

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
116 (4) 286-308 (1996)

脳神経系に機能する蛋白質の神経生化学的研究.
とくに神経成長因子に関する研究

林 恭三

岐阜薬科大学, 〒502 岐阜市三田洞東 5 丁目 6 の 1

**Biochemical Studies on Functional Proteins in the
Brain Nervous System. Neurobiochemical
Studies on Nerve Growth Factor**

Kyozo HAYASHI

*Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1,
Mitahora-higashi, Gifu 502, Japan*

(Received January 11, 1996)

Nerve growth factor (NGF) is a polypeptide that is necessary for the survival and growth of developing sympathetic and sensory neurons as well as basal forebrain cholinergic neurons in the brain. The effects of NGF are mediated by the binding of the factor to its specific receptor present on the surface of NGF-responsive cells. Since NGF-responsive basal forebrain cholinergic neurons are lost in Alzheimer's disease, treatment with NGF may be therapeutically beneficial for the patients with this disease.

Our studies were focused on the purification, amino acid sequence, enzyme immunoassay (EIA), NGF-biosynthesizing cells, regulation of the biosynthesis, compounds stimulating NGF-biosynthesis/secretion, etc.

The major results obtained are summarized as follows:

- 1) We purified NGFs from snake venoms and determined their amino acid sequences. Among them, *Crotalus adamanteus*- and *Vipera russelli*-NGFs were glycoproteins.
- 2) We developed highly sensitive (0.03—0.05 pg/tube or bead), simple, and reliable EIA systems for NGFs and NT-3.
- 3) Catecholamine, its derivatives, *p*-quinone derivatives, nicotine, nicotine derivatives, coenzymes, etc. enhanced the NGF-biosynthesis/secretion of fibroblasts and astrocytes by increasing their cellular content of NGF mRNA.
- 4) Basal forebrain-lesioned rats (an animal model of amnesia) administered 6-(4-hydroxybutyl)-2,3,5-trimethyl-1,4-benzoquinone (TMQ) orally showed improvement not only their NGF level and choline acetyltransferase (CAT) activity in the brain but also their memory and learning.
- 5) Interleukins (IL)-4 and -5 significantly increased the amounts of NGF secreted by mouse astrocytes; whereas IL-2, -3, and -6 had no significant effect.
- 6) Interferons- β and - γ inhibited the DNA- and NGF-synthesis in growing astrocytes cultured from neonatal mouse brain but they had no effect on the

本総説は、平成7年度日本薬学会賞の受賞業績を中心に記述したものである。

NGF-synthesis/secretion in quiescent astrocytes.

7) Alkylcatechols regulated the NGF gene expression in astrocytes *via* both protein kinase C- and cAMP-independent mechanisms.

Key words—nerve growth factor (NGF); Alzheimer's disease; cholinergic neuron; enzyme immunoassay (EIA); biosynthesis/secretion; astrocyte

はじめに

高齢化社会を迎え、老年期痴呆をはじめ各種神経疾患の成因や治療薬の開発など高次神経系に関する研究は医療の場より必然的に求められている最重要研究課題の1つであり、めざましく進展している生命科学の中でも特に多くの領域の研究者の注目を集めている。著者らは1960年代の後半よりヘビ粗毒から多くの神経毒や細胞毒蛋白などの分離精製、それらのアミノ酸配列、構造・活性相関について研究し、¹⁻⁴¹⁾ 得られた知見を活用してシビレエイ電気器官からニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を分離、分離した nAChR とヘビ神経毒を tool として重症筋無力症患者血中に存在する抗 nAChR 抗体測定法の開発⁴²⁻⁵⁴⁾ や nAChR の糖鎖構造の決定、^{55,56)} 糖鎖と受容体機能との関連⁵⁷⁾ などについて研究を行っている。また、これと併行して1970年代の後半からは神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の研究をはじめ種々な材料から NGF の分離精製、それらのアミノ酸配列、NGF に対する酵素免疫測定系 (EIA) の確立、NGF 産生細胞の検索、生合成制御機構、生合成促進物質、中枢神経系におけるサイトカインの NGF 合成・分泌に及ぼす影響などについて研究を続けている。本稿ではこれらの中、NGF に

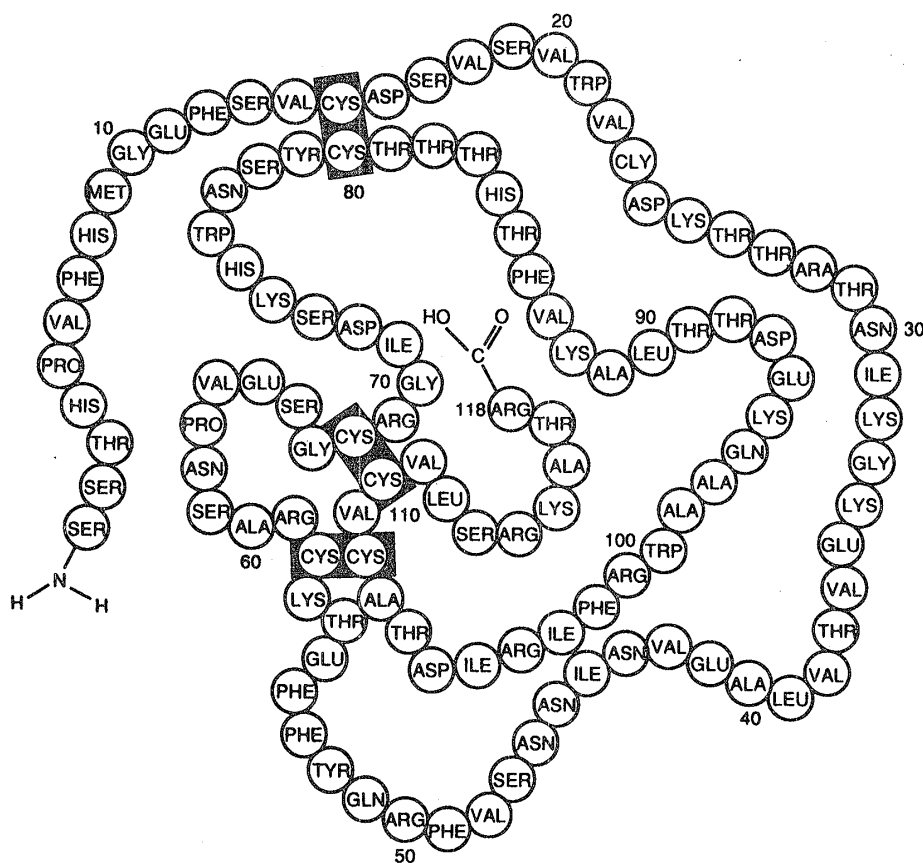


Fig. 1. Amino Acid Sequence Showing Disulfide Bridges of Mouse NGF

関する研究成果を中心に述べる。なお、ヘビ神経毒、NGFに関する著者らの研究成果については他の総説⁵⁸⁻⁶⁰⁾も参照していただければ幸いである。

1. 神経成長因子 (NGF) とは

NGFは神経栄養因子 (neurotrophic factor: NTF) の1つであり、NTFとしてその構造 (Fig. 1) や遺伝子が最初に明らかとなった生体分子である。NGFは交感神経によって支配される臓器や組織で生合成された後、神経末端のNGF受容体を介して細胞体へ逆軸索輸送され、交感神経細胞及び胎生期の知覚神経細胞の分化・成長、生存に機能している (Table 1)。最近、NGF受容体として低親和性以外に高親和性の受容体が見出されているがそれらの詳細な生理的役割は今後の興味ある課題である。また、最近NGFが前脳基底野のコリン作動性神経細胞の生存・機能維持に重要な役割を演じていることを示唆する多くの報告がなされ、アルツハイマー型痴呆症 (Alzheimer's disease: AD) との関連から注目を集めている。^{61, 62)}

NGFはとくにオスのマウスの顎下腺中に多量に含まれているほか、ヘビ毒、モルモット前立腺、ウシ精嚢や精液、ジャコウネズミの顎下腺などでその存在量は比較的高い。マウス顎下腺中の7SNGFは $\alpha\beta\gamma$ の3種のサブユニットからなる複合体であるが、NGFの生物学的特性である神経節からの神経突起の伸展活性は β サブユニットが保持している。^{59, 60)}

2. NGFの測定法

NGFの生物学的測定法としてはマウスあるいはニワトリの脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) からの神経線維の伸展活性を顕微鏡下で観察する方法が最も一般的である。高純度のNGFなら1-10 ng/mlで強力な伸展活性が見られる (Fig. 2)。DRGの摘出に時間がかかることや定量性に欠け、また多数の試料の測定には適していないため、*Pheochromocytoma cells (PC)-12* からの神経突起伸展活性を見る方法も用いられているがその検出限界はDRG法とほぼ同程度である。しかし一般にNTFの生理活性発現濃度や生体内での存在量はpg/g湿組織と考えられ、NTF類の生理生化学的研究を推進するためには高感度で簡便な測定法の開発が望まれた。そこで、著者らはNGFに対する再現性、特異性の高い高感度で迅速なEIA

Table 1. NGF Effects on Target Cells

Morphological
Neurite proliferation
Neurite stabilization
Cytoskeletal polymerization
Hypertrophy
Nuclear-membrane alterations
General trophic
Increased metabolic-precursor uptake
Continued maintenance of anabolic activity
Increased catalase activity
Specific anabolic increases in
Tyrosine hydroxylase synthesis
Dopamine- β -hydroxylase synthesis
Ornithine decarboxylase synthesis
Choline acetyltransferase
Neurotrophic
Directional orientation for neurite growth
Synaptic maintenance
Cell surface
Increased rate of cell-cell, cell-substratum adhesion
Surface-glycoprotein alterations
Other survival <i>in vitro</i>
Protection from neurotoxic substances
Enhanced regeneration
Alteration of ethylnitrosourea-induced carcinogenesis

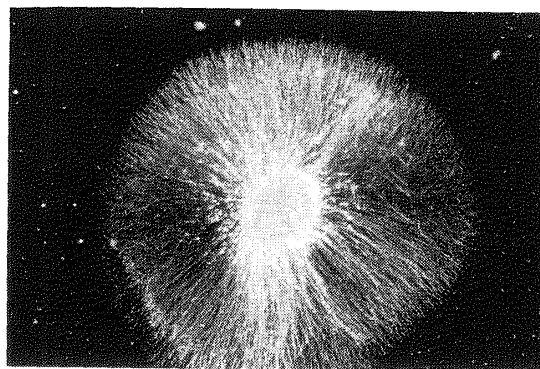
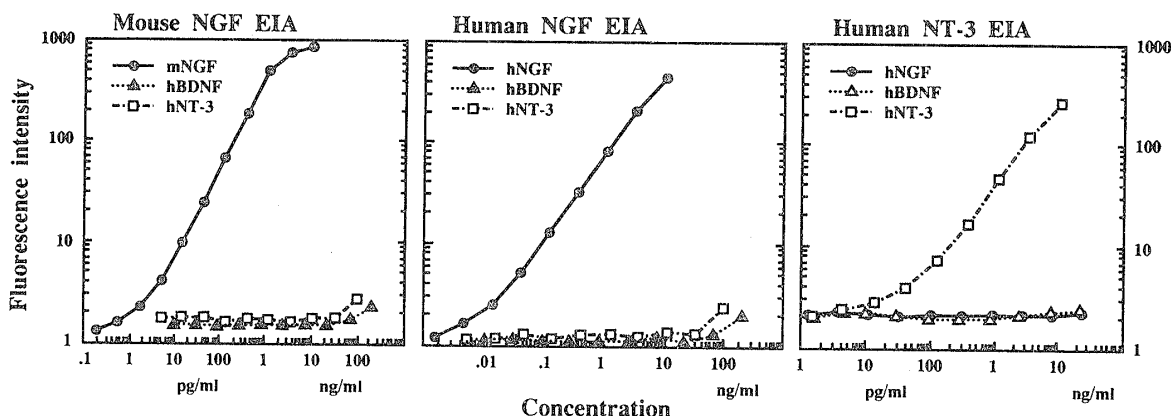


Fig. 2. Neurite Outgrowth from Chick Embryo Dorsal Root Ganglion (DRG)

Human	NGF	1	10	20	30	
Human, Rat, Mouse	BDNF	SSSHPIFHRGEFSVCDVS ¹⁰ VWV--GDKTTATDIK ³⁰ GK				
Human, Porcine, Rat, Mouse	NT-3	H*DPA--R***L***I*E**TAA**K**V*MS*G				
Oocyte	NT-4	YAE*KS-***Y***E*L**--T**SS*I*IR*H				
Human	NT-5	*D*VLSR***L***N***--T**R**V*DR**				
		*ETA*ASR***LA***A**G***--T*RR**V*LR*R				
		40	50	60	70	80
		EVMVLGEVNI ⁴⁰ NN ⁵⁰ S-VFKQYFFETKCRD-----PNPVD ⁶⁰ SGCRGIDSKH ⁷⁰ WNSYCT ⁸⁰				
		T*T**EK*TVSKG-QL***Y***NP-----MGYTKE***KR***Q*R				
		Q*T***IKTG**--PV***Y**R*KE-----AR**KN***D***Q*K				
		I*T*MS*IQTLTG-PL*****NP-----SGSTTR***V*K*Q*I*E*K				
		E*E*****PAAGGSPLR*****R*KADNAEEGG*GAGGG***V*RR**V*E*K				
		90	100	110	120	
		TTHTFVKALTMD-GKQAAWRFIRIDTACV ⁹⁰ CVLSRKAV ¹⁰⁰ RRRA ¹¹⁰				
		QSY*R***SK*RIG*****S***T*TI*RG*--				
		*SQ*Y*R***SENN*LVG**W*****S***A***IG*T-				
		AKQSY*R***I*AN*LVG**W*****T*LSRTG*T-				
		AKQSY*R***A*AQGRVG**W*****T*LSRTG*A-				

Fig. 3. Comparison of Amino Acid Sequences of Neurotrophins

Symbol (*) means the identical amino acid residue with that of human NGF.

Fig. 4. Standard Curves of Two-site EIA System for Mouse NGF, Human NGF, and Human NT-3⁶⁸⁾

系を確立し,⁶³⁻⁶⁷⁾ 本法と DRG を用いる bioassay 法を組合せつつ研究を進めている。

最近, NGF と構造の類似した BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 が見出されている (Fig. 3)。しかし著者らの開発したヒトあるいはマウス NGF, NT-3 に対する EIA 系は極めて簡便で特異性, 検出感度 ($3-5 \times 10^{-14}$ g/tube あるいは bead) の高い迅速な測定法である^{64,65,68)} (Fig. 4)。また, 神経細胞の生存維持活性の測定にはラットの海馬ニューロンからの神経突起の伸展活性や生存活性を観察する方法も併用している。⁶⁷⁾

3. NGF の構造活性相関

マウス顎下腺中の NGF は緩やかな条件下で精製すると分子量約 14 万の高分子量複合体として分離される。7SNGF は pH 5—8 では安定であるが, それ以外の pH, あるいは希釈するとそれぞれのサブユニットに解離する。3 種のサブユニットのうち γ サブユニットはアルギニンエステロペプチダーゼ活性をもつセリン酵素でウシトリプシンの構造と 35% 前後の相関性を示す糖タンパク質で NGF 産生時のプロセシング酵素と考えられている。 α サブユニットには特定の生物活性は見いだされていないが構造は γ サブユニットと相同性が高い。しかし, その生理的役割は不明である。7SNGF は 1—10 ng/ml 程度に希釈するとサブユニットに解離するため, 生体内での NGF の活性単位は β NGF と考えられている。⁶⁹⁾

	1	10	20	30	40	50	60	70	
(1) Human	SSSHPIFHRGEFSVCD	SVSVWVGDKTTATD	IKGKLVMLGEVNI	NNSVFKQYFFETK	CRDPNPVDSGCRG				
(2) Bovine	*****V*****I*****A*****E*****								
(3) Rat	**T**V**M*****T*****A*****R*****AS**E*****								
(4) Mouse	**T**V**M*****A*****T**A*****V**N*****S**E*****								
(5) Guinea pig	**T**V**M*****M*****T*****N*****R**S*****								
(6) Chicken	-ED**VHNL**H*****A**T-*****NT**T*MEN**LD**K**Y*****KN***EP*****								
(7) <i>Naja naja</i>	-ED**VHNL**H*****A**T-*****NT**T*MEN**LD**K**Y*****KN***EP*****								
(8) <i>Naja naja siamensis</i>	-ED**VHNL**H*****A**T-*****NT**T*MEN**LD**K**Y*****KN***EP*****								
(9) <i>Naja naja atra</i>	---**VHNQ*****AN*****MF*NT**T*MVD**L**N**Y*****KN***P*****								
(10) <i>Vipera russelli</i>	-ED**VHK*****Y*****N**AN**I*****LR*NI**T*MVD*****N**Y*****N***P*****								
(11) <i>Crotalus adamanteus</i>									
	80	90	100	110	120				
(1) Human	IDSKHWSYCTTTHTFVKAL	TMDGKQAARFIRIDTACV	CVLSRKAVRRA						(100.0%)
(2) Bovine	**A*****T*****TGQ**					114 / 120			(95.0%)
(3) Rat	*****T**D*****A**G					110 / 120			(91.7%)
(4) Mouse	*****T**E*****T**G					107 / 120			(89.2%)
(5) Guinea pig	*****T**N*****N**A**G					105 / 120			(87.5%)
(6) Chicken	**A*****E*****SG**P-					106 / 118			(88.1%)
(7) <i>Naja naja</i>	***S*****E*D**I*****E*N**S*****ITK*TGN--					80 / 116			(68.9%)
(8) <i>Naja naja siamensis</i>	***S*****E*D**I*****E*N**S*****ITK*KGN--					79 / 116			(68.1%)
(9) <i>Naja naja atra</i>	***S*****E*D**I*****E*N**S*****ITK*KGN--					79 / 116			(68.1%)
(10) <i>Vipera russelli</i>	**A*****D**R*****ERN**S*****N*****I**RDNFG					83 / 117			(70.9%)
(11) <i>Crotalus adamanteus</i>	**AR*****D*****E*N**S*****N*****I**NGN--					84 / 117			(71.8%)

Fig. 5. Sequences Alignment of Mammalian and Snake NGFs

Symbold (*) and (●) mean the identical amino acid residue with that of human NGF and the glycosylation site of asparagine residue.

Fig. 5 に現在までに明らかにされている哺乳類及びヘビ NGF のアミノ酸配列を示す。⁷⁰⁻⁷⁴⁾ 従来 NGF は単純蛋白質として知られていた。しかし、最近著者らが分離し構造決定したクサリヘビ⁷⁵⁾ やガラガラヘビ⁷⁶⁾ の NGF には血清型の糖鎖が 1 個結合している。興味深いことはヘビ NGF 相互の一次構造の相同性は極めて高いが糖鎖をもたないコブラ NGF 類 DRG からの神経線維の伸展活性は非常に弱いのに、糖鎖をもつヘビ NGF はほ乳類 NGF とほぼ同程度の強い生物活性を発現することである。糖鎖構造と詳細な機能との関連は今後の課題と考えている。

10 種類以上の NGF 構造が明らかになると構造活性相関についてもいくつかの知見が得られてきた。すなわち、1) 哺乳類 NGF 間では 87% 以上ヘビ NGF と哺乳類 NGF の間でも 68—72% と相同性が高い、2) アミノ酸残基 10—36, 48—59, 66—91, 95—115 位、15, 58, 68, 80, 108, 110 位の 6 残基の Cys, 75, 84 位の His, 21, 76, 99 位の Trp は不変領域を形成しており活性発現に必須な領域と考えられる、3) 分子中の 6 残基の Cys は種差を問わず同じ位置に配位しており特異な高次構造の保持に参与している、4) 種間で置換のみられるアミノ酸残基は分子全体に分散せず N 末、C 末、60—65 位及び 92—94 位の親水性アミノ酸残基からなる領域に局在している。抗原活性部位は主に親水性領域に存在していると言われている。⁷⁷⁾ NGF では動物種間相互で免疫学的交叉反応性が低いがそれらの NGF 分子間のアミノ酸残基の置換が主に親水性領域に集中していることと一致している、5) 33 位周辺の親和性アミノ酸残基からなる領域は動物間で置換の少ない領域で NGF 受容体との結合部位と考えられる、6) コブラ NGF の生物活性が哺乳類 NGF に比し弱い理由として 34—35 位の Lys—Glu がヘビでは Asn—Thr に、84 位の His が Asp に置換されていることが考えられる、7) Val 22 位は生物活性に必須である⁷⁸⁾ ことなどが明らかとなっている。

最近、神経細胞の生存や機能維持に必須な NTF の探索が行われ、いくつかの NGF ファミリーが発見されている。⁶⁰⁾ これらの中サケ、シビレイなどの BDNF, NT-3 には一部アミノ酸残基の置換が見られるが、ヒト、マウス、ラットの BDNF や、ヒト、ブタ、ラット、マウスの NT-3 は種間を超えて全く同じアミノ酸配列を有している。これらの NTF の相同性は 50—

60% と高い, しかし, それぞれ神経系に対する応答には明確な差異のあることが明らかになっている.⁶⁰⁾ さらに, McDonald ら⁷⁹⁾ は NGF の X 線解析から, 1) NGF の分子は偏平な 3 本の非平行型 β 構造であること, 2) NGF, BDNF, NT-3 は相互に相同性が高いが生物活性や交叉反応性で相互に明らかな違いが見られるのは 29—35, 43—48, 59—66, 92—98 位の 4 個所のアミノ酸配列の置換に富む領域が β ヘアピンループや reverse turn 構造の構築に関与し分子の表面に局在しており (Fig. 6), これらの部位が抗原活性部位, 特異的な生物活性発現時に受容体との結

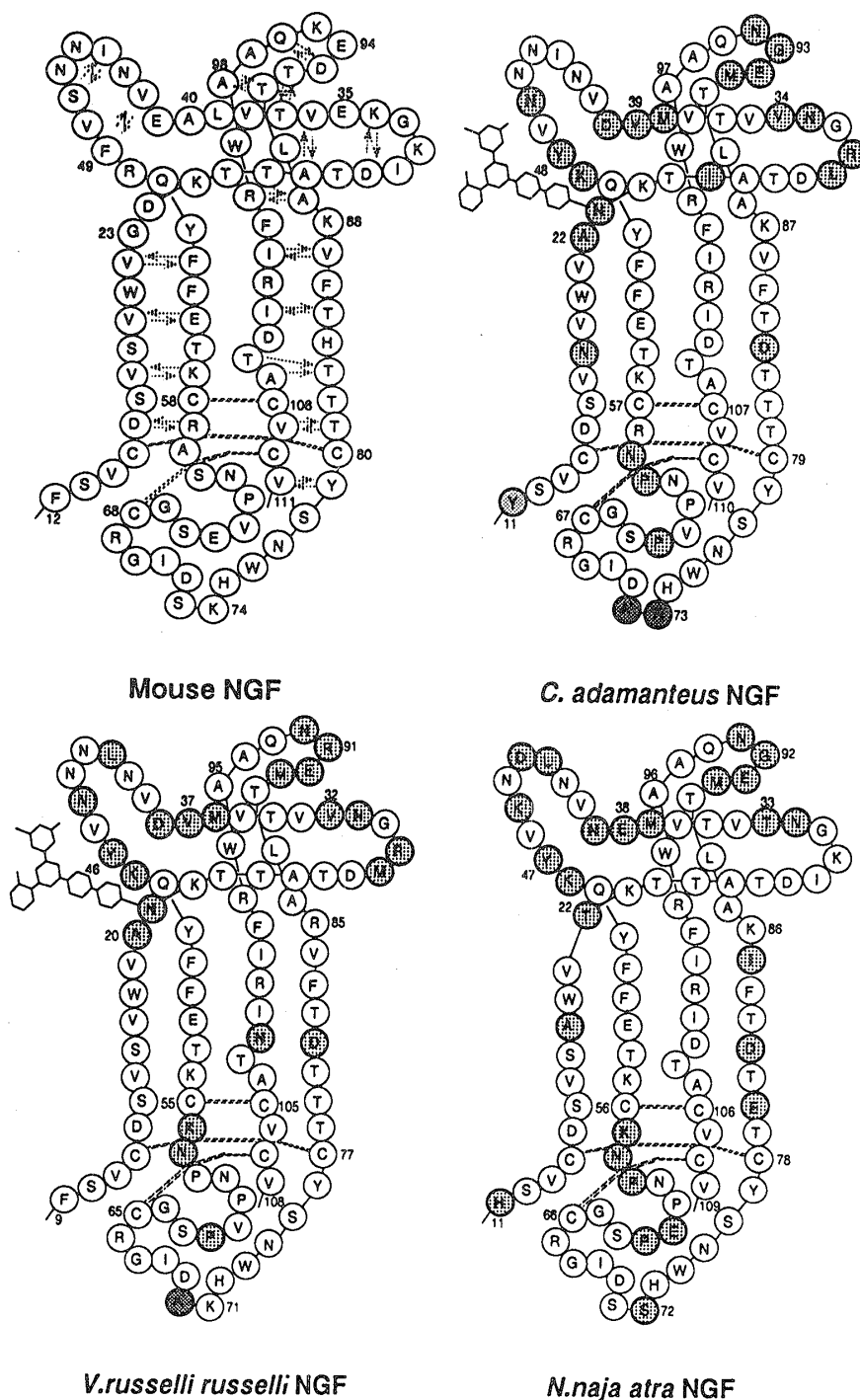


Fig. 6. Location of the Variable Sequences of NGF Structure Residues with Nonconservative Changes are Indicated by Their Shaded One Letter Amino Acid Codes

合に関与する領域を構成することなどを明らかにしている。

4. 生体内における NGF 産生細胞

末梢や中枢の深海細胞の生存、機能維持に必要な NGF が生体内のどのような細胞で生合成されているかは興味深い。Harper ら⁸⁰⁾ は交感神経節とニワトリの心臓細胞を併置培養すると交感神経節から伸展する神経突起の先端が心臓細胞に向かって伸びることを報告している。この結果は心臓細胞が NGF を産生している可能性を示唆している。そこで著者らは常法に従い、マウスの心臓を含め種々な組織から調製した細胞を培養、培地中に産生される NGF 量を測定し、NGF 産生能を検討した。その結果、心臓細胞 (Fig. 7) をはじめこれらの細胞はすべて NGF を産生することが分かった。⁸¹⁾ 新生マウスの末梢組織の初代培養細胞と 2 回継代培養したすべての組織の細胞が NGF を産生することや、初代培養細胞より継代細胞で合成量が多いことも明らかとなった。初代培養細胞はそれぞれの組織を構成する実質細胞と結合組織由来の線維芽細胞からなるが継代培養すると線維芽細胞に富む細胞集団となる。NGF 産生量は、Table 2 のごとく交感神経支配の強い臓器の線維芽細胞ほど NGF 産生量が高いことも分かった。^{81, 82)} マウス株化線維芽細胞の L-929 や L-M, BALB/c3T3 細胞も NGF を産生することから結合組織の線維芽細胞は末梢組織での NGF 産生を担う細胞と推定された。⁸³⁾

では脳内のどのような細胞が NGF を産生するのであろうか？ 脳の主体をなす細胞はアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトからなるグリア細胞と神経細胞である。これらの細胞の中、アストロサイトの突起は神経細胞と血管壁に伸びており、あるものはシナプスを包み込んでいる。単に神経細胞の物理的支持体としてだけでなく脳・血液関門を構築したり、神経細胞が機能しやすい微小環境の構築の役割を担っている。これらの受動的機能のほかアストロサイトは神経細胞の機能・生存維持に必要な因子の合成・分泌を行っていると考えられている。そこでマウスの脳よりアストロサイトを調製し、細胞増殖と NGF 産生量、細胞密度と NGF 産生量、1 日当たり培養液中に産生される NGF 量などについて検討した (Fig. 8)。その結果、マウスアストロサイトは抗原性、分子量、等電点、生物活性がマウス顎下腺 NGF と同一と考えられる NGF 分子を産生することが

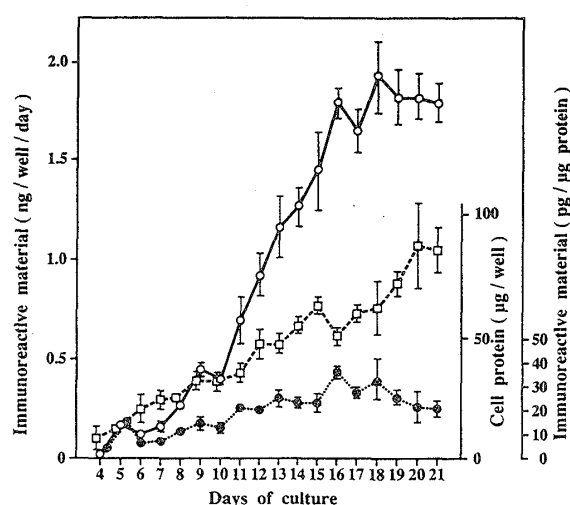


Fig. 7. Changes in the Amounts of Immunoreactive Material in Conditioned Medium and Cell Protein of Mouse Heart Cells during Culture⁸¹⁾

The hearts from 7-week-old male mice were dispersed into single cells and the cells subcultured on multiwell tissue culture plates at a density of 1 to 2×10^4 cells/well (well surface, 2.1 cm^2) on day 0. On the indicated days, the medium was changed to serum-free DMEM supplemented with 5 mg/ml of BSA. After 24 h , medium (0.5 ml) was collected and a 0.1-ml aliquot was applied to the EIA system. The amounts of immunoreactive material are represented as equivalent to the amounts of mouse submaxillary gland NGF (○). Cells were collected from the wells with 0.3 ml of 0.1 M NaOH and sonicated, and then protein concentrations were determined by the Coomassie blue technique on a 0.1 ml aliquot of this cell extract (□). One mg of cell protein is equivalent to 1.6×10^6 cells. Data (●) are the ratios of the amounts of the immunoreactive material in the medium to micrograms of cell protein. Each point is the mean \pm S.E. of four determinations.

Table 2. Biosynthesis/Secretion of NGF by Fibroblasts Derived from Various Organs/Tissues of New Born Mouse⁸¹⁾

Organs/Tissues	NGF synthesis (pg/d/ μ g cell protein)	
	Exp. 1	Exp. 2
Skin	0.4—4.0	
Muscle	0.6—1.8	
Spleen	0.5—4.6	0.3
Pancreas	1.8—6.5	5.3
Thymus	3.4—5.8	
Lung	2.3—6.2	5.1
Heart Atrium		17.4
Ventricle	6.0—14.0	53.9
Kidney		3.7
Adrenal gland		42.7
Intestine		20.8
Brain	0.1—0.7	

Cells were cultured with Dulbecco's MEM containing 10% fetal calf serum.

分かった。⁸⁴⁾

胎生後期から幼若期の培養マウスアストロサイトは盛んに増殖し、その NGF 合成速度は約 50 pg/10⁶ cells/h である。しかし脳内 NGF 量は最も多い海馬でも約 2 pg/mg 湿組織以下であり、アストロサイトの NGF 合成は脳内でいろいろな機構で制御されていると考えられる。成熟したアストロサイトはほとんど増殖を停止した静止期の細胞であるが、培養条件下では増殖をはじめる。すなわち、細胞を低密度で血清を含む培地で培養すると、細胞密度の増加とともに接触障害が起こり細胞増殖は低下する。この間細胞数の増加とともに培養液中の NGF 量は増大するが、一定細胞数当りの NGF 分泌量は低下する。これらのことから NGF 合成は細胞増殖依存性であることが分かった。⁸⁴⁾ またアストロサイトの NGF 合成は細胞周期に限定されず静止状態 (G₀ 期) から DNA 合成準備期 (G₁ 期) に移行する過程で合成が調節制御されていることも明らかとなった⁸⁵⁾ (Fig. 9)。ラットやマウスは生後数週間の脳の発達過程でアストロサイトが増殖する時期に急激な NGF mRNA の増大がみられるが、この時期のアストロサイ

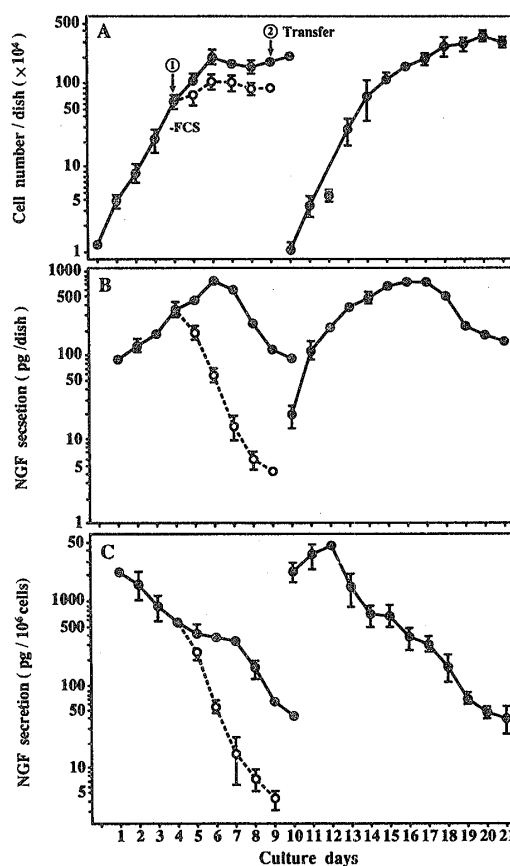


Fig. 8. Relationship between Cell Growth and NGF-Synthesis/Secretion in Astrocytes⁸⁴⁾

A: Growth curve of astrocytes. B: Changes in the amount of NGF secreted/dish/d. C: Changes in the amount of NGF secreted/10⁶ cells/d. Astrocytes were cultured at about 1×10⁴ cells/35 mm dish in 1 ml of DMEM containing 10% FCS. On day 4 (indicated by arrow 1), the medium of some of the dishes were replaced with 1 ml of DMEM containing 0.5% BSA and the cells were cultured for an additional 5 days. On day 9 (indicated by arrow 2), the confluent cultures which had formed were dissociated with 0.25% trypsin and recultured at about 1×10⁴ cells/dish. All CM were collected and replaced with fresh media every 24 h. An aliquot of each CM (100 μ l) collected was used in the EIA for the measurement of its NGF contents. The closed circles with solid lines indicate the values in the CM with DMEM containing 10% FCS, while the open circles with dashed lines indicate the values in the CM with 0.5% BSA. Each point is the mean \pm S.E. of three determinations.

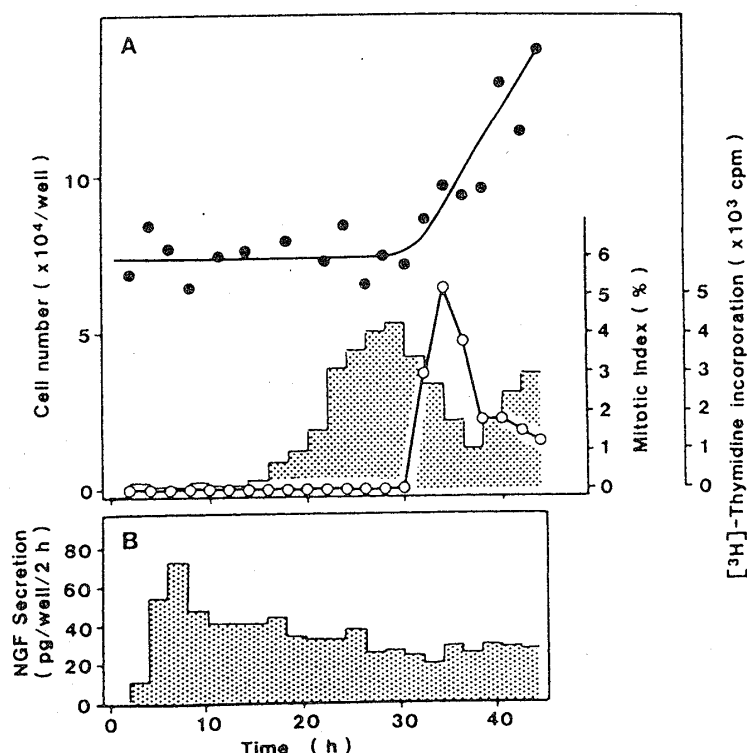


Fig. 9. Changes in Cell Number, DNA Synthesis, Mitogenic Activity and the Amounts of NGF Secreted after Refeeding of Quiescent Cell Cultures with FCS-Containing Medium⁸⁵⁾

Astrocytes were inoculated into 24-well plates and cultured in DMEM containing 10% FCS for 3 d. Then, the cells were cultured in FCS-free DMEM containing 0.5% BSA for 2 weeks with medium changes every 3 d. The medium of the quiescent cells (7.1×10^4 cells/well) was then replaced with 0.5 ml of DMEM containing 10% FCS, and this medium was replaced with fresh at 2 h before each collection time. After collection of the CM at the indicated times, (A) 1 ml of PBS was added, and the total cell number (●) and percentage of cells in mitosis (○) were determined from ten arbitrarily selected fields at 200× magnification. Rates of DNA synthesis was estimated by measurement of the incorporation of [³H]thymidine (0.2 μCi/ml) into trichloroacetic acid-insoluble materials per 2 h (stippled areas). (B) Aliquots (100 μl) of each CM were used in the EIA for determination of NGF contents. Values are the mean of three determinations.

トは NGF の産生を介してニューロンの分化に関与しているものと推測される。

成熟脳で、NGF 産生能をもつアストロサイトが最も活動するのは損傷時である。また、神経細胞死が起こるとその部位の反応性アストロサイトは増殖をはじめ、このような脳の損傷時に空隙浸出液中の NGF レベルの変動を測定すると損傷後 4 時間から NGF の上昇が見られ 16 時間後に最大に達し以後急速に低下する。⁸⁶⁾ しかし、正常時の 50% 程度高いレベルに約 1 週間保たれる。この時期は損傷周辺の反応性アストロサイトの出現とほぼ一致している。これらの知見はアストロサイトが脳発達のある時期に NGF 合成を介して神経細胞の分化に関与していることや脳の傷害が起きたときには NGF を産生して神経細胞の保護や神経再生に機能していることを示唆している。

5. NGF 生合成を調節する化合物群

1) カテコールアミン類 NGF は知覚・交感神経細胞の生存に必須な NTF の一種であることから、生体内での NGF 産生量は交感神経系の神経伝達物質のカテコールアミン類によ

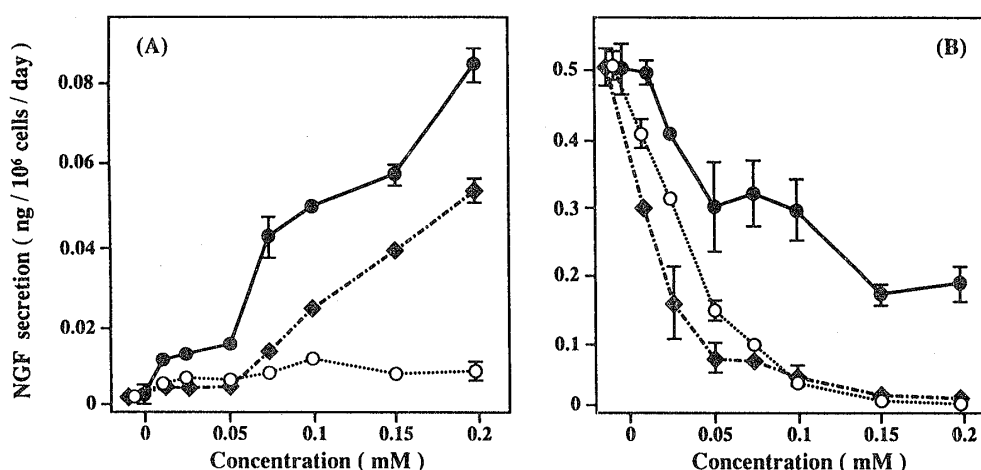


Fig. 10. Effects of Catecholamine on NGF Synthesis/Secretion by Astrocytes⁸⁷⁾

(A) Quiescent astrocytes ($2.2 \pm 0.4 \times 10^6$ cells/well) and (B) exponentially growing astrocytes ($3.4 \pm 0.4 \times 10^5$ cells/well) were cultured with various concentrations of catecholamine for 24 h. The CM was collected and its NGF content was determined by EIA. The values of epinephrine (●), norepinephrine (○), and dopamine (◆) are expressed as the mean \pm S.E. of four determinations.

り制御されていることが考えられた。著者らはまず NGF 産生細胞の合成・分泌を制御する化合物群を検索する測定系を開発した。⁸³⁾ すなわち、均一なアストロサイトあるいは線維芽細胞を培養し培地中から FCS を除去して BSA を加え静止期の細胞群とした後、培地中に検討しようとする化合物を添加一定時間培養を続けた後培養液中に産生された NGF 量を EIA 系で測定し無添加の場合の NGF 量と比較する方法である。

L-M 細胞やアストロサイトを用いて検討した結果カテコールアミンは静止期のこれらの細胞の NGF 合成を著しく促進するが対数増殖期の細胞では逆に抑制することが分かった (Fig. 10).^{83, 87-91)} 他の神経伝達物質の中ではアセチルコリンアゴニストが L-M 細胞の場合には全く応答しなかったもののアストロサイトの NGF 合成を 2—3 倍促進する作用があること (Table 3), 培地中の NGF 量はカテコールアミンの濃度に依存すること, 細胞内の NGF mRNA 量の上昇が先行すること, 類似の作用は他の線維芽細胞でも見られること, カテコール骨格の 4 位にアルキル基のある化合物は NGF 生合成促進作用が強いことも明らかとなった.^{92, 93)} これらの結果から, 神経系に存在するカテコールアミンやその代謝産物は NGF の生合成を調節している可能性のあることや, これらの化合物を動物に投与すれば生体内での NGF 合成を促進し傷害部位の神経細胞の機能修復・再生が行われることが示唆される。

カテコール化合物の NGF 生合成促進作用の機序について著者らはアドレナリン受容体を介さないと報告している。⁸³⁾ 一方, Mocchetti ら⁹⁴⁾ はラットの C₆ グリオーマ亜株を用いた系ではアドレナリン受容体を介することや, 誘導効果に先だって *c-fos* mRNA が誘導されると報告している。著者らの結果との差異の原因として正常細胞と腫瘍細胞の違いによることが考えられる。

前記のごとくカテコール類はアストロサイトや線維芽細胞の NGF 合成を 10 倍以上も亢進した (Table 4). また, プロテインキナーゼ C (PKC) のアクティベーターとして知られる phorbol 13-butyrate (PMA) にも弱いながらも促進効果が認められたが, これらの化合物を同時に添加すると相乗効果により 100 倍以上も強い促進効果が見られた。⁹⁵⁾ この時細胞内 NGF

Table 3. Effects of Various Neurotransmitters on the NGF Content in the Media of Astrocytes and L-M Cells⁸⁷⁾

Treatment	Concentration (mM)	Astrocytes	L-M cells
		Fold increase in NGF content	
None (Control)		1.00±0.13	
Epinephrine	0.1	8.70±0.13	12.83±1.26
	0.2	14.8 ±0.74	
Dopamine	0.1	6.04±0.56	13.91±0.81
	0.2	13.3 ±0.62	
Norepinephrine	0.1	3.77±0.45	7.48±0.24
	0.2	2.77±0.68	
Methacholine	0.1	2.79±0.11	1.18±0.17
	0.2	3.23±0.56	1.43±0.10
Carbamylcholine	0.1	2.80±0.64	1.20±0.03
	0.2	3.21±0.13	1.38±0.05
Nicotinic acid	0.1	0.95±0.13	0.97±0.07
	0.2	1.03±0.08	1.33±0.02
Serotonin	0.1	1.13±0.08	1.17±0.10
	0.2	1.03±0.38	1.38±0.11
Histamine	0.1	1.05±0.16	1.19±0.06
	0.2	0.97±0.26	1.15±0.09
GABA	0.1	1.03±0.08	1.09±0.12
	0.2	1.05±0.16	1.20±0.11
Glutamic acid	0.1	1.23±0.16	1.01±0.16
	0.2	1.08±0.15	1.51±0.26

mRNA 量も著明に上昇した (Fig. 11). また, *c-jun* mRNA の発現パターンは NGF mRNA のそれと類似し, デキサメサゾンの添加により消失してしまうことから, Jun 蛋白質の発現がカテコール類による NGF 合成促進効果に関与している可能性や, PKC 阻害剤の staurosporine や K252a もこの作用を抑制することから PKC も NGF の生合成調節に関わっていることが推測された. さらに, cAMP-依存性 protein kinase 阻害剤は PC-12 からフォルスコリンにより誘導される神経突起の伸展を阻害することも明らかとなった.⁹⁶⁾

以上のごとくカテコール化合物に NGF 合成促進効果が認められたため, その異性体のレゾルシノールや *p*-ハイドロキノン関連化合物についても検討した. その結果, レゾルシノールには全くそのような効果はみられなかったが, *p*-ハイドロキノン類や酸化型の *p*-キノン類にも強い促進効果があることが分かった⁹⁷⁾ (Fig. 12).

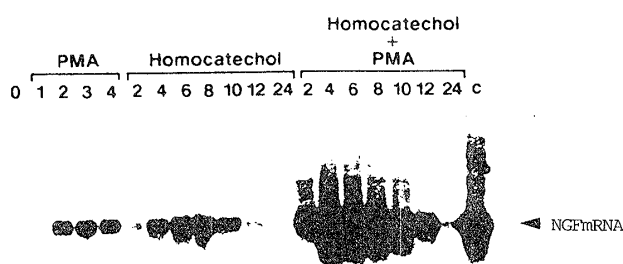
2) 細胞成長因子 アストロサイトの増殖を刺激する PDGF, bFGF, TGF- β , TNF などには強い, EGF, IGF-1, TGF- α には弱い促進作用のあることや TGF- β と EGF を共存させると相乗的に作用し添加後早い時期に著明な促進効果を示すことが認められた.^{98,99)} このことは NGF 生合成刺激の情報伝達系が複数個存在していることを示唆している. 脳損傷時にこれらの細胞成長因子が NGF 生合成と如何に相関しているかは興味ある課題である.

3) サイトカイン 脳内の神経系は脳血液関門が存在するため免疫寛容部位と考えられてきた. しかし最近神経系と免疫系は相互に機能しあっていることが明らかになっている. 著者ら⁹⁸⁾ はサイトカインによるアストロサイトの NGF 合成促進効果を調べ, インターロイキン

Table 4. Effects of Catecholamines and Catecholamine Analogues on the NGF Content in the Medium of L-M Cells⁸³⁾

Treatment	Structure ^{a)}					Fold increase in NGF content
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
None (control)						1.00±0.07
<i>l</i> -Epinephrine	OH	OH	OH	H	CH ₃	12.83±1.26
<i>l</i> -Norepinephrine	OH	OH	OH	H	H	7.48±0.24
Dopamine	OH	OH	H	H	H	13.91±0.81
<i>l</i> -DOPA	OH	OH	H	COOH	H	8.94±0.20
Epinephrine	OH	OH	H	H	CH ₃	13.86±1.06
<i>l</i> -Isoproterenol	OH	OH	OH	H	CH(CH ₃) ₂	8.23±1.68
<i>dl</i> -Synephrine	OH	H	OH	H	CH ₃	1.09±0.15
<i>dl</i> -Octopamine	OH	H	OH	H	H	1.21±0.14
Tyramine	OH	H	H	H	H	1.26±0.03
<i>l</i> -Tyrosine	OH	H	H	COOH	H	1.10±0.04
<i>l</i> -Phenylephrine	H	OH	OH	H	CH ₃	1.20±0.02
<i>dl</i> -Metanephrine	OH	OCH ₃	OH	H	CH ₃	1.16±0.10
<i>dl</i> -Normetanephrine	OH	OCH ₃	OH	H	H	1.08±0.09
3-Methoxytyramine	OH	OCH ₃	H	H	H	1.00±0.09
<i>dl</i> -3-Methoxytyrosine	OH	OCH ₃	H	COOH	H	0.90±0.14
Salbutamol	OH	OH ₂ OH	OH	H	C(CH ₃) ₃	1.16±0.03
Pyrocatechol						3.13±0.71

Cells were cultured with the indicated drugs for 24 h. The concentration of all drugs was 0.1 mM. The NGF content is expressed as a -fold increase over that in the absence of drugs.

Fig. 11. Time Course of the Effects of Homocatechol and/or PMA on NGF mRNA Levels in Mouse Astrocytes⁹⁵⁾

Cells were incubated for the indicated times (in hours) with 10^{-8} M PMA, 10^{-4} M homocatechol, or both drugs. Total cellular RNA was prepared and assayed for NGF mRNA; 10 μ g of it was used for each assay. Total cellular RNA (0.1 μ g) from mouse submaxillary gland was also analyzed in lane c.

(IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α に促進効果のあること, インターフェロン (INF)- β , γ には逆に合成抑制作用のあることを見出した⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ (Fig. 13). 脳が損傷を受けると種々のサイトカインが脳内に産生される. また, 破壊された血管から細胞成長因子が流出してアストロサイトの NGF 合成が高まることが推測される. これは生体防御反応の 1 つと考えられ, この機構により神経修復が行われるものと考えられる. しかし一方では INF- β , γ などのサイトカイ

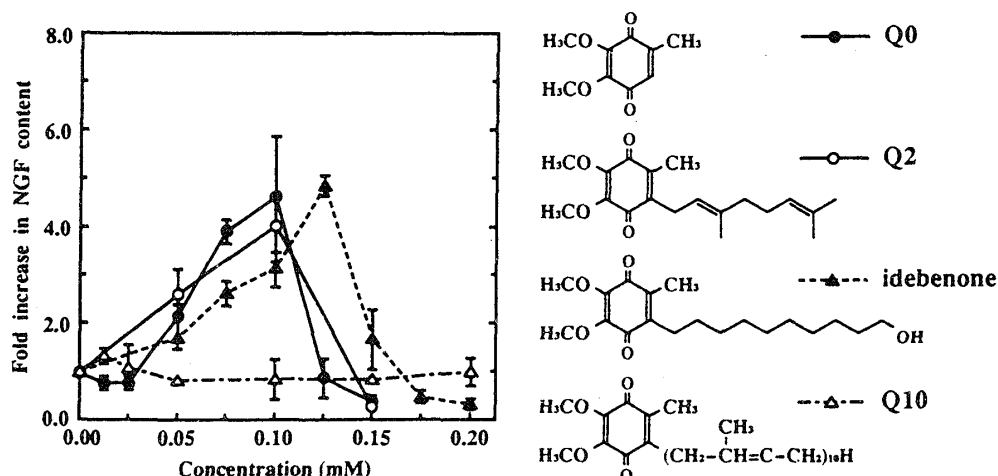


Fig. 12. Effects of 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone Derivatives on the NGF Content in Medium Conditioned by Mouse Astrocytes⁹⁷⁾

After a 24-h incubation with various concentrations of coenzyme Q0 (●), coenzyme Q2 (○), idebenone (▲), and ubiquinone 50 or coenzyme Q10 (△), medium was collected. The NGF content in the medium was determined by EIA and expressed as fold increase over that in the absence of a given drug. Each point is the mean ± S.E. of our determinations.

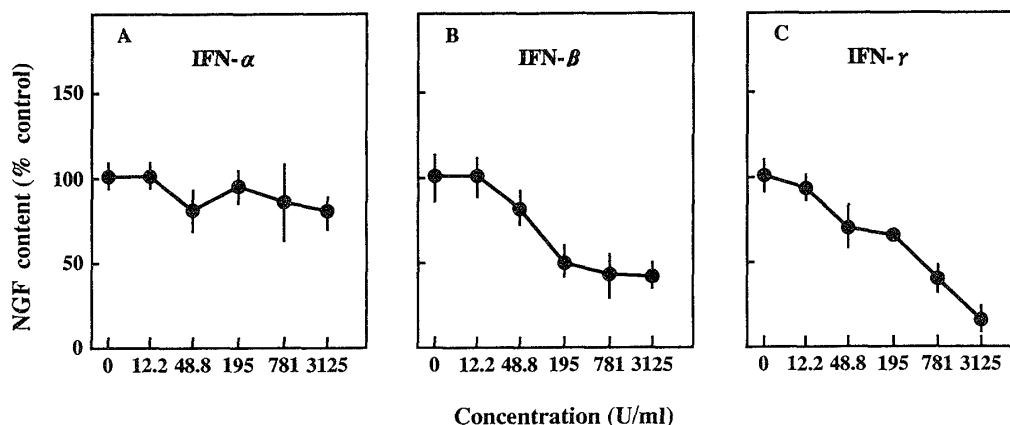


Fig. 13. Effects of IFN-α(A), β(B), and γ(C) on NGF Synthesis/Secretion by Growing Mouse Astrocytes¹⁰¹⁾

After a 24-h incubation with various concentrations of each IFN, the medium was collected, and the NGF content was determined by EIA and expressed as percentage of decrease over that in the absence of each sample (128 ± 17.7 pg/well/d).

ンがアストロサイトの増殖抑制を介し NGF の過剰産生を抑制する機構も存在しているものと思われる。

4) その他 最近著者ら¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾ は酸化還元酵素の補酵素の pyrroquinolylquinone (PQQ) や TOPA, チオクト酸や糖脂質に強い NGF 合成促進効果のある (Fig. 14) ことやその促進作用は細胞種により異なる (Fig. 15) ことを見出ししている。また、ニコチンやその誘導体にも同様の効果があるが、ニコチンアミドやニコチン酸には効果のないこと、さらにニコチンには NGF による神経細胞の生存維持活性を高める作用のあることを認めている。¹⁰⁵⁾

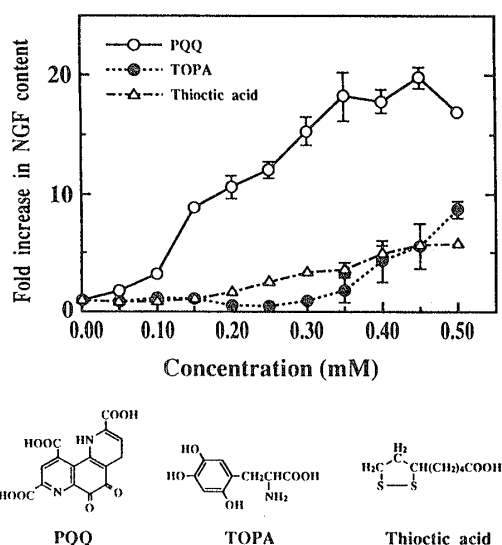


Fig. 14. Effects of Coenzymes on NGF Content in Medium Conditioned by Mouse Astrocytes¹⁰²⁾

Astrocytes were cultured with various concentrations of compounds tested (0.4 ml) in 24-well plated for 24 h. The NGF content in the medium was determined by EIA and expressed as fold increase over that in the absence of the drug. Each value is the mean \pm S.D. of three determinations.

これまで著者らは種々な化合物に NGF 合成促進効果があることを報告しているが、構造・活性相関や作用機序については現在も明確な解答を得ていない。

6. NGF の血中レベル

血中の NGF レベルは NGF 結合物質により過大評価されていた。この問題を解決するため著者ら⁶³⁾は 1983 年 two-site 法による NGF の EIA 系を確立した。この方法を用いて Korsching ら¹⁰⁶⁾はラット末梢組織や脳中に NGF が存在していることを明らかにしたが、本法によっても血中に存在する NGF 量は正確に測定し得なかった。^{107, 108)}そこで著者ら¹⁰⁹⁾は血中の NGF レベルを測定する改良法について検討した。すなわち、血中の α_2 -マクログロブリンが NGF と結合して測定系を阻害するものと考えられたため、まず NGF と α_2 -マクログロブリンとの結合について簡単な実験を行った。NGF (16 ng) と α_2 -マクログロブリン (0.5 mg) を混合 (モル比; 1:3 $\times 10^4$)、放置した後ゲルろ過した結果、溶出液中の NGF の回収率は 50% 以下であった。しかし各フラクションに塩酸グアニジン (1 M) になるように加え 37°C、5 時間処理した後測定すると高分子量領域のフラクション中に NGF が検出された (Fig. 16)。このことは NGF が α_2 -マクログロブリンと複合体を形成し高分子量領域に溶出されるが、複合体では NGF は本 EIA 系により測定されず、グアニジン処理により両者を解離すると NGF として測定されることを示唆している。このことを確かめるためラット血清に塩酸グアニジンを加え放置した後ゲルろ過した。その結果、NGF は分子量ほぼ 20000 前

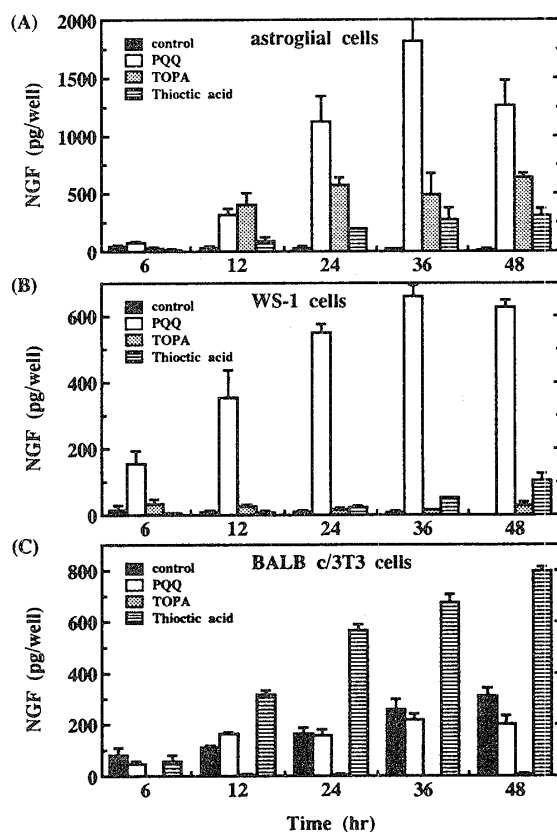


Fig. 15. Time Course of NGF Content in Medium Conditioned of Mouse Astrocytes (A), WS-1 Cells (B), and BALB c/3T3 Cells (C), Each Treated with 0.5 mM PQQ, TOPA, or Lipoic Acid¹⁰²⁾

Cells were cultured with each test sample (0.4 ml) in 24-well plates, and the NGF content was determined by EIA system at the indicated times. Each point is the mean \pm S.D. of three determinations.

後に単一のピークとして検出された。

この測定系を用いて血中 NGF レベルと個体発生・加齢との関係を調べた¹¹⁰⁾ (Fig. 17). その結果, NGF レベルは新生直後から5日齢をピークとして3週齢まで高値を維持するが4週齢で成熟期のレベルとなることや5週齢からゆっくり上昇がはじまり生後9週をピークとして以後低下する傾向で推移した. 9週齢をピークとする緩やかな上昇は免疫細胞とくに NGF 受容体をもち NGF により増殖刺激を受けることが知られている B 細胞の増殖や機能と関連しているのかも知れない. ラットの場合, 16週齢まで雌雄差は認められなかったが, 妊娠ラットで17—20週齢で高値を示した. また, 出産前は出産後より3—4倍高値を示すことも分かった. この変化は妊娠時にのみ分泌されるホルモンによる NGF 生合成調節機構の存在を示唆している.

アルツハイマー型痴呆症患者の血中レベルについても本法を用いて検討した. その結果, 血中 NGF, NT-3 レベルには健常人とほとんど差異は認められなかった.¹¹¹⁾ しかし, 患者数が少なく今後例数や症状も含め詳細に調べる必要がある.

7. アルツハイマー型痴呆症 (Alzheimer's Disease) と NGF

NGF は幼若ラットの前脳基底野のコリン作動性神経細胞の生存・機能維持に必須の栄養因子であることや, 成熟ラットではコリン作動性神経細胞の変性防御作用のある生体分子であることが知られている. また, 記憶学習能が低下したラットのこれらの機能を改善する作用のあること¹¹²⁾ や抗 NGF 抗体により学習記憶が低下すること^{113,114)} も明らかにされている. さらに, Olson¹¹⁵⁾ はアルツハイマー病患者の脳室内にマウス NGF の連続投与により, 脳内の微小血管の血流増加や物質代謝の改善とともに症状が一部回復することを報告している. また, アメリカ・フロリダ州で開催された米国神経科学学会年会で Tuszynski らは NGF を産生するように遺伝子操作を行った細胞のサルへの移植によって AD 患者に特有な脳細胞の消失が予防できたことやサルから摘出した皮膚細胞に遺伝子操作を行い NGF を産生させる細胞を調製し, AD 患者と同じ細胞が欠損しているサルの脳内に移植すると1カ月後移植細胞が AD 患者で見られる脳神経細胞の損失の程度を最大70%防止できたことを報告している. これらの知見は NGF が AD 病の治療薬となりうる可能性を示唆している. しかし, Butcher ら¹¹⁶⁾ は AD 病では神経細胞に病的再生変化が起こっており, NGF をこのような患者に投与すれば病的再生過

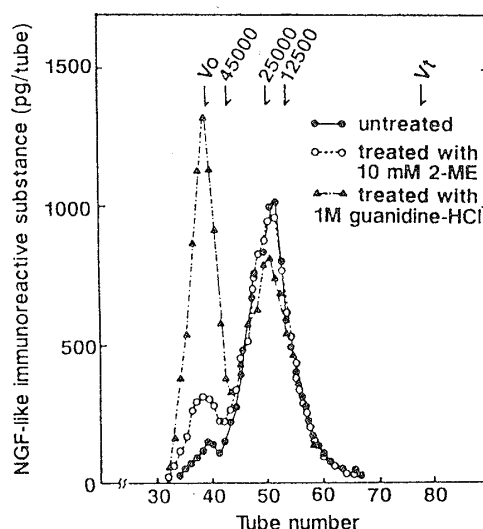


Fig. 16. NGF Level of Each Fraction Obtained by Gel Filtration of a Mixture of Human α_2 Macroglobulin and Mouse NGF on a Bio-Gel P-100 Column¹¹⁰⁾

Sixteen nanograms of mouse NGF and 0.5 mg of human α_2 macroglobulin were mixed, incubated at 37°C for 24 h, then applied to a Bio-Gel P-100 column (1.0 × 56.0 cm) equilibrated beforehand with Buffer A, and eluted with the same buffer. Fractions of 0.6 ml each were collected at a flow rate of 3.1 ml/h. After gel filtration, each fraction was treated with 10 mM 2-mercaptoethanol at room temperature for 5 h (○), or with 1 M guanidine hydrochloride at 37°C for 5 h (▲), or left untreated (○) and then subjected to EIA. Column calibration was performed with blue dextran (V_0), ovalbumin (45000), chymotrypsinogen (25000), cytochrome c (12500), and glucose (V_i) as molecular weight markers.

程を助長し症状を悪化させる薬物として働くのではなかろうかと考えている。池田ら¹¹⁷⁾も神経栄養因子により神経回路網が過剰にめぐらされその結果 AD 病がより進行するのではないかと推測している。

一方、アメリカでは 1990 年代を“Decade of the brain”と宣言し脳研究を積極的に推進し、その研究課題の 1 つとして「痴呆」がとりあげられ、AD の治療薬の開発を目的とした NGF 投与に関する臨床試験を行うに当たっての諸問題、諸条件を検討するための作業委員会が作られている。NGF が今後臨床応用されるか否かはこの委員会の成果が参考となることが考えられる。¹¹⁸⁾しかし、NGF 自身は高分子蛋白質であり末梢（皮内）に投与しても脳血管関門の通過は難しく、たとえ血中に投与しても種々なプロテアーゼによって加水分解されその生理作用は期待され難い。また、他の動物の NGF では抗原性に問題がある。NGF を脳室内に投与する方法は Quality of life から望ましい方法ではない。AD を含む神経疾患にもし NGF が有

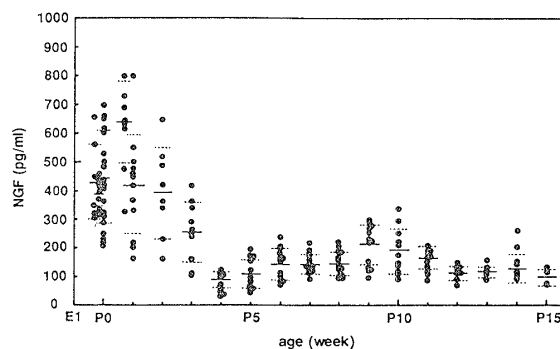


Fig. 17. Developmental Time Course of NGF Levels in Sera of Male and Female Rats¹¹⁰⁾

Each point indicates the mean of triplicate assays. Each horizontal line in the figure indicates the mean value. Each horizontal dotted line indicates the standard deviation.

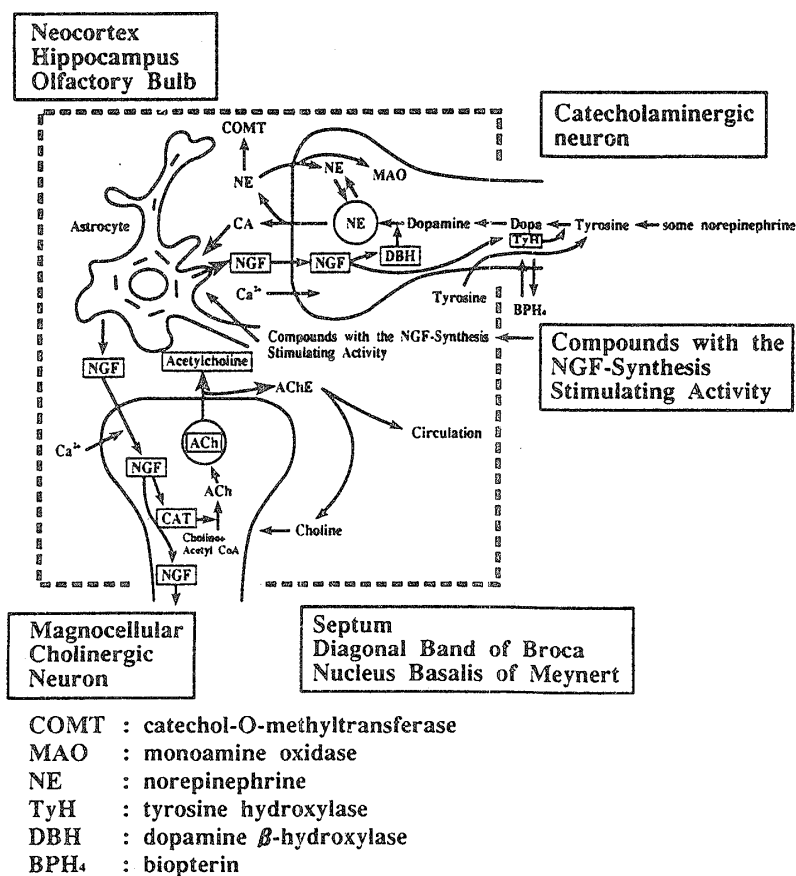


Fig. 18. Hypothesis of Regulatory Mechanism of NGF Synthesis in Brain

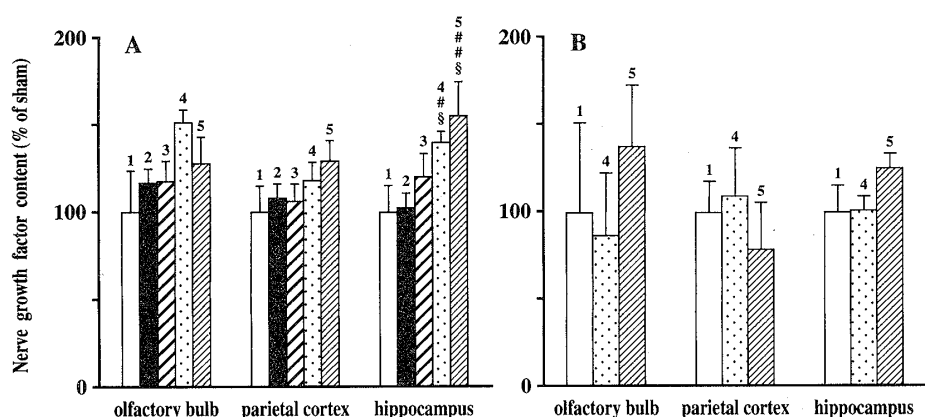


Fig. 19. Effect of TMQ on Nerve Growth Factor Content in Basal Forebrain-lesioned (A) and Intact (B) Rats¹¹⁹⁾

Nerve growth Factor was measured by EIA after 21 d of successive administration of the drug. Each column shows the mean \pm S.E. First columns: sham, 2nd columns: vehicle, 3rd columns: TMQ (5 mg/kg), 4th columns: TMQ (10 mg/kg), 5th columns: TMQ (20 mg/kg). $^{\S}p < 0.05$ vs. sham, $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ vs. vehicle (Tukey's test).

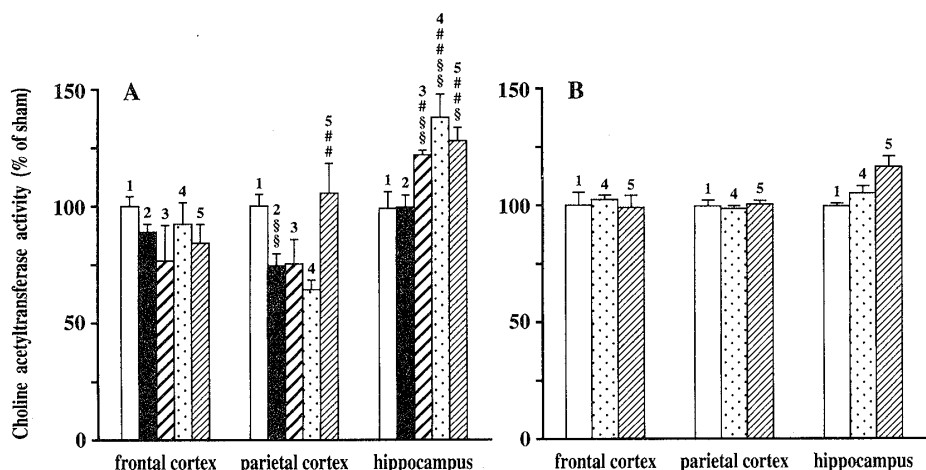


Fig. 20. Effects of TMQ on Choline Acetyltransferase Activity in Basal Forebrain-lesioned (A) and Intact (B) Rats¹¹⁹⁾

Choline acetyltransferase activity was measured after 21 d of successive administration of the drug. Each column shows the mean \pm S.E. First columns: sham, 2nd columns: vehicle, 3rd columns: TMQ (5 mg/kg), 4th columns: TMQ (10 mg/kg), 5th columns: TMQ (20 mg/kg). $^{\S}p < 0.05$, $^{\S\S}p < 0.01$ vs. sham, $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ vs. vehicle (Tukey's test).

効と考えられるとすれば鼻腔粘膜を介しての NGF 投与方法も考えられるが、著者らは NGF そのものを投与方法ではなく、脳血液関門を通過し、脳内 NGF 産生細胞の生合成能を促進させるような低分子化合物を末梢に投与して脳内での NGF 量を増大させることを介して、アセチルコリン合成酵素を誘導しアセチルコリンレベルを高め、その結果、神経細胞を賦活する (Fig. 18) ことにより、これらの疾患の治療薬の探索を行っている。

既に著者らはアストロサイトの NGF 生合成を促進する化合物の中の 1 種 6-(4-hydroxybutyl)-2,3,5-trimethyl-1,4-benzoquinone (TMQ) を前脳基底部破壊ラットに 20 日間連続投与す

ることにより脳内の NGF 量 (Fig. 19) 及びアセチルコリン合成酵素量 (Fig. 20) が特に海馬領域で上昇することや行動薬理の実験で学習・記憶の改善がみられる結果を得ている。^{119,120)}

おわりに

最近 NGF ファミリーに属する NTF や生理機能発現の引き金となる受容体としての *trk* 遺伝子が相ついで見出されている。また NGF 以外のいろいろな細胞成長因子に神経栄養因子様作用があることも明らかになりつつある。今後 NGF を含め神経栄養因子の研究領域は多面的に拡大し、より魅力的な研究課題の 1 つとなるものと思われる。また、これらの成果から神経系の傷害に基づく老年期痴呆症や他の疾患の治療薬が開発される糸口となればその社会的意義は極めて大きいと考えている。

謝辞 本研究は鈴木友二先生、山科郁男先生の御指導、御支援の下に行われたものであり厚く御礼申し上げます。また、本研究は著者が在籍した岐阜薬科大学、京都大学薬学部、大阪大学蛋白質研究所の教室員、大学院、学生諸氏や多くの他大学、研究所の研究協力者の創意工夫の賜物であります。夫々のお名前は出来るだけ多くの引用文献を挙げさせていただくことで感謝の意を表します。さらに、本研究は文部省、厚生省をはじめ多方面からの研究助成により成し得たものであり、これらの援助にも厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Hayashi K., Nakai N., Sasaki T., Suzuki T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 482—486 (1969).
- 2) Chang C. C., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 841—846 (1969).
- 3) Nakai K., Nakai C., Sasaki T., Kakiuchi K., Hayashi K., *Naturwissensch.*, **57**, 387—388 (1970).
- 4) Chang C. C., Yang C. C., Kurobe M., Nakai K., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 429—434 (1971).
- 5) Takechi M., Sasaki T., Hayashi K., *Naturwissensch.*, **58**, 323—324 (1971).
- 6) Chang C. C., Yang C. C., Hamaguchi K., Nakai K., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 164—173 (1971).
- 7) Nakai K., Sasaki T., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 893—897 (1971).
- 8) Chang C. C., Yang C. C., Nakai K., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 334—344 (1971).
- 9) Hayashi K., Takechi M., Sasaki T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1357—1362 (1971).
- 10) Kaneda N., Takechi M., Sasaki T., Hayashi K., *Biochem. Int.*, **9**, 603—610 (1984).
- 11) Takechi M., Hayashi K., *Mol. Pharmacol.*, **8**, 446—451 (1972).
- 12) Takechi M., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 584—590 (1972).
- 13) Ohta M., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 431—438 (1973).
- 14) Ohta M., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 981—987 (1974).
- 15) Ohta M., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 973—979 (1974).
- 16) Hayashi K., Takechi M., Sasaki T., Lee C. Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 360—366 (1975).

- 17) Hayashi K., Takechi M., Kaneda K., Sasaki T., *FEBS Lett.*, **66**, 210—214 (1976).
- 18) Ohta M., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **71**, 161—166 (1976).
- 19) Kaneda N., Sasaki T., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1450—1455 (1976).
- 20) Kaneda N., Sasaki T., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **70**, 217—222 (1976).
- 21) Kuraishi Y., Misu Y., Takagi H., Hayashi K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **27**, 464—467 (1976).
- 22) Takamatsu T., Harada T., Shimanouchi T., Ohta M., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **72**, 291—294 (1976).
- 23) Kaneda N., Sasaki T., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 53—66 (1977).
- 24) Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T., *Eur. J. Biochem.*, **102**, 417—430 (1979).
- 25) Takamatsu T., Harada I., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **622**, 189—200 (1980).
- 26) Ohta M., Sasaki T., Hayashi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1458—1462 (1981).
- 27) Ohta M., Sasaki T., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **671**, 123—128 (1981).
- 28) Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T., *Eur. J. Biochem.*, **120**, 117—124 (1981).
- 29) Kaneda N., Tanaka F., Kohno M., Hayashi K., Yagi K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 376—383 (1982).
- 30) Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T., *Eur. J. Biochem.*, **122**, 541—547 (1982).
- 31) Miyazawa T., Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Tamiya N., *Biopolymers*, **22**, 139—145 (1983).
- 32) Muszkat K. A., Khait I., Hayashi K., Tamiya N., *Biochemistry*, **23**, 4913—4920 (1984).
- 33) Endo T., Nakanishi M., Furukawa S., Joubert F. J., Tamiya N., Hayashi K., *Biochemistry*, **25**, 395—404 (1985).
- 34) Ohta M., Ohta K., Nishitani N., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **222**, 79—82 (1987).
- 35) Endo T., Oya M., Tamiya N., Hayashi K., *Biochemistry*, **26**, 4592—4598 (1987).
- 36) Endo T., Nakanishi M., Furukawa S., Joubert F. J., Tamiya N., Hayashi K., *J. Protein Chem.*, **6**, 227—236 (1987).
- 37) Tanaka F., Kaneda N., Mataga N., Tamai N., Yamazaki I., Hayashi K., *J. Phys. Chem.*, **91**, 6344—6346 (1987).
- 38) Ohkura K., Inoue S., Ikeda K., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **954**, 148—153 (1988).
- 39) Endo T., Oya M., Hayashi K., Miyazawa T., *J. Protein Chem.*, **8**, 575—581 (1989).
- 40) Endo T., Oya M., Joubert F. J., Hayashi K., Miyazawa T., *J. Protein Chem.*, **8**, 583—588 (1989).
- 41) Chang C. C., Kawata Y., Sakiyama F., Hayashi K., *Eur. J. Biochem.*, **193**, 567—5872 (1990).
- 42) Nakao K., Nishitani H., Suzuki M., Ohta M., Hayashi K., *New Engl. J. Med.*, **287**, 169 (1977).
- 43) Ohta M., Ohta K., Matsubara F., Nishitani H., Hayashi K., Shirai T., *Immunol. Lett.*, **1**, 209—212 (1980).
- 44) Ohta M., Matsubara F., Hayashi K., Nakao K., Nishitani H., *Neurology*, **31**, 1019—1022 (1980).
- 45) Kamo I., Furukawa S., Tada A., Mano Y., Iwasaki Y., Furuse T., Ito N., Hayashi K.,

- Satoyoshi E., *Science*, **215**, 995—997 (1982).
- 46) Furukawa S., Akazawa A., Furukawa Y., Kamo I., Satoyoshi E., Hayashi K., *J. Neuroimmunol.*, **6**, 397—409 (1984).
- 47) Kawanami S., Kamei H., Oita J., Kurokawa M., Uchida Y., Hayashi K., *J. Neurol.*, **234**, 207—210 (1987).
- 48) Hara H., Ohta K., Nishitani H., Takegami T., Okamoto S., Hayashi K., Ohta M., *Clin. Chem.*, **36**, 1967—1969 (1990).
- 49) Ohta M., Ohta K., Itoh N., Kurobe M., Hayashi K., Nishitani H., *Clin. Chem. Acta*, **187**, 255—264 (1990).
- 50) Ohta M., Ohta K., Mori F., Itoh N., Nishitani H., Hayashi K., *Clin. Chem.*, **36**, 911—913 (1990).
- 51) Ohta M., Itoh M., Hara H., Itoh N., Nishitani H., Hayashi K., *Clin. Chem. Acta*, **201**, 201—206 (1991).
- 52) Nomoto H., Nagaki Y., Ishikawa M., Shoji H., Hayashi K., *J. Nat. Toxins*, **1**, 33—44 (1992).
- 53) Hara H., Hayashi K., Ohta K., Itoh N., Ohta M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1269—1275 (1993).
- 54) Hara H., Hayashi K., Ohta K., Itoh N., Nishitani H., Ohta M., *Clin. Chem.*, **39**, 2053—2057 (1993).
- 55) Nomoto H., Takahashi N., Nagaki Y., Endo S., Arata Y., Hayashi K., *Eur. J. Biochem.*, **157**, 233—242 (1986).
- 56) Shoji H., Takahashi N., Nomoto H., Ishikawa M., Shimada I., Arata Y., Hayashi K., *Eur. J. Biochem.*, **207**, 631—641 (1992).
- 57) Nomoto H., Shoji H., Nagaki Y., Ohta M., Hayashi K., *J. Nat. Toxins*, **2**, 103—116 (1993).
- 58) Ohta M., Ohta K., Hayashi K., *Reptile Venoms and Toxins*, Vol. 5, Marcel Dekker, Inc. New York, 1991, pp. 349—376.
- 59) 林 恭三, 古川昭栄, *生化学*, **64**, 289—307 (1992).
- 60) 古川美子, 古川昭栄, 林 恭三, *生化学*, **68**, 14—30 (1996).
- 61) Hefti F., Mash D. C., *Neurobiol Aging*, **10**, 75—87 (1989).
- 62) Hefti F., Hartikka J., Kunsel B., *Neurobiol Aging*, **10**, 515—533 (1989).
- 63) Furukawa S., Kamo I., Furukawa Y., Akazawa S., Satoyoshi E., Itoh K., Hayashi K., *J. Neurochem.*, **40**, 734—744 (1983).
- 64) Murase K., Takeuchi R., Furukawa S., Hayashi K., *Biochem. Int.*, **22**, 807—813 (1990).
- 65) Murase K., Furukawa Y., Iwane M., Hayashi K., *Biochem. Int.*, **25**, 29—34 (1991).
- 66) Nakajima M., Furukawa S., Hayashi K., Kawashima T., Hayashi Y., *J. Neurochem.*, **60**, 267—273 (1993).
- 67) Awatsuji H., Furukawa Y., Nakajima M., Furukawa S., Hayashi K., *J. Neurosci. Res.*, **35**, 305—311 (1993).
- 68) Murase K., Igarashi K., Hayashi K., *Clin. Chim. Acta*, **227**, 23—36 (1994).
- 69) Isackson P. J., Dunbar J. C., Bradshaw R. A., Ullrich A., *Int. J. Neurosci.*, **26**, 95—108 (1985).
- 70) Furukawa S., Hayashi K., *J. Biochem.*, **80**, 1001—1009 (1976).

- 71) Furukawa S., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **553**, 383—395 (1978).
- 72) Nishiyama N., Saito H., Hayashi K., Satoyoshi E., Furukawa S., *Biomed. Res.*, **3**, 457—460 (1982).
- 73) Oda T., Ohta M., Inoue S., Ikeda K., Furukawa S., Hayashi K., *Biochem. Int.*, **19**, 909—917 (1989).
- 74) Inoue S., Oda T., Koyama J., Ikeda K., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **279**, 38—40 (1991).
- 75) Koyama J., Inoue S., Ikeda K., Hayashi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1160**, 287—292 (1992).
- 76) Horie S., Inoue S., Ikeda K., Hayashi K., *J. Nat. Toxins*, **3**, 165—176 (1994).
- 77) Hopp T. P., Wodds K. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3824 (1981).
- 78) Ibanez C. F., Hallbook F., Ebendal, T., Persson H., *EMBO J.*, **9**, 1477—1483 (1990).
- 79) McDonald N. Q., Lapatto R., Murray-Rust J., Gunning J., Wlodawer A., Blundell T., *Nature (London)*, **354**, 411—414 (1991).
- 80) Harper G. P., Al-Suffar A. M., Pearce F. L., Vernon C. A., *Dev. Biol.*, **77**, 379—390 (1980).
- 81) Furukawa Y., Furukawa S., Satoyoshi E., Hayashi K., *J. Biol. Chem.*, **259**, 1259—1264 (1984).
- 82) Murase K., Murakami Y., Takayanagi K., Furukawa Y., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 373—379 (1992).
- 83) Furukawa Y., Furukawa S., Satoyoshi E., Hayashi K., *J. Biol. Chem.*, **261**, 6039—6047 (1986).
- 84) Furukawa S., Furukawa Y., Satoyoshi E., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 57—63 (1986).
- 85) Furukawa S., Furukawa Y., Satoyoshi E., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 395—402 (1987).
- 86) Ishikawa R., Nishikori K., Furukawa S., *Neurosci. Lett.*, **127**, 70—72 (1991).
- 87) Furukawa S., Furukawa Y., Satoyoshi E., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1048—1054 (1987).
- 88) Ikegami R., Furukawa Y., Kaechi, K., Hayashi K., Furukawa S., *Biomed. Res.*, **11**, 61—65 (1990).
- 89) Furukawa Y., Fukazawa N., Miyama Y., Hayashi K., Furukawa S., *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 2337—2342 (1990).
- 90) Hanaoka Y., Ohi T., Furukawa S., Hayashi K., Matsukura S., *Exp. Neurol.*, **115**, 292—296 (1992).
- 91) Hanaoka Y., Ohi T., Furukawa S., Furukawa Y., Hayashi K., Matsukura S., *J. Neurol. Sci.*, **122**, 28—32 (1994).
- 92) Furukawa Y., Furukawa S., Ikeda F., Satoyoshi E., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **208**, 258—262 (1986).
- 93) Furukawa Y., Tomioka N., Satoyoshi E., Hayashi K., Furukawa S., *FEBS Lett.*, **247**, 463—467 (1989).
- 94) Mocchetti I., DeBernardi M. A., Szekely A. M., Alho H., Brooker G., Costa E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 3891—3895 (1989).
- 95) Furukawa Y., Furukawa S., Omae F., Awatsuji H., Hayashi K., *J. Neurosci. Res.*, **35**, 522—

- 529 (1993).
- 96) Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T., Hidaka H., *J. Biol. Chem.*, **265**, 5267—5272 (1990).
 - 97) Takeuchi R., Murase K., Furukawa Y., Furukawa S., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **261**, 63—66 (1990).
 - 98) Awatsuji H., Furukawa Y., Horita M., Murakami Y., Nii S., Furukawa S., Hayashi K., *J. Neurosci. Res.*, **34**, 539—545 (1993).
 - 99) Hattori A., Iwasaki S., Murase K., Tsujimoto M., Sato M., Hayashi K., Kohno M., *FEBS Lett.*, **340**, 177—180 (1994).
 - 100) Hattori A., Tanaka E., Murase K., Ishida N., Chatani Y., Tsujimoto M., Hayashi K., Kohno M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 2577—2582 (1993).
 - 101) Awatsuji H., Furukawa Y., Hirota M., Furukawa S., Hayashi K., *J. Neurochem.*, **64**, 1476—1482 (1995).
 - 102) Murase K., Hattori A., Kohno M., Hayashi K., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **30**, 615—621 (1993).
 - 103) Ohi T., Furukawa S., Hayashi K., Matsukura S., *Biochem. Int.*, **20**, 739—746 (1990).
 - 104) Kaechi K., Furukawa Y., Ikegami R., Nakamura N., Omae F., Hashimoto Y., Hayashi K., Furukawa S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 321—326 (1993).
 - 105) Murase K., Shimizu Y., Hayashi K., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 900—905 (1994).
 - 106) Korsching S., Thoenen H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 3513—3516 (1983).
 - 107) Furukawa S., Hayashi K., Ohi T., Imura H., *Life Sci.*, **26**, 837—842 (1980).
 - 108) Shinoda I., Takeuchi R., Kurobe M., Furukawa S., Hayashi K., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **5**, 135—144 (1988).
 - 109) 村瀬勝人, 竹内理恵, 古川美子, 古川昭栄, 林 恭三, 第 64 回日本生化学会大会発表抄録集, 1991, p. 971.
 - 110) Murase K., Takeuchi R., Iwata E., Furukawa Y., Furukawa S., Hayashi K., *J. Neurosci. Res.*, **33**, 282—288 (1992).
 - 111) Murase K., Nabeshima T., Robitaille Y., Quirion R., Ogawa M., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 198—203 (1993).
 - 112) Fischer W., Wictorin K., Bjorklund A., Williams L. R., Varon S., Gage F. H., *Nature (London)*, **329**, 65—68 (1987).
 - 113) Nabeshima T., Ogawa S., Ishimaru H., Kameyama T., Fukuta T., Takeuchi R., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 215—219 (1991).
 - 114) Nitta A., Murase K., Furukawa Y., Hayashi K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Neurosci.*, **57**, 495—499 (1993).
 - 115) Olson L., First IUBMB Conference “Biochemistry of Diseases” at Nagoya, Abstract 4-a-01-4, 1992.
 - 116) Butcher L. L., Woolf N. J., *Neurobiol. Aging*, **10**, 557—570 (1989).
 - 117) 池田和彦, 朝長正徳, *Dementia*, **4**, 235—240 (1990).
 - 118) Editor-in-Chief of Neurology, *Neurology*, **40**, 1483—1486 (1990).
 - 119) Nitta A., Murase K., Furukawa Y., Hayashi K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Eur. J.*

-
- Pharmacol.*, **250**, 23—30 (1993).
- 120) Nitta A., Murakami Y., Furukawa Y., Kawatsura W., Hayashi K., Yamada K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **349**, 401—407 (1994).