



Title	Regulatory Mechanism of the Src Family Tyrosine Kinase : Contribution of a Tyrosine Kinase Csk and a Tyrosine Phosphatase BEM-1.
Author(s)	大里, 義治
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42522
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

氏 名	おお ざと よし はる 大 里 義 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 6 4 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 6 月 27 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	Regulatory Mechanism of the Src Family Tyrosine Kinase: Contribution of a Tyrosine Kinase Csk and a Tyrosine Phosphatase BEM-1. (Src 型チロシンキナーゼの活性調節機構の解析 —チロシンキナーゼ Csk およびチロシンホスファターゼ BEM-1 の関与—)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 永井 克也 (副査) 教 授 田嶋 正二 教 授 吉川 和明 助教授 岡田 雅人

論 文 内 容 の 要 旨

Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFKs) は発生過程の神経系で発現が高いことから、神経系の発生や分化に重要であると考えられている。SFKs は C 末端に存在する活性調節チロシン残基のリン酸化、脱リン酸化によってその活性が調節される。この反応はチロシンキナーゼおよびチロシンホスファターゼによって触媒される。SFKs の機能を解明するにはこの活性制御メカニズムを明らかにすることが必要である。そこでまず、この活性制御チロシン残基を特異的にリン酸化し、Src の活性を抑制する因子であることが明らかとなっている C-terminal Src family kinase (Csk) について、PDGF 刺激や mitosis など、Src の活性上昇をとまなう細胞現象に対する機能を解析した。正常な Balb/c3T3 細胞では PDGF 刺激後細胞内蛋白のチロシンリン酸化レベルの著しい上昇が観察される。その細胞に対し Csk を過剰発現させるとこのリン酸化の上昇が抑えられた。そのなかでも、一過性のリン酸化のパターンを示す MAP キナーゼは、Csk の過剰発現による抑制効果が顕著であった。次に Src の基質の一つであると言われている Cortactin のリン酸化、脱リン酸化指標として、Csk 過剰発現による PDGF 刺激後の Src の活性化抑制を検討した。正常細胞では刺激後 10 分で抗 Cortactin 抗体によって免疫沈降される蛋白のリン酸化が見られた。このリン酸化は細胞周期の M 期にも見られた。Csk の過剰発現によって、これらのリン酸化が完全に抑えられた。M 期には Src そのものの活性化も観察されるが、Csk の過剰発現はこの活性化を抑制した。以上の結果より Csk は Src 活性化をとまなう現象においてその活性変動を制御することが明らかとなった。

Src の機能を探る次の段階として、Src の活性化因子として機能するような新たなチロシンホスファターゼの探索をおこなった。ラット cDNA ライブラリーより、ラット LCA の cDNA とのクロスハイブリダイゼーションする分子として得られた新規チロシンホスファターゼ Brain Enriched Membrane-linked PTP-1 (BEM-1) は一次構造を解析した結果、細胞外に接着分子様の構造を持つ受容体型であることが判明した。抗体を用いた時空的発現パターンの解析から BEM-1 は神経細胞の分化時、特に神経突起の伸展時に機能する分子であることが示唆された。BEM-1 を発現する細胞シート上での胚性癌細胞 P19 分化時の突起の伸展を検討したところ伸展速度は BEM-1 を発現していない細胞上での場合と比較して有意に上昇していた。この結果から P19 の外にある BEM-1 が P19 の内在性の BEM-1 と相互作用することによって突起伸展のシグナルを増強していることが想像された。そこで BEM-1 が、神経突起の伸展に関与することが知られている Src の活性制御チロシン残基 (Tyr-527) を脱リン酸化するのかどうかを調べた。その結果、BEM-1 の細胞内触媒領域と GST の融合蛋白は試験管内で用量依存的に Src の Tyr-527 を脱リン酸化

した。また、この処理により脱リン酸化された Src の活性をエノラーゼを基質として測定したところ、チロシンリン酸化活性が上昇していた。この活性化は293T細胞内においても再現された。また、COS-7細胞での発現実験よりBEM-1の細胞外領域はホモフィリックな結合をおこなうことが明らかとなった。以上の結果より、BEM-1はたとえば隣接する細胞が発現するBEM-1との相互作用が引き金となって、Srcをおそらく直接に脱リン酸化することにより、Srcが関与する神経突起伸展などの現象の制御をおこなう可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は Src 型チロシンキナーゼの活性調節機構を明らかにするため、その活性調節因子 C-terminal Src family Kinase (Csk)、Brain Enriched Membrane linked tyrosine phosphatase-1 (BEM-1) の機能解析をおこなったものである。本論文ではまず PDGF 刺激時や M 期における Src の活性変動に Src 活性抑制因子である Csk が関与することを示すとともに、Src の活性化因子としてチロシンホスファターゼ BEM-1 を新たに単離し、Src が関与することが知られている神経突起伸展機構に、BEM-1 も関与することを明らかにしたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。