

Title	The transmembrane phosphoprotein Cbp regulates activity of Src-family protein tyrosine kinases
Author(s)	川淵, 真大
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42624
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	川 澗 真 大
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15596 号
学位授与年月日	平成12年4月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	The transmembrane phosphoprotein Cbp regulates activity of Src-family protein tyrosine kinases (Src ファミリーチロシンキナーゼの活性調節に関与するチロシンリン酸化膜蛋白質 Cbp)
論文審査委員	(主査) 教授 永井 克也 (副査) 教授 吉川 和明 教授 岡本 光弘

論文内容の要旨

[目的]

Src-family protein tyrosine kinases (Src-PTKs) は、細胞の増殖、分化において重要な役割を果たしていることが知られている。当研究室において発見された C-Terminal Src Kinase (CSK) は、Src-PTKs の C 末端に位置するチロシン残基をリン酸化することによって、その活性を負に制御する。CSK は Src-PTKs と類似した構造を有し、SH3、SH2、Kinase domain より成るが、Src-PTKs とは異なり、細胞膜に結合するのに必要な脂肪酸修飾部位や、自己の活性調節に関わる被リン酸化チロシン残基が存在しない。Src-PTKs においては、自身の SH2 domain は、CSK によってリン酸化された C 末端のチロシン残基と相互作用することによって活性調節を行っていることが知られているのに対し、CSK の SH2 domain は CSK を細胞膜に移行させるのに重要であることが示唆されているが、その機能は明確ではなかった。そこで本研究においては CSK の活性制御機構を明らかにするために、CSK-SH2 domain に結合するチロシンリン酸化蛋白質を精製し、その機能解析を行った。

[方法ならびに成績]

CSK 結合蛋白質を精製する過程において、1 M の NaCl 存在下においても安定に CSK と複合体を形成しうるチロシンリン酸化蛋白質の存在を確認した。さらに、その複合体が Triron X-100 には不溶性を示したことから、detergent-insoluble membrane (DIM) 画分に存在する可能性が示唆された。そこで 250g の新生仔ラット脳より sucrose gradient 超遠心法によって DIM 画分を精製した。次いで、DIM 画分を大腸菌にて発現させた CSK-SH2 domain の組換え蛋白質を固定化したカラムにかけ、結合蛋白質を 1% SDS 溶液にて溶出した。その結果、分子量 80-90k のチロシンリン酸化蛋白質の精製に成功した。lysyl-endopeptidase 処理によって得られたペプチドのアミノ酸配列を決定し、その配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを作成した。新生児ラット脳 cDNA を鋳型として PCR 法にて部分配列を決定し、更に 5',3' -RACE 法にて全長配列を決定した。この遺伝子産物は 424 アミノ酸より成り、N 末端側から推定上の、細胞外領域、膜貫通領域、9 つのチロシン残基を持つ細胞内領域より成ることが示唆され、その構造は T 細胞レセプターシグナル伝達に必要なアダプターとして機能している linker for activation of T cell (LAT) と類似性の高いものであった。

精製した蛋白質 CSK binding Protein (Cbp) は一次構造からの推定分子量 46k であるのに対し、実際に精製した Cbp は分子量 80-90k のヘテロな蛋白質であった。そこで、SDS-PAGE 上で検出される分子量の差はリン酸化によるのではないかと考え、免疫沈降法にて得られた Cbp に対しアルカリホスファターゼ処理を行った。その結果、68k

の単一分子量となり、それはクローニングした cDNA を in-vitro translation したものと同一分子量であった。実際の分子量が68k と大きな値を示すのは、酸性側鎖をもったアミノ酸組成が多いためであると考えられる。また結合の特異性を確認するために Src、Fyn との結合実験を行ったが、それらに対する結合能は確認できなかった。

また、Src-PTKs 特異的阻害剤 PP2によって Cbp のリン酸化が阻害されることから Cbp のリン酸化に Src-PTKs が関与することが示唆された。次に、CSK の結合部位を同定するためにチロシン残基をアラニン残基に置換した Cbp と c-Src を 293T 細胞にて強制発現し、そこから CSK を免疫沈降して CSK-Cbp 複合体の有無を検討したところ、314番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した F314が CSK との複合体形成能が減少することから314番目のチロシン残基が CSK との結合に重要であることが示唆された。

CSK の SH2 domain は CSK を細胞膜に局在させるために重要であることが以前より示唆されていたために、そこに結合する Cbp が CSK を細胞膜へ移行させる機能を有するかどうかを検討した。COS7 細胞において、GFP と融合化した Cbp と CSK を共に強制発現させ、それらの細胞内局在を解析した。その結果、野生型 Cbp は CSK を細胞膜に局在させるが、F314や推定上の膜貫通領域を欠損させた ΔN は、CSK を細胞膜に局在化できない傾向を示した。

最後に、CSK が Cbp によって細胞膜へ局在化することが、細胞膜に存在する Src の活性に対してどのような影響を与えるか検討した。COS7、D5 (CSK-/-) 細胞において Cbp を強制発現し、各々の細胞より免疫沈降法によって Src を回収し、その活性を enolase を基質とし、かつ自己リン酸化反応を指標として評価した。その結果、野生型の Cbp を強制発現したときに、Cbp-CSK 複合体が多く形成され、Src の活性が減少する傾向が示された。

[総括]

- a) CSK の活性制御機構を解明するために CSK-SH2 domain に結合するチロシンリン酸化蛋白質 (Cbp) の精製を試み、Cbp の精製およびクローニングに成功した。
 - b) Cbp は Src-PTKs の基質となることが示唆された。
 - c) Cbp は CSK を細胞膜へと移行させうることが示唆された。
 - d) Cbp は Src の活性を負に調節することが示唆された。
- これらのことから、Src-PTKs の自己ループ型活性調節機構の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

Src family protein tyrosine kinases (Src-PTKs) は発癌、神経の分化や機能、免疫、骨形成など様々な生体機能やその破綻時の細胞内シグナル伝達機構に関与することが明らかになりつつある。当研究室では Src-PTKs の C 末端に位置するチロシン残基をリン酸化し、Src-PTKs の活性を負に制御する C-terminal Src kinase (CSK) を発見し、同定、解析を行った。ところで、CSK の活性制御に関して以下のことが示唆されていた。即ち、1) CSK が Src-PTKs の活性を抑制するには、CSK の細胞質から細胞膜への移行が重要であること、2) CSK は細胞膜に移行するとき、活性型 Src-PTKs の近傍に局在し、CSK の SH2ドメインを欠失させた変異体は局在化能力を失うこと。そこで本研究では CSK に結合するチロシンリン酸化蛋白質の探索を試みた。その結果、CSK の SH2ドメインに結合する80-90kDa の新規チロシンリン酸化蛋白質を発見し、精製、クローニングを行ったところ、この遺伝子産物は424アミノ酸より成ることが判明し、それを CSK binding Protein (Cbp) と命名した。その機能解析を行ったところ1) Cbp は Src-PTKs の基質となりうること、2) Cbp は CSK と結合し、CSK を細胞質から細胞膜へ移行させること、3) その結果として、Src-PTKs の活性を抑制すること、などが示唆された。これまで CSK を介する Src-PTKs の autophosphorylation regulatory loop の存在は予測されていたが、本研究の結果は CSK の SH2ドメインに結合する新規蛋白質 Cbp を発見し、CSK を介した Src-PTKs の活性制御機構における Cbp の役割を明らかにしたものである。本研究の成果は Src-PTKs および CSK の介する細胞内シグナル伝達機構をあきらかにし、それらの機能破綻に基づく疾患の治療に対する新たな方策をもたらす可能性を示唆した。したがって、本研究結果は博士号の学位授与に値するものと考えられる。