B846

神経回路形成における膜貫通型タンパク質 Caspr5 が担う GPI アンカー型接着分子 TAG-1 のシグナル変換

○竹本 大輔¹、武内 恒成¹、馬場 広子²、楠見 明弘¹ (¹ 名大院・理・生命理、² 東葉大・薬・機能形態)

Ig スーパーファミリーに属する神経細胞接着分子 TAG-1 は、神経細胞の伸長等を誘起することで神経回路形成に関わり、neurocan、phosphacan などをリガンドとして、それぞれ細胞内の Src family kinase である Fyn、Lyn を区別して活性化する。また TAG-1 は GPI アンカー型の分子であるため、情報伝達にラフトに関わる可能性もある。しかし、ラフトだけでは Fyn と Lyn を選別した活性化が説明できない。そこで、我々はさらに膜貫通型タンパク質が情報伝達に関わる可能性を検討し、リガンド依存的に TAG-1 と結合する新規タンパク質 Caspr5 を見出した。本研究では、TAG-1 と Caspr5 の相互作用と、これらによる情報伝達の解析を行った。TAG-1、Caspr5 を共発現する PC12D cells を用いて Caspr5 を免疫沈降することにより TAG-1 が共沈した。また、細胞内ドメインを欠失させた Caspr5 変異体では、neurocan 添加による Fyn の活性化は見られなかった。一方、免疫組織化学染色により、TAG-1 と Caspr5 は多くの神経組織で共局在していた。特に、中枢神経では細胞移動、回路形成の盛んな領域で、末梢神経では神経の node 領域において共局在が見られた。これらの結果は、特異的リガンド依存的な TAG-1/Caspr5 の側方結合によるシグナル伝達を示唆する。

D.Takemoto, K.Takeuchi, H.Baba and A.Kusumi : Transmembrane protein Caspr5 is responsible for signal transduction of a neuronal adhesion molecule TAG-1.

B848

ラット脳における性ステロイド合成酵素及び受容体の発現解析

○石井 寛高^{1,2,3}、古川 愛造^{3,4}、北條 泰嗣³、高橋 泰城³、川戸 佳^{1,2,3} (¹ 東大院・総合文化・生命環境、² 東大院・理学・物理、³CREST、⁴ 都立松沢病院)

脳ニューロステロイドは、末梢のステロイド合成器官とは独立に脳神経系でコレステロールから合成されるステロイドであり、神経情報伝達物質様に神経細胞に作用することで記憶、学習や情動に影響を与える。当研究室では記憶、学習の中枢である海馬でプレグネノロンやプロゲステロン、硫酸プレグネノロンが合成されていることを解明した。さらに、近年では脳海馬で性ステロイド（男性ホルモン:アンドロゲン、女性ホルモン:エストロゲンの合成を発見し、それらが性差によらず神経細胞に作用し、記憶、学習能に影響を与えていることを見出した。しかし、脳内のステロイド合成酵素及びステロイドの作用先である受容体は末梢の器官に較べ、発現量が少ないために詳細な解析が行われていない。そこで、本研究では記憶、学習の中枢であるラット脳海馬を用いて性ステロイド合成酵素及び性ステロイド受容体の発現を検討し、さらにそれらの発現を他の脳部位と比較を行った。12 週齢オスウイスターラットの脳組織から試料を調製し、RT-PCR 法を用いて性ステロイド合成酵素である P450c17、17β-HSD の各サブタイプ、P450arom、SRD5a 及び女性、男性ホルモン受容体の半定量的発現解析を行った。その結果、海馬では一連の性ステロイド合成酵素及び受容体が発現しており、合成酵素の発現は末梢合成器官と比較して 1/100-1/1000、受容体に関しては 1/10-1/100 程発現していることが明らかになった。脳では末梢と異なり、局所的にステロイドが合成されることから、それらは十分量発現していることがわかった。さらに脳の各部位で、発現量が異なっていたことから、脳の各部位で合成・作用に違いがあると予測された。今回、性ステロイド合成経路及びその作用の分子基盤が明らかになったことで、脳ニューロステロイドの局所的合成・作用の概念がより一層強固となった。

H.Ishii, A.Furukawa, Y.Hojo, T.Takahashi, S.Kawato : Expression analysis of enzymes and receptors for sex steroids in the rat brain

B847

微小ポリスチレンビーズ上に固定した NGF を用いた局所刺激に対する PC12 細胞の分化応答の観察

○山野 泰子¹、金子 智行¹、伊藤 嘉浩²、安田 賢二¹ (¹ 東大院・総合文化、² 神奈川科学技術アカデミー)

〔目的〕細胞増殖因子等のシグナル物質が細胞に作用する際には、細胞膜上に存在する特定の受容体への結合が必要であり、そこから細胞内に様々なシグナルを伝えることによって最終的に増殖、運動、分化などの細胞応答を引き起こすことが知られている。しかし、一般にシグナル物質は分泌性の液性因子であり、細胞培養系では通常、培養液中に拡散した状態で用いられているため、シグナル物質を結合した受容体の配置に関する時空間的な解析は従来の手法では困難であった。本研究では、シグナル物質として NGF を表面に固定したマイクロビーズを用い、これを光ピンセットで操作することによって規則的に配列させ、その上で PC12 細胞を培養した。NGF-beads の配列パターンと PC12 細胞の分化応答の比較を行った。
〔実験方法〕観察するモデル細胞として本研究では PC12 細胞株を用いた。副腎髄質クロム親和性細胞腫より単離された PC12 細胞は、NGF 存在下では突起を伸展して神経細胞様に分化する。NGF 修飾マイクロビーズは、カルボキシル基を表面にもつ微小ポリスチレンビーズに EDC 処理により、始めに I 型コラーゲンを、次に NGF を固定化することで作成した。これにより I 型コラーゲンコートディッシュ上に固定化できるようになった NGF ビーズを、光ピンセットを用いてディッシュ上に格子状に配列固定した。さらにこの格子状ビーズの上で培養した PC12 細胞の分化誘導の比較観察を行った。結果と考察に関しての詳細は本会にて報告する。

H. Yamano, T. Kaneko, Y. Ito, K. Yasuda : Observation of PC12 cells differentiation to local stimulus of NGF fixed on the polystyrene micro beads

B849

神経細胞樹状突起におけるシナプス入力統合作用の計算機シミュレーションによる解析

○高嶋 聡、高畑 雅一（北大・院理・生物科学）

アメリカザリガニ腹部最終神経節に存在する LDS 細胞（Local directionally selective interneuron）は同定ノンスパイクンク介在ニューロンである。LDS 細胞の伝達物質放出の調整は活動電位を介せず、樹状突起膜の連続的な膜電位変化によっておこなわれる。よって LDS 細胞の機能を理解するためにはシナプス入力→出力への変換、すなわちシナプス統合作用が樹状突起のどのような性質によって規定されるのか調査する必要がある。一般に樹状突起におけるシナプス統合作用は次の三つの要因によって規定される。1）樹状突起の三次元形態および突起膜の受動的電気性質（＝物理的性質、膜抵抗・容量など）に基づく細胞の電気緊張の構造 2）神経伝達物/レセプターの性質（たとえばニコチン型およびムスカリン型のアセチルコリンレセプターなど） 3）電位依存型イオンチャネルなどの樹状突起膜の能動的生理性質（電位依存型、Ca²⁺ 依存型膜コンダクタンスなど）今まで、LDS 細胞共焦点顕微鏡および透過型電顕を用いた形態学的な調査や単一ガラス管微小電極をもちいた電気生理学的調査と神経薬理学的調査により上記の 3 つの要因について実験的によく調査されている。そこで、今回これらの蓄積した実験データを元にして LDS 細胞のマルチコンパートメンタルモデルを作成し、これを用いてシナプス活動をコンピュータシミュレーションにより時空間的に再構成した。これにより、上記の実験的解析により得られた神経細胞の生理性質が神経細胞樹状突起におけるシナプス統合作用に対しどのような影響を与えるかを検討した。

A Takashima and M Takahata : Computational analysis of synaptic integration of dendrite