

早稲田大学審査学位論文(博士)

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

平成5年3月

宮澤淳夫

①

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

早稲田大学大学院理工学研究科  
物理学及応用物理学専攻  
理論生物学研究

宮澤 淳夫

# 目次

## 第1章 序論

- § 1 - 1. イノシトールリン脂質情報伝達系に関する  
従来の研究 1
- § 1 - 2. 本研究の目的と意義 13

### 参考文献

## 第2章 抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体

- § 2 - 1. 抗体の作製 18
- § 2 - 2. 抗体の反応性の解析 24
- § 2 - 3. 抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体の反応特異性 31

### 参考文献

## 第3章 カルシウムシグナリング系の解析

- § 3 - 1. PIP<sub>2</sub>およびIP<sub>3</sub>受容体の免疫組織化学 37
- § 3 - 2. グルタミン酸受容体アゴニストによる  
カルシウムシグナリング 45
- § 3 - 3. PIP<sub>2</sub>とカルシウムシグナリング 51

### 参考文献

第4章 活性化プロテインキナーゼCの局在

§ 4 - 1.	PS およびPKC の免疫組織化学	57
§ 4 - 2.	小脳発生におけるPKC 活性	64
§ 4 - 3.	小脳細胞質タンパク質による抗体結合の抑制	66
§ 4 - 4.	PS とPKC の相互作用	70

参考文献

第5章 本論文の要旨と結論	77
---------------	----

参考文献

謝辞	91
----	----

著者業績	92
------	----

## 第 1 章 序論

### § 1 - 1. イノシトールリン脂質情報伝達系に関する従来の研究

#### [A] 小脳プルキンエ細胞内のイノシトールリン脂質情報伝達系

脳には  $10^{10}$  個とも言われる膨大な数の神経細胞が存在している。これらの神経細胞は、最初是一本の神経管の上皮細胞から発生し、様々な形態と機能を持った神経細胞へと分化する。そして個々の神経細胞は、ある特定の神経細胞とシナプスを形成して行くことにより神経回路網を形成し、脳を形造ってゆく。このようにして出来上がった脳の細胞構築は大変複雑であるために、その神経細胞の機能に関する分子レベルでの解析は困難であるとされて来た。

しかし、運動の協調と学習の一部を司る小脳については、神経回路網の発生やその構成が中枢神経系の中でも特に良く解明されている。それは、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。図 1 - 1 に示したように、小脳皮質はプルキンエ細胞、顆粒細胞、バスケット細胞、星状細胞、ゴルジ細胞及びルガロ細胞の 6 種類の神経細胞から構成されており、それらが規則正しく配列することによって、小脳皮質は分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層から成る 3 層構造を形成する。<sup>1)</sup> また、小脳発生に伴うこれらの神経細胞の分化や、それらの細胞間におけるシナプス結合が、形態学および電気生理学的に明らかにされている。その代表的なものは、1972年に Altman が小脳発生における神経回路網の構築を形態学的に詳細に解析したものである(図 1 - 2)。<sup>2)</sup> これによると、生後 3 日目にプルキンエ細胞は既に分化し、小脳皮質に配列し始める。また、生後 7 日目になると、プルキンエ細胞は樹状突起を伸ばし出し、かつ外胚層中で増殖・分化した顆粒細胞は内顆粒層に移動し始め、その過程で顆粒細胞の軸索である平行線維とプルキンエ細胞の樹状突起との間にシ

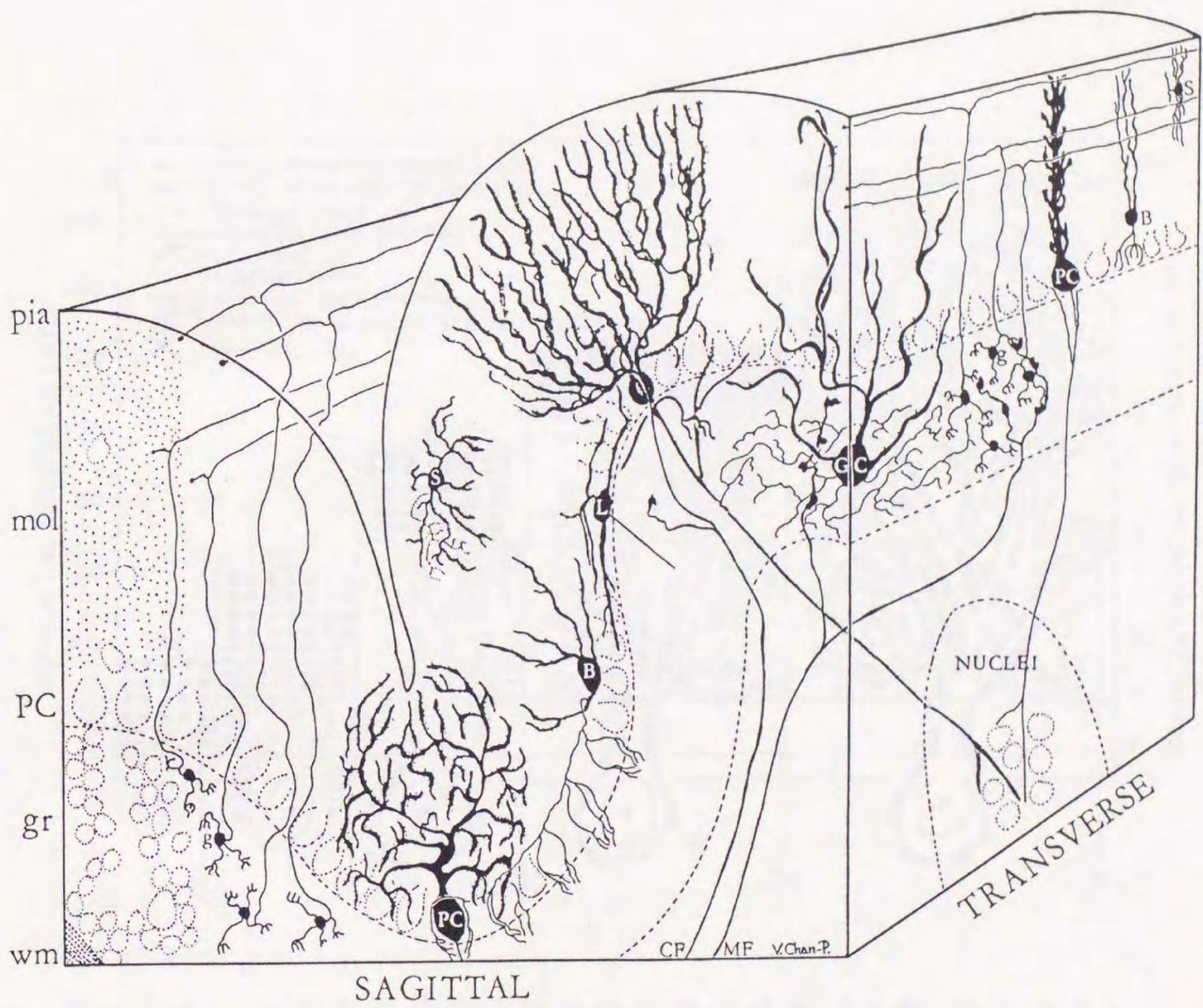


図 1 - 1. 小脳の構造 (文献 1) より)

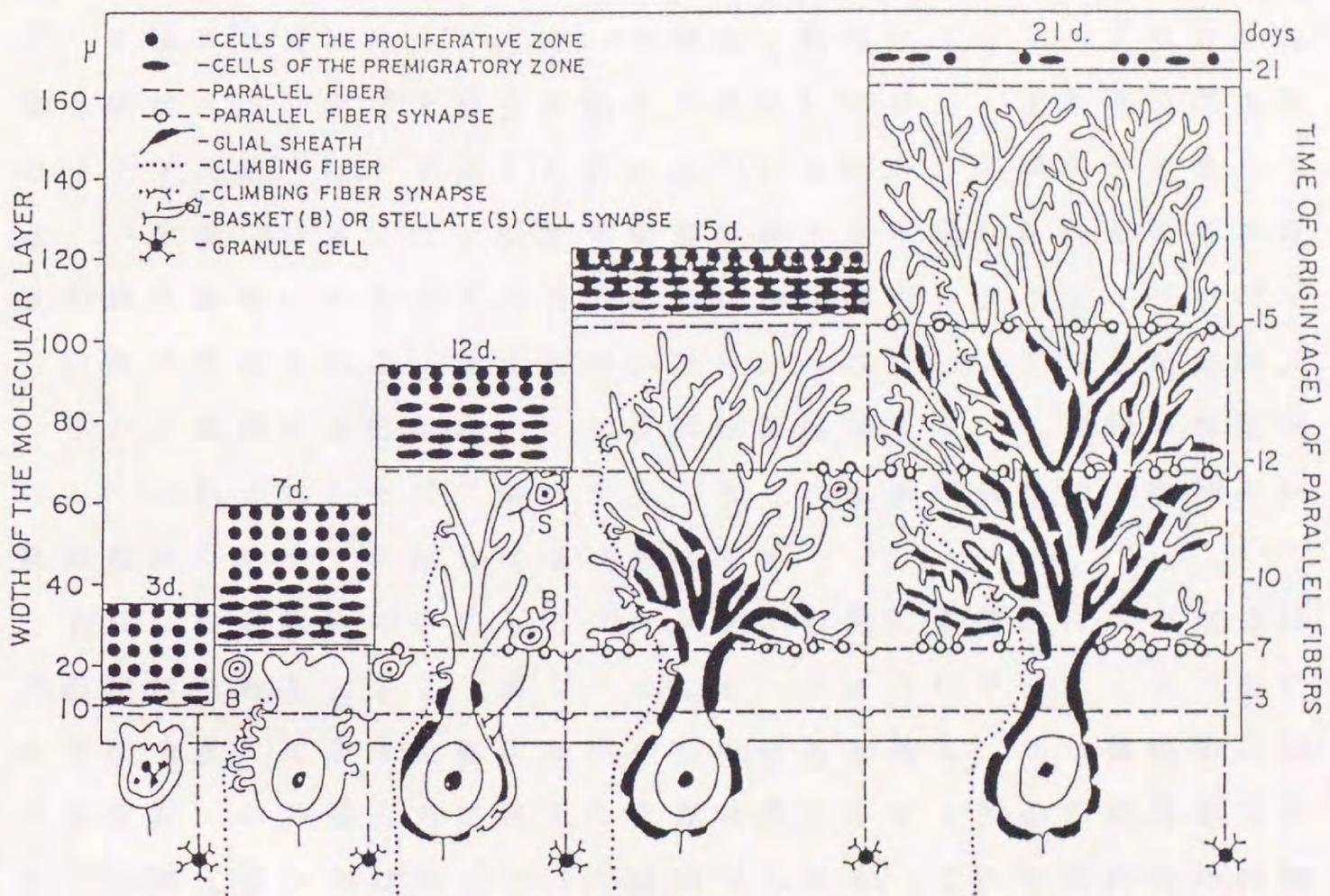


図 1 - 2. 小脳発生に伴う神経回路網の構築 (文献 2) より)

ナプスが形成される。更に生後12~15日目になると、抑制性の介在ニューロンであるバスケット細胞及び星状細胞が、それぞれプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起にシナプスを形成し、それらのシナプス結合部位以外のプルキンエ細胞の表面をグリア細胞が覆い始める。そして生後21日目で、小脳の神経回路網はほぼ完成する。また1976年には、Shimonoらにより、小脳発生における各神経細胞間のシナプス結合が電気生理学的に調べられた(図1-3)。<sup>3)</sup>これによると、生後3日目には、プルキンエ細胞と延髄の下オリーブ核からの登上線維とのシナプス結合が既に形成されており、また平行線維とのシナプス結合は、生後7日目から21日目にかけて順次形成されてゆく。生後10日目には、脳幹や脊髄の様々な小脳前核からの苔状線維が顆粒細胞に入力すると同時に、ゴルジ細胞によりフィードバック回路が形成される。更に生後12日目からは、バスケット細胞がプルキンエ細胞の細胞体と、また星状細胞はプルキンエ細胞の樹状突起と、それぞれシナプス結合する。そして生後21日目で、小脳の神経細胞間のシナプス結合はほぼ完成する。

小脳の神経細胞の中でも、プルキンエ細胞は形態的には中枢神経系の中でも最も大きく、図1-4に示したようにサジタール方向に水平に大きく広がった樹状突起をもつ細胞である。また機能的には、小脳皮質への各種入力に対する情報処理を行なう中心的な細胞であり、小脳皮質からの唯一の出力細胞でもある。この特徴的な神経細胞の分化や機能における分子機構の研究が、現在盛んに行なわれている。その結果、プルキンエ細胞に特異的な物質や、特に多く発現している物質が多数発見され、この細胞が脳の中でも特殊な細胞であることが分かってきた。プルキンエ細胞に特異的に発現しているペプチドとしてはcerebellin<sup>4)</sup>、PEP-19<sup>5)</sup>、spot 35<sup>6)</sup>等があり、プルキンエ細胞に特異的な糖タンパク質にはP<sub>400</sub><sup>7)</sup>がある。PEP-19とspot 35はそれぞれEF-hand structureをもつCa結合タンパク質である。<sup>5)</sup><sup>8)</sup>またP<sub>400</sub>は、細胞内Caストアーに存在するイノシトール1,4,5-三リン酸(IP<sub>3</sub>)の受容体であり、同時にCaチャンネル

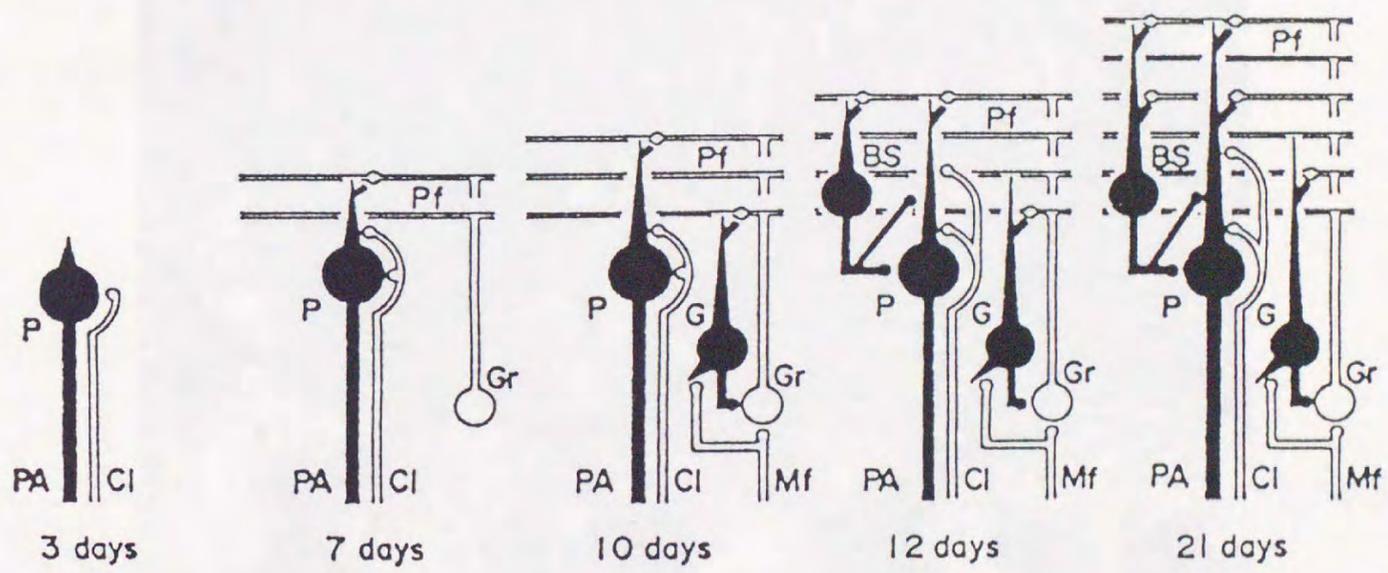


図 1 - 3. 小脳発生に伴う神経細胞間のシナプス結合の構築  
(文献 3) より)



図 1 - 4. アダルトラット小脳におけるプルキンエ細胞の顕微鏡  
写真（プルキンエ細胞に特異的な P<sub>400</sub> に対する抗体を  
用いて得られた染色像；Bar=50 $\mu$ m）

でもあることが明らかになった。<sup>9)</sup> 更に、プルキンエ細胞に多く発現しているタンパク質としては、cGMP 依存性プロテインキナーゼ<sup>10)</sup> や、ビタミンD 依存性Ca 結合タンパク質であるcalbindin<sup>11)</sup>、またリン脂質、Ca<sup>2+</sup> 依存性プロテインキナーゼC (PKC)<sup>12)</sup> などが報告されている。プルキンエ細胞に特異的なこれらの物質が、どのようにこの細胞の発生や分化に関与し、更に情報処理能力の獲得に関係しているのか、この問題は未だに良く分かっていない。しかし、これらの分子の多くは、その活性がCa<sup>2+</sup> によって調節されるものであり、またイノシトールリン脂質情報伝達系に関与する分子でもある。従って、細胞内Ca<sup>2+</sup> 濃度とPKC 活性と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のみならず、情報処理能力の獲得においても重要な役目を果たしているものと考えられる。

#### [B] イノシトールリン脂質情報伝達系に関する従来の研究

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、細胞膜表面の特異的な受容体を介してそれらの情報は細胞内へと伝達される。近年、cAMP、cGMP、Ca<sup>2+</sup>、更にはIP<sub>3</sub>やジアシルグリセロール(DG)などのセカンドメッセンジャーによって調節される細胞内情報伝達経路が、次々と明らかにされてきた。その中の一つにイノシトールリン脂質情報伝達系がある(図1-5)。この情報伝達系では、種々の伝達物質が受容体に結合することにより、Gタンパク質を介してホスホリパーゼC(PLC)が活性化される。この酵素により、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>)が加水分解され、IP<sub>3</sub>とDGという二つのセカンドメッセンジャーが同時に産生される。<sup>13)</sup> IP<sub>3</sub>は細胞内Ca ストアー(滑面小胞体)に存在する特異的な受容体に結合し、細胞内にCa<sup>2+</sup> を動員する。細胞内Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加は、種々のCa<sup>2+</sup> 依存性酵素や、Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリン依存性キナーゼ、ホス

ホリパーゼ A<sub>2</sub>などを活性化させる。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。<sup>14)</sup> ここで活性化された様々なプロテインキナーゼは、数多くの酵素、受容体、イオンチャネルなどの機能性タンパク質や、細胞骨格系タンパク質、核タンパク質などをリン酸化することにより、刺激に応じたある特定の応答を細胞に引き起こす。こうして、イノシトールリン脂質情報伝達系は、分泌・収縮現象などの一過性の早い応答に関する情報伝達のみならず、遺伝子の発現の制御や、学習・記憶、増殖・分化、更にはガン化などの持続的な生理作用の情報伝達にも、関与していると考えられている。

イノシトールリン脂質と細胞機能との関連性は、ハト膵臓切片でのアミラーゼ分泌とイノシトールリン脂質代謝亢進との相関が、M. R. Hokin と L. E. Hokin によって1953年に示されたことに始まる。<sup>15)</sup> その後1975年に、ホスファチジルイノシトールの代謝回転は細胞内へのCa<sup>2+</sup>の流入を促進するという仮説がMichel によって提唱され、<sup>16)</sup> また1983年には、Streb らがインスリン産生細胞について、PIP<sub>2</sub>がPLC によって加水分解されたときに生じたIP<sub>3</sub>により、小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出が促進されることを、初めて見出した。<sup>17)</sup> そして、1989年になると、Mikoshiha らにより小脳プルキンエ細胞に存在するIP<sub>3</sub>受容体(Caチャネル)が同定され、イノシトールリン脂質情報伝達系におけるCa<sup>2+</sup>動員仮説が実証された。現在、このIP<sub>3</sub>受容体はクローニングされ、<sup>18)</sup> その構造や生理的機能が明らかにされている。<sup>18)</sup> 更に、特異的モノクローン抗体を用いて、細胞内局在や各組織における分布も調べられている。<sup>19)</sup>

一方、1977年にNishizuka らにより、PKC はCa<sup>2+</sup>及びPS によって活性化されるセリン/スレオニン・リン酸化酵素として発見された。<sup>20)</sup>、<sup>21)</sup> その後、膜の微量成分でありPIP<sub>2</sub>の代謝物であるDG が、PKC の活性化に必要なCa<sup>2+</sup>濃度を引き下げることにより、生理的な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度においてもPKC が活性化されることから、<sup>22)</sup> 細胞

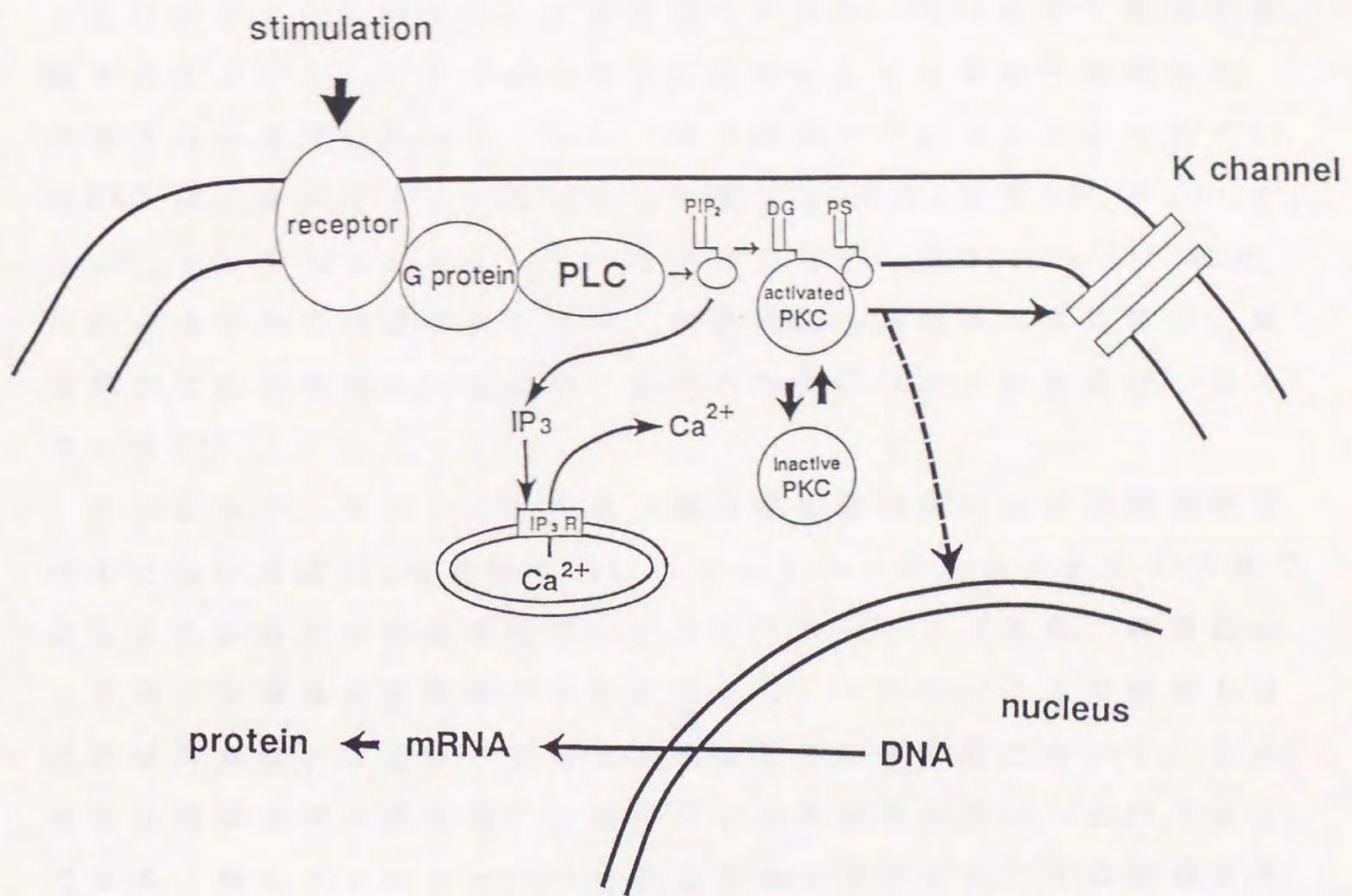


図 1 - 5. イノシトールリン脂質情報伝達系の模式図

刺激時のイノシトールリン脂質代謝回転によるPKCの活性化が示されてきた。また、これとは別に、発ガンプロモーターの一種であるホルボールエステルが、DGと同様の機構によりPKCを活性化することも分かった。<sup>23)</sup>その後、ホルボールエステルは発ガンプロモーションばかりでなく、細胞の増殖・分化の促進、分泌作用の調節、遺伝子の発現誘導などの多彩な生理機能を持つことが示された。このことにより、PKCのこれら生理機能への関与、更にはPKC活性を制御するイノシトールリン脂質情報伝達系のこれら機能への関与が、示唆されるようになった。また、単一の分子であると考えられていたPKCは、少なくとも10種類の分子種( $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\lambda$ )をもったファミリーであることが、分かった。<sup>24)</sup>現在、これら分子種の酵素学的性質や、生理機能への関与、更には分子種特異的な抗体を用いた組織内・細胞内局在についての検討が、進んでいる。<sup>25)</sup>

このように、イノシトールリン脂質情報伝達系における情報の受け手ともいえるIP<sub>3</sub>受容体やPKCについては、それらがタンパク質であることから分子生物学的手法によりクローニングされ、特異的モノクローン抗体の作製が行なわれて来た。しかし、ここで注意しなければならないことは、これらの機能性タンパク質において、その存在と機能発現(活性化)とは必ずしも等価ではない、ということである。特にイノシトールリン脂質情報伝達系では、その情報伝達様式が脂質とタンパク質との相互作用の上に成り立っていることから、細胞が刺激に対して応答するには、これら分子間の相互作用が完全に行なわれている必要がある。従って、この情報伝達系を解明するためには、機能性タンパク質を個々に調べるばかりではなく、情報伝達系の流れの中での位置を正確に踏まえて、そこに関与する脂質の作用を考えて行かなければならない。

しかし、生体膜を構成するリン脂質の1つであり、イノシトールリン脂質情報伝達系のkey moleculeともいえる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もあって、その

機能がはっきりと解明されていない物質である。図 1-6 に示したように、 $PIP_2$  はグリセロール 1 位の脂肪酸としてステアリン酸を約 70%、また 2 位の脂肪酸としてアラキドン酸（4 個の二重結合を有する）を 50~65% 含み、3 位の極性頭部中の 4 位と 5 位に、リン酸基が結合したイノシトールリン酸を有するリン脂質である。<sup>26)</sup> 従来、 $PIP_2$  の定量的解析は放射性同位元素を用いた手法によるか、またはホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PIP) キナーゼやホスファチジルイノシトール (PI) キナーゼなどの活性を測定する生化学的な手法により行なわれるか、のいずれかであった。しかし、これらの方法では、個々の細胞レベルでの  $PIP_2$  の定量的な解析が不可能であった。しかも、生化学的測定は *in vitro* で行なわなければならないために、*in vivo* での  $PIP_2$  の機能は推測の域を出なかった。

そこで、この問題を解決するために、 $PIP_2$  に対するポリクローン抗体の作製がまず試みられた。しかし、 $PIP_2$  は生体内に存在している物質であること、更にその分子量が小さいために、抗体が産生されにくいことが予想された。そこで、生体内に存在しない、しかも免疫原性の高い物質により、生体の免疫レベルを高め、更にこのタンパク質を担体として用い、ハプテンである  $PIP_2$  をこれに結合させることにより、生体内に存在する分子量の小さな物質に対しても、抗体を産生させようとする試みがなされた。Yoshioka らは、メチル化した牛血清アルブミン (BSA) に  $PIP_2$  を結合させ、これをウサギに免疫することにより、 $PIP_2$  に対するポリクローン抗体を作製した。<sup>27)</sup> 更にこれを用いて、ラットの視細胞<sup>28)</sup> やそのレンズ<sup>29)</sup>、更に内耳の有毛細胞<sup>30)</sup> における  $PIP_2$  の局在、及び  $PIP_2$  量の時間的変化が免疫組織化学的手法で測定された。しかし、この抗体は PIP を含む他の酸性リン脂質にも交差反応を示すことから、 $PIP_2$  に対する特異性が高いとは言えず、この抗体を用いた組織の染色性にも疑問が残った。そこで、 $PIP_2$  に対して特異性の高いモノクローン抗体を作製する必要性が高まった。

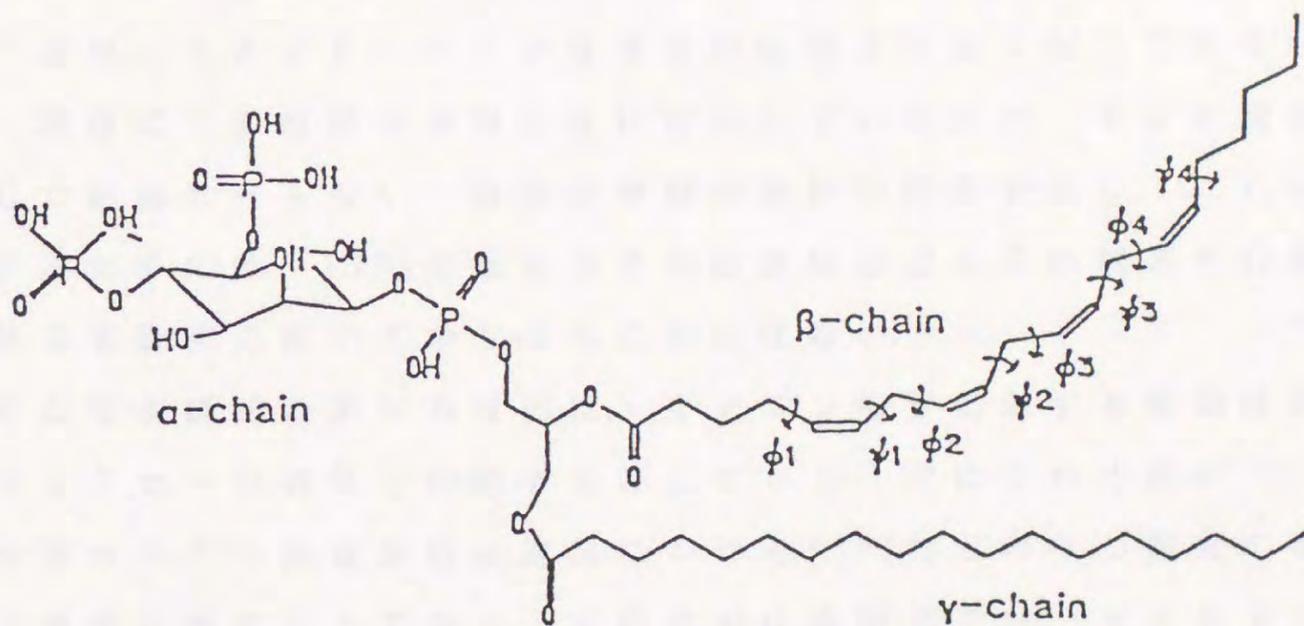


図 1 - 6. PIP<sub>2</sub>の構造式 (文献 26) より)

## § 1 - 2. 本研究の目的と意義

### [A] イノシトールリン脂質情報伝達系へのリン脂質関与の証明

これまで述べてきたように、イノシトールリン脂質情報伝達系の研究は、主に生化学的な手法を用いて行なわれて来た。その結果、*in vitro*での機能は解明されて来たが、*in vivo*での状態は単に推測されるのみであった。即ち、イノシトールリン脂質情報伝達系と言うものは、理論的に仮定されたものに過ぎない、ということである。また、イノシトールリン脂質情報伝達系の名に冠してある $PIP_2$ が、本当にこの細胞内情報伝達に関与しているのか、それを現実に示した証拠は何もない。細胞内情報伝達系の実在を示し、これを証明するためには、 $PIP_2$ を始めとする諸情報伝達分子の抗体を作製し、それらを研究に用いてゆく以外に方法はない。

そこで本研究の第一の目的は、まずリン脂質に対する特異性の高いモノクローン抗体を作製することである。次にこれを用いて、イノシトールリン脂質情報伝達系における $PIP_2$ などのリン脂質の関与を、現実に示すことである。そのために本研究では、イノシトールリン脂質情報伝達系を、脂質とタンパク質との相互作用という観点から、二つの系に分けて調べて行くことにした。一つは $PIP_2$ と細胞内 $Ca^{2+}$ 動員との関係、もう一つはPSとPKC活性との関係である。

これらの目的を達成するために、本論文では以下の三つの章に分けて研究を行なった。まず第2章では、イノシトールリン脂質情報伝達系の要であるリン脂質 $PIP_2$ の定量的解析を、個々の細胞レベルで行なえるようにするために、 $PIP_2$ 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。これまでのモノクローン抗体の作製では、タンパク質分子に対するものが主であったために、その免疫法や抗体のスクリーニング法をそのまま利用して $PIP_2$ を始めとする諸リン脂質の抗体を作製することが困難であった。そこで、免疫方法としては糖脂質の抗体作製に対する以前の方法を改良して用い、さらに

抗体のスクリーニングについては、新たに開発したリポソームアッセイを用いて行なうことにした。そしてこれらの手法により、 $PIP_2$  に対して特異性の高いモノクローン抗体の作製に挑むと共に、リン脂質の抗体作製に対する免疫法の確立、及び生体膜中に存在する微量な抗原分子の抗体に対するスクリーニング法の確立を試みた。

次に第3章では、得られた抗 $PIP_2$ モノクローン抗体を免疫組織化学的に用いて、生後発生中の小脳における個々の細胞内の $PIP_2$ の定量的解析を試みた。またこれと同時に、 $IP_3$ 受容体( $P_{400}$ )に対する抗体を用いて $Ca^{2+}$ 動員系の局在を調べることにより、発生段階を通して小脳のイノシトールリン脂質情報伝達系の構成状態を明らかにした。更にこれと平行して、グルタミン酸受容体のアゴニスト刺激による細胞内 $Ca^{2+}$ 動態を測定することにより、発生段階におけるカルシウムシグナリングの稼動状態を調べた。こうして、細胞内 $Ca^{2+}$ 動員機構における $PIP_2$ の関与の直接的な証拠を示し、小脳発生におけるそれらの役割の解明を試みた。

さらに第4章では、PSとPKCに対するモノクローン抗体を用い、細胞内における *in vivo* でのPSとPKCとの相互作用について、その証拠を示した。特に研究に用いた小脳において、PKCはその分子種ごとに存在する神経細胞が異なっており、各々の神経細胞の機能に関与していることが示唆される。また、小脳の発生におけるPKCの活性及び組織における活性化部位を明らかにすることは、小脳の神経細胞の分化を調べる上で重要である。本研究では、PKCが活性化に伴い細胞質中をトランスロケートして細胞膜のPSに結合するという性質を特に利用し、抗PS抗体と抗PKC抗体を用いることによって、生後の発生段階におけるラット小脳皮質中のPKCの活性化部位を明らかにすることを試みた。これは、生化学的な酵素活性の測定では分からない *in vivo* における活性化PKCの局在部位を、免疫組織化学的に明らかにする新しい方法である。

[ B ] 脳・神経系の研究における発生段階中の小脳の有用性

一般に、神経細胞の分化は、ある特定の時期にある特異的な物質が発現するといったように、予め遺伝的にプログラムされた先天的な要素と、外界からの入力刺激が細胞内情報伝達系を介して分化を促進したりその方向付けを変えたりする、後天的な要素との両方によって引き起こされるものと考えられる。特に後者の要素は、神経の可塑性と呼ばれている現象である。現在、脳における学習と記憶は、この神経の可塑的な性質によって営まれていると考えられており、従ってこの可塑性は、神経科学の領域で最大の関心事となっている。また、神経細胞に可塑的現象を引き起こすために、種々の強力なアゴニスト・アンタゴニストを作用させたり、入力線維を外科的に切断するなどの処置が行なわれている。しかし、このようなことは自然の生理的条件下で絶対に起こり得ないことである。また、そこで得られた結果に人工的な事象が混在する可能性も否定できず、*in vivo* での実際の機能を反映していない恐れがある。そこで、生理的に可塑的現象が起こっている系として考えられるのが、発生段階にある神経細胞である。特に生後発生する小脳は、細胞レベルでの形態学的・生理学的知識の蓄積という点からも、神経細胞の分化並びに可塑性を研究する上で最も適した系であると考えられる。

そこで、第二の目的として、生後の発生段階にある小脳の特にプルキンエ細胞に着目し、その細胞の発生・分化におけるイノシトールリン脂質情報伝達系の関与を明らかにしようとして試みた。なおこれは、小脳の発生系をこれまでの単なる発生生物学の分野から一歩進めて、生物の発生という自然現象を細胞内情報伝達系の研究に利用することが、如何に多くの情報をもたらすかを示すものであり、今後の神経科学研究に対する一つの実験方法を確立させるものでもある。

参考文献

- 1) A. Brodal: Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine. 3rd ed. (Oxford University Press, New York, Oxford, 1981).
- 2) J. Altman: J. Comp. Neur. 145(1972)399.
- 3) T. Shimono, S. Nosaka and K. Sasaki: Brain Res. 108(1976)279.
- 4) J. R. Slemmon, W. Danho, J. L. Hempstead and J. I. Morgan: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(1985)7145.
- 5) R. Ziai, Y. -C. E. Pan, J. D. Hulmes, L. Sangameswaran and J. I. Morgan: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(1986)8420.
- 6) T. Yamakuni, H. Usai, T. Iwanaga, H. Kondo, S. Odani and Y. Takahashi: Neurosci. Lett. 45(1984)235.
- 7) N. Maeda, M. Niinobe, K. Nakahira and K. Mikoshiba: J. Neurochem. 51(1988)1724.
- 8) T. Yamakuni, R. Kuwano, S. Odani, N. Miki, K. Yamaguchi and Y. Takahashi: J. Neurochem. 48(1987)1590.
- 9) T. Furuichi, S. Yoshikawa, A. Miyawaki, K. Wada, N. Maeda and K. Mikoshiba: Nature 342(1989)32.
- 10) M. Wassef, J. P. Zanetta, A. Brehier and C. Sotelo: Dev. Biol. 111(1985)129.
- 11) S. S. Jande, S. Tolnai and D. E. M. Lawson: Histochemistry 71(1981)99.
- 12) N. Saito, U. Kikkawa, Y. Nishizuka and C. Tanaka: J. Neurosci. 8(1988)369.
- 13) M. J. Berridge and R. F. Irvine: Nature 341(1989)197.
- 14) Y. Nishizuka: Nature 334(1988)661.
- 15) M. R. Hokin and L. E. Hokin: J. Biol. Chem. 203(1953)967.
- 16) R. H. Michell: Biochim. Biophys. Acta 415(1975)81.

- 17) H. Streb, R. F. Irvine, M. J. Berridge and I. Schulz: *Nature* 396 (1983)67.
- 18) N. Maeda, T. Kawasaki, S. Nakade, N. Yokota, T. Taguchi, M. Kasai and K. Mikoshiba: *J. Biol. Chem.* 266(1991)1109.
- 19) S. Nakanishi, N. Maeda and K. Mikoshiba: *J. Neurosci.* 11(1991) 2075.
- 20) Y. Takai, A. Kishimoto, M. Inoue and Y. Nishizuka: *J. Biol. Chem.* 252(1977)7603.
- 21) Y. Takai, A. Kishimoto, U. Kikkawa, T. Mori and Y. Nishizuka: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91(1979)1218.
- 22) A. Kishimoto, Y. Takai, T. Mori, U. Kikkawa and Y. Nishizuka: *J. Biol. Chem.* 255(1980)2273.
- 23) M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka: *J. Biol. Chem.* 257(1982)7847.
- 24) Y. Nishizuka: *Science* 258(1992)607
- 25) W. C. Wetsel, W. A. Khan, I. Merchenthaler, H. Rivera, A. E. Halpern, H. M. Phung, A. Negro-Vilar and Y. A. Hannun: *J. Cell. Biol.* 117(1992)121.
- 26) 新村信雄, 林浩平: *生物物理* 183(1992)1.
- 27) T. Yoshioka, K. Inomata: *Proc. Japan Acad.* 59(1983)28.
- 28) N. D. Das, T. Yoshioka, D. Samuelson, R. J. Cohen and H. Shichi: *Cell Struct. Funct.* 12(1987)471.
- 29) N. D. Das, T. Yoshioka, D. Samuelson and H. Shichi: *Ophthalmic Res.* 19(1987)57.
- 30) T. Horikoshi, K. Yanagisawa and T. Yoshioka: *Proc. Japan Acad.* 60(1984)157.

## 第2章 抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体

### § 2-1. 抗体の作製

#### [A] 材料

##### a) 脂質

卵黄ホスファチジルコリン(PC)は、卵黄よりBligh-Dyer法で抽出され、アルミナカラムクロマトグラフィー及びケイ酸カラムクロマトグラフィーで精製された。ホスファチジン酸(PA)は、卵黄より抽出したPCをホスホリパーゼD(EC 3, 1, 4, 4)で処理してから、分離・精製された。ホスファチジルエタノールアミン(PE)は、卵黄より抽出され、ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより精製された。ホスファチジルグリセロール(PG)は、大腸菌からBligh-Dyer法で抽出され、ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより精製された。<sup>1)</sup> PSは、牛脳白質より抽出され、更にFolch法により溶媒分画されて、<sup>2)</sup> CM-セファロースカラムクロマトグラフィーで精製された。<sup>3)</sup> PIは、酵母をTrevelyanらの方法により処理された後、<sup>4)</sup> Bligh-Dyer法で抽出され、更にイソプロパノールで分画された後、ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより精製された。カルジオリピン(CL)は、牛心筋よりFaure-Marechelの方法により抽出され、ケイ酸カラムクロマトグラフィー及びLH-20ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製された。<sup>5)</sup> ジミリストリルPC(DMPC), PIP<sub>2</sub>, PIP, ダイセチルホスフェイト(DCP)及びコレステロールは、Sigma社(U.S.A.)から購入された。

##### b) 薬品

4-メチルウンベリフェリルホスフェイト(UmP), アルカリ性ホスファターゼ, IP<sub>3</sub>, イノシトール 1,4-ニリン酸(IP<sub>2</sub>), イノシトール 1-ニリン酸(I(1)P<sub>1</sub>), イノシトール 2-ニリン酸(I(2)P<sub>1</sub>), フルクト

ース 1,6-ニリン酸( $FP_2$ ), 及び0-フェニレンジアミンは, Sigma 社から購入された. ウサギ抗マウス IgG 及び IgM 抗体は, Jackson Immuno Research 社から, またビオチニル化ヤギ抗マウス IgG+IgA+IgM 抗体及びペルオキシターゼストレプトアビジンは, Zymed 社から購入された.

#### c) 補体

体重約 300g の幼若モルモットの新鮮な血清を少量ずつ分注し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存したものを実験直前に解凍して用いた.

#### [B] 抗 $PIP_2$ モノクローン抗体の作製法

まず, 凍結保存しておいたサルモネラ菌 (*Salmonella Minnesota*; R595) を解凍し, Galanos らの方法にならって, 蒸留水で 1 回, アセトンで 2 回, ジエチルエーテルで 1 回洗浄し, 室温で一晩放置した. 次に, 1% 酢酸で 2 回洗浄した後, 再び 1% 酢酸を加え  $100^{\circ}\text{C}$  で 2 時間加熱した. これが十分冷えてから, それを蒸留水で 2 回洗浄した後, 凍結乾燥させ,  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した.<sup>6)</sup> こうして処理したサルモネラ菌  $250\mu\text{g}$  を  $250\mu\text{l}$  のリン酸緩衝液 (PBS) に懸濁し, かつ抗原脂質である  $PIP_2$  を  $20\mu\text{g}$  採って  $50\mu\text{l}$  のエタノールと混合し, これに  $200\mu\text{l}$  の PBS を加えた. ここで, サルモネラ菌と  $PIP_2$  を混合して,  $40^{\circ}\text{C}$  で 30 分間加熱した. その後, 更に  $500\mu\text{l}$  の PBS を加えて  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存し, これをマウス 1 匹の 1 回の免疫について  $200\mu\text{l}$  を尾静脈内に注射した.<sup>7)</sup> マウスについては生後 8 週令の BALB/c 系の雌を使用した. 初回の免疫から 8 週間後に, マウスから脾臓を取り出し, Galfre ら及び Kohler-Milstein の方法を用いて, ミエローマ細胞 (P3-X63-Ag. 653) と細胞融合させた.<sup>8), 9)</sup> 融合細胞 (ハイブリドーマ) の培養上清をとり, リポソームアッセイを用いて,  $PIP_2$  には反応するが  $PIP$  とは反応しない細胞株 (クローン) を選び出し, 3 回の限界希釈法を経て, 抗  $PIP_2$  抗体産生クローンを確立した.

## [C] 抗体の反応特異性の検討法

### a) リポソームアッセイ

多重層リポソームの調整法の模式図<sup>10)</sup>を、図2-1に示した。まず、DMPC、コレステロール、DCP及び抗原脂質を0.5:0.6:0.11:0.0121のモル比で含むクロロホルム溶液を試験管にとり、減圧蒸留して薄い脂質フィルムを作った。次に、これに20mMのUmPと240mMのグルコースを含む溶液を加え、ボルテックスミキサーで強く攪拌することによって、多重層リポソームを作製した。<sup>11)</sup>更にリポソーム内に取り込まれなかったマーカ- (UmP)を除去するために、75mM KClと75mM NaClを含む水溶液中で3時間透析を行ない、リポソームアッセイに使用するリポソームとした。図2-2は、補体依存性リポソーム崩壊反応による抗原抗体反応の検出(リポソームアッセイ)について、その原理を示したものである。リポソームアッセイでは、リポソーム内に取り込まれている全マーカ-量を100%、また補体のみによるリポソーム崩壊によるマーカ-流出量を0%として、抗体が抗原に結合したことによるリポソーム崩壊時のマーカ-流出量の割合から、抗原抗体反応が求められる。リポソーム外液中に流出したマーカ-は、アルカリ性フォスファターゼによりウンベリフェリル(Um)とリン酸基(P)に分解される。抗原抗体反応は、ここで生じたUmによる蛍光を測定することによって、検出される。<sup>12)</sup>測定はマイクロタイタープレートを用いて行なわれた。反応溶液100 $\mu$ lの組成は、リポソーム20 $\mu$ l、抗体20 $\mu$ l、補体として10倍に希釈したモルモット血清10 $\mu$ lと0.3U/mlのアルカリ性ホスファターゼ、0.15mM CaCl<sub>2</sub>及び0.50mM MgCl<sub>2</sub>を含むベローナル緩衝液50 $\mu$ lである。抗原抗体反応の検出については、抗体を入れてから24 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、流出したマーカ-量を蛍光マイクロプレートリーダー(MTP-32, CORONA)で測定した。

また、可溶性パプテン(イノシトールリン酸)による抗原抗体反応の抑制を利用して、可溶性パプテンと抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体と

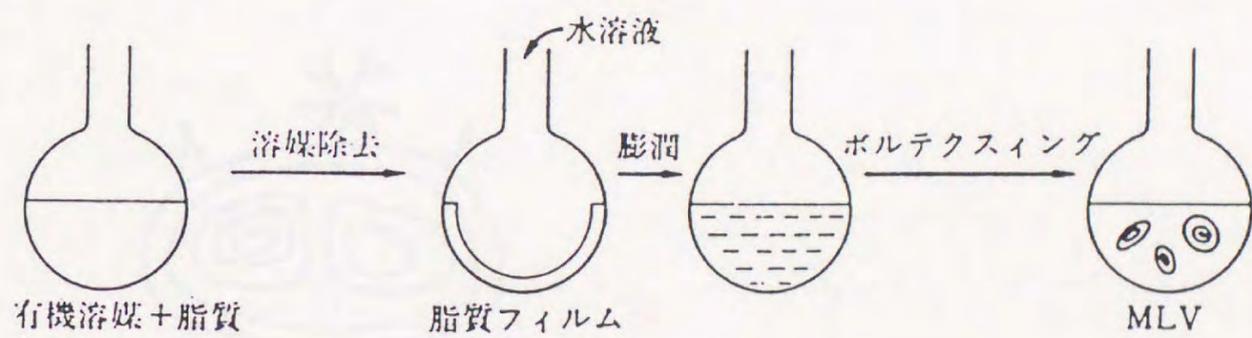


図 2 - 1. 多重層リポソーム調整法の模式図 (文献 10)より)

# Liposome Assay

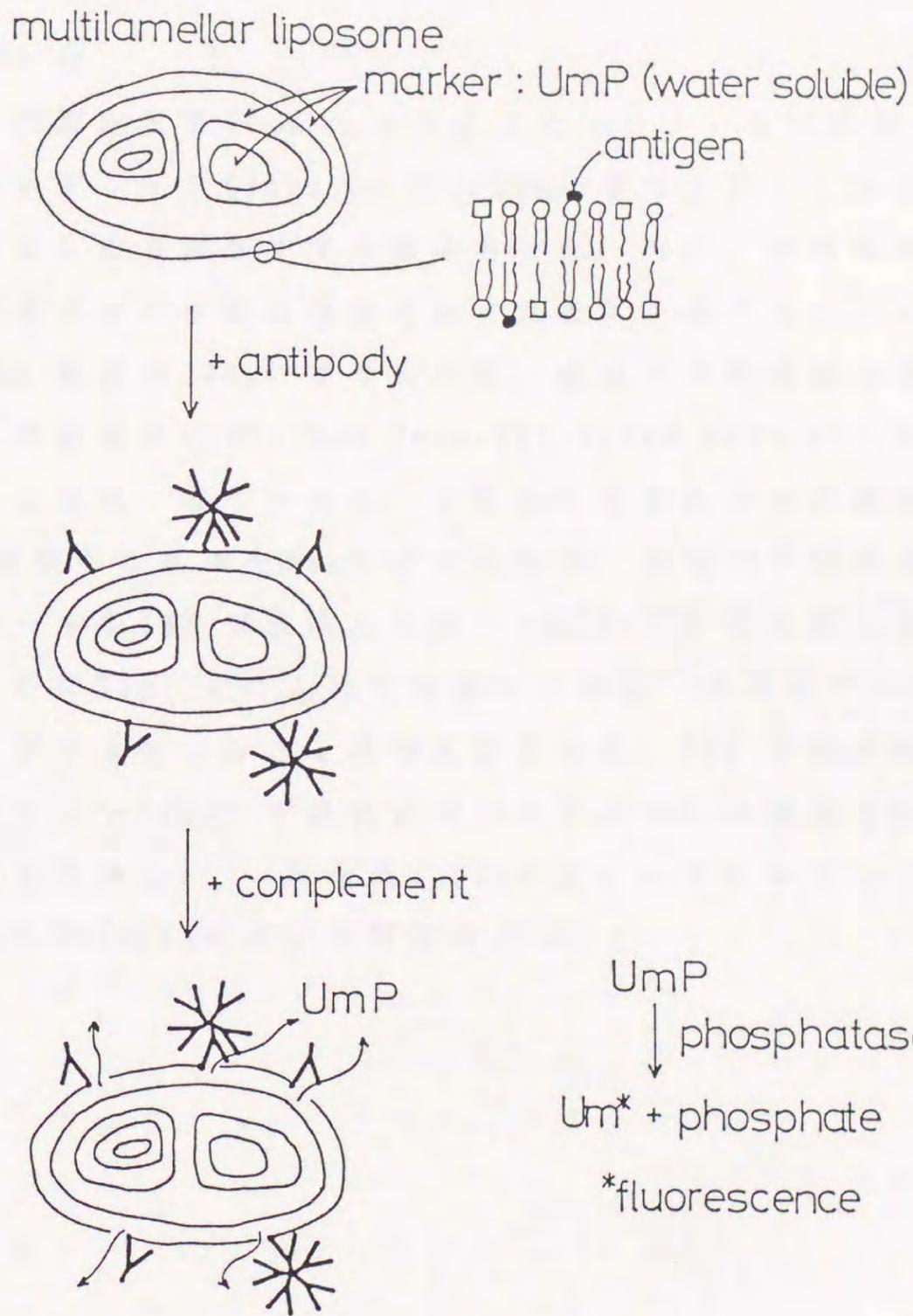


図 2 - 2. リポソームアッセイの原理

の反応性を、リポソーム崩壊の抑制効果により検討した。まず、抗体と可溶性ハプテンを室温で1時間反応させてから、前述のリポソーム、補体及びペローナル緩衝液をその反応系に加えて更に30分間反応させた後、マーカ一流出量を測定した。

#### b) ELISA 法

まず、抗原脂質を $30\mu\text{M}$ となるようにエタノールに溶解し、ELISA用マイクロプレート(Immulon 2)に $50\mu\text{l}$ ずつ入れて、室温で一晩放置することにより溶媒を完全蒸発させた。次に、非特異的なプレートへの抗体タンパク質の吸着を防ぐために、各ウェルに3%のBSAを含むPBS溶液を $200\mu\text{l}$ ずつ入れて、室温で2時間前処理を行なった。トリス緩衝液(TBS;  $10\text{mM}$  Tris-HCl,  $150\text{mM}$  NaCl, pH7.4)でプレートを洗浄した後、各ウェルに、1%BSAを含むトリス緩衝液(1%BSA-TBS)で希釈した抗体を $50\mu\text{l}$ ずつ入れて、室温で2時間反応させた。再びプレートをTBSで洗浄した後、1%BSA-TBSで希釈した2次抗体を各ウェルに $50\mu\text{l}$ ずつ入れて室温で2時間、さらにペルオキシターゼストレプトアビジンと1時間反応させた。TBSで洗浄後、0-フェニレンジアミン $100\mu\text{l}$ で発色させ、そこに4Nの硫酸を $50\mu\text{l}$ 入れて反応を停止させた。<sup>13)</sup> 吸光度(490nm)は、マイクロプレートリーダー(MTP-32, CORONA)を用いて測定された。

## § 2 - 2. 抗体の反応性の解析

### [A] リポソームアッセイによる反応特異性の解析

PIP<sub>2</sub>と反応するモノクローン抗体は、サルモネラ菌にコートした PIP<sub>2</sub>を BALB/c 系マウスに免疫することによって得られた。これらの抗体の反応特異性を、リポソームアッセイ、ELISA 法および可溶性ハプテンによるリポソーム崩壊の抑制効果に基づいて調べた。抗 PIP<sub>2</sub>抗体は全部で12クローン得られたが、それらは大きく三つのタイプに分けられた。それらの三つのタイプの中から一つずつ AM-2 (IgM, κ), AM-7 (IgM, κ) 及び AM-212 (IgG<sub>3</sub>, κ) を選び、それぞれの詳しい反応特異性を検討した。

リポソームアッセイでは、抗原脂質がリポソーム膜を構成する脂質の 1 mol% となるように調整・作製されたリポソームを用いて、モノクローン抗体と抗原脂質との反応性を検討した。その結果、すべての抗体が PIP<sub>2</sub> に対して極めて特異的に反応し、PIP を含む他の酸性リン脂質とは殆ど反応しなかった (図 2 - 3)。

AM-212 は抗体のサブクラスが IgG<sub>3</sub> であるために、AM-212 単独では補体の活性化能が低く、リポソームの崩壊を引き起こすことが出来ない。そこで、補体の活性化能を増大させるために、2次抗体としてウサギ抗マウス IgG 抗体をその反応溶液中に加えた。その結果、PIP<sub>2</sub> を含んだリポソームの崩壊率は非常に高くなったが、PIP<sub>2</sub> 以外の酸性リン脂質を含むリポソームの崩壊率に変化はなく、低いままであった (図 2 - 3 c)。また、AM-2 あるいは AM-7 の反応溶液中にウサギ抗マウス IgG 及び IgM 抗体を加えても、それらのリポソーム崩壊率には、何の変化も見られなかった。

更に、得られたモノクローン抗体の交差反応性を検討するために、PIP<sub>2</sub> 以外の酸性リン脂質のリポソーム内含有量を 10 mol% に上げたが、AM-2, AM-7 及び AM-212 によるリポソーム崩壊は殆ど見られなかった。

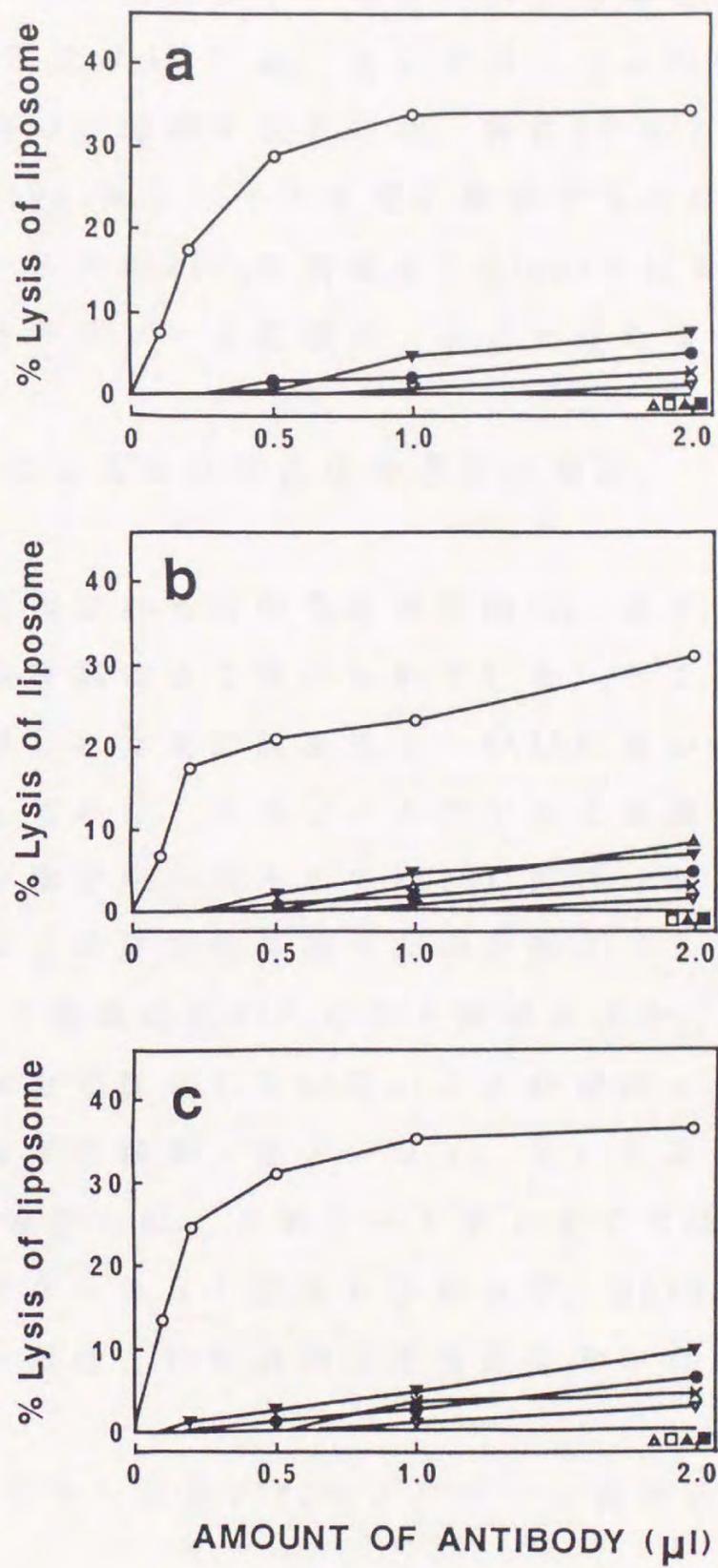


図 2 - 3. リポソームアッセイにおける抗 PIP<sub>2</sub> モノクローン抗体の反応特異性 (○: PIP<sub>2</sub>, △: PIP, □: PI, ●: PA, ▲: PC, ▼: PS, ■: PE, ▽: PG, ×: CL)

また図 2-4 は、モノクローン抗体によるリポソーム崩壊率について、リポソーム内の抗原リン脂質( $\text{PIP}_2$ )の濃度依存性を調べたものである。AM-2 及び AM-7 は、共にリポソーム内の濃度が 0.1mol% という  $\text{PIP}_2$  を十分に認識できること、特に AM-212 は、リポソーム内  $\text{PIP}_2$  濃度が 0.05mol% という大変低い濃度でも反応し得ることが分かった。リポソーム内の  $\text{PIP}_2$  の濃度を 0.01mol% にまで下げると、これらの抗体によるリポソーム崩壊が、全く見られなくなった。

#### [B] ELISA 法による抗体の反応特異性の解析

ELISA 法に代表される固相免疫測定法は、近年、抗リン脂質抗体の反応特異性の検討によく用いられている。そこで、リポソームアッセイにより得られた反応特異性と、ELISA 法から得られた反応特異性とを比較してみた。リポソームアッセイで調べたものと同様の様々な酸性リン脂質を抗原として ELISA 用アッセイプレート上にコートし、各抗体との反応性を調べたのが図 2-5 である。AM-2 と AM-212 は極めて特異的に  $\text{PIP}_2$  のみと反応するが、 $\text{PIP}$  などの他の酸性リン脂質とは全く反応していないことが分かった。この結果はリポソームアッセイの結果(図 2-3 a, c) とよく一致している。しかし AM-7 の場合には、リポソームアッセイでは  $\text{PIP}_2$  にのみ強く反応していた(図 2-3 b) にもかかわらず、ELISA 法では  $\text{PIP}$  並びに他の酸性リン脂質と非特異的交差反応を示した(図 2-5 b)。

#### [C] 可溶性パプテンと抗 $\text{PIP}_2$ モノクローン抗体との反応性の解析

モノクローン抗体とイノシトールリン脂質の可溶性極性頭部または他の構造類似体との反応性を、リポソームアッセイにおけるリポソーム崩壊率の抑制効果で調べた。その結果、AM-212 だけが可溶性パプテンとの反応性を示した。この AM-212 によるリポソーム崩壊に対して、 $\text{IP}_3$  の抑制効果が最も大きかった(図 2-6)。また、 $\text{IP}_2$

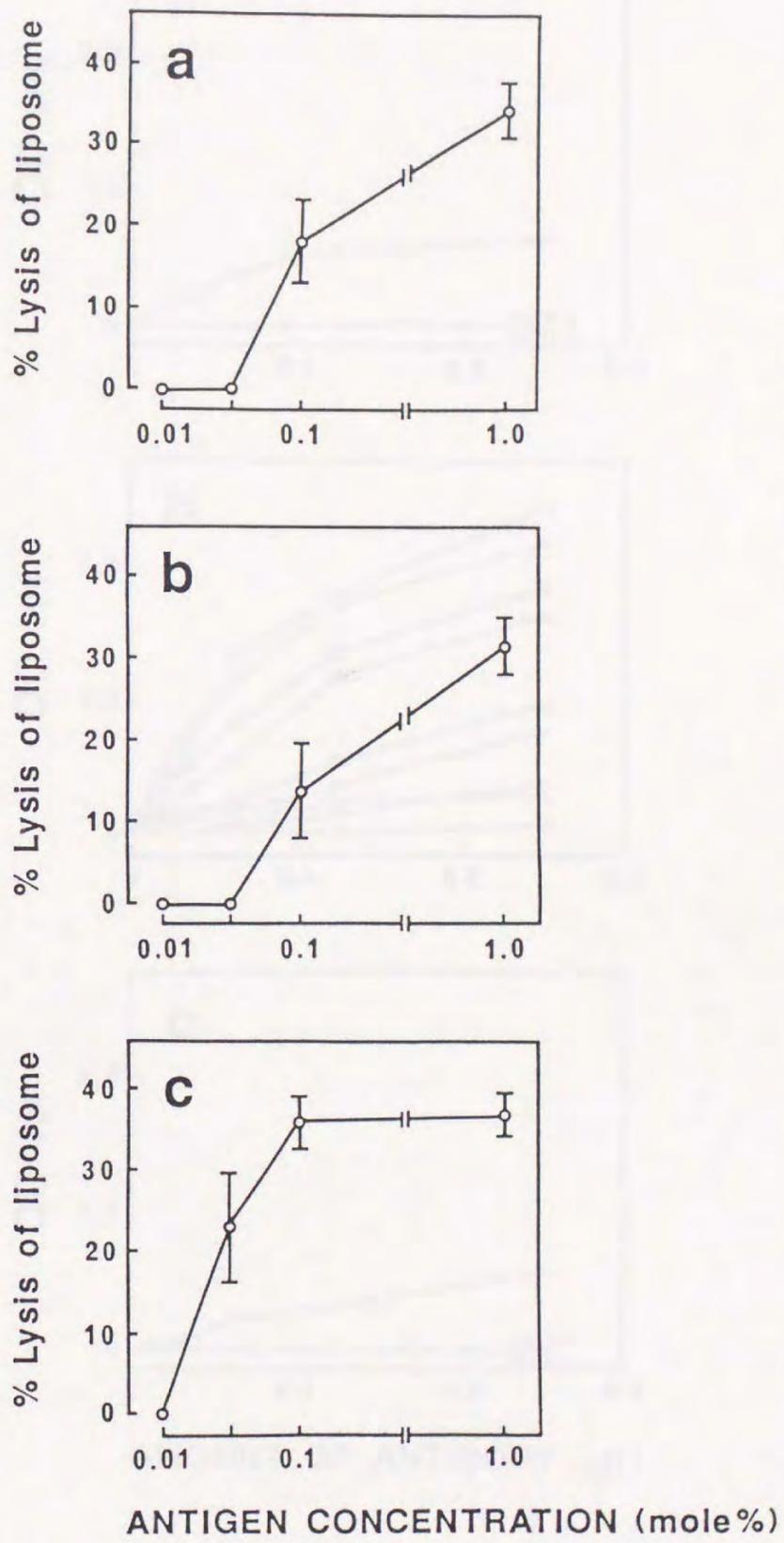


図 2 - 4. 抗原抗体反応における抗原脂質 (PIP<sub>2</sub>) の濃度依存性

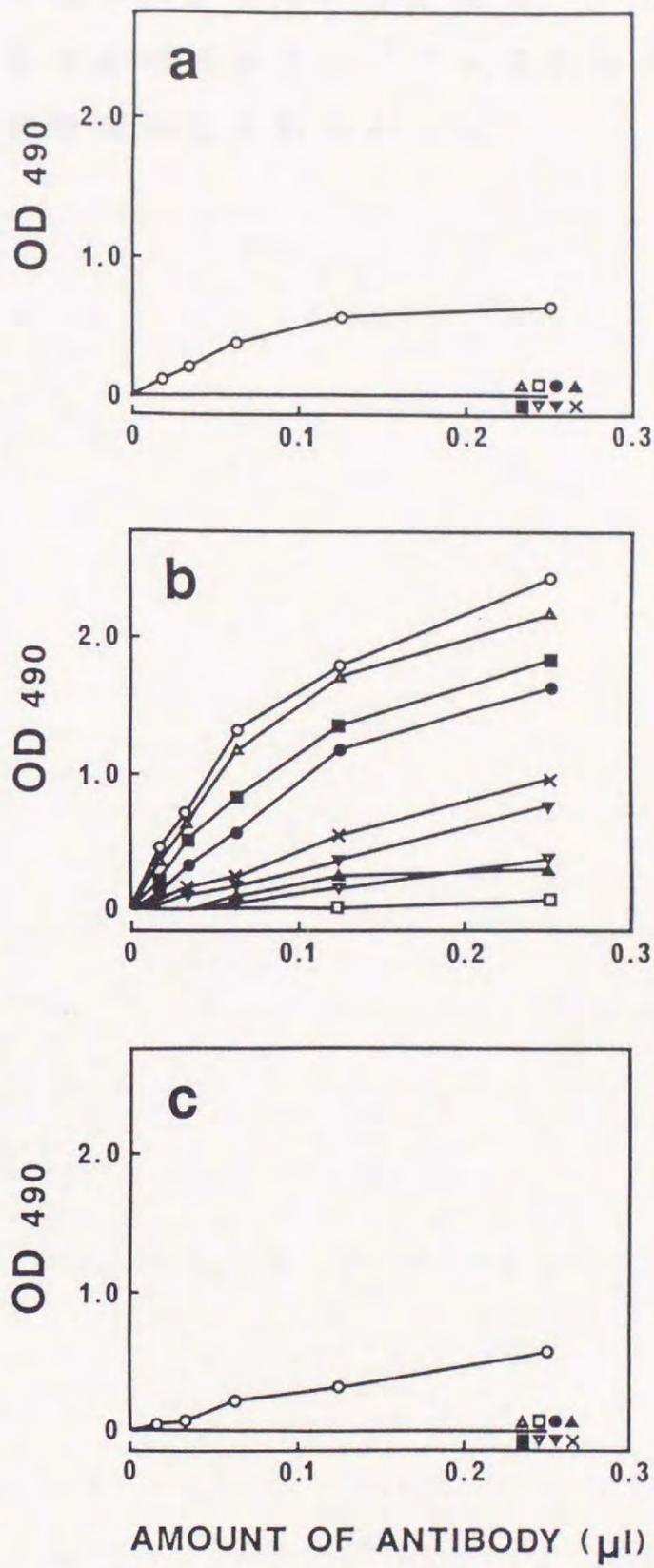


図 2 - 5. ELISA 法における抗 PIP<sub>2</sub> モノクローン抗体の反応特異性 (○: PIP<sub>2</sub>, △: PIP, □: PI, ●: PA, ▲: PC, ▼: PS, ■: PE, ▽: PG, ×: CL)

やFP<sub>2</sub>にもある程度の抑制効果が認められるものの、I(1)P<sub>1</sub>とI(2)P<sub>1</sub>では全く抑制効果が見られなかった。一方、AM-2及びAM-7では、加え得る最大量の可溶性ハプテンを反応系に加えても、リポソーム崩壊に抑制効果が見られなかった。



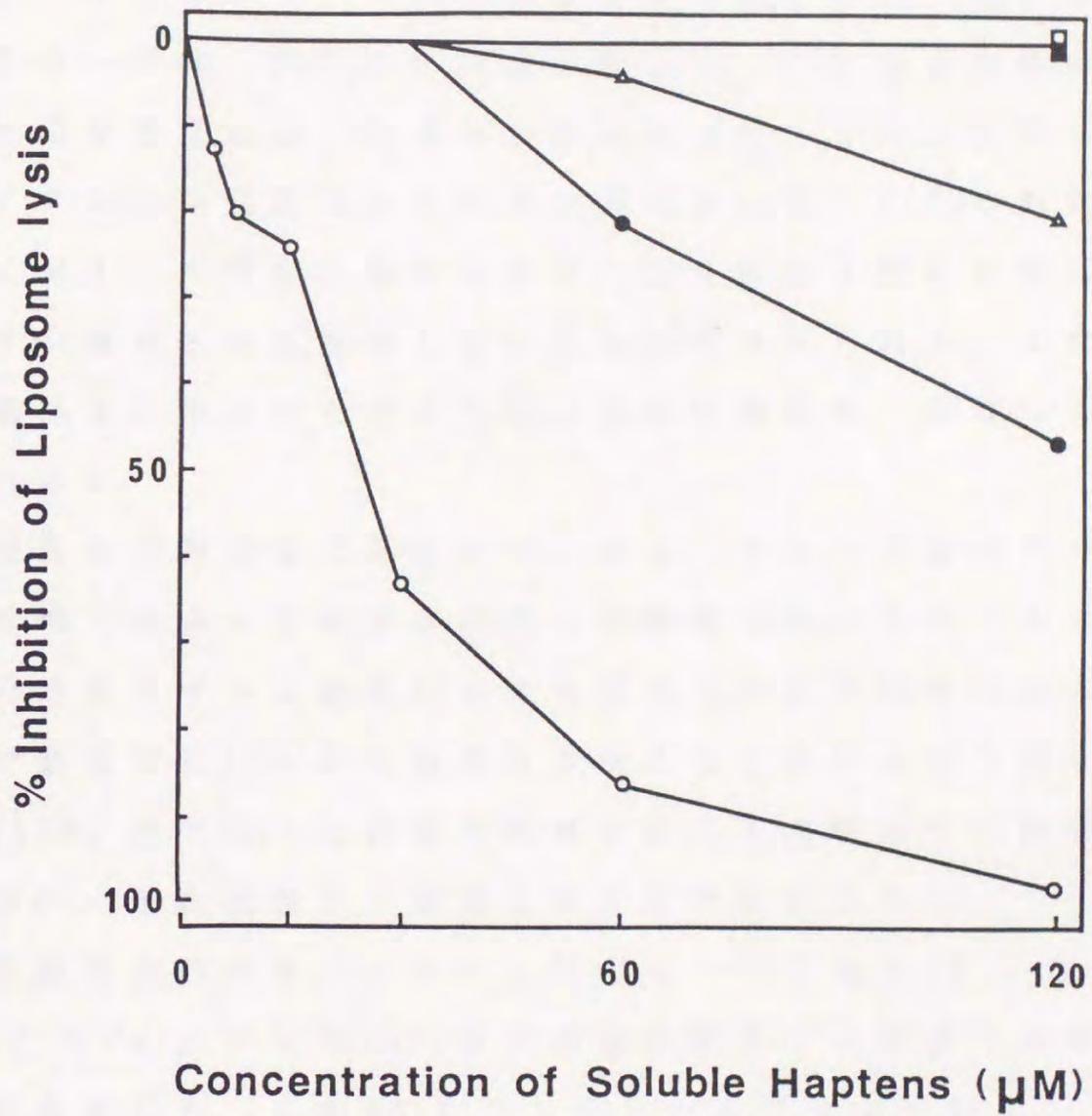


図 2 - 6. リポソームアッセイを用いた抗原抗体反応に対する  
 イノシトールリン酸の抑制効果 (○: IP<sub>3</sub>, △: IP<sub>2</sub>,  
 □: I(1)P<sub>1</sub>, ■: I(2)P<sub>1</sub>, ●: FP<sub>2</sub>)

### § 2 - 3. 抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体の反応特異性

本研究では、PIP<sub>2</sub>に対するモノクローン抗体として、全部で12クローンを確立した。まず始めに、これらのモノクローン抗体の反応特異性を、リポソームアッセイにより明らかにした。確立されたすべてのクローンは、PIP<sub>2</sub>にのみ強く反応し、PIPを含む他の酸性リン脂質との交差反応は、殆ど見られなかった。このことから、これらのモノクローン抗体はその抗原認識において、PIP<sub>2</sub>の極性頭部にあるイノシトール環の5位の位置または4位と5位の位置に置換された、リン酸基と相互作用しているものと考えられる。また、PIP<sub>2</sub>の極性頭部上に示された何か特殊な形態的構造を、認識しているのかもしれない。

固相酵素免疫測定法であるELISA法は、タンパク質がプラスチック表面に強く結合する性質を利用して開発されたものであり、タンパク質のみならずリン脂質に対する抗体の特異性を検討する際にも、これまで感度の良いしかも確かな方法として用いられて来た。<sup>14)</sup>しかし、ELISA法では、これまで報告されてきた酸性リン脂質の抗体の大部分が、他の酸性リン脂質とも交差反応を示した。<sup>15), 16), 17)</sup>本研究で確立されたモノクローン抗体の一つであるAM-7も、ELISA上ではPEやPAといったPIP<sub>2</sub>以外の他の酸性リン脂質と非特異的な交差反応を示した。このAM-7はリポソームアッセイにおいて、PIP<sub>2</sub>にのみ強く反応し、ELISA法で見られた他の酸性リン脂質(PIP, PE, PAなど)との交差反応は、リポソーム中の脂質の濃度を10mol%に上げてアッセイを行なっても、検出されなかった。AM-7が交差反応性を示した中でも、PEは特にコーン型分子であるため、その疎水的な炭化水素鎖が水相にさらされているような状態では、図2-7に示したヘキサゴナルII構造という非二重層の形態をとる傾向がある。<sup>18)</sup>従って、PEをポリビニルクロライド製のマイクロプレート上に直接コートした場合には、PEが疎水的な非二重層構造を取ったことによって、この抗体分子(AM-7)と非特異的な相互作用

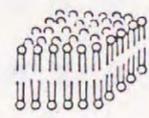
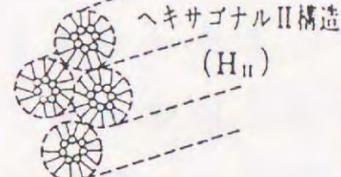
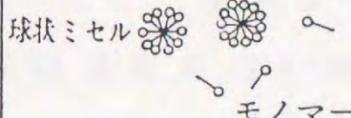
	シリンダー型分子	コーン型分子	逆コーン型分子 (くさび型分子)
分子形態	 極性 非極性		
分子集合体	 二分子膜構造 (ラメラ)	 ヘキサゴナルII構造 (H <sub>II</sub> )	 球状ミセル モノマー
脂質の例	ホスファチジルコン (>C <sub>14</sub> ) スフィンゴミエリン ホスファチジルセリン ホスファチジルグリセロール	カルジオリピン ホスファチジン酸 ホスファチジルエタノールアミン (コレステロール)	ホスファチジルコリン (<C <sub>8</sub> ) リゾホスファチジルコリン ガングリオシド ..... コール酸ナトリウム Tritonその他の界面活性剤
分子構造例	$  \begin{array}{c}  \oplus \text{N}(\text{CH}_3)_3 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{O} \\    \\  \text{O}=\text{P}-\text{O}^\ominus \\    \\  \text{O} \\    \\  \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\    \quad   \\  \text{O} \quad \text{O} \\    \quad   \\  \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\    \quad   \\  \text{R} \quad \text{R}' \\  \text{ホスファチジルコリン}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{OH} \\    \\  \text{O}=\text{P}-\text{O}^\ominus \\    \\  \text{O} \\    \\  \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\    \quad   \\  \text{O} \quad \text{O} \\    \quad   \\  \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\    \quad   \\  \text{R} \quad \text{R}' \\  \text{ホスファチジン酸}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \oplus \text{N}(\text{CH}_3)_3 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{O} \\    \\  \text{O}=\text{P}-\text{O}^\ominus \\    \\  \text{O} \\    \\  \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\    \quad   \\  \text{O} \quad \text{OH} \\    \quad   \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{R} \\  \text{リゾホスファチジルコリン}  \end{array}  $

図 2 - 7. 脂質の形状とその集合体の構造 (文献 19)より)

を引き起こしたのではないかと考えられる。あるいは、マイナス電荷を持ったリン脂質分子が非常に高い密度で固相上に局在しているために、抗体と酸性リン脂質との非特異的な静電的相互作用を引き起こしたのかもしれない。今のところ、ELISA 上での AM-7 の非特異的な反応については、その機序を説明できない。

一方、AM-2 と AM-212 モノクローン抗体は、ELISA 上で  $\text{PIP}_2$  のみを認識しているが、その脂質抗原との反応性は非常に弱いものであった。ELISA 法では、その測定の過程で行なわれる洗浄作業のために、糖脂質に対する抗体の測定には ELISA よりもリポソームアッセイの方が感度がよい、という報告がある。<sup>20)</sup> また、精製された CL は抗体とあまり反応せず、しかも最適な抗原抗体反応のためには、補助の脂質を必要とすることが知られている。更に、ガラクトセレブロシド<sup>21)</sup>、 $\text{CL}^2$ <sup>22)</sup>、またはステアリルアミン<sup>23)</sup>等の様々な脂質ハプテンと、それに対する抗体や血清因子との反応性は、それらハプテンの膜内での分布によって影響されることが、報告されている。 $\text{PIP}_2$  を含むハプテンの物理的な性質は、それを囲む脂質の影響を受けている可能性が考えられる。しかし現時点では、マイクロプレート上での酸性リン脂質の配列に関して、有効な情報は何一つ得られていない。

モノクローン抗体と  $\text{PIP}_2$  の水溶性極性頭部である  $\text{IP}_3$  との相互作用は、リポソーム崩壊に対する抑制効果から検討された。その結果、AM-212 だけが  $\text{IP}_3$  との反応性を示した。可溶性ハプテンと相互作用する抗体の能力は、ハプテンに対する抗体の親和性に依存しているものと考えられる。 $\text{IP}_3$  との反応性を示さなかった AM-2 と AM-7 は、抗原との安定した相互作用のために、ある程度のエピトープの密度を必要としているのかもしれない。また、抗体分子の抗原認識部位（抗  $\text{PIP}_2$  結合部位）と、抗原脂質のグリセロールなどの疎水的な部分との間における二次的な相互作用が、抗原抗体複合体の安定性に影響を及ぼしていることも考えられる。AM-212 における可溶性ハプテンとの反応性の順序は、 $\text{IP}_3 \gg \text{FP}_2 > \text{IP}_2$  の順であり、 $\text{I(1)P}_1$  と

I(2)P<sub>1</sub>ではリポソーム崩壊に全く抑制が掛からなかった。AM-212は静電的な相互作用を通してIP<sub>3</sub>のリン酸基と相互作用していることが考えられ、またFP<sub>2</sub>のリン酸基はIP<sub>3</sub>によって表現されるある特殊な構造的特徴と似ているのかもしれない。これらの抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体によって認識される正確なエピトープの決定には、更に進んだ研究が必要であると思われる。

最後に、これらのモノクローン抗体がリポソーム膜中に埋め込まれた極めて微量なPIP<sub>2</sub>(0.1mol%)を認識できるということは、注目すべきことである。実際の細胞膜中でのPIP<sub>2</sub>の含有量は、おおよそ0.25~0.5mol%である、と報告されている。<sup>24), 25)</sup> 従って、これらのモノクローン抗体は、様々な組織におけるPIP<sub>2</sub>の分布の組織化学的な解析や、細胞内情報伝達系を介した細胞機能の研究に対して、一つの有効な手段となることが予想される。

これまで、PIP<sub>2</sub>に対する幾つかのポリクローン抗体<sup>26)</sup>及びモノクローン抗体<sup>27), 28)</sup>の作製が試みられて来た。これらの抗体を用いた各組織に対する免疫組織化学的研究の結果から、これらの抗体も生体内に存在するPIP<sub>2</sub>を高い確率で認識していたと考えられる。しかし、ポリクローン抗体には、血清中のタンパク質を始めとして様々な物質が含まれているために、それらの影響を無視できない。一方、モノクローン抗体は、PIP<sub>2</sub>と類似したPIPにも交差反応性を示すなど、その反応特異性に問題があった。<sup>27), 28)</sup> 一般に、抗体の特異性の高さや、得られた抗体を大量に生産し精製する場合の容易さなどを考えてみると、モノクローン抗体の方が多くの優れた点を有している。特に、抗体のクラスがIgGであるものは、プロテインAを利用したカラムクロマトグラフィーにより、IgMに比べて簡易にしかも完全に精製される。従って、第3章におけるPIP<sub>2</sub>の免疫組織化学的解析では、抗体のクラスがIgGであるAM-212を、精製した後使用することにした。

参考文献

- 1) O. Doi and S. Nojima: *Biochim. Biophys. Acta* 248(1971)234.
- 2) J. Folch: *J. Biol. Chem.* 146(1942)35.
- 3) P. Comfurius and R. F. A. Zwaal: *Biochim. Biophys. Acta* 488  
(1977)36.
- 4) W. E. Trevelyan: *J. Lipid Res.* 7(1966)445.
- 5) M. Faure and J. Marechal: *Compt. Rend.* 254(1962)4518.
- 6) C. Galanos, O. Luderitz and O. Westphal: *Eur. J. Biochem.* 24  
(1971)116.
- 7) M. Umeda, I. Diego and D. M. Marcus: *J. Immunol.* 137(1986)3264.
- 8) G. S. Galfre, C. Howe, C. Milstein, G. W. Butcher and J. C. Howard:  
*Nature* 266(1977)550.
- 9) G. Kohler and C. Milstein: *Nature* 256(1975)495.
- 10) 井上圭三, 奥直人, 野島庄七: *代謝* 18(1981)81.
- 11) K. Inoue: *Biochim. Biophys. Acta* 339(1974)390.
- 12) H. R. Six, W. W. Jr. Young, K. Uemura and S. C. Kinsky:  
*Biochemistry* 13(1974)4050.
- 13) M. Umeda, I. Diego, E. D. Ball and D. M. Marcus: *J. Immunol.* 136  
(1986)2562.
- 14) E. N. Harris, A. E. Gharavi and G. R. V. Hughes: *Clinics in*  
*Rheumatic Diseases* 11(1985)591.
- 15) C. R. Alving: *Chem. Phys. Lipids* 40(1986)303.
- 16) S. Ghosh and A. M. Campbell: *Immunology Today* 7(1986)217.
- 17) D. Isenberg and Y. Shoenfeld: *Immunology Today* 8(1987)279.
- 18) P. R. Cullis and B. D. Kruijff: *Biochim. Biophys. Acta* 559(1979)  
399.
- 19) 菊池 寛, 井上圭三: *油化学* 34(1985)28.
- 20) T. Endo, D. D. Scott, S. S. Stewart, S. K. Kundu and D. M. Marcus:  
*J. Immunol.* 132(1984)1793.

- 21) T. Suzuki, H. Utsumi, K. Inoue and S. Nojima: *Biochim. Biophys. Acta* 644(1981)183.
- 22) T. Takashi, K. Inoue and S. Nojima: *J. Biochem.* 87(1980)679.
- 23) M. Tsujimoto, K. Inoue and S. Nojima: *J. Biochem.* 90(1981)1507.
- 24) G. Hauser, J. Eichberg and F. Gonzalez-Sastre: *Biochim. Biophys. Acta* 248(1971)87.
- 25) J. Eichberg and G. Hauser: *Biochim. Biophys. Acta* 326(1973)210.
- 26) A. J. Greenberg, A. J. Trevor, D. A. Johnson and H. H. Loh: *Molec. Immun.* 16(1979)193.
- 27) T. Yoshioka and K. Inomata: *Proc. Japan Acad.* 59(1983)28.
- 28) N. M. Wassef, F. Roerdink, G. M. Jr. Swartz, J. A. Lyon, B. J. Berson and C. R. Alving: *Molec. Immun.* 21(1984)863.

### 第3章 カルシウムシグナリング系の解析

#### § 3-1. PIP<sub>2</sub>およびIP<sub>3</sub>受容体の免疫組織化学

##### [A] 抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体による免疫染色

###### a) 方法

ラットをペントバルビタールで麻酔し、3%パラホルムアルデヒド・1%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)を、左心室より灌流して固定した。固定した脳を取り出し、同じ固定液に漬けた状態のまま、その後の操作をするまで4℃で保存した。小脳を5%寒天を含んだ50mM Tris-HCl(pH7.4)・150mM NaCl(TBS)中に包埋し、マイクロスライサー(堂阪イーエム)を用いて厚さ50μmのサジタール切片を作製した。これをTBSで十分に洗浄した後、抗体の非特異的な吸着を抑えるために1%牛血清アルブミンを含むTBS(1%BSA-TBS)を用いて、室温で2時間前処理を行ない、抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体(AM-212;5μg/ml)を含む1%BSA-TBSと4℃で24時間以上インキュベートした。次いでTBSで洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識のヤギ抗マウスIgG抗体(TAGO, U.S.A.)を1%BSA-TBSで100倍に希釈したものと、更に室温で2時間反応させた。これを再びTBSで洗浄後、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(同仁化学)で発色させ、光学顕微鏡で観察した。

###### b) 結果

誕生直後のラット(生後0日目)の小脳切片では、外顆粒層においてアストログリア等の線維状構造が濃く染色された。しかし、プルキンエ細胞などの小脳皮質にある特定の細胞が染色されることはなかった。生後3日目では、生後0日目と同様に、線維状構造に免疫染色が認められ、更にその下に配列途上にあるプルキンエ細胞の核が明瞭に染色された。また、このプルキンエ細胞の下側にも外顆

粒層から移動した顆粒細胞を含む何種類かの細胞の核が染色された。この時期では、核が染色されたプルキンエ細胞等の細胞において、細胞質の染色が認められなかった（図3-1a）。生後7日目になると、プルキンエ細胞層に一系列に配列したプルキンエ細胞で、核や細胞体、樹状突起等が染色された。更に、形成され始めた分子層が一様に染まり、その中にバスケット細胞および星状細胞の核とその細胞質が強く染色された。一方、顆粒層では、外顆粒層から移動し終えた顆粒細胞と、その顆粒層に見られる大型の細胞でゴルジ細胞と思われるものも、この時期に核と細胞質が染色された。しかし、移動する前の外顆粒層中の顆粒細胞は染色されなかった（図3-1b）。生後15日目では、プルキンエ細胞の核は染色されたが、その細胞体と樹状突起に免疫染色は認められなかった。これと対照的に、プルキンエ細胞の細胞体を取り囲むエピテリアルグリア細胞の細胞質が強く染色されて来た。またこの時期に、分子層ではバーグマン線維が染色されており、バスケット細胞及び星状細胞の核にも強い免疫染色が認められた。一方、顆粒層ではゴルジ細胞の核に強い免疫染色が認められたが、顆粒細胞の核の染色性は他の神経細胞の核に比べて低下していた（図3-1c）。生後21日目になると、顆粒細胞、バスケット細胞及び星状細胞の核が強く染色され、同時にこれらの核の染色に比べてより低い免疫染色が、プルキンエ細胞の核にも認められた。また、生後15日目には強く染色されていたエピテリアルグリア細胞に免疫染色は認められなくなったが、これとは逆に、プルキンエ細胞では、その樹状突起の部分が再び強く染色されて来た。しかし、プルキンエ細胞の細胞体における細胞質の免疫染色は、依然として認められなかった（図3-1d）。

このモノクローン抗体を用いてアダルトラットの脳切片を染色すると、小脳の神経回路網を構築する細胞であるプルキンエ細胞、顆粒細胞、バスケット細胞、星状細胞及びゴルジ細胞の核が染色された。また、バーグマングリア等のグリア細胞の核も染色された。免疫染色を細胞レベルで観察すると、幾つかのプルキンエ細胞では

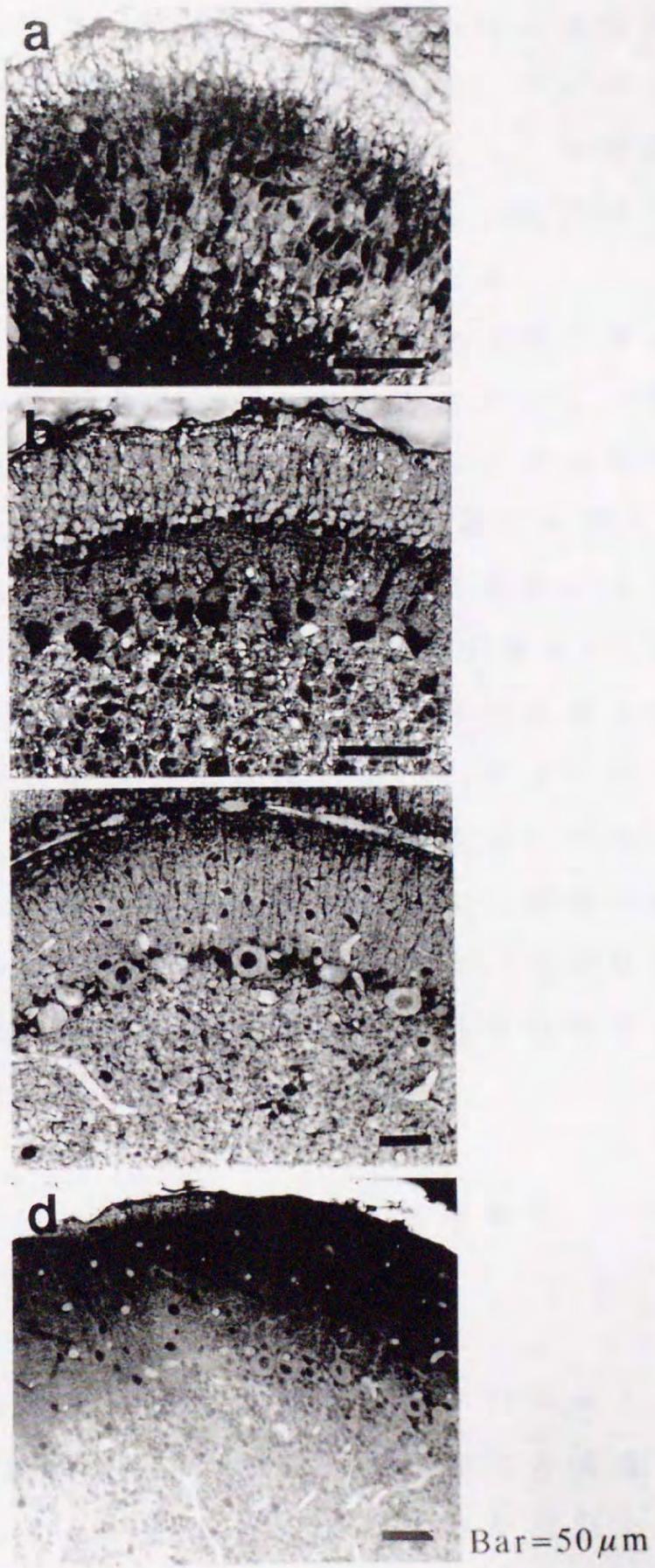


図 3 - 1. 小脳発生における抗 $PIP_2$ モノクローン抗体による染色像

樹状突起が強く染色されたが、細胞体には染色されたものと、染色されていないものがあった。プルキンエ細胞以外の神経細胞では、核以外の細胞質の部分に免疫染色が認められず、プルキンエ細胞の軸索や顆粒細胞の平行線維といった神経線維にも、免疫染色は認められなかった(図3-2a)。表3-1は、以上に述べた小脳発生に伴う抗PIP<sub>2</sub>染色の変化を、まとめたものである。

抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体によって免疫組織化学的に得られた染色像が、果たしてPIP<sub>2</sub>の存在を示したものであるかどうかを確かめるために、特異的な免疫染色のパターンを分析した隣接切片において、PIP<sub>2</sub>の極性頭部IP<sub>3</sub>により予め吸収した抗体で染色を行なった。その結果、図3-2bに示すように、特異的な免疫染色が全体的に非常に薄くなった。しかし、PIPやPIの極性頭部であるIP<sub>2</sub>及びIP<sub>1</sub>と、予め抗体を反応させた場合には、免疫染色に何の影響もなかった。また、この特異的な免疫染色の濃さは、抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体の希釈度を増すと減少し、さらに、酵素標識抗体として用いた抗マウスIgG抗体だけでは、小脳切片に免疫染色が全く認められなかった。

以上のような結果から、この抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体によって得られた特異的な免疫染色は、PIP<sub>2</sub>の小脳組織内での局在を実際に反映したものであると考えられる。

#### [B] 抗IP<sub>3</sub>受容体モノクローン抗体による免疫染色

##### a) 方法

ラットをペントバルビタールで麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)を、左心室より灌流して固定した。固定した脳を取り出し、同じ固定液に漬けた状態でその後24時間4℃で保存した。更に、氷晶防止処置として、小脳を30%蔗糖を含むTBS中に数日間4℃で保存した。O.C.T.コンパウンドで包埋したのち、クリオスタット(Leitz, Germany)を用いて厚さ13μmのサジタール切片を作製し、カバーガラスに張り付けた。これをTBSで十

Absorption with IP<sub>3</sub>

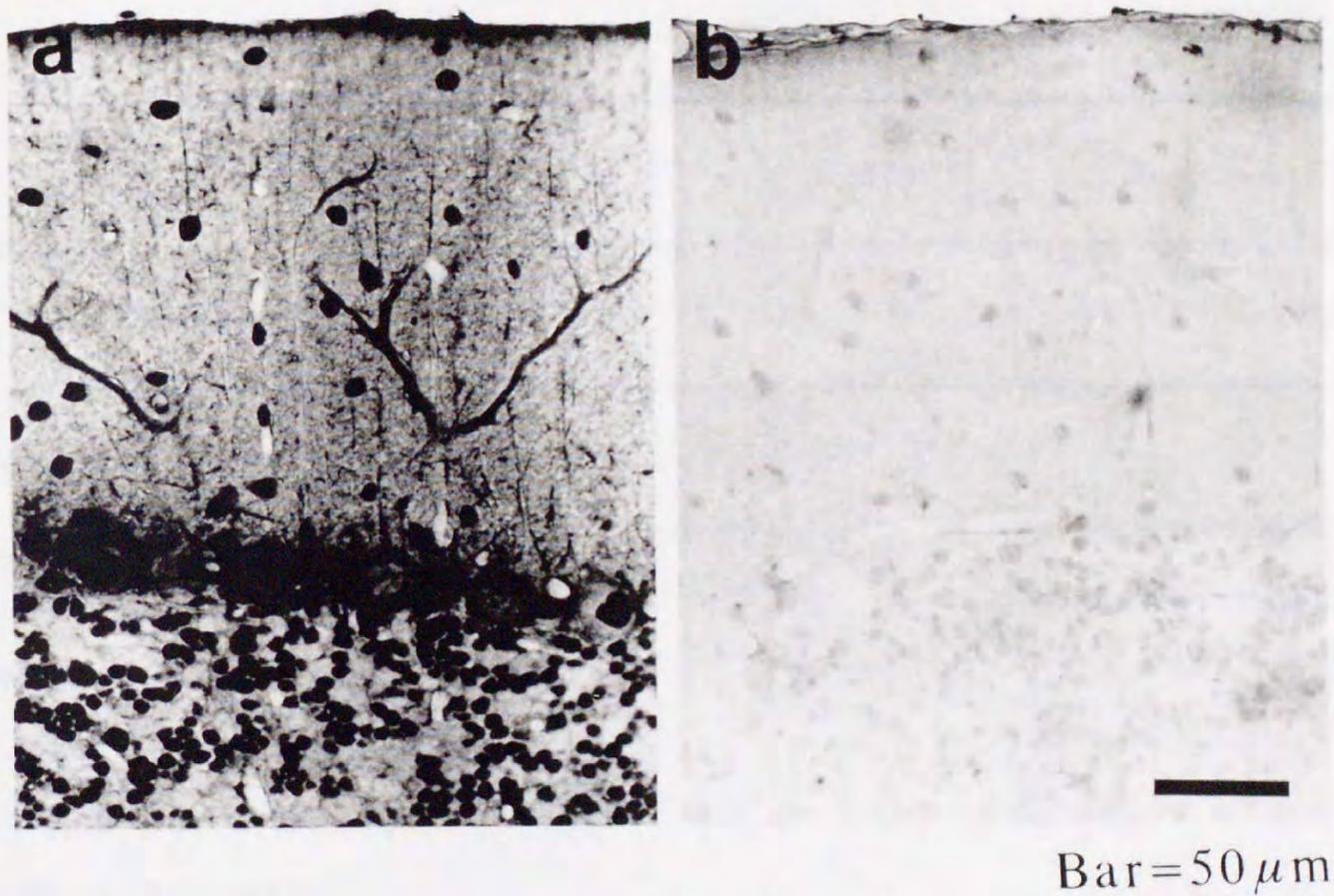


図 3 - 2. アダルトラット小脳における抗 PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体による染色像 ( a ), 及び IP<sub>3</sub>を用いた抗 PIP<sub>2</sub>抗体吸収後の染色像 ( b ).

表 3 - 1. 生後発生中の小脳における抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体による各神経細胞の染色性 (n, not identified; -, no reactivity; +, weak reactivity; ++, medium reactivity; +++, strong reactivity)

Region	PND							Adult
	0	3	5	7	10	14	21	
External germinal layer								
Germinal cell	-	-	-	-	-	-	n	n
Glial fiber	+	+	+	+	+	+	n	n
Molecular layer								
Stellate & basket cell	n	n	n	+++	+++	++	++	++
Bergmann fiber	n	n	-	-	++	++	+	+
Purkinje cell								
Dendrite	n	n	n	++	+	-	++	++
Perikaryon	+	+	++	++	+	+	+	++
Axon	n	n	n	n	n	n	n	n
Granular layer								
Granule cell	n	n	+	++	+	+	+	++
Golgi cell	n	n	n	++	++	++	+	++
Germinal cell	+	++	++	++	+	n	n	n

分に洗浄し、抗体の非特異的な吸着を抑えるために1%BSA-TBS 及び室温で2時間前処理を行なったのち、抗IP<sub>3</sub>受容体モノクローン抗体(4C11)<sup>1)</sup>と4℃で24時間以上インキュベートした。次いでTBSで洗浄後、ベクタステインABCキット(Vector Lab., U.S.A.)を用いて染色し、光学顕微鏡で観察した。

#### b) 結果

図3-3に示したように、抗IP<sub>3</sub>受容体染色は小脳の発生を通して、プルキンエ細胞の核を除く細胞質全体に常に見られた。しかし、小脳皮質の他の神経細胞には、その染色が全く見られなかった。これは以前に報告されたマウスの小脳での結果とよく一致している。<sup>1)</sup>特に、生後7日目からアダルトにかけて、プルキンエ細胞の樹状突起の樹枝状分岐が非常にはっきりと抗IP<sub>3</sub>受容体染色によって示され、その染色は各発生段階における樹状突起の成長と形態を忠実に示していた。生後21日目になると、染色されていない外顆粒層中の細胞が存在する点を除いて、アダルトの小脳とほぼ同様な染色パターンを示した。プルキンエ細胞の軸索は生後7日目以降弱いながらも染色されており、更にその逆行性側枝にも染色が見られた(図3-3d)。抗IP<sub>3</sub>受容体抗体によるプルキンエ細胞の細胞質の染色性は、小脳の発生を通してほぼ同じ強さであった。また、小脳発生の早い段階(生後0日目から7日目)には顆粒層にも弱い染色が見られたが、生後10日目以降には見られなくなった。この顆粒層の染色は非特異的なものであると考えられるが、現時点ではその理由が分からない。

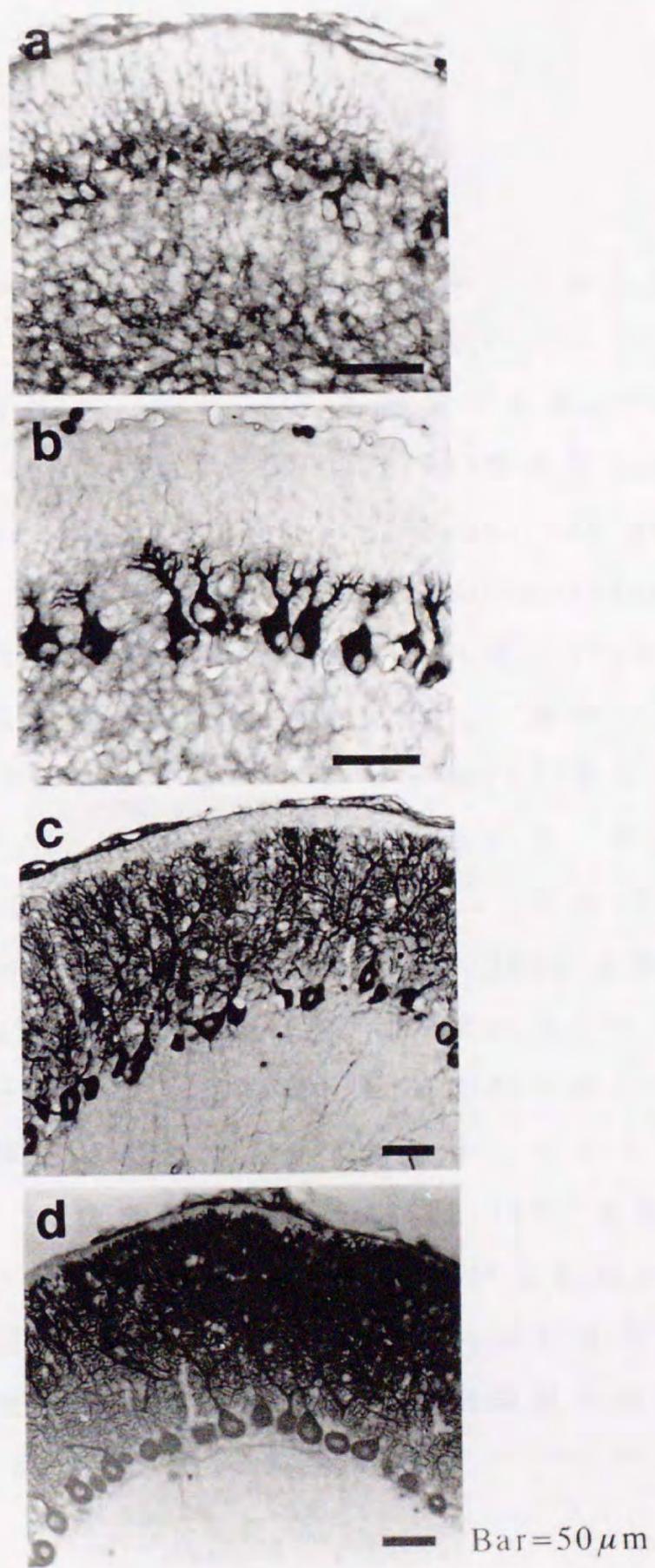


図 3 - 3. 小脳発生における抗  $IP_3$  受容体抗体による染色像

### § 3 - 2. グルタミン酸受容体アゴニストによるカルシウムシグナリング

#### [A] 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 測定法

ラットをジエチルエーテルで麻酔して素早く小脳を取り出し、ロータリースライサーを用いて厚さ  $200\mu\text{m}$  のサジタールスライスを作製した。このスライスを、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬である fura-2/AM ( $10\mu\text{M}$ ; Molecular Probe, U.S.A.) を  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95%/5%) で通気した人工脳脊髄液 (ACSF;  $113\text{mM}$  NaCl,  $3\text{mM}$  KCl,  $10\text{mM}$  glucose,  $1\text{mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $1\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $25\text{mM}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $0.4\mu\text{M}$  tetrodotoxin) に浸し、 $32^\circ\text{C}$  で 1 時間色素を負荷した。その後スライスを、ACSF ( $32^\circ\text{C}$ ,  $2\text{ml}/\text{min}$ ) を灌流している記録用チャンバーに移し、測定に備えた。グルタミン酸受容体アゴニストであるキスカル酸 (QA) 及び N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) は、Sigma 社より購入された。実験は、ACSF 中の QA 及び NMDA が  $100\mu\text{M}$  となるように調整し、その ACSF をスライスに 2 分間灌流投与して行なわれた。ただし、NMDA を投与するときには、ACSF 中から  $\text{Mg}^{2+}$  を除去した。また、同じスライスにアゴニストを連続投与するときには、30分以上間隔をおいて行なった。 $\text{Ca}^{2+}$  応答の測定は、高感度ビデオカメラ (浜松ホトニクス, C-2400-8) 及び画像解析装置 (浜松ホトニクス, ARGUS-100) を装着した倒立落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス, IMT-2) を用いて行なわれた。<sup>2)</sup> 図 3-4 は、この測定装置全体の概略を示したものである。<sup>3)</sup> 蛍光画像は、アゴニストを投与する前と後の  $340\text{nm}$  励起像の比をとって (F340/F340法)、偽似カラーで表示された。<sup>4), 5), 6)</sup>

#### [B] 小脳発生における $\text{Ca}^{2+}$ 動態

小脳皮質における  $\text{Ca}^{2+}$  応答画像を図 3-5 及び 3-6 に示した。生後 3 日目ではプルキンエ細胞が一行に配列しておらず、プルキン

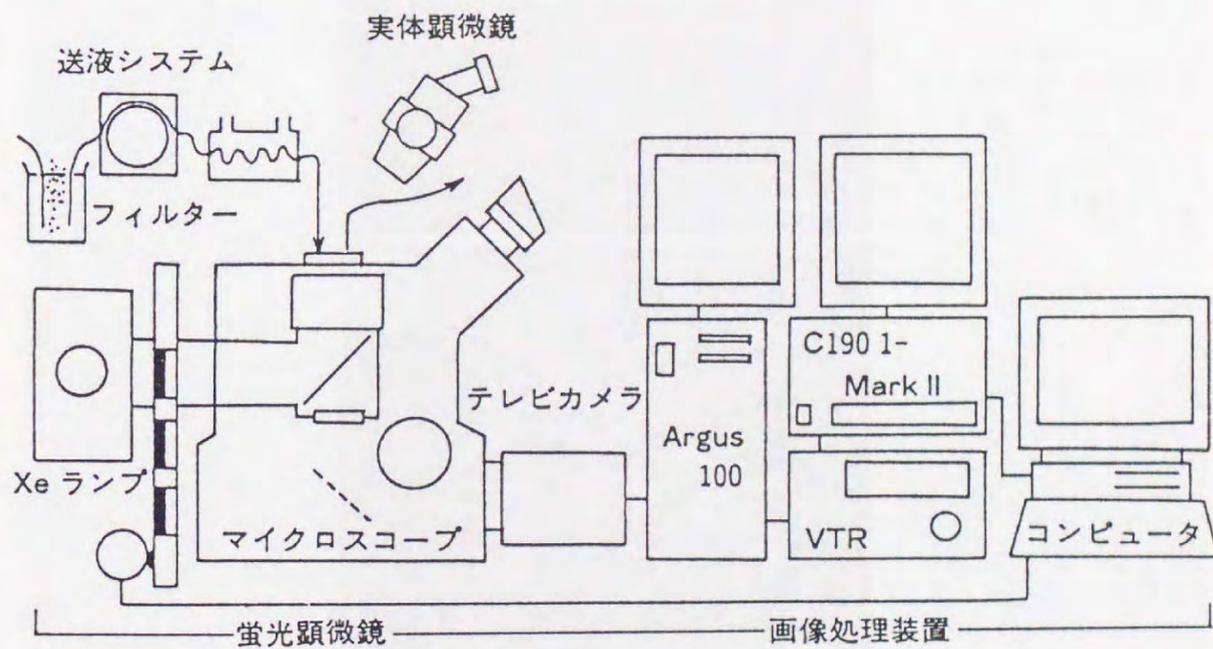


図 3 - 4. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定装置の概念図 (文献 3)より)

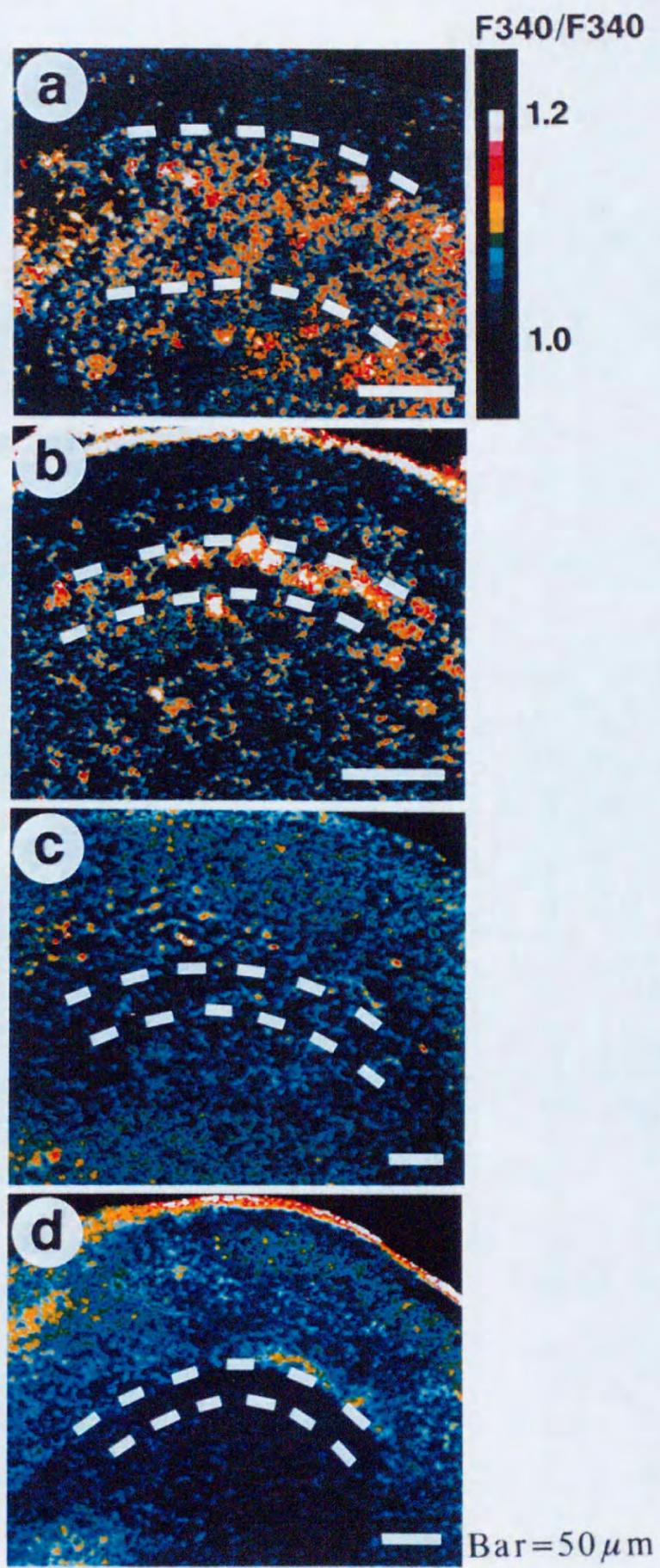


図 3 - 5. 発生中の小脳スライスにおける QA による  $Ca^{2+}$  応答

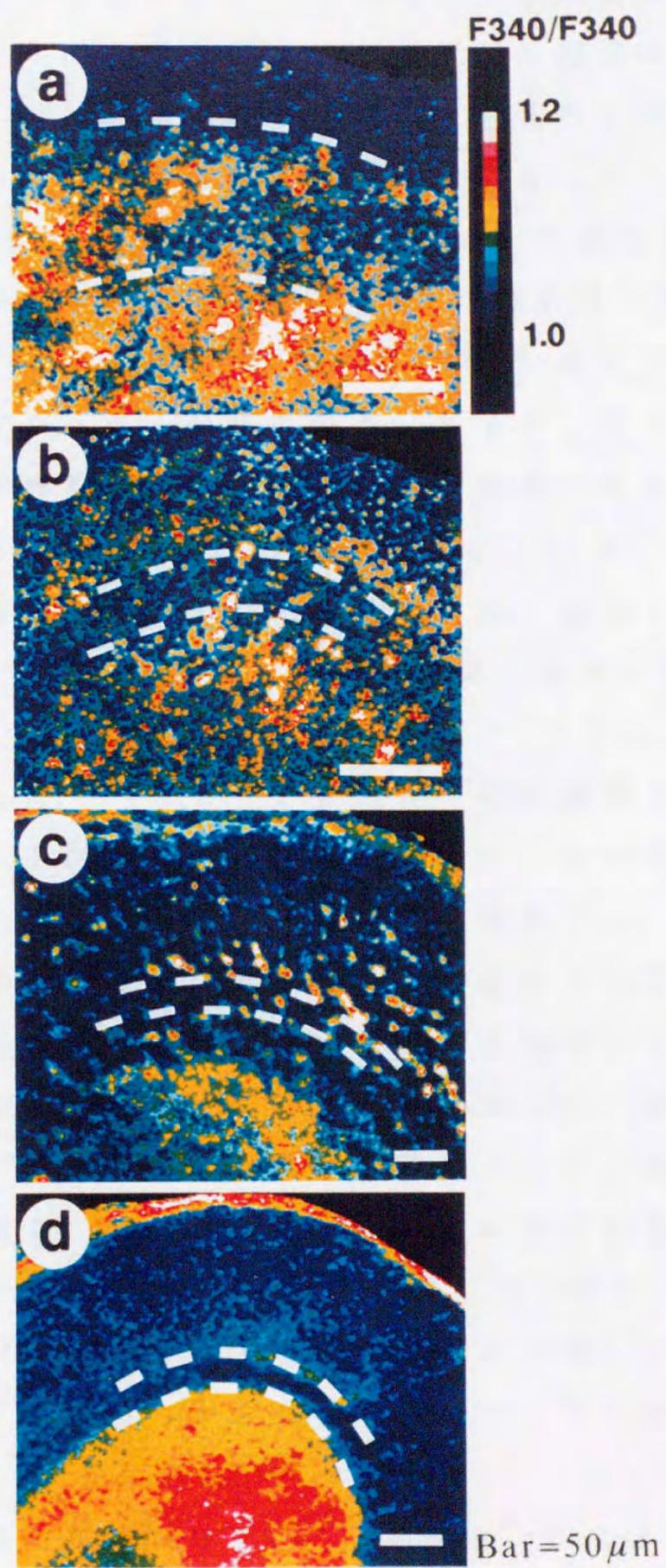


図 3 - 6. 発生中の小脳スライスにおける NMDA による  $\text{Ca}^{2+}$  応答

エ細胞層が形成されていないが,<sup>7)</sup> この時期から多くの登上線維がプルキンエ細胞とシナプスを作ることが、電気生理学的に証明されている。<sup>8)</sup> QAによるCa<sup>2+</sup> 応答はプルキンエ細胞の存在するところに見られたが、その応答部位は顆粒層にまで広がっていた(図3-5 a)。一方、NMDAによる応答部位はプルキンエ細胞層から顆粒層まで広範囲におよび、その応答の程度もQAの場合より強かった(図3-6 a)。また、外顆粒層では、QA及びNMDAの各々によるCa<sup>2+</sup> 応答が全く見られなかった。生後7日目になると、プルキンエ細胞は、その樹状突起の伸展と共に、顆粒細胞の軸索である平行線維とシナプスを形成し始める。<sup>8)</sup> このとき、QAによるCa<sup>2+</sup> 応答は、プルキンエ細胞層及び形成され始めた分子層に強く現われた(図3-5 b)。またNMDAでは、顆粒層と分子層に弱い応答が見られた(図3-6 b)。

生後15日目までには、バスケット細胞及び星状細胞といった抑制性の介在ニューロンとプルキンエ細胞との間に、シナプスも形成される。<sup>7)</sup> 従って、この時期までにプルキンエ細胞では、新たなタイプのシナプス形成や登上線維の退化といったすべての質的変化がほぼ完了し、樹状突起を更に伸展させて数多くのシナプスを作るといった量的変化が進行している。<sup>8)</sup> こうした時期では、QAまたはNMDA刺激によるCa<sup>2+</sup> 応答が、生後3日目や7日目と全く異なるパターンを示した。即ち、QAによる応答は非常に弱くなり、その応答部位は小脳皮質全体に渡って一様に分布していた(図3-5 c)。一方、NMDAによるCa<sup>2+</sup> 応答は、顆粒層と、プルキンエ細胞の細胞体の周辺に存在している幾つかの介在ニューロンとに局在していた(図3-6 c)。

生後21日目の小脳皮質におけるCa<sup>2+</sup> 応答は、これよりも早い発生段階のものとは大きく異なっていた。QAによるCa<sup>2+</sup> 応答は分子層に一様に見られたが、顆粒層には殆ど応答が見られなかった(図3-5 d)。一方、NMDA刺激では、顆粒層に強いCa<sup>2+</sup> 応答が見られたにも拘らず、分子層の応答は大変弱いものであった(図3-6 d)。

また、プルキンエ細胞層（プルキンエ細胞の細胞体）には、QA 及び NMDA の各々による  $Ca^{2+}$  応答が全く見られなかった。

### § 3 - 3. PIP<sub>2</sub>とカルシウムシグナリング

近年、神経細胞における神経伝達物質受容体とセカンドメッセンジャー系との複雑な関係が明らかにされて来た。特に、イノシトールリン脂質代謝と関連しているとされる、いわゆるメタボトロピック型のグルタミン酸受容体については、非常に研究が進み、多くのことが分かって来た。<sup>9), 10)</sup> これらの受容体はQAまたはtrans-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid(trans-ACPD)というアゴニストによって活性化され、Gタンパク質の活性化を介して、PIP<sub>2</sub>をIP<sub>3</sub>とDGに加水分解する。ここで生じたIP<sub>3</sub>は、細胞内CaストアーからのCa<sup>2+</sup>動員を引き起こす。こうしたメタボトロピック型グルタミン酸受容体は、小脳皮質に存在しており、アゴニスト刺激を行なうことにより、実際に細胞内にCa<sup>2+</sup>を動員することが示された。<sup>11), 12)</sup> なお、ここで示された細胞内Ca<sup>2+</sup>動員の機能的な役割は依然として不明のままであるが、α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid(AMPA)に選択的なイオノトロピック型グルタミン酸受容体の長期的な脱感作に関与し、それを促進する機構の一部を構成していることが証明された。<sup>13), 14)</sup>

そこで本研究では、メタボトロピック型グルタミン酸受容体とイノシトールリン脂質情報伝達系に注目して、両者の間の直接的関連性の解析を試みた。そのために、小脳皮質におけるカルシウムシグナリング系の生後発生を、QA刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化の測定と、PIP<sub>2</sub>とIP<sub>3</sub>受容体の局在の免疫組織化学解析を、平行して行なうことにより調べた。また、これと同時に、Caチャンネルに関連したグルタミン酸受容体のサブタイプを選択的に活性化するNMDAを用いて、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を同様に測定した。その結果、小脳皮質におけるCa<sup>2+</sup>動態については、生後21日目の時点で、興奮性アミノ酸によって刺激される領域が二つの部位に明確に分けられることが分かった(図3-5d, 図3-6d)。また、QA刺激により応答する部位は、プルキンエ細胞の樹状突起により構成されている分子層に

殆ど局在していた。一方、NMDA刺激により応答する部位は顆粒層に局在していた。この結果は、器官培養したスライス及びパッチクランプ記録法を用いたLlano等のデータと、よく一致している。<sup>15)</sup> 即ち、QA受容体はプルキンエ細胞の細胞体以外の部分に殆ど存在している、というものである。しかし、これら二つの異なる応答部位は、発生の初期の段階（生後3日目から15日目）では、はっきりと区別されなかった。

QA刺激により応答した部位は、抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体により染色された部位と、非常によく一致していた。このQA応答部位と抗PIP<sub>2</sub>免疫染色部位との一致は、生後3日目から21日目までの小脳の発生の間、常に認められた。特に生後7日目では、プルキンエ細胞の細胞体においてそれらの反応部位が完全に一致している。これらのことから、QA受容体は細胞内にCa<sup>2+</sup>を動員するのにIP<sub>3</sub>系を利用していることが推測される（図3-7）。これを証明するためには、プルキンエ細胞中にPIP<sub>2</sub>に特異的なPLCが存在すること<sup>16)</sup>を示さなければならないが、他の研究グループによって提唱されている仮説ともよく一致している。<sup>9), 10), 17)</sup> これに対して、NMDA刺激により応答した部位は、生後3日目を除いて、抗PIP<sub>2</sub>モノクローン抗体により染色された部位とは異なっていた。生後3日目では、小脳皮質が未成熟であるために、小脳の層構造が区別できない。従って、NMDAによるCa<sup>2+</sup>動員部位と抗PIP<sub>2</sub>染色部位との関係を、この時期において示唆することは困難である。生後7日目以降、NMDAによるCa<sup>2+</sup>動員部位と抗PIP<sub>2</sub>抗体による染色部位との相関関係は、殆ど認められなくなった。このことから、NMDA刺激によるCa<sup>2+</sup>応答はIP<sub>3</sub>セカンドメッセンジャー系と関係ない可能性が、導かれる。また、NMDA受容体はCaチャンネルと関連していることが示されており（図3-7）、この結果はその説を反映したものであると考えられる。

しかしながら、これらの結果は注意深く解釈されなければならない。なぜならば、PIP<sub>2</sub>分子自身はパラホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドによって、組織内に固定されないからである。更に、

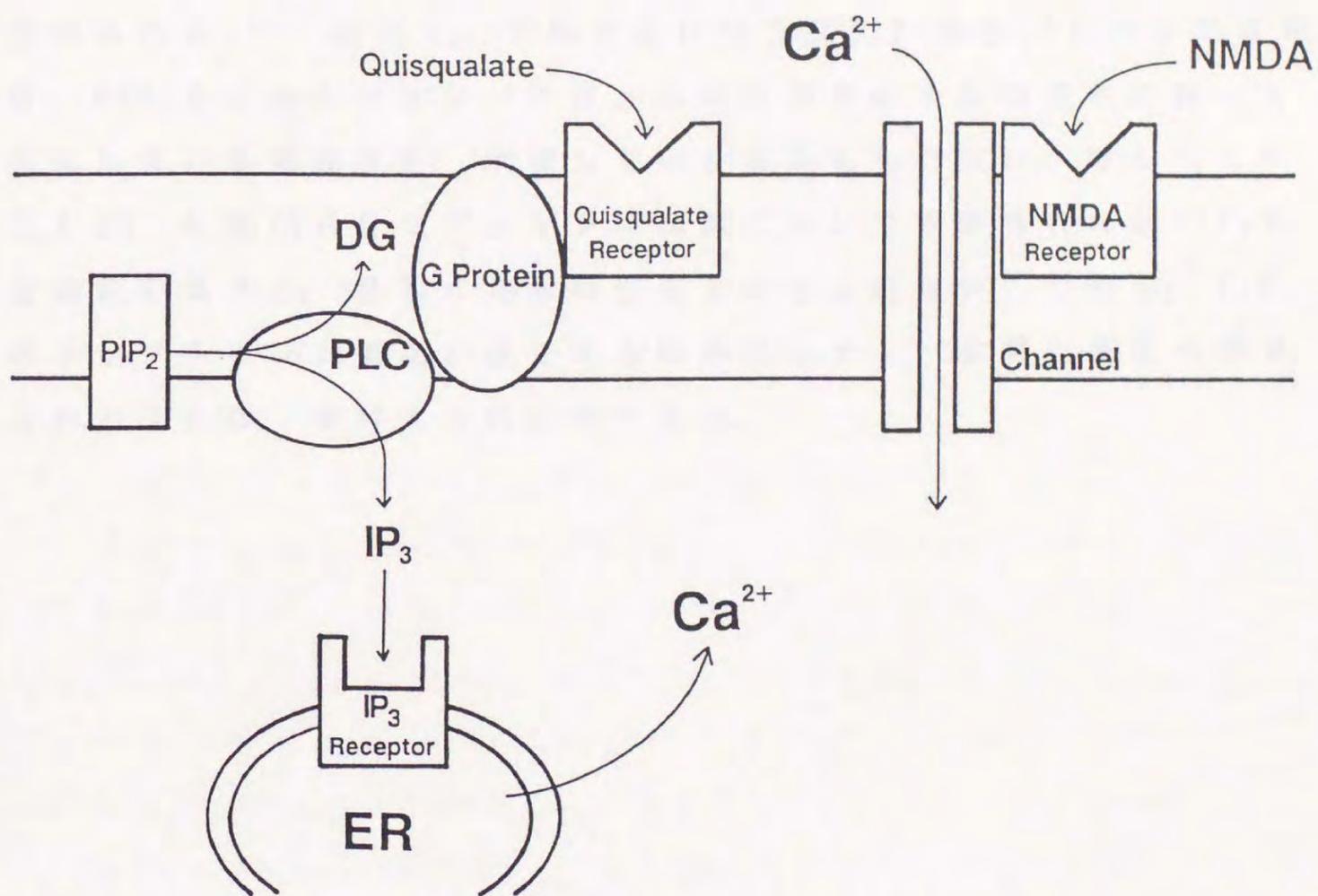


図 3 - 7. QA と NMDA による細胞内  $Ca^{2+}$  応答の模式図

抗PIP<sub>2</sub>抗体の免疫反応性は、細胞内のPIP<sub>2</sub>量の変化を反映したものであるというよりも、むしろPIP<sub>2</sub>分子の抗体への近づき易さが変化することによる可能性の高いことが、視細胞において示された。<sup>18)</sup> PIP<sub>2</sub>の加水分解反応で重要な役割を果たすと考えられる様々なタンパク質は細胞膜に結合することが知られており、視細胞ではこれらのタンパク質がPIP<sub>2</sub>分子上の抗体との結合部位をブロックしている可能性が示された。<sup>19)</sup> 従って、小脳発生に伴う抗PIP<sub>2</sub>染色パターンの変化は、PIP<sub>2</sub>とこれらのタンパク質との相互作用が小脳の発生に伴って変化している可能性を示唆しているのかもしれない。そしてこのことが、生後15日目のプルキンエ細胞において観察された抗PIP<sub>2</sub>免疫染色の低下を、説明するものになるかもしれない。ただし、PIP<sub>2</sub>分子がプルキンエ細胞に存在する特異的なタンパク質と相互作用するかどうかは、現時点では不明である。

参考文献

- 1) N. Maeda, M. Ninobe, Y. Inoue and K. Mikoshiba: *Dev. Biol.* 133 (1989)67.
- 2) A. Ogura, K. Akita and Y. Kudo: *Neurosci. Res.* 9(1990)103.
- 3) 工藤佳久: 実験医学別冊「神経生化学マニュアル」(1990)207.
- 4) Y. Kudo, K. Ito, H. Miyakawa, Y. Izumi, A. Ogura and H. Kato: *Brain Res.* 407(1987)168.
- 5) Y. Kudo, A. Ogura, K. Ito, H. Miyakawa and H. Kato: *Biomed. Res.* 9 (1988)153.
- 6) Y. Kudo, E. Ito and A. Ogura: *Excitatory Amino Acids and Neuronal Plasticity*, Y. Ben-Ari (Ed.), Plenum Press, New York, (1990)125.
- 7) J. Altman: *J. Comp. Neurol.* 145(1972)399.
- 8) T. Shimono, S. Nosaka and K. Sasaki: *Brain Res.* 108(1976)279.
- 9) H. Sugiyama, I. Ito and C. Hirano: *Nature* 325(1987)531.
- 10) H. Sugiyama, I. Ito and M. Watanabe: *Neuron* 3(1989)129.
- 11) P. M. Hwang, D. S. Bredt and S. H. Snyder: *Science* 249(1990)802.
- 12) A. J. Irving, J. G. Schofield, J. C. Watkins, D. C. Sunter and G. L. Collingridge: *Eur. J. Pharmacol.* 186(1990)363.
- 13) M. Ito and L. Karachot: *Neuroreport* 1(1990)129.
- 14) M. Ito and L. Karachot: *Neurosci. Res.* 8(1990)303.
- 15) I. Llano, A. Marty, J. W. Johnson, P. Ascher and B. H. Gähwiler: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(1988)3221.
- 16) C. A. Ross, M. W. MacCumber, C. E. Glatt and S. H. Snyder: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(1989)2923.
- 17) C. D. Blackstone, S. Supattapone and S. H. Snyder: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(1989)4316.
- 18) N. D. Das, T. Yoshioka, D. Samuelson, R. J. Cohen and H. Shichi: *Cell Struct. Funct.* 12(1987)471.

19) T. Yoshioka, H. Inoue, N. D. Das and H. Shichi: Inositol Lipids  
in Cell Signaling, R. H. Michell, A. H. Drummond and C. P.  
Downes (Eds.), Academic Press, New York, (1989) 337.

## 第4章 活性化プロテインキナーゼCの局在

### §4-1. PSおよびPKCの免疫組織化学

#### [A] 抗PSモノクローン抗体による免疫染色

##### a) 方法

ラットをペントバルビタールで麻酔し、3%パラホルムアルデヒド・1%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)を、左心室より灌流して固定した。固定した脳を取り出し、同じ固定液に漬けた状態のまま、その後の操作をするまで4℃で保存した。小脳を5%寒天を含むTBS中に包埋し、マイクロスライサーを用いて厚さ50 $\mu$ mのサジタール切片を作製した。これをTBSで十分に洗浄した後、抗体の非特異的な吸着を抑えるために、1%BSA-TBS及び室温で2時間前処理を行ない、抗PSモノクローン抗体(PS4A7;IgM)<sup>1)</sup>を1%BSA-TBSで36 $\mu$ g/mlに希釈して、4℃で24時間以上インキュベートした。次いでTBSで洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識のウサキ抗マウスIgM抗体(Zymed, U.S.A.)を1%BSA-TBSで100倍に希釈したものと、更に室温で2時間反応させた。これを再びTBSで洗浄後、3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩で発色させ、光学顕微鏡で観察した。

また、抗PS抗体の吸収に使用した小径の単層PS-リポソームは、多重層リポソームを超音波処理して作製された。即ち、2.5 $\mu$ molのPSを含む脂質フィルムをTBS中で振とうした後、4℃で5分間、窒素ガス下で超音波処理した。このリポソーム溶液を4℃で10分間、1万gで遠心し、その上清を実験に用いた。

##### b) 結果

生後0日目の小脳切片では、抗PSモノクローン抗体による染色が外顆粒層を除く胚細胞に見られた。プルキンエ細胞が配列し始める

生後3日目になると、抗PS染色はプルキンエ細胞の細胞質にも見られるようになった。生後5日目にはプルキンエ細胞の細胞質と核に強い抗PS染色が現われた。このとき同時に、弱い抗PS免疫反応が小脳の分子層にも見られた。また、外顆粒層にある増殖中の顆粒細胞には抗PS染色が全く見られなかったが、顆粒層の幾つかの細胞にはその細胞質と核に強い免疫反応が見られた。

生後7日目からは、抗PS免疫反応がプルキンエ細胞、バスケット細胞、星状細胞および内顆粒層に移動し終えた顆粒細胞でよく観察された(図4-1a)。生後10日目の抗PS抗体による免疫染色は、ほぼ生後7日目のものと同じパターンを示したが、顆粒細胞の免疫反応性は極端に弱くなっていた。

生後14日目になると、プルキンエ細胞の樹状突起に比べて細胞体の染色が弱くなった(図4-1b)。生後21日目になると、更にその染色が弱くなり、プルキンエ細胞の樹状突起の末端部がわずかに染色されたが、細胞体には全く染色が見られなくなった(図4-1c)。ここで、アルデヒドで固定した各発生段階にある小脳切片から、クロロホルム/メタノール溶液を用いて脂質の抽出を行なってみたが、小脳の発生に伴うPS量の変化は見られなかった。

アダルトラットの脳では、細胞体を除いてプルキンエ細胞が再び強く染色されるようになったが、顆粒細胞には染色が見られなかった(図4-1d)。このアダルトの脳切片を用いて、抗PS免疫反応が組織内のPSと抗PS抗体との抗原抗体反応に基づいたものであるかを確かめるために、PS-リポソームで抗PS抗体を吸収した後に染色を行なった。その結果、全く免疫染色が観察されなくなった(図4-1e)。表4-1は、以上述べた小脳発生における抗PS免疫反応を、まとめたものである。

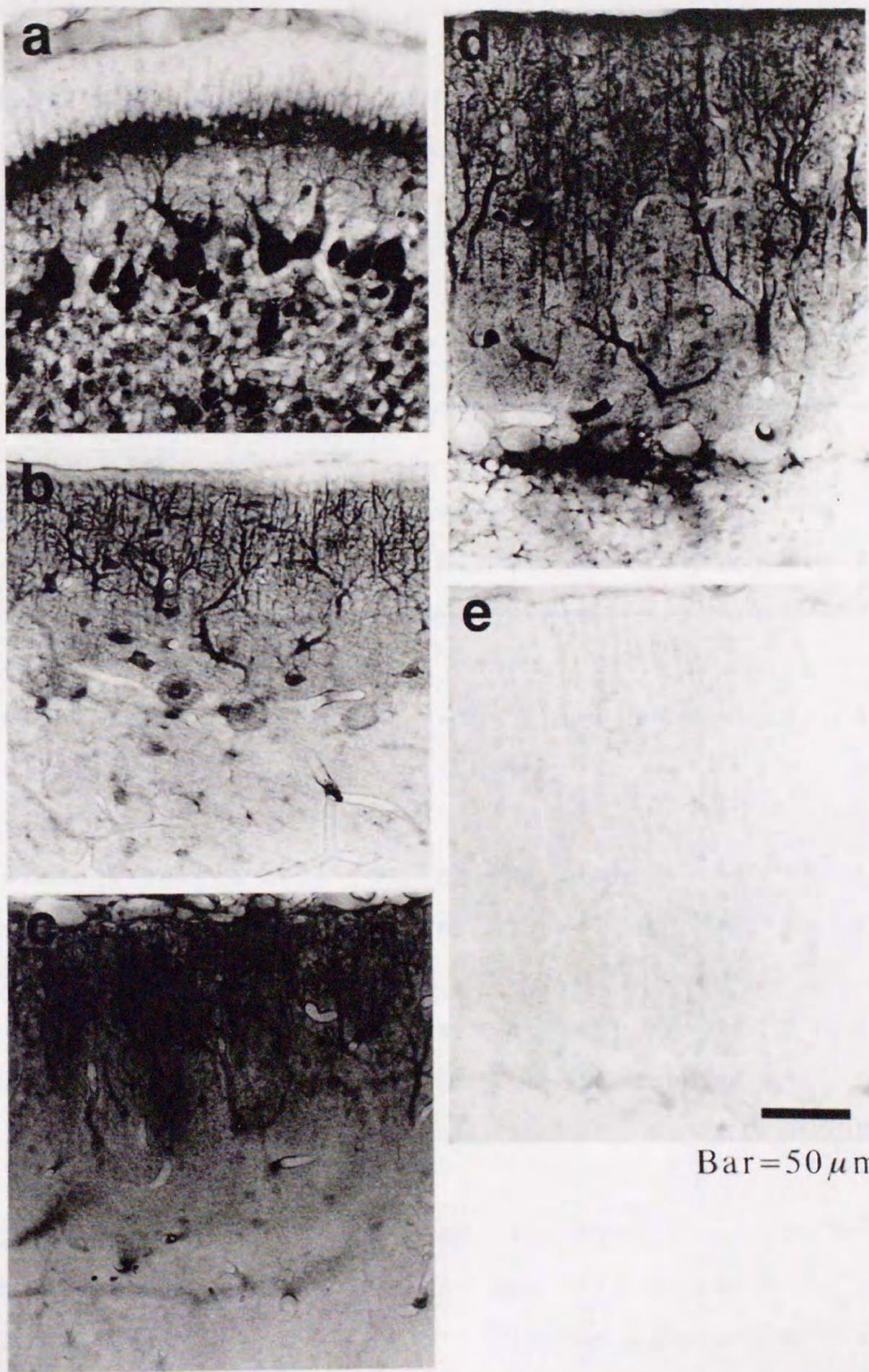


図 4 - 1. 抗 PS モノクローン抗体による小脳各発生段階の染色像

表 4 - 1. 生後発生中の小脳における抗 PS モノクローン抗体による  
各神経細胞の染色性 (n, not identified; -, no reactivity  
; +, weak reactivity; ++, medium reactivity; +++,  
strong reactivity)

Region	PND							
	0	3	5	7	10	14	21	Adult
External germinal layer								
Germinal cell	-	-	-	-	-	-	n	n
Glial fiber	+	+	+	+	-	-	n	n
Molecular layer								
Stellate & basket cell	n	n	n	+++	++	++	+	++
Bergmann fiber	n	n	-	+	+	++	++	++
Purkinje cell								
Dendrite	n	n	n	+++	+++	++	+	+++
Perikaryon	+	++	+++	+++	+++	+	-	-
Axon	n	n	n	n	n	n	n	n
Granular layer								
Granule cell	n	n	+	+++	+	-	-	-
Golgi cell	n	n	n	++	+	+	-	+
Germinal cell	++	++	++	++	++	n	n	n

## [B] 抗 $\gamma$ PKCモノクローン抗体による免疫染色

### a) 方法

ラットをペントバルビタールで麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)を左心室より灌流して固定した。固定した脳を取り出し、同じ固定液に漬けた状態で、その後24時間4℃で保存した。更に、氷晶防止処置として、小脳を30%蔗糖を含むTBS中に数日間4℃で保存した。O.C.T.コンパウンドで包埋した後、クリオスタットを用いて厚さ13 $\mu$ mのサジタール切片を作製し、カバーガラスに張り付けた。これをTBSで十分に洗浄し、更に抗体の非特異的な吸着を抑えるために、1%BSA-TBS及び室温で2時間前処理を行ない、抗 $\gamma$ PKCモノクローン抗体(CKI97-5;IgG)<sup>2), 3)</sup>を正常血清(ABCキット)で200倍に希釈したものと、4℃で24時間以上インキュベートした。次いでTBSで洗浄後、ベクタステインABCキットを用いて染色し、光学顕微鏡で観察した。

### b) 結果

抗 $\alpha$ PKC及び抗 $\beta$ PKC抗体による免疫反応が、小脳のプルキンエ細胞に殆ど見られないことから、<sup>4), 5), 6), 7)</sup>抗 $\gamma$ PKC抗体を用いた免疫染色のみを行なうことにした。ここで得られた結果は、Nishizukaらの研究室で得られたものとよく一致していた。<sup>3)</sup>抗 $\gamma$ PKC抗体の免疫反応は小脳ではプルキンエ細胞に特異的に存在し、その染色パターンは生後3日目からアダルトに至るまで小脳の発生を通じて均一であった。また、生後14日目から21日目にかけて、バスケット細胞及び星状細胞にも抗 $\gamma$ PKC免疫染色が見られたが、アダルトの小脳には見られなかった。生後7日目から21日目にかけては、抗 $\gamma$ PKC抗体による免疫染色により、プルキンエ細胞の樹状突起の樹枝状分岐がはっきりと観察できた(図4-2のa~d)。強い抗 $\gamma$ PKC免疫反応が、生後7日目から14日目までにプルキンエ細胞の軸索に見られたが、生後21日目以降はその染色が殆ど見られなくなっ

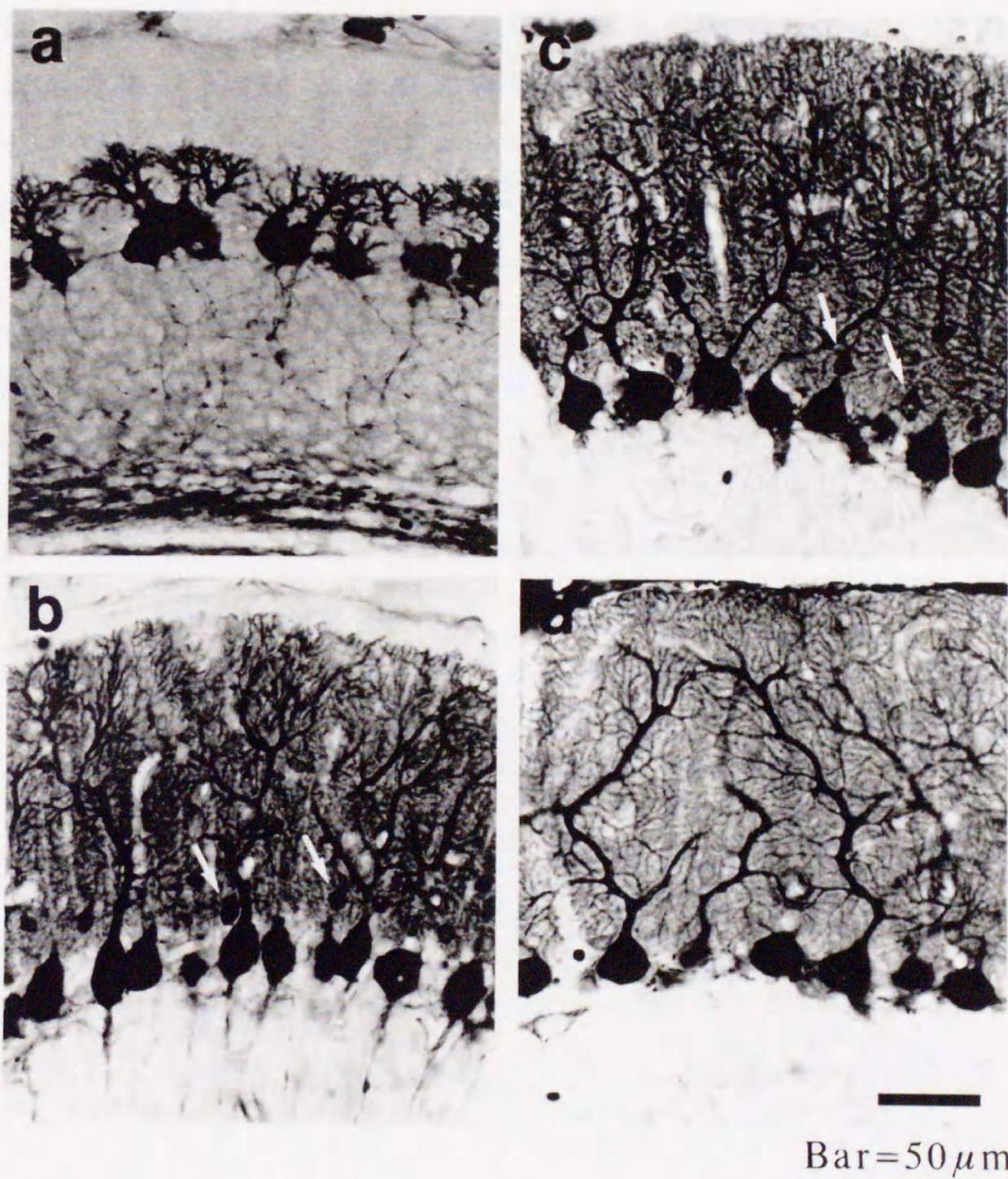


図 4 - 2. 抗  $\gamma$  PKC 抗体による小脳各発生段階の染色像

た。また、プルキンエ細胞の核にも、弱い抗 $\gamma$  PKC 免疫反応が生後3日目からアダルトまで見られた。生後10日目と14日目には、プルキンエ細胞の軸索及びその軸索上にある小さなバリコシティーに、抗 $\gamma$  PKC 染色が観察された。バスケット細胞における抗 $\gamma$  PKC 免疫反応は、生後14日目以降、常に星状細胞よりも強かった。これらの細胞における抗 $\gamma$  PKC 抗体の免疫反応は、その核と細胞質の両方に見られた。

#### § 4 - 2. 小脳発生におけるPKC 活性

##### [A] 方法

ラットをペントバルビタールで麻酔して、小脳を取り出し、それを $O_2/CO_2$  (95%/5%)を通気したACSFに浸しながら、マイクロスライサーで $200\mu m$ のサジタール切片にした。実体顕微鏡下でこの小脳切片から分子層を切り集め、液体窒素中で凍結させた。この小脳分子層を、緩衝液A (20mM Tris-HCl, pH7.2, 10mM  $MgCl_2$ , 2mM EDTA, 10mM EGTA,  $50\mu M$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF),  $50\mu g/ml$  leupeptin,  $2.5\mu g/ml$  pepstatine)でホモジェナイズし、 $2^\circ C$ で1時間、10万gで遠心した。上清を取り除き、残った沈澱を0.1% Triton X-100を含む緩衝液Aで再び懸濁した。PKC活性は、反応液 (20mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM  $MgCl_2$ , 0.5mM  $CaCl_2$ , 0.01% Triton X-100,  $50\mu g$  histone,  $10\mu M$  [ $^{32}P$ ]ATP,  $20\mu g$  PS,  $2\mu g$  diolein)中で、 $100\mu l$ の小脳の酵素サンプルを $25^\circ C$ で15分間反応させて、測定された。 $Ca^{2+}$ とPSに依存しない酵素の活性は、 $Ca^{2+}$ , PS及びdioleinを除き、かつ1mM EGTAを加えた条件下で測定された。酵素反応については、25%トリクロロ酢酸(TCA)を1ml加えることにより、それを停止させた。ここで生じた沈澱をフィルター上に集め、25%TCAで3回洗浄した後、放射活性を測定した。

##### [B] 結果

小脳の発生に伴う抗PS免疫染色パターンの変化及び抗 $\gamma$ PKC免疫染色の結果を考察するために、特に小脳皮質中の分子層におけるPKCの活性を、小脳の発生を追って調べた。その結果によると、PKC活性は生後7日目、14日目、21日目と1週ごとに増加し生後21日目に最大に達したが、アダルトではその活性がかなり減少し、生後14日目のものよりも低くなった(図4-3)。この小脳の分子層におけるPKC活性の変化のパターンは、抗PS抗体による免疫染色の変化のパターンと完全に相反するものであった。

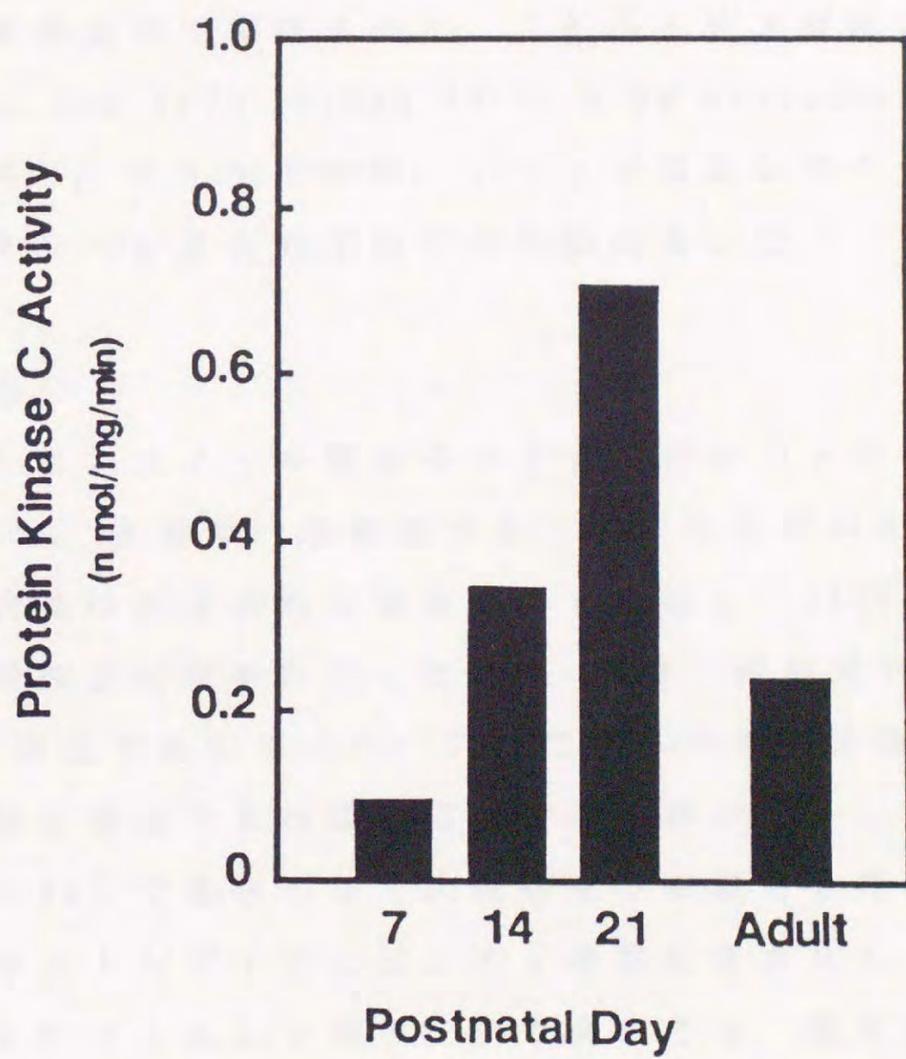


図 4 - 3. 小脳発生に伴う PKC 活性の変化

#### § 4 - 3. 小脳細胞質タンパク質による抗体結合の抑制

##### [A] 方法

###### a) 小脳細胞質タンパク質の調整

ラットをペントバルビタールで麻酔後、左心室より生理食塩水を約50ml 灌流して血液を洗い流した。小脳を取り出してブロック状に細切し、液体窒素中で凍結させた。これをトリス緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.4, 1mM EGTA, 200mM PMSF, 0.3% mercaptoethanol)でホモジェナイズし、2℃で1時間、10万gで遠心してその上清を回収し、細胞質タンパク質として以下の実験に用いた。

###### b) ELISA 法<sup>8)</sup>

PS の10 $\mu$ M のエタノール溶液をマイクロプレートの各ウェルに50 $\mu$ l ずつ入れて、室温で一晩放置することにより溶媒を完全蒸発させた。次に、抗体の非特異的な吸着を防ぐために、3%BSA-TBS 溶液及び室温で2時間前処理を行なった後、小脳の細胞質タンパク質100 $\mu$ l を加えて室温で反応させた。TBS でウェルを洗浄後、抗PS モノクローン抗体と室温で2時間反応させた。再びプレートをTBS で洗浄後、1%BSA-TBS で希釈した2次抗体及び室温で2時間、更にペルオキシターゼストレプトアビジンで1時間反応させた。TBS で洗浄後、最終的に0-フェニレンジアミンで発色させ、吸光度(490nm)を測定した。

##### [B] 結果

PKC の活性化の条件は、細胞質中のPKC がトランスロケートし膜のPS と結合することである。従って、PKC の活性の高い生後14日目及び21日目の段階で抗PS 染色が弱くなるのは、PKC が細胞膜のPS と結合したために抗PS 抗体がPS と結合できなくなつて、染色性が

低下したものと推測される。

そこで、PKC を始めとする小脳の細胞質タンパク質が、PS と抗PS 抗体との結合に対して抑制効果を持つかどうか、それをELISA 法で調べた。PS と抗PS 抗体との反応より前に細胞質タンパク質をELISA の反応系に入れると、PS と抗PS 抗体との結合が細胞質タンパク質の濃度に依存して抑制された。室温におけるこの反応系の最適条件を見つけるために、細胞質タンパク質の反応時間を変えて実験を行なった。その結果、図4-4に示したように、10分間の反応時間で充分であることが分かった。細胞質タンパク質によるPS と抗PS 抗体との結合の抑制は、生後7日目と21日目の小脳の細胞質タンパク質を用いて調べられた。その理由は、図4-3に示したように、生後7日目と21日目ではそのPKC 活性に大きな差があることから、組織中あたりのPKC 量に差があると考えられるからである。その結果、図4-5に示したように、PKC の存在量が多いと思われる生後21日目の小脳の細胞質タンパク質により、生後7日目のものよりも強く抑制がかかることが分かった。このことから、小脳の細胞質タンパク質に含まれるPS 結合分子は、PS 分子のエピトープをブロック出来ることが、分かった。更に、PKC はPS と抗PS 抗体との結合を抑制し得る第一の候補である、と推測された。

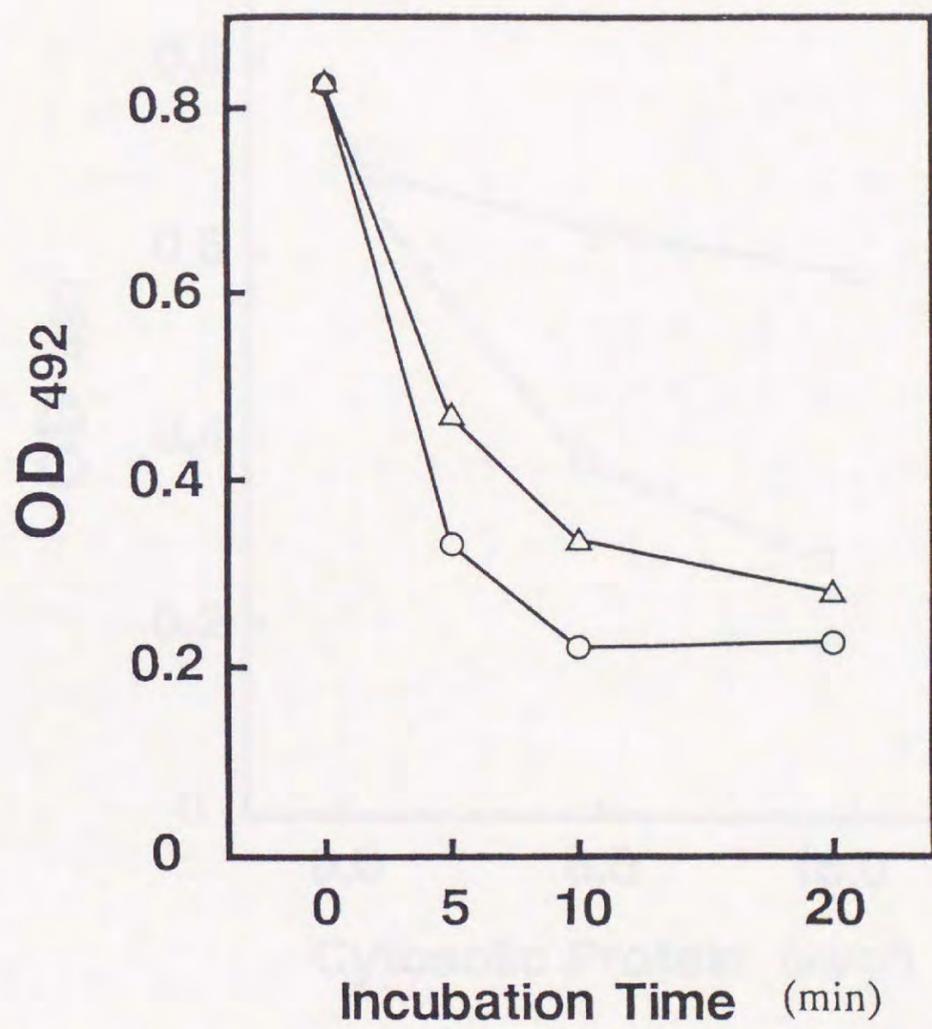


図 4 - 4. 小脳細胞質タンパク質による抗原抗体反応の抑制  
 (細胞質タンパク質 5 $\mu$ g/ml:Δ, 10 $\mu$ g/ml:○)

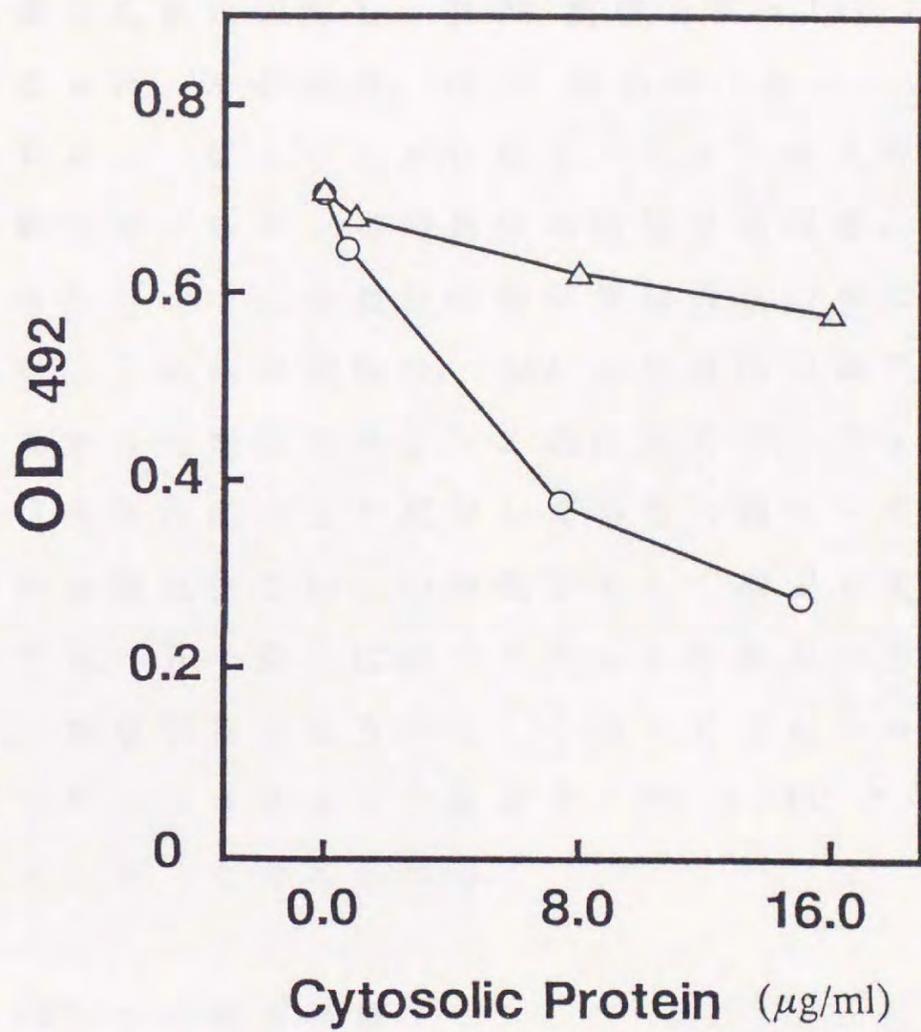


図 4 - 5. 生後 7 日目と 21 日目の小脳細胞質タンパク質による抗原抗体反応の抑制効果の比較 (生後 7 日目:  $\Delta$ , 生後 21 日目:  $\circ$ )

#### § 4 - 4. PS と PKC との相互作用

##### [A] PMA 処理後の小脳における免疫染色

PS と抗 PS 抗体との結合を阻害しているものが PKC であることを確かめるために、アダルトラットを PMA (200nM) を含む生理食塩水で 10 分間灌流した後に固定し、抗 PS 抗体と抗  $\gamma$  PKC 抗体を用いて免疫染色を行なった。その結果、抗 PS 染色のパターンは著しく変化した (図 4 - 6 a)。図 4 - 1 d と図 4 - 6 a とを比較すると、PMA 処理後の小脳ではプルキンエ細胞の細胞体と顆粒層に強い免疫反応が見られ、またプルキンエ細胞の樹状突起の太い幹にもかなりの染色が見られた。これらの部位は、PMA 未処理の小脳では染色がほとんど見られなかった部位である。これに反して、抗  $\gamma$  PKC 抗体による免疫反応は全体的にかなり減少しており (図 4 - 6 b)、特にプルキンエ細胞の細胞体の部分の染色が著しく減少していた。しかし、PMA 処理後でも、分子層中にはバスケット細胞及び星状細胞に相当する細胞に、免疫染色が見られた。これらのことから、PMA は PKC をトランスロケートさせることにより、PS と PKC との相互作用の程度を調節している、と考えられる。

##### [B] PS と PKC との相互作用

§ 4 - 3 の図 4 - 4 と 4 - 5 に示されたように、PS と抗 PS 抗体との結合は小脳細胞質タンパク質によって、かなり抑制されることが分かった。この結果から、図 4 - 1 ではなぜ PS がプルキンエ細胞に局在しているように見えるのか、その理由を説明出来るかもしれない。つまり、この PS 染色の濃さは組織中の PS 量を反映したものではなく、むしろ PS と PS 結合タンパク質との相互作用の程度を反映したものである、と示唆される。

これまで、多くの研究者により PS 結合タンパク質が同定されてお

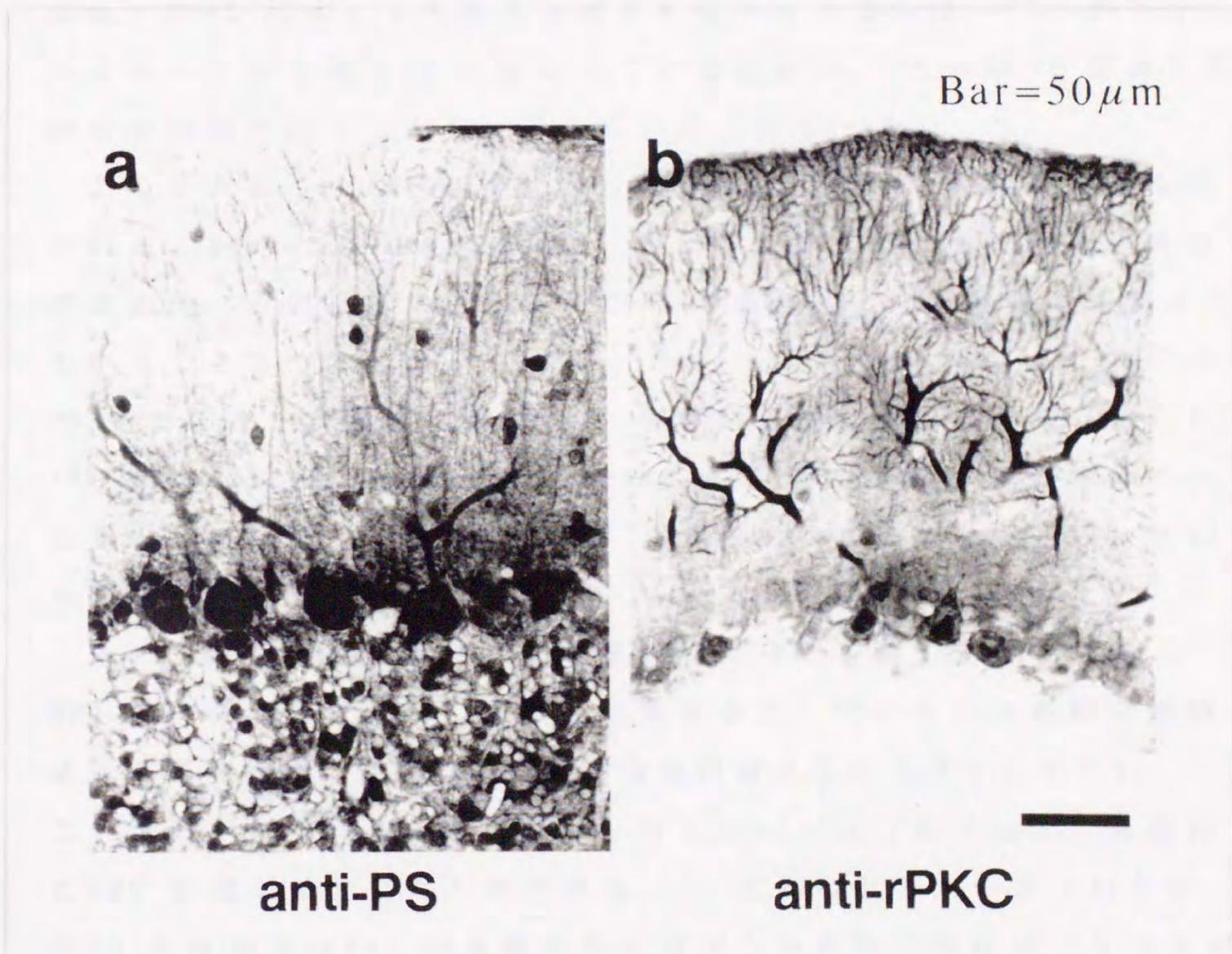


図 4 - 6. PMA 処理後のアダルトラット小脳のア PS 染色 ( a ),  
及び抗  $\gamma$  PKC 染色 ( b ).

り、これらのPS結合タンパク質がPSと抗PS抗体との結合を抑制できる可能性が、示されて来た。<sup>9)・10)・11)</sup> また、PS結合タンパク質の最も明らかな第一の候補はPKCである。このことから、図4-1に示した抗PS染色パターンは、組織内でのPSとPKCとの相互作用が小脳の発生段階により変化したことを示している、と考えられる。即ち、抗PS抗体により余り染色されなかった部位は、PKCがトランスロケートして膜のPSと結合しているために、PSと抗PS抗体との結合が抑制されたことを、示している(図4-7)。

このことは、他の研究者によって得られた実験的証拠により支持される。NewtonとKoshlandは、自己リン酸化と基質リン酸化の反応速度が、その反応系に含まれるPSの量によって特効的に調整されていることを、示した。<sup>12)</sup> また、BazziとNelsestuenは、PKCがPSを含んだリン脂質小胞にCa<sup>2+</sup>依存的に結合することを、示した。<sup>13)</sup> 更に、K.-P. HuangとF.L. Huangは、PSがPKCの調節ドメインに選択的に結合し、その結果PKCを活性化させることを、見出した。<sup>14)</sup>

また、この説明は図4-6の結果によっても強く支持される。PMAでアダルトラットの小脳を処理すると、プルキンエ細胞の細胞体とその周囲で、特にPKCの免疫染色が減少した(図4-6b)。これはPMAによるPKCのダウンレギュレーションによって、細胞内のPKCの量が減少したためである。<sup>15)</sup> と思われる。一方このとき、抗PS免疫染色はPKCの免疫染色が減少した部位で特に強くなっている。ここで示したすべての結果は、抗PS抗体とPKCがPS分子上の同じ領域を競合的に認識していることを、示唆している。また、PMA処理後の小脳では、顆粒細胞も抗PSモノクローン抗体により染色された。顆粒細胞にはプルキンエ細胞と異なる分子種のPKCが存在していることが報告されていることから、<sup>7)・16)</sup> 生後14日目以降の顆粒細胞ではPSとPKCが結合し、PKCが活性化されている、と考えられる。従って、抗PS抗体で染色されない部位の所在を調べることにより、組織におけるPKCの活性化部位を推定出来ることになる。

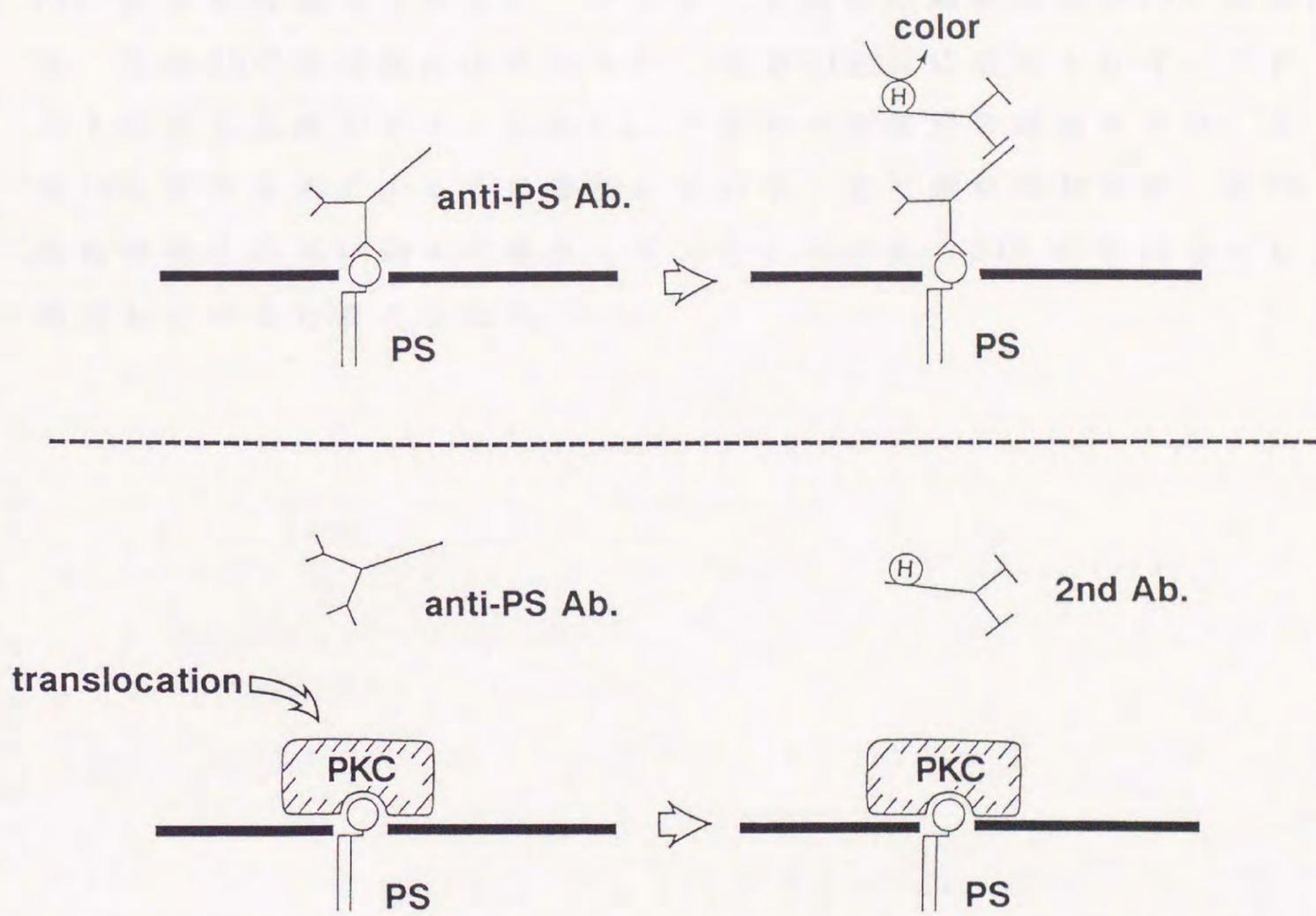


図 4 - 7. 活性化 PKC による抗 PS 染色抑制の模式図

以上の結果から、抗PS抗体による免疫染色の弱い所は、PSとPKCとの相互作用が強い所を示し、抗PS抗体による免疫染色の強い所は、PSとPKCとの相互作用が弱い所を示している、と結論される。こうして、PKCの活性を抗PKC抗体ではなく抗PS抗体の染色の強さで推定出来ることが分かった。

そこで、図4-1及び表4-1の結果から、発生中の小脳皮質のPKC活性を推定してみると、プルキンエ細胞の樹状突起のPKC活性は、生後14日目以降に活性化され、生後21日目に最大となり、アダルトになると減少する。しかし、プルキンエ細胞の細胞体では、生後14日目からアダルトまで増加している。また顆粒細胞では、抗PS染色が発生に伴い徐々に減少していることから、PKC活性は徐々に増加していると考えられる。

参考文献

- 1) M. Umeda, K. Igarashi, K. S. Nam and K. Inoue: *J. Immunol.* 143  
(1989)2273.
- 2) T. Kitano, T. Hashimoto, U. Kikkawa, K. Ase, N. Saito, C. Tanaka,  
Y. Ichimori, K. Tsukamoto and Y. Nishizuka: *J. Neurosci.* 7  
(1987)1520.
- 3) T. Hashimoto, K. Ase, S. Sawamura, U. Kikkawa, N. Saito, C. Tanaka  
and Y. Nishizuka: *J. Neurosci.* 8(1988)1678.
- 4) A. Ito, N. Saito, M. Hirata, A. Kose, T. Tsujino, C. Yoshihara,  
K. Ogita, A. Kishimoto, Y. Nishizuka and C. Tanaka: *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci. USA* 87(1990)3195.
- 5) K. Hosoda, N. Saito, A. Kose, A. Ito, T. Tsujino, K. Ogita,  
U. Kikkawa, Y. Ono, K. Igarashi, Y. Nishizuka and C. Tanaka: *Proc.*  
*Natl. Acad. Sci. USA* 86(1989)1393.
- 6) N. Saito, A. Kose, A. Ito, K. Hosoda, M. Mori, M. Hirata, K. Ogita,  
U. Kikkawa, Y. Ono, K. Igarashi, Y. Nishizuka and C. Tanaka: *Proc.*  
*Natl. Acad. Sci. USA* 86(1989)3409.
- 7) F. L. Huang, Y. Yoshida, H. Nakabayashi, W. S. Young III and  
K. -P. Huang: *J. Neurosci.* 8(1988)4734.
- 8) M. Umeda, I. Diego, E. D. Ball and D. M. Marcus: *J. Immunol.* 136  
(1986)2562.
- 9) M. Wolf and N. Sahyoun: *J. Biol. Chem.* 261(1986)13327.
- 10) A. C. Rybicki, R. Heath, B. Lubin and R. S. Schwartz: *J. Clin.*  
*Invest.* 81(1988)255.
- 11) M. A. Kaetzel, P. Hazarika and J. R. Dedman: *J. Biol. Chem.* 264  
(1989)14463.
- 12) A. C. Newton and D. E. Koshland Jr: *J. Biol. Chem.* 264(1989)  
14909.
- 13) M. D. Bazzi and G. L. Nelsestuen: *Biochemistry* 26(1987)115.

- 14) K. -P. Huang and F. L. Huang: J. Biol. Chem. 265(1990)738.
- 15) K. Ase, N. Berry, U. Kikkawa, A. Kishimoto and Y. Nishizuka: FEBS Lett. 236(1988)396.
- 16) K. Ase, N. Saito, M. S. Shearman, U. Kikkawa, Y. Ono, K. Igarashi, C. Tanaka and Y. Nishizuka: J. Neurosci. 8(1988)3850.

## 第5章 本論文の要旨と結論

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を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して情報処理を行な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、中枢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・分化及び機能に関わる分子機構の研究が、盛んに行なわれて来た。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結合性を示すものの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、PKCや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来た。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と伝達される。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IP<sub>3</sub>とDGが同時に産生される。水溶性のIP<sub>3</sub>は細胞質中に遊離し、細胞内Caストアー上のIP<sub>3</sub>受容体上に結合してCa<sup>2+</sup>を細胞内に動員し、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度の上昇により種々のCa依存性

酵素が活性化させる。一方、DGは $\text{Ca}^{2+}$ と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作用により、細胞は刺激に応じた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なわれて来た。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、Mikoshiharaらにより、プルキンエ細胞から、 $\text{IP}_3$ 受容体でありCaチャンネルでもあるタンパク質 $\text{P}_{400}$ が分離・精製された。そして、この $\text{P}_{400}$ 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、また脳内の他の領域にも存在することが示された。更に、Nishizukaらを始めとする多くのグループにより、PKCは10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 $\text{PIP}_2$ 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もあって、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、更にその情報伝達機構が脂質とタンパク質との相互作用の上に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なう必要がある。従来、 $\text{PIP}_2$ の定量的解析は、放射性同位元素の使用や、 $\text{PIP}_2$ 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なわれて来た。しかしこれらの方法では、個々の細胞レベルにおける $\text{PIP}_2$ 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*で行なわなければならないために、*in vivo*での $\text{PIP}_2$ の機能は、単に推測されるのみであった。これらの問題を解決するためには、 $\text{PIP}_2$ に対する抗体を用いた免疫組織化学的手法による解析が、大変有効である。そこで、Yoshiokaらにより、 $\text{PIP}_2$ 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、 $\text{PIP}_2$ の局在及び $\text{PIP}_2$ 量の時間的変化が測定された。

しかしこの抗体は、PIP やPA などの他の酸性リン脂質にも交差反応性を示すなど、PIP<sub>2</sub>に対する反応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。PIP<sub>2</sub>は、その分子量が小さいことや、それが実際に生体内に存在する物質であることなどから、抗原性が低く、抗体が非常に産生され難い。そこで、免疫方法としては、従来糖脂質の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という方法を用いた。更に、ハイブリドーマのスクリーニング及び抗体の反応性の検討には、補体依存性リポソーム崩壊反応を利用したリポソームアッセイを確立し、それを用いた。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(12クローン)を作製することに成功した。これは、サルモネラ菌を利用した免疫方法の抗原性が非常に高く、被免疫マウスの免疫反応性を効果的に高めることが出来たことによる、と考えられる。更に、スクリーニングに用いたリポソームアッセイが、抗原である脂質を生体内に存在する時と同じ脂質二重層に組み込み、リン脂質のエピトープである極性頭部を確実に抗体に提示することが出来たために、抗体の反応特異性の検討を厳密に行なうことが出来たことによる、と考えられる。

次に、得られた抗体を用いて、イノシトールリン脂質情報伝達系におけるPIP<sub>2</sub>と、細胞内Ca<sup>2+</sup>動員系との関連性を証明することを試みた。まず、得られた抗PIP<sub>2</sub>抗体と、細胞内Ca ストアーに存在するIP<sub>3</sub>受容体でありCa チャネルでもあるP<sub>400</sub>の抗体を用いて、発生段階にある小脳切片を免疫染色した。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>抗体によって染色された部位と、Gタンパク質共役型グルタミン酸受容体アゴニストであるQA による細胞内Ca<sup>2+</sup>動員部位とが非常に良く一致すること、また抗PIP<sub>2</sub>染色が低下していた生後15日目の小脳では、

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員も減少していることが分かった。一方、Ca チャネルである  $\text{P}_{400}$  の染色性には、小脳発生に伴う変化が見られなかった。これらのことから、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  動員は細胞内 Ca ストアーに存在する Ca チャネルではなく、 $\text{PIP}_2$  量に依存していることが示され、 $\text{PIP}_2$  と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員との直接的関連性が証明された。また、このとき Ca チャネル共役型グルタミン受容体アゴニストである NMDA による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を調べたところ、小脳の発生の進行に伴って、その応答部位が顆粒層に集約して行くことが分かった。その結果、生後 21 日目の小脳皮質では、QA と NMDA による  $\text{Ca}^{2+}$  応答部位が、それぞれ分子層と顆粒層に完全に分かれていることが、明らかになった。

更に、イノシトールリン脂質情報伝達系におけるもう一方の情報の受け手である PKC について、PS との相互作用及びその活性化を、それらに特異的なモノクローン抗体を用いて検討した。発生中の小脳における抗  $\gamma$  PKC 抗体による染色性は、常にプルキンエ細胞に存在し、小脳発生における変化は見られなかった。一方、プルキンエ細胞における抗 PS 染色は、生後 7 日目から生後 21 日目にかけて減少し、その後アダルトになると再び染色性が上昇するパターンとなった。また、発生中の小脳の分子層における膜画分の PKC 活性を測定すると、それは生後 7 日目から上昇して生後 21 日目に最大となり、アダルトでは再び減少するという、抗 PS 抗体による染色性と完全に相反的なパターンを示した。更に、PS と PKC との相互作用を明らかにするために、小脳を PMA で処理することにより、細胞内に存在する PKC をダウンレギュレーションさせた後に、PKC と PS の抗体を用いて染色を行なった。その結果、抗 PKC 染色が全体的に減少したのと対照的に、抗 PS 染色の染色性が上昇し、PMA 未処理の小脳では見られなかった部位にも、抗 PS 染色が見られるようになった。これは、PKC が活性化されている所では、膜にトランスロケートした 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による、と考えられる。これらの結果から、抗 PS

抗体による染色性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。

以上に述べたように、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、かつ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。

これらの実験結果については、注目しておくべき点がある。それは、抗体による免疫反応性とこれに関連した細胞応答との関係が、PIP<sub>2</sub>とPSとでは全く逆の関係にある、ということである。本研究では、小脳のプルキンエ細胞の発生段階において、抗PIP<sub>2</sub>染色と細胞内Ca<sup>2+</sup>動員機構が同調関係にあるが、抗PS染色とPKCの活性化は相反関係にあることが示された。これは、PIP<sub>2</sub>-Ca<sup>2+</sup>動員の関係とPS-PKC活性化の関係が、それぞれ異なることによるのかもしれない。ここで忘れていけないのは、脂質がタンパク質の固定剤であるアルデヒドによって固定されないことである。従って、組織中に留まっている脂質は、その脂質と相互作用する周囲のタンパク質に依存しており、免疫染色性の変化は脂質とタンパク質との相互作用の程度を反映したものである。そこで、このような視点から、PIP<sub>2</sub>-Ca<sup>2+</sup>動員の関係とPS-PKC活性化の関係を考えてみると、PIP<sub>2</sub>と相互作用する第一の候補はPLCと考えられる。PLCはPIP<sub>2</sub>に作用して、細胞内にCa<sup>2+</sup>を動員させるIP<sub>3</sub>を産生させる。従って、PIP<sub>2</sub>とPLCとの相互作用が強いとき、即ちPIP<sub>2</sub>が組織に留まり、抗PIP<sub>2</sub>染色が見られるときには、細胞内にCa<sup>2+</sup>を動員することが可能になる、と考えられる。これは実験結果とも良く一致している。一方、PSと相互作用する最も有力な候補はPKCである。PKCは細胞内をトランスロケートし、PSと結合することによって活性化される。従って、PIP<sub>2</sub>の場合と同様に考えるならば、PKCが活性化されている部位では組織中にPSが留まり、抗PS染色が見られる筈である。しかし、実験結果は全く異なり、抗PS染色の見られる所では、逆にPKCの活性化レベルが低く、更にPKCがPSに結合していると、抗PS抗体がPSに

結合出来ないことも分かった。このことは、PS と相互作用するタンパク質がPKC 以外にも存在していることを、示している。実際、PS 結合タンパク質と呼ばれるものが、現在までに多く同定されており、それらはAnnexin (I ~ VIII) として一群のファミリーを成している (表 5 - 1)。<sup>1)</sup> またAnnexin 以外にも、トランスミッター放出機構に係わるSynapsin I<sup>2)</sup> や、血液の凝固因子第VIII因子<sup>3)</sup> などのPS 結合タンパク質は、生体内で重要な生理機能を担っていることが予想される。

こうした脂質に関する免疫組織化学的問題点を解決するために、脂質を直接固定しようとする試みが、他の研究室で行なわれている。Yamashima らは、タンニン酸を含むアルデヒド溶液により、直接脂質を固定出来ることを示している。<sup>4), 5)</sup> また、van Meer らは、アルデヒド溶液で固定した組織を $-80^{\circ}\text{C}$ 前後の超低温で樹脂に包埋する凍結置換法と低温包埋剤とを組み合わせ、超低温のまま薄切することにより脂質を組織中に留めておくことに成功した。そして、これにポストエンベッティング法を適用することにより、電子顕微鏡で脂質の局在を明らかに出来ることを示した。<sup>6)</sup> 事実、本研究で作製された $\text{PIP}_2$ に対するモノクローン抗体を用いてMDCK 細胞が染色され、細胞内における $\text{PIP}_2$ の局在が電子顕微鏡で明らかにされている。<sup>7)</sup> 今後、これらの方法を用いて脂質の局在を直接観察することにより、細胞の生理機能や情報伝達における脂質の関与を、更に詳しく解析することが出来るであろう。

また、免疫組織化学における最大のweak point は、生きた組織や細胞における物質の局在を観察できない所にある。筆者は第4章において、抗PS 抗体を用いた免疫染色により、活性化PKC の局在を細胞レベルで推定出来ることを示した。しかし、この活性化PKC の局在は、動物を固定した時点でのものである。従ってこれでは、細胞外からの刺激受容時における応答を、第3章における細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定のようにリアルタイムで測定出来ないのも、情報伝達系のようなダイナミックな細胞内応答を調べる研究には不十分である、と

表 5 - 1. Annexin の分類 (文献 1) より)

Calcium/phospholipid-binding proteins				
Annexin	I	II	III	IV
Previous terminology	Lipocortin I p35 Calpactin II Chromobindin 9 GIF	Calpactin I Lipocortin II p36 Chromobindin 8 Protein I PAP-IV	Lipocortin III PAP-III 35- $\alpha$ Calcimedlin	Endonexin I Protein II 32.5K Calelectrin Lipocortin IV Chromobindin 4 PAP-II PP4-X 35- $\beta$ Calcimedlin
Annexin	V	VI	VII	VIII
Previous terminology	PAP-I IBC Lipocortin V 35K Calelectrin Endonexin II PP4 VAC- $\alpha$ 35- $\gamma$ Calcimedlin Calphobindin I Anchorin CII	p68, p70, 73K 67K Calelectrin Lipocortin VI Protein III Chromobindin 20 67K Calcimedlin Calphobindin II	Synexin	VAC- $\beta$

思われる。これを解決するためには、生きた細胞におけるPKCの活性化レベル及び活性化部位を観察できる新しい方法を、開発する必要がある。Kuoらは、ダンシル化したPSの蛍光強度が、PKCとの結合によって増加することを、報告した。<sup>8)</sup> このダンシル化-PSという新しいプローブが開発されたことにより、生細胞におけるPKCの活性化をリアルタイムで測定することが可能になるかもしれない。

現在、PKCの分子種は10種類ほど報告されているが、今後も新しい分子種が発見されて行く可能性が大いにある。またPKCの分子種は、その構造と性質から、三つのグループに分類することができ、その中にはCa<sup>2+</sup>及びPSとの結合部位が欠失しているものもあることが分かった(図5-1)。<sup>9)</sup> 更に、PKCの活性化因子であるDGがPIP<sub>2</sub>由来のものばかりではなく、細胞の増殖や分化といった長期的な細胞応答には、むしろPC由来のDGのほうが多いことが、報告されている(図5-2)。<sup>9)</sup> こうしたPKCの分子種の多様性が、身体のあらゆる組織に存在して細胞内の殆どの生理作用に関与するPKCの研究を、なお一層複雑なものにしている。PKCに対する今後の研究は、各組織・各分子種ごとに細分化されて、行なわれるようになるであろう。

また、細胞の刺激受容時の応答(短期的応答)と長期的応答におけるPKCの活性化機構については、それらが互いに異なる可能性が示されているが、一般的にも細胞の応答には短期的応答と長期的応答の2種類があると考えられている。短期的応答は、様々な細胞内情報伝達系により活性化されたキナーゼが、チャンネルタンパク質などの機能タンパク質をリン酸化することによって引き起こされる、と考えられる。一方、長期的応答は、細胞膜において変換された情報が核に伝達され、mRNAが発現して新たな機能タンパク質の合成を引き起こした結果である、と考えられる。細胞の刺激受容からその応答までを解析する細胞内情報伝達系の研究は、最終的には情報の最終伝達先である機能タンパク質のリン酸化、更には新たなタンパク質の合成にまで、その研究範囲を拡大して行くものと予想される。

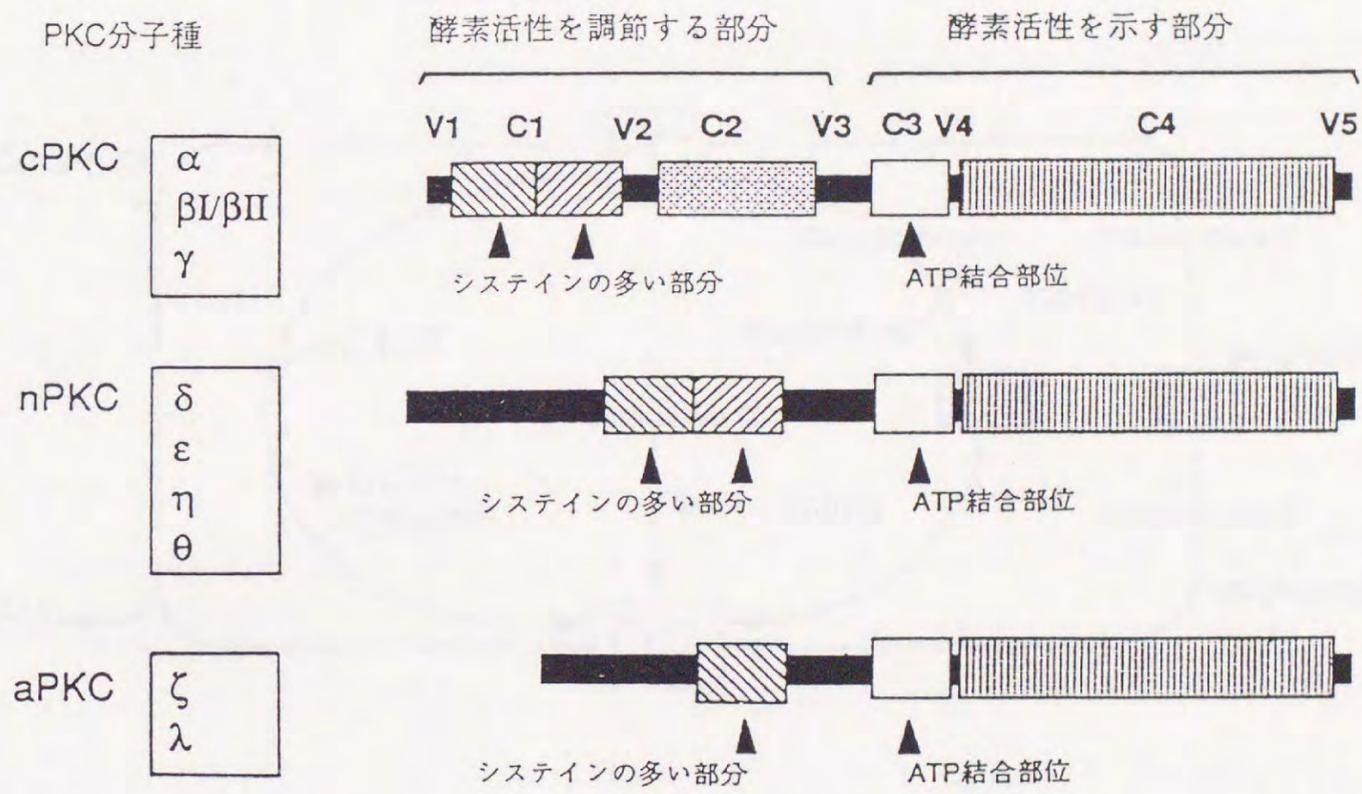


図 5 - 1. PKC 分子種の共通構造模式図 (文献 9) より)

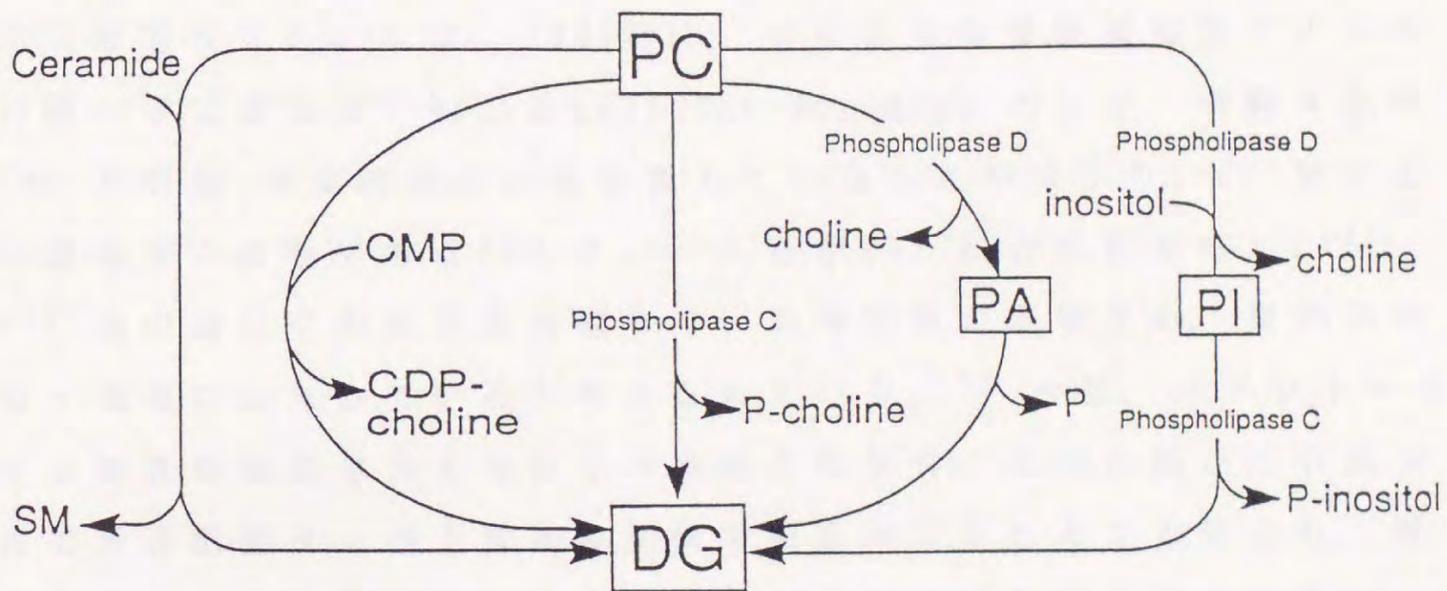


図 5 - 2. PC からの DG 生成経路 (文献 9) より)

現在、PKCを始めとするある種のキナーゼにより特異的にリン酸化される、標的タンパク質の同定が進んでいる。また、遺伝子発現との関係では、イノシトールリン脂質情報伝達系がc-myc遺伝子の発現と関与している、との報告がある。一つは、1985年にMacaraらによって、friend cellをホルボールエステルで分化させたとき、PI turnoverの抑制に引き続いてc-myc発現の減少が起こることが、報告された。<sup>10)</sup> また、1987年にはKubotaらにより、c-mycを発現しているヒトの腎ガンの細胞株では、PI turnover内のCDP-DGの過剰な蓄積が認められ、PI turnoverが抑制されている、と報告された。<sup>11)</sup> そもそもc-mycは、1983年に、にわたりの骨髄細胞腫ウイルスの持つガン遺伝子v-mycのcellular-oncogeneとして、単離された。<sup>12)</sup> その後、中枢神経系にも発現していることが分かり、<sup>13)</sup> 更にこの遺伝子の産物であるMYCタンパク質がDNA結合活性を有し、<sup>14)</sup> <sup>15)</sup> 他の遺伝子の転写を制御している可能性が示唆され、細胞の分化・増殖に関与していると考えられている。<sup>16)</sup> 今後、イノシトールリン脂質情報伝達系と遺伝子の発現との関係、並びに新たに合成されて来る機能タンパク質との関係が明らかにされることにより、短期的応答から長期的応答までを含む細胞内情報伝達系の全体像が、明らかにされることであろう。

最後に、本論文の概要を記して結びとする。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のが、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、本研究を行なうに至った経緯について解説した。次に§1-2では、PIP<sub>2</sub>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)について、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。また、可溶性ハプテンとAM-212との反応性については、リポソームアッセイの抑制効果により検討した。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、各発生段階におけるQA応答及びNMDA応答の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。更に§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。そして§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、細胞内情報伝達系の研究において、モノクローン抗体を用いた免疫組織化学的手法が果たす大きな役割について指摘し、今後の研究の問題点とその解決方法について議論した。

参考文献

- 1) M. J. Crumpton and J. R. Dedman: *Nature* 345(1990)212.
- 2) F. Benfenati, P. Greengard, J. Burunner and M. Bahlar: *J. Cell. Biol.* 108(1989)1851.
- 3) K. G. Mann, R. J. Jenny and S. Krishnaswamy: *Ann. Rev. Biochem.* 57(1988)915.
- 4) T. Yamashima and J. Yamashita: *Acta Neuropathol* 80(1990)255.
- 5) T. Yamashima, J. Yamashita and T. Takahashi: *J. Hirnforsch* 31(1990)795.
- 6) I. L. van Genderen, G. van Meer, J. W. Slot, H. J. Geuze and W. F. Voorhout: *J. Cell. Biol.* 115(1991)1009.
- 7) W. F. Voorhout, I. L. van Genderen, T. Yoshioka, K. Fukami, H. J. Geuze and G. van Meer: *TIGG* 4(1992)533.
- 8) J. M. Rodriguez-Paris, M. Shoji, S. Yeola, D. Liotta, W. R. Vogler and J. F. Kuo: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159(1989)495.
- 9) Y. Nishizuka: *Science* 258(1992)607.
- 10) D. L. Faletto, A. S. Arrow and I. G. Macara: *Cell* 43(1985)315.
- 11) Y. Kubota, T. Shuin, M. Yao, H. Inoue and T. Yoshioka: *FEBS Lett.* 212(1987)159.
- 12) D. Sheiness and J. M. Bishop: *J. Virol.* 31(1979)514.
- 13) C. Ruppert, D. Goldowitz and W. Wille: *EMBO J.* 5(1986)1897.
- 14) T. K. Blackwell, L. Kretzner, E. M. Blackwood, R. N. Eisenman and H. Weintraub: *Science* 250(1990)1149.
- 15) G. C. Prendergast and E. B. Ziff: *Science* 251(1991)186.
- 16) C. V. Dang: *Biochim. Biophys. Acta* 1072(1991)103.

## 謝 辞

本論文を作成するに当たり、大学院博士課程において、終始御指導下さいました早稲田大学理工学部教授・鈴木英雄先生に心から感謝致します。また、本課程における研究を遂行するに当たり、多くの御意見及び御指摘を頂きました早稲田大学人間科学部教授・吉岡亨先生に厚く御礼申し上げます。更に、本研究を行なうにあたり、多くの御指導を頂いた東京大学薬学部助手・梅田真郷先生、並びに三菱化成生命科学研究所・藤田忍室長及び工藤佳久室長に深く感謝致します。最後に、本課程在学中、多大な御協力を頂いた早稲田大学人間科学部・吉岡研究室並びに理工学部・鈴木研究室の皆様にも深く感謝致します。

# 研 究 業 績

種類別	題 名	発 表 年 月 発 行 年 月	発 表 ・ 発 行 掲 載 誌 名	連 名 者
1. 論文 (報文)○	Production and Characterization of Monoclonal Antibodies That Bind to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate	1988. 10	Molecular Immunology	M. Umeda T. Horikoshi K. Yanagisawa T. Yoshioka K. Inoue
(報文)	Developmental Assembly of Calcium-Mobilizing Systems for Excitatory Amino Acids in Rat Cerebellum	1991. 8	Neuroscience Research	E. Ito H. Takagi T. Yoshioka T. Horikoshi K. Yanagisawa T. Nakamura Y. Kudo M. Umeda K. Inoue K. Mikoshiba
(報文)○	Monoclonal Antibody Analysis of Phosphatidylserine and Protein Kinase C Localizations in Developing Rat Cerebellum	1992. 10	Journal of Neurochemistry	H. Inoue T. Yoshioka T. Horikoshi K. Yanagisawa M. Umeda K. Inoue
(総説)	Developmental Study of Signal Transduction in Rat Cerebellar Purkinje Cell	1992. 9	Neuroreceptor, Ion Channels and The Brain (Elsevier Science Publishers, B. V.)	T. Yoshioka E. Ito H. Takagi

# 研 究 業 績

種 類 別	題 名	発 表 行 年 月	発 表 ・ 発 行 掲 載 誌 名	連 名 者
2. 講演	ホスファチジルイノシトール2リン酸(PIP <sub>2</sub> ) 抗体の諸特性とそれを用いたPIP <sub>2</sub> の組織内局 在と濃度変化の検出	1987. 7	脂質生化学研究会 第29回研究集会	吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 志知 均 梅田真郷 井上圭三
	生理活性リン脂質に対するモノクローナル抗 体の作製とその性状解析	1988. 6	脂質生化学研究会 第30回研究集会	梅田真郷 南 景秀 吉岡 亨 井上圭三
	イノシトールリン脂質抗体の作製とその応用	1988. 10	生物物理学会 第26回年会	梅田真郷 吉岡 亨 井上圭三
	抗PIP <sub>2</sub> モノクローナル抗体によるラット小脳 の染色像	1989. 7	脂質生化学研究会 第31回研究集会	吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 梅田真郷 井上圭三
	抗PIP <sub>2</sub> 抗体によるラット小脳内PIP <sub>2</sub> の局在及 びその小脳発生に伴う変化	1989. 10	生物物理学会 第27回年会	吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 梅田真郷 井上圭三
	Localization of Phosphatidylinositol 4,5- Bisphosphate in The Rat Cerebellum	1989. 10	7th International Conference on Cyclic Nucleotides, Cal- cium, and Protein Phosphorylation	T. Horikoshi K. Yanagisawa T. Yoshioka M. Umeda K. Inoue
	抗PIP <sub>2</sub> 抗体による染色像の小脳発生にともな う変化	1989. 10	細胞生物学会 第42回年会	堀越哲郎 柳沢慧二 吉岡 亨 梅田真郷 井上圭三
	抗PIP <sub>2</sub> 抗体による染色像と小脳発生	1989. 10	生理研研究会 「聴覚の比較生理」	堀越哲郎 柳沢慧二 吉岡 亨 梅田真郷 井上圭三

# 研 究 業 績

種 類 別	題 名	発 表 年 月	発 表 ・ 発 行 掲 載 誌 名	連 名 者
	Developmental Changes of PIP <sub>2</sub> -Immunostaining and Glutamate-Response in The Rat Cerebellar Slice	1990. 2	The 25th NIBB Conference on Inositol Phosphates and Ca Signaling	T. Horikoshi K. Yanagisawa E. Ito T. Yoshioka T. Nakamura Y. Kudo
	ラット小脳の発生にともなったPIP <sub>2</sub> 局在の変化	1990. 4	生理学会 第67回年会	堀越哲郎 柳沢慧二 吉岡 亨
	ラット小脳プルキンエ細胞の発生段階におけるイノシトールリン脂質情報伝達系の発現	1990. 7	脂質生化学研究会 第32回研究集会	吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 梅田真郷 南 景秀 井上圭三 御子柴克彦 岸本 明
	ラット小脳発生に伴うPSとPKC-Iの免疫組織化学的局在の変化	1990. 9	生化学会 第63回年会	吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 梅田真郷 五十嵐浩二 井上圭三
	ラット小脳の発生に伴うグルタミン酸受容体アゴニストに対するCa応答部位の変遷及びPIP <sub>2</sub> 局在の変化	1990. 9	生化学会 第63回年会	伊藤悦朗 吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 中村 健 工藤佳久
	小脳プルキンエ細胞におけるIP <sub>3</sub> 情報伝達系の発生生物学的研究	1990. 10	生物物理学会 第28回年会	吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 五十嵐浩二 梅田真郷

# 研 究 業 績

種 類 別	題 名	発 表 年 月	発 表 ・ 発 行 掲 載 誌 名	連 名 者
	ラット小脳の発生に伴うIP <sub>3</sub> 情報伝達系の発現	1990. 12	神経科学学会 第14回集会	吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 五十嵐浩二 梅田真郷 井上圭三 御子柴克彦
	ラット小脳発生に伴うPIレスポンス駆動型 グルタミン酸受容体によるCa <sup>2+</sup> 応答部位の 変化	1990. 12	神経科学学会 第14回集会	伊藤悦朗 高木 博 吉岡 亨 堀越哲郎 柳沢慧二 中村 健 工藤佳久
	Selective Ca Response of Purkinje and Granule Cells to N-Methyl-D-Aspartate and Quisqualate in Developing Rat Cerebellum	1991. 8	Third IBRO World Congress of Neuro- science	E. Ito H. Takagi T. Yoshioka Y. kudo M. Umeda K. Inoue
	ラット小脳プルキンエ細胞におけるホスファ チジルセリンとCキナーゼの相互作用	1991. 10	生化学会 第64回年会	井上宏子 吉岡 亨 梅田真郷 五十嵐浩二 井上圭三
	抗ホスファチジルセリン抗体を用いた活性化 プロテインキナーゼCの可視化の試み	1992. 10	神経化学会 第35回年会	吉岡 亨
	Immunohistochemical Analysis of Signal Transduction System in Developing Rat Purkinje Cell by Using Antibodies for Signaling Molecules	1993. 1	The New York Academy of Sciences	M. Takahashi T. Horikoshi T. Yoshioka

## 研 究 業 績

種類別	題 名	発 表 年 月 発 行	発 表 ・ 発 行 掲 載 誌 名	連 名 者
3. その他 (講演)	Ara-C, MAM処理ラット小脳のグルタミン酸受容体の局在	1991. 9	生物物理学会 第29回年会	伊藤悦朗 吉岡 亨 工藤佳久 御子柴克彦
	ウミウシ感覚情報処理系におけるCキナーゼの局在	1991. 12	神経科学学会 第15回年会	井上宏子 吉岡 亨 D. L. Alkon
	小脳発生に伴う酸性リン脂質局在とc-myc発現の変化	1991. 12	神経科学学会 第15回年会	高橋 恵 吉岡 亨
	ラット小脳プルキンエ細胞のt-ACPD刺激に対する応答	1992. 4	生理学会 第69回年会	高木 博 吉岡 亨 J. de Barry 工藤佳久
	NG108-15細胞の分化誘導に伴うc-MYCタンパク質の変化	1992. 11	生物物理学会 第30回年会	竹下智子 瀧水英行 吉岡 亨
	発生段階のラットプルキンエ細胞におけるc-MYCの発現とイノシトールリン脂質の関係	1992. 12	神経科学学会 第16回年会	高橋 恵 吉岡 亨
	ブラジキニン刺激により誘起されるNG108-15細胞における形態変化に対する分化の効果	1992. 12	神経科学学会 第16回年会	瀧水英行 竹下智子 高木 博 吉岡 亨

理工社謹製