



# Stearic acid facilitates hippocampal neurotransmission by enhancing nicotinic ACh receptor responses via a PKC pathway

太田, 耕平

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2925

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002925>

※ 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。



【 8 1 】

氏 名・(本 籍) 太田 耕平 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1541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16年1月31日

【 学位論文題目 】

Stearic acid facilitates hippocampal neurotransmission  
by enhancing nicotinic Ach receptor responses  
via a PKC pathway

(PKC/ニコチン性アセチルコリン受容体を介したステアリン酸  
の海馬シナプス伝達促進作用)

審 査 委 員

主 査 教 授 甲村 英二

教 授 寺島 俊雄

教 授 尾原 秀史

## 【はじめに】

フォスホオリパーゼA<sub>2</sub>( PLA<sub>2</sub> )は細胞膜の構成成分であるリン脂質を加水分解し、アラキドン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ドコサヘキサエン酸等の不飽和脂肪酸を産生する。これらのシス型不飽和脂肪酸は、protein kinase C( PKC )を直接、活性化することが知られている。我々はこれまでの研究でアラキドン酸、リノール酸、リノレン酸が、PKC 経路を介してニコチン性アセチルコリン( nACh )受容体反応を増強することを明らかにしてきた。さらに、nACh 受容体反応の増強はシナプス前終末からのグルタミン酸放出を増加させ、海馬シナプス伝達を促進させることを見い出した。このように、不飽和脂肪酸はシナプス伝達において重要な役割を演じていることが示唆されている。しかし、シナプス伝達に対する飽和脂肪酸の役割は不明である。

本研究は、海馬シナプス伝達に対する飽和脂肪酸の一つであるステアリン酸の効果を明らかにすることを目的とした。

## 【材料および方法】

## nACh 受容体発現モデルの作成

シビレエイ電気器官nACh 受容体サブユニット $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  mRNA あるいは $\alpha 7$  受容体サブユニットmRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、2種類のnACh 受容体を強制発現させた。

## パッチクランプ記録

2電極電位固定法にて、ACh 誘発電流を測定した。

## 集合電位 ( PS ) 記録

ラット海馬切片の貫通路を刺激して歯状回顆粒細胞層より集合電位 ( PS ) を記録した。

## PKC 活性の測定

PKC 活性はmyelin basic protein 由来合成ペプチドをPKC- $\epsilon$  の基質として用いた逆相高速液体クロマトグラフィー ( 逆相HPLC ) にて評価した。HPLC で基質ピーク ( A ) とリン酸化基質ピーク ( B ) を分離し、 $B / ( A + B )$

をPKC 活性の指標とした。

#### MALDI-TOF MS (マトリックス支援レーザーイオン化法と飛行時間型質量

#### 分析計) による分子量の測定

逆相HPLC により分離された非燐酸化基質、リン酸化基質ピークからの  
溶出液をMALDI-TOF MS system にて解析し、分子量を測定した。

#### **【結果】**

#### nACh 受容体反応に対する飽和脂肪酸の効果

まず最初に、アフリカツメガエル卵母細胞膜発現シビレエイ電気器官  
nACh 受容体電流に対する各種飽和脂肪酸の効果について検討した。ラウ  
リン酸(炭素鎖12)、ミリスチン酸(炭素鎖14)、パルミチン酸(炭素鎖16)、  
n-ヘプタデカン酸(炭素鎖17)、ステアリン酸(炭素鎖18)、エイコサン酸  
(炭素鎖20) 10  $\mu$ M を10 分間の処理後10 分で、ACh 誘発電流は処理前  
の電流振幅と比較してそれぞれ120%、137%、141%、124%、168%、147%  
にまで増大した。これに対して、ドコサン酸(炭素鎖22) は逆にnACh 受

容体電流を88% にまで減少した。10 nM から100  $\mu$ M の濃度依存性反応  
においてステアリン酸の増大効果は10  $\mu$ M で最大を示した。ステアリン酸  
のnACh 受容体電流増大効果はPKC の選択的阻害剤であるGF109203X  
によって抑制された。このことは、ステアリン酸がPKC との相互作用によ  
りnACh 受容体反応を増強することを示唆している。

シビレエイ電気器官 nACh 受容体反応に対する効果と同様に、ステアリ  
ン酸 (10  $\mu$ M) は $\alpha 7$  受容体反応を増大し、その効果は持続的であった(10  
分間の処理後 110 分で、処理前の電流振幅と比較して 219%の増大を認め  
た)。また、10 nM から 100  $\mu$ M の濃度範囲においてステアリン酸の効果  
は 10  $\mu$ M で最大を示した。ステアリン酸の $\alpha 7$  受容体反応増大効果は  
GF109203X によって完全に抑制されたことから、この効果が PKC を介  
していることが示唆された。

#### PKC 活性に対するステアリン酸の効果

PKC に対するステアリン酸の相互作用を調べるために、逆相HPLC を  
用いてPKC 活性を測定した。PKC- $\varepsilon$  非存在下では基質ピークのみが認め

られ、PKC- $\epsilon$  添加 ( 活性化 ) により基質ピークに加えて新しいピークが同定できた。MALDI-TOF MS 解析によって、新しいピークの分子量は1453 ( 基質の分子量、1374 + PO<sub>3</sub> 分子量、79 = 1453 ) で基質が燐酸化されたものであることが明らかになった。このことは、逆相HPLC により得られる基質のリン酸化率 ( 燐酸化基質量 / 燐酸化基質量 + 非燐酸化基質量 ) がPKC 活性の指標になりえることを示している。この指標を用いてリノール酸活性化PKC 活性に対するステアリン酸の効果を検討した。その結果、ステアリン酸はPKC- $\epsilon$  活性をステアリン酸非存在下PKC- $\epsilon$  活性の154% ( 1  $\mu$ M )、189% ( 10  $\mu$ M )、148% ( 100  $\mu$ M ) まで増強した。しかし、ステアリン酸は直接、PKC- $\epsilon$  を活性化しなかった。

#### 海馬シナプス伝達に対するステアリン酸の効果

最後に、ラット海馬切片歯状回顆粒細胞層からPS を記録し、海馬シナプス伝達に対するステアリン酸の効果を検討した。10 分間のステアリン酸 ( 10  $\mu$ M ) 処理により、PS 振幅は徐々に増大し、投与後60 分で処理前のPS 振幅の182% にまで達した。この効果は、 $\alpha$ 7 受容体アンタゴニス

トである $\alpha$ -ブンガロトキシシンあるいはGF109203X によって抑制された。

この結果は、ステアリン酸がPKC との相互作用で $\alpha$ 7 受容体反応を増強し、海馬シナプス伝達を促進することを示唆している。

#### **【考察】**

我々の従来の研究で、不飽和脂肪酸がPKC 活性化を介してnACh 受容体反応を増大することを示してきた。本研究結果は、飽和脂肪酸もnACh 受容体反応増大効果を有することを示している。しかし、22炭素鎖をもつドコサン酸ではnACh 受容体反応増大効果が認められなかったことから、22以下の炭素鎖がその増大効果に重要であると考えられる。

ステアリン酸のnACh 受容体反応増大効果がPKC 阻害剤で抑制された結果はこの効果にPKC の関与を示唆している。不飽和脂肪酸とPKC との相互作用は以前より知られているが、飽和脂肪酸との相互作用に関しては報告がない。逆相HPLC を用いたPKC 活性測定において、ステアリン酸はそれ単独ではPKC- $\epsilon$  を活性化しなかったが、リノール酸活性化PKC- $\epsilon$  の活性を増強した。このことは、ステアリン酸はPKC の活性化物質としてで

はなく、修飾物質として機能していると考えられる。nACh 受容体反応に対するステアリン酸の増強効果発現にPKC 活性化が必須である。問題は、アフリカツメガエル卵母細胞膜発現モデルの実験系においてPKC はどのようにして活性化されるかということである。PKC は基底状態にあってもある程度、自発的に活性化されているかもしれない。また、PKC がnACh 受容体を介して活性化されるという報告もある。どのようにしてPKC が活性化されているかという疑問点は残されているが、飽和脂肪酸であるステアリン酸が活性化PKC の活性の程度を増強するという概念は重要な意義を持つと思われる。

ステアリン酸は $\alpha 7$  受容体、PKC 依存性に海馬シナプス伝達を促進していた。 $\alpha 7$  受容体はシナプス前終末に優位に発現しており、グルタミン酸等の興奮性神経伝達物質の放出を促すことが示されている。また、PKC- $\epsilon$  も脳内のシナプス前終末に豊富に存在することが明らかになっている。これらの事実を総合すると、ステアリン酸は活性化PKC- $\epsilon$  活性増強により $\alpha 7$  受容体反応を増大し、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を増加することが推測される。その結果、海馬シナプス伝達の促進をもたらすのでは

ないかと考えられる。

脳nACh 受容体は学習・記憶の細胞モデルであるシナプス伝達長期増強現象 ( LTP ) の発現に重要な役割を果たしていることが示されており、同受容体を標的とする物質は、記憶・学習能力などの認知機能を強化するものとして作用する可能性がある。その意味で、ステアリン酸は脳内における認知機能調整因子であるかもしれない。

#### 【まとめ】

本研究は、飽和脂肪酸の一つであるステアリン酸が活性化PKC- $\epsilon$  活性を増強することで、シナプス前終末 $\alpha 7$  受容体を標的として海馬シナプス伝達を促進することを示した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1542号	氏名	太田 耕平
論文題目	Stearic acid facilitates hippocampal neurotransmission by enhancing nicotinic ACh receptor responses via a PKC pathway  PKC/ニコチン性アセチルコリン受容体を介した ステアリン酸の海馬シナプス伝達促進作用		
審査委員	主 査 甲村 英子 副 査 寺島 俊雄 副 査 尾原 秀史		
審査終了日	平成 15 年 12 月 19 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

フォスホオリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)は細胞膜の構成成分であるリン脂質を加水分解し、アラキドン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ドコサヘキサエン酸等の不飽和脂肪酸を産生する。アラキドン酸、リノール酸、リノレン酸が、protein kinase C(PKC)を直接活性化してニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体反応を増強し、さらに、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を増加させ、海馬シナプス伝達を促進させることが示された。しかし、シナプス伝達に対する飽和脂肪酸の役割は不明である。本研究は、海馬シナプス伝達に対する飽和脂肪酸の一つであるステアリン酸の効果を明らかにすることを目的とした。

最初にシビレエイ電気器官nACh受容体サブユニットα、β、γ、δ mRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入しnACh受容体を強制発現させ、nACh受容体電流に対する各種飽和脂肪酸の効果についてパッチクランプ法を用いて検討した。ラウリン酸(炭素鎖12)、ミリスチン酸(炭素鎖14)、パルミチン酸(炭素鎖16)、n-ヘプタデカン酸(炭素鎖17)、ステアリン酸(炭素鎖18)、エイコサン酸(炭素鎖20)処理は、ACh誘発電流を増大させた。これに対して、ドコサン酸(炭素鎖22)は逆にnACh受容体電流を減少させた。濃度依存性の検討ではステアリン酸は10 μMで最大の効果を示した。また、ステアリン酸のnACh受容体電流増大効果はPKCの選択的阻害剤であるGF109203Xによって抑制された。このことは、ステアリン酸がPKCとの相互作用によりnACh受容体反応を増強することを示唆している。

同様にアフリカツメガエル卵母細胞に発現させたα7受容体でステアリン酸の効果を検討すると、ステアリン酸はα7受容体反応を増大させ、またその効果は持続的であった。濃度依存性の検討では、ステアリン酸の効果は10 μMで最大を示した。さらに、ステアリン酸のα7受容体反応増大効果はGF109203Xによって完全に抑制されたことから、この効果もPKCを介していることが示唆された。

PKCに対するステアリン酸の作用を調べるために、myelin basic protein由来合成ペプチドをPKC-εの基質として反応させ、逆相HPLCを用いてPKC活性を測定した。ステアリン酸はPKC-ε活性をステアリン酸非存在下PKC-ε活性の154%(1 μM)、189%(10 μM)、148%(100 μM)まで増強した。しかし、ステアリン酸は直接、PKC-εを活性化しな

かった。

最後に、ラット海馬切片歯状回顆粒細胞層からPS を記録し、海馬シナプス伝達に対するステアリン酸の効果を検討した。10 分間のステアリン酸(10  $\mu$ M)処理により、PS 振幅は徐々に増大し、投与後60 分で処理前のPS 振幅の182% にまで達した。この効果は、 $\alpha 7$  受容体アンタゴニストである $\alpha$ -ブンガロトキシンあるいはGF109203X によって抑制された。この結果は、ステアリン酸がPKC との相互作用で $\alpha 7$  受容体反応を増強し、海馬シナプス伝達を促進することが示唆された。

本研究は、シナプス伝達に対する飽和脂肪酸の効果について、主にその一つであるステアリン酸を用いて電気生理学的に検討したものであるが、ニコチン性アセチルコリン受容体反応に対してステアリン酸が増強効果を有し、 $\alpha 7$  受容体、PKC 依存性に海馬シナプス伝達を促進することを明らかにし、これらの反応における飽和脂肪酸とPKCの相互作用をはじめて示したものであり、価値ある集積であると認める。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。