

Title	Functional analysis of a tyrosine-phosphorylated protein, BIT, in the nervous system
Author(s)	濱田, 樹理
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45130">https://hdl.handle.net/11094/45130</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	はま だ じゅ り 濱 田 樹 理
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 18408 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 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	Functional analysis of a tyrosine-phosphorylated protein, BIT, in the nervous system (神経系におけるチロシンリン酸化タンパク質 BIT の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 永井 克也 (副査) 教授 吉川 和明 教授 岡田 雅人 助教授 奥村 宣明

#### 論文内容の要旨

##### 【背景・目的】

生物は地球環境により同調される約 24 時間周期の自己発振性の概日時計の仕組みを持つ。哺乳類の概日時計は視床下部視交叉上核 (SCN) に存在し、SCN で創り出される内因性の時刻信号により活動などの生命現象のリズムが生み出される。本研究室では、SCN で翻訳後修飾が変化する蛋白質を検索し、その機能解析を行うことにより哺乳類の概日時計の光同調機構の解明を試みてきた。その過程でチロシンリン酸化に概日リズムを示す蛋白質として BIT (brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs) が同定され、これまでに BIT が SCN において概日時計の光同調に関与することを明らかにしてきたが、BIT が関与する細胞内情報伝達系については殆ど解明されていない。

BIT は膜貫通型の糖蛋白質で、細胞内に ITIM と呼ばれるチロシンリン酸化モチーフを 2 つもち、リン酸化を受けると脱リン酸化酵素 SHP-2 が結合する。BIT は神経系に広く発現しているため、他の神経細胞でも機能すると予想される。私はまず、光照射による BIT のチロシンリン酸化が SCN に特異的な反応であるのかを調べる為に、網膜の BIT について検討した。更に、BIT の神経細胞における情報伝達機構を明らかにする為に BIT 結合蛋白質の検索を行った。

##### 【方法・結果】

ラット網膜の BIT のチロシンリン酸化レベルを様々な光照射条件で定量した結果、網膜の BIT は光照射時にリン酸化し、遮光すると速やかに脱リン酸化するという光依存的な反応性をもつことを見出した。また、Src family tyrosine kinase (SFK) の特異的阻害剤 PP-2 で阻害実験を行った結果、網膜の BIT は光照射により活性化する SFK によって高度にリン酸化されることがわかった。更に、BIT と SHP-2 は網膜内で外網状層と内網状層と呼ばれるシナプス層に局在していたことから、BIT は光依存的に SHP-2 をシナプス膜へリクルートすると考えられる。そこで、BIT のシナプス領域における情報伝達機構を明らかにする為に、BIT の細胞内ドメインに対する抗体を架橋したビーズを作製し、ラット脳から BIT 結合蛋白質をプルダウン法にて精製した。質量分析の結果、クラスリン被覆小胞の構成蛋白質であるクラスリン重鎖が同定された。クラスリン結合蛋白質である AP-2 複合体がクラスリン被覆小胞の積

荷蛋白質のチロシンモチーフをエンドサイトーシスシグナルとして認識することが知られていたため、GST プルダウン法による結合解析を行ったところ、BIT が脱リン酸化状態で AP-2 複合体と結合することが明らかとなった。更に COS-7 細胞で発現させた BIT は AP-2 複合体やクラスリンと共局在し、リソソームへと輸送されることが認められた。

#### 【まとめ】

本研究では光刺激により SCN のみならず網膜においても BIT がチロシンリン酸化されることを明らかにし、BIT が様々な神経細胞の活動に伴って機能する可能性を示した。更に BIT 結合蛋白質としてクラスリン重鎖を同定した。BIT はシナプス部位においてクラスリンを介した小胞輸送制御を受ける可能性があり、それには BIT のリン酸化状態が深く関与すると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、哺乳類の概日時計の光同調機構に関与することが示唆されている BIT 蛋白質が、1) 網膜及び脳神経細胞において光依存的にチロシンリン酸化され、脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合して細胞内情報伝達に関与すること、2) AP-2 複合体/クラスリンと結合し、クラスリン依存性にエンドサイトーシスを受けて分解すること、などを明らかにした。この研究成果は、神経系の細胞内情報伝達機構における BIT 蛋白質の生理的意義を理解する上で重要なものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値があるものと認める。