

脳機能改善薬の海馬における神経化学的  
作用機序に関する研究

1993

藤井健志

# 目次

緒言	1
第 I 編 モルモット海馬におけるbifemelaneの結合部位と薬理作用の 領域差	4
第 1 章 Bifemelane結合部位の存在	5
1. 実験方法	5
2. 実験成績	8
3. 考察	15
第 2 章 Bifemelaneのinositol 1,4,5-trisphosphate(IP <sub>3</sub> )とcAMP 含量に及ぼす影響	17
1. 実験方法	17
2. 実験成績	18
3. 考察	20
第 3 章 Bifemelaneのprotein kinase C (PKC) の細胞下分布に 及ぼす影響	21
1. 実験方法	21
2. 実験成績	23
3. 考察	26
第 1 編 小括	29
第 2 編 Bifemelaneのグルタミン酸遊離に及ぼす影響とその調節メカ ニズム	30
第 1 章 モルモット海馬苔状線維シナプトソーム調製と諸性質	31
1. 実験方法	31
2. 実験成績および考察	33
第 2 章 Bifemelane結合部位と情報伝達系	36
1. 実験方法	36
2. 実験成績	37

3. 考察	39
第3章 苔状線維終末からのグルタミン酸遊離に対するbifemelane の促進作用	41
1. 実験方法	41
2. 実験成績	42
3. 考察	46
第2編 小括	49
総括および結論	50
謝辞	52
発表論文目録	53
引用文献	54

## 緒言

大脳辺縁系にある海馬は、外科的切除や脳血管障害による錐体細胞壊死の結果によって記憶障害が認められることなど [89] から、記憶や学習に関連した重要な脳部位であるとされている。また、海馬は、大脳皮質とともにアルツハイマー型老年痴呆において、神経細胞の変性・脱落などの病変が著しい脳部位であり、ここでの病変が痴呆発症の原因の1つとして考えられている。この海馬内にある神経系においては入力線維への短時間の高頻度刺激により、その経路にシナプス伝達効率の長時間にわたる増強が比較的容易に観察される [4、10]。長期増強 (long-term potentiation: LTP) と呼ばれるこの現象は、記憶や学習に影響を及ぼす薬物により影響を受けたり、学習により発現しやすくなったりすること [1] が知られており、記憶や学習の基礎的過程を示すモデルとして現在考えられている [22]。

LTPの発現メカニズムに関しては、現在まで様々な方面から精力的な研究がなされてきている。最も研究の進んでいるのが海馬CA3領域の錐体細胞とCA1領域の錐体細胞を連絡する、Schaffer側枝-CA1系のシナプスにおけるLTPである [11]。一方、海馬歯状回 (dentate gyrus) の顆粒細胞とCA3領域の錐体細胞を連絡する苔状線維-CA3系のシナプスのLTPは、いくつかの点でSchaffer側枝-CA1系のLTPと発現メカニズムが異なることが示唆されている [42、43]。著しい相違点は、苔状線維-CA3系のシナプスのLTPにはN-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体の関与がないことである [31]。すなわち、Schaffer側枝-CA1系のLTPに提唱されているLTP発現機構のモデル [11] は、苔状線維-CA3系のLTPには当てはまらず、細胞内情報伝達系に関する問題を含め、今のところ統一的な見解は得られていないのが実状である。

近年、人口の高齢化に伴う老人におけるアルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆が社会的に問題となっており、優れた脳機能改善薬の開発が急がれている。これまでの薬物は、動物を用いた学習行動を指標としたスクリーニング方法に基づいて開発され、痴呆患者の症状をかなり良く改善するものも現れてきたが、作用

機序が明確で、かつ標準的な薬物はまだ開発されていない。

本研究室においては、薬物開発の有用なスクリーニング法として、海馬切片標本を用いた海馬内長期増強を指標とした方法を開発し、現在利用され始めている。脳機能改善薬として総称される薬物群の多くが、低濃度(0.01-1 $\mu$ M)でモルモット海馬苔状線維-C A 3系のシナプスのLTPを増大することも明らかにされている。また、海馬苔状線維の支配領域の広さと学習能力の間には高い相関性が認められることが示唆されている[19]。ことも考慮すると、苔状線維がこれら薬物の共通の作用部位として注目される。

さて、脳機能改善薬の1つであるbifemelaneについてはモルモット海馬内における神経回路特異的な作用が見出されてきた。例えば、海馬C A 3領域の錘体細胞へは3方向からの興奮性入力、すなわち、(1)苔状線維、(2)海馬采からの入力、(3)交連・連合線維の入力、が投射しているが、bifemelaneは、このうち苔状線維-C A 3系のシナプスのLTPのみを低濃度(0.01-1 $\mu$ M)で選択的に増大し、海馬采-C A 3系および交連・連合線維-C A 3系のLTPは1 $\mu$ Mでも増大しないことが明らかになっている[37]。また、bifemelane(1 $\mu$ M)は、Schaffer側枝-C A 1系のLTPは増大しない[73]。

そこで、著者はモルモット海馬内において海馬苔状線維-C A 3のシナプスのLTPを神経回路選択的に増大する脳機能改善薬としてbifemelaneを取り上げ、その神経化学的作用機序について、海馬切片標本および苔状線維シナプトソーム標本を用いて検討を行った。以下、本研究で得られた知見について2編に分けて論述する。

なお、本文中で用いた略号は以下の通りである。

#### 略号

4 $\alpha$ -PDD: 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate  
aCSF: artificial cerebrospinal fluid  
BSA: bovine serum albumin  
cAMP: cyclic adenosine-3',5'-monophosphate

dyn: dynorphin

DAG: diacylglycerol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

H-7: 1-(5isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine

IP<sub>3</sub>: inositol-1,4,5-trisphosphate

LTP: long-term potentiation

PDBu: 4 $\beta$ -phorbol 12,13-dibutylate

PDD: phorbol 12,13-didecanoate

PKC: protein kinase C

PLC: phospholipase C

QNB: (-)quinuclidinyl benzilate

RIA: radioimmunoassay

TES: sodium N-tris[hydromethyl]-methyl-2-aminoethanesulphonic acid

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane



## 第 1 章 Bifemelane 結合部位の存在

Bifemelaneは、比較的低濃度(0.01-1  $\mu$ M)でモルモット海馬苔状線維-CA3のLTPに対して増大作用を示すが、Schaffer側枝-CA1系、海馬采-CA3系および交連・連合線維-CA3系のLTPには増大作用を示さない[36、37、73]など、神経回路選択性が認められることから、モルモット海馬内に bifemelane 結合部位の存在が推察された。そこで本章では、 $^3\text{H}$ bifemelaneを用いて海馬シナプス膜標本に対する結合実験を行い、 $^3\text{H}$ bifemelane結合の薬理的性質や海馬内分布について検討した。また、苔状線維-CA3系のLTPは、グルタミン酸、ノルアドレナリン、アセチルコリン、オピオイドペプチドにより促進的に、GABAにより抑制的に調節されている。一方、bifemelaneのラットへの数週間の連続投与により、神経伝達物質受容体の種類によっては親和性や受容体数に変化が認められるものがあることが報告されている[23]。そこで、海馬全体のシナプス膜標本に対する $^3\text{H}$ bifemelane結合に及ぼす神経伝達物質受容体作用薬および拮抗薬の影響および bifemelane の3つの放射性リガンド結合( $^3\text{H}$ QNB、 $^3\text{H}$ DAMGO、 $^3\text{H}$ U69,593)に及ぼす影響について検討した。

### I-1-1. 実験方法

#### I-1-1-1 シナプス膜標本の調製

実験には体重250-400gの雄性Hartley系モルモットを用いた。モルモットを断頭してすばやく脳を摘出して氷冷した人工脳脊髄液(aCSF)中にて冷却した後、

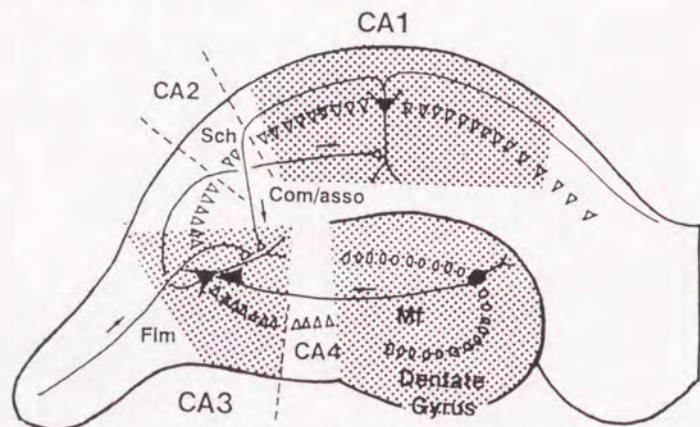


図1-1 海馬模式図と部位分けした領域(網をかけた部分)

Mf:苔状線維 Sch:Schaffer側枝 Fim:海馬采 Com/asso:交連・連合線維

海馬を氷上にて単離した。以下の操作は4  $^{\circ}\text{C}$ 下で行った。 $^3\text{H}$ bifemelane結合の性質や海馬内の分布を調べる実験の場合には、単離した海馬をさらに1 mm厚の切片にした後、CA1、CA3および歯状回に部位分けしてから次の操作に移った(図1-1)。各組織は氷冷した10倍量のbuffer A(0.3 M sucrose、15mM sodium N-Tris[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethanesulfonic acid [Na-TES]、1mM  $\text{MgSO}_4$ 、pH7.4)中でglass-Teflonホモジナイザーを用いてホモジナイズした(条件:1,200rpm $\times$ 10strokes)。これを10分間、1,000xgで遠心し、その上清を20分間、15,000xgで遠心した。得られた沈渣に10倍量のbuffer Aを加えて十分に再懸濁した後、再び20分間、15,000xgで遠心した。さらに、シナプス膜標本の洗浄操作のため、沈渣に30 mlの低張バッファー(buffer B: 50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.4)を加え十分に攪拌した後、20分間、15,000xgで遠心した。この洗浄操作を2回繰り返し、最終的に得られた沈渣に対して蛋白質濃度が150-3000  $\mu\text{g/ml}$ になるようにbuffer Bを加えてシナプス膜標本とした。蛋白質濃度はLowry法[52]により牛血清アルブミン(BSA; 生化学工業)を標準物質として用いて測定した。

### I-1-1-2 $^3\text{H}$ bifemelane結合実験

スタンダードアッセイの場合には、0.5 mlの容量、buffer B中で、I-1-1-1で得たシナプス膜標本を $^3\text{H}$ bifemelane(1 nM、エーザイより供与)とともに非放射性 bifemelane(1  $\mu\text{M}$ 、三菱化成より供与)の存在下および非存在下で4  $^{\circ}\text{C}$ 下、30分間インキュベーションした。ただし、図1-3に示す実験では、インキュベーション時間あるいは温度を変化させた。グラスファイバーフィルター(GF/C、Whatman)を用いた急速吸引ろ過法により反応を停止し、2.0mlのbuffer Bで6回フィルターを洗浄後、フィルター上に残った放射活性を液体シンチレーションカウンター(LS5000、Beckman)で測定した。結合実験は、duplicateで行った。なお、特異的結合(specific binding)は非放射性bifemelane(1  $\mu\text{M}$ )非存在下での全結合量(total binding)から存在下での非特異的結合量(nonspecific binding)を差し引いたものとした。 $^3\text{H}$ bifemelaneを1 nMとしたときの特異的結合は、全結合量のおよそ40-60%であった。

### I-1-1-3 $[^3\text{H}](\text{-})\text{quinuclidinyl benzilate}$ (QNB) 結合実験

海馬全体より調製したシナプス膜標本 (50-200  $\mu\text{g}$  タンパク質) および薬物を、0.5 mlの容量、0.1 nM  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  (41.5Ci/mmol; NEN) とともに、buffer C (50 mM Tris-HCl緩衝液、pH7.4、10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) 中で37°C、30分間インキュベーションした。GF/Cフィルターでろ過することにより反応を停止し、フィルターをbuffer Cで6回洗浄後、フィルター上の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。実験は、duplicateで行った。特異的結合量は、全結合より1  $\mu\text{M}$  atropine存在下の非特異的結合量を差し引いて求めた。

### I-1-1-4 $[^3\text{H}][\text{D-Ala}^2, \text{N-Me-Phe}^4, \text{Gly}^5\text{-ol}]$ enkephalin (DAMGO) 結合実験

海馬全体より調製したシナプス膜標本 (100-300  $\mu\text{g}$  タンパク質) および薬物を、0.5mlの容量、2 nM  $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$  (47.8Ci/mmol; NEN) とともに、buffer D (20 mM Tris-HCl緩衝液、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.1mM EDTA、1mM dithiothreitol、pH7.4) 中で25°C、40分間インキュベーションした。GF/Cフィルターでろ過することにより反応を停止し、フィルターをbuffer Dで6回洗浄後、フィルター上の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。実験は、duplicateで行った。特異的結合量は、全結合量より1  $\mu\text{M}$  DAMGOの存在下の非特異的結合量を差し引いて求めた。

### I-1-1-5 $[^3\text{H}]\text{U69, 593}$ 結合実験

海馬全体より調製したシナプス膜標本 (100-300  $\mu\text{g}$  タンパク質) および薬物を、0.5 mlの容量、5 nM  $[^3\text{H}]\text{U69, 593}$  (40.5Ci/mmol; NEN) とともに、buffer D 中で25°C、60分間インキュベーションした。反応停止と放射活性の測定は $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ 結合実験と同じ方法で行った。実験は、duplicateで行った。特異的結合量は、全結合量より10  $\mu\text{M}$  U69, 593の存在下の非特異的結合量を差し引いて求めた。

### I-1-1-6 データの解析と統計処理

飽和結合実験のデータは結合実験解析システム (SIMPLEX) によりコンピュータ解析した。結果は、分散分析 (analysis of variance; ANOVA) および modified Student's t-test (Bonferroni法) で多重比較を行った。危険率 (p)

が5%未満のとき統計学的に有意差ありと判定した。

### I-1-2. 実験成績

#### I-1-2-1 海馬CA3領域における $[^3\text{H}]\text{bifemelane}$ 結合の性質

$[^3\text{H}]\text{bifemelane}$ の特異的結合量は1アッセイチューブ当たりの蛋白質量が15から50  $\mu\text{g}$ の範囲で直線的であった (図1-2)。以下の実験では、1アッセイチューブあたりこの範囲内に蛋白質量が入るように調整して結

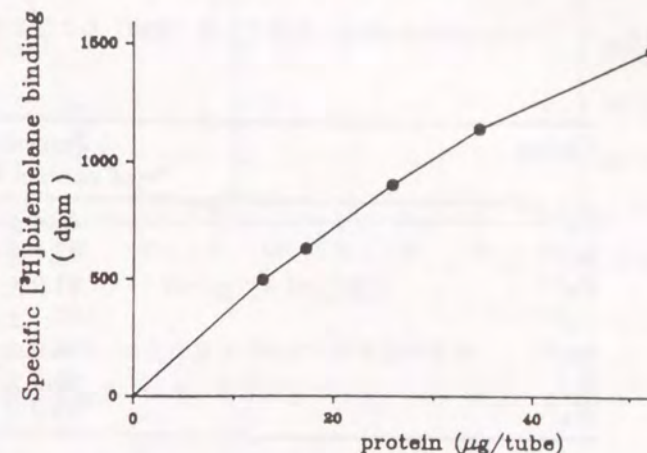


図1-2 特異的 $[^3\text{H}]\text{bifemelane}$ 結合のタンパク質濃度依存性

合実験を行った。図1-3に示すように、4°C下で実験を行った場合には、 $[^3\text{H}]\text{bifemelane}$ 結

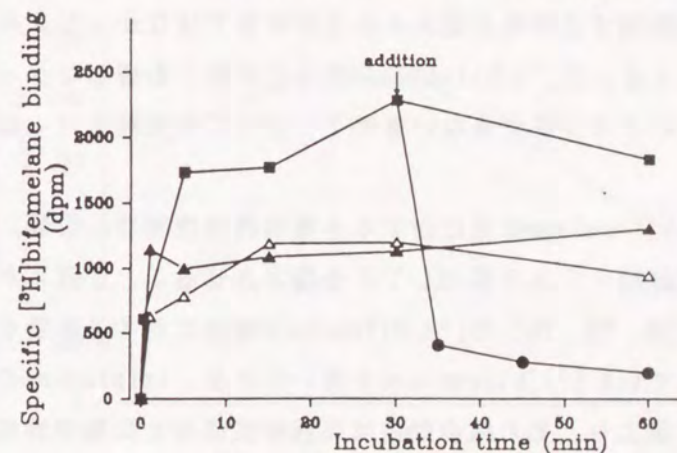


図1-3  $[^3\text{H}]\text{bifemelane}$ 結合の時間依存性および非放射性bifemelaneによる置換実験

結合実験は4°C (■)、25°C (△) および37°C (▲) で行った。30分の時点で vehicle (■) あるいは非放射性bifemelane (10  $\mu\text{M}$ ; ●) を添加した。

bifemelane結合はおよそ30分で平衡状態に達した。25°Cまたは37°Cで結合実験を行った場合には、それぞれ15あるいは1分後に平衡状態に達したが、その最大結合量は4°Cで結合

実験を行ったよりも少なかった(図1-3)。以下の実験では、インキュベーション温度は4℃とした。 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合は非放射性bifemelane(10  $\mu\text{M}$ )の添加により速やかに減少し、5分以内に消失した(図1-3)。このように $[^3\text{H}]$ bifemelane結合は可逆的であった。1価または2価イオンの $[^3\text{H}]$ bifemelaneの結合に対する影響を検討した(表1-1)。銅イオンは有意に $[^3\text{H}]$ bifemelane結合

表1-1  $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に及ぼす1価(20mM)および2価(10mM)カチオンの影響

Cation	Percentage of control binding
$\text{Cu}^{2+}$	45.4 $\pm$ 6.8*
$\text{Ni}^{2+}$	72.1 $\pm$ 4.1
$\text{Zn}^{2+}$	61.0 $\pm$ 6.0
$\text{Ca}^{2+}$	102.1 $\pm$ 3.4
$\text{Mg}^{2+}$	104.0 $\pm$ 13.1
$\text{K}^+$	56.3 $\pm$ 8.0
$\text{Na}^+$	52.2 $\pm$ 10.6

結果は、それぞれ3回の実験の平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。\* $p < 0.05$  vs. control

を減少させた( $p < 0.05$ )。ナトリウム、カリウム、ニッケルおよび亜鉛イオンは $[^3\text{H}]$ bifemelane結合を抑制する傾向が認められたが有意ではなかった。カルシウムおよびマグネシウムイオンは $[^3\text{H}]$ bifemelane結合には全く影響しなかった。以下の実験では、これらのイオンを含まない条件下ですべての実験を行った。

#### I-1-2-2 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に対する各種脳機能改善薬の影響

モルモット海馬苔状線維-CA3系のLTPを増大させることが明らかとなっている脳機能改善薬[36、73、76]の $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に対する影響を検討した。リガンド濃度として1nM  $[^3\text{H}]$ bifemelaneを用いたとき、imipramineの非存在下の飽和結合実験の結果より、その結合部位は高親和性成分と低親和性成分の比がおよそ1:1である。非放射性bifemelaneは0.01-1  $\mu\text{M}$ の濃度範囲で用量依存的に $[^3\text{H}]$ bifemelane結合を阻害したが、0.1-1 nMでは阻害しなかった(図1-4;  $\text{IC}_{50}$ 値は4.4 nM)。脳機能改善薬のうち調べたCa-hopantenate、indeloxazine、idebenone、piracetamおよびvinpocetineは0.1nM-1  $\mu\text{M}$ の濃度範囲で $[^3\text{H}]$ bifeme-

lane結合に対して有意な影響を与えなかった(図1-4)。

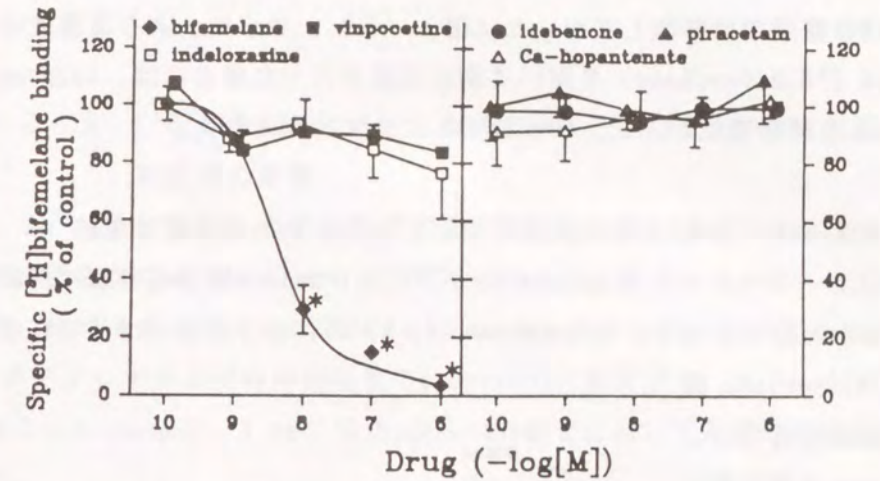


図1-4  $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に及ぼす脳機能改善薬の影響

結果は、3-4例の実験の平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。\* $p < 0.05$  vs. control

#### I-1-2-3 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に対するimipramineの影響

Bifemelaneは、ラット脳より調製した切片からのノルアドレナリン、ドーパミン

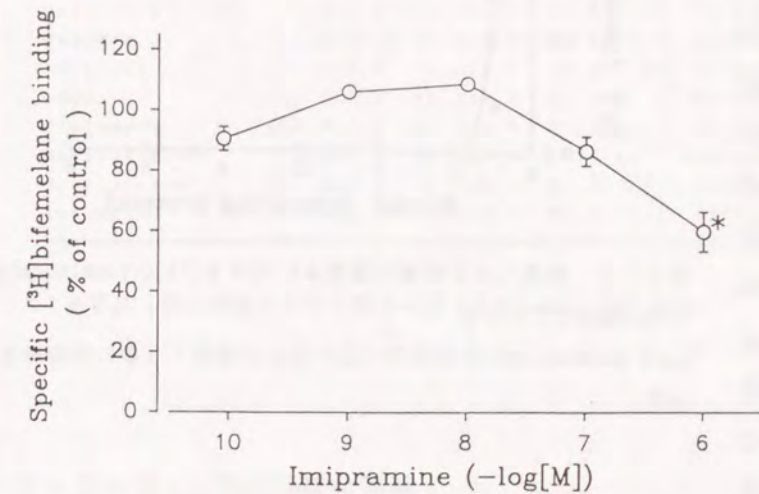


図1-5  $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に及ぼすimipramineの影響

結果は、対照に対する割合を示す。3回の実験の平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。

\* $p < 0.05$  vs. control

ンやセロトニンなどのモノアミン類のシナプス終末への取り込みを抑制することが示されており[24]、この抑制作用はimipramineと同程度である。そこで海馬CA3領域のシナプス膜標本への $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に



対する imipramine の影響を検討した。Imipramine は、 $1 \text{ nM}$   $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合を  $1 \mu\text{M}$  の濃度のとき結合量を  $59.8 \pm 6.6 \%$  ( $n=3$ ) にまで有意に抑制したが、 $0.1$  から  $100 \text{ nM}$  の濃度では抑制しなかった (図 1-5)。さらに、より高濃度のリガンド ( $15 \text{ nM}$   $[^3\text{H}]$ bifemelane) を用いて結合実験を行った場合には、imipramine ( $1 \mu\text{M}$ ) により結合量は  $13.1 \pm 5.0\%$  ( $n=3$ ) にまで抑制された。

#### I-1-2-4 海馬CA3領域における $[^3\text{H}]$ bifemelane飽和結合実験

前述の I-1-2-3 で imipramine が  $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合を有意に抑制することが明らかとなったので、imipramine ( $1 \mu\text{M}$ ) の存在下あるいは非存在下において  $[^3\text{H}]$ bifemelane 飽

和結合実験を行ない、親和性や結合量の変化について検討した。海馬CA3領域のシナプス膜標本を  $0.5$  から  $50 \text{ nM}$  の濃度の  $[^3\text{H}]$ bifemelane とともに  $4^\circ\text{C}$  下、 $30$  分間インキュベーションした。Imipramine の非存在下では Scatchard プロット解析により  $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合は少なくとも 2 つの

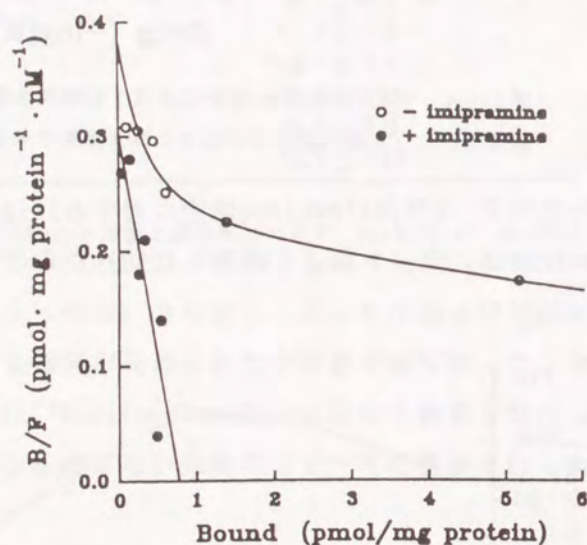


図 1-6 海馬CA3領域の膜標本に対する $[^3\text{H}]$ bifemelane結合のScatchardプロット  
 $1 \mu\text{M}$  imipramine の非存在下 (○) および存在下 (●) の曲線を示す。

結合部位よりなることが分かった (図 1-6)。コンピュータプログラム (SIMPLEX) を用いた非線形最小二乗法により、高親和性成分の  $K_d$  値および  $B_{\text{max}}$  値はそれぞれ  $1.0 \text{ nM}$  および  $177 \text{ fmol/mg protein}$  であり、低親和性成分は  $K_d$  および  $B_{\text{max}}$  値はそれぞれ  $258 \text{ nM}$  および  $35,000 \text{ fmol/mg protein}$  と計算された ( $n=2$ )。一方、

imipramine ( $1 \mu\text{M}$ ) の存在下では、見かけ上低親和性成分のみ消失し (図 1-6)、このときの  $K_d$  値は  $5.8 \text{ nM}$ 、 $B_{\text{max}}$  値は  $776 \text{ fmol/mg protein}$  と計算された ( $n=2$ )。

#### I-1-2-5 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に及ぼす神経伝達物質受容体作用薬および拮抗薬の影響

表 1-2 に示すように、オピオイド  $\mu$  受容体に結合する DAMGO と naloxone、オピオイド  $\kappa$  受容体に結合する dyn A(1-8) と U69,593、ムスカリン性アセチルコリン受容体に結合する atropine、GABA、glutamate、セロトニン拮抗薬の methysergide、 $\beta$  アドレナリン受容体拮抗薬の propranolol および  $\alpha_2$  アドレナリン受容体遮断薬の yohimbine は、 $1 \text{ nM}$   $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合に対して有意な影響を及ぼさなかった。

表 1-2  $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に及ぼす神経伝達物質受容体作用薬および拮抗薬の影響

	$10^{-11}\text{M}$	$10^{-10}\text{M}$	$10^{-9}\text{M}$	$10^{-8}\text{M}$	$10^{-7}\text{M}$
DAMGO	$86.6 \pm 6.9$	$81.9 \pm 5.0$	$70.0 \pm 7.8$	$73.7 \pm 6.6$	$73.3 \pm 6.9$
Naloxone	$94.8 \pm 6.4$	$83.7 \pm 7.2$	$83.9 \pm 3.8$	$64.0 \pm 11.4$	$60.3 \pm 5.9$
Dynorphin A(1-8)	$83.5 \pm 6.0$	$86.7 \pm 2.6$	$71.6 \pm 12.7$	$71.6 \pm 11.2$	$82.7 \pm 14.7$
U69,593	$87.5 \pm 14.0$	$83.0 \pm 8.8$	$85.3 \pm 10.4$	$82.2 \pm 9.9$	$60.9 \pm 13.3$
Atropine	$79.6 \pm 5.8$	$71.3 \pm 5.9$	$79.3 \pm 6.2$	$66.9 \pm 7.9$	$66.2 \pm 6.4$
GABA	$11.0 \pm 9.2$	$78.3 \pm 9.0$	$85.1 \pm 11.9$	$84.8 \pm 10.5$	$73.8 \pm 3.0$
Glutamate	$102.8 \pm 6.2$	$80.3 \pm 2.5$	$71.4 \pm 10.3$	$70.0 \pm 6.9$	$85.1 \pm 8.8$
Methysergide	$98.4 \pm 7.1$	$91.8 \pm 6.3$	$99.9^*$	$104.4 \pm 6.1$	$94.7 \pm 11.1$
Propranolol	$102.4 \pm 2.3$	$84.8 \pm 3.9$	$81.1 \pm 0.8$	$88.8 \pm 6.6$	$77.4 \pm 4.3$
Yohimbine	$92.5 \pm 3.3$	$104.2 \pm 2.0$	$91.9 \pm 11.7$	$95.7 \pm 7.3$	$95.1 \pm 6.6$

結果は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準誤差 (ただし \* は 2 回の平均)

#### I-1-2-6 $[^3\text{H}]$ QNB結合実験

ムスカリン性アセチルコリン受容体を標識する  $[^3\text{H}]$ QNB 結合 ( $0.5 \text{ nM}$ ) に対して bifemelane は  $1 \mu\text{M}$  で結合量を  $67.4 \pm 1.4\%$  にまで有意に抑制したが、 $1 \text{ nM}$  から  $0.1 \mu\text{M}$  においては抑制しなかった (図 1-7)。ムスカリン性アセチルコリン受容

体に結合するatropineおよびpirenzepineは用量依存的に [<sup>3</sup>H]QNB結合を抑制し、IC<sub>50</sub>値はそれぞれ1.3 nMおよび67nMであった(図1-7)。

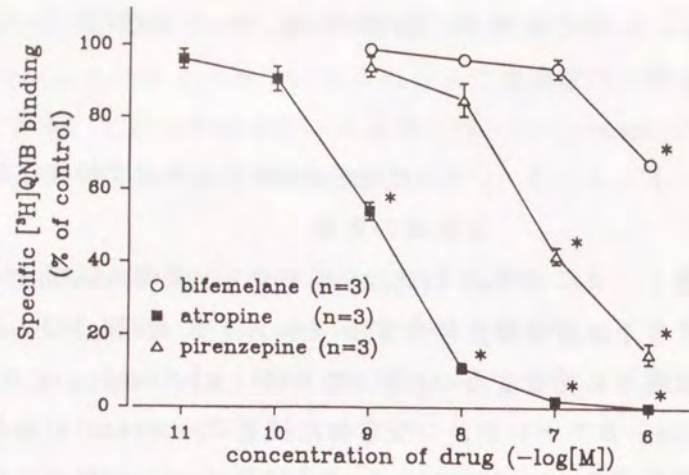


図1-7 [<sup>3</sup>H]QNB結合に及ぼす影響

\*p<0.05 vs. control

I-1-2-7 [<sup>3</sup>H]DAMGO結合

オピオイドμ受容体を標識する[<sup>3</sup>H]DAMGO結合(2 nM)に対してbifemelaneは1μMで結合量を53.9±9.7%にまで有意に抑制したが、0.1μMでは抑制しなかった(図1-8)。オピオイドペプチドのdyn A(1-8)およびdyn A(1-17)は用量依存的に[<sup>3</sup>H]DAMGO結合を抑制し、IC<sub>50</sub>値は、それぞれ110 nMおよび37nMであった(図1-8)。

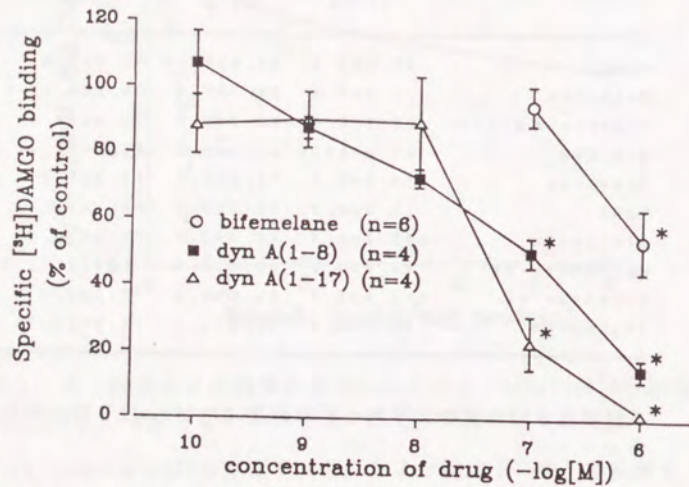


図1-8 [<sup>3</sup>H]DAMGO結合に及ぼす影響

\*p<0.05 vs. control

I-1-2-8 [<sup>3</sup>H]U69,593結合

オピオイドκ受容体を標識する[<sup>3</sup>H]U69,593結合に対してbifemelaneは1μMにおいて影響しなかった(図1-9)。オピオイドκ受容体に選択性が高い dyn A

(1-17)は非常に低濃度で用量依存的に抑制し、IC<sub>50</sub>値は0.37nMであった(図1-9)。

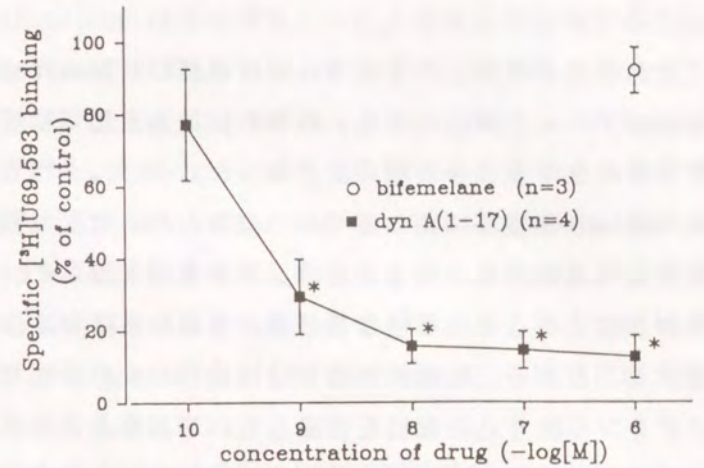


図1-9 [<sup>3</sup>H]U69,593結合に及ぼす影響

\*p<0.05 vs. control

I-1-2-9 モルモット海馬内における[<sup>3</sup>H]bifemelane結合部位数の比較

海馬におけるbifemelaneのLTP増大作用の神経回路選択性[36、37、73]の

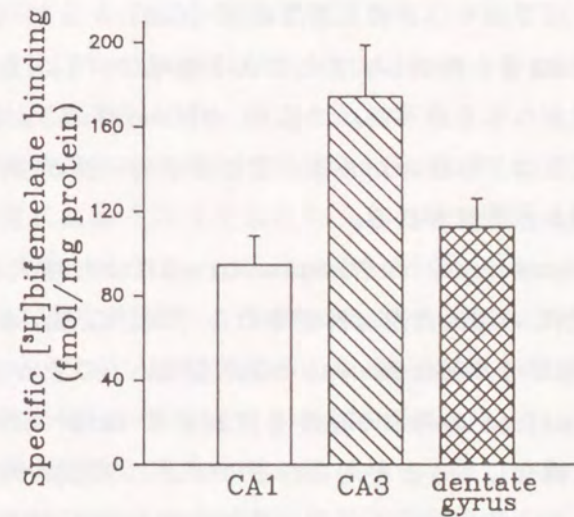


図1-10 海馬内3領域における[<sup>3</sup>H]bifemelane結合部位数の比較

結果はCA3 (n=9)、CA1 (n=12) および歯状回 dentate gyrus (n=8) の平均値±標準誤差で示す。

少なくとも一部は、bifemelaneの結合部位の領域差によると考えられる。この可能性を確かめるために、[<sup>3</sup>H]bifemelane結合部位数をCA1、CA3および歯状回領域よりそれぞれ調製したシナプス膜標本を用いて比較した。図1-10に示すように、[<sup>3</sup>H]bifemelane結合部位数は、CA3、歯状回、CA1領域の順に多かった。また、CA3領域における[<sup>3</sup>H]bifemelane結合部位数は、CA1領域より有意に多かった(p<0.01)。

### I-1-3. 考察

モルモット海馬CA3領域における $[^3\text{H}]$ bifemelane結合は飽和性を示し、Scatchardプロット解析の結果、高親和性結合と低親和性結合の少なくとも2つの結合部位よりなることが明らかとなった。また、 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合は非放射性bifemelaneの添加により速やかに消失した。すなわち、 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に飽和性と可逆性が見られることは、モルモット海馬にbifemelaneの特異的な結合部位が存在することを示唆している。低親和性結合はimipramine ( $1\mu\text{M}$ )により消失することから、低親和性結合はimipramine感受性で、その少なくとも一部はモノアミンの取り込み部位を標識していると考えられる。 $[^3\text{H}]$ bifemelaneの濃度を $1\text{nM}$ としてimipramineによる阻害実験を行った場合には、結合量は59.8%に減少した。しかし、より高濃度のリガンドを用いたとき ( $15\text{nM}$ )には、imipramineの添加により結合量が13.1%に減少したことからも、低親和性結合は主にimipramine結合部位に結合しているものと考えられる。

$1\mu\text{M}$ 以下のbifemelaneが苔状線維-CA3のLTPを増大する [36、37、73] ことが明らかになっているが、本研究ではそれと同じ濃度範囲 ( $0.01-1\mu\text{M}$ ) のbifemelaneが、 $1\text{nM}$   $[^3\text{H}]$ bifemelane結合を抑制し、またCA3領域の $[^3\text{H}]$ bifemelane結合数はCA1と歯状回領域よりも多かった。つまり、bifemelaneによる海馬におけるLTP増大作用の領域差は、bifemelane結合部位の不均一性が少なくとも一部関わっているのではないかと推察される。

苔状線維-CA3系のLTPは、noradrenalineやisoproterenolにより増大され、 $\beta$ -adrenoceptor blockerによりこの増大作用は抑制される [34] ことから、noradrenalineによるLTPの増大効果は $\beta$ -adrenoceptorを介していることが示唆される。Bifemelaneは、noradrenalineの再取り込みを抑制するimipramine感受性のモノアミン取り込み部位に結合しうると考えられるので、この部位へのbifemelaneの親和性は低いけれども、bifemelaneによるLTPの増大作用に関わっているかも知れない。

$[^3\text{H}]$ bifemelaneの高親和性結合が、どのようなものを標識しているかについては現在のところ不明である。苔状線維-CA3系のLTPは、様々な神経伝達物質により影響を受ける [34、56、74]。そこで、 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に及ぼす神

経伝達物質受容体作用薬および拮抗薬の影響を調べたが、特異的に抑制したものはなかった。ところで、bifemelaneはスコポラミンによる健忘を改善すること [80、81] や海馬からのアセチルコリン遊離を増大する [71、72] 作用を示すことなどから、bifemelaneのLTP増大作用にアセチルコリンレセプターへの結合が関わっていることが示唆される。しかし、ムスカリン性アセチルコリンレセプターをラベルする $[^3\text{H}]$ QNB結合 [87] を、bifemelaneは比較的高濃度である $1\mu\text{M}$ では抑制するが、 $0.1-10\mu\text{M}$ の濃度範囲では抑制しなかったことから、LTP増大作用が低濃度 ( $10\text{nM}$ ) でも認められることを考慮すると、ムスカリン性アセチルコリンレセプターへのbifemelaneの結合が、bifemelaneによるLTP増大作用の主たる作用機序であるとは考えられない。

さらに、オピオイド受容体へのbifemelaneの結合の可能性についても検討したが、bifemelaneは $[^3\text{H}]$ DAMGO結合を $1\mu\text{M}$ で抑制したことから、オピオイド $\mu$ 受容体への親和性は低いものの何らかの影響を及ぼし、高濃度のときのbifemelaneの海馬における薬理作用に関わっているかもしれない。一方、 $[^3\text{H}]$ U69,593結合に対してbifemelaneは $1\mu\text{M}$ でもほとんど影響しなかったので、 $\kappa$ 受容体へ影響を及ぼすことによる作用はあまり考えられない。

また、methysergideやyohimbineは、 $1\mu\text{M}$ でもほとんど $[^3\text{H}]$ bifemelane結合に対して影響しなかったことから考えると、bifemelaneはいずれの受容体に対しても非特異的に作用してしまうわけではない。

苔状線維-CA3系のLTPを増大させる脳機能改善薬のうち調べたidebenone、vinpocetine、piracetam、Ca-hopantenate およびindoloxazineは、 $0.01-10\mu\text{M}$ の濃度範囲で、 $[^3\text{H}]$ Bifemelane結合に対して影響しなかった。N-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体を標識する $[^3\text{H}]$ (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-di-benzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine結合に対し、bifemelaneを含む3種の薬物が阻害作用を示したり [41]、あるいは電気生理学的研究により電位依存性Caチャンネルへ結合している可能性 [40] が示唆されるなど、これらの薬物の作用部位には共通しているところもあると考えられる。しかし、 $[^3\text{H}]$ bifemelaneで標識される部位が脳機能改善薬の共通の作用部位ではないことが推察される。

## 第2章 Bifemelaneのinositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)とcAMP含量に及ぼす影響

前章でモルモットの海馬にbifemelane結合部位が存在することが明らかとなり、その高親和性結合部位のKd値は、神経伝達物質などの受容体への結合のKd値に匹敵する [53] ことから、bifemelane結合部位は、受容体機構と連関している可能性が考えられる。一般に、細胞外からの情報は、特異的受容体を介して細胞内に変化を引き起こす。細胞内応答の多くはセカンドメッセンジャーと呼ばれる細胞内情報伝達物質を介して行われる [8, 9]。LTPの発現メカニズムにおいて、様々な情報伝達機構の関与が想定されているが [50]、LTPが発現している時点で、イノシトールリン脂質代謝系およびアデニレートシクラーゼ系の活性化が認められ、それぞれの系よりセカンドメッセンジャーである inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) [5] および cAMP [14] 含量の増加が認められている。本章では、bifemelane結合部位が、これら2つの情報伝達系に連関しているのか否かについて検討した。

### I-2-1. 実験方法

#### I-2-1-1 海馬切片の調製と薬物処置

実験には体重250-400 gの雄性Hartley系モルモットを用いた。海馬切片の作製方法は山本の方法 [84] に従った手切りで行った。モルモットを断頭した後、直ちに脳を取り出し氷冷したaCSF中に入れ、脳を正中線で二分した。脳幹をピンセットで除去し、海馬を単離した。氷冷しながら実体顕微鏡下で海馬の長軸方向に対して垂直になるように、カミソリの刃で厚さ400-600 μmの切片を切りだした。

切りだした海馬の切片は95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>混合ガスで飽和させた34°CのaCSF中で90分間予備インキュベーションを行った後実験に使用した。なおaCSFの組成(単位mM)は以下の通りである; NaCl: 124, KCl: 1.76, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.25, MgSO<sub>4</sub>: 2.0, CaCl<sub>2</sub>: 2.0, NaHCO<sub>3</sub>: 25.9, glucose: 10。

#### I-2-1-2 Bifemelane処置

I-2-1-1で調製した海馬切片を1枚ずつを、aCSF 5.0 mlの入ったバイアルに移し、さらに34°Cで10分間インキュベーションした。さらに、bifemelaneは最終濃度で10nM-100 μMとなるように直接バイアルに添加し、切片を10分間処置した。対照の切片は、同じ時間だけaCSFでインキュベーションした。薬物処置後の切片はCA1、CA3および歯状回領域に部位分けした後(図1-1)、20%過塩素酸溶液の入ったマイクロチューブに移し、IP<sub>3</sub>およびcAMPの抽出まで-20°Cで保存した。

#### I-2-1-3 IP<sub>3</sub>およびcAMPの抽出と定量

I-2-1-2で保存しておいた切片を超音波破碎し氷上に15分間放置した。20分間、27,000xgで遠心し、上清を分取した。沈渣の組織はタンパク定量のため保存しておいた。分取した上清に10 μlのpH indicator (Merck)を加えた後、60 mM HEPESを含む1.5 N KOHでpHを7-8に合わせた。15分間氷上に放置した後、20分間、27,000xgで遠心し析出したKC10<sub>4</sub>を取り除いた。上清中のIP<sub>3</sub>およびcAMP量はAmershamのアッセイキットを用いてそれぞれ定量した。

#### I-2-1-4 データの処理

結果は保存しておいた組織中のタンパク質量をBradfordの方法 [12]により測定し、この値でIP<sub>3</sub>およびcAMPの量を補正した。統計処理はI-1-1-6に述べた方法で行った。

### I-2-2. 実験成績

#### I-2-2-1 Bifemelaneの海馬切片におけるIP<sub>3</sub>含量に及ぼす影響

Bifemelane (10 nM-100 μM)で海馬切片を処置するとCA3および歯状回領域では用量依存的にIP<sub>3</sub>含量が増加する傾向が認められたが、CA1領域ではIP<sub>3</sub>含量には変化がなかった(図1-11)。

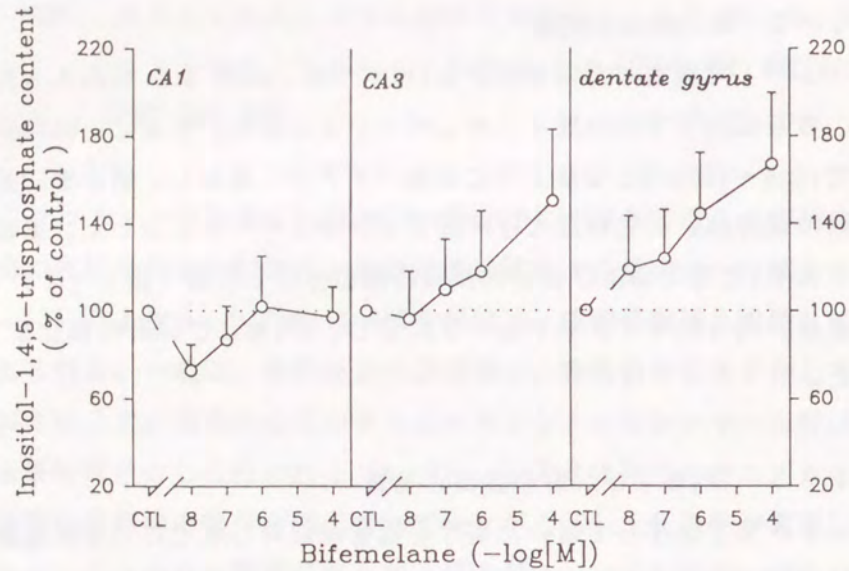


図1-11 IP<sub>3</sub>含量に及ぼすbifemelaneの影響

結果は、平均値±標準誤差で示す (n=9)。

#### I-2-2-2 Bifemelaneの海馬切片におけるcAMP含量に及ぼす影響

Bifemelane (10nM-100μM) で海馬切片を処置しても、CA1、CA3および歯状回領域のいずれにおいてもcAMP含量は変化しなかった (図1-12)。

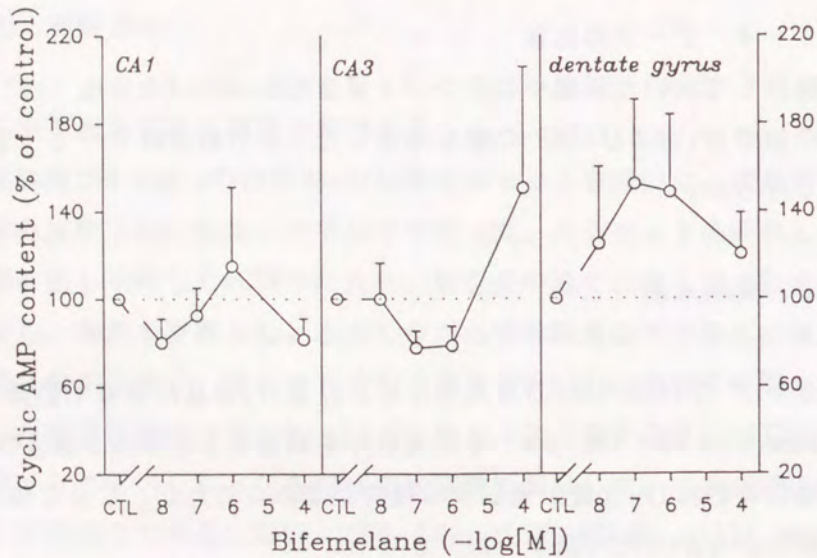


図1-12 cAMP含量に及ぼすbifemelaneの影響

結果は、平均値±標準誤差で示す (n=9)。

#### I-2-3. 考察

Bifemelane はモルモット海馬CA3および歯状回領域において、IP<sub>3</sub>含量を増加させる傾向が認められたが、一方、CA1領域ではIP<sub>3</sub>含量には影響しなかった。PLCの海馬内分布は、サブタイプにより必ずしも同一ではないが、CA1領域、CA3領域、歯状回領域において比較的均一に分布していることが報告されている [69]。すなわち、本実験での結果は、CA1領域にPLCが存在しないために、bifemelaneによりIP<sub>3</sub>含量の増加が認められなかったのではないかと考えられる。CA3あるいは歯状回領域では、第1章で認められたbifemelane結合部位が、PLCと関連しておりIP<sub>3</sub>含量の増加が起こったことが推論される。しかし、bifemelaneの結合部位のKd値や、1μMでは[<sup>3</sup>H]DAMGO結合や[<sup>3</sup>H]QNB結合を抑制すること、などから考えて、その増大作用メカニズムは複雑である。Bifemelane結合部位がCA3領域よりも少ない歯状回領域でIP<sub>3</sub>含量の増大がより顕著だが、bifemelaneが様々な神経伝達物質受容体に作用した結果ではないかと推察される。

海馬CA3、CA1および歯状回領域のいずれにおいても、bifemelaneによりcAMP含量には変化が認められなかったので、アデニレートシクラーゼ系に対してbifemelaneは明らかな影響を及ぼさないと考えられる。海馬内には、アデニレートシクラーゼも豊富に存在し、その分布には苔状線維が走行している部位に比較的多く存在しているという特徴が見られる [83]。セカンドメッセンジャー系の間には、相互に別の系を調節しあう「クロストーク」が報告されている。本実験ではLTP非発現時におけるbifemelaneの単独作用を観察したので、LTP発現時におけるcAMP含量に対しては、bifemelaneが何らかの間接的な影響を及ぼす可能性は否定できない。

### 第3章 Bifemelaneのprotein kinase C (PKC)の細胞下分布に及ぼす影響

Protein kinase C (PKC)は脳に高濃度含まれる酵素 [48] であり、イノシトールリン脂質代謝回転の促進に伴って生じるジアシルグリセロールにより、細胞質から細胞膜脂質環境への移行する [47] ことにより活性化される [62]。中枢神経系においては、神経伝達物質の遊離 [54、55] やイオンチャネル [7] の調節、あるいはLTP [10、85] のときのようなシナプス可塑性 [2、70] に重要である。ウサギの海馬では古典的条件づけにより24時間後にPKCの再分布が起こる [6]、あるいは空間学習能力の劣る系統のマウスの方が、細胞膜画分にPKC活性が低いこと [82] が明らかにされている。さらに、アルツハイマー病患者の海馬においては、細胞膜画分におけるPKC活性の低下が報告されており [16]、細胞膜画分におけるPKC活性と記憶・学習能力は密接に関連していることが示唆される。また、LTP発現メカニズムにPKCの細胞質から細胞膜脂質環境への移行の関与することが示されている [2]。そこで本章では、海馬におけるbifemelaneのPKCの細胞下分布に及ぼす影響について検討した。

#### I-3-1. 実験方法

##### I-3-1-1 海馬切片の作製方法

実験には体重250-400 gの雄性Hartley系モルモットを使用した。海馬の切片はI-2-1-1に詳述した方法で作製した。

##### I-3-1-2 灌流実験

I-3-1-1で作製した切片1枚ずつを容量1.0 mlの灌流チャンバーにいれ、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>混合ガスで飽和した35°C

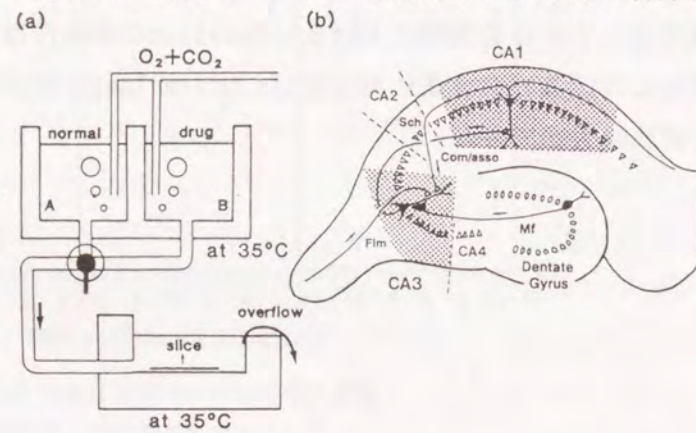


図1-13 海馬切片灌流実験に用いた装置 (a) と部位分け領域 (b)

のaCSFを流速2.0 ml/minで灌流した (図1-13a)。Bifemelaneは灌流aCSF中に添加して15分間適用し、その後aCSF中からbifemelaneを除いて15または45分間灌流した。対照の切片はaCSFで同じ時間だけ灌流した。灌流後の切片はドライアイス上で凍結させ、PKCの定量まで-80°Cで保存した。

#### I-3-1-3 細胞下分画

細分質画分と細胞膜画分の分離はAkersら [2] やZatz [88] の方法に従い、以下のようにして行った。定量操作の直前に、2枚分の切片のCA3とCA1領域をそれぞれ切りだし (図1-13b)、2.0mlのbuffer E (50 mM Tris-HCl緩衝液、pH7.4、0.1 mM EGTA、10 μg/ml leupeptin) でglass-Teflonホモジナイザーを用いてホモジナイズした。図1-17および1-18の実験では、buffer Eのかわりにbuffer F (0.32 M sucrose、0.1 mM EGTA、10 μg/ml leupeptin) でホモジナイズした。これを4°C下、60分間、100,000xgで遠心し、上清は細胞質画分とした。沈渣には2.0 mlのbuffer Eを加えて懸濁し、細胞膜画分として実験に用いた。細胞質画分のbufferはCentricon-30を用いてbuffer Eに置換してから実験に使用した。

#### I-3-1-4 [<sup>3</sup>H]PDBu結合実験

PKC量はTanakaら [77] の方法に従った [<sup>3</sup>H]PDBu結合実験により定量した。0.5mlの容量で、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4)、4 nM [<sup>3</sup>H]PDBu、0.5mM CaCl<sub>2</sub>、100 μg/ml phosphatidylserineとともに、5 μg蛋白質以上を含むそれぞれの各画分を、37°Cで15分間インキュベーションした。反応停止は、吸引下にろ過フィルター上に注ぐことで行った。結合型 [<sup>3</sup>H]PDBuと遊離型 [<sup>3</sup>H]PDBuの分離は、細胞質画分の場合はBA85フィルター (Schleicher&Schuell)、細胞膜画分の場合はGF/Bフィルター (Whatman) をそれぞれ用いて行った。非特異的結合を低下させるため、フィルターはさらに0.5% polyethyleneimineで前処理しておいた。各フィルターを0.5 mM CaCl<sub>2</sub>を含む50 mM Tris-HCl緩衝液2.5 mlで6回洗浄したのち、フィルター上に残った放射活性をLS5000 液体シンチレーションカウンター (Beckman) で測定した。実験は、duplicateで行った。非特異的結合は非放射性PDBu (4 μM) 存在下の [<sup>3</sup>H]PDBu結合活性とし、特異的結合は4 nM [<sup>3</sup>H]PDBuの全結合

より非特異的結合を差し引くことで求めた。蛋白質量は、Lowry ら [52] による方法によって求めた。

### I-3-1-5 統計処理

I-1-1-6 に詳述した方法に従って行った。データは平均値±標準誤差で示した。

### I-3-2. 実験成績

#### I-3-2-1 $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ 結合の性質と定量方法の妥当性

ホルボールエステルは、特異的に PKC に結合する [62、63、64] と考えられており、田中ら [77] は、精製した PKC を用いて  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合実験を行って PKC の定量方法を確立した。本研究ではカラムクロマ

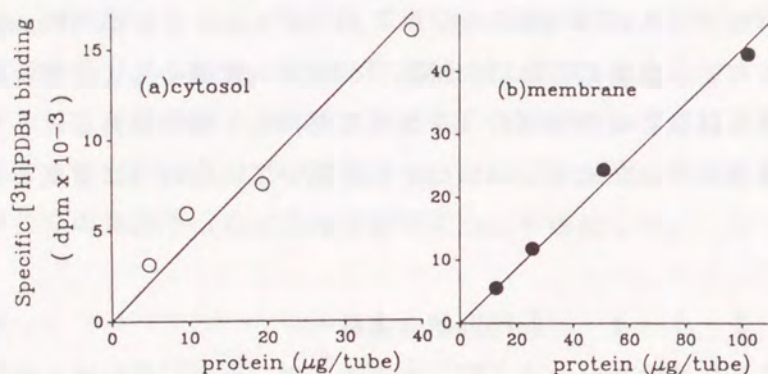


図1-14  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合の細胞質画分 (a) および細胞膜画分 (b) におけるタンパク質濃度依存性

トグラフィーなどで精製していない細胞質画分および細胞膜画分を用いているので、まず  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合の性質や定量方法の妥当性について検討した。細胞質画分および細胞膜画分の特異的  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合は、調べたタンパク質量の範囲内で良い直線性を示した (図1-14a、b)。また、この結果より  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合を行う際には1アッセイチューブ当たり細胞質画分は5 μg、細胞膜画分は10 μg以上を含むようにして以下の実験を行った。細胞膜画分における  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合はおよそ10分間で平衡に達し、非放射性の PDBu (1 μM) の添加により速やかに解離した (図1-15)。さらに、 $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  は生物学的に活性な誘導体である PDD (10 nM - 10 μM)

により抑制されたが、生物学的に不活性な  $4\alpha$ -PDD によっては抑制されなかった (図1-16)。また、bifemelane (100 nM - 100 μM) は  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合に対して影響しなかった (図1-16)。

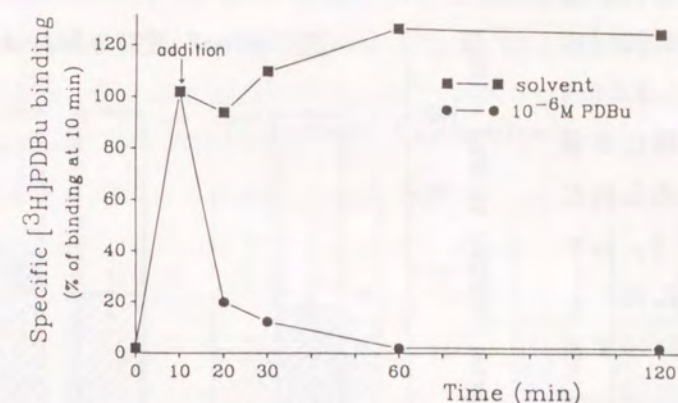


図1-15  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合の非放射性 PDBu による置換実験 10分のところで溶媒 (■) あるいは PDBu (1 μM; ●) を 10 μl の容量で添加した。

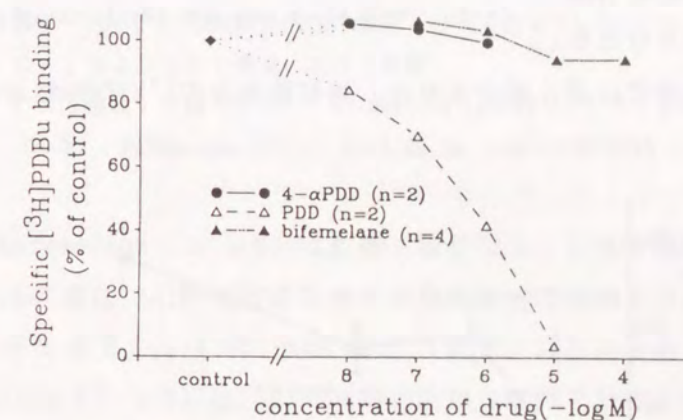


図1-16 ホルボールエステル誘導体  $4\alpha$ -PDD (●)、PDD (△) および bifemelane (▲) の  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合に及ぼす影響

#### I-3-2-2 CA3 領域における bifemelane の $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ 結合活性の細胞下分布に及ぼす影響

CA3 領域において、総  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性 (細胞質画分+細胞膜画分) は未処置切片 (11.0 ± 0.7 pmol/mg protein, n=9) と bifemelane 処置切片 (10 nM: 9.7 ±

1.1、n=5; 100 nM :  $10.2 \pm 0.9$ , n=7 ;  $1 \mu\text{M}$ :  $11.8 \pm 0.7$ , n=8) の間に有意な差は認められなかった ( $F_{3, 25} = 1.11$ ,  $p > 0.05$ )。図 1-17 に示すように、bifemelane (10nM -  $1 \mu\text{M}$ ) は用量に依存して細胞膜画分では有意に  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性を増加させたが、細胞質画分では逆に減少させた。細胞膜画分の  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性の増加は bifemelane ( $1 \mu\text{M}$ )

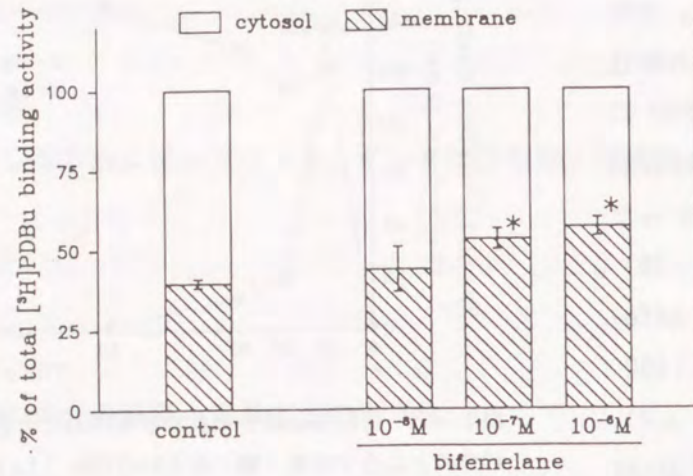


図 1-17  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性の細胞下分布に及ぼす bifemelane の影響  
 対照 (n=9)、bifemelane 10nM (n=5)、100nM (n=7) および  $1 \mu\text{M}$  (n=8) \* $p < 0.05$  vs. control (Bonferroni法)

により 15 分以内に見られ、bifemelane を灌流液中より除いても少なくとも 45 分間は持続した ( $F_{2, 12} = 2.66$ ,  $p > 0.05$ ) (図 1-18)。

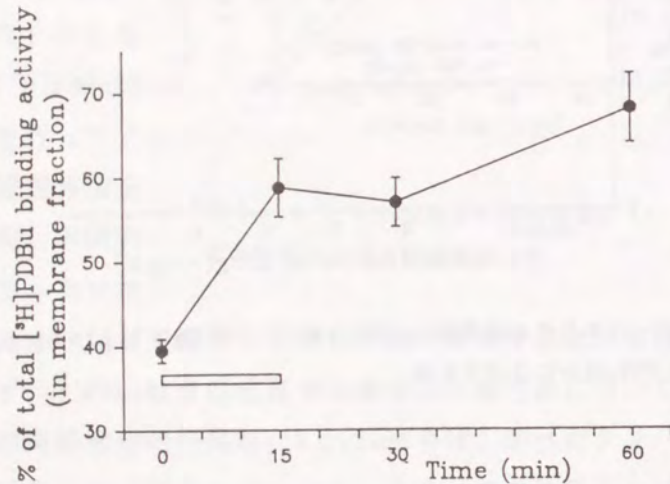


図 1-18  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性に及ぼす bifemelane の影響の時間経過膜画分における割合を示す。白カラムのところでは bifemelane ( $1 \mu\text{M}$ ) を作用させた。

### I-3-2-3 Bifemelane の $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ の細胞下分布に及ぼす影響の領域差

CA3 領域と CA1 領域における、bifemelane ( $1 \mu\text{M}$ ) による  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性の細胞下分布に及ぼす影響を比較した。

総  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性に対して、CA3 領域 (未処置:  $14.64 \pm 0.77 \text{ pmol/mg protein}$ ; bifemelane 処置:  $14.88 \pm 0.71 \text{ pmol/mg protein}$ ) あるいは CA1 領域 (未処置:  $19.10 \pm 1.12$

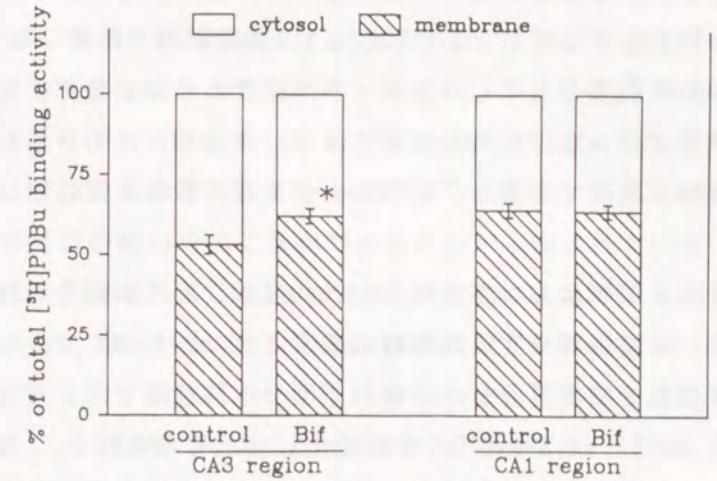


図 1-19  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性の細胞下分布に及ぼす bifemelane の影響の CA3 および CA1 領域における比較  
 bifemelane 処置: CA3 領域: 対照 (n=14)、bifemelane (n=10)、CA1 領域: 対照  $19.94 \pm 1.02 \text{ pmol/mg protein}$ ; bifemelane (n=5) \* $p < 0.05$  vs. control (ANOVA)

らの領域においても bifemelane ( $1 \mu\text{M}$ ) は影響しなかった。CA3 領域では、bifemelane ( $1 \mu\text{M}$ ) は有意に  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性を細胞膜画分で増加させたが、細胞質画分では減少させた ( $F_{1, 44} = 4.40$ ,  $p < 0.05$ ) (図 1-19)。しかし、CA1 領域では、bifemelane ( $1 \mu\text{M}$ ) は  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合活性の細胞下分布を変化させなかった ( $F_{1, 18} = 0.035$ ,  $p > 0.05$ ) (図 1-19)。

### I-3-3. 考察

$[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合実験はカラムクロマトグラフィーにより精製された protein kinase C (PKC) の定量に使用されている [77]。一方、未精製のサンプルを用いても本研究のように、サンプルに対する  $[^3\text{H}]\text{PDBu}$  結合は、(1) 蛋白質依存性が認められること、(2) 活性型ホルボールエステルの PDBu あるいは PDD によって阻害されるが、(3) 不活性型の  $4\alpha$ -PDD によっては阻害されないなど、その



性質は精製 P K C を用いた Tanaka らの結果と一致していた。さらに、PDBu のような活性型のホルボールエステルは直接 P K C に結合し、細胞質から細胞膜画分に移行させ P K C を活性化することが知られている [47、88]。Bifemelane は [<sup>3</sup>H] PDBu 結合に対して 100 nM から 100 μ M の濃度範囲で影響しなかったことから、bifemelane は直接 P K C にホルボールエステルの結合部位に結合しないと思われる。本研究で行った [<sup>3</sup>H] PDBu 実験により、海馬切片における bifemelane の P K C 細胞下分布に及ぼす影響を [<sup>3</sup>H] PDBu 結合実験で検討することは可能であると考えられる。

C A 3 領域において、bifemelane は総 [<sup>3</sup>H] PDBu 結合活性 (細胞質画分 + 細胞膜画分) には影響せず、比較的低濃度 (10 nM - 1 μ M) でかつ用量依存的に [<sup>3</sup>H] PDBu 結合活性を細胞質画分から細胞膜画分へ移行させた。すなわち、bifemelane は C A 3 領域において P K C を活性化したと考えられる。前章で記述したように、bifemelane は C A 3 領域における IP<sub>3</sub> 含量を増加させる可能性があるため、同薬物によってホスホリパーゼ C (P L C) が活性化されたことが考えられる。P L C が活性化されると、IP<sub>3</sub> とともにジアシルグリセロール (D A G) が生じるので、この D A G が P K C を細胞質から細胞膜画分へ移行させたと推察される。Bifemelane による P K C の細胞質から細胞膜への移行は、bifemelane を灌流液中より除いても、少なくとも 45 分間は持続した。ホルボールエステルによる P K C の活性化は、一過性であることが知られている。しかし、近年、培養細胞を用いた系で、アゴニストによる受容体刺激に伴う D A G 含量の変化は、2 相性の場合もあることが明らかにされた [60]。海馬切片標本を用いてアゴニスト刺激による D A G 含量変化を調べた報告はないが、本研究で観察された bifemelane を除いたあとの P K C 活性化の持続は、D A G 含量の第 2 相目の増加を反映している可能性がある。

ところで、bifemelane の IP<sub>3</sub> 含量の増加作用と P K C 活性化作用を示す濃度に差が認められるが、(1) IP<sub>3</sub> 含量の測定の際に、代謝を抑える処置をしていないので IP<sub>3</sub> 含量が低めに測定された、(2) 様々な神経伝達物質受容体に bifemelane が作用した、(3) 過塩素酸抽出法 (前章) と細胞下分画法 (本章) といった定量対象物質による抽出操作方法の違い、などが影響していることが考えられる。

P K C 活性化の bifemelane の薬理作用発現における意義についてであるが、0.01 - 1 μ M で bifemelane は苔状線維 - C A 3 系の L T P を増大させるが [73]、この時テタヌス刺激のない時の試験刺激による反応にはほとんど影響しない。P K C を活性化するホルボールエステルやオレイン酸などは、シナプス伝達には影響しない濃度で L T P を増大することが知られている [49、51]。ここで用いた濃度範囲の bifemelane による P K C 活性化は、適度なテタヌス刺激による L T P をより増大させるような基礎的条件を与えているのかもしれない。P K C は脱分極刺激に伴う神経伝達物質の遊離の増加に重要であることが示唆されている [20、55、61] ので、bifemelane による P K C 活性化は、この薬物によるマウス海馬切片からの高カリウム誘発性のアセチルコリン遊離の増大作用 [71] に関わっているのかもしれない。一方、C A 1 領域において、bifemelane は P K C の細胞下分布や L T P に対しては、C A 3 領域で効果の認められた最大濃度の 1 μ M でも効果がなかった。すなわち、C A 3 領域に見られた bifemelane による P K C の細胞下分布の変化は、L T P 増大効果に関連している可能性をさらに支持するものと思われる。

近年の研究で、P K C には数種類のサブタイプが存在することが遺伝子レベル [17、45、64、65、66、68] およびタンパク質レベルの研究 [35、44、67、75] で明らかになっている。Bifemelane で引き起こされた P K C の細胞下分布の変化は、どの P K C サブタイプのものを反映しているのかは不明である。PDBu はすべてのタイプの P K C を細胞質から細胞膜へ移行させる [39] し、海馬において、C A 3 領域 [86] あるいは C A 1 領域 [30] のいずれにおいてもホルボールエステルはシナプス伝達を促進することが示されている。 [<sup>3</sup>H] PDBu 結合に対して bifemelane が影響しなかったため、本研究の bifemelane による P K C 活性化作用は、bifemelane が P K C に直接結合し活性化している可能性は薄いと思われる。(ただし、P K C の別の部位に結合している可能性は除外できない。) 以上のことを考え合わせると、第 I 編第 1 章に述べたような C A 3 領域の bifemelane 結合部位を介して、P K C の活性化が生じている可能性が示唆される。海馬苔状線維 - C A 3 系の L T P の発現に際して、どのサブタイプの P K C の活性化が重要であるかとともに、bifemelane によりどのサブタイプの P K C が活性化されるのかは今後の研究を待たねばならない。

## 第 I 編小括

(1) モルモット海馬 C A 3 領域には、 $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合の飽和性かつ可逆的な結合部位が存在した。その結合部位は少なくとも 2 相性を示したが、低親和性結合は imipramine の添加により消失した。つまり、低親和性結合は imipramine 感受性で、おそらくモノアミン取り込み部位を標識していることが示唆された。

(2) Bifemelalane と同様に苔状線維 - C A 3 系の L T P を増大させる脳機能改善薬 (idebenone、indeloxazine、Ca-hopantenate、piracetam および vinpocetine) は  $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合に影響しなかったことから、この結合部位が、これら脳機能改善薬の共通の作用部位でないことが推察される。

(3) モルモット海馬において、bifemelane は、C A 3 および歯状回領域でイノシトールリン脂質代謝系に促進的作用を示したが、C A 1 領域では促進作用を示さなかった。

(4) モルモット海馬において、bifemelane は、C A 1、C A 3 および歯状回領域のいずれにおいても、アデニレートシクラーゼ系に対して明らかな影響を及ぼさなかった。

(5) Bifemelane は、海馬 C A 3 領域において用量依存的に P K C を細胞質画分から細胞膜画分に移行させた。一方、C A 1 領域では P K C の細胞下分布には影響しなかった。

## 第 II 編

### B i f e m e l a n e のグルタミン酸遊離に及ぼす影響とその調節メカニズム

## 第1章 モルモット苔状線維シナプトソーム調製と諸性質

海馬CA3領域の錘体細胞は少なくとも3つの異なる入力系、すなわち苔状線維、海馬采および交連・連合線維を受けている[13]。電気生理学的研究[37]により、bifemelaneは苔状線維-CA3系のLTPは増大するが、海馬采-CA3系および交連・連合線維-CA3系のLTPは増大しないので、bifemelaneは苔状線維もしくはその細胞体である顆粒細胞に作用するが、CA3領域の錘体細胞自体や他の入力系には作用していないと思われる。ところで、ラット海馬の苔状線維終末部は大きく不規則な形状をしている[3、15]ことが明らかにされており、Terrianらはラット海馬よりP3画分として苔状線維シナプトソームを調製できることを報告した[78]。そこで本章では、モルモット海馬よりP3画分シナプトソームを調製し、その性質について検討した。

### II-1-1. 実験方法

#### II-1-1-1 モルモット海馬苔状線維シナプトソームの調製

モルモット海馬苔状線維シナプトソームの調製はTerrianら[78]の方法を少し改変して行った。5から7匹の雄性モルモット(体重250-300g)の海馬を9倍量の氷冷0.3M sucrose(1mM MgSO<sub>4</sub>および15mM Na-*TES*を含む、pH7.4)で、Dounce-typeホモジナイザー(クリアランス0.25および0.15mm)を用いてホモジナイズした(条件:1strokeあたり10回転を25strokes)。これをナイロンメッシュ(メッシュサイズ110、70および60μm)でろ過した後、4℃下、10分間、900xgで遠心し、上清(S1)と沈渣(P1)に分離した。苔状線維終末部は、通常の神経終末部よりも大きいのでP1画分に含まれると考えられる。そこで、苔状線維終末部と核とを分離するために、沈渣(P1)に18%(w/v) Ficollを含む0.3M sucroseを加えて懸濁し、40分間、7,500xgで遠心した。この条件下では、上清中に苔状線維終末部は含まれているので、この上清を1.5倍量の0.3M sucroseで希釈し、20分間、13,000xgで遠心した。得られる沈渣をP3画分シナプトソームとして実験に用いた。通常の神経終末部を含む(P2)画分は、上清(S1)をさらに15分

間、15,000xgで遠心して得られる沈渣を用いた。両方のシナプトソーム(P2およびP3)は以下の組成(mM)に示すKrebs-bicarbonate bufferに再懸濁して実験に用いた。NaCl: 127、KCl: 3.9、MgSO<sub>4</sub>: 1.2、KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1.8、CaCl<sub>2</sub>: 1.8、NaHCO<sub>3</sub>: 20、D-glucose: 11(pH7.4)。

#### II-1-1-2 dynorphin抗体の作製

免疫動物は白色ウサギを用い、BSAをハプテンとしてdynorphin A(1-8)[dyn A(1-8)]およびdynorphin B(dyn B)をカルボジイミド法によりconjugateし、Freundのcomplete adjuvantで懸濁したものをウサギに免疫した。6カ月後に採血し抗血清を得た。予備実験の結果、抗血清の最終希釈倍率はdyn A(1-8)の場合は25,000倍、またdyn Bの場合は7,000倍としてラジオイムノアッセイ(RIA)に使用した。

#### II-1-1-3 トレーサーの標識

トレーサー(<sup>125</sup>I標識のペプチド)の標識はクロラミンT法により行った。Dyn A(1-8)あるいはdyn B(10nmol/100μl)を0.25Mリン酸バッファー(pH7.5)に溶解後チューブに入れ、Na<sup>125</sup>I(250mCi)をチューブに加えた。クロラミンT(0.5mg/mlリン酸buffer)を20μl加え直ちに20秒攪拌し、次いでメタ重亜硫酸ナトリウム(1mg/mlリン酸buffer)を20μl加えて攪拌して反応を停止させた。Bio-Gel P-2(Whatman)によりゲルろ過を行い、フラクションコレクターで溶出液を分取し、ペプチド標識ピークに相当するフラクションを-20℃で保存し、RIAに使用した。

#### II-1-1-4 dynorphinのRIA

抗体と結合したトレーサーはポリエチレングリコール法によりB/F分離した。定量実験は、duplicateで行った。抗体は高い選択性があり、他の神経ペプチド(1nM)による交叉反応性(%)は以下の通りであった。

抗dyn A(1-8)抗血清; dyn A(1-8): 69.2、dyn B: <0.1、dyn A(1-17): <0.1、  
[Met<sup>5</sup>]enkephalin: 1.1、β-endorphin: <0.1、

substance P: <0.1、somatostatin: 0.2、  
galanin: 5.7、cholecystokinin: 4.5 %。

抗dyn B 抗血清； dyn B: 44.5、dyn A(1-8): 2.6、dyn A(1-17): <0.1、  
[Met<sup>5</sup>]enkephalin: 1.8、 $\beta$ -endorphin: 2.4、  
substance P: 3.0、somatostatin: 7.1、  
galanin: 1.6、cholecystokinin 5.7 %。

#### II-1-1-5 グルタミン酸の定量

L-glutamateはGrahamとAprisonの方法 [29] にしたがって蛍光酵素法により定量した。測定は、duplicateで行った。蛍光はHitachi Model F-3000 蛍光光度計を用いて測定した。

#### II-1-1-6 亜鉛の定量

亜鉛の含量は、原子吸光光度法により、Hitachi Model 180-70原子吸光光度計を用いて測定した。測定は、duplicateで行った。

#### II-1-1-7 電子顕微鏡観察

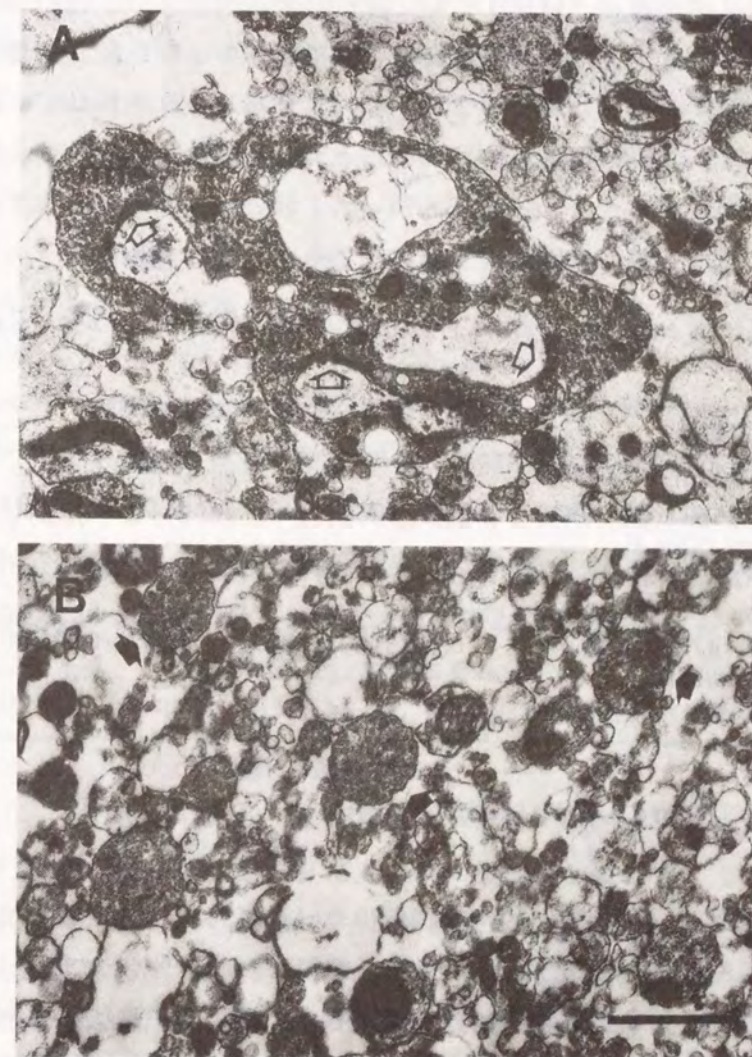
P3およびP2 画分シナプトソームを2.5 % glutaraldehydeおよび2 % paraformaldehydeで固定した後、超薄切片を作製した。5% uranyl acetateとlead citrateで2重染色した後、電子顕微鏡 (Hitachi H-550H) で観察した (倍率は10,000倍)。

#### II-1-1-8 統計処理

結果はStudent's t-test により検定を行い、危険率 (p) が5%未満の場合を統計学的に有意差ありと判定した。

#### II-1-2. 実験成績および考察

ラット海馬の苔状線維終末部は、かなり大きなシナプスボタンを形成しており、形状も不規則である [3、15]。モルモット海馬より調製したP3画分シナプトソームの形態学的な性質や生化学的な性質について、P2画分シナプトソームと比較



Bar = 1  $\mu$ m

図2-1 P3およびP2画分シナプトソームの電子顕微鏡写真

(A) 白矢印は active zone (シナプス間隙) を示す。(B) 黒矢印はP2画分に見られる小さなシナプトソームを示す。

した。P3およびP2画分シナプトソームを電子顕微鏡により観察した結果を図2-1に示す。P3画分シナプトソームは、大きく (長径約5  $\mu$ m) で形状も不規則で

あった(図2-1A)。さらに、このP3画分シナプトソームは非常に密にシナプス小胞を含んでおり、active zone(シナプス間隙)も見られた。一方、P2画分シナプトソームは小さく(直径1 $\mu$ m)てほぼ円形をしていた(図2-1B)。

P3およびP2画分シナプトソームにおける免疫活性dyn A(1-8)および dyn B、亜鉛およびグルタミン酸に含量を表2に示した。亜鉛、免疫活性dyn A(1-8)および dyn Bについては、P3画分はP2画分の約2倍と有意に高かった。これらの物質は、苔状線維の生化学的マーカーとなる[25、57、58、59]と考えられている。しかし、グルタミン酸含量には両画分で差は認められなかった。

表2 P3およびP2画分におけるダイノルフィン類、亜鉛およびグルタミン酸含量

Markers	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>
Dynorphin A-(1-8) (pmol/mg protein)	0.497 $\pm$ 0.049 <sup>a</sup> (5)	0.266 $\pm$ 0.028 (5)
Dynorphin B (pmol/mg protein)	0.565 $\pm$ 0.047 <sup>a</sup> (5)	0.253 $\pm$ 0.016 (5)
Zinc ( $\mu$ g/mg protein)	0.168 $\pm$ 0.029 <sup>a</sup> (6)	0.087 $\pm$ 0.006 (6)
Glutamate (nmol/mg protein)	24.8 $\pm$ 1.84 (7)	28.9 $\pm$ 1.84 (7)

a:p<0.05 vs. P2画分 (Student's t-test)

以上の結果より、本研究において、モルモット海馬より調製したP3画分シナプトソームは、Terrianらがラット海馬より調製したP3画分シナプトソーム[78]とその形態学的性質や生化学的性質が類似していること、苔状線維中の生化学的マーカーとなる物質を多く含んでいることなどから、苔状線維終末部の性質を比較的良く保持したまま調製されていることが明らかとなった。次章以下において、このP3画分およびP2画分シナプトソームを用いて、bifemelaneが苔状線維に直接作用している可能性について検討した結果について述べる。

## 第2章 Bifemelane結合部位と情報伝達系

本章では、モルモット海馬の苔状線維シナプトソームを調製し、bifemelaneが海馬苔状線維に直接作用しているのか否かについて検討した。

### II-2-1. 実験方法

#### II-2-1-1 海馬苔状線維シナプトソームの調製

II-1-1に詳述した方法で調製した。

#### II-2-1-2 [<sup>3</sup>H]Bifemelane結合実験

II-2-1-1で調製したシナプトソームに50mM Tris-HCl緩衝液(buffer G)を加えて十分に攪拌し、20分間、15,000xgで遠心した。沈渣にbuffer Gを加えて再び20分間、15,000xgで遠心した。最終的に得られた沈渣にbuffer Cを加えて(蛋白質濃度は150-500 $\mu$ g/ml)シナプス膜標本として使用した。 [<sup>3</sup>H]bifemelane結合実験はI-1-1-2に詳述した方法で行った。

#### II-2-1-3 IP<sub>3</sub>およびcAMP含量の測定

II-2-1-1で調製したシナプトソームをKrebs bicarbonate溶液に懸濁し、このうち450 $\mu$ lずつを反応チューブに入れ、37°Cで10分間インキュベーションした。次いで50 $\mu$ lの容量でbifemelane(最終濃度で10nM-100 $\mu$ M)を直接反応チューブに添加し、さらに37°Cで10分間インキュベーションした。対照は、溶媒のみを添加して同じ時間だけインキュベーションした。薬物処置後、200 $\mu$ lの20%過塩素酸を加えて反応を停止した。15分間氷上に放置したのち、I-2-1-3に詳述した方法にしたがってIP<sub>3</sub>およびcAMPを抽出し、Amershamのアッセイシステムを用いてそれぞれ定量した。

#### II-2-1-4 [<sup>3</sup>H]PDBu結合実験

II-2-1-1で調製したシナプトソームをKrebs bicarbonate溶液に懸濁し、これを反応チューブに450 $\mu$ lずつ分取し、35°Cで10分間インキュベーションした。

次いで50  $\mu$ lの容量でbifemelane (1  $\mu$ M) を反応チューブに直接添加し35°Cで10分間処置した。対照として溶媒のみを添加し同じ時間だけインキュベーションした。I-1-1-4に述べた $^3\text{H}$ PDBu結合実験によりPKC量を定量した。薬物処置後のシナプトソームに氷冷 $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs bicarbonate溶液 (CaCl<sub>2</sub>を除き、2mM EGTAを添加) を加え反応を停止した。薬物を洗い流すためにシナプトソームを10,000xgで3分間遠心し、シナプトソームを回収した。シナプトソームは50 mM トリス塩酸緩衝液 (0.5mM EGTAおよび1  $\mu$ g/ml leupeptinを含む) 2.0 mlを加えてホモジナイズした。さらに、細胞膜画分と細胞質画分を分離するために60分間、100,000xgで遠心した。 $^3\text{H}$ PDBu結合実験はこれらの粗分画サンプルを用いて行った。特異的結合は4  $\mu$ M PDBuの存在下および非存在下における4 nM  $^3\text{H}$ PDBu結合量の差とした。

#### II-2-1-5 統計処理

結果はStudent's t-testにより解析し、危険率(p)が5%未満のとき統計学的に有意差ありと判定した。

#### II-2-2. 実験成績

##### II-2-2-1 Bifemelane結合部位の存在

P3およびP2画分シナプトソームより調製した膜画分において、それぞれ、92.7  $\pm$  7.2 (n=3) および86.4  $\pm$  36.7 fmol/mg protein (n=3) の $^3\text{H}$ bifemelaneの特異的結合が認められた。

##### II-2-2-2 セカンドメッセンジャー含量に及ぼす影響

Bifemelane (10 nM-100  $\mu$ M) により、P3画分シナプトソームにおいてIP<sub>3</sub>含量は濃度依存的に増加した。しかし、P2画分シナプトソームでは変化しなかった(図2-2)。

cAMP含量については、P3およびP2画分シナプトソームのいずれにおいても、bifemelane (10nM-100  $\mu$ M) によって影響を受けなかった(図2-3)。

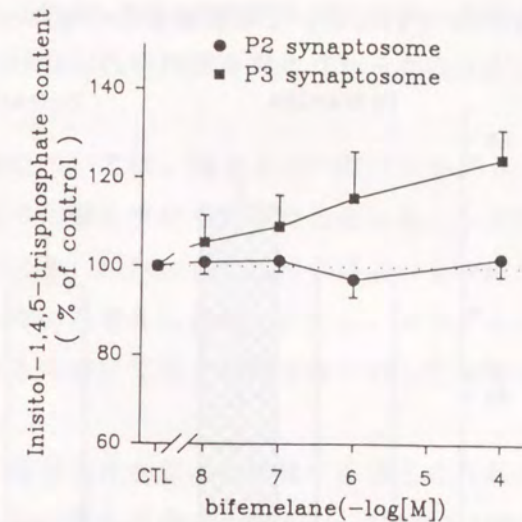


図2-2 P3およびP2画分におけるIP<sub>3</sub>含量に及ぼすbifemelaneの影響 (n=6)

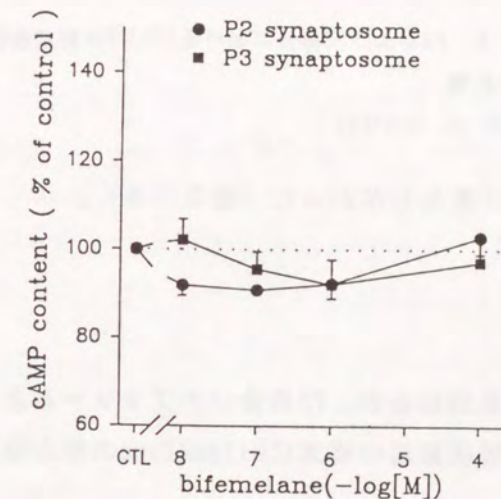


図2-3 P3およびP2画分におけるcAMP含量に及ぼすbifemelaneの影響 (n=7)

##### II-2-2-3 $^3\text{H}$ PDBu結合活性の細胞下分布に及ぼすbifemelaneの影響

Bifemelane (1  $\mu$ M) により、総 $^3\text{H}$ PDBu結合活性(細胞質+細胞膜画分)は、P3画分(control:8.5  $\pm$  0.6 pmol/mg protein; n=11、bifemelane:8.4  $\pm$  0.9 pmol/mg protein; n=8) およびP2画分シナプトソーム(control 7.9  $\pm$  0.8; n=5: bife-

melane  $7.8 \pm 1.0$ ;  $n=5$ ) のいずれにおいても影響を受けなかった。P3画分シナプトソームにおいては、bifemelane ( $1 \mu\text{M}$ ) により膜画分の [ $^3\text{H}$ ]PDBu 結合活性の割合が有意に増加した (図 2-4)。これに対しP2画分シナプトソームでは、膜画分における [ $^3\text{H}$ ]PDBu 結合活性は変化しなかった (図 2-4)。

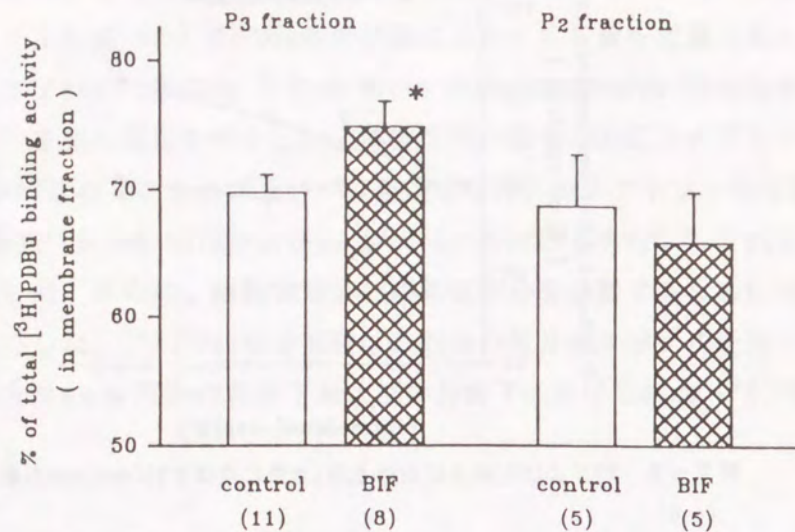


図 2-4 P3およびP2画分における [ $^3\text{H}$ ]PDBu 結合活性の細胞下分布に及ぼす影響  
\* $p < 0.05$  vs. control

### II-2-3. 考察

[ $^3\text{H}$ ]bifemelaneの特異的結合が、P3画分シナプトソームより調製した膜画分に認められたことから、苔状線維の終末にbifemelaneの結合部位が存在することが示唆される。

BifemelaneによるIP<sub>3</sub>含量変化とPKCの膜画分への移行(活性化)はP3画分シナプトソームのみで認められたことから、bifemelane結合部位と情報伝達系との連関は、苔状線維と苔状線維以外の神経終末では異なることが示唆される。一方、 [ $^3\text{H}$ ]bifemelane結合実験をimipramine存在下に行っていないので断言はできないが、P2画分における膜画分の [ $^3\text{H}$ ]bifemelane 結合部位は、imipramine感受性成分(つまり低親和性結合)の割合が、P3画分に比べ多いため、両シナプトソーム画分から調製した膜画分における [ $^3\text{H}$ ]bifemelane結合部位数に差が認められ

なかったことも考えられる。IP<sub>3</sub>含量変化が小さかった理由は、第I編第2章でも述べたがIP<sub>3</sub>定量の際にIP<sub>3</sub>の代謝を抑えなかったことが主な原因ではないかと推測される。

さらに、cAMP含量については、P3およびP2画分シナプトソームのどちらにおいてもbifemelaneにより影響を受けなかったことから、シナプトソームに対して他に刺激が加わらないとき、bifemelaneはアデニレートシクラーゼ系に対しては明らかな影響を及ぼさないと考えられる。しかし、シナプトソームに外から他の刺激が加えられた条件下においては、cAMP含量に対して影響を及ぼす可能性は否定できない。

以上の結果から、海馬切片を用いた実験から得られたCA3領域がbifemelaneの作用部位であるとの結果を考慮に入れると、bifemelaneの苔状線維終末部への作用が、bifemelaneの作用部位として重要であることが示唆された。

### 第3章 苔状線維終末からのグルタミン酸遊離に対する bifemelane の促進作用

苔状線維中の興奮性神経伝達物質としてはグルタミン酸が有力な候補となっている [18]。一方、PKCの活性化が神経伝達物質の遊離調節に重要な役割を果たしていることが知られている [21, 54, 55]。本編第1章においてモルモット海馬から作製したP3画分に苔状線維の終末が豊富に存在することが明らかになった。そこで本章では、このP3画分を用いて苔状線維終末からのグルタミン酸遊離に及ぼすbifemelaneの影響とその遊離調節メカニズムにおけるPKCの関与について検討した。

#### II-3-1. 実験方法

##### II-3-1-1 灌流実験

実験には雄性Hartley系モルモット(体重250-300 g)を使用した。海馬P3画分およびP2画分シナプトソームはII-1-1-1に詳述した方法で調製した。グルタミン酸の遊離に及ぼすbifemelaneの影響を調べるため、以下に述べるようなシナプトソームのインビトロ灌流実験を行った。図2-5のように、灌流カラム(0.5 ml)にあらかじめ綿、GF/BフィルターおよびSephadex G-10ゲル(0.2 ml)をつめておき、約1 mgのP3あるいはP2画分シナプトソームを入れた。シナプトソームを30℃、0.5 ml/minの流速、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>で飽和したKrebs bicarbonate

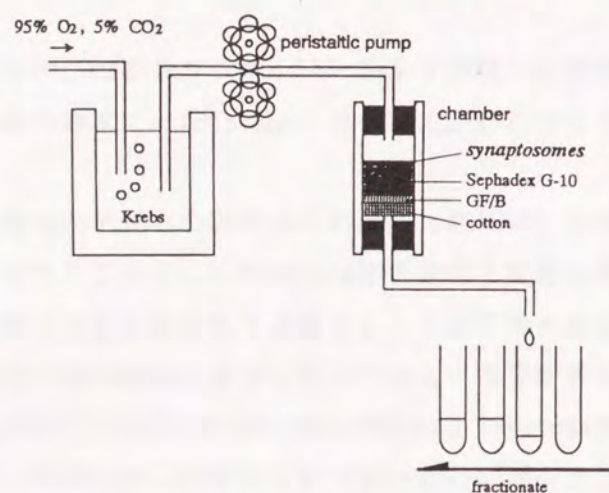


図2-5 灌流実験装置の模式図

溶液で灌流した。14分間の前灌流後、4分間隔で灌流液(各2ml)を回収した。シナプトソームを脱分極刺激する目的で、灌流液中のNaClを当モルのKClで置換して、外液のカリウム濃度を5mMから30 mMに増加させた。高カリウム刺激(脱分極刺激)は、灌流開始8分後(S1)と32分後(S2)の2回、それぞれ2分間行った。薬物投与は2回目の高カリウム刺激の8分前より灌流実験の終了まで灌流溶液に添加して行った。カルシウム非依存性のグルタミン酸遊離量を測定する場合には、灌流溶液中のCaCl<sub>2</sub>(2mM)を除き、当モルのEGTA(2mM)と置換した。内在性グルタミン酸遊離への薬物の効果は、一部の実験を除き、以下に述べる2パルス法により調べた。薬物の存在するときと存在しない時の高カリウム誘発グルタミン酸遊離量のS2/S1比により評価した。ここでS2/S1比は次のようにして計算した。 $(T2 - B2) / (T1 - B1) = S2 / S1$  なお、T1およびT2は、それぞれS1およびS2におけるグルタミン酸の全遊離量を示し、B1およびB2は、それぞれS1およびS2の直前2フラクションの平均のグルタミン酸遊離量(基礎遊離量)を示す。回収した灌流液は、90℃で15分間煮沸処理した後、グルタミン酸の定量操作まで-20℃で保存した。

##### II-3-1-2 グルタミン酸の定量

II-1-1-5に詳述した方法に従って定量した。なお、グルタミン酸の回収率について補正は行わなかった。

##### II-3-1-3 統計処理

結果はANOVAおよびmodified Student's t-test (Bonferroni法)で多重比較を行った。危険率(p)が5%未満のとき統計学的に有意差ありと判定した。

#### II-3-2. 実験成績

##### II-3-2-1 P3およびP2画分シナプトソームからのグルタミン酸の遊離

P3画分シナプトソームからの基礎遊離量および高カリウム誘発グルタミン酸遊離量の変化を図2-6 Aに示す。前灌流14分直後、グルタミン酸のP3およびP2画分シナプトソームからの基礎遊離量は、それぞれ  $0.597 \pm 0.045$  (n=10) および



0.341 ± 0.059 nmol·mg protein<sup>-1</sup>·fraction<sup>-1</sup> (n=10)であった。P3およびP2画分シナプトソームからのS1(2分間)における、高カリウム誘発グルタミン酸遊離量は、それぞれ0.689 ± 0.085 (n=10) および 0.609 ± 0.085 nmol·mg protein<sup>-1</sup>·fraction<sup>-1</sup> (n=10)であった。

両画分からの高カリウム誘発グルタミン酸遊離量には有意な差はなかったが、基礎遊離量については、P3画分のほうがP2画分シナプトソームよりも有意に高かった。

### II-3-2-2 Bifemelaneの高カリウム誘発グルタミン酸遊離量に及ぼす影響

図2-6Bに示すように、bifemelane (1 μM) はP3画分シナプトソームからのグルタミン酸の基礎遊離量には影響せずに、高カリウム誘発グルタミン酸遊離量を53%増加させた。また、その効果は0.01-1 μMの濃度範囲で用量依存的であった(図2-7)。しかし、P2画分シナプトソームからのグルタミン酸に対して

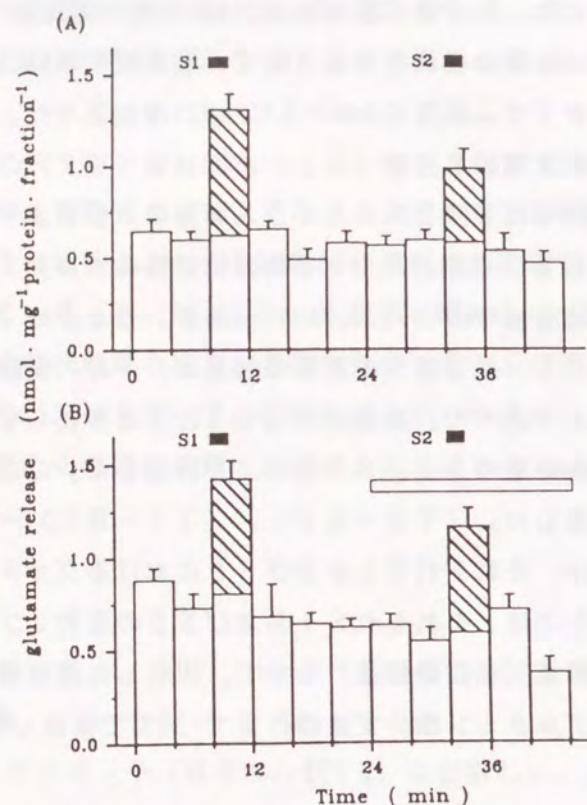


図2-6 P3画分シナプトソームからのグルタミン酸遊離に対する高カリウム刺激とbifemelaneの作用 (A)対照、(B) bifemelane (1 μM)。白カラムは bifemelaneを作用させた時間を示す。S1およびS2の黒カラムは外液カリウム濃度を5から30 mMに変えた時間(2分間)を示す。

1 μM bifemelaneは基礎遊離量および高カリウム誘発遊離量のいずれに対しても有意な効果を示さなかった(図2-7)。

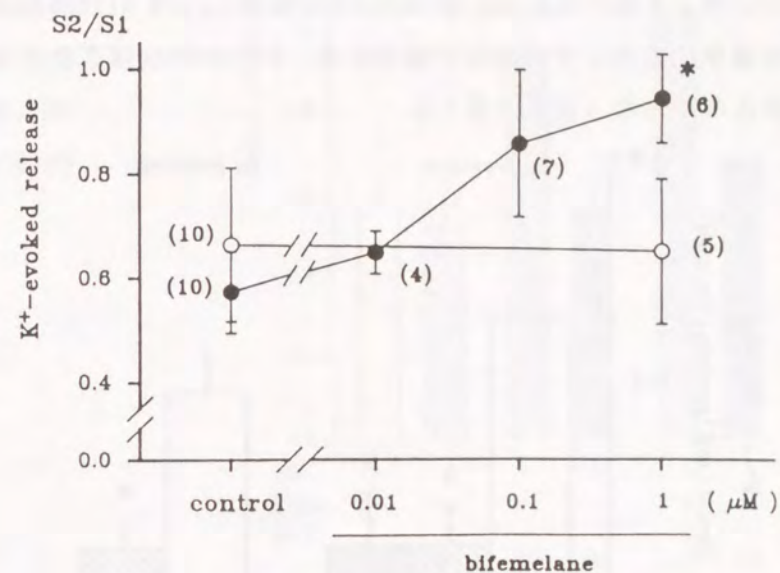


図2-7 P3およびP2画分シナプトソームからの高カリウム誘発グルタミン酸遊離に及ぼすbifemelaneの影響 括弧内は例数。\*p<0.05 vs. control

### II-2-2-3 P3およびP2画分シナプトソームからのグルタミン酸遊離のカルシウム依存性と、bifemelaneのカルシウム非依存性遊離に及ぼす影響

図2-8に、外液中にカルシウムが存在するときと存在しないときのP3およびP2画分シナプトソームからの高カリウム誘発グルタミン酸遊離量と、P3画分シナプトソームからのカルシウム非依存性のグルタミン酸遊離に及ぼすbifemelaneの影響について検討した結果を示した。本実験の場合、カルシウムが灌流外液中にない場合に、S1における高カリウム誘発グルタミン酸遊離は認められなかったため、S2における高カリウム誘発グルタミン酸遊離量として示した。P3およびP2画分シナプトソームからの高カリウム誘発グルタミン酸遊離量は、外液中にカルシウムが存在するときに比べ、存在しないときには有意に減少した。しかし、外液よりカルシウムを除いても基礎遊離量には変化がなかった。P3画分シナプトソームからのグルタミン酸遊離量の80%がカルシウム依存性であり、P2画分シナ

プトソームの場合は、70%がカルシウム依存性の遊離であった。Bifemelaneのグルタミン酸遊離増大作用に対する外液カルシウムの影響を調べるため、S2の8分前からカルシウムを除いたKrebs bicarbonate溶液に $1\mu\text{M}$  bifemelaneを添加して調べた。外液中にカルシウムがない場合には、bifemelaneはグルタミン酸遊離増大作用を示さなかった(図2-8)。

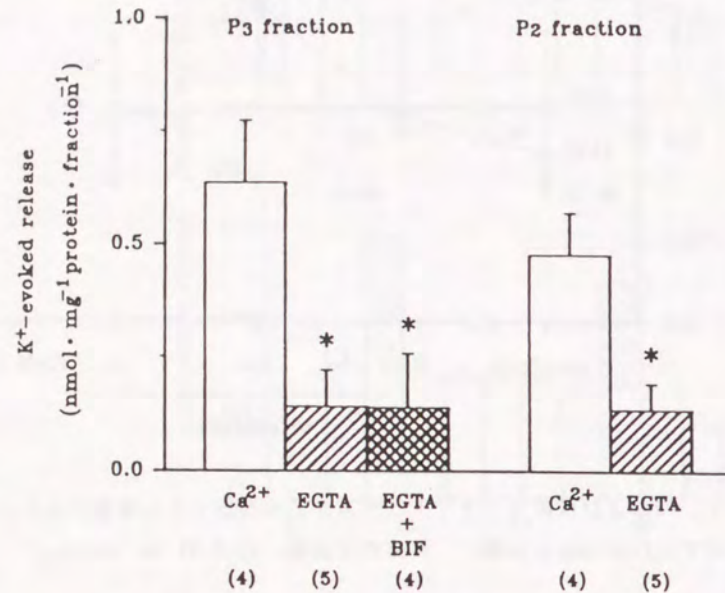


図2-8 グルタミン酸遊離の外液カルシウム依存性とカルシウム非依存性グルタミン酸遊離に及ぼすbifemelaneの作用  
縦軸は、S2におけるグルタミン酸遊離を示す。\* $p < 0.05$  vs. カルシウム存在下

II-3-2-4 Bifemelaneのグルタミン酸遊離増大作用におけるPKCの関与  
Bifemelaneによるグルタミン酸の遊離増大効果へのPKCの関与を調べるために、非特異的なタンパク質のリン酸化酵素阻害薬のH-7 [32, 33]の効果を検討した。H-7 ( $100\mu\text{M}$ )は、それ自体はP3画分シナプトソームからの高カリウム誘発グルタミン酸遊離量に対しては影響しなかった。しかし、P3画分シナプトソームからのbifemelaneによる高カリウム誘発グルタミン酸遊離量増大効果を有意に抑制した(図2-9)。PKC活性化薬のPDBuを用いて、H-7の濃度がPKCの活性の抑制に対して十分の濃度であったかを検討した。PDBu ( $1\mu\text{M}$ )は有意に高カリウム誘発グルタミン酸遊離を増大したが、基礎遊離量に 대해서는影響しな

かった。H-7 ( $100\mu\text{M}$ )は、このPDBuのグルタミン酸遊離増大作用を有意に抑制した( $p < 0.05$ )。

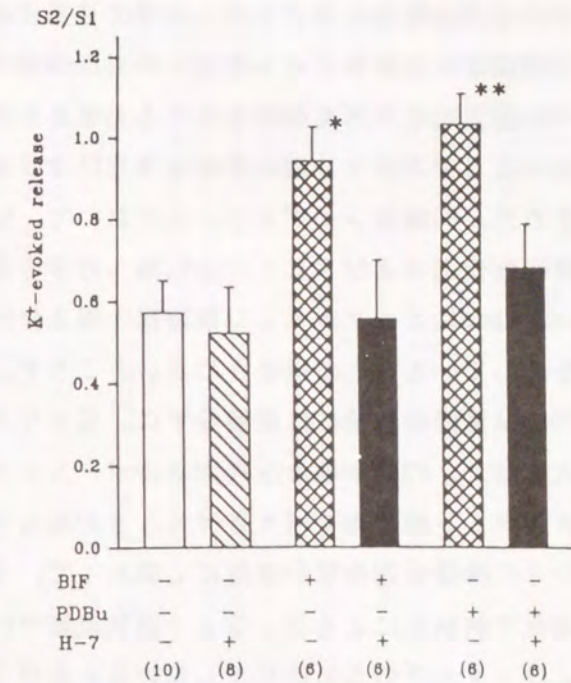


図2-9 BifemelaneおよびPDBuによるグルタミン酸遊離促進作用に及ぼすH-7の抑制効果  
\* $p < 0.05$  vs. 対照あるいはBif+H-7  
\*\* $p < 0.05$  vs. 対照あるいはPDBu+H-7

### II-3-3. 考察

Bifemelaneは、P3画分シナプトソームからのグルタミン酸の基礎遊離量には影響せず、高カリウム誘発グルタミン酸遊離量を、比較的低濃度 ( $0.01-1\mu\text{M}$ )で増大した。一方、P2画分シナプトソームからのグルタミン酸の基礎遊離量および高カリウム誘発遊離量に対しては影響しなかった。さらに、P3画分シナプトソームからのbifemelaneによるグルタミン酸遊離量増大効果発現には、外液にカルシウムが必要であった。したがって、bifemelaneは、直接的かつ選択的に苔状線維に作用し、脱分極性のグルタミン酸遊離量を増大させたと考えられる。Bifemelaneは海馬P3画分シナプトソームにおいて、PKCを細胞質から細胞膜へと移

行させた。しかし、P2画分シナプトソームではPKCの細胞下分布を変化させなかった。第I編における海馬CA3領域へのbifemelaneの選択的な作用は、苔状線維終末部への選択的な作用を反映していると考えられる。

Bifemelaneによるグルタミン酸の遊離増大作用はPKC阻害作用を有するH-7により抑制された。P3画分シナプトソームにおいて、bifemelaneはイノシトールリン脂質代謝回転促進およびPKCの細胞膜への移行を引き起こしたことを考慮すると、bifemelaneによるグルタミン酸遊離の増大作用の少なくとも一部はPKCの活性化を介していることが推察される。ところで、活性型のホルボールエステルであるPDBuは基礎遊離量には影響せず、高カリウム誘発性のグルタミン酸遊離量を増大させた。PDBuや他の活性型ホルボールエステルは、ラット苔状線維終末からのグルタミン酸遊離を増大させることが報告されている[79]。PKCは苔状線維からの神経伝達物質の遊離にも関わっている可能性が示唆される。一方、免疫組織化学的研究によると、ラット苔状線維中には、PKCサブタイプのうち $\beta$  IIおよび $\gamma$ タイプのもは存在しないことが明らかにされ[46]、さらにin situ ハイブリダイゼーション法により、 $\alpha$ タイプPKCのmRNAは歯状回顆粒細胞中になくことが報告されるなど[38]、苔状線維中にPKCを含まない可能性が指摘されている。しかし、Terrianらは、ウエスタンブロット法により $\alpha$ 、 $\beta$  および $\gamma$  タイプPKCのいずれもラット苔状線維中に存在することを示した[79]。このように、海馬苔状線維中に含まれるPKCサブタイプについての報告には不一致点が見られる。さらに、モルモット海馬に関しては、PKCおよびそのサブタイプの分布についての報告はなされていないため、どのサブタイプのPKCが苔状線維中に存在するのか不明である。この点も含め、bifemelaneによるグルタミン酸遊離増大作用に関わるPKCサブタイプを明らかにすることは、神経伝達物質の遊離調節メカニズムのさらなる解明に重要と考えられる。

海馬苔状線維からのグルタミン酸遊離は、いくつかの神経伝達物質により、促進的、あるいは抑制的に調節されていることが示唆されている[27、28、29]。苔状線維終末部にもbifemelane結合部位が存在することから、第I編・第1章にも述べた通り、その結合部位の性質については不明な点もあるが、bifemelaneがこれらの神経伝達物質の受容体に結合することにより、グルタミン酸の遊離を調節している可能性も考えられる。

近年、苔状線維-CA3系のLTPは、主としてシナプス前性に起こることが、パッチクランプ法により示されている[42]。Bifemelaneが苔状線維-CA3系のLTPを選択的に増大することは、この薬物がシナプス前膜性に作用して、グルタミン酸遊離の増大を起こすことが、少なくとも一部関与していると推論される。

## 第Ⅱ編小括

(1) モルモットより調製したP3画分シナプトソームは、苔状線維の性質を良く保持したまま調製されていた。

(2) 苔状線維シナプトソーム(P3)を使用することにより、苔状線維終末には $[^3\text{H}]$ bifemelaneの結合部位が存在し、イノシトールリン脂質代謝回転促進ならびにPKCの活性化作用も観察されたので、苔状線維終末部に作用している可能性が確かめられた。一方、苔状線維以外の神経終末部(P2)ではbifemelaneの作用は明確でなかった。

(3) Bifemelaneは、苔状線維シナプトソームからの高カリウム刺激によるグルタミン酸遊離を促進するが、この作用にはイノシトールリン脂質代謝系促進、PKC活性化が深く関わっている可能性が示唆された。

以上の結果より、モルモット海馬苔状線維終末部にbifemelaneが直接作用して、高カリウム刺激によるグルタミン酸遊離を促進していることが明らかとなった。この作用の少なくとも一部にイノシトールリン脂質代謝系-PKC細胞内情報伝達系が深く関わっていることが推察された。

## 総括および結論

著者は脳機能改善薬とくにbifemelaneの海馬における神経化学的作用機序に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

モルモット海馬のシナプス膜標本には、 $[^3\text{H}]$ bifemelaneに対する特異的結合部位が認められ、その結合部位の密度はCA3で高い。 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合部位には高親和性と低親和性の少なくとも2種類の存在が推定されたが、imipramineの存在下では高親和性の結合のみが観察された。低親和性結合部位の少なくとも一部はモノアミン取り込み部位を標識していると考えられる。 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合はbifemelaneにより抑制されたが、vinpocetine、indeloxazine、idebenone、piracetam およびCa hopantenateでは抑制されなかったので、この部位が脳機能改善薬の共通の作用部位ではないことが示唆される。

Bifemelaneは、CA3領域においてPLCとPKCの活性化を引き起こした。一方、CA1領域においてはPLCおよびPKCの活性に対してbifemelaneは影響を及ぼさなかった。

モルモット海馬P3画分シナプトソーム(主として苔状線維終末部を含む)にbifemelaneの結合部位が存在する。P3画分シナプトソームにおいて、bifemelaneはPLCとPKCの活性化作用を示した。P2画分シナプトソームにおけるPLCとPKCの活性に対しては、bifemelaneは影響を及ぼさなかった。したがって、苔状線維がbifemelaneの作用部位として重要であることが示唆される。

モルモット海馬P3画分シナプトソームからの高カリウム誘発性のグルタミン酸遊離をbifemelaneは濃度依存的に増大させたが、P2画分からのグルタミン酸の遊離量に対しては、bifemelaneは影響を及ぼさなかった。P3画分からのbifemelaneの高カリウム誘発グルタミン酸遊離量の増大作用がキナーゼ阻害薬H-7により抑制されたことから、遊離調節にはPKCが関わっていることが示唆される。

以上の諸成績より、脳機能改善薬bifemelaneが海馬苔状線維終末部の特異的な結合部位に直接作用し、少なくとも一部PKCの活性化を介して、神経伝達物質の候補であるグルタミン酸の遊離を増加させることにより苔状線維-C A 3系のLTPをシナプス前性に増大させている可能性が強く示唆される。苔状線維-C A 3系のLTPが脳機能改善薬の感受性が高いこと、苔状線維の支配領域の広さと学習能力の間には高い相関性が認められることから、苔状線維の機能強化が、記憶・学習能力の向上につながる事が考えられる。したがって、苔状線維終末部に対する薬物の作用を神経化学的に解析した本研究の成果は、薬物の作用点として、苔状線維に選択性を持たせることにより、新しい優れた脳機能改善薬の開発につながる可能性を示すものと考えられる。

## 謝辞

終わりに臨み、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学薬学部 佐藤公道教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するに当たり直接御指導を賜りました現富山医科薬科大学和漢薬研究所 倉石 泰教授に心より感謝いたします。

また、生化学実験に関して貴重な御助言を賜りました京都大学薬学部 金子周司助教授、現横浜市立大学医学部 植田弘師助教授に深く感謝します。

さらに、電子顕微鏡観察用試料調製ならびに写真撮影に御協力いただいた田辺製薬(株)安全性研究所 山村高章氏に深く感謝いたします。

本研究に御協力いただいた、京都大学薬学部 上田睦明修士、日本チバガイギー(株)国際科学研究所 岡田敏一博士並びに京都大学薬学部薬理学教室の教員の方々に感謝します。

## 発表論文目録

本研究の内容の大部分は以下の論文に公表した。

- 1) Fujii T., Kuraishi Y., Okada T. and Satoh M. Bifemelane induces translocation of protein kinase C in the CA3, but not CA1, region of guinea-pig hippocampus, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 68, 413-418 (1990)
- 2) Fujii T., Kuraishi Y., Ueda M. and Satoh M., Specific binding sites of bifemelane in the guinea-pig hippocampus, relevant to its pharmacological actions, Neuropharmacology, 30, 1291-1295 (1991)
- 3) Ueda M., Fujii T., Kuraishi Y. and Satoh M., Bifemelane enhances high K<sup>+</sup>-evoked release of glutamate from guinea-pig hippocampal synaptosomes, European Journal of Pharmacology, 219, 271-277 (1992)

## 引用文献

- (1) Ashton, D. and Werbrouck, L. (1991) Brain Res. 541: 167-170.
- (2) Akers, R. F., Lovinger, D. M., Colley, P. A., Linden, D. J. and Rottenberg, A. (1986) Science (Washington DC), 231: 587-589.
- (3) Amaral, D. G. and Dent, J. A. (1981) J. Comp. Neurol. 195: 51-86.
- (4) Alger, B. E. and Teyler, T. J. (1976) Brain Res. 110: 463-480.
- (5) Aronica, E., Frey, U., Wagner, M., Schroeder, H., Krug, M., Rutthrich, H., Catania, M. V., Nicoletti, F. and Reymann, K. G. (1991) J. Neurochem. 57: 376-383.
- (6) Bank, B., DeWeer, A., Kuzirian, A. M., Rasmussen, H. and Alkon, D. L. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 1988-1992.
- (7) Baraban, J., Snyder, S. H. and Alger, B. E. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 2538-2542.
- (8) Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1984) Nature 312: 315-321.
- (9) Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1989) Nature 341: 197-205.
- (10) Bliss, T. V. P. and Lomo, T. (1973) J. Physiol. (London), 232: 331-356.
- (11) Bliss, T. V. P. and Lynch, M. A. (1988) 'Long-term potentiation: From Biophysics to Behavior.' eds by Alan, R. 3-72.
- (12) Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254.
- (13) Brodal, A. (1981) The olfactory pathways, The amygdala, The hippocampus, The 'Limbic system', in: Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine, 3rd edn, eds. A. Brodal (Oxford, New York) p.640-697.
- (14) Chetkovich, D. M., Gary, R., Johnston, D. and Sweatt, J. D. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 6467-6471.
- (15) Claiborne, B. J., Amaral, D. G. and Cowan, W. M. (1986) J. Comp. Neurol. 246:435-458.
- (16) Cole, G., Dobkins, K. R., Hansen, L. A., Terry, R. D. and Saitoh, T.

- (1988) *Bran Res.* 452: 165-174.
- (17) Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., Francke, U. and Ullrich, A. (1986) *Science (Washington DC)*, 233: 859-866.
- (18) Crawford, I. L. and Connor, J. D. (1973) *Nature* 244: 442-443.
- (19) Crousio, W. E. and Schwegler, H. (1987) *Behav. Brain Res.* 26: 153-158.
- (20) Dekker, L. V., De Graan, P. N. E., Versteeg, D. H. G., Oestreicher, A. B. and Gispen, W. H. (1989) *J. Neurochem.* 52: 24-30.
- (21) Diaz-Guerra, M. J. M., Sanchez-Prieto, J., Bosca, L., Pocock, J., Barrie, A. and Nicholls, D. (1988) *Biochem. Biophys. Acta.* 970: 157-165.
- (22) Eccles, J.C. (1983) *Neurosci.* 10: 1071-1081.
- (23) 江頭 亨、永井敬之、金馬義平、高野律子、小畑俊男、山中康光 (1989) *日薬理誌* 93: 295-304.
- (24) 江川 三生、井口 富夫、飯田 成字、戸部 昭広 (1983) *日薬理誌* 82: 351-360.
- (25) Frederickson, C. J. and Danscher, G. (1990) *Prog. Brain Res.* 83: 71-84.
- (26) Gannon, R. L., Baty, L. T. and Terrian, D. M. (1989) *Brain Res.* 495: 151-155.
- (27) Gannon, R. L. and Terrian, D. M. (1991a) *Brain Res.* 548: 242-247.
- (28) Gannon, R. L. and Terrian, D. M. (1991b) *Neurosci.* 41: 401-410.
- (29) Graham, L. T. Jr. and Aprison, M. H. (1966) *Anal. Biochem.* 15: 487-497.
- (30) Gustafsson, B., Huang, Y. -Y. and Wigstrom, H. (1988) *Neurosci. Lett.* 85: 77-81.
- (31) Harris, E. W. and Cotman, C. W. (1986) *Neurosci. Lett.* 70: 132-137.
- (32) Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y. (1984) *Biochemistry* 23: 5036-5041.
- (33) Hidaka, H. and Hagiwara, M. (1987) *Trens. in Pharamac. Sci.* 8: 162-

- 164.
- (34) Hopkins, W.F. and Johnston, D. (1988) *J. Neurophysiol.* 59: 667-687.
- (35) Huang, K. -P., Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 8535-8539.
- (36) Ishihara, K., Katsuki, H., Sugimura, M. and Satoh, M. (1989) *Neuropharmacology* 28: 569-573.
- (37) Ishihara, K., Katsuki, H., Sugimura, M., Kaneko, S. and Satoh, M. (1990) *Neuropharmacology* 29: 487-492.
- (38) Ito, A., Saito, N., Hirata, M., Kose, A., Tsujino, T., Yoshihara, C., Ogita, K., Kishimoto, A., Nishizuka, Y. and Tanaka, C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 3195-3199.
- (39) Jaken, S. and Kiley, S.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 4418-4422.
- (40) Kaneko, S., Takahashi, H. and Satoh, M. (1990) *Eur. J. Pharmacol.* 189: 51-58.
- (41) Kaneko, S., Sugimura, M., Inoue, T. and Satoh, M. (1991) *Eur. J. Pharmacol.* 207: 119-128.
- (42) Katsuki, H., Kaneko, S., Tajima, A. and Satoh, M. (1991) *Neurosci. Res.* 12: 393-402.
- (43) Katsuki, H., Kaneko, S. and Satoh, M. (1992) *Brain Res.* 581: 108-114.
- (44) Kikkawa, U., Ono, Y., Ogita, K., Fujii, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Kosaka, Y., Igarashi, K. and Nishizuka, Y. (1987) *FEBS Lett.* 217: 227-231.
- (45) Knopf, J. L., Lee, M. -H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M. and Bell, R. M. (1986) *Cell* 46: 491-502.
- (46) Kose, A., Ito, A., Saito, A. and Tanaka, C. (1990) *Brain Res.* 518: 209-217.
- (47) Kraft, A.S. and Anderson, W.B. (1983) *Nature (London)* 301: 621-623.
- (48) Kuo, J. F., Andersson, R. G. G., Wise, B. C., Mackerlova, L., Salo-

- monsson, I., Brackett, N. L., Katoh, N., Shoji, M. and Wrenn, R. W. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77: 7039-7043.
- (49) Linden, D. J., Sheu, F.-S., Murakami, K. and Routtenberg, A. (1987) J. Neurosci. 7: 3783-3792.
- (50) Linden, D. J. and Routtenberg, A. (1989) Brain Res. Rev. 14: 279-296.
- (51) Lovinger, D. M., and Routtenberg, A. (1988) J. Physiol. (London) 400: 321-333.
- (52) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- (53) Lunt, G. G. (1987) "Neurochemistry: a Practical Approach" eds. by Turner, A. J. and Bachelard
- (54) Malenka, R. C., Madison, D. V. and Nicoll, R. A. (1986) Nature (London) 321: 175-177.
- (55) Malenka, R. C., Ayoub, G. S. and Nicoll, R. A. (1987) Brain Res. 403: 198-203.
- (56) Matsuoka, N., Kaneko, S. and Satoh, M. (1991) Neurosci. Lett. 129: 177-180.
- (57) McGinty, J. F., Henriksen, S. J., Goldstein, A., Terenius, L. and Bloom, F. E. (1982) Life Sci. 31: 1797-1800.
- (58) McGinty, J. F., Henriksen, S. J., Goldstein, A., Terenius, L. and Bloom, F. E. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 589-593.
- (59) McLean, S., Rothman, R. B., Jacobson, A. E., Rice, K. C. and Herkenham, M. (1987) J. Comp. Neurol. 255: 497-510.
- (60) Nakashima, S., Sukanuma, A., Matsuki, A. and Nozawa, Y. (1990) Biochem. J. 272: 71-77.
- (61) Nichols, R. A., Haycock, J. W., Wang, J. K. T. and Greengard, P. (1987) J. Neurochem. 48: 615-621.
- (62) Nishizuka, Y. (1984) Science (Washington DC) 225: 1365-1370.
- (63) Nishizuka, Y. (1986) Science (Washington DC) 233: 305-312.

- (64) Nishizuka, Y. (1988) Nature (London) 334: 661-665.
- (65) Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokokura, H., Sakoh, T. and Hidaka, H. (1987) Nature (London) 325: 161-166.
- (66) Ono, Y., Kurokawa, T., Fujii, T., Kawahara, K., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K. and Nishizuka, Y. (1986) FEBS Lett. 206: 347-352.
- (67) Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Fujii, T., Kurokawa, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K. and Nishizuka, Y. (1987) Science (Washington DC) 236: 1116-1120.
- (68) Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D. and Ullrich, A. (1986) Science (Washington DC) 233: 853-859.
- (69) Ross, C. A., MacCumber, M. W., Glatt, C. E. and Snyder, S. H. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 2923-2927.
- (70) Routtenberg, A., Colley, P., Linden, D. J., Lovinger, D. M. and Murakami, K. (1986) Brain Res. 378: 374-378.
- (71) Saito, K., Honda, S., Tobe, A. and Yanagiya, I. (1985a) Jpn. J. Pharmacol. 38: 375-380.
- (72) Saito, K., Honda, S., Egawa, M. and Tobe, A. (1985b) Jpn. J. Pharmacol. 39: 410-414.
- (73) Satoh, M., Ishihara, K. and Katsuki, H. (1988) Neurosci. Lett. 93: 236-241.
- (74) Satoh, M., Ishihara, K., Katsuki, H. and Sugimura, M. (1989) Adv. Biosci. 75: 193-196.
- (75) Shearman, M. S., Naor, Z., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 147: 911-919.
- (76) Sugimura, M., Ishihara, K., Katsuki, H. and Satoh, M. (1989) J. Pharmacobio-Dyn. 12: 771-774.
- (77) Tanaka, Y., Miyake, R., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1986) J. Biochem. 99: 257-261.
- (78) Terrian, D. M., Johnston, D., Claiborne, B. J., Ansah-Yiadom, R.,



- Strittmatter, W. J. and Rea, M. A. (1988) Brain Res. Bull. 21: 343-351.
- (79) Terrian, D. M., Ways, D. K. and Gannon, R. L. (1991) Hippocampus 1: 303-314.
- (80) Tobe, A., Egawa, M. and Nagai, R. (1983) Jpn. J. Pharmacol. 33: 775-784.
- (81) Tobe, A., Yamaguchi, T., Nagai, R. and Egawa, M. (1985) Jpn. J. Pharmacol. 39: 153-161.
- (82) Wehner, J. M., Sleight, S. and Upchurch, M. (1990) Brain Res. 523: 181-187.
- (83) Worley, P. F., Baraban, J. M., De Souza, E. B. and Snyder, S. H. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 4053-4057.
- (84) Yamamoto, C. (1972) Exp. Brain Res. 14: 423-435.
- (85) Yamamoto, C. and Chujo, T. (1978) Exp. Neurol. 58: 242-250.
- (86) Yamamoto, C., Hagashima, M. Sawada, S. (1987) Neurosci. Res. 5: 28-38.
- (87) Yamamura, H. I. and Snyder, S. H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71: 1725-1729.
- (88) Zatz, M. (1986) Brain Res. 385: 174-178.
- (89) Zola-Morgan, S., Squire, L. R. and Amaral, D.G. (1986) J. Neurosci. 6: 2950-2957.