

## 課題 13

### 霊長類大脳皮質のモノクローナル抗体による研究

藤田 忍(群大・医)

本研究は霊長類において最も発達した大脳皮質の神経構築を分子構成の面より解析するために有用なモノクローナル抗体を収集することを目的としている。前年度はシナプスのマーカーとなりうる抗体などが得られ報告した。本年度は脳下垂体ホルモンおよび大脳酢酸抽出物を免疫原として用い、前年同様にハイブリドーマ実験を行い、抗体の検索を行った。

脳下垂体を免疫原とした実験からはサル脳下垂体前葉の細胞種を染め分ける多数の抗体(約30)が見い出され整理中であるが、内分泌学的研究に有用と予想される(抗体の提供可)。さらに後葉の繊維を染める抗体のうち、432 B 7, 427 A 11, 434 C 2については、ラット視床下部室傍核等における陽性ニューロンの分布およびイムノプロット解析等により、ニューロフィジンに特異的であると考えられた。

サル大脳より2N酢酸で抽出される成分を免疫原として用いた検索からは、大脳皮質の一部少数のニューロンの周囲を染める抗体473A12と376F1が発見された。両抗体に反応するニューロンの分布は、大脳皮質の部位あるいは下位神経核によって異なり、たとえばマウス赤核では473A12陽性ニューロンのみ、大脳内嗅領では逆に376F1陽性ニューロンのみが認められ、後頭葉では両抗体に陽性のニューロンが多数みられた。このようなニューロンサブタイプ特異的な分布を示す物質は、特異的神経構築に関与している可能性が考えられるので現在抗原分子を検索中である。

### サルの大脳皮質における口腔内触覚と味覚情報処理機構の解析

小川 尚(熊本大・医)・伊藤真一(熊本大・医)

前年度我々は、サルをチェアにつけて、口腔内に強制的に与えた味溶液を味わうだけの行動をさせた時の大脳皮質味覚野ニューロンの活動を記録した。その実験では、サルは一時間位しか実験者に協力的でなかったため、本年度はサルに味刺激弁別 go-no-go タスクを課して、もっと長時間ニューロン活動を記録すると共に、ニューロン活動の意味づけをはっきりさせることを目的に実験を行った。

ニホンザル2頭を用いた。水と食塩の弁別を行わせた。食塩水を与えたときにレバーを押し、水の時にはレバーを押さないという go-no-go タスクを開発した。食塩に対する応答が正しければショ糖(0.3モル)を報酬として与えた。また実験の後半では、食塩や水に対して間違った応答をしたときはキニーネ(0.001M)を罰として与えた。0.3モル食塩に対し80%以上の正答率を示した後、0.1モル、0.03モルの食塩に対しても学習させた。学習成立後、ケタラールとネプタールの麻酔下で、サルの左側側頭部の大脳皮質前頭弁蓋部を覆うようにエパーツ型チェンバーを装着した。

約1週間の回復期間の後、サルを毎日1~2時間チェアに座らせ、水と食塩の弁別学習を行わせた。手術前の正答率に回復したのち、大脳皮質ニューロン活動の細胞外記録を開始した。記録電極には、カシュー塗料で絶縁コートしたタングステン電極(20-50 MΩ)を用いた。また左側咬筋にテフロンコートの電極を2本刺入し、筋電図も記録した。ニューロンのスパイク放電、咬筋筋電図、溶液の種類に関する信号、レバー押しの信号等とサルの顔の表情を一緒にビデオテープに収めた。なお、食塩と水の投与の時間的順序はランダム化し、MSXマイクロコンピューターで制御した。

記録できたニューロンの大部分は、レバー押しの前後に放電数を増加した。このなかには、食塩の濃度の増加と共に放電数が増加するものや、逆

に応答の減少するもの、不変のもの等があった。また少数のニューロンは、水または食塩が与えられると放電数が減少し、各トライアルの後半に放電数の増加するものが見い出された。報酬や罰に特異的に応答するものも少数あった。

サルはキナーゼに対してはgapingなど特異的な表情を示したが、水、食塩、ショ糖に対しては明瞭な表情を示さなかった。これらの表情に対して咬筋活動は良い示標とは成り得なかった。

今後、四基本味を刺激として使うことの出来るようなマッチングテストを用いると共に、より多くの筋活動を記録し、舌の動きや吸啜の示標を記録する必要があると思われる。

#### サル大脳におけるプロテインキナーゼの機能と生理的役割

高橋 進(名大・理)

脳のはたらきを理解するうえで、その情報伝達の機構解析は必須のことである。最近、情報伝達に関する種々の蛋白質がリン酸化-脱リン酸化により調節されていることが明らかにされて来ている。この際リン酸化に関与する酵素は、プロテインキナーゼであるが、本酵素に焦点をあてた。多くの動物において脳内には特に $Ca^{2+}$ -依存性プロテインキナーゼ活性が高いことが知られている。我々は昨年度、サル大脳にA-キナーゼ、C-キナーゼおよびその生体内基質を同定した。リン酸化をうけるアミノ酸はいずれもセリン残基であった。

本年度もひきつづき、これらプロテインキナーゼおよび生体内基質の精製を試みた。

サル大脳の可溶性分画より、酸処理、DEAEセルローズ、セファローズ6B、等電点電気泳動などにより酵素を精製した。この精製された酵素標品の性質を他動物より得られたものとの比較検討を行った。その結果、主要な性質についてはほぼ類似していた。

一方、分子量80Kの生体内基質蛋白の精製を試みた。遠心分画による結果では、顆粒分画、上清

分画ともに存在し、おそらく膜結合性のものと推定されるが完全には同定できていない。キナーゼの役割を明らかにするためにこの基質の精製を現在、継続中である。

また、脳内には他の $Ca^{2+}$ -依存性プロテインキナーゼ(Ca-カルモジュリン-依存性)も同定でき現在精製をすすめている。

#### 霊長類神経組織における神経ペプチドの生成・分解系の解析

高橋健治, 丹治雅夫, 津幡卓一(東大・理)

霊長類の神経組織中における神経ペプチドの生成、分解の機構を究明する研究の一環として、ニホンザル脳および脊髄より、カルシウムイオン依存性中性プロテアーゼ(CANP)を分別、精製し、その性状、とくに神経ペプチドに対する作用特異性を比較検索した。精製過程では、フェニルセファロースを用いるアフィニティークロマトグラフィーを導入し、その有用性が示された。精製酵素は、いずれも分子量の約10万で、約7万と3万のサブユニットから構成され、いずれも活性発現にミリモルオーダーのカルシウムイオンを必要とした。種々の神経ペプチドに対する作用を調べたところダイノルフィン(1-13)、ニューロテンシン、 $\alpha$ -および $\beta$ -ネオエンドルフィン等によく作用し、とくにアルギニルアルギニン結合、アルギニルリシン結合など塩基性アミノ酸が隣接している結合や、チロシンのカルボキシル基側の結合をかなり特異的に切断することが判明した。一方、メチオニンエンケファリン、ロイシンエンケファリンにはほとんど作用しなかった。また、脳、脊髄酵素間では顕著な差異はみられなかった。今後、神経組織内在性のタンパク質やペプチドあるいはそれらの前駆体への作用特異性、また神経組織内における局在性の究明が重要となろう。とくに、局在性の検索にはサル脳が有用と考えられる。