

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4688293号
(P4688293)

(45) 発行日 平成23年5月25日(2011.5.25)

(24) 登録日 平成23年2月25日(2011.2.25)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/50 (2006.01)

GO 1 N 33/50 Z

GO 1 N 33/15 (2006.01)

GO 1 N 33/15 Z

GO 1 N 33/483 (2006.01)

GO 1 N 33/483 E

GO 1 N 33/483 C

請求項の数 26 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2000-553803 (P2000-553803)
 (86) (22) 出願日 平成11年6月7日(1999.6.7)
 (65) 公表番号 特表2002-517754 (P2002-517754A)
 (43) 公表日 平成14年6月18日(2002.6.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB1999/001786
 (87) 国際公開番号 WO1999/064859
 (87) 国際公開日 平成11年12月16日(1999.12.16)
 審査請求日 平成18年6月1日(2006.6.1)
 (31) 優先権主張番号 9812127.0
 (32) 優先日 平成10年6月6日(1998.6.6)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 500559547
 ユニヴァースティ コート オブ ザ ユ
 ニヴァースティ オブ グラスゴウ
 イギリス国 ジー 1 2 8 キューキュー
 グラスゴウ ユニヴァースティ アヴェニ
 ュー ギルバート スコット ビルディン
 グ (番地なし)
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (72) 発明者 カイサー、 キム
 イギリス国 ジー 6 2 8 ディーディー ミ
 ルンガヴィー カースランド ドライブ
 1 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経活動の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 試験する生物内の、または試験の前に生物から切除しておいた、無傷の昆虫又はクモ類の脳組織における、神経活動の初期パターンを検出するステップと、

b) 化合物を脳組織に加え、生じる神経活動のパターンを検出するステップと、

c) 細胞内神経活動の初期パターンと生じた神経活動のパターンとを比較することにより、神経活動への化合物の薬理学的活性を調べるステップ
 とを含む、化合物を薬理学的活性に関してスクリーニングする方法。

【請求項 2】

前記神経活動をカルシウム振動のパターンとして検出する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

a) 細胞内カルシウム濃度をモニターする方法、

b) 細胞内カルシウムの信号伝達経路の作用をモニターする方法、

c) 他の種類の信号伝達経路の作用をモニターする方法、または

d) 神経電位をモニターする方法

によって、前記神経活動のパターンを直接的に又は間接的に検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記神経活動のパターンを検出する方法が、検査する脳組織においてアポエクオリンを発現することを含む、請求項 2 または請求項 3 の a) に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記アポエクオリンが遺伝子導入によって発現される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アポエクオリンが G A L 4 制御下でエクオリン遺伝子から誘導される、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アポエクオリンを発現する脳組織にセレンテラジンを加えることによって細胞内カルシウム濃度を検出する、請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記神経活動のパターンの検出を、C C D カメラ、ルミノメーター、又は他の適当な光検出手段を用いて実施する、請求項 4 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 9】

カルシウムと結合した場合にスペクトル応答を示す蛍光プローブの使用を含み、蛍光顕微鏡検査、フローサイトメトリー、又は蛍光分光法を用いて細胞内の遊離カルシウム濃度の変化を検出する、請求項 3 の a) に記載の方法。

【請求項 10】

前記蛍光プローブが、グリーン蛍光蛋白質 (G F P) のブルー又はシアン発光突然変異体、カルモジュリン、カルモジュリン結合ペプチド M 1 3、及び強調グリーン又はイエロー発光 G F P のタンデム融合を含むいわゆるカメレオンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

20

電位差測定光学プローブの使用を含む、請求項 3 の d) に記載の方法。

【請求項 12】

生存生物に関して検出を実施する、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

生物から切除した脳組織に関して検出を実施する、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記化合物の添加が、神経活動の一定期間の休止、活動パターンの変動、又はその両方を生じさせる、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

30

前記変動が、観測される振動の振幅の増大 / 低減、又は周波数及び / もしくは波のパターンの変化である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記化合物が作動的に働くか又は拮抗的に働くかを確認するための、請求項 14 または 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記薬理学的活性が治療作用に関連する、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

試験する化合物に帰することができる治療作用が、カルシウムチャネル遮断薬；抗コリンエステラーゼ；呼吸鎖修飾因子；抗高血圧薬；抗パーキンソン病薬；抗アルツハイマー病薬；抗狭心症薬、および抗不整脈薬からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 19】

薬理学的活性が有害作用又は毒性作用に関連する、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

農薬に関するスクリーニングにおいて使用するための、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

環境毒性物質に関するスクリーニングにおいて使用するための、請求項 19 に記載の方法。

50

法。

【請求項 2 2】

前記昆虫又はクモ類が、D i c t y o p t e r a (網翅類、ゴキブリ) ; I s o p t e r a (等翅類、シロアリ目) ; O r t h o p t e r a (直翅類、バッタ目) ; D i p t e r a (双翅類、ハエ目) ; H y m e n o p t e r a (膜翅類、ハチ目) ; A n o p l u r a (吸蟲類、正脱翅類、シラミ目) ; S i p h o n a p t e r a (隱翅類、微翅類、ノミ目) ; H e m i p t e r a (半翅類、有吻類、カメムシ目) ; 及び A c a r i (ダニ目) からなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記昆虫が双翅目からのものである、請求項 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

試験される昆虫又はクモ類の生物の脳組織における細胞内カルシウム振動のパターンを検出するステップと、

これを非突然変異体の昆虫又はクモ類の生物の神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンと比較するステップ

とを含む、カルシウム信号伝達突然変異体生物を検出するための方法。

【請求項 2 5】

外因性遺伝子を発現する昆虫又はクモ類の生物の神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンを検出するステップと、

前記パターンを、前記外因性遺伝子を発現しない昆虫またはクモ類の生物の神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンと比較するステップ

とを含む、神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンへの外因性遺伝子の影響を評価するための方法。

20

【請求項 2 6】

前記外因性遺伝子を発現する生物が、同等の内因性遺伝子に関して機能不全である、請求項 2 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、特に双翅類の脳組織に適した i n s i t u での昆虫脳組織アッセイ及びそのようなアッセイの使用に関する。

30

【0002】

多細胞生物では、細胞の交通が分化された組織の様々な活動を調節するために必須である。すべての動物において、保存された細胞内第二メッセンジャー経路が存在する。これらのうちでカルシウムは重要な第二メッセンジャーである。神経細胞、筋肉及びその他の細胞では、100 n M の典型的静止レベルからの細胞内カルシウム活性の変調が、多くの短期及び長期的プロセスを調節する。従って、カルシウムの測定は正常な機能と疾患状態の両方を理解するために極めて重要であり、カルシウム信号伝達を変調する薬剤は広い範囲の疾患を治療するうえで臨床的重要性を持つことが示されている。

【0003】

本出願の発明者は、遺伝モデル生物、ショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) においてトランスジェニックエクオリン発現系の有用性を明らかにした ; R o s a y ら (1997) 。

40

【0004】

合成 P 因子トランスポゾンに基づき、G A L 4 / U A S エンハンサートラップ系を使用して、本出願の発明者は、マルピーギ管の所定サブセットの細胞においてアポエクオリンを特異的に発現することが可能であり、新鮮切除した管組織をセレンテラジン中でインキュベートすると、十分に機能的エクオリンに還元できることを示した ; R o s a y ら (1997) 。

【0005】

本発明は、上述した手法を使用して細胞内カルシウム濃度の振動が無傷のショウジョウバ

50

工の脳で観察されるという発明者による予想外の発見に基づく。これらの振動は長期間であり、細胞型特異的、内因性で、強く且つ同調性であって、先例のない、本出願の発明者の知るかぎり最良の特徴の組合せである。この系におけるカルシウム振動は神経活動の振動を反映すると思われるので、神経活動をモニターすることができる他の手段も同じ基本的プロセスを明らかにすると予想できる。

【0006】

主として完全な組織ではなく単一細胞に関して、例えば神経系の場合には培養した海馬ニューロン(Jaffe, 1994; Seymour-Laurent, 1995; Ogdén, 1996)及び皮質ニューロン(Robinsonら、1993; WangとGruenstein, 1997)に関してであるが、同様の周期のカルシウム振動が一部の脊椎動物系で認められた。脊椎動物末梢組織を代表するいくつかの細胞系、例えばオキシトシン、バソプレシン、アンギオテンシン-II又はノルアドレナリンで処理した肝細胞は、ホルモン刺激下で5mHzの範囲で振動を示す(Woodsら、1986)。グルコースで処理した個々の膵ベータ細胞は、細胞質ナトリウム及びカルシウムの大きな振幅の振動を示す(Grapengiesserら、1988; Grapengiesser, 1996)。しかし、ニューロンではなく星状細胞に限定されと思われる海馬切片を除いて(Dani, 1995; Duffy, 1995)、in situで起こる同様の振動に関しては直接の証拠がほとんど存在しなかった。本出願の発明者は、昆虫神経系における同様の性質の振動に関する報告は全くないと認識している。

【0007】

最初の局面では、本発明は、次の段階を含む、化合物を薬理学的活性に関してスクリーニングするin situでの方法を提供する：

- a) 脳組織における神経活動の初期パターンを検出する；
- b) 化合物を脳組織に加え、生じる神経活動のパターンを検出する；そして
- c) 細胞内神経活動の初期パターンと生じた神経活動のパターンを比較することにより、神経活動への化合物の薬理学的作用を調べる。

【0008】

本発明の利点は、本発明の方法が培養細胞ではなく無傷組織に関して実施され、特定の試薬が神経機能に及ぼしうる作用の本当の生理的な反映を論証可能に提供することである。in situは、試験する生体内に残存する組織あるいは試験の前に生物から切除しておいた組織に適用することと解釈される。

【0009】

「神経活動」の語は、細胞内カルシウム濃度の変化に依存する、又はかかる変化を生じさせる、又は変化と平行して起こる、神経機能の測定可能なすべての局面を包含すると理解すべきである。通常は、「神経活動」は細胞内カルシウム振動のパターンとして検出する。

【0010】

「薬理学的活性」の語は、生物にとって有益であるか否かに関わらず、すべての活性を含むと理解すべきである。従って、活性は治療活性に関連する場合も、あるいはその代わりに活性が生物にとって有害又は毒性である、例えば生物致死性である場合もありうる。

【0011】

ショウジョウバエ脳組織に適用するとき、本アッセイは、薬理学的活性又は殺虫活性を持つ化学物質をスクリーニングするために直接使用することができる。神経活動の振動は、次のものを含むがそれらに限定されない広い範囲の方法によって直接又は間接的に検出する：a) トランスジェニックアポエクオリン；b) 細胞内カルシウム濃度をモニターする他の方法；c) 細胞内カルシウムの信号伝達経路の操作をモニターする他の方法；d) 他の種類の信号伝達経路の操作をモニターする方法；e) 神経電位をモニターする方法。

【0012】

例えば蛍光プローブ(フラ-2、インド-1、キン-2など)はカルシウムに結合するときスペクトル応答を示し、蛍光顕微鏡検査、フローサイトメトリー及び蛍光分光法を用い

10

20

30

40

50

て細胞内の遊離カルシウム濃度の変化を検出することが可能である。これらの蛍光指示薬の大部分は、非蛍光カルシウムキレート化合物、EGTA及びBAPTAのバリエーションである(CobboldとRink, 1987)。

【0013】

「カメレオン」と呼ばれる新しい蛍光指示薬も使用でき、これらは補因子なしに遺伝的にコードされ、細胞内の特定位置に標的可能である。これらのいわゆる「カメレオン」は、グリーン蛍光蛋白質(GFP)のブルー又はシアン発光突然変異体、カルモジュリン、カルモジュリン結合ペプチドM13、及び強調グリーン又はイエロー発光GFPのタンデム融合から成る。カルシウムの結合はM13ドメインの周囲をカルモジュリンでおおい、隣接するGFP間の蛍光共鳴エネルギー転移を高める(Miyawakiら、1997)又は低下させる(Romoserら、1997)。

10

【0014】

さらに、電位差測定光学プローブも使用できる。電位差測定光学プローブは細胞小器官及び細胞における膜電位を測定する。画像手法と組み合わせて、これらのプローブを用いて高い空間分解能とサンプリング頻度でニューロンに沿った及び細胞個体群間の膜電位の変動をマッピングすることができる(Rohr & Salzberg, 1994)。

【0015】

非制限的な例として、本出願の発明者は、本文中で述べる方法のモデルとしてショウジョウバエ(Drosophila)を使用し、酵母転写因子、GAL4の制御下でショウジョウバエの脳におけるアポエクオリンの発現により細胞内カルシウムレベルを検出した。

20

【0016】

特定のクラスの細胞の視覚化のため、及びそれらの細胞を生存生物において操作する手段を提供するために、ショウジョウバエP[GAL4]エンハンサートラップ系を使用する(Armstrong, 1997)。ゲノム転写エンハンサーの近くに生じるP[GAL4]トランスポゾンの挿入は、近接するエンハンサーを反映するパターンで酵母転写活性化因子GAL4の発現を導く。

【0017】

カルシウムリポーターであるエクオリンをGAL4制御下に置くことにより、本出願の発明者は、無傷ショウジョウバエ脳において非侵襲的且つ細胞型特異的に、振動するカルシウム濃度を検出することができる系を確立した。ここで述べるように、嗅覚に関連する学習と記憶及び配偶者選択に関する脳中枢、キノコ体において振動を検出した。キノコ体あるいは類似構造はすべての昆虫で認められる。原則として、いかなる細胞型においても振動活動に対して同じアプローチが適用できる。

30

【0018】

検出は生存生物全体について実施することができる。セレンテラジンのような必要な試薬(エクオリン発現系のため)を加えることができるように頭部クチクラの小さな部分を切除する。比較的透過性及び/又は半透明のクチクラを有する突然変異体生物も使用しうる。その代わりに、脳組織を切除して、それにセレンテラジンのような試薬を加えてもよい。

【0019】

ショウジョウバエの脳におけるエクオリン発現系の例に関しては、カルシウム振動はセレンテラジンの添加後すぐに検出可能となり、1時間以内に最大振幅に達し、15時間以上にわたって持続しうる。検出は、CCDカメラ、ルミノメーター、又は適当な光検出系を用いて実施することができる。

40

【0020】

ひとたび神経活動の初期パターン、例えば細胞内カルシウム振動が検出されれば、スクリーニングする化合物を加えて、神経活動へのその薬理学的作用を調べることができる。化合物は天然又は合成化合物を含みうる。

【0021】

薬理学的活性は様々な方法で発現しうる。例えば、化合物は一定期間の神経活動の休止あ

50

るいは活動パターンの変動又はその両方を生じうる。そのような変動は、振動の振幅の増大／低減、ならびに認められる振動数及び／又は波のパターンの変化を含みうる。

【 0 0 2 2 】

神経活動の初期パターンが検出されるので、化合物が作動的に働くかあるいは拮抗的に働くかを確認することが可能となる。すなわち、化合物がその後神経活動の周波数／振幅／度合を上昇させるか低下させるかである。

【 0 0 2 3 】

当該方法は特に、脳の自然の神経活動を変動させうる又は変化させうる化合物のスクリーニングに適用できる。かかる変化はカルシウム動力学に対するスクリーニング化合物の直接の結果であるか、あるいは化合物がナトリウム又はカリウムチャネルのような異なる経路に影響を及ぼして、カルシウム動力学への二次的な又は結果的な作用を及ぼすと考えられる。

10

【 0 0 2 4 】

本文中で述べる方法は、昆虫神経系のような有害生物の神経系に対する潜在的殺虫性化合物の活性を調べることにより、農薬の開発に特に適用できる。

【 0 0 2 5 】

本文中で述べる方法はまた、新しい薬剤あるいは神経組織への薬理学的活性を持つことが示されている既存薬剤についての新しい適用の開発を導きうる。そのような薬剤は、カルシウムチャネル遮断薬、抗コリンエステラーゼ、呼吸性興奮薬、抗高血圧薬、抗パーキンソン病薬、抗アルツハイマー病薬、抗狭心症薬及び抗不整脈薬を含む。

20

【 0 0 2 6 】

当該アッセイはまた、神経活動を変動させる又は変化させる環境毒性物質、例えば作物、土壌又は圃場から流出する水中の殺虫薬に関するスクリーニングにも使用しうる。

【 0 0 2 7 】

昆虫の脳におけるカルシウム振動の発見はまたさらなる適用を導いた。

【 0 0 2 8 】

さらなる局面において本発明は、被験生物の脳組織における細胞内カルシウム振動のパターンを検出し、これを非突然変異体生物の神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンと比較することを含む、カルシウム信号伝達突然変異体生物を検出するための方法を提供する。

30

【 0 0 2 9 】

かかる突然変異体は振動活性の異常を示すと考えられる。

【 0 0 3 0 】

そのような方法は、カルシウム動力学を変動させる、天然に起こる突然変異又は誘発突然変異をスクリーニングするために使用でき、またその産物が先に述べたクラスの薬剤についてあるいは農薬の開発において新しい標的となりうる新しい遺伝子の発見を導きうる。

【 0 0 3 1 】

さらなる局面では本発明はまた、外因性遺伝子を発現する生物の神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンを検出し、当該パターンを、当該外因性遺伝子を発現しない生物の神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンと比較することを含む、神経組織における細胞内カルシウム振動のパターンへの外因性遺伝子の作用を評価するための方法を提供する。

40

【 0 0 3 2 】

外因性遺伝子を一過性に発現させるか、あるいは生物の特定外因性遺伝子を遺伝子組み替えとすることができる。外因性遺伝子はいかなる由来のものでもよいが、特にヒト又は動物由来であり、神経系において外因性カルシウム信号伝達を変動させる又は変化させることを期待して選択することができる。その後化合物を、外来遺伝子の発現バックグラウンドにおけるカルシウム信号伝達への作用に関して試験することができる。

【 0 0 3 3 】

さらに上記の2つのアプローチを組み合わせることも可能であろう。例えば、特定遺伝子

50

を潜在的に正常な神経機能に関連するものとしてヒトにおいて同定する。ショウジョウバエでは機能不全であるこの遺伝子に相当するものの、突然変異体ショウジョウバエを作製するか又は利用可能にする。次にヒト遺伝子を突然変異体ショウジョウバエにおいて発現し、化合物をヒト遺伝子発現のバックグラウンドにおけるカルシウム振動への作用に関して試験する。

【0034】

ショウジョウバエ及びGAL4/UAS発現系を用いたエクオリン遺伝子の発現に関して上記に例示したが、そのような手法は、脳における神経活動の内因性振動を示す他の生物、及び上述したような神経活動を検出する代替的手段（例えばカルシウム及び電位差測定染料）に容易に拡大することができる。

10

【0035】

例えば、適当なトランスポゾンに基づく技術を使用して他の昆虫種にエクオリン遺伝子について遺伝子導入をすることができる。さらに細胞又は組織特異的プロモーターの制御下に、直接又はGAL4/UAS系のような系を通して、又は遍在的且つ非選択的に、熱ショック、アクチン又は同様のプロモーターを使用することにより、アポエクオリンを遺伝子導入によって発現させることができる。

【0036】

エクオリン遺伝子はまた、例えば昆虫におけるバキュロウイルスベクター系や脊椎動物系におけるアデノウイルス系のような病原菌を用いた一過性（非生殖細胞系）形質転換によっても発現することができる。

20

【0037】

適当な生殖細胞系形質転換技術を用いて、例えばアポエクオリン発現構築物を受精卵母細胞に注入することによって、あるいは現在マウス及びヒツジにおいて常套的であるES細胞の形質転換によって、他の動物にエクオリン遺伝子について遺伝子導入することができる。

【0038】

かかる一般のアプローチは、どのような昆虫、例えば病害虫とみなされる、その防除が必要な昆虫の神経組織にも拡大することができるであろう。そのような病害虫は、Diptera（ゴキブリ）；Isoptera（シロアリ）；Orthoptera（イナゴ、バッタ及びコオロギ）；Diptera（イエバエ、カ、ツエツエバエ、ガガンボ及びショウジョウバエ）；Hymenoptera（アリ、スズメバチ、ミツバチ、ハバチ、ヒメバチ及びタマバチ）；Anoplura（ハジラミ及び吸血シラミ）；Siphonaptera（ノミ）；Hemiptera（カメムシ及びアリマキ）ならびにAcari（マダニ及びダニ）のようなクモ類を含む。

30

【0039】

下記の非制限的实施例を参照して本発明をさらに説明する。

【0040】

（材料及び方法）

pUAST - エクオリンハエの作製

アポエクオリンcDNAをSmaIとPstIでの二重消化によってプラスミドpAQ2（Molecular Probes Inc. USAから入手可能）から抽出し、同様に開裂したpBKS+（Stratageneから入手可能）に挿入した。NotIとKpnIで再開裂して、5つのUAS_G（GAL-4結合）部位、hsp70 TATAボックス及び転写開始部位の下流で、同様に開裂したpUAST形質転換ベクター（Brand and Perrimon, 1993）に挿入した。生殖細胞系の形質転換ショウジョウバエを作製し、指示されている細胞遺伝学的位置（Rosayら、1997）にトランスジェーンを持つ、2つの機能的に等価の細胞系、UAS_G-aeq30DとUAS_G-aeq49Aを得た。染色体の起動を用いて、X染色体上、CyO平均体染色体上及び第三染色体上に新たな挿入部を作製した（表1参照）。

40

【0041】

50

ショウジョウバエ法

ここで述べる P { G A L 4 } 系統は Y a n g ら (1 9 9 5 ; 表 1) が述べたスクリーニングから生じたものである。G A L 4 はショウジョウバエにおいて機能的な酵母転写因子である。その発現のパターンと時期は挿入する P [G A L 4] 要素のゲノム環境に依存する。G A L 4 を使用して、G A L 4 応答性プロモーター、U A S_G に結合した第二リポーターの発現を促進することができる。

【 0 0 4 2 】

ヒドロキシ尿素の除去

d e B e l l e と H e i s e n b e r g (1 9 9 4) に準じて H U 除去を実施した。新しく孵化した幼虫 (幼虫孵化後 3 0 ± 3 0 分) に、4 時間パルスの 5 0 m g / m l H U を含む熱死滅酵母懸濁液を与えた。次に幼虫を H U を含まない標準培地に移した。対照昆虫には酵母だけを与えた。

10

【 0 0 4 3 】

ルミノメトリー

昆虫生理食塩水 (N a⁺、1 3 2 m M ; K⁺、2 0 m M ; C a²⁺、2 m M ; C l⁻、1 5 8 m M ; M g²⁺、8 . 5 m M ; H₂ P O₄⁻、4 . 3 m M ; H C O₃⁻、1 0 . 2 m M ; グルコース、5 m M ; N a O H で p H を 7 . 0 に調整した) の下で脳を切除した。各々のルミノメーターの痕跡は、2 . 5 μ M h c p - セレンテラジン (M o l e c u l a r P r o b e s) を含む上記培地 1 0 0 μ l 中で自由に浮遊する 1 個の脳を表わす。B e r t h o l d W a l l a c L B 9 5 0 7 ルミノメーターで発光を記録した。データは 5 - 1 5 秒間を平均した。発光は c p s / 1 0 で表わしている。G A L 4 不在下での最大バックグラウンド発光は 2 0 0 - 4 0 0 c p s であった。

20

【 0 0 4 4 】

(実施例 1)M B における内因性カルシウム振動

ショウジョウバエ キノコ体 (M B) の種々の神経サブタイプは P { G A L 4 } エンハンサートラップ系によって明らかにされる (Y a n g ら、1 9 9 5 ; A r m s t r o n g ら、1 9 9 8) 。ここでは、本出願の発明者は、M B 内でカルシウム感受性発光蛋白質、エクオリンの細胞質ゾル発現を促進するために P { G A L 4 } 系を使用した (R o s a y ら、1 9 9 7) 。エクオリン補因子、h c p - セレンテラジンを与えた無傷成虫脳 (1 0 3 Y - a e q 4 9 A ; 命名については表 1 参照) からの発光は、主として M B 萼から生じる。

30

【 0 0 4 5 】

G A L 4 指令ベータガラクトシダーゼ発現のパターンから予想されるパターンを有する活性エクオリンの細胞型特異的発現を、成虫キノコ体のケニヨン (K e n y o n) 細胞が明瞭に示される、P { G A L 4 } 系統 1 0 3 Y の環境で確認した。成虫脳 (1 0 3 Y - l a c Z) のクリオスタット前頭断面における G A L 4 指令ベータガラクトシダーゼ活性は、対のキノコ体の萼及び細胞体を明らかにする。2 . 5 μ M h c p - セレンテラジンを含むシュナイダー培地 (S i g m a) にひたし、B e r t h o l d N i g h t O w l C C D カメラ (ブルー) に 3 分間露出して、明るいフィールド画像のに二重焼き付けした、成虫脳全体における G A L 4 指令エクオリン活性は、萼を明瞭に示す。

40

【 0 0 4 6 】

図 1 a は 1 0 3 Y - a e q 4 9 A 脳におけるエクオリン活性のルミノメーター痕跡を示す。頭部の莢膜から脳を切除し、2 . 5 μ M h c p - セレンテラジンを含む単純な昆虫生理食塩水 (リンガー液) にひたした。分単位の平均周期でエクオリン活性の強い振動を認めた。アポエクオリン及びセレンテラジンからの活性エクオリンの形成に関して知られている時間依存性に一致して、振動は 3 0 分までに最大振幅に達し、1 5 時間以上にわたって持続しうる。作用の振幅は、同調して振動する多くの K C の重なり合った発光を意味する。

【 0 0 4 7 】

50

上記の特徴を持つ振動が、KC発現に基づいて選択したいくつかのP { G A L 4 } 系統の環境において認められた（例えば図1 b、c）。セレンテラジンを注入する頭部クチクラの小さなスリットを除いて手術外傷を受けていない、生体ハエにおいて振動を観察することができる（図1 e）。

【0048】

いずれの脳においても、周期、振幅及び波形は数時間にわたって有効に一定なままでありうる。振動は、P { G A L 4 } バックグラウンド及び雌雄に関わりなく、 3.24 ± 1.3 秒（ $n = 88$ ）の平均周期で起こる。

【0049】

下記に述べる実験は、P { G A L 4 } 系統30 Y及び117 Yの環境で実施した（図1 b、c；Yangら、1995；Tettamantiら、1997；Armstrongら、1998）。どちらも大きな割合の成虫KCを示し、一貫して高い振幅の振動を与える。いずれの場合も発現パターンは必ずしもキノコ体に限定されない。

【0050】

（実施例2）

ヒドロキシ尿素の除去及び発育時期

KCを選択的に除去しておいたG A L 4 - a e q ハエの試験によって、KC内で振動が起こることのさらなる証拠が提供された。各々のショウジョウバエキノコ体の2000 - 3000 KCがちょうど4つの神経芽前駆細胞から生じ、胚形成中期からさなぎ後期まで持続的に活性なままである。幼虫の孵化直後に、他のすべての神経芽細胞（1本の線）は静止状態になり、KCがヒドロキシ尿素（HU）のパルス供給によって除去されやすくなる。HU処理した動物は、90%以上の正常ケニオン細胞補体を欠いた健常成虫として生存し、その連合嗅覚学習能力が著しく損なわれる（de BelleとHeisenberg, 1994）。

【0051】

30 Y - a e q 系統（ $n = 8$ ）について図1 dに示すように、HU処理の効果は劇的である。117 Y - a e q 系統についても同様の結果が得られた。

【0052】

重要な割合の後期幼虫及びさなぎのKCがG A L 4 転写因子を強力に発現する117 Y - a e q 系統において、振動開始の時期を検討した。囲蛹殻形成後（APF）55時間から69時間までに振動が初めて検出可能になり、その後継続して存在した（図1 fとgを比較のこと）。これは成虫特異的なキノコ体要素、アルファ及びベータ小葉の起始の時点と一致する。

【0053】

（実施例3）

形質膜カルシウムチャンネル

緩衝液の置き換え（図2 a）あるいは1 mM E G T Aの添加（図示せず）によって、外部カルシウムの除去後振動は停止する。遊離体外カルシウムを加えると振動が回復する。コバルトは、ショウジョウバエ脳膜標本においてすべての電圧量ゲーティングカルシウムチャンネルを遮断することが報告されている（Pelzerら、1989）。ここでは1 - 10 mMの範囲で振動への段階的減少作用を持つことが認められる（図2 b）。

【0054】

脊椎動物のL型カルシウムチャンネルは、化学的に無関係な3つのクラスの化合物によって遮断される：フェニルアルキルアミン（例えばベラパミル）、1, 4 - ジヒドロピリジン（例えばニフェジピン）及びベンゾサイアゼピン（例えばジルチアゼム）で、各々がアルファ1（カルシウム伝導）サブユニット上の異なる部位に結合する。これに対し、ショウジョウバエ脳膜標本は、フェニルアルキルアミン（支配的であり、異例に高い親和性を持つ）及び1, 4 - ジヒドロピリジンに感受性のある独立したカルシウムチャンネルを含むと思われる（例えばPelzerら、1989）。ジルチアゼムについてはごくわずかな特異的結合が検出される。ミツバチのKCは、比較的高い濃度のベラパミルとニフェジピン

10

20

30

40

50

ンによって影響される ($100\text{ }\mu\text{M}$; Shaffer ら、1994) カルシウム電流を示す。

【0055】

本研究は、3つのクラスの薬剤すべてが他のショウジョウバエ系においてカルシウム電流を遮断するために使用される濃度 (Byerly と Leung, 1998; Gielow ら、1995; Gu と Singh, 1995) 又はそれ以下で振動振幅を有意に低下させる (図2c-e) ことを認めた。処理前と処理後に測定した振幅に基づいて作成した用量反応曲線は、ベラパミルについては $3\text{ }\mu\text{M}$ 、ジルチアゼムについては $10\text{ }\mu\text{M}$ に近い EC50 を示す (図2f)。3つの薬剤のいずれも、振動周波数には一貫した作用を及ぼさなかった。

10

【0056】

(実施例4)

カルシウムレベル振動への種々の薬剤の作用

ナトリウムチャネル

テトロドトキシン (TTX) はショウジョウバエ電圧量ゲーティングナトリウムチャネルの強力な遮断薬であり、従って神経電気活動の遮断薬である。ミツバチ KC は TTX 感受性ナトリウム電流を示す (Shaffer ら、1994)。TTX は、数サイクルの適用内で振動の停止を生じさせ (図3a)、その正確な時点は使用する濃度に依存する。介在期間後、再び TTX 濃度に依存して、非常に高い相対的振幅の間隔を置いた一連のバーストの形態で振動が再開する。各バーストの最初のピークは特に高い。基線カルシウム濃度の持続的な上昇を伴って、ナトリウムチャネル開放物質である $1\text{ }\mu\text{M}$ ベラトリジンにより、振動が排除される (図3b)。

20

【0057】

カリウムチャネル

その相対的寄与が細胞環境に依存する、ショウジョウバエにおけるいくつかの電圧量活性化カリウム電流の同定には、薬理学的判定基準が使用されてきた。4-アミノピリジン (4-AP) は、培養したショウジョウバエ幼虫の CNS ニューロンにおいて (Solc と Aldrich, 1988)、また培養ショウジョウバエ幼虫 KC (Wright と Zhong, 1995) 及び分離したミツバチ成虫 KC (Shaffer ら、1994) ではより適切に、迅速一過性電圧量ゲーティング電流 (IA 様) を遮断する。本研究では、4-AP が用量依存的に振動の振幅を低減させることが認められる (図4a; EC50 ~ $30\text{ }\mu\text{M}$)。同様に振動周期の用量依存的低減も認められる (図4e)。

30

【0058】

非 I_A 様ショウジョウバエ カリウムチャネルはすべて、酢酸テトラエチルアンモニウム (TEA; Gho と Maller t, 1986; Wu と Ganetzky, 1992) によって遮断されると思われる。本出願の発明者は、 $100\text{ }\mu\text{M}$ TEA が振動を排除することを認めている (図4h)。TEA に関する EC50 は ~ $70\text{ }\mu\text{M}$ である (図4b)。遅延整流電圧量ゲーティング電流 (I_K 様; Singh と Wu, 1989; Kraliz と Singh, 1997; Kraliz ら、1997) の遮断薬であるタクリンとキニジンは、振動の振幅と周波数の両方をより一層強力に低減させる (図4f, g; タクリンに関する EC50 は約 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、キニジンについては $2\text{ }\mu\text{M}$ である)。ミツバチ KC は、TEA に弱い感受性があるが、 $100\text{ }\mu\text{M}$ キニジンによって遮断される、遅延整流器型電流を示す (Shaffer ら、1994)。上記の3薬剤はそれぞれある程度他のイオンチャネル及び/又は他の神経学的に重要な分子を変調することができるので、これらの所見を4-AP 及びシェーカー (Shaker) に関して下記に述べるように突然変異体試験によって追跡した。

40

【0059】

シェーカー (Sh) 遺伝子座は電圧量ゲーティングカリウムチャネル α サブユニットの 4-AP 感受性サブクラスを規定する。Sh の生理的作用は、胚筋細胞、幼虫及びさなぎの筋における A 型カリウム電流の異常、神経活動及びシナプス伝導における付随したある程

50

度の欠損を含む（例えばHauglandとWu, 1990）。本出願の発明者はSh⁵突然変異の影響を検討した。通常はSh⁵バックグラウンドにおいて振動が起こったが（脳の30%が全く振動を生じなかった）、Sh⁺対照よりも4 - APに対して10倍感受性が低かった（図4a、d）。

【0060】

神経伝達物質及び修飾因子

他のいくつかの昆虫種における触角 - 系球体管線維（AGT - MB入力要素）はコリン作動性であり、培養したミツバチKCのカルシウム画像は、アルファ - ブンガロトキシンによって遮断されるアセチルコリン（ACh）及びニコチンのレセプタの存在を明らかにした（BickerとKreissl, 1994）。AChは振動の振幅を用量依存的且つ可逆的に漸次低減させる（図5a、b）。ニコチンのはるかに強力であり、1 μMで振動を完全に排除するのに十分であった（図5c）。

【0061】

KC樹状突起も、反復する外因性要因を通して阻害性のGABA（アミノ酪酸）作動性入力を受ける（Bickerら、1985；Groneberg, 1987）。1mM GABAは振幅と周期の両方を上昇させる（図5d）。GABAレセプタ拮抗物質であるピクロトキシンは反対の作用を持つ（図5e）。

【0062】

cAMP経路

アデニリルシクラーゼの活性化因子、フォルスコリンは、周期にはほとんど影響を及ぼさずに振動の振幅を低減する（図5f）。しかし、1mMジブチリルcAMPは無効であった。ルタバガ遺伝子は、キノコ体において高度に発現され、ショウジョウバエの学習と記憶における役割が明らかにされている（Hanら、1992）、カルシウム活性化アデニリルシクラーゼをコードする。rut1バックグラウンドにおける振動はフォルスコリンにほとんど感受性がなかった（図5g）。

【0063】

【表1】

系統	染色体の位置	参考文献
UAS _G -aeqA1	X染色体	本研究
UAS _G -aeq30D	30D	Rosayら、1997
UAS _G -aeq49A	49A	Rosayら、1997
UAS _G -aeqA8	CyO	本研究
UAS _G -aeqA10	染色体3	本研究
UAS _G -aeqA14	染色体3	本研究
P{GAL4}30Y	70E	Yangら、1995 Armstrongら、1997
P{GAL4}103Y	2D	Tettamantiら、1997
P{GAL4}117Y	34C	Tettamantiら、1997 Armstrongら、1998

本発明のアッセイを使用したさらなる化合物 / 突然変異の試験

表2はカルシウム振動に影響を及ぼす他の化合物を列記している。これらは、いくつかの既知の殺虫薬ならびに臨床治療用のいくつかの化合物を含む。健忘症遺伝子は、その活性が、少なくとも部分的に、cAMP経路を変調すると考えられるペプチドをコードする。

【0064】

【表2】

標的及び用途	化合物	神経活動への作用
a. 殺虫薬		
呼吸鎖		
NDH	ロテノン	B I, A D
SDH	チアプロニル	B I
脱共役剤	CCCP	B I, A D
神経刺激伝達		
AChエステラーゼ	パラオキシソ	A D, F I
GABA-Rチャンネル遮断薬	フィプロニル	A D, F I
グルタメート(C1-)R作用薬	イベルメクチンB1a	B I, A D
ニコチンACh R作用薬	イミダクロプリド	A D
	ニチアジン	A D
	ニコチン	A D
	スピノサド	A D
ナトリウムチャンネル開口薬	ベラトリン	B I
	ベラトリジン	B I
ナトリウムチャンネル修飾薬	レスメトリン	A D, F I
b. 人体治療薬		
AChエステラーゼ、アルツハイマー	タクリン	A D, F I
麻酔、疼痛	モルヒネ	A D, F I
抗白血病、抗腫瘍薬	ハリントニン	A D
眼科手術付随薬	アセチルコリン	A D
高血圧症、狭心症	ニフェジピン	A D
	ベラパミル	A D
	ジルチアゼム	A D
頻脈、不整脈	キニジン	A D, F I
嘔気、精神病	トリフルオペラジン	A D, B D
c その他		
アデニリルシクラーゼ	フォルスコリン	A D
カルシウムATPアーゼ	タプシガルジン	A D
カルシウムチャンネル拮抗薬	コバルト	A D
カルモジュリン拮抗薬	W7	A D
GABA-Rチャンネル作用薬	GABA	A I, F D
	ムシモール	A I, F D
GABA-Rチャンネル遮断薬	ピエロトキシン	A D, F I
ニコチン様ACh R拮抗剤	ジヒドロ-β-エリコジン	A I, F D
	メカミラミン	A I, F D
カリウムチャンネル拮抗薬	4-アミノピリジン	A D, F I
ナトリウムチャンネル拮抗薬	TEA	A D, F I
	テトロドトキシン	A D
突然変異	遺伝子産物	神経活動への作用
ルタバガ	アデニレートシクラーゼ	フォルスコリン非感受性
健忘症	神経ペプチド	A I
シェイカー	カリウムチャンネル	4-アミロリジン

略語：A = 振幅、F = 周波数、B = 基線レベル、D = 低下、I = 上昇、ACh = アセチルコリン、R = レセプタ

【0065】

(参考文献)

* Armstrong, J. と K. Kaiser, 1997、ショウジョウバエの脳のエンハンサートラップ試験、L. M. Houdebine 編集、トランスジェニック動物：作製と使用、Harwood Academic Publishers, p. 365 - 370。

【0066】

10

20

30

40

50

* Armstrong, D. J., de Belle, J. S., Wang Z. 及び Kaiser, K. (1998) キノコ体の変態; ショウジョウバエにおける連合学習及び記憶に関する神経基質の大規模再配列。Learning and Memory (印刷中)。

【0067】

* Bicker, G. と Kreissl, S. (1994) カルシウム画像は培養したキノコ体ニューロン上のニコチン様アセチルコリンレセプタを明らかにする。J. Neurophysiol. 71, 808 - 810。

【0068】

* Bicker, G., Schafer, S. 及び Kingan, T. G. (1985) ミツバチにおけるキノコ体フィードバック介在ニューロンはGABA様の免疫反応性を示す。Brain Res. 1985, 360, 394 - 397。

10

【0069】

* Brand, A. H. と Perrimon, N. (1993) 細胞運命を変化させ、優性表現型を生じる手段としての標的遺伝子発現。Development 118, 401 - 415。

【0070】

* Byerly L. と Leung, H. T. (1988) 胚培養におけるショウジョウバエニューロンのイオン電流。J. Neurosci. 8, 4379 - 4393。

【0071】

* Cobbold, P. H. と Rink, T. J. (1987) 細胞質遊離カルシウムの蛍光と生物発光の測定。Biochem. J. 248, 313。

20

【0072】

* Dani, J. と S. Smith, 1995. NMDA誘導のニューロン活性化による星状細胞カルシウム波のトリガリング: Ciba Found Symp., 188, 195 - 205。

【0073】

* de Belle J. S. と Heisenberg, M. (1994) キノコ体の化学的排除によって無効となる、ショウジョウバエにおける連合嗅覚学習。Science 236, 692。

30

【0074】

* Duffy, S. と B. MacVicar, 1995. 海馬切片内の星状細胞網におけるアドレナリン作動性カルシウム信号伝達: J. Neurosci., 15, 5535 - 5550。

【0075】

* Gho, M. と Mallart, A. (1986) ショウジョウバエの幼虫筋線維における2つの異なるカルシウム活性化K⁺電流。Pfluegers Arch. 407, 526 - 533。

【0076】

* Gielow, M. L., Gu, G - G. と Singh, S. (1995) ショウジョウバエ幼虫筋肉の電圧量依存性カルシウムチャネルの分解能と薬理学的分析。J. Neurosci. 15, 6085 - 6093。

40

【0077】

* Grapengiesser E., Gylfe E. 及び Hellman (1988) 膵ベータ細胞における細胞質Ca²⁺のグルコース誘導の振動。B Biochem Biophys Res Commun 1988 151(3): 1299 - 1304。

【0078】

* Grapengiesser E. (1996) グルコースは膵ベータ細胞において細胞質Na⁺の振動を誘導する。Biochem Biophys Res Commun 50

1996 226(3):830-835。

【0079】

* Gronenberg, W. (1987) ハチの脳におけるキノコ体のフィードバックニューロンの解剖学的及び生理学的特性。Exp. Biol. 46, 115-125。

【0080】

* Gu, G-G. と Singh, S. ショウジョウバエにおける心拍の薬理学的分析。J. Neurobiol. 28, 269-280。

【0081】

* Han, P-L., Levin, L.R., Reed, R.R. 及び Davis, R.L. (1992) 昆虫における学習についての神経中枢であるキノコ体でのショウジョウバエ ルタバガ遺伝子の選択的発現。Neuron 9, 619-627。

10

【0082】

* Haugland, F.N. と Wu, C.F. (1990) ショウジョウバエにおける幼虫筋カリウム電流へのシェーカー遺伝子座の遺伝子量効果の電位固定分析。J. Neurosci. 10, 1357-1371。

【0083】

* Kraliz, D. と Singh, S. (1997) ショウジョウバエにおけるタクリンによる遅延整流器カリウム電流の選択的遮断。J. Neurobiol. 32, 1-10。

【0084】

20

* Kraliz, D., Bhattacharya, A. 及び Singh, S. (1997) キニジン及び関連化合物によるショウジョウバエでの遅延整流器カリウム電流の遮断。J. Neurogenet. (印刷中)。

【0085】

* Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) グリーン蛍光蛋白質とカルモジュリンに基づく Ca^{2+} についての蛍光指示薬。Nature, 388(645):882-887。

【0086】

* Ogden, D., 1996。中枢ニューロンにおける細胞内カルシウム放出: Neurosci., 8, 281-291におけるセミナー。

30

【0087】

* Pelzer, S., Barhanin, J., Pauron, D., Trautwein, W., Lazdunski, M. 及び Pelzer, D. (1989) ショウジョウバエ脳膜における Ca^{2+} チャネルの多様性と新しい薬理学的特性。EMBO J. 8, 2365-2371。

【0088】

* Rohr, S. と Salzberg, B.M. (1994) パターン化した成長心臓細胞培養物における膜内外電圧量の多部位光学的記録(MSORTV): 細胞及び非細胞規模でのマイクロ秒解析による電気行動の評価。Biophys. J. 67, 1301。

40

【0089】

* Romoser VA, Hinkle PM, Persechini A (1997) カルモジュリン結合配列によって連結された2つのグリーン蛍光蛋白質変異体から成る指示薬の蛍光発光の Ca^{2+} 依存的变化の生存細胞における検出。新しいクラスの蛍光指示薬。J Biol Chem 1997 272(20):13270-13274。

【0090】

* Rosay, P., Davies, S., Yu, Y., Sozen, M.A., Kaiser, K. と Dow, J.A.T. (1997) ショウジョウバエ上皮における細胞型特異的カルシウム信号伝達。J. Cell. Sci. 110, 1683-1692。

【0091】

50

* Seymour - Laurent, K. と M. Barish, 1995。培養したマウス海馬ニューロンにおけるイノシトール 1, 3, 4 - トリスホスフェート及びリアノジンレセプタの分布と、アセチルコリン及びカフェイン誘導のカルシウム放出のパターン: J. Neurosci., 15, 2592 - 2608。

【0092】

* Shafer, S., Rosenboom, H. 及び Menzel, R. (1994) ミツバチのキノコ体からのケニヨン細胞のイオン電流。J. Neurosci. 14, 4600 - 4612。

【0093】

* Singh, S. と Wu, C - F. (1989) ショウジョウバエにおける4つのカリウム電流の完全な分離。Neuron 2, 1325 - 1329。

10

【0094】

* Solc, C. K. と Aldrich, R. W. (1988) ショウジョウバエの幼虫 CNS ニューロンにおける電圧量ゲーティングカルシウムチャネル。J. Neurosci. 8, 2556 - 2570。

【0095】

* Tettamanti, M., Armstrong, J. D., Endo, K., Yang, M. Y., Furukubo - Tokunaga, K., Kaiser, K. 及び Reichert, H. (1997) 連合学習と記憶に関する脳中枢である、ショウジョウバエ キノコ体の初期発生。Dev. Genes and Evol. 207, 242 - 252。

20

【0096】

* Wang X と Gruenstein E I (1997) 皮質ニューロンにおける同調 Ca²⁺ 振動の機序。Brain Res 767 (2): 239 - 249。

【0097】

* Woods, N., K. Cuthbertson 及び P. Cobbold, 1986。ホルモン刺激した肝細胞における細胞質遊離カルシウムの反復する一過性上昇: Nature, 319, 600 - 602。

【0098】

* Wright, N. J. と Zhong, Y. (1995) lacZ 発現によって同定した培養ショウジョウバエ キノコ体ニューロンにおける K⁺ 電流の特性付けと cAMP 依存性変調。J. Neurosci. 15, 1025 - 1034。

30

【0099】

* Wu, C - F. と Genetzk, B. (1992) ショウジョウバエにおけるイオンチャネルの神経形成試験。「イオンチャネル」第3巻より (T. Narahashi 編集)、Plenum Press, New York, p. 261 - 314。

【0100】

* Yang, M. Y., Armstrong, D. J., Vilinsky, I., Strausfeld, N. J. 及び Kaiser, K. (1995) エンハンサートラップ発現パターンによるショウジョウバエ キノコ体の細別。Neuron 15, 45 - 54。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ショウジョウバエのキノコ体におけるエクオリン活性のルミノメーター痕跡を示す。発光は、(a) セレンテラジン添加時から 103 Y - aeq の成虫脳; (b) 117 Y - aeq、成虫脳; (c) 30 Y - aeq、成虫脳; (d) 30 Y - aeq、HU 切除成虫脳; (e) 117 Y - aeq、ハエ全身; (f) 117 Y - aeq、早期さなぎ脳; (g) 117 Y - aeq、後期さなぎ脳を cps × 10⁻¹ で表わしている。

【図2】 図2はカルシウムチャネルの薬理学を示す。117 Y - aeq 成虫脳の代表的痕跡である。水平線は5分間を表わす。(a) カルシウム不含のリンガー液、(b) コバルト、(c) ベラパミル、(d) ニフェジピン及び (e) ジルチアゼムの作用。(f) L

50

型カルシウムチャネルの化学的に独立した遮断薬である、ベラパミル（フェニルアルキルアミン）とジルチアゼム（ベンゾサイアゼピン）についての用量反応。

【図3】 図3は、電圧量ゲーティングナトリウムチャネルの修飾因子のカルシウム信号伝達への作用を示す。117AY-a eq成虫脳のa) テトロドトキシン（TTX）、b) ベラトリジン処理の作用。ベラトリジンはナトリウムチャネル開放物質である。

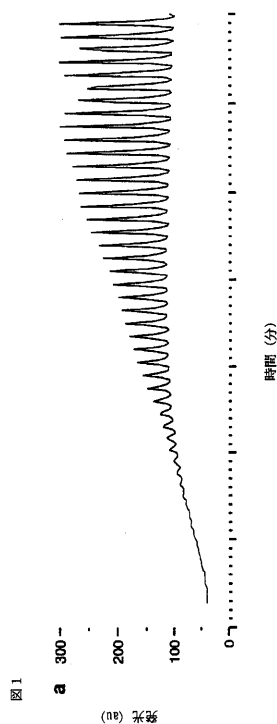
【図4】 図4は、細胞質カルシウム振動への電圧量ゲーティングカリウム遮断薬の作用を示す117Y-a eq成虫脳の代表的痕跡である。水平線は5分間を表わす。(a) 4-A P、タクリン、(b) TEA、キニジン、(c) 4-A Pは迅速一過性 I_A （シェーカー様）電流の遮断薬である、(d) シェーカー突然変異体（Sh⁵）は電圧量ゲーティングカリウムチャネルサブユニットの4-A P感受性サブクラスが欠如している、(e) 振動周期への4-A Pの作用、(f) タクリン及び(g) は遅延整流器の I_K 電流を遮断する、(h) TEAは I_K と迅速カルシウム活性化電流、 I_{CF} の両方を遮断することが示されている。

10

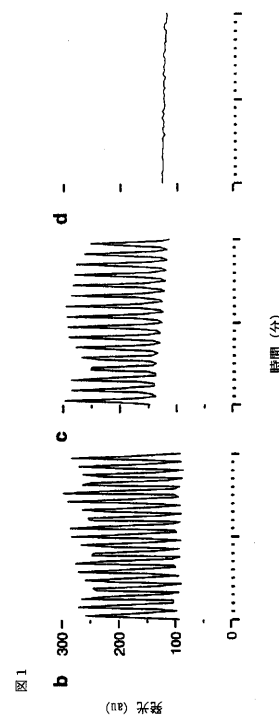
【図5】 図5は、神経伝達物質レセプタ及びcAMP第二メッセンジャー経路に関して活性な試薬のカルシウム信号伝達への作用を示す。117AY-a eq成虫脳の代表的痕跡である。水平線は5分間を表わす。アセチルコリンレセプタの薬理学：(a) アセチルコリンによる振動振幅の可逆的低減、(b) アセチルコリンに関する用量反応、(c) 1 μ Mのニコチンは振動を完全に排除するのに十分である。カルシウム振動におけるGABA作動性ニューロンの役割：(d) GABAは振幅と周期の両方を増大させる、(e) GABAレセプタ拮抗物質であるピクロトキシンは反対の作用を持つ。cAMP第二メッセンジャー経路に関して活性な試薬のカルシウム伝達経路への作用：(f) フォルスコリンは野生型環境では振動の振幅を低下させる、(g) しかしルタバガ突然変異体の背景では(rut1)より有効でない。ルタバガ突然変異体はカルシウム活性化アデニルシクラーゼを欠如している。

20

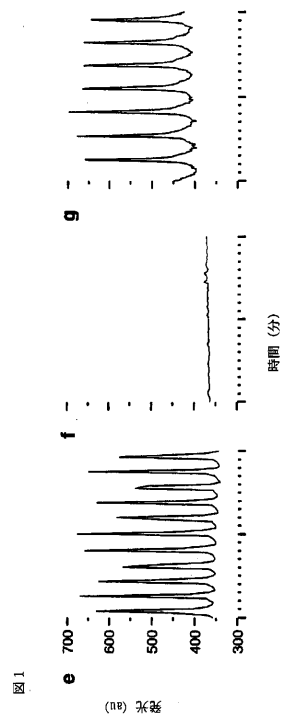
【図1a】



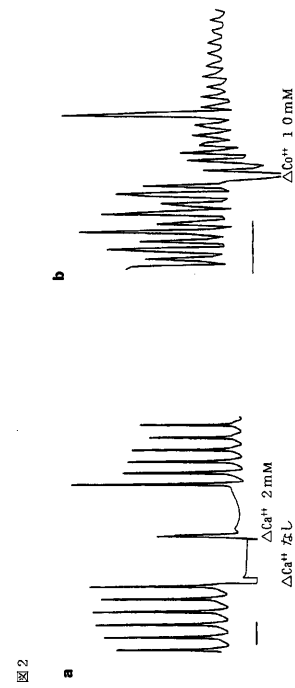
【図1b - 1c - 1d】



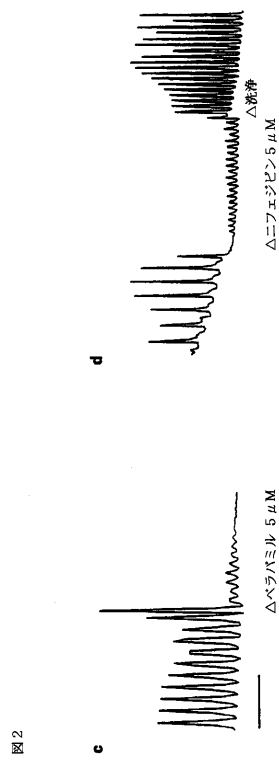
【図 1 e - 1 f - 1 g】



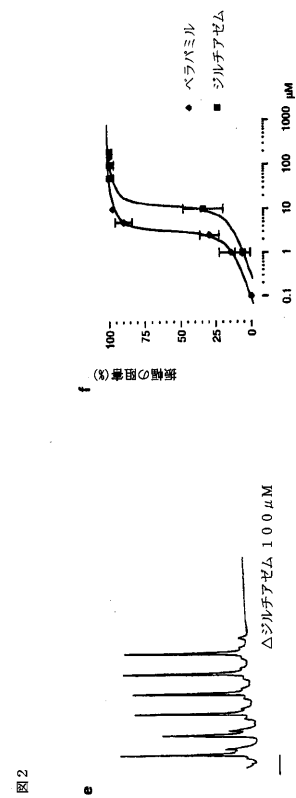
【図 2 a - 2 b】



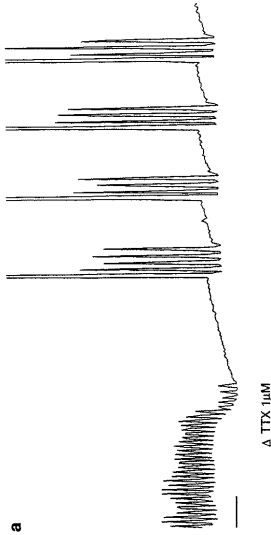
【図 2 c - 2 d】



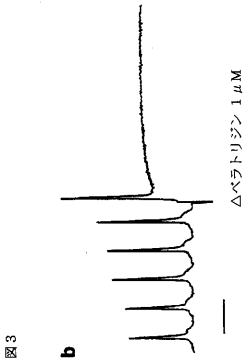
【図 2 e - 2 f】



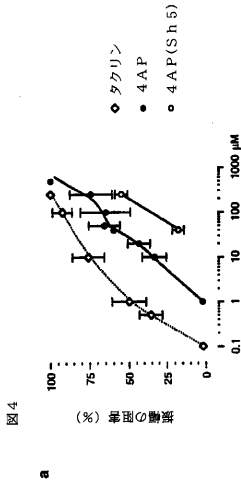
【図 3 a】



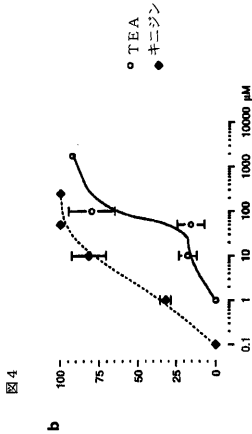
【図 3 b】



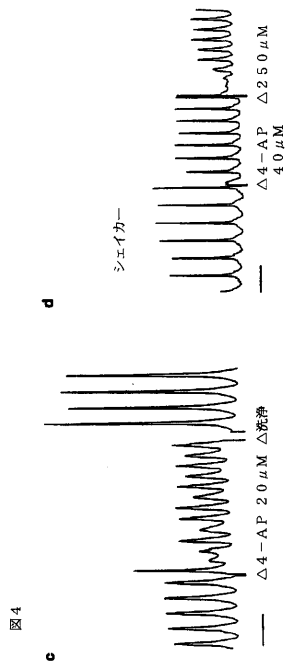
【図 4 a】



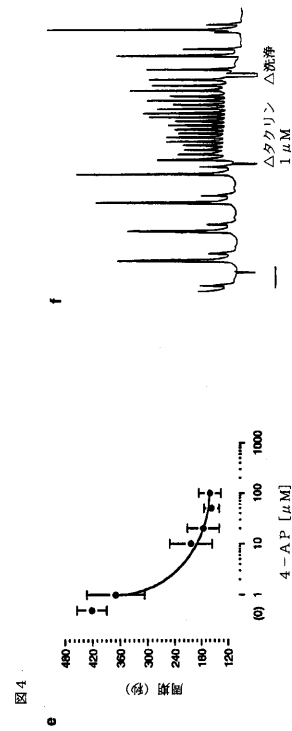
【図 4 b】



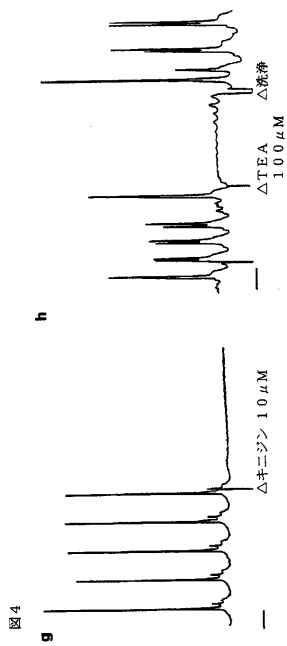
【図 4 c - 4 d】



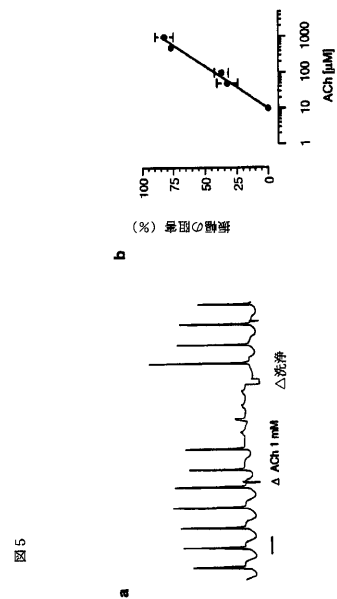
【図 4 e - 4 f】



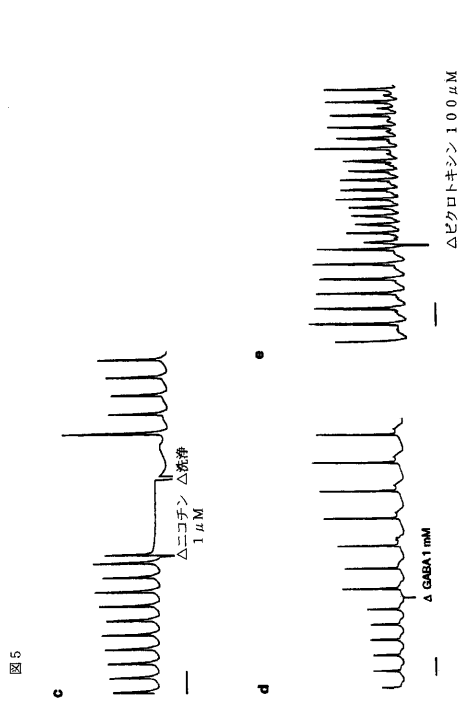
【図 4 g - 4 h】



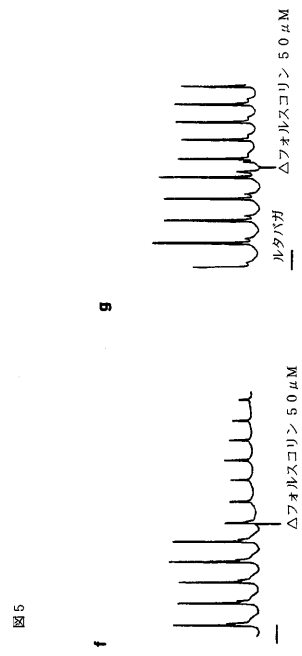
【図 5 a - 5 b】



【図 5 c - 5 d - 5 e】



【図 5 f - 5 g】



フロントページの続き

(72)発明者 ロゼー、 フィリップ

フランス国 エフ - 3 9 2 3 0 サン ラレン (番地なし)

(72)発明者 アームストロング、 ジェイムズ ダグラス

イギリス国 ジー 2 0 8 ビービー グラスゴウ オラン プレイス 2 9

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特開平 0 8 - 2 3 1 4 2 9 (J P , A)

国際公開第 9 3 / 0 1 5 1 8 4 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/50

G01N 33/15

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAplus(STN)