

学位論文題名

マウス小脳プルキンエ細胞における
タンパク質リン酸化酵素 PKC γ のストライプ状発現

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Protein Kinase C (PKC) は神経組織に豊富に存在するタンパク質リン酸化酵素で、イオンチャネル、受容体、酵素、細胞骨格タンパクなどのリン酸化を介してシナプス伝達やシナプス可塑性など、さまざまな神経機能の発現や制御に重要な役割を果たしている。PKC γ は3種の古典的PKCの一つで、Ca²⁺結合ドメインであるC2領域と、ジアシルグリセロールとの結合ドメインであるC1領域とを有し、Gqタンパク共役型受容体の活性化に際してその効果器酵素であるホスホオリパーゼ C β (PLC β) が産生するジアシルグリセロールと細胞内Ca²⁺濃度上昇により活性化する。PKC γ は小脳のプルキンエ細胞に最も高いレベルで発現し、そのmGluR1シグナル伝達系の下流の効果器酵素として、発達期における余剰な登上線維除去や長期抑制の誘発、協調運動などの小脳機能発現に重要な役割を果たしている。一方、プルキンエ細胞には、PLC β 3優勢なプルキンエ細胞群と PLC β 4優勢な群とが存在し、前者は解糖系酵素アルドラーゼ C (zebrinII 抗原) 陽性のプルキンエ細胞と、後者はアルドラーゼ C 陰性のプルキンエ細胞と一致する。不思議な事に、mGluR1 や PKC γ の遺伝子欠損マウスに生じる小脳表現型は、PLC β 4 遺伝子欠損マウスで再現され PLC β 3 遺伝子欠損マウスでは全く見られない。この事実は、小脳機能発現においてアルドラーゼ C 陰性/PLC β 4 発現強陽性のプルキンエ細胞が重要な機能的役割を果たしていることを示唆するが、どうしてこのような違いが生じるのか未だ不明である。今回、その手掛かりを得るため、PKC γ や PKC γ の活性化に関わるシグナル伝達分子の発現がこの2つの細胞群でどのように制御されているかを、免疫組織化学法を用いて検討した。

【材料と方法】 ネブタール麻酔下において、C57BL マウスを経心的に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。摘出した小脳から、マイクロスライサー切片を作成した。浮遊法にて、PKC γ 、PLC β 3、PLC β 4、EAAT4などの一次抗体と反応させた後、蛍光抗体法で発現を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果】 まず、PKC γ の小脳内発現分布を調べたところ、小脳前葉を通る冠状断切片では、PKC γ を強く発現する帯域が広いストライプ状発現が観察され、その間に弱く発現する狭い帯域が介在した。反対に、小脳後葉を通る切片では、PKC γ 発現の弱い帯域が広く、その間に発現の強い帯域が介在するストライプ状パターンを示した。PKC γ ノックアウトマウスの小脳に陽性反応は観察されなかったことから、この小脳の内外方向に並ぶストライプ状発現はPKC γ に特異的なシグナルであると判断した。また、小脳皮質ではPKC γ はプルキンエ細胞にのみ特異的に発現していることから、PKC γ のストライプ状発現はプルキンエ細胞の発現特性に由来することが判明した。次に、PKC γ のストライプ状発現を、2つの PLC β

の発現特性と比較した。小脳の前葉を通る冠状断切片では、PKC γ と PLC β 3 が相反するストライプ状発現を、PKC γ と PLC β 4 が一致するストライプ状発現を示した。拡大を上げて細胞レベルで観察すると、発現強度が切り替わる境界領域の 1 ~ 2 個のプルキンエ細胞において PKC γ の発現特性が PLC β 4 と一致したり、PLC β 3 と相反したりするようなゆらぎも観察された。このような発現パターンは、小脳の後葉を通る冠状断切片でも同様であった。この結果は、PKC γ のストライプ状発現は PLC β 4 のそれと概ね一致していることを示している。さらに、細胞外グルタミン酸濃度調節に関わる細胞膜グルタミン酸トランスポーターの 1 つにプルキンエ細胞に選択的な EAAT4 があり、この分子もストライプ状の発現を示すことが知られている。前葉と後葉のいずれにおいても、PKC γ と EAAT4 は概ね相補的なストライプ状の発現をしていた。最後に、この PKC γ のストライプ状発現が発生過程のいつ頃から形成されるかを追求した。生後 7 日ではストライプ状の発現パターンに乏しいが、生後 14 日までに成体期に認められるようなストライプ状の発現が明瞭となった。

【考察】以上の解析から、PKC γ も小脳においてストライプ状発現を示す分子の 1 つであり、その発現パターンは PLC β 4 のそれと概ね一致し、PLC β 3 や EAAT4、アルドラーゼ C のそれとは概ね相反するパターンをとることが明らかとなった。この結果は、PLC β 4 を豊富に発現するプルキンエ細胞群では PKC γ も豊富に発現が、EAAT4 の発現は低いことを示している。EAAT4 発現の弱いプルキンエ細胞では脱分極性応答、内因性カンナビノイドによる伝達物質放出抑制、小脳長期増強など、mGluR1 を媒介したシナプス伝達の活性化が制限されていることが報告されている。この点を考慮すると、このような異なる分子発現環境が mGluR1 シグナル伝達系による登上線維シナプス除去や小脳機能への異なる機能的関与の原因となり、高い PKC γ の発現もその要因の 1 つになっている可能性が考えられる。さらに、PKC γ のストライプ状発現は小脳シナプス回路の形成と成熟が最も活発となる生後第 2 週において顕在すること、そして従来のストライプ状発現と概ね一致するものの微妙な相違もあることから、この発現調節が単なる遺伝的制御だけでなく活動依存的な制御も関与している可能性が想定され、今後解決すべき重要な点であると思われる。

【結論】本研究では、小脳プルキンエ細胞においてシナプス回路発達、シナプス可塑性、小脳機能発現に深く関わっている mGluR1 から PKC γ に至るシグナル伝達分子のうち、PKC γ がマウス成体小脳においてストライプ状発現を示すことを見いだした。このストライプ状発現は、PLC β 4のそれと概ね一致し、PLC β 3 や EAAT4、アルドラーゼ C のそれとは概ね相反するパターンであった。これらの結果から、小脳における mGluR1 から PKC γ に至る情報伝達系の生理機能発現には、PLC β 4 を選択的に発現するプルキンエ細胞に豊富な PKC γ の発現が備わっていることも、その重要な分子細胞基盤となっていることを示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦

副 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 神 谷 温 之

学 位 論 文 題 名

マウス小脳プルキンエ細胞における タンパク質リン酸化酵素 PKC γ のストライプ状発現

Protein Kinase C (PKC) は神経組織に豊富に存在するタンパクリン酸化酵素で、イオンチャンネル、受容体、酵素、細胞骨格タンパクなどのリン酸化を介してシナプス伝達やシナプス可塑性など、さまざまな神経機能の発現や制御に重要な役割を果たしている。その主要なサブタイプの1つである PKC γ は、小脳プルキンエ細胞に豊富で、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 とその効果器であるホスホリパーゼ β の下流のタンパクリン酸化酵素として、発達期における余剰な登上線維除去や長期抑制の誘発、協調運動などの小脳機能発現に重要な役割を果たしている。本研究では、マウス小脳プルキンエ細胞における PKC γ の発現制御について、免疫組織化学法を用いて検討した。

PKC γ は小脳の全体に渡って、内外方向に並ぶストライプ状の発現を示した。この発現パターンは、PKC γ を強く発現する帯域が小脳前葉では広く、小脳後葉で狭いストライプであった。種々の細胞マーカーや終末マーカーとの多重染色により、このストライプ状発現は主にプルキンエ細胞の樹状突起上の発現の強弱に由来することが判明した。さらにこの発現パターンを、やはり相互に相補的なストライプ状を示す PLC β 3 と PLC β 4 との相関性を検討すると、PKC γ の発現は PLC β 3 の発現パターンとほぼ相補的で、PLC β 4 とはほぼ一致していた。さらに、細胞外グルタミン酸濃度調節に関わりストライプ状の発現を示すことが報告されている EAAT4 との関連も検討すると、PKC γ の発現パターンは EAAT4 とはほぼ相補的であった。生後発達過程におけるこのストライプ状発現の出現を追求したところ、小脳におけるシナプス形成と成熟が最も活発となる生後第2週に顕在化することがわかった。以上の結果から、PKC γ も小脳においてストライプ状発現を示す分子の1つであり、PKC γ を強く発現するプルキンエ細胞は PLC β 4 を優勢に発現し EAAT4 を低いレベルで発現し、一方 PKC γ を弱く発現するプルキンエ細胞は PLC β 3 を優勢に発現し EAAT4 を高く発現することが明らかとなった。PLC β 4 の分子欠損は mGluR1 欠損の小脳表現型を再現するが、PLC β 3 の欠損ではそのような表現型は起こらないことが報告されている。また、EAAT4 発現の低いプルキンエ細胞では、その高い細胞に比べ、脱分極性応答、内因性カンナビノイドによる伝達物質放出抑制、小脳長期増強など、mGluR1 を媒介したシナプス伝達機能が有意に制限されていることが報告されている。これらの点を考慮すると、このような異なる分子発現環境が mGluR1 シグナル伝達系による登上線維シナプス除去や小脳機能への異なる機能的関与の原因となり、高い PKC γ の発現もその重要な要因の1つになっていることを本研究結果は示唆するものである。

公開発表にあたり、副査の岩永教授から PKC γ が生後第 2 週でストライプ発現が完成する理由、他のストライプ状発現分子の出現時期との関係に関する質問があった。副査の神谷教授からは、バンド状発現の遺伝子制御メカニズム、バンド状の 2 つのモジュールの機能的差異や PKC γ の細胞内分布の違いについて質問があった。最後に、主査の渡辺教授から、今後この研究テーマを展開する上でどのような実験研究を行っていくべきであるかという申請者の考えを求められた。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、妥当な回答をした。

この論文は、小脳プルキンエ細胞に PKC γ のストライプ状の細胞発現調節機構があることを明らかにした点で高く評価され、今後の更なる生理機能解明につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。