

# カルパイン活性よりみたサル海馬における虚血性神経細胞障害の生化学的,免疫組織化学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9121">http://hdl.handle.net/2297/9121</a>

## カルパイン活性よりみたサル海馬における虚血性神経細胞障害の 生化学的, 免疫組織化学的研究

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

山 野 潤

カルパインはカルシウム依存性のシステインプロテアーゼで, 膜蛋白やプロテインキナーゼCなどを限定分解することが知られている。しかし, カルパインが虚血性神経細胞障害において果たす役割についてはまだ十分には解明されていない。本研究においては, ニホンザルを対象として, 一過性脳虚血後に海馬 cornu Ammonis 1 (CA1) に生ずる遅発性神経細胞死の機序に関して, カルパインに注目し, ウェスタンブロットと免疫組織化学による検索を行った。抗体としては, 非活性型のカルパイン, 活性型のカルパイン, およびカルパインの基質の一つであるフォドリンの分解産物に特異的に反応するものの計3種類を使用した。その結果, 虚血後の海馬においては正常海馬に比較して非活性型のカルパインは減少傾向を示し, 活性型のカルパインは海馬, ことにCA1において有意な増加を示した。また, フォドリンの分解産物は, 正常海馬にはみられず虚血後の海馬全領域において発現していた。以上の結果より, 一過性脳虚血後に海馬のCA1に特異的に生ずるカルパインの活性化は, その遅発性神経細胞死の一因をなすものと推測された。

**Key words** calpain, hippocampus, ischemia, monkey, delayed neuronal death

1982年に Kirino<sup>1)</sup>は砂ネズミを用いて, 一過性脳虚血の後に海馬 cornu Ammonis 1 (CA1) 領域の錐体細胞が遅発性神経細胞死をきたすことを報告した。それ以来, 遅発性神経細胞死の成因に関しては, 砂ネズミ, ラットなどの主として齧歯類を対象として, 多数の研究がなされている<sup>2)</sup>。それにもかかわらず, 遅発性神経細胞死の成因については, 現在なお未解決な点が多い。同様の虚血を受けているにもかかわらず, CA1領域のニューロンのみがなぜ選択的に脆弱性を示すかについては, 十分な説明がなされていない。

一過性脳虚血後の海馬ニューロンにおいては, 細胞外グルタミン酸濃度が著明に上昇<sup>3)</sup>, その結果, 細胞内のカルシウムイオン濃度が増加することは, 従来から広く知られている。グルタミン酸は *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (*N*-methyl-D-aspartate, NMDA) 受容体チャンネルを介して, 細胞外のカルシウムイオンの細胞内流入を促進すると推定されている。しかし, 最近 Nakanishi らのグループは, 組織におけるハイブリダイゼーション法により NMDA 受容体チャンネルは CA1 のみに限局せず海馬の全領域に分布していることを明らかにした<sup>4)</sup>。したがって, NMDA 受容体チャンネルを介するカルシウムイオンの流入が CA1 に特異的に生ずるとは考え難い。

先に, Yamashima ら<sup>5)</sup>はニホンザルの海馬スライス標本を用いて, 一過性脳虚血がもたらすカルシウムイオン濃度変化の動態解析とホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の免疫組織化学的検索をおこなった。その結果, 20分間の低酸素-無グルコース刺激の後には, 海馬の CA1 領域においてカルシウムイ

オン濃度の増加とホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の染色性の増加が特異的に生ずることを観察した。そして, ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の加水分解によって生ずるイノシトール 1,4,5-三リン酸が内在性のカルシウムイオンの動員をきたすものと推定した。しかし, カルシウムイオンの増加によってなぜCA1ニューロンの遅発性細胞死が惹起されるかについては, 現在なお未解決である。

本研究においては, カルシウムイオンによって活性化されるシステインプロテアーゼであるカルパイン<sup>6)</sup>とその基質であるフォドリン<sup>7)</sup>に注目して, 一過性脳虚血後に CA1 ニューロンに特異的に発生する病態を, ウェスタンブロットならびに免疫組織化学的に検討した。

### 対象および方法

#### I. 動物

実験には, 体重 6.5 から 9.8kg のニホンザル (*Macaca fuscata*) を9頭用いた。その内訳は, ウェスタンブロット用が4頭, 免疫組織化学的検索用が4頭, および脳循環動態の検索用が1頭である。

#### II. 脳循環動態の測定

<sup>15</sup>O-H<sub>2</sub>O を用いて, 一過性脳虚血の負荷前後の局所脳血流をポジトロン断層法 (positron emission tomography, PET) スキャナー・SHR-2400 (浜松ホトニクス製, 静岡) にて測定した。下腿静脈より注入した<sup>15</sup>O-H<sub>2</sub>O を, 大腿動脈より連続採血して, それより得た動脈血液中濃度曲線により絶対値を求めた。1回

平成6年12月16日受付, 平成7年2月6日受理

Abbreviations: CA, cornu Ammonis; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; PBS, phosphate-buffered saline; PET, positron emission tomography

の測定につき、1.3GBq の放射エネルギーを使用した。

Ⅲ. 虚血モデルの作成

1. 麻酔

1.5% のフローセンを吸入させた後、硫酸アトロピン (田辺, 東京) 0.2mg の筋注を行った。フローセンにより徐々に麻酔を導入し、気管内挿管して、全身麻酔を行った。麻酔の維持は、0.5~1.0% フローセン, 60% 笑気, 40% 酸素にて、半閉鎖式調

節呼吸として行った。麻酔中は乳酸リンゲル液の持続点滴を行った。

2. 虚血手術

全身麻酔下においてサルを仰臥位に固定し、正中部の第1から第3肋骨および胸骨を除去した。胸膜を破らないように留意しつつ縦隔内へ進入し、大動脈弓を露出した。腕頭動脈および鎖骨下動脈の分岐部を確保した後、金属クリップにて血流を完全

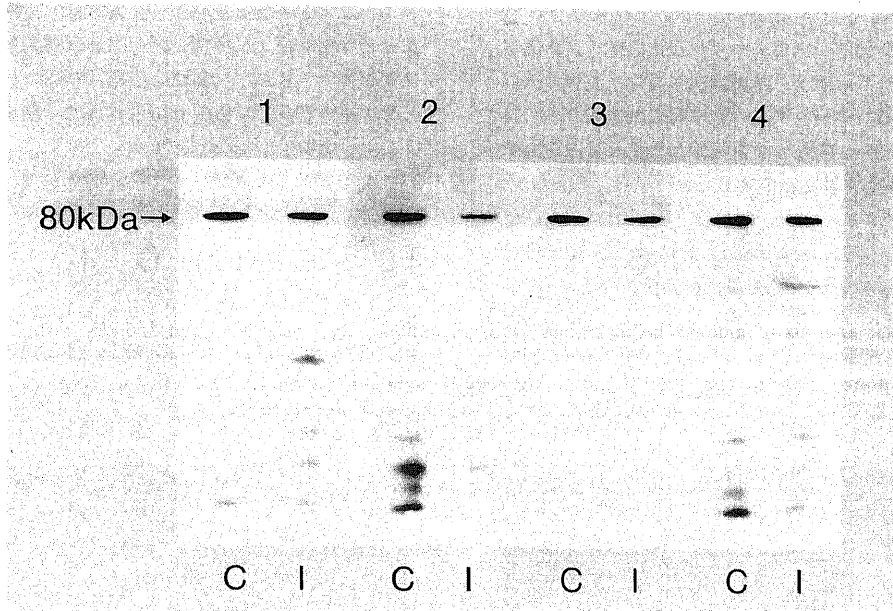


Fig. 1. Western blot analysis of monkey hippocampus using an antibody against inactivated form of  $\mu$ -calpain. Samples were loaded on 10% polyacrylamide gel, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane, and were detected using an antibody against inactivated form of  $\mu$ -calpain. Molecular weight is shown on the left. C, control; I, ischemia sample; 1, CA1 subfield; 2, CA2 subfield; 3, CA3 subfield; 4, CA4 subfield and dentate gyrus.

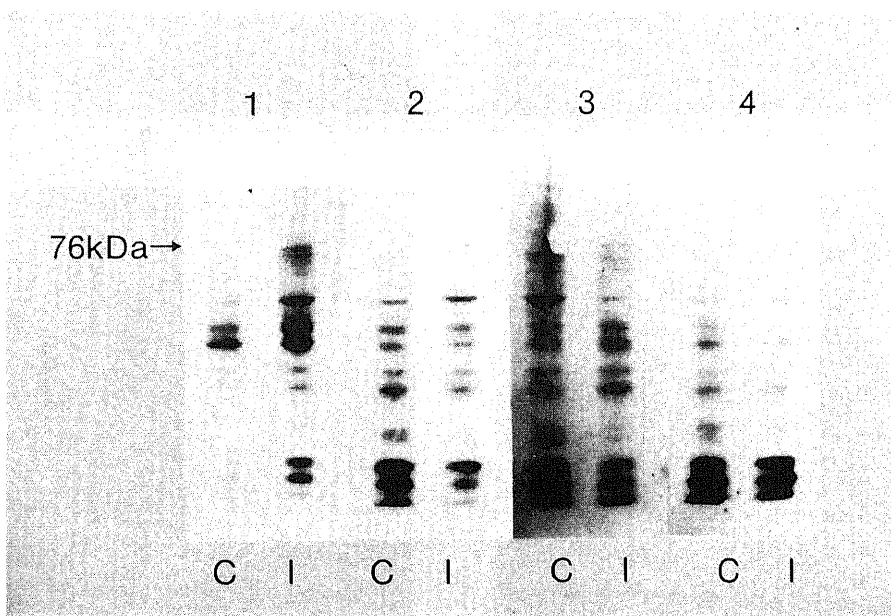


Fig. 2. Western blot analysis of monkey hippocampus using an antibody against activated form of  $\mu$ -calpain. Samples were loaded on 10% polyacrylamide gel, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane, and were detected using an antibody against activated form of  $\mu$ -calpain. Molecular weight is shown on the left. C, control; I, ischemia sample; 1, CA1 subfield; 2, CA2 subfield; 3, CA3 subfield; 4, CA4 subfield and dentate gyrus.

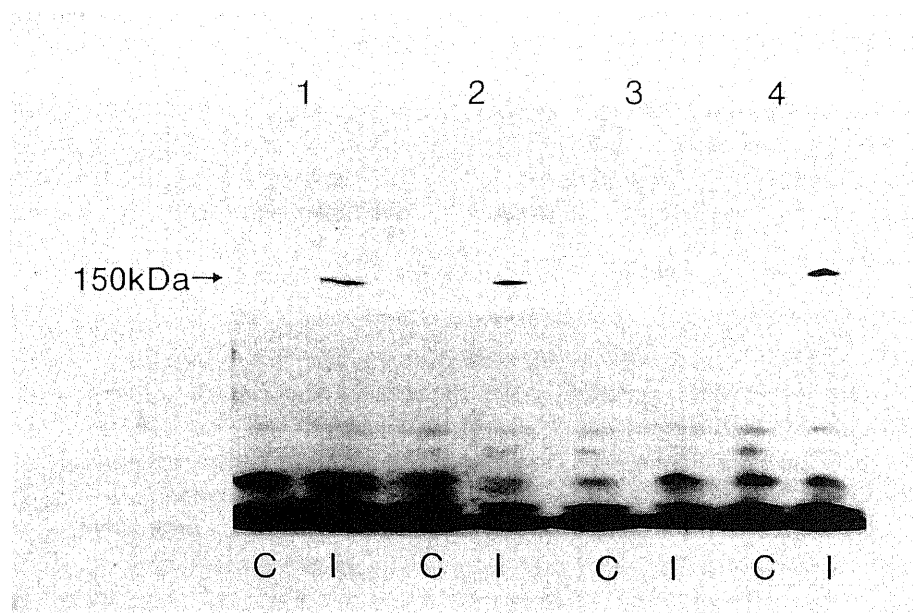


Fig. 3. Western blot analysis of monkey hippocampus using an antibody against proteolyzed 150-kDa form of fodrin. Samples were loaded on 5.5% polyacrylamide gel, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane, and were detected using an antibody against proteolyzed 150-kDa form of fodrin. Molecular weight is shown on the left. C, control; I, ischemia sample; 1, CA1 subfield; 2, CA2 subfield; 3, CA3 subfield; 4, CA4 subfield and dentate gyrus.

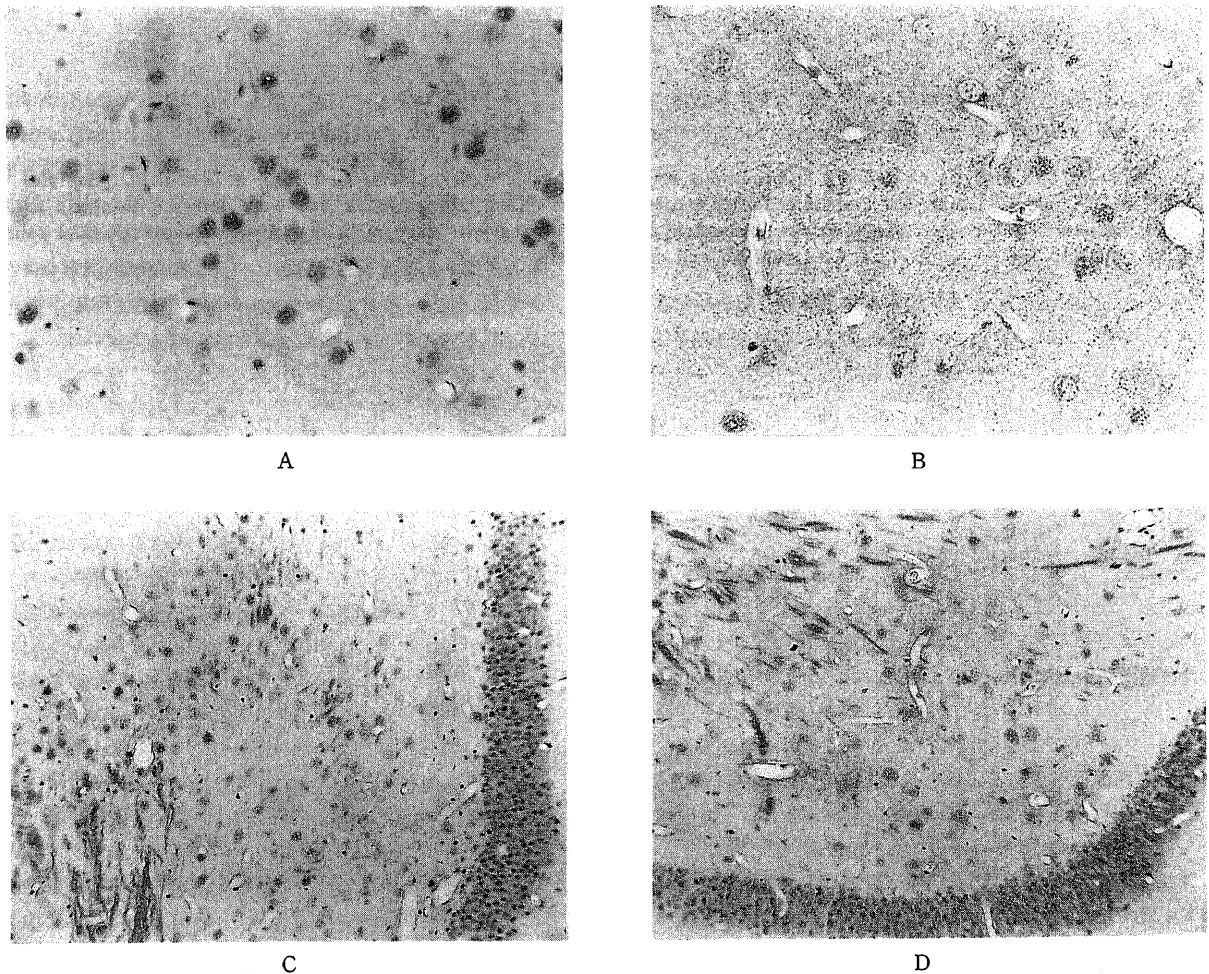


Fig. 4. Immunohistochemical staining of the monkey hippocampus using an antibody against inactivated form of  $\mu$ -calpain. (A) Control CA1 ( $\times 187$ ). (B) CA1 immediately after transient brain ischemia ( $\times 187$ ). (C) Control CA4 ( $\times 94$ ). (D) CA4 immediately after transient brain ischemia ( $\times 94$ ).

に遮断し、20分後に再開通させた。生化学的検索には、サルを腹臥位にして開頭し、ウィルス輪を凝固切断後すばやく脳を摘出した。摘出脳は、冷却した Tris 緩衝液 (pH7.6) に 5mM EDTA, 5mM メルカプトエタノール, 100 $\mu$ M ロイペプシンを含んだ溶液中にて、海馬の各部位を実体顕微鏡下に分割した。直ちに SDS 試料溶液中にてホモジナイズして、95 $^{\circ}$ C にて3分間温めた後 -20 $^{\circ}$ C にて保存した。

また、免疫組織化学的検索には、左心室より生食水を灌流した後、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) (phosphate-buffered saline, PBS) で溶解した 4% パラフォルムアルデヒド 1~2l を約1時間かけて注入し、灌流固定を行った。開頭して取り出した海馬組織は、同液でさらに24時間固定した後、アルコールにて脱水し、パラフィンに包埋した上で、4 $\mu$ m の薄切片を作製した。

#### IV. 抗体

非活性型のカルパインと活性型のカルパイン<sup>10</sup> およびフォドリンの分解産物<sup>11</sup> を特異的に認識する3種類のポリクローナル抗体を使用した。

#### V. ウェスタンブロット

電気泳動は、Laemmli<sup>12</sup> のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法により行った。ア

クリルアミドの濃度は、濃縮用ゲルは 5% (pH6.8) にした。分離用ゲルの濃度は、カルパイン検出用には 10% (pH8.8), 融解フォドリン検出用には 5.5% (pH8.8) に調節した。

電気泳動終了後、ゲル上の蛋白をポリビニリデンジフルオライド膜 (polyvinylidene difluoride membrane) (アトー, 東京) に転写させ、抗原の検出には、エンハンスドケモルミネセンス (enhanced chemoluminescence, ECL) ウェスタンブロット検出システム (アマシャム, 東京) を使用した。

#### VI. 免疫組織化学的観察

ポリ-L-リジン (poly-L-lysine) を塗布したスライドガラス上に貼布した検体を、キシレンを用いて脱パラフィンした。アルコールを通した後、内因性ペルオキシダーゼ活性を抑えるために 0.3% 過酸化水素を含むメタノールに20分間浸した。非特異的反応を抑えるために正常ウマ血清と30分間反応させた後、PBS にてよく洗浄し、上記の各抗体を室温にて12時間反応させた。アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) (Vector, Burlingame, 米国) を用いて免疫染色を施行し、0.02% 過酸化水素水と 0.1% (1mg/ml) ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate, DAB) 溶液 (0.1M Tris 緩衝液,

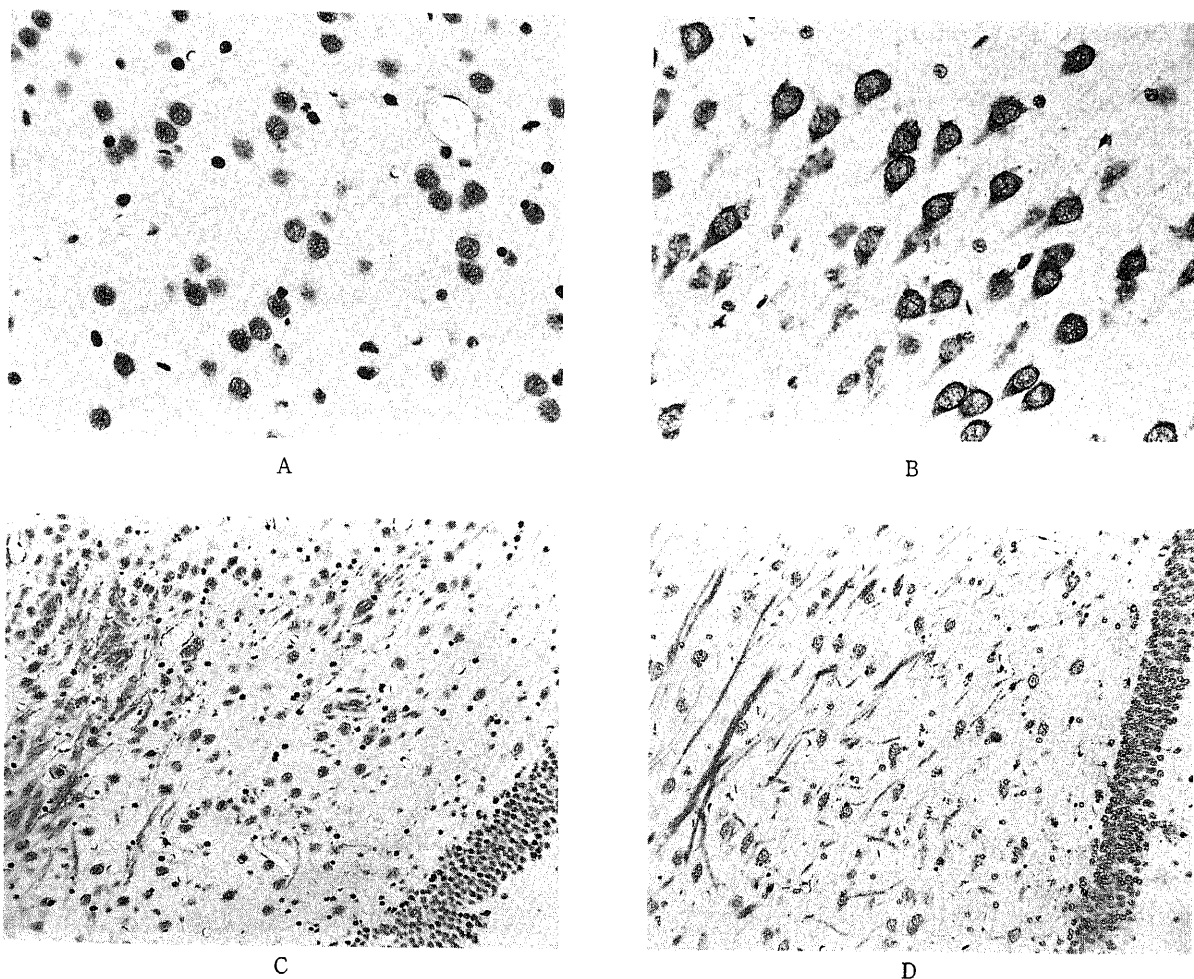


Fig. 5. Immunohistochemical staining of the monkey hippocampus using an antibody against activated form of  $\mu$ -calpain. (A) Control CA1 ( $\times 187$ ). (B) CA1 immediately after transient brain ischemia ( $\times 187$ ). (C) Control CA4 ( $\times 94$ ). (D) CA4 immediately after transient brain ischemia ( $\times 94$ ).

pH7.2 で調整) を同量混合した溶液中にて発色させて観察した。

## 成 績

### I. 脳循環動態

クリップ中はほぼ完全に脳血流が無くなっており、脳血流が完全に遮断されていることが PET で確認された。

### II. ウェスタンブロット

#### 1. 非活性型カルパイン

海馬の全領域において、非活性型のカルパインは虚血前に比べて、虚血後には僅かながら発現量が減少していた(図1)。しかし、CA1 と他の領域の減少の度合いには有意差は見られなかった。

#### 2. 活性型カルパイン

活性型のカルパインは、虚血前には発現は全くみられなかったが、虚血後においては全ての部位において発現がみられた。部位別にみると、CA1 における発現量は他の部位に比べて有意に多かった(図2)。

#### 3. フォドリンの分解産物

虚血前においてはフォドリンの分解産物の発現はみられな

かったが、虚血後においては、いずれの領域においても強い発現がみられた(図3)。

### III. 免疫組織化学的観察

#### 1. 非活性型カルパイン

虚血前では、海馬のいずれの部位においてもごく軽度の発現がみられた(図4, A, C)。虚血後においては、海馬のいずれの部位においても僅かながら発現の減少がみられた(図4, B, D)。

#### 2. 活性型カルパイン

虚血前では特異的な発現部位は無く、錐体細胞、顆粒細胞の核のみが薄く染まっていた(図5, A, C)。しかし、虚血後においては海馬の全ての領域において強く発現が見られた(図5, B, D)。特に CA1 において、核周囲の胞体に強く発現がみられた(図5, B)。

#### 3. フォドリンの分解産物

フォドリンの分解産物は、虚血前(図6, A, C)に比べて虚血後(図6, B, D)において、いずれの領域においても発現が増加していた。しかし、活性型カルパインのように核周囲の胞体だけでなく、上昇層、放線層、分子層など海馬全体的に発現が

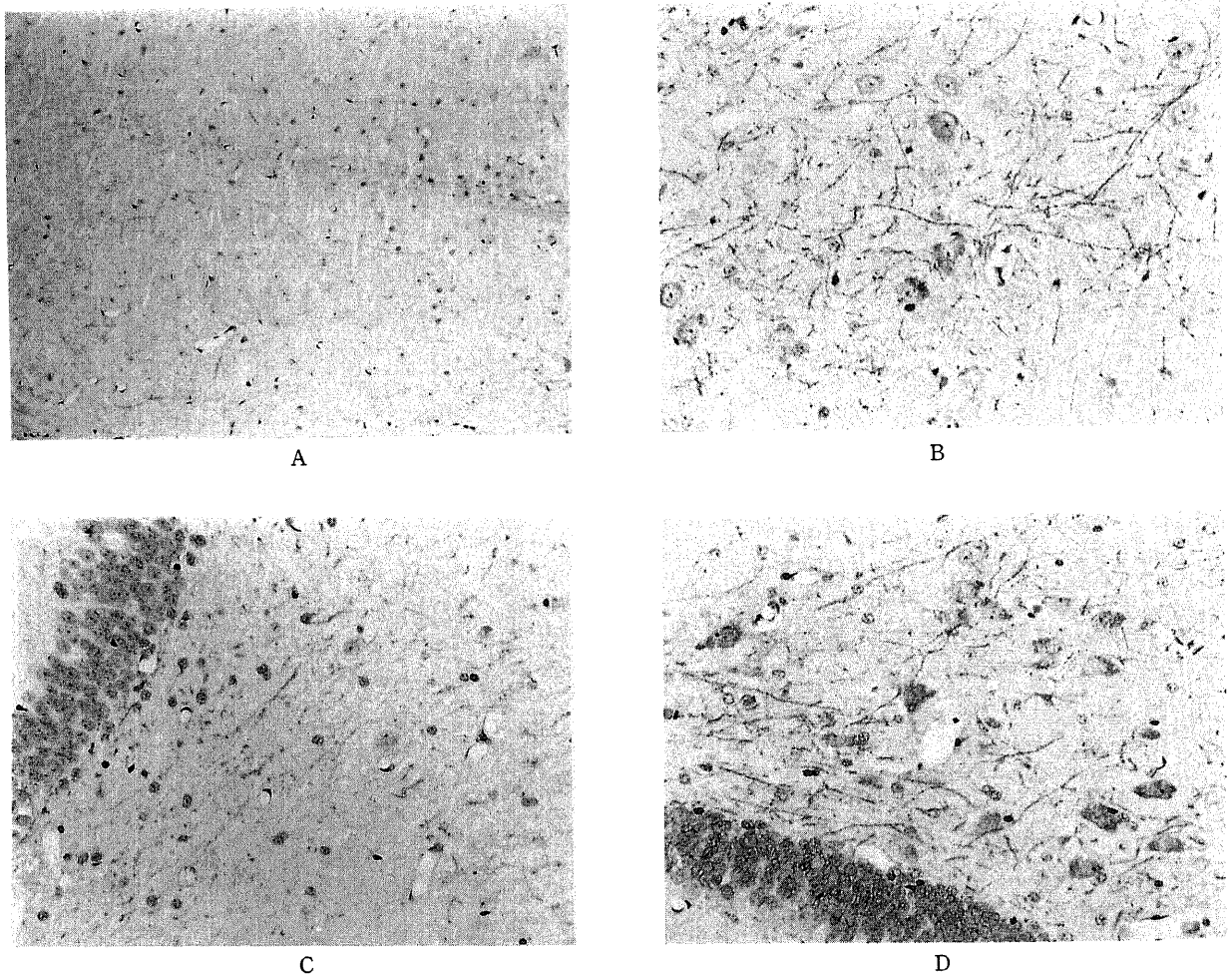


Fig. 6. Immunohistochemical staining of the monkey hippocampus using an antibody against proteolyzed 150-kDa form of fodrin. (A) Control CA1 ( $\times 94$ ). (B) CA1 immediately after transient brain ischemia ( $\times 187$ ). (C) Control CA4 ( $\times 187$ ). (D) CA4 immediately after transient brain ischemia ( $\times 187$ ).

強くなっていた。

## 考 察

脳虚血後に細胞外のグルタミン酸濃度が上昇する結果、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇することは、グルタミン酸・カルシウム仮説<sup>19)</sup>として広く認められている。このカルシウムイオンの上昇機構には、細胞外グルタミン酸により NMDA 受容体チャンネルを介してカルシウムイオンの流入が起こる系と、代謝調整型グルタミン酸受容体を介してホスホリパーゼ C が活性化され、その結果生ずるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の加水分解によって細胞内のカルシウムイオンの放出を促す系の両者がある<sup>19)</sup>。この細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって、カルシウム依存性のプロテアーゼが異常に活性化されるために、一連の虚血性神経細胞障害が起きるものと推定される。

カルパイン<sup>10)</sup>は、代表的なカルシウム依存性の細胞内プロテアーゼであり、基質を限定的に分解することによりその性質を修飾する作用がある。現在までに、 $\mu$ 型、m型の2種の亜型が同定されている<sup>9)</sup>。すなわち、前者は  $\mu$ M 濃度のカルシウムイオンで活性化が生ずるのに対して、後者はその活性化に mM 濃度のカルシウムイオンを必要とする。

$\mu$ およびmカルパインはともに分子量約8万の大サブユニットと分子量約3万の小サブユニットから構成される。小サブユニットは両者に共通であり、カルシウムイオンに対する要求性は大サブユニットによって決定されると考えられている。カルシウムイオンによってカルパインが活性化されると、大サブユニットはN末端のシステイン残基を自己消化し、活性化状態となる。

カルパインの基質としては、大まかに細胞骨格系蛋白質や酵素群、膜リセプターなどが知られている。神経細胞においてもカルパインが活性化されると、基質が限定分解を受け、その生化学的性状が変化する。たとえば、細胞内のアクチン<sup>18)</sup>やチューブリン<sup>19)</sup>などが基質となると、これらの形態変化のみならず、蛋白質の裏打ち構造の変化<sup>20)</sup>を介して膜や細胞の形態にまで影響を及ぼす。本研究においても、受容体の裏打ち蛋白質であるフォドリンの分解産物が海馬の全領域で証明された。

一方、カルパインは、リン酸化酵素、ホスファターゼ、ホスホリパーゼなどの酵素を活性化することにより、いわゆる情報伝達系を過剰に刺激するものと考えられる。たとえば、ホスホリパーゼCの活性化によるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の加水分解の促進や、プロテインキナーゼC<sup>21)</sup>の活性化による NMDA 受容体チャンネルの上向き調節は、細胞内カルシウム濃度の一層の上昇をもたらす。

神経細胞内のカルシウムイオン濃度は、およそ 100nM と推定されている。この生理的細胞内カルシウムイオン濃度は、感受性の高い $\mu$ カルパインですら活性化するには低すぎる。しかし、特定のリン脂質やその分解産物の存在下で $\mu$ カルパインの活性化に必要なカルシウムイオン濃度は低くなるとされている。すなわち、Hathaway ら<sup>22)</sup>は、ホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールなどがカルパインの活性化を促進することを報告した。また、Saido ら<sup>23)</sup>は、フォドリンを基質とする実験系を用いて、 $\mu$ M 以下の低いカルシウムイオン濃度ではこれらの酸性リン脂質よりもホスファチジルイノシトール 4-リン酸やホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸などのポリ

ホスホイノシチドが、より強くカルパインを活性化することを報告した。さらに、Yamashima ら<sup>7)</sup>は、一過性脳虚血後に海馬の CA1 ニューロンがホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の染色性の増加を示すことを、免疫組織化学的に証明した。したがって、本研究で明らかにした $\mu$ カルパインの活性化は、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の存在下で助長されている可能性が高い。

本研究においては、一過性脳虚血後に海馬 CA1 ニューロンにおいて $\mu$ カルパインが特異的に活性化されていることを、生化学的ならびに免疫組織化学的に証明し得た。しかし、 $\mu$ カルパインの基質であるフォドリンの分解産物に関しては海馬の各領域間に有意差を証明し得なかった。これについては、以下の如く3通りに解釈することが可能である。すなわち、第1には、活性化された $\mu$ カルパインが基質とするフォドリンの量に制限があり、活性化された $\mu$ カルパインの絶対量に比べてフォドリンのそれがはるかに少なかったことが考えられる。この場合、フォドリンの分解産物に見かけ上の差異がなくとも不思議ではない。第2には、活性化されたフォドリンの分解産物が不安定であるために、分解後の 150kDa の産物が次々と変性をきたし抗体に認識されなかった可能性がある。第3には、活性化された $\mu$ カルパインには CA1 において、フォドリン以外の蛋白質を基質としている可能性がある。

Saido らは、 $\mu$ カルパインが培養細胞の実験系でプロテインキナーゼCの調節ドメインをはずし、それを活性化することを証明した。また、Wieloch ら<sup>24)</sup>は一過性脳虚血後にプロテインキナーゼCの絶対量が増加していることを示した。もし、一過性脳虚血後に $\mu$ カルパインがプロテインキナーゼCを限定分解しているとするれば、活性化されたプロテインキナーゼCは NMDA 受容体チャンネルを上向き調節し、さらに多くのカルシウムイオンを細胞外から細胞内へと流入させる可能性がある。また、一旦、 $\mu$ カルパインによって調節ドメインをはずされたプロテインキナーゼCは他のプロテアーゼによる分解を受けやすいことが知られている。この場合、細胞内の情報伝達系そのものが破綻をきたし、細胞死につながる可能性がある。

以上まとめると、一過性脳虚血後にはサル海馬 CA1 ニューロンにおいて、特異的に $\mu$ カルパインの活性化が生ずることが生化学的ならびに免疫組織化学的に証明された。しかし、 $\mu$ カルパインの基質となり得るフォドリンの分解産物は、海馬の全領域にはほぼ同程度に見られた。したがって、 $\mu$ カルパインの活性化はフォドリンに作用するのみならず、プロテインキナーゼCなどを限定分解することによって、遅発性神経細胞死の一因をなしていることが推定された。

## 結 論

ニホンザルを用いて、全身麻酔下で腕頭動脈と無名動脈を一過性に遮断することにより脳虚血モデルを作製した。そして、カルシウム依存性のプロテアーゼであるカルパインとその基質であるフォドリンの分解産物の発現を、ウェスタンブロットならびに免疫組織化学により検索した。カルパインの活性化が虚血性神経細胞障害の発生にいかなる役割を果たしているかについて考察した。

1. 非活性型のカルパインは、正常海馬においては海馬の全領域に同程度に存在していたが、虚血後には僅かながらも減少を示した。

2. 活性型のカルパインは、ウェスタンブロットでは CA1 に有意に多く発現が見られ、虚血前に比べて CA1 ニューロン、特にその核周囲の胞体に強い発現を示した。

3. カルパインの基質であるフォドリンの分解産物の発現は、虚血後の海馬では有意な増加を示したものの、海馬の各領域による差異は見られなかった。

4. 虚血後に活性化されたカルパインは、CA1 ニューロンにおいて、プロテインキナーゼCなどフォドリン以外の蛋白を基質としていることが示唆された。

5. 以上より、脳虚血後に生じるカルパインの活性化は、海馬 CA1 における遅発性神経細胞死の発生に重要な役割を果たしていると考えられた。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始直接の御指導を賜りました金沢大学医学部脳神経外科学講座、山嶋哲盛助教授に心から感謝を致します。さらに、抗体を供与して頂きました東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門、西道隆臣博士と、御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部脳神経外科学講座および動物実験施設の皆様に深く感謝致します。

#### 文 献

- 1) Kirino, T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, **239**, 57-69 (1982).
- 2) 桐野高明: 脳虚血における遅発性神経細胞壊死. *神経科学レビュー* 2, 第1版, 173-199 頁, 医学書院, 東京, 1988.
- 3) Schmidt-Kastner, R. & Freund, T. F.: Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, **40**, 599-636 (1991).
- 4) Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Diemer, N. H.: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.*, **43**, 1369-1374 (1984).
- 5) Ohishi, H., Shigemoto, R., Nakanishi, S. & Mizuno, N.: Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.*, **335**, 252-266 (1993).
- 6) Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Niuno, N. & Nakanishi, S.: Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, **354**, 31-37 (1991).
- 7) Yamashima, T., Takita, M., Akaike, S., Hirano, M., Miyakawa, A., Miyazawa, A., Kudo, Y. & Yoshioka, T.: Temperature-dependent  $Ca^{2+}$  mobilization induced by hypoxia-hypoglycemia in the monkey hippocampal slices. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **205**, 1843-1849 (1994).
- 8) Suzuki K.: Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed. Biochim. Acta.*, **50**, 483-484 (1991).
- 9) Levine, J. & Willard, M.: Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. *J. Cell Biol.*, **90**, 631-642 (1981).
- 10) Saido, C. T., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H. & Suzuki, K.: Autolytic transition of  $\mu$ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *J. Biochem.*, **111**, 81-86 (1992).
- 11) Saido, C. T.: In situ capture of  $\mu$ -calpain activation in platelets. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25239-25243 (1993).
- 12) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 13) 桐野高明: 虚血性神経細胞死. *Annual Review 神経* 1993, 第1版, 119-131 頁, 中外医学社, 東京, 1993.
- 14) Choi, D. W.: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623-634 (1988).
- 15) Siesjö, B. K. & Bengtsson, F.: Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.*, **9**, 127-140 (1989).
- 16) 西道隆臣: カルパイン. プロテアーゼと生体機能—分子から病態まで—(鈴木紘一編), *現代化学 増刊*22, 32-43 頁, 東京化学同人, 東京, 1993.
- 17) 鈴木紘一: カルパインの生理機能の解明をめざして—活性化機構と組織特異的な新しいカルパイン—. *生化学*, **65**, 537-552 (1993).
- 18) Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I. & Robson, R. M.: Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.*, **266**, 8501-8510 (1991).
- 19) Yoshimine, T., Hayakawa, T., Ushio, Y., Morimoto, K., Yamada, K., Jamshidi, J., Mogami, H., Tanagihara, T. & Yamamoto, K.: Immunohistochemical study of ischemic neuronal damage with antiserum to tubulin, a microtubular protein. *No-to-Shinkei*, **36**, 543-551 (1984).
- 20) Saido, C. T., Yokota, M., Nagao, S., Yamaura, I., Yani, E., Tsuchiya, T., Suzuki, K. & Kawashima, S.: Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25239-25243 (1993).
- 21) Nishizuka, Y.: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, **258**, 607-614 (1992).
- 22) Coolican, S. A. & Hathaway, D. R.: Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle  $Ca^{2+}$ -dependent protease. Reduction of the  $Ca^{2+}$  requirement for autolysis. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11627-11630 (1984).
- 23) Saido, C. T., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H. & Suzuki, K.: Positive regulation of  $\mu$ -calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24585-24590 (1992).
- 24) Wieloch, T., Cardell, M. & Bingren, H.: Changes in the activity of protein kinase C and the differential subcellular redistribution of its isozymes in the rat striatum during and following transient forebrain ischemia. *J. Neurochem.*, **56**, 1227-1235 (1991).



**Immunoblot and Immunohistochemical Analyses of Ischemic Neuronal Injuries in the Monkey Hippocampus with Reference to Calpain Activation** Jun Yamano, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **104**, 154—161 (1995)

**Key words** calpain, hippocampus, ischemia, monkey, delayed neuronal death

**Abstract**

Calcium-activated neutral cysteine protease, calpain, is known to proteolyze fodrin or protein kinase C. However, the role of calpain in ischemic neuronal injuries has not been clarified. This study was performed to clarify the role of calpain in the development of delayed neuronal death after transient brain ischemia in the hippocampal CA1 of primates, using Western blotting and immunohistochemical analyses. Three antibodies that specifically recognize inactivated or activated forms of  $\mu$ -calpain, and fodrin breakdown products were used. Increase of activated  $\mu$ -calpain together with decrease of inactivated  $\mu$ -calpain were observed especially in the perikarya of CA1 neurons after transient brain ischemia. In contrast, fodrin breakdown products, which were not observed in the control hippocampus, increased in all sectors of hippocampus after the ischemia. These results suggest that the activation of  $\mu$ -calpain after brain ischemia plays an important role in the development of delayed neuronal death of the hippocampal CA1.