

に着目し、これに付着するペプチドが Rho 活性化のサイレンサーとして機能することを見出した。以上よりニューロトロフィンが p75 を介して Rho を非活性化することで神経突起の伸展を促進しているが、MAG は同じ受容体を介してこれとは逆のシグナルを伝えていることがわかった。

P243 神経可塑性に関わるセリンプロテアーゼ・ニューロプシンの内在性特異的インヒビターの同定  
加藤啓子（奈良先端大、CREST・JST）

ニューロプシンは、大脳辺縁系、特に海馬でその mRNA の高い発現が見られ、海馬スライスにおける LTP 増強作用や神経可塑性モデルの 1 つであるキンドリング動物の形成への関与が明らかとなっており、酸化ストレス時にもその mRNA の発現上昇が確認されている。また、ヒトアルツハイマー病において、コントロール群に比べ脳内で有意な mRNA の発現上昇が確認されており、アルツハイマー病の原因因子としても注目されている。ニューロプシンはセリンプロテアーゼであることから、その機能発現後、速やかに不活化されることにより脳内の恒常性が保たれると考えられ、特異的インヒビターによりニューロプシン活性がコントロールされていると考えられる。そこで本研究では、ニューロプシンの内在性特異的インヒビターを同定した。マウス大脳皮質・海馬ホモジネートより、リコンビナント・ニューロプシン (Baculo virus expression system) に結合する 2 種の蛋白質を精製し (SDS-耐性複合体を形成)、ペプチドシーケンスを行った結果、Serine Protease Inhibitor-3 (SPI3; ovalbumin serpin family) と Murinoglobulin 1 (MUG 1; pan-protease inhibitor) であることが明らかとなった。次に、この 2 種の蛋白質がニューロプシンの特異的インヒビターであることを、生化学的相互作用及び、脳内における発現分布を検討することにより証明した。1) リコンビナント・SPI3

(*Pichia pastoris* expression system) は、リコンビナント・ニューロプシンと SDS-耐性複合体を形成し、その結合平衡定数は  $3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であった。プロテアーゼと serpin family に属するインヒビターが特異的に作用する場合の結合平衡定数は  $10^5 - 10^7$  であることが知られており、SPI3 がニューロプシン活性を非常に強く抑制することが示された。また、in situ hybridization 組織化学法によりニューロプシン mRNA と SPI3 mRNA の発現分布を比較したところ、共に海馬 CA1-3 の錐体細胞に発現していることが明らかとなった。2) マウス血清より精製した MUG 1 は、ニューロプシンと SDS-耐性複合体を形成し、ニューロプシンによるファイブロンネクチン切断活性を有為に阻害した (ニューロプシン : MUG 1 = 1:2 (mole ratio), 76% 活性阻害)。免疫組織化学法により MUG 1 は、海馬における神経細胞及びその神経突起の細胞膜上に局在した。以上のことから、SPI3 と MUG 1 は、ニューロプシンの内在性特異的インヒビターであることが示された。MUG 1 は、痴呆症の原因因子の候補である  $\alpha 2$ -macroglobulin に属する一方で、SPI3 は、虚血時にその mRNA 発現が海馬で上昇することが報告されている。今後は、酸化ストレス時における SPI3 によるニューロプシンの活性制御機構を解明し、治療薬としての応用を目指す。

P244 Signal sequence trap法による神経機能関連遺伝子のクローニング---新規 TNF Receptor Superfamily, TROY, の単離と局在

森川吉博<sup>1</sup>、久岡朋子<sup>1</sup>、田村志宣<sup>1</sup>、北村俊雄<sup>2</sup>、仙波恵美子<sup>1,3</sup>

(1和歌山県立医大、2東大医科研、3CREST・JST)

TNF family cytokines は pleiotropic な作用を示し、それらの受容体も、現在では 20 を超えるメンバーを有する superfamily を形成しており (TNFRSF)、その機能は細胞死の誘導、細胞増殖や分化など多岐にわたる。

我々は、Retrovirus を用いた Signal Sequence Trap(SST-REX) 法により、マウス脳より TNFRSF に属する新規の受容体 TROY を単離し、その組織分布について検討した。TROY は、I型膜貫通蛋白で、TNFRSF に特徴的な複数の cysteine に富む領域を細胞外ドメインに持ち、細胞内には TRAF2 結合コンセンサス配列を持つが、Death Domain は持たない。293T 細胞における TROY の過剰発現は NFκB の転写を活性化したが、dominant negative TRAF2, TRAF5, TRAF6 の過剰発現は TROY による NFκB の転写活性化を著明に抑制した。このことは、TROY のシグナル伝達に TRAF family のアダプター分子が関与することを示している。成熟マウスでのノーザンブロットによる TROY mRNA の組織分布では、特に脳に強く発現し、その他心臓、肺、肝臓など多くの臓器に発現していた。胎生期では E11.5 より発現が見られ、成長に伴って増加し、特に皮膚で強発現していた。ISH により検討すると、胎児では皮膚表皮、結膜、肺胞上皮、神経上皮に mRNA 発現細胞が認められたが、新生児の皮膚では毛包に発現していた。脳では SVZ および大脳皮質・海馬などの神経細胞に mRNA シグナルが認められた。これらの分布パターンから、TROY は個体発生において神経系や上皮細胞など、多様な組織の発達に関与する可能性が示唆された。

#### P245 JCV の entry に関する研究

澤洋文 (北大医)

JCV はヒト以外の動物には感染せず、細胞レベルでもヒト神経系細胞でしか増殖しない。この狭い宿主域が細胞膜で規定されるか否かを調べるために、entry assay (semi-quantitative PCR 法) を確立し、ヒト、マウス、サル由来の細胞を含む 15 種類の細胞株に感染させた後、経時的に JCV genome を JCV entry assay、*in situ* hybridization 法により検索した。また FITC ラベルした JC virus-like particle (JC VLP) を吸着させて、各細胞株での JCV の細胞内での局在を検索し、抗 VP1 抗体、chlorpromazine、および DNase I の効果を調べた。これらの結果、JCV は多くの細胞に ubiquitous に発現している receptor と VP1 を介して細胞に吸着・侵入し、clathrin pathway を介して細胞内に移送され、virion の形で核に達していることが明らかとなった。

#### P246 シアル酸を含む糖鎖と JCV VP1 の結合

駒込理佳 (北大医)

JCV の細胞への接着はシアル酸が関与することが示唆されている。細胞への吸着の機構を明らかにするため JC virus-like particle (JC VLP) を作製し検索した。TLC および SDS 後の overlay assay により *in vitro* では JC VLP はシアル酸を複数個有する糖脂質とスルファチドに結合すること、また分鎖構造末端にシアル酸を有する糖蛋白質に結合することを明らかにした。また合成脂質による pre-incubation により JC VLP による細胞結合は抑制され、さらにシアリダーゼ処理、糖鎖合成阻害剤により JC VLP の細胞への吸着は抑制された。

#### P247 VP1 抗体カラムによる VP1 結合蛋白質の単離

山田美里 (北大医)

JC VLP を用いた overlay assay で JCV 許容細胞の膜分画には VP1 結合蛋白質が存在することが明らかとなった。そこで大腸菌で発現させた recombinant VP1 と細胞からの膜蛋白を反応させ、VP1 抗体カラムによるアフィニティ精製により VP1 結合蛋白質を単離した。分子量 100 kDa の band を SDS gel から抽出して、2 種類の