

Title	Activation of pp60c-src Depending on Cell Density in PC12h Cells
Author(s)	小林, 真
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40706
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"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	小林 眞
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13691 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Activation of pp60 ^{c-src} Depending on Cell Density in PC12h Cells (PC12hの細胞密度上昇に伴う c-Srcの活性化)
論文審査委員	(主査) 教授 永井 克也 (副査) 教授 岡本 光弘 教授 三木 直正

論文内容の要旨

【目的】

私は神経細胞における細胞内蛋白質のチロシンリン酸化の意義について研究を進める過程で、モデル細胞として用いた PC12h 細胞の密度が亢進するのに伴って細胞内チロシンリン酸化レベルが上昇し、このとき細胞性 Src (c-Src) の活性が上昇していることを見出した。そこでこのような条件下においていかなるメカニズムによって c-Src が活性化するのか、またそれに関わる調節因子は何であるのかを明らかにし、これを通して不明である Src キナーゼの活性化機構を解明し、神経系における Src ファミリーの機能を解析することを目的として研究を進めた。

【方法ならびに成績】

PC12h 細胞の細胞密度が亢進するに伴ってチロシンリン酸化レベルの上昇している蛋白質の中で特に変動の大きかった分子量約 120kDa の蛋白質についてイムノブロッティング法によって解析した結果、Src substrate として知られる蛋白質である p130^{cas} のチロシンリン酸化レベルが PC12h 細胞の細胞密度の亢進に伴い上昇していることが分かった。分子量約 120kDa のチロシンリン酸化蛋白質としては他に p125^{FAK} や p120^{c-cbl} があるが、これらのチロシンリン酸化レベルは変化していなかった。

p130^{cas} は Src の基質であることが知られているので、細胞密度の亢進に伴う c-Src の活性変化を enolase を基質に用いた *in vitro* kinase assay 法によって調べたところ、低密度状態時に比べ高密度時には 2.5 倍にもその活性を上昇させていることが分かった。しかし c-Src のチロシンリン酸化レベルの変化や c-Src 自身の発現量、及び Src ファミリーの負の活性制御を行う Csk の発現量は細胞密度の亢進に伴って変化することはなかった。

またこの細胞密度の亢進に伴う c-Src の活性化は PC12h 細胞に特異的なものであるのかを検討するために、親株である PC12 細胞や非腫瘍性細胞である NIH3T3 細胞、Balb/c3T3 細胞、そして腫瘍性の細胞である Hela 細胞において異なる細胞密度状態における c-Src の活性を調べた。その結果、細胞間において多少の違いはあるものの、いずれの場合においても細胞密度の亢進に伴う c-Src の活性の上昇が認められた。

さらに、細胞密度の上昇に伴う c-Src の活性化に c-SrcC 末端の活性制御部位のチロシン酸化が関与するか否かを調べるため、³²P を用いて *in vivo* ラベルした細胞より c-Src を免疫沈降し、それを CNBr によって分解し、SDS-PAGE 後オートラジオグラフィーによってラベルの取り込まれているフラグメントを調べた。しかし、異なる細胞

密度状態においてこれらのリン酸化部位において有意な差は検出できなかった。ところが、細胞抽出液を界面活性剤可溶性画分、不溶性画分に分割し c-Src の局在と活性の変化を調べたところ、高密度培養時には約10%の c-Src が界面活性剤不溶性画分へ移行しており、また界面活性剤不溶性画分の c-Src の比活性が上昇していた。

【総括】

PC12h 細胞において c-Src が細胞密度依存的に活性化することを初めて見出し、この c-Src の活性化が特定の細胞種に限った現象ではなく、腫瘍性、非腫瘍性細胞を問わず幅広い細胞種において見られることを確認した。またこの時の c-Src の活性化においては、活性制御部位である c-Src の C 末チロシン残基の脱リン酸化は有意に検出されず、細胞密度の上昇に伴って c-Src が界面活性剤不溶性画分へ移行し、その比活性が上昇することを確認した。これらのことより、PC12h 細胞の細胞密度の亢進に伴う c-Src の活性化には、細胞間接着によって細胞骨格画分へ c-Src が移行すること、つまりおそらく細胞骨格蛋白質への結合が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

チロシンキナーゼは神経細胞の細胞内シグナル伝達経路において多彩な役割を担っている。そのなかで、Src ファミリーチロシンキナーゼは神経系に豊富に存在しており、神経系において極めて重要な作用を持つと考えられる。しかし、Src ファミリーの機能はよくわかっておらず、どのような条件で活性化するかも明らかではない。これらを明らかにすることは、神経細胞における細胞内シグナル伝達を理解する上で不可欠であると考えられる。

小林君は、神経細胞における Src ファミリーキナーゼの機能解析を目的として研究を進めた結果、まず、PC12細胞において c-Src が細胞密度の上昇に伴って活性化すること、その際 c-Src が界面活性剤不溶性画分に移行すると共にその比活性が上昇することを見いだした。このことは、Src キナーゼが細胞接着に関与し、細胞骨格蛋白質と結合すること、またその結合によって Src キナーゼが活性化されることを示唆する。いかなる蛋白質と結合するかは現在解析中であるが、これらの結果から Src ファミリーの新たな活性制御機構が明らかになると考えられる。

小林君はさらに、PC12細胞を脱分極させたとき、Src ファミリーキナーゼである c-Src、及び Fyn が活性化すること、また Src ファミリーの基質の一つと考えられる p130^{Cas} のチロシンリン酸化がカルシウム依存的に亢進することを見いだした。カルシウムは神経細胞の興奮、とりわけグルタミン酸による神経活動に不可欠な要素であり、これらの結果は、神経細胞の種々の活動において、Src ファミリーが重要な役割を果たすことを示唆する。

以上の研究成果は、神経系における Src ファミリーキナーゼの機能と活性調節機構に重要な知見を与えるものである。したがって本研究は学位に値するものと認める。