

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 平井 孝明

---

本論文は、脳神経のシナプス形成を細胞内シグナル伝達分子プロテインキナーゼ C (PKC) の機能解析から論じたものである。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 10 種類の分子種が存在する。中でも $\zeta$ 分子種は発生初期から中枢神経系において強く発現するが、その生理機能はほとんど不明である。脳では PKC $\zeta$ 類似の mRNA が知られ、未同定のサブタイプの存在が示唆されていた。本研究では新たな PKC $\zeta$ 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 $\zeta$ の生理機能を検討した。更に PKC $\zeta$ 遺伝子欠損マウスを作製し、脳における PKC $\zeta$ 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。論文は序論に続き、二章および総括で構成されている。

序論では、高等動物の認知、記憶、感情などの複雑な高次機能を司る脳について概説し、シナプスを介した細胞間相互作用による神経回路網形成と多様な細胞内情報伝達系を介して行われる細胞同士の情報交換が、脳を理解する上で最も重要と説いている。高等動物の高次機能の仕組みを分子レベルで理解するために、脳特異的に発現するシグナル伝達分子の機能解析の重要性を強調し、本研究の目的を明確に述べている。

第一章は、新規 PKC $\zeta$ サブタイプ PKC $\zeta$ II の単離と同定について論じている。成体マウスでの PKC $\zeta$ の発現を抗体を用いて調べたところ、脳特異的に PKC $\zeta$ よりも低分子のタンパク質を発見した。マウス脳 cDNA ライブラリーから、PKC $\zeta$ 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 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、脳の PKC $\zeta$ 低分子型バンドと一致したため、PKC $\zeta$ II とした。PKC $\zeta$ II はホスファチジルセリン非存在下において活性化型 PKC $\zeta$ と同等の酵素活性を示し、触媒領域のみからなる恒常的活性化型キナーゼであることを明らかにした。

マウス脳切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、PKC $\zeta$ が脳全体で発現しているのに対して、PKC $\zeta$ II は前頭皮質、海馬、小脳プルキンエ細胞で発現していた。RT-PCR 法により、PKC $\zeta$ II-mRNA は小脳顆粒細胞 (CGNs) と CAGs の両方で検出された。一方 PKC $\zeta$ II タンパク質は CGNs でのみ認められた。神経細胞特異的な翻訳調節もしくは分解抑制機構により PKC $\zeta$ II の発現が調節されることを示した。

PKC $\zeta$ はシナプス細胞質画分に多く検出されるが、PKC $\zeta$ 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。海馬錐体細胞 (HPNs) においては、PKC $\zeta$ 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 $\zeta$ II はスパインには検出されず、シナプス膜画分に検出されたことから、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ことが示唆された。

第二章では、神経突起伸長、スパイン形成における PKC $\zeta$ / $\zeta$ II の生理機能について論じている。

PKC $\zeta$ / $\zeta$ II 及びドミナントネガティブ変異体 PKC $\zeta$ / $\zeta$ 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 $\zeta$ 、PKC $\zeta$ II 及び PKC $\zeta$ -KN 導入細胞では突起伸長が阻害されたが、PKC $\zeta$ II-KN 導入細胞では阻害されなかった。PKC $\zeta$ II は PKC $\zeta$ 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。また、PKC $\zeta$ / $\zeta$ II がスパイン形成に与える影響を検討した結果、PKC $\zeta$ 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 $\zeta$ II はスパインの成熟に必須と考えられた。

PKC $\zeta$ 遺伝子欠損 (KO) 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 $\zeta$ 発現組織に構造上の異常は認められなかった。しかし PKC $\zeta$ / $\zeta$ 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 PKC $\zeta$ / $\zeta$ 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。

総括として、PKC $\zeta$ II の神経細胞特異的に機能する仕組みを考察し、スパイン形成と成熟過程の関係を論じている。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強い発現を根拠に、PKC $\zeta$ II が 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するモデルを提起している。

以上、本論文は PKC $\zeta$ / $\zeta$ II が神経細胞のスパイン形成と成熟に関与することを明らかにし、学術上の貢献は少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。