



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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	藤本一朗
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第11226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 畠中 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後リポソームに組み込んだ。このリポ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0.1μM)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プロットと百日咳毒素による ADP リボシル化の実験から Go と Gi 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に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 CA 1 領域において RCK 1 蛋白と RCK 4 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 ベ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。