

Title	Structure of MCD peptide receptor involved in induction of long-term potentiation of synaptic transmission efficiency, and its functional regulation by MCD peptide.
Author(s)	藤本, 一朗
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3094139
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	藤 本 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 2 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学 位 論 文 名	Structure of MCD peptide receptor involved in induction of long-term potentiation of synaptic transmission efficiency, and its functional regulation by MCD peptide. (シナプス伝達効率の長期増強に関与するハチ毒 MCD ペプチドの受容体の構造解析と MCD による機能制御)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 昌 中 寛 (副査) 教 授 中 川 八 郎 教 授 小 倉 明 彦 生理学研究所教授 池 中 一 裕

論 文 内 容 の 要 旨

大脳の海馬体におけるシナプス伝達効率の長期増強現象 LTP は記憶のモデルとして考えられている。近年ハチ毒から精製された MCD が海馬切片上で LTP 様の現象を起こすことが報告された。この MCD を用いれば電気刺激で LTP を誘導するよりも容易に受容体など LTP に直結した物質を同定でき、分子生物学的アプローチに適していると考えられた。本研究で MCD が LTP 様の現象を誘導するのに最も重要である 2 つの作用に注目し、①MCD の脳内高親和性結合部位である電位依存性の K^+ チャンネルの精製と機能解析、②MCD で活性化される G 蛋白の下流の情報伝達経路について検討を行った。

①脳内 MCD 高親和性受容体の精製と機能解析

ヘビ毒 DTxI は MCD とおなじ脳内結合部位に MCD よりも強く結合する性質を有する。この性質を利用して DTxI のアフィニティーカラムを作製し、ラット脳膜画分から MCD 結合蛋白を精製した。DTxI はブラックマンバ毒からゲル濾過カラム、イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により精製し、アフィニティーカラムのリガンドとして用いた。アフィニティーカラムの溶出画分はイオン交換 HPLC 後リボソームに組み込んだ。このリボソームを平面脂質二重膜に組み込むと K^+ チャンネルを再構成した。これにより MCD 結合蛋白は、以前から推測されていたように電位依存性の K^+ チャンネルであることが確認された。さらにこの K^+ チャンネルは MCD 添加によりその K^+ 電流が阻害されることが新たに明らかとなった。そこで MCD 感受性のあると報告されている K^+ チャンネル (RCK1, RCK2, RCK5) に対するそれぞれのペプチド抗体を作製し、どの K^+ チャンネルが MCD の LTP 様誘導機構に最も重要であるか検討を行った。海馬の初代培養細胞とラットのパラフィン切片の海馬 CA1 領域における免疫組織を行い検討した結果、RCK1 の発現分布と MCD 結合部位の分布とがよく一致し、RCK1 が最も重要であると考えられた。しかしながら RCK1 チャンネルはゼノパス卵母細胞に発現させると遅延整流型の不活化しないチャンネルを形成するが、海馬 CA1 錐体細胞で MCD により阻害される K^+ チャンネルは一過性の A チャンネルであることが明らかとなり矛盾する結果となった。そこで RCK1 が他の K^+ チャンネルとヘテロマルチマーを構成し MCD 感受性であり、かつ一過性の電位依存性 K^+ チャンネルとして存在する可能性を検討した。その結果 MCD 非感受性であるが一過性の A チャンネルをゼノパス卵母細胞に形成する RCK4 蛋白が RCK1 蛋白と海馬 CA1 領域で同じ分布を示すことが明らかとなった。すなわちこの 2 つの K^+ チャンネルが海馬 CA1 の神経細胞でヘテロマルチマーを構成し MCD の LTP 誘導に関与していると考えられた。しかしながら MCD の LTP 様誘導に必要な濃度 (最低 $0.1 \mu M$) と脳内高親和性結合

部位への結合定数には 100 倍以上の開きがあることから MCD の G 蛋白活性化作用も重要であると考えられた。

② G 蛋白の活性化により阻害される K^+ チャンネルの存在

精製 MCD 結合蛋白を平面脂質二重膜に組み込んだ際、50nM の MCD では阻害がかからない K^+ チャンネルの存在が見いだされた。この K^+ チャンネルは平面脂質二重膜に大きなコンダクタンスを示すチャンネルであり高濃度の MCD (150nM 以上) でやっと抑制のかかるものであった。この MCD 濃度は高親和性結合部位への結合濃度ではなく G 蛋白を活性化する濃度に近いものであったので、精製蛋白画分に G 蛋白が含まれているのかどうか検討した。G 蛋白の抗体を用いたウェスタンブロットと百日咳毒素による ADP リボシル化の実験から G_o と G_i の G 蛋白の存在が確認された。そこでこの K^+ チャンネルに G 蛋白の活性化剤である GTP γ S を添加することによる影響について検討した。その結果この K^+ チャンネルは G 蛋白が活性化することにより直接阻害されるものであることが明らかとなった。G 蛋白が直接関与する K^+ チャンネルはこれまでも多く報告されているが、そのほとんどは G 蛋白が活性化することにより活性化される内向き整流型のものであり、G 蛋白が活性化することにより直接不活性化されるものは見つけられていない。今後このチャンネルの分子構造も明らかにしていく予定である。

以上の実験結果から MCD は海馬の CA1 領域において RCK1 蛋白と RCK4 蛋白のヘテロマルチマーとして存在する A チャンネルを阻害し、さらに G 蛋白を活性化することにより直接ある種の K^+ チャンネルを阻害することにより LTP 様の現象を誘導する可能性が高いと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本論文では、記憶の一つのモデルとされる海馬の長期増強現象について、MCD ペプチドの果たす作用を解析した。MCD は高親和性の結合を K^+ チャンネル蛋白質とすることなどを明らかにし、重要な知見を得ており、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。