

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, 勧
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

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 Zn²⁺の役割に関する研究

1991年

江 勧 藤

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 Zn²⁺の役割に関する研究

1991年

江藤 勧

緒			論	•••			••••		.,,,,,,				••••••								*****				*****	r 43 8 6 <i>8</i> 44	##3 9 16886	92 BI	1
本			論	•••		*****																		******		*****	,	***	2
第	I	章		幼	若	ラ	ツ	ト	海	馬	切り	片に	こお	らけ	トる	N	Μ	D	Α	受约	容体	本束	间滂	なに	よ	る			
				プ		テ	イ	ン	キ	ナ・	·	ゼ(; σ)斜	胞	内	移	動		******			******						2
	第	1	節		プ		テ	イ	ン	キ	ナ・	+	ž C	; <i>0</i> ,)細	胞	内	移	動	の	評亻	断な	こ良	す	る				
					基	礎	的	検	討				,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			*****			*****		****								2
	第	2	節		幼	若	ラ	ツ	<u>ኑ</u>	海.	馬	切片	FK	æ	らけ	5	N	Μ	D	A	受彳	容体	本本	刂滶	に	よる	5		
					プ		テ	イ	ン	キ	ナ・	- 1	ŽC	; σ)移	動	Ø	諸	性	質	****								7
	第	3	節		考	察	と	小	括			•••••						••		••••		*****	******	FC 36 32\$1		;		** 26 *	12
第	Π	章		成	熟	Ŧ,	ル	Ŧ	ッ	<u>ኑ</u>	大	凶及	と質	()	ノナ	プ	1	=	ユ	•••••		ソ -	- 2	くた	お	け	る		
				Ν	Μ	D	A	受	容	体	刺	敵に	- 1	: 7	ップ	'П	テ	イ	ン	牛	ナ・	- +	ž (ርወ	移	動			14
	第	1	節		成	熟	動	物	ற	神	経	組織	良に	: ŧ	らけ	る	Ν	Μ	D	A	受彳	容位	本束	刂滶	にに	ቴ	る		
					プ		テ	イ	ン	牛	ナ	- 1	ŽC	; Ø)移	動	に	関	す	3	基码	楚白	勺椅	討				****	14
	第	2	節		モ	ル	Ŧ	ッ	ト	大	脳	皮質	E Ì	ノナ	ープ	' Ի	Ξ	ユ		D	ソ・	- 1	らに	こお	け	る			
					Ν	M	D	A	受	容	体	刺汤	なに	: J	、る	プ	' ப	テ	イ	ン	+	ナ・	- t	ž C	ወ				
					細	胞	内	移	動	<i>ດ</i> :	機	構	*****		9 .				A # X + - E									** * * *	20
	第	3	節		興	奮	生	P	Ξ	ノ	酸	受彳	≶伯	大東	川湯	にに	対	す	る	脳	代書	谢ī	女著	ş 薬	Į				
					ib	ud	il	as	t	Ø	影	響					**									******			26
	第	4	節		考	察	と	小	括			******			40 0 JO 1			*****			******								29
第	Ш	章	1	フ	ם י	テ	イ	ン	キ	ナ	·	ゼ(C Ø)斜	田胞	内	移	動	に	お	け	3							
				内	在	性	Z	n	2 +	の	関	与				• d d) < u y			•••••										32
	第	1	節	i	N	М	D	Α	に	よ	る	プロ	コラ	- 1	ィン	/ キ	ナ	· •	ゼ	С	の7	8	助に	こ対	す	る			
					\mathbf{Z}	n	2 +	キ	ν	•	1	薬'	ΓE	Þ	E N	ற	抑	制	作	用	••••						*******	" ,	32
	第	2	節	i	Т	Ρ	E	Ν	の	作	用	機	あん	二月	司す	5	検	討						*****	*****			*****	36
	第	i 3	節	İ	2	価	力	チ	才	ン	に	よる	5 7	1 ธ	コラ	- 1	ン	+	ナ		ゼ	С	の毛	多動	に	対	する	•	
					Т	Ρ	E	N	ற	作	用																		39
	笰	; 4	節	i	考	察	と	小	括		** • • • *																		44
総	括	と	考	察	Ę		•••••			•••••																			46
譲	F		辞																										49
弓	用	忟	(献	<u>.</u>						,										******									50

目 次

.

緒論

プロテインキナーゼC (PKC) は1977年に西塚等¹⁾により発見された、 C a 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 布していることが知られている。生理的条件下で本酵素は細胞質に多く存在 しているが、リン脂質依存性であるため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明らかにされた²⁻⁶⁾。またPKCは特に、中枢神経系の 細胞に多く含まれていることから、神経機能への関与が考えられ、様々な研 究がなされてきた。その結果、記憶の分子機構の基礎過程であるlong-term potentiation (LTP)の維持に必須であることが明らかとなり^{7,8)}、PK Cが学習や記憶に重要な役割を持っていると考えられるようになった。LT P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にわたって上 昇する現象であり⁹⁾、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 N-methyl-D-aspartate (NMDA)タイプ受容体の活性化 が必要であることもよく知られている^{10,11)}。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。

また最近になって、興奮性アミノ酸神経伝達との関連からZn²⁺の神経生 理学的意義が、注目を集めている。種々の検討から、Zn²⁺によりNMDA 受容体とカップルしたCa²⁺チャネルが阻害されること¹²⁾や、NMDA刺激 により結合蛋白に結合したZn²⁺が遊離すること¹³⁾等が報告されている。さ らに、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Zn²⁺の結合構造に類似した部分が存在しており¹⁴⁾、PKC活性が Zn²⁺により影響を受けること¹⁵⁻¹⁷⁾も知られている。またCsermely等はT リンパ球においてPKCの細胞内移動に内在性のZn²⁺が必須であることを 報告している¹⁸⁾。神経系には特に高濃度のZn²⁺が存在している^{17、19、20)} が、その機能的役割の詳細は不明なままである。

そこで本研究においては、このNMDA受容体、PKCそして乙n²⁺の3 者の関連を追求する目的で種々の検討を行なった。

本 論

第 I 章 幼若ラット海馬切片における NMDA受容体刺激による プロテインキナーゼCの 細胞内移動

第1節 プロテインキナーゼCの細胞内移動の評価に関する基礎的検討

PKCは生体内で通常細胞質に多く存在しているが、その活性化にはリン 脂質が必要であるため、活性化に際して細胞質から細胞膜への移動を伴うこ とが明らかにされている²⁻⁶⁾。そこでNMDA刺激とPKCの活性化機構と の関連を追求する目的で、まずNMDA受容体刺激による細胞質から細胞膜 へのPKCの移動が検出できる実験系を検索した。

一般に、神経組織としての機能を維持させたまま、 in vitro での実験を行 なう場合、切片の系がよく用いられている。そこで、LTP等の実験にも用 いられているラット海馬の切片におけるPKCの移動に対するNMDA受容 体刺激の影響を検討した。

細胞膜におけるPKCはCa²⁺依存性に膜に結合したものとCa²⁺非依存 性に膜に挿入されたものの2つの状態で存在し、それぞれ異なった役割を持 っていると考えられている²¹⁻²³⁾。そこで本実験においては細胞膜分画とし てこの2つの状態のPKCの対応するEGTA-Ext.とCHAPS-Ext.の2つの分画を 調製し、細胞質と合わせて3つの分画について、PKCに特異的に結合する [³H]phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) 結合を測定した(Fig. 1)。

Hippocampal slices (0.25 mm)	homogenized in Tris-HCl buffer
↓	\$\Phi\$ 270,000 \times g, 15 min
preincubation (37 ℃, 60 min)	pellet supernatant (Cytosol)
↓	↓
reaction with drugs	resuspended in EGTA buffer
↓ (37 ℃, 30 min)	♀ 270,000×g, 15 min
washed with KR buffer	pellet supernatant (EGTA Ext.)
	↓ resuspended in CHAPS buffer ↓ 270,000×g, 15 min supernatant (CHAPS Ext.)

Fig. 1. Procedure for reaction of slices and preparation of three fractions - 2 -

実験には、1週齡(体重 10-15 g)、または10週齡(体重 180-250 g)の Sprague-Dawly系の雄性ラットを用い、Fig.1に示したプロトコールに従った。 即ち、海馬を摘出後、Mcllwain tissue chopperを使用して厚さ250μmの切片 を作成し、95%02/5% CO2で通気したKrebs-Ringer緩衝液(KR): 124 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 2.4 mM MgSO₄, 3 mM CaCl₂, 1.25 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glucose (pH 7.4)中で、37℃で60分間インキュベートした。MgSO4を除 いた KR (Mg-free KR)で切片を洗浄してから薬物を加えて37℃で30分間 Mgfree KR 中で反応後、氷冷したMg-free KRで洗浄して薬物を除去し、freeの Ca²⁺を1µM²⁵)とした緩衝液(25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100µM leupeptin, 815.8µM CaCl₂, 1 mM EGTA) 中でホモジナイズした。 このホモジネートを 270,000 x gで15分間遠心分離して細胞質分画(Cytosol)である上清を得た後、 生じた沈澱をEGTA緩衝液: 25 mM Tris-HCl, 100µM leupeptin, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA (pH 7.6)でサスペンドし、さらに遠心して上清(EGTA Ext.)と沈澱 に分離した。この沈澱をさらに 5 mM CHAPSを含むEGTA緩衝液中にサスペンド し、4℃で30分間静置して可溶化した後、遠心分離して上清(CHAPS Ext.)を得 た。

[³H] PDBu結合の測定

それぞれの分画に対する[³H]PDBu 結合の測定はTanaka等の方法²⁶⁾に従い、 200µlの反応緩衝液:20 mM Tris-maleate, 100 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 100 µg/ml phosphatidylserine, 30 nM [³H]PDBu, 0.5 % dimethylsulfoxide (DMSO) (pH 6.8) に 50μ lのサンプルを加え、30℃で20分間インキュベートした 後、4 mlの氷冷した0.5 % DMSOを添加して反応を停止させた。この反応液を 0.3 % polyethyleneimineに浸したガラスフィルター(Whatman GF/B)で吸引ろ 過し、さらに0.5 % DMSOで洗浄後、乾燥してフィルター上の放射活性を測定 した。この値から非特異的結合として非標識の 15μ M phorbol 12-myristate 13-acetate存在下で測定した値を差し引いて特異的結合を求めた。結果はそ れぞれの分画の特異的[³H]PDBu結合を、ホモジネートから求めた全結合量に 対するパーセンテージで示した。 プロテインキナーゼC活性の測定

PKC活性の測定は、Kikkawa等の方法²⁷⁾を若干変更して行なった。即ち、 反応液:20 mM Tris-HCl, 5 mM magnesium acetate, 200µg/ml H₁ histone, 1.25 mM CaCl₂, 4µg/ml phosphatidylserine, 0.8µg/ml dioleine, 10µM [γ-³²P]ATP (pH 7.5)に、25µgのサンプルを加えて、30℃で3分間インキュ ベートして、H₁ histoneに³²Pを取り込ませた。反応の停止は氷冷した25 % トリクロロ酢酸の添加で行ない、0.45µmのフィルターでろ過してフィルター 上の³²Pを測定した。

Western blotting

各分画のWestern blottingは、Laemmli等の方法²⁸⁾に従い 10 % のゲルで SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行ない、 $50 \mu g$ のサンプルを分離した後、 Towbin等の方法²⁹⁾によりニトロセルロース膜に転写した。膜を5 %のインス タントミルクを含むTBS-T:20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 (pH 7.6) で1時間インキュベートした後、マウスより調製したPK Cの各サ ブタイプに対するモノクロナール抗体で2時間、ビオチン化した抗マウス抗 体で20分間、ストレプトアビチンーアルカリフォスファターゼ複合体で20分 間、順次インキュベートした。アルカリフォスファターゼの基質溶液: 100 mM diethanolamine-HCl, 5 mM MgCl₂, nitro-blue tetrazolium, 5-bromo-4-chrolo-3-indolyl phosphate (pH 9.5)を加えて発色させニトロセルロース 膜上のPKCを同定した。

蛋白質の定量法

蛋白質の定量はLowry等の方法³⁰⁾に従って行なった。

実験結果

10週齢の成熟ラットの海馬切片においては、100µMおよび1 mMの濃度でも NMDA刺激による細胞質および2つの膜分画での[³H]PDBu結合の変化は認 められなかった。これに対して1週齢の幼若ラットの切片について検討を行な ったところ、100µMのNMDAにより著名な細胞質での[³H]PDBu結合の減少 と、それに伴った2つの膜分画での増加が認められた(Table 1)。

Table 1. Effect of NMDA on distribution of [3H]PDBu bindingsites in immature and mature rat hippocampal slices

	[³	[³ H]PDBu binding (% of total binding)							
	C3	rto	sol	EGTA	Ext.	CHAPS Ext.			
Immature (1 Week)									
None	43.1	±	0.6	$28.0 \pm$	1.2	29.0 ± 1.7			
100μM NMDA	7.6	±	1.1***	48.2 ±	1.7***	44.1 ± 0.6***			
Mature (10 We	eks)								
None	58.0	±	1.5	15.8 ±	0.9	26.2 ± 0.6			
100μM NMDA	59.5	±	2.3	16.8 ±	3.0	23.7 ± 0.7			
1 mM NMDA	60.9	±	1.7	14.7 ±	2.8	24.3 ± 1.7			

Values are means \pm S.E.M. of four experiments. Total homogenate binding (pmol/mg protein) are determined: None (1W), 2.88 \pm 0.32; 100 μ M NMDA (1W), 2.56 \pm 0.24; None (10W), 6.54 \pm 0.56; 100 μ M NMDA (10W), 6.36 \pm 0.42; 1 mM NMDA (10W), 6.47 \pm 0.47. *** P < 0.001 versus None.

PKCにはDNAクローニングの結果から7つ以上のisozymeが存在してい ることが認められており²²⁾、その内3つのタイプが分離精製されている²³⁾。 この3種のPKCのisozymeに対するモノクロナール抗体を用いて、Western blottingを行ない、幼若ラット海馬切片におけるNMDA受容体刺激による PKCの移動を検討した。PKCタイプIはほとんど存在していなかったが、 タイプII、IIは多く認められ、また海馬切片を100µMのNMDAで処置する ことにより、PKCのタイプII、IIにおいて細胞質分画での減少とそれに対 応した膜分画での増加が認められた(Fig. 2)。

PKC活性についても[³H]PDBu結合およびWestern bolttingの結果と同様、 海馬切片をNMDA処置により細胞質での減少と2つの膜分画での増加と顕 著な変化が認められた(Table 2)。



Ext.

Ext.

Fig. 2. Immunoblot analysis of NMDA-induced translocation of protein kinase C. Cytosol, EGTA Ext. and CHAPS Ext. fractions (50 μ g of protein each) were separated by SDS-PAGE (10 % gel) and transferred to nitrocellulose membrane. Each membrane were analyzed by immunoblotting with type I-, II-, and III-specific antibodies.

Table 2. Effect of NMDA on distribution of protein kinase C activity in immature rat hippocampal slices

	Protein kinase C activity (% of total activity)							
	Cytosol	EGTA Ext.	CHAPS Ext.					
None 100µM NMDA	63.4 ± 1.5 17.3 ± 0.8***	17.3 ± 0.7 $47.5 \pm 1.3^{***}$	19.3 ± 0.9 $35.2 \pm 1.6^{***}$					

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. None and NMDA-treated total homogenate activity are 3.45 \pm 0.26 and 3.19 \pm 0.20 (nmol Pi/3 min/mg protein), respectively. *** P < 0.001 versus None. 第2節 幼若ラット海馬切片におけるNMDA受容体刺激によるプロテイン キナーゼCの移動の諸性質

前節において、幼若ラット海馬切片でNMDA受容体刺激によるPKCの 移動が検出できることが明らかとなった。本節では、PKCの細胞内移動を [³H]PDBu結合を測定することで表し、NMDA受容体刺激によるPKCの移 動の諸性質を検討した。

実験方法

本節においてはすべて体重10-15 gの1週齢のSprague-Dawly系雄性ラット を使用した。切片の反応、各分画の調製及び[³H]PDBu結合は前節と同様の方 法で行なった。

実験結果

NMDA以外の興奮性アミノ酸受容体のサブタイプの選択的アゴニストで あるカイニン酸(KA) およびキスカル酸(QA) は100 μ Mの濃度でPKC の移動を起こさなかった(Fig. 3)。また生体内でのNMDAタイプ受容体の アゴニストであるグルタミン酸(G1u)が100 μ Mの濃度でPKCの移動を 引き起こさなかった(Fig. 3)ことからG1uの用量反応を検討したところ、 NMDAが20 μ Mの濃度から有意なPKCの移動を引き起こしたのに対して、 G1uでは200 μ M以上の濃度で有意な変化を引き起こした(Fig. 4)。

次にNMDAによるPKCの移動に対して、NMDA受容体とイオンチャ ネルとの複合体に影響を与える薬物の作用を検討した(Fig. 5)。NMDA受 容体の選択的拮抗薬である 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) や イオンチャネル内部に結合する阻害薬 ketamine はそれぞれ500 μ Mの濃度で 100 μ M NMDAによるPKCの移動を完全に抑制した。また外液の KB から C a ²⁺を除くとNMDAによるPKCの移動は認められなくなった。これに 対して膜電位依存性にチャネルをブロックする10 mMのMg²⁺やMg²⁺とは異 なった部位に作用してNMDA受容体複合体を阻害する1 mMのZn²⁺はNM DAによるPKCの移動に影響を与えなかった。受容体に対するNMDAの 親和性をあげることで、NMDA受容体を活性化させるグリシンもPKCの 移動には影響しなかった(Fig. 6)。



Fig. 3. Effect of excitatory amino acids on distribution of $[{}^{3}H]PDBu$ binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 100 μ M glutamate (\underline{M}), 100μ M NMDA (\underline{M}), 100μ M kainate (\underline{M}) or 100μ M quisqualate (\underline{M}). Cytosol, EGTA Ext. and CHAPS Ext. fractions were prepared and then $[{}^{3}H]PDBu$ binding to each fractions was determined, independently. Results are shown as the percentage of $[{}^{3}H]PDBu$ binding in the each fractions to the total binding. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus None.



Fig. 4. Dose response curve of NMDA- and glutamate-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were incubated for 30 min at 37 ℃ with several concentrations of NMDA (○) and glutamate (●). Values are means ± S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus control.</p>



Fig. 5. Effect of NMDA antagonists on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in immature rat hippocampal slices.
Slices were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 100 μ M NMDA (2022) with 10 mM MgSO₄ (2022), 1 mM ZnCl₂ (2022), 500 μ M APV (2022) or 500 μ M ketamine (2022), or in the presence of 100 μ M NMDA in Ca²⁺-free KR buffer (2022). Values are means ± S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus none.
† P < 0.05, †† P < 0.01, ††† P < 0.001 versus 100 μM NMDA.



Fig. 6. Effect of glycine on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of several concentration of glycine: None (O), $1 \mu M$ ($\textcircled{\bullet}$), $10 \mu M$ ($\textcircled{\bullet}$), $100 \mu M$ (\Box) with several concentration of NMDA. Values are means \pm S.E.M. of four experiments.

考 察

NMDA受容体刺激によるPKCの活性化機構を検討する目的で、まずN MDA受容体刺激によるPKCの細胞内移動が検出できる実験系を検索した。 その結果、幼若ラットの海馬切片においてNMDA受容体刺激によるPKC の細胞質から細胞膜への顕著な移動が認められることが明らかとなった。P KCの細胞内移動は細胞質分画と細胞膜分画における[³H]PDBu結合を測定す ることで表したが、PKCのモノクロナール抗体を用いたNestern blotting による検討やPKC活性を測定した結果より、細胞質分画と細胞膜分画にお ける[³H]PDBu結合の変化は、PKCの移動を反映していることを確認した。 Nestern blottingの結果(Fig. 2)においてPKCタイプIの存在がほとんど 認められなかったが、Yoshida等³³⁾は生後の発育過程の海馬ではPKCの発 現はそのタイプにより異なり、タイプIはタイプI、IIより遅れて発現する という報告をしており、本実験における結果と一致するものであった。

また幼若ラット海馬切片におけるNMDA受容体刺激によるPKCの移動 の諸性質を検討した結果、NMDA受容体拮抗薬APV³⁴⁾により阻害を受け ること、また外液中のCa²⁺に依存していることが明らかとなった。これら のことから、幼若ラット海馬切片におけるNMDAによるPKCの移動は、 NMDAタイプの興奮性アミノ酸受容体刺激による、細胞内へのCa²⁺の流 入を介したものであると考えられた。しかし、細胞膜の電位に依存してNM DA受容体とカップルしたCa²⁺チャネルを阻害するMg^{2+ 35)}や、Mg²⁺ とは別の部位に作用してCa²⁺チャネルを阻害するZn^{2+ 36)}、さらにNM DAに対する親和性を上昇させることでNMDA受容体を活性化することが 認められているグリシン^{37、38)}はNMDAによるPKCの移動に影響を与え なかった。以上の結果は、成熟動物で明らかにされたNMDA受容体の性質 とは若干異なっているが、Brady等³⁹⁾やMcDonald等⁴⁰⁾によって報告された幼 若期のNMDA受容体の性質とよく一致するものであった。即ち、Brady等³⁹⁾ は幼若期のNMDA受容体Ca²+チャネル複合体が膜電位依存性のMg²+に よる抑制を受けなかったと報告している。またMcDonald等⁴⁰⁾は、幼若期の動 物においてNMDA受容体Ca²+チャネル複合体の構成成分であるグリシン 結合部位やphencyclidine結合部位を伴わないNMDA結合部位が、成熟動物 よりも多く発現していることを報告し、幼若期のNMDA受容体複合体が特

殊な制御を受けて神経の発達過程に重要な役割を持っている可能性を示唆し ている。さらに、幼若期の神経系発生過程においてLTPが頻発しているこ と⁴¹⁾を考え合わせると、発生初期の動物の中枢神経系においては、成熟期と は異なった制御を受けている多数のNMDA受容体Ca²⁺チャネル複合体が 存在しており、この複合体への刺激は細胞内へ多量のCa²⁺の流入を引き起 こし、細胞質から細胞膜へのPKCの著名な移動を引き起こすと考えられた。 神経系の発達に伴い、NMDA受容体Ca²⁺チャネル複合体が完全な制御を 受けるようになると、NMDA受容体Ca²⁺チャネル複合体が完全な制御を 受けるようになると、NMDA受容体刺激により細胞内に流入するCa²⁺の 量は制限されるため、成熟動物では幼若期ほど大きなPKCの移動が起きな くなるのかもしれない。事実、データには示さないが、本実験においてNM DA受容体刺激によるPKCの移動の発育との関連を検討したところ、1 週 齢から2 週齢までのラット海馬切片ではNMDAによるPKCの移動は確認 されたが、3 週齢以降の動物では認められなかった。これは、McDonald等に より報告されたグリシン結合部位などの発現が成熟動物のレベルに達する時 期と一致するものであった。

小 括

- 1. 幼若ラット海馬切片においてNMDA受容体刺激により細胞質から 細胞膜への著名なPKCの移動が起きることが明らかとなった。
- 2. 海馬切片を用いた検討では、成熟動物においてNMDA受容体刺激に よるPKCの移動は認められなかった。
- 3. NMDAによるPKCの移動はNMDAタイプの興奮性アミノ酸受容 体とCa²⁺チャネル複合体の活性化を介した細胞内へのCa²⁺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。

第 II 章 成熟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受容体刺激による プロテインキナーゼCの移動

第1章において、NMDA受容体刺激によるPKCの移動は、幼若ラット 海馬切片においては認められたが、成熟したラット海馬切片においては認め られなかった。しかし成熟動物においてもLTPは認められ⁹⁹、その誘導に はNMDA受容体の活性化が^{10、11}、維持にはPKCが必要であること^{7、8)} が報告されているので、成熟動物においてもNMDA受容体刺激によるPK Cの活性化が起きていることは十分考えられた。

そこで本章では、成熟動物の神経組織において、NMDA受容体刺激とP KCの活性化との関連を追求する目的で種々検討を行なった。

第1節 成熟動物の神経組織におけるNMDA受容体刺激によるプロテイン キナーゼCの移動に関する基礎的検討

成熟動物の神経組織の標品として用いたラットの海馬切片では、NMDA 受容体刺激によるPKCの移動は認められなかったことから、他の標品とし てラット大脳皮質の切片、またモルモットの海馬および大脳皮質の切片につ いての検討を行なった。さらに、NMDA受容体刺激によるPKCの活性化 は、シナプスの前部と後部において局所的に起きていると考えられることか ら、Hollingsworth 等⁴²⁾によって見いだされた、シナプス前部と後部を多く 含んだ標品であるシナプトニューロソームについても検討を行なった。

実験方法

実験にはSprague-Dawly系雄性ラット(体重 200-250 g)及びHartley系雄 性モルモット(体重 300-500 g)を使用し、それぞれの大脳皮質及び海馬の 切片については第1章第1節の方法に従い反応後、各分画を調製した。

シナプトニューロソームの調製

ラット及びモルモットの大脳皮質及び海馬のシナプトニューロソームにつ いては Fig. 7に示した実験のプロトコールに従った。



Fig. 7. Procedure for preparation of synaptoneurosomes and three fractions

即ち、各組織をKrebs-Ringer-Henseleit緩衝液 (KRH):125 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 5 mM glucose, 20 mM TES-NaOH (pH 7.4)中で、glass-glass homogenizerを用いて穏やかにホモジ ナイズし、160µmのナイロンメッシュでろ過した後、10µmのフィルターでろ 過し、1000 x g で15分間遠心分離して得られる沈澱をシナプトニューロソー ムとした。このシナプトニューロソームをMgSO₄を除いた KRH で洗浄した後、 37℃で5分間インキュベートした。1.3 mM CaCl₂と薬物を加えてさらに10分間 インキュベートした後、遠心して薬物を除き1µM free C a ²⁺ 緩衝液 (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100µM leupeptin, 815.8µM CaCl₂, 1 mM EGTA)中で ホモジナイズし、以降は第 I 章第1節と同様の方法で各分画を調製した。

モルモット大脳皮質シナプトソームの調製

モルモット大脳皮質シナプトソームについてはNicollsの方法⁴³⁾ に従い、 フィコール密度勾配遠心分離により調製し、シナプトニューロソームと同様 の反応、各分画の調製を行なった。

各分画における[³H]PDBu結合の測定は第 I 章第1節の方法に従った。

実験結果

成熟ラットおよびモルモットの大脳皮質、海馬からそれぞれ作成した切片 をNMDAで処置後、細胞質分画と2つの膜分画を調製して[³H]PDBu結合を 測定した結果、NMDA処置による変化は認められなかった(Table 3)。

Table 3. Effect of NMDA on distribution of [³H]PDBu bindingsites in mature rat and guinea pig cerebral slices

	[³ H]PDBu binding (% of total binding)					
	Cytosol	EGTA Ext.	CHAPS Ext.			
Rat hippocamp	us					
None	58.0 ± 1.5	15.8 ± 0.9	26.2 ± 0.6			
100µM NMDA	59.5 ± 2.3	16.8 ± 3.0	23.7 ± 0.7			
1 mM NMDA	60.9 ± 1.7	14.7 ± 2.8	24.3 ± 1.7			
Rat cerebral	cortex					
None	57.2 ± 1.4	17.7 ± 1.2	25.0 ± 1.5			
100μM NMDA	55.0 ± 1.1	18.4 ± 1.2	26.5 ± 1.1			
1 mM NMDA	54.2 ± 2.3	22.1 ± 1.8	26.6 ± 1.7			
Guinea pig hi	ppocampus					
None	57.6 ± 2.1	15.6 ± 1.5	26.8 ± 0.9			
100μM NMDA	59.0 ± 1.6	14.7 ± 1.5	26.3 ± 1.5			
1 mM NMDA	61.6 ± 1.6	13.7 ± 2.2	24.6 ± 0.7			
Guinea pig ce	rebral cortex					
None	56.6 ± 0.1	17.8 ± 1.4	25.6 ± 1.4			
100μM NMDA	56.5 ± 1.9	16.4 ± 1.3	27.1 ± 0.7			
1 mM NMDA	55.9 ± 1.2	17.4 ± 1.0	27.0 ± 0.9			

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. Total homogenate binding (pmol/mg protein) are determined: Rat hippocampus, 6.54 \pm 0.56; Rat cerebral cortex, 5.94 \pm 0.42 Guinea pig hippocampus, 8.67 \pm 0.63; Guinea pig cerebral cortex, 8.38 \pm 0.54. ー方、成熟したラットおよびモルモットの大脳皮質、海馬からそれぞれシナ プトニューロソームを調製し、NMDAで処置した後、3つの分画に分けて [³H]PDBu結合を測定した結果、それぞれについて 5-10 %程度のPKCの移動 が認められた(Table 4)。

Table 4. Effect of NMDA on distribution of [³H]PDBu binding sites in mature rat and guinea pig cerebral synaptoneurosomes

	[³ H]PDBu binding (% of total binding)							
	Cytosol	EGTA Ext.	CHAPS Ext.					
Rat hippocamp	us							
None	51.0 ± 1.3	14.7 ± 0.5	34.3 ± 1.1					
100µM NMDA	49.4 ± 1.1	$17.6 \pm 0.4^*$	32.9 ± 0.7					
1 mM NMDA	46.1 ± 1.2	18.1 ± 0.6*	35.8 ± 1.0					
Rat cerebral	cortex							
None	45.7 ± 0.9	14.2 ± 0.7	40.0 ± 1.2					
100μM NMDA	42.6 ± 1.1	16.5 ± 0.5	40.9 ± 1.1					
1 mM NMDA	$42.3 \pm 0.8^*$	17.6 ± 0.6*	40.1 ± 0.7					
Guinea pig hi	ppocampus							
None	64.4 ± 1.8	3.4 ± 0.4	32.2 ± 0.8					
100μM NMDA	58.6 ± 1.1	4.1 ± 0.3	37.4 ± 1.1*					
1 mM NMDA	$56.9 \pm 1.2^*$	$5.4 \pm 0.4^*$	37.6 ± 1.0*					
Guinea pig ce	Guinea pig cerebral cortex							
None	46.3 ± 1.4	2.8 ± 0.4	51.0 ± 1.0					
100μM NMDA	$39.1 \pm 1.1^*$	4.7 ± 0.3*	56.2 ± 1.0*					
1 mM NMDA	35.4 ± 1.0**	* 5.8 ± 0.3**	58.8 ± 0.7**					

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. Total homogenate binding (pmol/mg protein) are determined: Rat hippocampus, 7.82 \pm 0.64; Rat cerebral cortex, 6.89 \pm 0.39 Guinea pig hippocampus, 7.23 \pm 0.47; Guinea pig cerebral cortex, 6.26 \pm 0.34. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus None. この中でモルモット大脳皮質から調製したシナプトニューロソームにおいて、 NMDA受容体刺激に対する反応が最も大きかったことから、モルモットの 大脳皮質について、シナプス前部のみを多く含む標品であるシナプトソーム に関しても検討したが、NMDA処置によるPKCの移動は認められなかっ た(Table 5)。

Table 5. Effect of NMDA on distribution of [³H]PDBu binding sites in mature guinea pig cerebral preparations

	[³ H]PDBu binding (% of total binding)						
	Cytosol	EGTA Ext.	CHAPS Ext.				
Slices							
None	56.6 ± 0.1	17.8 ± 1.4	25.6 ± 1.4				
100µM NMDA	56.5 ± 1.9	16.4 ± 1.3	27.1 ± 0.7				
1 mM NMDA	55.9 ± 1.2	17.4 ± 1.0	27.0 ± 0.9				
Synaptosomes							
None	51.1 ± 1.4	4.5 ± 1.3	44.4 ± 1.6				
100μM NMDA	50.8 ± 1.1	4.1 ± 0.9	45.0 ± 1.4				
1 mM NMDA	51.9 ± 1.2	4.4 ± 1.0	43.6 ± 2.0				
Synaptoneurosomes							
None	46.3 ± 1.4	2.8 ± 0.4	51.0 ± 1.0				
100μM NMDA	39.1 ± 1.1*	$4.7 \pm 0.3^*$	56.2 ± 1.0*				
1 mM NMDA	35.4 ± 1.0**	5.8 ± 0.3**	58.8 ± 0.7**				

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. Total homogenate binding (pmol/mg protein) are determined: Slices, 8.38 \pm 0.54; Synaptosomes, 6.44 \pm 0.57; Synaptoneurosomes, 6.26 \pm 0.34. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus None. また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の用量反応を検討したところ、100μM以上の濃度で 5-10 %の有意なPKCの移動が認められた。(Fig. 8)



NMDA-induced response curve o f Fig. 8. Dose translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig Synaptoneurosomes were incubated synaptoneurosomes. for 10 min at 37 °C with several concentrations of Cytosol, EGTA Ext. and CHAPS Ext. fractions NMDA. [³H]PDBu binding to each prepared and then wеге independently described determined a s fractions was previously. Results are shown as the percentage of the each fractions to the total binding in [³H]PDBu ± S.E.M. of four means Values аге binding. experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus control.

第2節 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 受容体刺激によるプロテインキナーゼCの細胞内移動の機構

前節で、シナプトニューロソームの系においては、成熟動物でもNMDA 受容体刺激によるPKCの移動が認められることが明らかとなった。そこで、 特にNMDA刺激に対する反応が大きかったモルモット大脳皮質のシナプト ニューロソームについて、NMDA受容体刺激によるPKCの移動の諸性質 を検討した。

実験方法

本節においては、すべて Hartley系雄性モルモット(体重 300-500 g)を 使用した。モルモット大脳皮質シナプトニューロソームの調製、反応及び各 分画の調製は第 II 章第1節の方法に従い、[³H] PDBu結合の測定は第 I 章第1 節の方法に従って行なった。

⁴⁵C a²⁺の取り込みの測定

モルモット大脳皮質シナプトニューロソーム内への⁴⁵ C a ²⁺の取り込みは、 シナプトニューロソームをKBHにサスペンドし37℃で5分間インキュベートし た後、1.3 mM ⁴⁵CaCl₂と薬物を添加してさらに10分間インキュベートして行 なった。反応の停止は、氷冷した10 mM EGTAの添加によって行ない、ガラス フィルターでろ過してフィルターの放射活性を測定した。

イノシトールリン酸の測定

イノシトールリン酸の蓄積は、Dudek等の方法⁴⁴⁾に従って検討した。即ち、 シナプトニューロソームに[³H]myo-inositolを取り込ませた後、10 mM LiCl 存在下に薬物と37℃で20分間反応し、 5 % トリクロロ酢酸の添加により反応 を停止させた。生成したイノシトールリン酸をBaudry等の方法⁴⁵⁾で定量した。

実験結果

成熟モルモット大脳皮質のシナプトニューロソームにおけるPKCの移動 に対して、他の興奮性アミノ酸受容体のアゴニストの影響を検討した結果、 100μMのKAやQAではPKCの移動は認められなかった(Fig. 9)。



Effect of excitatory amino acids o n Fig. 9. distribution of [³H]PDBu binding sites in guinea pig synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were incubated with 100 µM of each excitatory amino acids as described in Fig. 8. Results are shown as the percentage of [³H]PDBu binding in the each fractions to the total binding. Values are means ± S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus none.

また、シナプトニューロソーム内への⁴⁵Ca²⁺の取り込みに対する興奮性 アミノ酸の影響を検討した結果、GluとNMDAによってのみ⁴⁵Ca²⁺の 取り込みが増加した(Fig. 10)。

さらに、近年のイノシトールリン脂質(PI)代謝系と連関した興奮性ア ミノ酸受容体が存在するという報告⁴⁶⁻⁴⁸⁾に基づき、モルモット大脳皮質シ ナプトニューロソームにおけるイノシトールリン脂質代謝系への興奮性アミ ノ酸の影響を検討したところ、⁴⁵Ca²⁺の取込の場合とは異なり、NMDA では作用がみられず、QAによって増加がみられた(Fig. 11)。



 $45_{C_2}^{2+}$ Effect of excitatory amino acids 0 N Fig. 10. synaptoneurosomes. guinea pig uptake into Synaptoneurosomes were incubated for 10 min at 37 °C with 1.3 mM ⁴⁵CaCl₂ in the presence of either 100 µM glutamate (💹), Ϊ́ΟΟ μΜ ΝΜDΑ (💹), 100 μΜ kainate quisqualate (🎆). Values are () or 100 µM experiments. * P < 0.05, four means ± S.E.M. of ** P < 0.01 versus none.



Fig. 11. Effect of excitatory amino acids o n of [³H]inositol-1~phosphate in formation guinea [³H]Inositol-labeled synaptoneurosomes. pig synaptoneurosomes were incubated for 20 min at 37 °C in the presence of either 100 µM glutamate (🕅), 100 µM NMDA (💹), 100 µM kainate (🎹) or 100 µM quisqualate (🕅). Values are means ± S.E.M. o f four experiments. ** P < 0.01 versus none.

次に、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の移動に対する、NMDA受容体Ca²⁺チャネル複合体の阻害薬の 作用を検討した(Fig. 12)。500μMのAPVおよび ketamine、そして10 mM Mg²⁺により、100μMNMDAによるPKCの移動は完全に抑制された。 またこの系におけるNMDAによるPKCの移動にも外液のCa²⁺に対する 依存性が認められた。グリシンの添加は、若干のNMDAによるPKCの移 動を促進させる傾向を示したが大きな変化ではなかった(Fig. 13)。



Fig. 12. Effect of NMDA antagonists on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig synaptosomes. Synaptosomes were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 100 μ M NMDA (2022) with 10 mM MgSO₄ (2022), 1 mM ZnCl₂ (2022), 500 μ M APV (2022) or 500 μ M ketamine (2022), or in the presence of 100 μ M NMDA in Ca²⁺-free KR buffer (2022). Values are means ± S.E.M. of four experiments.
* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus None.
†† P < 0.01, ††† P < 0.001 versus 100 μ M NMDA.



Fig. 13. Effect_of glycine 0 n NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were incubated for 10 min at 37 °C with several concentration o f glycine in the absence (🌑) and presence (🔿) of 100 µM NMDA. Results are shown as the percentage o f [³H]PDBu binding in the each fractions to the total binding. Values are means ± S.E.M. o f four control. ****** P < 0.01 versus experiments.

第3節 興奮性アミノ酸受容体刺激に対する脳代謝改善薬ibudilastの影響

Ibudilast (KC-404) は脳代謝改善作用を有し⁴⁹⁾、同時に抗喘息作用も併 せ持つ^{50、51)}、ユニークな薬物である。このibudilastの作用機序として抗喘 息作用については、気管支喘息メディエーターであるleukotriene D4により 起こされるPI代謝促進を抑制することを見いだし、既報⁵²⁾において明らか にしている。Hirayana等⁵³⁾は中枢神経系におけるibudilastの作用機序を追 求する過程で、モルモット海馬切片において電気刺激により起こしたLTP をibudilastが増幅することを報告している。このLTPへの関与に着目して、 NMDAによるPKCの移動を主として、興奮性アミノ酸受容体刺激を介し た諸反応に対するibudilastの影響を、モルモット大脳皮質シナプトニューロ ソームにおいて検討した。

実験方法

本節においては、すべてHartley系雄性モルモット(体重 300-500 g)を使用した。モルモット大脳皮質シナプトニューロソームの調製、反応及び各分画の調製は第Ⅱ章第1節の方法に従い、[³H]PDBu結合の測定は第Ⅰ章第1節の方法に従って行なった。

シナプトニューロソームへの⁴⁵C a ²⁺の取り込み及びイノシトールリン酸の測定は第Ⅱ章第2節の方法に従って行なった。

実験結果

NMDA受容体刺激によるPKCの移動に対して10 μM のibudilastは影響しなかった(Table 6)。またibudilastはNMDAによるシナプトニューロ ソーム内への⁴⁵Ca²⁺の取り込み(Table 7)、およびG1uによるPI代謝促 進(Table 8)には影響しなかった。

Table 6. Effect of ibudilast on NMDA-induced changes of distribution of [³H]PDBu binding sites in mature guinea pig cerebral synaptoneurosomes

	[³ H]PDBu binding (% of total binding)						
	Cytosol	EGTA Ext.	CHAPS Ext.				
Control							
None	46.3 ± 1.4	2.8 ± 0.4	51.0 ± 1.0				
100μM NMDA	39.1 ± 1.1*	4.7 ± 0.3*	56.2 ± 1.0*				
10 μM ibudil	ast						
None	45.8 ± 1.2	3.1 ± 0.3	51.1 ± 1.2				
100µM NMDA	38.9 ± 1.4*	4.4 ± 0.2*	56.7 ± 1.4*				

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus None.

Table 7.	Effect of	ibudilast on	⁴⁵ Ca ²⁺ uptake
	in guinea	pig cortical	synaptoneurosomes

	⁴⁵ Ca ²⁺ uptake (nmol/mg protein/10 min)						
-	Control 10 µM ibudilast						
None 100 µM NMDA 40 mM KC1	5.63 ± 0.15 5.58 ± 0.18 $6.62 \pm 0.16^*$ $6.71 \pm 0.11^*$ $8.79 \pm 0.22^{***}$ $8.88 \pm 0.25^{***}$						

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. * P < 0.05, *** P < 0.001 versus None Table 8. Effect of ibudilast on formation of inositol phosphate in guinea pig cortical synaptoneurosomes

IPı	formation (fmol/	mg protein/20 min)
	Control	10 μM ibudilast
None	0.38 ± 0.06	0.41 ± 0.08
100 μM glutamate	$1.03 \pm 0.06^{++}$	0.99 ± 0.13*

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus None

考 察

成熟動物においても、シナプトニューロソームの系ではNMDA受容体刺激によるPKCの移動が起きることを明らかにした。このことから第 I章の ラット海馬切片の系において、NMDA受容体刺激によるPKCの細胞内移 動が幼若動物でのみ認められ、成熟動物では認められなかった原因は、切片 という実験系によるものであると考えられた。

シナプトニューロソームは、Hollingsworth等⁴²⁾ により見いだされたシナ プス前部と後部を多く含む標品であり、彼等によればこの標品の94 %以上は シナプス前部であるシナプトソームと後部であるニューロソーム、さらに両 者が接合したシナプトニューロソームで占められている。またこの標品にお いてはアゴニスト刺激によるアデニレートシクラーゼの活性化⁴²⁾、Ca²⁺や C1⁻の取り込み増加^{54、55)}、さらにPI代謝の促進⁵⁵⁾が認められている。 本研究において、NMDA受容体刺激によるPKCの移動がシナプトニュー ロソームで認められたことは、成熟動物での興奮性アミノ酸神経伝達の検討 を行なう際に、本標品が有用であることを示唆している。しかし、シナプト ニューロソームの調製はサンプルのロスを若干伴うため、幼若動物の海馬等 の量の少ない組織には不向きであり、実験目的に応じて選択する必要がある と考えられた。

また、成熟モルモット大脳皮質からフィコール密度勾配遠心法により調製 した、シナプス前部のみを多く含む標品シナプトソームにおいては、NMD AによるPKCの移動が認められなかったことより、NMDA受容体刺激を 介したPKCの移動にはシナプスの後部の存在が必要であると考えられた。

成熟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の移動の性質を検討した結果、APV、ketamineによる拮抗と外液 Ca²⁺に対する依存性が認められた。第I章での幼若ラット海馬切片の場合 とは異なり、この系においてはMg²⁺によりNMDAの作用は阻害され、成 熟動物にみられるNMDA受容体Ca²⁺チャネル複合体の性質と一致するも のであった。またグリシンについては、若干NMDAの作用を増幅する傾向 がみられたがそれほど大きなものではなかった。これはグリシンの作用機序 がNMDA受容体のNMDAに対する親和性を上昇させることにあり、最大 反応には影響しないこと³⁸⁾から、高濃度のNMDAを用いた今回の検討では

- 29 -

作用が現れにくいと考えられた。

ところで興奮性アミノ酸受容体の多くは、イオンチャネルとカップルして いると考えられているが56、57)、近年PI代謝系とカップルしたものの存在 が報告された46-48)。PI代謝の促進は、生体内でのPKCの活性化物質で あると考えられるジアシルグリセロール(DG)と、細胞内のCa²+貯蔵部 位からのCa²⁺の遊離を引き起こすイノシトール3リン酸(IP₃)を増加さ せる。DGとIP₃はPKCの活性化と密接に関連していること^{47、58、59)}か ら、モルモット大脳皮質シナプトニューロソームにおける、興奮性アミノ酸 受容体のサブタイプのアゴニストによる45Ca²⁺の取り込みと、PI代謝系 に対する影響を比較検討した。その結果、45 C a 2+の取り込みについては、 GluとNMDAのみで増加作用がみられ、PI代謝系に対してはGluと QAのみに促進作用が認められた。PKCの移動に対する結果を考え合わせ ると、成熟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の移動は、PI代謝の促進を直接介したものではなく、NMD A受容体の活性化に伴った外液Ca²⁺の流入により引き起こされていると考 えられた。また Fig. 9 において、NMDAよりも多くのCa²⁺のシナプト ニューロソーム内へ取り込みを起こしたGluは、 Fig. 8 のPKCの移動 においてはNMDAよりも小さな作用しか示さなかった。このことについて、 現在明らかにはされていないが、NMDA受容体以外にもCa²⁺の流入を引 き起こす受容体が存在しており、G1uによるCa²⁺の流入がその受容体の 活性化を介している可能性も考えられた。また、G1uよりもさらに多くの C a²⁺をシナプトニューロソーム内へ流入させるhigh K⁺刺激(第Ⅲ章第2節 Table 10 参照)は、データには示さないが有意なPKCの移動を引き起こさ なかったことより、生理的な条件下におけるPKCの移動には単にCa²⁺の 流入だけでなくNMDA受容体自身の活性化が必要であるのかもしれない。

脳代謝改善薬である ibudilast はモルモット大脳皮質のシナプトニューロ ソームにおいて、NMDA受容体刺激によるPKCの移動、NMDA受容体 刺激によるCa²⁺の取り込み、そしてGluによるPI代謝の促進作用には 影響しなかった。Hirayama等⁵³⁾により報告されたモルモット海馬切片におけ るibudilastのLTP増強作用は、NMDA受容体の関与が認められている海 馬のCA1野におけるものではなく、PI代謝系とカップルした興奮性アミ ノ酸受容体およびβ-アドレナリン受容体(β-受容体)の関与が示唆されて いるCA3野におけるものであった。また、このibudilastによるLTP増強 作用がβ-受容体のアンタゴニストにより阻害されることも明らかにされてい る。データには示さないが、モルモット海馬切片においてibudilastがβ-受 容体刺激によるcyclic AMPの産生を増加させることから、ibudilastのLTP 増強作用はβ-受容体を介したものであり、興奮性アミノ酸受容体への影響は 少ないと考えられた。

小 括

- モルモット大脳皮質シナプトニューロソームにおいてNMDA受容体 刺激によるPKCの移動が認められることを成熟動物の標品としては 初めて明らかにした。
- モルモット大脳皮質シナプトニューロソームにおけるPKCの移動は、 PI代謝系の促進を直接介したものではなく、NMDA受容体刺激に よるシナプトニューロソーム内へのCa²⁺の流入を介することが示さ れた。
- 3. 脳代謝改善薬ibudilastはモルモット大脳皮質シナプトニューロソーム において、興奮性アミノ酸受容体刺激を介した種々の反応に影響しな かった。

第 III 章 プロティンキナーゼCの細胞 内移動における内在性 Z n²⁺の 関与

第1章、第1章においてNMDA受容体刺激とPKCの細胞内移動の関連 が明らかとなった。本章においては、NMDA受容体とPKCの関連に対し て、さらに本研究のもう一つの目的であるZn²⁺の関与を検討した。

第1節 NMDAによるプロテインキナーゼCの移動に対する Zn²⁺キレート薬TPENの抑制作用

中枢神経系には高濃度のZn²⁺が存在しており^{17、19、20、65)}、神経刺激に 応じたシナプスからの遊離や再取り込みが認められている⁶⁰⁻⁶⁴⁾。Zn²⁺の 神経生理学的意義としては、興奮性アミノ酸神経伝達への関与^{12、13、66、67)} や、PKCへの影響¹⁵⁻¹⁷⁾が示唆されているが、その詳細は明らかではない。

そこで中枢神経系でのZn²⁺の役割として、NMDA受容体刺激によるP KCの移動に対する内在性のZn²⁺の関与を、Zn²⁺に極めて高い親和性を もつ、膜透過性の重金属イオンのキレーターである N,N,N',N'-tetrakis(2pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN)⁵⁷⁾を用いて検討した。

実験方法

本節においては、すべて Hartley系雄性モルモット(体重300-500 g)を使用し、第Ⅱ章第1節に従ってモルモット大脳皮質シナプトニューロソームの 調製、反応及び各分画の調製を行ない、[31] PDBu結合の測定は第Ⅱ章第1節 の方法に従って行なった。

シナプトニューロソーム内へのTPENの取り込み

モルモット大脳皮質シナプトニューロソーム内へのTPENの取り込みは、 シナプトニューロソームを10分間、TPENもしくはその金属複合体とイン キュベートし、第I章第1節の方法に従って各分画を調製した後、TPEN 個有の255 nmの波長の吸収⁵⁷⁾を測定することで行なった。サンプル中の核酸 や蛋白質による影響を考慮して、蛋白質による280 nmの波長の吸収を測定し、 255 nmにおける吸収との比を取ってTPENの濃度の指標とした。 また1週齡のSprague-Dawly系ラット(体重 10-15 g)の海馬切片について は、第1章第1節に従い、反応、各分画の調製を行なった。ただし、TPE N及びその金属との複合体の処置は、切片作成直後から1時間行なった後、 薬物と反応させた。

実験結果

モルモット大脳皮質シナプトニューロソームを100 μ MのTPENと共に5 分間プレインキュベーションしてからNMDAを添加すると、TPEN処置 後ではNMDAによるPKCの移動は、ほとんど認められなくなった(Fig. 14)。また、予めTPENを同濃度のZn²⁺を混合し、両者の複合体(Zn-TPEN)を形成させることでこのTPENのNMDAによるPKCの移動 に対する抑制作用は消失した。これに対してTPENをCa²⁺で処置しても TPENの抑制作用は変化しなかった。1 nM のTPENとモルモット大脳皮 質シナプトニューロソームをインキュベートした後、細胞質と細胞膜分画に 存在するTPENについて、TPENに特異的な 255 nm の波長の吸収⁵⁷⁾を 測定した結果、シナプトニューロソーム内への取り込みは、Zn-TPEN でもTPEN単独の場合と同程度であった(Table 9)。

Table 9. Incorpolation of TPEN and its zinc complex into guinea pig synaptoneurosomes

	OD ₂₅₅ / OD ₂₈₀	
	Cytosol	CHAPS Ext.
Control 1 mM TPEN 1 mM Zn-TPEN	1.264 ± 0.005 1.281 ± 0.003* 1.293 ± 0.006**	0.875 ± 0.000 $0.905 \pm 0.005^{**}$ $0.924 \pm 0.007^{**}$

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus Control



Fig. 14. Effect of TPEN and its metal complexes 0 N translocation of [³H]PDBu binding sites NMDA-induced pig synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes in guinea Zn-TPEN or Capreincubated with 100 µM TPEN, were in TPEN for 5 min and then incubated the presence () or absence () of 100 µM NMDA for 10 min. Zn-TPEN and Ca-TPEN show mixtures of 100 µM TPEN and respectively, and these 100 µM ZnCl₂ or 100 µM CaCl₂, mixture were prepared 1 hr before the addition to synaptoneurosomes. Cytosol, EGTA-Ext. and CHAPS-Ext. fractions were prepared and then [³H]PDBu binding to determined independently as each fractions was as the previously. Results are shown described [³H]PDBu binding in each fractions percentage o f the binding. Values are means ± S.E.M. of to the total four experiments.

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus none. † P < 0.05, tt P < 0.01 versus control. また、幼若ラット海馬切片においても、切片を100μMのTPENで1時間 処置することでNMDAによるPKCの移動に対して、モルモット大脳皮質 シナプトニューロソームの場合と同様の抑制作用が認められた(Fig. 15)。



Fig. 15. Effect of TPEN and Zn-TPEN complexes on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were preincubated with 100 μ M TPEN and Zn-TPEN for 60 min and then incubated in the presence (\fbox) or absence (\fbox) of 100 μ M NMDA for 30 min. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus None. † P < 0.05, ††† P < 0.001 versus control. 第2節 TPENの作用機序に関する検討

前節において、NMDA受容体刺激によるPKCの移動を細胞膜透過性の Zn²⁺のキレーターであるTPENが抑制したことから、その抑制作用の機 構を検討した。

実験方法

本節においては、すべてHartley系雄性モルモット(体重 300-500 g)を使用した。モルモット大脳皮質シナプトニューロソームの調製、反応及び各分画の調製は第Ⅱ章第1節の方法に従い、[³H] PDBu結合の測定は第Ⅰ章第1節の方法に従って行なった。

Quin2の蛍光測定

Quin2の蛍光に対するZn²⁺とTPENの影響は、25µMのQuin2 を含むCa²⁺を除いた KRH 溶液に10µM CaCl₂を加えて蛍光を生じさせて、 Zn²⁺およびTPENの添加による蛍光の変化を測定して行なった。なお、 Quin2による蛍光は励起波長 339 nm、蛍光波長 492 nmで測定した。

モルモット大脳皮質シナプトニューロソームへの⁴⁵Ca²⁺の取り込みは、 第 II 章第2節の方法に従い、モルモット大脳皮質の細胞質分画におけるプロ テインキナーゼC活性の測定は第 I 章第1節の方法に従って行なった。

実験結果

まず、TPENのZn²⁺に対する選択性を検討した。Caインジケーター であるQuin2の溶液にCa²⁺を添加し発生させた蛍光は、Zn²⁺の添加 により濃度依存的に減少し、さらにここにTPENを添加すると濃度依存的 にZn²⁺によるQuin2の蛍光の減少を回復させた(Fig. 16)。



Fig. 16. Effect of Zn^{2+} and TPEN on quin-2 fluorescence in solution.

またTPENは 100μM の濃度でNMDAや high K⁺ 刺激によるシナプト ニューロソーム内へのCa²⁺の取り込みに影響しなかった(Table 10)。

TPENはモルモット大脳皮質可溶性分画のPKC活性には影響しなかったが、Zn²⁺の添加により抑制されたPKC活性を回復させた(Table 11)。

Table 10. Effect of TPEN on ⁴⁵Ca²⁺ uptake in guinea pig cortical synaptoneurosomes

_	⁴⁵ Ca ²⁺ uptake (nmol/mg protein/10 min)	
	Control	100 μM TPEN
None 100 µM NMDA 40 mM KCl	5.63 ± 0.15 $6.62 \pm 0.16^*$ $8.79 \pm 0.22^{***}$	5.77 \pm 0.17 6.47 \pm 0.03* 8.93 \pm 0.11***

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. * P < 0.05, *** P < 0.001 versus None

Table 11. Effect of TPEN on protein kinase C activity

	Protein kinase C activity (nmol Pi/mg protein/3 min)	
	Control	100 μ M TPEN
None	3.51 ± 0.11	3.59 ± 0.40
100 μM ZnCl ₂	2.11 ± 0.05***	$3.31 \pm 0.24^{\dagger\dagger}$

Values are means \pm S.E.M. of three experiments. *** p < 0.001 versus None, \ddagger p < 0.01 versus Control

第3節 2価カチオンによるプロテインキナーゼCの移動に対する TPENの作用

本章第1節、第2節において、NMDA受容体刺激によるPKCの移動に 対するTPENの抑制作用は細胞内Zn²⁺のキレートによることが示された。

本節ではさらに、NMDA受容体刺激を介さないPKCの移動における内 在性Zn²⁺の役割を追求する目的で、TPENを用いて検討を行なった。

実験方法

本節においては、すべてHartley系雄性モルモット(体重300-500 g)を使用し、第 II 章第1節に従ってモルモット大脳皮質シナプトニューロソームの 調製、反応及び各分画の調製を行ない、[³H] PDBu結合の測定は第 I 章第1節 の方法に従って行なった。

ホモジネートにおける2価カチオンの影響の検討は、モルモット大脳皮質 シナプトニューロソームを調製後反応せずにホモジネートし、2価カチオン を加えて37℃で10分間インキュベートしてから遠心分離を行ない、以後は第 I章第1節の方法に従って各分画を調製した。なお、過剰の2価カチオンは [³H]PDBu結合に影響を与える^{16,69)}ため、Sephadex G-25カラムを用いて除去 した後、[³H]PDBu結合を行なった。

実験結果

カルシウムイオノフォアA23187によりモルモット大脳皮質シナプトニュー ロソーム内への非生理的なCa²⁺の流入を起こし、PKCの移動を検討した ところ、A23187は濃度依存的にPKCの移動を引き起こした。100µMのTP ENの添加はこのA23187によるPKCの移動を若干抑制した(Fig. 17)。

また、PKCの移動におけるCa²⁺およびZn²⁺の影響をより明確にする ために、シナプトニューロソームをホモジネートしたものについて検討した ところ、Ca²⁺及びZn²⁺の添加によりPKCの移動が濃度依存的に生じた (Fig. 18、19)。ホモジネートにおいて 100 μ M Ca²⁺と 500 μ M Zn²⁺によ り引き起こされた同程度のPKCの移動に対して、TPENの作用を検討し た結果、Zn²⁺に対しては濃度依存的にPKCの移動を抑制したが、Ca²⁺ に対しての作用は500 μ Mの濃度においても認められなかった(Fig. 20)。



dose response o f curve Fig. 17. Effect of TPEN on A23187-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were preincubated with (🔿) or without (🌑) 100 µM and then incubated with several 5 min TPEN for Results are shown concentration of A23187 for 10 min. as the percentage of [³H]PDBu binding the each in fractions to the total binding. Values are means ± S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, tt P < 0.01 ******≉ P < 0.001 versus none. † P < 0.05, versus control.



Fig. 18

Fig. 19

- Fig. 18. Effect of Ca^{2+} and TPEN on distribution of $[^{3}H]PDBu$ binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37 °C in the absence (\odot) or presence (\bigcirc) of 100 μ M TPEN with several concentration of CaCl₂. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus None.
 - Fig. 19. Effect of Zn²⁺ and TPEN on distribution of [³H]PDBu binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37 ℃ in the absence (●) or presence (○) of 100 µ M TPEN with several concentration of ZnCl₂. Values are means ± S.E.M. of four experiments. ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus None.
 † P < 0.05 versus control.

- 41 -



Fig. 20. Effect of TPEN on Ca^{2+} or Zn^{2+} -induced translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37 °C in the absence (\blacktriangle) or presence of 100 μ M CaCl₂ (\bigcirc) or 500 μ M ZnCl₂ (\bigcirc) with several concentration of TPEN. Results are shown as the percentage of [³H]PDBu binding in the each fractions to the total binding. Values are means \pm S.E.M. of four experiments.

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus none. † P < 0.05, †† P < 0.01, ††† P < 0.001 versus 0 µM TPEN. 単独では PKCの移動を起こさない 10μ Mの Zn²⁺をホモジネートに添加す ると、 10μ MのCa²⁺による PKCの移動を増強し、 TPENの添加はこの移 動を完全に阻害した (Fig. 21)。



TPEN on Ca²⁺-Zn²⁺-induced and Fig. 21. Effect of translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37 °C in the presence ($\boxed{22}$) or absence ($\boxed{22}$) of 10 µM CaCl₂ with 10 µM ZnCl₂ or 10 µM TPEN. Results are shown as the percentage of [³H]PDBu binding in the each fractions to the total binding. Values аге means ± S.E.M. of four experiments. + P < 0.05 versus 10 µM ** P < 0.01 versus none. ZaCl₂.

考 察

 Zn^{2+} は神経系において、Na⁺、K⁺、Mg²⁺についで多く含まれる金属 イオンであり⁷⁰⁾、その神経組織での濃度は報告者によって若干の差があるも のの、およそ200-300µM程度と計算されている¹⁷⁾。また、 Zn^{2+} は海馬の苔 状線維終末に代表されるように、神経終末に局在しており、神経刺激により シナプス間隙へ遊離することや再取り込みされること等⁶⁰⁻⁶⁵⁾が報告されて いる。 Zn^{2+} の欠乏による神経系の発達不良⁷¹⁾や学習獲得障害⁷²⁾が認めら れることなどから、 Zn^{2+} の神経系における機能的役割が注目されているが その詳細は不明である。近年の様々な研究により、 Zn^{2+} がNMDA受容体 を阻害する¹²⁾など興奮性アミノ酸神経伝達への関与が明らかにされているが、 Kihara等⁷³⁾は、ラット海馬切片からの[³H]G1uの遊離を Zn^{2+} が阻害する ことを報告している。また、 Zn^{2+} の多くは細胞内において、その結合蛋白 質と結合した形で存在していると考えられるが、Baba等¹³⁾はNMDAにより 結合蛋白質からの Zn^{2+} の遊離が促進されることを明らかにしており、興奮 性アミノ酸受伝達と Zn^{2+} の関連はますます深くなっている。

ところで、最近明らかにされたPKCの一次構造中にはCys-残基の繰り 返し構造、いわゆる"DNA-zinc finger"と呼ばれるZn²⁺の結合構造に類似 した部分が存在することが知られており¹⁴⁾、またZn²⁺によりPKC活性が 制御されている可能性も示唆されている¹⁵⁻¹⁷⁾。さらにCsermely 等¹⁸⁾はT リンパ球においてPKCの移動に内在性のZn²⁺が必須であったと報告して いる。

これらのことから、本研究の目的であるNMDA受容体刺激、PKCの活 性化、さらにZn²⁺の関与を明らかにする目的で、NMDA受容体刺激によ るPKCの移動に対する内在性Zn²⁺の影響を、膜透過性の重金属のキレー ターであるTPENを用いて検討した。その結果、TPENによりPKCの 移動が阻害され、その抑制作用は、細胞内Zn²⁺のキレートによることが示 された。

また、A23187による非生理的なCa²⁺の流入を介したPKCの移動への、 Zn²⁺の関与が示されたことから、PKCの移動におけるCa²⁺とZn²⁺の 関係をシナプトニューロソームをホモジネートしたものについて検討した。 A23187によるシナプトニューロソーム内でのPKCの移動においてTPEN の効果がみられたのに対して、ホモジネートにおいてCa²⁺の添加によるP KCの移動にTPENが作用しなかった理由は、内在性のZn²⁺が希釈によ ると考え、単独ではそれぞれPKCの移動に大きな作用を持たないZn²⁺と Ca²⁺の相互作用を検討した結果、以下のことが示唆された。

Zn²⁺は高濃度では単独でPKCの移動を引き起こし、生理的な濃度では 低濃度のCa²⁺、すなわち生理的な刺激により、細胞内で上昇し得る程度の Ca²⁺によるPKCの移動を増強していると考えられた。

第 I 章の幼若ラットの海馬切片及び、第 I 章の成熟モルモット大脳皮質シ ナプトニューロソームを用いた検討において、NMDA受容体Ca²⁺チャネ ル複合体を阻害するとされる濃度のZn²⁺はNMDA受容体刺激によるPK Cの移動に影響を与えなかった。このことについて Weiss等⁷⁴⁾は、Zn²⁺は NMDA受容体を阻害するにもかかわらず、NMDA受容体とカップルした イオンチャネルを通って細胞内に取り込まれる可能性を示唆しているので、 神経刺激により神経終末より遊離したZn²⁺はシナプス後部へ取り込まれ、 内部のZn²⁺を増加させ、Ca²⁺に誘導されるPKCの移動を増幅している と考えられた。

小 括

- NMDA刺激によるPKCの移動を重金属のキレート薬TPENが 抑制することが明らかとなった。
- 2. TPENの抑制作用は内在性Zn²⁺のキレートによると考えられた。
- 3. Zn²⁺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、Ca²⁺によるPKCの移動を増強していることが示唆された。

総括と結論

総 括

中枢神経系においてG1uやアスパラギン酸などの興奮性アミノ酸は神経 伝達物質として働き、学習や記憶等の高次の神経機能に関連していると考え られている56、75)。また、PKCは中枢神経系に多く含まれ、神経機能への 関与が知られており、乙n²+についても同様に神経機能における重要性が示 唆されている。本研究の主目的は、興奮性アミノ酸受容体、中でもNMDA 受容体とPKCの活性化、さらに乙n²⁺の3者の関連を明らかにすることで あった。その結果、PKCの活性化に伴った細胞質から細胞膜への移動が、 NMDA受容体刺激により生じること、そしてこのPKCの移動には内在性 のZn²⁺が必要であることを明らかにした。またこのNMDAによるPKC の移動は、NMDAタイプの興奮性アミノ酸受容体刺激を介したCa²⁺の流 入に依存しており、PI代謝系を直接介したものではなかった。NMDAに よるPKCの移動は、幼若期の動物において特に顕著であり、発育に伴い減 少していると考えられたが、成熟期においてもこの現象は確認できた。近年 の報告76-78)において、興奮性アミノ酸受容体刺激によるPKCの移動は、 幼若ラット小脳から培養した顆粒細胞でのみ認められており⁵⁴⁾、成熟動物に 関してはいずれも否定的であった55、56)。本研究でも、成熟動物において切 片、シナプトソームの系では、NMDA受容体刺激によるPKCの移動は確 認できなかったが、シナプトニューロゾームの系で成熟動物では初めてNM DAによるPKCの移動を明らかにし、シナプトニューロソームが興奮性ア ミノ酸神経伝達の検討に有用であることを示した。

本研究で明らかにされた結果と、既に明らかにされている知見より、興奮 性アミノ酸神経伝達におけるPKCと乙n²⁺の関与をまとめ、Fig. 22 に図 示した。神経の興奮により電位依存性Ca²⁺チャネルを通ったCa²⁺は、シ ナプス前部からのG1uの遊離を起こし、このG1uはシナプス後部におい て、イオンチャネルとカップルしたQAタイプやKAタイプの受容体と結合 して脱分種を起こす。成熟動物の場合、生理的条件下でNMDAタイプの受 容体は、細胞外液に存在するMg²⁺により膜電位に依存した阻害を受けてい るが、QAやKAタイプ受容体を介した脱分種により、Mg²⁺の電位依存性 の抑制は解除される。また幼若動物の場合は、QA、KA受容体は余り発現 しておらず、Mg²⁺に非感受性のNMDA受容体が多く認められている。



Fig. 22. Schematic diagram of excitatory amino acid neurotransmission.

そしてG1uがNMDA受容体を刺激すると外液からCa²⁺の流入を引き起 こし、Ca²⁺依存性酵素の活性化やPKCの細胞質から細胞膜への移動、活 性化へと至るが、このPKCの移動には内在性のZn²⁺が必要とされる。ま た、PI代謝系とカップルしたQAタイプ受容体の活性化は、ホスホリパー ゼC(PLC)によるDGとIP₃の産生を増加させ、PKCの活性化や細胞 内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺の誘導を引き起こし、これらのセカンドメッ センジャー系を介して細胞内部へと情報が伝達されていると考えられた。

さらに、シナプス前部の興奮は同時に、Zn²⁺の遊離をも引き起こすが、 シナプス間隙へ遊離されたZn²⁺は、シナプス前部に対してG1uの遊離を 制御し、またシナプス後部に取り込まれて、内在性のZn²⁺を増し、PKC の移動を促進していると考えられた。そしてシナプス後部に流入したCa²⁺ による活性化を受けた、Ca²⁺依存性酵素により逆行性伝達物質が産生され、 シナプス後部からシナプス前部へと逆行性に刺激が伝わり、シナプス前部で もZn²⁺依存性にPKCの移動、活性化が生じる。このPKCの活性化を介 してG1uの遊離が促進され、長期間にわたる刺激の維持によりLTP等の 現象に至ると考えられた。

結 論

- 1. 幼若期のラット海馬切片においてNMDA受容体刺激により細胞内へ のCa²⁺の流入を介して、PKCの細胞質から細胞膜への著名な移動 が生じることを明らかにした。
- 2. モルモット大脳皮質シナプトニューロソームにおいてNMDA受容体 刺激によるPKCの移動が認められることを成熟動物で初めて明らか にし、この標品の有用性を示した。
- 3. 中枢神経系におけるPKCの細胞内移動に内在性のZn²⁺が必須であることを明らかにした。

謝 辞

.

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、 大阪大学薬学部教授、岩田平太郎先生に謹んで感謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、種々御討論、御指導していただきました 大阪大学薬学部助教授、馬場明道先生に深謝いたします。

さらに、ibudilastを御供与下さいました杏林製薬中央研究所、大橋光雄博 士に感謝いたします。

最後に、本実験に御協力、御援助下さいました大阪大学薬学部薬理学教室 の皆様に感謝いたします。

引 用 文 献

- Inoue, M., Kishimoto, A.. Takai, Y. Nishizuka, Y., Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues, J. Biol. Chem., 252 (1977) 7610-7616.
- 2 Nishihira, J., McPhail, L. C. and O'Flaherty, J. T., Stimulus-dependent mobilization of protein kinase C, Biochem. Biophys. Res. Commun., 134 (1986) 587-594.
- Melloni, E., Pontremoli, S., Michetti, M., Sacco, O., Sparatore, B., Salamino, F. and Horecker, B. L., Binding of protein kinase C to neutrophil membranes in the presence of Ca²⁺ and its activation by a Ca²⁺-requiring proteinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 6435-6439.
- Ho, A. K., Thomas, T. P., Chik, C. L., Anderson, W. B. and Klein, D. C., Protein kinase C: subcellular distribution by increased Ca²⁺ influx, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 9292-9297.
- 5 TerBush, D. R., Bittner, M. A. and Holz, R. W., Ca²⁺ influx causes rapid translocation of protein kinase C to membranes, *J. Biol. Chem.*, **263** (1988) 18873-18879.
- 6 Phillips, W. A., Fujiki, T., Rossi, M. W., Korchak, H. M. and Johnston, R. B., Jr., Influence of calcium on the subcellular distribution of protein kinase C in human neutrophils, *J. Biol. Chem.*, **264** (1989) 8361-8365.
- 7 Akers, R. F., Lovinger, D. M., Colley, P. A., Linden,
 D. J. and Routtenberg, A., Translocation of protein
 kinase C activity may mediate hippocampal long-term
 potentiation, Science, 231 (1986) 587-589.
- 8 Malinow, R., Madison, D. V. and Tsien, R. W., Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation, *Nature*, **335** (1988) 820-824.

- 9 Bliss, T. V. P. and Lomo, T., Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path, J. Physiol., 232 (1973) 331-356.
- Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G. S. and Baudry,
 M., Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5, *Nature*, 319 (1986) 774-776.
- 11 Muller, D., Joly, M. and Lynch, G., Contributions of quisqualate and NMDA receptors to theinduction and expression of LTP, *Science*, **242** (1988) 1694-1697.
- 12 Peters, S., Koh, J. and Choi, D. W., Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartateon cortical neurons, *Science*, **236** (1987) 589-592.
- 13 Baba, A., Kihara, T., Sawada, T. and Iwata, H., Excitatory amino acids enhance dissociation of zinc from soluble protein in cytosol of rat hippocampus, Brain Research, 486 (1989) 372-375.
- 14 Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D. and Ullrich, A., The complete primary structure of protein kinase C the major phorbol ester receptor, *Science*, 233 (1986) 853-859.
- 15 Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ase, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y., Mode of activation and kinetic properities of three distinct forms of protein kinase C from rat brain, J. Biochem., 103 (1988) 759-765.
- 16 Speizer, L. A., Watson, M. J., Kanter, J. R. and Brunton, L. L., Inhibition of phorbol ester binding and protein kinase C activity by heavy metals, J. Biol. Chem., 264 (1989) 5581-5585.
- Murakami, K., Whiteley, M. K. and Routtenberg, A., Regulation of protein kinase C activity by cooperative interaction of Zn²⁺ and Ca²⁺, J. Biol. Chem., 262 (1987)

13902-13906.

- 18 Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. and Somogyi, J., Zinc can increase activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes, J. Biol. Chem., 263 (1988) 6487-6490.
- 19 Kihara, T., Ishihara, T., Baba, A. and Iwata, H., Effect of diphenylthiocarbazone (dithizone) on glutamate level in hippocampus preparation in vitro and in vivo, J. Pharmaco-Dyn., 13 (1990) 225-230.
- 20 Crawford, I. L. and Connor, J. D., Zinc in maturing rat brain: Hippocampal concentration and localization, *J. Neurochem.*, **19** (1972) 1451-1458.
- Bazzi, M. D. and Nelsestuen, G. L., Properties of membrane-inserted protein kinase C, *Biochemistry*, 27 (1988) 7589-7593.
- 22 Gopalakrishna, R., Barsky, S. H., Thomas, T. P. and Anderson. W. B., Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C, J. Biol. Chem., 261 (1986) 16438-16445.
- 23 Burgoyne, R. D., A role for membrane-inserted protein kinase C in cellular memory? *Trends Biochem. Sci.*, 14 (1989) 87-88.
- 24 Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. and Nishizuka, Y., Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters, J. Biol. Chem., 258 (1983) 11442-11445.
- Bartfai, T., Preparation of metal-chelate complexes and the design of steady-state kinetic experiments involving metal nucleotide complexes, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 10 (1979) 219-242.
- 26 Tanaka, Y., Miyake, R., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y., Rapid assay of binding of tumor-promoting phorbol esters to protein kinase C, *J. Biochem.*, **99** (1986) 257-261.

- 27 Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inomata, S. and Nishizuka, Y., Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain, J. Biol. Chem., 257 (1982) 13341-13348.
- 28 Laemmli, U. K., Cleavage of structiural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- 29 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulase sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979) 4350-4354.
- Lowly, O. H., Rosebrough, K. J., Farr, A. L. and Randall,
 R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent,
 J. Biol. Chem., 193 (1951) 265-275.
- 31 Ono, Y., Fujiki, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi,
 K. and Nishizuka, Y., Identification of three additional members of rat protein kinase C family: δ-, ε- and ζ-subspecies, *FEBS Lett.*, 226 (1987) 125-128.
- 32 Jaken, S. and Kiley, S. C., Purification and characterization of three types of protein kinase C from rabbit brain cytosol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 4418-4422.
- 33 Yoshida, Y., Huang, F. L., Nakabayashi, H. and Huang,
 K.-P., Tissue distribution and developmental expression of protein kinase C isozymes, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 9868-9873.
- Evans, R. H., Francis, A. A., Jones, A. W., Smith, D. A.
 S. and Watkins, J. C., The effects of a series of ω-phosphonic α-carboxylic amino-acids on electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal-cord preparations, Br. J. Pharmacol., 75 (1982) 65-75.

- 35 Ascher, P., Bregestovski, P. and Nowak, L., N-methyl-Daspartate activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions, J. Physiol., 399 (1988) 207-226.
- 36 Yeh, G.-C., Bonhaus, D. W. and McNamara, J. O., Evidence that zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor-gated ion channel activation by noncompetitive antagonism of glycine binding, *Mol. Pharmacol.*, 38 (1990) 14-19.
- Johnson, J. W. and Ascher, P., Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, *Nature*, 325 (1987) 529-531.
- 38 Fadda, E., Danysz, W., Wroblewski, J. T. and Costa, E., Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes, Neuropharmacology, 27 (1988) 1183-1185.
- 39 Brady, R. J. and Swann, J. W., The effects of extracellular calcium on the epileptiform activity and NMDA responses are different in mature and immature hippocampal slices, Soc. Neurosci. Abstr., 14 (1988) 98.7.
- 40 McDonald, J. W. and Johnston, M. V., Physiological and pathphysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development, *Brain Res. Rev.*, 15 (1990) 41-70.
- 41 Harris, K. M. and Teyler, T. J., Developmental onset of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampus, J. Physiol. (Lond.), 346 (1984) 27-48.
- 42 Hollingsworth, E. B., McNeal, E. T., Burton, J.L., Williams, R. J., Daly, J. W. and Creveling, C. R., Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosome preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes, J. Neurosci., 5 (1985) 2240-2253.

- 43 Nicolls, D. G., Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mirochondria from guineapig cerebral cortex and rat heart, *Biochem. J.*, **170** (1978) 511-522.
- 44 Dudek, S. M., Bowen, W. D. and Bear, M. F., Postnatal changes in glutamate stimulated phosphoinositide turnover in rat neocortical synaptoneurosomes, *Dev. Brain Res.*, 47 (1989) 123-128.
- Baudry, M., Evans, J. and Lynch, G, Excitatory amino acids inhibit stimulation of phosphatidylinositol metabolism by aminergic agonistsa in hippocampus, Nature, 319 (1986) 329-331.
- 46 Nicoletti, F., Iadarola, M. J., Wrolewski, J. T. and
 Costa, E., Excitatory amino acid recognition sites
 coupled with inositol phospholipid metabolism:
 Developmental changes and interaction with α₁-adrenoceptors,
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (1986) 1931-1935.
- 47 Manzoni, O. J. J., Finiels-Marlier, F., Sassetti, I., Blokaert, J., Peuch, C. and Sladeczek, F. A. J., The glutamate receptor of the Qp-type activates protein kinase C and is regulated by protein kinase C, *Neurosci. Lett.*, 109 (1990) 146-151.
- 48 Schoepp, D. D. and Johnson, B. G., Excitatory amino acid agonist-antagonist interactions at 2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive quisqualate receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis in slices of rat hippocampus, J. Neurochem., 50 (1988) 1605-1613.
- 49 Armsted, W. M., Mirro, R., Leffler, C. W. and Busija, D.
 W., The role of prostanoids in the mediation of responses to KC-404, a novel cerebrovasodilator, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244 (1988) 138-143.

- 50 Eda, K., Ohashi, M. and Nishino, K., Effect of KC-404 on antigen-induced increase in vascular permeability in guinea pig airway smooth muscle, *Jpn. J. Pharmacol.*, **43** (1987) 178.
- 51 Ohashi, M., Nakai, R., Nishino, K., Sato, T. and Takayanagi, I., Antagonistic effects of KC-404, a new anti-asthmatic agent, on leukotriene D₄-induced contraction responses in isolated guinea pig smooth muscles, *Prostaglandins*, 32 (1986) 875-888.
- 52 Etoh, S., Ohashi, M., Baba, A. and Iwata, H., Inhibition of ibudilast of leukotriene D₄-induced formation of inositol phosphates in guinea-pig lung, *Br. J. Pharmacol.*, 100 (1990) 564-568.
- 53 Hirayama, T., Ohashi, M. and Nishino, K., Effect of ibudilast on long-term potentiation in guinea-pig hippocampal slices, *Jpn, J. Pharmacol*, **52** (1990) 355.
- 54 Schwartz, R. D., Suzdak, P. D. and Paul, S. M., γ-Aminobutyric acid (GABA)- and barbiturate-mediated ³⁶Cl⁻ uptake in rat brain synaptoneurosomes: evidence for rapid desensitization of the GABA receptor-coupled chloride ion channel, *Mol. Pharmacol.*, **30** (1986) 419-426.
- 55 Gusovsky, F. and Daly, J. W., Formation of inositol phosphates in synaptoneurosomes of guinea pig brain: stimulatory effects of receptor agonists, sodium channel agents and sodium and calcium ionophores, *Neuropharmacology*, **27** (1988) 95-105.
- 56 Watkins, J. C. and Evans, R. H., Excitatory amino acid transmitters, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21** (1981) 165-204.
- 57 Ascher, P. and Nowak, L., Quisqualate- and kainateactivated channels in mouse central neurones in culture, *J. Physiol.*, **399** (1988) 227-245.

- 58 Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. and Nishizuka. Y., Activation of calcium and phospholipiddependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover, J. Biol. Chem., 255 (1980) 2273-2276.
- 59 Kolesnick, R. N. and Clegg, S., 1,2-Diacylglycerols, but not phorbol esters, activate a potential inhibitory pathway for protein kinase C in GH₃ pituitary cells, J. Biol. Chem., 263 (1988) 6534-6537.
- 60 Crawford, I. L. and Connor, J. D., Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fibre pathway, *Nature*, **244** (1973) 442-443.
- 61 Howell, G. A., Welch, M. G. and Frederickson, C. J., Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices, *Nature*, **308** (1984) 736-738.
- 62 Aniksztejn, L., Charton, G. and Ben-Ari, Y., Selective release of endogeneous zinc from the hippocampal mossy fibers in situ, *Brain Research*, **404** (1987) 58-64.
- Assaf, S. Y. and Chung, S.-H., Release of endogeneous Zn²⁺ from brain tissue during activity, *Nature*, 308 (1984) 734-736.
- 64 Charton, G., Rovira, C., Ben-Ari, Y. and Leviel, Y., Spontaneous and evoked release of endogeneous zinc in the hippocampal mossy fiber zone of the rat in situ, *Exp. Brain Res.*, **58** (1985) 202-205.
- 65 Frederickson, C. J., Klitenick, M. A., Manton, W. I. and Kirkpatrick, J. B., Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat, *Brain Research*, 273 (1983) 335-339.
- 66 Slevin, J. T and Kasarskis, E. J., Effects of zinc on markers of glutamate and aspartate neurotransmission in rat hippocampus, *Brain Research*, **334** (1985) 281-286.

- 67 Valdes, J. J., Hartwell, S. W., Sato, S. M. and Frazier,
 J. M., Lateralization of zinc in rat brain and its
 relationship to a spatial behavior, *Pharmacol. Biochem.*Behav., 16 (1982) 915-917.
- 68 Arslan, P., Virgilio, F. D., Beltrame, M., Tsien, R. Y. and Pozzan, T., Cytosolic Ca²⁺ homeostasis in Ehrich and Yoshida carcinomas: a new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca²⁺, J. Biol. Chem., 260 (1985) 2719-2727.
- 69 Forbes, I. J., Zalewski, P. D., Hurst, N. P., Giannakis, C. and Whitehouse, M. W., Zinc increases phorbol ester receptors in intact B-cells, neutrophil polymorphs and platelets, *FEBS Lett.*, 247 (1989) 445-447.
- Donaldson, J., St. Pierre, T., Minnich, J. L. and Barbeau,
 A., Determination of Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, and Mn²⁺
 in rat brain regions, *Can. J. Biochem.*, 51 (1973) 87-92.
- 71 Dreosti, I. E., In Frederickson, C. J., Howell, G. A. and Kasarskis, (Eds.), The Neurobiology of Zinc, Part B. pp.1-26, Liss, New York (1984)
- 72 Kawamoto, J. C. and Halas, E. S., In Frederickson, C. J., Howell, G. A. and Kasarskis, (Eds.), The Neurobiology of Zinc, Part B. pp.33-48, Liss, New York (1984)
- Kihara, T., Baba, A., Ishihara, T. and Iwata, H., Inhibition of [³H]glutamate release by Zn²⁺ in rat hippocampal slices, J. Pharmaco-Dyn., 13 (1990) 321-326.
- 74 Weiss, J. H., Koh, J.-Y., Christine, C. W. and Choi, D. W., Zinc and LTP, *Nature*, **338** (1989) 212.
- 75 Lincoln, J., Coopersmith, R., Harris, E. W., Cotman, C. W. and Leon, M., NMDA receptor activation and early olfactory learning, *Dev. Brain Res.*, **39** (1988) 309-312.

- 76 Vaccarino, F., Guidotti, A. and Costa, E., Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 8707-8711.
- 77 Diaz-Guerra, M. J. M., Sanchez-Prieto, J., Bosca, L., Pocock, J., Barrie, A. and Nicholls, D., Phorbol ester translocation of protein kināse C in guinea-pig synaptosomes and the potentiation of calcium-dependent glutamate release, *Biochim. Biophys. Acta*, **970** (1988) 157-165.
- 78 Zatz, M., Translocation of protein kinase C in rat hippocampal slices, *Brain Research*, **385** (1986) 174-178.

· · ·