

## 論文の内容の要旨

### 論文題名

タンパク質キナーゼおよび脂質キナーゼによる開口放出制御機構の解析

氏名 青柳 共太

脳では多くの神経細胞がシナプスを介して情報伝達を行っている。シナプスではシナプス小胞に貯蔵された神経伝達物質がシナプス前終末から開口放出機構によってシナプス間隙へと放出され、シナプス後部の受容体に結合することによって情報伝達が行われている。記憶や学習はシナプスにおける神経細胞間の情報伝達効率が可塑的に変化することに起因すると広く考えられている。シナプスにおける情報伝達効率の可塑性はシナプス前終末とシナプス後部で複雑に制御されており、その短期的な制御には様々なキナーゼが関わっていることが知られている。しかしながら、シナプス伝達の可塑性を制御するキナーゼが生体内でどのようにして活性化されるのかについてはほとんどわかっていない。様々なキナーゼの活性は代謝型受容体を介して制御されている。脳内には様々な生理活性を持つ神経ペプチドが数多く存在し、痛覚の伝達、食欲、性周期など生物としての基本的な機能から、記憶・学習などの高次機能にまで深く関与していると考えられている。神経ペプチドの多くは通常、代謝型受容体を介して作用する。従って、神経ペプチドによるシナプス伝達可塑性の制御・調節機構を明らかにすることは脳の高次機能を理解する上で重要である。

神経ペプチドの一種である PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) はラット海馬の神経標本においてシナプス伝達の効率を変化させることや、*Drosophila* において記憶に関わる分子と相同性を持つことから、脳の高次機能に関与することが示唆されている。また PACAP 受容体がシナプス前終末に存在していることや PACAP は膵臓ランゲルハンス島からのインスリン分泌を促

進することが報告されている。これらの報告は、PACAP はシナプス前終末からの開口放出を制御することによりシナプス可塑性に関与していることを示唆しているが、シナプスにおける情報伝達の制御に PACAP がどのように関与しているかについてはほとんど明らかでない。

本論文の第一章では PC12 細胞と培養小脳神経細胞を用いて PACAP の一種である PACAP38 が開口放出に与える影響について研究を行った。PC12 細胞への高濃度 (10 nM) PACAP38 処理は電位依存性 Ca チャンネルを介した細胞内への  $Ca^{2+}$  流入とそれに伴う一過的なドーパミン (DA) 放出を誘導することを確認した。一方、PC12 細胞に従来報告されているよりも低濃度 (0.1 nM) の PACAP38 を作用させると、一過的な DA 放出は観察されなかったが、脱分極刺激依存的な DA 放出が顕著に亢進することを見いだした。低濃度 PACAP38 処理では細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の一過的な上昇は観察されなかった。また、低濃度 PACAP38 処理による DA 放出の増強作用はイオノマイシンによって Ca チャンネルを介することなく細胞内に  $Ca^{2+}$  を導入しても同様に観察されたことから、低濃度 PACAP38 処理の効果は  $Ca^{2+}$  流入以降におこる何らかの過程を変化させることにより、開口放出を制御・調節していると結論した。

低濃度および高濃度の PACAP38 処理による DA 放出の制御・調節に関わる細胞内シグナル伝達系を明らかにするために、protein kiase A (PKA)、protein kinase C (PKC)、MAPK/ERK kinase (MEK) および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の阻害剤としてそれぞれ H-89、bisindolylmaleimide-I (BIS)、U0126 および wortmannin (WM) を用いて実験を行った。高濃度 PACAP38 処理誘発性の DA 放出は H-89、U0126 および WM 処理によって顕著に抑制され、BIS 処理によってわずかに抑制された。それに対し、低濃度 PACAP38 処理によるイオノマイシン刺激誘発性 DA 放出の増強は BIS、U0126 および WM 処理で抑制されたが、H-89 処理では抑制されなかった。従って、低濃度および高濃度 PACAP38 処理の作用に関わる細胞内シグナル伝達系は異なっており、高濃度 PACAP38 処理誘発性 DA 放出には PKA、PKC、MEK および PI3K が関与し、低濃度 PACAP38 処理によるイオノマイシン誘発性 DA 放出の増強には PKC、MEK および PI3K が関与しているが PKA は関与していないと結論した。

培養小脳神経細胞では高濃度 (0.1 nM) PACAP38 処理誘発性グルタミン酸放出は観察されなかった。しかしながら、低濃度 (1 nM) PACAP38 処理では非常にゆっくりとしたグルタミン酸放出と、脱分極刺激依存的なグルタミン酸放出が引き起こされた。

以上の結果から、PC12 細胞において、PACAP38 は処理濃度によって異なる機構により開口放出を制御・調節することを明らかにした。また、中枢神経細胞においても PACAP38 は開口放出の制御・調節に関わっている可能性があるかと結論した。

PACAP 処理による神経伝達物質放出の制御に phosphatidylinositol (PI) をリン酸化する PI3K の関与が見いだされたことは、シナプス伝達において PI のリン酸化代謝がシナプス伝達の可塑性において何らかの重要な役割を果たしていることを示唆している。PI は PI のリン酸化状態依存的に様々な機能分子と結合することにより、多くの細胞機能に深く関与していることが明らかとなっている。これまでに PI のリン酸化状態が開口放出依存的に変化することや、開口放出に至る過程において phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $PI(4,5)P_2$ ) の産生を制御するタンパク質が重要な役割を果たし

ていることが様々な細胞を用いた解析から明らかにされている。さらにシナプス小胞上には PI(4,5)P<sub>2</sub> 結合するタンパク質が存在することから、PI(4,5)P<sub>2</sub> は何らかの PI(4,5)P<sub>2</sub> 結合タンパク質を介して開口放出に関与している可能性が示唆されている。しかしながら PI(4,5)P<sub>2</sub> がどのようにして開口放出を制御しているのかについては明らかでない。

本論文の第二章では PI のリン酸化代謝を制御する脂質キナーゼによる開口放出の制御・調節機構を明らかにするために、PI(4,5)P<sub>2</sub> の細胞膜上における分布と、開口放出部位の相関について研究を行った。その結果、PI(4,5)P<sub>2</sub> は細胞膜上において局所的に集積したマイクロドメインを形成すること、また PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインとシンタキシンの両方と共局在する分泌小胞の数と Ca<sup>2+</sup>依存的な開口放出能に相関が認められることを明らかにした。PC12 細胞の細胞膜のみを二次元的に観察するために、超音波処理により PC12 細胞から分泌小胞を結合した細胞膜(細胞膜シート)を調製し、観察を行った。細胞膜上における PI(4,5)P<sub>2</sub> の分布について調べるために、細胞膜シートを抗 PI(4,5)P<sub>2</sub> 抗体で免疫染色すると、細胞膜シート上に小さなドット状のシグナルが多数観察された。PI(4,5)P<sub>2</sub> に高親和性で結合する PLCδ の pleckstrin homology (PH) ドメインと EGFP の融合タンパク質 (PH-GFP) を用いた場合にも細胞膜シート上および生きた PC12 細胞の細胞膜上にドット状のシグナルが観察されることを見いだした。PI(4,5)P<sub>2</sub> のドット状構造は細胞膜シートに結合している小胞に由来する可能性が考えられる。しかしながら免疫沈降により単離した分泌小胞には抗 PI(4,5)P<sub>2</sub> 抗体の免疫反応性が確認できなかった。以上の結果より細胞膜上には PI(4,5)P<sub>2</sub> が局所的に高濃度で集積した PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインが存在すると結論した。

開口放出における PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインの機能的役割について調べるために、細胞膜シート上における分泌小胞の結合位置と PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメイン、および開口放出に必須なタンパク質であり細胞膜上でクラスターを形成するシンタキシンの位置関係を免疫染色により調べた。細胞膜シート上に検出される分泌小胞の 15~20%が PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインとシンタキシンクラスターの両方と共局在を示した。脱分極刺激を持続的に与えることにより開口放出能を低下させた PC12 細胞から調製した細胞膜シートでは PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインとシンタキシンクラスターの両方と共局在する分泌小胞の数が有意に減少した。一方、PI(4)P から PI(4,5)P<sub>2</sub> を産生する PIP5K を一過的に発現させた PC12 細胞では細胞膜シート上において PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインの数が顕著に増加し、PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインとシンタキシンクラスターの両方と共局在する分泌小胞の数も著しく増加した。さらに PIP5K を発現させた PC12 細胞では Ca<sup>2+</sup>依存的な開口放出が増強すること、また PIP5K 発現による開口放出増強作用は脱分極刺激の強度に依存しないことを明らかにした。

以上の結果に基づき、PC12 細胞の細胞膜上には PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインが存在していると結論した。さらに PI(4,5)P<sub>2</sub> マイクロドメインの形成を時間的・空間的に制御することにより神経伝達物質放出が制御・調節されている可能性があることを結論した。