

Title	The roles of Src tyrosine kinases during postnatal development of cerebellar Purkinje cells
Author(s)	小谷, 武徳
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47648
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	小 谷 武 徳
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 8 8 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 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	The roles of Src tyrosine kinases during postnatal development of cerebellar Purkinje cells (小脳プルキンエ細胞の生後発達における Src チロシンキナーゼの役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 田 雅 人 (副査) 教 授 吉 川 和 明 教 授 八 木 健

論 文 内 容 の 要 旨

まず本研究では小脳プルキンエ細胞特異的に活性を示す L7 プロモーターを用いて n-Src、Fyn 及びそれらの活性型を発現するトランスジェニックマウス（以下 TG マウス）を作製し、表現型の観察を行った。その結果 Fyn TG マウスの小脳では外見上の異常が認められないのに対し、Src TG マウスの小脳では生後 7 日以降、神経突起形成異常を伴う異所性プルキンエ細胞が小脳分子層に出現することを確認した。電子顕微鏡下における生後 10 日目の Src TG マウスの樹状突起の観察により、Src TG マウスでは微小管密度の増大、及び微小管形態の異常が観察された。また、Src 及び Fyn TG マウス小脳では 4 種類のタンパク質チロシンリン酸化の亢進が顕著であることを確認し、特に 85 kDa のタンパク質 (p85) は Fyn よりも n-Src を発現する TG マウスの小脳で強くリン酸化され、形態異常発生の相関性が認められた。そこで p85 の同定を試みたところ、p85 のバンドは mDab1 を含むことを明らかとした。しかし mDab1 欠損マウス (scramblar マウス) と Src TG マウスの交配によって得られた scramblar/Src TG マウスでは mDab1 の欠損によって起こる表現型と Src TG マウスの表現型が共存していた。またウエスタンブロッティングにおいて scramblar/Src TG マウスでは mDab1 が存在しないにもかかわらず 85 kDa 付近に亢進したチロシンリン酸化バンドが見られた。そこでさらに生化学的な解析を加えたところ、このバンドが PI3K の p85 サブユニットであることが明らかとなった。また、Src TG マウス小脳において PI3K の下流分子にあたる Akt の活性化を確認した。

次に、小脳細胞の初代培養を行ったところ、Src TG マウス由来のプルキンエ細胞では樹状突起が異常に太く、先端に異常な成長円錐様構造を持つことが明らかとなった。これらの異常は Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) インヒビターである PP2 を添加した培地中では形成されなかったが、PP2 は樹状突起の正常な伸長を阻害することも明らかとなり、プルキンエ細胞の正常な発達には SFK の活性が必要であることを示した。一方、PI3K インヒビターである LY294002 を添加した培地中では、Src TG マウス由来のプルキンエ細胞に見られる異常な表現型は部分的に抑えられたが、樹状突起を伸展しないプルキンエ細胞が増加することが明らかとなった。さらに、野生型及び Src TG マウスに由来するどちらのプルキンエ細胞においても、樹状突起の分岐が顕著に促進された。この結果から樹状突起形成における Src-PI3K の関係を完全に理解することは出来なかったが、PI3K の活性がプルキンエ細胞の樹状突起形成を制御していることが明らかとなった。

そこで、レチノイン酸によって神経突起伸長が誘導されるヒトニューロblastoma SH-SY5Y 細胞株を用いて神経突起伸長に焦点を絞った Src-PI3K 経路の役割について検討したところ、Src-PI3K 経路の活性化がレチノイン酸によって誘導される神経突起伸長に必須であることが確認された。さらに n-Src を過剰発現した SH-SY5Y 細胞は、レチノイン酸で刺激をしない状況でも PI3K の活性化を導き、神経突起を伸長することを明らかとした。以上の結果は Src-PI3K 経路の活性が神経突起の形態を制御する能力を有していることを示す。これらの結果により、Src-PI3K 経路の活性が微小管の挙動を制御することで *in vivo* においても樹状突起の形態を決定している可能性が予想された。

論文審査の結果の要旨

Src family tyrosine kinase (SFK) は、細胞の増殖、分化、移動などの細胞機能の制御に関与する必須の細胞内シグナル分子である。脳の形態形成時においても、SFK メンバーの Src および Fyn が神経細胞の分化・発達過程で機能すると考えられているが、それらの *in vivo* における実際の機能は明らかでなかった。本研究では、マウス小脳プルキンエ細胞特異的に Src および Fyn を高発現するトランスジェニックマウス (TG) を用いた機能解析を行った。その結果、Src TG の小脳では、樹状突起形成異常を伴う異所性プルキンエ細胞が小脳分子層に蓄積することを見出した。電子顕微鏡観察では微小管密度の増大や微小管形態の異常が認められ、Src の活性が微小管構築の制御に関与することが示唆された。細胞内シグナル伝達経路の解析からは、Src TG では mDab1 と PI3K のチロシンリン酸化が表現型とリンクして亢進することを見出した。さらに mDab1 欠損マウスや培養細胞系を用いた解析から、Src による PI3K の活性化が主要な経路であることが示された。本研究によって明らかになった神経細胞における Src の機能は、神経細胞の形態形成機構を理解する上で重要なものと思われる。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。