The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Roles of Shp- 2 and BIT in BDNF Signaling in Cultured Cerebral Cortical Neurons
Author(s)	荒木, 敏行
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41906
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【41】

氏　　名	荒　木　敏　行（あらき　としゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　15173　号
学位授与年月日	平成12年3月24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	Roles of Shp-2 and BIT in BDNF Signaling in Cultured Cerebral Cortical Neurons （大脳皮質ニューロンのBDNFシグナルにおけるShp-2およびBITの役割）
論文審査委員	（主査） 教　授　畠中　寛 （副査） 教　授　永井　克也　　教　授　吉川　和明　　助教授　池内　俊彦

論文内容の要旨

脳由来神経栄養因子（BDNF）は、ニューロンの分化や生存、またシナプス可塑性の制御において重要な役割をもつ蛋白質である。BDNFはTrkBレセプターに結合し、この蛋白質のチロシンキナーゼを活性化させることによって細胞内に情報を伝えていく。私は、BDNFによる細胞内シグナルに注目し、TrkBの発現が高い培養大脳皮質ニューロンを用い、これらのシグナル分子の強制発現系によって解析を行った。本研究では、Shp-2及びBIT/SHPS-1に注目しその機能を解析するために、それぞれのwild type及びmutantを発現させるアデノウイルスベクターを構築した。

1．BDNFシグナルにおけるShp-2の機能

私は、Shp-2の機能を解析するために3種類のアデノウイルスベクターを構築した。1つはShp-2のwild typeであり、1つはShp-2の活性中心にあたる463番目のcysteineをserineに置換することで、ホスファターゼ活性を不活化したmutant（以後C/S mutantと呼ぶ）であり、もう1つはホスファターゼdomainを欠失したmutant（以後ΔP mutantと呼ぶ）を発現するアデノウイルスである。

BDNFによってチロシンリン酸化される細胞内蛋白質への効果を調べるために、BDNF添加前と添加後とで細胞内蛋白質を抽出し、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロティングを行った。その結果、C/S mutantを発現させた大脳皮質ニューロンにおいては、2種の蛋白質においてのみチロシンリン酸化の増強が観察された。この結果はShp-2は特定の蛋白質を基質としており、その基質特異性が高いことを示している。続いて、Shp-2と会合している蛋白質への効果を明らかにする目的で、抗Shp-2抗体を用いて免疫沈降を行い、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロティングを行った。その結果、C/S mutantを発現している大脳皮質ニューロンでは、少なくとも4種の蛋白質のチロシンリン酸化が増強していた。これらの蛋白質はShp-2の基質と考えられる。そのなかで、68kDa付近の蛋白質は、その分子量から推測すると、Shp-2自身と考えられた。また、83kDa付近の蛋白質はBIT/SHPS-1と考えられた。そこでBIT/SHPS-1のチロシンリン酸化状態を同様に抗BIT/SHPS-1抗体を用いて調べたところ、C/S mutantを発現している大脳皮質ニューロンにおいてそのチロシンリン酸化が顕著に増強していた。このことは大脳皮質ニューロンにおいてShp-2はBIT/SHPS-1を基質としていることを示している。一方Trkのチロシンリン酸化については、Shp-2のwild type及びC/S mutantは影響をおよぼさなかった。さらにGrb2と結合している蛋白質のチロシンリン酸化状態についても解析したが、それらの蛋白質のチロシンリン酸化状態には、違いは観察されな

かった。このことは、TrkやGrb 2と結合しているリン酸化された蛋白質を基質としていないことを示している。次にBDNFによるMAPキナーゼの活性化への影響を調べたところ、他の増殖系の細胞での結果と違い、MAPキナーゼの活性化は、control、wild type、C/S mutant、ΔP mutantを発現させた大脳皮質ニューロンにおいて大きな差は観察されなかった。

2．BIT/SHPS-1の機能

BIT/SHPS-1の機能を解析するために、BIT/SHPS-1のwild type及びチロシン残基をアラニンに置換したmutant（以後4F mutantと呼ぶ）を発現するアデノウイルスベクターを作製した。BIT/SHPS-1 wild typeを大脳皮質ニューロンに発現させたところ、BIT/SHPS-1のチロシンリン酸化が亢進し、Shp-2との相互作用が増強した。しかしながら、このときShp-2のチロシンリン酸化には大きな変化は観察されなかった。このことは、Shp-2のチロシンリン酸化と、BIT/SHPS-1とShp-2の相互作用がそれぞれ独立した機構で行われていることを示している。次に、BDNFによる生存維持効果に対する影響を調べたところ、興味深いことに、BIT/SHPS-1 wild type及び4F mutantを発現しているニューロンにおいて、BDNFによる生存維持が増強していた。またこの増強効果は、P13キナーゼの阻害剤では抑制されなかった。BIT/SHPS-1のwild typeと4F mutantが同様の効果を示したことは、BIT/SHPS-1がShp-2即ちチロシンリン酸化のシグナル伝達系路を介さずに大脳皮質ニューロンの生存に関わっていることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、脳神経系において、ニューロンの分化・生存・可塑性の維持に働いている情報蛋白質である脳由来神経栄養因子（BDNF）の細胞内情報伝達を調べたものである。初代培養大脳皮質ニューロンを用い、BDNFシグナルにおけるShp-2およびBITの役割に関連して興味ある知見を見いだしており、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。