

FGFR3による軟骨前駆細胞の増殖抑制とMAPKの持続的活性化

林 惠理子
安 倍 慎 一
清 水 昭 男
瀬 尾 美 鈴

序 論

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor: FGF) は形態形成において重要な働きをする。現在23種類のFGFが確認されており¹⁾、これらに対するレセプターである線維芽細胞増殖因子レセプター (Fibroblast Growth Factor Receptor: FGFR) には4種類の遺伝子が存在する。FGFRは膜を一回貫通するチロシンキナーゼ型受容体である²⁻⁴⁾。その構造は、細胞外領域に免疫グロブリン様ドメインが3個 (IgI, IgII, IgIII) と、IgIとIgIIとの間に酸性アミノ酸に富んだアシッドボックス領域があり、N末端側から膜貫通領域と細胞膜内領域にはチロシンキナーゼドメインがある。このチロシンキナーゼドメインにはキナーゼ挿入ドメインがあり、最後に受容体のC末端ドメインから構成されている^{3,4)}。さらにIgIドメインを欠損するアイソフォームやIgIIIの後半部部分をコードする異なるエキソンが選択的スプライシングされることにより多くのアイソフォームを生じ細胞特異的に発現している。

FGFがFGFRと結合するとFGFRは二量体化し、チロシンキナーゼが活性化されお互いのチロシン残基をリン酸化し、細胞内へとシグナルが伝達されていく^{2,4-7)}。この二量体化にはヘパラン硫酸が関与している。近年のシグナル伝達の研究によりFGFR3は、577, 647, 648, 724, 760, 770番目のチロシンがFGF刺激によりリン酸化されることが報告されている⁸⁾。FGFR3を介して活性化される主なシグナル伝達経路として現在わかっているのは、低分子量Gタンパク質 Ras を介する経路、PLC- γ を介する経路、Jak/Stat経路、PI3-kinase経路などである

35899)

FGFは発生初期において四肢のパターン形成を司る分子の一つである。それゆえ、FGFRに遺伝子突然変異があると骨格形成異常が生じる。中でも、FGFR1、またはFGFR2はPfeiffer症候群^{10,11)}、Crouzon症候群^{10,11)}が報告されている。Pfeiffer症候群の主な症状は頭蓋骨縫合早期癒合症や合指症である。Crouzon症候群では頭蓋骨と顔面骨の早期癒合によって頭蓋縫合早期癒合症に眼球突出、上顎低形成などの合併などを呈する。FGFR3では軟骨形成不全症^{12,13)}、軟

骨無形成症^{11,12)}、致死性軟骨異形成症 (TDI, TDII)^{9,14,29)} などが報告されている。軟骨形成不全症とは背の低さとともに、鼻根部陥凹を伴った大きな頭、腰椎前彎、短小な手および丸く太い指などの特徴を有するジストロフィである。軟骨無形成症とは小人症を呈し、大きな頭、背腰部の後彎、小肢症、大きな腹部、泉門の癒合遅延などが見られる。致死性軟骨異形成症の症状もまた軟骨無形成症と似通った症状を呈する。しかし軟骨無形成症よりも致死性が高く、胎生致死性を示す。このように、FGFR3は軟骨内骨化に特に重要であり、FGFR1やFGFR2は頭蓋骨形成、膜内骨化に重要であることがわかる¹¹⁾。

本研究において軟骨形成におけるFGFR3の役割を解析するため、*in vitro*での軟骨分化モデルであるATDC5細胞を用いた^{15,16)}。ATDC5細胞は渥美らによって軟骨分化能を指標にマウス胚性腫瘍細胞から分離された¹⁵⁾。ATDC5細胞は*in vitro*で成熟軟骨細胞に分化するにしたがって、その形態が丸くなりCDKインヒビターであるp21^{CIP1}の発現レベルが上昇し、完全に増殖を停止させる⁷⁾。ATDC5細胞の軟骨分化過程におけるFGFRの発現を調べると、未分化なATDC5細胞にはFGFR1とFGFR2は発現しているが、FGFR3は発現していないことがわかった。しかしATDC5細胞が軟骨細胞に分化する過程でFGFR3の発現が上昇した。FGFR3の発現パターンを解析しているときに、新規のFGFR3アイソフォームを1996年に多田孝一郎氏が発見した。そのアイソフォームは未分化なATDC5細胞に発現しており、1998年に清水昭男氏がその遺伝子をクローニングし全長の塩基配列を決定したところ、アシッドボックス領域をコードしているexon4が欠損している以外はマウス完全型FGFR3 (MFGFR3) と全く同じ一次構造であることがわかった (MFGFR3 Δ AB)¹⁷⁾。MFGFR3とMFGFR3 Δ ABをATDC5細胞にそれぞれ強制発現させその機能を解析すると、MFGFR3を発現する細胞ではFGF1を添加すると細胞の形態が球状になり、完全に増殖が停止した⁴³⁾。一方、MFGFR3 Δ ABを発現する細胞でも増殖は抑制されたが、細胞の形態はスピンドル様のままであった^{7,43)}。この結果は、MFGFR3が軟骨細胞の増殖の負の調節因子として機能することを*in vitro*で初めて証明したものである。同時にMFGFR3が負の調節因子として機能を完全に発現するためには、細胞外ドメインのアシッドボックス領域が必要不可欠であることがわかった。

そこで、MFGFR3とMFGFR3 Δ ABの機能の違いはどのような細胞内シグナルの違いに起因するのかを明らかにしようとした。FGFRからのシグナルは、非常に多くのシグナル伝達物質を活性化し、空間・時間的に多数の遺伝子発現が調節されやがて様々な細胞応答が誘導される。FGFRからのシグナルではRas/MAPK (ERK1/2) 経路がよく研究されている。ERK1/2とはextracellular-regulated-kinase1/2のことであり、FGFRの様なチロシンキナーゼ型レセプターがリガンドにより活性化されることによって膜結合型低分子量Gタンパク質であるRasとセリン/スレオニンキナーゼであるRafを出発点とするMAPKカスケードの最下流分子である^{2,3,4,8,9)}。活性化されたERK1/2は核内へ移行しセリン/スレオニンキナーゼとして働き、転写因子のリン酸化を介して遺伝子発現を制御している。またそれ以外にも細胞質のタンパク質をリン酸化

していることも報告されている^{32,34)}。このようにして活性化されたERK1/2は多くのタンパク質の発現を誘導し、結果として細胞分化や細胞増殖などの細胞応答を調節する。

本研究において、FGFからのシグナルがFGFR3とFGFR3ΔABからでは異なっていると考え、*in vitro*の系で分子メカニズムを解析するために優れているATDC5細胞を用いて、特に活性化される細胞内シグナル伝達経路の時間的な経過がどのように違うのかを解析した。さらにFGFR3のチロシンリン酸化を調べるため、Santa Cruz Biotechnology社の抗ヒトFGFR3抗体と親和性が高くなるようにMFGFR3及びMFGFR3ΔABのC末端の一部をヒトFGFR3 (HFGFR3)のC末端の一部と組み換えを行った。その結果として、この組み換えによりFGFR3のC末端がCDKインヒビターであるp21^{CIP1}の発現に関与していることが示唆された。

略語表

cDNA : complementary DNA

DMEM/F12 : Dulbecco's modified Eagle medium: Nutrient Mixture F-12

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid salt dihydrate

FBS : fetal bovine serum

FGF : fibroblast growth factor

FGFR : fibroblast growth factor receptor

PCR: polymerase chain reaction

PBS : phosphate-buffered saline

PVDF : polyvinylidene fluoride

SDS : sodium dodecyl sulfate

結 果

(1) マウスとヒトのキメラFGFR3アイソフォームの作製とATDC5細胞クローンにおけるFGFR2とFGFR3の発現

ATDC5細胞は*in vitro*で軟骨細胞に分化し、FGFR3による増殖抑制機構を分子レベルで解析するために優れた系である。しかし、マウスFGFR3に対する良い抗体が得られず、FGFR3アイソフォームによって引き起こされる細胞内シグナル伝達を解析することが非常に困難であった^{6,7)}。そこでマウスFGFR3のC末端部分をヒトFGFR3のC末端部分に置換し、ヒトFGFR3に対する抗体を利用しようと考えた (Fig. 1, Fig 2)。マウスFGFR3の2つのアイソフォームであるMFGFR3ΔABとMFGFR3のC末端をそれぞれヒトFGFR3 (HFGFR3) のC末端に置換した。そして発現ベクターであるpBKRSVへと組み換えなおした。ヒトの塩基配列と組み換え塩基

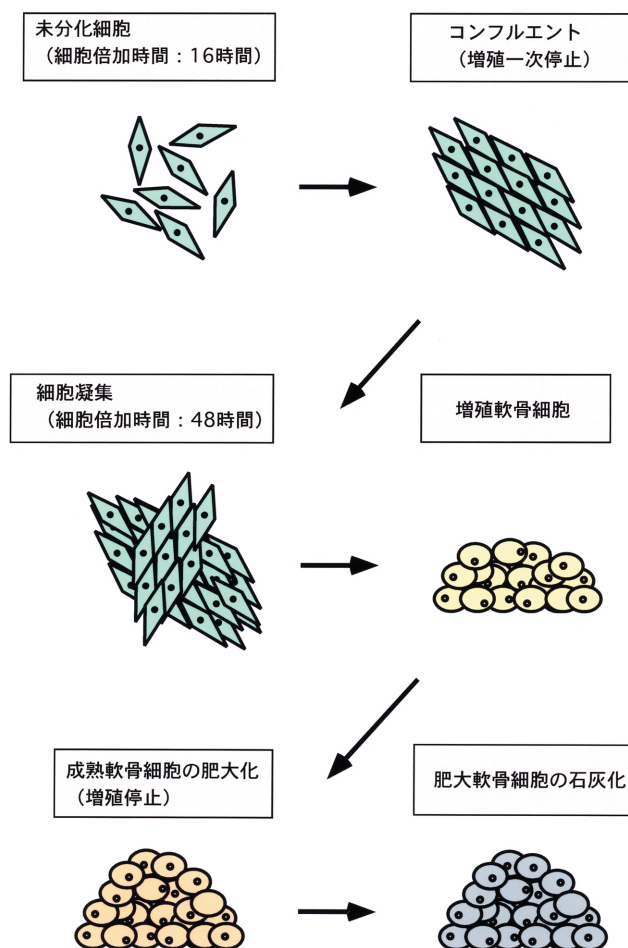


Fig.1 ATDC5細胞の軟骨分化モデル

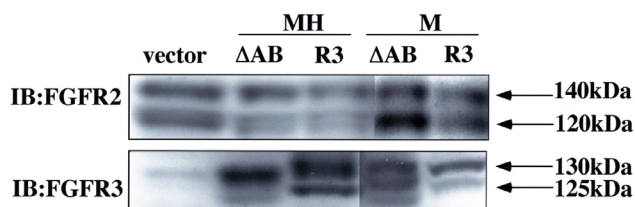


Fig. 2 ATDC5細胞におけるFGFR3の強制発現

vector, MHFGFR3, MHFGFR3ΔAB, MFGFR3, MFGFR3ΔABをそれぞれ強制発現させたクローン細胞をRIPAバッファーに溶解し、タンパク質を抽出した。各タンパク質量60μgをSDSを含む7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ウエスタンブロッティングによって検出した。

数は307個、アミノ酸数では81個であった。その中でチロシンキナーゼドメインの一部も24個のアミノ酸が置換されていた。また、これらの置換した部位には2つのチロシン (Y-754, Y-

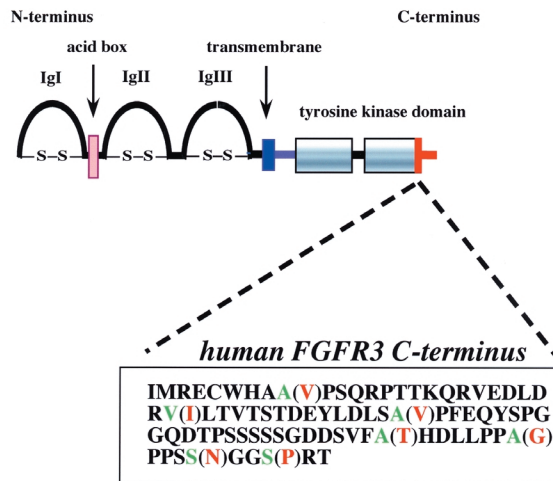


Fig. 3 Mouse-Human FGFR3の作成

(1) FGFR3のモデル図

FGFRは細胞外ドメインにIgI, IgII, IgIIIと酸性アミノ酸に富んだアシッドボックスを持ち、膜貫通領域をはさんで細胞内にチロシンキナーゼドメインを持っている。

(2) 置換したFGFR3 (C末端) のアミノ酸配列

マウスの81個のアミノ酸をヒトのアミノ酸と置換した。そのうち異なるアミノ酸数は7個(緑)である。直前のアミノ酸がヒトのアミノ酸配列で、赤字はマウスのアミノ酸配列である。

764) が含まれており、ヒトとマウスのアミノ酸の違いは7個であった (Fig. 3, 4)。

作製したそれぞれのキメラレセプターをATDC5細胞にエレクトロポレーション法によって遺伝子導入し、安定発現細胞をクローニングしてレセプターの発現と機能を確認した。未分化なATDC5細胞には内在性のFGFR1, FGFR2, FGFR3ΔABが発現していることが報告されている^{7, 17)}。MFGFR3ΔABは軟骨細胞に発現しているアイソフォームで選択的スプライシングにより生じ、細胞外ドメインのアシッドボックスを欠損している。このようなATDC5細胞にMHFGFR3ΔABまたはMHFGFR3を遺伝子導入した結果、ウエスタンブロッティングで抗ヒトFGFR3抗体を用いるとMHFGFR3細胞では125kDa, 130kDaの部位にバンドが検出され、MFGFR3ΔAB, MFGFR3の遺伝子を導入されたATDC5細胞より強くFGFR3の発現が確認できた。130kDaのバンドは糖鎖修飾された成熟型のFGFR3であり、125kDaのバンドは未成熟型のFGFR3であると考えられる。MHFGFR3ΔAB細胞では、MHFGFR3細胞よりもやや小さいバンドが検出された。対照として、空ベクター (pBKRSV) のみを遺伝子導入しクローン化した細胞 (vector細胞) では、FGFR3の発現は見られなかった。一方、抗ヒトFGFR2抗体で内在性のFGFR2を同様に検出したところ、120kDaと140kDaのバンドが全てのクローンに確認できた。140kDaのバンドはIgIドメインを持つ完全型のFGFR2であり、120kDaのバンドはIgIを欠損したFGFR2であると考えられる (Fig. 2)。

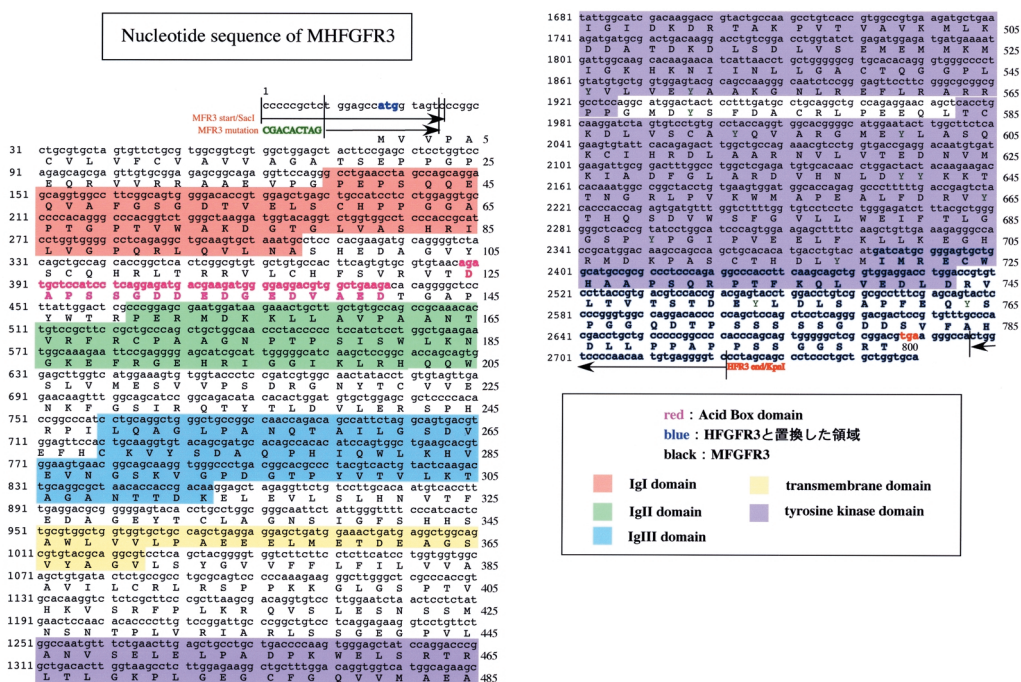


Fig. 4 MHFGR3の塩基配列

HFGFR3 DJM1-short : DJM1細胞からクローニングされた膜貫通領域欠損型ヒトFGFR3

MHFGR3ΔAB : アシッドボックスが欠損したMHFGR3

左横の数字 : 塩基配列

右横の文字 : アミノ酸配列

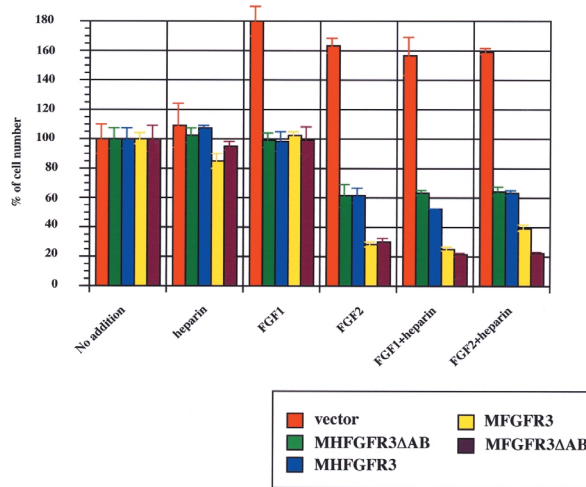
：RT-PCRによってMFGFR3とHFGFR3をクローニングする際に用いたプライマーを示した．

緑色の文字 : チロシンキナーゼドメインにあるチロシン残基

(2) MHFGR3またはMHFGR3ΔABを発現しているATDC5細胞のFGF刺激による増殖抑制

(Fig. 2) で用いたクローン細胞で増殖アッセイを行った．各クローン，24穴プレートに 6×10^3 個/ウェル/500 μ l で播種した．翌日，FGF1，FGF2 (10 ng/ml)，ヘパリン (10 μ g/ml) を加え，3日後に細胞数をコールターカウンターで計測した．そして非添加のものをそれぞれのクローンのコントロールと考え，それを100%の増加率とし，各クローンがどれだけ増加したかを%表示で表した (Fig. 5)．VectorクローンはFGF1，またはFGF2刺激によって増殖が促進された (160% ~ 180%)．また，その程度はヘパリンを添加してもほとんど変わらなかった．一方MFGFR3ΔAB，MFGFR3，MHFGR3ΔAB，MHFGR3を導入したクローンではFGF2単独，FGF1+ヘパリン，FGF2+ヘパリンの添加によって増殖が強く抑制された．しかし，FGF1単独，ヘパリン単独では増殖にほとんど影響は認められなかった．また，マウスレセプター (MFGFR3とMFGFR3) ではFGFのみ，FGF+ヘパリンで非添加の20 ~ 30%にまで強く増殖が抑制されたが，ヒトキメラレセプター (MHFGR3とMHFGR3ΔAB) では非添加の50 ~

A



B

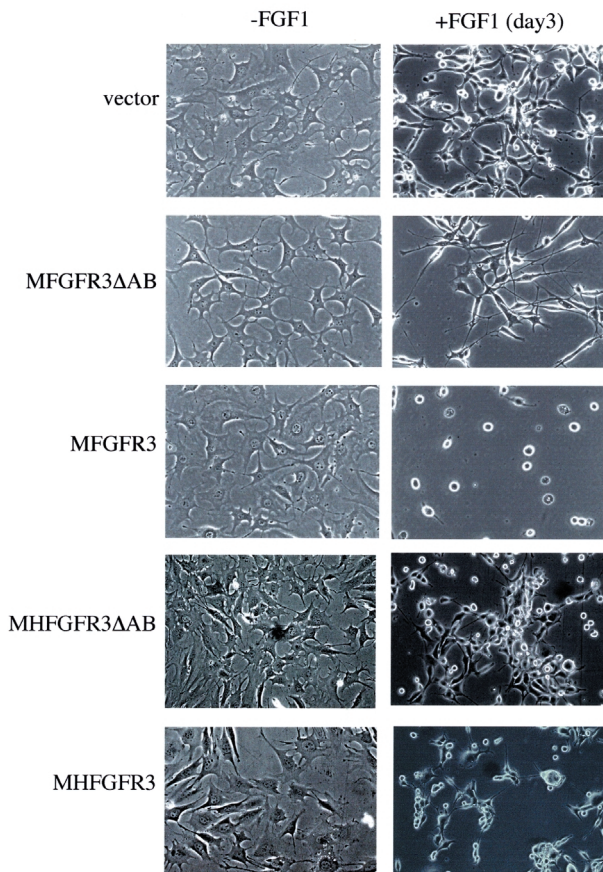


Fig. 5 アシッドボックス欠損型または完全型FGFR3を発現しているATDC5細胞のFGF1刺激による増殖抑制

MHFGFR3, MHFGFR3ΔAB, MFGFR3, MFGFR3ΔABをそれぞれpBKRSVに挿入し, ATDC5細胞に遺伝子導入したのちクローニングした。またコントロールとしてpBKRSVのみを遺伝子導入した細胞もクローニングした。各クローンを5%ウシ胎児血清入り(FBS) DMEM/F12中に 6×10^3 個/ウェル/500 μ l (24穴培養皿)の密度で播種し, 24時間後にFGF1, またはFGF2 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μ g/ml) を添加し, CO₂インキュベーター中で37℃, 5% CO₂下で培養した。

A. 3日後に細胞を回収し, コールターカウンターで細胞数を計測した。グラフ中の各点は3つの独立した実験の平均値を示し, 標準偏差をバーで示した。
B. FGF1非刺激と刺激後3日目の各クローンの形態。

60%程度にまでしか抑制されなかったことから、ヒトキメラレセプターはそのシグナルが減弱してしまったことが示唆された。

またFGF刺激による形態にも違いが見られた。FGF1+ヘパリン刺激後3日目と比較すると、vector, MFGFR3ΔAB, MHFGFR3ΔAB, MHFGFR3ではスピンドル様の形状を示していた。しかしMFGFR3では完全な球状を示していた (Fig. 5-B)。

(3) CDKインヒビター-p21^{CIP1}の各クローンにおける発現レベル

以上の結果から、FGFR3はATDC5細胞に対して増殖抑制のシグナルを伝達することが示された。そこでFGFR3シグナルを伝達する下流タンパク質を同定しようと試みた。致死性軟骨異形性症 (TDII) の原因遺伝子はドミナントアクティブ型変異を持ったFGFR3であり、変異型FGFR3から恒常的なシグナルが軟骨細胞に入力されることにより長骨の成長板における軟骨の増殖を阻害することが報告されている²⁹⁾。この時変異型FGFR3により転写因子であるSTAT1がリン酸化され、CDKインヒビターであるp21^{CIP1}の発現が増加していた。

(Fig. 5) で示したように、vectorクローンを除いては全クローンでFGF1+ヘパリン刺激により増殖抑制が起こった。増殖抑制の原因を知るため、CDKインヒビターであるp21^{CIP1}とp27^{KIP1}について調べた。各クローン細胞を播種し、翌日にFGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) を添加し、1日後と2日後にそれぞれタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングによって検出した。面白いことに、MFGFR3クローンとわずかながらMFGFR3ΔABにのみp21^{CIP1}の発現が見られたが、MHFGFR3とMHFGFR3ΔABには検出されなかった (Fig. 6)。またp27^{KIP1}の発現は全クローンで見られたが、FGF刺激による変化は見られなかった (データ示さず)。以上の結果から、MFGFR3とMHFGFR3ΔABはFGF刺激によりp21^{CIP1}のタンパク質の発現を誘導し、細胞増殖を抑制していると考えられた。しかし、ヒトキメラレセプターでは全くp21^{CIP1}タンパク質が検出されず、今回キメラレセプターにするために行ったマウスFGFR3のC末端の置換がp21^{CIP1}の発現に影響を与えたものと考えられた。また、MFGFR3とMHFGFR3ΔABを比較すると、MFGFR3の方がより強くp21^{CIP1}タンパク質を誘導することが分かった。さらに、

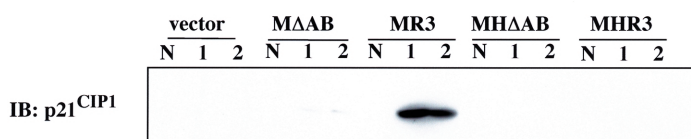


Fig. 6 FGF1刺激によるp21^{CIP1}発現の誘導

各クローンをFGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で非刺激 (N) または刺激した後、1日後と2日後 (1, 2) にタンパク質をRIPAバッファーで回収した。そして各タンパク質量60 μgをSDSを含む12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ウエスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗p21^{CIP1}抗体を使用した。vector: control, MΔAB: Mouse FGFR3ΔAB, MR3: Mouse FGFR3, MHΔAB: Mouse-Human FGFR3ΔAB, MHR3: Mouse-Human FGFR3

p21^{CIP1}の発現を誘導しないヒトキメラレセプターによっても細胞増殖が抑制されることからp21^{CIP1}以外の増殖抑制メカニズムが考えられた。

(4) FGFR3アイソフォームから誘導されるMAPキナーゼ活性

Ras/Raf/MAPキナーゼ経路はFGFRを介して活性化される主なシグナル伝達経路である。一般的にFGFからのシグナルは増殖・分化を誘導するが、FGFR3を発現しているATDC5細胞は増殖抑制のシグナルを伝達することが以上の研究でわかった。次に、FGFR3が増殖抑制シグナルを伝達するとき、Ras/Raf/MAPキナーゼ経路にどのような影響を与えるか調べた。研究室の以前の研究で、MHFGFR3ΔAB及びMHFGFR3クローンをFGF1で刺激するとMAPキナーゼ(ERK1; p44, ERK2; p42)が強く活性化されることが示されている⁷⁾。Fig. 7に示すように、FGF1刺激により、vector細胞のMAPKは、FGF1刺激後5分ですみやかにリン酸化されるが、60分後にはリン酸化が低下していた。一方、MHFGFR3ΔAB、MHFGFR3クローンではMAPK(ERK1とERK2)がvector細胞よりも強く活性化され、FGF1刺激後、60分以降も420分まで持

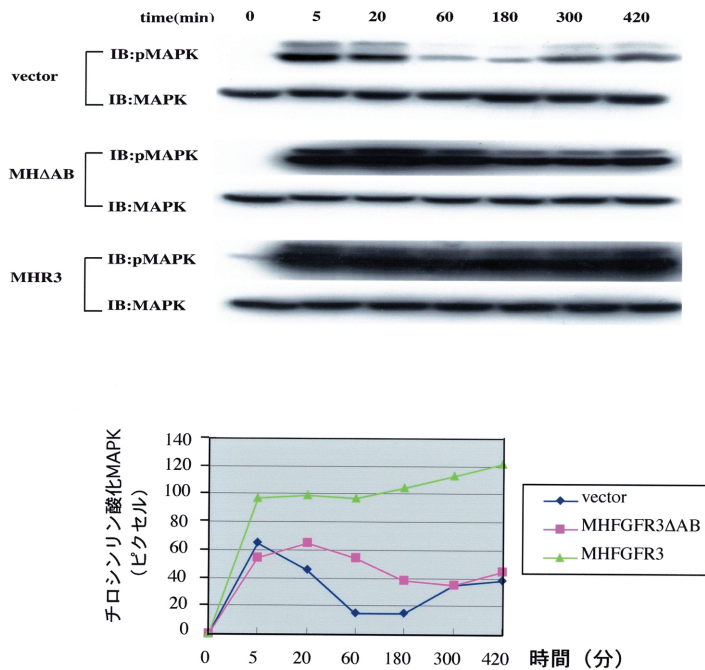


Fig.7 リン酸化MAPKの持続性

各ATDC5クローン細胞をFGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で記述された時間刺激した。その後、タンパク質をRIPAバッファーによって回収した。その後、タンパク質40 μgを8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗MAPK (ERK1/2) と抗p-MAPK (ERK1/2) 抗体を使用した。下図はチロシンリン酸化されたMAPKをNIHイメージ (ソフトウェア) によって取り込み、グラフ化したものである。

続していることが分かった。しかし、MHFGFR3 Δ ABではFGF1刺激後、180分では活性の低下が認められるのに対し、MHFGFR3では180分以降さらに活性化が増していた。以上の結果から、MHFGFR3の方がMHFGFR3 Δ ABよりも持続的にMAPKを活性化することが分かった (Fig. 7)。Ras/Raf/MAPK経路が活性化されると細胞増殖を誘導することが知られているが、Raf/MAPK経路を強く活性化すると、PC12細胞^{32,34)}やその他のHL60細胞⁴⁰⁾では増殖抑制を起こすことも報告されている。今回のATDC5細胞の結果が後者の結果と一致しているものと考えられた。

(5) 活性化FGFR3アイソフォームが引き起こすFRS2とShp2のチロシンリン酸化

FGFRからのシグナル伝達としてRas/Raf/MAPK経路が主流であると述べてきたが、Fig. 7の結果からMHFGFR3 Δ ABとMHFGFR3クローンとの間でMAPK活性化の時間的経過に違いが見られた。そこでRas/Raf/MAPKシグナル伝達経路の上流に焦点を当てて研究を行った。FGFRはFGFにより刺激を受けると2量体化し、お互いのチロシンキナーゼをチロシンリン酸化する。そして、そのリン酸化チロシン残基にSH2ドメインを持ったアダプタータンパク質、例えばFRS2 (FGFR-substrate-2) やGrb2 (growth factor receptor bound protein 2), Shp2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2) が結合する。その後Grb2と複合体を形成したグアニチンヌクレオチド交換因子Sos (son of sevenless) がシグナルを受け、Sosが低分子量Gタンパク質Rasに結合することによってMAPKカスケードが引き起こされる。またこれらのシグナルはフィードバック抑制されることが報告されている。つまり活性化されたMAPキナーゼがセリン/スレオニンキナーゼとして機能し、FRS2のセリン/スレオニンをリン酸化することによってシグナルを減弱調節することが報告されている^{32,34)}。

それらのなかで、FRS2とShp2の結合が持続的なMAPKの活性化に重要な役割を果たしていることが報告されているので¹⁸⁾、FRS2とShp2のチロシンリン酸化レベルと結合度合いを調べてみた。vector, MHFGFR3 Δ AB, MHFGFR3クローンのFGF刺激によるFRS2のチロシンリン酸化を調べると、刺激後5分という短い時間に非常に強くリン酸化されていた。チロシンリン酸化FRS2は80kDaと90kDaの二つが検出できた。この大きさの違いはFRS2のセリン/スレオニンのリン酸化の違いであると考えられる。FRS2のチロシンリン酸化ではなく、セリン/スレオニンをリン酸化することで分子量が見かけ上大きくなり、ゲルシフトが起きることが報告されている^{26,32,34)}ので、80kDaと90kDaの大きさの違いもセリン/スレオニンリン酸化の違いであることが示唆された。FGF1刺激60分後のvectorクローンでは、FRS2は再び脱リン酸化型にもどっていたが、MHFGFR3 Δ AB, MHFGFR3クローンではまだ少しリン酸化されていた (Fig. 8-A)。

次にShp2について調べた。Shp2はチロシンホスファターゼであるが、自分自身がチロシンリン酸化されるとFRS2と結合することでFGFRの下流に位置しているFRS2とGrb2の間に入っ

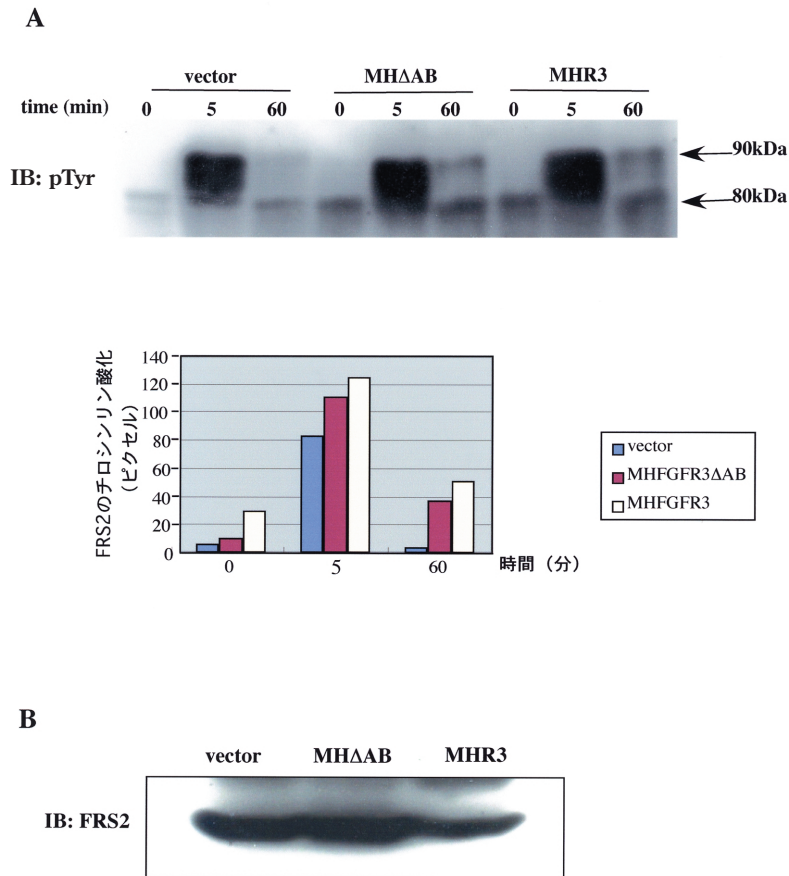


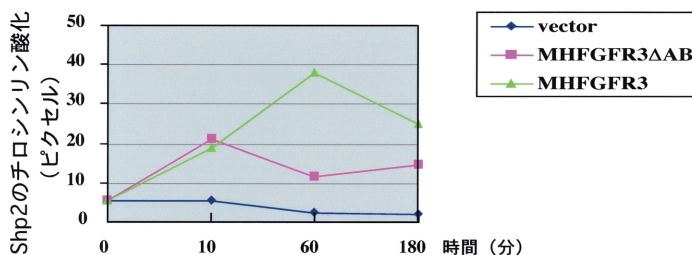
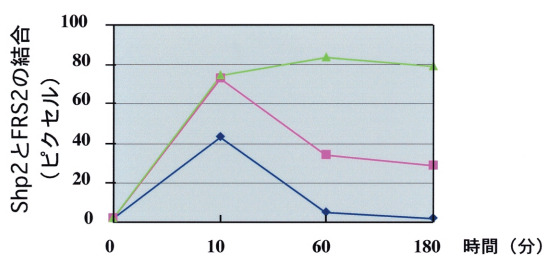
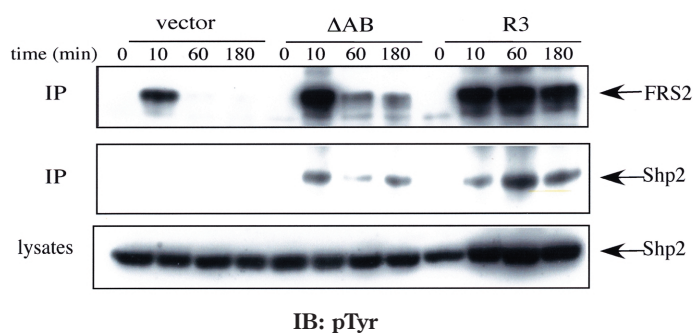
Fig. 8 FGF1刺激によるFRS2のチロシンリン酸化

MHFGFR3, MHFGFR3ΔABクローン細胞にFGF1 (10 ng/ml) とペパリン (10 μg/ml) で上記の時間だけ刺激を与えた。その後, Lysis Aバッファーに溶解させ, タンパク質を抽出した。A. タンパク質 (500 μg) を抗FRS2抗体と一晚免疫沈降し, protein A-セファロースを加えて遠心した。その沈殿をLysis Aバッファーで4回洗浄後, SDS-PAGEのサンプルとして使用した。そして8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, ウェスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗リン酸化チロシン抗体を使用した。下図はFRS2のリン酸化をNIHイメージ (ソフトウェア) で取り込み, グラフ化したものである。B. 各クローンで非刺激のタンパク質 (60 μg) をAと同様にSDS-PAGE後, ウェスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗FRS2抗体を使用した。

てアダプター分子として機能し, それらの結合時間と結合の強度を補足していると考えられている²⁷⁾。したがって, Shp2はRas/MAPK経路の持続的活性化に重要な役割を果たしていると報告されている^{18, 26, 27)}。そこでMHFGFR3によるMAPKの持続的活性化にShp2が関与しているかどうか調べるため, これらのクローンをFGF1で刺激後, 抗Shp2抗体で免疫沈降し, Shp2のチロシンリン酸化とFRS2との結合を調べた。その結果, 90kDaのチロシンリン酸化されたFRS2と60kDaのチロシンリン酸化されたShp2が検出され, MHFGFR3クローンでは180分後

も強くチロシンリン酸化されていることがわかった (Fig. 9-A). FRS2とShp2の結合をさらに確認するため、FGF1刺激後p13^{SUC1} アガロースを用いてFRS2を細胞溶解液から沈殿させた。その結果、チロシンリン酸化されたFRS2が回収された。MHFGFR3ではFGF1刺激後、10、60、180分でも変わらず、FRS2とShp2との結合が強く見られたが、MHFGFR3 Δ ABでは10分では強く60分以降では結合が低下した。また、vectorクローンでは10分のみに弱く結合が見られたが、60分以降では全く見られなかった (Fig. 9-B)。以上の結果より、MHFGFR3 Δ AB、MHFGFR3クローンではFGF1刺激後Shp2は長時間チロシンリン酸化されており、またShp2とFRS2との結合も長時間続いていた。それはMHFGFR3クローンにおいてより顕著であった (Fig. 9-A, B)。以上の結果からMHFGFR3 Δ AB、MHFGFR3クローンにおけるRas/MAPK経路の持続的活性化にFRS2とShp2のチロシンリン酸化と持続的な結合が影響を与えているものと考えられる。

A



B

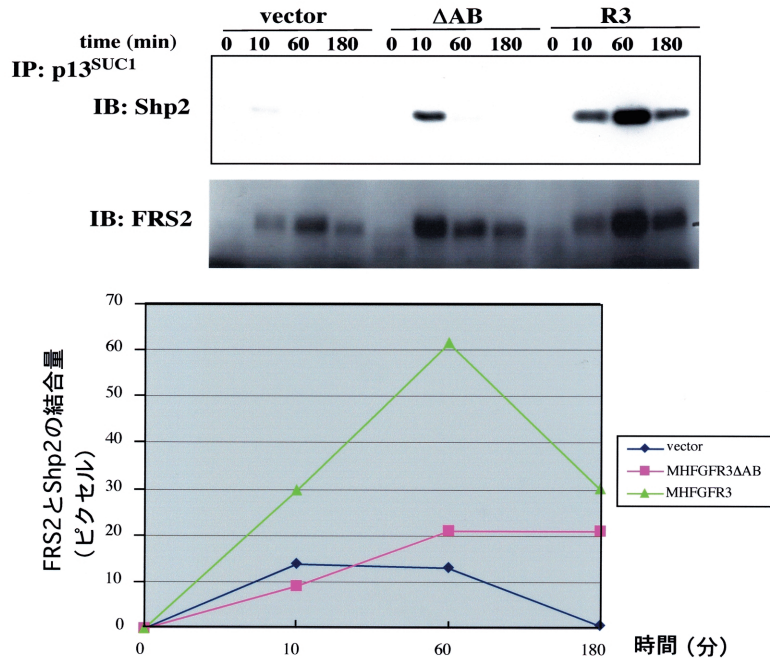


Fig. 9 FGF1刺激によるFRS2とShp2のチロシンリン酸化と持続的結合

MHFGFR3またはMHFGFR3ΔABクローン細胞にFGF1 (10 ng/ml) とペパリン (10 μg/ml) で図示した時間刺激を与えた。その後、Lysis Aバッファーに溶解させ、タンパク質を抽出した。A. タンパク質 (500 μg) を抗Shp2抗体で一晩免疫沈降し、Lysis Aバッファーで4回洗浄後、SDS-PAGEのサンプルとして使用した。そして8%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) を使用した。また溶解液のほうはタンパク質60μgを8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗Shp2抗体を使用した。Shp2のリン酸化とShp2とFRS2の結合をNIH イメージ (ソフトウェア) によって取り込み、グラフ化したものである。B. タンパク質 (500 μg) をp13^{SUC1}アガロースで一晩インキュベートした後、Lysis Aバッファーで4回洗浄後、SDS-PAGEのサンプルとして使用した。8%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗Shp2抗体を使用した。その後Restore™ Western Blot Stripping Bufferを用いて抗体を剥がし、再度抗FRS2抗体で検出した。FRS2とShp2の結合をNIH イメージ (ソフトウェア) によって取り込み、グラフ化したものである。

(6) FRS2とMAPKの結合

近年の報告により、Ras/MAPK経路の負の調節にFRS2とMAPキナーゼ (ERK1/2) が関与していることが示された^{28, 32, 34}。PC12細胞では、活性化されたMAPKがFRS2のセリン/スレオニン残基をリン酸化することによってRas/MAPK経路のシグナルを抑制する^{28, 32}。そのメカニズムは、FRS2のセリン/スレオニン残基がリン酸化されることにより、チロシンリン酸化部位へのアダプタータンパク質の結合が阻害されるため、下流へのシグナル伝達が遮断されるためであると考えられているが、まだ詳細は明らかにされていない。それらの報告をふまえて、これらのクローンにおけるFRS2とMAPKの結合を調べた。すると全てのクローンで結合が見ら

れた．またMHFGFR3クローンにおいては刺激180分後でもかなりの強さで結合しているのが確認できた (Fig. 10)．しかし，この結果は報告されているMAPK活性のフィードバック阻害と矛盾しており，ATDC5細胞におけるMAPKのFRS2への結合と長時間の活性化にどのような関係があるのか，全く分かっていない．

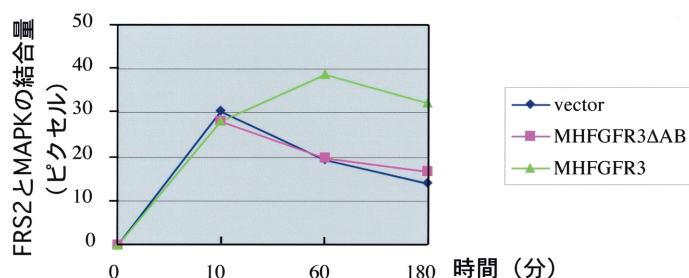
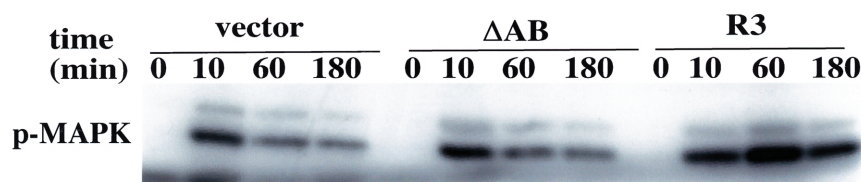


Fig. 10 FRS2とMAPKの結合

MHFGFR3またはMHFGFR3ΔABクローン細胞にFGF1 (10 ng/ml) とペパリン (10 μg/ml) で図に示した時間だけ刺激を与えた。その後，Lysis Aバッファーに溶解させ，タンパク質を抽出した。そのタンパク質 (500 μg) をp13^{Suc1} アガロースと一晚インキュベートした後遠沈し，Lysis Aバッファーで4回洗浄後，SDS-PAGEのサンプルとして使用した。8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し，ウエスタンブロッティングによって検出した。抗体は抗p-MAPK (ERK1/2) 抗体を使用した。下図FRS2とMAPKの結合をNIHイメージ (ソフトウェア) で取り込み，グラフ化したものである。

考 察

FGFは形態形成において非常に重要な働きをしている^{2,3,4)}．FGFはその他の形態形成因子とともに細胞の増殖や分化に影響を与え，運命を決定している．FGFの受容体 (FGFR) は4種類が同定されている．なかでもFGFR3は，形態形成の中で特に骨に関する発生に強く関わっていることが報告されている^{9,11,12,14,35)}．FGFR3をノックアウトすると，骨格形成に異常が見られ，脊柱後弯症・脊柱側弯症・弯曲した尻尾・屈曲し異常成長した長骨や脊椎などの症状が見られた³⁶⁾．これはFGFR3からのシグナルが伝達されなかったので，骨に置き換わる軟骨細胞が異常増殖したためであると考えられた^{9,11,12,14,35)}．

本研究において、FGFR3は*in vitro*での軟骨分化モデルであるATDC5細胞においても増殖抑制という負のシグナルを伝えることを示した。増殖抑制のシグナルが必要な理由は、FGFR3からのシグナルによって軟骨形成を抑制し、成長段階に応じて適度な四肢の長さへと調節するためである。以前の研究で、ATDC5細胞が軟骨細胞に分化する過程でFGFR3の発現が上昇することが示されている⁷⁾。このような軟骨形成過程で調節役をしているFGFR3の突然変異には2パターンあり、骨格形成の異常を引き起こす。一つはFGFR3からのシグナルが入り続けるドミナントアクティブ型変異であり、軟骨無形成症の原因遺伝子である^{11,13)}。この変異型FGFR3の恒常的活性化により、軟骨が形成されなくなり骨に置換されないため四肢が異常に短くなる。もう一つは、ドミナントネガティブ型の変異であり、FGFR3のチロシンキナーゼが活性化しないためシグナルが全く入らなくなる。その結果、軟骨増殖が活発に行われ、FGFR3 ノックアウトマウスと同じように四肢が異常に長くなる³⁶⁾。

FGFR3には現在3種類のアイソフォームが発見されている。一つは完全型FGFR3で膜貫通型受容体である。もう一つはIgIIIドメインの後半領域と膜貫通ドメインを欠損したFGFR3ΔTM、そして最後にアシッドボックスを欠損しているFGFR3ΔABである。FGFR3ΔTMは可溶型受容体でヒト扁平上皮癌細胞であるDJM-1細胞よりクローニングされた^(5, 37)。また、FGFR3ΔABはFGFR3と同様に膜貫通型受容体であり、ATDC5細胞よりクローニングされた。FGFR3は未分化な軟骨細胞には発現しておらず、軟骨細胞への分化とともに発現が上昇する。一方、FGFR3ΔABは未分化なATDC5細胞にも発現が確認されている⁷⁾。そして分化が進行しても、その発現には変化はない。本研究において、これらのアイソフォームを強制発現したATDC5細胞の増殖への影響を調べた結果、FGF1とヘパリンによる刺激によってMFGFR3、MFGFR3ΔABはともに対照 (vector) の約12%程度に増殖が抑制された。つまりFGFR3ΔABもFGFR3と同様に細胞増殖抑制のシグナルを伝達することから、FGFR3ΔABは未分化な軟骨前駆細胞に発現し、増殖速度を調節している可能性が考えられた。しかし、FGFR3ΔABが増殖抑制のシグナルだけでなく他のシグナルに関与していることは十分考えられる。一方、ATDC5細胞においてFGF刺激によって増殖を促すのは主にFGFR1、FGFR2を介するシグナル伝達であると考えられる。*in vitro*におけるATDC5細胞の軟骨分化過程におけるFGFR1、2、3それぞれの発現量をRT-PCRを用いて比較すると、軟骨への分化が進行するにしたがって増加する傾向が見られた。

本研究において、FGFR3による増殖抑制のシグナルがどのような経路を介しているのか、細胞内シグナル伝達について詳細に調べようとした。最初に、FGFR3のチロシンリン酸化を調べる目的で、MFGFR3、MFGFR3ΔABクローンの細胞溶解液を抗ヒトFGFR3抗体により免疫沈降したが、FGFR3検出感度が低かった (結果示さず)。これは、この抗体が認識する部位のアミノ酸配列がマウスと異なっているためであると考え、FGFR3のC末端部位をヒトFGFR3の塩基配列と置換したマウスヒトキメラレセプターMHFGFR3、MHFGFR3ΔABを作成し、これらのレセプターを発現したクローンを得た。これらのクローンをFGF1とヘパリンによって刺

激をしたところ、MHFGFR3、MHFGFR3 Δ ABともに対照の約30%程度に増殖が抑制された。しかし、これらのクローンをFGF1刺激後、抗ヒトFGFR3抗体を用いて免疫沈降しレセプターのチロシンリン酸化を調べたがほとんど検出することは出来なかった（結果示さず）。そこで次に、FGF刺激によりチロシンリン酸化される細胞内の主要なタンパク質であるFRS2を介するシグナル伝達経路について解析を行った^{7,44}。

FGFRがFGF刺激により活性化されると、FGFRはまずFRS2と結合する。FRS2は二通りのシグナル経路を持っている。一つはGrb2を介してSosと結合し、Ras/MAPKカスケードを活性化する経路と、もう一つはShp2を介してGrb2、Sos、Ras/MAPKカスケードへとシグナルが伝達される経路である^{21-27,33}。ERK1/2はRasによって活性化されるMAPKカスケードの最下流に位置するシグナル伝達タンパク質であり、セリン/スレオニンキナーゼ活性を持っている。FGFR3とFGFR3 Δ ABの細胞内へのシグナル伝達に局限して解析すると、FGFR3 Δ ABよりもFGFR3のほうがFRS2、Shp2、ERK1/2といったRas/MAPK経路の主要シグナル伝達タンパク質を、強くかつ長時間活性化（チロシンリン酸化）していた。FGF1刺激後、FGFR3細胞ではFRS2は60分、Shp2は3h以上、ERK1/2は7h以上チロシンリン酸化され、CDKインヒビターであるp21^{CIP1}の発現は2日以上持続していた。また、FRS2とShp2の結合時間を比較すると、コントロールでは刺激後10分までは結合していたが、60分以降は全く結合していなかった。FGFR3 Δ ABでは、刺激後10分で結合量は最大となり、60分以降は結合が弱まった。しかしFGFR3では、刺激後60分で結合が最大となり、その結合は刺激後3時間以降も続いていた。FGFR3細胞外領域のアシッドボックスドメインの有無だけでこのような差が生じたのは非常に面白い。

アシッドボックスはその名の通り酸性アミノ酸が多く存在している部位であり、18個のアミノ酸で構成されている。アシッドボックスのC末端側に存在するIgIIドメインにはヘパラン硫酸鎖が結合すると報告されている^{38,39}。このアシッドボックスが欠損することで、ヘパラン硫酸鎖との結合が強くなると考えられた。Ba/F3細胞を用いた実験では、FGFR3 Δ ABのほうがFGFR3よりもFGF2に対する活性が強くBa/F3細胞の増殖を促進した^{7,47}。逆に、ATDC5細胞ではどちらのレセプターもFGF2刺激またはFGF1とヘパリン刺激によって細胞増殖を抑制したが、MFGFR3のほうがMFGFR3 Δ ABよりも増殖抑制効果が強かった。FGFR3 Δ ABとFGFR3とのFGF1とヘパリン刺激による細胞内シグナル伝達タンパク質の活性化を比較した結果、MFGFR3 Δ ABはMFGFR3よりもFRS2、Shp2、ERK1/2のリン酸化の程度が弱かった。この結果は、アシッドボックスが存在する方がATDC5細胞ではシグナルを強く入力できることを示しており、上記の説明とは矛盾する。BaF/3細胞とATDC5細胞におけるMFGFR3とMFGFR3 Δ ABの作用の違いが何に起因するものなのか明らかにする必要がある。アシッドボックス欠損によってFGFRの立体構造が変化することでFGFのIgIIとIgIIIへの結合に影響があるのかもしれない。

ATDC5細胞の増殖抑制にはCDKインヒビター・p21^{CIP1}の発現誘導が起り、細胞周期がG₁

期で停止することが重要であるが、その発現にもクローン間での差異が見られた。軟骨細胞において $p21^{CIP1}$ の誘導には主に Stat1 が関与しているとの報告がある²⁹⁻³¹⁾。MFGFR3 は $p21^{CIP1}$ の発現を強く誘導した⁴³⁾。しかし、MFGFR3 Δ AB による誘導は低かった⁴³⁾。MFGFR3 と MFGFR3 Δ AB からの増殖抑制の度合いは経時的に見ていくと、MFGFR3 は ATDC5 細胞の増殖を完全に停止させる。しかし FGFR3 Δ AB はゆるやかに増殖抑制させるのみである⁷⁾。この違いは $p21^{CIP1}$ の発現レベルと一致した。しかし、これらの現象は全てマウスの FGFR3 のみで起こる反応であった。ヒトキメラレセプター (MHFGFR3 Δ AB, MHFGFR3) を用いた実験では、FGF 刺激後3日目の増殖抑制程度はマウスレセプターと比較して若干弱かったが、経時的に見てみるとやや増殖抑制を起こすだけで MFGFR3 が引き起こした完全増殖停止は見られなかった (結果示さず)。この事実 $p21^{CIP1}$ の発現が、キメラレセプターでは全く誘導されなかったという事実と一致する。しかし $p21^{CIP1}$ の発現が見られなくても、増殖抑制は見られたので、 $p21^{CIP1}$ にかわる増殖抑制シグナル伝達タンパク質が作用していると思われる。 $p21^{CIP1}$ の他にも増殖抑制シグナル伝達タンパク質としては $p27^{KIP1}$ 、 $p16^{INK4/MST1}$ などが有名であるが、 $p27^{KIP1}$ の発現は FGF 刺激してもそれ自体の発現量には変化は見られなかった (結果示さず)。面白いことに、 $p27^{KIP1}$ の発現量には差は見られなくても、細胞外の刺激によってその局在場所が変化 (核外から核内へ移行) し増殖抑制のシグナルを伝達するのではないかという報告がなされている⁴²⁾。 $p27^{KIP1}$ だけでなくその他のタンパク質においても、発現量だけでなく局在場所も重要であることが考えられる。 $p21^{CIP1}$ の発現は、キメラレセプターを発現するクローンにおいては全く確認することができなかった。おそらく FGFR3 の C 末端領域がマウスからヒトのアミノ酸配列へと置換することで、組み換え部位のチロシン残基周辺のアミノ酸が変化して立体構造が変化し、マウスの細胞内シグナル伝達タンパク質と結合できなくなったのではないかと推測される。その結果、キメラ FGFR3 からのシグナルは $p21^{CIP1}$ を誘導できなかったのではないかと考えられた。また、形態の変化と $p21^{CIP1}$ の誘導が並行して起こっていることから、増殖抑制と球状への形態変化には相関性が見いだせた。MFGFR3 からのシグナルにより細胞接着が阻害され、球状に変化したと考えられる。細胞接着が抑制されることで細胞増殖が完全に停止するのであろう。MHFGFR3、MHFGFR3 Δ AB からの増殖抑制のシグナルは MFGFR3 とは異なるシグナル伝達経路を伝わっているのかもしれない。その候補としては、PLC γ や Src などの他のシグナル伝達タンパク質の関与が予測される。活発な研究により FGFR3 には7個のチロシン残基があり、各々リン酸化されることでシグナルが伝達されることが報告されている。なかでも主なシグナル伝達を担っているのは724番目 (Fig. 4-718番目) のチロシン残基である。このチロシンが主体となって送るシグナルは MAPK の活性化、Shp2 のリン酸化、PI3-kinase の活性化、Stat1/3 の活性化である。このチロシン残基は、面白いことに今回ヒトの塩基配列と組み換えた部位と非常に近い。また760番目 (Fig. 4-754番目) には PLC γ が結合することが確認されており、この領域は全ての FGFR において相同性を持っている。そして Stat1/3 の活性化にも一役かって

いる．770番目（Fig. 4 -764番目）のチロシンは形質転換を促進したり，PI3-kinase活性の持続に必要であるらしい⁸⁾．リン酸化チロシン部位を認識する細胞内の標的タンパク質はSrcホモロジー領域2（SH2）をほとんどのものが有しており，キナーゼ活性を持つ群と持たない群に分かれる．そして細胞内へとシグナルが伝達されていく．以上のようなチロシン残基特異的なシグナル伝達タンパク質の標的が明らかとなっているので，今後本研究とのシグナル伝達の相性を更に研究していきたいと考えている．

FGF以外の増殖因子としてepidermal growth factor（EGF）やnerve growth factor（NGF）などからのシグナルもFGFと同様にRas/MAPK経路を活性化する．EGFレセプターもNGFレセプターもFGFRと同じくチロシンキナーゼ型受容体である．ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞の神経への分化をRas/MAPK経路に着目した研究報告^{34,41)}から，EGFとNGFはPC12細胞に対してMAPKの活性化時間が異なっていることが解った．EGFはMAPKを一時的に活性化し（刺激後15分まで），NGFは持続的に（1時間以上）活性化した．Ras/MAPK経路のRasの下流にはセリン/スレオニンキナーゼRafがあり，Rafにはc-RafとB-Rafが存在する．

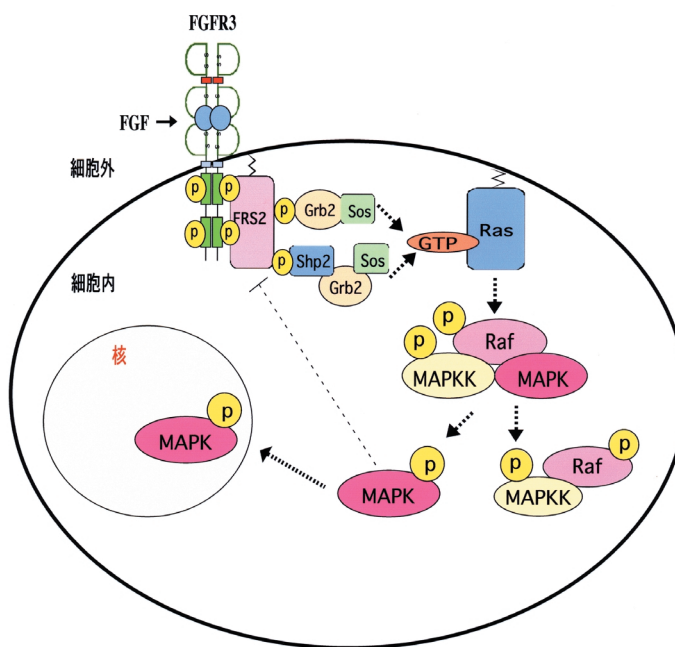


Fig. 11 FGFR3によるMAPK活性化のシグナルカスケード

ATDC5細胞において細胞外からのFGF刺激によりFGFR3が活性化されると，FGFR3の細胞内ドメインがチロシンリン酸化され，足場タンパク質であるFRS2タンパク質が結合する．引き続きFRS2がチロシンリン酸化されるとFRS2へのチロシンホスファターゼSHP2の結合が持続的に起こっていた．FRS2へのSHP2の持続的な結合を介してRasの強い活性化が起こり，MAPK経路が強く持続的に活性化されると考えられる．さらにMHFGFR3が活性化されると，MAPKがFRS2に持続的に結合していたことから，MAPKの核移行が阻害されている可能性が考えられた．

増殖因子からのシグナルが入ると、受容体チロシンキナーゼが活性化され、Grb2, Sos, Ras とシグナルが伝達されc-Rafが活性化され、その結果MEK, MAPKが活性化される。もう一つの経路は、アダプタータンパク質であるCrkを介してSos, 低分子量型Gタンパク質であるRap1を経由してB-Rafが活性化される。そしてMEK, MAPKが活性化されシグナルが核内へと伝達される。興味深いことにEGFからのシグナルはc-Raf, B-Rafともに一時的に活性化させ、MAPKも一時的に活性化し細胞の増殖を誘導する。しかしNGFでは、c-Rafを一時的に、B-Rafを持続的に活性化させ、MAPKの持続的活性化を誘導することでPC12細胞を神経へと分化させる⁴¹⁾。このように同様なシグナル経路を活性化しても、その活性化時間の長さの違いによって細胞増殖を促進するのか細胞分化（増殖停止）を誘導するのか、細胞の応答が異なってくる。FGFR3とFGFR3ΔABにおいてもRafの活性について調べる必要がある。

セリン/スレオニンキナーゼであるMAPK (ERK) は核内へ移行し、転写因子をリン酸化し遺伝子発現の制御を行うだけではなく、細胞質のタンパク質をリン酸化してシグナル伝達を誘導する。最近、MAPKがフィードバック効果でシグナル伝達を停止させることが報告された^{32,34)}。PC12細胞では、活性化されたMAPKがFRS2のセリン/スレオニンをリン酸化し、セリン/スレオニンをリン酸化されたFRS2は下流へとシグナルを伝達できなくなり、FGFのシグナルが減弱していく^{32,34)}。FRS2のセリン/スレオニンがリン酸化されることで立体構造が変化し、リン酸化されていたチロシンが覆い隠されてシグナル伝達が阻害されるのかもしれないが、詳しいメカニズムはまだ明らかにされていない。本研究において、vectorクローンではFGF刺激後60分でMAPK活性が弱まるが、FGFR3では強く活性化されたままであるので、このようなフィードバック効果を解除するメカニズムがFGFR3ではあるかもしれないと考え、FGF刺激後のMAPKとFRS2の結合を調べた (Fig. 10)。面白いことにvector及びFGFR3ΔABクローンではFGF刺激後10分でMAPKとFRS2の結合が起こり、60分ではその結合が減少していたが、FGFR3細胞ではFGF刺激後60分でさらにMAPKのFRS2への結合が高くなり、180分後でも10分後と同様に結合していた。MAPKがFRS2に持続的に結合することと、MAPKの活性化の維持にはどのような関係があるのか、今後明らかにされるべきである (Fig. 11)。

以上、本研究においてMHFGFR3とMHFGFR3ΔABを作製し、これらのキメラレセプターを用いてATDC5細胞におけるFGFR3からの増殖抑制のシグナルを分子的に解析した。また、軟骨細胞の増殖抑制のシグナルに重要なp21^{CIP1}発現には、マウスFGFR3のC末端ドメインが必要不可欠であることを示した。

引用文献

- 1) Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., and Yamashita, T. (2001) Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:, 6500-6505
- 2) 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 Vol. 27 No. 3 自然科学系列 第5号
- 3) 山本雅, 秋山徹 (2000) 細胞内シグナル伝達がわかる (p30 ~ 40) 羊土社
- 4) Powers, C. J., Mcleskey, S. W., and Wellstein, A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer.*, 7:, 165-197
- 5) 寺田基剛 (1998) 京都産業大学工学部生物工学科卒業論文 Human fibroblast growth factor receptor 3 variantの遺伝子クローニング
- 6) 真金典子 (1998) 京都産業大学工学部生物工学科卒業論文 In Vitro Kinase assayによる完全型FGFR3とAcid Box欠損型FGFR3の機能解析
- 7) Shimizu, A. (2001) 京都産業大学工学研究科生物工学専攻博士論文 Studies on two alternatively spliced fibroblast growth factor receptor 3 isoforms.
- 8) Hart, K. C., Robertson, S. C., and Donoghue, D. J. (2001) Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3- kinase activation. *Mol. Biol. Cell.*, 12:, 931-942
- 9) Legeai-Malet, L., Benoist-Lassel, C., Delezoide, A. L., Munnich, A., and Bonaventure, J. (1998) Fibroblast growth factor receptor3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in thanatophoric dysplasia. *J. Biol. Chem.*, 273:, 13007-13014
- 10) Rutland, P., Pulleyn, L. J., Reardon, W., Baraitser, M., Hayward, R., Jones, B., Malcolm, S., Winter, R. M., Oldridgy, M., and Slaney, S. F. (1995) Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouson syndrome phenotypes. *Nat. Genet.* 9:, 173-176
- 11) Vajo, Z., Francomano, C. A., and Wilkin D. J. (2000) The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: The achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouson syndrome with acanthosis nigricans. *Endocrine Reviews.*, 21:, 23-39
- 12) Aviezer, D., Golembo, M., and Yayon, A. (2003) Fibroblast growth factor receptor-3 as a therapeutic target for achondroplasia-genetic short limbed dwarfism. *Current Drug Targets.*, 4:, 353-365
- 13) Bellus, G. A., McIntosh, I., Smith, E. A., Aylsworth, A. S., Kaitila, I., Horton, W. A., Greenhaw, G. A., Hecht, J. T., and Francomano, C. A. (1995) A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat. Genet.*, 10:, 357-359
- 14) Tavormina, P. L., Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Wilkin, D. J., Lachman, R. S., Wicox, W. R., Rimoin, D. L., Cohn, D. H., and Wasmuth, J. J. (1995) Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.*, 9:, 321-328
- 15) Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K., and Ikawa, Y. (1990) A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell. Differ. Dev.*, 30:, 109-116
- 16) Shukunami, C., Ohta, Y., Sakuda, M., and Hiraki, Y. (1998) Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. *Exp. Cell. Rec.*, 241:, 1-11
- 17) Shimizu, A., Tada, K., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kurokawa, T., Magane, N., and Seo-Kurokawa, M.

- (2001) A novel alternatively spliced fibroblast growth factor receptor 3 isoform lacking the acid box domain is expressed during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J. Biol. Chem.*, 276:, 11031-11040
- 18) Agazie, Y. M., Movilla, N. Ishchenko, I., and Hayman, M. J. (2003) The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. *Oncogene.*, 22:, 6909-6918
- 19) Wong, A., Lamothe, B., Li, A., Schlessinger, J., and Lax, I. (2002) FRS2 attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:, 6684-6689
- 20) Corson, L. B., Yamanaka, Y., Lai, K. V., and Rossant, J. (2003) Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development.*, 160:, 4527-4537
- 21) Monsonego-Ornan, E., Adar, R., Rom, E., and Yayon, A. (2002) FGF receptors ubiquitylation: dependence on tyrosine kinase activity and role in downregulation. *FEBS Lett.*, 528:, 83-89
- 22) Watanabe, H., de Caestecker, M. P., and Yamada, Y. (2001) Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor- β -induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J. Biol. Chem.*, 276:, 14466-14473
- 23) Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997) A lipid-anchors Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell.*, 89:, 693-702
- 24) Cross, M. J., Lu, L., Magnusson, P., Nyqvist, D., Holmqvist, K., Welsh, M., and Claesson-Welsh, L. (2002) The Shb adaptor Protein binds to tyrosine 766 in the FGFR-1 and regulates the Ras/MEK/MAPK pathway via FRS2 phosphorylation in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, 13:, 2881-2893
- 25) Kanai, M., Gke, M., Tsunekawa, S., and Podolsy, D. K. (1997) Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. *J. Biol. Chem.*, 272:, 6621-6628
- 26) Hadari, Y. R., Gotoh, N., Kouhara, H., Lax, I., and Schlessinger, J. (2001) Critical role for the docking-protein FRS2 in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:, 8578-8583
- 27) Hadari, Y. R., Kouhara, H., Lax, I., and Shlessinger, J. (1998) Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 18:, 3966-3973
- 28) Schlessinger, J. (2003) Autoinhibition Control. *Science.*, 300:, 750-52
- 29) Su, W. S., Kitagawa, M., Xue, N., Xie, B., Garofalo, S., Cho, J., Deng, C., Horton, W. A., and Fu, X. (1997) Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanotophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature.*, 386:, 288-292
- 30) Sahni, M., Ambrosetti, D. C., Mansukhani, A., Gertner, R., Leby, D., and Basilico, C. (1999) FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes & Development.*, 13:, 1361-1366
- 31) Aikawa, T., Segre, G. V., and Lee, K. (2001) Fibroblast growth factor inhibits chondrocytic growth through induction of p21 and subsequent inactivation of cyclin E-Cdk2. *J. Biol. Chem.*, 276:, 29347-29352
- 32) Lax, I., Wong, A., Lamothe, B., Lee, A., Frost, A., Hawes, J., and Schlessinger, J. (2002) The docking protein FRS2 controls a MAP Kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *Molecular Cell.*, 10:, 709-719

- 33) Yu, D., Qu, C., Henegariu, O., Lu, X., and Feng, G. (1998) Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J. Biol. Chem.*, 273:, 21125-21131
- 34) Wu, Y., Chen, Z., and Ullrich, A. (2003) EGFR and FGFR signaling through FRS2 is subject to negative feedback control by ERK1/2. *Biol. Chem.*, 384:, 1215-1226
- 35) Tavormina, P. L., Bellus, G. A., Webstar, M. K., Bamshad, M. J., Fraley, A. E., McIntosh, I., Szabo, J., Jiang, W., Jabs, E. W., Wilcox, W. R., Wasmuth, J. J., Donoghue, D. J., Thompson, L. M., and Francomano, C. A. (1996) A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 15:, 520-527
- 36) McDonald, M. P., Miller, K. M., Li, C., Deng, C., and Crawley, J. N. (2001) Motor deficits in fibroblast growth factor receptor-3 null mutant mice. *Behav. Pharmacol.*, 12:, 477-486
- 37) Itoh, N., Terachi, T., Ohta, M., and Kurokawa-Seo, M. (1990) The complete amino acid sequence of the shorter form of human fibroblast growth factor receptor deduced from its cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169:, 680-685
- 38) Allen, B. L., Filla, M. S., and Rapreager, A. C. (2001) Role of heparan sulfate as a tissue-specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. *J. Biol. Chem.*, 155:, 845-857
- 39) Kan, M., Wang, F., Xu, J., Crabb, J. W., Hou, J., and McKeenan, W. L. (1993) An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science*, 259:, 1918-1921
- 40) Das, D., Pintucci, G., and Stern, A. (2000) MAPK-dependent expression of p21^{WAF} and p27^{Kip1} in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett.*, 472:, 50-52
- 41) Kao, S., Jaiswal, R. K., Kolch, W., and Landreth, G. E. (2001) Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the MAPK cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 276:, 18169-18177
- 42) Lee, H. T., Kim, T. Y., and Kay, E. P. (2002) Cdk4 and p27^{Kip1} play a role in PLC γ 1-mediated mitogenic signaling pathway of 18 kDa FGF-2 in corneal endothelial cells. *Mol. Vis.*, 8:, 17-25
- 43) Shimizu, A., Takashima, Y., and Kurokawa-Seo, M. (2002) FGFR3 isoforms have distinct functions in the regulation of growth and cell morphology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290:, 113-120