



Involvement of a protein kinase C-dependent process long-term potentiation formation in guinea pig superior colliculus slices

富田, 洋司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0962

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000962>

※ 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）	とみ 富 田 ひろ 洋 し 司 （大阪府）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第723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3年3月31日
学位論文題目	Involvement of a protein kinase C-dependent process in long-term potentiation formation in guinea pig superior colliculus slices (モルモット上丘切片の長期増強形成における蛋白キナーゼCの関与)
審 査 委 員	主査 教授 岡 田 安 弘 教授 松 本 悟 教授 住 野 公 昭

論 文 内 容 の 要 旨

〔緒言〕

シナプス前線維の，頻回刺激後のシナプス伝達効率の増強は，長期増強（long-term potentiation, LTP）現象として知られている。LTPは Bliss らによって1973年海馬で発見され，海馬が記憶・学習形成に関与していることから，LTPの解析は主として海馬で研究されてきた。しかし，LTPは海馬に限った現象ではなく，大脳皮質・小脳・内側膝状体・上丘にも存在する。海馬においてはLTP形成とくにLTPの維持に蛋白キナーゼC（PKC）が関与するという報告があるが，その作用部位・作用機構についてはいまだ一致した見解が得られていない。また海馬以外の部位においてはLTPの発現機構に関する研究はなされておらず，それに対するPKCの関与についての報告はない。本論文においては，モルモット上丘切片でのLTP形成に対するPKCの関与について研究した。すなわちPKC活性化剤としてホルボールエステル，PKC阻害剤として，ポリミキシンB，メリチン，H-7などの薬物が上丘LTP形成をどの様に変容するかを上丘切片を用いて明らかにした。さらにPKC系が伝達物質の放出を増強することによってLTPに関与している可能性も明らかにするため，上丘切片でのホルボールエステルが伝達物質（グルタミン酸）放出を増加させるのかも検索した。

〔方法〕

モルモット（体重200～300 g）を断頭後上丘を取り出し，厚さ400～600 μm の傍矢状断切片を作成した。上丘視神経層を電気刺激し，上丘浅灰白質層よりシナプス後電位（集合電位，PSP）を oscilloscope（日本光電 VC-11）で記録した。テスト刺激の強さは，最大PSPが得られる刺激強度

の $\frac{1}{3}$ とした。通常、LTP現象を得るために、上丘視神経層へ50Hzで20秒間の連続刺激（テタヌス刺激）が加えられた。PKC活性化剤としてホルボールエステル、PKC阻害剤としてポリミキシンB、メリチン、H-7を灌流液中に適用し、PSPの振幅およびLTP形成に対する影響を調べた。また上丘切片より浅灰白質層のみを取り出し、高カリウム（40mM）下でのグルタミン酸の放出量を、ホルボールエステル存在下ないし非存在下で測定した。放出されたグルタミン酸はNADP-NADPHの酵素循環法を用いた酵素的定量法で測定した。各切片組織の蛋白はLowry法で定量した。

【結果】

上丘切片におけるLTPの形成

上丘視神経層に50Hzで20秒間のテタヌス刺激を加えると、5～10分の経過でPSPの振幅はもとの140%～150%に増大し、LTPの形成が確認された。

PKC活性化薬とLTP形成

LTP形成についてPKCが関与していることが海馬などで示唆されているが、上丘でのLTP形成に対するPKCの関与を調べた。活性型ホルボールエステルである12-myristate 13-acetate（PMA）を灌流液に適用（ 10^{-10} M以上）とすると、5～10分の経過でPSPの振幅はもとの140%～150%に増大した。このPSPの振幅の増大の時間経過、また度合いはテタヌス刺激により得られるLTPと類似していた。また、このようにPMAによりPSPの振幅が増大した後に、テタヌス刺激を加えてもPSPはそれ以上の振幅の増大を示さなかった。不活性型ホルボールエステルである4- α -phorbol 12, 13-didecanoate（PdiD）ないし 10^{-11} M以下の濃度のPMAを灌流液に適用してもPSPは何ら変化を示さなかった。この状態でテタヌス刺激を加えると、PSPの振幅は増大しLTPが形成された。PSPの振幅に変化を起こさせない量の 3×10^{-12} M濃度のPMAの適用下に、それ自身ではLTPを惹起しない弱い刺激条件（30Hz、20秒間）のテタヌス刺激を同時に加えるとPSPの振幅は増大し、LTPが形成された。

蛋白キナーゼC（PKC）阻害剤のLTP形成に対する効果

PKC阻害剤であるポリミキシンB（ 10^{-7} M以上）、メリチン（ 10^{-8} M以上）、H-7（ 10^{-4} M以上）は、テスト刺激によるシナプス電位の振幅に変化を与えないが、テタヌス刺激によるLTP形成を抑制した。さらにテタヌス刺激でLTPが形成された後、灌流後にH-7（ 10^{-4} M）を作用させるとシナプス電位はLTP形成前の振幅にまで抑えられた。H-7を灌流液から除去するとPSPは再びLTPで増強された振幅まで増大した。

ホルボールエステルによるグルタミン酸放出量の増加

PKC活性化剤としてのホルボールエステルのシナプス電位増大作用についてシナプスでの伝達物質の放出を促進することによる可能性を検索した。すなわち、シナプス電位を記録している上丘の浅灰白質層での神経伝達物質であるグルタミン酸の放出に対するホルボールエステルの効果を調べた。浅灰白質層のみを含む切片を摘出し、三群に分け、一群（A）は高カリウム（40mM）液、他の一群（B）は高カリウム（40mM）液にPMA（ 10^{-6} M）を加え、C群では高カリウム液にPdiD（ 10^{-6} M）を加え、メジウム中に放出されるグルタミン酸の量を決定した。A群ではグルタミン酸量は5.8nmol

／mg切片蛋白であったが、B群では12.5nmol／mg切片蛋白、C群では5.8nmol／mg切片蛋白でホルボールエステルによってグルタミン酸放出は有意に増加していた。

【考察】

上丘切片において視神経層の刺激で浅灰白質層に誘発されるシナプス電位で、視神経層へのテタヌス刺激（50Hz 20sec）によりLTPが形成された。LTPによって増大するシナプス電位の振幅は、平均140%～150%であった。一方、テタヌス刺激を加えなくともPMAの投与（ 10^{-6} M）によってもそれと同程度の増大があった。PMAによって増大したシナプス電位を得た後、さらにテタヌス刺激を加えても電位の増大は観察出来なかった。PMAそれ自身ではシナプス電位を変化させない低濃度のPMAを作用させ、さらにそれ自身ではLTPを惹起できない弱い低頻度のテタヌス刺激の組合せでLTPを形成させることが出来た。一方、PKC阻害剤であるポリミキシンB（ 10^{-7} M以上）、メリチン（ 10^{-8} M以上）、H-7（ 10^{-4} M以上）の存在下ではLTPは形成されず、一旦形成されたLTPがH-7（ 10^{-4} M）で可逆的に抑制された。これらのことはLTP形成、特にその維持機構にPKC系の関与が必須であることを強く示唆している。上丘LTPの形成についてNMDA受容体の阻害薬（APV, 2-amino-phosphonovaleric acid）を用いた我々の研究で、APVがLTPの誘発を抑制するが、一旦形成されたLTPは上述のH-7の作用とは異なってAPVによって抑制されないことから、上丘においてのLTPでNMDA系はLTPの誘発に、PKC系はその維持機構に関与するであろうと考えられる。また、PKC活性化剤であるホルボールエステルが上丘浅灰白質層でのグルタミン酸放出を促進することから、上述のLTPによるシナプス電位の増大はシナプス前部からの伝達物質の放出による可能性を示唆している。

上丘は視覚系、聴覚系、感覚、運動系の統合によって眼球運動や注視に重要な働きをもっている部位であり、本論文でのLTP発現と維持の機構に関する諸結果は、今後上丘の統合作用とその情報処理機構に解析していく上に大きな示唆を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

シナプス前線維の、頻回刺激後のシナプス伝達効率の増強は、長期増強（longterm potentiation, LTP）現象として知られている。LTPは Bliss らによって1973年海馬で発見され、海馬が記憶・学習形成に関与していることから、LTPの解析は主として海馬で研究されてきた。しかし、LTPは海馬に限った現象ではなく、大脳皮質・小脳・内側膝状体・上丘にも存在する。海馬においてはLTP形成とくにLTPの繊維に蛋白キナーゼC（PKC）が関与するという報告があるが、その作用部位・作用機構についてはいまだ一致した見解が得られていない。また海馬以外の部位においてはLTPの発現機構に関する研究はなされておらず、それに対するPKCの関与についての報告はない。本論文においては、モルモット上丘切片でのLTP形成に対するPKCの関与について研究した。

モルモットの上丘切片を作成し、視神経層を電気刺激して浅灰白質層よりシナプス後電位（集合電

位, PSP) を記録した。視神経層へ50Hzで20秒間の連続刺激(テタヌス刺激)を加えると, 5~10分の経過でPSPの振幅はもとの140%~150%に増大し, LTPが形成された。PKC活性化剤としてホルボールエステル, PKC阻害剤としてポリミキシンB, メリチン, H-7を灌流液中に適用し, PSPの振幅およびLTP形成に対する影響を調べた。

活性型ホルボールエステルである12-myristate 13-acetate (PMA) を灌流液に適用すると, PSPの振幅は5~10分でもとの140~150%に増大した。このPSPの振幅の増大の程度と時間経過は, テタヌス刺激により得られるLTPと類似していた。不活性型ホルボールエステルである4- α -phorbol 12, 13-didecanoate (PdiD) にはこの効果はみられなかった。また, PSPの振幅に変化を起こさせない量の 3×10^{-12} Mの濃度PMAの適用下に, それ自身ではLTPを惹起しない弱い刺激条件(30Hz, 20秒間) テタヌス刺激を同時に加えるとPSPの振幅は増大し, LTPが形成された。PKC阻害剤であるポリミキシンB (10^{-7} M以上), メリチン (10^{-8} M以上), H-7 (10^{-4} M以上) は, テスト刺激によるシナプス電位の振幅に変化を与えなかったが, テタヌス刺激によるLTP形成を抑制した。また, テタヌス刺激でLTPが形成された後, 灌流後にH-7 (10^{-4} M) を作用させるとシナプス電位はLTP形成前の振幅にまで抑制されたが, H-7を灌流液から除去するとPSPは再びLTPで増強された振幅まで増大した。

上丘の浅灰白質層での神経伝達物質であるグルタミン酸放出量に対するホルボールエステルの効果を知る目的で, 浅灰白質層のみの微細切片を摘出し, 高カリウム依存性のグルタミン酸放出を測定した。その放出に対しPMAは顕著な促進効果(対照群の2倍)を示したが, PdiDには促進効果はなく, PKCの活性化によってグルタミン酸の放出が増大することが明らかとなった。

これらの実験結果は, 上丘でのLTP形成, 特にその維持機構にPKC系の関与が必須であることを強く示唆している。上丘LTPの形成についてNMDA受容体の阻害剤APV (2-amino-phosphonovaleric acid) を用いた我々の研究で, APVがLTPの誘発を抑制するが, 一旦形成されたLTPはAPVによって抑制されないことから, 上丘におけるLTPでNMDA系はLTPの誘発に, PKC系はその維持機構に関与するであろうと考えられる。また, PKC活性化剤であるホルボールエステルが上丘浅灰白質層でのグルタミン酸放出を促進することから, 上述のLTPによるシナプス電位の増大はシナプス前部からの伝達物質の放出による可能性を示唆している。

上丘は視覚系, 聴覚系, 感覚, 運動系の統合によって眼球運動や注視に重要な働きをもっている部位であり, 本論文では従来全く報告されなかった上丘でのLTP維持にPKCが関与することを明らかにしたものであり, この成果は今後上丘の統合作用とその情報処理機構に解析していく上に重要な知見を与えたものとして価値ある集積であると認める。

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。