

31G-pm03

c-Src のリソソームにおけるチロシンリン酸化基質の探索

○阿部 紘平¹, 盛永 敬郎¹, 久保田 翔¹, 幸 龍三郎¹, 福本 泰典¹, 中山 祐治¹, 山口 直人¹ (¹千葉大院薬・分子細胞生物学)

【目的】非受容体型チロシンキナーゼである Src 型チロシンキナーゼは細胞増殖や接着に重要な働きを担っている。Src ファミリーのメンバーである c-Src は細胞膜に局在し増殖や接着等のシグナルの伝達に参与している。これまでに我々は c-Src がリソソーム膜上にも局在して細胞膜との間を移動することを見出してきたが、c-Src のリソソームにおけるチロシンリン酸化基質はまだ同定されていない。そこでリソソームにおける c-Src のチロシンリン酸化タンパク質を検出することを目的とした。

【方法・結果】c-Src の C 末に HA タグを付加した c-Src-HA 発現プラスミドを構築した。ヒト子宮頸癌由来 HeLa S3 細胞を用いて、doxycycline (Dox) 添加により c-Src-HA の誘導発現調節が可能である細胞株を樹立した。この細胞株に Dox を処理して 24 時間 c-Src-HA を誘導し、細胞を破碎後遠心して核を取り除いた (post nuclear supernatant, PNS)。PNS を 0.25-1.5 M ショ糖密度勾配中で 100,000 x g, 85 分間の超遠心を行ない、細胞膜が豊富な画分 (細胞膜画分) とリソソームが豊富な画分 (リソソーム画分) に分画した。それぞれの画分に ATP を加えて *in vitro* でリン酸化反応させた。チロシンリン酸化タンパク質を検出する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、リソソーム画分に特異的なチロシンリン酸化タンパク質を検出した。

【考察】c-Src-HA 誘導発現細胞のリソソーム画分において細胞膜画分とは異なるチロシンリン酸化タンパク質が検出された。このことからリソソーム膜上の c-Src は細胞膜の c-Src とは異なった基質をチロシンリン酸化することで機能する可能性がある。