

論文審査の結果の要旨

氏名 金 玫秀

本論文はチロシンキナーゼを介するシグナル経路を負に制御する分子の一つである Cbl ファミリーの機能について述べられている。本論文の内容を要約すると以下のようなになる。

第 1 章では新規 Cbl ファミリー分子 Cbl-c の遺伝子クローニング及び Cbl-c の機能について述べられている。

論文提出者はデータベース検索により今まで知られているファミリー以外に *cbl* と相同性を示す EST クローン を見つけた。検索の結果、この EST クローンが 新しい Cbl ファミリーをコードする可能性が示唆され、*cbl-c* と命名し、その遺伝子クローニングを行った。

cbl-c は計算上の分子量は 474 アミノ酸からなる 52 kDa の蛋白質であった。Cbl-c はその構造上、リン酸化チロシンを認識して結合する TKB ドメイン、RING フィンガー、プロリンに富む領域を有していた。Cbl 及び Cbl-b と比較して、TKB ドメインと RING フィンガーは 50% の相同性を示すが、その C-末端は大きく欠失していた。ノザン解析を用いて、*cbl-c* の mRNA の発現を調べた。その結果、*cbl-c* は大腸、小腸などで発現が見られ、他の *cbl* ファミリー分子とは異なる発現を示し、これらの細胞で Cbl ファミリーの役割を担うと考えた。

また、Cbl-c の C-末端には SH3 ドメインと相互作用をするプロリンに富む領域の配列が 2 カ所あることを見だし、SH3 ドメインを持つ蛋白質と Cbl-c が相互作用する可能性があると考えた。そこで SH3 ドメインを持つ Src 型チロシンキナーゼ Fyn との会合を GST-pull down アッセイを用いて調べた。その結果、Cbl-c は Cbl-c のプロリンに富む領域を介して Fyn の SH3 ドメインと会合することを示した。Cbl-c と Fyn の細胞内での会合も調べた。293T 細胞に Cbl-c と Fyn を発現させ、免疫共沈実験により両者の会合を調べた。その結果、

Cbl-c は Fyn と 293T 細胞内で会合した。その会合は Fyn のキナーゼ活性と SH3 ドメインに依存することも示した。

次に、今まで知られている Cbl ファミリー分子はすべて受容体型チロシンキナーゼである EGF 受容体と会合し、そのシグナルを負に制御するとされているので、Cbl-c も他のファミリー分子と同様に EGF 受容体シグナル経路に関与するかを調べた。293T 細胞の再構成系を用いて調べた結果、Cbl-c は EGF 刺激に伴い、その TKB ドメインを介して EGF 受容体と会合することを示した。また、EGF 受容体の自己リン酸化チロシン残基の変異体を用いて、Cbl-c は EGF 受容体の 1045 番目のチロシン残基のリン酸化を認識して会合することを示した。Cbl がユビキチンリガーゼとして機能することに注目し、Cbl-c について調べた。その結果、Cbl-c は EGF 刺激に伴って EGF 受容体のユビキチン化を促進した。

以上のことより、Cbl-c はチロシンキナーゼのシグナルを制御する新規 Cbl ファミリー分子であることを示した。

第 2 章では RING 型ユビキチンリガーゼとしての Cbl-c の機能に注目して研究を進め、Cbl-c による Src の分解について述べられている。

論文提出者は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いることに注目し、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を考えた。そこでまず、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。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。*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。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た。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いる。

以上のことより、Cbl-c は Src のユビキチンリガーゼとして機能し、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。

以上、論文提出者は新規 Cbl ファミリー分子 Cbl-c の遺伝子クローニングを行い、更に Cbl-c を中心として Cbl ファミリーによるチロシンキナーゼシグナルの抑制についての解析を進めた。

チロシンキナーゼの活性上昇はヒトの癌で良く見られ、Cbl ファミリーによるチロシンキナーゼシグナル伝達経路の抑制機構を明らかにすることは癌化機構の解明に寄与する研究であると考えた。また、Cbl ファミリーの解析は Cbl ファミリー分子が制御する生命現象の理解のみならず、生命高次機能に重要な他のユビキチンシステムの理解にも展開できる研究であると考えた。従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。

なお、本論文では手塚徹氏、鈴木穰氏、菅野純夫氏、平井百樹氏、山本雅氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。