



2-Pyrrolidinone induces a long-lasting facilitation of hippocampal synaptic transmission by enhancing $\alpha 7$ ACh receptor responses via a PKC pathway

宮本, 宏人

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2926

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002926>

※ 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。



【 82 】

氏 名・(本 籍) 宮本 宏人 (岡山県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1542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 】

2-Pyrrolidinone induces a long-lasting facilitation of hippocampal synaptic transmission by enhancing $\alpha 7$ Ach receptor responses via a PKC pathway
($\alpha 7$ アセチルコリン受容体を標的とした
2-ピロリドン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】

ピロリドン骨格を有するアニラセタムはグルタミン酸受容体の1つである AMPA 受容体の脱感作を抑制し反応を増大することが知られている。これまで、我々はアニラセタムの代謝産物である 2-ピロリドンがカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) を介して AMPA 受容体反応を増大させることを明らかにしてきた。この事実は、2-ピロリドンが海馬シナプス伝達を促進する可能性を示唆している。予備実験で、2-ピロリドンは確かに海馬シナプス伝達を促進するが、その作用は CaMKII の選択的阻害剤で消失しないことが判明した。このことは、2-ピロリドンが CaMKII/AMPA 受容体の経路とは別の機序で海馬シナプス伝達を促進していることを意味している。

そこで、本研究は 2-ピロリドンの海馬シナプス伝達促進作用の機序解明を目的とした。

【材料と方法】

受容体の発現

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、 $\alpha 7$ 受容体受容体を強制発現させた。

$\alpha 7$ 受容体電流記録

2電極電位固定法にて、ACh 誘発電流を測定した。

PKC 活性の測定

PKC 活性は myelin basic protein 由来合成ペプチドを PKC-ε 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。

ウェスタンプロッティング

選択的 PKC 基質の myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCS) 抗体を用いてウェスタンプロッティングを施行した。

集合興奮性シナプス後電位 (fEPSP) 記録

ラット海馬切片においてシェーファー側枝を刺激し、CA1 領域錐体細胞層から fEPSP を記録した。

【結果】

$\alpha 7$ 受容体反応に対する 2-ピロリドンの効果

アフリカツメガエル卵母細胞膜に $\alpha 7$ 受容体を発現させ、ACh 誘発電流に対する 2-ピロリドンの効果を検討した。20 分間の 2-ピロリドン (100 nM) 处理により ACh 誘発電流振幅は増大し、投与後 60 分には処理 ACh 誘発電流振幅の $189 \pm 14\%$ に至った。アフリカツメガエル卵母細胞膜発現モデルにおいて、ACh 誘発電流は ACh 受容体チャネル電流成分と同受容体チャネルから細胞内に流入する Ca^{2+} によって活性化される Cl^- チャネル電流成分から成っている。2-ピロリドンは フォスフォリバーゼ C (PLC) 経路を介して誘発される Cl^- チャネル電流には影響を与えたことから、2-ピロリドンによる ACh 誘発電流増強効果は $\alpha 7$ 受容体チャネル電流の増大によるものと考えられた。2-ピロリドンの効果はベル型濃度依存相關 ($1 \text{ nM}-10 \mu\text{M}$) を示し、 100 nM の時に最大の増大効果が得られた。2-ピロリドンの $\alpha 7$ 受容体反応増大効果は選択的 PKC 阻害剤である GF109203X によって抑制されたが、選択的 CaMKII 阻害剤である KN-63 や 選択的 protein kinase A (PKA) 阻害剤である H-89 では抑制されなかった。このことは、2-ピロリドンが PKC 経路を介して $\alpha 7$ 受容体反応を増大していることを示唆している。

PKC 活性に対する 2-ピロリドンの効果

PKC アイソザイムの中で PKC-ε は不飽和脂肪酸によって活性化されることが知られている。本実験では PKC-ε の活性化にリノール酸を用いた。 $10 \mu\text{M}$ の基質に $10 \mu\text{M}$ リノール酸と $10 \mu\text{M}$ ATP そして PKC-ε を加え、2-ピロリドン存在下・非存在下で 30°C 10 分間反応させた後、逆相 HPLC で解析を行った。PKC-ε 非存在下では基質ピークのみが認められ、PKC-ε 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。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量分析装置 (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、 $1374 + \text{PO}_3$ 分子量、 $79 = 1453$) で基質が磷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 (磷酸化基質量/磷酸化基質量 + 非磷酸化基質量) が PKC 活性化の指標になりえることを示している。リノール酸非存在下では 2-ピロリドンによる基質のリン酸化は起こらなかった。しかし、PKC-ε 活性化状態で 2-ピロリドン ($200 \mu\text{M}$) は 2-ピロリドン非存在下の 1.8 ± 0.1 倍の基質リン酸化を引き起こした。この結果は、2-ピロリドン自身は直接の PKC-ε 活性化に関与しないが、活性化 PKC-ε 活性を増強する働きがあることを示唆している。

さらにこの 2-ピロリドン作用を証明するために、脳に多く存在する PKC の基質の MARCKS 抗体を用いたウェスタンプロットティングを施行した。2-ピロリドン (100 nM) の処理・非処理ラット海馬切片において、2-ピロリドン処理群は 非処理群と比較して MARCKS 抗体反応シグナルがより強度に検出された。このことは、2-ピロリドンが 活性化 PKC 活性を増強することを示している。

海馬シナプス伝達に対する 2-ピロリドンの効果

最後に、ラット海馬切片 CA1 領域から fEPSP を記録し、海馬シナプス伝達に対する 2-ピロリドンの効果を検討した。10 分間の 2-ピロリドン (100 nM) 処理により fEPSP slope は経時的に増大し、投与後 60 分には処理前 fEPSP slope の $170 \pm 13\%$ に達した。この効果は、 $\alpha 7$ 受容体阻害剤である α -ブンガロトキシン や GF109203X によって抑制された。以上の結果は、2-ピロリドンがシナプス前終末 PKC- ϵ を介して $\alpha 7$ 受容体反応を増大し、海馬シナプス伝達を促進することを示している。

【考察】

我々はこれまでの研究で、2-ピロリドンが AMPA 受容体 (GluR 1, 2, 3 と GluR 1, 3) 反応を増大させるが、GluR1, 2 受容体反応は抑制することを明らかにした。また、この増大作用には CaMKII が関与していた。2-ピロリドンは海馬シナプス伝達を促進するが、この効果は選択的 CaMKII 阻害剤で抑制されなかった。従って、2-ピロリドンの海馬シナプス伝達促進作用は AMPA 受容体を介さない別の経路が考えられた。

今回の研究で最も重要な所見は 2-ピロリドンが活性化 PKC- ϵ 活性を増強することである。 $\alpha 7$ 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分かっている。また、PKC- ϵ もシナプス前終末に多く発現していることが知られている。本研究において、2-ピロリドンは活性化 PKC- ϵ 活性を増強し、 $\alpha 7$ 受容体反応を増大した。さらに、2-ピロリドンは PKC/ $\alpha 7$ 受容体依存性に海馬シナプス伝達を促進していた。今回、2-ピロリドンが $\alpha 7$ 受容体を介してグルタミン酸放出を刺激するという証拠は示していない。しかし、本研究結果は、2-ピロリドンが PKC- ϵ を標的として $\alpha 7$ 受容体反応を増大し、その結果、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を刺激し、海馬シナプス伝達を促進すること（認知機能改善）を強く示唆している。このように、2-ピロリドンは抗痴呆薬に発展する可能性がある。

【まとめ】

本研究結果は、アニラセタムの代謝産物である 2-ピロリドンに活性化 PKC 活性の増強作用があることを示した。この作用は $\alpha 7$ 受容体反応を増大し、海馬シナプス伝達を促進しているかもしれない。このことは、PKC- ϵ を標的とした新しい抗痴呆薬開発の戦略となる可能性を提示した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1543 号	氏名	宮本 宏人
論文題目	<p>2-Pyrrolidinone induces a long-lasting facilitation of hippocampal synaptic transmission by enhancing α_7 ACh receptor responses via a PKC pathway</p> <p>α_7 アセチルコリン受容体を標的とした 2-ピロリドンの海馬シナプス伝達促進作用</p>		
審査委員	主査 甲村 天二 副査 寺尾 伸也 副査 佐倉 秀里		
審査終了日	平成 15 年 11 月 19 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

ピロリドン骨格を有するアニラセタムはグルタミン酸受容体の 1 つである AMPA 受容体の脱感作を抑制し反応を増大することが知られている。これまでに、アニラセタムの代謝産物である 2-ピロリドンがカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) を介して AMPA 受容体反応を増大させることを明らかにし、2-ピロリドンが海馬シナプス伝達を促進する可能性が示唆された。しかしその作用は CaMKII の選択的阻害剤で消失しないことが判明した。2-ピロリドンが CaMKII/AMPA 受容体の経路とは別の機序でも海馬シナプス伝達を促進していることが示唆され、本研究は 2-ピロリドンの海馬シナプス伝達促進作用の機序解明を目的とした。

α_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アフリカツメガエル卵母細胞膜に α_7 受容体を発現させ、2 電極電位固定法にて、ACh 誘発電流に対する 2-ピロリドンの効果を検討した。2-ピロリドン処理により ACh 誘発電流振幅は増大した。2-ピロリドンは フォスフォリパーゼ C 経路を介して誘発される Cl^- チャネル電流には影響を与えたことから、2-ピロリドンによる ACh 誘発電流増強効果は α_7 受容体チャネル電流の増大によるものと考えられた。2-ピロリドンの効果はベル型濃度依存相関 (1 nM-10 μM) を示し、100 nM の時に最大の増大効果が得られた。2-ピロリドンの α_7 受容体反応増大効果は選択的 PKC 阻害剤である GF109203X によって抑制されたが、選択的 CaMKII 阻害剤である KN-93 や 選択的 PKA 阻害剤である H-89 では抑制されなかった。このことは、2-ピロリドンが PKC 経路を介して α_7 受容体反応を増大していることを示唆している。

次に、myelin basic protein 由来合成ペプチドを PKC- ϵ の基質として 2-ピロリドンの存在ないしは非存在下で 10 分間反応させ、逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相 HPLC) を用いて基質のリン酸化を測定評価した。PKC- ϵ の活性化にはリノール酸を用いた。リノール酸非存在下では、2-ピロリドンによる基質のリン酸化は起こらなかった。しかし、PKC- ϵ 活性化状態では、2-ピロリドンは 2-ピロリドン非存在下の 1.8 ± 0.1 倍の基質リン酸化を引き起した。この結果は、2-ピロリドン自身は PKC- ϵ を活性化しないが、活性化 PKC- ϵ 活性を増強する働きがあることを示唆している。

さらにこの 2-ピロリドン作用を証明するために、海馬切片を 2-ピロリドンの存在ないしは
非存在下で 20 分間培養し、脳に多く存在する PKC 基質である
MARCKS(myristoylated alanine-rich C kinase substrate)がリン酸化されたものに対する
抗体を用いたウェスタンブロッティング を施行した。2-ピロリドン処理群は 非処理群と比
較して抗リン酸化 MARCKS 抗体反応シグナルがより強度に検出された。このことは、2-ピ
ロリドンが 活性化 PKC 活性を増強することを示している。

最後に、2-ピロリドン 10 分間処理後のラット海馬切片においてシェーファー側枝を刺
激し、CA1 領域錐体細胞層から fEPSP を記録、2-ピロリドンの海馬シナプス伝達への影
響を検討した。2-ピロリドン(100 nM) 処理により fEPSP slope は経時的に増大し、投与
後 60 分には処理前 fEPSP slope の $170 \pm 13\%$ に達した。この効果は、 $\alpha 7$ 受容体阻害
剤である α -ブンガロトキシン や GF109203X によって抑制された。以上の結果は、2-
ピロリドンがシナプス前終末 PKC- ϵ を介して $\alpha 7$ 受容体反応を増大し、海馬シナプス伝
達を促進することを示唆している。

本研究は、アニラセタムの代謝産物である 2-ピロリドンについて、海馬シナプス伝達
促進作用の機序を研究したものであるが、2-ピロリドンが活性化 PKC- ϵ 活性を増強し、
さらに $\alpha 7$ 受容体反応を増大させることによって生じることを示し、新しい抗痴呆薬開発
の戦略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
究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。