



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	https://hdl.handle.net/11094/39006
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

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 1 1 7 6 8 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チロシンモノクローナル抗体 (PY20) を用いてウエスタンブ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℃、10%CO₂ 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、抗ホスチロシンモノクローナル抗体 (PY20) を用いたウエスタンブロットによって解析した。部分精製は、DEAE Sephacel 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 -³²P] 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100 μ M 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、抗ホスチロシンモノクローナル抗体 (PY20) を用いたウエスタンブロットを行った。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50 μ M 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っており、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の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。