The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	NF-L phosphorylation by Rho-kinase
Author(s)	橋本, 亮太
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41789
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	橋本亮太（はしもと　りょうた）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15287　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	NF-L phosphorylation by Rho-kinase （ニューロフィラメント－LのRhoキナーゼによるリン酸化）
論文審査委員	（主査） 教　授　武田　雅俊 （副査） 教　授　杉田　義郎　　教　授　吉峰　俊樹

論文内容の要旨

【目的】

ニューロフィラメントは神経系に特異的に発現している中間径線維であり、神経細胞の構造の維持、神経細胞突起の伸展や退縮に大きく関与していると考えられている。ニューロフィラメントにはNF－H、NF－M、NF－Lの3つのサブユニットがあるが、NF－Lがフィラメント構造の中核をなしていると考えられている。NF－LはAキナーゼやCキナーゼにより部位特異的にリン酸化され脱重合することが知られている。しかし、近年培養神経細胞突起の退縮に関与すると言われているRhoキナーゼとNF－Lについては全く研究されていない。そこでRhoキナーゼの神経系における分布とNF－LのRhoキナーゼによるリン酸化と構造への影響を検討した。

【方法ならびに結果】

1．Rhoキナーゼの抗体の検定

牛由来のRhoキナーゼの、coiled－coil domain,catalytic domain,Rho－binding domainのそれぞれ部位のフラグメントを家兎に免役して作成した抗体（anti－Coil,anti－CAT,anti－RB）検定を行った。牛の大脳皮質、海馬、小脳のホモジネイトをサンプルとして用いてそれぞれの抗体でウエスタンブロットを行うと、3種類とも160kdaのRhoキナーゼを強く認識した。よってこれらの3種類の抗体を抗Rhoキナーゼ抗体として使用できることと、脳のそれぞれの部位におおよそ同じぐらい存在することが示された。

2．Rhoキナーゼの神経系における分布

牛脳の前頭葉におけるanti－Coil抗体によるRhoキナーゼの免疫染色では白質に比べ灰白質で強く染色された。次に前頭葉の白質と灰白質をわけたサンプルをホモジネイトし、anti－Coil抗体でウエスタンブロットを行い、デンシトメーターで定量した。免疫染色での結果と同様に、Rhoキナーゼは白質に比して皮質に豊富であることが示された。3種類の抗体で牛脳の大脳皮質の免疫染色を行うと神経細胞体とその樹状突起が強く染色され、Rhoキナーゼは神経細胞に豊富に発現していることが判明した。次にまた、海馬CA1領域のanti－Coil抗体を用いた免疫染色にてCA1錐体細胞の細胞体と樹状突起とRhoキナーゼが豊富に存在することがわかっている血管が強く染色された。小脳におけるanti－Coil抗体を用いた免疫染色ではプルキンエ細胞、顆粒細胞に多く、分子層、髄質と順に少なく分布した。以上の結果により、Rhoキナーゼは神経細胞に豊富に分布することが示された。

3．NF－LのRhoキナーゼによるリン酸化とフィラメント構造の脱重合

精製した牛NF－Lは非活性型であるGDP結合型RhoA存在下に比してと活性型であるGTP型結合型RhoA存在下にて約18倍リン酸化された。よってNF－LはRhoAの活性化に依存したRhoキナーゼの活性によりリン酸化されることが示された。また活性型GST－RhoキナーゼによってNF－L 1モル当たり1.2 モルのリン酸が入り約2時間でプラトーに達した。NF－Lはイオン強度を上げることにより重合し10nmフィラメントを形成するが、活性型GST－Rhoキナーゼによってリン酸化したNF－Lはイオン強度をあげても重合しないこと、また重合したNF－LはGST－Rhoキナーゼでリン酸化されると脱重合することが電顕のnegative stainによって示された。同様の結果が重合したNF－Lと脱重合したNF－Lを遠心分離法によってわけることによって示された。

4．NF－LのRhoキナーゼによるリン酸化部位の決定

活性型GST－Rhoキナーゼによってリン酸化したNF－Lをトリプシンで消化し逆相のHPLCにより分離した。分離した約100個のフラグメントの分子量を質量分析計であるMALDI／TOFを用いて測定した。トリプシン消化であらわれるNF－Lのhead部分に相当するフラグメントの理論上の分子量を計算し、次に測定した分子量のうちで理論値と近いものをプロテインシークエンスした。その結果、NF－Lのhead部分に相当するフラグメントをすべて、見つけだすことができた。さらにリン酸化したフラグメントを非リン酸化のフラグメントより分子量が80増えることで予測した。リン酸化セリンはプロテインシークエンスすると欠失することが知られているので、そのフラグメントをプロテインシークエンスすることでセリンの欠失を確認しリン酸化部位を決定した。得られたリン酸化部位はセリンの26番目と57番目であった。この二つの部位は新しいNF－Lのリン酸化部位で、しかもその付近のアミノ酸配列は他の種でも保存されているため、重要であると考えられた。

【総括】

NF－Lは神経細胞に豊富に分布するRhoキナーゼによってリン酸化された。NF－Lの重合・脱重合はNF－Lのセリンの26番目と57番目の部位特異的なリン酸化によることが判明した。NF－Lは神経細胞骨格としてRhoキナーゼによって制御され機能することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ニューロフィラメントは神経系に特異的に発現している中間径線維であり、神経細胞の構造の維持、神経細胞突起の伸展や退縮に大きく関与していると考えられている。しかし、近年培養神経細胞突起の退縮に関与すると言われているRhoキナーゼとNF－Lについては全く研究されていない。そこで本研究ではRhoキナーゼの神経系における分布とNF－LのRhoキナーゼによるリン酸化と構造への影響を検討している。その結果Rhoキナーゼは中枢神経系では神経細胞の細胞体と樹状突起に豊富に分布していた。またNF－LはRhoキナーゼによってリン酸化され、フィラメント構造の重合脱重合がそのリン酸化により制御されていた。NF－LのRhoキナーゼによってリン酸化される部位はセリンの26番目と57番目であった。本研究はRho－kinaseの中枢神経系における分布を初めて報告し、そこで神経特異的な構造蛋白であるニューロフィラメントをリン酸化することにより、Rho－キナーゼが神経細胞骨格制御に関与することを示唆し、学位の授与に値するすばらしい研究であると考えられる。