

博士論文番号：0281009

c-Src の新規会合タンパク質 ADAP の同定とその機能解析

古賀 慎太郎

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)

平成 17 年 7 月 22 日提出

目次

序論	3
材料と方法	10
結果	13
考察	30
総括	41
謝辞	42
参考文献	43

序論

c-Src の構造と機能

c-*src*はラウス肉腫ウィルスのがん遺伝子v-*src*の原がん遺伝子として同定された (Jove and Hanafusa, 1987)。c-*src*は他の8つの原がん遺伝子とともに*src*ファミリーを構成しており、これらの遺伝子は非受容体型チロシンキナーゼをコードしている。c-Srcは細胞膜への局在に関わるミリスチン酸が結合する部位、Srcファミリー内でユニークな領域、SH3、SH2、キナーゼドメイン、C末端の調節部位を有している (参考図 1)。不活性化状態のc-SrcはC末端領域のTyr⁵²⁷がCsk (C-terminal Src kinase)によってリン酸化されており (Okada et al., 1991)、このリン酸化チロシンが分子内のSH2と結合し、さらにSH2と触媒領域の間にあるリンカー領域がSH3と結合することによって、全体として「閉じた」構造をしている (Xu et al., 1997)。c-Srcが活性化するためにはTyr⁵²⁷の脱リン酸化、Tyr⁴¹⁶の自己リン酸化が必要であり、またSH3、SH2ドメインと他の分子との相互作用もc-Srcの活性化の維持、制御に重要な役割を果たす (参考図 1、Thomas and Brugge, 1997)。

c-Srcは普遍的な組織で発現が認められ、インテグリン、受容体型チロシンキナーゼ、Gタンパク質共役型受容体、サイトカイン等のシグナル伝達経路において活性化され、下流の分子をリン酸化する。そしてその結果、増殖や分化、細胞遊走、アポトーシスを含む多岐に渡る細胞現象を制御する重要な分子の一つである (Thomas and Brugge, 1997)。その中でc-Srcは血小板や神経細胞、破骨細胞に高発現していることが知られているが、c-*src*遺伝子欠損マウスでは血小板や神経細胞などには異常が認められず、唯一の表現型として破骨細胞の機能的な異常による大理石骨病を発症する (Soriano et al., 1991)。また破骨細胞には複数のSrcファミリー分子が発現しているにも関わらず (Horne et al., 1992)、それらを遺伝子欠損させても破骨細胞に表現型は現れない。これらのことからc-Srcは、破骨細胞において他のSrcファミリー分子には補完のできない、特有の機能を有していることが考えられる。

骨代謝における破骨細胞とその分化、活性化制御機構

骨組織は体の支持組織であり、またカルシウムの貯蔵や造血環境の提供に欠かせない組織でもある。物理的な強度の維持や血中カルシウム濃度の調節のために、骨組織では常に骨形成と骨吸収が繰り返されている。破骨細胞はこの骨組織を分解、吸収する能力を有した多核の細胞である (Suda et al., 1999)。破骨細胞は単球・マクロファージ等のミエロイド系細胞を前駆細胞とし、それらが最終的に細胞融合により多核化することで形成される (参考図 2)。生体内において破骨細胞の分化は、間葉系由来のストローマ細胞や骨芽細胞によって厳密に制御されており、適時適所の骨代謝を可能にしている。これらの間葉系細胞はPTH (parathyroid hormone)やビタミンD等のホルモン

刺激により、破骨細胞分化に必須の因子であるRANKL (Receptor Activator of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ Ligand)を発現する。RANKLはTNF (Tumor necrosis factor)ファミリーに属する2型膜貫通タンパク質であり、間葉系細胞、T細胞においてその発現が認められる (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998; Wong et al., 1997)。RANKLは破骨細胞前駆細胞に発現しているRANKと結合し、RANKの細胞内領域にTRAF (TNF receptor-associated factor)ファミリー分子がリクルートされることでシグナル伝達経路を活性化する。そして転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、AP-1、NFAT2を介して、破骨細胞の分化、機能に必要な遺伝子群が転写される (Hogan et al., 2003; Tanaka et al., 2003)。これらの転写因子やTRAFファミリーの一つであるTRAF6は、遺伝子欠損マウスの解析等によりいずれも破骨細胞の分化に必須のシグナル伝達因子であることが示されている (Teitelbaum and Ross, 2003)。転写因子の標的となる遺伝子は近年マイクロアレイの導入によって解析が進んでおり、現在までに細胞接着を担う $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、破骨細胞の骨吸収機能に関連するカルシトニン受容体、v-ATPase共役型プロトンポンプ、各種プロテアーゼ等、多くの分子がRANKLを介したシグナル伝達によって発現が上昇することが分かっている。特にNFAT2は破骨細胞の多核化に必須の転写因子であることが最近報告され、また前駆細胞にNFAT2を発現させるだけで分化過程における主要な遺伝子群が発現上昇して多核破骨細胞へと分化することから、破骨細胞分化において必要十分な制御分子である (Ishida et al., 2002; Takayanagi et al., 2002)。

多核化した成熟破骨細胞はRANKLやIL-1、 $\text{TNF-}\alpha$ 等のサイトカイン刺激により活性化され、骨吸収を促進する。活性化した破骨細胞は細胞骨格を再構成して極性化し、また骨組織に密着して閉鎖空間を形成する (Väänänen et al., 2000)。この破骨細胞と骨組織に形成される閉鎖空間はv-ATPase共役型プロトンポンプやCl⁻チャンネルにより酸性に保たれ、また空間内にカテプシンK等のプロテアーゼが分泌されることによって骨基質を効率的に分解、吸収する。この空間に接している細胞膜は、酸性小胞の分泌や分解物の吸収が盛んに行われているために波状の構造をしており、形態学的な骨吸収の指標として波状縁 (ruffled border)と呼ばれている。上記のイオン輸送に関連する分子やプロテアーゼの遺伝子欠損マウスでは破骨細胞の骨吸収能に障害が見られており、いずれも破骨細胞の機能に重要な役割を果たすことが示唆されている (Teitelbaum and Ross, 2003)。

破骨細胞における c-Src の役割

破骨細胞分化過程において、c-Srcは分化の進行に従ってその発現が著しく上昇する (Tanaka et al., 1992)。c-src遺伝子欠損マウスは多核破骨細胞を有しており、またc-src^{-/-}前駆細胞を用いた*in vitro*破骨細胞分化誘導実験においても同様の結果が報告されている。しかしc-src^{-/-}破骨細胞は骨吸収能が著しく低下しており、形態学的に見るとc-src^{-/-}の破骨細胞は波状縁が存在せず、細胞骨格の構造も異常である (Boyce et al., 1992)。またSrc

ファミリーあるいはc-Srcに特異的な阻害剤を作用させることで、破骨細胞の骨吸収能、生体での骨消失が抑制される。これらのことからc-Srcは、破骨細胞の骨吸収能に必須の役割を果たしていることが考えられる。

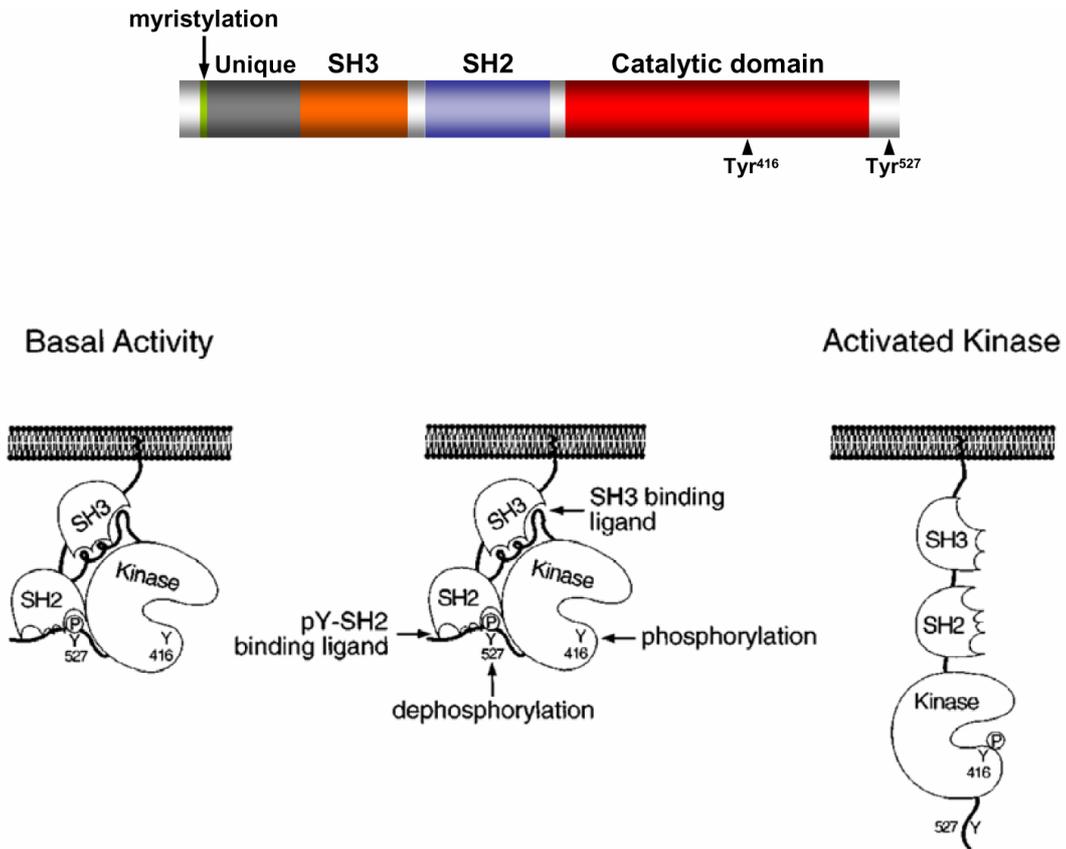
破骨細胞におけるc-Srcの具体的な機能の1つとして、基質となる分子のリン酸化によりシグナル伝達経路を制御する「チロシンキナーゼ」としての機能が考えられる。実際にアデノウィルスを用いてCskを多核破骨細胞に発現させると、細胞骨格が崩壊して骨吸収活性が著しく阻害され、逆に酵素不活性化型変異体であるCsk-KDでは骨吸収が上昇する (Miyazaki et al., 2000)。またリウマチ関節炎モデルラットにアデノウィルスにより *csk* 遺伝子を導入すると、骨破壊が抑制され病態が改善する (Takayanagi et al., 1999)。これらのことから *in vivo*、*in vitro* の破骨細胞の骨吸収機能において、c-Src の酵素活性は重要な役割を果たすことが示唆される。しかし 1997 年に Schwartzberg らは *c-src* 遺伝子欠損マウスに酵素不活性化型 *c-src*^{K295M} を導入したトランスジェニックマウスを作製し、破骨細胞の形態、骨吸収能が部分的に回復すること、その結果大理石骨病が改善することを報告した (Schwartzberg et al., 1997)。またこの中で、破骨細胞におけるタンパク質のチロシンリン酸化パターンが大きく回復していることも示している。このことは、破骨細胞の機能においてc-Srcの酵素活性が絶対的に必要ではないことを示唆するものである。しかし最近 *in vitro* において *c-src*^{-/-} 破骨細胞に *c-src*^{K295M} を導入した実験により、c-Srcの酵素活性が破骨細胞の骨吸収機能に必須であることが報告された (Miyazaki et al., 2004)。このため酵素活性の重要性については一定の見解が得られておらず、現在も議論が行われている。しかし現在までの知見から、c-Srcは「チロシンキナーゼ」としての機能だけでなく、SH2、SH3 ドメインと他の分子との相互作用を介した「アダプター分子」としての機能も重要であることが考えられる。

本研究の目的

c-Src を介したシグナル伝達機構の解析においては、現在までに様々な分子が c-Src と会合すること、また c-Src によりリン酸化されることが報告されてきた。しかし破骨細胞形成における c-Src を中心とした詳細な分子メカニズムは未だ明らかになっていない。最近当研究室では、マクロファージ細胞株 RAW264 と可溶性 RANKL を用いた *in vitro* 破骨細胞分化誘導系において、*c-src* が RANKL 刺激後 NF κ B と AP-1 によって発現誘導され、また分化過程で上昇する *c-src* の発現をアンチセンスにより抑制した結果、多核細胞の形成が著しく阻害されることを報告した (Kumagai et al., 2004)。このことは *in vitro* の系を用いて、破骨細胞分化過程における c-Src の機能解析を行うことが可能であることを示している。

そこで当研究室では破骨細胞における c-Src の機能をより理解するために、c-Src のアダプター分子としての側面に着目し、*in vitro* 分化誘導系を利用することにより会合分子の探索を行った。GST と融合させた c-Src の SH3-SH2 ドメインを用いて、破骨細

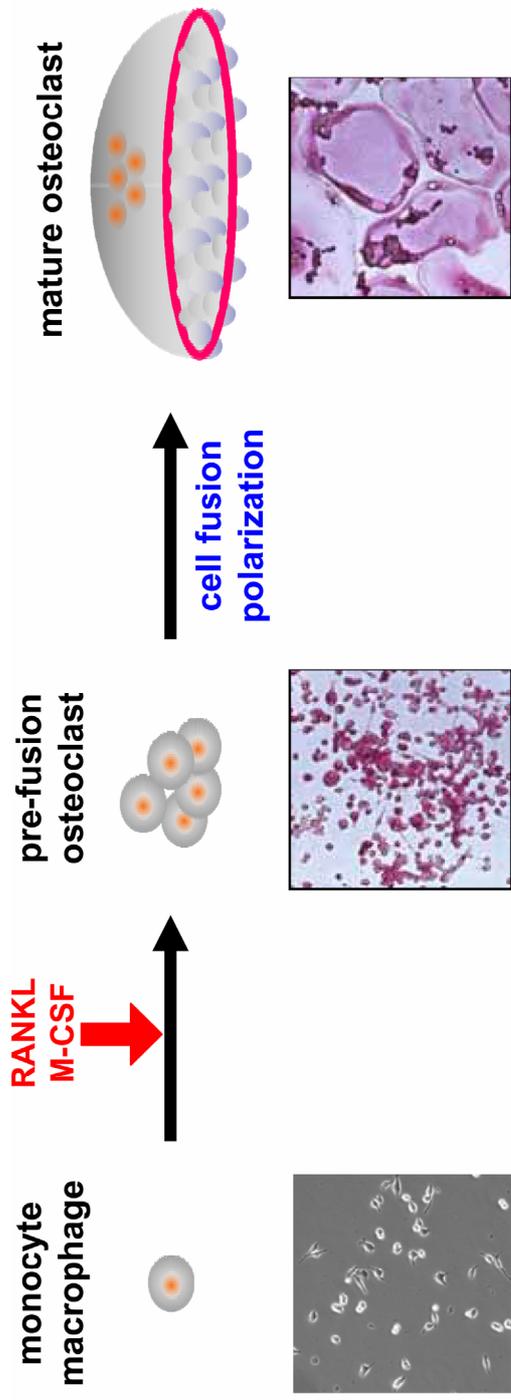
胞において会合するタンパク質を LC-MS/MS で解析した結果、10 個の分子を検出した (参考図 3)。そしてその候補分子の 1 つとして ADAP (adhesion and degranulation-promoting adaptor protein) が得られた。ADAP は以前から Fyb (Fyn-binding protein) あるいは SLAP-130 (SLP-76 associated phosphoprotein of 130 kDa) として知られていたアダプタータンパク質であり、T 細胞において「inside-out」シグナルを介してインテグリンの活性化、細胞接着の促進に重要な役割を果たしている (Griffiths and Penninger, 2002; Peterson, 2003)。検出された分子の中で、WASP、SHIP1、Sam68 等は既に他の細胞において c-Src と会合することが知られていたが、これまでに c-Src と ADAP の会合は報告されていなかった。そこで私は、c-Src と ADAP の会合様式や破骨細胞分化過程における ADAP の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。



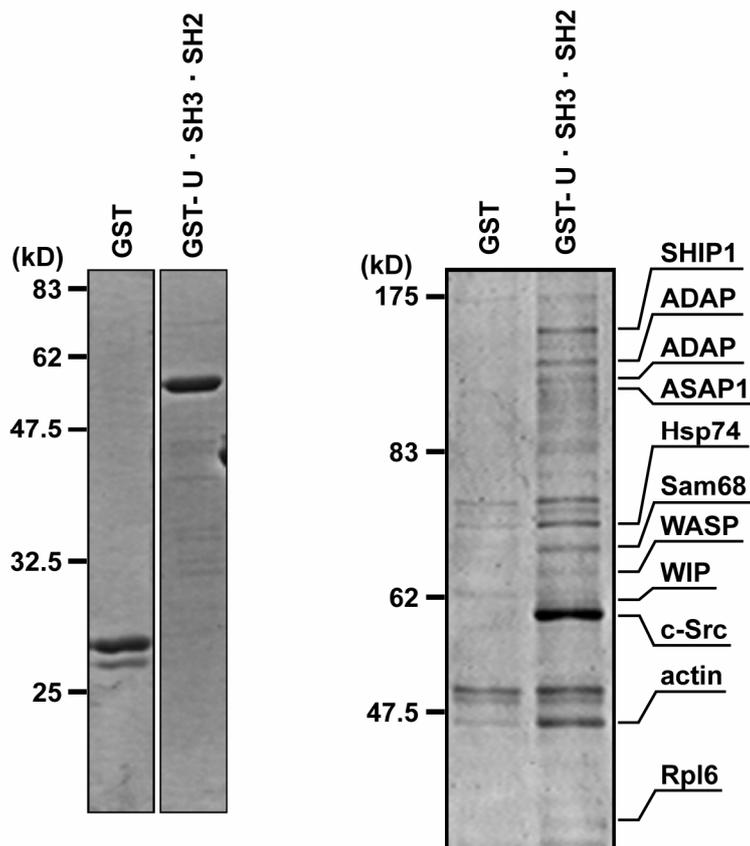
参考図 1 c-Src の 1 次構造と活性化制御モデル

c-Src の 1 次構造 (上図)。酵素活性制御に重要なチロシンの位置を矢頭で示す。

c-Src の活性化制御モデル (下図)。左は不活性化状態の c-Src の構造、中央は活性化に
関与するメカニズムを示し、右は活性化状態の c-Src の構造を示している。このモデルは結晶構造解析
を基に構築されており (Xu et al., 1997)、また図は Thomas らの論文より転載した (Thomas and
Brugge, 1997)。



参考図2 破骨細胞の分化過程
 単球・マクロファージ由来の前駆細胞は、骨芽細胞等の支持細胞が発現するRANKL、およびM-CSFの刺激により分化を開始する。その分化過程において前駆細胞は単核の破骨細胞へと分化し (pre-fusion osteoclast)、細胞融合を経て多核の破骨細胞が形成される。多核破骨細胞は細胞骨格を再構成して細胞内に極性を形成することで、骨吸収能を有する成熟破骨細胞となる (mature osteoclast)。



参考図3 c-Src に会合するタンパク質の LC-MS/MS による解析

c-Src のユニークドメイン、SH3、SH2 ドメインを GST 融合タンパク質として精製し (GST-U · SH3 · SH2、左図)、RAW264 細胞より分化させた破骨細胞の細胞抽出液において *in vitro* で会合するタンパク質を GST プルダウンアッセイにより得た。LC-MS/MS によって検出されたタンパク質とその分子の位置を右図に示す。

材料と方法

1) 可溶性 RANKL の精製

可溶性 RANKL の発現ベクターは、RANKL の細胞外領域 244 アミノ酸を pGEX-2TK (Amersham Biosciences) に挿入したものをを用いた。pGEX-2TK-RANKL あるいは標準ベクター pGEX-2TK を導入した大腸菌にタンパク質を発現させ、Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) を用いて GST-RANKL、GST を精製した。大腸菌の細胞壁構成成分である LPS (lipopolysaccharide) が破骨細胞の分化に影響を与えることから、精製したタンパク質は LPS 除去カラム (Pierce) に通した後に各実験系に用いた。

2) 細胞培養と *in vitro* 破骨細胞分化

Human embryonic kidney (HEK) 293 細胞、マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264 細胞はそれぞれ D-MEM (Invitrogen)、E-MEM (Nissui) により培養、維持した。

RAW264 細胞を用いた分化誘導は既報の方法に従った (Ishida et al., 2002)。マウス骨髄球由来マクロファージ (BMM) を用いた分化誘導系を、以下に略説する。動物実験指針に従って 6 週齢の ddY マウス (メス) を安楽死させ、大腿骨と脛骨から採取した骨髄を溶血処理後 1% M-CSF 培養上清を添加した α -MEM (Invitrogen) 中で一晚培養した。浮遊している血球系細胞を採取して 3% M-CSF 培養上清添加の α -MEM 中で 2 日間培養することでマクロファージへと分化させ、その後は RAW264 の場合と同様の方法で破骨細胞分化誘導を行った。分化させた単核破骨細胞、多核破骨細胞様細胞は、分化の指標である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性を TRAP 染色により検定することで確認した。

3) 発現ベクター構築

マウス c-Src をコードする cDNA はマウス破骨細胞様細胞より調製した mRNA から RT-PCR で増幅させ、pRc/CMV (Invitrogen)、あるいはレトロウイルス発現ベクター pCX4-puro へ組み込んだ。pCX4-puro は大阪バイオサイエンス研究所の赤城剛博士の御厚意により頂いた (Akagi et al., 2003)。c-Src 欠損変異体 Unique-SH3 ドメイン (1-149aa)、Unique-SH3-SH2 ドメイン (1-262aa) も同様に作製し、GST 融合ベクター pGEX-3X (Amersham Biosciences) へ組み込んだ。c-Src の酵素不活性型変異体 (K295M) (KD)、および活性化型変異体 (Y527F) (CA) は QuikGene Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した。

ADAPp130 アイソフォームの cDNA は c-Src の場合と同様に得て、pFLAG/CMV2 (Eastman Kodak Company) に組み込んだ。p130ADAP のチロシンリン酸化部位変異体 (YF 変異体) は、QuikGene Mutagenesis Kit を用いて目的のチロシン残基をフェニルアラニン残基へと置換した。各種 ADAP 欠損変異体は、pFLAG/CMV2-p130ADAP をテン

プレートとして目的の部位を PCR により増幅、あるいは制限酵素により切断することで作製した。必要に応じて、前述の p130ADAP およびその変異体は pCX4-puro へ導入した。ADAP に対する short interfering (si) RNA は、マウス ADAP に特異的な 2 ヶ所の標的部位に対してヘアピン型のものを設計した。標的部位を以下に示す。

siADAP-1: 5'-AACCTACCTACGAGGAGAA-3' (200 から 218 番目)

siADAP-2: 5'-AAGCCTGCTGCGATGTCAA-3' (1514 から 1532 番目)

設計したオリゴヌクレオチドは pSuper-Neo (OligoEngine) に組み込んだ。

4) GST プルダウンアッセイ

RAW264 より分化させた破骨細胞を GST pulldown buffer (1% NP-40, 25mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM MgCl₂, 10% glycerol, 2mM Na₃VO₄, 10mM NaF, and protease inhibitors) で溶解させた。細胞抽出液に c-Src 欠損変異体の GST 融合タンパク質を加え、結合したタンパク質は Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) により沈降させた。

5) 細胞への遺伝子導入、レトロウイルス産生

HEK293 細胞への遺伝子導入はポリエチレンジアミン法 (PEI 法) を用いた (Thomas and Klibanov, 2002)。概略は以下の通りである。5% glucose/PBS に 7.5 μg の DNA を加え、これに等量の 3.3mM PEI25/5% glucose/PBS を混合して 20 分間静置した。HEK293 細胞は 60mm プレートで培養し、無血清下で上記の DNA 溶液を加え、6 時間インキュベートした。ADAP に対する siRNA を発現させた RAW264 細胞株は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて pSuper-siADAP-1、siADAP-2 の混合、あるいは空ベクターを遺伝子導入し、G418 耐性のクローンを単離した。

レトロウイルスの産生は、FuGENE 6 (Roche) を用いて HEK293 細胞あるいは PLT 細胞に目的の遺伝子を挿入した pCX4-puro、pGL、pE-Eco (TaKaRa) を遺伝子導入し、2 日後に培養上清を回収した。感染効率を向上させるために、8000 × g で 16 時間遠心することでウイルスを濃縮し、これを RAW264 細胞に 2 日間感染させた。その後 4-5 μg/ml の puromycin で選別し、薬剤耐性の安定細胞株を樹立した。

6) 免疫沈降、ウェスタンブロッティング

用いた一次抗体は以下の通りである。

Normal mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology)

マウス抗 Src モノクローナル抗体 (OP-07, Calbiochem Oncogene Research Products)

マウス抗 β-actin モノクローナル抗体 (AC-74, Sigma)

マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2, Sigma)

マウス抗 ADAP モノクローナル抗体 (BD Transduction Laboratories)

マウス抗 Cas モノクローナル抗体 (BD Transduction Laboratories)

マウス抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体 (4G10, Upstate Biotechnology)

免疫沈降法、ウェスタンブロッティングは既報を基に行った (Ishida et al., 2002)。細胞は 1% Triton lysis buffer (1% Triton, 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl (pH7.4), 2mM EDTA, 2mM Na₃VO₄, 10mM NaF, protease inhibitors)、あるいは RIPA (0.1% SDS, 1% Triton, 1% DOCS, 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl (pH7.4), 2mM EDTA, 2mM Na₃VO₄, 20mM NaF, protease inhibitors)により溶解させ、細胞抽出液を得た。免疫沈降において、タンパク質と抗体の複合体は Protein G-Sepharose (Amersham Biosciences)、あるいはウサギ抗マウス IgG (MP Biomedicals)を結合させた Protein A-Sepharose (Amersham Biosciences)を用いて沈降させた。ウェスタンブロッティングにおけるシグナルの検出は、ヤギ抗マウス IgG-HRP と ECL 検出キット (Amersham Biosciences)を用いた。

Cas の immunodepletion は、細胞抽出液を抗 Cas 抗体あるいは normal mouse IgG により 2 回免疫沈降し、その上清をアッセイに用いた。

7) 細胞の免疫染色

既報の方法を基に行った (Geng et al., 2001)。細胞を 2% PFA/PBS で 10 分間固定後、0.1% Triton X-100/PBS で 10 分間処理した。5% skim milk/5% FCS/PBS で 30 分間ブロッキングし、抗 ADAP 抗体、続いて Alexa Fluor 488 抗マウス IgG (Molecular Probes)でそれぞれ 30 分間インキュベートした。染色画像は共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM410 (Carl Zeiss)で取得した。

8) 細胞接着

RAW264 細胞を RANKL 刺激し、48 時間培養した。培地を無血清培地に交換してさらに一晩培養し、細胞を Cell dissociation solution (Sigma)で遊離させた。無血清培地で洗浄後、細胞は浮遊状態で維持するか、ビトロネクチンあるいは poly-D-lysine でコートしたプレートに 1 時間接着させた。

9) 細胞遊走の定量化

12 ウェルプレートに RAW264 細胞を播種し、RANKL 刺激後 48 時間まで分化させた。ウェルにミネラルオイルを重層し、ステージチャンバー内で培養しながら Axiovert 200M (Carl Zeiss)で観察した。位相差画像を 5 分毎に 10-15 時間取得し、細胞の移動距離は核の中心点の移動距離を Scion Image (Scion Corporation)で定量することで算出した。

結果

1) c-Src 会合タンパク質 ADAP の同定

破骨細胞の細胞抽出液において、c-Src のユニークドメイン、SH3、SH2 ドメインを含んだ GST 融合タンパク質に会合する分子として、ADAP を同定した。ADAP に関して LC-MS/MS により 9 つのペプチド断片が得られ、配列のカバー率 (sequence coverage) は 15.6% であった (図 1A)。ADAP は血球系細胞特異的に発現しており、T 細胞受容体刺激によりチロシンリン酸化され、c-Fyn のアイソフォームである Fyn-T および SLP-76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kDa) に結合するアダプター分子としてクローニングされた (da Silva et al., 1997; Musci et al., 1997)。オルタナティブスプライシングにより、46 アミノ酸残基異なる 2 つのアイソフォーム (p120/p130) が存在する。その 1 次構造からプロリンリッチ領域、EVH1 結合領域、SH3-like 領域を有しており、また Fyn-T、SLP-76 の結合部位を含む複数のチロシンリン酸化部位が知られている (図 1B)。c-Src における ADAP 会合領域を決定するために、RAW264 より分化させた破骨細胞の細胞抽出液と c-Src 欠損変異体の GST 融合タンパク質を用いて GST プルダウンアッセイを行ったところ、ADAP との会合には c-Src の SH2 ドメインが関わるということが分かった (図 1C)。また移動度の異なる 2 本のバンドが検出されたことから、破骨細胞には ADAP の両方のアイソフォームが発現していることが考えられる。

2) ADAP の c-Src の会合様式

c-Src と ADAP の全長配列での会合を調べるために、HEK293 細胞に FLAG タグを付加した p130ADAP および c-Src の野生型 (WT)、酵素不活性化型 (KD)、活性化型 (CA) を発現させ、免疫沈降によるアッセイを行った。その結果、c-Src WT、CA においては FLAG-ADAP との共沈が見られたのに対して、c-Src KD の場合では見られなかった (図 2A)。また c-Src KD が発現している場合では FLAG-ADAP がチロシンリン酸化されず、c-Src と FLAG-ADAP の共沈の結果と相関していた (図 2A)。これらのことから FLAG-ADAP は c-Src の酵素活性依存的にチロシンリン酸化され、またこのリン酸化は c-Src との会合に必要なことが考えられる。また RAW264 細胞に c-Src CA、および KD をレトロウィルスにより発現させ、同様の実験を試みた。その結果、内在性の ADAP も c-Src の酵素活性に依存してチロシンリン酸化され、c-Src と会合することが確認された (図 2B)。

c-Src の SH2 領域と酵素活性が ADAP との会合に必要なことから、次に ADAP 側の結合部位を、チロシン残基に着目して探索した。まず ADAP の C 末端欠損変異体 FLAG-ADAP 1-325、1-614 を作製し (図 3A)、c-Src CA と共に HEK293 細胞に発現させた。そして c-Src との会合を調べた結果、ADAP(1-325)、ADAP(1-614) とともに会合が認められず、また ADAP のチロシンリン酸化が顕著に減少していることが分かった (図

3B)。このことからADAPのC末端側 615-819 アミノ酸の領域が主要なリン酸化部位であり、またc-Srcとの会合に関わることが考えられた。そこでチロシンキナーゼによるリン酸化が予想される部位をTechnical University of DenmarkのNetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)を用いて分析した結果、4ヶ所のチロシン残基(Tyr615, 687, 791, 807)が見出された(図4A)。このうちTyr⁶¹⁵とTyr⁶⁸⁷はそれぞれFyn-T、SLP-76の結合部位として報告されている(Geng et al., 1999; Raab et al., 1999)。これらのチロシン残基のうち、3ヶ所あるいは全てをフェニルアラニンに置換した変異体(YF変異体)を作製し(図4A)、c-Src CAとともにHEK293細胞に発現させた。そしてc-Srcとの会合、ADAPのリン酸化について調べた結果、Tyr⁸⁰⁷が主要な結合部位であることが分かった(図4B)。Tyr⁸⁰⁷はC末端に位置しており、これまでに知られているADAPの会合タンパク質において報告されていない、新規の結合部位であった。複数回の実験の結果、c-SrcはFyn-Tとの結合部位であるTyr⁶¹⁵にも結合することが分かったが、Tyr⁸⁰⁷と比較してその結合活性は低かった(図4B)。また今回調べた4ヶ所のチロシン残基全てにおいてc-Srcによるリン酸化が考えられ、4ヶ所全てを置換した変異体においても低いレベルではあるがリン酸化が確認された(図4B)。

3) 破骨細胞におけるADAPの発現とc-Srcとの会合

次に破骨細胞分化過程におけるADAPの発現を調べるために、RAW264あるいはマウス骨髄球由来マクロファージ(BMM)の*in vitro*破骨細胞分化誘導システムを用いた。どちらのシステムにおいても、RANKL刺激後48時間にはほとんどの細胞がTRAP陽性の単核破骨細胞へ分化し、96時間以内に成熟した多核破骨細胞が形成される(図5A)。またc-SrcはRANKL刺激後24時間後には発現が認められ、その後経時的に上昇することが分かっている(Kumagai et al., 2004)。しかしc-Srcの発現パターンと異なり、ADAPは分化前よりその発現が認められた。そしてRANKL刺激後も単核破骨細胞の段階まで発現が維持されているが、その後多核細胞の形成にともなって減少することが分かった(図5B)。RAW264、BMM両方のシステムにおいて同様の結果が得られたが、BMMの方がADAPのp130アイソフォームの発現が顕著であった(図5B)。

上記の結果を踏まえ、細胞内におけるADAPの発現、局在を免疫染色により観察した。その結果、多核破骨細胞にはその発現がほとんど見られず、単核破骨細胞に顕著な発現が認められた(図6)。これらのことから、ADAPは成熟破骨細胞よりも、むしろ単核の破骨細胞においてその機能を果たすことが考えられる。また単核破骨細胞におけるADAPの局在を観察すると、主に細胞質に点状に存在するが、ラメリポディアの先端や仮足にも局在が観察された(図6)。

続いてRAW264、BMM由来の単核破骨細胞におけるADAPとc-Srcの会合を免疫沈降により確認した。その結果、内在性の発現レベルで複合体を形成していることが示唆された(図7)。

4) 細胞接着における ADAP のリン酸化

これまでの結果から、ADAPのチロシンリン酸化はc-Srcとの会合に必須であることが考えられる。そこで単核破骨細胞においてADAPのチロシンリン酸化がどのように制御されているか調べるために、細胞接着に着目した。破骨細胞においては $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが高発現していることから、本研究ではそのリガンドとしてビトロネクチンを用いた (Duong et al., 2000)。RAW264 をRANKL刺激して単核の破骨細胞まで分化させ、細胞の浮遊、接着状態におけるADAPのチロシンリン酸化を調べた。その結果浮遊状態に比べて、ビトロネクチンに対する接着においてADAPのチロシンリン酸化は顕著に上昇していた (図 8A)。さらにpoly-D-lysineに対する接着ではリン酸化の上昇が見られなかったことから、インテグリンシグナル依存的なADAPのリン酸化であることが考えられる (図 8A)。またc-SrcとADAPの会合にはTyr⁸⁰⁷のリン酸化が必要であることから、インテグリン依存的なTyr⁸⁰⁷のリン酸化が見られるのか検討した。RAW264 に図 4 のアッセイで用いたFLAG-ADAPのYF変異体を発現させて同様の実験を行ったところ、ビトロネクチンに対する細胞接着によってY615/687/791F ADAPはリン酸化が有意に上昇し、さらにそのリン酸化の上昇は4YF ADAPよりも顕著であった (図 8B)。これらのことから、インテグリン依存的な接着によってTyr⁸⁰⁷を含めたADAPのチロシンリン酸化が促進することが示唆される。

5) 破骨細胞分化における ADAP の役割

破骨細胞分化過程における ADAP の役割を明らかにするために、ADAP の発現を short interference RNA (siRNA)によって抑制した。3ヶ所の配列に対する siRNA 発現ベクターを作製し、準備実験として単独およびそれらの組み合わせによる ADAP の抑制効率を検討した結果、siADAP-1 と siADAP-2 を同時に遺伝子導入する方法が最も効果的であった (data not shown)。そこでこれらを RAW264 に遺伝子導入して細胞をクローニングし、90%以上の発現抑制が確認された2クローン (siADAP cl.1、cl.2)を単離した (図 9A)。この2クローンを破骨細胞分化誘導した結果、TRAP 陽性の単核細胞には分化するが、多核細胞の形成が著しく阻害されていた (図 9B)。ADAP が単核の破骨細胞に多く発現していることも考えると、*in vitro* の破骨細胞分化過程において、ADAP は単核破骨細胞の多核化に重要な役割を果たしていることが考えられる。またこの分化阻害は、アンチセンスにより *c-src* を抑制した RAW264 で見られた表現型と類似している (Kumagai et al., 2004)。

次に ADAP 発現抑制細胞を用いて、単核破骨細胞の細胞遊走への影響を解析した。RAW264 細胞の親株および siADAP cl.1、cl.2 を単核破骨細胞まで分化させ、タイムラプス顕微鏡を用いて分化過程での細胞遊走を計測した。無作為に 50 個の細胞について遊走速度を算出したところ、親株の 60%以上の細胞が 20-40 μ m/hr で遊走するのに対

して、siADAP 細胞株はいずれも 70%以上の細胞が 20 μ m/hr 以下の速度であり、明らかに細胞遊走能が低下していた (図 10)。なお、空ベクターを導入した RAW264 細胞の細胞遊走能は親株と同等であった (data not shown)。これらのことから、*in vitro* において ADAP は単核破骨細胞の細胞遊走能に重要な役割を果たしていることが考えられる。

6) p130^{Cas} のチロシンリン酸化における ADAP の機能

破骨細胞において、チロシンリン酸化を介したシグナル伝達機構は細胞接着や細胞遊走に重要な役割を果たすことが報告されている (Duong et al., 2000)。そこで単核破骨細胞におけるチロシンリン酸化タンパク質の状態を調べたところ、130kD 付近に主要なリン酸化タンパク質を検出し、また ADAP 発現抑制細胞においてそのチロシンリン酸化レベルが低下していた (図 11A)。この 130kD 付近のタンパク質を明らかにするために、p130^{Cas} (Crk-associated substrate) に着目した。Cas はインテグリンを介したシグナル伝達においてチロシンリン酸化され、アクチン細胞骨格や細胞遊走の制御に関わるアダプター分子である (Chodniewicz and Klemke, 2004a)。そこで細胞抽出液から抗 Cas 抗体を用いて immunodepletion を行った結果、130kD 付近のチロシンリン酸化タンパク質は大きく減少し、このことから Cas が破骨細胞分化過程において主要なチロシンリン酸化タンパク質であることが示唆された (図 11B)。また ADAP と Cas が複合体を形成していることが報告されていたことから (Hamid et al., 1999; Deleuil et al., 2003)、RAW264 細胞に FLAG-ADAP を発現させて Cas との会合を検討した結果、FLAG-ADAP と Cas の会合が見られた (図 12A)。さらに RAW264 細胞に c-Src CA を発現させると、内在性の ADAP と Cas の会合が上昇することが分かった (図 12B)。実際に ADAP 発現抑制細胞において Cas のチロシンリン酸化は大きく減少しており (図 12C)、これらの結果から単核破骨細胞において、ADAP は Cas のチロシンリン酸化に重要な役割を果たすことが考えられる。またアンチセンスにより c-src を抑制した細胞においても、ADAP 発現抑制細胞と同様に 130kD 付近のタンパク質のチロシンリン酸化レベルが低下し、Cas のチロシンリン酸化も抑制されていた (図 13A、B)。c-Src は Cas のリン酸化に必須であることが知られており (Vuori et al., 1996)、また本研究において c-Src と ADAP が Src 活性依存的に会合することを示していることから、c-Src は ADAP との会合を介して Cas のリン酸化を促進している可能性がある。

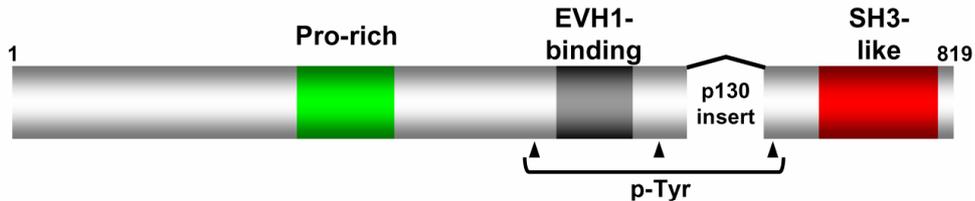
A)

```

1 MAKFNTGSNP TEEAATSSRP FKVAGQSSPS GIQSRKNLFD NQGNASPPAG
51 PSSMPKFGTT KPPLAAKPTY EEKPEKEPKP PFLKPTGGSP RFGTQPNSVS
101 RDPEVKVGFL KPVSPKPTSL TKEDSKPVVL RPPGNKLHNL NQESDLKTPG
151 PKPGPAPPVP ENELKPGFSK VAGAKSKFMP AAQDTDSKPR FPRHTFGQKP
201 SLSTEDSQEE NTSKNVPVQK GSPVQLGAKS KGAPFKPPKE DPEDKDHGAP
251 SSPFPGVVLK PAASRGSPGL SKNFEEKKED RKTDLAKNIF LNKLNQEEPA
301 RFPKAPSKLT AGTPWGQSQE KEGDKNSATP KQKALPPLSV LGPPPPKPNR
351 PPNVDLTRFR KADSANSATK SQTPLYSTSL PPPPPTHAS QPPLPASHPA
401 HPPVPSLPPR NIKPPLDLKH PINDENQDGV MHSDBGTNLE EEQESEGETY
451 EDIDSSKERD KKREKEEKKR LELERKEQKE REKKEQELKK KFCLTGP IQV
501 IHAKACCDV KGGKNELSFK QGEDIEIIRI TDNPEGKWLG RTARGSYGYI
551 KTTAVEIDYD SLKRKKNSLN AVPPRLVEDD QDVYDDVAEQ DAPNSHGQSG
601 SGGMFPPPPPT DDEIYDGIEE EDDDDGSPVQ VDEKTNASW GILKMLKGKD
651 DRKKSIREKP KVSESDNNEG SSLPSQHKQL DVGEEVYDDV DASDFPPPPA
701 EMSQGMSVGR AKTEEKDPKK LKKQEKEEKD LRKKFKYDGE IRVLYSTKVA
751 SSLTSSKKWGA RDLQIKPGES LEVIQSTDDT KVLCRNEEGK YGYVLRSYLV
801 DNDGEIYDDI ADGCIYDND

```

B)



C)

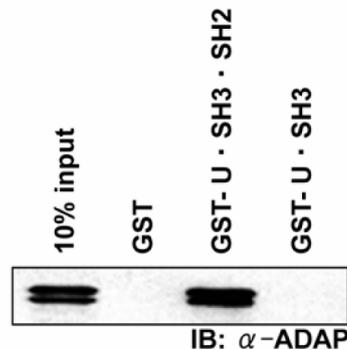
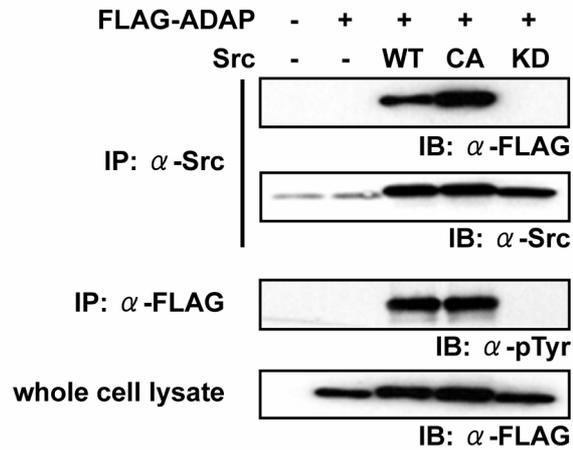


図1 c-Src 新規会合タンパク質 ADAP の同定

- A) マウス p130-ADAP のアミノ酸配列。赤字は LC-MS/MS により検出されたペプチド、下線は p120-ADAP において欠損している部位を示している。
- B) ADAP の 1 次構造。チロシンリン酸化されることが報告されている部位を矢頭で示す。
- C) GST プルダウンアッセイによる c-Src 側の会合部位の解析。GST、ユニーク領域 (U)-SH3-SH2 の GST 融合タンパク質または GST-U-SH3 を破骨細胞の細胞抽出液と反応させ、プルダウン後 ADAP の会合をウェスタンブロッティングにより検出した。

A)



B)

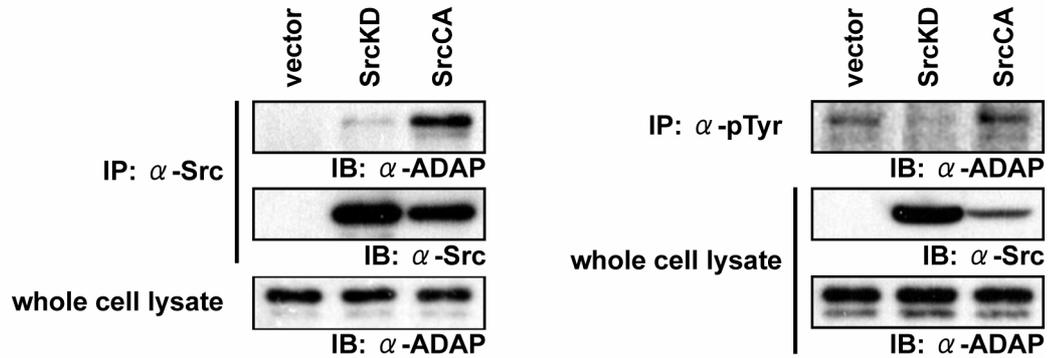


図2 c-Src の酵素活性依存的な ADAP のリン酸化と会合

- A) FLAG-ADAP と c-Src の野生型 (WT)、酵素活性化型 (CA)、不活性化型 (KD) を HEK293 細胞に発現させ、抗 Src 抗体あるいは抗 FLAG 抗体で免疫沈降することにより ADAP と c-Src の会合および ADAP のチロシンリン酸化を調べた。
- B) RAW264 細胞にレトロウィルスを用いて空ベクター (vector)、SrcKD あるいは SrcCA を発現させ、A) と同様の実験を行った。

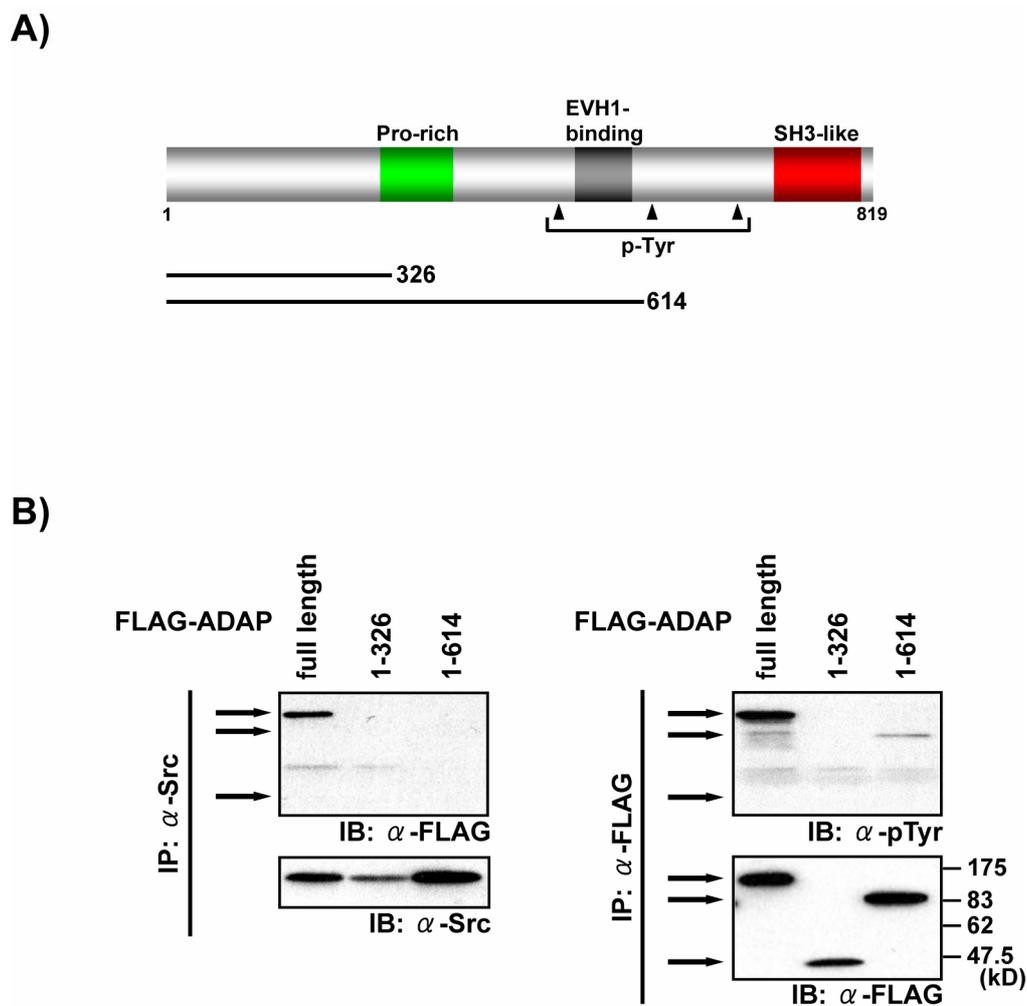
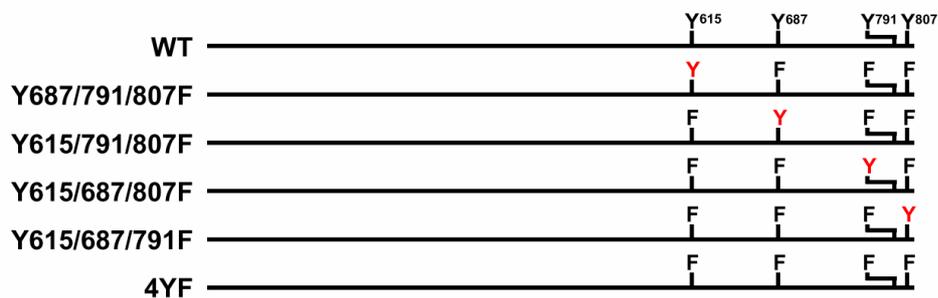
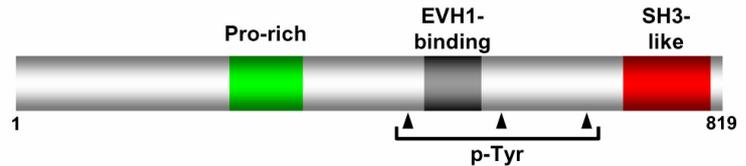


図3 c-Src との会合に必要な ADAP の領域の解析

- A) ADAP の欠損変異体 ADAP 1-326、1-614 の領域を示す。
- B) FLAG-ADAP の全長 (full length)、1-326、1-614 を c-Src CA とともに HEK293 細胞に発現させた。細胞抽出液を抗 Src 抗体あるいは抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、c-Src と ADAP の会合および ADAP のリン酸化について調べた。

A)

601 SGGMFPPPPT DD**EIY⁶¹⁵DGI**EE EDDDDGSVPQ VDEKTNASW GILKMLKGKD
Fyn-T-binding
 651 DRKKSIREKP KVSESDNNEG SSLPSQHKQL DVGE**EY⁶⁸⁷DDV** DASDFPPPPA
SLP-76-binding
 701 EMSQGMSVGR AKTEEKDPKK LKKQEKEEKD LRKKFKYDGE IRVLYSTKVA
 751 SSLTSKKWGA RDLQIKPGES LEVIQSTDDT KVLCRNEEGK **Y⁷⁹¹GYV**LRSYLV
 801 DNDG**EIY⁸⁰⁷DDI** ADGCIYDND



B)

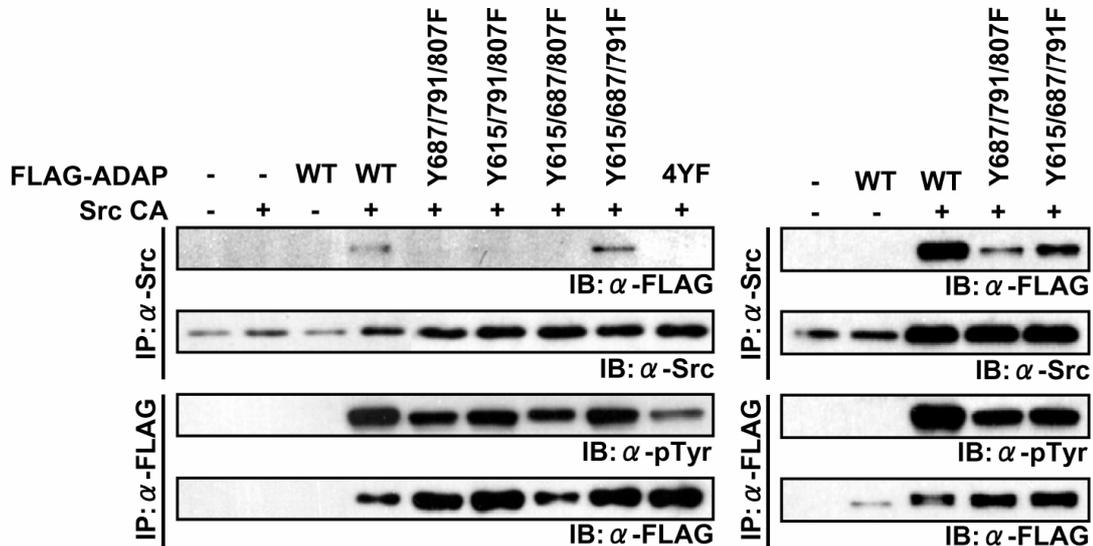
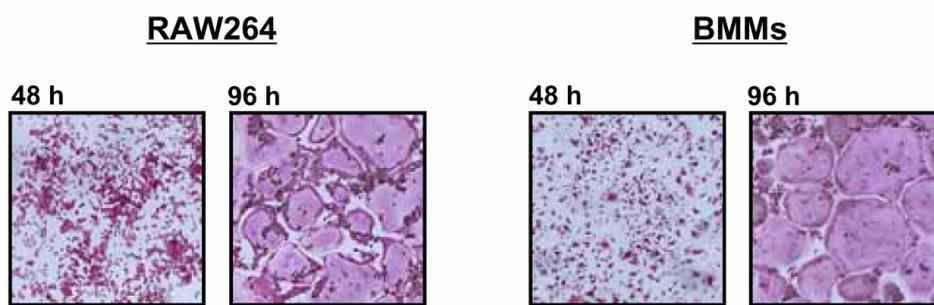


図4 c-Src との会合に必要な ADAP のチロシン残基の探索

- A) ADAP の C 末端部位のアミノ酸配列 (上図)。予想されるチロシンリン酸化モチーフを下線で、それぞれのチロシン残基を赤字で表記した。また Fyn-T と SLP-76 の結合部位も示した。下図は本研究で用いた YF 変異体の模式図である。
- B) FLAG-ADAP の野生型 (WT) および YF 変異体を c-Src CA とともに HEK293 細胞に発現させ、ADAP のリン酸化と c-Src との会合について解析した。

A)



B)

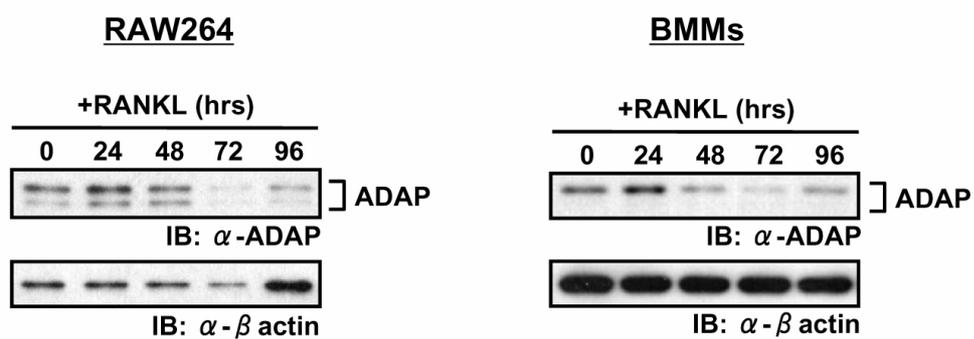


図5 破骨細胞分化過程における ADAP の発現

- A) RAW264 細胞およびマウス骨髓球由来マクロファージ (BMMs)を RANKL により刺激し、それぞれ 48、96 時間後の細胞を TRAP 染色した。Bar; 100 μ m
- B) A)と同様に RANKL 刺激し、その後 24 時間毎に得た細胞抽出液を用いて ADAP の発現をウェスタンブロッティングにより調べた。内部標準として β -actin の発現量を確認した。

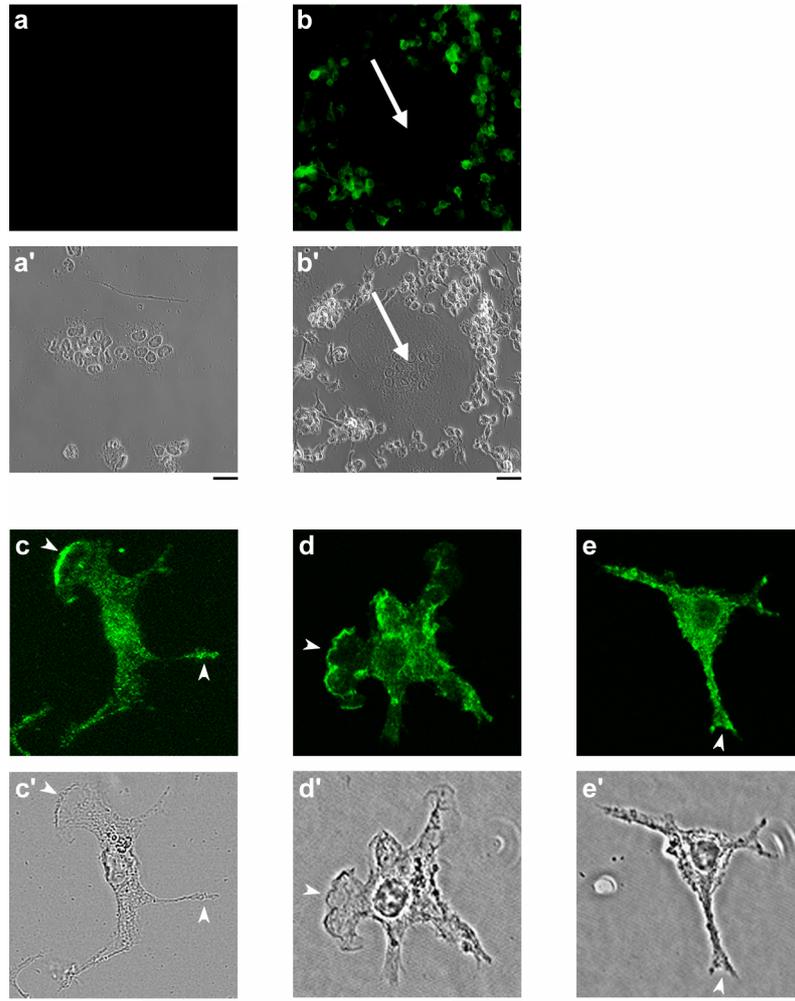


図 6 破骨細胞における ADAP の局在

RAW264 (b, c) および BMMs (d, e)を、RANKL 刺激後 96 時間(b)、48 時間(c-e)の時点で抗 ADAP 抗体を用いて免疫染色した。コントロールとして ADAP が発現していないことが分かっている HEK293 を同様に染色した(a)。各々の細胞の位相差写真を下側に示している(a'-e')。多核破骨細胞の位置を矢印で、またラメリポディア、仮足における ADAP の局在を矢頭で示す。Bar, 20 μ m

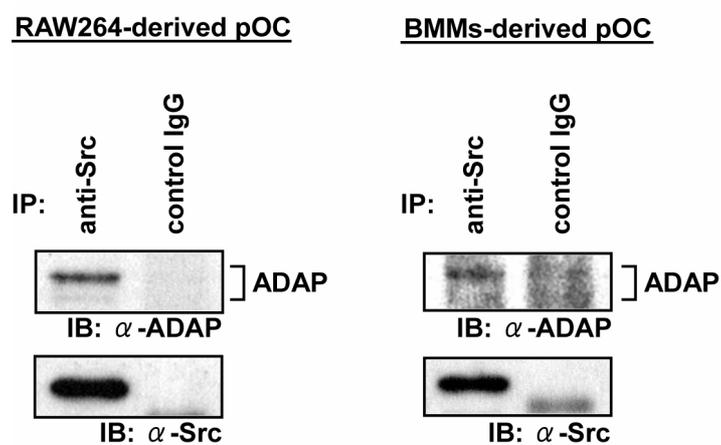


図7 単核破骨細胞における ADAP と c-Src の会合

RAW264 細胞および BMMs を RANKL 刺激し、48 時間後の細胞から細胞抽出液を調製した。抗 c-Src 抗体で免疫沈降し、内在性の ADAP と c-Src の会合を調べた。

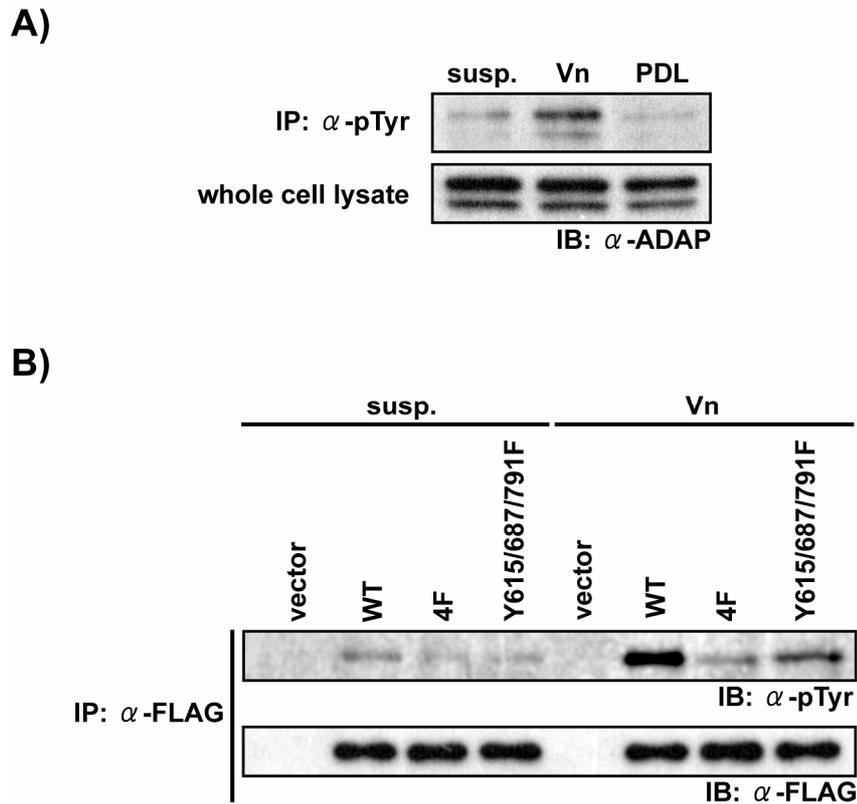


図 8 インテグリンを介した細胞接着による ADAP のリン酸化

- A) RAW264 細胞を単核破骨細胞まで分化させ、細胞を浮遊状態で維持するか、ビトロネクチン(Vn)あるいは poly-D-lysine (PDL)でコートしたプレート上に接着させた。各細胞抽出液を抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降して ADAP のリン酸化を調べた。
- B) RAW264 細胞にFLAG-ADAPの野生型(WT)、Y615/687/791/807F (4F)、Y615/687/791Fを発現させ、A)と同様のアッセイを行うことでビトロネクチンに対する細胞接着において ADAPのTyr⁸⁰⁷がリン酸化されるのか解析した。

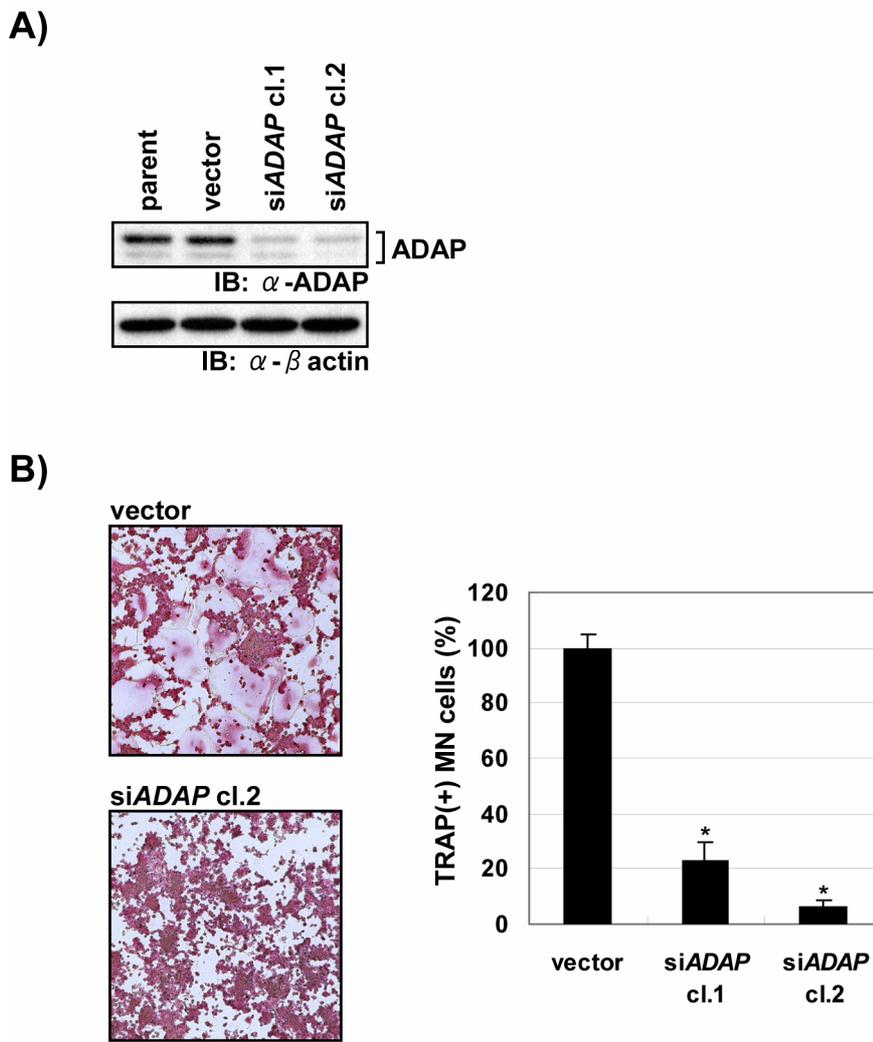


図9 ADAP 発現抑制による破骨細胞分化への影響

- A) RAW264 細胞へ ADAP に対する siRNA 発現ベクターを導入し、ADAP の発現が顕著に抑制された 2 クローン (siADAP cl.1, 2) を樹立した。これらの細胞株と、RAW264 の親株および空ベクターを導入した細胞株 (vector) における ADAP の発現を比較した。
- B) A) のクローンを RANKL 刺激により破骨細胞へと分化させ、3 核以上を有する多核破骨細胞の細胞数を定量した。空ベクターを導入した細胞株 (vector) における多核破骨細胞数を 100% として siADAP cl.1, 2 の多核細胞形成効率を算出した。アスタリスク (*) は t 検定により、vector と比較して有意な差が認められたことを示している ($p < 0.01$)。

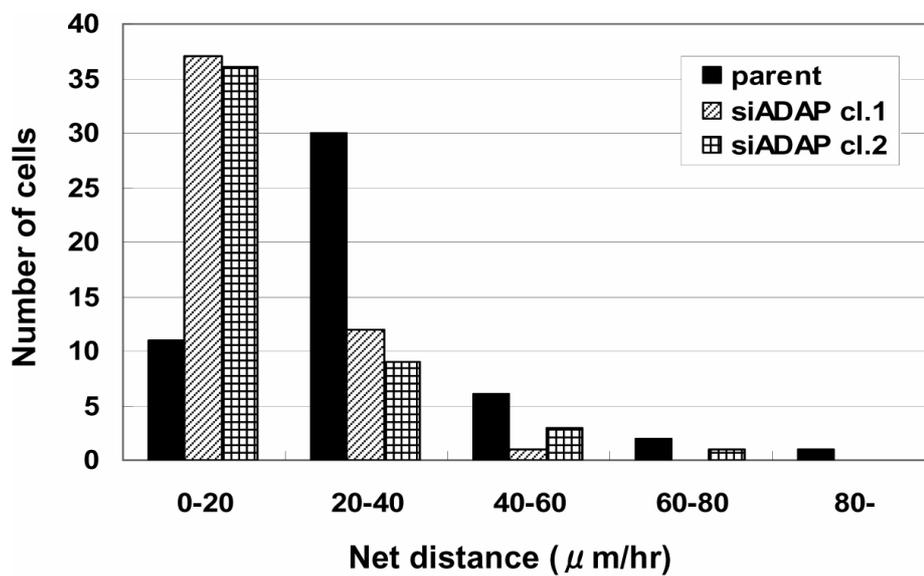


図 10 ADAP 発現抑制細胞における細胞遊走の減少

RAW264 細胞の親株および siADAP cl.1、cl.2 を RANKL 刺激後 48 時間まで分化させた後、タイムラプス顕微鏡で分化過程での細胞遊走を観察した。無作為に選んだ 50 個の細胞について、細胞遊走速度を算出した。

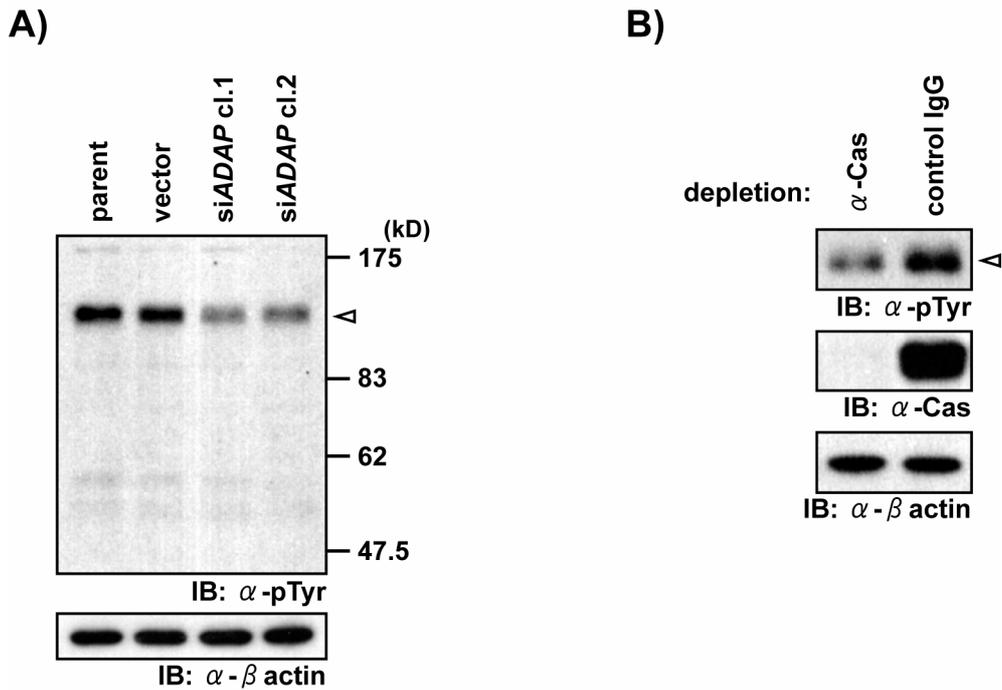


図 11 単核破骨細胞における Cas のチロシンリン酸化

- A) RAW264 細胞の各細胞株を単核破骨細胞まで分化させ、タンパク質のチロシンリン酸化パターンを抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロッティングすることにより調べた。
- B) RAW264 細胞を RANKL 刺激して分化させ、細胞抽出液を抗 Cas 抗体で 2 回免疫沈降することにより抽出液中の Cas を除いた。この細胞抽出液と control IgG で同様の操作を行ったもので、130kD 付近のチロシンリン酸化レベルを比較した。
- 矢頭は SDS-PAGE で同じ移動度となるバンドの位置を示している。

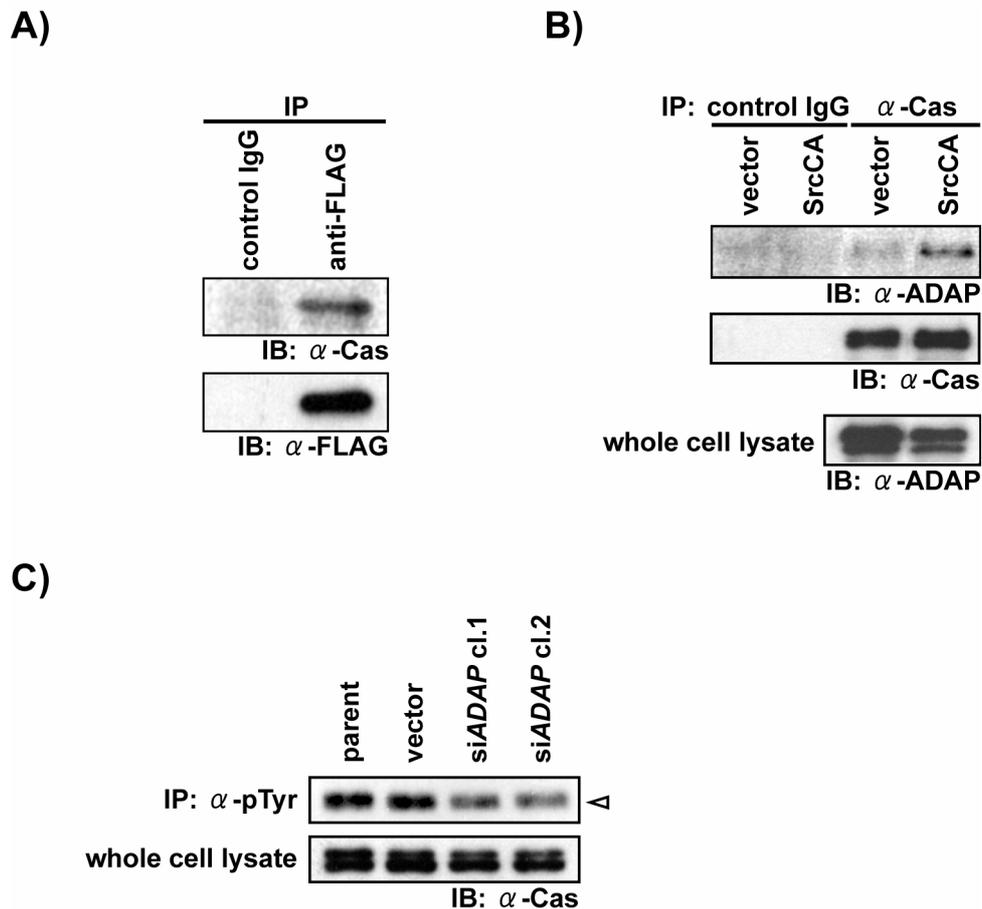


図 12 単核破骨細胞における Cas と ADAP の会合と ADAP 依存的な Cas のリン酸化

- A) RAW264 細胞に FLAG-ADAP を発現させ、単核破骨細胞の細胞抽出液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降することにより FLAG-ADAP と Cas の会合を調べた。
- B) 空ベクターおよび c-SrcCA を RAW264 細胞に発現させ、単核破骨細胞における内在性の ADAP と Cas の会合を免疫沈降により解析した。
- C) 各細胞株を単核破骨細胞まで分化させて、抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降することにより Cas のチロシンリン酸化を調べた。矢頭は図 11 と同様の位置を示している。

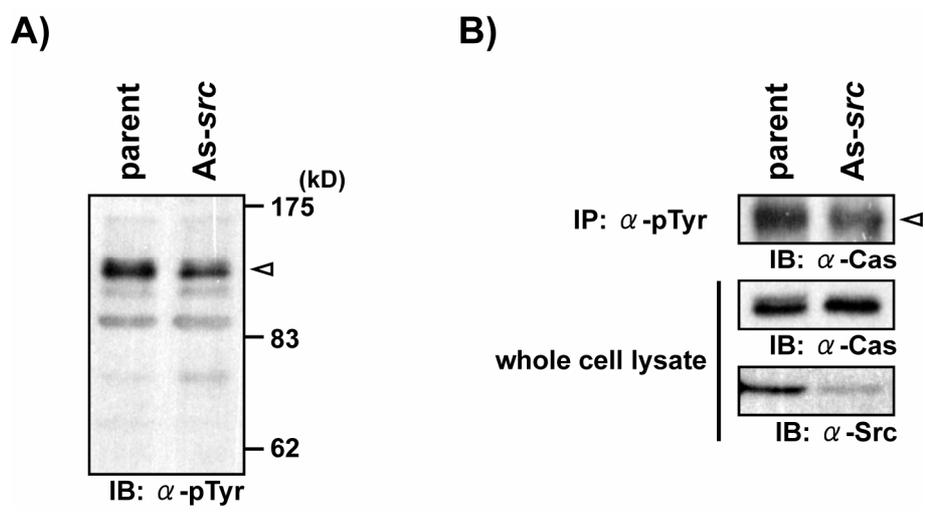


図 13 c-Src 発現抑制細胞における Cas のリン酸化

A) RAW264 細胞の親株および c-src に対するアンチセンスを発現させた細胞株(As-src)を単核破骨細胞まで分化させ、タンパク質のチロシンリン酸化のパターンを調べた。

B) A)と同様に細胞を分化させ、細胞抽出液を抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降し、Cas のチロシンリン酸化を調べた。

矢頭は図 11、12 と同様の位置を示す。

考察

c-Src による ADAP のリン酸化と会合様式

本研究において、c-Srcの新規会合タンパク質としてADAPを同定した。ADAPはT細胞受容体の活性化によりチロシンリン酸化されるタンパク質として以前から知られていたが、1997年に2つのグループにより相次いでクローニングされた (da Silva et al., 1997; Musci et al., 1997)。T細胞やミエロイド系の細胞に発現しているアダプタータンパク質であり、多くのタンパク質間相互作用ドメインとチロシンリン酸化部位を有していることから、現在までにFynT、SLP-76、SKAP55 (Src-kinase-associated protein of 55kDa)、VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)等のチロシンキナーゼやアダプタータンパク質、細胞骨格制御分子と会合することが報告されている (Peterson, 2003)。近年2つのグループからADAP欠損マウスの解析が報告され、*adap*^{-/-}T細胞はT細胞受容体刺激に依存したインテグリンのクラスターリングや β_1 、 β_2 インテグリンを介した細胞接着の促進が欠如していることが分かった (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001)。このことから、ADAPはT細胞受容体を介した「inside-out」シグナルによってインテグリンの活性化と極性を制御し、T細胞と抗原提示細胞間での免疫シナプスの形成に必須の役割を果たす。

T細胞におけるADAPのリン酸化は、主にSrcファミリーのFyn-Tが担っていると考えられており、実際に*fyn*^{-/-}T細胞ではT細胞受容体活性化によるADAPのリン酸化が大きく減少している。これに対して、同じSrcファミリーであるLckはADAPをリン酸化する活性が非常に低いことから、ADAPはSrcファミリーによって異なるリン酸化制御を受ける可能性がある (Raab et al., 1999)。今回c-SrcとADAPの会合にはADAPのTyr⁸⁰⁷が必要であることを見出した。Tyr⁸⁰⁷はSH3-likeドメインよりもさらにC末端に位置する新規のリン酸化部位であり、またこれまでにこの領域に結合するタンパク質は知られていなかった。リン酸化ペプチドや点変異体を用いた解析から、Fyn-Tの結合部位はヒトp120-ADAPのTyr⁶²⁵ (マウスp130-ADAPのTyr⁶¹⁵にあたる)であり、さらにヒトp120-ADAPにおいてFyn-Tによりリン酸化される部位は主に585から670番目のアミノ酸領域、特にTyr⁵⁹⁵とTyr⁶⁵¹ (マウスp130-ADAPのTyr⁵⁸⁴とTyr⁶⁸⁷)であることが報告されている (Geng et al., 1999; Raab et al., 1999)。本研究においてc-SrcによるADAPのリン酸化様式について解析を行った結果、主要なリン酸化部位はC末端側615番目以降の領域であり、614番目以前の領域にはほとんどリン酸化が見られなかった。しかし327から614番目の領域にも低レベルであるがリン酸化が考えられ、この部位が既知のTyr⁵⁸⁴であるのか確認する必要がある。またYF変異体を用いた解析から、今回調べた4ヶ所のチロシン残基についていずれもチロシンリン酸化されている可能性が考えられる。Tyr⁷⁹¹については会合分子が知られておらず、リン酸化の意義は不明である。参考としてヒトおよびマウスADAPの主要なリン酸化部位と既知の会合分子の対応を示す

(参考図 4)。ただ YF 変異体を用いた解析は、変異を導入した結果として本来リン酸化されない部位がリン酸化されてしまう可能性があるため、今後詳細なリン酸化部位の解析においてはペプチドマッピングを行う必要がある。しかし今までの知見や本研究で得られた結果は、ADAP のリン酸化、会合における Fyn-T、Lck、c-Src の違いを示唆しており、また同時に、シグナル伝達機構における Src ファミリー内での機能的な違いを説明する 1 つのメカニズムであることが考えられる。また本研究で用いた ADAP は p130-ADAP であるのに対して、これまでの会合やリン酸化の解析で用いられたのは p120-ADAP であることから、アイソフォームによってリン酸化様式、Src ファミリーとの会合様式が異なる可能性がある。p120/p130-ADAP は細胞によって発現比が異なっており、例えば未熟 T 細胞では p120-ADAP の発現が高く、成熟に伴って p130-ADAP の発現が優位になる。しかし p120、p130 はどちらも T 細胞受容体刺激に対して IL-2 の転写活性を促進することが報告されており (Veale et al., 1999)、現在までにアイソフォームによる機能の違いは分かっていない。

また本研究では、細胞接着によって ADAP の YF 変異体 Y615/687/791F が 4YF よりも顕著にリン酸化されることを示した。この結果はインテグリンを介した細胞内シグナル伝達経路において ADAP の Tyr⁸⁰⁷ がリン酸化されることを示唆しており、ADAP の機能において Tyr⁸⁰⁷ が重要な役割を果たしていることが考えられる。また Y615/687/791F のリン酸化レベルは野生型 ADAP よりも明らかに低いことから、細胞接着によって Fyn や SLP-76 の結合部位である Tyr⁶¹⁵、Tyr⁶⁸⁷ といった、他のチロシン残基もリン酸化されている可能性がある。今後はペプチドマッピングによって、細胞接着依存的にどのチロシン残基がリン酸化されるのか詳細に解析する必要がある。

Tyr⁸⁰⁷ の非常に近接した位置に存在する SH3-like ドメインは、通常の SH3 ドメインと 1 次構造において相同性があるが、他の SH3 ドメイン間で保存されている複数のアミノ酸残基が異なることから、固有の機能が予想されていた。最近 Heuer らはヒト p120-ADAP の SH3-like ドメインを NMR スペクトルによって構造解析し、さらにこの中で SH3-like ドメインは様々なプロリンリッチなモチーフに対して結合活性を有しないことを報告した (Heuer et al., 2004)。この報告によれば、SH3 ドメインの核となる 4 つの β シート (twisted β sheet) の構造は通常の SH3 ドメインに類似しているが、SH3-like ドメインの N 末側には通常の SH3 ドメインにはない α ヘリックスが存在している。この α ヘリックスが、リガンド結合特異性を規定する RT-loop 領域や twisted β sheet 内の複数のアミノ酸残基と van der Waals 力によって相互作用することで、全体の構造を安定化させ、またリガンド結合部位の環境を変化させている (参考図 5、Heuer et al., 2004)。Heuer らの解析で用いられた領域はヒト p120-ADAP の 683 から 771 アミノ酸残基であり、マウス p130-ADAP における 719 から 807 残基に相当する。そして Tyr⁸⁰⁷ は SH3-like ドメインの構造に非常に近接した位置に存在することが考えられるが、Tyr⁸⁰⁷ を含めた議論は行われていない (参考図 5、Heuer et al., 2004)。このため、本研究

で明らかになったTyr⁸⁰⁷のリン酸化およびc-Srcとの会合がSH3-likeドメインに及ぼす影響は不明であり、今後解析が行われる必要がある。最近*in vitro*において、SH3-likeドメインにフォスファチジルセリンやフォスファチジルイノシトールなどの酸性脂質が結合することが報告され、このことからADAPはシグナル伝達においてSH3-likeドメインを介して細胞膜のリン脂質にリクルートされ、機能する可能性がある (Heuer et al., 2005)。また肥満細胞においてIgE-抗原複合体によりFc ϵ 受容体Iが活性化された際に、ADAPはチロシンリン酸化される分子の1つとして知られており、ADAPを過剰発現させるとフィブロネクチンへの細胞接着とFc ϵ 受容体Iシグナル依存的な脱顆粒が亢進することが報告されている (Geng et al., 2001)。この中で、SH3-likeドメイン以下を欠損した変異体では細胞接着能に変化はないが、脱顆粒の減少が認められたことから、肥満細胞においてSH3-likeドメインは細胞接着ではなく脱顆粒の促進に重要な役割を果たすことが考えられる。ただSH3-likeドメインに対する生理的なりガンドが同定されていないため、シグナル伝達におけるSH3-likeドメインの詳細な機能については明らかになっていない。

破骨細胞分化過程における ADAP の発現と局在

破骨細胞における ADAP の機能については今まで報告されていなかったことから、本研究では ADAP の破骨細胞分化過程における機能解析を行い、いくつかの新たな知見を得た。まず破骨細胞分化依存的に発現が上昇する c-Src とは異なり、ADAP は分化前から発現しており、RANKL 刺激後 48 時間以降に発現の減少が観察された。ADAP は RAW264 細胞などのマクロファージ細胞株や初代マクロファージにおいて発現が認められることから、現在までにマクロファージにおける機能が解析されてきた。Fc γ 受容体シグナルを介したマクロファージの貪食作用において、ADAP は異物を貪食する際の「phagocytic cup」に集積し、WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)や VASP ファミリーである Evi (Ena/VASP-like)と複合体を形成することが報告されている (Coppolino et al., 2001)。phagocytic cup は異物の貪食作用に必要な構造であり、アクチン細胞骨格の再構成により異物の周囲に仮足が伸長することで形成される。この報告から Fc γ 受容体活性化により ADAP、VASP、WASP がリクルートされ、これらの分子複合体がアクチン細胞骨格を再構成することでマクロファージの貪食機能に重要な役割を果たすことが考えられる。また ADAP は抑制性免疫受容体である SHPS-1 と会合しており、マクロファージにおいて SHPS-1 を介したシグナルにより細胞接着を制御していることも報告されている (Timms et al., 1999)。しかしマクロファージと異なり、ADAP は多核破骨細胞での発現がほとんど認められない。破骨細胞分化過程において単核の破骨細胞は、RANKL 刺激 48 時間から 72 時間後にかけて細胞融合することがタイムラプス顕微鏡を用いた解析により分かっている (data not shown)。このことから ADAP の発現は多核化の進行にともなって減少することが考えられるが、発現が減少

するメカニズムとその意義は不明である。しかし今回の結果から ADAP は多核化した成熟破骨細胞よりも単核の破骨細胞において機能していることが示唆される。

単核破骨細胞におけるADAPの局在は、主に細胞質に分散して存在しており、さらにラメリポディアの先端や仮足に局在が認められた。定常状態のT細胞において、ADAPは細胞質や核に存在することが報告されており (Raab et al., 1999; Veale et al., 1999)、本研究においても同様の存在が見られている。ADAPの核への存在は核局在シグナルを有していることに起因すると考えられるが、核におけるその機能は分かっていない。またT細胞のT細胞受容体シグナルを抗CD3抗体ビーズで活性化すると、ADAPはT細胞とビーズの接触面に局在し、この時にEvl、WASP、Arp2/3 と共局在していることが報告されている (Krause et al., 2000)。これは、活性化T細胞における β_2 インテグリンLFA-1(lymphocyte-function-associated antigen 1)の局在と類似している (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001)。またKrauseらは血小板の解析において、ADAPがラメリポディアに限局しており、VASPと共局在していることを報告している (Krause et al., 2000)。本研究においてADAPの局在が見られたラメリポディアや仮足は、アクチン細胞骨格の活発な再構成やインテグリンの極性化が見られる動的な構造である (Chodniewicz and Klemke, 2004b)。上記のT細胞や血小板における知見を考えると、単核破骨細胞においてADAPは細胞接着を介したシグナル伝達やアクチン細胞骨格の再構成に関与していることが考えられる。実際に本研究において細胞接着とADAPの関連を調べた結果、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介した細胞接着依存的なADAPのチロシンリン酸化が見られた。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンシグナル伝達においてc-Srcが活性化することが知られており、ADAPはこのシグナル伝達においてc-Srcによりリン酸化され、機能することが考えられる。

破骨細胞分化過程における ADAP の機能

破骨細胞分化におけるADAPの重要性を明らかにするために、本研究ではsiRNAによってRAW264細胞におけるADAPの発現を抑制し、その結果*in vitro*において単核破骨細胞の細胞遊走能の低下と多核破骨細胞の形成阻害を観察した。タイムラプス顕微鏡を用いた解析の結果、RAW264はRANKL刺激後初期にはほとんど動かず増殖し、48時間以降に活発に細胞遊走を開始することが分かっている (data not shown)。破骨細胞の細胞遊走や細胞接着は、主に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの活性化、極性化を介していると考えられており、これらのインテグリンサブユニットは破骨細胞分化に従って発現が上昇する (Nakamura et al., 1998)。また α_v サブユニットの遺伝子欠損マウスは胎生致死だが、 β_3 サブユニットの遺伝子欠損マウスは成長後期で破骨細胞の機能不全により骨硬化症を呈し、*in vitro*において $\beta_3^{-/-}$ BMMsは多核破骨細胞の形成に障害があることが報告されている (Bader et al., 1998; McHugh et al., 2000; Faccio et al., 2003)。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの機能をdisintegrinであるエキスタチンで阻害すると単核破骨細胞の細胞遊

走が阻害され、またそれにともなって多核破骨細胞の形成が阻害されることから、少なくとも*in vitro*において $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの機能と単核破骨細胞の細胞遊走は、破骨細胞分化に必須であることが考えられる (Nakamura et al., 1998a, 1999)。ADAPの細胞遊走への関連はT細胞において解析されており、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリンを活性化するとADAPがリン酸化され、ADAPの過剰発現によりT細胞の走化性が上昇することが報告されている (Hunter et al., 2000)。同様に本研究において $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介したADAPのリン酸化が上昇したことや、単核破骨細胞においてラメリポディアなどの仮足に局在が見られたことを考えると、*in vitro*においてADAPのシグナル伝達を介して細胞遊走が促進され、その結果として破骨細胞の多核化に重要な役割を果たすことが考えられる。またADAPの発現を抑制することで細胞遊走能が低下したことから、インテグリンを介した細胞接着の制御が異常になっている可能性があった。そこで*siADAP*細胞株とRAW264の親株を単核破骨細胞まで分化させ、RANKLや血清の非存在下でのビトロネクチンに対する細胞接着能を解析したが、このアッセイでは有意な差を見出せなかった (data not shown)。しかしこれまでの報告から、*adapt*^{-/-}T細胞はT細胞受容体刺激による細胞接着の促進が欠如しているのに対して、定常状態では野生型と比較して同等の細胞接着能を有している (Griffiths et al., 2001; Peterson et al., 2001)。このことから、今後はRANKLやM-CSFで刺激した時に細胞接着能とADAPの関連が見出せるのか調べる必要がある。

今回の解析において単核破骨細胞の細胞遊走とADAPの関連を見出すことができたが、ADAPが $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの活性化を制御するシグナル伝達機構の詳細は明らかにできなかった。前述したように、T細胞においてADAPはT細胞受容体シグナルを介してインテグリンのクラスターリングや極性化を制御することが知られている。しかしT細胞においても同様に、ADAPがこのinside-outシグナルを制御する詳細なメカニズムは明らかになっていない。このためADAPを介したシグナル伝達の下流に存在する分子の同定が必要であるが、その候補として低分子量Gタンパク質であるRap1が挙げられる。T細胞においてRap1は、T細胞受容体や走化性因子の刺激によるインテグリンのクラスターリングや極性化を制御し、細胞遊走や細胞接着を促進する (Togni et al., 2004)。最近Rap1のエフェクター分子としてRAPL (regulator for adhesion and polarization enriched in lymphocytes)がクローニングされ、RAPLはRap1によるinside-outシグナルを統制し、T細胞や樹状細胞における細胞接着や細胞遊走を促進することが報告されている (Katagiri et al., 2003, 2004)。現段階では破骨細胞分化過程において、ADAPのリン酸化を促進する受容体や、また $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを制御するRap1-RAPLシグナル伝達系の様な機構が存在するのか不明である。しかし破骨細胞においてRANKLやM-CSFを介したシグナル伝達がc-Srcを活性化することから (Wong et al., 1999; Nakamura et al., 2001)、今後はRANKLやM-CSFによってADAPがリン酸化されるのか解析し、またADAPを介したinside-outシグナル伝達系に重要な分子を探索することが必要だと考え

る。

本研究の結果を踏まえて、得られた2つのADAP発現抑制細胞株に対してADAPを再発現させることを考えた。このために、siRNAの標的部位にサイレント変異を導入したADAP発現ベクターを構築し、レトロウイルスでこれらの細胞株に発現させた。ウェスタンブロッティングの結果、これらの細胞株はRAW264の親株に比べて過剰なADAPの発現(5倍以上)が認められた。そこでこれらの細胞の多核破骨細胞形成能に回復が見られるのか解析を行ったが、どちらの細胞株も適切に分化しなかった(data not shown)。原因としてはADAPを過剰発現させた影響や、細胞株樹立の際に細胞の性質が変化してしまった可能性がある。しかしADAPは分化後期に発現が減少することから、現段階では恒常的に発現させたために正常な分化過程が阻害されてしまったのではないかと考えている。またADAP発現抑制株はそれぞれ単一クローンとして得られたことから、クローン特有の性質のために破骨細胞分化が阻害された可能性も存在する。この可能性を除外するために、現在BMMsにレトロウイルスを用いてsiADAP発現ベクターを導入し、破骨細胞分化への影響を解析中である。

以前当研究室では、c-srcの発現を抑制することで*in vitro*における多核破骨細胞の形成が阻害されることを示した(Kumagai et al., 2004)。またこの細胞株の表現型はADAP発現抑制細胞と類似しており(参考図6)、このことからc-SrcとADAPの機能的な相関が考えられる。しかしc-src遺伝子欠損マウスは多核の破骨細胞を有していることから、*in vivo*においてc-src遺伝子の欠損による破骨細胞分化への影響はほとんどない様に思われる。1つの可能性としては、個体発生の段階で他のSrcファミリーによって機能が補完されることが考えられ、実際にc-srcとc-hckの二重欠損マウスではc-src欠損マウスと比較してより重篤な大理石骨病とそれに伴う造血環境の破綻が見られ、さらにc-src^{-/-}破骨細胞では野生型と比較してc-Hckの発現が上昇していることが分かっている(Lowell et al., 1996)。他の細胞においてもSrcファミリー内の補完が報告されており、最近では遺伝子欠損マウスで異常の見られないc-yesがRNAiを用いてES細胞の自己複製能に重要な役割を果たすことが示された(Anneren et al., 2004)。我々の報告も含めて、*in vitro*におけるSrcの機能解析から得られた結果は慎重に判断すべきであるが、個体レベルで見られなかったSrcファミリーの機能を明らかに出来る可能性がある。同様にADAPにおいて、遺伝子欠損マウスではミエロイド系細胞の発達やマクロファージの貪食能に影響がないことが報告されている(Peterson, 2003)。このことに関して、マクロファージにはADAPに相同性のあるPRAM-1 (PML-RAR α regulated adaptor molecule-1)が発現しており、このアダプター分子がマクロファージにおけるADAPの機能を補完していることが考えられている(Moog-Lutz et al., 2001; Peterson, 2003)。またADAP遺伝子の欠損による骨組織や破骨細胞への影響は報告されていないが、マクロファージと同様にPRAM-1が破骨細胞分化過程においても機能している可能性がある。実際にPRAM-1はADAPのTyr⁸⁰⁷にあたるチロシンリン酸化モチーフを保存してお

り (Moog-Lutz et al., 2001)、このことから破骨細胞分化におけるc-SrcとPRAM-1 の関係やその機能を解析する必要があると考える。

c-Src-Cas シグナル伝達系における ADAP の役割

アダプタータンパク質Casは*v-src*や*v-crk*遺伝子によってがん化した細胞においてチロシンリン酸化されるタンパク質として同定され、これらの遺伝子ががん遺伝子として機能するための必須の役割を担っている (Bouton et al., 2001)。また正常な細胞内シグナル伝達においても、多くの受容体やインテグリンの活性化を介してCasはリン酸化され、CrkやC3G、Grb2等の多様な分子と複合体を形成することで、細胞増殖や細胞の生存、接着、遊走といった細胞現象を制御することが知られている (Bouton et al., 2001; Chodniewicz and Klemke, 2004a)。*cas*^{-/-}繊維芽細胞はアクチン細胞骨格の異常からストレスファイバーが消失しており、またこれに伴い細胞遊走能が低下することから、Casはアクチン細胞骨格の再構成や細胞遊走に重要な役割を果たしている (Honda et al., 1998, 1999)。現在までにインテグリンを介したシグナル伝達において、Casのリン酸化にはSrcファミリーやFAK (focal adhesion kinase)、Pyk2 (protein-tyrosine kinase)、Ablが単独で、あるいは協調的に機能することが必要であると報告されている (Vuori et al., 1996; Chodniewicz and Klemke, 2004a)。破骨細胞におけるCasは、1998年にNakamuraらが破骨細胞のアクチンリング形成に依存してチロシンリン酸化されるタンパク質として同定し、c-Srcによるチロシンリン酸化を介してアクチン細胞骨格の再構成に関与することを報告して以来、その機能解析が進められてきた (Nakamura et al., 1998b)。単核破骨細胞においてCasは、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介した細胞接着やM-CSFの刺激によりリン酸化され、またこのリン酸化は*c-src*^{-/-}細胞で欠如していることから、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンシグナルによるCasのリン酸化においてc-Srcが必須のチロシンキナーゼであることが考えられる (Nakamura et al., 2001)。同様に単核破骨細胞において、Pyk2もCasのリン酸化に重要な役割を果たすことが*pyk2*に対するアンチセンスを用いた解析で示されている (Duong et al., 2001)。またPyk2とCasは細胞の接着状態やc-Srcの有無に関わらず安定に会合していることが報告されており (Lakkakorpi et al., 1999)、これらの知見から破骨細胞においては、c-SrcとPyk2が協調的に機能することによりCasのチロシンリン酸化が促進されると考えられる。

本研究ではチロシンリン酸化を介したシグナル伝達におけるADAPの役割に着目し、ADAPの発現を抑制した単核破骨細胞においてCasのチロシンリン酸化が減少していることを見出した。単核破骨細胞においてADAPはc-Srcと会合することから、c-SrcによるCasのリン酸化においてADAPの関与が考えられる。ADAPとCasの分子的な相互作用については、グラム陰性菌である*Yersinia*属による宿主免疫応答の抑制機構において報告されている。ペスト菌に代表される*Yersinia*属はマクロファージやリンパ球のインテグリンを介して細胞外に会合し、細胞内に毒性因子であるYops (*Yersinia*

outer proteins)を分泌する。Yops ファミリーの中で YopE、YopT、YopH が細胞毒性を有する分子であることが分かっており、これらの分子は細胞内のアクチン細胞骨格や細胞接着構造を破壊し、マクロファージの貪食能などの宿主防御機構を抑制する (Stainer and Cornelis, 1998)。活性化型のチロシンフォスファターゼである YopH は、現在までにマクロファージにおいて Cas、SKAP55、ADAP を脱リン酸化することが報告されており、その結果これらのインテグリンシグナルやアクチン細胞骨格の再構成に関与する分子の機能が抑制される (Black and Bliska, 1997; Black et al., 2000; Hamid et al., 1999)。YopH の免疫沈降物中に Cas と ADAP が検出され、また YopH と Cas、ADAP の会合部位の解析から、YopH と Cas、ADAP は複合体を形成している可能性が考えられている (Hamid et al., 1999; Deleuil et al., 2003)。実際に本研究では、単核破骨細胞において Cas と ADAP の会合が見られ、さらに活性化型 c-Src によってその会合は上昇した。今後は ADAP のリン酸化と c-Src との会合が Cas のリン酸化に及ぼす影響を明らかにするために Cas と ADAP の会合様式を解析することが必要であるが、本研究の結果は c-Src による Cas のリン酸化機構において、ADAP の会合による c-Src/ADAP/Cas 複合体の形成が Cas のリン酸化を促進することを示唆している。また他の細胞系の解析から、インテグリンシグナル伝達において Cas のリン酸化は Crk との会合を促進し、Crk の SH3 ドメインにリクルートされる DOCK180 が Rac1 を活性化することでアクチン細胞骨格を再構成、細胞遊走を促進することが報告されている (Kiyokawa et al., 1998; Bouton et al., 2001)。このことから ADAP 発現抑制細胞で見られた Cas のリン酸化の減少は、細胞遊走能の低下における 1 つの要因であることが考えられる。

```

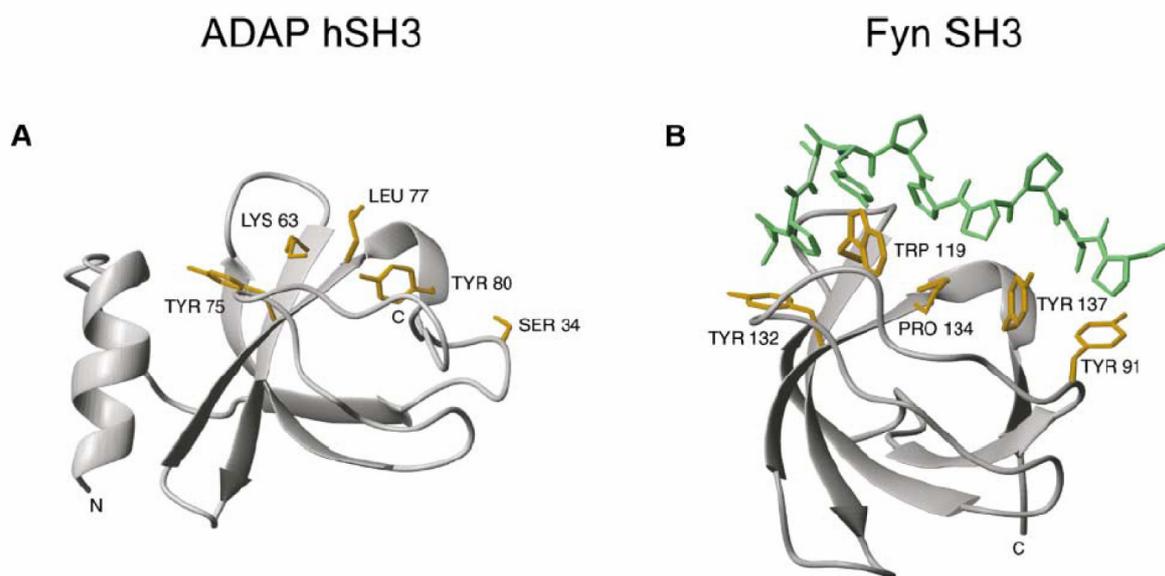
human ADAP-p120 541:RITDNPEGKWLGRRTARGSYGYIKTTAVEIDYDSLKLLKDSLGA-PSRPIEDDQEVYDDVA 599
human ADAP-p130 541:RITDNPEGKWLGRRTARGSYGYIKTTAVEIDYDSLKLLKDSLGA-PSRPIEDDQEVYDDVA 599
mouse ADAP-p120 529:RITDNPEGKWLGRRTARGSYGYIKTTAVEIDYSLKRKKNLSNAVPPRLVEDDQDVYDDVA 588
mouse ADAP-p130 529:RITDNPEGKWLGRRTARGSYGYIKTTAVEIDYDSLKRKKNLSNAVPPRLVEDDQDVYDDVA 588
*****
human ADAP-p120 600:EQDDISSHSQSGSGGIFPPPP-DDDIYDGIEEEDADDG----- 636
human ADAP-p130 600:EQDDISSHSQSGSGGIFPPPP-DDDIYDGIEEEDADDGSTLQVQEKSNVSWGILKMLKG 658
mouse ADAP-p120 589:EQDAPNSHGQSGSGGMFPPPTDDEIYDGIEEEDDDDG----- 626
mouse ADAP-p130 589:EQDAPNSHGQSGSGGMFPPPTDDEIYDGIEEEDDDDGVPQVDEKTNVSWGILKMLKG 648
*** ** ***** ***** ** ***** **
human ADAP-p120 637:-----FPAPPKQLDMGDEVYDDVDTSDFPVSSAEMSQGTNV 672
human ADAP-p130 659:KDDRKKSIREKPKVSDSDNNEGSSFPAPPKQLDMGDEVYDDVDTSDFPVSSAEMSQGTNV 718
mouse ADAP-p120 627:-----LPSQHKQLDVGEEVYDDVDASDFPPPPAEMSQGMV 662
mouse ADAP-p130 649:KDDRKKSIREKPKVSESDNNEGSSLPQHKQLDVGEEVYDDVDASDFPPPPAEMSQGMV 708
* **** * ***** ** ***** *
human ADAP-p120 673:GKAKTEEKDLKLLKQEKKEKDFRKKFKYDGEIRVLYSTKVTTTSITSKKWGTRDLQVKPG 732
human ADAP-p130 719:GKAKTEEKDLKLLKQEKKEKDFRKKFKYDGEIRVLYSTKVTTTSITSKKWGTRDLQVKPG 778
mouse ADAP-p120 663:GRAKTEEKDPKLLKQEKKEKDLRKKFKYDGEIRVLYSTKVASSLTSKKWGARDLQIKPG 722
mouse ADAP-p130 709:GRAKTEEKDPKLLKQEKKEKDLRKKFKYDGEIRVLYSTKVASSLTSKKWGARDLQIKPG 768
* ***** ***** ***** ***** * ***** **
human ADAP-p120 733:ESLEVIQTDDTKVLCRNEEGKYGYVLRSYLADNDGEIYDDIADGCIYDND 783
human ADAP-p130 779:ESLEVIQTDDTKVLCRNEEGKYGYVLRSYLADNDGEIYDDIADGCIYDND 829
mouse ADAP-p120 723:ESLEVIQSTDDTKVLCRNEEGKYGYVLRSYLVDNDGEIYDDIADGCIYDND 773
mouse ADAP-p130 769:ESLEVIQSTDDTKVLCRNEEGKYGYVLRSYLVDNDGEIYDDIADGCIYDND 819
***** ***** ***** *****

```

binding to...	SLP-76	Fyn-T	SLP-76	?	c-Src
human p120	595	625	651	755	771
human p130	595	625	697	801	817
mouse p120	584	615	641	745	761
mouse p130	584	615	687	791	807

参考図 4 ヒトおよびマウス ADAP のアミノ酸配列の比較

ADAP の C 末端のアミノ酸配列と、ヒトとマウスの相同性について上図に示す。青字はチロシンリン酸化モチーフを、またアスタリスクは全ての ADAP 配列において一致したアミノ酸残基を示している。また各 ADAP のリン酸化チロシン残基の位置(アミノ酸番号)と、現在までに報告されている結合タンパク質の対応を下表にまとめた。

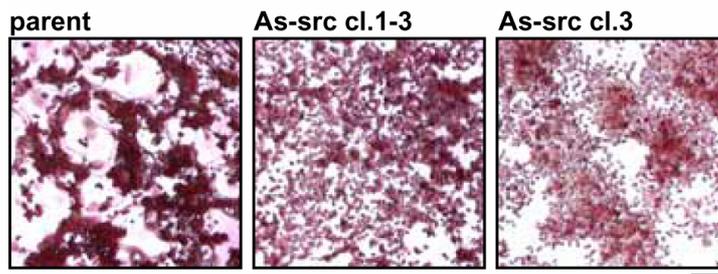
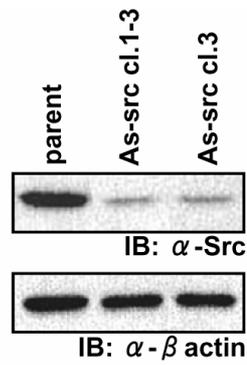


Human p120-ADAP:	1 (683)	KKLKKQEKEE	KDFRKKFKYD	GEIRVLYSTK	VTTSITSKKW	GTRDLQVKPG	50 (732)	
	51 (733)	ESLEVIQTTD	DTKVLCRNEE	GKYGVLRSY	LADNDGEIY		89 (771)	
Human Fyn	:	85	TLFVALYDYE	ARTEDDLSFH	KGEKFQILNS	SEGDWWEARS	LTTGETGYIP	134
		135	SNYVAP					140

参考図 5 SH3-like ドメインの三次元構造と、Fyn の SH3 ドメインとの比較

ヒト p120-ADAP の SH3-like ドメイン (A) とヒト Fyn の SH3 ドメイン (B) の三次元構造。Heuer らの論文より転載した (上図、Heuer et al., 2004)。B においてリガンドであるプロリンリッチなペプチドを緑色で、リガンドとの結合に重要なアミノ酸の側鎖を黄色で示している。A において、これらのアミノ酸残基にあたる ADAP のアミノ酸側鎖を同様に黄色で示す。

構造解析に用いられたヒト p120-ADAP およびヒト Fyn の SH3 ドメインのアミノ酸配列を下表に示した。ヒト p120-ADAP の配列の中で、Heuer らが SH3-like ドメインとして定義した部位を太字で表記し、上図の黄色で示したアミノ酸を赤字で示した。また Heuer らが表記したアミノ酸番号と、実際の全長配列のアミノ酸番号 (括弧内の数字) を対応させた。青字のチロシン残基は本研究で言及している Tyr⁸⁰⁷ にあたる部位である。

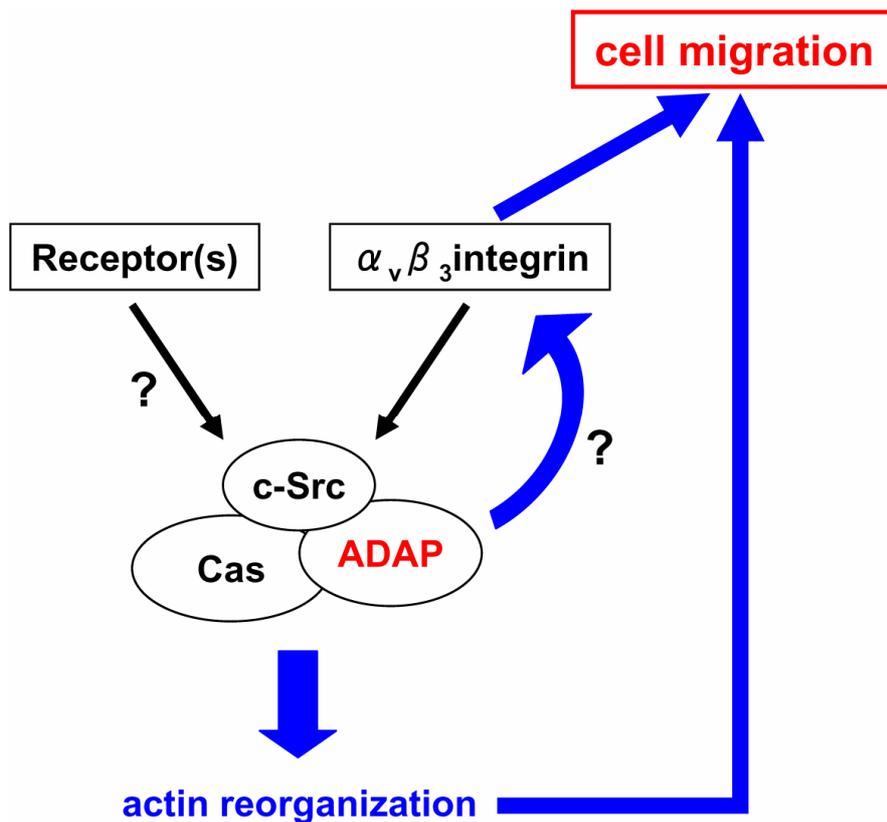


参考図 6 c-src 発現抑制細胞株における多核破骨細胞の形成阻害

RAW264 細胞に *c-src* アンチセンス発現ベクターを導入し、*c-Src* の発現が抑制されたクローンを樹立した (上図)。これらの細胞を破骨細胞へと分化誘導した結果、多核の破骨細胞形成が阻害されていた (下写真、*Bar*, 100 μ m)。

総括

本研究では、破骨細胞においてADAPをc-Srcの新規会合タンパク質として同定し、またc-Srcの酵素活性依存的にADAPがチロシンリン酸化され、c-Srcと会合することを明らかにした。またこの会合には、これまでに報告がないリン酸化チロシンTyr⁸⁰⁷が必要であることを見出した。RAW264 細胞においてADAPの発現を抑制すると単核破骨細胞の細胞遊走と多核破骨細胞の形成が阻害され、また単核破骨細胞でCasのリン酸化が減少していた。これらのことから、ADAPがc-SrcによるCasのリン酸化において重要な役割を果たし、このシグナル伝達が単核破骨細胞における細胞遊走を制御する1つのメカニズムとして機能することが示唆される。そしてその結果、多核破骨細胞の形成が促進されるのではないかと考えている(下図)。



謝辞

本研究を行うにあたり、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました当研究室の竹家達夫教授、宋戸知行助教授、石田教弘助手、与語圭一郎助手に厚く御礼申し上げます。また未発表データを提供して下さいました与語圭一郎助手に重ねて御礼申し上げます。またこの五年間、常に叱咤激励し合った同期の秋山元英君にも心より感謝いたします。

本研究はバイオ COE プロジェクトの一環として多大なサポートをして頂き、このような形で結果を残すことができました。この場を借りまして研究科の先生方や、研究施設、機器の維持に日々尽力されておりますスタッフの方々に厚く御礼申し上げます。

最後に五年の長い間、大学院生の私を見守ってくれた家族に感謝します。

参考文献

- Akagi, T., Sasai, K., and Hanafusa, H. (2003) Refractory nature of normal human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13567-13572
- Anneren, C., Cowan, C. A., and Melton, D. A. (2004) The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal. *J. Biol. Chem.* 279, 31590-31598
- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., and Hynes, R. O. (1998) Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 95, 507-519
- Black, D. S., and Bliska, J. B. (1997) Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J.* 16, 2730-2744
- Black, D. S., Marie-Cardine, A., Schraven, B., and Bliska, J. B. (2000) The *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2, 401-414
- Bouton, A. H., Riggins, R. B., and Bruce-Staskal, P. J. (2001) Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene* 20, 6448-6458
- Boyce, B. F., Yoneda, T., Lowe, C., Soriano, P., and Mundy, G. R. (1992) Requirement of pp60^{c-src} expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J. Clin. Invest.* 90, 1622-1627
- Chodniewicz, D., and Klemke, R. L. (2004a) Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim. Biophys. Acta.* 1692, 63-76.
- Chodniewicz, D., and Klemke, R. L. (2004b) Guiding cell migration through directed extension and stabilization of pseudopodia. *Exp. Cell Res.* 301, 31-37
- Coppolino, M. G., Krause, M., Hagendorff, P., Monner, D. A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J., Sechi, A. S. (2001) Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP,

SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J. Cell Sci.* 114, 4307-4318

da Silva, A. J., Ki, Z., De Vera, C., Canto, E., Findell, P., and Rudd, C. E. (1997) Cloning of a T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7493-7498

Deleuil, F., Mogemark, L., Francis, M. S., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (2003) Interaction between the Yersinia protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. *Cell. Microbiol.* 5, 53-64

Duong, L. T., Lakkakorpi, P., Nakamura, I., and Rodan, G. A. (2000) Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol.* 19, 97-105

Duong, L. T., Nakamura, I., Lakkakorpi, P. T., Lipfert, L., Bett, A. J. and Rodan, G. A. (2001) Inhibition of osteoclast function by adenovirus expressing antisense protein-tyrosine kinase 2. *J. Biol. Chem.* 276, 7484-7492

Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross F. P., and Teitelbaum, S. L. (2003) c-Fms and the αvβ3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest.* 111, 749-758

Geng, L., Raab, M., and Rudd, C. E. (1999) Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. *J. Immunol.* 163, 5753-5757

Geng, L., Pfister, S., Kraeft, S. K., and Rudd, C. E. (2001) Adaptor FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release: differential involvement of the FYB SH3 domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11527-11532

Griffiths, E. K., Krawczyk, C., Kong, Y. Y., Raab, M., Hyduk, S. J., Bouchard, D., Chan, V. S., Kozieradzki, I., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Wakeham, A., Ohashi, P. S., Cybulsky, M. I., Rudd, C. E., and Penninger, J. M. (2001) Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* 293, 2260-2263

Griffiths, E. K., and Penninger, J. M. (2002) Communication between the TCR and integrins:

role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 317-322

Hamid, N., Gustavsson, A., Andersson, K., McGee, K., Persson, C., Rudd, C. E., and Fallman, M. (1999) YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb. Pathog.* 27, 231-42

Helfrich, M. H. (2003) Osteoclast diseases. *Microsc. Res. Tech.* 61, 514-532

Heuer, K., Kofler, M., Langdon, G., Thiemke, K., and Freund, C. (2004) Structure of a helically extended SH3 domain of the T cell adapter protein ADAP. *Structure* 12, 603-610

Heuer, K., Arbusova, A., Strauss, H., Kofler, M., and Freund, C. (2005) The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain. *J. Mol. Biol.* 348, 1025-1035

Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205-2232

Honda, H., Oda, H., Nakamoto, T., Honda, Z., Sakai, R., Suzuki, T., Saito, T., Nakamura, K., Nakao, K., Ishikawa, T., Katsuki, M., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1998) Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nat. Genet.* 19, 361-365

Honda, H., Nakamoto, T., Sakai, R., and Hirai, H. (1999) p130(Cas), an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration, and cell spreading in fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 25-30

Horne, W. C., Neff, L., Chatterjee, D., Lomri, A., Levy, J. B. and Baron, R. (1992) Osteoclasts express high levels of pp60c-src in association with intracellular membranes. *J. Cell Biol.* 119, 1003-1013

Hunter, A. J., Ottoson, N., Boerth, N., Koretzky, G. A., and Shimizu, Y. (2000) Cutting edge: A novel function for the SLAP-130/FYB adapter protein in beta 1 integrin signaling and T lymphocyte migration. *J. Immunol.* 164, 1143-1147

Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M.,

Kimura, T., and Takeya, T. (2002) Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis *in vitro* and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J. Biol. Chem.* 277, 41147-41156

Jove, R. and Hanafusa, H. (1987) Cell transformation by the viral *src* oncogene. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 31-56

Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M., and Kinashi, T. (2003) RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat. Immunol.* 4, 741-748

Katagiri, K., Ohnishi, N., Kabashima, K., Iyoda, T., Takeda, N., Shinkai, Y., Inaba, K., and Kinashi, T. (2004) Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 5, 1045-1051

Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., and Matsuda, M. (1998) Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12, 3331-3336

Krause, M., Sechi, A. S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F. B., and Wehland, J. (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 149, 181-194

Kumagai, N., Ohno, K., Tameshige, R., Hoshijima, M., Yogo, K., Ishida, N., and Takeya, T. (2004) Induction of mouse *c-src* in RAW264 cells is dependent on AP-1 and NF-kappaB and important for progression to multinucleated cell formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 758-768

Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliot, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W. J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176

Lakkakorpi, P. T., Nakamura, I., Nagy, R. M., Parsons, J. T., Rodan, G. A. and Duong, L. T. (1999) Stable association of PYK2 and p130(Cas) in osteoclasts and their co-localization in

the sealing zone. *J. Biol. Chem.* 274, 4900-4907

Lowell, C. A., Niwa, M., Soriano, P. and Varmus, H. E. (1996) Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis. *Blood* 87, 1780-1792

McHugh, K. P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M. H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F. P., Hynes, R. O., and Teitelbaum, S. L. (2000) Mice lacking beta 3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest.* 105, 433-440

Miyazaki, T., Takayanagi, H., Isshiki, M., Takahashi, T., Okada, M., Fukui, Y., Oda, H., Nakamura, K., Hirai, H., Kurokawa, T., Tanaka, S. (2000) *In vitro* and *in vivo* suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced *csk* gene. *J. Bone Miner. Res.* 15, 41-51

Miyazaki, T., Sanjay, A., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W. C., and Baron, R. (2004) Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J. Biol. Chem.* 279, 17660 – 17666

Moog-Lutz, C., Peterson, E. J., Lutz, P. G., Eliason, S., Cave'-Riant, F., Singer, A., Di Gioia, Y., Dmowski, S., Kamens, J., Cayre, Y. E., and Koretzky, G. (2001) PRAM-1 is a novel adaptor protein regulated by retinoic acid (RA) and promyelocytic leukemia (PML)-RA receptor a in acute promyelocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 276, 22375-22381

Musci, M. A., Hendricks-Taylor, L. R., Motto, D. G., Paskind, M., Kamens, J., Turck, C. W., and Koretzky, G. A. (1997) Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 11674-11677

Nakamura, I., Tanaka, H., Rodan, G. A., and Duong, L. T. (1998a) Echistatin inhibits the migration of murine perfusion osteoclasts and the formation of multinucleated osteoclast-like cells. *Endocrinology* 139, 5182-5193

Nakamura, I., Jimi, E., Duong, L. T., Sasaki, T., Takahashi, N., Rodan, G. A. and Suda, T. (1998b) Tyrosine phosphorylation of p130Cas is involved in actin organization in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 273, 11144-11149

Nakamura, I., Pilkington, M. F., Lakkakorpi, P. T., Lipfert, L., Sims, S. M., Dixon, S. J., Rodan,

G. A., and Duong, L. T. (1999) Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *J. Cell Sci.* 112, 3985-3993

Nakamura, I., Lipfert, L., Rodan, G. A. and Duong, L. T. (2001) Convergence of alpha(v)beta(3) integrin- and macrophage colony stimulating factor-mediated signals on phospholipase Cgamma in perfusion osteoclasts. *J. Cell Biol.* 152, 361-373

Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T. and Nakagawa, H. (1991) CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J. Biol. Chem.* 266, 24249-24252

Peterson, E. J., Woods, M. L., Dmowski, S. A., Derimanov, G., Jordan, M. S., Wu, J. N., Myung, P. S., Liu, Q. H., Pribila, J. T., Freedman, B. D., Shimizu, Y., and Koretzky, G. A. (2001) Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 293, 2263-2265

Peterson, E. L. (2003) The TCR ADAPts to integrin-mediated cell adhesion. *Immunol. Rev.* 192, 113-121.

Raab, M., Kang, H., da Silva, A., Zhu, X., and Rudd, C. E. (1999) FYN-T-FYB-SLP-76 interactions define a T-cell receptor zeta/CD3-mediated tyrosine phosphorylation pathway that up-regulates interleukin 2 transcription in T-cells. *J. Biol. Chem.* 274, 21170-21179

Rodan, G. A. and Martin T. J. (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289, 1508-1514

Schwartzberg, P. L., Xing, L., Hoffmann, O., Lowell, C. A., Garrett, L., Boyce, B. F. and Varmus, H. E. (1997) Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in src^{-/-} mutant mice. *Genes Dev.* 11, 2835-2844

Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. and Bradley, A. (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64, 693-702

Stainer, I., and Cornelis, G. R. (1998) The Yop virulon of *Yersinia*: a bacterial weapon to kill host cells. *Clin. Microbiol. Infect.* 4, 673-676

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. and Martin, T. J. (1999)

Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 20, 345-357

Sweeney, S. E. and Firestein, G. S. (2004) Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 372-378

Takayanagi, H., Juji, T., Miyazaki, T., Iizuka, H., Takahashi, T., Isshiki, M., Okada, M., Tanaka, Y., Koshihara, Y., Oda, H., Kurokawa, T., Nakamura, K., and Tanaka, S. (1999) Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J. Clin. Invest.* 104, 137-146

Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* 3, 889-901

Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Sasaki, T., Fukui, Y., Kurokawa, T. and Suda, T. (1992) Osteoclasts express high levels of p60^{c-src}, preferentially on ruffled border membranes. *FEBS Lett.* 313, 85-89

Tanaka, S., Nakamura, I., Inoue, J-I., Oda, H., and Nakamura, K. (2003) Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *J. Bone. Miner. Metab.* 21, 123-133

Teitelbaum, S. L., and Ross, F. P. (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4, 638-649

Thomas, M., and Klibanov, A. M. (2002) Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14640-14645

Thomas, S. M., Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609

Timms, J. F., Swanson, K. D., Marie-Cardine, A., Raab, M., Rudd, C. E., Schraven, B., Neel, B. G. (1999) SHPS-1 is a scaffold for assembling distinct adhesion-regulated multi-protein complexes in macrophages. *Curr. Biol.* 9, 927-930

Togni, M., Lindquist, J., Gerber, A., Kolsch, U., Hamm-Baarke, A., Kliche, S., and Schraven, B. (2004) The role of adaptor proteins in lymphocyte activation. *Mol. Immunol.* 41, 615-630

Veale, M., Raab, M., Li, Z., da Silva, A. J., Kraeft, S. K., Weremowicz, S., Morton, C. C., and Rudd, C. E. (1999) Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J. Biol. Chem.* 274, 28427-28435

Väänänen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. and Halleen, J. M. (2000) The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* 113, 377-381

Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S., and Ruoslahti, E. (1996) Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2606-2613

Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F. S., III, Frankel, W. N., Lee, S. Y. and Choi, Y. (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* 272, 25190–25194.

Wong, B. R., Besser, D., Kim, N., Arron, J. R., Vologodskaya, M., Hanafusa, H., and Choi, Y. (1999) TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* 4, 1041-1049

Xu, W., Harrison, S. C. and Eck, M. J. (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N. Takahashi, N. and Suda, T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 3597-3602