

博士論文番号:0681022

Abi-1によるチロシンリン酸化酵素Ablの
活性制御と機能に関する研究

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座
博士後期課程3年 圓岡 真宏
平成21年1月26日提出

目次	1-
----	----

第一章

Abi-1によるc-Ablの活性制御モデルの普遍性の解析

序論	2-
材料および方法	6-
結果	9-
考察	12-
本章のまとめ	14-

第二章

Abi-1を介したチロシンリン酸化酵素Ablの新規基質VASPの同定と機能の解析

序論	15-
材料及び方法	18-
結果	20-
考察	23-
本章のまとめ	27-
総括	28-
参考図	29-
Figure	34-
謝辞	47-
参考文献	48-

第一章

Abi-1によるc-Ablの活性制御モデルの普遍性の解析

序論

1. c-Ablの酵素活性制御機構

c-Ablは、Abelson白血病ウイルスv-Ablの原ガン遺伝子として同定された非受容体型チロシンリン酸化酵素の一つであり、細胞の増殖、分化、ストレス応答、細胞骨格形成など、細胞内で起こる様々なイベントに関与することが示唆されている(Woodring, P.J. et al., 2005, Woodring, P.J. et al., 2003, Wang, J.Y., 2000)。c-Ablは、スプライシングバリエントによりN末がミストイル化されない I 型Ablと、ミストイル化されるIV型Ablが主な転写産物である。また、その構造に続いてCapドメイン、SH3ドメイン、SH2ドメイン、キナーゼドメインを含む領域は、c-Srcと相同な領域を含むほか、c-Ablに特有のpolyproline領域、アクチン結合領域、DNA結合領域が保持されている(参考図1)。

c-Ablの酵素活性は、c-Srcとは全く異なるメカニズムではあるが、c-Src同様の非常によく似た立体構造をとることで、酵素活性が厳密に制御されることが結晶構造解析の結果から明らかになってきた(Wang, J.Y., 2000, Hantschel, O. et al., 2003, Pluk, H. et al., 2002)。c-Srcにおいては、C-terminal Src Kinase (CSK)によりc-Srcの527番目のチロシンがリン酸化され、そのリン酸化をN末のSH2ドメインが認識し、分子内で閉じた構造をとることで酵素活性が負に制御されることが明らかになっている(Levinson, N.M. et al., 2008)。また、Y527は脱リン酸化されることでc-Srcは開いた活性化構造をとることにより、活性化状態へと遷移するものと考えられている。一方、c-Ablにおいては、ミストイル化されるIV型AblのN末の構造解析の結果、酵素ドメインの疎水性ポケットにN末のミストイル基が入り込むことで閉じた構造をとり、酵素活性が負に制御されることが明らかになっている(Wang, J.Y., 2000, Hantschel, O. et al., 2003)(参考図2)。しかしながら、c-Ablにおいてはどのようなメカニズムで閉じた構造から開いた構造へと状態が遷移するのかについてはこれまでほとんど明らかにされていない。また、ミストイル化されない I 型Ablに関しては、N末のCapおよびSH3ドメインが活性制御に重要であることが明らかになっているが(Pluk, H. et al., 2002)、どのようなメカニズムで閉じた構造から開いた構造へと変化し、活性を持つようになるのかについては明らかではない。少なくとも、c-AblのC末端領域はc-Srcに保持されていない多くのタンパク質間相互作用に関与する領域を保持していることから、その酵素活性は、他の分子との相互作用に起因する構造変化により制御されることが予想されている。

c-Ablの発現は様々な組織で認められており、その局在についても細胞質と核内を移行することが明らかにされている。またc-Abl ノックアウトマウスでは、骨髄におけるB細胞の分化異常、胸腺および脾臓の萎縮、Tリンパ球およびBリンパ球の減少、骨粗鬆症などを示し、生後1-2週間で死亡することが知られている(Schwartzberg, P.L. et al., 1991)。これらのことからc-Ablは、細胞レベル、

個体レベルで重要な役割を担うことが予想されるが、c-Ablが細胞内のどのような部位で活性化され、どのような基質を認識し、どのようなシグナル伝達経路に関与するのかについては不明な点が多い。

私の研究室では、c-Ablの酵素活性がトランスに作用するアダプタータンパク質により制御される可能性を示してきた(Shishido, T., and Suzuki, J., 2005, Shishido, T. et al., 2001, Tani, K. et al., 2003)。その一つとしてchicken sarcoma CT10より同定されたガン遺伝子v-Crkの相同遺伝子として同定された分子c-Crkがある。興味深いことに、v-CrkはSH2ドメインと2つのSH3ドメインのみで構成された分子であり、時期を同じくして同定されたガン遺伝子v-Src、v-Ablと異なり酵素ドメインを保持していないにもかかわらず、細胞内の著しいリン酸化レベルの上昇が認められていた(Mayer, B.J., and Hanafusa, H., 1990)。我々のグループは、c-Crkがc-Ablと結合することでc-Ablの酵素活性をトランスに制御するアダプター分子として機能することを示し、v-Crkによる細胞のガン化メカニズムを理解する上で重要と考えられる幾つかの知見を得た(Shishido, T. et al., 2001)。具体的には、c-Crkはc-Ablと結合することでc-Ablの構造を活性化状態へと変化させ、c-Ablによりヒトc-Crkにおける222番目のチロシン(マウスにおける221番目のチロシン)がリン酸化される。この222番目のリン酸化をc-CrkのSH2ドメインが認識し分子内で相互作用することで閉じた構造をとり、c-Ablと解離することによりc-Ablは再び閉じた構造をとり不活性化状態へと酵素活性が制御されるというモデルを示した。また、ガン遺伝子型のv-Crkにおいては、c-Crkにおける222番目のチロシンを保持していないことから、c-Ablの酵素活性を恒常的に活性化状態にし、細胞内の著しいリン酸化の上昇が認められた(Shishido, T. et al., 2001)。さらに、近年c-CrkのNMR解析によりリン酸化型Crkと非リン酸化型Crkの構造解析が報告された(Kobashigawa, Y. et al., 2007)。それによるとc-Crkのリン酸化は、SH2ドメインと分子内で動的に相互作用することが明らかになり、我々のグループが示すc-Crkによる活性制御モデルをよりサポートする結果であると考えられる。以上のことよりc-Crkは、c-Ablの活性をトランスに制御するアダプター分子として機能することが考えられる。しかしながら、c-Crkにより活性化されたc-Ablが、p130^{Cas}などのリン酸化に関与するという報告はなされているものの、その活性が細胞内で、いつ、どのような刺激により制御されるのか、その生理的な機能などについては未解明な部分が多く残されたままである。

また我々は、c-Ablに結合する分子として同定され、v-Ablによるガン化を抑制することが報告されていたAbi-1もまた、Ablの活性を制御する分子であることを明らかにしてきた(Tani, K. et al., 2003)。ショウジョウバエにおいて、*Drosophila* Abl(d-Abl)の基質としてEnabled(Ena)が同定されており、哺乳類においてもEnaのホモログであるMammalian Enabled(Mena)がc-Ablの基質である可能性が考えられたものの、c-AblによるMenaのリン酸化は検出されなかった。しかしながら我々は、c-Crkに関する一連の研究から、哺乳類においてc-AblはMenaのリン酸化を行なう際にc-Crkと同様なアダプター分子を必要とするのではないかと考えた。そこで、そのようなアダプター分子を同定する目的で、Menaをベイトに用いたYeast two-hybrid法により、Mena結合分子をスクリーニングした。その結果、c-Abl、v-Ablに結合する分子として報告されていたAbl interactor-1 (Abi-1)を、Mena結

合タンパク質として同定した。そこで、Abi-1がc-Crkと同様な役割を担う可能性を検討するため、c-Abl、Abi-1、Menaを同時に過剰発現した実験系で、Abi-1がc-AblによるMenaのリン酸化を促進することを見出した。詳細な解析の結果、Abi-1はc-Ablに結合し、c-Ablの活性を正に制御するだけでなく、Abi-1がMenaに結合することがc-AblによるMenaのリン酸化に重要な役割を果たすことが明らかになった(Tani, K. et al., 2003)。この結果から我々は、酵素と基質の双方に結合するアダプター分子Abi-1により、c-Ablの酵素活性が制御され、同時にc-AblによるMenaの認識を制御するというc-Ablの活性制御メカニズムを明らかにした(Shishido, T., and Suzuki, J., 2005)。

そこで次に、私はこのメカニズムがMenaのリン酸化に特有のメカニズムであるのか、或いは、他の基質のリン酸化にも関与する普遍的なメカニズムであるのかを解析するため、Abi-1に結合する分子がc-Ablの基質となるかを検討することで、このメカニズムの普遍性を問うことにした。そこで、Abi-1をベイトとしたYeast two-hybrid法を用いて、Abi-1結合タンパク質を探索した結果、近年B細胞の分化に重要であることが示唆されてきたBCAP(B cell adaptor for PI3K) (Okada, T. et al., 2000) が得られた。

2.c-Ablの新規基質分子としてのBCAPの可能性

BCAPは黒崎らのグループにより同定された分子の一つであり、血球系細胞においてはB細胞に強く発現が認められ、少量ではあるがマクロファージ系の細胞にも発現が認められている分子である(Yamazaki, T. et al., 2002, Inabe, K., and Kurosaki, T., 2002)。BCAPはB細胞受容体BCRの下流で活性化されるPI3-kinaseのシグナル伝達に関与する分子を得る目的で同定された分子である(Okada, T. et al., 2000)。その構造はAnkyrin repeat、proline-rich、coiled-coil、PI3Kp85 α サブユニットの結合部位を保持しており、この構造からBCAPは、B細胞内で他の分子が働くためのアダプターとして機能することが考えられている。特にB細胞においてBCAPは、BCR刺激の下流でBtk、Sykなどのチロシンリン酸化酵素にリン酸化され、c-Relの発現を制御してB細胞の分化に関与することが示唆されている(Yamazaki, T., and Kurosaki, T., 2003)。BCAPノックアウトマウスの解析結果から、未成熟B細胞数の減少、B細胞分化過程で認められるCD5陽性B細胞の欠失などが報告されていることから、BCAPはB細胞の分化段階でその役割をはたしていることが考えられる(Yamazaki, T., and Kurosaki, T., 2002)。

一方B細胞内でのc-Ablの機能は、BCR刺激時の発現量およびリン酸化レベルの上昇が知られており、c-Ablノックアウトマウスでは、いくつかの表現型が現れるが、その中でB細胞における分化異常、B細胞の生存率低下、BCR刺激後のシグナル伝達に低感受性であることなどの点がBCAPノックアウトマウス由来のB細胞と一致する(Dorsch, M., and Goff, S.P., 1996)。またBCAP欠損DT40細胞に、BCAPのPI3K結合ドメインのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を遺伝子導入した場合、BCAP WTを導入した場合と比較して、BCR刺激後のBCAPのリン酸化レベルは若干の低下が認められるものの、チロシンリン酸化は依然として高いレベルを維持したままである(Yamazaki, T., and Kurosaki, T., 2002)。c-Ablは、BCRの補助レセプターCD19の下流で活性化されることが報告されており(Grove, M. et al., 2004)、近年の研究でBCAPはCD19の下流で

PI3-Kinaseの活性化に重要な役割を担うことが報告されている(Aiba, Y. et al., 2008)。これらのことから、B細胞においてBCR刺激時にc-Ablが活性化され、BCAPのリン酸化に関与する可能性が十分考えられた。

3. ガン遺伝子型v-AblによるB細胞のガン化機構

c-Ablのガン遺伝子型として知られるv-Ablは、pre-B細胞を選択的にガン化することが知られている。v-Ablでガン化したB細胞の細胞表面には、CD43⁺CD25⁻という、B細胞の分化段階でpro-B細胞後期からpre-B細胞前期において認められる表面抗原を提示している。さらに他の特徴としては、細胞表面にBCRを発現していないことや、細胞内でRAG (Recombination Activating Gene)の発現が認められないことがあげられる(Rosenberg, N., 1994)。またv-AblはB細胞内でサイトカインシグナルをはじめとした様々なシグナルを擬似することで、サイトカイン非存在下でもB細胞の増殖を行い続けることが報告されているが、v-AblによるB細胞の詳細なガン化メカニズムは明らかにされていない(Rosenberg, N., 1994, Shore, S.K. et al., 2002)。

これらのことから、BCAPはc-Ablだけでなくv-Ablの基質にもなりうる可能性が考えられ、v-Ablによるガン化メカニズムを理解する上でも興味深い分子の一つと考えた。

4. 本章の目的

前述したとおり、BCAPはB細胞で発現が確認されており、さらにAblの基質としての可能性が考えられるため、本研究では、分子生物学的手法によりBCAPがc-Ablの基質であるか否かを検討することを目的とした。そこでYeast Two-Hybrid法とHEK293T細胞を用いた過剰発現系により、BCAPとAbi-1との会合を検討し、両者間での結合部位の同定を試みた。またBCAPがc-Ablの基質となりうるかを検討し、BCAPのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を用いてリン酸化部位の同定を行った。さらに、恒常的な酵素活性を有するv-AblによるBCAPのリン酸化を検討し、AblによるBCAPのリン酸化とAbi-1への結合がどのような意義を持つのかについて知見を得ることを目的として実験を行った。

材料及び方法

材料

発現プラスミドの構築

c-Ablは、マウス1b型のミリストイル化修飾を受けるタイプ(ヒトにおける I 型Abl)を用いた。発現ベクターとしてpcDNA3 (invitrogen)を使用した。(pcDNA3 c-Abl) Abi-1はヒトAblbp4(NCBI Accession No AF001628)を使用した。発現ベクターとしてpFLAG-CMV2(Sigma)を使用した。v-AblはDr.Goff(Howard Hughes Medical Institute)から供与されたものを、発現ベクターであるpcDNA3に導入したものをを使用した。(pcDNA3 v-Abl)

ヒト BCAPは、Yeast-Two hybrid法で得られた断片をGST融合型発現ベクターであるpEBGに導入したもの(pEBG BCAP Frg)を予備実験的に使用した。ヒト

BCAP ORF全長(BCAP WT)は、Marathon- ready Human Bone marrow cDNA (clontech)をtemplateとしてPCRにより増幅し、GST融合型として発現するためpEBGに組み込んだ(pEBG BCAP WT)。PCRは以下のprimerを用いて行った。

Forward 5'-cgcgatccaccatggcagcctcaggggtgcc,

Reverse 5'-cgcgatcctcagcgtcctctgggtggaac

BCAP Frg Y/F 変異体は、前任者が作成したpEBG BCAP Frg Y/F 変異体 (pEBG-BCAP Frg 513Y、Frg553Y、Frg570Y、Frg594Y、Frg694Y、Frg5F)を使用した(吉田佳代, 2004)。また、これらの変異体をVan91I-XbaIで切断し、pEBG BCAP WTに寄せ換えた完全長のY/F 変異体を作成した(pEBG BCAP 513Y、553Y、570Y、594Y、694Y、CT5F)。

BCAPにおけるAbi-1との結合ドメインを解析するため、BCAP N末端領域欠損変異体とC末端領域のProline-Rich領域の欠損変異体を作成した。N末端領域欠損変異体の作成にはpEBG BCAP FrgをtemplateとしてPCRを行い、増幅産物をBamH I で切断し、pEBG (BamH I)ベクターに組み込み、塩基配列を確認した(pEBG-BCAP 602-805、672-805)。C末端領域欠損変異体の作成には、pEBG BCAP WT をtemplateとしてPCRを行い、増幅産物をpEBGに組み込んだ(pEBG-BCAP ΔCTPR)。PCRは以下に示すprimerを用いて行った。

N末端欠損変異体作成に用いたprimer

602-805 Forward 5'-cgcgatccggccagcggcagcttatcac,

672-805 Forward 5'-cgcgatccgagatcacgtcccaattcgg,

Reverse (602-805,672-805共通) 5'-cgcgatcctcagcgtcctctgggtggaac

C末端欠損変異体作成に用いたprimer

Forward 5'-cgcgatccaccatggcagcctcaggggtgcc,

Reverse 3'-tcaactgcgacttctgtaacctca

細胞

HEK293T細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)に10%血清 および1%抗生物質を加えた培地を用いて、5%CO₂ 37℃で継代維持した細胞を使用した。

抗体

Ablの検出には8E9 (Pharmingen)を用いた。FLAGの検出には、M2(Sigma)を用いた。Abi-1の検出には1G9(Tani et al.,2003)を用いた。BCAPの検出にはラビットとマウスを免疫し、得られた抗血清を使用した。リン酸化チロシンの検出には4G10 (Upstate biotechnology)を使用した。β-Actinの検出にはAc-74(Sigma)を使用した。RBの検出にはG3-245 (Pharmingen)を使用した。

方法

HEK293T Transfection

過剰発現系による実験に関しては、すべてHEK293T細胞を使用した。Transfectionの前日にHEK293T細胞を 1.0×10^6 個/2mlの濃度で35mm dishへ撒き、5%CO₂ 37℃の条件下で一晩培養した。それぞれのplateに対して97ulの抗生物質およびFBSを含まないD-MEMとFugene6 (Roche) 3ulを混合し、室温で10分間静置した。その後混合物とplasmid DNAを合計2ug加え、15分間室温で静置した。各plateに混合物を添加し、ゆっくりplateを揺らして攪拌させた。Transfection48時間後、cold PBSで細胞を二回洗浄し、lysis buffer(1% Triton X-100, 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 50mM NaCl, 30mM sodium pyrophosphate, 50mM sodium fluoride, 20mM -glycerophosphate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM sodium vanadate, 20 μg/ml aprotinin, 1mM PMSF)で細胞を融解した。テフロンスクレーパーを用いて細胞を掻き取り、1.5mlTubeに移した後、on iceで15分間静置した。その後、15000rpmで10分間遠心し、上清をlysateとして回収した。タンパク質量はBCA protein assay kit (pieace)を用いて濃度を測定した。

GST pull down

回収したLysateのタンパク量をtotal 500ug/500ulに調製し、lysis bufferにより50%スラリーで調製されたglutathione-Sepharose 4B (Amersham) 10ulを加えて4℃で一時間緩やかに攪拌した。その後、6000rpmで遠心し、アプロチニンを含まないMAPK Lysis beffer 500ulで洗浄する操作を三回繰り返した。その後沈渣に2×stop buffer 40ulを加えて105℃で5分間 熱処理した。

免疫沈降

回収したlysateのタンパク量をTotal 1000ug/mlに調製し、Abi-1およびBCAPの抗体を加えて4℃

で一晩緩やかに撹拌した。さらにProtein G Sepharose (Pharmacia) 10ulを加えて4℃で2時間緩やかに撹拌した。その後、6000rpmで遠心し、lysis beffer 500ulで洗浄する操作を三回繰り返し、sodium vanadate (100mM)1ulと、2×Stop buffer 40ulを加えて105℃で5分間 boilした。

Western Blotting

調製したsampleを20ulずつ、8-12%のアクリルアミドゲルにアプライしてSDS-PAGEを行った。その後 Immobilon-P membrane (Millipore) にタンパク質を転写し、5%skimmilk-TBS-Tまたは5%BSA-TBS-Tを用いて室温で30分間Blockingした。Blocking液を除いた後、一次抗体で一晩4℃でインキュベートした。その後二次抗体で1時間インキュベートし、ECL plus(Amersham)で検出した。

結果

我々はこれまでの研究で、Abl interactor-1 (Abi-1)がアダプタータンパク質として機能し、酵素であるc-Ablとその基質分子であるMenaの相互に作用することで、c-AblによるMenaの296番目のチロシンをリン酸化することを報告した。私は、この機構が、他の基質のリン酸化においても見られる一般的なものであるかを解析するため、Abi-1をベイトとしたYeast two-hybrid法によって結合タンパク質を探索した。その結果、B cell adaptor for PI3K (BCAP)をAbi-1に結合するc-Ablの基質候補分子として見出したことから、さらにこの分子を詳細に解析することとした。具体的には、まずBCAPがc-Ablの基質となるかを検討するため、Abi-1とBCAPの両者間での結合ドメインの同定を行った。またc-AblによるAbi-1存在下でのBCAPのリン酸化を確認し、BCAPのリン酸化部位の同定を行った。さらに、ガン遺伝子型のv-AblによるBCAPのリン酸化についても解析した。

1. Abi-1のBCAPへの結合ドメインの解析

Abi-1結合タンパク質として得られたBCAP C末端領域の断片(BCAP Frg)とAbi-1の結合ドメインの解析をYeast two-hybrid法により行った。Abi-1はタンパク質間相互作用に関与すると考えられる領域としてpolyproline領域とSH3ドメインを保持しているため、これらの領域を欠損した変異体を用いてBCAP Frgとの結合を確認した(Fig.1a)。BCAP Frg とAbi-1の Δ PP(Δ 335-362)においては β -Gal活性が認められたが、BCAP FrgとAbi-1 Δ SH3(1-391)においては β -Gal活性は認められなかった。これらの結果より、Abi-1のSH3ドメインがBCAPとの結合に重要であることが示唆された。

2. BCAPのAbi-1への結合ドメインの解析

HEK293T細胞を用いた過剰発現系により、BCAPとAbi-1の結合を解析した。GST-BCAP FrgおよびGST-BCAP WTをFLAG-Abi-1、c-Ablと共にHEK293T細胞にトランスフェクションした。回収したlysateに対してGST-BCAPをglutathion sepharose 4Bでpull-downし、抗FLAG抗体を用いてFLAG-Abi-1を検出した。その結果、GST-BCAP WT およびGST-BCAP FrgにおいてFLAG-Abi-1の共沈が見られた(Fig.2b)。これらの結果から、細胞内においてもBCAPとAbi-1の結合が示唆された。次にBCAPにおけるAbi-1の結合ドメインを解析するため、BCAPのN末端領域を欠損した変異体(GST-BCAP 602-805、GST-BCAP 672-805)と、C末端領域のproline-rich領域を欠損した変異体(GST-BCAP Δ CTPR)を作製した(Fig.2a)。これらの変異体をc-Abl、FLAG-Abi-1と共にHEK293T細胞で過剰発現させた。その結果、BCAPのN末端領域欠損変異体602-805、672-805においてはFLAG-Abi-1の共沈が確認されたが、 Δ CTPRにおいては共沈が見られなかった(Fig.2b)。これらの結果より、BCAPのC末端にあるproline-rich領域がBCAPとの結合に重要であることが示唆された。

3. c-AblはAbi-1の存在下でBCAPのリン酸化を行う

BCAPがMenaと同様なメカニズムでリン酸化されるかを確認するため、c-Abl、FLAG-Abi-1、

GST-BCAP FrgまたはGST-BCAP WTを、HEK293T細胞に共発現させ、GST-BCAPをpull-downした後、抗リン酸化チロシン抗体を用いてBCAPのリン酸化を検出した(Fig.3a.)。その結果、c-Ablのみ、FLAG-Abi-1のみではGST-BCAP Frg、およびGST-BCAP WT のリン酸化は認められないのに対し、c-Abl、Abi-1の共発現下において、GST-BCAP FrgおよびGST-BCAP WTにリン酸化が認められた。これらの結果より、BCAPが、Abi-1の存在下でc-Ablの基質となりうる可能性が示唆された。Fig.2bで示したGST pull-down後のサンプルを用いて抗リン酸化チロシン抗体によるWestern Blotを行った。BCAPのN末端領域欠損変異体では、すべてにおいてGST-BCAPのリン酸化が検出されたが、GST-BCAP Δ CTPRではBCAPのリン酸化は認められなかった。これらの結果は、Abi-1がBCAPと会合することが、c-AblによるBCAPのリン酸化に重要であることを支持する結果であると考えられる。またGST-BCAP 672-805変異体においてもBCAPのリン酸化が検出されたことから、BCAPのこの領域に存在するチロシン(694Y)がc-Ablによりリン酸化される可能性が考えられた。

4. c-AblはBCAPのC末端領域をリン酸化する

Yeast two-hybrid 法で得られたヒト BCAP Frg には 5 つのチロシンが存在する。ヒト BCAP の C 末端領域に存在する 5 つのチロシンは、マウス、ラット、ニワトリといった種間の異なる BCAP においても保存されている(Fig4.a)。c-Abl、FLAG Abi-1 の存在下で GST BCAP Frg のリン酸化が検出されたことから、BCAP Frg に存在する 5 つのチロシンに変異を導入し、抗リン酸化チロシン抗体を用いてそれぞれの変異体のリン酸化レベルを Western Blot により検出したところ、694 番目のチロシンが最も強くリン酸化され、続いて 513 番目、570 番目、594 番目、553 番目の順で強いリン酸化が認められた。また、Frg5F ではリン酸化は認められなかった。そこでさらに Frg の領域以外のチロシンがリン酸化されるかを確認するため、BCAP 全長の Y/F 変異体を用いて同様の実験を行なった(Fig.4c 右)。その結果、694 番目、513 番目のチロシンが非常に強くリン酸化され、続いて 570 番、594 番、553 番の順で強いリン酸化が検出されたことから、BCAP Frg Y/F 変異体で得られた結果と同様であった。また、CT5F におけるリン酸化はほとんど検出されなかった。これらの結果より、c-Abl による BCAP のリン酸化部位は、C 末端領域の 5 つのチロシンが主にリン酸化され、BCAP Frg 以外の領域におけるチロシンは c-Abl によりほとんどリン酸化されないことがわかった。

5. v-Ablは、c-Ablと同様にBCAPのC末端領域のチロシンをリン酸化する

v-Ablは、c-AblのSH3ドメインがウイルスのコードする蛋白質であるgagに入れ替わっており、恒常的な酵素活性を有する(Fig.5a)。Abi-1はc-Ablに結合する分子として同定され、v-AblによるNIH3T3細胞のガン化を抑制することが示されている。そこで、v-AblがBCAPをリン酸化する際に、Abi-1がBCAPのリン酸化にどう影響を与えるのかを検討するため、Abi-1の存在下、および非存在下でv-AblによるBCAPのリン酸化への影響を検討した(Fig.5b 左側4Lane)。その結果、c-Ablと同様にv-AblでもBCAPのリン酸化はFLAG-Abi-1の存在下でさらに亢進することがわかった。そこでさらにv-AblによるBCAPのリン酸化部位がc-Ablと異なるか否かを検討するため、pEBG-BCAP

CT5Fを用いて同様にBCAPのリン酸化を検討した。その結果、c-Ablと同様にv-AblでもGST-BCAP CT5Fのリン酸化はほとんど検出されなかった (Fig.5b 右側 lane4)。これらの結果から、v-Ablはc-Ablと同様にBCAPのC末端領域のチロシンをリン酸化する可能性が示された。

考察

1. Abi-1によるc-Ablの基質リン酸化メカニズム

我々はこれまでの研究で、c-AblがAbi-1の存在下で基質であるMenaをリン酸化するというc-Ablの新規基質リン酸化メカニズムを提唱している。本研究では、このメカニズムがMena以外の基質のリン酸化に関与する可能性を検討する目的で、Abi-1結合タンパク質BCAPをc-Ablの基質候補分子として解析を行った。Menaと同様にBCAPも、細胞内でAbi-1と結合し、その結合ドメインはBCAPの最もC末端領域に位置するproline-rich領域と、Abi-1におけるSH3ドメインである可能性が示された。Abi-1は、c-AblにおけるSH3ドメインおよびpolyproline領域と結合することが示されており、c-Abl、Abi-1、BCAPが細胞内で複合体を形成することで、c-AblによるBCAPのリン酸化が行われると考えられる。しかしながらMenaにおいては、MenaのN末端領域におけるEVH1ドメインとAbi-1におけるpolyproline領域が相互作用し、c-Ablによりリン酸化を受けることが示されている。他の研究グループの報告によると、Abi-1を介したc-Ablの基質として同定されたcdc2(Lin, T.Y. et al., 2004)、WAVE2(Stuart, J.R. et al., 2006, Leng, Y. et al., 2005)に関しては、Abi-1のN末領域のcoiled-coilドメインとHox-homologyドメインとが相互作用することで、c-Ablによりリン酸化されることが明らかになった。このように、Abi-1と基質との結合様式は基質によって異なっており、Abi-1によるc-Ablの活性化に伴い一度に多岐にわたる基質のリン酸化が行なわれ、様々なシグナル伝達が行なわれる可能性が考えられる(参考図3)。

次に、MenaとBCAPのc-Ablによるリン酸化部位を検討してみると、Menaにおいては296番目のチロシンのみがリン酸化されることが示されたが、BCAPのリン酸化部位はC末端領域の5つのチロシンがすべてリン酸化されることが分かった。さらにFig4a.に示したとおり、ヒト BCAPのC末端領域に存在する5つのチロシンとその近傍のアミノ酸配列は、マウス、ラット、ニワトリといった種間の異なるBCAPにおいても高度に保存されていることから、BCAPは異なる種間でもc-Ablによりリン酸化される可能性が考えられる(Fig.4a)。リン酸化レベルを比較すると、694番目と513番目のチロシンが特に強くリン酸化されており、続いて、570番目、594番目、553番目の順で強いリン酸化が検出された。特に強いリン酸化が認められた694番目と513番目のチロシンは、これら5つのチロシンのうち最も両端に位置しているが、BCAPのC末端領域におけるcoiled-coil領域で折りたたまれることにより、構造変化をもたらすことで5つのチロシンが密接し、c-Ablによるリン酸化が行われやすくなるのではないかと考える。では、Abi-1がこの構造変化をもたらすのだろうか。c-AblによるMenaのリン酸化においては、Menaの構造変化にAbi-1が結合することが重要であると示された(Tani, K. et al., 2003)。本研究においても我々は、BCAPのリン酸化にAbi-1の結合が重要であると考えられるデータをいくつか示した。以下にそれを論じたい。

BCAP 欠損変異体を用いて Abi-1 への結合を解析した際に、C 末端領域における proline-rich 領域の欠損変異体において、c-Abl によるリン酸化はほとんど検出されなかった。この結果は、BCAP の proline-rich 領域が Abi-1 との結合に重要であることを示唆すると同時に、BCAP が Abi-1 と結合することが c-Abl によるリン酸化に重要であることを示すものであると考える。BCAP N 末端領

域における欠損変異体により共沈した FLAG-Abi-1 のタンパク質量は、BCAP WT と比較して BCAP Frg、BCAP 602-805 では多かったが、BCAP 672-805 では WT とほぼ等量であった (Fig.2b)。そこで Abi-1 の結合量が BCAP のリン酸化レベルに影響するかどうかを検討すると、BCAP Frg に対して BCAP WT のリン酸化レベルが低いことから、BCAP のリン酸化は Abi-1 の結合量に依存している可能性が考えられる (Fig.3b)。ところが、BCAP 672-805 と BCAP 602-805 のリン酸化レベルを比較すると、BCAP 672-805 の方が Abi-1 の結合量が少ないにもかかわらず、強くリン酸化されていた (Fig.3b)。しかし、BCAP 672-805 が保持するチロシンは、強いリン酸化が検出された Y694 であり、リン酸化されやすいことを考慮すると、Abi-1 の結合量が BCAP のリン酸化に依存しないとは言いきれない。いずれにしても、Abi-1 が基質に結合することが重要であるのか、Abl の活性を制御するのに重要であるのかを明らかにするために、これらのタンパク質を全長で精製し、BCAP の Abi-1 との結合が c-Abl による BCAP のリン酸化にどう影響するのかを、生化学的に解析することが必要である。

また我々は、c-Abl と、そのガン遺伝子型である v-Abl とでは、BCAP のリン酸化に何らかの違いがあるかどうかを検討した。v-Abl は c-Abl の酵素活性制御に関与すると考えられている SH3 ドメインが、ウイルスのコードする蛋白質である gag (glycosaminoglycan) に入れ替わっており、恒常的な酵素活性を有することが知られている。そこで、v-Abl が BCAP をリン酸化する際に、Abi-1 が BCAP のリン酸化にどう影響を与えるのかを検討するため、Abi-1 の存在下、および非存在下で v-Abl による BCAP のリン酸化への影響を検討した (Fig5b)。その結果、c-Abl と同様に v-Abl も BCAP のリン酸化に Abi-1 が必要であることがわかった。また、v-Abl による BCAP のリン酸化部位を検討するため、BCAP の C 末端領域のチロシンをすべてフェニルアラニンに置換した変異体 (BCAP CT5F) を用いて解析した結果、c-Abl と同様に v-Abl も BCAP CT5F をリン酸化しないことが分かった。v-Abl が BCAP をリン酸化する際に、BCAP の Abi-1 への結合様式が c-Abl と同様であるのか、また v-Abl による BCAP のリン酸化が c-Abl と同様であるかについては検討を行っていないが、これらの結果から、Abi-1 は Abl の酵素活性を制御すると同時に、基質である BCAP へ結合することで、Abl によるリン酸化を受けやすい状態にしているのではないかと考えられる。このような推察からも、Abi-1 と基質との相互作用、Abl と基質との相互作用の重要性を生化学的に解析し、我々が提唱する”Abi-1 を介した c-Abl の基質リン酸化モデル” (参考図4) を解析していく必要があると考える。

本章のまとめ

本章では、c-Abl の新規基質として BCAP を分子生物学的手法により同定した。Abi-1 結合タンパク質 BCAP を Abl の基質として同定したことは、酵素と基質の双方に結合する Abi-1 により Abl の活性が制御されるというモデルが、Abl による基質のリン酸化制御において普遍的なメカニズムであることを示唆する結果であると考ええる。

第二章

Abi-1を介したチロシンリン酸化酵素Ablの新規基質VASPの同定と機能の解析

序論

1. Mena/VASP/Evlファミリーの機能と制御

我々はこれまでの研究で、Abi-1を介したc-Ablの新規基質分子としてMamalian Enabled (Mena)を同定した(Tani, K. et al., 2003)。Menaは*Drosophila*におけるenabled (Ena)のhomologueとして同定された分子であり、哺乳類においてはMenaのほかにVASP (Vasodilator-Stimulated phosphoprotein)や、Evl(Ena/VASP Like)などが、そのファミリーに属する分子として報告されている(Gertler, F.B. et al., 1996)。Mena/VASP/Evlファミリーの一次構造は、N末からEVH1 (Ena-VASP homology 1)ドメイン、proline-richドメイン、EVH2ドメインで構成されている。EVH1ドメインは、(D/E)FPPX(D/E)(D/E)モチーフと呼ばれる特徴的な配列をもつタンパク質、Zyxin、vinculin、actAなどの接着班の形成に関与するタンパク質との相互作用ドメインとして機能することが報告されており、細胞内での局在を決定する部位として機能するものと考えられている(Fedorov, A.A. et al., 1999, Prehoda, K.E. et al., 1999)。また、proline-richドメインは、profilinなどのアクチン結合蛋白質との相互作用ドメインとして機能する他、c-Ablやc-SrcのSH3ドメインと会合し、VASPそれ自身のアクチン重合活性に必須なドメインである(Gertler, F.B. et al., 1996, Ahern-Djamali, S.M. et al., 1999)。EVH2ドメインは、F-actin、G-actin結合ドメインと、テトラマー形成に重要なcoiled-coilドメインを保持している(Bachmann, C. et al., 1999)。Mena/VASP/Evlは、様々な組織、細胞系で発現が認められており、その機能は重複しているものと考えられる。その理由として、Mena/VASP/Evlファミリーはすべて細胞辺縁部、特に葉状仮足、糸状仮足の先端に位置するほか、浸潤能を獲得した腫瘍細胞が細胞外基質中に侵入する際に形成する突起 (invadopodia) に集積することが挙げられる(Krause, M. et al., 2003, Philipper, U. et al., 2008)。また、これらの構造体は細胞の運動性や細胞外基質との接着を制御するが、特に、Mena/VASP/Evlのそれぞれを欠損させた線維芽細胞は、すべて細胞運動能が増加し、ダブル・トリプルノックアウトしたマウス由来の線維芽細胞は、より顕著な運動能の増加が認められている(Bear, J.E. et al., 2000, Kwiatkowski, A.V. et al., 2007)。また、それとは逆に、Mena/VASP/Evlを過剰発現した細胞では、顕著な運動能の低下が認められていることから、Mena/VASP/Evlファミリーの重複した機能が示唆されている(Bear, J.E. et al., 2000)。

Mena/VASP/Evlファミリーの中でも特にVASPに関しては非常によく研究がなされており、その中でも特に細胞骨格制御や細胞運動に関与することが数多く報告されている。また、VASPはセリン・スレオニンキナーゼであるcAMP-dependent protein kinase A/G(PKA/PKG)によりリン酸化されることで、アクチン重合活性が制御されることが*in vitro*の解析結果より示されている。

2. VASPとc-Ablの機能的相互作用

哺乳類細胞においてVASPは1990年に同定され(Halbrugge, M. et al., 1990)、その後 *Drosophila Ena*の相同分子として報告された。前述のとおり、Mena/VASPファミリーは哺乳類細胞ではセリン/スレオニンキナーゼであるPKA/PKGの基質として報告されたが(Halbrugge, M. et al., 1990)、*Drosophila Ena*においてはチロシンリン酸化酵素である*Drosophila Abl*によりリン酸化される基質であることが、*in vitro*および*in vivo*で示されている。また、*Drosophila Ena*のチロシンリン酸化部位は中央部に位置する6つのチロシン残基であることが報告され、その機能としてはアクチン重合活性を負に制御するものと考えられてきた(Comer, A.R. et al., 1998, Gertler, F. et al., 1995)(参考図6)。しかしながら、哺乳類細胞においてVASPはc-Ablと結合し、VASPそれ自身の機能制御に関与することが報告されているものの、内在性レベルでのチロシンリン酸化については報告されていなかった(Gertler, F.B. et al., 1996, Howe, A.K. et al., 2002)。

3. BCR-Ablによるガン化におけるAbiファミリーの関与

c-Abl は、ヒト第 22 染色体にコードされるセリン/スレオニンキナーゼの一つである Breakpoint Cluster Region(BCR)が、第 9 染色体における c-Abl 配列と染色体相互転座を起こし、恒常的酵素活性を有する BCR-Abl 融合遺伝子を形成する。BCR-Abl の形成は、ヒトの慢性骨髄性白血病(CML ; Clonic Myeloid Leukemia)や、急性骨髄性白血病(AML;Acute Lymphoblastic leukemia)などを引き起こし、CMLにおいては、実に95%以上の患者でBCR-Ablの融合遺伝子の形成が認められている。BCR-Abl でガン化した白血病細胞内では、Abi-1 がチロシンリン酸化されるが、そのファミリー分子である Abi-2 の発現は完全に消失することが知られている(Dai, Z. et al., 1998)。近年、Abi-1 は BCR-Abl によるガン化に認められる細胞骨格の形成異常や、invadopodia の形成を伴う細胞外基質への接着性と浸潤能の獲得に関与するとの報告が相次いでいる(Li, Y. et al., 2007, Yu, W. et al., 2008, Sun, X. et al., 2007)。これらの報告から、ガン遺伝子型の BCR-Abl も Abi-1 を介したシグナル伝達経路に関与することが考えられる。

I

4. BCR-Ablでガン化した白血病細胞内におけるVASPのチロシンリン酸化

近年の質量分析装置の発達と定量技術の開発により、細胞内のタンパク質の翻訳後修飾を定量的かつ網羅的に解析することが可能となった。GossらはBCR-Ablでガン化した細胞株と、BCR-Ablの分子標的治療薬STI-571で処理した細胞内におけるチロシンリン酸化タンパク質を質量分析により網羅的に解析した(Goss, V.L. et al., 2006)。その結果、我々のグループが既に同定していたAbi-1の213番目のチロシンリン酸化のほかにも、198番目のチロシンのリン酸化が示された。また、これまでに他のグループがAbi-1を介したc-Ablの基質として同定したCDC2の15番目のチロシンのリン酸化や、我々が報告したBCAPの570番目のチロシンのリン酸化が報告された。興味深いことに、Menaのチロシンリン酸化については報告されなかったが、そのファミリーであるVASPについては多くの細胞株で、39番目のチロシンのリン酸化が示されていた。

5. 本章の目的

以上のことより、我々はMenaと同様VASPもまたAbi-1を介したAblの基質となる可能性があると考えた。また、Abi-1を介したBCR-Ablによる基質のリン酸化過程において、MenaではなくVASPがより白血病細胞のガン化において重要な働きを持つ分子ではないかと考えた。そこで本章では、まずVASPがAbi-1 に結合するAbl の基質となるかを検討し、白血病細胞内でのリン酸化とその機能について解析し、さらに正常細胞における機能について解析することを目的として研究を行った。

材料及び方法

材料

Plasmid

マウスc-Ablの発現プラスミドは、前述のpcDNA3に組み込まれたものを使用した。マウスARGはCB6+に組み込まれたものを使用した。BCR-Ablはp210タイプをpcDNA3またはpcx4BSR(Akagi T et.al.,)に組み込んだものを使用した。

ヒトAbi-1、ヒトAbi-2、ヒトAbi-3に関しては、pFLAG-CMV-6cに組み込まれたものを使用した(Hirao, N. et al., 2006)。

マウスEcotropic retrovirus receptor(EcoR)は、pCX4BSRに組み込まれたものを使用した。ヒトVASPはMarathon Ready human bone marrow cDNAをtemplateとして、以下のプライマーを使用してPCR法により作成した(Forward ;5'-gaattcaccatgagcgagacggctcatctg-3', Reverse ;5'-gcggccgctcagggagaaccccgttcctc-3')。

細胞

HEK293T細胞は前述の方法で継代維持した細胞を使用した。K562細胞はRPMI1640(Nikken)に、10%fetal bovine serum、1%penicillin/streptomycin、50nM 2-mercaptoethanolを加えた培地を用いて、5%CO₂ 37℃で培養した。NIH3T3細胞はD-MEM(nikken)に10%fetal bovine serum、1%penicillin/streptomycinを加えた培地で5%CO₂ 37℃で維持した。

方法

293T Transfection

293T 細胞への発現ベクターの導入には、前述したFugene 6による方法およびリン酸カルシウム法により導入した。

Western Blotting

Western blottingは前述の方法に従って行った。以下に用いた抗体を示す。
anti-Abl 8E9 mouse monoclonal(pharmingen), anti-FLAG M2 mouse monoclonal (Sigma),
anti-VASP A290 rabbit monoclonal(Cell signaling), anti-VASP ,Goat polyclonal(Santa cruz),
anti-GST mouse monoclonal (Santa cruz).

Retrovirusの作成と感染

Retrovirus の作成にはパッケージング細胞としてPLAT-E(Morita, S. et al., 2000)細胞を用いた。Transfectionの6時間前に 3.0×10^6 cells/10mlで100mmシャーレPLAT-E細胞を播種し、retrovirus vector 8ugと、gag-pol 遺伝子発現プラスミドである pGP、エクトロピック env 遺伝子発現プラスミドであるpE-Eco(Takara Bio)を4ugずつリン酸カルシウム法によりtransfectionした。

翌日培地交換し、2日間培養後の培養液を0.45umのディスクでろ過した後、NIH3T3或いはK562細胞に感染させた。感染24時間後に薬剤を加えた培地に交換し1週間培養した細胞を実験に使用した。

Adhesion assay

BCR-Ablを発現するヒト白血病細胞株であるK562細胞を用いた細胞接着能の解析を行った。VASPの安定発現株を構築するため、まず我々はEcoRを安定発現するK562細胞を作成した。K562細胞にpcx4BSR-EcoRプラスミドをDMR1E-C (Invitrogen) により一過的に発現させ、翌日前述の方法で作成したpcx4BSR-EcoR retrovirusを感染させた。その翌日、blasticidin S 1ug/mlの濃度で調製されたRPMI1640の完全培地に置き換え、1週間薬剤選択を行った細胞を実験に使用した。以降この細胞株をK562-EcoRと表記する。

K562-EcoR細胞にpcx4puro-GFP-VASP WT、Y39F、およびmock (pcx4puro-GFP) を Multiplicity of Infectivity(MOI) 0.3以下でそれぞれ感染させ、puromycin 2ug/mlの濃度で調製されたRPMI1640の完全培地で1週間培養したものを実験に使用した。

これらの細胞を、1%BSAを含むPBSまたは50ug/mlにPBSで調製されたファイブロネクチン(Sigma、from bovine plasma F4759)でコートされた96-well plateに 1×10^5 cells/200ulずつそれぞれ播種し、24時間培養した。非接着細胞を血清を含まないRPMI1640 200ulで1回洗浄し、さらに3回PBS200ulで洗浄した。接着した細胞はPBSで調製された4%paraformaldehydeで室温15分間固定した。固定液を取り除き、2回PBSで洗浄した後、蒸留水で1%濃度に希釈されたゲンチアナバイオレットで室温15分間染色した。染色液を取り除き、wellを水道水で十分濯いだ後、蒸留水で調製された0.5%Triton 50ulを各wellに加えて、一晩抽出した。その後抽出液をプレートリーダーでAbs570nmのO.D.値を測定した。

Wound-healing migration assay

タイムラプス顕微鏡(Carl Zeiss)を用いてWound-healing migration assayを行った。レトロウイルスベクターpcx4puro-GFP-VASP WT、-GFP-VASP Y39F、-GFP-VASP Y39Dを所定の方法でNIH3T3細胞に感染させ、puromycin (2.5ug/ml)で1週間薬剤選択したものを実験に使用した。6well-plateを25ug/mlのファイブロネクチンで一晩コートしたwellに、樹立した細胞を 8×10^5 cells/2ml D-MEM(Nikken-Bio)で播種した。16時間後にイエローチップの先端でスクラッチし、Timelapse顕微鏡により2時間ごとに写真を撮影した。

結果

我々は、Abi-1を介したc-Ablによる基質リン酸化反応が、Menaのリン酸化のみに特有のメカニズムではなく、新規基質BCAPを同定することで、他の基質のリン酸化にも関与する普遍的なメカニズムであると考えた。質量分析法による白血病細胞内でのチロシンリン酸化タンパク質の網羅的解析の結果から、Menaのファミリー分子VASPのチロシンリン酸化が報告された(Goss, V.L. et al., 2006)。このことから、我々はVASPもAbi-1を介したc-Ablの基質となる可能性を考えた。そこでMenaと同様にVASPもAbi-1結合タンパク質となるかを解析し、BCR-Ablやc-AblによるVASPのリン酸にAbi-1や、そのファミリーがどの様に関与するのかについて解析した。また、その機能について、BCR-Ablでガン化した細胞や、正常の線維芽細胞を用いて解析した。

1. Abi-1とVASPの会合の検討

我々の示すモデルでは、Abi-1は酵素だけでなく、酵素と基質の双方に作用することで基質のリン酸化が促進されるというモデルを示してきた(参考図4)。そこで、VASPがAblの新規基質となりうるかを解析するため、我々はまず293T細胞を用いた過剰発現系により、FLAG-タグの付加されたAbi-1と、GST-タグが付加されたVASPを293T細胞に過剰発現し、両者の会合をプルダウンアッセイにより解析した。その結果、Abi-1はVASP結合蛋白質であることがわかった(Fig.6)。

2. Abi-1のBCR-Ablとc-AblによるVASPのリン酸化への影響

次に、Abi-1がBCR-Ablやc-AblによるVASPのリン酸化に関与する可能性を、過剰発現系を用いた解析により検討した。その結果、c-Ablのみの発現下でGST-VASPのリン酸化は認められなかったが、Abi-1とともに過剰発現させることでVASPのリン酸化が認められた。また、BCR-AblにおいてはAbi-1非存在下においてもGST-VASPの若干のリン酸化が認められたが、Abi-1の共発現下においてリン酸化が亢進した(Fig.7)。

さらに、Ablの関連遺伝子として知られているc-Arg (Abl related gene)によるVASPのリン酸化を解析した。c-ArgはSrc相同のN末領域がc-Ablと90%の相同性を有する分子であるが、それ以降のC末領域ではわずか30~40%程度の相同性しか有していない。そのドメイン構造としては、DNA-binding ドメインや、Nuclear localization signalが保持されておらず、その局在は主に細胞質に限定されている(Wang, B., and Kruh, G., 1996)。Etsファミリーに属するTEL遺伝子とc-Ablとの染色体相互転座で生ずるTEL-Abl(Janssen, J.W.G. et al., 1995) も白血病の原因遺伝子として知られているが、TEL遺伝子とARG遺伝子の染色体相互転座により生ずるTEL-ARGも同様に白血病を呈することが知られており(Cazzaniga, G. et al., 1999)、c-Ablと同様にARGもガン遺伝子として機能していることが示唆されている。このことからVASPがAblのみならずARGの基質となりうる可能性が考えられた。そこで、293T細胞を用いた過剰発現系でc-Ablおよびc-ARGによるVASPのリン酸化を検討した。その結果、c-ARGはAbi-1との共発現下においてもc-Ablと比較してVASPをほとんどリン酸化しなかった(Fig.7b)。

3. VASPのチロシンリン酸化部位の同定

これまでに我々は、c-AblによりMenaのprilink-richドメイン内の296番目のチロシンがリン酸化されることを報告している(Tani, K. et al., 2003)。しかしながら、VASPにはそれに相当するチロシンは含まれていない(参考図6)。また、リン酸化タンパク質の網羅的解析の結果から、VASPは39番目のチロシンがリン酸化されることが分かっているが、他のチロシンもリン酸化される可能性も否定できない。そこで、VASPが保持する4つのチロシンのうち、1つのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体と、1つのチロシンのみを残し、残りのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を作成し、リン酸化部位の同定を行なった(Fig.8a)。その結果、一つのチロシンのみをフェニルアラニンに置換した変異体においては、16、72、341番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体ではWTとほとんど同レベルのリン酸化を認めたが、39番目のチロシンのみを置換した変異体においてリン酸化レベルの顕著な低下が認められた(Fig.8b 左)。また、一つのチロシンのみを残し、残りのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体と、すべてのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を用いて解析した結果、16、72、341番目のチロシンのみを保持する変異体では、すべてのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体と同様にリン酸化が認められなかったのに対し、39番目のチロシンのみを残した変異体ではWTと同レベルのリン酸化が認められた(Fig.8b 右)。これらの結果から39番目のチロシンがBCR-Ablによるリン酸化部位であることが示唆された。そこで次に、このリン酸化部位がc-Ablと同様のリン酸化部位であるかを検討した。c-AblとともにAbi-1とVASP WT、Y39F、Y39を用いて解析したところ、BCR-Ablの発現下と同様、Y39Fではリン酸化が認められず、Y39ではWTと同レベルのリン酸化が認められた(Fig.8c)。これらの結果から、VASPの39番目のチロシンがBCR-Ablとc-Ablによるリン酸化部位であることが示唆された。

4. チロシンリン酸化型VASPの細胞内局在の解析

VASPはこれまでに細胞内においてアクチンストレスファイバーへの集積や、フィロポディア、ラメリポディアへの局在すること、乳がん細胞株においてMenaの腫瘍特異的なスプライシングバリエントは、invadopodia/podosomeのマーカーであるCortactinと共局在することが知られている(Philipper, U. et al., 2008)。また、セリンリン酸化型VASPは細胞間結合部位のマーカーであるZO-1と共局在することが知られており(Comerford, K.M. et al., 2002)、チロシンのリン酸化によってもその局在が変化する可能性が考えられた。そこで我々はまず、c-AblとAbi-1をVASPと共に過剰発現させることで、チロシンリン酸化型VASPの細胞内局在を解析した。293T細胞にGFP-Tagを付加したVASPを単独で発現させた場合(Fig.9左)では、細胞内とその辺縁部にGFP蛍光が認められた。さらに、c-AblおよびAbi-1を共に過剰発現させた場合、すべての細胞ではないが、GFP蛍光を認めた1-2割程度の細胞において非常に大きなフォーカスを形成した(Fig.9中央)。そこでさらに、39番目のチロシンをグルタミン酸に置換した偽リン酸化型変異体を作成し、単独で293T細胞に過剰発現した場合、ほとんどすべての細胞において大きなフォーカスの形成

が確認された (Fig9.右)。これらのフォーカスはinvadopodia/podosome状の構造体によく似ていたことから、VASPのチロシンリン酸化はinvadopodia/podosomeの形成に関与する可能性が考えられた。

5. VASPとそのリン酸化部位変異体を導入したK562細胞を用いた細胞接着性への影響

293T細胞内でのリン酸化型VASPの局在を解析した結果、invadopodia/podosome状の構造体の形成が認められ、その構造体はBCR-Ablでガン化したBa/F3細胞内でのBCR-Ablの局在と酷似していた (Li, Y. et al., 2007) (参考図7)。また、BCR-Ablでガン化した白血病細胞は接着能や組織への浸潤能を獲得することが知られている。これらのことからVASPのチロシンリン酸化は細胞の接着性に関与する可能性が考えられた。そこで、BCR-Ablでガン化したヒト白血病細胞株であるK562細胞に、野生型およびリン酸化部位変異型VASP (Y39F) を発現する細胞株を樹立し、細胞接着能を解析した。その結果、野生型VASPを発現する細胞は空ベクターを感染させた細胞と比較して若干の接着能の減少が認められたが、Y39Fを発現する細胞株では野生型を発現する細胞と比較して顕著な接着能の減少が認められた (Fig.10)。このことから、VASPのチロシンリン酸化は白血病細胞における接着能の獲得に関与する可能性が考えられた。

6. VASPとそのリン酸化部位変異体を導入した線維芽細胞を用いた細胞運動性への影響

これまでの報告で、線維芽細胞内においてVASPはc-Ablと機能的に相互作用する分子であることが報告されてきたが、チロシンのリン酸化についてはこれまで報告されていなかった (Howe, A.K. et al., 2002)。293T細胞にc-Abl、Abi-1、GFP-VASP WTを過剰発現した細胞内でのフォーカスの形成は、チロシンフォスファターゼである過バナジン酸で処理することにより増加傾向が認められた (データ非掲載)。このことからVASPのチロシンリン酸化はフォスファターゼ活性により速やかに脱リン酸化される可能性が考えられた。VASPの線維芽細胞での機能としては細胞の運動性に関与することが知られていることから、VASPのリン酸化部位変異体を導入した細胞を用いてWound-Healing assayにより細胞の運動性への影響を調べた。NIH3T3細胞にVASP WTおよびY39F変異体またはY39D変異体を安定的に発現する細胞を樹立し、タイムラプス顕微鏡を用いて時間経過ごとに細胞を観察した。これまでの報告どおり、VASP WTを発現することで空ベクターを感染させた細胞と比較して細胞の運動性の低下が認められた (Fig.11) (Bear, J.E. et al., 2000)。しかしながらリン酸化部位変異体型VASPを発現する細胞では、運動性の低下が認められなかった。また、偽リン酸化型VASPを発現する細胞は、WTのVASPを発現する細胞と同様の運動能の低下が認められた。これらの結果からVASPのチロシンリン酸化は線維芽細胞における運動性に関与する可能性が考えられた。

考察

1. Abi-1を介したチロシンリン酸化酵素Ablの新規基質VASPの同定

これまでの研究で、我々はAbi-1がc-Ablと基質の双方に結合することでc-Ablによる触媒反応を促進することを見出してきた。BCAPのリン酸化においては、Abi-1はc-Ablだけでなく、ガン遺伝子型v-Ablによるリン酸化を促進することが明らかになった。また、VASPのリン酸化においても、ガン遺伝子型BCR-AblによるVASPのリン酸化をAbi-1は促進した。これらの結果から、Abi-1はc-Ablの活性を制御するだけでなく、基質との結合においてもリン酸化に重要な役割を担うものと考えられる。現在のところAbi-1とVASPの結合ドメインは未解析のままであるが、MenaのEVH1ドメインがAbi-1のpolyproline領域と相互作用することが報告されていることから、おそらくVASPにおいてもEVH1ドメインがAbi-1のpolyproline領域との相互作用ドメインであると考えられる。また、c-AblによるMenaとVASPのリン酸化部位に注目すると、Menaにおいては296番目のチロシンがリン酸化部位であることが明らかになっているが、VASPのチロシンリン酸化部位は39番目であることがわかった。これまでの我々のグループの研究ではマウス由来のMenaを用いてきたが、マウスMenaの296番目のチロシンはラットなどのげっ歯類にしか保持されておらず、ヒト、ブタ、チキンなどには保持されていない。それに対しVASPの39番目のチロシンは哺乳類におけるMena/VASP/Evlすべてにおいて保存されている。また、Menaのリン酸化は、チロシン変異体を作成しWestern blotにて解析した実験結果であり、チロシンを296番目のみ残した変異体で強いリン酸化が認められているが、WTとのリン酸化レベルの比較や、ペプチドマップなどによる解析は行なっていない(Tani, K. et al., 2003)。このことから、マウス、ラットにおいてMenaの296番目のチロシンが一旦リン酸化を受けることで、その後39番目のチロシンがリン酸化される可能性が考えられる。VASPのリン酸化に関しては、39番目のみのチロシンを残したVASPのリン酸化レベルと野生型VASPのそれと比較すると、ほとんど差が認められなかった(Fig.8b.c.)。このことからVASPのリン酸化部位は39番目のみであると考えられるが、いずれにしてもペプチドマップなどを用いてリン酸化部位が39番目のみであるかを解析することが望ましいと考える。

次に、VASPのチロシンリン酸化部位がEVH1ドメイン内であることを注目したい。EVH1ドメインは、特徴的な(D/E)FPPPX(D/E)(D/E)というproline-richな領域に結合するモジュールであり、Zyxin、vinculinなどとの相互作用ドメインとして知られている。Zyxin、vinculinはVASPの細胞内局在を制御するタンパク質として知られ、Zyxin欠損線維芽細胞では、VASPのストレスファイバーへの局在が適切に行なわれなくなることが報告されている(Hoffman, L.M. et al., 2006)。そこでVASPのチロシンリン酸化がZyxinとの会合に影響を与える可能性を考え、293T細胞にGST-VASP、Zyxin、Abi-1およびc-Abl WTまたは酵素不全型c-Ablを過剰発現させ、チロシンリン酸化型、非リン酸化型のGST-VASPに結合するZyxinの共沈を解析した(データ非掲載)。その結果、リン酸化型と非リン酸化型VASPとで共沈するZyxinの量に変化は認められず、偽リン酸化型VASPでも同様に野生型VASPと結合するZyxinの量に変化は認められなかった。このことからVASPのチロシンリン酸化はZyxinやVinculinなどの(D/E)FPPPX(D/E)(D/E)モチーフを有するタンパク質との結合に影響を与

えない可能性が高い。Fig.9に示すとおり、リン酸化型VASPの局在は293T細胞において大きなフォーカスを形成した。おそらくこの構造体には、vinculinやそれに付随するタンパク質paxillin、talin、integrin、cortactinなどの接着班の形成に関与するタンパク質と複合体を形成するinvadopodiaであると考えられる(参考図7)。実際、BCR-Ablでガン化したBa/F3細胞内において、BCR-Ablの局在はリン酸化型VASPの局在と酷似したinvadopodia状の構造体を形成し、Abi-1、paxillin、F-actin、integrinと共局在することが報告されている(Li, Y. et al., 2007)。興味深いことに、VASPの偽リン酸化変異体は、それ自身を単に過剰発現するだけでAblの酵素活性とは無関係にinvadopodia状の構造体を形成した(Fig.9右)。このことからVASPのチロシンリン酸化は、それ自身がinvadopodiaへと接着班形成に関与するタンパク質のリクルートに関与する可能性が考えられる。今後この構造体に内在性の接着班形成に関与するタンパク質や、c-Abl、Abi-1が共局在するかについて検討し、さらに浮遊系細胞に偽リン酸化型VASPを発現した細胞がBCR-Ablでガン化した白血病細胞と同様に接着能を獲得するかどうかを検討したい。

2. VASPのチロシンリン酸化とその機能

これまでVASPはGアクチンおよびFアクチンをともに結合し、アクチンフィラメントの形成への関与、細胞接着、細胞運動などにおける広範囲の働きが示唆されてきた。また、VASPはインテグリン-細胞外基質との相互作用によるインサイド-アウト シグナリングやアウトサイド-イン シグナリングなどに関与する可能性があり、その活性はPKA/PKG によって制御させることが明らかになっている(Krause, M. et al., 2003)。本研究により示されたVASPの39番目に位置するチロシンのリン酸化は、これらのVASPの活性制御にどのように関わるのであろうか。

VASPはPKAによりリン酸化されることで、c-Ablとの相互作用が低下することが*in vitro*および*in vivo*での解析結果から明らかになっている(Howe, A.K. et al., 2002, Harbeck, B. et al., 2000)。このことから、VASPのPKAによるセリン/スレオニンのリン酸化とc-Ablによるチロシンのリン酸化はそれぞれ独立して起こりうることが予測された。そこで293T細胞にc-Abl、Abi-1、VASPを過剰発現させ、forskolin及びIBMX処理によりPKAを活性化した細胞と未処理の細胞内における、VASPのチロシンリン酸化とセリン/スレオニンのリン酸化レベルを比較した(データ非掲載)。その結果、予想に反してセリン/スレオニンリン酸化状態においてもVASPのチロシンリン酸化レベルに変化は認められなかった。このことから、PKAによるVASPのセリン/スレオニンのリン酸化状態においてVASPとの直接的な相互作用は維持されないが、Abi-1との相互作用は維持された結果としてc-Ablによるチロシンのリン酸化が行なわれるものと考えられる。今後は精製したタンパク質を用いてこれらの詳細なリン酸化メカニズムの解析を行う必要があると考える。

3. 白血病細胞における細胞接着への関与

これまでにBCR-Ablでガン化した白血病細胞は、接着性が増加し能組織へ浸潤能を獲得することが知られている。近年、BCR-Ablによるガン化経路においてAbi-1が接着性と組織への浸潤に関与することが報告されてきた(Li, Y. et al., 2007, Yu, W. et al., 2008, Sun, X. et al., 2007)。そこで、

Abi-1を介したBCR-Ablの基質としてVASPのチロシンリン酸化が細胞接着性の獲得に関与している可能性が考えられた。BCR-Ablを発現する白血病細胞株であるK562細胞に、VASPとそのリン酸化部位変異体を発現する細胞株を樹立し、ファイブロネクチンに対する接着性を解析したところ、接着能の低下が認められた (Fig.10)。このことから、VASPのチロシンリン酸化は白血病細胞の接着性に関与することが示唆された。しかしながら、K562細胞においては293T細胞内のリン酸化型VASPやBCR-Ablでガン化したBa/F3細胞内でのBCR-Ablの局在と同様のフォーカスの形成は認められなかった (データ非掲載)。この点について比較すると、Liらはp185型BCR-Ablでガン化したBa/F3細胞を使用している点と、K562細胞ではp210型BCR-Ablを発現していることが注目される。これらBCR-Ablの違いとして、p185型BCR-AblはBCR領域におけるRhoA GTPase 活性化ドメインとPHドメインを欠く点が挙げられる(Harnois, T. et al., 2003) (参考図5)。詳細は不明であるが、RhoAの活性化やPHドメインによる局在制御により、Ba/F3細胞で認められる特長的な構造体の形成が阻害されている可能性が考えられる。今後p185型とp210型のBCR-Ablでガン化したBa/F3細胞内でのVASPの局在についても解析したいと考えるが、いずれにしてもVASPのチロシンリン酸化は接着性に関与する可能性が考えられるため、細胞外マトリックスを用いた浸潤能や免疫不全マウスを用いてVASPのチロシンリン酸化による浸潤能の獲得について解析する必要がある。

4. 線維芽細胞における細胞運動性への関与

線維芽細胞内においてVASPはc-Ablと相互作用するものの、チロシンリン酸化についてはこれまで報告されていなかった(Howe, A.K. et al., 2002)。c-Abl、Abi-1、GFP-VASP WTを過剰発現した293T細胞内で、遺伝子導入が成立した細胞の1-2割程度は、偽リン酸化型VASPと同様のフォーカスを形成した。さらにc-Abl、Abi-1、GFP-VASP を過剰発現した細胞をフォスファターゼ阻害剤であるpervanadateで処理することにより、フォーカスの増加傾向が認められた (データ非掲載)。このことからVASPのチロシンリン酸化はフォスファターゼ活性により速やかに脱リン酸化されることで、内在性レベルではチロシンリン酸化が検出されないものと考えられる。実際、ヒルにおけるフォスファターゼの一つであるHmLAR2 (哺乳類におけるLAR (Leukocyte antigen related; protein tyrosine phosphatase receptor type-F) のhomologue) をノックダウンすることにより、beta-integrin、paxillin とともにEna/VASPのチロシンリン酸化レベルが増加することが報告されている(Baker, M.W. et al., 2008)。また、*Drosophila*の神経分節形成過程においてD-LarはAbl-Enaと複合体を形成し、*in vitro*においてEna-AblはD-larの基質となることも報告されている(Wills, Z. et al., 1999)。そのため、VASPの内在性レベルのチロシンリン酸化はLARなどのフォスファターゼ活性により検出されないが、VASPのチロシンリン酸化は正常細胞においても何らかの役割を担っている可能性が考えられた。VASPのその機能の一つとして細胞の運動性の制御への関与を解析するため、マウス線維芽細胞NIH3T3細胞にVASPとそのリン酸化部位変異体、偽リン酸化型変異体を安定発現する細胞を樹立し、wound-healing assayにより細胞の運動能を解析した (Fig.11)。その結果、他の報告と同様にVASP WTを発現することで細胞の運動能の低下が認められた(Bear, J.E. et al., 2000)。これに対し、リン酸化部位変異体型VASPを発現する細胞では、WTを過剰発現した細胞と比較して運

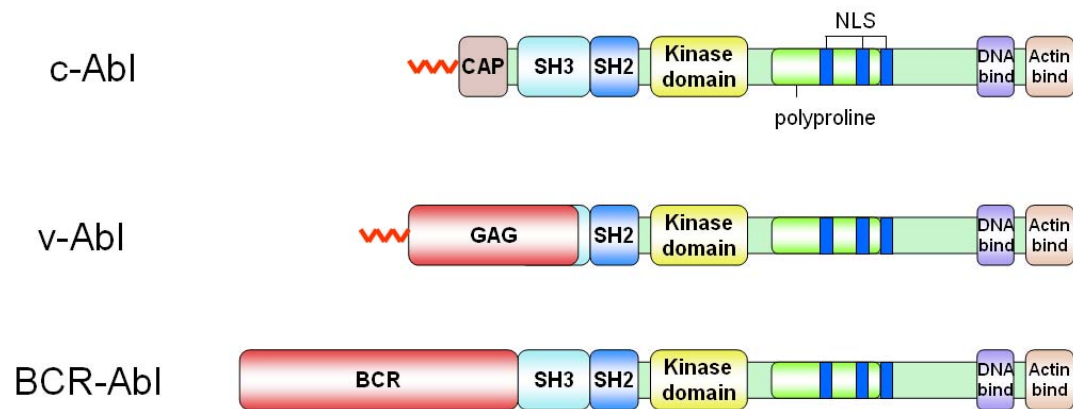
動性の低下はほとんど認められなかった。このことからVASPのチロシンリン酸化は細胞の運動能の制御において役割を担うものと考えられる。また、偽リン酸化型変異体型VASPを導入した細胞では、WTとほとんど差を認めなかった。このことからVASPのチロシンが脱リン酸化されることが、細胞の運動性制御においては必ずしも必要ではないものと考えられる。細胞運動の制御においてVASPのチロシンリン酸化が局在制御によるものなのか、或いはVASPそのもののアクチン重合活性に影響を与えるのかについては定かではないが、いずれにしても今後は関連するフォスファターゼの同定や*in vitro*におけるアクチン重合アッセイと細胞内での局在制御を解析することで、細胞骨格形成におけるVASPのチロシンリン酸化の機能が明らかにされるものと考えられる。

本章のまとめ

本章では、Abi-1を介したc-Ablの新規基質としてVASPの同定を示した。また、Abi-1はガン遺伝子型BCR-AblによるVASPのリン酸化を促進し、その機能としては白血病に認められる接着性の亢進に関与することが示唆された。さらに、正常細胞における運動性の制御にも関与する可能性が示された。これらの結果は、Abi-1が正常型のc-Ablの活性制御を担うだけでなく、ガン遺伝子型BCR-Ablによるガン化機構を理解する上でも注目すべき新たなシグナル伝達経路を明らかにした点で意義があると考ええる。

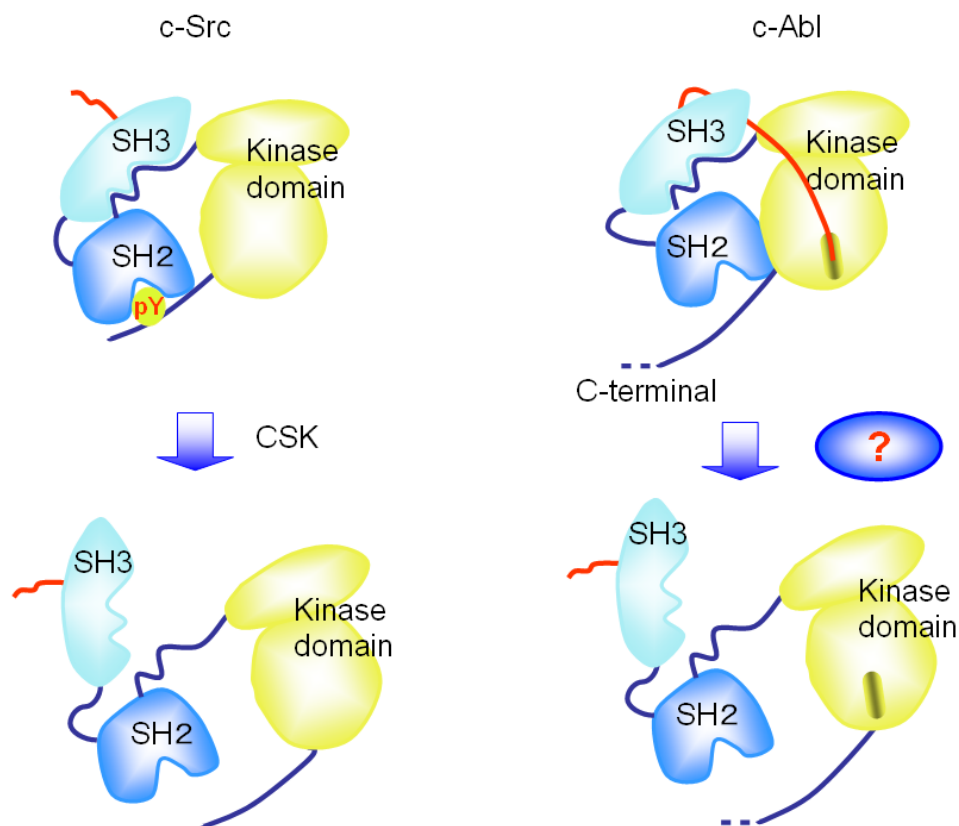
総括

本研究では、Mena のチロシンリン酸化において、チロシンリン酸化酵素 Abl の酵素活性がアダプタータンパク質 Abi-1 により制御されるというモデルが、c-Abl による基質のリン酸化経路において普遍的なメカニズムであることを、2 つ目の基質 BCAP を新規に同定することで示した。また、ガン遺伝子型 BCR-Abl による細胞のガン化経路においてリン酸化され、細胞の接着性に寄与すると考えられる VASP を、Abi-1 を介した Abl の基質として同定した。さらに、恒常的酵素活性を有する v-Abl あるいは BCR-Abl によっても、BCAP や VASP のリン酸化は Abi-1 存在下で促進された。これら一連の研究結果は、Abi-1 により c-Abl の活性が制御されるという新しい概念を提唱するだけでなく、ガン遺伝子型の Abl によるシグナル伝達経路を理解する上でも重要な新たな活性制御メカニズムを明らかにした点で意義があると考ええる。



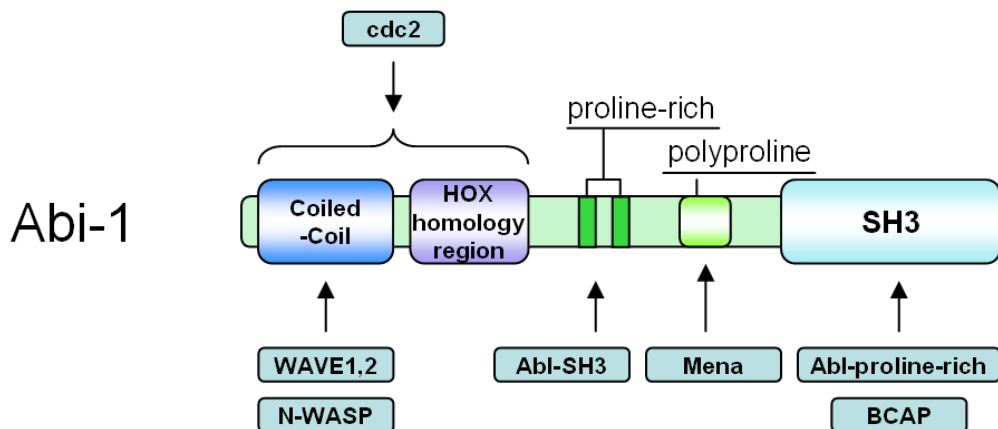
参考図 1 原ガン遺伝子 c-Abl とガン遺伝子 v-Abl、BCR-Abl の一次構造

c-Abl は N 末からまた、その構造に続いて CAP ドメイン、SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメイン polyproline 領域、Nuclear Localization Signal (NLS)、DNA 結合領域、アクチン結合領域が保持されている。マウス白血病遺伝子として同定された v-Abl は、N 末の SH3 ドメインがウイルス由来の GAG (Group specific antigen) に入れ代わっている。また、BCR-Abl においては N 末の CAP ドメインが BCR (Breakpoint cluster region) と入れ代わっている。



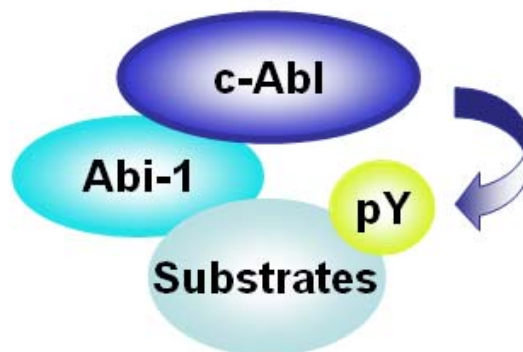
参考図2 c-Src と c-Abl の活性制御機構

c-Src においては、c-terminal src kinase(CSK)により c-Src の 527 番目のチロシンがリン酸化され、そのリン酸化を N 末の SH2 ドメインが認識し、分子内で閉じた構造をとることで酵素活性が負に制御されると考えられている。また、Y527 は脱リン酸化されることで c-Src は開いた活性化構造をとることにより、活性化状態へと遷移するものと考えられている(図左)。一方、c-Abl においては、ミストイレル化されるIV型 Abl の N 末の構造解析の結果、酵素ドメインの疎水性ポケットに N 末のミストイレル基が入り込むことで閉じた構造をとり、酵素活性が負に制御されることが明らかになっている(図右)。しかしながら、c-Abl においてはどのようなメカニズムで閉じた構造から開いた構造へと状態が遷移するのかについてはこれまでほとんど明らかにされていない。



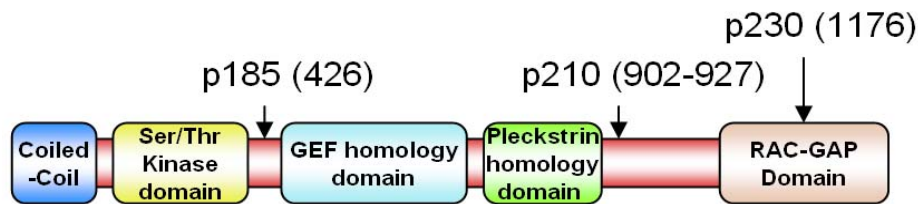
参考図3 Abi-1 の一次構造と結合タンパク質

Abi-1 はN 末から coiled-coilドメイン、HOX ホモロジー領域、proline-rich 領域、polyproline 領域、SH3ドメインを保持している。WAVE-1(Echarri, A. et al., 2004),WAVE-2(Leng, Y. et al., 2005, Innocenti, M. et al., 2004)、N-WASP(Burton, E.A. et al., 2005)は coiled-coilドメインと相互作用し、cdc2 は coiled-coil と HOX homology domain を含む配列と相互作用する(Lin, T.Y. et al., 2004)。c-Abl は SH3ドメインと proline-rich 領域を介して Abi-1 の proline-rich 領域と SH3ドメインでそれぞれ結合する(Ichigotani, Y. et al., 2002)。Mena は EVH1ドメインを介して Abi-1 の SH3ドメインと相互作用する。また、本研究において BCAP の C 末の polyproline 領域が Abi-1 の SH3ドメインと相互作用することが示唆された。



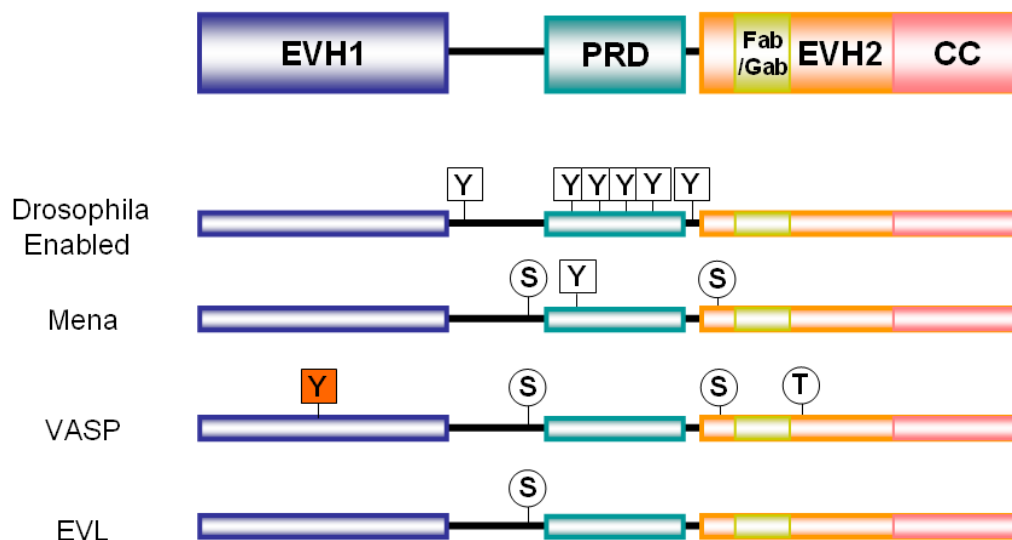
参考図4 Abi-1 を介した c-Abl による基質リン酸化モデル

アダプタータンパク質 Abi-1 は、酵素である c-Abl と、基質の双方に結合することで c-Abl による基質のリン酸化を促進するというモデルを提示している。



参考図5 BCR の一次構造と Abl との相互転座部位

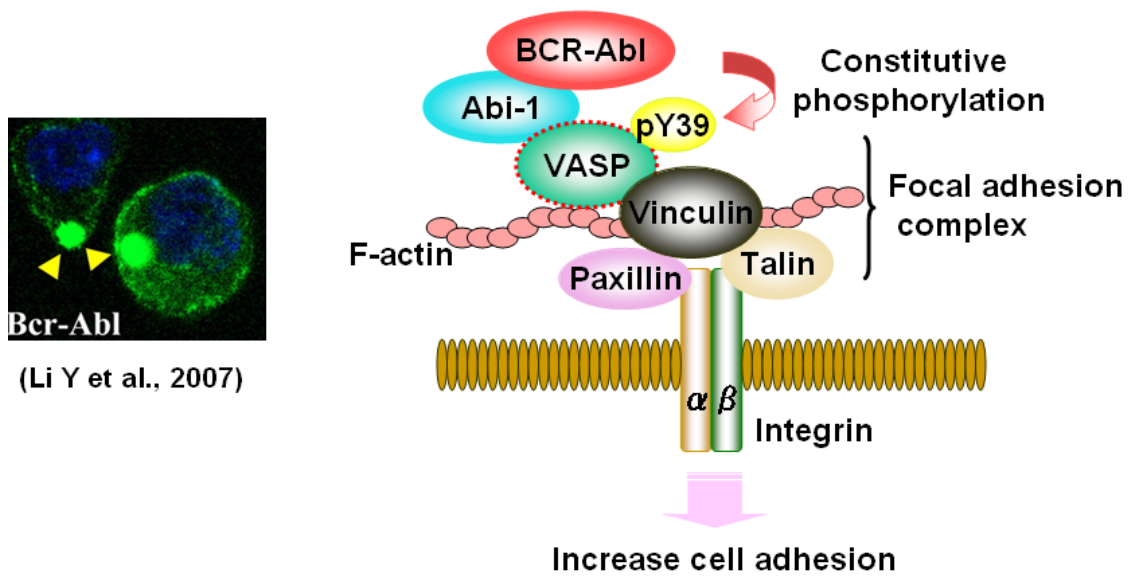
BCR(Breakpoint Cluster Region)は Ser/Thr キナーゼの一つであり、N 末から coiled-coil ドメイン、キナーゼドメイン、CDC42 guanine-nucleotide exchange factor homology (DH) ドメイン、pleckstrin homology (PH) ドメイン、および Rac guanosine triphosphatase-activating protein (Rac-GAP) ドメインを保持している。BCR-Abl は c-Abl との相互転座部位により p185、p210、p230 の 3 つのフォームを形成する。p185 の場合 427 番目のアミノ酸、p210 の場合 902-927 番目の領域において、p230 では 1176 番目のアミノ酸をコードする部位で融合している。



参考図6 Ena/VASP ファミリーの一次構造

Ena/VASP ファミリーは N 末に EVH1 (Ena/VASP Homology) ドメイン、中央部に proline-rich ドメイン (PRD)、C 末の F-actin 結合 (Fab) ドメイン、G-actin 結合 (Gab) ドメイン、coiled-coil ドメイン (CC) を含む EVH2 ドメインで構成されている。

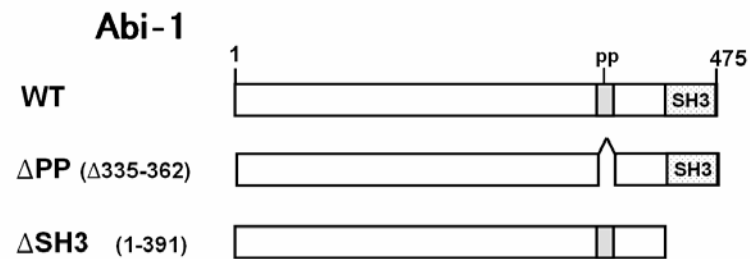
四角で囲われた Y はチロシンリン酸化部位を示し、丸で囲われた S および T はセリン／スレオニンのリン酸化部位を示す。



参考図7 BCR-Abl による VASP のチロシンリン酸化における役割の可能性

BCR-Abl でガン化した白血病細胞内において、VASP が Abi-1 を介して BCR-Abl により恒常的にリン酸化された結果、接着班形成に参与するタンパク質 (vinculin、paxillin、talin、integrin、F-actin) をリクルートし、integrin を介して細胞の接着能の獲得に寄与するものと考えられる。

a)



b)

BCAP Fragment	Abi - 1	β-Gal activity
+	—	• —
+	WT	• +
—	WT	• —
+	ΔPP	• +
—	ΔPP	• —
+	ΔSH3	• —
—	ΔSH3	• —

Fig1.Abi-1におけるBCAPの結合ドメインの解析

(a.) Abi-1欠損変異体の模式図 pp;PolyProline SH3;Src Homology3

(b.) (a.)に示す Abi-1 変異体と BCAP Frg を用いて Yeast two-hybrid 法により Abi-1 における BCAP の結合ドメインの解析を行った。Abi-1 WT と Abi-1 の proline-rich 領域を欠損した変異体 (ΔPP) では、BCAP Frg との結合は認められなかったが、Abi-1 の SH3ドメインを欠損した変異体 (ΔSH3) では BCAP Frg との結合は認められなかった。

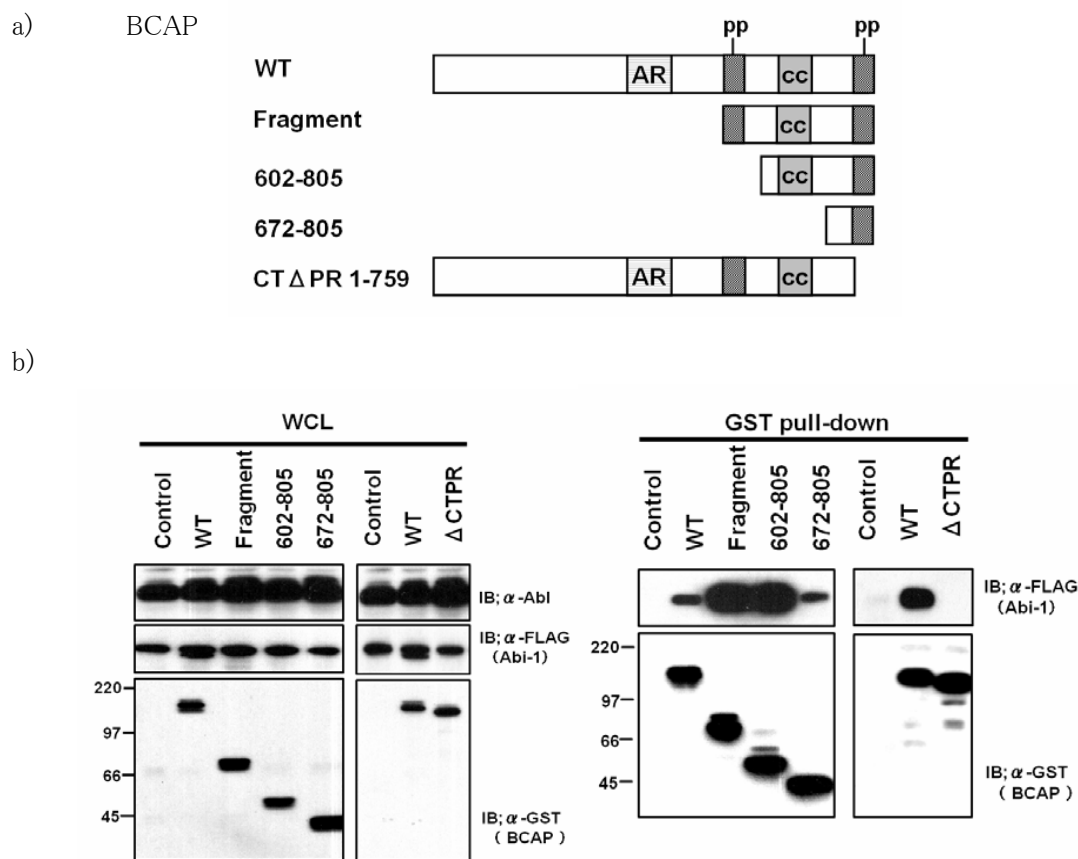


Fig.2 BCAPにおけるAbi-1の結合ドメインの解析

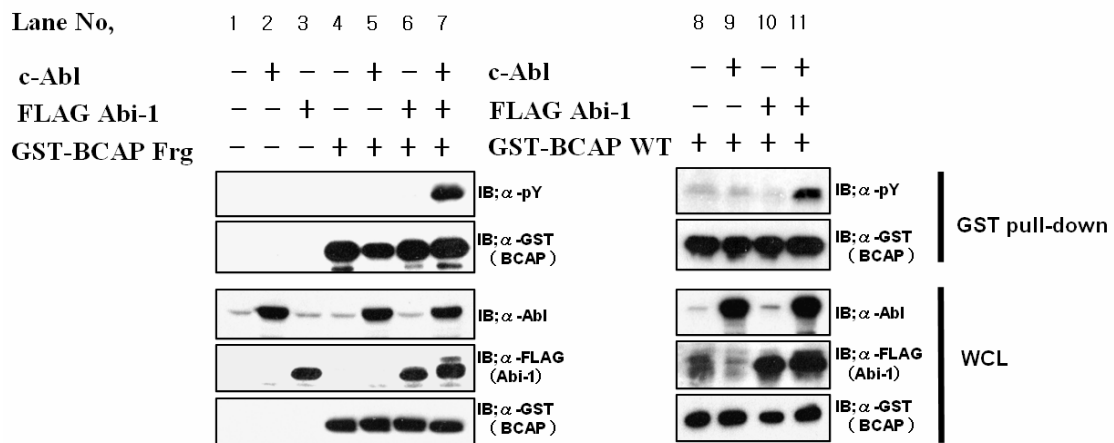
(a.) BCAP欠損変異体の模式図

BCAP ORF全長(WT 805a.a.) Yeast two-hybrid 法で得られたBCAP Frg(446-805)、602-805、672-805、CT Δ PR(1-705)

AR;Ankyrin repeat cc;coiled-coil pp;proline-rich

(b.) (a.) 上記のBCAP欠損変異体にGSTタグを付加し、c-Abl、FLAG-Abi-1と共にHEK293T細胞に過剰発現させた後、GST-BCAPを pull downし、抗FLAG抗体を用いて共沈するFLAG-Abi-1を検出した。BCAP WT、Frg、602-805、672-805においてはFLAG-Abi-1の共沈が確認されたが、C末端のproline-rich領域を欠損した変異体である Δ CTPRでは、FLAG-Abi-1の共沈は認められなかった。

b)



b)

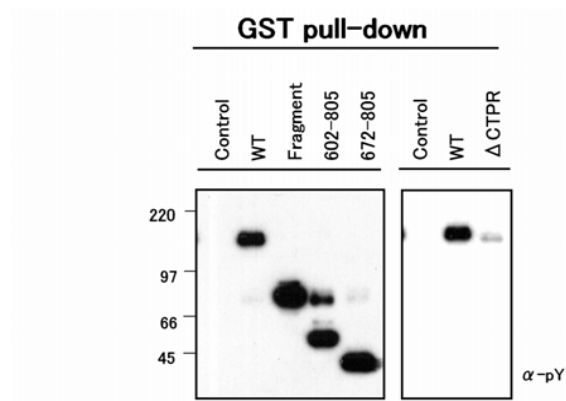


Fig.3 c-AblはAbi-1の存在下でBCAPのリン酸化を行う

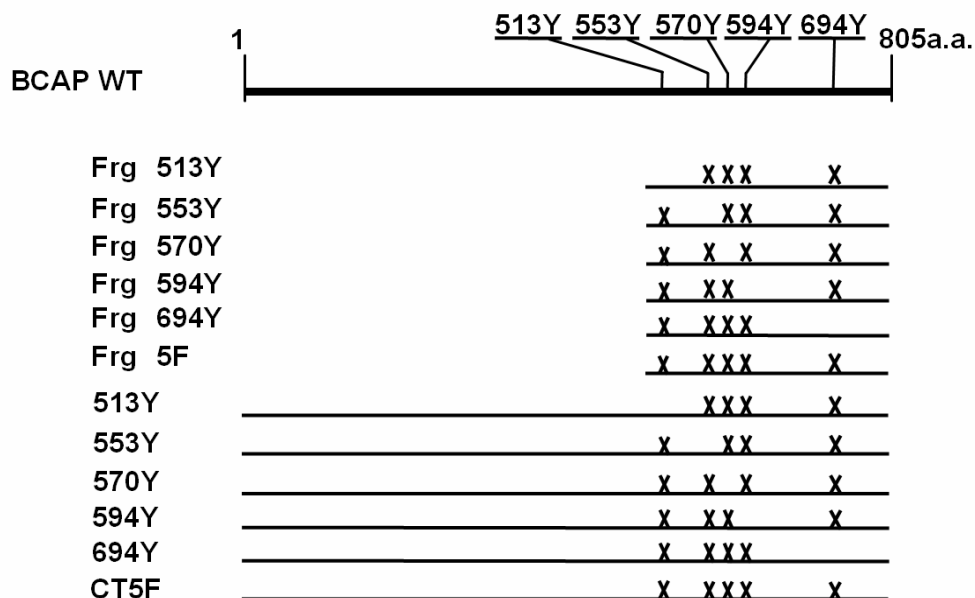
(a.) Fig.2(a.)で示したBCAP FrgまたはBCAP WTにGST-Tagを付加し、c-Abl、FLAG-Abi-1と共にHEK293T細胞で共発現させ、BCAPのリン酸化を検出した。c-Abl、FLAG-Abi-1のみの発現下ではGST-BCAP FrgおよびWTのリン酸化は認められなかった (Lane4, 5および9, 10)。しかしc-Abl、Abi-1の共発現下において、BCAP FrgおよびWTにリン酸化が認められた (Lane 7、11)。

(b.) Fig.2のサンプルを用いて抗リン酸化チロシン抗体によるWestern Blotを行った。Abi-1の共沈が認められたBCAP WT、Frg、602-805、672-805においてはリン酸化が認められたが、共沈が認められなかったΔCTPRではリン酸化はほとんど認められなかった。

a)

		513		553	
bcap Human.gnu	508	Q E E D V Y H T V D D E A F S V D L A S R P P V P V P R P E T T A F G A H Q L P D N E P Y I F K V F A E K S Q E R P G	567		
bcap chicken.gnu	343	Y G E D L Y Y S V E K D - T F P Q E M A S R P P V P V P R P E S S S P - - - - Q P D N E L Y I S K V F A Q K A Q - R P E	396		
bcap mouse.gnu	508	Y G E E L Y H I V D E D E T F S V D L A N R P P V P V P R P E A S A P G P P P P D N E P Y I S K V F A E K S Q E R L G	567		
bcap rattus.gnu	647	H G E E L Y H T V E E D E T F S V D L A N R P P V P V P R P E T S T P G P H P L P D N E P Y I S K V F A E K S Q E R V G	706		
		570		594	
bcap Human.gnu	568	N F Y V S S E S I R R G P P V R P W R D R P Q S S I Y D P F A G M K T P G Q R Q L I T L Q E Q V K L G I V N V D E A V L	627		
bcap chicken.gnu	397	N L Y V P G K V R K E T I V R P V R D L S Q S S I Y D P F A G M K T P G Q R Q L I T L Q E Q V K M G I L N V D E A V L	456		
bcap mouse.gnu	568	N F Y V S S E S I R R E P L V R P W R D R P P S S I Y D P F A G M K T P G Q R Q L I T L Q E Q V K L G I V N V D E A V L	627		
bcap rattus.gnu	707	N F Y V S S E S I R R E P L V R P W R D R P P S S I Y D P F A G M K T P G Q R Q L I T L Q E Q V K L G I V N V D E A V L	766		
bcap Human.gnu	628	H F K E W Q L N Q K K R S E S F R F Q Q E N L K R L R D S I T R R Q R E K Q K S G K Q T D L E I T V P I R H S Q H L P A	687		
bcap chicken.gnu	457	H F K E W Q L N Q K K R S E S F R F Q Q E N L K R L R D S I T R R Q M E K Q K S G K S A D L E I T V P I R H S H N T L G	516		
bcap mouse.gnu	628	H F K E W Q L N Q K K R S E S F R F Q Q E N L K R L R E S I T R R R K E K P K S G K H T D L E I T V P I R H S Q H L P E	687		
bcap rattus.gnu	767	H F K E W Q L N Q K K R S E S F R F Q Q E N L K R L R D S I T R R Q R E K Q K S G K H A D L E I T V P I R H S Q H L P G	826		
		694			
bcap Human.gnu	688	K V E F G V Y E S G P R K S V I P P T E L R R G D W K T D S T S S T A S S T S N R S S T R S L L S V S S G H E G D N E	747		
bcap chicken.gnu	517	K P E C G I Y E Y A P R K N I F P P K K E L K R G D W K T E S T S S T T S S A S N R S S T R S I L S V S S G H E G D S E	576		
bcap mouse.gnu	688	K V E F G V Y E S G P R K S V L P A R T E L R R G D W K T D S M S S T A S S T S N R S S T R S L L S V S S G H E G D N E	747		
bcap rattus.gnu	827	K V E F G V Y E S G P R K S V F P A R T E L R R G D W K T D S T S S T A S S T S N R S S T R S L L S V S S G H E G D N E	886		
bcap Human.gnu	748	D N E V P E I T R S R S P G P P Q V D G T P T H S - - - - - L E R P P R V P P R A A S Q R P P T R E T F H P P P P V P	801		
bcap chicken.gnu	577	D N E V S E A S R S R S P I P S Q A E R L P - - - - - L P L P E R P P R V P P R G A S - R P V N C E G F Y P P P - V P	628		
bcap mouse.gnu	748	D N E I P E I T R S R S P G P T Q V D G A P V V T G T P V G T L E R P P R V P P R A A S Q R P L T R E S F H P P P P V P	807		
bcap rattus.gnu	887	D N E V P E I T R S R S P G P T Q V D G A P V V T G T P V G I L E R P P R V P P R A A S Q R - - - - -	932		
bcap Human.gnu	802	P R G R			805
bcap chicken.gnu	629	P R G R			632
bcap mouse.gnu	808	P R G R			811
bcap rattus.gnu	932	----			932

b)



c)

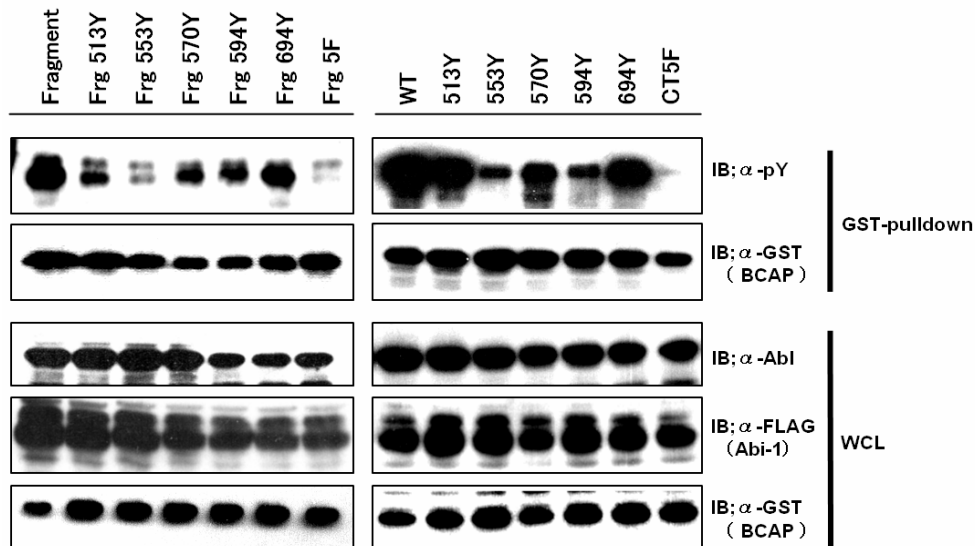


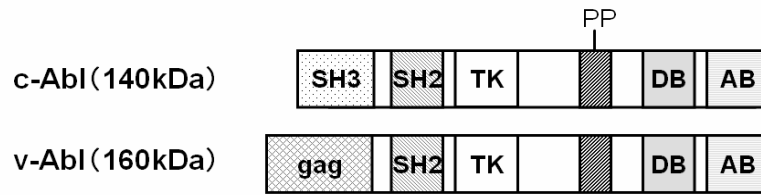
Fig.4 c-AblはBCAPのC末端領域をリン酸化する

(a.) ヒト、ニワトリ、マウス、ラットにおけるBCAP C末端領域のアミノ酸配列の比較。Yeast Two-hybridで得られたヒト BCAP Frgに存在する5つのチロシンは、異なる種間ですべて保存されている。

(b.) BCAP のリン酸化部位を同定するため、Frgにおけるチロシン(Y)をフェニルアラニン(F)に置換したY/F変異体と、BCAP WTでのY/F変異体の模式図

(c.) (b.) に示したBCAP変異体を用いてc-Abl、FLAG-Abi-1と共にHEK293T細胞に共発現させ、BCAP変異体のチロシンリン酸化レベルを確認した。BCAP WTおよびFrgの両者においてC末端領域におけるすべてのチロシンのリン酸化が確認された。特に513Y、694Yに強いリン酸化が認められた。また、CT5Fにおけるチロシンリン酸化はほとんど認められなかった。

a)



b)

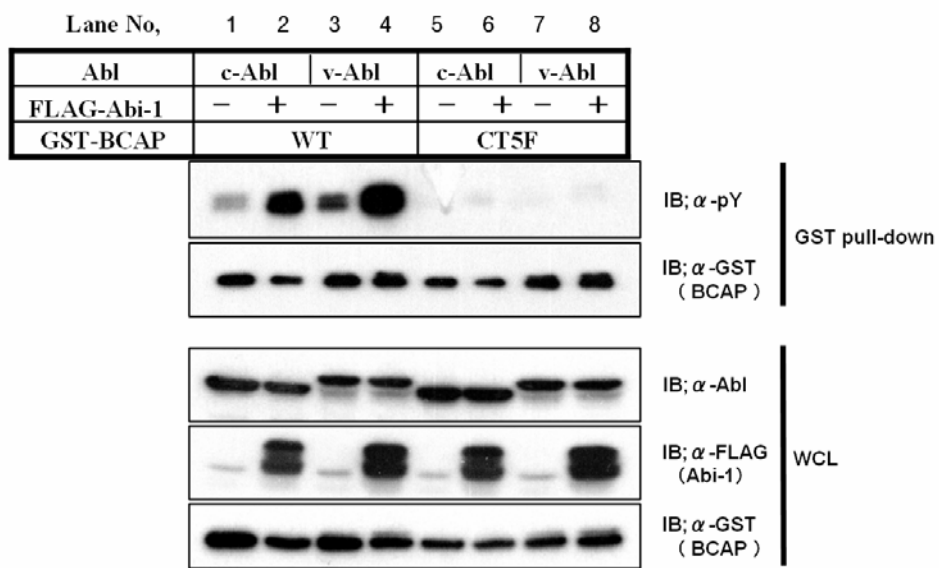


Fig.5 v-Ablは、c-Ablと同様にBCAPのC末端領域のチロシンをリン酸化する

(a.) c-Ablとv-Ablの模式図

TK;Tyrosine Kinase pp;polyproline AB;Actin Binding DB;DNA binding

(b.) c-Ablのガン遺伝子型であるv-AblによるBCAPのリン酸化を検討した。c-Ablと同様にv-Ablも Abi-1存在下でGST-BCAP WTのリン酸化レベルの上昇が認められた (Lane1-4)。また、 GST-BCAP CT5Fでは、c-Ablと同様にv-Abl でもほとんどリン酸化は検出されなかった (Lane5-8)。

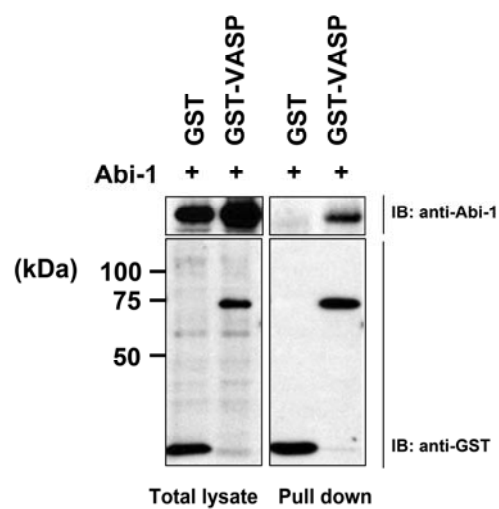


Fig.6 VASPはAbi-1結合タンパク質である。

293T細胞を用いた過剰発現系により、FLAG-タグの付加されたAbi-1と、GST-タグが付加されたVASPを上記のように293T細胞に過剰発現し、両者の会合をプルダウンアッセイにより解析した。その結果、VASP はAbi-1結合蛋白質であることがわかった。

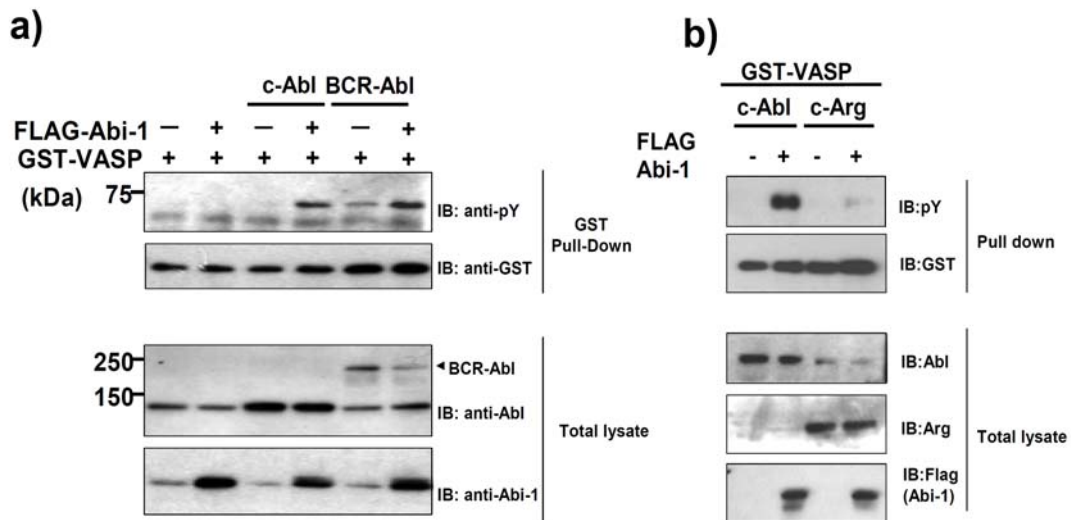
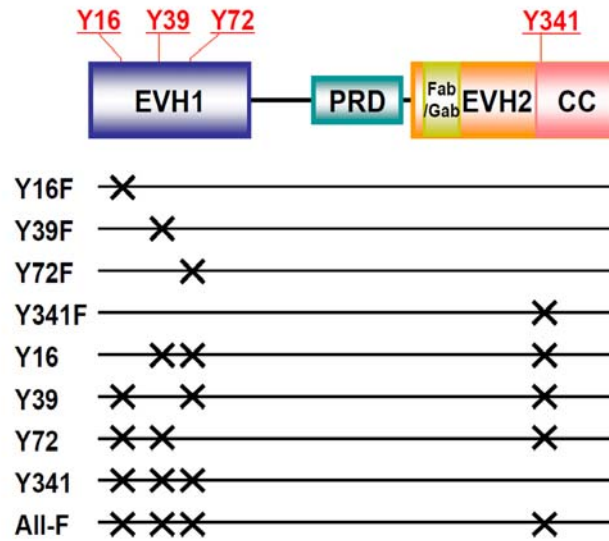


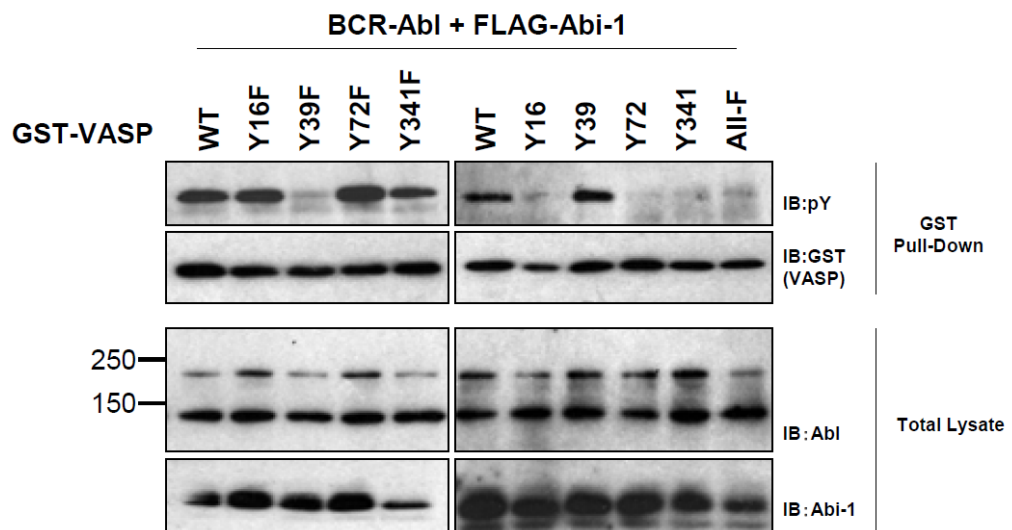
Fig.7 VASPはAbi-1との共発現下でチロシンリン酸化酵素Ablの基質となる

- a) Abi-1がBCR-Ablやc-AblによるVASPのリン酸化に関与するかどうかを過剰発現系で解析した。その結果、c-Ablのみの発現下でGST-VASPのリン酸化は認められなかったが、Abi-1とともに過剰発現させることでVASPのリン酸化が認められた。また、BCR-AblにおいてはAbi-1非存在下においてもGST-VASPの若干のリン酸化が認められたが、Abi-1の共発現下においてリン酸化が促進された。VASPの共発現下においてはさらにそのリン酸化が促進された。
- b) さらに、Ablの関連遺伝子として知られているc-Arg (Abl related gene) によるVASPのリン酸化を解析した。その結果、c-ARGはAbi-1との共発現下においてもc-Ablと比較してVASPをほとんどリン酸化しなかった。

a)



b)



c)

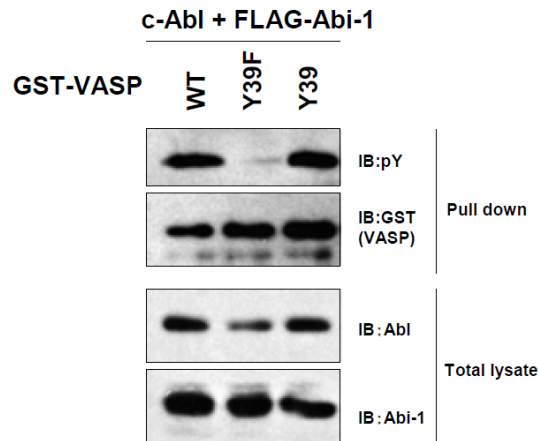


Fig.8 VASPの39番目に位置するチロシンがAbl kinaseによるリン酸化部位である。

- VASPに保持されるチロシンの位置と作成した変異体を示した模式図。VASPには4つのチロシンが保持されている。Y16F、Y39F、Y72F、Y341Fは、一つのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体。Y16、Y39、Y72、Y341は、一つのチロシンのみを残し、残りのチロシンをすべてフェニルアラニンに置換した変異体。All-Fは、すべてのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体。
- BCR-AblとAbi-1とともにa)の変異体を過剰発現させ、リン酸化レベルを解析した。Y39F変異体で顕著なリン酸化レベルの低下が認められ、Y39ではWTと同レベルのリン酸化が認められた。
- c-AblとAbi-1の過剰発現によるVASPのリン酸化を、Y39F、Y39を用いて検討した。BCR-Abl過剰発現下と同様に、Y39Fではリン酸化が認められなくなり、Y39ではWTと同様のリン酸化が認められた。

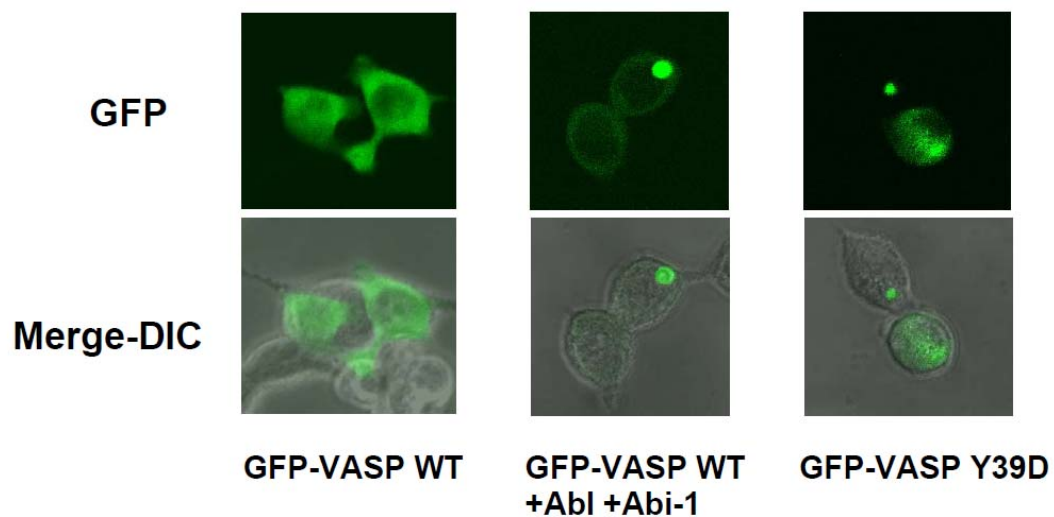


Fig.9 細胞内におけるリン酸化VASPの局在の解析

293T細胞にGFP-Tagを付加したVASPを単独で発現させた細胞(パネル左)と、c-AblおよびAbi-1を共に過剰発現させた細胞(パネル中央)、および偽リン酸化型変異体(パネル右)の蛍光画像を共焦点顕微鏡により撮影した。

VASP単独発現下では細胞質全体と辺縁部に蛍光が認められたが、c-AblとAbi-1の過剰発現下でVASPがinvadopodia/podosome状の構造体を形成した。また、偽リン酸化変異体でも同様の構造体が観察された。

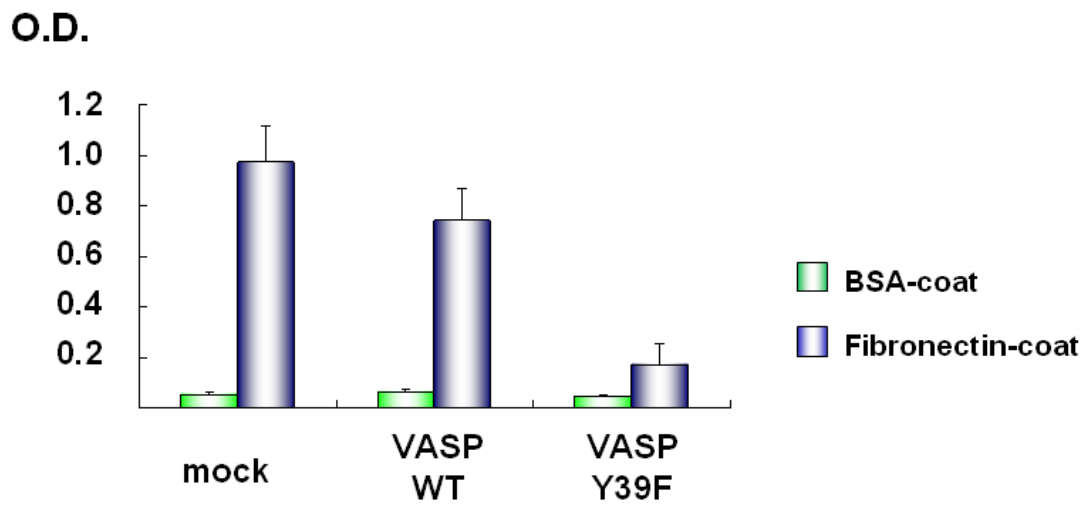


Fig.10 VASPのチロシンリン酸化は細胞接着に関与する。

BCR-Ablを発現するヒト白血病細胞株であるK562細胞に、野生型およびリン酸化部位変異型 VASP (Y39F)を発現する細胞株を樹立し、細胞接着能を解析した。野生型VASPを発現する細胞は空ベクターを感染させた細胞と比較して若干の接着能の減少が認められたが、Y39Fを発現する細胞株では野生型を発現する細胞と比較して顕著な接着能の減少が認められた。

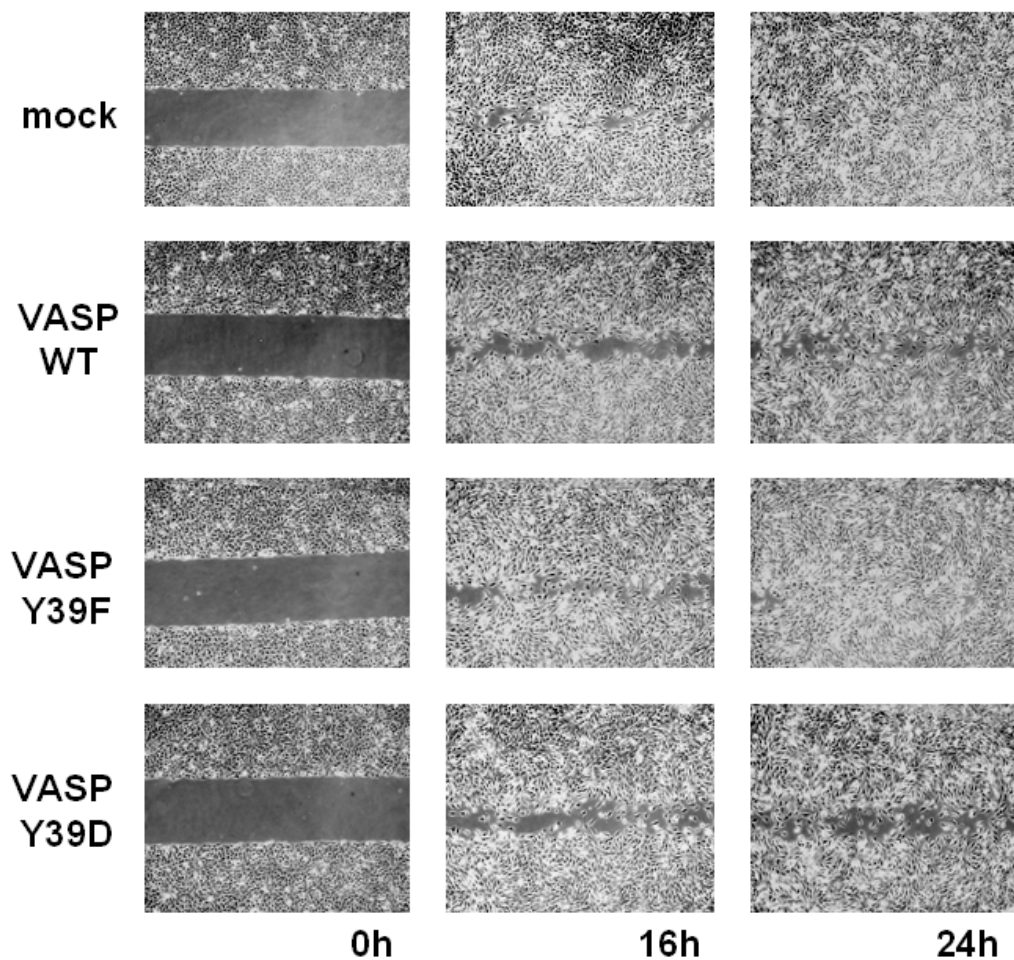


Fig.11 VASPの39番目のチロシンは細胞の運動性に関与する。

VASPとそのリン酸化部位変異体を導入した繊維芽細胞細胞を用いてWound-Healing assayにより細胞の運動性への影響を調べた。タイムラプス顕微鏡を用いて時間経過ごとに細胞を観察した結果、VASP WTを発現することで空ベクターを感染させた細胞と比較して細胞の運動性の低下が認められた。しかしながらリン酸化部位変異体型VASPを発現する細胞では、運動性の低下は認められなかった。また、偽リン酸化型VASPを発現する細胞は、WTのVASPを発現する細胞と同様の運動能の低下が認められた。

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始適切なお指導賜りました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座 竹家達夫教授、宍戸知行准教授、北川教弘助教、小川拓哉助教、静岡大学農学部 与語圭一郎准教授に深く感謝いたします。

本論文を審査頂きました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座 川市正史教授、石田靖雅准教授、動物細胞工学講座 河野憲二教授に深く感謝いたします。

度重なる助言を頂きました秋山元英博士、古賀慎太郎博士、鈴木淳博士、諸先輩方に感謝いたします。また、様々な面でサポート頂きました細胞増殖学講座の皆様に感謝いたします。

最後に、一度社会に出た後、大学院でもう一度学びたいというわがまを聞いて下さり、最後まで支えてくださった父と母と、おばあちゃんに感謝いたします。

参考文献

- Ahern-Djamali, S.M., C. Bachmann, P. Hua, S.K. Reddy, A.S. Kastenmeier, U. Walter, and F.M. Hoffmann. 1999. Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for *Drosophila* Enabled. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:4977-4982.
- Aiba, Y., M. Kameyama, T. Yamazaki, T.F. Tedder, and T. Kurosaki. 2008. Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood*. 111:1497-1503.
- Bachmann, C., L. Fischer, U. Walter, and M. Reinhard. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J.Biol.Chem.* 274:23549-23557.
- Baker, M.W., S.M. Peterson, and E.R. Macagno. 2008. The receptor phosphatase HmLAR2 collaborates with focal adhesion proteins in filopodial tips to control growth cone morphology. *Dev.Biol.* 320:215-225.
- Bear, J.E., J.J. Loureiro, I. Libova, R. Fassler, J. Wehland, and F.B. Gertler. 2000. Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell*. 101:717-728.
- Burton, E.A., T.N. Oliver, and A.M. Pendergast. 2005. Abl kinases regulate actin comet tail elongation via an N-WASP-dependent pathway. *Mol.Cell.Biol.* 25:8834-8843.
- Cazzaniga, G., S. Tosi, A. Aloisi, G. Giudici, M. Daniotti, P. Pioltelli, L. Kearney, and A. Biondi. 1999. The Tyrosine Kinase Abl-Related Gene ARG Is Fused to ETV6 in an AML-M4Eo Patient With at (1; 12)(q25; p13): Molecular Cloning of Both Reciprocal Transcripts. *Blood*. 94:4370.
- Comer, A.R., S.M. Ahern-Djamali, J.L. Juang, P.D. Jackson, and F. Hoffmann. 1998. Phosphorylation of Enabled by the *Drosophila* Abelson Tyrosine Kinase Regulates the In Vivo Function and Protein-Protein Interactions of Enabled. *Mol.Cell.Biol.* 18:152-160.
- Comerford, K.M., D.W. LAWRENCE, K. SYNNESTVEDT, B.P. LEVI, and S.P. COLGAN. 2002. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability 1. *The FASEB Journal*. 16:583-585.

Dai, Z., R.C. Quackenbush, K.D. Courtney, M. Grove, D. Cortez, G.W. Reuther, and A.M. Pendergast. 1998. Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev.* 12:1415-1424.

Dorsch, M., and S.P. Goff. 1996. Increased sensitivity to apoptotic stimuli in c-abl-deficient progenitor B-cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:13131-13136.

Echarri, A., M.J. Lai, M.R. Robinson, and A.M. Pendergast. 2004. Abl interactor 1 (Abi-1) wave-binding and SNARE domains regulate its nucleocytoplasmic shuttling, lamellipodium localization, and wave-1 levels. *Mol.Cell.Biol.* 24:4979-4993.

Fedorov, A.A., E. Fedorov, F. Gertler, and S.C. Almo. 1999. Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat.Struct.Biol.* 6:661-665.

Gertler, F., A. Comer, J. Juang, S. Ahern, M. Clark, E. Liebl, and F. Hoffmann. 1995. enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes and Development.* 9:521.

Gertler, F.B., K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, and P. Soriano. 1996. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell.* 87:227-239.

Goss, V.L., K.A. Lee, A. Moritz, J. Nardone, E.J. Spek, J. MacNeill, J. Rush, M.J. Comb, and R.D. Polakiewicz. 2006. A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. *Blood.* 107:4888-4897.

Grove, M., G. Demyanenko, A. Echarri, P.A. Zipfel, M.E. Quiroz, R.M. Rodriguiz, M. Playford, S.A. Martensen, M.R. Robinson, W.C. Wetsel, P.F. Maness, and A.M. Pendergast. 2004. ABL2-deficient mice exhibit defective cell migration, aberrant dendritic spine morphogenesis, and deficits in learning and memory. *Mol.Cell.Biol.* 24:10905-10922.

Halbrugge, M., C. Friedrich, M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher, and U. Walter. 1990. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J.Biol.Chem.* 265:3088-3093.

Hantschel, O., B. Nagar, S. Guettler, J. Kretschmar, K. Dorey, J. Kuriyan, and G. Superti-Furga. 2003. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*. 112:845–857.

Harbeck, B., S. Huttelmaier, K. Schluter, B.M. Jockusch, and S. Illenberger. 2000. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J.Biol.Chem.* 275:30817–30825.

Harnois, T., B. Constantin, A. Rioux, E. Grenioux, A. Kitzis, and N. Bourmeyster. 2003. Differential interaction and activation of Rho family GTPases by p210bcr-abl and p190bcr-abl. *Oncogene*. 22:6445–6454.

Hirao, N., S. Sato, T. Gotoh, M. Maruoka, J. Suzuki, S. Matsuda, T. Shishido, and K. Tani. 2006. NESH (Abi-3) is present in the Abi/WAVE complex but does not promote c-Abl-mediated phosphorylation. *FEBS Lett.* 580:6464–6470.

Hoffman, L.M., C.C. Jensen, S. Kloeker, C.L. Wang, M. Yoshigi, and M.C. Beckerle. 2006. Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling. *J.Cell Biol.* 172:771–782.

Howe, A.K., B.P. Hogan, and R.L. Juliano. 2002. Regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and interaction with Abl by protein kinase A and cell adhesion. *J.Biol.Chem.* 277:38121–38126.

Ichigotani, Y., K. Fujii, M. Hamaguchi, and S. Matsuda. 2002. In search of a function for the E3B1/Abi2/Argbp1/NESH family (Review). *Int.J.Mol.Med.* 9:591–595.

Inabe, K., and T. Kurosaki. 2002. Tyrosine phosphorylation of B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase is required for Akt activation in response to CD19 engagement. *Blood*. 99:584–589.

Innocenti, M., A. Zucconi, A. Disanza, E. Frittoli, L.B. Areces, A. Steffen, T.E. Stradal, P.P. Di Fiore, M.F. Carlier, and G. Scita. 2004. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat.Cell Biol.* 6:319–327.

Janssen, J.W.G., S.A. Ridge, P. Papadopoulos, F. Cotter, W.D. Ludwig, C. Fonatsch, H. Rieder, W. Ostertag, C.R. Bartram, and L.M. Wiedemann. 1995. The fusion of TEL and ABL in human

acute lymphoblastic leukaemia is a rare event. *Br.J.Haematol.* 90:222.

Kobashigawa, Y., M. Sakai, M. Naito, M. Yokochi, H. Kumeta, Y. Makino, K. Ogura, S. Tanaka, and F. Inagaki. 2007. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 14:503–510.

Krause, M., E.W. Dent, J.E. Bear, J.J. Loureiro, and F.B. Gertler. 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 19:541–564.

Kwiatkowski, A.V., D.A. Robinson, E.W. Dent, J. Edward van Veen, J.D. Leslie, J. Zhang, L.M. Mebane, U. Philippar, E.M. Pinheiro, A.A. Burds, R.T. Bronson, S. Mori, R. Fassler, and F.B. Gertler. 2007. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron.* 56:441–455.

Leng, Y., J. Zhang, K. Badour, E. Arpaia, S. Freeman, P. Cheung, M. Siu, and K. Siminovitch. 2005. Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102:1098.

Levinson, N.M., M.A. Seeliger, P.A. Cole, and J. Kuriyan. 2008. Structural basis for the recognition of c-Src by its inactivator Csk. *Cell.* 134:124–134.

Li, Y., N. Clough, X. Sun, W. Yu, B.L. Abbott, C.J. Hogan, and Z. Dai. 2007. Bcr-Abl induces abnormal cytoskeleton remodeling, beta1 integrin clustering and increased cell adhesion to fibronectin through the Abl interactor 1 pathway. *J.Cell.Sci.* 120:1436.

Lin, T.Y., C.H. Huang, W.G. Chou, and J.L. Juang. 2004. Abi enhances Abl-mediated CDC2 phosphorylation and inactivation. *J.Biomed.Sci.* 11:902–910.

Mayer, B.J., and H. Hanafusa. 1990. Mutagenic analysis of the v-crk oncogene: requirement for SH2 and SH3 domains and correlation between increased cellular phosphotyrosine and transformation. *J.Virol.* 64:3581–3589.

Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 7:1063–1066.

Okada, T., A. Maeda, A. Iwamatsu, K. Gotoh, and T. Kurosaki. 2000. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity*. 13:817-827.

Philippier, U., M. Oser, H. Yamaguchi, H. Kim, S. Giampieri, Y. Wang, S. Goswami, J. Wyckoff, D. Lauffenburger, E. Sahai, J. Condeelis, and F. Gertler. 2008. A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. *Developmental Cell*. 15:813-828.

Pluk, H., K. Dorey, and G. Superti-Furga. 2002. Autoinhibition of c-Abl. *Cell*. 108:247-259.

Prehoda, K.E., D.J. Lee, and W.A. Lim. 1999. Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell*. 97:471-480.

Rosenberg, N. 1994. Abl-mediated transformation, immunoglobulin gene rearrangements and arrest of B lymphocyte differentiation. *Semin. Cancer Biol*. 5:95-102.

Schwartzberg, P.L., A.M. Stall, J.D. Hardin, K.S. Bowdish, T. Humaran, S. Boast, M.L. Harbison, E.J. Robertson, and S.P. Goff. 1991. Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*. 65:1165-1175.

Shishido, T., and J. Suzuki. 2005. Regulation of Abl kinases by adaptor proteins. *Gene Ther Mol Biol*. 9:339-342.

Shishido, T., T. Akagi, A. Chalmers, M. Maeda, T. Terada, M.M. Georgescu, and H. Hanafusa. 2001. Crk family adaptor proteins trans-activate c-Abl kinase. *Genes Cells*. 6:431-440.

Shore, S.K., R.V. Tantravahi, and E.P. Reddy. 2002. Transforming pathways activated by the v-Abl tyrosine kinase. *Oncogene*. 21:8568-8576.

Stuart, J.R., F.H. Gonzalez, H. Kawai, and Z.M. Yuan. 2006. c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J. Biol. Chem*. 281:31290-31297.

Sun, X., Y. Li, W. Yu, B. Wang, Y. Tao, and Z. Dai. 2007. MT1-MMP as a downstream target of BCR-ABL[*sol*] ABL interactor 1 signaling: polarized distribution and involvement in BCR-ABL-stimulated leukemic cell migration. *Leukemia*. 22:1053.

Tani, K., S. Sato, T. Sukezane, H. Kojima, H. Hirose, H. Hanafusa, and T. Shishido. 2003. Abl interactor 1 promotes tyrosine 296 phosphorylation of mammalian enabled (Mena) by c-Abl kinase. *J.Biol.Chem.* 278:21685–21692.

Wang, B., and G. Kruh. 1996. Subcellular localization of the ARG protein tyrosine kinase. *Oncogene(Basingstoke)*. 13:.

Wang, J.Y. 2000. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene*. 19:5643–5650.

Wills, Z., J. Bateman, C.A. Korey, A. Comer, and D. Van Vactor. 1999. The tyrosine kinase Abl and its substrate enabled collaborate with the receptor phosphatase Dlar to control motor axon guidance. *Neuron*. 22:301–312.

Woodring, P.J., T. Hunter, and J.Y. Wang. 2005. Mitotic phosphorylation rescues Abl from F-actin-mediated inhibition. *J.Biol.Chem.* 280:10318–10325.

Woodring, P.J., T. Hunter, and J.Y. Wang. 2003. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J.Cell.Sci.* 116:2613–2626.

Yamazaki, T., and T. Kurosaki. 2003. Contribution of BCAP to maintenance of mature B cells through c-Rel. *Nat.Immunol.* 4:780–786.

Yamazaki, T., and T. Kurosaki. 2002. Immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 47:2242–2247.

Yamazaki, T., K. Takeda, K. Gotoh, H. Takeshima, S. Akira, and T. Kurosaki. 2002. Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. *J.Exp.Med.* 195:535–545.

Yu, W., X. Sun, N. Clough, E. Cobos, Y. Tao, and Z. Dai. 2008. Abi1 gene silencing by short hairpin RNA impairs Bcr-Abl-induced cell adhesion and migration in vitro and leukemogenesis in vivo. *Carcinogenesis*. 29:1717–1724.

吉田佳代. 2004. BCAP:c-Abl の基質としての同定. 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文.