

氏 名(本 籍)	おち いし とも よ 落 石 知 世 (福 岡 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,275 号
学位授与年月日	平 成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Ca ²⁺ /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの中樞神経系における機能の解析 生化学的および免疫組織化学的研究
主 査	筑波大学教授 医学博士 松 下 松 雄
副 査	筑波大学教授 医学博士 小 田 晋
副 査	筑波大学教授 医学博士 庄 司 進 一
副 査	工業技術院電子技術 工学博士 山 根 茂 総合研究所情報科学部 脳機能研究室長 (筑波大学併任教授)
副 査	筑波大学助教授 医学博士 佐 藤 重 仁

論 文 の 要 旨

〈目的〉

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ(CaM キナーゼⅡ)は、 α アイソフォーム(50kDa)と β アイソフォーム(60kDa)とから構成されている。本酵素は神経伝達物質の生合成や放出、細胞骨格タンパク質のリン酸化による微小管の脱重合、シナプスの可塑性や長期増強に関与する物質として注目されている。本研究では中樞神経系における CaM キナーゼⅡの機能を調べる目的で以下の2点について解析を行った。

1. シナプス後膜肥厚部における CaM キナーゼⅡの性質および自己リン酸化

CaM キナーゼⅡはシナプス後膜肥厚部(postsynaptic density; PSD)の主要タンパク質をなし、非可溶性である。CaM キナーゼⅡは Ca²⁺存在下で自己リン酸化され、その結果、Ca²⁺非依存性の活性が得られることから、シナプスにおける長期増強への関与が示唆されている。そこで、PSD分画を用いて、PSD に結合した CaM キナーゼⅡ(PSDCaM キナーゼⅡ)の生化学的性質、Ca²⁺非依存性活性調節を調べ、可溶性 CaM キナーゼⅡ(細胞質の可溶性分画に存在する)の性質と比較した。

2. 中樞神経系における CaM キナーゼⅡ α および β アイソフォームの局在

CaM キナーゼⅡ α および β アイソフォームがそれぞれホモポリマーを形成し、単独で活性を持つ。このことは各アイソフォームは中樞神経系において、それぞれ独立した生理機能をもつ可能性を示唆

している。そこで、各アイソフォームのモノクローン抗体を用いて、ラットの中枢神経系における各アイソフォームの局在を、免疫組織化学的に調べた。

〈方法と材料〉

1. ラット大脳より PSD 分画を単離し、CaM キナーゼⅡを精製した。自己リン酸化による Ca^{2+} 非依存性の酵素活性の出現および変化は、syntide-2を基質として測定した。また、SDS ポリアクリルミドゲル電気泳動の1次元および2次元のリン酸化ペプチドマップを作成し、自己リン酸化部位を調べた。
2. ラットを4%パラホルムアルデヒド-7%飽和ピクリン酸を用いて灌流固定後、脳および脊髄の組織切片を作成した。組織切片は、各アイソフォームに対するモノクローン抗体で免疫染色後、光学並びに電子顕微鏡下で観察した。

〈結果と考察〉

1. シナプス後膜肥厚部における CaM キナーゼⅡの性質および自己リン酸化

(1) PSDCaM キナーゼⅡの比活性は可溶性 CaM キナーゼⅡの比活性の約 9 分の 1 であって、両酵素の基質特異性に違いが認められた。(2) PSDCaM キナーゼⅡの自己リン酸化による Ca^{2+} 非依存性活性は可溶性 CaM キナーゼⅡのそれより長期間持続する。このことは、シナプス部における長期増強の発現に関連して重要であると考えられた。(3) 可溶性 CaM キナーゼⅡの α 分子は全て活性型であるのに対し、PSDCaM キナーゼⅡの α 分子は2種類の活性型と1種類の不活性型からなる。(4) 両者はリン酸化されるペプチドが異なることが見出された。

2. 中枢神経系における CaM キナーゼⅡ α および β アイソフォームの局在

(1) 大脳では両アイソフォームとも広い領域に分布した。淡蒼球、手網核、視床下核、視床網様核では β アイソフォームのみが発現した。脊髄では、後角と皮質脊髄路にのみ α アイソフォームが発現した。 β アイソフォームは灰白質全体に広く発現するが、皮質脊髄路にはほとんど発現しなかった。

(2) 大脳皮質の電子顕微鏡による観察から、両アイソフォームの細胞内における局在に違いが見られた。すなわち、 α アイソフォームの免疫陽性反応産物は細胞質に均一に分布し、核にもその強い蓄積が認められたが、 β アイソフォームの免疫陽性反応産物は細胞質内に小斑状に分布し、核には全く認められなかった。このことから核内で起こる現象に α アイソフォームが関与する可能性が示唆された。

(3) 網膜では α のみならず β アイソフォームも発現し、核アイソフォームの局在に違いが認められた。すなわち、両アイソフォームはアマクリン細胞、視神経節細胞および内網状層に発現した。内網状層では、 β アイソフォームが層全体に均一に分布するのに対し、 α アイソフォームは2層に局限して発現した。このバンド状の分布は、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の分布様式に酷似していること、 α アイソフォームと ChAT が同一アマクリン細胞において高率で共存していることから、CaM キナーゼⅡが網膜において、コリン作動性の神経機構(light on および light off)に関与している可能性が示唆された。

審 査 の 要 旨

本研究は Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ (CaM キナーゼⅡ) の各 α アイソフォームと β アイソフォームの生化学的性質, 細胞内局在, 中枢神経系における局在について, 種々の手法を用いて多角的に調べ, 新しい知見を提供している。

1. シナプス後膜肥厚部における CaM キナーゼⅡ は, 可溶性 CaM キナーゼⅡ とはその酵素学的性質が異なることから, シナプス部に存在する CaM キナーゼⅡ は特殊な機能を持ち, 情報伝達に重要な役割を持つ可能性が示唆された。

2. CaM キナーゼⅡ の各アイソフォームは, 細胞内においても, また中枢神経系においても局在部位が異なることから, 各アイソフォームが細胞内や脳内で機能的に分化している可能性が示唆された。

本研究は綿密な解析と, 種々の側面から加えられた実験的検証に基づく秀れた研究である。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。