

生成を刺激し、2種類の異なる作用を引き起こした。1) NA 刺激で生成された cAMP は過分極活性型陽イオンチャンネル (H チャンネル) を直接刺激して、BC に脱分極、スパイク発射を起こし、自発的 GABA シナプス反応 (IPSC) を増加した。2) H チャンネル抑制下に、NA は刺激で誘発される IPSC の振幅を増加し、微小 IPSC の頻度および高浸透シロ糖溶液で引き起こされる GABA 電流を増加した。BC の  $\beta$  受容体活性化は、興奮性の増大と GABA 遊離機構の増強に連関することが示された。

#### P121 脂質メディエーター合成諸酵素の脳内局在に関する免疫組織化学的検討

島田厚良<sup>1,2</sup>、岸川正大<sup>1,2</sup>、清水孝雄<sup>2,3</sup> (1 愛知コロニー、2CREST・JST、3 東大院医)

ホスホリパーゼ A2 (cPLA2)、ロイコトリエン C4 水解酵素 (LTC4S)、ロイコトリエン A4 水解酵素 (LTA<sub>4</sub>H)、5-リポキシゲナーゼ (5-LO) のマウスにおける脳内局在を知るために、免疫組織化学的染色を行った。cPLA2 は小脳プルキンエ細胞に強く発現し、LTC4S は視床下部の室傍核・視索上核・後室周囲核の神経細胞および互いの核を結ぶ軸索線維束に、それぞれ極めて選択的に局在した。LTA<sub>4</sub>H は、脳室系周囲・後索核・小脳皮質・脳神経核と線維束を主体に神経細胞に局在し、まれに大脳皮質神経細胞が陽性であった。5-LO については淡い陽性像が白質に見られた。以上、脂質メディエーター合成諸酵素がニューロンに発現していたのは興味深い。

#### P122 刺激依存性・海馬歯状回特異的新規ホスホリパーゼ A 2 アイソフォーム

岸本幸治<sup>7</sup>、魚住尚紀<sup>1,7</sup>、和泉孝志<sup>1,7</sup>、白川純<sup>1</sup>、清水孝雄<sup>1,7</sup>、黒柳秀人<sup>3</sup>、鈴木陽一<sup>4</sup>、白澤卓二<sup>4</sup>、中館和彦<sup>5</sup>、渡辺恭良<sup>5,6</sup>

(1 東大院、生化学細胞情報、2 群馬大・医・生化学、3 東医歯大・機能解剖、4 老人研・分子遺伝、5 大阪バイオ研・神経科学、6 大阪市大・医・第一生理、7 CREST・JST)

85kDa 細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cPLA2) は脳神経細胞に豊富に発現し、膜リン脂質からアラキドン酸を切り出すなど、種々の神経機能に関与することが示唆されている。神経刺激によるラット脳での cPLA2 の発現変化を調べたところ、カイニン酸処理で、一過性に、海馬歯状回特異的に発現する mRNA を見いだした (KIDS cPLA2)。この mRNA が蛋白質として存在することがウエスタンブロットと免疫組織染色でも確認され、神経前駆細胞に誘導されることもわかった。また、このアイソフォームの誘導発現は cPLA2 のノックアウトマウスのカイニン酸刺激によっても観察され、推定されるプロモーター配列が cPLA2 遺伝子のイントロン中に存在し、種を越えて高度に保存されていることなども明らかになった。現在はその生物学的意義の解明を行っている。 K.Kishimoto, et.al. (1999) Neuroscience, 92:1061-1077.

#### P123 神経系に発現する G-タンパク質共役型受容体のリガンド探索

横溝岳彦、萩谷洋、川沢百可、石井聡、清水孝雄 (CREST・JST、東大院医)

ヒトゲノム上には 3000 種類程度の G-タンパク質共役型受容体 (GPCR) が存在すると推定されているがこれまでにリガンドが同定されたものは約 400 個に過ぎない。リガンドが不明な受容体は孤児受容体 (Orphan receptor) と呼ばれ、そのかなりの割合は脂質をリガンドとする受容体であると考えられる研究者も多い。これまでに我々は血小板活性化因子受容体、二つのロイコトリエン B4 受容体遺伝子を単離し、これらを解析

することで脂質メディエーターの細胞内、生体内での役割を明らかにしてきた。これらの経験を元に神経系に発現する GPCR のリガンド探索を目指して実験を開始した。様々な GPCR の一次構造との相同性比較を行い、これまでに報告のない受容体も含めて約 20 種類の孤儿受容体の発現ベクターを構築した。それらを一過性、あるいは、安定的に哺乳動物細胞に発現させ、細胞膜への受容体の発現とリガンド探索をおこなっている。一部を除いた多くの孤儿受容体は細胞膜への発現が極めて低いレベルにとどまり、これがリガンドの同定を困難にする要因の一つになっていることが明らかとなった。今後はこれらの GPCR の細胞膜への移行のメカニズムとリガンドの同定を目指して実験を行っていきたいと考えている。

#### P124 cPLA2 遺伝子欠損マウスの海馬 CA1 領域のシナプス可塑性

星野明美<sup>1,2</sup>、加藤邦夫<sup>3</sup>、魚住尚紀<sup>1,2</sup>、清水孝雄<sup>1,2</sup> (1 東京大院医、2CREST・JST、3 東大医精神科)

cPLA2 は中枢神経系に広範囲に分布し、カルシウム依存性に活性化されて脂質の代謝に関係する酵素である。特にアラキドン酸の活性に関与する酵素として信号伝達系に関与する役割がよく知られていて、虚血や細胞障害後に上昇することから細胞死との関わりが注目されている。cPLA2 の遺伝子欠損マウスの生理学的役割を検討するために遺伝子欠損マウスを製作し、海馬スライス標本を用いて CA1 領域での神経可塑性に与える影響を電気生理学的に調べてみた。前シナプスの機能の指標となる paired-pulse inhibition では欠損マウスと野生型には差がみられなかった。また LTP の大きさには差がみられなかったが、LTD が誘導されにくい傾向がみとめられたことから、シナプス可塑性に対してアラキドン酸やその代謝物が関与する可能性が示唆された。

#### P125 アラキドン酸 5-リポキシゲナーゼの細胞内局在と移行に関する解析

花香博美<sup>1,2</sup>、和泉孝志<sup>1,3</sup>、清水孝雄<sup>1,2</sup> (1CREST・JST、2 東大院医、3 群大医)

ロイコトリエン (LT) 合成系路の初発酵素である 5-リポキシゲナーゼ (5-LO) は、アラキドン酸から 2 段階の反応を触媒し、LTA<sub>4</sub> を合成する。5-LO は細胞により細胞質と核質における局在の割合が異なり、細胞がカルシウム上昇などの刺激を受けると膜 (特に核膜) に移行することが報告されている。だが、5-LO の細胞内局在と膜移行のメカニズムに関しては不明な点が多い。我々は EGFP と野生型又は変異型の 5-LO との融合タンパク質 (GFP-5LO) を用いて細胞内局在の制御機構を見いだした。また、GFP-5LO を安定的に発現させた CHO-K1 細胞において、さまざまな刺激による経時的な 5-LO の膜移行を解析し、カルシウム増加やストレス刺激による核外輸送と核膜移行の機構を見いだした。

#### P126 血小板活性化因子受容体欠損マウスにおける神経細胞移動

徳岡 (三田村) 涼美、石井聡、清水孝雄 (CREST・JST、東大院医)

ヒトの滑脳症の原因遺伝子である Lis1 遺伝子は PAF 分解酵素の 1 つである PAF アセチルヒドロラーゼ Ib 型 (PAF-AH) の  $\beta$  サブユニットをコードし、この欠損により神経細胞移動に異常が起こる。本研究では、PAF とその受容体の神経細胞移動における役割を明らかにすることを目的に、PAF 受容体欠損マウスを用いた解析を行った。小脳顆粒細胞の培養系を用いた実験により、PAF 受容体欠損マウスの神経細胞移動速度が、野生型マウスよりも低く、かつ野生型マウスの顆粒細胞へ PAF 受容体拮抗薬 (WEB2086) 投与により移動が遅くなることがわかった。培地中へ mc-PAF (PAF 受容体アゴニスト) を添加した際の神経細胞移動速度への影響