

論文の内容の要旨

論文題目 癌原遺伝子産物 Cbl ファミリーの機能解析

氏名 金 玫秀

チロシンキナーゼは受容体型・非受容体型に分けられ、正常細胞では細胞の増殖や分化、さらに免疫系や神経系での高次機能に重要である。細胞癌化において、多くの癌でチロシンキナーゼの活性が異常に上昇していることが報告されている。チロシンキナーゼを介する情報伝達経路を制御するシグナル伝達分子は今まで数多く同定されてきているが、その中で私はチロシンキナーゼシグナルを負に制御する Cbl ファミリー分子を対象にして研究を進めた。

v-cbl はマウスに pre-B リンパ腫、pro-B リンパ腫、骨髄性白血病を発症させる Cas NS-1 レトロウイルスから単離された。その細胞ホモログである *c-cbl* の遺伝子クローニングから *cbl* 遺伝子は無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存されており、研究開始当時は線虫では *sli-1*、ハエでは *D-cbl*、更にヒトでは *cbl*、*cbl-b* が同定されて Cbl ファミリーを形成していた。

Cbl はその構造上、リン酸化チロシンを認識して結合する tyrosine-kinase-binding (TKB) ドメイン、RING フィンガー、リンカードメイン、プロリン富む領域、ロイシンジッパー、ubiquitin-associated (UBA) ドメインを有する (図 1)。ファミリーメンバーの間では TKB と RING フィンガーはすべてによく保存されているが、その C-末端側は多様性があり、*Sli-1* は

プロリン富む領域まで、D-Cbl (Short form) は RING フィンガーまでを有する。

Cbl は種々の細胞外の刺激 (例えば EGF、PDGF、GM-CSF、抗原など) に伴って活性化される広範なチロシンキナーゼ (受容体型、非受容体型) のよい基質である。線虫の遺伝学を用いた系で Cbl のホモログ Sli-1 が EGF 受容体 (Let-23) からのシグナルを負に制御することが示された。さらに哺乳類の系においても Cbl ファミリーはチロシンキナーゼを介したシグナルを抑制することが示された。その抑制メカニズムについて現在、Cbl ファミリーは RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、チロシンキナーゼのユビキチン化・分解を促進すると提唱されている。*cbl* 欠損マウスでは、リンパ系組織や乳腺の過形成 (hyperplasia) が見られた。また *cbl* 欠損 T 細胞では、抗原受容体刺激による細胞内タンパクのチロシンリン酸化の増強、また ZAP-70 キナーゼ活性の上昇が見られた。最近、報告された *cbl-b* 欠損マウスでは T 細胞受容体の副シグナルである CD28 非依存的な細胞活性化が見られ、マウスは自己免疫疾患になる。しかし、Cbl や Cbl-b 欠損による異常は限られた組織・細胞でしか見られず、Cbl や Cbl-b またそれ以外の Cbl ファミリー分子によって、機能相補があると考えられた。

第1章で私は Cbl の生理的な役割を解明する過程で、新規ヒト Cbl ファミリー分子 Cbl-c の同定及び遺伝子クローニングを行い、その機能解析を行った。

c-cbl を用いてホモロジー検索を行ってみると今まで知られているファミリー以外に *cbl* と相同性を示しているヒト EST クローンが見つかった。検索の結果、この EST クローンは新しい Cbl ファミリー分子をコードする可能性が唆され、*cbl-c* と命名した。この EST クローンを入手し、cDNA クローニングを行った。ヒト腎臓及び胎盤 cDNA ライブラリーのスクリーニングやオリゴ・キャッピング法を用いてヒト *cbl-c* の全長 cDNA を単離した。その塩基配列を決定した結果、予想される Cbl-c の計算上の分子量は 474 アミノ酸からなる 52 kDa であった (図1)。Cbl-c は大腸・小腸で発現が高い蛋白質で、Cbl 及び Cbl-b と異なる発現を示した。ファミリー間で保存されている TKB ドメイン、RING フィンガーは 50% の相同性を示すが、その C-末端側は大きく欠失していた。その構造上 Cbl-c は線虫の Sli-1 に類似していた (図1)。Cbl-c の C-末側にはプロリンに富む配列が見つかり、Src、PI3K p85 など SH3 ドメインを持つ蛋白質との結合が予想された。実際私は Cbl-c と種々の SH3 ドメインを持つ蛋白質 (Fyn、Grb2 など) との会合を示した。さらに Cbl-c と Fyn との細胞内での会合をみるため、293T 細胞に Cbl-c と Fyn の野生型または変異体を共発現させ、免疫沈降実験で調べた。その結果 Cbl-c は Fyn の SH3 ドメインに会合することが示された。またこれとは別に Fyn のキナーゼ活性に依存した Fyn と Cbl-c との結合様式があることがわかり、この結合は Cbl-c の TKB ドメインを介するものと考えられる。

これまで報告されていた Cbl ファミリーは EGF 受容体からのシグナルを負に制御していた。

私は 293T 細胞の再構成系において、Cbl-c が EGF 刺激に伴い、EGF 受容体に会合し、チロシンリン酸化されることを示した。この EGF 受容体との会合及びチロシンリン酸化は Sli-1 の機能減弱変異に相当する変異 (G276E) により失われた。また、Cbl-c が認識する EGF 受容体のリン酸化チロシン残基を解析した。その結果、Cbl-c は EGF 受容体のチロシン 1045 のリン酸化を認識して結合した。最近、Cbl 及び RING フィンガーを持つ蛋白質がユビキチンリガーゼとして働くことが明らかになった。Cbl-c についてもユビキチンリガーゼ活性があるかを調べた。Cbl-c と EGF 受容体を共発現させると、EGF 刺激に伴う EGF 受容体のユビキチン化が促進された。従って Cbl-c も他の Cbl ファミリー分子を同様にユビキチンリガーゼの活性を持つことが示された。

以上より第 1 章では、新規 Cbl ファミリー分子 Cbl-c は RING 型ユビキチンリガーゼとしてチロシンキナーゼのシグナルを負に制御する分子だと示唆される。

次に第 2 章では Cbl ファミリー分子間の機能の相違や Cbl ファミリーの標的基質についての解析を進め、Cbl-c の標的基質として v-Src を同定した。

蛋白質分解を介するユビキチン・プロテアソームシステムは急速に解析が進み、現在は細胞周期制御・分化・発生・癌や神経変異疾患など様々な生命現象に関わっていることが明らかになってきた。従ってユビキチンリガーゼとして機能することによりチロシンキナーゼシグナルを負に制御する Cbl ファミリー分子はこれらの種々の生命現象に重要であると考えられる。実際、Cbl や Cbl-b を欠損するマウスでは免疫系での異常が報告されている。しかし Cbl ファミリー分子の生理的重要性は細胞・個体レベルでも充分には理解されておらず、Cbl ファミリー分子によりユビキチン化される標的分子の同定も不十分である。

非受容体型チロシンキナーゼである Src の活性が高い大腸癌細胞株が報告されており、Src の分解を促進する分子が癌抑制分子として働く可能性が考えられた。そこで私は Cbl-c、Cbl 及び Cbl-b が v-Src による癌化を抑制するかを検討した。Cbl-c をコードするレトロウイルスを v-Src により癌化した NIH3T3 細胞に感染させ、軟寒天コロニーアッセイを行った。その結果 v-Src 癌化細胞によるコロニー形成は Cbl-c により抑制され、v-Src 癌化細胞の形態も平坦に回復した。この抑制は Cbl-c の TKB ドメイン変異体 (G276E) では見られず、RING フィンガー変異体 (C351A) では部分的であった。従って Cbl-c の TKB ドメイン及び RING フィンガーの重要性が示された。293T 細胞再構成系において、野生型 Cbl-c は c-Src のユビキチン化を促進した (図 2)。in vitro の系において、Cbl-c はユビキチン転移酵素 UbcH5 と協調して Src をユビキチン化した。また Cbl-c 自身のユビキチン化も確認された。Cbl-c と Src の会合実験により Cbl-c はその TKB ドメインにより、チロシン 419 が自己リン酸化した Src と結合すると考えられた。以上より、Cbl-c は v-Src のユビキチン化・

分解によって癌化を抑制すると考えられる。Cbl-c は発現している正常細胞においても c-Src を直接抑制すると考えられる。一方、同様の系により Cbl 及び Cbl-b も v-Src 癌化細胞のコロニー形成を抑制したが、細胞の形態には影響がなく、Cbl-c との違いが見られた。このことは Cbl、Cbl-b は v-Src とは異なる細胞癌化に重要なチロシンリン酸化蛋白質を標的にして、v-Src による癌化を抑制することを示唆しており、今後そのメカニズムを明らかにしたい。

The Cbl family

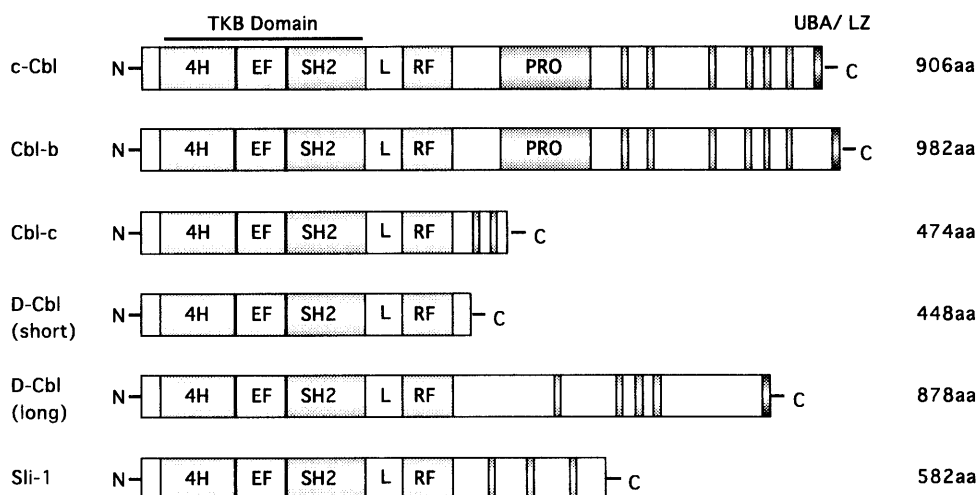


図1. Cbl ファミリーの構式図

ヒト Cbl ファミリー: c-Cbl, Cbl-b, Cbl-c, ショウジョウバエ Cbl: D-Cbl (Short, Long) 線虫の Cbl: Sli-1. TKB はリン酸化チロシン結合ドメイン、L はリンカー、RF は RING フィンガー、PRO はプロリンに富む領域、UBA は Ubiquitin-associated ドメイン、LZ はロイシンジッパーを示す。TKB ドメインは 4-helix bundles (4H)、calcium binding EF hand (EF)、unusual SH2 (SH2) ドメインからなる。私が同定した Cbl-c は 474 aa からなる 52 kDa の蛋白をコードする。

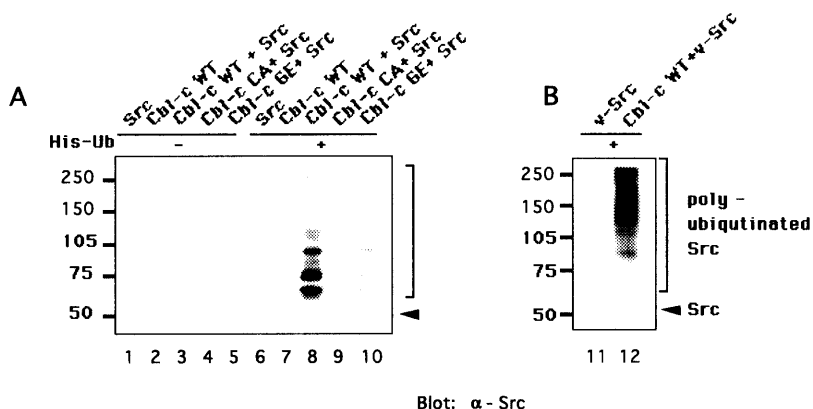


図2. Cbl-c による Src 及び v-Src のユビキチン化

293T 細胞に Src、His-Ub、Cbl-c の野生型 (WT) 及び変異型 (G276E、C351A) を発現させ、6M 塩酸 Guanidinium に可溶化した。この溶液に Ni-NTA アガロースを加え、His-Ub が結合した分子を精製した。ユビキチン化された Src のシグナルを抗 Src 抗体を用いて調べた。その結果、野生型 Cbl-c、Src、His-Ub を共発現させたレーンで高分子量のユビキチン化された Src 蛋白質のシグナルが検出された (A のレーン8)。このようなシグナルは Cbl-c の変異体を発現させたレーン9、10ではほとんど検出できなかった。B) は同様な実験系を用いて v-Src のユビキチン化について調べた。その結果、Cbl-c は v-Src をユビキチン化を促進した (Bのレーン12)。矢頭はもとの Src の位置を示す。