

1B1-5

E1マウスの痙攣におけるNMDA受容体の関連について

静岡県立こども病院*1 島根医科大学小児科*2
京都大学小児科

小黑克彦*1 ○伊藤正利*2 津田英夫 武藤庫参
○白石英幸 ○白坂幸義 三河春樹

〔目的〕興奮性アミノ酸受容体の一つであるN-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体は一部動物モデルにおいて痙攣発現に関与していることが知られている。我々は遺伝性痙攣モデル動物であるE1マウスの大脳皮質で (^3H) glutamateの特異的結合能が低下していることを既に報告している。今回は (^3H) CPPを用いて各部位別に最大受容体密度 (B_{\max})、及び結合親和性 (K_D) を測定し、大脳皮質については痙攣誘発前後、及び週令による変化についても検討した。

〔方法〕E1マウスは4週令より週1回放り上げを行い痙攣を誘発しえた群をE1(+)、刺激を与えなかった群をE1(-)とし、対照として母系のddYを用いた。断頭後、全脳を7部位に分けて保存し、実験時、シナプス膜を作成して使用した。(^3H) CPP 結合実験には、glutamateをdisplacerとして用い、Scatchard分析を行なった。

〔結果及び結語〕22-24週令においてE1(+)及びE1(-)は、ddYに比し大脳皮質においてのみ、 B_{\max} の低下が見られた。 K_D に有意差は見られなかった。加令による変化を調べたところ、このE1系の B_{\max} の低下は12週令以後より見られた。さらに、E1(+)では痙攣誘発後、一過性に大脳皮質の B_{\max} の低下を認めた。一方、E1(-)では放り上げ刺激の前後で変化を認めなかった。以上の結果より、E1系は共通の痙攣感受性を備えていること、痙攣の発現には興奮性アミノ酸の放出を促す機構が存在すると思われた。

1B1-6

けいれん発現と神経細胞内蛋白質変化

神奈川歯科大学生理 城西大学薬科生薬材料*2
埼玉医科大学第一生理*1 慶応大学生理*3

○菅谷英一 北村邦男*1 菅谷愛子*2 植村慶一*3
田中早苗*1 坂本安*1 津田整*2 保田和美*2
高木玉喜 梶原景正 高木久明 野村正彦*1

〔目的〕私たちは、以前にカタツムリのペンチレンテトラゾール (PTZ) 感受性神経細胞を用いてPTZ作用時に特定の細胞内蛋白に質的量的変化がおこることを指摘した。しかしけいれん時に変化する細胞内蛋白の意義は全く不明である。そこでけいれん発現時に変化する神経細胞内蛋白質の性質、発現の意義、けいれん発現との因果関係をあきらかにする目的でけいれん時に変化する細胞内蛋白質の一次構造の決定を試みた。

〔方法〕ラットの大脳皮質初代培養神経細胞にペンチレンテトラゾール (PTZ) を細胞外から与えるとあきらかなbursting activityを示すことがわかっている。そこでPTZ (25mM) を加えたメジウムでincubateした神経細胞を正常の細胞と比較した。PBSで3回洗浄したのちホモジナイズし10,000g上清蛋白質を出発材料とした。

〔結果と考察〕正常およびPTZ処理細胞の可溶性蛋白質をマイクロ二次元電気泳動すると10~20kDaの酸性蛋白領域に存在する3つの蛋白質、 P_1 、 P_2 および P_3 のうち、PTZ処理後 P_1 と P_3 にあきらかな増加を認めた。そして P_2 の量には変化がなかった。そこでこれら3つの蛋白質の一次構造の決定をおこなった。DEAE-Sephadex A25カラムを用い、0.1, 0.2, 0.4, 1.0 M NaClの段階的溶出により粗分画し、0.4M溶出液をSephadex G15にて脱塩後、Ultron ODSカラムによるHPLCで分画した。精製蛋白質はリジルエンドペプチダーゼにて消化、再びODSカラムで分画し得られたペプチドを気相シーケンサーでアミノ酸配列を決定した。その結果、 P_2 由来のペプチドはカルモジュリンの部分配列(22-30, 78-94)に一致していた。従ってPTZ処理で変化のない P_2 はカルモジュリンと結論された。次に、 P_3 の酵素消化ペプチドのODS HPLCの主要ピークの配列を決定した。これらの酵素消化ペプチドの配列は、最近全一次構造が決定されたパラサイモシン α (ParaT) の構造と完全に一致していた。ついで P_1 消化物のODS HPLCを行い5つの主要ピークを得てこれらのN末端配列を決定しホモロジー検索をしたところ、プロサイモシン α (ProT) と完全に一致していた。ParaTもProTも胸線の免疫系に関与する蛋白質であり、大脳皮質神経細胞にこのような蛋白が存在し、しかもけいれん時に増加することの意義は今後に残された解決すべき大きな問題である。