



Title	Identification and functional analysis of Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) as a target of cGMP-dependent protein kinase (PKG)
Author(s)	松原, 稔哉
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45624
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	まつばらとしや 松原稔哉
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 19213 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Identification and functional analysis of Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) as a target of cGMP-dependent protein kinase (PKG) (PKG の標的蛋白質としての MARCKS の同定と機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 永井 克也 (副査) 教授 八木 健 教授 吉川 和明 助教授 奥村 宣明

論文内容の要旨

一酸化窒素 (NO) は血管拡張や神経伝達、細胞毒性などの生理的作用をもつ内在性の物質です。哺乳類の神経細胞では一酸化窒素は神経型の一酸化窒素合成酵素 (nNOS) によって主に合成され、神経伝達物質の放出やホルモン分泌などに関与すると考えられています。また、脳における nNOS の分布は主に視床下部、嗅球、小脳に多く発現していることが知られており、特に視床下部では概日リズムの発信や自律神経を介した血圧調節に関与していると考えられています。神経細胞で nNOS によって合成された NO は可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) の活性化を介して細胞内 cGMP 濃度を上昇させ、cGMP の主要な細胞内結合蛋白質である cGMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG) を活性化します。視床下部における NO の作用はこれら cGMP と PKG を介していることが現在までに報告されています。以上のことから、脳における NO の詳細な作用機構を明らかにするためには NO/sGC/cGMP/PKG 情報伝達機構の構成因子について調べる必要があると考えられます。しかし、PKG の標的となるタンパク質の詳細についてはほとんど明らかにされていません。そこで、私は PKG の基質となる蛋白質を検索し、その機能を明らかにすることを目的として以下の研究を行いました。

cGMP-dependent protein kinase の基質検索

ラット脳のホモジネートを [γ - 32 P]ATP 存在下にリン酸化を起こさせ、SDS-PAGE 及び 2 次元電気泳動によって分離し、リン酸化蛋白質を Autoradiogram によって検出する方法を用いて、cGMP 存在下と非存在下でのリン酸化程度の変化を調べた。その結果、ラット脳のサイトゾル画分より分子量 80 kDa、pI3-4 付近に cGMP 依存的なリン酸化と考えられるスポットが検出された。このスポットは分子量と pI 値および、スポットの形状から Myristoylated Alanine Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) であることが推測された。そこで、分子量 80 kDa、pI3-4 のスポットが MARCKS であることを確かめるために、抗 MARCKS 抗体を用いた Immunoblot 法による解析を行った結果、分子量 80 kDa、pI3-4 付近に MARCKS 蛋白質のスポットが検出され、さらに、cGMP 存在下では pI 値が酸性側に移動することが確認された。以上のことから、分子量 80 kDa、pI3-4 のリン酸化蛋白質は MARCKS であることが示唆された。

NIH3T3 細胞における MARCKS の cGMP 依存的リン酸化と分解

PKG による MARCKS のリン酸化について In Vitro Kinase Assay 法によって検討した結果、PKGI β 、PKGII 両アイソフォーム共に MARCKS を強くリン酸化した。細胞内で cGMP 依存的なリン酸化が起こるかどうかが検討するため、NIH3T3 細胞を用いて内在的に発現する MARCKS のリン酸化レベルの変化を調べた。その結果、cGMP のアナログである 8pCPT-cGMP や培養液中で NO を発生する試薬である SNP で刺激したとき、MARCKS のリン酸化レベルの亢進が起こった。また、過剰量の 8pCPT-cGMP で細胞を刺激すると分解物様のリン酸化バンドが検出された。さらに、NIH3T3 細胞に PKG をトランスフェクションし、MARCKS のリン酸化レベルの変化を調べると、8pCPT-cGMP を添加した活性化状態で分解物様のリン酸化バンドが検出された。以上の結果から、NIH3T3 細胞において MARCKS は PKG によってリン酸化されることが示唆され、それによって分解されるのではないかと考えられた。次に、PKG の活性化による MARCKS の分解を検討するため、NIH3T3 細胞内の MARCKS の蛋白質質量の変化を Western blotting 法によって調べると、8pCPT-cGMP や培地中で一酸化窒素を発生する試薬 (SNP, SNAP) で刺激することにより経時的、濃度依存的に減少した。また、これら減少はプロテアーゼインヒビターを培地に添加することによって抑制されることが分かった。以上の結果から、MARCKS の分解は PKG の活性化によって誘導されることが示唆された。

MARCKS の細胞内動態の解析

MARCKS の GFP 融合蛋白質を NIH3T3 細胞に発現させると、特に細胞膜に強く局在化して、フィロポディア様の微細な突起が多数形成した。また、SNP や 8pCPT-cGMP で刺激すると細胞膜が退縮することによりフィロポディア様の突起がより顕著に発達することが分かった。この結果から、PKG は MARCKS を介して NIH3T3 細胞の細胞骨格、あるいは細胞接着制御に関与していると考えられた。さらに、PC12 細胞に MARCKS を過剰発現させると軸索の進展や成長円錐の形成が亢進され、PKG の活性化によってそれら軸索様突起の進展が抑制された。

まとめ

MARCKS は細胞骨格関連蛋白質として神経細胞の軸索進展やシナプス形成に関与する蛋白質であると考えられているが、本研究より NO/cGMP/PKG signaling pathway の活性化は MARCKS のリン酸化、および分解を介して、細胞内の蛋白質質量を調節することにより、神経細胞の軸索進展やシナプス形成などの調節に負に関与していることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、NO-cGMP-PKG 情報伝達系がラット脳で発現している MARCKS 蛋白質をリン酸化して、本蛋白質の分解を誘導し、PC12 細胞の神経様突起の伸展を負に制御することを明らかにした。この研究成果は哺乳類の神経細胞における NO の役割の解明に新たな手がかりを与えるものであり、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。