

氏名	つるの 鶴野 瞬 <small>しゅん</small>
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第 3310 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	小脳長期抑圧におけるリン酸化酵素の働き

論文調査委員 (主査) 教授 平野 丈夫 教授 藤吉 好則 教授 森 和俊

論文内容の要旨

神経細胞はシナプスを介して情報伝達を行う。神経細胞の活動履歴に応じて情報伝達効率に変化するシナプス可塑性という現象が、中枢神経系の多くの部位で見出されており、学習の細胞レベルでの基礎過程と考えられている。小脳プルキンエ細胞が平行線維と登上線維から同期した入力を受けると、平行線維—プルキンエ細胞間シナプスにおける伝達効率が長期的に減弱する。この現象は小脳長期抑圧 (LTD) と呼ばれ、運動学習で重要な役割を果たす。

プルキンエ細胞中のプロテインキナーゼ C α (PKC α) は、シナプス後膜上の AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 サブユニットをリン酸化することを介して、小脳 LTD の誘導に関与する。PKC α は Ca²⁺ とジアシルグリセロール (DAG) によって活性化される。したがって、プルキンエ細胞においては、登上線維入力によって流入する Ca²⁺ と、平行線維入力によって産生される DAG が共同して PKC α を活性化すると考えられてきた。そして、PKC α 活性は長期抑圧を引き起こす際に必要であることも知られていた。しかしながら、PKC α の活性が LTD 誘導に加えてその維持にも必要であるかは不明であった。PKC α は活性化する際に細胞質から細胞膜へ移動するため、細胞内局在を観察することによって、その活性状態を推定できる。私は、培養プルキンエ細胞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) と PKC α の融合タンパク質を発現させ、刺激に対して PKC α の局在がどのように変化するかを観察した。細胞に脱分極刺激を与えると、GFP-PKC α は細胞内 Ca²⁺ 濃度依存的に細胞膜へ一過的に移動し、この移動は C2 ドメインへの Ca²⁺ の結合に依存していた。細胞膜透過型 DAG や DAG lipase の阻害剤を投与して細胞膜中の DAG 量を増加させると、C1 ドメインへの DAG の結合に依存して PKC α の細胞膜滞在時間が延長した。これらの結果は、プルキンエ細胞においても、PKC α が Ca²⁺ と DAG によって協調的に活性化されることを示している。脱分極とグルタミン酸投与の組み合わせ刺激をプルキンエ細胞に与えると、LTD が誘導されたが、その際に PKC α は細胞膜へ一過的に移動した後細胞質へ戻り、そこに留まった。この結果から、LTD の維持に PKC α の長期的な活性は必要でないことが分かった。また、PKC α の細胞膜への移動に、平行線維入力を介在する代謝型グルタミン酸受容体 1 (mGluR1) は明らかな影響を及ぼさなかった。このことは、mGluR1 が PKC α 以外の分子を介して小脳 LTD 誘導に関わる可能性を示唆する。

Src ファミリープロテインチロシンキナーゼ (SFK) は、抑制性神経細胞—プルキンエ細胞間のシナプス伝達の長期増強を抑制し、また mGluR1 の下流のシグナル経路にも影響を及ぼすことが知られていた。私は、mGluR1 による小脳 LTD 制御に、SFK が関わっている可能性を考え、検証を行った。mGluR1 の阻害剤を投与すると、LTD の誘導が抑制されたが、同時に SFK の阻害剤を投与することによって回復した。また、細胞内に SFK の一種である Src タンパク質を投与すると、LTD の誘導が抑制された。これらの結果は、SFK が LTD 誘導を抑制することを示し、mGluR1 が何らかのタンパク質のチロシンリン酸化を抑制することによって、LTD 誘導を促すことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経細胞はシナプスを介して情報伝達を行うが、シナプスは神経細胞の活動履歴に応じて情報伝達効率を変化させる。こうしたシナプス可塑性は、学習の細胞レベルでの基礎過程と考えられている。小脳皮質では、唯一の出力神経細胞であるプルキンエ細胞が、平行線維と登上線維から同期した入力を受けると、平行線維—プルキンエ細胞間シナプスの伝達効率が長期間減弱する。この現象は小脳長期抑圧 (LTD) と呼ばれ、運動学習の基盤機構と考えられている。

LTDが引き起こされる際に、プロテインキナーゼC α (PKC α) の活性化が必要であることは以前から報告されていた。しかしながら、LTDの発現・維持におけるPKC α 制御およびそのはたらきの詳細は不明であった。ところで、PKC α はCa²⁺と結合すると細胞膜へ移動し、そこでさらにジアシルグリセロール (DAG)と結合することによって、活性化されることが知られていた。このように、PKC α は活性化する際に、細胞質から細胞膜へ移動するため、細胞内局在を観察することによって、その活性状態を推定できる。申請者は、培養プルキンエ細胞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) とPKC α の融合タンパク質を発現させ、様々な刺激に対してPKC α の局在がどのように変化するかを観察する実験等を行った。その結果、PKC α は細胞内Ca²⁺濃度依存的に細胞膜へ一過的に移動すること、DAG量の増加により、細胞膜滞在時間が延びることがわかった。さらに、LTDが起こる際に、PKC α は細胞膜へ一過的に移動した後、細胞質に戻ることも明らかになった。この結果は、LTDの維持にPKC α の長期的な活性は必要でないことを示している。また、PKC α の移動に平行線維入力を介在する代謝型グルタミン酸受容体1(mGluR1)が明らかな影響を及ぼさないこともわかった。こうしたことから、申請者は、mGluR1がPKC α 以外の分子を介して小脳LTD誘導に関わる可能性を考えた。そして、Srcファミリープロテインチロシンキナーゼ (SFK)が、mGluR1によるLTD制御に関わるという仮説を立て、その検証を行った。その結果、SFKの一種であるSrcタンパク質をプルキンエ細胞内に投与するとLTDが抑制されること、mGluR1を抑制した場合でも、SFKも阻害するとLTDが引き起こせること、がわかった。これらの結果は、SFKが小脳LTD誘導を抑制することを示し、mGluR1がタンパク質のチロシンリン酸化を抑制することによってLTD誘導を促すという可能性が示唆された。

以上のように本論文では、小脳の長期抑圧制御にかかわるリン酸化酵素のはたらきに関する研究を行い、長期抑圧の維持にPKC α 活性の持続が関与しないこと、またSrcファミリープロテインチロシンキナーゼが長期抑圧の発現を抑える作用を有すること、等を示した。これらの知見は哺乳類中枢神経系におけるシナプス可塑性制御の分子機構解明に寄与する重要な成果であると評価できる。したがって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められる。また、論文内容とそれに関連した試問を行い、合格と認めた。