

## 新規アダプター分子APSおよびJABの機能解析

Characterization of novel adaptor molecules, APS and JAB

研究代表者 久留米大学分子生命科学研究所 研究員 横内 雅博

Reserach Fellow, Institute of Life Science, Kurume University Masahiro Yokouchi

A novel adaptor protein, APS (adaptor molecules containing PH and SH2 domains), which was cloned by us in 1997 was tyrosine phosphorylated in response to various cytokines and growth factors. Here we report that ectopical expression of the wild type but not C-terminal truncated APS in NIH-3T3 fibroblasts and Ba/F3 cells suppressed PDGF-induced cell proliferation and erythropoietin (EPO)-induced STAT5 activation. PDGF and EPO induced phosphorylation of the tyrosine residue of APS close to the C-terminal end. In vitro binding experiment suggest that APS bound to the b type PDGF receptor, mainly via the phosphotyrosine 1021 (pY1021), and Y343 of the EPO receptor. In vitro and in vivo binding experiments indicate that tyrosine phosphorylated C-terminal region of APS bound to c-Cbl. Coexpression of c-Cbl and APS synergistically inhibited PDGF-induced c-fos promoter activation, and EPO-induced STAT5 activation. We also found that c-Cbl RING finger domain interacts with Ubch7, a member of ubiquitin-conjugating enzymes E2. We propose a novel negative regulatory mechanism of tyrosine kinases by APS and c-Cbl.

### 研究目的

細胞増殖因子の受容体の多くは細胞内ドメインにチロシンキナーゼを内在しているかもしくは造血因子やサイトカインの受容体のようにJAK型チロシンキナーゼが非共有結合によって会合している。これらのチロシンキナーゼが突然変異などによって恒常的に活性化されるとがん遺伝子として作用することはよく知られている。またそれらのシグナル伝達機構の一部は近年著しい勢いで解明がすすめられているが、完全な理解には新規の基質の検索が不可欠である。本研究では酵母two-hybrid系を応用して得られた新規SH2蛋白APSおよびJABの細胞増殖、分化および癌化における機能を細胞レベル、個体レベルで明らかにすることを目的とする。特に我々はAPSはCblと結合してシグナルを負に調節することを見い出しておりその分子機序を解明する。

### 研究経過

(1) APSのクローニングと発現；  
c-kitの活性化型キナーゼドメインをbaitとした酵母でのtwo-hybrid systemによるスクリーニングの結果、新規のSH2蛋白質、APS (Adaptor containing PH and SH2 domains)を見い出した。APSはリン脂質との結合に関与するとされるPHドメインとりん酸化チロシン残基に結合するSH2ドメインを含んでおり、同様の構造がSH2-BおよびLnkでも認められる。SH2-BはITAM配列に結合する分子として、LnkはT細胞受容体の刺激でりん酸化される分子としてクローニングされたがそれらの機能は明らかにされていない。まずAPSの機能を解析するためにAPSのポリクローナル抗体の作成を行った。どのような細胞で発現しているかスクリーニングを行ったところB細胞株(Raji,Daudi) および骨肉腫細

胞Saos2に高い発現がみられた。これらの細胞を用いてどのような増殖因子、サイトカインの刺激でAPSがリン酸化されるのかを調べた。その結果B細胞においては抗原受容体 (IgM) 刺激で、Saos2ではPDGF,IGFなどの増殖因子によってチロシンリン酸化をうけることを見出した。またインターフェロン $\gamma$ 、白血病阻止因子 (LIF)、エリスロポエチン (EPO) などのサイトカイン刺激によってもAPSはチロシンリン酸化された (図-1)。

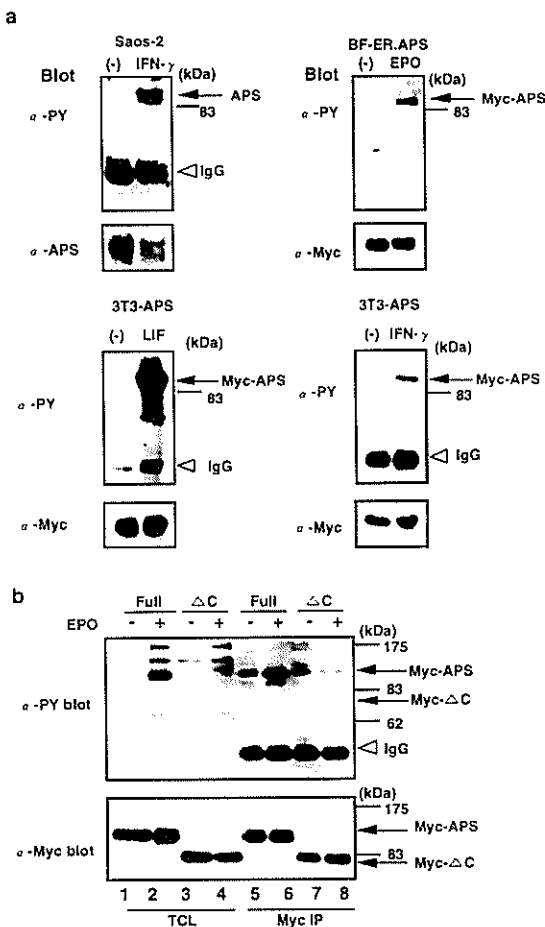


図-1

(a) 様々なサイトカイン刺激によるAPSのチロシンリン酸化

(b) EPO刺激による野生型APS(full)およびC末端を欠失させた変異体 ( $\Delta$ C) のチロシンリン酸化

(2) APSの強制発現によるチロシンキナーゼシグナルの抑制; APSの生理機能を明かにするために繊維芽細胞NIH-3T3および血球細胞Ba/F3の安定形質転換株を作成した。繊維芽細胞APS強制発現の結果PDGFに依存したDNA合成および細胞数の増加が抑制されていた。このような効果はC末端を欠いた変異APSではみられなかった。したがってC末端のリン酸化部位がPDGFシグナル、とくに細胞増殖シグナルの抑制に関与しているものと考えられた。またBa/F3細胞ではEPOによるSTAT5の活性化が抑制されていた (図-2)。以上の結果APSはチロシンキナーゼの新たな負の制御因子であることが示唆された。

(3) APSのリン酸化部位と結合分子; 次にAPSのどの部位がリン酸化されるのか調べるためにC末端ないしN末端を欠いた変異体を作成し、293細胞にPDGF受容体cDNAやEPO受容体/JAK2とともにトランスフェクトした。PDGFやEPO刺激後のリン酸化はC末端を欠いた変異体では見られなかった。C末端側にはチロシン残基は1個しかなくこれらはAPSとファミリーをなすSH2-BおよびLnkでも保存されている。この部位のリン酸化が機能上重要であることが示唆された。すなわちAPSのチロシンリン酸化サイトはさらに次の情報伝達分子の結合サイトとして作用すると考えられる。そこでチロシンリン酸化部位に結合する分子の同定を試みた。APSのC末端部位のリン酸化ペプチドを合成しセファロースビーズに結合させた。これを用いて細胞抽出液からアフィニティー精製を行い、結合する情報伝達分子を調べたところ、Grb-2とc-Cblがよく結合することがわかった。これらはAPSそのものを免疫沈降した場合も共沈してくることがわ

かった。c-Cblは様々な受容体チロシンキナーゼのユビキチン化を促進しチロシンキナーゼを負に制御することが知られている。APSはc-Cblと会合することでシグナルを抑制する可能性が示唆された。実際293細胞の場合STAT5の抑制にはc-Cblの共発現が必要であった(図-2)。

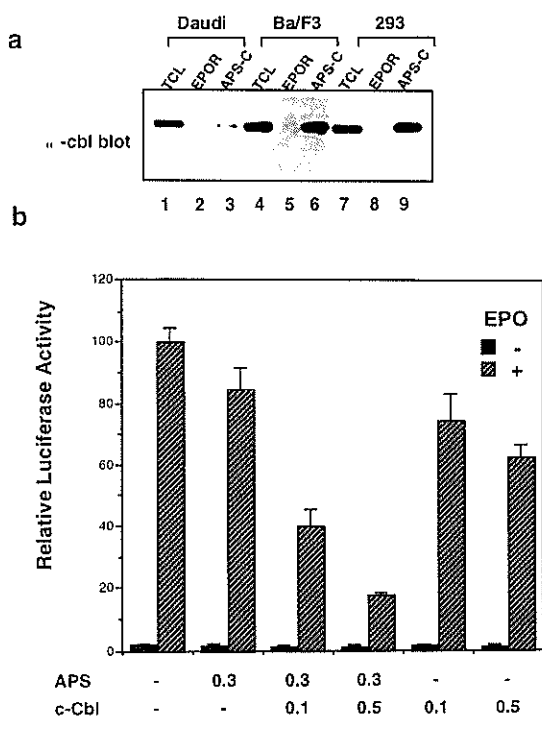


図-2

(a) APSのC末端リン酸化ペプチドとc-Cblの結合。TCLはアプライしたc-Cblを、EPORはY343リン酸化ペプチド、APS-CはAPSのC末端リン酸化ペプチドを示す。

(b) APSとc-Cblの共発現によるEPO依存性STAT5活性化の抑制

(4) APSのSH2ドメインが認識するモチーフ；APSはPDGF刺激後190キロダルトンのリン酸化蛋白と会合する。この分子は分子量からPDGF受容体そのものと考えられた。そこでAPSのSH2

ドメインが認識するリン酸化部位を特定するために受容体の5個の主要なチロシンリン酸化部位をフェニルアラニンに置換した変異体(F5)とそれぞれ1個ずつチロシン残基をもどしたadd-back mutantをPDGFで刺激後、大腸菌で作成した組み換えAPS-SH2ドメインとインキュベートし結合を調べた。その結果APS-SH2ドメインはPDGF受容体の1021番目のチロシン残基(pY1021)を認識することがわかった。この部位はフォスホリパーゼCが結合することが知られているが、実際APSを強制発現させるとPDGFによるフォスホリパーゼCのリン酸化は減弱した。またEPO受容体ではリン酸化ペプチドを用いてY343と結合することを明らかにした。

(5) c-Cblとユビキチン化；これまでの様々な研究からc-CblはPTBドメインを介して結合する分子(チロシンキナーゼを含む)のユビキチン化を促進しその結果チロシンキナーゼを負に制御することが明かにされてきた。しかしながらその分子機構は全く不明であった。そこで我々はc-Cblの研究を精力的に行っているアメリカ合衆国Yale大学細胞生物学のBaron教授と共同研究を行いc-Cblの特にRINGフィンガードメインに会合する分子の検索を行った。c-CblのRINGフィンガードメインは腺虫、ハエでも保存されており、この部分が欠失することでc-Cblはがん遺伝子として作用することが知られているからである。酵母two-hybridスクリーニングの結果我々はc-CblのRINGフィンガードメインがユビキチン化酵素E2の一種UbcH7と特異的に結合することを見出した。すなわちc-Cblは基質をユビキチン化酵素ヘリクルートするE3様の機能を果たしていることになる。RINGフィンガードメインを欠く変異c-CblではE2は結合せず

むしろドミナントネガティブに作用することもわかった（論文投稿中）。RINGフィンガードメインはE2結合分子であるRbxタンパクにもみられRINGフィンガードメインとE2の結合は一般化できそうである。我々はAPSはc-Cbl-E2複合体をサイトカイン受容体にリクルートすることでシグナル抑制作用を著すと考えている（図-3）。

### 今後の課題と発展

APSはSH2ドメインによってPDGF受容体に会合しC末端がりん酸化をうける。このりん酸化がPDGFシグナルを抑制することが明らかとなった。C末端にはCblが結合するが、CblはEGF受容体やSykなどのチロシンキナーゼのシグナルを負に制御することが知られている。その分子機構は今まで明らかではなかったが我々はCblがE3分子として作用するという仮説を提唱した（論文投稿中）。しかしAPSの真の生理機能を明らかにするためにはトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスの解析が必要であり現在作成を検討している。APSに類似の分子はショウジョウバエでも見つかり生体にとって重要な役割を果たしていることが想像される。APSがチロシンキナーゼシグナルを負に調節することからこれをがんの遺伝子治療に応用することも期待される。

### 発表論文

(1) Yokouchi M, Sanjay A, Yoshimura A and Baron R; The c-Cbl RING finger domain interacts with a ubiquitin-conjugating enzyme UbcH7 that mediates ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. 投稿中

(2) Yokouchi M, Wakioka T, Sakamoto H, Yasukawa H, Ohtsuka S, Sasaki A, Ohtsubo M, Valius M, Inoue A, Komiya S, and Yoshimura A; APS, an adaptor protein containing PH and SH2 domains, is associated with the PDGF receptor and c-Cbl, and inhibits PDGF-induced mitogenesis. *Oncogene* 18:759-768,1999

(3) Wakioka T, Sasaki A, Mitsui K, Yokouchi M, Inoue A, Komiya S, and Yoshimura A; APS, an Adaptor Protein Containing PH and SH2 Domains Inhibits the JAK-STAT Pathway in Collaboration with c-Cbl. *Leukemia* 13:760-767, 1999

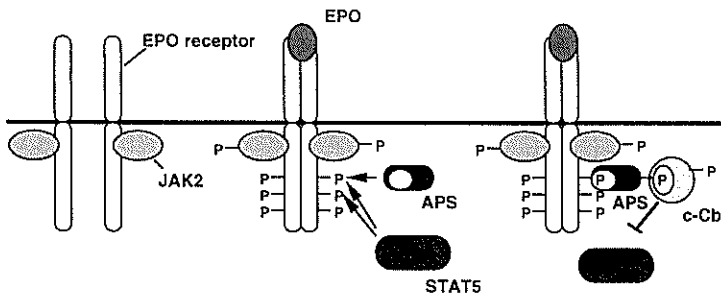


図-3

APS-c-Cbl複合体によるEPO受容体のSTAT5活性化抑制のモデル