The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	神経組織におけるガングリオシドによる蛋白質リン酸化の調節に関する研究
Author(s)	平井, 圭介
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36369
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【23】

氏名・(本籍)	平井圭介（ひらい けいすけ）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 8566 号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**神経組織におけるガングリオシドによる蛋白質リン酸化の調節に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 中川 八郎 (副査) 教授 福井 俊郎　教授 畠中 寛

論文内容の要旨

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは，広く動物の各組織に存在しているが，神経組織には特に高い含量で存在している。神経組織におけるガングリオシドの分布は部位，または細胞の種類の相違によってその濃度や組成が異なっており，発生や分化のマーカーとして捉えられてきた。しかし，ガングリオシド蓄積症のネコの顕微鏡所見から巨大神経突起や多数の神経突起が生じていることが見いだされたばかりでなく，神経芽腫瘍細胞においても神経突起形成がガングリオシドによって誘導されることが観察されたことから，ガングリオシドの神経細胞分化誘導や神経機能調節作用が注目されつつある。そこで私は細胞内情報伝達の一つである蛋白質リン酸化に及ぼすガングリオシドの効果について検討した。

1. ガングリオシドによるクロム親和性細胞腫ＰＣ１２h におけるＮＧＦ効果の促進と蛋白質リン酸化。

ＰＣ１２h 細胞はＮＧＦの作用によりクロム親和性細胞様の性質から交感神経細胞様の性質に変わる。ガングリオシドＧＭ１とＮＧＦ存在下にＰＣ１２h 細胞を培養したところ，４日後には約６０％の細胞に突起形成がみられた。しかし，ＮＧＦのみでは，突起形成は約４０％の細胞にしか見られなかった。ＰＣ１２h 細胞をガングリオシドＧＭ１とＮＧＦ存在下に６日間培養したところ，チロシン水酸化酵素の比活性はＮＧＦのみに比べて有意に増加した。また，ＰＣ１２h 細胞においてＮＧＦは数種の蛋白質のリン酸化を特異的に促進するが，ガングリオシドＧＭ１存在下にＮＧＦ依存性のリン酸化を測定すると，分子量６０－ＫＤa および３３－ＫＤa の蛋白質のリン酸化が強められることが判明した。しかし，ガングリオシドのみでは，蛋白質のリン酸化は変化しなかった。さらに，抗体を用いた免疫沈降から分子量６０－ＫＤa の蛋白質はチロシン水酸化酵素であると確認された。また，核分画にもＮＧＦ依存性に２２－ＫＤa と１４－ＫＤa の蛋白質にリン酸の取り込みがみられたが，１４－ＫＤa の蛋白質への

リン酸の取り込みのみが強められた。これらの蛋白質リン酸化のガングリオシドによる変化はガングリオシドによるＮＧＦ作用の促進と関連していると考えられる。

2. ラット脳膜画分における蛋白質リン酸化のガングリオシドによる調節

ラット脳膜画分を用いて種々の脂質を加え，内在性の蛋白質を基質にしてリン酸化を行った。その結果，ガングリオシドのみが６２－ＫＤａの蛋白質へのリン酸の取り込みを促進した。精製されたガングリオシドＧＴ１ｂ，ＧＤ１ａやＧＭ１でも同様の効果が見られたが，アシアロＧＭ１，セレブロシドやシアル酸などではこのリン酸化の促進は見られなかった。リン酸化アミノ酸の分析を行うと，この蛋白質は主にセリン残基とスレオニン残基がリン酸化されていた。ガングリオシド依存性の６２－ＫＤａの蛋白質リン酸化はCa^{2+}，ｃＡＭＰ，ホスファチジルセリンやカルモジュリンなどによってほとんど影響を受けなかった。脳の細胞分画を行い細胞内局在を調べたところ，シナプトソーム画分に特に強い活性が認められ，他の画分の活性は弱かった。発生過程では，脳のガングリオシド量が急速に増加する生後２週間頃に急激な活性の増加が観察された。さらにこの内在性の基質である６２－ＫＤａの蛋白質を二次元電気泳動法で分析すると，その等電点は6.8－7.2で，Ca^{2+}，カルモジュリン存在下でも他にスポットが見られないことから，基質となる６２－ＫＤａの蛋白質は多機能性カルモジュリン依存性プロテインキナーゼのβサブユニットであると推定された。このことから，ガングリオシド依存性プロテインキナーゼが脳の膜画分に存在しカルモジュリン依存性プロテインキナーゼを介して機能していることが示唆された。

さらに，ラット脳膜画分よりガングリオシド依存性プロテインキナーゼの分離を試みた。ラット脳膜画分をNonidet Ｐ－４０で可溶化し，ＤＥ５２カラムにかけ，２種のガングリオシド依存性の蛋白質リン酸化活性を得た。さらに種々のカラムクロマトグラフィーを用いてこれらをより高度に精製した。部分精製標品はそれぞれガングリオシドＧＴ１ｂによって約４倍（type Ⅰ）および約６倍(type Ⅱ)に活性化された。両酵素とも合成ペプチド（Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Val）をリン酸化したがヒストンやカゼインはほとんどリン酸化しなかった。しかし，type Ⅱ酵素は微小管蛋白質，特にＭＡＰ２をよくリン酸化した。これらのガングリオシド依存性プロテインキナーゼは基質特異性やｃＡＭＰ，Ca^{2+}，カルモジュリン，ホスファチジルセリンなどでほとんど影響を受けないことから，プロテインキナーゼＡ，プロテインキナーゼＣやカルモジュリン依存性プロテインキナーゼとは異なると考えられた。

以上の結果はガングリオシドが種々の蛋白質リン酸化酵素活性を直接および間接的に調節することにより，神経細胞の分化や神経機能の調節に関与している可能性を示唆するものである。

論文の審査結果の要旨

ガングリオシドは神経組織における主要な糖脂質である。最近，ガングリオシドが神経の分化，修復および神経機能の調節などに関与することが明かにされつつある。その作用に関しては，外部から加えられ

たガングリオシドが速かに細胞膜に取込まれて，そこで機能を発揮すると考えられているが，その機構はほとんど明らかにされていない。

本研究は，ガングリオシドが神経成長因子による神経突起形成，神経伝達物質合成の促進を介する分化の誘導を刺激するのみならず，細胞内の特定のタンパク質のリン酸化を強めることを示した。また，ラット脳膜画分中にガングリオシド依存性タンパク質リン酸化酵素が存在すること，その主要な基質が多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼβーサブユニットであることを示した。

神経組織にガングリオシド依存性タンパク質リン酸化酵素が存在すること，その主要な基質を示した本研究の成果は，神経組織中におけるガングリオシドの役割および作用機構を考える上で重要な知見である。したがって，本研究は理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認められる。