



Proto-oncogene c-Cb1-mediates negative regulation of EphA2 receptors

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 友潔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1234

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 381号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	王 友 潔		
論文題目	Proto-oncogene c-Cbl mediates negative regulation of EphA2 receptors (癌遺伝子 c-Cbl による EphA2 チロシンキナーゼ活性の負の制御)		

博士(医学) 王 友 潔

論文題目

Proto-oncogene c-Cbl mediates negative regulation of EphA2 receptors

(癌遺伝子 c-Cbl による EphA2 チロシンキナーゼ活性の負の制御)

論文の内容の要旨

[はじめに]

受容体チロシンキナーゼ(RTK: receptor tyrosine kinase)の多くは細胞外からの増殖シグナルや分化シグナルを受容し、活性化され、様々の細胞内シグナル伝達分子へと情報を伝える。細胞の増殖、分化、細胞の移動、apoptosis、そして癌の発症進展に受容体チロシンキナーゼが深く関わるということが分かってきた。Eph 受容体チロシンキナーゼは RTK ファミリの中、最も大きい亜族である。現在14種類のメンバーを含む。Eph は A と B 2クラスに分けられる。細胞膜に GPI で付けられているリガンドは EphrinA 群で、EphrinA で活性化できるのは EphA クラスの受容体である。細胞膜に膜通過ドメインで結合しているリガンドは EphrinB 群で、EphrinB で活性化できるのは EphB クラスである。

C-Cblは、TKB (tyrosine kinase binding) 領域、RING finger 領域とプロリンに富む C 末を持ち、120kDa の癌遺伝子である。最近の研究によって、Cblは EGFR や PDGFR の様な RTK のシグナルを抑制していることが分かってきた。この Cblによるチロシンキナーゼの負制御は活性化された RTKs の ubiquitination を促進し、そして、proteasome で分解することによるとされている。

Eph チロシンキナーゼは、神経システムの発達とそのネットの形成、胚胎の発達、血管の形成、癌の発生にかかわる。これまで、Eph の活性の制御についてはほとんど報告されていない。制御は Eph の正常な機能にとって非常に重要な事と考えられる。

本研究は293T 細胞にそれぞれの Eph、Cbl、Cblの変異体を共発現させ、Eph の活性の変化について検討したものである。

[材料ならびに方法]

1. プラスミド: 各種 Eph と Cbl のコンストラクトは、293T に transfection するため哺乳類発現ベクター pAltermax へ、GST 融合蛋白を作るために pGEX2T へ Subcloning した。
2. 細胞の培養: 293T 細胞は10% FBS の DMEM、5% CO₂、37°C で培養した。
3. Eph 刺激用の effector の作成: EphrinA1 と EphrinB1 の細胞外 domain とマウスの IgG2bFc を融合し、pAlterMax に subcloning し、293T 細胞に一過性発現させ、その medium を回収し、これに ProteinA を加え、Fe 融合蛋白を精製する。
4. 293T 細胞にリン酸カルシウム方法で、種々の Eph 受容体および Cbl の cDNA を導入し、8 時間後、medium を交換し、48 時間後細胞を剥離し、lysis buffer で溶解し、そして12000g 遠心し、上清をとる。タンパクの濃度は Bio-Rad protein assay で測定、同じ量のタンパクを SDS-PAGE で分離したのち、Western blotting で Cbl と Eph の発現を確認した。Cbl を導入の有無で、細胞の EphA2 の発現と活性を調べた。
5. Cbl と Eph の結合の確認: Western blot で Cbl と Eph 発現を確認できた Lysate に Cbl の抗体を加え、4

℃で1.5時間 incubate し、そして、protein A を加え、さらに、4℃で1.5時間 incubate し、protein A beads を4回洗って、SDS-PAGE で分離した。一次抗体は anti-EphA2 を使い、Western blot で Cbl と Eph の結合を調べた。

6. EphA2 と GST-Cbl-N の結合：Cbl の N 末端(amino acid 1-436) の野生型 Cbl-436 と変異体 Cbl-436-G306E を pGEX2T ベクターに subcloning し、*E. coli* で発現させ、GST-beads で精製し、EphA2 発現している 293T 細胞の lysate を加え、4℃で1.5時間 incubate し、SDS-PAGE で分離し、Western blotting で EphA2 と GST-Cbl-N の結合を調べた。
7. Proteasome inhibitor MG132 の影響：EphB2 発現している 293T 細胞に EphrinB1-Fc 刺激する 2 時間前、50 μ M MG132 を加えた。Western blotting で MG132 の有無の細胞の EphB2 量を比べた。

[結果]

1. 作成した分泌型の EphrinA1-Fc、EphrinB1-Fc は EphA2、EphB1 と EphB2 を発現している 293T 細胞を刺激し、EphA2、EphB1 と EphB2 のリン酸化を起こした。
2. Cbl の共発現により EphA2 の発現量は少なくなった、同時に EphA2 の活性も低下した。Cbl と EphA2 は細胞内結合していた。
3. 一方 Cbl の発現により EphB1 と EphB2 の発現量と活性は変わらなかった。
4. Cbl の TKB ドメインは、Cbl と EphA2 の結合にとって、必要な部位であった。
5. Cbl の RING finger ドメインは EphA2 への負制御によって不可欠であった。
6. Cbl による EphA2 の負制御は EphA2 の活性化に依存することが分かった。
7. EphB2 は proteasome の inhibitor MG132 により分解のスピードは遅くなったことが、証明された。

[結論ならびに考察]

最近の研究によって、Cbl は新しい ubiquitin ligase であることが証明されている。Cbl の TKB domain は活性化された EGFR や PDGFR のような substrate に結合し、一方、RING finger domain は Cbl の特有な ubiquitin conjugation enzyme (E2) に結合する。Cbl は E2 から ubiquitin 分子を substrate に移動させ、substrate に polyubiquitin chain を形成し、proteasome はこの polyubiquitin を認識、そして、proteasome で分解する。これは Cbl による受容体チロシンキナーゼの負制御の一般的な mechanism である。

本研究は、Cbl の野生型による EphA2 の発現量と活性の減少を確認するとともに、いくつかの Cbl の変異体を用いて、この作用に必須の Cbl の部位を同定した。一方、Cbl の dominant negative mutant 70Z-Cbl により EphA2 の発現量と活性が増加した。ここで用いている 70Z-Cbl は RING finger ドメインと TKB ドメインの間に 17 個のアミノ酸を deletion し、E2 との結合できなくなっているものであるが、dominant negative mutant 過剰発現させることによって、野生型の Cbl の機能を阻止し、EphA2 が細胞内に蓄積したと考えられた。また、Cbl の TKB ドメインが Cbl と EphA2 の結合にとって必要な部分であったことも証明された。つまり、G306E mutant は TKB ドメインに point mutation がある変異体だが、この point mutation によって、EphA2 との結合を阻止し、EphA2 に対する負制御が消失した。さらに、この負制御は EphA2 の活性にも依存した。EphA2 kinase-inactive mutant は Cbl による負制御を受けず、Cbl との相互作用も見られなかった。また、Cbl と結合しない EphB2 に関しては、刺激された EphB2 が proteasome の inhibitor MG132 によって分解のスピードは遅くなったことにより、Cbl 系以外の ubiquitin ligase により proteasome で分解する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

c-CblはN末端側にTKB (tyrosine kinase binding)領域、中央にRINGフィンガー領域、C末端側にプロリンリッチ領域とロイシンジッパー領域をもつ分子量120kDのユビキチンリガーゼE3である。c-CblはEGF受容体(EGFR)やPDGF受容体(PDGFR)などの受容体チロシンキナーゼ(RTK)およびSyK、ZAP-70などの非受容体型チロシンキナーゼに対する負の調節因子である。これはc-CblがTKB領域でリン酸化されたチロシンキナーゼを結合し、一方でRINGフィンガー領域にE2酵素を結合することにより、選択的にユビキチン系をリクルートすることにより、プロテアソームで標的分子を分解することによる。

EphはRTKファミリーの中で最も大きな亜集団であり、EphAとEphBクラスに分けられる。EphAとEphBクラスは各々それらのリガンドであるephrin Aおよびephrin Bによって活性化される。Ephファミリーは神経システムとそのネットの形成、胚胎の発達、血管形成、発癌に関与するとされているが、Ephの活性制御に関しては明らかにされていない。そこで、申請者らはEph活性のc-Cblによる制御について、それぞれの遺伝子およびその変異体を293T細胞に共発現させることにより検討した。得られた結果は以下の通りである。

- (1) 分泌型のephrin A1-Fcおよびephrin B1-Fcは、それらのFcを抗体で連鎖させることにより、各々293T細胞の内因性EphA2および導入発現させたEphB1、EphB2を刺激し、これらの分子のリン酸化を惹起した。
- (2) c-CblをEphA2またはEphB1、EphB2と共発現させたところ、EphA2のみに発現量、自己リン酸化の低下を認めた。これに一致して、EphA2のみがc-Cblと細胞内結合していた。
- (3) EphA2のキナーゼ領域の変異体はc-Cblとの細胞内結合を示さなかった。
- (4) c-CblのTKB領域の変異体(G306E)はEphA2と結合できず、TKB領域が活性化EphA2との結合に必須であることが分かった。
- (5) RINGフィンガー領域のN末を含む17アミノ酸を欠失した70Z-Cblは、量依存的にEphA2のリン酸化および蛋白量を増大させ、ドミナント・ネガティブ効果を示した。
- (6) EphB2はプロテアソーム阻害剤MG132により分解速度が遅くなることが判明した。

以上より、申請者らはc-Cblが活性化EphA2に結合し、この発現量と活性を負に制御すること、および、EphB1とEphB2には影響を与えないことを示した。また、変異体を用いた実験により、c-CblのTKB領域は活性化EphA2との結合に必須であり、RINGフィンガー領域はEphA2に対する負の制御に不可欠であることを示した。

審査委員会では、EphA2がc-Cblによって負の制御を受けることを初めて明らかにした点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) c-CblがEphA2の分解を亢進しているという直接証拠は、インターナルコントロールを取ったか
- 2) 蛋白の分解速度を検討する方法は
- 3) EphA2がc-Cblによってユビキチン化されるという直接証拠は
- 4) 内因性c-Cblと遺伝子導入による外来性c-Cblの比は
- 5) 遺伝子導入したc-CblとEphが同じ細胞に発現しているという証拠は
- 6) EphA2には何故タグを付けなかったか

- 7) 293T 細胞は内因性の EphB1、EphB2を発現していないか
- 8) 導入した遺伝子が過剰発現かどうかはどのように決めるのか
- 9) 遺伝子導入した EphB の発現が EphA2に較べ弱い理由は
- 10) 免疫沈降に抗 Cbl抗体を使用して、抗 HA 抗体を使用しなかった理由は
- 11) 70Z-Cblの dominant negative 効果が弱い理由は
- 12) MG132の活性化 EphB2に対する影響を検討した実験で、EphB2を定量したか
- 13) EphA2を介した細胞反応に対する c-Cblの影響を検討したか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 小 出 幸 夫
副査 三 浦 直 行 副査 北 川 雅 敏