

博士論文

論文題目 質量解析を用いた白血病関連遺伝子 *BAALC* の結合蛋白質
の同定およびその機能解析

氏名 牧 宏彰

質量解析を用いた白血病関連遺伝子 *BAALC* の結合蛋白質の同定

およびその機能解析

所属：血液・腫瘍内科

指導教官：黒川 峰夫

牧 宏彰

目次

【目次】	1
【要旨】	2
【序文】	3
【研究方法】	14
【結果】	26
【考察】	44
【結論】	47
【謝辞】	48
【参考文献】	49

【要旨】

血液細胞に発現している *BAALC* (Brain and Acute leukemia cytoplasmic) 遺伝子は白血病において過剰発現し、予後不良因子といわれているが作用機序は不明である。私は質量解析を利用して *BAALC* 蛋白質の結合蛋白質 *Drebrin1* を同定した。*BAALC* 発現下では *Drebrin1* は細胞質から細胞膜表面に局在が変化し、その接着能が上昇していた。また *CXCR4* (C-X-C chemokine receptor type 4) のリン酸化が上昇していた。以上の結果により *BAALC* は白血病細胞において *Drebrin1* と協調し組織、特に骨髄ニッチでの細胞休止期に関与している可能性がある。

【序文】

生体での血球は階層構造をもって発生・分化が成立しており、自己複製機能と多能性を持ちすべての血球を産生する造血幹細胞が存在する。造血幹細胞は自己複製能によって維持され、さらに多種多様の造血細胞を秩序立って産生することにより、正常の造血が維持されている。また、正常の造血維持機構のみならず悪性腫瘍細胞の維持においても一部に自己複製能をもつ細胞分画、すなわち腫瘍幹細胞が存在することが明らかになってきた [1] (Fig.1)。腫瘍幹細胞は化学療法に抵抗性であり再発・難治性に寄与することから、同細胞を治療標的とした治療戦略の考案は重要であるが、その性質は十分に明らかにされていない。正常及び腫瘍性造血における幹細胞の維持機構の詳細な解明が、正常幹細胞の維持とそこからの効率的な分化を通じた再生医療の実現、あるいは腫瘍における自己複製能の維持機構の解明とそれをターゲットとした効果の高い分子標的療法の開発をする上で望まれている。

造血幹細胞の発生・維持に関わる遺伝子の変異が、白血病などの造血器悪性腫瘍の多くにみられることが知られている。造血幹細胞活性は白血病幹細胞活性と一部共通の分子機構によって維持されていると考えられるが、予後不良白血病において発現が上昇している遺伝子が造血幹細胞活性においても重要な役割を果たしていると考えられている。染色体異常トリソミー8を持つ白血病症例から cDNA-RDA (representational difference analysis) によって新規白血病関連遺

伝子として分離された *BAALC* もそのひとつである。*BAALC* は、神経外肺葉由来細胞とヒトの造血幹細胞を含む細胞分画である CD34 陽性細胞で発現が亢進している遺伝子であり、正常核型急性骨髄性白血病においてその発現上昇が予後不良因子として同定された [2,3]。この分子はヒト造血幹細胞分画にも発現していることから、幹細胞機能を通じて白血病の難治化に関与していると考えられる。

近年、small RNA deep sequencing によりメラノーマと小児 ALL (acute lymphocytic leukemia) において miR-3151 が *BAALC* のイントロン 1 に結合していることが報告された [4]。miRNA はノンコーディング RNA であり mRNA に作用してその発現を制御しており、白血病発生に関与している。

一方で *BAALC* の蛋白質相互作用の機能解析はあまり進んでいない。理由の一つとしては、この分子は他の既知の蛋白質と明確な相同性を持たないことが挙げられる。神経系においては、*BAALC* は前頭葉のシナプス領域に発現している。その N 末端領域はカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の α サブユニット (CaMKII α) の C 末端領域と結合し、両蛋白質はシナプス領域の脂質ラフトに局在している。脂質ラフトは細胞膜を構成するマイクロドメインの一種で膜を介したシグナル伝達、細胞接着あるいは細胞内小胞輸送、細胞内極性、細菌やウィルスの感染などに重要な役割を有する機能ドメインであることから、*BAALC* がシナプスにおけるシグナル伝達にかかわっている可能性が示唆され

ている [5]。しかし未だ白血病の難治性や幹細胞機能の維持に寄与する機序は不明である。

正常及び白血病幹細胞は個体において骨髄中、特にニッチ (niche) と呼ばれる特定の部位に局在している。ニッチは骨芽細胞、類洞内皮細胞 (sinusoidal endothelial cell)、間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cell)、交感神経、及び細胞外基質からなる組織であり、造血幹細胞の休止期、自己複製、増殖、分化、局在を制御している [6-8]。ニッチで休止期にある造血幹細胞及び白血病幹細胞は多くの抗腫瘍薬に対して低感受性となる。*BAALC* は造血幹細胞分画で発現が上昇しているという特徴を考えると、*BAALC* が高発現している白血病幹細胞がニッチにて休止期を維持され、治療抵抗性を示しているという仮説が考えられる。

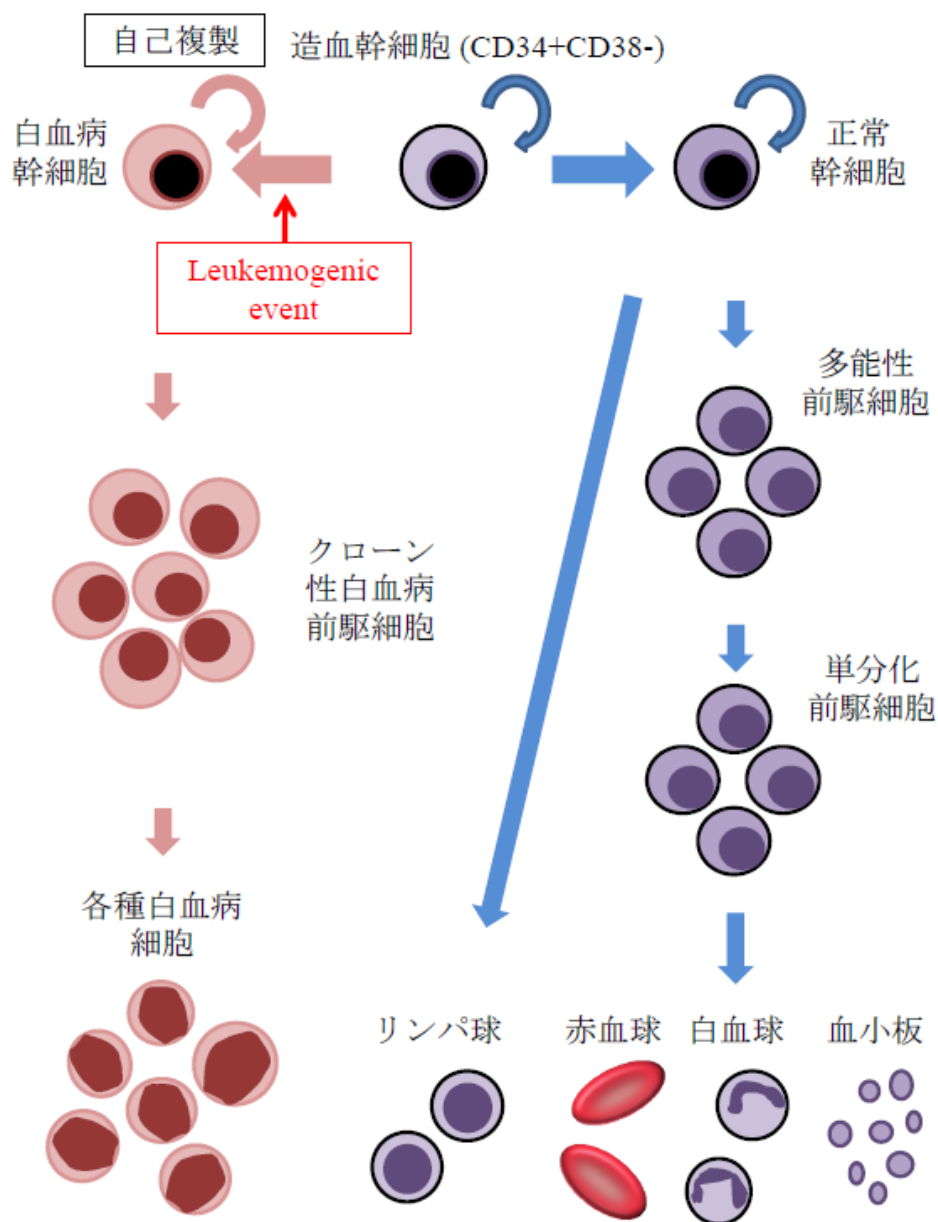


Figure 1: 造血幹細胞と白血病幹細胞の分化

正常末梢血血球はすべて造血幹細胞から分化して産生される。造血幹細胞はその表面抗原が Lin (-), CD34 (+), CD38 (-), CD90 (+) のパターンを呈することが特徴であり、分化能と自己複製能を持っている。造血細胞の未分化な分画に *JAK2* (Janus kinase 2) 変異や *AML1* (acute myelogenous leukemia) -*ETO* (eleven twenty-one) などの染色体変異、また複数の発癌に関わるとされる遺伝子異常が蓄積され、自己複製活性の亢進された白血病幹細胞が存在することがわかっている。

BAALC の機能について蛋白質相互作用は未解明であることから、私は結合蛋白質の同定を目指した。また結合蛋白の単離の手法として、私は質量分析 (Mass Spectrometry : MAS) に注目した。質量解析は 1980 年代に開発された蛋白質同定及び解析手法である。目的の化合物をイオン化した上で質量と電荷の比で分離し、化合物のイオンに関するデータ (マススペクトル) を解析する (Fig. 2)。マススペクトルには分子量をあらわす分子量関連イオンとその開裂産物であるフラグメントイオンが出現する。得られたマススペクトラムより化合物の同定が可能となる。1990 年代にデータの解析ソフトが開発され、また解析技術の発展により分子のより高感度な検出が可能になり、プロテオミクスにおいて不可欠な手法となった [9]。

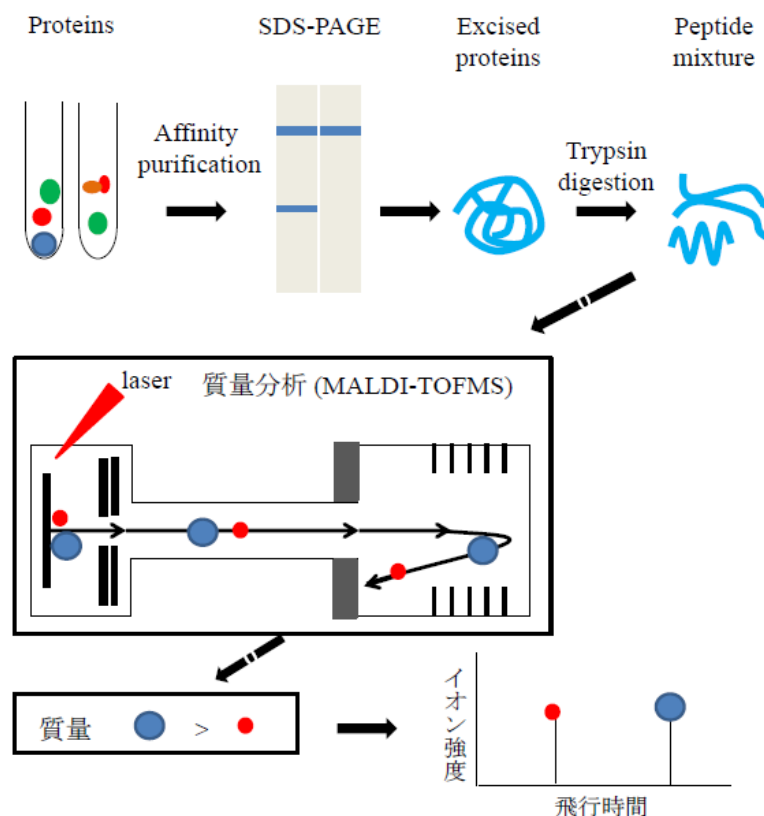


Figure 2：質量分析

各サンプルから抽出された蛋白質群から標的とする蛋白質（とその結合蛋白質）を抗体による免疫沈降（IP）などで purify し、ゲル上に展開したのち染色する。染色された蛋白質バンドを切り出し還元アルキル化および（trypsin などによる）in-gel-digestion を経て質量分析にかける。分析器内にてレーザー照射によりイオン化されたペプチド断片は、フライトチューブ内を質量に応じた速度で移動するため、これをイオン検出器にてデータ化し、マススペクトルとして解析する。

私は本テーマの研究を行う以前に骨髓系腫瘍でその変異が頻発する *TET2* (Ten Eleven Translocation2) の結合蛋白質を質量分析で単離し、機能解析を行っていた。*TET2* は DNA 脱メチル化酵素である *TET* family (*TET1*, *TET2*, *TET3*) の一つで、*TET* 遺伝子は 2000 年前半に *MLL* (Mixed-Lineage, Leukemia) -AML において *TET1* (Ten-Eleven Translocation) 遺伝子が *MLL* に融合しているということが初めて報告された [10,11]。その後骨髓系腫瘍患者で、4q より *TET2* が、11q より *c-Cbl* が責任遺伝子として同定された。*TET2* の変異は骨髓異形成症候群 (MDS (myelodysplastic syndromes)) や急性骨髓性白血病 (AML (acute myelogenous leukemia))、慢性単球性白血病 (CMML (Chronic myelomonocytic leukemia)) などの 20–50% にみられるという報告がされている [12,13]。DNA メチル化はエピジェネティック修飾の一つであり遺伝子発現抑制と密接に関係すると考えられている。その中で *TET2* 遺伝子産物はゲノム DNA 中の 5-methylcytosine (5-mC) から 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) への変換に関与しており、*TET2* の変異があると 5-hmC が減少し、エピジェネティクスに異常を起こすことにより骨髓性悪性

疾患を引き起こしていると考えられている。ただ 5mC から 5hmC への変化がメチル化に影響を与える機序はよくわかっていない。

TET2 の結合蛋白質を単離するにあたり、当初 endogenous に発現している TET2 を免疫沈降し、結合蛋白の単離を行う方針としたが、免疫沈降が可能な抗体がなかったため、*TET2* 強制発現細胞から抽出した蛋白質を利用することとした。まず FLAG-myc-tag を付加した FLAG-myc-TET2 コンストラクトを HEK293T 細胞にトランスフェクションした細胞を構築し、この細胞とベクターのみをトランスフェクションしたコントロール細胞をそれぞれ 3×10^7 個用意し、蛋白質を抽出後 FLAG 抗体 (Anti DYKDDDDK tag, Monoclonal Antibody, Wako, 1:1000, 4°C 2 時間) で免疫沈降し、ゲル上に展開後クマシー染色したが、*TET2* 発現蛋白質に特異的にみられる蛋白質バンドは見られなかった。原因として結合している蛋白質の生体内での発現が低く、クマシー染色の検出感度以下の蛋白量しかゲル上に存在しなかったと考え、次にそれぞれの細胞数を 5×10^8 個に増量し、同様の実験を行った。その結果 *TET2* 発現細胞由来の蛋白質より約 100kDa の蛋白質バンドが特異的に見られ、質量分析の結果、同蛋白質を O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase1 : OGT1 と同定した (Fig.3)。OGT1 は細胞内タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に GlcNAc を付加することで、転写活性化やタンパク質分解などの多様な機能を果たしている。

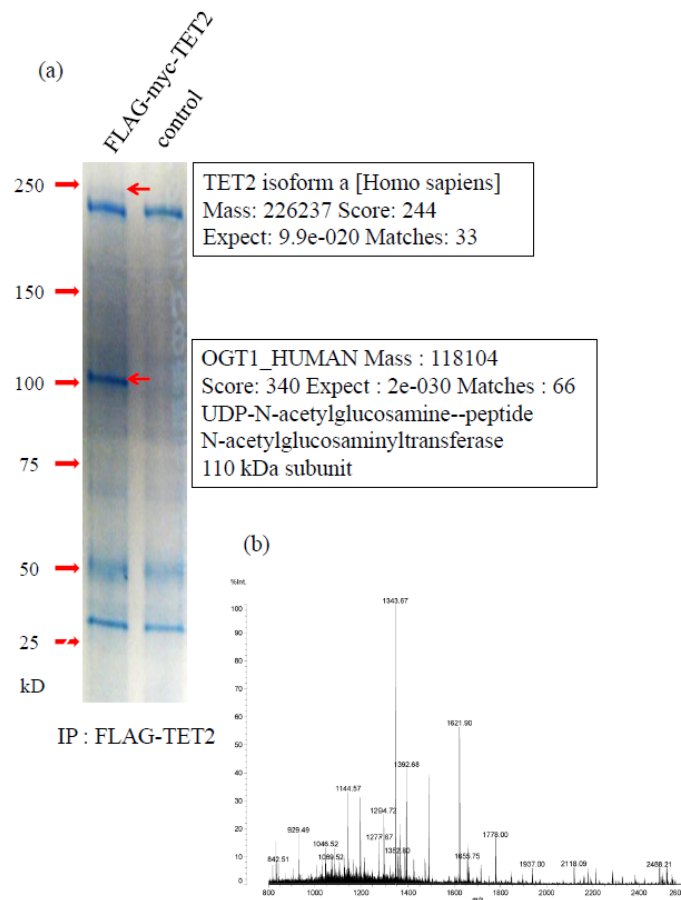


Figure 3: 質量分析による TET2 結合蛋白質 OGT1 の同定

(a) : HEK293T 細胞に FLAG-myc-TET2 コンストラクトとコントロールをトランスフェクションした細胞をそれぞれ 5×10^8 個用意し、蛋白質を抽出し IP 後 SDS-PAGE ゲル上に展開した。赤矢印に示すバンドが *TET2* 発現蛋白質から特異的に検出され、それぞれのバンドを切り出し質量分析に提出した結果、下の発現の強いバンドから OGT1 が、上の発現の弱いバンドから TET2 蛋白質が検出された。(b) : OGT1 が検出されたゲルのマスペクトル。

しかしその後まもなく同蛋白質が TET2 の結合蛋白質として報告されたため [14]、その後の研究を断念する形となったが、この報告で筆者らは HEK293T 細胞に *TET2* を発現させた stable line を構築し、litter scale の細胞から蛋白質を抽出し、免疫沈降後ゲル上に展開し、鍍銀染色したバンドから質量分析を用いて

OGT1 を検出していた。つまり細胞モデル、サンプルサイズ、蛋白質の purification の手法など私の実験系と同様であり、現行の実験手法で結合蛋白質の同定が可能であると考え、次に造血器腫瘍関連遺伝子 *BAALC* をターゲットとし、その結合蛋白質の同定を足掛かりに *BAALC* の機能解析についての研究を開始した。質量分析の結果、私は *BAALC* の結合蛋白質として後述する *Drebrin1* (developmentally regulated brain protein1) を同定した。*Drebrin1* は Shirao らによって神経細胞より同定された蛋白質であり [15]、5 番染色体に位置する遺伝子 *DBN1* によってコードされ、細胞質及び細胞膜上に存在するアクチン結合タンパクである [16,17]。*Drebrin1* に actin-depolymerizing factor homology (ADFH) ドメイン、Coiled-Coil (CC) ドメイン、Helical (Hel) ドメイン、Proline-rich region (PP)、C 末端の blue-box (BB) 領域の 5 領域に分類される [18] (Fig.5)。ADFH ドメインはアクチンフィラメント (F-actin) と結合し、構造を modify している。ADFH ドメインのみを発現させると F-actin とともに細胞内にびまん性に局在する。一方で Coiled-coil (CC) ドメインと Helical (Hel) ドメインもそれぞれ独立して F-actin と結合しており、両ドメインのみを付着細胞に発現させると仮足形成を促進し、F-actin は仮足に集中する。また PP 及び BB ドメインを Hel ドメインに付加すると、仮足形成が抑制される一方で CC-Hel ドメインに付加しても抑制されない。以上のように *Drebrin1* のドメイン間には複雑な auto-inhibitory システムが存在している。*Drebrin1* は神経細胞では細胞の突起形成とシナプス領域に認められるシ

ナプス後肥厚の形成に必要とされている[19]。Shirao らは Drebrin1 の樹状突起スパインでの役割を直接的に証明するために GFP 融合 Drebrin1 を大脳神経細胞で発現させたところ、GFP 融合 Drebrin1 は樹状突起スパインに集積し、その過剰発現によりスパインの延長をもたらすことを発見した [20]。また、Drebrin1 の発現をノックダウンすると樹状突起上のスパイン密度の減少、幅の狭い未熟なスパイン形成をもたらす [21]。Drebrin1 は細胞の接着能及び遊走能を制御しており[22,23]、Drebrin1 は細胞-組織や細胞-細胞間におけるスパイン形成とそれに基づく接着能、遊走能を制御する他、シナプスに類似した他細胞・組織とのシグナル伝達の間を形成していると考えられている。

Drebrin1 と悪性腫瘍との関連についての知見は限られているが、Drebrin1 はグリオブラストーマにおいて過剰発現しており、その形態と浸潤・遊動性を維持していることが報告されている [24]。また肺癌のうち stage I-III の非小細胞癌の患者の microarray 解析で再発患者に Drebrin1 遺伝子が高発現していた [25]。一方、造血器腫瘍との関連については、小児の *TEL/AML1* 陽性前駆 B リンパ芽球性白血病で Drebrin1 の高発現が報告されており [26]、小児 ALL では Drebrin1 の発現は良好な予後と相関しているという報告もある [27]。詳細な機序は明らかではないが、小児 ALL においては Drebrin1 の発現は予後の改善に影響しているようであり、固形腫瘍とはその生物学的意義が異なるようである。

以下に質量分析により Drebrin1 を同定するに至った詳細と、BAALC との相互

作用についての解析について記述する。

Drebrin1



Figure 4: Drebrin1 のドメイン構造 (分子量 110-132 kDa)

ADFH : actin-depolymerizing factor homology、CC : Coiled-Coil、Hel : Helical、PP : Proline-rich region、BB : blue-box (C 末端領域)

【研究目的】

今回私は質量解析を用いることによって **BAALC** の結合蛋白質を同定し、続いて同定された蛋白質と **BAALC** との相互作用を解析し、**BAALC** の生理的機能及び造血器腫瘍における機能について解明することを目的とした。

【研究方法】

I. BAALC 過剰発現細胞の質量解析

[I-1] BAALC 過剰発現細胞の構築

BAALC 過剰発現細胞の構築にあたって、BAALC 遺伝子を 5x myc-pcDNA3 に導入したコンストラクトを使用した。同コンストラクト及び pcDNA3 empty vector を HEK293T 細胞に遺伝子導入した。HEK293T 細胞を選択した理由は大量培養、遺伝子導入が容易であることと、前回の *TET2* についての実験で、血液細胞を用いた実験と同様の結合蛋白質が得られたためである。導入法はリン酸カルシウム法による transfection を用いた。BAALC コンストラクト及びベクター 20ug と 2.5 M CaCl₂ 50 ul を混合し HeBS (20 mM Hepes, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄-12H₂O, 0.1% Glucose D(+) pH 7.1) 1000 ul に apply 後 pipetting にて mix し RT 30 min incubate 後に HEK293T 細胞 / 10cm dish に apply し、48 時間後に細胞を回収した。また、血液細胞モデルとしてヒト急性リンパ性白血病細胞株である Jurkat 細胞に同様のプラスミドをウィルス感染にて発現させた細胞も構築した。2 細胞の myc-BAALC の発現をウェスタンブロットにて確認した (ウェスタンブロットのプロトコールは後述する)。

[I-2] 免疫沈降 (IP) -ウェスタンブロット (WB) アッセイ

I-1 の細胞を Lysis Buffer (1 % NP-40, 15 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄-H₂O,

150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, Protease inhibitor cocktail (Roche)) にて溶解し、30 min on ice にて incubate 後 15000 rpm 20 min 遠心分離し、上清を回収し蛋白質を抽出した。同蛋白質を Protein G sepharose beads (GE health care) 及び抗 myc 抗体 (Myc-Tag (9B11) Mouse mAb, Cell Signaling , 1:1000, 4°C 2 時間 rotate) にて免疫沈降反応を行った。反応後の beads をムロマックカラム S (ムロマチテクノス) に apply し Lysis Buffer を用いて洗浄し、beads を回収し Sample Buffer (100 mM Tris-HCL, 4 % SDS (sodium dodecyl sulfate), 20 % Glycerol, BPB (Bromophenol blue)) を 45 ul 添加後、95°C で 5 min boil し蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質を SDS-PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) mini gel に apply し電気泳動 (200V, 45 min)し、泳動後の gel を CBB 染色液 (coomasy brilliant blue R-250 #161-0436, BIORAD) に浸し (RT overnight 振盪) 、続いて脱色液 (10% 酢酸水, RT 振盪) にて脱色し含有する蛋白質を特異的に染色した。

[I-3] 質量分析：ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) による蛋白質の同定

結合蛋白質の解析を行うにあたり、池川雅哉氏 (京都府立医科大学ゲノム医学科学講座) 、及び嶋田崇史氏 (島津津製作所基盤技術研究所ライフサイエンス研究所) と共同研究を行った。染色後の gel から *BAALC* 発現細胞由来の蛋白質にのみ検出されたバンドについて質量分析を行った。クマシーブリリアントブ

ルー染色後の蛋白質のバンドを SDS-PAGE ゲルから切出し、10 mM ジチオト
レイトール (DTT) / 100 mM 炭酸水素アンモニウム添加後、55 mM ヨードアセ
トアミド / 100 mM 炭酸水素アンモニウムを添加した。アセトニトリルを除去
後、ゲルを乾燥させ 50 ng trypsin gold (Promega) / 50mM 炭酸水素アンモニウム
+0.5mM 塩化カルシウムにて 37°C overnight で incubation し in-gel digestion を
行った。Incubation 後 ZipTip μ C18 (Merck Millipore) を用いてゲルのトリプシン
ペプチドを取り除き脱塩処理した。マトリックス剤として 2,5-ジヒドロキシ安
息香酸 (10 mg / mL in 0.1% トリフルオロ酢酸+50%アセトニトリル, Shimadzu
GLC) を加え、AXIMA Resonance matrix-assisted laser desorption/ionization
quadrupole ion trap time-of-flight mass spectrometer (MALDI-QIT-TOF MS,
Shimadzu Corporation) を使用しペプチドの質量分析を行った。蛋白質の同定法
は PMF を用いた。質量範囲は 650-4000 Da とした。アンギオテンシン II (m/z
1046.54) と ACTH フラグメント 18-39 (m/z 2465.20) (Sigma-Aldrich) のプロ
トン化マスシグナルによって外部キャリブレーションを、またトリプシン分解
フラグメント (m/z 842.51 and m/z 2211.10) により内部キャリブレーションを
行った。ローデータは Mascot Distiller, version 2.4.3.3, peak processing software
(Matrix Science) を用いてデフォルトパラメーターでプロトン化モノアイソト
ピックピークを解析した。蛋白質は Mascot Server, version 2.4.1 (Matrix Science)
により同定し、配列データベースは Swiss-Prot (2013/11/11; 541,561 human

sequence entries) を用いた。検索条件を以下に示す。

missed cleavage of trypsin : 1, peptide tolerance : 0.2 Da, fixed modifications : cystein carbamydomethylation, variable modifications : methionine oxidation, Protein scores : > 56 ($p < 0.05$)。

II. 免疫沈降-ウェスタンブロット (IP-WB) アッセイ

リン酸カルシウム法にて 5x myc-BAALC-pcDNA3 コンストラクト及び pcDNA3 empty vector を導入した HEK293T 細胞から蛋白質を抽出し、抗 myc 抗体にて IP 後 boil にて抽出した蛋白質を SDS-PAGE を行い、PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) 膜に blot (45V, 130 mA, 90 min) 後 5% BSA-TN (10mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl) にて blocking (RT, 1hr 振盪) し、抗 Drebrin1 抗体 (Cell Signaling Drebrin1 (pan) Antibody, 1:1000, 4°C overnight) にて immunoblot を行なった。一次抗体反応後のメンブレンを抗 Rabbit-HRP 抗体 (Goat-anti Rabbit HRP antibody, Santa-Cruz, 1:5000, RT 30 min) を用いて二次抗体反応を行なった。Wash (TN 30 min、TNT (TN+tween20) 1hr) 後のメンブレンを immunostar (WAKO) にひたし、FUJIFILM LAS-4000 LUMINESCENT IMAGE ANALYZER (Fujifilm) にて撮影した。

III. コンストラクトの構築

[III-1] Drebrin1 過剰発現コンストラクトの構築

Full length Human Drebrin1 の N 末端側に FLAG 配列を挿入してタグを付加した PCR primer を用いて、FLAG-Human Drebrin1 cDNA を HEK293T 細胞の cDNA より PCR (polymerase chain reaction) 反応により作成し、PCR 反応試薬は KOD FX Neo (TOYOBO) をメーカーのプロトコールに従い使用した。PCR 後 cDNA を制限酵素 BamHI-EcoRI サイトを用いて pcDNA3 に ligation high (TOYOBO 16°C 2hr) を用いて ligation した。Ligation 後に XL1-blue competent E.coli. に apply し incubate (on ice, 30min) 後温浴槽にて heat shock (42°C 45sec) し transformation した。反応後 1 ug / ml Ampicillin in 2x TY plate に散布し incubate (37°C 18hr) し、出現した colony を 1ug / ml Amp in 2x TY 液体培地 2ml にて incubate (37°C 14hr rotate) した。Culture medium から miniprep (PI-50 Automatic DNA isolation system, KURABO) にてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドを BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてメーカーのプロトコールに従い sequencing PCR 反応、精製後、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行い、配列を確認した。正しい配列のプラスミドを 1ug / ml Amp in 2x TY 液体培地 250 ml で culture し、Plasmid DNA purification kit (NucleoBond Xtra Midi / Maxi タカラバイオ) を用いてプラスミドを抽出し、FLAG-Drebrin1-pcDNA3 プラスミドを構築した。

[III-2] BAALC / Drebrin1 deletion mutant コンストラクトの構築

KOD -Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて 5x myc-BAALC-pcDNA3 コンストラクトの N 末端 (aa2-81) 及び C 末端 (aa81-145) の deletion モデル (delN / delC) を構築した。また同様に FLAG-Drebrin1-pcDNA3 の各 domain の deletion モデル (delADFH / CC / Hel / PP / BB) を構築した [18]。それぞれのコンストラクトはシーケンスにて配列を確認した。

実験に使用した各プライマーは下記の通りである。

Primer	Sequence (5'-3')
FLAG-Drebrin1 construct primer	
Forward	GCGGATCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGCCGG
Reverse	GCGAATTCCAGCTAATCACCACCCTCGAAGCCCTCC
Drebrin1 sequence primer	
Primer1	GCTGTGGAAATGAAGCGGATTAACC
Primer2	CCCTGTCGCTGAGCAGATAG
Primer3	TGACCTATGGCCTGGCAACG
Primer4	GCTTCGAGGGTGGTGATTAG
BAALC del 81-145 (C-terminal region) construct primer	
Forward	TAGCAGAGAGTCCAAGCAGAAGGGC
Reverse	CTTCTTCTCTGGGTGGGTATTCCACC
BAALC del 2-62 (N-terminal region) construct primer	
Forward	AATGGTGTGCCCCGATCTACAGCC

Reverse	CATCCGGATCCCCAGATCCTCTTCC
Drebrin1 delADFH (actin-depolymerizing factor homology domain) construct primer	
Forward	GGGCTGGCGCGACTCTC
Reverse	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCC
Drebrin1 delCC (coiled-coil domain) construct primer	
Forward	TTGGTGACCATCGGGATGAG
Reverse	GTTAATCCGCTTCATTTCACAGC
Drebrin1 delHel (helical domain) construct primer	
Forward	CTGGATGAGGTCACCTCCTCG
Reverse	GATAGACTGCTCCTTCAACCGC
Drebrin1 delPP (proline-rich region) construct primer	
Forward	GCAGAGGACTTGATGTTCATGGAG
Reverse	GGAGGTGACCTCATCCAGG
Drebrin1 delBB (blue box) construct primer	
Forward	TAGCTGGAATTCTGCAGATATCCATC
Reverse	GACAGCCTGCTCTGCAGACT

IV. Co-transfection IP-WB アッセイ

HEK293T 細胞に 5 x myc-BAALC Wild type (WT) / delN / delC-pcDNA3 / empty vector 及び FLAG-Drebrin1 WT / delADFH / delCC / delHel / delPP / delBB -pcDNA3 / empty vector を遺伝子導入し、48 時間後細胞を回収しそれぞれから蛋白質を抽出し、それぞれ抗 myc 抗体 / 抗 FLAG 抗体にて免疫沈降反応を行い、抗 myc

抗体 / 抗 FLAG-HRP 抗体 (Sigma-Aldrich, 1:1000, 4°C overnight) にて一次抗体反応を、引き続いて抗 myc 抗体反応メンブレンを抗 mouse-HRP 抗体 (anti-mouse-HRP antibody, GE healthcare) にて二次抗体反応を行い、wash 後撮影した。

V. 免疫蛍光染色

Cos7 細胞に 5 x myc-BAALC-pcDNA3 及び FLAG-Drebrin1-pcDNA3 を遺伝子導入し、3.7 %ホルムアルデヒドで 30 分間固定、0.2 %TritonX にて 10 分間 permeabilize、1 %BSA PBS にて 40 分間 blocking し、抗 FLAG 抗体 (ANTI-FLAG antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich, 4 °C overnight) にて抗体反応させ、Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, 1:500, 室温 1 時間)、TO-PRO3 (Invitrogen, 1:1000, 室温 1 時間)、Anti-c-myc FITC conjugate (Sigma-Aldrich, 1:200, 室温 1 時間) 抗体にて室温で 1 時間インキュベートした。染色後蛍光顕微鏡 (FluoView FV10i, Olympus) にて観察した。

VI. Drebrin1 RNA 干渉実験

[VI-1] Drebrin1 RNA 干渉コンストラクトの構築

Mouse *DBN1* short-hairpin (sh) RNA オリゴを Clontech RNAi Designer を利用して設計し、pSIREN retro Q puro vector に BamHI-EcoRI にて ligation し transformation

を行い、mouse sh*DBN1*-1 / 2 を構築した。Mouse sh*DBN1*-1 / 2 の RNA 干渉効果を確認するため、NIH3T3 細胞にレトロウィルストランスダクションにより各 shRNA を発現させ、ウェスタンブロットにて確認した。

各オリゴの配列を以下に示す。

Oligo	Sequence (5'-3')
Mouse <i>DBN1</i> shRNA1	
Top Strand	GATCCGCTCAGATGACCTCAAGCTTTTCAAGAGAAAGCTTGA GGTCATCTGAGTTTTTTACGCGTG
Bottom Strand	AATTCACGCGTAAAAAACTCAGATGACCTCAAGCTTTCTCTTG AAAAGCTTGAGGTCATCTGAGCG
Mouse <i>DBN1</i> shRNA2	
Top Strand	GATCCGCGAGAACCAGAAAGTGATGTTCAAGAGACATCACTT TCTGGTTCTCGTTTTTTTACGCGTG

[VI-2] レトロウィルストランスダクションによる

BAALC 過剰発現-*DBN1* knock down 細胞株の樹立

5x myc-*BAALC*-pGCDNsam-IRES-GFP コンストラクト/ empty vector を PlatE 細胞に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、48 時間後にウィルスを含むメディウムを回収し、レトロネクチン (30ug / ml in PBS) 塗布した 12 well plate に散布し incubate (37°C 4hr) した。メディウムチェンジ後 Ba/F3 細胞を散布し incubate (48hr) 後 Flow Cytometry

(FACSAria II) にて sort した GFP 陽性細胞に、引き続いて *DBN1* に対する shRNA2 種類を同様に transduction し、puromycin 1 ug / ml にて selection した。

VII. 細胞増殖アッセイ

BAALC および *DBN1* の shRNA をウイルス導入した Ba/F3 を 12 well plate に 1×10^4 個 / well incubate し、1 週間の増殖を観察した。

VIII. 細胞接着アッセイ

フィブロネクチンを塗布した 96 穴平底プレートに *BAALC* / mock 発現 Ba/F3 細胞を 2.5×10^4 個ずつ撒布し、1 時間インキュベート後 60 秒間 Vortex で shake し、プレート底面の一定範囲内に付着した細胞数をカウントした。

IX. SDF1 chemotaxis アッセイ

BAALC-Drebrin1 complex の骨髄ニッチにおける機能を検証するため、ニッチにおいて血液細胞を骨芽細胞までリクルートするリガンドである SDF1 (stromal cell-derived factor 1) に対する感受性を chemotaxis アッセイで評価することとした。Transwell (Costar 5.0 μ m polycarbonate membrane) の bottom well に 10 ng / ml の SDF1 (Wako) を加えたメディウムを浸し、upper insert に 2×10^5 / 200 μ l の *BAALC* / mock をウイルス導入した Jurkat 細胞を apply し、37 °C で 2 時間 incubate 後 bottom well に移動した細胞をカウントした (Fig. 6)。

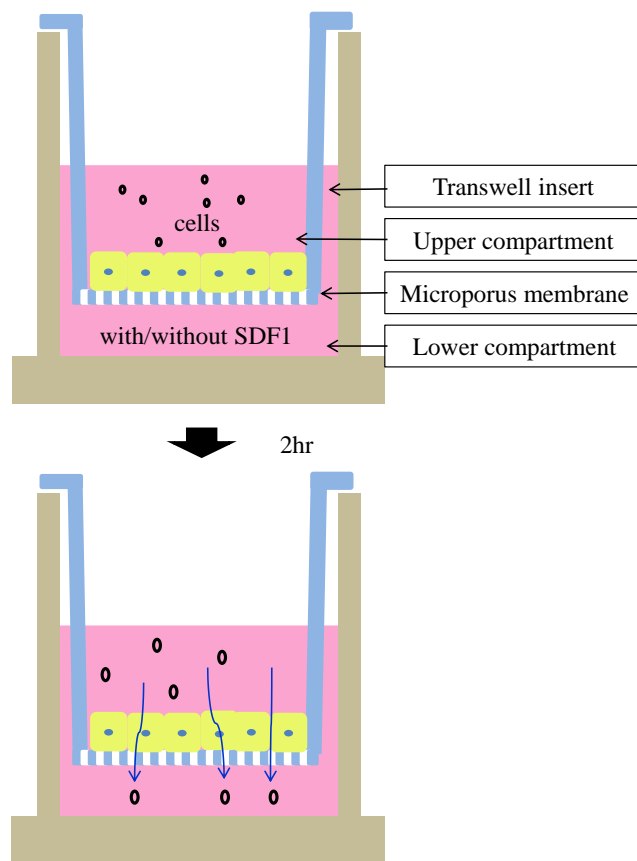


Figure 5 : Transwell による chemotaxis アッセイ

lower compartment に SDF1 (10 ng / ml) を含む medium と含まない medium を用意し、transwell insert に 2×10^5 個の各細胞を apply し、2 時間インキュベート後に細胞数を測定した。実験に用いた SDF1 の濃度は 20～80 ng / ml である。

X. リン酸化 CXCR4 ウェスタンブロットアッセイ

BAALC および *DBN1* の shRNA をウィルス導入した Ba/F3 からそれぞれ蛋白質を抽出し、抗リン酸化 CXCR4 抗体 (Anti-CXCR4 (phospho S339) antibody, Abcam, 1:1000, 4°C overnight) を使用して WB を行った。

XI. 統計解析

すべての実験について 3 回以上独立した実験を行った。細胞接着アッセイ及び SDF1 chemotaxis アッセイの結果について、統計学的有意差は unpaired t test を用いて評価した。

【結果】

I. BAALC 過剰発現細胞由来蛋白質の免疫沈降の結果

HEK293T 細胞に 5x myc-BAALC--pcDNA3 コンストラクト及び pcDNA3 empty vector を遺伝子導入し、抗 myc 抗体を使用しウェスタンブロットにて 30-40 kD の位置に 5x myc-BAALC 蛋白質の発現を確認した。また、同細胞と 5x myc-BAALC / mock をウィルス感染にて導入し、ウェスタンブロットにて発現を確認した (Fig.6) Jurkat 細胞からそれぞれ約 300 mg の蛋白質を免疫沈降反応後 SDS-PAGE を行い、CBB 染色した。染色後 BAALC 発現 HEK293T 細胞では 100-150 kD の範囲に 3 本のバンドが、Jurkat 細胞では同部位に 2 本のバンドがみられ、2 本のバンドは分子量が一致していると考えられた (Fig. 8)。また Jurkat 細胞では BAALC 発現サンプルで 37-50 kD の範囲に 2 本のバンドがみられた。各バンドを質量分析に提出した。

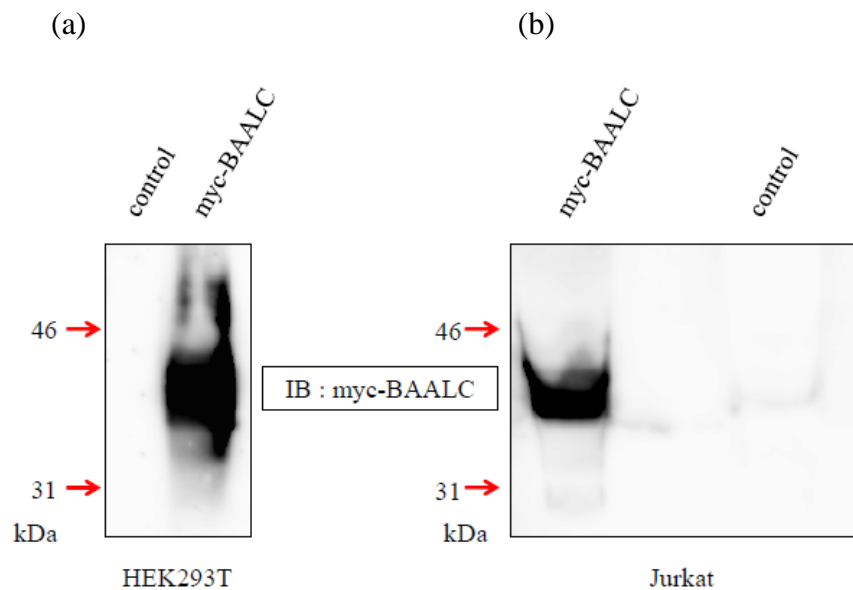


Figure 6 : *BAALC* 発現細胞の発現確認 (WB)

質量分析のサンプルとして使用した、myc-BAALC を発現させた(a) : HEK293T 細胞及び (b) : Jurkat 細胞から抽出した蛋白質を抗 myc 抗体で WB し、それぞれの細胞における myc-BAALC (40kD) の発現を確認した。

II. 質量分析の結果

蛋白質バンド 1 (約 60kDa) 及び 2 (約 140kDa) からそれぞれ vimentin [Homo sapiens]、Drebrin1 [Homo sapiens]が検出された。以下にそれぞれのマススペクトル、Mascot による検索結果、一致ペプチド配列のデータを示す (Fig.7)。また分析した各蛋白質バンドから Table 1 に示す蛋白質が検出された。このなかで私はまず Drebrin1 という蛋白質に注目した。理由は HEK293T 細胞と Jurkat 細胞の両者より検出されたことと、vimentin などのように一般的な免疫沈降-質量分析 (IP-MAS) で非特異的に検出される蛋白質も存在するが、Drebrin1 はそのような蛋白質としても検出されたことがないためである。

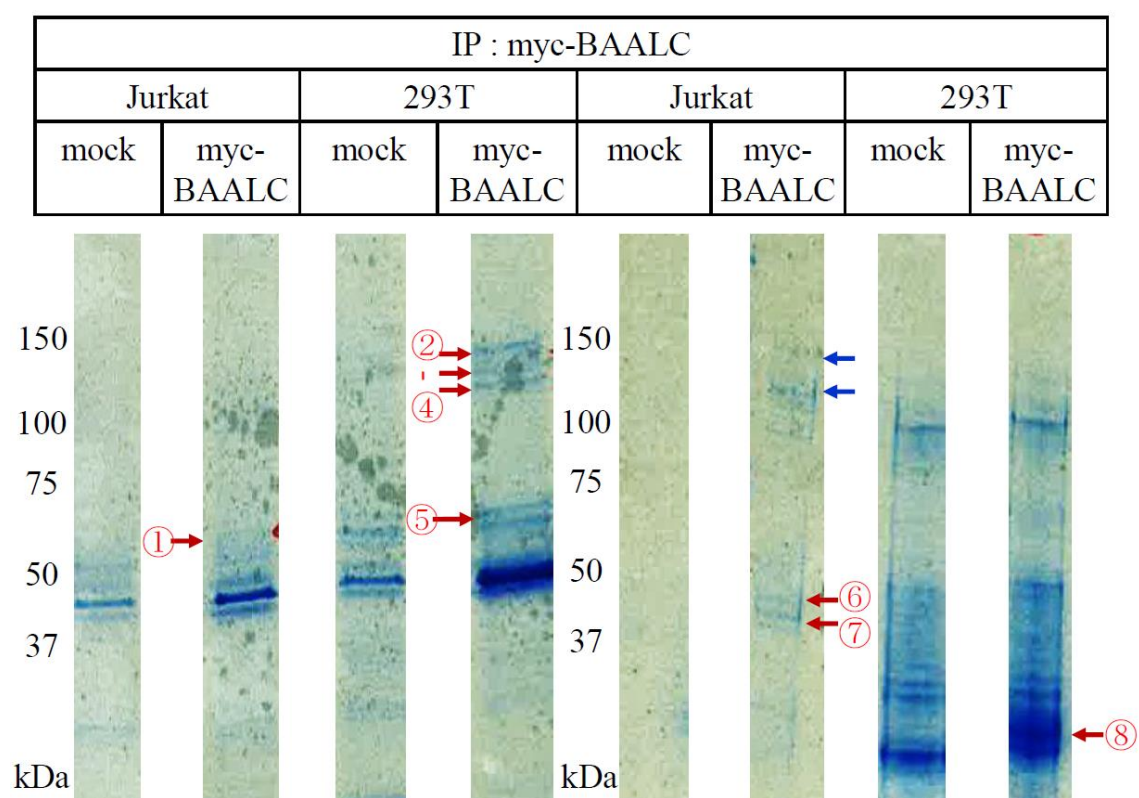
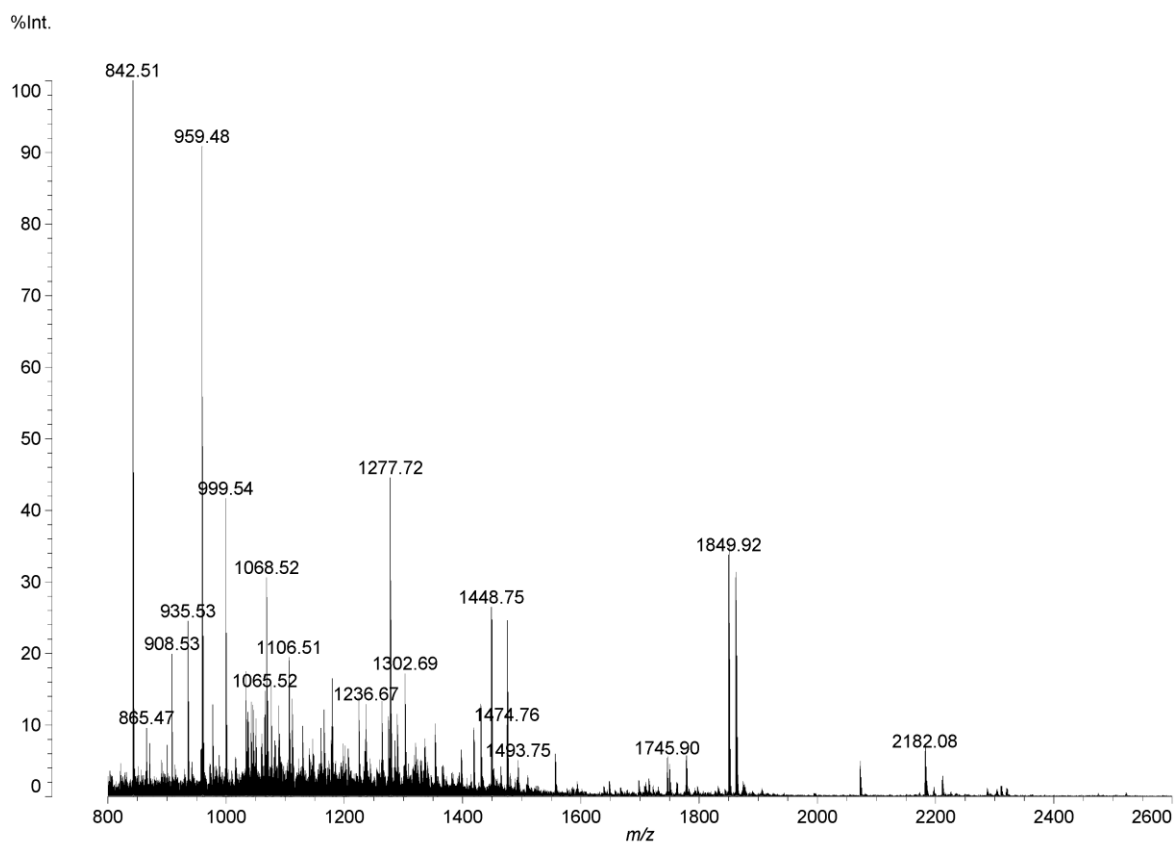


Figure 7: 蛋白質の免疫沈降 - 電気泳動後 CBB 染色

BAALC / mock を HEK293T 細胞に遺伝子導入したモデルと Jurkat 細胞に発現させた stable line を用意し、抗 myc (*BAALC*) 抗体で IP し電気泳動後にクマシー染色した。2 回行った結果を図に示す。番号で示すバンドが *BAALC* 発現細胞で特異的に見られた。青色矢印で示されたバンドはそれぞれ②・④のバンドと同一と考えられた。また 8 番のバンドは特に強い発現を示していた。それぞれのバンドについて質量解析を行った。

(a)



DREB_HUMAN Mass: 71842 Score: 173 Expect: 1e-013 Matches: 36
Drebrin Protein sequence coverage: 42%

Matched peptides shown in bold red

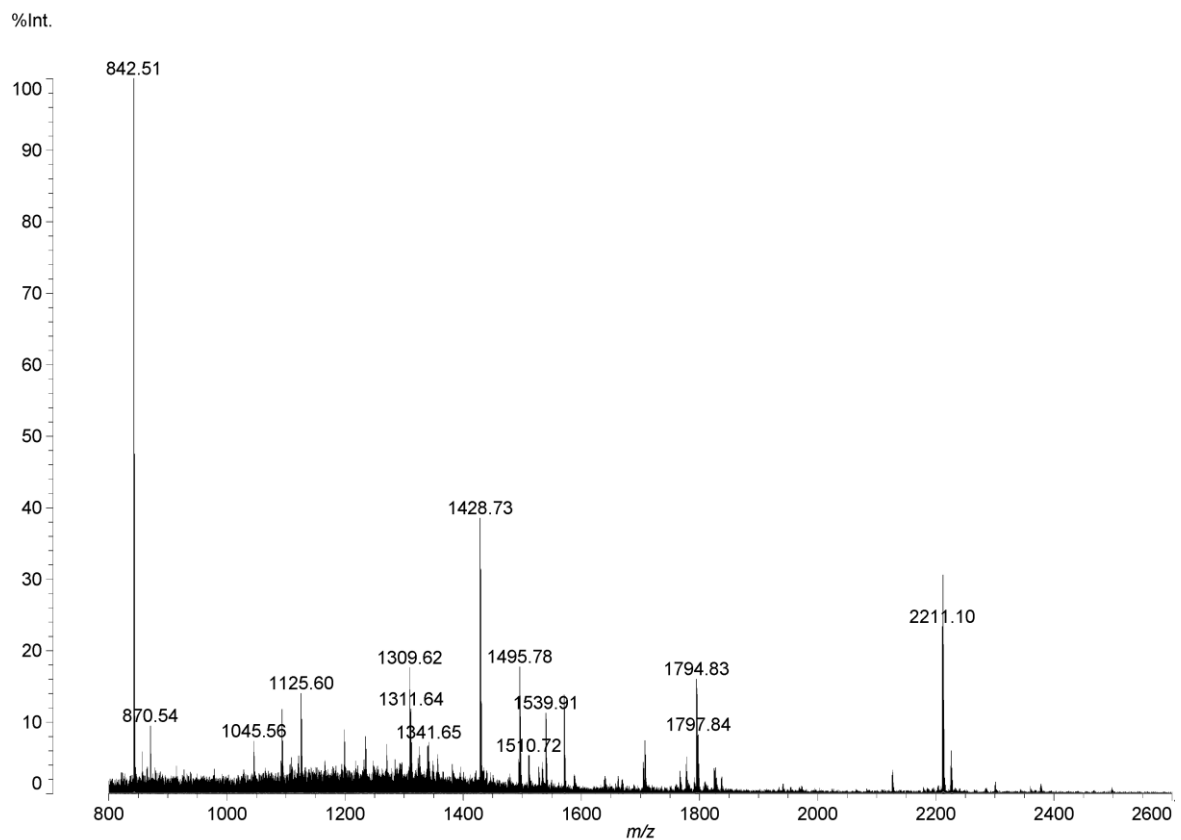
1	MAGVSFSGHR LELLAAYEEV IREESAADWA LYTYEDGSDD LK LAASGEGG
51	LQELSGHFEN QKVMYGFCSV KDSQAALPKY VLINWVGEDV PDARKCACAS
101	HVAKVAEFFQ GVDVIVNASS VEDIDAGAIG QRLSNGLARL SSPVLHRLRL
151	REDENAEPVG TTYQKTDAAV EMKRINREQF WEQAKK EEEL RKEEERKKAL
201	DERLRFEQER MEQERQEQEE RERRYREREQ QIEEHRRKQQ TLEAEEAKRR
251	L KEQSI FGDH RDEEEETHMK KSESEVEEAA AIAQRPDNP REFFKQQERV
301	ASASAGSCDV PSPFNHRPGS HLDSHRR MAP TPIPTRSPSD SSTASTPVAE
351	QIER ALDEVT SSQPPPLPPP PPPAQETQEP SPILDSEETR AAAPQAWAGP
401	MEEPPQAQAP PR GPGSPAED LMFMESAEQA VLAAPVEPAT ADATEIHDA
451	DTIETDTATA DTTVANNVPP AATSLIDLWP GNGEGASTLQ GEPRAPTPPS
501	GTEVTLAEVP LLDEVAVEPL LPAGEGCATL LNFDELPEPP ATFCDPEEVE
551	GESLAAPQTP TLPSALEELE QEQEPEPHLL TNGETTQKEG TQASEGYFSQ
601	SQEEFAQSE ELCAPAPPV FYNKPPEIDI TCWDADPVPE EEEGFEGGD

Matched peptide lists

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	M	Peptide sequence
11-22	1418.79	1417.78	1417.78	0.002	0	R.LELLAAYEEVIR.E
43-62	2072.02	2071.01	2071.00	0.016	0	K.LAASGEGGLQELSGHFENQK.V
63-71	1090.53	1089.52	1089.50	0.021	0	K.VMYGFCSVK.D
63-71	1106.52	1105.51	1105.49	0.015	0	K.VMYGFCSVK.D + Oxidation (M)
80-94	1745.90	1744.89	1744.88	0.010	0	K.YVLINWVGEDVPDAR.K
80-95	1873.96	1872.95	1872.97	-0.026	1	K.YVLINWVGEDVPDARK.C
95-104	1131.53	1130.53	1130.53	-0.006	1	R.KCACASHVAK.V
96-104	1003.49	1002.49	1002.44	0.050	0	K.CACASHVAK.V
105-132	2906.49	2905.48	2905.45	0.036	0	K.VAEFFQGVDTVIVNASSVEDIDAGAIGQ R.L
140-147	908.53	907.52	907.52	-0.005	0	R.LSSPVLHR.L
150-165	1849.91	1848.91	1848.89	0.021	1	R.LREDENAEPVGTTYQK.T
152-165	1580.78	1579.77	1579.70	0.068	0	R.EDENAEPVGTTYQK.T
166-174	1036.52	1035.51	1035.50	0.010	1	K.TDAAVEMKR.I + Oxidation (M)
175-185	1448.74	1447.73	1447.72	0.012	1	R.INREQFWEQAK.K
178-185	1065.52	1064.51	1064.49	0.020	0	R.EQFWEQAK.K
178-186	1193.59	1192.59	1192.59	-0.002	1	R.EQFWEQAKK.E
204-210	977.52	976.51	976.51	0.001	1	R.LRFEQER.M
206-215	1381.68	1380.67	1380.61	0.064	1	R.FEQERMEQER.Q
206-215	1397.65	1396.64	1396.60	0.034	1	R.FEQERMEQER.Q + Oxidation (M)
211-221	1491.74	1490.73	1490.64	0.090	1	R.MEQERQEER.E
211-221	1507.67	1506.67	1506.64	0.030	1	R.MEQERQEER.E + Oxidation (M)
216-223	1103.52	1102.52	1102.50	0.015	1	R.QEQEERER.R
227-236	1353.67	1352.66	1352.64	0.015	1	R.EREQQIEEHR.R
229-236	1068.52	1067.52	1067.50	0.016	0	R.EQQIEEHR.R
229-237	1224.62	1223.61	1223.60	0.012	1	R.EQQIEHRR.K
238-248	1274.66	1273.65	1273.65	0.001	1	R.KQQTLEAEEAK.R
239-248	1146.56	1145.56	1145.56	0.001	0	K.QQTLEAEEAK.R
239-249	1302.69	1301.68	1301.66	0.022	1	K.QQTLEAEEAKR.R
253-261	1088.57	1087.56	1087.50	0.059	0	K.EQSIFGDHR.D
262-270	1163.57	1162.56	1162.44	0.120	0	R.DEEEETHMK.K + Oxidation (M)
271-291	2310.20	2309.19	2309.16	0.032	1	K.KSESEVEEAAIIAQRPDNPR.E
272-291	2182.10	2181.09	2181.07	0.022	0	K.SESEVEEAAIIAQRPDNPR.E
292-299	1111.56	1110.55	1110.55	0.005	1	R.EFFKQQR.V

328–336	999.54	998.53	998.52	0.009	0	R.MAPTPIPTR.S + Oxidation (M)
337–354	1861.90	1860.89	1860.87	0.023	0	R.SPSDSSTASTPVAEQIER.A
391–412	2287.11	2286.10	2286.09	0.017	0	R.AAAPQAWAGPMEEPPQAQAPPR.G + Oxidation (M)

(b)



VIME_HUMAN Mass: 53676 Score: 240 Expect: 2e-020 Matches: 37

Vimentin Protein sequence coverage: 74%

Matched peptides shown in bold red.

1	MSTRSVSSSS YRR MFGGPGT ASRPSSRSY VTTSTR TYSL GSALRPSTSR
51	SLYASSPGGV YATR SSAVRL RSSVPGV RL QDSVDFSLAD AINTEFK NTR
101	TNEKVELQEL NDRFANYIDK VRFLE QQNKI LLAELEQLKGQGSRLGDLY
151	EEEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVERDN LAE DIMRLREKLQ EEMLQREEAE
201	NTLQSFRQDV DNASLAR LDL ERK VESLQEE IAFLKK LHEE EIQELQAQIQ
251	EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AK NLQEAEEW YKSKFADLSE
301	ANRNNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN
351	FAVEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY
401	RKLLEGEESR ISLPLNFSS LNLRETNLDS LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451	DGQVINETSQ HHDDLE

Matched peptide lists

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	M	Peptide sequence
14-28	1510.72	1509.71	1509.70	0.009	0	R.MFGGPGTASRPSSSR.S + Oxidation (M)
29-36	914.45	913.45	913.45	-0.005	0	R.SYVTTSTR.T
37-50	1495.78	1494.77	1494.78	-0.008	0	R.TYSLGSALRPSTSR.S
51-64	1428.72	1427.71	1427.70	0.007	0	R.SLYASSPGGVYATR.S
79-97	2126.05	2125.04	2125.06	-0.015	0	R.LLQDSVDFSLADAINTEFK.N
101-113	1587.78	1586.78	1586.79	-0.015	1	R.TNEKVELQELNDR.F
114-120	870.53	869.52	869.43	0.095	0	R.FANYIDK.V
114-122	1125.60	1124.59	1124.60	-0.008	1	R.FANYIDKVR.F
130-139	1169.60	1168.59	1168.71	-0.115	0	K.ILLAELEQLK.G
130-143	1539.90	1538.90	1538.90	-0.007	1	K.ILLAELEQLKGQGS.S
146-155	1254.62	1253.61	1253.56	0.049	0	R.LGDLYEEEMR.E
146-155	1270.60	1269.60	1269.55	0.041	0	R.LGDLYEEEMR.E + Oxidation (M)
146-158	1668.79	1667.78	1667.78	0.001	1	R.LGDLYEEEMREL.R + Oxidation (M)
160-170	1287.63	1286.62	1286.66	-0.034	1	R.QVDQLTNDKAR.V
171-184	1688.80	1687.79	1687.82	-0.028	1	R.VEVERDNLAEDIMR.L
171-184	1704.82	1703.81	1703.81	-0.006	1	R.VEVERDNLAEDIMR.L + Oxidation (M)
187-196	1319.63	1318.62	1318.66	-0.033	1	R.EKLQEEMLQR.E + Oxidation (M)

197–207	1323.64	1322.63	1322.61	0.021	0	R.EEAENTLQSFR.Q
208–217	1088.52	1087.51	1087.53	-0.011	0	R.QDVDNASLAR.L
224–236	1533.83	1532.82	1532.85	-0.027	1	K.VESLQEEIAFLKK.L
283–292	1309.62	1308.62	1308.60	0.017	0	K.NLQEAEEWYK.S
295–304	1093.54	1092.53	1092.52	0.008	0	K.FADLSEAANR.N
295–310	1776.86	1775.85	1775.86	-0.004	1	K.FADLSEAANRNNDALR.Q
314–320	912.45	911.45	911.40	0.047	0	K.QESTEYR.R
322–342	2377.14	2376.13	2376.16	-0.031	1	R.QVQSLTCEVDALKGTNESLER.Q
343–364	2634.16	2633.15	2633.15	0.002	1	R.QMREMEENFAVEAANYQDTIGR.L + 2 Oxidation (M)
346–364	2202.98	2201.97	2201.95	0.019	0	R.EMEENFAVEAANYQDTIGR.L + Oxidation (M)
365–378	1734.79	1733.78	1733.81	-0.027	1	R.LQDEIQNMKEEMAR.H
365–378	1766.81	1765.80	1765.80	0.004	1	R.LQDEIQNMKEEMAR.H + 2 Oxidation (M)
374–381	1041.50	1040.49	1040.52	-0.026	1	K.EEMARHLR.E
379–390	1527.80	1526.80	1526.82	-0.025	1	R.HLREYQDLLNVK.M
391–401	1295.64	1294.63	1294.66	-0.026	0	K.MALDIEIATYR.K
391–401	1311.66	1310.65	1310.65	-0.004	0	K.MALDIEIATYR.K + Oxidation (M)
391–402	1439.71	1438.71	1438.75	-0.042	1	K.MALDIEIATYRK.L + Oxidation (M)
411–424	1570.89	1569.88	1569.89	-0.005	0	R.ISLPLPNFSSLNLR.E
425–440	1824.88	1823.88	1823.94	-0.062	1	R.ETNLDLPLVDTHSKR.T
451–466	1836.83	1835.82	1835.79	0.030	0	R.DGQVINETSQHDDLE.-

Figure 8：質量分析のデータ

(a)：バンド 2 (Fig.7)及び(b)：バンド 1 のマスペクトル、Mascot search による Protein スコア、検索された各蛋白質のシーケンス (ペプチド配列に一致する部位を赤字で示す)。

Cell	Band	Protein	Coverage (%)
293T	2	<u>Drebrin 1</u>	43
	3	myosin IG	54
	4	alpha-actinin-4	59
	5	<u>Vimentin</u>	70
	8	BAALC	37

Cell	Band	Protein	Coverage (%)
Jurkat	1	<u>vimentin</u>	74
	6	<u>Drebrin 1</u>	25
	7	ACTB protein	59

Table 1 : 質量解析により検出された蛋白質

質量解析により検出された蛋白質。6番のバンドは45 kD前後のサイズであるが、Drebrin1として検出されており、クリベージモデルと考えられた。また発現の強いバンド⑧はBAALC蛋白質であった。

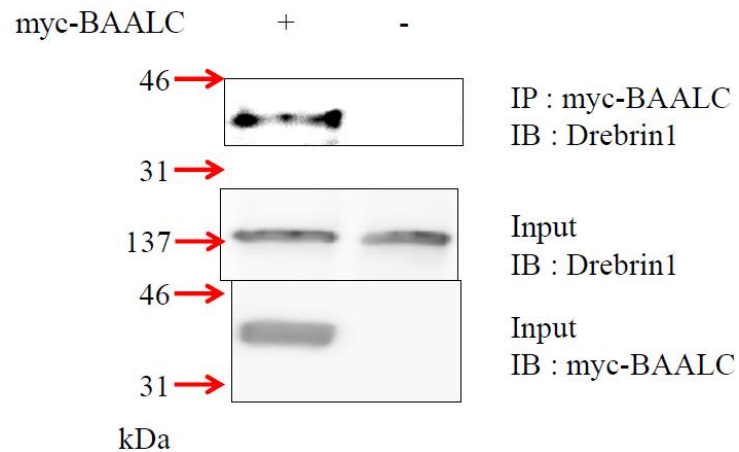
III. IP-WB アッセイの結果

BAALC 発現 HEK293T 蛋白質を抗 myc 抗体 (BAALC) にて免疫沈降反応させ、抗 Drebrin1 抗体にて immunoblot を行ったところ、endogenous Drebrin1 が検出された (Fig. 9)。また HEK293T 細胞に 5x myc-BAALC-pcDNA3 及び FLAG-Drebrin1-pcDNA3 を transfection し、同蛋白質を抗 FLAG 抗体にて免疫沈

降反応させ、抗 myc 抗体にて immunoblot を行った結果 BAALC が検出された(Fig.

9b)。以上の結果より BAALC と Drebrin1 の結合が確認された。

(a)



(b)

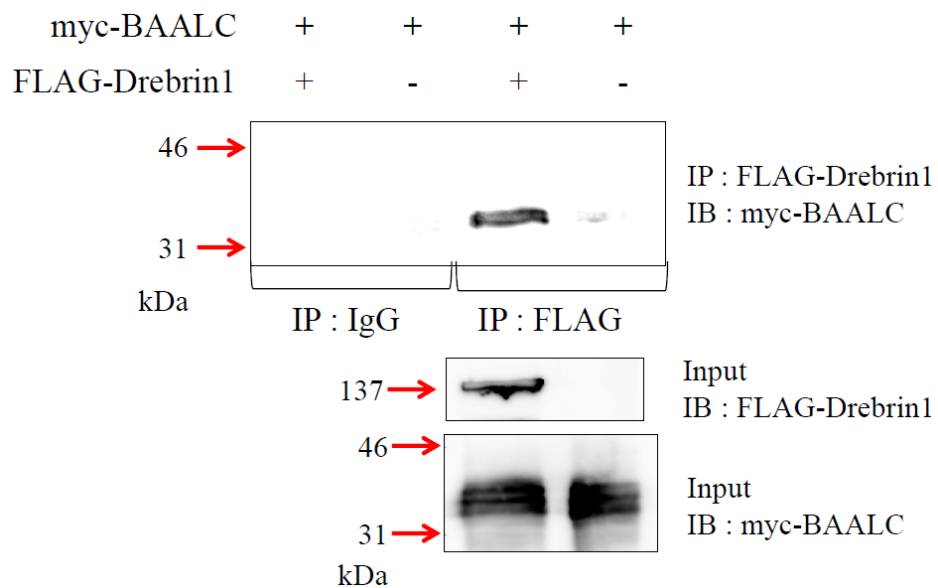


Figure 9 : IP-WB による BAALC-Drebrin1 結合の検証

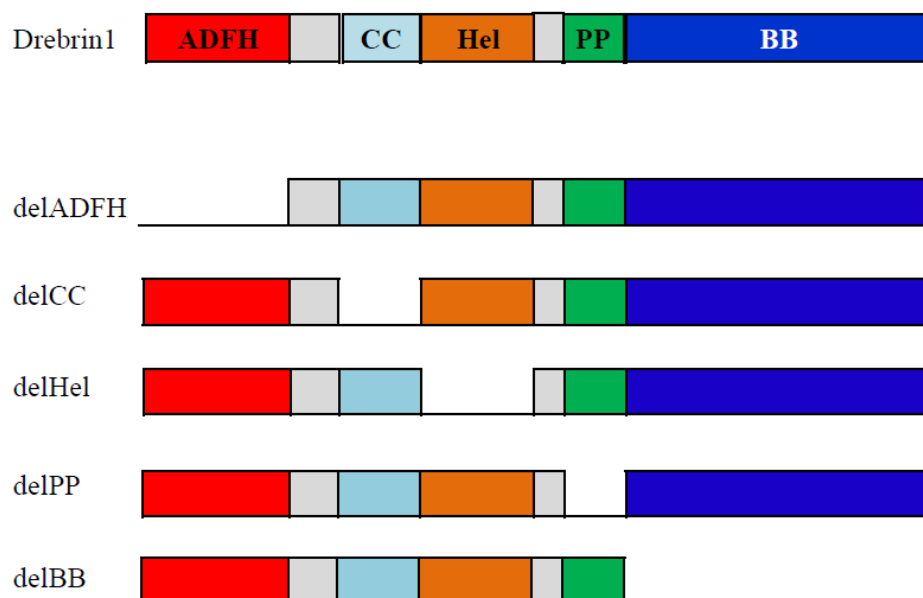
(a) : *BAALC* 発現 HEK293T の蛋白質を抗 myc 抗体にて免疫沈降後、抗 Drebrin1 抗体にてウェスタンブロットを行い、全長の endogenous Drebrin1 を確認した。

(b) : *BAALC*・*DBN1* 共発現 HEK293T 細胞を構築し抗 FLAG 抗体 (Drebrin1) にて免疫沈降後、抗 myc 抗体にてウェスタンブロットし、BAALC との結合を確認した。

IV. BAALC 及び Drebrin1 の結合部位の検証の結果

BAALC と Drebrin1 の結合部位を解析するため、それぞれの **deletion** プラスミドを構築した (Fig. 10a)。HEK293T に共発現させ、IP-WB によりそれぞれの蛋白質の発現 (Fig. 10b)とそれに引き続いて各 **deletion** モデルにおける相互の結合の変化を解析した。その結果 BAALC **deletion mutant** ではいずれも Drebrin1 の結合が低下し、また Drebrin1 の **deletion mutant** はすべて BAALC と結合した。以上の結果より、BAALC と Drebrin1 は両者ともに複数のドメインを介して複雑な立体構造を作って結合している可能性が示唆された。

(a)



(b)

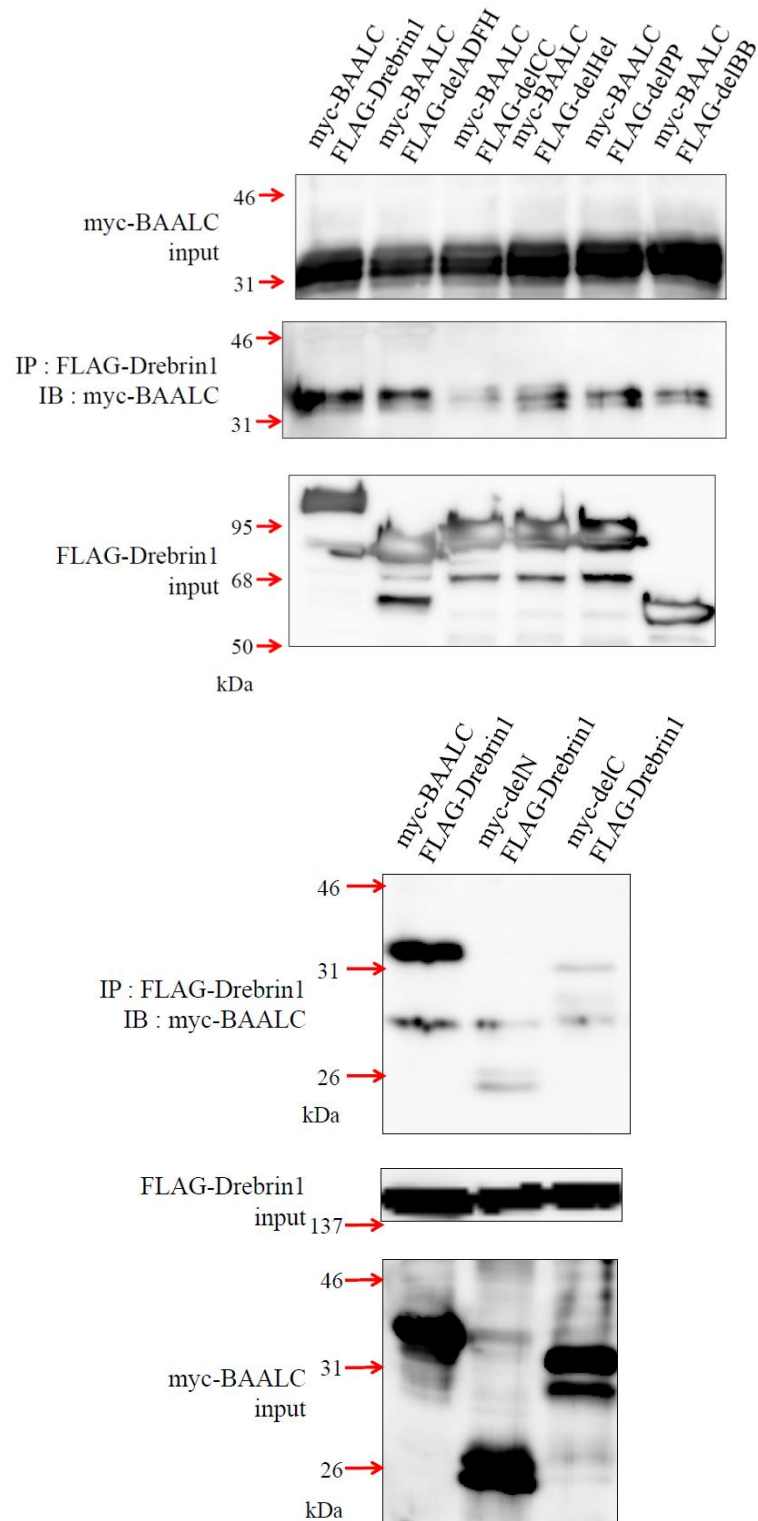


Figure 10 : Drebrin1 deletion モデルと結合部位の検証

(a) : Drebrin1 の domain deletion モデルの scheme。

(b) : それぞれの発現プラスミドを構築し、HEK293T 細胞に導入し、IP-WB を行った。

V. 免疫蛍光染色の結果

BAALC と Drebrin1 の細胞内局在を、Cos7 細胞を用いて免疫蛍光染色にて確認した。それぞれ単独を遺伝子導入すると両者は細胞質全体に存在していた (Fig. 11a)。ところが、両者を同時に導入した際には、細胞質でも特に細胞膜内側に局在することが示された (Fig. 11b)。BAALC と Drebrin1 の両者は結合した状態だと細胞膜にリクルートされる可能性が考えられた。

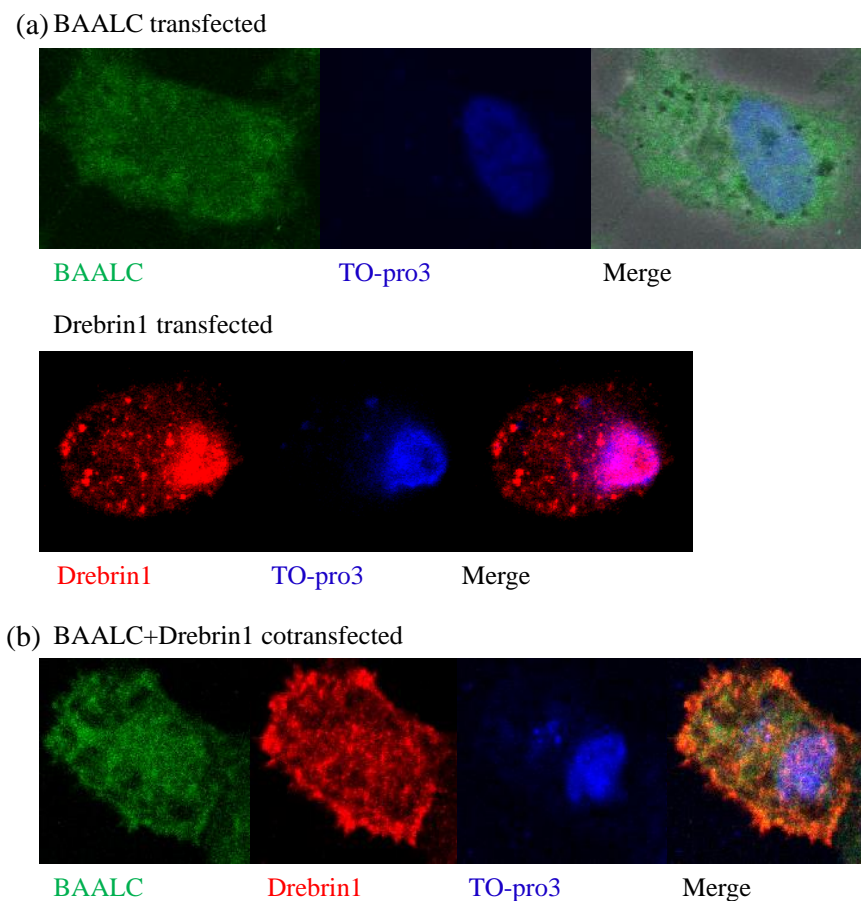


Figure 11： 免疫蛍光染色

Cos7 細胞に *BAALC* 単独 / *DBN1* 単独 / *BAALC-DBN1* 両者をそれぞれ発現させ、免疫蛍光染色を行った。単独ではそれぞれ細胞質にびまん性に散在しているが、両者を同時に発現させると細胞膜に両者が強く局在する。

VI. Drebrin1 shRNA コンストラクトの RNA 干渉効果の確認の結果

NIH3T3 細胞にそれぞれの shDrebrin1 (2 種類およびコントロール) を導入し、WB にてそれぞれの発現を確認した (Fig. 12)。

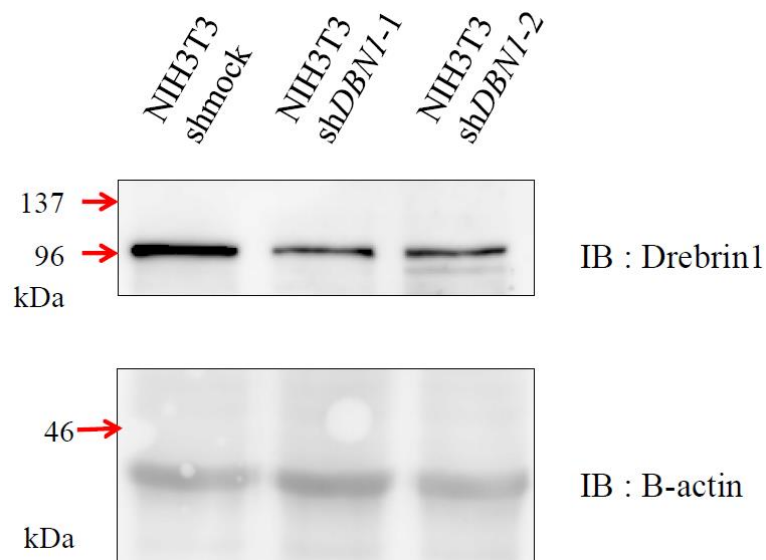


Figure 12 : mouse Drenrin1 shRNA の効果確認

Control vector を発現させた NIH3T3 に比べ shDrebrin1-1 / 2 では Drebrin1 の発現が低下していた。

VII. Drebrin1 ノックダウンモデルにおける細胞増殖アッセイの結果

構築した 5 x myc-BAALC / mock-shmock / Drebrin1-1 / 2 Ba/F3 細胞の増殖を 1 週間観察した結果、6 群間に有意な差は見られず、BAALC 過剰発現及び Drebrin1 ノックダウンの細胞増殖に与える影響は少ないと考えられた (Fig.13)。

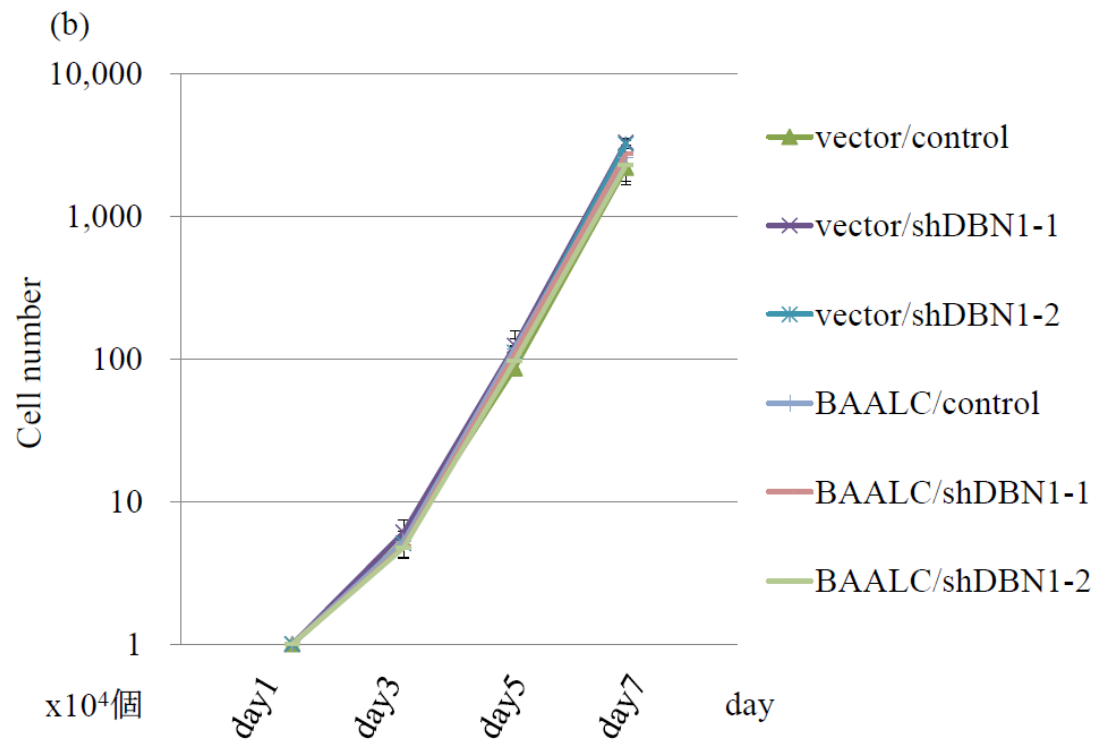


Figure 13 : Drebrin1 shRNA モデル

BaF3 に BAALC と Drebrin1 shRNA を感染させ細胞増殖を観察したが、増殖に変化はなかった。

VIII. BAALC 発現細胞の細胞接着アッセイの結果

細胞接着アッセイでは BAALC 発現細胞の接着細胞数が増加しており、adhesion 機能が上昇していた (Fig. 14)。細胞の adhesion の制御は Drebrin1 の機能としても知られており [22]、上記の細胞内局在の変化を考慮すると、BAALC 発現細胞においては BAALC-Drebrin1 複合体が細胞膜表面にリクルートされることで細胞の接着能を亢進させる可能性が考えられた。

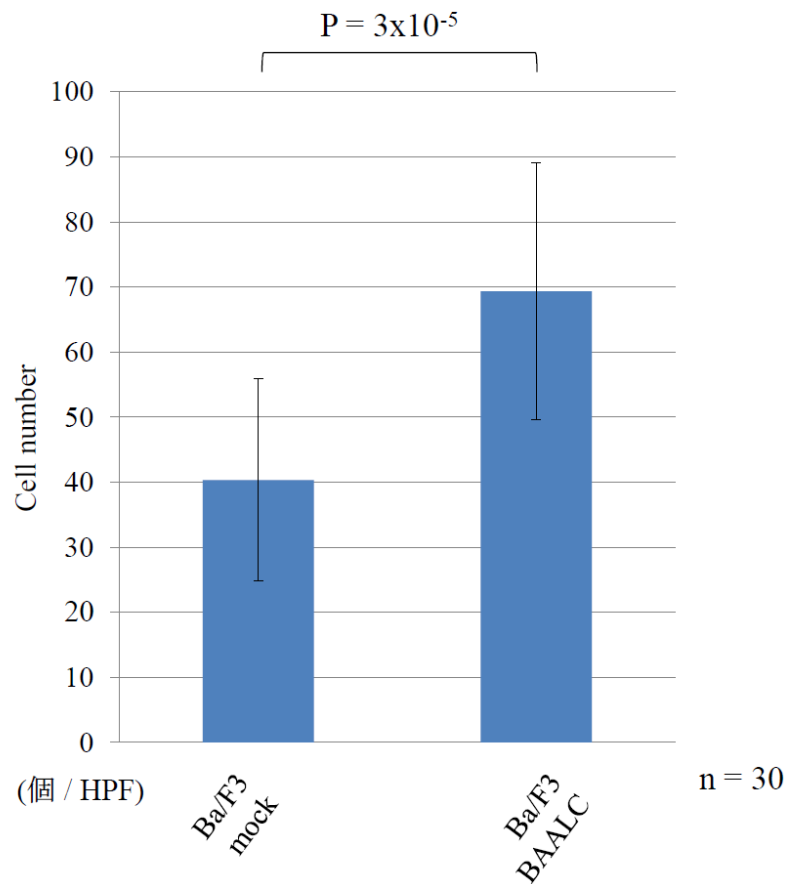


Figure 14: 細胞接着アッセイ

BAALC 発現によるフィブロネクチンへの接着能の変化を検証した。BAALC の発現によって接着能が有意に上昇していた。

IX. SDF1 chemotaxis アッセイの結果

SDF1 を用いた細胞遊走アッセイでは有意差はみられなかったものの BAALC 発現細胞の遊走能がコントロールに比較して亢進する傾向がみられた (Fig. 15)。

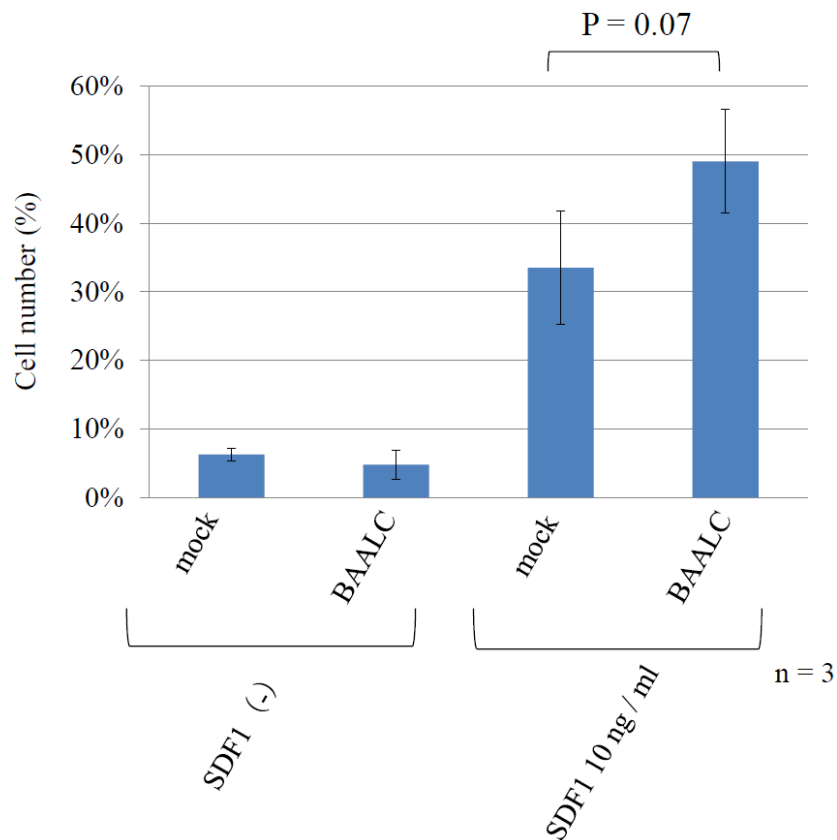


Figure 15 : SDF1 chemotaxis アッセイ

SDF1 chemotaxis アッセイでは BAALC 発現細胞の SDF1 に対する chemotaxis が上昇する傾向がみられるものの有意差は認められなかった。

X. リン酸化 CXCR4 のウェスタンブロットアッセイの結果

SDF1 の受容体である CXCR4 は活性化されると 339 番目のセリンがリン酸化される [28]。そこで BAALC および Drebrin1 による CXCR4 活性の変化をみるために抗リン酸化 CXCR4 抗体を用いた WB により評価した。その結果、BAALC 発現細胞ではリン酸化 CXCR4 の発現が上昇しており、また Drebrin1 を knock down した細胞ではその効果が消失し、mock 細胞とほぼ同程度の発現に低下した (Fig. 16)。

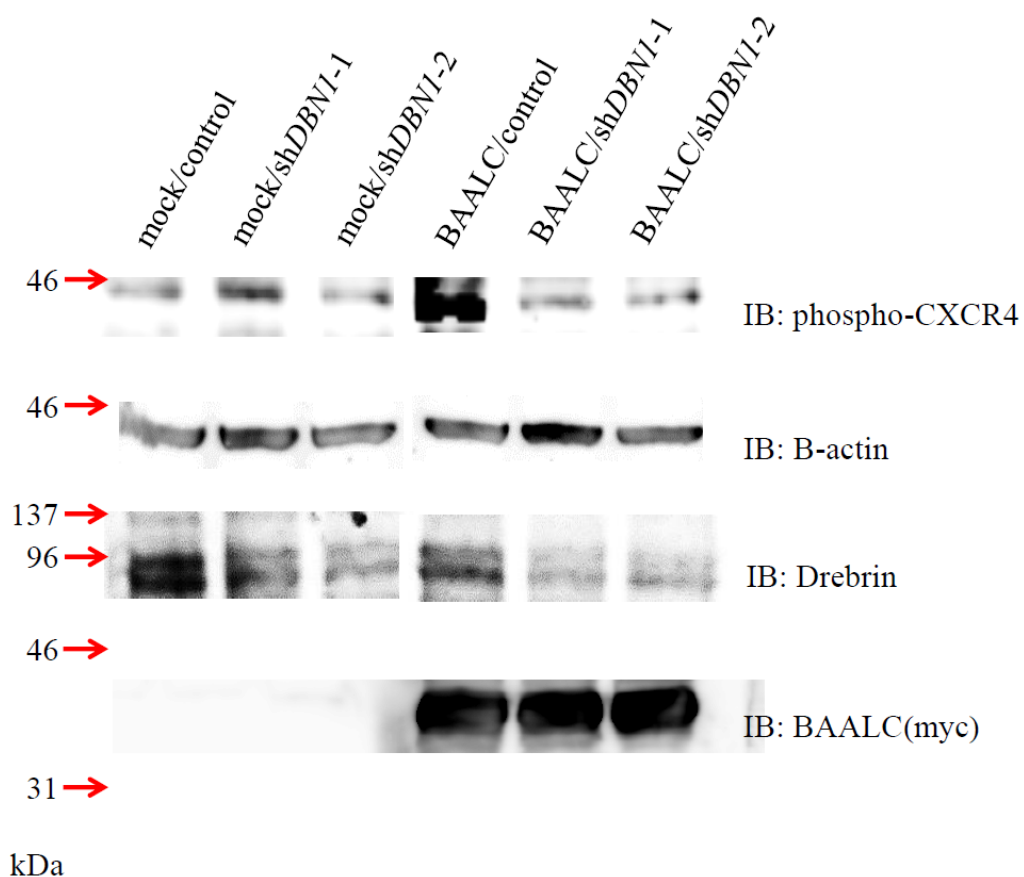


Figure 16: 抗リン酸化 CXCR4 抗体によるウェスタンブロット
抗リン酸化 CXCR4 抗体を用いて各細胞の CXCR4 の活性を WB で確認した。BAALC 過剰発現細胞では CXCR4 のリン酸化が上昇し、Drebrin1 のノックダウンにより、コントロールと同等まで低下がみられた。

【考察】

本研究で私は質量分析をもとに白血病関連遺伝子 *BAALC* の結合蛋白質 *Drebrin1* を同定した。*BAALC-Drebrin1 complex* は細胞膜側細胞質に局在しており、結果として *Drebrin1* の *adhesion* 機能の上昇を誘導した。以上の結果及び既報の情報から、私は *BAALC* は白血病細胞において細胞質-細胞膜の分子輸送を担っており、過剰に発現した *BAALC* は *Drebrin1* と結合することにより *Drebrin1* を細胞膜にリクルートしその機能である接着能を亢進し、ニッチにおいて骨芽細胞との接着を促進しその相互作用に促進的にはたらくのではないかと考えた。

Drebrin1 は主に神経細胞や上皮細胞系の細胞に発現が認められており、同分野における機能の研究がこれまで主になされているが、*Drebrin1* は *CD34* 陽性の造血幹細胞においても発現しているが、*Drebrin1* 以外にも未分化な段階の造血細胞で神経幹細胞に特異的と考えられてきた遺伝子の発現が認められることが知られており [29-31]、神経形成と造血におけるシグナルに共通性が示唆されている。序論で述べたが *BAALC* もまた神経細胞で主に発現しており、特に細胞質に局在しているが、神経細胞においては *CaMKIIa* と *complex* を形成しシナプス領域にリクルートすることでシグナル伝達、細胞接着、細胞内輸送、アクチン細胞骨格の制御に関与している [32,5]。以上のことを考えると *BAALC* は *Drebrin1* と結合し、*complex* を形成しながら細胞膜表面まで *Drebrin1* をリクルートし、造血幹細胞や白血病幹細胞の細胞骨格の維持や細胞-細胞間または細胞-組織間におけ

る接着、シグナル伝達を制御しているのではないかと予想された。実際に本研究で BAALC を過剰発現させた血球は接着能の上昇が認められ、また細胞内において BAALC と Drebrin1 を共発現すると両者の局在は細胞膜周辺に変化した。このことから BAALC と Drebrin1 が結合すると、Drebrin1 が細胞膜表面にリクルートされ、その機能の活性化を引き起こしていると考えられた。BAALC が CaMKIIa と相互作用する際には、BAALC の N 末端はミリスチル化及びパルミトイル化されており [33-36]、この 2 種類の蛋白翻訳後修飾は細胞膜におけるシグナル経路に重要であると考えられている。BAALC-Drebrin1 complex が細胞膜にリクルートされ、特異的に機能していることを検証する手段としては、BAALC のミリスチル化とパルミトイル化の有無を検証することが有効かもしれない。

BAALC は CD34 陽性の造血幹細胞に発現が亢進していることから骨髄ニッチとの interaction の制御に関与する可能性があるとして述べた。ニッチの機能には複数のサイトカインが関与しており、中でも骨芽細胞より分泌される SDF1 は、その受容体であり造血幹細胞に発現している CXCR4 と作用し、血球の骨髄ニッチへの接着を促進し、細胞の維持と増殖制御に関与している [37-39]。また SDF1 は間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) の angiopoietin-1 (Ang-1) 分泌を制御しており、Ang-1 とその受容体である Tie2 は造血幹細胞の quiescence の維持に関わる [38,40]。BAALC を発現した細胞では CXCR4 のリン酸化が上昇しており、

shRNA によって Drebrin1 を knock down させると BAALC 発現によるリン酸化がキャンセルされる。この結果から BAALC が高発現を示す白血病では、BAALC-Drebrin1 complex が増加し、細胞膜にリクルートされる結果、腫瘍細胞は骨髄ニッチにとどまり、また CXCR4 を活性化し SDF1 との interaction により細胞を quiescence へと導くことが、抗腫瘍薬への抵抗性獲得に寄与している可能性が示唆された。この点に関しては in vivo における検討が望ましいが、マウスの骨髄細胞においては造血幹細胞を含む分画における BAALC の発現が低く、必ずしもヒトの BAALC 高発現白血病における病態を反映しない可能性が高いため、マウスモデルを用いた解析が困難である。上記の検討においては BAALC、Drebrin1 の両者とその細胞内局在の変化、接着能の亢進、SDF1-CXCR4 パスウェイの制御に関わるが、BAALC と Drebrin1 のどちらがどの機能にとって重要な役割を果たすか今後の検討を要する。既報から考えると、BAALC はその翻訳語修飾により細胞内から細胞膜へ結合した Drebrin1 とともに移行し、細胞膜で Drebrin1 が actin filament を制御して細胞外微小環境における遊走及び接着を促進している、という仮説が考えられる。

【結論】

本研究で私は造血器腫瘍関連遺伝子 *BAALC* の結合蛋白質として *Drebrin1* を同定した。*BAALC-Drebrin1 complex* は細胞膜表面に局在しており、結果として *Drebrin1* の *adhesion* 機能の上昇を誘導した。また同時に *CXCR4* のリン酸化の上昇および *SDF1* 感受性の上昇がみられた。

BAALC は造血幹細胞において *Drebrin1* と協調し細胞骨格の形成に関与している可能性が考えられ、特に骨髄ニッチにおける基質細胞への *adhesion* を促進していると考えられる。また *CXCR4* を活性化することによって *SDF1* 感受性を上昇させ、ニッチでの幹細胞の *quiescence* への導入を制御していると考えられる。*BAALC* 過剰発現白血病では、ニッチへの *adhesion* が亢進し、また *CXCR4* 活性上昇による腫瘍細胞の *quiescence* への導入が促進された結果、薬剤抵抗性を示す *population* が増加し、臨床における治療抵抗性・生存率の低下に寄与している可能性がある。今後 *Drebrin1* の *migration* や *adhesion* に関するシグナルの変化を明らかにすることによって、*BAALC* 過剰発現の効果を抑制し、難治性である *BAALC* 高発現白血病の予後改善に結びつく治療法を開発することを目指して、さらに研究を進める必要がある。

【謝辞】

本研究全般ならびに論文作成にあたってご指導頂きました、血液・腫瘍内科
教授 黒川峰夫先生、京都府立医科大学ゲノム医科学講座准教授 池川雅哉先生、
島津津製作所 嶋田史崇先生、血液・腫瘍内科の吉見昭秀先生、上久保靖彦先生、
荒井俊也先生に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3:730-737.
2. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005; 11:1416-1424.
3. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Koltz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003; 102:1613-1618.
4. Eisfeld AK, Marcucci G, Maharry K, Schwind S, Radmacher MD, Nicolet D, Becker H, Mrozek K, Whitman SP, Metzeler KH, Mendler JH, Wu YZ, Liyanarachchi S, Patel R, Baer MR, Powell BL, Carter TH, Moore JO, Koltz JE, Wetzler M, Caligiuri MA, Larson RA, Tanner SM, de la Chapelle A, Bloomfield CD. miR-3151 interplays with its host gene BAALC and independently affects outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012; 120:249-258.
5. Wang X, Tian QB, Okano A, Sakagami H, Moon IS, Kondo H, Endo S, Suzuki T.

BAALC 1-6-8 protein is targeted to postsynaptic lipid rafts by its N-terminal myristoylation and palmitoylation, and interacts with alpha, but not beta, subunit of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem.* 2005; 92:647-659.

6. Xie Y, Yin T, Wiegraebe W, He XC, Miller D, Stark D, Perko K, Alexander R, Schwartz J, Grindley JC, Park J, Haug JS, Wunderlich JP, Li H, Zhang S, Johnson T, Feldman RA, Li L. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature.* 2009; 457:97-101.

7. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003; 425:836-841.

8. Krause DS, Scadden DT, Preffer FI. The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom.* 2013; 84:7-20.

9. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000; 405:837-846.

10. Lorschach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia.* 2003; 17:637-641.

11. Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell*

Cycle. 2009; 8:1698-1710.

12. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gaken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Maciejewski JP, Germing U, Mufti GJ. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*. 2010; 116:3923-3932.

13. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP, Rao A. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010; 468:839-843.

14. Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*. 2013; 493:561-564.

15. Shirao T, Obata K. Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo. *J Neurochem*. 1985; 44:1210-1216.

16. Peitsch WK, Grund C, Kuhn C, Schnolzer M, Spring H, Schmelz M, Franke WW. Drebrin is a widespread actin-associating protein enriched at junctional plaques, defining a specific microfilament anchorage system in polar epithelial cells. *Eur J Cell Biol*. 1999; 78:767-778.

17. Keon BH, Jedrzejewski PT, Paul DL, Goodenough DA. Isoform specific expression

of the neuronal F-actin binding protein, drebrin, in specialized cells of stomach and kidney epithelia. *J Cell Sci.* 2000; 113 Pt 2:325-336.

18. Worth DC, Daly CN, Geraldo S, Oozeer F, Gordon-Weeks PR. Drebrin contains a cryptic F-actin-bundling activity regulated by Cdk5 phosphorylation. *J Cell Biol.* 2013; 202:793-806.

19. Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S, Shirao T. Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci.* 2003; 23:6586-6595.

20. Hayashi K, Shirao T. Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons. *J Neurosci.* 1999; 19:3918-3925.

21. Takahashi H, Mizui T, Shirao T. Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurones. *J Neurochem.* 2006; 97 Suppl 1:110-115.

22. Ikeda K, Shirao T, Toda M, Asada H, Toya S, Uyemura K. Effect of a neuron-specific actin-binding protein, drebrin A, on cell-substratum adhesion. *Neurosci Lett.* 1995; 194:197-200.

23. Kobayashi S, Isa K, Hayashi K, Inoue HK, Uyemura K, Shirao T. K252a, a potent inhibitor of protein kinases, inhibits the migration of cerebellar granule cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995; 90:122-128.

24. Terakawa Y, Agnihotri S, Golbourn B, Nadi M, Sabha N, Smith CA, Croul SE, Rutka JT. The role of drebrin in glioma migration and invasion. *Exp Cell Res*. 2013; 319:517-528.
25. Mitra R, Lee J, Jo J, Milani M, McClintick JN, Edenberg HJ, Kesler KA, Rieger KM, Badve S, Cummings OW, Mohiuddin A, Thomas DG, Luo X, Juliar BE, Li L, Mesaros C, Blair IA, Srirangam A, Kratzke RA, McDonald CJ, Kim J, Potter DA. Prediction of postoperative recurrence-free survival in non-small cell lung cancer by using an internationally validated gene expression model. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011; 17:2934-2946.
26. Vaskova M, Kovac M, Volna P, Angelisova P, Mejstrikova E, Zuna J, Brdicka T, Hrusak O. High expression of cytoskeletal protein drebrin in TEL/AML1pos B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia identified by a novel monoclonal antibody. *Leuk Res*. 2011; 35:1111-1113.
27. Bhojwani D, Kang H, Menezes RX, Yang W, Sather H, Moskowitz NP, Min DJ, Potter JW, Harvey R, Hunger SP, Seibel N, Raetz EA, Pieters R, Horstmann MA, Relling MV, den Boer ML, Willman CL, Carroll WL. Gene expression signatures predictive of early response and outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group Study [corrected]. *J Clin Oncol*. 2008; 26:4376-4384.

28. Woerner BM, Warrington NM, Kung AL, Perry A, Rubin JB. Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res.* 2005; 65:11392-11399.
29. Goolsby J, Marty MC, Heletz D, Chiappelli J, Tashko G, Yarnell D, Fishman PS, Dhib-Jalbut S, Bever CT, Jr., Pessac B, Trisler D. Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:14926-14931.
30. Steidl U, Bork S, Schaub S, Selbach O, Seres J, Aivado M, Schroeder T, Rohr UP, Fenk R, Kliszewski S, Maercker C, Neubert P, Bornstein SR, Haas HL, Kobbe G, Tenen DG, Haas R, Kronenwett R. Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood.* 2004; 104:81-88.
31. Terskikh AV, Easterday MC, Li L, Hood L, Kornblum HI, Geschwind DH, Weissman IL. From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:7934-7939.
32. Hering H, Lin CC, Sheng M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci.* 2003; 23:3262-3271.
33. Alland L, Peseckis SM, Atherton RE, Berthiaume L, Resh MD. Dual myristylation and palmitoylation of Src family member p59fyn affects subcellular localization. *J Biol Chem.* 1994; 269:16701-16705.
34. Shenoy-Scaria AM, Dietzen DJ, Kwong J, Link DC, Lublin DM. Cysteine3 of Src

family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol.* 1994; 126:353-363.

35. Milligan G, Parenti M, Magee AI. The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20:181-187.

36. Robbins SM, Quintrell NA, Bishop JM. Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol.* 1995; 15:3507-3515.

37. Broxmeyer HE, Cooper S, Kohli L, Hangoc G, Lee Y, Mantel C, Clapp DW, Kim CH. Transgenic expression of stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 enhances myeloid progenitor cell survival/antiapoptosis in vitro in response to growth factor withdrawal and enhances myelopoiesis in vivo. *J Immunol.* 2003; 170:421-429.

38. Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol.* 2011; 29:591-599.

39. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996; 382:635-638.

40. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone

marrow niche. Cell. 2004; 118:149-161.