



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

GPCRシグナル依存性Rho活性化因子PLEKHG2の蛋白質間相互作用を介した制御機構とその細胞機能

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-06-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西川, 将司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/77982

GPCR シグナル依存性 Rho 活性化因子 PLEKHG2 の
蛋白質間相互作用を介した制御機構とその細胞機能

Cellular functions of regulation mechanisms of PLEKHG2,
a Rho family small G-protein-specific guanine nucleotide exchange factor,
by protein-protein interaction

2019

西川 将司

目次

序論	1
本文	
第一章 FHL ファミリーの GPCR シグナルによる PLEKHG2 調節機構への影響	
第一節 緒言	12
第二節 実験材料及び実験方法	14
1. プラスミド	
2. 細胞培養と遺伝子導入	
3. Serum response element 依存的遺伝子転写活性測定法	
4. 免疫沈降法	
第三節 結果	17
1. FHL ファミリーのアミノ酸構造の相同性	
2. PLEKHG2 と各種 FHL の相互作用	
3. FHL1A の GPCR シグナルによる PLEKHG2 調節機構への影響	
第四節 考察	23

第二章 PLEKHG2 と ABL1 の相互作用が誘導する新規細胞増殖抑制機構

第一節 緒言 27

第二節 実験材料及び実験方法 30

1. プラスミドと試薬
2. 細胞培養と遺伝子導入
3. 遺伝子転写活性測定法
4. 免疫沈降法
5. 細胞形態観察

第三節 結果 33

1. ABL1 によるチロシンリン酸化非依存的な PLEKHG2 の活性抑制
2. ABL1 による PLEKHG2 の活性抑制における蛋白質間相互作用の寄与
3. PLEKHG2 と ABL1 の相互作用による細胞内蛋白質凝集体の形成
4. PLEKHG2 と ABL1 の細胞内蛋白質凝集体形成における ABL1 のチロシンリン酸化依存的/非依存的関与の必要性
5. PLEKHG2 と ABL1 の細胞内蛋白質凝集体形成による nuclear factor- κ B シグナル依存的な細胞増殖の抑制
6. PLEKHG2 の機能に対する BCR-ABL と ABL1 の異なる作用

第四節 考察 53

総括	56
謝辞	58
参考文献	59

序論

我々ヒトを含む多細胞生物のからだは、組織とよばれる協調した細胞の集合体によって構成されている。発生過程や外的環境変化等に対し、各細胞は個体の必要に応じた分化、休止、分裂、死という挙動をとり、組織のホメオスタシスを維持している。協調性を保つ仕組みの一つとして、神経伝達物質、ホルモン、サイトカイン等の細胞外シグナルを用いた、複数の細胞に対する同時多発的制御が挙げられる。各細胞は、形質膜上及び細胞内に、細胞外シグナルを細胞内シグナルに変換するための各種受容体を有する。これらによる細胞内シグナルの時空間的制御は、適切な細胞増殖、細胞運動等の細胞応答を誘導する。

一般的に細胞内シグナルは、蛋白質群の構造変化の連鎖反応により伝達される。構造変化の例として、リン酸化酵素によるリン酸化、プロテアーゼによる切断、セカンドメッセンジャー等との結合、蛋白質-蛋白質間相互作用等が挙げられる。その中で、グアニンヌクレオチド結合蛋白質 (G 蛋白質) の役割は大きい。G 蛋白質は、細胞内で GDP または GTP と結合している。GDP と結合している構造は不活性型だが、GTP と結合している構造は活性型であり、細胞内の種々のエフェクター分子と相互作用を介してシグナルを伝達する。G 蛋白質は、一般的に内在性の GTPase 活性を有するため、結合している GTP を GDP に加水分解することで、自身を不活性化させる。シグナル伝達に関わる G 蛋白質は、三量体 G 蛋白質と、Ras に代表される Ras スーパーファミリー/低分子量 G 蛋白質に大別される。

ヒトゲノムの 2% を占め、約 700 種あると推定されている三量体 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、形質膜上に存在する主要な受容体ファミリーの一つである。GPCR に共役する三量体 G 蛋白質は、 $G\alpha$ サブユニットと $G\beta\gamma$ サブユニットから

構成されており、約 40 kDa の $G\alpha$ サブユニットに GDP もしくは GTP が結合する。三量体 G 蛋白質の形質膜への局在化は、 $G\alpha$ サブユニットの N 末端と $G\gamma$ サブユニットの C 末端への脂質付加によって規定されると考えられる。 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{12}$ のサブファミリーに大別される $G\alpha$ サブユニットは、それぞれ特定の GPCR と共役し、特異的なエフェクターを有する。一方で、 $G\beta$ サブユニットは 5 種類、 $G\gamma$ サブユニットは 11 種類以上同定されているが、現在のところ $G\beta\gamma$ サブユニットの組み合わせについて、各種 $G\alpha$ サブユニットのように明確な役割分担があるかは不明である (表 1)。

クラス	メンバー	エフェクター
Gas	Gas Gαolf	Adenylate cyclase (↑) Ca ²⁺ channel
Gai	Gai1, Gai2, Gai3 GαoA, GαoB Gat1, Gat2 Gagust Gaz	Adenylate cyclase (↓) Ca ²⁺ channel K ⁺ channel
Gαq	Gαq, Gα11 Gα14 Gα15 Gα16	PLC-β p63-RhoGEF TRIO
Gα12	Gα12, Gα13	p115-RhoGEF PDZ-RhoGEF LARG
Gβγ	Gβ (5種類) Gγ (11種類以上)	PLC-β PI3K Ca ²⁺ channel K ⁺ channel Na ⁺ channel

表 1 各種三量体 G 蛋白質のエフェクター

GDP 結合型の $G\alpha$ サブユニットは $G\beta\gamma$ サブユニットと三量体を形成している。リガンドを結合した GPCR は、構造変化を伴い、 $G\alpha$ サブユニットに結合した GDP を解離させ GTP に置換させる。GTP 結合型の $G\alpha$ サブユニットと $G\beta\gamma$ サブユニットは解離し、遊離したそれぞれのサブユニットが様々なエフェクターに作用することで、遺伝子転写活性、細胞骨格の再編成等に影響を与える。一般的に、regulator of G protein signaling (RGS) が、 $G\alpha$ サブユニットが有する内在性の GTPase 活性を賦活化し、素早く GTP 結合型から GDP 結合型に戻すことで、GPCR シグナルを収束させると考えられている (図 1)。

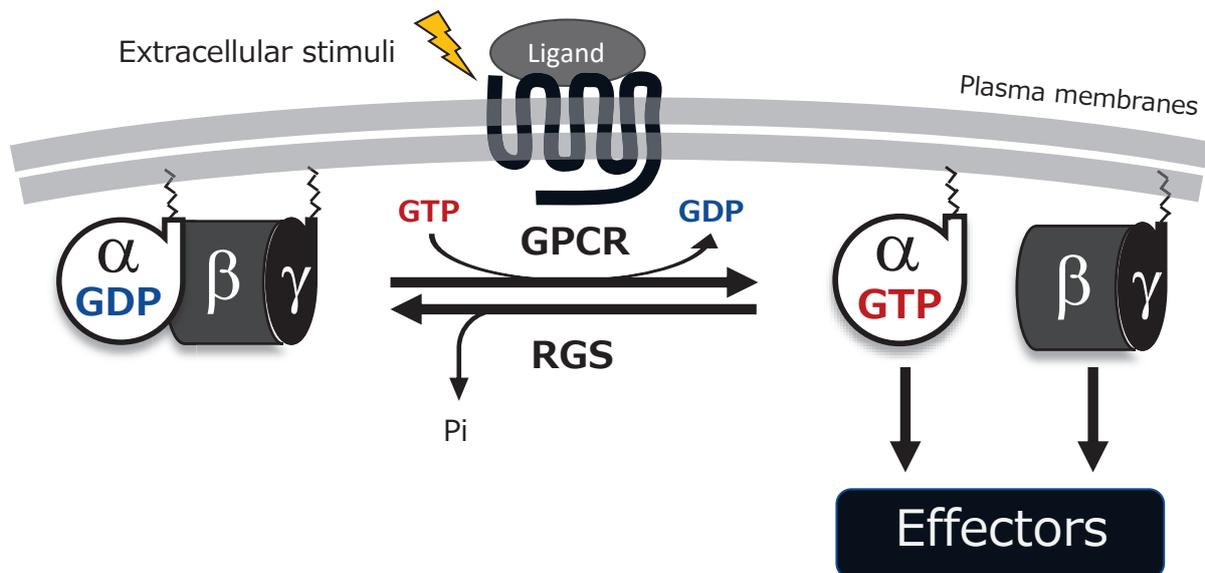


図 1 三量体 G 蛋白質の活性制御機構

一方、分子量が約 20-25 kDa の低分子量 G 蛋白質は、単量体で機能することが知られ、アミノ酸配列と機能の違いから Ras ファミリー、Rho ファミリー、Rab ファミリー、Arf ファミリー、Ran ファミリーの 5 つに大別される (表 2)。それぞれの主な細胞機能は、Ras ファミリーは増殖制御、Rho ファミリーはアクチン細胞骨格再編成を介した形態制御や運動制御、Rab、Arf ファミリーは細胞内小胞の輸送制御、Ran ファミリーは細胞質-核間の物質輸送制御であると考えられている。ほとんどの低分子量 G 蛋白質は、C 末端領域にあるシステイン残基の脂質修飾により細胞膜上で作用すると考えられている。それぞれの機能に応じて形質膜、ゴルジ、小胞体、核、エンドソーム等に局在化した低分子 G 蛋白質は、GPCR 及び受容体型チロシンキナーゼ (RTK) 等から発信される種々の活性化シグナルに応答する (図 2)。一般的に、GDP-GTP 交換活性が低いことで知られる低分子量 G 蛋白質は、各種受容体シグナルを介して活性化された guanine nucleotide exchange factor (GEF) の触媒作用により、GDP 結合型から GTP 結合型に変換され、それぞれ特異的なエフェクターを介してシグナルを伝達する。GTP 結合型の低分子量 G 蛋白質は、GTPase-activating protein (GAP) より、内在性の GTPase 活性が賦活化され、素早く GDP 結合型に戻ることが知られている。

特定の蛋白質の変異等が原因で、組織の協調的制御から外れた自律した増殖能力、運動能力を獲得した細胞は、結果的に浸潤、転移能力を有するがん細胞に形質転換してしまう。ヒト遺伝子において最初に同定されたがん原遺伝子は増殖シグナルを司る Ras である。Ras のがん遺伝子は、GTPase 活性が非常に低下する変異が生じている。正常な Ras が GAP による内在性 GTPase 活性化を受けるのに対し、変異 Ras は GAP による活性化を受けない。そのため、一度 GTP 結合型になると GDP 結合型に戻ることができず、恒常的活性化状態になってしまい、過剰な増殖シグナルを発信してしまう。同様の変異が、三量体 G 蛋白質にも生じることで、がんの原因となることもわかっている。また、GEF 等を含む G 蛋白質の活性化因子が恒常的に活性化してしまう変異でも、がんの原因となることが知られている。特に、浸潤、転移能力の獲得に関わると考えられる Rho ファミリーに特異的に作用する GEF (RhoGEF) のうち、Dbl、Vav、phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate-dependent Rac exchanger (P-REX) 等は、がん原遺伝子として報告されている (1)。

Rho ファミリー (Rho) はアクチン細胞骨格の再編成や、遺伝子転写活性制御等を介して細胞の運動、分裂、分化等に関与している。ヒトの Rho では、機能が異なる 23 種類が同定されており、そのうち特に RhoA、Rac1、Cdc42 に関する研究が進んでいる。主な機能として、RhoA はアクチンストレスファイバーの形成、Rac1 は葉状仮足の形成、Cdc42 は糸状仮足の形成に関与することが知られている (2)。一般的に細胞が運動するとき、運動方向に対し、前方では Rac1、Cdc42 が細胞体の伸展もしくは突起伸長に寄与する一方で、後部では RhoA が細胞体収縮に寄与することが知られている (3)。Rho は、他の G 蛋白質と同様に、不活性型の GDP 結合型と活性型の GTP 結合型の変換により制御されることが知られている。Rho の GDP

結合型から GTP 結合型への交換反応は RhoGEF によって促進され、GTP の加水分解反応は RhoGAP により促進される (図 3)。

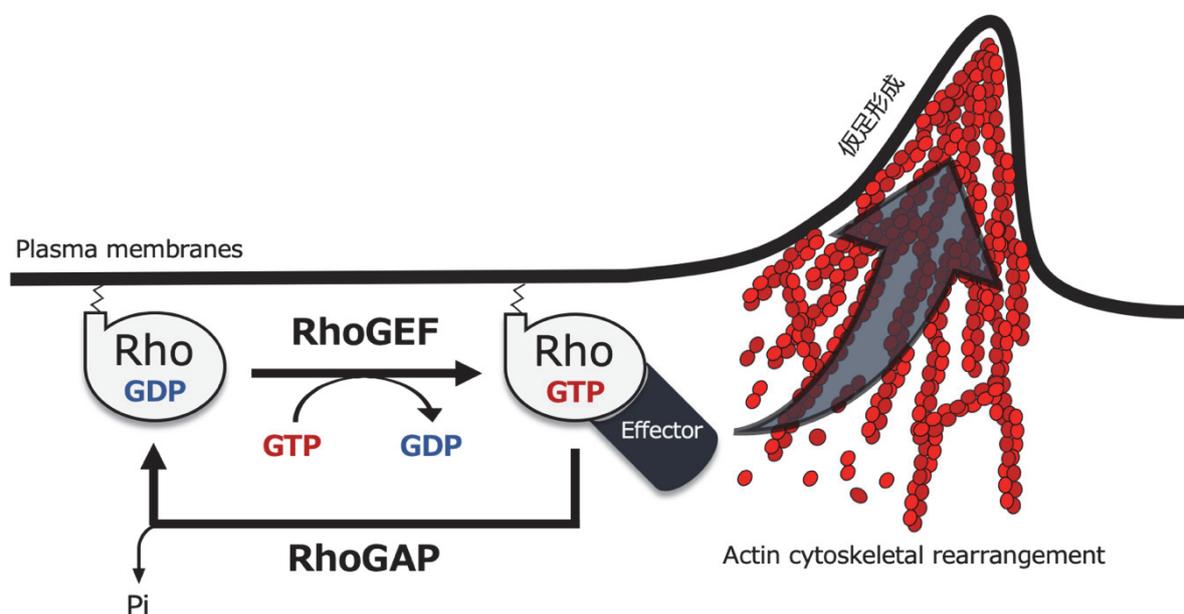


図 3 Rho の活性制御機構

RhoGEF は現在、その蛋白質構造から大きく二つのファミリーに分けられる (4)。一つは GEF の触媒活性を担う Dbl homology (DH) ドメインをもつ Dbl ファミリー RhoGEF であり、これらのほとんどが各種リン脂質と相互作用し細胞膜への局在に関わる pleckstrin homology (PH) ドメインも含有する (5)。もう一つは、DH ドメインと PH ドメインの代わりに、Dock homology region (DHR) ドメインを含有する Dock ファミリー RhoGEF である (6)。ヒトゲノム上において、Dbl ファミリー RhoGEF が約 70 種類、Dock ファミリー RhoGEF は 11 種類存在することが知られている。Dbl ファミリー RhoGEF の DH ドメインと PH ドメインは隣接しているが、通常は PH ドメインが DH ドメインと結合して覆い隠していると考えられている。

PH ドメインに phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) により生成される phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate (PIP₃) 等を含む様々なリン脂質が結合すると、PH ドメインと DH ドメインの親和性が低下し、DH ドメインが露出して活性化される (図 4)。いくつかの Dbl ファミリー RhoGEF は、RTK シグナルや Gβγ シグナルにより活性化された PI3K により、前述の分子機構に従って活性化されることが知られている。このような RhoGEF の活性制御機構が破綻すると、Rho シグナルの異常亢進による過剰な細胞運動、細胞増殖等に繋がると考えられている。

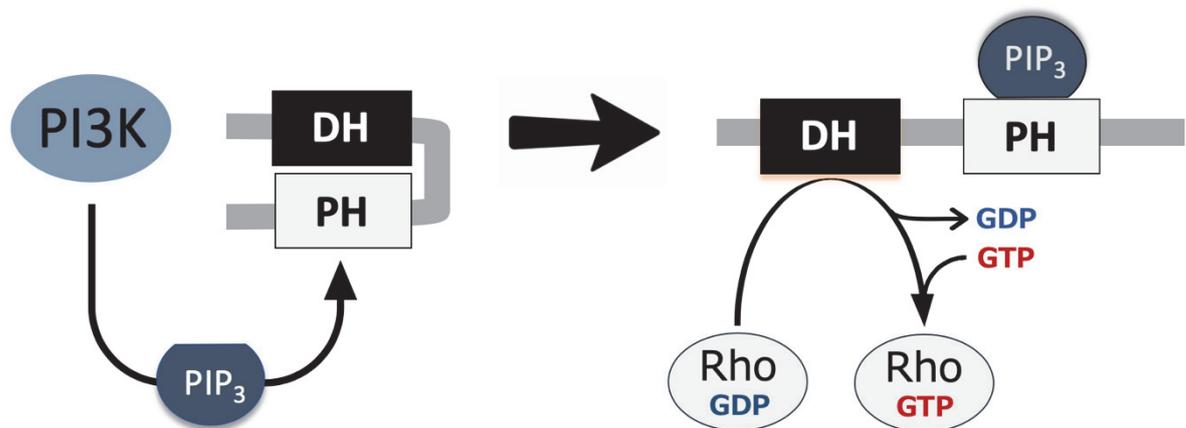


図 4 PI3K-PIP₃ による Dbl ファミリー RhoGEF の活性化

Dbl ファミリー-RhoGEF に属する p115-RhoGEF は、 $G\alpha 12$ サブユニット及び $G\alpha 13$ サブユニットに対して RGS として機能するドメイン領域 (RGS ドメイン) を有しており、活性型 $G\alpha 12$ サブユニット及び $G\alpha 13$ サブユニットの GTPase 活性を促進する。それと同時に、RGS ドメインを介した活性型 $G\alpha 12$ サブユニット及び $G\alpha 13$ サブユニットとの直接的な相互作用は、p115-RhoGEF の RhoGEF 活性を賦活化することが明らかになった (7)。この発見が、三量体 G 蛋白質サブユニットにより直接制御される RhoGEF としての初めての報告となり、 $G12$ シグナルによる Rho シグナルの活性化機構を解明する糸口となった。その後、p115-RhoGEF と同様の機構により、活性型 $G\alpha 12$ サブユニット及び $G\alpha 13$ サブユニットにより活性化される PDZ-RhoGEF、leukemia-associated RhoGEF (LARG) が同定された (8, 9)。また、異なる三量体 G 蛋白質サブユニットにより制御される RhoGEF の探索も試みられ、活性型 $G\alpha q$ サブユニットにより活性化される p63-RhoGEF、TRIO が同定された (10, 11)。これらの RhoGEF は、p115-RhoGEF のように RGS ドメインを持たないが、活性型 $G\alpha q$ サブユニットが、PH ドメイン近傍に直接相互作用し、PH ドメインによる DH ドメインの分子内抑制を解除することにより、活性化させるという分子機構が提唱されている。さらに、 $G\beta \gamma$ サブユニットと PIP_3 の直接的な相互作用により活性化される P-REX1 が同定された (12)。P-REX1 は DH ドメインと PH ドメインの他に、蛋白質間相互作用に関わる Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin (DEP) ドメイン、PSD95, DLG1 and ZO1 (PDZ) ドメイン、inositol polyphosphate-4-phosphatase (IP4P) ドメインを有する。 $G\beta \gamma$ サブユニットの相互作用領域に関しては、各種機能ドメインが関わっているという報告もあるが、詳

細は不明である。P-REX1 は前述したように、がん原遺伝子として同定されており、悪性黒色腫細胞や前立腺がん、乳がんの悪性化に関与すると考えられている。

Ueda らは、P-REX1 以外に $G\beta\gamma$ サブユニットにより活性化される RhoGEF の探索を行い、pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGEF domain) member 2 (PLEKHG2)/FLJ00018 を同定した (13)。 $G\beta\gamma$ サブユニットは PLEKHG2 の N 末端領域に存在する DH ドメインに直接相互作用することを示している。その後、Runne らが C 末端領域にも相互作用することを示し、GPCR シグナル依存的なリンパ球の細胞遊走促進に関与することも報告されている (14)。また、近年、活性型 $G\alpha_s$ サブユニットが PLEKHG2 の N 末端領域に存在する DH ドメイン近傍に直接的に相互作用することにより、RhoGEF 活性を抑制することも見出された (15) (図 5)。

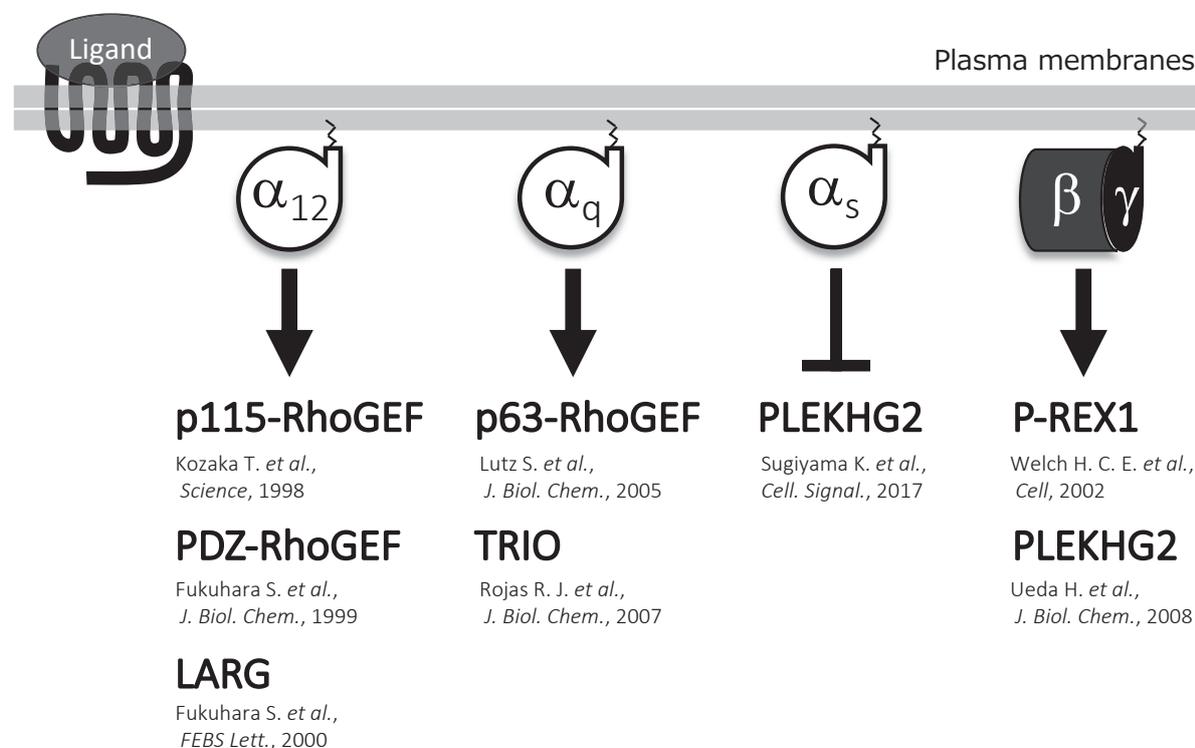


図 5 三量体 G 蛋白質により活性制御される Dbl ファミリー RhoGEF

P-REX1をはじめ、多くの RhoGEF は、細胞内の蛋白質間相互作用を含めた複数のシグナルを受け取ることができると考えられている。P-REX1 は、前述したように種々の機能ドメインを有するが、PLEKHG2 には DH ドメインと PH ドメイン以外に既知の機能ドメインは見出されておらず、一次構造から機能を推測することが困難である (図 6)。

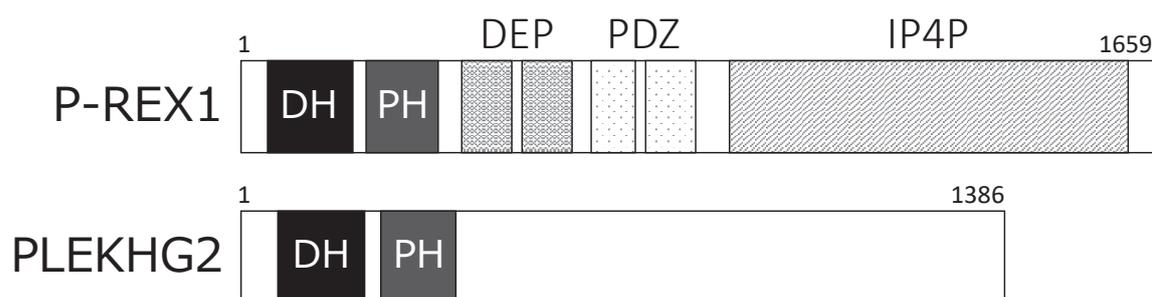


図 6 P-REX1 と PLEKHG2 の一次構造の比較

私が所属するグループでは、PLEKHG2 の細胞機能を明らかにするため、種々の蛋白質間相互作用を網羅的に検討してきた。PLEKHG2 の DH ドメイン、PH ドメインを含む N 末端領域を用いた酵母 Two-hybrid 法による網羅的解析から、PLEKHG2 の RhoGEF 活性を賦活化する four-and-a-half LIM domains (FHL) 1 を同定した (16)。さらに src homology (SH) 2 アレイを用いて、エフリン B2 受容体 (EPHB2) 刺激により活性化される非受容体型チロシンキナーゼ SRC によりチロシンリン酸化された PLEKHG2 と Abelson tyrosine kinase (ABL) 1 が相互作用することを報告した (17)。しかし、それぞれの蛋白質が PLEKHG2 の細胞機能に与える影響は、未だ不明である。本研究では、GPCR シグナル依存性 Rho 活性化因子 PLEKHG2 の蛋白質間相互作用を介した制御機構とその細胞機能の詳細を検討するため、FHL1 の GPCR シグナルによる PLEKHG2 調節機構への影響、及び、PLEKHG2 と ABL1 の相互作用が誘導する新規細胞増殖抑制機構について検討を行った。

第一章

FHL ファミリーの GPCR シグナルによる PLEKHG2 調節機構への影響

第一節 緒言

Rho は、アクチン細胞骨格の再編成に寄与し、細胞の運動性、分裂、遺伝子転写等を制御することが知られている。一般的な Rho は細胞内において、活性型である GTP 結合型と不活性型である GDP 結合型の二つの状態をもつ分子スイッチとして機能しており、GPCR を含む各種受容体シグナル等に応答した RhoGEF によって活性化される (18)。

一般的に、RhoGEF の一つのグループである Dbl ファミリー RhoGEF は、細胞内の種々のシグナルにより制御されることが報告されている (19, 20)。例えば、PLEKHG2 と同様に $G\beta\gamma$ サブユニットにより活性化されることで知られる P-Rex1 や P-Rex2 は、p21-activated kinase 1 や、protein kinase A、protein kinase C 等を含む種々のリン酸化酵素によるリン酸化によって制御されることが知られている (21-25)。近年、我々のグループの Sato らは EGF-Ras-MAPK シグナル経路による PLEKHG2 の 680 番目のスレオニンのリン酸化が、PLEKHG2 依存的な細胞形態変化を制御することを報告した (26)。また、非受容体型チロシンキナーゼの一種である SRC による PLEKHG2 のチロシンリン酸化が、PLEKHG2 と PI3KR3 や ABL1 との相互作用を誘導することも報告した (17)。さらに、 β -アクチン及び γ -アクチンが PLEKHG2 と相互作用することにより、PLEKHG2 の負の制御因子として作用することも見出した (27)。さらに、過去の研究において、four-and-a-half LIM domains (FHL) 1 は PLEKHG2 の正の活性制御因子として同定された (16)。FHL 蛋

白質が持つ LIM ドメインは、cysteine-rich double-zinc-finger 構造をもち、蛋白質間相互作用を調節することが知られており、細胞接着等を含む様々な細胞生物学的過程に関与していると考えられている。FHL ファミリーは FHL1-4 と、FHL5 として知られている activator of CREM in testis (ACT) から構成されている (28)。特に FHL1、FHL2、FHL3 は、がんの発生や成熟に関与していることが報告されている (29)。さらに、FHL1、FHL2、FHL3 は、SMAD 蛋白質と物理的及び機能的に相互作用することで、肝癌の細胞増殖を抑制することが *in vitro* と *in vivo* の実験系によって証明されている。また、FHL1、FHL2、FHL3 は C2C12 筋芽細胞の核と接着斑の両方に局在することが報告されており、FHL1、FHL2、FHL3 の過剰発現は細胞伸展と細胞運動を引き起こすことが示されている。特に、FHL1 は、インテグリン依存的な細胞骨格再編成を制御することで、筋芽細胞の接着を抑制し、細胞伸展及び細胞遊走を亢進させることが知られている (30)。FHL2 は細胞骨格の再編成や、脂質誘発性シグナル分子として機能するためにアクチンと結合し、細胞運動等を制御することが示されている (31)。また、FHL3 もアクチンに結合し、 α -actinin を制御することにより、細胞伸展やアクチンストレスファイバーの崩壊を促して細胞運動性を亢進させることから、細胞のがん化の一端を担う可能性が示唆されている (32)。これらの報告から、PLEKHG2 と相互作用する FHL1 だけではなく、FHL2 と FHL3 も Rho シグナル経路に関与している可能性が考えられた。そこで本章では、FHL2、FHL3 が PLEKHG2 関連シグナルに与える影響と、これら FHL ファミリーが、GPCR シグナルによる PLEKHG2 の調節機構に与える影響を検討した結果について論じる。

第二節 実験材料及び実験方法

1. プラスミド

ヒト FHL2a と FHL3-1 は、FHL1 と同様に、ヒト脳 cDNA ライブラリー (QUICK-Clone™ cDNA; Clontech, Mountain View, CA) から PCR を用いてクローニングした (16)。DNA 断片は SgfI/PmeI Flexi Enzyme Mix (Promega, Madison, WI) を用いて作製し、pF5A-FLAG-CMV-neo vector に導入した。pSRE.L-luciferase reporter plasmid は pRL-SV40 は Stratagene から、pRL-SV40 は、Nippon Gene から購入した。PLEKHG2 の完全長 cDNA クローンは、かずさ DNA ヒト長鎖遺伝子解読プロジェクトにより得られた。PLEKHG2 の ORF 領域は、Gateway システム (Life Technologies) を用いて pcDNA3.1-DEST47 ベクターに組み換えられた。pcDNA3.1-DEST47-PLEKHG2 から、制限酵素処理、PCR 法を用いて、pFN21A-Myc-PLEKHG2 を作製した。

2. 細胞培養と遺伝子導入

HEK293 細胞は、37°C、5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% fetal bovine serum (FBS) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて培養した。遺伝子の一過性導入には、polyethylenimine (PolySciences Inc., Warrington, PA) を用いた (33)。遺伝子導入の 6 時間後、無血清培地に置き換え、18 時間培養した。

3. Serum response element 依存的遺伝子転写活性測定法

24 well plate に細胞播種してから 24 時間後、各種遺伝子発現ベクターを一過性に導入した。遺伝子導入して 24 時間後、細胞を氷冷 PBS で一回洗浄後、passive lysis buffer (Promega) を用いて溶解させた。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) を用いて測定した。各種サンプルの活性は、コントロールベクター導入細胞の活性を用いて標準化した。

4. 免疫沈降法

6 cm dish に細胞播種してから 24 時間後、各種遺伝子発現ベクターを一過性に導入した。遺伝子導入 24 時間後、細胞を氷冷 PBS で二回洗浄し、lysis buffer (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl (Invitrogen)、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM Na_3VO_4 、0.5% Nonidet P-40、phosphatase inhibitor solution (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)、protease inhibitor solution (Roche Diagnostics))を用いて溶解させた。細胞溶解液を $16,000 \times g$ で 10 分間遠心して得られた上清に anti-Myc IgG を $1 \mu\text{g}$ 添加し、 4°C で 2 時間インキュベートした。その後、lysis buffer で平衡化した protein G-agarose (EMD Milipore, Billerica, MA) を添加し、 4°C で 1 時間インキュベートした。レジンを wash buffer (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM Na_3VO_4 、0.1% Nonidet P-40、phosphatase inhibitor solution、protease inhibitor solution) を用いて、3 回洗浄し、sample buffer を用いて結合蛋白質を溶出した。免疫沈降サンプルは、SDS-

PAGE で分離し PVDF 膜に転写した。蛋白質転写後の PVDF 膜は、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いてブロッキングし、Myc-tag もしくは Flag-tag の検出には、HRP 融合 anti-Myc IgG (Wako, Osaka, Japan) もしくは HRP 融合 anti-Flag IgG (Wako, Osaka, Japan) を用いた。各種蛋白質の可視化には、enzyme-linked chemiluminescence (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA) と LAS-4000 luminescent image analyzer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いた。

第三節 結果

1. FHL ファミリーのアミノ酸構造の相同性

FHL1 には、FHL1A、FHL1B、FHL1C という三つのアイソフォームが存在することが知られている。我々のグループの Sato らは以前に、FHL1A は FHL1B よりも PLEKHG2 と強く相互作用し、PLEKHG2 による serum response element 依存的遺伝子転写活性 (SRE 活性) を大きく上昇させることを報告した (16)。一方、FHL2 と FHL3 にもそれぞれ二種類のアイソフォームが存在する (図 1)。そのうち、FHL1A と同じように、4 つと半分の LIM ドメインを有するのは、FHL2 isoform a (FHL2a) と FHL3 isoform 1 (FHL3-1) である。これら蛋白質の全アミノ酸配列は、FHL1A と FHL2a で 48%、FHL1A と FHL3-1 で 44% であり、比較的保存されている。

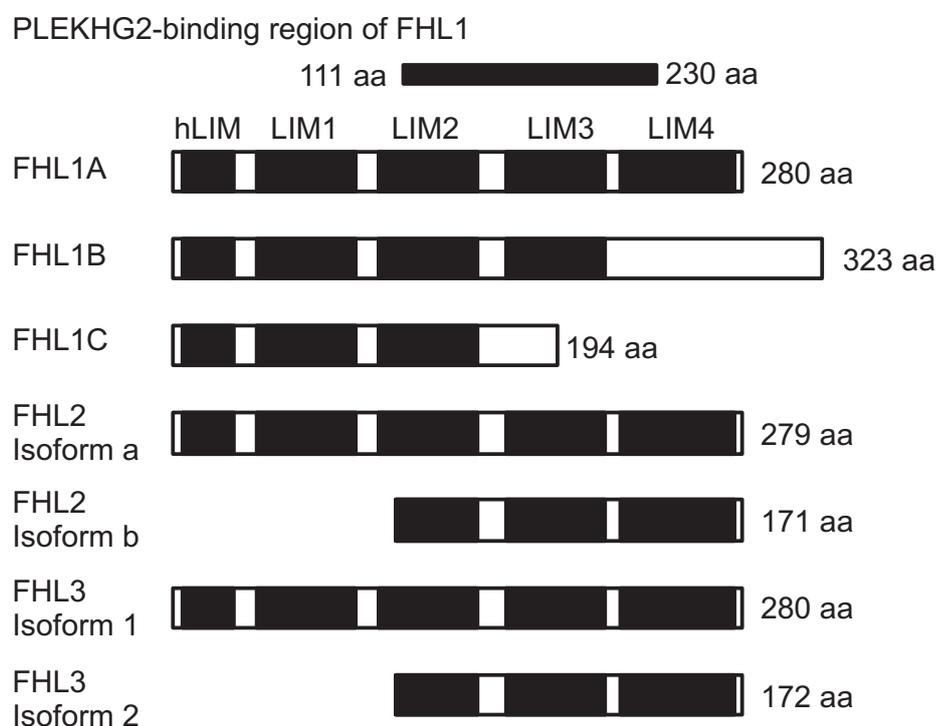


図 1. FHL ファミリーの蛋白質構造

FHL1A、FHL2a、FHL3-1 は half LIM ドメインと LIM ドメインを含有する。aa, amino acids; hLIM, half LIM domain; LIM, LIM domain

2. PLEKHG2 と各種 FHL の相互作用

FHL2a と FHL3-1 が、FHL1A と同様に PLEKHG2 による SRE 活性に影響を与えるかを検討するため、Myc タグを付加した PLEKHG2 (Myc-PLEKHG2) と Flag タグを付加した FHL1A (Flag-FHL1A)、FHL2a (Flag-FHL2a)、FHL3-1 (Flag-FHL3-1) をそれぞれ共発現させた細胞における PLEKHG2 依存的 SRE 活性を測定した。その結果、PLEKHG2 依存的 SRE 活性は、FHL1A との共発現細胞において顕著に上昇したが、FHL2a と FHL3-1 との共発現細胞ではコントロールと比べて変化がみられなかった (図 2A)。次に、FHL2a と FHL3-1 が PLEKHG2 と細胞内で相互作用するかを検討するため、Myc-PLEKHG2、Flag-FHL1A、Flag-FHL2a、Flag-FHL3-1 をそれぞれ培養細胞に共発現させ、抗 Myc 抗体を用いて Myc-PLEKHG2 を免疫沈降した。その結果、Flag-FHL1A の共沈降は検出されたのに対して、Flag-FHL2a と Flag-FHL3-1 の共沈降は検出されなかった (図 2B)。これらの結果から、FHL1A は、FHL2a や FHL3-1 を含む FHL ファミリーの中で、PLEKHG2 と特異的に強く相互作用することが示唆された。また、PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響に関しても、FHL1A が特異的に PLEKHG2 による SRE 活性を制御することが示唆された。

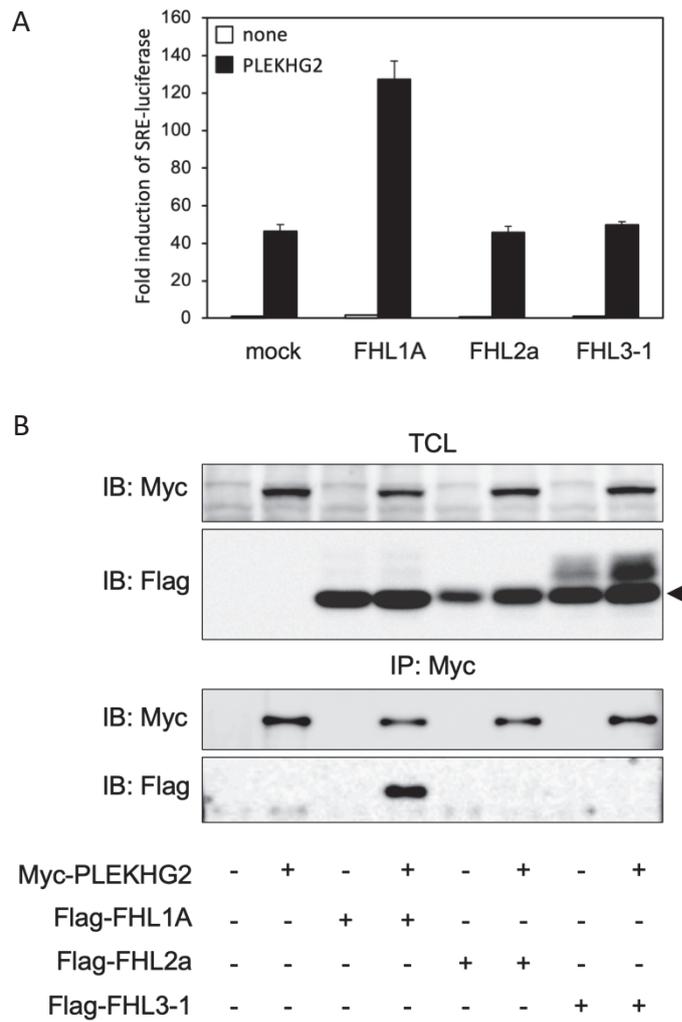


図 2. FHL ファミリーの PLEKHG2 依存的 SRE 活性に対する影響と PLEKHG2 との相互作用

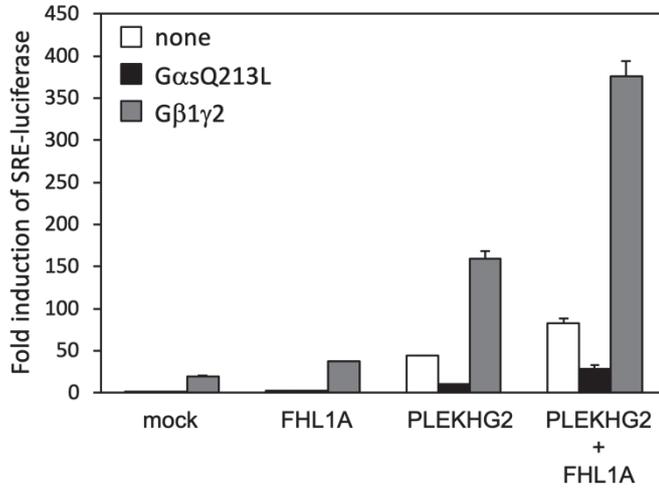
(A) HEK293 細胞における FHL1A、FHL2a、FHL3-1 による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(B) HEK293 細胞における Myc-PLEKHG2 と Flag-FHL1A、Flag-FHL2a、Flag-FHL3-1 の相互作用 TCL, total cell lysate; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting

3. FHL1A の GPCR シグナルによる PLEKHG2 調節機構への影響

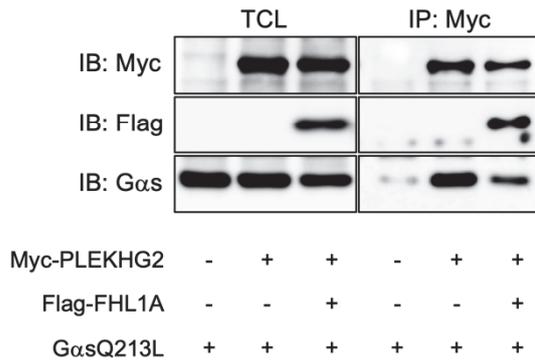
最近、我々のグループの Sugiyama らは、活性化型の $G\alpha s$ サブユニットが PLEKHG2 と直接相互作用することで、PLEKHG2 依存的 SRE 活性を抑制することを報告した (15)。その中で、 $G\alpha s$ サブユニットの恒常的活性化型変異体 ($G\alpha sQ213L$) は $G\beta\gamma$ サブユニットにより活性化された PLEKHG2 依存的 SRE 活性も抑制することも明らかになった。一方、Sato らは、FHL1A は $G\beta\gamma$ サブユニットにより活性化された PLEKHG2 依存的 SRE 活性を PLEKHG2 と相互作用することで、さらに亢進させることを報告している。そこで、FHL1A が活性化型 $G\alpha s$ サブユニットにより抑制された PLEKHG2 依存的 SRE 活性に影響を与えるかを検討するため、Myc-PLEKHG2、Flag-FHL1A、 $G\beta 1\gamma 2$ 、 $G\alpha sQ213L$ をそれぞれ HEK293 細胞に共発現させた。その結果、過去の報告と同様、FHL1A は、 $G\beta\gamma$ サブユニットにより活性化された PLEKHG2 依存的 SRE 活性を亢進させることを確認した。その一方で、Flag-FHL1A を共発現させた細胞では、 $G\alpha sQ213L$ による PLEKHG2 依存的 SRE 活性の抑制効果が、若干減弱した (図 3A)。次に、FHL1A が活性化型 $G\alpha s$ サブユニットと PLEKHG2 の相互作用に与える影響を検討するため、Myc-PLEKHG2 と Flag-FHL1A、 $G\alpha sQ213L$ をそれぞれ HEK293 細胞に共発現させた。その結果、Flag-FHL1A を共発現させた細胞において、Myc-PLEKHG2 と $G\alpha sQ213L$ の相互作用の減弱がみられた (図 3B)。さらに図 3C に示したように、イムノブロットにより得られた免疫沈降物のバンド強度を統計処理した結果、コントロールと比べて有意に減弱していることがわかった。この結果から、Flag-FHL1A が Myc-PLEKHG2 と $G\alpha sQ213L$ の相互作用を若干減弱させることを確認した。以上の結果より、FHL1A は活性化型 $G\alpha s$ サブユニットと PLEKHG2 の相互作

用を減弱させ、活性型 $G\alpha s$ サブユニットによる PLEKHG2 依存的 SRE 活性の抑制効果を減弱させることが示唆された。また、FHL1A は活性型 $G\alpha s$ サブユニットと PLEKHG2 の相互作用を完全に阻害しないことから、FHL1A の PLEKHG2 における相互作用領域と $G\alpha s$ サブユニットの PLEKHG2 における相互作用領域が異なるため、FHL1A は活性型 $G\alpha s$ サブユニットによる PLEKHG2 の抑制効果に大きく影響を与えない可能性が考えられた。

A



B



C

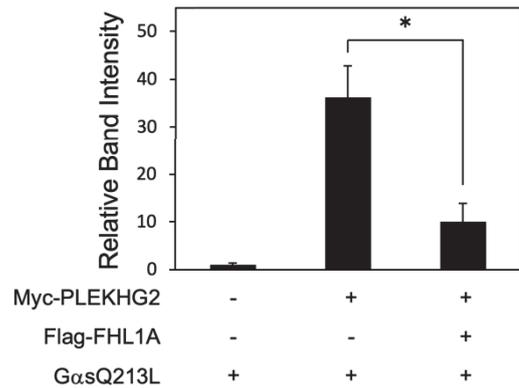


図 3. FHL1 が Gs シグナル依存性 PLEKHG2 に与える影響

(A) HEK293 における FHL1 による Gs シグナル依存性 PLEKHG2 誘導性 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(B) HEK293 における Flag-FHL1A が Myc-PLEKHG2 と GαsQ213L の相互作用に与える影響 TCL, total cell lysate; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting (C) 共沈降された GαsQ213L の定量化分析 定量化には ImageJ ソフトウェアを用いた。*, P < 0.05

第四節 考察

本研究では、FHL1A、FHL2a、FHL3-1 を含む FHL ファミリーの中で、FHL1A が PLEKHG2 と特異的に強く相互作用し、PLEKHG2 依存的 SRE 活性を亢進させることを明らかにした。さらに、FHL1A が PLEKHG2 と相互作用することにより、GPCR シグナルが制御する PLEKHG2 依存的 SRE 活性を調節することを明らかにした (図 4)。

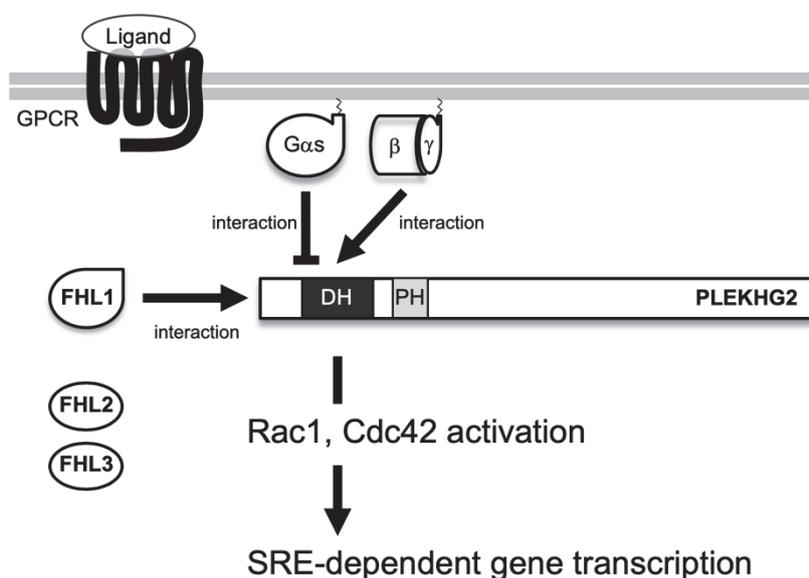


図 4. FHL1 による GPCR シグナル依存性 PLEKHG2 の制御機構の提唱

遊離した Gβγ サブユニットは PLEKHG2 を活性化し、アクチン細胞骨格の再編成を促す。活性型 Gαs/olf サブユニットは PLEKHG2 の 1-310 a.a.に相互作用し、PLEKHG2 活性を抑制する。FHL1 は PLEKHG2 の 58-150 a.a.に相互作用し PLEKHG2 を活性化する。a.a., amino acids; DH, Dbl homology domain; PH, pleckstrin homology domain

過去、我々のグループの Sato らは、酵母 two-hybrid 法及び免疫沈降法を用いて、PLEKHG2 が FHL1A の 111-230 アミノ酸領域に相互作用することを同定した (16)。FHL1A の 111-230 アミノ酸領域は、LIM3 ドメイン全域と LIM2 ドメイン及び LIM4 ドメインの一部を含んでいる (図 1)。FHL1A の 111-230 アミノ酸領域は、FHL2a と 56%、FHL3-1 と 50%保存されている (図 5)。しかし、これだけ高いアミノ酸相同性がありながら、FHL2a と FHL3-1 は PLEKHG2 と相互作用を示さなかった。一般的に、蛋白質間相互作用は数アミノ酸で決定されることが知られている。FHL1A、FHL2a、FHL3-1 を比較すると、いくつかのアミノ酸領域で相同性が低い箇所がある。今後さらに、FHL ファミリー間のアミノ酸相同性と PLEKHG2 との相互作用を比較検討することにより、FHL1A と PLEKHG2 との相互作用の特異性を担う重要なアミノ酸領域を同定できる可能性があると考えられる。

```

FHL1A  111  gdqnveykgtvwhkdcftcsnckqvigtgsffpkgedfycvtchetkfakhcvkcnkait 170
FHL2a  111  gtrkmeykgsswhetcfichrcqqpigtksfipkdnqnfvcpcyekqhamqcvqckkpit 170
FHL3-1 111  gsrkleygggtwhehcfllcsgceqplgsrsfvpdkgahycvpcyenkfaprcarcskltl 170
      *  :::** *   **: ** *  *: *  *: **.*      **: **:*:*:*  :*:**.*  :*
      171  sggityqdqpwhadcfvvtcskklagqrftavedqyyvdcyknfvakkcagcknpitg 230
      171  tggvtyreqpwhkecfvctacrqlsgqrftarddfayclncfcdlyakkcagctnpisg 230
      171  qggvtyrdqpwhreclvctgcqtplagqqftsrdedpycvacfgelfapkcscsrpivg 230
      **:***:*****  :*:**.*  *  .  *:***:**:  ::  **: *  :  : *  **:*.*..** *

```

図 5. FHL1A の 111-230 アミノ酸領域と FHL2a 及び FHL3-1 のアミノ酸相同性
 各種 FHL 蛋白質における 111-230 アミノ酸領域のアライメントには、Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) を用いた。赤は疎水性、緑は親水性、青は酸性、マゼンダは塩基性アミノ酸を表す。

一方、Sato らにより、PLEKHG2 の 58-150 アミノ酸領域と FHL1A が相互作用することが報告されている (16)。さらに Sugiyama らにより、活性型 $G\alpha s$ サブユニットが PLEKHG2 の 1-310 アミノ酸領域に相互作用することが報告されている (15)。これらの報告から、FHL1A の PLEKHG2 における相互作用領域は、 $G\alpha s$ サブユニットの相互作用領域に含まれることが示唆される。本研究において、FHL1A が PLEKHG2 と相互作用することにより、活性型 $G\alpha s$ サブユニットと PLEKHG2 の相互作用を若干減弱させ、活性型 $G\alpha s$ サブユニットによる PLEKHG2 依存的 SRE 活性の抑制効果を減弱させることを見出した。このことから、次の二つの可能性が考えられる。一つは、 $G\alpha s$ サブユニットと FHL1A の PLEKHG2 における相互作用領域が一致しており、PLEKHG2 と $G\alpha s$ サブユニットとの相互作用の親和性が、FHL1A との相互作用よりも高いという可能性が考えられる。二つ目は、 $G\alpha s$ サブユニットと FHL1A の PLEKHG2 における相互作用領域が異なっており、 $G\alpha s$ サブユニットの相互作用が PLEKHG2 に与える影響の方が、FHL1A の相互作用が PLEKHG2 に与える影響よりも大きいという可能性が考えられる。今後、PLEKHG2、FHL1、 $G\alpha s$ サブユニット、 $G\beta\gamma$ サブユニットの複合体における分子メカニズムを解明するには、時空間的なシグナル解析や構造解析等を含めた検討が必要である。

また Sato らは、PLEKHG2、 $G\beta\gamma$ サブユニット、FHL1 を細胞に共発現させると、細胞の突起伸長が促進されることを報告した (16)。ヒト胎児脳 cDNA を用いた酵母 two-hybrid 法により、FHL1 と PLEKHG2 の相互作用が示されたことから、両者の相互作用は、ヒト神経系において何らかの細胞機能を有していることが考えられる。また、PLEKHG2 は T 細胞のようなリンパ系細胞において、細胞運動の制御因子としてはたらくことも報告されている (14)。さらに、PLEKHG2 と同様に、

Gβγサブユニット依存的に制御される RhoGEF として知られる P-Rex1 は、GPCR の一つである CXCR4 のシグナルにより活性化され、乳がん細胞の転移に寄与していることが報告されている (34)。これらの報告から、PLEKHG2 は神経系だけに限らず、他の細胞種においても機能的にはたらくことが示唆される。上述したように、FHL1 もまた、種々の細胞においてアクチン細胞骨格を制御することで細胞伸展や細胞遊走に関与していることが知られている (31, 32)。一方、FHL2 は GPCR の一種である sphingosine1-phosphate (S1P) receptor (S1PR) シグナルとの関係性が報告されている。線維芽細胞では、S1PR シグナルは RhoA を活性化し、FHL2 の核への局在変化を誘導することが知られている (35)。また免疫系においても、未熟樹状細胞において、S1PR2 シグナルが Rho の活性化を介して FHL2 の核移行を誘導することが報告されている (36)。これらの報告から、PLEKHG2 と FHL1 A も S1P シグナルに何らかの影響を与える可能性も考えられる。この可能性を証明するためには、今後 PLEKHG2 と FHL1 の相互作用について、時空間的制御機構等の詳細な分子メカニズムと生理学的機能について研究する必要があると考えられる。

第二章

PLEKHG2 と ABL1 の相互作用が誘導する新規細胞増殖抑制機構

第一節 緒言

これまで述べてきたように Rho は、アクチン細胞骨格の再編成を介した細胞形態変化、細胞増殖等の様々な細胞応答を制御することが知られている (37)。これらの Rho は様々な受容体を介した細胞外からのシグナルを受け取った RhoGEF 等の作用を介し、時空間的に制御され、細胞の遊走や浸潤を制御していると考えられている (38, 39)。

Dbl ファミリー RhoGEF の一つである PLEKHG2 は、三量体 G 蛋白質の $G\beta\gamma$ サブユニット及び $G\alpha_s$ サブユニットと相互作用することにより、その活性が制御されることが報告されている (13, 15)。また、PLEKHG2 は β -actin や FHL1 等を含む種々の細胞内蛋白質と相互作用することで、その活性が制御されていることも明らかになっている (16, 27, 40)。さらに、PLEKHG2 が epidermal growth factor receptor (EGFR) シグナルや、EPHB2/SRC シグナルにより、リン酸化されることも報告されている (17, 26)。Sato らによって、EPHB2 刺激を受けた細胞において、PLEKHG2 の Tyr489 が SRC によりリン酸化され、そのリン酸化チロシンを介して SH2 を有する PIK3R3 や ABL1 が相互作用することが報告された。さらに、PLEKHG2 の Tyr489 は ABL1 によってもリン酸化されることと、ABL1 はチロシンリン酸化非依存的な条件下においても PLEKHG2 と相互作用することが示唆された。しかしながら、PLEKHG2 と ABL1 の相互作用による生理学的機能に関しては、未だ明らかになっていない。

ABL ファミリーは ABL1/c-Abl と ABL2/Arg の二つのアイソフォームをもつ (41)。ABL1 は SH2 ドメイン、SH3 ドメイン、F-actin binding domain (FABD) 等の機能ドメインを有し、細胞内で種々の蛋白質と相互作用し、Rho シグナルが関わるアクチン細胞骨格の再編成を含めた様々な細胞生物学的過程で重要な役割を担っていると考えられている (42)。ショウジョウバエの軸索形成においては、Rho の一種である Rac シグナルを介したアクチン細胞骨格再編成に関与していることが報告されている (43, 44)。また、ABL1 は、自身の SH3 ドメインを介して、RhoGEF の一種である Trio に結合することが報告されている (45)。他の報告では、ABL1 が神経細胞におけるアクチン細胞骨格ネットワークを Trio のチロシンリン酸化を介して制御していることが報告されている (46)。さらに哺乳類細胞では、ABL1 が Ras と Rac の GEF として知られている Sos-1 をチロシンリン酸化することも見出されている (47)。一方、ABL1 は三つの核移行シグナル配列と、一つの核外搬出シグナル配列を有しており、これらのアミノ酸配列が ABL1 の細胞内局在を制御していると考えられている (48)。過去の研究において、シスプラチンによる DNA ダメージは、ABL1 の活性化を促進し、p53 関連遺伝子の一種である p73 遺伝子産物を凝集させることで、DNA ミスマッチ修復依存的な細胞増殖抑制及びアポトーシスを誘導することが報告されている (49)。核に局在する ABL1 は p73 蛋白質のプロリンリッチ配列に、自身の SH3 ドメインを介して相互作用し、p73 をチロシンリン酸化することで細胞死を誘導すると考えられている (50)。これらのことから、ABL1 は種々の蛋白質と相互作用することにより細胞形態、細胞増殖、細胞死等の細胞応答を示すことが知られているが、これらの分子メカニズムは完全に理解されているわけではない。

本章では、HEK293 細胞において、ABL1 が PLEKHG2 と相互作用することにより PLEKHG2 依存的 SRE 活性を抑制することを明らかにし、両者が細胞質内で蛋白質凝集体を形成することを見出した点、さらに、その蛋白質凝集体は、細胞増殖関連シグナルの一つである nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナルの活性化を介して細胞増殖を抑制する可能性を示す。これらの知見は、RhoGEF と ABL1 の相互作用に由来する蛋白質凝集体が NF- κ B シグナルを介して細胞増殖を制御することを示す初めての報告である。

第二節 実験材料及び実験方法

1. プラスミドと試薬

SRC の恒常的活性化型変異体のプラスミドは Millipore から購入し、pF5A-CMV-neo ベクターに PCR 法と制限酵素を用いて導入した。クローニングした ABL1 及び PLEKHG 2 は pF5A-CMV-neo-Flag、または pF5A-CMV-neo-Myc に導入した。pSRE.L-luciferase reporter plasmid は pRL-SV40 は Stratagene から、pRL-SV40 は、Nippon Gene から購入した。ABL1 特異的な阻害剤である GNF2 は Sigma-Aldrich から購入した。

2. 細胞培養と遺伝子導入

HEK293 細胞は、37°C、5% CO₂ 加湿大気圧下で、10% fetal bovine serum (FBS) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて培養した。遺伝子の一過性導入には、polyethylenimine (PolySciences Inc., Warrington, PA) を用いた (33)。遺伝子導入の 6 時間後、無血清培地に置き換え、18 時間培養した。

3. 遺伝子転写活性測定法

24 well plate に細胞播種してから 24 時間後、各種遺伝子発現ベクターを一過性に導入した。遺伝子導入して 24 時間後、細胞を氷冷 PBS で一回洗浄後、passive lysis buffer (Promega) を用いて溶解させた。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) を用いて測定した。各種

サンプルの活性は、コントロールベクター導入細胞の活性を用いて標準化した。

4. 免疫沈降法

6 cm dish に細胞播種してから 24 時間後、各種遺伝子発現ベクターを一過性に導入した。遺伝子導入 24 時間後、細胞を氷冷 PBS で二回洗浄し、lysis buffer (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl (Invitrogen)、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM Na_3VO_4 、0.5% Nonidet P-40、phosphatase inhibitor solution (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)、protease inhibitor solution (Roche Diagnostics))を用いて溶解させた。細胞溶解液を $16,000 \times g$ で 10 分間遠心して得られた上清に anti-Myc IgG を $1 \mu\text{g}$ 添加し、 4°C で 2 時間インキュベートした。その後、lysis buffer で平衡化した protein G-agarose (EMD Milipore, Billerica, MA) を添加し、 4°C で 1 時間インキュベートした。レジンを wash buffer (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM Na_3VO_4 、0.1% Nonidet P-40、phosphatase inhibitor solution、protease inhibitor solution) を用いて、3 回洗浄し、sample buffer を用いて結合蛋白質を溶出した。免疫沈降サンプルは、SDS-PAGE で分離し PVDF 膜に転写した。蛋白質転写後の PVDF 膜は、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いてブロッキングし、Myc-tag もしくは Flag-tag の検出には、HRP 融合 anti-Myc IgG (Wako, Osaka, Japan) もしくは HRP 融合 anti-Flag IgG (Wako, Osaka, Japan) を用いた。P-Tyr や ABL 関連蛋白質を検出するために、anti-

P-Tyr IgG (Santa Cruz) と anti-c-Abl (Santa Cruz) を用いた。一次抗体を検出するために、HRP 融合 anti-mouse IgG、anti-rabbit IgG (MBL Co.) を二次抗体として用いた。各種蛋白質の可視化には、enzyme-linked chemiluminescence (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA) と LAS-4000 luminescent image analyzer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いた。

5. 細胞形態観察

カバーガラス上に播種した HEK293 細胞に各種遺伝子を導入した。遺伝子導入 24 時間後、氷冷 PBS で一回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて 30 分間固定した。界面活性剤で処理する場合、細胞を氷冷 PBS で一回洗浄した後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0.5% Triton X-100, phosphatase inhibitor solution and protease inhibitor solution) で 10 秒間処理し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞は、0.1% Triton X-100 を用いて透過処理し、4 回 PBS で洗浄した。その後、10%ヤギ血清で 1 時間ブロッキングした。PBS で洗浄後、一次抗体および Alexa Fluor 488 が付加された二次抗体 (Life Technologies Co.)、Alexa Fluor 568 Phalloidin (Life Technologies Co.)、hoechst33342 (Dojin) を用いて染色した。カバーガラスは PermaFluor を用いてスライドガラスに固定した。細胞は、Zeiss laser scanning confocal microscope (LSM-710; Carl Zeiss) を用いて観察した。

第三節 結果

1. ABL1 によるチロシンリン酸化非依存的な PLEKHG2 の活性抑制

過去、Sato らは、SRC および ABL1 が PLEKHG2 の Tyr489 をリン酸化し、ABL1 が自身の SH2 ドメインを介して PLEKHG2 と相互作用することを報告した。また、ABL1 はチロシンリン酸化非依存的な条件下においても PLEKHG2 と相互作用する可能性も示した (12)。はじめに、ABL1 と SRC が PLEKHG2 の RhoGEF 活性に与える影響を検討するため、共発現細胞における PLEKHG2 依存的 SRE 活性を測定した。その結果、PLEKHG2 の野生型 (PLEKHG2WT) と ABL1 の野生型 (ABL1WT) の共発現により PLEKHG2 依存的 SRE 活性が抑制されることが明らかとなった。一方で、SRC の恒常的活性化型変異体 (SRCCA) との共発現による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響はみられなかった (図 1A)。この時、Sato らの報告と同様に、PLEKHG2WT が ABL1WT と SRCCA によってチロシンリン酸化されていることも確認した (図 1A)。次に、ABL1 による PLEKHG2 のチロシンリン酸化が PLEKHG2 依存的 SRE 活性に与える影響について検討するため、ABL1WT と PLEKHG2 の ABL1 によりリン酸化されるチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 (PLEKHG2Y489F) を共発現させた細胞における SRE 活性を測定した。その結果、ABL1WT と PLEKHG2WT の共発現細胞の SRE 活性と同程度であったことから、PLEKHG2 の Tyr489 のリン酸化は、ABL1 による PLEKHG2 の抑制には関与していないことが考えられた (図 1B)。次に、ABL1 のチロシンキナーゼ活性が PLEKHG2 の活性抑制に必要などうかを検討するため、ABL1 特異的チロシンキナーゼ阻害剤である GNF2 を使用した (51)。PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞に GNF2 を添加した際も、ABL1WT による PLEKHG2 依存的 SRE 活性の抑制がみられた。ま

た、同条件下において、PLEKHG2 のチロシンリン酸化が抑制されていることも確認した (図 1C)。これらの結果から、ABL1 は PLEKHG2 の活性をチロシンリン酸化非依存的に抑制することが示唆された。

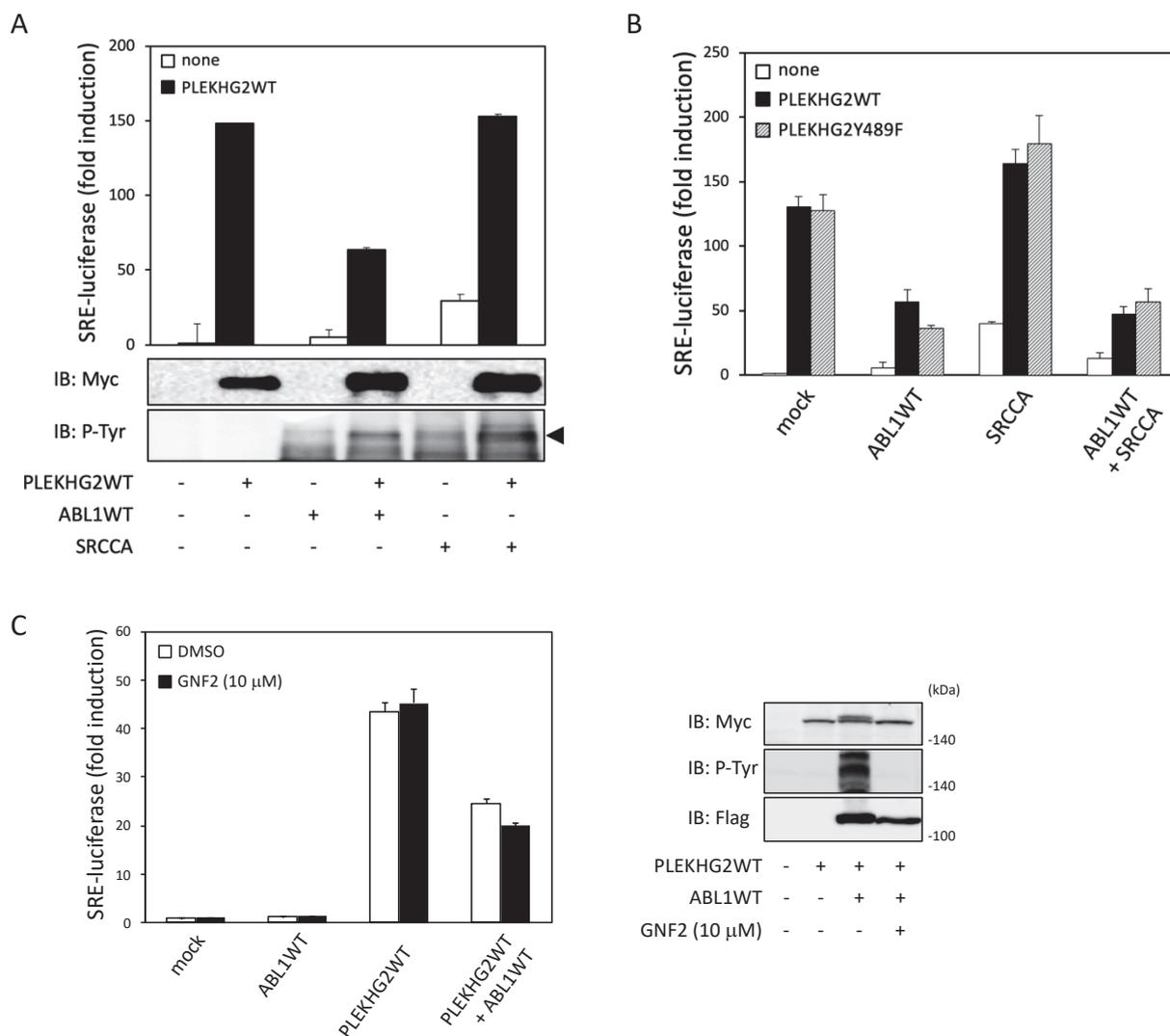


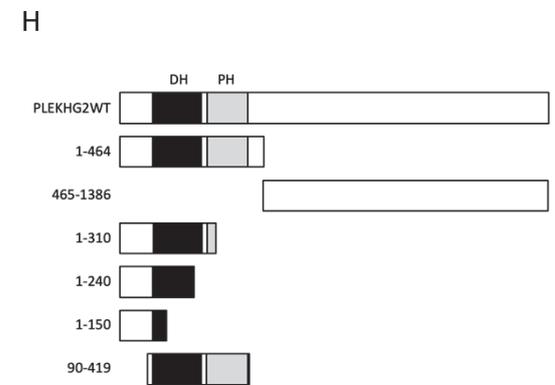
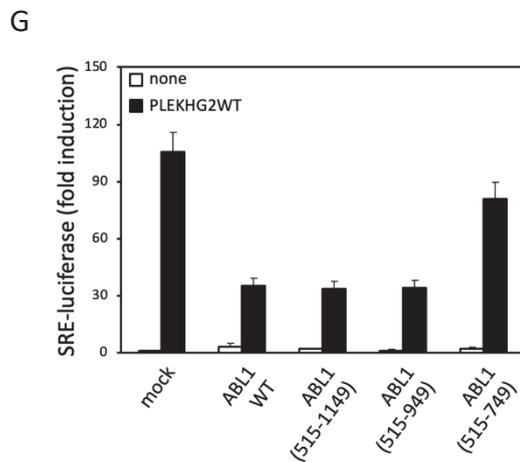
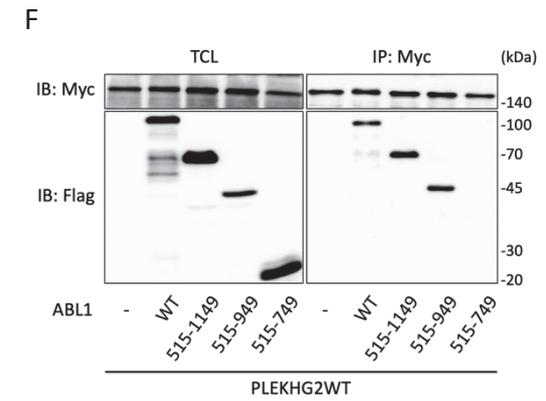
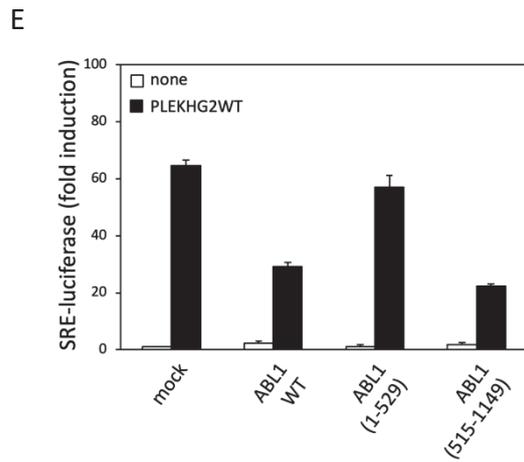
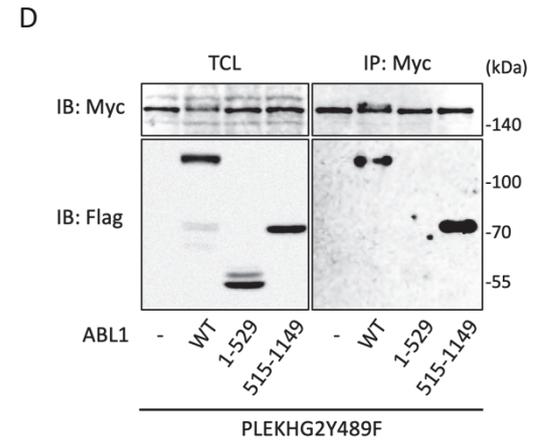
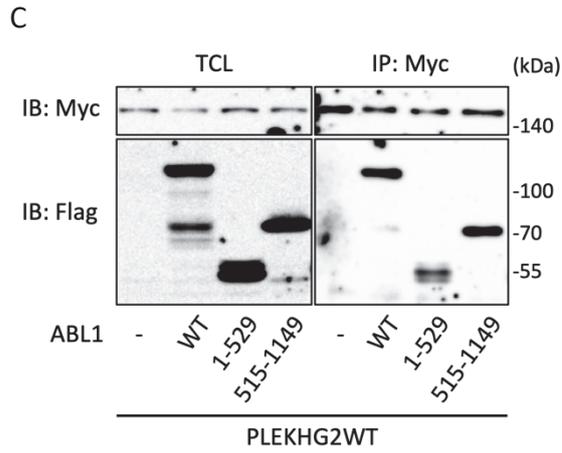
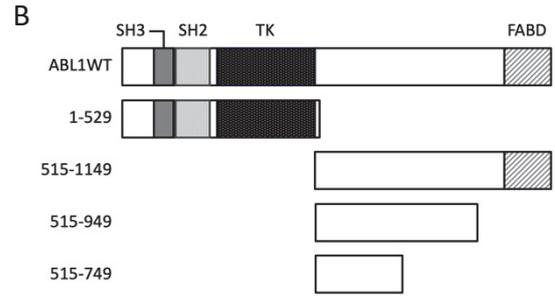
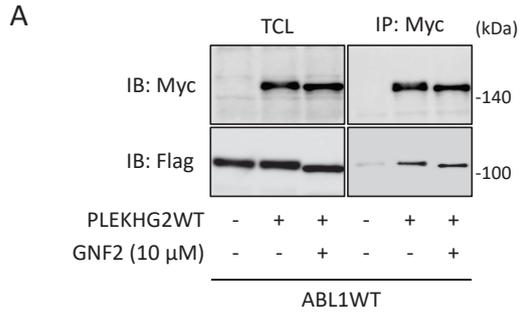
図 1. ABL1 による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響

(A) ABL1WT、SRCCA による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(B) ABL1WT、SRCCA による PLEKHG2Y489F 依存的 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(C) GNF2 存在下における ABL1WT による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。

ABL1 による PLEKHG2 のチロシンリン酸化と、ABL1 による PLEKHG2 の活性抑制との相関が低いことから、過去に報告された PLEKHG2 と ABL1 のリン酸化非依存的相互作用 (17) に着目し、実験を行った。初めに、PLEKHG2 と ABL1 がリン酸化非依存的に相互作用するかどうかを確かめるため、GNF2 処理した Myc-*PLEKHG2*WT 及び Flag-*ABL1*WT の共発現細胞を用いて、抗 Myc 抗体で免疫沈降した。その結果、Flag-*ABL1*WT が Myc-*PLEKHG2*WT と共沈降されたことから、過去の報告と同様に、ABL1 が PLEKHG2 とチロシンリン酸化非依存的に相互作用することが強く示唆された (図 2A)。次に、ABL1 と PLEKHG2 の相互作用様式を検討するため、図 2B に示すような ABL1 の各種欠損変異体を作製した。これらの変異体を Myc-*PLEKHG2*WT で免疫沈降した結果、ABL1 (1-529) と ABL1 (515-1149) が共沈降されることがわかった (図 2C)。一方で、Myc-*PLEKHG2*Y489F で免疫沈降した結果、ABL1 (1-529) と ABL1 (515-1149) のうち、ABL1 (515-1149) だけが共沈降された (図 2D)。この結果、ABL1 の SH2 ドメインが、PLEKHG2 のリン酸化された Tyr489 と相互作用することが示唆された。次に、これらの ABL1 変異体が PLEKHG2 依存的 SRE 活性に与える影響を検討した。その結果、ABL1 (515-1149) は、ABL1WT と同程度 PLEKHG2 依存的 SRE 活性を抑制したが、ABL1 (1-529) は SRE 活性に大きな影響を与えなかった (図 2E)。これらの結果から、ABL1 による PLEKHG2 活性の抑制には、ABL1 の 515-1149 アミノ酸領域が必要であるということが示唆された。さらに相互作用領域の詳細を明らかにするため、図 2B に示した各種 ABL1 変異体を用いて検討した。PLEKHG2WT を免疫沈降した際、ABL1 (515-949) は共沈降されたが、ABL1 (515-749) は共沈降されなかった (図 2F)。さらに、これらの変異体が PLEKHG2 依存的 SRE 活性に与える影響を検討した結果、

ABL1 (515-949) は、ABL1WT と同程度の抑制効果がみられたが、ABL1 (515-749) では抑制効果の減弱がみられた (図 2G)。これらの結果から、ABL1 の 750-949 アミノ酸領域が PLEKKG2 との相互作用と、PLEKKG2 の活性抑制に重要だということが示唆された。

次に、ABL1 の PLEKKG2 における相互作用領域を検討するため、PLEKKG2 の各種欠損変異体を作製した (図 2H)。免疫沈降の結果、ABL1WT は PLEKKG2 (1-464) と PLEKKG2 (465-1386) によって共沈降された (図 2I)。PLEKKG2 の 1-464 アミノ酸領域は DH ドメインと PH ドメインを含有しており、PLEKKG2 の RhoGEF 活性を担うと考えられている。そのため、本研究では PLEKKG2 の 1-464 アミノ酸領域に着目した。PLEKKG2 の各種 C 端欠損変異体を ABL1 (515-1149) を用いて免疫沈降した結果、PLEKKG2 (1-310)、PLEKKG2 (1-240)、PLEKKG2 (1-150) が共沈降された (図 2J)。さらに、PLEKKG2 (90-419) を用いた免疫沈降によって ABL1WT は共沈降された (図 2K)。これらの結果から、ABL1 は PLEKKG2 の DH ドメインの一部を含む 90-150 アミノ酸領域と相互作用することが示唆された。



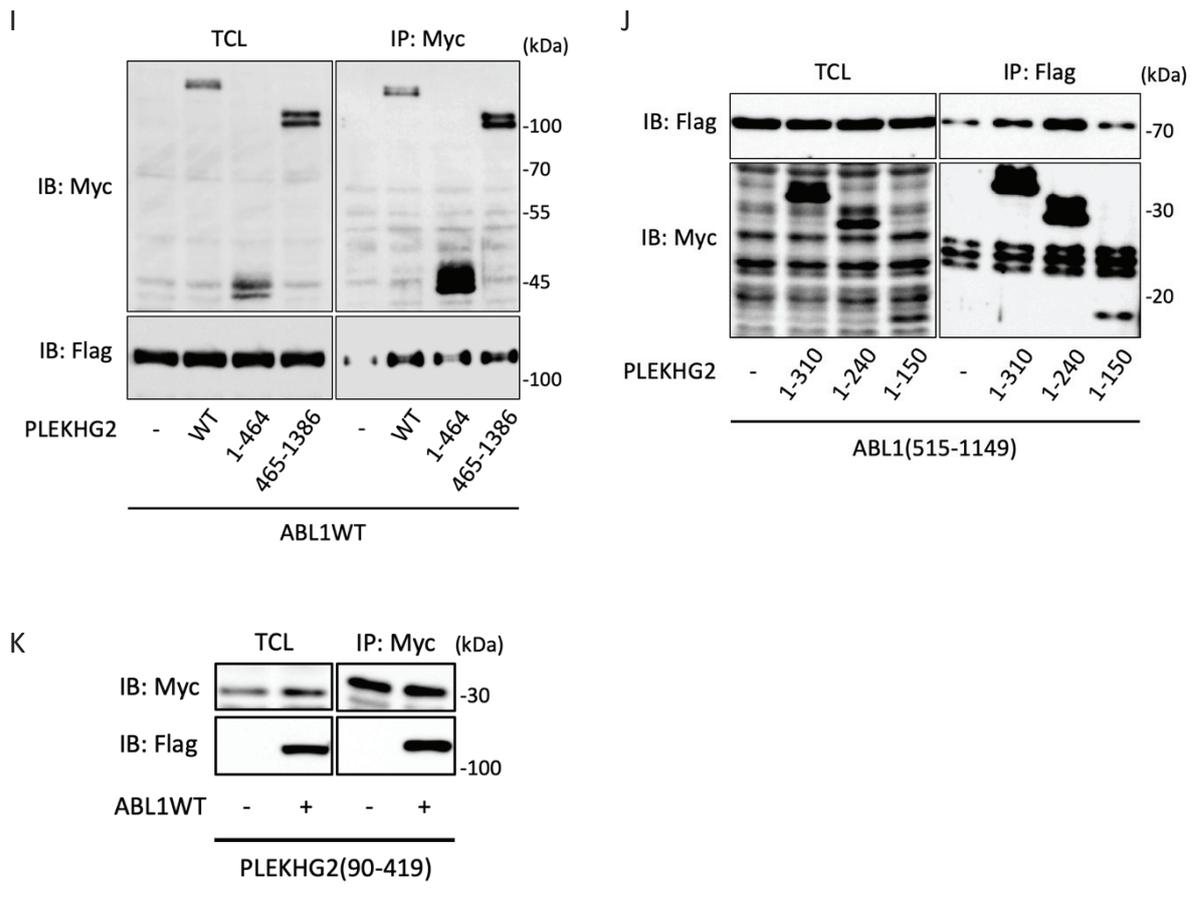


図 2. PLEKHG2 と ABL1 の相互作用領域の同定と、各種 ABL1 変異体による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響

(A) GNF2 が PLEKHG2 と ABL1 の相互作用に与える影響 TCL, total cell lysate; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting (B) ABL1WT、ABL1 (1-529)、ABL1 (515-1149)、ABL1 (515-949)、ABL1 (515-749) の蛋白質構造 SH2, Src homology 2 domain; SH3, Src homology 3 domain; TK, tyrosine kinase domain; FABD, F-actin binding domain; 1-529, ABL1 (1-529); 515-1149, ABL1 (515-1149); 515-949, ABL1 (515-949); 515-749, ABL1 (515-749) (C) PLEKHG2WT と ABL1WT、ABL1 (1-529)、ABL1 (515-1149) の相互作用 TCL, total cell lysate; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting (D) PLEKHG2Y489F と ABL1WT、ABL1 (1-529)、ABL1 (515-1149) との相互作用 (E) ABL1WT、ABL1 (1-529)、ABL1 (515-1149) による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(F) PLEKHG2WT と ABL1WT、ABL1 (515-1149)、ABL1 (515-949)、ABL1 (515-749) の相互作用 (G) ABL1WT、ABL1 (515-1149)、ABL1 (515-949)、ABL1 (515-749) の PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(H) PLEKHG2WT、PLEKHG2 (1-464)、PLEKHG2 (465-1386)、PLEKHG2 (1-310)、PLEKHG2 (1-240)、PLEKHG2 (1-150)、PLEKHG2 (90-419) の蛋白質構造 (I) ABL1WT と PLEKHG2WT、PLEKHG2 (1-464)、PLEKHG2 (465-1386) の相互作用 (J) ABL1WT と PLEKHG2 (1-310)、PLEKHG2 (1-240)、PLEKHG2 (1-150) の相互作用 (K) ABL1WT と PLEKHG2 (90-419) の相互作用

3. PLEKHG2 と ABL1 の相互作用による細胞内蛋白質凝集体の形成

PLEKHG2 と ABL1 の相互作用が、両分子の細胞内局在及び、細胞形態に与える影響を検討するため、monomeric Azami-Green (mAG)、monomeric Keima-Red (mKR) の各種蛍光蛋白質や各種抗体等を用いて細胞染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。mAG-PLEKHG2 を発現させた細胞における mAG の蛍光観察の結果、PLEKHG2 は細胞質から細胞膜まで広く分布しているのが観察された。それに対して、mAG-PLEKHG2 と mKR-ABL1 を共発現させた細胞では、細胞中心部に PLEKHG2 が強く凝集する様子が観察された。それと同時に、mKR に対する蛍光観察から、ABL1 が PLEKHG2 と共局在していることが示された (図 3A)。さらに、mAG-PLEKHG2Y489F と mKR-ABL1 の共発現細胞において、PLEKHG2Y489F も野生型と同様に細胞内で凝集し、ABL1 と共局在している様子が観察された。これらの結果から、PLEKHG2 と ABL1 の相互作用は、PLEKHG2 のチロシンリン酸化非依存的に細胞内蛋白質凝集体を形成することが示唆された。次に PLEKHG2 と ABL1 の蛋白質凝集体の細胞内局在を検討した。ABL1 は核移行する蛋白質として知られている (48)。そこで、PLEKHG2 と ABL1 が、核に局在しているかどうかについて検討するため、核膜のマーカー蛋白質として知られている lamin を免疫染色観察した。その結果、PLEKHG2 と ABL1 は核膜の外側に局在することが観察された (図 3B)。このことから、PLEKHG2 と ABL1 は核近傍の細胞質で蛋白質凝集体を形成していることがわかった。過去 Sato らは、PLEKHG2 がアクチンと相互作用することを報告した (27)。また、ABL1 も C 末端領域に FABD を有する (42)。これらの知見から、PLEKHG2 と ABL1 は F-actin と共局在する可能性が考えられた。この可能性を検討するため、一般的に F-actin 結合蛋白質が Triton X-100 不溶性画分に局

在することを利用し、パラホルムアルデヒドで細胞を固定する前に、細胞内の蛋白質を Triton X-100 を用いて溶出して、細胞観察を行った (52)。mAG と mKR-ABL1 の共発現細胞では、mAG の蛍光は Triton X-100 処理により消失したが、mKR の蛍光は検出された。それに対して、mAG-PLEKHG2 と mKR-ABL1 の共発現細胞では、Triton X-100 処理後においても mAG と mKR の蛍光が検出された (図 3C)。これらの結果から、PLEKHG2 と ABL1 は F-actin と共局在することが示唆された。さらに詳細な PLEKHG2 と ABL1 の細胞内局在を調べるために、細胞内蛋白質を生化学的に分画し解析した。その結果、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞において、PLEKHG2 の細胞骨格画分への分布が顕著に増大した (図 3D)。これらの結果から、PLEKHG2 と ABL1 が形成する細胞内蛋白質凝集体は、F-actin と PLEKHG2 との相互作用、F-actin と ABL の相互作用、またはその両方が関与している可能性が示唆された。

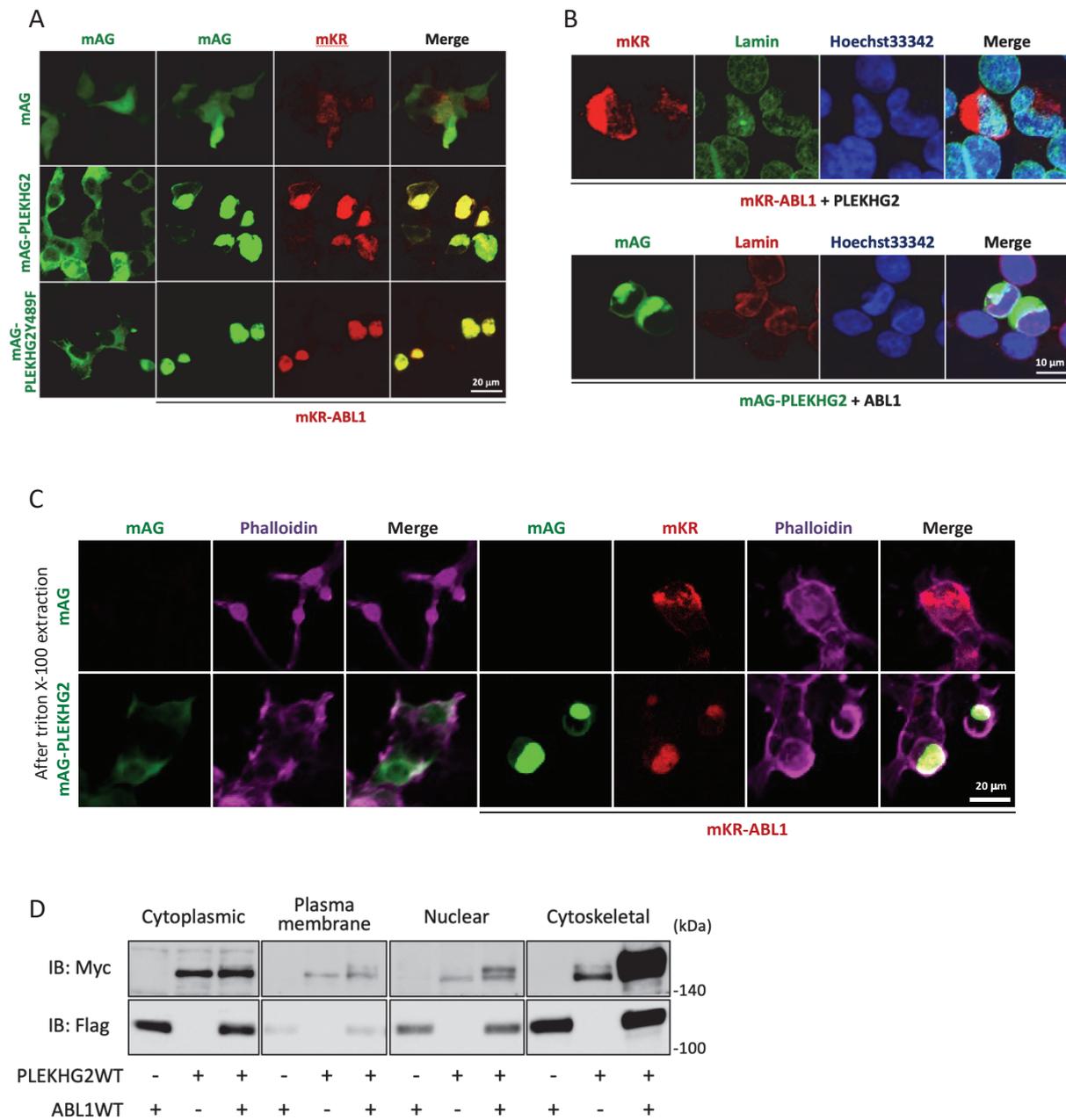
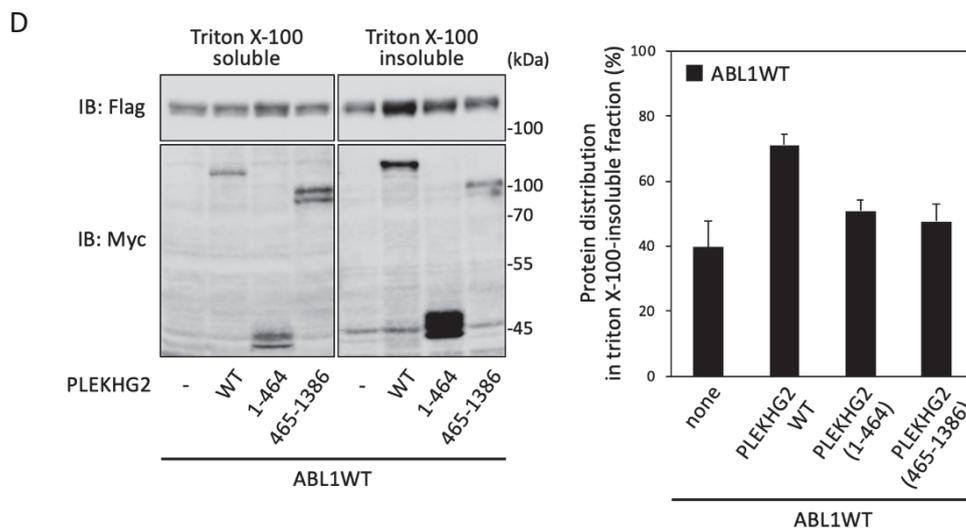
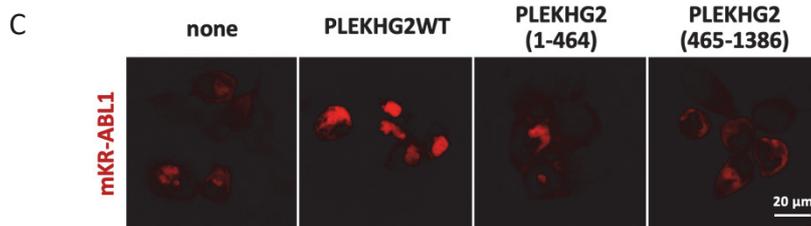
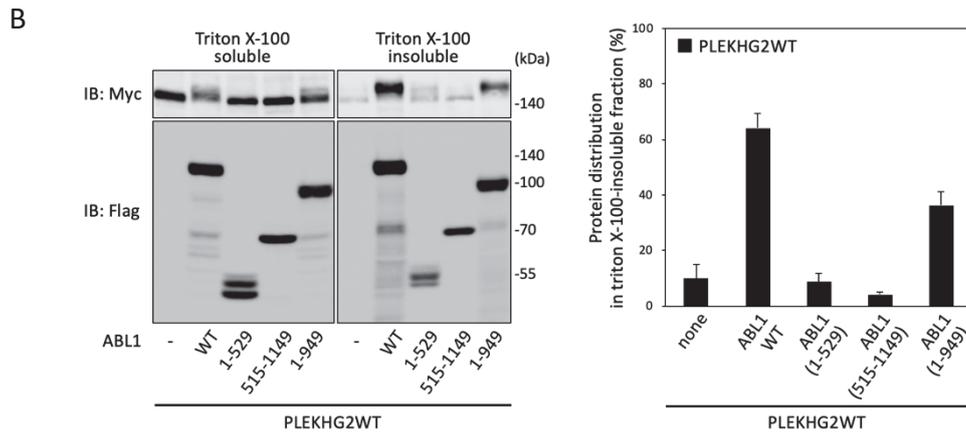
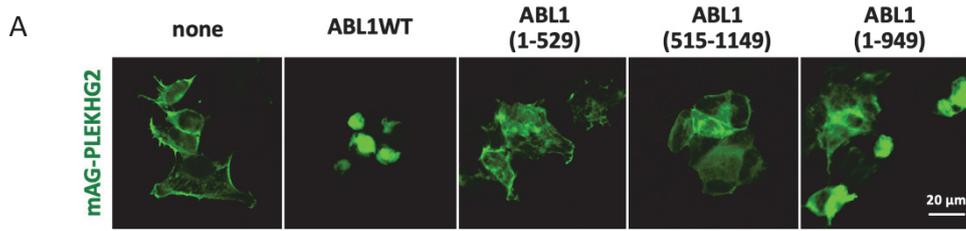


図 3. PLEKHG2 と ABL1 の共発現細胞における細胞質内蛋白質凝集体形成の誘導
 (A) mKR-ABL1 による mAG-PLEKHG2 及び mAG-PLEKHG2Y489F の局在変化 mAG, monomeric Azami Green fluorescent protein; mKR, monomeric Keima Red fluorescent protein (B, C, D) PLEKHG2 と ABL1 の蛋白質凝集体の細胞内局在

4. PLEKHG2 と ABL1 の細胞内蛋白質凝集体形成における ABL1 のチロシンリン酸化依存的/非依存的関与の必要性

ABL1 と PLEKHG2 の蛋白質凝集体の形成に必要な ABL1 と PLEKHG2 のアミノ酸構造を検討するため、各種欠損変異体を培養細胞に発現させて蛋白質が凝集するかを観察した。はじめに、ABL1 について検討するため、mAG-PLEKHG2 と ABL1 の各種欠損変異体を共発現させた細胞において、PLEKHG2 の細胞内分布を観察した。その結果、ABL1WT との共発現細胞では、mAG-PLEKHG2 が凝集している様子が観察されたが、ABL1 (1-529) と ABL1 (515-1149) との共発現細胞ではみられなかった。また、チロシンキナーゼドメインと PLEKHG2 の相互作用領域を含む ABL1 (1-949) との共発現細胞では、mAG-PLEKHG2 の凝集が低頻度だが観察された (図 4A)。また、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞において、PLEKHG2 は蛋白質凝集体が含まれる Triton X-100 不溶性画分に分布したが、ABL1 (1-529) または ABL1 (515-1149) との共発現細胞では、PLEKHG2 は Triton X-100 不溶性画分にほとんど分布しなかった。それに対して、ABL1 (1-949) との共発現細胞では、ABL1WT との共発現細胞と同様に、PLEKHG2 は Triton X-100 不溶性画分に比較的多く分布することがわかった (図 4B)。これらの結果から、ABL1 の PLEKHG2 相互作用領域、チロシンキナーゼドメイン、SH2 ドメイン、SH3 ドメインが、PLEKHG2 と ABL1 が細胞内で凝集するのに必要だということが考えられた。次に、凝集体形成に必要な、PLEKHG2 のアミノ酸構造を検討するため、mKR-ABL1 と PLEKHG2 の各種欠損変異体を共発現させた細胞において、mKR-ABL1 の細胞内分布を観察した。その結果、mKR-ABL1 と PLEKHG2WT の共発現細胞で ABL1 の蛋白質凝集体が観察されたが、PLEKHG2 (1-464) または PLEKHG2 (465-1386) の共

発現細胞ではみられなかった (図 4C)。同じように、ABL1WT は PLEKHG2WT との共発現細胞で Triton X-100 不溶性画分に強く分布したが、PLEKHG2 (1-464) または PLEKHG2 (465-1386) との共発現細胞では Triton X-100 不溶性画分への強い分布はみられなかった (図 4D)。これらの結果から、PLEKHG2 の全長構造が、ABL1 が凝集するに必要だということが示唆された。次に、ABL1 のチロシンキナーゼ活性が、PLEKHG2 が凝集するのに必要かを検討するため、mAG-PLEKHG2 と ABL1WT の共発現細胞に GNF2 を添加した条件下にて細胞を観察した。その結果、GNF2 処理により、mAG-PLEKHG2 の蛋白質凝集体が消失した (図 4E)。また同条件で、PLEKHG2WT の Triton X-100 不溶性画分への分布も減少した (図 4F)。この結果から、PLEKHG2 と ABL1 が蛋白質凝集体を形成するのに、ABL1 のチロシンキナーゼ活性が必要であることが示唆された。しかしながら、図 3A に示したように PLEKHG2Y489F と ABL1 は蛋白質凝集体を形成することから、ABL1 によりチロシンリン酸化される他の蛋白質が、PLEKHG2 と ABL1 の凝集に必要だという可能性が考えられた。蛋白質凝集体の形成条件等は、今後更なる詳細な検討が必要である。



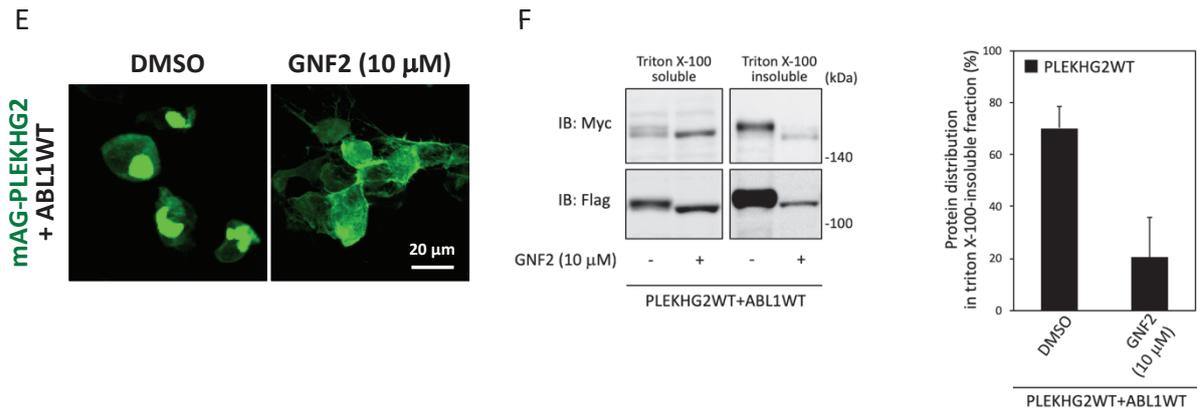


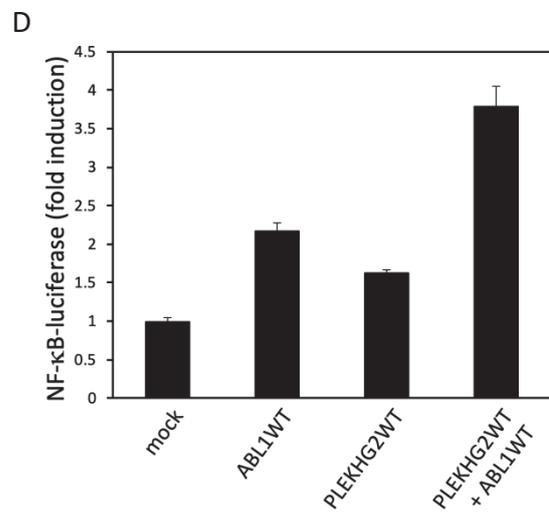
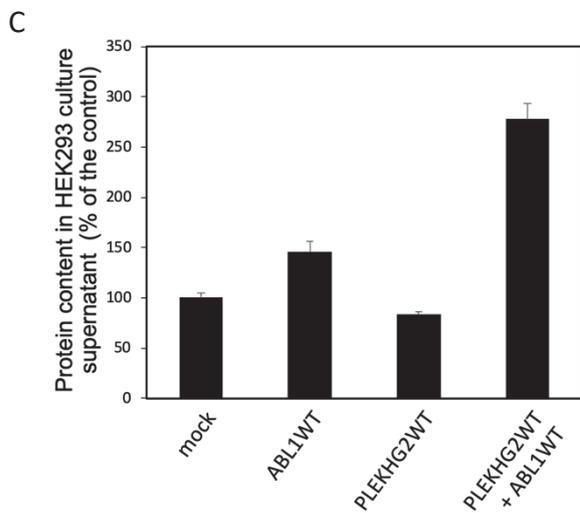
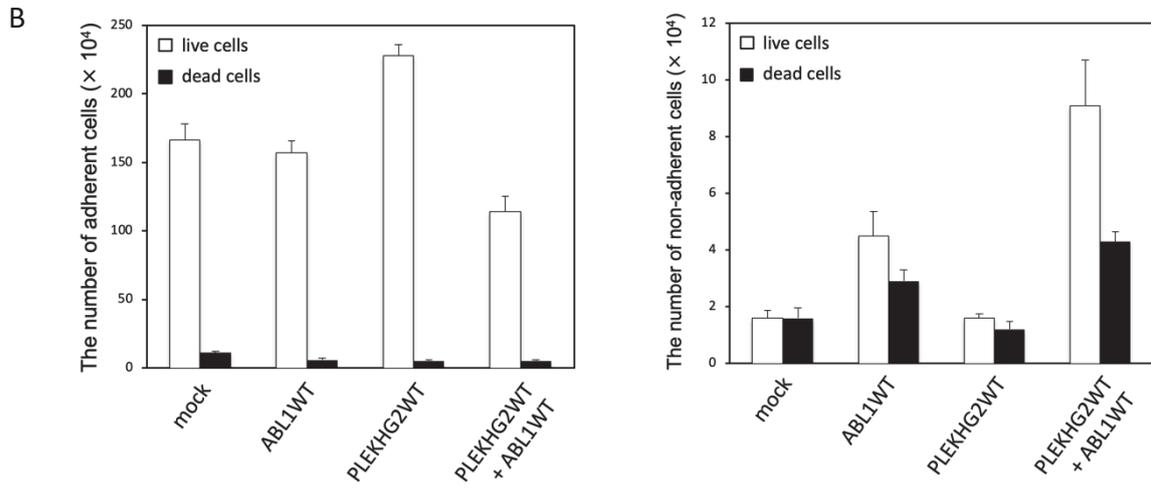
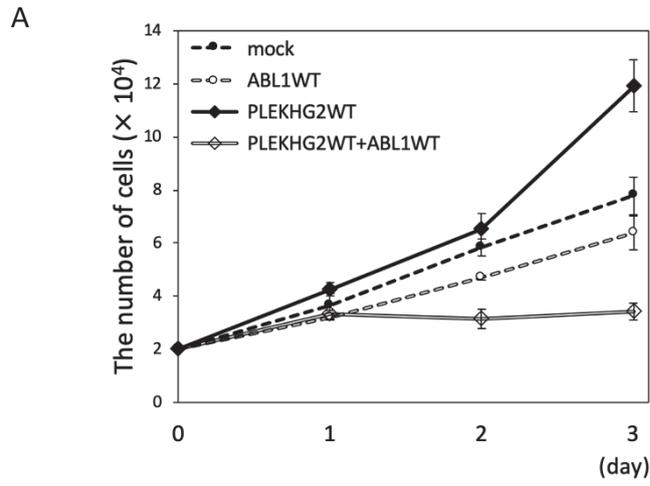
図 4. PLEKHG2 と ABL1 の細胞内蛋白質凝集体形成における ABL1 のチロシンリン酸化依存的/非依存的関与

(A, B) ABL1WT、ABL1 (1-529)、ABL1 (515-1149)、ABL1 (1-949) が PLEKHG2 の細胞内局在に与える影響 Triton X-100 不溶性フラクションにおける PLEKHG2 の分布は、バンド強度を image J ソフトウェアで定量化し、(Triton X-100 insoluble) / (Triton X-100 soluble + insoluble) (%) を用いて平均値 ± S.D. で示した。IB, immunoblotting (C, D) PLEKHG2WT、PLEKHG2 (1-464)、PLEKHG2 (465-1386) が ABL1 の細胞内局在に与える影響 Triton X-100 不溶性フラクションにおける ABL1 の分布は、バンド強度を image J ソフトウェアで定量化し、(Triton X-100 insoluble) / (Triton X-100 soluble + insoluble) (%) を用いて平均値 ± S.D. で示した。(E, F) GNF2 が PLEKHG2 及び ABL1 の細胞内局在に与える影響 Triton X-100 不溶性フラクションにおける PLEKHG2 の分布は、バンド強度を image J ソフトウェアで定量化し、(Triton X-100 insoluble) / (Triton X-100 soluble + insoluble) (%) を用いて平均値 ± S.D. で示した。

5. PLEKHG2 と ABL1 の細胞内蛋白質凝集体形成による NF- κ B シグナル依存的な細胞増殖の抑制

PLEKHG2 と ABL1 が形成する蛋白質凝集体の細胞機能を明らかにするため、細胞増殖への影響について検討した。その結果、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞の増殖速度は、コントロールベクター発現細胞、PLEKHG2WT 発現細胞、ABL1WT 発現細胞と比較して、顕著に低かった (図 5A)。また、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞の培養上清において、他の細胞と比べて生細胞と死細胞を含む浮遊細胞の数が多いことが観察された (図 5B)。さらに浮遊細胞の数を定量するため培養上清中の蛋白質量を測定した結果、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞の培養上清中の蛋白質量が最も高かった (図 5C)。以上の結果から、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞では、細胞死、細胞接着抑制、細胞増殖抑制関連のシグナルが亢進している可能性が考えられた。一般的に、NF- κ B シグナルは細胞増殖や細胞接着等を含む種々の細胞機能に関与していることが知られている。そこで、本研究でみられた細胞増殖抑制に NF- κ B シグナルが関与しているのかを検討するため、PLEKHG2 と ABL1 の各種遺伝子を発現させた細胞における NF- κ B 依存的遺伝子転写活性 (NF- κ B 活性) を測定した。その結果、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞では、PLEKHG2WT、ABL1WT の単独発現細胞に比べて、NF- κ B 活性が相乗的に増加した (図 5D)。この結果から、PLEKHG2 と ABL1 の共発現細胞でみられる細胞増殖抑制と NF- κ B シグナルが関連していることが示唆された。次に、NF- κ B シグナルがどのように細胞増殖抑制に影響しているのかを調べるために、inhibitor of NF- κ B (I- κ B α) 発現ベクターを用いて実験を行った。はじめに、I- κ B α が PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞における NF- κ B 活性を

抑制するかについて確認した (図 5E)。次に同条件下において、I- κ B α が、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞における細胞増殖抑制に影響を与えるかについて検討した。その結果、I- κ B α を共発現させた細胞では、細胞増殖抑制がみられなくなった (図 5F)。これらの結果から、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞における細胞増殖抑制は NF- κ B シグナルが関与していることが示唆された。次に、NF- κ B シグナルの活性化に寄与する ABL1 と PLEKHG2 のアミノ酸構造を検討するため、ABL1 と PLEKHG2 の各種変異体を発現させた細胞において NF- κ B 活性を測定した。PLEKHG2WT と ABL1 (1-529) もしくは ABL1 (515-1149) を共発現させた細胞における NF- κ B 活性は、ABL1WT と共発現させた細胞における NF- κ B 活性より低かった。また、PLEKHG2WT と ABL1 チロシンキナーゼ活性欠損変異体である ABL1 K290R を共発現させた細胞の NF- κ B 活性も低いことがわかった (図 5G)。一方、ABL1WT と PLEKHG2 (1-464) もしくは PLEKHG2 (465-1386) を共発現させた細胞における NF- κ B 活性は PLEKHG2WT と共発現させた細胞における NF- κ B 活性より低かった (図 5H)。これらの結果から、PLEKHG2 と ABL1 の蛋白質凝集体の形成と NF- κ B 活性の上昇に関連がみられた。以上の結果から、PLEKHG2 と ABL1 が形成する細胞内蛋白質凝集体が NF- κ B シグナルを介して細胞増殖抑制を誘導するという新規の機構が考えられた。



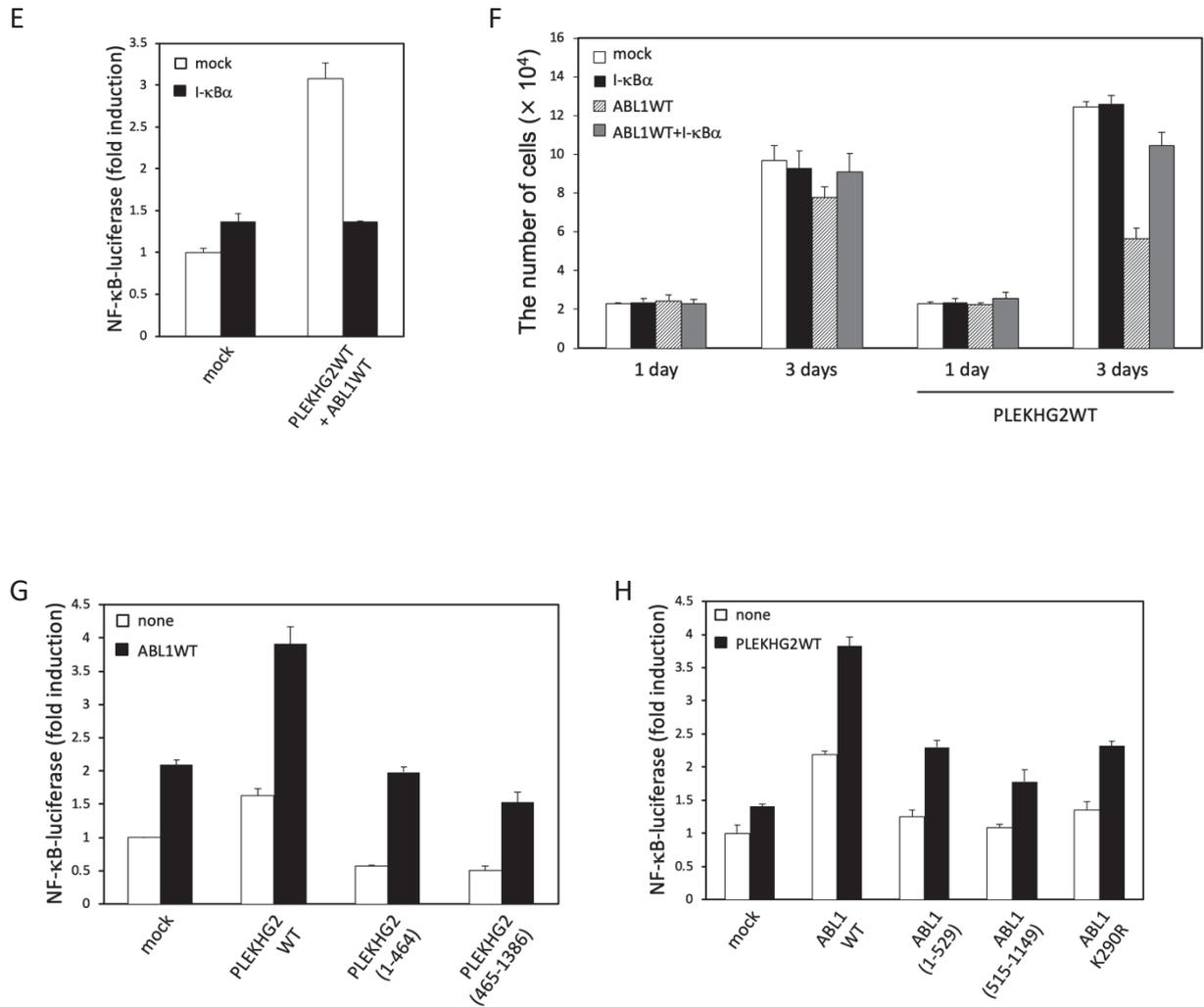


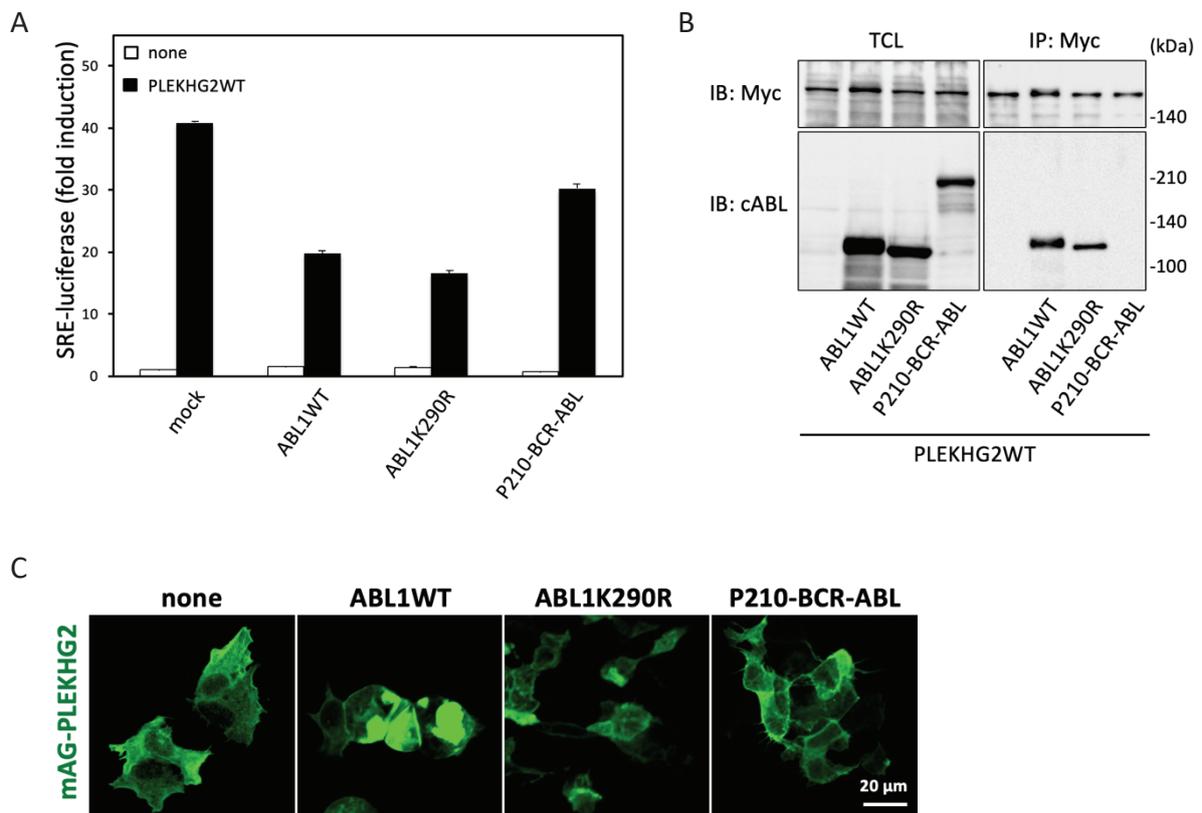
図 5. PLEKHG2 と ABL1 の蛋白質凝集体による NF-κB シグナル依存的細胞増殖への影響

(A) PLEKHG2WT、ABL1WT をそれぞれ発現させた細胞の増殖曲線 播種後、1-3 日目の細胞数を平均値±S. D. で示した。(B, C) PLEKHG2 及び ABL1 が細胞の増殖、生死、接着に与える影響 播種後 3 日目の接着細胞及び浮遊細胞をトリパンブルーで染色後、生細胞と死細胞の数を平均値±S. D. で示した。浮遊細胞数は、BCA 法を用いて培養液上清中の蛋白質量を測定することで、定量化した。値は平均値±S. D. で示した。(D) PLEKHG2 及び ABL1 が NF-κB 活性に与える影響値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(E) I-κBα が PLEKHG2 及び ABL1 依存的 NF-κB 活性に与える影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。(F) I-κBα が PLEKHG2 及び ABL1 の共発現による細胞増殖抑制に与える影響 値は平均値±S. D. で示した。(G, H) PLEKHG2、ABL1 の各種変異体が NF-κB 活性に与える影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値±S. D. で示した。

6. PLEKHG2 の機能に対する BCR-ABL と ABL1 の異なる作用

9 番染色体長腕 (9q34.1) に座位する *ABL1* 遺伝子と 22 番染色体長腕 (22q11.2) に座位する *breakpoint cluster region (BCR)* 遺伝子との相互転座により *BCR-ABL* キメラ遺伝子が形成され、チロシンキナーゼ活性の亢進した P210-BCR-ABL 等が生産されることが知られている。ABL1 は、がん細胞のアポトーシスや細胞増殖を調節することが報告されていることから、がん等を含む様々な疾患に関与している蛋白質として知られている (44, 53)。その一方、BCR-ABL は形質転換能をもち、慢性骨髄性白血病や、急性リンパ性白血病に関与していると考えられている (26-30)。また、BCR-ABL は、RhoGEF の一つである VAV1 と相互作用し、Rac シグナルを調節することも知られている (54)。異なる細胞機能を持つ ABL1 と BCR-ABL が PLEKHG2 に与える影響を検討するため、ABL1WT もしくは P210-BCR-ABL による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響を測定した。その結果、P210-BCR-ABL による PLEKHG2 依存的 SRE 活性の抑制効果は、ABL1WT や ABL1K290R に比べて弱いことがわかった (図 6A)。次に、PLEKHG2 と BCR-ABL の相互作用と、PLEKHG2 と ABL1 の相互作用を比較するため、これらの遺伝子を発現させた細胞を用いて、PLEKHG2 により免疫沈降を行った。その結果、ABL1WT と ABL1K290R の共沈降は検出されたが、P210-BCR-ABL の共沈降は検出されなかった (図 6B)。次に、PLEKHG2 と BCR-ABL は蛋白質凝集体を誘導するのかを検討した。その結果、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞でみられた蛋白質凝集体が、PLEKHG2WT と ABL1K290R の共発現細胞と PLEKHG2WT と P210-BCR-ABL の共発現細胞ではみられなかった (図 6C)。さらに、Triton X-100 を用いた分画法でも、PLEKHG2WT と ABL1WT の共発現細胞において Triton X-100 不溶性画分の

PLEKHG2の量が増加したのに対し、PLEKHG2WTとABL1K290Rの共発現細胞、PLEKHG2WTのP210-BCR-ABLの共発現細胞ではTriton X-100不溶性画分のPLEKHG2の量は増加しなかった(図6D)。次にBCR-ABLの細胞増殖およびNF- κ B活性に与える影響を検討した。その結果、PLEKHG2WTとABL1K290Rの共発現細胞とPLEKHG2WTとP210-BCR-ABLの共発現細胞では細胞増殖の抑制はみられなかった(図6E)。それと同様に、PLEKHG2WTとABL1K290Rの共発現細胞とPLEKHG2WTとP210-BCR-ABLの共発現細胞では、NF- κ B活性の上昇はみられなかった(図6F)。これらの結果から、BCR-ABLは、PLEKHG2との相互作用が弱いため、NF- κ Bシグナルを介した細胞増殖抑制能力が弱いと考えられた。



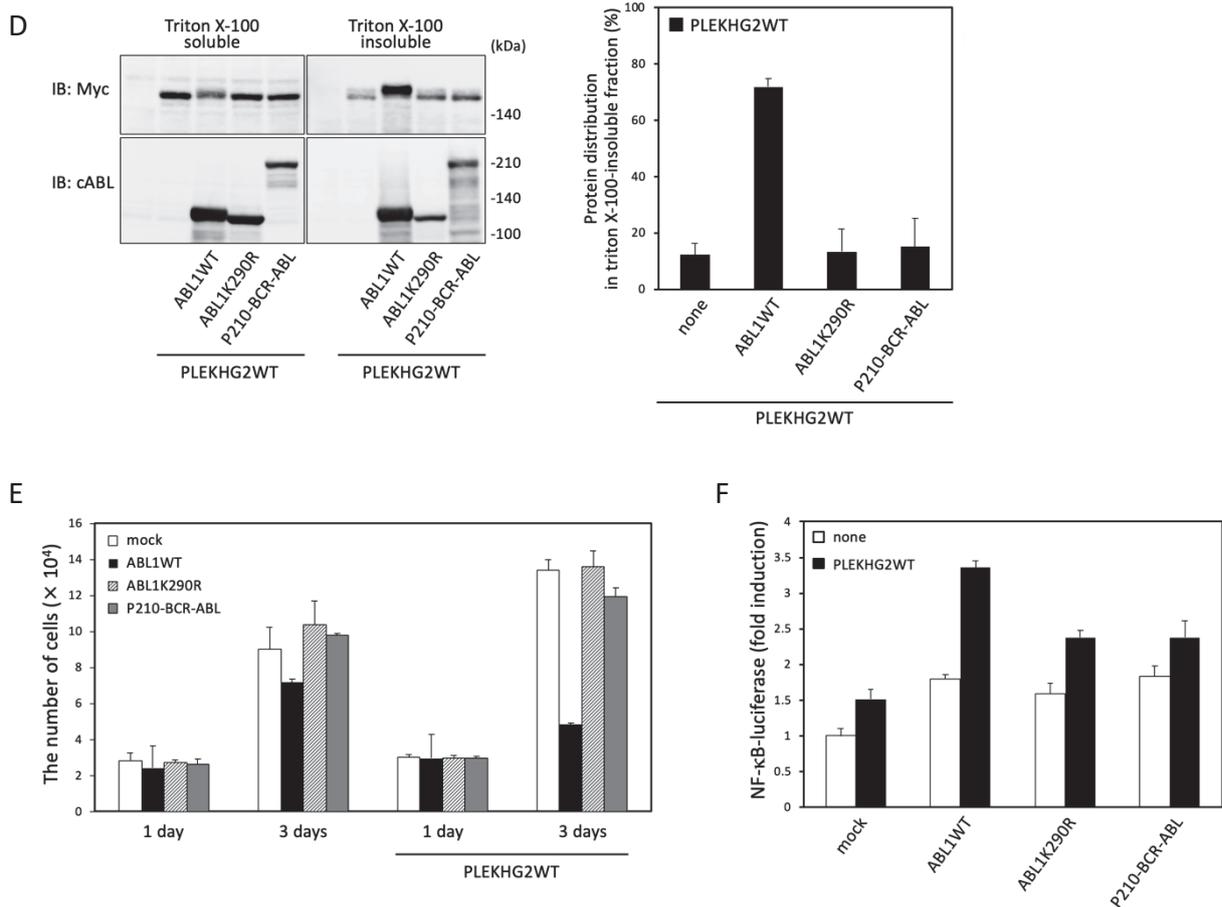


図 6. PLEKHG2 と P210-BCR-ABL の共発現が細胞機能に与える影響

(A) ABL1WT、ABL1K290R、P210-BCR-ABL による PLEKHG2 依存的 SRE 活性への影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値 ± S. D. で示した。(B) PLEKHG2WT と ABL1WT、ABL1K290R、P210-BCR-ABL の相互作用 TCL, total cell lysate; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting (C, D) ABL1WT、ABL1K290R、P210-BCR-ABL が PLEKHG2 の細胞内局在に与える影響 Triton X-100 不溶性フラクションにおける PLEKHG2 の分布は、バンド強度を imageJ ソフトウェアで定量化し、(Triton X-100 insoluble) / (Triton X-100 soluble + insoluble) (%) を用いて平均値 ± S. D. で示した。(E) PLEKHG2WT、ABL1WT、ABL1K290R、P210-BCR-ABL が細胞増殖に与える影響 平均値 ± S. D. で示した。(F) PLEKHG2WT、ABL1WT、ABL1K290R、P210-BCR-ABL が NF-κB 活性に与える影響 値は mock を 1.0 として標準化し、平均値 ± S. D. で示した。

第四節 考察

本研究では、HEK293 細胞において、ABL1 が相互作用により PLEKHG2 依存的 SRE 活性を抑制することと、その相互作用が NF- κ B シグナルを介して細胞増殖を抑制することを論じた。

Sato らは以前、EPHB2 シグナルにおいて、SRC により Tyr489 がリン酸化された PLEKHG2 が、SH2 ドメインを有する ABL1 および PIK3R3 と相互作用することを報告した。(17) 一方、ABL1 が Sos-1、Trio、Kalirin を含む RhoGEF をチロシンリン酸化し、活性化させるという報告がある (15, 16, 32, 33)。しかしながら、ABL1 がこれらの RhoGEF に相互作用してその活性を制御しているかについての報告はまだない。本研究では、ABL1 がチロシンリン酸化非依存的な相互作用により、PLEKHG2 依存的な遺伝子転写活性を抑制することを明らかにした。さらに、過去、 β -actin と三量体 G 蛋白質 $G\alpha_s$ サブユニットは PLEKHG2 の DH ドメイン近傍に相互作用することにより、PLEKHG2 の活性を抑制することが報告されている (15, 27)。これらの結果から、ABL1 が PLEKHG2 の DH ドメインに直接的または間接的に相互作用することで PLEKHG2 を抑制的に制御することが考えられる。

本研究では NF- κ B シグナルの上昇が PLEKHG2 と ABL1 の相互作用が作り出す細胞内蛋白質凝集体と細胞増殖抑制に関わっていることを見出した。その一方、c-Abl をノックアウトした線維芽細胞は NF- κ B 活性が恒常的に上昇するという報告がある (34)。本研究において、ABL1 は PLEKHG2 と共発現すると細胞内局在が変化することが見出された。このことから、細胞内における ABL1 活性の局所的な増減が NF- κ B シグナルの上昇に繋がっている可能性が考えられた。また、PLEKHG2 と ABL1 の蛋白質凝集体形成には、ABL1 によってチロシンリン酸化される PLEKHG2

以外の蛋白質が関与している可能性も考えられる。その候補として考えられるのが、ABL1によりチロシンリン酸化され、ABL1と相互作用し、細胞内で共局在することが知られている RapGEF に属する C3G である (55)。Rap は I- κ B キナーゼの相互作用分子として知られており NF- κ B シグナルを調節することも知られている (56)。本研究結果とこれらの報告から、ABL1-*PLEKHG2*-NF- κ B シグナルと ABL1-C3G-Rap シグナルの間でクロストークが存在する可能性が考えられる。この点においてはさらなる検討が必要である。

PLEKHG2 と BCR-ABL の共発現細胞では、ABL1 とは異なり、NF- κ B シグナル依存的な細胞増殖を抑制しないことが明らかとなった。BCR-ABL は BCR 部分のアミノ酸構造により、分子内抑制機構が破綻していることから、そのチロシンキナーゼ活性は恒常的に活性化していることが知られている (57)。また、BCR 部分のアミノ酸構造により分子間相互作用することで、細胞内でオリゴマー化していると考えられている (58)。したがって、BCR のアミノ酸構造による ABL1 領域の構造変化が BCR-ABL と *PLEKHG2* の相互作用が弱い理由の一つとして考えられる。一方で、BCR-ABL は、BCR のアミノ酸構造により、その細胞内局在やチロシンキナーゼ活性の特異性が ABL1 から変化しているという報告がある (59, 60)。本研究の結果から、*PLEKHG2* と ABL1 によって蛋白質凝集体が形成されるには、ABL1 によりチロシンリン酸化される第 3 の蛋白質が必要である可能性が示唆される。BCR-ABL は蛋白質凝集体の形成に必要な特定の蛋白質をチロシンリン酸化できない可能性が考えられる。さらに BCR-ABL には P210、P185、P230 という三つの異なる白血病型から同定された異なる分子量をもった変異体が存在する (37)。おそらく各種 BCR-ABL

が PLEKHG2 に与える影響はそれぞれ異なる可能性があるので、将来さらなる解析が必要であると考えられる。

本研究では、HEK293 細胞における PLEKHG2 と ABL1 の相互作用による細胞機能への影響を明らかにした。ABL1 は PLEKHG2 の活性をチロシンリン酸化非依存的な相互作用を介して抑制し、さらにその相互作用は細胞内蛋白質凝集体を形成することを明らかにした。そして PLEKHG2 と ABL1 により形成された細胞内蛋白質凝集体が NF- κ B シグナルを介して細胞増殖抑制を引き起こすことを見出した (図 7)。

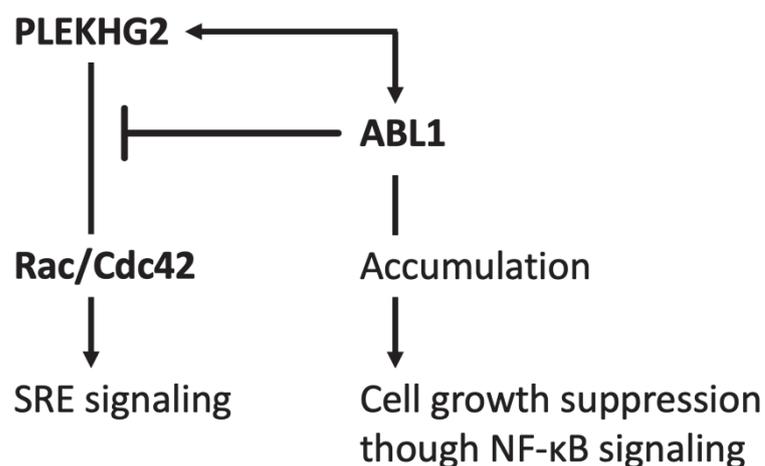


図 7. PLEKHG2 と ABL1 の相互作用による細胞機能

ABL1 は PLEKHG2 と相互作用することにより PLEKHG2 依存的 SRE 活性を抑制する。さらに PLEKHG2 と ABL1 は細胞質内で蛋白質凝集体を形成し、NF- κ B 依存的細胞増殖抑制を引き起こす。

総括

細胞接着や遊走等を司るアクチン細胞骨格の重合/脱重合反応の調節には、Rho や、その主要な活性化因子である RhoGEF が関与している。p115RhoGEF や P-REX1、PLEKHG2 等を含む RhoGEF 群は、細胞外刺激の一種である GPCR シグナルにより時空間的に制御されることが知られている。過去、PLEKHG2 が三量体 G 蛋白質サブユニットの $G\beta\gamma$ サブユニットとの相互作用により活性化され、活性型 $G\alpha_s$ サブユニットとの相互作用により抑制されることが報告された。PLEKHG2 は、ある種の lymphoma や神経疾患との関連も報告されていることから、これらの病態解明のために PLEKHG2 の制御機構や細胞機能の詳細を明らかにする意義は大きいと考えられる。

一般的に蛋白質の細胞機能は、その蛋白質が持つドメイン構造から推測することができるが、PLEKHG2 は RhoGEF 活性を担う DH/PH ドメイン以外に既知の機能ドメインを持たない。そのため、Sato らにより、PLEKHG2 の相互作用蛋白質の探索が行われてきた。本研究では、その過程で同定された FHL1 と ABL1 による PLEKHG2 の活性及びその細胞機能への影響について検討し、次の二点について明らかにした。

1. FHL1 の GPCR シグナルによる PLEKHG2 調節機構への影響について

酵母 Two-hybrid 法により PLEKHG2 の相互作用分子として見出された FHL1 は、FHL2 と FHL3 の三つのアイソフォームからなる。本研究では、これら三つのアイソフォームの中で、FHL1 が PLEKHG2 と特異的に相互作用することを明らかにした。さらに、FHL1 は $G\beta\gamma$ サブユニットによる PLEKHG2 の活性化効果を増強し、活性型 $G\alpha s$ サブユニットによる抑制効果を減弱させることを示した。これらのことから、FHL1 が GPCR シグナルによる PLEKHG2 の活性調節を制御する因子として働くことが示唆された。

2. PLEKHG2 と ABL1 の相互作用が誘導する新規細胞増殖抑制機構について

細胞の癌化と密接に関わる非受容体型チロシンキナーゼの一種である SRC によりリン酸化された PLEKHG2 と相互作用する蛋白質の一つに ABL1 が見出された。本研究では、PLEKHG2 と ABL1 の相互作用が、PLEKHG2 を不活性化し細胞伸展を抑制すること、また、細胞内で蛋白質凝集体を形成することを明らかにした。さらに、蛋白質凝集体が NF- κ B シグナルを介して細胞増殖を抑制している可能性を見出した。

本研究により、PLEKHG2 は蛋白質間相互作用を介して、細胞形態制御に関わる Rho シグナルだけではなく、細胞増殖に関わる NF- κ B シグナルの制御も担っていることが示唆された。今後、さらに PLEKHG2 を中心としたシグナル経路を明らかにすることで、今まで知られていない疾病原因の解明につながる可能性や、それに伴い PLEKHG2 をターゲットとした創薬開発が進むことが期待される。

謝辞

本研究遂行に際し、終始御懇篤なるご指導及びご助言を賜りました岐阜大学連合創薬医療情報研究科 上田 浩 教授に深く感謝いたします。

本論文作成に際し、有益なご助言及び御校閲を賜りました岐阜大学連合創薬医療情報研究科 横川 隆志 教授、武藤 吉徳 教授、赤尾 幸博 特任教授に深く感謝いたします。

共同研究を御快諾頂き、有益なる御助言を賜りました岐阜医療科学大学保健科学部 杉山 剛志 教授、かずさDNA研究所 長瀬 隆弘 博士及び 山川 央 博士に深く感謝いたします。

参考文献

1. Cook, D. R., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2014) Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*. **33**, 4021–35
2. Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. **279**, 509–14
3. Weiner, O. D., Servant, G., Welch, M. D., Mitchison, T. J., Sedat, J. W., and Bourne, H. R. (1999) Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. *Nat. Cell Biol.* **1**, 75–81
4. Aittaleb, M., Boguth, C. A., and Tesmer, J. J. G. (2010) Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Pharmacol.* **77**, 111–25
5. Zheng, Y. (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 724–732
6. Côté, J. F., and Vuori, K. (2007) GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* **17**, 383–393
7. Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G., and Sternweis, P. C. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science*. **280**, 2109–11
8. Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T., and Gutkind, J. S. (1999)

- A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J. Biol. Chem.* **274**, 5868–79
9. Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J. S. (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett.* **485**, 183–8
 10. Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M., and Wieland, T. (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* **280**, 11134–9
 11. Rojas, R. J., Yohe, M. E., Gershburg, S., Kawano, T., Kozasa, T., and Sondek, J. (2007) Gα_q directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem.* **282**, 29201–10
 12. Welch, H. C. E., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gβ₂γ-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell.* **108**, 809–21
 13. Ueda, H., Nagae, R., Kozawa, M., Morishita, R., Kimura, S., Nagase, T., Ohara, O., Yoshida, S., and Asano, T. (2008) Heterotrimeric G protein β₂γ subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* **283**, 1946–53
 14. Runne, C., and Chen, S. (2013) PLEKHG2 promotes heterotrimeric G

- protein $\beta \gamma$ -stimulated lymphocyte migration via Rac and Cdc42 activation and actin polymerization. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4294–307
15. Sugiyama, K., Tago, K., Matsushita, S., Nishikawa, M., Sato, K., Muto, Y., Nagase, T., and Ueda, H. (2017) Heterotrimeric G protein G α s subunit attenuates PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by direct interaction. *Cell. Signal.* **32**, 115–123
 16. Sato, K., Kimura, M., Sugiyama, K., Nishikawa, M., Okano, Y., Nagaoka, H., Nagase, T., Kitade, Y., and Ueda, H. (2016) Four-and-a-half LIM Domains 1 (FHL1) Protein Interacts with the Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor PLEKHG2/FLJ00018 and Regulates Cell Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **291**, 25227–25238
 17. Sato, K., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Kitade, Y., Nagase, T., and Ueda, H. (2014) PLEKHG2/FLJ00018, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, is tyrosine phosphorylated via the EphB2/cSrc signaling pathway. *Cell. Signal.* **26**, 691–6
 18. Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* **265**, 23–32
 19. Lazer, G., and Katzav, S. (2011) Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: Good therapeutic targets for cancer therapy? *Cell. Signal.* **23**, 969–979
 20. Schmidt, A., and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587–609

21. Barrows, D., He, J. Z., and Parsons, R. (2016) PREX1 protein function is negatively regulated downstream of receptor tyrosine kinase activation by p21-activated Kinases (PAKs). *J. Biol. Chem.* **291**, 20042–20054
22. Mayeenuddin, L. H., and Garrison, J. C. (2006) Phosphorylation of P-Rex1 by the cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma-mediated regulation of its activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 1921–8
23. Fritsch, R., De Krijger, I., Fritsch, K., George, R., Reason, B., Kumar, M. S., Diefenbacher, M., Stamp, G., and Downward, J. (2013) XRAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Cell.* **153**, 1050–1063
24. Urano, D., Nakata, A., Mizuno, N., Tago, K., and Itoh, H. (2008) Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein $\beta \gamma$ subunits and PKA. *Cell. Signal.* **20**, 1545–1554
25. Montero, J. C., Seoane, S., García-Alonso, S., and Pandiella, A. (2016) Multisite phosphorylation of P-Rex1 by protein kinase C. *Oncotarget.* **7**, 77937–77949
26. Sato, K., Sugiyama, T., Nagase, T., Kitade, Y., and Ueda, H. (2014) Threonine 680 phosphorylation of FLJ00018/PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by epidermal growth factor receptor signaling regulates cell morphology of Neuro-2a cells. *J. Biol.*

Chem. **289**, 10045–56

27. Sato, K., Handa, H., Kimura, M., Okano, Y., Nagaoka, H., Nagase, T., Sugiyama, T., Kitade, Y., and Ueda, H. (2013) Identification of a Rho family specific guanine nucleotide exchange factor, FLJ00018, as a novel actin-binding protein. *Cell. Signal.* **25**, 41–9
28. Shathasivam, T., Kislinger, T., and Gramolini, A. O. (2010) Genes, proteins and complexes: The multifaceted nature of FHL family proteins in diverse tissues. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 2702–2720
29. Johannessen, M., Møler, S., Hansen, T., Moens, U., and Van Ghelue, M. (2006) The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 268–284
30. Ding, L., Wang, Z., Yan, J., Yang, X., Liu, A., Qiu, W., Zhu, J., Han, J., Zhang, H., Lin, J., Cheng, L., Qin, X., Niu, C., Yuan, B., Wang, X., Zhu, C., Zhou, Y., Li, J., Song, H., Huang, C., and Ye, Q. (2009) Human four-and-a-half LIM family members suppress tumor cell growth through a TGF- β -like signaling pathway. *J. Clin. Invest.* **119**, 349–61
31. Müller, J. M., Metzger, E., Greschik, H., Bosserhoff, A.-K., Mercep, L., Buettner, R., and Schüle, R. (2002) The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J.* **21**, 736–48
32. Coghill, I. D., Brown, S., Cottle, D. L., McGrath, M. J., Robinson, P. A., Nandurkar, H. H., Dyson, J. M., and Mitchell, C. A. (2003) FHL3 is an

- actin-binding protein that regulates α -actinin-mediated actin bundling. FHL3 localizes to actin stress fibers and enhances cell spreading and stress fiber disassembly. *J. Biol. Chem.* **278**, 24139–24152
33. Godbey, W. T., Wu, K. K., and Mikos, A. G. (1999) Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J. Control. Release.* **60**, 149–60
34. Hynes, N. E., and Gattelli, A. (2011) P-Rex1, a guanine exchange factor that is overexpressed in breast cancer, is a convergence node for ErbB and CXCR4 signaling. *Mol. Cell.* **41**, 5–7
35. Wixler, V., Hirner, S., Müller, J. M., Gullotti, L., Will, C., Kirfel, J., Günther, T., Schneider, H., Bosserhoff, A., Schorle, H., Park, J., Schüle, R., and Buettner, R. (2007) Deficiency in the LIM-only protein Fhl2 impairs skin wound healing. *J. Cell Biol.* **177**, 163–172
36. König, K., Diehl, L., Rommerscheidt-Fuss, U., Golletz, C., Quast, T., Kahl, P., Kolanus, W., Knolle, P., Buettner, R., and Heukamp, L. C. (2010) Four-and-a-Half LIM Domain Protein 2 Is a Novel Regulator of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 in CCL19-Induced Dendritic Cell Migration. *J. Immunol.* **185**, 1466–1475
37. Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature.* **420**, 629–635
38. Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 167–80

39. Goicoechea, S. M., Awadia, S., and Garcia-Mata, R. (2014) I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adh. Migr.* **8**, 535–49
40. Nishikawa, M., Sato, K., Nakano, S., Yamakawa, H., Nagase, T., and Ueda, H. (2017) Specific activation of PLEKHG2-induced serum response element-dependent gene transcription by four-and-a-half LIM domains (FHL) 1, but not FHL2 or FHL3. *Small GTPases.* **0**, 1–6
41. Kruh, G. D., Perego, R., Miki, T., and Aaronson, S. A. (1990) The complete coding sequence of arg defines the Abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5802–6
42. Wang, J. Y. J. (2014) The capable ABL: what is its biological function? *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1188–97
43. Hernández, S. E., Krishnaswami, M., Miller, A. L., and Koleske, A. J. (2004) How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol.* **14**, 36–44
44. Bradley, W. D., and Koleske, A. J. (2009) Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: emerging mechanisms and physiological contexts. *J. Cell Sci.* **122**, 3441–54
45. Forsthoefel, D. J. (2005) The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in Drosophila. *Development.* **132**, 1983–1994
46. Kannan, R., Song, J.-K., Karpova, T., Clarke, A., Shivalkar, M., Wang, B.,

- Kotlyanskaya, L., Kuzina, I., Gu, Q., and Giniger, E. (2017) The Abl pathway bifurcates to balance Enabled and Rac signaling in axon patterning in *Drosophila*. *Development*. **144**, 487–498
47. Sini, P., Cannas, A., Koleske, A. J., Di Fiore, P. P., and Scita, G. (2004) Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. *Nat. Cell Biol.* **6**, 268–74
48. Wen, S. T., Jackson, P. K., and Van Etten, R. A. (1996) The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.* **15**, 1583–95
49. Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levvero, M., and Wang, J. Y. (1999) The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*. **399**, 806–9
50. Agami, R., Blandino, G., Oren, M., and Shaul, Y. (1999) Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature*. **399**, 809–13
51. Tong, H., Qi, D., Guan, X., Jiang, G., Liao, Z., Zhang, X., Chen, P., Li, N., and Wu, M. (2018) c-Abl tyrosine kinase regulates neutrophil crawling behavior under fluid shear stress via Rac/PAK/LIMK/cofilin signaling axis. *J. Cell. Biochem.* **119**, 2806–2817
52. Friederich, E., Vancompernelle, K., Huet, C., Goethals, M., Finidori, J.,

- Vandekerckhove, J., and Louvard, D. (1992) An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin. *Cell*. **70**, 81–92
53. Khatri, A., Wang, J., and Pendergast, A. M. (2016) Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J. Cell Sci.* **129**, 9–16
54. Bassermann, F., Jahn, T., Miething, C., Seipel, P., Bai, R. Y., Coutinho, S., Tybulewicz, V. L., Peschel, C., and Duyster, J. (2002) Association of Bcr-Abl with the proto-oncogene Vav is implicated in activation of the Rac-1 pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 12437–12445
55. Mitra, A., and Radha, V. (2010) F-actin-binding domain of c-Abl regulates localized phosphorylation of C3G: role of C3G in c-Abl-mediated cell death. *Oncogene*. **29**, 4528–42
56. Teo, H., Ghosh, S., Luesch, H., Ghosh, A., Wong, E. T., Malik, N., Orth, A., de Jesus, P., Perry, A. S., Oliver, J. D., Tran, N. L., Speiser, L. J., Wong, M., Saez, E., Schultz, P., Chanda, S. K., Verma, I. M., and Tergaonkar, V. (2010) Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF-kappaB-dependent gene expression. *Nat. Cell Biol.* **12**, 758–67
57. Greuber, E. K., Smith-Pearson, P., Wang, J., and Pendergast, A. M. (2013) Role of ABL family kinases in cancer: From leukaemia to solid tumours. *Nat. Rev. Cancer*. **13**, 559–571
58. McWhirter, J. R., Galasso, D. L., and Wang, J. Y. (1993) A coiled-coil

- oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7587–7595
59. Koptyra, M., Nieborowska-Skorska, M., Gillespie, E. B., Stoklosa, T., Hoser, G., Wasik, M., Muschen, M., Richardson, C., and Skorski, T. (2013) Normal ABL1 Is a Tumor Suppressor and Therapeutic Target In BCR-ABL1–positive Leukemias. *Blood.* **122**, 2131–2144
60. Voss, J., Posern, G., Hannemann, J. R., Wiedemann, L. M., Turhan, a G., Poirel, H., Bernard, O. a, Adermann, K., Kardinal, C., and Feller, S. M. (2000) The leukaemic oncoproteins Bcr-Abl and Tel-Abl (ETV6/Abl) have altered substrate preferences and activate similar intracellular signalling pathways. *Oncogene.* **19**, 1684–1690