



Inositol 1,4,5-trisphosphate binding sites in the brain : regional distribution, characterization, and alterations in brains of patients with parkinson's disease

北村, 登

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0870

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000870>

※ 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)	きたむらのぼる 北村登 (大阪府)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第659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2年3月31日
学位論文題目	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Binding Sites in the Brain: Regional Distribution, Characterization, and Alterations in Brains of Patients with Parkinson's Disease (ヒト死後脳におけるイノシトール1,4,5-三リン酸結合部位： 脳内分布，特性，およびパーキンソン病における変化)
審査委員	主査 教授 田中千賀子 教授 岡田安弘 教授 中井久夫

論文内容の要旨

〔緒言〕

神経伝達物質，ホルモン，ケミカルメジエーターなどの刺激に応答し，細胞膜イノシトール磷脂質の代謝回転亢進に伴い産生されるイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP_3) は， Ca^{2+} イオンをその貯蔵部位から遊離させることによる細胞内情報伝達に重要な役割を担うと考えられている。放射性リガンドを用いた結合実験により，中枢神経系における IP_3 結合部位は末梢組織に比べて数百倍多いことが知られている。本研究において，トリチウム標識のイノシトール1,4,5-三リン酸 ($[^3H] IP_3$) を用いて，ヒト脳における IP_3 結合部位を同定し，その脳内分布を検討した。さらに，パーキンソン病患者死後脳における結合量の変化について検索した。

〔実験方法〕

対 象

正常対照群は28例（男性20例，女性8例，平均年齢 52 ± 4.9 才），パーキンソン病群は15例（男性11例，女性4例，年齢 71 ± 1.3 才）であった。疾患群と正常対照群との結合量の比較においては年齢を対照させた。

IP_3 結合実験

ヒト剖検脳組織湿重量あたり50倍体積の1 mM EDTAを含む50 mM Tris塩酸緩衝液 (pH 8.3) を加えホモジナイズした後，48,000xg，20分間遠心し，その沈渣を粗膜標品として用いた。この標品を $[^3H] IP_3$ と1 mg/ml 牛血清アルブミンおよび1 mM EDTAを含む50 mM Tris塩酸緩衝液 (pH 8.3) 中で，4°，10分間インキュベートした。遊離リガンドの分離はWhatmann

GF/Bガラス線維濾紙を用いる減圧下吸引濾過法によった。 $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合は $1 \mu\text{M}$ の非標識 IP_3 存在下, 非存在下の結合量の差と規定した。

[結 果]

IP_3 結合の薬理学的特性

ヒト小脳および大脳皮質における $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 飽和結合実験 ($0.6-30\text{nM}$) の結果, $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合は飽和性で, Scatchard解析より結合は高親和性の単一成分からなっていた。小脳では解離定数 17nM , 最大結合量 $6.4\text{pmol/mg protein}$, 大脳皮質ではそれぞれ 11nM , $0.8\text{pmol/mg protein}$ であった。

ヒト小脳皮質から得られた膜分画に対する $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合の薬理学的特性をイノシトールリン酸とイノシトールを用いて検討した。 $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合はイノシトール 1, 4, 5-三リン酸により強く阻害され IC_{50} 値は 2.4nM であった。それに対し, イノシトール 1, 3, 4, 5-四リン酸, イノシトール 1, 4-二リン酸, イノシトール一リン酸は IC_{50} 値が各々 $5.2 \mu\text{M}$, $12 \mu\text{M}$, $41 \mu\text{M}$ の阻害を示したにすぎず, イノシトールは $100 \mu\text{M}$ でも結合を阻害しなかった。

IP_3 結合部位のヒト脳内分布

ヒト脳膜分画に対する $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合は, 小脳>>基底核, 大脳皮質>嗅脳>間脳, 中脳の順に高く, 不均等分布を示した。基底核の中では尾状核体部が最も高く, 視床及び淡蒼球ではそれぞれ尾状核体部の 70%, 50% の結合を示した。大脳皮質では感覚野で高い結合を示した。嗅脳では, 側坐核と扁桃核は尾状核体部の 50%, 海馬はさらに低く 30% の値を示した。赤核は脳内で最も低く, 尾状核体部の 20% の結合を示した。

$[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 結合量の最も高かった小脳において, プロテインキナーゼ C を標識するとされる $[^3\text{H}] \text{PDBu}$ 特異結合と $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合との間には有意の正の相関を認めた ($r=0.92$, $P<0.001$)。

IP_3 結合の年齢相関

対照群大脳皮質において $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合と死亡時年齢との間には有意な負の相関が認められた ($r=-0.78$, $P<0.001$)。 IP_3 結合に影響を及ぼし得る因子とし, 死亡時から凍結までの時間, 凍結保存期間, 死因, 性別について検討を加えたが, 各因子と IP_3 結合との間には一定の関係は認められなかった。

パーキンソン病における IP_3 結合部位の変化 パーキンソン病群における $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合は, 対照群と比して, 尾状核, 被殻, 淡蒼球で約 50% の有意の減少を示した。大脳皮質では有意の変化は認められなかった。

[考 察]

ヒト脳における $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ 特異結合は, 小脳で極めて高いことを特徴とする不均等分布を示した。この結果はラット脳における IP_3 結合部位の分布と一致した。ラット小脳では IP_3 結合部位

はプルキンエ細胞および分子層に特に密に分布することから、ヒト脳 IP_3 結合部位もプルキンエ細胞およびその樹状突起に局在すると考えられる。

プロテインキナーゼCを標識すると考えられている $[^3H]$ PDBu特異結合と $[^3H]$ IP_3 特異結合のヒト脳内分布は異なっていた。プロテインキナーゼCには現在7種類のサブタイプの存在が知られており、そのうち4種類のサブタイプはそれぞれ異なる分布を示すことはよく知られている。小脳で γ サブタイプがプルキンエ細胞に存在することからプルキンエ細胞では IP_3 結合部位と γ タイプのプロテインキナーゼCが共存するものと考えられる。ヒト小脳において $[^3H]$ PDBu特異結合と $[^3H]$ IP_3 特異結合との間に相関を認めたことは、 IP_3 - Ca^{2+} 系、ジアシルグリセロール-プロテインキナーゼC系が緊密に関連していることを示唆している。

IP_3 結合部位と年齢との間に負の相関がみられたことは加齢に伴う神経活動の低下に関連していると考えられる。

黒質-線条体ドーパミン神経の変性を主たる特徴とするパーキンソン病の線条件において IP_3 結合は有意に減少した。ラット基底核での IP_3 結合部位は線条件-黒質ニューロンに主に分布していると報告されている。対象患者はすべてYahrのV度であったこと、パーキンソン病線条件ではドーパミン神経系だけでなく線条体-黒質ニューロンを含めた他の神経系の変化をも伴うことが報告されていることから、 IP_3 結合部位の減少はドーパミン神経だけでなく他の神経系の変化も反映している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

神経伝達物質、ホルモン、ケミカルメジエーターなどの刺激に応答し、細胞膜イノシトール磷脂質の代謝回転に伴い産成されるイノシトール1, 4, 5-三リン酸(IP_3)は、 Ca^{2+} イオンを貯蔵部位から遊離させ細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることにより細胞内情報伝達に重要な役割を担うと考えられている。放射性リガンドを用いた結合実験により、哺乳動物の中枢神経系において IP_3 結合部位は末梢組織に比べて数百倍多いことが知られているが、現時点ではヒト脳における IP_3 結合部位については報告されていない。申請者はヒト脳での IP_3 結合部位の特性、脳内分布およびその病態を明らかにする目的で、本研究を企画した。対象としては正常対照群28例とパーキンソン病群15例の死後脳を用いた。 IP_3 結合部位の測定には $[^3H]$ IP_3 をリガンドとして用い結合実験を行った。

その結果、 IP_3 結合部位は高親和性、単一の結合部位であり、その薬理学的特性から IP_3 受容体を標識していると考えられた。さらに、ヒト脳での IP_3 結合量は小脳皮質で最も高く、基底核、大脳皮質、嗅脳、間脳、中脳の順の不均等な分布を示し、ラット脳における IP_3 受容体の分布と一致した。大脳皮質では IP_3 特異結合は年齢との間に有意な負の相関を認めた。また、パーキンソン病患者基底核では、 IP_3 結合量は正常対照脳に比べ約50%の有意な減少を認めた。ラット基底核において IP_3 結合部位は主に線条体-黒質ニューロンに存在することから、パーキンソン病死後脳においてもドーパミン神経系の変性だけでなく線条体-黒質ニューロンを含めた総合的な変化を反映し

ていると考えられた。

本研究はヒト脳IP₃結合部位についてその薬理学的特性および脳内分布および老化とパーキンソン病における病態を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったヒト脳の細胞内情報伝達系について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。