

実験的脳虚血における細胞骨格蛋白質の 分解の意義に関する研究

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：菊池晴彦教授）

緒 方 伸 好

〔原稿受付：昭和63年10月28日〕

Degradation of cytoskeletal proteins in cerebral ischemia

NOBUYOSHI OGATA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HARUHIKO KIKUCHI)

Abstract

Degradation of neurofilament (NF) triplet proteins (Mw 200,000 (NF200), Mw 150,000 (NF150), Mw 68,000 (NF68)), high molecular weight microtubule-associated proteins (MAP1 and MAP2) and other cytoskeletal proteins in rat brain during ischemia was investigated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-gel electrophoresis and immunoblot methods using anti-NF200 monoclonal antibody. Selective degradation of NF200 and NF150 was observed during the initial 10 to 15 minutes of ischemia: and the degradation of MAP1 and MAP2 during the initial 15 to 30 minutes of ischemia. These degradations suggest that the activation of a protease occurs at the very early stage of cerebral ischemia, which are the earliest irreversible neuronal changes ever to be reported. Effect of ischemia on polymerization of microtubule proteins was also investigated by turbidity assay. A rapid decrease of the ability of polymerizing microtubules was observed during the initial 5 minutes of ischemia. This loss of polymerization ability was apparently independent of the degradation of MAP1 and MAP2.

はじめに

脳虚血とは脳を循環する血流が減少あるいは途絶し、代謝障害をおこした状態で、虚血の程度が強く、あるいは長く続くと神経細胞は機能障害をおこす。それが

さらに持続すると、やがて神経細胞は不可逆的な変化に陥り、もはや血流が回復しても神経機能は回復しない。脳神経外科領域に於て脳虚血は、脳血栓、脳塞栓、くも膜下出血後の脳血管れん縮、また手術中の一時的な血行の遮断の際にみられる重要な現象であり、その

Key words: Cerebral ischemia, Cytoskeletal Proteins, Neurofilament, Microtubule-associated proteins, Protease.

索引語：脳虚血，細胞骨格蛋白質，ニューロフィラメント，微小管結合蛋白質，プロテアーゼ。

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

研究の意義はあらためて強調する必要もないと思われる。しかしながら、虚血による脳神経組織の不可逆的な障害過程はいまだあきらかではない³⁰⁾。

脳が他の臓器にくらべて虚血に対する抵抗性が弱いということは、心停止後、心臓の拍動が再開し、他臓器の機能が回復しても、しばしば脳の機能はその間の虚血によりすでに不可逆的な変化に陥っており回復せず、いわゆる脳死状態となるという事実からもあきらかである。そのような完全な脳虚血では回復可能な時間は現在ではだいたい10分から15分以内と考えられている^{27,19,20)}。しかしながら病理組織学的にはそうした虚血早期では不可逆的な変化は証明されていない^{30,31)}。

脳虚血の不可逆的な変化の原因として現在最も注目されている現象は虚血中の細胞内への Ca^{2+} の流入である。その細胞内 Ca^{2+} の増加がもたらす二次的な変化の一つとして、細胞骨格を含む細胞内の蛋白質の分解をひきおこす可能性が示唆されている³⁰⁾。しかし、虚血により細胞骨格蛋白質が分解されたことを証明した報告はまだなされていない³⁰⁾。

神経細胞の細胞骨格は neurofilament (NF) と微小管と microfilament の3種類の線維構造を主体として構築されている³⁴⁾。NF は中間径 filament と総称される線維構造のうち神経細胞に特異的なものであり、分子量の異なる3種の蛋白質 subunit, NF200 (分子量約20万), NF150 (分子量約15万), NF68 (分子量約6.8万) からなる。

微小管蛋白質は主な構成成分である tubulin と微小管結合蛋白質(microtubule-associated proteins(MAPs)) よりなるが、MAPs のうち高分子量の MAP1, MAP2 は *in vitro* において微小管重合を促進する働きがあり³²⁾, protease により分解されやすいとされている²⁷⁾。また MAP2 は神経細胞に特異的であるとされ¹²⁾, MAP1 は一部、軸索輸送に関与していると推定されている²⁵⁾。

今回、上記の細胞骨格蛋白質の分解の有無、時間経過を SDS 電気泳動および immunoblot で解析し、併せて濁度検定法により微小管重合能でも測定し、その虚血における意義を考察した。

方 法

(1) 断頭による虚血の作成

体重 200-250 gm の Wistar 系雄性 rat (月齢3-4ヶ月) を用いた。diethylether にて麻酔後、断頭して虚血を作成した。頭部はその後 37°C に一定時間保ち、

その時間を虚血時間とした。

(2) 30分虚血後、24時間再灌流モデルの作成 (Pulsinelli の変法)^{6,26)}

体重 200-250 gm の Wistar 系雄性 rat (月齢3-4ヶ月) を pentobarbital (60 mg/kg) にて腹腔内麻酔し、気管切開後、小動物用人工呼吸器を用いて調節呼吸とした。頸部正中線上に小皮切を加え、両総頸動脈を迷走神経、頸静脈より剝離露出し、血行遮断装置を装着した後、動物を腹臥位にかえた。さらに後頸部皮膚を正中線上で切開し第一頸椎の alar foramina を露出し、針電極を刺入して電氣的に凝固遮断した。その後、1分以内に両総頸動脈の血流遮断装置を閉鎖して虚血を作成した。そして30分後に血流遮断装置を解放し24時間後に実験に使用した。

(3) NF 画分の調製法¹⁴⁸⁾

全脳を1分以内に取り出し、ハサミにて細切後、氷冷した 30 ml の buffer A (1 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 1 mM NEM (N-ethylmaleimide), 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl-fluoride), 30 mM KCl, 50 mM MES (1-N-morpholinoethane sulfonic acid), 0.85 M sucrose, pH 6.5) を加えて、Teflon glass homogenizer にて8回 homogenize した。homogenate は 15,000G にて30分間遠心した。表層に浮かぶ薄膜を spoon で集め、15 ml の buffer B (1 mM EDTA, 1 mM NEM, 1 mM PMSF, 30 mM KCl, 50 mM MES, pH 6.5) にて homogenize した。この浮遊液を magnetic stirrer にて90分間強くかくはんした。これに 15 ml の buffer C (1 mM EDTA, 1 mM NEM, 1 mM PMSF, 30 mM KCl, 50 mM MES, 1.7 M sucrose, pH 6.5) を加え、さらに 20,000G にて30分間遠心した。pellet を再び 0.4 ml の buffer B にて homogenize し、SDS sample buffer に溶解して sample を作成した。

(4) NF 画分の調製法²²⁸⁾

全脳を細切し氷冷した buffer D (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM Tris-HCl, 1 M sucrose, 1% Triton X-100, pH 7.4) を加えて、homogenize し、100,000G で60分間遠心した。得られた Triton に不溶性の pellet を再び buffer D を加え homogenize し遠心して得られた pellet より SDS sample を作成した。

(5) 微小管蛋白質の調製法²³⁰⁾

全脳を1分以内に取り出し、硬膜と凝固血液を除去

し、蒸留水と buffer E (100 mM MES, 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA (pH 6.8)) にて洗浄後、脳 1g に対して 0.7 ml の buffer F (100 mM MES, 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM GTP, 0.5 mM PMSF, 0.01% leupeptin (pH 6.8)) を加え、Teflon glass homogenizer にて 8 回 homogenize した。25,000G, 60分, 2°C にて遠心し、その上清を脳粗抽出液とした。脳粗抽出液に1/3容の glycerin と GTP を最終 1 mM となるように加えた。かくはん後、36°C で30分加熱し、100,000G, 45分, 30°C で遠心して、再構成された微小管を沈殿として回収した。沈殿した微小管は buffer E を加えて、Teflon glass homogenizer にて 4 回 homogenize した。この操作で微小管は低温にさらされることにより脱重合するが、この微小管蛋白質液を 100,000G, 45分遠心して、上清を回収し、この 1 回の重合-脱重合の cycle により得られた上清を部分精製微小管蛋白質とした。

(6) SDS 電気泳動および immunoblot 解析

NF の分析には5-15%, 微小管蛋白質の分析には4-

15% の acrylamide の濃度勾配をもつ 2 mm の厚さの slab gel を Laemmli らの方法¹⁷⁾ により電気泳動を行った。泳動を終えた gel は Coomassie 染色液にて染色するか、あるいは Towbin らの方法³³⁾ により蛋白質を slab gel より nitrocellulose 膜へ転写した。蛋白質を転写した nitrocellulose 膜は blocking solution (10% の馬血清を含む 50 mM Tris-buffer solution (TBS) pH 7.2) にて15分間 block した。そして、抗 NF200 monoclonal 抗体にて一晚 incubate した。膜は TBS にて再び洗浄し、二次抗体 (peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG) にて incubate した後、再び TBS にて洗浄し、最後に 4-chloro-1-naphthol を用いて Hawkes らの方法¹⁰⁾ により発色させた。

(7) 濁度測定による微小管重合の定量⁵⁾

虚血時間0, 3, 5, 10, 15, 30分の脳粗抽出液を buffer F で希釈し、cuvette holder を恒温槽に接続して 36°C に保ってある cuvette に入れることにより重合反応を開始させ、分光光度計で 350 nm の吸収の重合30分間の時間変化を測定した。横軸に蛋白質濃度、縦軸に重

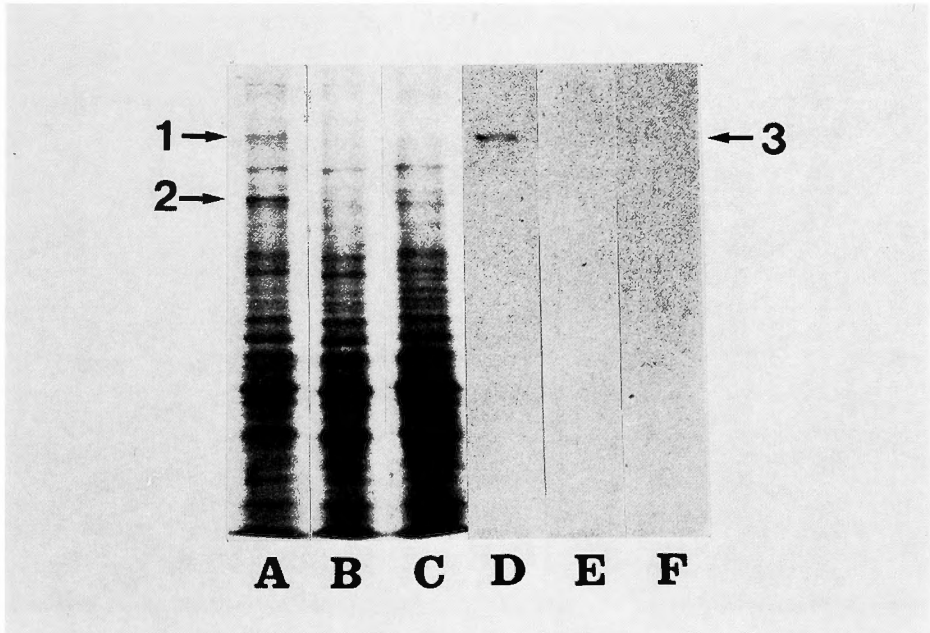


Fig. 1. Degradation of neurofilament (NF) 200 and NF150 in rat brain after 6 hours of complete ischemia caused by decapitation (lanes B and E) and in rat brain subjected to 30 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion (lanes C and F). Amidoblack staining (lanes A, B, C) and immunoblot staining with anti-NF200 antibody (lanes D, E, F) of the NF fraction prepared according to Method 1 (see text). Lanes A and D: control rat brain. Bands 1 and 3: NF200; band 2: NF150. For further description see text.

合による吸収の変化をとり plot すると横軸と交わる直線関係が得られる。実験は各虚血時間につき3匹ずつ行い、この直線の勾配を微小管重合能の指標とした。この指標を縦軸に、虚血時間を横軸にとり作図し、虚血による重合能の変化を解析した。

結 果

(1) 脳虚血における NF 蛋白質の分解の SDS 電気泳動および immunoblot による解析

Fig. 1 は断頭により作成した6時間完全虚血と Pulsinelli 変法により作成した30分虚血後、24時間再灌流 model の結果である。amidoblack による蛋白質染色で control 脳 (lane A) では NF200 ははっきりとした一本の band として認められるが、6時間虚血 (lane B) および30分間の一時的虚血 (lane C) では認められない。同様の結果は抗 NF200 monoclonal 抗体を用いた immunoblot でも認められた (lanes D-F)。NF200 は明らかな抗体に反応する band として con-

trol (lane D の band 3) では出現するが6時間虚血 (lane E)、30分間の一時虚血 (lane F) では完全に消失した。NF150 も同様な変化を示した。control (lane A) で見られる NF150 (band 2) は6時間の完全虚血 (lane B) および30分間の一時虚血 (lane C) で消失した。これらの結果より NF200 と NF150 の分解が、断頭により作成した虚血でも、血管の閉塞により作成した虚血でも、虚血後30分以内におこり、血流が回復しても回復しない不可逆的なものであることが示された。

(2) 脳虚血による NF 蛋白質の分解の時間経過

Fig. 2 は NF200 および NF150 の分解が虚血後15分以内におこることをしめしている。amidoblack による蛋白質染色で NF200 (band 1) と NF150 (band 2) は control (lane A)、5分虚血 (lane B)、10分虚血 (lane C) ではあきらかな一本の band として認められるが、15分虚血 (lane D) および30分虚血 (lane E) では消失していた。また immunoblot によっても、15分

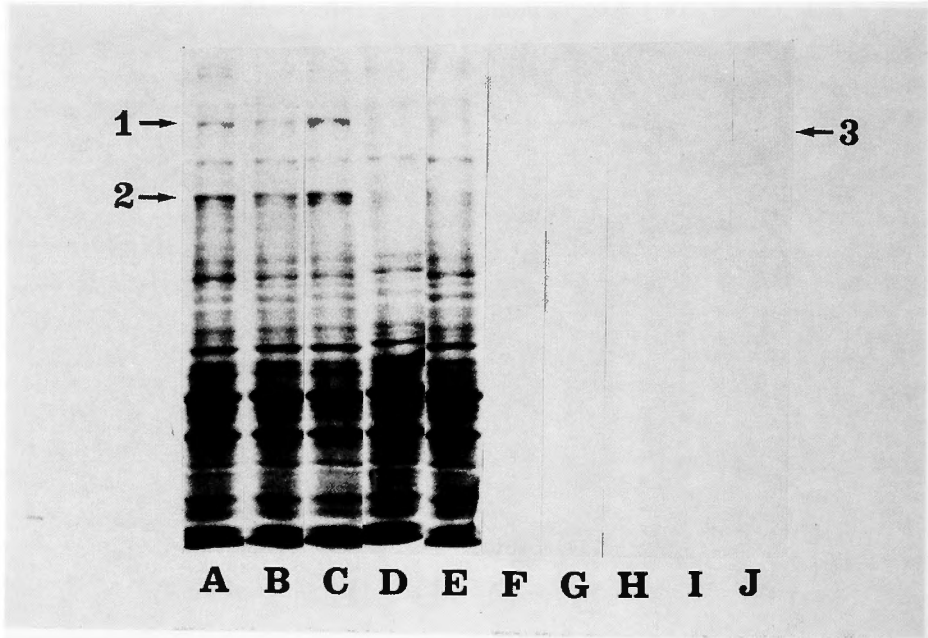


Fig. 2. The time course of neurofilament (NF) 200 and NF150 degradation in rat brains with complete ischemia during the initial 5 to 30 minutes. Amidoblack staining (lanes A, B, C, D, E) and immunoblot staining (lanes F, G, H, I, J) of the NF fraction prepared according to Method 1 (see text). Lanes A and F: control rat brain; lanes B and G: brain after 5 minutes of ischemia; lanes C and H: brain after 10 minutes of ischemia; lanes D and I: brain after 15 minutes of ischemia; lanes E and J: brain after 30 minutes of ischemia. Bands 1 and 3: NF200; band 2: NF150. For further description see text.

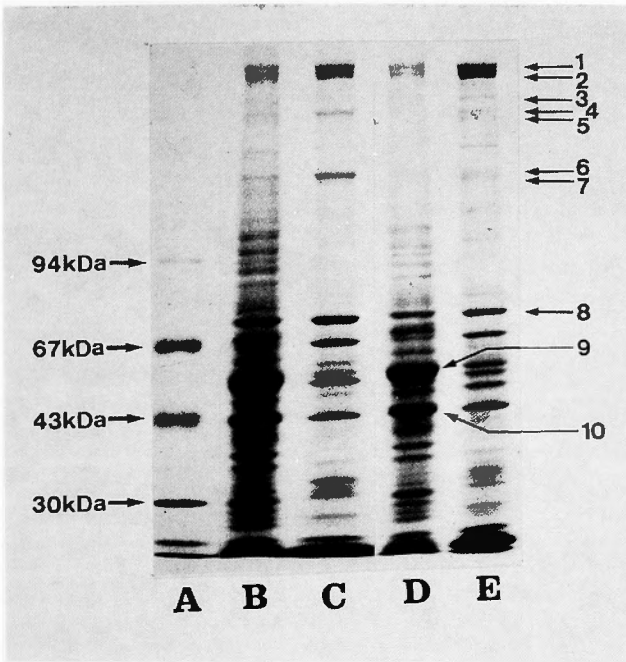


Fig. 3. Degradation of cytoskeletal proteins observed in total brain homogenate and in Triton-insoluble pellet in rat brains after 20 minutes of ischemia induced by the decapitation method. Preparation of neurofilament (NF)-fraction was by Method 2 (see text). Gel was stained by Coomassie brilliant blue. Lane A: molecular weight standard: lanes B and D: total brain homogenate: lanes C and E: Triton-insoluble pellet prepared according to Method 2; lanes B and C: control rat brain; lanes D and E: brain with 20 minutes of ischemia after decapitation. Bands 1 and 2: fodrins; band 3: 210 to 220 kDa protein; band 4: NF200; band 5: 195 to 200 kDa protein; band 6: NF150; band 7: 145 to 150 kDa protein; band 8: NF68; band 9: tubulin; band 10: actin. For further description see text.

(lane I) 及び30分虚血 (lane J) において抗 NF200 抗体に反応する band の消失が示された。これらの結果より NF200 および NF150 の分解は虚血後10分間前後の潜伏期間をおいた後始まり、10分から15分の間に急速に進行すると考えられた。

(3) 虚血における Triton X-100 不溶性 pellet 中の NF およびその他の細胞骨格蛋白質の変化

Fig. 3 は、control 脳において NF200 と NF150 が NF 画分の調製法 2 によって得られた Triton X-100 不溶性 pellet (lane C) および全脳の homogenate (lane B) において明瞭な band として認められることを示している。しかしながら20分虚血では NF200 と NF150 は全脳の homogenate (lane D) においては全く認められず、Triton X-100 不溶性 pellet 画分 (lane E) においてもかなりの染色性の低下を認めた。この

NF200 と NF150 の消失に伴ってそれぞれの band の直下に minor band (分子量 195,000-200,000(band 5), 分子量 145,000-150,000(band 7)) の出現を認めた。NF68(band 8), tubulin(band 9), actin(band 10) の分解は20分虚血においては認めなかった。fodrin (band 1, 2) の染色性はあまり変化しなかったが、20分虚血において分子量 210,000-220,000 の minor band (band 3) の出現を認め、一部が分解されている可能性は否定できない。このように NF の分解に伴って minor band が出現することは、NF の分解が protease の作用によるものであることを示唆していると考えられた。

(4) 虚血による MAP1, MAP2, tubulin の変化

Fig. 4 は方法(3)で作成した部分精製微小管蛋白質の SDS 電気泳動の蛋白質染色である。染色 pattern と分子量 marker の比較により容易に major proteins

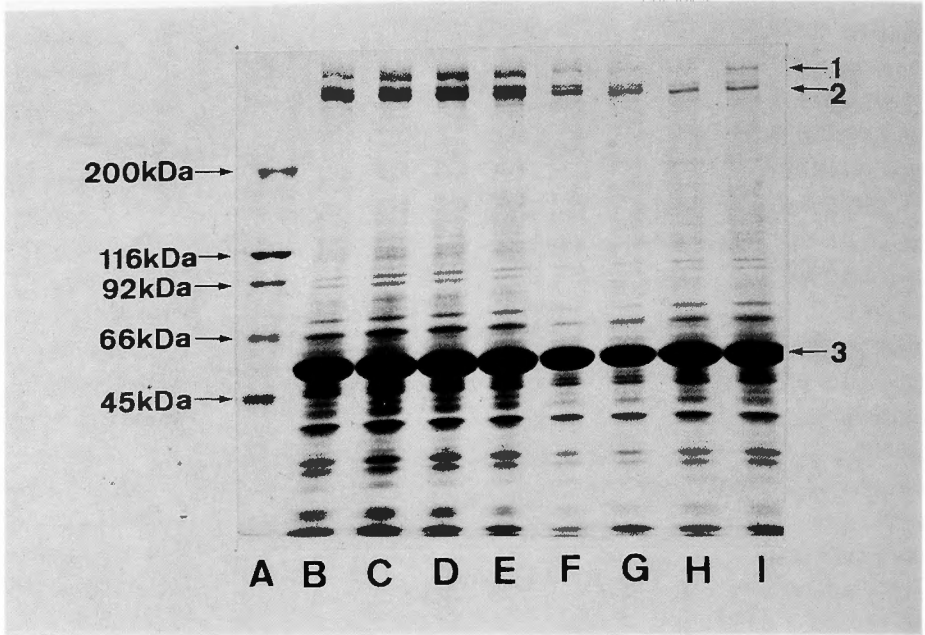


Fig. 4. Degradation of MAP1 and MAP2 in the Partially-Purified Microtubule Proteins during Ischemia. Lane A: molecular weight protein standard; lane B: control rat brain; lane C: brain after 5 minutes of ischemia; lane D: brain after 10 minutes of ischemia; lane E: brain after 15 minutes of ischemia; lane F: brain after 20 minutes of ischemia; lane G: brain after 25 minutes of ischemia; lane H: brain after 30 minutes of ischemia; lane I: brain after 60 minutes of ischemia. For further description see text.

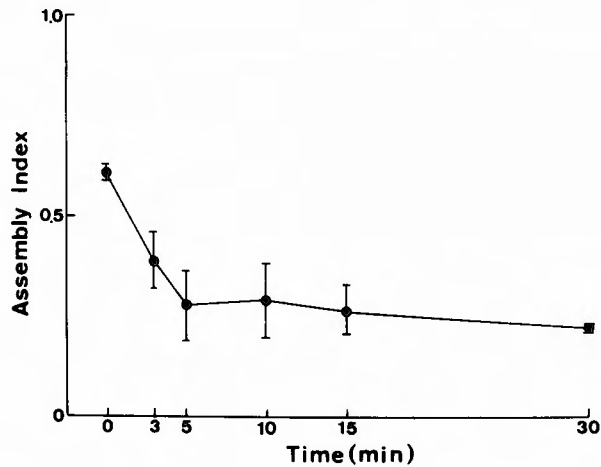


Fig. 5. Decrease of the Ability of Polymerizing Microtubules in the Crude Brain Extract during Ischemia. Assembly Index was calculated from the changes of absorbance at 350 nm through the polymerization of microtubules in the samples from the crude brain extracts. Vertical bars indicate standard errors of the mean. Three preparations were used for each ischemic time. For further description see text.

である MAP1(band 1), MAP2(band 2), tubulin(band 3) が識別できる. MAP1, MAP2 の染色性は虚血15分まで (lanes B-E) はあまり変化がないが, 20分以降 (lanes F-I) 徐々に減少した.

tubulin には大きな変化は認めなかった. このことは脳虚血15分以降に MAP1, MAP2 が protease により選択的に分解されたことを示すと考えられる.

(5) 虚血による微小管重合能の変化

Fig. 5 は方法(4)により求めた微小管重合能の指標の虚血による変化であるが, control (虚血0分) と比べ, 虚血後3分, 5分と急速に低下しており, その後はほぼ plateau に達した. このことより, in vitro における微小管の重合能が虚血後5分以内に急速に低下する可能性が示唆された.

考 察

本研究は実験的脳虚血において, 神経細胞に特異的な細胞骨格蛋白質が選択的に分解されるという不可逆的な変化が虚血早期におこることを証明した最初の報告である.

脳虚血の特徴として, 組織を維持するための energy 量, 血流量が多い, 血管構築の特殊性, 成熟した神経細胞の再生の困難さといった点があげられるが, 心臓, 肝臓, 腎臓といった他の重要臓器よりもさらに虚血に対する抵抗性が弱いということと考えればそれだけでは不十分で, 神経細胞自身が虚血に弱く早期に不可逆的な変化に陥りやすいと考える必要がある.

脳虚血の際には energy 代謝の変化は早期 (数分以内) から認められるが, 短時間の follow up では, rat の15分および30分虚血²⁴⁾, また猫や猿においては60分をこえた後でも^{15,16)}, 脳の energy 代謝はかなりの回復を示すことが示されている.

しかしながら長期の follow up では, 猿の実験では完全脳虚血からの最長の回復時間はおおよそ15分前後と考えられている²²⁾, さらにもっと短い時間 (5分から10分) でも数時間から数日後に不可逆的な障害を引き起こすという報告もある^{13,14,26)}. したがって現在では最良の条件下でも完全脳虚血における最長の回復時間は15分を越えないと考えられている³¹⁾. しかしながら組織病理学的に不可逆的な神経細胞障害がおこっているという所見は虚血後数時間から数日後にはじめて得られ, すでに不可逆的な変化が始まっていると考えられる虚血後10分から15分といった時点ではあきらかな不可逆的な神経細胞障害の証拠は得られていない³⁰⁾.

NF200 および NF150 の分解は脳虚血後10分から15分後におこり, また分解は再灌流を伴う一時的脳虚血でもおこる. 分解は選択的であり, NF68, tubulin, actin といった他の主要な細胞骨格蛋白質の変化は早期には認めなかった. これらの結果は, NF の分解には特異的な蛋白質の分解機構が関与しており, そしてそれは, 今までに報告された不可逆的な神経細胞障害機構の中でもっとも早いものであることを示している.

NF の分解は rat の坐骨神経の切断²⁸⁾, および脊髄損傷¹⁾ において報告され, Ca²⁺ 依存性の蛋白質分解酵素である calpain によるものとされている. 今回の実験では NF の分解は10分から15分にかけて急速に進行しているが, それは虚血後 Ca²⁺ が細胞内に流入する時間と一致している²³⁾. 免疫組織化学的研究では calpain I (2種類の isozyme のうちの一つで低い Ca²⁺ 濃度で活性化される) が小脳の Purkinje 細胞や海馬や新皮質の錐体細胞など虚血による障害に弱いとされている部位に特に多く存在することが示され⁹⁾, 内因性 calpain inhibitor である calpastatin の活性が脳では他の組織にくらべて低いとされている²¹⁾. このことより NF の分解の原因となる protease は calpain である可能性が高いと考えられる.

MAP1, MAP2 の分解は tubulin に対する量比の減少という形で示された. 一般に MAP1, MAP2 は重合脱重合の cycle を繰り返しても, 常に tubulin に対して一定の割合で精製されるとされている³²⁾. したがってこの結果は, MAP1, MAP2 が虚血により選択的に分解されたことを示すと考えられる. MAP1, MAP2 は微小管機能に重要な役割を果していることより, この結果はまた微小管機能の不可逆的な障害が虚血後15分から30分後にはおこるということを示している. MAP1, MAP2 も Ca²⁺ 依存性の蛋白質分解を受けやすいことが報告されているので²⁷⁾, 原因となる protease は calpain である可能性が強いと考えられる.

微小管重合能の検定法には, 濁度検定法⁹⁾, 遠心による重合蛋白質量の定量, 電子顕微鏡による観察等があり, 通常2回重合脱重合の cycle を繰り返し精製したものをもちいるが, 重合量は一般に glycerin や Mg²⁺ 濃度のわずかな変化により大きく変わるとされており, 精製微小管をもちいた場合, そうした誤差のため比較定量は非常に困難である. そのため本実験では脳の粗抽出液を用いて, 微小管重合能の指標を算出した. その結果, 微小管重合能の低下は虚血後3分以内に始まり5分以内に急速に進行した. これは MAP1, MAP2

の分解よりもはるかに早期におこり, MAP1, MAP2 の分解とは無関係な可逆的な現象である可能性が高いと考えられるが, 他の物質による影響も考えられ, この指標が *in vivo* の重合能をどの程度反映するのは今後の検討が必要である。

これらの細胞骨格蛋白質の分解の意義については NF および微小管の機能がまだ完全に解明されていないため推論にとどまるが, 仮説の一つを以下に述べる。NF および微小管は軸索輸送を含む細胞内輸送に関与しているとされる^{3,4,7,11,25,28,34}。もしこれらの障害の程度が軽く範囲が限定されたものであれば, 分解された蛋白質は蛋白質輸送機構によりあらたに合成された同じ蛋白質が運ばれることにより細胞骨格系は修復されうると考えられる。しかしながら分解の程度が広範なものであればこれらの細胞骨格自身が関与している蛋白質輸送機構の障害のため修復は不可能となる。その場合, たとえ神経機能が一時的に回復したとしても傷害された neuron は死を免れない可能性が高い。また NF, MAP2 は tubulin や actin と違い, 神経系に特異性に存在するため, それらが早期に選択的に傷害されるという事実は neuron の虚血に対する脆弱性につながりうると考えられる。したがって NF, MAP1, MAP2 の分解は神経細胞の不可逆的な障害を示す現象である可能性が強いと思われる。完全脳虚血による障害が不可逆的になるまでの時間と NF が分解されるまでの時間が一致していることもまた NF の分解が脳虚血における不可逆的な神経細胞障害に重要な役割を果たしていることを示唆している。

これらの結果は実験的な完全脳虚血におけるものであり, 実際, 臨床的にはもっと不完全な脳虚血が多いと思われるので, このような不可逆的な変化が出現するまでの時間もより長いと考えられる。また, もし protease による細胞骨格蛋白質の分解をうまく制御できれば, 虚血に対する抵抗性を増大させ, 血行再建術の適応を拡大しうると可能性があると思われるが, それについては今後の研究が必要である。

結 論

実験的完全脳虚血において, 虚血後10分から15分で NF200, NF150, 虚血後15分から30分で MAP1, MAP2 の細胞内 protease によると思われる選択的な分解を認めた。これらの分解は NF および微小管の機能障害をきたすことにより不可逆的な神経細胞障害につながっていると推定された。また, 濁度検定法による微小

管重合能測定では虚血後5分以内に重合能の急速な低下を認めたが, これらは protease の作用を伴わない可逆的な障害である可能性が強いと考えられた。

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました京都大学脳神経外科学教室教授, 菊池晴彦先生に深甚の謝意を表すと共に, 終始, 御指導, 御協力を賜った京都大学検査医学教室教授, 村地孝先生, 同講師, 神奈木玲児先生, 研究室諸兄, 国立循環器病センター脳神経外科部長, 米川泰弘先生, 同脳血管障害研究室長, 滝和郎先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Banik NL, Hogan EL, Powers JM, et al.: Degradation of cytoskeletal proteins in experimental spinal cord injury. *Neurochem Res* 7: 1465-1475, 1982.
- 2) Cole SL, Corday E: Four-minute limit for cardiac resuscitation. *J Am Med Assoc* 161: 1454-1458, 1956.
- 3) Friede RL, Samorajski T: Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec* 167: 379-388, 1970.
- 4) Gan S, Fan M, He G: The role of microtubules in axoplasmic transport *in vivo*. *Brain Res* 369: 75-82, 1986.
- 5) Gaskin F, Cantor CR, Shelansky ML: Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J Mol Biol* 89: 737-758, 1974.
- 6) Goto Y, Okamoto S, Yonekawa Y, et al.: Degradation of phospholipid molecular species during experimental cerebral ischemia in rat. *Stroke* 19: 728-735, 1988.
- 7) Grafstein B, Forman DS: Intracellular transport in neurons. *Physiol rev* 60: 1167-1284, 1980.
- 8) Grenell RG: Central nervous system resistance. I. The effects of temporary arrest of cerebral circulation for periods of two to ten minutes. *J Neuropathol Exp Neurol* 5: 131-154, 1946.
- 9) Hamakubo T, Kannagi R, Murachi T, et al.: Distribution of calpains I and II in rat brain. *J Neurosci* 6: 3103-3111, 1986.
- 10) Hawkes R, Nidaz E, Gordon B: A dot immunoblot assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 119: 142-147, 1982.
- 11) Hoffman PN, Lasek RJ: The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 66: 351-366, 1975.
- 12) Huber G, Matus A: Difference in the cellular distributions of two microtubule-associated pro-

- teins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *J Neuroscience* 4: 151-160, 1984.
- 13) Ito U, Spatz M, Walker JT Jr, et al. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* 32: 209-223, 1975.
 - 14) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69, 1982.
 - 15) Kleihues P, Hossmann KA, Pegg AE, et al.: Resuscitation of the monkey brain after one hour complete ischemia III. Indications of metabolic recovery. *Brain Res* 95: 61-73, 1975.
 - 16) Kleihues P, Kobayashi K, Hossmann KA: Purine nucleotide metabolism in the cat brain after one hour of complete ischemia. *J Neurochem* 23: 417-425, 1974.
 - 17) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
 - 18) Matus A, Pehling G, Ackermann M, et al.: Brain postsynaptic densities: their relationship to glial and neuronal filaments. *J Cell Biol* 87: 346-359, 1980.
 - 19) Miller JR, Myers RE: Neurological effects of systemic circulatory arrest in the monkey. *Neurology* 20: 715-724, 1970.
 - 20) Miller JR, Myers RE: Neuropathology of systemic circulatory arrest in adult monkeys. *Neurology* 22: 888-904, 1972.
 - 21) Murachi T, Tanaka K, Hatanaka M, et al.: Intracellular Ca^{2+} dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv Enzyme Regul* 19: 407-424, 1981.
 - 22) Nemoto EM, Bleyaert AL, Stezoski SW, et al.: Global brain ischemia: a reproducible monkey model. *Stroke* 8: 558-564, 1977.
 - 23) Nicholson C, Bruggencate GT, Steinberg R, et al.: Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-selective micropipette. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 1287-1290, 1977.
 - 24) Nordstrom CH, Rehnrona S, Siesjo BK: Restoration of cerebral energy state, as well as of glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids after 30 minutes of complete ischemia in rats anaesthetized with nitrous oxide or phenobarbital. *J Neurochem* 30: 479-486, 1978.
 - 25) Paschal BM, Vallee RB: Retrograde transport by the microtubule-associated protein 1c. *Nature* 330: 181-183, 1987.
 - 26) Pulsinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanaesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272, 1979.
 - 27) Sandoval IV, Weber K: Calcium-induced inactivation of microtubule formation in brain extracts. *Eur J Biochem* 92: 463-470, 1978.
 - 28) Schlaepfer WW, Lee C, Lee VMY, et al.: An immunoblot study of neurofilament degradation in situ and during calcium-activated proteolysis. *J Neurochem* 44: 502-509, 1985.
 - 29) Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR: Microtubule Assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 765-768, 1973.
 - 30) Siesjo BK: Review article: cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 60: 883-908, 1984.
 - 31) Siesjo BK: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1: 155-185, 1981.
 - 32) Sloboda RD, Dentler WL, Rosenbaum JL: Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochem* 15: 4497-4505, 1976.
 - 33) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: A procedure for the electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979.
 - 34) Wuerker RB, Kirkpatrick JB: Neuronal microtubules, neurofilaments and microfilaments. *Int Rev Cytol* 33: 45-75, 1972.