

Title	神経系における蛋白質チロシン残基リン酸化反応の意義に関する研究 : pp60c-srcの活性制御に関与するプロテインチロシンキナーゼ
Author(s)	岡田, 雅人
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36660">https://hdl.handle.net/11094/36660</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【19】

氏名・(本籍)	お 岡	だ 田	まさ 雅	と 人
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	8401	号	
学位授与の日付	昭和63年12月14日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	神経系における蛋白質チロシン残基リン酸化反応の意義に関する研究 : pp60 <sup>c-src</sup> の活性制御に関するプロテインチロシンキナーゼ			
論文審査委員	(主査)			
	教授	中川 八郎		
	(副査)			
	教授	堀尾 武一	教授	浅野 朗

論文内容の要旨

神経系細胞,特にニューロンにおいて,高いレベルの pp60<sup>c-src</sup> (RSV発ガン遺伝子産物の細胞内類縁体で蛋白質チロシン残基リン酸化酵素 (PTK) 活性を有する) の発現が見いだされ,神経系特有の分化,機能における PTK活性の意義が注目されている。しかしながら, pp60<sup>c-src</sup>以外の PTKの関与の可能性, pp60<sup>c-src</sup>のN末から527残基目の Tyrをリン酸化し活性制御する PTKの実体,さらに pp60<sup>c-src</sup>の基質蛋白質,及びそれ自身の活性調節に関与する蛋白質チロシン残基脱リン酸化酵素 (PTPase) の性質についてなど多くの問題点が残されている。本研究は,上記諸点を検討することで,神経系における蛋白質チロシン残基リン酸化反応の意義,制御機構を明らかにすることを目的とする。

まず, PTK活性の神経系における意義を確認するために,ラット大脳の成長過程における活性変動を調べた。その結果,ニューロンの成熟期にあたる出生直後から一週間以内で最も高い比活性が得られた。次に,この時期に発現している PTK酵素分子の同定, pp60<sup>c-src</sup>との関連性を明らかにするため新生ラット脳からの分離精製を試みた。ミクロソーム画分を出発材料とし,数段のカラムクロマトグラフィーの結果,3種類の PTKが分離された。その内の2種は,免疫学的性質などからいずれも pp60<sup>c-src</sup>であり,新生脳特有と考えられる1種を pp60<sup>n-c-src</sup>と名付けた。残り1種は,抗 pp60<sup>c-src</sup>抗体によって免疫沈降しないこと,その IgG重鎖をリン酸化しないこと,分子量が約47Kで pp60<sup>c-src</sup>より小さいこと,更に,人工基質,ATPに対する Km値,二価カチオンの要求性,阻害剤の効果等が異なることから, pp60<sup>c-src</sup>とは別種の PTKであると結論され,便宜上 N-PTKと名付けた。N-PTKは,ほとんどの PTKが有する自己リン酸化活性を示さず, pp60<sup>c-src</sup>の基質蛋白質を全くリン酸化しなかった。

N-PTKが,精製過程で pp60<sup>c-src</sup>と挙動を共にする事から相互の関係が注目され, pp60<sup>c-src</sup>が

N-PTKの基質となる可能性を検討した。その結果、N-PTKは intact の pp60<sup>c-src</sup> を顕著にリン酸化した。リン酸化部位は、V8 protease, trypsin を用いた peptide mapping から C 末 fragment 内の自己リン酸化部位 (Tyr-416) とは異なる Tyr であることが明らかになった。更に、Tyr-527 を含む C 末配列の合成 peptide, それに対する抗体を用いた実験から Tyr-527 であることが示された。また、N-PTK のリン酸化によって、pp60<sup>c-src</sup> の enolase を基質にした活性が有意に抑制された。以上の結果は、N-PTK が pp60<sup>c-src</sup> の Tyr-527 をリン酸化し活性制御を司る “c-src kinase” であることを強く支持する。

PTK 作用の調節, pp60<sup>c-src</sup> の活性調節に関与する PTPase の性質を明らかにするため、ラット脳からの精製を試み、細胞質画分から 4 種の PTPase を分離した。均一精製に成功した 2 種は、酸性領域で活性を示し、1 種は低分子量型酸性ホスファターゼと同一分子であった。部分精製した他の 2 種は、中性領域で活性を示し、phosphotyrosine protein のみ脱リン酸化した。また、いずれも EDTA によって特異的に活性化された。これら中性 PTPase について pp60<sup>c-src</sup> の脱リン酸化活性を調べた結果、自己リン酸化 pp60<sup>c-src</sup>, c-src kinase にリン酸化された pp60<sup>c-src</sup> ともに有意に脱リン酸化した。

以上の実験結果は、神経系特有の分化、機能に主要な役割を果たしている PTK は pp60<sup>c-src</sup> であること、そしてその作用発現は c-src kinase, PTPase の厳密な制御のもとにあることを示唆する。

### 論文の審査結果の要旨

蛋白質チロシン残基リン酸化酵素 (チロシンキナーゼ) 活性は、元来レトロウィルスのがん遺伝子産物や、増殖因子の受容体に見出され、細胞のがん化や増殖と関連するものと考えられてきた。しかし、神経細胞に代表される高度に分化し、増殖能を失った細胞にも高い活性が得られるので、最近では、細胞分化に対する役割が注目され始めた。本研究は、神経細胞におけるチロシンキナーゼの実体を把握し、その機能及び制御機構を明かにすることによって、その分化に対する役割解析することを目的としておこなわれたものである。

岡田雅人君は、先づラット脳について、チロシンキナーゼ活性の発達に伴う変化を追跡し、神経細胞の成熟期に高い活性が得られることを確認した。次いで、その時期に発現している主要なチロシンキナーゼが、2 種類の pp60<sup>c-src</sup> (ラウス肉腫ウィルスがん原遺伝子発現産物) とは免疫学的にも、酵素学的にも異なる新型のチロシンキナーゼであることを証明した。N-PTK と名付けたその酵素は際立った特異性を示し pp60<sup>c-src</sup> のみをリン酸化し、その活性を強く抑制した。また、そのリン酸化部位は、pp60<sup>c-src</sup> の N 末端から 527 残基目のチロシンであることも実証した。これらの実験結果は N-PTK が、かねてから発がんの鍵を握るとして、その実体の究明が望まれていた pp60<sup>c-src</sup> の Tyr-527 をリン酸化し、活性制御をおこなう特異的なチロシンキナーゼである可能性を強く示唆する。さらに同君はチロシンキナーゼの対抗調節因子として作用する蛋白質チロシン残基に特異的な脱リン酸化酵素 (PTP

Pase) についても解析し、ラット脳から分離した4種類のPTPPaseの性質明かにした。

以上の成績から、神経系で分化に伴って機能している主要なチロシンキナーゼは、pp60<sup>c-src</sup>であること、その機能発現はTyr-527に特異的なチロシンキナーゼ、及びPTPPaseによって制御されるとの結論が導き出された。

以上の研究成果、特にpp60<sup>c-src</sup>の活性制御に関与するチロシンキナーゼの同定は、未だに大きな課題として残されているpp60<sup>c-src</sup>の神経系における生理機能の解明に大きく貢献するものである。よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。