

## モルモット各種組織細胞質蛋白中の EGF 受容体 ／キナーゼに対する基質

内海耕隼\*・森下誠治\*・佐藤英介\*\*・杉野泰生\*・小渕浩嗣\*

(\*生物学教室・\*\*日本学術振興会特別研究員)

### Distribution of EGF Receptor/Kinase Substrates in Various Organs of Guinea Pig

Kozo UTSUMI\*, Seiji MORISHITA\*, Eisuke F. SATO\*\*,  
Yasuo M. SUGINO\* and Hirotsugu KOBUCHI\*

\*Department of Medical Biology, Kochi Medical School, Kochi 781-51, Japan and

\*\*JSPS Fellowships for Japanese Junior

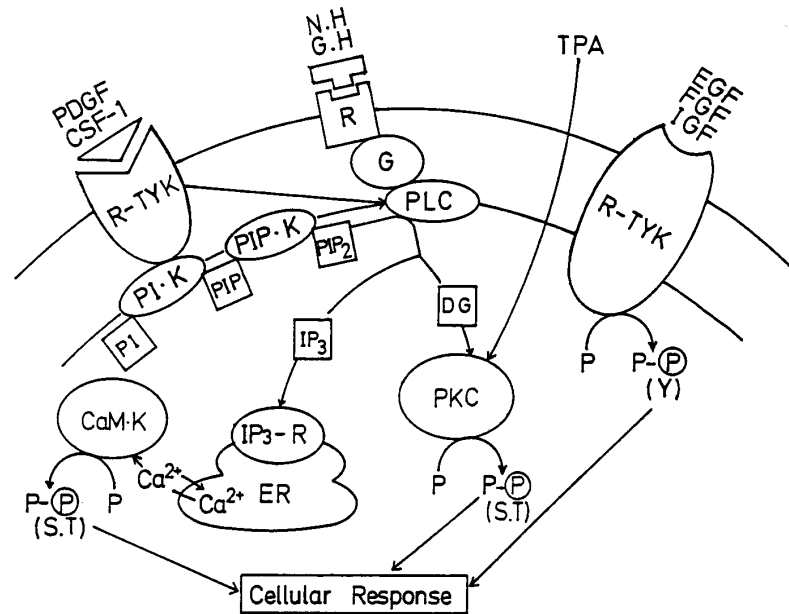
Scientists

**Abstract.** Distribution of EGF receptor/kinase substrates in cytoplasmic proteins of guinea pig various organs was studied. 35kDa and 38kDa proteins in SDS-PAGE were detected as substrates for the enzyme in lung, spleen, stomach, urinary bladder and skin. 35kDa protein is confirmed as lipocortin-like 39K protein of neutrophils by the method of immunoblotting using antibody of 39K protein. The  $Ca^{2+}$ -dependent membrane binding activity protein was an important character for the protein phosphorylation by this enzyme. A recombinant 39K protein was also phosphorylated by EGF receptor/kinase and the amount of phosphorylated 38kDa detected on SDS-PAGE was increased by the time of incubation.

#### 「緒言」

動物細胞の増殖は、蛋白質性の増殖因子や種々の分裂促進因子 (mitogens) によって制御されている。中でも、近年、ポリペプチド性の因子が注目され、それらの化学的性状や生物作用の分子機序に関する解析が急速に進められている。これらの増殖因子のなかには EGF (epidermal growth factor: 上皮増殖因子)<sup>1,2)</sup> や、PDGF (platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子)<sup>3,4)</sup>、IGF (insulin-like growth factor; インシュリン様増殖因子)<sup>5,6)</sup> などがあり、いずれも細胞膜の特異的な受容体に結合することによって細胞内の代謝回転や蛋白合成を速め、

核のDNA複製を促進して細胞分裂を導く。現在考えられている増殖因子とそれによる細胞増殖の調節機構を図示すると Fig.1 のようである。すなわち、増殖因子と細胞膜の受容体との結



**Fig.1.** Mechanism of cell growth factor

PDGF: Platelet-derivde growth factor. CSF-1: Colony stimulating factor-1. N.H: Neurotransmitter hormone. G.H: Growth hormone. TPA: 12-0-Tetra-decanoylphorbol 13-acetate. EGF: Epidermal growth factor. FGF: Fibroblast growth factor. IGF: Insulin-like growth factor. R-TYK: Receptor/tyrosine kinase. R: Receptor. G: GTP binding protein. PI-K: Phosphatidylinositol kinase. PIP-K: Phosphatidylinositol 4-monophosphate kinase. PLC: Phospholipase C. PI: Phosphatidylinositol. PIP: Phosphatidylinositol 4-monophosphate. PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol 4, 5-bis-phosphate. IP<sub>3</sub>: Inositol 1, 4, 5-triphosphate. DG: Diacylglycerol. CaM-K: Calmodulin kinase. IP<sub>3</sub>-R: IP<sub>3</sub> receptor. PKC: Protein kinase C. ER: Endoplasmic reticulum. P: Protein. P-Ⓟ: Phosphoprotein. S: Serine. T: Threonine. Y: Tyrosine.

合、受容体の持つチロシンキナーゼドメインの活性化、受容体の自己リン酸化とそれに伴う酵素活性の発現、標的蛋白質のチロシン残基のリン酸化、pHあるいはCa<sup>2+</sup>濃度の変化、フォスファチジルイノシトール代謝回転の亢進とそれに伴うC-キナーゼの活性化、増殖関連遺伝子の発現、あるいはそれに対応した代謝応答の発現、という一連の反応によって調節されているものと考えられている<sup>7)</sup>。この図の中でチロシン特異的なキナーゼは当初癌細胞で発見され発癌ビールの一種src遺伝子産物(p60<sup>src</sup>)がチロシンキナーゼそのものであったこともあり、細胞内特定蛋白質のチロシン残基のリン酸化が癌化に重要な働きを持つものと考えられた。しかし、現在では、種々の生物現象にこれら蛋白質チロシン残基の特異的なリン酸化が多く関与することが明らかにされ、それが癌細胞特異的反応でなく、むしろ細胞分化や増殖と関係するも

のと考えられるようになった。また EGF は Cohen<sup>2)</sup>により NGF (nerve growth factor ; 神経成長因子) の研究過程でマウス顎下腺より酸で抽出されたアミノ酸53個からなる生理活性ポリペプチドで、新生児マウスの眼瞼開裂、切歯出現を早める作用を持つ因子として発見されたものである。この EGF に対するレセプターは分子量170kDa で、N-末端側の EGF 結合ドメイン、中央部の疎水性アミノ酸に富む膜貫通ドメイン、C-末端側のチロシンキナーゼドメインか

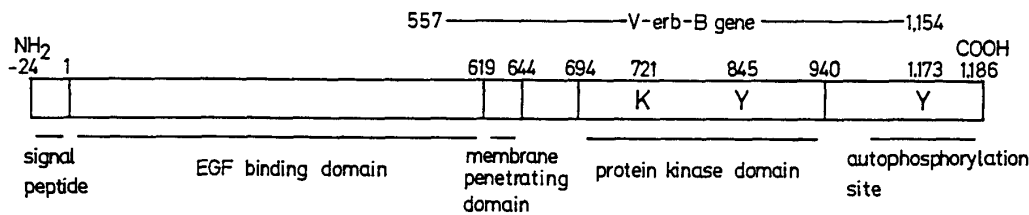


Fig.2. Structure of EGF receptor/kinase

らなっている (Fig. 2)。特に694番目からはじまる250個のアミノ酸は、トリ赤芽球ウイルス (AEV) の癌遺伝子 v-erbB と高い相同性があり、チロシンキナーゼドメインに相同することが明らかにされている (Fig. 2)<sup>1,8)</sup>。ここで、これまで報告されている EGF による生物現象は、細胞膜の情報伝達という点では共通しているが、チロシン特異的なリン酸化の結果生じる細胞の変化は多種多様であり、蛋白質のリン酸化と細胞の生物現象との間はブラックボックスとして未解決の課題となっている。従って、その標的蛋白質を探索することは、EGF の作用あるいはチロシンキナーゼの作用機序を研究するうえで、重要な課題といえる。このような理由から我々は、モルモットの各組織における EGF 受容体/キナーゼの標的蛋白質の検索を試みた。そして、我々が、これまで研究してきた好中球に多く含まれる39K 蛋白質<sup>9-13)</sup>や、それと抗原性に共通のある蛋白質が特異的に極めて強くリン酸化されることを明らかにし、39K 蛋白質のリン酸化のもつ重要性を示唆する結果を得た。

### 「材料と方法」

#### 1. 材 料

EGF は、フナコシ薬品工業より、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP は ICN より購入した。モルモットは(株)日本エルエスシーより購入したハートレー系雄400g のものを使用した。各種組織は、採取後よく切り刻み組織中の血液を除いた後、20mM HEPES (pH7.4), 0.1M KCl buffer, 1 mM EGTA, 0.01% leupeptin, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) 液中で、0°C にて5分間2000rpm にてホモゲナイズし、100,000×g 60分間遠心分離し、得られた上清を55°C, 3分間熱処理したものを標品とした。また、エチレンジグリコールビス ( $\beta$ -アミノエチルエーテル)-N, N, N', N',-四酢酸 (EGTA) 抽出蛋白は、前述のようにホモゲナイズした後、 $\text{Ca}^{2+}$ を加

えて膜画分に結合させ遠心分離し、その沈渣に EGTA を加え  $\text{Ca}^{2+}$  依存性膜結合蛋白を溶出させ遠心分離した上清を標品とした。その他、試薬は、すべて特級を用いた。

## 2. EGF 受容体/キナーゼによるリン酸化反応

ヒト上皮系腫瘍細胞である A431細胞は、10% FCS を含むダルベッコ改良イーグル培地で75  $\text{cm}^2$  の培養フラスコで維持し、コンフルエントになった細胞を使用した。リン酸化酵素としての膜画分の調整は、Fava and Cohen<sup>14)</sup>の方法に従った。リン酸化反応は、総量60 $\mu\text{l}$ とし、A431細胞の膜画分(5-40 $\mu\text{g}$ の蛋白量、EGF 受容体/キナーゼを含む)と約1 mg/mlの基質となる細胞質蛋白、20mM Hepes (pH7.4) 20mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 $\mu\text{M}$  Na-O-Vanadate (チロシンフォスファターゼの特異阻害剤), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (15 $\mu\text{M}$ ; 2-3 $\mu\text{Ci}$ ) を含む液で行った。反応液は EGF の存在下(100ng)あるいは非存在下に、ATP を除し、反応液を 0 $^\circ\text{C}$ , 10分間 preincubate し、リン酸化反応は、ATP の添加によって開始し、0 $^\circ\text{C}$ , 5分間行った。反応は、等量の SDS カクテルを添加して終了させ、100 $^\circ\text{C}$  で3分間加熱処理して停止させる。この液を Laemmli<sup>15)</sup>の方法に従い SDS-ポリアクリルアミドゲル(12%)電気泳動(SDS-PAGE)し乾燥後オートラジオグラムに供し、そのリン酸化像を検討した。

## 3. 組み換え39K 蛋白(39K)のEGF受容体/キナーゼによるリン酸化

組み換え39K は、我々が先に報告した<sup>13)</sup>ごとく、39KcDNA を発現ベクターに組み込み酵母で発現させたものを精製し実験に供した。リン酸化反応は2と同様の方法によった。

### 「結果と考察」

#### 1. モルモットの各組織の EGF 受容体/キナーゼに対する基質

モルモット各組織について、EGF 受容体/キナーゼに対する基質を検討し、Fig. 3のような結果を得た。すなわち、肺、脾、胃、皮膚、膀胱に SDS-PAGE 上の分子量で約35kDa (p35)と38kDa を示す蛋白が特異的に強くリン酸化された。しかしながら、脳、心臓、肝、腎ではリン酸化蛋白は検出されなかった。この p35蛋白は、EGF 受容体/キナーゼに対する基質として、Cohen らによって A431細胞において発見されている p35<sup>16)</sup>と同一の蛋白であると考えられる。この蛋白質の正常組織での分布については、De ら<sup>17)</sup>によって SD 系ラットについて一部報告されている。彼らは、p35に対する抗体を用いてその組織分布を検討し、p35が肺、胎盤に多く存在し、脾、胸腺にやや少なく存在し、前立腺、膵、顎下腺、腎にごくわずかに存在することを示し、肝、骨格筋、心筋、精巣、脳には全く存在しないことを示した<sup>17)</sup>。その後さらに、これらの組織における EGF 受容体/キナーゼによりリン酸化される基質蛋白は、肺、脾、胎盤、顎下腺であるが、肝、腎、腸、脳、心筋、精巣には基質の存在しないことを示した<sup>17)</sup>。我々のモルモットで得られた結果は、彼らの報告とほぼ一致し、共通の組織で p35の強いリン酸化を認め

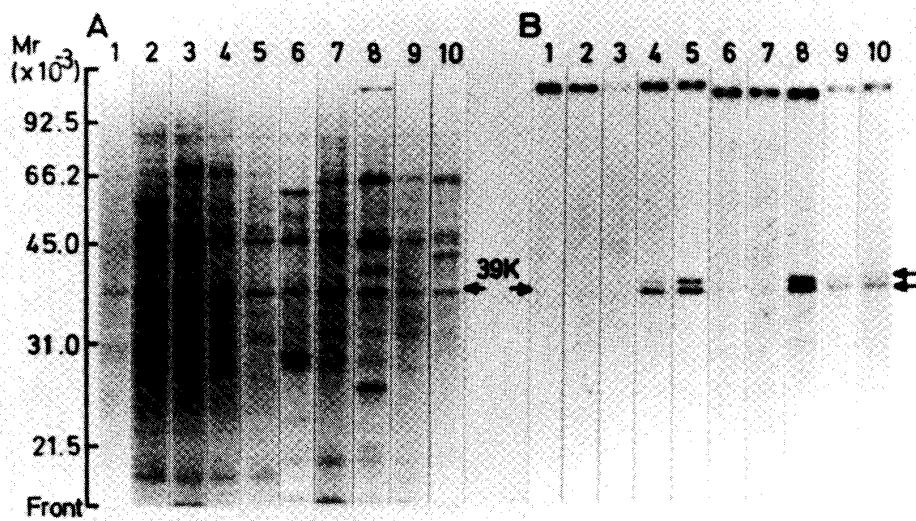


Fig.3. Phosphorylation of cytoplasmic proteins of guinea pig various organs by EGF receptor/kinase

The reaction mixtures contained 20mM Hepes (pH7.4), 2mM  $MgCl_2$ , 0.5mM  $CaCl_2$ , 10 $\mu$ M Na-0-Vanadate, 2-3 $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP, aliquots of the A431 total particulate fraction and cytosol of guinea pig various organs as a substrate. The total volume of reaction medium was 60 $\mu$ l. The reaction tube containing all components except the ATP were placed on ice and preincubated for 10 min at 0°C in the presence of EGF (100ng). The reaction was initiated by adding [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP. After 5 min of incubation at 0°C, the reaction was terminated by adding 60 $\mu$ l of the SDS solution and heating for 3 min at 100°C.

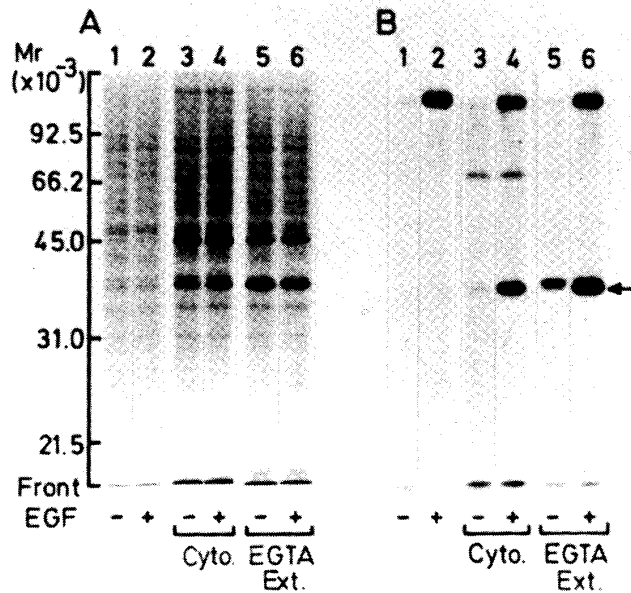
A, CBB staining ; B, autoradiography

1, membrane fraction of A431 cells (control) ; 2, brain ; 3, heart ; 4, lung ; 5, spleen ; 6, liver ; 7, kidney ; 8, urinary bladder ; 9, stomach ; 10, skin ; upper  $\leftarrow$ , 38kDa ; lower  $\leftarrow$ , 35kDa.

たが、さらに、胃、皮膚、膀胱といった、彼らが報告していない上皮系の組織においても、リン酸化基質の存在することを明らかにした。

## 2. リン酸化基質としての39K

現在、この p35 はリポコルチン I と同一のものであることが部分アミノ酸配列および cDNA クローニングより明らかにされている<sup>18)</sup>。我々は、これまでモルモット好中球中の  $Ca^{2+}$  依存的に酸性リン脂質に結合する 39K の構造と機能について研究し、これがリポコルチン I とよく似た蛋白であることを明らかにした<sup>11,12)</sup>。そしてその蛋白の抗体により、この蛋白の組織分布を検討した結果<sup>10)</sup>は、ここで示した EGF 受容体/キナーゼに対する基質の分布と一致し、EGF 受容体/キナーゼによりリン酸化されるモルモット各組織の基質蛋白は我々が研究してきた好中球 39K と共通したものと考えられる。事実、好中球の細胞質蛋白あるいは EGTA 抽出蛋白を基質



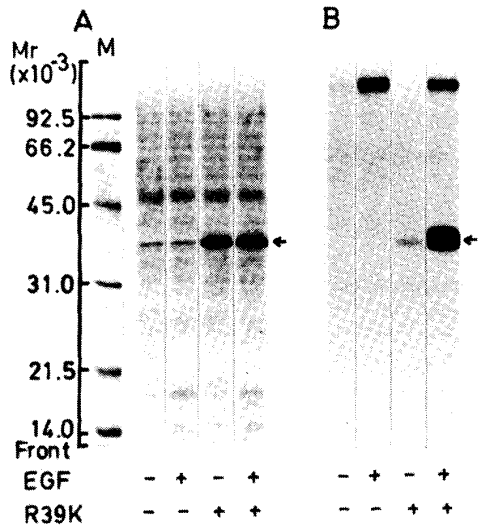
**Fig.4.** Phosphorylation of cytoplasmic proteins of guinea pig neutrophil by EGF receptor/kinase

Experimental conditions were as described in Fig.3. except that the substrates were cytoplasmic proteins of guinea pig neutrophils and their EGTA extract. Phosphorylation was carried out with (+) or without EGF (-). A, CBB staining; B, autoradiography 1, 2: membrane fraction of A431 cell (control). 3, 4: Cyto.: cytoplasmic proteins of guinea pig neutrophil. 5, 6: EGTA Ext.: EGTA extract of cytoplasmic proteins of guinea pig neutrophil; ←, 39K.

とし、EGF 受容体/キナーゼのリン酸化をみると Fig. 4 に示されるように、39K が特異的に強くリン酸化される。しかし、詳細に分析すると CBB (Coomassie brilliant blue) 染色では認められないが、リン酸化蛋白の SDS-PAGE のオートラジオグラフィで 35kDa と 38kDa の二つのバンドとして認められるようになり、これが同一の蛋白か否かは極めて興味深い。

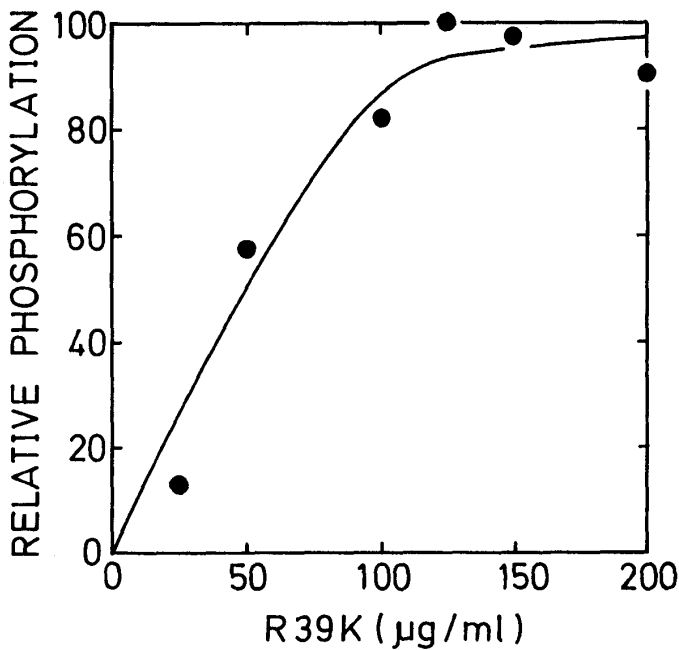
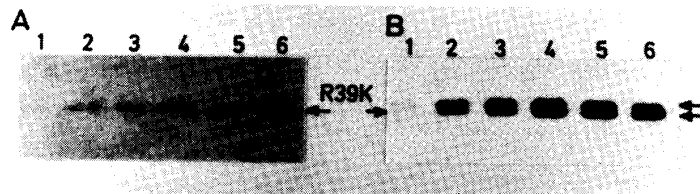
### 3. 組み換え39K の EGF 受容体/キナーゼによるリン酸化

最近、我々は、39K の cDNA クローニングとその塩基配列の決定を行い全アミノ酸配列を明らかにし<sup>12)</sup>、その cDNA を酵母の発現ベクターに組み込み、酵母による39K の生産に成功した<sup>13)</sup>。そこで、酵母で生産された組み換え39K を精製し、それを基質として、リン酸化機構を検討した。Fig. 5 に示すごとく、組み換え39K は、EGF 受容体/キナーゼによって強くリン酸化され、そのリン酸化は蛋白質の濃度に依存していた (Fig. 6)。さらに、組み換え39K は、反応時間依存的にリン酸化が進行し、この実験条件下では液体シンチレーションカウンターで計測される<sup>32</sup>P の取り込みにおいても、またオートラジオグラムにおいても、0 °C 5 分間の反応で最



**Fig.5.** Phosphorylation of recombinant 39K protein by EGF receptor/kinase

Experimental conditions were as described in Fig.3 except that the substrate was a recombinant 39K protein (200 $\mu$ g/ml). Phosphorylation was carried out with (+) or without EGF (-). A, CBB staining; B, autoradiography. R39K, recombinant 39K upper  $\leftarrow$ , 38kDa; lower  $\leftarrow$ , 35kDa.

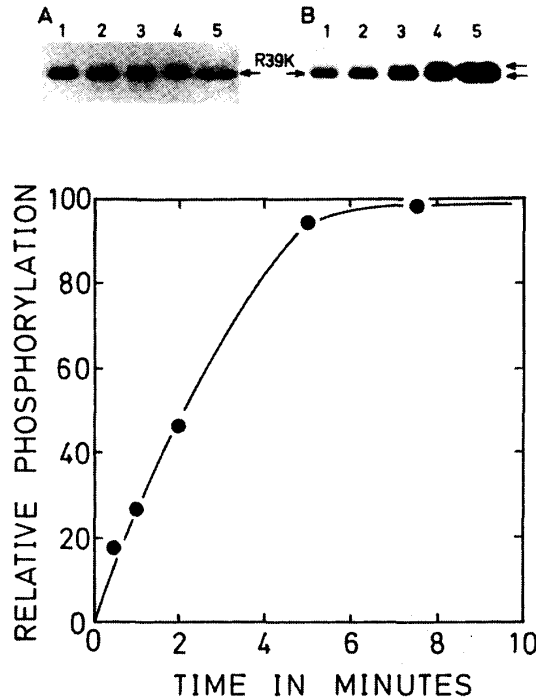


**Fig.6.** Dose-dependent curve of recombinant 39K protein-phosphorylation by EGF receptor/kinase

Experimental conditions were as described in Fig.5 except the concentration of recombinant 39K protein was changed. After phosphorylation by EGF receptor/kinase, the reaction mixtures were suspended with 1mM EGTA and centrifuged at 10,000 $\times$ g for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. The supernatant was analyzed by SDS-PAGE (A) and the radioactive products were visualized by autoradiography (B). Concentrations of recombinant protein were 1, 25 $\mu$ g/ml; 2, 50 $\mu$ g/ml; 3, 100 $\mu$ g/ml; 4, 125 $\mu$ g/ml; 5, 150 $\mu$ g/ml.

R39K, recombinant 39K upper  $\leftarrow$ , 38kDa; lower  $\leftarrow$ , 35kDa.

高値に達した (Fig. 7)。しかし詳細に検討すると蛋白リン酸化の進行に伴い明らかに SDS-PAGE において 39K より遅く泳動されるリン酸化蛋白が増加することが確認された。

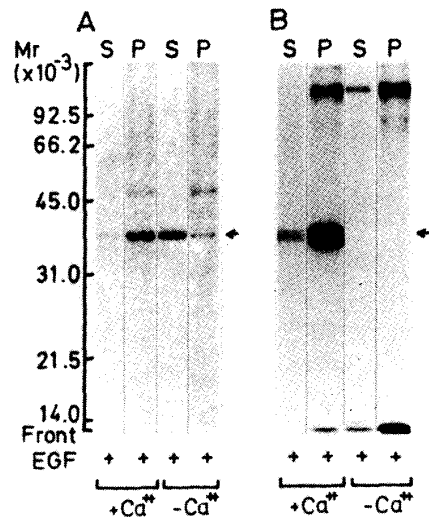


**Fig.7.** Time-dependent curve of recombinant 39K protein-phosphorylation by EGF receptor/kinase

Experimental conditions were as described in Fig.5 except the reaction time was changed. After phosphorylation by EGF receptor/kinase, the reaction mixtures were suspended in the medium of 1mM EGTA and centrifuged at  $10,000\times g$  for 10 min at  $4^{\circ}C$ . The supernatant was analyzed by SDS-PAGE (A) and the radioreactive products were visualized by autoradiography (B). The reaction times were 1, 30 seconds; 2, 1 min; 3, 2 min; 4, 4 min; 5, 5 min; 6, 7.5 min.

このことは、今後更に検討する必要がある興味深い問題であるが、各組織中で観察された 35 kDa, 38kDa 蛋白は共に 39K で、蛋白のリン酸化に伴いその泳動速度が低下した事を示し、39 K がリン酸化に伴い蛋白質の構造に変化の起こる事を示唆する。しかも、この 39K のリン酸化は  $Ca^{2+}$  を要求し、EGTA 存在下ではリン酸化は認められず (Fig. 8), リン酸化反応の終了後、反応液を  $100,000\times g$  で 10 分間遠心し、上清 (可溶性分画) と沈渣 (不溶性分画) とに分画するときそのリン酸化蛋白は膜分画にのみ認められた (Fig. 8)。これらのことは、この蛋白が  $Ca^{2+}$  に依存して酸性リン脂質膜に結合する性質をもつ<sup>9)</sup>ことから、 $Ca^{2+}$  存在下では細胞膜と結合し、膜結合の EGF 受容体/キナーゼによりリン酸化されるが、EGTA 存在下では、膜に結合することなく上清分画にあり、膜結合の EGF 受容体/キナーゼとの接触が充分でないためリン酸化





**Fig.8.**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent-membrane binding and phosphorylation of recombinant 39K protein by EGF receptor/kinase

Experimental conditions were as described in Fig.5. except the phosphorylation was carried out in the presence of 0.5mM  $\text{Ca}^{2+}$  (+ $\text{Ca}^{2+}$ ) or 1mM EGTA ( $-\text{Ca}^{2+}$ ). After phosphorylation, the reaction mixtures were centrifuged at  $10,000\times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . Each of the supernatant (S) or precipitant (P) fraction was analyzed by SDS-PAGE (A) and the radioreactive products were visualized by autoradiography (B).

されないことを示唆する。即ち、組み換え39KがEGF受容体/キナーゼによってリン酸化されるためには受容体の存在する膜への結合を必要とすることを示唆する。このことは、Fava<sup>14)</sup>らとCohen<sup>16)</sup>らのA431細胞のp35の膜への結合性とリン酸化が $\text{Ca}^{2+}$ 要求性であることという報告と一致するが、本実験の結果は更にその現象をより解析したものと考える。次に、これまでリポコルチンによるフォスホリパーゼA<sub>2</sub>の阻害作用が、リポコルチンのリン酸化によって調節されリン酸化による膜結合性の変化が関与するのではないかと考えられている<sup>19,20)</sup>が、これを支持するに十分な結果は得られなかった。しかし、リン酸化蛋白の一部が39Kより泳動速度を低下する事実を考えると、細胞内で増減するレベルの $\text{Ca}^{2+}$  ( $1\ \mu\text{M}$ ) 濃度ではリン酸化39Kが膜から解離し、それによってフォスホリパーゼA<sub>2</sub>活性を調節する可能性も考えられ、今後更に解析を進めたい。

### 「結論」

モルモットの各組織における細胞質蛋白についてEGF受容体/キナーゼの標的蛋白質の検索を試みた。さらに、組み換え39K蛋白を用いて詳細な解析を試み、以下の結果を得た。

1. モルモットの各組織のなかで、肺、脾、胃、膀胱、皮膚はEGF受容体/キナーゼによって

- 強くリン酸化される35kDa, 38kDa 蛋白が認められる。
2. その主要な基質蛋白は何れの組織においても39K である。
  3. 39K は、膜と結合することによって、膜結合の EGF 受容体／キナーゼによりリン酸化される。
  4. 組み換え39K の EGF 受容体／キナーゼのリン酸化の解析から、各組織でみられた38kDa リン酸化蛋白は35kDa 蛋白に由来することが示唆される。

## 文 献

- 1) Carpenter, G. and Cohen, S. (1979) *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 193-216.
- 2) Cohen, S. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 555-562.
- 3) Antoniades, H.N. Scher, C.D. and Stiles, C.D. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **76**, 1809-1813.
- 4) Cohram, B. (1985) *Adv. Cancer, Res.* **45**, 183-216.
- 5) 春日雅人(1983)インスリンの作用機序, レセプター最新の知見, 糖尿病学, P.46, 診断と治療社
- 6) 春日雅人 (1984) 蛋白質核酸酵素**29**, 533-550.
- 7) 清水信義, 清水淑子 (1989) 蛋白質核酸酵素**34**, 1040-1048.
- 8) Hunter, T. and Cooper, J.A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 897-930.
- 9) Utsumi, K., Sato, E., Okimasu, E., Miyahara, A. and Takahashi, R. (1986) *FEBS Lett.* **201**, 277-281.
- 10) Soto, E.F., Morimoto, Y.M., Matsuno, T., Miyahara, M. and Utsumi, K. (1987) *FEBS Lett.* **214**, 181-186.
- 11) Sato, E.F., Miyahara, M. and Utsumi, K. (1988) *FEBS Lett.* **227**, 131-135.
- 12) Sato, E.F., Tanaka, Y. and Utsumi, K. (1989) *FEBS Lett.* **244**, 108-112.
- 13) Sato, E.F., Tanaka, Y., Edashige, K., Kobuchi, H., Morishita, S., Sugino, Y.M., Inoue, M. and Utsumi, K. (1989) *FEBS Lett.* in press.
- 14) Fava, R.A. and Cohen, S. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2636-2645.
- 15) Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- 16) Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C. and Chinkers, M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1523-1531.
- 17) De, B.K., Misono, K.S., Lukas, T.J., Mroczkowski, B. and Cohen, S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13784-13792.
- 18) Huang, K. S., Wallner, B.P., Mattalino, R.J., Tizard, R., Burse, C., Frey, A., Hession, C., McGay, P., Sinclair, L.K., Chow, E.P., Browning, J.L., Ramachandran, K.L., Tang, J., Smart, J.E. and Pepinsky, R.B. (1986) *Cell*, **46**, 191-199.
- 19) Hirata, F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7990-7997.
- 20) Powell, M.A. and Glenn, J.R. (1987) *Biochem. J.* **247**, 321-328.

(1989年9月7日受理)