

内92-47

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

小脳プルキンエ細胞における  
イノシトールリン脂質情報伝達系の  
免疫組織化学的解析

申請者

宮澤 淳夫

Atsuo Miyazawa

物理学及应用物理学専攻  
理論生物学研究

平成 4年 12月

運動の協調と学習の一部を司る小脳は、神経回路網の発生やその構成が中枢神経系の中でも最も良く解明されている器官である。これは小脳皮質を構成する神経細胞が6種類に限られていること、更に小脳が個体の誕生後に発生するために、発生の各段階において分化する神経細胞が特定出来たことによる。小脳の神経細胞の中でもプルキンエ細胞は、小脳皮質への各種入力に対する情報処理を行う中心的な細胞であり、唯一の出力細胞でもある。また形態的には、中脳神経系における最も大きな神経細胞である。今日まで、この特徴的な細胞の発生・分化及びその機能に関わる分子機構の研究が、盛んに行われてきた。その結果、プルキンエ細胞に特異的に発現しているタンパク質やペプチドには、Ca結合性を示すものが多いことが分かった。またプルキンエ細胞には、細胞内Caストアーに存在するCaチャンネルを始めとして、プロテインキナーゼC(PKC)やホスホリパーゼC(PLC)といった、イノシトールリン脂質情報伝達系に関与する分子が特に多く存在することも示されてきた。従って、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度とPKC活性を同時に制御するイノシトールリン脂質情報伝達系が、プルキンエ細胞の発生や分化に関与するのみならず、情報処理能力の獲得にも関係していることが十分予想される。

神経伝達物質やホルモンを始めとする様々な細胞間伝達物質が細胞に作用すると、それらの情報は細胞膜表面の特異的な受容体を介して細胞内へ伝達される。この細胞内情報伝達の経路の一つとして、イノシトールリン脂質情報伝達系がある。この伝達経路では、種々の伝達物質が特異的な受容体に結合すると、その刺激はGタンパク質を介してPLCを活性化し、細胞膜を構成するリン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)を加水分解する。その結果、二つのセカンドメッセンジャー、即ちイノシトール1,4,5-三リン酸(IP<sub>3</sub>)とジアシルグリセロール(DG)が同時に産生される。IP<sub>3</sub>はCa<sup>2+</sup>を細胞内Caストアーより細胞内に動員し、種々のCa依存性酵素を活性化させる。一方、DGはCa<sup>2+</sup>とホスファチジルセリン(PS)の存在下でPKCを活性化させる。こうして活性化された酵素の反応により、細胞は刺激に応じて様々な応答を示すのである。

このようなイノシトールリン脂質情報伝達系について、これまで次のような研究が行われて来た。例えば、分子生物学的手法の発達によって、タンパク質の一次構造や分子種の存在が明らかにされており、PLCには少なくとも4種類の分子種が存在すること、またそれらの組織内分布が異なることが示された。また、Mikoshiba等により、プルキンエ細胞から、IP<sub>3</sub>受容体でありCaチャンネルでもあるタンパク質P<sub>400</sub>が分離・精製された。そして、このP<sub>400</sub>が筋細胞に存在するライアノジン受容体とは異なること、また他の組織にも存在することが示された。更に、Nishizuka等を始めとする多くのグループにより、PKCは8種類の分子種から成るファミリーであること、また各分子種の組織内分布が異なることが示された。一方、イノシトールリン脂質情報伝達系のkey moleculeとも言えるPIP<sub>2</sub>は、その存在量が極微量であり、しかも死後分解が極めて早いことにより、その

機能が未だにはっきりと解明されていない。イノシトールリン脂質情報伝達系が細胞膜に存在していること、更にその情報伝達が、脂質とタンパク質との相互作用の上で成り立っていることから、タンパク質の解析と平行して、脂質を主体にした情報伝達系の研究を行う必要がある。従来、PIP<sub>2</sub>の定量的解析は、放射性同位元素の使用や、PIP<sub>2</sub>合成に関わる酵素の活性を測定する等の生化学的手法によって行われて来た。しかしこれらの方法では、個々の細胞レベルにおけるPIP<sub>2</sub>の定量的解析が不可能であった。しかも、生化学的測定は*in vitro*で行わなければならないために、*in vivo*でのPIP<sub>2</sub>の機能は、単に推測されるのみであった。そこで、これらの問題を解決するために、PIP<sub>2</sub>に対するポリクローン抗体が作製され、これを用いて免疫組織化学的に、PIP<sub>2</sub>の局在及びPIP<sub>2</sub>量の時間的変化が測定された。しかしこの抗体は、他の酸性リン脂質にも反応性を示すなど、PIP<sub>2</sub>に対する特異性が高いとは言えず、抗体の染色性にも疑問が残っていた。

そこで本論文では、まずPIP<sub>2</sub>に対して特異性の高いモノクローン抗体の作製を試みた。その際、免疫方法としては、従来糖脂質のモノクローン抗体の作製に用いられて来た抗原脂質をサルモネラ菌にコートして、マウス尾静脈に注射する方法を用いた。更に、抗体のスクリーニングについては、補体依存性膜損傷反応を利用したリボソームアッセイを確立し、これを用いた。その結果、PIP<sub>2</sub>に対して極めて特異性の高いモノクローン抗体を作製することに成功した。次に、この抗PIP<sub>2</sub>抗体を用いて、発生段階にある小脳切片を免疫染色した。またこれと同時に、イノシトールリン脂質情報伝達系を介した細胞内Ca<sup>2+</sup>動員部位を調べ、PIP<sub>2</sub>と細胞内Ca<sup>2+</sup>動員との直接的関連性を検討した。その結果、抗PIP<sub>2</sub>染色が低下していた生後15日目の小脳では、Ca<sup>2+</sup>動員が減少していることが分かった。一方、抗P<sub>400</sub>抗体でも同様に染色したが、小脳発生に伴う変化が見られなかったことから、Ca<sup>2+</sup>動員は細胞内Caストアーに存在するCaチャンネルではなく、PIP<sub>2</sub>に依存していることが証明された。更に、もう一方の情報の受け手であるPKCについて、PSとの相互作用を、それらに特異的なモノクローン抗体を用いて検討した。その結果、抗PKC抗体による染色性は小脳発生において変化しなかったが、抗PS染色は生後21日目に最低となった。また、発生中の小脳の膜画分におけるPKC活性を測定すると、生後21日目に最大となっていることが判明した。これは、活性化PKCがPSと結合しているために抗PS抗体がPSと結合できず、その染色性が低下したことを示している。この結果に基づき、抗PS抗体による免疫染色の程度を観察することによって、活性化PKCの局在を明らかにすることが出来た。つまり、本論文では、脂質とタンパク質との相互作用の解析における免疫組織化学の有用性が示され、イノシトールリン脂質情報伝達系における脂質の重要な役割が明らかにされた訳である。

本論文は五つの章から構成されている。第1章では、イノシトールリン脂質情報伝達系を解明する上で、ラット小脳のプルキンエ細胞に着目すること、しかも

その発生を追って調べることに、如何に重要であるかを述べた。まず § 1-1 では、イノシトールリン脂質情報伝達系に関する従来の研究について概説し、本研究を行うに至った経緯について解説した。次に § 1-2 では、 $PIP_2$  に対して特異性の高いモノクローン抗体作製の重要性を述べた。更に、情報伝達における脂質とタンパク質との相互作用を、抗リン脂質抗体を用いて免疫組織化学的に解析する本研究の斬新性について述べ、本研究の目的及び意義を明らかにした。

第 2 章では、 $PIP_2$  に対するモノクローン抗体の作製法と、得られた抗体の反応特異性について述べた。まず § 2-1 では、抗体作製法について詳しく述べた。また、リポソームアッセイ及び ELISA 法という、抗体の反応特異性の検討法についても解説した。次に § 2-2 では、 $PIP_2$  と反応する三つのモノクローン抗体 (AM-2, AM-7, AM-212) に対し、それぞれの反応特異性をリポソームアッセイ及び ELISA 法で検討した。AM-2 及び AM-212 については両検討法により共に一致する結果が得られたが、AM-7 については異なる結果が示された。また、可溶性ハプテンと AM-212 との反応性についても検討した。そして § 2-3 では、抗体の特異性及びその検討法について、その妥当性を考察した。

第 3 章では、小脳発生におけるカルシウムシグナリング系の動態について述べた。まず § 3-1 では、小脳発生の各段階における  $PIP_2$  及び  $IP_3$  受容体の局在を、免疫組織化学的に調べた。次に § 3-2 では、小脳発生におけるグルタミン酸アゴニスト (QA (キスカル酸) と NMDA (N-メチル D-アスパラギン酸)) によるカルシウムシグナリングについて調べ、QA 応答及び NMDA 応答の各発生段階における応答部位の変動について解説した。そして § 3-3 では、QA による  $Ca^{2+}$  動員部位は小脳の発生段階全体を通して抗  $PIP_2$  染色部位と一致するが、NMDA による  $Ca^{2+}$  動員部位は抗  $PIP_2$  染色部位と関連がないことを示し、 $PIP_2$  とグルタミン酸受容体アゴニストとの関連性を指摘した。

第 4 章では、小脳発生における活性化 PKC の局在について述べた。まず § 4-1 では、小脳発生の各段階における PS 及び PKC の局在を免疫組織化学的に調べた。次に § 4-2 では、小脳発生における PKC 活性の変化について述べ、そのパターンが抗 PS 抗体による免疫染色の変化のパターンと全く相反するものであることを示した。そして § 4-3 では、PKC 活性に違いのある生後 7 日目と 21 日目の二つの小脳細胞質タンパク質を用い、抗体結合に及ぼす抑制効果の違いについて調べ、PKC 活性の高い細胞質タンパク質がより強く PS と抗 PS 抗体との結合を抑制することを示した。更に § 4-4 では、PS と抗 PS 抗体との結合を抑制するものが PKC であることを確かめ、活性化 PKC の局在を、抗 PKC 抗体ではなく抗 PS 抗体による染色性から、推定出来ることを示した。

最後に第 5 章では、第 1 章から第 4 章までの内容が要約され、本論文の結論がまとめられた。また、今後の細胞内情報伝達系の研究について、モノクローン抗体を用いた免疫組織化学的手法が大きな役割を果たすことを指摘した。