B842

ラット海馬におけるエストロゲン受容体ER α の分布の解析

○村上 元¹、向井 秀夫^{1,2}、北條 泰嗣^{1,2}、小南 思郎³、Janssen William⁴、Morrison John⁴、川戸 佳^{1,2} (¹ 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻、² 科学技術振興事業団戦略基礎、³ 広島大学総合科学部、⁴ Fishberg Center of Neurobiology of Aging, Mt.Sinai School of Medicine)

女性ホルモンであるエストロゲンは生殖器官のみならず中枢神経に作用し、記憶・学習の増強や神経細胞保護などの効果をもつことが明らかになってきている。また近年、内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の脳における作用の危険性が注目されているが、環境ホルモンは擬似エストロゲンとして働くのでその経路がエストロゲン受容体を介する可能性が考えられている。そこで我々は記憶・学習の中核である海馬における、主要なエストロゲン受容体であるER α 蛋白質の存在と分布の同定を行った。ウェスタンブロット解析により、従来用いられてきた抗体はいずれもER α よりも交差反応の方が大きいことが判明したので、新規にラットのER α のC末端に対する抗体の作製を試みた。その結果、ER α のみを認識するポリクローナル抗体RC-19の作製に成功し、ウェスタンブロットで海馬におけるER α の検出に成功した。次にこの抗体で成体オスラット海馬スライスに対し免疫組織化学的検討を加え、光学顕微鏡レベルではER α は海馬の神経細胞全体に分布していることが明らかになった。海馬内ではCA 3の錐体神経細胞に多く分布し、CA 1領域ではCA3より薄い錐体細胞層が染色を示した。歯状回(DG)では顆粒細胞層全体が染色を示したが、中でも強い反応を示した細胞は介在ニューロンと考えられる。更に超薄切片に対し免疫電子顕微鏡による解析を行った結果、核のみならずシナプスにもER α が存在していることが明らかになった。これらの結果は、エストロゲンがER α を介して核における遺伝子転写のみならずシナプスにおける神経情報伝達にも関与している可能性を示唆している。

G.Murakami, H.Mukai, Y.Hojo, S.Kominami, W.Janssen, J.Morrison, S.Kawato : Analysis of localization of estrogen receptor alpha in the rat hippocampus

B844

単一細胞におけるCREB遺伝子発現量の定量測定

○伊藤 悦朗^{1,2}、定本 久世¹、我妻 明湖²、須貝 理央² (¹ 北大・創成、² 北大・院理・生物)

軟体動物であるヨーロッパモノアラガイは、神経回路が単純なわりには高度な学習を習得し、学習・記憶に関与する神経細胞の同定が進んでいる。現在、長期記憶が形成される際には、転写調節因子群cAMP responsive element 結合蛋白質(CREB)が働くことが多くの動物で報告されている。また、CREBには転写調節において促進性に働くCREB1と、抑制性に働くCREB2が存在することが知られている。本研究では、モノアラガイの長期記憶形成時における転写調節因子CREBの働きを調べるために、リアルタイムPCR法を用いて、これらCREB遺伝子の発現量変化を単一細胞内で測定した。リアルタイムPCR法とは、合成cDNAを標準として定量的にmRNA発現を解析できるシステムである。これにより、異なる遺伝子の発現量を比較することで、複数の遺伝子の動態を同時に追うことが可能となる。まずCREB1の遺伝子発現を詳細に解析するために、CREB1遺伝子のアイソフォームを同定した。その結果5つのアイソフォームを発見し、これらのうち最も発現が多く他動物のCREB1配列と近いアイソフォームの遺伝子を、モノアラガイにおけるCREB1遺伝子と決定した。CREB2については一種類の遺伝子のみしか検出できなかった。次に味覚嫌悪学習に伴うCREB1遺伝子をCREB2遺伝子の発現解析を行った。味覚嫌悪学習後に、この学習で重要な働きをするcerebral giant cell (CGC)を単離し、単一細胞レベルで遺伝子発現を解析した結果、CREB2は学習後には有意にその発現が減少することがわかった。これに対し、CREB1遺伝子は発現レベルが低く、一つの細胞では測定不可能であった。

E.Ito, H.Sadamoto, A.Wagatsuma and R.Sugai : Quantitative measurement of CREB mRNAs in single neurons

B843

神経ステロイド(PREGS)で誘導されるラット海馬長期増強のシグナル機構：PKC依存性ERK1/2のカスケード

○陳 玲¹、宮本 嘉明²、森 望²、曾我部 正博^{1,3} (¹ 科技団国際共同研究「細胞プロジェクト」、² 長寿研分子遺伝子研究室、³ 名大・医・生理2)

It is generally believed that pregnenolone sulfate (PREGS), one of the most important neurosteroid, contributes to the enhancing cognitive performance, however, the underlying mechanisms remain largely unknown. We have recently shown that short time (10 min) application of PREGS (50 μ M) to rat hippocampal slices evokes a rapid and sustained potentiation of EPSP over 60 min at the dentate gyrus, termed PREGS-induced long-lasting potentiation (LLP_{PREGS}). We found that LLP_{PREGS} depended on extracellular Ca²⁺ and functional NMDA receptor, suggesting that a Ca²⁺ driven postsynaptic signaling cascade is involved in LLP_{PREGS} processes. Here, we reported that maintenance of LLP_{PREGS} requires PKC dependent activation of ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase1/2) cascade. Bath application of PREGS to hippocampal slices caused rapid phosphorylation of ERK1/2 followed by ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB (cAMP-response element binding protein). Pre-treatment of MEK (MAPK kinase) inhibitors, PD98059 and U0126, prevented LLP_{PREGS} induction. Furthermore, Chelerythrine a PKC inhibitor significantly attenuated the activation of ERK1/2 as well as LLP_{PREGS}. GluR ϵ 2 NMDA receptor inhibitor (Ifenprodil) and NMDA receptor channel blocker (MK-801) also inhibited both LLP_{PREGS} and ERK1/2 activation. These findings provide evidence for a novel signaling route that couples the stimulation of NMDA receptor by PREGS to the activation of ERK1/2 in a Ca²⁺ and PKC dependent manner.

L.Chen, Y.Miyamoto, N. Mori and M. Sokabe : Signaling mechanisms of long-lasting potentiation induced by neurosteroid PREGS in rat hippocampus

B845

神経樹状突起における翻訳開始制御のイメージング

○宮城 拓^{1,2}、椎名 伸之^{1,2}、徳永 万喜洋^{1,2,3} (¹ 遺伝研、² 総研大、³ 理研・免疫センター)

記憶・学習の基盤としてのシナプス可塑性に関して、長期増強(LTP)によって神経伝達が強化され、シナプス伝達効率調節されている。シナプスの構造的な変化と新しいシナプスの形成が行われ、新しいタンパクの合成が必要とされる。そのタンパク合成は、長期増強刺激依存的であり、しかも細胞体から切り離れた樹状突起のみで起こりうるということが報告されている。そこで本研究では、樹状突起において長期増強刺激により引き起こされる、翻訳の開始の時期や場所および分子動態を明らかにし、シナプス形成における翻訳制御の分子機構を解明することを目的として、翻訳に関わる因子の可視化を行った。翻訳開始因子として、eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) と eIF4G とが知られている。eIF4E は mRNA の 5' キャップ構造に結合する分子であり、eIF4G が eIF4E に結合することによって、リボソームのリクルート及び翻訳が開始される。私たちは、ラット海馬神経の初代培養細胞に eIF4E 抗体および eIF4G 抗体を用いた免疫染色を行い、樹状突起における両者の局在ならびに、脳由来神経栄養因子 BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) を用いた長期増強刺激による変化を観察した。その結果、長期増強刺激のない場合には eIF4E と eIF4G は、樹状突起の異なる位置に粒子状に存在し、大部分の局在は一致しなかった。しかし BDNF で刺激を与えた細胞では、eIF4E と eIF4G の共局在の割合が増加が見られた。これは、eIF4E と eIF4G とが、樹状突起に別々に局在し、刺激によって結合して翻訳が開始されることを意味している。今後、eIF4E と eIF4G の局在が、リボソーム、mRNA 輸送複合体や他のタンパク質、あるいはシナプスの変化と時間的・空間的にどのように関係しているか明らかにすることにより、翻訳開始制御のメカニズムを動的に解明できると考えている。

H. Miyagi, N. Shiina, M. Tokunaga : Molecular imaging of translation initiation in neuronal dendrites