



# Expression of a Kinase—Defective Eph—like Receptor in the Normal Human Brain

松岡, 広

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1814

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001814>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



|            |   |
|------------|---|
| 氏名・(本籍)    | まつ 松 岡 ひろし 広 (兵庫県)  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 博い第1161号  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位授与の日付    | 平成10年3月31日  |
| 学位論文題目     | Expression of a Kinase-Defective Eph-like Receptor<br>in the Normal Human Brain<br>(ヒト正常組織に発現するキナーゼ活性欠損型新規増殖<br>因子受容体のクローニング) |
| 審査委員       | 主査 教授 千 原 和 夫<br>教授 春 日 雅 人 教授 片 岡 徹  |

## 論文内容の要旨

### 【緒 言】

私達は、造血細胞の分化・増殖に関与する未知の機能分子の探索において、キナーゼ活性を欠如する新しい増殖因子型受容体を発見した。増殖因子型受容体(受容体型チロシンキナーゼ)は細胞内によく保存されたキナーゼ領域を持つが、この領域中にキナーゼ活性に必須とされる不変なアミノ酸残基が存在している。私達は、ヒト正常血液及び脳由来cDNAライブラリーより、10個の不変アミノ酸残基のうち6個に置換が見られる新規*Eph*ファミリー受容体遺伝子-HEPと命名-を単離し、その遺伝子産物がキナーゼ活性を欠如することを証明した。これまでキナーゼ活性を欠如する増殖因子型受容体のほとんどは疾患を引き起こす変異受容体として報告されてきたが、HEPはヒト正常血液細胞及び脳に強い発現がみられた。

### 【実験材料および方法】

#### 1) HEP cDNAのクローニング

ヒト正常血液及び脳由来cDNAライブラリーを、*Eph*ファミリー受容体型チロシンキナーゼの一つであるHTKのキナーゼ領域をプローブとしてlow stringency hybridization法によりスクリーニングし、全長cDNAクローンを含む5個のHEP cDNAオーバーラップクローンを得た。

#### 2) CHO-K1細胞におけるHEPの強制発現

HEPの全長cDNAを発現ベクターに挿入しChen-Okayama法によりCHO-K1細胞に導入・発現した。さらに二つのキメラcDNA-*c-fms*受容体の細胞外領域に、HEPもしくはHTKの細胞内領域を結合(FMS/HEP及びFMS/HTK)-を作製し同様にCHO-K1細胞に導入・発現した。また、*c-fms*受容体の全長cDNAを同様にCHO-K1細胞に導入・発現した。

#### 3) 免疫ブロット法によるHEP蛋白発現の解析

抗HEP抗血清は、HEP cDNAより推定されるC末端19アミノ酸のペプチドを合成し、これを家兎に免疫して作製した。CHO-K1細胞等より調整した細胞可溶性分画ないしは上記抗血清を用いた免疫

沈降物を、SDSポリアクリルアミド電気泳動にて展開し、PVDF膜に転写後、免疫ブロットを行った。

#### 4) *in vitro*キナーゼ・アッセイ

CHO-K1細胞に発現させ免疫沈降法にて精製した3種類の受容体（FMS/HEPキメラ受容体、FMS/HTKキメラ受容体、FMS受容体）蛋白を、M-CSF添加ないしは非添加の条件下でキナーゼバッファー中でインキュベートした。その後、抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体を用いた免疫ブロットを行い、受容体自己リン酸化の有無を検出した。

#### 5) 染色体マッピング

ヒト末梢血リンパ球染色体を用い、HEP cDNAをプローブとしてfluorescence *in situ* hybridization (FISH)を行い、染色体マッピングを行った。

### 【結 果】

#### 1) HEPの一次構造

ホモロジー解析において、HEPの一次構造はEphファミリー受容体型チロシンキナーゼと高い相溶性（CEK9と59%）を示した。細胞外領域にはEphファミリーに特徴的な構造（多システイン領域、フィブロネクチンⅢ様領域）を、細胞内によく保存されたキナーゼ領域をもっていた。しかし、キナーゼ活性に重要とされる10個の不変アミノ酸のうち6個に置換が見られた。すなわち、HEP細胞内領域では蛋白リン酸化酵素（キナーゼ）に特徴的なアミノ酸配列がよく保存されているにも関わらず、キナーゼ活性に必須のATP結合部位のリジンはグルタミンに、リン酸転送部位のアスパラギン酸はセリンに置換されている。同様に、キナーゼ領域サブドメインⅢおよびⅥの不変アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギンはそれぞれアルギニン、セリンへ置換され、いわゆるDFGモチーフもRLG（アルギニン、ロイシン、グリシン）となっている。この塩基配列より予想されるアミノ酸置換は、ヒト正常血液・脳・脾細胞由来の複数個のHEP cDNAクローン、ヒト正常ゲノムDNAクローンにおいて同様に証明された。

#### 2) *in vitro*キナーゼ・アッセイ

FMS/HTKキメラ受容体、FMS受容体においては、ATP存在下で明らかな受容体チロシン残基の自己リン酸化が観察されたが、FMS/HEPキメラ受容体では受容体リン酸化は見られなかった。さらにFMS受容体においてはM-CSF添加により受容体リン酸化の増強が認められた。

#### 3) ヒト正常組織におけるHEPの発現

RNAブロット法により、ヒト正常組織において4.0kbのHEP遺伝子転写産物の発現が認められた。HEP遺伝子転写産物は脳と脾臓に強く発現し、心臓、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓ではごく弱く発現していた。抗HEP抗血清を用いた免疫ブロット法により、ヒト正常脳において135kDaのHEP蛋白の強い発現が観察された。

#### 4) 染色体マッピング

FISH法によりHEP遺伝子はヒト染色体7q33→q35上にマップされた。

### 【考 察】

キナーゼ領域中のよく保存されたアミノ酸配列はキナーゼ活性にとって重要な役割を担っている。HEPにおいてグルタミンに置換しているATPや結合部位のリジンは、キナーゼ活性にとって必須であることが示されてきた。v-Src, v-Mos, v-Fps, EGF受容体、インスリン受容体やPDGFβ型受容体では、ATP結合部位のリジンに対して部位特異的点突然変異を導入するとチロシンキナーゼ活

性が消失する (Hanks et al., 1988)。同様に, HEPにおいてセリンに置換しているリン酸転送部位のアスパラギン酸は既知のすべての蛋白リン酸化酵素 (キナーゼ) で不変とされている。このリン酸転送部位のアスパラギン酸がアスパラギンに置換している *c-kit* 受容体の W<sup>42</sup> 型変異においては *c-kit* 受容体のリガンド依存性自己リン酸化は消失している (Tan et al., 1990)。そこで私達は HEP 受容体の内因性チロシンキナーゼ活性について *in vitro* キナーゼ・アッセイにより検討した。HEP 特異的リガンドはまだ不明なので, *c-fms* 受容体のリガンド結合領域を持つキメラ受容体を作製し用いた。FMS/HEP キメラ受容体では M-CSF 存在下にもチロシンリン酸化は認められず, HEP は内因性チロシンキナーゼ活性を欠如しているものと考えられた。

キナーゼ領域中の不変アミノ酸残基における点突然変異はヒトの病気や変異マウスの原因となりうる。例えば, ある種の糖尿病ではインスリン受容体遺伝子のキナーゼ領域中の不変アミノ酸残基における点突然変異が見られる。限局性白斑症や W<sup>42</sup> 変異マウスは, 不変アミノ酸残基における点突然変異によりキナーゼ活性を欠如する *c-kit* 受容体により引き起こされることが報告されている。このように, キナーゼ活性を欠如する増殖因子型受容体は異常を引き起こす変異受容体として一般的に報告されてきた。

しかし, 私達は HEP 蛋白の強い発現をヒト正常組織中に見出した。これは, HEP が, 内因性チロシンキナーゼ活性を欠如するにもかかわらず, 生理的機能を担っている可能性を強く示唆する。

キナーゼ活性を欠如しヒト正常組織に発現する新しい増殖因子型受容体の発見は, 増殖因子型受容体による血液・神経細胞の増殖・分化の分子機構に新しい知見を与えるものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

造血幹細胞は自己複製能を持つ正常細胞であるがその増殖に関与する機能分子は不明のままである。申請者達は造血幹細胞の分化・増殖に関与する未知の機能分子を単離する目的でヒト正常血液細胞由来 cDNA ライブラリーを Eph ファミリー受容体型チロシンキナーゼの一つである Htk のキナーゼ領域をプローブとして low stringency hybridization 法によりスクリーニングし, human kinase-defective Eph-family receptor protein (HEP) と申請者達が命名した新奇な増殖因子型受容体を見出した。HEP の一次構造は Eph ファミリー受容体型チロシンキナーゼと相同性を示し, 細胞外領域には Eph ファミリーに特徴的な多システイン領域, ファブロネクチン III 様領域を持ち, 細胞内にはよく保存されたキナーゼ領域を持っていた。しかしキナーゼ活性に重要とされる 10 個の不変アミノ酸のうち 6 個に置換が見られ, HEP 内因性チロシンキナーゼ活性を欠く可能性が考えられた。その可能性を証明するために HEP あるいは HTK の細胞内領域を *c-fms* 受容体の細胞外領域と結合させたキメラ cDNA を作製し CHO-K1 細胞に導入, 発現させた。FMS/HTK キメラ受容体では ATP 存在下で明らかな受容体チロシン残基の自己リン酸化が観察されたが FMS/HEP キメラ受容体では受容体リン酸化は見られなかった。RNA ブロット法でヒト正常組織において 4.0 kb の HEP 遺伝子転写産物の発現が認められ, 特に脳と脾臓に強く発現し, 心臓, 肺, 胎盤, 肝臓, 骨格筋, 腎臓には弱く発現していた。HEP cDNA より推定される C 末端 19 アミノ酸のペプチドに対して作製した抗 HEP 抗血清を用いた免疫ブロットにより, ヒト正常脳において 135 kDa の HEP 蛋白の強い発現が観察された。ヒト末梢地リンパ球染色体を用い, HEP cDNA をプローブとして fluorescence in situ hybridization (FISH) を行ったところ HEP 遺伝子はヒト染色体 7q33→q35 上にマップされた。増殖因子型受容体は細胞内によく保存されたキナーゼ領域を持ち, その領域中にはキナーゼ活性に必須とされる不変なア

ミノ酸残基が存在している。一般的にこれらのキナーゼ領域中の不変アミノ酸残基における点突然変異はヒトの病気や変異マウスの原因となりうる。例えば、ある種の糖尿病ではインスリン受容体遺伝子のキナーゼ領域中の不変アミノ酸残基における点突然変異が見られる。限局性白斑症や $W^{42}$ 変異マウスは、不変アミノ酸残基における点突然変異によるキナーゼ活性を欠如するc-*kit*受容体により引き起こされることが報告されている。このように、キナーゼ活性を欠如する増殖因子型受容体は異常を引き起こす変異受容体として一般的に報告されてきた。しかし、申請者達はHEP蛋白の強い発現をヒト正常組織中に見出した。これは、HEPが、内因性チロシンキナーゼ活性を欠如するにもかかわらず、生理的機能を担っている可能性を強く示唆するが、具体的なevidenceは現在のところまだ皆無であり今後の研究が必要である。以上、本研究は、造血幹細胞の増殖・複製に関与する機能分子を探索する過程で内因性チロシンキナーゼ活性を欠如する新奇な増殖因子型受容体HEPを発見し、血液・神経細胞の増殖・分化の分子機構の解明に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。