

学位論文の内容の要旨

専攻	分子情報制御医学専攻	部門	病態制御医学部門
学籍番号	09D737	氏名	新谷 高理
論文題目	Cbl negatively regulates erythropoietin-induced growth and survival signaling through the proteasomal degradation of Src kinase		
(論文要旨)			
<p><背景及び目的> エリスロポエチン (EPO) は赤芽球系前駆細胞の増殖や分化を調節する重要なサイトカインであり、Jak2やSrc familyによるEPOレセプターのチロシンリン酸化を介して、PI3-kinase/AktやJak/Statシグナル伝達系を調節している。CblはE3ユビキチンリガーゼ活性を有し、受容体型及び非受容体型 protein tyrosine kinases (PTKs) のユビキチン化とproteasome経路による分解により、PTKsを介したシグナル伝達を負に制御することが知られている。最近、Cblによるp85 (PI3-kinase 調節サブユニット) のユビキチン化がEPOレセプターのinternalization/downregulationを調節していることが報告されたが、EPOレセプターを介したシグナル伝達におけるCblの生物学的機能は明らかではない。本研究では、ヒト赤白血病細胞を用いて、EPOシグナル伝達におけるCblの生物学的機能とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。</p> <p><方法> 1. F-36Pヒト赤白血病株化細胞に、Cbl short interfering RNA (siRNA) 発現ベクター及び発現ベクターのみを導入したF-36P-Cbl-siRNA及びF-36P-mock細胞を作製した。EPO刺激後の細胞の増殖をWST-1 assayを用いて検討した。またアポトーシス誘導は、FITC-labeled annexin Vで細胞を染色した後、フローサイトメトリーで解析した。</p> <p>2. F-36P細胞をSrc阻害剤PP1及びJak阻害剤AG490で前処理した後EPO刺激を行い、Cblのチロシンリン酸化に及ぼす影響を検討した。また、CblcDNAをSrc及びJak2cDNAとCOS7細胞内に共発現させ、PTKによるCblのチロシンリン酸化を検討した。更に、recombinant Src蛋白を用いたin vitro PTK assayにより、SrcによるCblチロシンリン酸化を解析した。</p> <p>3. F-36P-Cbl-siRNA及びF-36P-mock細胞をタンパク合成阻害剤cycloheximideで前処理後EPO刺激し、経時的にSrcの発現量を解析した。また、Src発現に及ぼすproteasome阻害剤MG-132とlysosome阻害剤NH4Clの影響についても検討した。</p> <p>4. F-36P細胞を用いてEPO刺激によるSrcのユビキチン化の有無、PP1によるSrcユビキチン化への影響を検討した。また、293T細胞にFLAG-tagged Src, Cbl及びHA-tagged Ubiquitin cDNAを共発現させ、Cbl及びSrcキナーゼ活性のSrcユビキチン化に及ぼす影響について解析した。</p> <p>5. F-36P細胞を用いてEPO刺激によるCblのユビキチン化の有無、PP1及びAG490によるCblユビキチン化への影響を検討した。また、293T細胞にSrc, Jak2, Cbl及びHA-tagged Ubiquitin cDNAを共発現させ、PTKのCblユビキチン化への影響を検討した。</p>			

<結果>

1. Cblの発現を抑制したF-36P-Cbl-siRNA細胞では、F-36P-mock細胞に比べEPO刺激による細胞増殖が亢進し、アポトーシスが抑制された。これらはEPOの生理的濃度またはそれ以下において顕著であった。
2. PTK阻害剤を用いた実験及びCOS7細胞を用いた共発現実験の結果、Jak2ではなくSrcがEPO刺激によるCblのチロシンリン酸化に関与していた。In vitro PTK assayでも、SrcによるCblのチロシンリン酸化が確認された。
3. 阻害剤を用いた実験から、Src蛋白はlysosome経路ではなく、proteasome経路で分解されていた。またF-36P細胞におけるCbl発現の抑制により、EPO刺激によるSrc蛋白の分解が抑制された。
4. Cblの発現を抑制したF-36P-Cbl-siRNA細胞では、EPO刺激によるSrcのユビキチン化が抑制された。
5. PP1はEPO刺激によるSrcのユビキチン化を抑制した。293T細胞内でCblをwild-type Srcと共発現させた際にはSrcがユビキチン化されていたが、kinase-inactiveあるいはdominant-negative Srcとの共発現ではSrcはユビキチン化されなかった。
6. EPO刺激によるCblのユビキチン化は、AG490ではなく、PP1で阻害された。また、293T細胞内でCblをwild-type Srcと共発現させた際にはCblがユビキチン化されていたが、kinase-inactive Srcあるいはwild-type Jak2との共発現ではCblはユビキチン化されなかった。

<結語>

Cblは、Srcをユビキチン化した後proteasome経路を介して分解することにより、EPOシグナルを負に制御していることが明らかとなった。EPOシグナルにおいてCblのE3リガーゼ活性やチロシンリン酸化は、Jak2ではなくSrcによって調節されていた。また、Cblのユビキチン化もSrcキナーゼ活性に依存しており、Cblはそれ自身によりユビキチン化されていることが示唆された。

掲 載 誌 名	Blood Cells, Molecules and Diseases			第	卷, 第	号
(公表予定) 掲 載 年 月	2014 年 7 月 (掲載受理)	出版社(等)名	Elsevier B.V.			
Peer Review	有		無			

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。