



Immunocytochemical localization of the α -, β I-, β II- and γ -subspecies of protein kinase C in the monkey visual pathway

福田, 薫

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-01-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1889

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001889>

※ 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)	ふく だ 薫	(兵庫県)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博ろ第1430号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成7年1月11日	
学位論文題目	Immunocytochemical localization of the α -, β I-, β II-and γ -subspecies of protein kinase C in the monkey visual pathway (サル視覚路におけるプロテインキナーゼC (α 、 β I、 β II、 γ) 各分子種の免疫組織化学的局在)	
審査委員	主査 教授 山本 節 教授 岡田安弘 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は、神経系に最も高い活性を示し、情報伝達物質の遊離、神経可塑性の調節、遺伝子発現の調節などにおいて、重要な役割を果たしていることが示されている。また少なくとも10種類以上のサブタイプが中枢神経系に存在していることが知られており、各サブタイプは、独自の組織内分布、細胞内局在、活性化機構を示し、異なった神経機能に関与していると考えられている。大脳の視覚野は神経可塑性の研究が精力的に行われている脳部位であり、本部位におけるPKCの研究は、可塑性におけるPKCの機能を明らかにするための糸口となると考えられている。

本研究はサル大脳皮質視覚路におけるPKC各サブタイプ(α , β I, β II, γ)の分布を免疫組織化学的に明らかにし、視覚路の細胞構築と比較することにより、PKCサブタイプの機能について推定することを目的とした。

[方法]

1. 特異抗体の作製

a. 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ナール抗体で γ -PKCのみを認識する。

b. 抗 α -, β I-および β II-PKC抗体：各々のC末端部のオリゴペプチド(α -PKCはQFVH PILQSAV, β I-PKCはSYTNPEFVIN, β II-PKCはSFVNSEFLKPEVKS)を合成し、ウサギに免疫して得られたポリクロナール抗体。

なおサル脳の可溶性分画を用いたイムノプロット法によって各サブタイプに対する抗体は、サルにおいても分子種特異的に反応することを確認した。

2. 免疫染色

実験には、体重が2.7-3.8kgのrhesus monkey (Macaca Mulatta)を使用した。ケタミン(10mg/kg)とペントバルビタール(35mg/kg)により深麻酔した後、灌流固定、脳と眼球を摘出し、さら

に2日間固定、ショ糖液にて洗浄後、脳は20μmの凍結切片を作製した。この切片を0.3% Triton X-100を含む0.1Mリン酸緩衝食塩水に浮遊させた後、浮遊状態で各プロテインキナーゼCサブタイプに特異的な抗体を第1抗体としてPAP法で免疫染色を行った。網膜は7μmの凍結切片をスライドグラスに張り付け、同様にして免疫染色を行い、サル視覚路（網膜、外側膝状体、大脳皮質視覚野）における各サブタイプの免疫陽性反応の分布を光顕観察した。

[結果]

1) 網膜

第1次ニューロンの一つである錐体細胞と、第2次ニューロンの双極細胞の細胞膜とそれに連なる神経線維、さらに内網状層にある神経節細胞との接点と思われる神経終末で α -PKC陽性反応を認めた。また内網状層では顆粒状に、さらに第3次ニューロンの神経節細胞の細胞体とそれに連なる視神経線維では β I-PKC陽性反応を示した。 β II, γ -PKCでは陽性反応を示さなかった。

2) 外側膝状体

各サブタイプのうち γ -PKCにのみ陽性反応を示した。1, 2層に存在する大細胞のうちの30-40%と、3-6層に存在する小細胞のうちの1-6%の細胞が陽性反応を示した。 α , β I, β II-PKCでは陽性反応を示さなかった。

3) 大脳皮質視覚野(17野)

1, 2, 3, 4b, 4c, 6層に存在する中型細胞の細胞膜に α -PKC陽性反応を認め、 β I-PKC陽性細胞は中型細胞で、ほぼ全層に散在的に認めた。また、2, 3, 6層で細胞の細胞体と樹状突起の接合部に点状に β II-PKC陽性反応を認めた。 γ -PKCは1, 4a, 4c, 6層のニューロピルに強い陽性反応を示した。また γ -PKC陽性反応は2層では長い樹状突起を持った小型の錐体細胞で、6層では長い樹状突起を持った大型の錐体細胞で、共に細胞膜と樹状突起に見られた。外側膝状体からの神経線維が入力する第4層では、外側膝状体の1, 2層に存在する大型細胞からの入力を受ける4c層において、stellate cellの細胞膜にそって α -PKC陽性反応を認め、その細胞を取り囲むように点状に γ -PKC陽性反応を認めた。

[考察]

網膜及び大脳皮質視覚野におけるプロテインキナーゼCの分布に関しては、数多くの報告がなされているが、各サブタイプ別に報告したもの、また視覚路の第1次ニューロンから大脳皮質視覚野まで通して述べたものは、この研究が最初の報告である。

網膜においては、第2次ニューロンである双極細胞と3次ニューロンである神経節細胞が内網状層でシナプスを形成しており、その神経終末に α -, β I-PKCの陽性反応が見られたことから、本シナプスにおける情報伝達に α -, β I-PKCが関与している可能性が考えられた。

外側膝状体においては、視標の動きの解析に関与しているとされている1, 2層に存在する大型細胞において γ -PKC陽性反応が見られたが、微細な構造の分析や色覚に関与しているとされている3-6層の小型細胞ではほとんど陽性反応がみられなかった。視神経節細胞および視神経線維で見られた β I-PKC陽性反応が外側膝状体において見られなかったことより、第3次ニューロンにおいて β I-PKCは、神経終末よりむしろ細胞体や軸索で機能していることが示唆された。

大脳皮質視覚野の第4c層においては、外側膝状体の大型細胞からの線維が入力する層であり、外側膝状体の大型細胞に γ -PKC陽性反応が存在したことから、第4c層に見られる γ -PKC陽性反

応は外側膝状体から投射する神経終末に存在すると考えられる。また、 α -PKC陽性反応が第4c層のstellate cellに存在することから、 γ -PKCが外側膝状体の大型細胞からの皮質入力線維の前シナプス性で、また α -PKCは後シナプス性で情報伝達に関与している可能性が示唆された。

[結語]

γ -及び α -、 β I-、 β II-PKCに対する特異抗体を用いて、サル視覚路における各分子種の局在を示した。各分子種は異なった分布を示し、各分子種間に機能の分担があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

[審査の要旨]

プロテインキナーゼCは神経系に最も高い活性を示し、情報伝達物質の遊離、神経可塑性の調節、遺伝子発現の調節などに、重要な役割を果たしていることが知られている。大脳の視覚野では神経可塑性の研究が大いに行われており、この部位におけるPKCの研究は、可塑性におけるPKCの機能解明の糸口として重要である。そこで本研究者は、サル大脳皮質視覚路におけるPKC各サブタイプ(α 、 β I、 β II、 γ)の分布を免疫組織化学的に明らかにし、視覚路の細胞構築と比較することにより、PKCサブタイプの機能について検討した。

[方法]

抗 γ -PKC抗体はモノクロナール抗体を、抗 α -、 β I-、 β II-PKC抗体はポリクロナール抗体をそれぞれ作成し、イムノプロット法によりサルにおいても分子種特異的に反応することを確認した。実験にはrhesus monkeyを使用した。深麻酔後、灌流固定、凍結切片を作製し、各プロテインキナーゼCサブタイプに特異的な抗体を第1抗体としてPAP法で免疫染色をし、サル視覚路(網膜、外側膝状体、大脳皮質視覚野)における各サブタイプの免疫陽性反応の分布を検討した。

[結果]

網膜では錐体細胞、双極細胞とその神経線維、内網状層の神経終末で α -PKC陽性反応を認め、神経節細胞とそれに連なる視神経線維では β I-PKC陽性反応を示した。外側膝状体では γ -PKCのみに陽性反応を示し、1、2層の大細胞の30-40%と、3-6層の小細胞の1-6%に陽性反応を示した。また大脳皮質視覚野では1、2、3、4b、4c、6層の細胞に α -PKC陽性反応を認め、 β I-PKC陽性反応はほぼ全層に散在的に認めた。また2、3、6層で細胞の細胞体と樹状突起の接合部に点状に β II-PKC陽性反応を示した。 γ -PKCは1、4a、4c、6層のニューロピルに強い陽性反応を示した。また2、6層の錐体細胞の細胞膜と樹状突起に γ -PKC陽性反応を示した。外側膝状体の大型細胞からの入力を受ける4c層において、stellate cellの細胞膜にそって α -PKC陽性反応を認め、その細胞を取り囲むように点状に γ -PKC陽性反応を示した。

[結論]

プロテインキナーゼCは、神経系においてさまざまな重要な役割を果たしていることが知られており、また各サブタイプは、異なった神経機能に関与していると考えられているが、まだその詳細は解明されていない。本研究者は、サル視覚路におけるPKC各サブタイプの局在を免疫組織化学的に明

らかにし、各サブタイプ間に機能の分担があることを示唆した。

本研究は、視覚路の第一次ニューロンから大脳皮質視覚野までの各部位のプロテインキナーゼC各サブタイプの分布を免疫組織化学的に明らかにした最初のものであり、視覚路におけるプロテインキナーゼC各サブタイプの機能を解明する重要な知見を得たものとして、価値ある研究と認める。よって、本研究者は、博士（医学）として学位を得る資格があると認める。