

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

1991年

江藤 勸

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

1991年

江藤 勸

目 次

緒 論	1
本 論	2
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	2
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	2
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	7
第 3 節 考察と小括	12
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	14
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	14
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	20
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	26
第 4 節 考察と小括	29
第 III 章 プロテインキナーゼ C の細胞内移動における 内在性 Zn^{2+} の関与	32
第 1 節 NMDA によるプロテインキナーゼ C の移動に対する Zn^{2+} キレート薬 TPEN の抑制作用	32
第 2 節 TPEN の作用機序に関する検討	36
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	39
第 4 節 考察と小括	44
総括と考察	46
謝 辞	49
引用文献	50

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、 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)}、PKC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。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 Zn^{2+} 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、 Zn^{2+} によりNMDA受容体とカップルした Ca^{2+} チャン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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} の結合構造に類似した部分が存在しており¹⁴⁾、PKC活性が Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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)。

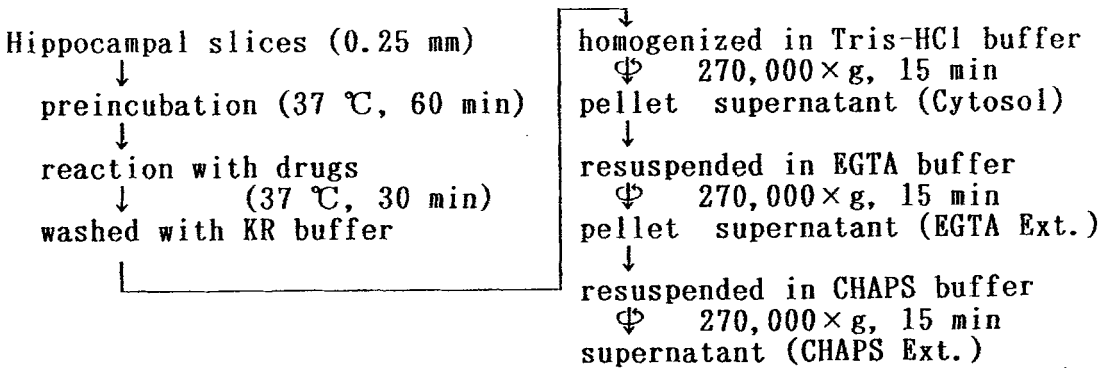


Fig. 1. Procedure for reaction of slices and preparation of three fractions

実験方法

実験には、1週齢（体重 10-15 g）、または10週齢（体重 180-250 g）の Sprague-Dawley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、McIlwain tissue chopperを使用して厚さ250 μ mの切片を作成し、95%O₂/5% 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°C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°Cで30分間 Mg-free 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1 μ M²⁵⁾とした緩衝液(25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 μ M leupeptin, 815.8 μ M 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, 100 μ M 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°C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、200 μ lの反応緩衝液: 20 mM Tris-maleate, 100 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 100 μ g/ml phosphatidylserine, 30 nM [³H]PDBu, 0.5 % dimethylsulfoxide (DMSO) (pH 6.8)に50 μ lのサンプルを加え、30°C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15 μ 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, 200 μ g/ml H₁ histone, 1.25 mM CaCl₂, 4 μ g/ml phosphatidylserine, 0.8 μ g/ml dioleine, 10 μ M [γ -³²P]ATP (pH 7.5)に、25 μ g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、0.45 μ m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 μ 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PKC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-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-chloro-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、100 μ M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、100 μ M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 binding sites in immature and mature rat hippocampal slices

	[³ H]PDBu binding (% of total binding)		
	Cytosol	EGTA Ext.	CHAPS Ext.
Immature (1 Week)			
None	43.1 ± 0.6	28.0 ± 1.2	29.0 ± 1.7
100 μM NMDA	7.6 ± 1.1***	48.2 ± 1.7***	44.1 ± 0.6***
Mature (10 Weeks)			
None	58.0 ± 1.5	15.8 ± 0.9	26.2 ± 0.6
100 μM 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 ± S.E.M. of four experiments.

Total homogenate binding (pmol/mg protein) are determined:

None (1W), 2.88 ± 0.32; 100 μM NMDA (1W), 2.56 ± 0.24;

None (10W), 6.54 ± 0.56; 100 μM NMDA (10W), 6.36 ± 0.42;

1 mM NMDA (10W), 6.47 ± 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に対するモノクローナル抗体を用いて、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、IIIは多く認められ、また海馬切片を100 μMのNMDAで処置することにより、PKCのタイプII、III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 blotting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)。

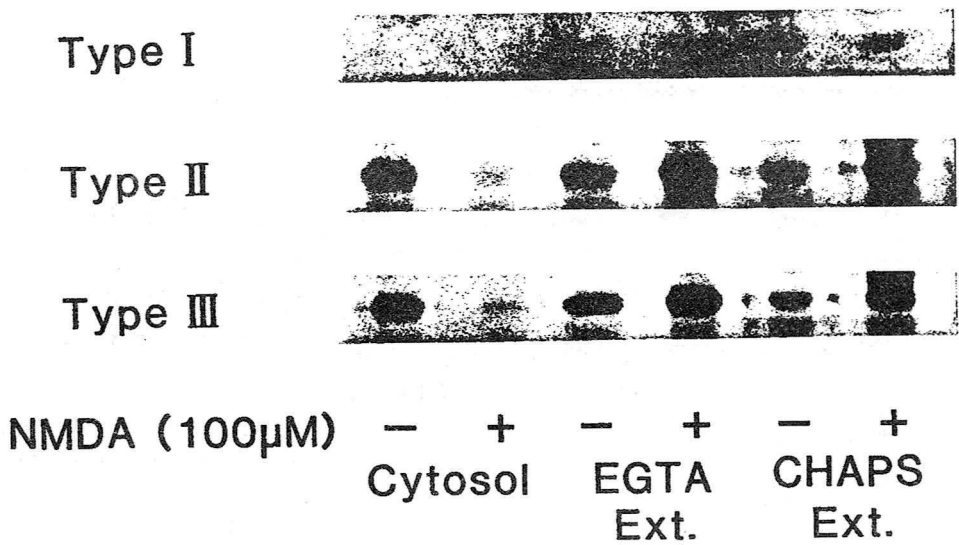


Fig. 2. Immunoblot analysis of NMDA-induced translocation of protein kinase C. Cytosol, EGTA Ext. and CHAPS Ext. fractions (50 µg of protein each) were separated by SDS-PAGE (10 % gel) and transferred to nitrocellulose membrane. Each membrane were analyzed by immunoblotting with type I-, II-, and III-specific 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	63.4 ± 1.5	17.3 ± 0.7	19.3 ± 0.9
100 µM NMDA	17.3 ± 0.8***	47.5 ± 1.3***	35.2 ± 1.6***

Values are means ± S.E.M. of three experiments. None and NMDA-treated total homogenate activity are 3.45 ± 0.26 and 3.19 ± 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 $[^3\text{H}]$ 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-Dawley系雄性ラットを使用した。切片の反応、各分画の調製及び $[^3\text{H}]$ 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 $100\mu\text{M}$ 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(Glu)が $100\mu\text{M}$ の濃度でPKCの移動を引き起こさなかった(Fig. 3)ことからGluの用量反応を検討したところ、NMDAが $20\mu\text{M}$ の濃度から有意なPKCの移動を引き起こしたのに対して、Gluでは $200\mu\text{M}$ 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 $500\mu\text{M}$ の濃度で $100\mu\text{M}$ NMDAによるPKCの移動を完全に抑制した。また外液のKBから Ca^{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 10mM の Mg^{2+} や Mg^{2+} 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 1mM の Zn^{2+} はNMDA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)。

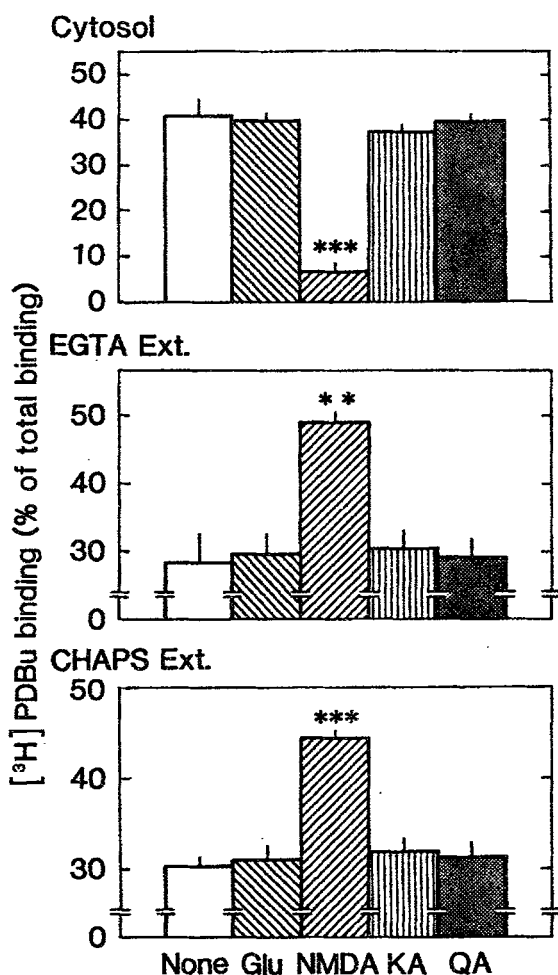


Fig. 3. Effect of excitatory amino acids on distribution of $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ binding sites in immature rat hippocampal slices.

Slices were incubated for 30 min at 37°C in the presence of $100\ \mu\text{M}$ glutamate (diagonal lines), $100\ \mu\text{M}$ NMDA (cross-hatch), $100\ \mu\text{M}$ kainate (vertical lines) or $100\ \mu\text{M}$ quisqualate (stippled). Cytosol, EGTA Ext. and CHAPS Ext. fractions were prepared and then $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ binding to each fractions was determined, independently. Results are shown as the percentage of $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ 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.

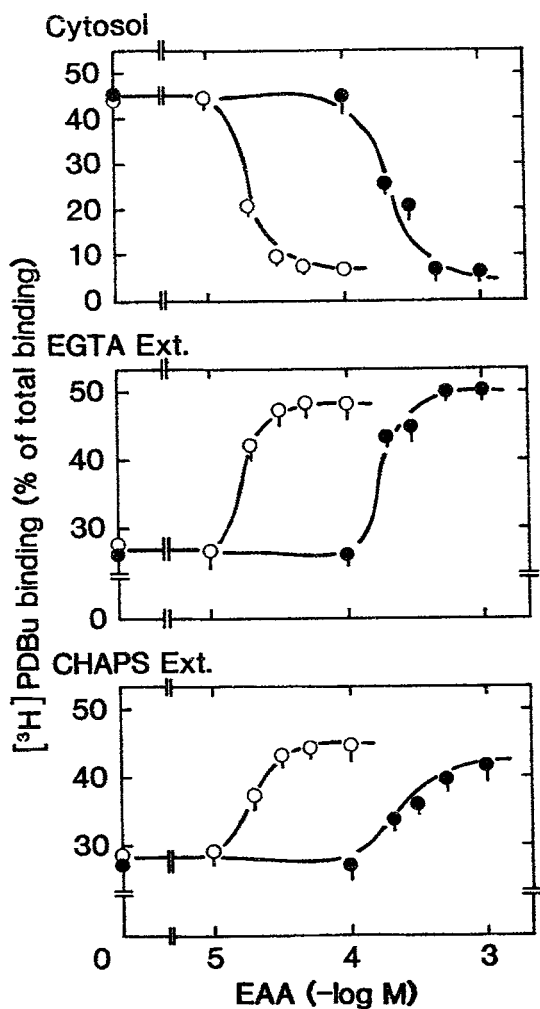


Fig. 4. Dose response curve of NMDA- and glutamate-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were incubated for 30 min at 37 °C with several concentrations of NMDA (○) and glutamate (●). Values are means ± S.E.M. of four experiments. * P < 0.05, ** P 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

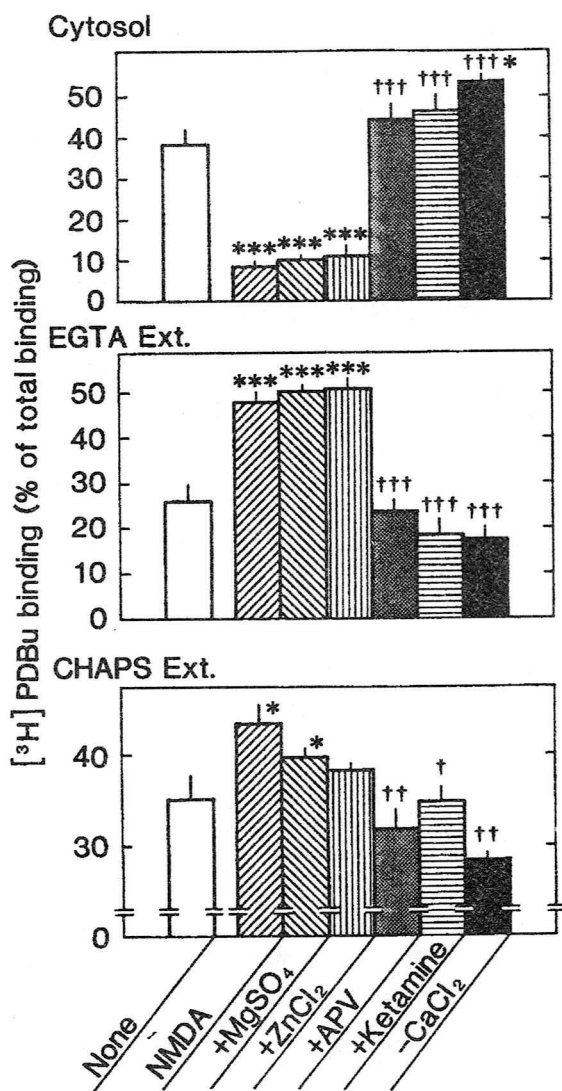


Fig. 5. Effect of NMDA antagonists on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 100 μM NMDA (▨) with 10 mM MgSO₄ (▩), 1 mM ZnCl₂ (▧), 500 μM APV (▦) or 500 μM ketamine (▤), or in the presence of 100 μM NMDA in Ca²⁺-free KR buffer (■). 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.

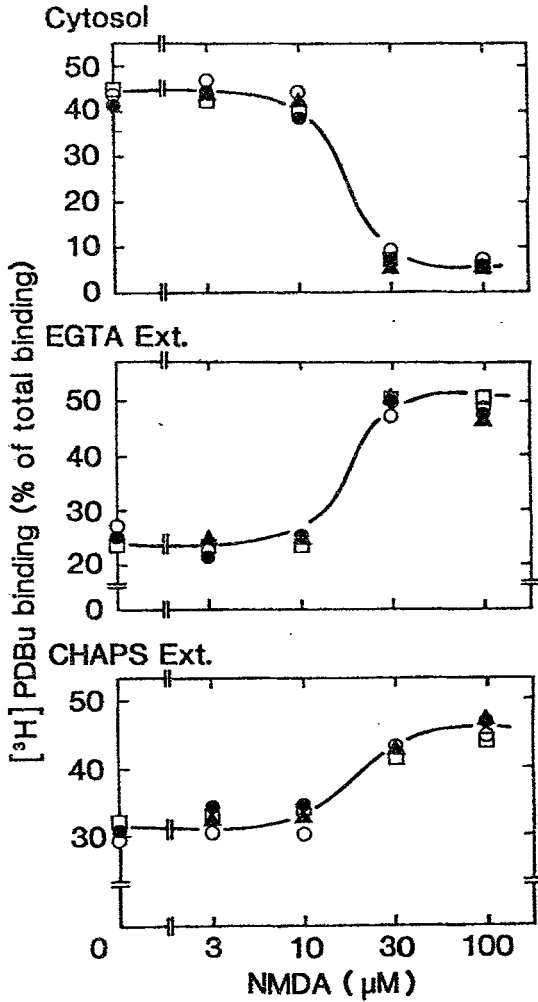


Fig. 6. Effect of glycine on NMDA-induced translocation of $[\text{}^3\text{H}]\text{PDBu}$ binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were incubated for 30 min at $37\ \text{C}$ in the presence of several concentration of glycine: None (\circ), $1\ \mu\text{M}$ (\bullet), $10\ \mu\text{M}$ (\blacktriangle), $100\ \mu\text{M}$ (\square) 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NMDA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。PKCの細胞内移動は細胞質分画と細胞膜分画における $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ 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Western 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 $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ 結合の変化は、PKCの移動を反映していることを確認した。Western 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II、III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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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NMDA受容体とカップルした Ca^{2+} チャネルを阻害する Mg^{2+} ³⁵⁾や、 Mg^{2+} とは別の部位に作用して Ca^{2+} チャネルを阻害する Zn^{2+} ³⁶⁾、さらにNMDA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 Ca^{2+} チャネル複合体が膜電位依存性の Mg^{2+} 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 Ca^{2+} 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樞神経系においては、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NMDA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 I 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⁹⁾、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 PKC 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 PKC 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-Dawley 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 I 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。

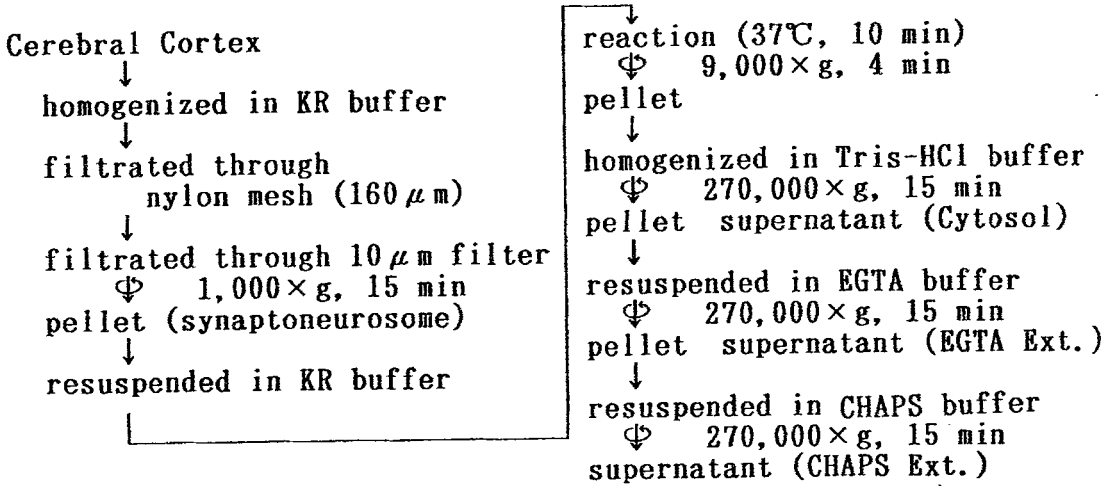


Fig. 7. Procedure for preparation of synaptoneuroosomes and three fractions

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、160 μm のナイロンメッシュでろ過した後、10 μm 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°C 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 1 μM free Ca²⁺ 緩衝液 (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 μM leupeptin, 815.8 μM 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 $[^3\text{H}]$ 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 $[^3\text{H}]$ PDBu binding sites in mature rat and guinea pig cerebral slices

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

一方、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 $[^3\text{H}]$ 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 $[^3\text{H}]$ PDBu binding sites in mature rat and guinea pig cerebral synaptoneurosomes

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

Total homogenate binding (pmol/mg protein) are determined:

Slices, 8.38 ± 0.54; Synaptosomes, 6.44 ± 0.57;

Synaptoneuroosomes, 6.26 ± 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、100 μ M以上の濃度で 5-10 %の有意なPKCの移動が認められた。(Fig. 8)

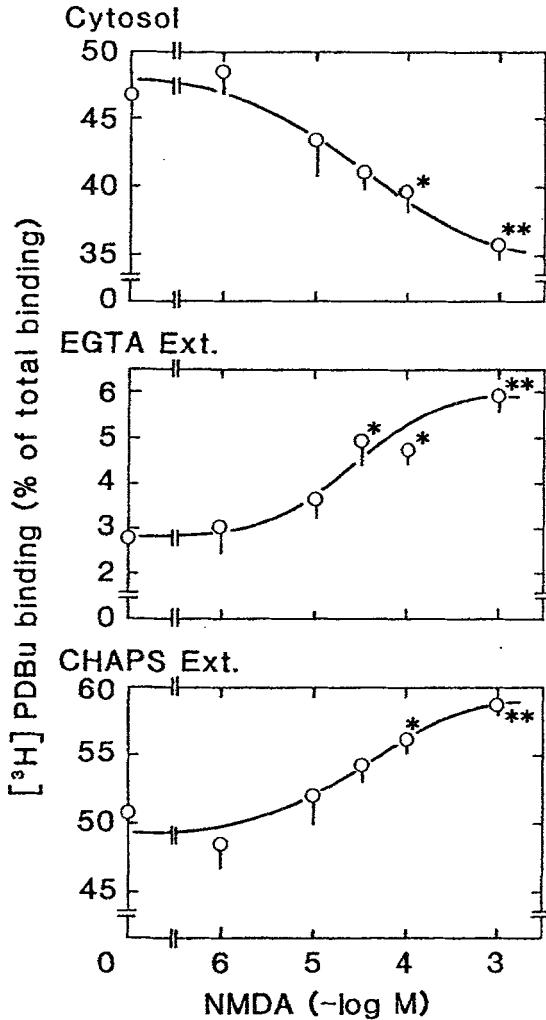


Fig. 8. Dose response curve of NMDA-induced translocation of [3 H]PDBu binding sites in guinea pig synaptoneuroosomes. Synaptoneuroosomes were incubated for 10 min at 37 °C with several concentrations of NMDA. Cytosol, EGTA Ext. and CHAPS Ext. fractions were prepared and then [3 H]PDBu binding to each fractions was determined independently as described previously. 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 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300-500g）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、 $[^3\text{H}]$ PDBu結合の測定は第I章第1節の方法に従って行なった。

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みは、シナプトニューロソームをKRHにサスペンドし37°Cで5分間インキュベートした後、1.3 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ 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 $[^3\text{H}]$ myo-inositolを取り込ませた後、10 mM LiCl存在下に薬物と37°C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、100 μM のKAやQAではPKCの移動は認められなかった(Fig. 9)。

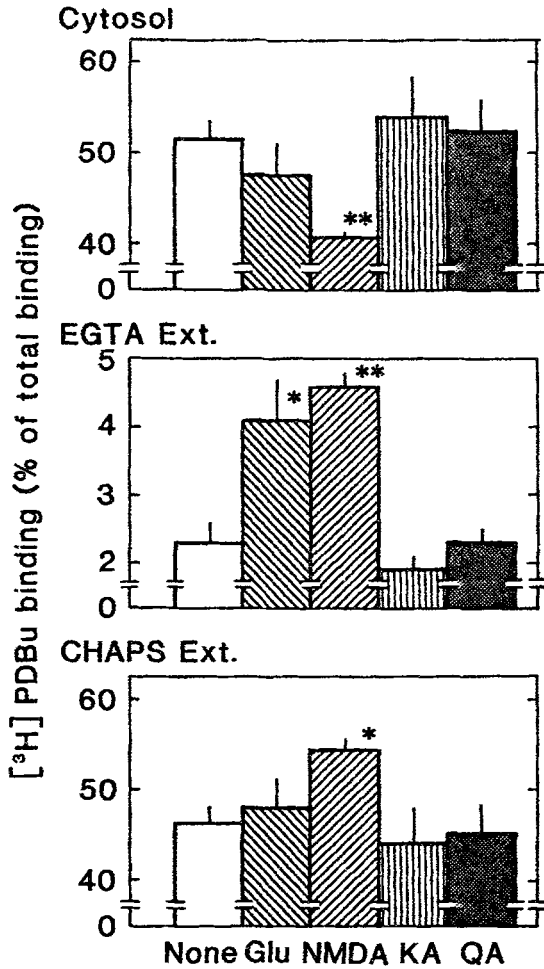


Fig. 9. Effect of excitatory amino acids on distribution of $[^3\text{H}]$ PDBu binding sites in guinea pig synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were incubated with $100 \mu\text{M}$ of each excitatory amino acids as described in Fig. 8. Results are shown as the percentage of $[^3\text{H}]$ PDBu binding 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.

また、シナプトニューロソーム内への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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)代謝系と関連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、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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)。

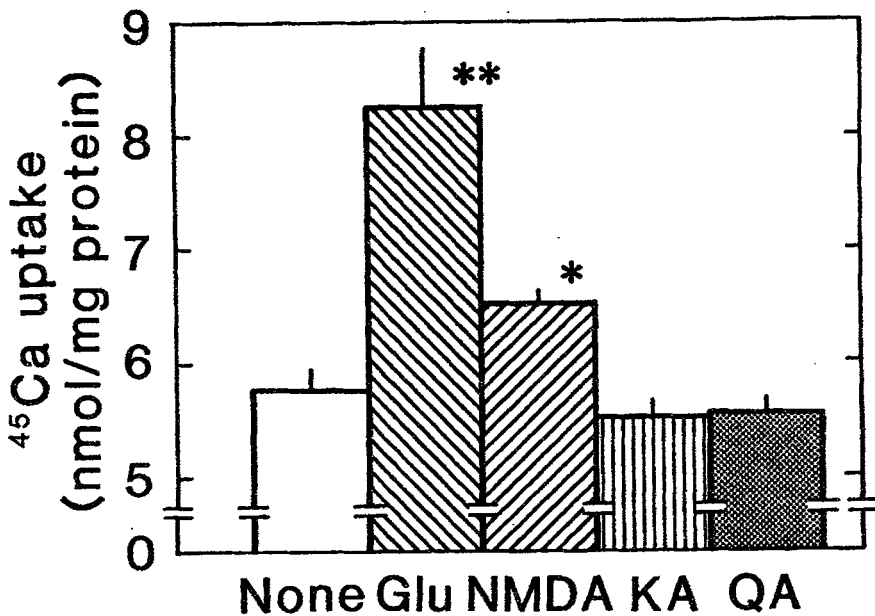


Fig. 10. Effect of excitatory amino acids on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake into guinea pig synaptoneuroosomes. Synaptoneuroosomes were incubated for 10 min at 37°C with $1.3\text{ mM }^{45}\text{CaCl}_2$ in the presence of either $100\text{ }\mu\text{M}$ glutamate (▨), $100\text{ }\mu\text{M}$ NMDA (▧), $100\text{ }\mu\text{M}$ kainate (▩) or $100\text{ }\mu\text{M}$ quisqualate (■). Values are means \pm S.E.M. of four experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus none.

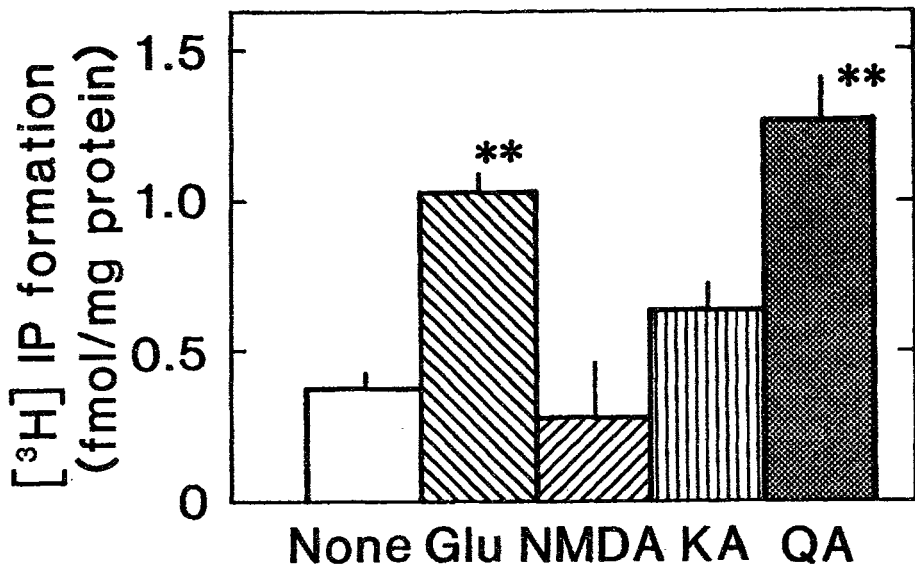


Fig. 11. Effect of excitatory amino acids on formation of [³H]inositol-1-phosphate in guinea pig synaptoneuroosomes. [³H]Inositol-labeled synaptoneuroosomes were incubated for 20 min at 37 °C in the presence of either 100 μM glutamate (▨), 100 μM NMDA (▧), 100 μM kainate (▩) or 100 μM quisqualate (▦). Values are means ± S.E.M. of 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)。500 μMのAPVおよびketamine、そして10 mM Mg²⁺により、100 μM NMDA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)。

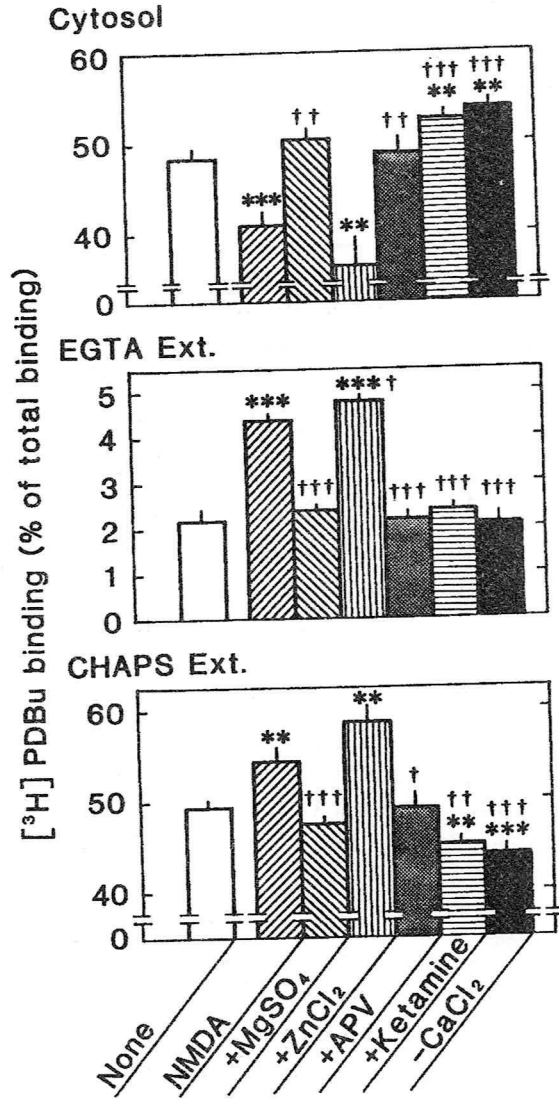


Fig. 12. Effect of NMDA antagonists on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig synaptosomes. Synaptosomes were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 100 μM NMDA (▨) with 10 mM MgSO₄ (▧), 1 mM ZnCl₂ (▩), 500 μM APV (▦) or 500 μM ketamine (▥), or in the presence of 100 μM NMDA in Ca²⁺-free KR buffer (■). 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 μM NMDA.

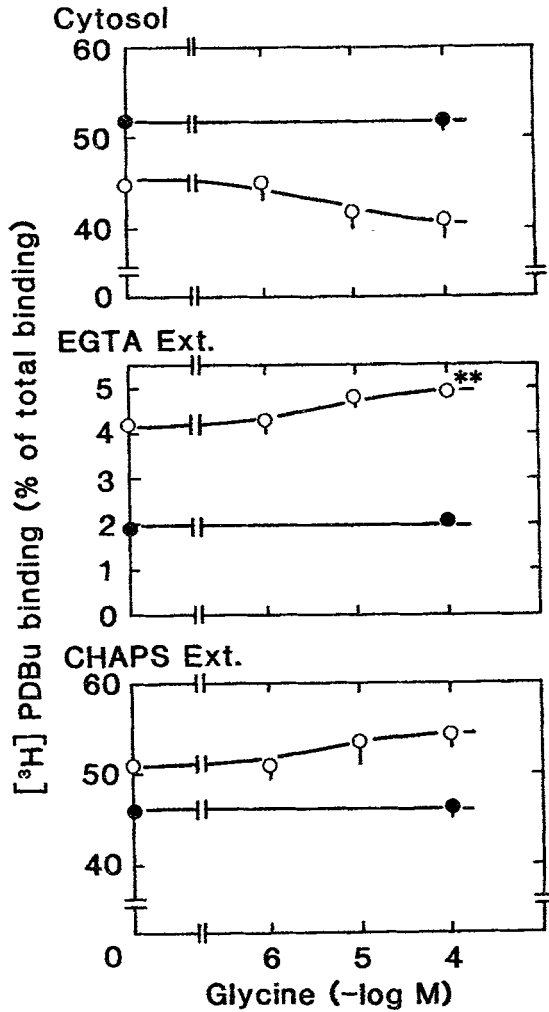


Fig. 13. Effect of glycine on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were incubated for 10 min at 37 °C with several concentration of glycine in the absence (●) and presence (○) of 100 μM NMDA. Results are shown as the percentage of [³H]PDBu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

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P I代謝促進を抑制することを見だし、既報⁵²⁾において明らかにしている。Hirayama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⁴⁵Ca²⁺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GluによるP I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
100 μM NMDA	39.1 ± 1.1*	4.7 ± 0.3*	56.2 ± 1.0*
10 μM ibudilast			
None	45.8 ± 1.2	3.1 ± 0.3	51.1 ± 1.2
100 μM NMDA	38.9 ± 1.4*	4.4 ± 0.2*	56.7 ± 1.4*

Values are means ± S.E.M. of three experiments.

* P < 0.05, ** P < 0.01 versus None.

Table 7. Effect of ibudilast on ⁴⁵Ca²⁺ uptake in guinea pig cortical synaptoneurosomes

	⁴⁵ Ca ²⁺ uptake (nmol/mg protein/10 min)	
	Control	10 μM ibudilast
None	5.63 ± 0.15	5.58 ± 0.18
100 μM NMDA	6.62 ± 0.16*	6.71 ± 0.11*
40 mM KCl	8.79 ± 0.22***	8.88 ± 0.25***

Values are means ± 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 synaptoneuroosomes

IP ₁ formation (fmol/mg protein/20 min)		
	Control	10 μ M ibudilast
None	0.38 \pm 0.06	0.41 \pm 0.08
100 μ M glutamate	1.03 \pm 0.06**	0.99 \pm 0.13*

Values are means \pm S.E.M. of three experiments.

* P < 0.05, ** P < 0.01 versus None

第4節 考察と小括

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⁾、 Ca^{2+} や Cl^- 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、NMDA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 Ca^{2+} 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 Mg^{2+} 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 Ca^{2+} チャン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

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P I代謝系とカップルしたものの存在が報告された⁴⁶⁻⁴⁸⁾。P I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、P I代謝系に対する影響を比較検討した。その結果、⁴⁵Ca²⁺の取り込みについては、GluとNMDAのみで増加作用がみられ、P I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、P I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、Glu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、Gluよりもさらに多くのCa²⁺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P I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、P I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

1. 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。
2. 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 Ca^{2+} 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 プロテインキナーゼCの細胞内移動における内在性 Zn^{2+} の関与

第Ⅰ章、第Ⅱ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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} キレート薬TPENの抑制作用

中枢神経系には高濃度の Zn^{2+} 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⁾。 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} の役割として、NMDA受容体刺激によるPKCの移動に対する内在性の Zn^{2+} の関与を、 Zn^{2+} 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(2-pyridylmethyl)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、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週齢のSprague-Dawley系ラット(体重 10-15 g)の海馬切片については、第I章第1節に従い、反応、各分画の調製を行なった。ただし、TPEN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⁺と混合し、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 mM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. Incorporation of TPEN and its zinc complex into guinea pig synaptoneurosomes

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

Values are means \pm S.E.M. of three experiments.

* P < 0.05, ** P < 0.01 versus Control

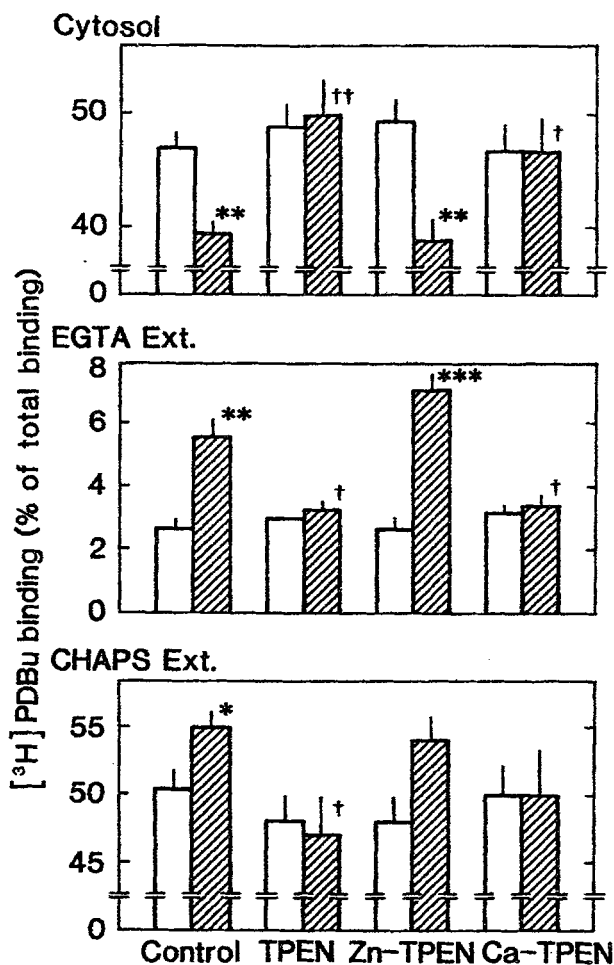


Fig. 14. Effect of TPEN and its metal complexes on NMDA-induced translocation of $[^3\text{H}]$ PDBu binding sites in guinea pig synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were preincubated with 100 μM TPEN, Zn-TPEN or Ca-TPEN for 5 min and then incubated in the presence (▨) or absence (\square) of 100 μM NMDA for 10 min. Zn-TPEN and Ca-TPEN show mixtures of 100 μM TPEN and 100 μM ZnCl_2 or 100 μM CaCl_2 , respectively, and these mixture were prepared 1 hr before the addition to synaptoneurosomes. Cytosol, EGTA-Ext. and CHAPS-Ext. fractions were prepared and then $[^3\text{H}]$ PDBu binding to each fractions was determined independently as described previously. Results are shown as the percentage of $[^3\text{H}]$ PDBu binding in the each fractions to the total binding. Values are means \pm S.E.M. of four experiments.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus none.
 † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ versus control.

また、幼若ラット海馬切片においても、切片を100 μ M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)。

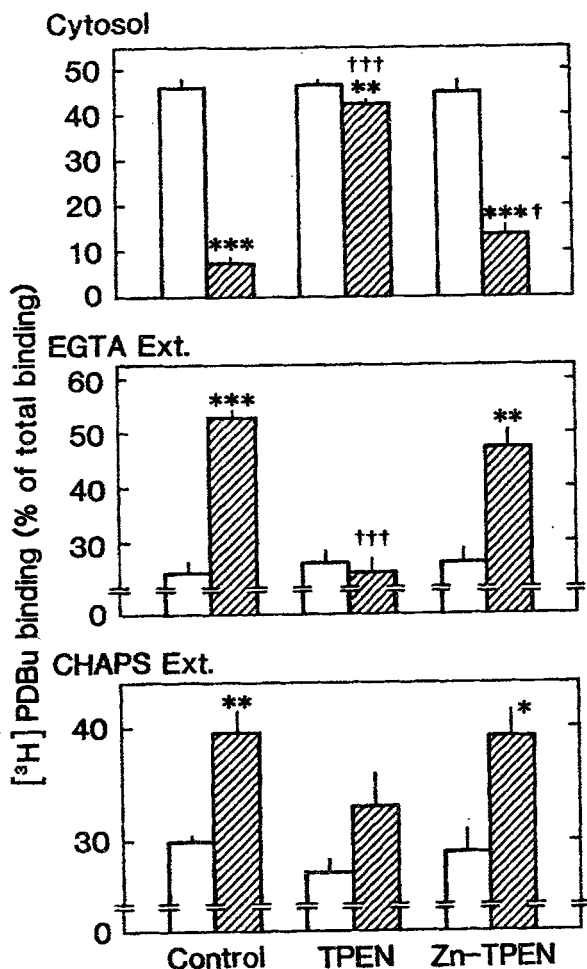


Fig. 15. Effect of TPEN and Zn-TPEN complexes on NMDA-induced translocation of [³H]PDBu binding sites in immature rat hippocampal slices. Slices were preincubated with 100 μ M TPEN and Zn-TPEN for 60 min and then incubated in the presence (▨) or absence (□) of 100 μ M NMDA for 30 min. Values are means \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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} とTPENの影響は、25 μ MのQuin2を含む Ca^{2+} を除いたKRH溶液に10 μ M $CaCl_2$ を加えて蛍光を生じさせて、 Zn^{2+} 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 $^{45}Ca^{2+}$ 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 Zn^{2+} 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 Ca^{2+} を添加し発生させた蛍光は、 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} によるQuin2の蛍光の減少を回復させた(Fig. 16)。

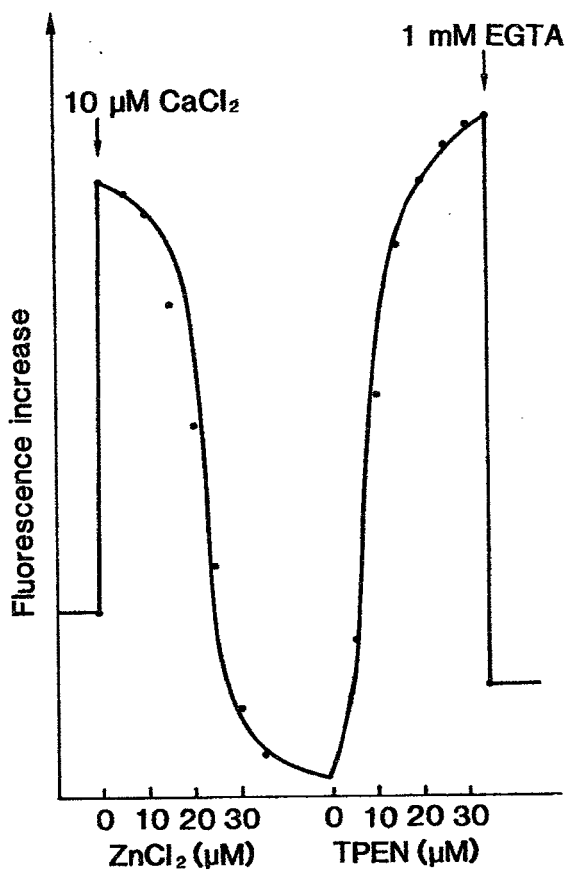


Fig. 16. Effect of Zn²⁺ and TPEN on quin-2 fluorescence in solution.

またTPENは 100 μ M 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 Ca^{2+} 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、 Zn^{2+} 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 $^{45}Ca^{2+}$ uptake
in guinea pig cortical synaptoneuroosomes

	$^{45}Ca^{2+}$ uptake (nmol/mg protein/10 min)	
	Control	100 μ M TPEN
None	5.63 \pm 0.15	5.77 \pm 0.17
100 μ M NMDA	6.62 \pm 0.16*	6.47 \pm 0.03*
40 mM KCl	8.79 \pm 0.22***	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 \pm 0.11	3.59 \pm 0.40
100 μ M $ZnCl_2$	2.11 \pm 0.05***	3.31 \pm 0.24 $\dagger\dagger$

Values are means \pm S.E.M. of three experiments.

*** $p < 0.001$ versus None, $\dagger\dagger p < 0.01$ 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Ca^{2+} の流入を起し、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。100 μ MのTPEN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 Ca^{2+} および Zn^{2+} 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、 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} 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 Ca^{2+} と500 μ M Zn^{2+} 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、 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)。

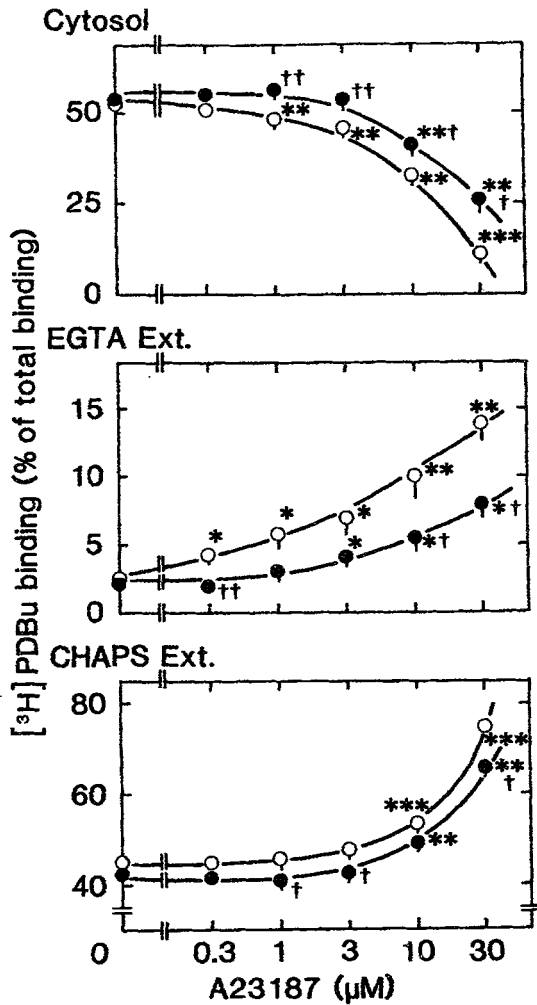


Fig. 17. Effect of TPEN on dose response curve of A23187-induced translocation of $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ binding sites in guinea pig synaptoneuroosomes. Synaptoneuroosomes were preincubated with (○) or without (●) 100 μM TPEN for 5 min and then incubated with several concentration of A23187 for 10 min. Results are shown as the percentage of $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ 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. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ versus control.

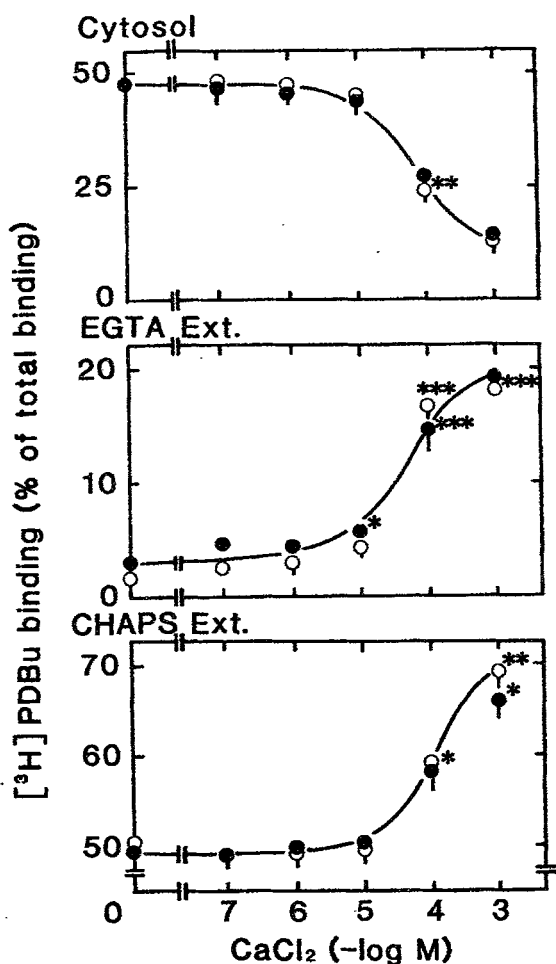


Fig. 18

Fig. 18. Effect of Ca^{2+} and TPEN on distribution of $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37°C in the absence (\bullet) or presence (\circ) of $100\ \mu\text{M}$ TPEN with several concentration of CaCl_2 . Values are means \pm S.E.M. of four experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus None.

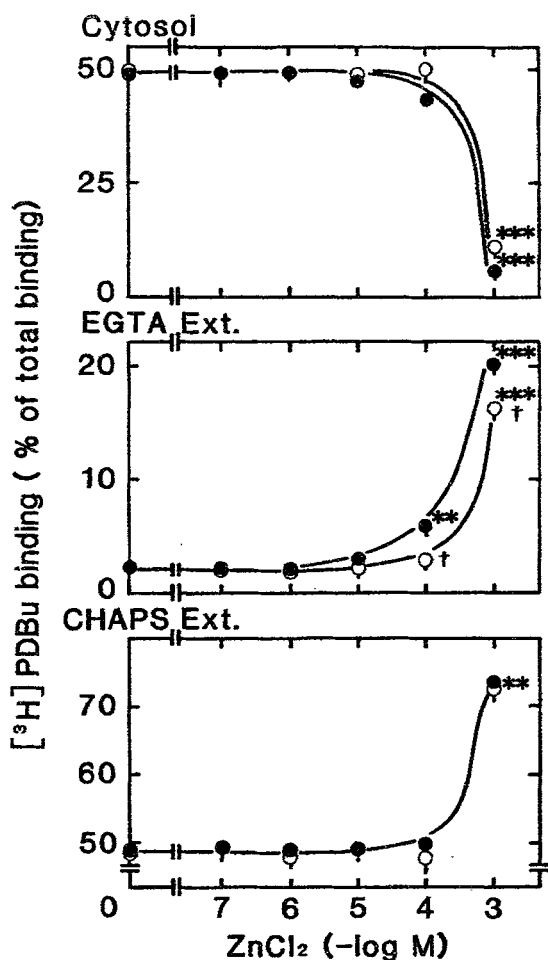


Fig. 19

Fig. 19. Effect of Zn^{2+} and TPEN on distribution of $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37°C in the absence (\bullet) or presence (\circ) of $100\ \mu\text{M}$ TPEN with several concentration of ZnCl_2 . Values are means \pm S.E.M. of four experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus None.

† $P < 0.05$ versus control.

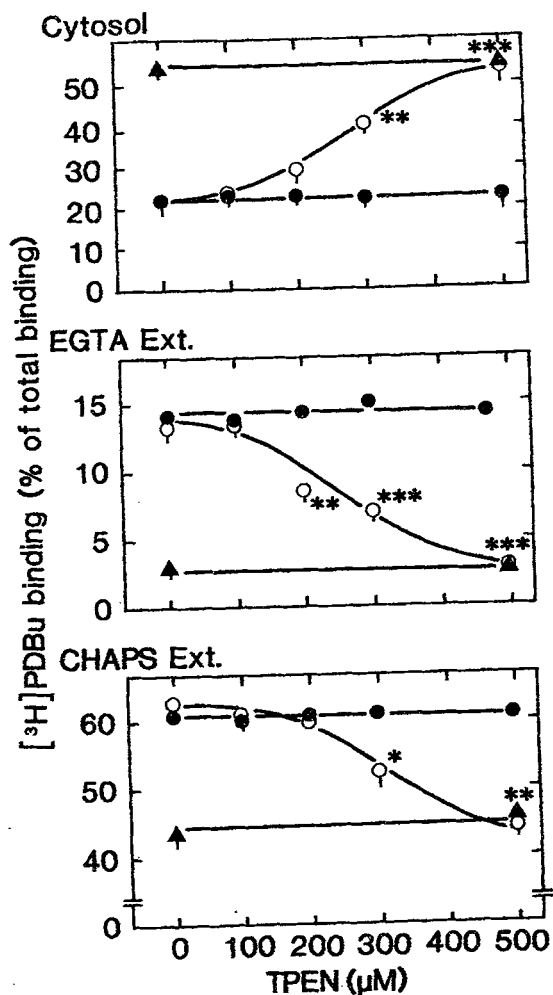


Fig. 20. Effect of TPEN on Ca^{2+} - or Zn^{2+} -induced translocation of [³H]PDBu binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37 °C in the absence (▲) or presence of 100 μM CaCl_2 (●) or 500 μM ZnCl_2 (○) with several concentration of TPEN. Results are shown as the percentage of [³H]PDBu binding in the each fractions to the total binding. Values are means ± 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 $10\mu\text{M}$ の Zn^{2+} をホモジネートに添加すると、 $10\mu\text{M}$ の Ca^{2+} 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)。

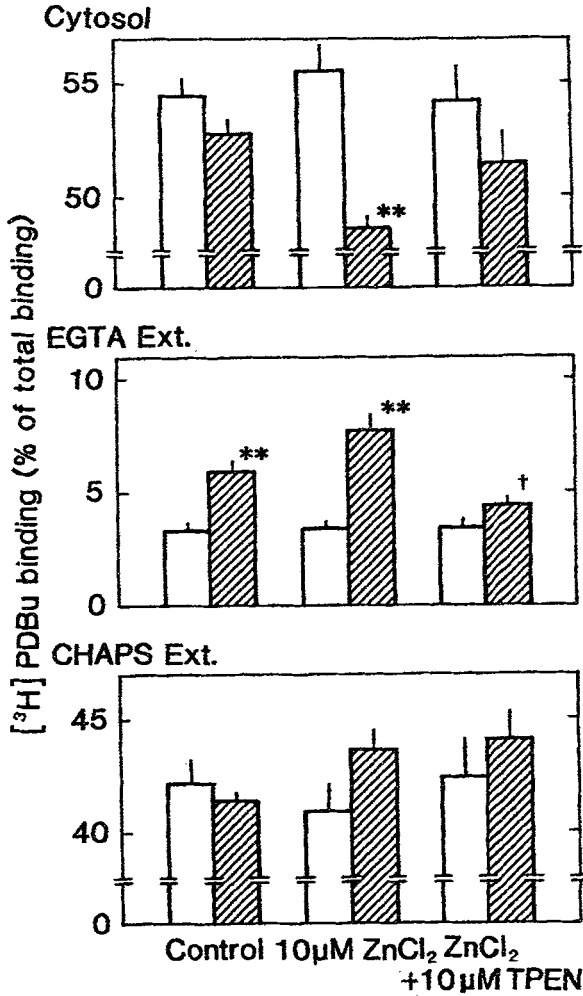


Fig. 21. Effect of TPEN on Ca^{2+} - and Zn^{2+} -induced translocation of $[^3\text{H}]$ PDBu binding sites in guinea pig cerebral homogenate. Homogenate was incubated for 10 min at 37°C in the presence (▨) or absence (□) of $10\mu\text{M CaCl}_2$ with $10\mu\text{M ZnCl}_2$ or $10\mu\text{M TPEN}$. Results are shown as the percentage of $[^3\text{H}]$ PDBu binding in the each fractions to the total binding. Values are means \pm S.E.M. of four experiments. ** $P < 0.01$ versus none. † $P < 0.05$ versus $10\mu\text{M ZnCl}_2$.

第4節 考察と小括

考 察

Zn^{2+} は神経系において、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} について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200-300 μ M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 $[^3H]Glu$ 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} 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 Zn^{2+} の影響を、膜透過性の重金属のキレートである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 Zn^{2+} 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 Ca^{2+} の流入を介したPKCの移動への、 Zn^{2+} の関与が示されたことから、PKCの移動における Ca^{2+} と Zn^{2+} 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 Ca^{2+} の添加によるPKCの移動にTPENが作用しなかった理由は、内在性の Zn^{2+} が希釈による考え、単独ではそれぞれPKCの移動に大きな作用を持たない Zn^{2+} と Ca^{2+} の相互作用を検討した結果、以下のことが示唆された。

Zn^{2+} 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 Ca^{2+} 、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 Ca^{2+} 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II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 Ca^{2+} チャンネル複合体を阻害するとされる濃度の Zn^{2+} はNMDA受容体刺激によるPKC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、 Zn^{2+} 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ンネルを通し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 Zn^{2+} はシナプス後部へ取り込まれ、内部の Zn^{2+} を増加させ、 Ca^{2+} 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

1. 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 Zn^{2+} のキレートによると考えられた。
3. Zn^{2+} は高濃度においては単独でPKCの移動を引き起こし、生理的な濃度では、 Ca^{2+} 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Glu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、Zn²⁺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Zn²⁺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、シナプトニューロソームの系で成熟動物では初めてNMDA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Zn²⁺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Gluの遊離を起こし、このGlu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極を起こす。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極により、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。

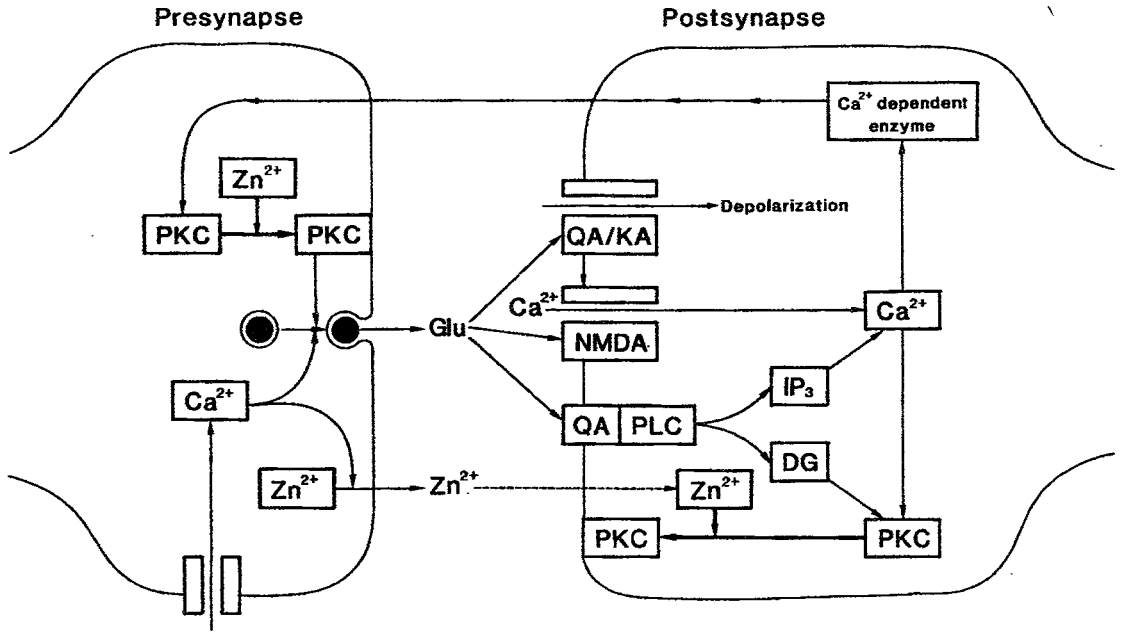


Fig. 22. Schematic diagram of excitatory amino acid neurotransmission.

そしてGlu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Glu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Glu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 Ca^{2+} 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 Zn^{2+} 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感謝いたします。

引 用 文 献

1. 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.
3. 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 Ca^{2+} and its activation by a Ca^{2+} -requiring proteinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (1985) 6435-6439.
4. Ho, A. K., Thomas, T. P., Chik, C. L., Anderson, W. B. and Klein, D. C., Protein kinase C: subcellular distribution by increased Ca^{2+} influx, *J. Biol. Chem.*, **263** (1988) 9292-9297.
5. TerBush, D. R., Bittner, M. A. and Holz, R. W., Ca^{2+} 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.
- 10 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 the induction 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-aspartate on 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 properties 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.
- 17 Murakami, K., Whiteley, M. K. and Routtenberg, A., Regulation of protein kinase C activity by cooperative interaction of Zn^{2+} and Ca^{2+} , *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. Pharmacol-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.
- 21 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.
- 25 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 structural 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 nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (1979) 4350-4354.
- 30 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.
- 34 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-D-aspartate 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.
- 37 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 pathophysiological 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 mitochondria from guinea-pig 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 synaptoneuroosomes, *Dev. Brain Res.*, **47** (1989) 123-128.
- 45 Baudry, M., Evans, J. and Lynch, G., Excitatory amino acids inhibit stimulation of phosphatidylinositol metabolism by aminergic agonists in hippocampus, *Nature*, **319** (1986) 329-331.
- 46 Nicoletti, F., Iadarola, M. J., Wroblewski, J. T. and Costa, E., Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: Developmental changes and interaction with α_1 -adrenoceptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** (1986) 1931-1935.
- 47 Manzoni, O. J. J., Finiels-Marlier, F., Sasseti, 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 -Amino-butyric acid (GABA)- and barbiturate-mediated ³⁶Cl⁻ uptake in rat brain synaptoneuroosomes: 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 synaptoneuroosomes 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 kainate-activated 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 phospholipid-dependent 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.
- 63 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 Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas: a new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} , *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.
- 70 Donaldson, J., St. Pierre, T., Minnich, J. L. and Barbeau, A., Determination of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} 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)
- 73 Kihara, T., Baba, A., Ishihara, T. and Iwata, H., Inhibition of [^3H]glutamate release by Zn^{2+} in rat hippocampal slices, *J. Pharmacol-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 kinase 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.

