

脳由来神経栄養因子 (BDNF) の細胞内チロシンリン酸化シグナルの解析

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced intracellular signaling

研究代表者 大阪大学蛋白質研究所生合成部門 助手 山田 雅司
Instructor, Division of Protein Biosynthesis, Institute for Protein Research, Osaka University
Masashi Yamada

Activated receptor tyrosine kinases induce a large number of tyrosine phosphorylation-dependent protein-protein interactions through which they mediate their various ligand-exerted functions including regulation of proliferation, differentiation and survival. TrkB receptor tyrosine kinase activated by binding of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) also stimulates various protein interactions in a tyrosine phosphorylation-dependent manner in neuronal cells. To examine tyrosine phosphorylation-dependent interactions stimulated by active TrkB, I developed a modified yeast two-hybrid system, which we call the yeast two-and-a-half-hybrid system. In this system, yeast was engineered to express a tyrosine kinase domain of TrkB as an effector, in addition to two fusion proteins with GAL4 DNA-binding and GAL4 activation domains as bait and prey proteins, respectively. Using this system with Shp2 as the bait, I demonstrated that Shp2 interacts directly with BIT/SHPS-1 (also called SIRP) and Grb2 depending on tyrosine phosphorylation mediated by TrkB. Furthermore, I screened an adult human brain cDNA library with the yeast two-and-a-half-hybrid system. As a result, I found that fibroblast growth factor receptor substrate 2 β (FRS2 β), also called SNT2, interacts with Shp2 dependently on TrkB-mediated tyrosine phosphorylation of FRS2 β /SNT2. Therefore, I show that the two-and-a-half-hybrid system is a powerful tool for studying tyrosine phosphorylation-dependent protein-protein interactions in intracellular signaling pathways stimulated by TrkB receptor tyrosine kinase.

1. 研究目的

脳由来神経栄養因子 (BDNF) およびそのレセプターである TrkB チロシンキナーゼは、共に脳において発現が高く、ニューロンに対して分化、成熟、生存維持等の作用を持っている。しかし、BDNF がどのようにしてこれらの多様な機能を発揮しているか、その細胞内シグナル伝達に関する研究はほとんど進んでいない。BDNF は TrkB に結合し活性化させることにより、細胞内において様々なシグナル蛋白質のチロシンリン酸化、蛋白質-蛋白質相互作用等を誘導し、これらの作用を發揮している。また近年、BDNF シグナル伝達系に関わる新規シグナル蛋白質が報告されつつある。私は今まで、既知のシグナル蛋白質に対する抗体を用いて、BDNF 細胞内シグナル伝達の解析を行ってきたが、想像以上に様々な蛋白質のチロシンリン酸化および蛋白質相互作用が観察されることがわかった。しかしながら、これらのシグナル蛋白質については未同定なものも多く、ましてやこれらシグナル蛋白質の生理的役割につい

ては全くわかっていない。そこで本研究では、BDNF 細胞内シグナルの全ぼう解明を目的とし、特に今回、TrkB チロシンリン酸化シグナルにおける蛋白質-蛋白質相互作用に着目し解析を行った。

2. 研究経過

2. 1. 方法

改変型酵母 *Two-hybrid* 系 (酵母 *Two-and-a-half-hybrid* 系)

酵母 *Two-hybrid system* の応用として、TrkB のキナーゼドメインを酵母に発現させることにより、酵母内で TrkB によるチロシンリン酸化が起こる系の構築を行った。その際、野生型 TrkB キナーゼドメインは、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質 (GST-TrkB) として発現させた。TrkB はリガンドである BDNF が結合することにより二量体を形成し、その結果、活性化することがわかっている。また、GST は二量体化能を有することが知られており、GST-TrkB 融合蛋白質は、GST 部分を介した二量体形成により TrkB キナ

ーゼドメインの活性化を示す。なお、対照として、キナーゼ不活化変異体 (ATP 結合部位に存在するリシン残基をアルギニン残基に置換した) TrkB キナーゼドメインの GST 融合蛋白質 (GST-TrkB Kin⁻) を用いた。また今回、DNA 結合ドメインと融合させる蛋白質 (bait) として Shp2 を、活性化ドメインと融合させる蛋白質 (prey) として BIT/SHPS-1、Grb2、あるいはヒト脳 cDNA ライブラリー蛋白質を用いた。蛋白質相互作用の解析は、ヒスチジン不含 3-aminotriazole 含 synthetic complete 寒天培地 (-His+3AT) 上での増殖、およびβ-ガラクトシダーゼ活性を指標に行った。蛋白質相互作用が起こっている場合、その酵母は、-His+3AT 培地上において増殖することができ、さらにβ-ガラクトシダーゼ活性の上昇も示す。

酵母内における TrkB によるチロシンリン酸化の検出

野生型 TrkB キナーゼドメインと GST の融合蛋白質 (GST-TrkB WT) あるいはキナーゼ不活化変異体 GST 融合蛋白質 (GST-TrkB Kin⁻) を酵母に発現させた後、細胞抽出液を調製した。そして、この抽出液を抗ホスチロシン抗体を用いたウエスタンブローディングにより解析を行った。また、GST-TrkB 融合蛋白質の発現確認は、抗 TrkB 抗体を用いて同様に行った。

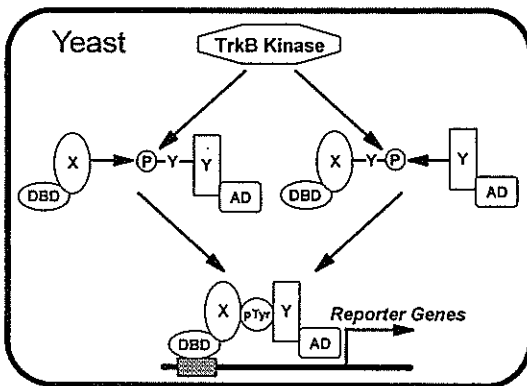


Figure 1. Modified yeast two-and-a-half-hybrid system (two-and-a-half-hybrid system). In the yeast two-and-a-half-hybrid system, yeast expresses the tyrosine kinase domain of TrkB as an effector, in addition to two fusion proteins with GAL4 DNA-binding domain (DBD) and GAL4 activation domain (AD) as bait and prey proteins, respectively. X and Y are proteins fused with DBD and

AD, respectively. In this study, X is Shp2, and Y is BIT/SHPS-1, Grb2 or human brain cDNA library. (発表論文 1 より引用)

2. 2. 結果および考察

我々は、チロシンリン酸化依存的蛋白質相互作用を解析するため、酵母 Two-hybrid 系を応用し、bait (GAL4 DNA 結合ドメインとシグナル蛋白質との融合蛋白質) と prey (GAL4 活性化ドメインと目的のシグナル蛋白質あるいはヒト脳 cDNA ライブラリー蛋白質との融合蛋白質) と共に活性型の TrkB 細胞質ドメインを酵母内に発現させる系を構築した。その結果、酵母内で TrkB によるチロシンリン酸化を誘導し、チロシンリン酸化に伴う蛋白質相互作用を同定することに成功した。この場合、bait 蛋白質とチロシンリン酸化された prey 蛋白質との相互作用、および prey 蛋白質とチロシンリン酸化された bait 蛋白質との相互作用の両方が検出可能である (Figure 1)。

Figure 2 には、酵母内に TrkB 細胞質ドメインを発現させることによって、蛋白質チロシンリン酸化が誘導されることを示している。一方、対照として、キナーゼ不活化変異体 TrkB を発現させた酵母においてはチロシンリン酸化は観察されなかった。

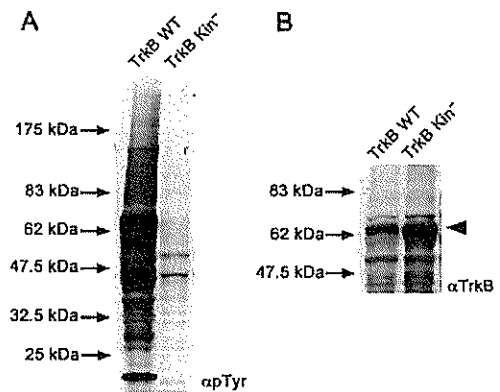


Figure 2. Tyrosine phosphorylation of cellular proteins in yeast expressing TrkB intracellular domain. (発表論文 1 より引用)

次に、Two-and-a-half-hybrid 系を用いて、Shp2 と BIT/SHPS-1 および Shp2 と Grb2 のチロシンリン酸化依存的相互作用の解析を行った (Figure 3)。その結果、これら 2 種類の相互作用は、TrkB のチロシンキナーゼ活性に依存して観察された。また、Shp2 と BIT/SHPS-1 間の相互作用は、BIT/SHPS-1 の細胞

質に存在する 4 つのチロシン残基のリン酸化を必要とすること、Shp2 と Grb2 間の相互作用には、Shp2 の 542 番目と 580 番目のチロシン残基のリン酸化を必要とすることがわかった。

続いて、Shp2 を bait に用いて、ヒト脳 cDNA ライブラリーを Two-and-a-half-hybrid 法によりスクリーニングを行った。その結果、4 つの陽性クローンを得ることに成功した。そのうち、2 つは FRS2 β /SNT2 で、残りは BIT/SHPS-1 であることがわかった。さらに、Shp2 結合蛋白質として報告されていなかった FRS2 β /SNT2 についてさらに解析を行った結果、Shp2 と FRS2 β /SNT2 間の相互作用には、FRS2 β /SNT2 の 417 番目と 455 番目のチロシン残基のリン酸化を必要とすることがわかった。Table 1 には、これらの Shp2-FRS2 β /SNT2 間相互作用の強度を、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより定量的に解析を行った結果を示す。

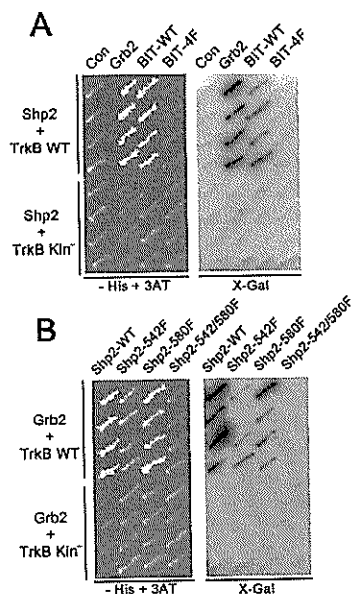


Figure 3. Analysis of interactions of Shp2 with Grb2 and BIT/SHPS-1 by means of the yeast two-and-a-half-hybrid system. (発表論文 1 より改変して引用)

3. 研究成果

私は、酵母 Two-hybrid 系を改変し、bait と prey と共に、TrkB 細胞質チロシンキナーゼドメインを酵母内に発現させる系(酵母 Two-and-a-half-hybrid 系)を新たに構築した。その結果、酵母内において TrkB によるチロシンリン酸化を誘導し、それに伴

う蛋白質-蛋白質相互作用を観察する系を確立した。

4. 今後の課題と発展

細胞内シグナル蛋白質の生理的役割の解析については、アデノウイルス発現系を用いて、培養中枢ニューロンに目的のシグナル蛋白質を発現させることにより進めたい。アデノウイルス発現系は、ニューロンなどの非分裂細胞において非常に効率よく目的蛋白質を発現させることが可能であり、BDNF 作用に対する、目的シグナル蛋白質の生化学的解析を可能にしてくれる。

Table 1. Assessment of the degree of interaction between FRS2 β /SNT2 and Shp2 by the yeast two-and-a-half-hybrid liquid β -galactosidase assay.

	TrkB WT	TrkB Kin ⁻
Con.	607.7 + 24.0	629.3 + 71.3
FRS2 β /SNT2		
WT	70672.1 + 802.1	991.1 + 91.2
Y417F	21670.0 + 63	886.5 + 103.2
Y455F	3958.1 + 198	1078.1 + 55.4
Y417/455	1055.6 + 170.2	1108.6 + 44.2

(発表論文 1 より引用)

5. 発表論文リスト

1. Yamada, M., Suzuki, K., Mizutani, M., Asada, A., Matozaki, T., Ikeuchi, T., Koizumi, S., and Hatanaka, H. (2001) Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent protein-protein interactions in TrkB-mediated intracellular signaling using modified yeast two-hybrid system. *J. Biochem.*, in press.
2. Yamagishi, S., Yamada, M., Ishikawa, Y., Matsumoto, T., Ikeuchi, T., and Hatanaka, H. (2000) p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.*, 267, 5129-5133.
3. Araki, T., Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., and Hatanaka, H. (2000) BIT/SHPS-1 enhances brain-derived neurotrophic factor-promoted neuronal survival in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 75, 1502-1510.
4. Araki, T., Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Uetsuki, T., and Hatanaka, H. (2000) Shp-2 specifically regulates several tyrosine-phosphorylated proteins in brain-derived neurotrophic factor signaling in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, 74, 659-668.