



サル脳運動領野におけるプロテインキナーゼCの4分子種の局在

富永, 正吾

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1135

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001135>

※ 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 なが しょう ご 富 永 正 吾	(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814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	サル脳運動領野におけるプロテインキナーゼCの4分子種の局在	

審 査 委 員	主査 教授	玉 木 紀 彦	
	教授	尾 原 秀 史	教授 田 中 千賀子

論 文 内 容 の 要 旨

(緒言)

プロテインキナーゼC (PKC) は少なくとも8種類の分子種 (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ε 、 ζ 、 η) から構成されるセリン/スレオニン蛋白質磷酸化酵素群であり、イノシトール磷脂質の代謝回転によって生成されるジアシルグリセロールによってカルシウムイオン及び磷脂質の存在下に活性化を受け、様々な細胞膜情報伝達機構に関与していると考えられている。中枢神経系には豊富に存在し、可塑性、神経伝達物質の遊離、イオン透過性など種々の神経機能との関連が示されている。今回、霊長類大脳運動領野における α -、 β I-、 β II-及び γ -PKCの局在を詳細に検討し、他の動物種のPKCの分布、神経伝達物質・受容体の分布と比較することにより各分子種の機能について解析した。

(方法)

1. 各分子種に対する特異抗体の作製

α -、 β I-、 β II-PKCについてはそれぞれに特異的なC末端側のオリゴペプチドを合成し、それらをウサギに接種することによってそれぞれの分子種に特異的に反応するポリクローナル抗体を得た。 γ -PKCについてはラット大脳から精製したPKCをマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製した。

2. 免疫染色

アカゲザル (*Macaca mulatta*; 京都大学霊長類研究所より提供) を同研究所の取り扱い指針に従い、ケタミンの筋肉内投与及びペントバルビタールの静脈内投与による深麻酔下に左心室経由で灌流

固定した。固定液は γ -PKCに適したA液：0.5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸を含む0.1M 磷酸緩衝溶液 (pH7.0) 及び α -、 β I- β II-PKCに適したB液：0.05%ピクリン酸を含むPLP (periodatelysine-paraformaldehyde) 固定液の2種類を準備した。灌流固定完了後、全脳を取り出し数個のブロックに分けてそれぞれA液からグルタルアルデヒドを除いた液もしくはB液に浸して後固定した。厚さ20 μ mの前額断クリオスタット切片とし、適当な濃度に希釈した上記の抗体を用いてPAP法で染色し、光学顕微鏡下に観察した。

(結果)

Broadmannの第4野においては、 α -PKCに対する免疫反応は第1及び2層の水平細胞と円形細胞、第3層の小錐体細胞、そして皮質下白質内の星状膠細胞に認められた。 β I-PKCに対する免疫反応は第1層の円形細胞とBetz細胞を含む第5層の錐体細胞に認められた。 β II-PKCに対する免疫反応は第2、3、5、6層の小さいし中型の錐体細胞の細胞質内に斑点状に認められたが、第1層には認められなかった。 γ -PKC陽性細胞は第2、3、6層に認められたが、それらのほとんどは錐体細胞であった。Broadmannの第6野においても、Betz細胞以外同様の所見が見られた。

(考察)

ラット大脳皮質運動領野においてはイノシトール燐脂質の代謝回転と共役しているとされる α 1アドレナリン受容体は第5層に際だって豊富に存在し、その第5層に γ -PKC陽性細胞が最も多く認められることが報告されている。一方サルの場合、第5層には γ -PKC陽性細胞は認められず、むしろ第3層に多くみられ、 α 1アドレナリン受容体の分布も第1層から第3層に多い。これらのことから、サル大脳運動領野では γ -PKCは第3層の錐体細胞において α 1アドレナリン受容体を介した情報伝達機構になんらかの役割を果たしているものと考えられる。

β Iと β IIの2つの分子種は単一遺伝子から alternative splicing によって発現するといわれているが、酵素学的な違いは現在のところ明らかにされていない。サル大脳運動領野においてそれぞれの β -PKCは異なったタイプの錐体細胞に発現していたが、類似した細胞内局在を示した。ラットでの電子顕微鏡による検索では、その斑点状の免疫反応はゴルジ装置のtrans側に相当することが示されている。今後サルにおいても電子顕微鏡による検索が必要であるが、 β I-および β II-PKCはサル大脳運動領野の錐体細胞においてはゴルジ装置と関連があるものと考えられる。

今回最も興味深かったのはBetz細胞が強い β I-PKC陽性反応を示し、さらに他の分子種に対する免疫反応は認められなかった点である。Betz細胞は並外れた大きさや形を有し、局在もBroadmannの第4野のみと著しく限られており、その軸索は錐体路を構成する線維のわずか3%を占めるのみであるが、運動に先駆けての抗重力筋のトーンスの一時的緩和という特殊な機能を担っていると考えられている。電気生理学的検索によれば、Betz細胞はイノシトール燐脂質の代謝回転と共役しているM1およびブラジキニンによって興奮することがわかっており、 β I-PKCがこれらの受容体を介した情報伝達に関与しているものと考えられる。また非Betz錐体細胞のほとんどが β II-PKCと γ -PKC

の両方に対して免疫反応を示しているのに対し、Betz細胞は β I-PKCのみ陽性である。Betz細胞は非Betz錐体細胞に比して高率に加齢による退行性変化を示すことが報告されており、1つの神経細胞に複数の分子種のPKCが発現していることが細胞の生存上有利な条件となりうる可能性を示唆している。

PKCが星状膠細胞に存在し、ホルボールエステルによって活性化されると星状膠細胞が多角形状の細胞から多数の突起を持った細胞へと形を変え、intermediate filament proteinの磷酸化が倍増し、さらにグリオーマ細胞には、 α -PKCが存在することが既に報告されている。 α -PKCが血液脳関門の構成要素である星状膠細胞において重要な役割を果たしており、グリオーマの発生にはPKCの中でも特に α -PKCが大きく関与している可能性がある。

中枢神経系におけるPKCの生理学および病理学的関連を理解するためには他の部位における各PKCの分布の検討や δ -、 ϵ -、 ζ -、 η -PKCといった他の分子種に対する特異抗体の作製及びそれらを用いた免疫組織化学的検索、それぞれの分子種に特異的な活性化物質もしくは阻害物質に関する研究、他の情報伝達機構との関連についての研究、さらに病的モデルにおける種々の検討が必要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼC (PKC) は中枢神経系には豊富に存在し、可塑性、神経伝達物質の遊離、イオン透過性など種々の神経機能との関連が示唆されている。本研究は霊長類大脳運動領野におけるPKC α -、 β I、 β IIおよび γ -各分子種の局在を解析したものである。同時に他の動物種のPKCの分布、神経伝達物質、受容体の分布と比較し各分子種の機能について考察した。

研究方法：

1. 各分子種に対する特異抗体の作成：

α -、 β I、 β II-PKCについては、それぞれに特異的なC末端側のオリゴペプチドを合成し、それらをウサギに接種し、それぞれの分子種に特異的に反応するポリクローナル抗体を得た。 γ -PKCについてはラット大脳から精製したPKCをマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製した。

2. 免疫染色：

アカゲザルをケタミン筋肉内投与、ペントバルビタールの静脈内投与による深麻酔下に左心室經由で灌流固定した。固定液は α -、 β I、 β II-PKCに適した0.05%ピクリン酸を含むPeriodate-lysine-paraformaldehydeと、 γ -PKCに適した0.5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸等を含む0.1M 磷酸緩衝溶液 (pH7.0) を用いた。灌流固定完了後、全脳を取り出し数個のブロックに分けて後固定を行った。厚さ20 μ mの前額断クリオスタット切片とし、適当な濃度に希釈した上記抗体でPAP染色し、光学顕微鏡下に観察した。

結果：

1. Broadmann第4野：① α -PKCに対する免疫反応は第1、2層の水平細胞と円形細胞と円形細胞

胞、第3層の小錐体細胞、皮質下白質内星状膠細胞に認められた。② β I-PKC に対する免疫反応は第1層の円形細胞と第5層の錐体細胞および Betz 細胞に認められた。③ β II-PKC に対する免疫反応は第2、3、5、6層の小型ないし中型錐体細胞の細胞質内には認められたが、第1層のみ認められなかった。④ γ -PKC 陽性細胞は第2、3、6層の錐体細胞であった。

2. Broadmann の第6野: Betz 細胞以外第4野と同様の所見が認められた。

今回の研究結果と α 1-アドレナリン受容体の分布に関する研究結果から、サル大脳運動領野では、 γ -PKC は第3層の錐体細胞において α 1 アドレナリン受容体の機能に関与している可能性が示唆された。

β -PKC はサル大脳運動領野において異なったタイプの錐体細胞に発現していたが、類似した細胞内局在を示した。

Betz 細胞は強い β I-PKC 陽性反応を示し、他の分子種に対する免疫反応は認められなかった。従って細胞内情報伝達も他の錐体細胞とは異なる可能性が示唆された。

α -PKC が神経膠細胞に存在することを示し、血管脳関門の機能、グリオーマの発生についての今後の研究の一助となることを示した。

本研究は従来なかった高等動物アカゲザルの運動領野における PKC の分子種の正常局在分布をはじめて解明したものである。またサルの Broadmann 第4野の Betz 細胞は一種類の PKC すなわち β I-PKC のみ陽性反応を示したのに反し、他の非 Betz 錐体細胞のほとんどは β II-PKC と γ -PKC の両方に対して免疫反応を示すことが判明した。

本研究によってサルの神経細胞とくに運動領野の Betz 細胞と非 Betz 錐体細胞における細胞内情報伝達系が異なること、さらに Betz 細胞の機能を解明する上に極めて重要な知見が得られたものとして価値ある集積であるといえる。

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。