

生体膜とニューロンの細胞機能的研究

毛利哲郎

Studies on the Cytological Function of the Biomembrane and the Neurons

Tetsuro MOHRI

Department of Biodynamics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa City 920-1181, Japan

(Received June 26, 2002)

Na⁺-dependent and -independent transport sites were elucidated for glycine and L-leucine, respectively, in Chang liver cells, a human culture cell line. Findings of acceleration of the L-leucine uptake by the cells in the acidic medium and synchronized acidification within the cell membrane vesicles with the uptake by them all suggested cotransport of L-leucine and proton and the uptake of L-leucine dependent on the inward proton gradient in Chang liver cells. Cotransport of L-leucine and proton was also demonstrated in human peripheral lymphocytes and accelerated by the addition of concanavalin A, probably accompanied by membrane hyperpolarization. It was shown that the Na⁺-gradient-dependent uptake of glycine can be regulated by insulin and 17 β -estradiol in the rat uterus and by Ca²⁺-calmodulin and membrane potential in Chang liver cells. D-Aspartate uptake as a model of glutamate transport was characterized in rat hippocampal slices and found to consist of Na⁺-dependent (higher-affinity) and -independent (lower-affinity) components. The vulnerability of hippocampal neurons to the Alzheimer β -amyloid protein was confirmed *in vitro* with primary cultured rat hippocampal neurons in the presence of the amyloid protein β 1–42 or its core fragments. The toxicity of the amyloid protein could be blocked by the addition of insulin and several other growth factors to the medium. The addition of genipin, a plant-derived iridoid, was demonstrated to prevent the toxicity of a synthetic fragment of β 1–42, β 25–35. Genipin had a neurotogenic activity in PC12h cells, a rat pheochromocytoma cell line, an activity extremely sensitive to inhibitors of the nitrogen oxide (NO) synthase and soluble guanylate cyclase and an NO scavenger. It was also demonstrated in PC12h cells that the activation of the MAP kinase cascade was essential for the neurogenesis of genipin. These properties of genipin are very comparable to those of nerve growth factor in the cells. It is considered likely that various useful, neurotrophic substances and their extracts will be found in plants in future.

Key words—membrane transport; amino acid; cultured cell; hippocampal neuron; β -amyloid protein toxicity; genipin

1. はじめに

動物細胞における膜への強い関心は、組織形態学的、生化学的には神経ミエリン鞘や赤血球膜の電子顕微鏡による観察技術の改良とそれらの脂質及び蛋白質の研究に始まり、また薬理学的には全身麻酔薬の脂溶性とその効果の相関から、作用のターゲットとして細胞の脂質、特に中枢神経細胞の脂質二分子膜が指摘されたことに始まったと思われる。周知の通りそれらの研究結果及びその後の膜脂質と蛋白質構造に関する物理化学的、生化学的な多くの実験事

実から、形質膜 (plasma membrane) の全体的な構成と形態に関する見解として、Singer-Nicolson の膜流動モザイクモデル (1972) が、少しずつ変形されつつも、最近まで生化学の教科書等に載っていたものである。

一方 1948 年 R. P. Ahlquist が adrenaline のレセプター (α と β) の存在を提唱し、また 1970 年 K. Hofmann らが ACTH の副腎皮質細胞膜小胞との結合とその作用との関係を示唆し、1972 年には insulin レセプターの実在も論議され始めたこともあって、にわかに形質膜の生理学的な重要性とともにホルモンの作用機構解明の糸口が見えてきた。さらに 1960 年頃には J. C. Skou が神経細胞膜で、R. L. Post らが赤血球で、それぞれ ATPase がナトリウムとカリウムの能動的な輸送を行っていることを提

北陸大学薬学部生物活性教室 (〒920-1181 金沢市金川町ホ 3 番地)

e-mail: t-mohri@hokuriku-u.ac.jp

*本総説は、平成 13 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

唱して、形質膜の輸送担体蛋白質の存在がクローズアップされてきた。

種々の蛋白質ホルモンやステロイドホルモンの生理的、薬理的な作用・効果が明らかになってきて、次の課題はそれらの作用機構であった。特に前者がまず細胞膜でどうかかわりあいを持つのか、またレセプターの実体は何かというような問題が、具体的に解明されることが期待された。レセプターの同定に先立って、1960年頃、細胞内で cyclicAMP (cAMP) レベルが上昇することが *adrenaline* で示されたが、このいわゆるセカンドメッセンジャーを産生するのも、形質膜にあるアデニルシクラーゼであり、後には cAMP が *glucagon* の作用にもかかわることになって、一気に形質膜のレセプターあるいは酵素と輸送体などの蛋白質に注目が集まってきた。

2. アミノ酸の培養細胞膜輸送とホルモン作用

Insulin の血糖低下作用が、グルコースの細胞への取込みを促進していることによるらしい、ということは 1955 年頃から文献に見られ、また 1958 年にはラットの横隔膜の実験で、*insulin* がアミノ酸の細胞取込みも促進することが発表された。

そこで私はホルモンのアミノ酸の能動的輸送に対する作用が蛋白質合成を動かして、細胞機能に影響するというスキームを考えた。なお当時は *insulin* の脂質分解抑制作用とともに、蛋白質合成促進についても一部示唆されていた。

その頃簡単に手に入ったホルモンはステロイドホルモンであり、また *cortisol*, *cortisone* がリウマチ、その他の炎症からアレルギーまで万能薬として注目され、一方アナボリックステロイドも成長促進剤として登場していたので、これらのステロイドのアミノ酸輸送に対する作用を調べることにした。

当時組織培養法は、鶏胚などからの特定組織の初期培養のための培地組成など栄養的な研究（当時東京大学薬学部生理化学教室の遠藤浩良先生は、鶏胚骨の器官培養を応用したホルモン研究を手掛けておられたが、当時まだ世界でも数少ない研究テーマであった）、または長期にわたって細胞を増殖させることができる、いわゆる樹立細胞株による癌研究や、光学的あるいは電子顕微鏡による形態観察が主であった。そして手に入った *HeLa* 細胞は癌細胞であるがヒト由来であり、血清など不明確な要素が培地に入ってくるものの、半合成培地で長く、しかも

早い増殖を続けることができるので、単細胞モデルとして生化学的、定量的な研究目的に応用したいと考えた。特にこの細胞はガラス面に平面的に、最初は上皮様にはぼ一層になって増殖するので、一次的な細胞膜透過の実験には最適であり、当時よく用いられていた反転腸管、組織スライス、浮遊細胞（腹水腫瘍など）などにおいては、細胞経由の透過、逆輸送や細胞間スペースの問題、細胞種や活性の不均一性が除かれ、また細胞処理終了時間の精密さ（細胞層を速やかに冷却塩類溶液で洗えば良い）も向上したと思う。30—60 分のアミノ酸取込み時間（ラベル放射能の比活性が低かったことにもよる）を、1 分以下に縮めることもできた。

HeLa 細胞の細胞内遊離アミノ酸については、すでに MEM 培地の創製で有名な *Eagle* らによる研究発表があったが（1958）、私達の普段使っていた培地は *Hanks* 塩類溶液にラクトアルブミン加水分解物を 0.4% (w/v) 混じていたので、その条件で細胞内アミノ酸の濃縮度を定量した。いわゆる非必須アミノ酸（特にグリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン）の濃縮度は高いことが確認された。¹⁾ マウス由来の繊維芽細胞（メチルコラントレン処理した樹立細胞株）（L-929）についても同じ培地の条件で調べたが、濃縮度は *HeLa* よりもかなり高いものの、各アミノ酸の間では同じ傾向であった。細胞増殖が遅く、ラット正常組織由来の繊維芽細胞（JTC-4）でもグリシン、アスパラギン酸の濃縮度は *HeLa* よりも低いものの、傾向は同じであった。ただ大きな違いは、*HeLa* と L 細胞ではタウリンの細胞内濃度（スタンダードをおこなったので、正確な定量値は不明であるが）が極めて高い（培地中には検出できなかった）のに対して、JTC-4 細胞では検出できないくらいに少なかったことである。また比放射能は低かったが、 C^{14} でラベルしたグリシンの、*HeLa* 細胞への取込みを調べ、やはり 1 分よりは 3 分ではその速度が遅くなるのが分かり、内外二方向の輸送に平衡関係があることが示された。

肝臓ではアナボリック作用を示し、末梢組織の細胞に対しては抗アナボリック作用があるという通説から予想された通り、*cortisol* (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 72 h 処理) は細胞当たりのアミノ酸一般の消費量を抑え、細胞内アミノ酸プール（各アミノ酸のメデューム中

濃度に対する細胞内濃度の比で表した) をどの細胞でも小さくした (1/2—1/10 に) (Table 1—3). それに対して同濃度の 19-nortestosterone はアミノ酸プール全体に対しては, 大きな変化は与えなかった. 実際のアミノ酸 (グリシン) の取込み速度に対

する cortisol と deoxycorticosterone の作用を後で調べた結果でも, それぞれ抑制作用を示すことが確かめられた (Table 4, 5).²⁾ ここで 17 β -estradiol と estradiol はグリシン取込み速度に影響を与えないことも分かり, ヒト子宮頸部上皮がん由来の HeLa 細胞

Table 1. Amino Acid Pools of HeLa Cells; the Effects of Cortisol and 19-Nortestosterone

	Control			Cortisol			19-Nortestosterone	
	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)	D.R.	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)	D.R.	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)
LYS	1.36	2.67	1.2	1.60	1.25	0.64	1.08	1.76
HIS	0.38	0.74	2.8	0.43	0.337	1.2	0.36	0.59
ASP	1.84	3.61	9.7	1.10	0.860	2.0	1.96	3.20
THR	1.66	3.21	4.2	2.30	1.79	2.1	1.98	3.23
SER	2.48	4.85	4.3	3.60	2.81	2.4	2.88	4.70
GLU	2.18	4.27	4.4	2.57	2.01	2.0	2.54	4.14
PRO	1.14	2.23	2.3	1.43	1.12	1.5	1.58	2.58
GLY	2.62	5.13	13	2.31	1.81	3.9	2.90	4.73
ALA	3.24	6.34	4.0	4.38	3.42	2.2	3.52	5.74
VAL	1.46	2.85	2.2	1.19	0.930	—	1.30	2.12
ILE	1.20	2.36	2.6	1.38	1.08	1.2	1.06	1.73
LEU	2.81	5.50	2.5	2.55	1.99	0.91	2.62	4.27
TYR	0.82	1.60	3.5	0.81	0.634	1.3	0.88	1.44
PHE	0.86	1.69	3.4	0.88	0.685	1.3	0.91	1.49
TAU	‡			‡			‡	

D.R. = distribution ratio, *i.e.*, the ratio of the concentration in the cells to that in medium at the time of harvest. ‡ = Present, but not quantitatively determined. Steroid treatment was much the same as in Table 1. The D.R. of 19-nortestosterone-treated cells is not shown, for amino acid concentrations in the medium were not determined. Each set of experiments was performed in duplicate for each cell line; the variations between corresponding values were, for the amount per 10^8 cells, within $\pm 12\%$ of the mean and within $\pm 15\%$ for both the intracellular concentrations and the D.R.

Table 2. Amino Acid Pools of JTC-4 Cells; the Effects of Cortisol and 19-Nortestosterone

	Control			Cortisol			19-Nortestosterone	
	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)	D.R.	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)	D.R.	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)
LYS	4.73	4.29	2.1	1.35	0.340	0.19	4.05	3.68
HIS	0.94	0.86	2.7	0.43	0.108	0.33	0.80	0.73
ASP	3.26	2.95	4.9	1.09	0.275	0.44	2.95	2.67
THR	4.59	4.15	4.2	2.96	0.748	0.84	4.25	3.85
SER	8.02	7.25	4.3	4.88	1.24	1.0	6.35	5.74
GLU	8.34	7.55	5.7	6.12	1.55	0.98	18.3	16.6
PRO	2.81	2.55	1.7	1.84	0.466	0.44	3.08	2.80
GLY	4.30	3.90	6.3	2.34	0.594	0.80	3.89	3.52
ALA	8.25	7.48	3.7	3.92	0.985	0.55	7.46	6.76
VAL	3.23	2.93	2.2	1.99	0.503	0.37	2.74	2.48
ILE	2.97	2.68	2.3	1.44	0.365	0.32	2.38	2.15
LEU	6.18	5.60	2.2	3.52	0.890	0.36	4.95	4.49
TYR	1.71	1.55	2.3	0.99	0.251	0.47	1.56	1.43
PHE	1.81	1.64	2.6	1.13	0.286	0.48	1.60	1.45
TAU	0			0			0	

Table 3. Amino Acid Pools of L Cells; the Effects of Cortisol

	Control			Cortisol		
	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)	D.R.	$\mu\text{moles}/10^8$ cells	concn in cell (mM)	D.R.
LYS	10.3	16.3	8.9	1.87	2.94	1.7
HIS	2.0	3.1	11	0.43	0.681	2.5
ASP	14.1	22.1	52	2.48	3.89	7.8
THR	14.5	22.7	32	2.11	3.30	4.0
SER	28.7	45.0	43	3.38	5.30	4.2
GLU	65.0	103.0	106	8.36	13.1	11.0
PRO	11.9	18.6	21	1.39	2.18	2.5
GLY	44.8	70.4	169	7.54	11.8	23.0
ALA	29.3	46.0	34	4.16	6.52	4.2
VAL	7.9	12.4	13	1.37	2.16	1.9
ILE	5.9	9.2	11	0.98	1.53	1.7
LEU	13.9	21.9	10	2.33	3.66	1.6
TYR	4.2	6.5	13	—		
PHE	4.6	7.2	13	0.80	1.26	2.2
TAU	43.0	67.5		11.6	18.2	

The D.R. of taurine is assumed to be extremely large, for the concentration of it in the medium was too small to be measured.

Table 4. Comparison of Cortisol Effect on Glycine- ^{14}C Uptake into the Alcohol-Soluble Fractions between Incubation Media

Media	Control	Cortisol	<i>p</i>
Eagle	5.21 ± 0.35	3.46 ± 0.20	<0.01
Lactalbumin	1.42 ± 0.07	1.20 ± 0.05	<0.05

Each value indicates mean of uptake of radioactivity in cpm/ μg DNA and \pm S.E. of the mean. The uptake was determined with four bottles of cells per group incubated for 10 min with glycine- ^{14}C after 48 hr of cultivation with or without cortisol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Table 5. Effect of Deoxycorticosterone on Glycine- ^{14}C Uptake into the Alcohol-Soluble Fractions in Eagle's Medium

	Min of incubation	
	10	30
Control	6.12 ± 0.40	12.04 ± 0.78
Deoxycorticosterone	3.41 ± 0.17	6.99 ± 0.59
<i>p</i>	<0.01	<0.01

The uptake was determined with four bottles of cells per group after 48 hr of cultivation with or without deoxycorticosterone (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

であるが、エストロゲン感受性をも失っていることを示唆した。

ラット未成熟子宮の *in vitro* の実験によって、17- β estradiol がこの組織へのグリシン取込みを促

進することは、T. R. Riggs により示されていたが、私は子宮への α -アミノイソ酪酸 (AIB) の取込み (ナトリウム依存性) が insulin によって促進され、この輸送はスルフヒドリル基のブロッカーである N-エチルマレイミド (NEM) と子宮とのプレインキュベーションによって著しく阻害されることを見出した。³⁾ ロイシンとバリンの子宮への取込みは insulin によって全く促進されなかった。またロイシンの細胞取込みが NEM によってむしろ有意に増加することもある (Chang 肝細胞) ので、^{4,5)} 必ずしも NEM が輸送蛋白質 (あるいはそれに影響する蛋白質) の SH 基をブロックすることが輸送を障害するとは限らないということである。

グルココルチコイドは胸腺、骨格筋、ヘパトーマでもアミノ酸取込みを抑えるが、肝臓細胞ではむしろ取込みを促進することがそのころ発表された。時あたかも G. M. Tomkins らにより、肝臓では cortisol がチロシニアミノトランスフェラーゼなどいくつか特殊な酵素の合成誘導を行うことを見出されており、これが哺乳類組織における RNA 依存性の酵素誘導の発見の端緒となり、また肝臓における糖新生の機構証明にもなるのである。それに対して胸腺や筋肉では cortisol によって蛋白質合成は抑えられ、細胞は萎縮する。

3. アミノ酸輸送機構

HeLa 細胞がヒト組織由来細胞であることから、さらに別のヒトの細胞と比べるために、肝臓由来（その後癌化）樹立細胞株の Chang 肝細胞についてもアミノ酸の輸送機構を検討した。その結果これら二種の培養細胞では、各アミノ酸の輸送速度、カチオン（特にナトリウム）依存性、側鎖構造類似アミノ酸相互の拮抗と交換輸送の促進現象などにおいて、極めてよく一致していた。⁶⁾

これらの輸送特性について、米国ミシガン大学の H. N. Christensen の一派はマウス腹水腫瘍細胞（腹水中で増殖、継代する細胞で、特殊な注射器の中で短時間にアミノ酸の取込みを測定する方法が使われた）と得意のアミノ酸合成を駆使して、kinetics から数種のアミノ酸（特に中性、塩基性アミノ酸）輸送系を提唱していた。初めは A, ASC, L, Ly⁺ の 4 種で、A 系については N-methyl-2-aminoisobutyric acid (Me-AIB), また L 系については D,L-b-2-aminobicyclo-[2,2,1]-heptane-2-carboxylic acid (b-BCH) という非常に特異的な輸送基質を合成して、その後の細胞アミノ酸輸送機構の研究に大変貢献した。Me-AIB は AIB とともに代謝され難いので、アミノ酸輸送モデルとして今日でもよく用いられるが、その細胞取込みはどの細胞、組織においても細胞外 Na⁺ 濃度依存性であり、その高い細胞内外濃度勾配及び膜分極形成に大きく寄与する Na⁺K⁺-ATPase の阻害剤や、ATP 産生を低下させる呼吸阻害剤の影響を非常に受け易い。b-BCH の L 系特異性については当時やはり異論があったが、ヒト Chang 肝細胞では特異的にロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニンなどの L 系アミノ酸（側鎖に中性の大きなグルーをもつもの）のモデルとなることをいち早く証明して、Christensen に喜ばれた記憶がある。その典型的な実験結果を Table 6 に示す。

この L 系のアミノ酸輸送は Na の電気化学的勾配ではなくて細胞外の pH 酸性側で活性化されることが、Christensen らによってマウス腹水腫瘍細胞で見いだされたが、この活性化機構が不明であった。私達は Chang 肝細胞でも同様のことを観察し、また当時使われはじめた Na⁺-H⁺ 交換阻害剤（アミロライド及びその誘導体の EIPA）（Fig. 1）やプロトンイオノフォア（細胞外酸性のとき）（Table 7）

Table 6. Inhibition of Uptakes of [¹⁴C] Leucine and -Glycine by the Presence of System-Specific Model Amino Acids

¹⁴ C-labeled amino acid	Intracellular concentration (mM)		
	None (Control)	Me-AIB	b-BCH
Leucine	2.40 (100)	2.18 (91)	0.98 (41)
Glycine	3.71 (100)	1.78 (48)	3.82 (103)

Cell sheets were incubated for 5 min with 0.5 mM [¹⁴C] glycine or-leucine in HSS in the presence or absence of 5 mM Me-AIB or b-BCH at 38°C. The uptake of labeled amino acid was expressed as intracellular concentration. The values in parentheses show % of control uptake. Each value is the average of 3-4 observations.

Table 7. Effect of FCCP on H⁺ Gradient-Stimulated L-Leucine Uptake

Experimental condition	L-leucine uptake (pmol/mg protein/min)		p
	Control	FCCP	
No H ⁺ gradient	62.2	12.4	—
No H ⁺ gradient + FCCP	98.7	37.8	n.s.
H ⁺ gradient	182.4	24.4	<0.01
H ⁺ gradient + FCCP	92.0	23.4	n.s.

Each value represents the mean ± the standard error of mean triplicate determinations. n.s.: Not significant.

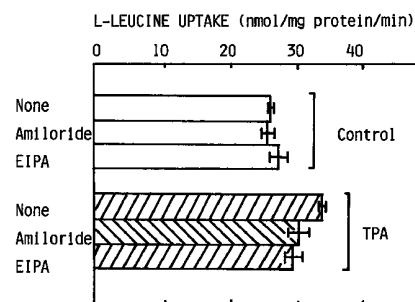


Fig. 1. The Effect of Amiloride and EIPA on the Basal and TPA-Stimulated Leucine Uptakes

Cells were preincubated in the presence (hatched bars) or absence (open bars) of TPA (10⁻⁷M) with 1 mM amiloride, 0.01 mM EIPA or neither of them in HBS for 10 min. One-minute uptake of leucine (1 mM) was determined in HBS. Error bars represent ±S.E. (n=4).

によってロイシンの取込みが著しく阻害されたことから、始めてプロトンとロイシンの共輸送を提唱した。⁷⁾ Na⁺-H⁺ 交換体は Na⁺ を含むメジウム (HBS) において、細胞内プロトンの上昇に反応してそれを細胞外へ追い出すことにより、ロイシン取込みを促進するものと考えられる。

このような L 系輸送の特性は、ヒトのリンパ球

においても示された。⁸⁾ リンパ球におけるロイシンの取込みはコンカナバリン A (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の共存で著しく増大するが、これはコンカナバリン A による細胞内 Ca イオン上昇がカルモジュリン活性化を介して K チャネルを開き、過分極する (細胞内陰性の増大) ためにロイシンのプロトン共輸送が促進されたものであった (Table 8) (Figs. 2—5).⁹⁾ またロイシンの取込みによる細胞内プロトンの増大 (蛍光色素 BCECF を取込ませたリンパ球の蛍光変化により測定) は、膜にある Na^+-H^+ 交換体を活性化して、結果的にプロトンを細胞から追い出していると考えられる。^{10,11)}

当時イオンとしてのプロトンが生化学的な反応に直接加わる例としては、クロロプラストにおける電子伝達系の活動の結果、チラコイド膜をはさんで形

Table 8. Effect of TMB-8 on Basal and Concanavalin A- and A23187-Stimulated Leucine Uptake

TMB-8 in incubation	Leucine uptake (% of control)		
	None	Concanavalin A	A23187
—	100 \pm 10 (control)	132 \pm 3*	250 \pm 25**
+	92 \pm 18	106 \pm 13	168 \pm 45*

Lymphocytes were preincubated with concanavalin A (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min or A23187 (0.1 μM) for 10 min or with neither in the presence or absence of TMB-8 (100 μM) in Earle's balanced salt solution. Leucine uptake for 5 min is expressed as percent of control. Each value represents the mean \pm S.E. ($n=4$).

* Significantly different from control ($p<0.05$), ** Significantly different from control ($p<0.005$).

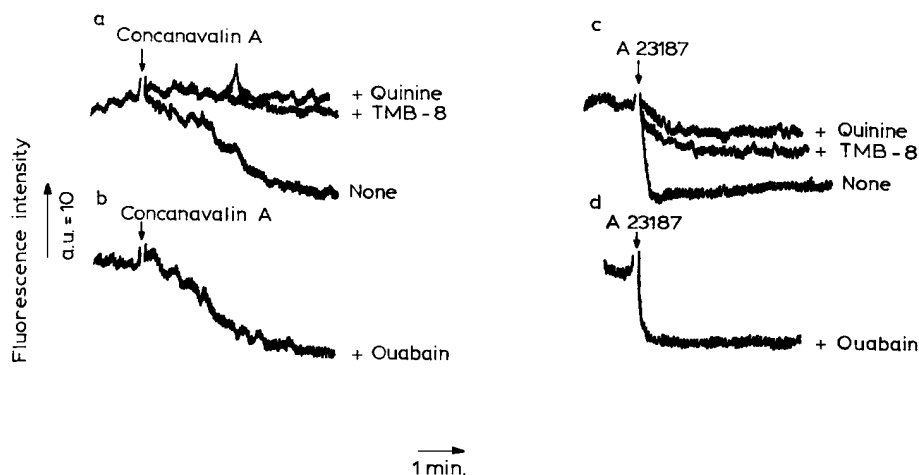


Fig. 2. Concanavalin A- and A23187-Induced Hyperpolarization and Effects of Quinine, TMB-8 and Ouabain

Lymphocytes ($4 \cdot 10^6$ cells/ml) were suspended in HEPES-buffered saline and the membrane potential was determined with bis-oxonol. Where indicated, quinine (0.5 mM), TMB-8 (100 μM) or ouabain (0.1 mM) was present in medium. Where indicated by the arrow, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concanavalin A (a, b) or 0.1 μM A23187 (c, d) was added to the medium. A downward deflection indicates hyperpolarization.²³⁾ The traces are representative of four similar experiments.

成されるプロトン勾配 (pH 差) がプロトン駆動力となって ATPase を ATP 産生の方に動かすこと、また動物ミトコンドリアでもいわゆる酸化リン酸化の機構として、従来の高エネルギー中間物の生成を介する ATP の産生説が否定され、プロトン駆動力により ATP を産生するという P. Mitchell の chemiosmotic theory が提唱されていた。また安楽泰宏により酵母の液胞膜にプロトンポンプが見い出されていた。

われわれは当時形質膜のみのベシクルを窒素加圧法で Chang 肝細胞からつくり、ロイシンの取込みがプロトンの輸入を伴うことを、ベシクル内の pH

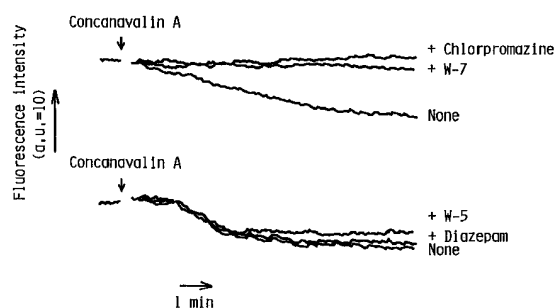


Fig. 3. Effects of Calmodulin Inhibitors on the Concanavalin A-Induced Membrane Hyperpolarization

Lymphocytes ($4 \cdot 10^6$ cells/ml) were suspended in HEPES-buffered saline and change of membrane potential (fluorescence quenching) was determined with bis-oxonol. W-7 (100 μM), chlorpromazine (100 μM), W-5 (100 μM) or diazepam (50 μM) was present in medium as indicated throughout measurement. 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concanavalin A was added to medium at arrows. The fluorometric traces are representative of three similar experiments.

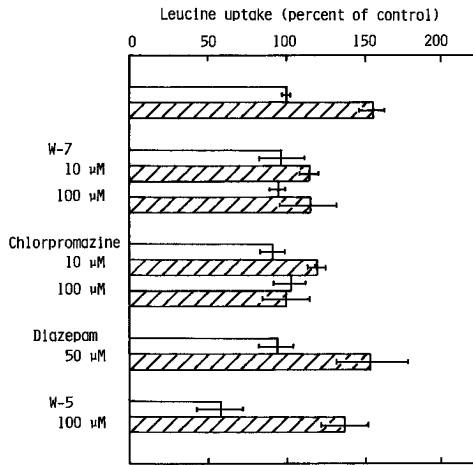


Fig. 4. Effects of Calmodulin Inhibitors on the Basal and Concanavalin A-Stimulated Leucine Uptake

Lymphocytes were incubated in the presence (hatched bars) or absence (open bars) of 32 $\mu\text{g/ml}$ concanavalin A in Earle's balanced salt solution for 30 min after they were treated with or without calmodulin inhibitors as indicated for 3 min. Then leucine uptake (0.2 mM) for 5 min was determined in Earle's balanced salt solution. Each value represents the mean \pm S.E. ($n=4$).

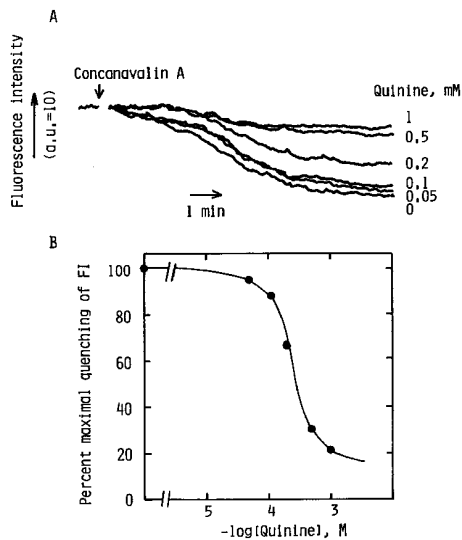


Fig. 5. (A) Concentration Dependence of the Inhibition by Quinine of the Concanavalin A-Induced Membrane Hyperpolarization

Change of membrane potential was determined as described in legend to Fig. 3 with quinine in medium at concentrations indicated. The traces are representative of three similar experiments. (B) Dose-response curve of quinine inhibition of the concanavalin A-induced membrane hyperpolarization. Quenching was read 8 min after concanavalin A was added to medium on the curves in A.

変化を 9-アミノアクリジンの蛍光変化で測定することにより推定した。細胞においても、FITC-デキストランをあらかじめ取込ませておいて、その蛍光変化からロイシンとプロトンの共輸送を証明した

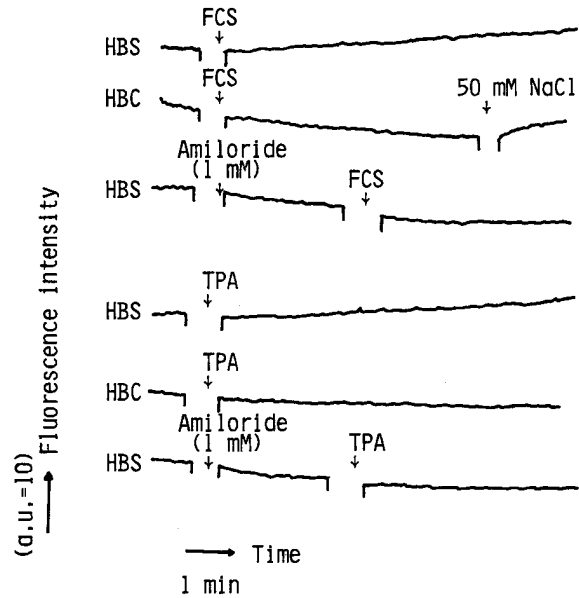


Fig. 6. Cytoplasmic pH Changes Induced by Fetal Calf Serum and TPA

Cells were loaded with the fluorescent pH indicator FITC-dextran using the scrape-loading method and the fluorescence was recorded as described in Materials and Methods. The fluorescence trace of typical experiments are depicted before and after addition of 5% (v/v) fetal calf serum (FCS) or $1 \cdot 10^{-6}$ M TPA at the arrows. HBS: HEPES-buffered saline, HBC: HEPES-buffered choline.

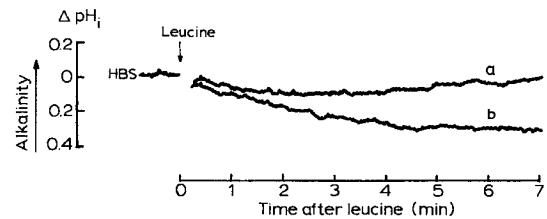


Fig. 7. Leucine-Induced Cytoplasmic Acidification and the Effect of Amiloride

BCECF-loaded lymphocytes were suspended in buffer A and the fluorescence was recorded at 37°C. Where indicated, 1 mM leucine was added to medium in the presence (b) or absence (a) of 1 mM amiloride. Traces are representative of at least five experiments.

(Fig. 6).^{12,13} その後やはり細胞内 pH の指示薬である BCECF の蛍光変化を利用してこれを追試した (Fig. 7). また再構成膜タンパク質リポソームを用いた実験において、pH 勾配によって促進されるロイシン輸送はプロトンのアンカプラーである FCCP の共存により打ち消されることが示された (Fig. 8) (Table 9). したがって L 系輸送はプロトン駆動力によってエネルギーを得るものと思われる (細胞外が酸性でなくても、細胞内の電氣的陰性、アミノ酸の濃度勾配によって、細胞への取込みは起こりう

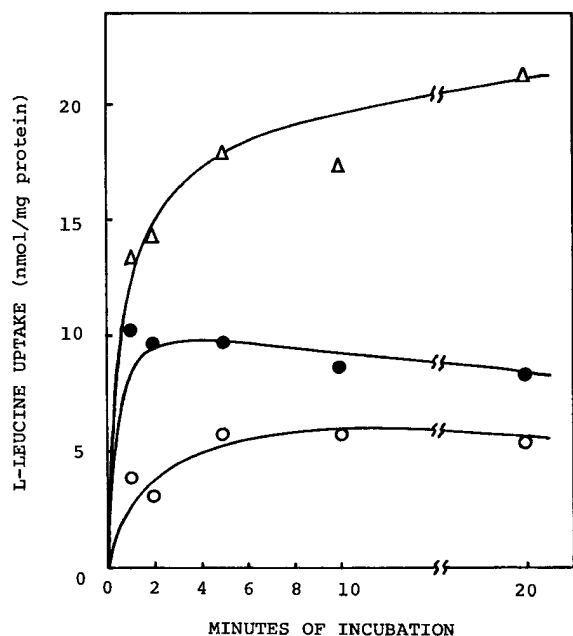


Fig. 8. External pH Dependence of Leucine Uptake by Reconstituted Proteoliposomes

The leucine uptakes were determined in 10 mM Tris-HCL (pH 7.4) (○), 10 mM Hepes-Tris (pH 6.4) (●) or 10 mM Mes-Tris (pH 5.4) (Δ) buffers containing 0.15 M KCl, 1 mM MgCl₂ and 1 mM DTT. The reconstituted proteoliposomes were incubated for 10 min at 37°C and then the uptake was initiated by addition of 0.3 mM leucine. Each point is expressed as the mean of duplicate samples.

Table 9. Inhibition by FCCP of H⁺ Gradient-Stimulated Leucine Uptake by Reconstituted Proteoliposomes

Experimental condition		(L-Leucine uptake nmol/mg protein per min)	<i>P</i>
External pH	FCCP		
7.4	—	6.45 ± 1.60	—
7.4	+	6.19 ± 0.85	n.s.
5.4	—	13.95 ± 3.03	<0.05
5.4	+	6.71 ± 0.76	n.s.

Each value represents the mean ± S.E. (*n*=4). n.s., not significant FCCP, 5 μM.

る)。このロイシン輸送は通常、細胞外のナトリウムイオンを利用して、形質膜にある Na⁺-H⁺ 交換輸送体によりプロトンを追いつくことによって逆輸送を制御しているものと思われる (Figs. 9, 10)。この輸送系は細胞内外に向けて基質アミノ酸同士で 1 対 1 の交換輸送をすることも特徴の一つである。

今日、哺乳動物細胞の L 系輸送に相当する輸送体 (b-BCH により拮抗される) として分離同定されたものでは、LAT1 (ラットグリオーマ細胞から) があるが、これは桁違いにその Km 値がわれわれのものより低い。しかし基質アミノ酸同士の交換輸

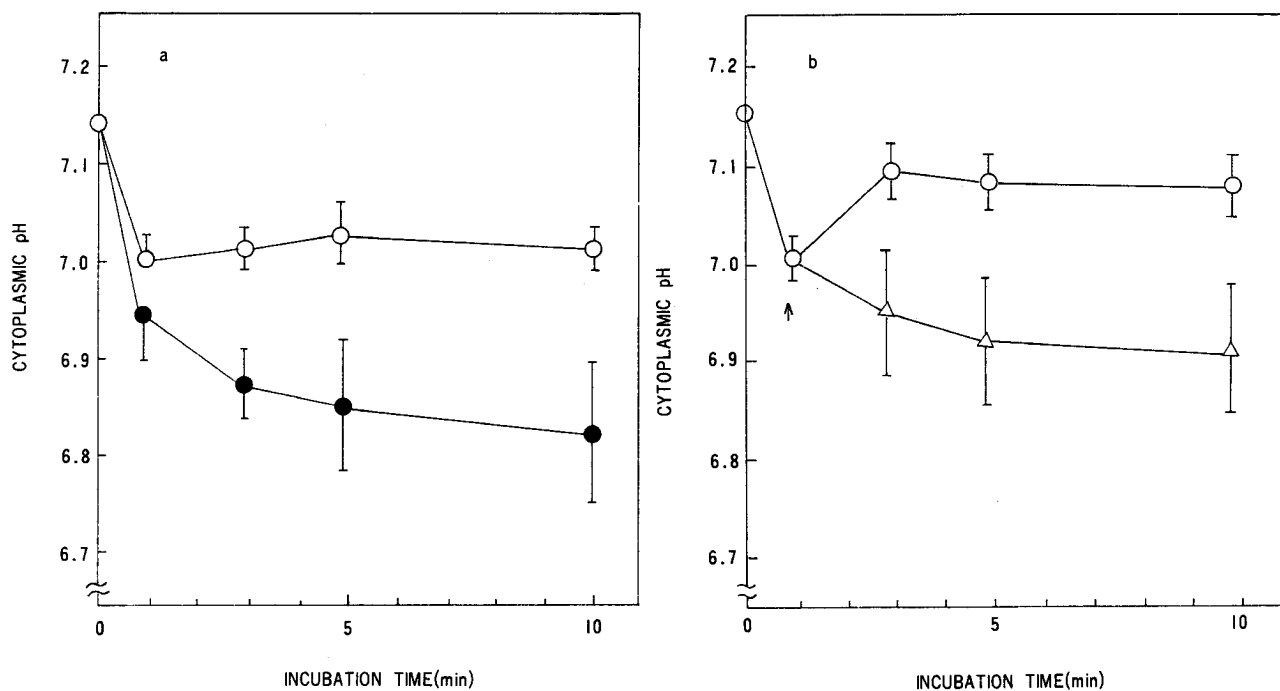


Fig. 9. L-Leucine-Induced Cytoplasmic Acidification in the Presence or Absence of Na⁺ and the Effect of Amiloride

Cells were preloaded with FITC-dextran, and the fluorescence intensity recorded was converted to pH values, a: 1 mM leucine was added to either HBS (○) or HBC (●) buffer at zero time of incubation. b: medium was changed to HBS containing 1 mM leucine with (Δ) or without (○) 1 mM amiloride at arrow after 1 min of incubation with 1 mM leucine in HBS. Each point represents mean of three experiments and ± S.E.

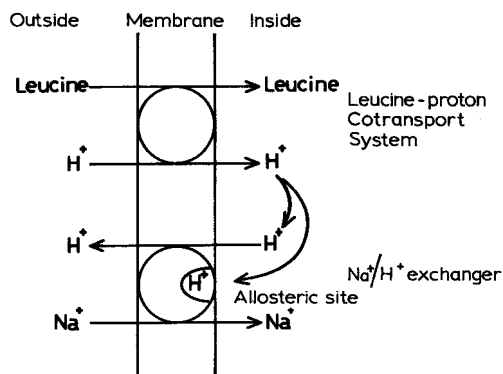


Fig. 10. A Schematic Presentation of Functional Linking of Leucine-Proton Cotransport with the Na^+/H^+ Exchanger

送をし易い事は共通している。LAT1がプロトン共輸送するかどうかは不明である。この輸送蛋白質はラット脳や牛脳 (LAT) の血液脳関門 (血管内皮), 脾臓, 精巣に特異的に存在している (肝臓にはみられないが, ヘパトーマにはある) と言うことであるが, 今後そのホモログが他の組織細胞で発見されることは十分考えられる。ロイシン, イソロイシン, バリン, フェニルアラニンはすべて必須アミノ酸であり, しかも細胞内プールは小さいので, 輸送系が細胞の蛋白質合成をレギュレーションしている可能性があり, したがってその輸送体の量と活性は細胞の増殖や諸機能の基本的なキャパシティの維持に関係しているのではないだろうか。前述したように, リンパ球のロイシン輸送はコンカナバリン A, TPA (ホルボールエステル) の刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇によって増大し, また Chang 肝細胞においても, TPA あるいはジアシルグリセロール添加によって細胞内 pH は上昇し, 同時にロイシンの取込み速度が大きくなることをわれわれは明らかにしている (Figs. 11, 12).¹⁴⁾

一方グリシン, セリン, アラニン, グルタミン, アスパラギン, メチオニンなどの A 系アミノ酸の輸送は insulin, 成長ホルモン, ACTH, エストロゲン (ラット子宮), アンドロゲン, カテコラミン, glucagon, 甲状腺ホルモンによって著しく促進される。これらのホルモン作用も細胞の Ca^{2+} -カルモジュリン系を介して, 細胞内外の K^+ や Na^+ の分布, または膜電位を変えることによって達成される可能性がある。¹⁵⁾

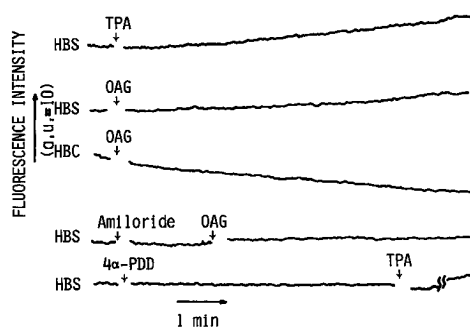


Fig. 11. Cytoplasmic pH Changes Induced by TPA and OAG

Cells were preloaded with a fluorescent pH indicator, FITC-dextran, and the fluorescence was recorded. The changes of the fluorescence of typical experiments are traced before and after addition of 10^{-17} M TPA or $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ OAG at arrows to HBS or HBC (made by replacing NaCl of HBS by choline chloride and adjusting pH with KOH).

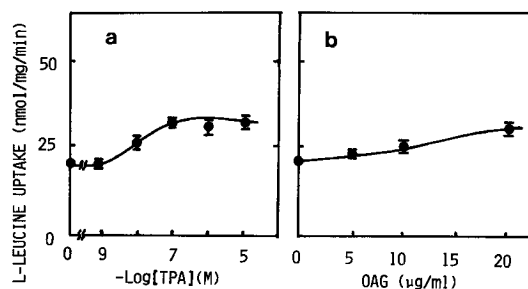


Fig. 12. Dose-Response Curves for the Effect of TPA (a) and OAG (b) on Leucine Uptake

Cells were incubated with addition of various concentrations of TPA or OAG indicated to HBS. After 10 min of incubation, 1-min uptake of leucine (1 mM) was determined in HBS. Error bars represent \pm S.E. ($n=4$).

4. ラット海馬のグルタミン酸輸送系

グルタミン酸, D-アスパラギン酸の輸送は, 脳の神経系の活動とその研究に重要であるが, われわれはラット大脳海馬のスライスを用いて, グルタミン酸の取込みのモデルアミノ酸 (非代謝性) として D-アスパラギン酸の輸送を研究した。脳においてグルタミン酸は重要な神経刺激物質であるが, 神経興奮時に放出されたあとのその再取込みの機構と, 過剰分泌 (脳虚血時) による興奮毒性の問題が提起されていた。われわれは海馬において温度依存性のナトリウム要求性 (K_m 約 0.2 mM), 及び非要求性 (K_m 約 3 mM) の D-アスパラギン酸取込み機構を見出した (Fig. 13).¹⁶⁾ 前者の取込みは L-アスパラギン酸及び L-グルタミン酸によりブロックされ, エネルギー要求性であり (Table 10), また虚血条件として低酸素及び低グルコースの影響を調べたところ, これらの条件によって D-アスパラギン

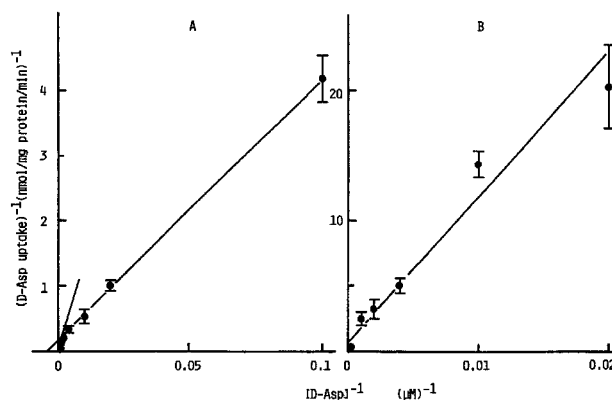


Fig. 13. Double-Reciprocal Plots of D-Asp Uptake by Hippocampal Slices in the Presence or Absence of 124 mM Na⁺

Slices were incubated for 1 min at 37°C with D-[³H]Asp at concentrations ranging from 10 μM to 10 mM in HEPES-Krebs medium (A) or at concentrations ranging from 50 μM to 5 mM in Na⁺-free HEPES-Krebs medium (B) in tissue culture plates. The uptake of D-Asp by slices was determined as described in Materials and Methods. Uptake data (mean of three determinations) were corrected for apparent uptake measured at 4°C. SEM values are shown by vertical lines except for extremely high concentrations of the substrate. Two crossing lines in A show the result of least-square fitting of the data by two-component analysis according to a nonlinear computer program described by Yamaoka et al. (1981).

Table 10. Effect of Addition of Various Amino Acids on D-Asp Uptake by Hippocampal Slices

	Amino acid	mM	D-Asp uptake (% of control)	p value
Experiment I	—	—	100 ± 13	
	L-Asp	0.1	68 ± 14	NS
		1	39 ± 10	< 0.05
	L-Glu	0.1	63 ± 12	NS
		1	33 ± 1.4	< 0.01
	DHK	0.1	67 ± 10	NS
		1	49 ± 1.8	< 0.05
	D-Glu	0.1	74 ± 6.2	NS
		1	72 ± 6.4	NS
	Gly	0.1	139 ± 17	NS
1		102 ± 12	NS	
L-Lys	0.1	100 ± 14	NS	
	1	80 ± 3.9	NS	
Experiment II	—	—	100 ± 9.7	
	THA	0.1	64 ± 6.8	< 0.01
		1	45 ± 4.7	< 0.01

Slices were incubated with or without (control) the indicated concentrations of various amino acids for 5 min at 37°C in HEPES-Krebs medium in tissue culture plates. Then D-[³H]Asp (2 μM) was added to the medium to measure D-Asp uptake for 1 min, as described in Materials and Methods. Data are expressed as means ± SEM (n=3) of percentage of uptake in control, corrected for apparent uptake measured at 4°C, and significance was evaluated by Student's *t* test. Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid, DHK: dihydrokainic acid, Gly: glycine, Lys: lysine, NS: not significant compared with control.

酸の取込みは著しく阻害された (Fig. 14). 海馬は特に脳虚血の影響を受け易く, グルタミン酸の興奮毒性によって神経障害が起こり易いが, このグルタ

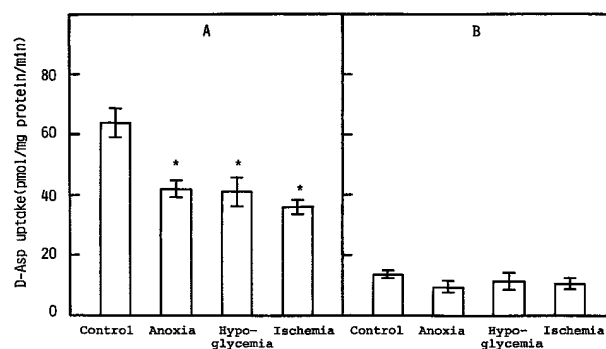


Fig. 14. Effects of "Anoxia," "Hypoglycemia," and "Ischemia" on Na⁺-Dependent (A) and Na⁺-Independent (B) Uptake of D-Asp by Hippocampal Slices (2 μM) D-Asp

Slices were incubated under similar conditions, as described in Fig. 5, before assay. The uptake of D-[³H]Asp was measured at 2 μM. Na⁺-dependent and Na⁺-independent uptakes of D-Asp are defined as in the legend to Fig. 4. Vertical lines represent SEM (A: n=4, B: n=6). Evaluation of variance and its expression are the same as in Fig. 4.

ミン酸取込みが神経シナプスにおけるアミノ酸再取込み活性を表しているとするれば, 脳虚血によるグルタミン酸の過剰障害は説明できるかもしれない。

現在牛の脳血管障壁 (血管内皮) で非常に Km の低い (約 14 μM), キャパシティの小さいナトリウム依存性の輸送蛋白質が同定されているが, 一時的な虚血などでグルタミン酸濃度が mM オーダーになるとすると, あまり低い Km の輸送体はその取込みに効果的ではないはずである。虚血によって輸送速度が抑えられても, むしろ Km の高い輸送系の方が Vmax が大きいので, 速やかな細胞間か

らの除去に寄与するはずである。われわれはアミノ酸の濃度を 0.05 mM 以上でしか解析していないので、上記のように低い Km の輸送系がラット脳にあるかどうかは分からない。

5. 培養海馬神経細胞とアルツハイマー病 β アミロイド蛋白質毒性

海馬はアルツハイマー病において、最も神経細胞の変性が起こり易い部位の 1 つである。そして β アミロイド蛋白質の重篤な脳沈着（老人斑）とアルツハイマー病痴呆の発症とは関係があるようである。海馬はいわゆる大脳辺縁系の中の重要な、しかも大きな器官である。辺縁系は旧皮質・古皮質とも言われ、哺乳動物で下等なほどその脳でしめる割合合いが大きい。辺縁系は外部情報の認知や記憶、あるいはそれらに対する感情や判断、それに基づく行動の基本的な形成の場であり、ヒトにおいても海馬

は新しいことを学習することによって、短期記憶や作業記憶、また皮質との連携プレイによる長期記憶の固定や空間記憶の形成にも中心的に働くと考えられている。しかし海馬の神経細胞に対して、アルツハイマー病 β アミロイド蛋白質がどのような作用を及ぼすのか、その作用と細胞変性とはどのように結びつくのか、未だに明らかではない。

われわれは最初、 β アミロイド蛋白質の疎水性コアが本当に直接細胞変性を起こすか検討するために、ラット海馬の培養神経細胞を用いて lactate dehydrogenase (LDH) の細胞外漏出を指標に、合成ペプチド (β 25-35 及び β 22-35 を用いた。それぞれ β アミロイド蛋白質の 25-35 位、22-35 位のアミノ酸配列をもつフラグメント) で細胞毒性を評価した。 β 25-35 は 1991 年にアメリカの A. Yankner らにより、海馬神経細胞に対して変性（トリパンブルー色

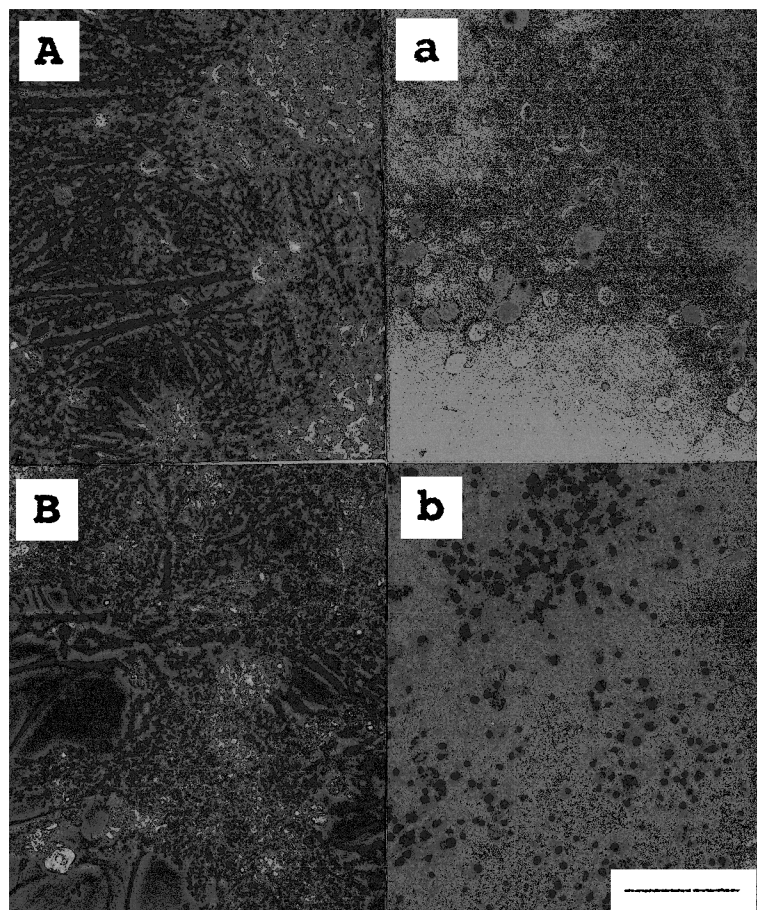


Fig. 15. Morphological Change and Death of the Rat Hippocampal Neurons after β 22-35 Treatment

Cells (B and b) were treated for 3 days with β 22-35 by addition of 20 μ l of the stock mixture (2 mg/ml of β 22-35 in betaine buffer (0.7% betaine and 20 mM NH_4HCO_3) pH 8.5) to 1 ml medium. Control cells (A and a) were treated with the betaine buffer alone. They were incubated at 37°C under a gas mixture of 95% air/5% CO_2 . Morphological change of cells was checked throughout the course of experiment on phase-contrast microscopy (A and B). Cell viability was finally tested by Trypan blue staining (a and b). Specimens were all at 3 days of treatment. Bar=100 μ m.

素透過性) を起こすことが発表されたものであるが (Fig. 15), このペプチドは事実上中性の緩衝液には溶けない. ベタイン緩衝液でも沈殿が残り, 約 20% は不溶性のままである. 後にこの不溶性の重合物を形成することが細胞毒性の発現に関係すると言われるようになるのであるが, 当時としては沈殿物を細胞に添加するというに抵抗を感じたので, N-末端側に親水性のアミノ酸残基(グルタミン酸, アスパラギン酸)を伸ばして, $\beta 22-35$ を合成したが, これも一部まだ不溶性であった (Fig. 16). われわれは海馬培養神経細胞では初めて, LDH の培地への漏出に対するこれら 2 種のペプチドの効果を, $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で試験したところ, 血清無添加の培地で培養数日後, それらの培地添加濃度に依存して細胞の LDH 漏出を促進することが分かった (Fig. 17).¹⁷⁾ 沈殿物(ペプチド分子重合繊維)のリンタンゲステン酸染色電子顕微鏡像は $\beta 22-35$, $\beta 25-35$ の両者でよく似ているが, 延長ペプチドの方が大きな固まりは少ないようであった.

それにしてもペプチドが不溶性であるにもかかわらず, 添加濃度に依存して細胞毒性が強く現れることは不可解であった. この沈殿物存在下での毒性の濃度依存性は P. T. Lansbury, Jr. ら (1993) が主張する, β アミロイド繊維形成の重合速度論(ペプチド核依存説)を支持しているものかもしれない. つまりペプチド分子重合体形成は二段階で進行し, ペ

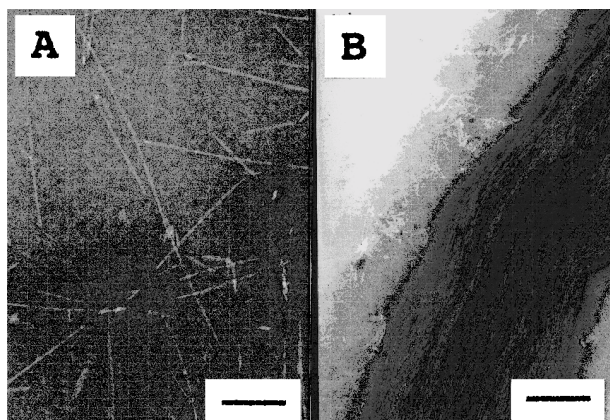


Fig. 16. Electron Micrographs of the $\beta 22-35$ Peptide Assemblies

The fibrous aggregates from betaine buffer were stained negatively with 4% (w/v) uranyl acetate or 2% (w/v) phosphotungstic acid after adsorption onto 180 mesh carbon-coated formvar grid and subjected to electron microscopic observation using JEM12EX2 at 100 kV. A: fibrils of $\beta 22-35$. B: fibrous bundles. Bars=(A) 200 nm, (B) 500 nm.

プチドモノマーから核オリゴマー形成は速度が小さいが, 核から繊維形成の第二段階は極めて速いので, わずかのオリゴマー核の濃度増加によって重合体形成の速度が著しく大きくなるため, 重合体が爆発的に増える可能性がある. しかし実際に蛋白質添加量に依存して増す毒性が, このように増えていく不溶性の重合体によるものか, 核オリゴマーと平衡して存在するモノマーあるいは小さなオリゴマーによるものかは分からない.

われわれは, これらのペプチドの $20 \mu\text{M}$ を添加することにより培養海馬神経細胞死が起こり, その毒性を insulin, dibutyryl cAMP, 又は IGF-I 及び -II が防御することを示した (Fig. 18).¹⁸⁾ 透析血清を加えた培地では $\beta 25-35$ の毒性は現われなかった. また $\beta 22-35$ の C 末端のアミド型は $40 \mu\text{M}$ でも毒性は見られず, 対照として用いた逆配列型 $\beta 25-35$ ペプチドにも毒性はみられなかった.

キサンチン誘導体の 1 つで脳代謝改善薬として使われたこともある propentofylline (PPF) は, ラット培養海馬神経細胞においてアデノシンの取込みを著しく押さえて(アデノシンの再吸収を押さえる), その効果を持続させることをわれわれは見出ししている (Fig. 19).¹⁹⁾ アデノシンはそのレセプター (A2) を介して cAMP を産生し, 神経生存維持作

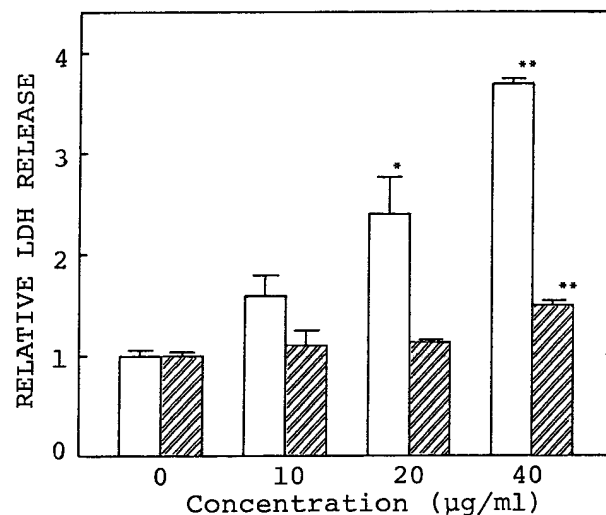


Fig. 17. Concentration Dependence of the Neurotoxicity of $\beta 22-35$ and $\beta 22-35\text{-NH}_2$

Cell injury was assessed by measuring of lactate dehydrogenase (LDH) activity released into the medium 3 days after treatment with varying concentrations of $\beta 22-35$ (blank bar) or $\beta 22-35\text{-NH}_2$ (hatched bar) up to $40 \mu\text{g/ml}$. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 sister cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. no addition).

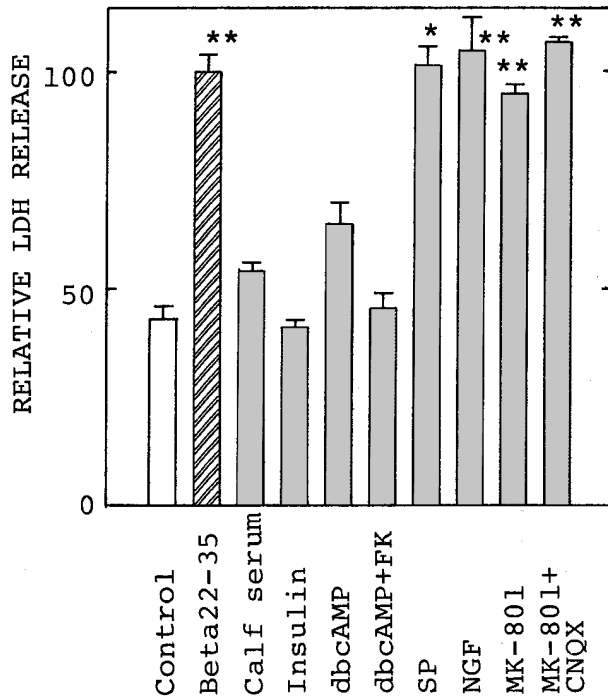


Fig. 18. Effects of Various Agents on the Neurotoxicity Induced by β 22-35

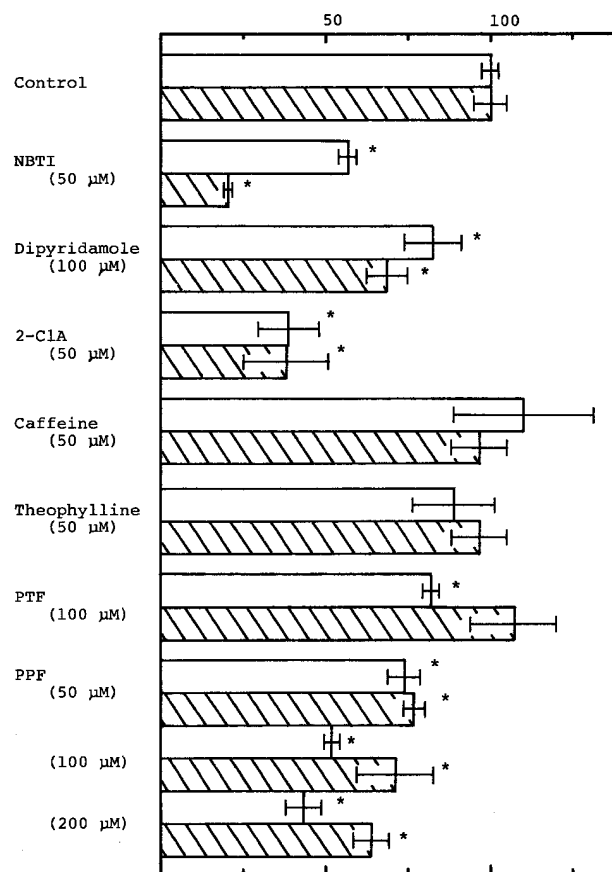
Hippocampal neurons were cultured with 40 μ g/ml of β 22-35 alone or in the presence of 1% calf serum, 0.2 mg/ml insulin, 1 mM dibutyryl cAMP, 1 mM dibutyryl cAMP + 10 μ M forskolin (FK), 0.1 mM substance P, 100 ng/ml NGF, 10 μ M MK-801 or 10 μ M MK-801 + 20 μ M CNQX as described in the legend to Fig. 2. Control was with betaine buffer only. Cell injury was evaluated by LDH release. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 sister cultures. * p <0.05, **<0.01 (vs. control).

用を有することが認められているが、PPF 自身にホスホジエステラーゼ抑制作用があり、それによって細胞内 cAMP 濃度を上げて、やはり細胞の生存維持に働く可能性がある。そこで PPF と β アミロイド蛋白質を培養海馬神経細胞の培地に加えたところ、PPF はアミロイドの毒性に対して防御効果を示すことも分かった。

6. 植物成分の神経栄養因子様作用

上に述べたように、cAMP や insulin あるいは IGF-II のような、代謝あるいは細胞シグナル伝達系に広範囲に影響を与える物質が、アルツハイマー病のアミロイド蛋白質の神経細胞毒性を押さえることが分かった。また神経成長因子 (NGF) などの神経栄養因子や繊維芽細胞成長因子 (FGF) は酸素欠乏、あるいは活性酸素による脳神経細胞死や培養神経細胞死を防止したり、神経分化を誘導することが多く報告されている。今日一般に細胞の増殖・分化の促進、毒物や悪性因子に対する抵抗性を誘導

ADENOSINE UPTAKE (% of Control)



NBTI : Nitrobenzylthioinosine, 2-ClA : 2-Chloroadenosine, PTF : Pentoxifylline, PPF : Propentofylline

Fig. 19. Effects of Various Compounds on the Adenosine Uptake by Cultured Hippocampal Cells

Neurons (open bars) or glial cells (striped bars) were incubated with assay medium containing 10 μ M [3 H]adenosine for 15s in the presence or absence (control) of indicated compounds. Each value shows mean \pm S.E.M. of 3-6 samples relative to control. * p <0.05 by Student's *t*-test.

する上記のような生物活性因子の刺激に基づいて、それら細胞の生存維持に働く細胞シグナルを survival signal と言うようになった。例えば MAP キナーゼカスケード、PI3 キナーゼ-Akt 系、cAMP-CREB 系、anti-apoptotic Bcl-2 系、PKA-NF- κ B 系などである。

ニンジン、あるいはその成分ジンセノシドが強壮、生体防御能力向上などの効果を持つことは知られている。斉藤洋らは培養鶏胚脊髄後根神経節細胞の神経突起誘導に対して、NGF とジンセノシド (Rb1) が協力作用を示すことを報告した。これにヒントを得て、われわれは細胞膜透過性を考慮してニンジンの脂溶性エキスに単独で神経栄養因子様の

作用をもつものがないか検討した。すると、ニンジンのエーテルエキスは NGF と同じように、その 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で PC12h 細胞において神経突起誘導作用を示した (Fig. 20)。PC12h 細胞は副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞のクローン細胞で、神経細胞に分化するとアセチルコリンやカルバコールに反応して、細胞内カルシウムイオンの濃度の上昇が見られる。PC12h 細胞は特に NGF により特異的に分化して、アセチルコリン刺激で興奮してカルシウムを取込み、チロシンヒドロキシラーゼの活性の著しい上昇とドパミン分泌の増加を示すようになる。ニンジン

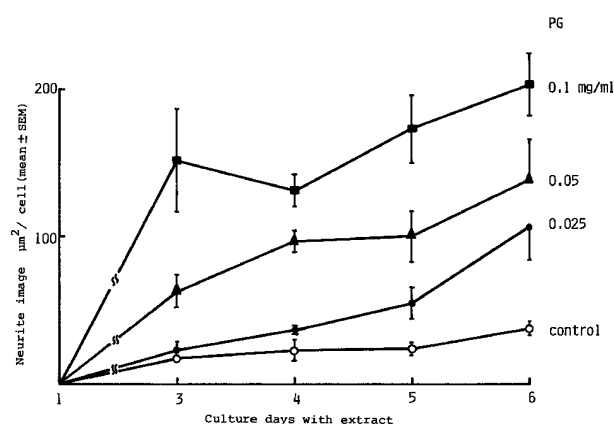


Fig. 20. Neurite Outgrowth of PC12h Cells in Culture with the Diethyl Ether Extract

Cells were inoculated at $1-2 \times 10^4$ in 2 ml medium in each 35 mm culture plate and cultured with addition at day 1 of the indicated concentrations of the extract of *Panax ginseng* (PG) or vehicle only (control) to medium.

ンのエーテルエキスを添加して 1 週間培養した細胞では、カルバコールのカルシウムレベル上昇作用が増強された (Fig. 21).²⁰⁾ その後ニンジンの成分である panaxynol などの脂溶性 polyacetylene が PC12h 細胞において強い神経突起誘導作用を有することを認めた.²¹⁾

同じような PC12h 細胞に対する神経突起誘導作用とカルバコール反応性増強作用は生薬の淫羊藿 (イカリソウ) の酢酸エチル又はエーテルエキスにもあり (ムスカリン作用の増強によると思われる, Table 11),²²⁾ また植物生薬由来の syringaresinol, baicalein, 及び数種のイリドイドにも PC12h 細胞の神経突起誘導作用がある (Fig. 22).²³⁾ これらの化合物の配糖体にもそのような作用はあるが、比活性はアグリコンと同じか、やや弱い。

われわれはそこで生薬の山梔子 (クチナシの実) などのイリドイド成分である geniposide と genipin (Fig. 23) について、それらの神経突起誘導作用の分子機構を追求した.^{24,25)} まず PC12 細胞における NGF の神経突起誘導においてそれを阻害することが示されている一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤 (L-NAME) (Fig. 24), NO スカベンジャー (carboxy-PTIO) (Fig. 25), 及び可溶性グアニレートシクラーゼ (SGC, NO により活性化される) 阻害剤 (ODQ) の影響を、genipin (22 μM) による神経突起誘導に対して調べた。その結果いずれの薬物も、添加時間を早くするほど強く genipin (22 μM)

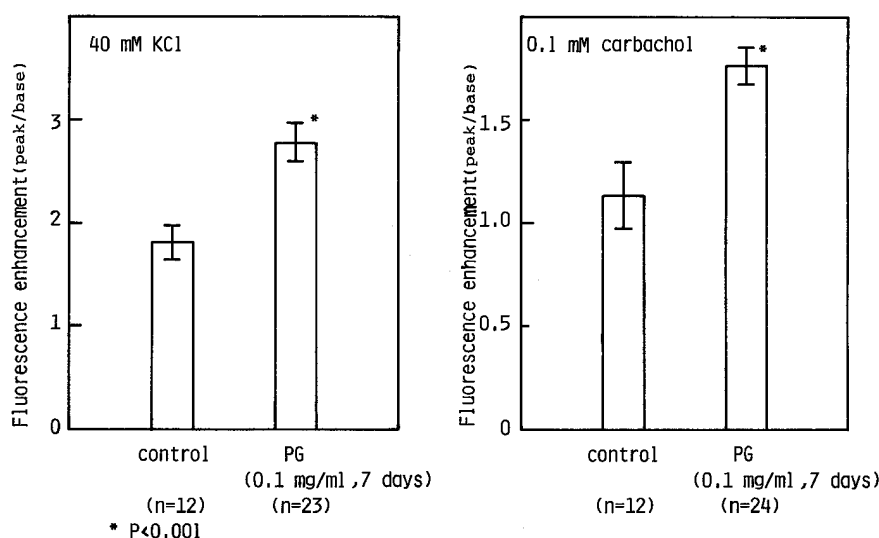


Fig. 21. Effect of Extract Treatment on the Response of Intracellular Free Ca^{2+} Level of PC12h Cells to Carbachol and 40 mM KCl

Table 11. Effect of the Ethyl Acetate Extract on Atropine-Sensitive QNB Binding to PC12h Cells

Exptl. No.	Treatment		n	Binding mean \pm SEM fmol QNB/mg protein	p
	Days	Group			
1	3	C	4	127 \pm 53	n.s.*
		E	10	223 \pm 37	
2	3	C	6	103 \pm 15	<0.01**
		E	6	266 \pm 80	
3	3	C	6	45 \pm 16	n.s.*
		E	8	69 \pm 15	
4	3	C	3	70 \pm 13	n.s.*
		E	3	133 \pm 39	
5	4	C	9	54 \pm 10	<0.05*
		E	10	132 \pm 31	

Cells were treated with (E) or without (C) extract (0.05 mg/ml) for 3 or 4 days before binding assay. Total binding of QNB to cells was determined by incubation of numbers of culture plates (n) indicated for each group with [3 H] QNB in HEPES-buffered DMEM for 10 min, and atropine-insensitive binding by incubation of corresponding numbers of plates in the presence of 1.0 μ M atropine sulfate in medium. Difference between the total and atropine-insensitive (average) bindings was assumed to be the sensitive binding.

* Significance between means of control (C) and extract-treated (E) groups by Student's *t*-test. n.s.: Not significant. ** Significant by the non-parametric test according to the method of Wilcoxon between control and treatment groups.

による PC12h 細胞の突起誘導を抑制した。実際に NOS 蛋白質の増加 (genipin 添加後遅くとも 4 時間までに) が western blot によって確かめられ (Fig. 26), また NGF の場合と同じく MAP キナーゼカスケードの活性化が 10 分後に見られた。その時間前に MEK 阻害剤 (U0126) を加えると神経突起誘

導は著しく抑制された (Fig. 27)。細胞の NOS の活性増加は genipin 添加 30 分で十分観察されるので、NOS (神経型) の蛋白質増加に先立って constitutive な NOS の活性化が起こる可能性もある。これについては現在検証中である。ちなみに NO 発生剤 (SNP, NOR4) のみを PC12h 細胞に添加しても神経突起誘導は見られた。

Genipin 処理による著しい神経突起誘導は、NGF レセプター (TrkA) を欠く Neuro2a 細胞 (ラット neuroglioma 由来) でも見られるので、NGF を介さない細胞分化誘導機構が両細胞で働いていると考えられる。また genipin を添加して 12 時間培養に用いた培地 (genipin はアミノ酸と反応し、分解されている) を新しい PC12h 細胞に添加しても、突起誘導は見られなかったので、NGF などの活性因子が genipin との共存によって産生されているとは

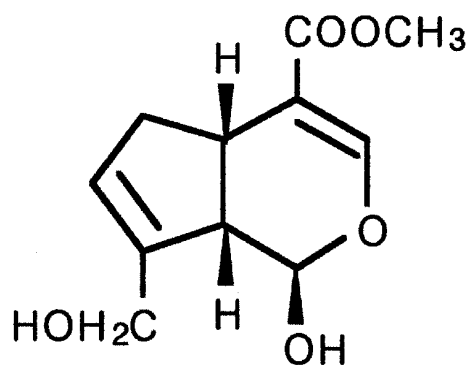


Fig. 23. Chemical Structure of Genipin

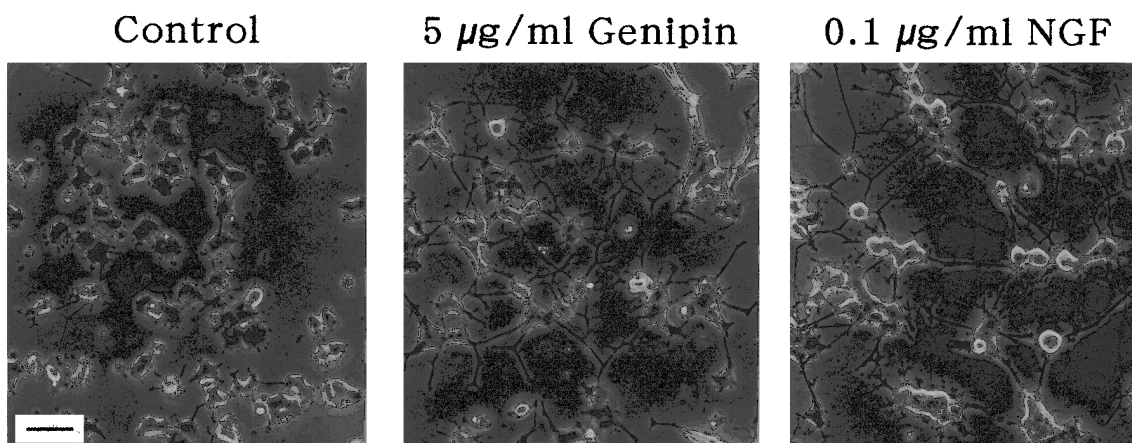


Fig. 22. Phase-Contrast Photomicrographs of Genipin- and NGF-Induced Neurites

Cells were treated with vehicle (control), genipin or NGF as indicated for 3d. Genipin was dissolved in 50% DMSO, NGF in phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% bovine serum albumin, to make stock solutions. Scale = 50 μ m.

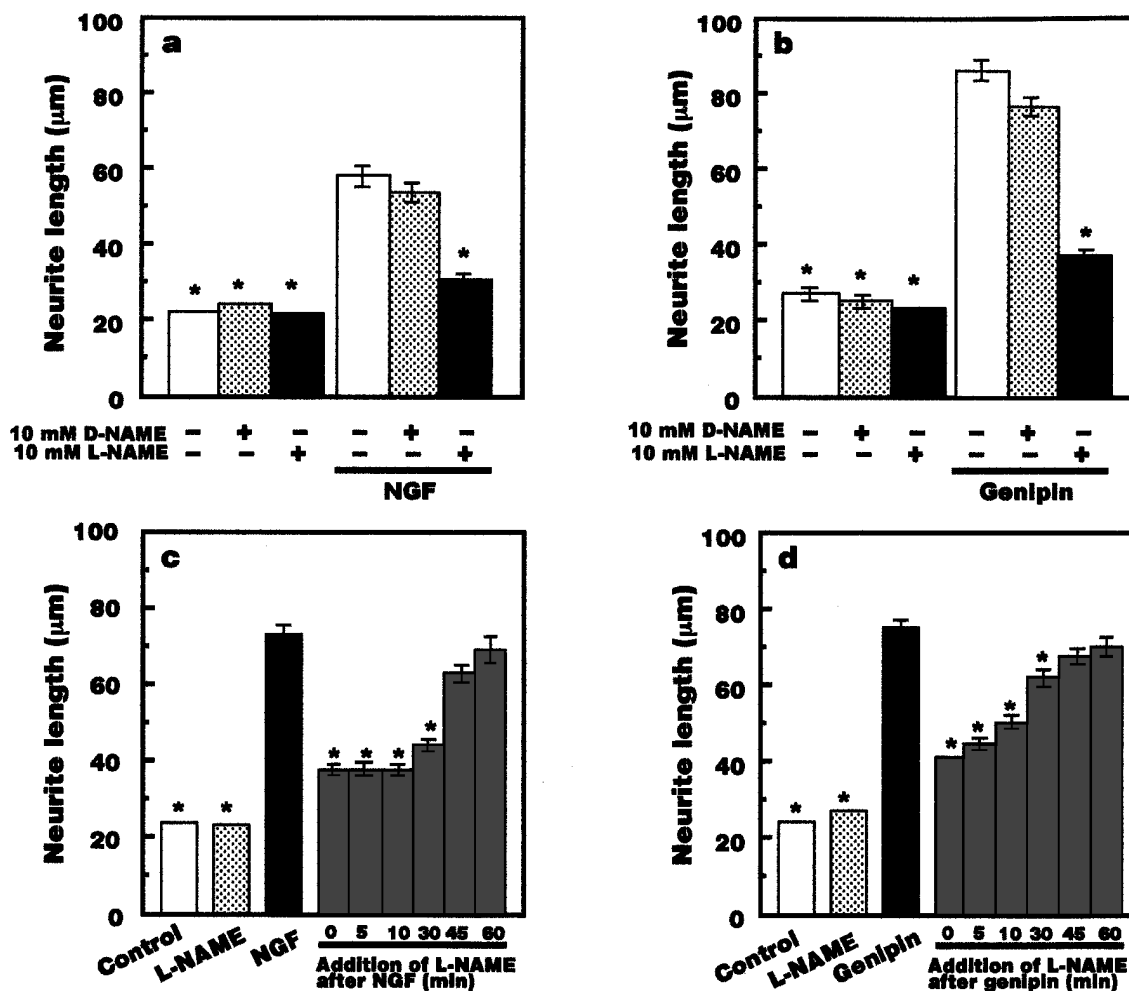


Fig. 24. Effect of NOS Inhibitor on the Neuritogenesis Induced by Genipin and NGF and Time Dependence of the Effect after Addition of the Inducers

(a and b) L-NAME (10 mM), D-NAME (10 mM) or their vehicle (–) was added to the medium 30 min before addition of NGF (1 ng/ml, a), genipin (5 µg/ml, b) or their vehicle (a and b) as indicated. (c and d) L-NAME (10 mM) was added to the medium at various times (~60 min) after addition of NGF (c) or genipin (d) as indicated. The neurite outgrowth was evaluated at 48 h of the treatment as described in Materials and Methods. Each value was expressed as mean ± SEM. **p*<0.01 versus treatment with NGF or genipin alone.

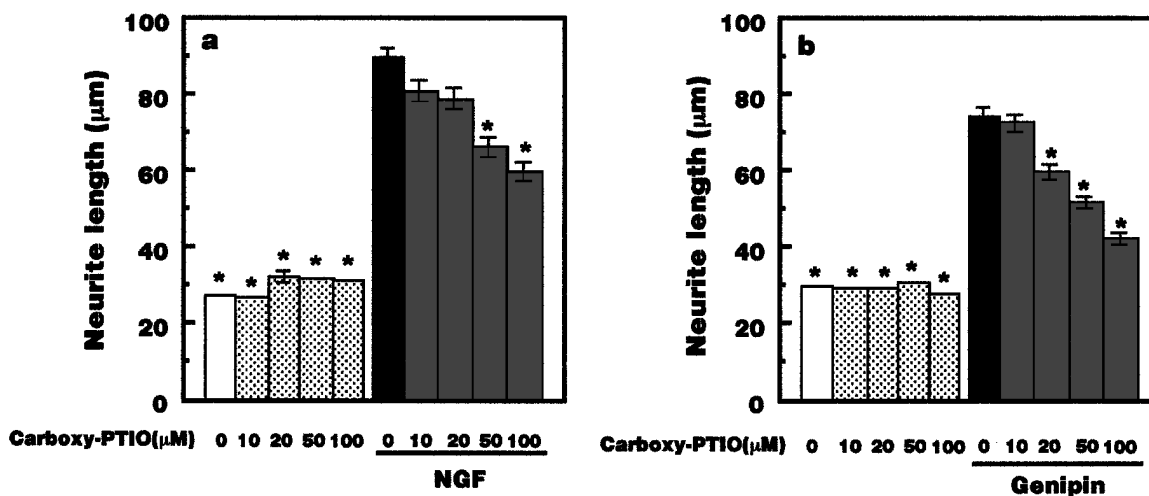


Fig. 25. Effect of NO Scavenger on the Neuritogenesis Induced by Genipin and NGF

Carboxy-PTIO (~100 µM) or its vehicle was added to the medium together with or without 1 ng/ml NGF (a) or 5 µg/ml genipin (b) for 24 h as indicated. The neurite outgrowth was evaluated as described in Materials and Methods and each value was expressed as mean ± SEM. **p*<0.01 versus treatment with NGF or genipin alone.

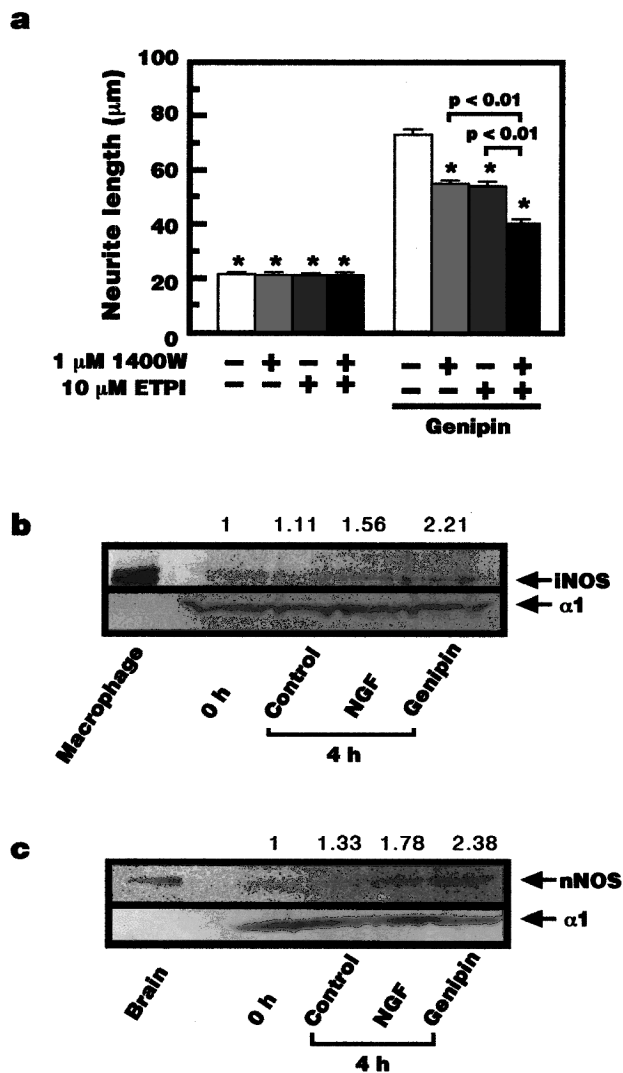


Fig. 26. Effect of Selective NOS Inhibitors on the Neuritogenesis Induced by Genipin and NGF and Western Blot Analysis of Protein Levels of NOSs

(a) The 1400 W (iNOS inhibitor) and/or ETPI (nNOS inhibitor) or their vehicle (-) was added to medium 60 min before addition of 5 μg/ml genipin or its vehicle as indicated. The neurite outgrowth was evaluated in 48 h of treatment. Each value was expressed as mean ± SEM. **p* < 0.01 versus treatment with genipin alone. (b and c) PC12h cells were treated with or without 5 μg/ml genipin or 1 ng/ml NGF for 4 h. Each sample of partially purified NOS proteins corresponding to 2.6 mg (b) or 1.3 mg (c) of cytoplasmic extract proteins was subjected to SDS-PAGE. The immunoreactive signal of Na⁺/K⁺ ATPase α1 subunit is illustrated for assessment of equality of protein loading. Values shown above the panels are relative NOS protein levels normalized for Na⁺/K⁺ ATPase α1 subunit protein. (b) The iNOS band in the position of ~130 kDa was detected with mouse anti-iNOS monoclonal antibody. The lysate of interferon-γ-stimulated mouse macrophage commercially obtained, was used as positive control of iNOS protein. (c) the nNOS band in the position of ~160 kDa was detected with mouse anti-nNOS monoclonal antibody. Rat brain extract was used as positive control of nNOS protein. These each are representative blots of three independent experiments.

考え難い。

細胞の有無に関係なく、培地中の genipin の半減期は約 60 分であり、その間に PC12h 細胞では神経型 NOS の増加、MAP キナーゼの活性化（リン酸化）が細胞抽出物のウェスタン・ブロット法で証明された。むしろ NOS 阻害剤による神経突起誘導抑制は、genipin 添加前、あるいは添加後 40 分以内の阻害剤添加でのみ有効である事実と、MAP キナーゼ（ERK-I, II）のリン酸化は 10 分以内に始まって

いることから（Fig. 28）、突起誘導のイニシエーションは 60 分以内で終了し、また十分であると考えられる。

このような作用機構は NGF と genipin で極めてよく似ているが、後者ではプロテインキナーゼ A (PKA) を介する突起伸展作用も一部働いていることが、PKA 特異的阻害剤 (H89) を用いた実験によって示された。

Genipin は両親媒性であり蛋白質とも結合し易い

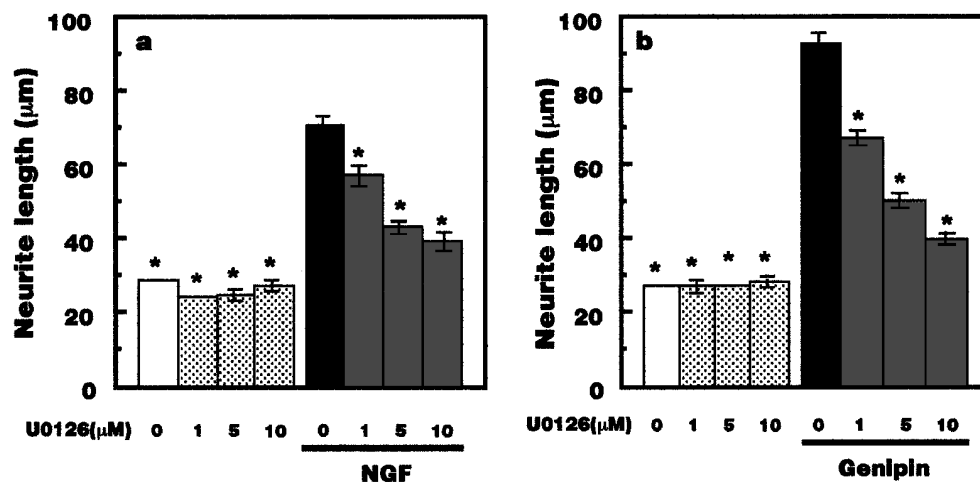


Fig. 27. Effect of MEK Inhibitor on the Neuritogenesis Induced by Genipin and NGF

U0126 ($\sim 10 \mu\text{M}$) or its vehicle (0) was added to the medium 60 min before addition of 1 ng/ml NGF (a) or 5 $\mu\text{g/ml}$ genipin (b) for 48 h. The neurite outgrowth was evaluated as described in Materials and Methods: Each value is expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.01$ versus treatment with NGF or genipin alone.

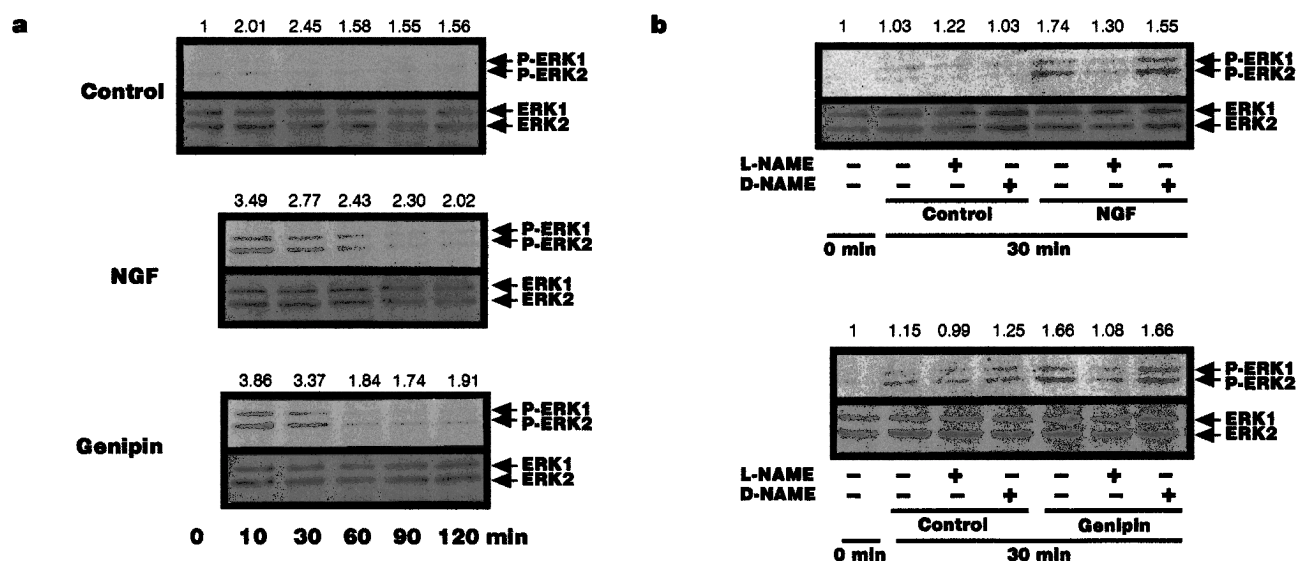


Fig. 28. Western Blot Analysis of ERK Phosphorylation Induced by NGF and Genipin and Its Inhibition by NOS Inhibitor

(a) PC12h cells were treated with or without 1 ng/ml NGF or 5 $\mu\text{g/ml}$ genipin for various times (~ 120 min). (b) L-NAME (10 μM), D-NAME (10 μM) or their vehicle was added to the medium 30 min before treatment with 1 ng/ml NGF or 5 $\mu\text{g/ml}$ genipin for 30 min as indicated. Then, 10 μg of cytoplasmic extract proteins was subjected to SDS-PAGE for each sample. Total ERK proteins and dually phosphorylated ERK proteins were detected as described in Materials and Methods. Values shown above the panels are relative P-ERKs levels normalized for total ERK proteins. These each are representative blots of three independent experiments.

ので、細胞の形質膜をそのまま透過して、直接細胞蛋白質に何らかの作用をすることが考えられるが、非特異的な結合で、しかもアミノ基と反応して分解するのは以上の作用を説明できない。そこで現在細胞内の genipin の一次ターゲットを探索するために genipin あるいは geniposide の抗体を作成して、genipin 添加後の PC12h 細胞ホモジネートからイリドイド構造特異的な結合蛋白質を検出することを試

みている。

他の活性な植物成分の作用機構については全く分かっていない。ニンジン、イカリソウ（神経突起誘導作用のある脂溶性の1つの成分は syringaresinol と同定した）の有効成分、baicalein など、genipin と基本構造の全く異なる化合物が同じような作用をすることは不可解であるが、なおさらそれらがどのような作用機構に基づいて効果を表すのか興味のある

るところである。

最近植物学者によるタバコのウイルス感染の研究によって、NOSの活性化に基づいてMAPキナーゼカスケードも活性化され、cGMPが産生されるという防衛反応が植物にも存在するということが証明された。そのような活性化機構をコントロールする特有の物質が、各植物において合成されているのかもしれない。サリチル酸もそのような作用を植物で発揮している1つの化合物であると言う。

ちなみに genipin (20 μ M) は β 25-35 の培養海馬神経細胞に対する毒性を有意に軽減することができる。²⁶⁾ また genipin をマウスに連続投与 (4 mg/ka/day, ip) することにより、スコポラミン投与後の実験的学習・記憶障害が改善されることを、能動的条件回避試験、潜在学習試験、自発的交代歩行試験を用いて証明した。²⁷⁾ 前述したように、NGF, FGF2, insulin, あるいは cAMP²⁸⁾ が神経細胞分化を促進すると同時に、神経細胞死を防御する効果も持っている。PPF も PC12h 細胞に対して神経突起誘導作用を有する (未発表)。したがって前述の survival signal の活動による共通の転写因子の活性化が、細胞状態のスイッチにより、あるいは分化、あるいは保存維持に働くということが考えられる。この意味においても、パラニューロンにおける神経突起誘導物質を探り、またその作用メカニズムを追求することは、神経保護あるいは神経再生の分子メカニズムを明らかにすることにも結びつくものと考えられる。

謝辞 ここに網羅できなかつたそれぞれのテーマによる研究も含め、それらを遂行していただいた元北陸大学薬学部生理化学教室、及び同創薬研究施設の第二研究部、医薬情報部門、また現同生物活性教室の教員の方々に対して、またそれら研究に基づいた教育の実践にあたって、大学設立当初より絶大な支援と協力をいただいた北陸大学当局と職員、ならびに大学院、学部生の方々に対して、ひたすら衷心より感謝申し上げます。また、研究に対して御協力と親切な御指導を賜った学外諸機関関係者の方々にも、あらためて深く感謝の気持ちを捧げたいと思います。

この投稿の機会を与えて下さいました薬学雑誌編集委員会の方々に感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Mohri T., *Endocrinology*, **81**, 454-460 (1967).
- 2) Mohri T., Nakagawa C., Kitagawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 11-15 (1971).
- 3) Mohri T., Kitagawa H., Riggs T. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 249-260 (1974).
- 4) Takadera T., Mohri T., *Biochim. Biophys. Acta*, **691**, 293-299 (1982).
- 5) Takadera T., Mohri T., *Biochim. Biophys. Acta*, **735**, 197-202 (1983).
- 6) Mohri T., Yamaguchi T., Kitagawa H., *J. Biochem.*, **85**, 681-689 (1979).
- 7) Mohri T., Mitsumoto Y., Ohyashiki T., *Biochem. Int.*, **7**, 159-167 (1983).
- 8) Mitsumoto Y., Sato K., Mohri T., *Biochim. Biophys. Acta*, **968**, 353-358 (1988).
- 9) Sato K., Mitsumoto Y., Mohri T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 570-575 (1988).
- 10) Mitsumoto Y., Mohri T., *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 187-193 (1986).
- 11) Mitsumoto Y., Sato K., Mohri T., *Biochim. Biophys. Acta*, **939**, 349-354 (1988).
- 12) Mitsumoto Y., Sato K., Ohyashiki T., Mohri T., *J. Biol. Chem.*, **261**, 4549-4554 (1986).
- 13) Mitsumoto Y., Mohri T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 171-174 (1991).
- 14) Mitsumoto Y., Mohri T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 900-906 (1987).
- 15) Takadera T., Kikuchi K., Mohri T., *Cell Struct. Funct.*, **14**, 447-458 (1989).
- 16) Kuwahara O., Mitsumoto Y., Chiba K., Mohri T., *J. Neurochem.*, **59**, 616-621 (1992).
- 17) Takadera T., Sakura N., Mohri T., Hashimoto T., *Neurosci. Lett.*, **161**, 41-44 (1993).
- 18) Takadera T., Mohri T., *Shinkeikagaku* 神経化学, **32**, 144-145 (1993).
- 19) Ohkubo T., Mitsumoto Y., Mohri T., *Neurosci. Lett.*, **133**, 275-278 (1991).
- 20) Mohri T., Chiba K., Yamazaki M., Shimizu M., Morita N., *Planta Medica*, **58**, 321-323 (1992).
- 21) Yamazaki M., Hirakura K., Miyaichi Y., Imakura K., Kita M., Chiba K., Mohri T., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1434-1436 (2001).

-
- 22) Mohri T., Yamazaki M., Chiba K., Watanabe H., Shimizu M., *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **9**, 182–189 (1992).
- 23) Yamazaki M., Hirota K., Chiba K., Mohri T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1604–1608 (1994).
- 24) Yamazaki M., Chiba K., Mohri T., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 791–795 (1996).
- 25) Yamazaki M., Chiba K., Mohri T., Hatanaka H., *J. Neurochem.*, **79**, 45–54 (2001).
- 26) Yamazaki M., Sakura N., Chiba K., Mohri T., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1454–1455 (2001).
- 27) Imakura K., Yamazaki M., Mohri T., *J. Tradition. Med.*, **13**, 173–179 (1996).
- 28) Takadera T., Maki T., Hibino H., Mohri T., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 24–28 (1996).