

論文題目 ヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)

レセプターの生化学的解析

指導教官名 矢野義雄教授

昭和63年4月

東京大学大学院医学系研究科

第3種博士課程(医学)

第一臨床医学専攻 入学

氏名 花 岡 豊

①

論文題目

ヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)レセプターの生化学的解析

指導教官名 矢崎義雄 教授

昭和63年4月

東京大学大学院医学系研究科

第3種博士課程(医学)

第一臨床医学専攻 入学

氏名 花園 豊

目次

第1章 研究の背景	3
1-1 CML 好中球の機能低下と G-CSF	3
1-2 困難な G-CSF の放射性ヨード標識	4
第2章 研究材料と方法	7
2-1 ヒト組換え体 G-CSF 誘導体 (YPY-G-CSF) の作製	7
2-2 コロニーアッセイ	7
2-3 YPY-G-CSF の放射性ヨード標識	7
2-4 末梢血好中球の分離	8
2-5 結合実験	9
2-6 化学的架橋実験	10
2-7 架橋複合体の分解過程の解析	10
2-8 ペプチドマッピング	11
2-9 N-糖鎖の切断	11
付図 (図 1-3)	13
第3章 結果	16
3-1 YPY-G-CSF の生物活性	16
3-2 YPY-G-CSF の放射性ヨード標識	16
3-3 特異的結合の時間依存性	16

3-4 YPY-G-CSF の好中球に対する結合の特異性	17
3-5 正常および CML 好中球の Scatchard 解析	17
3-6 架橋実験	18
3-7 架橋後の蛋白質分解	19
3-8 ペプチドマッピング	20
3-9 N-糖鎖の修飾	20
付図 (表 1、図 4-1 2)	22
第 4 章 考察	32
4-1 125 I-YPY-G-CSF	32
4-2 CML 好中球の G-CSF レセプター	32
4-3 二種類の リガンド・レセプター複合体	33
発表論文	37
関連論文	37
引用文献	38

第1章 研究の背景

1-1 CML 好中球の機能低下と G-CSF

慢性骨髄性白血病 (CML) 慢性期は様々な造血器悪性腫瘍のなかでもユニークな特徴をもっている。すなわち、悪性のクローンから多数の好中球が派生し末梢血中に出現するがそれらの悪性細胞は正常好中球と形態学的に区別することができない。また、CML の好中球機能も正常好中球とほとんど変わらないといわれている。しかし、全く正常というわけではなく、たとえば好中球アルカリフォスファターゼ (NAP) 活性の低値などのような機能異常も存在する[1, 2]。NAP 活性の低値は CML を他の造血器疾患と鑑別するのに有用である。CML 好中球の NAP 活性低値の原因は不明である。

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は顆粒球前駆細胞の増殖と分化を刺激する造血因子である。G-CSF はさらに正常好中球の機能を亢進させる[3, 4]。NAP 活性は G-CSF によってコントロールされているという報告があり[5]、また、我々の研究室から湯尾らは CML 好中球の NAP 活性は G-CSF によって上昇すると報告した[6]。ただし、それに必要な G-CSF の濃度は生理的濃度をはるかに上回っている。これらのことから、正常好中球と CML 好中球との間には G-CSF レセプターの数や構造に違いがあるのではないかと考えられる。そこで私は CML 好中球の G-CSF レセプターを正常好中球と比較する実験を行なった。

2-2 困難な G-CSF の放射性ヨード標識

レセプター研究で最も重要なことは純度の高いリガンドが大量に得られることと、高い比活性をもち生物活性の失われていないリガンドの標識体の作成である。ヒト G-CSF をコードする cDNA はすでにクローン化されており[7, 8]、極めて純度の高い組換え体が研究にも臨床にも使われている。純化された組換え体を使って、いくつかのグループはヒトの好中球における G-CSF レセプターを生化学的に分析している。それによると、G-CSF レセプターは単一の親和性をもち[9, 10]、架橋実験からその分子量は 150 kD と推定されている (リガンド・レセプター複合体として 170 kD)[9]。しかしながら、それらの実験に用いられた標識リガンド体の比活性は概して低い。放射性比活性を高めるためにヨード標識しやすい G-CSF アナログを作製しているグループもあるが、それでも比活性は必ずしも高くなく、3,000-10,000 cpm/ng protein である[9, 11]。他の造血因子が複数のサイズのレセプターをもっていたり、二相性の結合部位をもっていることを考えると[11-16]、この比活性ではすべての種類の G-CSF レセプターを見い出すことは不可能かもしれない。

私の経験によると、G-CSF の放射性ヨード標識は極めて困難である。これはおそらく G-CSF の構造上の理由によると思われる。この問題を克服するために渡辺らは YPY-G-CSF と名づけた G-CSF の新しい誘導体を作成した[17]。これは G-CSF の N 末端から 1 番めのスレオニンと 3 番めのロイシンとともにチロシンに置換した変異遺伝子を作成し大腸菌に導入、発現させたものである。YPY-G-CSF は G-CSF の生物活性を完全に保持している。放射性標識した YPY-

G-CSF の比活性は 7-14 kBq/ng (200,000-400,000cpm/ng) であった。これは一分子の YPY-G-CSF に一分子以上の ^{125}I 分子が導入されていることを意味する。YPY-G-CSF は CML 好中球の病態生理や G-CSF レセプターの化学構造を解明していく上できわめて有用であると思われる。

第2章 研究材料と方法

2-1 ヒト組換え体 G-CSF 誘導体 (YPY-G-CSF) の作製

G-CSF をコードする cDNA から site-directed mutagenesis によって、N 末端から一番めのスレオニンと三番めのロイシンをチロシンに置換した変異 cDNA を作成し expression vector に挿入した (図 1)。それを大腸菌にトランスフェクトし産生物 (YPY-G-CSF) を純化精製した (詳細は文献[17])。

2-2 コロニーアッセイ

YPY-G-CSF の生物活性をコロニーアッセイによって G-CSF と比較検討した。マウスの骨髓細胞を大腿骨から採取し、 2×10^5 の細胞を寒天培地にまき、様々な濃度の YPY-G-CSF または G-CSF を添加した。5% CO₂, 37°C の条件下で 5 日間培養後、CFU-G 由来のコロニーをカウントした。実験は triplicate で行い、データは平均値と標準偏差で示した。

2-3 YPY-G-CSF の放射性ヨード標識

YPY-G-CSF の放射性ヨード標識はラクトペルオキシダーゼ法によって行なった。1.5 ml エッペンドルフ・チューブに、20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 10 μ l, 46 mM NaI 5 μ l, Na¹²⁵I 5 μ l (18.5 MBq または 0.5 mCi), YPY-G-

CSF 2 μ g, Enzymobead reagent (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) 2 μ l, 2% β -D-glucose 2 μ l を加え 4°C, 5 時間インキュベートした。反応は 100 μ g/ml Na₂S₂O₅ 30 μ l, 0.1% NaI 30 μ l を加えることによって終了した。放射性標識した YPY-G-CSF (¹²⁵I-YPY-G-CSF) は PD-10 カラム (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) を用いて、elution buffer (10 mM sodium acetate pH 4.6, 100 mM NaCl, 0.2% bovine serum albumin (BSA), 0.02% NaN₃) にて分離精製した。¹²⁵I-YPY-G-CSF の比活性は self-displacement analysis によると 7-14 kBq/ng protein であった[18]。

2-4 末梢血好中球の分離

健康成人と Ph¹ 染色体陽性の CML 患者の末梢血を同意を得た上でヘパリン採血し、同量の生理食塩水に溶かした 1% デキストラン (Nakarai Chemicals Company, Kyoto) と混和する。混和した検体を室温で 40-50 分間静置すると赤血球が沈降する。上清を Ficoll-Metrizoate (比重 1.077 g/ml; Lymphoprep, Nycomed As, Oslo, Norway) に重層し、室温で 1,500 rpm, 4°C で遠心する。純粋な好中球は沈殿物中に含まれるが、混和した赤血球を取り除くために沈殿物に対して hypotonic shock を行なう。即ち、沈殿物を氷冷した水に 30 秒間懸濁し赤血球を溶血したのち（この条件では好中球は溶血されない）2 倍に濃縮された生理食塩水を加えて溶液を等張に戻す。hypotonic shock を行なったのち細胞を氷冷した phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗い、binding buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 0.1% BSA, 0.02% NaN₃, 0.01% bacitracin を含む alpha-medium) に懸濁する

(図2)。以上の操作によって95%以上の純度をもつ好中球が得られる(Wright-Giemsa染色による形態学的な評価)(図3)。

2-5 結合実験

特に指示のない限り、末梢血好中球 4×10^5 を binding buffer 40 μ l に懸濁し、 125 I-YPY-G-CSF を加える。このとき100倍量の放射性標識していない G-CSF を必要に応じて加える。懸濁液は特に指示のない限り4°C, 4時間インキュベートする。0.4 ml の tapred tube に 100 μ l の fetal calf serum (FCS) を加え、そこに懸濁液を重層する。これらのチューブを 1,500 rpm で5分間遠心すると、細胞に結合した 125 I-YPY-G-CSF (Bound) は沈澱分画に入り、結合していない 125 I-YPY-G-CSF (Free) は FCS の上層に残るので、沈澱物の真上でチューブを切断する(B/F分離)。沈澱物の放射活性をガンマカウンター(Aloka, Tokyo)で測定する。実験は全て duplicate で行い平均値を採用する。特異的結合(specific binding)は非標識の G-CSF を加えていない放射活性(総結合量 total binding)から非標識の G-CSF を加えた放射活性(非特異的結合 non-specific binding)を差し引いたものとする。レセプターの数と親和性は Scatchard 解析によって行った[19]。

2-6 化学的架橋実験

化学的架橋実験のために 4×10^7 の末梢血好中球を 500 μ l の binding buffer に懸濁し、 125 I-YPY-G-CSF (2 nM) を加える。このとき必要に応じて100倍量の非

標識の G-CSF を加える。細胞は 4°C, 4 時間インキュベートする。20 mM の disuccinimidyl suberate (DSS) (DSS は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶かす) を 5 μ l だけ懸濁液に加え (DSS の最終濃度は 0.2 mM) よく振蕩し、氷上で 30 分間インキュベートする。反応は氷冷した quenching buffer (25 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) を 1 ml 加えることによって終わらせる。細胞を氷冷した PBS で 2 回洗い 10,000 rpm で 1 分間遠心する。沈澱物に 120 μ l の lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM HEPES pH 7.4, 500 U/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM EDTA) を加えよくビベッチングし 30 分間氷上でインキュベートすることによって細胞を可溶化する。次に 10,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心しその上清に Laemmli の sample buffer (50 mM dithiothreitol (DTT) 含有) [20] を加え 3 分間煮沸する。検体は 6% SDS-PAGE によって展開し、ゲルの固定、Coomassie Brilliant Blue による染色、乾燥を行ったのち、オートラジオグラフィーによって解析する。

2-7 架橋複合体の分解過程の解析

DSS で架橋した好中球を 37°C, 30 分間インキュベートしたのち、lysis buffer で細胞を可溶化する。可溶化産物は上に述べた方法によって SDS-PAGE で展開しオートラジオグラフィーで解析する。他方の系では架橋後の可溶化産物を 37°C, 10 分間インキュベートしてから SDS-PAGE, オートラジオグラフィー解析を行う。

2-8 ペプチドマッピング

架橋されたりガンド・レセプター複合体のペプチドマッピングを Cleveland らの方法によって行なった[21]。問題のバンドをオートラジオグラフィーによって検出し未固定の SDS-PAGE のゲルから切り出す。切り出したバンドは適当な濃度の *Staphylococcus aureus* V8 protease (Sigma Chemical Co., MO) と共に SDS-PAGE ゲルにアブライし、切り出したバンドに含まれる蛋白質と V8 protease が stacking gel に充分はいるまで電流を流す。いったん電流を切って 60 分間インキュベートし protease が蛋白質を部分分解させたのち、電流を再び流し蛋白質を展開する。SDS-PAGE ゲルは固定、乾燥したのち、FUJIX BAS 2000 Bio-image Analyzer (Fuji Photo Film Company Limited, Tokyo) を用いて 4 日間の暴露の後、現像する。

2-9 N-糖鎖の切断

架橋された 160 kD のリガンド・レセプター複合体の N-glycanase (endo- α -N-acetyl-D-galactosaminidase, Sigma Chemical Co., MO) による消化を以下のように行った。問題のバンドをオートラジオグラフィーによって検出し、未固定の SDS-PSGE ゲルから切り出す。切り出したバンドを、10 mM 1,10-phenanthroline hydrate, 1,000 u/ml aprotinin, 1 mM PMSF, 0.1% SDS を含有する 0.2M リン酸緩衝液 (pH 8.6) に加え、ゲルをよくほぐす。適当量の N-glycanase を加え 37°C で一晩インキュベートする。その後、Laemmli の sample buffer (DTT(+)) を加え 3 分

間煮沸する。検体は6% SDS-PAGE によって展開し、ゲルの固定、Coomassie Brilliant Blue による染色、乾燥を行ったのち、オートラジオグラフィーによって解析する。

図1 YPY-G-CSF の構造

チロシン残基を N 末端に組み込んだ全く新しい G-CSF 誘導体 YPY-G-CSF の cDNA を site-directed mutagenesis によって作製し、その cDNA を大腸菌に発現させた。YPY-G-CSF はラクトペルオキシダーゼ法による放射性ヨード標識が容易で、その比活性は充分に高い。

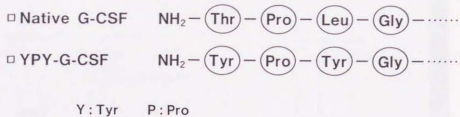


図2 末梢血好中球の分離

方法は本文参照。

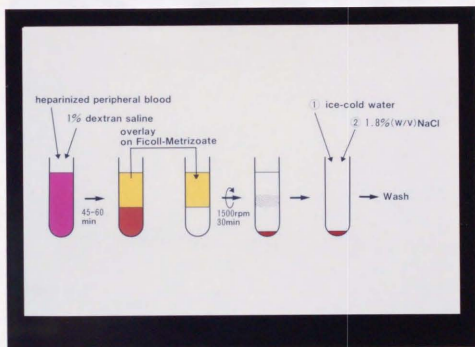
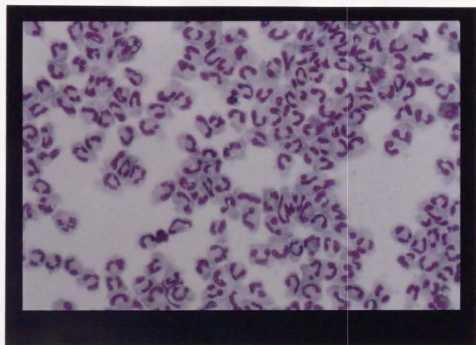


図3 分離した好中球の Wright-Giemsa 標本

上記の操作によって 95% 以上の純度をもつ好中球が得られる。



第3章 結果

3-1 YPY-G-CSF の生物活性

図4で示された通り、マウスの骨髄細胞を用いた YPY-G-CSF と G-CSF のコロニー形成能に有意差は認められない。

3-2 YPY-G-CSF の放射性ヨード標識

YPY-G-CSF は二つのチロシン残基を N 末端に余分にもっているため、ラクトペルオキシダーゼ法によるヨード化が容易である。その放射性比活性はレセプターの生化学的解析に充分な 7-14 kBq/ng protein であり、しかもその活性は少なくとも 14 日間は保たれている。

3-3 特異的結合の時間依存性

4°C における ^{125}I -YPY-G-CSF の正常人末梢血好中球に対する特異的結合の時間経過を図5に示す。特異的結合はインキュベーションを始めて約 4 時間後に最大に達しており、その後はほぼ一定である。

3-4 YPY-G-CSF の好中球に対する結合の特異性

様々な濃度の未標識の YPY-G-CSF, G-CSF, エリスロポエチン (EPO)、interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) が ^{125}I -YPY-G-CSF の末梢血好中球に対する結合を阻害するかどうかを調べた結果が図 6 である。YPY-G-CSF と G-CSF のみが ^{125}I -YPY-G-CSF の結合を濃度依存性に阻害した。他の造血因子 EPO, IL-3, GM-CSF は ^{125}I -YPY-G-CSF 結合に影響を与えなかった。

3-5 正常および CML 好中球の Scatchard 解析

図 7 A は ^{125}I -YPY-G-CSF の正常好中球に対する結合の飽和曲線の典型例を示す。 ^{125}I -YPY-G-CSF の正常好中球に対する結合を Scatchard 解析すると図 7 B に示すように、単相性の直線が得られ、G-CSF レセプターは単一の親和性を持つことがわかる。4 人の正常人から行った Scatchard 解析から解離定数 (Kd) を求めると、 $235 \pm 62 \text{ pM}$ であった。また、結合部位数は細胞一個あたり $1,840 \pm 674$ であった。図 8 A は ^{125}I -YPY-G-CSF の CML 好中球に対する結合の飽和曲線を示す。その Scatchard 解析を行ったものが図 8 B である。CML 好中球の場合も G-CSF レセプターは単一の親和性をもつことがわかる。3 例の CML 患者から行った Scatchard 解析より、解離定数 (Kd) と細胞一個あたりのレセプター数の平均はそれぞれ $245 \pm 66 \text{ pM}$, 1400 ± 685 であった (表 1)。CML 好中球の解離定数とレセプター数は正常好中球のそれと有意差は認められなかった。

(Student's *t*-test, $p > 0.9$)。図 7 A, 8 A からわかる通り非特異的結合は大変低く全体の 10% 以下であることにも注目しておきたい。

3-6 架橋実験

^{125}I -YPY-G-CSF と正常好中球を化学的架橋剤である DSS を用いて架橋した。そのオートラジオグラフィーの結果を図 9 A に示す。過剰量の非標識の G-CSF の存在下では見られない二本の特異的なバンドが観察される。分子量は還元下でも非還元下でも各々 160 kD と 110 kD であった。さらに、かすかであるが 145 kD のバンドも観察された。CML 好中球の場合でも全く同様に、160 kD と 110 kD の二つの特異的なバンドが観察された (図 9 B)。 ^{125}I -YPY-G-CSF の分子量は 18 kD であるから、レセプター蛋白質の分子量は 142 kD と 92 kD と計算される。

DSS で架橋した後に SDS-PAGE で展開する前にレセプターに結合したのが架橋されていない ^{125}I -YPY-G-CSF を取り除くことために好中球を PBS で二回洗浄した。DSS による架橋の効率はきわめて低く結合したリガンドのうちごくわずかなのみがレセプターに共有結合される。したがって、図 9 のゲルの先端 (写真では下端) を見ると非標識の G-CSF によってほとんど競合されていないように見えるが、これは洗浄効率の違いによるものと考えられる。しかし特異的なバンドは完全に競合されている。

3-7 架橋後の蛋白質分解

110 kD のリガンド・レセプター複合体が 160 kD のリガンド・レセプター複合体の人工的な蛋白質分解産物であるかどうかを調べるために、160 kD と 110 kD の蛋白質の分解過程を追ってみた。すなわち、リガンドとレセプターを架橋後、あるいは、細胞可溶化後に、37°C のインキュベーションステップを挿入し、160 kD や 110 kD のバンドの濃さがどう変化するかを観察した (図10)。

レーン B は架橋後、細胞懸濁液を 37°C で 30 分間インキュベートしたもので、レーン C は可溶化した架橋産物を 37°C で 30 分間インキュベートしたものである。レーン A はコントロールとして通常の架橋実験を行ったものである (37°C のインキュベーションを行わない)。レーン B では 160 kD と対照的に 110 kD のバンドが薄くなりさらに小さいバンドが出現した。レーン C では 110 kD のバンドは変わらないのに 160 kD のバンドは明らかに二つに分かれ 160 kD と 145 kD のバンドになった。このことから 145 kD のバンドは実験上の人工産物であることがわかる。さらに、110 kD のバンドは 160 kD のバンドの架橋や可溶化の操作によって生じた人工的な蛋白質分解産物である可能性以外に、G-CSF のレセプターは二種類存在しリガンドと結合後異なった細胞内代謝過程をとる可能性も指摘できる。なお、図 10 でゲルの先端 (図では下端) の放射活性の相違はゲルにアプライした蛋白量の相違によるものと思われる。

3-8 ペプチドマッピング

160 kD と 110 kD の蛋白質が関連する遺伝子の産物かどうかを明らかにするために架橋された 160 kD と 110 kD の蛋白質のペプチド構造を調べた。Scatchard 解析および架橋実験から明かなように CML 好中球の G-CSF レセプターは正常好中球の G-CSF レセプターと同様の結合特性をもつ。CML の患者の方が正常人よりはるかに多数の好中球を採取できるので私はこの実験には CML 好中球を用いた。固定されていないゲルから標識されたバンドを切りだし V8 protease で部分消化した。160 kD と 110 kD のバンドをそれぞれ 5, 20, 50 μ g の V8 protease を反応させて生じたペプチド断片のオートラジオグラムを図 11 に示す。V8 protease 消化しない場合の元来の 160 kD と 110 kD の標識バンドの泳動位置を→で示してある。5 μ g の V8 protease 消化によって、160 kD と 110 kD の蛋白質から共に二つのペプチド断片が生じる。二つの断片のうち大きい方の断片のサイズは同じだが、小さい方の断片のサイズは異なる。それぞれの分子量は 30 kD, 26 kD, 23 kD である。これらの分子量は 125 I-YPY-G-CSF の分子量 18 kD より大きく、これらの断片が 125 I-YPY-G-CSF 由来のペプチド断片を示すものではないことがわかる。V8 protease のアプライ量を増やすと 160 kD のバンド由来でも 110 kD のバンド由来でも大きい方のバンドは薄くなり小さい方のバンドは濃くなる。160 kD のバンドは 50 μ g の V8 protease で消化するとゲルから姿を消してしまうが、110 kD のバンドはまだゲルにとどまっている。これらの結果から 160 kD の蛋白質と 110 kD の蛋白質では V8 protease に対する感受性が異なることが考えられる。

3-9 N-糖鎖の修飾

オートラジオグラフィーで検出した 160 kD のバンドを未固定のゲルから切り出し、そのゲルに N-glycanase を加えて 37°C で一晩インキュベートしたサンプルを SDS-PAGE で展開しオートラジオグラフィーで解析したものが図 12 である。充分量の N-glycanase (5-20 μ g) をアプライしたレーンでは、160 kD のリガンド・レセプター複合体はややスメア状に広がりつつも、よく見ると二つのバンドを形成している。上のバンドが intact のリガンド・レセプター複合体 (160 kD)、下のバンドが N-glycanase によって消化されリガンド・レセプター複合体 (132 kD) である。その差は 28 kD である。実験に用いた YPY-G-CSF は大腸菌で生産されたものなので糖鎖をもたない。したがって、28 kD の差はそのまま 142 kD のレセプター分子を修飾している N-糖鎖の分子量である。充分量の N-glycanase を反応させたにもかかわらず、完全に消化されず上のバンドが残るのは、切り出したバンドと N-glycanase の混和が充分でなかったためと思われる。

図4 YPY-G-CSFの生物活性

CFU-G由来のコロニーは 2×10^5 のマウス骨髓細胞を寒天培地で様々な濃度の YPY-G-CSF または G-CSF と5日間インキュベートした後にカウントした。

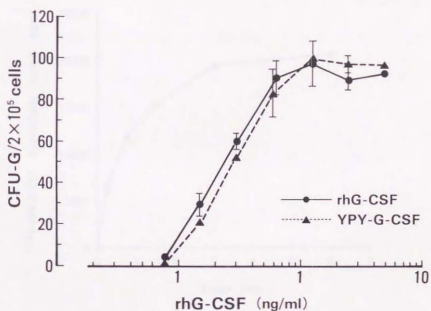


図5 ^{125}I -YPY-G-CSF のヒト正常好中球に対する特異的結合の時間依存性

4×10^6 の好中球を用いて 4°C でインキュベーションを行った。

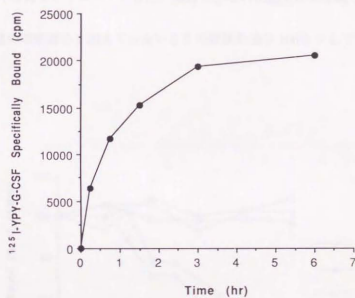


図6 ^{125}I -YPY-G-CSF の正常好中球に対する結合阻害

標識していない YPY-G-CSF, intact G-CSF, interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), erythropoietin (EPO) が ^{125}I -YPY-G-CSF の正常好中球に対する結合を阻害するかどうかを調べた。 4×10^5 の好中球に対して 600,000 cpm の ^{125}I -YPY-G-CSF を用いて 4°C , 4 時間インキュベートした。横軸に示された濃度の未標識の増殖因子を加えた。データは未標識の増殖因子を加えていないときの総結合量を 100% として示してある。

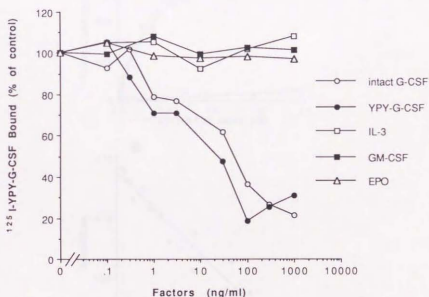


図7 正常好中球に対する ^{125}I -YPY-G-CSF の飽和曲線 (A) と Scatchard 解析 (B)

4×10^5 の正常好中球を過剰量の非標識 G-CSF の存在下あるいは非存在下で様々な濃度の ^{125}I -YPY-G-CSF と 4°C , 4 時間でインキュベートした。パネル A: total binding (○), specific binding (●), non-specific binding (□)。パネル B より単一の親和性を示すレセプターの存在が示唆される。

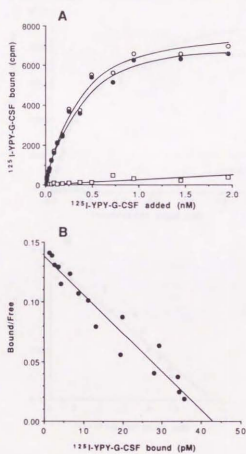


図8 CML好中球に対する ^{125}I -YPY-G-CSFの飽和曲線(A)とScatchard解析(B)

データは図6と同様な方法によって得た。正常好中球と同様に単一の親和性をもつレセプターの存在が示唆される。パネルA: total binding (○), specific binding (●), non-specific binding (□).

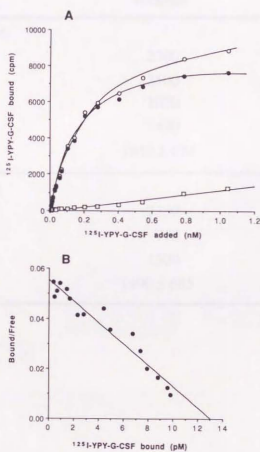


表1 正常及び CML 好中球における G-CSF レセプターの比較

レセプター数及び Kd は Scatchard 解析より求めた。それらは、正常好中球でも CML 好中球でも有意差はなかった。

neutrophils	G-CSF receptors	
	sites/cell	Kd (pM)
normal donors		
1	2300	190
2	2500	317
3	1070	247
4	1490	185
mean \pm SD	1840 \pm 674	235 \pm 62
CML patients		
1	2130	315
2	770	234
3	1300	185
mean \pm SD	1400 \pm 685	245 \pm 66

図9 ^{125}I -YPY-G-CSF と正常好中球 (A) 及び CML 好中球 (B) との架橋実験

4×10^7 の好中球を非標識 G-CSF の存在下または非存在下で ^{125}I -YPY-G-CSF (5×10^6 cpm) と 4°C , 4 時間インキュベートした。 ^{125}I -YPY-G-CSF とそのレセプターを DSS によって架橋し、リガンド・レセプター複合体をオートラジオグラフィーで検出した。SDS-PAGE は還元下で行った。正常好中球でも CML 好中球でも、リガンド・レセプター複合体は二種類検出され、その分子量は 160 kD と 110 kD であった。

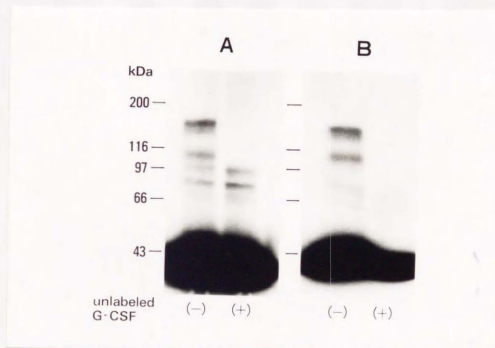


図10 リガンド・レセプター複合体の分解過程の検討

レーン A: 通常の架橋実験

レーン B: 架橋した細胞を 37°C, 30 分間インキュベートした。

レーン C: 架橋し細胞可溶後のサンプルを 37°C, 10 分間インキュベートした。

レーン D: 非標識の G-CSF を過剰量加えた通常の架橋実験

レーン B では、160 kD のバンドの濃さに変化は見られなかったが、110 kD のバンドは薄くなり、その degradation と思われる複数の小さいバンドが新たに出現した。レーン C では、160 kD のバンドの degradation と思われる 145 kD のバンドが明瞭になった。

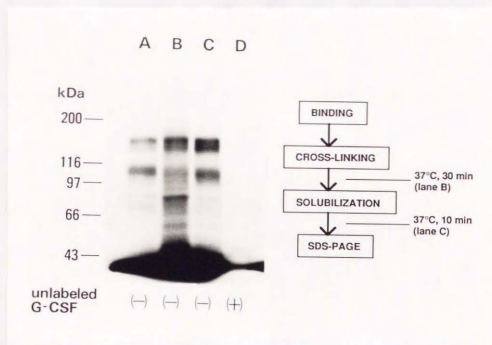


図11 160 kD と 110 kD の蛋白質のペプチドマッピング

未固定のゲルからオートラジオグラフィーで検出したバンドを切り出し、示された濃度の V8 protease と共に 10% SDS-PAGE にアブライした。stacking gel 中で V8 protease による反応を行ったのち、resolving gel で分解産物を展開した。ゲルは Fujix BAS 2000 Bio-image Analyzer で解析した。→ は元来の 160 kD と 110 kD の蛋白質の泳動位置を示す。

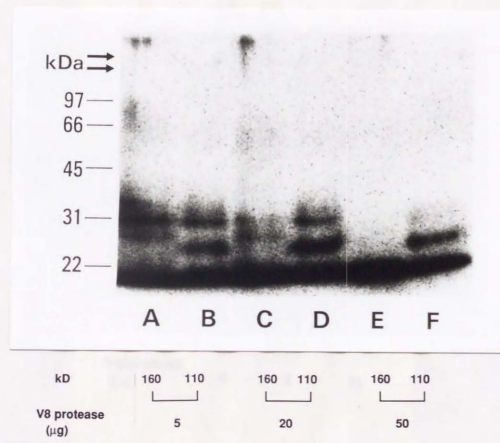
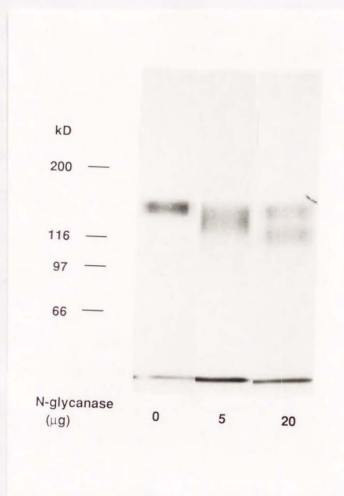


図12 160 kDの蛋白質のN-糖鎖による修飾

未固定のゲルからオートラジオグラフィーで検出した160 kDのバンドを切りだし、示された量のN-glycanaseと共に一晩37°Cでインキュベートした。サンプルは6% SDS-PAGEとオートラジオグラフィーで解析した。



第4章 考察

4-1 ^{125}I -YPY-G-CSF

G-CSF の N 末端にチロシン残基を余分に二つもった YPY-G-CSF は G-CSF と同様の生物活性をもち、ラクトペルオキシダーゼ法による放射性ヨード標識が容易であった。しかもその放射性比活性は 7-14 kBq/ng と極めて高く一分子の YPY-G-CSF に最低一個以上の ^{125}I 分子を導入することができた。この ^{125}I -YPY-G-CSF は G-CSF レセプターの生化学的解析を行うにあたって強力なツールになると期待される。

4-2 CML 好中球の G-CSF レセプター

正常人と CML 患者の好中球に G-CSF に特異的な結合部位 (レセプター) が存在することを明らかにした。Scatchard 解析によると CML 好中球の G-CSF レセプターは単一の親和性をもち細胞一個あたり 1,400 個存在しその K_d は 245 pM であり、個数も親和性も正常好中球の G-CSF レセプターと統計的に有意差はみられなかった。これは換言すれば、G-CSF は正常好中球でも CML 好中球でも全く同様にそのレセプターに結合するわけである。CML 好中球の G-CSF レセプターの解析の報告は今までなくこれが最初である。この結果から好中球アルカリフォスファターゼ活性の低値等の CML 好中球の機能異常は G-CSF レセプターの数や親和性によるものではなく、おそらくレセプター以降のシグナ

ル伝達機構等の細胞内代謝の違いによるものであると思われる。なお、私が調べた G-CSF レセプターの親和性 (K_d 値) は今までの報告と大差はないが、細胞一個あたりの数は今までの報告に比べて多かった。

4.3 二種類の リガンド・レセプター複合体

正常好中球と CML 好中球の G-CSF レセプターの基本的構造を調べるために架橋実験を行ったところ、分子量 160 kD と 110 kD の二つの特異的なバンドが正常好中球にも CML 好中球にも同定された。今までの報告によるとヒト好中球[9]でもマウスの株細胞[21]でも 125 I-G-CSF を用いた架橋実験で 170 kD の特異的バンドがただ一本検出されているのみである。私が観察した 160 kD のバンドは今まで報告されている 170 kD のバンドと同じであると思われるが、110 kD のバンドの方は今までに報告のないものである。この 110 kD のバンドを検出するためには架橋実験を蛋白質分解酵素の働かない条件下で行うことが重要である。なぜならば、図 7 レーン B で示したように架橋した好中球を 37°C でインキュベートすると 110 kD のバンドは薄くなってしまうからである。私は 145 kD のバンドも検出している。これは図 7 レーン C に示す通り、架橋後可溶化したサンプルを 37°C でインキュベートすると 145 kD のバンドを濃くすることができる（換言すればバンドの強さを人工的に操作できる）が、同じ条件下で 110 kD のバンドの強さは変化していない。これらのことから 145 kD の蛋白質は実験操作中の蛋白質分解酵素の作用による 160 kD の蛋白質の分解産物であるが、110 kD の蛋白質はそのような分解産物ではない可能性が示唆される。

私は 160 kD と 110 kD の蛋白質の構造をさらに詳しく調べてみた。この二つの蛋白質のペプチドマッピングの結果、それぞれ二つのペプチド断片が得られたが、そのうちの一つのサイズは同じだったが、もう一つはお互い違うサイズであった。このことから二つのレセプター蛋白質は一部に同じペプチド構造をもつが、違う部分をもつことがわかる。また、二つのレセプター蛋白質は G-CSF に対して同じ親和性をもつことも Scatchard 解析から明かである。したがって、この二つのレセプター蛋白質はリガンドとの結合に関与しない部位に構造上の違いがある可能性がある。

N-glycanase を用いた実験から、160 kD の蛋白質は 28 kD の N-糖鎖をもっていることがわかった。したがって 160 kD の蛋白質は 110 kD の蛋白質に N-糖鎖が余分に付いたものではない。レセプター蛋白質が O-糖鎖をもっているかどうか、また、O-糖鎖の違いで二つの異なるレセプター蛋白質が生じ得るかどうかは不明であるが、ペプチド構造を壊さずに O-糖鎖を切り取る良い方法がないため、このことは検討できないでいる。

最近、G-CSF レセプターが胎盤組織と trophoblast に存在することが結合実験の結果判明している[23]。架橋実験では 170 kD と 140 kD の複合体が同定されているが Scatchard 解析では単一の親和性 (K_d 390 pM) を示した。胎盤組織や trophoblast でも二種類の G-CSF のリガンド・レセプター複合体が検出されたのは興味深い。

一方、福永らは、マウスの G-CSF レセプターの cDNA のクローニングに成功した[24]。彼らはホモロジーを利用してヒトの白血病細胞株である U937 とヒトの胎盤の cDNA ライブラリーからヒトの G-CSF レセプターの cDNA のクローニ

ングにも成功した[25]。その際、ヒトの G-CSF レセプターにはスプライシングの違いで三つの異なる mRNA が存在することが明らかになっている。そのうち一つは細胞外ドメインのみをもついわゆる可溶性レセプターで残りの二つが膜貫通部位をもつレセプターであった。細胞膜に G-CSF レセプターが mRNA レベルで二種類存在することが証明されたわけである。“第2”のレセプターは胎盤に多く発現しており、細胞内ドメインに27残基のアミノ酸が新たに挿入されていた。胎盤では G-CSF のレセプターが二種類存在することが遺伝子レベルで証明されたことになる。この二種類の G-CSF レセプター mRNA と好中球や胎盤組織の架橋実験から示された二種類のリガンド・レセプター複合体との関係はいまのところ不明である。

桑木らは、 ^{125}I -YPY-G-CSF を用いて株化された骨髓性白血病細胞には架橋実験の結果 G-CSF のレセプターは一種類しかないことを示している (unpublished data)。それは好中球の G-CSF のレセプターの大きい方に相当する約 150 kD のレセプターであった。成熟した骨髓細胞である好中球や胎盤組織には G-CSF のリガンド・レセプター複合体が二種類存在し、未熟な骨髓細胞である白血病細胞には G-CSF のリガンド・レセプター複合体は一種類しか存在しないのはどういうことであろうか。

一つの可能性として好中球や胎盤組織では alternative splicing により二種類の G-CSF レセプターが存在することが考えられる。実際、胎盤組織では二種類の G-CSF レセプター mRNA が存在することは前述した通りである。この alternative splicing がリガンドとの結合に関係ない部位で生じたと考えれば Scatchard 解析で単一の親和性をもつことも納得できる。また、この可能性は37°Cのインキュ

バージョンステップを挿入した代謝過程の実験（図10）やペプチドマッピング（図11）の実験と矛盾しない。しかし、好中球はすでに分化の最終段階の細胞であり蛋白質合成を行っていないことを考えると alternative splicing で二種類の G-CSF レセプターが存在するならば、それらはまだ蛋白質合成を行っている骨髓芽球の段階またはこれらの白血化した細胞株でも二種類の G-CSF レセプターが検出されなくてはならないことになる。しかし、前述した通り、少なくとも骨髓系の白血病細胞では一種類の G-CSF レセプターしか検出されていない。従って二種類のリガンド・レセプター複合体は splicing の違いによって生じた可能性は少ない。

次に考えられるのは processing の違いである。好中球や胎盤組織には多くの種類の protease や glycanase が存在するため合成された蛋白質は様々な processing を受ける可能性がある。この可能性も 37°C のインキュベーションステップを挿入した代謝過程の実験（図10）やペプチドマッピング（図11）の実験と矛盾しない。さらに小さいリガンド・レセプター複合体は大きい方の実験操作中の単なる degradation product である可能性も捨て切れない。好中球には多くの種類の protease が存在しており、その中には 4°C でも充分働き得るような protease も存在する可能性があるからである。いずれにせよ、現段階では好中球にみられた二つのリガンドレセプター複合体の由来を結論づけることは困難であり今後の検討が必要である。

発表論文

Hanazono, Y., Hosoi, T., Kuwaki, T., Matsuki, S., Miyazono, K., Miyagawa, K. & Takaku, F. Structural analysis of the receptors for granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils. *Experimental Hematology*, **18**, 1097-1103 (1990).

関連論文

1. Kuwaki, T., Hosoi, T., Hanazono, Y., Tsumura, H., Ishikawa, F., Miyazono, K., Miyagawa, K. & Takaku, F. Distribution of human G-CSF receptors on hematopoietic and non-hematopoietic cell lines. *Japanese Journal of Cancer Research* **81**, 560-563 (1990).
2. Hanazono, Y., Piao, Y.-F., Mao, X.-M., Chiba, S., Shibuya, K., Kuwaki, T., Taketazu, F., Miyazono, K., Miyagawa, K., Hirai, H. & Takaku, F. The targets and biological effects of G- and GM-CSF. In: Miyazaki, T., Takaku, F. & Uchino, H. eds. Myelodysplastic syndrome and cytokines. Elsevier Science Publishers B.V. 3-12 (1991).

引用文献

1. Wachstein, M. Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J. Lab. Clin. Med.* **31**, 1-17 (1946).
2. Valentine, W.N. & Beck, W.S. Biochemical studies on leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **38**, 39-55 (1961).
3. Nicola, N.A., Begley, C.G., & Metcalf, D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature* **314**, 625-628 (1985).
4. Morstyn, G. & Burgess, A. Hemopoietic growth factor: A review. *Cancer Res.* **48**, 5624-5637 (1988).
5. Sato, N., Asano, S., Koeffler, H.P., Yoshida, S., Takaku, F., & Takatani, O. Identification of neutrophil alkaline phosphatase-inducing factor in cystic fluid of a human squamous cell carcinoma as granulocyte colony-stimulating factor. *J. Cell. Physiol.* **137**, 272-276 (1988).
6. Yuo, A., Kitagawa, S., Okabe, T., Urabe, A., Komatsu, Y., Itoh, S., & Takaku, F. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **70**, 404-411 (1987).
7. Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziyo, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H., & Ono, M. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony stimulating factor. *Nature*

- 319, 415-418 (1986).
8. Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R., & Welte, K. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* **232**, 61-65 (1986).
 9. Uzumaki, H., Okabe, T., Sasaki, N., Hagiwara, K., Takaku, F., & Itoh, H. Characterization of receptor for granulocyte colony-stimulating factor on human circulating neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 1026-1032 (1988).
 10. Budel, L.M., Touw, I.P., Delwel, R., & Loewenberg, B. Granulocyte colony-stimulating factor receptors in human acute myelocytic leukemia. *Blood* **74**, 2668-2673 (1989).
 11. Park, L.S., Friend, D., Price, V., Anderson, D., Singer, J., Prickett, K.S., & Urdal, D.L. Heterogeneity in human interleukin-3 receptors. *J. Biol. Chem.* **264**, 5420-5427 (1989).
 12. D'Andrea, A.D., Lodish, H.F., & Wong, G.G. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* **57**, 277-285 (1989).
 13. Kuwaki, T., Kitamura, T., Tojo, A., Matsuki, S., Tamai, Y., Miyazono, K., & Takaku, F. Characterization of human interleukin-3 receptors on a multi factor-dependent cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 16-22 (1989).
 14. Park, L.S., Waldron, P.E., Friend, D., Sassenfeld, H.M., Price, V., Anderson, D.,

- Cosman, D., Andrews, R.G., Bernstein, I.D., & Urdal, D.L. Interleukin-3, GM-CSF, and G-CSF receptor expression on cell lines and primary leukemia cells: Receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness. *Blood* **74**, 56-65 (1989).
15. Chiba, S., Tojo, A., Kitamura, T., Urabe, A., Miyazono, K., & Takaku, F. Characterization and molecular features of the cell surface receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Leukemia* **4**, 29-36 (1990).
16. Chiba, S., Shibuya, K., Piao, Y.-F., Tojo, A., Sasaki, N., Matsuki, S., Miyagawa, K., Miyazono, K., & Takaku, F. Identification and cellular distribution of distinct proteins forming human GM-CSF receptor. *Mol. Biol. Cell. (formaly Cell Regulation)* **1**, 327-335 (1990).
17. Watanabe, M., Fukamachi, H., Uzumaki, H., Kabaya, K., Tsumura, H., Ishikawa, M., Matsuki, S., & Kusaka, M. Mutant protein of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor for receptor binding assay. *Anal. Biochem.* **195**, 38-44 (1991).
18. Calvo, J.C., Radicella, J.P., & Charreau, E.H. Measurement of specific radioactivities in labeled hormones by self-displacement analysis. *Biochem. J.* **212**, 259-264 (1983).
19. Scatchard, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672 (1949).
20. Laemmli, U.K. Cleavage of structural properties during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).

21. Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., & Laemmli, U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **253**, 1102-1106 (1977).
22. Nicola, N.A. & Peterson, L. Identification of distinct receptors for two hemopoietic growth factors (granulocyte colony-stimulating factor and multipotential colony-stimulating factor) by chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* **261**, 12384-12389 (1986).
23. Uzumaki, H., Okabe, T., Sasaki, N., Hagiwara, K., Takaku, F., Tobita, M., Yasukawa, K., Ito, S., & Umezawa, Y. Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **86**, 9323-9326 (1989).
24. Fukunaga, R., Ishibashi-Ikeda, E., Seto, Y., & Nagata, S. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell* **61**, 341-350 (1990).
25. Fukunaga, R., Seto, Y., Mizushima, S., & Nagata, S. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 8702-8706 (1990).

