



Negative regulation of Lyn protein-tyrosine kinase by c-Cb1 ubiquitin-protein ligase in Fc ϵ RI-mediated mast cell activation

姜, 臣縞

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3375

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003375>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 101 】

氏 名・(本 籍) 姜 臣 縞 (韓国)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1654号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Negative regulation of Lyn protein-tyrosine kinase
by c-Cbl ubiquitin-protein ligase in Fc ϵ RI-mediated
mast cell activation

(ユビチキン-蛋白質リガーゼc-Cbl は高親和性
IgE 受容体を介するマスト細胞の活性化において
チロシンキナーゼLynを負に制御する)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一
教 授 熊谷 俊一
教 授 堀田 博

【緒言】

Src ファミリーキナーゼである Lyn は肥満細胞において抗原刺激により最も早期に活性化されるチロシンキナーゼであり、肥満細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たしている。この Lyn の活性制御メカニズムとしては Csk また CD45 による C 末のチロシン残基のリン酸化、脱リン酸化による立体構造の変化による機構、自己リン酸化による酵素活性の上昇による機構が知られている。しかし Lyn のユビキチンリガーゼによるユビキチン化、分解による活性制御メカニズムは詳しく解析されていない。肥満細胞では Fcε 受容体、チロシンキナーゼ Syk がユビキチンリガーゼ c-Cbl のターゲットとなりユビキチン化されることが報告されているが、より上流に位置付けられている Lyn に対する影響は解明されていない。本研究では我々は c-Cbl の肥満細胞における機能、特に Lyn のユビキチン化及びダウンレギュレーションとの関わり合いについて解析を行った。肥満細胞において Lyn は抗原刺激後に c-Cbl 依存性にユビキチン化修飾されることから、c-Cbl が Lyn の負の調節因子であることを証明した。

【方法と結果】

初めに我々は肥満細胞において実際に Lyn がユビキチン化修飾を受けるのかを調べた。N 末に Flag タグを付加したユビキチン cDNA を安定発現させたラットの肥満細胞株である RBL-2H3 細胞にて、抗原刺激をおこない Lyn の抗体にて免疫沈降し Flag にて immunoblot したところ抗原刺激後早期 15 秒をピークとした Lyn のユビキチン化を検出し、肥満細胞において Lyn が抗原刺激依存性にユビキチン化修飾されることを確認した。Yeast two-hybrid screen にて Lyn は c-Cbl と会合することが過去に報告されており、我々はこのことより肥満細胞において c-Cbl が Lyn のユビキチン化に関わっているのではないかと予測し、両者の関係について調べた。

そこでまず肥満細胞におけるユビキチンリガーゼ c-Cbl と Lyn との会合について調べた。RBL-2H3 細胞を抗原刺激し c-Cbl の抗体にて免疫沈降シタイムコースをとったが、チロシンリン酸化抗体による immunoblot にて c-Cbl のチロシンリン酸化を検出するとともに、55kDa あたりにより早期にチロシン

リン酸化された c-Cbl と共沈するダブルバンドを認めた。Lyn の抗体によるリプローブにてこのダブルバンドが Lyn であることが判明し抗原刺激後 c-Cbl と Lyn が一過性に会合することが明らかとなった。さらに Cbl ファミリーのセカンドメンバーであるユビキチンリガーゼ Cbl-b においても同様に Lyn と一過性に会合するという結果を得た。

細胞膜の一部の GEMs/Raft とよばれる部位はシグナル伝達に重要な役割を担っている。肥満細胞においても抗原刺激すると c-Cbl をはじめ種々の蛋白質が GEMs/Raft に集積する。そこで我々はミリスチン酸化、パルミチン酸化の翻訳後修飾により c-Cbl をあらかじめ細胞膜、GEMs に移行するようなタグ、すなわち 3 番目のセリンをシステインに変異させた c-Src の N 末 16 アミノ酸を付加した GEMs 移行型 c-Cbl 発現プラスミドを構築し RBL-2H3 細胞に安定発現させることにより機能解析を行った。そこでまず Lyn のユビキチン化への影響について調べた。

コントロールの RBL-2H3 細胞と比較して、GEMs 移行型 c-Cbl 発現細胞では、抗原刺激後の劇的な Lyn のユビキチン化の増強を認めた。また COS 細胞での DNA トランスフェクションによる一過性発現において、Lyn は自己のキナーゼ活性依存性に c-Cbl によりユビキチン化された。そこでこの肥満細胞における c-Cbl による Lyn のユビキチン化の増強が Lyn のキナーゼ活性に与える影響について検討した。

Enolase を基質とした *in vitro* Lyn kinase assay にて parental 細胞と比較して、GEMs 移行型 c-Cbl 発現細胞では抗原刺激に伴う Lyn キナーゼ活性の著明な減弱を認めた。Fcε 受容体は抗原刺激後 Lyn によりチロシンリン酸化されるが、Lyn キナーゼ活性の減弱と平行に Fcε 受容体のチロシンリン酸化の減弱、またこれらの下流分子である Syk のチロシンリン酸化も同様の減弱を認めた。

次にこの細胞膜にターゲティングした c-Cbl の生理学的重要性を検討した。肥満細胞において最も重要な生理機能である脱顆粒、サイトカイン産生について調べた。脱顆粒においては Ca イオノフォアに対して抗原刺激により放出されるベータヘキソサミニダーゼの割合をみたが、parental 細胞と比較して GEMs 移行型 c-Cbl 発現細胞で脱顆粒の減少を認めた。またサイトカイン産生においては RNase protection assay により IL-3、IL-6 及び TNF-α の産生減弱を認めた。次に c-Cbl のユビキチンリガーゼ活性が脱顆粒に及ぼす影響につ

いて検討した。さきの結果と矛盾なく、GEMs 移行型 c-Cbl を一過性発現させることにより有意な脱顆粒の抑制がみられたが、対照的にユビキチンリガーゼ活性を消失した GEMs 移行型 70-Z c-Cbl の一過性発現では脱顆粒の抑制がみられず、この c-Cbl のユビキチンリガーゼ活性が脱顆粒の抑制に必要であることが確認された。

【考察】

ユビキチン化とは目的蛋白質にユビキチンを付加することにより分解過程へと導く翻訳後修飾の一つである。そのユビキチンを付加する酵素ユビキチンリガーゼの一つに c-Cbl があり N 末より SH2 domain、RING finger domain、Proline rich domain を有し ubiquitous に発現しており EGFR などの受容体型、Syk などの非受容体型チロシンキナーゼをユビキチン化修飾することが知られている。我々は肥満細胞において Lyn が抗原刺激後にユビキチン化修飾され、その酵素活性が分解により制御されていることを見出したが、これは既に知られている Csk による Lyn C 末のチロシン残基のリン酸化による不活性化とは全く異なる新しいメカニズムである。過去の報告で肥満細胞において、c-Cbl は Syk の酵素活性を負に調節し脱顆粒を抑制することが言われているが、我々の結果より c-Cbl は Syk のみならずその上流に位置付けられている Lyn に対してもユビキチン化によりその酵素活性を負に制御する事が明らかとなった。

Cbl ファミリーのセカンドメンバーである Cbl-b も c-Cbl と同じくユビキチンライゲースとしての機能を有するが、T 細胞での解析では c-Cbl が T 細胞受容体や Zap-70、Cbl-b が PI3 kinase のユビキチン化に関わるということ、またそれぞれの遺伝子欠損マウスで c-Cbl は Zap-70、Cbl-b はコレセプター CD28 を介する経路にそれぞれ関わる負の調節因子であることが報告されており、それぞれ異なった機能を有している様に思われる。しかしこれとは別に EGF 受容体や Syk は c-Cbl、Cbl-b 両者ともにユビキチン化されることが報告されており、共通の機能も持ち合わせていると考えられる。我々は肥満細胞において c-Cbl のみならず Cbl-b の発現、抗原刺激後のチロシンリン酸化を確認したが、これに関しては更なる詳細な機能解析が必要である。

近年肥満細胞において Lyn 以外の Src ファミリーキナーゼとして Fyn が脱顆粒に至る相補的な経路すなわち、Fyn-Gab2-PI3 kinase を介する pathway

が同定された。我々は肥満細胞を抗原刺激させると、Fyn も Lyn と同様に早期にユビキチン化されることを見出した。Fyn に対しても Lyn のユビキチン化より c-Cbl がユビキチンリガーゼとして作用することが推測されるが、Cbl-b による影響も否定できず、これに関しては更なる解析が必要と考えられる。

【結論】

肥満細胞において抗原刺激後 c-Cbl のユビキチンリガーゼ活性依存性に Lyn はユビキチン化修飾の増強を受け、そのキナーゼ活性が負に調節される事を見出した。さらに c-Cbl を細胞膜の一部である GEMs/Raft に局在させることにより、脱顆粒、サイトカイン産生ともに抑制され、c-Cbl を介する肥満細胞の負の制御機構の研究がアレルギー治療薬としての開発へと発展する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1665号	氏 名	姜 臣 鎬
論文題目	Negative regulation of Lyn protein-tyrosine kinase by c-Cbl ubiquitin-protein ligase in FcεRI-mediated mast cell activation ユビキチン-蛋白質リガーゼ c-Cbl は高親和性 IgE 受容体を介するマスト細胞の活性化においてチロシンキナーゼ Lyn を負に制御する		
審査委員	主 査 中 村 俊 一 副 査 熊 谷 俊 一 副 査 堀 田 博		
審査終了日	平成 17 年 2 月 17 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

<p>アレルギー反応において中心的役割を担っているマスト細胞は高親和性 IgE 受容体が抗原により架橋化すると、ヒスタミンなどの化学伝達物質を放出する脱顆粒反応やサイトカインまた炎症性メディエーターであるロイコトリエンを産生する。近年は分子生物学的アプローチを取り入れたアレルギーの研究が進展しており、本研究はアレルギー疾患の分子メカニズムの一部を解明し、病態についての更なる理解を深めるものである。</p> <p>方法としては細胞内における分子の能力を最大限に引き出すことを目的として、細胞内シグナル伝達における重要な起点である GEMs/Raft にあらかじめ移行するユビキチンリガーゼ c-Cbl 発現プラスミドを作成し、これをマスト細胞に安定発現させた細胞株を樹立したことなどの特徴がある。その結果、c-Cbl を GEMs/Raft に安定発現させることにより、脱顆粒反応の抑制またサイトカイン産生の減少を引き起こすことを見出すことに成功した。</p> <p>またマスト細胞において抗原刺激後に高親和性 IgE 受容体とチロシンキナーゼ Syk がユビキチンリガーゼ c-Cbl によりユビキチン化されることが知られていたが、本研究においてこれら分子の上流分子であり抗原刺激後最も早期に活性化するとされるチロシンキナーゼ Lyn をも c-Cbl がユビキチン化することを世界で初めて見出した。さらに c-Cbl は Lyn のキナーゼ活性依存性に Lyn をユビキチン化し、マスト細胞においてそのキナーゼ活性を負に制御することを明らかにした。従って従来教科書的な Lyn の活性化モデルとして Csk と CD45 による C 末端のチロシン残基のリン酸化及び脱リン酸化により Lyn の活性が制御されていると考えられていたが、新たに c-Cbl による Lyn のユビキチン化による負の制御機構が存在することを発見した。</p> <p>更に本研究において、Cbl ファミリーのセカンドメンバーである Cbl-b の発現をマスト細胞において初めて同定し、抗原刺激により Cbl-b がチロシンリン酸化されることを見出した。また Cbl-b も c-Cbl と同様に一過性発現の系において Lyn をユビキチン化することを見出した。これらの知見は Cbl-b もマスト細胞において重要な機能を有している可能性を示唆しており非常に興味深く今後のマスト細胞における Cbl ファミリーの機</p>

能研究において架け橋的な役割を果たすものと考えられる。

また本研究ではマスト細胞において抗原刺激後の Lyn のユビキチン化以外にも脱顆粒の相補的な経路に重要な役割を果たすとされる Fyn がユビキチン化されることも明らかにしており、これら Src ファミリーチロシンキナーゼのユビキチン化と Cbl ファミリーの研究がアレルギー発症の抑制ひいてはアレルギー治療へとつながる可能性が示唆される。

以上、本研究はマスト細胞におけるチロシンキナーゼ Lyn の負の活性制御機構に Csk による C 末端のリン酸化による機構以外に、ユビキチンリガーゼ c-Cbl によるユビキチン化による負の活性制御機構の存在をはじめて明かにした価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。