1P237

大脳皮質由来のニューロンの凍結における凍結保護剤の影響

○本村 寿太郎¹、内田 努¹、永山 昌史¹、郷原 一寿¹、平 敏夫²、清水 恭子²、酒井 雅人² (¹北大・理工・応用物理、²株式会社プライマリーセル)

細胞の凍結保存に関する研究は古くから行われてきたが、近年 ES 細胞などの凍結保存の成功により、再び注目が集まっている。細胞を凍結する際には、細胞内の氷晶生成を抑制することが重要である。従来の凍結法では DMSO (Dimethyl Sulfoxide) や糖類などの凍結保護剤を含んだ溶液を用いることで、この氷晶の生成を抑制する。しかし、細胞種の違いにより効果は異なり、株化細胞や癌細胞などについてはすでに凍結方法が確立されているが、ニューロンに関しては未だ確立されていない。本研究では、数種類の凍結保護剤を用いてニューロンの凍結に適する凍結保護溶液を探索した。まず、ラット新生児の大脳皮質をトリプシン処理した後、培養液中に懸濁した。その後、凍結保護剤を含んだ溶液に置換して -80℃まで緩慢凍結した。 -80℃で1週間冷凍保存した後、細胞を取り出して 37℃で急速解凍した。解凍後はニューロン用の培養液に置換し、24 ウェルプレートで培養を開始した。培養後のニューロンに対して位相差顕微鏡による観察を行ったところ、細胞が基板上に張り付き、仮足を伸ばして活動を再開している様子が観察された。この結果により、細胞が解凍後も生存していることが確認できる。DMSO 濃度 5%、10%、20% における結果を比較すると、解凍後に仮足を伸ばしている細胞数は濃度 10% では濃度 5% に対して 6 割程度であった。これに対して濃度 20% で凍結すると、仮足を伸ばしている細胞がほとんど確認できなかった。これらの結果から、DMSO はニューロンの凍結保存に対して凍結保護剤として働くが、濃度が高くなると凍結保護剤としての働きよりも、ニューロンに対する毒性のほうが大きく現れたと考えられる。本発表では、凍結時の細胞密度の変化による影響や、DMSO の代わりに糖類などを用いた結果についても検討する予定である。

J.Motomura, T.Utida, M.Nagayama, K.gohara, T.Taira, K.Shimizu, M.Sakai : Protective Effect of Chemicals from Freezing on Neuron derived from Cerebral Cortex

1P239

ギムネマ酸とシクロデキストリンの相互作用解析

○泉谷 悠介¹、金折 賢二²、織田 昌幸¹ (¹京府大院・農・生物機能、²京工繊大・繊維・応用生物)

インド原産の *Gymnema sylvestre* の葉に含まれるギムネマ酸 (GA) は強い甘味抑制作用を有するトリテルペン配糖体であり、側鎖のアシル基の違いにより多くの同属体が存在する。GA は味蕾に発現している甘味レセプターに結合し、本来のリガンドである甘味物質の結合を阻害していると考えられている。GA の甘味抑制作用は通常 30 分から 1 時間持続するが、0.5% γ -シクロデキストリン (γ -CD) 溶液により速やかに解消することが知られている。そこで本研究では味覚修飾物質 GA とその阻害剤 γ -CD との分子間相互作用に着目し、等温滴定型熱量計 (ITC) を用いた熱力学的解析を行った。また NMR や動的光散乱 (DLS) により構造的見地からの検討も行った。ITC 測定より得られた熱力学量は、25℃、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 条件下で ΔH : -4.4 kcal/mol、 K_a : 5.5×10^5 M⁻¹、 ΔG : -7.8 kcal/mol、 $T \Delta S$: 3.4 kcal/mol であり、負の ΔH と正の ΔS により駆動される相互作用が示された。さらに負に大きな熱容量変化 (ΔC_p = -0.14 kcal/mol・℃) を示すことから、主に疎水性相互作用に起因する結合であることが示唆された。一方、¹H-NMR 測定において GA 単独では非常にブロードなスペクトルが、 γ -CD の添加時のみ明らかにシャープなスペクトルとなった。このスペクトル変化は、ITC の結果と同様に GA と γ -CD の特異的結合を示すとともに、水溶性凝集体を形成していた GA が γ -CD に包接され単分子化されることを示唆した。このことは DLS 測定から見積もった GA の直径が単独存在下では 125.2 ± 34.0 nm と 37.1 ± 3.5 nm の 2 つの分布を示し、 γ -CD の添加により 2.2 ± 0.4 nm へと変化したことから支持された。GA の凝集体形成は、複数分子によるアビディティや解離後の再結合が影響し甘味抑制作用の持続性と関連があるのではないかと考えている。

Y. Izutani, K. Kanaori, M. Oda : Analysis of the interaction between gymnemic acid and cyclodextrins

1P238

加齢による海馬錐体細胞の膜流動性の低下

○榊原 学¹、深谷 泰亮²、権平 巧¹、樫八重 泰斗¹ (¹東海大・開発工・生物工、²東海大院・開発工・生物工)

これまで加齢に伴って、海馬神経細胞においてムスカリン性 M1 受容体、NMDA 受容体が減少し、あわせて細胞膜の粘性が増加するとの報告がある。ここでの膜の粘性は、脳のホモジネートを若齢と老齢で比較解析し、統計的にうらづけたものであった。このような神経細胞の膜における変化は、老化に伴う学習・記憶能力の減退と関係付けられることが多く、膜の基質である不飽和脂肪酸、特にアラキドン酸産生能の加齢による減退を補うことが効果的であると動物の行動実験から明らかにされ、海馬錐体細胞の電気生理学的変化とも、よく対応付けられている。本報告では若齢動物 (2ヶ月齢ラット) と老齢動物 (最小 21ヶ月齢) の海馬神経細胞の膜流動性を共焦点顕微鏡システム (FV1000、オリンパス) で蛍光退色回復法 (Fluorescent Recovery After Photobleaching: FRAP) により検討した。海馬スライス標本を D II - C で染色し、錐体細胞細胞体の一部を直径 1.2 μ m の光点 (405nm) で退色させ、その後の蛍光強度の回復過程を解析した。回復過程は、ほぼ完全に 1 次の拡散過程で近似され、回復率、拡散係数、輸送係数、時定数などで特徴づけられる。加齢動物の海馬錐体細胞の膜流動性は、時定数において若齢動物に比較して有意に大きく、一方、拡散係数、回復率はいずれも有意に小さかった。これらの結果は、これまでの報告を裏付けるもので、加齢に伴って膜の流動性が低下することを示すとともに、水迷路試験で評価される動物の空間認知能力の減弱と平行している。

M. Sakakibara, T. Fukaya, T. Gondaira and Y. Kashiya : Decrease of membrane fluidity at hippocampal pyramidal neuron due to aging

1P240

RNG105 による神経シナプス刺激依存的な局所的翻訳制御

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

神経樹状突起における局所的タンパク合成は、シナプス刺激依存的な長期的シナプス可塑性に重要な役割を果たしている。神経樹状突起への mRNA の輸送と局所的タンパク合成の制御には、RNA granule と呼ばれるリボソームや mRNA から成る高次複合体が中心的な役割を担っている。

我々は、海馬および大脳新皮質神経細胞における RNA granule の新規構成タンパク質として RNG105 (RNA granule protein 105) を同定した。RNG105 は直接 mRNA に結合し、翻訳を抑制する活性をもつことを明らかにした。RNG105 のドメイン解析により、C 末の RGG box / RG-rich 領域で RNA granule に結合し、N 末の coiled-coil 領域で mRNA に結合してその翻訳を抑制することを明らかにした。また、経時的な蛍光イメージングにより、シナプス刺激 (BDNF 刺激) によって RNG105 が RNA granule から解離することを見いだした。この時、RNA granule におけるリボソームの蛍光量には変化がなかった。RNG105 の RNA granule からの解離は、RNA granule 近傍での局所的タンパク合成の活性化と密接に関連していた。以上の結果から、RNG105 は刺激のないときは RNA granule においてタンパク合成を抑制しているが、シナプス刺激依存的に RNA granule から解離し、その結果刺激されたシナプスにおいて局所的タンパク合成が起こる、というメカニズムを考えている。

以上の結果とあわせて、現在進行中の RNG105 ノックアウトマウスの解析等の経過についても紹介したい。

N.Shiina, K.Shinkura and M.Tokunaga : RNG105: A regulatory protein in synaptic stimulation-dependent local translation in neuronal dendrites