



# Postnatal development of a brain-specific subspecies of protein kinase C in rat

橋本, 規

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0834

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000834>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	橋 本 規 （兵 庫 県）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第 640号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成元年3月31日
学 位 論 文 題 目	Postnatal Development of a Brain-Specific Subspecies of Protein Kinase C in Rat (ラット脳組織におけるプロテインキナーゼC分子種の生後発 育に伴う変化について)
審 査 委 員	主査 教授 西 塚 泰 美 教授 廣 畑 和 志    教授 岩 井 誠 三

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 序 文

プロテインキナーゼCは受容体刺激に伴う形質膜のイノシトール磷脂質の代謝回転に共役して活性化され、外界情報が細胞内に伝達される際、重要な働きをしている。また、本酵素は他の組織に比して脳組織に非常に多く存在し、神経伝達物質の放出や神経刺激の伝達等の反応に関与し、神経機能の調節において多くの役割を担っていると考えられている。

最近、分子クローニングにより脳組織のプロテインキナーゼCには少なくとも4種類 ( $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ) の分子種が存在することが示されている。また、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによって、脳組織より精製された3種類の酵素分画 (Type I, Type II, Type III) に分離されることが報告されており、Type Iは $\gamma$ に、Type IIは $\beta$  Iおよび $\beta$  IIに、Type IIIは $\alpha$ に対応することが明らかとなっている。本論文では、ラット脳組織におけるプロテインキナーゼCの分子種が、生後発育に伴いそれぞれ特有の活性の増加を示すことを明らかにした。また、プロテインキナーゼCの分子種のうちType Iは神経組織に特異的に存在する分子種であるが、このType Iに対するモノクローン抗体を用いた免疫組織化学的方法により、神経細胞におけるType Iの生後発育に伴う形態学的変化が、活性の変化とよく一致し、神経の成長に伴って増加することを明らかにした。

#### 実験方法

プロテインキナーゼCは、生後各日数のラット脳組織よりDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより部分精製した。この部分精製したプロテインキナーゼCを高速液体クロマトグラフィーシステムによるハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、酵素分画Type

I, II, IIIに分離した。プロテインキナーゼCの活性は、 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATPから仔ウシ胸腺のH<sub>1</sub>ヒストンへの $^{32}\text{P}$ の転移により測定した。タンパク量は、Lowryらの方法に従って測定した。プロテインキナーゼCに対するモノクローン抗体としては、Kitanoらにより作成された抗体 (CKI-97) を用いた。本抗体の特異性は、免疫沈降反応およびウエスタンブロット法により確認した。プロテインキナーゼCの免疫組織学的研究は、生後各日数のラット小脳切片をモノクローン抗体 (CKI-97) と反応の後、ペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ法により発色を光学顕微鏡下に観察することにより行った。

## 結 果

ラット脳組織におけるプロテインキナーゼCの活性は、生後発育に伴い増加を示した。生下直後から数日は比較的ゆるやかに増加し、4日目から14日目の間に急速な増加をし、14日目以降は、わずかな増加を示したのみであった。ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、本酵素分子種、Type I ( $\gamma$ )、Type II ( $\beta$  Iおよび $\beta$  II)、Type III ( $\alpha$ ) の生後発育に伴う活性の変化を解析したところ、それぞれ異なる経過を示した。Type II ( $\beta$  Iおよび $\beta$  II)、Type III ( $\alpha$ ) は生下直後よりその活性が観察され、以後急速に増加し生後2週目においてほぼ最大活性を示した。一方、Type I ( $\gamma$ ) は生下直後ではその活性が観察されず、以後ごくゆるやかに増加し、生後4週目以降に最大活性を示した。

一方、ラット脳組織より精製したプロテインキナーゼCを抗原としてモノクローン抗体 (CKI-97) が得られていたが、このモノクローン抗体はType I ( $\gamma$ ) と特異的に反応することが明らかとなった。すなわち、本抗体CKI-97よりプロテインキナーゼCの3種類の分子種の免疫沈降反応を行ったところType I ( $\gamma$ ) のみ著明な沈降が観察された。また、ウエスタンブロット法によってもモノクローナル抗体CKI-97はType I ( $\gamma$ ) と特異的に反応することが確認された。プロテインキナーゼC分子種のうちこのType I ( $\gamma$ ) は神経組織に特異的に存在し、また、小脳皮質プルキンエ細胞に多く存在することが示されていた。そこで、本抗体CKI-97を用いて生下後のラット小脳皮質プルキンエ細胞におけるType I ( $\gamma$ ) の分布を形態学的に観察したところ、生下時においては免疫反応は観察されず、また生後1週目ではプルキンエ細胞の輪郭、軸索、短い樹状突起が染色された。生後2週目においてはプルキンエ細胞はまだ十分成長していないが、成熟ラットとほぼ同様のType I ( $\gamma$ ) の分布が確認された。以上の結果は、Type I ( $\gamma$ ) の生後発育に伴う活性の変化とよく合致する。

## 考 察

今回の解析により、ラット脳組織においてプロテインキナーゼC分子種は生後著明に増加し、その増加は分子種により異なることが示された。また、本酵素分子種のうちType I ( $\gamma$ ) は神経組織に特異的に発現されているが、小脳プルキンエ細胞においては神経の成長に伴い増加が明らかになった。

この Type I ( $\gamma$ ) は、小脳プルキンエ細胞のみならず錐体細胞、海馬などの他の神経細胞にも多く存在することが証明されており、プルキンエ細胞と同様にこれらの細胞においても Type I ( $\gamma$ ) は神経の成長に伴い発現が増加していると考えられる。以上の結果より、プロテインキナーゼCの分子種 Type I ( $\gamma$ ) は神経機能に特異的な役割を果たしていることが推定される。今後、プロテインキナーゼCの機能の研究を行うためには、Type I ( $\gamma$ ) のみならず Type II ( $\beta$  I および  $\beta$  II)、Type III ( $\alpha$ ) に特異的な抗体を作成し比較検討を行うことが重要であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

生体における情報伝達の仕組みの研究は現在の医学生物学の主要なテーマの一つであるが、細胞膜に達した種々の生理活性物質の刺激がそれぞれの受容体に識別感知された場合、あるいは興奮性細胞の膜脱分極がおこった場合など、イノシトール磷脂質の分解が認められる。この現象と共役して、細胞内ではプロテインキナーゼC (PKC) が活性を発揮し、その結果、種々の情報が細胞内部へと伝送される。

PKCは神経組織にもっとも活性が高いことが知られていたが、最近、多くの実験手技によって、その構造が解明され、分子種として7種以上の酵素が同定された。本学位申請者は、これらの研究の途上、各分子種の僅かな相違に着目し、その一次構造の相違する部分に相当する合成ペプチドを作成し、これに対する抗体を用いて、脳内に存在する多数の分子種の特異的な分子識別の方法を確立した。この方法と平行して、酵素化学的手法による各分子種の分離をおこない、ことにヒドロキシアパタイトカラムによる高速液体クロマトグラフィーによって、脳内に存在する  $\alpha$ 、 $\beta$  I、 $\beta$  II および  $\gamma$  種の PKC の分離に成功した。これらの方法から、各分子種の構造とその性質の対比、脳内の分布を仔細に検討した結果、これらの各 PKC 分子種の脳内の局在は均一ではなく、部位により相違すること、また、生後発育にともなう PKC 各分子種の挙動には著しい相違があり、ことに  $\gamma$  種は脳神経系のみにも局在して発現しており、他の組織には発現しないことを明らかにした。この  $\gamma$  種 PKC は、他の PKC 分子種とことなり、アラキドン酸、リポキシン A 等によっても活性が発揮される特有な性質があり、神経シナプスにおける長期増強現象との関連や、各種のイオンコンダクタンスの修飾との関連が強く示唆される。

本研究は、酵素化学的手法のみでなく、免疫組織化学的手法をもちいて、脳内に発現している各種の PKC 分子種の挙動と性質を詳細に調査し、その局在、発育、性質等をあきらかにしたものであり、多彩な情報の交叉する脳組織において果たす PKC の生理学的役割に関する研究に対して一つの指標を与えたものであり、従来、全く不明であった PKC の研究に重要な貢献を果たしたものと認める。よって本申請者は医学博士の学位を得る資格があると認める。