

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 14 年度博士課程進学

氏 名 平井 孝明

指導教員名 千田 和広

論文題目 新規タンパク質リン酸化酵素 PKC ζ II の同定と機能解析

高等動物は発達した脳を持ち、認知、記憶、感情などの複雑な高次機能を有する。脳の多数の神経細胞同士は、シナプスを介した細胞間相互作用によって神経回路網を形成してこれらの高次機能を司る。機能的な神経回路網はいくつかの独立した段階を経て形成される。新生神経細胞は特定の位置へと移動し、目的の領域へ適切に神経突起を伸展させ、他の神経細胞とシナプスを形成する。神経細胞との間で形成されたシナプスは維持され、更に可塑的变化を受ける。各段階で重要なのは多様な細胞内情報伝達系を介して行われる神経細胞同士の情報交換である。従って高等動物の高次機能の仕組みを分子レベルで理解する上で、神経細胞における細胞内情報伝達機構の解明は必須と考えられる。

重要な細胞内情報伝達分子の一つにプロテインキナーゼ C (PKC) がある。PKC は脂質によって活性調節されるセリン/スレオニンキナーゼで、神経伝達物質や増殖因子などを介した情報伝達に関与している。PKC には 10 種類の分子種が存在し、構造上及び活性化機構の差異から cPKC (α , β , γ)、nPKC (δ , ϵ , η , θ)、aPKC (λ , ζ) の 3 群に分類される。中でも発生初期から中枢神経系において強く発現するのが ζ 分子種である (1)。上皮細胞や脂肪細胞を用いた研究により PKC ζ が細胞極性形成や細胞内小胞輸送に関与することが示されている。しかし神経細胞での PKC ζ の生理機能はほとんど不明である。また同定された当初から、脳では類似した mRNA が

複数存在することが示唆されていることから、PKC ζ には未同定のサブタイプが存在すると考えられた。

本研究では未知の PKC ζ サブタイプを同定し、初代培養系を用いて神経回路形成における PKC ζ の生理機能を検討した。更に PKC ζ 遺伝子欠損マウスを作製し、脳における PKC ζ の機能について分子レベルから個体レベルまで総合的に解析した。

1. 新規 PKC ζ サブタイプ PKC ζ II の単離と同定

成体マウスの各組織における PKC ζ の発現を抗 PKC ζ 抗体を用いて調べた。ほとんどの組織において相対分子質量 75kD の PKC ζ 特異的なバンドを検出した。更に脳では 50kD の特異的なバンドも検出した。この 50kD のタンパク質は脳特異的に発現する PKC ζ サブタイプである可能性が考えられた。そこで PKC ζ -cDNA をプローブとしてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、PKC ζ の触媒領域と同配列を持ち、上流側の制御領域とは異なる配列を持つクローンを得た。このクローンは PKC ζ の偽基質領域のエクソン上流に 300bp の特異的配列を持っていたが、その中には開始コドンは存在しなかった。しかし PKC ζ における 188 番目のメチオニンから翻訳され得る配列を持っていたため、この cDNA を NRK 細胞内で強制発現させたところ 50kD のタンパク質が合成された。これは脳特異的に検出された PKC ζ 低分子型バンドの 50kD と一致した。更に特異的な配列を用いてノザン解析を行ったところ脳でのみ発現していた。そこでこのサブタイプ候補を PKC ζ II とした (2)。粗精製した PKC ζ II は PKC ζ の活性化因子であるホスファチジルセリン非存在下において活性化型 PKC ζ と同等の酵素活性を示した。従って PKC ζ II は PKC ζ の触媒領域のみからなる分子質量が 46,109 の恒常的活性化型キナーゼであると考えられた。

マウス PKC ζ 遺伝子の構造解析から、イントロン 4 の中に PKC ζ II 特異的な単一エクソン (エクソン 1') を見出した。エクソン 1'の上流には CRE 配列が存在し、大脳星状膠細胞 (CAGs) 内で強いプロモーター活性が認められた。CREB を活性化したところ、PKC ζ II のプロモーター活性は約 30%上昇した。PKC ζ II-mRNA の発現は PKC ζ -mRNA のスプライシングによらず、活性化型 CREB による転写調節により制御されると考えられた。

PKC ζ II-mRNA の脳内発現分布を調べるために、成体マウスの脳切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。PKC ζ は脳全体で弱く発現していたが、PKC ζ II は前頭皮質、海馬、小脳プルキンエ細胞で強く発現していた。更に小脳顆粒細胞 (CGNs) と CAGs を用いて細胞レベルでの発現分布を検討した。RT-PCR 法により PKC ζ II-mRNA は CGNs と CAGs の両方で検出された。一方ウエスタン解析で

は PKC ζ II の発現は CGNs でのみ認められた。従って神経細胞特異的な翻訳調節機構もしくは分解抑制機構により PKC ζ II の発現は調節されると考えられた。

PKC ζ / ζ II の細胞内局在を遠心分画法により検討した。PKC ζ はシナプス細胞質画分に多く検出され、核画分とシナプス膜画分にはほとんど検出されず、PKC α 、PKC γ の分画パターンと一致した。一方 PKC ζ II はシナプス膜を含むすべての画分においてほぼ均等に検出された。また海馬錐体細胞 (HPNs) を用いた FLAG タグ融合タンパク質の強制発現系により PKC ζ / ζ II の細胞内局在を検討した。PKC ζ は細胞体、軸索、樹状突起、スパインに均一に検出され特徴的な局在を示さなかった。一方 PKC ζ II は細胞体、軸索、樹状突起に検出されたが、スパインには検出されなかった。シナプス膜画分にも検出されたことから、PKC ζ II は細胞外刺激依存的に樹状突起からスパインへと局在変化する可能性が示唆された。

2. 神経突起伸長、スパイン形成における PKC ζ / ζ II の生理機能解析

PKC ζ は細胞極性タンパク質 Par3 や Par6 と複合体を形成し、Cdc42 の活性制御を介してアクチン繊維の合成や細胞極性形成を制御することが知られている。そこで PKC ζ / ζ II 及びドミナントネガティブ変異体 PKC ζ / ζ II-KN を CGNs に導入し、神経突起伸長に与える影響を検討した。PKC ζ 導入細胞では約 20%、PKC ζ II 及び PKC ζ -KN 導入細胞では約 40%突起伸長が阻害された。一方 PKC ζ II-KN 導入細胞では突起伸長は阻害されなかった。従って神経突起伸長において PKC ζ は Par3/Par6 との複合体を介して Cdc42 を正に制御している可能性が考えられた。また PKC ζ II は PKC ζ とは異なる機構で神経突起伸長を負に制御すると考えられた。

神経突起伸長と成熟ニューロンにおけるスパイン形成では類似の分子機構が存在するため、PKC ζ / ζ II がスパイン形成に与える影響を検討した。培養 5 日目 (DIV-5) の HPNs に遺伝子導入し、DIV-14 に固定、染色により各遺伝子導入細胞のスパインの形態と密度を解析した。スパイン密度に有意な差はなかったが、PKC ζ II-KN 導入細胞のみ細長いスパインの割合が高かった。従って PKC ζ II はスパインの成熟に必須と考えられた。

3. PKC ζ 遺伝子欠損マウスの作製と解析

類似する PKC λ の遺伝子欠損マウスが胚性致死となるため、PKC ζ 遺伝子欠損マウスは Cre/*loxP* 系を用いたコンディショナル法を用いて作製した。また PKC ζ と PKC ζ II が別のプロモーターから転写されることから、活性中心である ATP 結合サイトのエクソン 8 とエクソン 9 を標的とした。発生工学的に作製したキメラマウスから PKC ζ / ζ II^{+/flox} マウスを得た後、全身で Cre を発現するトランスジェニックマウス

スとの交配により PKC ζ / ζ II^{-/-}マウス (PKC ζ / ζ IIKO マウス) を得た。PKC ζ / ζ IIKO マウスはメンデルの法則による期待値通りに発生し、外見、行動、生殖能などに異常は認められなかった。また脳を含め主要な PKC ζ 発現組織に構造上の異常は認められなかった。

胚性 16.5 日目の野生型マウス及び PKC ζ / ζ IIKO マウスの HPNs を培養し、神経突起長を計測したが有意な差はなかった。しかし PKC ζ / ζ IIKO マウス由来 HPNs は野生型に比べて極性形成が正常な細胞の割合が低かった。また DIV-14、DIV-21 の各細胞におけるスパイン密度に差はなかった。しかし PKC ζ / ζ IIKO マウス由来細胞では野生型に比べて未成熟なスパインの割合が高かった。

4. まとめ

本研究では脳特異的に発現する恒常的活性化型キナーゼ PKC ζ II を同定した。一般的にこのようなキナーゼは細胞内で分解されやすいため、神経細胞特異的に発現し PKC ζ II の活性を抑制する分子が存在すると予想される。候補として PKC ζ II に特異的に相互作用する KIBRA を見出している。KIBRA の PKC ζ II に対する作用機構を検討することで、PKC ζ II が神経細胞特異的に機能する仕組みが解明できると思われる。

更に PKC ζ II の生理機能として神経突起伸長とスパイン成熟に関与することを明らかにした。Par3/Par6 との複合体を介して Cdc42 を正に制御することで PKC ζ は神経突起伸長を促進する。一方、PKC ζ II は未知の機構によって神経突起伸長を抑制することが示唆された。最近 PKC ζ II は AMPA 受容体を介して長期増強を維持し、ショウジョウバエでは記憶を増強することが報告された。また、静止シナプスに LTP を誘導すると AMPA 受容体の後シナプス膜への挿入にともなうスパイン成熟を引き起こすことが知られている。スパイン成熟が必須である前頭皮質、海馬、小脳プルキンエ細胞において PKC ζ II が強く発現していたことから、PKC ζ II は AMPA 受容体の膜輸送を促進することでスパイン成熟を正に制御している可能性が考えられた。現在のところスパイン成熟が個体の高次機能に与える影響はほとんど不明である。本研究で得られた PKC ζ / ζ IIKO マウスを用いた動物行動解析などを通して、スパイン形成を中心とした神経細胞の構造と個体の高次機能との関係を解明できると思われる。

(1) Hirai T. and Chida K. *J. Biochem.* **133**, 1-7, 2003.

(2) Hirai T., Niino Y. S. and Chida K. *Neurosci. Lett.* **348**, 151-154, 2003.