



Title	低分子量ニューロフィラメントの部位特異的燐酸化の解析
Author(s)	平賀, 定一
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39426
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	平 賀 定 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 1 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 0 月 1 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	低分子量ニューロフィラメントの部位特異的磷酸化の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 祖 父 江 憲 治 教 授 柳 原 武 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

ニューロフィラメント (NF) は高 (NF-H), 中 (NF-M), 低 (NF-L) 分子量の3種のサブユニットからなり, 細胞体で合成された後 axon の近位部で磷酸化を受け, 末梢に向かって輸送される途中 assembly に組み込まれる。従って細胞体や樹状突起には磷酸化NFはほとんど存在しないと言われている。ところが筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病の神経細胞の axon 近位部や細胞体に存在する spheroid や neurofibrillary tangle の主な構成要素は磷酸化NFであることが抗体による研究で明らかにされている。一方ニューロフィラメントの磷酸化には部位特異的キナーゼ, フォスファターゼが働き, それぞれ異なった役割を担っていると考えられている。従って各疾患において磷酸化の部位を同定しその化学量論的異常を検討することは病因との関係を明らかにするのに重要と思われる。NF-Lはニューロフィラメントの core となるサブユニットであるがその磷酸化部位, その機能, 部位特異的キナーゼに関してはほとんど解っていない。また各疾患における部位特異的磷酸化の異常を解析する方法は現在抗体しかない。しかし抗体による方法はNF-Lのように必要な抗体が得難い場合, または化学量論的検討が必要な場合は困難である。そこでわれわれは capillary electrophoresis (CE) と Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) によりNF-Lの in vivo での磷酸化部位の同定, 化学量論的解析を試みた。

【方法及び結果】

ウシ大脳髄質, 脊髄およびヒト小脳髄質よりアルカリフォスファターゼインヒビター (NaF, Na₃VO₃) 存在下でトリトンX-100 不溶性分画としてNF-L, NF-M, NF-Hなどを含む粗精製NFを得る。さらにイオンクロマトグラフィー, 逆相高速液体クロマトグラフィー (rHPLC) (カラム: Vydac C4) によりNF-Lを精製した。この精製NF-Lをトロンビン消化し, rHPLC (カラム: Vydac C4) によりNF-LのC-末端に位置する13KDのペプチド (Th-13KD) を得た。ウシ脊髄NF-Lより得たTh-13KD ペプチドのESI-MSの結果, このペプチドは修飾を受けていないペプチドと磷酸1個が付加されたペプチドから成ることが解った。さらに磷酸化ペプチドの割合を測定するためにTh-13KD をアルカリフォスファターゼ処理しCEで分析した結果, 磷酸化ペプチドは全体の約70%

であった。ウシ大脳髄質由来およびヒト小脳髄質由来の Th - 13KD およびも同様に分析し、磷酸化ペプチドはそれぞれ全体の約 70 % および 60 % であった。次に磷酸化部位を同定するためにウシ脊髄由来 Th - 13KD をエンドプロテイナーゼ Asp - N で消化し rHPLC (カラム: Cosmosil C18 - 300AR) にて分画し, aspartic acid 469 から glutamic acid 513 を含む分子量約 5KD のペプチド (Asp - 5KD) を得た。このペプチドの磷酸化可能部位は serine 473 のみである。この ASP - 5KD を ESI - MS で分析した結果, 無修飾 Asp - 5KD の化学的質量 4922 と一致するペプチドとそれより 80 ダルトン大きい質量のペプチドが検出された。この結果より serine 473 が磷酸化部位と決定された。ウシ大脳由来 Asp - 5KD でも同じ結果を得た。

【総括】

NF - L の serine 473 に関してはラットで約 70 % が磷酸化されていると報告されている。我々の研究では serine 473 の磷酸化の割合はウシ脊髄あるいは大脳由来 NF - L で約 70 %, ヒト小脳でも 60 % と比較的よく保たれている事が解った。この事は serine 473 の重要性を予想させるが、その機能に関してはいくつかの可能性が考えられている。第 1 は NF - H の C - 末端の機能からの類推で、NF - L の C - 末端と他の構造蛋白との相互作用を調整しているかもしれない。第 2 にニューロフィラメントは静的な相と動的な相から成り、動的な相は静的な相を維持するために細胞体で新しく合成された蛋白を静的な相に供給していると考えられる。serine 473 の磷酸化はこの 2 つの相間の移行に関係しているか、あるいはそのどちらかの相に特異的なものかもしれない。第 3 は serine 473 の磷酸化がニューロフィラメントによる細胞骨格形成を制御している可能性である。以上のような機能は部位特異的キナーゼの働きによると考えられ、今後 ALS, アルツハイマー病などの神経変性疾患におけるニューロフィラメントの磷酸化の異常と病因との関係を明らかにするためには正常における各部位における磷酸化の機能と同時に各疾患における磷酸化の部位の異常、化学量論的異常を明らかにすることが重要であろう。そのために本研究は有用な方法論を提示したと言えるだろう。

論文審査の結果の要旨

筋萎縮性側索硬化症の spheroids や globbules あるいはアルツハイマー病の neurofibrillary tangle において抗体を用いた研究によりニューロフィラメントの磷酸化の異常が報告されている。またアイソトープを利用してマウスやラットのニューロフィラメントの磷酸化の部位を決定する研究も行われている。これらの変性疾患において磷酸化の異常を化学量論的に明らかにすることはその病因及び病態を解明するうえで重要と思われる。しかしながら従来の抗体やアイソトープを用いる方法では上記のようなヒトの神経変性疾患におけるニューロフィラメントの磷酸化の部位特異的磷酸化の異常を化学量論的に解析することは困難であった。

本研究においては Capillary electrophoresis と Electrospray ionization mass spectrometry を用いてウシ脊髄および脳由来の低分子量ニューロフィラメントの serine 473 が約 70 % 磷酸化されており、またヒト小脳由来低分子量ニューロフィラメントのトロンビン消化で得られる C - 末端のペプチドは約 60 % 磷酸されていることが明らかとなった。

以上、本研究はヒトの神経変性疾患におけるニューロフィラメントの磷酸化の異常を解明する上で新しい有用な方法論を提供したものであり学位の授与に値するものと考えられる。