

原 著

ミエリンよりの塩基性蛋白—酸性脂質
複合体の単離・同定・生物活性

国 下 龍 英

信州大学医学部附属順応医学研究施設生化学部門

(指導: 武富 保教授)

ISOLATION, IDENTIFICATION AND BIOACTIVITY OF BASIC
PROTEIN-ACIDIC LIPID COMPLEX FROM MYELIN

Tatsuhide KUNISHITA

(Director: Prof. Tamotsu TAKETOMI)

Department of Biochemistry, Institute of Adaptation Medicine, Shinshu

University School of Medicine

KUNISHITA, T. *Isolation, identification and bioactivity of basic protein-acidic lipid complex from myelin.* Shinshu Med. J., 28: 469-481, 1980

The basic protein-acidic lipid complex was extracted with chloroform-methanol (2:1, v/v) from canine myelin which was pretreated with n-propanol-n-hexane (2:3, v/v). The complex was composed of one mole of basic protein, six moles of sulfatide, three moles of phosphatidylserine and one mole of ganglioside. The basic protein was electrostatically and hydrophobically associated with these acidic lipids. It was found that the acidic lipids combined with basic protein showed their own typical fatty acid compositions. These findings suggest that the basic protein-acidic lipid complex is present in the native myelin and somehow makes a contribution toward the maintenance of myelin structure.

The basic protein-acidic lipid complex was also found to have an encephalitogenic activity, which was less severe than that of basic protein itself. Histological examination of central nervous system showed the perivascular granulomatous inflammation particularly in spinal cords. The infiltration with monocytes and lymphocytes was also observed in meninges and plexus.

A model for the molecular organization of myelin was discussed in view of the findings about the basic protein-acidic lipid complex.

(Received for publication; May 24, 1980)

Key words; ミエリン (myelin)

塩基性蛋白 (basic protein)

酸性脂質 (acidic lipid)

実験的アレルギー性脳脊髄炎 (experimental allergic encephalomyelitis)

複合体 (complex)

I はじめに

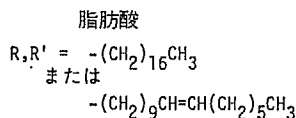
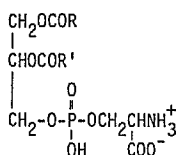
ミエリンは神経刺激を効率良く伝達するための絶縁機能を持った膜成分であり、マルチラメラ構造を有している。ミエリン膜は比較的単純な蛋白組成と特有の脂質組成を有しているが、これら蛋白と脂質がいかにミエリンラメラ構築や維持に役立っているのか、今日においても満足できる解答は得られていない。

一方、ミエリンの蛋白と種々の脂質による *in vitro* における相互作用は、多くの研究者によって報告され

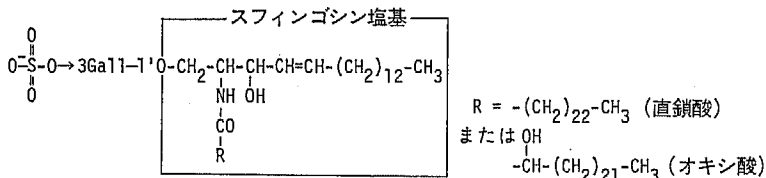
てきた(1)-10)。このうち塩基性蛋白に関するものは、この蛋白が実験的アレルギー性脳脊髄炎（以下 EAE と略す）発症因子であり、ラメラ構造の維持に関与していることから注目され、特に酸性脂質との強い相互作用などは興味を引くものである(4)-10)。

最近、著者らは犬のミエリンより塩基性蛋白-酸性脂質複合体を得ることができ、既にその一部を報告した(1)(2)が、今回、さらに、複合体に関するいくつかの新しい知見が得られたので、本論文では、この複合体の生化学的性質ならびに EAE 発症を起こす新しい因

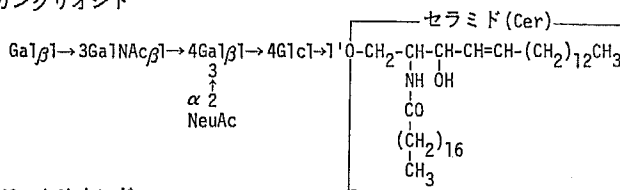
ホスファチジルセリン(PS)



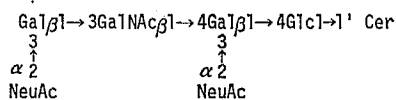
サルファタイド (CSE)



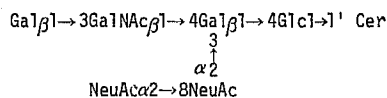
G_{M1} ガングリオシド



G_{D1a} ガングリオシド



G_{D1b} ガングリオシド



G_{T1b} ガングリオシド

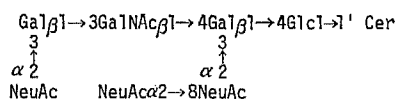


図1 犬ミエリンの複合体に関する主な酸性脂質の化学構造

ミエリンよりの塩基性蛋白-酸性脂質複合体

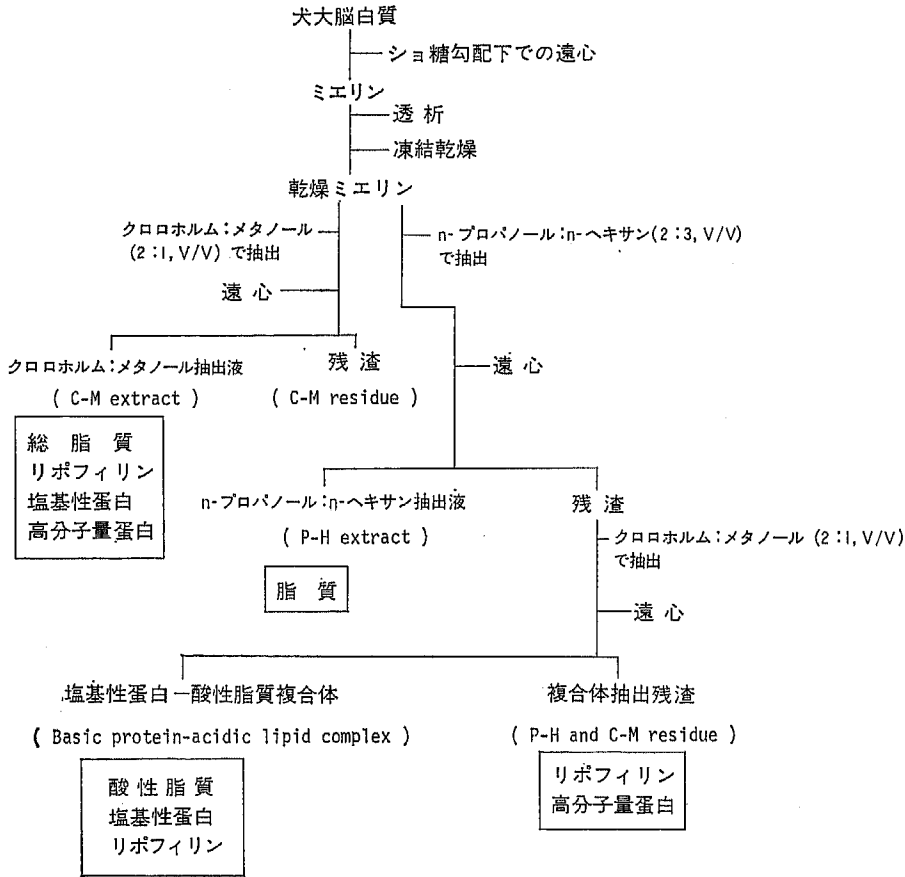


図2 ミエリンからの脂質と蛋白の抽出手順

子としての活性を明確にするとともに、これら複合体の分子構造モデルと、これらが組み込まれたミエリン膜構築の分子機構を考察することを目的とした。

II 材料および方法

A ミエリンの調製

犬大脳白質(湿重量9.0g/単操作)を用いSunらの方法¹³⁾に従って、0.32M、0.8Mシヨ糖液の中間層にミエリンを得た。ミエリンは脱イオン水に対し2日間透析(1日に3回外液交換)した後、凍結乾燥して-20°Cに使用時まで保存した(平均収量:乾燥重量148.5mg/単操作)。

B 塩基性蛋白-酸性脂質複合体の調製

図2に示すように、乾燥ミエリン10mgにつき1mlのn-プロパノール:n-ヘキサン混合液(以下P-H

と略す。2:3, v/v)で1夜室温攪拌抽出し、4°C、30,000g、20分間遠心した後、残渣を得た。さらに抽出時間を1時間とし、同様の操作を1回繰り返した。得られた残渣を、さらに0.5mlのクロロホルム:メタノール混合液(以下C-Mと略す。2:1, v/v)で1夜室温攪拌抽出し、0°C、30,000g、60分間遠心した後上清を得た。残渣について抽出時間を1時間とし、同様の操作をさらに1回繰り返した。抽出液を合わせ、塩基性蛋白-酸性脂質複合体とした。

対象として、乾燥ミエリンを直接C-M(2:1, v/v)で抽出し、以下の実験に供した(C-M抽出物)。抽出および分離条件は上記と同様である。

C EAE発症実験

モルモット(300~500g、静岡産ハートレー系、♂)を用い、常法により完全フロインドアジュバント(牛

型結核死菌 5 mg/mlを含む)とともに、塩基性蛋白-酸性脂質複合体を足底皮内に注入した。なお、対象として等張食塩水、犬脳ミエリンおよび Gonzalez-Sastre の方法¹⁴⁾により調製した犬犬脳ミエリン塩基性蛋白を用いた。

発症は、体重の20%減少および下肢の麻痺によって診断した。観察は、発症後死亡まで、または寛解後も60日目まで続けた。

EAE発症モルモットの犬脳から馬尾に至る中枢神経組織は、Hematoxylin-Eosin ならびに Klüver-Barrera 染色により病理組織学的に検討した。

D 分析方法

リン脂質およびコレステロール量は、Bartlett法¹⁵⁾ Zak 法¹⁶⁾でそれぞれ測定した。糖脂質はメタノール中3%塩化水素により3時間、100°Cメタノリシスした後、トリメチルシリル誘導体として内部標準(マニトール)に対する糖量からその量を算出した。ガスクロマトグラフィーのカラムには2%OV-1, 2mを用い、測定は160°Cで行った。

ガングリオシド以外の脂質組成は、総脂質を Horrocks の二次元薄層クロマトグラフィー¹⁷⁾にかけて決定した。各脂質の定量は上記の方法によった。

ガングリオシドは、抽出液を塩化カリウムにより除蛋白した後、遠心分離(30,000g, 10分, 10°C)後の上清から、以下の操作により純化して得た。上清は40°Cで減圧濃縮を行い、蒸発乾固した。さらに一夜、減圧下デシケーター中で乾燥した後、乾固物に C-M(2:3, v/v)を加え、減圧口過により可溶部のみを得た。可溶部を減圧乾固後、少量のクロロホルム:メタノール:水(以下C-M-Wと略す。30:60:8, v/v/v)に溶かして、同液であらかじめ調製したDEAE-セファデックスA-25(酢酸型, ϕ 1.0×36cm)カラム¹⁸⁾にかけた。C-M-W(30:60:8, v/v/v)で、ミエリン調製時に混入したショ糖を主成分とする中性脂質画分を除いた後、C-M-0.8M酢酸ナトリウム(30:60:8, v/v/v)でガングリオシドを含む酸性脂質画分を得た。酸性脂質画分は、減圧乾固後少量の水に溶かし、脱塩のためセファデックスG-50(medium)カラム¹⁹⁾にかけた。ガングリオシドと他の酸性脂質の分離は、河村と武富によるカラムクロマトグラフィー法²⁰⁾の変法によった。すなわち脱塩した酸性脂質画分をシリカゲル40-シリカゲルG(1:1, w/w)のカラムクロマトグラフィーにかけ、他の酸性脂質をC-M-25%, アンモニア(32:8:1, v/v/v)で溶出した

後、C-M-W(60:35:8, v/v/v)でガングリオシドを溶出回収した。総ガングリオシド量はレゾルシノール法²¹⁾により、シアル酸(NeuAc)量から決定し、各ガングリオシド組成は、プレーコートシリカプレートによる一次元薄層クロマトグラフィー(展開溶媒として、C-M-0.25%塩化カリウム:60:35:8, v/v/v)を用いた。)で総ガングリオシド画分を展開分離し、レゾルシノール発色²²⁾したものについて、デンストメーター(Helena Laboratories, 570nm)で測定し、定量した。

1 構成脂肪酸組成

薄層クロマトグラフィーおよびカラムクロマトグラフィーにより調製した酸性脂質を、メタノール中3%塩化水素により3時間、100°Cメタノリシスした。反応後、n-ヘキサン可溶部に得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーにより分析した。測定用カラムには、15%DEGS 2m, 2%OV-1 2mを用いた。

2 蛋白定量

定量はエチルエーテル:エタノール(3:2, v/v)により脱脂した試料についてLowryらの方法²³⁾で行った。対象としてウシ血清アルブミンを用い、試料は1%SDS溶液または水溶液に溶かした。また¹⁵N-分析器(JASCO, model NIA-1)を用いた¹⁵N-硫酸アンモニウム(99 atom%)の希釈法からも蛋白量を算出した。

3 スラブ-SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEはLaemmliの方法²⁴⁾に従って行った。すなわち約5 μ gの蛋白を、0.1%SDSを含む13%ポリアクリルアミドゲル(厚み0.4mm)上の5%濃縮ゲル上端にのせ、トリス緩衝液(0.02Mトリス, PH. 8.3, 0.192Mグリシン, 0.1%SDS)中25mA定電流でゲル下端より1cmの所まで泳動した。固定は水:エタノール:酢酸(9:9:2, v/v/v)で行い、染色には、水:エタノール:酢酸(83:10:7, v/v/v)中0.0005%クマジー、ブリリアント、ブルー色素(w/v)を用いた。泳動に供する蛋白試料はすべて、Greenfieldらの方法²⁵⁾に従いエチルエーテル:エタノール(3:2, v/v)で脱脂した。

複合体中の蛋白は、泳動後デンストメーター(Helena Laboratories, 595nm)にかけられ、含まれる塩基性蛋白量は、Carnegieらの方法²⁶⁾により調製されたブタ塩基性蛋白の検量線から算出決定した。

4 複合体の結合様式

複合体へのイオン結合の関与の検討は、Gonzalez-Sastre の方法¹⁴⁾に従って行った。すなわち、塩基性蛋白-酸性脂質複合体の C-M (2:1, v/v) 溶液に、最終濃度7.7%になるように0.1M塩化カリウム水溶液を添加した。生じたフラッフを溶媒比が C-M-W (8:16:1, v/v/v) になるようにメタノールを加えることにより沈殿させ、遠心分離 (30,000 g, 10分, 10°C) により上清を得た。溶液中の蛋白濃度の変化は紫外吸収スペクトルで検討した。対象として、塩の添加なしに同様の操作を行った複合体の C-M (2:1, v/v) 溶液を用いた。同様の操作は、C-M 抽出物についても行った。

一方、遠心分離によって得られた沈殿蛋白は、SDS-PAGE により検討された。

5 紫外吸収スペクトル (UV-スペクトル)

日立 EPS-3T 型自記分光光度計を用い、C-M-W (8:16:1, v/v/v) を溶媒として吸収曲線を測定した。

III 結 果

A 塩基性蛋白-酸性脂質複合体の単離, 同定

1 複合体の単離

図2に従った犬ミエリンよりの複合体の収量は、1mg乾燥ミエリンあたり56.2μgであった。

2 複合体の同定

a 脂質組成

表1に各画分における脂質組成を示した。複合体画

Table 1. Lipid composition of cerebral myelin

	C-M	P-H	Basic protein-acidic lipid complex
yield (ug/mg myelin)	750.0	668.2	56.2
ratio of protein/lipid composition (Weight %)	0.09	0.00	2.56
cholesterol	21.8	24.6	2.6
sphingomyelin	9.8	8.7	6.3
phosphatidylcholine	12.0	11.4	—
phosphatidylserine	6.6	2.8	22.8
plasmalogen ethanol-amine	10.8	17.5	—
phosphatidylethanol-amine	4.0	4.2	—
cerebroside	24.9	27.3	—
sulfatide	9.1	2.8	55.6
gangliosides	1.0	0.1	12.4

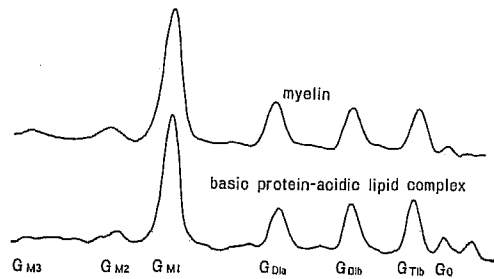


図3 犬ミエリンおよび複合体ガングリオシドの薄層クロマトグラム
発色はレゾルシノール試薬で行った。

分には、図1に構造を示した酸性脂質が特異的に存在し、総脂質の91%を占めていた。すなわち、サルファタイドが55.6%、次いでホスファチジルセリン、総ガングリオシドがそれぞれ22.8%、12.4%存在した。

ガングリオシドの組成は、図3に示したごとく、犬ミエリン固有のそれに非常に類似していた。主成分である GM1 ガングリオシドは全体の59.0%存在し、その他 GD1a, GD1b, GT1b ガングリオシドがそれぞれ11.2%、11.8%、8.0%を占めていた。

また、複合体において、脂質に対する蛋白の比率は重量で2.56であった。

b 複合体の蛋白組成

写真1のaのカラムに示したごとく、ミエリンは塩基性蛋白 (分子量18,000)、リポフィリン (いわゆるプロテオリピド蛋白の主成分:分子量27,000)、DM-20 (プロテオリピド蛋白の1成分:分子量20,000) および高分子量蛋白 (ウォルフグラム蛋白が主成分:分子量50,000~60,000) を含んでいた。一方、dのカラムで示した複合体の主成分は塩基性蛋白であり、その他微量のリポフィリンおよび高分子量蛋白が存在した。塩基性蛋白はデンストグラムによる検量線から、複合体に存在する蛋白の74.8% (重量%) を占めることが示された。したがって、表1から塩基性蛋白に対する総酸性脂質のモル比は、9.4と計算され、サルファタイド、ホスファチジルセリン、ガングリオシド、塩基性蛋白が、それぞれ 5.9:2.8:0.7:1 (モル比) で結合して複合体を形成していた。

c 構成脂肪酸組成

表2に塩基性蛋白と結合した脂質の脂肪酸組成を示した。ホスファチジルセリンの主要脂肪酸は C_{18:0} と C_{18:1} であり、C₁₈脂肪酸が全体の92.8%を占めた。またガングリオシドでも同様に、C₁₈脂肪酸が全体の73

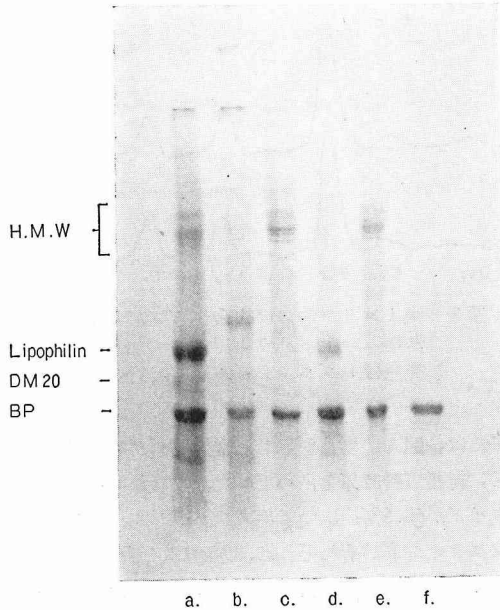


写真1 犬ミエリン蛋白の SDS-PAGE
 a : ミエリン, b : C-M 抽出物,
 c : C-M 抽出残渣, d : 複合体,
 e : 複合体抽出残渣, f : 塩化カリウム添加により析出した画分

Table 2. Fatty acid compositions of phosphatidylserine, sulfatide and gangliosides combined with myelin basic protein (%)

Phosphatidylserine	Fatty acids	Fatty acids	Sulfatide		Ganglioside
			Normal	Hydroxy	
16:0	0.4	16:0	6.7	—	8.5
18:0	59.7	18:0	16.0	1.3	72.1
18:1	33.1	18:1	2.5	—	0.9
20:1	trace	20:0	1.2	1.0	6.9
20:2	trace	22:0	3.5	3.7	1.3
20:3	0.2	22:1	1.4	—	—
20:4	0.7	23:0	8.3	10.3	1.2
22:4	0.5	24:0	34.5	44.1	2.9
22:5	4.0	24:1	13.6	22.2	3.6
22:6	1.3	25:0	2.8	5.1	0.8
		25:1	2.8	6.1	1.5
		26:0	trace	2.6	trace
		26:1	3.5	3.3	trace

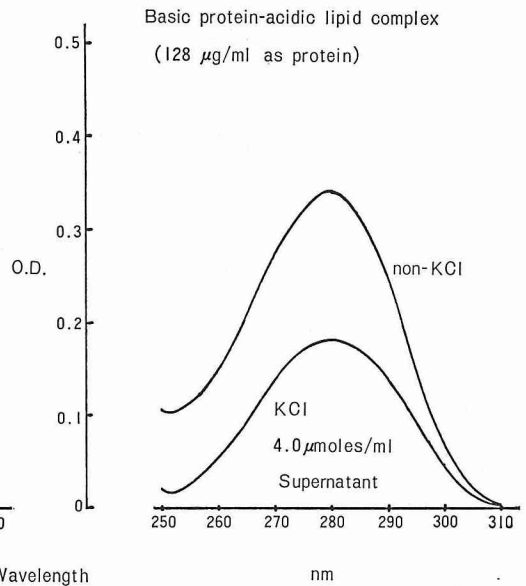
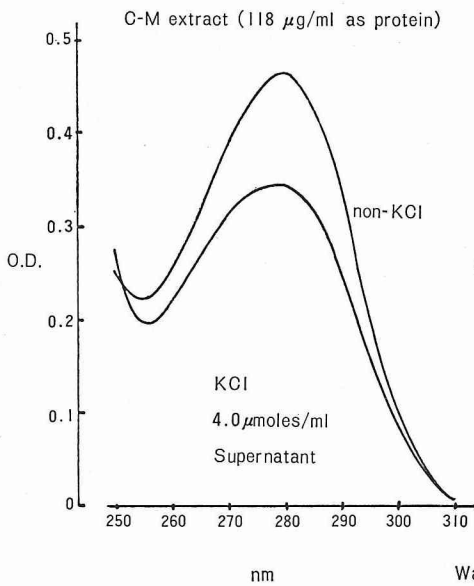


図4 塩化カリウム添加による複合体蛋白の解離
 溶媒は C-M-W (8:16:1, v/v/v) を用いた。

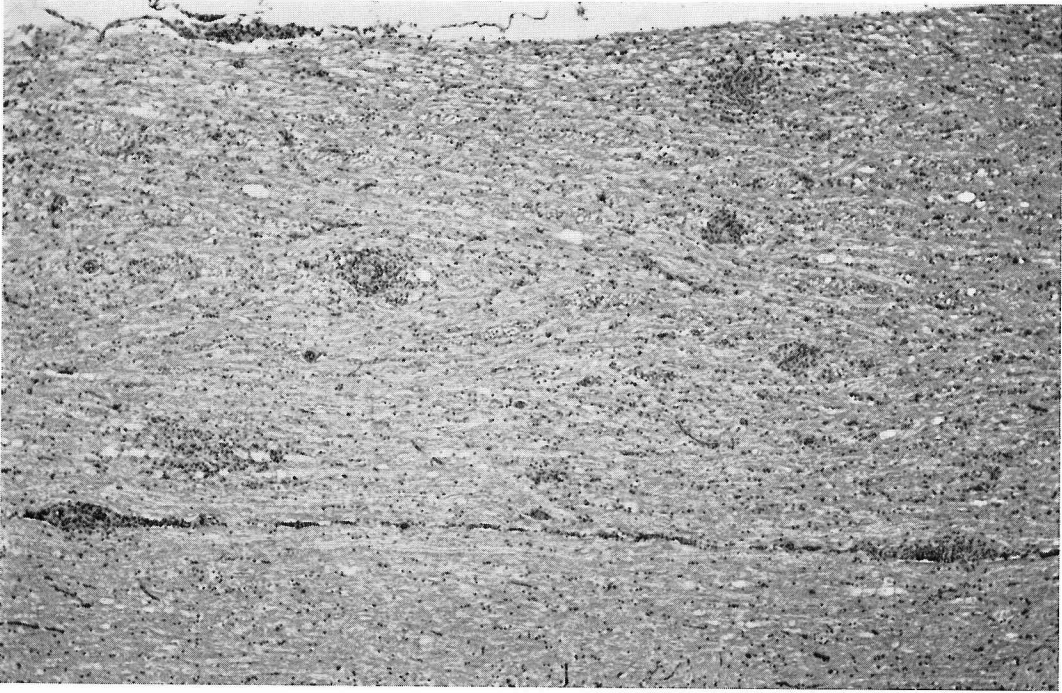


写真 2

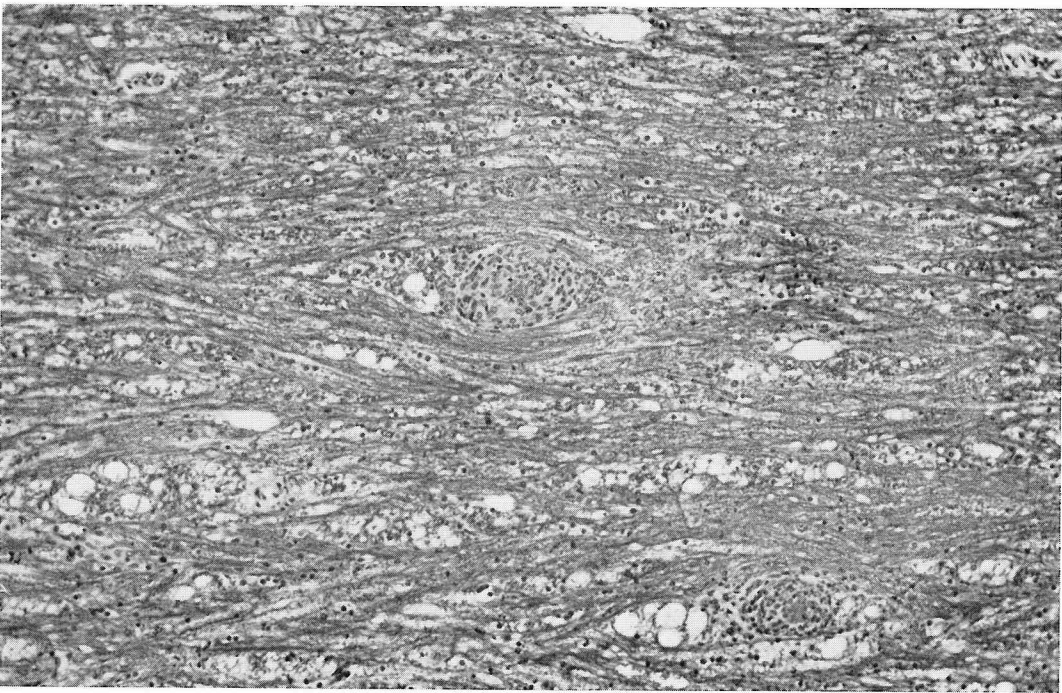
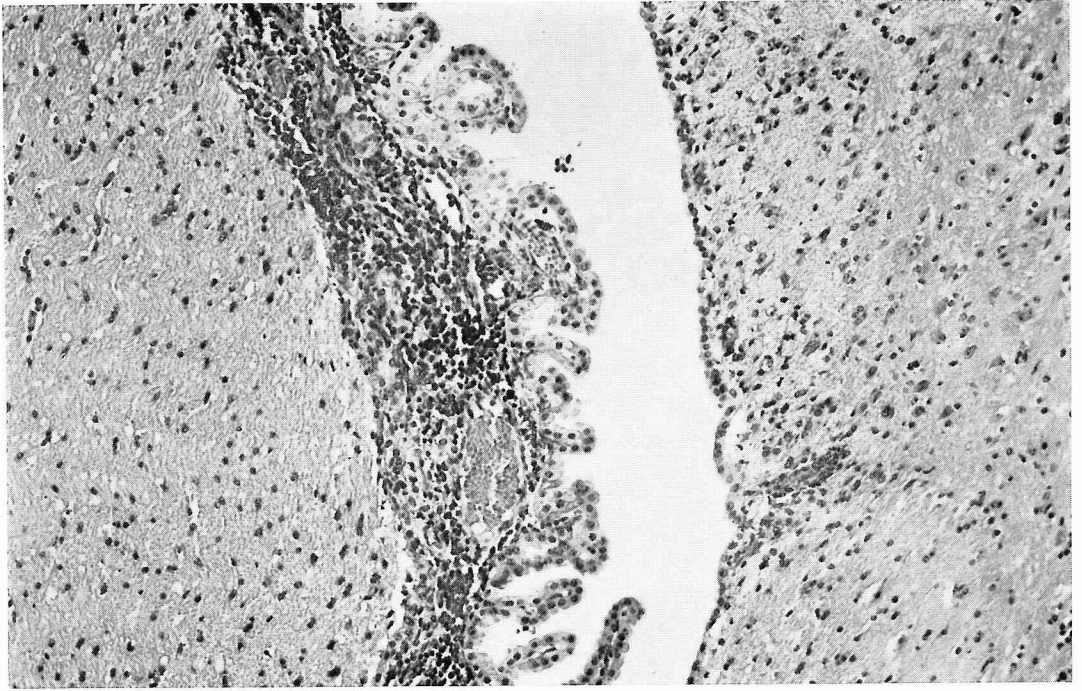


写真 3



写 真 4

写真2 馬尾：血管周囲を中心とした白質部および髄膜への単球，リンパ球による細胞浸潤 H-E 染色×50

写真3 腰髄：白質部に主として見られる細胞浸潤像 K-B 染色×100

写真4 大脳右前頭部側脳室：白質部血管周囲および脈絡膜へのリンパ球の浸潤 H-E 染色×100

%存在した。一方、サルファタイドにおいては、直鎖酸、オキシン酸ともに、長鎖脂肪酸(C₂₂-C₂₆)が多く含まれ、それぞれ全体の70.4%, 97.4%を占めていた。主要脂肪酸は、直鎖酸、オキシン酸いずれの場合もC₂₄であった。

各脂質のこのような脂肪酸組成の特徴は、通常ミエリンにおいて見られるものであった。

3 複合体の結合様式

電解質の添加により、複合体のイオン結合への依存度を調べたのが図4である。塩化カリウムを最終濃度4.0μmol/ml C-M-W (8:16:1, v/v/v) 添加すると、C-M抽出物の場合は対象に対して25.6%吸光度(280nm)の減少しか示さないのに対し、複合体では46.4%の吸光度減少を示した。このことは、複合体におけるイオン結合への依存度がC-M抽出物の場合よりも高いことを示しているばかりでなく、複合体形成自体にイオン結合が強く関与していることを示している。また、写真1のカラムfに示したごとく、電解質の添加によって塩基性蛋白が析出したことは、この蛋白がイオン結合と強く関連していることを示している。

したがって、図4のC-M抽出物、複合体両者の対象(塩を添加しない場合)の吸光度に差異が見られることも、塩基性蛋白の280nmにおける吸光係数(E_{1cm}^{1%})が他の蛋白のそれに比して約1/2である結果を反映したものと考えられた。

B 塩基性蛋白-酸性脂質複合体のEAE活性

表3に示したごとく、対象として用いられた犬ミエリン塩基性蛋白と犬大脳ミエリンで感作したモルモットは13~16日目に総て臨床症状を呈し、発症後1~2日で死亡した。これらに対して、複合体(A群)では3/11の発症率で、その症状は3~4週目に見られ、発

症後1週して死亡した。複合体(B群)では5/5の発症率で、その症状は2~3週目に見られ、発症後1週間以内で3/5が死亡した。しかし、2/5は寛解し、観察期間内では、以後、体重の減少は見られなかった。複合体によって感作・発症したモルモットは下半身のみの衰弱が目立ち、比較的軽度な発症として観察された。

C 発症モルモットの病理組織学的所見

複合体による感作で発症・死亡したモルモットの中樞神経系内に、細胞浸潤と血管周囲性肉芽性炎症像が見られた(写真2-4)。浸潤細胞はリンパ球が主で、脊髄では多核好中球の浸潤が見られた。細胞浸潤および炎症像は脊髄(特に馬尾、腰髄)に最も強く、脳幹、大脳、小脳にも散在して見られた。病変は髄膜、血管周囲、脈絡膜に見られ、灰白質より白質に好発していた。しかし、病変の周囲には脱髄の拡がる傾向までは見られなかった。

IV 考 察

犬大脳ミエリンのP-H(2:3, v/v)抽出残渣よりC-M(2:1, v/v)によって塩基性蛋白-酸性脂質複合体が抽出されたことは、ミエリン膜構築の分子機構を考えるうえに極めて重要なことである。従来より、ミエリン塩基性蛋白と種々の脂質の相互作用は、*in vitro*において研究されてきている(4)-10)。彼らの実験系はいずれも、塩基性蛋白を水溶性の単純蛋白として単離し、この蛋白に脂質を加えるというものであったが、それらの知見から種々の塩基性蛋白-酸性脂質複合体のモデルが今日までに示されてきた(7)(9)(10)。それらのモデルの1つにおいてJonesとRumsby⁹⁾は、塩基性蛋白のC-末端側、117-170番のペプチドフラ

Table 3. EAE test on guinea pig

antigens	groups	protein (ug)	ratio of onset	clinical onset (days)	killed number
basic protein-acidic lipid complex	A	77.2	3/11	21-28	3
	B	102.4	5/5	15-18	3
myelin	C	94.6	5/5	13-15	5
basic protein	D	11.5	5/5	14-16	5
control (saline)	E	0	0/5	—	0

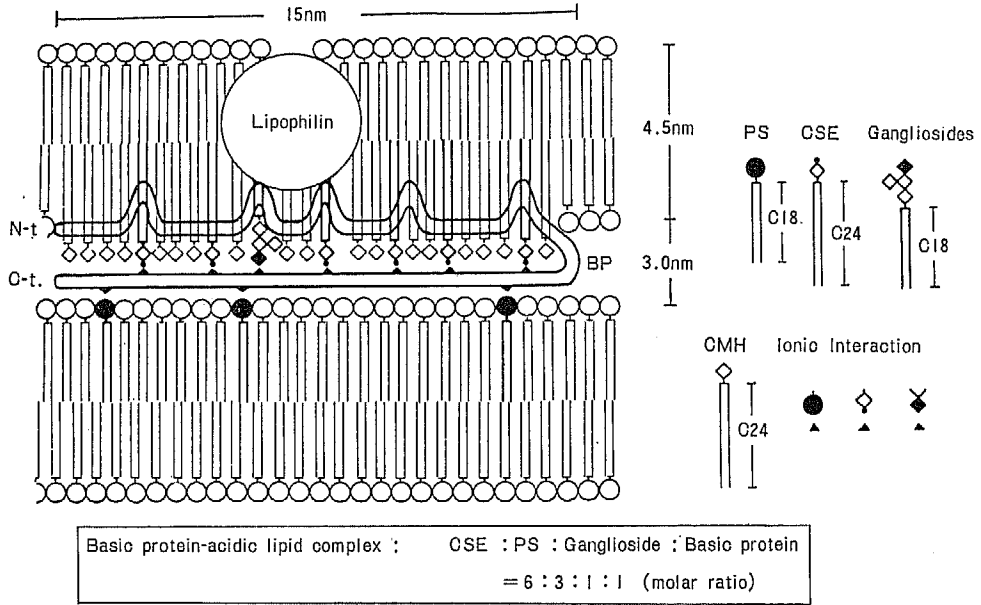


図5 ミエリン膜の分子構造モデル

複合体の分子構造は太線で示した。塩基性蛋白とリポフィリンの結合は Rumsby¹⁰⁾により示されたように1:1(モル比)とした。複合体形成部分以外の詳細な脂質構成および高分子量蛋白は示していない。

BP:塩基性蛋白, PS:ホスファチジルセリン, CSE:サルファタイド, CMH:セレプロンド, C-t.:C-末端, N-t.:N-末端

グメントが酸性脂質と特異的に反応し、しかも酸性脂質のうちサルファタイドはホスファチジルセリンとは違った方向からペプチドフラグメントと結合するという仮説をたてた。今回、塩基性蛋白1モルと酸性脂質10モルよりなる複合体をC-M可溶として単離したが、その分子構造を考えるうえで、この仮説は重要な示唆を与えた。

図5にミエリンにおける複合体の分子構造モデルが太線で示されている。このモデルにおいては、ヘアピン構造をとる塩基性蛋白のC-末端側ポリペプチドにサルファタイドとガングリオンドがイオン結合し、それらの糖部分はC-末端側とN-末端側ポリペプチドの間に位置している。また脂質のスフィンゴシンとオキソ酸のイミノ基(-NH)、水酸基(-OH)はN-末端側ポリペプチドと水素結合を形成し、脂肪酸の炭化水素部分はN-末端側ポリペプチドの一部疎水部分と疎水結合している。これら種々の結合により、サルファタイドとガングリオンドはかかなり安定に塩基性蛋白と結合するものと考えられる。一方、ホスファチジルセリンは逆の方向からC-末端側ポリペプチド

にイオン結合するものと考えられ、サルファタイドに比して結合量が少ないことは、両者の結合様式の違いによるものと想像される。これらの酸性脂質の間で脂肪酸の長さが違うことも、このような結合様式と決して無関係ではないように思われる。

この複合体を中心核として、その周辺に脂質二重層がうまく組み合わさって形成されたものが、ミエリン膜構築の分子モデルと考えられる。図5のモデルでは、サルファタイドとガングリオンドとの透間に、ミエリンの主要糖脂質であるセレプロンドが配置してある。

ミエリン膜には、塩基性蛋白の他にリポフィリンや高分子量蛋白などが存在するが、本研究における複合体形成や、EAE活性から考えて、ミエリン膜における塩基性蛋白の役割は極めて大きいものと思われる。

また、複合体のEAE活性が塩基性蛋白単独の場合に比べて軽度であることも興味ある知見であった。今日までEAE発症の抑制実験が種々報告されている^{27)~31)}が、それらの現象をうまく説明できる解釈は現在までない。本研究における発症の軽度化が、複合体の形成に基づくものなのか、酸性脂質の潜在的な作用

によるものなのかは、現在までの知見では不明である。しかし、さらにうまい感作によりこのような複合体が、本来極めて難しいとされた多発性硬化症の増悪、寛解を伴う症状ならびに脱髄現象を解明するための実験モデル作成に役立てば幸いである。

V 結 語

犬大脳白質ミエリンから塩基性蛋白-酸性脂質複合体が単離された。その化学構造および EAE 活性が検討され、以下の結果が得られた。

1 複合体は乾燥ミエリンを P-H (2:3, v/v) で処理した後、C-M (2:1, v/v) で抽出することで得られた。収量は 1 mg 乾燥ミエリンあたり 56.2 μg であり、脂質に対する蛋白の比率は 2.56 であった。

2 複合体に関する酸性脂質は総脂質の 91% を占めていた。酸性脂質はサルファタイド (55.6%), ホスファチジルセリン (22.8%), 総ガングリオンド (12.4%) から成り立っていた。総ガングリオンドの 59.0% は GM₁ ガングリオンドであった。

3 脂質の構成脂肪酸は各脂質においてミエリン特有のものであった。サルファタイドには直鎖酸、オキシン酸ともに長鎖脂肪酸が多く含まれ、主要脂肪酸はいずれの場合も C₂₄ であった (それぞれ、48.1%, 66.3%)。ホスファチジルセリンの主要脂肪酸は C₁₈ (92.8%) であり、ガングリオンドでも同様に C₁₈ 脂肪酸が全体の 73% を占めていた。

4 蛋白成分の 74.8% はミエリン塩基性蛋白であり、その他微量のミエリン蛋白 (リポフィリン, 高分子量蛋白) が含まれていた。

5 複合体の形成は、塩基性蛋白と酸性脂質によるイオン結合に大きく依存していた。

6 複合体による EAE の発症は、塩基性蛋白やミエリンを用いた場合よりも、臨床的に比較的軽度なものであった。複合体で感作した群は、対象より遅い発症を示し、発症後約 1 週で死亡した。また一部は寛解したが、観察期間内 (60 日間) では再発は見られなかった。

7 複合体による感作で発症、死亡したモルモットの中枢神経系内における細胞浸潤と血管周囲性肉芽性炎症像は脊髄に最も強く、脳幹、大・小脳にも散在していた。白質に好発していたが、病変の周囲に脱髄の拡がる傾向までは見られなかった。

8 複合体は、サルファタイド:ホスファチジルセリン:ガングリオンド:塩基性蛋白が 6:3:1:1 (モ

ル比) で構成されていた。複合体の化学構造における知見から、ミエリン膜における複合体の分子構造モデルが示された。

この実験を進めるに当たり、終始御指導下さった信州大学医学部順応生化学教授 武富 保博士、また、病理組織学的検討を行って戴いた信州大学医学部精神神経科教授 原田憲一博士、組織標本の写真撮影に協力して下さいました信州大学医学部第一病理学教授 重松 秀一博士、および助手 赤川直次博士に深く感謝の意を表します。

この研究の要旨は、1979年11月、第18回日本神経化学会 (東京) にて発表した。

文 献

- 1) Braun, P. E. and Radin, N. S. : Interaction of lipids with a membrane structural protein from myelin. *Biochemistry*, 8 : 4310-4318, 1969
- 2) Brophy, P. J. : Association of proteolipid apoproteins from bovine myelin with phospholipid in bilayer vesicles. *FEBS Lett*, 84 : 92-96, 1977
- 3) Cockle, S. A., Eband, R. M. and Moscarello, M. A. : Intrinsic fluorescence of a hydrophobic myelin protein and some complexes with phospholipids. *Biochemistry*, 17 : 630-637, 1978
- 4) Palmer, F. B. and Dawson, R. M. C. : Complex formation between triphosphoinositide and experimental allergic encephalitogenic protein. *Biochem J*, 111 : 637-646, 1969
- 5) Demel, R. A., London, Y., Geurts van Kessel, W. S. M., Vossenbergh, F. G. A. and van Deenen, L. L. M. : The specific interaction of myelin basic protein with lipids at the air-water interface. *Biochem Biophys Acta*, 311 : 507-519, 1973
- 6) London, Y., Demel, R. A., Geurts van Kessel, W. S. M., Vossenbergh, F. G. A. and van Deenen, L. L. M. : The protection of A₁ myelin basic protein against the action of proteolytic enzymes after

- interactions of the protein with lipids at the air-water interface. *Biochem Biophys Acta*, 311 : 520-530, 1973
- 7) London, Y., and Vessenberg, F. G. A. : Specific interaction of central nervous system myelin basic protein with lipid. Specific regions of the protein sequence protected from the proteolytic action of trypsin. *Biochem Biophys Acta*, 478 : 478-490, 1973
 - 8) Banik, N. L. and Davison, A. N. : Lipid and basic protein interaction in myelin. *Biochem J*, 143 : 39-45, 1974
 - 9) Jones, A. J. S. and Rumsby, M. G. : Localization of sites for ionic interaction with lipid in the C-terminal third of the bovine myelin basic protein. *Biochem J*, 167 : 583-591, 1977
 - 10) Crang, A. J. and Rumsby, M. G. : Molecular organization of lipid and protein in the myelin sheath. *Biochem Soc Trans*, 5 : 1431-1434, 1977
 - 11) Kunishita, T., Uemura, K., Okano, A. and Taketomi, T. : Isolation of basic protein-acidic lipid complex from myelin. *J Exp Med*, 49 : 391-396, 1979
 - 12) 国下龍英, 武富 保 : n-Propanol-Hexane 混合溶媒による脳組織からの脂質の抽出—Chloroform-Methanol (2 : 1) との比較, 脂質生化学研究, 20 : 257-260, 1978 (東京)
 - 13) Sun, G. Y. and Sun, A. Y. : Phospholipids and acyl groups of synaptosomal and myelin membranes isolated from the cerebral cortex of squirrel monkey (*saimiri sciureus*). *Biochem Biophys Acta*, 280 : 306-315, 1972
 - 14) Gonzalez-Sastre, F. : The protein composition of isolated myelin. *J Neurochem*, 17 : 1049-1056, 1970
 - 15) Bartlett, G. R. : Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 234 : 466-468, 1959
 - 16) Zak, B. : Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. *Am J Clin Pathol*, 27 : 583-588, 1957
 - 17) Horrocks, L. A. : The alk-1-enyl group content of mammalian myelin phosphoglycerides by quantitative two-dimensional thin layer chromatography. *J Lipid Res*, 9 : 469-472, 1968
 - 18) Yu, R. K. and Ledeen, R. W. : Gangliosides of human, bovine and rabbit plasma. *J Lipid Res*, 13 : 680-686, 1972
 - 19) Ueno, K., Ando, S. and Yu, R. K. : Gangliosides of human, cat and rabbit spinal cords and cord myelin. *J Lipid Res*, 19 : 863-871, 1978
 - 20) Kawamura, N. and Taketomi, T. : A new procedure for the isolation of brain gangliosides, and determination of their long chain base compositions. *J Biochem(Tokyo)*, 81 : 1217-1225, 1977
 - 21) Miettinen, T. and Takki-Luukkainen, I-T. : Use of butyl acetate in determination of sialic acid. *Acta Chem Scand [B]*, 13 : 856-858, 1959
 - 22) Svennerholm, L. : Quantitative estimation of sialic acid, III. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochem Biophys Acta*, 24 : 604-611, 1957
 - 23) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 : 265-275, 1951
 - 24) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685, 1970
 - 25) Greenfield, S., Norton, W. T. and Morell, P. : Quaking mouse : Isolation and characterization of myelin protein. *J Neurochem*, 18 : 2119-2128, 1971
 - 26) Carnegie, P. R., Bencina, B. and Lamoireux, G. : Experimental allergic encephalomyelitis, Isolation of basic proteins and polypeptides from central nervous tissue. *Biochem J*, 105 : 559-568, 1967
 - 27) Einstein, E. R., Chao, L. P. and Csejtey, J. : Suppression of EAE by chemically

- modified encephalitogen. *Immunochemistry*, 9: 1013-1019, 1972
- 28) Driscoll, B. F., Kies, M. W. and Alvord, E. C. : Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in guinea pigs with homologous myelin basic protein. *J Immunol*, 112: 392-397, 1974
- 29) Nagai, Y. : In "Proceeding of the Asian Multiple Sclerosis Workshop," Japan Medical Research Foundation (eds.), pp 207-223, University of Tokyo Press, Tokyo, 1975
- 30) Willenborg, D. O., Staten, E. A. and Witting, G. F. : Experimental allergic encephalomyelitis: Modulation by intraventricular injection of myelin basic protein. *Exp Neurol*, 61: 527-536, 1978
- 31) Alvord, E. C. Jr., Show, C-M. and Hruby, S. : Myelin basic protein treatment of experimental allergic encephalomyelitis in monkeys. *Ann Neurol*, 6: 469-473, 1979
(55. 5. 24受稿)
-