



Title	Adenovirus-mediated Overexpression of C-terminal Src Kinase (Csk) in Type I Astrocytes Interferes with Cell Spreading and Attachment to Fibronectin : CORRELATION WITH TYROSINE PHOSPHORYLATIONS OF PAXILLIN AND FAK
Author(s)	高山, 喜晴
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41653">https://hdl.handle.net/11094/41653</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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	高 山 喜 晴
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 14458 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Adenovirus-mediated Overexpression of C-terminal Src Kinase (Csk) in Type I Astrocytes Interferes with Cell Spreading and Attachment to Fibronectin : CORRELATION WITH TYROSINE PHOSPHORYLATIONS OF PAXILLIN AND FAK (アデノウィルスを用いたCskのタイプIアストロサイトへの過剰発現は細胞の伸展やファイブロネクチンへの接着を阻害する: paxillinとFAKのチロシンリン酸化の関連)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 永井 克也
	(副査) 教授 祖父江憲治 教授 三木 直正

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

Src ファミリーチロシンキナーゼは中枢神経系に高発現している事が知られている。神経細胞において Src ファミリーは神經突起の伸長、束化やイオンチャネルのリン酸化によるコンダクタンスの調節に関与している可能性が示唆されているが、そのグリア細胞における機能については明らかでない。そこで Src ファミリーのグリア細胞における機能を解析するため、初代培養タイプIアストロサイトに Src ファミリーの活性抑制因子であるチロシンキナーゼ Csk (C-terminal Src kinase) を強制発現させ、アストロサイトの形態および細胞内のチロシンリン酸化に及ぼす影響を解析した。

#### 【方法ならびに成績】

胎生18日目のICRマウスの大脳皮質より神経細胞とアストロサイトを dispase 处理により単離した。collagen でコートしたディッシュ上に撒いた後、継代操作を2回行いアストロサイトを選別した。培養細胞の純度は細胞をタイプIアストロサイトに特異的な抗 GFAP 抗体で蛍光染色して確認した。

この細胞に組み替えアデノウィルスベクターを用いて Csk を細胞に発現させたところ、ウィルスの MOI (Multiplicity of Infection) に依存して Csk の発現量が増加し、Src の自己リン酸化活性および enolase のリン酸化活性が非感染細胞の10%程度に抑制されていた。同様にアデノウィルスを用いて  $\beta$ -galactosidase またはキナーゼ活性を持たない変異型の Csk (Csk-K222R) 発現させても Src 活性の抑制は認められなかった。

アストロサイトへの Csk の強制発現の影響は以下の通りであった。

- 1) 細胞の collagen への面積がコントロールと比較して減少していた。
- 2) fibronectin への接着能力がコントロールに比べて低下していた。接着能力の検定は fibronectin でコートしたディッシュに細胞を撒いた後、一定時間ごとに接着した細胞を固定し、crystal violet 染色により細胞数を定量して行った。
- 3) コントロール細胞を抗 paxillin 抗体および抗リン酸化チロシン抗体で染色した場合に細胞の周辺部で観察される接着斑が、Csk を過剰発現した細胞では減少し、細胞質全体が染色される傾向にあった。細胞骨格を phalloidin で染色したところ actin stress fiber の形成が不明瞭であった。

- 4) paxillin と分子量約100kDa の未同定の蛋白質のチロシンリン酸化が亢進していた。
- 5) FAK (focal adhesion kinase) の自己リン酸化活性および poly glutamate tyrosine のリン酸化活性がコントロールの20-30%に低下していた。

一方、Csk-K222R を過剰発現させた細胞の表現型は以下の通りであった。

- 1) collagen への接着面積がコントロールと比較して著しく増加している細胞が散見された。
- 2) fibronectin への接着能力はコントロール細胞と同様であった。
- 3) 接着斑および actin stress fiber がコントロールよりも顕著に形成された。
- 4) paxillin および FAK のチロシンリン酸化レベルが亢進していた。
- 5) FAK の自己リン酸化活性の上昇が認められた。

Csk および Csk-K222R を発現させた細胞のいずれにおいても paxillin はチロシンリン酸化された。いずれの細胞において paxillin は GST と Csk の SH 2 領域との融合蛋白質に結合し、抗 Csk 抗体による免疫沈降により Csk と共に沈降された。Csk を過剰発現した細胞より免疫沈降した Src および Csk は *in vitro* で paxillin をリン酸化したが、Csk-K222R を発現させた細胞から免疫沈降した Csk は paxillin をリン酸化出来なかった。この結果は Csk-K222R を強制発現させた細胞においては paxillin のチロシンリン酸化は Src もしくは FAK によってなされた事を示唆している。また、paxillin のチロシンリン酸化のみでは、細胞接着構造の維持に十分ではない事を示している。

#### 【総括】

Csk が過剰発現され Src の活性が抑制された細胞では FAK の活性が低下し接着が阻害された。一方、Csk-K222R を発現させた細胞では FAK のチロシンリン酸化レベルおよび自己リン酸化活性が上昇し、細胞の接着能力が部分的に亢進していた。この結果から、アストロサイトにおいても Src ファミリーのチロシンキナーゼ活性が細胞接着の維持に重要である事が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

Src ファミリーチロシンキナーゼは中枢神経系に高発現している事が知られており、神経細胞においては神経突起の伸長やイオンチャネルのリン酸化によるコンダクタンスの調節に関与している事が明らかになっているが、神経系を構成するもう一つの細胞であるグリア細胞に於ける Src ファミリーの機能については明らかでなかった。

本研究は Src ファミリーチロシンキナーゼの活性抑制因子である Csk を初代培養アストロサイトにアデノウィルスベクターを用いて導入し、その影響を生化学的、細胞生物学的に解析したものである。本研究は(1)線維芽細胞と同様、アストロサイトにおいても Src ファミリーチロシンキナーゼ接着斑によるファブロネクチン、コラーゲンへの接着に必須であること、(2)Csk が Src ファミリーのみならず接着斑に局在する蛋白質である paxillin をリン酸化が可能であること、(3)paxillin のチロシンリン酸化のみではアストロサイトの細胞接着の維持に十分ではないことを明らかにした。

本研究は Src ファミリーおよび Csk の細胞接着における機能について新しい知見を提供するもので、学位の授与に値するものと考えられる。