院, ²コロンビア大学

目的

RAGE(Receptor for Advanced Glycation Endoproducs)は AGE に対するレセプターとしてクローニングされた細胞膜貫通型の Immunoglobulin superfamily に属するレセプターである。その後、生理的 ligand の検索が行われ、胎生期神経系発生期における神経細胞運動等に深く関与している細胞表面蛋白である Amphoterin に対するレセプターであることが、明らかになった。そこで我々は glioma cell を用い、RAGE を介した細胞運動の制御と、その応用として腫瘍細胞における影響を検討した。

結果

RAGE と Amphoterin 結合による細胞運動の制御 RAGE と Amphoterin は C6 Glioma の主に leading edge に発現しており、その結合を阻害すると、glioma 細胞の leading edge の進展を抑制し細胞移動が阻害された。また、細胞内シグナル伝達は、p44/42Map Kinase などの MAP kinase を通じて行われており、RAGE を介した制御は細胞運動だけでなく、metaroproteinase 等の proteinase をも調節していることを明らかにした。

腫瘍細胞に対する応用

以上の結果と、RAGE と Amphoterin の発現がヒト癌細胞にて up regulate されているとの知見より、その腫瘍細胞における役割を検討した。C6 Glioma の in vivo の実験では RAGE と Amphoterin 結合を阻害することにより、生体内にても腫瘍細胞の運動、浸潤が抑制され、腫瘍サイズも縮小することが観察された。また、非神経系細胞である Lewis Lung 細胞を使った癌転移モデルでも、RAGE と Amphoterin の結合阻害が癌転移を抑制する事を示した。以上のように、我々は神経系の形態形成という非常に基礎的な研究より、臨床的に RAGE-Amphoterin の結合阻害が癌細胞の浸潤、転移を抑制し得るということを示した。

Functions of gicerin in the developing and adult nervous system

°Eiichi Taira¹, Shigeki Okumura¹, Keiko Kohama¹, Yasuhiro Tsukamoto², Naomasa Miki¹

¹Department of Pharmacology, Osaka University,

²Department of Veterinary Anatomy, Osaka Prefectural University

Gicerin is a cell adhesion molecule of an immunoglobulin superfamily molecules. It has homophilic cell adhesion activity and heterophilic binding activity to NOF. NOF is a laminin family extracellular matrix protein and has strong neurite promotion activity. We have reported that gicerin mediates neurite promotion activity by NOF and its expression is restricted to the developmental period in the nervous system in a chicken. This time we also found that gicerin mediates cell migration of neurons to form layer structure in the developing chick midbrain. In addition, gicerin has two isoforms which only differ in the cytoplasmic domain. This time, we isolated rat gicerin and gicerin homologous molecule, LU. We could isolate both isoforms of gicerin and found that an intracellular domain of gicerin is highly conserved among species and its important role was expected. We generated a cell line which express rat gicerin and found that these transfectants increased the number and the length of microvilli. And we characterized the domain important for this promotion activity. On the other hand, the third loop structure of gicerin has high homology with LU third loop. So, we further characterized the feature of LU to check LU and found that LU is also expressed in the brain. While chick gicerin is expressed only in the developmental stage, rat gicerin continues to express in the adult brain. We found that distribution of these two molecules is parallel in the brain.

S55

ダウン症精神遅滞候補遺伝子 DSCAM の解析

°山川 和弘, Kishan Lal AGARWALA
理研・脳センター・神経遺伝

ダウン症候群は第21染色体が3倍体になることによって引き起こされる、最も頻度の高い精神遅滞の原因として知られる。第21染色体上でも、とくに領域21q22.1-q22.2の4Mbの領域が、ダウン症の症状、特に精神遅滞と先天性心疾患の発症に重要であることが示唆されている。我々は、以前この領域より新規な遺伝子 DSCAM を単離した。DSCAM は10のIG-C2ドメインと6のfibronectin typeIIIドメイン、膜透過領域、細胞内領域よりなる、イムノグロブリンスーパーファミリーの中でも最も大きなメンバーである。最近の第21染色体の全DNA配列の解読により、DSCAM はこの染色体上で最も大きな遺伝子(840Kb)であることも明らかにされた。以前の我々の組織 in-situ ハイブリダイゼーション解析により、DSCAM が胎児期から成人期までにわたり、広い範囲の神経組織で発現することが明らかとなっている。今回我々は、DSCAM 蛋白の機能を探るため、DSCAM をマウスL細胞に強制発現させ、解析した。DSCAM Ig3領域のペプチドに対する抗体は、ウェスタンブロット解析において198KDaのバンドを検出した。DSCAM を発現したL細胞は発現していない細胞に比べ、二価陽イオンの非存在下で高い接着性を示した。又、マウスを用いた組織免疫染色により、DSCAM が大脳皮質、海馬、小脳などで発現していること、更にはマウス小脳の初代培養細胞を染色することにより、DSCAM がプルキンエ細胞の軸索などに見いだされることを明らかにした。これらの結果は、DSCAM が神経細胞で発現し細胞接着因子として働いていることを確認するものであり、更に神経系の発生・分化に重要な働きを担っていることを示唆するものである。

S56

遺伝子産物のシナプス選択的な機能発現の機構

°井ノ口 馨
三菱化学生命科学研究所

海馬の長期増強(LTP)には比較的短時間で減衰する初期相(E-LTP)と持続時間の長い後期相(L-LTP)が存在する。E-LTPからL-LTPへの移行はタンパク質合成依存的である。一方、LTPは入力特異性を持っている。すなわち一つのニューロンに存在する多数のシナプスのうち特定の入力を受けたシナプス群にのみ可塑的な変化が生じる。従って、L-LTPの成立には、新たに合成されたタンパク質がシナプス選択的に機能発現する機構が存在することになる。この機構として、新規発現のmRNAから細胞体で翻訳されたタンパク質が入力を受けたシナプスに選択的に局在する場合と、樹状突起やシナプス部位に存在するmRNAから入力依存的にタンパク質が合成され供給される場合が考えられる。これらの機構は、合成されるタンパク質によって使い分けられていると思われる。我々が見いだしたVesl-1S(Homer-1a)タンパク質は、代謝型グルタミン酸受容体mGluR1/5やIP3受容体と相互作用するシナプスの足場タンパク質の一種である。vesl-1S mRNAはL-LTPに伴いシナプス後細胞で発現が誘導されるが細胞体にとどまる。一方、Vesl-1Sタンパク質はシナプス後部に局在している。このことからVesl-1Sタンパク質はL-LTPに伴い細胞体で合成された後に、入力を受けたシナプス部位に選択的に局在するタンパク質であると期待される。本シンポジウムでは、Vesl-1Sタンパク質に着目して前者の機構を解析した例を紹介する。

発達期小脳シナプスの選択的除去機構

°橋本 浩一, 狩野 方伸

金沢大学医学部生理学第二講座

成熟動物では小脳プルキンエ細胞はただ 1 本の登上線維に支配されるが、幼若動物では複数の登上線維による多重支配を受けることが知られている。マウスでは生後 3 週の間に過剰な登上線維が排除され、生後 20 日で 1 対 1 の関係がほぼ完成する。私たちは、プルキンエ細胞の興奮性シナプス後部に強く発現する代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) とその下流のシグナル伝達が、登上線維シナプス除去に必要であることを示した。プルキンエ細胞において、mGluR1 は Gq ファミリーの 3 量体 G 蛋白 ($G_{\alpha q}$)、phospholipase C β 4 (PLC β 4) を介して、プロテインキナーゼ C (PKC γ) の活性化を引き起こすと考えられる。私たちは、これら分子のノックアウトマウスにおいて小脳登上線維シナプスの生後発達を電気生理学的に調べた。小脳スライスを作製しプルキンエ細胞から whole-cell recording を行った。登上線維刺激の強度をゼロから徐々にあげてゆき、誘発される興奮性シナプス後電流 (EPSC) のステップの数により、記録しているプルキンエ細胞を支配する登上線維の本数を同定した。これら 4 種類のノックアウトマウスでは、いずれにおいても、生後 3 週以降、40-50% のプルキンエ細胞が 2 本以上の登上線維による multiple innervation を受けていることを発見した。しかし、これらのマウスでは、生後 2 週までの登上線維シナプスの発達は正常であった。登上線維シナプスおよび平行線維シナプスの生理学的および薬理的性質は正常であり、また、光顕および電顕での観察で形態学的に異常は認めなかった。これらから、mGluR1-G αq -PLC β 4-PKC γ のカスケードが生後 3 週目におこる過剰な登上線維の除去に必要であると結論された。さらに、私たちは、プルキンエ細胞特異的な L7 promoter を用いて、ラットの mGluR1 α transgene を mGluR1 ノックアウトマウスに導入し、プルキンエ細胞のみで機能的な mGluR1 を発現するマウスを作製した。このマウスは、正常な登上線維シナプス除去を示し、mGluR1 ノックアウトマウスで顕著である小脳失調も回復していた。この結果より登上線維シナプス除去に必要な mGluR1-G αq -PLC β 4-PKC γ のカスケードはプルキンエ細胞内で働くことが明らかとなった。

海馬シナプス伝達可塑性の分子機構

°真鍋 俊也

神戸大学医学部生理学第一講座

海馬は記憶や学習に重要な役割を果たすが、そこで観察される長期増強 (LTP) や長期抑圧はその細胞レベルでのモデルとして盛んに研究されている。これらのシナプス可塑性の誘導・発現に、NMDA 受容体の活性化とそれに引き続く細胞内生化学過程の調節が重要であることは一般的に認められているが、最近のノックアウトマウスをはじめとする分子生物学的解析から、これらの主要経路以外にも、シナプス周囲に存在する機能分子がシナプス可塑性の調節を行っていることが明らかになりつつある。

海馬での興奮性シナプス伝達はグルタミン酸によって媒介されているが、シナプス前終末から放出されたグルタミン酸はグリアに存在するグルタミン酸トランスポーターにより速やかに取りこまれ、シナプス間隙のグルタミン酸濃度は急激に低下する。海馬の場合、GLT-1 がその主役を演じるが、この蛋白を欠失したマウスでは、正常シナプス伝達においては、グルタミン酸が放出されたあとシナプス間隙でのグルタミン酸濃度がより高いままの状態がより長くことがわかっている。この変異マウスでは、海馬 CA1 領域の LTP が障害されていることがわかったが、その原因が NMDA 受容体の過度の活性化であることを明らかにした。したがって、GLT-1 は正常シナプス伝達のみならず、シナプスの可塑性においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

シナプスの前部と後部を結合させる分子として、シナプス活性化部位周囲に存在する細胞接着分子の存在が知られているが、海馬に多く分布しているカドヘリン 11 あるいはテレンセファリンを欠損するマウスでは、正常シナプス伝達には異常は見られないが、LTP が野生型に比べて 2 倍程度に増大しており、さらに LTP の飽和レベルも有意により高くなっていることがわかり、これらの細胞接着分子がシナプス伝達効率の可変域を調節していることが明らかとなった。これら以外にも多くの分子がシナプス可塑性を制御していることがどんどん報告されており、今まで考えられていたよりもはるかに複雑な機構でシナプス機能が調節されていることが明らかになりつつある。

S59

神経シナプス足場蛋白質 S-SCAM による分子集積機構

°畑 裕

東医歯大・大学院・病態代謝解析学

神経シナプスには、神経伝達物質の放出・受容に関わる機構や、神経伝達の効率を変化させるシグナル伝達分子が集積して、シナプス可塑性の分子機構を形成している。これらの神経シナプス構成分子の集積に、細胞膜裏打ち蛋白質が重要な役割を果たしていることが、近年明らかにされている。後シナプス肥厚の裏打ち蛋白質 PSD-95 は、3つの PDZ 領域の他に、1つの SH3 領域、1つのグアニル酸キナーゼ (GK) 領域をもち、これらの蛋白質結合領域を介して、NMDA 型グルタミン酸受容体・神経細胞接着因子 neuroligin や、チロシンキナーゼ・一酸化窒素合成酵素・低分子量 G 蛋白質 Ras の GTPase 活性化因子、あるいは SAPAP などの細胞骨格関連分子と相互作用している。私共は、6つの PDZ 領域と2つの WW 領域、1つの GK 領域をもつ神経特異的な細胞膜裏打ち蛋白質を見いだして synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) と命名している。S-SCAM も、後シナプス肥厚に局在して、NMDA 型グルタミン酸受容体・神経細胞接着因子 neuroligin と SAPAP に結合する。さらに、Raf キナーゼに結合する MAGUIN や、低分子量 G 蛋白質 Rap1 の GDP/GTP 交換反応を促進する nRapGEP とも相互作用する。S-SCAM は C 末端の PDZ 領域を介して、ホモダイマーを形成すると同時に、PSD-95 の GK 領域とも相互作用する。すなわち S-SCAM は、神経シナプスにおいて、PSD-95 と共同して受容体・細胞接着因子を裏打ちし、シグナル伝達分子や細胞骨格とこれらの膜蛋白質をつなぐ機能を果たしている可能性がある。現在、S-SCAM による分子集積が、選択的なシナプス強化・除去の機構にどのように関わっているかを解明しようとしている。

S60

PDZ 領域を持つアクチン結合蛋白質 Neurabin I および I-Afadin のシナプスにおける微細局在と機能

°溝口 明

京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座

私共は、アクチン線維と結合活性を持つ新規の膜下蛋白質を発見段階の脳から探索し、PDZ 領域を一カ所持つ足場蛋白質、Neurabin I および I-Afadin を同定している。Neurabin I は脳特異的に発現しており、完成したシナプスでは、主としてポスト側のスパインに局在していた。発生期の脳では未熟なシナプスのプレ・ポスト両側に局在していた。これらの結果から、Neurabin I は完成したシナプスではスパインの運動に、未熟なシナプスでは細胞間接着に関与すると思われる。I-Afadin は、全身の多くの臓器に存在し、小腸や肝臓などの非神経組織では、主としてアドヘレンスジャンクションに Cadherin 系と共存していた。脳では、I-Afadin は、海馬 CA3 領域の苔状線維終末-錐体細胞樹状突起間のシナプスの Puncta Adhaerentia Junction に両側対称性に局在していた。そこで I-Afadin と結合する細胞接着分子をイーストツーハイブリッド法で検索した結果、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する Nectin が見出された。Nectin は、細胞外領域に Ca 非依存性細胞接着活性を持ち、細胞内領域の C 末端で I-Afadin の PDZ 領域と結合する。Nectin は、1 型、2 型、3 型のアイソフォームからなる。海馬の苔状線維終末には 1 型が、錐体細胞樹状突には 3 型が特異的に局在していたことから、Nectin-I-Afadin 系接着機構は、シナプスの形態形成、可塑性の調節に重要な役割を果たしていると思われる。

S61

開口放出を介した選択的シナプス可塑性の機構

*高橋 正身

三菱化学生命科学研究所

シナプス伝達が、短期的、長期的にどの様に制御されているかを明らかにすることは、記憶や学習などの機構を理解する上で重要な課題である。シナプス伝達は、シナプス前部から開口放出される神経伝達物質によって担われている。我々は神経伝達物質放出の制御機構を明らかにするために、ラット副腎髄質細胞腫由来の PC12 細胞を用いて解析を行ってきた。PC12 細胞は神経伝達物質としてドーパミンとアセチルコリンを放出するが、前者は大型の有芯小胞に、後者は小型のシナプス小胞に貯蔵されるため、形態的に異なる小胞の開口放出を同じ細胞を用いて調べる事が可能である。我々は小型のシナプス小胞の開口放出の機構を明らかにするため、様々な遺伝子を導入したり、細胞膜の透過性を高めたリーキー細胞を用いて開口放出の制御機構を調べる実験系を確立した。さらに GFP とモノアミントランスポーターおよびアセチルコリントランスポーターとの融合タンパク質を発現させ、生きた細胞でのシナプス小胞の局在変化を解析した。この様な解析の結果、PC12 細胞からの神経伝達物質放出は、PKA、PKC、MAPK などのセリンスレオニンキナーゼやフォールボールエステル結合タンパク質によって促進的に、非受容体型チロシンキナーゼや JAK 型チロシンキナーゼによって抑制的に制御されていることが明らかとなった。さらに PI 3 キナーゼによっても神経伝達物質放出が促進的に制御されていることも明らかとなった。これらの多様な制御タンパク質は、開口放出に至るまでの異なるステップに作用し、生理的に異なる役割を持つ制御機構に関わっている可能性が考えられる。神経伝達物質放出の制御タンパク質と考えられる complexin I および complexin II の局在を、培養した海馬神経細胞で調べた結果、両者は同一神経細胞のシナプス前終末に異なって分布していた。この様なことから、神経細胞は個々の神経終末での制御タンパク質の種類を変化させることにより、シナプスの性質を選択的に変化させている可能性が考えられた。

S62

レプチンにより誘導される新規遺伝子群の探索

*森川 吉博, 上山 栄子, 久岡 朋子, 岩本 武史, 仙波 恵美子

和歌山県立医科大学第二解剖学

肥満とはエネルギーの摂取と消費のバランスが崩れ、体内に蓄積されたエネルギーが過多となった状態であり、肥満により種々の生活習慣病が引き起こされ、先進国において深刻な問題となっている。Coleman による正常マウス、ob/ob マウス、db/db マウスの併体結合実験から、液性の飽食因子による摂食とエネルギー消費のバランスを保つ調節機構が提唱され、Friedman らによりその液性飽食因子、レプチンがクローニングされた。レプチンレセプターは膜一回貫通型受容体で、インターロイキン 6 ファミリーのサイトカインの共通の受容体である gp130 と高い相同性を有し、JAK (Janus kinase)-STAT (signal transducers and activators of transcription) と MAP kinase がレプチンの細胞内シグナル伝達に関与することが明らかとなった。また、ヒトの肥満患者においては、レプチンの異常による肥満が 2 例、レプチンレセプターの異常による肥満が 1 例発見されたのみで、多くはレプチンに対する抵抗性が肥満の主な発症原因であると考えられている。今回、我々はレプチンに対する抵抗性が生じる原因を明らかにするため、その下流での遺伝子発現について検索を試みた。レプチンを静脈注射した ob/ob マウスの脳より PCR-based subtractive cDNA library を作成し、レプチンにより脳内に誘導される分子の単離、同定を行った。subtractive cDNA library より約 100 クローンをシーケンスし、未知の遺伝子を中心とする 17 クローンについてノーザンブロットによりその誘導性をチェックした。subtractive cDNA library 作成に使用した mRNA によるノーザンブロットでは 17 クローン中 16 クローン (94%) でその発現に増加が認められた。再現性を確かめるために他のマウスで得られた mRNA によりノーザンブロットを行ったところ、8 クローン (47%) でその発現に増加が認められた。そのうち、2 クローンについて脳内における発現の局在を調べるために in situ hybridization を行ったところ、2 クローンとも視床下部において強い発現を認めた。このうち、1 クローンは脾臓のラ氏島においてもレプチンにより誘導された。さらに、このクローンは脾 b 細胞株をレプチンで刺激した時、30 分後の早期から誘導が観察された。現在、これらのクローンの完全長のクローニングを行っているところである。

S63

視床下部レプチン作用とヒスタミン神経の役割

°坂田 利家, 吉松 博信, 正木 孝幸
大分医科大学医学部内科学第一講座

脂肪細胞は肥満遺伝子 (ob gene) を発現し、そのコード蛋白のレプチンを分泌する。このレプチンには視床下部のレプチン受容体 (OB-Rb) を介した食欲抑制作用と体エネルギー消費の亢進作用がある。脂肪細胞由来の液性信号が脳を介して、過剰な脂肪蓄積を防止する仕組みなのである。視床下部では corticotropin releasing hormone や proopiomelanocortin, それに neuropeptide Y や agouti gene-related protein がレプチンによって制御され、前二者はエネルギー蓄積に対し抑制性に、後二者は促進性に調節されている。我々はエネルギー代謝の統合的調節因子として、視床下部ヒスタミン (HA) 神経系に注目し、その生理的な役割を解析してきた。その結果によると、レプチンは HA 神経を賦活化し、この賦活化は ob gene 発現を抑制する、つまり両調節系の間には負のフィードバック形成の存在が明らかになった。H₁ 受容体ノックアウト (HIKO) マウスでは、レプチンによる摂食抑制作用が有意に減弱されることから、この抑制作用は HA 神経系を介していることがわかった。HA 神経の賦活化は、一方で末梢脂肪細胞の脂肪分解を亢進させ、とくに内臓脂肪で顕著だった。このシグナルは交感神経によって伝達されていた。HA 神経は acyl CoA synthetase や glucose transporter4 の遺伝子発現を同時に抑制し、脂肪合成を抑制した。HA 神経慢性賦活やレプチン投与による脱共役蛋白群 (UCP family) の発現亢進が、HIKO マウスではいずれも減弱した。OB-Rb に異常のある Zucker obese rats や db/dbmice ではレプチン作用が欠損するため、視床下部 HA 神経系の機能が障害されることも明らかになった。脳脊髄液中の HA 濃度は肥満症で有意に低く、神経性食欲不振症では逆に高かった。HA 神経系はこのように視床下部レプチン作用のターゲットの一つとしても機能しており、エネルギー摂取と放出の調節、つまりエネルギー代謝の恒常性維持に重要な役割を果たしていることがわかってきた。

S64

オレキシンによるエネルギーホメオスタシスの制御

°桜井 武, 原 淳子, 山中 章弘, 後藤 勝年
筑波大学基礎医学系薬理

オレキシン-A と-B は、われわれが 1998 年に発見した神経ペプチドであり、動物の脳室内にオレキシン A または B を投与すると、摂食量の増加が認められる。さらに、最近では、オレキシン遺伝子欠損マウスが作成され、摂食量が 20% 減少するとともに、ナルコレプシー様の睡眠障害を呈することが示され、オレキシンが、摂食行動だけでなく、睡眠の制御にも関与していることが示されている。われわれは、オレキシン神経の摂食行動と覚醒の制御における役割を発生工学的手法により解析している。ヒトオレキシン遺伝子プロモータを用いて、神経変性疾患のひとつである Machado-Joseph 病の原因遺伝子の cDNA のうち、ポリグルタミンリピートをオレキシン神経特異的に発現させたマウスを作成した。このマウスを解析すると、8 週令までに、ほぼすべてのオレキシン神経が神経細胞死により脱落することが明らかになった。また、MCH 神経をはじめ、他のニューロン群には影響がなかった。このマウスはナルコレプシー様の症状を呈するとともに、摂食量の著明な減少がみられている。大変興味深いことに、摂食量が低下するにも関わらず、12 週以降から肥満がみられた。このことから、オレキシン神経は覚醒の制御、エネルギー代謝調節に重要な役割をしていると考えられた。

オレキシン含有神経は、摂食中枢として知られる視床下部外側野に存在し、脳内の広範な領域に投射している。一方、オレキシン神経への入力系についてしらべるために、電気生理学的な手法を用いる必要がある。ヒトオレキシン遺伝子プロモータを用いて、Green Fluorescent Protein を発現させるコンストラクトを構築し、トランスジェニックマウスを作成し、このマウスの視床下部から、蛍光を発生するニューロンを単離し、オレキシン産生ニューロンの性質をパッチクランプ法によって明らかにすることを試みている。

S65

Novel neuropeptides implicated in the control of food intake

°Masamitsu NAKAZATO

Third Department of Internal Medicine, Miyazaki Medical College

Orphan G-protein-coupled receptors (GPCRs) have been used as targets for unidentified signaling molecules, including new peptide hormones, neuropeptides, and neurotransmitters. Recent genomic analyses have led to the discovery of many orphan GPCRs for which ligands have not been isolated. The search for endogenous ligands of these orphan GPCRs is a useful method for the discovery of unknown neuronal functions and development of new drugs. Orexin, melanin-concentrating hormone (MCH), and neuropeptide Y (NPY), orexigenic peptides located in the hypothalamus, have been identified as ligands for GPCRs. Very recently, we discovered important bioactive neuropeptides relative to the central regulation of feeding behavior using cultured cells expressing orphan GPCRs. We here present the way these novel neuropeptides interact with other neuropeptides including orexin, MCH, and NPY.

S66

ボンベシン受容体と摂食

°和田 圭司, 山田 一之, 和田 恵津子

国立精神・神経センター神経研究所

ボンベシンは *Bombina bombina* と呼ばれるヨーロッパ産スズガエルの皮膚から単離された生理活性ペプチドで、哺乳類ではこれまでにガストリン放出ペプチド (GRP)、ニューロメジン B (NMB) と呼ばれる 2 種のボンベシンによく似たペプチドの存在が確認されている。いずれも消化管や脳に広く分布し、内外分泌、平滑筋収縮、代謝などの調節に関与する。ボンベシンの作用は膜を 7 回貫通する G 蛋白質共役型の受容体により細胞に伝えられるが、哺乳類では GRP に高親和性の GRP 受容体、NMB に高親和性の NMB 受容体、さらに、両者に相同性を示すものの内在性の高親和性リガンドが不明のボンベシン受容体サブタイプ 3 (BRS-3) の 3 つが存在する。GRP 受容体、NMB 受容体が脳に加えて消化管などの末梢組織に広く分布するのにに対し、BRS-3 はほぼ脳に限局した分布を示し、特に視床下部領域での発現が強い。哺乳類における個々のボンベシン受容体の生体内機能を解明する目的で各受容体の遺伝子欠損マウスを作製したところ BRS-3 欠損マウスが肥満、高血圧を呈するのを見出した。BRS-3 欠損マウスでは軽度の過食、酸素消費量の低下を認め、インスリン抵抗性、耐糖能障害も存在した。他方、GRP 受容体欠損マウスでは明らかな肥満を認めないものの、GLP-1 やインスリンの分泌障害を認め耐糖能も低下していた。ボンベシンあるいは GRP による摂食抑制は BRS-3 欠損マウスでは野生型同様保持されていたが GRP 受容体欠損マウスでは認められなかった。以上の結果から、BRS-3 はエネルギー収支の制御に主に関係し、GRP 受容体は摂食抑制により強く関与している可能性が示された。ボンベシン受容体システムにおいては、摂食とエネルギー収支は一元的に制御されているというよりも個々のボンベシン受容体により多面的に制御を受けていると考えられる。

S67

摂食に関わる Neuropeptide Y 遺伝子発現制御

°樋口 宗史, 村岡 修, 山口 剛, 貝津 雅稔, 三富 明夫
新潟大学医学部薬理学講座

Orexigenic な神経ペプチド Neuropeptide Y (NPY) の遺伝子発現の変化が摂食行動に主要な役割を果たすことが明かにされつつある。日周リズムや絶食に伴い NPY 遺伝子発現が著しく変化することから NPY 遺伝子発現調節が摂食調節の主体ではないかという報告がある。このことに関して、私達は摂食行動を変化させる成長ホルモン、甲状腺ホルモン、絶食、低血糖誘発薬物刺激によって *in vivo* の中枢 NPY 神経での神経活動の変化や引き続いて起きる NPY 遺伝子発現の著しい変動を報告する。また NPY 受容体には5つのサブクラス (Y1-Y5) が存在し、発現部位の違いによって多彩な NPY の作用を伸介している。今回、摂食調節における NPY 受容体サブクラスの脳内分布・遺伝子発現変化も *in situ hybridization* (ISH) によって調べたので報告する。Y1、Y5 の mRNA は弓状核・傍室核に強く発現していたが、NPY 受容体各サブクラスの遺伝子発現調節が組織特異的な転写調節因子によって各々制御を受けている可能性があり、今後、絶食・甲状腺ホルモンなどによる摂食行動の変化と NPY 受容体サブクラス遺伝子発現調節との関連が明らかになるとと思われる。

摂食行動に関わる NPY 遺伝子発現調節の分子メカニズムの主体は、神経活動にともなう細胞核内の転写活性の変化である。NPY 遺伝子転写活性化を引き起こす細胞内シグナルは少なくとも3つあり、ここでは Ca/calmodulin 依存性の活性化シグナル、ニューロトロフィンを介するシグナル、leptin を介するシグナル系が NPY 遺伝子転写をどのように調節するかを報告する。培養神経と *In vivo* システムを用いて摂食での NPY 遺伝子転写調節を特異的な転写因子のレベルから明らかにしたいと考えている。

S68

脳のホメオスタシスとミクログリア：Overview

°錫村 明生
市立四日市病院 神経内科

ミクログリアは中枢神経系を構成するグリア細胞の一つで、オリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのマクログリアに対応して命名された。一般的には周産期に脳内に移行した単球・マクロファージ系の細胞と考えられているが細胞の起源については今日尚議論のあるところである。1980年代後半にミクログリアの分離培養法が確立し、細胞生物学、分子細胞学の進歩とあいまってこの細胞の機能が急速に明らかになってきている。ミクログリアの機能として1) 神経系の発生段階における作用；老廃物の処理や他の神経系細胞の分化促進作用、2) サイトカイン、神経栄養因子、接着因子の産生を介した神経細胞の保護、栄養作用、3) 脳内の免疫担当細胞、4) 感染防御作用、等の生理作用のほか、5) HIV などある種のウイルスの標的として注目されており、また、6) 炎症性サイトカインやフリーラディカルを産生し、脱髄や神経変性のエフェクターとして神経細胞や髄鞘の障害にも重要な働きをする事が示されている。すなわち、神経系の分化保護栄養と障害という相反する二つの作用を有し、神経系のホメオスタシスに関わる Key 細胞としての役割を担っている。この相反する作用が同一細胞に対する違ったシグナルでおこっているか、異なった細胞亜群が相反する作用を担っているかは現在不明であるが、後者を示唆する研究結果がいくつか明らかになっている。すなわち、ミクログリアには単球マクロファージ系の異なった分化段階をあらわす表面マーカーを持った亜群が存在し、Mac1 や F4 / 80 など分化マクロファージのマーカーを持つ亜群は腫瘍壊死因子などの炎症性サイトカインを産生し、iNOS が誘導され一酸化窒素を産生するが未分化マーカーを持つ亜群はこれらを産生せず、nNOS mRNA のみを表現し、神経栄養因子を産生する。さらに T 細胞の分化を規定する IL-12 や IL-18 も前者のみが産生し、後者は産生しない。これらの知見はミクログリアの多種の機能が異なった細胞群によって担われている可能性を示しており、神経系のホメオスタシスにおけるミクログリアの役割を考える上で重要であると考えられる。

S69

グルタミン酸を介した神経－ミクログリア 連関

*野田 百美

九州大学・大学院・薬学研究院・病態生理学分野

グリア細胞のうち、アストロサイトやオリゴデンドロサイト同様、ミクログリアにもグルタミン酸トランスポーターとグルタミン酸受容体があることを発見した。脳内で免疫系を司ると言われているミクログリアの生理的機能はまだ不明点が多いが、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を介した新たな神経－ミクログリア連関が示唆される。神経細胞およびグリア細胞のグルタミン酸トランスポーターが、細胞外のグルタミン酸濃度を速やかに減少させることはよく知られているが、ミクログリアにもグルタミン酸トランスポーターが存在することを、電気生理学的に証明した。さらに、神経障害時や虚血時に予想される細胞外カリウム濃度で逆向きに働き、グルタミン酸をさらに放出することも示唆された。この作用は、ミクログリアをアミロイドベータ蛋白で処置しておくことと増大したことから、アルツハイマー病などの脳神経疾患において、ミクログリアのグルタミン酸トランスポーターが重要な働きをしている可能性がある。また、従来ミクログリアにグルタミン酸受容体が存在するかどうか、不明であったが、今回、グルタミン酸の代わりにカイニン酸を用いることによって、イオンチャネル型のグルタミン酸受容体電流を測定することができた。カイニン酸による電流は、CNQXにより阻害され、電流の大きさは、カイニン酸の濃度に依存した。AMPA型受容体電流の不活性化を阻害するサイクロシヤザイド(0.1 mM)存在下では、AMPA、グルタミン酸は、カイニン酸よりも大きな電流を誘発した。このことから、ミクログリアのグルタミン酸受容体は主にAMPA型であることが示唆された。また、Caの透過性が低いことが電流－電圧曲線から示唆され、免疫染色およびRT-PCRより、GluR2,3,4,5が発現していることが示された。更に、グルタミン酸受容体の機能として、ミクログリアからの腫瘍壊死因子(TNF-alpha)の放出が増大することが観察された。以上のことから、ミクログリアもグルタミン酸を介して神経と密接に関連していることが示唆され、新たなミクログリアの機能解明が期待される。

S70

ミクログリアの抗原提示機能におけるカテ プシンEの役割

*中西 博, 西奥 剛, 山本 健二

九州大学大学院歯学研究院口腔機能分子科学

我々はこれまでにアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンE(CE)はミクログリアにおいて活性型酵素として初期エンドソームに非常に特異的に局在することを明らかにしてきた。ところが本酵素のミクログリアにおける役割については不明のままである。そこで今回、初期エンドソームにおけるタンパク質の限定分解が重要な役割を果たしている外因性抗原提示におけるCEの役割について検討を行った。まず、ovalbumin(OVA)特異的T細胞ハイブリドーマと新生仔マウスより調整した初代培養ミクログリアとの共培養系を構築し、IL-2の産生分泌をT細胞活性化の指標としてアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤 pepstatin Aの影響を検討した。その結果、pepstatin AはOVAによる抗原提示を抑制したが、OVA抗原ペプチドによる抗原提示には全く影響を及ぼさなかった。この結果は pepstatin Aがインバリアント鎖の分解には全く影響しないことを示唆するイムノブロット解析の結果とよく一致していた。さらにCEによりOVAを処理すると、抗原ペプチドが生成することが明かとなった。以上の結果より、CEはミクログリアの外因性抗原提示において抗原ペプチドの生成において重要な役割を果たしていることが明かとなった。

S71

ミクログリアにおけるアミロイドベータ蛋白のシグナル伝達系

°中井 真通, 長谷川 浩史, 田中 千賀子
兵庫県立高齢者脳機能研究センター

アルツハイマー病患者の脳を特長付けるものとして、多数の老人班の存在があげられる。この老人班の主要な構成成分のひとつにアミロイドベータ蛋白があり、この蛋白はアルツハイマー病発症あるいは病像形成に深く関与していると考えられている。ところで、アルツハイマー病の老人班には多数の活性化ミクログリアが認められており、老人班の主要構成成分であるアミロイドベータ蛋白はミクログリアを活性化しうることが報告されている。そこで私どもはラット初代培養ミクログリアを用いてアミロイドベータ蛋白がどのような細胞内情報伝達系を介してミクログリアを活性化しうのか検討した。アミロイドベータ蛋白刺激により膜分核において PKC- δ のチロシン残基がリン酸化をうけ、キナーゼ活性が亢進した。さらに PKC の基質である MARCKS がリン酸化し、MARCKS の細胞内転移が認められた。一方 ERK-1、ERK-2、MEK のリン酸化、ERK-1、ERK-2 の活性亢進も認められた。活性化された ERK-1、ERK-2 はともに MARCKS を *in vitro* でリン酸化した。以上よりアミロイドベータ蛋白は少なくともチロシンキナーゼ系-PKC 系と MAPK 系の dual-pathway でミクログリアを活性化していると考えられた。

S72

神経-ミクログリア相互作用における脳内ケモカイン類の役割

°南 雅文, 佐藤 公道
京大院・薬・生体機能

ケモカインは白血球走化活性化作用を有し、炎症反応あるいは免疫反応のメディエーターとしてその機能や発現調節の研究が精力的に進められてきている一群の生理活性ペプチドであるが、近年、脳内においてもケモカインが種々の神経変性疾患の病態形成において重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。我々は、ケモカイン類のうちで唯一の膜結合型タンパク質であるフラクタルカインが、脳内では神経細胞で構成的に発現しており、さらに、その受容体である CX3CR1 が脳内ミクログリア細胞で構成的に発現していることを見だし、脳内ケモカインが病態時だけでなく正常時においても細胞間情報伝達物質としての役割を担っている可能性を示した。そこで、正常時および病態時におけるフラクタルカインの動態を免疫組織化学的手法により詳細に検討した。病態モデルとしては一過性前脳虚血モデルを用いた。また、フラクタルカインの動態は特に海馬に焦点をあて検討した。コントロールのラット海馬では、錐体細胞層や顆粒細胞層などの神経細胞が弱く染色された。脳虚血負荷後の時間経過を追って調べた結果、フラクタルカイン様免疫活性は CA1 野において 6 時間後から増大し、1 日後、3 日後、7 日後では強い免疫活性を示す細胞が観察された。さらに、CA1 野錐体細胞におけるフラクタルカイン様免疫陽性細胞中にしめる TUNEL 染色陽性細胞の割合は脳虚血負荷後の時間経過とともに増加し虚血 7 日後ではほぼすべての CA1 野錐体細胞が強いフラクタルカイン様免疫活性を示すとともに TUNEL 染色陽性であった。この結果は海馬 CA1 野錐体細胞が細胞死に至る過程でフラクタルカインが蓄積されることを示している。一過性前脳虚血後の CA1 野錐体細胞層では遅延性の神経細胞死とそれに伴うミクログリアの集積・活性化が起こることが知られている。我々は、インビトロの実験においてフラクタルカインがミクログリアの遊走を惹起することも明らかにしており、海馬錐体細胞が細胞死に至る過程で細胞表面あるいは細胞内に蓄積されたフラクタルカインが神経障害部位への活性化ミクログリアの集積に関与している可能性が考えられる。

ミクログリアの数と活性を決める因子

°田中 潤也¹, 徳 和子¹, 前田 信治¹, 阪中 雅広²

¹愛媛大・医・生理, ²愛媛大・医・二解剖

ミクログリアは、種々の神経病理学的過程や発達期に増殖し、同時に活性化が起こる。逆に疾患の治療期や脳の成熟が進んだ段階では、ミクログリアは静止化し、細胞密度も低下する。我々は、ミクログリアの増殖活性化あるいは静止化と細胞数の減少を誘導する因子について、培養ラットミクログリアを用いた検討を行ってきた。まずミクログリアの活性化を誘導する因子について、一酸化窒素 (NO)、TNF α 、IL-6 の産生を指標に検索を行った。これらの生理活性物質産生誘導には、リポポリサッカライド (LPS) が必要であった。しかし、LPS 単独添加の効果は小さく、50 μ M 程度の L-セリンまたはグリシンが同時に存在するときに、著しい産生増大が見られた。血清についても検討したが、L-セリン・グリシンがごく低濃度しか存在しないときには、血清 +LPS の効果はごく限られたものであった。一方、血清は 1% の濃度で、ミクログリアの増殖を著しく刺激したが、L-セリンやグリシンにこの効果はなく、LPS は逆に血清の増殖刺激効果を抑制した。ミクログリア活性の L-セリン・グリシン依存性は、両アミノ酸の生合成に必要な 3 フォスフォグリセリン酸脱水素酵素の発現レベルが極めて低いためであると考えられた。これらの結果は、ミクログリアの増殖と活性化は異なる因子によって制御されている可能性を強く示唆する。ミクログリアの静止化と細胞数の減少に関しては、Th2 サイトカインであるインターロイキン 4 (IL-4) に着目した。IL-4 は、活性化ミクログリアによる NO とスーパーオキシドアニオン産生を抑制し、L-セリン・グリシンを含まない無血清培養液中では、ミクログリアにアポトーシス様細胞死を誘導した。IL-4 によるミクログリアの細胞死誘導は、低濃度の過酸化水素存在下で著しく加速された。RT-PCR により IL-4 と過酸化水素負荷時のミクログリアの遺伝子発現の変動を見ると、c-fos mRNA の一過性上昇後、GADD45、FAS の各 mRNA の急激な発現上昇が見られた。今回の実験条件では、GADD45 の発現上昇に伴うアポトーシスが観察されているものと思われた。IL-4 に関する実験結果は、脳内に侵入してくる T リンパ球が、ミクログリアの脳内密度決定に重要な役割を果たしていることを示唆している。

脳障害時におけるミクログリアでのヘムオキシゲナーゼ-1 誘導

°北村 佳久

京都薬科大学病態生理学

近年、脳障害時に神経細胞は細胞死が引き起こされるが、グリア細胞は比較的細胞死に陥りにくいことが知られている。この「生死を分けるものは何か」について、我々は熱ショック蛋白質として知られるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) に着目し、研究している。ヘムオキシゲナーゼは、NADPH チトクローム P450 還元酵素と共役し、ヘムを基質として一酸化炭素とビリベルジンが産生される。ビリベルジンはさらにビリベルジン還元酵素によりビリルビンに代謝され、ビリベルジンおよびビリルビンは生体内産生の強力な抗酸化物質として知られている。我々は以前、一酸化窒素 (NO) による神経細胞死の研究で、in vitro 系の培養グリア細胞において細菌内毒素 (LPS) 処理によりミクログリアに誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が誘導され、大量の NO を産生することを見出した。神経細胞は NO により細胞死を引き起こすにもかかわらず、ミクログリアはあまり細胞死に陥らないことに疑問を持った。この点について解析していくと、グリア細胞は NO により HO-1 を誘導することを見出したことが、HO-1 に着目するきっかけとなった。そこで、in vivo 系で、1) LPS とインターフェロン γ をラット海馬内に微量注入、2) カイニン酸の脳室内投与、3) 一過性前脳虚血を行ったところ、いずれもグリア細胞に HO-1 が誘導されることを見出した。さらに、抗炎症作用を持つプロスタグランジン (15d-PGJ2) や非ステロイド性抗炎症薬が HO-1 誘導を引き起こすことが明かとなった。最近、利根川グループにより HO-1 遺伝子欠損マウスが作成され、さらに昨年、世界初のヒト HO-1 遺伝子欠損の症例が金沢大学のグループから報告された。これらを比較すると、個体レベルでの症状および細胞レベルでのストレス感受性の高さなど、共通点が多い。また、HO-1 遺伝子導入マウスでは、脳梗塞巣が減弱するという報告もある。これらのことから、構成的に発現している HO-2 だけでは過剰のヘムの処理や生体防御能力としては不十分であること、また HO-1 の誘導によりストレス耐性を獲得することが推定される。

S75

ミクログリアのプロトンチャネルと pH ホメオスタシス

°久野 みゆき, 森畑 宏一

大市大・院・医・分子細胞生理

神経活動は一般にアシドーシスで抑制されアルカローシスで促進されるなど、中枢神経系の pH ホメオスタシスはニューロンやグリアの機能を維持するための重要な要因である。虚血、感染、変性疾患など神経組織の病変には細胞内外の pH の変化を伴うことが多いが、このような病態で活性化されるミクログリアが pH 環境の調節にどのように関与するかはよくわかっていない。ミクログリアにはユニークな pH 調節機構として膜電位依存性プロトン (H^+) チャネルが備わっている。このチャネル活性は静止型ミクログリア (ramified type) では低く活性型 (round/amoeboid type) では高い。 H^+ チャネルは、脱分極によって開口し細胞内から細胞外へと H^+ を排出するが、ポンプやトランスポータなど他の H^+ 調節機構に比べ大量の H^+ を急速に排出する能力があり、phagocytosis の過程で発生する強い細胞内アシドーシスと脱分極の補正に働くことが示唆されている。私達はアシドーシス環境下でのミクログリアの細胞行動に H^+ チャネルがどのように関与するかを検討してきた。lactacidosis 条件下ではミクログリアの細胞内 pH が顕著に低下すると共に細胞の膨化が起こるが、細胞外 pH が正常 (7.3) に保たれている場合でも細胞内 pH が低くなると cell swelling が誘発された。 H^+ チャネル活性は acidosis-induced swelling の過程に伴って増強され、cytotoxic な swelling からミクログリアを保護するように働く。同時に排出された H^+ が神経組織での H^+ シグナルの発信源となる可能性も示唆されている。ミクログリアの H^+ チャネルは細胞およびその周辺の状態にตอบสนองして細胞内外の pH ホメオスタシスに貢献すると考えられる。

S76

ニューロフィラメントのサブユニット構成と軸索内輸送

°田代 朋子

青山学院大学理工学部化学科

膜成分を運ぶ速い軸索内輸送の速度はほぼ一定であるが、細胞骨格を運ぶ遅い輸送は、神経の種類や生理的状況に応じてその速度や成分が変化する。なかでも、ニューロフィラメント (NF) 蛋白の輸送速度が老化によって著しく低下することは、NF の異常蓄積や輸送障害の原因として重要である。これは、モーター蛋白の速度で決まる速い輸送に対して、遅い輸送の速度は平均速度であり、細胞骨格蛋白の動態 (輸送されやすさ) に依存するためと考えられる。ここでは、ラット坐骨神経運動繊維の系を中心に、NF のリン酸化状態やサブユニット組成と輸送速度との関連をまとめ、NF の輸送調節機構について考察する。

NF の三種類のサブユニット蛋白 (NF-H, NF-M, NF-L) のうち、NF-L は大部分が重合状態にあるが、NF-H は細胞体からの距離によらず約 20% が可溶性である。輸送途上の標識 NF-H に注目すると、輸送の波のピークに比べ、先端部で溶解性が有意に高い。軸索損傷後の再生過程では、チューブリン、アクチンの選択的加速が起こるのに伴い、損傷部位の近位側で輸送途上の NF-H の溶解性が上昇する (35%)。損傷遠位側では 1 週間以内に既存 NF 蛋白が完全に消失した後、新たに伸長する再生軸索の NF-H は溶解性が高く (60%)、C-末端側のリン酸化程度が低い。再生過程を通じて NF-L の溶解性は低いままであることから、NF の脱重合ではなく、主として NF-H の離脱が起こると考えられる。一方、発育初期 (生後 1 週) の NF 蛋白は、輸送速度が 4.5 mm/日と速く、NF-H の溶解性が高いことと並んで、NF-H 含量が低く、NF-M 含量が高いという特徴を示す。生後 3 週にかけて、NF-H が増加するとともに、NF の輸送速度が低下する。更に、NF の輸送速度が 0.8 mm/日以下に低下した老化神経では、NF-M の相対的減少がみられている。

成熟軸索の NF は、高リン酸化型 NF-H を多く含み、大きなネットワーク構造を形成している。以上の *in vivo* 実験から結論される輸送されやすい NF はこれとは反対に、a) NF-H 含量が低い、b) NF-H のリン酸化状態が低い、c) NF-M 含量が多い、という特徴を示し、*in vitro* でもネットワークに組み込まれにくいことから、輸送頻度が高くなるものと考えられる。

S77

Slow Axonal Transport of Neurofilaments

°Anthony BROWN

Department of Biological Sciences, Ohio University

Neurofilaments are synthesized and assembled in the nerve cell body and transported along axons by slow axonal transport. Previous attempts to demonstrate the movement of these cytoskeletal polymers in cultured nerve cells using fluorescence photobleaching have been unsuccessful, and this has led to considerable controversy concerning the mechanism of movement. To confirm that neurofilaments are transported in cultured nerve cells, we adapted the classic axonal constriction paradigm to single cells by constricting single axons with fine glass fibers. Neurofilaments accumulated proximal to the constriction site in an energy-dependent manner and at an estimated average rate of 3.1 mm/day, consistent with net anterograde movement by slow axonal transport. To investigate the transport of single neurofilaments, we used live-cell fluorescence imaging to observe GFP-tagged neurofilament polymers in naturally occurring and photobleached gaps in the axonal neurofilament array of cultured nerve cells. The neurofilaments moved rapidly, with peak rates of up to 3 $\mu\text{m/s}$, but spent most of their time pausing. Approximately 20-30% of the filaments moved in a retrograde direction. These data indicate that the slow rate of slow axonal transport is the result of rapid bi-directional movements interrupted by lengthy pauses. This suggests a general model for slow axonal transport in which the movement of cytoskeletal and cytosolic proteins is rapid, intermittent and highly asynchronous. The neurofilament polymers may be transported along microtubules by the action of plus- and minus- end directed motor proteins.

S78

ニューロフィラメントの重合制御と細胞骨格の可塑性

°中村 祐, 武田 雅俊

大阪大学大学院・医学系研究科・神経機能医学講座
精神医学

中間径線維蛋白であるニューロフィラメント (NF) は神経細胞骨格蛋白の中で最も含量多い蛋白であるが、従来は神経細胞の基本的骨格を形成する静的な細胞骨格蛋白と考えられてきた。しかし、我々は蛍光標識された NF-L を用いて、実際は動的な平衡状態にある細胞骨格であることを証明し、さらに、そのダイナミックス (重合の調節及び平衡状態の調節) はリン酸化により調節を受けているを見いだしてきた。一方、カルモデュリン依存性リン酸化酵素 II (CaMKII) は、海馬における長期増強作用現象 (LTP) などに関与し、記憶の形成や神経の可塑性に深く関わっていることが知られている。In vitro の実験系においては、CaMKII が NF-L の head 領域をリン酸化し、重合-脱重合を制御していることがみられた。そこで我々は CaMKII などの kinase による NF-L のリン酸化部位の決定を MALDI/TOF 型質量分析計を用いた非 RI 的な方法により行い、NF-L のリン酸化部位特異的な抗体群 (abNFLs) を作成した (J.Neurochem. 74:949, 75:373, 2000)。abNFLs を用いて LTP を生じたマウス海馬切片を検索したところ、CaMKII のリン酸化部位を認識する抗体 (abNFL57) で、一部の apical dendrite が染色され、AP-5, KN-62 の存在下ではみられなかった。また、Immunoprecipitation/western blot 法 (IP-w 法) によると LTP を生じた切片では、約 3 倍に abNFL57 で認識される NF-L が増加していた (J.Neurochem. 75:373, 2000)。さらに、長期抑制作用 (LTD) を生じたマウス海馬切片を染色したところ、LTP と同様に abNFL57 で、一部の apical dendrite が染色された (Neuroreport, in press)。さらに、開眼以前より長期完全暗室飼育された dark rearing rat に 1 時間の光刺激を負荷すると、大脳視覚野に限局して、LTP や LTD で見られたのと同様に、abNFL57 で線維状の構造物が染色された。さらに同部位にて、IP-w 法によると abNFL57 で認識される NF-L が約 5 倍に増加していた。これらの結果から、CaMKII による特異的な NF-L のリン酸化が神経の可塑性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

S79

プロリン指向性キナーゼとニューロフィラメントのリン酸化

°久永 真市

東京都立大学理学研究科生物科学専攻

ニューロフィラメントは神経細胞に特異的な中間径繊維であり、軸索の最も主要な細胞骨格成分である。ニューロフィラメントは他の中間径繊維と異なり、分子量の異なる三つのサブユニット (NF-L、NF-M、NF-H) から構成されている。NF のサブユニットはいずれも N 末頭部、 α -ヘリックス構造をとるロッドと呼ばれる中央部、C 末尾部の三つの領域からなるが、NF-M と NF-H の尾部には Lys-Ser-Pro (KSP) 配列からなる数多くのリン酸化部位が存在する (NF-M で 20 から 30、NF-H で 50 前後)。それらは軸索内では殆どがリン酸化されており、そのため MF-M と NF-H は神経細胞内における最もリン酸化されている蛋白として知られている。KSP 配列は二種以上に区別され、異なるプロリン指向性キナーゼのターゲットとなっている。KSPXK 配列は CDK5 によってリン酸化され、KSPXK と KSPXX 配列は MAP キナーゼによってリン酸化される。また、NF-H の尾部のロッドに近いところには Glu に富む種間で保存のよい領域があるが、この領域内の SP 配列は GSK3 β によってリン酸化されることが最近判明した。このように、NF-H は三つの異なるプロリン指向性キナーゼによって、部位特異的にリン酸化される珍しい蛋白質である。NF-H の C 末尾部内における全体のリン酸化は尾部の負電荷を増し、隣り合うニューロフィラメント間の距離を広げていると推測されている。一方、CDK5 によるリン酸化部位は微小管との相互作用に関係していることが示されているが、他のリン酸化部位の役割は全く判っていない。一方、プロリン指向性キナーゼである MAP キナーゼ、CDKs、GSK3 など、いずれも細胞内の情報伝達系において重要な役割を果たしている。それぞれのプロリン指向性キナーゼが NF-H のどのような配列をどのように認識し、そのリン酸化がどのように制御されているかは非常に興味ある点である。ニューロフィラメント蛋白は軸索に大量にあり、軸索におけるプロリン指向性キナーゼの活性変化などを検出するのに優れた蛋白でもある。ここでは、我々の研究を中心にして、NF 蛋白の PDPKs によるリン酸化についてこれまで判っていることを紹介する予定である。

S80

ニューロフィラメントの異常を伴う疾患—筋萎縮性側索硬化症を中心として

°佐々木 彰一

東京女子医科大学脳神経センター神経内科

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では病初期からニューロフィラメント (NF) NF の蓄積が軸索、前角細胞の胞体および樹状突起に認められる。時に脊髄前角細胞と連結してみられる近位部軸索の腫大 (spheroid) は、錯綜する NF の蓄積からなり、連結する神経細胞体がしばしば正常構造を示すことから、ALS の初期変化のひとつとされている。NF は正常状態では軸索内でのみリン酸化され、神経細胞体や樹状突起では非リン酸化の状態にあるが、ALS では下位運動ニューロンの胞体および近位部軸索内の NF がリン酸化されて蓄積している。これは、NF の軸索流の障害により胞体内から軸索への輸送が妨げられた結果、NF が長期間胞体内に停留し、早期からリン酸化されたものと考えられる。同様な状態が ALS の動物モデルである iminodipropionitrile やアルミニウム中毒、あるいは canine spinal muscular atrophy のイヌなどで認められている。

ヒト NF-H 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、ヒト ALS と同様に前角細胞や近位部軸索に NF の異常蓄積がみられ、ヒト NF-L 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスでも、早期に NF の異常蓄積を伴う運動ニューロン症状が出現している。さらに、NF の組立 (assembly) を妨害し早期から運動ニューロンの変性を生じさせた NF-L の突然変異マウスの一部で、前角細胞の胞体および近位部軸索に NF の著明な蓄積が生じている。われわれは、変異 SOD1 トランスジェニックマウス (G93A) の脊髄を検索し、前角内にしばしば spheroid あるいは帯状の軸索腫大を認めた。NF の軸索輸送の障害が、直接的あるいは間接的に運動ニューロンの変性に関与しているものと考えられる。

グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) の酵素免疫測定法 (EIA) の確立とラット脳発達過程における発現変化

°新田 淳美, 堀 琢也, 古川 美子, 古川 昭栄
岐阜薬大・薬・分子生物

グリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF) は比較的最近見出された神経栄養因子の1つである。脳内ドパミン作動性神経系に対して分化・生存維持作用を持つことからパーキンソン病の治療薬としても関心を持たれている。しかし、GDNFをタンパクレベルで定量する方法が確立されていないことから、生体内での局在や生理機能についての詳細についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、GDNFの酵素免疫測定法 (EIA) の確立を試み、ラット脳発達過程における発現変化について検討した。

ヒト組換え型 GDNF をウサギに免疫することによって抗血清を作成した。プロテイン A で精製した IgG を固相抗体、アフィニティカラムで精製した抗体を標識抗体として、two-site EIA 法を確立した。Wistar 系雄性ラットの脳を胎生期 16、17、19、20、21 日齢および生後 1、3、5、8、14 日、3、4、8、20 週目に取りだし、脳各部位 (大脳皮質、線条体、海馬および小脳) に分割し、サンプルとした。

本研究で確立した EIA 系の検出感度は 1.0 pg/ml であり、1 µg/ml の TGF-β や Neurturin などの関連因子とは交叉を示さなかった。またラット脳を部位別に分割し、19 倍容量の 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH7.4, 1M NaCl, 2% ウシ血清アルブミンを含む) でソニケーターにて破碎した後超遠心を行った。上清を同容量のクロロホルムと攪拌し遠心上清を EIA のサンプルとした。100pg/ml の GDNF を含む同上緩衝液で脳組織をソニケーションした時の添加回収率は 73.5% であった。ラット大脳皮質では、今回測定した全ての発達過程において測定が可能であったが、胎生期よりも生後において高い発現量を示した。また、線条体では、胎生期、特に出生直前に高い発現が観察されたが出生後は発現量が著しく低下した。また小脳では、胎生期に著しく高い発現が観察されたが、出生直前で低下し、出生後は検出限界以下となった。これらの結果は、GDNF が大脳皮質における神経細胞の生存維持や機能発現に関与し、線条体や小脳における初期神経分化に働いている可能性を示唆する。

L-Ser は小脳プルキンエ細胞の生存と分化を促進するバグマングリア由来の栄養因子である

°古屋 茂樹¹, 田端 俊英², 三苫 純也³, 山田 恵子⁴, 山崎 美和子⁴, 渡辺 雅彦⁴, 狩野 方伸², 平林 義雄¹
¹理化学研究所脳科学総合研究センター神経回路メカニズム研究グループ, ²金沢大学医学部第2生理学教室, CREST 科学技術振興事業団, ³Glycobiology Program, The Burnham Institute, ⁴北海道大学医学部生体構造解析学

アストロサイトは中枢神経細胞の生存維持、機能、損傷からの修復に必須の役割を果たしている。さらに発達中の神経細胞に対しても積極的に栄養因子を供給し、その生存を支えていると考えられている。しかし、アストロサイトに由来する中枢神経細胞の生存促進因子の物質的な実体はまだ明らかになっていない。

我々は小脳アストロサイトから調製した条件培養液がプルキンエ細胞の生存と樹状突起形成を著しく促進することから、その機能分子の同定を行なった。その結果、非必須アミノ酸 L-Ser がアストロサイト条件培養液中の小脳プルキンエ細胞の生存維持と樹状突起分化を促進する主要な因子であることを明らかにした。L-Ser はアストロサイトによって条件培養液中に大量に放出されており、その濃度は3日間のコンディショニングによって 0.1 mM に達した。この活性は L- 体特異的であり、D-Ser には見られなかった。また同条件培養液の中に検出される中性非必須アミノ酸 Gly にも同程度の生存促進活性が観察されたが、条件培養液中の濃度は L-Ser に比べ 1/5 程度であった。これらのアミノ酸は培養プルキンエ細胞の膜興奮性の発達にも必須であった。

L-Ser によるプルキンエ細胞の生存分化促進の分子機構を明らかにするために、L-Ser 合成関連酵素群の脳内発現を検討した。その結果、プルキンエ細胞において L-Ser 合成の第1段階酵素である 3-phosphoglycerate dehydrogenase の mRNA と蛋白質レベルの発現が著しく抑制されており、その一方でプルキンエ細胞に隣接して親密な空間配置を取るバグマングリア細胞で高発現していることが明かとなった。バグマングリア細胞はプルキンエ細胞に栄養支持的な作用を持つと推定されていたが、以上の結果は、L-Ser がそのメディエーターとして *in vivo* で機能している可能性を強く示している。

S83

活性化 Akt は p53 による神経細胞死を抑制する

山口 淳¹, 玉谷 実智夫¹, 松崎 秀夫¹, 涛川 一彦², 木山 博資², 満田 憲昭¹, 遠山 正彌¹

¹大阪大学医学部機能形態学講座、CREST, JST, ²旭川医科大学第一解剖

セリン/スレオニン・キナーゼ Akt は、成長因子により、PI3-K を介してリン酸化を受け活性化され、神経細胞において抗アポトーシス作用をもつ。これまで、Akt の細胞保護作用機構としては、Akt が、アポトーシス経路で働く、BAD、Caspase9、FKHRL1 を直接リン酸化することにより、それらの作用を抑制することが報告されている。一方、癌抑制遺伝子として知られる p53 は、低酸素や過剰な一酸化窒素 (NO) のなどのストレス時に神経細胞に誘導され、神経細胞死を誘導することが報告されている。今回、我々は、p53 knock out マウスの初代神経細胞培養や、Akt を強制発現させるアデノウイルスを用いて、Akt が、低酸素や NO により誘導される p53 が惹起する神経細胞死を抑制し、その機構の一つとして、p53 を介する Bax 等の転写活性を Akt が抑制することを明らかにしたので報告する。

S84

エリスロポエチン受容体を介した神経伝達物質放出の阻害と虚血性神経細胞死の抑制

川上 政勝^{1,2}, 関口 真理子², 二本松 伊都子², 小崎 俊司³, 高橋 正身^{1,2}

¹東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻, ²三菱化学生命科学研究所, ³大阪府立大学

脳虚血が起こると一過性のグルタミン酸 (Glu) の放出が引き起こされ、その結果 NMDA 受容体の過興奮による細胞内へのカルシウムの過剰流入が生じ、神経細胞死へとつながると考えられている。脳虚血時に低酸素状態になると、造血因子として知られるエリスロポエチン (EPO) の遺伝子が腎臓のほか、脳でも誘導されることが知られてお、虚血性神経細胞死からの保護作用が注目されている。培養した小脳顆粒細胞や、PC12 細胞に EPO を作用させると Ca²⁺ 依存的な神経伝達物質の放出が顕著に抑制された。EPO による抑制作用は、処理後約 20 分で最大に達した。同様な抑制効果は EPO レセプターのアゴニストである EPO mimetic peptide (EMP) によっても見られたが、Cys を Ser に置換した不活性アナログでは見られなかった。EPO による抑制作用はチロシンキナーゼの阻害剤である genistein で見られなくなったが、不活性アナログである genistin では影響されなかった。さらに EPO を作用させると JAK のチロシンリン酸化が亢進された。小脳顆粒細胞に glucose 除去下で KCN を作用させ、化学虚血を起こさせると顕著な Glu 放出が認められた。シナプス小胞の開口放出を阻害する B 型ボツリヌス毒素によって虚血による Glu 放出は顕著に抑制された。化学虚血による Glu 放出は EMP によって顕著に抑制された。培養した海馬スライスを 20 分間化学虚血処理を行うと、24 時間後に CA1 や歯状回で神経細胞死が引き起こされたが、EMP を作用させるとその神経細胞死は著しく軽減された。以上の結果から、EPO レセプターの活性化によって脳虚血時の Glu の過放出が抑制され、結果的にシナプス後部への NMDA 受容体を介したカルシウムの過剰流入を抑えることにより、脳虚血急性期での神経細胞死が軽減される可能性が考えられた。

1B1400

小胞体を起源とする細胞死メカニズムの解析

°片山 泰一^{1,2,3}, 人見 淳一^{1,3}, 今泉 和則^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学 (解剖学第2),

²田辺製薬 (株) 創薬研究所, ³CREST 科学技術庁

最近、アルツハイマー病や脳虚血で観察されるような神経細胞死が小胞体 (ER) を起源とする細胞死であると指摘され始めた。ER は糖鎖修飾や立体構造形成を通して、蛋白質の正常な折り畳みを行う場である。Tunicamycin や Thapsigargin のような ER 機能を攪乱する刺激によって ER 内に折り畳みの異常な蛋白質が蓄積する状態を ER ストレスと呼ぶ。この状態が長時間続くと細胞はアポトーシス様の細胞死を引き起こす。しかしその詳細なメカニズムは明らかではない。我々は ER ストレスを負荷した際の細胞死シグナル伝達機構について神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞を用いて、ER ストレス負荷後、経時的に細胞を回収或いは固定し、遠心分離法による細胞内オルガネラ分画、免疫沈降法、免疫組織化学的解析等により検討を行った。分子シャペロン BiP/GRP78 および ER ストレスの際に、特異的に活性化される Caspase-12 が ER ストレス負荷時に ER から細胞質に放出されることを見出した。また、それに同調するかたちで Caspase-3 活性の上昇とその後に核の断片化を伴うアポトーシス様の形態変化を観察した。本学会では、この BiP/GRP78 及び Caspase-12 の細胞質への遊離が ER ストレス後の細胞死シグナルの活性化にどのように結びつくかを議論したい。

1B1420

シスタチン C の酸素ストレスによる神経細胞死抑制効果

°西山 啓次, 西尾 チカ, 山田 雅司, 畠中 寛
大阪大学蛋白質研究所生合成部門

我々はラット胎仔培養中枢ニューロンを用い、高酸素 (50%) 気相下で誘導される細胞死について研究を行ってきた。この死はアポトーシスであり、この過程で、システインプロテアーゼインヒビターのひとつであるシスタチン C の mRNA および蛋白質の発現が上昇することを見出した。シスタチン C は主にリソソーム内のシステインプロテアーゼであるカテプシン B、H および L に特異的に働き、これらを強く阻害することが知られている。しかし、脳神経系におけるニューロン死に関わる機能については明らかになっていない。

今回我々は、高酸素負荷によって誘導される細胞死において、シスタチン C がどのような役割を担っているかを明らかにするため、PC12h 細胞のシスタチン C 安定発現株を樹立した。この細胞株は高酸素負荷に対して強い耐性を示した。また、この細胞死抑制効果はシスタチン C の発現量に依存した。さらに、この効果がシスタチン C のカテプシン阻害作用によるものであるかを調べるため、カテプシン阻害剤である CA074、E-64c、ロイペプチンの添加実験を行った。しかし、どの薬剤においても細胞死抑制効果は認められなかった。この結果はシスタチン C の細胞死抑制効果がそのカテプシン阻害作用とは異なる働きによるものである可能性を示唆している。PC12h 細胞以外に初代培養海馬、大脳皮質ニューロンについても、シスタチン C を発現させ、シスタチン C の細胞死抑制効果についての解析も行っており、予備的知見を得ている。

1B1440

脊髄神経節ニューロンのアポトーシスにおける APP 断片の蓄積

○桑子 賢一郎, 西村 伊三男, 二宮 貢士, 吉川 和明
阪大・蛋白研・機能制御

アルツハイマー病アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 中でも APP695 はニューロンに豊富に発現している膜結合型蛋白質である。しかし、*in vivo* および *in vitro* 条件下で分裂終了ニューロンに APP695 を過剰発現させると、ニューロンはカスパーゼ 3 の活性化を伴ったアポトーシスを起こす。一方、初代培養したニワトリ脊髄前角運動ニューロンの培養液から栄養因子を除去すると、アポトーシスが起るが、その際、APP の遺伝子発現上昇を伴って細胞内に APP 断片が蓄積する。これらの知見から、ニューロン内に APP が蓄積するとカスパーゼ 3 が活性化され、同時に APP 自身がカスパーゼ 3 の基質になるものと推定される。そこで今回は、発生期に起こるニューロンの生理的細胞死 (アポトーシス) において、APP 断片の蓄積とカスパーゼ 3 の活性化が見られるか否かを、マウス胎仔 (E12.5) の脊髄神経節 (DRG) を用いて免疫組織化学的に検討した。

マウス胎仔 (E12.5) から摘出した DRG を常法に従って、パラフィン包埋し、ABC 法および蛍光抗体法により免疫染色を行った。APP の C 末端に対する抗体 (AC1) で染色すると、DRG や三叉神経節などで強い免疫陽性を示す細胞が見られた。AC1 免疫陽性細胞の多くは TUNEL 陽性を示し、核の凝縮も認められた。これらの AC1 免疫陽性細胞は、活性型カスパーゼ 3 特異的抗体によっても染色された。一方、APP の細胞内ドメインに存在する活性型カスパーゼ 3 の切断配列 (APP661-664) の N 末端側の断端に特異的な抗体 2 種 (SAC, LAC) を作製して免疫染色を行うと、DRG 内で両抗体で染色される細胞が見られた。また、発生期にアポトーシスが起ることが報告されている三叉神経節、脊髄前角、小脳、中脳などでも両抗体で強い免疫陽性を示す細胞が見られた。さらに、DRG の連続切片を作製して、活性型カスパーゼ 3 特異的抗体と SAC または LAC で染色すると、両者に免疫陽性を示す細胞が認められた。これらの結果から、ニューロンの発生期におけるプログラム細胞死においても APP-カスパーゼ 3 系が働き、APP の蓄積と同時に、カスパーゼ 3 によって切断された APP 断片が蓄積することが推定される。

1B1500

活性酸素によるニューロン死とミトコンドリア呼吸鎖活性の低下

○五味 不二也¹, 内田 洋子²
¹都老人研超微形態部門, ²都老人研神経病理部門

活性酸素は、変性疾患の最終段階でニューロン死をひき起こす共通の原因として有力視されている。そこで活性酸素による細胞死の際に発現が変化する遺伝子の探索を試みた。その結果ミトコンドリアにコードされる NADH dehydrogenase subunit 4 が細胞死の commitment point (酸素曝露 12 時間) で減少していたため、ミトコンドリアにコードされる他の遺伝子の発現を調べた。さらにミトコンドリア呼吸鎖活性、細胞内 ATP 量、cytochrome c の細胞質への漏出及びミトコンドリアの膜電位について酸素曝露後の経時的变化を調べた。

NADH dehydrogenase subunit 4 は酸素曝露開始時よりその発現が低下し、24 時間後には対照の 60% 以下まで減少した。ATPase subunit 6 の発現は 6 時間後には対照の 70% 以下に減少し、その減少は 24 時間まで続いた。Cytochrome b と cytochrome oxidase subunit 1 の発現も酸素曝露 6 時間目から約 20% 減少し、その減少は 24 時間まで続いた。Cytochrome oxidase subunit 2 と 12S RNA は酸素曝露後 6 ~ 12 時間で、約 20% の発現減少を認めたが、24 時間後にはほぼ対照値に戻った。NADH dehydrogenase subunit 1 にはほとんど変動が見られなかった。ミトコンドリア呼吸鎖の complex II 及び IV の活性低下が酸素曝露後 12 時間で認められた。他の complex の活性も酸素曝露後 24 時間で低下していた。しかし、ニューロンの ATP 含量は 48 時間まで低下しなかった。ミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の漏出は酸素曝露後 6 時間で確認できた。一方ミトコンドリアの膜電位の低下は 48 時間まで認められなかった。

以上の結果よりニューロン死に必要な酸素曝露 12 時間で起きている呼吸鎖 complex II 及び IV の活性低下と cytochrome c の漏出が 50% 酸素によるニューロン死の決定に関与していると考えられる。

1B1520

NR2B 選択的 NMDA 受容体アンタゴニストによるアポトーシスの誘導

°坂本 ゆかり, 高寺 恒雄, 大屋敷 孝雄
北陸大学薬学部臨床化学

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体のひとつである NMDA 受容体は、 Ca^{2+} 透過性を有し、サブユニット NR1 と NR2 から構成されている。NR2 には 4 つのサブタイプ (NR2A-2D) があり、大脳皮質では NR2A 及び NR2B が発現している。今回、NR2B 選択的 NMDA 受容体アンタゴニストの ifenprodil により誘導される細胞毒性とそのメカニズムについて、ラット大脳皮質初代培養神経細胞を用いて調べた。

ラット胎仔 (胎齢 18-20 日) から大脳皮質細胞を調製し、培養 9-10 日目の細胞に ifenprodil (1-10 μM) 処理を 1~2 日間行った。細胞毒性の程度をトリパンブルー染色及び乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出量により測定し、蛍光試薬 Hoechst 33258 による核染色及び DNA 断片化の検出によりアポトーシス様細胞死の有無を調べた。Caspase-3 活性は蛍光ペプチド基質 (Ac-DEVD-MCA) を用いて測定した。細胞内 Ca^{2+} 濃度は蛍光試薬 Indo-1 を用いた ACAS570 による画像解析により測定した。

ifenprodil の添加により細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下がみられ、濃度依存的に神経細胞死が誘導された。この細胞死は NMDA 受容体アゴニストである NMDA の添加によって抑制された。また、ifenprodil の濃度依存的に caspase-3 の活性上昇がみられ、核の凝集・断片化及び DNA 断片化が確認されたことから、アポトーシスであることが示された。ifenprodil による細胞死は、caspase-3 阻害剤の添加によって抑制された。また、神経栄養因子である insulin-like growth factor I (IGF-I) 及び brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide は、ifenprodil による caspase-3 の活性化及びアポトーシスを完全に抑制した。

以上のように、培養 10 日後のラット大脳皮質神経細胞では NR2B を含む NMDA 受容体の阻害によって caspase 活性化を介したアポトーシスが誘導され、NMDA 受容体を介したシグナル経路の生存維持への関与が示唆された。

1B1540

PKC は PC12 細胞の覚醒剤誘導細胞死を抑制する

°上村 公一, 吉田 謙一
東大院・医・法医

【目的】覚醒剤である methamphetamine (MAP) は、興奮系薬剤に分類され、dopamine neuron の変性及び神経細胞死を引き起こすが、その機構については十分に解明されていない。MAP による神経系細胞の細胞死に対する apoptosis の関与、その過程での protein kinase C (PKC) の関与について明らかにするために、PC12 cell を用いて検討した。

【方法及び結果】副腎褐色細胞腫由来の PC12 cell を、血清存在下、DMEM 培地で培養し、1~5 mM MAP を添加し、6~48 時間後に erythocin B を用いた色素排除法で生存率を測定したところ、濃度及び時間依存的に低下し、TUNEL 陽性細胞の数は増加した。また、Giemsa 染色では核の濃染像が見られた。caspase の非特異的阻害剤 z-VAD-fmk は、生存率の低下を抑制し、caspase に依存した細胞死であることが示唆された。しかし、DNA 断片化 (ladder) や核の縮小、断片化、アポトーシス小体形成は認めないことにより、典型的なアポトーシスとは異なる。

細胞死は PMA (PKC activator) で抑制され、PKC 阻害剤である calphostin C、bisindolylmaleimide で促進された。MAP 添加により、PKC 活性は 24 時間後まで漸増したことから、この細胞死は MAP により活性化される PKC により抑制されることが示された。各々 PKC- α 、 δ の特異的阻害剤 safinol, rottlerin により生存率の低下が認められなかったことから PKC- α 、 δ は、MAP による細胞死に関与していないと推定された。Western blot 法で PKC の局在を観察すると経時的に PKC- ϵ が細胞質から細胞膜へ translocation していた。一方、antisense PKC- ϵ は MAP による細胞死を増強させた。さらに、glutamine 受容体拮抗薬 MK801 は MAP による細胞死を抑制し、その効果は PKC 阻害剤により抑制された。

【考察】MAP は PC12 cell に細胞死を引き起こすが、純粋な apoptosis ではない。その過程で、PKC- ϵ が活性化され、PC12 細胞の MAP による細胞死を抑制していることが示唆された。PKC が glutamine 受容体をリン酸化し、その効果を修飾することにより、PKC- ϵ は glutamine 受容体を介して、PC12 細胞の MAP による細胞死を抑制している可能性がある。

1B1600

NAIP suppression of the cell death requires a 4 alpha-helix BIR domain

Erin YOSHIDA N¹, Harumi SAKAI¹, Asako OTOMO¹, °Joh-E IKEDA²

¹NeuroGenes, ICORP/Japan Science and Technology Corporation, ²Department of Molecular Neuroscience, Institute of Medical Sciences, Tokai University

The neuronal apoptosis inhibitor protein (NAIP) was isolated as a causative gene for spinal muscular atrophy (SMA), a neurodegenerative disease characterized by the loss of anterior horn cells in the spinal cord, it eventually leads to death in the most severe Type 1 form. During the same screen for SMA candidate genes, an independent locus named survival motor neuron (SMN) was also identified. With regards to NAIP's anti-apoptotic function, it was first shown that ectopic expression of NAIP rescued Rat-1 and CHO cells from menadione-induced cell death. Subsequent *in vivo* analyses have shown that increased expression of NAIP protects rat hippocampal neurons from ischemic damage, granulosa cells in the mouse ovarian follicle from developmental apoptosis, and mouse neurons from kainic-acid induced injury. NAIP is being known as an inhibitor of apoptosis protein (IAP) that contains baculoviral IAP repeats (BIRs). IAP proteins have been shown to protect cells from viral infection, receptor-mediated apoptosis and chemotoxic stresses. We tested NAIP's ability to suppress cell death caused by various apoptosis-inducing compounds and defined which regions of the protein are essential for this activity. We found that clones which expressed an N-terminal fragment containing the 3 BIR domains suppressed cell death due to menadione, but not death caused by various other cytotoxins. Finer mapping of this activity, we found that the BIR domains are necessary, and in particular, that the BIR2 is essential. As well, all four BIR2 α -helices are required as truncation of the fourth helix eliminates inhibition of cell death. Considering that previous studies have shown that NAIP does not directly inhibit caspases *in vitro*, and since the region upstream of its BIR2 motif does not show conservation of key residues that are known to be involved in caspase 3 inhibition, NAIP may block cell death via the BIR2 domain using a caspase-independent mechanism.

1B1620

コルヒチンによる上頸神経節細胞のアポトーシスにおけるカスパーゼ非依存的過程

°木下 雅之¹, 二宮 孝文², 小池 達郎¹

¹北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻, ²札幌医科大学医学部解剖学講座

コルヒチンは microtubules の解重合を促進し、軸索輸送を阻害するため、神経ネットワークの障害による神経細胞変性のモデル系作製に良く用いられる neurotoxin である。培養ラット上頸神経節細胞をコルヒチンで処理すると用量依存的に細胞死が誘発された。C5-NBD-ceramide や β -tubulin 抗体などを用いた染色によりその効果を確認した。この細胞死は TUNEL 染色陽性であり、Hoechst 染色により核の断片化が確認された。カスパーゼ-3 の活性測定や免疫組織化学などからカスパーゼ-3 の活性化が起こるにもかかわらず、その阻害剤 Ac-DEVD-CHO では細胞死も核の断片化も抑制されなかった。一方、カスパーゼの一般的な阻害剤である z-VAD-fmk では核の断片化は抑制されたが、細胞死そのものは部分的にしか抑制されなかった。一方、セリンプロテアーゼの阻害剤である TLCK は単独でも細胞死を著しく抑制し、さらに z-VAD-fmk と組み合わせることで顕著な効果が見られた。即ち、コルヒチンが誘発する小胞体の空包化、核の断片化などが二つの阻害剤の組み合わせによって完全に抑制されることが電子顕微鏡観察により確認された。TPCK、ロイペプシン、APMSF などはこの神経細胞死を抑制しなかった。このような結果から、ラット上頸神経節細胞をコルヒチン処理すると、カスパーゼに依存的な細胞死過程と非依存的な細胞死過程が誘導され、後者では TLCK 感受性のセリンプロテアーゼが重要な役割を果たしていることが示唆された。

1C1400

BMP とレチノイン酸によって誘導される神経特異的新規遺伝子のプロモーター解析

°中谷 俊幸¹, 荒井 直亮¹, 川野 裕美¹, 小林 三和子¹, 松本 健一², 有賀 寛芳², 松岡 一郎¹

¹北海道大学大学院薬学研究科神経科学分野, ²北海道大学大学院薬学研究科分子生物学分野

これまでに我々は、骨形成因子 (BMP) とレチノイン酸 (RA) が、交感神経の発達初期に作用して神経栄養因子に対する応答性を誘導することを見いだした。この作用機構を明らかにするために、BMP/RA によって誘導される遺伝子を探索したところ、神経特異的な新規遺伝子が見いだされた。この遺伝子は既知の蛋白質とは全く相同性を持たない約 80KDa の新規蛋白質をコードしているが、プロセッシングを受け約 40KDa の蛋白質として存在することが示唆された。本研究ではこの新規遺伝子の発現調節機構を明らかにするために、遺伝子上流域を解析した。

種々の神経系株化細胞を用いて Dual-Luciferase-Assay 法により、この遺伝子上流部の転写活性を測定した。その結果、エクソン 1 の転写開始点より上流約 4.5kb までの領域にプロモーター活性が見いだされた。さらにこの領域を詳細に解析したところ、上流約 340bp まで短くしても同様の活性が見られた。一方、エクソン 1 上流 4.5kb までの領域には BMP / RA に対する応答配列が存在することも示唆された。現在、この遺伝子の機能を明らかにするために遺伝子欠損マウスを作成中であり、組み換え ES 細胞株を樹立したところである。

1C1420

HLH 型転写因子によるオリゴデンドロサイト発生分化の調節

°鹿川 哲史¹, 斉藤 哲一郎², 和田 圭樹¹, 中平 英子¹, 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部門, ²京都大学再生医学研究所再生統御学研究部門

ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子は神経初期発生を調節する重要な分子であることが知られている。我々は昨年度の本学会においてオリゴデンドロサイトの初期発生も Mash1 によって促進され、Hes5、Ids などの HLH 型転写因子により抑制的に調節を受けている可能性を示した。本年は、オリゴデンドロサイト前駆細胞株 CG4 をもちいて、分化誘導培養条件下でのこれら HLH 型転写因子群の相互作用を考察した。

CG4 細胞をその培養液から B104 細胞の培養上清を除きオリゴデンドロサイトに分化誘導をかけると、オリゴデンドロサイトに特徴的な突起を数多く伸ばし、72 時間後には 70% の細胞が O4 抗体陽性細胞に分化する。Mash1 蛋白質の DNA 結合活性をゲルシフトアッセイ法を用いて測定すると、誘導開始後急速な変化が見られ 72 時間後には消失した。ところがこの間 Mash1-mRNA の量は変化しなかった。Id2、3、4-mRNA は誘導開始後一過性に発現が消失し 72 時間後には再び強く発現してくることがわかった。すなわち Mash1 蛋白質の活性がこれを阻害する Ids の発現量によって調節されていることが考えられた。一方、CG4 細胞を 20% 血清条件で培養し、アストロサイトへ分化誘導をかけた際にも Mash1 の DNA 結合活性は消失する。この際にも Mash1-mRNA 量は変化せず、持続的な Ids の発現上昇が見られた。この CG4 細胞に Hes5 や Id2 を強制発現させると、細胞分化に特徴的な突起伸展が見られ、HLH 型転写因子が実際に細胞分化に機能していることが示唆された。逆に Mash1 を持続的に過剰発現させても形態的变化はほとんど見られなかった。これらの結果をまとめると、前駆細胞からオリゴデンドロサイトやアストロサイトへの細胞分化過程には共通して Hes5 や Ids による HLH 転写因子の活性阻害が見られるが、オリゴデンドロサイトへ分化する際には一過性に Mash1 の活性上昇を必要とすることが考えられた。現在 Mash1 ノックアウトマウスの解析を進めているので合わせて報告したい。

1C1440

ラット前脳由来の Neurospheres の増殖と分化における発生初期での FGF および EGF 応答性について

○中山 たかね, 山之端 万里
創価大学生命科学研究所

目的: 胎仔脳には神経幹細胞・前駆細胞が比較的多く、フローサイトメトリー (FCM) を使って Sorting すると解剖後 4~6 時間で幹細胞を分取することができる。発生初期 (E12) の幹細胞は分取した後に Basic fibroblast growth factor (FGF-2) または Epidermal growth factor (EGF) で増殖する。しかし、FGF-2 および EGF による初代培養系では、neurospheres を形成し、増殖する時期に違いが認められる。この FGF-2 応答性と EGF 応答性の spheres の違いは発生過程でどのような意義があるかを調べるために、分化への影響について検討を行った。

方法: ラット胎仔 (E12) の前脳から FCM によって幹細胞を Sorting し、Transferrin, Insulin, Heparin を含む DMEM/F12 (TIH/DF) に FGF-2 あるいは EGF を添加してそれぞれ培養した。培養での経時の変化を調べるために、形成した spheres は neurosphere formation assay し、二重染色で抗原解析した。

結果: 培養初期では FGF-2 応答性幹細胞が増殖し、spheres を形成するが、EGF 応答性の spheres は認められなかった。しかし、培養後期 (10 日以降) では、FGF-2 応答性 spheres は死滅したが、逆に EGF 応答性 spheres の形成が認められた。また、培養初期に認められる FGF-2 応答性 spheres と培養後期に認められる EGF 応答性 spheres の抗原解析では、FGF-2 応答性では FGF-receptor と EGF-receptor 共に陽性であったが、EGF 応答性では FGF-receptor のみ陽性であった。さらに、FGF-2 応答性では Nestin, Tuji1, Map-2, A2B5 陽性であるのに対して、EGF 応答性では Nestin と A2B5 が陽性を示した。EGF 応答性 spheres を培養 20 日目で differentiation medium に切り換えると、GFAP 及び O4 陽性であった。考察: 発生初期の幹細胞の増殖には FGF-2 応答性が認められるが、これは FGF および EGF-receptor の発現時期の差による細胞応答性の違いとして現れることが示唆された。また、抗原解析の結果より、FGF 応答性の幹細胞は Neuron 系、EGF 応答性の幹細胞は Glia 系へと分化の方向が差別化されることが示唆された。以上より asymmetric に分裂する幹細胞からの Neuron 系プロジェクターの発現は培養初期から認められる事が示唆されるが、Glia 系プロジェクターの発現時期については今後検討していきたい。

1C1500

神経突起伸長における BDM1 の関与

○本郷 茂樹, 大木 武, 中田 規之, 竹田 稔
昭和大学・医・生化学

胎生期に比べ生後の脳発達過程において発現が増強する遺伝子として我々は Bdm1 をクローニングした。Bdm1 mRNA 発現は脳と心臓にのみ検出される。Bdm1 は、ツニカマイシン、2-メルカプトエタノール、カルシウムイオノフォア等による小胞体 (ER) ストレス刺激やガン細胞の正常様細胞への分化に伴い発現が高まる RTP/Drg1/Cap43/rit42/Ndr1 と、相同性があり、これらは遺伝子ファミリーを形成していると考えられるがいずれも機能やその分子機構は明確ではない。Bdm1 の機能を明らかにするためタンパク質の特性、アンチセンス RNA 法による細胞の変化を調べた。まず GST-BDM1 融合タンパク質に対する抗体を作製しウエスタンブロットにより BDM1 を分析した。また pEGFP ベクターに Bdm1 cDNA をアンチセンス方向に挿入後、これを PC12 細胞にトランスフェクトし、安定的にアンチセンス RNA を発現する細胞 (AS 細胞) をクローニングした。PC12 細胞への安定的 DNA 導入は RT-PCR により確認した。AS 細胞と対照の細胞に NGF を作用させ細胞の突起の伸長を比較した。(1) ラット脳の細胞分画において BDM1 は大部分ミクロソーム画分に存在し、電気泳動上 45kDa のバンドとして検出された。このバンドは脳にのみ認められ、胎生 18 日から生後 10 日にかけて発現が増強した。BDM1 は 2% Triton X-100 によりミクロソーム画分から可溶化された。(2) AS 細胞は 9 種クローニングし、7 種において内在性 Bdm1 mRNA および BDM1 の発現が低下していることを確認した。これらの AS 細胞の NGF による細胞突起の伸長は対照の細胞のものに比べて阻害された。BDM1 はアミノ酸配列の PSORT 解析では小胞体に存在するタイプ-2 の膜タンパク質と推定され、これは我々の実験結果とも一致する。KDEL 配列を含むカルレティキュリンは軸索表面にも存在し神経突起の形成にも寄与することが報告されている。BDM1 は類似の機構により神経突起伸長に働いている可能性も考えられる。

1C1520

膜型セマフォリン分子、Sema4D - plexin シグナル伝達

°稲垣 忍, 藤岡 しほ, 増田 健太

大阪大学医学部保健学科神経生物学研究グループ

分泌型セマフォリン分子は成長円錐を退縮させる神経反発因子として見出され、その代表である Sema3A は知覚神経や運動神経、交感神経などの末梢神経を正しい標的に誘導するための環境因子の 1 つとして機能していることが明らかにされている。同分子はニューロピリンと結合し、ニューロピリンを介して成長円錐や軸索の退縮を引き起こすことが 1997 年に示されたが、ニューロピリン自身は細胞内に情報を伝えることはできない。プレキシンを介したシグナル伝達系の存在が昨年、報告されたものの、その詳細はまだ不明である。一方、膜型セマフォリンは昆虫を用いた研究から、接触性反発分子であると考えられているがその詳細はよく分かっていない。最近、一部の膜型セマフォリンがプレキシンと結合することが報告され、プレキシンは膜型セマフォリン分子の直接の受容体としても機能していることが示唆されたが、その詳細はまだ不明である。私達はこれまでにタイプ 4 の膜型セマフォリン分子について調べてきた。Sema4D は神経系や免疫系組織に豊富に存在するセマフォリン分子であり、免疫系では T 及び B リンパ球など広範な白血球細胞に発現し、B リンパ球の凝集能や生存性をあげる。一方、神経系での機能はまったく不明である。Sema4D は胎生早期から神経突起に発現し、軸索誘導に関与している可能性が示唆されるが それを裏付ける証明はまだなされていない。私達はプレキシン発現細胞を用いて、Sema4D のプレキシン結合の特異性とそのシグナルについて調べた。

1C1540

中枢神経系細胞, CAD, の分化におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の誘導と突起伸展への関与

°土内 瞳, 祖川 由美, 山内 卓

徳島大学大学院薬学研究科生化学研究室

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) は脳神経系に高濃度に存在し、シナプス可塑性や記憶をはじめ高次機能の調節に重要な役割を果たしている。私達は、本酵素を培養細胞系において過剰に発現させることにより機能を解析し、本酵素が神経突起の伸展に重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究では中枢神経系の CAD 細胞を用いて分化を促す条件下に本酵素の発現の変化と突起の伸展の関係を解析した。CAD 細胞はマウス海馬から株化した細胞であり、無血清で培養することにより、分化し突起が伸展することが知られている。本研究において、cAMP の添加によっても分化が促進されることが明かとなった。CAD 細胞を無血清培養や cAMP 添加により分化させ、CaM キナーゼ II 活性を測定することにより本酵素が誘導されることが見い出された。分化開始 1 日で活性は 2-3 倍となり、5 日の培養期間中高い活性が維持された。突起は分化誘導条件下に 1 日目からほぼ一定の割合で伸長した。また、CAD 細胞に CaM キナーゼ II *isoform* cDNA を導入し酵素を発現した場合は、分化条件にしくなくても突起形成が観察された。これらの結果から、CAD 細胞において本酵素が突起形成に重要な役割を果たすことが明かとなった。一方、本酵素は 4 種類のアイソフォーム (a, b, g, d) を有しており、それぞれ発現が時間的・空間的に制御されていることが知られている。CAD 細胞の分化過程においては、どのようなアイソフォームが関与するか RT-PCR により解析した結果、d アイソフォームが主要なアイソフォームであることが明かとなった。d アイソフォームにはスプライシングの異なる分子種が存在することが知られているが、未分化細胞では、主として d2 アイソフォームが発現し、分化にともない d4 アイソフォームが生成し、スプライシングが変化することが明かとなった。以上の結果から、CAD 細胞は分化に先立ち CaM kinase II が誘導され、本酵素が突起伸展に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、分化にともない異なるスプライシング産物が生成することから、分化に特異的なスプライシング機構が存在することが明かとなった。

1C1600

生地黄中の神経突起伸展促進物質の単離と作用の検討

°東田 千尋, パスネット プルソタム, 小松 かつ子
富山医科薬科大学和漢薬研究所薬効解析センター

【目的】我々は、シナプス形成を促進する薬物を同定することを目的とし、その基礎となる神経突起伸展を指標にした伝統薬物のスクリーニングを human neuroblastoma SK-N-SH 細胞を用いて行ってきた。その結果、1) 和漢薬の乾地黄のメタノールエキスによる神経突起伸展作用と、2) 熟地黄エキスが無効であること、を見出した。本研究では、地黄メタノールエキスから活性成分を単離・同定し、さらにその作用を解析することを目的とした。【方法】新鮮な日本産カイケイジウ (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz) の肥大根 (生地黄) からメタノールエキスを抽出した。単一化合物を得るまでエキスの分画と活性測定を繰り返した。神経突起伸展活性は SK-N-SH 細胞の培養液にエキス画分を加え 6 日後に、50 μm 以上の長さの突起を有する細胞の割合を計測し求めた。免疫蛍光染色は抗 MAP2 抗体あるいは抗リン酸化型 neurofilament-H 抗体と、抗 MAPs 抗体との組み合わせで二重染色を行った。【結果と考察】乾地黄と熟地黄の作用の差が、乾地黄中に多いイリドイド化合物に起因する可能性を考え、さらにイリドイド化合物の含量が高い生地黄を材料とした。生地黄のメタノールエキス (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 処理により、有意な神経突起伸展が認められた。メタノールエキスのクロロホルム可溶性画分 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は同濃度のメタノールエキスよりも強い活性があった。神経突起伸展活性をガイドにクロロホルム可溶性画分の分画を進めた結果、単一化合物が単離された (仮称 Jio-A)。構造については現在検討中であるが既知のイリドイド化合物とは異なる可能性がある。Jio-A は、用量依存的に (0.5 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 神経突起を伸展させ、特に 100 μm 以上の長い突起の伸展を有意に促進した。伸展した突起の大部分が樹状突起マーカーの MAP2 陽性であり、軸索マーカーであるリン酸化型 neurofilament-H に陽性の突起は見られなかった。以上、生地黄から神経突起伸展活性を有する成分を単離し、それが主として樹状突起を伸展させることを示唆した。

1C1620

無インスリン培地におけるラット大脳皮質初代神経培養細胞の神経突起形成への Rho-kinase の寄与

°松本 均彦, 中村 祐, 柏木 雄次郎, 福所 英理子, 山森 秀長, 武田 雅俊
大阪大学大学院医学系研究科 生体統合医学・神経機能医学講座

我々は、ラット大脳皮質初代神経培養細胞系の神経突起形成における Rho-kinase (Rho-associated kinase) の寄与について検討した。無血清培地である Neurobasal/B27 を用いた場合、Rho-kinase の特異的拮抗薬である Y-27632 は神経突起にわずかな効果しか及ぼさなかった。そこで我々は Neurobasal/B27 に含まれる大量のインスリンが Rac 信号伝達系に影響を及ぼすことを考慮し、インスリンの有無を調整した培地を作成し、神経細胞の形態学的変化を経時的に観察した。インスリンの有無は基本的に神経突起に変化を及ぼさなかった。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のインスリン存在下では 10 μM 濃度の Y-27632 の影響は神経突起平均長にのみ見られた。しかし、インスリン非存在下においては、10 μM 濃度の Y-27632 の投与によって神経突起平均長、一細胞あたり神経突起総延長、一細胞あたり神経突起終末数はいずれも著明に増大した。さらに、インスリン非存在下において、protein phosphatase 1 の拮抗薬である 5 nM 濃度の Calyculin A の投与によって神経突起退縮は明確に引き起こされた。これは Rho-kinase に拮抗して働くと考えられる脱リン酸化酵素の抑制によって、Rho-kinase の活性が増強した事を示している。これらの結果、Rho-kinase が神経発達の初期において潜在的に寄与している可能性が示唆された。

1D1400

NG108-15 細胞中に存在するイノシトールリン脂質代謝に共役しない 5-HT_{2C} 受容体様 mRNA の構造

°東田 道久¹, 野村 靖幸², 東田 陽博³, 渡辺 裕司¹
¹富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験, ²北海道大学大学院薬学研究科薬理学分野, ³金沢大学大学院医学研究科分子情報医学細胞遺伝学講座

セロトニン 2C 受容体サブタイプ (5-HT_{2C}) は、セロトニンに高親和性で、イノシトールリン脂質代謝 (PI 代謝) に共役することが広く知られており、また向精神薬、抗うつ薬との親和性を有することも数多く報告されている。5-HT_{2C} の細胞生理機能とこれら薬物の作用機構を解明する上において、培養細胞系の利用は有益な情報をもたらすと期待される。しかし、内在性に 5-HT_{2C} を保持する培養細胞系の報告はほとんど見られない。今回、NG108-15 細胞中の 5-HT_{2C} mRNA の存在について検討を行ない、その様式に興味ある知見が得られたので報告する。NG108-15 細胞より酸性フェノール法により RNA を抽出し、逆転写反応によって一本鎖 DNA を合成した。5-HT_{2C} の第 III 細胞内ループ部位近傍を認識する primer により PCR を行なったところ、アクリルアミドゲル上の予想される分子量サイズ 400 bp の位置に、2 本の近接したバンドが得られた。それぞれのバンドを切り出した後、各々を再増幅し、配列を解析したところ、1 本はラット 5-HT_{2C} 配列と、もう 1 本はマウスの配列と完全に一致した。NG108-15 細胞の PI 代謝について検討したところ、セロトニン刺激による各種イノシトールリン酸量の増大は認められなかった。近年、5-HT_{2C} には、第 II 細胞内ループ部において、RNA splicing および RNA editing による修飾が生ずることが報告されている。そこで、この部分を認識する primer を設計して PCR 反応を行なったところ、生来の 5-HT_{2C} の配列よりも短い単一バンドが得られた。その配列を解析したところ、92 塩基が欠落していることが明らかとなった。以上の結果より、rat glioma と mice neuroblastoma の雑種細胞である NG108-15 細胞中には、マウスとラット両遺伝子に由来する 5-HT_{2C} mRNA が存在するが、その RNA は splicing により 92 塩基短いものであること、そのため 5-HT_{2C} 蛋白は生成されず、PI 代謝を生じないことが示唆された。今後、この短い 5-HT_{2C} 様因子の生理機能についての検討を行なう予定である。

1D1420

Fluoxetine によるパーキンソン病モデルラット線条体での外来性 L-DOPA 由来ドーパミン放出減少効果

°大和 博^{1,2}, 神成 一哉^{1,2}, 沈 活¹, 須田 俊宏², 松永 宗雄¹
¹弘前大学医学部脳研神経統御部門, ²弘前大学医学部第 3 内科

【背景】これまでに我々はパーキンソン病モデルラットにおける外来性 L-DOPA のドーパミン (DA) への転換及び細胞外への放出はセロトニンニューロンで行われることを明らかにしてきた。したがって、セロトニンニューロンの活動に影響を与える薬物が L-DOPA 由来の DA 放出に変化を与える可能性が考えられる。パーキンソン病に伴ってみられるうつ状態の患者に対し、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) がしばしば使用されるが、SSRI がパーキンソン症状を悪化させるとする結果がいくつか報告されている。その原因は明らかにされていないが、SSRI がセロトニンニューロンに影響を及ぼして L-DOPA 由来の DA 放出を減少させている可能性が考えられる。そこで、パーキンソン病モデルラットの線条体細胞外 DA 濃度をマイクロダイアリシス法を使って経時的に測定し、SSRI 投与によって L-DOPA 由来の DA 放出が変化するかどうかを検討した。【方法】ラットの右内側前脳束に 6-hydroxydopamine (8 µg) を注入して作成したパーキンソン病モデルの右側線条体に半透膜プローブを留置し、人工髄液を灌流して回収した透析液中の DA 濃度を 25 分毎に連続して計測し、L-DOPA (50 mg/kg i.p.) 単独投与群、Fluoxetine (SSRI, 10 mg/kg i.p.) + L-DOPA 併用群、WAY-100635 (5-HT_{1A} アントゴニスト, 2 mg/kg i.p.) + Fluoxetine + L-DOPA 併用群と比較した。【結果】細胞外 DA 濃度最大値は L-DOPA 単独群で 257.5 ± 16.0 fmol/50 µL、Fluoxetine + L-DOPA 併用投与群で 126.6 ± 14.7 fmol/50 µL となり、Fluoxetine によって L-DOPA 由来の細胞外 DA 濃度は Fluoxetine 非投与時の 49% に減少した ($p < 0.01$)。WAY-100635 + Fluoxetine + L-DOPA 併用群では 179.3 ± 16.4 fmol/50 µL であり L-DOPA 単独群と有意差がなかった。【考察】Fluoxetine は L-DOPA 由来の DA 放出を有意に減少させた。この効果は 5-HT_{1A} アントゴニストで消失したことから、Fluoxetine の 5-HT_{1A} アゴニスト様作用によってセロトニンニューロン自己受容体である 5-HT_{1A} 受容体が刺激されて L-DOPA 由来 DA 放出が減少したものと考えられる。したがって、SSRI によるパーキンソン症状の悪化は SSRI が L-DOPA 由来の DA 放出を減少させることが原因の一つとなっていることが想定される。

1D1440

線条体特異的に発現する新規 G protein-coupled receptor 遺伝子 *Gpr88* の単離

°水島 和幸^{1,2}, 榎 佳之², 伊藤 隆司¹¹金沢大学がん研究所遺伝子染色体構築分野, ²東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター構造解析

中枢神経系は部位特異的に機能分化した多様な神経細胞により構成されており、各部位特異的に発現する遺伝子群がそれらの発生や機能に強く関与すると考えられる。我々は蛍光 differential display 法を用い、ラット脳の各部位において特異的な発現パターンを示す新規遺伝子の同定を試み、その過程で線条体に特異的な cDNA 断片を見出した。対応する全長クローンを単離したところ、385 アミノ酸からなる 7 回膜貫通型 G protein-coupled receptor (GPCR) family A をコードすると予想される新規 cDNA が得られた。この遺伝子は GPCR の統一命名システムによって *Gpr88* と名付けられた。ラット *Gpr88* (*rGpr88*) の発現は in situ hybridization により線条体特異的であることが確認された。GPCR を介して情報を伝えるリガンドは多岐にわたっているが、*Gpr88* は 5HT_{1D} receptor, beta-3 adrenergic receptor と膜貫通領域において、それぞれ 25%, 22% の相同性を示し、biogenic amine をリガンドとする可能性が高いと考えられる。さらにヒトおよびマウスホモログ (*hGPR88*, *mGpr88*) を単離したところ *rGpr88* とアミノ酸レベルで 95% の高い相同性を示した。*hGPR88* および *mGpr88* 遺伝子は多くの GPCR 遺伝子と同様に ORF にイントロンを認めず、FISH 法にて互いに syntenic なヒト 1p21、マウス 3G1 領域にマップされた。また Northern blot および in situ hybridization によって、ヒトおよびマウスにおいても線条体に特異的な発現が確認された。構造的にもまた発現パターン上も高度に保存された *Gpr88* は運動や情動行動の調節等の線条体機能に関与する可能性が高いと考えられる。現在、*Gpr88* 遺伝子の線条体特異的な発現の分子機構を明らかにするためにプロモーター領域の解析とそれに結合する転写因子の同定を進めている。

1D1500

海馬スライスをを用いた代謝型グルタミン酸受容体刺激による ERK 応答の解析

°小林 正明, 近島 博道, 高松 研

東邦大学医学部生理学第2講座

神経系においてグルタミン酸受容体を介する生理的応答あるいは病的変化が誘導される過程には多くの細胞内情報伝達系が関与している。なかでも、MAP kinase 系は核への情報伝達を制御する機構として重要な役割を担っている。今回、マウス海馬スライス標本を用い、各代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) を刺激した際の extracellular signal-regulated kinase (ERK) 応答を解析した。Group I mGluR の刺激には (S)-3,5-DHPG を、group II には (1S,3S)-ACPD を、group III には L-AP4 をアゴニストとして用いた。活性化型 ERK は抗リン酸化 ERK 抗体を用いて検出した。Group I, II, III いずれも 10 分間のアゴニスト刺激により、アゴニスト濃度依存性に ERK の活性化を生じた。各アゴニスト (100 オ M) 刺激後の経時変化では、いずれも刺激後 5 分および 10 分では ERK の高い活性化を認め、20 分以降では活性化の減少を認めた。Group I mGluR 刺激によって PLC の活性化が生ずることから、PLC 阻害剤: U73122 の効果を検討した。U73122 は DHPG による ERK の活性化を部分的に抑制したが、ACPD, AP4 による ERK の活性化には影響を認めなかった。一方、group II, III mGluR 刺激によって adenylyl cyclase が抑制されることが報告されているが、海馬スライスを forskolin で処理することより ERK の活性化が認められた。Group II, III を介した ERK の活性化には adenylyl cyclase の抑制以外の要因が働いていると考え、ERK 応答に対するチロシンキナーゼ阻害剤: Genistein の効果を検討した。Genistein は DHPG による ERK の活性化を約 40%, ACPD による活性化を約 65%, AP4 による活性化を約 75% 程度抑制した。これらの結果から、Group I mGluR では PLC 経路が ERK 活性化に関与しており、Group II, III では adenylyl cyclase 経路には依存しない ERK 活性化機構が存在すると考えられた。また、いずれの受容体にも共通して、G 蛋白質 beta/gamma サブユニットを介するチロシンキナーゼ系が ERK 活性化機構の一部を担っていることが示唆された。

1D1520

ラット前頭前野皮質のモノアミン遊離における NMDA 受容体サブユニット NR2B の関与

°梶畑 俊雄¹, 川原 健^{1,2}, 黒木 俊秀¹, 田代 信雄¹, 中原 辰雄³

¹九州大学大学院医学系研究科精神病態医学, ²福岡県立太宰府病院, ³九州大学理学部化学科

近年、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の分子構造が明かとなり、同受容体を構成するサブユニットの機能の解明が進められている。NMDA 受容体は、内側前頭前野皮質 (mPFC) においてモノアミン・ニューロンの活動を制御することにより、認知機能や情動に関与している可能性がある。最近、精神分裂病患者の脳において NMDA 受容体のサブユニットの一つ、NR2B の発現の増加が報告されており、とくに NR2B とモノアミン系の連関が示唆される。今回の研究では、NR2B が mPFC のモノアミン遊離に関与している可能性を検証するために、ラット mPFC における細胞外ドーパミン (DA) およびセロトニン (5-HT) レベルに対する NR2B アンタゴニスト ifenprodil、および eliprodil の影響を、脳内透析法を用いて、調べた。

Wistar 系雄ラットを用いて、左側 mPFC に脳内透析用プローブを刺入し固定する手術を行った。その翌日に脳内透析実験を行い、各薬物を投与した。薬物の前処置は、次の薬物投与の 60 分前に行った。

Ifenprodil の全身性投与 (3-10 mg/kg) および透析用プローブを介する mPFC 局所投与 (1-100 μ M) により、細胞外 DA および 5-HT レベルの増加が用量依存性にみられた。とくに局所投与による増加が著明であった。Eliprodil の全身性投与 (30 mg/kg) でも細胞外 DA および 5-HT レベルの増加がみられた。Ifenprodil (1-10 mg/kg) の前処置により、NMDA チャンネルブロッカー PCP (7.5 mg/kg)、あるいは MK-801 (1 mg/kg) の mPFC DA 遊離作用が有意に増強された。Eliprodil (10-30 mg/kg)、あるいは NR2B 阻害作用をもつ haloperidol (1-10 mg/kg) の前処置でも、PCP による DA 遊離増加が促進した。一方、 α_1 、5-HT_{2A}、あるいは DA-D₂ 受容体アンタゴニスト (各々、prazosin、ritanserin、sulpiride) の前処置では、PCP の作用の増強がみられなかったことから、ifenprodil や haloperidol の効果はこれらの受容体の遮断作用を介したものと考えるににくい。以上の結果は、NR2B が mPFC において DA および 5-HT 遊離を抑制的に制御している可能性を示唆しており、NR2B アンタゴニストは NMDA チャンネルの遮断効果を更に増強する方向に働くと考えられる。

1D1540

ラット松果体特異的に発現している Na⁺ 依存性グルタミン酸輸送体 (GLT-1) ホモログのクローニング

°八代 聖基¹, 金井 好克², 森山 芳則¹

¹岡山大学 薬学部 生理化学教室, ²杏林大学 医学部 薬理学教室

ラットの松果体実質細胞は時間情報ホルモンであるメラトニンを合成・分泌する内分泌細胞である。近年私達は、松果体細胞がメラトニンを分泌する他に、グルタミン酸を細胞間情報伝達物質として用い、メラトニン合成を負に制御していることを明らかにした。(Yamada et al, 1996) 放出されたグルタミン酸は、Na⁺ 依存性グルタミン酸輸送体 (GLT-1) により細胞内へ再吸収される。すなわち神経組織と同様松果体細胞には、グルタミン酸シグナルの終止系が存在しているものと考えられる。本研究において、松果体の Na⁺ 依存性グルタミン酸輸送体の cDNA クローニングを行った。ラット松果体 cDNA ライブラリーから 1 種類のポジティブクローンを得た。このクローンは、全長 2289bp からなり 562 個のアミノ酸をコードしている。この輸送体は推定アミノ酸一次構造解析から、神経組織に発現している GLT-1 とは C 末端の 22 アミノ酸が異なる新しいホモログと考えられる。この新規輸送体の mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、グルタミン酸の取り込み活性を測定したところ、神経組織に発現しているグルタミン酸輸送体と同様に、Na⁺ 依存的に L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸を取り込むことがわかった。以上の結果から、ラット松果体細胞には、新規 GLT-1 ホモログが発現しており、グルタミン酸の再吸収システムとして機能していると結論した。

1D1600

興奮性グルタミン酸トランスポーター EAAT-1 発現制御における CREB の関与

°池田 正行¹, 氷見 敏行², 室田 誠逸²¹国立厚労病院臨床研究部, ²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能

脳内興奮性アミノ酸濃度はナトリウム依存性の取り込み機構によって興奮毒性を示さない濃度に維持されている。脳虚血などの脳疾患では、この興奮性アミノ酸取り込み機構が破綻していることが明らかにされている。この興奮性アミノ酸取り込み機構に関係しているトランスポーターのうち、脳内に広く分布することが知られているのは EAAT-1 ~ -3 の 3 種類である。脳内で EAAT-1 と EAAT-2 はアストロサイトに、また、EAAT-3 は神経細胞に発現している。これらのトランスポーターのうち、脳内グルタミン酸濃度の維持に一番大きく貢献しているのは EAAT-1 であると考えられており、その活性調節機構は、転写、翻訳、細胞内分布、トランスポーターのリン酸化の各レベルにおいて研究されている。本研究では、さまざまな種類の栄養因子による EAAT-1 発現に対する作用を検討した。

大脳皮質の細胞を 10% FCS 存在下に DMEM 中で分散培養し、培養皿に密になったところでトリプシンによって分散し、再び播種した。さらに無血清下 2 日間培養した後、栄養因子を加えて 2 日間培養した。ウエスタンブロットによって EAAT-1 の発現を検討した。bFGF および IGF は顕著に EAAT-1 の発現を誘導したのに対し、TGFβ, CNTF ならびに HGF は EAAT-1 発現に対してほとんど影響を示さなかった。PDGF と EGF は、単独ではわずかに EAAT-1 を誘導したが、dibutyl cAMP 存在下では強く誘導した。bFGF と IGF による EAAT-1 発現誘導に対し、PKA 阻害剤 H89、ならびに MEK 阻害剤 PD98059 と U0126 は阻害作用を示したのに対し、PI3 kinase 阻害剤 wortmannin と LY294002 はほとんど影響を与えなかった。PKA 阻害剤及び MEK 阻害剤は CREB 活性化を抑制したのに対し、dibutyl cAMP 存在下 PDGF は CREB 活性化を強く促進した。以上の結果より、これらの栄養因子は CREB リン酸化を介して EAAT-1 の発現調節を行っていることが示唆された。

1D1620

大脳皮質シナプトソーム分画における [³H]D-セリンの取り込みと放出の解析

°山本 直樹¹, 富田 麗¹, 海野 麻未¹, 金田 小幸¹, 川口 直恵¹, 岩間 久行^{1,2}, 土田 英人¹, 西川 徹^{1,2}¹国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部, ²東京医科歯科大学大学院精神行動医科学

D-セリンは哺乳動物脳において NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2B サブユニットと類似した局在を示し、NMDA 受容体のグリシン結合部位にアロステリック・アゴニストとして作用することから、D-セリンが本受容体の脳における内在性調節因子であると考えられている。今回、細胞外 D-セリン濃度の調節に関わる機構を明らかにする目的で、シナプトソーム P2 分画における [³H]D-セリンの取り込みおよび放出について解析した。D-セリンの大脳皮質 P2 分画への取り込み活性は、温度依存性で、経時的に直線的に上昇して約 4 分後にはプラトーに達した。分画を低浸透圧で前処理すると D-セリン取り込み活性は消失した。また、Na⁺ イオンおよび Cl⁻ イオンを他のイオンに置換するとそれぞれ、24%、47%に低下した。取り込み活性は大脳皮質ついで小脳において高値を示すのに対して、肝臓や腎臓ではほとんど活性を認めなかった。Kinetics (Km: 483 μM, Vmax: 278 pmol/mg protein/min) から低親和型トランスポーターを介した取り込みが示唆された。大脳皮質における [³H] グリシンの取り込みが pH 6.5-8.5 の範囲で高い活性を保っているのに対して、[³H]D-セリン取り込みの至適 pH は 6.5-7.0 であった。[³H]D-セリンの取り込みは 1 mM グリシンによって抑制されたが、[3H]グリシンの取り込みは 1 mM D-セリンによって阻害されなかった。これらから、D-セリンの取り込みはグリシントランスポーターとは独立した取り込み機構を介すると思われる。一度取り込ませた [³H]D-セリンの P2 分画からの放出を [³H] グルタミン酸と比較した。グルタミン酸の放出は、高 K⁺ イオンによる脱分極刺激により約 2.4 倍上昇したのに対して、D-セリン放出の高 K⁺ イオンおよび veratrine による脱分極刺激による上昇はいずれも 1.3 倍程度であった。さらに、外液から Ca²⁺ イオンをキレートしても変化しなかった。これらの結果から脱分極刺激に非依存性でカルシウムを要求しない D-セリン放出系の存在が示唆される。

3A1300

PC12D 細胞に安定的に導入したヒトプレセニリン 1 および突然変異プレセニリンの作用

°亀谷 富由樹¹, 田中 喜久子¹, 宇佐美 美穂子¹, 丸山 敬¹, 森 啓²

¹東京都精神医学総合研究所分子生物研究部門, ²大阪市立大学医学部老年医学研究部門

アルツハイマー病 (AD) 原因遺伝子産物プレセニリン 1 (PS1) はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 代謝に関与し, Aβ 産生を制御していることが知られている。最近, PS1 は γ 分泌酵素そのものであるという報告もなされているが, 依然として不明な点も多い。我々はこれまで PS1 と APP 代謝との関連性を解析し, ヒト PS1 を発現する PC12D 細胞において, APPC 末断片の分布が変動することを報告した。本研究では PC12D 細胞に安定に導入したヒト PS1 および突然変異 PS1 と PC12D 細胞が持っているラット PS1 との違いについて解析した。

ヒト PS1 および突然変異 PS1 を安定的に発現する PC12D 細胞を RIPA 溶液でホモゲナイズあるいはショ糖溶液を用いて膜画分を細分し, 含まれるヒトおよびラット PS1 およびその誘導体を電気泳動およびイムノブロットで解析した。さらに, このホモゲナートに 70 %ギ酸溶液になるようにギ酸を加え, 超音波処理した。17,000 x g の遠心上清を PVDF 膜にドットブロットし, 抗 Aβ40 および 42 抗体等を用いて Aβ 半定量解析を行なった。

ラット由来 PS1 の N 末断片はどの膜画分にも回収されたが, ヒト PS1 および突然変異 PS1 の N 末断片は比重の重い膜画分に主として回収された。またこの画分では APP の C 末断片の存在割合も増加していた。また, Aβ42 の割合が PS1 および突然変異 PS1 を導入した細胞で有意に増加し, ヒト正常 PS1 および突然変異 PS1 の発現量に依存して変動した。しかし, 導入したヒト PS1 と突然変異 PS1 とでは PC12D 細胞での存在状態および APP の代謝系に与える影響において差は見られなかった。このことから, PC12D 細胞では, 導入したヒト PS1 および突然変異 PS1 はともに変異 PS1 として働き, γ 分泌酵素活性を変化させると推定された。

3A1320

変異プレセニリン 1 による小胞体ストレスセンサーの活性化障害

°本田 章子^{1,2,3}, 片山 泰一^{1,2,3}, 森 和俊⁴, 今泉 和則^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}

¹阪大院・医・機能形態, ²田辺製薬 (株) 創業研究所, ³CREST・JST, ⁴京大院・生命科学

家族性アルツハイマー病 (FAD) の大多数はプレセニリン 1 (PS1) のミスセンス変異によって発症する。我々はこれまでに, 変異 PS1 は小胞体 (ER) ストレスセンサー Ire1 の活性化に障害を与え, ER ストレスに対して脆弱性を増大させることを報告してきた。今回, Ire1 とは異なった経路で ER ストレス応答のシグナル伝達に関わる ATF6, PERK と変異 PS1 との関連について検討した。

ATF6 は分子量 90kDa の一回膜貫通型蛋白質で, ER の膜上に存在する。ER ストレス負荷時には, ATF6 は ER の膜近傍で切断され, 細胞質側の約 50kDa 断片が核に移行し, ER 分子シャペロン群の転写因子として機能する。PERK は ER 膜上に存在する膜貫通型のたんぱく質キナーゼで, ER ストレス負荷により, 自己リン酸化によって活性型となり, 基質である eIF2α をリン酸化して新たなたんぱく質合成を阻害する。

変異 PS1 を発現する細胞では, ER ストレス負荷時の ATF6 の ER 膜近傍での切断および切断断片の核移行が, 正常細胞に比べ遅延していた。また, PERK の自己リン酸化および eIF2α のリン酸化も, 正常細胞に比べ, それぞれ遅延していた。PS1 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞では, 正常細胞と比べて ATF6 および PERK の活性化に差は認められなかった。

以上のことから, 変異 PS1 による ER ストレス応答性の低下には, Ire1 だけでなく, ATF6 や PERK の活性化障害も関与していることが示唆された。

3A1340

Wnt シグナル伝達系における変異プレセニリン 1 の抑制作用

°川村 勇樹^{1,2}, 菊池 章³, 高田 律子⁴, 高田 慎治^{4,5},

芝本 さゆみ⁶, 柳澤 勝彦¹, 駒野 宏人¹

¹国立長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部, ²科技団・科学技術特別研究員, ³広島大・医・生一, ⁴科技団・ERATO・近藤誘導分化プロジェクト, ⁵京大・理・分子発生生物学研究センター, ⁶摂南大・薬・生一

[目的] プレセニリン 1 は家族性アルツハイマー病の主要原因遺伝子である。プレセニリン 1 蛋白 (PS-1) は、アミロイド β 蛋白の産生に関与していることが明らかとなってきたが、PS-1 の機能の詳細は未だ不明である。PS-1 結合蛋白の一つとして β -カテニンが同定されている。 β -カテニンは、形態形成に参与する Wnt シグナル伝達系を担っており、Wnt の刺激を受けると、細胞内 β -カテニンが蓄積され核へ移行し遺伝子発現制御することが知られている。しかしながら、 β -カテニンと結合している PS-1 が Wnt シグナル伝達系に関与しているか否かは不明である。我々は、この点を明らかにするため、家族性アルツハイマー病発症に認められる変異をもつ PS-1 が、Wnt シグナル伝達系にどのような影響を及ぼすかを解析した。[方法] ヒト野生型 PS-1 cDNA および変異 PS-1 (M146L) cDNA をそれぞれ過剰発現させたマウス N2a 細胞を Wnt-3a を含む conditioned medium で培養し Wnt 刺激を与えた。Wnt 刺激後、細胞内に蓄積される β -カテニンをイムノブロットにより検出し、野生型 PS-1 と変異 PS-1 とで比較した。また、Wnt 刺激化での細胞内 β -カテニンの分解を解析するため、Wnt-3A 処理後、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドを培地中に添加し、 β -カテニンの分解を経時的に解析し、野生型 PS-1 と変異 PS-1 とで比較した。[結果] Wnt-3a の刺激による β -カテニンの蓄積は、変異 PS-1 を過剰発現させた細胞では野生型 PS-1 を過剰発現させた細胞と比べ低いことが明らかとなった。また、Wnt-3A 処理下での β -カテニンの分解を解析したところ、変異 PS-1 を過剰発現させた細胞では、 β -カテニンの分解が野生型 PS-1 発現細胞に比べ遅かった。[結論] 今回の我々の結果から、変異 PS-1 が Wnt シグナル依存におこる β -カテニンの安定化に対して抑制的に働くことが明らかとなった。今後は、さらに、変異 PS-1 の Wnt シグナル伝達系に対する抑制的作用と家族性アルツハイマー病の発症との関連の解析が必要であると思われる。

3A1400

beta-secretase の Alzheimer's disease と連結するか?: ラット Cortex における MK-801 の影響

°AHMED Md.Mahiuddin¹, 知久間 敏幸², RAHMAN

Md.Khalilur³, 加藤 武¹

¹横浜市大・院・総合理学, ²昭和薬大・薬品分析, ³ダッカ大・生化学

エンドペプチダーゼ EC 3.4.24.15 (EP 24.15) は脳、脳下垂体および生殖腺に広く見られるメタロエンドペプチダーゼである。最近 APP の processing に関連すると言ったことが判明した BACE (beta-site APP-cleaving enzyme) と呼ばれる transmembrane aspartic protease の異常な processing も Alzheimer's disease (AD) に関連している。以前に BACE の過度の分泌が beta-secretase の切断生成物の量を増加させる事が証明された。本研究では Q-sepharose column chromatography の方法を使用して、ラット脳の EP 24.15 を部分的に精製、そして QFS, CL-peptide と PZ-peptide の三つの別々の基質を使用した HPLC と fluorescence spectrophotometer によって酵素活性を測定した。EP 24.15 抗体を用いたラット脳内 cytosolic fraction の Western blot 分析は、約 75 kDa と 50 kDa の molecular mass に対応する二つの異なる EP 24.15 immunoreactivity バンドを示した。ラット BACE 抗体でラット脳の膜 bound fraction の Western blot 分析から、約 55 kDa molecular mass に対応する BACE immunoreactivity バンドを示した。AD に対する EP 24.15 と BACE の両方の生理学的役割を調べるため、私たちは MK-801 という NMDA receptor antagonist を AD の早期痴呆モデルとして使用した。私たちはラット脳の beta-secretase 酵素を精製し、ラット脳の異なる部分の beta-secretase への MK-801 の影響を調べる予定です。

3A1420

免疫化学的手法によるアルツハイマー病患者脳での D-Ser26 β 25-35(40) 様抗原の検出

°久保 武一, 熊谷 善弘, 金子 勲
三共株式会社第三生物研究所

アルツハイマー病 (AD) 患者脳内で老人斑内に沈着した β アミロイド ($A\beta$) が, 十数年後に海馬神経変性を惹起するメカニズムは明らかではない。我々は加齢とともにラセミ化される $A\beta$ (D-Ser26 β 1-40) が可溶性になり不活性体であるが, ラット脳内蛋白質分解酵素により D-Ser26 β 25-35, D-Ser26 β 25-40 などの活性体に変換することを示唆した。そこで, 実際の AD 患者脳内に D-Ser26 β 25-35 様抗原が存在するかを 2 種の D-Ser26 β 25-35 特異抗体 (20.1, 22.7) 及び既知市販抗体 (4G8, 6E10, AT-8) を用いて詳細に検討した。20.1 は D-Ser26 β 25-35, -26-35 に, 22.7 は D-Ser26 β 25-35, -25-40 に特異的に結合し, いずれも L 体の $A\beta$ ならびに D-Asp1,7,23 および D-Ser8 含有 $A\beta$ には結合しない。免疫染色の結果, 20.1 は AD 患者 9 例 (平均 76.8 歳) 中 8 例の海馬, 扁桃体領域で一部の老人斑, ghost tangle 及び血管アミロイドを染色したが, 正常脳 6 例 (平均 77.5 歳) では染色性を示さなかった。この染色は, D-Ser26 β 25-35 で吸収され, β 25-35 では吸収されなかった。また, 6E10 或いは 4G8 との二重染色の結果から, 20.1 は瀰漫性老人斑は染色せず, 成熟型老人斑のコア部分を染色することが分かった。一方, 22.7 は老人斑を染色しなかったが, 調べた AD 患者 9 例全例で, 海馬 CA1, 海馬台, 嗅内皮質の変性神経細胞を染色した。正常脳 6 例では全例陽性染色を認めなかった。この染色は, D-Ser26 β 25-40 で部分的に吸収され, β 25-40 では吸収されなかった。また, AT-8 陽性 NFT 含有神経細胞の一部が 22.7 で染色された。以上の免疫染色の結果は, D-Ser26 β 25-35, -25-40 様抗原が, AD 患者脳の老人斑や変性神経細胞に特異的に存在することを示唆する。以上のことより我々は, $A\beta$ が老人斑に蓄積後, 加齢に伴いラセミ化され, 可溶性の D-Ser26 β 1-40 が老人斑から溶出し, 脳内蛋白質分解酵素に抵抗性の活性体 (D-Ser26 β 25-35 や D-Ser26 β 25-40) に変換され, それらが興奮性アミノ酸に対する感受性を増大させることにより, 海馬神経細胞に傷害を与えると考察した。一方, 通常の β 1-40 や D-Asp 含有 $A\beta$ はその強い微小線維形成能のため不溶性であり老人斑に局限すると考えた (南カリフォルニア大学, C.A Miller 教授との共同研究)。

3A1440

ラット脳室内への β -アミロイド蛋白の持続注入により誘発される誘導型一酸化窒素合成酵素の発現とニコチン誘発性アセチルコリン遊離の障害

°TRAN Manh Hung, 山田 清文, OLARIU Ana, REN Xiu Hai, 鍋島 俊隆
名古屋大学大学院医学研究科医療薬学

【緒言】アルツハイマー病の発症には, 老人斑の主要構成成分である β -アミロイド蛋白 ($A\beta$) が重要な役割を果たしていると考えられている。これまでに我々は, ラット脳室内へ $A\beta$ を持続的に注入すると, 学習記憶, 海馬の長期増強, およびニコチン刺激によるアセチルコリン (ACh) とドパミン遊離などが障害されることを報告している。今回, これら $A\beta$ により誘発される脳機能障害のメカニズムを解明するために, ACh 遊離に対する種々の $A\beta$ フラグメントの効果を検討した。さらに, $A\beta$ による ACh 遊離の障害における誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の役割について検討した。【実験方法】 $A\beta$ (300pmol/day) は, 35%アセトニトリル / 0.1%トリフルオロ酢酸に溶解し, 浸透圧ミニポンプを用いてラット側脳室内へ持続的に注入した。ACh 遊離は $A\beta$ の注入開始から 11 日目に in vivo dialysis 法を用いて行った。NO 代謝物は HPLC を用いて測定した。【結果および考察】 $A\beta$ 1-40, 1-42 および $A\beta$ 25-35 の持続注入により, 溶媒投与群に比較して, 大脳皮質-海馬領域でのニコチン誘発性 ACh 遊離は著明に減少した。しかし, $A\beta$ 40-1 投与群では変化は認められなかった。また, $A\beta$ 1-40 の投与により, 投与開始から 3-7 日目に海馬において著明な NO 代謝物の増加と Ca 非依存性 NOS 活性の増加が認められた。さらに, $A\beta$ の持続注入により, 海馬において iNOS mRNA が発現することも確認した。最後に, $A\beta$ による ACh 遊離の障害における iNOS の役割について, 種々の NOS 阻害剤を用いて検討した。iNOS 阻害剤 aminoguanidine および S-methylisothiurea を $A\beta$ の注入開始日より ACh 遊離を測定する前日まで 1 日 1 回投与すると, $A\beta$ による ACh 遊離の障害は著明に改善された。以上の結果より, $A\beta$ による ACh 遊離の障害には iNOS により合成される大量の NO が関与していることが示唆された。

3A1500

FTDP-17 脳における野生型、変異型タウの解析

°宮坂 知宏^{1,2}, 森島 真帆¹, 長嶋 和郎², RAVIDRivka³, VAN SWIETEN John C.⁴, 井原 康夫^{1,5}¹東京大学医学部神経病理学, ²北海道大学医学部分子細胞病理学, ³Netherlands Brain Bank, ⁴Department ofNeurology, Erasmus University, ⁵CREST, JST

Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) は、常染色体優性遺伝の家族性痴呆疾患であり、特徴的な病理変化として神経細胞の脱落、神経細胞、ときにグリア細胞、内の多数の神経原線維変化が知られている。98年に、これらの家系でタウ遺伝子上にエクソン型、イントロン型変異が発見され、タウと神経細胞死の関係を解明する上での重要なモデルとして注目されている。エクソン型変異の中でも P301L 変異は比較的発症が早く、痴呆の進行も速いことから、促進型変異と考えられている。これに対し、R406W 変異は発症が遅く、痴呆の進行も遅いことから遅延型変異と考えられている。われわれは P301L, R406W 剖検脳を用い、水可溶性、サルコシル不溶性画分における野生型、変異型タウの存在比を、タンパク化学的、免疫化学的手法により求めた。すべての FTDP-17 脳はオランダブレインバンクより供与された。われわれはまず、野生型タウ、P301L、R406W 変異タウを特異的に認識する抗体を作成し、P301L、R406W 脳より調製したサルコシル不溶性画分を、ウエスタンブロットにより解析した。その結果、P301L 脳では変異型タウのみが沈着していた。R406W 脳では野生型、変異型タウはほぼ等量比で沈着していた。このことから、野生型に比べ P301L 変異が積極的にタウの線維化、不溶化に関与していることがわかった。次に、P301L 脳の可溶性画分について同様に解析したところ、不溶性タウの量とは関係なく、変異型タウの減少が認められた。さらにわれわれは、野生型タウと R406W 変異タウが逆相液体クロマトグラフィーにおいて溶出時間が異なることを見つけ、不溶性画分中の野生型、変異型タウを分離することに成功した。分離したタウをウエスタンブロットにより解析すると、R406W 脳に沈着する変異型タウは、野生型と同様に高度にリン酸化されていることが明らかとなった。これに対し、可溶性画分中の変異型タウは、野生型のものと比べ、リン酸化の程度が低かった。このことは、R406W 変異脳における神経細胞死の過程に、強いリン酸化の亢進状態が関与していることを示唆している。

3A1520

14-3-3 regulates phosphorylation of tau proteins.

°MITSUKO HASHIGUCHI¹, KAZUYA SOBUE²,HEMANT PAUDEL K³, TOSHIO HASHIGUCHI¹¹Department of Physiology, Tokyo Medical University,²Department of Anesthesiology, Nagoya CityUniversity, ³Department of Neurology and

Neurosurgery, McGill University

Neurofibrillary tangles (NFTs) are one of the hallmarks for pathogenesis on neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD). NFTs contain fibrous paired helical filaments consisting of hyperphosphorylated tau proteins. Hyperphosphorylation of tau proteins impairs tau-mediated stabilization of microtubules, thus leading to cytoskeletal instability and tau aggregation in NFTs in AD brain. Phosphorylation of tau are thought to be regulated by not only kinases and phosphatases, but also effectors.

Now we are reporting that 14-3-3, which was reportedly found in NFTs in AD brain, tightly associates with tau proteins in brain and stimulates phosphorylation of tau by cAMP-dependent protein kinase (PKA). 14-3-3ζ failed to enhancement of PKA-catalyzed phosphorylation of the synthetic peptide. We also show how 14-3-3ζ modulates phosphorylation of tau by PKA. Direct binding assay of 14-3-3ζ with tau deletion mutants revealed that 14-3-3ζ binds to tau on the microtubule-binding domains. Furthermore the Western blottings, using phosphorylated or nonphosphorylated site specific antibodies against tau, indicate that 14-3-3ζ potentiates PKA-catalyzed phosphorylation specifically on Ser^{262/356} of tau.

These results indicate that 14-3-3ζ plays a pivotal role in phosphorylation of tau and may cause tau aggregation in AD brain.

3B1300

リルゾール投与による脳内 BDNF 合成の誘導と海馬歯状回における細胞分裂促進

°仙波 りつ子^{1,2}, 山田 敦子^{1,2,3}, 浅野 富子¹, 上田 浩¹, 森下 理香¹, 竹内 郁夫¹, 稲熊 裕¹, 加藤 兼房¹
¹愛知県コロニー研究所, ²CREST 科学技術振興事業団, ³鳥取大学医学部神経生物

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、自然老化ラット海馬で増加するが、アルツハイマー病患者では減少していることから、海馬の神経細胞の生存や神経活動に重要な働きをしていることが示唆される。私達は、イオンチャネル活性化剤や阻害剤の BDNF 合成に対する効果を調べているが、今回、電位依存性ナトリウムチャネル (VDSC) の阻害剤であり、抗痙攣剤でもあるリルゾールによるラット海馬の BDNF 合成の促進を見出したので報告する。生後 4-5 週齢のラット腹腔内に 20 mg/kg のリルゾール塩酸塩を一回投与後、海馬の BDNF 量の経時的变化を調べると、mRNA は 4 時間で、蛋白は 8 時間で最大 (約 5-10 倍) となった。増加した BDNF には、30 kDa の前駆体もかなり検出され、BDNF 合成の活性化が示唆される。海馬 BDNF の合成誘導に要するリルゾール量は、15 mg/kg 以上であった。組織化学的には、リルゾール投与による神経細胞死はみられず、BDNF は海馬歯状回の顆粒細胞で合成され、門や CA3-CA4 領域の放射状層に分泌されることが示唆された。リルゾールは、VDSC 阻害を介してグルタミン酸放出を阻害するので、VDSC 阻害剤であるビンボセチン (VIN) やグルタミン酸放出阻害剤である DCG-IV や 2R,4R-4-アミノピリジン-2,4-ジカルボン酸 (APDC) の投与を試みた。VIN は、脳内 BDNF を上昇させないが、DCG-IV や APDC は明らかに海馬の BDNF を上昇させることから、グルタミン酸放出阻害と BDNF 合成促進には何らかの関連があるものと思われる。次に、BDNF の海馬顆粒細胞における増加が、この細胞層の幹細胞あるいは前駆細胞の分裂に影響するかどうかについて検討した。海馬の BDNF を一過性に上昇させても、細胞増殖には何ら影響がなかったが、リルゾールを 5 日間連続投与し BDNF を高値に保つと、分裂する細胞数が増加した。この条件下で、死にいたる神経細胞数には差がみられなかった。リルゾールは筋萎縮性側索硬化症の治療薬としてすでに認可されているが、今回、リルゾールが海馬顆粒細胞の BDNF 合成を促進させ、その結果、この細胞層の神経細胞新生をも促進することが明らかになった。

3B1320

イムノフィリンリガンドによる BDNF 産生誘導作用と神経保護効果

°西岡 博史, 新田 淳美, 古川 昭榮
 岐阜薬大・薬・分子生物

中枢神経変性疾患の多くは、難治性かつ進行性であり、根本的な治療法は確立されていない。最近、免疫抑制剤の結合タンパク質イムノフィリンが神経細胞死の抑制に関与しているという報告がなされているが、そのメカニズムについてはほとんどわかっていない。イムノフィリンに結合する物質はイムノフィリンリガンドと総称され、免疫抑制剤もこれに含まれる。本研究では、免疫抑制剤の一つであるシクロスポリン A (CsA) について、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) の合成に及ぼす効果および神経細胞死の抑制効果について検討した。

常法に従ってラット胎仔 (18 日齢) の海馬より神経細胞を培養し、種々の濃度の CsA (0.1 ng/ml-10 µg/ml) を 24 時間作用させた。上清中の BDNF の濃度を酵素免疫測定法で測定したところ、500 ng/mL の CsA の添加により著しく BDNF 含量が増加した。さらに CsA を上清中に加えたまま 7-9 日間培養をつづけると、生存神経細胞数が、無添加の場合に比べ有意に増加していた。一方、8 週齢のラットに CsA (1.5 mg/kg/day) を 7 日間腹腔内投与すると脳各部位で有意な BDNF 含量の増加が観察された。これらの結果から、CsA は脳での BDNF 産生量を増加させることにより、神経細胞死を抑制する可能性が示唆された。しかし、CsA は免疫抑制作用を有するため、中枢神経疾患治療薬としての使用には限界がある。イムノフィリンリガンドがイムノフィリンに結合すると、IP3 受容体が活性化されることが知られている。そこで IP3 受容体との結合部位の構造類似ジペプチドである Leu-Ile について同様に検討した結果、神経細胞死を抑制する作用をもつことが判明した。

本研究の結果から、CsA は海馬神経細胞の生存維持作用を持ち、その作用には BDNF の産生誘導が一部寄与していると考えられる。免疫抑制作用と神経保護効果は異なる機構で進行するので、神経作用だけをもつ活性物質の創薬が可能であると考えられる。この観点から、現在 Leu-Ile の免疫抑制作用の有無について検討を行っている。神経栄養因子は高分子タンパクであり末梢投与による脳での効果はあまり期待できないため、イムノフィリンリガンドやその関連物質などの低分子化合物を用いた新しいアプローチが期待される。

3B1340

神経芽細胞腫における BDNF mRNA の発現

°青山 峰芳¹, 浅井 清文², 宍倉 朋胤³, 河本 竹正³,
宮地 泰士¹, 横井 誉¹, 三浦 裕², 加藤 泰治², 中川原 章³

¹名古屋市立大学 小児科, ²名古屋市立大学 分子医学
研究所生体制御, ³千葉県立がんセンター 生化学部

予後良好の神経芽細胞腫 16 例と予後不良の神経芽細胞腫 15 例および神経芽腫細胞株について脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現を調べた。N-myc の増幅を認める予後不良の神経芽細胞腫では N-myc 増幅を認めない予後良好の神経芽細胞腫に比べて BDNF mRNA の発現量が有意に高値であった。さらに我々は human BDNF mRNA に 6 種類の splice variants が存在することを見いだした。そのうちの 4 種類については予後不良群で有意に発現を認めた。神経芽細胞腫の 80% 以上に BDNF の受容体である TRKB の発現を認めた。予後不良群では full-length type の受容体が優位で予後良好群では tyrosine kinase domain を欠く truncated type の受容体が優位だった。これらの結果から予後不良の神経芽細胞腫では BDNF が autocrine または paracrine に分泌され TRKB を介したシグナル伝達系が刺激され、その結果細胞死が抑制され cell survival へ向かうと考えられた。

3B1400

培養ラット海馬および視床下部神経細胞に対するエストロゲンの作用機構

°柏原 めぐみ, 西尾 チカ, 畠中 寛
大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門

エストロゲンは、女性ホルモンとして生殖系の発達、機能調節に必須の重要なホルモンの 1 つである。また、乳癌、子宮癌や前立腺癌の悪性化にも深く関わっていること以外に、脳神経系、免疫系、肝臓、血管、骨や皮膚等の広範の臓器において種々の作用を及ぼしていることがわかってきている。本研究では、エストロゲンが発生過程の脳神経系に及ぼす影響を調べるために、ラット胎生 19 日目の海馬および視床下部から調製した初代培養細胞を用いて、エストロゲンによる細胞生存維持作用、および下流応答遺伝子との関係について検討した。この培養系は、ほぼ神経細胞であり、グリア細胞などの間接的な影響を排している。

E19 のラット胎児、海馬および視床下部組織をパバインで消化し、その培養翌日に無血清培地に交換した。同時にこの時、エストラジオール (10-1000 nM) を 3 日間作用させたところ、エストラジオールによる神経細胞の生存維持効果が見られた。またこの効果は、エストロゲン受容体に対するアンタゴニスト、タモキシフェンにより阻害されたことより、エストロゲン受容体を介した作用であると考えられる。また、抗エストロゲン受容体 α 抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、培養神経細胞の核においてエストロゲン受容体の発現を確認した。

さらに、この細胞生存維持効果の作用機構を解析するために、下流応答遺伝子である、BDNF との関係性を解析した。エストラジオール (10-1000 nM) を 6 時間および 24 時間作用させ、RT-PCR 法によって BDNF mRNA 量を測定したところ、10 nM エストラジオール添加後 6 時間で最も高い効果が見られ、BDNF mRNA 量が約 2 倍増加した。この結果は、エストラジオールによる細胞生存維持効果の一部に、BDNF を介している可能性を示唆するものである。

3B1420

BDNF 遺伝子発現を制御する 4 つのプロモーター活性化の相違と Ca^{2+} 応答性転写調節領域の解析

○田淵 明子, 天野 賢示, 津田 正明
富山医薬大・薬・分子神経生物

脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子は、4 つのプロモーター (P-I, -II, -III, -IV) によって転写が調節されており、多様な発現制御機構が存在していると考えられる。BDNF 遺伝子は、脱分極に伴う細胞外からの Ca^{2+} 流入によって発現が誘導されるが、 Ca^{2+} シグナルによる 4 つのプロモーターの活性制御機構についての詳細は不明である。我々は、初代培養大脳皮質ニューロンへ 4 つの BDNF 遺伝子プロモーターそれぞれをルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターベクターを遺伝子導入し、脱分極状態におけるプロモーター活性変化について検討した。また、すでに報告のある P-III の応答エレメントとの比較のために P-I の応答エレメントの同定を試みた。

その結果、KCl 濃度の上昇による大脳皮質ニューロンの脱分極が、L-タイプ Ca^{2+} チャネル (L-VDCC) と N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターの双方を活性化すること、そして KCl 濃度を変化させて BDNF 遺伝子発現を調べたところ、その遺伝子発現誘導には適した脱分極状態が存在することが明らかとなった。また、脱分極状態で BDNF P-I, II, -III が活性化すること、さらに、この 3 つのプロモーターは、 Ca^{2+} の流入するチャネルの種類によって感受性が異なり、P-I, -II は L-VDCC 経由、P-III は L-VDCC, NMDA レセプター双方からの Ca^{2+} シグナルに応答するという相違のあることが明らかとなった。そして、P-I の応答エレメントは 2 つの異なるプロモーター領域に存在しており、P-III とは異なった転写因子を介して活性化する可能性が示唆された。この相違は、神経細胞に対する BDNF の多彩な機能性を発揮するための調節機構の一つであると考えられる。現在、それぞれのプロモーター活性化に関与するシグナル伝達経路について検討を加えている。

3B1440

カルシウム依存的な PACAP 遺伝子の発現誘導と神経細胞死抑制効果

○津田 正明, 中坪 純, 田淵 明子
富山医薬大・薬・分子神経生物

マウス小脳顆粒細胞 (CGCs) では、膜の脱分極によって L-型電位依存性カルシウムチャネル (L-VDCC) から Ca^{2+} が流入し、神経細胞死が抑制される。この際、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) の遺伝子発現が誘導される。本研究では、PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) 遺伝子が Ca^{2+} 流入によって誘導されるかどうかについて、また、内在的に合成された PACAP が神経細胞死を抑制するかどうかについて検討した。また、細胞死抑制に関わる情報伝達系について検討を加えた。初代培養系の CGCs に脱分極で L-VDCC に Ca^{2+} を流入させると、PACAP mRNA 合成が顕著に誘導された。この際、2 つの新たなスプライスバリエントが生成した。PACAP の内在的な合成も増加し、PACAP38 レセプターのアンタゴニスト PACAP6-38 を加えると、脱分極によって誘起される神経細胞死抑制が部分的に阻害された。これは、内在的に合成された PACAP38 が、 Ca^{2+} シグナル依存的な神経細胞死抑制に関わっていることを示す。PACAP38 の添加によっても神経細胞死抑制が認められるが、これは PD98059 や KY294002 の添加によって阻害された。PACAP38 や BDNF 添加によって c-jun 発現の減少や TCA サイクル酵素のアコニターゼ活性の減少抑制が認められたが、これら変化も PD98059 や KY294002 によって阻害された。これらの結果は、PACAP38 による神経細胞死抑制には、Ras/MAPK 系、および PI3K 系が関与していることを示している。また、ラット大脳皮質ニューロンの初代培養系において、PACAP 遺伝子プロモーターのカルシウム応答性について検討を行っている。

3B1500

脳に特異的な新規蛋白質である 40kDaBINP 受容体の cDNA クローニング とその性質

濱 登希子, 丸山 六三, 岩島 牧夫, 奈良 清光
三菱化学生命研

目的: BINP (Brain Injury-derived Neurotrophic Peptide) は種々の培養神経細胞に神経細胞死抑制作用を持つ 13 個のアミノ酸からなるペプチドである。その作用機構について検討する目的で、受容体の構造を明らかにした。**方法:** 受容体については、¹²⁵I ラベルした BINP 誘導体とラット脳シナプトソームを用いた架橋実験から約 40, 50, 100 kDa の蛋白質が候補として得られていた。さらに、ラット中隔シナプトソームを抗原とし、ラット脳シナプトソームと ¹²⁵I ラベルした BINP 誘導体との結合の阻害を指標として、モノクローナル抗体を取得することができた。このモノクローナル抗体 (6A22) は、BINP の作用を阻害し、約 40 kDa の蛋白質を認識していることが免疫沈降で示された。さらに 6A22 は細胞表面の蛋白質を認識していることが細胞染色、FACS による解析で示された。そこで、この抗体 6A22 を用いて抗原である 40 kDa 蛋白質の cDNA クローニングを行った。cDNA 発現クローニングはラット海馬より調製した cDNA library を細胞に発現させ、6A22 を用いて染色後 FACS による sorting、分析を繰り返すことにより行った。**結果:** 得られた cDNA は polyA と ORF を含む完全長の新規の cDNA であった。Northern blotting による解析から、その mRNA はラットで脳に特異的であり、胎児期より生後で増加していた。この cDNA の配列解析では膜貫通部位があり、三カ所の予想される糖鎖結合配列があった。ラットシナプトソームを脱グリコシレーション後にクローニングに用いた抗体 6A22 で免疫沈降すると、得られた cDNA がコードすると予想される分子量の蛋白質が沈降された。この cDNA を COS7 細胞に発現させると細胞膜上に発現が見られ、BINP の結合を測定することができた。以上のことから、得られた cDNA は BINP 受容体蛋白質と予想される 40 kDa 蛋白質をコードする cDNA であることが示された。

3B1520

ラットの Glia Maturation Factor- γ (rGMFG) の cDNA のクローニングとその 組織分布

横井 誉^{1,2}, 浅井 清文², 立木 秀樹^{1,2}, 三浦 裕², 山本 愛美², 井上 雄一朗², 河合 洋子³, 多田 豊敏³, 森山 昭彦⁴, 加藤 泰治²

¹名古屋市立大学医学部小児科学教室, ²名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門, ³名古屋市立大学看護学部, ⁴名古屋市立大学自然科学研究教育センター

グリア細胞成長因子- β (Glia Maturation Factor- β : GMFB) は、脊椎動物のグリア細胞とニューロンの成長・分化に関与する因子であり、1991 年にヒト GMFB の cDNA がクローニングされた。我々はアストロサイトにおける GMFB の発現をノーザンブロッティング法で解析していたところ、GMFB に対応する 4.1 kb のバンド以外に弱く交差する 0.9 kb のバンドを認めた。新たな GMFB の homologue の存在を考えたため、その cDNA のクローニングを行ったところ、ヒトにおいて GMFB と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を発見し、グリア細胞成長因子- γ (GMFG) と名付けた。今回我々は、ラットの GMFG (rGMFG) の cDNA をクローニングし、ノーザンブロッティング法、ウェスタンブロッティング法、In-situ hybridization 法で各組織での発現を調べた。

rGMFG の cDNA 全配列を決定したところ、426 塩基からなる Open Reading Frame を持っており、142 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが分かった。その予想されたタンパク質のアミノ酸配列はラットの Glia Maturation Factor- β (rGMFB) と高い相同性 (78.9%) があり、rGMFB の生物学的な活性に非常に重要であるとされている第 8、87、96 番のシステイン残基は rGMFG においても完全に保存されていた。ノーザンブロッティング法で臓器発現を調べたところ、ラットの胸腺、精巣、脾臓において rGMFG に対応する 0.9 kb の mRNA が強く発現しているのを認めた。また抗 rGMFG 抗体を作製しウェスタンブロッティング法を行ったところ、胸腺と脾臓でタンパク質発現が認められた。さらに In-situ hybridization 法により脳の海馬と精巣で rGMFG が強く発現しているのを認めた。

これらの結果より、rGMFG の分布は rGMFB と異なり増殖が盛んな組織に多いと考えられた。

3B1540

酸化型ガレクチン-1を起点とした末梢神経再生へ向けてのカスケード

堀江 秀典¹, 門屋 利彦², 樋川 直司¹, 三五 一憲³,
竹下 歌織¹, 浅輪 玲子¹, 廣井 智子¹, 佐藤 真奈美¹,
石川 義弘¹

¹横浜市大医学部第一生理, ²キリンビール医薬探索研究所, ³東京都神経科学総合研究所発生形態

(目的) 末梢神経損傷後の初期過程において軸索再生を調節する因子は不明であったが、我々は酸化型ガレクチン-1がその調節因子であることを明らかにした。しかし、損傷後再生軸索や活性化されたシュワン細胞から放出された酸化型ガレクチン-1がどのように神経再生を促進するのかは不明であった。この発表では酸化型ガレクチン-1の標的細胞が何であるのか、その標的細胞に作用した結果その細胞内でのシグナル伝達系はどのように活性化されるのか、そしてその細胞から分泌された因子により神経再生が促進されるのか？こうした問題点に答えることにより酸化型ガレクチン-1を起点とした末梢神経再生へ向けてのカスケードを明らかにする。(方法) 成熟ラットから脊髄後根神経節 (DRG) を摘出・分離し DRG 神経細胞、シュワン細胞を単離し培養する。また腹腔よりマクロファージを洗い出して用いた。これらの細胞を蛍光ラベルされたリコビナントヒト GAL-1/Ox (rhGAL-1/Ox) により標識することにより標的細胞を決めた。標的細胞のチロシンリン酸化に対する酸化型ガレクチン-1の効果を検討し、更にその細胞の培養上清を DRG 器官培養系に作用させ培養上清に末梢神経再生促進作用があるかどうかを調べた。(結果) 蛍光標識された rhGAL-1/Ox によりマクロファージの細胞膜が標識され、rhGAL-1/Ox のターゲット細胞の1つがマクロファージであることが判明した。他の培養細胞では標識は確認されなかった。rhGAL-1/Ox で刺激されたマクロファージではチロシンリン酸化に変化が起こり、細胞内シグナル伝達系が活性化された。刺激されたマクロファージの培養上清が DRG 器官培養系の神経側切断端からの軸索再生を強く促進した。(結論) 末梢神経損傷後の酸化型ガレクチン-1を起点とした神経再生のカスケードは以下のように行われていると考えられる。損傷後細胞内で還元状態にある GAL-1 は再生組織中の再生軸索成長円錐や活性化されたシュワン細胞から分泌され体液中で酸化され、GAL-1/Ox となってマクロファージを刺激しマクロファージから末梢神経再生を促進する因子の分泌を促進し軸索再生を促進する

3C1300

アゴニスト刺激性血小板内カルシウム濃度増加反応における PKC 及びカルモジュリンの調節機構に関する検討

鈴木 克治, 秋本 達之, 佐々木 由紀, 久住 一郎, 小山 司

北海道大学大学院医学研究科/神経機能学講座精神医学

一部の感情障害患者の血小板でセロトニン (5-HT) あるいはトロンビン (Thr) 刺激による細胞内カルシウム (Ca) 濃度増加反応が亢進していることが知られている。このメカニズムについては未だ明らかではない。今回、われわれは健常者を対象とした予備的検討として、アゴニスト刺激性血小板内 Ca 濃度増加反応 (Ca 反応) におけるプロテインキナーゼ C (PKC) 及びカルモジュリン (CaM) の調節機構について検討した。Ca 反応の測定は、既報の方法に従い血小板を調整後、蛍光 Ca 試薬 fura-2 を加え、蛍光分光時計 F-2000 を用いて行い、10 μ M の 5-HT または 50U/l の Thr 刺激で得られる Ca 濃度の変化を算出した。PKC 刺激剤として PMA を、PKC 阻害剤として staurosporine (STAU) 及び bisindolylmaleimide II (BIS) を、また CaM 阻害剤として W-7、Ca/CaM 依存性プロテインキナーゼ II 阻害剤として KN-93、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤として ML-9 を用い、それぞれ濃度展開して 4 分間前処置し、同反応系への影響を比較した。PMA は双方のアゴニスト刺激による Ca 反応を濃度依存性に抑制し、IC₅₀ 値は 5nM であった。STAU は 10nM までは同反応系に影響を与えず、100nM で双方のアゴニスト刺激による Ca 反応を有意に抑制した。1 μ M では 5-HT 刺激による反応をさらに抑制したが Thr 刺激による反応は抑制されなかった。BIS は 100nM までは同反応系に影響を与えず、1 μ M で双方のアゴニスト刺激による Ca 反応を有意に抑制した。W-7 は 30 μ M では双方のアゴニスト刺激による Ca 反応を亢進させた。また、100 μ M 以上の濃度では Thr 刺激性 Ca 反応を亢進させたが、逆に 5-HT 刺激性 Ca 反応を抑制した。KN-93 は 1 μ M までは同反応系に影響なく、10 μ M で双方のアゴニスト刺激による Ca 反応を亢進させた。ML-9 は 30 μ M で双方のアゴニスト刺激による Ca 反応を亢進させた。100 μ M では Thr 刺激性 Ca 反応を亢進させたが、逆に 5-HT 刺激性 Ca 反応を抑制した。以上より、ヒト血小板では PKC が刺激されても阻害されても 5-HT 及び Thr 刺激性 Ca 反応は亢進しないが、CaM 依存性の信号伝達が阻害されると Ca 反応が亢進する可能性が示唆された。今後は対象を感情障害患者に広げ、健常者の結果と比較検討していく予定である。

3C1320

副腎クロマフィン細胞における cyclic ADP-ribose の分泌における役割

森田 克也, 北山 滋雄, 土肥 敏博
広島大・薬・薬理

Cyclic ADP-ribose (cADPR) は内因性リアノジン (RyR) アゴニストと目され、精力的な研究が行われてきたにもかかわらず、cADPR の作用発現、受容体刺激に応答した生合成・分解系の調節、生理的役割等メッセンジャーとして必要不可欠な条件が証明されていない。私達は副腎クロマフィン細胞に於ても cADPR が RyR に作用し Ca^{2+} 遊離を引き起こすこと、cADPR 生合成活性は ACh 刺激に応答して刺激後短時間で促進されることを見出し、RyR の内因性リガンドとして機能している可能性を示唆してきた。近年、 IP_3 受容体や RyR には FK506-binding protein (FKBP) が会合して Ca^{2+} 放出チャンネルの安定性に関わる可能性が示されつつある。さらに cADPR が FKBP12.6 に作用し Ca^{2+} 動員作用を現すことが膵臓 β 細胞で明らかにされた。そこで、副腎クロマフィン細胞での cADPR の作用様式および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態、カテコールアミン (CA) 遊離における cADPR の役割について、cADPR 阻害薬 8Br-cADPR、FKBP に作用する各種免疫抑制薬および RyR 阻害薬を用いて検討した。

Digitonin で膜透過性としたクロマフィン細胞で FK506, rapamycin は cADPR の Ca^{2+} 動員作用を抑制した。これら薬物は caffeine, ryanodine による Ca^{2+} 動員に対しては強い増強作用を示した。FK506 および rapamycin は FKBP に結合し、RyR から解離させることから、cADPR の作用点が FKBP にあることが示唆される。無傷細胞で ACh は急峻で一過性の上昇とそれに続く持続した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした。FK506, rapamycin は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を一過性に増強したが、ピーク後急速に下降し、持続時間の著しい短縮を認めた。cADPR 阻害薬 8Br-cADPR や RyR を阻害する imperatoxin inhibitor (IpTx) でも同様に持続相を抑制した。また、8Br-cADPR の作用は FK506, rapamycin, IpTx で処置した細胞では認められず、cADPR が RyR に作用し $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の維持に寄与していることが示唆された。さらに、8Br-cADPR, FK506, rapamycin は ACh による CA 遊離を 50-70% 抑制した。

以上の結果より、ACh 刺激により産生された cADPR が FKBP に作用し、RyR チャンネルから Ca^{2+} 遊離を引き起こすこと、この Ca^{2+} 動員が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の維持とそれに基づく CA 遊離に寄与していることを示唆した。

3C1340

アネキシン I の G 蛋白質 α サブユニットとの結合及び GTPase 活性調節

相馬 仁¹, CREUZ Carl E², MCINTIRE William E², GARRISON James C², 大川 浩子³, 黒木 由夫¹

¹札幌医科大学医学部生化学第一講座, ²Department of Pharmacology, University of Virginia, ³札幌医科大学保健医療学部作業療法学科

アネキシンは、 Ca^{2+} 依存的リン脂質結合蛋白質である。ゆる臓器に存在し、哺乳類には 10 種のアイソフォームが存在する。一部のアネキシンは、リン脂質のみならず蛋白質と結合することが示され、新たな機能発現に結びつく可能性が考えられる。本研究では、アネキシン I と結合する細胞膜内蛋白質の存在を検討するために、A549 細胞膜画分を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写しアネキシン I とインキュベートしアネキシン I に対する特異抗体によってアネキシン I 結合蛋白質を検討した。その結果、いくつかのバンドのうち分子量約 40kDa のバンドは G 蛋白質 α サブユニットであることが判明した。次に、精製した $\text{G}\alpha$ との結合を Ca^{2+} 及びリン脂質リボソーム存在下で $\text{G}\alpha$ がアネキシン I と共沈するか否かで検討した結果、アネキシン I は牛脳より調製した $\text{G}\alpha$ と結合したが $\text{G}\alpha$ との結合は認められなかった。また、アネキシン I は $\text{Gq}\alpha$ と結合することがわかった。一方、他のアネキシンアイソフォーム (アネキシン II, IV, V, VII) と $\text{G}\alpha$ の結合は認められず結合特異性があると考えられる。更に、アネキシン I は、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 存在下でより強く $\text{G}\alpha$ と結合し、GTP 状態の $\text{G}\alpha$ との親和性が強いことを示している。アネキシン I と $\text{G}\alpha$ との結合の生理的意味を探るためにアネキシン I 存在下で $\text{G}\alpha$ の GTPase 活性、及び $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性を検討した。その結果、アネキシン I は $\text{G}\alpha$ の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性には全く影響を与えなかったが、GTPase 活性は弱いながら活性化されることが明らかになった。以上のことから、アネキシン I が $\text{G}\alpha$ の活性抑制に働くこと示唆され、G 蛋白質を介する新しい細胞情報伝達に関わる可能性が考えられる。

3C1400

ラット初代培養アストロサイトにおける ATP 受容体刺激による iNOS 誘導増強機構について—PKC および AP-1 の関与—

°向井 由幸¹, 村山 俊彦², 大熊 康修¹, 野村 靖幸¹
¹北大・薬・薬理, ²千葉大・薬・薬品化学

ATP は中枢において神経伝達物質として働いているが、細胞傷害時には大量に放出され、これによってグリア細胞が活性化されることが知られている。活性化したグリア細胞は、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を増大させ大量の NO 生成し、神経細胞死を引き起こす。iNOS の発現は NF- κ B、AP-1 などの転写因子によって制御されているが、ATP 受容体刺激が転写因子や iNOS 誘導に及ぼす影響については不明な点が多い。そこで、ラット初代培養アストロサイトおよび C6 グリオーマ細胞を用い、iNOS 発現誘導機構を検討した。

アストロサイトでは、LPS 刺激によって iNOS の誘導が起こる。これは p38 阻害薬の SB203580 で処理すると抑制されたが、MEK 阻害薬の PD98059、PKC 阻害薬である GF109203X で処理しても抑制されなかった。PMA または ATP γ S で 24 時間前処理後に LPS で刺激すると、iNOS 誘導量が増大した。この増強作用は、GF109203X の前処理によって抑制されたことから、PKC を介していることが示唆された。また、SB203580、PD98059 で処理した場合も、この増強作用は部分的に抑制された。しかし、PMA、ATP γ S 単独で 24 時間処理しても iNOS 誘導は見られなかった。次に、転写因子の転写活性を測定したところ、アストロサイトでは、LPS 刺激により NF- κ B の転写活性が上昇したが、PMA、ATP γ S 刺激ではほとんど活性化しなかった。一方、AP-1 の転写活性は、LPS によって 2 倍程度上昇し、PMA、ATP γ S によっては 3～5 倍程度上昇した。C6 グリオーマでは、LPS 刺激での iNOS タンパク誘導量は検出限界以下であった。このとき NF- κ B の活性化は見られたが、AP-1 の活性化は見られなかった。しかし PMA と LPS を共刺激することで、iNOS の誘導が起こった。以上のことから、NF- κ B と AP-1 の両方の活性化が iNOS の誘導には重要である可能性が示唆された。

3C1420

Ca²⁺ /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II によるインスリン分泌の調節

°山本 秀幸¹, 田淵 博孝^{1,2}, 松本 和也², 福永 浩司¹, 平岡 秀仁³, 佐々木 泰治³, 七里 元亮², 宮本 英七¹
¹熊本大・医・一薬理, ²熊本大・医・代謝内科, ³旭化成

神経細胞において Ca²⁺ /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) によるシナプシン I の磷酸化反応は、神経伝達物質の放出に関与することが知られている。CaM キナーゼ II とシナプシン I はシナプス小胞に結合して存在する。我々はマウスインスリノーマ細胞 (MIN6 細胞) においても CaM キナーゼ II とシナプシン I が多量に存在し、インスリン分泌顆粒に結合していることを見いだした。今回、MIN6 細胞に存在する CaM キナーゼ II のアイソフォームを全て同定した。さらに、主要なアイソフォームを MIN6 細胞に過剰発現し、シナプシン I の磷酸化とインスリン分泌への影響について検討した。RT-PCR 法と免疫プロット法により β' e と δ 2 が MIN6 細胞の主要なアイソフォームであることが明らかになった。MIN6 細胞に両アイソフォームを過剰発現させると、グルコース及びトルブタミド刺激による酵素の活性化が認められた。CaM キナーゼ II で磷酸化されたシナプシン I に対する特異抗体を用いた免疫プロット法により、両酵素の過剰発現によるシナプシン I の磷酸化の増強が確認された。インスリン分泌反応も両酵素の過剰発現により増強された。触媒活性のない酵素の過剰発現では増強効果は認められなかった。これらの結果はインスリン分泌細胞に存在する CaM キナーゼ II がシナプシン I の磷酸化反応を介してインスリン分泌に関与することを示唆している。

3C1440

高酸素負荷によるラット脳ホスホリパーゼ C- δ 1 レベルの上昇

°藤本 貞毅¹, 谷野 浩子¹, 楠田 敏博¹, 岸本 あずさ¹, 尾方 英俊¹, 岡村 将平¹, 下濱 俊²

¹京都薬科大学衛生化学教室, ²京都大学医学部神経内科学教室

アルツハイマー病脳において、ホスホリパーゼ C (PLC) アイソザイムのひとつである PLC δ 1 が異常蓄積していることが認められているが、その原因は不明である。我々は先に、アルミニウム (Al) を腹腔内投与したラット脳において PLC δ 1 のタンパク質レベルが有意に高いことを認めているが、この変化が Al の金属ストレスによるものか、あるいは Al によって引き起こされる酸素ストレスによるものかは明らかではない。今回、100%酸素中で飼育したラット脳において PLC アイソザイムの変動を調べた。

7 週齢 Wistar 雄性ラットを用い、100%酸素下およびその対照として空気中で 60 時間飼育した後の海馬、大脳皮質を試料とした。酸素ストレスの指標として低分子量 (LMW) 型チロシンホスファターゼ活性を測定した。PLC アイソザイムのタンパク質レベルの変動はそれぞれの特異抗体を用いた western blot 法により解析した。また PLC 活性は、phosphatidyl inositol を基質として測定した。

高酸素負荷ラット群では、大脳皮質において対照群と比べて LMW 型チロシンホスファターゼの活性は有意に低下していた。海馬、大脳皮質において、PLC アイソザイムのうち PLC γ 1、PLC δ 1 は主に細胞質分画に存在し、PLC β 1 は細胞質分画、膜分画どちらにも存在していた。高酸素負荷ラット群の海馬、大脳皮質の細胞質分画における PLC δ 1 のタンパク質レベルは対照群のそれらに比べて有意に上昇していた。PLC β 1、PLC γ 1 のタンパク質レベルは細胞質分画、膜分画ともに両群間で差は認められなかった。また、大脳皮質において、総 PLC 活性も両群間で差は認められなかった。以上の結果より、脳組織において酸素ストレスにより PLC δ 1 タンパク質レベルの異常蓄積が起こる可能性が示唆された。

3C1500

海馬ニューロンにおけるエストロゲンの IGF-1 mRNA 発現誘導のメカニズム

°新郷 明子 S., 鬼頭 昭三

兵庫大学附属研究所

我々の従来の実験から、estrogen がラット海馬で IGF-1 mRNA の発現を誘導することが確認されている。しかし、この estrogen による反応の情報伝達経路については不明である。最近 estrogen は細胞膜上にも特異的結合部位を有し、それは G 蛋白-cAMP 系と共役していることが推定されている。これに伴って、estrogen の genomic な効果と non-genomic な効果との crosstalk がこの領域での topics の一つとなっている。

本研究では、ラット胎仔海馬神経細胞を不死化させた H19-7 細胞を用いて実験を行った。この細胞は estrogen α 受容体を有することが確認されている。この細胞に各種の量の estradiol を加えると、この estrogen 受容体の up-regulation が見られた。また estradiol を加えることで IGF-1 mRNA 発現の誘導も確認された。この発現は H8 または PD98059 を加えることによって阻止されたが、tamoxifen や ICI182,780 によっては影響を受けなかった。estrogen による IGF-1 mRNA 発現の誘導に伴って、Erk リン酸化の促進が見られた。これらの結果から estrogen による IGF-1 mRNA 発現誘導の mechanism について考察する。H19-7 細胞は Chicago 大学の Dr. Eves から供与、本研究は喫煙科学研究財団研究助成金による補助を受けた。

3C1520

αCaMKII mRNA の樹状突起への局在を決定するシス領域の検索

°森 泰丈^{1,3}, 今泉 和則^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座, ²田辺製薬 (株), ³科学技術振興事業団

我々は神経細胞の樹状突起に分布する mRNA の輸送メカニズムを解明する目的で、樹状突起に分布する mRNA の中で特に脳の高次機能に重要な役割を果たすカルモジュリン依存性キナーゼ IIα サブユニット (αCaMKII) mRNA に着目した。これまで αCaMKII mRNA の樹状突起への局在には、mRNA 自身の 3' 非翻訳領域 (3'UTR) が必要であることが示唆されているが、3'UTR のどの領域が樹状突起への輸送に必要かつ不可欠なのかについての解析はなされていない。我々は樹状突起に局在するために必要かつ十分な領域 (シス領域) を同定する目的で以下の実験を行った。まずラット脳ライブラリーより αCaMKII の 3'UTR のスクリーニングを行い、その全長を取得した。次にこの領域に様々なディリーションを加えることで神経細胞内での mRNA の局在がどのように変化するかを *in situ* hybridization 法を用いて検討した。蛍光蛋白質である GFP の翻訳領域の下流に様々なディリーションを加えた αCaMKII 3'UTR を融合し、これを CMV プロモーターにより強制発現させるプラスミドを作製した。また αCaMKII の翻訳領域を融合したプラスミドを同時に作製し、これらをリポフェクション法を用いてラット海馬初代培養神経細胞に導入した。GFP より発せられる蛍光により細胞へのプラスミドの導入を確認し、各プラスミドより発現した融合 mRNA の細胞内分布を GFP 配列のアンチセンスプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。その結果、融合 mRNA の樹状突起への局在には αCaMKII の翻訳領域ではなく 3'UTR が必要であることを確認した。さらにディリーションアッセイにより、5' 末端側の 30 塩基が融合 mRNA の樹状突起への局在にとって必要かつ十分であることを確認した。

3C1540

NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇に対する遊離 Fe^{2+} の阻害効果

°中道 範隆², 大野 博司², 倉本 展行³, 高柳 雅子¹, 中村 洋一¹, 米田 幸雄¹

¹金沢大・薬・薬物, ²金沢大・がん研・分子薬理, ³金沢大・薬・微生物

NMDA 受容体活性化に伴う細胞質の遊離 Ca^{2+} 濃度上昇は、脳内の興奮性神経情報伝達物質であるグルタミン酸による細胞外シグナルを、細胞核へと伝える細胞内シグナル伝達系の引き金と考えられる。本研究では、神経細胞における NMDA シグナル伝達系の基礎となる細胞内メカニズムを解明するために、NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇を、初代培養ラット大脳皮質神経細胞を用いて検討した。

6 日間および 9 日間培養の場合とは異なり、3 日間培養の大脳皮質神経細胞では、GFAP 発現は観察されなかった。この 3 日間培養大脳皮質神経細胞を fluo-3 で前処理したのち、様々な薬物を適用して、細胞の蛍光強度変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。培養細胞を NMDA あるいは L-Glu に暴露したところ、 MgCl_2 添加時に比べて MgCl_2 非添加時の暴露の方が、ともに暴露 2 分後の蛍光強度が顕著に増加することが判明した。この蛍光強度増加の細胞内局在性は、暴露 5 分後の時点では、NMDA と Glu 間に顕著な相違は見られなかった。NMDA 受容体の特異的アンタゴニストである MK-801 の前処理により、NMDA 添加による蛍光強度上昇は完全に抑制された。KCl 添加による蛍光強度上昇は、暴露継続中でも経時的に減弱されたのに対して、NMDA の場合では暴露中は常に蛍光強度上昇が観察された。 FeCl_2 の添加は、NMDA によって上昇した蛍光強度を速やかに減少させたが、KCl による蛍光強度上昇は、 FeCl_2 添加による影響をほとんど受けなかった。NMDA 誘発性の蛍光強度上昇に対する抑制効果は、10 から 200 μM の濃度範囲内では添加する FeCl_2 の濃度依存的に出現することが確認された。しかしながら、 FeCl_3 添加は NMDA による蛍光強度上昇に著変を与えなかった。

以上の結果より、NMDA 受容体の活性化が細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加を引き起こすこと、および膜電位依存型 Ca^{2+} チャネルでは速やかに脱感作が招来されるのに対して、NMDA 受容体 Ca^{2+} チャネルでは脱感作が誘発されにくいことが確認された。また、この NMDA による Ca^{2+} 濃度上昇は、遊離 Fe^{2+} により選択的に阻害される可能性が示唆される。

3D1300

MPTP induced chronic hemi-parkinsonism model in Goettingen/CSK miniature pig

^{*}Kyuichiro Onoe^{1,3}, Hitoshi Osuga², Fumihito Yoshii³, Yukito Shinohara³, Joh Ikeda -E²

¹JST/ICORP Canada Int's Research Program, NeuroGenes Project, ²Department of Molecular Neuroscience, Institute of Medical Sciences, Tokai University, ³Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Tokai University School of medicine

A consistent animal model is indispensable to analyze the pathophysiology of diseases. Miniature pig (MP) has been recognized as a good candidate for animal model in various human diseases by its anatomical and physiological similarities. However, the application of MP for neurological disorders has not been established. The purpose of this study is to establish MPTP-induced MP parkinsonism model and evaluate pathophysiology in this model, histologically and behaviorally. Ten male MPs were used in this study. In 4 pigs, MPTP (5 or 10mg/kg) were subcutaneously injected. Immediately after the MPTP administration, these animals exhibited transient hyperkinesia, which lasted for several hours. Then severe akinesia and rigidity of hind limbs rapidly developed over several days after MPTP administration. These apparent symptoms of parkinsonisms were completely disappeared in 2 weeks. In 6 pigs, MPTP (0.3, 0.5, 1.0 mg/kg) were slowly injected through right common carotid artery (CCA) toward the brain. The animals administered larger dosages (0.5, 1.0 mg/kg) exhibited only mild bradykinesia and the symptom was completely disappeared within 4 days after MPTP administration. The animals administered smaller dosage (0.3mg/kg) did not exhibit any symptoms or alterations of behavior. In symptomatic animals, apomorphine (APO; 1 mg/kg) and methamphetamine (METH; 3 mg/kg) could induced aggressive rotatory movement similar to that in previously reported rodent hemi-parkinsonism (METH induced ipsilateral and APO induced contralateral rotation to the lesion side). These APO or METH induced rotations were consistently observed in initially symptomatic animals at 6 months after MPTP administration. These results suggested that an injection of MPTP through unilateral common carotid artery effectively induced chronic hemi-parkinsonism in MPs and this model would be a suitable clinical model for human Parkinson disease.

3D1320

ヒト脳内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinol によるドーパミン神経の細胞死の機序

^{*}丸山 和佳子¹, 赤尾 幸博², 直井 信³

¹長寿医療研究センター老化機構研究部生化学代謝研究室, ²岐阜国際バイオ研究所, ³応用生化学研究所脳科学研究部

N-methyl(R)salsolinol [NM(R)Sal]はヒト脳内でドーパミンから酵素的に生成されるイソキノリンであり、黒質線条体に蓄積が認められる。NM(R)Sal をラット線条体に持続注入した結果、黒質ドーパミン神経細胞の脱落が惹起された。さらに、患者サンプルの分析により、未治療パーキンソン病患者の脳脊髄液中 NM(R)Sal の濃度が増加していること、NM(R)Sal 生成の律速酵素である中性 (R)salsolinol N-methyltransferase の活性がパーキンソン病患者のリンパ球で高値をとることが示された。NM(R)Sal によるドーパミン神経細胞に対する選択的な細胞毒性の機序を明らかにする研究を行った。ヒトドーパミン神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を NM(R)Sal で処理したところ、濃度依存的にアポトーシスが惹起されたが、ネクローシスは殆ど認められなかった。一方光学異性体である N-methyl(S)salsolinol は殆ど細胞毒性を示さなかった。NM(R)Sal 処理後 60 分以内でミトコンドリア膜電位の低下が認められ、それに引き続きカスパーゼの活性化と細胞核の濃縮、分葉化が認められた。一方、近年アポトーシスのシグナル伝達に関わっているとの報告がある glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の核内移行が NM(R)Sal 処理後 10-12 時間後より認められた。NM(R)Sal によるアポトーシス、ミトコンドリア膜電位低下、および GAPDH の核内移行は抗アポトーシスタンパクである bcl-2 の過剰発現により抑制された。この結果は GAPDH の核内移行がミトコンドリア膜電位低下の下流のアポトーシスシグナルとして働いていることを示唆している。さらに単離ミトコンドリアに対しても NM(R)Sal は膜電位を低下させた。ドーパミン神経細胞のミトコンドリア内には N-methylsalsolinol の光学異性体を認識し、アポトーシスシグナルを起動する標的因子が存在する可能性がある。

3D1340

1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) によるラット線条体のミトコンドリア機能障害

°中井 正三, 森 厚詞, 渡部 昭仁, 光本 泰秀
大塚製薬 (株) 医薬第二研究所・神経変性疾患グループ

パーキンソン病は黒質線条体系ドパミン作動性神経細胞の変性を主病変とする疾患であり、その病因は、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) とその活性代謝物 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) を用いた検討から、ミトコンドリア機能障害とそれに引き続く酸化ストレスであることが明らかにされつつある。本研究では、MPP⁺処置パーキンソン病モデル動物のミトコンドリア機能障害を解析する目的で、MPP⁺ (10-80 nmol/Striatum) 注入後のラット線条体シナプトソームにおけるミトコンドリア酸化還元活性と膜電位の変化を測定した。

その結果、MPP⁺注入 18 時間後のシナプトソームにおけるミトコンドリア酸化還元活性と膜電位は、Alamar Blue と JC-1 蛍光色素を用いた検討より、MPP⁺の注入量に依存して減少することが見出された。その時、抗チロシン水酸化酵素抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、MPP⁺は、線条体チロシン水酸化酵素タンパク量に対してほとんど影響を与えていなかった。一方、MPP⁺処置 7 日後のチロシン水酸化酵素タンパク量は減少することが確認された。また、40 nmol MPP⁺によるミトコンドリア酸化還元活性、膜電位およびチロシン水酸化酵素タンパク量の低下は、選択的ドパミン取り込み阻害剤GBR-12909の投与によりほぼ完全に抑制された。このことから、同用量の MPP⁺によるミトコンドリア機能障害はドパミン作動性神経終末に起因するものと考えられた。

本研究の結果から、ミトコンドリア酸化還元活性の低下とおそらくそれに引き続いて起こるミトコンドリア内膜の脱分極が、線条体ドパミン作動性神経終末の変性に先立って誘導されることが示唆された。

3D1400

チューブリンは NACP/ α -synuclein 線維形成の seed となる：Parkinson 病病理形成における意義

°上田 健治¹, アリム M.アブドゥル M.¹, ホセイン シャハナラ MST.¹, 泉山 洋子², 有馬 邦正²
¹東京都精神医学総合研究所神経化学研究部門, ²東京都精神医学総合研究所超微形態研究部門

NACP は Alzheimer 病 (AD) 脳アミロイドの分析から見出された NAC (non-Abcomponent of AD amyloid) の前駆体としてクローニングされた。後にシビレエイ Synuclein と相同であることから、ヒト α -synuclein とも称され、その遺伝子変異が家族性 Parkinson 病 (PD) の疾患原因遺伝子として同定され、Lewy 小体 (LB) の主要線維成分と判明し、多系統萎縮症の細胞内封入体の線維成分としても検出された。さらに、家族性 AD 脳においても LB の頻繁な存在が確認されつつある。しかし家族性変性疾患は稀である事実から、孤発型での NACP 病理形成を促進する因子の存在が推察される。この因子を解析する目的で、リコンビナント NACP を用いたアフィニティークロマトグラフィー法で、ヒト大脳皮質の水溶性蛋白質画分を解析したところ、 α -チューブリンが NACP 結合蛋白質として検出された。この結合が生理的結合であることを検証するため、抗 NACP 抗体で免疫沈降を行ったところ、沈降物にチューブリンが検出され、逆に抗 α -チューブリン抗体での免疫沈降で NACP が検出された。さらに、ラット脳から微細管を精製し、精製微細管画分に NACP が存在することが Western blot と、免疫電顕で確認され生理的結合が示された。次に、NACP 病理形成へのチューブリンの関与の可能性を考慮し、生理的条件の in vitro 系で NACP 線維形成反応を検討したところ、チューブリンの存在下でのみ NACP 線維形成が確認された。他方、神経病理検索では、LB 等の NACP 異常構造体にチューブリンが共存することが、二重免疫蛍光ラベル法により確認された。以上から、チューブリンが NACP 線維形成の seed となり、ひいては LB 等の NACP 病理形成の促進因子である可能性が示唆され、従って、微細管系に影響を与えチューブリンを遊離せしめる化学物質は PD や Lewy 小体型痴呆の危険因子である可能性がある。また、チューブリンと NACP との結合は、NACP 病理が関与する変性疾患の治療薬の標的になり得る可能性がある。さらに、我々の NACP 線維形成反応系はこの治療薬の検定に利用し得る可能性が示唆された。

3D1420

ミトコンドリア DNA を欠失した神経系の rho-0 細胞は細胞の起源により異なる代謝的適応を示し、酸化ストレスに脆弱であり、アポトーシスあるいはネクローシスによる細胞死を示す

°中瀬 泰然, 福山 隆一, 鳥羽 裕恵, 才脇 卓也, 伏木 信次
京都府立医科大学附属脳血管系老化研究センター病態病理学

ミトコンドリア病とミトコンドリア異常が関与する神経系の疾患の細胞モデルとして、ミトコンドリア DNA(mtDNA) 欠失細胞の作製を試みた。本学小児科にて神経芽細胞腫より樹立された S 細胞、マウスのシュワン細胞由来の I 細胞、ヒト胎児性癌由来 NT-D2 細胞を用いた。これらの細胞を 0.01 - 10 mg/ml 濃度のエチジウムブロミド存在下で 2-3 ヶ月にわたって培養し、残存した細胞よりクローニングして何種類かの株を得た。それぞれ S rho-0 と I rho-0 と名づけたが、NT-D2 細胞は高いエチジウムブロミド感受性のためか、rho-0 化できなかった。rho-0 クローンは O₂ 消費能と mtDNA 量は検出感度以下であった。ミトトラッカー染色にて不整な塊状の形態が観察されるのみであった。電子顕微鏡による観察では親株には見られない、腫大し、明るいマトリックスを持つ異型な胞状構造が多数存在していた。短小なクリステも見られることから、病的なミトコンドリアであると考えられた。層状あるいは同心円状構造を示すクリステなどクリステの異常が著明であった。S rho-0 細胞の LDH 活性は減少し、乳酸産生量は親株と同程度であったが、I rho-0 細胞はどちらも上昇していた。酸化ストレスに対する感受性と細胞死のパターンを調べるため、H₂O₂ 処理を行った。細胞死の程度はメディウム中の LDH 活性にて、細胞死のパターンは DNA ゲル電気泳動パターンにより評価した。S 細胞、I 細胞および I rho-0 細胞は用量依存性にアポトーシスを示したが、S rho-0 細胞はネクローシスを示した。また、親株より rho-0 細胞の方が数倍感受性が高かった。親細胞のアポトーシスは鉄キレート剤、デフェロキサミンにて完全に抑制されたが、rho-0 細胞死はほとんど抑制されなかった。二種類の神経系由来の mtDNA 欠失細胞の検討より、高度の呼吸傷害という病態にいかなる適応を示すかは細胞種で異なること、酸化ストレスに高感受性で、その機構には鉄あるいはその他の因子が重要であること、アポトーシスあるいはネクローシスどちらの細胞死も起こしうること、が明らかとなった。この細胞系は神経系の疾患の一定の細胞モデルになりうると考えられた。

3D1440

V-1 タンパク質による一酸化窒素 (NO) 毒性からの保護効果とテトラヒドロbiopterin (BH4) の関与

°湯山 耕平¹, 山本 秀子², 山国 徹³, 宗 時榮³, 加藤 武¹, 山本 敏文¹

¹横浜市大・総合理・分子認識, ²東京都精神研・精神薬理, ³三菱化学生命研

V-1 タンパク質は、アミノ酸 117 個からなる可溶性タンパク質として同定された分子である。中枢神経系の神経細胞において広範に発現している V-1 タンパク質はラット小脳において生後一過的に強く発現することから神経分化に関与していることが示唆されるが、その詳細な生理的役割は明らかとなっていない。我々はこれまでに、V-1 タンパク質を PC12D 細胞に過剰発現した系を用いた研究から、V-1 タンパク質が一酸化窒素 (NO) により引き起こされる細胞死に対して細胞保護作用をもつことを報告してきた。

本研究では、V-1 タンパク質の NO 毒性保護作用の機序を調べるために、V-1 過剰発現 PC12D 細胞を用いて、アスコルビン酸とならんで NO 毒性を抑制する抗酸化剤でもあるテトラヒドロbiopterin (BH4) の関与について検討を行った。V-1 過剰発現細胞の細胞内 BH4 含量を測定した結果、ベクターのみを導入した対照株と比較して 3 倍以上の BH4 を含んでいた。また、BH4 の生合成酵素である GTP cyclohydrolase I の阻害剤 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP; 1,3mM) で細胞を 3 日間処理すると V-1 過剰発現細胞で観察された NO 毒性に対する保護効果は、DAHP 濃度依存的に消失した。DHP3mM での細胞生存率は対照株と同程度にまで低下しており、BH4 生合成系を介して細胞内 BH4 含量を増加させることによってその保護効果を示していることを示唆している。これらの結果は、V-1 タンパク質が酸化ストレスに対する保護作用を有する可能性を示しているものと考えられる。

3D1500

ドパミンの核内への直接移行と集積に関する検討

°浅沼 幹人, 宮崎 育子, 田中 健一, 小川 紀雄
岡山大学医学部神経情報学部門

過剰のドパミン (DA) による神経障害は、フリーラジカル種の発生やアポトーシス関連蛋白の発現に基づくとの報告もあるが、他の作用機序の存在も考えられる。今回われわれは、DA の核内への直接移行と集積の有無をみるために、培養 DA 系神経細胞 B65 に DA を添加し経時的に抗 DA 抗体による蛍光免疫染色を行い、DA の細胞下分布を観察した。DA を B65 神経細胞に添加すると、1 時間後から濃度依存的な細胞質での DA 陽性シグナルの著明な集積が認められた。また、DA 添加 2 時間後にはアポトーシス様変化に一致して、核内にも微小点状の DA 陽性シグナルの集積が認められた。この核内への DA 陽性シグナルの移行は細胞質内での集積に比べ緩徐であった。さらに、2 時間の DA 暴露後に DA 非添加正常培養液に替えさらに 22 時間培養しても、核内の DA の集積は DA 暴露 2 時間後よりもむしろ増強していた。これらの結果から、DA は脳細胞の細胞質のみならず核内にも移行し蓄積すること、さらにこの核内の DA の蓄積は遷延することが明らかになった。このような DA の核内への直接移行と遷延性の集積は、DA 神経作用薬の神経変性過程への新たな作用経路とも考えられる。現在、DA の核内移行を阻止する薬剤と DA の核内での標的分子の検索を行っている。

3D1520

伸張ポリグルタミン鎖は TATA 結合蛋白随伴因子 (TAF130) との結合を介し、CREB 転写活性化を阻害する

°下畑 享良¹, 中島 利博², 山田 光則³, 内田 千晴⁴, 小野寺 理¹, 成瀬 聡¹, 佐藤 俊哉¹, 木村 哲也¹, 野崎 兼吉¹, 小宅 睦郎¹, 高橋 均³, 辻 省次¹
¹新潟大学脳研究所神経内科, ²筑波大学医学部応用生物化学, ³新潟大学脳研究所病理, ⁴浜松医科大学大学生化学

現在までに歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) を含む 8 つの遺伝性神経変性疾患がポリグルタミン鎖をコードする CAG リピートの伸張により発症することが明らかにされている。これらポリグルタミン病の病因蛋白の多くが、その配列内に核移行シグナルを持つこと、さらに SCA6 を除くポリグルタミン病剖検脳において病因蛋白を含む核内封入体を認めることから、伸張ポリグルタミン鎖を含む変異蛋白の核移行が病態機序に重要であると考えられている。我々は yeast two-hybrid system を用いて伸長ポリグルタミン鎖と結合する核蛋白を検索し、TATA 結合蛋白随伴因子のひとつ TAF130 が伸長ポリグルタミン鎖と結合することを見いだした。この結合は Far Western 法、免疫共沈法、および培養細胞への共発現実験で確認した。また DRPLA およびマシヤド・ジョセフ病患者剖検脳に対して行った病理学的検索でも核内封入体は抗 TAF130 抗体にて陽性に染色された。一方、TAF130 は転写因子 CREB に直接結合し、補助因子として転写を活性化させることから、伸長ポリグルタミン鎖と TAF130 の結合は CREB が関与する転写の活性化を阻害する可能性が考えられた。レポーター遺伝子を用いて解析したところ、部分 DRPLA 蛋白 (82 リピート) を培養細胞に発現させると、CREB 依存性の転写活性化が強く抑制された。さらに、Neuro2a, COS7 細胞を用いて、TAF130 を同時に過剰発現させると、ポリグルタミン鎖による細胞死を 50% 抑制した。以上より、伸長ポリグルタミン鎖は TAF130 に結合することで、CREB 依存性の転写活性化を阻害する可能性が示唆された。CREB 応答遺伝子群の中には、神経成長因子や長期増強、長期抑圧などに関与する遺伝子が含まれており、これらの遺伝子産物の減少が神経細胞に機能障害を引き起こす可能性が示唆された。

1P-01

新しい分子生物学的アプローチによる痛覚伝達機構の解析

*奥瀬 賢司, WOOD John N.

ロンドン大学生物学科

感覚神経に発現するNaチャンネルは痛覚刺激を脊髄神経に伝える上で重要な役割を果たしており、このチャンネルに対する阻害剤が新しい鎮痛薬として働く事が期待されている。

感覚神経にはTTX感受性NaチャンネルとTTX非感受性Naチャンネルが存在する。我々は感覚神経に特異的に発現するTTX非感受性Na⁺チャンネルをクローニングしSNSと名付け、その痛覚伝達機構における役割を研究してきた。その結果SNSは機械的侵害刺激、熱侵害刺激、炎症刺激時の感覚神経の異常興奮性に関与する事を明らかにした。SNSは他のNaチャンネルと異なり培養細胞腫での発現が極めて困難であり、発現したチャンネル特性も感覚神経で観測される物と異なる。更に既知のβ修飾サブユニットをSNSと共に培養細胞腫に発現させても、SNSの発現量やチャンネル特性に変化が見られない。この事から感覚神経にはSNSの発現を司る因子の存在が予測され、その同定は痛覚伝達機構の解明に有益な情報を与え、鎮痛剤の新しいターゲットとしての可能性も秘める。そこで我々はYeast 2 hybrid法を用いて、DRG由来cDNAライブラリーからSNSに特異的に結合する因子の探索を行い、9つの蛋白質を同定した。

一方、神経に直接侵害が加わるニューロパシーの発生にはTTX感受性のtype-III Naチャンネルが関与する事を我々は最近明らかにした。type-III Naチャンネルはその幅広い生体分布から、通常のノックアウトマウス作製法では感覚神経におけるその役割の解析が困難である。Cre/loxP組み換え系を用いた組織特異的ノックアウト法は、このような広範に発現する遺伝子の特定組織における役割を調べるのに適する。そこで我々は、感覚神経特異的な遺伝子発現を司るプロモーターを用いたCreマウスを作製した。このマウスはtype-III Naチャンネルのみならず、様々な遺伝子の感覚神経における役割を解析するのに最適なモデルを提供すると期待される。本大会ではこれらの新たな試みから得られた最近の知見を紹介する。

これらの新しい手法により、感覚神経の研究における分子生物学的アプローチの価値と情報提供性が増す事が期待され、こうした研究の発展が近い将来の様々な痛みに対する有益な治療法の開発へと結びつくだろう。

1P-02

膜電位依存性カリウムチャンネルの構成サブユニット(Kv1.1, Kv1.2)のラット一次感覚ニューロンにおける発現局在

*横山 茂¹, 長谷川 光広², 申 然淑¹, 山下 純宏², 東田 陽博¹¹金沢大学大学院医学研究科分子情報系独立専攻細胞遺伝子学, ²金沢大学医学部脳神経外科学

【目的】Kv1.1およびKv1.2は膜電位依存性カリウムチャンネルの構成サブユニットであり、神経組織に豊富に存在する。これらのサブユニットが形成するチャンネルが特定の感覚情報の伝達にどのように関与するかを知るために、一次求心性ニューロンにおける発現局在を調べた。【方法】Kv1.1およびKv1.2のアミノ末端の配列に基づいて合成したペプチドでウサギを免疫し、得られた血清を抗原の親和クロマトグラフィーによって精製した。成熟ラットを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、神経組織を取り出し、通常の酵素抗体法(ABC法)あるいは間接蛍光抗体法によって組織染色を行った。【結果】腰部脊髄後根神経節と三叉神経節において、Kv1.1、Kv1.2に対するいずれの抗体も中型から大型の細胞体で強い染色を示した。二重染色を行ったところ、Kv1.1強陽性細胞およびKv1.2強陽性細胞の多くはRT95抗neurofilament抗体陽性であり、抗peripherin抗体陽性のものはわずかであった。脊髄後角では、Kv1.1、Kv1.2共にIII-IV層において強い染色が認められた。電子顕微鏡下の観察では、Kv1.1、Kv1.2いずれの染色も中型から大型のニューロンの細胞質内および細胞膜に認められた。【結論】Kv1.1およびKv1.2は主として一次求心性ニューロンにおける非侵害性感覚の情報伝達に関与することが示唆された。

1P-03

副腎髄質クロマフィン細胞におけるエンドセリン刺激時のカルシウム流入経路：ストア作動性カルシウムチャンネルの関与について

°李 憲¹, 張 曉峰², 岩室 康司², 三輪 聡—²

¹岐阜大学医学部生理学第一講座, ²京都大学大学院医学研究科循環生理学

最近、我々は、培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞 (AMCC) からの、エンドセリン (ET) によって誘発されるカテコールアミン (CA) 遊離におけるカルシウム調節機構には、L-type 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VOC) の他に、2つの Ca^{2+} 透過性非選択的陽イオンチャンネル (NSCC-1 および NSCC-2 と命名) が関与することを明らかにした。今回、さらにこの系において、 Ca^{2+} ストア作動性 Ca^{2+} チャンネル (SOCC) が関与するかどうかを、NSCC 阻害剤である LOE908、および、SK&F96365 (SOCC 阻害剤でもある) を用いて検討した。外液 Ca^{2+} 非存在下に AMCC を曝露した後、thapsigargin (TG、小胞体膜 Ca^{2+} ポンプ阻害剤) を添加すると、緩徐に細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は上昇し、その濃度は TG 非存在下の約 2 倍に達した。この増加に対して、LOE908 は全く影響を与えなかったが、SK&F96365 によってはほぼ完全に遮断された。一方、外液 Ca^{2+} 非存在下において ET-1 刺激を加えても、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は変化しなかった。次いで、外液に Ca^{2+} を添加すると、著明に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加し、外液 Ca^{2+} 存在下の ET-1 刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と同程度に達した。SK&F96365 は、SOCC 阻害剤でもあることを考慮すると、これらの結果は、AMCC において、SOCC は存在するが、その機能は極めて弱く、また、ET-1 刺激時には殆ど機能していないことが明らかとなった。

1P-04

Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca^{2+} channel isoforms: molecular structures and functional characterization

°Lei Zhang, David Saffen

Department of Neurochemistry, Faculty of Medicine, University of Tokyo

In this study, we report the molecular cloning of cDNAs encoding three distinct isoforms of rat TRP6 Ca^{2+} channels. The longest isoform, rTRP6A, contains 930 amino acid residues. rTRP6B lacks 54 amino acids (3-56) at the N-terminus and rTRP6C is missing an additional 68 amino acids near the carboxyl terminus. Transient transfection of COS cells with expression vectors encoding rTRP6A or rTRP6B increased Ca^{2+} influx and gave rise to a novel Ba^{2+} influx following activation of M_3 muscarinic acetylcholine receptors. By contrast, depletion of intracellular Ca^{2+} stores with thapsigargin failed to induce Ba^{2+} influx in cells expressing rTRP6 isoforms. These results suggest that rTRP6 participates in the formation of a Ca^{2+} channel that is regulated by a G-protein coupled receptor, but not by intracellular Ca^{2+} stores.

1P-05

PSD-95 による NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体の機能制御

°山田 康枝¹, 岩本 敬², 祖父江 憲治³, 乾 誠¹¹山口大学医学部薬理学講座, ²山口大学医学部神経精神医学講座, ³大阪大学医学部神経生化学講座

細胞膜骨格蛋白質 PSD-95 は NMDA 受容体の C 末端に結合しその集合化を引き起こすのみならず、脳の可塑性に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。我々はこれまでにアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、PSD-95 が NR1/NR2B サブタイプ受容体のグルタミン酸に対する感受性の低下とプロテインキナーゼ C による活性化の抑制を引き起こし、受容体を機能的に制御することを見い出してきた。今回はさらに PSD-95 の NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体に対する効果を検討した。その結果 NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体は PSD-95 によりプロテインキナーゼ C による活性化の抑制を引き起こすが、グルタミン酸に対する感受性に影響を与えなかった。NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体はチロシンリン酸化酵素 (Src) によって活性化されるが、PSD-95 が共存すると、その活性化は認められなかった。PSD-95 の PDZ ドメイン欠変異体では PSD-95 非存在下と同様の活性化が認められた。チロシンリン酸化酵素による NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体の活性化には、 Zn^{2+} 阻害の抑制が関与していると考えられているので、PSD-95 による NMDA 受容体の Zn^{2+} 感受性への効果を調べた。その結果、PSD-95 は、 Zn^{2+} による NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体阻害を著明に抑制することが明らかとなった。すなわち PSD-95 が Zn^{2+} による NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体の活性抑制に関与し、チロシンリン酸化酵素による活性化に影響を与えていることが示された。PSD-95 は、NR1/NR2A サブタイプ NMDA 受容体を NR1/NR2B サブタイプとはまた違った様式で機能的に制御していることが示唆された。

1P-06

受容体刺激による KCNQ2/KCNQ3 チャンネル抑制の分子機構の解析

°星 直人, 張 家生, 横山 茂, 東田 陽博

金沢大院・医・細胞遺伝子

(目的) M タイプの電位依存性カリウムチャンネルは、 $G_{\beta 11}$ タンパク共役受容体刺激で抑制され、中枢神経、自律神経での神経興奮性の制御を担っている。受容体刺激からチャンネル抑制に至るシグナル伝達経路は、まだよくわかっていない。今回我々は、M チャンネル抑制の分子機構を解析する目的で、M チャンネルを形成すると報告された KCNQ2/KCNQ3 チャンネルについてその受容体以降のシグナル伝達の同定を試みた。(方法) アフリカツメガエル卵母細胞に KCNQ2, KCNQ3, ブラジキニン受容体等の cRNA を注入し電位固定法で電流を観察した。また、CHO 細胞に KCNQ2, KCNQ3, アセチルコリン (M_1) 受容体等を共発現して電流を観察した。(結果) アフリカツメガエル卵母細胞では受容体刺激によるチャンネル抑制は非常に緩慢で CHO で観察された早い抑制とよい対比を示していた。この緩慢なチャンネル抑制は、ラット A-kinase anchoring protein (AKAP)150 を共発現することで促進されることがわかった。また、チャンネルの PKC 依存性リン酸化部位の変異によりチャンネル抑制が修飾されることがわかった。これらのことから、受容体刺激によるチャンネル抑制に PKC と AKAP150 が重要な役割を果たしていると考えられた。

1P-07

坐骨神経結紮ラットの後根神経節における、サブスタンス P とそのプロセシング酵素のアロディニアに伴う変化

°土田 健¹, 知久馬 敏幸², 矢嶋 隆一³, 加藤 武¹

¹横浜市立大学大学院総合理学研究科, ²昭和薬科大学薬品分析, ³特殊免疫研究所

痛みはいくつかに分類されるが、本来痛みを感じるはずのない刺激が痛みを生じるアロディニアはまだ研究の歴史が浅く、その効果的な治療薬の開発も進んでいない。本研究で注目した神経ペプチドのサブスタンス P(SP) は、痛みの主要な伝達物質の一つとして注目されており、その生合成の調節が様々な痛み・炎症において重要である。実際に、侵害受容時には SP の発現が増加し、そのシグナルが痛みの発生に関与している事がわかっている。本研究では、アロディニアモデルとして坐骨神経結紮ラットを用い、その一次知覚神経である後根神経節(DRG)を摘出し、コントロール群と坐骨神経結紮ラット DRG におけるサブスタンス P(SP)、その生合成を調節しているプロセシング酵素 [カルボキシペプチダーゼ E(CPE) とアミド化酵素 (PAM)] の免疫活性と酵素活性の変化を検討した。その結果、アロディニアモデルにおいてはコントロール群に比べ SP、CPE、PAM のいずれの免疫活性も酵素活性も減少した。以前の研究において、SP の前駆体であるプレプロタキキニンのノックアウトマウスがアロディニアを発生する事から、SP はアロディニアに関与しないと考えられた。しかし今回の研究から、SP やそのプロセシング酵素の発現の抑制が関与している事が示唆された。

1P-08

ビオプテリン生合成酵素遺伝子の組織特異的発現調節領域の解析

°大江 瑞恵, 澤田 浩秀, 西井 一宏, 永津 俊治, 一瀬 宏

藤田保健衛生大学・総医研

テトラヒドロビオプテリン (BH4) は、神経伝達物質であるカテコールアミンやセロトニンの生合成酵素であるチロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素および一酸化窒素合成酵素の必須の補酵素である。BH4 の欠乏はカテコールアミンやセロトニンの減少を引き起こし、BH4 生合成の律速酵素である GTP シクロヒドローラーゼ I (GCH) の遺伝子欠損は黒質線条体系ドーパミンニューロンの機能不全により発症する瀬川病を引き起こす。GCH 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることは、BH4 によるカテコールアミンニューロンやセロトニンニューロンの調節機構の解明にもつながるので、今回我々は、ヒト GCH 遺伝子の組織特異的発現調節領域をトランスジェニックマウス (Tg) および培養細胞を用いて解析した。ヒト GCH 遺伝子の 5' 上流 8.1 kb, 5.4 kb, 0.6 kb に、レポータ遺伝子としてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を連結した遺伝子を構築し、Tg をそれぞれ複数ライン作製した (hGCH pro8.1, hGCH pro5.4, hGCH pro0.6)。各組織における CAT の発現を、酵素免疫測定法により解析した結果、hGCH pro0.6 の Tg では脳特異的な CAT の発現がみられたが hGCH pro5.4 では脳を含む全身で発現がみられなかった。一方、hGCH pro8.1 では脳及び末梢組織ともに CAT タンパク質が検出され、特に胸腺、脾臓などの免疫系組織において高い発現がみられた。さらに、免疫組織化学染色により、脳や胸腺に内在する GCH の局在と比較したところ、脳における CAT の発現は、内在の GCH の発現とあまり一致しなかったが、胸腺、脾臓においては同様の細胞での発現がみられた。また、マウス神経芽細胞腫由来の NIE-115 細胞に、Tg と同様の遺伝子を導入した。その結果、0.6kb をもつプラスミドではレポータ遺伝子の高い発現がみられたが、5.4kb の長さをもつプラスミドではレポータ遺伝子の発現が抑制された。以上の結果から、ヒト GCH 5' 上流領域 0.6-5.4kb の中には、脳での GCH の発現を抑制する領域が存在する事が示唆された。

1P-09

高張刺激により誘導される開口放出過程の解析

°大西 浩史¹, 山森 早織¹, 平田 加奈子¹, 近藤 俊三¹, 笠井 陽子¹, 小崎 俊司², 高橋 正身¹

¹三菱化学生命科学研究所, ²大阪府立大学大学院農学生命科学研究科

神経細胞シナプスを電気生理学的に解析する際、 Ca^{2+} 非依存的に神経伝達物質放出を誘導する方法として Sucrose による高張刺激が頻用されている。今回我々はこの高張刺激を神経のモデル細胞 PC12 に用いて神経伝達物質放出過程の解析を行った。PC12 細胞を高張刺激したところ、シナプスの場合と同様に、細胞外 Ca^{2+} 非依存的にカテコールアミンの分泌を誘導することが分かった。この高張刺激で誘導される分泌が正常な開口放出過程によるものであるかどうかを検討するために、破傷風毒素を用いた阻害実験を行った。破傷風毒素は特異性の高いプロテアーゼで、神経伝達物質の放出に必須な VAMP 蛋白質を特異的に切断することで、シナプスにおける神経伝達物質の放出を強く阻害することが知られている。破傷風毒素軽鎖 (TeNT-LC) の動物細胞での発現系を構築し、外来性に導入したヒト成長因子 (hGH)、アセチルコリン (ACh) をリポーターとして PC12 細胞での機能解析を行ったところ、TeNT-LC は、高張刺激 (0.6-0.75M sucrose) によって引き起こされる放出をほぼ完全に阻害する事が分かった。このことは高張刺激による分泌が VAMP 蛋白質に依存した開口放出過程によるものであることを示している。一方、TeNT-LC は高カリウム刺激によって引き起こされる分泌も阻害したが、予想に反して、その効果は部分的であり、TeNT-LC 存在下でもかなりの分泌が観察された。以上の結果は、高カリウム刺激誘導型と高張刺激誘導型の開口放出過程の TeNT-LC 感受性の違いを明確に示すものである。2つの刺激によって誘導される分泌は、いずれも VAMP 蛋白質に依存した開口放出過程によると考えられるが、高張刺激による開口放出は、細胞外カルシウムに依存しない点で高カリウム刺激の場合とは大きく異なる。開口放出過程に含まれるいくつかのステップのうち、TeNT-LC に感受性のステップが存在し、カルシウム流入によってこのステップが補われている可能性が考えられる。

1P-10

カテコールアミン分泌能の低下した PC12 細胞株の解析

°笠井 陽子, 板倉 誠, 桑原 玲子, 平田 加奈子, 近藤 俊三, 高橋 正身

三菱化学生命科学研究所

PC12細胞は神経伝達物質の放出機構を解析する上で有効なモデルである。私共はこれまでに多くの垂株を分離しているが、そのひとつ PC12-2B3 は外液の K 濃度を高めて脱分極刺激をしても、イオノマイシンなどの Ca イオノフォアで刺激してもほとんどドーパミンの放出がみられない低分泌株である。昨年の本大会にて、前シナプス蛋白の synaptophysin の発現が低下していると報告したが、本年度はこの低分泌株に synaptophysin を一過性に過剰発現させ、同時に導入した hGH の分泌を調べた。抗体染色による発現効率とイムノプロットによる発現量の検討から、細胞レベルでは正常株と同様に発現していると思われたが、脱分極刺激による hGH の分泌は回復しなかった。これらのことから、synaptophysin の発現が少ないことは低分泌の原因ではないと結論した。一方、電子顕微鏡による分泌顆粒の形態観察では、その数と密度には低分泌株と正常株との差はみられなかったが、局在には著しい違いがあった。即ち、細胞膜の近傍にある顆粒、いわゆるドッキングしている顆粒の全顆粒にたいする割合をもとめると、正常株では 15.7% (n=20) であるのに低分泌株 PC12-2B3 では 2.4% (n=32) ときわめて減少しており、これが低分泌の原因となる可能性が考えられた。そこで、releasable pool にある顆粒からの放出を引き起こすとされている高濃度シュクロスを細胞外液に加えて分泌顆粒から伝達物質放出を引き起こさせた。しかし、低分泌株でも正常株と同程度にドーパミンが放出され、readily releasable pool にある顆粒に違いは見られなかった。微分干涉顕微鏡で観察したところ、高濃度シュクロスによって細胞は収縮し、細胞質のなかに液胞状の構造が見られた。このような形態変化は低分泌株でも正常株でも観察された。以上の結果から、低分泌株 PC12-2B3 では分泌顆粒の releasable pool は正常株とかわらないが、ドッキングの機構になんらかの欠陥があることが示唆された。

1P-11

受容体 subunit からみた海馬ニューロンに
対する nicotine の作用

°鬼頭 昭三, 新郷 明子 S.
兵庫大学附属研究所

海馬において、ニコチン性アセチルコリン受容体が記憶学習機能を促進する上で役割を演じていることが知られている。我々の従来の実験により、ニコチンがラット海馬で IGF-1 mRNA を誘導することによって海馬ニューロンに有利に働き、一方では、ニコチンがやはり海馬でエストロゲン α 受容体 mRNA の発現を抑制することがわかっている。

本研究ではニコチンが海馬で IGF-1 mRNA 発現を誘導するメカニズムについて、ニコチン受容体の各種の subunit およびエストロゲン α 受容体 mRNA との関係性を明らかにする目的で実験を行った。

ニコチン 1.0mg/kg のラット腹腔内投与は、IGF-1 mRNA の発現を促進と並行して $\alpha 3$ および $\beta 4$ subunit mRNA の発現を上昇させた。これら mRNA の発現は nifedipine によってブロックされ、mecamylamine によって部分的に抑制された。mecamylamine と $\alpha 7$ subunit の特異的拮抗物質である methyllycotonine の同時投与は IGF-1 mRNA の発現を完全にブロックした。ニコチンによるエストロゲン α 受容体 mRNA 発現の阻止メカニズムについて、ニコチン受容体各種 subunit との関係性を明らかにする目的で実験を行った。以上の in vivo の実験結果を細胞内情報伝達の立場からより詳細に明らかにするために、ラット胎仔海馬神経細胞を不死化させた細胞系 H19-7 細胞を用いてさらに実験を行った。H19-7 細胞はシカゴ大学の Dr. Eves から供与されたものである。本研究は喫煙科学研究財団研究助成金による補助を受けた。

1P-12

マウス脳における [3H] スペルミジンの細胞
核内輸送

°荒町 勝英¹, 倉本 展行², 中村 洋一¹, 米田 幸雄¹
¹金沢大・薬・薬物, ²金沢大・薬・微生物

ポリアミンは、細胞核内で核酸の安定化や構造変化などを起こすだけでなく、細胞膜の NMDA レセプターに対するアゴニスト活性を有する。その活性化は、細胞核内の転写制御因子である AP1 の DNA 結合能を選択的に増強するが、この AP1 結合能に対して特定のポリアミン類は増強効果を発揮する。これらの事を考えると、細胞質で生合成されたポリアミンが、細胞外へ遊離されるだけでなく、細胞核内へも輸送される必然性がある。よって本研究ではこのポリアミンの細胞核内輸送メカニズム解明を中心に、標的蛋白質の生合成制御機構に対するポリアミンの効果を考察することとした。

マウス全脳から調製した細胞核抽出液に、ポリアミン類を種々濃度添加して、ゲルシフトアッセイにより、転写制御因子の DNA 結合能に対する影響を調べた。また、全脳細胞核標品を [3H] スペルミジン (SPD) と反応させたのち、GF/C ガラスフィルター上での吸引濾過により反応を停止した。フィルター上の放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定することにより SPD の輸送活性を解析した。

マウス全脳の細胞核抽出液に、50-500 μ M の SPD やスペルミンを添加すると、濃度依存的に AP1 DNA 結合能に対する著明な増強効果が認められたが、ブトレッシン、カダベリンあるいはアグマチンにはこのような増強作用はみられなかった。[3H]SPD を細胞核標品と反応させると、反応温度 30 度の場合は、反応開始後 30 分までは反応時間とともに、ほぼ直線的に放射活性が取り込まれたが、30 分以降はこの取り込み能はほぼ平衡状態に到達した。反応温度 2 度では、その輸送活性は三分の一以下になった。[3H]SPD 輸送活性は、界面活性剤やホスホリパーゼ類の添加によって顕著に阻害された。上述の各種ポリアミン類を用いた検討から、これらポリアミン類の [3H]SPD 輸送阻害能と、AP1 DNA 結合増強能との間には、正の相関性が存在することが判明した。

以上の結果より、特定ポリアミンが温度依存性とリン脂質感受性を示す輸送担体を介して、細胞核内に輸送されたのち、AP1 DNA 結合能上昇を招来する可能性が示唆される。

1P-13

マウス青斑核における GTP cyclohydrolase I の発現は LPS 投与により増加する

金子 葉子¹, 池本 桂子², 森 啓至¹, 中島 昭¹, 太田 明¹

¹藤田保健衛生大学医学部生理学I, ²藤田保健衛生大学医学部解剖学II

【目的】グラム陰性桿菌の細胞壁から産生されるエンドトキシンであるリポ多糖 (LPS) をマウスの末梢に投与すると、視床下部、脳幹といった部位でカテコールアミンの生合成が変化すると報告されている。それに対して、中枢神経系 (CNS) においてカテコールアミンの生合成に関与している酵素が末梢での LPS 投与によってどのように変化するかについてはほとんど報告されていない。我々は LPS 投与によるカテコールアミンの変化を、生合成に関与している酵素の点から解析することを目的に本研究を行った。tyrosine hydroxylase (TH) は、L-チロシンから L-ドーパへの変換を触媒するカテコールアミン生合成系の律速酵素であり、補酵素としてテトラヒドロbiopterin (BH4) が必須である。GTP cyclohydrolase I (GCH) は、BH4 の生合成の律速酵素である。そこで、ノルエピネフリン神経からなる脳幹内の最大の核である青斑核における TH および GCH の発現量および BH4、ノルエピネフリンの生合成量の変化を解析した。

【方法】1. マウスに 5μg LPS を投与し、脳の切片を抗 GCH 抗体、抗 TH 抗体で染色した。対照群のマウスには、生理食塩水を投与し、同様に処理した。2. マウスに 5μg LPS を投与し、脳の青斑核の部分を出し、その部分に含有されている BH4 およびノルエピネフリンとその代謝産物の量を測定した。

【結果】1. LPS 投与 6 時間後には、GCH のタンパク質の発現量が、著明に上昇した。それに対して、TH のタンパク質量はほとんど変化しなかった。2. 青斑核における BH4 含有量は、LPS 投与後 4 時間まで上昇した。同部位におけるノルエピネフリンおよびその代謝産物の含有量も同様に投与後 4 時間まで高値を示した。

【考察および結論】末梢での LPS 投与により、青斑核におけるノルエピネフリンの生合成量が増加するのは、GCH によって生合成される BH4 の生成量が増加し、結果として BH4 を補酵素とする TH の活性が上昇したためであると考えた。

1P-14

エストロゲン受容体刺激はキノリン酸によるラット海馬神経細胞死を抑制する

黒木 康富, 諫田 泰成, 水野 勝重, 西尾 昌洋, 渡辺 康裕

防衛医大・薬理

【目的】エストロゲンは、神経細胞の生存あるいは細胞死などに関与すると考えられている。我々は、ラットの海馬において、キノリン酸 (QA) による神経細胞障害に対してエストロゲンが保護作用を有するのかどうか、また、神経保護作用を示すならば、どのような機構によって、その作用を示すのかについて検討を行った。

【方法】8～9 週齢の雄性 SD ラットを用いた。(1) 左側脳室前角に、17β-estradiol (E₂) を注入し、10 分後に、QA を海馬へ注入した。24 時間後に脳を摘出、切片作成後、ニッスル染色を行った。(2) 左側脳室前角に、E₂ を注入し、5、10、15 分後の海馬サンプルを調製して、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 活性を測定した。(3) エストロゲン受容体拮抗薬のタモキシフェンまたは ICI 182780 は E₂ と同時に、脳室内へ投与した。(4) ERK kinase 阻害薬の U0126 は E₂ 注入の 30 分前に、脳室内へ投与した。

【結果】(1) 50 nmol QA の海馬注入により、背側海馬の CA1 部の錐体細胞が部分的に脱落を来したが、この神経細胞障害は、50 pmol E₂ の脳室内投与により消失した。(2) ラット海馬において、50 pmol E₂ の脳室内投与により ERK は、投与 5 分後で約 3 倍にまで活性上昇を示し、15 分後には低下した。(3) 5 nmol のタモキシフェンまたは ICI 182780 によって、E₂ による ERK の活性化は阻害を受けなかったが、E₂ の保護作用は消失した。(4) 0.5 nmol U0126 によって、E₂ による ERK の活性化は阻害され、E₂ の保護作用は消失した。

【考察】ラット海馬において、エストロゲンは、QA による神経細胞障害に対して保護作用を示した。このエストロゲンの保護作用の機構には、従来の核内エストロゲン受容体を介した経路と、ERK を介したもう一つの経路が存在する事を示唆している。

1P-15

グループ I 型メタボトロピックグルタミン酸受容体の局在

○檜井 栄一, 中村 洋一, 米田 幸雄
金沢大学薬学部薬物学研究室

メタボトロピック型グルタミン酸受容体 (mGluR) は、アゴニストに対する感受性や細胞内セカンドメッセンジャーの相違などにより、Group I から Group III までの 3 種類のサブタイプに分類される。しかしながら、今までのところ放射性リガンドを用いた mGluR の標識は行われていない。したがって、今回 [^3H] キスカル酸 (QA) を用いて、mGluR の標識に着手した。

ラットの全脳および末梢組織から調製した膜標品を用いて、[^3H]QA をリガンドとするレセプターバインディングアッセイを行ったところ、NMDA, AMPA および KA をそれぞれのレセプター結合をほぼ完全に阻害する濃度添加した条件下では、Group I 型アゴニストである (S)-3,5-DHPG および trans-ACPD は、[^3H]QA 結合を濃度依存的に阻害することが判明した。しかしながら、Group II および Group III アゴニストの [^3H]QA 結合阻害作用は比較的軽度であった。GTP- γ -S、Gpp(NH)p および GTP は強い結合阻害作用を示したが、GDP の阻害効果は軽度であった。GMP や ATP はこの条件下の [^3H]QA 結合に対して全く影響を与えなかった。また、[^3H]QA 結合の脳内および末梢組織内分布を検索したところ、脳内では全部位に不均一な分布が見られたのに対して、末梢組織である下垂体、副腎および脾臓のいずれの組織においても結合は検出されなかった。抗 mGluR1 抗体および抗 mGluR5 抗体を用いたイムノプロット法や、さらに両サブユニットを特異的に認識するプライマーを用いた RT-PCR 法を用いても、上記末梢組織に Group I 型メタボトロピックレセプターは検出出来なかった。

以上の結果より、[^3H]QA は GTP 結合タンパク質と機能的に共役する Group I 型の mGluR を標識する可能性が示唆される。また、Group I 型 mGluR は中枢神経系に局在性が高いものと推察される。

1P-16

海馬由来神経刺激ペプチド (HCNP) 受容体の同定とその性質 - 第 2 報

○森下 学, 大塚 康史, 松川 則之, 上田 龍三, 小鹿 幸生
名古屋市立大学医学部第二内科

HCNP は海馬組織に豊富に存在し、培養中隔核のコリン作動性神経の分化を促進する我々は第 41 回の本学会で HCNP の結合受容体の性質を明らかにする目的で Radiolabelled receptor assay (RRA) 法を確立し、特異的結合は P2 画分に存在することを報告した。今回この RRA 法を改変してより特異性を高め、HCNP 受容体の性質について検討したので報告する。方法: RRA に用いた緩衝液や測定系のスケール、反応温度や時間は前回と同じであるが、以下の点で改変し、実施した。Bolton-Hunter 法によるヨード化率を高めた 125I-HCNP を標識リガンドとし、0.32M ショ糖溶液中で各組織をホモジナイズ後遠沈法で得た P2 画分 (ミトコンドリア・シナプトソーム画分) は凍結・融解後、十分洗浄し内因性リガンドを除去し標本として使用した。非結合リガンドを除去する Whatman GF/F フィルターは 0.3 % のヒト免疫グロブリンを塗布し非特異結合を最小限にした。また各種ペプチドは固相法により合成した。結果及び考察: 今回実施した測定法ではより高感度に安定した結果が得られ、全脳を用いた実験から 125I-HCNP 結合受容体は、(1) P2 画分に 45% 存在し、(2) その飽和実験のスキッチャー解析から単一成分からなり K_d は 35.4 nM, B_{max} は 84.5 nM/mg protein で (3) 海馬組織に最も多く存在し、次いで前頭葉、後頭葉、視床-線条体、中脳、小脳の順であった。また (4) その海馬組織における加齢変化は明らかではなく、生後 1, 2, 4, 8 週でもほぼ同程度の結合部位が存在した。さらに (5) HCNP の断片ペプチドを非標識リガンドとして 125I-HCNP との競合実験をすると、125I-HCNP の結合は C 末端側の配列を有するペプチドで阻害されたが、N 末端側や中間部の配列を有するペプチドでは阻害されなかった。以上から HCNP は高親和性の単一受容体に結合し、その C 末端近傍が結合部位である。本受容体が成熟動物にも存在することから、HCNP は神経活動にも重要な役割を持っていると思われる。

1P-17

ノシセプチン受容体と Gi2 α サブユニットの融合タンパク質をモデルとしたリガンドスクリーニング系の開発

°武田 茂樹¹, 岡田 知明², 岡村 理子¹, 芳賀 達也^{1,2}, 南野 直人³

¹東大・医・神経生化学, ²CREST, ³国立循環器病センター

G タンパク質共役受容体は多様な細胞間情報伝達物質をリガンドとしており新規薬物の主要なターゲットである。新規リガンド検索のために多くの high-throughput screening systems が開発されている。我々は新しいリガンド検索系の候補としてノシセプチン受容体と Gi2 α サブユニットの融合タンパク質を作製し、各種リガンドの効果と脳抽出物中の内在性ノシセプチンの検出への応用を検討した。

融合タンパク質を Sf9 細胞に発現させ、その細胞膜画分に各種リガンドを添加した際に生じる [³⁵S]-GTP γ S の結合活性を解析した。その結果、ノシセプチン添加により [³⁵S]-GTP γ S 結合活性は上昇し、その変化から得られる EC₅₀ 値は [³H]-ノシセプチンの解離定数 (K_d = 2 nM) とほぼ一致した。アゴニストの結合により GDP に対する親和性が低下するのでリガンド添加の効果は GDP 存在下で顕著であった。 [³⁵S]-GTP γ S の結合を GDP で阻害する実験から GDP に対する親和性を算出すると、フルアゴニスト添加時に最も低く (IC₅₀ = 1 μ M)、パーシャルアゴニスト添加 (0.4 μ M)、アンタゴニスト添加 (0.05 μ M) の順に増加した。このことから、融合タンパク質を利用すれば [³⁵S]-GTP γ S 結合活性を指標にフルアゴニストとパーシャルアゴニストを区別したりリガンドの解析が可能である。

同様な実験からブタ脳抽出物にも内在性ノシセプチン活性を検出する事ができ、活性の検出には約 1 g 湿組織相当の抽出物で十分であることがわかった。さらにこの活性はゲルろ過および逆相系 HPLC を用いた分析において、合成ノシセプチンと全く同様の挙動を示すことが確認できたので、この融合タンパク質の [³⁵S]-GTP γ S 結合活性だけを指標にしてノシセプチンの精製が可能であることが示された。これらのことから我々は、融合タンパク質を利用した活性測定が orphan 受容体の内在性リガンドの同定に応用できると考えている。

1P-18

ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2, M4 サブタイプの細胞内移行

°吉田 典弘, 岩田 健, 芳賀 達也

東京大学大学院医学系研究科神経生化学

ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内移行は、サブタイプや発現している細胞の種類によって、複数の異なる経路を取ることが示唆されている (Tsuga et al., J. Pharm. Exp. Ther. 284, 1218-1226 (1998))。HEK293-tsA201 細胞に発現させたムスカリン受容体では、M2 サブタイプ (M2 受容体) だけが dynamin 非依存性経路を取ることが Hoesly と Koppen グループによって報告された。我々は、Gi/Go に共役する M2 受容体と M4 受容体を選び、その細胞内移行の違いを明らかにする事を試みた。

M2, M4, M2-M4 キメラ受容体を HEK293-tsA201 細胞に発現させ、細胞表面からの [³H]N-methylscopolamine 結合部位の消失によって細胞内移行を測定した。M2, M4 受容体共にアゴニスト依存的に細胞内に移行した。M4 受容体の細胞内移行は dominant-negative mutant of dynamin (DN-dynamin) (GTPase 活性を欠損させた変異種) の共発現で抑制されたが、M2 受容体の細胞内移行は影響を受けなかった。M2 受容体の細胞内第 3 ループを M4 受容体のものに置き換えたキメラでは、DN-dynamin の影響を受けたが、M4 受容体の細胞内第 3 ループを M2 受容体のものに置き換えたものは影響を受けなかった。この結果は、ムスカリン受容体の細胞内移行が dynamin 依存性経路を取るか非依存性経路を取るかは、受容体の細胞内第 3 ループによって決定されることを示唆する。

我々は、COS 細胞に発現させたドーパミン D2 受容体が dynamin 依存性に細胞内移行し、それが低分子量 G 蛋白質 rab5A で促進されることを見いだした (Iwata et al. Eur. J. Biochem., 263, 596-602 (1999))。そこで rab5A を HEK293-tsA201 細胞に共発現させ M2, M4 受容体の細胞内移行への効果を検討した。M2 受容体の細胞内移行は rab5A の共発現によって促進されたが、M4 受容体の細胞内移行は rab5A, DN-rab5A によって影響されなかった。この結果は、M2 と M4 受容体の細胞内移行が rab5A の効果に関しても異なることを示している。dynamin 依存性経路を取ることと rab5A によって影響されることは連携しておらず、独立な効果であることを示唆している。

1P-19

絶食および甲状腺ホルモンによる中枢 NPY 受容体サブクラス遺伝子発現への影響

°山口 剛, 貝津 雅稔, 長谷川 歩未, 樋口 宗史
新潟大学医学部薬理学教室

Neuropeptide Y (NPY) の遺伝子発現の変化、NPY 受容体の感受性の変化が摂食行動の調節に主要な役割を果たすことが明かにされつつある。日周リズムや絶食時には NPY 遺伝子発現の変化を伴うことから NPY 遺伝子発現調節が摂食調節の主体ではないかという報告があるが、シナプス後膜での NPY 受容体の感受性や分布の変化、量的変動も摂食調節に重要と考えられる。そこで我々は摂食調節における NPY 受容体の脳内分布・遺伝子発現変化を *in situ* hybridization (ISH) によって調べた。NPY 受容体には 5 つサブクラス (Y1-Y5) が存在し、発現部位の違いやサブクラスの組み合わせによって多彩な NPY の作用が発現している。この内、摂食行動に関わっているのは特異的アンタゴニストによる研究から Y1、Y5 ではないかと考えられている。Y2 は神経伝達物質放出の抑制に働いていると考えられ、直接的には特異的アゴニストによって摂食行動は誘発されない。ISH のデータでは Y1、Y5 とともに海馬での強い発現が認められた。さらに、摂食中枢と考えられている視床下部において、これらサブクラスの mRNA は弓状核・傍室核に発現していた。すでに Y1 receptor のプロモーター解析の結果では、転写調節因子の違いによって 5' noncoding region の異なる Y1 receptor mRNA が合成され組織特異的な発現をしている可能性が報告されている。このことは Y1 レセプターを含む NPY 受容体各サブクラスの遺伝子発現調節が組織特異的な転写調節因子によって各々制御を受けている可能性を示唆している。本研究により絶食・甲状腺ホルモンによる摂食行動の変化と NPY 受容体サブクラス遺伝子発現調節との密接な関連が明らかになると考えられる。

1P-20

シグマ-1 受容体リガンドの神経細胞への取り込みには複数の経路が存在する。

°山本 秀子¹, 山本 敏文^{1,2}, 鷲 直樹¹, 高橋 真司³, 堀込 和利³, 唐沢 淳一³, 奥山 茂⁴, 額田 敏秀⁵, 曾良 一郎¹

¹ (財) 東京都精神研・精神薬理, ²横浜市大院・総合理学, ³三井製薬, ⁴大正製薬, ⁵ (財) 東京都精神研・神経学

数多くの抗精神病薬がシグマ-1 (σ_1) 受容体に親和性を有し、 σ_1 受容体リガンドが細胞内に取り込まれる可能性が示唆されているが、その経路に関する詳しい報告は無い。我々は初代培養神経系を用いて同位体標識 σ_1 リガンドの取り込みについて検討をおこなった。選択的 σ_1 受容体リガンドである [^3H](+)Pentazocine 及び [^3H]MS-377 はラット大脳由来神経細胞に時間、エネルギー、温度依存性に取り込まれ、能動的輸送機構が存在することを示唆した。これらの取り込みは ouabain で抑制されず、大部分は Na イオンに依存しなかった。これら σ_1 リガンド取り込みの薬理学的性質を調べた結果、37℃では [^3H](+)Pentazocine の取り込みは σ_1 受容体の結合親和性の強さの順に阻害されたが、[^3H]MS-377 の取り込みは σ_1 受容体の親和性の強さとは相関しなかった。[^3H]MS-377 の取り込みはハロペリドールにより極めて強い結合阻害能が認められた (IC_{50} , 約 2 nM) が、NE-100 による置換では極めて低い阻害能を示した (IC_{50} , 約 4.5 μM)。この NE-100 による [^3H]MS-377 の取り込み阻害は速度論的解析より non-competitive であり、NE-100 は MS-377 の取り込み部位には直接作用していないことが明らかとなった。他にも、これら 2 種の σ_1 リガンドの神経細胞への取り込みには明確な差異が認められた。以上の結果は σ_1 リガンドの細胞内取り込みには複数の経路が存在しており (i.e. sigma-1 selective pathway and haloperidol-sensitive pathway)、取り込まれた MS-377 の大部分は NE-100 及び (+)Pentazocine が細胞内貯蔵 (結合) されるところとは異なる細胞内コンパートメントに誘導される可能性が示唆された。

σ_1 受容体を介する細胞内情報伝達経路の詳細は明らかでないことから、 σ_1 リガンドの神経細胞内の貯蔵・結合のメカニズムを明らかにすることが必要とされる。我々は σ_1 リガンドが複数の経路を経て取り込まれる可能性を示唆したが、更に σ_1 リガンドの薬理作用が取り込み経路により異なるかどうか (例えば神経終末、細胞体)、複数の細胞内の標的蛋白の存在等の可能性についての検討が必要と考えている。

1P-21

神経細胞の Na ポンプアイソフォームの活性制御における細胞外 K^+ と細胞内 Na^+ の関与

井上 順雄, 曾我 智子, 加藤 尚彦
横浜市大・医・生化学

神経細胞の Na ポンプアイソフォームのイオン輸送活性の制御機構を解析した。ラット大脳の初代培養神経細胞には、 $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 (神経細胞型) Na ポンプと、 $\alpha 1$ 型 (普遍型) Na ポンプが存在する。両者の存在量の比とイオン輸送活性の比を比較すると、無処理、無刺激の条件下 (basal な状態) では、 $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 Na ポンプのイオン輸送効率は $\alpha 1$ 型 Na ポンプより低かった。このイオン輸送効率の相違は、イオン輸送活性の細胞外 K^+ 濃度依存性を解析した結果から、 $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 Na ポンプの活性だけが生理的濃度の細胞外 K^+ で阻害されているためであることが明らかになった。すなわち、 $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 Na ポンプの K^+ に対する親和性は $\alpha 1$ 型 Na ポンプより高く、その活性は 0.5 mM 付近で最大値になるが、1 mM 以上の K^+ では阻害された。一方、 $\alpha 1$ 型 Na ポンプは K^+ によって阻害されなかった。これに対して、グルタミン酸刺激後の細胞では、 K^+ による $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 Na ポンプの活性の阻害はほとんど消失し、イオン輸送効率も $\alpha 1$ 型 Na ポンプとほぼ同等になった。さらに、活性の最大値も上昇し、全体のイオン輸送活性も増加した。このグルタミン酸刺激と同様の活性制御が、細胞を CaM キナーゼ II の阻害薬である KN-93 で処理し、ナトリウムイオノフォアである monensin で刺激することにより再現された。すなわち、KN-93 処理で K^+ による $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 Na ポンプの阻害が消失し、monensin 刺激で活性の最大値も上昇した。以上の結果から、basal な状態では CaM キナーゼ II が関与する機構で $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 Na ポンプ活性が細胞外 K^+ により阻害される可能性が示された。また、グルタミン酸刺激により、第一は、細胞外 K^+ による活性の阻害が解除され、第二は、細胞内 Na^+ 濃度が上昇し活性の最大値が上昇するという二つの機構により、 $\alpha 2$ 型/ $\alpha 3$ 型 Na ポンプの活性が顕著に上昇すると推定された。これは、神経細胞の Na ポンプ活性が、細胞外 K^+ と細胞内 Na^+ の両者により巧妙に制御されていることを意味する。

1P-22

血液脳関門における Aquaporin-4 の発現とウシ Aquaporin-4 cDNA のクローニング

祖父江 和哉¹, 山本 直樹², 米田 和広², 藤田 義人¹, 稲垣 雅昭¹, 津田 喬子¹, 三浦 裕², 浅井 清文², 勝屋 弘忠¹, 加藤 泰治²

¹名古屋市立大学医学部麻酔・蘇生学, ²名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門

水チャンネルである aquaporin (AQP) は、哺乳類において 10 種類のアイソフォームが確認されている。その中でも AQP-4 は脳において高発現しており、また他のアイソフォームとは異なり水銀非感受性である。さらに、血液脳関門 (BBB) を形成する毛細血管の周囲を覆うアストロサイト足突起に多く分布している。そこで、我々は BBB における水の調節機構を解明したいと考えた。まず始めに *in vitro* BBB モデルではウシ脳毛細血管内皮細胞がよく使用されることから、未だ明らかにされていなかったウシ AQP-4 cDNA のクローニングを試みた。また、以前より議論がなされてきた alternative splicing により形成される 2 種類のアイソフォームについて、2 種類で一致するメチオニンより上流の遺伝子発現機構の解明を genomic DNA を用いて試みた。次に、BBB と AQP-4 との関連を検討するため、BBB の本体である脳毛細血管内皮細胞における AQP-4 の発現を調査した。

その結果、ウシ脳 cDNA library より全長約 5.5 kb の AQP-4 cDNA を得た。予想されるアミノ酸配列は、human、rat、mouse AQP-4 に対して、それぞれ 96.6% 94.7% 93.2% の相同性を示した。また、我々が得たウシ AQP-4 cDNA においても 2 種類のアイソフォームを認め、genomic DNA に対して PCR を行ったところ、exon1 より 2kb 上流に exonX、3kb 上流に exonO を確認した。

また、ウシ脳毛細血管内皮細胞において AQP-4 mRNA の発現を認め、これまで報告されているアストロサイトでの AQP-4 mRNA の発現を考慮すると、AQP-4 がこれらの細胞によって構成される BBB における水の調節に関与している可能性が示唆された。

アストロサイトにおける Aquaporin-4 発現調節機構

°山本 直樹¹, 米田 和広¹, 祖父江 和哉², 藤田 義人², 稲垣 雅昭², 三浦 裕¹, 浅井 清文¹, 加藤 泰治¹

¹名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門,

²名古屋市立大学医学部麻酔・蘇生学

アクアポリン4 (AQP4) は水銀非感受性水チャネルであり、中枢神経系において豊富に存在し、特にアストロサイトと上皮細胞に高発現している。その機能は、脳における細胞内外の水の恒常性維持に関わっていると推測されている。しかし、中枢における発現誘導のメカニズムについてほとんど知られていない。そこで我々は、P19, mouse embryonal carcinoma cell の神経系細胞への分化誘導に伴う AQP4 の発現変化と、glioma cell (C6) の細胞周期による発現変化を検討した。なお、mRNA の検出は reverse transcription-PCR (RT-PCR) で行い、タンパク質の発現は western blotting により検討した。

まず、P19 をレチノイン酸で分化誘導したところ、アストロサイトのマーカーである GFAP の発現増加にやや遅れて、AQP4 mRNA ならびに蛋白質が誘導された。また、一般的な培養条件下、アストロサイトでは、AQP4 mRNA は高発現していたが、C6 では検出されなかった。しかし、C6 に CDK inhibitor である p21 cDNA を含むプラスミドを導入し、p21 を一過性に発現させ、細胞周期を G0/G1 期で停止させることによって、AQP4 の発現は誘導された。

これらの結果から、アストロサイトへの分化に伴い、AQP4 の発現が増加する傾向にあることが示唆されたが、アストロサイトの分化過程において、AQP4 がどのような機能を果たすかは今後の検討を要する。また、外傷や脳腫瘍に起因する脳損傷、脳浮腫における AQP4 の果たす役割は十分わかっていない。細胞周期による AQP4 の発現の変化が今回の実験により示唆されたが、このことと脳損傷、修復過程における脳浮腫との関与は興味深いと思われた。

サンドイッチ型酵素免疫測定法を用いた AMPA 型グルタミン酸受容体複合体形成機構の解析

°茨木 京子, 那波 宏之

新潟大学脳研究所分子神経生物学

AMPA 型グルタミン酸受容体チャネルは、速い神経伝達、シナプス可塑性過程において、重要な役割を果たしている。この AMPA 型グルタミン酸受容体チャネルは、GluR1-R4 のサブユニットから成る 4 量体であると示唆されている。しかしながら、細胞のどこで、どのように受容体複合体形成が制御されるかについてはまだ明らかにされていない。本研究では、各サブユニットに対する特異的抗体で受容体複合体を測定しうるサンドイッチ型酵素免疫測定法を確立し、これらの疑問点の解明を試みた。最初に興奮性神経活動が、AMPA 型グルタミン酸受容体の複合体形成に関わっているかを検討するために、ピクロトキシンによりけいれんを誘導した生後 15 日令ラット海馬における受容体複合体形成度を測定した。AMPA 受容体複合体の測定にはサンドイッチ型酵素免疫測定法を用い、抗 GluR2/3-C 末抗体を 1 次抗体、ピオチン化抗 GluR1-N 末抗体を 2 次抗体とした。未処理海馬、ピクロトキシンによってけいれん誘導した 5 分、30 分後の海馬を 2 % Triton-X 100, 0.1 % SDS で可溶化し、遠心後の上清を測定対象とした。免疫活性を測定したところ、けいれん 30 分後の海馬において、確かな AMPA 受容体複合体の上昇がみられた。この現象は、興奮性神経活動により、AMPA 受容体複合体量が増加したことを示唆している。そこで次に、興奮性神経活動による AMPA 受容体増加の基本機構の一つとして酸化還元制御の関与を検討した。酸化剤、還元剤、チオール試薬を海馬スライス、カルチャー、粗膜分画に反応させ、AMPA 受容体複合体形成に対する効果を測定した。海馬スライスにおいて酸化剤により AMPA 受容体複合体形成が上昇したが、カルチャーや粗膜分画においては変化が見られなかった。よって酸化剤による複合体形成増加は AMPA 受容体サブユニットに対する直接の修飾ではなく、PDZ 蛋白などの蛋白の結合によって受容体複合体形成が促進されている可能性が考えられるが、現在検討中である。

1P-25

高親和性コリントランスポーター遺伝子のプロモーター解析

岡村 理子, 奥田 隆志, 芳賀 達也
東京大学大学院医学系研究科神経生化学

アセチルコリンは主要な神経伝達物質の一つである。コリン作動性神経細胞に特異的に発現するタンパク質のうち、アセチルコリン合成を行うコリンアセチルトランスフェラーゼ、小胞内にアセチルコリンを取り込む小胞アセチルコリントランスポーターがすでにクローニングされている。最近、我々の研究室で、3番目のマーカーである細胞外からのコリンの取り込みを担う高親和性コリントランスポーターを線虫、ラット、ヒトにおいて同定した。

今回、この細胞特異的発現を示す高親和性コリントランスポーターの転写調節機構を明らかにするため、ヒトコリントランスポーター遺伝子の構造解析、さらにプロモーター解析を行った。はじめに、ヒトの脊髄RNAを材料として5'-RACE、オリゴキャッピング法を行い、転写開始点を決定した。転写開始点領域周辺は、GCに富んでおり、TATA-boxもみられた。また、5'非翻訳領域の異なるmRNAが存在することを見いだした。得られたcDNAとヒトゲノムプロジェクトで示された配列を比較したところ、これらはalternative splicingによって生じたものであることがわかった。次に、プロモーター解析を行うために、翻訳開始点の5'側をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポータープラスミドを構築し、コリン作動性神経細胞株、非神経細胞株に導入した。その結果、5'上流約2.9 kbで細胞非特異的なルシフェラーゼ活性が観察された。プロモーター活性があるこの領域は、転写開始点より5'側上流約1.2 kbを含み、Sp-1、CREB、NF- κ Bなどの転写因子の結合部位を含んでいた。これらが転写調節に関与している可能性が考えられる。現在、細胞特異的な制御を示すシスエレメントの同定を行うための解析を進めている。

1P-26

Cloning of a novel brain-specific cDNA homologous to mitochondria tricarboxylate carrier

Shin-ichi MIYAKE^{1,5}, Michio TAMATANI^{1,5},
Noriaki MITSUDA^{1,5}, Manabu TANIGUCHI^{1,5},
Osamu HORI², Yoshikuni KAWAI³, Emiko SENBA³,
Kohji SATO⁴, Masaya TOHYAMA^{1,5}

¹Department of Anatomy and Neuroscience, Osaka University Medical School, ²Department of Neuroanatomy Kanazawa University Medical School, ³Department of Anatomy Wakayama Medical College, ⁴Department of Anatomy Hamamatsu Medical college, ⁵CREST Japan Science and Technology

The tricarboxylate carrier belongs to a family of transport proteins found in the inner mitochondrial membranes. We isolated a novel cDNA, designated as MTA, 34% homologous to that of mitochondrial tricarboxylate carrier protein from a rat brain cDNA library. The protein sequence of MTA has a length of 338 amino acids and hydrophobicity analysis predicted that MTA contains five membrane-spanning regions. Northern blot analysis revealed that the presence of a single transcript is observed in the brain, but none in the heart, lung, liver, kidney, spleen, and testis. Similarly, western blot analysis detected a single band exclusively in the brain. Immunohistochemical study showed that the MTA protein was expressed in accessory nucleus, hypoglossal nucleus, the dorsal motor nucleus of the vagus nerve, and most prominently in Bergmann glial cells. Furthermore, immunoelectron microscopy localized the MTA protein in the mitochondrial membranes in Bergmann glial cells. The function of the MTA protein was investigated.

1P-27

ラット脳における Xenobiotic responsive elements への結合蛋白質の検出

馬場 勝弘, 中村 洋一, 米田 幸雄
金沢大・薬・薬物

ダイオキシン類は、催奇形性、発癌促進、免疫抑制などの毒性を示す一方、CYP 1A1 などの薬物代謝酵素を誘導することが知られている。これらの多くは核内受容体 aryl hydrocarbon receptor (AhR) により仲介されるが、肝臓などの末梢組織に比べて、中枢系での機能はあまり研究されていないのが現状である。演者らは、脳内での AhR の検出および機能を追及する目的で、AhR が特異的に結合する xenobiotic responsive elements (XRE) について、XRE への結合能を持つ脳内蛋白質を検索した。ラット全脳から核抽出画分を調製し、XRE のコア配列 (CACGCAA) を含む放射性 2 本鎖オリゴヌクレオチドからなるプローブと、10 mM Mg^{2+} 存在下、非存在下で 30 分間反応させた。次いで、ゲル移動度シフト法により XRE 結合能を持つ蛋白質を検出した。XRE への認識特異性について、非放射性の XRE のほか、コア配列の 1 塩基対を変異 (CACACAA) した mutation XRE (mXRE) および AP1, CREB の 2 本鎖プローブを用いて、それぞれ 200 倍までの濃度範囲で競合実験を行った。 Mg^{2+} 存在下において、移動度の異なる 2 種類の XRE 結合能をもつバンドが検出された。移動度の遅いバンドは Mg^{2+} 非存在下で増加したのに対し、速いバンドは減少した。また、非放射性の 2 本鎖 XRE の添加により、両バンドは濃度依存的に減少し、 Mg^{2+} 存在時、100 倍量の添加によりほとんど検出されなくなったが、非存在下における移動度の遅いバンドは 200 倍量の添加においてもわずかに検出された。mXRE 添加による阻害は弱く、200 倍量の添加でも、2~4 割の阻害が見られたに過ぎなかった。一方、AP1, CREB は、200 倍までの濃度範囲では Mg^{2+} の有無に関わらず、両バンドに明確な阻害を与えなかった。以上の結果より、ラット脳内に、XRE と特異的に結合する Mg^{2+} に感受性の異なる 2 種類の蛋白質が存在し、これらの蛋白質の一方、もしくは両方が AhR に由来する可能性が示唆される。

1P-28

発達期ラット脳由来の syntaxin 1A 結合蛋白質

五十嵐 道弘^{1,3}, 大山 晃弘^{1,2}, 小宮 義章¹

¹群馬大学医学部分子病態学, ²群馬大学医学部麻酔・蘇生学, ³新潟大学医学部生化学第二

Syntaxin 1A はシナプス伝達時の開口放出の分子機構において最も重要な蛋白質の一つであり、小胞輸送や軸索成長などの過程においても役割を果たしている。この分子の成長円錐における役割を明らかにしたわれわれは、次にその調節機構を明らかにすべく、発達期の脳より syntaxin 1A 結合蛋白質を精製して、その結合の性状を明らかにしたので報告する。(方法) 大腸菌によって産生された種々の syntaxin 1A 由来の GST 融合蛋白質を不動化して、発達期及び成熟期のラット脳より調製した S2 画分を結合させ、GST と syntaxin 1A のヒンジ部分をプロテアーゼで分解した。遠心後、上清に回収された画分を SDS-PAGE によって解析して、構造を決定した。(結果) 2 種類の蛋白質がこの方法で syntaxin 1A に結合することがわかった。部分構造を決定すると、前者は蛋白キナーゼ、後者は細胞骨格関連蛋白であった。これらの syntaxin 1A への結合はこれまで報告が無く、結合の性質を詳細に解析した。両者共に、 Ca^{2+} , ATP 依存性の結合であり、結合には $10^{-6}M$ 以上の Ca^{2+} 濃度を必要とした。また両者は syntaxin 1A の別のドメインに結合することが分かった。前者の蛋白キナーゼは、シナプス形成時に著明に発現量が増大したが、後者の細胞骨格関連蛋白は成長円錐にも相当量存在した。これらの蛋白と syntaxin 1A の複合体はシナプトソームからの免疫沈降によって検出された。(結論・考察) これらの蛋白質と syntaxin 1A の結合は Ca^{2+} , ATP 依存性であることからユニークであり、in vivo でも複合体形成が生じていると考えられる。現在、この複合体形成の生理的意義を検討中である。

1P-29

シンタキシン N 末領域の機能の解析：制御開口放出の抑制とシナプトタグミン結合におけるシンタキシン 1A (HPC-1) とシンタキシン 2 の比較

°藤野 一郎, 赤川 公朗
杏林大・医・二生理

シンタキシン 1A (HPC-1) とシンタキシン 2 は主として形質膜に局在し、いずれも t-SNARE として小胞の形質膜付加過程及び開口放出を制御するものと考えられている。しかし PC12 に過剰発現すると、シンタキシン 1A は large dense core vesicle (LDCV) からの制御開口放出を抑制するのに対し、シンタキシン 2 は抑制しないという違いがある。そこでこの違いに関係する領域を特定する目的で、両者のキメラ蛋白の開口放出抑制作用を比較検討した。その結果、シンタキシン 1A の N 末をシンタキシン 2 の N 末で置換したキメラ蛋白では、LDCV からの開口放出を抑制しないことを見いだした。一方このキメラ蛋白は COS 細胞の構成性開口放出はシンタキシン 1A と同様に抑制した。そこで置換した N 末端 29 アミノ酸残基中に、制御開口放出で特異的に作用する領域がある可能性が示唆された。制御開口放出では、低親和性のカルシウムセンサーであるシナプトタグミン 1 とシンタキシン 1A の相互作用が重要な役割を果たすものと考えられている。そこで GST 融合シンタキシンを用いてラット脳シナプトソームに含まれるシナプトタグミン 1 との相互作用について検討した。その結果、シナプトタグミン 1 は高濃度のカルシウム存在下で、濃度依存的にシンタキシン 1A に結合したのに対し、シンタキシン 2 とはそれより低濃度側でも相互作用した。一方キメラ蛋白に対しては、シナプトタグミン 1 は高カルシウム濃度側ではシンタキシン 1A に対するのと同様の濃度依存性で結合したが、低カルシウム濃度側ではシンタキシン 1A の場合よりも結合量が増加しており、シンタキシン 2 の場合に近いカルシウム濃度依存性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、シンタキシンの N 末領域は PC12 での非興奮時のカルシウム濃度におけるシナプトタグミン 1 との相互作用に関与し、それが N 末を修飾されたシンタキシン 1A が過剰発現下で制御開口放出を抑制しないことと何らかの関係がある可能性が考えられた。

1P-30

神経伝達物質放出における PI 3- キナーゼの役割

°板倉 誠¹, 大西 浩史¹, 網野 真也², 関口 真理子¹,
山森 早織¹, 片岡 正和¹, 高橋 正身¹
¹三菱化学生命研, ²東大院・総合文化

イノシトールリン脂質は、さまざまな情報伝達系においてセカンドメッセンジャーとして働いている。神経伝達物質の放出においても PI(4,5)P₂ を産生する PIP 5-キナーゼがプライミングステップに関わっていると考えられている。今回我々は、神経伝達物質放出への PI 3-キナーゼの関与について検討を行った。PC12 細胞を NGF やインスリン様成長因子 (IGF-1) で 10 分間前処理すると、脱分極あるいはイオノマイシン刺激によって誘発されるドーパミン放出が顕著に促進された。これらの促進作用は、PI 3-キナーゼの阻害剤である wortmannin, LY294002 で抑制された。さらに NGF や IGF-1 処理によって、PI 3-キナーゼの下流にあるプロテインキナーゼ B(PKB) のリン酸化が引き起こされた。これらのことから NGF や IGF-1 による神経伝達物質放出促進には PI 3-キナーゼが関与していると考えられた。興味深いことに NGF によるドーパミン放出の促進は MAP キナーゼの活性化も必要であるのに対し、IGF-1 の場合は MAP キナーゼ非依存性であった。この違いが活性化される PI 3-キナーゼの局在の差である可能性を調べるため、PI 3-キナーゼが産生する PI(3,4)P₂, PI(3,4,5)P₃ に結合する PKB のイノシトールリン脂質結合ドメイン (PH ドメイン) と GFP の融合タンパク質 (GFP-PKBPH) を PC12 細胞に一過的に発現させ、その局在変化から PIPs が産生される部位を調べた。その結果、NGF 処理では GFP-PKBPH は細胞膜へトランスロケートされるのに対し IGF-1 刺激ではトランスロケートは観察されなかった。以上の結果から PI 3-キナーゼの活性化によって神経伝達物質放出が促進されるが、その促進機構は少なくとも 2 つ存在すると考えられた。すなわち NGF による促進では細胞膜上で PI 3-キナーゼと MAP キナーゼが協同して働くのに対し、IGF-1 による促進では細胞質中、おそらくは分泌小胞膜上で PI 3-キナーゼが働いていると思われる。

1P-31

Ca 結合タンパク質フリクエニンのシナプス伝達への効果

°陳 小良, 東田 陽博, 横山 茂
金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学講座

フリクエニンは EF ハンドモチーフを持つ Ca 結合タンパク質である。ハエにこのタンパク質を大量に発現すると、誘発性の神経伝達物質放出が促進される。また、カエル脊髄神経細胞にフリクエニンタンパク質を打ち込むと、自発および誘発性の伝達物質放出が増えることがわかっている。しかし、フリクエニンが放出機構にどう作用するかわかっていないし、また、フリクエニンが哺乳動物細胞で同じような事をするかについても不明である。そこで今回、ラットフリクエニン cDNA をトランジェントまたはパーマネントに NG108-15 細胞に導入し、アセチルコリンの遊離を観察した。NG108-15 細胞フリクエニンは内在し、細胞表面に限局して存在している。トランスフェクションによりそれが増加した。自然遊離する ACh および活動電位により誘発される ACh の放出が、フリクエニン発現細胞で増加していた。また、発現細胞の神経突起の伸展は増えないどころか少し減少していた。以上の結果は、哺乳動物細胞でもフリクエニンはトランスミッター遊離促進効果があることが証明された。詳細なメカニズムについて、NG108-15 細胞を発現の場として使うことにより解明されることが考えられる。

1P-32

シナプス形質膜に存在する神経特異的エノラーゼ (NSE) の解析

°永沢 秀子¹, 上田 祐司¹, 大藪 友利子¹, 堀 均¹, 大倉 多美子², 阿相 皓晃³, 植村 慶一⁴
¹徳島大・工・生物工, ²慶応大・先端研, ³都老人研・細胞生物, ⁴慶応大・医・生理

既に報告したように、我々は、けいれん関連遺伝子 PTZ-17 の推定タンパク質の C 末ペプチドに対する抗体 Ab17 を生成した。ラット組織の免疫ブロッティング解析において、この抗体によって約 49 kDa (p49) と約 36 kDa (p36) のバンドが染色され、いずれも脳に特異的に発現し、肺、心臓、肝臓、腎臓には認められなかった。p49 はラット脳より調製した細胞質分画に、p36 は膜分画に存在していた。まず p49 の同定のため、細胞質分画の 50 ~ 75% 硫酸アンモニウムを固定化等電点ゲル二次元電気泳動により分離した結果、pI 約 5.2, 48 kDa 付近に 7 個のスポットが Ab17 で染色された。そこで各々のスポットを 2D ゲルより回収して In-gel トリプシン分解を行い、RP-HPLC でペプチドを分取後、アミノ酸配列を決定した。これらをデータベース上で検索した結果、全ての配列が神経特異的エノラーゼ (NSE) の部分配列と一致した。以上の結果から p49 は NSE であると同定された。

一方、上記の膜分画の二次元電気泳動においても NSE のスポットが認められた。そこで、不連続ショ糖密度勾配遠心によって成熟ラット大脳皮質よりシナプトゾームを分離し、各分画のエノラーゼ活性を Lim らの方法¹に基づいて 0.25% Triton X-100 存在下で定量した。その結果ミエリン分画とシナプトゾーム分画に高い比活性が認められたが、抗 NSE 抗体による免疫ブロッティング解析においては、シナプトゾーム分画にだけ強い染色が認められたことから、ミエリン分画のエノラーゼ活性は非神経型エノラーゼ (NNE) によるものと考えられた。さらにシナプトゾームを、浸透圧ショックの後、不連続ショ糖密度勾配に付してシナプス形質膜を分離した。可溶性及びシナプス小胞分画にはエノラーゼ活性が認められなかったが、シナプス形質膜分画に、Triton X-100 存在下及び非存在下でそれぞれで 0.07 ~ 0.1 及び 0.001 ~ 0.02 U/mg protein の活性が認められ、抗 NSE 抗体で染色された。以上により、成熟ラット大脳皮質のエノラーゼ活性のうち約 0.1 % が、シナプス形質膜に会合した NSE によることが明らかになった。

¹L.Lim et al., *J. Neurochem.*, **41**, 1177-82 (1983).

1P-33

アグリン、レクチン、ラミニンによる
AChR 凝集のシグナル機構の解析°重本 和宏¹, 久保 幸穂², 中村 洋一³, 丸山 直記²¹愛媛大学医学部衛生学, ²東京都老人総合研究所分子病理,
³金沢大学薬学部薬物学教室

胎生期に運動神経終末シナプス前膜(運動神経終末)から分泌されるアグリン(ヘパラン硫酸プロテオグリカン)により、シナプス後膜上(筋肉組織)に存在するMusk/Nsk2リセプター型タイロシンキナーゼ(RTK)が活性化され、アセチルコリンレセプター(AchR)を凝集する。この機構は神経筋シナプス形成の初期シグナルとして重要である。我々はC2C12培養筋細胞上のAchR凝集をリコンビナントアグリンで誘導する実験系を作成しこれを用いて、AchR凝集の細胞内シグナル伝達機構の解析を行っている。AchR凝集はアグリン以外にも植物レクチン(VVA-B4)とlaminin-1によっても誘導が可能である。このことはVVA-B4と親和性のあるN-acetylgalactosamine (GalNAc)を末端に持つ糖鎖分子、あるいはlaminin受容体からのシグナルはアグリン-Musk/Nsk2 RTKの下流シグナルとしても作用していると考えられる。今回我々はアグリン、VVA-B4、laminin-1によるAchR凝集に対して種々のシグナル抑制剤を用いて解析を行ったので報告する。

1P-34

成熟マウス脳海馬への5-bromo-2'-deoxyuridine
取り込みに対するNMDAレセプター活性化の
影響°北山 友也, 米山 雅紀, 中村 洋一, 米田 幸雄
金沢大学薬学部薬物学研究室

神経細胞に存在するN-methyl-D-aspartic acid(NMDA)レセプター活性化は、核内蛋白質である転写制御因子 activator protein -1(AP1)を介して、種々標的遺伝子の転写調節を行うと推察されるが、我々は全身的NMDA適用の結果、脳内でも特に海馬歯状回において、特異的なAP1 DNA結合能の一過性増強が招来されることを見出した。今回は、この歯状回特異的なAP1結合能増強の機能的意義追究を目的として、新規DNA合成の指標となる5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)の取り込み活性を中心に検討した。薬物投与後各時間経過した成熟マウスについて、クライスラットを用いて全脳凍結冠状切片を作製し、免疫組織化学法を用いて海馬内のAP1ファミリー蛋白質およびBrdU取り込み活性を検討した。その結果、腹腔内投与2時間後では、対照群の海馬においてFosファミリー蛋白質の中では、c-Fos、FosBおよびFra2蛋白質の発現はほとんど観察されなかった。NMDA投与群では、歯状回顆粒細胞層においてのみ、c-FosおよびFra2蛋白質の強い発現が観察されたが、FosB蛋白質の著明な発現は認められなかった。Junファミリーでは、対照群海馬にc-JunおよびJunB蛋白質の発現が見られたが、NMDA投与群ではc-Jun蛋白質発現の増強のみが歯状回顆粒細胞層において観察された。これに対して、JunBおよびJunD蛋白質発現は、いずれの海馬内神経細胞層においてもNMDA投与に伴い誘発されなかった。BrdUを二日間連続的に腹腔内投与すると、脳内では特に嗅球、小脳および海馬に著明な取り込み活性が認められたが、組織学的に海馬を検討したところ、歯状回顆粒細胞層にのみ強い取り込み活性が認められた。NMDAをBrdUと同時に投与すると、歯状回顆粒細胞層へのBrdU取り込みが強く阻害されることが明らかとなった。これらより、NMDA投与が一過性AP1 DNA結合能増強を介して、成熟脳海馬歯状回顆粒細胞層における細胞増殖メカニズムを抑制する可能性が示唆される。

Kainate と NMDA で誘導した神経細胞死における Cdk5 活性化サブユニット p35 の分解様式の違い

○魏 范研, 斎藤 太郎, 久永 真市
東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻

p35 は神経細胞でのみ発現されている Cdk5 の活性化サブユニットである。p35/Cdk5 は神経突起の伸長や神経細胞の移動に関わっているとされている。最近、アルツハイマー病患者の脳内において、p35 がカルパインにより p25 へと限定分解されることが報告され、p35 の限定分解と神経細胞死との関連が示唆された。一方、さまざまな神経細胞死誘導系のなかで、グルタミン酸などのような興奮毒性を示すアミノ酸による神経細胞死の誘導は、生理的に又はある種の神経変性疾患で実際に起こっているものと考えられる。しかし、興奮性アミノ酸で神経細胞死が誘導される時に p35 がどのように代謝されているかはまだ明らかではない。我々は、異なるグルタミン酸レセプターに対するアゴニストを培養神経細胞に加えると、刺激されるレセプターの種類によって p35 の分解の様式も一様ではないことを見つけたので報告する。

マウス胎児大脳皮質の初代培養神経細胞にグルタミン酸、又は、NMDA、カイニン酸をそれぞれ加えて、時間経過を追って細胞の生存率を観察し、p35 についてはウェスタンブロッティングにより調べた。0.1 mM のグルタミン酸又は NMDA を培地に加えると、p35 の p25 への限定分解が観察されたが、神経細胞死は誘導されなかった。グルタミン酸と NMDA の濃度を 1 mM まで上げると、p35 の限定分解とともに神経細胞死も確認された。それに対して、0.1 mM のカイニン酸の存在下では、神経細胞死が誘導され、p35 は消失してしまった。p35 の消失はカルパインのインヒビターでは阻害されず、プロテアソームインヒビターによって抑制されたことから、プロテアソームによる全分解と考えられた。これらの結果から、グルタミン酸によって引き起こされる細胞死は刺激されるレセプターの種類によって活性化される経路が異なり、少なくとも p35 に関しては、NMDA はカルパインを活性化して p35 の限定分解を引き起こし、カイニン酸はプロテアソームを活性化して p35 の全分解を引き起こすことが示された。

初代培養海馬神経細胞における NMDA 短期暴露による AP1 DNA 結合上昇

○平居 貴生¹, 丸山 裕子¹, 倉本 展行², 中村 洋一¹, 米田 幸雄¹

¹金沢大学薬学部薬物学, ²金沢大学薬学部微生物学

演者らは、マウス腹腔内への NMDA 投与に伴い、選択的に海馬歯状回顆粒細胞層において、転写制御因子 AP1 DNA 結合能が一過性に上昇することを既に報告した。今回は、NMDA の脳内移行性やあるいは動物の過度興奮など、インビボ実験系の不便性を補足する目的で、海馬初代培養神経細胞を用いて、NMDA 暴露に伴う AP1 DNA 結合能の変化を検討した。【方法】培養 3 日目のラット胎仔脳海馬から調製した初代培養神経細胞を、種々の条件下で NMDA に暴露したのち、一定時間経過後に細胞を集めて、ゲル移動度シフト法を用いて AP1 結合能を測定した。【結果】NMDA (100-500 μ M) に 2 時間暴露後、直ちに細胞を集めて DNA 結合を測定すると、Mg イオン添加条件下の暴露の場合でも、有意な AP1 結合上昇が誘発されたが、Mg イオンを添加しない暴露条件の場合は、この結合上昇は Mg イオン添加時に比べて 2 倍以上に増強された。これに対して、NMDA に短時間 (5 分間) だけ暴露し、2 時間後に細胞を集めた場合、Mg イオン添加条件下の暴露では有意な結合変化は見られなかったが、暴露時に Mg イオンを除去すると、100 μ M NMDA により約 2 倍、および 500 μ M NMDA により 8 倍以上の結合上昇がそれぞれ観察された。この 5 分間、Mg イオン非添加、500 μ M NMDA 暴露条件では 30 分後にすでに約 2 倍の結合上昇が見られ、暴露 4 時間後には約 10 倍の上昇が認められた。NMDA アンタゴニストの MK-801 は、単独添加では AP1 DNA 結合に有意な影響を与えなかったが、NMDA 添加に伴う結合上昇を完全に阻止した。【考察】以上の結果より、初代培養海馬神経細胞においても、一過性の NMDA レセプター活性化ののち、一定時間経過後には AP1 蛋白質が誘導される可能性が示唆される。

1P-37

C6 グリオーマ細胞における酸化ストレス
惹起 GDNF 発現と NF- κ B 活性化機構

°木綿 しのぶ, 大熊 康修, 西屋 禎, 宮崎 浩之, 上原 孝, 野村 靖幸
北大院・薬・薬理

グリア細胞株由来神経栄養因子 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は、中脳ドパミンニューロンおよび運動ニューロンに強い生存活性を有する。最近、我々は脳虚血時の神経細胞死が GDNF 前処理により抑制されることを明らかにしたが、GDNF の発現機構についての詳細は未だ明らかではない。

ラットアストロサイト由来 C6 グリオーマ細胞において、GDNF 蛋白質の発現は活性酸素種 H_2O_2 処理の時間、濃度依存的に増加した。また、この増加はチロシンキナーゼ阻害薬であるハービマイシン A により抑制されたことから、 H_2O_2 による GDNF の産生には何らかのチロシンキナーゼが関与していることが示唆された。GDNF のプロモーター領域に転写因子、NF- κ B の結合サイトである κ B 配列が存在することから、GDNF の発現には転写因子 NF- κ B の関与が示唆されている。また H_2O_2 により NF- κ B が活性化されることも知られている。NF- κ B (p50-p60-I κ B α) の活性化において、I κ B キナーゼ (IKK) による I κ B α の Ser-32, Ser-36 のリン酸化、それに続くプロテアソームによる I κ B α の分解と活性 NF- κ B 化した (p50-p60) の核内移行が一般的な経路として知られている。今回、I κ B α の Ser-32, Ser-36 を Alanine に改変した優性変異体を強制発現させた C6 細胞を用いて検討したところ、 H_2O_2 刺激による GDNF の発現量に変化は認められなかった。この結果より、この系における GDNF の発現に NF- κ B の活性化が重要でない可能性も考えられた。しかし、活性酸素種による NF- κ B の活性化機構については不明な点が多い。とくに活性酸素種による NF- κ B の活性化は IKK の活性化を含むのか否かについても現在のところ不明である。そこで H_2O_2 による NF- κ B の活性化機構について検討を行ったところ、 H_2O_2 処理により I κ B α の分解が生じることが明らかとなった。さらに現在、IKK および/または他のキナーゼの関与について検討中である。

1P-38

Cdk5 活性化サブユニット p35 のカルパインによる限定分解～分解部位とリン酸化による分解制御の解析～

°藤田 悠一, 斎藤 太郎, 久永 真市
東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻

Cdk5 は分化し、分裂しない神経細胞で活性が認められる特異なサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) であり、大脳皮質の層構造形成に関わっていることが知られている。Cdk5 は調節サブユニットである p35 によって活性化され、p35 の量はユビキチン・プロテアソーム系による分解で制御されている。一方、神経細胞の細胞死誘導時に、p35 はカルパインにより N 末 98 アミノ酸を欠いた p25 に限定分解される。しかし、カルパインの基質認識機構はまだ判っておらず、p35 についても限定分解に必要な領域は不明である。今回、限定分解に関与する p35 のアミノ酸領域を解析したので報告する。p35 の cDNA よりアミノ酸置換した、又は一部のアミノ酸領域を欠いた p35 遺伝子を作製し、これを reticulocyte lysate の in vitro 無細胞翻訳系で翻訳した蛋白を in vitro 限定分解系として用いた。Reticulocyte lysate 中の Cdk5 と結合した p35 を Cdk5 の抗体で免疫沈降し、Cdk5/p35 complex を得た。これにラット脳抽出液と Ca^{2+} を加え、限定分解反応をおこなった。カルパインによる分解は分解部位の N 末側のアミノ酸に依存するとされているが、分解部位の N 末側アミノ酸を Gly に置換した変異体では影響が見られず、切断部位を中心に 25 アミノ酸を欠いた変異体では限定分解が抑えられた。このことは、カルパインが基質の一次配列ではなく、二次あるいはそれ以上の高次構造を認識し、基質を分解することを示唆するものである。一方、p35 のリン酸化も限定分解に関わっていることが in vitro の実験から示されている。p35 の限定分解に関わるリン酸化について明らかにするため、まず Cdk5 による自己リン酸化部位と考えられる SP/TP 配列の Ser 及び Thr を全て Ala に置換した変異体を用いてリン酸化による限定分解への影響を見たが、正常な p35 との違いは認められなかった。このことから、Cdk5 による自己リン酸化以外の可能性も考え、限定分解に関わる p35 のリン酸化部位の同定をおこなっているところである。

1P-39

ラット脳および培養海馬神経細胞におけるCaM キナーゼキナーゼ分子の発現とリン酸化反応

°笠原 二郎, 上江洲 章吉, 福永 浩司, 宮本 英七
熊本大学医学部薬理学第一講座

私達は脳内におけるカルモデュリン (CaM) キナーゼ分子の発現、リン酸化/活性化反応およびその機能的役割を検討している。CaM キナーゼキナーゼ (CaMKK) は CaM キナーゼ I、IV を活性化するキナーゼであり、 α と β の二つのアイソフォームの存在が報告されている。それぞれのアイソフォームに対する特異的ポリクローナル抗体を作成し、CaMKK の (1) 脳内発現パターンをイムノブロット法、(2) 培養海馬神経細胞における発現を免疫染色法、(3) リン酸化反応を ^{32}P ラベリングによって検討した。

(1) CaMKK α と β は、脳内において異なる発現パターンを示した。 α と β は共に大脳皮質と海馬に豊富に存在した。 α は嗅球、大脳基底核、脳幹部で発現が認められたが、 β の発現はきわめて弱かった。一方、小脳では β の発現が強く、 α の発現はきわめて弱かった。

(2) 培養海馬神経細胞では、CaMKK α 免疫反応性は神経細胞の核、細胞体、細胞体近傍の神経突起に認められた。一方、CaMKK β 免疫反応性は、細胞体と神経突起全般に認められ、核には認められなかった。

(3) 培養神経細胞を ^{32}P ラベルしてグルタミン酸、高カリウムで刺激した。いずれの刺激によっても、CaMKK α と β のリン酸化反応は顕著に増大した。CaMKK は *in vitro* 実験によって、CaM 存在下に自己リン酸化反応を示すことから、神経細胞の刺激による CaMKK のリン酸化反応増大は、主として自己リン酸化反応によるものと考えられる。また、グルタミン酸刺激によるリン酸化反応の増大は NMDA 受容体阻害薬 D-APV によって抑制され、高カリウム刺激によるリン酸化反応の増大は、L 型 Ca チャネル阻害剤ニフェジピンによって抑制された。これらの特徴は、以前に報告した CaM キナーゼ II、IV のリン酸化反応と類似していた。

以上の結果は、CaMKK が CaM キナーゼ II、IV と同様に神経活動に伴って活性を調節されていることを示している。更に α と β の二つのアイソフォームが脳内及び神経細胞内において異なる局在を示したことから、両アイソフォームは異なる機能的役割を持っていることが示唆された。

1P-40

シナプスの形成に関するフォスファチジルイノシトール 4-リン酸化酵素の役割

°申 然淑, 東田 陽博

金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学講座

[目的] 神経伝達物質放出のメカニズムに関わる種々の調節タンパク質のうち、 Ca^{2+} 結合タンパク質である frequenin はその一つである。frequenin cDNA を過剰発現した神経腫瘍 NG108-15 細胞ではアセチルコリンの自発的および誘発的放出が増加した。しかし、frequenin が神経伝達物質の放出に関与するメカニズムについてはまだ十分な見識が得られていない。frequenin に結合するタンパク質としてフォスファチジルイノシトール 4-リン酸化酵素 (PI4K) が酵母において見出されている。PI4K は、フォスファチジルイノシトールのイノシトール環の 4 位をリン酸化する酵素で、細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすフォスファチジルイノシトール 4、5-2 リン酸 (PtdIns-4,5- P_2) の産生の前段階を担っている。今回、frequenin が PI4K を介して伝達物質放出メカニズムに関与しているか否か、また PtdIns 4,5- P_2 の細胞内発現量を変えるとどのような細胞機能の変化が生じるかを知る目的で PI4K cDNA の細胞内導入を試みた。まず、始めに PI4K cDNA を導入した NG108-15 と併置培養した筋繊維から発生する微小終板電位 (mepp) の測定を測り、シナプスでの PI4K の関与を調べたので報告する。[方法] ラット新生仔の後肢から筋芽細胞を単離してコラーゲン塗布皿に一週間培養し、筋繊維を完成させた。そこに NG108-15 (2×10^4 cells/35-mm dish) を加えて筋繊維と並置培養した。NG108-15 細胞への PI4K cDNA の導入には Lipofectamine PLUS を用いた。並置培養と同時に cAMP を培養液に加えて NG108-15 細胞の分化を誘導した。並置培養による機能的な神経筋シナプスの形成は電気生理学的な測定を 1-7 日行う。測定はオリンバスの簡易培養顕微鏡を利用した。電極間抵抗を 7 M Ω から 15 M Ω に保った微小間電極を筋細胞内に挿入し、膜電位を得た。NG108-15 から遊離されたアセチルコリンにより、mepp を記録した。2 分間測定して 4 つ以上の mepp を発生する細胞を同定した。[結果] mepp を発生する細胞の割合は、PI4K を導入した NG108-15 細胞と並置培養した筋繊維の方が対象群の方より高かった。この結果から PI4K は NG108-15 細胞と筋繊維間のシナプスでアセチルコリンの放出を増加させ、筋繊維の mepp の発生に関与していると考えられる。

1P-41

交感神経興奮によるラット心室心筋内での
サイクリック ADP リボース形成の上昇°張 家生¹, 東田 陽博¹, 横山 茂¹, 野田 百美²¹金沢大学大学院・医・細胞遺伝子学, ²九州大学大学院・薬・病態生理学

交感神経興奮により、心収縮と心拍数は増加する。心収縮増加に対する、これまでの仮説は、放出されたノルアドレナリンにより、 β アドレナリン受容体を刺激し、生じた cAMP により A キナーゼが活性化され、引き続き L 型 Ca^{2+} チャネルがリン酸化された結果、 Ca^{2+} 流入が増加し、それがさらにリアノジン受容体からの大量の Ca^{2+} 放出を生じることからその Ca^{2+} 放出が多くなると収縮が増加すると説明されてきた。一方、このリアノジン受容体からの Ca^{2+} 放出にサイクリック ADP リボース (cADPR) が協調的に関与していると考えられている。それならば、 β アドレナリン受容体により、cADPR の産生もコントロールされているのではないかと考え、この仮説をラット心筋で検証することにした。[方法] 細胞表面膜を酵素源とし、ADP リボシルシクラーゼを [^3H]NAD からの [^3H]ADPR の産生を TLC で、さらに、NGD からの cADPR の産生を蛍光分光学的に測定した。[結果] ラット心筋粗膜分画で $5.62\text{nmol/min/mgprotein}$ の ADP リボシルシクラーゼの活性が得られた。イソプロテレノール (ED_{50} = 約 50 nM) 添加により、約 1.8 倍活性が上昇した。プロプラノーロールにより阻害された。10 nM GTP も活性を上昇させたが、イソプロテレノールとの同時添加で相加的や相乗的な上昇はみられなかった。コレラ毒素を前投与したラットではこの上昇が喪失していた。[考察] 以上の結果は、心室筋細胞膜表面膜に、 β アドレナリン受容体から ADP リボシルシクラーゼに G タンパクを介して伝わる信号伝達経路があることを示唆している。交感神経刺激による心機能調節にこの信号伝達系が関与していると思われる。

1P-42

副腎髄質クロマフィン細胞における分泌顆粒運動の実画像解析

°今泉 美佳, 大久保 晋吾, 林 光紀, 保坂 早苗, 笹川 展幸, 熊倉 鴻之助

上智大学生命科学研究所

クロマフィン細胞の開口分泌機構は、高透過性細胞等を用いた実験結果より、分泌顆粒を releasable pool へ供給し、放出可能な状態 (MgATP 依存性プライミング) にする分泌顆粒供給過程と、 Ca^{2+} 依存性開口過程の少なくとも 2 つの過程から構成されていると考えられている。我々は、分泌顆粒供給過程の分子機構に注目し、すでにミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK)、アクチンフィラメント、及びアクチン-ミオシン相互作用がこの過程において重要な役割を持つことを高透過性細胞系および正常細胞からのカテコールアミン分泌動態解析 (リアルタイムモニタリング法) により示唆してきた。今回は、より詳細に分泌顆粒供給過程を解析するために、蛍光ラベルした分泌顆粒運動の実画像解析を行った。

培養クロマフィン細胞を LysoTracker Green DND-26 (LTG) で preincubation し (100 nM , 30 min)、クロマフィン顆粒をラベルしたのち、蛍光顕微鏡下に置き、冷却型デジタル CCD カメラを用いて刺激後の顆粒の運動変化を経時的に観察した。高カリウム刺激後、2 分後から 2 分間の運動解析では、Control 細胞では素速く動く ($0.5\text{ }\mu\text{m/s}$ 以上) 顆粒が全顆粒のうち約 25% あり、始点からの移動距離も長かった ($2.5\text{ }\mu\text{m}$ 以上)。アクチンフィラメントをモノマーに解離させ、アクチン-ミオシン相互作用を阻害する物質、Mycalolide B 処理、また MLCK 阻害剤 Wortmannin 処理によりこれらの顆粒の出現が濃度依存性に見られなくなったことから、これら素速く動く顆粒はアクチン-ミオシン相互作用によって放出部位へ移動、供給されていることが示唆された。

単離ニューロフィラメントによる高次架橋構造の *in vitro* 形成

°倉知 正¹, Leterrier Jean-Francois², 小宮 義璋³, 内田 敦子^{4,5}, 田代 朋子⁵

¹群馬大学医学部分子病態学教室, ²ボワティエ大学細胞相互作用研究施設, ³群馬大学医学部分子病態学教室, ⁴東京都立大学理学部生物学科, ⁵青山学院大学理工学部化学科

ニューロフィラメント (NF) を構成する三種類のサブユニット蛋白のうち、NF-L は典型的な中間径フィラメント蛋白であるが、NF-H と NF-M は、C-末端側に長い延長部分を見え、部位および発育過程によって NF に含まれる量やリン酸化状態が異なることから、NF 同士あるいは NF と他の細胞骨格構造との相互作用に関与すると考えられている。このような相互作用は軸索の安定化に寄与する反面、老化神経や一部の神経変性疾患にみられる NF の異常蓄積の要因となる可能性がある。我々は、NF 間相互作用とその調節機構を明らかにする目的で、ラット脊髄から単離した NF を材料に、ビデオ増強微分干渉 (VEC-DIC) 顕微鏡法、蛍光抗体法、および蛍光標識 NF を用いて、NF の形成する高次架橋構造を観察した。NF は Leterrier らの方法により、可能な限り intact な状態で脊髄から抽出し、ショ糖密度勾配遠心で精製した。成熟動物由来 NF (3mg/ml) を VEC-DIC 顕微鏡で観察すると、(A) 密度の高い、ロープを束ねたような構造と、(B) コントラストの低い繊維状物質を含むマット状構造、の二種類の大きな構造が共存していた。抗 NF-H 抗体を用いた蛍光抗体法で、(A) は非常に明るく染まり、(B) は細かい繊維の絡み合った三次元の網目構造であることがわかった。(B) の状態の NF は falling ball 法で粘度上昇が検出されることから、これまでに報告されている NF ゲルに相当すると考えられる。網目の構成繊維はほぼ直線的であるが、アルカリフォスファターゼ (ALP) 処理によって、やや縮れた繊維となる。一方、(A) はこれまでに記載のない、規則性のある NF 凝集体である。(A) は非常に安定で、ALP 処理、高いイオン強度などでは分散不可能であった。更に、精製 NF (pNF) およびこれを脱リン酸したもの (dpNF) をローダミン標識し、未標識 pNF あるいは dpNF と混合して *in vitro* 再構成実験を行った結果、pNF は *in vitro* でも大きな凝集体を形成するとともに、これに容易に組み込まれることがわかった。これに対して、dpNF はより細かく分散しており、pNF 凝集体にも組み込まれにくい。*in vitro* で形成されるこのような構造は、NF 濃度の高い軸索内では充分形成可能であり、*in vivo* での架橋構造調節機構を研究する上で有用な手掛かりを与えると考えられる。

ニューロフィラメント-H E-segment の GSK3 β による特異的リン酸化

°佐々木 孝寛¹, 田岡 万悟², 石黒 幸一³, 内田 敦子¹, 斎藤 太郎¹, 磯辺 俊明², 久永 真市¹

¹東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻, ²東京都立大学大学院理学研究科化学専攻, ³三菱化学生命科学研究所

ニューロフィラメント (NF) は、軸索の最も主要な骨格成分であり、軸索直径の決定に関わると考えられている。NF は分子量の異なる 3 つのサブユニット (NF-L, NF-M, NF-H) から構成されている。分子量の大きい NF-M と NF-H の C 末尾部はフィラメント軸から突出し、NF 間または他の細胞内構造と相互作用をする領域となり、その相互作用は C 末尾部中央に存在する KSP repeat のリン酸化により調節されていると考えられている。一方、KSP repeat の N 末端側に位置する種間で保存された Glu に富んだ領域 (E-segment) にも多くの Ser, Thr が存在するが、それらのリン酸化については全く解っていない。我々は、NF-H のリン酸化の全容を明らかにするため、ラット脳から CDK5 や MAP キナーゼと異なる NF-HC 末尾部キナーゼを精製し、それが GSK3 β であったこと、そのリン酸化部位は KSP repeat と E-segment にあることを昨年報告した。今回我々は E-segment 内の GSK3 β のリン酸化部位を二次元ホスホペプチドマッピングと推定リン酸化部位のアミノ酸置換変異体の解析から特定した。この結果、リン酸化部位は KSP repeat のすぐ N 末端側にある SP 配列の Ser493 であることが判明した。また、前回は KSP repeat を含む C 末尾部全体を基質としたため、KSP repeat 部分のリン酸化を反映したキナーゼ活性として GSK3 β が単離されたと考えられる。そこで Ser493 を含む E-segment をリン酸化するキナーゼを E-segment 部分のみを基質に用いてラット脳から再検索した。脳抽出液から E-segment キナーゼ活性をカラムクロマトグラフィーにより精製したところ各段階で単一の活性として部分精製された。この活性は LiCl により阻害され、また活性ピークの抗体との反応性から GSK3 β であることが判明した。さらに Ser493 は他のプロリン指向性キナーゼによってはリン酸化されにくいことから、GSK3 β が唯一の Ser493 キナーゼと考えられた。ラット脊髄から単離した NF-H の E-segment のリン酸化状態を MALDI/TOF mass spectrometry を用いて調べたところ、Ser493 は *in vivo* でもリン酸化されていることが示された。現在は、この部位のリン酸化の役割を構造的側面から検討しているところである。

1P-45

ラット坐骨神経における puromycin-sensitive aminopeptidase の軸索内輸送

°山本 賢¹, 矢嶋 隆一², 知久馬 敏幸³, 平野 久⁴, 山本 好男⁵, 西 克治⁵, 大久保 岩男⁶, 加藤 武¹

¹横浜市大・院・総合理学, ²特殊免疫研, ³昭和薬大・薬品分析, ⁴横浜市大・木原生研, ⁵滋賀医大・法医, ⁶滋賀医大・二生化

神経ペプチドの作用はその分解酵素によって停止すると考えられている。puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA) は最初にエンケファリンの分解酵素として単離されたが、その後、*in vitro*において、コレシストキニン、ダイノルフィン、ソマトスタチンのような様々な神経ペプチドの不活性化に関与することが示された。PSA は他の器官と比べ脳に最も高く発現する。脳には膜結合形態 (約 20%) の PSA が存在するけれども、PSA の細胞内分布は大部分が可溶性形態 (約 80%) として細胞質内に存在することが示されており、*in vivo*での PSA の神経ペプチド分解機能は疑問視されている。もし PSA が神経ペプチド分解に関与しているならば、それは順行性軸索輸送されているであろう。そこで本研究ではラット坐骨神経 2 重結紮法を用いて、PSA の軸索内輸送を調べた。結紮 0, 48, 120 時間後に坐骨神経を取り出し、酵素活性測定、Western blotting、免疫組織化学的手法によって分析した。生化学的、免疫学的分析の結果は、結紮 48 時間後に、PSA がラット坐骨神経中を主に順行性輸送され、また少しの逆行性輸送されていることを示した。これは PSA が細胞外神経ペプチド分解に関与していることを示す。ラット坐骨神経中膜形態 PSA の基質とその機能はまだ不明であるが、PSA は神経情報伝達の調節に働いているであろう。

1P-46

アルミニウムのパルス曝露による *in vivo* 系での軸索輸送障害

°柏木 雄次郎, 福所 英里子, 中村 祐, 松本 均彦, 武田 雅俊

大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学・精神医学

アルツハイマー病の環境危険因子の一つと考えられているアルミニウムの神経毒性はよく知られているが、その毒性機序については未だ解明されていない。この毒性機序を検討するために、種々の動物モデルが検討されてきた。

これまで、我々はラット初代神経培養細胞において、培養初期 (培養開始 6 時間後) にアルミニウムを高濃度・短時間曝露 (パルス曝露) させるとニューロフィラメント L と速い軸索輸送蛋白質の異常分布が生じるにもかかわらず、チューブリン、アクチン、クラスリンなど遅い軸索輸送蛋白には異常が生じないことを報告してきた。

今回、我々はアルミニウムを妊娠 9 日目のラット母体の腹腔内に投与することで、出生仔の脳において *in vivo* 系でも同様の変化が起こり得るのかどうかを検討した。

その結果、生後 7 日目のラットの脳各部位において、対照群ではニューロフィラメント陽性の線維構造の形成が認められるのに対し、アルミニウム投与群ではそのような構造の形成はほとんど認められなかった。また生後 16 日目の所見では、対照群でさらに線維構造が増加していたが、アルミニウム投与群では線維構造の形成が著しく遅延していた。一方、ニューロフィラメント陽性の線維状構造物の減少・消失により空白となる部位 (radial glial fiber の下縁) を同じ中間径線維に属するビメンチンの抗体で免疫染色したところ、濃く染色された。これは本来この時期には消失しているはずのビメンチンが残存して軸索形態維持を代償しているものと考えられた。

また、神経機能発達検査 (righting reflex, negative geotaxis: これらは共に、原始反射の一種であり、中枢神経と筋の統合運動発達の程度を示す) を行ったところ、アルミニウム投与群では対照群に比べ新生児期早期において中枢神経と筋の統合運動発達の遅延が認められた。

これらの結果から、アルミニウムの神経毒性について病理学的変化と神経機能を検討しうる動物実験モデル系を提供することができた。また、アルツハイマー病脳では、ニューロフィラメントの分布異常と軸索輸送の異常が認められている。アルミニウムの神経毒性をアルツハイマー病の病理過程には共通する部分があると言える。

老化ラットで選択的に見られる NF-M の合成量低下と軸索輸送速度の減少

°内田 敦子^{1,2}, 田代 朋子², 小宮 義章³, 久永 真市¹

¹東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻, ²青山学院大学理工学部化学科, ³群馬大学医学部分子病態学教室

ニューロフィラメント (NF) は神経細胞に特異的な中間径フィラメントで、軸索内の最も主要な細胞骨格である。NF は他の細胞骨格と同様に細胞体で合成され、1日に1mm程度の遅い軸索輸送により軸索末端へと供給される。NFの輸送機構については不明な点が多いが、NFの輸送速度は老化に伴い低下することが知られている。老化に伴い発症率が増加する筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では軸索内に NF の蓄積が頻繁に見られる。ALS の疾患モデル動物では、軸索内の NF の蓄積に先立ち NF の軸索輸送速度が低下することから、その背景には老化による軸索輸送障害が関与していると考えられる。そこで老化に伴う NF の軸索輸送速度の低下の原因は NF の構造変化と関連があると考え、老齢ラットと若齢ラットの NF について比較検討を行っている。前回の大会で、老齢ラットでは脊髄前根を含む軸索近位部の NF 密度は高く、遠位部では密度が低くなり、NF-M の割合が NF-H、NF-L に比べ減少していることを報告した。今回は、NF-M の減少が合成、輸送のどの段階で生じているかを明らかにするために各サブユニットの合成比と輸送比について調べた結果を報告する。まず定量的 RT-PCR により、mRNA 量を調べたところ、老齢ラットではすべての NF サブユニットの mRNA レベルが若齢ラットに比べ減少していたが、特に NF-M の mRNA レベルが著しく減少していることがわかった。次に運動神経細胞体のある脊髄前角部位に [³⁵S] メチオニンを導入し、合成直後の NF 蛋白の構成比を調べたところ、mRNA レベルと同様に、老齢ラットでは NF 蛋白全体の合成量が低下しており、中でも NF-M の減少の割合が著しかった。さらに坐骨神経における各 NF サブユニットの軸索輸送速度と輸送量を調べたところ、老齢ラットではすべてのサブユニットの軸索輸送速度が若齢ラットに比べ低下していた。また若齢ラットでは NF-M の輸送速度が NF-H に比べ速いのに対し、老齢ラットでは NF-M の輸送速度が NF-H に比べ低下していた。これらの結果は、老齢ラット軸索内での NF の密度変化は NF-M の合成量並びに輸送量の低下に起因することを示唆し、NF の輸送機構において、NF-M が輸送速度決定に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

ミクログリアの膜ラフリング形成におけるシグナル伝達と Iba1 の機能解析

°金澤 裕子, 今井 嘉紀, 大澤 圭子, 佐々木 洋, 上田 睦明, 高坂 新一

国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

Iba1 は2つの EF ハンド構造を有する分子量 17kDa のカルシウム結合タンパク質であり、脳内ではミクログリアに特異的に発現する。ミクログリア細胞株 MG5 を用いて Iba1 の細胞内局在を検討した結果、Iba1 はラフリング部位に集積することが明らかとなった。そこで、Iba1 を線維芽細胞に強制発現させ、アクチン細胞骨格とシグナル伝達において解析した。Iba1 発現細胞では PDGF 刺激による膜ラフリングの増強がみられ、Iba1 はラフリング部位に集積していた。これに対して、糸状仮足やストレスファイバーの形成には Iba1 の発現による変化は認められなかった。線維芽細胞でのラフリングに関与するシグナル伝達分子として PI3-キナーゼが知られており、PI3-キナーゼの阻害剤であるワートマニンで処理すると正常細胞においてはラフリングが抑えられた。これに対して、Iba1 発現細胞ではワートマニン処理によってもラフリングは抑えられなかった。そこで、自己リン酸化部位のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 PDGF レセプターを用いて検討した結果、Iba1 発現細胞では PI3-キナーゼだけではなく、PLC- γ を介してもラフリングが形成されることが明らかとなった。GST-PAK による Pull Down 法で Rac の活性を調べると、Iba1 発現細胞では PI3-キナーゼに加えて PLC- γ を介して Rac の活性がみられ、ラフリングの結果と一致した。さらに Iba1 が PLC- γ と結合することも示され、Iba1 は PLC- γ から Rac に至るシグナル伝達経路を形成することが示唆された。実際に、Iba1 を内在的に発現している MG5 を PLC- γ の阻害剤である U73122 で処理すると M-CSF によって引き起こるラフリングが抑えられた。以上よりミクログリアのラフリングは線維芽細胞とは異なり、チロシンキナーゼ型レセプターの活性化により主に PLC- γ を介してラフリングが起きることが示された。Iba1 は PLC- γ の関与する新しいシグナル伝達経路で機能する重要な分子であり、ミクログリアの強い遊走能の分子的基盤となっていることが示唆された。

1P-49

PC12D 細胞神経突起内におけるペルオキシソームの局在性と運動性に関する解析

*石川 哲也¹, 川井 千景¹, 佐野 護², 湊川 洋介¹¹川崎医大・医・生化一, ²京都府医大・医・生物

[目的] Zellweger syndrome のようなペルオキシソーム病では、神経系にも障害が生じる。従って、ペルオキシソームが神経系で重要な役割を担っていると考えられる。しかし、その役割についてはほとんど明らかにされていない。神経終末などにペルオキシソームが存在すると言う報告はあるが、どれくらいの数のペルオキシソームがどのように分布しているのか示した報告はない。そこで、神経系のペルオキシソーム機能を明らかにするために、まず神経突起におけるペルオキシソームの局在性と運動性を調べた。

[方法] ペルオキシソームを検出するために、EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) に peroxisome targeting signal 1 (Ser-Lys-Leu-COOH) を連結させた EGFP-SKL を発現するプラスミド pEGFP-SKL を作製した。pEGFP-SKL を培養神経系細胞 PC12D 細胞にトランスフェクションした後、培地に NGF を加えて神経突起を伸長させた。そして2日後に蛍光顕微鏡を用い緑色の蛍光としてペルオキシソームを検出した。

[結果] ペルオキシソームは神経突起中、特に growth cone, varicosity, 分岐点に多数観察できた。神経突起伸長作用を持つ、dbcAMP, forskolin, staurosporine を用いても神経突起中にペルオキシソームが観察できたことから、ペルオキシソームの細胞体から神経突起中への移行は NGF の直接的効果と言うより、神経突起の伸長と関係があると考えられる。また、短い神経突起中にも観察でき、非常に長い神経突起中には非常に多くのペルオキシソームが存在していた。さらに、neural terminal-like structure 中や、active な growth cone 中にも観察できたことから、ペルオキシソームはそのような神経突起の重要な部分で何らかの役割を担っていると考えられる。また、ペルオキシソームが神経突起内を anterogradely および retrogradely に移動する様子も観察できた。以上のことから、細胞体で作られたペルオキシソームは anterograde transport により神経突起中を移動して growth cone または neural terminal へ移行する。そこで何らかの機能を発揮し、その後、retrograde transport により細胞体へもどるのではないかと考えられる。

1P-50

変異 SOD-1 と野生型 SOD-1 の培養細胞内凝集体における共存

*豊島 至¹, 菅原 正伯¹, 和田 千鶴¹, 小出 隆司², 中野 亮^{—2}¹秋田大学医学部第一内科, ²新潟大学脳研究所神経内科

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の一部は superoxide dismutase-1 (SOD-1) の変異が原因となる。変異 SOD-1 はニューロン内に凝集体を作り、これに様々な分子が関与することが知られているが、細胞死機構の詳細は明らかでない。今回は変異 SOD-1 と野生型 SOD-1 を蛍光ラベルし、細胞内発現の経過をビデオ顕微鏡で観察したので報告する。方法：野生型 SOD-1 を green fluorescent protein (GFP) でラベルし (Koide et al 1998) 変異 SOD-1 を red fluorescent protein (RFP) でラベルした。これを、同時に、COS7 細胞に発現させ蛍光観察した。長時間蛍光観察には、光源を 0.01% に減光し 3CCD カメラで取り込み、タイムラプスビデオで記録した。結果：COS7 細胞内に発現した RFP ラベル変異 SOD-1 は、主に核周囲に凝集体を形成した。GFP ラベル野生型 SOD-1 は多くの細胞で凝集体内に共存し、G85R, d126p, G93A の順で多く見られた。共存の程度は凝集体の大きさには必ずしも依存しなかった。凝集体の存在する細胞では変異 SOD-1 の背景蛍光は低かったが、野生型 SOD-1 は凝集体を含まない細胞と同様の細胞質内蛍光を示した。凝集体が存在する COS7 細胞は 24 時間程度では細胞死に至らなかった。結論：変異 SOD-1 による FALS は優性遺伝なので、同一細胞内に変異 SOD-1 と野生型 SOD-1 が共存するが、互いの関係が明らかでない。今回は、この両者を同時発現させたときに、野生型 SOD-1 が変異 SOD-1 による凝集体形成に関与することを明らかにした。しかし、その関与は一様ではなく、また、変異によっても差が見られ、細胞質内の一部の野生型 SOD-1 がこれに加わるにすぎないことも明らかになった。運動ニューロン細胞死の機序については今後の検討が必要である。

1P-51

システインプロテアーゼインヒビターによるアストロサイトの分化誘導機構の解明

°長谷川 明子¹, 岩崎 靖乃¹, 山田 真久², 小川 正晴², 池中 一裕¹

¹岡崎国立共同研究機構・生理学研究, ²理化学研究所脳科学総合研究センター細胞培養技術開発チーム

我々は、これまでに GFAP プロモーターの活性化を指標に、グリアの分化誘導因子を探索し、システインプロテアーゼの内因性インヒビターであるシスタチン C を単離した。本大会では、シスタチン C がグリア細胞の分化に影響を与えるかを検証するために、ラットの O-2A 前駆細胞株である CG4 を培養し、培養液中にシスタチン C を添加した。その結果、添加後 4-6 日目で GFAP 陽性細胞の数が増加した。この GFAP 陽性細胞の増加は、シスタチン C の濃度に依存して起こることも明らかになった。さらに、他のシステインプロテアーゼインヒビターである E64 を培地中に添加した際にも、GFAP 陽性細胞の数が増加することが明らかになった。一方セリンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンを培地中に添加した際には、GFAP 陽性細胞数の有意な増加は認められなかった。これらの結果から、シスタチン C はシステインプロテアーゼを阻害することにより、アストロサイトへの分化を誘導していることが考えられる。現在、マウスの脳初代培養細胞を用い、シスタチン C の作用を検討している。

1P-52

Expression patterns of gliosis-specific transcription factor, OASIS and Proteoglycan Core Protein genes in the CNS glial scar

°Ken ISEKI^{1,2}, Takuya NIKAI¹, Tetsuji MORI¹, Seita HAGINO¹, Junko TAKEDA¹, Yuxiang ZHANG^{1,2}, Hiromi TAKAKI¹, Mayumi TAKEUCHI¹, Sachihiko YOKOYA¹, Masahiro MURAKAWA², Akio WANAKA¹

¹Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University, ²Department of Anesthesiology, School of Medicine, Fukushima Medical University

OASIS is a novel member of the CREB/ATF transcription factor family. Its gene expression is specifically upregulated in gliosis after brain injury. Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are also upregulated in such a glial scar and inhibit axonal regeneration. We hypothesize that OASIS may be involved in transcription of some, if not all, of the CSPG core protein genes and make lesions non-permissive to regenerating axons. We first compare the OASIS gene expression with the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and TAPA (marker of proximal reactive astrocyte) immunoreactive cells in cryo-injured mouse brain. The distribution pattern of the OASIS mRNA-positive cells overlapped with that of the cells strongly positive for TAPA immunoreactivity and partially with GFAP-positive cells. We next examined the expression of several PG core protein genes in a glial scar using in situ hybridization. The genes for core proteins of NG2 proteoglycan, Phosphacan, Brevican, and Versican were intensely expressed in the lesions. When we compared the expression of these PGs with OASIS expression pattern by double labeling of in situ hybridization and immunofluorescence, NG2 proteoglycan core protein gene expression overlapped significantly with OASIS expression. Since NG2 proteoglycan is known as a marker of the O-2A progenitor cells, OASIS is likely to be expressed in the O-2A progenitor cells in addition to reactive astrocytes. Consistent with this notion, Versican also showed overlapping pattern with that of OASIS. On the other hand, Brevican and Phosphacan gene expression was rather similar to GFAP expression patterns (distal reactive astrocytes). These findings suggest that OASIS is upregulated in O-2A progenitor cells and proximal reactive astrocytes and is involved in proteoglycan production.

1P-53

Transcriptional activity of gliosis-specific transcription factor, OASIS, that belong to the CREB/ATF family

^oTakuya NIKAI^{1,2}, Ken ISEKI¹, Tetsuji MORI¹, Seita HAGINO^{1,2}, Junko TAKEDA¹, Yuxiang ZHANG¹, Hiromi TAKAKI¹, Mayumi TAKEUCHI¹, Sachihiko YOKOYA¹, Shin-ichi KIKUCHI², Akio WANAKA¹

¹Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University, ²Department of Orthopedic Surgery, Fukushima Medical University

A novel member of the CREB/ATF family, OASIS, isolated from long-term cultured astrocyte is upregulated in the cryo-injured cerebral cortex and the distribution of the OASIS-positive cells resembled those of several inhibitory proteoglycans (see Iseki et. al., this meeting). The open reading frame of OASIS gene is 1560bp long, which encodes a 520-amino acid protein with bZIP domain. We first examined transcriptional activity of full-length OASIS with GAL4-UAS-luciferase reporter assay in COS7 cells. OASIS protein activated transcription, but did not inhibit basal transcription driven by AdML promoter. To determine critical portion(s) of the OASIS protein in transcriptional activation, we next examined whether various deletion constructs of OASIS gene affected the activity. The assay revealed that an activation domain lies in a region upstream of the bZIP domain. We are further narrowing down the region with PCR-based mutagenesis. Proteins containing a bZIP domain are known to bind specifically to their cognate DNA recognition sequences, CRE to regulate gene expression. To ascertain whether the OASIS protein was able to specifically recognize the CRE sequence, gel shift assays were performed. With 32P-labeled double stranded oligonucleotide containing a CRE consensus sequence, the gel-shifted band were detected as the OASIS-CRE consensus oligonucleotide complexes. This result suggests that OASIS protein may interact with CRE consensus sequence like other CREB family members. Based on these findings, we propose that OASIS protein functions as a positive regulator of gene transcription recognizing the CRE consensus sequence. Downstream genes of the OASIS gene, therefore, are of particular interest. Stable transfectants or induced expression system in cell lines would be useful in searching for such candidates.

1P-54

P2Y receptor を介するマイクログリア機能抑制 ; Receptor subtype に関して

^o尾形 直則, 森野 忠夫, 竹葉 淳, 田口 康智, 堀内 秀樹, 山本 晴康
愛媛大学医学部整形外科

【目的】ATP は生体内に於いてエネルギーの主な供給源であるだけでなく P2 receptor を介して様々な生理作用を司っていることが明らかとなってきた。我々は ATP がマイクログリアの機能の一つであるサイトカインの放出を抑制することを見だし、それが P2X receptor ではなく P2Y receptor を介して起こることを報告してきた。今回は更に P2Y receptor のどのサブタイプがこの機能に関与しているのかを検討した。【方法】ラット胎児脊髄より採取したアストロサイトを中心とする culture 上に増殖してくるマイクログリアを shaking にて分離培養し、実験に用いた。約 90% の細胞が isolectin 染色に陽性なマイクログリアであった。この細胞を 24 時間 LPS(100 ng/ml) に暴露し、培養液中に放出されたサイトカイン量を ELISA 法にて測定した。【結果及び考察】LPS による培養マイクログリアからの TNF- α の放出能に対して、100 μ M の濃度で Endogenous な purine の効果を調べてみたところ、ATP が最も強く TNF- α の放出量を抑制した。TNF- α は ATP 添加により LPS 刺激のみの放出量 (control 値) の約 25% まで減少し、ADP がそれに次ぐ効果を示した。これに対して CTP, UDP, UTP の効果は弱く (CTP β S, 2-methylthio-ATP を 10 μ M の濃度で使用したところ、2-methylthio-ATP は 100 μ M の ATP に匹敵する抑制作用を示したが、ADP β S の効果はやや劣っていた。この結果より ATP のサイトカイン放出抑制機構には P2Y のサブタイプの内、P2Y₁ と P2Y₅ の関与が大きいのではないかと考えられた。

ラット顔面神経核由来ミクログリアのグルタミン酸トランスポーターについて

°中嶋 一行^{1,2}, 本田 静世², 遠山 陽子¹, 栗原 正¹, 高坂 新一²

¹創価大学・生命科学研究所, ²国立精神・神経センター、神経研究所、代謝研究部

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、細胞外に過剰に存在したり停留すると、ニューロンに対し興奮性毒素として作用するため素早く除去される必要がある。これにはニューロン周囲のグリア細胞が重要な働きをすると考えられている。我々はラットの顔面神経切断時、神経核で活性化ミクログリアがグルタミン酸トランスポーター、GLT-1を強発現する現象を明らかにし、これらのミクログリアがグルタミン酸除去機能を持つ可能性を示した。しかし、これらのミクログリアが実際にグルタミン酸を取り込む活性を有するかどうかは不明であった。そこで今回、顔面神経切断時、神経核に誘導される活性化ミクログリアを培養系に取り出し、¹⁴C-グルタミン酸を使用することによりグルタミン酸取り込み能を検討した。その結果、ミクログリアの示す¹⁴C-グルタミン酸の取り込みは、過剰のコードグルタミン酸の共存下にはほとんど見られないことから、特異的な取り込みであることが示された。また、これらのミクログリアに存在するグルタミン酸トランスポーターは主に GLT-1 であった。以上の結果より、顔面神経切断により神経核に出現する活性化ミクログリアは、グルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸除去能を持つ神経保護的細胞と考えられた。

ミクログリアには beta2 アドレナリン受容体に加え beta1 アドレナリン受容体も発現している

°田中 謙二^{1,2}, 浅井 昌弘², 鈴木 弘美¹, 小野 健治^{1,4}, 澤田 誠^{1,3}

¹藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病共同研究部門, ²慶應義塾大学大学院医学研究科神経精神医学分野, ³さがけ21 科学技術振興事業団, ⁴名古屋市立大学薬学研究科

マクロファージに beta2 アドレナリン受容体が存在することは明らかになっている。副腎髄質から放出されたエピネフリンがこの beta2 アドレナリン受容体を介して、マクロファージの炎症作用を抑制している。マクロファージで観察されるカテコラミン性細胞機能調節が、中枢神経系のマクロファージ様細胞と呼ばれるミクログリアに存在するかどうか明らかにするための基礎的研究として、ミクログリアにアドレナリン受容体が発現するかどうか調べた。ラットミクログリア初代培養とラットミクログリア株細胞 (R1) を用い、アドレナリン受容体の全アイソフォームの mRNA の有無を RT-PCR 法で検討した。受容体が機能的であるかどうかは、細胞内のセカンドメッセンジャーを ELISA で測定し検討した。ミクログリアはマクロファージと異なり、beta2 アドレナリン受容体だけでなく beta1 アドレナリン受容体をも発現していた。beta3 アドレナリン受容体はミクログリア、マクロファージともに発現が認められなかった。ノルエピネフリンは beta2 アドレナリン受容体に親和性が低く beta1 アドレナリン受容体に親和性が高いことに加え、中枢ではエピネフリンよりノルエピネフリンが優位に存在することから、ミクログリアに beta1 アドレナリン受容体が存在することは合目的に考えると都合がよい。さらにノルエピネフリン神経の軸索には、軸索瘤 varicosity と呼ばれる特殊な構造があり、神経終末のみならず軸索瘤からもノルエピネフリンが放出される。このことはシナプスを介さないノルエピネフリンの伝達が存在することを示唆しており、伝達の対象にミクログリアが候補となる可能性がある。当日はノルエピネフリン刺激によってミクログリアで誘導される物質についても報告し、ノルエピネフリン神経がミクログリアの機能をどのように修飾しているのか考察したい。

1P-57

ミクログリア細胞死における caspase-1 ならびに caspase-3 の役割

°氷見 敏行, 森田 育夫, 室田 誠逸

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能

ミクログリアは中枢神経系におけるマクローファージ様の免疫担当細胞であり、脳の障害に反応して増殖や細胞障害性因子の産生を行うことが知られている。炎症反応が終わったときには、過剰なミクログリアはアポトーシスによって細胞数を減らすと考えられている。本研究では単離ミクログリア細胞の培養系を用いて、細胞死の分子機構を検討した。

胎生ラットより混合グリア細胞を調製し、10% FCS を含有する DMEM 中で 10-14 日間培養し、発生したミクログリアを震盪によって単離、播種した。無血清下、mCSF (1 ng/ml) を含む DMEM 中で培養した。

mCSF の除去により細胞中のリン酸化 Akt 及びリン酸化 MAP キナーゼの減少が観察され、最終的に細胞死に至った。この細胞死は非特異的 caspase 阻害剤 zD によって阻害された。また、caspase-1 阻害剤 YVAD-FMK (0.01 mM) と caspase-3 阻害剤 DEVD-FMK (0.01 mM) の共存によって抑制された。しかしながら、YVAD-FMK, DEVD-FMK それぞれ単独では、部分的に細胞死を抑制するにとどまった。

PI3-kinase 阻害剤 wortmannin (500 nM) ならびに LY294002 (100 nM) によって誘導される細胞死は、早い段階でチトクローム C の遊離や caspase-3 の活性化が観察され、この細胞死は DEVD-FMK によって抑制された。反対に、MAP キナーゼ阻害剤 PD98059 (0.1 mM) や U0126 (0.01 mM) によって誘導される細胞死では、チトクローム C の遊離や caspase-3 の活性化は細胞死間際の段階で観察された。また、MAP キナーゼ阻害剤による細胞死は、YVAD-FMK, DEVD-FMK それぞれ単独では、部分的に細胞死を抑制するにとどまり、両者の共存によって強く抑制された。

以上の結果から、mCSF によるミクログリアの生存維持には Akt と MAP キナーゼ両方の活性化が関わっており、Akt 阻害によって誘導される細胞死はミトコンドリア機能障害と caspase-3 活性化を経て進行するのに対し、MAP キナーゼ阻害によって誘導される細胞死は、caspase-1 と caspase-3 の両方の経路を経て進行する可能性が示唆された。

1P-58

オリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体 4F2 の抗原の性質と同定

霜田 靖¹, 吉村 和法^{1,2}, °小林 淳子¹, 桜井 洋子¹, 堂前 直³, 瀧尾 擴士³, 野村 正彦², 阿相 皓晃¹¹都老人研神経生物学部門, ²埼玉医科大学医学部生理学, ³理研生体分子解析室

オリゴデンドロサイトは中枢神経系においてミエリンを形成する細胞である。厳密な細胞系譜に沿ってプロジェニターから成熟したミエリン形成細胞へと分化することが知られているが、その分化を制御する分子機構はまだ明らかになっていない。神経疾患にはミエリンの欠損に起因するものが少なくないことから、その原因や治療法を究明するためにも、オリゴデンドロサイトの分化の制御機構を明らかにすることは重要である。そこで我々は、オリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体を作製し、それを使って分化段階特異的に発現している分子を探索した。

未成熟な培養オリゴデンドロサイトを抗原としてモノクローナル抗体を作製し、オリゴデンドロサイトを認識する抗体のひとつとして 4F2 を得た。in vivo および in vitro での免疫染色により、4F2 の抗原はプロジェニターの段階から未成熟なオリゴデンドロサイトまで発現し、成熟してミエリンを形成する段階では消失することがわかった。このことから 4F2 抗原はオリゴデンドロサイトの細胞系譜を維持する役割を担っていることが示唆された。

4F2 を用いたウェスタンブロットティングにより、胎生 18 日ラット胎児脳ホモジネートでは、80K と 120K のバンドが検出された。免疫沈降により精製された 80K のタンパク質は、ペプチド配列分析により NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) と推定された。SNARE モデルと同様の小胞輸送がオリゴデンドロサイトの分化においても重要であることが示唆された。120K タンパク質の同定についても報告する。

オリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体 12F7 の抗原の性質

°霜田 靖¹, 吉村 和法^{1,2}, 藤牧 香代², 小林 淳子¹, 桜井 洋子¹, 野村 正彦², 阿相 皓晃¹

¹都老人研神経生物学部門, ²埼玉医科大学医学部生理学

オリゴデンドロサイトは中枢神経系においてミエリンを形成する細胞である。厳密な細胞系譜に沿ってプロジェニターから成熟したミエリン形成細胞へと分化することが知られているが、その分化を制御する分子機構はまだ明らかになっていない。オリゴデンドロサイトの分化の制御機構を明らかにする目的で、我々はまずオリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体を作製し、それを使って分化段階特異的に発現している分子を探索した。

未成熟な培養オリゴデンドロサイトを抗原としてモノクローナル抗体を作製し、オリゴデンドロサイトを特異的に認識する抗体のひとつとして 12F7 を得た。成体ラットの免疫組織化学により、12F7 の抗原は小脳の白質に強く発現していることが明らかとなった。さらに免疫電顕により、12F7 抗原は細胞質に局在することがわかった。12F7 を用いたウェスタンブロッティングにより、胎生 18 日ラット胎児脳ホモジネートでは、110K のバンドが検出された。イムノスクリーニングによって行った分子の同定についても報告する。

中枢神経系におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞発生の起源

°中平 英子, 鹿川 哲史, 和田 圭樹, 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

オリゴデンドロサイト (OL) は脊椎動物中枢神経系のミエリン形成細胞である。OL は成体では中枢神経系内全体に存在する細胞であるが、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OLP) のマーカーである血小板由来成長因子 α 受容体 (PDGFR α)、ミエリンプロテオリピド (PLP) の m-RNA の発現細胞の局在により発生初期に OLP は胎生期神経管の腹側の限局された領域から発生すると考えられている。最近の研究から OL の発生も背腹軸に沿って制御を受けており、脊髄では Sonic hedgehog (Shh) など、脊索や脊髄腹側から放出される OL 誘導因子と当研究室で明らかにされた背側から分泌される OL 分化抑制因子の濃度勾配のバランスにより誘導される事がわかってきた (引用文献 1)。最近 PDGFR α や PLP よりも早い OLP のマーカーとして basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である OLG-1, OLG-2 が報告された。そこで本研究では OLG-1/2 の m-RNA の発現を in situ hybridization 法によりマウス発生段階を追って調べ、特に脊髄以外での中枢神経系における OL が最初に発生する位置とそれがどのように中枢神経系全体に広がってゆくのかを PDGFR α の発現と比較しながら検討した。脊髄での OLG-2 の発現は腹側の神経上皮細胞層に限局して始まり、その後局在の変化が PDGFR α とほぼ一致していることから、OL 系譜の細胞に発現していると考えられる。これに比べ前脳の OLG-2 m-RNA は PDGFR α と異なり早くから広範囲に分布が見られた。PDGFR α mRNA の発現は胎生 11 日目に telencephalon と diencephalon の境界あたり、preoptic area 近傍の脳室下層の狭い領域に出現する。OLG-2 では同じ胎生 11 日目に ganglionic eminence の脳室壁層全体を覆うような発現が見られた。また、胎生 12, 13 日目には PDGFR α は前脳では腹側にまばらに存在する細胞のみにしか発現しないが、OLG-2 では腹側以外にも thalamus の第三脳室の脳室壁層 w にも発現がみられた。このような PDGFR α と OLG-2 の発現パターンの不一致から、複数の異なる OL 細胞系譜が存在するか、または前脳では OLG-2 発現細胞のうち一部が OL に分化する事が考えられた。引用文献 1, Wada et al, (2000) Developmental Biology in press

1P-61

Twitcher マウス由来培養シュワン細胞株の樹立

沈 勁松¹, 渡部 和彦³, 大橋 十也^{1,2}, 衛藤 義勝^{1,2}¹慈恵医大DNA医学研遺伝子治療, ²慈恵医大小児科,³都神経研分子神経病理

Twitcher マウスはヒト Krabbe 病のモデルマウスであり, galactocylceramidase (GALC) の先天的な欠損により中枢・末梢神経の脱髄病変を来す。この病変は psychosine (galactosylsphingosine) の蓄積によるオリゴデンドロサイトとシュワン細胞の機能低下・変性によるものと考えられているが, なお不明な点が多い。そこで同マウスの神経系細胞を単離しその特徴を検討することは, 本疾患の発症機序の解明および治療法の開発に重要な意義を持つと思われる。本研究で我々は twitcher マウスからシュワン細胞株を樹立し種々の検討を加えた。生後 20 日の twitcher マウスより頸～腰部後根神経節および連続する末梢神経を採取し初代培養とした。このシュワン細胞を 8～9 ヶ月培養維持したところ, コロニーを形成しはじめ, 不死化したと考えられる細胞株 (336C1) を得ることが出来た。336C1 細胞は蛍光抗体法で S100 蛋白, laminin, p75NTR が強陽性であり, RT-PCR で L1, Po, PMP22, GAP43 が検出され, 明確なシュワン細胞の形質を示し, 週 2 回の継代, 6 ヶ月経過後も不変であった。336C1 細胞の genome PCR により GALC 遺伝子の点変異を認め, 同細胞の GALC 活性は著明に低下していた (正常対照マウス・シュワン細胞株 IMS32: 42.8 ± 1.0 nmol/mg/hr; 336C1 細胞: 0.7 ± 0.0 nmol/mg/hr)。さらに, 336C1 細胞において psychosine の蓄積が認められた (IMS32 細胞: 2.8 ± 0.2 pmol/mg; 336C1 細胞: 14.7 ± 1.2 pmol/mg)。また, GALC は正常シュワン細胞株 IMS32 から培養液中に分泌されるが, その培養液で 336C1 細胞を培養することにより 336C1 細胞の GALC 活性上昇 (2.6 ± 0.3 nmol/mg/hr) を認めた。これは GALC の endocytosis による cross-correction 現象と考えられ, mannose-6-phosphate 負荷により部分的に阻害された。一方, LacZ 組換えアデノウイルスは 336C1 細胞にはほぼ 100% の効率で感染し, GALC 組換えアデノウイルスの感染により GALC 活性の著しい増加 (45.6 ± 13.7 nmol/mg/hr) を認めた。以上のことから, 本研究で得られた twitcher シュワン細胞株は, twitcher マウスの神経病変を解析しその治療法を検討する上で有用であると考えられた。

1P-62

培養ミクログリア活性化のプロテインキナーゼによる制御

中村 洋一, 米田 幸雄

金沢大・薬・薬理

ミクログリア異常活性化により産生される大量の一酸化窒素 (NO) は様々な中枢神経疾患の病因となりうる。とされているが, NO 産生に関わる細胞内情報伝達過程については不明な点が多い。本研究では C キナーゼ (PKC) によるミクログリア活性化制御機構を解明する目的で, 培養ミクログリアをリポポリサッカライド (LPS) で刺激した場合の NO 産生について, 様々な PKC 阻害剤等の効果について検討した。

培養ミクログリアを 10 ng/ml LPS で刺激したときの NO 産生は, staurosporine により 0.01-10 nM の濃度域で濃度依存的に数倍に増強された。staurosporine は高濃度域で PKA も阻害するとされているが, 特異性の高い PKA 阻害剤である H89 は NO 産生に影響を与えなかった。一方他の PKC 阻害剤 Goe6976 は staurosporine と反対に NO 産生を阻害し (IC_{50} はおよそ 20 nM), もう一つの PKC 阻害剤 Ro-32-0432 は NO 産生に影響を与えなかった。興味深いことに, PKC 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) も 1-10 nM の濃度域で NO 産生を増強した。これは長時間の PMA 処置に起因する PKC のダウンレギュレーションによるものである可能性が高い。

これらの結果を総合すると, ある特定種の PKC アイソフォーム (例えば δ 型) の阻害あるいはダウンレギュレーションが NO 産生を増強し, 他の種 (例えば μ 型) の阻害は NO 産生の抑制の原因となっていることが示唆される。アイソフォーム特異性の異なる阻害剤により様々な効果をおよぼす事実は, PKC アイソフォームの各々が様々なミクログリアの機能制御に関与していることを示している。

1P-63

PASII/PMP22 タンパクは CLAUDIN SUPERFAMILY に属するか？

°植村 慶一^{1,3}, 武田 泰生², 韓 春錫¹, 北村 邦男³

¹慶應義塾大学医学部生理学, ²東京都老人総合研究所,

³埼玉医科大学生理学

末梢神経ミエリンには2種の主要糖タンパク:P0とPASII/PMP22が存在する。PASIIの発現の量的異常または点変異は遺伝性ニューロパチーの原因となる。最近、中枢神経系のoligodendrocyte-specific protein (OSP)がclaudin familyに属し、ミエリンのradial componentに局在することが示された。PASIIはOSPと類似の構造を示すので、PASIIのclaudin superfamilyに属する可能性を検討し、その機能解析を行った。PASIIとOSPは共に4回膜貫通型であるが、N型糖鎖数はPASIIは1、OSPは0であり、両者のアミノ酸残基の一致率はヒト、マウスともに21%であった。この一致率はsuperfamilyの範囲内であるが、claudinのアミノ酸配列中の重要な骨格が不明のため結論は保留された。ラットC6細胞にPASIIcDNAを含むpBactSTneo発現ベクターを導入してPASII発現細胞系を確立して機能解析を試みた。PASII発現細胞の細胞増殖およびBrdUの取込みはコントロールの細胞に対して明らかに低く、PASII発現によって細胞増殖の抑制が示された。細胞接着能に関しては、P0発現細胞が強い同種性の接着能を示すのに対し、PASII発現細胞は有意の細胞接着能を示さなかった。脊髄後根神経節細胞をPASII発現細胞と共培養すると神経突起伸展の有意の抑制が見られ、P0発現細胞が突起伸展を促進することと対照的であった。PASIIの空間的、時間的発現様式はP0と類似しているが、両者の生理的機能は明らかに異なっており、PASIIはシュワン細胞の発達過程において、増殖と分化の変化点に働く可能性がある。claudin発現細胞が強い細胞接着能を示し、隣接の細胞とタイトジャンクションを形成するのにに対し、PASII発現細胞の細胞接着能が低かったこと、末梢神経ミエリンのradial componentの存在が不明なことなど、現在のところ、PASIIがclaudin superfamilyに属する可能性を支持する結果は得られていない。

1P-64

有髄軸索上の電位依存性Na⁺およびK⁺ channel局在におけるスルファチドの重要性

°石橋 智子^{1,2}, 池中 一祐¹, 平原 幸恵³, 本家 孝一⁴,

西野 仁雄², 馬場 広子²

¹生理学研究所神経情報部門, ²名古屋市立大学医学部第二生理, ³大阪府立母子保健総合医療センター研究所,

⁴大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学 生化学・分子生物学講座

脊椎動物有髄神経線維では、活動電位の発生・伝達に関与している電位依存性Na⁺ channelはnodeに、軸索とミエリンが接するparanodeにはParanodin/Contactin-associated protein (Caspr)が、それに接するjuxtaparanodeにはK⁺ channelがそれぞれ部位特異的にクラスターを形成している。これらの蛋白の局在化にはオリゴデンドロサイトまたはミエリン膜に関与していると考えられているが、詳細な機序は明らかにされていない。この局在化に関わるミエリン膜上の分子を明らかにする目的で、我々はミエリン特異的に局在する糖脂質であるスルファチドを合成する酵素、Cerebroside sulfotransferase (CST) 欠損マウスにおけるこれら軸索上の蛋白質局在の変化を解析した。CST欠損マウスは、生後6週齢頃から神経症状が出現し、電子顕微鏡検索ではcompact myelinが形成されているにもかかわらず、paranodal junctionの形成異常があることが確認されている。免疫組織学的検索の結果、コントロールマウスと比較して、(1)Na⁺およびK⁺ channelクラスターの減少、(2)nodeの長さの延長、(3)通常では認められないparanode部位におけるK⁺ channelクラスターの存在、(4)paranodeでのCasprのクラスター消失とinternodeにおけるびまん性の局在、などcompact myelinが存在するにもかかわらず、軸索における蛋白の局在化の明らかな異常が認められた。これらの変化は発達に伴い顕著であった。以前に報告されているガラクトセブロシドおよびスルファチドの欠損しているCeramide galactosyltransferase (CGT) 欠損マウスと比較すると、CGT欠損マウスでは同様の異常が高頻度に認められた(Dupree et al. 1999)。したがって、絞輪周辺部の軸索上の正常な蛋白質局在はparanode形成に依存していること、そしてparanode形成にはスルファチドが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

1P-65

ミエリン DM20 のアミノ酸配列を使った系統解析では現生魚類の中で肺魚が四足動物に最も近縁である

°遠山 陽子¹, 一宮 智美¹, 吉田 弘美¹, 曹 纓², 長谷川 政美², 小嶋 久子³, 玉井 洋一³, 栗原 正¹

¹創価大・生命科学研究, ²統計数理研, ³北里大・医・生物学

シーラカンスの脳には哺乳類 PLP の抗体と強い交叉反応を示すタンパクが存在し、シーラカンスが現生魚類の中で四足動物に最も近縁であることの証拠とされる (Wachneldt ら 1989)。我々はシーラカンスの PLP/DM20 遺伝子をクローニングし、エクソン部分の配列からタンパクのアミノ酸配列を推定した (遠山ら 1999)。発現するタンパクは DM20 であった。DM20 のアミノ酸配列を比較する限り、シーラカンスは他の魚類特に肺魚にくらべても四足動物に似ていて、Wachneldt らの結果を追認した。ところが、DM20 のアミノ酸配列から系統樹を構築すると肺魚の方がシーラカンスよりも四足動物に近縁に見えた。肺魚 DM20 は部分配列しか利用できず、系統解析は不十分と思われた。そこで我々は、肺魚の脳から DM20 の cDNA をクローニングし、DM20 の全アミノ酸配列を決定した。5 つの可能な系統樹を DM20 の配列でテストしたところ、最尤法は系統樹 1 [((tetrapods, lungfish), coelacanth), zebrafish, shark] 又は系統樹 5 [((tetrapods, lungfish), (coelacanth, zebrafish), shark) を支持した。両系統樹とも現生魚類の中で肺魚が四足動物に最も近縁であることを示唆する。

1P-66

末梢神経ミエリン糖蛋白質糖鎖の加齢による変化

°北村 邦男, 関 剣虹, 坂本 安, 野村 正彦
埼玉医科大学第一生理

ウシ末梢神経ミエリンの P0 糖蛋白質の主成分糖鎖はハイブリッド型の GP3, GP4, GP5 が主成分であり、PASII/PMP22 では複合型の OPPE1 が主成分である。これら糖鎖は全て硫酸含有糖鎖であり、P0-G5 と PASII-OPPE1 は硫酸化グルクロン酸を含有することが明らかとなっている。今回、これらの糖蛋白質糖鎖構造が成長の過程や加齢によって変化するかどうかを、生後 5 日齢から数ヶ月齢ラットおよび老齢ラットとして 2 歳および 3 歳のラットの各末梢神経を使用して検討した。末梢神経よりミエリン画分を得た後、プロテアーゼ消化により糖ペプチド画分を、更に糖ペプチドをグリコペプチダーゼ A 消化を行いオリゴ糖を得た。これらのオリゴ糖はビリジルアミノ化による蛍光標識をした後、HPLC により分析した。その結果、今回検討した全年齢において 2 つの主成分ピーク (AYA-1 と AYA-2) が観察された。両者とも硫酸化された糖鎖であり、その内の 1 つ (AYA-2) はハイブリッド型のウシ P0-GP3 と一致した。これらの主要なピークの加齢による大きな変動はなかったが、全体的なパターンは、ミエリン形成期である 9 日齢以前と一ヶ月齢以降では明らかな違いが認められた。最も明瞭な違いは、高マンノース型の糖鎖が 9 日齢以前のミエリンには多く存在し、一ヶ月以降では殆ど存在しないことであった。AYA-1 の構造はまだ未決定であるが、このものは幼若期に多く、14 日齢までは減少した。その他、加齢によって増加するもの、減少するものがマイナーな成分として観察された。ラットには P0-GP5 糖鎖および PASII-OPPE1 糖鎖に相当する糖鎖は存在しないか、あったとしても極めて微量であろうと考えられた。以上のことから、ミエリン形成初期のミエリン形成細胞においてはハイマンノース型から複合型あるいはハイブリット型へ変換する種々の糖転移酵素が未発達であり、ミエリン形成が完了する時期において成熟型の合成系が完成するものと考えられた。その後の糖蛋白質糖鎖合成系は老化によっても殆ど変化しないと考えられた。

The paraneoplastic neurological syndrome antigen-specific cytotoxic T lymphocytes may not be a primary cause of the autoimmune neuronal degeneration in mice.

^oJunko Takeda^{1,2}, Yukio Sato², Tetsuji Mori¹, Takuya Nikaido¹, Ken Iseki¹, Seita Hagino¹, Yuxiang Zhang¹, Hiromi Takaki¹, Mayumi Takeuchi¹, Sachihiko Yokoya¹, Akio Wanaka¹

¹Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University School of Medicine, ²Department of Internal Medicine II, Fukushima Medical University School of Medicine

Paraneoplastic encephalomyelitis or sensory neuropathy (PEM/PSN) is a rare disorder associated with certain type of cancer and is thought to be immune-mediated. Patients with PEM/PSN harbor characteristic anti-neuronal autoantibody in their sera and cerebrospinal fluid, which may cause neuronal damage. However, recent studies suggested that the antibody itself is not pathogenic. Rather, the presence of T-cell infiltrates in the nervous system and peripheral activation of specific cytotoxic T cells (CTLs) in patients with the PEM/PSN implicate that the disease could be primarily mediated by a CTL response against autoantigens. In the present study, we tried to induce systemic Th1 immune response with CTL activity in a mouse to see whether such an immune response can cause neuropathological symptoms. We chose mouse Hel-N1 (Mel-N1) as a model antigen, because it belongs to Hu antigen family that is one of the most popular autoantigen of the PEM/PSN. We immunized mice with recombinant Mel-N1 protein together with oligonucleotide that contains an unmethylated CpG dinucleotide motif. Such a DNA sequence is known as an immunostimulatory DNA sequences, which is a potent adjuvant for systemic Th1 immune responses. The mice showed high Mel-N1 antigen-specific CTL activity and a Th1- biased immune response. Control mice immunized only with oligonucleotide did not show such a specific cellular immune response. The mice with cellular immune response inhibited growth of transplanted syngeneic tumor that expresses Mel-N1 antigen. However, they have not so far showed overt symptoms including sensory deficits and infiltration of immune cells into brain parenchyma. These results suggest that peripheral activation of specific CTLs may not be a primary cause of the autoimmune neuronal degeneration.

Histological Analysis of Mice Lacking LIM Homeobox Transcription Factor, L3/Lhx8

^oTetsuji MORI, Yuxiang ZHANG, Hiromi TAKAKI, Mayumi TAKEUCHI, Takuya NIKAIIDO, Ken ISEKI, Seita HAGINO, Junko TAKEDA, Sachihiko YOKOYA, Akio WANAKA
Department of Cell Science, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University

It is known that LIM Homeobox (Lhx) transcription factors are involved in the development of the various organs. We isolated L3/Lhx8, one of the Lhx family members, and have analyzed its function. In the central nervous system (CNS), L3/Lhx8 mRNA was expressed only in the Medial Ganglionic Eminence (MGE), where many neural progenitors exist and they differentiate into the globus pallidus. In order to study L3/Lhx8 function in vivo, we generated KO mice and did histological analysis. We performed in situ hybridization histochemistry or immunohistochemistry for molecular markers (Dlx1/2, Dlx5, Gbx2, Nkx2.1, Lhx6, Shh) identifying Lateral Ganglionic Eminence (LGE : the origin of the striatal cells) or MGE and for neurotransmitters (GABA, Substance P and Enkephalin). As for these gene products, there was no overt difference between KO mice and wild type mice. Next, it was recently shown that MGE has a crucial role for the formation of the thalamocortical tract. We are now investigating this tract's development of KO mice by injecting fluorescent tracer Dil into the dorsal thalamus. KO mice exhibited a phenotype of cleft palate and died soon after birth. L3/Lhx8 mRNA was expressed in the first branchial arch during the mid gestation period. This expression may be crucial for palate formation and neonatal KO mice could die of respiratory failure. The primary structure of L3/Lhx8 shows the highest homology to Lhx6. They compose a subgroup within the Lhx family and their gene expression domains overlap significantly. This, together with phenotype of KO mice, suggests that Lhx6 might compensate L3/Lhx8 function in the CNS of KO mice, rendering the brain structure to appear normal. On the other hand, in the palate formation, L3/Lhx8 may have unique role(s) and Lhx6 could not substitute for L3/Lhx8.

1P-69

P19 神経細胞分化における長鎖の Lewis X エピトープ糖脂質の発現

°小山内 たか¹, Chai Wengang², 田島 陽一³, 霜田 靖⁴, 佐内 豊³, Yuen Chun-Ting²

¹都臨床研、生命情報, ²英国医学研究機構, ³都臨床研、生命情報, ⁴都老人研、神経生物

レチノイン酸(RA)の刺激によって神経細胞へ分化する P19 細胞を用いて、神経系の分化過程における LeX エピトープ糖脂質分子の構造解析、糖脂質合成酵素活性、糖脂質合成酵素遺伝子の発現、局在など系統的に検討した。構造解析には、RA 処理による凝集塊細胞から LeX エピトープ糖脂質を抽出した。TLC-LSIMS で解析した結果、5、7、8 単糖の LeX エピトープを持つ 3 種類の糖脂質が同定された。今回は LeX エピトープ糖鎖合成に関与する糖脂質、糖タンパク質、PA 化糖鎖合成酵素活性を測定した。これらの活性は共に神経細胞で高くなっていた。糖脂質合成酵素活性の方が糖タンパク質合成酵素活性よりもはるかに高く、PA 化糖鎖合成酵素活性は未分化細胞の約 30 倍にも達していた。マウスでは特異的な α -1,3 フコース転移酵素は Fuc-TIV と Fuc-TIX で、RT-PCR 法によって遺伝子発現を検討した。Fuc-TIV (511 bp) 遺伝子の発現は凝集塊細胞のみに見られたが、神経細胞では消失していた。一方、Fuc-TIX (530 bp) 遺伝子の発現は未分化細胞、凝集塊細胞、神経細胞に見られたが、未分化細胞よりも凝集塊細胞と神経細胞で顕著に強くなっていた。HRPT 遺伝子の発現量はどの細胞にも変化はなかった。以上の結果から、RA によってフコース転移酵素 Fuc-TIX 遺伝子の発現が増強され、長鎖の LeX エピトープ糖脂質が合成されることが認められた。

1P-70

Identification of Forssman glycolipid in the brain of Brn1/2 deficient and wild type mouse fetus

°Tamotsu TAKETOMI¹, Yoshinobu SUGITANI², Tetsuo NODA², Hiroya HIDAKA³, Minoru TOZUKA³, Tetsuo NAKABAYASHI³, Tsutomu KATSUYAMA³

¹Shinshu Clinical Lipid Reaserch Institute, ²Cancer Institute, Dept. of Cellular Biology, ³Shinshu Univ.Sch.Med.Central Clinical Lab.

Gene transcription regulating factors, Brn1/2 are found in the CNS during fetal period and act for its formation. Cerebral sphingo(glyco)lipids were compared between different types of fetal mice of 17.5 days, that is, (O/O) type of Brn1(-/-)Brn2(-/-), litter mates (E/E) type of Brn1(-/+)Brn2(-/+) and (W/E) type of Brn1(+/-)Brn2(-/+), and wild (W/W) type of Brn1(+/-)Brn2(+/-). A crude sphingolipid fraction was prepared by mild alkaline hydrolysis of total lipid extracted from the fetal cerebral tissue. It was analyzed by DE MALDI-TOF MS in reflector mode with 2,6-dihydroxy benzoic acid as a matrix. The neutral sphingo(glyco)lipids were identified in positive ion mode, and the acidic sphingoglycolipids done in negative ion mode. As results, in the (O/O) fetus showing abnormal growth of the cerebral cortex and in the (W/E), (E/E) and (W/W) ones showing its normal growth, various sphingo(glyco) lipids were found a little different quantitatively, but qualitatively almost similar. Thus, Brn1/2 did not seem to be directly associated with the expression of sphingo(glyco)lipids for the formation of CNS. However, Forssman glycolipid which is an important differentiation antigen at embryonic stages in Forssman-positive mice, were found in the cerebral tissues of all mice used for the experiment, although it has not yet been chemically identified in the postnatal or adult mice. Cerebroside and sulfatide were quantitatively much less than sphingomyelin, suggesting the fetal brain just before birth. However, the most important gangliosides in the cerebral cortex were unable to be clearly identified, indicating how the metabolic pathway of globo-series like Forssman glycolipid disappears, and that of ganglio-series appears in the development of the postnatal brain remain to be clarified.

ニューロンにおける necdin 結合蛋白質の 同定と解析

°谷浦 秀夫¹, 谷口 直子¹, 高山 千利², 新延 道夫¹,
吉川 和明¹

¹阪大・蛋白研・機能制御, ²北大院・医・解剖

Necdin は、神経系の発生分化に伴って発現誘導され、ニューロンに特異的に発現している 43kDa 蛋白質である。Necdin を強制発現させた細胞はその増殖が強く抑制される。また necdin は細胞周期制御に関わる転写因子 p53 および E2F1 と結合して転写活性を抑制する。これらのことから necdin はニューロン分化に伴う分裂終了の誘導、維持機構に関与していることが示唆される。マウス胚性がん P19 細胞は多分化能を持ち、レチノイン酸処理によりニューロンに分化する。Necdin はレチノイン酸による分化刺激により P19 細胞で発現誘導される。そこで necdin の E2F1、p53 結合ドメインを bait として酵母 two-hybrid 法でレチノイン酸処理をした P19 細胞 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、カルシウム (Ca) 結合蛋白質 NEFA と核マトリックス蛋白質 hnRNP U が necdin 結合蛋白質として同定された。in vitro 結合実験で necdin 結合部位を調べたところ、necdin は NEFA の Ca 結合ドメインである EF hand 領域に、また hnRNP U の C 末端多グリシン領域のすぐ N 末側に結合することがわかった。次にそれぞれに対する抗体を作製し分化ニューロンにおける分布を調べてみた。Necdin はニューロンの核および細胞質の両者に存在するが、NEFA は主に細胞質、hnRNP U は核に存在していた。NEFA についてさらに免疫電顕を行ったところニューロンの小胞体および核膜に局在し、Ca 貯蔵に関与していることが示唆された。hnRNP U は核マトリックスを介してクロマチンの高次構造の変化に関与していると考えられている。常法にしたがって分化ニューロンより核マトリックスを調製したところ hnRNP U のみならず necdin もまた核マトリックスに存在することがわかった。免疫沈降法で内在性蛋白質の結合を調べてみた。Necdin と NEFA との結合については 1% Triton X-100 で可溶化した細胞質画分を、hnRNP U との結合については 0.1% SDS で可溶化した核画分を用いたところ、それぞれの特異的抗体でのみ necdin との結合が検出された。以上の結果、necdin はニューロンにおいて NEFA を介して細胞質の Ca 濃度調節、hnRNP U を介して核の高次構造の変化に関与しているものと推定される。

Ashwagandha 成分 withanolide A と withanoside VI による神経突起伸張作用

°久保山 友晴¹, 東田 千尋¹, 趙 静², 服部 征雄², 小松 かつ子¹

¹富山医科薬科大学和漢薬研究所附属薬効解析センター,

²富山医科薬科大学和漢薬研究所薬物代謝工学部門

【目的】これまでに我々は、アーユルヴェーダ生薬 Ashwagandha (ナス科 *Withania somnifera* Dunal の根) のメタノールエキスが、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞の神経突起を multi-polar に伸展させ、それが主として樹状突起であることを明らかにした。そこで、Ashwagandha メタノールエキス中の神経突起伸張作用を担う成分を単離、同定し、それらの成分の作用機序を明らかにする目的で本研究を行なった。

【方法】Ashwagandha メタノールエキスより 11 種の化合物を単離し、構造を決定した。これらの化合物を SK-N-SH 細胞液に加え、5～6 日培養後に、長さ 50 μm 以上の神経突起を有する細胞の割合を測定した。また、各種 protein kinase 阻害剤を化合物と同時に細胞液に加え、その効果を検討した。

【結果と考察】Ashwagandha メタノールエキスより、withanolide A、withanolide B、withanolide D、27-hydroxywithanolide B、withacoagin、withanoside V、withanoside VI、withanoside VIII、withaferin A、b-sitosterol、daucosterol を単離した。そのうち、withanolide A (WL-A) と withanoside VI (WS-VI) が強い神経突起伸張作用を示し、その効果はいずれも 0.01～1 μM の範囲で用量依存的だった。また WL-A と WS-VI は共に、Ashwagandha メタノールエキスと同様、multi-polar な神経突起の割合を増加させた。WL-A と WS-VI の作用に対する PKA、PKG、PKC、MAPK kinase 及び CaM kinase II の阻害剤の効果を検討した結果、WL-A (1 μM) は KN-93 (0.5 μM) に、WS-VI (1 μM) は PD-98059 (10 μM) により、最も強く神経突起伸張作用が抑制された。以上、Ashwagandha メタノールエキスから神経突起伸張作用を有する成分として WL-A と WS-VI を同定した。また、WL-A と WS-VI の作用経路にはそれぞれ CaM kinase II、MAPK kinase が少なくとも一部関与していることを明らかにした。

1P-73

発達中のマウス小脳で特異的に発現する遺伝子の解析

°古市 貞一, 中村 浩, 鏡 良弘, 佐藤 明
理化学研究所脳科学総合研究センター分子神経形成研究チーム

マウス小脳の回路網形成と構造上の完成は多種多様な発達ステージを経て生後の3週間でほぼ成し遂げられる。従ってマウス小脳は特異的な遺伝子発現と脳回路形成におけるそれらの重要性を調べるには適していると言えよう。このような特異的な遺伝子を単離する目的で、我々は2つの方法を用いた(蛍光ディフュージョン・ディスプレイ [FDD] と Affymetrix GeneChip 遺伝子発現解析)。これまでの FDD 解析から全表示 DNA 断片の約 17% (11,700 FDD 断片中約 2,300) が小脳発達期に特異的に発現することが示された。これらの特異的に表示された FDD 断片 (17%) はその発現プロファイルから 3 グループに分類された (遺伝子発現の低下調節 [6%]、一過性調節 [3%]、上昇調節 [8%])。一方、GeneChip 解析からは既知遺伝子や EST を含むマウスの 13,179 遺伝子 (Mu 11K subA と subB アレイを使用) のうちの 58.1% が小脳に発現して、6.3% (小脳発現遺伝子の 10.9% に相当) が生後発達期における発現レベルにおいて 4 倍以上の増減差を示すことが明らかとなった。これらの特異的な遺伝子はその発現プロファイルから、あるいはデータベースから機能的な注釈が得られればその特性からも、クラスター分類することができた。現在、我々は小脳生後発達のステージに特徴的な発現プロファイルを示すいくつかの EST についてその完全長 cDNA のクローニングを行っている。本報では cDNA クローニングを含むその後の研究について討議する予定である。

1P-74

初代培養下神経細胞の自発的発火頻度の変化における抑制性シナプスの役割

°根岸 隆之¹, 石井 寿幸¹, 河村 晴次¹, 吉川 泰弘¹, 黒田 洋一郎²

¹東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室,

²都立神経研究所・神経生化学

初代培養下神経細胞は高密度神経回路網を形成する結果、シナプスを介し自発的かつ周期的に発火する。これは細胞内カルシウム濃度の周期的変化 (シンクロナスオシレーション) として観察できる。また、この現象は NMDAR 選択的アンタゴニストにより阻害されることから興奮性シナプスが重要な役割を果たしていると考えられる。今回、我々はこのシンクロナスオシレーション頻度の経時的変化と抑制性シナプスの関係を検討した。

(材料と方法) 胎齢 18 日 SD ラット胎仔より得られた大脳皮質神経細胞を 10% FCS 含有 DMEM にて培養した。オシレーション頻度はカルシウム蛍光指示薬 Fura-2 を用いた細胞内カルシウム濃度の変化により計測した。興奮性および抑制性シナプスを調べるために、それぞれ Western blotting 法により NMDAR1、GABA_AR を半定量した。また神経細胞および前シナプスの動態を知るために同様にそれぞれ MAP-2、Synaptophysin の経時的半定量を行った。

(結果) オシレーションは培養 3 日目から観察され、その頻度は 10 日目に最も高く (0.17 Hz) なり以後減少した。単位面積あたりの総タンパク量は培養 5 日目に最高値をとり以後減少した。NMDAR1 の密度は培養 7、10、14 日目ではほとんど変化せず 18 日目に減少した。他方、GABA_AR の密度は培養 18 日目まで上昇しつづけた。MAP-2 の密度は培養 7 日目で以降減少した。Synaptophysin の密度は培養 7 日目以降、顕著に上昇した。

(考察) 培養 7 日目以後において単位面積あたりの総タンパク量および MAP-2 が減少していることは神経細胞を含む初代培養下細胞の消失を示唆する。しかしながらオシレーション頻度は 7 日目から 10 日目にかけて上昇し、Synaptophysin は一貫して著しい増加を示しているため神経回路は 7 日目以降も成熟を続けると考えられる。オシレーション頻度は培養 10 日目から 14 日目にかけて著しく減少しているが、NMDAR の密度はほとんど変わらず GABA_AR の密度は増加した。以上より培養 7 日目以降のシンクロナスオシレーション頻度の変化は神経細胞の生死だけでなく、神経回路の成熟および抑制系の発達が関与している可能性が示唆された。

1P-75

培養ニワトリ胚 DRG neuron に対する抗ガン剤の細胞毒性とラディシコール、ゲルダナマイシンによるその抑止効果

°佐野 護

京都府立医科大学生物医学

培養ニワトリ胚 DRG neuron は、充分量のニューロトロフィン添加状態で、シスプラチン、ビンクリスチン、タキソールなどの抗ガン剤などに極めて感受性が高く、細胞死が引き起こされる。そのような培養系に 20nM のラディシコールを加えると効果的にその細胞死が抑制された。ラディシコールの神経栄養因子様の効果については既に報告した (Sano et al., 1998, J. neurochem. 72, 2256)。最近、ラディシコールとゲルダナマイシンの共通の細胞内の標的がヒートショック蛋白質 HSP90 であり、その作用を阻害する可能性が報告されている (Schulte et al., 1999)。今回、低濃度 (2nM) のゲルダナマイシンが、ニューロトロフィンの添加、無添加状態で、ラディシコールと同様に、ニワトリ DRG neuron の培養に栄養因子作用を示す事実を認めた。しかしゲルダナマイシンは、より高濃度 (5nM) では、細胞毒性が認められた。ラディシコール、ゲルダナマイシンそれぞれのトロフィックな濃度を同時添加した場合にも、細胞毒性が認められた。今回得られた諸結果は、これらの薬物の類似した神経栄養因子作用が、同一の標的 HSP90 に対する作用である可能性を示唆している。

1P-76

PC12 細胞の分化における低親和性受容体 p75^{NTR} の役割

°伊藤 久則, 野元 裕, 古川 昭榮

岐阜薬大・薬・分子生物

神経細胞への分化の過程でニューロトロフィンは重要な役割を果たしている。この神経分化機構を明らかにするため、神経分化のモデルとしてよく用いられている PC12 細胞の変異株を作製することを試みた。PC12 細胞に神経成長因子 (NGF) 遺伝子を導入したところ、NGF を安定的に産生、分泌し、かつ盛んに増殖する細胞株を得た。この細胞は、短い突起を伸ばしているが、増殖を停止しないという点で神経細胞への分化とは相反する。そこで、この変異 PC12 細胞を解析し、これまでとは異なる視点から神経分化の分子機構にアプローチした。今回得られた変異 PC12 細胞を PC84 細胞と総称し、親株の PC12 細胞との比較により解析を行った。

PC84 細胞は活性のある NGF を分泌しており、分泌された NGF は TrkA を介して突起の伸長を誘導するが、PC84 細胞の増殖能には関与していなかった。PC84 細胞では分化マーカーの NF-M の発現と AChE 活性の上昇がみられ、分化細胞としての性質を持っていたが、分化した PC12 細胞よりもその分化レベルは低かった。また、NGF レセプターの TrkA と p75^{NTR} の発現量を親株 PC12 細胞と比較すると、TrkA の発現量に違いはみられないのに対し、p75^{NTR} の発現量が PC84 細胞で明らかに減少していた。この PC84 細胞に p75^{NTR} の発現プラスミドを導入し、p75^{NTR} の発現を上昇させると長い突起の伸長が観察された。このことから、PC84 細胞は、p75^{NTR} の発現の減少により増殖の停止あるいは突起の伸長が不完全であることが考えられる。また、アンチセンスにより p75^{NTR} の発現を抑制した PC12 細胞は、未処理の PC12 細胞と比較して、NGF によって誘導される突起の長さが短くなり、分裂を繰り返す傾向があった。

以上の結果より、低親和性レセプター p75^{NTR} の発現の程度によって PC12 細胞の NGF に対する応答感受性が変化し、PC12 細胞の分化に影響すると考えられる。また、p75^{NTR} 欠損マウスの交感神経細胞におけるニューロトロフィンの突起伸長の誘導あるいは生存についても検討しており、その結果についてもあわせて報告する。

1P-77

6-OHDA 投与ラットのドーパミンニューロン変性に及ぼすインスリン様成長因子-1(IGF-1)の効果

°柏原 健一, 真邊 泰宏, 割田 仁, 村上 哲郎, 阿部 康二
岡山大学医学部神経内科

インスリン様成長因子-1(IGF-1)は神経栄養因子の1種であり、ラットの坐骨神経障害に対して IGF-1 を投与するとその再生を促すことが知られている。中枢神経系でも神経細胞やグリアの障害に保護的に作用する可能性が指摘され、筋萎縮性側索硬化症患者への皮下投与で症状進行抑制効果も報告されている。IGF-1 は生存シグナルの伝搬に介在する Akt を活性化することも知られ、筋萎縮性側索硬化症以外の神経変性疾患についても進行抑制効果が期待される。本研究はパーキンソン病における黒質ドーパミンニューロンの変性脱落到に対する IGF-1 の効果を検討する目的で行った。すなわちラットの一側内側前脳束に 6-OHDA を投与、同時に IGF-1 の 1 または 10 μ g/kg/日を浸透圧ミニポンプを用い脳室内投与開始した。コントロール群には生食を同様に投与した。2週間後アポモルフィン 0.05 mg/kg を皮下投与し、回転行動を測定したところ、IGF-1 投与群では容量依存性に回転数が低値であった。IGF-1 持続投与によりドーパミン枯渇による受容体感受性亢進が抑制されたと考えられた。行動実験後断頭し、黒質のチロシン水酸化酵素(TH)陽性細胞を免疫組織化学的に検出したが、TH 陽性細胞はコントロール群も IGF-1 投与群も同様に減少していた。本実験条件下では IGF-1 は 6-OHDA による黒質ドーパミンニューロンの脱落を抑制しないが、線条体におけるドーパミン放出を維持することで機能的にドーパミン伝達性を改善、あるいはシナプス後受容体感受性変化を抑制した可能性が考えられた。

1P-78

培養海馬ニューロンにおける synaptic bouton の数を BDNF は増大させる。

°安達 直樹¹, 沼川 忠広^{1,2}, 松本 知也¹, 横幕 大作¹, 畠中 寛¹
¹阪大院 蛋白研 蛋白質合成部門, ²日本学術振興会 特別研究員

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、ニューロンの生存維持や分化促進といった役割に加え、シナプスの可塑的な変化への役割が明らかにされている。これらシナプス可塑性への効果には、シナプス長期増強(LTP)や神経伝達物質放出の増強が注目されている。しかし、これらの現象のメカニズムには、未だ不明な点が多い。本研究では、培養海馬ニューロンにおいて長期間の BDNF 処理によって、synaptic bouton の増加が観察されたので報告する。出生後すぐのラットから海馬の初代培養ニューロンを調製し、培養3日目から、5-10日間の BDNF の添加をおこなった。その後、蛍光指示薬 FM1-43 によって synaptic bouton を標識し、共焦点レーザー顕微鏡下に観察した。その結果、BDNF 添加群において synaptic bouton の有意な増加を観察した。このことは、BDNF が神経伝達物質の放出部位を増加させていることを示唆している。細胞体から 50 μ m 以内の神経繊維でも若干の増加を観察したが、差は有意ではなかった。神経突起の枝分かれには BDNF による効果は観察されなかった。BDNF による synaptic bouton の増加は、形態的にみて錐体細胞様のものでよく観察された。これらの結果は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出機構が、BDNF によって増強されている可能性を示しており、現在、直接培養海馬ニューロンからのグルタミン酸放出量の測定を試みている。また、このような神経伝達物質放出部位の増加が、BDNF 特異的な作用であるのかについても検討中である。

1P-79

中脳黒質ニューロンに対する BDNF の栄養因子作用における細胞質型チロシンホスファターゼ Shp-2 の役割

°高井 里美, 山田 雅司, 小清水 久嗣, 荒木 敏行, 畠中 寛

大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、ニューロンの分化や生存、また可塑性の制御に関わることが知られており、受容体型チロシンキナーゼである TrkB に結合してその機能を発揮する。Shp-2 は、N 末端に 2 つの SH2 ドメインをもつ細胞質型チロシンホスファターゼで、その発現は脳、心筋、骨格筋に極めて高く、その他の臓器にも広く認められる。特に、神経細胞においてはシナプスを中心に分布している。Shp-2 は上皮増殖因子 (EGF), 血小板由来増殖因子 (PDGF) 等の様々な増殖因子によって活性化され、増殖シグナルを正に制御すると考えられている。我々は既に BDNF による細胞内シグナルに Shp-2 が関与していることを培養中枢大脳皮質ニューロンを用いて報告してきた。今回、パーキンソン病の際に脱落することが知られている黒質ドーパミン作動性ニューロンに着目し、Shp-2 の野生型及び変異体を発現するアデノウイルスベクターを用いて Shp-2 の機能解析を行った。用いたアデノウイルスは 3 種類で、i) 野生型、ii) 463 番目のシステイン残基をセリン残基に置換してホスファターゼ活性を不活化した変異体 (C/S 変異体)、iii) ホスファターゼドメインを含む C 末端領域を欠失させた変異体 (Δ P 変異体) である。出生直前のラットより培養した黒質ニューロンにこれらのアデノウイルスを感染させて 2 日後より BDNF (50 μ g/ml) 存在、非存在下で培養をさらに数日行った。ドーパミン作動性ニューロンの生存数ならびに形態変化を観察するために抗チロシン水酸化酵素 (TH) モノクローナル抗体を用いて染色し、その結果、野生型 Shp-2 を発現させたニューロン群において BDNF による TH ニューロンの生存および突起伸展効果の増強が認められた。反対に、C/S 変異体、 Δ P 変異体の Shp-2 を発現させたものでは、生存、突起伸展効果が共に抑えられた。一方、培養下の全ニューロン数の生存に対しては、3 種類の Shp-2 発現によって影響は見られなかった。以上の結果は、Shp-2 が黒質ドーパミン作動性ニューロンに対して BDNF による栄養因子効果を正に制御する因子であることを示している。

1P-80

培養マウス小脳顆粒細胞の細胞生存因子

°下永 友和, 藤川 直人, 富永 恵子, 小倉 明彦
大阪大学大学院理学研究科生物科学

活動依存的なニューロンの生存の機構を調べるモデル実験系として、ラット小脳顆粒細胞 (CGC) の分散培養系がしばしば用いられる。この系は培地に KCl やグルタミン酸などを添加してシナプス活動を模擬しないかぎり長期に維持できない。ところが、同様の実験をマウス CGC で行うと結果が異なり、系統差があることがわかり、昨年度の本大会で報告した。C57Bl 系マウス CGC はラット CGC と同様だが、BalbC 系マウス CGC は培地に KCl を添加しなくても生存し、かつ共存させた C57Bl 系マウス CGC を生存させることができる。この共存は、直接接合する必要はなく、フィルターを隔てた培地の交流だけで有効である。ただし、保存した条件培地は無効である。したがって、BalbC-CGC からは、溶存しないか不安定かの何らかの生存支持因子が低 KCl 培養条件でも分泌されており、BalbC-CGC 自身や C57Bl-CGC に作用していると考えられる。この想定因子は、C57Bl-CGC に NGF や BDNF などのニューロトロフィン (NT) 類を与えても生存支持が見られないことから、NT 類ではない。また、BalbC-CGC にグルタミン酸受容体阻害薬を与えても生存が抑制されないことから、グルタミン酸でもない。これらから、新規の神経栄養因子の関与が期待されるため、この因子の性質をさらに詳しく調べた。隔離的共存培養に用いるフィルターを限外濾過フィルターに変えて分子量を推定すると、想定因子は 3,000Da 以下の低分子の可能性が高い (限外濾過フィルター培養法の有効性は、PC12細胞に対する NGF の効果が 10,000Da フィルターを通過しないことから確認した)。幼若ニューロンにはグルタミン酸同様興奮性に働くと考えられる GABA について検討したが、無効であった。一方、BalbC-CGC は PKA 阻害剤の添加で死滅し、C57-CGC は膜透過性 cAMP アナログで生存することから、想定因子のシグナルは cAMP 動員を介するものである可能性がある。

1P-81

NGF 依存的に活性化される BDNF レセプター「Trk A / Trk B キメラ」を用いた、Trk B シグナリングの *in vitro* 解析

°佐藤 洋助¹, 小島 正己^{1,2}, 鈴木 健二³, 山田 雅司¹, 畠中 寛¹

¹大阪大学蛋白質研究所蛋白質生成部門, ²大阪工業技術研究所有機機能材料部脳神経工学ラボラトリー, ³杏林大学医学部衛生学公衆衛生学教室

海馬・大脳皮質領域では、ニューロトロフィン受容体として主に TrkB が発現しており、TrkA はほとんど発現していない。このことは生理的濃度の NGF に対してこれらのニューロンがほとんど応答しないことを意味する。そこで我々は、細胞外領域が TrkA、細胞内領域が TrkB のキメラレセプターをニューロンに強制発現することを計画した。この時ニューロンでは、NGF 添加によってキメラ分子のみが活性化されて内在性の TrkB は活性化されない。つまり、元々発現している TrkB からの細胞内シグナリングを、強制発現したキメラ分子の細胞内シグナリングに置き換えて解析できるものと期待した。本研究ではさらに、TrkB のチロシンキナーゼドメインに存在するいくつかのチロシン残基に変異を導入することで、中枢ニューロンに対して BDNF が行う生理作用（細胞分化・生存維持効果、シナプス可塑性等）に関わるチロシン残基を同定したいと考えた。TrkA/TrkB キメラ遺伝子の作製は、PCR 増幅した TrkA 細胞外領域と同様に PCR 増幅した TrkB 膜貫通領域以下の細胞内領域をライゲーションすることで行った。キメラ分子の TrkB 細胞内領域としては、Wild type (WT)、Y504F (Shc (-)), Y805F (PLC (-)), K560N (kinase negative) の 4 種類を用意した。また、各キメラ遺伝子と GFP 遺伝子を同一プラスミド (pBudCE4) 上に導入することで、キメラ分子発現細胞を GFP によりモニターできるようにした。最初に、これらのキメラ遺伝子を COS 細胞に導入し、数日後、GFP の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。そして、NGF 添加 (100 ng / ml, 5 min) 後のチロシンキナーゼの自己リン酸化とキメラ分子の発現をウエスタンブロットで確認した。現在、これらのキメラ遺伝子を導入した初代培養ニューロンに NGF を添加し、形態変化や生存維持効果などを解析している。

2P-01

Gicerin is involved in the formation of microvilli

°Shigeki OKUMURA¹, Keiko KOHAMA¹, Yasuhiro TSUKAMOTO², Hidekazu TANAKA¹, Naomasa MIKI¹, Eiichi TAIRA¹

¹Department of Pharmacology 1, Osaka University School of Medicine, ²Department of Veterinary Anatomy, College of Agriculture, Osaka Prefecture University

Recently, we isolated rat gicerin, a novel cell adhesion molecule belonging to the immunoglobulin superfamily and examined the expression pattern of gicerin mRNA and protein in various tissues. Although we previously reported that gicerin plays an important role in neurite outgrowth, gicerin mediated signal transduction pathway remain elusive. To examine the functional role of gicerin, we transfected gicerin cDNA into L cells. Interestingly, immunostaining of stable transfectant showed that gicerin predominantly located at microvilli. To further investigate a protein associated with the cytoplasmic domain of gicerin, we produced GST-gicerin-cytoplasmic domain (GCD) fusion protein and carried out GST pull down assay. As a result, moesin was co-precipitated with GST-GCD fusion protein. The immunostaining data confirmed the colocalization of gicerin and moesin at microvilli on the transfectants. Moesin positive microvilli were elongated on the gicerin transfectant, as compared with the control transfectant. The immunostaining data also showed that gicerin co-localized with F-actin in the tips of microvilli. In contrast to these results, L cells stably transfected with truncated gicerin which lacked cytoplasmic domain showed no clear elongation of surface microvilli and this truncated mutant was not co-localized with moesin or F-actin. These findings suggest that gicerin was associated with actin bundles via moesin in the microvilli and the cytoplasmic domain of gicerin is necessary for the elongation of microvilli.

2P-02

GPI-アンカー型神経接着分子 NB-3 の遺伝子欠損マウスの解析

°武田 泰生¹, 赤阪 啓子¹, 李 順姫¹, 小林 悟¹, 浅野 雅秀², 須藤 カツ子², 岩倉 洋一郎², 川野 仁³, 渡辺 和忠¹

¹東京都老人総合研究所細胞認識部門, ²東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター, ³東京都神経科学総合研究所解剖発生学研究部門

脳神経系の発生は神経管の形成に始まり高次精神活動の獲得に至るが、これらのすべての過程に神経接着分子が重要な役割を果たしている。当研究室では中でも免疫グロブリンスーパーファミリーのコンタクチン/F3 サブグループに注目し、特にNB-2とNB-3の2分子を中心に機能解析を進めてきた。これまでの研究結果から両分子はラットの大脳において、生後その発現が強く誘導され、1週目において一過性の上昇を示し、成体に至り減少することが明らかとなった。このような発現様式から両分子は機能的シナプスの形成や獲得の過程に関与する可能性が考えられた。本研究ではNB-3の生理機能を詳細に検討する目的でNB-3遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスはNB-3遺伝子の一部を欠損させ、代わりにリポーター遺伝子としてLacZを発現するよう組換えられたマウスである。今回このマウスを用いて、NB-3遺伝子の発現様式の検討、ならびに行動解析による運動機能調節系へのNB-3の関わりについて検討したので報告する。1) 生後14日目のヘテロ接合体を用いてNB-3遺伝子の脳における発現をLacZリポーター遺伝子の発現で検討した結果、副嗅球、梨状皮質、視床前背側核、赤核、下丘、皮質第2/3および5層などかなり限局した部位に発現することが明らかとなった。一方、小脳における発現は生後初期に一部のプルキンエ細胞層で、その後小脳全体の内顆粒細胞層で認められ、成体に至っても高く維持されることが明らかとなった。これらの結果を背景に、成体マウスを用いて2) 種々の行動実験を行い、特に運動機能調節系への影響について検討した。その結果、懸垂実験における安定姿勢の獲得、直径1.8 cm丸木棒渡り、直径3 cm/回転率10 rpmの回転棒上での歩行の各テストにおいて、野生型に比べてホモ型マウスは明かな運動機能失調が観察された。一方、握力テスト、傾斜板テストおよびぶらさがりテストにおいてはいずれも遺伝子型による差異は認められなかった。以上の結果から、NB-3はバランス感覚-運動機能協調性に関わる高次機能において生理的役割を果たしていることが示唆された。

2P-03

The recruitment mechanism of de novo synthesized cadherin into the activated synaptic loci

°Hidekazu Tanaka¹, Takahiro Fujimoto¹, Hong Shi¹, Eiichi Taira¹, Hiroko Sugiura², Kanato Yamagata², Naomasa Miki¹

¹Department of Pharmacology, Osaka University School of Medicine, ²Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

Modulation of the environment of synaptic cleft is one of the key mechanisms of the regulation of synaptic activity. Among various cell adhesion molecules, which have been postulated to be involved in the regulation of synaptic cleft environment, cadherin molecules have been shown to exist at synaptic cleft, and be modulated by both protein synthesis dependent (Yamagata et al., J Biol Chem, 274, 19473-9; 1999) and independent (Tanaka et al., Neuron, 25, 93-107; 2000) manners. Here, two hours after the synaptic stimulation of cultured rat hippocampal neurons, arcadin, a neural activity-regulated cadherin, was overexpressed, and incorporated into the excitatory synaptic loci, where N-cadherin already exists and undergoes conformational modulation instantly upon stimulation. The relation between these two cadherin related mechanisms will be discussed.

2P-04

Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity

°Hidekazu TANAKA¹, David COLMAN R.²¹Department of Pharmacology, Osaka University School of Medicine, ²Department of Molecular Biology, Mount Sinai School of Medicine

The relationship between adhesive interactions across the synaptic cleft and synaptic function has remained elusive. At certain CNS synapses, pre- to post-synaptic adhesion is mediated at least in part by neural (N-) cadherin, a calcium dependent adhesion molecule. Here we demonstrate that upon depolarization of hippocampal neurons in culture by K⁺ treatment, or by direct application of NMDA or α -latrotoxin synaptic N-cadherin dimerizes and becomes markedly protease-resistant. These properties are in other systems indices of strong and stable, enhanced cadherin-mediated intercellular adhesion. N-cadherin retained protease resistance for at least 2 hours after recovery, while other surface molecules, including other classic cadherins, NCAM and the AMPA receptor subunits GluR1 and 2/3, were readily and completely degraded. The acquisition of protease resistance and dimerization of N-cadherin is not dependent on new protein synthesis, nor is it accompanied by internalization of N-cadherin from the cell surface. By immunocytochemistry, we found that high K⁺ selectively and rapidly induces dispersion of some N-cadherin from synaptic puncta, which, after recovery, returns to an exclusively synaptic punctal location. N-cadherin dispersion under high K⁺ treatment parallels in time the rapid expansion of the presynaptic membrane consequent to the massive vesicle fusion that occurs with this type of depolarization. In contrast with direct application of NMDA to the culture, N-cadherin does not disperse, but does acquire enhanced protease resistance and dimerizes. Our data strongly suggests that synaptic adhesion is dynamically and locally controlled, and modulatable by synaptic activity.

2P-05

神経系に特異的なプロテオグリカン、NGC、のコンドロイチン硫酸鎖結合部位の同定

°青野 幸子, 時田 義人, 山内 忍, 周尾 卓也, 松井 ふみ子, 慶野 宏臣, 川島 祥子, 大平 敦彦
愛知コロニー研・周生期学部

神経系に特異的に発現しているニューログリカン C (NGC) は、膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである (1)。小脳ではプルキンエ細胞に存在し、発達に伴ってコンドロイチン硫酸鎖が結合したプロテオグリカン型からコンドロイチン硫酸鎖の結合していない非プロテオグリカン型に変化する。また、プルキンエ細胞における局在も発達とともに変化し、神経回路形成の盛んな幼若期には細胞体および太い樹状突起の膜上に存在するが、成獣では太い樹状突起の hypolemmal cisternae に存在するようになる (2)。コンドロイチン硫酸鎖の有無と小脳の発達は密接に関連していると思われるが、現時点では小脳におけるコンドロイチン硫酸鎖付加調節機構は明らかとはなっていない。調節機構を解明するための第一歩として、今回、NGC におけるコンドロイチン硫酸鎖結合部位の同定を行った。pCI-neo ベクターに組み込んだマウス NGC cDNA を数種の細胞に発現させたところ、Neuro2a 細胞がコンドロイチン硫酸鎖の結合した NGC を発現していたので、以下の実験には Neuro2a 細胞を用いた。コンドロイチン硫酸鎖はセリン-グリシン配列あるいはグリシン-セリン配列のセリン残基に結合することが明らかとなっているが、マウス NGC にはコンドロイチン硫酸鎖を結合する可能性のある部位が 6ヶ所ある。それぞれセリン残基をアラニン残基に置き換え Neuro2a 細胞で発現させたところ、123 番目のセリン残基をアラニン残基に置き換えた場合は非プロテオグリカン型の NGC を発現していたが、あとの 5ヶ所のセリン残基をアラニン残基に置き換えた場合はすべてプロテオグリカン型の NGC を発現していた。以上の結果より、NGC の 123 番目のセリン残基のみにコンドロイチン硫酸鎖が結合することが明らかとなった。

(1) Watanabe, E., Maeda, N., Matsui, F., Kushima, Y., Noda, M., and Oohira, A. J. Biol. Chem. 270:26876-26882, 1995. (2) Aono, S., Keino, H., Ono, T., Yasuda, Y., Tokita, Y., Matsui, F., Taniguchi, M., Sonta, S., and Oohira, A. J. Biol. Chem. 275:337-342, 2000.

2P-06

成体ラットの神経細胞新生部位に選択的に局在する G 蛋白質

°浅野 富子¹, 森下 理香¹, 上田 浩¹, 篠原 春夫², 河村 則子¹, 仙波 りつ子¹, 岸川 正大¹, 加藤 兼房¹
¹愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所, ²三重大学医学部解剖学

哺乳動物の中樞神経系における神経細胞産生は主に胎生期に集中して起こり、成体では起こらないとされてきたが、ここ数年の研究により生涯新生が起こっている領域が2か所あることが明らかにされた。1つは側脳室周辺の subventricular zone (SVZ)、もう1つは海馬・歯状回である。げっ歯類の脳では、SVZは嗅球の神経細胞を供給しており、SVZから嗅球まで分裂能をもつ神経前駆細胞の長い流れ (rostral migratory stream, RMS) を形成している。これらの神経細胞新生部位に存在し、神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーとして用いられている nestin や Musashi は、胎生期脳では神経細胞を産生している脳室周辺の神経上皮細胞層に強く発現している。

私たちは、これまでに G 蛋白質の各種サブユニットのうち $\gamma 5$ と $Gi2\alpha$ は胎生期の脳室周辺の神経上皮細胞に特異的に局在し、神経細胞への分化に伴い減少し、成体脳では低濃度しか存在しないサブタイプであることを報告した。今回、 $\gamma 5$ と $Gi2\alpha$ が、nestin や Musashi のように成体脳の神経細胞新生が起きている部位にも存在するかを検討した。免疫組織化学的に観察すると $\gamma 5$ 、 $Gi2\alpha$ とともに SVZ および RMS に高濃度存在し、特に $\gamma 5$ は選択性の高い局在を示した。また、神経幹細胞の候補である脳室上皮細胞の線毛に $\gamma 5$ と $Gi2\alpha$ が局在していた。さらに、やはり神経細胞の新生が起こるとされる嗅神経の神経線維層にも強い $\gamma 5$ の免疫染色がみられたが、 $Gi2\alpha$ の免疫活性はみられなかった。SVZ や RMS における増殖期の細胞をプロモドオキシウリジン投与でラベルし、抗体で検出すると、 $\gamma 5$ 、 $Gi2\alpha$ 陽性細胞と一致した。一方、 $\gamma 5$ や $Gi2\alpha$ の染色像はアストロサイトのマーカーである GFAP の染色像と一致しないので、アストロサイトには局在しないと考えられる。これらの結果から、 $\gamma 5$ と $Gi2\alpha$ は神経細胞新生において未分化な細胞の機能に関与すると考えられる。

2P-07

成熟ラット後根神経節細胞の接着ならびに神経突起再生に対するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、phosphacan と neurocan の作用

°三五 一憲¹, 大平 敦彦², 安食 京子¹, 渡嘉敷 晶子¹, 川野 仁¹
¹東京都神経科学総合研究所発生形態部門, ²愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所周生期学

<目的> phosphacan (PC) と neurocan (NC) は、ともに神経組織における主要なコンドロイチン硫酸プロテオグリカンで、神経系の発生ならびに再生の諸過程における制御因子として注目されている。特に *in vitro* の系で、胎生～新生仔期の神経細胞の接着や神経突起伸長に対する、PC もしくは NC の作用が検討されてきた。しかしながら、成熟動物神経細胞の初代培養系を用いた研究報告はない。今回我々は、成熟ラット後根神経節 (dorsal root ganglia (DRG)) より単離した感覚神経細胞の接着ならびに神経突起再生に及ぼす、PC と NC の効果について検討した。

<方法> (1) PC もしくは NC を種々の濃度 (10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml) で poly-L-lysine (PL, 10 μ g/ml) 上にコートした培養皿に、3ヶ月齢 SD ラットの DRG より単離した神経細胞を撒布し、培養3時間後の細胞接着率ならびに48時間後の再生神経突起長を計測した。(2) PC もしくは NC を 1 μ g/ml の濃度で培養液に加え、PL 上及び PL/laminin (LM, 10 μ g/ml) 上で培養した DRG neuron の48時間後の再生神経突起長を計測した。

<結果> (1) PL 上にコートされた PC 及び NC は、DRG neuron の接着ならびに神経突起伸長を抑制した。この抑制効果は PC 及び NC の濃度に依存しており (10 μ g/ml > 1 μ g/ml > 0.1 μ g/ml)、chondroitinase ABC 処理により減弱した。(2) 培養液に加えられた PC 及び NC は、PL 上で培養した DRG neuron からの神経突起再生を抑制した。一方、PL/LM 上で培養した neuron からは旺盛な神経突起再生が観察され、PC 及び NC の添加によっても抑制されなかった。

<結論> PC 及び NC は、DRG neuron の PL への接着ならびに PL 上での神経突起再生に抑制的に作用し、その抑制機序にコンドロイチン硫酸鎖の関与が示唆された。

2P-08

神経可塑性に関わるシアル酸転移酵素遺伝子の発現 -ST3Gal IV mRNA 発現上昇について-

○町田 敦紀, 俵 佳江, 岡 卓也, 岡部 明仁, 塩坂 貞夫, 加藤 啓子
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
細胞生物学専攻

近年、脳内においてシアル酸の神経可塑性への関与が報告されている。シアル酸は、シアル酸転移酵素により糖蛋白や糖脂質に付加されることから、我々は、シアル酸付加がどのように神経可塑性に関与するのかを明らかにするために、1) 海馬からシアル酸転移酵素遺伝子をクローニングし、2) 神経可塑性モデル・キンドリングマウス (けいれん閾値以下の電気刺激を毎日与えることにより作成)・海馬における発現変動を *RI-in situ* hybridization 組織化学法及び半定量 RT-PCR 法を用いて観察した。具体的には、7種類のシアル酸転移酵素遺伝子 (ST3Gal I-IV, ST6Gal I, ST6GalNAc II, ST8Sia IV) が単離され、ST3Gal IV, ST6GalNAc II が mRNA 発現上昇を、ST3Gal I, ST8Sia IV が減少を、そして ST3Gal II-III, ST6Gal I は変動を示さなかった。次に、海馬以外におけるキンドリングの影響を観察したところ、ST3Gal IV mRNA の発現上昇が視床において認められた。そこで、ST3Gal IV mRNA の発現分布とキンドリング前後の発現上昇パターンを、*RI-in situ* hybridization 組織化学法を用いて更に詳しく検討した。mRNA 発現は、背側外側核、後外側腹側核、後内側腹側核、外側膝状体の神経細胞に分布し、キンドリング獲得後、これら領域において発現上昇を示し、新たに背内側核・神経細胞においてその発現を確認した。次に、マクロオートラジオグラフィーにより視床における発現量を検討した。キンドリング獲得過程を5段階に分類し発現量を比較したところ、キンドリング初期に一過性に発現が上昇した後、その後減弱し、再び顕著な発現上昇がステージ進行に伴って観察され、最終的に5.3倍 (ANOVA; $F=0.472$, $p < 0.0001$) の発現上昇を示した。以上のことから、キンドリング獲得後、視床における神経細胞が可塑的变化を示したことが明らかになり、それに伴い ST3Gal IV によるシアル酸付加がその可塑的变化に何らかの作用を示していることが示唆された。

2P-09

グルタミン酸受容体サブユニットとそのアンカータンパク質のシナプス後部内局在

○鈴木 龍雄¹, 高木 博¹, 伊藤 仁一², 清水 秀夫³, 斎藤 文典¹

¹信州大・医・加齢研・神経可塑性, ²名古屋市大・医・第一生化, ³名古屋市大・医・共同研

目的、方法: スパイン内での NMDAR と AMPAR の局在の違いが報告されている。AMPAR はシナプス以外の場所にも局在し、それらのシナプスへの輸送が LTP の発現に寄与しているという silent synapse 説も提唱されている。今回、ラット大脳のシナプス膜から、Triton X-100 不溶性の低比重画分 (仮に Postsynaptic raft, PSR 画分) を得て、その特性を調べた。また、PSR 画分と PSD 画分における、GluR subunit およびそれらのアンカータンパク質の局在を Western blotting にて調べた。結果: PSR は主に膜成分からなる均一な画分で、コレステロールに富むこと、低温での Triton X-100 不溶性などからシナプス領域の raft を集めた画分であると考えられた。また、NMDAR は PSD 画分には限局していたが、AMPAR のかなりの部分が PSR 画分にも分布していた。次に、LTP を誘導したラット前脳スライスから PSD と PSR 画分を調製して分布を調べたが、LTP 誘導により大きな変化は見られなかった。結論: スパイン内では、AMPAR はシナプス以外にも raft 様部位に分布していることが示唆された。さらに、シナプス後部での情報処理には PSR と PSD のクロストークが必要であることが示唆された。

培養中枢ニューロンにおける神経伝達物質放出の estrogen による増強作用

°横幕 大作¹, 沼川 忠広^{1,2}, 安達 直樹¹, 松本 知也¹, 西尾 チカ¹, 畠中 寛¹

¹大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門, ²日本学術振興会特別研究員

estrogen は性ホルモンの一種であり, 子宮, 乳腺などに対する作用が主であると考えられてきた。しかし, 中枢神経系においても estrogen 受容体が発現していることが明らかになり, その生理的役割が研究されてきた。なかでも視床下部や下垂体に働き, 発生段階において脳の性分化を促進する作用と, 性腺刺激ホルモンの分泌量を調節し, 成体における性ホルモンのバランスをコントロールすることはよく知られている。一方で, 中枢神経系においてこれらの作用以外に, 神経細胞の生存やシナプスの可塑性に深く関与している BDNF などの神経栄養因子と類似の作用を estrogen が持っている可能性が近年報告されつつある。シナプス可塑性において, 神経伝達物質の放出は重要な要素である。

今回, 我々は初代培養神経細胞を用い, estrogen の神経伝達物質放出の増強作用を持つ可能性を検討した。生後 2 日齢のラットの脳から分散培養した海馬, 小脳, 大脳皮質の神経細胞に, 17 beta-estradiol (10^{-7} M) を添加して血清培地中で約 1 週間培養を行った。その後 HPLC を用いて, 中枢神経系において特に重要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の脱分極に伴う放出量を測定した。その結果, estradiol 添加群は非添加群に比べて, 有意に脱分極依存性のグルタミン酸放出量の増強が起こっていることが明らかになった。この結果は estrogen が, 中枢神経系において興奮性シナプスを増強する可能性を示唆している。この増強作用が BDNF などの栄養因子の発現を介したものなのか, それとも estradiol に特異的なメカニズムによって引き起こされているのかについて解析を続行中である。

ニューロブシンに対する 2 種の特異的インヒビターの解析

°秋貞 盛人¹, 薮地 智寛¹, Bird Phillip², 岡 卓也¹, 堂前 直³, 瀧尾 擴士³, 岸 忠明¹, 三宅 義雅⁴, 山本 和彦⁵, 松本 和政¹, 塩坂 貞夫¹, 加藤 啓子¹

¹奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞生物学専攻, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, ³理化学研究所, ⁴近畿大学薬学部, ⁵近畿大学医学部生化学2

ニューロブシン(NP)は, 大脳辺縁系, 特に海馬で mRNA の高い発現が見られ, 海馬スライスにおける LTP 増強作用や神経可塑性モデルの 1 つであるキンドリング動物の形成への関与が明らかとなっている。その一方で, NP は神経細胞で発現し活性を持たない pro 型として細胞外に分泌された後に, プロセッシングを受けて活性化されることが示唆されている。しかし, 活性化された後どのように NP の活性が調節され不活性化されるのかは未だに明らかになっていない。そこで NP に対するインヒビターを同定する目的で, 直接マウスの海馬・大脳皮質ホモジネートから, リコンビナント・ニューロブシン (r-NP; Baculo virus expression system) と SDS 耐性の複合体を形成するタンパク質の同定を試みた。その結果, 65kDa, 260kDa の SDS 耐性の複合体が検出され, ペプチドシーケンスの結果から NP のインヒビターは, Serine Protease Inhibitor-3 (SPI3; 65kDa 複合体由来) と Murinoglobulin (MUG; 260kDa 複合体由来) であることが解った。次にそれぞれが, NP の特異的なインヒビターであることを生化学的相互作用及び脳内における分布から検討した。1) SPI3: リコンビナント・SPI3 (Pichia expression system) と r-NP の結合平衡定数は $2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ で, 生理学的に有意な相互作用を示した。さらにマウス脳における *in situ* hybridization 組織化学法によって SPI3 の mRNA を検出したところ, 海馬 CA1, CA3 の錐体細胞層に発現が見られ, 特に CA3 において強く発現していた。これは NP の発現パターンと一致していた。また, 活性基を一塩基置換させたミュータント NP は, 65kDa 複合体を形成しなかった。これらの結果から, SPI3 は NP に特異的に働くインヒビターであると考えられた。2) MUG: マウス血清から精製した MUG は r-NP と SDS 耐性の複合体を形成し, r-NP のフィブロネクチン切断活性を測定したところ, MUG を等モル比添加した場合, 50% の活性阻害がみられた。また, 活性基を一塩基置換させたミュータント NP では, 260kDa 複合体は形成されなかった。これらの結果から, MUG も NP の活性基に特異的に結合するインヒビターと考えられる。MUG の脳組織内での局在については現在検討中である。

2P-12

神経可塑性関連セリンプロテアーゼ
ニューロブシンの分泌機構について

岡 卓也, 加藤 啓子, 秋貞 盛人, 塩坂 貞夫
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

マウス海馬 cDNA ライブラリーよりクローニングされたニューロブシン (NP) は、分泌型のセリンプロテアーゼである。NP は、神経細胞特異的接着因子や、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンに対して特異的な分解活性を示すことから、細胞-細胞間、もしくは、細胞-細胞外マトリックス間の相互作用を制御すると考えられる。一方で、NP の生理機能として、海馬スライスにおける LTP 増強作用が確認されており、細胞外における NP のプロテアーゼ活性が、シナプス機能の獲得に必須であることが示唆されている。これらのことから、NP が何処からどの様に分泌されるのかを明らかにすることは、NP の機能を理解する上で重要であると考えられる。今回我々は、マウス海馬初代培養神経細胞と神経内分泌系モデルとして用いられている Neuro2a 細胞を用いて NP の分泌機構について解析した。海馬初代培養神経細胞に NP-GFP fusion cDNA を導入したところ、細胞体・軸索・樹状突起に点状に局在した。これは、NP の輸送経路には、極性のないことを示している一方、活動依存的に分泌誘導が生じることを示唆している。通常、分泌経路には構成性 (constitutive pathway) と調節性 (regulated pathway) が知られているが、Neuro2a 発現系を用いて、NP 分泌制御の関係について調べたところ、NP は、神経突起上に点状の局在を示すものの、ただらかに分泌される、constitutive like pathway を示した。神経内分泌細胞における regulated pathway は、分泌タンパク質が secretory granule に凝集されることがカギになると考えられているが、N 結合型糖鎖を破壊したミュータントは、凝集が減り、分泌量も減少していた。このことから、NP の持つ N 結合型糖鎖は、NP の凝集を調節することによって、NP の分泌に関与している可能性が示唆された。また、初代培養神経細胞において細胞外のみを抗 NP 免疫染色したところ、グルタミン酸刺激後 15 分において、未刺激のニューロンよりも強いシグナルが観察された。これらのことから、NP は、神経活動に依存して分泌され、神経突起の細胞膜上で作用することが示唆された。

2P-13

Mechanism of neuroprotective effects of
immunophilin ligands against cell death

Ken-ichi TANAKA, Naoko FUJITA, Masato
ASANUMA, Norio OGAWA
Department of Neuroscience, Okayama University
Medical School

We examined the effects of FK506 and its non-immunosuppressive derivative, GPI1046, on H_2O_2 -induced cell death in four various cell lines such as NG108-15, C6, Neuro 2A and SH-SY5Y cells. Pretreatment with FK506 and GPI1046 significantly prevented the reduction of cell viability induced by H_2O_2 . The protective effects of GPI1046 are equipotent with those of FK506 and may be mediated by increased intracellular concentrations of glutathione (GSH). Moreover, FK506 and GPI1046 might also have anti-apoptosis effects, since H_2O_2 caused apoptotic cell death in the case of several cell lines. Thus, non-immunosuppressive immunophilin ligands such as GPI1046 might be potential drugs for neurodegenerative diseases, particularly since they do not have serious side effects such as immune deficiency.

E2F1 強制発現によるニューロンアポトーシス誘導機構の解析

°植月 太一, 西村 伊三男, 原 ともし, 谷浦 秀夫, 吉川 和明

阪大・蛋白研・機能制御

E2F1 は、細胞周期の G1/S 期移行に重要な役割を果たしている転写因子である。分裂停止ニューロンにおいても E2F1 遺伝子は発現しているがその生理的な意義は不明である。我々は胚性ガン細胞 (P19) 由来の分化ニューロンに E2F1 を強制発現するとアポトーシスを誘導することを既に報告した。今回はヒト胚性ガン細胞 NT2 から分化したニューロン (NT2 ニューロン) およびヒト骨肉腫細胞 Saos-2 細胞に E2F1 を導入し強制発現することにより、そのアポトーシス誘導機構を解析した。E2F1 を発現するアデノウイルスベクターを感染させると両方の細胞で 48 時間後にアポトーシスを起こした。この際、細胞を抗活性型カスパーゼ 3 抗体で染色すると、いずれの細胞においても E2F1 を蓄積したアポトーシス細胞で免疫陽性となっていた。カスパーゼ 3 依存的なニューロンのアポトーシスの際には APP のカスパーゼ 3 による切断断片が出現するとの報告がある。そこでカスパーゼ 3 により切断される APP 断端に特異的な抗体で染色したところ、核が凝集している NT2 ニューロンにおいて免疫陽性の細胞が見いだされた。以上の結果から E2F1 を NT2 ニューロンで強制発現するとカスパーゼ 3 活性化と APP の切断を伴ったアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。さらに E2F1 をニューロンや Saos-2 細胞で強制発現すると、E2F1 が核内に斑点状に強く染色される像が見られ、この核内構造体は抗 PML 抗体で染色された。PML は、前骨髄球性白血病の原因遺伝子の 1 つとして同定され、核内で PML Nuclear Body と名付けられた核内構造体に局在し、PML を強制発現すると細胞によってはアポトーシスを誘導することが知られている。これらの知見から E2F1 が核内で斑点状の PML 陽性核内構造体を形成することとニューロンでのアポトーシス誘導が重要な関連を持っている可能性が示唆される。

マウス胎生期の神経形成における SEK1 のはたらき

°丸岡 弘規¹, 榎戸 靖¹, 山岸 寛¹, 仁科 博史², 畠中 寛¹

¹大阪大学蛋白質研究所蛋白質生成部門, ²東京大学大学院薬学系研究科生理化学

SEK1 (MKK4/JNK1) は、SAPK/JNK を活性型に導く MAP キナーゼキナーゼであり、SAPK/JNK 分子内の Thr-Pro-Tyr 配列中のスレオニン (Thr) とチロシン (Tyr) 残基をリン酸化することで知られている。Drosophila における胚発生時の背部癒合 (dorsal closure) 過程では、Hep → Bsk → Djun へのカスケードが関与することが示唆されている。このカスケードは哺乳類における SEK → SAPK/JNK → c-Jun へのシグナルカスケードに相当することが知られている。このことは、SEK1 が哺乳類の発生過程に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。また、SEK1 ノックアウトマウスを用いた解析の結果から、SEK1 ノックアウトマウスは肝臓の形成不全により胎生 10.5 ~ 12.5 日目で致死となることが明らかとなっている。このことから SEK1 遺伝子は生存に関して重要な働きを持つと考えられるが、脳神経系における SEK1 の働きについてはまだ不明な点が多い。

本研究では、マウス胎生期における SEK1 の神経形成への影響に注目し、解析を行った。マウス胎生 11 日目の SEK1 ノックアウトマウスをホールマウントして、脳神経系における形態を観察した結果、野生型マウスに比べて、脊髄が波打った形を呈する、終脳が小さいなどの変化が見られた。このことより、マウス胎生期における神経形成において、SEK1 は重要な働きを持つことが示唆された。次に、胎生 11 日目の SEK1 ノックアウトマウスと野生型マウスから取り出した三叉神経節ニューロンを NGF 存在下で培養し、NGF 除去後の生存率の比較を行った。その結果、SEK1 ノックアウトマウスより培養したニューロンの方が、野生型のマウスのものより高い生存率を示すことが分かった。このことより、三叉神経節ニューロンにおいて、NGF 除去による細胞死に SEK1 が関与していることが示唆された。

2P-16

The relationship between the inhibitor of apoptosis protein NAIP and cell cycle elements in a rat focal ischemia model.

°Hitoshi OSUGA¹, Raouf FETNI², Sachiko OSUGA³, Antoine HAKIM M³, David PARK S³, Joh-E IKEDA¹

¹Department of Molecular Neuroscience, The Institute of Medical Sciences, Tokai University, ²NeuroGenes, International Cooperative Research Project, Japan Science and Technology Corporation, ³Neuroscience Research Institute, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

Apoptosis is believed to be a major pathway of cell death in terminally differentiated neurons in many neuropathological conditions. NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) is a member of a family of intrinsic cellular suppressors of apoptosis (IAPs) which have well conserved antiapoptotic domains called BIR. Overexpression of NAIP has been shown to suppress apoptosis in response to various apoptotic inducers. Recently, another member of the IAP family, survivin, has been shown to have a strong association with the cellular spindle checkpoint in cultured cells. There are several reports suggesting that neurons can possibly re-enter the cell cycle after ischemia. Previously we have characterized the appearance of apoptotic cells and upregulation of NAIP in the rat transient MCA and CCA occlusion model. The purpose of this study is to define the relationships between NAIP expression levels, TUNEL positive cells and cell cycle elements in a rat transient focal ischemia model. We also tested the protective effect of CDK (cyclin dependent kinase) inhibitor on the subsequent development of cerebral infarction. In this serial experiments, re-entrance into the cell cycle by affected cortical neurons after ischemia was demonstrated in terms of cyclin D1, pRB and E2F expression. The localization of NAIP positive cells was well correlated with cyclin D1 and TUNEL positive cells. Pre-treatment of CDK inhibitor suppressed the upregulation of cell cycle related elements and reduced the size of infarction by 40%. These results suggest that cell cycle related elements, which presumed to have a cell death signal in neurons were upregulated after ischemic insult. Together with previous results, our data suggest that NAIP seems to be related to the cell cycle and might be one of the endogenous cell cycle associated protein in terminally differentiated neurons.

2P-17

高カリウム、血清除去による小脳顆粒細胞死における VDUP1 遺伝子の発現上昇

°齊藤 達哉, 田中 秀逸, 小池 達郎

北海道大学 理学研究科 生物科学専攻 行動知能学講座

私たちは、改良を加えた Differential Display 法を用いて、高カリウム、血清除去による小脳顆粒細胞死において、発現量の増加する遺伝子の探索を行った。その結果、発現量の増加する 6 つの既知、3 つの未知のクローンを得た。既知の遺伝子である、Glutathione S transferase, Vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1), hemeoxygenase, p21(neuron specific golgi protein), LMO-4(LIM only protein) などについて、ノーザンブロット法により発現上昇の確認と定量を行った。その内、VDUP1 は、もっとも顕著な発現の増加を示した。初代培養した小脳顆粒細胞における VDUP1 の mRNA 発現は、非常に低い状態にあるが、培地から高カリウム、血清を除去すると、2 時間後をピークとして、迅速かつ顕著に発現量が増加した。この非常に早い段階での活性化から、VDUP1 は、c-jun などと並んで、細胞死のカスケードの上流因子に作用すると考えられる。また、VDUP1 は、未成熟な小脳顆粒細胞が低カリウム条件下で、細胞死を起こす過程においても、発現量の増加が見られた。VDUP1 は、Thioredoxin (TRX) と結合し、その働きを負に制御するタンパクとして見出された。TRX は、JNK/SAPK、p38 から c-Jun のリン酸化に至るカスケードの上流に位置する Apoptosis signal regulating kinase 1(ASK-1) の活性を抑制することが知られている。VDUP1 は、高カリウム、血清除去による小脳顆粒細胞死において、TRX の活性を抑え、ASK-1 カスケードの伝達を促進すると考えられ、このカスケードが小脳顆粒細胞死に関与する可能性が示唆された。

2P-18

NOによる神経細胞死におけるBDNFの細胞死促進にはリン酸化Bcl-2が関与している。

°石川 保幸, 池内 俊彦, 畠中 寛
大阪大学蛋白質研究所

BDNFはニューロンの生存維持に働く栄養因子として知られている。BDNF作用のもつ別の側面として我々は、BDNFはNO依存性のニューロン死をむしろ促進することがあることを明らかにした。今回、このBDNFによるニューロン死の促進効果における細胞内シグナル伝達経路について、さらに詳細に検討した。その結果、BDNFによって顕著に促進されるNOによる細胞死はアポトーシスであることが明らかとなった。また、この細胞死およびBDNFによる促進効果はp38MAPKの選択的阻害剤であるSB202190、SB203580、およびERKの阻害剤であるU0126によって抑制されたことからp38MAPK、ERKが関与することが示唆された。また、p38MAPK、ERKは、この細胞死の過程において活性化されることも明らかとなった。さらに、この時、Bcl-2の顕著なリン酸化を観察した。このBcl-2のリン酸化はERK、p38MAPKの阻害剤によって阻害された。これらの結果は、Bcl-2のリン酸化が細胞死に関与することを強く示唆している。Bcl-2のリン酸化を担うものを明らかにする目的でERKとBcl-2が結合するかどうかを調べたところ、ERKとBcl-2は結合することを明らかにした。以上の結果はNOによる細胞死はMAPKファミリーによるBcl-2のリン酸化状態の制御によって引き起こされておりこのカスケードのBDNFによる活性化が、その死を促進していることを示唆している。

2P-19

Na⁺-Ca²⁺exchanger サブタイプの発達と過剰イオン流入による神経毒性

°小池 達郎, 益本 将司
北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻

ラット上頸神経節細胞(SCG)は胎生14日頃シナプス形成し、生後も更にシナプスは増加し続ける。従って生後1日目のラットSCGの生存はNGFに依存するが、膜脱分極による生存促進は生後1日目のラットの上頸神経節細胞では起こらない。これは後者がL型Ca²⁺チャネルの発達に依存しているためである。この系を用いて膜電位依存Na⁺チャネルの賦活剤veratridineによる神経毒性の発達とNa⁺-Ca²⁺exchanger活性を調べた。この薬物は7DIVや21DIVのSCG細胞死を惹起するが、1DIVではSCG細胞死は起こらない。1DIVのSCGでも膜電位依存Na⁺チャネルはすでに発達し、実際にveratridine処理によってNa⁺の流入は起こる。Veratridine処理によってCa²⁺も同時に流入するが、持続しない。この持続性にはNa⁺-Ca²⁺exchanger活性が主要な役割を果たすことが分った。Na⁺-Ca²⁺exchanger活性は1DIVでは見られないが、7DIVでは顕著に増加することが蛍光カルシウム画像解析によりわかった。さらに、RT-PCR法によりNa⁺-Ca²⁺exchanger遺伝子サブタイプ1と2は7DIVでは急激にその発現が増加するのに対し、サブタイプ3の発現レベルは低く、発達に依存しなかった。さらに細胞死の形態に関しては、7DIVではアポトーシスが起こることを、bis-benzimide染色、TUNELや電子顕微鏡により証明したが、Z-VADやAc-DEVD-CHOなどのカスパーゼ阻害剤は核断片化を抑制したものの、細胞死を抑制しなかった。一方、21DIVではネクローシスのみが起こった。同じパラダイムによる細胞死も神経細胞の発達段階及びそれに依存したイオン流入に依存しているといえる。

2P-20

恐怖条件付けラットの海馬および扁桃核に
発現する一酸化合成酵素 (NOS) の定量的
解析

°加藤 尚彦, 小坂田 健一, 佐藤 光, 阿部 一樹, 井上
順雄, 中山 孝
横浜市立大学医学部生化学第一講座

ラットに音 (CS, 条件刺激) と足掌への電気刺激 (US, 非条件刺激) を組み合わせる Pavlov 型の恐怖条件付け (fear conditioning) を行い, その海馬の 6 層 [CA1 の str. oriens (*Ori*), pyramidal cell layer (*Pyr*), str. radiatum (*Rad*); 歯状回の suprapyramidal blade (*Sup*), granule cell layer (*Grl*), infrapyramidal blade (*Inf*)] と扁桃核の 3 神経核 [*Cen* (central nucl.), *Lat* (lateral nucl.), *Bl* (basolateral nucl.)] の凍結乾燥試料を調製した。対照ラットには CS のみを与えた。秤量した試料 (0.98-3.07 μ g) の poly(A)+ mRNA を抽出して, NOS の isoforms (nNOS, neuronal NOS; eNOS, endothelial NOS) の mRNA を既に開発した定量的 RT-PCR を用いて測定した (Wang et al., Dev Brain Res 111: 65-75, 1998)。対照脳と比較すると, 条件付け脳の海馬 6 層の nNOS と eNOS の mRNA 濃度は変わらず, nNOS は *Pyr* と *Grl* に高濃度に見られ, eNOS は各層とも同程度の濃度を示した。これに反し扁桃核の *Cen* と *Bl* の nNOS mRNA 濃度は恐怖条件付けによりそれぞれ対照の 59 および 41 % 減少したが, *Lat* では差が無かった。eNOS mRNA の濃度はこれら扁桃核内の神経核間では対照との差は無かった。同じ凍結乾燥試料 (1.23-3.07 μ g) を直接 Laemmli の溶解緩衝液に溶かし, SDS-polyacrylamide microslab gel 中で蛋白質を泳動分離して, 半定量的な解析を行った。扁桃核と較べて海馬では eNOS 蛋白質が多く発現し, 特に *Rad* に多量に見い出されたが, nNOS 蛋白質の発現は少なく海馬各層で著しい差が見られなかった。海馬に較べて扁桃核では eNOS の発現は少なく, nNOS が高濃度に発現し, 各神経核間の差は殆ど無かった。従来の報告を考慮すると, 以上の結果から海馬の空間的な位置に関する記憶形成には, *Pyr* の錐体細胞に発現する eNOS が生成する NO が細胞間逆行性 messenger として重要な働きをし, 海馬による 実験環境に対する contextual fear conditioning には nNOS は関与せず, 扁桃核における音による cued fear conditioning では nNOS が生成する NO が減少し, 細胞内 messenger として NO が重要な働きをしていると思われる。

2P-21

グルタミン酸作動性内分泌細胞の発見

°森山 芳則¹, 山田 浩司¹, 林 美都子¹, 大塚 正人¹,
八代 聖基¹, 石尾 将吾¹, 中塚 修一¹, 木下 美香¹, 山
本 章嗣²

¹岡山大学・薬・生理化学, ²関西医科大学・医・第一生理

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として機能しており, 脳機能に本質的に重要である。グルタミン酸が細胞間の情報伝達物質として機能するために, 神経・グリア細胞は, グルタミン酸シグナルの出力・入力および終止系を備えている。すなわち, グルタミン酸の開口放出系・受容体とそのシグナル伝達系ならびに Na⁺ 依存性の輸送系である。我々は, これら一連のグルタミン酸作動系がメラトニンの内分泌器官である松果体に存在しており, 末梢におけるメラトニン合成の抑制系として機能していることを示してきた。今回, 我々は睪嚢ラ氏島の α 細胞がグルタミン酸の開口放出系・受容体とそのシグナル伝達系ならびに Na⁺ 依存性の輸送系を備えていることを見いだした。特に, グルタミン酸の開口放出系について述べる。末梢性グルタミン酸作動系 (peripheral glutamatergic system) の働きにより, グルタミン酸が末梢においても細胞間伝達物質として機能していると考えられる。

甲状腺ホルモンによる摂食ペプチド Neuropeptide Y 遺伝子発現の変化

°貝津 雅稔, 山口 剛, 長谷川 歩未, 樋口 宗史
新潟大学医学部薬理学講座

発育、代謝に関わるホルモンである甲状腺ホルモンの過剰状態、甲状腺機能亢進症では食欲は亢進し多量の食物を摂取するにもかかわらず、急速な体重減少を認めることが知られている。マウスに T_3 を投与すると、酸素消費量の増大などの代謝亢進作用とともに、より高い投与量 $50.0\mu\text{g}/100\text{g body weight}$ では、摂食量が増加することが報告されている。一方、中枢性には複数の神経ペプチドが食欲・摂食を制御している。特に強い orexigenic な作用をもつ neuropeptide Y (NPY) の脳室内投与では、摂食行動を誘発することが知られている。そこで、甲状腺ホルモンが中枢 NPY 神経に働き、NPY 遺伝子発現レベルを変えて摂食・食欲の機構を調節しているかを明らかにする目的で、甲状腺ホルモンと抗甲状腺薬投与マウスの中枢神経系の NPY 遺伝子発現を調べた。8 週令雄性 CD-1 マウスの一群に triiodothyronine (T_3) $50.0\mu\text{g}/100\text{g body weight}$ を投与した。コントロール群には、生理的食塩水を 1 日 1 回 7 日間腹腔内投与投与した。同時に他の実験群として、0.025% methimazole と 0.05% propylthiouracil を自由給水により各々投与するものを用いた。投与終了後、断頭し、凍結切片を作成した。脳切片に対し、ペーリンガーマンハイムのプロトコルに準じて In situ hybridization (ISH) を行った。 T_3 投与により、NPY mRNA の分布は、生理的食塩水投与コントロールマウスのそれと同じだが、摂食の中枢の一つである視床下部の弓状核で、NPY mRNA が減少した。抗甲状腺薬 methimazole においては、弓状核 NPY mRNA は生理的食塩水投与コントロールマウスのそれと同程度であった。抗甲状腺薬 propylthiouracil においては、弓状核 NPY mRNA は生理的食塩水投与コントロールマウスのそれに比して増加した。以上のことから、甲状腺ホルモンは弓状核 NPY 神経において摂食誘発ホルモンの NPY 遺伝子発現を負に調節し、摂食調節因子として働くことが示唆された。

Leptin による NPY 遺伝子プロモーターの 活性制御機構の解析

°村岡 修, 許 波, 弦巻 立, 樋口 宗史
新潟大学医学部薬理学

Neuropeptide Y (NPY) は食欲を調節する因子の一つとして重要な働きをしており、in vivo の研究から、NPY 遺伝子の発現は Leptin により抑制されることが報告されている。私たちは Leptin により NPY 遺伝子プロモーターがどのように調節されているのかを研究するため、培養細胞による実験系を用いている。Mouse neuroblastoma 由来 N18TG2 細胞に NPY プロモーターを上流に持つルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し Leptin で刺激したところ、予想に反して NPY プロモーターが活性化された。また、Forskolin、KCl により細胞を刺激すると、NPY プロモーターは活性化されるが、Leptin と同時に刺激すると相加的な活性化が認められた。このことは Leptin による活性化は Forskolin、KCl による活性化のメカニズムとは別の機構によることを意味する。Leptin レセプターはサイトカインレセプターと類似した構造を持っており、そのシグナル伝達により STAT3 が活性化される。STAT3 は IL-6 をはじめとするサイトカインのシグナルを伝える転写因子であり、リン酸化により活性化された STAT3 が下流の遺伝子の発現を活性化することがわかっているため、NPY プロモーターにも同様の機構が働いていることが予想されるが、これについては現在検討中である。またこの結果は、in vivo での NPY 遺伝子の挙動と逆の結果を示しており、Leptin による NPY 遺伝子発現調節には少なくとも 2 つのメカニズムがあると予想される。生体内で Leptin が NPY 遺伝子を抑制する機構は Leptin 刺激による直接的作用か、あるいは神経活動による間接的な作用か、未だに明らかにされていない。私たちの研究により、Leptin のメカニズムの詳細が明らかになると期待している。

2P-24

ラット脳スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の加齢による変化

°江頭 亨¹, 高山 房子¹, 山中 康光¹, 酒井 久美子²
¹大分医大・医・薬理, ²大分医大・医・実験実習機器セ

活性酸素種と老化およびその防護機構の一つとしての SOD と老化との関連について、様々な角度から研究されている。今回、ラット脳を用いて、脳各部位の SOD isozyme (Cu,Zn-SOD と Mn-SOD) の加齢変化を酵素活性および酵素免疫法の両面から検討した。また、同時に脳脊髄液 (CSF) 中のそれらについても検討した。

Wistar 系雄ラット、6 ~ 120 週齢の脳および CSF をただちに採取し、脳試料は Frontal cortex (FC), Striatum (ST), Hippocampus (HP), Hypothalamus (ST) および cerebellum (CE) の 5 部位に分割した。脳および CSF 試料の SOD 様活性はスピントラップ剤 (DMPO) を用いた電子スピン共鳴 (ESR) 法で、SOD isozyme タンパクは酵素免疫法で検出した。

Cu,Zn-SOD 様活性では、FC、HP および CE では加齢変化は認められなかったが、ST および ST 部位では加齢とともに活性低下がみられた。Mn-SOD 様活性では、FC を除きその他の部位では加齢とともに有意な活性増加がみられ、特に HP では 20 週齢で最大活性を示し、その後もその活性を維持した。一方、CSF 中では、両活性とも高値を示し、加齢とともに低下した。また、すべての脳部位で、Cu,Zn-SOD および Mn-SOD のタンパクのバンドが Western blotting で検出されたが、明らかなタンパク検出量の加齢変化は認められなかった。しかし、CSF を試料とした場合、Cu,Zn-SOD のわずかなタンパクのバンドが検出されたが、Mn-SOD はほとんど検出できなかった。

加齢による SOD の変化では、出生後、成長過程では増加し、老化が進につれ活性が低下する傾向にあるとの報告が多い。今回、ラット脳の各部位で SOD isozyme の加齢による変動を検討したが、Cu,Zn-SOD 活性の変動は小さく、一定の発現をしているものと思われる。一方、Mn-SOD 活性は脳各部位で加齢とともに増加を示し、Mn-SOD は加齢により惹起される細胞の活性酸素種からの保護蛋白として働いている可能性がある。しかし、CSF 中の Cu,Zn-SOD および Mn-SOD 様活性の高値がみられたが、Cu,Zn-SOD および Mn-SOD のタンパクのバンドの検出はわずかであったことから、CSF 中の Cu,Zn-SOD および Mn-SOD 様活性の大部分は内因性の抗酸化物質によるものと思われる。

2P-25

片側性内頸動脈 MPTP 投与によるサル脳グルタミン酸代謝の変化 - 非侵襲的 ¹³C-MRS による研究 -

°金松 知幸¹, 南部 篤², 大槻 泰介³, 小田 正記¹, 高田 昌彦², 徳野 博信², 渡邊 英宏⁴, 岡本 和也⁴, 梅田 匡朗⁴, 塚田 裕三¹
¹創価大学生命科学研究所, ²東京都神経科学総合研究所, ³国立精神・神経センター武蔵病院脳外科, ⁴(株) 東芝医用機器・システム開発センター

我々は、非侵襲的 ¹³C-MRS 法 (2 T) を用いて、生体に ¹³C でラベルされたブドウ糖を投与した後に、脳内の ¹³C-signal を multivoxel で測定する方法 (Multislice ¹H-¹³C correlation HSQC spectroscopy) を開発してきた。今回、カニクイザル (*Macaca fascicularis*, 5 kg, 雌) に片側性 (左側) に内頸動脈より MPTP (0.5 mg/kg) を投与し、その後経時的 (3, 8, 15, 45 日後) に、脳内左右 (各 1.7 x 2 x 3 cm) 2 voxels の ¹³C-signal を同時に測定した。麻酔下 (ketamine : xylazine = 3 : 1) で、一側の内伏在静脈より [¹³C]-ブドウ糖を、bolus (0.28 g/kg) 投与後、可変量的に連続 3 時間 (0.72 g/kg) にわたり投与した。その間 ¹³C-MRS 測定を 5 分間隔で行った。他側の内伏在静脈より経時的に血液を採取し、血中ブドウ糖の ¹³C 濃度 (¹³C-F.E.) を分析用 ¹H-NMR にて測定した。¹³C-F.E. は ¹³C-ブドウ糖投与開始直後 (2.5 分) にほぼ 60% に達し、その後 120 分まで同じ値を示していた。このことから、¹³C-MRS により脳内グルタミン酸 4 位の signal の経時変化を (相対値として) 測定し、その時定数を求めることにより、グルタミン酸代謝速度 (V_{glu}) の算出が可能であることが示された。MPTP 投与前に 2 回 ¹³C-MRS 測定を行ったところ、ともに左右 2 voxels の V_{glu} は等しい値を示した。MPTP 投与に伴う明らかな Parkinsonism の症状は認められなかったが、MPTP 投与後 3、15 日、45 日目まで左脳の V_{glu} が著しく低下していた。MPTP はドーパミン作動性神経毒であり、黒質線条体路の変性を生じることが知られており、また、V_{glu} は neuron の TCA 回路代謝速度を示していることから、今回の実験結果は、ドーパミン作動性神経の機能低下に伴い、観測領域の neuron 代謝活性が低下したことを示しているものと思われる。

¹³C-NMR スペクトロスコピーによる非侵襲的ヒト脳内グルコース代謝動態の解析—[1-¹³C]-glucose 経口投与による測定—

°松本 暁子¹, 大槻 泰介¹, 金松 知幸², 岡本 和也³, 渡邊 英宏³, 梅田 匡朗³, 塚田 裕三²

¹国立精神・神経センター, ²創価大学生命科学研究所, ³(株)東芝 医用機器・システム開発センター

＜目的＞¹³C-NMR spectroscopy (¹³C-MRS)を用いた脳代謝計測により、脳内でのブドウ糖-アミノ酸代謝動態を定量的かつ経時的に計測することが可能となっているが、従来の¹³C-MRSによるヒト脳のグルコース代謝計測法は、¹³C 標識グルコースを持続的に静脈内に注入する必要があり、幅広い臨床応用には困難な面があった。最近、我々は新しい¹³C-MRS 測定技術（局所励起 HSQC 法）を開発し、安定同位体¹³C 標識グルコース (¹³C-Glc) 投与によるマルチボクセルでの脳内グルタミン酸 (Glu)、グルタミン (Gln) 代謝の計測に成功した。今回、¹³C-Glc の経口投与によりヒト脳内 TCA 回路代謝速度 (Vtca)、脳内グルコース代謝速度 (CMRglc) を計測したので報告する。

＜対象と方法＞対象は、検査に関するインフォームドコンセントを書面にて得た 20 代健康ボランティア 5 名（男性 3 名、女性 2 名）で、測定には（株）東芝製 2.0T スキャナを用い、[1-¹³C]-Glc 溶液 0.75 g/kg を経口投与後、両側後頭葉に設定した各 48ml または 64ml の観測域より経時的に¹³C-MRS 信号を計測した。その間、血糖、血中グルコースの¹³C-fractional enrichment (F.E.)、インシュリン濃度を経時的に測定した。

＜結果＞血中グルコースの¹³C-F.E. はグルコース投与後 60-180 分において、ほぼ一定であった。[4-¹³C]-Glu はグルコース投与約 30 分後より観測され始め、遅れて [3-¹³C]-Glu、[4-¹³C]-Gln が観測された。また数学的代謝モデルを用いて血中グルコースの¹³C-F.E. を入力して計算したところ、Vtca=0.36 ± 0.16 μmol/g/min、CMRglc=0.22 μmol/g/min となり、測定領域に白質が多く含まれていたことを考慮すると、これまでに報告された PET 等による値に近い値と考えられた。

＜結論＞¹³C グルコース経口投与による¹³C-MRS 脳内グルコース-グルタミン酸代謝計測は、新しい非侵襲的脳代謝測定法となる可能性が考えられた。代謝の左右差計測も可能であり、今後、脳機能の解析や痴呆などの脳障害時の病態把握と早期診断の手段、将来的な治療法の開発や薬物効果判定など、臨床的応用が期待される。

Apolipoprotein A-I によるコレステロール搬出に関するアストロサイト細胞内反応

°伊藤 仁一, 長安 祐子, 横山 信治
名市大・医・一生化

アストロサイトは自ら apoE を分泌し、cholesterol-rich な HDL を細胞外に生成する一方、外来性 apoA-I に反応して、cholesterol-poor な HDL も形成する。本研究では ApoA-I によるアストロサイトの HDL 新生に関わる細胞内コレステロールの動向を解析した。ラットアストロサイトに対し、apoA-I は作用開始後 120 分以降に ER でのコレステロール合成を促進した。しかしながら、この合成が促進される 30 分前には、すでに ER で合成されているコレステロールの細胞質へ移行が一過性に促進された。また新たに合成されたコレステロールの apoA-I による細胞外搬出も apoA-I 作用後 1 時間以降に徐々に促進され、細胞質に移行したコレステロールは直ちに細胞膜に到達し、かつ apoA-I により細胞外へと搬出されることが示唆された。一方、細胞質における caveolin 1 もコレステロールの細胞質移動と相関して apoA-I 作用後 60-90 分で一過性に上昇した。また apoA-I 刺激に伴い細胞質に移行したコレステロールは、密度勾配遠心分析により phosphatidylcholine や sphingomyelin とともに密度 1.10 ~ 1.15 g/ml に分布し、caveolin 1 や cyclophilin A もこの画分に colocalize することがわかった。しかし、細胞質における cyclophilin A 分布は caveolin 1 のように apoA-I 作用によるコレステロール分布変化と連動した変化を示めさなかった。cyclophilin A と特異的に結合する cyclosporin A (Cs-A) は、apoA-I による細胞質内へのコレステロールの移動、ER におけるコレステロール合成の上昇、コレステロールの細胞外への搬出、さらに caveolin 1 の細胞質への出現など apoA-I によるコレステロール搬出に強く関わるいずれの反応も抑制した。これらの結果から、アストロサイトでは apoA-I の作用により ER のコレステロールが細胞質内での脂質・蛋白質複合粒子を介して輸送され、細胞外で新生する HDL に積み込まれることが示唆された。またこの細胞内輸送は caveolin 1 と cyclophilin A に機能的に依存し制御されることが示唆された。

2P-28

acidic FGF により分化誘導されたラットアストロサイトーマ GA-1 のコレステロール放出に関する apolipoprotein A-I 反応性の変化

°張 力勇, 伊藤 仁一, 横山 信治
名古屋市大・医・一生化

アストロサイトは apolipoprotein E (apoE) を産生・分泌し、細胞のリン脂質とともにコレステロールを放出することにより、細胞外に HDL を形成する。また、外来性 apoA-I に反応してコレステロール含量の低い HDL を産生する。本実験で我々は、未分化型アストロサイトーマ GA-1 のコレステロール代謝をラットアストロサイトと比較検討すると同時に、aFGF で分化誘導することにより、コレステロール放出に関する apoA-I 反応性がどのように変化するかを調べた。

(方法) ラットアストロサイトーマ GA-1 およびラット胎児脳より分離したアストロサイトに [³H] コレステリルエステル含有 LDL (25mg/mL) と [³H] コリンを 24 時間負荷してコレステロールとコリンリン脂質を標識した後、培養液中にヒト apoA-I を添加して細胞からのコレステロールとリン脂質の放出を経時的に観察した。脂質の分析は、細胞および培養液中から有機溶媒にて抽出後、薄層クロマトにて分離し放射能を測定して行った。

(結果および考察) アストロサイトーマ GA-1 はアストロサイトと比べ apoE の産生が極めて低く、コレステロール放出も低い。一方、外来性 apoA-I に対して高い反応性を示す。aFGF 処理された GA-1 はコレステロール合成が約 20%、また phosphatidylcholine 合成が約 25% 増加した。しかしながら、コレステロール放出については顕著な増加が認められなかった。GA-1 はラットアストロサイトとは異なり、aFGF 処理によって apoE mRNA の発現および分泌に増加が認められなかったことがその原因と考えられた。一方、外来性 apoA-I に対する反応性は低下し、apoA-I-mediated cholesterol release は著しく減少した。ラットアストロサイトも apoA-I 反応性が低いことから、aFGF で処理された GA-1 は apoA-I 反応性に関して分化型に近づいたことが示唆された。また、aFGF で処理された GA-1 は LDL 負荷によるコレステロール供給によってコレステロール合成が著しく抑制され、コレステロール合成の制御機構の発達が示唆された。一方、apoE 産生には変化が認められず、内在性 apoE 依存性のコレステロール搬出については未分化型の特性を維持していた。

2P-29

恐怖条件付けストレスにおける 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase の関与

°野崎 歩^{1,2}, 野田 幸裕¹, 永井 拓¹, 原 明², 鍋島 俊隆¹

¹名古屋大学大学院医学研究科医療薬学, ²岐阜薬科大学生化学

本研究では、恐怖条件付けストレス (CFS) 反応における脳内ステロイドの役割を調べるため、ニューロステロイドの代謝酵素に着目した。そこで、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) を androstendione に代謝する酵素である 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) の CFS 反応時の酵素活性およびこの酵素を阻害した時の、ストレス反応への影響を行動薬理学的および生化学的に検討した。動物はマウスを用い、ストレス反応は CFS 試験を用いた。すなわち、第 1 日目にマウスを装置に入れ、電気ショック (1mA, 200msec) を床グリッドより 10 秒毎に 6 分間与えた。第 2 日目にマウスを同一装置内に入れ、電気ショックを与えず、行動量を 6 分間測定した (stress 群)。DHEAS (0.1 nmol/mouse) を脳内投与または 3 β -HSD 阻害薬のトリロスタンと連続投与すると、CFS 反応は有意に緩解され、これらの緩解作用はシグマ₁ 受容体拮抗薬 (5 mg/kg ip) によって有意に拮抗された。これらの結果から DHEAS の CFS 反応の緩解作用は脳内シグマ₁ 受容体を介して発現していることが示唆される。また、トリロスタンは 3 β -HSD を阻害することによって、DHEA から androstendione への代謝経路を抑制し、その結果、相対的に DHEA が増加したことによりストレス反応が緩解されたものと考えられる。事実、トリロスタン連続投与マウスの脳内 3 β -HSD 活性は抑制されていた。一方、第 1 日目に電気ショックを負荷したマウスの脳内 3 β -HSD 活性は、非ストレス群のそれに比べて有意に増加していたが、恐怖条件付けストレス反応を呈したマウスのそれは、有意に低下していた。以上の結果より、CFS による緩解作用は末梢ではなく脳内の sigma₁ 受容体を介していることが示唆され、3 β -HSD 活性の変化に伴う脳内 DHEAS 含量の変化が、CFS 反応の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

胎児性アルコール症候群モデルラット脳の糖鎖発現

°川島 麗^{1,3}, 中村 和生^{1,3}, 李 洪珍³, 斎藤 真希², 田口 雅之², 斎藤 克², 玉井 洋一^{1,4}, 小嶋 久子^{1,3}

¹北里大院・分子病態医化学, ²北里大・医・産婦人科学, ³北里大・医・生化, ⁴人間総合科学大学

妊婦のアルコール摂取は“胎児性アルコール症候群”と呼ばれる中枢神経障害を起こすことがある。我々は、妊娠中のラットにアルコールを強制摂取させると、生まれた仔ラット脳ミエリンの2',3',-環状ヌクレオチド3'-リン酸水解酵素とミエリン塩基性タンパク質のmRNA発現が低下すること、プロテオリビドプロテイン (PLP) のmRNA発現が対照に比較して遅延することを観察し、胎仔期のアルコール被曝によるミエリン形成の遅れが生化学的検索から示唆された。本研究では、ミエリン形成開始に関与するミエリン関連糖タンパク質 (MAG) の発現をノーザンブロットで調べた。対照群 (生食投与) に比較して胎仔期アルコール被曝群 (2g/kg 体重/日、または2.5g/kg 体重/日) の発現が著しく遅延し、発現のパターンはPLPと相似していた。MAGはFynチロシンキナーゼと相互作用して細胞内情報伝達を行うとともに、特定のガングリオシドとも相互作用することが知られている。最近、胎仔に対するアルコールの投与が、GABAレセプターやNMDAレセプターに影響を与えて、アポトーシスを引き起こすことなどが報告されている。ガングリオシド等の糖鎖も神経系ではシグナル伝達に関与する重要な物質であるので、ガングリオシド合成酵素の動態についても検討した。CMP-シアル酸:ガラクトースβ-1,3ガラクトサミンα2,3-シアル酸転移酵素のcDNA断片をプローブとするノーザンブロット分析では、対照群と胎仔期アルコール被曝群に明瞭な差は認められなかった。脳のガングリオシド組成を検討すると、薄層クロマト上、GD2の増加とGQ1bの減少が観察され、その程度はアルコール被曝量が多い程顕著であった。α2,8-シアル酸転移酵素やN-アセチルガラクトサミン転移酵素の活性変化が予想されるので、ノーザンブロットによるこれら糖転移酵素のmRNA発現と酵素活性を検討中である。

Caspases are involved in hypoxia/ ischemia-induced death of oligodendrocytes.

°Mamoru SHIBATA^{1,2}, Shin HISAHARA², Hideaki HARA³, Takemori YAMAWAKI⁴, Yasuo FUKUUCHI¹, Junying YUAN⁵, Hideyuki OKANO², Masayuki MIURA²

¹Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, ²Division of Neuroanatomy, Department of Neuroscience, Osaka University Graduate School of Medicine, ³Nara Research and Development Center, Santen Pharmaceutical Co. Ltd., ⁴Division of Cerebral Circulation Research, National Cardiovascular Center Research Institute, ⁵Department of Cell Biology, Harvard Medical School

Caspases play a pivotal role in cell death in normal development and pathological conditions. Oligodendrocytes (OLGs) are the only myelin-forming cells in the central nervous system, and are known to be susceptible to hypoxia and ischemia. However, the precise mechanism whereby such insults lead to OLG death remains unknown. We established a transgenic mouse line conditionally expressing p35, a baculovirus-derived wide-range caspase inhibitor, in the context of the myelin basic protein promoter (p35 Tg). After 6 hours of hypoxia, OLG primary cultures prepared from wild-type mice (WT-OLG) exhibited a substantial cell loss and robust DNA fragmentation in remaining cells, which was accompanied by caspase-3 activation. OLGs derived from p35 Tg (p35 Tg-OLG) were resistant to the hypoxic insult and, as expected, no significant caspase-3 activation occurred after hypoxia. This finding indicated that caspases are important mediators of hypoxia-induced OLG death. Western blot analysis revealed that the expression of caspase-11 was elevated in both WT-OLG and p35 Tg-OLG after hypoxia. OLGs prepared from caspase-11 knockout mice were less vulnerable to hypoxia and showed only a modest increase in caspase-3 activation, suggesting that caspase-11-dependent caspase-3 activation is concerned with hypoxia-induced OLG death. In a focal permanent ischemia model, wild-type mice displayed a time-dependent loss of OLGs and increased occurrence of DNA fragmentation in the ischemic cortex. The expression of caspase-11 was up-regulated, which started as little as 1 hour after ischemia. In p35 Tg and caspase-11 knockout mice, OLGs were significantly resistant to ischemic insult. These findings suggest that caspases play an important role in ischemia-induced OLG demise and that caspase-11 is a key upstream arbiter.

2P-32

ラット軽度脊髄損傷モデルにおける感覚異常の検討

森野 忠夫, 堀内 秀樹, 尾形 直則, 竹葉 淳, 山本 晴康
愛媛大学医学部整形外科

【目的】脊髄損傷後の痛覚過敏・鈍麻、allodyniaなどの感覚異常は、そのメカニズムが不明であることから有効な治療法も乏しく、治療に難渋する病態である。我々はこれまでにラットの脊髄を軽度圧迫すると、圧迫後1～3日まで徐々に立ち上がり回数が減少していく遅発性運動障害モデルを作成してきた。このモデルでは立ち上がり回数の減少に比例して、圧迫部位の脊髄組織内にマイクログリアが増殖してきており、遅発性運動障害にマイクログリア増殖を含む炎症反応が関与している可能性がある。今回我々は、軽度脊髄損傷モデルの温痛覚閾値を測定し、圧迫後の炎症反応が感覚異常を引き起こすか否かを検討した。【方法】3～5ヶ月齢のWistar系雌ラットの、第11胸椎レベルで椎弓を切除し、脊髄軽度損傷ラットは、20gの重錘を硬膜上に20分間置くことによって脊髄に軽度な障害を加えた。shamラットは、椎弓切除のみを行った。障害後1～7日まで1日ごとにHargreaves' Plantar test apparatus (Ugo Basil, Varese, Italy)を用いて、両後肢足底部の熱刺激によるwithdrawal latencyの変動を測定した。結果は、処置を加えていないnormalラットのlatencyに対する割合として示した。【結果】椎弓切除のみを行ったshamラットでは、処置後1週間まで温痛覚閾値の低下は認められなかったが(94-105%)、脊髄に圧迫を加えたラットでは処置後1日目から温痛覚閾値の低下、すなわちlatencyの短縮が認められ(1日目:84%, 2日目87%)、3日目から回復し始めて(94%)、4日目から1週間後にはshamラットとほぼ同じレベルまで回復していた(96-104%)。【考察】今回の実験では、ラット胸髄に軽度圧迫を加えると、一過性の温痛覚の過敏が生じることが分かった。本研究における温痛覚過敏の出現時期は、脊髄組織内にマイクログリアが増殖する期間にほぼ一致しており、マイクログリア増殖をはじめとする炎症反応が温痛覚過敏の原因の1つとなっている可能性が考えられた。

2P-33

ストレスによる脳内ヒスタミン含量の変化

櫻井 映子¹, 遠藤 雅俊¹, 揚 志博², 渡邊 建彦¹, 谷内 一彦¹

¹東北大学大学院医学系研究科・薬理, ²サントリー基礎研

生理活性物質ヒスタミンは、日内リズムや摂食行動との関係が明らかにされ、最近ではH1、H2、H3受容体を介した役割が解明されつつある。また外部環境によるストレスにもヒスタミンは関与していることが考えられる。今回は、ストレスとヒスタミン神経系との関係について検討した。ストレスを負荷したマウスおよびラットの脳では、慢性的に与えられたストレスにより、コントロールに比べ脳内のヒスタミン含量が増加していた。強制水泳を行わせながらマイクロダイアリス法を用いて脳内から遊離されるヒスタミン量を測定したところ、灌流液中のヒスタミン量は基礎レベルの約1.7倍に増加していた。よってストレス負荷によりヒスタミンは遊離すると考えられる。そこで肥満細胞欠損(w/wv)マウスと野生型マウス(w+/w+)を個々のホルダーに入れ拘束ストレスを与えて3時間後に脳を取り出し、ヒスタミン含量を調べた。w/wvマウスで脳内ヒスタミンが有意に減少していたのに対して、w+/w+マウスでは逆に有意に増加していた。ストレス時にはヒスタミン神経系からヒスタミンが遊離され脳内のヒスタミンは減少し、肥満細胞由来のヒスタミンが増加すると考えられた。さらに薬物のよるヒスタミン神経系の賦活効果を、食餌制限下にActivity-stressを負荷したラットに観察されるhyperactivityを指標として調べた。我々は以前にActivity-stress負荷により回転運動量が増加(hyperactivity)し、hyperactivity時にはヒスタミン神経系の活動が低下していることを報告している。今回、ヒスタミンの前駆物質であるヒスチジンの投与群では有意にhyperactivityが抑制され、また脳室内に持続的に微量投与したヒスタミン処理群においてもhyperactivityは抑制された。逆にヒスチジン脱炭酸酵素の特異的阻害剤である α -Fluoromethyl-histamine(FMH)投与では、hyperactivityが生理食塩水投与群より増加した。以上の結果は、ストレスによって誘発されるhyperactivityをヒスタミン神経系が抑制している可能性を示している。

2P-34

Effects of levodopa combined with dopa decarboxylase inhibitor on dopaminergic dysfunction in the 6-OHDA-lesioned mouse striatum

°Naoko FUJITA, Ken-ichi TANAKA, Norio OGAWA
Department of Neuroscience, Okayama University
Medical School

Levodopa is usually administered as a mixture with peripheral dopa decarboxylase inhibitor (DCI), benserazide and carbidopa. Clinically, some reports showed no differences between both mixtures in terms of improvement insymptoms and adverse effects, but many showed the discrepancy of pharmacological properties between two DCIs. In the present study, we examined the effects of levodopa combined with DCI on 6-OHDA-induced dopaminergic dysfunction in the mouse striatum, to clarify the influence of levodopa concentrations or combination ratio with levodopa and DCI. Daily treatments of levodopa/DCI (50/12.5 mg/kg) for 7 days enhanced lipid peroxidation induced by auto-oxidation in the 6-OHDA-lesioned mouse striatum. Furthermore, levodopa/DCI also increased dopamine and its turnover, and glutathione contents. Moreover, it seemed that benserazide, but not carbidopa, acted on central dopa decarboxylase.

2P-35

Propargylamine 類による神経細胞のアポトーシス防御の機序

°直井 信¹, 丸山 和佳子², 赤尾 幸博³, 高橋 勤⁴

¹応用生化学研究所脳科学研究部, ²国療長寿医療研究センター老化機構研究部生化学代謝研究室, ³岐阜国際バイオ研究所, ⁴愛知江南短大

(-)-deprenyl (selegiline) は B 型モノアミン酸化酵素 (MAO-B) の阻害剤であるが、近年その神経保護作用が注目されている。我々は、ドパミン細胞のモデルである MAO-B が発現していない神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い、propargylamine による抗アポトーシス作用を検討し、その細胞内機構を明らかにした。in vitro のアポトーシス実験系として内在性神経毒 N-methyl(R)salsolinol (NM(R)Sal), 合成神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA)、パーオキシナイトライトを生成する SIN-1 を用い propidium iodide, Hoechst 33342 による蛍光染色を用いた形態変化の測定から抗アポトーシス作用を検討した。ミトコンドリア permeability transition pore (PTP) に対する作用を JC-1 を用いたミトコンドリア膜電位の測定より検討し、ラット肝より単離したミトコンドリアを用いて PTP への propargylamine の直接作用を検討した。Selegiline を含む propargylamine 類は 10 nM という低濃度においても抗アポトーシス作用を示した。この作用のためには propargylamine 基が必須であり、MAO-B 阻害活性と抗アポトーシス活性の間には相関は認められなかった。propargylamine は NM(R)Sal, 6-OHDA, SIN-1 いずれによる細胞死も防御し、その作用発現のためには予め細胞を propargylamine で処理しておくことが必要であった。propargylamine 類によりミトコンドリア膜電位の低下が抑止されたとともに、caspase-3 の活性化が阻害された。さらに単離ミトコンドリアにおいても、propargylamine 類はミトコンドリア膜電位を保持し PTP からの Rohdamine 123 の流出を阻止した。propargylamine 類はミトコンドリアに存在する標的タンパクに直接作用し、抗アポトーシス作用を示した可能性がある。

2P-36

ヒトニューロblastomaにおける MPP⁺誘発細胞障害とミトコンドリア機能異常

°森 厚詞, 中井 正三, 光本 泰秀

大塚製薬 (株) 医薬第二研究所・神経変性疾患グループ

MPTP は脳内で B 型モノアミン酸化酵素によって MPP⁺に変換され、この毒性代謝物はドパミントランスポーターを介してドパミン神経細胞内に特異的に取り込まれる。取り込まれた MPP⁺はミトコンドリア電子伝達系の複合体Iを阻害することによりエネルギー産生系の障害を惹起し、神経変性を引き起こすと考えられている。また培養神経細胞系では、MPP⁺の添加により細胞内 ATP 量の低下並びに NADH 量の増加が認められ、更にはクロマチンの断片化を伴った典型的なアポトーシスの形態が観察される。そこで SH-SY5Y ヒトニューロblastoma を用い MPP⁺で誘発される形態的細胞傷害に至るまでのミトコンドリア機能変化について検討した。

10%牛胎仔血清を含んだ DMEM で維持した SH-SY5Y ヒトニューロblastoma を無血清 N2 含有 DMEM に培地交換と同時に種々濃度の MPP⁺添加した。一定時間処理後、細胞代謝活性は MTT 還元能をミトコンドリア酸化還元活性は Alamar blue 蛍光を各々指標に測定した。またミトコンドリア内膜電位は JC-1 の蛍光比を指標に測定し、アポトーシスの形態的評価は Hoechst 33258 染色による核断片化を蛍光顕微鏡により観察した。

MPP⁺ 24 時間処理後のニューロblastoma 細胞では、その濃度依存的 (0.1-2.5 mM) に MTT 還元能並びに Alamar blue 蛍光の減少が認められ、2.5 mM でコントロールの約 50%であった。この処理時間においては JC-1 蛍光比に殆ど変化は認められなかった。更に MPP⁺ 48 時間処理後では、その濃度依存的に MTT 還元能並びに Alamar blue 蛍光の減少が認められ、2.5 mM MPP⁺でコントロールの約 5%であった。またこの処理時間では、1 mM 以上の濃度で JC-1 蛍光比の減少が認められ、核の断片化が観察された。

以上の結果から、このニューロblastoma における MPP⁺誘発細胞傷害機構として、ミトコンドリア酸化還元活性の低下並びにそれに引き続いて起こるミトコンドリア内膜の脱分極によるアポトーシスの誘導が示唆された。

2P-37

機能不全骨格筋における αB クリスタリンのリン酸化

°加藤 兼房, 稲熊 裕, 伊東 秀記, 亀井 慶子, 岩本 郁子

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部

細胞・組織中の αB クリスタリンは種々のストレスに応答して分子内の三カ所のセリン残基 (Ser-19, Ser-45, Ser-59) がリン酸化され、Ser-45 は p44/42 MAP キナーゼ、Ser-59 は MAPKAP キナーゼ 2 によってリン酸化されることを明らかにしてきた (1,2)。ラット心筋・骨格筋の αB クリスタリンは熱や虚血ストレスによってリン酸化が促進されるがその生理的意義は不明である。今回、αB クリスタリンのリン酸化の意義を明らかにするために、成獣ラット下肢筋が種々の機能不全状態 (除神経、腱切断あるいは尾懸垂による廃用萎縮) に陥った時に、αB クリスタリンのリン酸化状態がどのように変化するかを解析した。(方法) それぞれの機能不全状態のヒラメ筋 (SOL) と長指伸筋 (EDL) を経日的に採取して、組織抽出液を可溶性分画と不溶性分画に分け、不溶性分画は 7 M 尿素を含む緩衝液で溶解し、それぞれを SDS-PAGE あるいは IEF 後ニトロセルロース膜に転写し、三カ所のセリン残基のリン酸化を認識する抗体を含む種々の抗体を用いて解析した。(結果) αB クリスタリンは赤筋である SOL で多く、リン酸化型 (おもに Ser-59) も検出された。上記の三種類の処置のいずれの場合も Ser-59 と Ser-45 のリン酸化型が増量したが、とくに廃用萎縮筋で顕著で、懸垂 2 日目から可溶性・不溶性分画ともに急増し、10 日目では廃用萎縮筋でのみ Ser-59 のリン酸化型が高いレベルを示した。Ser-59 と Ser-45 のリン酸化活性も上昇し、リン酸化型 (活性型) の p44/42 MAP キナーゼと p38 MAP キナーゼが増加していた。(結語) 骨格筋の機能不全とくに廃用萎縮の早期の応答として、抗重力筋中の αB クリスタリンの Ser-59 が、p38 MAP キナーゼカスケードの活性化を伴ってリン酸化されることが明らかになった。1) J. Biol. Chem., 272, 29934-41, 1997) 2) J. Biol. Chem., 273, 28346-54, 1998

骨格筋変性過程における、HCNP 前駆体蛋白の経時的発現。

°鈴木 日子¹, 松川 則之¹, 藤森 修², 上田 龍三¹, 小鹿 幸生¹

¹名古屋市立大学医学部第二内科, ²名古屋市立大学医学部第二解剖学

HCNP は培養内側中隔核コリン作動性神経のアセチルコリン産生を促進する 11 アミノ酸からなるペプチドである。HCNP 前駆蛋白 (HCNPpp) は多機能蛋白と考えられ、HCNP の前駆蛋白としてのみならず、ATP やフォスファチジルエタノールアミンなどの結合蛋白としても機能している。更に最近 Raf-1 kinase のインヒビターとして、Raf/MEK/ERK 系の調節因子として機能していることが判明した。また我々はこれまでに HCNP 関連抗原が、ヒト疾患で中枢神経系や骨格筋に封入体として沈着している事を報告し、これらの組織の傷害過程に HCNP 関連成分が関与していることを示唆した。今回、骨格筋組織の傷害モデルを用い筋傷害時の HCNPpp 変化について検討したので報告する。

方法: 300g ~ 330g のメス Wistar-rat をネンブタール麻酔し、640g のアルミニウムブロックを 25cm の高さからヒラメ筋に落下して筋に損傷を与えた。損傷後 2 時間, 4 時間, 8 時間, 24 時間, 2 日, 4 日, 5 日, 7 日にラットを麻酔下に 4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定し、パラフィン包埋した。5µm の連続切片を作成し、H.E 染色及び抗 HCNPpp 特異抗体、抗デスミン抗体を用い SAB 法で免疫染色を実施した。また、傷害巣とその近傍の骨格筋の抽出蛋白 30µg を 12% SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写、抗 HCNPpp 抗体を用い Western blot を行った。バンドの検出は ECL 法によった。

結果及び考察: 筋傷害後 2 時間より、時間の経過と共に傷害筋線維は増加し、4 日後には最大に達し、同時にデスミン抗体陽性の再生線維が観察されるようになった。免疫組織染色に於いて抗 HCNPpp 抗体に反応する抗原は、傷害筋線維に検出され、すでに 2 時間後の早期より傷害筋線維に確認された。傷害筋線維の増加と共に HCNPpp 抗原陽性線維も経時的に増加を示したが、7 日後には観察されなくなった。非傷害部の正常筋線維や再生筋線維には HCNPpp 抗原陽性線維は認められなかった。受傷 2 日後の筋組織を Western-blot 法で検討すると、非傷害部筋組織にも HCNPpp 抗原は認識されたが、傷害部筋組織で明らかな増加を示した。

これらの結果から、HCNPpp の発現は正常筋組織では少量であるが、骨格筋の傷害により早期に発現し、その傷害過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

中大脳動脈皮質枝閉塞後のニューロピリン 1、2 及びセマフォリン III mRNA の発現変化

°藤田 弘子¹, 張 波², 阪中 雅広¹

¹愛媛大学解剖学第二, ²愛媛大学生理学第一

ニューロピリンやセマフォリンは、神経軸索ガイダンスに関わる物質としてよく知られているが、神経の再生や細胞死にも関与することも報告されている。これらの発現が、脳梗塞により神経細胞死や神経変性がおこる虚血脳でどのような挙動をとるのかは、知られていない。本研究では、特異的な各 cRNA プローブを作成し、左中大脳動脈皮質枝 (MCA) 閉塞後のニューロピリン 1、2 及びセマフォリン III の各 mRNA の時間的・空間的な発現変化を in situ hybridization で調べた。大脳皮質梗塞巣は、12 週齢 (250-300g) の脳卒中易発症型高血圧自然発症ラットの、MCA をハロセン麻酔下で穿通枝より遠位部で焼灼凝固することにより作成した。ニューロピリン 1 は、コントロール側に比べ梗塞側で、閉塞後 3h から大脳皮質 5・6 層の頭頂葉付近で、6h には梗塞部を除く大脳皮質 5・6 層の側頭葉でも有意に上昇した。セマフォリン III は、閉塞後 3h から、梗塞側の頭頂葉付近の 6 層の一部で有意に上昇したが、その他の部位ではコントロール側と比べ有意な変化はみられなかった。ニューロピリン 2 は、頭頂葉の 2 層の一部での発現が閉塞後 1h から有意に上昇した。これらのコントロール側との差は、脳梗塞後 12h になると認められなくなった。またこれらの mRNA の発現は、いずれも神経細胞において生じると考えられた。梗塞巣の神経細胞でのニューロピリンやセマフォリン発現は、MCA 閉塞後 3 日目には消失した。皮質梗塞後二次変性をきたす視床後腹側核では、MCA 閉塞後 2 週間まで観察したがニューロピリンやセマフォリンの発現はみられなかった。MCA 閉塞後 1 週間には、梗塞巣でのニューロピリン 1、2 の新たな発現が顕著に観察された。この梗塞巣での発現細胞はマイクログリア/マクロファージであると考えられた。以上の結果から、(1) 梗塞巣での神経細胞死にセマフォリン III は、あまり関与していないこと、(2) ニューロピリン 1 の一過性の上昇は、ischemic penumbra の神経細胞の生存に寄与する可能性があること、(3) 梗塞巣でのマイクログリア/マクロファージにおけるニューロピリン 1、2 の発現は、これらの細胞が梗塞巣に移動するのに関与する可能性があることが示唆された。

2P-40

局所脳虚血・再灌流時の ERK signal cascade の役割

°小堺 有史, 福内 靖男, 田中 耕太郎, 野川 茂, 伊東 大介, 鈴木 重明, 傳法 倫久
慶應義塾大学医学部神経内科

【目的】: 脳虚血時における extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal cascade の役割には、神経細胞に対して保護作用があるとする報告と障害作用があるとする報告の両者があり、明らかな結論はでない。今回、ラット局所脳虚血モデルを用いて、リン酸化 ERK の発現の分布を TUNEL 染色陽性細胞の分布と比較した。

【方法】: Sprague-Dawley ラットを sham 手術群 (n=3) と虚血・再灌流群 (n=5) に分けた。虚血・再灌流群では、右中大脳動脈起始部を血管内栓子法で 90 分間閉塞、その後 24 時間再灌流した。灌流固定後、脳を凍結し、クリオスタットで厚さ 20 μ m の連続切片を作成した。その後、抗リン酸化 ERK 抗体 (New England Biolab) を用い、ABC 法によって免疫染色を行った。また、TUNEL 染色および cresyl violet 染色を行った。

【結果】: sham 群のリン酸化 ERK 陽性細胞は極く少数で染色強度も弱かった。また、TUNEL 陽性細胞は認めなかった。虚血・再灌流群では、リン酸化 ERK は虚血周辺部の神経細胞に強く発現しており、これは虚血中心部の TUNEL 陽性細胞の分布領域に隣接した領域であった。すなわち、リン酸化 ERK の発現が明らかな領域では TUNEL 陽性細胞は認められず、cresyl violet 染色上神経細胞は正常な形態を示していた。

【結論】: ERK リン酸化を介した情報伝達は、梗塞周辺部で神経保護的に作用している可能性がある。

2P-41

VEGF は Akt、ERK の活性化を介して神経保護効果を示す

°松崎 秀夫^{1,3}, 玉谷 実智夫^{1,3}, 満田 憲昭^{1,3}, 涛川 一彦², 木山 博資², 三宅 進一^{1,3}, 山口 淳^{1,3}, 遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座, ²旭川医科大学医学部第一解剖学講座, ³科学技術振興事業団

初代培養神経細胞を用い、VEGF (血管内皮増殖因子) の神経保護効果について検討した。VEGF はグルタミン酸による神経細胞死を用量依存性に抑制し、Akt、ERK の活性化を誘導した。この VEGF の神経保護作用は PI-3kinase、MEK の阻害ないし kinase-defective Akt の発現により抑制された。一方、活性化型 Akt ないし MEK を神経細胞に強制発現させることによりグルタミン酸による神経細胞死は有意に抑制された。さらに VEGF 受容体 (Flt-1、Flk-1) のアンチセンスオリゴを加えて神経細胞を培養し、各受容体を選択的に阻害すると、Flk-1 を阻害した場合にのみ VEGF の神経保護効果および Akt、ERK の活性化が顕著に抑制された。以上の結果から VEGF は Flk-1 を介して Akt、ERK を活性化することで神経保護効果を示すものと考えられた。

局所脳虚血・再灌流時の CREB リン酸化、Bcl-2 発現と組織損傷の関係

°田中 耕太郎, 福内 靖男, 野川 茂, 伊東 大介, 鈴木 重明, 傳法 倫久, 小堺 有史
慶應義塾大学医学部神経内科

[目的]: 最近、各種神経栄養因子による神経保護効果が、cyclic AMP 応答エレメント結合蛋白 (CREB) のリン酸化を介する Bcl-2 蛋白の発現によることが細胞培養系で示されている。今回、脳虚血モデルで、CREB リン酸化、Bcl-2 発現と組織損傷の関係について検討した。
[方法]: Sprague-Dawley ラットを用い、sham 手術群 (n=5) と虚血・再灌流群 (n=6) に分けた。虚血・再灌流群では、右中大脳動脈起始部を血管内栓系法で 90 分閉塞し、その後 48 時間再灌流した。灌流固定後、脳を凍結し、クリオスタットで厚さ 20 μ m の連続切片を作成した。その後、抗リン酸化 CREB 抗体および抗 Bcl-2 抗体を用い、ABC 法によって免疫染色を行った。また、TUNEL 染色および cresyl violet 染色も施行した。これら免疫染色陽性細胞数を各脳領域で計測した。

[結果]: Sham 群の大脳皮質でリン酸化 CREB 陽性細胞数は 61.2 ± 5.6 (0.15 mm²) であり、染色強度は軽度であった。また Bcl-2 陽性細胞および TUNEL 染色陽性細胞は特に認めなかった。虚血・再灌流群の梗塞巣中心部大脳皮質ではリン酸化 CREB 陽性細胞数は 24.3 ± 7.3 と有意に減少し、Bcl-2 陽性細胞は 0 ± 0 、TUNEL 染色陽性細胞は 165.5 ± 43.3 であり、cresyl violet 染色上、神経細胞の損傷は明らかであった。一方、梗塞巣周辺部では、リン酸化 CREB 陽性細胞数は 148.3 ± 1.5 と有意に増加しており染色強度も増加していた。また Bcl-2 陽性細胞も 121.4 ± 9.5 と有意に増加し、一方、TUNEL 染色陽性細胞は 1.1 ± 0.6 と殆ど認めず、神経細胞は形態的に正常に保たれていた。2 重染色で Bcl-2 陽性細胞は、リン酸化 CREB 陽性であることが確認された。

[結論]: CREB リン酸化を介する情報伝達は、梗塞巣周辺部で、Bcl-2 発現を介し細胞保護的に作用していると考えられる。

GRP94(94kDa Glucose-Regulated Protein) は虚血性神経細胞死を抑制する

°板東 良雄^{1,2}, 玉谷 実智夫^{1,2}, 谷口 学^{1,2}, 河西 克介¹, 遠山 正彌^{1,2}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座(第2解剖),
²科学技術振興財団

GRP94 は GRP78 と同様に小胞体中存在する分子シャペロンである一方、低酸素・虚血などの小胞体ストレスにより誘導され、低酸素環境における細胞機能の維持に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、GRP94 が虚血性神経細胞死にどのように関わっているかについては未だ解明されていない。そこで、GRP94 の虚血性神経細胞死への関与について検討した。ヒト神経芽細胞種 SY5Y 細胞を用いて検討したところ、低酸素・再酸素負荷や A23187 負荷により GRP94 は誘導された。次に GRP94 の機能を検討するために、アデノウイルスを用いて GRP94 の強制発現系を作成した。GRP94 を過剰発現させると低酸素・再酸素化や A23187 負荷に対して細胞死は抑制されたが、GRP94 の誘導を抑制すると viability はさらに低下した。このときの細胞内カルシウムを fura-2 を用いて測定したところ、これら負荷に対して細胞内カルシウムの上昇は GRP94 を過剰発現 (AdGRP94S) させることにより抑制され、GRP94 の誘導抑制により顕著に上昇した。このことは小胞体内のカルシウムの漏出が細胞死を進行させる、さらにその制御に GRP94 が関与していることを示唆する。次に砂ネズミの一過性脳虚血モデルを用いて in vivo における役割について検討した。片側の CA1 領域に AdGRP94S を遺伝子導入し、AdGRP94 による虚血耐性の獲得について検討した。その結果、導入側は反対側に比して有為に虚血による神経細胞死を抑制した。以上の結果から、GRP94 は小胞体においてカルシウムホメオスタシスの維持に重要な役割を担っており、細胞内カルシウムの上昇を防ぐことにより、虚血性神経細胞死を抑制することが示唆された。

2P-44

脳虚血再灌流負荷後に投与した 17 β -estradiol による海馬組織内 caspase-3 活性化の抑制効果

°藤田 公和¹, 山内 理充², 加藤 寿章¹, 柴山 健三¹, 芳本 信子³, 永田 豊¹, 宮地 栄一¹

¹藤田保健大・医・生理学教室, ²愛知学泉短期大学, ³名古屋文理短期大学

[目的] 砂ネズミの両側総頸動脈を 10 分間遮断する一過性の前脳虚血負荷後に、特に海馬 CA1 領域で発生する遅発性神経細胞死を抑制する目的で、10 μ g の 17 β -estradiol(17 β -ED) を腹腔内へ投与した。そしてこの抑制効果を、Ca²⁺ 依存性でタンパク架橋を促進する変性指標酵素の組織型トランスグルタミナーゼ (TGase) 活性値と TGase 酵素蛋白量の変動を指標として証明した。今回はさらに 17 β -ED の神経細胞死抑制の作用機序を検討するために、海馬組織中の caspase-3 活性の測定と TUNEL 染色を実施した。

[方法] 体重 60 ~ 70g の砂ネズミ (雄のみ) をフローセン・ガスによる全身麻酔下に、両側総頸動脈を同時に 10 分間閉塞して脳血流を遮断した。そして脳血流再灌流後 1 日目、3 日目および 7 日目に再び麻酔した動物を断頭して、脳組織を摘出した。負荷動物に 10 μ g の 17 β -ED を含む生理食塩水 1ml を、手術直後とその後毎日 6 日間 (1 日 1 回)、腹腔内へ注射した。脳組織内 caspase-3 活性値の測定は CPP32/Caspase-3 colorimetric protease assay kit (MBL 社製) を用いて実施した。

[結果と考察] 脳虚血再灌流負荷したネズミの海馬組織内 caspase-3 活性値は、対照と比較して 1 日後にはほとんど変動が認められなかったが、3 日後では 119.3%、7 日後には 147.7% まで増加した。一方、脳虚血負荷後 17 β -ED を投与したネズミの海馬組織内 caspase-3 活性値は 3 日後で対照の 103.1%、7 日後で 110.8% の増加に留まった。また、脳虚血再灌流負荷後に海馬組織内で観察される TUNEL 陽性反応神経細胞数は、17 β -ED 投与により減少する傾向が認められた。従って、脳虚血負荷後に投与した 17 β -ED は caspase-3 の活性化を抑えることによってアポトーシスを抑制することが示唆された。

2P-45

脳虚血によるミクログリアの神経細胞における遊走能と保護作用

°鈴木 弘美^{1,2}, 今井 文博², 澤田 誠^{1,3}

¹藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・難病治療共同研究部門, ²藤田保健衛生大学・医学部・脳神経外科,

³科学技術振興事業団さがけ 21

ミクログリアは脳内のマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で、脳に対して特異的な役割を持つ細胞と考えられている。その役割の一つとして、脳虚血では内在性ミクログリアが活性化し、虚血巣に遊走し増殖すると言われている。しかし、集積・活性化したミクログリアが変性巣ではどのような作用をもっているのかは明確にはわかっていない。我々は、これまでに種々の方法で標識したミクログリアを血中投与すると血液脳関門を通過して脳実質内に侵入すること、さらに、他の臓器にはあまり侵入がみられず脳に特異的に移入する性質を持つことを確認している。今回、これらの実験系を用いて外来性ミクログリアの脳の虚血巣への遊走及び、その影響を検討した。スナネズミに蛍光色素 (PKH26) 標識ミクログリアを動脈注入し、翌日に両側頸動脈の 5 分間閉塞による一過性前脳虚血の処置を施した。虚血処理後 1・3・5・7 日で脳を採取し、TUNEL 染色・ニッスル染色・サイモシン染色・レクチン染色により虚血後の細胞死についてミクログリアの動態と虚血後の細胞死について検索を行った。細胞注入 24 時間後には脳全体への標識ミクログリアの侵入は認められたものの、海馬にはあまり認められなかったのに対し、遅発性神経細胞死が見られる時期に一致して海馬 CA1 領域の錐体細胞巣に標識ミクログリアが集積していることを確認した。この時、内在性ミクログリアも海馬周辺広範囲にわたって集積活性化も確認できた。さらに、脳内に標識ミクログリアを血中投与した場合においては有意に CA1 錐体細胞の神経細胞死が抑制されることがわかった。これらの結果からミクログリアが神経変性巣に対して保護的に作用する働きがあることが考えられる。

2P-46

モルモット蝸牛における音響刺激による転写制御因子の変動

°荻田 喜代一¹, 松延 毅², 小川 郁², SCHACHT Jochen³

¹摂南大学薬学部薬理学研究室, ²慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室, ³ミシガン大学クレスギ聴覚研究所

〔目的〕音響刺激による聴覚障害は、蝸牛内有毛細胞の障害・壊死に起因することは周知の事実である。近年、この有毛細胞の音響刺激障害が興奮性アミノ酸による興奮毒性あるいは活性酸素による酸化ストレスなどにより惹起される可能性が報告されている。一方、転写制御因子 activator protein-1(AP-1) および Nuclear factor κB(NFκB) は、興奮性アミノ酸や活性酸素により誘導され、神経細胞の障害に関与することが示唆されている。したがって本研究では、モルモット蝸牛内組織における音響外傷による AP-1 および NFκB の変動について解析した。〔方法〕モルモットを騒音発生装置中 (4 kHz octave band, 115 dB) で 5 時間音響刺激を行ったのち、一定時間後に蝸牛内組織 (コルチ器、血管条、および蝸牛神経組織) を得た。各組織より調製した細胞核抽出液について、AP-1 および NFκB の DNA 結合能をゲル移動度シフト法により測定した。〔結果〕本音響刺激により不可逆的は聴覚障害が惹起されるとともに、蝸牛内外有毛細胞の選択的障害が観察された。非音響刺激動物における AP-1 DNA 結合は、蝸牛神経組織でもっとも高く、コルチ器および血管条ではほとんど認められなかった。音響刺激直後では、コルチ器および血管条の AP-1 結合能が著明に増強されたが、蝸牛神経組織では著変が認められなかった。コルチ器および血管条での AP-1 結合能の増強は、いずれも刺激後 5 時間で消失したが、コルチ器の AP-1 結合は刺激後 15 時間で再度著しい増強が見られた。一方、蝸牛神経組織では少なくとも刺激後 24 時間まで変化が観察されなかった。特異的抗体を用いたスーパーシフト法により、音響刺激によるコルチ器の AP-1 結合能上昇は、ほとんどすべての Fos 関連蛋白質の発現に起因することが確認されたが、それらの中でも Fra2 の関与が最も高いことが判明した。一方、NFκB の DNA 結合能はいずれの組織においても刺激直後に増強すること明らかとなった。〔結論〕蝸牛内外有毛細胞の音響外傷には、AP-1 および NFκB の発現が関与する可能性が示唆される。

2P-47

NMDA、MK-801 投与によるラット大脳皮質脳微小透析内アセチルコリン、コリンへの影響

°小嶋 哲史¹, 中沢 康至¹, 永井 康雄², 知久馬 敏幸³, 加藤 武¹

¹横浜市大・院・総合理学, ²ビーエフ研, ³昭和薬大・薬品分析

ラットの大脳皮質神経は、NMDA レセプターアンタゴニストである MK-801 の全身投薬によって損傷される。この神経変性のパターンとアルツハイマー病 (AD) で起こる神経原線維の変性のパターンは酷似していることや、NMDA レセプターは加齢や AD 患者で機能低下することから、Olney らは NMDA 機能低下は AD における神経変性を説明する候補として提案した。一方、AD の脳ではリン脂質代謝の異常や機能障害は AD の原因と成りうることを示す報告もされている。

そこで本研究では、MK-801 と NMDA を投与し、前頭皮質と posterior cingulate and retrosplenial cortex (PS/RSC) での ACh と Ch の変化を脳微小透析法によって測定した。MK-801 (0.5 mg/kg, i.p.) は両部位において ACh の増加を起こしたが、灌流液を介しての投与では変化は見られなかった。NMDA の灌流液を介しての直接的な投与 (100 μM) では、両部位において ACh は増加しなかったが、Ch の増加が見られた。PC/RSC での Ch の増加は前頭皮質での 3 分の 1 であった。また、NMDA と MK-801 の共灌流は両部位において NMDA による Ch の増加を完全に抑制した。

これらの結果はラット PC/RSC での NMDA レセプターによるコリン神経終末の調節機構は前頭皮質での調節機構と異なる事を示している。MK-801 の低濃度 (0.5, 1 mg/kg i.p.) の投薬による損傷は可逆的であるが、高濃度の投薬 (5, 10 mg/kg i.p.) は 3 日後から 10 日後にかけて不可逆的な損傷を起こすことが報告されている。今後、高濃度の MK-801 の投薬による効果を検証したい。

2P-48

アルツハイマー型初期症状を誘発する MK-801 体性投与のラット脳内コレスチキニン神経に与える影響

°粕谷 知之¹, 大山 佳悟¹, 武田 克道², 知久馬 敏幸³, 加藤 武¹

¹横浜市大・院・総合理学, ²ダイナボット, ³昭和薬大・薬品分析

哺乳類の脳内において、コレスチキニン (CCK) は CCK-8S の形で皮質、海馬などの脳領域に多く存在しており、記憶、学習との関連が示唆されている神経ペプチドの一つである。この事は実際に、CCK が長期増強に関わるグルタミン酸の放出を制御し、痴呆モデルラットにおいて記憶改善効果を持つことから示唆されている。CCK による記憶調節機構を研究するために、我々は MK-801 投与によるアルツハイマー (AD) 型記憶障害モデルラットを使用した。NMDA レセプターアンタゴニストである MK-801 はグルタミン酸、GABA、アセチルコリンなどの神経を含む神経ネットワークを介して、後部帯状束/後膨大部皮質 (PC/RSC) における神経細胞の空胞化を引き起こし、解剖学および行動学的に AD 型モデルを誘発する薬物と言われている。低濃度の MK-801 投与によるアセチルコリン放出の増加を伴った細胞障害効果は、数時間で消失してしまうため、AD のモデル動物として使用できない。そのため本研究では高濃度 (10mg/kg) の MK-801 をラット腹腔内に投与した AD 型若年性痴呆モデルを使用した。投与3日後に脳を摘出し、CCKmRNA 量の変化を Northern Hybridization 法によって、CCK ペプチド様免疫活性の変化を酵素免疫測定法によって定量した。その結果、皮質、海馬においては CCKmRNA 量の有意な増加が見られたが、PC/RSC においては有意な変化は見られなかった。前頭皮質における CCKmRNA 量の増加は、NMDA 受容体を介してドーパミン、CCK などの神経が活性化されたためであると思われる。これらの変化と比較した CCK ペプチドのレベルの変化については現在検討中である。

2P-49

細胞内コレステロール量依存的タウ蛋白リン酸化調節の検討

°道川 誠¹, 范 企文¹, 澤村 直哉¹, 愈 璋², 千田 隆夫², 柳澤 勝彦¹

¹国立長寿医療研究センター, ²名古屋大学第一解剖学教室

【目的】我々は、アポリポ蛋白 E (apoE)4 のアルツハイマー病発症促進に関与する分子機構解明にあたり、apoE の脂質代謝調節作用に着目して研究を行ってきた。その結果、(1) コレステロール代謝の恒常性維持が神経細胞生存に重要であること、(2) 神経細胞のコレステロール代謝は apoE によりアイソフォーム特異的に調節されることを明らかにした。本研究では更に、細胞外から取り込んだ後のコレステロール輸送障害を持つ Neimann Pick disease type C (NPC) の脳に神経原線維変化が生じることから、細胞内コレステロール代謝の変動がタウ蛋白のリン酸化状態に与える影響を検討した。

【方法】胎生 17 日目のラット大脳皮質から神経細胞を無血清培地下に初代培養した。培養 6 時間後にコレステロール合成阻害剤 (コンパクチン) 処理を開始し、1 から 3 日間の処理後に回収し、非リン酸化およびリン酸化タウ蛋白をそれぞれ認識する各種抗体でのウエスタンブロットによる検討を行った。同時に軸索微小管の安定性につき、免疫染色法、電子顕微鏡および生化学的検討を行った。また、細胞内コレステロール量に依存する kinase 活性につきウエスタンブロットにより検討した。

【結果】細胞内コレステロールの低下に伴い、(1) タウ蛋白のリン酸化の亢進、(2) 微小管の脱重合およびそれに伴う軸索輸送障害、および (3) MAP kinase の活性化誘導が認められた。

【考察】細胞内コレステロール量の減少に伴い、MAP kinase が活性化され、タウ蛋白のリン酸化促進および微小管の脱重合が引き起こされると考えられた。アルツハイマー病脳においてコレステロール代謝異常が起こっているとすれば、タウ蛋白のリン酸化-神経原線維変化をコレステロール代謝変動から説明できる可能性がある。なお、我々は NPC モデルマウス脳におけるタウ蛋白リン酸化亢進を確認した。(当学会別演題参照)

孤発性アルツハイマー病脳にみられるプレセニリン-2 スプライシング異常 — スプライシング制御因子の同定を目指して —

°眞部 孝幸^{1,3}, 今泉 和則^{1,2,3}, 佐藤 直也^{1,2,3}, 遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学教室, ²田辺製薬株式会社創薬研究所, ³科学技術振興事業団

これまでに孤発性アルツハイマー病患者の脳に、家族性アルツハイマー病原因遺伝子のひとつであるプレセニリン-2 (PS) 遺伝子のエクソン5を欠くスプライシング変種 (PS2V) が発現することを明らかにしてきた。このスプライシング変種はヒト神経芽細胞腫SK-N-SH細胞に低酸素刺激を行うことにより発現する。また、スプライシング変種がコードする蛋白質が、実際に孤発性アルツハイマー病患者の海馬や大脳皮質神経細胞に発現する。発現細胞の多くはアポトーシス様形態を示し、中にはPS2Vを含む細胞質内封入体を形成する神経細胞も認められる。

我々は孤発性アルツハイマー病脳でPS2Vがどのような機序で産生されるのかを明らかにする目的で、PS2遺伝子のエクソン5をスキップさせる因子の同定を試みた。スプライシングに関わる因子の同定のために、我々は独自のRNA結合実験法を構築した。すなわち、低酸素刺激時のみに、エクソン5前後のPS2プレメッセンジャーRNA(pre-mRNA)に直接結合する因子をRNAゲルシフトを指標にして検出する方法である。ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH細胞に22時間低酸素刺激し、核抽出液を回収してPS2 pre-mRNAの一部配列を有する合成RNAを用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、低酸素刺激により結合が確認できる分子量約18kDaの蛋白質を見出した。この結合蛋白質は、PS2 pre-mRNAのエクソン5の3'側とイントロン部分の約50 bpの領域に結合することも明らかとなった。低酸素刺激したSK-N-SH細胞からPS2 pre-mRNA結合蛋白質の単離精製を試み、銀染色で単一のパンドになる程度まで精製できた。現在、アミノ酸配列の決定を行っている。

ニューロン内カスパーゼ3活性化に関与するAPPドメインの解析

°西村 伊三男, 桑子 賢一郎, 原 とも子, 植月 太一, 吉川 和明

阪大・蛋白研・機能制御

野生型アミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein: APP) を過剰発現させると、ラット脳ニューロンやヒト胚性ガン細胞由来の分裂終了ニューロン (NT2 ニューロン) は、カスパーゼ3活性化に引き続いてアポトーシスを起こす (Nishimura et al. J. Neurosci. 18: 2387-2398, 1998; Uetsuki et al. J. Neurosci. 19: 6955-6964, 1999). 今回我々は、このニューロン死に関与するAPPのドメインあるいはアミノ酸配列を明らかにすることを目的として、アデノウイルスベクターを用いて変異型APPをNT2ニューロンに遺伝子導入しカスパーゼ3の活性化に関わる領域を調べた。

野生型APPをNT2ニューロンに過剰発現させるとカスパーゼ3が活性化された。そこで、APP細胞内ドメインに存在するカスパーゼ3至適切断部位661-664 (VEVD) においてAPPが切断され生成される断片APP-ΔC31のC末端側とAPP-C31のN末端側に対する断端特異的抗体を作製した。これらの抗体を用いて免疫染色、ウエスタンブロットを行ったところ、導入後48時間以降にAPP-ΔC31およびC31の断片が検出された。また、野生型APPをBu17グリオーマ細胞などの増殖性細胞に発現させても、カスパーゼ3は活性化せずアポトーシスも誘導されなかった。これに対して、APP-ΔC31をNT2ニューロンやBu17細胞などに発現させると、凝縮した核、TUNEL反応陽性の核を伴うアポトーシスが誘導されたが、カスパーゼ3の活性化は認められなかった。一方、Aβ(1-20)を欠失したAPP(APP-ΔAβ)、あるいはAβから膜貫通領域までをnotchの膜貫通領域に置換したもの (APP-ΣNM) をNT2ニューロンに発現させた場合、カスパーゼ3は活性化されず細胞死も起こらなかった。

以上の結果より、APP過剰発現によるニューロン特異的なカスパーゼ3の活性化機構はAβドメインに依存するものと考えられる。さらに、カスパーゼ3によりAPPが切断された結果生じるAPP-ΔC31が二次的にカスパーゼ3非依存性のアポトーシスを誘導し、ニューロン死を増強するものと推定される。

2P-52

アルツハイマー病患者脳脊髄液中の Abeta40、Abeta42、apoE および GFAP の測定と APOE の 2 つの遺伝子多型 (e2/e3/e4 および -491A/T) について

°福山 隆一¹、水野 俊樹²、水野 哲也³、柳澤 勝彦³、伊豆本 種野¹、畑中 弘樹¹、中島 健次²、伏木 信次¹
¹京都府立医科大学付属脳血管系老化研究センター病態病理、²京都府立医科大学付属脳血管系老化研究センター神経内科学、³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(AD)における診断マーカーとしての有用性とこの疾患の発症機構における意義を探索するため、コントロールおよび AD 患者脳脊髄液 (CSF) 中の Ab40、Ab42、apoE および GFAP 量をサンドイッチ ELISA 法にて測定した。神経学的症候が否定された患者のもの、および、当大学病院にて採取された CSF のうち、生化学的、細胞学的、血清学的異常がないものよりランダムにサンプリングしたものをコントロールとした。AD の診断は NINCDS-ADRDA によった。痴呆度評価には MMSE 値を用いた。まず、加齢による変化を調べると、Ab40、Ab42 は小児期に最低であり、青年期に最高値をとった後、暫減した。apoE は小児期に最高値をとり、それ以降暫減した。GFAP は加齢と共に上昇傾向を示した。AD ではコントロールに比べ、Ab42 の Ab40 に対する割合は減少し、apoE および GFAP は高値を示した。MMSE との連関でも同様の傾向を示した。これと平行して APOE のふたつ遺伝子多型を調べた。AD では APOEe4 および -491T の頻度が上昇していた。これは両者がハーディー=ワインバグ平衡にあるためと推定された。以上のことより、AD の大脳では神経細胞の変性にともなって、Ab42 が特異的に減少する一方、反応性グリアは増加し、その結果 apoE 産生および分泌が亢進していると考えられた。細胞内線維である GFAP が CSF 中に増加していたことは、AD の大脳では神経細胞のみならず、アストロサイトも変性していることを推測させる。これらのマーカーの量的変化と痴呆度との間には相関があったので、以上の検査は AD の進行のモニターとして臨床応用できる可能性が高い。APOEe4 の保持と CSF 中 apoE 量の間に統計的な連関がなく、apoE の遺伝子発現を促進する効果がない -491T 多型と AD が連関するという結果は、AD の病態発生における apoE の関与は量的なものではなく、質的なものであるとの考えを示唆している。

2P-53

凝集した Amyloid β -protein は神経細胞におけるコレステロール代謝に大きな影響を及ぼす

°キョウ 建生、澤村 直哉、范 企文、柳澤 勝彦、道川 誠
国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

【目的】我々は、アポリポ蛋白 E(apoE)4 のアルツハイマー病発症促進に関与する分子機構解明のため、apoE の脂質代謝調節作用に着目して研究を行ってきた。その結果、(1) コレステロール代謝の恒常性維持が神経細胞生存に重要であること、(2) 神経細胞のコレステロール代謝は apoE によりアイソフォーム特異的に調節されることを明らかにした。さらに、細胞内コレステロール代謝の変動がタウのリン酸化を亢進させることを in vitro および in vivo で明らかにした (前出の 2 演題参照)。本研究では、コレステロール代謝に対する amyloid β -protein (A β) の影響を検討した。

【方法】胎生 17 日目のラット大脳皮質から神経細胞およびアストロサイトをそれぞれ初代培養した。合成 A β 1-40 (ペプチド研) は使用前に PBS に 350 μ M の濃度で溶解し 37 度 C で 24 時間インキュベーションした (凝集 A β)。神経細胞およびアストロサイトを培養した培地は KBr による密度勾配法により分画し、各分画の脂質解析、免疫沈降-脂質解析、免疫沈降-ウエスタンブロット解析を行った。また免疫電顕により HDL 粒子を解析した。

【結果】(1) 凝集 A β はコレステロールおよびリン脂質を細胞外へ搬出し HDL 様粒子を形成した。(2) 用時調整した fresh な A β には搬出作用を認めなかった。(3) 凝集 A β によって形成された HDL は、細胞に取り込まれなかった。

【考察】凝集 A β は、細胞から脂質を搬出し HDL を形成するが、その HDL は細胞内へ取り込まれないため、細胞内コレステロールを減少させる可能性がある。当学会で我々が明らかにしたように、細胞内コレステロール量の減少がタウの異常リン酸化を誘導することを考え合わせると、A β 凝集からタウの異常リン酸化に至る amyloid cascade の分子機構にコレステロールが重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

propentofylline による β -amyloid protein 毒性からの神経細胞保護作用における cAMP の役割

○郡山 恵樹, 千葉 賢三, 毛利 哲郎
北陸大・薬 生物活性教室

【目的】我々はすでにアルツハイマー病の発症との関連で注目されている β amyloid protein β (1-42) を用い、そのラット胎仔海馬培養神経細胞毒性に対する propentofylline (PPF) の保護効果について報告している。今回、その作用機序について、PPF が持つ phosphodiesterase (PDE) 阻害作用による神経細胞の cAMP 量の上昇、protein kinase A (PKA) 作用の寄与について調べた。【方法】ラット胎仔海馬培養神経細胞はラット 18 日齢胎仔から調製し、10% 牛準胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を用いて、ポリリジンコートした 48Well マルチウエルプレートに培養した。培養 2 日目まで Ara C 処理によりグリアの増殖を止め、4 日目に各薬物処理を行った。一定期間培養し、細胞障害とそれに対する抑制作用を、MTT reduction assay、あるいは培養液中に漏出する LDH の活性測定により判定した。また、海馬神経細胞を 10 分間各薬物処理した後、cAMP EIA system キットを用い、細胞内 cAMP の定量を行った。【結果及び考察】PPF (0, 10, 20, 40 μ g/ml) 10 分間処理した海馬神経細胞内の cAMP 量は、濃度依存的な上昇が確認された。また、20 μ g/ml PPF は 20 μ M β (1-42) 7 ~ 8 日処理による細胞毒性をいずれの指標を用いた場合にも軽減することが示された。さらに細胞内 cAMP レベルの上昇による β (1-42) の神経細胞毒性抑制効果を試験するため、 β (1-42) の海馬培養神経細胞障害に対する dbcAMP 添加の影響について調べた結果、いずれの assay によっても、dbcAMP によって有意に β (1-42) による細胞障害が抑制された。PPF による β (1-42) 細胞毒性に対する抑制効果は PKA の選択的阻害剤である H-89 (1 μ M) 添加で見られなくなったことから β (1-42) 細胞毒性の一部が、PKA の活性低下、あるいは PDE 活性の上昇による可能性が示された。現在、 β (1-42) による apoptosis と cAMP 濃度の関連を検討している。

老齢犬脳におけるアミロイド β 蛋白、APP、Bcl2、Bax に関する免疫組織化学的検討—年令、痴呆評点との相関

○伊藤 龍生¹, 佐藤 隆夫¹, 林 義之¹, 玉井 良尚², 橋本 重夫¹
¹近畿大学医学部第二病理学, ²近畿大学医学部第三内科

目的: 犬脳においても加齢性変化としてアミロイド β 蛋白 (AB) の沈着が生じており、臨床的にも老齢犬の中で痴呆症状を呈するものがあることが近年明らかにされてきた。今回我々は、犬脳の前頭葉に関して AB、アミロイド前駆体蛋白 (APP) とアポトーシスに関連する Bcl2、Bax に関して免疫組織化学的に検討した。そして、それらの免疫染色結果と年令及び内野らによるイヌ痴呆診断基準による痴呆評点 (score) との関係を解析した。

方法: 11 歳から 19 歳の犬 (13 匹) の全脳を摘出し、4 % paraformaldehyde にて浸漬固定後、前頭葉より脳を切り出し、マイクロスライサーにて、50 μ m の連続切片を作製した。AB、APP、Bcl2 及び Bax に関して免疫染色を行った。その後、AB 陽性面積を NIH image 1.61 ソフトを用いて測定した。APP 陽性神経細胞数、Bcl2 陽性神経細胞数、Bax 陽性神経細胞数を対物 20 倍で顕微鏡下にて数えた。

結果: Score と年令、score と AB 陽性面積、年令と AB 陽性面積、年令と Bax 陽性神経細胞数には有意 ($p < 0.05$) な相関が得られた。AB 陽性面積と Bax 陽性神経細胞数は相関する傾向を示した。年令と Bcl2 陽性神経細胞数、score と APP 陽性神経細胞数、Bcl2 陽性神経細胞数と AB 陽性面積、Bcl2 陽性神経細胞数と Bax 陽性神経細胞数は有意 ($p < 0.05$) な逆相関を示した。年令と APP 陽性神経細胞数、AB 陽性面積と APP 陽性神経細胞数は逆相関の傾向を示した。

考察: AB の沈着の程度は加齢による記憶・学習の変化と関係した。Bcl2 及び Bax の変化は加齢により神経細胞のアポトーシスが惹起されやすいことを示唆し、AB、Bcl2、Bax の関係は AB の沈着がアポトーシスを誘導する可能性を示唆した。老齢犬脳における AB の沈着は APP の upregulation なしに生じる可能性が年令、APP 陽性細胞数、AB の沈着の関係より示唆された。

2P-56

アルツハイマー病患者脳由来タウタンパク質のアスパラギン結合型糖鎖構造

°佐藤 雄治¹, WANG Jian-Zhi², 内藤 康秀³,
GRUNDKE-IQBAL Inge², IQBAL Khalid², 遠藤 玉夫¹
¹東京都老人総合研究所糖鎖生物学部門, ²New York
State Institute for Basic Research in Developmental
Disabilities, ³北陸先端科学技術大学院大学材料科学研
究科

(目的) 神経原線維変化(NFT)はアルツハイマー病(AD)に特徴的な病理所見の一つであり、その構成単位として高度にリン酸化等の修飾を受けたタウタンパク質がpaired helical filaments(PHF)を形成し神経細胞内に蓄積している。我々はAD患者に見られる細胞質の高リン酸化タウ(AD P-Tau)及びPHFに含まれるタウ(PHF-Tau)はレクチンプロットングの結果アスパラギン結合型糖鎖による修飾を受けている可能性を示した。(Nature Med., 2, 871-875, 1996)。今回ADの発症機構を明らかにする研究の一環として、このAD P-Tau及びPHF-Tauの糖鎖構造を詳細に解析した。

(方法) AD患者より調製したAD P-Tau, PHF-Tauからヒドラジン分解法によりアスパラギン結合型糖鎖を遊離させ、2-aminobenzamide (2AB)により蛍光標識した。これらの糖鎖混合物を各種カラムクロマトグラフィーにより分離精製し、各々の構造を糖鎖構造特異的exoglycosidase消化及び質量分析計を用いて解析した。

(結果) AD P-Tau, PHF-Tauともに高マンノース型糖鎖、複合型糖鎖を含んでいた。しかしながら、各々の構造及び構成比率は異なっていた。PHF-Tauには高マンノース型糖鎖が多く存在し、更に分子量の小さなものが多く検出された。一方AD P-Tauからは高マンノース型糖鎖に加え複合型3本鎖構造が検出され、細胞内の存在状態によってタウタンパク質の糖鎖構造が異なることが明らかになった。

(考察) 本来タウタンパク質は正常な状態では細胞質に存在し、アスパラギン結合型糖鎖による修飾は受けない。今回の検討からAD患者のAD P-Tau, PHF-Tauにはアスパラギン結合型糖鎖が存在することが明らかとなり、AD患者ではアスパラギン結合型糖鎖の生合成に関わる機能に異常をきたし、糖鎖付加を受けたタウタンパク質が発現している可能性が示唆された。

2P-57

組換えアデノウイルスを用いたラット脳内APP遺伝子導入によるカスパーゼ3活性化と炎症反応誘導

°升村 誠¹, 秦 龍二^{1,3}, 西村 伊三男², 植月 太一², 澤田 徹¹, 吉川 和明²
¹ビーエフ研究所, ²阪大・蛋白研・機能制御, ³愛媛大・医・二解剖

本学会において我々は、アデノウイルスベクターを用いてアミロイド前駆体蛋白質(APP)を*in vitro*, *in vivo*のニューロンへ遺伝子導入、強制発現させるとカスパーゼ3が活性化され、アポトーシスの特徴を示す変性が引き起こされることを既に報告した。今回は、ラット脳へのAPP遺伝子導入により引き起こされる病理組織学的経時変化について更に検討を加えたので報告する。

APP発現アデノウイルスをラット海馬に注入後、3～7日後にAPP免疫陽性細胞が数多く観察され、その後ヘキスト染色による核の分断化を示すニューロンの変性像が認められた。活性型カスパーゼ3断端特異的抗体の免疫陽性は、7～14日後に観察され、APPが発現していないニューロンにおいても観察された。特にAPP発現ウイルス感染14日後では、APP免疫陽性が認められない細胞に活性型カスパーゼ3断端特異的抗体の免疫陽性が数多く観察された。この損傷部位の近傍ではC3b_i受容体陽性ミクログリア・マクローファージに加えてCD45、CD4免疫陽性を示す浸潤性のリンパ球も観察された。また、LacZ発現コントロールウイルスを注入したラット海馬では、上記のような細胞死も炎症反応も注入後14日後までには観察されなかった。

以上の結果から、強制発現されたAPPは直接ニューロンにアポトーシスを誘導するのみならず、ミクログリア活性化やその他の炎症反応をも誘導し、その炎症反応によって更に二次的な神経変性が引き起こされると考えられた。

2P-58

Apolipoprotein E4 は p44/p42 MAP kinase 系の活性化により CREB のリン酸化を行う

°大久保 信孝^{1,2}, 満田 憲昭^{1,2}, 玉谷 美智夫^{1,2}, 山口 淳^{1,2}, 李 永敦^{1,2}, 遠山 正彌^{1,2}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座(A-2),

²CREST, JST

Apolipoprotein E (ApoE) のアイソフォーム ApoE4 はアルツハイマー病の危険因子とされているが、その発症メカニズムは十分に解明されていない。そこで ApoE peptide (aa.141-155)² により活性化される転写因子をスクリーニングしたところ、CREB が活性化されることがわかった。さらに p44/p42 MAP kinase 系の活性化、細胞内カルシウム濃度の上昇もみられた。また、ApoE peptide では receptor associated protein (RAP)、MK801、Nifedipine などの阻害剤により、CREB のリン酸化だけでなく細胞内カルシウムの上昇も抑えられた。CREB の活性化は ApoE4 では見られたが、ApoE3 では見られなかった。以上より ApoE4 は CREB を活性化し、下流のタンパク合成を調節していることが示唆された。また、この経路にはカルシウムの流入や p44/p42 MAP kinase 系の活性化が関与していることも示唆された。

2P-59

非ステロイド性消炎鎮痛薬は NO による神経細胞死を抑制する

°宮崎 育子, 浅沼 幹人, 小川 紀雄

岡山大学医学部神経情報学部門

炎症反応がアルツハイマー病の病態形成に関与していると考えられており、非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs) 投与が進行を抑制することが報告されている。また、一酸化窒素ラジカル (NO $\cdot$) は炎症反応の増悪因子であり、神経細胞のアポトーシス様の細胞死を惹起する。本検討では、NSAIDs およびステロイドの NO $\cdot$ 消去能と NO $\cdot$ による B65 培養神経細胞傷害に対する効果を検討した。4 種の NSAIDs (aspirin, mefenamic acid, indomethacin, ketoprofen) は NO $\cdot$ 供与体から発生する NO $\cdot$ を用量依存的に消去したが、ステロイド (hydrocortisone, dexamethason) は消去作用を示さなかった。NO $\cdot$ 供与体添加による神経細胞の生存率の低下とアポトーシスと考えられる核の分葉化、クロマチンの凝集は、NSAIDs の同時添加により有意に抑制されたが、inducible NO 合成酵素陽性シグナルの増加は不変であった。しかし、ステロイドは保護効果を示さなかった。これらの結果より、この神経保護効果は主として NSAIDs の NO $\cdot$ に対する直接消去作用に基づくと考えられる。NSAIDs は消炎鎮痛作用のみならず NO $\cdot$ の直接消去という新たな薬理作用により神経保護効果を発揮しうることが明らかにできた。

2P-60

神経細胞に対する終末糖化反応生成物 (AGEs) の細胞障害に関する研究

°竹内 正義¹, 鈴木 貴子¹, 大窪 忠利², 山崎 眞津美³, 杉江 智則¹, 柳瀬 由紀子¹, 亀田 幸彦¹, 牧田 善二⁴
¹北陸大学薬学部生化学教室, ²救急薬品工業株式会社,
³北陸大学薬学部生物活性教室, ⁴久留米大学医学部内分泌代謝内科

メイラード反応 (非酵素的タンパク質糖化反応) の後期段階で生成される終末糖化反応生成物 (Advanced Glycation End-products: AGEs) は, 老化および糖尿病性慢性合併症の成因として注目されている。また, 近年ではこの終末糖化反応生成物がアルツハイマー病の病因になっているとする仮説が多数報告されている。しかしながら, これまで直接的に AGEs の神経細胞障害性を証明した報告はなされていない。そこで我々は, *in vitro* で作製した各種 AGEs 構造体ならびに *in vivo* より調製した AGEs 分画を用いてラット胎仔大脳皮質神経細胞に対する細胞毒性を検討した。初代培養神経細胞を用いて各種 AGEs の細胞毒性を MTT assay および Trypan blue 染色法により検討した結果, AGEs-1 ~ -5 (Mol. Med. 5:393 (1999) & 6:114 (2000)) に有意な細胞毒性が認められたが, 既知構造体の Carboxymethyllysine (CML) では毒性は認められなかった。特に AGEs の中でも AGE-2 (Glyceraldehyde 由来 AGE 構造体) に強力な細胞毒性が認められ, この毒性は AGE-2 抗体の添加により特異的に中和された。次に健常者ならびに糖尿病性腎不全透析 (DM-HD) 患者血清中の各種 AGEs 量を AGEs 特異抗体を用いた競合 ELISA 法 (Mol. Med. 5:393 (1999) & 6:114 (2000)) により測定した結果, AGE-1 および CML 構造体では分子量の異なる 3 種のピーク (Peaks-1, -2, & -3) が検出されたのに対して, AGEs-2 ~ -5 では AGE-1 と分子量的に一致した 2 種のピーク (Peaks-1 & -3) が検出された。これら 3 種の AGEs 分画に対する神経細胞毒性を検討した結果, DM-HD 患者由来の Peaks-1 & -3 においてのみ有意な細胞毒性が認められた。各種 AGEs 抗体を用いた中和実験の結果, 両ピーク共に AGE-2 抗体の添加により特異的に細胞毒性が中和されることが明らかとなった。

以上の結果より, *in vitro* ならびに *in vivo* より調製した AGEs が直接的な神経細胞毒性を示し, 特に AGE-2 構造体に強力な作用があることが明らかとなった。

2P-61

PS1 ミスセンス変異を有するノックインマウス胎児の神経発達に対するアルミニウムの影響

°福所 英里子, 柏木 雄次郎, 中村 祐, 中野 有香, 松本 均彦, 工藤 喬, 武田 雅俊
大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学専攻神経機能医学講座精神医学

プレセニリン 1 (PS1) 変異は, 家族性アルツハイマー病 (FAD) の主要な原因の一つです。既に報告した I213L の変異の家系では, 45 ± 4.2 歳で発症し, FAD の典型的な症状を呈する。我々は既にこのミスセンス変異を有するノックインマウスを作成し, 16 ~ 20 週齢のノックインマウスの脳組織において, ミスセンス変異を有する PS1 の遺伝子発現量に応じてアミロイド β ($A\beta$)、特に $A\beta_{40}$ ではなく $A\beta_{42}$ (43) が増加することが判明している。

また, 慢性的なアルミニウム神経毒性は, すでに確立されているが, その毒性とアルツハイマー病の病理の関連については, いまだ明らかにされていない。我々は, ラット初代神経培養細胞において培養初期にアルミニウムをパルス曝露すると, チュブリン・アクチン・クラスリンなどの軸索輸送タンパク質には異常が生じないにもかかわらず, ニューロフィラメント L と速い軸索輸送タンパク質の分布に異常が生じることを報告している。

今回, 我々は PS1 ノックインマウスの遺伝子型ヘテロマウスの胎児において *in vivo* におけるアルミニウムの神経毒性について検討した。妊娠マウスへのアルミニウムの曝露の影響を検討するために, 妊娠 9 日目の遺伝子型ヘテロマウスにアルミニウム溶液を腹腔内投与とした。このアルミニウム溶液は, 塩化アルミニウムとマルトールを等モル濃度混合したものである。その結果, 二つの行動発達テストにおいて, コントロール群との比較でアルミニウム投与群において発達が遅れる傾向が認められた。Righting reflex においては, 生後 0・7 日目において差異は認められないが, 生後 3 日目において反射が遅れる傾向がみられた。Negative geotaxis では生後 7 日目において神経発達が遅延する傾向が認められた。胎児における免疫組織学的手法によると, アルミニウムの毒性により様々の部位, 特に piriform cortex においてニューロフィラメント陽性の線維状構造物の分布の変化が認められた。PS1 変異をもつ遺伝子型ヘテロマウスの胎児へのアルミニウム曝露はニューロフィラメント分布異常を伴う神経発達障害を起こすものと考えられる。

ニーマンピック病 C 型 モデルマウスにおける タウ蛋白のリン酸化の検討

○澤村 直哉, キョウ 建生, 柳澤 勝彦, 道川 誠
国立中部病院長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

神経原線維変化はアルツハイマー病の病理学的特徴の一つであり、その出現頻度は神経細胞の脱落の程度と相関することが知られている。神経原線維変化の単位は paired helical filament (PHF) であり、その主要構成成分は異常にリン酸化されたタウ蛋白である。しかし、PHF 形成および神経変性に至る機序については不明である。一方、Niemann Pick disease, type C (NPC) は細胞外コレステロールを取り込んだ後のコレステロールの細胞内輸送機構に障害があり、主にライソソームにコレステロールを含む脂質が沈着する疾患である。この疾患脳にも神経原線維変化が認められる。したがって、アルツハイマー病脳に出現する神経原線維変化の形成機構をコレステロールとの関連で解明するための重要なモデルになると考えられる。これまでに我々は、コレステロール合成阻害剤を用いてコレステロールの慢性的欠乏状態を培養系で確立し、この系でタウ蛋白のリン酸化が促進することを明らかにした。本研究では、NPC のモデルマウス (*npc^{nh}*) を用いて、コレステロール代謝の変化とタウ蛋白のリン酸化の分子メカニズムについて検討を行った。

はじめにマウス大脳、小脳、肝臓のホモジェネートより postnuclear supernatant を調製し、NPC1 に対する抗体でウェスタンブロットを行った。正常マウスの大脳と小脳では分子量約 165 kDa の位置に、肝臓では約 180 kDa の位置に NPC1 蛋白の発現が確認できた。これに対し、*npc^{nh}* のホモ接合体ではこれらのバンドは消失していた。次に数種のタウ蛋白に対する抗体でウェスタンブロットを行った。正常マウスと比較して、*npc^{nh}* のホモ接合体の大脳、小脳、肝臓ではタウ蛋白の脱リン酸化部位を認識する抗体による染色性が減少し、リン酸化を認識する抗体での染色性が増加する傾向が見られた。以上の結果より生体内でもコレステロール代謝の変化によりタウ蛋白のリン酸化が促進される可能性が示唆された。

ラット脳におけるコンプレキシン遺伝子発現 に対するハロペリドール長期投与の影響

○中原 辰雄¹, 本村 啓介², 植木 裕司², 橋本 喜次郎²,
後藤 玲央¹, 中根 博², 堤 哲之², 本藤 久雄², 黒木
俊秀³, 平野 誠², 内村 英幸²

¹九州大学大学院理学研究院化学部門, ²国立肥前療養所情
動行動障害センター臨床研究部, ³九州大学大学院医学
研究院精神病態医学分野

コンプレキシンはシナプス前蛋白質複合体に作用して神経伝達物質の開口放出 (エキソサイトシス) を制御するが、2 種類のアイソフォームが存在し、コンプレキシン I は細胞体に投射する神経線維 (抑制性神経線維)、コンプレキシン II は樹状突起に投射する神経線維 (興奮性神経線維) の末端に局在する。本研究では、長期の抗精神病薬投与に应答する神経線維が興奮性であるか抑制性であるかを決定するために、ハロペリドール長期投与ラットのコンプレキシン I および II の遺伝子発現を検討した。

Wistar 系雄性ラット (240-260g) を用い、ハロペリドールの持続型製剤、haloperidol decanoate (ハロマンズ、大日本製薬) の 25 eq. mg/0.5ml/kg あるいは vehicle 0.5ml/kg を投与し、28 日後に断頭して前頭葉皮質、側坐核、線条体、黒質および腹側被蓋野から RNA を抽出した。コンプレキシンの mRNA レベルは β -アクトチンを内部標準とした RT-PCR によって測定した。

コンプレキシン I mRNA レベルはハロペリドールの長期投与によって、前頭葉皮質 (-23%)、側坐核 (-37%) および腹側被蓋野 (-40%) で有意に減少した。線条体および黒質にはコンプレキシン I mRNA の変化は見られなかった。全ての脳部位で、ハロペリドールの長期投与によるコンプレキシン II mRNA レベルの変化は認められなかった。コンプレキシンはシナプス蛋白の SNARE 複合体に結合して α SNAP 結合を阻害するので、コンプレキシンが減少するとエキソサイトシスは増強される。コンプレキシン I は抑制性神経線維に局在することから、腹側被蓋野、側坐核、前頭葉皮質におけるコンプレキシン I 発現の減少はこれらの部位の神経活動が抑制されていることを示唆する。これらの結果は、皮質辺縁系ドーパミンニューロンの活動が長期のハロペリドール投与で抑制されること (depolarization block) を反映したものであろう。他方、精神分裂病の死後脳ではコンプレキシン II の減少が報告され、この変化は薬剤の影響によるものではないとされているが、今回の結果はこの報告を支持する。

2P-64

ラット大脳皮質におけるメタンフェタミン急性投与による遺伝子発現の変化: Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法による解析

°窪田 恭彦¹, 倉増 敦朗², 渡邊 建彦², 佐藤 光源¹, 伊藤 千裕¹

¹東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野, ²東北大学大学院医学系研究科細胞薬理学分野

メタンフェタミン (MAP) はドーパミントランスポーターに作用し, 急性投与により移所運動量や常同行動の増加をもたらす。さらに MAP の反復投与により, これらの行動が長期持続的に増強されることが知られており, 逆耐性現象あるいは行動感作と呼ばれている。行動感作は, その長期持続性から脳の可塑性に基づく現象であり, 遺伝子発現及び蛋白合成の変化を伴うと考えられている。メタンフェタミン投与による遺伝子発現の変化を包括的に把握することは, メタンフェタミンが脳の可塑性に及ぼす影響を理解するうえで非常に重要である。そこで今回われわれは, メタンフェタミン急性投与による遺伝子発現の変化を, Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いて解析した。

SAGE 法は, ある細胞で発現している全ての遺伝子を同時にかつ定量的に解析する方法である。この方法の特徴は以下の2点である。(1) cDNA の決まった位置にある 9-10bp の短い断片 (tag) を作成する。この tag は, 個々の mRNA を同定するのに十分な情報を含んでいる。(2) 多数の tag を繋げて, ひとつの分子にした後シーケンスすることにより, たくさんの tag の塩基配列を効率的に決定する。

このようにして得られたシーケンスのデータをもとに tag の出現頻度の一覧表を作れば, ある細胞でどのような遺伝子がどれくらい発現しているかがわかる。また複数の SAGE ライブラリー間での比較から, いろいろな遺伝子の発現量の違いを知ることができる。これまでに, メタンフェタミン (4mg/kg) および生理食塩水 (1ml/kg) を投与し, 1 時間後に断頭したラット大脳皮質から作成した SAGE ライブラリーより, それぞれ約 20,000 個の tag を解析し, 9,000 種以上の mRNA を同定している。この SAGE の解析結果をもとに, メタンフェタミン急性投与に伴う遺伝子発現の変化について報告する。

2P-65

メタンフェタミンによるドーパミン遊離に対するトリヘキシフェニデールの抑制効果について

°霜里 和朗¹, 長尾 憲樹², 渡辺 悟¹, 北山 滋雄³

¹川崎医科大学薬理学教室, ²川崎医療福祉大学健康体育学科, ³広島大学歯学部歯科薬理学講座

私たちは, 抗コリン薬トリヘキシフェニデール (THP) がコカインアナログのドーパミントランスポーター結合を阻害するにもかかわらず, ドーパミン (DA) 再取り込み阻害活性が弱いことを報告した。これは THP がコカインの報酬効果を減弱する可能性を示す。しかしそれに続く行動薬理学実験により, THP は期待されたコカインではなく, メタンフェタミン (MAP) によるマウスの conditioned place preference (CPP) を抑制することが明らかになった。本研究はそのメカニズムを解明するため, マウス側坐核における DA とセロトニンにおよぼすコカインおよび MAP の増加効果とそれに対する THP の影響を, 脳内微小透析法を用いて検討した。

THP 5 mg/kg 前処理は生理食塩水投与の対照マウスにおける側坐核 DA レベルには影響を与えなかった。MAP 1 mg/kg は投与後 20 ~ 40 分をピークとして, 投与前に比べて最大 600% の DA 放出を引き起こした。この DA 放出は THP 前処理によりピーク時のレベルで投与前の 280 ~ 290% にまで有意に抑制された。一方, コカイン 10 mg/kg による側坐核 DA レベルの増加は THP 前処理により影響は認められなかった。DA の代謝物 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) は MAP により投与後 40 ~ 80 分, 投与前値の 50 ~ 67% に減少したが, この減少は THP と生理食塩水前処理群で差は認められなかった。側坐核セロトニンおよびその代謝物 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) は中枢興奮薬投与には影響を受けなかった。

以上の結果は, THP は側坐核における MAP による DA 放出を抑制することにより, マウスの MAP 誘発 CPP を抑制した可能性を示唆する。

2P-66

マイクロアレイ法による抗うつ薬慢性投与誘導遺伝子の探索

°西田 朗¹, 久岡 一恵¹, 前正 秀宣^{1,2}, 岡本 泰昌², 森信 繁², 山脇 成人²

¹国立呉病院臨床研究部精神神経科学研究室, ²広島大学医学部神経精神医学教室

(目的) マイクロアレイ (DNAchip) 法は一度に多数 (数百 - 数万個) の遺伝子の発現変化をスクリーニングできる最新の分子生物学的手法である。本法により薬物投与誘導性の遺伝子発現変化のモニタリングが可能になる。そこで、我々はマイクロアレイ法を利用して抗うつ薬慢性投与により発現変化する遺伝子の解析を行なったので報告する。

(方法) 慢性 amitriptyline 処理 (4 日間, 1 μ M) をマウス neuroblastoma 由来の N18TG2 細胞に行い mRNA を精製した。遺伝子スクリーニングをマイクロアレイ法で行い発現量に変化のあった遺伝子についてノーザンブロット解析を行って再現確認と発現様式の詳細を検討した。

(結果) マイクロアレイ法により、9,800 種の遺伝子の発現変化を検討し、対照と比べて amitriptyline 処置群で上昇した (2.5 倍以上) 遺伝子は一つ、低下した (2.5 倍以下) 遺伝子は二つであった。増大した遺伝子についてノーザンブロット法でも確認した。この遺伝子は amitriptyline 処置一日目では発現増大せず、二日目から増大し始め、四日目まで発現増大しており慢性処置により発現することが判った。また、1-10 μ M まで amitriptyline 処理濃度依存性に増大することが判った。他の抗うつ薬処置 (clomipramine, mianserin) でも遺伝子発現が増大していた。

(考察) 抗うつ薬慢性投与により誘導される遺伝子の探索にマイクロアレイ法が有効であることが示された。臨床使用濃度に相当する比較的低濃度の抗うつ薬処置で発現変化が検出できた遺伝子が予想以上に少ないこと明らかになった。発現量に変化のあった遺伝子については全配列の決定や遺伝子機能解析を進めている。マイクロアレイ法により新規の抗うつ薬誘導遺伝子が明らかにされて、うつ病の病態の解明や新規抗うつ薬の創薬に寄与する可能性があることが示された。

2P-67

エタノールによるアネキシン IV の発現変化

°橋本 恵理¹, 大川 浩子², 相馬 仁³, 黒木 由夫³, 小澤 寛樹¹, 齋藤 利和¹

¹札幌医科大学医学部神経精神医学講座, ²札幌医科大学保健医療学部作業療法学科, ³札幌医科大学医学部生化学第一講座

精神的・身体的障害を引き起こしうるエタノールの作用は、様々な側面から注目されている。我々は、セカンドメッセンジャー系へのエタノールの影響に注目してきた。すなわち、アルコール慢性投与した動物モデル及び、アルコール依存症患者サンプルで Gs α 、アデニル酸シクラーゼ (AC) 量の低下に伴う細胞内 cAMP 濃度低下が起こることを示してきた。一方、エタノールの長期暴露により細胞内 Ca²⁺ 濃度に影響を与えることが明らかにされ、NMDA 受容体亢進を伴うことが注目されている。本研究では、アルコールの Ca²⁺ シグナル変化に注目し、その動態を Ca²⁺ 結合蛋白質 (アネキシン) で検討した。NMDA 受容体亢進は、虚血・ストレス性傷害で起こることが知られ、アルツハイマー、脳虚血では、アネキシンアイソフォームの発現量の増大・局在の変化が起こることが示されている。今回、アルコールの Ca²⁺ シグナル伝達機構への影響を更に調べる目的で培養細胞 (A549) を用いてアネキシンアイソフォームの mRNA、蛋白発現量の変化を検討した。その結果、特に、アネキシン IV の発現量がエタノールで増大することがわかった。しかし、アネキシン I、アネキシン V 共に発現量は、コントロールと比較して変化が認められなかった。一方、アルコール依存症患者死後脳を用いたウエスタンブロットから、海馬領域でアネキシン IV の発現量がコントロールと比較して有意に増大していることが示された。また、アルコール依存症患者血清には、健常者と比べてアネキシン IV に対するより高い自己抗体も検出された。以上のことから、アルコールの Ca²⁺ シグナル変化にアネキシン IV が関与することが示唆され、今後アネキシン IV がどのように関わるか興味もたれる。

2P-68

ソマン類似物質 bis(pinacolyl methyl)phosphonate (BPMP) の培養ラットアストロサイトに対する影響

磯部 一郎, 前野 善孝, 長尾 正崇, 岩佐 峰雄, 小山 宏義, 中村 昌美, 大瀧 純, 杉原 樹梨
名古屋市立大学医学部法医学講座

サリン、ソマンなどの有機リン系神経剤の生体への毒性機序はアセチルコリンエステラーゼ阻害を介したコリン作動性神経系の異常亢進によるものと考えられているが、これらの神経剤の細胞への直接の毒性など、その他の作用についての詳細は明らかにされていない。また、これらの神経剤のグリア細胞に対する影響についてはこれまでほとんど検討されてこなかった。我々はこれまでに、日本ではその製造、使用が厳しく制限されているサリン、ソマンの構造的類似物質 bis(isopropyl methyl)phosphonate (BIMP) および bis(pinacolyl methyl)phosphonate (BPMP) を合成し、その生体作用などもまた、サリン、ソマンと多くの類似性を有することを報告してきた。今回、我々は BPMP を用いて、培養ラットアストロサイトに対する作用について検討した。

実験には、胎生 18 日令の SD ラット胎児大脳皮質より調製したアストロサイトを使用し、BPMP の合成は既に報告した方法 (Nijima, H. et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 64-69, 1999) に従って行った。はじめにアストロサイトに対する細胞毒性について、BPMP 暴露後 24 時間で、細胞数をコントロールと比較したところ、軽度の細胞数減少傾向が認められたが、tetrazolium salt のひとつである WST-8 からなる細胞増殖のアクセシ系では BPMP によりアストロサイトによるこの tetrazolium salt の還元能の亢進が認められた。また、BPMP によりアストロサイトの顕著な形態変化が認められた。すなわち、BPMP で約 24 時間刺激すると、広がった細胞体を有する形質性アストロサイトから細長い突起を持った線維性アストロサイトへの変化が認められた。このときの細胞内シグナル伝達系の挙動を明らかにするために、p44/42 MAP キナーゼのリン酸化の状態を抗リン酸化抗体によるウェスタンブロットで検討したところ、BPMP 暴露直後には、MAP キナーゼのリン酸化状態にはっきりした変化はなかったが、刺激開始後約 8 ~ 24 時間において持続的なリン酸化の亢進が認められた。

2P-69

Release of amino acids from hippocampal synaptosomes of kindled rats

°Kazuhihsa MAEDA, Hideaki MITANI, Sin-ichi YOSHIOKA, Takefusa NAGAMI, Ryuzo KAWAHARA
Department of Neuropsychiatry, Faculty of Medicine, Tottori University

Many studies have been reported on the changes of amino acids in experimental epilepsy models by using slices of the brain or microdialysis methods. In this study, we use the superfusion technique of synaptosomal fraction to evaluate the kindling induced changes of presynaptic amino acid systems in the brain.

Wistar rats were used for this study. Bipolar electrode was implanted into the right amygdala and the stimulus was a 50 Hz biphasic square wave at intensity above the threshold for after discharges. In the course of kindling, three consecutive stage 5 seizures were considered as fully kindled. Control group was implanted electrode but was not electrically stimulated. One week after the last stimulation, rats were killed and the hippocampus was quickly removed. The tissue was homogenized in 0.32 M sucrose, buffered with 20 mM Tris-HCl. The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min and the pellet was resuspended in KRB. Synaptosomes were isolated from the supernatant by re-centrifugation and were layered on filters. Superfusion was conducted at a flow rate of 0.5 ml/min with KRB. 40 minutes after the start of superfusion, the synaptosomes were stimulated with 30mM KCl for 2 min. Endogenous glutamic acid (Glu) and GABA released from synaptosomes were measured by HPLC methods and the amount of amino acid released into each fraction was expressed as pmol/min/mg protein of synaptosomes. The basal amounts of Glu and GABA released of control rats were 16.0 and 2.8, respectively. The basal amounts of these amino acids released of ipsilateral side of kindled rats were 15.5 and 3.1. When the synaptosome was exposed to KCl, significant increases in the amounts of Glu and GABA released were observed. The increasing rate of Glu in kindled rats by depolarization was greater than that of control rats.

てんかん原性確立過程において eNOS は必要か

°村島 善也¹, 吉井 光信¹, 鈴木 二郎²

¹東京都精神医学総合研究所神経生理研究部門, ²東邦大学医学部精神医学

【目的】学習や記憶に関与する長期増強 (LTP) は、てんかん原性の獲得にも関与する可能性がある。Nitric Oxide (NO) は LTP に関する逆行性メッセンジャーの候補のひとつであり、NO 合成酵素 (NOS) により生成される。NOS には主として神経系に局在している nNOS と、主として免疫系細胞に局在しており、酵素誘導の起こりやすい iNOS と、さらに血管内皮細胞に局在している eNOS の 3 つの代表的アイソザイムが知られている。LTP には nNOS と eNOS の両方が関与している。iNOS についてはフリーラジカルを産生し、細胞死を起こして免疫系の制御に関与しており、一方、nNOS は神経伝達上の役割が示唆されている。血管拡張作用を有する eNOS が、EL マウスのてんかん原性確立過程でどのような役割を果たしているのかを、EL マウスの母系で DDY/TIP マウスと比較しながら半定量的に検討した。

【方法】10,20,30 週齢の発作履歴を繰り返した EL マウス (EL[s])、観察する限り発作履歴のない EL (EL[ns])、DDY/TIP マウス 各 6 匹を用いた。海馬の試料を homogenate とし、これを 15,000rpm で 20 分 4℃ で遠心した上清を Westernblot にかけた。SDS polyacrylamidegel で電気泳動を行い、Sigma 社の nNOS (N 末, C 末)、iNOS (N 末)、eNOS (N 末, C 末) ポリクローナル抗体を 1 次抗体として用い、horseradish peroxidase を結合した 2 次抗体を用い、市販の Lumino Substrate Kit で発色検出した。このフィルムをデンストメーターにて半定量し、比較した。

【結果】EL[s] 海馬の iNOS は 10 週齢から徐々に上昇し始め 20 週齢で既にピークを迎え、30 週齢でも 20 週齢と同じレベルであった。nNOS は 10 週齢で既に検出され、20 週齢ではさらに明確に認められ、30 週齢では急激に増大していた。これに反して、eNOS の発現量は極めて低かった。DDY については週齢を問わず、eNOS、nNO しか検出されなかった。

【考察】nNOS の産成する NO が異常可塑性成立過程において逆行性メッセンジャーとして、神経伝達に関与している可能性を示している。一方フリーラジカルの上昇を示唆する iNOS も発作の結果はなく異常可塑性成立のトリガー因子として働いているものと思われる。さらに eNOS 発現が極めて低いことが異常可塑性成立の基礎をなしているものと思われる。

Alzheimer's disease-related gene expression in human cell lines following infection with *Mycobacterium leprae*

°Masumi ENDOH

Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

In our previous study, elderly patients with leprosy have a low prevalence of senile dementia of Alzheimer type. In addition, the frequency of β -amyloid protein deposition was lower, and hippocampal neurons were well preserved in the brain of non-demented patients with leprosy than in controls. In the present study, we examined the levels of Alzheimer's disease-related genes (β -amyloid precursor protein, presenilin-1, -2, apolipoprotein E, tau), neurotrophic factors and cytokines (NGF, GDNF, CNTF, BDNF, IGF-1, NT-3, TGF- β , IL-2, IL-6, IL-12), proinflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1 α/β) and C-C chemokines (MCP-1, RANTES) mRNA by reverse transcription-competitive PCR in human neural cell lines (SK-N-SH, IMR-32) following infection with *Mycobacterium leprae*. The constitutive expression of every kind of Alzheimer's disease-related genes, and CNTF, BDNF, IGF-1, NT-3, IL-12, TNF- α , IL-1 α/β , RANTES mRNA was identified in these cell lines. The levels of Alzheimer's disease-related genes mRNA were unaltered in IMR-32 cell lines following exposure to lysate of *Mycobacterium leprae*, whereas PS-2 mRNA expression was upregulated in SK-N-SH cells after this treatment. The levels of RANTES mRNA was also upregulated in both cell lines after this treatment. These results indicate that the existence of cell specific mechanisms and/or different regulatory system for the expression of PS-1,2 genes in human neural cells. These finding is also speculated that *Mycobacterium leprae*-infected human neural cells produce C-C chemokine RANTES, its induce focal inflammatory with resulting nerve damage in central nervous system. Further work is in progress to clear the significance of expression of Alzheimer's disease-related genes in human neural cells following infection with *Mycobacterium leprae*.

2P-72

ストレス負荷に伴う副腎内 AP1 DNA 結合能上昇に対する NMDA レセプターの関与

°藤森 さゆ美, 檜井 栄一, 中村 洋一, 米田 幸雄
金沢大学薬学部薬物学研究室

環境ストレスは、生体内において様々な長期的機能変化を生じさせるが、これは一過性のストレス負荷の影響が、生体内に長期間固定される可塑性変化の結果だと考えられる。我々は、以前にストレス負荷に伴う NMDA レセプターの誘導、および NMDA レセプター活性化による細胞核内転写制御因子発現を見いだした。したがって、今回はストレス負荷による生体機能的変化と可塑性変化との関係を明らかにするため、ストレス負荷に伴うロイシンジッパー型転写制御因子発現について検討した。

8 週齢の Wistar 系雄性ラットを金属製ストレスゲージにて拘束し、25℃の恒温槽中で 1.5-6 時間鎖骨下まで水に浸すことにより、水浸拘束ストレス負荷を行った。ストレス負荷終了一定時間経過後に、脳内各部位、下垂体および副腎を摘出して細胞核抽出液を調製し、ゲルシフトアッセイにより転写制御因子 AP1 の DNA 結合能を測定した。また、ストレス負荷前に NMDA (100 mg/kg) および NMDA レセプターのアンタゴニストである MK-801 (10 mg/kg) を、それぞれ腹腔内投与した場合についても、同様に AP1 DNA 結合能を測定した。

3 時間ストレス負荷直後では、脳内各部位および下垂体では AP1 DNA 結合能にいずれも著明な変化は認められなかったのに対して、副腎において対照群の約 5 倍の AP1 結合上昇が認められた。この副腎 AP1 結合の上昇は、ストレス負荷終了直後で最も大きく、負荷終了後 9 時間目までは持続したが、24 時間目には有意な結合変化は認められなかった。3 時間ストレス負荷終了直後の副腎内 AP1 結合上昇は、NMDA レセプターアンタゴニストである MK-801 前投与では影響を受けなかったが、NMDA を前投与すると有意に抑制された。免疫組織化学的検討を行ったところ、副腎髄質部に NR1、NR2C および NR2D サブユニットタンパク質の発現が認められた。

以上の結果より、一過性のストレス負荷の影響が、特定転写制御因子 AP1 の発現を介して、副腎で長期固定されると推察される。また、この発現メカニズムに少なくとも一部は、副腎髄質内 NMDA レセプターが関与する可能性が示唆される。

2P-73

Effect of antidepressants on expression of dopamine receptor mRNA

°Jun MIURA, Teruaki TANAKA, Kensuke KAMEDA, Ichiro KUSUMI, Tsukasa KOYAMA
Department of Psychiatry, Hokkaido University

Antidepressant drugs have been assumed to exert their clinical effects through noradrenergic and serotonergic systems. However, the locomotor stimulant effects of dopamine (DA) agonists have also been found to be potentiated after chronic treatment with antidepressant drugs. We therefore examined the expression of mRNA coding for dopamine D1 receptor (D1R), D2 receptor (D2R) and D3 receptor (D3R) in the rat brain. Male Wistar rats (180-200g) received daily injections of amitriptyline (20mg/kg BW i.p.), desipramine (20mg/kg BW i.p.), fluvoxamine (20mg/kg BW i.p.) and sulpiride (10 and 100mg/kg BW i.p.) for 21 days. Four hours after the last injection, total RNA was extracted from striatum, nucleus accumbens and frontal cortex. Expression of mRNA was analysed by northern hybridization. In the striatum, there were trends that D1R mRNA increased after treatment with fluvoxamine and that D2R mRNA decreased after treatment with amitriptyline. In nucleus accumbens, D1R mRNA significantly decreased and D2R and D3R mRNA tended to decrease after treatment with amitriptyline. There is a trend that D2R and D3R mRNA decreased after treatment with sulpiride (10mg/kg BW). In frontal cortex, D1R mRNA increased and D2R mRNA decreased significantly after treatment with amitriptyline. There is a trend that D1R mRNA decreased after treatment with sulpiride (10mg/kg BW). In summary, antidepressant drugs have some effect on dopaminergic system.

2P-74

脳及び胸腺に特異的に発現する p38MAPK α の新規スプライス産物の同定 と解析

°日下 永子, 石川 保幸, 池内 俊彦, 畠中 寛
大阪大学蛋白質研究所蛋白質生合成部門

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) は細胞質に存在するセリン-スレオニンキナーゼであり、細胞外からの種々の刺激に対して広く応答する。この MAPK ファミリーの中で、特に p38MAPK ファミリーに注目した。p38 α /RK/CSBP2 や、p38 β 、p38 γ /ERK6/SAPK3、p38 δ /SAPK4 のように、MAPK ファミリーには、いくつかのアイソフォームが存在する。さらに、これらのアイソフォームには、p38 α に対する Mxi2、p38 β に対する p38 β 2 というスプライスバリエントが有ることが知られている。今回、p38 α に新規のスプライス産物 (p38 α 2 と命名) が存在するのを見い出したので報告する。この p38 α 2 は、p38 α の既知のスプライスバリエントである Mxi2 とは明らかに異ったスプライシングを受けていた。また、MAPK には、その活性化に重要である MAPKK 結合ドメインである CD ドメインが存在することがすでに知られているが、p38 α 2 は C 末端に存在している CD ドメインを欠損していた。実際、p38 α 及び p38 α 2 を cos 細胞で強制発現させたところ、p38 α はリン酸化されたが、p38 α 2 はリン酸化を受けなかった。また、p38 α 2 の mRNA 発現における組織分布を調べたところ、全脳と胸腺に特異的に発現していることがわかった。これらの結果から、p38 α 2 は組織特異的に重要な機能を担っていると考えられるので、その機能を明らかにすべく研究を続行中である。

謝 辞

第43回日本神経化学会（金沢）大会の開催に際しましては多くの団体、医療機関、企業から多大のご助成、ご協賛をいただきました。ここに団体名、医療機関名、企業名を掲げ、深謝の意を表します。

石川県、金沢市、金沢コンベンションビューロー

ユーアイサイビ、財団法人石川県予防医学協会、財団法人ブレインサイエンス振興財団株式会社半田、塩野義製薬株式会社、片岡薬品株式会社、丸文通商株式会社、ジェンザイム・ジャパン株式会社、木村科学器械株式会社、藤沢薬品工業株式会社、藤本製薬株式会社、株式会社医学書院、近畿日本ツーリスト株式会社、山之内製薬株式会社、富木医療器株式会社、日本光電工業株式会社、明治製菓株式会社、大鵬薬品工業株式会社、第一製薬株式会社、レノバサイエンス株式会社、日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社、日本シェーリング株式会社、平野純薬工業株式会社、日水製薬株式会社、雪印乳業株式会社、北陸製薬株式会社、ノバルティス・ファーマ株式会社、大正製薬株式会社、金沢東急ホテル、医療法人石井医院、東レ株式会社、田辺製薬株式会社、住友製薬株式会社、参天製薬株式会社、日研化学株式会社、持田製薬株式会社、大日本製薬株式会社、ファイザー製薬株式会社、萬有製薬株式会社、三共株式会社、小野薬品工業株式会社、宇野酸素株式会社、アサヒビール株式会社、エーザイ株式会社、大塚製薬株式会社、帝國製薬株式会社、グラクソ・ウエルカム株式会社、武田薬品工業株式会社、日本たばこ産業株式会社、帝人株式会社

■ 機器・書籍

松下電気 ME 営業所、インターメディカル、住友ベークライト、ワイリー・ジャパン

■ 広告

トミー精工株式会社、バックマン・コールター株式会社、インターメディカル、ライフテックオリエントアル、松下電気 ME 営業所

（平成12年9月6日現在）

第43回日本神経化学会（金沢）大会
大会長 東田陽博

編集後記

学会誌「神経化学」第39巻第3号をお届けいたします。本号は第43回日本神経化学会（金沢）大会抄録号です。本抄録は三木理事長はじめ学会関係者のご助言を賜り、インターネットによって投稿していただいた演題を日本学会事務センターのご尽力のもとで作製しました。その結果プログラム号と抄録号の編集が、教室員の人手を借りなくて済みました。主催する側にとって大変ありがたい事でした。ただミスがないよう細心の注意をしたつもりですが、最後まで間違いがないか不安です。この点会員の皆様のご理解とご協力に期待します。

1900年代を締めくくる本大会では、シンポジウム委員会により日本生物学的精神医学会との合同公開シンポジウムが企画され、また、第一回の奨励賞受賞者が決定される奨励賞選考シンポジウムが組まれています。昨年のノーベル賞の対象になりました細胞内輸送に関連した教育講演とワーキンググループセミナーも行われます。公募によるシンポジウム77題、一般演題212題をみているとやはり神経化学会独自のテーマがあるようです。あまりかたくなであってはいけないと思いますが、神経化学会のアイデンティティを高める機会であれば幸いです。

21世紀の幕開け間近となりました。金沢に多数の会員の皆様をご参集下さり神経化学の真髄を語り合われることを心よりお待ち申し上げます。

（第43回日本神経化学会大会長 東田陽博）

マルチチャンネル細胞外記録システム

平面微小電極アレイを備えたMEDプローブの採用により、*in vitro*でのマルチチャンネル電気生理測定を実現しました。

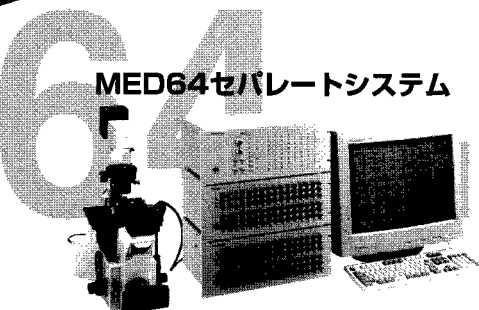
MECのフローブ上にあらかじめパターンニングされた64個の平面微小電極を用いて、マルチチャンネル電気生理測定を可能にしました。それぞれの微小電極は、電気刺激適用としても利用することができ、神経回路の2次元のつながりを観察するのに最適です。

従来の電気生理実験と異なり、特殊な実験訓練や複雑な装置・環境を準備することなくマルチチャンネル電気生理測定が行えます。

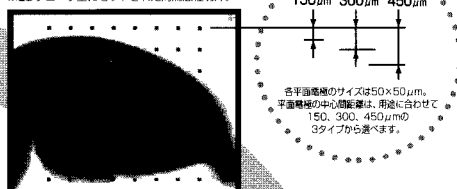
MEDプローブ上で神経細胞や脳切片等の培養が可能です。従来の電気生理実験法と異なり微小電極を細胞または組織内に挿入する必要がないため組織に与えるダメージが少なく、長期間にわたる測定が行えます。神経回路網の可塑的変化・発達過程の研究や長期にわたる薬物効果の研究に有効です。

長期測定

MED64セパレートシステム



MEDプローブ上にセットされた海馬急性切片。



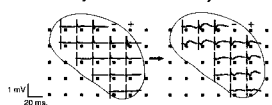
写真の試料から同時測定された刺激誘発電位。
64個の電極のうちシェファード剣枝に位置した電極(図中の空白部分)から定電流刺激を加え、他の63個の電極で誘発電位を測定しました。

シナプス形成の観察

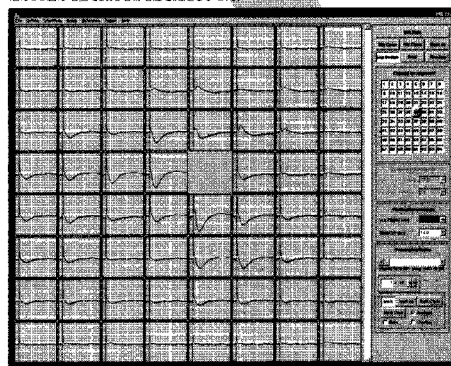
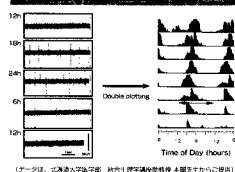
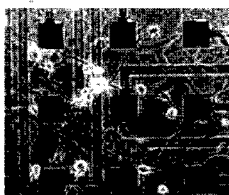


5 days *in vitro*

10 days *in vitro*



サーカディアンリズムの観察

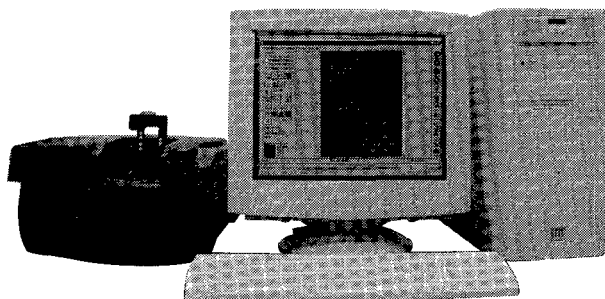


<http://www.panasonic.co.jp/avc/med/>

■お問い合わせは：ME営業所 〒105-0012 東京都港区芝大門 ナショナル6号館
Tel: 03-5472-8282 Fax: 03-5472-5716 Eメール: med-sales@crl.mei.co.jp

GenePix™ 4000A

Integrated Microarray Scanner
and Analysis Software



GenePix4000A

Stanford大学、P.O.Brownラボ他、世界中のラボで高い評価をうけています。

News レーザー波長が増えました!

標準(532nm, 635nm)、オプション
(409nm, 473nm, 594nm, 670nm, 690nm)
から2波長をお選び頂けます。

蛍光色素例: Cy2, 3, 5, 5.5, 7, Alexa430, 488,
532, 546, 5-FAM, ROPO-3 等

2波長同時スキャン

時間経過や機械による画像のズレはありません。

高速スキャン

スライドガラス全体を高解像度10μmで約5分、
プレビュー40μmで約1分半です。

ハードウェアとソフトウェアを一体化

16ビットのダイナミックレンジ

画像データ、数値データを保存可能で、他の
ソフトウェアでも利用できます。

アレイリストに対応

スタンピング装置上での遺伝子名を読み込むことが
できます。

コンパクトでタフなボディ

リーズナブル

コンピュータ込み980万円で御購入いただけます。

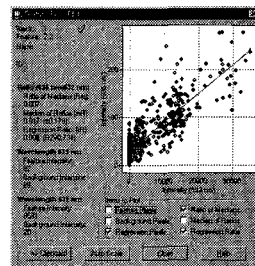
Image	Spot	Intensity	Background	Ratio	Ratio Error	Ratio Z	Ratio P	Ratio Q	Ratio R	Ratio S	Ratio T	Ratio U	Ratio V	Ratio W	Ratio X	Ratio Y	Ratio Z	Ratio AA	Ratio AB	Ratio AC	Ratio AD	Ratio AE	Ratio AF	Ratio AG	Ratio AH	Ratio AI	Ratio AJ	Ratio AK	Ratio AL	Ratio AM	Ratio AN	Ratio AO	Ratio AP	Ratio AQ	Ratio AR	Ratio AS	Ratio AT	Ratio AU	Ratio AV	Ratio AW	Ratio AX	Ratio AY	Ratio AZ	Ratio BA	Ratio BB	Ratio BC	Ratio BD	Ratio BE	Ratio BF	Ratio BG	Ratio BH	Ratio BI	Ratio BJ	Ratio BK	Ratio BL	Ratio BM	Ratio BN	Ratio BO	Ratio BP	Ratio BQ	Ratio BR	Ratio BS	Ratio BT	Ratio BU	Ratio BV	Ratio BW	Ratio BX	Ratio BY	Ratio BZ	Ratio CA	Ratio CB	Ratio CC	Ratio CD	Ratio CE	Ratio CF	Ratio CG	Ratio CH	Ratio CI	Ratio CJ	Ratio CK	Ratio CL	Ratio CM	Ratio CN	Ratio CO	Ratio CP	Ratio CQ	Ratio CR	Ratio CS	Ratio CT	Ratio CU	Ratio CV	Ratio CW	Ratio CX	Ratio CY	Ratio CZ	Ratio DA	Ratio DB	Ratio DC	Ratio DD	Ratio DE	Ratio DF	Ratio DG	Ratio DH	Ratio DI	Ratio DJ	Ratio DK	Ratio DL	Ratio DM	Ratio DN	Ratio DO	Ratio DP	Ratio DQ	Ratio DR	Ratio DS	Ratio DT	Ratio DU	Ratio DV	Ratio DW	Ratio DX	Ratio DY	Ratio DZ	Ratio EA	Ratio EB	Ratio EC	Ratio ED	Ratio EE	Ratio EF	Ratio EG	Ratio EH	Ratio EI	Ratio EJ	Ratio EK	Ratio EL	Ratio EM	Ratio EN	Ratio EO	Ratio EP	Ratio EQ	Ratio ER	Ratio ES	Ratio ET	Ratio EU	Ratio EV	Ratio EW	Ratio EX	Ratio EY	Ratio EZ	Ratio FA	Ratio FB	Ratio FC	Ratio FD	Ratio FE	Ratio FG	Ratio FH	Ratio FI	Ratio FJ	Ratio FK	Ratio FL	Ratio FM	Ratio FN	Ratio FO	Ratio FP	Ratio FQ	Ratio FR	Ratio FS	Ratio FT	Ratio FU	Ratio FV	Ratio FW	Ratio FX	Ratio FY	Ratio FZ	Ratio GA	Ratio GB	Ratio GC	Ratio GD	Ratio GE	Ratio GF	Ratio GG	Ratio GH	Ratio GI	Ratio GJ	Ratio GK	Ratio GL	Ratio GM	Ratio GN	Ratio GO	Ratio GP	Ratio GQ	Ratio GR	Ratio GS	Ratio GT	Ratio GU	Ratio GV	Ratio GW	Ratio GX	Ratio GY	Ratio GZ	Ratio HA	Ratio HB	Ratio HC	Ratio HD	Ratio HE	Ratio HF	Ratio HG	Ratio HH	Ratio HI	Ratio HJ	Ratio HK	Ratio HL	Ratio HM	Ratio HN	Ratio HO	Ratio HP	Ratio HQ	Ratio HR	Ratio HS	Ratio HT	Ratio HU	Ratio HV	Ratio HW	Ratio HX	Ratio HY	Ratio HZ	Ratio IA	Ratio IB	Ratio IC	Ratio ID	Ratio IE	Ratio IF	Ratio IG	Ratio IH	Ratio II	Ratio IJ	Ratio IK	Ratio IL	Ratio IM	Ratio IN	Ratio IO	Ratio IP	Ratio IQ	Ratio IR	Ratio IS	Ratio IT	Ratio IU	Ratio IV	Ratio IW	Ratio IX	Ratio IY	Ratio IZ	Ratio JA	Ratio JB	Ratio JC	Ratio JD	Ratio JE	Ratio JF	Ratio JG	Ratio JH	Ratio JI	Ratio JJ	Ratio JK	Ratio JL	Ratio JM	Ratio JN	Ratio JO	Ratio JP	Ratio JQ	Ratio JR	Ratio JS	Ratio JT	Ratio JU	Ratio JV	Ratio JW	Ratio JX	Ratio JY	Ratio JZ	Ratio KA	Ratio KB	Ratio KC	Ratio KD	Ratio KE	Ratio KF	Ratio KG	Ratio KH	Ratio KI	Ratio KJ	Ratio KL	Ratio KM	Ratio KN	Ratio KO	Ratio KP	Ratio KQ	Ratio KR	Ratio KS	Ratio KT	Ratio KU	Ratio KV	Ratio KW	Ratio KX	Ratio KY	Ratio KZ	Ratio LA	Ratio LB	Ratio LC	Ratio LD	Ratio LE	Ratio LF	Ratio LG	Ratio LH	Ratio LI	Ratio LJ	Ratio LK	Ratio LL	Ratio LM	Ratio LN	Ratio LO	Ratio LP	Ratio LQ	Ratio LR	Ratio LS	Ratio LT	Ratio LU	Ratio LV	Ratio LW	Ratio LX	Ratio LY	Ratio LZ	Ratio MA	Ratio MB	Ratio MC	Ratio MD	Ratio ME	Ratio MF	Ratio MG	Ratio MH	Ratio MI	Ratio MJ	Ratio MK	Ratio ML	Ratio MM	Ratio MN	Ratio MO	Ratio MP	Ratio MQ	Ratio MR	Ratio MS	Ratio MT	Ratio MU	Ratio MV	Ratio MW	Ratio MX	Ratio MY	Ratio MZ	Ratio NA	Ratio NB	Ratio NC	Ratio ND	Ratio NE	Ratio NF	Ratio NG	Ratio NH	Ratio NI	Ratio NJ	Ratio NK	Ratio NL	Ratio NM	Ratio NN	Ratio NO	Ratio NP	Ratio NQ	Ratio NR	Ratio NS	Ratio NT	Ratio NU	Ratio NV	Ratio NW	Ratio NX	Ratio NY	Ratio NZ	Ratio OA	Ratio OB	Ratio OC	Ratio OD	Ratio OE	Ratio OF	Ratio OG	Ratio OH	Ratio OI	Ratio OJ	Ratio OK	Ratio OL	Ratio OM	Ratio ON	Ratio OO	Ratio OP	Ratio OQ	Ratio OR	Ratio OS	Ratio OT	Ratio OU	Ratio OV	Ratio OW	Ratio OX	Ratio OY	Ratio OZ	Ratio PA	Ratio PB	Ratio PC	Ratio PD	Ratio PE	Ratio PF	Ratio PG	Ratio PH	Ratio PI	Ratio PJ	Ratio PK	Ratio PL	Ratio PM	Ratio PN	Ratio PO	Ratio PP	Ratio PQ	Ratio PR	Ratio PS	Ratio PT	Ratio PU	Ratio PV	Ratio PW	Ratio PX	Ratio PY	Ratio PZ	Ratio QA	Ratio QB	Ratio QC	Ratio QD	Ratio QE	Ratio QF	Ratio QG	Ratio QH	Ratio QI	Ratio QJ	Ratio QK	Ratio QL	Ratio QM	Ratio QN	Ratio QO	Ratio QP	Ratio QQ	Ratio QR	Ratio QS	Ratio QT	Ratio QU	Ratio QV	Ratio QW	Ratio QX	Ratio QY	Ratio QZ	Ratio RA	Ratio RB	Ratio RC	Ratio RD	Ratio RE	Ratio RF	Ratio RG	Ratio RH	Ratio RI	Ratio RJ	Ratio RK	Ratio RL	Ratio RM	Ratio RN	Ratio RO	Ratio RP	Ratio RQ	Ratio RR	Ratio RS	Ratio RT	Ratio RU	Ratio RV	Ratio RW	Ratio RX	Ratio RY	Ratio RZ	Ratio SA	Ratio SB	Ratio SC	Ratio SD	Ratio SE	Ratio SF	Ratio SG	Ratio SH	Ratio SI	Ratio SJ	Ratio SK	Ratio SL	Ratio SM	Ratio SN	Ratio SO	Ratio SP	Ratio SQ	Ratio SR	Ratio SS	Ratio ST	Ratio SU	Ratio SV	Ratio SW	Ratio SX	Ratio SY	Ratio SZ	Ratio TA	Ratio TB	Ratio TC	Ratio TD	Ratio TE	Ratio TF	Ratio TG	Ratio TH	Ratio TI	Ratio TJ	Ratio TK	Ratio TL	Ratio TM	Ratio TN	Ratio TO	Ratio TP	Ratio TQ	Ratio TR	Ratio TS	Ratio TT	Ratio TU	Ratio TV	Ratio TW	Ratio TX	Ratio TY	Ratio TZ	Ratio UA	Ratio UB	Ratio UC	Ratio UD	Ratio UE	Ratio UF	Ratio UG	Ratio UH	Ratio UI	Ratio UJ	Ratio UK	Ratio UL	Ratio UM	Ratio UN	Ratio UO	Ratio UP	Ratio UQ	Ratio UR	Ratio US	Ratio UT	Ratio UY	Ratio UV	Ratio UW	Ratio UX	Ratio UY	Ratio UZ	Ratio VA	Ratio VB	Ratio VC	Ratio VD	Ratio VE	Ratio VF	Ratio VG	Ratio VH	Ratio VI	Ratio VJ	Ratio VK	Ratio VL	Ratio VM	Ratio VN	Ratio VO	Ratio VP	Ratio VQ	Ratio VR	Ratio VS	Ratio VT	Ratio VU	Ratio VV	Ratio VW	Ratio VX	Ratio VY	Ratio VZ	Ratio WA	Ratio WB	Ratio WC	Ratio WD	Ratio WE	Ratio WF	Ratio WG	Ratio WH	Ratio WI	Ratio WJ	Ratio WK	Ratio WL	Ratio WM	Ratio WN	Ratio WO	Ratio WP	Ratio WQ	Ratio WR	Ratio WS	Ratio WT	Ratio WU	Ratio WV	Ratio WW	Ratio WX	Ratio WY	Ratio WZ	Ratio XA	Ratio XB	Ratio XC	Ratio XD	Ratio XE	Ratio XF	Ratio XG	Ratio XH	Ratio XI	Ratio XJ	Ratio XK	Ratio XL	Ratio XM	Ratio XN	Ratio XO	Ratio XP	Ratio XQ	Ratio XR	Ratio XS	Ratio XT	Ratio XU	Ratio XV	Ratio XW	Ratio XX	Ratio XY	Ratio XZ	Ratio YA	Ratio YB	Ratio YC	Ratio YD	Ratio YE	Ratio YF	Ratio YG	Ratio YH	Ratio YI	Ratio YJ	Ratio YK	Ratio YL	Ratio YM	Ratio YN	Ratio YO	Ratio YP	Ratio YQ	Ratio YR	Ratio YS	Ratio YT	Ratio YU	Ratio YV	Ratio YW	Ratio YX	Ratio YY	Ratio YZ	Ratio ZA	Ratio ZB	Ratio ZC	Ratio ZD	Ratio ZE	Ratio ZF	Ratio ZG	Ratio ZH	Ratio ZI	Ratio ZJ	Ratio ZK	Ratio ZL	Ratio ZM	Ratio ZN	Ratio ZO	Ratio ZP	Ratio ZQ	Ratio ZR	Ratio ZS	Ratio ZT	Ratio ZU	Ratio ZV	Ratio ZW	Ratio ZX	Ratio ZY	Ratio ZZ
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

▲Results tab

★セットコンピュータ例★

21インチカラーディスプレイ
IBM AT互換機

- ・Pentium III 800MHz
- ・384MBメモリ
- ・30GBハードディスク
- ・CD-R/Wドライブ
- ・MS-WindowsNTインストール
- ・フロッピーディスクドライブ



▲Pixel plot

日本総代理店

Inter Medical co.,ltd.
株式会社 インターメディカル

本社 〒464-0850 名古屋市千種区今池三丁目40番4号 TEL (052) 731-8000(代)
FAX (052) 731-5050
東京支店営業部 〒157-0063 東京都世田谷区粕谷三丁目32番16号 TEL (03) 5384-6387
FAX (03) 5384-6487
大阪営業所 〒532-0011 大阪市淀川区西中島四丁目3番4号 TEL (06) 6886-4151
FAX (06) 6886-4152
e-mail: int-med@mbf.sphere.ne.jp
website: http://www.intermedical.co.jp/

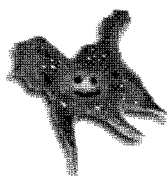
Effectene™ Reagent

your fast and easy
way to great transfections



迅速で簡単な操作手順と...

- 希釈不要で即使用可能なトランスフェクション試薬
- トランスフェクション複合体の形成はわずか5分
- トランスフェクション複合体除去も不要
- 必要なDNAは他の試薬に比較して著しく少量



... 最高のパフォーマンス

- エンドトキシンフリー：高いトランスフェクション効率
- 細胞にやさしい：低い細胞毒性
- 高い安定性：日々の実験で常に再現性のある結果

最高のトランスフェクション結果は簡単で迅速な
Effectene Transfection Reagentで！

詳細はテクニカルサポート部にお問い合わせください。

© 2000 QIAGEN, all rights reserved

株式会社 キアゲン

〒104-0054
東京都中央区勝どき3-13-1 Forefront Tower II
Tel: 03-5547-0811
Fax: 03-5547-0818
E-mail: techservice@jp.qiagen.com

www.qiagen.com



新発売

PP製ラックのワンタッチ着脱が可能な

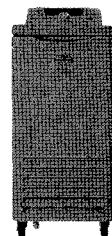
TOMY

カーボン製超軽量『ラック・イン・ロータ』に対応。

(特許出願中)

MX-200/300

微量高速冷却遠心機



2.2ml×72本の
同時多量遠心を実現した

MX-300

- ・最高回転数: 16,000rpm
- ・最大遠心加速度: 21,130G
- ・最大容量: 50ml×4本
- ・本体寸法: 345W×465D×780Hmm
- ・電源容量: AC100V 単相15A

株式会社トミー精工

本社: 東京都練馬区田柄3-14-17 TEL 03-5987-3111 事業所: 札幌・仙台・つくば・神奈川・名古屋・大阪・福岡
URL: <http://bio.tomys.co.jp>

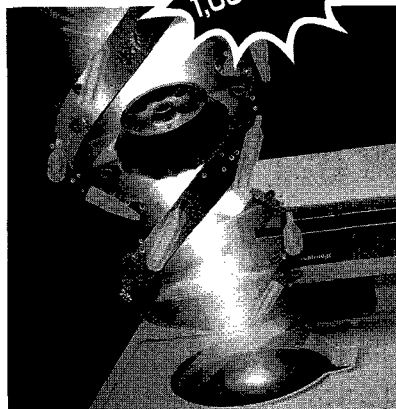


卓上型超遠心機 Optima™ MAX

1,000,000gの壁を突破!

世界をリードするベックマン・コールターが、
パワフルなOptima MAX シリーズを発表。
究極の未体験ゾーンをお楽しみください。

- 既存の全てのTL/TLXロータもそのまま使用できます。
- ロータのセットは回転軸にのせるだけ。ロックの必要はありません。
- 必要電源は100V、15Aです。
- タンパク質、DNA、RNA、細胞内成分、膜、ウイルス、リポタンパク等
すべての分離がより迅速に行えます。
- 最大遠心容量は 8×8mlです。



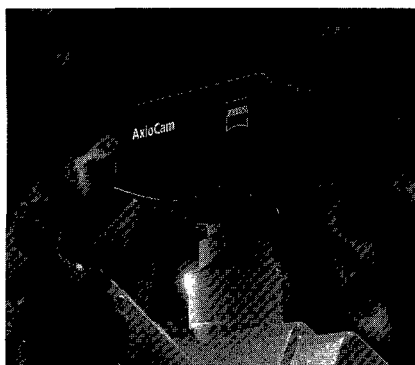
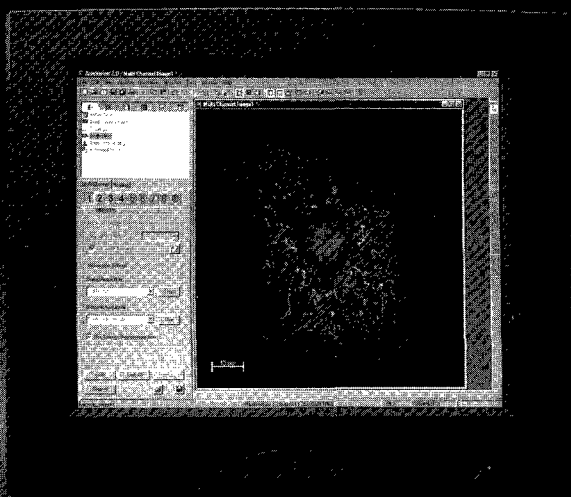
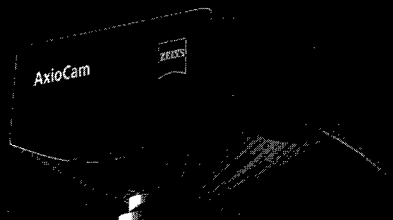
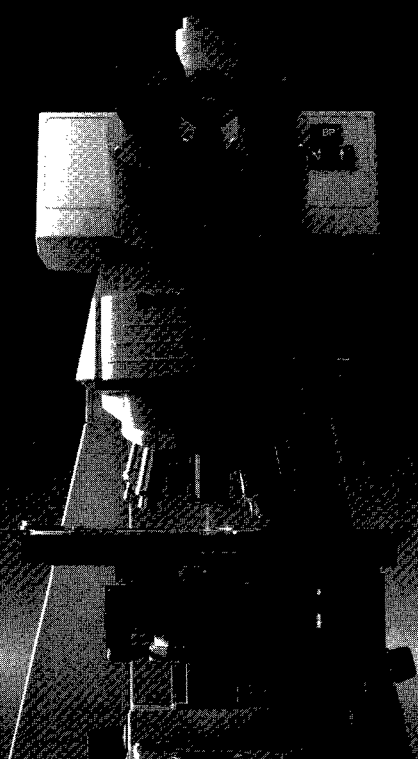
ベックマン・コールター株式会社 (ホームページ: <http://www.beckmancoulter.com>)

本社 〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-5-1 虎ノ門37森ビル お客様専用 ☎ 0120-70-5201 TEL 03-5404-8359 FAX 03-3578-4606

札幌 ☎(011)825-9243・仙台 ☎(022)225-8057・つくば ☎(0298)52-6640・名古屋 ☎(052)934-3081・大阪 ☎(06)4863-1671・福岡 ☎(092)622-7391

高解像度デジタルカメラシステム AxioCam

NEW



顕微鏡観察をより高精度、効率的にする最新鋭デジタルカメラ。

- ◆最高 1200 万画素解像度 [3900 (H) x 3090 (V)]
- ◆全ての顕微鏡観察に対応
- ◆最高水準の色再現性
- ◆自由に設定可能な解像度
- ◆顕微鏡システムへの拡張性

AxioCam (アキシオカム) は、顕微鏡のCarl Zeissが提供する、あらゆる顕微鏡観察に対応した画期的なデジタルカメラです。ピエゾ制御方式により最高 1200 万画素まで解像度を選択可能です。リアルタイムのオンライン画像は位置決め、ピント合わせを簡単にし、ペルチエ冷却方式の採用により明視野だけでなく、位相差、微分干涉、偏光、そして蛍光等、の全ての検鏡において高解像度画像を提供します。

このほかにも数多くの新開発・新設計・すぐれた技術が搭載されております。

輸入/販売元
Carl Zeiss 株式会社
顕微鏡部

〒160-0003 東京都新宿区本塩町 22 番地
Tel. 03-3355-0332 Fax 03-3358-7554
URL <http://www.zeiss.co.jp>
営業所 大阪/名古屋/福岡/仙台



The International Society for Neurochemistry
is pleased to introduce its
NEW COMMUNITY PORTAL

at

<http://www.neurochem.org>

This new site replaces the existing one, is free to all will open on September 1, 2000. The Society expects that this site will become the international source of comprehensive information on neurochemistry and will become interactive. Please visit.

The International Society for Neurochemistry
is pleased to announce that the
JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY

is now available online at

<http://www.jneurochem.org/>

This site is free and available to all on the Internet until the end of the trial period which is 31st January 2001.

Please see Subscription Information for further details.

人名索引

(A)

AGARWALA Kishan Lal S55
 AHMED Md.Mahiuddin 3A1400
 ABLESON Alan S20
 ASANUMA Masato 2P-13
 阿部 一樹 2P-20
 阿部 康二 1P-77
 阿部 貴子 S52
 阿部 輝雄 S33
 安達 直樹 1P-78 2P-10
 安食 京子 2P-07
 赤川 公朗 1P-29
 赤尾 幸博 2P-35 3D1320
 赤阪 啓子 2P-02
 秋本 達之 3C1300
 秋貞 盛人 2P-11 2P-12
 アリム M.アブドゥル M. 3D1400
 天野 賢示 3B1420
 網野 真也 1P-30
 青野 幸子 2P-05
 青山 峰芳 3B1340
 荒井 直亮 1C1400
 荒木 敏行 1P-79
 荒町 勝英 1P-12
 有賀 寛芳 1C1400
 有馬 邦正 3D1400
 有岡 学 S35
 浅井 清文 1P-22 1P-23 3B1340
 3B1520
 浅井 昌弘 1P-56
 浅野 雅秀 2P-02
 浅野 富子 2P-06 3B1300
 浅沼 幹人 2P-59 3D1500
 浅輪 瑠子 3B1540
 阿相 皓晃 1P-32 1P-58 1P-59

(B)

Bird Phillip 2P-11
 BROWN Anthony S77
 馬場 広子 1P-64
 馬場 勝弘 1P-27
 板東 良雄 2P-43
 バスネット プルソタム 1C1600
 許 波 2P-23

(C)

Chai Wengang 1P-69
 COLMAN R. Dvid 2P-04
 CREUZ Carl E 3C1340
 曹 縵 1P-65
 陳 小良 1P-31
 千葉 賢三 2P-54
 近島 博道 1D1500
 知久間 敏幸 3A1400
 知久馬 敏幸 1P-07 1P-45 2P-47
 2P-48

(D)

DEVADAS Malini S41
 傳法 倫久 2P-40 2P-42
 土肥 敏博 3C1320
 堂前 直 1P-58 2P-11
 土内 瞳 1C1540

(E)

ENDO Masumi 2P-71
 江頭 亨 2P-24
 遠藤 玉夫 2P-56
 遠藤 雅俊 2P-33
 榎戸 靖 2P-15
 衛藤 義勝 1P-61

(F)

FETNI Raouf 2P-16
 FUKUUCHI Yasuo 2P-31
 FUJIMOTO Takahiro 2P-03
 FUJITA Naoko 2P-13 2P-34
 2P-53
 范 企文 2P-49
 藤川 直人 1P-80
 藤川 徹 S13
 藤牧 香代 1P-59
 藤森 修 2P-38
 藤森 さゆ美 2P-72
 藤本 貞毅 3C1440
 藤野 一郎 1P-29
 藤岡 しほ 1C1520
 藤田 弘子 2P-39
 藤田 公和 2P-44
 藤田 哲也 S43
 藤田 義人 1P-22 1P-23
 藤田 悠一 1P-38
 福永 浩司 1P-39 3C1420
 福所 英理子 1C1620 1P-46 2P-61
 福内 靖男 2P-40 2P-42
 福山 隆一 2P-52 3D1420
 古市 貞一 1P-73
 古川 昭栄 1P-76 3B1320 S81
 古川 美子 S81
 古屋 茂樹 S82
 伏木 信次 2P-52 3D1420

(G)

GARRISON James C 3C1340
 Ghosh Manik L2
 GRUNDKE-IQBAL Inge 2P-56
 五味 不二也 1B1500
 キョウ 建生 2P-53 2P-62
 五嶋 良郎 S47
 後藤 勝年 S64
 五斗 進 S17
 後藤 玲央 2P-63

(H)

HAGINO Seita 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 HAKIM Antoine M 2P-16
 HARA Hideaki 2P-31
 HASHIGUCHI MITSUKO 3A1520
 HASHIGUCHI TOSHIO 3A1520
 HIDAKA Hiroya 1P-70
 HISAHARA Shin 2P-31
 HORI Osamu 1P-26
 芳賀 達也 1P-17 1P-18 1P-25
 S12
 濱 登希子 3B1500
 韓 春錫 1P-63
 原 明 2P-29
 原 淳子 S64
 原 とも子 2P-14 2P-51
 長谷川 明子 1P-51

長谷川 歩未 1P-19 2P-22
 長谷川 浩史 S71
 長谷川 政美 1P-65
 長谷川 光広 1P-02
 橋井 美奈子 S37
 橋本 恵理 2P-67
 橋本 喜次郎 2P-63
 橋本 浩一 S57
 橋本 重夫 2P-55
 秦 龍二 2P-57
 畑 裕 S59
 畑中 弘樹 2P-52
 畠中 寛 1B1420 1P-78 1P-79
 1P-81 2P-10 2P-15
 2P-18 2P-74 3B1400
 服部 征雄 1P-72
 林 美都子 2P-21
 林 光紀 1P-42
 林 剛史 S47
 林 義之 2P-55
 秀 和泉 S23
 東田 陽博 1D1400 1P-02 1P-06
 1P-31 1P-40 1P-41
 S37
 樋口 宗史 1P-19 2P-22 2P-23
 S67
 樋川 直司 3B1540
 永見 敏行 1D1600 1P-57
 檜井 榮一 1P-15 2P-72
 平林 義雄 S82
 平原 幸恵 1P-64
 平居 貴生 1P-36
 平野 久 1P-45
 平野 誠 2P-63
 平岡 秀仁 3C1420
 平田 加奈子 1P-09 1P-10
 廣井 智子 3B1540
 久原 真 2P-31
 久永 真市 1P-35 1P-38 1P-44
 1P-47 S79
 久岡 一恵 2P-66
 久岡 朋子 S62
 人見 淳一 1B1400
 本田 章子 3A1320
 本田 晶 S34
 本田 静世 1P-55 S22
 本田 岳夫 S52
 本藤 久雄 2P-63
 本郷 茂樹 1C1500
 本家 孝一 1P-64
 堀 均 1P-32
 堀 修 S27
 堀 琢也 S81
 堀江 秀典 3B1540
 堀込 和利 1P-20
 堀内 秀樹 1P-54 2P-32
 保坂 早苗 1P-42
 星 直人 1P-06
 ホセイン シャハナラ MST.
 3D1400
 堀田 優子 S52

(I)

IKEDA Joh-E 1B1600 2P-16
 3D1300
 IQBAL Khalid 2P-56

ISEKI Ken 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 茨木 京子 1P-24
 一宮 智美 1P-65
 一瀬 宏 1P-08
 五十嵐 道弘 1P-28
 井原 康夫 3A1500
 池田 正行 1D1600
 池本 桂子 1P-13
 池中 一祐 1P-64
 池中 一裕 1C1420 1P-51 1P-60
 S42
 池内 俊彦 2P-18 2P-74
 今井 文博 2P-45
 今井 嘉紀 1P-48 S22
 今泉 和則 1B1400 2P-50 3A1320
 3C1520
 今泉 美佳 1P-42
 稲垣 雅昭 1P-22 1P-23
 稲垣 忍 1C1520
 稲熊 裕 2P-37 3B1300
 井ノ口 馨 S56
 井上 敦子 S23
 井上 和秀 S21 S24
 井上 順雄 1P-21 2P-20
 井上 雄一郎 3B1520
 乾 誠 1P-05
 石橋 智子 1P-64
 石黒 幸一 1P-44
 石井 寿幸 1P-74
 石川 哲也 1P-49
 石川 保幸 2P-18 2P-74
 石川 義弘 3B1540
 石尾 将吾 2P-21
 磯部 一郎 2P-68
 磯辺 俊明 1P-44
 板倉 誠 1P-10 1P-30
 伊藤 千裕 2P-64
 伊東 大介 2P-40 2P-42
 伊東 秀記 2P-37
 伊藤 久則 1P-76
 伊藤 仁一 2P-09 2P-27 2P-28
 伊藤 隆司 1D1440 S18
 伊藤 龍生 2P-55
 岩倉 洋一郎 2P-02
 岩間 久行 1D1620
 岩本 郁子 2P-37
 岩本 敬 1P-05
 岩本 武史 S62
 岩室 康司 1P-03
 岩佐 峰雄 2P-68
 岩崎 靖乃 1P-51
 岩島 牧夫 3B1500
 岩田 健 1P-18
 泉山 洋子 3D1400
 伊豆本 種野 2P-52
 (J)
 蔣 健 S13
 (K)
 KAMEDA Kensuke 2P-73
 KATSUYAMA Tsutomu 1P-70
 KAWAHARA Ryuzo 2P-69
 KAWAI Yoshikuni 1P-26
 KIKUCHI Shin-ichi 1P-53

Klee Claude L2
 KLENCHIN Vadim A. S35
 KOHAMA Keiko 2P-01 S54
 KOTLYAR Max S20
 KOYAMA Tsukasa 2P-73
 KUSUMI Ichiro 2P-73
 門屋 利彦 3B1540
 鏡 良弘 1P-73
 鹿川 哲史 1C1420 1P-60
 貝淵 弘三 S39
 貝津 雅稔 1P-19 2P-22 S67
 梶畑 俊雄 1D1520
 蒲地 智寛 2P-11
 亀田 幸彦 2P-60
 亀井 慶子 2P-37
 亀谷 富由樹 3A1300
 上口 裕之 S48
 金保 安則 S34
 金井 好克 1D1540
 金松 知幸 2P-25 2P-26
 金澤 裕子 1P-48 S22
 諫田 泰成 1P-14
 金田 小幸 1D1620
 金子 勲 3A1420
 金子 葉子 1P-13
 神成 一哉 1D1420
 狩野 方伸 S57 S82
 唐澤 博史 S13
 唐沢 淳一 1P-20
 笠原 二郎 1P-39
 河西 克介 2P-43
 笠井 陽子 1P-09 1P-10
 柏原 健一 1P-77
 柏原 めぐみ 3B1400
 柏木 雄次郎 1C1620 1P-46 2P-61
 柏谷 知之 2P-48
 片岡 正和 1P-30
 片山 泰一 1B1400 3A1320
 加藤 総夫 S26
 加藤 兼房 2P-06 2P-37 3B1300
 加藤 啓子 2P-08 2P-11 2P-12
 加藤 聖 S41
 加藤 泰治 1P-22 1P-23 3B1340
 3B1520
 加藤 尚彦 1P-21 2P-20
 加藤 武 1P-07 1P-45 2P-47
 2P-48 3A1400 3D1440
 加藤 寿章 2P-44
 勝屋 弘忠 1P-22
 川口 綾乃 S8
 川口 直恵 1D1620
 川原 健 1D1520
 川井 千景 1P-49
 河合 洋子 3B1520
 川上 政勝 S84
 河本 竹正 3B1340
 河村 則子 2P-06
 河村 晴次 1P-74
 川村 勇樹 3A1340
 川村 裕美 1C1400
 川野 仁 2P-02 2P-07
 川島 麗 2P-30
 川島 祥子 2P-05
 川戸 佳 S4
 香山 雪彦 S15
 慶野 宏臣 2P-05

菊池 章 3A1340
 菊池 薫 S47
 菊野 玲子 S19
 木村 文隆 S14
 木村 哲也 3D1520
 木村 徹 S47
 木下 美香 2P-21
 岸 忠明 2P-11
 岸川 正大 2P-06
 岸本 あずさ 3C1440
 北本 勝ひこ S35
 北村 邦男 1P-63 1P-66
 北村 佳久 S74
 北尾 康子 S27
 北山 滋雄 2P-65 3C1320
 北山 友也 1P-34
 鬼頭 昭三 1P-11 3C1500
 木山 博資 2P-41 S38 S83
 小林 淳子 1P-58 1P-59
 小林 正明 1D1500
 小林 悟 2P-02
 小林 三和子 1C1400
 高坂 新一 1P-48 1P-55 S22
 上村 公一 1B1540
 小出 隆司 1P-50
 小池 達郎 1B1620 2P-17 2P-19
 小泉 修一 S24
 小嶋 哲史 2P-47
 小嶋 久子 1P-65 2P-30
 小島 正己 1P-81
 駒野 宏人 3A1340
 小松 かづ子 1C1600 1P-72
 小宮 義璋 1P-28 1P-43 1P-47
 小宮 百合子 S13
 近藤 俊三 1P-09 1P-10
 木下 雅之 1B1620
 郡山 恵樹 2P-54
 小堺 有史 2P-40 2P-42
 小笹 貴史 S16
 小清水 久嗣 1P-79
 小山 宏義 2P-68
 小山 司 3C1300
 小山 純正 S15
 小堺 郁夫 S52
 小崎 俊司 1P-09 S84
 久保 幸穂 1P-33
 久保 武一 3A1420
 窪田 恭彦 2P-64
 久保山 友晴 1P-72
 工藤 喬 2P-61
 熊谷 善弘 3A1420
 熊倉 鴻之助 1P-42
 久野 みゆき S75
 倉知 正 1P-43
 倉増 敦朗 2P-64
 倉本 展行 1P-12 1P-36 3C1540
 栗原 正 1P-55 1P-65
 黒田 洋一郎 1P-74
 黒木 俊秀 1D1520 2P-63
 黒木 康富 1P-14
 黒木 由夫 2P-67 3C1340
 日下 永子 2P-74
 楠田 敏博 3C1440
 久住 一郎 3C1300
 桑原 玲子 1P-10
 桑子 賢一郎 1B1440 2P-51

桑野 良三 S52

(L)

Leterrier Jean-Francois 1P-43

李 憲 1P-03

李 順姫 2P-02

李 永敦 2P-58

李 洪珍 2P-30

劉 中武 S41

(M)

MAEDA Kazuhisa 2P-69

MARTIN Thomas F. S35

MCINTIRE William E 3C1340

MIKI Naomasa 2P-01 2P-03

S54

MISENER Steve S20

MITANI Hideaki 2P-69

MITSUDA Noriaki 1P-26

MIURA Jun 2P-73

MIURA Masayuki 2P-31

MIYAKE Shin-ichi 1P-26

MORI Tetsuji 1P-52 1P-53

1P-67 1P-68

MURAKAWA Masahiro 1P-52

町田 敦紀 2P-08

前田 信治 S73

前野 善孝 2P-68

牧田 善二 2P-60

眞部 孝幸 2P-50

眞鍋 俊也 S58

眞邊 泰宏 1P-77

萬代 研二 S49

丸岡 弘規 2P-15

丸山 裕子 1P-36

丸山 敬 3A1300

丸山 六三 3B1500

丸山 直記 1P-33

丸山 和佳子 2P-35 3D1320

正木 孝幸 S63

増田 健太 1C1520

益本 将司 2P-19

升村 誠 2P-57

松井 ふみ子 2P-05

松井 稔 S13

松川 則之 1P-16 2P-38

松川 通 S41

松本 暁子 2P-26

松本 和政 2P-11

松本 和也 3C1420

松本 健一 1C1400

松本 均彦 1C1620 1P-46 2P-61

松本 知也 1P-78 2P-10

松永 宗雄 1D1420

松延 毅 2P-46

松岡 一郎 1C1400

松山 知弘 S29

松山 知弘 S28

松崎 秀夫 2P-41 S83

道川 誠 2P-49 2P-53 2P-62

三木 直正 S50

三國 雅彦 S6

南 雅文 S72

南野 直人 1P-17

湊川 洋介 1P-49

三苫 純也 S82

三富 明夫 S67

満田 憲昭 2P-41 2P-58 S83

光本 泰秀 2P-36 3D1340

三浦 正幸 2P-31

三浦 裕 1P-22 1P-23 3B1340

3B1520

三輪 聡一 1P-03

宮地 栄一 2P-44

宮地 泰士 3B1340

三宅 進一 2P-41

三宅 義雅 2P-11

宮本 英七 1P-39 3C1420

宮坂 知宏 3A1500

宮田 卓樹 S8

宮崎 秀幸 S34

宮崎 浩之 1P-37

宮崎 育子 2P-59 3D1500

三好 淳 S49

溝口 明 S49 S60

水野 勝重 1P-14

水野 哲也 2P-52

水野 俊樹 2P-52

水島 和幸 1D1440

毛利 哲郎 2P-54

木綿 しのぶ 1P-37

森 厚詞 2P-36 3D1340

森 啓 3A1300

森 和俊 3A1320

森 啓至 1P-13

森 泰丈 3C1520

森畑 宏一 S75

森川 吉博 S62

森野 忠夫 1P-54 2P-32

森信 繁 2P-66

森島 真帆 3A1500

森下 学 1P-16

森下 理香 2P-06 3B1300

森田 育夫 1P-57

森田 克也 3C1320

森山 昭彦 3B1520

森山 芳則 1D1540 2P-21

本村 大輔 S13

本村 啓介 2P-63

向井 由幸 3C1400

村上 哲郎 1P-77

村岡 修 2P-23 S67

村島 善也 L. 2P-70

村山 俊彦 3C1400

室田 誠逸 1D1600 1P-57

(N)

NAGAMI Takefusa 2P-69

NAKABAYASHI Tetsuo 1P-70

NAKAZATO Masamitsu S65

NEMOTO Yasuo S36

NIKAIDO Takuya 1P-52 1P-53

1P-67 1P-68

NODA Tetsuo 1P-70

鍋島 俊隆 2P-29 3A1440 S2

永井 拓 2P-29

永井 康雄 2P-47

長尾 正崇 2P-68

長尾 憲樹 2P-65

永沢 秀子 1P-32

長瀬 隆弘 S19

長嶋 和郎 3A1500

永田 豊 2P-44

永津 俊治 1P-08 L3

長安 祐子 2P-27

内藤 康秀 2P-56

中別府 雄作 S31

中田 規之 1C1500

中福 雅人 S7

中川原 章 3B1340

中原 辰雄 1D1520 2P-63

中平 英子 1C1420 1P-60

中井 正三 2P-36 3D1340

中井 真通 S71

中嶋 一行 1P-55

中島 健次 2P-52

中島 利博 3D1520

中島 八東 S29

中道 範隆 3C1540

中村 史雄 S47

中村 浩 1P-73

中村 和生 2P-30

中村 昌美 2P-68

中村 洋一 1P-12 1P-15 1P-27

1P-33 1P-34 1P-36

1P-62 2P-72 3C1540

中村 祐 1C1620 1P-46 2P-61

S78

中根 博 2P-63

中西 博 S70

中西 宏之 S49

中野 亮一 1P-50

中野 有香 2P-61

中瀬 泰然 3D1420

中島 昭 1P-13

中島 欽一 S10

仲田 義啓 S23

中谷 俊幸 1C1400

中坪 純 3B1440

中塚 修一 2P-21

中山 学 S19

中山 たかね 1C1440

中山 孝 2P-20

中沢 康至 2P-47

南部 篤 2P-25

湊川 一彦 S83 2P-41

直井 信 2P-35 3D1320

奈良 清光 3B1500

成瀬 聡 3D1520

那波 宏之 1P-24

名和田 新 S3

根岸 隆之 1P-74

二本松 伊都子 S84

新延 道夫 1P-71

二宮 貢士 1B1440

二宮 孝文 1B1620

西 克治 1P-45

西田 朗 2P-66

西井 一宏 1P-08

西川 徹 1D1620

西村 裕之 S29

西村 伊三男 1B1440 2P-14 2P-51

2P-57

仁科 博史 2P-15

西野 仁雄 1P-64

西尾 チカ 1B1420 2P-10 3B1400

西尾 昌洋 1P-14

西岡 博史 3B1320

西奥 剛 S70
 西屋 禎 1P-37
 西山 啓次 1B1420
 西崎 知之 S25
 新田 淳美 3B1320 S81
 野田 百美 1P-41 S69
 野田 幸裕 2P-29 S2
 野上 真宏 S34
 野川 茂 2P-40 2P-42
 野元 裕 1P-76
 野村 正彦 1P-58 1P-59 1P-66
 野村 靖幸 1D1400 1P-37 3C1400
 野崎 歩 2P-29
 野崎 兼吉 3D1520
 額田 敏秀 1P-20
 沼川 忠広 1P-78 2P-10

(O)

OGAWA Norio 2P-13 2P-34
 OKANO Hideyuki 2P-31
 OKUMURA Shigeki 2P-01 S54
 OLARIU Ana 3A1440
 Onoe Kyuichiro 3D1300
 OSUGA Hitoshi 2P-16 3D1300
 OSUGA Sachiko 2P-16
 OTOMO Asako 1B1600
 落合 和 S10
 小田 正記 2P-25
 尾方 英俊 3C1440
 尾形 直則 1P-54 2P-32
 小川 郁 2P-46
 小川 正晴 1P-51 S11
 小川 紀雄 2P-59 3D1500
 小川 智 S27 S28
 荻田 喜代一 2P-46
 小倉 明彦 1P-80
 小倉 博雄 S16
 小原 収 S19
 大橋 十也 1P-61
 大川 浩子 2P-67 3C1340
 大木 武 1C1500
 大久保 岩男 1P-45
 大久保 信孝 2P-58
 大窪 忠利 2P-60
 大倉 多美子 1P-32
 大西 浩史 1P-09 1P-30
 大野 博司 3C1540 L4
 大澤 圭子 1P-48 S22
 大山 晃弘 1P-28
 大瀧 純 2P-68
 大屋敷 孝雄 1B1520
 大江 瑞恵 1P-08
 小鹿 幸生 1P-16 2P-38
 岡 卓也 2P-08 2P-11 2P-12
 岡部 明仁 2P-08
 岡田 知明 1P-17
 岡本 和也 2P-25 2P-26
 岡本 昌也 S29
 岡本 泰昌 2P-66
 岡村 理子 1P-17 1P-25
 岡村 将平 3C1440
 岡野 栄之 S8
 大久保 晋吾 1P-42
 奥田 隆志 1P-25 S12
 大熊 康修 1P-37 3C1400
 奥瀬 賢司 1P-01

奥山 茂 1P-20
 小野 勝彦 S45
 小野 健治 1P-56 S44
 小野寺 理 3D1520
 大平 敦彦 2P-05 2P-07
 大塚 正人 2P-21
 小坂田 健一 2P-20
 小山内 たか 1P-69
 大隅 典子 S9
 太田 明 1P-13
 大塚 康史 1P-16
 大槻 泰介 2P-25 2P-26
 大藪 友利子 1P-32
 小宅 睦郎 3D1520
 大山 佳悟 2P-48
 小澤 寛樹 2P-67

(P)

PARK David S 2P-16
 PAUDEL HEMANT K 3A1520
 PHAM Hai S20

(R)

RAHMAN Md.Khalilur 3A1400
 RAVID Rivka 3A1500
 Ren Hao L2
 REN XiuHai 3A1440

(S)

Saffen David 1P-04
 SAKAI Harumi 1B1600
 Samouilov Alexandre L2
 SATO Kohji 1P-26
 Sato Yukio 1P-67
 SCHACHT Jochen 2P-46
 Schmid AnnMarie S53
 SCHMIDT Ann M. L1
 SCHWARTZ Michal S40
 SENBA Emiko 1P-26
 SHIBATA Mamoru 2P-31
 SHI Hong 2P-03
 Shinohara Yukito 3D1300
 SOBUE KAZUYA 3A1520
 SOMOGYI Roland S20
 STEEG Evan S20
 Stern David S53
 STERN David M. L1
 SUGITANI Yoshinobu 1P-70
 SUGIURA Hiroko 2P-03
 鷲 直樹 1P-20
 斎藤 克 2P-30
 斎藤 真希 2P-30
 斎藤 太郎 1P-35 1P-38 1P-44
 斉藤 達哉 2P-17
 斉藤 哲一郎 1C1420
 齋藤 利和 2P-67
 斎藤 文典 2P-09
 斉藤 宏 S52
 才脇 卓也 3D1420
 酒井 久美子 2P-24
 榎 佳之 1D1440
 坂本 安 1P-66
 坂本 ゆかり 1B1520
 阪中 雅広 2P-39 S73
 坂田 利家 S63
 櫻井 映子 2P-33

桜井 武 S64
 桜井 洋子 1P-58 1P-59
 佐内 豊 1P-69
 三五 一憲 2P-07 3B1540
 佐野 譲 1P-49 1P-75
 笹川 展幸 1P-42
 佐々木 彰一 S80
 佐々木 孝寛 1P-44
 佐々木 泰治 3C1420
 佐々木 洋 1P-48 S22
 佐々木 由紀 3C1300
 佐々木 幸生 S47
 佐藤 明 1P-73
 佐藤 光 2P-20
 佐藤 真奈美 3B1540
 佐藤 光源 2P-64
 佐藤 直也 2P-50
 佐藤 俊哉 3D1520
 佐藤 雄治 2P-56
 佐藤 公道 S72
 佐藤 洋助 1P-81
 佐藤 隆夫 2P-55
 澤田 浩秀 1P-08
 澤田 誠 1P-56 2P-45 S44
 澤田 徹 2P-57
 澤本 和延 S8
 澤村 直哉 2P-49 2P-53 2P-62
 関口 真理子 1P-30 S84
 仙波 恵美子 S62
 仙波 りつ子 2P-06 3B1300
 千田 隆夫 2P-49
 沈 活 1D1420
 沈 勁松 1P-61
 施 虹 2P-03
 芝本 さゆみ 3A1340
 柴崎 芳一 S35
 柴山 健三 2P-44
 七里 元亮 3C1420
 重本 和宏 1P-33
 島崎 琢也 S8
 清水 秀夫 2P-09
 霜田 靖 1P-58 1P-59 1P-69
 下濱 俊 3C1440
 下畑 享良 3D1520
 下永 友和 1P-80
 霜里 和朗 2P-65
 申 然淑 1P-02 1P-40
 新郷 明子 S. 1P-11 3C1500
 篠原 春夫 2P-06
 塩坂 貞夫 2P-08 2P-11 2P-12
 六倉 朋風 3B1340
 周尾 卓也 2P-05
 祖父江 和哉 1P-22 1P-23
 祖父江 憲治 1P-05
 曾我 智子 1P-21
 祖川 由美 1C1540
 相馬 仁 2P-67 3C1340
 宗 時榮 3D1440
 曾良 一郎 1P-20
 須田 俊宏 1D1420
 須藤 カツ子 2P-02
 菅原 正伯 1P-50
 杉江 智則 2P-60
 杉原 樹梨 2P-68
 杉田 實 S29
 杉谷 加代 S41

杉浦 弘子 S50
 鈴木 日子 2P-38
 鈴木 弘美 1P-56 2P-45
 鈴木 二郎 2P-70
 鈴木 克治 3C1300
 鈴木 健二 1P-81
 鈴木 重明 2P-40 2P-42
 鈴木 貴子 2P-60
 鈴木 龍雄 2P-09
 鈴木 智久 S23
 錫村 明生 S68

(T)

TAIRA Eiichi 2P-01 2P-03
 S54
 TAKAKI Hiromi 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 TAKEDA Junko 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 TAKETOMI Tamotsu 1P-70
 TAKEUCHI Mayumi 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 TAMATANI Michio 1P-26
 TANAKA Hidekazu 2P-01 2P-03
 2P-04 S50
 TANAKA Ken-ichi 2P-13 2P-34
 TANAKA Teruaki 2P-73
 TANIGUCHI Manabu 1P-26
 TOHYAMA Masaya 1P-26
 TOZUKA Minoru 1P-70
 TRAN ManhHung 3A1440
 TSUKAMOTO Yasuhiro 2P-01
 S54
 田端 俊英 S82
 田淵 明子 3B1420 3B1440
 田淵 博孝 3C1420
 多田 豊藏 3B1520
 田賀 哲也 S10
 田口 明彦 S53
 田口 雅之 2P-30
 田口 康智 1P-54
 田島 陽一 1P-69
 高田 昌彦 2P-25
 高田 律子 3A1340
 高田 慎治 3A1340
 高寺 恒雄 1B1520
 高木 博 2P-09
 高橋 均 3D1520
 高橋 正身 1P-09 1P-10 1P-30
 S61 S84
 高橋 信一 S13
 高橋 真司 1P-20
 高橋 勤 2P-35
 高井 里美 1P-79
 高井 義美 S49
 高松 研 1D1500
 高山 千利 1P-71
 高山 房子 2P-24
 高柳 雅子 3C1540
 竹葉 淳 1P-54 2P-32
 武田 克道 2P-48
 武田 雅俊 1C1620 1P-46 2P-61
 S78
 竹田 稔 1C1500
 武田 茂樹 1P-17
 武田 泰生 1P-63 2P-02

竹下 歌織 3B1540
 武藤 誠 M. S13
 竹内 郁夫 3B1300
 竹内 正義 2P-60
 瀧尾 擴士 1P-58 2P-11
 滝沢 琢己 S10
 玉井 洋一 1P-65 2P-30
 玉井 良尚 2P-55
 玉谷 実智夫 2P-41 2P-43 S28
 S83
 玉谷 美智夫 2P-58
 田辺 勝久 S38
 田中 千賀子 S71
 田中 潤也 S73
 田中 健一 3D1500
 田中 謙二 1P-56
 田中 喜久子 3A1300
 田中 耕太郎 2P-40 2P-42
 田中 秀逸 2P-17
 谷口 学 2P-43 S28
 谷口 直子 1P-71
 谷野 浩子 3C1440
 谷浦 秀夫 1P-71 2P-14
 田岡 万悟 1P-44
 田代 信雄 1D1520
 田代 朋子 1P-43 1P-47 S76
 俵 佳江 2P-08
 鳥羽 裕恵 3D1420
 藤堂 謙一 S53
 東田 千尋 1C1600 1P-72
 東田 道久 1D1400
 遠山 正彌 1B1400 2P-41 2P-43
 2P-50 2P-58 3A1320
 3C1520 S27 S28
 S83
 遠山 陽子 1P-55 1P-65
 渡嘉敷 晶子 2P-07
 時田 義人 2P-05
 徳 和子 S73
 徳野 博信 2P-25
 富永 恵子 1P-80
 富田 麗 1D1620
 豊島 至 1P-50
 土田 英人 1D1620
 土田 健 1P-07
 津田 正明 3B1420 3B1440
 津田 喬子 1P-22
 立木 秀樹 3B1520
 辻 省次 3D1520
 塚田 裕三 2P-25 2P-26
 塚本 吉胤 S28
 弦巻 立 2P-23
 堤 哲之 2P-63
 (U)
 内田 敦子 1P-43 1P-44 1P-47
 内田 千晴 3D1520
 内田 洋子 1B1500
 内村 美幸 2P-63
 上田 浩 2P-06 3B1300
 植田 弘師 S5
 上田 健治 3D1400
 上田 睦明 1P-48
 上田 龍三 1P-16 2P-38
 上原 孝 1P-37
 植木 裕司 2P-63

上田 祐司 1P-32
 植月 太一 2P-14 2P-51 2P-57
 上山 栄子 S62
 上江洲 章吉 1P-39
 梅田 匡朗 2P-25 2P-26
 海野 麻未 1D1620
 宇佐美 美穂子 3A1300
 植村 慶一 1P-32 1P-63

(V)

VANSWIETEN JohnC. 3A1500

(W)

WANAKA Akio 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 WANG Jian-Zhi 2P-56
 Wang Xutong L2
 WOOD John N. 1P-01
 和田 千鶴 1P-50
 和田 恵津子 S66
 和田 圭司 S66
 和田 圭樹 1C1420 1P-60
 割田 仁 1P-77
 渡部 和彦 1P-61
 渡部 昭仁 3D1340
 渡邊 英安 2P-25 2P-26
 渡辺 裕司 1D1400
 渡辺 和忠 2P-02
 渡邊 学 S53
 渡邊 雅彦 S46 S82
 渡辺 悟 2P-65
 渡邊 建彦 2P-33 2P-64
 渡辺 康裕 1P-14
 魏 范研 1P-35

(Y)

YAMAGATA Kanato 2P-03
 YAMAWAKI Takemori 2P-31
 YAN Shi-Du L1
 YOKOYA Sachihiko 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 YOSHIDA Erin N 1B1600
 Yoshii Fumihito 3D1300
 YOSHIOKA Sin-ichi 2P-69
 Yuan Junying 2P-31
 Yuen Chun-Ting 1P-69
 矢嶋 隆一 1P-07 1P-45
 山田 敦子 3B1300
 山田 浩司 2P-21
 山田 和雄 S32
 山田 一之 S66
 山田 恵子 S82
 山田 清文 3A1440
 山田 真久 1P-51
 山田 雅司 1B1420 1P-79 1P-81
 山田 光則 3D1520
 山田 康枝 1P-05
 山形 要人 S50
 山岸 覚 2P-15
 山口 淳 2P-41 2P-58 S27
 S28 S83
 山口 剛 1P-19 2P-22 S67
 山川 和弘 S55
 山国 徹 3D1440
 山森 秀長 1C1620
 山森 早織 1P-09 1P-30

山本 章嗣 2P-21
 山本 晴康 1P-54 2P-32
 山本 秀子 1P-20 3D1440
 山本 秀幸 3C1420
 山本 和彦 2P-11
 山本 健二 S70
 山本 愛美 3B1520
 山本 賢 1P-45
 山本 直樹 1D1620 1P-22 1P-23
 山本 敏文 1P-20 3D1440
 山本 好男 1P-45
 山中 章弘 S64
 山中 康光 2P-24
 山西 嘉晴 S16
 山之端 万里 1C1440
 山崎 美和子 S82
 山崎 哲盛 S30
 山下 純宏 1P-02
 大和 博 1D1420
 山内 理充 2P-44
 山内 忍 2P-05
 山内 卓 1C1540
 山脇 成人 2P-66 S1
 山脇 健盛 2P-31
 山崎 正和 S34

山崎 眞津美 2P-60
 関 剣虹 1P-66
 柳 秀樹 S28
 柳澤 勝彦 2P-49 2P-52 2P-53
 柳澤 亮 S10
 谷内 一彦 2P-33
 柳瀬 由紀子 2P-60
 揚 志博 2P-33
 安田 新 S50
 八代 聖基 1D1540 2P-21
 横井 誉 3B1340 3B1520
 横幕 大作 1P-78 2P-10
 横山 茂 1P-02 1P-06 1P-31
 横山 信治 2P-27 2P-28
 米田 和広 1P-22 1P-23
 米田 幸雄 1P-12 1P-15 1P-27
 米田 幸雄 1P-34 1P-36 1P-62
 米田 幸雄 2P-72 3C1540
 米山 雅紀 1P-34
 吉田 明 S5
 吉田 弘美 1P-65
 吉田 謙一 1B1540
 吉田 典弘 1P-18

吉田 成孝 S51
 吉井 光信 2P-70
 吉川 和明 1B1440 1P-71 2P-14
 吉川 和明 2P-57
 吉川 和明 2P-51
 吉川 泰弘 1P-74
 吉松 博信 S63
 芳本 信子 2P-44
 吉村 和法 1P-58 1P-59
 愈 璋 2P-49
 湯山 耕平 3D1440

(Z)

Zhang Lei 1P-04
 ZHANG Yuxiang 1P-52 1P-53
 1P-67 1P-68
 Zweier Jay L2
 前正 秀宣 2P-66
 張 波 2P-39
 張 家生 1P-06 1P-41
 張 力勇 2P-28
 張 曉峰 1P-03
 趙 靜 1P-72

キーワード索引

(A)

Abeta 3A1300
Accelerated lipolysis in visceral fat S63
ACCUMBENS 2P-63
ACETYLCHOLINE [ACH] 1P-18
1P-25 2P-47 3A1440
S12 S13 S14
S15 S16
ACETYLCHOLINESTERASE [ACHE] 1P-31 S16
ACID S75
ACIDIC FGF 2P-28
ACTIN 1P-42 2P-01 S60
ACTIVATION 2P-23 S73
ACTIVITY 1P-24 1P-80 2P-03
2P-04 S50
ADDICTION 2P-65
ADENOSINE TRIPHOSPHATE 1P-54
Adenovirus 2P-43
ADENOVIRUS VECTOR 2P-57
ADHESION 1C1520 1P-63
2P-02 2P-03 2P-04
2P-07 S19 S48
S50 S51 S52
S54 S58 S60
ADRENAL 3C1320
ADRENERGIC 1P-56
Afdin S49
AGING [AGEING] 1P-47 2P-24
2P-60 3A1420
agrin 1P-33
ALCOHOL 2P-30 2P-67
ALS [AMYOTROPHIC LATERAL
SCLEROSIS] 1P-50 S80
ALUMINUM 1P-46 2P-61
ALZHEIMER 1B1440 1P-46
2P-47 2P-48 2P-49
2P-50 2P-51 2P-52
2P-53 2P-54 2P-56
2P-58 2P-59 2P-60
2P-61 2P-62 2P-71
3A1300 3A1320 3A1340
3A1400 3A1420 3A1520
3C1440 L1 S16
Alzheimer Disease S71
Alzheimer's disease 3A1440
AMINO ACID 2P-69 S46
S82
AMPA 1P-24 2P-09
AMYGDALA 2P-20
amyloid 2P-55
amyloid beta protein S71
AMYLOID PRECURSOR PROTEIN 2P-57 3A1300
Anoxia S25
ANTAGONIST 2P-47 2P-48
ANTICHOLINERGIC 2P-65
ANTICONVULSANT 3B1300
ANTIDEPRESSANT 2P-66
2P-73
Antidepressant agent S6

antigen presentation S70
ANTISERUM 3A1500
ANXIETY S2
APOLIPOPROTEIN 2P-28
apolipoprotein A-I 2P-27
APOLIPOPROTEIN E 2P-58
apoptosis 2P-35 2P-43 2P-55
2P-57 S30 S73
APPETITE 2P-22
aquaporin S32
arcuate nucleus S62
arousal S64
ASSOCIATION 1P-32
ASTROCYTE [ASTROGLIA] 1C1420 1D1600 1P-23
1P-51 1P-52 1P-53
2P-27 2P-28 2P-68
3C1400 S21 S42
S46 S74 S82
astrocytes S24
ASTROCYTOMA 2P-28
ATP S24 S25
ATP receptor S21
AUTOIMMUNITY 1P-67
autonomic S13
AUTONOMIC CONTROL S26
AXON 1C1520 1P-43 2P-49
S39 S41 S48
AXONAL TRANSPORT
[AXOPLASMIC TRANSPORT] 1P-45 1P-46 1P-47
S76 S77 S80
AXOTOMY 3B1540

(B)

BASAL FOREBRAIN 1P-68
BDNF 3B1340
BEHAVIOR 1P-77 2P-02
3D1300
3β-hydroxysteroid dehydrogenase 2P-29
1P-29
BINDING S17 S18
bioinformatics S17 S18
bombesin S66
BOVINE 1P-22
Brain 1P-26 S81
Brain function S21

(C)

CA1 2P-44
Cadherin S49
CALCIUM [CA] 1B1520 1P-03
1P-04 1P-29 1P-31
1P-41 1P-71 2P-58
2P-67 3B1440 3C1300
3C1320 3C1340 3C1540
L2 S37 S4
CALMODULIN 1C1540 1P-21
1P-39 3C1300 3C1420
3C1520 L2 S78
CAM 2P-01 S54
CASPASE-3 2P-57
CATECHOLAMINE 3C1320
cathepsin E S70
Ca²⁺ wave S24
CCK [CHOLECYSTOKININ]

2P-48
CDNA S19
Cell Adhesion Molecule S55
Cell-Cell Adhesion S49
cerebellum 1P-73 1P-80 2P-05
2P-10 3B1440 S19
S57
cerebral cortex S11
cerebral ischemia channel transporter S32
CHANNEL 1P-03 1P-04
1P-06 1P-22 1P-23
2P-19 3B1300 3B1420
S75
chaperone S28
CHEMORECEPTOR S72
CHICK EMBRYO S45
cholesterol 2P-27
CHOLINERGIC 1P-25 S12
S16
CHROMAFFIN 1P-03 1P-42
3C1320
Citrate 1P-26
clathrin S36
COCAINE 2P-65
COCHLEA 2P-46
CORD 2P-32
CORTEX 1B1420 1B1520 1P-70
2P-10 2P-18 2P-39
2P-63 3B1420
CREB 2P-58
CTCLOSPORIN A 3B1320
CULTURE 1C1440 1P-03
1P-36 1P-72 1P-75
1P-80 3B1320 S52
CUNEATE S14
CYCLIC ADP RIBOSE 1P-41
3C1320 S37
CYCLIC AMP [CAMP, C-AMP] 1C1540 2P-54
cystatin C 1P-51
cytokines S10
CYTOSKELETON 1P-43 1P-48
S76 S79

(D)

DATABASE S18
DEATH 1B1400 1B1420 1B1440
1B1520 1B1540 1B1620
1P-57 1P-75 2P-14
2P-17 2P-18 2P-19
2P-31 2P-36 2P-51
2P-59 S72
DEGENERATION 1B1620 2P-38
2P-44 3D1400 3D1520
DEMENTIA 3A1400 3A1420
3A1500
DEMYELINATION 1P-61
dendrite 1C1600 3C1520
DENERVATION 2P-37
DENTATE S50
DEPRESSION S2 S6
DEVELOPMENT 1B1440 1C1420
1C1500 1P-60 1P-66
1P-68 1P-70 2P-15
2P-61 S47 S52

	S54	S57	S7
	S76	S81	S9
DHEA(S)			S3
DIABETES		2P-60	L1
DIALYSIS			ID1520
differential display			IP-73
DIFFERENTIATION			IC1400
	1C1440	1C1500	1C1540
	1P-51	1P-69	1P-70
	1P-71	1P-76	S8
DISUSE			2P-37
DNA repair			S31
dog			2P-55
DOPA	1D1420	2P-34	3D1500
DOPAMINE		1D1420	1D1520
	1P-10	2P-65	2P-73
		3D1320	3D1500
DOPAMINERGIC		2P-34	2P-36
			3D1340
DORSAL HORN			IP-02
DORSAL ROOT GANGLION [DRG]			
	1P-02	1P-07	1P-61
		1P-75	2P-07
Down Syndrome			S55
DRUG			2P-59

(E)

EAR			2P-46
EIA			S81
ELECTROPORATION			S9
EMBRYO			1B1440
ENDOCRINE			2P-23
endocytosis			S36
Endoplasmic reticulum			2P-43
			S28
endosome			S70
ENDOTHELIAL			IP-22
ENERGY		L1	S66
ENOLASE			IP-32
ENZYME			S41
EPILEPSY		2P-08	2P-69
			2P-70
EPITHELIUM			L4
ESTROGEN [ESTRADIOL]			1P-14
	2P-10	3B1400	3C1500
EVOLUTION			IP-65
EXOCYTOSIS		1P-09	1P-10
	1P-28	1P-29	1P-30
	1P-42	2P-21	3C1420
	S35	S61	S84
EXTRACELLULAR			S51
EXTRACELLULAR POTASSIUM			
			1P-21

(F)

FEAR			2P-20
FEEDING	1P-19	2P-22	S65
			S67
feeding behavior			S64
FIBRIL			3D1400
food			S66
FOREBRAIN			IC1440
FUNCTIONAL GENOMICS			S18
function analysis			S17

(G)

GABA [GAMMA-AMINOBUTYRIC]			
		1P-74	S25
GANGLIOSIDE		1P-70	2P-30
GDNF			S81
GENE	1D1400	1D1440	1P-22
	1P-27	2P-17	2P-66
	S19	S56	S62
			S9
gene expression			1P-73
genome			S17
GFA [GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN]			1P-51
GLIA	1C1420	1P-37	S46
		S68	S8
glial differentiation			S43
gliogenesis			S10
GLIOMA		1P-23	S53
GLUCOSE		2P-25	2P-26
GLUTAMATE		1D1500	1D1540
	1D1600	1D1620	1P-15
	1P-35	1P-55	2P-10
	2P-21	2P-25	2P-26
	2P-41	3B1300	S46
			S58

GLUTAMATE RECEPTOR

			1P-21
			S69
GLUTAMATE RELEASE			S26
glutamate transporter			S69
GLYCINE			1D1620
GLYCOLIPID		1P-69	1P-70
GLYCOPROTEIN		1P-63	1P-66
	1P-69	2P-02	2P-56
GLYCOSYLTRANSFERASE			
	1P-69	2P-08	2P-30
			2P-56
GMFG			3B1520
GRANULE CELL		1P-80	2P-17
GROWTH CONE		1P-28	1P-49
	S39	S48	S52
GTP	2P-06	3C1340	S5
GTP CYCLOHYDROLASE			1P-13
GTP cyclohydrolase I			1P-08
GUIDANCE		1C1520	S47

(H)

HALOPERIDOL		1P-20	2P-63
hippocampus			S24
HIPPOCAMPUS		1D1500	1P-11
	1P-14	1P-16	1P-34
	1P-36	2P-08	2P-10
	2P-11	2P-20	2P-44
	2P-54	2P-70	3A1440
	3B1300	3B1320	3B1400
	3C1500	S29	S4
		S50	S58
HISTAMINE		2P-33	S15
HISTAMINE NEURONS			S63
HISTOCHEMISTRY			1P-77
HPA-axis			S6
HPLC			3A1500
H ₁ -receptor knockout (H1KO) mice			
			S63
HYBRIDIZATION			2P-39
2-hydroxyadenine			S31
HYPERACTIVITY			2P-33

HYPERALGESIA			2P-32
HYPOTHALAMUS	1P-19		3B1400
		S62	S67
HYPOXIA	2P-31	2P-41	2P-43
	2P-50	S28	S83
hypoxia/ischemia			S27

(I)

Immunoglobulin super family			S55
IMMUNOREACTIVITY			1C1480
	1P-67	3D1500	S74
IMMUNOSUPPRESSION			2P-13
INFECTION			2P-71
INFLAMMATION			2P-57
INHIBITION			2P-11
INJURY	1P-52	1P-53	2P-32
	2P-38	2P-46	S38
INOSITOL			S37
INSULIN		1C1620	3C1420
INTERLEUKIN			S73
INTRACELLULAR		1D1500	1P-03
Intracellular calcium			1P-74
ION		2P-19	S75
ISCHEMIA		2P-31	2P-39
	2P-40	2P-42	2P-44
	2P-45	S28	S29
		S72	S84

(K)

KAINIC ACID			1P-35
KEGG			S17
KINASE	1P-06	1P-39	2P-18
		S35	S61
KINDLING	2P-08	2P-69	S51
KINETIC [KINETICS]			1P-16
			2P-11

(L)

LAMELIPODIA			S34
layer formation			S11
leptin	S62	S63	S64
LIPID		2P-53	2P-62
LIPOPROTEIN		2P-49	2P-53
LOCALIZATION		1P-39	3D1500
LPS			1P-62
L-serine			S73
LTP [LONG-TERM POTENTIATION]			
	2P-09	S51	S56
	S58	S60	S78
LYSOSOME			L4

(M)

MACROPHAGE		3B1540	S40
MAO [MONOAMINE OXIDASE]			
			2P-35
MAPK			S71
MAP kinase			S59
Maternal deprivation			S6
matrix cell			S43
MEMBRANE		1P-32	1P-63
MEMBRANE POTENTIAL			2P-35
			3D1320
MEMBRANE RUFFLING			S34
MEMORY			2P-20
MEPP			1P-40
METABOLISM		2P-25	2P-26

METHAMPHETAMINE 1B1540
2P-64 2P-65
mice 2P-29
microarray 1P-73
MICROGLIA 1P-48 1P-54
1P-55 1P-56 1P-57
1P-62 2P-32 2P-45
S21 S22 S23
S43 S44 S68
S69 S70 S71
S72 S73 S74
S75
MICROTUBULE 2P-62 3A1520
MIGRATION S45 S53
MITOCHONDRIA 1B1500 1P-26
1P-57 2P-35 2P-36
3D1320 3D1340 3D1420
L1 S31
MOSSY FIBER S60
MOTILITY S22
mouse S57
MPTP 2P-36 3D1300 3D1340
MRNA 2P-48 2P-71 2P-73
3C1520
MUSCARINIC 1P-04 1P-18
S13 S14
MUSCLE 2P-38
Musk RTK 1P-33
MUTANT 1P-68 2P-70 3A1500
Mycobacterium leprae. 2P-71
MYELIN 1P-63 1P-64 1P-65
1P-66 2P-30
MYELINATION S45
MYOTUBE 1P-40

(N)
NACP 3D1400
NA-K ATPASE 1P-21
NECROSIS 2P-42 S30
Nectin S49
NERVE S38
NEURAL STEM CELL S8
neural stem cells S10
NEURAL TUBE [NEURAL CREST,
NEURAL PLATE] S9
NEURITE 1B1620 1C1500 1C1520
1C1540 1C1600 1C1620
1P-49 S34
NEUROBLASTOMA 1D1400
2P-36 2P-71 3A1340
3B1340
NEUROENDOCRINE S4
NEUROFILAMENT 1P-43
1P-44 1P-46 1P-47
2P-61 S76 S77
S78 S79 S80
neurogenesis S10 S7
neuromuscular synapse 1P-33
NEURON 1B1400 1B1440 1B1500
1B1600 1B1620 1P-20
1P-21 1P-27 1P-36
1P-69 2P-16 2P-20
2P-39 2P-40 2P-42
2P-51 2P-59 2P-60
3B1320 3C1540 S21
S37 S40 S46

S8
Neuronal cell death S30
neuronal death S28
NEUROPATHOLOGY 2P-14
NEUROPEPTIDE 1P-07 1P-19
1P-45 2P-22 2P-23
S65 S67
NEUROSECRETION 2P-12
neurosteroid S3
neurosteroids 2P-29
NEUROTOXICITY 1P-14
1P-35 1P-46 2P-13
2P-14 2P-16 2P-51
2P-54 2P-61 3D1320
3D1440
NEUROTRANSMITTER 1P-10
1P-78 2P-21 L3
neurotransmitter release S61
NEUROTROPHIC 1B1520 1P-01
1P-37 1P-72 1P-77
1P-78 1P-79 1P-80
1P-81 2P-13 2P-18
3B1300 3B1400 3B1420
3B1440 3B1500 3B1540
S82
NEUROTROPIC 3B1320
NGF [NERVE GROWTH FACTOR]
1P-76 1P-81 2P-15
L3
NICOTINE 1P-11
NICOTINIC S14
Nitric oxide 3A1440
NMDA [N-METHYL-D-ASPARTATE]
1B1520 1D1520 1D1620
1P-05 1P-12 1P-34
1P-35 1P-36 1P-74
2P-47 2P-48 3A1400
3B1420 3C1540
NMDA receptor S59
NMR 2P-25 2P-26
NO 1P-62
NOCICEPTION S5
NOISE 2P-46
NOREPINEPHRINE
[NORADRENALINE] 1P-13
1P-56 S15 S35
NUCLEOTIDE S22
NUCLEUS 1P-71 2P-14 3D1500
NUCLEUS OF THE SOLITARY
TRACT S26

(O)
obesity S64 S66
OLIGODENDROCYTE
[OLIGODENDROGLIA] 1C1420
1P-58 1P-59 1P-60
2P-31 S42 S45
ON 2P-59
OOCYTE 1P-05
orexin S64 S65
ORGANOPHOSPHATE 2P-68
ovalbumin S70
OXIDATION 1B1420 1P-24
2P-13
Oxidative DNA damage S31
8-oxoguanine S31

OXYGEN 1B1500
OXYGENE 3C1440

(P)
PAIN 1P-01 1P-07
paranode 1P-64
PARASYMPATHETIC S13
PARKINSON 1D1420 1P-77
2P-25 2P-34 2P-35
3D1300 3D1320 3D1340
L3
patch clamp S69
pathway analysis S17
PAX6 S9
PC12 1P-09
pedigree S43
PEROXIDATION 2P-34
PEROXISOME 1P-49
PHEOCHROMOCYTOMA [PC12,
PC-12] 1B1420 1P-10 1P-49
1P-76
PHOSPHATASE 1C1620 L2
PHOSPHATIDYLINOSITOL 1D1400
1P-40 S33 S35
PHOSPHATIDYLINOSITOL
4-PHOSPHATE 5-KINASE S34
PHOSPHOINOSITIDE 1P-30
S36
PHOSPHOLIPASE 3C1440
PHOSPHOLIPID 2P-47 S36
PHOSPHORYLATION 1C1620
1D1500 1P-38 1P-39
1P-43 1P-44 2P-18
2P-37 2P-62 2P-74
3A1500 3A1520 3C1500
L2 S61 S78
S79
physiological action of DHEA S3
PKC S71
PLASMA MEMBRANE [AXOLEMMA]
3C1340 L4
platelet 3C1300
POLARITY S39
POLYAMINE 1P-12
POSTSYNAPTIC 2P-09
POSTSYNAPTIC CURRENT S26
postsynaptic density S59
potassium channel 1P-64
POTASSIUM [K] 1P-06
POTASSIUM [K] CHANNEL 1P-02
P2-purinoreceptor S24
PREFRONTAL 1D1520
presenilin 3A1300
prevention of Adult disease S3
Primate S30
PROLIFERATION 1C1440 1P-76
2P-06 S45
PROTEASE 1P-45 1P-51
2P-11 2P-12 3A1400
S51
Protection S25
PROTEIN 1B1600 2P-16 2P-38
L4
PROTEIN KINASE 1B1540 1C1540
1P-44 1P-62 2P-37
2P-68 3A1520 3C1300

3C1400 3C1420 S79		SEROTONIN	1D1400 1D1420		2P-07
PROTEIN-PROTEIN INTERACTION			1D1520 S15		3B1520
	S18	SIGMA	1P-20 S2 S5		S69
protein secretion	S27	sigma receptors		2P-29	
PROTEOGLYCAN	1P-52 2P-05	SIGNAL TRANSDUCTION		2P-58	TOXICITY 2P-19 2P-68 3D1300
	2P-07	SLICE		S14	TOXIN 1P-09
PROTEOLIPID	1P-65	SMALL GTPASE		S34	TRANSCRIPTION 1C1400 1C1420
PROTEOLYSIS	1P-35 1P-38	SNARE		1P-28	1P-19 1P-27 1P-34
PURINERGIC	3C1400 S22	sodium channel		1P-64	1P-36 1P-53 2P-23
	S23	sodium-myoinositol transporter			2P-42 2P-46 2P-72
PURINERGIC RECEPTOR	S26		S32		3B1420 3C1400 L2
PURKINJE CELL	2P-05 S57	SODIUM [NA]	1D1540 1P-01		S67
	S82	SPINAL	2P-15 2P-32		TRANSDUCTION 1P-06
P2X receptor	S25	stem cell		S7	transgenic mouse 1P-08
(Q)		STEROID	2P-44 S2 S4		TRANSMISSION S29 S33
QUINOLINIC	1P-14		S5		TRANSPLANT S44 S8
(R)		STRESS	1B1420 1P-52 1P-53		TRANSPORT 1D1540 1D1600
			2P-29 2P-33 2P-72		1P-12 1P-49 2P-27
			3A1320 3C1440 S2		L4 S58
Rat	3A1440 3B1520		S74		TRAUMA S40
rats	S81	Stress protein	2P-43		TRIGEMINAL 2P-15
RECEPTOR	1D1440 1D1500	STRUCTURE	1P-66		TRIGEMINAL GANGLION 1P-02
	1P-04 1P-05 1P-11	SUBSTANCE P	1P-07		TRKB 3B1340
	1P-14 1P-16 1P-17	SUBSTANTIA NIGRA	1P-79		TROPHIC 1D1600 1P-11 1P-75
	1P-18 1P-19 1P-20	SUCROSE	1P-10		3C1500
	1P-56 1P-76 1P-81	sulfatide	1P-64		TRP6 1P-04
	2P-21 2P-73 3B1500	SUPPRESSION	2P-23		TTX [TETRODOTOXIN] 1P-01
	3C1400 S13 S22	SYMPATHETIC	1B1620 1P-41		TUMOR 1P-67 S53
	S5 S52 S67		2P-19		TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA 1P-54
reelin	S11	SYNAPSE	1P-31 1P-40 1P-74		TWO-HYBRID SYSTEM S18
REGENERATION	2P-07 2P-38		2P-03 2P-04 2P-63		TYROSINE HYDROXYLASE 1P-13
	3B1540 S38 S40		S37 S56 S57		
	S41 S7 S76		S61 S84		
REINNERVATION	S38	SYNAPSIN		3C1420	(U)
RELEASE	1P-42 S23	SYNAPTIC	1P-32 1P-78		ubiquitin-like protein S27
REM SLEEP	S15		S29 S33 S35		Up-regulation of uncoupling protein
RHO	S39	synaptic plasticity	S59		family S63
Risk factor	S6	synaptic vesicle	S36		UPTAKE 1D1620 1P-20 S12
RNA	2P-30 2P-66	SYNAPTOGENESIS	1P-28		(V)
(S)		SYNAPTOSOME	1D1620 1P-32		VASCULAR 2P-41
SAGE	2P-64		2P-69 3D1340		VENTRICLE 2P-06
scaffold	S59	Synchronous oscillation	1P-74		VIRUS 1P-61 1P-79
SCHWANN CELL	1P-61	syntaxin	1P-28		VISUAL S78
SECRETION	1P-31 1P-42	SYNUCLEIN	3D1400		(W)
SEIZURE	1P-24 S50				WATER 1P-22 1P-23
SENSORY NEURONS	1P-01	(T)			(Z)
	1P-02 1P-75	TELENCEPHALON	2P-15		ZINC 1P-05
serial analysis of gene expression		tetrahydrobiopterin	1P-08 1P-13		
	2P-64	THALAMUS	2P-08		
		TISSUE CULTURE	1P-61		

神経化学 39巻 第3号

平成12年10月1日発行

編集兼発行者 日本神経化学会

代表者 三木 直正

発行所 日本神経化学会

〒113-8622 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 阿部写真印刷(株)