Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP- dependent protein kinase

井澤，一郎

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1996-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1523
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001523

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　井澤一郎（いざわいちろう）　（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　博士（医学）
学位記番号　博い第1035号
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付　平成8年3月31日

学位論文題目　Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase
（神経線維腫症1型遺伝子産物（ニューロフィブロミン）のAキナーゼによるリン酸化）

審査委員　主査　教授　玉木紀彦
教授　前田　盛　教授　千原和夫

論文内容の要旨

神経線維腫症1型（neurofibromatosis type1,NF1）の責任遺伝子，NF1遺伝子は癌抑制遺伝子のひとつと考えられている。NF1遺伝子にコードされる蛋白はニューロフィブロミン（neurofibromin）と呼ばれ，この蛋白のほぼ中央には哺乳動物のGTP分解酵素活性化蛋白（GTPase activating protein,GAP）の触媒領域などと高い相同性をもつ領域（GAP related domain,GRD）が存在する。GRDにはalternative splicing機構により21アミノ酸が挿入されるtype-eⅡと挿入されないtypeⅠとがあり，このスプライス変化によるNF1蛋白のGAP活性の変化が神経系細胞の分化シグナルに影響を与えている可能性が報告されている。本研究は，NF1蛋白の細胞内でのリン酸化を検討し，NF1蛋白をリン酸化する酵素（neurofibromin-kinase）の解析を行い，NF1蛋白の機能を解明しようと試みたものである。

対象と方法

NF1蛋白の特徴ある5つの領域，cysteine／serine rich domain（CSRD），GRD typeⅠおよびtypeⅡ，leucine repeat domain（LRD），c-terminal domain（CTD）に注目し，これらのdomainを大腸菌でGST融合蛋白として作製した。GST-NF1融合蛋白でラットを免疫し，抗NF1蛋白ポリクローナル抗体を得た。

NF1蛋白が細胞内で実際にリン酸化されているかどうかを調べるため，ヒトSH-SY5Y神経芽細胞腫細胞を〔^{32}P〕orthophosphateでラベルし，細胞抽出液よりNF1蛋白を抗NF1抗体で免疫沈降し解析した。

NF1蛋白をリン酸化する酵素活性を検出するために，SH-SY5Y細胞とSV40-transformedヒト線維芽（VA13）細胞を用い，FCS飢餓後およびPMA，forskolin，EGF刺激後細胞抽出液を作製し，この抽出液とGST-NF1融合蛋白を混合してリン酸化反応を行い，NF1蛋白リン酸化酵素活性を検出した。さらにゲル内リン酸化法（in-gel kinase assay）にてNF1蛋白リン酸化酵素の分子量と活性を測定した。

cAMP-dependent protein kinase（Aキナーゼ）がNF1蛋白をリン酸化しうるかどうかを検討するため，GST-NF1融合蛋白およびSH-SY5Y細胞より免疫沈降したNF1蛋白を基質としてAキナーゼの精製catalytic subunitでリン酸化反応を行い解析した。

結果および考察

作製した抗NF1抗体は，免疫沈降・ウエスタンブロットでNF1蛋白を分子量約250kDaの特異的バンドとして同定した。また，〔^{32}P〕orthophosphateラベル実験で，NF1蛋白は，細胞内でリン酸化されていることを確認した。*In vitro*リン酸化反応において，GRD type Ⅰ，type Ⅱ，およびLRDに対するリン酸化酵素活性は認めなかったが，CSRDおよびCTDをリン酸化する酵素活性を認めた。このリン酸化酵素活性はforskolin刺激にて増大し，また，Aキナーゼの活性を阻害するPKA inhibitor peptide（PKI）によって抑制された。CTDをリン酸化する酵素活性は，forskolin刺激のみならずPMAおよびEGF刺激にて増大し，PKIにて抑制されないものも認められた。

ゲル内リン酸化反応では，CSRDおよびCTDをリン酸化する約41kDaの分子量をもつ酵素活性を検出した。

これらの結果より，NF1蛋白リン酸化酵素の候補として，cAMP-dependent protein kinase（Aキナーゼ）が考えられた。このため，Aキナーゼが実際にNF1蛋白をリン酸化しうるかを検討した。Aキナーゼの精製catalytic subunitは，作製したGST-NF1融合蛋白のうちCSRDおよびCTDのみを特異的にリン酸化し，さらに免疫沈降したnativeのNF1蛋白もリン酸化した。

*In vivo*におけるNF1蛋白のAキナーゼによるリン酸化は，現在のところ証明されていないが，本検討結果は，AキナーゼがNF1蛋白リン酸化酵素のひとつであることを強く示唆した。

結論

NF1蛋白は細胞内でリン酸化されており，NF1蛋白リン酸化酵素のひとつとしてcAMP-dependent protein kinase（Aキナーゼ）が考えられた。GAP活性の存在，Aキナーゼや他のリン酸化酵素によるリン酸化の可能性より，NF1蛋白が細胞の増殖，分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経線維腫症1型（NF1）は，出生3000〜4000人に1人の割合で見られる極めて発生頻度の高い常染色体優性遺伝性疾患である。その責任遺伝子，NF1遺伝子は癌抑制遺伝子のひとつとされている。

NF1遺伝子にコードされる蛋白はニューロフィブロミンと呼ばれ，そのほぼ中央には哺乳動物のGAPの触媒領域と高い相同性をもつ領域（GAP related domain,GRD）が存在し，さらにその領域を含む広い範囲で酵母のGAP類似蛋白IRA1，IRA2との間で相同性が認められている。

本研究は，NF1蛋白の細胞内でのリン酸化を検討し，NF1蛋白をリン酸化する酵素の解析を行い，NF1蛋白の機能を解明しようと試みたものである。

今回の研究結果より，NF1蛋白は細胞内でリン酸化されており，NF1蛋白をリン酸化する酵素のひとつとして，cAMP-dependent protein kinase（Aキナーゼ）が考えられた。GAP活性の存在，Aキナーゼや他のリン酸化酵素によるリン酸化の可能性より，NF1蛋白が細胞の増殖，分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

これらより，NF1蛋白はGAP-rasシグナル伝達経路およびcAMPシグナル伝達経路という２つの重要なシグナル伝達に関与していることが示唆されたが，この所見はシグナル伝達におけるNF1蛋白の役割を解析していく上で非常に重要な意義をもち，NF1蛋白機能解明に新しい光明を与えるものである。

本研究は，NF1蛋白リン酸化の解析とNF1蛋白の生物学的機能を研究したものであるが，従来ほとんどなかったNF1蛋白のシグナル伝達における役割について重要な知見を得，又将来的にはNF1患者や悪性腫瘍の治療にも役立つ重要な知見をも得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。