

2013 (平成 25) 年度 博士論文

核内 c-Abl チロシンキナーゼの機能解析：

核内 F-actin bundle 形成と

ヒストン脱アセチル化酵素を介したクロマチン構造変換

千葉大学大学院 医学薬学府

先端生命科学専攻 4年博士課程 4年

ゲノム機能学講座 分子細胞生物学研究室

10JD0301 青山 和正

2014 (平成 26) 年 2 月 提出

目次

序論・目的	2
結果	2
1. 核内 c-Abl による核内 F-actin bundle 形成	
1-1. NLS-c-Abl による核内 F-actin bundle 形成	
1-2. 内在性 c-Abl による核内 F-actin 形成	
1-3. c-Abl による核内 F-actin bundle 形成とクロマチン構造の関係	
2. 核内 c-Abl によるヒストン脱アセチル化を介したクロマチン凝縮	
2-1. NLS-c-Abl によるクロマチン凝縮の誘導	
2-2. NLS-c-Abl によるヒストン修飾の誘導	
2-3. 内在性 c-Abl によるクロマチン凝縮・ヒストン脱アセチル化の誘導	
2-4. 核内 c-Abl による RASSF1A の転写抑制	
総括	5
Figures	6
材料・方法	7
参考文献	9
主論文目録	11
謝辞	12

序論・目的

がん原遺伝子産物 c-Abl は、非受容体型チロシンキナーゼで、組織普遍的に発現している。c-Abl は、Src homology (SH) 3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメインと、c-Abl に特有な last exon region からなる。last exon region は、核移行シグナル (NLS)、核排出シグナル (NES)、DNA 結合ドメイン、アクチン結合ドメインなどを含む (Hantschel and Superti-Furga, 2004)。c-Abl は、NLS と NES を介して、核内外を行き来することが知られている (Taagepera et al., 1998)。細胞質の c-Abl はよく研究されており、細胞増殖・分化・接着・移動などを制御する重要なシグナル伝達分子であり (Sirvent et al., 2008)、細胞質のアクチンダイナミクスに関わることも知られている (Van Etten et al., 1994; Woodring et al., 2003; Leng et al., 2005)。しかし、核内における c-Abl の機能は未解明な部分が多い。そこで、我々は c-Abl の核内機能を探索した。

結果

1. 核内 c-Abl による核内 F-actin bundle 形成

1-1. NLS-c-Abl による核内 F-actin bundle 形成

c-Abl の核局在は細胞質局在に比べ少ないため、NLS をアミノ末端に連結させた核移行型 c-Abl (NLS-c-Abl) を作成した (主論文 1, Fig. 2A)。NLS-c-Abl は大部分が核内に局在し (主論文 1, Fig. 2B)、NLS-c-Abl が誘導した核内チロシンリン酸化反応は、imatinib (Abl 阻害剤) で完全に阻害された (主論文 1, Fig. 2F)。このことから、NLS-c-Abl は核内 c-Abl の機能探索において有用なツールと考えられた。NLS-c-Abl の核内局在を調べたところ、一部の発現細胞において、核内で繊維状に局在していた (図 1)。c-Abl が actin 結合ドメインを有していることから、actin 重合体 (filamentous actin, F-actin) に局在している可能性を考え、Phalloidin で F-actin を染色したところ、繊維状局在した NLS-c-Abl と共局在する束状の F-actin (F-actin bundle) が検出された。この F-actin bundle は、NLS-c-Abl 非発現細胞では見られないことから、核内 c-Abl は F-actin bundle を形成することがわかった (主論文 2, Fig. 1C, H)。この F-actin bundle の形成は、アクチン重合阻害剤で阻害されることを確認した (主論文 2, Fig. 1E)。この F-actin の形態を詳しく解析するため、Z 軸をずらし 0.9 μm おきに顕微鏡画像を取得したところ、F-actin bundle は核の底面から頭頂部まで立体的に形成され、長くつながった構造をしていることがわかった (主論文 2, Fig. 1G)。F-actin bundle 形成における核内 c-Abl のチロシンリン酸化活性の寄与を調べるため、NLS-c-Abl 発現細胞に imatinib を処理したところ、F-actin bundle 形成が阻害された。しかし、imatinib を処理しても F-actin の核内染色強度が減少しなかった。よって、核内 c-Abl のチロシンリン酸化活性は、F-actin の bundle を形成するのに必要であり、F-actin 形成 (アクチン重合) には必要ないことが示唆された (主論

文 2, Fig. 3A)。次に、actin 結合ドメインを含むカルボキシ末端の欠損変異体 (NLS-c-Abl Δ C) を作成した。NLS-c-Abl Δ C を発現させると、核内にチロシンリン酸化が検出されたが、核内に F-actin は見られなかった (主論文 2, Fig. 5A-D)。よって、核内 F-actin 形成 (アクチン重合) には、actin 結合ドメインが必要であることがわかった。

1-2. 内在性 c-Abl による核内 F-actin 形成

核内 F-actin 形成における内在性 c-Abl の寄与を調べるため、c-Abl ノックダウン細胞株を作成した (主論文 2, Fig. 2A)。 β -actin の過剰発現で核内 F-actin レベルを比較したところ、親株よりも c-Abl ノックダウン細胞株の方が有意に低かった (主論文 2, Fig. 2B)。以上から、内在性 c-Abl は核内 F-actin 形成に関わることがわかった。

1-3. c-Abl による核内 F-actin bundle 形成とクロマチン構造の関係

c-Abl に形成された核内 F-actin bundle とクロマチン構造の位置関係を調べた。クロマチンは propidium iodide による DNA 染色で可視化した。顕微鏡観察により、NLS-c-Abl によって形成された核内 F-actin bundle はクロマチンの間に形成されていること、凝縮したクロマチンと部分的に近接していることがわかった (主論文 2, Fig. 5F)。ことから、核内 F-actin bundle は、クロマチン構造の制御に関わる可能性などが考えられた。

2. 核内 c-Abl によるヒストン脱アセチル化を介したクロマチン凝縮

2-1. NLS-c-Abl によるクロマチン凝縮の誘導

細胞の DNA を染色すると、染色強度が濃い高密度クロマチン領域と薄い低密度クロマチン領域に分かれている様子が観察できる。DNA 染色におけるピクセル蛍光強度の標準偏差 (SD) を用いてクロマチン凝縮を定量する方法を当研究で確立した (Takahashi et al., 2009)。様々な細胞の SD を測定すると、SD はクロマチン凝縮のレベルと相関することがわかる (図 2)。この方法を用いて、c-Abl とクロマチン凝縮の関係を調べた。野性型 c-Abl は、SD をわずかに上昇させただけであったが、NLS-c-Abl はより大きく SD を上昇させた。NLS-c-Abl 発現細胞では、SD が 1000 を超える非常に強いクロマチン凝縮が誘導された細胞も見られた (主論文 1, Fig. 2D)。また、imatinib は、NLS-c-Abl による SD 上昇を大きく抑制した (主論文 1, Fig. 2G)。これらから、c-Abl が核内でチロシンリン酸化活性依存的にクロマチン凝縮を誘導することが示された。

2-2. NLS-c-Abl によるヒストン修飾の誘導

クロマチン凝縮・脱凝縮は、ヒストン修飾によって制御されることが知られている

(Jenuwein and Allis, 2001; Fischle et al., 2003)。そこで、ヒストン修飾と核内 c-Abl によるクロマチン凝縮の関係を調べた。ヒストン修飾抗体を用いた免疫染色を行ったところ、興味深いことに、SD が高い細胞で、ヒストン H3 lysine 9 trimethylation (H3K9Me3) の上昇、H3K4Me3、ヒストン H3 lysine 14 acetylation (H3K14Ac)、H4K16Ac などの低下が見られた。特に、H4K16Ac の低下は顕著で、染色強度による定量値の減少と SD の上昇が大きく相関した (主論文 1, Fig. 4A, B)。さらに、trichostatin A (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) は、NLS-c-Abl の活性を阻害することなく、クロマチン凝縮と H4K16 脱アセチル化を阻害した (主論文 1, Fig. 4 J-L)。よって、核内 c-Abl によるチロシンリン酸化反応が、ヒストン脱アセチル化酵素を介してクロマチン凝縮を誘導していることが示された。

2-3. 内在性 c-Abl によるクロマチン凝縮・ヒストン脱アセチル化の誘導

クロマチン凝縮・ヒストン脱アセチル化に対する内在性 c-Abl の寄与を調べた。内在性 c-Abl のノックダウンは、H4K16Ac のレベルを上昇させ、クロマチン凝縮を抑制した (主論文 1, Fig. 7H)。内在性 c-Abl がクロマチン凝縮およびヒストン脱アセチル化に関わることが示された。

2-4. 核内 c-Abl による RASSF1A の転写抑制

上記した核内 c-Abl によるヒストン修飾は、一般に遺伝子発現を負に制御していることが知られている。がん抑制遺伝子 RASSF1A の転写もそのプロモーター領域におけるヒストン修飾により負に制御されている (Strunnikova et al., 2005; Kawamoto et al., 2007)。そこで semiquantitative RT-PCR を用いて、RASSF1A の mRNA 量を定量したところ、NLS-c-Abl の発現で低下した (主論文 1, Fig. 8B)。よって、核内 c-Abl によるヒストン修飾およびクロマチン凝縮は、転写を制御していることが示唆された。

総括

以上から、核内 c-Abl が核内 F-actin bundle を形成すること、クロマチン凝縮を誘導すること、ヒストン修飾に関わること、転写を抑制することを新規に見出した。核内 c-Abl によって形成された核内 F-actin bundle は、凝縮したクロマチンと近接していたため (主論文 2, Fig. 5F)、クロマチン凝縮に関わる可能性が考えられる。また、核内 c-Abl によるクロマチン凝縮は、ヒストン脱アセチル化酵素に依存していたこと (主論文 1, Fig. 4J)、アクチン重合阻害剤で核内ヒストン脱アセチル化酵素の塩抽出における solubility が上がること (Andrin and Hendzel, 2004) から、核内 F-actin bundle は、ヒストン脱アセチル化酵素の足場などとなって、ヒストン脱アセチル化、クロマチン凝縮、転写抑制に寄与している可能性が考

えられる (図 3)。我々はこれまでに、核内 Src family kinases や核内 ErbB4 によるチロシンリン酸化が、クロマチン構造変換、ヒストン修飾、遺伝子発現の制御などに関わることを示してきた (Takahashi et al., 2009; Ishibashi et al., 2013; Kubota et al., 2013) が、本研究では、c-Abl の核内機能も新規に見出すことができた。

Figures

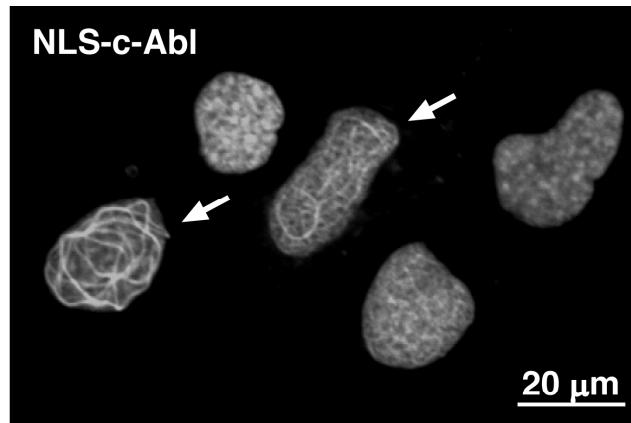


図 1. NLS-c-Abl の核内繊維状局在

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、核移行型 c-Abl (NLS-c-Abl) の細胞内局在を調べた。NLS-c-Abl は、全ての細胞で核内に局在したが、一部の細胞で繊維状に局在していた。(矢印：繊維状局在を示した細胞)

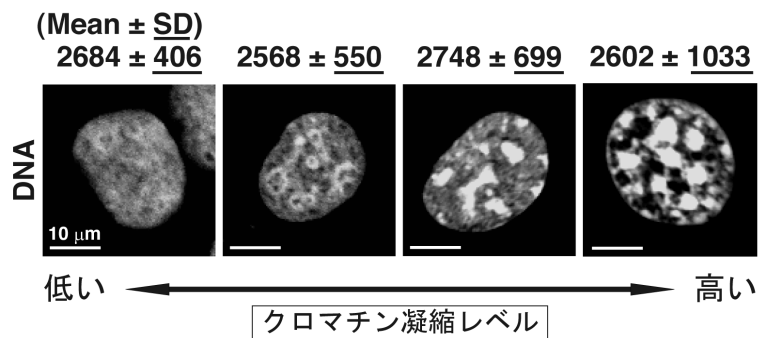


図 2. ピクセルイメージングによるクロマチン凝縮定量法

DNA 染色をした核を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。クロマチン密度が高い (蛍光強度が高い) 領域と低い (蛍光強度が低い) 領域を含む細胞は、核内ピクセル蛍光強度の平均値 (Mean) が一定のとき標準偏差 (SD) が高くなる。核内 c-Abl は、SD を上昇させる。

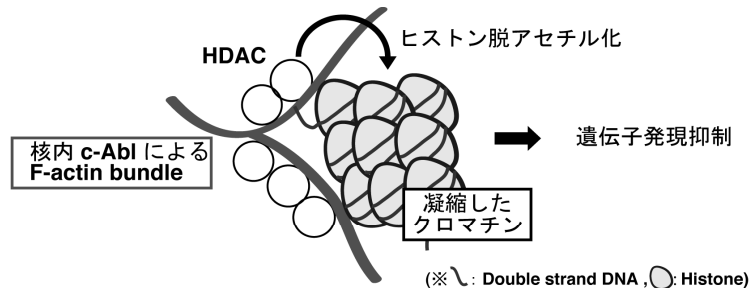


図 3. 核内 c-Abl による F-actin bundle 形成とクロマチン凝縮

核内 c-Abl が形成した核内 F-actin bundle は、凝縮したクロマチンとの近接領域において、HDAC の足場などとなってクロマチン凝縮・遺伝子発現抑制に寄与している可能性が考えられる。

材料・方法

プラスミド

cDNA encoding human wild-type c-Abl-1b (c-Abl) (provided by E. Canaani; [Shtivelman et al., 1985]) を pcDNA4/TO vector (Invitrogen) に組み込んだ (Kasahara et al., 2007)。NLS-c-Abl は、FLAG epitope、HA epitope、NLS (Hübner et al., 1997) を c-Abl のアミノ末端に結合させ、pcDNA4/TOneo vector (Nakayama et al., 2009) に組み込んだ。NLS-c-Abl Δ C は、pcDNA4/TOneo-NLS-c-Abl を Apa I で digestion し、blunting し、ligation して作成した。

抗体

以下の抗体を使用した。

phosphotyrosine (pTyr) (4G10 and polyclonal antibody: Upstate Biotechnology, Inc; provided by T. Tamura and T. Yoshimoto [Tamura et al., 2000]), Abl (8E9; BD-Pharmingen), FLAG (M2 and polyclonal antibody; Sigma), α -tubulin (MCA78G; Serotec), histone H4 acetylated on lysine 16 (H4K16Ac; Sigma-Aldrich), histone H3 acetylated on lysine 4 (H3K14Ac; Cell Signaling Technology), histone H4 acetylated on serine 1, lysine 5, lysine 8, and lysine 12 (H4Ac (S1, K5, K8, K12); Santa Cruz Biotechnology), histone H3 trimethylated on lysine 4 (H3K4Me3) (ab8580; Abcam), histone H3 trimethylated on lysine 9 (H3K9Me3) (ab8898; Abcam). Horseradish peroxidase (HRP)-F(ab')₂ secondary antibodies were purchased from Amersham Bioscience. TRITC-IgG, and Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 647-IgG secondary antibodies were purchased from BioSource International, Sigma-Aldrich, and Invitrogen.

細胞・遺伝子導入

以下の細胞を使用した。

COS-1 細胞と HeLaS3 細胞 (Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka) は 5% bovine serum (BS) または、4%BS + 1% fetal bovine serum (FBS) を含む Iscove's modified DME containing で培養した。遺伝子導入は linear polyethylenimine (25 kDa) (Polyscience, Inc.) (Fukumoto et al., 2010) を用いた。

免疫蛍光染色

細胞を paraformaldehyde または methanol で固定し、phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% saponin and 3% bovine serum albumin を room temperature で処理し、permeabilization した。細胞は適切な 1 次抗体で反応後、PBS containing 0.1% saponin で洗い、FITC- or TRITC-conjugated secondary antibody を反応させた。DNA staining は propidium iodide (PI) で行なった。Fluoview FV500 confocal laser scanning microscope (Olympus, Tokyo) で画像を取得した。

ウェスタンブローディング

ウェスタンブローディングは enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience) を用いて行なった。 whole cells の Lysate は SDS-sample buffer に溶かし SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し、 polyvinylidene difluoride membranes に転写した。 Protein bands は適切な抗体を用いて検出した。 Rebroting は stripping buffer と 0.1% NaN_3 により HRP を完全に除去後行なった。

参考文献

- C. Andrin, M.J. Hendzel, F-actin-dependent insolubility of chromatin-modifying components, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25017-25023.
- W. Fischle, Y. Wang, C.D. Allis, Histone and chromatin cross-talk, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 172-183.
- Y. Fukumoto, Y. Obata, K. Ishibashi, N. Tamura, I. Kikuchi, K. Aoyama, Y. Hattori, K. Tsuda, Y. Nakayama, N. Yamaguchi, Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine, *Cytotechnology* 62 (2010) 73-82.
- O. Hantschel, G. Superti-Furga, Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 33-44.
- S. Hübner, C.Y. Xiao, D.A. Jans, The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17191-17195.
- K. Ishibashi, Y. Fukumoto, H. Hasegawa, S. Kubota, K. Aoyama, S. Kubota, Y. Nakayama, N. Yamaguchi, Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 is antagonized by EGFR-activated c-Src, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 625-637.
- T. Jenuwein, C.D. Allis, Translating the histone code, *Science* 293 (2001) 1074-1080.
- K. Kasahara, Y. Nakayama, Y. Nakazato, K. Ikeda, T. Kuga, N. Yamaguchi, Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5327-5339.
- K. Kawamoto, S.T. Okino, R.F. Place, S. Urakami, H. Hirata, N. Kikuno, T. Kawakami, Y. Tanaka, D. Pookot, Z. Chen, S. Majid, H. Enokida, M. Nakagawa, R. Dahiya, Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 2541-2548.
- S. Kubota, Y. Fukumoto, K. Aoyama, K. Ishibashi, R. Yuki, T. Morinaga, T. Honda, N.-t. Yamaguchi, T. Kuga, T. Tomonaga, N. Yamaguchi, Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and heterochromatin protein 1 α (HP1 α) with heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 17871-17883.
- Y. Leng, J. Zhang, K. Badour, E. Arpaia, S. Freeman, P. Cheung, M. Siu, K. Siminovitch, Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 1098-1103.

Y. Nakayama, A. Igarashi, I. Kikuchi, Y. Obata, Y. Fukumoto, N. Yamaguchi, Bleomycin-induced over-replication involves sustained inhibition of mitotic entry through the ATM/ATR pathway, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 2515-2528.

E. Shtivelman, B. Lifshitz, R.P. Gale, E. Canaani, Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia, *Nature* 315 (1985) 550-554.

A. Sirvent, C. Benistant, S. Roche, Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells, *Biol. Cell* 100 (2008) 617-631.

M. Strunnikova, U. Schagdarsurengin, A. Kehlen, J.C. Garbe, M.R. Stampfer, R. Dammann, Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A promoter, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 3923-3933.

S. Taagepera, D. McDonald, J.E. Loeb, L.L. Whitaker, A.K. McElroy, J.Y.J. Wang, T.J. Hope, Nuclear-cytoplasmic shuttling of c-Abl tyrosine kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7457-7462.

A. Takahashi, Y. Obata, Y. Fukumoto, Y. Nakayama, K. Kasahara, T. Kuga, Y. Higashiyama, T. Saito, K.K. Yokoyama, N. Yamaguchi, Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 1117-1141.

T. Tamura, T. Kunimatsu, S.T. Yee, O. Igarashi, M. Utsuyama, S. Tanaka, S. Miyazaki, K. Hirokawa, H. Nariuchi, Molecular mechanism of the impairment in activation signal transduction in CD4 T cells from old mice, *Int. Immunol.* 12 (2000) 1205-1215.

R.A. Van Etten, P.K. Jackson, D. Baltimore, M.C. Sanders, P.T. Matsudaira, P.A. Janmey, The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity, *J. Cell Biol.* 124 (1994) 325-340.

P.J. Woodring, T. Hunter, J.Y.J. Wang, Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 2613-2626.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

(主論文 1) K. Aoyama, Y. Fukumoto, K. Ishibashi, S. Kubota, T. Morinaga, Y. Horiike, R. Yuki, A. Takahashi, Y. Nakayama, N. Yamaguchi, Nuclear c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation, Exp. Cell Res. 317 (2011) 2874-2903.

(主論文 2) K. Aoyama, R. Yuki, Y. Horiike, S. Kubota, N.-t. Yamaguchi, M. Morii, K. Ishibashi, Y. Nakayama, T. Kuga, Y. Hashimoto, T. Tomonaga, N. Yamaguchi, Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase, Exp. Cell Res. 319 (2013) 3251-3268.

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	伊藤素行
副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	村山俊彦
副査	千葉大学大学院教授 (医学研究院)	医学博士	岩間厚志

謝辞

本研究において、終始御指導、御鞭撻を賜り、また研究への道を開いてくださった千葉大学大学院 薬学研究院 分子細胞生物学研究室 山口直人教授に深く感謝いたします。

論文発表、学会発表、日々の実験において、様々な助言をくださった中山祐治准教授（現京都薬科大学教授）、福本泰典講師、核内チロシンキナーゼの研究を先導し、多くの経験を元に客観的で的確な意見をくださった山口憲孝助教に深く感謝いたします。

大変お忙しい中、本論文を審査し、貴重な意見をくださった本学伊藤素行教授、村山俊彦教授、岩間厚志教授に深く感謝いたします。

様々な面で支援、協力していただき、苦楽を共にした分子細胞生物学研究室の皆様、特に、膨大な数の顕微鏡画像を取得し、クロマチン構造変換・ヒストン修飾の解析を共に行った久保田翔氏、多くの実験を快く引き受け、早朝深夜、平日休日を問わず素早くこなしてくれた幸龍三郎氏、チロシンリン酸化基質の研究において共に試行錯誤を繰り返し、日々意見交換を行ってきた阿部紘平氏、本田拓也氏、森井真理子氏、武田祐美氏、本テーマを引き継ぎ核内チロシンリン酸化基質の研究を頑張っている後輩の九鬼和雅氏、柴崎美里氏、中條暖奈氏、山口弘美氏に深く感謝いたします。

最後に、長く続いた学生生活を陰で支え、励まし応援してくれた、両親、親戚一同に深く感謝いたします。