

情報伝達分子の遺伝子改変による情報伝達機構の解析

Analysis of signal transduction mechanism by alternation of the gene coding for a receptor of a signal transduction molecule

代表研究者 東京工業大学生命理工学部助手 山根和彦
Res. Assoc., Faculty of Biosci. and Biotech., Tokyo Inst. of Tech.
Kazuhiko YAMANE

To analyze signal transduction mechanism, two major common structures of growth factor receptors were altered by molecular biological methods. One of major structures is a positively charged region after the transmembrane region, in the epidermal growth factor (EGF) receptor-type membrane proteins. EGF-induced tyrosine phosphorylation of the receptor was strongly inhibited by removal of this basic region. The receptor lacking the basic region internalized normally on addition of EGF. In EGF receptor type proteins, another major structure is one transmembrane region. This hydrophobic region was replaced by random artificial hydrophobic regions. Now, I am trying transfection of cells with mutated receptor genes. The length of the hydrophobic region of the EGF receptor was also systematically altered, and transfection of the cell with mutated receptor genes is also under way.

研究目的

一般的な増殖因子受容体の特徴的な構造と受容体機能との関連を調べることにより、情報伝達の普遍的な機構を明らかにし、ひいては細胞の外界認識の機構の解明のための一助とする。

研究経過

EGF レセプター型増殖因子受容体の特徴的な構造は原形質膜を1回貫通する疎水性領域があることと原形質膜の細胞質表面に塩基性領域があることである。代表者はこの特徴的な構造のひとつである塩基性領域を遺伝子改変により除去することでEGF レセプターのEGFによって誘起されるチロシンキナーゼ活性が消失することを発見した。本研究では、a.この塩基性領域を除去されたEGF レセプターの詳細な特徴づけを行う。すなわち、この変異によって、EGF レセプターのインターナリゼーションが起こっているかどうかを調べる。b. EGF レセプターの膜貫通疎水領域をランダムな人工的な疎水領域に置換した場合EGF 応答がどうなるかを調べる。c. 23 アミノ酸残基のEGF レセプターの膜貫通領域を段階的に

削除し、この領域が8, 10, 12, 14 残基などの長さの変異EGF レセプターを作成し、シグナル伝達への影響を調べる。

研究成果

a. 塩基性領域を除去されたEGF レセプターの詳細な特徴づけを行った。すなわち、この変異によってEGF レセプターのインターナリゼーションが起こっているかどうかを調べた。インターナリゼーションは野生型と同様に起こっていた。

b. EGF レセプターの膜貫通疎水領域をランダムな人工的な疎水領域に置換した。変異EGF レセプターを2種類ほど作成することができた。現在、細胞にトランスフェクションを行って、機能変化を観察しようとしている。

c. 23 アミノ酸残基のEGF レセプターの膜貫通領域を段階的に削除し、この領域が8, 10, 12, 14 残基などの長さの変異EGF レセプターを作成することができた。現在、細胞にトランスフェクションを行って、機能変化を観察しようとしている。

今後の課題と発展

塩基性領域を除去された EGF レセプターのインターナリゼーションが起こっているかどうかを調べ、インターナリゼーションは野生型と同様に起こっていたことを見いだした。この結果はインターナリゼーションのための領域がチロシンキナーゼ活性と独立しているという知見と矛盾しない結果である。EGF レセプターの変異株の作成は極めて順調に進んだ。これは、1 本鎖合成 DNA を使った部位特異的変異をかける方法で変異株をつくろうとせず、変異部分を含む 2 本鎖 DNA をカセット式に組み込む方法を取ったためである。今後、変異 EGF レセプターを培養細胞で発現させ、機能変化を解析しようとしているが、作成した変異 EGF レセプターは極めて興味深いさまざまな変異を持っているので、独創的な結果が

得られると期待している。

また、今後、変異 EGF レセプターの二量体化がどうなっているかを調べたい。細胞増殖因子受容体（例えば IL-2 レセプター、T 細胞レセプター）は原形質膜の細胞質側表面に塩基性領域を持っているので、この塩基性領域は情報伝達に普遍的な働きをしていることを示唆している。よってヒト発がんの機構を解明する上でも重要である。

発表論文リスト

- 1) Yamane, K. *et al.*: Ligand-induced functions of the epidermal growth factor receptor require the positively charged region asymmetrically distributed across plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1301-1310 (1992).
- 2) 山根和彦: 組換え体の発現. 新化学実験講座, **2**, 271-282 (1992).