



Title	Studies on Mechanisms Involved in LTP-induction by Synthetic MCD Peptide
Author(s)	近藤, 哲朗
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38002
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【10】

氏 名	近 藤 哲 朗
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 1 4 8 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	Studies on Mechanisms Involved in LTP-induction by Synthetic MCD Peptide (シナプス伝達効率の長期増強 (LTP) を誘導する MCD ペプチドの化学合成及び作用機序の解析)
論文審査委員	(主査) 教 授 御子柴克彦 (副査) 教 授 三木 直正 教 授 津本 忠治

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

シナプス前線維に高頻度電気刺激(テタヌス刺激)を与えると伝達効率が上昇し,長期にわたって持続する現象,すなわちシナプス伝達効率の長期増強(LTP: Long-term Potentiation)は記憶や学習の基本素子として考えられている。ハチ毒 Mast Cell Degranulating Peptide (MCD) は, テタヌス刺激を行わなくても海馬 CA1 領域において LTP を誘導することが知られており, MCD の作用機序を解明することは, 記憶の分子機構を明らかにしていくうえで重要な糸口となることが期待される。実際, MCD の高親和性結合部位が脳のシナプトソーム画分に存在すること, しかもそれはヘビ毒 Dendrotoxin-I の受容体(ある種の電位依存性 K^+ チャンネル)と同一の分子であることが報告されている。したがって MCD による LTP 誘導機構には K^+ チャンネルへの結合が関与していると考えられる。しかし, MCD が LTP を誘導するのに必要な濃度(100nM)と K^+ チャンネルとの解離定数(150pM)とは大きく異なっており, K^+ チャンネルへの結合が LTP 誘導の直接の引き金なのか疑問が生じる。そこで本研究では, MCD は K^+ チャンネルに結合すること以外にどのような性質を有するのか, そしてその内でどの性質が LTP 誘導に最も重要であるのかを解析することを目的とした。

(方法ならびに成績)

MCD の合成および生理活性; MCD 分子内には 2 個の S-S 結合が存在するためシステイン残基を脱保護条件の異なる 2 種類の保護基で保護し, 2 段階の反応を経て S-S 結合を選択的に形成させた。このものをイオン交換カラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC を用いて精製し, アミノ酸分析及び質量分析によって構造を確認した。

モルモットの海馬のスライスを作成し、刺激電極をシャーファー側枝に刺入し、記録電極を CA 1 領域の錐体細胞層とその樹状突起のある領域においた。前者の記録電極により集合活動電位の振幅とそのピーク潜時を、後者により集合 EPSP の傾きを計測した。灌流液中に合成 MCD ($1 \mu\text{M}$) を加え 5 分間灌流すると、集合活動電位が増大し、並行してピーク潜時が短縮し、集合 EPSP の傾きの増大が認められ、しかも計測期間中持続した。すなわち合成 MCD による LTP の誘導が認められた。

MCD の諸性質と LTP 誘導能 ; (1) 平面脂質二重膜で仕切られた KCl の濃度勾配のあるチャンバーの一方に MCD (2.5nM) を加えると、電位依存性に開閉するカチオン選択性のチャネルを形成した。(2) Fura 2 を取り込ませた肥満細胞に MCD ($1 \mu\text{M}$) を添加すると、細胞内カルシウム濃度が上昇した。これは百日咳毒素処理により抑えられたので、MCD による G 蛋白質の活性化が考えられる。以上の結果より、MCD は少なくとも 3 つの作用を有していることが明かとなった。即ち K^+ チャネルへの結合能、人工脂質二重膜におけるイオンチャネル形成能、肥満細胞における G 蛋白質活性化能である。これらのうちどれが LTP 誘導能と最も密接に関係しているかを解析するために、MCD 誘導体や MCD アナログを用いて上記の諸性質と LTP 誘導能との関連性を比較検討したところ、 K^+ チャネルへの結合が最も相関性の高いことがわかった。そこで、実際に LTP が誘導されている時、MCD は海馬のどの領域に結合しているのかを細胞レベルで検討する目的で、以下の実験をおこなった。

MCD 結合部位の組織学的局在 ; MCD の N 末端にビオチン基を導入し、LTP 誘導能を有することを確認したうえで、海馬スライスを $1 \mu\text{M}$ のビオチン化 MCD と 5 分間インキュベートした後洗浄し、2 %パラホルムアルデヒド / 0.2 %グルタルアルデヒド / PBS で固定した後パラフィン切片を作製し、FITC アビジンと反応させた。陽性反応は CA 1 と CA 3 領域に見いだされ、錐体細胞の細胞体とその樹状突起の基部に存在したが、樹状突起の先端やシナプス前の神経終末部分には殆ど認められず、¹²⁵I-MCD (10^{-11}M) を用いた高親和性結合部位の局在を示すオートラジオグラムとは必ずしも一致しない結果が得られた。

(総括)

MCD の諸性質のうち、LTP 誘導には K^+ チャネルへの結合が最も重要であると考えられるが、LTP を誘導する MCD アナログ全てに G 蛋白質活性化能も存在するので、MCD による LTP 誘導に G 蛋白質の活性化も関与していることが考えられる。しかも MCD の LTP 誘導濃度に最も近いのは G 蛋白質活性化濃度である。また、近年高頻度電気刺激によって誘導される LTP に G 蛋白質活性化が関与していることが明らかとなっている。しかし G 蛋白質の活性化のみでは LTP を誘導できない事実と考え合わせると、MCD は、単に高親和性結合部位への結合、すなわち神経終末の K^+ 電流を修飾し伝達物質の放出を増加させているだけでなく、細胞体にも直接作用して G 蛋白質の活性化をはじめ細胞内代謝の変化を伴った現象を引き起こして LTP 誘導に関与している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、記憶・学習の基本素子であるシナプス伝達の長期増強 (Long-term potentiation; LTP) の分子機構の解明を目的とし、従来の電気生理学的研究方法とは全く異なるユニークな視点から研究を行ったものである。すなわちハチ毒 MCD ペプチドは高頻度電気刺激を行わなくても LTP を誘導できることに着目して、まず MCD ペプチドの化学合成を行った。つぎにこれを用いて LTP 誘導の作用機序の解析を行った結果、LTP の誘導には、MCD がある種の K^+ チャンネルに結合することと、百日咳毒素感受性の GTP 結合蛋白質を活性化させるという二面性が重要であることを明らかにした。さらに、脳内に MCD に類似した内因性物質が存在することを証明し、この内因性物質が脳内で LTP 様の現象に関与していることを示唆した。

これは今後の記憶の分子機構の解明に資するところ大であり、学位の授与に値するものと考えらる。