



Title	Tyrosine phosphorylation of a 58kDa protein induced by morphine in SK-N-SH cells
Author(s)	中野, 浩一
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39006">https://hdl.handle.net/11094/39006</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	中野浩一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11768号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Tyrosine phosphorylation of a 58kDa protein induced by morphine in SK-N-SH cells (ヒト神経芽細胞腫細胞(SK-N-SH)においてモルヒネによってチロシンリン酸化される58kDaのタンパク質)
論文審査委員	(主査) 教授 三木直正  (副査) 教授 祖父江憲治 教授 平野俊夫

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

近年オピオイド受容体を介する情報伝達のメカニズムに関する研究が進み、モルヒネが Gi タンパク質に関連したオピオイド受容体に結合することによって細胞内のカリウム、カルシウム、cAMP、および A キナーゼを変化させることが明らかになった。情報伝達系においてチロシンキナーゼが果たす役割について研究が進んで来ているが、モルヒネの情報伝達系ではチロシンキナーゼ関与は明らかではなかった。本研究では、ヒト神経芽細胞腫(SK-N-SH)細胞ライセートを抗ホスホチロシンモノクローナル抗体(PY20)を用いてウエスタンプロットすることによってモルヒネ刺激でチロシンリン酸化される58kDaのタンパク質を見い出した。また、δアゴニストであるDPDPEおよびμアゴニストであるDAGOを用いた実験によって58kDaタンパク質のチロシンリン酸化を惹起する受容体のサブタイプを検討するとともに、百日咳毒素をもちいて58kDaタンパク質のチロシンリン酸化反応と Giとの関連について検討した。

#### 【方法】

ヒト神経芽細胞腫(SK-N-SH)細胞を37°C、10%CO<sub>2</sub>の条件下に90%DMEM、10%FCSで培養した。細胞はRIPA buffer (50mM Tris-HCl [pH7.4], 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10mM ピロリン酸ナトリウム, 10mg/ml aprotinin, 10mg/ml leupeptin, 10mg/ml pepstein, 1 mM PMSF, 1%グリセロール)で可溶化し、12%SDS PAGEの後、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体(PY20)を用いたウエスタンプロットによって解析した。部分精製は、DEAE Sephadexで20mM NaClで溶出されたフラクションをさらにMonoQカラムを用いて塩濃度0-200mMで溶出した。カラムクロマトグラフィーは50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM ピロリン酸ナトリウム, 1 mM PMSFバッファーで行った。58kDaタンパク質のリン酸化実験は、抗c-Raf-1ポリクローナル抗体で沈降させた免疫複合体に、[γ-<sup>32</sup>P]ATPを取り込ませて行った。MAP kinase活性はMBPを基質として抗c-Raf-1ポリクローナル抗体を用いた In vitro phosphorylationによって測定した。

#### 【成績】

モルヒネ100μMでインキュベートしたSK-N-SH細胞のライセートを12%SDS PAGEによって分離し、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体(PY20)を用いたウエスタンプロットを行った。モルヒネ刺激によってチロシンリン酸化される58kDaのタンパク質を見いだした。58kDaのタンパク質のチロシンリン酸化は刺激後5分で誘導され約

30分間持続し、濃度依存性であった。また、このリン酸化反応はナロキソン50μMの前処理で抑制された。δアゴニストであるDPDPEは58kDaタンパク質のチロシンリン酸化を惹起したが、μアゴニストであるDAGOはリン酸化に影響を及ぼさなかった。58kDaタンパク質のチロシンリン酸化は百日咳毒素によって抑制された。これらの結果より、58kDaタンパク質はGiタンパク質に関連したδオピオイド受容体を介してチロシンリン酸化されることが示唆された。抗c-Raf-1ポリクローナル抗体を用いて行った58kDaタンパク質のリン酸化実験の結果、58kDaタンパク質はc-Raf-1と複合体を形成する可能性があることが示唆された。また、抗c-Raf-1ポリクローナル抗体を用いてMAP kinase活性を測定した結果、モルヒネ刺激によってMBPのリン酸化亢進が亢進していた。カラムクロマトグラフィーによって部分精製した58kDaタンパク質はpI約5.5の酸性タンパク質であった。

#### 【総括】

ヒト神経芽細胞腫（SK-N-SH）細胞においてモルヒネによってチロシンリン酸化される58kDaのタンパク質を発見した。この58kDaタンパク質は、Giタンパク質に関連したδオピオイド受容体を介してチロシンリン酸化された。また、58kDaタンパク質はc-Raf-1と複合体を形成する可能性があることが示唆された。また、モルヒネ刺激したライセートの抗c-Raf-1ポリクローナル抗体免疫沈降物でMBPのリン酸化が亢進していたことより、モルヒネによってc-Raf-1を介する経路によってMAP kinase系が活性化されることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

近年、オピオイド受容体を介する情報伝達のメカニズムに関する研究が進んで来ており、モルヒネがGiタンパク質に関連したオピオイド受容体に結合することによって細胞内のカリウム、カルシウム、cAMP、およびAキナーゼを変化させることができ明らかになっている。また、情報伝達系においてチロシンキナーゼが果たす役割について研究が進んで来ているが、モルヒネの情報伝達系でのチロシンキナーゼ関与は明らかではなかった。本研究では、ヒト神経芽細胞腫（SK-N-SH）細胞においてモルヒネによってチロシンリン酸化される58kDaのタンパク質を発見したものであり、オピオイド受容体を介する情報伝達系においてチロシンキナーゼの関与についての初めての報告である。学位を授与するに値する研究であると認める。