



# Differential localization of four subspecies of protein kinase C in the rat striatum and substantia nigra

吉原, 千佳

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1038

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001038>

※ 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）	よし はら ち か 佳 （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第761号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成4年3月31日
学位論文題目	Differential Localization of Four Subspecies of Protein Kinase C in the Rat Striatum and Substantia Nigra (ラット線条体及び黒質におけるプロテインキナーゼC分子種の特異的局在)
審査委員	主査 教授 田 中 千賀子 教授 春日 雅 人 教授 西 塚 泰 美

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

プロテインキナーゼC（PKC）は、カルシウム，磷脂質依存性の蛋白質磷酸化酵素で，細胞内情報伝達機構に重要な役割を有すると考えられている。近年，遺伝子クローニングにより，PKCは少なくとも7種以上の分子種より成るファミリーであることが判明した。PKCは生体内に広く分布しているが，中枢神経系に最も多く，免疫組織化学的及び生化学的な手段により，脳における各分子種の機能について，研究されてきている。線条体－黒質系にも，PKC含量の指標としてのホルボールエステル結合部位が多く存在することが示され，臨床的には，パーキンソン病やハンチントン病患者脳における結合能の減少が報告されている。今回，我々は，ラット線条体－黒質系におけるPKC 4分子種の局在と神経伝達物質との共存について，免疫組織化学的に検討し，それらの機能について考察した。

### 【方法】

PKC各分子種に対する抗体は， $\alpha$ ， $\beta$  I， $\beta$  IIについては，各々に特異的なC末端側オリゴペプチドをウサギあるいはマウスに， $\gamma$ については，ラット脳精製PKCをマウスに免疫して得た。 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）はウシ血清アルブミンと結合させて，ウサギ及びマウスに免疫して作製し，いずれも特異的に認識することを確認した。コリンアセチルトランスフェラーゼ（CAT）及びチロシンヒドロキシラーゼ（TH）に対するウサギ抗体はそれぞれ，Chemicon, Eugene Tech International Inc. より購入した。

ウィスター系雄ラットを3つのグループに分け、第一のグループはコントロールとして用い、第二のグループには、灌流48時間前にコルヒチン ( $0.5 \mu\text{g/g}$ ) を脳室内に注入し、第三のグループには、灌流7日前に片側の線条体にカイニン酸 ( $50\text{nM}$ ) を注入した。これらの動物を麻酔下に、左室より固定液を注入し、灌流固定を行なった。固定液は各抗体に適する様、4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸、0.5%グルタルアルデヒドを含む0.1M磷酸緩衝液と過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド固定液の2種類を用意した。固定後、脳組織を取り出し、後固定の後、ショ糖液に浸漬し、クリオスタットにて20ミクロン切片を作成した。Triton X 100を含む磷酸緩衝食塩水 (PBS) に切片を浮遊させ、PAP法を用いて、免疫染色した。共存をみるために、動物種の異なる二種の抗体を用い、二重染色を行なった。即ち、PKC分子種に対する抗体を用いてPAP法にて発色させた後、神経伝達物質あるいは他の分子種に対する抗体を用い、間接蛍光抗体法により発色させた。これらは、透過型明視野及び蛍光顕微鏡にて観察した。電顕用切片は脳組織を液体窒素にて凍結融解後、40ミクロンに薄切し、Triton X 100を含まないPBS中で染色し、オスミウム酸固定、脱水、エポン樹脂包埋の後、超薄切片にて観察した。

### 【結果】

#### 1) 線条体におけるPKC各分子種の局在

光顕レベルでは、 $\alpha$ は散在する大型の神経細胞に、 $\beta \text{ I}$ はやや大きめの中型細胞に、 $\beta \text{ II}$ と $\gamma$ は多数の中型細胞と neuropil や線維束に存在した。電顕レベルでは、 $\alpha$ は細胞膜に沿って、 $\beta \text{ I}$ は細胞膜直下にクラスター状に、 $\beta \text{ II}$ はゴルジ体のトランス領域に、 $\gamma$ は細胞内小器官内部を除く細胞質全体と核に存在した。

#### 2) 線条体におけるPKC分子種と神経伝達物質との共存

PKC各分子種同士で共存しているものは認められなかった。 $\alpha$ 陽性細胞のほとんどがCATを有していた。コルヒチン処置ラットでは、未処置のラットで認められる強いGABA陽性反応を示す細胞に加えて、弱い陽性反応を示す細胞も認められた。GABA強陽性細胞の8割は $\beta \text{ I}$ 陽性反応を、GABA弱陽性細胞の9割は $\beta \text{ II}$ 陽性反応を示した。

3) 黒質におけるPKC分子種の局在及び神経伝達物質との共存  $\alpha$ は neuropil と緻密質に存在する神経細胞に、 $\beta \text{ I}$ は黒質全体に散在する神経細胞に、 $\beta \text{ II}$ と $\gamma$ は neuropil のみに存在した。二重染色により、 $\alpha$ 陽性細胞の9割はTH陽性であることが判明した。また、カイニン酸による線条体の破壊により、 $\beta \text{ II}$ 及び $\gamma$ に陽性反応を呈した neuropil は処置側で明らかに減少したが、 $\alpha$ と $\beta \text{ I}$ については変化を認めなかった。

### 【考察】

線条体の神経細胞は大きさや樹状突起の形態により細かく分類されており、また逆行性、順行性標識法により、線条体-黒質系の神経回路網が検索されている。線条体神経細胞の約70%が中型有棘細胞で、これらが黒質に投射していると考えられている。 $\alpha$ は、線条体のコリン作動性神経細胞や黒質

のドーパミン作動性神経細胞に存在していたが、これはCATやTHがPKCの基質と成りうるというデータと矛盾しない。また、 $\alpha$ は細胞膜に沿って存在していることから、これらの神経細胞での細胞膜応答を修飾している可能性が有る。

$\beta$  I も、 $\alpha$ に類似して、neuropil よりも神経細胞体に多く存在していた。線条体では、コルヒチン処置の有無に関係なく、GABA強陽性を示す細胞に存在し、細胞膜直下に分布していることから、内在性GABA細胞の細胞膜応答に関与している可能性が有る。

$\beta$  II や  $\gamma$  は、 $\alpha$  や  $\beta$  I と異なる、以下の様な特徴を持つ。1) 線条体では神経細胞のみならず、neuropil にも存在した。2) 黒質では neuropil のみに存在し、陽性細胞は認められなかった。3) 線条体破壊により、処置側の黒質の免疫反応は明らかに減少した。以上の所見より、 $\beta$  II と  $\gamma$  は線条体から黒質に投射している神経細胞に存在すると考えられる。投射型細胞にはGABA、サブスタンスP、ダイノルフィンの3種の神経伝達物質の存在が確認されている。コルヒチン処置の結果より、 $\beta$  II は投射型GABA細胞に存在していると考えられる。PKCが線条体切片や線条体培養細胞、黒質切片からのGABA遊離を促進したとの報告があり、線条体、黒質いずれにおいても neuropil の  $\beta$  II 陽性反応が  $\beta$  I よりも強いことから、GABA遊離には  $\beta$  II が関与している可能性が高い。

また、PKCが線条体においてアセチルコリンやドーパミンの遊離を促進するとの報告があるが、 $\alpha$ は神経細胞体に多く、neuropil には少ないので、まだ同定されていないPKC分子種が遊離に関係しているかもしれない。

臨床的には、パーキンソン病やハンチントン病患者脳でホルボールエステル結合能の減少が報告されている。パーキンソン病患者黒質におけるPKC減少には、変性ドーパミン細胞内の  $\alpha$  やシナプスを介して変性したGABA細胞内の  $\beta$  II が関与していると考えられる。ハンチントン病ではGABA、サブスタンスP等の減少や中型有棘細胞の変性が報告されており、PKC減少には  $\alpha$  や  $\beta$  I よりも  $\beta$  II や  $\gamma$  が関与している可能性が高いと考えられる。

#### 【結語】

以上の結果より、 $\alpha$ -PKCは線条体コリン作動性細胞や黒質のドーパミン作動性細胞、 $\beta$  I -PKCは線条体内在性GABA細胞の細胞膜応答に関与し、 $\beta$  II -及び  $\gamma$  -PKCは線条体-黒質系投射型細胞の機能に、特に  $\beta$  II はGABA神経のGABA遊離に関係していると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼC (PKC) は、カルシウム、磷脂質依存性の蛋白質磷酸化酵素で、細胞内情報伝達機構に重要な役割を有すると考えられている。近年、遺伝子クローニングにより、PKCは少なくとも7種以上の分子種から成るファミリーであることが判明した。PKCは生体内に広く分布しているが、脳に最も多く含まれ、脳に特異的に存在する分子種もあるなど、脳における情報伝達の重要な役割を担うものと考えられている。本申請者は、線条体-黒質系にも、PKC含量の指標として

のホルボールエステル結合部位が多く存在することが示され、パーキンソン病やハンチントン病患者脳における結合部位の減少が報告されていることに着目し、ラット線条体-黒質系におけるPKC 4分子種の局在と神経伝達物質との共存について、分子種特異抗体を用いて、免疫組織学的に検索し、それらの機能について考察した。

ラット線条体の神経細胞は大きさや樹状突起の形態により細かく分類されているが、その約70%が中型有棘細胞で、黒質に投射していると考えられている。 $\alpha$ -PKCは、散在する大型の神経細胞に、 $\beta$  I-PKCはやや大きめの中型細胞に、 $\beta$  II、及び $\gamma$ -PKCは多数の中型細胞とそれぞれ異なる細胞に発現することが明らかになった。黒質では、 $\alpha$ -PKCは緻密質に存在する神経細胞と neuropil に、 $\beta$  I-PKCは黒質全体に散在する神経細胞に、 $\beta$  II-、 $\gamma$ -PKCは neuropil にその分布が認められた。また、PKC各分子種と神経伝達物質マーカーの二重染色の結果、 $\alpha$ -PKCは線条体の大型のコリン作動性神経細胞と黒質のドーパミン作動性神経細胞に、 $\beta$  I-、 $\beta$  II-PKCは線条体のGABA細胞に含まれることを明らかにした。さらに、線条体の破壊やコルヒチン処置実験を行い、 $\beta$  I-PKCは内在性GABA細胞に、 $\beta$  II-PKCは線条体から黒質に投射しているGABA細胞に存在し、 $\gamma$ -PKCはGABA細胞以外の投射型神経細胞に存在していることを証明した。電顕免疫組織化学によって、各PKC分子種はそれぞれ分子種に特異的な細胞内局在を示し、 $\alpha$ -PKCは細胞膜に沿って、 $\beta$  I-PKCは細胞膜直下にクラスター状に、 $\beta$  II-PKCはゴルジ体のトランス領域に、 $\gamma$ -PKCは細胞内小器官を除く細胞質全体と核に存在することを明らかにした。

PKCは、線条体におけるアセチルコリン、GABA、ドーパミンの遊離促進、黒質でのGABA遊離促進に関与し、コリンアセチルトランスフェラーゼやチロシンヒドロキシラーゼはPKCの基質であることが報告されている。 $\alpha$ -PKCは線条体コリン作動性細胞や黒質のドーパミン作動性細胞において、その細胞膜応答の調節、神経伝達物質の合成あるいは遊離等に関与している可能性を、 $\beta$  I-PKCは内在性GABA細胞の細胞膜応答に、 $\beta$  II-PKCは線条体-黒質系投射型GABA細胞のGABA遊離に関係している可能性を示した。また、パーキンソン病では黒質ドーパミン細胞の変性が主病変であり、そのPKC含量減少には黒質のドーパミン細胞内の $\alpha$ -PKCやシナプスを介して変性したGABA細胞の $\beta$  II-PKCが関与している可能性がある、ハンチントン病患者線条体では、GABA、サブスタンスP等の減少が報告されており、 $\beta$  IIや $\gamma$ -PKCが関与している可能性が大きい。

以上の様に、本研究は、中枢神経系において重要な役割を担っていると考えられるPKCについて、線条体-黒質系に注目し、免疫組織化学的に検討したものである。PKC各分子種が各々異なった神経細胞に存在し、異なった神経伝達物質と共存しているのみでなく、特徴的な細胞内局在を示すことを明らかにし、各種の神経機能に関与している可能性を示唆したことは重要な知見であり、線条体-黒質系の神経変性疾患に関する今後の臨床研究に役立つと考えられる。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。