

## 審査の結果の要旨

氏名 松村 有子

c-Cbl は、マウスに感染するとBリンパ系腫瘍を発症するレトロウイルスの遺伝子より、proto-oncogene として同定された分子である。全身の組織に普遍的に発現しており、T細胞受容体やB細胞受容体、EGF受容体、PDGF受容体、IL-2等のサイトカイン受容体、インスリン受容体等を通じた様々な細胞外刺激によりリン酸化され、シグナル伝達経路で重要な役割を担う。また、Syk、Zap、Src、Grb2、Nck、Crk、PI-3 kinase等と結合することが知られている。上記の受容体下流のシグナル伝達において、c-CblはRINGフィンガードメインを介してユビキチン化に関与し、負の制御を行うことが明らかにされている。近年、c-Cblが細胞形態やアクチンの細胞骨格形成においても重要な役割を担う事がわかってきた。しかし未だ不明な点が多く、特に生理的な条件下におけるc-Cblの役割の解析についてはこれまで報告されていなかった。申請者の研究はc-Cblノックアウトマウスから得た胎児線維芽細胞を用いて、c-Cblが細胞形態や細胞骨格形成、細胞運動能に関する事を明らかにしたものである。

- 1 c-Cblノックアウトマウスの胎児線維芽細胞に、フィブロネクチンによるインテグリン刺激を行い、細胞の接着、伸展、運動能について野生型同胞マウスの胎児線維芽細胞と比較する実験を行った。その結果、c-Cbl欠損線維芽細胞では、フィブロネクチン刺激による細胞の移動 (migration) が有意に低下していた。一方、フィブロネクチンをコートした培養皿への細胞の接着伸展 (spreading) は、ノックアウトマウス由来細胞は野生型に比べて迅速であった。逆に、細胞のフィブロネクチンへの固着 (adhesion) や *in vitro* での損傷回復には両者に明らかな差はみられなかった。
- 2 抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) を用いたウエスタンブロットを行い、インテグリン刺激後のタンパクリン酸化を、c-Cblノックアウトマウスと野生型マウスの線維芽細胞で比較した結果、c-Cbl欠損細胞ではインテグリン刺激後のFAK、Cas、Crkのチロシンリン酸化が正常細胞に比べて有意に低下していた。c-Cblが線維芽細胞において、FAK、Cas、

Crk を介したインテグリンシグナル伝達に関与している事を明らかにした。さらに免疫沈降法を用いて、c-Cbl と Cas、c-Cbl と FAK が細胞内で結合する事を明らかにした。

- 3 c-Cbl 欠損細胞と野生型細胞において、インテグリン刺激後の Rac、Rho の活性を調べ、c-Cbl 欠損細胞では、インテグリン刺激前の Rac、Rho の活性が正常細胞に比べて有意に高い事を示した。このことから、c-Cbl 欠損細胞では、インテグリン刺激による Rho ファミリー低分子量Gタンパク質の経時的な活性制御が障害されている可能性を示した。
- 4 インテグリン刺激による p38 のリン酸化が、c-Cbl 欠損細胞では野生型細胞に比較して有意に低下している事、p38 の薬理的阻害物質存在下ではフィブロネクチン刺激による細胞運動能が低下した事を示し、c-Cbl が p38 のリン酸化を正に制御し、p38 を介して細胞運動を正に調節している可能性を示した。

以上、申請者の研究は、c-Cbl が Cas、FAK へのシグナル伝達経路に関与してこれを正に制御し、Rho ファミリータンパクの活性化を調節すること、細胞形態や細胞骨格形成、細胞運動能に関与する事を明らかにしたものであり、学位の授与に値するものと考えられる。