



Title	中枢神経系のプロテインキナーゼC細胞内移動における Zn^{2+} の役割に関する研究
Author(s)	江藤, 勸
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3085205
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏名・(本籍)	江藤 勸
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 9718 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	中枢神経系のプロテインキナーゼC細胞内移動における Zn^{2+} の役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎 (副査) 教授 真弓 忠範 教授 三村 務 教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

プロテインキナーゼC (PKC) は、近年発見された Ca^{2+} 、リン脂質依存性の蛋白質リン酸化酵素であり、多くの組織に広く分布している。中でも中枢神経系の細胞に多く含まれており、本酵素の神経機能への関与が示唆されている。最近、記憶の分子機構の基礎課程である long-term potentiation (LTP) の維持にPKCの活性化が必須であることが明らかとなり、PKCが学習や記憶に重要な役割を担っていることが示された。LTPとは、高頻度の電気刺激によりシナプスの伝達効率が長期間上昇する現象であり、この現象の誘発には、興奮性アミノ酸受容体のサブタイプのひとつであるNMDAタイプ受容体の活性化が必要であることも知られている。しかし、NMDA受容体刺激からPKCの活性化に至る系の詳細は、未だ明らかになっていない。一方、最近になって興奮性アミノ酸神経伝達との関連から Zn^{2+} の神経生理学的意義が注目されている。また、近年明らかになったPKCの一次構造中には、“DNA-zinc finger” と呼ばれる Zn^{2+} の結合構造に類似した部分が存在しており、 Zn^{2+} とPKCとの関連についても興味を持たれている。中枢神経系においては、特に高濃度の Zn^{2+} が存在しているがその生理的役割の詳細は不明なままである。そこで本研究では、中枢神経系における興奮性アミノ酸受容体への刺激とPKCの活性化との関連、さらに内在性の Zn^{2+} の関与を明らかにする目的で種々の検討を行なった。

生理的条件下で、PKCは細胞質に多く存在しており、活性化に際して細胞質から細胞膜への移動を伴うことが知られていることから、NMDA受容体刺激とPKCの移動との関連をラット海馬の切片を用いて検討した。切片を薬物で処置した後、細胞質分画、細胞膜分画を調製し、それぞれの分画についてPKCに特異的な、 $[^3H]$ phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu) 結合を測定した。成熟したラット

の海馬切片においては高濃度のNMDA刺激によっても $[^3\text{H}]$ PDBu結合の変化は認められなかったが、幼若ラットの海馬切片においては、 $100\mu\text{M}$ のNMDA刺激により細胞質分画での著名な $[^3\text{H}]$ PDBu結合の減少とそれに伴った膜分画での結合の増加が認められた。PKCのモノクロナール抗体を用いたWestern blottingの結果、およびPKC活性についても細胞質分画での減少と膜分画での増加が認められたことから、NMDA刺激による $[^3\text{H}]$ PDBu結合の変化は、PKCの細胞内移動を反映していると考えられた。他の興奮性アミノ酸受容体サブタイプのアゴニストであるカイニン酸やキスカル酸では、PKCの移動は認められなかったが、生体内でのNMDA受容体のアゴニストであるグルタミン酸は $200\mu\text{M}$ 以上の濃度でPKCの移動を引き起こした。

成熟動物でも、モルモット大脳皮質により調製したシナプス前部と後部を多く含む標品であるシナプトニューロソームにおいて、NMDAの添加によりPKCの移動が認められた。カイニン酸やキスカル酸ではPKCの移動が認められないことと、NMDA受容体阻害薬を用いた実験結果から、この系におけるPKCの移動は、NMDA受容体を介したものであると考えられた。また、 Ca^{2+} の取り込みやイノシトールリン脂質(PI)代謝系に対する興奮性アミノ酸の影響を検討した結果より、NMDA受容体刺激によるPKCの移動はPI代謝の促進を直接介したのではなく、NMDA受容体の活性化に伴ったシナプトニューロソーム内への、 Ca^{2+} の流入により引き起こされていることが明らかとなった。またこのことより、シナプトニューロソームが成熟動物の神経組織において興奮性アミノ酸神経伝達の検討をする際に有益な標品であることが示された。

次に、NMDAによるPKCの細胞内移動に対する Zn^{2+} の役割を、膜透過性で、 Zn^{2+} に対して高い親和性をもつ重金属イオンのキレーターであるTPENを用いて検討した。TPENは $100\mu\text{M}$ の濃度で、モルモット大脳皮質シナプトニューロソームにおけるNMDAによるPKCの移動を顕著に抑制した。また、TPENは幼若ラット海馬切片においてもNMDAによるPKCの移動に対して同様の抑制作用を示した。予め、TPENを同濃度の Zn^{2+} と混合し、両者の複合体を形成させると、このTPENの抑制作用は消失した。これに対してTPENを Ca^{2+} で処置してもTPENの抑制作用は変化しなかった。またTPENのキレート作用は Zn^{2+} に選択的で Ca^{2+} をほとんどキレートしないことが明らかとなった。さらに、シナプトニューロソーム内への Ca^{2+} の取り込みやPKC活性にはTPENは影響しなかった。以上のことから、NMDA受容体刺激によるPKCの移動に対するTPENの抑制作用は、内在性の Zn^{2+} のキレートによることが示された。

また、NMDA受容体の刺激を介さずに、シナプトニューロソーム内への Ca^{2+} の流入を引き起こすカルシウムイオノフォアによるPKCの移動に対しても、TPENは抑制作用を示した。一方、シナプトニューロソームのホモジネートに Ca^{2+} 及び Zn^{2+} を添加して引き起こしたPKCの移動において、TPENは Zn^{2+} に対しては濃度依存的にPKCの移動を抑制したが、 Ca^{2+} に対する作用はみられなかった。単独ではPKCの移動を起こさない濃度の Zn^{2+} をホモジネートに添加すると、低濃度の Ca^{2+} によるPKCの移動を増強し、TPENはこの増強作用を完全に抑制した。これらの結果より、 Zn^{2+} は高濃度においては単独でPKCの移動を引き起こし、生理的濃度では低濃度の Ca^{2+} によるPKCの移動を増強していることが示された。

以上より、中枢神経系においては、NMDA受容体刺激によりPKCの細胞内移動が引き起こされ、内在性の Zn^{2+} はこれに深く関与しており、NMDA受容体、PKCそして Zn^{2+} の3者が興奮性アミノ酸神経伝達の一端を担っている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は中枢神経系における興奮性アミノ酸受容体への刺激とプロテインキナーゼCの活用化の関連さらに内在性の Zn^{2+} の関与について新しい知見を加えたもので、薬学博士の称号を与えるに値するものである。