

ット活動を記録した。ディスプレイ上に受容野を定め、種々のパターン及び色覚刺激によりその生理学的性質を調べた後、サルに以下の三条件の視覚関連課題を行わせて課題遂行時のユニット活動を解析した。(1)受容野内に呈示した視覚刺激の弁別を注視行動中に行う。(2)注視点から受容野内に呈示した視覚刺激への眼球運動(サッケード)を行ってから弁別をする。(3)注視行動中に受容野に刺激呈示をするが弁別しない(コントロール)。これまでに視覚刺激に応答を示すユニットを84個記録したが、diffuse lightのon-offに反応を示すもの、方向選択性を示すもの、注視点から弁別刺激へのサッケードに先行して発火するもの、auditoryやsomatosensory刺激によって発火頻度が増大するもの等があることが分かった。現在記録と解析を継続中である。

課 題 6

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)

本研究の目的は、霊長類において最も発達した大脳皮質の神経構築に関与する分子、およびその解明の手がかりとなる未知分子を発見解析することである。本年度は、前年度に発見した一部の中枢ニューロンの周囲を染めるモノクローナル抗体群を集散的に研究した。抗体478の認識する抗原分子は、イムノプロット法、組織切片のコンドロイチナーゼ処理などによりプロテオグリカン様物質と考えられた。抗体478とは異なるニューロン群を染める抗体376もコンドロイチナーゼ処理により抗原が不活化された。さらに軟骨研究のために開発された抗プロテオグリカン抗体の中に、一部の中枢ニューロンの周囲を染めるものが見出された。これらより、プロテオグリカンまたは近縁の物質が一部中枢ニューロンの周囲に存在することが明らかとなった。

さらに異なるニューロン群に結合する抗体の存在を想定し、サル脳海馬組織・ニワトリ胚組織等でマウスを免疫し、モノクローナル抗体を免疫組織化学的に検索したところ、さらに7抗体を発見

入手した。これらの抗体間の異同関係は解析中であるが、いずれもコンドロイチナーゼ処理により抗原活性が失われる。これらのことは、中枢ニューロン間の何らかの相互作用のために、多様なプロテオグリカン様分子が利用されている可能性を示唆している。

霊長類網膜の運動刺激検出機構について

田内雅規(国立身障者リハセンター研)

脊椎動物の視覚系では、動く刺激に対して非常に強く反応する機構が存在する。このような機構は網膜においてすでに認められており、我々は網膜におけるこの運動刺激検出の成立を解明するうえで、特に網膜のアセチルコリン(Ach)が重要な神経伝達物質としての役割を担っていることを明らかにしてきた。霊長類の網膜においては、Achの存在は知られているものの、その局在やAchを持つ細胞の形態については全く判っていない。従って、今回はサル網膜を用いて、Achを合成する酵素であり、コリン作動性神経細胞のマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の抗体を用いてコリン作動性神経の局在を検討すると共に、他の動物ではコリン作動性神経細胞を特異的に染色することが知られている核酸染色性蛍光色素を用い、コリン作動性神経の生体染色を試みた。

麻醉下で放血直後の動物(ニホンザル)から眼球をできるだけ速やかに摘出し、4%パラフォルムアルデヒドと0.02%グルタルアルデヒドの混液中で、一昼夜4℃で固定した後、ChATの免疫組織化学に供した。一方、網膜細胞の生体染色については、摘出直後の眼球から前眼部および硝子体を取り除き眼球胚標本を作り、4', 6-diamidino-2-phenyl-indole(DAPI, Sigma)を0.3 mg/ℓの濃度で含むAmes液の中に入れ細胞ラベルを行った。

この実験の結果、サルの網膜にはChATに対する免疫活性が内網膜に認められた。細胞体はそれぞれ内顆粒層と神経節細胞層にあり、細胞の突起は内網状層中に二つの層として存在していた。一方DAPIによる生体染色の結果、神経節細胞層内に直径が約10 μm程度で規則的に配列する小さな

細胞が標識されているのが認められた。この標識された細胞が果して単一種の細胞であるのか、またどのような形態を持つのか、引き続き検討している。

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(山口大・教養)

情報伝達において蛋白質リン酸化反応および Ca^{2+} の役割は重要であるが、 Ca^{2+} の関与するプロテインキナーゼは、大別して2種に分けられる。すなわち、Protein Kinase Cおよび Ca^{2+} /calmodulin 依存性プロテインキナーゼである。とりわけ後者に属する酵素のうち、Calmodulin 依存性で基質特異性の比較的広い多機能プロテインキナーゼが注目されている。両酵素ともに、脳組織には活性が高く、ネズミ、ウサギなどから酵素蛋白は純化されている。昨年度までに筆者らは、サル大脳よりいくつかのプロテインキナーゼ(A-Kinase, C-Kinase, CaM-PK)を見出し、その基質蛋白質を同定した。本年度はこれらのうち、高分子量をもつ多機能-カルモデュリン依存性プロテインキナーゼに着目して実験を行った。

酵素は、大脳の100,000 g上清のDEAE-セルロースクロマトグラフィー、硫酸分画(0-0.4飽和)、ハイドロキシルアパタイト、カルモデュリン-アガロース、セファローズCL-6Bなどのクロマトグラフィーにより純化に成功した。電気泳動的には均一である。分子量はほぼ50~60万であり、これまでに報告されている多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼと同一の酵素と考えられた。基質特異性は広く、シナプシン、チューブリン、などに対して活性が高く、各種ヒストン、プロタミン、ホスビチンに対しては低い基質特異性を示した。カゼインに対する活性はシナプシン1に対し $1/10$ 程度であった。脳内において60%は上清分画に、残りは顆粒分画に存在した。カルモデュリンに対する $K_{0.5}=70\text{ nM}$ でありイヌ心臓、ラット脳などから得られた酵素とよく似ている。

本酵素の生体内基質をSDS-PAGE、オートラジオグラフィーにより検索した結果、350 K、170

K、80K、78K、50Kの4種の基質が同定できた。いずれも上清分画には存在しない。現在、これら基質の同定を行っている。

課 題 7

等電点電気泳動法を用いたニホンザルの地域遺伝分化に関する研究

川本 芳(名大・農)

昨年度の共同利用研究で等電点電気泳動法によりニホンザルのビタミンD結合性タンパク(DBP)変異を検出できることが確認できた。今年度をこのDBP変異の地理的分布を明らかにすることを目的として、各地から収集され京大豊長研に保存されている血液試料の表現型を判定した。44地域集団(ホンダザル43群とヤクザル)計884個体について検索したところ、これまでに異なった等電点をもつ5種類のDBP分子が検出できた。また泳動により判別される表現型は単一バンド、二本バンドのいずれかであり、他生物で報告されている常染色体共優性遺伝子による支配が予想された。

変異の地理的な出現傾向は以下のようにまとめられる。

- ①他の血液タンパク多型の例と同様に、DBPにおいてもニホンザルにみられる変異型は地域集団全体に広く認められるタイプ(a型)と、いくつかの集団に限って検出されるタイプ(b, c, d, e)に大別できる。
- ②b型は中部・関東(房総群を除く)、東北地方の群れで検出され、大部分の近畿以西群では認められない。
- ③c型は近畿圏のいくつかの群れだけに集中分布する。

ニホンザルにおける従来のタンパク多型調査では、変異の著しい地域局在化傾向が観察され、ニホンザル祖先の日本列島侵入後の分布拡大と関連づけて議論できる標識タンパクは乏しい。今回DBPのb型で認められた分布傾向(上記まとめの②)は、列島内でニホンザル分布域が変化した過程を示唆する結果と考えられ、ニホンザルの進化を考察する上で興味をもたれる。