



Electron microscopic localization of γ - and β II-subspecies of protein kinase C in rat hippocampus

古瀬, 明子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1395

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001395>

※ 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)	古瀬明子 (佐賀県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1145号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成2年2月28日
学位論文題目	Electron microscopic localization of γ - and β II- subspecies of protein kinase C in rat hippocampus (ラット海馬におけるプロテインキナーゼCの γ 及び β II 分子種の電子顕微鏡的局在)
審査委員	主査 教授 田中千賀子 教授 西塚泰美 教授 伊東宏

論文内容の要旨

[緒言]

プロテインキナーゼC (PKC) は種々の生理過程で情報伝達機構に重要な役割を果す蛋白質磷酸化酵素である。本酵素は当初単一と考えられていたが最近になって少なくとも7種の分子種 (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ) からなることがわかり, 前4者については蛋白レベルでの分類タイプI (γ), タイプII (β I + β II), タイプIII (α) との対応も証明されている。これらの分子種がPKCの多彩な機能を分担している可能性が指摘され, それぞれの機能や局在に興味を持たれている。一方最近, 記憶・学習の中枢とされる海馬でその基礎機構と考えられている長期増強 (long-term potentiation: LTP) にPKCが関与するとして注目されている。

本研究は光顕及び電顕を用いた免疫組織化学により海馬に特に多い γ 及び β II-PKCについてその詳細な細胞内分布を明らかにし, LTPにおけるPKC各サブタイプの役割を推定することを目的とした。

[方法]

1. PKCの抗体の作製

抗 γ -PKC抗体: ラット脳精製PKCをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体でタイプI (γ -) PKCのみを認識する。

抗 β II-PKC抗体: β II-PKCのC末端に特異的なオリゴペプチド (660-673: SFVNSE-FLKPEVK) を合成しウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体。

両者ともその特異性は共同研究者らによりすでに証明されている。

2. コルヒチン処置

灌流固定24時間前にコルヒチン100 μ gを生食10 μ lに溶解して左側脳室に注入した。

3. 免疫染色

ウィスター系ラットを麻酔下に4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸、0.5%又は1%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液で灌流固定し脳を摘出した。後固定、30%ショ糖液浸漬後、クリオスタットで20 μ mに薄切し、0.03%トリトンX-100を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)に浮遊させ上記抗体を用いたPAP法で免疫染色し光顕観察した。

4. 電顕用試料作製

上記の後固定した脳ブロックを液体窒素で凍結融解し、ビブラトームで40 μ mに薄切した後、トリトンX-100を含まないPBSを用いて同様に免疫染色した。オスミウム酸後固定後脱水しエポン包埋して超薄切片を作製しウラン染色を施した後電顕観察した。

[結果]

1. 海馬体内の γ -及び β II-PKCの分布

γ -PKCの海馬体全体、特にアンモン角のCA1領域に高濃度に存在するが、 β II-PKCはCA1領域にのみ強い免疫反応が認められた。

CA1領域における γ -PKCと β II-PKCの層分布は異なり、 γ -PKCは錐体細胞層、多形細胞層、放線層、網状分子層の全ての層にわたり錐体細胞の細胞体及び樹状突起の細胞質に均一に存在していた。CA2-3領域でも濃度はやや低いがパターンは同じであった。歯状回においては分子層(特に内側1/3)に強い免疫反応が認められた。これに対し、 β II-PKCは、錐体細胞層では錐体細胞の核を取り囲むように点状の免疫反応が認められ、他の層で線維状の免疫反応陽性像が見られた。コルヒチン処置動物では β II-PKCはCA1領域の錐体細胞の細胞体に集積し、海馬に投射する他の部位に新たな染色は見られなかった。

2. 電顕観察

海馬CA1領域では両分子種の細胞内局在を比較してみると γ -PKCは光顕で観察されたと同様に錐体細胞の核周囲から末梢樹状突起に至るまで細胞質全体に均一に分布するが、 β II-PKCは核周囲及び尖頂樹状突起幹においてはゴルジ体の周囲(特にトランス側)に集積し、末梢樹状突起では細胞質に存在していた。またCA3での γ -PKCの分布は基本的にはCA1と同じであるが、錐体細胞の尖頂樹状突起起始部から伸びる樹状突起棘は免疫反応陽性であったがそれを取り囲む歯状回顆粒細胞から投射する苔状線維の神経終末は陰性であった。両分子種ともシナプス後部に免疫反応が多く、調べ得た範囲では神経終末には認められなかった。

[考察]

海馬のLTPにPKCが関与しているという証拠は数多く報告されている。LTPの本質的な過程がシナプス前であるかシナプス後であるかまたPKCがどの過程でどこに働くかについては議論があり、両方が複雑にからみあって構成されているようであるがその詳細はまだ明らかにされていない。本研究の結果 γ -および β II-PKCが海馬CA 1領域の錐体細胞に豊富に存在し、その細胞内局在は微妙に異なること、また両者ともシナプス後部に存在することが明らかとなり、CA 1領域で両者がシナプス後部でLTPに関与している可能性が示唆された。 γ -PKCは苔状線維-CA 3経路においてもシナプス後部で働いている可能性がある。

γ -及び β II-PKCの分布は樹状突起に豊富で、微小管関連蛋白 2 (microtubule-associated protein 2 : MAP 2) の分布と似ている。MAP 2は樹状突起の可塑性に重要な役割を果たしておりPKCによってリン酸化されることにより微小管の重合が抑制され可塑性が増強することが報告されている。またLTPの状態の海馬で樹状突起棘の変形がおくとされており、PKCによるMAP 2のリン酸化が樹状突起の形状変化を引き起こしシナプス伝達効率を上げる可能性も考えられる。

また β II-PKCがゴルジ体周囲に集積していることからこの分子種がゴルジ体の機能に関与する可能性もある。

この研究では両分子種ともどの層でも神経終末には免疫反応は認めなかった。しかし免疫組織学においてはある閾値以下の濃度の抗原は検出できないため神経終末にはPKCが存在しないと結論できない。さらにこれら以外の分子種が神経終末すなわにシナプス前後に存在している可能性も否定できない。

[結語]

γ -及び β II-PKCに対する特異抗体を用いて、ラット海馬における両分子種の分布と細胞内局在を示した。両分子種は海馬錐体細胞に存在し、シナプス後部側で機能している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼC (PKC) は種々の生理過程で情報伝達機耗に重要な役割を果たしている。本酸素には少なくとも7種の分子種 (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ) が存在し、PKCの多彩な機能を分担している可能性が指摘されてくる。中枢神経系には特に豊富に存在し、特徴のある分布を示すことから、各分子種の特定の機能集団としての神経回路での役割分担に興味が持たれている。

一方、海馬はPKCが特に豊富に存在する部位であり、記憶・学習の中枢とされている。その基礎機構と考えられている長期増強 (long-term potentiation : LTP) にPKCが関与するとして注目されている。

本研究は光顕及び電顕を用いた免疫組織化学により、海馬における γ 及び β II-PKCの詳細な細胞内分布を明らかにし、LTPにおけるPKC各サブタイプの役割を推定することを目的としている。

実験に用いた抗体は γ -PKCに対するモノクローナル抗体と β II-PKCに特異的なオリゴペプチドを抗原にして作製したポリクローナル抗体で、どちらもその特異性は確認されている。

免疫染色の結果、 γ -PKCは海馬全体、特にアンモン角のCA 1 領域に高濃度に存在し、 β II-PKCはCA 1 領域にのみ強い免疫反応が認められた。

電子顕微鏡で比較すると γ -PKCは錐体細胞の細胞質全体に均一に分布するが、 β II-PKCは核周囲及び尖頂樹状突起起始部においてはゴルジ体の周囲に集積し、末梢樹状突起では細胞質に存在していた。両分子種ともシナプス後部に集積し、神経終末には認められなかった。

海馬のLTPにPKCが関与しているという証拠は数多く報告されており、LTPの本質的な過程がシナプス前であるかシナプス後であるか、またPKCがどの過程でどのように働くかについては議論があり、その詳細はまだ明らかにされていない。本研究の結果、海馬CA 1 領域の錐体細胞に多量の γ -および β II-PKCが存在し、その細胞内局在は微妙に異なるが、両者がシナプス後部に存在し、LTPに関与している可能性が示唆された。

以上のように本研究は分子種特異抗体による免疫組織化学によりPKC分子種の局在を研究したものであり、初めて海馬の錐体細胞内のPKC γ および β II分子種の局在も明らかにしたものであり、PKCのLTPへの役割について形態学的基礎を与えた価値ある業績である。

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。