

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41906">https://hdl.handle.net/11094/41906</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

氏名	荒木敏行
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  $\Delta P$  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ッティングを行った。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ッティングを行った。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、 $\Delta P$  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 4 F 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 4 F 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 4 F 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。