



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 はし 橋 もと りょう た
太

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 5 2 8 7 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疫して作成した抗体 (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ェ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 抗体でウェスタンブロットを行い、デンス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ケンスした。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ケ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ケ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。