

v-Crkとv-Srcの共通信号媒介分子p130の構造・機能解析

郭 隆 一

論文題目 v-Crkとv-Srcの共通信号媒介分子p130の構造・機能解析

氏名 堺 隆 一

<< 目次 >>

I.	緒言	1
II.	方法	4
	1. 用いた細胞株と培養条件	4
	2. v-Crk発現細胞の樹立	4
	3. 実験に用いたモノクローナル抗体とその大量調整	4
	4. ウェスタンブロッティング	5
	5. 2次元電気泳動	5
	6. 細胞の正リン酸ラベル	6
	7. in-vitroでの各種酵素処理	6
	8. 抗体カラムの作成	7
	9. p130蛋白質の抗体カラムによる精製	7
	10. p130蛋白質のPVDF膜上でのプロテアーゼ消化	8
	11. 部分アミノ酸配列の決定	8
	12. 変性プライマーを用いたRT-PCR	8
	13. cDNAライブラリーの作成とスクリーニング	9
	14. ジデオキシ法によるDNA塩基配列の決定	9
	15. データベース検索と一次構造の解析	9
	16. ノーザンプロット解析	10
	17. GST融合タンパク質によるポリクローナル抗体の作成	10
	18. キナーゼアッセイ	10
	19. V8プロテアーゼによる限定分解の断片の解析	10
	19. 細胞分画の調製	11
III.	結果	12
	1. v-Crk発現細胞におけるv-Crk結合リン酸化蛋白質の同定	12
	2. 2次元電気泳動法によるp130の検出	12
	3. p130の多段階のリン酸化による多様性	15
	4. v-Crkを発現するラット3Y1細胞からのp130の精製	18
	5. p130の部分アミノ酸配列の決定	22
	6. ラットp130のcDNAクローニング	26
	7. 新規の信号伝達分子としてのp130の構造の特徴	26
	8. ポリクローナル抗体の作成とp130 ^{Cas} の検出	29

9. v-Crkとv-Srcの主要な基質成分であるp130 ^{Cas}	34
10. NIH3T3細胞のがん化に関連したp130 ^{Cas} のリン酸化	39
11. p130 ^{Cas} のチロシンリン酸化による細胞内局在の変化	42
IV. 考察	45
V. おわりに	50
VI. 謝辞	51
VII. 文献	52

図・表

図1	13
図2	14
図3	16
図4	17
図5	19
図6	20
図7	21
図8	23
図9	24
表1	25
図10	27
図11	28
図12	30
図13	31
図14	32
図15	33
図16	35
図17	36
図18	37
図19	38
図20	40
図21	41
図22	43
図23	44
図24	49

略 語 表

2D	two-dimensional
BAP	bacterial alkaline phosphatase
CEF	chicken embryo fibroblasts
CIP	calf intestine alkaline phosphatase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	dithiothreitol
GST	glutathione S-transferase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pI	isoelectric point
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PTH	phenylthiohydantoin
PVDF	polyvinylidene difluoride
SH	Src homology

I. 緒言

正常細胞の分化・増殖は細胞内の精巧なシグナル伝達機構によって維持されている。その秩序が崩れた状態である細胞のがん化は、そのシグナル伝達の調節の異常に端を発すると考えることができる。がん化した細胞でしばしばみられるリン酸化蛋白質の量的変化は、細胞のがん化という現象に、蛋白質のリン酸化を制御する信号伝達分子群が関与していることを示唆する。

このような信号伝達分子の中で、チロシンキナーゼを中心とする一群の分子の中には約100アミノ酸からなるSrc Homology(SH)2領域と約50アミノ酸からなるSH3領域という2つの興味深い領域が見ついている(Sadowski *et al.*, 1986; Mayer *et al.*, 1988; Koch *et al.*, 1991)。最近の研究でこれらの領域は特異的な標的蛋白質と結合することにより信号を制御するものと思われている(Moran *et al.*, 1990; Pawson and Gish, 1992; Birge and Hanafusa, 1993)。特にSH2領域はチロシン残基とそれに続く数個のアミノ酸の特異的配列を認識して、このチロシンがリン酸化したときにのみに結合することから、リン酸化依存性信号伝達機構として注目されている(Songyang *et al.*, 1993, 1994)。またSH3領域も特徴的なプロリンに富むアミノ酸配列と結合して信号の受け渡しをすることが明らかになってきた(Ren *et al.*, 1993)。Srcファミリーに属するSrc, Fps, Ablなどのチロシンキナーゼ群ではこれらの領域はキナーゼドメインのすぐ上流に位置しており、これらのキナーゼの活性型では、この領域の欠損変異体はキナーゼとしての活性の阻害やトランスフォーム活性の消失(Sadowski *et al.*, 1986; Wang and Parsons, 1989)または宿主依存性のトランスフォーム能の発現(DeClue *et al.*, 1987, Hirai and Varmus, 1990)をもたらす。これらの結果よりSH2/SH3領域がこれらのキナーゼによる細胞のがん化シグナルにおいてきわめて重要な役割をしていることが示唆される。SH2/SH3保有分子としては非レセプター型のチロシンキナーゼなどのように活性のわかっている分子以外に、Nck(Lehmann *et al.*, 1990), Grb2/Ash/Sem-5 (Lowenstein *et al.*, 1992; Matuoka *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1992), Crkなどのように独自のSH2とSH3領域だけをその機能ドメインとして含むアダプター分子と呼

ばれる蛋白質が存在している。これらのアダプター分子は2個かそれ以上の分子を結びつけることによって信号を制御していると考えられる。

v-crkは元来、トリ肉腫ウイルスのCT10とASV-1から単離されたトランスフォーム活性を持つ遺伝子である(Mayer *et al.*, 1988; Tsuchie *et al.*, 1989)。構造的にはウイルス由来のgagと正常細胞にあるc-crk遺伝子産物のうち1組のSH2とSH3を持つ領域とが融合したものである(Matsuda *et al.*, 1992; Reichman *et al.*, 1992; Ogawa *et al.*, 1994)。v-crk遺伝子産物(以下v-Crkとよぶ)はこのことから蛋白質間の結合を介して細胞がん化のシグナルを伝えているものと考えられ、そのメカニズムに興味を持たれてきた(Mayer and Hanafusa, 1990a)。

私のこれまでの実験及び他の施設の報告より、v-crkを細胞内に導入すると細胞のがん化に伴い、いくつかの蛋白質がチロシン残基でのリン酸化を受けることがわかっていた(Matsuda *et al.*, 1990; Mayer and Hanafusa, 1990b)。更にそのうちいくつかがv-Crk蛋白質と強固な結合をしており、その1つとして70kDのpaxillinが同定されている(Birge *et al.*, 1993)。しかしながら、v-Crkと結合している分子のうち、チロシン残基でのリン酸化がもっとも際だっている蛋白質は、トリでは130-140kDの、ラットでは125-135kDの未知の蛋白質p130である(Matsuda *et al.*, 1990; Birge *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1994a)。v-Crkとp130の結合には主としてSH2ドメインが必要であり、この結合を阻害するようなv-Crkの欠損変異体はトランスフォーム活性も失うことが報告されている(Matsuda *et al.*, 1991, 1993)。これらの事実は、キナーゼ活性を持たないv-Crkがどういう機構で細胞のチロシンリン酸化とトランスフォーメーションを引き起こすかを解明するためにp130蛋白質が鍵を握る分子であることを示唆している。

一方、線維芽細胞におけるSrcの活性化の際にも数多くの蛋白質のチロシンリン酸化が認められているが、Parsonsらは1989年よりCEFの系にv-Srcを発現させることによりチロシン残基でリン酸化をうけるp110, p120, p125, p130の各分子を同定し、抗リン酸化チロシン抗体で粗精製したそれぞれの試料に対するモノクローナル抗体をつくって解析してきている(Reynolds *et al.*, 1989; Kanner *et al.*, 1990, 1991)。現在までにp110-AFAP(Flynn *et al.*,

1993), p125-FAK(Schaller *et al.*, 1992)がクローニングされており、p120もすでに armadillo repeatsを有するカテニン類似蛋白質であることがわかっている(Reynolds *et al.*, 1992)。これらの中で、リン酸化にともないin vivoでv-Srcと最も顕著に結合する 130kDの蛋白質p130は、主としてSrcのSH2と結合することから注目されてきていた。さらに弱いながらもCrkのp130と抗体での交差反応が認められることから、両者の異同も問題になっていた(Kanner *et al.*, 1991)。抗体によるp130の発現クローニングなども試みられてきているが、抗体の質やライブラリーのリン酸化の条件などの問題があって現在までCrkのp130共々クローニングには至らなかった。

以上のことから、私はこのp130がどのような機能を持つ蛋白質分子であるのかに興味を持ち、v-Crkによりトランスフォームしたラット及びトリ線維芽細胞にみられるp130に生化学的解析を加えた後、抗体カラムを使ってラットp130を精製する手法を確立した(Sakai *et al.*, 1994a)。また、精製したp130を用いてその部分アミノ酸配列を決定することにより、p130のcDNA全長をクローニングした(Sakai *et al.*, 1994b)。さらにはcDNAにより発現したGST融合タンパク質よりポリクローナル抗体を作成し、免疫化学的解析を行った(Sakai *et al.*, 1994b)。

II. 方法

1. 用いた細胞株と培養条件

ASV-1ウイルスはPeter Vogt博士より供与された(Tsuchie *et al.*, 1989)。ASV-CEF細胞はトリ胎仔線維芽細胞(CEF)にASV-1ウイルスを感染させた細胞株である。CEF及びそのASV-CEF細胞は10%ウシ胎児血清、1%トリ血清、10%トリプトースブロス(TPB: Flow Laboratories)、100単位/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン添加DMEM培地中で5%CO₂の条件下に継代した(Hanafusa, 1969)。SR-3Y1細胞(Zaitzu *et al.*, 1988)はv-SrcをもつRous肉腫ウイルスによりトランスフォームしたラット3Y1細胞(Kimura *et al.*, 1975)である。SR-3Y1細胞、3Y1細胞とそのトランスフェクタントは10%ウシ血清、100単位/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン添加DMEM培地中で5%CO₂の条件下に継代した。

2. v-Crk発現細胞の樹立

ASV-1由来のv-crk cDNAはPeter Vogt博士より(Tsuchie *et al.*, 1989)、CT10由来のv-crk cDNAは花房秀三郎博士より供与された(Mayer *et al.*, 1988)。ラット3Y1細胞にv-Crkを発現させるために、マウス肉腫ウイルスのプロモーターを持つ発現ベクターpMV-7(Kirschmeier *et al.*, 1988)にv-crkのcDNAをリン酸カルシウム法によるトランスフェクションにて導入し、ベクターの持つG418に対する抵抗性で細胞を選別した。そのようにして選ばれたトランスフェクタント3Y1-Crkはv-Crkを高発現する安定細胞株である。c-Src、活性型Src(Y527F c-Src)、v-Srcのそれぞれを高発現するNIH3T3の安定細胞株はすでに報告されたものを用いた(Hirai and Varmus, 1990)。

3. 実験に用いた抗体とその大量調整

ウイルスのgag蛋白質に対するモノクローナル抗体1A1とそのハイブリドーマ細胞はV.M.Vogt博士より供与された(Potts and Vogt, 1987)。またリン酸化チロシンに対するモ

ノクローナル抗体4G10とそのハイブリドーマ細胞はD.K.Morrison博士より供与された(Morrison *et al.*, 1990)。通常の免疫化学的解析には、1A1はハイブリドーマ細胞を無血清培地Cell Gresser H(住友化学)で培養した培養上清を、4G10はハイブリドーマ細胞を10%牛胎児血清添加RPMIで培養した培養上清を用いた。精製の際の大量の抗体の調製には、1A1はハイブリドーマ細胞をプリスタンで前処置したBALB/Cマウスの腹腔内に注射し2週間後に腹水を採取した。抗体のIgG分画はMABTrapG (Pharmacia)を用いて精製した。バキュロウイルスベクターにより発現したv-Crkを1A1を用いて精製し、ウサギのポリクローナル抗体 α -vCrkを作製した。Srcに対するモノクローナル抗体MAb 327はJ. S. Brugge博士より分与された(Lipsich *et al.*, 1983)。

4. ウエスタンブロッティング

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)は従来の方法で行った(Laemmli, 1970)。ウエスタンブロッティングは湿式のブロッティング装置(マリソル)とPVDFフィルター(ミリポア)を用いてブロッティングを行い(Towbin *et al.*, 1979)、ProtoBlot APシステム(Promega)にて発色した。一次抗体としては4G10(培養上清原液)、 α -vCrk(5000倍希釈)、MAb327(1000倍希釈)、 α Cas1-3(2500倍希釈)を用いた。ゲルの銀染色は記載された方法で行った(Hochstrasser *et al.*, 1988)。

5. 2次元電気泳動

2次元電気泳動(2D-PAGE)はO'Farrelによる原法(O'Farrel, 1975)をWirthらが改良した方法にそって行った(Wirth *et al.*, 1987)。アンフォライン(LKB)はpH5-8を4%、pH3.5-10を1%混合して使用した。等電点電気泳動は2x130mmのガラスチューブ内で450Vで16時間、600Vで1時間泳動した。二次元目のSDS-PAGEは1mm厚の9%ポリアクリルアミドゲルで行った。それぞれのサンプルを2枚ずつ電気泳動にかけ、1枚は銀染色にて解像度をチェックし、1枚はPVDFフィルターにプロットしたのち、抗リン酸化チロシン抗体にてウエスタンプロットを行った。

6. 細胞の正リン酸ラベル

6cm径のシャーレにsemi-confluentな細胞をリン酸を含まない培養液で30分前処置した後に、1mlの培養液中で0.5mCiのphosphorus-32によって4時間ラベルした。その際に100 μ Mの Na_3VO_4 を加えたものと加えないものをつくり比較した。細胞はRIPA buffer(50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% deoxycholate, 1% Triton X-100, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 10 u/ml leupeptin, 1mM Na_3VO_4)にて溶解し7.5%SDS-PAGEにて解析した。

7. in-vitroでの各種酵素処理

種々の酵素処理は15cm径のシャーレ1枚からの細胞溶出液をモノクローナル抗体1A1のIgG分画(0.9 μ g/ μ l)と30 μ lのProtein A セファロースにて免疫沈降した免疫沈降物に対して行った。それぞれのセファロースゲルはsuspension buffer(10 mM sodium phosphate pH 7.0, 150mM NaCl, 1mM DTT, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM Na_3VO_4 , 10 u/ml aprotinin)にて3回洗浄した後、酵素反応を70 μ lの反応系でおこなった。O-Glycanase (Takara)による処理は5uの酵素を含むsuspension bufferにて行った。N-Glycanase (Takara)による処理は、1mM Tris-HCl pH 8.0を最終濃度10mMで加えることと2.5uの酵素を用いたこと以外はO-Glycanaseによる処理と同様に行った。酵素活性を持つc-Srcキナーゼはバキュロウイルスベクターを用いた系で作成された。c-Srcキナーゼと Na_3VO_4 による処理はreaction buffer(50mM HEPES pH7.5, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 , 40 μ M ATP)にてさらに2回ゲルを洗浄した後、reaction buffer内で行った(Morgan *et al.*, 1989)。アルカリホスファターゼによる処理はゲルをさらに2回AP buffer (1mM ZnCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl pH 8.3)にて洗浄した後2uのアルカリホスファターゼ(CIP:Takara)を加えたAP bufferにて行った。酵素処理の後にそれぞれのゲルはSDS-PAGEの sample buffer(2% SDS, 0.1M Tris-HCl pH6.8, 10% glycerol, 0.01%

bromophenol blue, 0.1M DTT)にて煮沸した後、4G10を用いたウエスタンブロットにより解析した。

8. 抗体カラムの作成

p130蛋白質の精製には2種類の抗体カラムを用いたが、どちらもCNBr-セファロースビーズ(Pharmacia)に抗体を吸着させることにより作成した。IgGフラクションのみを精製した1A1および4G10の抗体を、従来の方法で前処理したCNBr-セファロースカラムに6mg IgG/mlゲルの濃度で12時間カップリングさせたのち、未反応残基を不活化した。

9. p130蛋白質の抗体カラムによる精製

15cm径のシャーレにて培養された3Y1-Crk細胞はPBSにて2回洗浄した後、1% Triton-X buffer(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 u/ml aprotinin, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 100 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin)により回収した。

50枚のシャーレからの細胞溶出液は50mlチューブの中で、2mlの1A1セファロースビーズとともに4℃にてゆっくりと回転させながら6時間結合させた。結合後の1A1セファロースビーズはEconoカラム(Bio-Rad)に充填し、カラムボリュームの10倍量の1% Triton X bufferにて洗った。その後結合した蛋白質は8M尿素 buffer(8 M urea, 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Na_3VO_4)にて800 μl ずつのフラクションで溶出した。p130を含むフラクションは4G10を用いたウエスタンブロットにより確認し、集めてから10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl and 1 mM Na_3VO_4 に対して透析した。透析後の試料は次に10分の1量の4G10セファロースビーズと混ぜ4℃にて5時間結合させた。結合後の4G10セファロースビーズはEconoカラムに充填し、1% Triton X bufferにて一回洗った後、0.1% heptylglucoside, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl を含む液で洗浄した。結合したリン酸化蛋白質は1% phenylphosphate buffer(0.1 M phenylphosphate, 0.1% heptylglucoside, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl)により溶出した。ウエス

タンプロットと銀染色によりp130を含むフラクションを検出し、1つのチューブに集めた。合計で約3000枚のシャーレからの細胞($\sim 3 \times 10^{10}$ 個)からリン酸化チロシンを含むp130を以上の手順で部分精製し、これらの試料を最終的に5%トリクロロ酢酸により沈殿させて液量を減らした後、アミノ酸配列解析のためにSDS-PAGEにより分離した。

10. p130蛋白質のPVDF膜上でのプロテアーゼ消化

電気泳動により分離して、PVDF膜上にプロットしたのち、1%酢酸、0.1%Ponceau Sにて染色することにより膜上の蛋白質を検出した、このメンブレンよりp130に相当するバンドを切り出し、アミノ酸シークエンス決定のために用いた。膜上の蛋白質はそのまま還元反応とSカルボキシメチル化を行った後、0.2pmolのリシルエンドペプチダーゼにより消化した(Iwamatsu, 1992)。

11. 部分アミノ酸配列の決定

膜上での消化により生じたペプチド断片は日立L6200/6000液体クロマトグラフィシステムにWakosil-II AR ODSカラムを装着して高速液体クロマトグラフィにかけられた。ペプチド溶液は、アセトニトリル濃度を下げるため水により希釈したのち、Rheodyne (7125型)サンプルインジェクターと250mlのサンプルループを用いてインジェクションにかけられた。溶出条件は、以下の溶媒Aと溶媒Bを用いて、溶媒Bの2%-50%のリニアグラジエントを用いた(溶媒A:0.05%トリフルオロ酢酸水溶液、溶媒B:イソプロパノール:アセトニトリルの7:3混合液+0.02%トリフルオロ酢酸)。溶出液は日立L4000ディテクターとユニオンUni-2ベースラインアジャスターを用いて214nmの吸光度をモニターしながら、各ピークフラクションごとに手作業で集めた。アミノ酸配列の解析はShimadzu PSQ-1分析装置を用いて行った。

12. 変性プライマーを用いたRT-PCR

ペプチドシークエンスによって得られたアミノ酸配列の情報を用いて22種類のセンス及びアンチセンスプライマーを設計し、391型DNA合成機(PCR-MATE:ABI)を用いて各ブ

ライマーを合成した。PCRに用いるcDNAはラット3Y1細胞から抽出したmRNA 5 μ gを10mM DTT, 0.5 mM dNTP(Pharmacia), 1 u RNase inhibitor(Takara), 500 u MLV-reverse transcriptase(BRL), 2 μ g random hexamerを含む50 μ lの反応液中で37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させて合成した。

このうち2.5 μ lを50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.01 % gelatin, 0.5 μ gの各プライマー, 0.12 mM dNTP, 0.625 uのTaq polymerase (Takara)を含む25 μ lの反応液中でPCRにかけた。PCRはサーマルサイクラー(Cetus)を用いて94 $^{\circ}$ C1分、50 $^{\circ}$ C2分、72 $^{\circ}$ C2分の条件で行った(Honda *et al.*, 1993)。

13. cDNAライブラリーの作成

cDNAライブラリーはラット3Y1細胞のmRNAを用いてオリゴ(dT)をプライマーに用いて通常の方法で作成した。合成されたcDNAフラグメントはEcoR I-Not I-BamH Iアダプター(TAKARA)を用いて λ ZAPIIベクターに挿入してライブラリーを構築した。

14. ジデオキシ法によるDNA塩基配列の決定

クローニングされたp130のcDNAは λ ZAPIIベクターよりpBlueScriptに入った形で切り出され(*in vivo* excision)、Exo-Mung DNA sequencing system(Stratagene)によって系統的な欠損変異体が作成された。これらの変異体を373A DNAシーケンサー(Applied Biosystems)とSequenase(USB)によって端からの塩基配列を順次読みとり、それらをつなぎ合わせることによってp130のcDNA全長の塩基配列を両方向から決定した。

15. データベース検索と一次構造の解析

データベース検索はEntresバージョン10と、Genbank・PIRデータベースに対するFASTAを用いた検索にて行った。さらに疎水性など1次構造の解析にはMacVectorプログラム(ABI)を用いた(Kyte and Doolittle, 1982)。

16. ノーザンプロット解析

RNAの抽出はacid guanidine/phenol chroloform法によって行った(Chomczynsky and Sacchi, 1987)。6週令の雄のラットから各臓器を取り出し、RNAを抽出した。RNAは6%ホルマリンを含む1%アガロースゲルにて分離した後、Hybond Nフィルターにプロットされた。プローブのラベルは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ を用い、Multiprime DNA Labeling System (Amersham)によって行った。ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド、5xSSC、5xDenhardt溶液、0.5% SDS、 $20\mu\text{g/ml}$ 変性salmon sperm DNAとラベルされたプローブDNAを含む溶液中で、 42°C の条件で行った。その後フィルターは2xSSC/0.1%SDS、0.5xSSC/0.1%SDS、0.1xSSC/0.1%SDSの各条件で20分づつ 50°C で洗浄した後、オートラジオグラフィーにかけた。

17. GST融合タンパク質によるポリクローナル抗体の作成

p130のPvuII消化断片のうち、ヌクレオチド番号936-1402, 1403-2106, 2107-2431の3つをそれぞれpGEX-2T, pGEX-1, pGEX-3Xに導入してGST融合タンパク質の形で大腸菌にて発現した。これらをグルタチオンカラムにて精製した後、ウサギに皮内注射し、3種類のポリクローナル抗体を作成した。それぞれ $\alpha\text{Cas1, 2, 3}$ と呼ぶ。

18. キナーゼアッセイ

キナーゼアッセイは $500\mu\text{g}$ の蛋白質を含む細胞溶出液を適当な抗体で免疫沈降したのち、1%Triton X bufferで3回洗浄し、さらにkinase buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10mM MnCl_2)にて3回洗浄してから行った。最終的に $30\mu\text{l}$ のkinase bufferに浮遊する免疫沈降物に $5\mu\text{Ci}$ の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加えて室温で30分反応させた後、SDS-PAGEにかけてオートラジオグラフィーでリン酸化された蛋白質を検出した。

19. V8プロテアーゼによる限定分解の断片の解析

V8プロテアーゼによる限定分解は、基本的にはClevelandらの原法に沿って行った

(Cleveland *et al.*, 1977)。 ^{32}P でラベルした蛋白質を乾燥したゲルから切り出した後、0.1M TrisHCl pH6.8にて膨潤させ、そのまま再度15%SDS-PAGEにかけた。その際に $1\mu\text{g}$ あるいは $4\mu\text{g}$ のStaphylococcus aureus のV8プロテアーゼを含むsample bufferを重層してから泳動を行い、スタッキングゲルの下端にて一度泳動を止めてゲル内で30分間プロテアーゼ反応を行った。

20. 細胞分画の調製

約 1×10^7 個の細胞を0.5mlのhypotonic suspension buffer (10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4)中でDounce型 homogenizerにて粉碎した後、遠心力によって分離した。1000gの遠心力で核分画をさらに100000gの遠心力で膜分画と細胞質分画とを分離しそれぞれ全体の1/10をSDS-PAGEにかけて解析した。

III. 結果

1. v-Crk発現細胞におけるv-Crk結合リン酸化蛋白質の同定

v-Crkの導入によりリン酸化される蛋白質群を解析するため、私は主として2種類の異なる方法で樹立された細胞株を用いた。1つはトランスフォーミング遺伝子としてv-Crkを持つトリ肉腫ウイルスASV-1を感染させたCEF細胞(ASV-CEF)であり、もう一つはv-Crkを発現ベクター3Y1に導入し、トランスフェクション法により発現させたラット3Y1細胞(3Y1-Crk)である。これらの細胞をそれぞれその親株であるCEF細胞と3Y1細胞と比較することによって解析した。図1に示すようにASV-CEF細胞と3Y1-Crk細胞の双方でいくつかの蛋白質のチロシンリン酸化の亢進が観察される。それらの中で変化のもっとも顕著なリン酸化蛋白質はASV-CEFにおいては130-140kD、3Y1-Crkにおいては120-135kDの蛋白質でありこれらはウイルスのgagに対するモノクローナル抗体でv-Crkを免疫沈降したときに共沈して観察されることから、細胞内でv-Crkと複合体をつくって存在しているものと考えられる。どちらのバンドもきわめてブロードに見えることから何らかの修飾が加わっているものと推察される。それらの蛋白質は見かけ上の分子量に幾分差がみられるものの、どちらもv-Crkの導入によりチロシン残基でリン酸化を受け、v-Crkと複合体をつくる主要蛋白質であることから、仮にp130-cとp130-r(トリp130とラットp130)と名付け、生化学的解析を行った。

2. 2次元電気泳動法によるp130の検出

最初にそれぞれのp130分子(p130-cとp130-r)が何らかの修飾を受けた単一分子であり、かつ両者が同一分子であることを確認するために2次元電気泳動法による解析を行った(図2)。等電点電気泳動と9%SDS-PAGEによる二次元で分離した後、ウエスタンブロット法により抗リン酸化チロシン抗体でp130を検出した。同時に行った銀染色により、等電点(pI)が4.7-8.5の蛋白質がマップされていることを確認した。



図1 v-Crk発現細胞におけるp130のリン酸化とp130のv-Crkとの結合

トリ線維芽細胞(CEF)(lane 1)とラット3Y1細胞(lane 3)にそれぞれASV-1ウイルスの感染(lane 2)あるいはトランスフェクション(lane 4)でv-Crkを発現させ抗リン酸化チロシン抗体でイムノプロットしたもの。さらにlane 2,4の試料より抗gag抗体にてv-Crkとともに免疫沈降された蛋白質をそれぞれlane 5,6に示す。p130のプロードなバンドに印がつけてある。

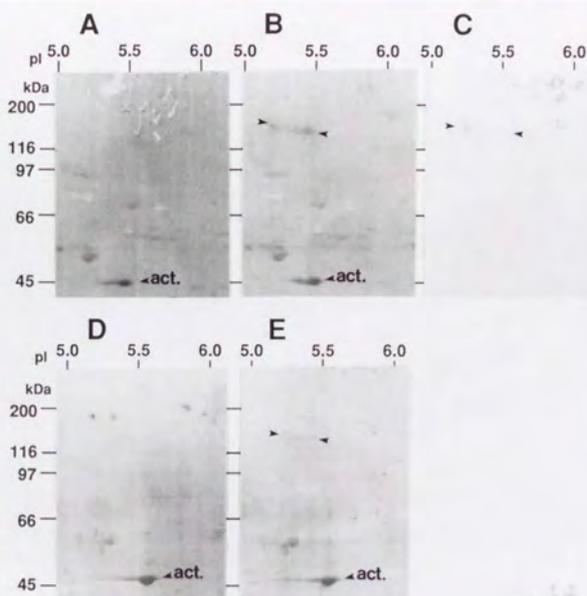


図2 p130の2次元電気泳動による検出

ASV-CEF細胞(B)と3Y1-Crk細胞(E)の細胞溶出液を2次元電気泳動にかけ、リン酸化チロシンによるイムノプロットでp130蛋白質を検出した。コントロールとなる正常のCEF細胞(A)と3Y1細胞(D)ではみられないp130のスポットが、等電点が酸性の領域にみられる(矢ではさんで示した)。さらにASV-CEF細胞からv-Crkと結合するものを免疫沈降するとこのスポットだけが残る(C)。

その範囲に明瞭に観察される約30のリン酸化チロシンを含む蛋白質のうち、v-Crk発現細胞においてははっきりと増強しているスポットはASV-CEFと3Y1-Crkどちらの細胞でも酸性領域(pI=5.2-5.5)に観察される約130kDの特徴的なスポットであり(図2B,E)、この部分以外には130kD付近のリン酸化蛋白質は観察されなかったことから、これらがp130-cとp130-rに相当するものと考えられた。さらに確認のため、ASV-Crkをv-Crkで免疫沈降した共沈物を同様に2次元電気泳動を行ったが、その際にはほとんど唯一のリン酸化チロシンを含むスポットが同じ位置に観察された(図2C)。これらのことからp130-cとp130-rは種が違うだけで同一の、しかもそれぞれがおそらく単一のリン酸化蛋白質であろうと結論づけた。

3. p130の多段階のリン酸化による多様性

このチロシンでリン酸化された蛋白質p130はv-Crk発現細胞を正リン酸によりラベルした場合にも観察される。ASV-CEF細胞と3Y1-Crk細胞を正リン酸でラベルして、v-Crkとともに免疫沈降した後SDS-PAGEにて分離し、チロシン残基でのリン酸化を強調するため1N KOHで一時間処理してから観察すると、p130-cとp130-rの位置にメインのリン酸化蛋白質が誘導されていることがわかる(図3, lane 3, 6)。この細胞のラベルの際に、培養液中に100 μ Mのチロシンホスファターゼの阻害剤であるNa₃VO₄を添加しておくこと、p130のブロードなバンドは上にシフトしややシャープなバンドとして観察される(図3, lane 4)。この結果から、p130のブロードなバンドは、細胞内のチロシンホスファターゼの作用により脱リン酸化されたp130が細胞内で種々の程度にチロシンリン酸化を受けていることを反映しているものと考えられる。

さらに、免疫沈降により粗精製したp130を様々な酵素により処理することにより、p130分子のどのような化学的修飾が起こっているのかを検討した。細胞内のp130をv-Crkとともに共沈した後、N-glycanaseやO-glycanaseにて処理してもp130のバンドのブロードな様相には影響を与えなかったため(図4, lane 4, 5)、グリコシレーションはp130の多様性にほとんど関与していないと考えた。



図3 細胞内のp130の正リン酸ラベル

正リン酸でラベルしたCEF細胞(lane 1,2)とASV-CEF細胞(lane 3,4)のリン酸化蛋白質のうち、アルカリ処理でリン酸化チロシンを強調したもの。4時間のラベルの間に培養上清に $100 \mu\text{M}$ の Na_3VO_4 を加えたもの(lane 2, 4)と比較して影響をみた。3Y1細胞(lane 5)と3Y1-Crk細胞(lane 6)を正リン酸でラベルしたのもを示す。



図4 粗精製したp130に対する各種修飾酵素の影響

3Y1-Crk細胞から1A1による免疫沈降で粗精製したp130を、ビーズ上でいくつかの酵素にて処理を行ったのち、4G10のイムノプロットでp130を検出した。元の3Y1(lane 1)と3Y1-Crk(lane 2)の細胞溶出液と未処理の粗精製したp130(lane 3)を左に示す。N-glycanase(lane 4)やO-glycanase(lane 5)処理ではイムノグロブリン(Ig)しか影響を受けないのに対し、 Na_3VO_4 ではp130のバンドがわずかに上に広がった(lane 6)。酵素活性のあるSrcで処理するとSrcの自己リン酸化のバンド(Src)の出現とともにp130のバンドが140kD付近のシャープなバンドになった(lane 7)。逆にアルカリホスファターゼによって処理するとバンドが120kD付近まで下がった(lane 8)。

Na_3VO_4 にて処理するとp130のバンドはわずかに上にシフトした(図4, lane 6)。それに対してSrcキナーゼで処理するとラットp130のバンドが顕著に上昇し、140kD周辺の比較的シャープなバンドになった(図4, lane7)。逆にアルカリホスファターゼで処理すると、30分で120-130kD周辺までバンドの位置が下がり(図4, lane8)、さらに長い処理ではリン酸化蛋白質として検出できなくなった。以上よりSDS-PAGEにみられるp130の多様性は多くのチロシン残基によるリン酸化が種々の程度に起こっているためであると推定された。

4. v-Crkを発現するラット3Y1細胞からのp130の精製

次に、p130について解析を進めるために、p130の精製を目的としてその条件検討を行った。当初、ASV-CEF細胞、3Y1-Crk細胞、v-Crkを導入したNIH3T3細胞、v-Crkを発現するヌードマウス腫瘍など材料として精製を試みた。しかしp130は抗リン酸化チロシン抗体では明瞭に検出されるにもかかわらず、蛋白量としてはそれほど多くないと考えられ、ほとんどの場合に粗精製したp130を銀染色で検出するところまでもいかなかった。その中でも3Y1-Crkは比較的リン酸化されたp130を多く含むことが示唆されたため、最終的に図5に示したプロトコルを用いてSDS-PAGE上でp130の単離されたバンドを検出できる程度に部分精製することに成功した。

第一段階の抗体カラムはv-Crkを認識するgagに対するモノクローナル抗体1A1をCNBrセファロースに結合させて作成した。3Y1-Crkの細胞溶出液をこのカラムにかけ、v-Crkとともにそれと結合する蛋白質群を吸着させた後に洗浄・溶出する。その際の溶出条件としては8M尿素を含むバッファーをもちいると、溶出効率が優れているのに加え(図6)、第二段階の抗リン酸化チロシン抗体による抗体カラムへの吸着効率も優れていることが確認された。抗リン酸化チロシン抗体4G10によるカラムも同様の方法にて作成し、透析によって尿素を除去したサンプルの中で、リン酸化チロシンを含むものが吸着された。このカラムからの溶出条件もいくつか検討したが、図7に示すようにリン酸化チロシンの類似物であるphenylphosphateによる溶出がその特異性において優れていることが銀染色により確認されたためこれを用いた。

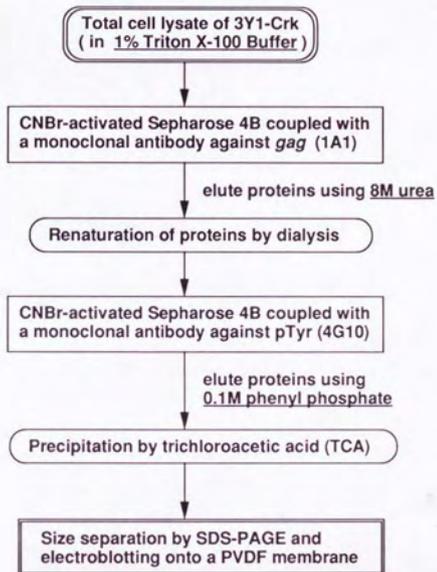


図5 2段階の抗体カラムによるp130部分精製の流れ図

ペプチドシーケンス決定に用いられたp130の部分精製の方法を簡略化してフローチャートで示す。



図6 抗gag抗体(1A1)を用いたp130精製の第一段階

3Y1-Crkの細胞溶出液を1A1セファロースカラムにかけた後、実験方法にのべたように8M尿素によって溶出した。カラムにかける前(pre)と後(sup)の細胞溶出液、8M尿素によって溶出した各フラクション(1-9)をウエスタンブロットにより解析した。ブロット後、メンブレンを約70kDのところで上下に分け、高分子量を抗リン酸化チロシン抗体4G10(α -pTyr)で低分子量をv-Crkの抗体(α -vCrk)でそれぞれp130とv-Crkを検出した。

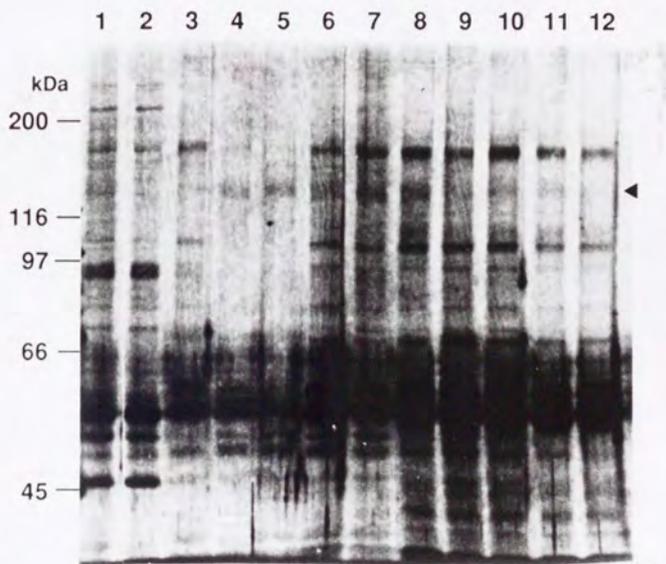


図7 4G10セファロースカラムの溶出条件の検討

1A1カラムから溶出されたサンプルを透析した後に、4G10カラムに吸着させ、いくつかの方法で溶出させてその効率を比較した。4G10カラムに吸着の前後のサンプルをそれぞれ直接泳動したものをlane 1とlane 2に示す。各条件で溶出した後に、溶出液(lane 3-7)とゲルに残留したもの(lane 8-12)をそれぞれsample buffer(実験方法参照)で煮沸してSDS-PAGEにかけ、その中の蛋白質を銀染色で検出した。条件は8M尿素(lane 3,8)、0.1MグリシンpH2.0(lane 4,9)、0.1M phenylphosphate (lane 5,10)、2% SDS (lane 6,11)、sample buffer (lane 7,12)である。

以上の2段階の抗体カラムによる精製を用いることにより、p130を効率よく精製し銀染色で検出可能な量を得ることができることを確認したが、最終的な収量は図8に示すように15cm径のシャーレ100枚(約 1×10^9 個)の細胞から150-200ng程度と少量であった。そこでp130の部分アミノ酸配列決定のためにさらにスケールを増し、15cm径のシャーレ3000枚にて培養した3Y1-Crk細胞の細胞溶出液を調整し、2段階の抗体カラムにより精製した。このカラムに使う大量の抗体はマウスの腹水系で調整する必要がある。第二段階のカラムから溶出されたサンプルは凍結乾燥と5%TCA(トリクロロ酢酸)による沈殿で濃縮したのち7%SDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンにプロットした。このメンブレンをボンソーSにより染色すると、130kD(p130)と免疫グロブリンに由来すると思われる50kDのバンドのほか、70kDの弱いバンドが検出された。精製されたp130の量は4 μ g程度と推定されたため、このバンドを切り出しアミノ酸配列分析に用いることとなった。

5. p130の部分アミノ酸配列の決定

p130の内部アミノ酸配列は、メンブレン上の蛋白質をAchromobacter Protease Iにより消化することにより得た。p130を含むPVDFメンブレンは還元反応とS-カルボキシメチル化を行った後、プロテアーゼ処理を行い、その時に溶出されたペプチド断片をHPLCにかけて分析した(図9)。小さなピークの混入やバックグラウンドなどが認められないことから、試料中にはおそらく単一の蛋白質が高純度(>90%)で含まれているものと考えられた。すべてのピーク分画のアミノ酸配列分析を行った結果、表1に示すAP-1からAP-7の分画からアミノ酸配列に関する情報が得られた。その他の分画はPTHアミノ酸の量が少ないか、ピークが重なっているかのために解析できなかった。以上のことより、p130の内部アミノ酸配列として(K)ILVGMYPD, (K)APGPEGSSS, (K)TQQGLYQAPGPNPQFQS, (K)GQLELQQL, (K)ALYDNVAESPDEL, (K)KPAAPGPGPPATPPQPQ(括弧内のKは切断部位よりの推定)の6つが得られた。これらのどの配列も Entrez release 10.0 データベースで既知の蛋白質との有意な類似性を有さなかったため、次にこれらの情報を用いてcDNAクローニングを行うことにした。

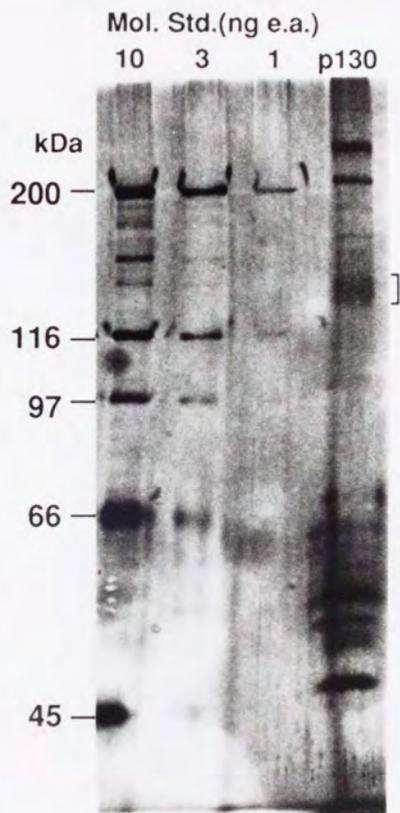


図8 部分精製したp130の量的検討

2段階の抗体カラムによって部分精製したp130の質的・量的検討を行うため、15cm径のシャーレ100枚からスタートしたサンプルの50分の1を銀染色により解析した。p130のバンドの位置を印でしめす。横にコントロールとして希釈した分子量マーカーをながし、各バンドのおおよその蛋白質量を上に示した。

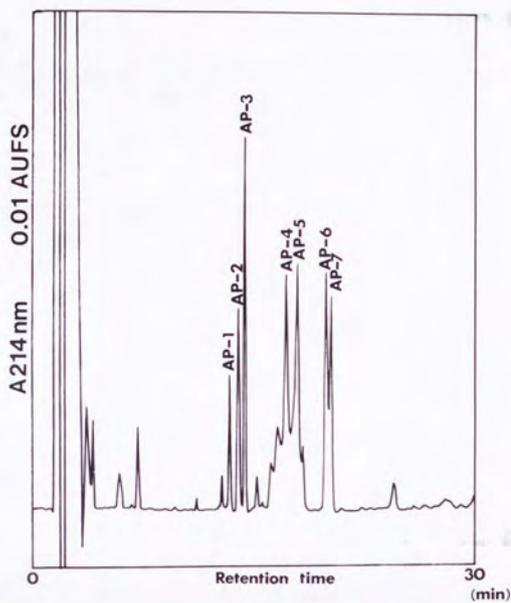


図9 逆相HPLCによるペプチダーゼ処理後のp130断片の検出

メンブレンごと切り出したp130をそのままペプチダーゼ処理して、はずれてきたペプチド断片を逆相のHPLCにより分析した。AP-1からAP-7までのピークをアミノ酸配列分析に用いた。

表1. p130の内部アミノ酸配列分析

Cycle No.	AP-1		AP-2		AP-3		AP-4		AP-5		AP-6		AP-7	
	Amino Acid	Yield (pmol)												
1	Ile	3.6	Ala	7.2	Thr	0.9	Gly	4.5	Ala	3.2	Lys	1.0	Lys/Gly	1.5/2.3
2	Leu	7.2	Pro	4.4	Gln	3.8	Gln	5.0	Leu	3.0	Pro	1.3	Pro	3.8
3	Val	5.9	Gly	4.5	Gln	3.9	Leu	5.0	Tyr	2.3	Ala	1.3	Ala/Asn	2.3/2.3
4	Gly	3.6	Pro	4.6	Gly	1.4	Glu	5.4	Asp	2.7	Ala	1.4	Ala/Gly	2.3/0.8
5	Met	5.7	Gly	3.3	Leu	2.2	Leu	4.1	Asn	2.1	Pro	0.8	Pro/Arg	2.2/1.0
6	Tyr	4.5	Pro	2.9	Tyr	1.5	Gln	2.4	Val	2.2	Gly	0.5	Gly/Asp	1.0/0.9
7	Asp	2.9	Glu	0.9	Gln	0.8	Gln	2.7	Ala	1.8	Pro	1.0	Pro	1.8
8			Gly	1.4	Ala	1.4	Leu	1.5	Glu	1.4	Gly	0.3	Gly/Leu	0.8/0.4
9			Ser	1.1	Pro	1.2			Ser	0.7	Pro	0.7	Pro/Leu	0.7/0.4
10			Ser	1.8	Gly	0.8			Pro	1.0	Pro	0.8	Pro/Asp	0.8/ +
11			Ser	1.9	Pro	1.1			Asp	0.4	Ala	0.5	Ala/Val	1.2/0.6
12					Asn	0.9			Glu	0.3	Thr	0.1	Thr	0.2
13					Pro	1.0			Leu	0.3	Pro	0.5	Pro	0.7
14					Gln	0.7					Pro	0.6	Pro	0.8
15					Phe	+					Gln	0.3	Gln	0.6
16					Gln	0.5					Pro	0.6	Pro	0.5
17					Ser	0.3					Gln	0.2		

+ : not quantitatively determined

6. ラットp130のcDNAクローニング

それぞれのアミノ酸配列から推定される塩基配列よりセンスとアンチセンス各1-3種類の変性プライマーを設計した。ラット3Y1細胞のmRNAをランダムヘキサマーでcDNAのファーストストランド合成を行った後、変性プライマーを用いてあり得るすべての組み合わせでRT-PCRを行った。増幅されたDNA断片を解析したところ、6つのペプチド配列のうち4つを同じフレームに含む384塩基からなる断片を見いだしたためこれをcDNAライブラリースクリーニングのプロープに用いることにした。

ラット3Y1細胞より構築したcDNAライブラリーのスクリーニングし50万のうち20ヶの陽性クローンを得た。それらの大部分は3.1kbから3.4kbのサイズで開始コドンのATG (Kozak, 1981)と上流のin-frameの終止コドンを含むほぼ全長のcDNAであると考えられた。3クローンは968アミノ酸のコード配列を持つ長いタイプのcDNA(long form)であり、8クローンはN末端の94アミノ酸からなるin-frameの欠損により874アミノ酸をコードするcDNA(short form)であった(図10)。それらのコードする蛋白質の予想分子量はそれぞれ94.3kDと104.1kDであった。short formにみられる欠損はその欠損領域の両端がスプライシング部位の5'側と3'側のコンセンサス配列(Mount, 1982)に類似するため、alternative splicingによるものと考えることができる。アミノ酸配列分析で決定した6つのアミノ酸配列のすべてがこれらのcDNAのコード配列の中に存在していた。

7. 新規の信号伝達分子としてのp130の構造の特徴

GenbankとPIRデータベースの検索を行ったところ、p130のcDNAにはヒトの脳のcDNAライブラリーからランダムにクローニングされた410bpの断片(Adams et al., 1993)と81%の相同性を持つ領域があるもの(ヌクレオチド1990-2393)、全く新規の蛋白質をコードする遺伝子であることがわかった。p130は、チロシンキナーゼを含めて従来知られているどのような酵素群にも相同性を示さなかった。構造的にはp130はN末側にSrc homology 3(SH3)領域をもつシグナル伝達分子であることがわかる(図10、図11)。

gtatcgcggg...
M R L V L V S V G A G P A
12
144
36
216
60
288
84
360
108
432
132
504
156
576
180
204
228
252
276
300
324
348
372
396
420
444
468
492
516
540

TCCTTGAGGT...
S L E V V V P G R E P L E L E V A V E T L A R L
564
1800
588
1872
612
1944
2016
684
2304
756
2520
828
2736
2808
2880
2952
3024
3096
3168
3240
3312
3384
3456
3528
3600
3672
3744
3816
3888
3960
4032
4104
4176
4248
4320
4392
4464
4536
4608
4680
4752
4824
4896
4968
5040
5112
5184
5256
5328
5400
5472
5544
5616
5688
5760
5832
5904
5976
6048
6120
6192
6264
6336
6408
6480
6552
6624
6696
6768
6840
6912
6984
7056
7128
7200
7272
7344
7416
7488
7560
7632
7704
7776
7848
7920
7992
8064
8136
8208
8280
8352
8424
8496
8568
8640
8712
8784
8856
8928
9000
9072
9144
9216
9288
9360
9432
9504
9576
9648
9720
9792
9864
9936
10008
10080
10152
10224
10296
10368
10440
10512
10584
10656
10728
10800
10872
10944
11016
11088
11160
11232
11304
11376
11448
11520
11592
11664
11736
11808
11880
11952
12024
12096
12168
12240
12312
12384
12456
12528
12600
12672
12744
12816
12888
12960
13032
13104
13176
13248
13320
13392
13464
13536
13608
13680
13752
13824
13896
13968
14040
14112
14184
14256
14328
14400
14472
14544
14616
14688
14760
14832
14904
14976
15048
15120
15192
15264
15336
15408
15480
15552
15624
15696
15768
15840
15912
15984
16056
16128
16200
16272
16344
16416
16488
16560
16632
16704
16776
16848
16920
16992
17064
17136
17208
17280
17352
17424
17496
17568
17640
17712
17784
17856
17928
18000
18072
18144
18216
18288
18360
18432
18504
18576
18648
18720
18792
18864
18936
19008
19080
19152
19224
19296
19368
19440
19512
19584
19656
19728
19800
19872
19944
20016
20088
20160
20232
20304
20376
20448
20520
20592
20664
20736
20808
20880
20952
21024
21096
21168
21240
21312
21384
21456
21528
21600
21672
21744
21816
21888
21960
22032
22104
22176
22248
22320
22392
22464
22536
22608
22680
22752
22824
22896
22968
23040
23112
23184
23256
23328
23400
23472
23544
23616
23688
23760
23832
23904
23976
24048
24120
24192
24264
24336
24408
24480
24552
24624
24696
24768
24840
24912
24984
25056
25128
25200
25272
25344
25416
25488
25560
25632
25704
25776
25848
25920
25992
26064
26136
26208
26280
26352
26424
26496
26568
26640
26712
26784
26856
26928
27000
27072
27144
27216
27288
27360
27432
27504
27576
27648
27720
27792
27864
27936
28008
28080
28152
28224
28296
28368
28440
28512
28584
28656
28728
28800
28872
28944
29016
29088
29160
29232
29304
29376
29448
29520
29592
29664
29736
29808
29880
29952
30024
30096
30168
30240
30312
30384
30456
30528
30600
30672
30744
30816
30888
30960
31032
31104
31176
31248
31320
31392
31464
31536
31608
31680
31752
31824
31896
31968
32040
32112
32184
32256
32328
32400
32472
32544
32616
32688
32760
32832
32904
32976
33048
33120
33192
33264
33336
33408
33480
33552
33624
33696
33768
33840
33912
33984
34056
34128
34200
34272
34344
34416
34488
34560
34632
34704
34776
34848
34920
34992
35064
35136
35208
35280
35352
35424
35496
35568
35640
35712
35784
35856
35928
36000
36072
36144
36216
36288
36360
36432
36504
36576
36648
36720
36792
36864
36936
37008
37080
37152
37224
37296
37368
37440
37512
37584
37656
37728
37800
37872
37944
38016
38088
38160
38232
38304
38376
38448
38520
38592
38664
38736
38808
38880
38952
39024
39096
39168
39240
39312
39384
39456
39528
39600
39672
39744
39816
39888
39960
40032
40104
40176
40248
40320
40392
40464
40536
40608
40680
40752
40824
40896
40968
41040
41112
41184
41256
41328
41400
41472
41544
41616
41688
41760
41832
41904
41976
42048
42120
42192
42264
42336
42408
42480
42552
42624
42696
42768
42840
42912
42984
43056
43128
43200
43272
43344
43416
43488
43560
43632
43704
43776
43848
43920
43992
44064
44136
44208
44280
44352
44424
44496
44568
44640
44712
44784
44856
44928
45000
45072
45144
45216
45288
45360
45432
45504
45576
45648
45720
45792
45864
45936
46008
46080
46152
46224
46296
46368
46440
46512
46584
46656
46728
46800
46872
46944
47016
47088
47160
47232
47304
47376
47448
47520
47592
47664
47736
47808
47880
47952
48024
48096
48168
48240
48312
48384
48456
48528
48600
48672
48744
48816
48888
48960
49032
49104
49176
49248
49320
49392
49464
49536
49608
49680
49752
49824
49896
49968
50040
50112
50184
50256
50328
50400
50472
50544
50616
50688
50760
50832
50904
50976
51048
51120
51192
51264
51336
51408
51480
51552
51624
51696
51768
51840
51912
51984
52056
52128
52200
52272
52344
52416
52488
52560
52632
52704
52776
52848
52920
52992
53064
53136
53208
53280
53352
53424
53496
53568
53640
53712
53784
53856
53928
54000
54072
54144
54216
54288
54360
54432
54504
54576
54648
54720
54792
54864
54936
55008
55080
55152
55224
55296
55368
55440
55512
55584
55656
55728
55800
55872
55944
56016
56088
56160
56232
56304
56376
56448
56520
56592
56664
56736
56808
56880
56952
57024
57096
57168
57240
57312
57384
57456
57528
57600
57672
57744
57816
57888
57960
58032
58104
58176
58248
58320
58392
58464
58536
58608
58680
58752
58824
58896
58968
59040
59112
59184
59256
59328
59400
59472
59544
59616
59688
59760
59832
59904
59976
60048
60120
60192
60264
60336
60408
60480
60552
60624
60696
60768
60840
60912
60984
61056
61128
61200
61272
61344
61416
61488
61560
61632
61704
61776
61848
61920
61992
62064
62136
62208
62280
62352
62424
62496
62568
62640
62712
62784
62856
62928
63000
63072
63144
63216
63288
63360
63432
63504
63576
63648
63720
63792
63864
63936
64008
64080
64152
64224
64296
64368
64440
64512
64584
64656
64728
64800
64872
64944
65016
65088
65160
65232
65304
65376
65448
65520
65592
65664
65736
65808
65880
65952
66024
66096
66168
66240
66312
66384
66456
66528
66600
66672
66744
66816
66888
66960
67032
67104
67176
67248
67320
67392
67464
67536
67608
67680
67752
67824
67896
67968
68040
68112
68184
68256
68328
68400
68472
68544
68616
68688
68760
68832
68904
68976
69048
69120
69192
69264
69336
69408
69480
69552
69624
69696
69768
69840
69912
69984
70056
70128
70200
70272
70344
70416
70488
70560
70632
70704
70776
70848
70920
70992
71064
71136
71208
71280
71352
71424
71496
71568
71640
71712
71784
71856
71928
72000
72072
72144
72216
72288
72360
72432
72504
72576
72648
72720
72792
72864
72936
73008
73080
73152
73224
73296
73368
73440
73512
73584
73656
73728
73800
73872
73944
74016
74088
74160
74232
74304
74376
74448
74520
74592
74664
74736
74808
74880
74952
75024
75096
75168
75240
75312
75384
75456
75528
75600
75672
75744
75816
75888
75960
76032
76104
76176
76248
76320
76392
76464
76536
76608
76680
76752
76824
76896
76968
77040
77112
77184
77256
77328
77400
77472
77544
77616
77688
77760
77832
77904
77976
78048
78120
78192
78264
78336
78408
78480
78552
78624
78696
78768
78840
78912
78984
79056
79128
79200
79272
79344
79416
79488
79560
79632
79704
79776
79848
79920
79992
80064
80136
80208
80280
80352
80424
80496
80568
80640
80712
80784
80856
80928
81000
81072
81144
81216
81288
81360
81432
81504
81576
81648
81720
81792
81864
81936
82008
82080
82152
82224
82296
82368
82440
82512
82584
82656
82728
82800
82872
82944
83016
83088
83160
83232
83304
83376
83448
83520
83592
83664
83736
83808
83880
83952
84024
84096
84168
84240
84312
84384
84456
84528
84600
84672
84744
84816
84888
84960
85032
85104
85176
85248
85320
85392
85464
85536
85608
85680
85752
85824
85896
85968
86040
86112
86184
86256
86328
86400
86472
86544
86616
86688
86760
86832
86904
86976
87048
87120
87192
87264
87336
87408
87480
87552
87624
87696
87768
87840
87912
87984
88056
88128
88200
88272
88344
88416
88488
88560
88632
88704
88776
88848
88920
88992
89064
89136
89208
89280
89352
89424
89496
89568
89640
89712
89784
89856
89928
90000
90072
90144
90216
90288
90360
90432
90504
90576
90648
90720
90792
90864
90936
91008
91080
91152
91224
91296
91368
91440
91512
91584
91656
91728
91800
91872
91944
92016
92088
92160
92232
92304
92376
92448
92520
92592
92664
92736
92808
92880
92952
93024
93096
93168
93240
93312
93384
93456
93528
93600
93672
93744
93816
93888
93960
94032
94104
94176
94248
94320
94392
94464
94536
94608
94680
94752
94824
94896
94968
95040
95112
95184
95256
95328
95400
95472
95544
95616
95688
95760
95832
95904
95976
96048
96120
96192
96264
96336
96408
96480
96552
96624
96696
96768
96840
96912
96984
97056
97128
97200
97272
97344
97416
97488
97560
97632
97704
97776
97848
97920
97992
98064
98136
98208
98280
98352
98424
98496
98568
98640
98712
98784
98856
98928
99000
99072
99144
99216
99288
99360
99432
99504
99576
99648
99720
99792
99864
99936
100008
100080
100152
100224
100296
100368
100440
100512
100584
100656
100728
100800
100872
100944
101016
101088
101160
101232
101304
101376
101448
101520
101592
101664
101736
101808
101880
101952
102024
102096
102168
102240
102312
102384
102456
102528
102600
102672
102744
102816
102888
102960
103032
103104
103176
103248
103320
103392
103464
103536
103608
103680
103752
103824
103896
103968
104040
104112
104184
104256
104328
104400
104472
104544
104616
104688
104760
104832
104904
104976
105048
105120
105192
105264
105336
105408
105480
105552
105624
105696
105768
105840
105912
105984
106056
106128
106200
106272
106344
106416
106488
106560
106632
106704
106776
106848
106920
106992
107064
107136
107208
107280
107352
107424
107496
107568
107640
107712
107784
107856
107928
108000
108072
108144
108216
108288
108360
108432
108504
108576
108648
108720
108792
108864
108936
109008
109080
109152
109224
109296
109368
109440
109512
109584
109656
109728
109800
109872
109944
110016
110088
110160
110232
110304
110376
110448
110520
110592
110664
110736
110808
110880
110952
111024
111096
111168
111240
111312
111384
111456
111528
111600
111672
111744
111816
111888
111960
112032
112104
112176
112248
112320
112392
112464
112536
112608
112680
112752
112824
112896
112968
113040
113112
113184
113256
113328
113400
113472
113544
113616
113688
113760
113832
113904
113976
114048
114120
114192
114264
114336
114408
114480
114552
114624
114696
114768
114840
114912
114984
115056
115128
115200
115272
115344
115416
115488
115560
115632
115704
115776
115848
115920
115992
116064
116136
116208
116280
116352
116424
116496
116568
116640
116712
116784
116856
116928
117000
117072
117144
117216
117288
117360
117432
117504
117576
117648
117720
117792
117864
117936
118008
118080
118152
118224
118296
118368
118440
118512
118584
118656
118728
118800
118872
118944
119016
119088
119160
119232
119304
119376
119448
119520
119592
119664
119736
119808
119880
119952
120024
120096
120168
120240
120312
120384
120456
120528
120600
120672
120744
120816
120888
120960
121032
121104
121176
121248
121320
121392
121464
121536
121608
121680
121752
121824
121896
121968
122040
122112
122184
122256
122328
122400
122472
122544
122616
122688
122760
122832
122904
122976
123048
123120
123192
123264
123336
123408
123480
123552
123624
123696
123768
123840
123912
123984
124056
124128
124200

図10 (前のページの図) p130^{Cas}の核酸配列と予想されるアミノ酸配列

非コード領域と、コード領域内の5'側にあるalternative splicingにより多くのクローンで欠失している領域の核酸配列を小文字で、その欠損領域の両側にあるスプライシングのドナーとアクセプター部位を下線で示す。開始コドンに先行するin frameの終止コドンを棒で囲んだ。アミノ酸配列分析で決定した6カ所のアミノ酸配列を太字で、SH3領域を下線で示す。さらにリン酸化を受けSH2と結合されうる4アミノ酸からなるモチーフが集中する領域(基質領域)のコアとなるYDXPモチーフを実線で囲み、その回りの変種モチーフを点線で囲った。SrcSH2の結合コンセンサスとなりうるYENS, YDYVモチーフを二重下線で示した。

```

rat      p130  ALYDN VAESPD E - LS FRK G DIMTVLERDTQGLDG WW LCSLHG---- GIVP GN RLK
chicken c-src ALYDY ESRTET D - LA FKK G ERLQIV---MNTEGD WW LAHSLTTGQT GYIP SN YVA
mouse   v-abl ALYDF VASGDN T - LS ITK G EKLRVLG--YHNHGE WC EAQTK-NGQ- GWVP SN YIT
chicken v-crk ALFDF KGNDDE D - LP FKK G DILKIR---DKPEEQ WW NAEDMD-GKR GMIP VP YVE
human   GRB2 (N) AKYDF KATADD E - LS FKR G DILKVL--NEECDQN WY KAELN--GKD GFIP KN YIE
human   GRB2 (C) ALFDF DPQEDG E - LG FRR G DFIHVM---DNSDPN WW KGACH----- GQTG MF PRN
human   PLC-γ ALFDY KAQRED E - LT FTK S AIIQNV---EKQEGG WW RGDYGGKKQ- LWFP SN YVE
bovine  GAP    AILPY TKVPDT D E IS FLK G DMFIVH---NELEDG WM WVTNLRTDEQ GLIV ED LVE

```

図11 p130^{Cas}のSH3領域の他のSH3との比較

種々の信号分子に共通して見いだされるSH3領域のアミノ酸配列を、代表的な蛋白質の間で比較した。SH3で保存されるアミノ酸を太字で示した(Mayer *et al.*, 1988; Lowenstein *et al.*, 1992; Booker *et al.*, 1993)。

その下流には特徴的な領域が存在し、ここにはチロシン残基をその中心とする互いにきわめて似通ったモチーフが15-30アミノ酸おきに15回反復して出現していることが見いだされた(図9、図12)。この反復するモチーフの中に繰り返し現れるチロシン残基の多くはすぐ上流に1つか2つの酸性アミノ酸(D,E)を持つことからチロシンキナーゼの基質になりやすい。一方、最近SH2はリン酸化チロシン残基と結合する際にその後続く主として3つのアミノ酸を認識して特異的な結合をすることが示された(Songyang *et al.*, 1993)。この領域には9つのYDXPモチーフ(YDVP, YDTP)を中心に15ヶの似通ったSH2結合能を持ちうる配列が出現している。このYDXPモチーフは合成ペプチドを用いた実験でCrkやNckの結合配列と考えられ、この領域とCrkが強固に結合していることが示唆され、この領域を基質領域(substrate region)と呼ぶことにした。更にp130には3カ所ほどプロリンが集中する領域がありSH2と同時にSH3との結合がある可能性もある。私はこのp130蛋白質をCas (Crk-associated Substrate: Crk結合基質)と命名した。

ノーザンブロット解析ではp130のRNAは約3.2kbの単一のバンドとして観察された(図13)。3Y1-Crk細胞におけるp130のmRNAの発現は3Y1細胞と大差なくv-Crkによる細胞のトランスフォーメーションに際してp130の転写レベルでの変化は認められなかった。p130のmRNAはあらゆる臓器で発現が認められたが精巣・腸管・肺において比較的高発現を認めた(図13)。

8. ポリクローナル抗体の作成とp130^{Cas}の検出

p130の親水性と構造上の特徴を図14にまとめる。この図に示したp130^{Cas}の3種類の部分領域Cas1,2,3のGST(グルタチオンSトランスフェラーゼ)との融合タンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し(それぞれ α Cas1,2,3と呼ぶ。)、免疫化学的解析を行った。3種類の抗体は、どれも粗精製したp130を4G10にて認められたのと同じ125-135kDの位置に鋭敏に検出した(図15, lane 6-8)。また、 α Cas1以外の抗体はラット3Y1-Crk細胞からリン酸化したp130を免疫沈降することができた。これに加えて3Y1-Crk細胞には、リン酸化チロシンを含まないと思われる大部分のp130^{Cas}が125kDの位置に存在することがわかった。

Positions	Surrounded Sequences	Candidate SH2 molecules (deduced from sequences)
	*	
213	P <u>D</u> NVYLVPTPS	
226	QQGLYQAPGPN	
263	AT <u>D</u> LYQVPPGP	
277	AQ <u>D</u> IYQVPPSA	
290	GH <u>D</u> IYQVPPSL	
332	<u>EQDE</u> YDTPRHL] Crk Nck
347	SQ <u>D</u> IYDVPPVR	
365	GQ <u>E</u> VYDTPPMA	
385	LL <u>D</u> VYDVPPSV	
404	HHSVYDVPPSV	
425	RE <u>E</u> TYDVPPAF	
460	A <u>E</u> DVYDVPPPA	
470	AP <u>D</u> LYDVPPGL	
485	P <u>G</u> TLYDVPRER	
508	<u>DDGV</u> YAVPPPA	
650	M <u>E</u> DVYQTLVVH	
751	P <u>D</u> GQYENSEGG] Src family
762	WM <u>E</u> DYDYVHLQ	

図12 p130Cas内のSH2結合コンセンサス

p130Casのアミノ酸配列に見られる多数のSH2と結合しうるチロシン残基とその位置を示す。その多くが下線で示す酸性アミノ酸を直前に1-2個伴うことから、リン酸化を受けやすい。

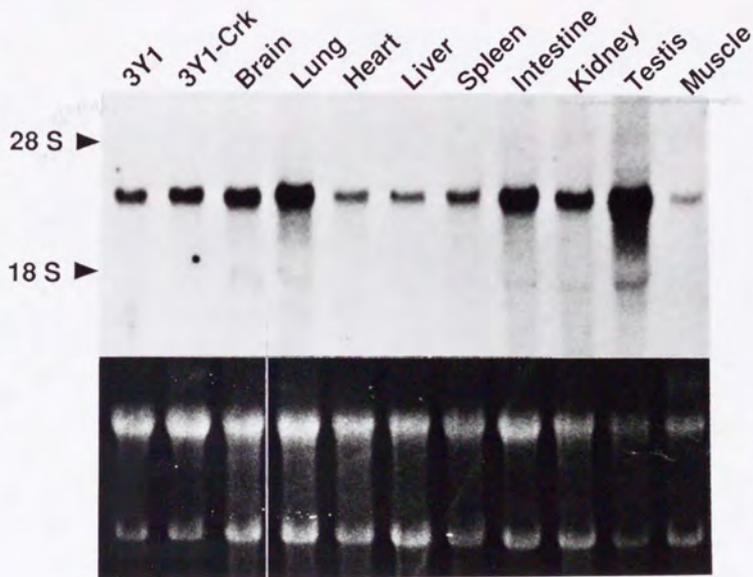


図13 3Y1およびラットの各臓器におけるp130^{Cas}のmRNAの発現

3Y1細胞とラットの各臓器におけるp130^{Cas}の発現量をノーザンプロットにより解析した。各レーン20 μ gのtotal RNAをp130^{Cas}のcDNA全長をプローブにして解析した。28Sと18Sのリボゾームの位置を左に示し、RNA量を見るためゲルの臭化エチジウムによる染色を下に示す。

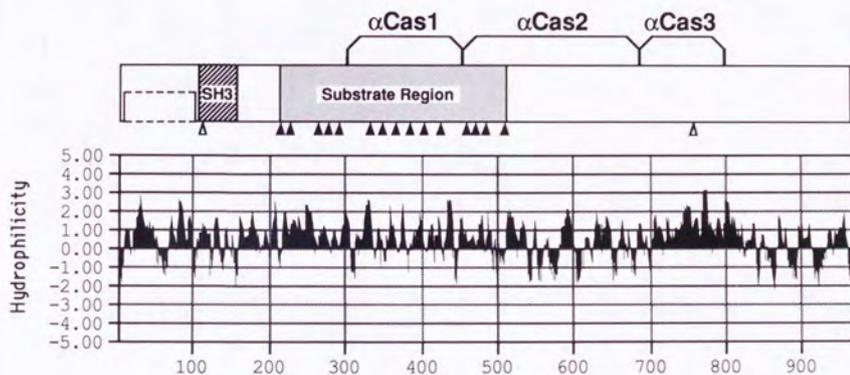


図14 p130Casの予測される一次構造

p130Casの特徴的な2つの領域とともに予測されるSH2結合部位のチロシン(黒い三角)を図示する。同時に下に各部位の親水性のグラフ(Kyte and Doolittle,1982; window size=7)を表示する。GST融合タンパク質の形でポリクローナル抗体をつくるのに使った領域を α Cas1~3で示す。

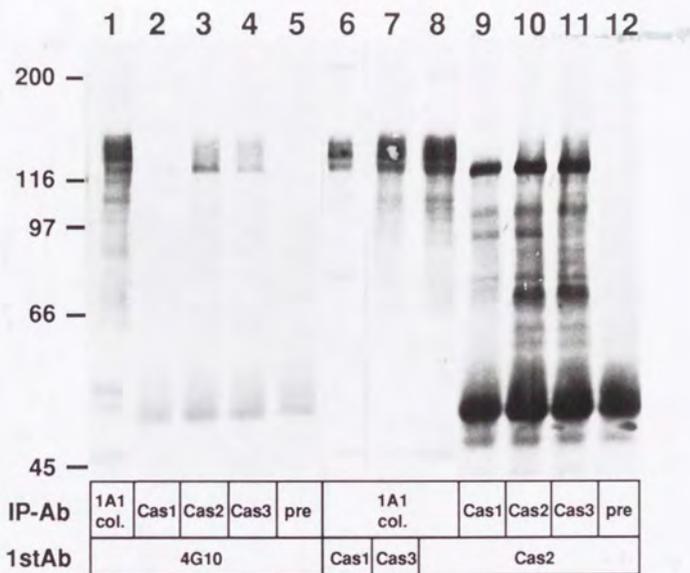


図15 3種類のポリクローナル抗体によるp130^{Cas}の検出と免疫沈降

1A1により粗精製されたp130を、作成した3種類の抗体(α Cas1-3)によるイムノプロットで検出して(lane 6-8)、4G10により検出されるp130と比較した(lane1)。一方、3種類の抗体とpreimmune血清で免疫沈降した3Y1-Crkの細胞溶出液を、4G10(lane 2-5)あるいは α Cas2(lane 9-12)でイムノプロットしてp130を観察した。

基質領域の中心部のペプチド配列に対する α Cas1のみがリン酸化したp130を免疫沈降できないことは、チロシンのリン酸化によりこの領域のエピトープに変化が起きていることを示唆する。図16にまとめて示すようにp130^{Cas}は正常の3Y1細胞では115kDと125kDの主として2本のリン酸化チロシンを含まないバンド(Form A,B)として検出されるが(図16, lane 1,4)、3Y1-CrkではForm Aが減少しその代わりに強くリン酸化をうけた125kD以上のブロードなバンド(Form C)が出現する(図16, lane 2,5)。この細胞においてv-Crkを免疫沈降によって落とすと主としてチロシンリン酸化されたForm Cのp130が共沈してくる。図17に示すようにForm Cのp130をアルカリホスファターゼにて処理するとその位置がさがり最終的にはForm AとForm Bの位置に移動することからForm Cは多くの部位でリン酸化されることによりForm AとForm Bの位置のバンドが移動したものであると説明できるのに対して、Form AとForm Bの差はリン酸化のみでは説明できないことがわかる。cDNAの多様性が関わっている可能性が考えられる。

p130^{Cas}の著明なリン酸化はv-Srcでトランスフォームした3Y1細胞(SR-3Y1)でも認められる(図16, lane 6)。ただしリン酸化による移動度のずれはv-Crkとv-Srcの発現系で異なり、両者でリン酸化部位の配置や数の違いがあるものと推測される。SR-3Y1細胞においてもSrcで免疫沈降するとp130^{Cas}が共沈することから、v-Srcとp130が複合体を形成していることがわかる(図16, lane 9)。このようなp130^{Cas}のチロシンリン酸化はv-fes,v-fms,v-raf,v-K-ras,v-erbB,SV40によるトランスフォーマントでは検出されず、これらの癌遺伝子が少なくとも部分的にはv-crkやv-srcと異なるシグナル伝達系を用いていると考えることができる。

9. v-Crkとv-Srcの主要な基質成分であるp130^{Cas}

p130^{Cas}とv-Crkあるいはv-Srcとの結合をさらに確認するため、逆の実験としてp130^{Cas}による免疫沈降物中にこれらの癌遺伝子産物が検出できることを示した(図18, lane 5、図19, lane 3)。さらに3Y1-Crk細胞ではp130^{Cas}と細胞内のc-Srcとが結合していることも示された(図16, lane 8、図19, lane 2)。

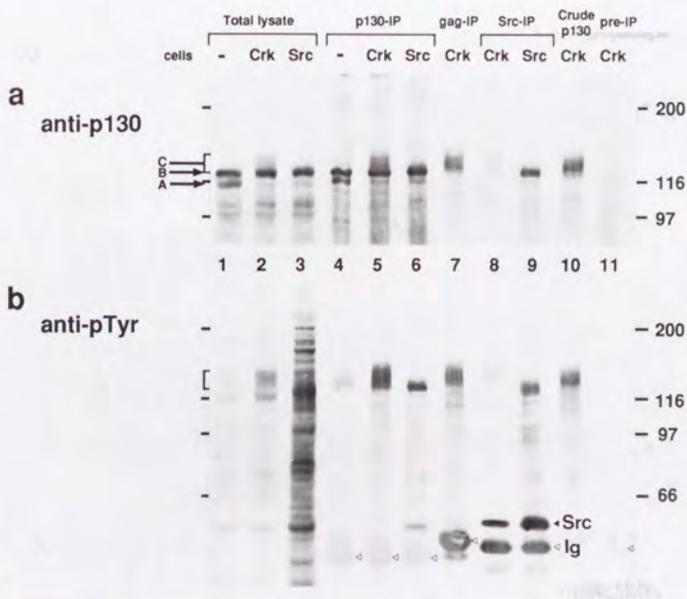


図16 v-Crk/v-Src発現細胞におけるp130Casのリン酸化とCrk/Srcとの結合

正常ラット3Y1細胞(-)およびv-Crk,v-Srcをそれぞれ発現する3Y1-Crk細胞(Crk)、SR-3Y1細胞(Src)をそのまま(lane 1~3)、p130^{Cas}で免疫沈降(lane 4~6)、v-Crkで免疫沈降(lane 7)、あるいはSrcで免疫沈降したのち(lane 8,9)、p130^{Cas}(上段a)とpTyr(下段b)でイムノプロットした。コントロールとしてカラムで粗精製したCrkのp130^{Cas}(lane 10)とPreimmuneの血清で免疫沈降したもの(lane 11)を示す。リン酸化されない状態の2種類のp130^{Cas}の位置(A,B)とリン酸化後に移動する領域(C)を左に示す。

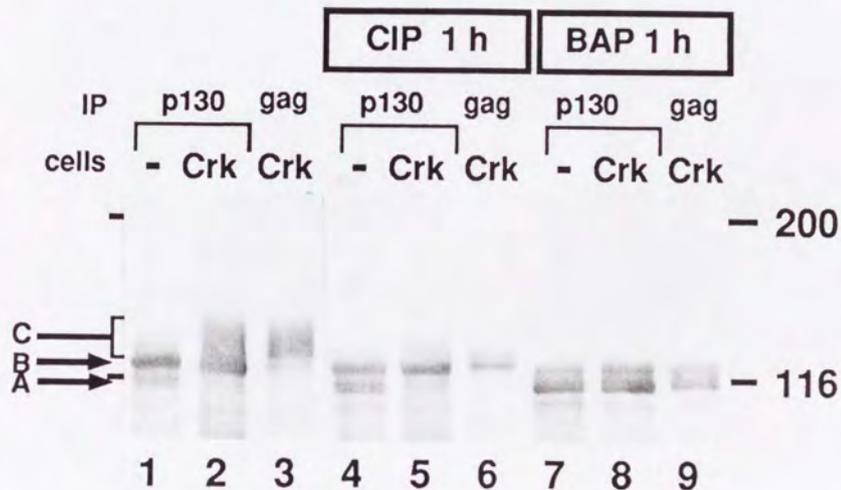


図17 p130^{Cas}の各フォームのホスファターゼ処理

正常3Y1細胞(-)あるいは3Y1-Crk細胞(Crk)の溶出液を α Cas2(p130)により免疫沈降し(lane 1,2)、あるいは3Y1-Crk細胞の溶出液を1A1(gag)によりv-Crkで免疫沈降し(lane 3)、沈降物中のp130^{Cas}を α Cas2により検出した。これらをCIP(calf intestine alkaline phosphatase)で1時間(lane 4-6)、あるいはBAP(bacterial alkaline phosphatase)で1時間処理して(lane 7-9)、p130^{Cas}のバンドのパターンを比較した。左に元のp130^{Cas}にみられる3つのフォーム(Form A, B, C)の位置を示した。

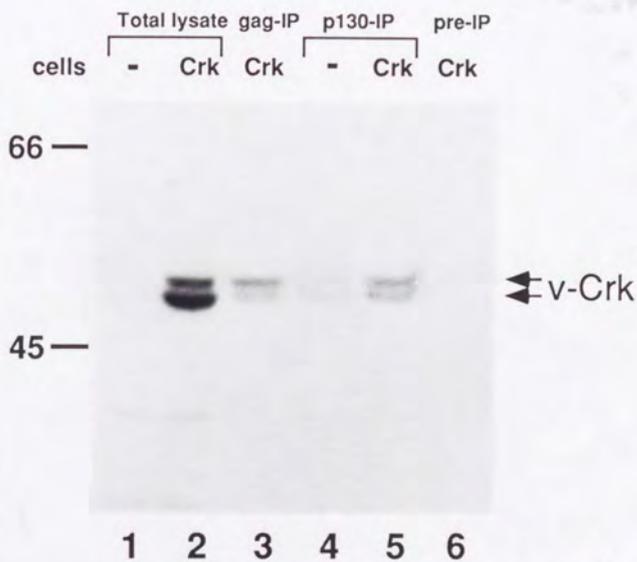


図18 p130^{Cas}とv-Crkとの細胞内での結合

p130^{Cas}の免疫沈降により、p130^{Cas}と共沈されるv-Crkを検出した。3Y1細胞(-)と3Y1-Crk細胞(Crk)の溶出液(lane 1, 2)をp130^{Cas}に対する抗体(α Cas2)により免疫沈降した(lane 4, 5)。比較のため、3Y1-Crk細胞の溶出液を1A1(lane 3)あるいはpreimmune血清(lane 6)で免疫沈降した。これらのサンプルを α -vCrkによるイムノプロットで解析した。

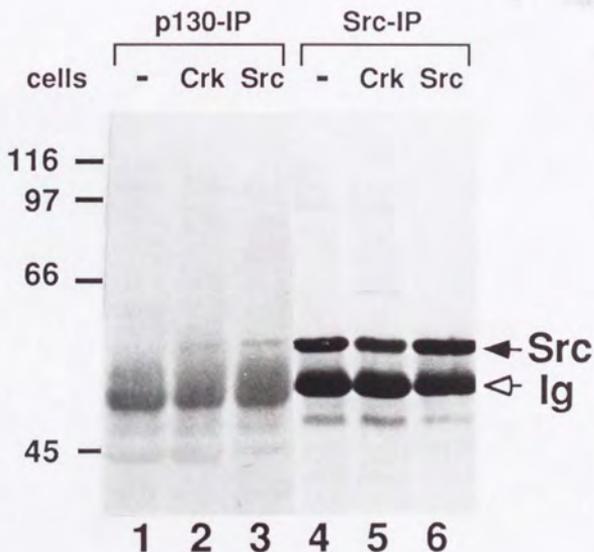


図19 p130CasとSrcとの細胞内での結合

p130Casの免疫沈降により、p130と共沈されるSrc蛋白質(c-Srcおよびv-Src)を検出した。3Y1細胞(-)、3Y1-Crk細胞(Crk)、SR-3Y1細胞の溶出液をp130Casに対する抗体(α Cas2)で免疫沈降して、抗Src抗体(MAb 327)でイムノプロットした(lane 1-3)。これをSrcの抗体(2-17)で免疫沈降したもの(lane 4-6)と比較して解析した。

p130^{Cas}にはいくつかのSrcのSH2と結合する可能性のある領域がある。SH3領域内のYDNV配列、C末のYENSとYDYVの配列それから多少変異しているが基質領域内のYDxP配列である。C末の2つの配列は酸性アミノ酸の直後にあることもあり可能性が高い。

これまで、v-Srcによるトランスフォーメーションに際してリン酸化されv-Srcと結合する約130kDの未知の基質蛋白質がよく研究されている。図16、図19の結果から今回v-Crkに関連してクローニングしたp130^{Cas}がこの分子と同一である可能性が高い。実際これまでのいくつかのin vitroのデータは両者が同一である可能性を示唆している。そこで次にこのv-Srcの主要な基質蛋白質とp130^{Cas}とが同一分子であることを確認した。図20のキナーゼアッセイに示すようにCrk・Srcの発現細胞双方でp130^{Cas}は免疫沈降物のもつキナーゼ活性の大変よい基質となる。またそれぞれの細胞をv-Crkあるいはv-Srcで免疫沈降した場合にもp130と全く同じサイズのリン酸化バンドがみられる。Srcと結合した最大の基質は従来から言われるSrcのp130であることがわかっているので、p130^{Cas}の免疫沈降物によるp130^{Cas}のリン酸化バンドと、Srcで免疫沈降したときにリン酸化される130kDのメインのバンドを(図20の, lane5と6)V8プロテアーゼで部分消化したところ、全く同じ消化パターンが得られた(図21)。以上の結果より、今回クローニングしたp130^{Cas}が従来からSrcに結合する主要なリン酸化基質として知られるp130と同一分子であるという結論を得た。

10. NIH3T3細胞のがん化に関連したp130^{Cas}のリン酸化

p130^{Cas}のチロシンリン酸化は、調べた範囲ではv-Srcとv-Crkを介した細胞のがん化に特異的に関与していると考えられる。p130^{Cas}と細胞のトランスフォーメーションという現象のつながりをNIH3T3細胞の系でも確認した。NIH3T3細胞ではv-Crk単独では形態的にトランスフォーメーションを起こさない。これに単独ではトランスフォーミング活性のないc-Srcを同時に発現させると、すでに報告があるように(Sabe *et al.*, 1992)細胞が形態的に紡錘状になり、フォーカス形成能やヌードマウスにたいする造腫瘍性などのがん細胞の性質を獲得する。また、よく知られているように活性型Src(Y527F c-Src)やv-Srcは単独でトランスフォーミング活性があり、その活性はv-Srcにもっとも強くみられる。

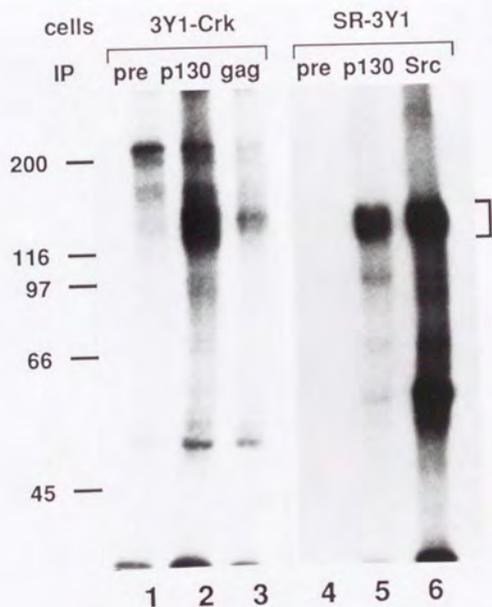


図20 v-Crkおよびv-Src発現細胞のキナーゼアッセイ

3Y1-Crk細胞とSR-3Y1細胞をp130^{Cas}(lane 2,5), v-Crk(lane 3)あるいはSrc(lane 6)により免疫沈降し、免疫沈降物のキナーゼアッセイを行った。lane 1,4はpreimmune血清によるコントロールである。露光はlane 1~3が5hr、lane 4~6が30minである。p130^{Cas}のリン酸化と考えられる位置に印を付けた。

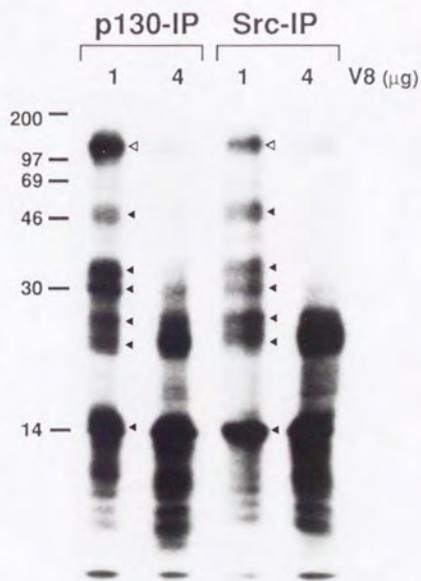


図21 p130^{Cas}はv-Srcと結合する130kDの主要基質と同一である。

キナーゼアッセイにみられるv-Srcの130kDの基質分子(図20, lane 6)がp130^{Cas}と同じものかどうかを確かめるためV8による部分消化でマッピングを行った。図20のlane 5(p130-IP)とlane 6(Src-IP)にみられる130kDのメインバンドを切り出し、それぞれ1 μ gあるいは4 μ gのV8プロテアーゼで泳動中に部分消化した。1 μ gでの消化による未消化のバンドと主要な断片に印を付けて示す。

これらの細胞でp130^{Cas}のチロシンリン酸化を調べると、トランスフォームした細胞にのみp130^{Cas}のリン酸化が認められ、v-Srcにおいてもっとも顕著である(図22)。この結果はp130^{Cas}のチロシンリン酸化がトランスフォーメーションという現象と密接に結びついていることを示唆する。

11. p130^{Cas}のチロシンリン酸化による細胞内局在の変化

細胞分画の解析からp130^{Cas}は正常細胞でリン酸化されていない状態では主として細胞質に存在している(図23, lane 5)。それに対してv-Crkによる細胞のトランスフォーメーションの際に生ずるチロシンでリン酸化されたフォーム(Form C)は細胞膜と核を含む不溶画分に移動することが示された(図23, lane 2,4)。この細胞内でもリン酸化チロシンを含まないp130^{Cas}(Form B)はもとの細胞質に存在している(図23, lane 6)。この事実からp130^{Cas}がチロシンリン酸化の有無により細胞内の局在を変え他の分子に信号を伝えることが示唆される。

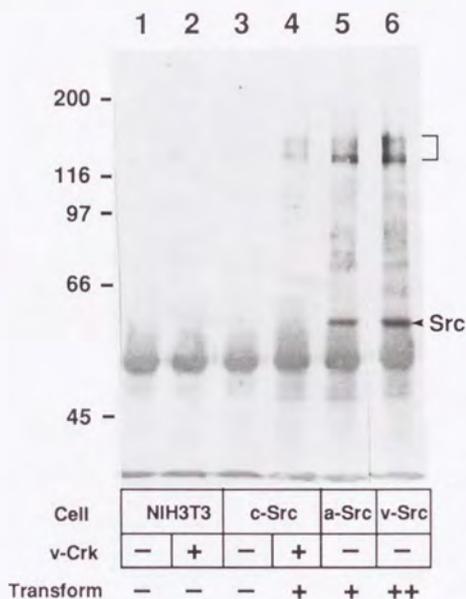


図22 NIH3T3細胞のトランスフォーメーションの際のp130Casのリン酸化

NIH3T3細胞(lane 1)及びそれにc-Src(lane 3)、活性型Src(Y527F c-Src; lane 5)、v-Src(lane 6)を導入したトランスフェクタントについて、p130Casで免疫沈降した後、4G10でイムノブロットをすることによりp130Casのチロシンリン酸化の程度を調べた。同時に、それだけではNIH3T3細胞ではトランスフォームした形態を示さないv-Crkのトランスフェクタント(lane 2)と、さらにそれにc-Srcを共発現させることによりトランスフォームした細胞(lane 4)も解析した。



図23 p130Casのリン酸化による細胞内局在の変化

低張液で粉碎した3Y1細胞(-)と3Y1-Crk細胞を 10^3 gと 10^5 gの遠心力でp1(Nuc), p100 (Mem), s100(Cyto)の各分画に分離し、それぞれp130CasとpTyrにてイムノブロットを行った。p130Casの3つのフォームを矢印と角括弧で示した。下にまとめたように、リン酸化されていない2つのフォームが主として細胞質にあるのに対し、リン酸化されたフォームは核と細胞膜分画に移行している。

IV. 考察

細胞のがん化をきたす遺伝子及びそのコードする蛋白質については近年解析が進んでおり、活性型癌遺伝子産物とそれに対応する正常細胞内の癌遺伝子産物(c-onc)が細胞の分化と増殖を制御する分子として注目されている。これらの分子の多くは、チロシンキナーゼあるいはセリン・スレオニンキナーゼとして直接的に、あるいは他の分子を介して間接的に細胞内蛋白質のリン酸化を調節することがわかっている。従ってそれらの蛋白質群によってリン酸化される標的分子を解析することは、細胞のがん化や分化・増殖などの調節機構を知る上できわめて重要である。最近になってPLC- γ (Wahl *et al.*, 1988)、GAP(Ellis *et al.*, 1990)、Nck(Li *et al.*, 1992; Meisenhelder and Hunter, 1992; Park and Rhee, 1992)、Vav (Bustelo *et al.*, 1992; Margolis *et al.*, 1992)、Shc(Pellicci *et al.*, 1992)、Syp/SH-PTP2(Feng *et al.*, 1993)、Cortactin(p80/p85; Wu and Parsons, 1993)などの信号伝達分子が増殖因子刺激や細胞のトランスフォーメーションの際にリン酸化を受けることが報告されている。これらのSH2/SH3保有分子は特定の上流からのシグナルを受けることによって細胞の分化・増殖に関わるシグナルをリン酸化依存性で下流へのシグナルを伝えるものと考えられる。

トランスフォーメーションの際のp130^{Cas}の多段階のチロシンリン酸化

この研究では、まずトリ及びラットの線維芽細胞においてv-Crkを発現させた際に顕著なチロシンリン酸化によって検出される130kD周辺のプロードなバンドが単一のp130蛋白質に由来するものであること、そのプロードなバンドは主としてp130が多くの部位で種々の程度にチロシン残基でリン酸化されていることに主として由来していることをしめした。この多くのリン酸化部位はその後のクローニングで基質領域のSH2結合能を持つと考えられる15カ所のチロシン残基とC末側のSrcと結合することが示唆される2つのチロシン残基として同定された。このように多くの部位のリン酸化によってp130^{Cas}は抗リン酸化チロシンの抗体で明瞭に検出できるわけであるが、それは逆に実際にリン酸化されたp130蛋白質の量が予想以上に少ないという結果をもたらした。最終的に確立した精製法は、二段

階の抗体カラムを中心として非常に収率の高い方法であるが、それでも結果として 3×10^{10} の細胞から精製されたp130Casは約 $4 \mu\text{g}$ (30pmol)であり、その内部アミノ酸配列決定にかろうじて足りる量であった。その後作成したp130Casの抗体により、チロシンでリン酸化されたp130Casは少なくともv-Crkのトランスフォーマントにおいては全体のごく一部で、多くのp130Casはリン酸化されずv-Crkと結合しない形で状態でストックとして存在しているらしい。

v-Crkとv-Srcの共通信号媒介因子としてのp130Cas

p130Casの遺伝子クローニングと免疫化学的解析によっていくつかのことが明らかになったが、その中で注目すべきはv-Crkとv-Srcという2つの全く異なるグループに属する癌遺伝子産物と結合し、もっとも著明にチロシンリン酸化を受ける細胞内蛋白質がp130Casという単一の蛋白質であるということが最終的に証明できたことである。この結果は、p130Casがv-Srcとv-Crkによる細胞のトランスフォーメーションのシグナルを両方も伝える直接の信号伝達分子であること示す。このp130Casを介した細胞がん化のシグナルは、v-Crkとv-Src以外の他の活性化癌遺伝子産物によっても使われている可能性があるが、私の調べた範囲ではv-fes, v-fms, v-fos, v-raf, v-K-ras, v-erb B, SV40などによる繊維芽細胞のトランスフォーメーションには関与していないと考えられる。このことからp130Casを経由するシグナル伝達系路はv-Crkとv-Srcの系に比較的特異的である可能性もある。p130Casはそのリン酸化されうるチロシン残基の個数が多いこともあり、Srcなどのチロシンキナーゼの基質としてきわめて有能であり、そのリン酸化は抗リン酸化チロシン抗体によってきわめて鋭敏に検出されうる。Srcファミリーのチロシンキナーゼを中心にp130Casの基質としての特異性が明らかになれば、細胞内での特定のチロシンキナーゼのわずかな活性上昇を検出するための有用な手段となりうる。

p130Casのリン酸化のメカニズム

細胞がん化の際にp130Casをリン酸化しているチロシンキナーゼが何であるかは重要な

問題である。v-Srcはきわめて強いキナーゼであるので、v-Srcとp130Casの複合体の中でp130Casをリン酸化しているのはv-Srcであると考えられる。それではv-Crkと複合体をつくったp130Casをリン酸化しているのは何であろうか。可能性として考えられるのはc-Srcである。私の実験でも3Y1-Crk細胞の中で微量ながらp130Casとc-Srcが結合していることが示された(図16, lane 8)。現時点ではデータはないが、v-Crkの導入によりc-Srcのキナーゼ活性が上がり、細胞のトランスフォーメーションの方向に働く可能性がある。その活性化のメカニズムとしてSrcのC末端の527番のリン酸化しているチロシン残基に結合することによりc-Srcの活性が上がることを示唆されている(Bibbins *et al.*, 1993)。この活性化したc-Srcによってp130Casがリン酸化されるということで説明ができる。これを支持する他のデータとしてc-Srcの過剰発現とv-Crkがトランスフォーメーションに対して協調的に働き、さらにSrcのC末端のチロシンをリン酸化するCskによりこのトランスフォーメーションが抑制されるという報告がある(Sabe *et al.*, 1992)。またc-Srcに限らずSrcファミリーに属するFyn, Yes, Fgr, LynなどのキナーゼもC末端のチロシンリン酸化により活性が押さえられているため、同じような機序でv-Crkによるトランスフォーメーションに関わる可能性がある。また、最近になってc-AblがCrkのSH3と結合してCrkをリン酸化することが示され(Ren *et al.*, 1994, Feller *et al.*, 1994)、c-AblがCrkと同時にp130Casもリン酸化している可能性もある。現在リン酸化部位のマッピングから関与するキナーゼの検索を試みている。

何らかのキナーゼ活性が上がっている可能性とともに、v-Crkがp130Casの脱リン酸化をブロックする可能性が考えられる。私のデータでもチロシンフォスファターゼを阻害することによりp130のリン酸化の程度がさらに上がることが示された(図3)。また大腸菌でつくらせたv-Crkを加えることにより、リン酸化されたp130が脱リン酸化を受けにくくなるという報告もある(Birge *et al.*, 1992)。p130Casのリン酸化の程度の多様性が示すように、p130Casのリン酸化がキナーゼによるリン酸化とホスファターゼによる脱リン酸化の間の微妙な平衡状態によって決まっていると考えると、v-CrkのSH2がp130Casのリン酸化部位に結合することにより、この平衡状態がリン酸化の方向にシフトするものと考えられることができる。

SH2保有分子の"シグナル集積分子"としてのp130の役割

リン酸化していないp130Casは主として細胞質に存在するのに対して、v-Crkによりチロシンでリン酸化したp130Casは膜分画と核分画に移行することが示された。p130Casがリン酸化した状態でSH2結合能を持つことから考えると、p130Casが細胞膜内あるいはSrcファミリーのキナーゼなどのように膜に結合して存在するSH2保有分子と複合体をつくって存在しているものと考えられる。このような局在の変化はp130Casが細胞膜から核へのシグナル伝達に関わる重要なシグナル伝達分子の一つであることを示唆する。

v-Src, v-Yes, v-Fpsの各キナーゼによる細胞のトランスフォーメーションに際して共通する蛋白質群がリン酸化されているという報告がある(Kamps and Sefton, 1988)。またp130Casと同一と考えられる130kDのリン酸化蛋白質がv-Src, v-Fyn, v-Fgrの各分子と結合していることもいわれており(Sartor *et al.*, 1991)、Srcファミリーの非レセプター型チロシンキナーゼの多くに共通する信号伝達系路がp130Casを介していることが予想される。またアダプター分子であるCrkとNckはそのSH2の結合するコンセンサス配列が非常に類似していることから(Songyang *et al.*, 1993)、Nckもp130Casの基質領域と結合する可能性の高い分子の一つである。p130CasはSH3の他に約250アミノ酸からなる領域中にSH2結合配列と考えられるお互いに類似した6種類のモチーフが全体で15回繰り返して現れる特徴的な領域を持つことから、この領域が多くのSH2保有分子と同時に結合する可能性がある。p130Casと似た構造を持つものとして、現在までに見つかっている分子の中ではインスリンレセプターキナーゼの基質であるIRS-1が数カ所にYMXMモチーフを持つことがわかっており(Sun *et al.*, 1991)、SH2の信号伝達に関わるキナーゼの基質分子に共通する構造であると考えられる。p130Casの構造全体をみると、信号伝達分子の中できわめて特異な構造を持っており、従来のアダプター分子と異なり、Srcファミリーのチロシンキナーゼを含むいくつかのSH2保有分子と同時にあるいは競合的に結合してSH3から下流へのシグナルのON/OFFを決定するようなsignal-assembler molecule(シグナル集積分子)としての役割を持つことが考えられる(図24)。この特徴的な構造がどのような機能を担っているのかは今後の解析を待つ必要がある。

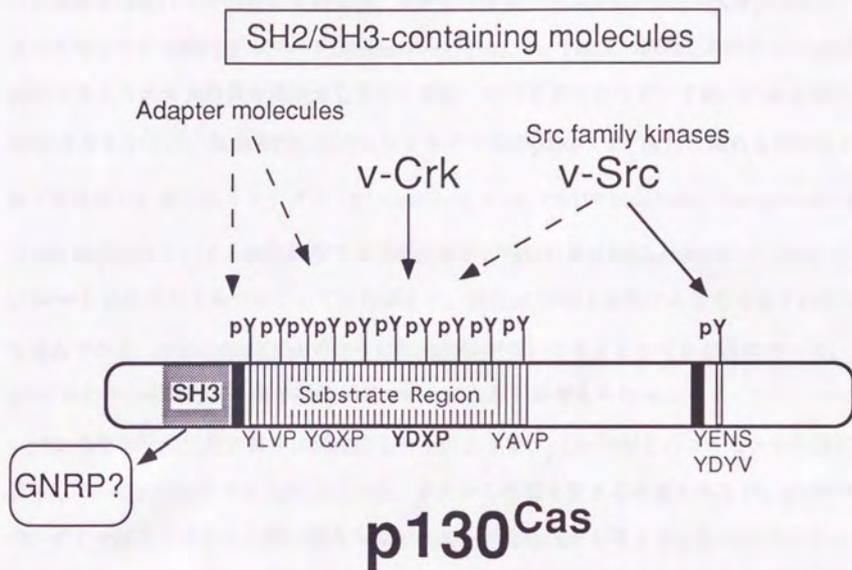


図24 信号伝達分子としてのp130^{Cas}の機能

p130^{Cas}の構造とそれから予想されるp130^{Cas}の"Signal Assembler"としての役割を模式図で示した。プロリンに富む領域を黒で示す。(GNRP: グアニンヌクレオチド交換因子)

V. おわりに

この研究により、1989年より多くの研究者によって観察・報告されながらクローニングにいたらず、一部の研究者に"Mystery Molecule"とまでよばれたv-Srcとv-CrkのSH2結合分子p130の分子構造が明らかになったことになる。これまでのp130に関する研究は多くは線維芽細胞の系で行われているが、マクロファージの系ではc-fes/c-fpsがp130をターゲットとしてリン酸化するデータ(Arecas *et al.*, 1994)や、T細胞の活性化の際にはc-fynがp130と考えられる蛋白質を基質としてリン酸化し結合するというデータ(da Silva *et al.*, 1993)なども示され、組織特異的なチロシンキナーゼがp130のリン酸化に関わる可能性もあり興味深い。さらにインテグリン β 1(Kornberg *et al.*, 1991)やbombesin, vasopressinなどの生理活性分子による細胞刺激でリン酸化する130kDの蛋白質(Zachary *et al.*, 1992)もp130^{Cas}との異同を今後つめていく必要がある。現在p130^{Cas}と結合する新たな分子の同定も進んでおり、今回のSrcとCrkのように従来関係がないと考えられてきた系において、p130^{Cas}を介した共通する信号経路が見つかることが十分考えられる。

p130の生物学的機能の解析は現在始まったばかりで、p130^{Cas}がどのような生命現象に関与しているかが明らかになるまでには、まだ少し時間を要すると思われるが、p130^{Cas}のシグナル伝達分子として他に類をみないユニークな構造から考えて、この分子の更なる解析が細胞の分化・増殖に関わる基本的なシグナル伝達機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。

VI. 謝辞

本研究の遂行に当たりまして、御指導と御鞭撻下さいました東京大学医学部第三内科講師平井久丸博士に心から感謝いたします。

本研究の共同研究者であり、アミノ酸配列決定という重要なステップを行っていただきましたキリンビール基盤技術研究所岩松明彦博士に心から感謝いたします。

v-crkのcDNAを供与いただいた花房秀三郎博士とPeter Vogt博士に感謝いたします。

蛋白質の精製や取り扱い技術全般について多くの助言をいただきました竹縄忠臣博士、芝崎太博士、次田皓博士に感謝いたします。

多くの助言をいただいた共同研究者の間野博行博士、西田淳二博士に心から感謝いたします。

分子生物学のほとんどの技術を教えていただいた石川冬木博士、林健志博士に心から感謝いたします。

最後に東京大学医学部第三内科血液学教室と自治医科大学分子生物学教室の皆様にご感謝いたします。

VII. 文献

Adams, M. D., Soares, M. B., Kerlavage, A. R., Fields, C., and Venter, J. C. (1993). Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genet.* **4**, 373-380.

Areces, L. B., Sbarba, P.D., Juker, M., Stanley, E. R., and Feldman, R. A. (1994). Functional specificity of cytoplasmic and transmembrane tyrosine kinases: identification of 130- and 75-kilodalton substrates of c-fps/fes tyrosine kinase in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4606-4615.

Bibbins, K. B., Boeuf, H., and Varmus, H. E. (1993). Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7278-7287.

Birge, R. B., Fajardo, J. E., Mayer, B. J., and Hanafusa, H. (1992). Tyrosine-phosphorylated epidermal growth factor receptor and cellular p130 provide high affinity binding substrates to analyze Crk-phosphotyrosine-dependent interactions in vitro. *J. Biol. Chem.* **267**, 10588-10595.

Birge, R. B., Fajardo, J. E., Reichman, C., Shoelson, S. E., Songyang, Z., Cantley, L. C., and Hanafusa, H. (1993). Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4648-4656.

Birge, R. B., and Hanafusa, H. (1993). Closing in on SH2 specificity. *Science* **262**, 1522-1524.

Booker, G. W., Gout, I., Downing, A. K., Driscoll, P. C., Boyd, J., Waterfield, M. D., and Campbell, I. D. (1993). Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 α subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **73**, 813-822.

Bustelo, X. R., Ledbetter, J. A., and Barbacid, M. (1992). Product of *vav* proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* **356**, 68-71.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 569-574.

Clark, S. G., Stern, M. J., and Horvitz, H. R. (1992). *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**, 340-344.

Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **252**, 1102-1106.

da Silva, A. J., Janssen, O., and Rudd, C. E. (1993). T cell receptor ζ / CD3-p59^{fyn}-associated p120 / p130 binds the SH2 domain of p59^{fyn}(T). *J. Exp. Med.* **178**, 2107-2113.

DeClue, J. E., Sadowski, I., Martin, G. S., and Pawson, T. (1987). A conserved domain regulates interactions of the v-fps protein-tyrosine kinase with the host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 9064-9068.

Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M., and Weinberg, R. A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**, 45-51.

Ellis, C., Moran, M., McCormick, F., and Pawson, T. (1990). Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* **343**, 377-381.

Feller, S.M., Knudsen, B. & Hanafusa, H. (1994). c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J.* **13**, 2341-2351.

Feng, G. S., C. C. Hui and T. Pawson. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* **259**,1607-1611.

Flynn, D. C., Leu, T. -H., Reynolds, A. B., and Parsons, J. T. (1993). Identification and sequence analysis of cDNAs encoding a 110-kilodalton actin filament-associated pp60^{src} substrate. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7892-7900.

Hanafusa, H. (1969). Rapid transformation of cells by Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 318-325.

Hirai, H., and Varmus, H. E. (1990). Mutations in homology regions 2 and 3 of activated chicken c-src that result in preferential transformation of mouse or chicken cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8592-8596.

Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A.-C., Miller, M. J., and Merrill, C. R. (1988). Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173**, 424-435.

Honda, H., Shibuya, M., Chiba, S., Yazaki, Y., and Hisamaru, H. (1993). Identification of novel protein-tyrosine phosphatases in a human leukemia cell line, F-36P. *Leukemia* **7**, 742-746.

Iwamatsu, A. (1992). S-carboxymethylation of proteins transferred onto polyvinylidene difluoride membranes followed by *in situ* protease digestion and amino acid microsequencing. *Electrophoresis* **13**, 142-147.

Kamps, M. P., and Sefton, B. M. (1988). Identification of multiple novel polypeptide substrates of the *v-src*, *v-yes*, *v-fps*, *v-ros*, and *v-erb-B* oncogenic tyrosine protein kinases utilizing antisera against phosphotyrosine. *Oncogene* **2**, 305-315.

Kanner, S. B., Reynolds, A. B., Vines, R. R., and Parsons, J. T. (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3328-3332.

Kanner, S. B., Reynolds, A. B., Wang, H. C., Vines, R. R., and Parsons, J. T. (1991). The SH2 and SH3 domains of pp60^{src} direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110. *EMBO J.* **10**, 1689-1698.

Kimura, G., Itagaki, A., and Summers, J. (1975). Rat cell line 3Y1 and its virogenic polyoma- and SV40-transformed derivatives. *Int. J. Cancer* **15**, 694-706.

Kirschmeier, P. T., Housey, G. M., Johnson, M. D., Perkins, A. S., and Weinstein, I. B. (1988). Construction and characterization of a retroviral vector demonstrating efficient expression of cloned cDNA sequences. *DNA* **7**, 219-225.

Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668-674.

Koch, C. A., Moran, M. F., Anderson, D., Liu, X. Q., Mbamalu, G., and Pawson, T.

(1992). Multiple SH2-mediated interactions in v-src-transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1366-1374.

Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E., Prockop, C., and Juliano, R. L. (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of $\beta 1$ integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8392-8396.

Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5233-5262.

Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lehmann, J. M., Riethmuller, G., and Johnson, J. P. (1990). Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1048.

Li, W., Hu, P., Skolnik, E. Y., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5824-5833.

Lipsich, L. A., Lewis, A. J., and Brugge, J. S. (1983). Isolation of monoclonal antibodies that recognize the transforming proteins of avian sarcoma viruses. *J. Virol.* **48**, 352-360.

Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431-442.

Margolis, B., Hu, P., Katzav, S., Li, W., Oliver, J. M., Ullrich, A., Weiss, A., and Schlessinger, J. (1992). Tyrosine phosphorylation of *vav* proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* **356**, 71-74.

Matsuda, M., Mayer, B. J., Fukui, Y., and Hanafusa, H. (1990). Binding of transforming protein, P47^{gag-crk}, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* **248**, 1537-1539.

Matsuda, M., Mayer, B. J., and Hanafusa, H. (1991). Identification of domains of the *v-crk* oncogene product sufficient for association with phosphotyrosine-containing proteins. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1607-1613.

Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T., and Shibuya, M. (1992). Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3482-3489.

Matsuda, M., Nagata, S., Tanaka, S., Nagashima, K., and Kurata, T. (1993). Structural requirement of CRK SH2 region for binding to phosphotyrosine-containing proteins. Evidence from reactivity to monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **268**, 4441-4446.

Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A., and Takenawa, T. (1992). Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3

domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9015-9019.

Mayer, B. J., Hamaguchi, M., and Hanafusa, H. (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* **332**, 272-275.

Mayer, B. J., and Hanafusa, H. (1990a). Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2638-2642.

Mayer, B. J., and Hanafusa, H. (1990b). 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.

Meisenhelder, J., and Hunter, T. (1992). The SH2/SH3 domain-containing protein Nck is recognized by certain anti-phospholipase C- γ 1 monoclonal antibodies, and its phosphorylation on tyrosine is stimulated by platelet-derived growth factor and epidermal growth factor treatment. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5843-5856.

Moran, M. F., Koch, C. A., Anderson, D., Ellis, C., England, L., Martin, G. S., and Pawson, T. (1990). Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8622-8626.

Morgan, D. O., Kaplan, J. M., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1989). Mitosis-specific phosphorylation of p60^{src} by p34^{cdc2}-associated protein kinase. *Cell* **57**, 775-786.

Morrison, D. K., Kaplan, D. R., Rhee, S. G., and Williams, L. T. (1990). Platelet-

derived growth factor (PDGF)-dependent association of phospholipase C- γ with the PDGF receptor signaling complex. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2359-2366.

Mount, S. M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**, 459-474.

O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

Ogawa, S., Toyoshima, H., Kozutsumi, H., Hagiwara, K., Sakai, R., Tanaka, T., Hirano, N., Mano, H., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1994). The C-terminal SH3 domain of the mouse c-Crk protein negatively regulates tyrosine-phosphorylation of Crk associated p130 in rat 3Y1 cells. *Oncogene* **9**, 1669-1678.

Park, D., and Rhee, S. G. (1992). Phosphorylation of Nck in response to a variety of receptors, phorbol myristate acetate, and cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5816-5823.

Pawson, T., and Gish, G. D. (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* **71**, 359-362.

Pelicci, G., Lanfrancone, F., Grignani, J., McGlade, F., Cavallo, G., Forni, I., Nicoletti, F., Grignani, T., Pawson and P. G. Pelicci. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**, 93-104.

Potts, W. M., and Vogt, V. M. (1987). A simple method for immunoaffinity purification of nondenatured avian sarcoma and leukemia virus gag-containing proteins. *Virology* **160**, 494-497.

Reichman, C. T., Mayer, B. J., Keshav, S., and Hanafusa, H. (1992). The product of the cellular *crk* gene consists primarily of SH2 and SH3 regions. *Cell Growth Differ.* 3, 451-460.

Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157-1161.

Ren, R., Ye, Z.-S. & Baltimore, D. (1994). Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes & Dev.* 8, 783-795.

Reynolds, A. B., Kanner, S. B., Wang, H. C., and Parsons, J. T. (1989). Stable association of activated pp60^{src} with two tyrosine-phosphorylated cellular proteins. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3951-3958.

Reynolds, A. B., Herbert, L., Cleveland, J. L., Berg, S. T., and Gaut, J. R. (1991). p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60^{v-src} is related to cadherin-binding factors β -catenin, plakoglobin and *armadillo*. *Oncogene* 7, 2439-2445.

Sabe, H., Okada, M., Nakagawa, H., and Hanafusa, H. (1992). Activation of c-Src in cells bearing v-Crk and its suppression by Csk. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4706-4713.

Sadowski, I., Stone, J. C., and Pawson, T. (1986). A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130^{gag-fps}. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4396-4408.

Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., and

Hirai, H. (1994a). Characterization and purification of p130, the main phosphoprotein associated with v-Crk oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **269**, 32740-32746.

Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1994b). A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes *in vivo* with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* **13**, 3748-3756.

Sartor, O., Sameshima, J. H., and Robbins, K. C. (1991). Differential association of cellular proteins with family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **266**, 6462-6466.

Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B., and Parsons, J. T. (1992). pp125^{FAK} a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5192-5196.

Suefferlein, T., and Rozengurt, E. (1994). Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. *J. Biol. Chem.* **269**, 9345-9351.

Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chanudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., and Cantley, L. C. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**, 767-778.

Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Oliver, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnofsky, S., Feldman, R. A., and Cantley, L. C. (1994). Specific motifs recognized by the SH2

domains of CSK, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2777-2785.

Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., and White, M. F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350-4354.

Tsuchie, H., Chang, C. H., Yoshida, M., and Vogt, P. K. (1989). A newly isolated avian sarcoma virus, ASV-1, carries the *crk* oncogene. *Oncogene* **4**, 1281-1284.

Wahl, M. I., Daniel, T. O., and Carpenter, G. (1988). Antiphosphotyrosine recovery of phospholipase C activity after EGF treatment of A-431 cells. *Science* **241**, 968-970.

Wang, H. C., and Parsons, J. T. (1989). Deletions and insertions within an amino-terminal domain of pp60^{v-src} inactivate transformation and modulate membrane stability. *J. Virol* **63**, 291-302.

Wirth, P. J., Rao, M. S., and Evarts, R. P. (1987). Coordinate polypeptide expression during hepatocarcinogenesis in male F-344 rats. *Cancer Res.* **47**, 2839-2851.

Wu, H. and J. T. Parsons. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60^{src} substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J. Cell. Biol.* **120**, 1417-1426.

Zachary, I., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (1992). Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 19031-19034

Zaitsev, H., Tanaka, H., Mitsudomi, T., Matsuzaki, A., Ohtsu, M., and Kimura, G. (1988). Differences in proliferation properties among sublines of rat 3Y1 fibroblasts transformed by various agents in vitro. *Biomed. Res.* **9**, 181-197.

