

Title	虚血に伴う脳蛋白質の変化
Author(s)	山下, 正
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/35293">http://hdl.handle.net/11094/35293</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【38】

氏名・(本籍)	山 下 正
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7677 号
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	虚血に伴う脳蛋白質の変化
論文審査委員	(主査) 教授 西村 健 (副査) 教授 吉田 博 教授 吉川 邦彦

## 論文内容の要旨

### 〔目 的〕

脳血管性痴呆は老年痴呆と並んで発現頻度が高く、病因・治療両面にわたる研究が急務とされている。その基礎となる脳血流障害時の病態を知る目的で、実験的脳虚血モデルを作製し、虚血に伴う脳内蛋白質の変化を検討した。

### 〔方法ならびに成績〕

砂ネズミの脳血管は、頸動脈系と椎骨脳底動脈系との連絡が殆んどないため、両側総頸動脈の閉塞により内頸動脈支配領域にはほぼ一様な虚血を作成することができる。そこで砂ネズミの両側総頸動脈を 5 分、10 分、15 分間閉塞し、血流再開通直後、4 日後、1 週後に断頭して、4℃の条件下で前頭葉皮質、線条体、海馬を摘出し、各部位をホモゲナイズした後超遠心により水溶性蛋白質分画と不溶性蛋白質分画に分離し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で各蛋白質組成の検討を行なった。その結果、水溶性蛋白質のうち分子量約 260K (band-1)、230~240K (band-2)、180K (band-3) などの高分子量蛋白質が脳虚血により変化することを見出した。

各ゲルをデンストメーターでスキャンして各蛋白質組成を定量化し、虚血群 9 グループ各 5 匹の平均値と対照群 (sham operation 群) 3 グループ各 5 匹の平均値とを比較した。band-1 蛋白質は再開通直後に各閉塞時間 (5 分、10 分、15 分)、部位 (皮質、線条体、海馬) で対照群の 20~40% に減少し、4 日後では 40~75% と回復傾向を示した。1 週後では 5 分虚血群及び 10 分虚血群の皮質で更に回復したが、10 分虚血群の線条体と海馬及び 15 分虚血群で再び減少した。部位別の比較では線条体と海馬が皮質に比べて減少の程度が強かった。band-2 蛋白質は再開通 4 日後の線条体でいずれの閉塞時間でも対照群

の50%程度に減少し、1週後では5分虚血群の大脳皮質を除く全ての場所で減少した。band-2蛋白質も線条体、そして海馬で減少傾向が強かった。band-3蛋白質は再開通直後では5分虚血群の皮質、線条体を除いて有意な変化を認めず、概ね経時的に減少し、1週後では全ての場所において対照群の40~60%に減少した。しかしband-1蛋白質やband-2蛋白質で認められた線条体、海馬における選択的な脆弱性は明瞭ではなかった。

各蛋白質の同定はSDS-PAGE及びimmunoblotting法によった。band-1蛋白質は砂ネズミ脳より重合・脱重合をくり返して得られた微小管蛋白質分画のMAP2 (microtubule associated protein 2) と電気泳動上易動度が一致し、抗MAP2抗体と免疫学的交叉性を示した。band-2, band-3蛋白質はウシ脳カルスベクチン及びクラスリンと易動度が一致し、各抗体との交叉性より各々カルスベクチンとクラスリンであることが同定された。

15分虚血1週後の脳水溶性分画を抗カルスベクチン抗体を用いたimmunoblotting法で検討したところ、分子量160~170Kの2本のバンドが検出され、このバンドは従来の結果から考え併せるとカルパインにより分解を受けた限定分解産物であると想像される。そこで脳虚血に伴うband 1~3蛋白質の変化がカルパインを含む蛋白質分解酵素によるものである可能性を検討した。

砂ネズミ脳水溶性分画を1mM EGTA存在下 (pH7.2)に抽出し、Sephadex G-25カラムクロマトグラフィーで脱塩した後、Ca<sup>2+</sup>濃度変化に伴う各蛋白質の分解パターンを検討した。MAP2はほぼCa<sup>2+</sup>濃度に依存して分解され、カルスベクチンは5mM Ca<sup>2+</sup>で分解を受け、それらの変化は共にロイペプチンで抑制された。しかしクラスリンは殆んど変化しなかった。次に、ウシ脳から精製したMAP2, カルスベクチン, クラスリンを基質とし、砂ネズミ脳水溶性分画をenzyme sourceとして行なった同様の実験でもMAP2はCa<sup>2+</sup>濃度依存性に分解され、Ca<sup>2+</sup>を添加しないものを対照としてCa<sup>2+</sup>濃度1.1×10<sup>-7</sup>Mで91%, 6.4×10<sup>-7</sup>Mで78%, 2.0×10<sup>-4</sup>Mで51% (同ロイペプチン(+): 101%), 5.0×10<sup>-3</sup>Mで20% (同: 88%)に減少した。カルスベクチンは1.1×10<sup>-7</sup>Mで96%, 6.4×10<sup>-7</sup>Mで94%, 2.0×10<sup>-4</sup>Mで88% (同: 93%), 5.0×10<sup>-3</sup>Mで62% (同: 90%)と変化した。クラスリンは全く分解を受けなかった。

#### [総括]

- (1) 砂ネズミの両側総頸動脈閉塞、再開通モデルを用いて脳虚血状態における脳蛋白質の変化を検討したところ、主に3種類の高分子蛋白質 (260K, 230~240K, 180K) が変化した。
- (2) SDS-PAGEによる易動度の一致及びimmunoblotting法により、それらの蛋白質をMAP2, カルスベクチン, クラスリンと同定した。
- (3) MAP2は虚血後早期から著明に減少し、虚血の程度に応じた変化を示した。カルスベクチンとクラスリンはほぼ経時的に減少した。
- (4) MAP2, カルスベクチンの分解には、Ca<sup>2+</sup>依存性蛋白分解酵素が関与している可能性が示唆された。クラスリンの減少には異なる機作が働いているものと推測された。

## 論文の審査結果の要旨

脳血管性痴呆の病態に関する報告は多いが、脳蛋白質の変化に関する報告は少ない。そこで、本研究では、その基礎となる脳血流障害時の脳内蛋白質の変化を知るために、砂ネズミの両側総頸動脈閉塞・再開通モデルを用いて実験的脳虚血を作製し、脳蛋白質の変化をSDSゲル電気泳動法及びimmuno-blotting法で検討した。その結果、MAP2, calspectin, clathrinなどが、虚血の程度及び経過時間に対応して変化することが明らかとなり、同時にMAP2及びcalspectinの変化にはCa<sup>2+</sup>依存性蛋白分解酵素が関与している可能性が示された。これらの成績は、虚血による脳障害の程度や回復の指標になりうる蛋白質の存在を明らかにするとともに、この種の脳障害の治療にも重要な示唆を与えるものであり、学位の授与に値すると考える。