

シグナル伝達アダプター分子 CRK の生物学的役割

田中伸哉

CRK (CT10 regulator of kinase) は、チロシンキナーゼと低分子量 G タンパク質活性化因子(グアニンヌクレオチド交換因子)をリンクするアダプター分子であり、細胞の増殖、運動、接着を制御し、がんの浸潤・転移、感染症、免疫、食食、神経分化など様々な生命現象に深く関与する。CRK の機能の多様性は、上流、下流の様々な分子との結合の多様性に起因するが、最近の構造解析の結果、CRK 自身様々な形態をとることが判明した。CRK-I はフレキシブルで恒常的にシグナルが ON の状態、CRK-II は三つの SH 領域が固定されたコンパクトな構造を有しシグナルは ON/OFF の平衡状態、リン酸化 CRK-II は標的とは結合せず OFF の状態である。疾患との関連では CRK シグナルを抑制することで、がん腫、肉腫、脳腫瘍、中皮腫と様々な腫瘍細胞の悪性化能が著明に低下することが判明しており、がんの治療薬開発の標的となることが期待される。本稿では CRK について、研究の歴史から現状までを概説したい。

はじめに

20 世紀初頭に端を発したがんウイルス研究からがん遺伝子研究が誕生し、その潮流はゲノムプロジェクトが終了した現在においてシグナル伝達研究へと展開し、がん細胞のみならず周囲環境との相互作用に焦点が移行しつつある。遺伝子ハンティングとともに一世を風靡した Oncogene Meeting も第 20 回をもって 2004 年に終了した¹⁾。現在細胞内でタンパク質が結合してシグナルを伝達することは常識となっており、エピジェネティックなヒストンコードの解明が急速に進んでいる²⁾。2009 年現在ヒトで 300 を越える SH2 (Src homology 2) 領域、800 を越える SH3 領域を含む分子が同定されているが³⁾、それらの織りなすシグナル経路は今後さらに、より精巧な形で我々の前に姿を現わすと思われる。

筆者がこれまで深く関わってきたアダプター分子 CRK

についても、その機能解析がタンパク質間相互作用研究の時代の幕を切ったわけであったが、この研究領域が成熟した現在、さらにヒト疾患における役割の解明が求められている。本稿では、シグナル伝達分子 CRK について、Part I ではその時代を先導した仕事を経時的に、Part II では CRK と相互作用する個々の分子の役割や、CRK とがんや感染症を中心とする疾患との関わりについて述べる。

Part I CRK 研究の原点から現在まで

1. 研究の背景

1911 年、米国ロックフェラー医学研究所にイーストリバーの川向こうのロングアイランドの農場から 1 羽の腫瘍を発症したニワトリがもち込まれた。Payton Rous 博士はこのニワトリの肉腫をホモジェナイズし、ろ過液を注射することで別のニワトリに肉腫を作ることに成功した⁴⁾。この“ろ過性病原体”の発見は後にウイルス発がん説として確立され、Rous 博士は'66 年にノーベル賞を受賞した⁵⁾。この発がんウイルスは Rous 肉腫ウイルスと呼ばれたが、そのコードするタンパク質 Src はウイルス特異的なものではなく、ほ乳類のゲノムに存在することを花房秀三郎博士が発見し⁶⁾、がん遺伝子の概念の形成に貢献したことで花房博士は'82 年のラスカー賞に輝いた。また Harold Varmus 博士と Micheal Bishop 博士はハイブリダイゼーション法で

北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野・同探索病理学講座 (〒060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 丁目)

Biological roles for signaling adaptor protein CRK
Shinya Tanaka (Laboratory of Cancer Research, Department of Pathology, and Department of Translational Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, N15, W7, Sapporo 060-8638, Japan)

ゲノム上に cSrc を同定し'89年のノーベル賞を受賞した。

Rous 博士よりやや遅れて1920年代に同じくロックフェラー研究所の Albert Claude 博士はニワトリの腫瘍から様々な腫瘍ウイルスの分離を行った⁷⁾。Claude 博士はその後細胞内小器官の分離同定の仕事へと移行し、Christian de Duve 博士、George Palade 博士らとともに細胞内小器官の発見で'74年のノーベル賞を受賞することになるが、Claude 博士は研究テーマを替えた際、肉腫の試料を凍結しておいた。これは長年保存されていたが、'88年に花房研究室の大学院生だった Bruce Mayer は ATCC のカタログから、その一つ CT10 (chicken tumor No. 10) を取りよせてレトロウイルスを同定した。CT10 で形質転換したニワトリ胎児線維芽細胞 CEF (chicken embryonic fibroblast) ではチロシンリン酸化が亢進していたため、CT10 のコードするがん遺伝子を CRK (CT10 regulator of kinase: New York で流行していたドラッグとの語呂合わせで、クラックと発音) と命名し Nature 誌に発表した⁸⁾。

当時の研究背景は'86年に Dennis Stacey 博士が「チロシンキナーゼ→Ras→Raf→myc」というシグナル伝達系が存在することを発表した直後であった⁹⁾。種々のがん遺伝子で形質転換した細胞に抗 Ras 抗体 Y13-259 をマイクロインジェクションし、増殖能が低下するか否かで Ras の上流分子か下流分子かを決定したのである。がん遺伝子研究がシグナル伝達研究へと転換するいわばシグナル伝達研究の黎明期であった。

2. cCRK の単離とその特徴

(1) vCRK 研究から SH2 機能解明へ

CT10 のコードするがん遺伝子産物 vCRK (viral CRK) のアミノ酸配列がチロシンキナーゼ型がん遺伝子産物 Src の調節領域と相同性を有していたことから、Src と CRK に共通する二つの配列は Src 相同 (SH: Src homology) 2, SH3 領域と命名された⁸⁾ (図 1)。因みに SH1 はチロシンキナーゼ領域である。

vCRK でがん化した細胞では 130 kDa と 68 kDa のタンパク質のチロシンリン酸化が著明に亢進していたが (図 2A), vCRK はなんら酵素活性を有さないため、その理由は謎であった⁸⁾。vCRK が同定された直後に花房研究室に留学した松田道行博士 (東京大学医学部病理学教室出身) は用意周到な実験で、vCRK の SH2 領域がリン酸化チロシンと特異的に結合することを発見し'90年に Science 誌に発表した¹⁰⁾。チロシンキナーゼ型受容体は自己リン酸化され、そこに基質が SH2 領域を介して特異的に結合するという原理が明らかとなった^{11,12)}。

松田博士は論文の最後に cSrc のチロシン残基 Y527 がリン酸化されること、Y527 を欠損した vSrc が活性化型であることの二つの事実より、Y527 がリン酸化を受けて Src

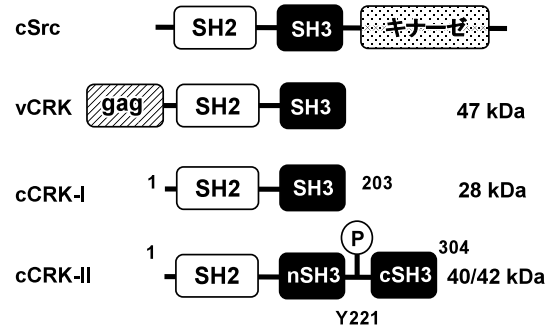


図 1 CRK のドメイン構造の概略

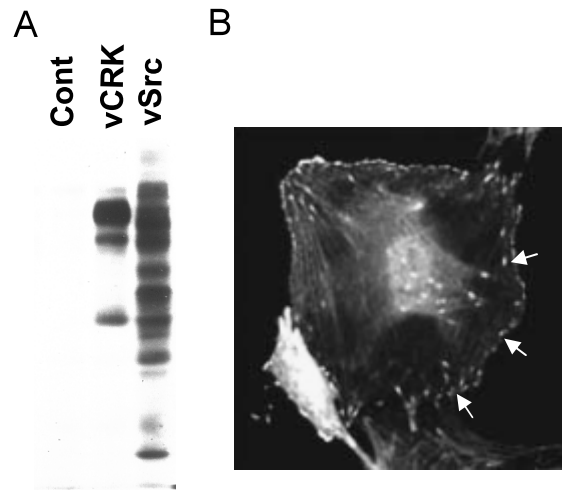


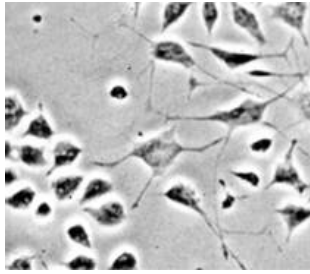
図 2 A. CRK によるチロシンリン酸化の亢進。CEF にウイルスを感染させた後の抗ホスホチロシン抗体でのウエスタンブロット。B. vCRK の発現誘導によるストレスファイバーの形成。vCRK は細胞接着斑に局在する。抗 gag 抗体による vCRK の蛍光染色とアクチン線維のファロイジン染色。矢印は vCRK を示す。

自身の N 末端の SH2 に結合して、Src が不活化型になる構造変換の存在を推測している¹⁰⁾。このモデルが正しいことは Src の三次元構造解析の結果により'97年に証明されるわけだが¹³⁾、先の予測が難しい生物学研究の分野において、理論的考察により構造を予言した数少ない例の一つである。

(2) ヒト cCRK 遺伝子の単離と SH3 領域の機能解明

花房研究室から帰国した松田博士は'92年に国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所) で cCRK (cellular CRK) を単離した¹⁴⁾。cCRK には 40kDa の cCRK-II (SH2-nSH3-cSH3) と、オルタナティブスプライシングによって cSH3 が一つ欠けた型の 28kDa の cCRK-I (SH2-nSH3) がある (図 1)。cCRK-I が活性化型で 3Y1 ラット線維芽細胞に導入するとリン酸化チロシン含量が増加し増殖能が高まる¹⁴⁾。

この時点で筆者が松田博士と取り組んだのが SH3 領域



CRK注入

図3 CRKによるPC12細胞の神経突起誘導
大腸菌で発現させたcCRK-IIをマイクロインジェクション法にてPC12細胞に導入後48時間後。

の機能解明であった。'93年にはcCRKタンパク質をPC12細胞にマイクロインジェクションすると神経突起形成を誘導することを見出し(図3)、様々なSH3変異体を用いることで、SH3が機能領域であることを明らかにした¹⁵⁾。さらに独自に開発したFar-Western blot法で発現ライブラリーをスクリーニングして二つの新規遺伝子を同定した。いずれも低分子量Gタンパク質活性化因子/グアニンヌクレオチド交換因子(GEF: guanine nucleotide exchange factor)であり、一つをC3G(CRK SH3 domain binding GEF)¹⁶⁾と命名した。もう一つは、後のDOCK180(downstream of CRK 180 kDa protein)¹⁷⁾である。

これらの分子のクローニングにより、二つの重要な生命科学の基本原則が明らかとなった。一つは、「チロシンキナーゼ→アダプター分子→GEF→低分子量Gタンパク質」というチロシンキナーゼから低分子量Gタンパク質に至るシグナル伝達のメイン経路である。もう一つは「SH3領域の機能はポリプロリン配列と結合する」という原則である。これはGrb2とSosの結合、Ablと3BP-1の結合も同様で、'94年にScience誌にまとめて記載された¹⁸⁾。

(3) CRKのSH2標的の同定

我々はSH3の機能に焦点をあてて研究を進めていたが、SH2の標的分子は'94年に東京大学の平井久丸博士らにより明らかにされた。vCRKでがん化した細胞では130kDaのタンパク質に著明なチロシンリン酸化が入ることが知られていたが、平井研究室の堺隆一博士によってこのタンパク質が精製同定されp130Cas(CRK associated substrate)と命名された¹⁹⁾。このタンパク質はその中央部にCRKのSH2領域の結合コンセンサス配列YXXPを15個有する。また同年、花房研究室のRaymond Bierge博士によってvCRKでチロシンリン酸化されるもう一つのタンパク質pp68はパキシリンであり、パキシリンもCRKと結合することが明らかにされた²⁰⁾。p130Cas、パキシリンともに細胞接着斑の構成タンパク質であり、'96年にはVuori博士ら

によりインテグリンの下流でp130Cas/CRK複合体が機能し細胞接着を制御することが示された²¹⁾。実際3Y1細胞にvCRKの発現を誘導すると48時間でvCRKは細胞接着斑に局在しストレスファイバーを形成した(図2B)。

一方、花房研究室の大学院生であったStephan FellerはcCRK-IIは二つのSH3領域間のチロシン残基Y221がAblによってリン酸化され、CRKのSH2自身がこのリン酸化配列pYAQPを認識することで分子内結合が起こり、CRKがSH2標的から離脱してシグナルがOFFとなる、すなわち不活性型になるというモデルを提唱した²²⁾。

3. CRKによる細胞内シグナル伝達と構造解析

CRKのシグナル伝達機構は'96年頃までにおよその骨格が明らかにされたが、上流因子は、細胞接着斑構成分子ばかりではなくEGF、FGF、NGF、PDGFなど様々な増殖因子受容体やIRS-1、Gab1、Cblなどのアダプター分子であることが報告された^{3,23)}。現在でもCRKは実に多様な生命現象に関与することが明らかにされている(表1)。

我々も中でも特にCRKとヒトのがんとの関連に着目し、後述するようにCRKががん化に必須の分子であることを明らかにした。そしてCRKが分子標的治療の候補であると結論づけ、'07年には北海道大学薬学研究院構造解析分野の稲垣冬彦教授らとの共同研究にて三次元構造を明らかにした²⁴⁾。実際の解析は稲垣研究室の小橋川博士により行われ、CRK-IIはリン酸化と非リン酸化状態によってドラスティックに構造が変わり、シグナル伝達を制御することが明らかとなった。以下にその概要を示す。

(1) CRK-Iは伸びてフレキシブルな、CRK-IIはコンパクトな構造を有する。

CRKタンパク質を大腸菌にて調製し、NMRにて距離制限情報(NOE)および角度制限情報(RDC: residual dipolar coupling)を取得し構造計算を行った。CRK-Iの最低エネルギー構造20個について、SH2を重ね合わせるとその構造はよく重なるが、それ以外の領域はランダムであった(図4A)。またSH3を基準に重ね合わせても同様であった。このことからCRK-IのSH領域はフレキシブルなリンカーにより連結されていることが判明した(図4A)。

CRK-IIは三つのSH領域が、SH3間のリンカー領域(224-237AA)により固定され、全体としてコンパクトな構造を形成していた(図4B)。この中心となる領域をインターSH3コア:ISC(inter SH3 core)と命名した。CRK-IIのリン酸化部位であるY221は分子表面に露出しており、SH2の認識配列であるYAQPのP224はISCに含まれ固定化されている。従って、チロシンキナーゼによりY221がリン酸化されやすく、また、CRKのSH2領域がpYAQPと結合する段階でISCの構造も崩れてCRK-II自身の構造

表1 CRK シグナルを活性化する様々な細胞外刺激

I. 増殖因子等

細胞刺激/受容体	チロシンリン酸化 タンパク質	細胞応答	文献	年
神経成長因子/TrkA	TrkA, p130Cas	神経突起伸長	Ribon, V., et al.	J. Biol. Chem. 1996
上皮細胞増殖因子/EGFR	EGFR, Cbl, p130Cas	細胞増殖	Fukazawa, T., et al. Ojaniemi, M., Vuori, K.	J. Biol. Chem. 1996 J. Biol. Chem. 1997
インシュリン/IR インシュリン様増殖因子/IGFR	IR, IGR, p130Cas, IRS-1, SH-PTP2	細胞増殖 グルコース輸送	Beitner-Johnson, D., et al. Chiang, S.H., et al.	J. Biol. Chem. 1996 Nature 2001
血小板増殖因子/PDGFR α	PDGFR α -Y762	細胞増殖	Yokote, K., et al.	Oncogene 1998
血管増殖因子/VEGFR	VEGFR, FRS2	内皮細胞運動 血管新生	Stoletov, K.V., et al. Ito, N., et al.	FASEB J. 2002 Cell Signal 2001
肝細胞増殖因子/Met	Met, Gab1	細胞増殖, 細胞運動	Garcia-Guzman, M., et al. Furge, K.A., et al.	Oncogene 1999 Oncogene 2000
線維芽細胞増殖因子/FGFR	FGFR1-Y463	細胞増殖	Larsson, H., et al.	J. Biol. Chem. 1999
Ephrin/EphB	p130Cas, Cbl	血管内皮細胞ラッフリング	Nagashima, K.	Mol. Biol. Cell 2002

II. サイトカイン等

細胞刺激/受容体	チロシンリン酸化 タンパク質	細胞応答	文献	年
IL2/IL2-R トロンボポイエチン/ TPO-R	STAT5	転写亢進	Oda, A., et al.	BBRC 2000
IL3/IL3R エリスロポイエチン/ EpoR	Cbl, p130Cas	細胞増殖	Barber, D.L., et al.	Blood 1997
IL8/IL8R	p130Cas	メラノーマ増殖	Schraw, W., et al.	Biochem. 1995
T細胞受容体	p130Cas, Cbl, ZAP70	細胞増殖 Clonal expansion	Buday, L., et al. Sawadkisol, S., et al.	J. Biol. Chem. 1996 J. Immunol. 1996
B細胞受容体		B細胞活性化・分化	Ingham, R.J., et al.	J. Biol. Chem. 1996
TGF β /TGF β 1R	p130Cas	E-カドヘリン制御・細胞接着	Kim, J.T., Joo, C.K.	J. Biol. Chem. 2002
ケモカイン SDF-1/CXCL12	JAK2, p130Cas, パキシリン	血液幹細胞の運動	Zang, X.F.	Blood 2001
ケモカイン CCL20/CCR6		イオン輸送	Yang, C.C., et al.	Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005
カルシトニン/CalcitoninR	HEF1/p105CasL	細胞骨格制御	Zhang, X.F., et al.	Blood 2001
Reelin/ApoER2	Dab1-Y220, Y232	脳の層構造形成	Ballif, B.A., et al.	Curr. Biol. 2004
LPA/bombesin	p130Cas, パキシリン	ストレスファイバー形成	Flinn, H.M., Ridley, A.J.	J. Cell Sci. 1996
GABA/m3 Muscarinic R	FAK, p130Cas	腺外分泌	Rosado, J.A.,	Arch. Biochem. Biophys. 2000

III. 細胞外基質関連・貪食・その他

基質等/受容体等	チロシンリン酸化タンパク質	細胞応答			
フィブロネクチン/Integrin $\beta 1$	p130Cas, Fak	細胞接着・運動	Nojima, Y., et al.	J. Biol. Chem.	1995
u プラスミノージェン活性化因子/uPAR	p130Cas	腫瘍細胞運動	Smith, H.W., et al.	J. Cell Biol.	2008
MCSP/Integrin $\alpha 4 \beta 1$	p130Cas	メラノーマコンドロイチンプロテオグリカンによる腫瘍浸潤	Eisenmann, K.M., et al.	Nat. Cell Biol.	1999
コラーゲン/Col-R	パキシリン-Y31, Y118	細胞運動 (膀胱がん細胞株 NBT-II)	Petit, V., et al.	J. Cell Biol.	2000
ラミニン 10/11	p130Cas	細胞運動 (脳腫瘍細胞株)	Gu, J., et al.	J. Biol. Chem.	2001
ヒアルロン酸/CD44	ERM (Ser リン酸化)	細胞運動 (ラット線維芽細胞株)	Tsuda, M., et al.,	J. Biol. Chem.	2004
KAI1/CD82	p130Cas	細胞運動抑制 (前立腺癌細胞株)	Zhang, X.A., et al.	J. Biol. Chem.	2003
Neuropilin1	p130Cas	細胞運動 (脳腫瘍細胞株 U87)	Frankel, P., et al.	EMBO Rep.	2008
TIMP-2	パキシリン	血管内皮細胞のスプレッド	Chang, H., et al.	BBRC	2006
Shingosine-1 phosphate	p130Cas	血管内皮細胞運動	Ohmori, T., et al.	J. Biol. Chem.	2001
Shear stress	p130Cas	細胞接着斑再構成	Okuda, M., et al. Sawada, Y., et al.	J. Biol. Chem. Cell	1999 2006
アポトーシス細胞	p130Cas	貪食	Albert, M.L., et al.	Nat. Cell Biol.	2000
CD36	PYK2, パキシリン, p130Cas	貪食	Stuart, L.M., et al.	J. Biol. Chem.	2007
MFG-E8	p130Cas	貪食	Akakura, S., et al.	Exp. Cell Res.	2004
Fc- γ 受容体	ND	貪食	Lee, W.L., et al.	J. Biol. Chem.	2007

も大きく変わるのであろう。類似の構造を有するアダプター分子 Grb2 が常時フレキシブルな構造をとるのとは対照的であった。

CRK-II のコンパクトな構造の重要な特徴の一つは、nSH3 の標的分子と結合するインターフェースが SH2 領域によって覆われていることである。「半分閉じた」状態と考えられるが、nSH3 の標的ペプチドとの親和性は CRK-I に対して 1/6 に低下しており、実際プルダウンアッセイにおいても標的分子との結合が減少した (図 4C)。

(2) pCRK-II では SH2 のみならず nSH3 の標的分子認識表面もブロックされる。

CRK-II は 221 番目のチロシン残基がリン酸化され、CRK-II 自身の SH2 が pY221 と結合することが予想されていた²²⁾。実際に pCRK-II₁₋₂₂₈ (pCRK の 1-228 アミノ酸) の NMR 解析において、SH2 が pY221 に結合することが明らかとなった (図 4B)。また、今回の構造解析で新しく nSH3 の標的分子認識表面も、SH2-nSH3 間のリンカー領域 (R122-Q133) により覆われていることが明らかとなった。pCRK-II と nSH3 標的ペプチドとの親和性は CRK-II より

もさらに弱く (解離定数の相対値は CRK-I : CRK-II : pCRK-II = 1 : 6 : 15.9)、プルダウンアッセイでも pCRK-II と標的の結合は認められなかった。このことから、pCRK-II は SH2/SH3 領域のいずれの標的分子とも結合できず、シグナル OFF の状態であることが判明した。

(3) CRK-II の ISC 変異体は CRK-I と同様の活性を有する。

ISC の CRK-II の制御における役割を検討するために、ISC の変異体を作製した。ISC 変異体ではコンパクトな構造は維持されず、nSH3 と標的分子との親和性が増加することがプルダウンアッセイにて確認された (図 4C)。また、CRK および変異体をレトロウイルスベクターで 3Y1 細胞に発現させ、薬剤耐性株をポリクローナルな状態で用いて検討したところ、CRK-I では運動能、増殖能の亢進が観察された (図 4D, 4E)。CRK-II ではいずれも低下傾向であったが、CRK-II の ISC 変異体では CRK-I と同程度までに運動能、増殖能が亢進した (図 4D, 4E)。これより、ISC を介して CRK-II がコンパクトな構造を形成することが CRK-II のシグナル伝達制御において重要であることが示

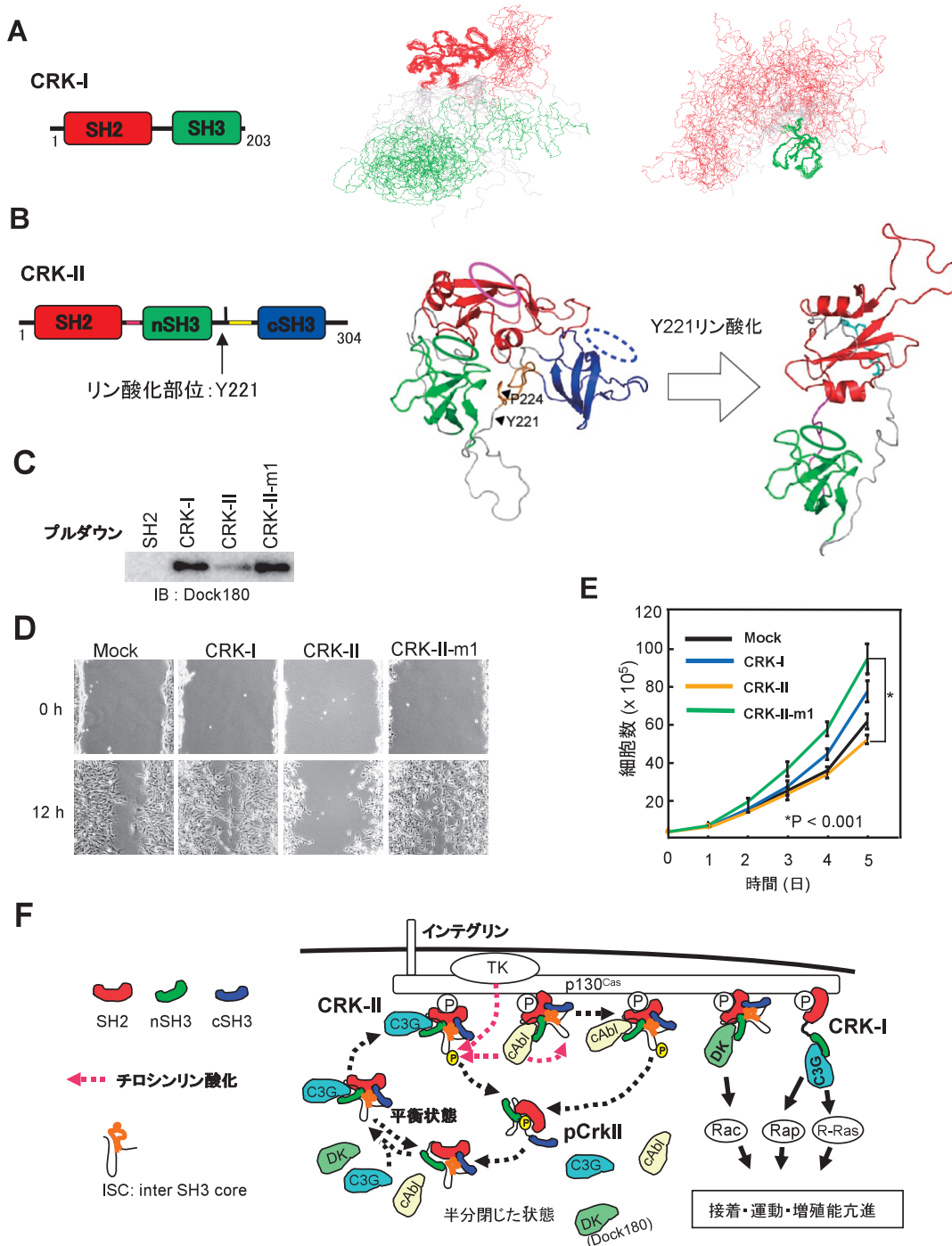


図4 CRKのNMRによる構造解析

A. CRK-IのNMR構造. 最低エネルギー構造20個の重ね合わせ. SH2の重ね合わせ(左), SH3の重ね合わせ(右). B. 非リン酸化CRK-II(左)およびリン酸化pCRK-II₁₋₂₂₈(右)のリボンモデル. 各SH領域の標的分子認識部位を楕円で示す. また, 右図においてシアンはリン酸化配列YAQPを示す. なおSH2(赤), nSH3(緑), cSH3(青), ISC(黄), SH2-nSH3リンカー/Arg122-Glu133(マゼンダ)を色分けで示している. C. プルダウンアッセイによるCRKとDOCK180との結合. 293T細胞lysateをMBP融合リコンビナントCRKタンパク質と反応させた. CRK-II-m1はCRK-IIのISC変異体. D. wound healing assayによるCRK発現細胞の運動能解析. E. CRK発現細胞の増殖能の解析. D, Eは各CRKを発現する3Y1細胞を用いた. F. CRKを介するシグナル伝達系. 細胞が細胞外基質などからの刺激を受けると, CRK-IはSH2領域で標的に結合し, 恒常的にシグナルを低分子量Gタンパク質へ伝達する. CRK-IIは, SH2の標的に結合した後, CRK自身が結合しているAblキナーゼや細胞接着斑に存在するチロシンキナーゼによってリン酸化され, シグナルはシャットオフされる. 標的と解離した後, 脱リン酸化されたCRK-IIの一部は再度nSH3の標的分子と結合し, シグナリングサーキットに入る.

された。

以上の結果より、CRK-Iは恒常的にシグナルONの状態であり、持続的にシグナルを伝達することが明らかとなった。またCRK-IIは細胞の静穏状態ではON/OFFの平衡状態であり、刺激がはいると適切な局在をとりシグナルを伝達し、リン酸化を受けることでシグナルは完全にOFFになるというサイクルが想定された(図4F)。実際CRK-Y221F変異体では、CRKとC3GやDock180との結合量は増加するが、Rac依存性のシグナルが減弱し、ラフリングが抑制されることから²⁵⁾、細胞骨格の制御にはCRK-IIのリン酸化、脱リン酸化のサイクルが重要であると考えられる。また、CRK-IIのニワトリのnSH3-cSH3のみを用いた構造解析から、238番アミノ酸のプロリンのシス型とトランス型のアイソマーによって構造が変化するという結果が報告されている²⁶⁾。

(4) CRKシグナル阻害薬剤の探索

CRKシグナル抑制化合物を得るためにはいくつかの戦略が考えられる。(i)立体構造に基づく*in silico* drug designでSH3またはSH2のインターフェースをブロックする薬剤を設計する。(ii)nSH3のインターフェースが「半分閉じた」状態であることに着目して架橋する薬剤を設計する。(iii)ほ乳類ツーハイブリッド法を用いてSH3と標的との結合を阻害する化合物をランダムにスクリーニングする。(iv)新規スクリーニング系を用いてCRK特異的シグナル阻害剤を探索する。

(iv)については最近当研究室において、笹井研博士を中心に新しい薬剤スクリーニング系を開発した²⁷⁾。一つの遺伝子の発現で規定される増殖シグナルを抑制するものを同定可能な系であり、現在ヒト正常アストロサイトを用いてAkt (protein kinase B) に対するシグナル抑制剤の同定に成功している²⁷⁾。この系の利点は非特異的に細胞障害性を有するものを排除できる点であり、今後CRKシグナル特異的阻害剤を探索していきたい。

Part II CRKとその関連分子の生物学的な役割

1. 代表的なCRKの上流因子(SH2領域結合分子)と下流因子(SH3領域結合分子)

CRKは様々なシグナル伝達に関与することが知られているが(表1)その多様性の一つの理由は、CRKに関連するタンパク質複合体は細胞の種類によって異なるためである。すなわちCRK-I/C3G、CRK-I/DOCK180、CrkII/C3G、CrkII/DOCK180、CrkL/C3G、CrkL/DOCK180などの複合体が様々な割合で細胞質に存在する。以下に主なCRKの標的分子を示す。

p130Cas:細胞接着斑の構成成分で130kDaのドッキング分子。N末にSH3領域を有し中央部には15箇所のYXXPコンセンサス配列をもつ(図5)¹⁹⁾。関連分子としてp105CasL/Hef-1、Efs/Sinが存在する^{28,29)}。p130Casのノックアウトマウスは心筋形成の異常により胎性致死である³⁰⁾。

vCRKにより形質転換した線維芽細胞ではp130Casのチロシンリン酸化が著明に亢進するが、これはSrcファミリーチロシンキナーゼ(Src family tyrosine kinase, SFTK)が関与する。特にSrc、Fyn、Abl、FAK、Cskのノックアウトマウス由来の線維芽細胞(MEF)を用いた検討ではFyn^{-/-}細胞でのみこのリン酸化が著しく減少した³¹⁾。また、SFTKを負に制御するCskに細胞接着斑局在タグであるFAT (focal adhesion targeting) シークエンスをつけたCskを発現させることでCRK-II/C3G/Rap、CRK-L/C3G/Rap経路が不活性化されることから、インテグリンからp130Cas/CRKを介するシグナル伝達にもSFTKが関与することがわかった³²⁾。

p130CasはN末のSH3領域でFAKと結合し、C末でLyn、Fyn、Yesに結合する(図6)。p130CasのSH3領域のみを欠損(exon 2 knockout mice)させた場合はFAKの

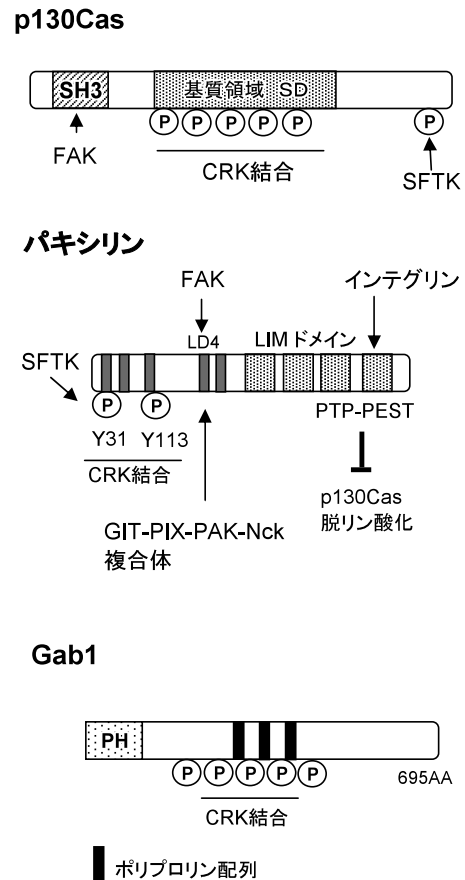


図5 CRKのSH2領域の標的分子p130Cas、パキシリン、Gab1の構造と結合タンパク質の概略

活性が低下し細胞運動能が低下することが報告された³³⁾。また、vCRKによるCEFの形質転換では、FAKのY397のリン酸化によるPI-3キナーゼ経路の活性化が必要であり³⁴⁾、p130Cas/CRK-II複合体がFAK-Y397のリン酸化を誘導しPI-3キナーゼのリクルートを増強することが報告されている(図6)³⁵⁾。

p130Cas/CRK/DOCK180/Racはインテグリンβ1の下流で機能しラップリング、フィロポディア形成、細胞運動を制御する³⁶⁾。肺腺がん細胞A549細胞ではラミニン10(α5β1γ1)、ラミニン11(α5β2γ1)はα3β1インテグリンを介して、またはフィブロネクチンはインテグリンα5β1、を介してRac、Rhoを活性化して細胞運動を制御すること

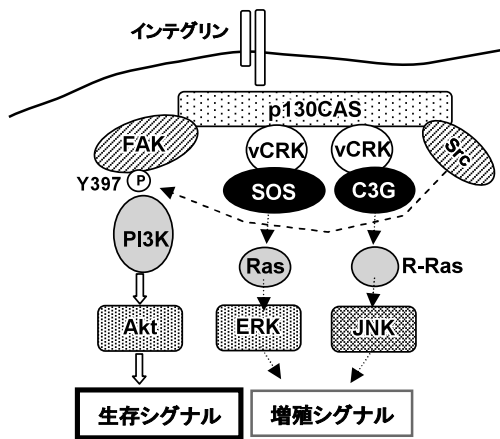


図6 vCRKによる細胞がん化のシグナル伝達

が報告されている³⁷⁾。最近 p130Cas^{-/-}MEFを用いた実験で、vCRKによるRacの活性化とそれに伴うラップリングと細胞運動はp130Casに依存しないという報告がなされた³⁸⁾。これはp130Cas関連分子、パキシリン、Gab1などのドッキング分子がその機能を代償するためと考えられる。

細胞が物理的刺激を感じ取るメカニズムは不明な点が多いが、p130Casが物理刺激センサー(メカノセンサー)の役割を果たすという興味深い結果が示されていた³⁹⁾。非リン酸化p130Casでは中央部の基質結合領域(SD substrate domain)は折りたたまれた構造をとっており、細胞が物理的な力を受けた時、p130Cas分子もN末端とC末端に力を受けて引き延ばされ、C末に結合したSFTKによりSD領域がリン酸化され、そこにCRK/C3G複合体が多数結合し、Rap1を活性化しシグナルを伝達するというものである(図7)。

p130Casはがんとの関連でも臨床的に重要である。乳がんのエストロゲン治療抵抗性を規定する分子としてp130Casが同定されBCAR1(breast cancer antiestrogen resistance1)とも呼ばれている⁴⁰⁾。p130Casの発現量が予後因子になることが報告されており今後の展開が期待される⁴¹⁾。

パキシリン Paxillin: 細胞接着斑の構成成分で分子量68kDaのドッキング分子(図5)^{42,43)}。C末端のLIMドメインでインテグリンα4と結合し細胞接着斑に局在する。特にロイシンとアスパラギン酸リッチなLD領域をN末側

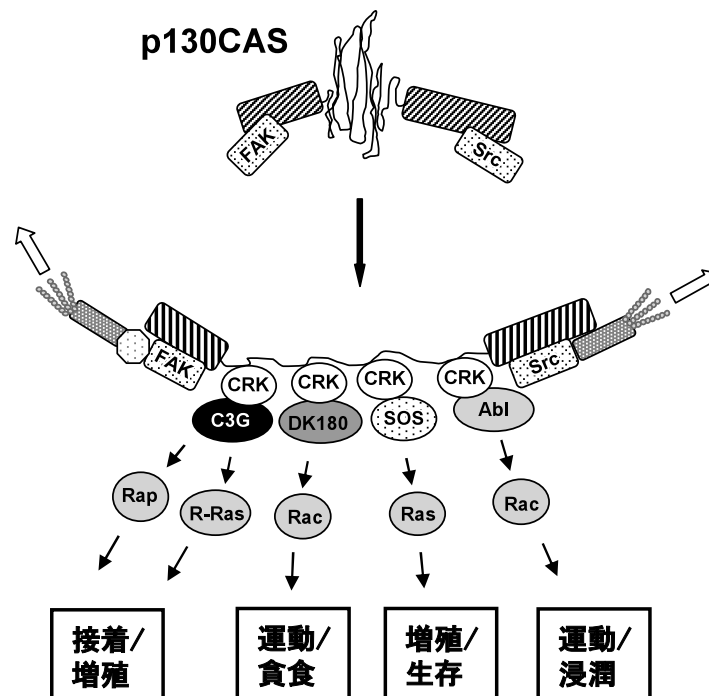
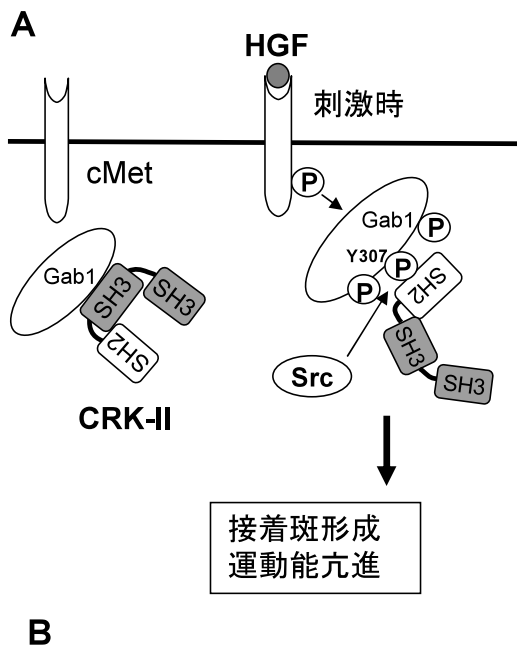


図7 p130Casのメカノセンサーの概略

に5個有しており、その中で273Serを含むLD4が、GIT (G-protein-coupled receptor kinase interacting protein)-PIX (PAK-interacting exchange factor)-PAK (p21 activated Ser/Thr kinase) 複合体と結合する。GITはArfGAP活性を有しておりSFTKでチロシンリン酸化を受ける⁴⁴⁾。S273はPAKによりリン酸化を受け、この複合体形成はRacの活性制御に関わる⁴⁵⁾。またLD4にはFAKが結合しリン酸化により解離することも報告されており、細胞運動の制御に重要な役割を果たす⁴⁶⁾。またパキシリンはCdk5によりSer244がリン酸化を受けてFAKと結合することがミエリン形成を指標とするオリゴデンドロサイトの分化に必要であることが報告されており興味深い⁴⁷⁾。

細胞接着や様々な増殖因子の刺激で、パキシリンのY31



B

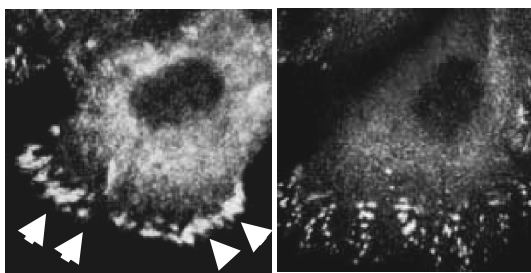


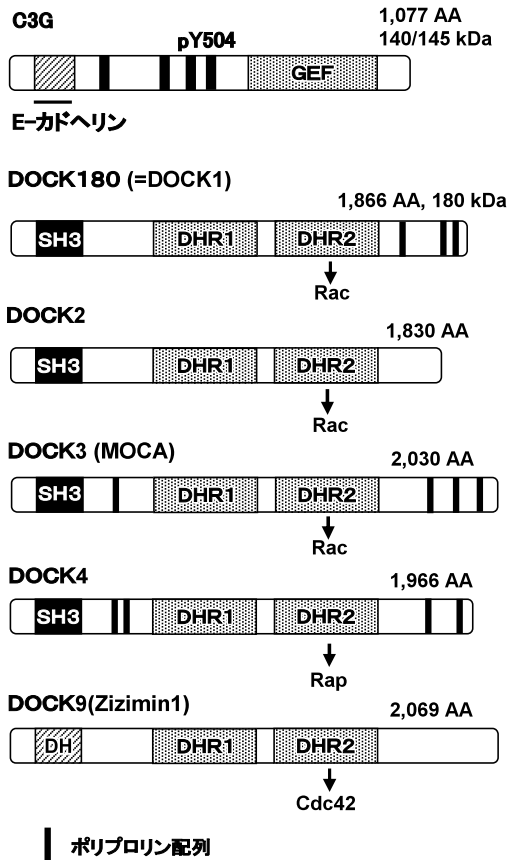
図8 A. Gab1とCRKのシグナル伝達。非刺激状態ではCRKはSH3を介してGab1と結合しているが、HGF刺激下ではSrcによりGab1のY307がリン酸化を受けてそこにCRKがSH2を介し結合してシグナルを伝達する。B. MDCK細胞におけるGab1野生型(左)とGab1-Y307F変異体(右)の発現とHGF刺激による細胞接着斑形成。パキシリンの蛍光染色。左図の矢印は細胞膜のラップリングとその近傍の強い細胞接着斑形成。

とY118がチロシンリン酸化を受けCRKが結合し、これらのチロシンの変異体では細胞運動が抑制されることからpY31, pY118, LD4 (pS273)を介する分子複合体の結合、解離のターンオーバーが細胞のダイナミックな動きにリンクすると考えられている⁴⁸⁾。また、パキシリンは、SrcのSH3領域とN端で結合し、p130Casの脱リン酸化酵素PTP-PESTとC末で結合することから、p130Casのリン酸化の制御にも関わっており、パキシリンによる細胞接着斑がダイナミックに制御される⁴⁹⁾。

Gab1 (Grb2-associated binder 1) (図5)：Gab1はHGF受容体/cMetによりリン酸化されるドッキング分子で中央部に五つのCRKと結合するコンセンサス配列YXXP配列をもつ⁵⁰⁾。HGF (hepatocyte growth factor) シグナルは多くのヒトのがん細胞の浸潤あるいは幹細胞の分化増殖に関与するが⁵¹⁾Gab1はGrb2のSH3と恒常的に結合しており、自己リン酸化されたMetとはGrb2またはShc/Grb2によって間接的に結合する。MetはGab1をリン酸化し、そこにCRK, SHP2, PI-3キナーゼ, PLCγなどが結合してシグナルを伝達する⁵²⁾。一般的にがん細胞の運動、浸潤にはRacが関与するが、HGF刺激によるRacの活性化はCRKをshRNAでノックダウンすると抑制される⁵³⁾。

CRKはリン酸化されたGab1に結合するが、我々はCRKとGab1を過剰発現させるとGab1に著明なチロシンリン酸化が入ることに着目し、CRKはSFTKを介してGab1Y307のチロシンリン酸化を制御することを見出した(図8A)。さらにGab1のY307F変異体では細胞の運動能が低下した⁵⁴⁾。また、興味深いことに、Gab1のY307変異体ではHGFによる細胞膜周辺の著明な細胞接着斑形成が誘導されない⁵⁴⁾(図8B)。

DOCK180：DOCK180はCRKのSH3領域結合タンパク質として同定された分子量180kDaのタンパク質であるが¹⁷⁾、線虫のCed-5、ショウジョウバエのmyoblast cityと相同性があることからCDM (Ced-5, DOCK180, myoblast city) ファミリータンパク質とも総称される(図9)⁵⁵⁾。DOCKファミリーは現在11分子が知られているがDOCK180=DOCK1が原型である。DOCK180はRacに対するGEF活性を有するが従来の典型的なDH領域はもたず、DOCKファミリーに共通してみられるDOCK homology region 1 (DHR1), DHR2をもち、DHR1はPI_{3,4,5}P₃と結合し、DHR2で基質であるRacと結合する。DOCK180はそのC末端にCRK結合ポリプロリン配列を有する。N末端のSH3領域でELMO (engulfment and cell motility) と結合する⁵⁶⁾。Racの活性化の際に、ELMOのPH領域とDock180のDHR2でRacを挟むbipartite GEFモデルが想定されている(図10)。またELMOはインテグリン刺激



ポリプロリン配列

図9 CRKのSH3領域の標的分子C3GとDOCKファミリー分子の概略

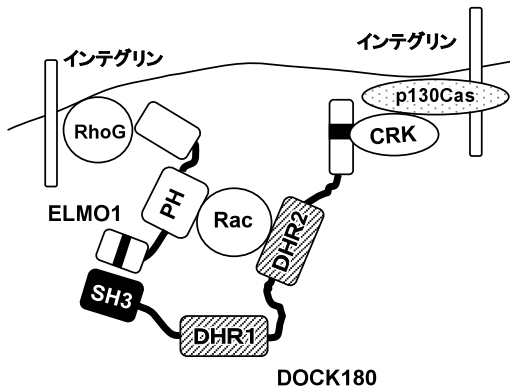


図10 DOCK180とELMO1によるRacのbipartite activation

で活性化されたRhoGと結合する⁵⁷。さらにHckのSH3領域とELMOが結合しELMO自身がチロシンリン酸化を受けDOCK180のGEF活性を制御する⁵⁸。我々も細胞運動を制御するELMOの別のリン酸化部位を同定している(牧野ら, 投稿準備中)。また, DOCK180はユビキチン化を受け, それをELMOが抑制することが*in vitro*で示されているが⁵⁹, このメカニズムが局所のRac活性の制御を行う可能性がある。

ショウジョウバエの卵形成のcollective migration (細胞

集塊状移動)においては, 細胞運動は2期に分けられる。いずれもPDGF, VGF, EGFが作用するが, 初期にはボーター細胞のリーディングエッジにおいてDOCK180/ELMOが必要であり, 後期にはMAPキナーゼとPLC γ が活性化され, phaseによってエフェクターが替わるという興味深い結果である⁶⁰。

DOCKファミリー分子の中で, DOCK2は松田研究室で西原らによってクローニングされた⁶¹。DOCK2はCRK結合プロリン配列を有さないが血球系の細胞においてCRK-Lとbipartiteに結合しRacを活性化する⁶²。実際, ランダム挿入系で樹立されたDOCK2欠損マウスの血球細胞ではケモタキシスが低下することが報告されている⁶³。DOCK3/MOCA (modifier of cell adhesion)は脳に特異的に発現し, アミロイド前駆体物質の代謝に関与し⁶⁴, その変異はマウスにおいて注意欠陥多動(ADH; attention deficit hyperactive disorder)に類似する異常を誘導する。DOCK4は*in vitro*ではRapに対してGEF活性をもち様々なヒトがんで変異があることが知られており, がん抑制遺伝子の候補である⁶⁵。DOCK4はWnt/ β -カテニンシグナルを制御し⁶⁶, またラットの海馬ではCRK-II/ELMO2と複合体を形成し神経細胞の軸索形成に関与することが報告されている⁶⁷。DOCK9/Zizimin1はCdc42とRac2に対するGEF活性を有する⁶⁸。

がんとの関連ではヒト悪性脳腫瘍である膠芽腫において, 腫瘍の浸潤先進部でDOCK180の過剰発現が認められる⁶⁹。

C3G: 分子量140と145kDaの分子としてウエスタンブロット法で認識される¹⁶。C末端にGEF領域をもちRap1およびR-Rasに対するGEF活性を有する。Rap1の下流ではAF6を介してE-カドヘリンに作用することでCRK/C3G/Rap1は細胞接着を制御する⁷⁰。C3Gのノックアウトマウスは胎性7.5日以前で胎性致死であり, マウス胎児線維芽細胞では細胞接着能が低下する⁷¹。

C3GはNIH3T3細胞に強制発現させた場合にはJNKを活性化し形質転換に促進的に作用する⁷²。またJNKの活性化はR-Ras依存性であり⁷³, 特にMetによる線維芽細胞の形質転換ではGab1/CRK複合体形成によるJNKの活性化ががん化に重要である。通常の線維芽細胞はインテグリン刺激下でFAKのリン酸化が起こり, p130Cas/CRK複合体が優位に作用して細胞接着に基づく足場依存性増殖を制御するが, Met発現細胞ではCRKはGabと優位に結合し, 細胞接着斑の数が減少する⁷⁴。p130CasとGab1がシグナルスイッチとして機能するのである。

また, CHO細胞では成長ホルモンGH刺激でp130Cas/CRKがJNKの活性化を誘導する⁷⁵。NIH3T3細胞ではGHによるCRK/C3G依存性のRap1の活性化にはC3Gの

Y504のリン酸化が関与する⁷⁶⁾。さらにメタアンフェタミン投与でp130Cas, CRK, Srcの発現が増加しJNK活性が上がる⁷⁷⁾。CRKによるJNKの制御には様々な役割がある。

C3GのN末端93から205アミノ酸はヒトとショウジョウバエ⁷⁸⁾で保存された領域であり、E-カドヘリンと直接結合する⁷⁹⁾。さらにC3Gの中央部よりN端側にはアポトーシス誘導能があり、Hckと結合するためと報告されている⁸⁰⁾。またドッキング分子Ksr-1を介してPP2Aと結合する⁸¹⁾。

C3Gはこのように細胞接着、増殖、アポトーシスに関与するわけであるが、ヒトがんとの関係は不明な点が多い。肺がんではC3Gの過剰発現があり増殖亢進とされ⁸²⁾、子宮頸がんにおいてはC3Gには変異があり過剰発現でがん化能が低下するとされており⁸³⁾、議論がある。Rap1もRasで形質転換した線維芽細胞のリバートントとして単離されたもの^{84,85)}であるが、Swiss3T3細胞では増殖に正に働くという報告もあり⁷⁶⁾、下流の分子の存在パターンによる違いが表現型の違いに関与すると想定される。

2. CRKの生物学的役割と今後の課題

(1) 増殖、運動、接着

CRKの細胞増殖に対する影響は細胞の種類に依存する。すなわち細胞によってCRK-IとCRK-IIの量や複合体の量が異なる。vCRKとCRK-Iは線維芽細胞の増殖に対しては正に作用するが、これは主としてCRK/Sos/Ras/Erk経路が活性化されるためである⁸⁶⁾。CRK-IIの場合は強制発現で明らかな増殖能の増加はみられずむしろ形態変化、ラッフリングの亢進がみられる²⁴⁾。CRK-IIはリン酸化によりON/OFFの制御を受けその構造変換の際により親和性の高いDOCK180やC3Gが標的としてリクルートされ、CRK-II/DOCK180/RacあるいはCRK-II/C3G/Rap1経路のシグナルが優位に伝達されるためと考えられる²⁴⁾。

DOCK180/Racはラッフリング、フィロポディア形成の亢進と運動能の増加を誘導するが、ラッフリングの亢進が運動能の増加と結び付かない場合もある。さらに、C3G/Rap1は細胞間あるいは細胞-基質間の接着も制御するが、接着を正に制御するということががん化にとってはむしろ抑制的に働くことも考えられる。今後はCRK^{-/-}MEFを使ってCRK-IとCRK-IIの機能を詳細に解析することが求められる。

多くの細胞ではCRK-IIの発現がCRK-Iよりも優位であるが、中にはCRK-Iが優位なものも存在する。ヒトの悪性脳腫瘍組織においては、CRK-Iの発現量と悪性度が正の相関を示すことが報告されている⁸⁷⁾。CRKタンパク質はユビキチン化による分解は知られていないので、mRNAの量で発現が決まるとすれば、スプライシングが腫瘍の悪性化、生命予後を規定することになり、そのメカニズムを

解明していきたい。

CRKに関する最近報告された機能としては以下が挙げられる。uPAR (urokinase plasminogen activator receptor) はインテグリンβ3を介してp130Cas/CRK-II/Racの経路を用いて腫瘍細胞の形態変化を誘導する⁸⁸⁾。また、CRK阻害ExoT ADP-ribosyltransferaseを用いた系においてパキシリン/CRK複合体がシタキシン2を中央体に局在させることが見出され、CRKが細胞質分裂後期に必須の分子であることが示された⁸⁹⁾。

(2) ヒト腫瘍との関連 (表2)

ヒト腫瘍組織でのCRKの過剰発現：我々はヒトCRKのゲノム構造を明らかにし⁹⁰⁾、PCR-SSCP法にて多数のヒトがん腫、肉腫を解析したが変異は検出されなかった。次いで免疫染色法にて様々なヒトの腫瘍組織を検討したところ多くのがんで過剰発現が認められた(図11)⁹⁰⁾。我々の報告に引き続き、肺がん⁹¹⁾、脳腫瘍⁸⁷⁾など様々な腫瘍でCRKの関与が報告された。

CRK shRNAによるがん化能の抑制：CRKががん化に必要な否かを検討するためshRNA法を用いてCRKの発現を恒常的に抑制したヒト腫瘍細胞株を樹立した。卵巣がん(MCAS)、滑膜肉腫(SYO-1, HS-SY-II, FUJI)、脳腫瘍(KM-G4)、中皮腫(MESO1)、いずれの細胞株においても細胞接着斑の数が著明に減少し細胞増殖能、運動能の低下がみられた^{53,92,93)}。またHGF依存性の腫瘍細胞ではHGF刺激によりRac活性が4倍増加するが、CRKノックダウン細胞ではRacの活性化は認めなかった(図12A)。また、卵巣がん細胞では腹膜播種がほぼ完全に抑制され、CRKは腫瘍細胞の悪性化能に必須の分子であることが明らかとなった(図12B)⁹²⁾。

CRKシグナルを考える場合に考慮しなければならないことは、生体にはCRKに類似した別の遺伝子産物CRK-L (CRK-like)が存在し重複性を示すことである。我々が検討した限りのヒト腫瘍細胞株ではCRKとCRK-Lの複合体形成を比較すると、CRK-LによるCRK-L/C3G, CRK-L/DOCK180などの「複合体形成がCRKよりも優位であった。CRK-Lノックダウン細胞の樹立を試みたが確立されず、テトラサイクリン誘導shRNA系を用いたCRK-Lノックダウン誘導系では、約1週間で細胞が浮き上がって死滅する。このことからがんの治療では、CRK-LではなくCRKを標的とすることが適切と思われた。

microRNA126 (miR126)：microRNAは21-25ヌクレオチドの長さで様々な遺伝子発現を制御するが、miR126は9q34.3に位置するEGF like-7遺伝子内にコードされる。最近miR126は乳がんの増殖・転移の抑制分子であることが報告された⁹⁴⁾。また肺がんの非小細胞がんの浸潤も抑制

表2 CRK とヒトがんとの関連の報告

年	がんの種類	方法と結果	文献
2002	がん腫・肉腫多数	肺がん, 乳がん, 胃がん, 軟骨肉腫で免疫染色にて過剰発現を認めた.	Nishihara, H., et al., Cancer Letter
2002	肺腺がん	86 症例 (stage I 67, stage III 19). 4,966 の gene profiling で CRK の発現増加がみられた.	Beer, D. G., et al., Nature Med.
2003	肺腺がん	96 例を gene chip 解析. 103 例 (腺がん 93) の stage I と III を定量的 RT-PCR で比較し stage III で CRK の高発現を認めた.	Miller, C. T., et al., Oncogene
2003	脳腫瘍	5 症例の膠芽腫で RT-PCR で非腫瘍部と腫瘍部を比較する. 5 例ともに CRK の増加がみられた.	Takino, T., et al., Cancer Res.
2003	肺がん	65 例の小細胞がん で 17p13.3 の LOH を検索. CRK の欠損を確認. 但し codon17, 38, 68 は SNPs.	Konichi, H., et al., Oncogene
2005	卵巣がん	MCAS 細胞の shRNA で CRK ノックダウン細胞を樹立. Rac 活性の低下, 増殖, 浸潤能が低下.	Linghu, H., et al., Oncogene
2005	乳がん・肺がん	乳がん細胞 MDA-231, MDA-435, 肺がん細胞 H1299, HeLa 細胞で CRK siRNA で浸潤能低下.	Rodrigues, S.P., et al., Mol. Cancer Res.
2006	滑膜肉腫	FUJI, SYO-1, HS-SY-II 細胞にて shRNA で CRK ノックダウン細胞を樹立. 悪性化能が低下.	Watanabe, T., et al., Mol. Cancer Res.
2007	脳腫瘍	KMG4 細胞にて shRNA で CRK ノックダウン細胞を樹立. 悪性化能が低下.	Wang, L., et al., BBRC
2009	中皮腫	細胞にて shRNA で CRK ノックダウン細胞を樹立. 悪性化能が低下.	Tanino, M., et al., in preparation

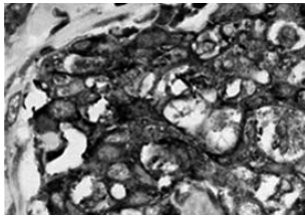


図11 ヒト乳がんでのCRKの過剰発現
抗CRK抗体による浸潤性乳管がんの免疫染色。

し、その時ターゲット分子としてCRKの発現が著明に低下することが報告された⁹⁴⁾。今後miR126をCRKシグナル抑制に応用していきたいと考えている。

(3) 慢性骨髄性白血病 chronic myelogenous leukemia (CML)

CRK-LはCMLの染色体転座の切断点に位置する遺伝子として同定された⁹⁵⁾。CRK-LはCML細胞で著明にチロシンリン酸化されており、またCRK-Lを過剰発現させるとp190Bcr-Ablのがん化能が充進する。しかしながらCRK-L^{-/-}マウスにおいてもBcr-AblによってCMLが誘導されることから、CRK-LはBcr-Ablによるがん化に必要なわけではない⁹⁶⁾。しかし、この場合は通常のCML細胞では非リン酸化状態であるCRK-IIがリン酸化されておりCRK-IIがCRK-Lの機能を代償する可能性が残る。

CMLの治療に関しては、イマチニブはAblキナーゼに対する効果的な阻害薬で臨床の場で繁用されているが、T315Iなどのイマチニブ耐性分子ではキナーゼ活性は阻害されない。CRK-LはBcr-Ablの感度の高い基質であるので、白血病細胞のチロシンリン酸化状態をモニターすることは、イマチニブをはじめ新規薬剤を含めて薬剤有効性の

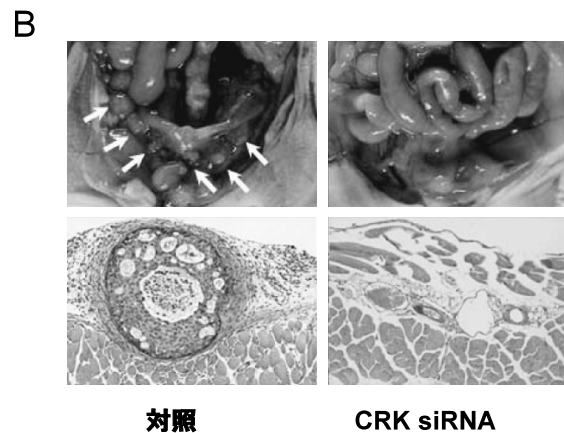
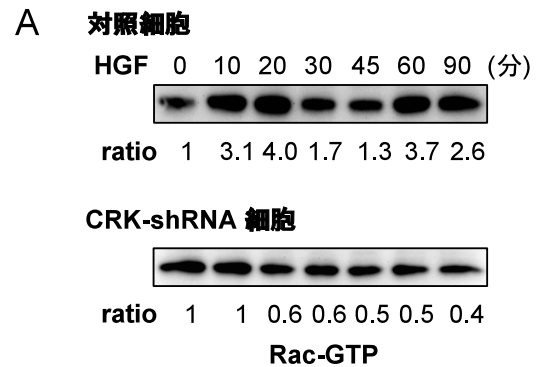


図12 A. ヒト肉腫細胞株におけるHGF刺激によるRacの活性化。野生型FUJI細胞(上段), CRKノックダウンFUJI細胞(下段)。B. ヒト卵巣がんの腹膜播種。野生型MCAS細胞(左), CRKノックダウンMCAS細胞(右)。野生型では腹膜に多数の腫瘍を形成するがCRKノックダウン細胞では見られない。下段はリンパ管侵襲の組織所見。

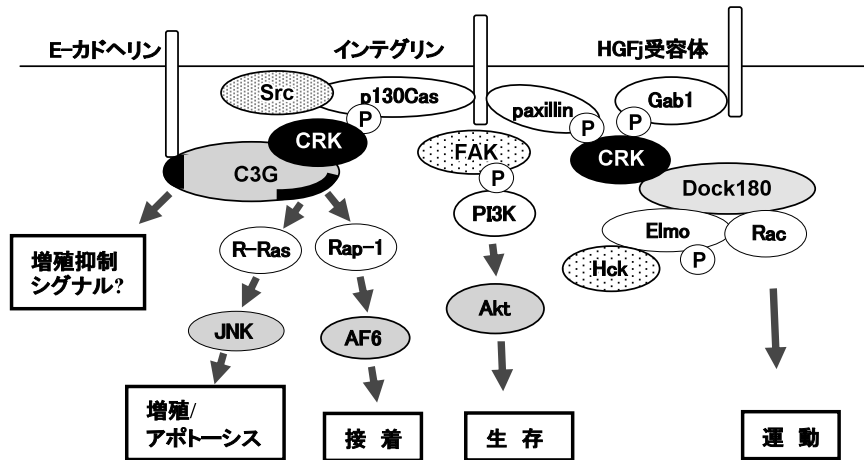


図 13 CRK によるシグナル伝達メカニズムの概要

検査の一つとして有用である。

(4) 食食と免疫系

'98年線虫の食食と運動に必要な Ced-5 が同定されヒト DOCK180 と相同であることが報告された⁹⁷⁾。インテグリン $\alpha v \beta 5$ 依存性の食食が CRK-II/DOCK180/Rac 依存性であることが判明し⁹⁸⁾，その後オプソニンの一つ FMG-E8 依存性の食食も CRK/DOCK180/Rac が関与することが明らかにされた^{99,100)}。最近では，Fc γ 受容体依存性のマクロファージの食食能にも CRK が関与することが報告されている¹⁰¹⁾。

免疫系では T 細胞，B 細胞において，p120Cbl のチロシンリン酸化 pY700，pY704 が CRK 結合部位で，抗原刺激のネガティブシグナルに関与する。T 細胞の特定の抗原に対する反応性の低下（アナジー）は T 細胞受容体/Cbl/CRK/C3G/Rap1 により調節される¹⁰²⁾。また最近 NK 細胞 inhibitory 受容体が MHC class I と結合することで ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) を介して CRK のリン酸化を誘導しシグナルを抑制することが示された⁵⁸⁾。

(5) 神経分化

筆者等は PC12 細胞を用いた実験で CRK が神経分化誘導能を有することを見出したが⁵⁵⁾，その後 vCRK を神経特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは軸索伸長が亢進することが判明した¹⁰³⁾。NGF 受容体/CRK-II/C3G/Rap1/B-Raf1/Erk の経路による ERK の持続的活性化が NGF 依存性の分化誘導であると報告されているが，この C3G/Rap1/B-Raf/Erk 系については議論が多い¹⁰⁴⁾。また大脳皮質の層構造形成や神経線維の走行を制御する分泌タンパク質 Reelin は，VLDL や ApoE 受容体のリガンドで，下流で Disabled-1 (Dab-1) が Src や Fyn によりリン酸化され，

そこに CRK および CRK-L が結合し，C3G/Rap および PI3K/Akt にシグナルが伝達される^{105,106)}。

(6) CRK と感染症

CRK は下記のように様々な微生物と相互作用する。

***Pseudomonas aeruginosa* 緑膿菌**：サイトトキシンである exoenzyme T (ExoT) は CRK の SH2 結合表面に位置するアルギニン R20 を ADP-リボシル化し¹⁰⁷⁾，そのことによって SH2 と標的分子との結合が阻害され細胞運動が抑制される^{107,108)}。

***Yersinia pseudotuberculosis* エルシニア**：エルシニアは菌体の invasin 分子と細胞表面の $\beta 1$ インテグリンが結合し，エンドサイトーシスで細胞内に入るがその時 p130Cas/CRK/Rac 経路が機能する。HeLa 細胞に CRK 変異体を過剰発現させると感染量が減少する¹⁰⁹⁾。

***Shigella flexneri* シゲラ**：シゲラが上皮細胞に入る際にはチロシンキナーゼ Abl と Arg が活性化され CRK-II のチロシンリン酸化が起こる¹¹⁰⁾。また，CRK-II のチロシン変異体ではシゲラの感染効率が減少することから，コルタチンと CRK が協調してアクチン重合を促進することがシゲラの進入に重要であると考えられている¹¹¹⁾。

***Helicobacter pylori* ピロリ菌**：リン酸化された CagA タンパク質と CRK が結合しシグナルを伝達する。胃の上皮細胞において CRK の変異体を過剰発現させることで，あるいは siRNA で CRK を減少させることで，CagA 依存性の細胞スキヤタリング，細胞接着が抑制される¹¹²⁾。

Influenza virus インフルエンザウイルス：CRK は SH3 領域で，スペイン風邪の原因として知られるインフルエンザ H7N3 型および新型インフルエンザ H5N1 型の NS1 タンパク質のアミノ酸 210-219 番のポリプロリン配列に特異的に結合する¹¹³⁾。H1N1 型などの他の病原性が低い株の NS1 タンパク質とは結合しない¹¹³⁾。NS1 タンパク質のリ

ン酸化チロシン pY89 に PI-3 キナーゼがリクルートされ感染細胞の生存能を高めることでウイルス増幅が亢進することが示されているが¹¹⁴⁾、CRK はこの Y89 のリン酸化を誘導する可能性がある。今後、病原性への関与も含めて検討していきたい。

(7) CRK と疾患

CRK ホモ欠失マウスは CRK-I, CRK-II とともに発現せず胎性後期 E15.5 日で致死となり、心血管系と顔面頭蓋部の形成異常をきたす¹¹⁵⁾。ランダム挿入法で CRK-II のみが欠損したマウスは出生するが、生後 0 日で死亡する¹¹⁶⁾。この死因は不明だが病理組織形態的には異常がみられず（未発表）症状からは呼吸器系の異常が推測される。このことから CRK-I は少なくとも胎性期の器官形成に必要であり、CRK-II は生存に適切な機能を獲得することに必要であることがわかる。

一方 CRK-L のホモ欠失マウスは、神経堤障害である DiGeorge 症候群／口蓋心顔面症候群様の症状を呈する。神経堤や心形成に関与する様々な部位に種々の発達障害が起こる¹¹⁷⁾。胸腺、副甲状腺、甲状腺の低形成、頭蓋部の低形成などである。CRK-L ホモ欠失マウスは誕生まで至るものも少数みられる。

最近、ヒト半肢-指趾欠損症である SHFLD syndrome (split-hand/foot malformation) associated with aplasia of long bones の原因遺伝子座が 17p13.1-17p13.3 にマッピングされ CRK が候補遺伝子として挙げられている¹¹⁸⁾。

おわりに

CRK がクローニングされてから 21 年経ち、その研究の過程で各論のみならず、多くの原則の発見がなされた。また、花房秀三郎先生が見出されたこともあり、多くの日本人研究者が関与してきた。CRK は概説したようにがんを中心として様々な生命現象に関わっている。我々は三次元構造を明らかにしたが、重要な研究の方向の一つは、その結果に基づいて CRK シグナルを抑制する低分子化合物を探索していくことである。CRK がその名のとおり基礎医学と臨床医学のアダプター（架け橋）となることを期待したい。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、これまでの研究をご指導戴いた北海道大学長嶋和郎名誉教授、京都大学医学部病理学教授松田道行博士に深謝致します。また CRK の構造解析では北海道大学大学院薬学研究院構造生物学分野稲垣冬彦教授、解析を推進した小橋川敬博博士に感謝致します。また津田真寿美博士をはじめ、実際に研究を一緒に進めてきた北海道大学医学部病理学第二講座の教室員全員に謝意を表

します。

本総説を、執筆中の平成 21 年 3 月 15 日に永眠された恩師ロックフェラー大学名誉教授故花房秀三郎先生に捧げます。

文 献

- Hunter, T. & Simon, J. (2007) *Oncogene*, 26, 1260-1267.
- Turner, B.M. (2002) *Cell*, 111, 285-291.
- Feller, S.M. & Lewitzky, M. (2006) *Curr. Pharm. Des.*, 12, 529-548.
- Weinberg, R.A. (2007) *The Biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Frabcus Group, New York.
- Corner, G.W. (1964) *A History of The Rockefeller Institute 1901-1953 Origins and Growth*. The Rockefeller Institute Press, New York City.
- Kawai, S. & Hanafusa, H. (1972) *Virology*, 49, 37-44.
- Burk, D., Sprince, H., Spangler, J.M., Kabat, E.A., Furth, J., & Claude, A. (1941) *J. Nat. Cancer Inst.*, 2, 201-240.
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M., & Hanafusa, H. (1988) *Nature*, 332, 272-275.
- Mulcahy, L.S., Smith, M.R., & Stacey, D.W. (1985) *Nature*, 313, 241-243.
- Matsuda, M., Mayer, B.J., Fukui, Y., & Hanafusa, H. (1990) *Science*, 248, 1537-1539.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., et al. (1993) *Cell*, 72, 767-778.
- Yaffe, M.B. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3, 177-186.
- Xu, W., Harrison, S.C., & Eck, M.J. (1997) *Nature*, 385, 595-602.
- Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T., & Shibuya, M. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, 12, 3482-3489.
- Tanaka, S., Hattori, S., Kurata, T., Nagashima, K., Fukui, Y., Nakamura, S., & Matsuda, M. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4409-4415.
- Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K., & Matsuda, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3443-3447.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., & Matsuda, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1770-1776.
- Birge, R.B. & Hanafusa, H. (1993) *Science*, 262, 1522-1524.
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y., & Hirai, H. (1994) *EMBO J.*, 13, 3748-3756.
- Birge, R.B., Fajardo, J.E., Reichman, C., Shoelson, S.E., Songyang, Z., Cantley, L.C., & Hanafusa, H. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4648-4656.
- Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S., & Ruoslahti, E. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 2606-2613.
- Feller, S.M., Knudsen, B., & Hanafusa, H. (1994) *EMBO J.*, 13, 2341-2351.
- Feller, S.M. (2001) *Oncogene*, 20, 6348-6371.
- Kobashigawa, Y., Sakai, M., Naito, M., Yokochi, M., Kumeta, H., Makino, Y., Ogura, K., Tanaka, S., & Inagaki, F. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 503-510.
- Abassi, Y.A. & Vuori, K. (2002) *EMBO J.*, 21, 4571-4582.
- Sarkar, P., Reichman, C., Saleh, T., Birge, R.B., & Kalodi-

- mos, C.G. (2007) *Mol. Cell*, **25**, 413–426.
- 27) Wang, L., Sasai, K., Akagi, T., & Tanaka, S. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 392–396.
- 28) Bouton, A.H., Riggins, R.B., & Bruce-Staskal, P.J. (2001) *Oncogene*, **20**, 6448–6458.
- 29) O'Neill, G.M., Fashena, S.J., & Golemis, E.A. (2000) *Trends Cell Biol.*, **10**, 111–119.
- 30) Honda, H., Oda, H., Nakamoto, T., Honda, Z., Sakai, R., Suzuki, T., Saito, T., Nakamura, K., Nakao, K., Ishikawa, T., Katsuki, M., Yazaki, Y., & Hirai, H. (1998) *Nat. Genet.*, **19**, 361–365.
- 31) Sakai, R., Nakamoto, T., Ozawa, K., Aizawa, S., & Hirai, H. (1997) *Oncogene*, **14**, 1419–1426.
- 32) Li, L., Okura, M., & Imamoto, A. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1203–1217.
- 33) Tazaki, T., Miyazaki, K., Hiyama, E., Nakamoto, T., Sakai, R., Yamasaki, N., Honda, Z., Noda, M., Miyasaka, N., Sueda, T., & Honda, H. (2008) *Genes Cells*, **13**, 145–157.
- 34) Akagi, T., Shishido, T., Murata, K., & Hanafusa, H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7290–7295.
- 35) Iwahara, T., Akagi, T., Fujitsuka, Y., & Hanafusa, H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17693–17698.
- 36) Gustavsson, A., Yuan, M., & Fallmann, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 22893–22901.
- 37) Gu, J., Sumida, Y., Sanzen, N., & Sekiguchi, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27090–27097.
- 38) Sung, B.H., Yeo, M.G., Oh, H.J., & Song, W.K. (2008) *Mol. Cell*, **25**, 131–137.
- 39) Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., & Sheetz, M.P. (2006) *Cell*, **127**, 1015–1026.
- 40) Brinkman, A., van der Flier, S., Kok, E.M., & Dorssers, L.C. (2000) *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 112–120.
- 41) Dorssers, L.C., Grebenchtchikov, N., Brinkman, A., Look, M. P., van Broekhoven, S.P., de Jong, D., Peters, H.A., Portengen, H., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G., van Tienoven, D.T., Geurts-Moespot, A., Span, P.N., Foekens, J.A., & Sweep, F.C. (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**, 6194–6202.
- 42) Deakin, N.O. & Turner, C.E. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 2435–2444.
- 43) Brown, M.C. & Turner, C.E. (2004) *Physiol. Reviews*, **84**, 1315–1339.
- 44) Nayal, A., Webb, D.J., Brown, C.M., Schaefer, E.M., Vicente-Manzanares, M., & Horwitz, A.R. (2006) *J. Cell Biol.*, **173**, 587–589.
- 45) Nishiya, N., Kiesses, W.B., Han, J., & Ginsberg, M.H. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 343–352.
- 46) Bertolucci, C.M., Guibao, C.D., & Zheng, J.J. (2008) *Biochemistry*, **47**, 548–554.
- 47) Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Chan, J.R., Okada, A., Tomooka, Y., Hisanaga, S., & Tanoue, A. (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 4355–4366.
- 48) Vinkenoog, R., Speranca, M.A., Ramesar, J., Thomas, A.W., del Portillo, H.A., Janse, C.J., & Waters, A.P. (1998) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **95**, 229–240.
- 49) Jamieson, J.S., Tumbarello, D.A., Halle, M., Brown, M.C., Tremblay, M.L., & Turner, C.E. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 5835–5847.
- 50) Gotoh, N., Toyoda, M., & Shibuya, M. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1824–1831.
- 51) Boccaccio, C. & Comoglio, P.M. (2006) *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 637–645.
- 52) Furge, K.A., Zhang, Y.W., & Vande Woude, G.F. (2000) *Oncogene*, **19**, 5582–5589.
- 53) Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Ichihara, S., Sawa, H., Minami, A., Mochizuki, N., Nagashima, K., & Tanaka, S. (2006) *Mol. Cancer Res.*, **4**, 499–510.
- 54) Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Konstantinou, T., Nishihara, H., Majima, T., Minami, A., Feller, S.M., & Tanaka, S. (2009) *Cell Res.*, (in press).
- 55) Cote, J.F. & Vuori, K. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 4901–4913.
- 56) Gumieny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemerget, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M.O., & Ravichandran, K.S. (2001) *Cell*, **107**, 27–41.
- 57) Katoh, H. & Negishi, M. (2003) *Nature*, **424**, 461–464.
- 58) Yokoyama, N., deBakker, C.D., Zappacosta, F., Huddleston, M.J., Annan, R.S., Ravichandran, K.S., & Miller, W.T. (2005) *Biochemistry*, **44**, 8841–8849.
- 59) Makino, Y., Tsuda, M., Ichihara, S., Watanabe, T., Sakai, M., Sawa, H., Nagashima, K., Hatakeyama, S., & Tanaka, S. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 923–932.
- 60) Bianco, A., Poukkula, M., Cliffe, A., Mathieu, J., Luque, C. M., Fulga, T.A., & Rorth, P. (2007) *Nature*, **448**, 362–365.
- 61) Nishihara, H., Kobayashi, S., Hashimoto, Y., Ohba, F., Mochizuki, N., Kurata, T., Nagashima, K., & Matsuda, M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1452**, 179–187.
- 62) Nishihara, H., Maeda, M., Oda, A., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., & Tanaka, S. (2002) *Blood*, **100**, 3968–3974.
- 63) Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., & Sasazuki, T. (2001) *Nature*, **412**, 826–831.
- 64) Kashiwa, A., Yoshida, H., Lee, S., Paladino, T., Liu, Y., Chen, Q., Dargusch, R., Schubert, D., & Kimura, H. (2000) *J. Neurochem.*, **75**, 109–116.
- 65) Yajnik, V., Paulding, C., Sordella, R., McClatchey, A.I., Saito, M., Wahrer, D.C., Reynolds, P., Bell, D.W., Lake, R., van den Heuvel, S., Settleman, J., & Haber, D.A. (2003) *Cell*, **112**, 673–684.
- 66) Upadhyay, G., Goessling, W., North, T.E., Xavier, R., Zon, L. I., & Yajnik, V. (2008) *Oncogene*, **27**, 5845–5855.
- 67) Ueda, S., Fujimoto, S., Hiramoto, K., Negishi, M., & Katoh, H. (2008) *J. Neurosci. Res.*, **86**, 3052–3061.
- 68) Kwofie, M.A. & Skowronski, J. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 3088–3096.
- 69) Jarzynka, M.J., Hu, B., Hui, K.M., Bar-Joseph, I., Gu, W., Hirose, T., Haney, L.B., Ravichandran, K.S., Nishikawa, R., & Cheng, S.Y. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 7203–7211.
- 70) Kooistra, M.R., Dube, N., & Bos, J.L. (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 17–22.
- 71) Ohba, Y., Ikuta, K., Ogura, A., Matsuda, J., Mochizuki, N., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mayer, B.J., Maki, K., Miyazaki, J., & Matsuda, M. (2001) *EMBO J.*, **20**, 3333–3341.
- 72) Tanaka, S., Ouchi, T., & Hanafusa, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2356–2361.
- 73) Mochizuki, N., Ohba, Y., Kobayashi, S., Otsuka, N., Graybiel, A.M., Tanaka, S., & Matsuda, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 12667–12671.
- 74) Lamorte, L., Royal, I., Naujokas, M., & Park, M. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1449–1461.
- 75) Zhu, T., Goh, E.L., LeRoith, D., & Lobie, P.E. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 33864–33875.
- 76) Ling, L., Zhu, T., & Lobie, P.E. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**,

- 27301-27311.
- 77) Jayanthi, S., McCoy, M.T., Ladenheim, B., Cadet, J.L. (2002) *Mol. Pharmacol.*, **61**, 1124-1131.
- 78) Ishimaru, S., Williams, R., Clark, E., Hanafusa, H., & Gaul, U. (1999) *EMBO J.*, **18**, 145-155.
- 79) Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M., Birchmeier, W., & Fujita, Y. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 6690-6700.
- 80) Shivakrupa, R., Radha, V., Sudhakar, C., & Swarup, G. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 52188-52194.
- 81) Martin-Encabo, S., Santos, E., & Guerrero, I. (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 3881-3891.
- 82) Hirata, T., Nagai, H., Koizumi, K., Okino, K., Harada, A., Onda, M., Nagahata, T., Mikami, I., Hirai, K., Haraguchi, S., Jin, E., Kawanami, O., Shimizu, K., & Emi, M. (2004) *J. Hum. Genetics*, **49**, 290-295.
- 83) Okino, K., Nagai, H., Nakayama, H., Doi, D., Yoneyama, K., Konishi, H., & Takeshita, T. (2006) *Int. J. Gynecol. Cancer*, **16**, 763-771.
- 84) Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., & Noda, M. (1989) *Cell*, **56**, 77-84.
- 85) Yoshida, Y., Kawata, M., Miura, Y., Musha, T., Sasaki, T., Kikuchi, A., & Takai, Y. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3407-3414.
- 86) Greulich, H. & Hanafusa, H. (1996) *Cell Growth Differ*, **7**, 1443-1451.
- 87) Takino, T., Nakada, M., Miyamori, H., Yamashita, J., Yamada, K.M., & Sato, H. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 2335-2337.
- 88) Smith, H.W., Marra, P., & Marshall, C.J. (2008) *J. Cell Biol.*, **182**, 777-790.
- 89) Shafikhani, S.H., Mostov, K., & Engel, J. (2008) *Cell Cycle (Georgetown, Tex)*, **7**, 2868-2876.
- 90) Nishihara, H., Tanaka, S., Tsuda, M., Oikawa, S., Maeda, M., Shimizu, M., Shinomiya, H., Tanigami, A., Sawa, H., & Nagashima, K. (2002) *Cancer Lett.*, **180**, 55-61.
- 91) Miller, C.T., Chen, G., Gharib, T.G., Wang, H., Thomas, D. G., Misek, D.E., Giordano, T.J., Yee, J., Orringer, M.B., Hanash, S.M., & Beer, D.G. (2003) *Oncogene*, **22**, 7950-7957.
- 92) Linghu, H., Tsuda, M., Makino, Y., Sakai, M., Watanabe, T., Ichihara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Mochizuki, N., & Tanaka, S. (2006) *Oncogene*, **25**, 3547-3556.
- 93) Wang, L., Tabu, K., Kimura, T., Tsuda, M., Linghu, H., Tani-no, M., Kaneko, S., Nishihara, H., & Tanaka, S. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 976-981.
- 94) Crawford, M., Brawner, E., Batte, K., Yu, L., Hunter, M.G., Otterson, G.A., Nuovo, G., Marsh, C.B., & Nana-Sinkam, S. P. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 607-612.
- 95) ten Hoeve, J., Morris, C., Heisterkamp, N., & Groffen, J. (1993) *Oncogene*, **8**, 2469-2474.
- 96) Hemmeryckx, B., Reichert, A., Watanabe, M., Kaartinen, V., de Jong, R., Pattengale, P.K., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2002) *Oncogene*, **21**, 3225-3231.
- 97) Reddien, P.W. & Horvitz, H.R. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**, 131-136.
- 98) Albert, M.L., Kim, J.I., & Birge, R.B. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**, 899-905.
- 99) Akakura, S., Singh, S., Spataro, M., Akakura, R., Kim, J.I., Albert, M.L., & Birge, R.B. (2004) *Exp. Cell Res.*, **292**, 403-416.
- 100) Wu, Y., Singh, S., Georgescu, M.M., & Birge, R.B. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 539-553.
- 101) Lee, W.L., Cosio, G., Ireton, K., & Grinstein, S. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 11135-11143.
- 102) Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D. L., & Nadler, L.M. (1997) *Science*, **278**, 124-128.
- 103) Weinstein, D.E., Dobrenis, K., & Birge, R.B. (1999) *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **116**, 29-39.
- 104) York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., & Stork, P.J. (1998) *Nature*, **392**, 622-626.
- 105) Ballif, B.A., Arnaud, L., Arthur, W.T., Guris, D., Imamoto, A., & Cooper, J.A. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 606-610.
- 106) Park, T.J. & Curran, T. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 13551-13562.
- 107) Sun, J. & Barbieri, J.T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 32794-32800.
- 108) Deng, Q., Sun, J., & Barbieri, J.T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 35953-35960.
- 109) Weidow, C.L., Black, D.S., Bliska, J.B., & Bouton, A.H. (2000) *Cell Microbiol.*, **2**, 549-560.
- 110) Burton, E.A., Plattner, R., & Pendergast, A.M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 5471-5479.
- 111) Bougneres, L., Girardin, S.E., Weed, S.A., Karginov, A.V., Olivo-Marin J.C., Parsons, J.T., Sansonetti, P.J., & Van Nhieu, G.T. (2004) *J. Cell Biol.*, **166**, 225-235.
- 112) Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T., & Sasakawa, C. (2005) *J. Exp. Med.*, **202**, 1235-1247.
- 113) Heikkinen, L.S., Kazlauskas, A., Melen, K., Wagner, R., Ziegler, T., Julkunen, I., & Saksela, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 5719-5727.
- 114) Hale, B.G., Batty, I.H., Downes, C.P., & Randall, R.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 1372-1380.
- 115) Park, T.J., Boyd, K., & Curran, T. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 6272-6282.
- 116) Imaizumi, T., Araki, K., Miura, K., Araki, M., Suzuki, M., Terasaki, H., & Yamamura, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 569-574.
- 117) Guris, D.L., Fantes, J., Tara, D., Druker, B.J., & Imamoto, A. (2001) *Nat. Genet.*, **27**, 293-298.
- 118) Lezirovitz, K., Maestrelli, S.R., Cotrim, N.H., Otto, P.A., Pearson, P.L., & Mingroni-Netto, R.C. (2008) *Hum. Genetics*, **123**, 625-631.