

housekeeping gene の GAPDH mRNA の発現量と比較した。GAPDH mRNA レベルを 1 とすると、chitotriosidase は GAPDH の約 0.016 倍、AMCase は約 30 倍の発現レベルであった。マウスの胃と肺の可溶性画分を AMCase 抗体で解析したところ、約 50 kD にバンドが認められ、それ以外の分子種は検出できなかった。以上の結果から、マウスにおいては AMCase が主要なキチナーゼであることが分かった。

P1-17.

酸化型フェノキサジン 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7H-phenoxazine-3-one (Phx-1) と 2-amino-phenoxazine-3-one (Phx-3) はヒト好中球の細胞内 pH を低下させ、スーパーオキシド産生を抑制し、ミトコンドリア脱分極を誘発し、選択的にアポトーシスを誘導する

(茨城・消化器外科)

○田淵 崇伸、田淵 崇文

(生化学)

車 暁芳、宮澤 啓介、友田 燁夫

(Phx-1) と 2-aminophenoxazine-3-one (Phx-3) をヒト血液に対して作用させたところ、特異的に好中球のアポトーシスを誘導することを発見した。本研究ではその詳細を検討した。正常成人より採取した新鮮血に対して Phx-1 あるいは Phx-3 を添加し 37℃ にて 18 時間孵置したところ好中球にアポトーシスの形態的特色である細胞の収縮と核の凝集化が顕著にみられた。しかしながらそのような所見は血液中のリンパ球、単球には見られなかった。このことは Phx-1、Phx-3 がヒト血液中の好中球に対して特異的にアポトーシスを引き起こしていることを示唆している。そこで新鮮血から分離した好中球に対して 50 μ M 濃度の Phx-1 や Phx-3 を添加し、6 時間後にフローサイトメトリー解析を行ったところ、かなりの好中球にアポトーシスが起きていることが示された。さらに Phx-1 や Phx-3 の添加して 24 時間後には殆んど好中球にアポトーシスが見られるか形態的消失が引き起こされていた。一方では Phx-1 や Phx-3 を添加しなかった好中球 (= 対照群) は正常の形態を維持していた。

さらに Phx-1 や Phx-3 を添加した好中球では顕著な細胞内 pH 低下が 30 分以内に引き起こされ、ミ

トコンドリアの脱分極は 6 時間以内に誘発されることが明らかとなった。これらの先行的現象が好中球のアポトーシス誘発の大きな原因となっていることが示唆された。

またホルボールミリステート酢酸 (PMA) によって刺激される好中球のスーパーオキシド産生は 50 μ M 濃度の Phx-1、Phx-3 の添加によってつよく抑制された。このことは Phx-1 や Phx-3 が好中球の機能を抑制し、炎症反応を強く抑制する可能性を示唆している。

本研究により Phx-1、Phx-3 はヒト好中球のアポトーシスを選択的に誘導することが明らかとなった。将来的に Phx-1 や Phx-3 などの酸化型フェノキサジンは細胞死を誘導し食細胞による炎症反応を阻害する特異的な薬剤として臨床的な応用、とくに好中球が原因となっているいくつかの疾患の治療への応用が可能となるのではないかと考えられた。

P1-18.

PKC- δ による IgA 抗体産生機序の解析

(免疫学)

○豊田 博子、矢那瀬紀子、水口純一郎

Protein Kinase C (PKC) ファミリーのメンバーである PKC- δ は、免疫反応の負の制御因子である。PKC- δ ノックアウトマウスは加齢とともに脾臓が異常に肥大し、自己免疫疾患を誘発しやすくなることが知られている。

抗体反応における PKC- δ の関与を明らかにするため、私たちは PKC- δ ノックアウトマウスに T 細胞依存的抗原 (TD) である NP-卵白アルブミン (NP-OVA)、または T 細胞非依存的抗原 (TI) である NP-Ficoll を 0 日目および 28 日目に投与して、0、14、28、35、42 日目に採血し、酵素結合免疫測定法 (ELISA) を用いて各アイソタイプの免疫グロブリン産生量を測定した。NP-OVA 投与野生型マウスに比べて、NP-OVA 投与 PKC- δ ノックアウトマウスでは高い NP 特異的 IgA 抗体産生が観察された。NP-Ficoll 投与群でも、野生型マウスよりも PKC- δ ノックアウトマウスのほうが、NP 特異的 IgA 抗体産生能が高かった。これらのことから、in vivo において、PKC- δ は特異的 IgA 抗体産生を負に制御していることが明らかとなった。

IgA 反応における PKC- δ の役割を更に調べるため、PKC- δ ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を各サイトカインおよび抗 CD40 抗体で刺激し、IgA 抗体産生量を測定した。意外なことに、リポ多糖類 (LPS) および TGF- β 刺激に対する PKC- δ ノックアウトマウスの B 細胞産生 IgA 抗体量は、野生型マウスに比べて低かった。以上のことより、IgA 抗体反応はサイトカインや B 細胞サブセットの違いによって異なった制御を受けていることが示唆された。

P2-19.

Analysis of the contents of PrP-targeted mitochondrial aggregate

(神経生理学)

○西島 佳奈、八谷 如美、加藤 大樹
金子 清俊

Transgenic mice harboring a high-copy-number of wild-type mouse (Mo) cellular prion protein (PrP^C) are known to develop a spontaneous neuronal cell death in an age-dependent manner, even without inoculation of the scrapie isoform of prion protein (PrP^{Sc}). These mice exhibited an aberrant mitochondrial localization of PrP^C concomitant with decreased proteasome activity, while younger littermates did not.

By utilizing in vitro reconstitution system, we have found that mitochondrial targeting of PrP^C evoked the apoptosis and that it requires 14-3-3 η (N.H. et al., submitted). Furthermore, PrP^C targeted mitochondria formed a large aggregate near the perinuclear region at the in vitro and in vivo. Therefore, we next examined the contents of this aggregate, using sucrose density gradient centrifugation following western blotting. Mouse neuroblastoma neuro2a (N2a) cells containing PrP-targeted mitochondrial aggregate were homogenized and centrifuged within the 5-20% of linear sucrose gradient. After the centrifugation, samples were fractionated and performed SDS-PAGE and immunoblotting then analyzed with anti-PrP antibodies. PrP was found at the bottom fraction with mitochondrial marker proteins, on the other hand, without the aggregation, PrP was collected around the top fractions. Using this experimental

system, we examined the western blot membrane with various antibodies against antigens such as aggresome-related proteins, molecular chaperone-related proteins, mitochondrial-proteins, and Creutzfeldt Jakob disease-related proteins.

Among these antigens, mitochondrial proteins, HSP70 and 14-3-3 proteins, were highly detected along with PrP-targeted mitochondrial aggregate fractions. Clusterin, which seems associated with Alzheimer's disease was also contained in this aggregate. While, aggresome-related proteins were not observed in the aggregates. Furthermore, these results were confirmed by immunofluorescent microscopy observation. Taken together, we concluded to date that PrP-targeted mitochondrial aggregate consists of mitochondrial proteins, PrP, 14-3-3 proteins and clusterin.

P2-20.

ムスカリンはラット基底核出力部（黒質網様部）へのシナプス伝達を抑制する。

(細胞生理学)

○宮崎 武文

基底核出力部—淡蒼球内節（嚙歯類では脚間核）と黒質網様部—は主に GABA ニューロンより構成されている。このニューロンは常時数十 Hz で自発放電活動を行うニューロンで、軸索を主に視床運動核に送っている。随意運動の開始時、線条体からの「直接路」の活性化により、出力部 GABA ニューロンの放電が抑制され、視床運動核ニューロンが脱抑制されることが必要である。本研究では、黒質網様部 GABA ニューロンへのシナプス伝達に対するムスカリンの作用を、膜電流測定法で検討した。

灌流投与されたムスカリン (10 μ M) は、内包電気刺激による GABA 性 IPSC (抑制性後シナプス電流) と視床下核電気刺激によるグルタミン酸性 EPSC (興奮性後シナプス電流) のいずれをも可逆的にほぼ半減させた。両者に対するムスカリンの抑制作用は低濃度 (50 nM) 4-DAMP (特異的 M₃ 型ムスカリン受容体阻害剤) でほぼ消失したが、100 nM ピレンゼピン (特異的 M₁ 型阻害剤) は有意な効果を持たなかった。ムスカリン液中で、微小 IPSC の振幅に変化はなく、頻度が減少した。二発