

## 線維芽細胞増殖因子レセプター 1 アイソフォームによる 細胞増殖および神経分化誘導とシグナル伝達

新 田 政 弘  
瀬 尾 美 鈴

(平成 16 年 9 月 13 日提出)  
(平成 16 年 12 月 10 日修正)

### 要 旨

線維芽細胞増殖因子 (FGF) の作用は細胞特異的であり, FGF は線維芽細胞のみならず筋芽細胞の増殖を促進し, 神経細胞においては分化と増殖停止を誘導することが知られている. 標的細胞の FGF に対する感受性は FGF レセプター (FGFR) の発現に依存している. FGFR は 4 種類の異なる遺伝子が存在し, 選択的スプライシングによりさらに多くのアイソフォームを生じる. FGFR は細胞外に 3 個の免疫グロブリン様ドメイン (Ig) を持つチロシンキナーゼ型レセプターである. FGFR1 には Ig1 部位 (N 末端側の Ig) の欠損している FGFR1S と欠損していない FGFR1L が存在しているが, 現在までにその機能の違いは明らかにされていない. Ig1 部位の有無が FGFR1 のリガンドとの結合特異性や, その他の因子による活性調節, また立体構造の変化によるシグナル伝達能に大きな影響を与えているのではないかと予想された. そこで著者らはそれぞれの FGFR1 アイソフォームを安定発現させたクローンをを用いて, FGF 刺激による細胞増殖能, 分化能などの機能を解析した.

ラット筋芽細胞 L6 に, FGFR1S または FGFR1Sm を安定発現させると, どちらも FGF 刺激により細胞増殖を促進した. しかし, FGFR1Sm の変異は L6 細胞において N 型糖鎖修飾に影響し, FGF 特異性に違いが生じることが示唆された. さらに L6 細胞ではヘパリンを添加すると FGF による細胞増殖促進効果が抑制されることが分かった. 次に, FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm を安定発現させた Ba/F3 細胞では, ヘパリンを添加したときのみ FGF による細胞増殖の促進効果が得られた. プロテインキナーゼ阻害剤を用いて細胞内シグナル伝達経路を抑制した結果から, FGFR1 アイソフォームによる Ba/F3 細胞増殖の誘導には Ras-MAP キナーゼ経路と Src キナーゼの活性が重要であることが示された. また, FGFR1S は JAK2 キナーゼと PI3 キナーゼ阻害剤により細胞増殖が完全に抑制されるが, FGFR1L と FGFR1Sm はより耐性であることが示された. これらの結果から, FGFR1 アイソフォームにより活性化する細胞内シグナル伝達経路に違いがあることが示唆された.

FGFR アイソフォームを発現した PC12 細胞は, FGF 刺激により神経突起伸長が誘導された. 親株の PC12 細胞では FGF 刺激によって細胞増殖速度が低下し, 神経突起が伸長した. しかし, これらのクローンでは対照の細胞でみられる FGF 刺激による細胞増殖の阻害は起こらなかった. 特に FGFR1Sm 発現細胞では FGF 刺激後 3 日間は増殖の促進効果が見られた. FGFR1 シグナル伝達経路を調べた結果, すべての FGFR1 発現クローンにおいて FRS2, MAP キナーゼが FGF 刺激により強く活性化されていた. 特に FGFR1Sm では強い FRS2 のチロシンリン酸化と 98 kDa タンパク質のチロシンリン酸化が認められた. これらの結果より FGFR1Sm の変異は FRS2 やその他のシグナル伝達経路の活性化を惹起し, その結果 FGFR1S や FGFR1L より強く神経突起伸長と細胞増殖が促進されることが示唆された.

以上, 本研究で Ig1 の選択的スプライシングにより生じる FGFR1L と FGFR1S を発現している細胞では, FGF 感受性が異なっていることが示された. また Ig1 の有無は細胞内シグナル伝

達経路に違いを生じさせ、FGF による細胞増殖や分化誘導に異なる作用を及ぼすことが明らかになった。

キーワード：線維芽細胞増殖因子レセプター 1，選択的スプライシング，細胞増殖，神経分化，細胞内シグナル伝達

## 目 次

1. 序論
2. 略語表
3. 材料と方法
  - 3.1 材料
  - 3.2 FGFR1 発現プラスミドの構築
  - 3.3 哺乳動物細胞における FGFR1 アイソフォームの発現
    - 3.3.1 細胞培養
    - 3.3.2 FGFR1 アイソフォームの安定発現
    - 3.3.3 <sup>3</sup>H-チミジン取り込み分析
    - 3.3.4 細胞増殖の測定
    - 3.3.5 細胞増殖におよぼすキナーゼ阻害剤の影響
    - 3.3.6 FGFR1 タンパク質発現の解析
    - 3.3.7 FGFR1 自己リン酸化と細胞内シグナル伝達タンパク質の解析
    - 3.3.8 免疫沈降
    - 3.3.9 ウェスタンブロットティング
    - 3.3.10 N-グリコシダーゼ F/エンドグリコシダーゼ F 処理
    - 3.3.11 神経突起の伸長の測定
  - 3.4 プライマー表
4. 結果
  - 4.1 L6 細胞における FGFR1S と FGFR1Sm の機能解析
    - 4.1.1 FGFR1 アイソフォーム
    - 4.1.2 L6 細胞における FGFR1S と FGFR1Sm の安定発現
    - 4.1.3 FGF による L6 細胞増殖促進効果
  - 4.2 Ba/F3 細胞における FGFR1 アイソフォームの機能解析
    - 4.2.1 Ba/F3 細胞における FGFR1 アイソフォームの安定発現
    - 4.2.2 FGF による Ba/F3 細胞増殖促進効果

#### 4.2.3 Ba/F3 細胞増殖に与えるプロテインキナーゼ阻害剤の影響

### 4.3 PC12 細胞における FGFR1 アイソフォームの機能解析

#### 4.3.1 PC12 細胞における FGFR1 アイソフォームの安定発現

#### 4.3.2 細胞増殖と神経突起伸長に対する FGF の効果

#### 4.3.3 FGFR1 アイソフォームからのシグナル伝達

## 5. 考察

### 謝辞

### 参考文献

## 1. 序 論

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) は、線維芽細胞や血管内皮細胞に作用するとその増殖を促進し、神経前駆細胞に作用すると分化を誘導し増殖を停止させる [1]。すなわち、FGF の作用は細胞によって変わると言えるがこの機構は明らかにされていない。FGF の作用は標的細胞に発現する受容体 FGFR の活性化に依存する。FGFR は 4 種類の遺伝子が同定され、遺伝子ファミリーを形成している [2]。細胞特異的な FGF の作用発現のためにはそれぞれ異なるシグナル伝達を担う FGFR が存在し、ある受容体は細胞増殖を促進し、ある受容体は細胞分化と増殖抑制シグナルを伝達することが知られている。また、現在までに同定されている 20 種類の FGF [3] に 4 種類の FGFR がどのように対応しているかに興味を持たれる。

FGFR はいずれもが細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域からなる 1 回膜貫通チロシンキナーゼ型受容体である [2]。細胞外領域には 3 個の免疫グロブリン様ドメイン (Ig) が存在し、N 末端側の最初の Ig 様ドメイン (IgI) と 2 番目の Ig 様ドメイン (IgII) の間には 8 個の酸性アミノ酸からなるアシッドボックスが存在している。また 3 番目の Ig 様ドメイン (IgIII) は FGFR1、FGFR2、FGFR3 では遺伝子上に 3 種類のエキソン (IIIa, IIIb, IIIc) が存在している [4-6]。IIIa は 3 番目の Ig 様ドメインの N 末端側半分をコードし、IIIb と IIIc は C 末端側半分をコードしているが、IIIb と IIIc は細胞特異的な選択的スプライシングが起こることによってリガンド特異性に大きく影響を及ぼすことが報告されている [6,7]。細胞膜貫通領域は疎水性アミノ酸によって構成され、細胞内領域はチロシンキナーゼドメインとチロシンキナーゼ挿入ドメインより構成されている。

FGFR は選択的スプライシングにより多くのアイソフォームが生じる [2,8]。FGFR1 では上述の IgIII における IIIb 型と IIIc 型だけでなく [9]、IgI でも選択的スプライシングが起こり、IgI 欠損型 FGFR1 (FGFR1S) と欠損していない完全型 FGFR1 (FGFR1L) が存在する [10]。FGFR1L と FGFR1S は神経上皮細胞、線維芽細胞、心臓や筋肉では共に発現しているが、発生段階の脳では FGFR1L が主として発現している [11]。以前、著者らは *in vitro* の神経細胞モデル系としてよ

く用いられるラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞では、主に FGFR1L が発現しており、FGF による神経細胞への分化誘導にともなって FGFR1S の発現が低下することを示した [12]。逆に、ヒトアストロサイトーマの悪性化にともなって FGFR1S の発現が増加することが報告されている [13]。これらの研究から、FGFR1L は神経細胞への分化誘導に関与し、FGFR1S は細胞増殖に関与しているのではないかと推測された。また FGFR1 の主要なアイソフォームを全て遺伝子破壊したノックアウトマウスを作成すると、胚形成期において重度の増殖遅延と中胚葉構造の欠損が起こり原腸胚形成期に死亡するが、FGFR1L のみ選択的に遺伝子破壊すると後部胚形成のみに異常をきたした。これらの結果から、FGF/FGFR1L シグナルはマウス形態形成において後部側形成因子として作用することが報告された [14-17]。これらの研究からも示されるように、IgI 部位の有無は FGFR の機能に強く影響する可能性が考えられる。

本研究において、著者らは線維芽細胞や神経細胞等に幅広い分布が見られる FGFR1 アイソフォームの細胞増殖能、分化能の違いについて解析し、FGF によりどのような分子機構で広範囲の細胞の増殖と分化が精巧に制御されているのかを明らかにしようとした。

そこで著者らは正常型 FGFR1L、FGFR1S、変異型 FGFR1Sm の 3 種類の FGFR1 の細胞増殖能、分化能とシグナル伝達能を解析した。3 種類の FGFR1 を、内在性 FGFR を発現していないラット筋芽細胞 L6 またはマウス pro-B 細胞株 Ba/F3 に安定形質発現させ、これらの FGFR1 による細胞増殖促進と FGF に対する応答性、ヘパリン要求性、シグナル伝達経路の違いを比較した。また PC12 細胞にこれらの FGFR1 を安定発現させ、神経細胞への分化誘導と増殖抑制との関係、およびシグナル伝達タンパク質の活性化を比較した。

## 2. 略語表

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

BSA: bovine serum albumin

cDNA: complementary DNA

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid salt dihydrate

FBS: fetal bovine serum

FGF: fibroblast growth factor

FGFR: fibroblast growth factor receptor

HS: heparan sulfate

IPTG: isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside

NBT: nitro blue tetrazolium chloride

LA PCR: long and accuracy polymerase chain reaction

LB: Luria bertain

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF: polyvinylidene fluoride

RPMI: Roswell park memorial institute

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulfate

TB: Terrific Broth

TE: Tris-EDTA buffer

TSR: Template Suppression Reagent

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

### 3. 材料と方法

#### 3.1 材料

FGF1, FGF2, FGF9N3, FGF9N33 は武田薬品工業株式会社黒川勉氏および佐々田礼子氏から恵与された。その他のリコンビナントヒト FGF は R & D systems, Inc. (U.S.A.) から購入した。ヘパリンは Porcine Intestinal Mucosa (力価; 160 U/mg), および PM19486 (力価; 169 U/mg) (Hepar Inc., U.S.A.) を使用した。

#### 3.2 FGFR1 発現プラスミドの構築

ヒト胎盤 cDNA ライブラリーからクローニングした FGFR1Sm (インサート; 3328 bp) を含む  $\lambda$ gt11 クローン (18, GenBank Accession Number; M37722) から FGFR1Sm を *Apa*I と *Nco*I で切断した。平滑末端にした FGFR1Sm インサート全長 DNA 2312 bp を, 平滑化した pBKRSV ファージミッドベクターと連結した。

FGFR1S は, FGFR1Sm の変異部分を RT-PCR により修正して得た。ヒト悪性扁平上皮癌細胞 DJM1 の cDNA を HFR1*Nhe*I/1292-HFR1*Pst*I/1759R プライマーを用いて PCR により増幅した。この増幅断片を pT7Blue2 ベクターに組み込んだ。pT7Blue2-FGFR1S プラスミドを *Nhe*I と *Pst*I で切断した。FGFR1S 断片 (*Nhe*I-*Pst*I 断片) を, *Nhe*I と *Pst*I で切断し精製した pBKRSV-FGFR1Sm と連結した。

FGFR1L を作成するために DJM1 の cDNA を HFR1*Bam*HI/182-Flg05 プライマーを用いて PCR により増幅することで IgI 領域を獲得した。この増幅断片を pT7Blue2 ベクターに組み込み, *Hinc*II

処理により IgI 部位を切り出した。FGFR1S を組み込んだ pT7Blue2 (pT7blue2-FGFR1S) を *HincII* で切断し、切断部位に IgI を挿入し、pT7Blue2 ベクター上で FGFR1L を作成した。pT7Blue2-FGFR1L から *BamHI* を用いて FGFR1L を切り出し、*BamHI* で切断した pBKRSV と組み換えた。*SpeI* と *HindIII* で FGFR1L を切り出した。pBKRSV から大腸菌発現用 lac プロモーターを取り除くため、プラスミドを *NheI* と *HindIII* (Takara) で切断した。このベクターを FGFR1L との連結に用いた。FGFR1L インサートを、*NheI* と *HindIII* で切断した pBKRSV ベクターと連結し pBKRSV-FGFR1L を完成した。

FGFR1 アイソフォームの塩基配列は、ABI dye terminator 法で決定した。シーケンサーは、ABI PRISM 310Genetic Analyzer を用い、データは遺伝子解析ソフトウェア Sequencher3.1RC11 を用いて解析した。

### 3.3 哺乳動物細胞における FGFR1 アイソフォームの発現

#### 3.3.1 細胞培養

ラット由来の筋原細胞 L6 の培養には 10% FBS (GIBCO BRL), 0.15% 炭酸水素ナトリウム, 2mM L-グルタミン, 54 U/ml-54 mg/ml ペニシリン ストレプトマイシンを含む DMEM (日水製薬株) を用いた。100mm 組織培養皿 (Falcon) に  $5 \times 10^4$  細胞/ml の濃度の細胞を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。2~3日に一度 Trypsin-EDTA (GIBCO BRL) 処理して継代した。

マウス IL3 依存性 pro-B 細胞 Ba/F3 は、10% マウス白血球 WEHI3 細胞培養上清, 10% FBS, 0.25% 炭酸水素ナトリウム, 2mM L-グルタミン, 54 U/ml-54 mg/ml ペニシリン ストレプトマイシンを含む RPMI1640 (日水製薬株) で 100mm 組織培養皿に  $1 \times 10^4$  細胞/ml の濃度の細胞を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。2~3日に一度継代した。

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞 PC12 は、10% FBS, 5% HS (GIBCO BRL) 0.15% 炭酸水素ナトリウム, 2mM L-グルタミン, 54 U/ml-54 mg/ml ペニシリン ストレプトマイシンを含む DMEM で、100mm 組織培養皿に  $5 \times 10^4$  細胞/ml の濃度の細胞を播種し、2~3日に一度継代した。

#### 3.3.2 FGFR1 アイソフォームの安定発現

細胞を PBS で 2 回洗浄後、 $5 \times 10^6$  細胞/ml になるように K-PBS (30.8mM 塩化ナトリウム, 120.7mM 塩化カリウム, 8.1mM リン酸水素ナトリウム, 1.46mM リン酸二水素カリウム, 10mM 塩化マグネシウム) に懸濁した。この細胞 0.8ml をとり 20 $\mu$ g の発現用遺伝子を加えて 10 分氷上でインキュベート後、キュベット (BioRad) に移した。これを Gene Pulser (BioRad) にセットし、960 $\mu$ FD, 400V または 450V の条件でパルスをかけたのち、氷中に戻し、10 分間静置した。

L6 細胞は 96 ウエルプレート (Falcon) の各ウエルに 1000 細胞ずつ播種し, 300  $\mu\text{g/ml}$  の G418 (ナカライテスク) で形質転換細胞を選択した. Ba/F3 細胞は 10 ng/ml の FGF1, 100  $\mu\text{g/ml}$  のヘパリン, 10% FBS を含む RPMI1640 で 2 日間培養後, 96 ウエルプレートの各ウエルに 30 細胞ずつで播種し, 600  $\mu\text{g/ml}$  の G418 で形質転換細胞を選択した. PC12 細胞は 500  $\mu\text{g/ml}$  の G418 で 1 週間培養後, 96 ウエルプレートの各ウエル 50 細胞ずつ播種した.

### 3.3.3 $^3\text{H}$ -チミジン取り込み分析

96 ウエルプレートに DMEM (0.5% FBS) で  $1 \times 10^4$  細胞数/ml に希釈した L6 細胞を 200  $\mu\text{l}$  ずつ分注した. 翌日, 0.4 ng/ $\mu\text{l}$  の各 FGF を 10 ng/ml の最終濃度になるように添加した. またこの時のヘパリンを最終濃度 0  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加した. そして FGF1, FBS を加えた全てのウエルに  $^3\text{H}$ -チミジン (ICN; 24066, 247.9 GBq/mmol) を 37 kBq ずつ加えた. 3 日後, プレートを 0.9% 生理食塩水で洗い, メタノールを注ぎ 5 分放置し, メタノールを変えてさらに 5 分放置した. 蒸留水でリンスした後, 次に 5% TCA を注ぎ 10 分放置し, 再び 5% TCA を注ぎ 10 分放置した. 次に 0.3 N 水酸化ナトリウムを 150  $\mu\text{l}$  加え, 全量をバイアルに移してから, 4.5 N 塩酸を 10  $\mu\text{l}$  とクリアゾール I (ナカライテスク) を 3 ml 注ぎ, 液体シンチレーションカウンター (Packard TRI-CARB1500) で放射活性を測定した. 測定値は 3 ウエルの値を平均し標準誤差を求めた.

### 3.3.4 細胞増殖の測定

FGFR1 を発現している Ba/F3 細胞を, 10% FBS を含む RPMI1640 で洗浄後, 24 ウエルプレートに 10% FBS を含む RPMI1640 で  $2 \times 10^4$  細胞数/ml に希釈し 500  $\mu\text{l}$ /ウエルで播種した. 1 ng/ $\mu\text{l}$  の各 FGF を 10 ng/ml になるように添加した. FGF に対する感受性を比較する場合は, ヘパリン終濃度 10  $\mu\text{g/ml}$  存在下で各 FGF を 0 ~ 5 nM の最終濃度になるように添加した. ヘパリンの要求性を比較する場合は, FGF 終濃度 10 ng/ml 存在下でヘパリンを 0  $\mu\text{g/ml}$  ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加した. 3 日後, コールターカウンター ZM (ベックマン・コールター) を用いて細胞数を測定した.

### 3.3.5 細胞増殖におよぼすキナーゼ阻害剤の影響

FGFR1 を発現している Ba/F3 細胞を, 10% FBS を含む RPMI1640 培養液で洗浄後, 24 ウエルプレートに 10% FBS を含む RPMI1640 で  $2 \times 10^4$  細胞数/ml に希釈しウエル当たり 500  $\mu\text{l}$  ずつ播種した. これに FGF1 を 10 ng/ml, ヘパリンを 10  $\mu\text{g/ml}$  になるように加えた. 同時に DMSO (和光純薬) で溶かした FGFR1 キナーゼ阻害剤 SU5402 (Calbiochem), MAPK 阻害剤 PD98059 (Calbiochem), JAK2 キナーゼ阻害剤 AG490 (Calbiochem), PI3 キナーゼ阻害剤 LY294002 (Sigma), Src キナーゼ阻害剤 PP1 (Alexis) または DMSO のみを加えた. この時各ウエル中の DMSO の終

濃度が 0.5% になるようにそろえた。3 日後にコーンターカウンターを用いて細胞数を測定した。3 ウェルの平均を誤差線と共に示し、阻害剤非添加時 (0.5% DMSO 添加) の値を 100% にした。

### 3.3.6 FGFR1 タンパク質発現の解析

培養液を除去後、L6 細胞を PBS で 2 回洗浄し、1 ml の細胞採集液 (2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% アプロチニン, 1 mM オルソバナジン酸ナトリウムを含む PBS) を加えた。セルスクレーパー (Costar) を用いて細胞を回収した後、15,000 rpm, 4℃ で 5 分間の遠心後、沈殿を RIPA バッファー (1% NP-40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 100 mM 塩化ナトリウム, 50 mM トリス 塩酸 pH 8.0, 1 mM PMSF, 1% アプロチニン, 1 mM オルソバナジン酸ナトリウム) を加え溶解させた。

Ba/F3 細胞は細胞懸濁液を 50 ml チューブに移し、2 回 PBS で洗浄後 RIPA バッファーに細胞を溶解した。Ba/F3 細胞を PBS で 2 回洗浄後 5 ml の等張緩衝液に溶解し、ポッター型ホモジナイザー (井内盛栄堂・ホモジナイザー用攪拌機) を用いて破碎した。2,000 rpm, 4℃, 5 分間遠心後上清を 50,000 rpm, 4℃, 1 時間遠心した。遠心後沈殿を RIPA バッファーに溶解させ、細胞膜画分とした。

PC12 細胞は、培養皿からピペティングにより回収した後 PBS で 2 回洗浄し RIPA バッファーに細胞を溶解した。

タンパク質濃度の定量は回収した細胞抽出液 2  $\mu$ l に RIPA バッファー 23  $\mu$ l を加え、DC プロテインアッセイキット (Bio-RAD) を用いて行った。

### 3.3.7 FGFR1 の自己リン酸化と細胞内シグナル伝達タンパク質の解析

L6 細胞は、血清を含まない DMEM (1% BSA を含む) で 24 時間インキュベート後 FGF1 を最終濃度 10 ng/ml, ヘパリンを 10  $\mu$ g/ml になるように加え、37℃, 5 分間でインキュベートした。その後、タンパク質を回収した。

Ba/F3 細胞は、培養液を血清および WEHI3 細胞培養上清を含まない RPMI1640 (0.1% BSA を含む) に交換し、37℃, 4 時間 5% CO<sub>2</sub> でインキュベート後 FGF1 を 10 ng/ml, ヘパリンを 10  $\mu$ g/ml になるように加え、37℃, 5 分間でインキュベートした。その後、タンパク質を回収した。

PC12 細胞は、10% FBS と 5% HS を含む DMEM で培養し FGF1 を最終濃度 10 ng/ml, ヘパリンを 0.1  $\mu$ g/ml になるように加え、37℃, 5 分間でインキュベートした。その後、タンパク質を回収した。

### 3.3.8 免疫沈降

タンパク質濃度を 1 mg/ml に調製した細胞抽出液を 1 ml とり、抗 FGFR1 抗体 (Santa-Cruz



sc-121 ウサギポリクローナル IgG 200 ng/ $\mu$ l), または抗リン酸化チロシン抗体 (Santa-Cruz sc-508 マウスモノクローナル IgG 200 ng/ $\mu$ l) を 2 ng/ $\mu$ l になるように加えた. 4 で一晩インキュベート後, protein-A セファロースを 10  $\mu$ l 加え, 4 で 1 時間混合した. 反応後の protein-A セファロースを RIPA バッファーで 4 回洗浄後, 40  $\mu$ l の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用の 3x ローディングバッファー (75 mM トリス 塩酸 pH 6.8, 36% グリセリン, 6% SDS, 15% メルカプトエタノール, 0.05% BPB) を加え 95 で 5 分間処理後, 遠心上清を回収した.

### 3.3.9 ウェスタンブロッティング

細胞抽出液 (タンパク質 60  $\mu$ g) または免疫沈降タンパク質 20  $\mu$ l を 4% アクリルアミドゲルで濃縮後, 7.5% のポリアクリルアミドゲルで分離した. 分離したバンドを PVDF 膜 (Millipore) にトランスファーした後, 膜をブロッキング液 (5% スキムミルク, 10 mM トリス 塩酸, 150 mM 塩化ナトリウム) で 2 時間処理した. これを最終濃度 4 ng/ $\mu$ l の抗 FGFR1 抗体 (Santa-Cruz; sc121), 最終濃度 0.2 ng/ $\mu$ l の抗リン酸化チロシン抗体 (Santa-Cruz; sc-508), 抗 FRS2 抗体 (Santa-Cruz; sc-8318) 又は抗リン酸化 MAP キナーゼ抗体 (Cell Signaling Technology; 9101S) と 0.1% Tween-20 を含むブロッキング液で 1 時間処理した. 0.1% Tween-20 を含むブロッキング液で 4 回洗浄後, 80 pg/ml の抗ウサギ IgG アルカリフォスファターゼ連結抗体 (Santa-Cruz; SC2007, 400 ng/ $\mu$ l) または抗マウス IgG アルカリフォスファターゼ連結抗体 (Cappel; 59294), 0.1% Tween-20 を含むブロッキング液 1 時間処理した. 0.1% Tween-20 を含むブロッキング液で 4 回, 蒸留水で 2 回洗浄後 NBT (Bio-Rad) と BCIP (Bio-Rad) を含むアルカリフォスファターゼ基質緩衝液を用いて抗体と反応したバンドを検出した.

また PC12 細胞でのリン酸化タンパク質の検出では 1 次抗体までは同様に行い, 80 pg/ml の抗ウサギ IgG わさびペルオキシダーゼ 連結抗体 (Santa-Cruz; SC2054 400 ng/ $\mu$ l) または抗マウス わさびペルオキシダーゼ 連結抗体 (Santa-Cruz; C2055 400 ng/ $\mu$ l), 0.1% Tween-20 を含むブロッキング液 1 時間処理した. 0.1% Tween-20 を含むブロッキング液で 4 回, 蒸留水で 2 回洗浄後 supersignal west pico chemiluminescent substrate (Pierce; 34080) を用いて検出した.

### 3.3.10 N-グリコシダーゼ F / エンドグリコシダーゼ F 処理

抗 FGFR1 抗体による免疫沈降タンパク質に 3x ローディングバッファーを加える代わりに酢酸ナトリウム緩衝液 (50 mM 酢酸ナトリウム p.H 5.5, 1% NP-40, 0.1% SDS) で 2 回洗浄した. 20  $\mu$ l の酢酸ナトリウム緩衝液を加え 95 で 5 分間処理後, 4  $\mu$ l の N-グリコシダーゼ F / エンドグリコシダーゼ F (Boehringer Mannheim Biochemica 0.05 U/ $\mu$ l) を加え 37 で一晩処理した. 20  $\mu$ l の SDS ポリアクリルアミド電気泳動用 3x ローディングバッファーを加え 95 で 5 分間処理後, 遠心上清を回収し, ウェスタンブロッティングに用いた.

## 3.3.11 神経突起の伸長の測定

PC12 細胞又は FGFR1 を発現している PC12 細胞懸濁液 ( $2 \times 10^4$  細胞/ml) をプライマリア 24 ウエルプレート (Falcon; 3847) の各ウエルに播種した。24 時間後最終濃度 10 ng/ml の FGF2 と最終濃度 0.1  $\mu$ g/ml のヘパリンを加え, FGF 添加後 2 日目と 3 日目に位相差顕微鏡写真を撮影し, 細胞体よりも長い神経突起を伸長している細胞数を測定した。

## 3.4 プライマー表

FGFR1 プライマー	F/R	シーケンス
HFR1BamHI/182	F	5'CAT GGA GAT GTG GAT CCT TGT CAC
flg07	F	5'TTC TGG GCT GTG CTG GTC AC
flg05	R	5'TAT GAT GCT CCA GGT GGC AT
flgIII	F	5'ACC ACC TAC TTC TCC GTA AAT GT
flg04	R	5'TAA CGG ACC TTG TAG CCT CC
RAM3	R	5'TCC CTC ATC ATC ATG TAC AG
HFR1seq336	F	5'GGA GGA TGA TGA TGA TGA TG
HFR1seq549	F	5'ACC TGA CCA CAG AAT TGG AGG CTA C
HFR1seq955	F	5'GAG GAC GCA GGG GAG TAT ACG TGC T
HFR1seq1021A	R	5'CTT CCA GGG CTT CCA GAA CGG TCA A
AMP2	F	5'ATG GAG ATG ATG AAG ATG AT
HFR1seq1733A	R	5'AGC TGC TCC TCT GGG TTG TGG CTG G
HFR1seq2101	F	5'GGT CAC CGC ATG GAC AAG CCC AGT A
HFR1seq2318A	R	5'AAG ACG GAA TCC TCC CCT GAG GAG C
HFR1seq!Nhe!RI/1292	F	5'CTG GTT CGG CCA TCA CGG CTC TCC
HFR1seqKpnI/1084	F	5'GTA CCT GGA GAT CAT CAT CTA TTG
HFR1seqPstI/1759A	R	5'CCT TGG AGG AGA GCT GCT CCT CTG
FR1EX11A	R	5'TCT TGT CCC GTGG CAG CTC CCA GCC
FGFR1Rev primer	R	5'GGG ATC CAG CTG ACG GTG GAG T

pBK-RSV プライマー	F/R	シーケンス
pBK-RSV	F	5'CGC CAT TTG ACC ATT CAC CAC A

pT7-Blue2 プライマー	F/R	シーケンス
M13-21	R	5'TGT AAA ACG ACG GCC AGT

F; Forward primer, R; Reverse primer

## 4. 結果

## 4.1 L6 細胞における FGFR1S と FGFR1Sm の機能解析

## 4.1.1 FGFR1 アイソフォーム

以前, 著者らの研究室でヒト胎盤 cDNA ライブラリーよりクローニングした FGFR1 は IgI 部

A-1

```

1 catggagatg tggagccttg
21 tcaccaacct ctaactgcag aactgggatg tggagctgga agtgctcct cttctgggct
M W S W K C L L F W A 11
81 gtgctggcca cagccacact ctgcaccgct aggccgtccc cgaccttgcc tgaacaagcc
V L V T A T L C T A R P S P T L P E Q A 31
141 cagccctggg gagccctgt ggaagtggag tcttctctgg tcccccggg tgacctgctg
Q P W G A P V E V E S F L V H P G D L L 51
201 cagcttcgct gtcggctgcg ggaagatgag cagagcatca actgagctcg ggacggagtg
Q L R C R L R D D V Q S I N W L R D G V 71
261 cagctggcag aagcgaaccg caccgcctac acagggggag aggtggaggt gcaggactcc
Q L A E S N R T R I T G E E V E V Q D S 91
321 gtgcccgag actccgect ctatgctgc gtaaccagca gcccccggg cagtgcaccc
V P A D S G L Y A C V T S S P S G S D T 111
381 acctacttct ccgtcaatgt ttcagatgct ctcccctcct cggaggatga tgatgatgat
T Y F S V N V S D A L P S S E D D D D D 131
441 gatgactcct cttcagagga gaaagaaca gataacacca aaccaaaccg tatgcccgta
D D S S S E E K E T D N T K P N R M P V 151
501 gctccatatt ggacatccc agaagaagatg gaaagaaat tgcatgcagt gcccgctgcc
A P Y W T S P E K M E K K L H A V P A A 171
561 aagacagtga agttcaaatg ccctccagtg gggaccccaa accccacact gcgctggttg
K T V K F K C P S S G T P N P T L R W L 191
621 aaaaatggca aagaattcaa acctgaccac agaattggag gctacaaggt ccgttatgcc
K N G K E F K P D H R I G G Y K V R Y A 211
681 acctggagca tcataatgga ctctgtggtg ccctctgaca agggcaacta cacctgcatt
T W S I I M D S V V P S D K G N Y T C I 231
741 gtggagaatg agtacggcag catcaaccac acataccagc tggatgtcgt ggagcggctc
V E N E Y G S I N H T Y Q L D V V E R S 251
801 cctcaccgcc ccactctgca agcaggggtg cccgcaaca aaacagtggc cctgggtgac
P H R P I L Q A G L P A N K T V A L G S 271
861 aacgtggagt tcattgttaa ggtgtacagt gaccgcgagc cgcacatcca gtgctaaag
N V E F M C K V Y S D P Q P H I Q W L K 291
921 cacatcgagg tgaatgggag caagattggc ccagacaacc tgccttatgt ccagatcttg
H I E V N G S K I G P D N L P Y V Q I L 311
981 aagactgctg gagttaatac caccgacaaa gagatggagg tgcttcactt aagaaatgtc
K T A G V N T T D K E M E V L H L R N V 331
1041 tcctttgagg acgaggggga gtatactgac ttggcgggta actctactcg actctcccat
S F E D A G E Y T C L A G N S I G L S H 351
1101 cactctgcat ggttgaccgt tctggaagcc ctggaagaga ggccggcagt gatgacctcg
H S A W L T V L E A L E E R P A V M T S 371
1161 cccctgtacc tggagatcat catctattgc acaggggcct tcctcatctc ctgcatggtg
P L Y L E I I I Y C T G A F L I S C M V 391
1221 gggctcggta tcgtctacaa gatgaagagt ggtaccaaga agagtgactt ccacagccag
G S V I V Y K M K S G T K K S D F H S Q 411
1281 atggctgtgc acaagctggc caagagcatc cctctgcgca gacaggtaac agtgtctgct
M A V H K L A K S I P L R R Q V T V S A 431
1341 gactccagtg catccatgaa ctctgggggtt cttctgggtc ggccatcacg gctctcctcc
D S S A S M N S G V L L V R P S R L S S 451

```

図1 FGFR1 アイソフォームの一次構造と模式図

A) FGFR1 アイソフォームの塩基配列

左側に塩基番号，右側にアミノ酸番号を示した．N型糖鎖修飾部位(N-X-S/T)のアミノ酸に二重下線を引いた．FGFR1SはIgIが欠損していた(塩基番号138-404)．またFGFR1Sはスプライシングジャンクションにより塩基番号489-494が欠損していた．FGFR1Smでは1453番目のc(緑字)がtに変わっていたために469番目のアミノ酸がプロリンからロイシンに変異していた．

B) FGFR1 の模式図

C) ヒト FGFR 膜近傍領域のアミノ酸配列

: FRS2 結合部位，\*: FGFR1Sm でロイシンに変異している部位

A-2

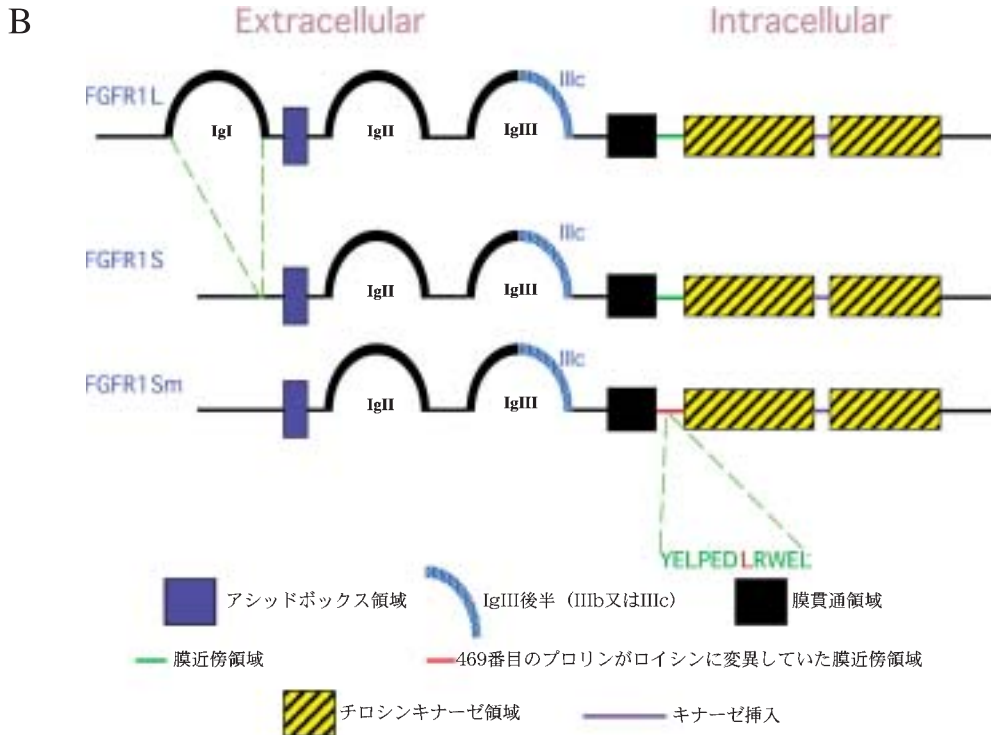
```

1401 agtgggactc ccatgctagc aggggtctct gagtatgagc ttccccgaaga ccctcgcgtgg
      S G T P M L A G V S E Y E L P E D P R W 471
1461 gagctgcctc gggacagact ggtcttaggc aaaccctgg gagagggctg ctttggcag
      E L P R D R L V L G K P L G E G C F G Q 491
1521 gtggtgttgg cagaggctat cgggctggac aaggacaac ccaaccgtgt gaccaaagtg
      V V L A E A I G L D K D K P N R V T K V 511
1581 gctgtgaaga tgttgaagtc ggacgcaaca gagaagact tgtcagcct gatctcagaa
      A V K M L K S D A T E K D L S D L I S E 531
1641 atggagatga tgaagatgat cgggaagcat aagaatatca tcaacctgct gggggcctgc
      M E M M K M I G K H K N I I N L L G A C 551
1701 acgcaggatg gtcctctgta tgtcatcgtg gagtatgcct ccaagggcaa cctgcggggag
      T Q D G P L Y V I V E Y A S K G N L R E 571
1761 tacctgcagg cccggaggcc cccagggctg gaatactgct acaaccccag ccacaacca
      Y L Q A R R P P G L E Y C Y N P S H N P 591
1821 gaggagcagc tctcctccaa ggacctggtg tcctgcgcct accagggtggc ccgaggcatg
      E E Q L S S K D L V S C A Y Q V A R G M 611
1881 gagtatctgg cctccaagaa gtgcatacac cgagacctgg cagccaggaa tgtcctggtg
      E Y L A S K K C I H R D L A A R N V L V 631
1941 acagaggaca atgtgatgaa gatagcagac tttggcctcg cacgggacat tcaccacatc
      T E D N V M K I A D F G L A R D I H H I 651
2001 gactactata aaaagacaac caacggccga ctgcctgtga agtggatggc acccgaggca
      D Y Y K K T T N G R L P V K W M A P E A 671
2061 ttatttgacc ggatctacac ccaccagagt gatgtgtggt ctttcgggggt gctcctgtgg
      L F D R I Y T H Q S D V W S F G V L L W 691
2121 gagatcttca ctctgggctg ctccccatac cccgggtgtgc ctgtggagga acttttcaag
      E I F T L G G S P Y P G V P V E E L F K 711
2181 ctgctgaagg agggctaccg catggacaag cccagtaact gcaccaacga gctgtacatg
      L L K E G H R M D K P S N C T N E L Y M 731
2241 atgatgcggg actgctggca tgcagtgccc tcacagagac ccaccttcaa gcagctggtg
      M M R D C W H A V P S Q R P T F K Q L V 751
2301 gaagacctgg accgcatcgt ggccttgacc tccaaccagg agtacctgga cctgtccatg
      E D L D R I V A L T S N Q E Y L D L S M 771
2361 cccttgacc agtactcccc cagctttccc gacaccgga gctctacgtg ctctcaggg
      P L D Q Y S P S F P D T R S S T C S S G 791
2421 gaggattccg tcttctctca tgagccgctg cccgaggagc cctgcctgcc ccgacacca
      E D S V F S H E P L P E E P C L P R H P 811
2481 gccagcttg ccaatggcgg actcaaacgc cgctgactgc caccacacg ccctccccag
      A Q L A N G G L K R R * 822
2541 actccaccgt cagctgtaac cctcaccac agcccctgcc tgggccacc acctgtccgt
2601 ccctgtcccc tttcctgctg gg

```

図1 (つづき)

位(塩基番号 138-404)が欠損していることが分かった(図 1A)[18]。以後 IgI 欠損型を FGFR1S (アミノ酸残基 731 個), 完全型を FGFR1L (アミノ酸残基 822 個)とよぶ。また, ヒト胎盤よりクローニングされた FGFR1S は, エクソン 2 とエクソン 3 のスプライシングジャンクションにあたる塩基番号 489-494 も欠損していた(図 1A)。さらに FGFR1L と比べ 1453 番目の c が t に変異しており, その結果 469 番目のアミノ酸がプロリンからロイシンに変異していた (FGFR1Sm)。この 469 番目のプロリンは FGFR の細胞内膜近傍領域に位置し, FGFR ファミリーで非常に相同性の高い領域であった(図 1B, C)。FGF の刺激で Grb2/Sos-Ras-MAPK シグナル伝達経路が活性化されるためには, Grb2/Sos の上流シグナル伝達分子であるドッキングタンパク質 FRS2



**C**

```

FGFR1 398 KMKSGTKKSDFFHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASINSGVLLVR-PSRLSSS-GTPMLAGVSEYELPEDPR 470
FGFR2 410 RMKNNTTKKPDFSSQPAVHKLTKRIPLRRQVTVSAESSSSMNSNTPLVRITRRLSSTADTPMLAGVSEYELPEDPK 484
FGFR3 410 RLRSPPKK--GLGSPTVHK-ISRFLKRQV--SLESNASMSSNTPLVRI-ARLSS-GEGPTLANVSELELPADPK 477
FGFR4 401 YRGQALHGRHRPPATVQK-LSRFPLARQ--FSLESGSSGKSSSSLVLR-GVRLSSS-GPALLAGLVSLDLPLDPL 470
    
```

図1 (つづき)

が FGFR1 の膜近傍領域に結合し、レセプターの活性化によってチロシンリン酸化されることが必要であると報告されている [19-21] . そこでこのプロリン変異は FGFR1 の機能に重大な影響を及ぼすかもしれないと考えた .

4.1.2 L6 細胞における FGFR1S と FGFR1Sm の安定発現

まず、正常型 FGFR1S と変異型 FGFR1Sm の機能を比較するため、これらの遺伝子を pBKRSV 発現ベクターに組換え、培養ラット筋芽細胞に導入した . それぞれの安定形質発現クローンを G418 によって選択し、ウエスタンブロット法によりそれぞれの受容体の発現量が一定であるクローンを選んだ . その結果、約 140 kDa の位置に FGFR1S が、約 130 kDa の位置に FGFR1Sm が検出された ( 図 2 ) . 塩基配列から推定される FGFR1S と FGFR1Sm のペプチド部分の分子量

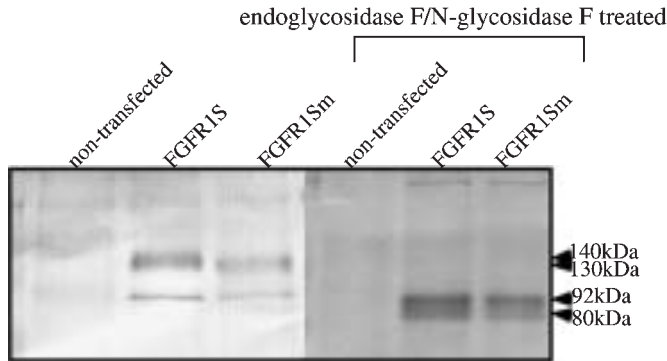


図2 L6細胞におけるFGFR1S及びFGFR1Smの発現及び変異による分子量の変化  
 FGFR1SまたはFGFR1Smを安定形質発現しているL6クローンから全タンパク質を抽出し、抗FGFR1抗体で免疫沈降した。免疫沈降タンパク質をエンドグリコシダーゼF/N-グリコシダーゼFで処理した。そのサンプルを7.5% SDS-PAGEで電気泳動後、PVDF膜に転写した。この膜を抗FGFR1抗体で検出した。

は約80kDaであり、見かけ上50~60kDa程度大きい値を示した。この分子量の相違がなぜ生じたのかを調べるために、L6クローンの細胞抽出液からこれら受容体を抗FGFR1抗体で免疫沈降し、エンドグリコシダーゼF/N-グリコシダーゼFによって処理した。その結果FGFR1S、FGFR1Sm共に80kDa、92kDaの位置に移動した。これらの結果から469番目のプロリン変異は糖鎖修飾にも影響することが解った。92kDaのバンドはエンドグリコシダーゼF/N-グリコシダーゼFにより糖鎖が完全に切除できなかったためか、またはNグリコシド型糖鎖以外の修飾が起こっているためなのかは、現在のところ明らかではない。

#### 4.1.3 FGFによるL6細胞増殖促進効果

次に、L6細胞に発現するFGFR1SとFGFR1Smは、FGFにより刺激されると細胞増殖にどのような影響を及ぼすか調べた。細胞増殖は、DNAへの<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量を測定し、FGFで刺激しない時の<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量を100%（対照）として比較した（図3）。FGFR1Sを発現するL6細胞ではFGF1、FGF2、FGF4、FGF6、FGF8、FGF9N3、FGF9N33によって刺激すると対照と比較してDNAへの<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量が上昇し細胞増殖を促進することが分かった。しかし、FGF5、FGF7、FGF10では、ほとんど細胞の増殖は促進されなかった。一方、FGFR1SmではFGF2、FGF4、FGF6、FGF9N33、FGF10によって対照と比較し細胞増殖が促進された。FGFR1Sと比較して、FGFR1Smの方が促進効果は弱かったが、これは図2に示したように、FGFR1Smの方が発現量が低いためであると考えられた。しかしながら、FGF10の効果はFGFR1Smの方が高く、一方FGF8やFGF9N3の効果はFGFR1Sでは認められるのに、FGFR1Smでは全く認められないなど、それぞれのレセプターのFGF選択性の違いが示された。FGFR1S

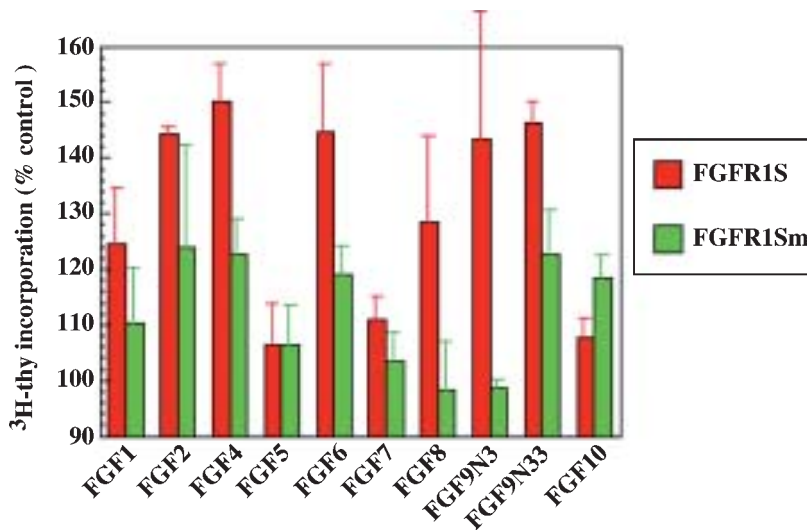


図3 FGFR1S 又は FGFR1Sm を発現している L6 クローンの FGF による細胞増殖促進効果  
 FGFR1S または FGFR1Sm を発現している L6 クローンを  $1 \times 10^4$  細胞数/ウエルになるように 0.5% FBS を含む DMEM で希釈して 96 ウエルプレートに播種した。24 時間後、10 ng/ml の FGF と 37 kBq/ウエルの  $^3\text{H}$ -チミジンを加え、72 時間後に  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み量を測定した。FGF を加えていない時の  $^3\text{H}$ -チミジン取り込み量を 100% とした。それぞれ 3 ウエルの平均を誤差線と共に示した。

と FGFR1Sm はリガンドが結合する細胞外領域の一次構造は同一と考えられるのに、なぜ異なるリガンド特異性を示すのかは現時点では明らかではないが、細胞内ドメインのアミノ酸配列の変異 (P469L) により細胞外ドメインの立体構造にも影響があるのではないかと推察された。

FGF が FGFR に結合し細胞内にシグナルを伝達するためにはヘパリンまたはヘパラン硫酸 (HS) が必須であり、FGF/FGFR/ヘパリン様糖鎖の 3 者複合体を形成しなければならないことが報告されている [22-24]。しかし、図 3 に示すように FGFR1S を発現する L6 細胞では、ヘパリン無添加でもこれらの FGF による細胞増殖促進効果が得られ、ヘパリンを添加すると逆に増殖促進効果の抑制が見られた (図 4)。増殖促進効果を持つすべての FGF に対して、ヘパリンは増殖抑制効果を持っていたが、それぞれの FGF によってその抑制効果の強さは異なっていた。これは、L6 細胞が HS を内在性に発現しており [25]、FGF/FGFR1S と FGF/FGFR1Sm は内在性 HS を利用することが出来たためと考えられる。しかし、ヘパリンによって抑制されるのは、内在性の HSの方がヘパリンよりも FGF/FGFR1 複合体を、シグナル伝達により都合の良い立体構造に保つためではないかと考えられた。



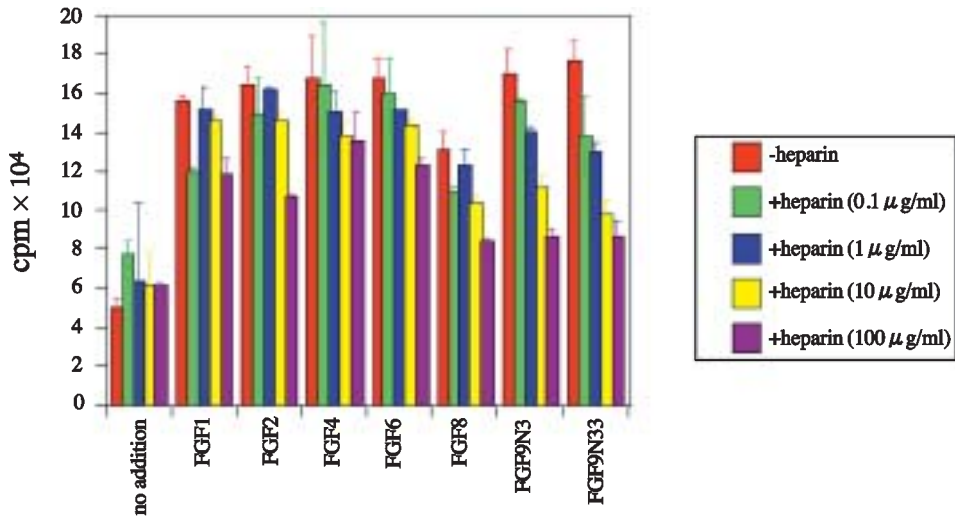


図4 FGFR1Sを発現しているL6クローンのヘパリンによる細胞増殖抑制効果  
 FGFR1Sを発現しているL6クローンを $1 \times 10^4$ 細胞数/ウエルになるように0.5% FBSを含むDMEMで希釈して96ウエルプレートに播種した。24時間後、10 ng/mlのFGF, 0~100  $\mu$ g/mlのヘパリンと37 kBq/ウエルの<sup>3</sup>H-チミジンを加え、48時間後に<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量を測定した。それぞれ3ウエルの平均を誤差線と共に示した。

## 4.2 Ba/F3細胞におけるFGFR1の機能解析

### 4.2.1 Ba/F3細胞におけるFGFR1アイソフォームの安定発現

次に、内在性のFGFRを発現せず細胞表面のHSも低レベルで、シンデカンも検出されていないマウス pro-B 細胞株 Ba/F3 [26] を用いて、FGFR1S, FGFR1Sm と FGFR1L の機能を解析した。まず、pBKRSV に組換えた FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm を Ba/F3 細胞に安定発現したクローンを選抜した。各クローンに発現した FGFR1L, FGFR1S と FGFR1Sm をウエスタンブロット法により解析した(図5)。FGFR1L では160 kDa と130 kDa のバンド(塩基配列から推定されるペプチド部分の分子量は約90 kDa)を、FGFR1S と FGFR1Sm では140 kDa と92 kDa のバンドを確認した。FGFR1L の160 kDa のバンドと FGFR1S の140 kDa のバンドは翻訳後糖鎖修飾されたレセプターであると考えられたが、その分子量の差(約20 kDa)は塩基配列から推定されるペプチド部分の分子量(約10 kDa)に比べてさらに10 kDa 大きかったことから、FGFR1L の持つ IgI 部位にも糖鎖修飾がされたためではないかと考えた。そこで、これらのクローンの抽出液を抗 FGFR1 抗体と反応させて得られたレセプタータンパク質をエンドグリコシダーゼ F/N-グリコシダーゼ F 処理し、ウエスタンブロット法で解析した(図5B)。その結果 FGFR1L は125 kDa と130 kDa に、FGFR1S は80 kDa と92 kDa に移動した。しかし FGFR1L と FGFR1S の見かけ上の分子量の差は変わらなかったため、IgI 部位では N グリコシド型糖鎖修飾以外の修



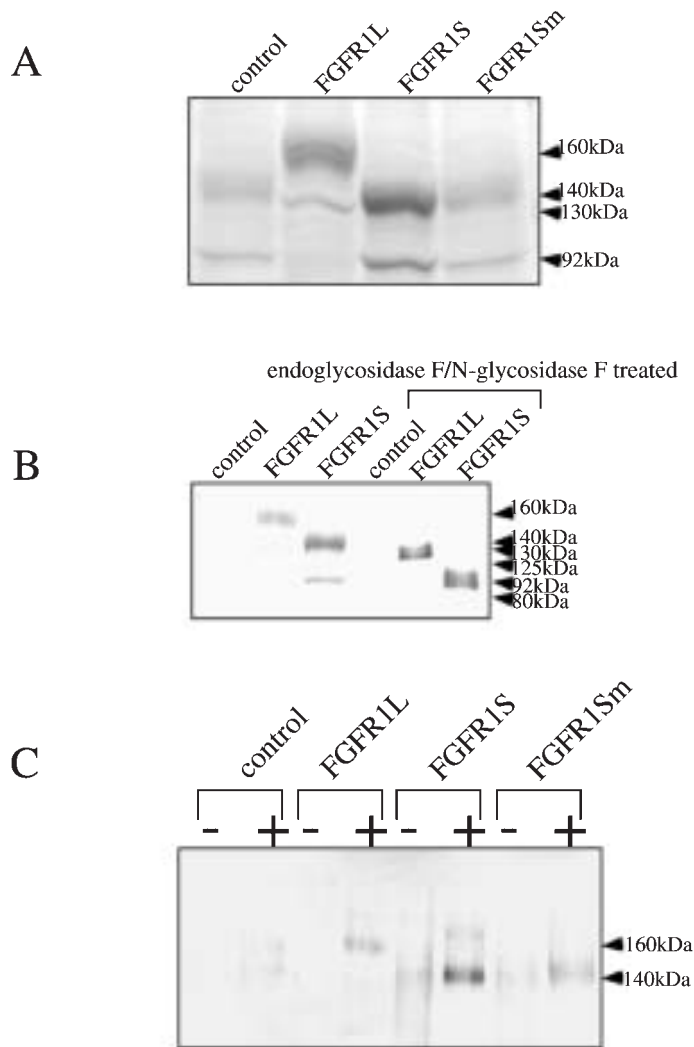


図5 Ba/F3細胞におけるFGFR1アイソフォーム発現

(A) FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を安定形質発現している Ba/F3 クローンの細胞膜画分を 7.5% SDS-PAGE で分離後, 抗 FGFR1 抗体で検出した.

(B) FGFR1S または FGFR1Sm を安定形質発現している L6 クローンから全タンパク質を抽出し, 抗 FGFR1 抗体で免疫沈降した. 免疫沈降タンパク質をエンドグリコシダーゼ F/N-グリコシダーゼ F で処理した. そのサンプルを 7.5% SDS-PAGE で電気泳動後, PVDF 膜に転写した. この膜を抗 FGFR1 抗体で検出した.

(C) FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を安定形質発現している Ba/F3 クローンに 10 ng/ml の FGF と 10 μg/ml のヘパリンで 5 分間刺激後, 全タンパク質を抽出し, リン酸化チロシンに対する抗体を用いて免疫沈降した. 7.5% SDS-PAGE で分離後, 抗 FGFR1 抗体で検出した. control: 対照 Ba/F3 細胞, -: FGF 非刺激, +: FGF 刺激

節が起こっている可能性も考えられた。

これらの分子量の異なる FGFR1 アイソフォームが実際に FGF のシグナルを受容できるのか調べるため、FGF 刺激によるチロシンリン酸化を調べた (図 5C)。その結果、FGF1 刺激時に FGFR1L では 160 kDa の位置に、FGFR1S と FGFR1Sm では 140 kDa の位置にチロシンリン酸化されたレセプターが検出された。この結果から、実際に FGF と結合しレセプターの自己リン酸化を起こすことが出来るのは、翻訳後 N グリコシド型糖鎖修飾されたレセプターであることが示された。

#### 4.2.2 FGF による Ba/F3 細胞増殖促進効果

次にこれらの Ba/F3 クローンを用いて FGF 刺激による細胞増殖効果を測定した (図 6)。これらのクローンを 24 ウエルプレートに  $1 \times 10^4$  細胞 / ウエルになるように播種し 10 ng/ml の FGF と 10  $\mu$ g/ml のヘパリン存在下、または非存在下で 3 日間培養後細胞数を測定した。その結果 FGF とヘパリンが存在するときのみ強い細胞増殖の促進効果が認められたが、FGF1 とヘパリンが存在しないとき (no addition) は FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm の細胞数はそれぞれ 1,293, 1,260, 1,020 に減少した。これは、Ba/F3 細胞が内在性の HS を発現していないため、外からヘパリンを添加しなければどの FGFR1 アイソフォームも FGF によって細胞内に刺激を伝達することが出来ないためであると考えられる。どの FGFR1 発現クローンにおいても FGF1, FGF2, FGF4, FGF6 添加により強い促進効果が認められたが、FGF9 では弱く、FGF5, FGF7, FGF8,

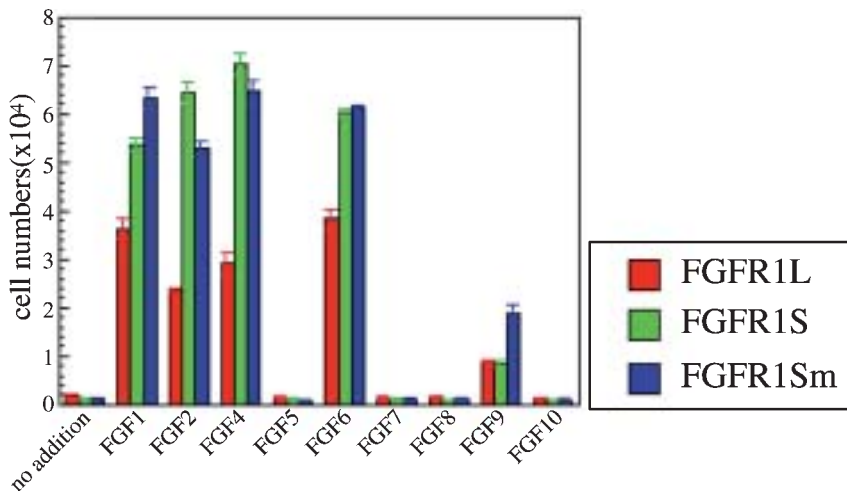


図 6 FGFR1 アイソフォームを発現している Ba/F3 クローンにおける各 FGF の細胞増殖促進効果  
FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を発現している Ba/F3 細胞を  $1 \times 10^4$  細胞数 / ウエルになるように 10 % FBS を含む RPMI1640 で希釈後、24 ウエルプレートに播種した。10  $\mu$ g/ml のヘパリンと 10 ng/ml の各 FGF を加え、3 日後にコーンターカウンターを用いて細胞数を測定した。3 ウエルの平均を誤差線と共に示した。

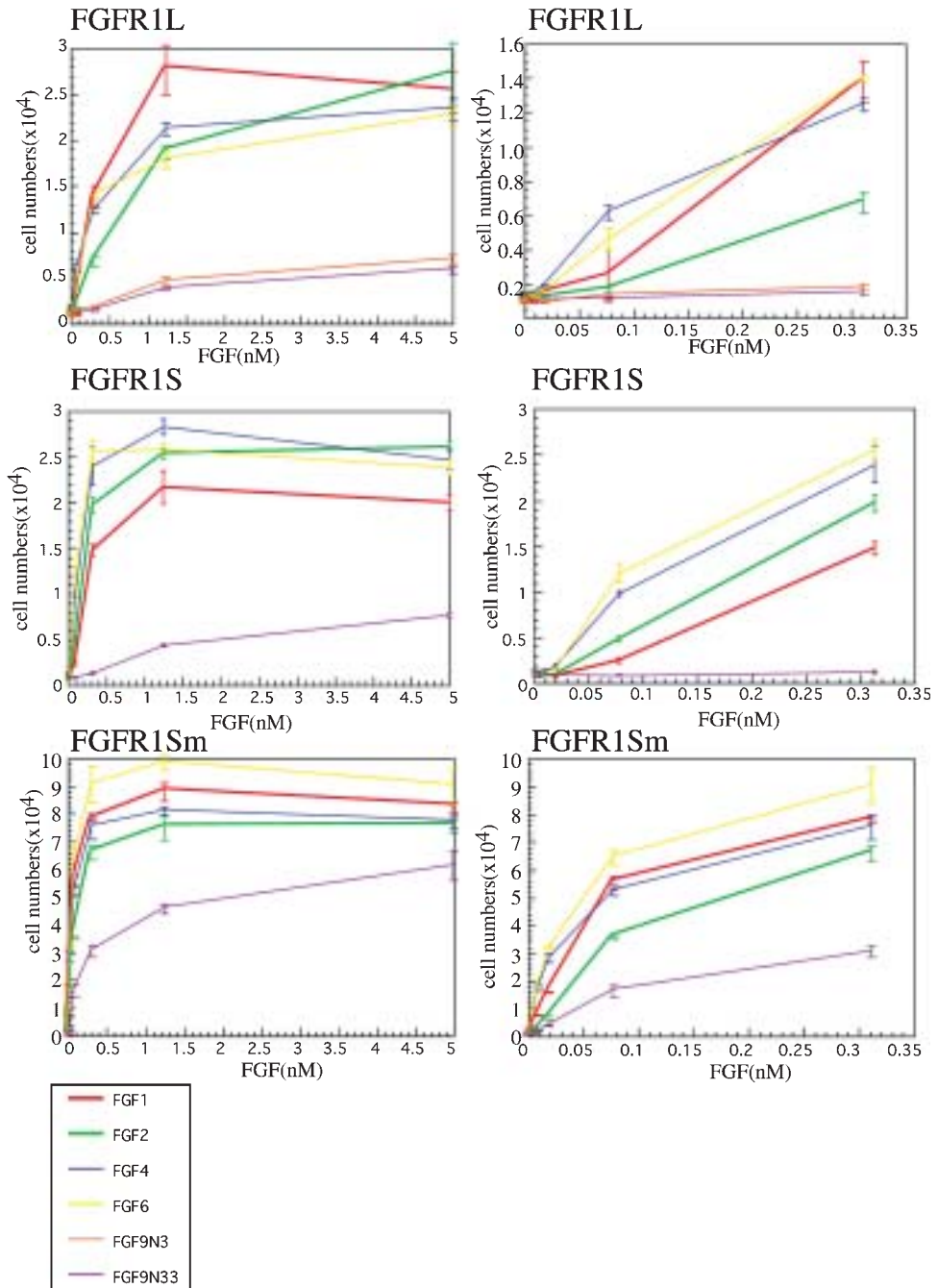


図7 FGFR1を発現しているBa/F3クローンにおけるFGF濃度の細胞増殖効果  
 FGFR1L, FGFR1SまたはFGFR1Smを発現しているBa/F3細胞を $1 \times 10^4$ 細胞数/ウエルになるように10% FBSを含むRPMI1640で希釈後, 24ウエルプレートに播種した.  $10 \mu\text{g/ml}$ のヘパリンと各濃度(図左側: 0~5 nM, 右側: 0~0.313 nM)のFGFを加え, 3日後にコルターカウンターを用いて細胞数を測定した. 3ウエルの平均を誤差線と共に示した.

表 1 FGFR1 発現 Ba/F3 クローンの細胞増殖におけるヘパリン要求性

	FGF1	FGF2	FGF4	FGF6	FGF9N33
FGFR1L	3.4	0.2	1.7	0.5	6.1
FGFR1S	7	0.7	1.9	2.3	29.5
FGFR1Sm	2.2	0.1	0.7	0.7	14.2

FGFR1L, FGFR1S 及び FGFR1Sm を発現している Ba/F3 細胞を  $1 \times 10^4$  細胞数/ウエルになるように 10% FBS を含む RPMI1640 で希釈後, 24 ウエルプレートに播種した. 終濃度 0~100  $\mu\text{g/ml}$  のヘパリンと 10 ng/ml の表に示した FGF を加え, 3 日後にコールターカウンターを用いて細胞数を測定した. この時得られた最大活性の 50% の値を与えるヘパリン濃度 (kd 値) を示した. (単位  $\mu\text{g/ml}$ )

FGF10 では全く効果が得られなかった. つぎに FGF の濃度を変えて細胞増殖促進効果を比較した (図 7, 左側: FGF 濃度 0-5 nM, 右側: FGF 濃度 0-0.313 nM). 図 7 に示した全てのクローンで 0.313 nM の FGF 濃度では FGF6 によって最も強く細胞増殖が促進された. FGF 刺激による細胞増殖の促進能は FGFR1Sm, FGFR1S, FGFR1L の順で高くなっていった. 次に, 各 FGF による増殖促進の強さを比較した. 0.313 nM の FGF6 に対する細胞増殖促進効果を標準 (100%) として同濃度における各 FGF の効果を比較したところ, すべてのクローンは FGF4 に対して高い反応を示したが (FGFR1L: 85%, FGFR1S: 93%, FGFR1Sm: 83%), FGF9N33 には低い反応性を示した (FGFR1L: 5%, FGFR1S: 1%, FGFR1Sm: 33%). FGF2 には FGFR1L は 43% と低い反応性を示したが, FGFR1S と FGFR1Sm は中程度の反応性を示し (それぞれ 76%, 73%), FGF1 に対しては FGFR1L と FGFR1Sm は高い反応性を示したが (それぞれ 97%, 86%), FGFR1S は 57% と低い反応性を示した. 面白いことに, FGFR1L の FGF2 に対する反応性は FGFR1S, FGFR1Sm よりも非常に弱く, IgI ドメインの存在が FGF2 に対する反応性に大きな影響を与えていることが示された.

つぎに FGF1, FGF2, FGF4, FGF6, FGF9N33 を用いて FGF 濃度を一定にし (10 ng/ml), ヘパリン濃度の細胞増殖への影響を比較した (表 1). ヘパリンは 0-100  $\mu\text{g/ml}$  を添加し, Kd 値 (最大活性の 50% を与える濃度) を求めた. FGF が FGFR に結合するためにはヘパリンまたは HS 鎖が必要であるため [22], FGF だけを添加してもヘパリンを添加しなければ全く細胞増殖は誘発されなかった. FGF1 添加時では FGFR1L, FGFR1Sm のヘパリン Kd 値はそれぞれ 3.4  $\mu\text{g/ml}$  と 2.2  $\mu\text{g/ml}$  であり, FGFR1S の 7.0  $\mu\text{g/ml}$  と比較し, より低い濃度で細胞増殖が促進された. これは他の FGF 添加時でも同様のことが示された. また, 同じレセプターでも FGF 間で Kd が異なるのは FGF のヘパリンに対する親和性の違いに起因する可能性が考えられた.

#### 4.2.3 Ba/F3 細胞増殖に与えるプロテインキナーゼ阻害剤の影響

次に FGFR1 は Ba/F3 細胞のどのシグナル伝達経路を利用して, 細胞増殖を促進しているのか, また FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm とではそのシグナル伝達経路に違いがあるのか, シグナル伝

達分子であるプロテインキナーゼの阻害剤を用いて検討した ( 図 8 ). Ba/F3 細胞の増殖は本来インターロイキン 3 (IL-3) 依存性であるため, 対照として IL-3 存在下でこれらのクローンを培養し, 各種プロテインキナーゼ阻害剤が細胞増殖に与える影響を比較した. FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm のクローンをそれぞれ  $5 \times 10^4$  細胞 / ウエル播種し IL-3 存在下で培養すると, 3 日後には  $5.63 \times 10^5$ ,  $4.96 \times 10^5$ ,  $8.78 \times 10^5$  細胞 / ウエルに増加した. この値をそれぞれ 100% として比較したところ, IL-3 の細胞増殖促進効果には FGFR1 のキナーゼ阻害剤 (SU5402) の影響はほとんど見られず ( 10 ~ 20% 増殖阻害 ), MAPK キナーゼ (PD98059), JAK2 キナーゼ (AG490), Src キ

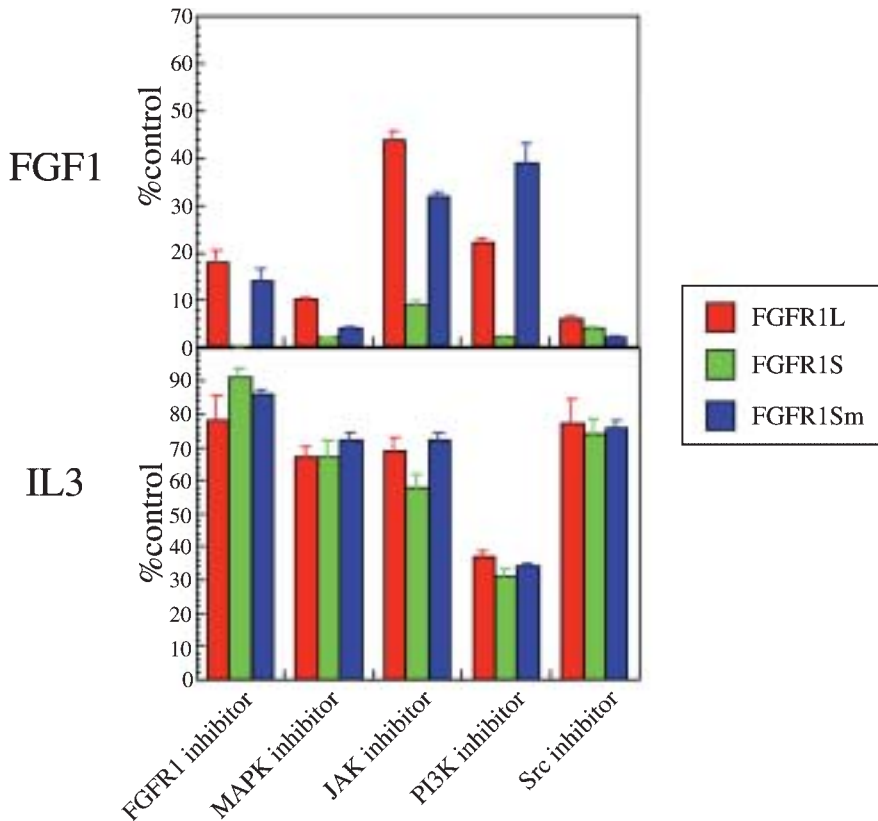


図 8 プロテインキナーゼ阻害剤の BaF3 細胞増殖に対する効果

FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を発現している Ba/F3 細胞を 24 ウエルプレートに  $5 \times 10^4$  細胞数 / ウエルで播種した.  $10 \mu\text{g/ml}$  のヘパリンと  $10 \text{ ng/ml}$  の FGF1 または 5% の WEHI3 細胞の培養上清 (IL-3) を加えた. さらに FGFR1 キナーゼ阻害剤 SU5402 を  $10 \mu\text{M}$ , MAPK 阻害剤 PD98059 を  $50 \mu\text{M}$ , JAK2 キナーゼ阻害剤 AG490 を  $10 \mu\text{M}$ , PI3-キナーゼ阻害剤 LY294002 を  $3 \mu\text{M}$ , または Src キナーゼ阻害剤 PP1 を  $10 \mu\text{M}$  のいずれかを加え, 3 日後にコルターカウンターを用いて細胞数を測定した. 3 ウエルの平均を誤差線と共に示し, 阻害剤非添加時 (0.5% DMSO 添加) の値を 100% にした. 3 日後の細胞数はそれぞれ, FGFR1L:  $1.23 \pm 0.02 \times 10^5$  細胞数 / ウエル, IL3- $5.63 \pm 0.67 \times 10^5$  細胞数 / ウエル, FGFR1S:  $1.18 \pm 0.10 \times 10^5$  細胞数 / ウエル, IL3- $4.96 \pm 0.23 \times 10^5$  細胞数 / ウエル, FGFR1Sm:  $1.50 \pm 0.10 \times 10^5$  細胞数 / ウエル, IL3- $8.78 \pm 0.20 \times 10^5$  細胞数 / ウエルであった.

ナーゼ阻害剤 (PP1) で 30~40%の阻害が, また PI3 キナーゼ阻害剤 (LY294002) では 60~70%の強い阻害が認められた. この結果から IL-3 による増殖シグナルは PI3 キナーゼを介する伝達経路により強く依存していることが示唆された. また, FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm を発現しているクローン間での差違はほとんど認められなかった. 一方, これらのクローンを FGF1 とヘパリン存在下で IL-3 を加えずに培養すると 3 日後には  $1.23 \times 10^5$  (FGFR1L),  $1.18 \times 10^5$  (FGFR1S),  $1.50 \times 10^5$  (FGFR1Sm) 細胞/ウエルに増殖した. この FGF1 刺激による増殖促進は FGFR1 キナーゼ, MAP キナーゼ, Src キナーゼ阻害剤によって強く阻害された. これら結果は, FGFR1 が Ba/F3 細胞内で MAP キナーゼ経路 (Ras 依存性経路) と Src キナーゼ経路 (Ras 非依存性経路) を介して増殖シグナル伝達していることを示唆している. ところが, FGFR1L と FGFR1Sm では FGFR1S と比べて JAK2 キナーゼと PI3 キナーゼ阻害剤による細胞増殖阻害効果が弱く, Ba/F3 細胞においては FGFR1L と FGFR1Sm の増殖シグナルは JAK2 キナーゼと PI3 キナーゼ伝達経路にはそれほど依存していないことが示唆された (図 8). 以前, Ba/F3 細胞に発現させた EGFR の増殖促進シグナルに JAK2 キナーゼと PI3 キナーゼ伝達経路が必要であると報告されているが [27], ここで得られた結果は FGFR1L と FGFR1Sm による増殖シグナルは EGFR の場合と異なっていることを示している. 興味深いことに FGFR1L と FGFR1S の細胞内ドメインのアミノ酸配列は全く同じであり, 構造上の違いは細胞外の IgI だけであるにもかかわらず, 細胞内への増殖シグナル伝達経路が異なる可能性が示唆された. さらに, その機構は現在明らかでないが FGFR1S の膜近傍領域の 1 アミノ酸変異によっても, FGFR1L と同様のシグナル伝達経路を介するようになることが示された.

### 4.3 PC12 細胞における FGFR1 の機能解析

#### 4.3.1 PC12 細胞における FGFR1 アイソフォームの安定発現

ラット褐色腫由来細胞 PC12 は, FGF 刺激により神経細胞に分化し神経突起を伸長する [12]. この特性を利用して FGFR1 の分化誘導の機能を比べるために FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm を PC12 細胞に安定発現させた. それぞれの遺伝子を導入したクローンを G418 で選択し, 発現した FGFR1 をウエスタンブロット法により解析した (図 9). FGFR1L では 160 kDa と 145 kDa のバンド, FGFR1S と FGFR1Sm では 140 kDa と 92 kDa のバンドが検出された. コントロールの PC12 細胞にも 160 kDa の弱いバンドが認められた. これは PC12 細胞に発現している内在性の FGFR1 である [12]. 次に, FGF2 刺激による FGFR1 の自己チロシンリン酸化を調べた (図 9). その結果, FGF2 刺激時に FGFR1L では 160 kDa の位置に, FGFR1S と FGFR1Sm では 140 kDa の位置にチロシンリン酸化されたバンドを確認することができた. この時 FGFR1L, FGFR1S, FGFR1Sm の発現量は同程度だが FGFR1Sm が最も強く自己リン酸化していたことから, FGF2

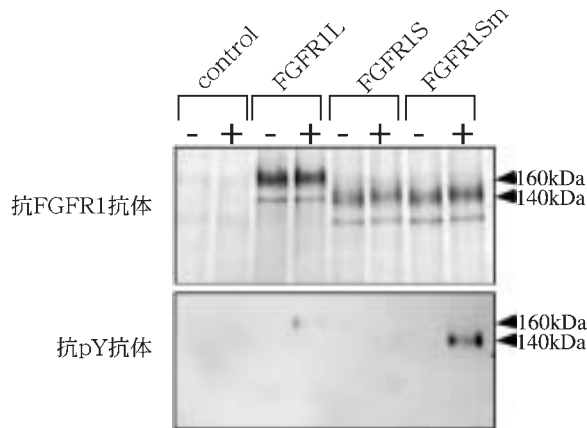


図9 PC12細胞におけるFGFR1アイソフォームの発現

FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を発現している PC12 クローンに 10 ng/ml の FGF2 と 0.1 μg/ml のヘパリンで 5 分間刺激後, 全タンパク質を抽出し, 抗 FGFR1 抗体で免疫沈降した. 7.5% SDS-PAGE で分離後, 抗 FGFR1 抗体又は抗リン酸化チロシン (pY) 抗体で検出した. control: 対照 PC12 細胞, -: FGF2 非刺激, +: FGF2 刺激

の刺激を最も強く細胞内に伝達していることが示唆された.

#### 4.3.2 細胞増殖と神経突起伸長に対する FGF の効果

FGFR1 を発現している PC12 クローンを用いて細胞増殖と神経突起伸長に及ぼす FGF2 の効果を比較した (図 10, 図 11A, B). 対照として用いた親株の PC12 細胞では FGF2 を添加すると増殖速度が遅くなり, FGF2 を添加していないときの細胞数を 100 とすると 1, 2, 3 日と日を追うごとに細胞数は対照の 87%, 66.6%, 61.2% と低下した (図 10). これに対して FGFR1L, FGFR1S 発現クローンを FGF2 存在下で培養したときの 1, 2, 3 日目の細胞数は FGF2 非添加時とほとんど変わらなかったが 4 日目にはそれぞれ 66.2%, 64.8% に低下した. また FGFR1Sm クローンは FGF2 を加えると増殖が促進され 2 日目で 155.0%, 3 日目で 137.3% となった. しかし神経突起を伸長している細胞数を比べると, 対照細胞では 2 日目で 24%, 3 日目で 25.7% であるのに対して, FGFR1L 又は FGFR1S クローンでは 2 日目でそれぞれ 77.2% と 89.2%, 3 日目で 86.9% と 87% となり分化誘導能は対照細胞よりも強いことが示された (図 11A). 一方 FGFR1Sm クローンでは 2 日目で 64.6% であり, FGFR1L と FGFR1S よりやや低い割合を示したが, 3 日目では 82.4% となり FGFR1L と FGFR1S と同程度になった. しかし神経突起の長さは FGFR1Sm が最も長く, 次に FGFR1S, FGFR1L 発現細胞の順で対照細胞は最も短くなっていった (図 11B). これらの結果から FGFR1Sm, FGFR1S, FGFR1L は FGF 刺激により PC12 細胞を神経細胞へ分化誘導することが出来ることが示された. しかし, これらのクローンでは対照の PC12 細胞で見られるような分化誘導にともなう細胞増殖の阻害は起こらなかった. 特に FGFR1Sm では, FGF

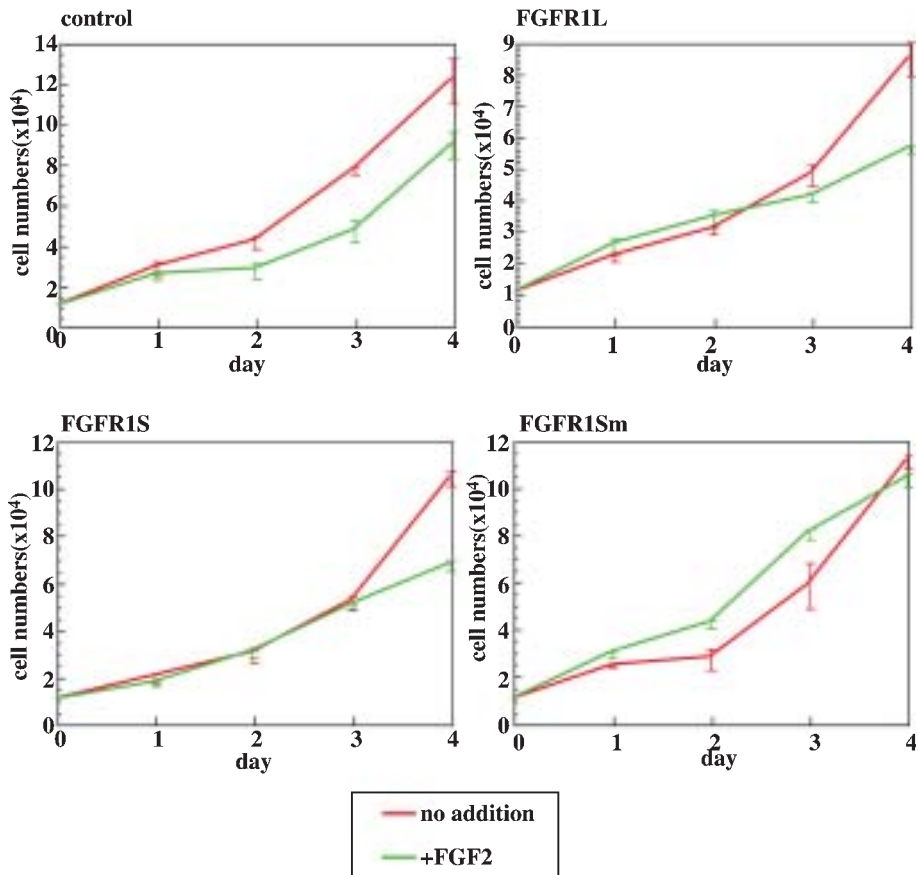


図 10 FGFR1 を発現している PC12 クローンの FGF による細胞増殖効果

FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を発現している PC12 クローンを  $1 \times 10^4$  細胞数 / ウェルになるように 10% FBS と 5% ウマ血清を含む DMEM で希釈後、プライマリア 24 ウェルプレートに播種した。0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のヘパリンと 10 ng/ml の FGF2 を加え、添加後から 4 日間細胞数をコーンターカウンターを用いて測定した。3 ウェルの平均を誤差線と共に示した。

刺激後 3 日間は逆に増殖の促進が見られた。FGFR1Sm で 2 日目に神経突起を伸長する細胞の割合が他のレセプターと比較し、やや低いのはこのためであるかもしれない。

#### 4.3.3 FGFR1 アイソフォームからのシグナル伝達

この時の細胞内シグナルの違いを調べるために、PC12 細胞抽出液に含まれるチロシンリン酸化タンパク質を検出したところ、対照および全ての FGFR1 発現 PC12 細胞において FGF 刺激に依存しない 120 kDa タンパク質のチロシンリン酸化が認められた (図 12 上, 抗 pY 抗体)。さらに、FGF 刺激に依存して全ての FGFR1 発現 PC12 細胞において、80 kDa タンパク質が強くチロシンリン酸化されていた。しかし対照では FGF 刺激による 80 kDa タンパク質のチロシン



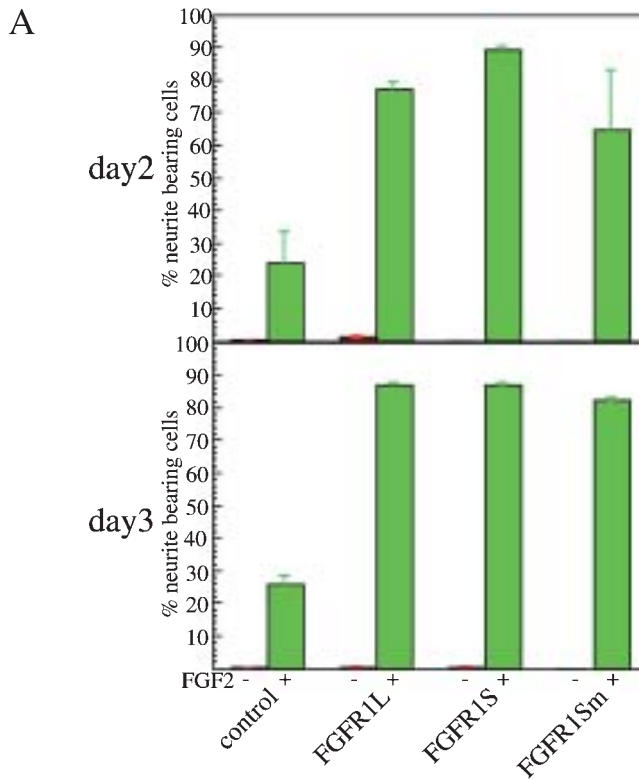


図 11 FGFR1 アイソフォーム発現 PC12 クローンにおける FGF による神経突起伸長

A) FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を発現している PC12 クローンを  $1 \times 10^4$  細胞数 / ウェルの濃度に 10% の FBS と 5% ウマ血清を含む DMEM で希釈し, プライマリア 24 ウェルプレートに播種した. 10 ng/ml の FGF2 と 0.1  $\mu$ g/ml のヘパリンを加え, 2 日後と 3 日後に細胞体より長い神経突起を伸長している細胞数を測定した. 2 ウェルの平均を標準誤差線と共に示した. B) A) と同様にして培養し, 3 日後の写真を示した.

リン酸化は認められなかった. 同様に, 全ての FGFR1 発現 PC12 細胞では, FGF 刺激に依存して 98 kDa タンパク質のチロシンリン酸化が認められた. 80 kDa タンパク質と 98 kDa タンパク質のチロシンリン酸化は, FGFR1Sm で最も強く認められた. 現在のところ, 120 kDa と 98 kDa のタンパク質が何であるのか明らかではない. しかし, 80 kDa のタンパク質は, FGFR の活性化を細胞内に伝えるアダプタータンパク質 FRS2 (FGF receptor substrate 2) [19] である可能性が高かったので, 同じプロットング膜に抗 FRS2 抗体を反応させて確認した(図 12 中, 抗 FRS2 抗体). その結果, 80 kDa のバンドはチロシンリン酸化された FRS2 であることが示された. 図 12 の抗 FRS2 抗体による検出で, FGF 刺激しないときは, 対照および全ての FGFR1 発現 PC12 細胞において, 65 kDa のバンドが検出された. これは, 非リン酸化 FRS2 であると考えられた. ここには示さないが, 抗 FRS2 抗体を用いた免疫沈降により 80 kDa チロシンリン酸化タンパク質は FRS2 であり, 65 kDa のタンパク質は非リン酸化型 FRS2 であることを確認した. 面白いこ

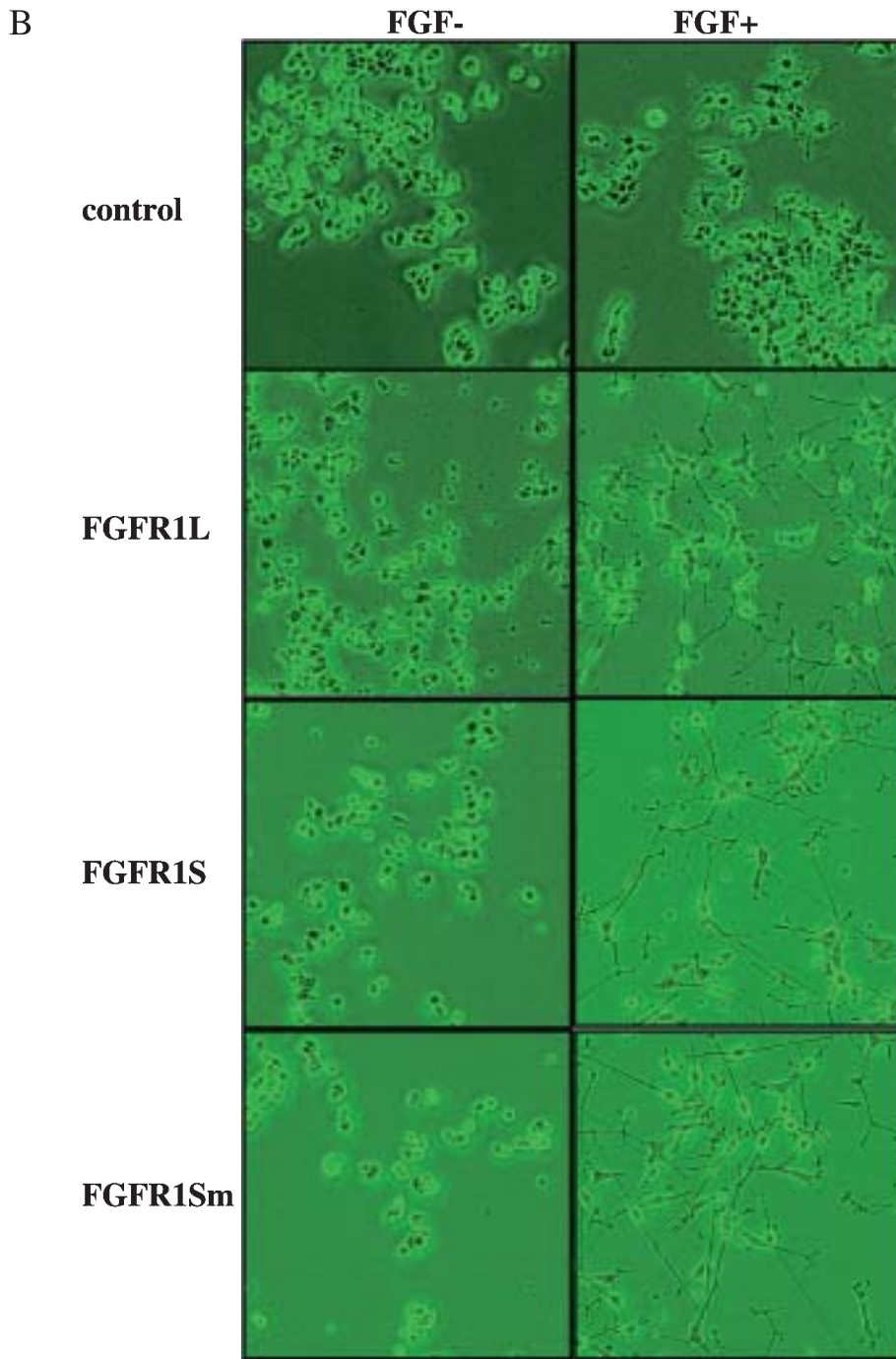


図 11 (つづき)

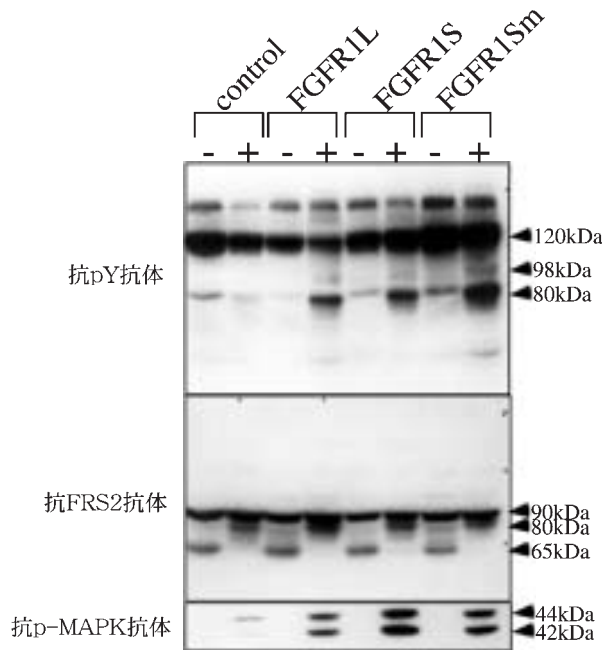


図 12 FGF 刺激による FGFR1 発現 PC12 クローンのシグナル伝達タンパク質のリン酸化  
 FGFR1L, FGFR1S または FGFR1Sm を発現している PC12 クローンを 10ng/ml の FGF2 と 0.1μg/ml のヘパリンで 5 分間刺激後, 全タンパク質を抽出し, 60μg のタンパク質を 7.5% SDS-PAGE で分離後, 抗リン酸化チロシン (pY) 抗体, 抗 FRS2 抗体または抗リン酸化 MAP キナーゼ (p-MAPK) 抗体で検出した. control: 対照 PC12 細胞, -: FGF2 非刺激, +: FGF2 刺激

とに, 対照において FGF 刺激したとき, pY 抗体で検出した上の図ではチロシンリン酸化 FRS2 (80 kDa) は検出されなかったが, 抗 FRS2 抗体で検出した中の図では, FGFR1 発現 PC12 細胞と同様に 80 kDa のバンドとして検出された. これは, FRS2 はチロシンリン酸化部位とセリン・スレオニンリン酸化部位を持つタンパク質であり, セリン・スレオニンのリン酸化が起ることによって, ポリアクリルアミド電気泳動の移動度が変化し見かけ上の分子量が上昇することが報告されている [36]. 対照の FRS2 は FGF 刺激によってセリン・スレオニン部位のみがリン酸化され, チロシンリン酸化は起こっていないが, FGFR1 発現細胞では FRS2 のセリン・スレオニンリン酸化とチロシンリン酸化の両方が起っていることが示唆された. また, FGFR1Sm クローンにおいて最も強い FRS2 のチロシンリン酸化が認められた.

FRS2 は細胞膜の内側にアンカーされており, 活性化 FGFR によってチロシンリン酸化されると, そのチロシンリン酸化部位に Grb2/Sos 複合体が細胞質よりリクルートされる. Sos は Ras の GTP 交換促進因子であり, Ras が Sos によって活性化されると Raf/MAPK (ERK) 経路を活性化することによって, PC12 細胞の神経線維伸展を促進することが知られている [32]. そこで, FGF 刺激による MAPK 活性化 (リン酸化) を調べた (図 12 下, 抗 p-MAPK 抗体). その結果, 全て

の FGFR1 発現 PC12 細胞において対照に比べてより強い MAP キナーゼ (ERK1; 44 kDa, ERK2; 42 kDa) のリン酸化が起っていたが, なかでも FGFR1S クローンで最も強い MAPK のリン酸化が検出された. このことは, FGFR1S クローンでは, FGF 刺激 2 日後で神経突起を伸長している細胞数が最も多かったことと一致していた.

## 5. 考 察

FGFR1 では Ig1 の選択的スプライシングが組織特異的に起こることが報告されているが [2,13], その生理的意義については明らかにされていない. 本研究において, 著者らは Ig1 の選択的スプライシングにより生じる FGFR1L と FGFR1S アイソフォームについて, FGF 特異性やその他の因子による活性調節の感受性が異なっているのか, またその結果細胞内シグナル伝達が異なるのか解析し, これらのアイソフォームが細胞の増殖と分化にどのような役割を果たしているか明らかにすることを試みた. また FGFR1S の膜近傍領域に 1 アミノ酸変異を持つ FGFR1Sm についても同様に解析し, FGFR1 の構造変化が細胞内の情報の流れにどのような影響を与えるのか検討した.

最初に FGFR1S と FGFR1Sm の機能を解析するため, L6 細胞に FGFR1S または FGFR1Sm の発現用プラスミドを導入し安定発現させた. これらのクローンに発現している FGFR1 を調べた結果, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によってそれぞれ 140 kDa と 130 kDa の分子量を示し, N グリコシド型糖鎖修飾がされていることが分かった. さらにこの分子量の差は N グリコシド型糖鎖の大きさの違いによるものであった. この修飾の差は後述の Ba/F3 細胞や PC12 細胞に発現させたときには確認することができなかったので, L6 細胞に特異的な糖鎖修飾酵素によるものであると考えられる. また N グリコシド型糖鎖が 40 ~ 60 kDa 付加していたことから FGFR1 には複数の N グリコシド型糖鎖が付加していたことが考えられる. 図 1A に示したように, 推定の N グリコシド型糖鎖付加部位は FGFR1 で 7 カ所存在している. FGFR1Sm の変異部位は細胞内領域であり, 1 アミノ酸変異による立体構造の変化が N グリコシド型糖鎖修飾に影響したと考えられる. FGFR1S または FGFR1Sm を発現している L6 細胞はヘパリン非存在下でも FGF 刺激により細胞増殖が促進され, ヘパリン添加により増殖抑制が起こった. FGFR1S と FGFR1Sm は FGF10, FGF8, FGF9N3 で反応性に差が生じた.

次に Ba/F3 細胞に FGFR1S, FGFR1Sm, FGFR1L を発現し, FGF による細胞増殖効果を測定した結果では, ヘパリン存在下でのみ FGF1, FGF2, FGF4, FGF6 により細胞増殖が誘発された. FGF9N33 に弱い細胞増殖促進が見られた. どの FGFR1 も 0.313 nM では FGF6 に最も高い反応性を示した. FGF への反応性は, FGFR1Sm が最も高く, 次に FGFR1S であり, FGFR1L は最も反応性が低くなっていた.

FGF は FGF の高親和性受容体である FGFR と結合するが, 低親和性受容体である HS と結

合し、HS は FGF の貯蔵部位としての役割を果たしていると考えられている。また FGF とは独立して FGFR にも HS が結合している。さらに FGF と FGFR の結合には HS またはヘパリンが必要不可欠で、FGF/FGFR/HS の三分子複合体を形成し FGFR が二量体化する事で細胞内シグナル伝達が引き起こされると考えられている [22–24]。FGFR が二量体を形成すると、お互いの細胞内領域のチロシンをリン酸化（自己リン酸化）し、これらのリン酸化チロシンを認識するシグナル伝達分子が結合することで細胞内にシグナルカスケードが生じる [28]。Ba/F3 細胞では内在性の HS により FGF/FGFR 複合体が形成されないため、ヘパリンを添加しなければ FGF による細胞増殖の促進効果は全く認められない。FGF の濃度を一定にしてヘパリン要求性を比較すると、FGFR1Sm は最も低いヘパリン濃度で活性化され、次に FGFR1L であり、FGFR1S は最も高濃度のヘパリンが必要であった。これは各レセプターとヘパリンとの結合性または FGF、ヘパリン複合体との結合性の違いに起因するのかもしれない。FGF1 はすべての FGFR に結合することが知られているので、0.313 nM の FGF1 を標準として同濃度のその他の FGF によりどの程度の細胞増殖促進効果が得られるかを比較すると、FGFR1S では FGF2、FGF4、FGF6 により強い増殖促進効果が得られたが、FGFR1L と FGFR1Sm ではこれらの FGF の効果は FGF1 と同程度か低い効果しか得られなかった（図 7）。これらの結果から、FGFR1L と FGFR1S とは FGF 特異性が異なっていることが示された。IgI 部位にはリガンドである FGF は直接結合しないことが示されているので [28]、この FGF 特異性の違いは Ig 部位存在による FGFR1L の FGF 結合部位への立体障害の効果、または FGFR1L におよぼすタンパク質のフォールディングへの影響などの可能性が考えられた。FGFR1 アイソフォームに対する FGF の結合がどのように違っているのかについても今後検討されなければならない。

細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たすプロテインキナーゼに対する阻害剤を用いた実験によって、Ba/F3 細胞において FGF 刺激により細胞増殖を誘導するために FGFR1 が利用するシグナル伝達は、Ras-MAPK 経路と Src キナーゼの活性を介する経路の 2 つが重要であることが示された。しかし、PI3 キナーゼや Jak2 キナーゼ阻害剤に対しては FGFR1L は FGFR1S よりも耐性であることから、それほど依存していないことが示された。FGFR1Sm では変異の影響によりやはり PI3 キナーゼや Jak2 キナーゼ阻害剤に対して耐性が増しており、FGFR1L と同様なシグナル伝達経路の活性化パターンを示した。これらの結果から、FGFR1 アイソフォームにより活性化される細胞内シグナル伝達経路には違いがあることが示唆された。これは、*in vivo* において FGFR1 アイソフォームにより、また結合する FGF の種類により活性化されるシグナル伝達経路が異なり、誘導される細胞の反応に違いが現れる可能性を示唆している。

PC12 細胞では、すべての FGFR1 は FGF2 刺激により神経突起の伸長を誘導し神経細胞への分化を誘導した。FGF2 刺激によるレセプターの自己チロシンリン酸化を比較すると、FGFR1 の発現量は同程度にもかかわらず FGFR1Sm、FGFR1L、FGFR1S の順で強かった。しかし今回の実験より神経突起伸長の誘導では FGFR1S は最も強い活性を示した（2 日目）ことから、シ

グナルの強さはレセプターのチロシンリン酸化だけに依存するわけではないことが示された。FGFR は、EGFR や PDGFR など他の細胞増殖因子のチロシンキナーゼ型レセプターと比較すると、FGFR の自己リン酸化の程度は一般的に低いとされていることと一致している。

FGFR1 を遺伝子導入していない対照の PC12 細胞は FGF2 刺激により神経細胞への分化が誘導され、増殖が抑制された。しかし、FGFR1 を安定発現すると FGF2 による神経突起の伸長効果は強く促進されたが、細胞増殖の抑制効果は弱まった。特に FGFR1Sm 発現クローンでは、逆に細胞増殖が促進された。これらの結果は、FGFR1 が PC12 細胞の神経細胞への分化は誘導するが、細胞増殖は抑制しないことを示している。FGF 刺激により対照の PC12 細胞の細胞増殖が抑制されたのは、内在性の FGFR を発現しているため、他の FGFR による細胞増殖抑制シグナルが働いたためであると考えられる [30]。また神経突起を伸長させている細胞の割合は FGFR1L、FGFR1S、FGFR1Sm では同レベルだったが (3 日目)、伸長させた神経突起の長さは FGFR1Sm、FGFR1S、FGFR1L の順番で長かった (図 11B)。これらの結果より FGFR1Sm は細胞増殖効果、分化誘導能共に FGFR1L や FGFR1S よりも強いことが示唆された。

PC12 細胞におけるこれらの FGFR1 シグナル伝達経路の違いを調べた結果、FRS2 の FGF2 刺激によるチロシンリン酸化が認められた。FRS2 はアダプタータンパク質であり FGFR1 によるチロシンリン酸化後、Grb2/Sos 複合体や Shp2 に結合し Ras を活性化することでシグナルを伝達し、最終的に MAPK を活性化する。Ras/MAPK 経路の活性化は細胞の増殖だけでなく分化誘導にも必須であることが報告されている [3,19–21,31–33,35]。さらに、全ての FGFR1 のアイソフォームを発現したクローンでは、FGF 刺激によって FRS2、98 kDa タンパク質、MAPK が活性化されたことで対照に比べて神経突起誘導や細胞増殖がより促進されたと考えられる。しかし、98 kDa タンパク質については、このタンパク質が何であるのか現在分かっていない。また、FGFR1Sm は FGFR1S と FGFR1L に比べて 98 kDa のタンパク質や FRS2 のチロシンリン酸化が強かった。このことが細胞増殖効果の差に影響したのではないかと考えられる。FRS2 の N 末端側の PTB ドメインは FGFR1 の膜近傍領域 (AA412–433) に直接結合することが報告されている [21]。したがって、FGFR1Sm の変異部位 P469L はこの FRS2 の結合領域に近いので、変異によって FRS2 との結合になんらかの影響を及ぼしていると考えられる。しかし FGFR1Sm の FRS2 のチロシンリン酸化は最も強いにもかかわらず、MAP キナーゼの活性化は FGFR1S が最も強かったことから、MAP キナーゼの活性化には FRS2 を経由しない別の経路も作用している可能性が示唆された。

PC12 細胞におけるシグナル伝達の研究から、Ba/F3 細胞における FGFR1S と FGFR1Sm の反応性の違いは、FGFR1Sm の変異によって 1) FRS2 をはじめとする細胞内シグナル伝達タンパク質との結合性に变化が生じたため、2) FGF 結合後の FGFR 活性化のための立体構造変化が起こりやすくなったため、等の可能性が示唆された。L6 細胞における FGFR1S と FGFR1Sm の糖鎖修飾の違いもこの変異が原因で生じたと考えられ、FGFR 細胞外ドメインと FGF との結合性が

変化したのではないかと推測される。しかし、これらの点についてはさらに解析を進め明らかにする必要がある。

以上、本研究で IgI の選択的スプライシングにより生じる FGFR1L と FGFR1S アイソフォームは、FGF 特異性やヘパラン硫酸鎖・ヘパリンによる活性調節の感受性が異なっていることが示された。またその結果細胞内シグナル伝達経路に違いが生じ、細胞増殖や分化誘導に異なる作用を及ぼすことが明らかになった。FGFR1 は PC12 細胞の細胞増殖は抑制せず、神経細胞への分化を誘導することが分かった。

FGFR1 に結合し細胞内シグナル伝達を活性化する様々な FGF の *in vivo* における役割は未だに完全に明らかにされていない。例えば骨格筋に発現する FGF6 は神経細胞の FGFR1 を刺激し神経突起伸長を誘導し、シナプス形成に役立つことが考えられている [30]。また、FGF4 は形態形成において肢芽の AER (外胚葉頂堤) から分泌される因子 [34] として間葉細胞に発現する FGFR1 を刺激し、間葉細胞の増殖を誘導することが考えられる。また神経系に多く存在する FGF1, FGF2, FGF9 も神経細胞の増殖及び分化促進に役割を果たしていると考えられる。FGF と FGFR1 の発現組織と発現時期を *in vitro* で再現することができればさらに詳細な FGFR1 の機能を解析できるであろう。そしてこれらのアイソフォームによる細胞内シグナル伝達についてさらに解析することにより、生体内に存在する多様な細胞の増殖と分化が多数発見されている FGF によりどのような分子機構で精巧に制御されているのかその全貌が解明されるであろう。

## 謝 辞

本研究に関して清水昭男博士をはじめ瀬尾研究室の伊藤 (金光) 祐子氏、神農秀美氏にご協力頂いたことに深く感謝します。また、この論文校正をしていただいた安倍慎一氏に深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

- [1] Kurokawa-Seo, M., Doctrow, S. R., and Klagsbrun, M. 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 7686–7691.
- [2] Johnson, D. E. and Williams, L. T. 1993. *Adv. Cancer Res.* 60, 1–41.
- [3] Klint, P. and Claesson-Welsh, L. 1999. *Frontiers in Bioscience* 4, 165–177.
- [4] Johnson, D. E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L. T. 1991. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4627–4634.
- [5] Miki, T., Bottaro, P., Fleming, T. P., Smith, C. L., Burgess, W. H., Chan, A.M-L., and Aaronson, S. A. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 246–250.
- [6] Chellaiah, A. T., McEwen, D. G., Werner, S., Xu, J., and Ornitz, D. M. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 11620–11627.
- [7] Werner, S., Duan, D. S., de Vries, C., Peters, K. G., Johnson, D. E., and Williams, L. T. 1992.

- Mol. Cell. Biol. 12, 82–88.
- [8] Shimizu, A., Tada, K., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kurokawa, T., Magane, N., and Seo, M. K. 2001. *J. Biol. Chem.* 276, 11031–11040.
- [9] Beer, H. D., Vindevoghel, L., Gait, M. J., Revest, J. M., Duan, D. R., Mason, I., Dickson, C., and Werner S. 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 16091–16097.
- [10] Reid, H. H., Wilks, A. F., and Bernard, O. A. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1596–1600.
- [11] Bernard, O., Li, M., and Reid, H. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7625–7629.
- [12] 瀬尾美鈴 . 1993 . PC12 細胞の神経細胞への分化誘導における FGF レセプターの発現 京都産業大学国土利用開発研究所紀要 第 14 号 .
- [13] Yamaguchi, F., Saya, H., Bruner, J. M., and Morrison, R. S. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 484–488.
- [14] Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M., Daugherty, C., Ornitz, D. M., and Leder, P. 1994. *Gene & Dev.* 8, 3045–3057.
- [15] Deng, C., Bedford, M., Li, C., Xu, X., Yang, X., Dunmore, J., and Leder, P. 1997. *Dev. Biol.* 185, 42–54.
- [16] Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M., and Rossant, J. 1994. *Gene & Dev.* 8, 3032–3044.
- [17] Xu, X., Li, C., Takahashi, K., Slavkin, H. C., Shum, L., and Deng, C. X. 1999. *Dev. Biol.* 208, 293–306.
- [18] Itoh, N., Terachi, T., Ohta, M., and Seo, M. K. 1990. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 680–685.
- [19] Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. 1997. *Cell* 89, 693–702.
- [20] Lin, H. Y., Xu, J., Ischenko, I., Ornitz, D. M., Haleboua, S., and Hayman, M. J. 1998. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3762–3770.
- [21] Ong, S. H., Guy, G. R., Hadari, Y. R., Laks, S., Gotoh, N., Schlessinger, J., and Lax, I. 2000. *Mol. Cell. Biol.* 20, 979–989.
- [22] Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P., and Ornitz, D. M. 1991. *Cell* 64, 841–848.
- [23] Rapraeger, A. C., Krufka, A., and Olwin, B. B. 1991. *Science* 252, 1705–1708.
- [24] Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M. A., Dikic, I., Ladbury, J. E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J., and Lax, J. 1994. *Cell* 79, 1015–1024.
- [25] Reich-Slotky, R., Bonneh-Barkay, D., Shaul, E., Bluma, B., Svahn, C. M., and Ron, D. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 32279–32285.
- [26] Ornitz, D. M., Yayon, A., Flanagan, J. G., Svahn, C. M., Levi, E., and Leder P. 1992. *Mol. Cell. Biol.* 12, 240–247.
- [27] Walker, F., Kato, A., Gonez, L. J., Hibbs, M. L., Poulit, N., Levitzki, A., and Burgess, A. W. 1998. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7192–7204.
- [28] Hubbard, S. R., Mohammedi, M., and Schlessinger, J. 1998. *J. Biol. Chem.* 273, 11990.
- [29] Johnson, D. E., Lee, P. L., Lu, J., and Williams, L. T. 1990. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4728–4736.
- [30] 瀬尾美鈴 . 1996. FGF による神経細胞の分化誘導 FGF と FGF レセプターの遺伝子発現と機能の解析 . 京都産業大学論集 第 27 巻 第 3 号 自然系列 II 第 5 号 ( 抜刷 ) .
- [31] Huang, J., Mohammadi, M., Rodrigues, G. A., and Schlessinger, J. 1995. *J. Biol. Chem.* 270,



5065–5072.

- [32] Hadari, Y. R., Kouhara, H., Lax, I., and Schlessinger, L. 1998. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3966–3973.
- [33] Xu, H., Lee, K. W., and Goldfarb, M. 1998. *J. Biol. Chem.* 273, 17987–17990.
- [34] Martin, G. R. 1998. *Genes Dev.* 12, 1571–1586.
- [35] Shimizu, A., Takashima, Y., and Kurokawa-Seo, M. 2002. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 113–120.

## Proliferation of L6 Cells and Ba/F3 Cells and Differentiation of PC12 Cells Induced by Alternatively Spliced Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Isoforms

Masahiro NITTA

Misuzu SEO

### Abstract

Fibroblast growth factors (FGFs) are the mitogenic peptides essential for the development and maintenance of life processes in multicellular organisms. The biological effects of FGFs are mediated by FGF receptors (FGFRs). FGFR consists of a single-pass polypeptide chain with a membrane-spanning domain, an extracellular region with three immunoglobulin-like (Ig) domains, and a cytoplasmic region with a catalytic tyrosine kinase domain. Alternative splicing in the exons for the extracellular region of FGFRs generates receptor variants with different ligand-binding specificities and other unknown characteristics.

We have previously shown that PC12 cells expressed two alternatively spliced isoforms of FGFR1, i.e., the long form containing three Ig domains (FGFR1L), and the short form containing two Ig domains (FGFR1S). PC12 cells were originally cloned from rat pheochromocytoma and can be differentiated to sympathetic-like neuronal cells by treatment with nerve growth factor or FGF2. However, which FGFR1 isoform stimulates neuronal differentiation of PC12 cells in response to FGF has not been understood.

To understand the biological functions and signal transduction of these FGFR1 isoforms, we stably transfected rat myoblast L6 cells, mouse pre B BaF/3 cells, and PC12 cells with these genes, and analyzed the effect of various FGFs. In response to FGFs, FGFR1S stimulated cell proliferation in L6 cells in the absence of exogenous heparin. The addition of heparin suppressed the proliferation in FGFR1S-expressing L6 cells. In contrast, FGFR1L and FGFR1S could stimulate cell proliferation in Ba/F3 cells only in the presence of exogenous heparin. FGF6 is the most potent among the nine FGFs for inducing cell proliferation in FGFR1L- or FGFR1S-expressing Ba/F3 cells. However, FGF4 and FGF2 preferentially stimulated FGFR1S, but FGF1 preferentially stimulated FGFR1L. Inhibition of MAP kinase activity or Src kinase by the kinase inhibitor PD98059 or PP1 treatment almost completely suppressed the cell proliferation induced by FGF in both FGFR1L- and FGFR1S-expressing Ba/F3 cells. In contrast, the inhibition of JAK2 kinase or PI3 kinase by AG490 or LY294002 strongly suppressed the cell proliferation in FGFR1S-expressing cells but induced moderate growth inhibition in FGFR1L cells. These data indicate that FGFR1L and FGFR1S (i) are capable of signaling in a similar fashion; (ii) primarily use MAP kinase and Src kinase; (iii) but that FGFR1S also strongly depends on JAK kinase and PI3 kinase. Next, we compared the neuronal differentiation of PC12 cells induced by FGFR1 isoforms. FGF2 treatment induced neurite outgrowth in both FGFR1L- and FGFR1S-expressing PC12 cells. However, the neurites were longer in FGFR1S cells than those in FGFR1L cells. Furthermore, FGFR1S induced stronger FRS2 phosphorylation and stronger activation of MAPK. Taken together, the different biological responses mediated by FGFR1L and FGFR1S appear to be due to a difference in their ability to bind FGFs and utilize

the intracellular signaling pathways.

**Keywords:** FGFR1, alternative splicing, cell proliferation, neuronal differentiation, signal transduction