

博士論文番号：0881009

アダプター分子 Abi-1 のチロシンリン酸化部位の同定と  
Abl キナーゼの活性制御機構

佐藤 みずほ

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 23 年 1 月 28 日提出

## 目次

序論	2-
材料および方法	7-
結果	12-
考察	17-
まとめ	21-
参考図	22-
<b>Figure</b>	<b>27-</b>
謝辞	40-
参考文献	41-

## 序論

### 1. c-Abl の酵素活性制御機構

c-Abl は、Abelson 白血病ウイルスである v-Abl の原がん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であり、細胞の増殖、分化、ストレス応答、細胞骨格形成などに関与することが報告されている。(Woodring,P.J. et al.,2005, Woodring,P.J. et al.,2003, Wang,J.Y., 2000, Barilà,D. et al., 2003)。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、骨粗しょう症などを示し、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)。c-Abl の発現は様々な組織で認められており、その細胞内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。しかしながら、c-Abl がどのようなメカニズムで活性化されるかについては不明な点が多い。

c-Abl はスプライシングの違いにより生じる N 末端にミリストイル化されていない I 型とミリストイル化された IV 型が主な転写産物であり、その構造に続いて、Cap 構造、SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメイン、プロリンリッチ領域、DNA 結合ドメイン、アクチン結合ドメインが存在している(参考図 1)。c-Abl の酵素活性は、構造変化により制御されてい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. et al., 2000, Hantschel, O. et al., 2003, Pluk, H. et al., 2002)。IV 型 c-Abl の N 末端の結晶解析の結果から、c-Abl のキナーゼドメインの疎水ポケットに N 末のミリストイル基が入り込むことで閉じた構造をとり、酵素活性が負に調節されることが明らかとなっている。

(Wang,J.Y.,2000, Hantschel, O. et al.,2003)。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遷移するかについてはほとんど分かっていない。また、ミリストイル化されない I 型 Abl に関しては、N 末端の Cap 構造と SH3 ドメインが活性制御に重要であることが報告されているが (Pluk,H.et al.,2002)、どのようなメカニズムで構造が変化し、活性を持つようになるかについては明らかではない。c-Abl の活性抑制の解除に関して、同じ非受容体型チロシンキナーゼである c-Src と比較すると、両者の構造の違いは C 末端にある。c-Src の C 末端には、リン酸化されるチロシン(Y527)が存在し、自身の SH2 ドメインと分子内相互作用することで酵素の抑制に関与する(Levinson, N. M. et al., 2008)。一方、c-Abl は C 末端領域にプロリンリッチ領域、DNA 結合ドメイン、アクチン結合ドメインなどユニークな構造を有しており、他の分子との相互作用に起因する構造変化により酵素活性が制御されることが予想される。実際、アクチン結合ドメインに結合するアクチンは、酵素活性を抑制すること

が知られている(Woodring, P. J., et al 2001)。また、我々はプロリンリッチ領域に結合するアダプター分子が酵素の活性化に重要な役割を果たしていることを見出ししている(Shishido et al., 2005; Shishido et al., 2001; Tani et al., 2003、参考図2)。

## 2. アダプター分子による c-Abl の活性化メカニズム

アダプター分子とは、タンパク質-タンパク質間相互作用に関与する機能ドメインを介して、キナーゼや酵素による基質のリン酸化や修飾を効率的に促進したり、不要な反応を防ぐことによりシグナル伝達の特異性を高める役割を担っている分子であると考えられている。我々はこれまでに、厳密に制御される c-Abl の活性がトランスに働くアダプター分子により制御されていることを報告した(Shishido, T. et al., 2005, Shishido, T et al., 2001, Tani, K. et al., 2003)。アダプター分子の1つである c-Crk は、CT10 (chicken tumor No.10) より単離されたがん遺伝子 v-Crk の相同遺伝子として同定された分子である。c-Crk は SH2 ドメインと SH3 ドメインのみで構成され、キナーゼ活性を保持していないにも関わらず、v-Crk を細胞内に過剰に発現させると細胞内タンパク質チロシンリン酸化レベルの著しい上昇と細胞のがん化を引き起こすことが確認されていた(Mayer, B.J. et al., 1990)。また我々のグループは、c-Crk が c-Abl に結合することで、c-Abl の酵素活性を正に制御するアダプター分子であることを示し、v-Crk による細胞のがん化メカニズムを解明するいくつかの知見を得た(Shishido, T. et al., 2001)。具体的には、c-Crk が保持する221番目のチロシンがリン酸化され、自身のSH2ドメインがそのリン酸化チロシンと結合することで閉じた構造をとり、c-Abl から解離し c-Abl が不活性化状態へと戻るというフィードバック阻害がなされると考えられる(参考図3、a)。一方、チロシンリン酸化部位変異体 Y221F の c-Crk では、c-Abl により c-Crk がリン酸化されないため、閉じた構造をとることができず、c-Abl は恒常的に活性化される。また、がん遺伝子産物 v-Crk では、このリン酸化部位を含む C 末端領域が欠損しているため、変異型 Y221F c-Crk と同様に c-Abl を恒常的に活性化することを示した(参考図3、b)。c-Crk の構造解析の結果、c-Crk はリン酸化と非リン酸化状態によって構造が変化することが明らかとなった(Kobashigawa 2007)。これは、我々の提唱するモデルを支持する結果であり、c-Abl による基質のリン酸化過程におけるアダプタータンパク質 c-Crk のリン酸化が酵素活性制御に重要であることを示している(Shishido et al., 2001)。

## 3. Abi-1 を介した c-Abl による基質リン酸化メカニズム

Abi-1 (Abl interactor-1) は、Abl に結合するタンパク質として同定された分子で

あり、我々は Abi-1 が c-Abl の酵素活性および基質認識にも関与するアダプター分子であることを明らかにした(Tani, K. et al., 2003)。Mena(Mammalian enabled)はアクチン結合タンパク質として知られており、最初 *Drosophila* Abl(d-Abl)ノックアウトの表現系をレスキューする遺伝子(enabled:d-Ena)として同定された。しかし、哺乳類培養細胞で Mena と c-Abl を共発現させても Mena のリン酸化はほとんど起こらないことから、Mena と c-Abl の間をつなぐ第三の分子の存在が予想された。その後、酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより、Mena タンパク質に結合するタンパク質として Abi-1 が同定され、Mena、c-Abl との共発現により、Mena が効率的にリン酸化されることを見いだした。欠損変異体を用いた詳細な解析の結果、Abi-1 は単に c-Abl と Mena を物理的につなぐアダプター分子ではなく、c-Abl に結合して c-Abl の構造を変化させることにより活性化する機能と、基質である Mena に結合し、Mena の構造を変化させそのリン酸化を受けやすい状態にするという機能を併せもつタンパク質であることを明らかにした。これらの結果より、酵素と基質の双方がアダプター分子により変化することで、効率的に触媒反応が促進されるという c-Crk の場合とは異なる「アダプター分子を介した基質リン酸化機構」に関する新しいモデルを提唱している(Tani,K. et al., 2003、Shishido,T. et al., 2005)。その後、Abi-1 を介して Abl によりリン酸化される基質として、Mena の他に WAVE2(Leng,Y. et al., 2005)、CDC2(Lin,T.Y. et al., 2004)、BCAP(Maruoka,M. et al., 2005)、VASP(Maruoka, 博士論文, 2009)が報告されており、このモデルが c-Abl の基質リン酸化過程において、より広範囲に適用される可能性が考えられる。

また、このとき、Abi-1 自身も c-Crk 同様、c-Abl によりチロシンリン酸化されることが知られている。しかし、そのリン酸化の意義は明らかにされていない。さらに、Abi-1 はセリンのリン酸化も報告されている(Biesova,Z. et al., 1997)。このセリンのリン酸は、SDS-PAGE において Abi-1 のバンドシフトと関係している。しかしながら、セリンをリン酸化する酵素などは未だ明らかとなっていない。

#### 4. Mena、VASP、WAVE2 のチロシンリン酸化の意義

これまでに、Abi-1はアクチンフィラメントの重合を制御するWAVE複合体の構成因子であること、c-AblとWAVE複合体を繋ぐ因子であることが示された(Echarri, A. et al., 2004, Innocenti,M. et al., 2004)。また、PDGFレセプターの下流で活性化されたc-AblがWAVE複合体中のWAVE2をリン酸化することが膜ラップリング形成に重要であり、この時Abi-1がc-AblとWAVE2の直接的な結合を媒介することが報告されている(Stuart,J.R. et al., 2006、Hirao, N. et al., 2006)。また、

Abi-1を介してリン酸化される他のアクチン骨格関連タンパク質として、哺乳類においてはMenaやVASPが知られている。Mena、VASPタンパク質はEvl(Ena/VASP Like)と共にEna/VASPファミリーとして知られている(Gertler, F.B. et al., 1996)。Ena/VASPファミリーは、細胞接着、極性化、遊走時にアクチン再構築部位に会合する細胞骨格の重要な制御因子であることが報告されている(Krause, M. et al., 2003, Kwiatkowski, A.V. et al., 2007)。d-EnaはDrosophila Abl(d-Abl)によりリン酸化される基質であることが示されており、そのチロシンリン酸化部位は中央に6箇所存在し、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.B. et al., 1995)。マウス由来のMenaでは、c-Ablリン酸化部位は296番目のチロシンであることが明らかになっている(Tani, K. et al., 2003)。しかし、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おらず、リン酸化による機能制御に関しても明らかになっていない。VASPに関しては、細胞骨格制御や細胞運動に関する報告が多数なされている。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(Howe, A.K. et al., 2002, Harbeck, B. et al., 2000)。チロシンリン酸化に関しては、c-Ablとの機能的な相互作用は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(Howe, A.K. et al., 2002, Gertler, F.B. et al., 1996)。しかし近年、BCR-Ablでがん化した細胞におけるリン酸化タンパク質の網羅的な解析の結果、VASPの39番目のチロシンがリン酸化を受けることが示された(Goss, V.L. et al., 2006)。また、我々は変異体を用いた実験により実際に39番目のチロシンがAblによりリン酸化されることを確認した(Maruoka, M. 博士論文, 2009)。またその際、VASPのチロシンリン酸化は白血病に認められる接着性の亢進に関与する可能性を見出した。このようにAbi-1を介してc-Ablによりリン酸化された基質は、アクチン骨格制御に関与している可能性が考えられる。

## 5. がん化における Abi ファミリータンパク質の役割

Abiファミリータンパク質はAbi-1, Abi-2, NESH/Abi-3の3つのファミリーが存在する。我々はこれまでに、c-Ablの酵素活性制御においてAbi-1, Abi-2が正の因子、NESHは負の因子として機能することを明らかにしている(Hirao, N. et al., 2006, Ichigotani, Y., et al., 2002)。ヒトのがんとの関連では、c-Ablの染色体転座により形成された融合タンパク質BCR-Ablが、慢性骨髄性白血病(CML; clonic myeloid Leukemia)や、急性骨髄性白血病(ALL; Acute Lymphoblastic leukemia)の発症の要因となることが知られている。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でがん化した白血病細胞内ではAbi-1のチロシンリン酸化が確認されているが、そのファミリータンパク質であるAbi-2の発現は消失することが知られている(Dai,Z.H. et al., 1998)。近年、Abi-1がBCR-Ablによるがん化における細胞骨格の形成異常や、 $\beta 1$  インテグリンのクラスタリングや細胞接着能の亢進に関与することが報告されている(Li,Y. et al., 2007)。これらの報告より、BCR-AblにおいてもAbi-1を介したシグナル伝達に関与することが考えられる。

## 6. 本研究の目的

本研究はアダプター分子 Abi-1 を介した c-Abl による「新しい基質リン酸化機構」を詳細に解析し、そのメカニズムを明らかにすることにより、c-Abl の酵素制御の破綻によるがん発生機構を理解するための基盤とすることを目指した。

## 材料および方法

### 材料

#### 発現プラスミドの構築

c-Abl は、マウス 1 b 型のミリスチ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。BCR-Abl は p210 タイプを pcDNA3 またはレトロウイルスベクター pcx4BSR ベクターに組み込んだものを使用した。

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-CMV6(Sigma)と GST 融合発現ベクターである pEBG を使用した。Abi-1 Y/F 変異体は、pFLAG-CMV6 Abi-1 を template として Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて作成した。また、Abi-1 WT および、これらの変異体を EcoRI で切断し、GST 融合型として発現するためレトロウイルスベクター pGXGFP (Suzuki J, et al., 2006) へ組み込んだ。GFP 融合型として発現するため pcx4BSR-GFP へ組み込んだ。

マウス Ecotropic retrovirus receptor(EcoR)は、pcx4BSR に組み込まれたものを使用した。マウス Mena は pEBG に組み込まれたものを使用した (Tani,K. et al.,2003)。

### 細胞

HEK293T 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)に 10% fetal bovine serum(FBS)、および 1% 抗生物質を加えた培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>, 37°C で継代維持した細胞を使用した。K562 細胞は RPMI1640(Nikken)に、10%FBS、1%抗生物質、50nM 2-mercaptoethanol を加えた培地を用いて、50%CO<sub>2</sub>, 37°C で培養した。BaF3 細胞は、RPMI1640(Nikken)に、10%FBS、1%抗生物質、50nM 2-mercaptoethanol、0.2%マウス Interleukin-3 を産生するミエローマ細胞の培養上清を加えた培地を用いて培養した。CHO-S-EcoR 細胞は以前作成したものを使用した (Suzuki,J. et al.,2006)。HeLa 細胞は D-MEM に 10%FBS、および 1%抗生物質を加えた培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>, 37°C で維持した。

### 抗体

Abl の検出には 8E9(PharMingen)、C-19(Santa Cruz Biotechnology)を用いた。FLAG の検出にはM2(Sigma)、GST の検出にはC-14(Santa Cruz Biotechnology) を用いた。Abi-1 の検出には 1G9 (Tani,K. et al., 2003)を用いた。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。GFP の検出には anti-GFP(MBL)を用いた。Abi-1 のリン酸化抗体(pY213)は、目的の部位をリン酸化したペプチドを合成し、免疫をおこなったウサギから採集した抗血清より精製した(北山ラベス株式会社)。

## 方法

### HEK293T Transfection

過剰発現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  $1.0 \times 10^6$  個/2ml の濃度で 35mm dish へ撒き、5%CO<sub>2</sub>, 37°Cの条件下で一晩培養した。発現ベクターの導入には、Fugene 6 によるリポフェクション法、またはリン酸カルシウム法により導入した。遺伝子導入 24 時間後、氷冷した PBS で細胞を二回洗浄し、lysis buffer(1% Triton X-100、10mM Tris-HCl,pH7.6、50mM NaCl、30mM sodium pyrophosphate、50mM sodium fluoride、20mM β-glycerophosphate、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM sodium vanadate、20μg/ml aprotinin、1mM PMSF)で細胞を溶解した。テフロンスクレーパーを用いて細胞を掻き取り、1.5ml Tube に移した後、on ice で 15 分間静置した。その後、15,000rpm 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(piece)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 1mg 分に対して、lysis buffer により 50%スラリーとして調整した glutathione-Sepharose 4B(Amersham) 30μl を加えて 4°Cで 2 時間以上緩やかに攪拌した。その後、6,000rpm で遠心し、アプロチニンを含まない MAPK lysis buffer 500μl による洗浄操作を 3 回繰り返した。その後沈渣に 2×stop buffer 50μl を加えて 105°Cで 5 分間、熱処理した。

### Western blotting

調製した sample を 5-20-%のアクリルアミドゲルにアプライして SDS-PAGE をおこなった。その後 Immobilion-P membrane (Millipore)にタンパク質を転写し、5%スキムミルク-TBSTまたは5%BSA-TBSTを用いて室温 30分間 Blocking した。Blocking 液を除いた後、一次抗体で一晩、4°C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、Immobilon western で検出した。

## レトロウィルスの作成と感染

レトロウィルス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。遺伝子導入の6時間前に $3.0 \times 10^6$  cells/10ml で100mmシャーレに PLAT-E 細胞を播種し、retrovirus vector 7 $\mu$ g と gag-pol 遺伝子発現プラスミドである pGP、エコトロピック env 遺伝子発現プラスミドである pE-Eco(Takara Bio)を 3.5 $\mu$ g 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 0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過した後、CHO 細胞、BaF3 細胞あるいは K562 細胞に感染させた。感染 24 時間後に培地交換し、1 週間培養した。その後、GFP 陽性細胞をフローサイトメトリー(FACS Vantage SE; BD Bioscience)を用いて分取した。分取した細胞をそれぞれ増殖させた後、実験に使用した。

## 大腸菌で発現させた GST 融合タンパク質の精製

GST-Crk(a.a.120-225)タンパク質は、大腸菌 BL21 に pGEX-Crk 発現ベクターを導入し、LB-Amp+プレートで一晩培養した。

GST-Abi-1 タンパク質は、大腸菌 JM109 に pGEX6p-1-Abi-1 WT または、変異体発現ベクターを導入し、LB-Amp+プレートで一晩培養した。

シングルコロニーを 10ml の LB-Amp+培地を用い、37°Cで一晩前培養した。前培養したものを 500ml の LB-Amp+培地に移し、37°Cで 3-5 時間培養し、OD600 が 0.6 になったら、終濃度 0.1mM の IPTG を添加し、さらに 18°Cで一晩培養し、タンパク質を発現させた。6,000rpm で 30 分遠心し、上清を捨て、氷冷した PBS で 2 回洗浄した。沈殿をボルテクスし、軽く沈殿を破壊した後、沈殿 2g に対して 10ml の Lysis buffer を加え、2 時間以上 4°Cで緩やかに攪拌した。その後、lysate を 22G のシリンジに 10 回通したものを、氷冷したガラスチューブに移し 12,000rpm、4°Cで 30 分遠心した。回収した上清に 500 $\mu$ l の GSH ビーズを加え、4°Cで 4 時間以上緩やかに攪拌した。Lysis buffer で 4 回洗浄した後、500 $\mu$ l のグルタチオン溶出液(30mM 還元型グルタチオン、150mM Tris-HCL pH9.0)を加え、4°Cで 1 時間穏やかに攪拌した。6,000rpm で 2 分遠心し上清を回収した。コンタミしたビーズをクロマトディスクにより除き、透析チューブ(Bio DesignInc.)に移した。

## 透析

透析チューブに入ったサンプルを 500ml の Dialysis buffer(20mM Tris-HCL , 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH7.6)を用いて 4°Cで 1 時間透析をおこなった。さらに、新しい Dialysis buffer500ml で 1 時間透析をおこなった後、新し

い Dialysis buffer 1 L で一晩透析をおこなった。その後、透析チューブを回収し、チューブ内に残っている目的タンパク質を回収した。

### 免疫沈降法による c-Abl の精製

Kinase assay で用いる c-Abl タンパクを精製する為、c-Abl を過剰発現させた HEK293T 細胞から回収した lysate と、c-Abl と Abi-1 野生型(WT) または変異体を共発現させた HEK293T 細胞から回収した lysate のタンパク量 1mg 分に対して、Abl の抗体(C-19)を 1 $\mu$ g 加えて 4 $^{\circ}$ C で 4 時間以上緩やかに攪拌した。さらに Protein G Sepharose (Pharmacia) 30 $\mu$ l を加えて 4 $^{\circ}$ C で 2 時間以上緩やかに攪拌した。その後、6,000rpm で 2 分間遠心し、500 $\mu$ l の kinase buffer(20mM Tris-HCL pH7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT )で洗浄する操作を 4 回繰り返した。その後、沈渣に kinase buffer 100 $\mu$ l を加えたものを c-Abl タンパク質として反応に用いた。

### Kinase assay

前述の方法で精製してきた各種タンパク質と kinase buffer(+ 1mM PMSF, 10mM MgCl<sub>2</sub> 添加) を混ぜ合わせ Total 20 $\mu$ l になるように調整した。酵素反応は 0.5 $\mu$ M ATP を加え、30 $^{\circ}$ C で 15 分間おこなった。その後、SDS-PAGE sample buffer を加えて 105 $^{\circ}$ C で 5 分間、熱処理した。

### Adhesion assay

ファイブロネクチンでコートされた 96-well プレート(Biocoat; BD bioscience) に、それぞれの細胞を 5 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/100 $\mu$ l で播種し、プレートを 410rpm で 2 分間遠心し、細胞を接着させた後、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。その後 PBS で 3 回穏やかに洗浄し、接着しなかった細胞を除いた。接着した細胞は PBS で調製された 4%パラホルムアルデヒドで室温 15 分間固定した。固定液を除き、2 回 PBS で洗浄した後、蒸留水で 1% 濃度に希釈された Gentian Violet で 15 分間室温にて染色した。染色液を除き、well を水道水で十分にすすいだ後、蒸留水で調製された 0.5%Triton 50 $\mu$ l を各 well に加えて、一晩抽出した。翌日、M-T Max マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で抽出液の Abs570nm の O.D. 値を測定した。

### 質量分析法による GST-Abi-1 のリン酸化部位の検出

レトロウィルスを用いて GST-Abi-1 および c-Abl を安定的に発現する CHO 細胞を作成し、これを Abl 阻害剤であるイマチニブ(LC laboratories)を 10 $\mu$ M の濃度で添加し、24 時間培養した細胞と、非添加の細胞を培養し、6000rpm で 5 分間遠心し細胞を回収した。10ml の lysis buffer(1% triton-X-100,10mM Tris-HCl pH7.6,

50mM NaCl, 30mM sodium pyrophosphate, 20mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM sodium vanadate, 20 $\mu$ g/ml aprotinin, 1mM PMSF)で細胞を溶解した。その後、8,000rpm で 15 分間遠心して上清を lysate として回収した。タンパク質量は BCA protein assay kit(piece)を用いて濃度を測定した後、Total タンパク質量 20mg 分に対し、glutathione-Sepharose 4B(Amersham) 500 $\mu$ l を加えて 4 $^{\circ}$ C で 2 時間以上緩やかに攪拌した。その後、6,000rpm で遠心し, lysis buffer 10ml で洗浄する操作を 4 回繰り返した。その後、8% SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、CBB 染色をおこなった。目的タンパク質のバンドをゲルから切り出し、超純粋で洗った後、100%アセトニトリルで脱水と脱色をおこなった。10mM DTT/100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で膨潤した後、55mM iodoacetamide/100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  でアルキル化してから、100%アセトニトリルで 2 回脱水し、乾燥させた。目的タンパク質は、50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で調製した Lys-C とキモトリプシンで 37 $^{\circ}$ C、16 時間消化した。消化したペプチドを初めに 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /アセトニトリル(1:2, v/v)で抽出し、次に 5%ギ酸水溶液/アセトニトリル(1:2.5, v/v)で抽出した。これら抽出液を合わせ、真空エバポレーターを用いて乾燥させた後、ペプチドを 5%ギ酸水溶液に再懸濁した。このペプチドを LC/Q-TOF 質量分析器を用いて解析した。

### 細胞の免疫染色

フィブロネクチンコートしたカバーガラス上に、観察する細胞を播種し、5%  $\text{CO}_2$ , 37 $^{\circ}$ C で 2 時間静置し、細胞を接着させた。その後、PBS で 2 回洗浄し、PBS で調製した 3.7%ホルマリンで、室温、15 分間固定した。その後、TBS で 3 回洗浄し、TBS で調製した 0.5%Triton X-100 により 15 分間透過処理をおこなった。その後、TBS で 2 回洗浄し、TBS で調整した 5%BSA で 30 分間ブロッキングをおこなった。その後、一次抗体(抗 GFP 抗体、抗リン酸化 Abi-1(pY213)抗体)、続いて二次抗体(抗マウス IgG 抗体-FITC 標識、抗ラビット IgG 抗体-Texas Red)でそれぞれ 1 時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 LSM510(Carl Zeiss)で取得した。

## 結果

### 1. c-Abl との会合に関わる Abi-1 チロシンリン酸化部位の同定

アダプター分子として c-Abl の活性制御に関わる c-Crk は、c-Abl のキナーゼ活性非依存的に c-Abl と会合し、アダプター分子としての機能を果たしていることが知られている(Oda, T. et al.,1994)。そこで、Abi-1 でも同様の作用機序が見られるかどうかについて検討を行った。初めに、c-Abl と Abi-1 との結合に c-Abl の酵素活性が必要かどうかを検討するため、c-Abl WT あるいは酵素活性を持たない変異体 (KD) と GST-Abi-1 を 293T 細胞に共発現させ、GST-Abi-1 に結合するタンパク質を GST pulldown 法および Western blotting 法により確認した。c-Abl WT を発現させた細胞においては、GST-Abi-1 のリン酸化および c-Abl との結合がみられた(Fig.1 a)。しかし、c-Abl KD を発現させた細胞においては、GST-Abi-1 のリン酸化および c-Abl との結合とも見られなかった。c-Abl の阻害剤であるイマチニブを用いた場合 (data not shown)、さらに、c-Abl の抗体で免疫沈降して Abi-1 との結合を確認した場合においても同様の結果が確認された(Fig. 1 b)。これらの結果は、少なくとも 293T 細胞過剰発現系においては、Abi-1 は c-Abl によってチロシンリン酸化されること、さらにそのリン酸化が c-Abl との結合に必須であることを示唆している。

次に、c-Abl による Abi-1 のチロシンリン酸化様式を理解するために、CHO 細胞による GST-Abi-1 と c-Abl タンパク質高発現システムと質量分析法を利用して Abi-1 のチロシンリン酸化部位の同定を試みた。具体的には、GST-Abi-1 と c-Abl を安定的に発現する CHO 細胞を、イマチニブ存在下 (10mM) または非存在下で 24 時間培養した。その後、GST pull down をおこない、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後、CBB 染色、および Western blotting により検出した。その結果、GST-Abi-1 は c-Abl キナーゼによりリン酸化されており、イマチニブ処理によってこのリン酸化が抑えられることが確認できた (Fig.2 a)。さらに、リン酸化型および非リン酸化型 GST-Abi-1 のペプチドを LC/Q-TOF 解析した結果、Y213 と Y398 がリン酸化部位として同定された (Fig.2 b,c)。

新しく同定されたチロシンリン酸化部位をさらに確認するため、293T 細胞過剰発現系を利用した。すなわち、293T 細胞に c-Abl と GST-Abi-1 WT または該当チロシン残基をフェニルアラニンに置換した GST-Abi-1 変異体 Y213F、Y398F、Y213/398(2YF)を共発現させ、GST pulldown 法および Western blotting 法により、GST-Abi-1 のチロシンリン酸化状態を調べた。その結果、一か所置換した変異体 (Y213F あるいは Y398F) のリン酸化レベルは WT と比較して有意に減少すること、また、2YF 変異体においてはさらに顕著に減少することが認

められた(Fig.3 b,c)。このとき GST-Abi-1 と共沈する c-Abl を調べたところ、Abi-1 のチロシンリン酸化レベルと相関して共沈する c-Abl の量が減少していた(Fig.3 b,d)。さらに、c-Abl による Abi-1 のリン酸化がこれら分子間の直接の会合に拠ることを *in vitro* キナーゼ測定法により確認した。すなわち、大腸菌で発現させ、精製した GST-Abi-1 WT または各種変異体と、293T 細胞で発現させた後、免疫沈降により精製した c-Abl タンパク質を用いておこなった。Western blotting により GST-Abi-1 のリン酸化を確認した結果、WT に比べ 213F、Y398F 変異体ではリン酸化レベルの低下が認められ、2 YF ではさらに顕著な減少が認められた(Fig.4 a)。同時に、c-Abl と共沈する GST-Abi-1 の量を、抗 c-Abl 抗体で免疫沈降した後、Western blotting により確認した結果、c-Abl と共沈する GST-Abi-1 量はリン酸化部位変異体で減少した(Fig.4 b)。以上の実験結果は、c-Abl と Abi-1 が会合するためには c-Abl による Y213 および Y398 を介した Abi-1 のリン酸化が必要であることが見出された。このことは、同じアダプター分子として分類される c-Crk と Abi-1 は異なったメカニズムを通して機能することを示している。最後に、GST-Abi-1 2YF 変異体において残存レベルでチロシンリン酸化シグナルがみられたことから(data not shown)、Y213 と Y398 以外の他のリン酸化部位が存在する可能性は否定できない。

## 2. c-Abl と Abi-1 との会合様式

これまでの結果から、c-Abl と Abi-1 の相互作用とリン酸化との間には強い相関が見られた。そこで、c-Abl と Abi-1 の相互作用に関わるドメインの同定とその会合様式の検討を行った。これに関連し、v-Abl p90 の C-末端領域が Abi-1 の SH3 ドメインと結合するために必要であること (Shi, Y. et al., 1995)、また c-Abl の SH3 ドメインが Abi-1 の PXXP モチーフ(プロリンリッチ領域)との結合に関与すること(Li,Y.Z et al., 2007)などが、これまで報告されている。そこで、本研究では c-Abl と Abi-1 の結合に必要なドメインについてさらに詳細な解析をおこなった。

まず、c-Abl との結合に必要な Abi-1 の領域を同定するため、以前よりその関与が示唆されていた Abi-1 SH3 ドメインに着目した。SH3 ドメインを欠損させた変異体 ( $\Delta$ SH3) と SH3 ドメインに点変異をいれた変異体 (W421K) を作成し、これらを用いて c-Abl との結合能を解析した。その結果、W421K 変異体と  $\Delta$ SH3 変異体では、どちらも c-Abl との結合はほとんど認められなかった(Fig.5 b)。また、この時の Abi-1 のチロシンリン酸化も、両変異体において顕著に減少していた(Fig.5 b)。このことから、c-Abl による Abi-1 のリン酸化、それら両分子の会合には少なくとも Abi-1 の SH3 ドメインが関与することが明らかとなった。次に、Abi-1 との結合に関わる c-Abl 上の領域を分析した。これまでの研究で、c-Abl

SH3 ドメインの W118 とキナーゼドメインの K290 が活性に重要であることが報告されている。また、c-Abl のプロリンリッチ領域は Abi-1 の SH3 ドメインの標的となることが予測されることなどから、まず c-Abl のプロリンリッチ領域に着目した。c-Abl WT または変異体と GST-Abi-1 を 293T 細胞に共発現させ、GST pull down 法により c-Abl との結合を検討した。その結果、Abi-1 と共沈する c-Abl の量は、2ヶ所の変異をいれた P2X 変異体において WT の約半分に低下した。さらに 4 か所変異をいれた P4X 変異体では顕著に減少した。この時、Abi-1 のチロシンリン酸化レベルも同様に低下していた(Fig.6 b)。このように c-Abl のプロリンリッチ領域が Abi-1 との結合に重要である可能性が示唆されたことから、c-Abl のプロリンリッチ領域と Abi-1 との直接の会合を検討することにした。すなわち、c-Abl WT のプロリンリッチ領域と P4X 変異体のプロリンリッチ領域のみ発現する変異体を作成し、Abi-1 との結合を確認した。その結果 c-Abl WT のプロリンリッチ領域と Abi-1 の結合は確認されたが、一方の P4X 変異体のプロリンリッチ領域のみを発現させた細胞においては Abi-1 との結合は確認されなかった (Fig.6d)。また、c-Abl WT のプロリンリッチ領域と Abi-1 YF 変異体との結合においては、c-Abl WT と比べて特に目立った差は認められなかった。

以上の結果から、c-Abl と Abi-1 との会合にはそれぞれのプロリンリッチ領域ならびに SH3 ドメインが関わっていることが明らかとなった。

### 3. Abi-1 のリン酸化状態により c-Abl キナーゼ活性が制御される

c-Abl と Abi-1 の結合が Abi-1 のリン酸化に関与することが示されたことより、Abi-1 が c-Abl と結合し Abi-1 がリン酸化されることにより、c-Abl のキナーゼ活性が調節される可能性が考えられた。そこで、c-Abl のキナーゼ活性に Abi-1 のリン酸化状態がどのように影響するかどうかを調べるために GST-Crk (a.a. 120-225) を基質とする *in vitro* キナーゼ活性測定反応をおこなった。GST-Crk は、大腸菌で発現させた後、GSH beads を用いて精製した。c-Abl は、Abi-1 WT または各種変異体と共発現させた 293T 細胞から、抗 Abl 抗体を用いた免疫沈降法により調製した。精製した GST-Crk と c-Abl を ATP 存在下で反応させ、その後 Western blotting 法により GST-Crk のチロシンリン酸化を検出した。その結果、Abi-1 と共発現した細胞からの c-Abl と反応させた GST-Crk のチロシンリン酸化レベルは、c-Abl のみを発現させた細胞からのものよりも高い比活性を示した (Fig.7a)。このことから、Abi-1WT は c-Abl のキナーゼ活性を上昇させた一方、Abi-1 各種変異体においては、c-Abl の酵素比活性が約 50%に留まっていた (Fig.7b)。

#### 4. Abi-1 のリン酸化状態は c-Abl による基質 (Mena、VASP、WAVE2) リン酸化を制御する

次に、Abi-1 のリン酸化状態が c-Abl によるその基質へのリン酸化に関与する可能性を検討した。これまでに、c-Abl の基質である Mena、VASP、WAVE2 は Abi-1 を介して、そのチロシンリン酸化が促進されることが分かっている。そこで、この Mena、VASP、WAVE2 のチロシンリン酸化に Abi-1 のリン酸化状態がどのように影響するかを検討した。まず、293T 細胞の過剰発現系において、GST-Mena、GST-VASP、GST-WAVE2 それぞれと c-Abl、FLAG-Abi-1 WT あるいは FLAG-Abi-1 各種変異体の 3 者を共発現させ、GST pull down 後、Western blotting 法により Mena、VASP、WAVE2 それぞれのチロシンリン酸化レベルを確認した。その結果、Abi-1 WT と共発現したものと比較して、Abi-1 の各種変異体と共発現した Mena、VASP のチロシンリン酸化レベルが減少した(Fig.8 a,b)。しかし、WAVE2 においては、Abi-1 変異体を共発現させてもそのリン酸化レベルに影響は認められなかった(Fig.8 c)。また、c-Abl の代わりに BCR-Abl を用いた場合は、Abi-1 非存在下においても、GST-Mena と VASP の若干のリン酸化は認められたが、Abi-1 WT の共発現によりそのリン酸化レベルが亢進した。しかし、Abi-1 変異体の共発現下においては、わずかにリン酸化レベルの低下が認められた(Fig.9 a,b)。以上より、Abi-1 のリン酸化状態は、c-Abl、BCR-Abl どちらが発現した場合においても Mena と VASP のリン酸化に影響を与えるが、WAVE2 への影響はないことが分かった。

そこで、これらの違いの詳細な解析をおこなう為、リン酸化 Abi-1 と基質の結合を解析した。その結果、Mena、VASP と共沈する Abi-1 の量が、Abi-1 変異体の発現下では減少していることが分かった(Fig.8 a,b)。また、BCR-Abl を用いて同様の実験をおこなった結果も、c-Abl の場合と同様であった(Fig.9 a,b)。一方、WAVE2 では共沈する Abi-1 の量に変化はみられなかった(Fig.8 c)。これらのことから、Abi-1 のリン酸化状態が c-Abl による基質の認識にも関与するという興味深い結果が得られた。

#### 5. Abi-1 チロシンリン酸化と細胞内局在性との関連

これまでに Abi-1 の 53 番目のチロシンリン酸化が Abi-1 の核内—細胞質間のシャトリングに重要である(Proepper,C. et al., 2007)と言う報告があることから、Y213 および Y398 のチロシンリン酸化が Abi-1 の細胞内局在性に影響する可能性が考えられた。そこで、この可能性を検討するために、c-Abl と Abi-1WT または変異体を共発現させ、各種チロシンリン酸化型 Abi-1 の細胞内局在を解析した。HeLa 細胞に GFP-tag を付加した Abi-1 WT または変異体を c-Abl と共発現させた細胞における Abi-1 の局在を観察したが、どちらも細胞質と辺縁部に集積が見ら

れ、特にリン酸化状態による違いは認められなかった(Fig.10)。

## 6. Abi-1 は BCR-Abl による細胞接着性制御に関わる

これまでに、BCR-Abl 発現によりがん化した白血病細胞は、接着性が増加し、組織への浸潤能を獲得することが知られている。一方、これまでの研究で、BCR-Abl によるがん化過程において、Abi-1 が接着性と浸潤能に関与することも報告されている (Li,Y et al., 2007、Yu,W. et al., 2008、Sun,X. et al., 2007)。これらのことから、Abi-1 のチロシンリン酸化状態が細胞の接着性の制御に関与する可能性が考えられた。そこで、マウス pro-B 細胞株である BaF3 細胞に BCR-Abl を導入した白血病モデル細胞と、BCR-Abl でがん化したヒト白血病細胞株である K562 細胞に、GFP-Abi-1 WT または変異体を導入した細胞株を樹立し(Fig.11 a)、細胞接着能への影響を解析した。その結果、BaF3 細胞において、BCR-Abl を導入することでフィブロネクチンへの接着性は上昇した。また、そこへ GFP-Abi-1 WT を発現させるとさらに接着性は亢進した。一方、GFP-Abi-1 Y213 と Y398 を発現させた細胞は WT を発現した細胞と比較して接着能の低下が認められた。さらに、2 YF 変異体においては空ベクターを感染させた細胞と同程度にまで接着能が減少した(Fig.11 b)。K562 細胞においても同様の結果が認められた(Fig.11 c)。このことから、Abi-1 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。

## 考察

### 1. Abi-1 の新規チロシンリン酸化部位 (Y398) の同定

アダプター分子がリン酸化される現象は、c-Crk においてよく研究されており、c-Crk は c-Abl と結合し、活性化された c-Abl により自身がリン酸化されることで構造変化を引き起こし、結果として c-Abl との結合能を失い再び酵素活性を負に制御することが報告されている (Shishido, T. et al., 2002)。一方、もう一つのアダプター分子である Abi-1 に関しても、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 による基質へのリン酸化反応を促進することを見出しており (Tani, K., et al., 2003)、この時 Abi-1 自身も c-Abl によりリン酸化されることが知られていた。本研究において、Abi-1 と c-Abl の結合には c-Abl のキナーゼ活性が必要であり、Abi-1 がリン酸化されることが結合に重要であることを見出した。この知見は、同じアダプター分子として分類される c-Crk と Abi-1 との間での作用メカニズムの相違点を明らかにしたものである。

次に、質量分析法により Abi-1 のリン酸化部位の同定を行い、Y213 と Y398 のリン酸化部位を同定した。Y213 のリン酸化については、近年他のグループから報告があったが (Xiong, X.L. et al., 2008)、Y398 のリン酸化は新しく同定したものである。また、Y53 もリン酸化されるという報告があるが (Proepper, C. et al., 2007)、我々の条件下では検出することが出来なかった。その理由として、質量分析の前におこなうペプチドの断片化の際に、使用する消化酵素の種類により検出されにくい部位が生ずることがあり、今回使用したトリプシンとキモトリプシンの組み合わせでは、Abi-1 の全アミノ酸に対し、約 65% のカバー率であり、53 番目を含むペプチド断片がカバーされなかった可能性が考えられる。さらに、Y213、Y398 をフェニルアラニンに置換した変異体を作成し、293T 細胞発現系と精製タンパク質を用いた *in vitro* キナーゼ活性測定系により Y213、Y398 とともにリン酸化される部位であることを確認した。しかしながら、Y213 と Y398 の両方を置換した変異体においても Abi-1 のリン酸化が消失しなかった。そこで、報告のある Y53 と Y213、Y398 の 3 ヶ所すべてを置換した変異体を作成し、そのチロシンリン酸化状態を調べたが、リン酸化のバンドが消失することはなかった。従って、上記 3 ヶ所以外にも、Abi-1 の (マイナーな) リン酸化部位の存在が予想される。実際 BCR-Abl でガン化した細胞株と、BCR-Abl の分子標的治療薬 STI-571 (イマチニブ) 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 番目のチロシンと 333 番目のリン酸化が報告されている (Goss, V.L. et al., 2006, Salomon, A.R. et

al., 2003)。

## 2. c-Abl 酵素活性調節におけるリン酸化 Abi-1 の機能

Abi-1 と c-Abl の結合に関して、Abi-1 のリン酸化部位変異体で c-Abl との結合性が減少した。このことから、Abi-1 のリン酸化状態と c-Abl との結合性との間には密接な関係があることが示唆された。これまでに c-Abl の C-末端領域と Abi-1 の SH3 ドメインが結合に関与すること、また c-Abl の SH3 ドメインと Abi-1 のプロリンリッチ領域が結合に関与することが報告されているが、詳細な解析はなされていなかった。本研究において、Abi-1 の SH3 ドメインと c-Abl のプロリンリッチドメインが両分子間の結合に中枢的な役割を果たすことを明らかにした。これより、Abi-1 の Y213 と Y398 のリン酸化が c-Abl の酵素活性の亢進に必要であることが考えられた。実際、Abi-1 WT の共存下で見られた c-Abl の酵素活性は、Abi-1 変異体では約半分に抑えられていた。しかしながら、Xiong らは、Y213 のリン酸化が c-Abl の活性を抑制すると報告している (Xiong, X.L. et al., 2008)。Abi-1 のリン酸化の機能に関してこのように異なる結果が生じた理由として、以下の 2 点が考えられる。その一つは、用いた c-Abl バリエーションの違いである。彼らは N-末端にミリストイル修飾のされない I 型 c-Abl を用いたのに対し、本実験ではミリストイル化される IV 型 c-Abl で実験をおこなった。したがって、リン酸化 Abi-1 による c-Abl の酵素活性調節はミリストイル型 c-Abl に特異的なメカニズムである可能性が考えられる。もう 1 つの異なる点は、彼らはリン酸化ペプチドを用いて実験をおこなっているが、ここでは Abi-1 全長を用いている点である。Y213 リン酸化ペプチドを用いることにより、リン酸化ペプチドが c-Abl と結合してしまい、本来の Abi-1 全長と c-Abl の結合が阻害された為、キナーゼ活性が抑制された可能性が考えられる。

これらの結果から、現在我々は、c-Abl のキナーゼ活性における Abi-1 のリン酸化の役割として、Abi-1 が SH3 ドメインを介して c-Abl のプロリンリッチ領域と結合し、Abi-1 がリン酸化されることにより c-Abl-Abi-1 複合体が安定化し、c-Abl が活性をもつのではないかと考えている。さらに、興味あることに、新しく見出した Y398 は SH3 ドメイン内に存在する。Y398 は多くの SH3 ドメイン間で保存されている残基であり、立体構造的には最初の  $\beta$  シートの直後に存在すること、また他のペプチド配列との相互作用に関わる残基であることなどがわかっている。また、c-Abl と Abi-1 が相互作用する際に、Abi-1 が Homo-あるいは Hetero-dimer を作ること (Fan, P.D. et al., 2003)、その過程には SH3 ドメインが関わることを考えると、Y398 がそのリン酸化を通して、これらのプロセスに関わることを予想される。

### 3. Abi-1 を介した c-Abl による基質リン酸化

Abi-1を介し、c-Ablによりリン酸化される基質の中には、Mena、VASP、WAVE2などのアクチン骨格系に関連する分子がある。これら分子のリン酸化とAbi-1のリン酸化の関係を検討した結果、Mena、VASPにおいてはAbi-1のリン酸化状態が重要であることが示された。一方、WAVE2に関してはAbi-1のリン酸化状態は影響しなかった。これらの分子を一次構造レベルで比較すると、Abi-1との結合ドメインでの違いが注目される。Mena、VASPはそれぞれEVH1ドメインとEVH2ドメインがAbi-1のポリプロリン構造と結合するのに対し、WAVE2はWAVEホモロジードメイン(WHD)とAbi-1のWAVE結合ドメイン(WBD)が結合する。Abi-1のポリプロリン構造は、プロリンリッチ領域とSH3ドメインの間に存在するのに対し、WBDはAbi-1のN末端に存在する。したがって、Abi-1の構造から考えると、リン酸化部位の間で結合するMena、VASPの方がリン酸化の影響をより受けるのではないかと推測される。また、アクチン骨格における機能的観点から、Mena、VASPとWAVE2を比較すると、Mena、VASPはアクチンの伸長を停止させるキャッピングタンパク質を競合的に阻害することによりアクチン繊維を伸長させるが(Bear, J.E., et al., 2002)、WAVE2はArp2/3と複合体を形成し、新たなアクチンの核化と重合を促し、枝分かれ状のアクチン線維を構築することが知られている(Pollard, T.D. 2007)。このように、アクチン伸長を引き起こす点ではおなじであるが、そのメカニズムは異なっている。したがって、Abi-1のリン酸化により生じる基質選択の違いが、それに続くアクチン骨格制御に影響を与えている可能性が考えられる。

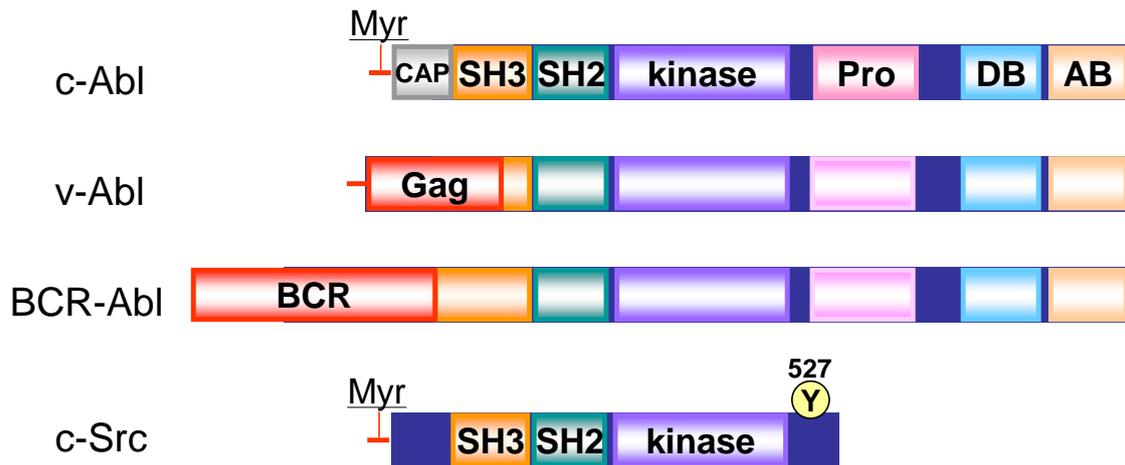
### 4. 白血病細胞における細胞接着への関与

これまでに、BCR-Abl でがん化した白血病細胞は、接着性が増加し、他組織への浸潤能を獲得することが知られている。近年、BCR-Abl によるがん化経路においてAbi-1が接着性と組織への浸潤能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)。さらに、Abi-1 を介した BCR-Abl の基質として同定された VASP の 39 番目のチロシンリン酸化が細胞接着性の獲得に関与することが示唆された(圓岡、博士論文、2009)。そこで、Abi-1 のリン酸化が細胞接着性の獲得に関与する可能性が考えられた。BCR-Abl を発現させたマウス白血病モデル細胞株である BaF3 細胞と、BCR-Abl を発現する白血病細胞である K562 細胞に、Abi-1 とそのリン酸化部位変異体を発現する細胞株を樹立し、フィブロネクチンに対する接着性を解析したところ、両細胞で変異体における接着能の低下が認められた。このことから、Abi-1 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。近年、哺乳類

細胞において葉状仮足の先端部分に局在化し、Ena/VASP タンパク質に結合する Lamellipodin(Lpd)が、c-Ablによりリン酸化されると Ena/VASP タンパク質との結合が増加し、その結果、細胞辺縁部における細胞骨格の制御に働くことが報告されている(Michael,M. et al., 2010)。従って、白血病細胞で見られた Abi-1 による接着能の亢進は、BCR-Ablによってリン酸化された Abi-1 が Mena を含む Ena/VASP タンパク質の局在や機能を調節している結果であると推測される。

## まとめ

本研究において、アダプター分子 Abi-1 による c-Abl の活性制御機構の解析を行った。その結果、Abi-1 上に新しいチロシンリン酸化部位を同定するとともに、そのリン酸化が c-Abl との会合、c-Abl による基質リン酸化反応制御(参考図 5)、さらには白血病細胞の接着性などに関わっていることを明らかにした。本研究の成果は、c-Abl の活性制御メカニズムにおけるアダプター分子 Abi-1 の新たな機能とその独自性を明らかにした点で意義があると考えられる。

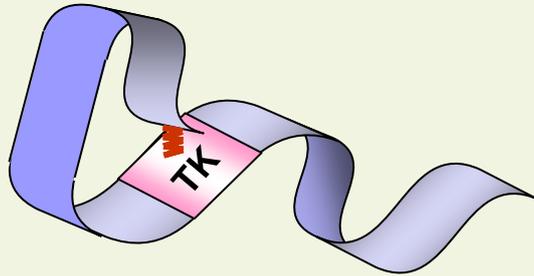


参考図1 Abl と c-Src の一次構造

c-Abl は N 末端側からミリストイル修飾、CAP 構造、SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメイン、プロリンリッチ領域、DNA 結合ドメイン、アクチン結合ドメインが保持されている。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 は、N 末の CAP 構造が BCR(Breakpoint cluster region) と入れ代わっている。

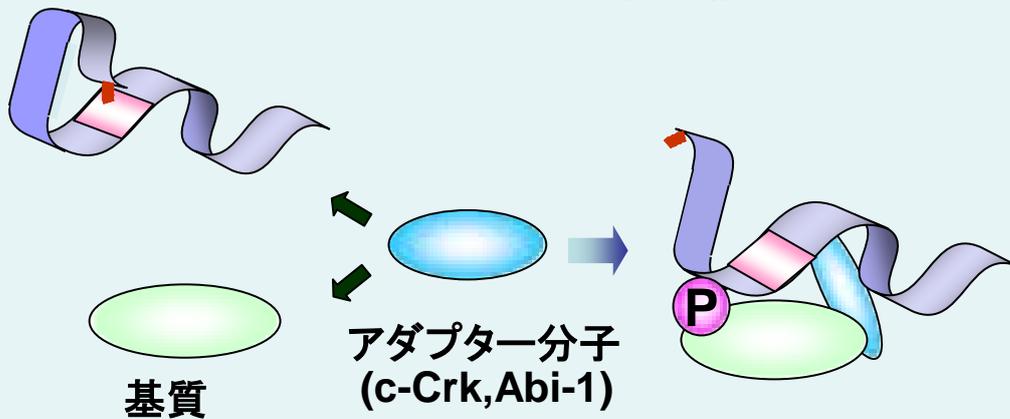
c-Src の C 末端にはリン酸化されるチロシン(Y527)が存在する。

c-Ablは通常不活性化型である



如何にして活性化するのか？

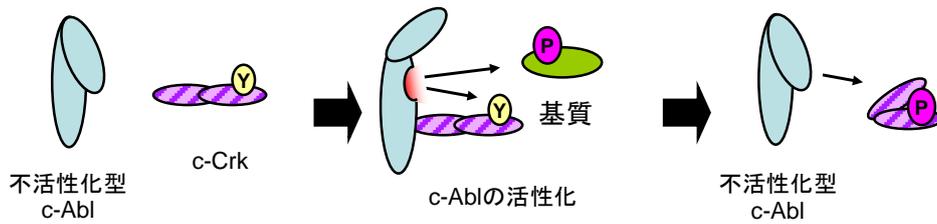
c-Ablの酵素活性制御機構モデル



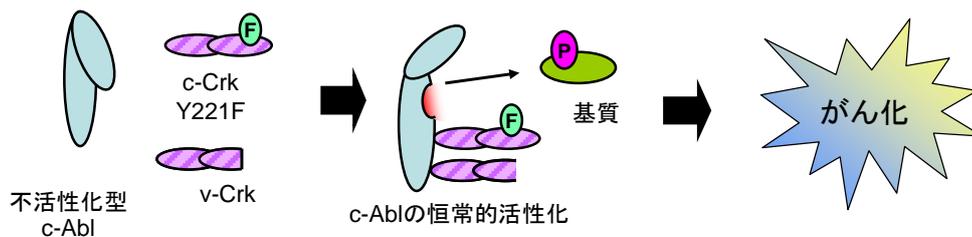
参考図 2 c-Abl の活性制御機構

c-Abl はミリスチル基(赤)がキナーゼドメイン(TK)に入り込むことで、閉じた構造をとり酵素活性が負に制御されていることが明らかとなっている。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かについて、我々はアダプター分子を介したモデルを提唱している。

a) c-Crk によるc-Ablの活性化モデル



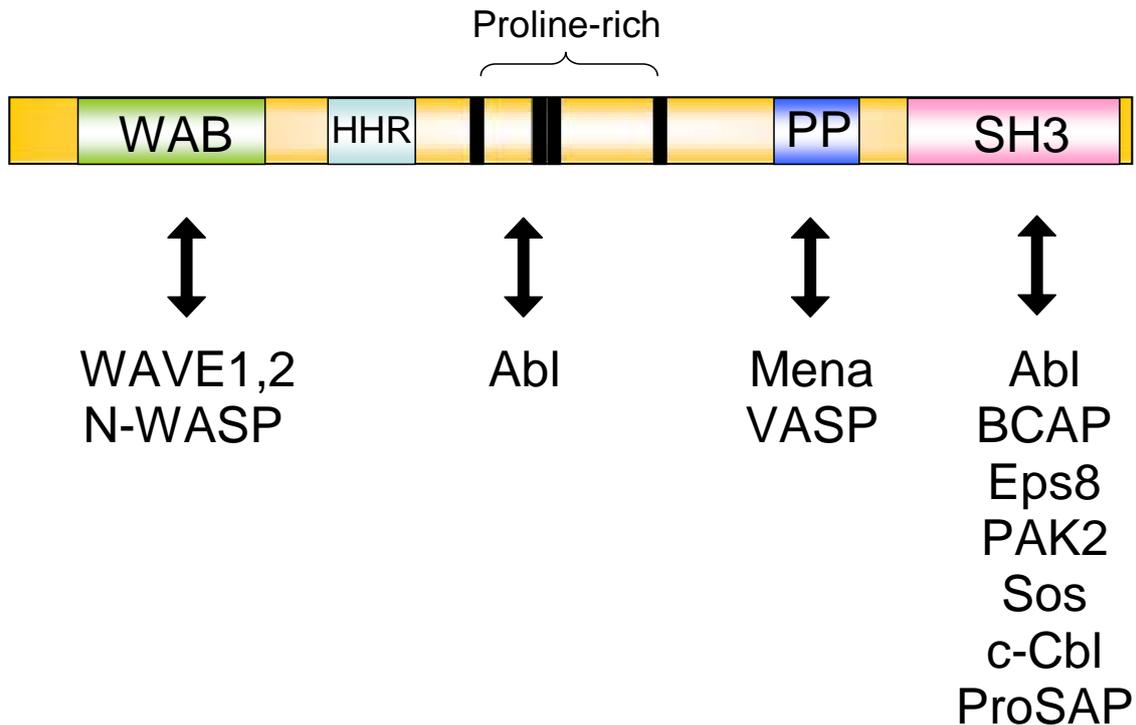
b) 変異型Crkによるc-Ablの活性化モデル



(Shishido *et al.*, Genes to Cells., 2001.)

参考図3 Crk による c-Abl 活性化モデル

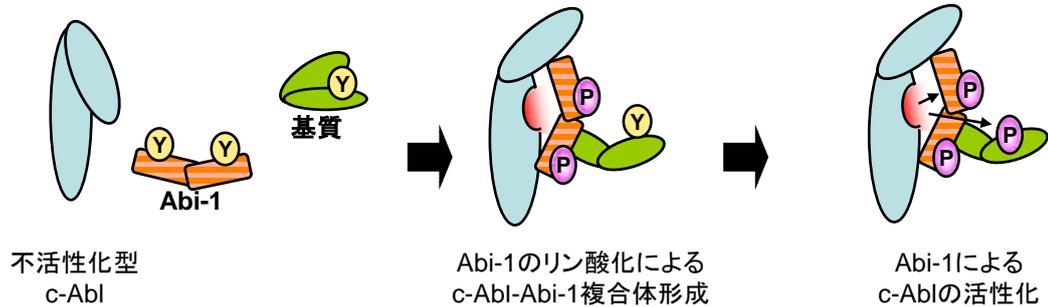
- a) c-Crk による c-Abl の活性化モデルを示す。Yは221番目のチロシンを、Pはリン酸化修飾を表す。不活性化状態の c-Abl は c-Crk が結合することにより活性化する。活性化された c-Abl は基質をリン酸化し、同時に c-Crk もリン酸化する。リン酸化された c-Crk は閉じた構造をとることにより c-Abl に結合できず、c-Abl は不活性化状態に戻ると考えられる。
- b) 変異型 Crk による c-Abl の活性化モデルを示す。Fは221番目のチロシンがフェニルアラニンに置換されていることを表す。不活性化状態の c-Abl は、v-Crk または c-Crk Y221F が結合することにより活性化する。活性化された c-Abl は基質をリン酸化するが、Crk をリン酸化できないため、Crk は閉じた構造をとることができず、c-Abl は恒常的に活性化すると考えられる。



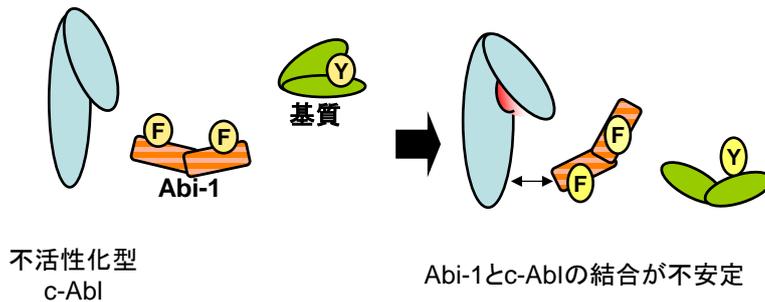
参考図4 Abi-1 の一次構造と結合タンパク質

Abi-1 はN末端から WAVE 結合ドメイン(WBD)、HOX ホモロジー領域(HHR)、プロリンリッチ領域、ポリプロリン構造(PP)、SH3 ドメインを保持している。WAVE1、WAVE2、N-WASP はWBDと相互作用し、c-Abl はSH3 ドメインとSH3 ドメインを介して結合し、Mena と VASP はポリプロリン構造と結合する。Abi-1 の SH3 ドメインに結合するタンパク質としては、BCAP、Eps8、PAK2、Sos、c-Cbl、ProSAP が知られている。

a) Abi-1 によるc-Ablの活性化モデル

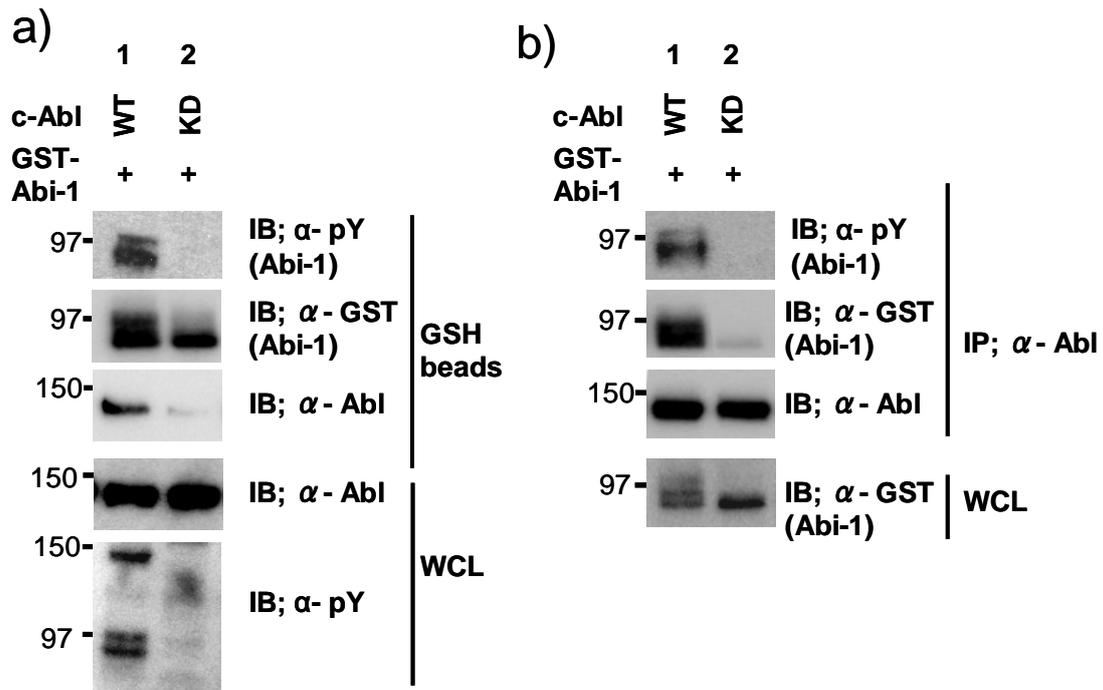


b) 変異型Abi-1によるc-Ablの活性化モデル



参考図 5 Abi-1 による c-Abl 活性化モデル

- a) Abi-1 による c-Abl の活性化モデルを示す。Y は 213 番目と 398 番目のチロシンを、P はリン酸化修飾を表す。不活性化状態の c-Abl は Abi-1 が結合することにより活性化する。活性化された c-Abl は Abi-1 をリン酸化する。リン酸化された Abi-1 は c-Abl と安定的に結合し、Abi-1 と結合する基質のリン酸化が促進される。
- b) 変異型 Abi-1 による c-Abl の活性化モデルを示す。F は 213 番目と 398 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換されていることを表す。不活性化状態の c-Abl は、Abi-1 変異体と結合しようとするが、Abi-1 のリン酸化が起こらないため、c-Abl と安定的に結合できず、c-Abl は活性化されないと考えられる。



**Fig.1** Abi-1 はチロシンリン酸化依存的に c-Abl と会合する。

- a) GST-Abi-1 と c-Abl WT または KD 変異体を 293T 細胞で共発現させ、GST pull-down 後、Western blotting により GST-Abi-1 のチロシンリン酸化を検出した。GST-Abi-1 は c-Abl WT によるチロシンリン酸化が認められたが、Abl KD では認められなかった。また、このとき KD と Abi-1 との結合はほとんど認められなかった。
- b) GST-Abi-1 と c-Abl WT または KD 変異体を 293T 細胞で共発現させ、抗 Abl 抗体を用いた免疫沈降をおこない、共沈する GST-Abi-1 のリン酸化を Western blotting により検出した。Abl WT と GST-Abi-1 の結合およびリン酸化は認められたが、KD ではどちらも認められなかった。





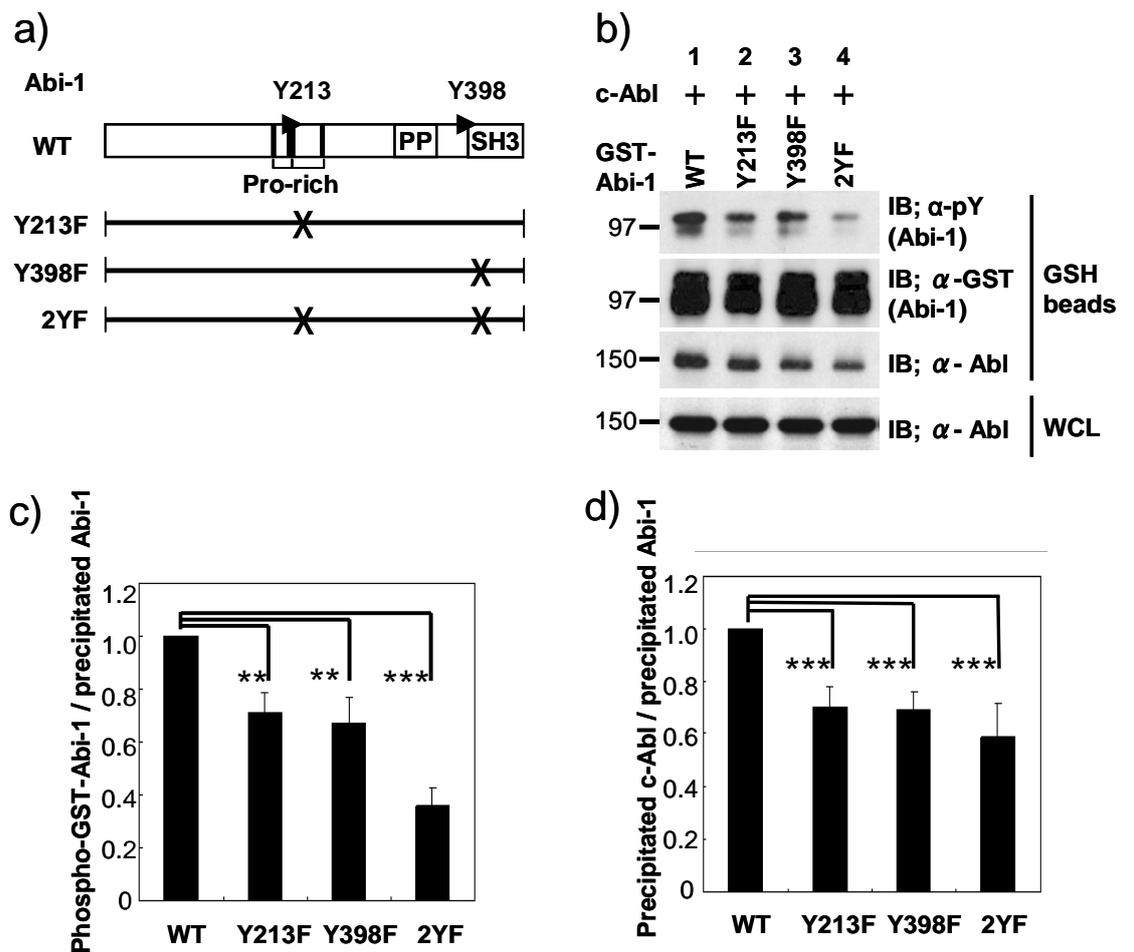
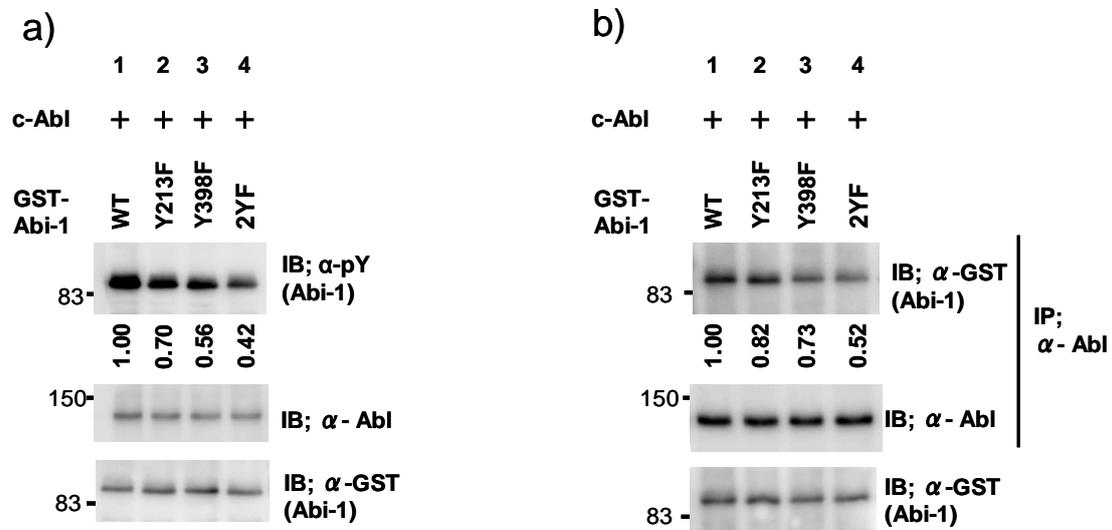
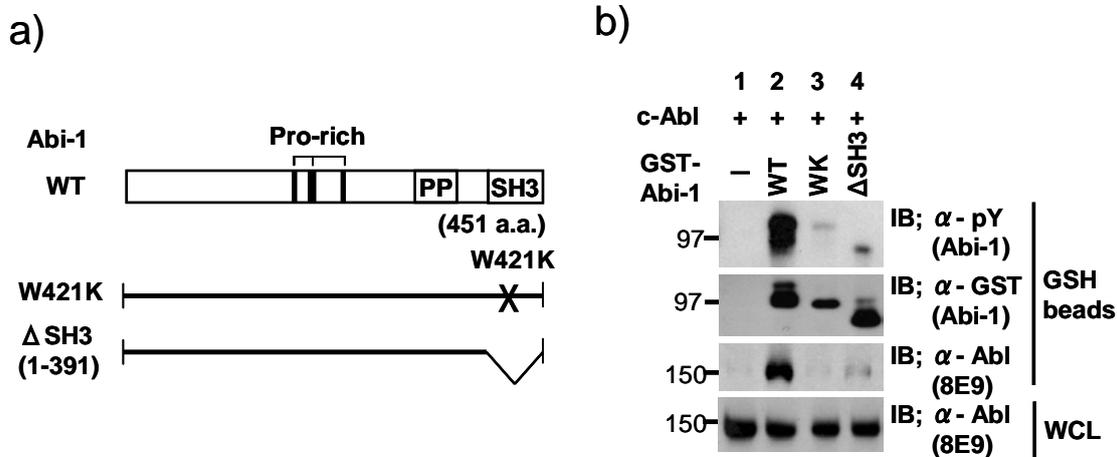


Fig.3 Abi-1 の Y213 と Y398 は c-Abl によってリン酸化される。

- a) Abi-1 のリン酸化部位を同定するため作成した変異体を示した模式図。Y213F、Y398F 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。2YF は 2 ヶ所のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体。Pro-rich ; プロリンリッチ領域、PP ; ポリプロリン構造、SH3 ; SH3 ドメイン。
- b) c-Abl と共に a)の変異体を過剰発現させ、リン酸化レベルを解析した。Y213F,Y398F 変異体でリン酸化レベルの低下が認められ、2YF ではさらに顕著な減少が認められた。また、GST-Abi-1 と共沈する c-Abl の量は、リン酸化レベルと相関して YF 変異体において減少した。
- c) b)の Western blotting の定量化。GST-Abi-1 のリン酸化レベルは、リン酸化部位変異体で減少した。\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$
- d) b)の Western blotting の定量化。GST-Abi-1 と共沈する c-Abl の量はリン酸化部位変異体で減少した。\*\*\* $P < 0.001$



**Fig.4** *In vitro*においても Abi-1 の Y213/398 は c-Abl によりリン酸化される。  
a) 大腸菌を用いて発現し、精製した GST-Abi-1 WT または変異体と、293T 細胞で発現させた後、免疫沈降により精製した c-Abl を用いて kinase assay をおこなった。Western blotting により GST-Abi-1 のリン酸化を確認した結果、213F, Y398F 変異体でリン酸化レベルの低下が認められ、2 YF ではさらに顕著な減少が認められた。  
b) a) で精製したタンパク質を用いて、c-Abl と共沈する GST-Abi-1 の量を、抗 c-Abl 抗体で免疫沈降した後、Western blotting により確認した。c-Abl と共沈する GST-Abi-1 はリン酸化部位変異体で減少した。

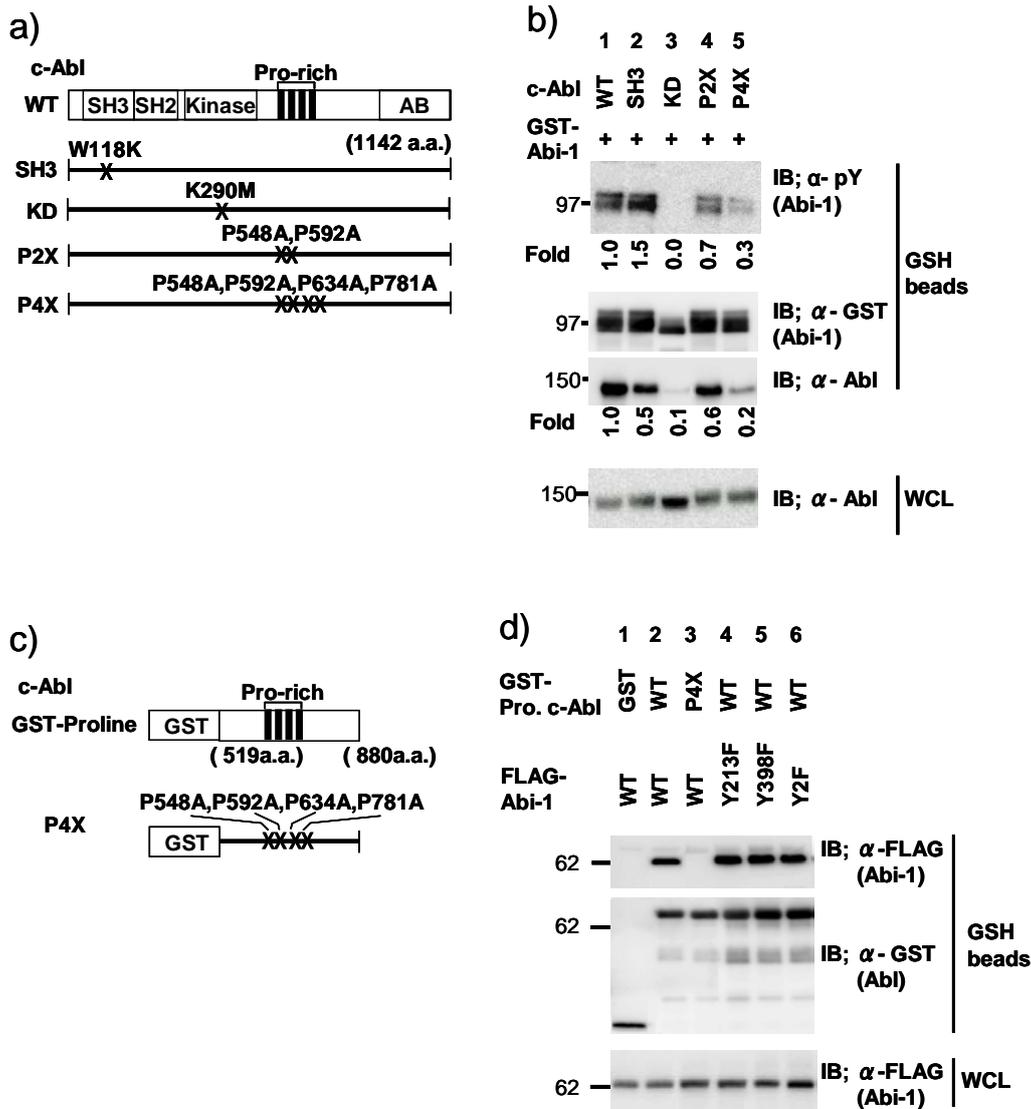


**Fig.5 Abi-1 SH3 ドメインは c-Abl との会合において必要である。**

a) Abi-1 の変異体の模式図。

Abi-1 の全長、SH3 ドメイン内の 421 番目のトリプトファン(W)をリシン(K)に置換したもの。SH3 ドメインを欠損したもの(ΔSH3)。

b) 上記の Abi-1 変異体に GST タグを付加し、c-Abl と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ、Abi-1 変異体と結合する c-Abl の量を確認した。W421K 変異体と ΔSH3 変異体は共に c-Abl との結合はほとんど認められなかった。また、この時の Abi-1 のチロシンリン酸化も、変異体において顕著に減少した。



**Fig.6** c-Abl プロリンリッチ領域は Abi-1 との複合体形成およびリン酸化に寄与する。

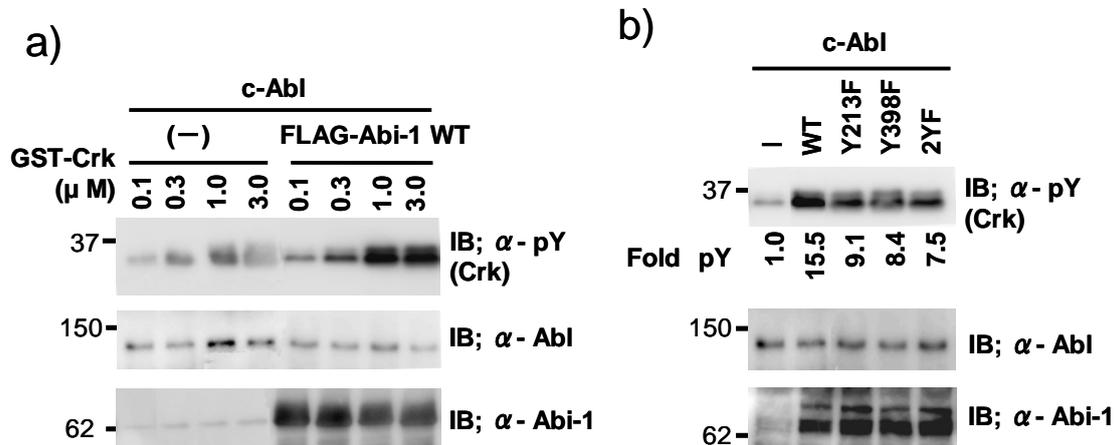
a) c-Abl の変異体の模式図。

c-Abl の全長、SH3 ドメイン内の 118 番目のトリプトファン(W)をリシン(K)に置換した変異体(SH3)、酵素活性を失くした変異体(KD)、プロリンリッチドメインの 2 ヶ所のプロリンをアラニンに置換した変異体(P2X)、プロリンリッチドメインの 4 ヶ所のプロリンをアラニンに置換した変異体(P4X)。

b) 上記の c-Abl 変異体と、GST-Abi-1 を共に HEK293T 細胞に過剰発現させ、GST-Abi-1 と結合する c-Abl の量を確認した。その結果、Abi-1 と共沈する Abl の量は、SH3 と P2X 変異体において WT の約半分に減少した。P4X 変異体ではさらに顕著に減少した。またこのとき Abi-1 のチロシンリン酸化レ

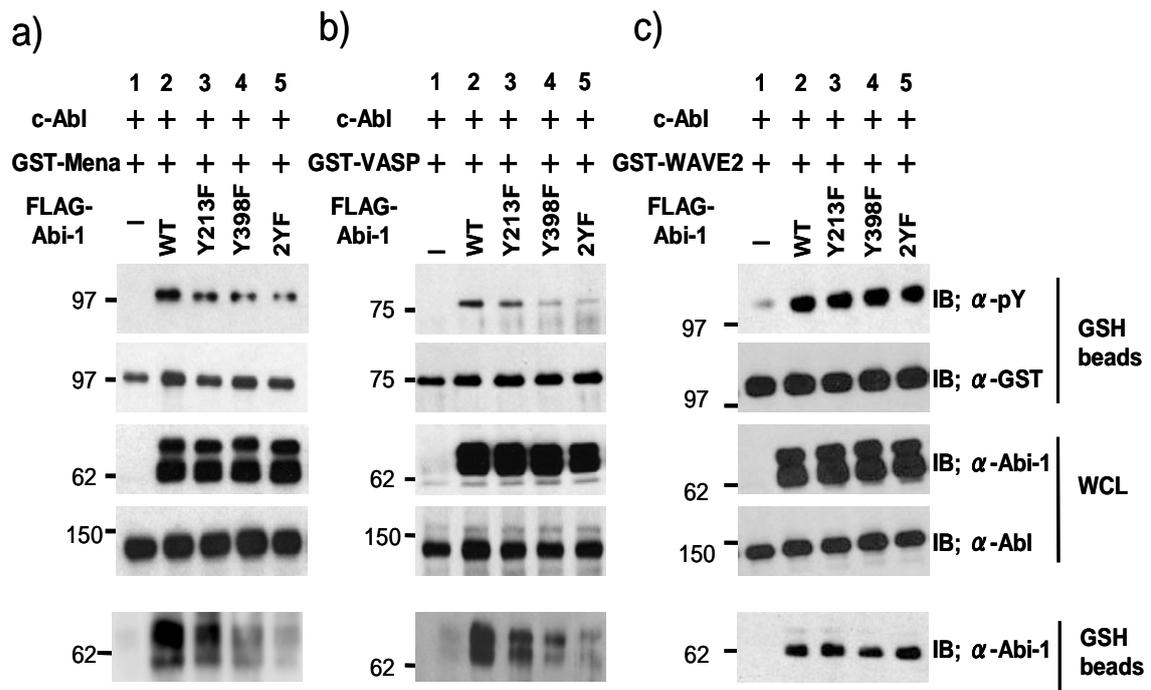
ベルも同様に減少していた。

- c) c-Abl のプロリンリッチドメインとその変異体の模式図。  
GST タグを付加した c-Abl WT のプロリンリッチドメイン(a.a.519-880)と、  
4ヶ所のプロリンをアラニンに置換した変異体(P4X)。
- d) 上記の GST-c-Abl 変異体と、FLAG-Abi-1 を共に HEK293T 細胞に過剰発現  
させ、GST-Abl と結合する Abi-1 の量を確認した。Abl WT のプロリンリッ  
チドメインと Abi-1 の結合は確認されたが、一方の P4X 変異体においては  
Abi-1 との結合は確認されなかった。また、Abl WT のプロリンリッチド  
メインと Abi-1 YF 変異体との結合においては、Abi-1 WT と比べて特に目立  
った差は認められなかった。

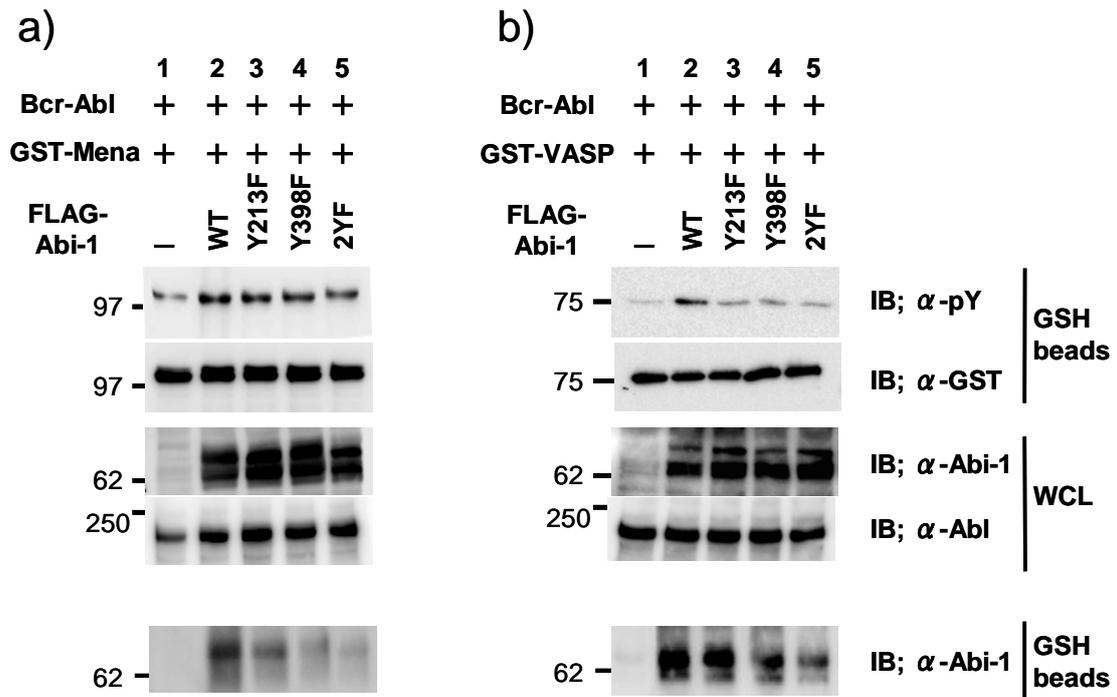


**Fig.7** Abi-1 のリン酸化は c-Abl の酵素活性を促進する。

- a) 大腸菌を用いて発現させた後、GST pull downにより精製した GST-Crk と、c-Abl 単独、または c-Abl と Abi-1 WT を 293T 細胞で共発現させた後、抗 Abl 抗体を用いた免疫沈降により精製した c-Abl を用いて、kinase assay をおこなった。Western blotting により GST-Crk のリン酸化を確認した結果、Abi-1 を共発現させることにより c-Abl の活性が上昇することが示された。
- b) GST-Crk と、c-Abl と Abi-1 WT または変異体を 293T 細胞で共発現させた後、抗 Abl 抗体を用いた免疫沈降により精製した c-Abl を用いて、kinase assay をおこなった。Western blotting により GST-Crk のリン酸化を確認した結果、Abi-1 変異体を共発現させた c-Abl の活性は、WT と比較して低下した。

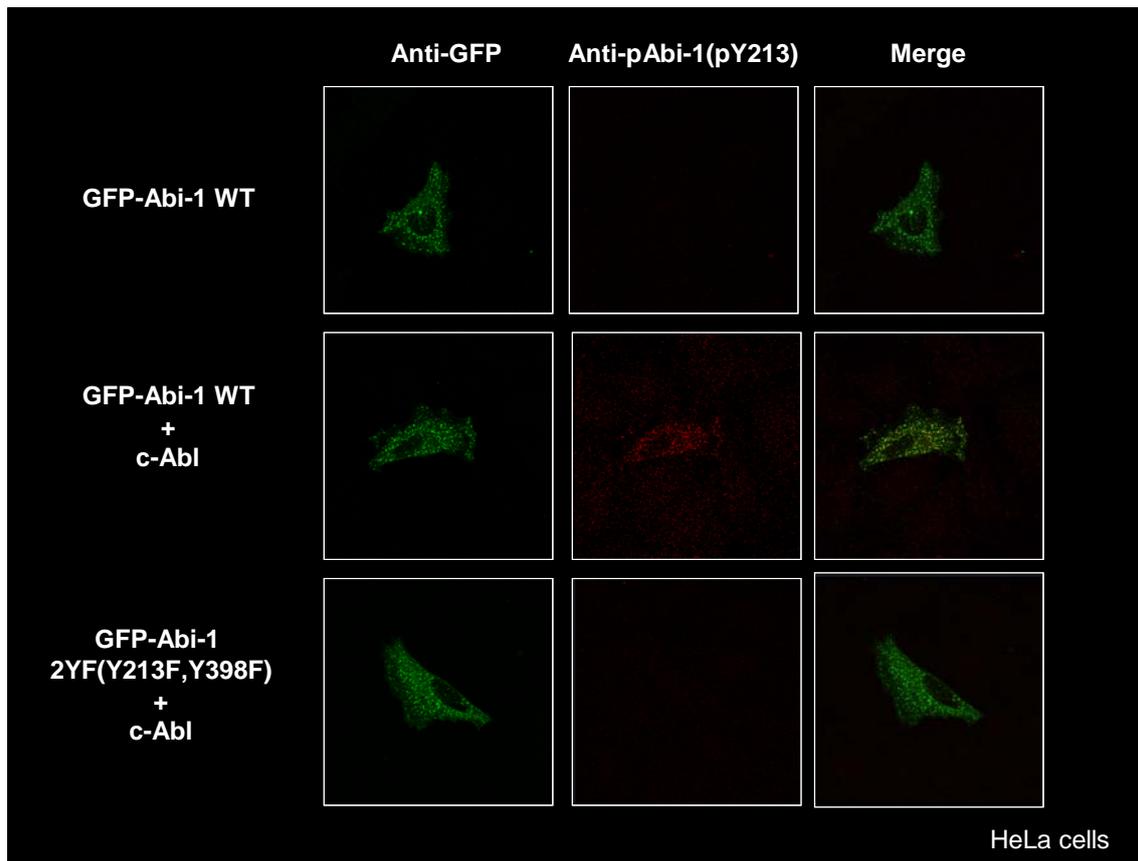


**Fig.8** Abi-1のリン酸化はc-AblによるMenaとVASPのリン酸化を促進する。  
a,b,c) 293T 細胞の過剰発現系において、GST-Mena(a)、GST-VASP(b)、GST-WAVE2(c)それぞれとc-Abl、FLAG-Abi-1 WTまたは、リン酸化部位変異体を共発現させ、GST pull-down後、western blottingによりMena、VASP、WAVE2のチロシンリン酸化レベルを確認した。その結果、Abi-1 WTと共発現したものと比較して、Abi-1の各種変異体ではMenaとVASPのチロシンリン酸化レベルが減少した。しかし、WAVE2のリン酸化レベルはAbi-1のリン酸化状態に関係なく変化しなかった。さらに、GST-Mena、GST-VASP、GST-WAVE2それぞれと共沈するAbi-1の量を確認したところ、MenaとVASPではAbi-1の各種変異体との結合が減少しているものの、WAVE2ではAbi-1 WT、変異体共に同程度結合していた。



**Fig.9** Abi-1 のリン酸化は BCR-Abl による Mena と VASP のリン酸化を促進する。

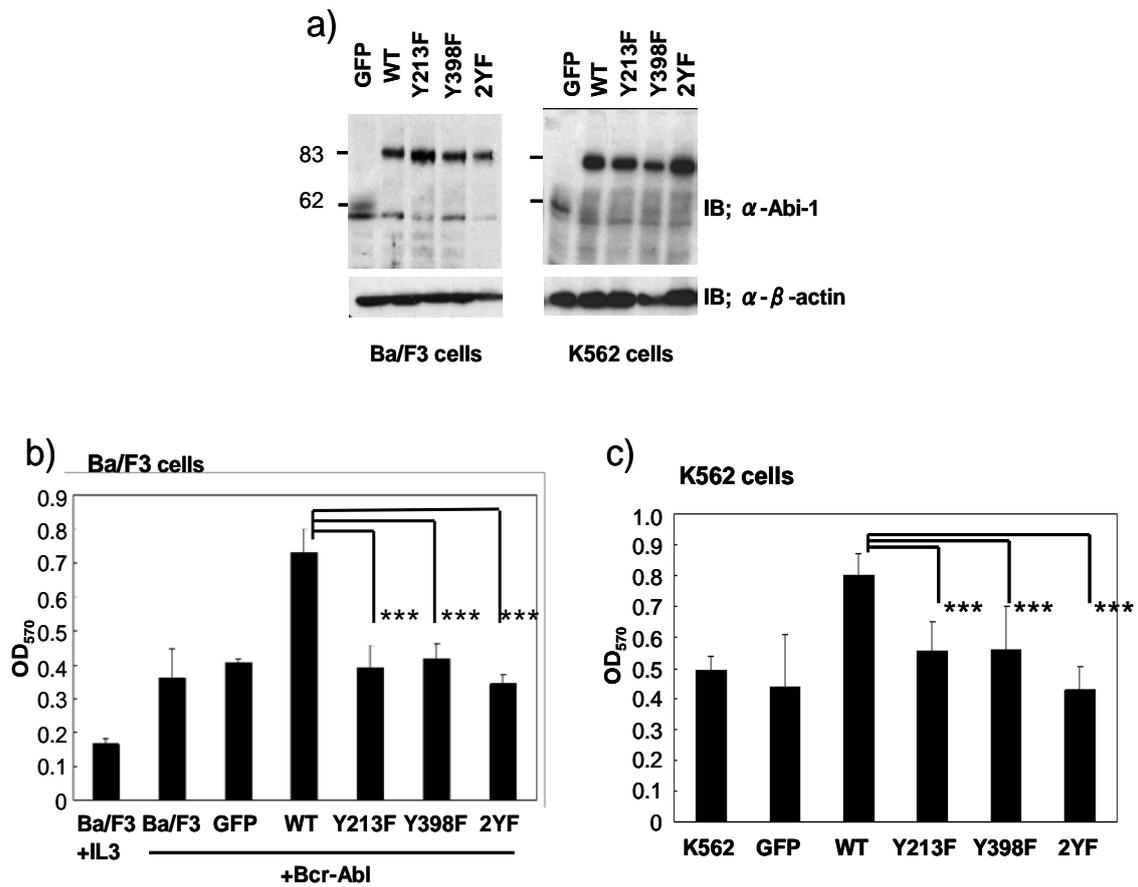
a,b) 293T 細胞の過剰発現系において、GST-Mena(a)、GST-VASP(b) と BCR-Abl、FLAG-Abi-1 WT またはリン酸化部位変異体を共発現させ、GST pull-down 後、western blotting により Mena、VASP のチロシンリン酸化レベルを確認した。その結果、Abi-1 の各種変異体では Mena と VASP のチロシンリン酸化レベルがわずかに減少した。さらに、GST-Mena、GST-VASP それぞれと共沈する Abi-1 の量を確認したところ、Abi-1 の各種変異体との結合の減少が認められた。



**Fig.10** Abi-1 のチロシンリン酸化による細胞内局在への影響。

Hela 細胞に GFP-Abi-1 WT のみを発現させた細胞（上段）と、c-Abl および GFP-Abi-1 WT を共発現させた細胞（中段）と、c-Abl および GFP-Abi-1 2YF 変異体を共発現させた細胞（下段）を抗 GFP 抗体と抗リン酸化 Abi-1 抗体（pY213）を用いて免疫染色の蛍光画像を共焦点顕微鏡により撮影した。

Abi-1 のチロシンリン酸化による局在の変化は認められなかった。



**Fig.11** Abi-1 のチロシンリン酸化は白血病細胞の細胞接着に関与する。

- a) マウス白血病モデル細胞株である BCR-Abl を発現した BaF3 細胞と、BCR-Abl を発現するヒト白血病細胞株である K562 細胞に、WT およびリン酸化部位変異型 Abi-1(Y213F,Y398F,2YF)を発現する細胞株を樹立した。
- b) 樹立した BaF3 細胞の細胞接着能を解析した結果、GFP-Abi-1 WT を発現させると接着性は亢進したが、GFP-Abi-1Y213F と Y398F を発現させた細胞の接着能は減少し、さらに 2YF 変異体においては空ベクターを感染させた細胞と同程度にまで接着能が減少した。\*\*\*P<0.001
- c) 樹立した K562 細胞の細胞接着能を解析した結果、BaF3 細胞を用いた場合と同様の結果となった。\*\*\*P<0.001

## 謝辞

本研究をおこなうにあたり、終始適切なお指導を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、宍戸知行先生、北川(石田)教弘助教、小川拓哉助教、大阪大学微生物研究所 細胞機能分野 目加田英輔教授、岩本亮准教授、東北大学大学院 生命科学研究所 渡邊直樹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、鈴木淳博士、中村尚志博士、圓岡真宏博士、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も感謝いたします。

最後に、遠方より見守り支えてくださった両親に深く感謝いたします。

## 参考文献

- Barilà D, Rufini A, Condò I, Ventura N, Dorey K, Superti-Furga G, Testi R. 2003. Caspase-dependent cleavage of c-Abl contributes to apoptosis. *Mol Cell Biol.* 23:2790-2799
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., and Gertler, F.B. 2002. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109: 509–521.
- Biesova, Z., Piccoli, C., and Wong, W.T. 1997. Isolation and characterization of e3B1, an eps8 binding protein that regulates cell growth. *Oncogene* 14:233-241.
- 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.
- Dai Z, Quackenbush RC, Courtney KD, Grove M, Cortez D, Reuther GW, Pendergast AM. 1998. Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev.* 12(10):1415-24.
- 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.
- Fan PD, Cong F, Goff SP. 2003. Homo- and hetero-oligomerization of the c-Abl kinase and Abelson-interactor-1. *Cancer Res.* 63:873-877.
- 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.
- Hantschel, O., B. Nagar, S. Guettler, J. Kretzschmar, 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.
- 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.
- 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.
- Innocenti, M., A. Zucconi, A. Disanza, E. Frittoli, L.B. Areces, A. Steffen, T.E. Stradal, P.P. Di Fiore, M.F. Carrier, and G. Scita. 2004. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat.Cell Biol.* 6:319-327.
- 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. Rubinson, 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 neuriteogenesis 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.
- Maruoka, M., Suzuki, J., Kawata, S., Yoshida, K., Hirao, N., Sato, S., Goff, S.P., Takeya, T., Tani, K., Shishido, T. 2005. Identification of B cell adaptor for PI3-kinase (BCAP) as an Abl interactor 1-regulated substrate of Abl kinases. *FEBS Lett.* 579 ; 2986-2990.
- Michael M, Vehlow A, Navarro C, Krause M. 2010. c-Abl, Lamellipodin, and Ena/VASP proteins cooperate in dorsal ruffling of fibroblasts and axonal morphogenesis. *Curr Biol.* 20:783-791
- 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.
- Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. 1994. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem.* 16:22925-8
- Pluk, H., K. Dorey, and G. Superti-Furga. 2002. Autoinhibition of c-Abl. *Cell.* 108:247-259.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36: 451–477.

- Proepper, C., Johannsen, S., Liebau, S., Dahl, J., Vaida, B., Bockmann, J., Kreutz, M. R., Guddelfinger, E. D., and Boeckers, T. M. 2007. Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *EMBO J.* 26: 1397-1409
- Salomon AR, Ficarro SB, Brill LM, Brinker A, Phung QT, Ericson C, Sauer K, Brock A, Horn DM, Schultz PG, Peters EC. 2003. Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21:443-448.
- 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 *abl*<sup>m1</sup> mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell.* 65:1165-1175.
- Suzuki J, Fukuda M, Kawata S, Maruoka M, Kubo Y, Takeya T, Shishido T. 2006. A rapid protein expression and purification system using Chinese hamster ovary cells expressing retrovirus receptor. *J. Biotech.* 126(4):463-74.
- 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.
- 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, J.Y. 2000. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene.* 19:5643-5650.

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.

Woodring PJ, Hunter T, Wang JY. 2001. Inhibition of c-Abl tyrosine kinase activity by filamentous actin. *J Biol Chem.* 276(29):27104-27110

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.

Xiong X, Cui P, Hossain S, Xu R, Warner B, Guo X, An X, Debnath AK, Cowburn D, Kotula L. 2008. Allosteric inhibition of the nonMyristoylated c-Abl tyrosine kinase by phosphopeptides derived from Abi1/Hssh3bp1. *Biochim Biophys Acta.* 1783(5):737-47.