

上皮成長因子受容体(EGF-R)の構造と
機能に関する分子生物学的解析

指導教官名 矢崎義雄 教授

平成元年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

後藤 典子

①

論文題目

上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGF-R)

の構造と機能に関する分子生物学的解析

平成元年

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 後藤 典子

目次

序文	p2
----	----

第一章 上皮成長因子受容体 (EGF-R) チロシンキナーゼ触媒領域内に高く保存された845チロシン残基の生物学的意義に関する解析

1-1 序	p6
1-2 研究材料と方法	p7
1-3 結果	p13
1-4 考案	p20

第二章 上皮成長因子受容体 (EGF-R) チロシンキナーゼ内カルボキシル領域の生物学的意義に関する解析

1-1 序	p22
1-2 研究材料と方法	p24
1-3 結果	p31
1-4 考案	p50

まとめ	p56
謝辞	p58
参考文献	p59
発表論文	p73

序文

細胞の癌化という現象は、細胞が生体の制御に反応しなくなり、無制限に増殖することと言い替えることができる。それを解明するためのひとつのアプローチは、まず生理的な細胞の増殖なる現象を理解することである。多細胞生物は、細胞社会を構成していて、ホルモンや増殖因子等の細胞外因子に対して鋭敏に反応することにより、均衡を保っている。細胞膜上には、増殖因子に対する受容体が発現されていて、受容体を介して細胞内へシグナルが伝達される。すなわち細胞増殖を理解するためには、受容体を介したシグナル伝達の研究が重要になってくる。その代表的なものに上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor ; EGF-R) があり (Reviewed in 2)、これは上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor ; EGF) (Reviewed in 1, 5 & 3, 4) に対する細胞膜上の受容体であり、多くの組織に分布し、主に細胞増殖という生理反応をつかさどっている。また、EGF-R 遺伝子が、ヒト癌組織内で増幅あるいは再構成している例があり、癌化に関わっていることを示唆する報告がいくつかある。我々の研究室でも、ヒト脳腫瘍においてEGF-R遺伝子再構成を伴い増幅している例を見いだした(107)。

EGF-Rは、受容体型チロシンキナーゼに属する (Reviewed in 6, 7, 8, 9, 10)。受容体型チロシンキナーゼは既に20種以上が同定され、それぞれの構造をもとにサブファミリーに分かれる。EGF-Rは、erbB-2、erbB-3と共にサブファミリーを構成する。細胞外ドメインは、二つのシステインリッチな部分により4つのドメインに分かれる。リガンドは、ドメイン1あるいは3に結合すると考えられている。膜

通過ドメインにより細胞膜を通過し、細胞内は、膜近接領域、触媒領域、カルボキシル領域の3つに分かれる。リガンドは、EGFの他、TGF- α (Transforming Growth Factor- α) (11), vaccinia virus growth factor (VGF) (12), heparin binding EGF-like growth factor (13)、amphiregulin (5) が知られている。

モノマーの状態でリガンドがドメイン3あるいは1に結合すると(14)、コンフォメーションの変化がoccur (15)、レセプターがダイマーを形成して(16)、分子内のチロシンキナーゼが活性化するという反応機構がSchlessingerらにより提唱され(17, 19)、現在広く受け入れられている。活性化したチロシンキナーゼは、自己のいくつかのチロシン残基をリン酸化すると共に細胞内の基質をリン酸化し、その結果、細胞内へのシグナルカスケードが展開し、総体として細胞増殖が引き起こされる (Reviewed in 18)。カルボキシル領域は、最もチロシンキナーゼ間で多様性のあるドメインであり、EGF-Rの場合、同定されている自己リン酸化部位は、すべてここにクラスターをなして存在している。主要な自己リン酸化部位は、Y1068, Y1148, Y1173の3箇所であり、少量のリン酸化が起こるとされている部位は、Y992, Y1086の2箇所が報告されている(20, 21, 22)。EGF-Rの活性化に伴って起こる自己リン酸化が、チロシンキナーゼの活性化や基質特異性を決定するために重要であると考えられてきた(23, 24, 25, 69, 70, 71)。しかし、具体的な機能については十分解析されていないのが現状である。

また膜近接領域内の654スレオニン残基は、プロテインキナーゼCにより(26)、669スレオニン残基は、Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase により(27, 28, 29)、またカルボキシル領域の1046/7セリン残基もリン酸化を受ける(29, 30)。これらセリン・スレオニ

ンキナーゼによるリン酸化によって、チロシンキナーゼ活性が抑制されるトランスモジュレーションの機構が働く(30,36)。更に、インターナリゼーションにより、リガンドと結合した受容体は、細胞内へ輸送され(35)、そのほとんどはリゾソームで分解される。十分なリガンド存在下では、細胞膜上のレセプター数はダウンレギュレーションにより減少している(36,37)。

シグナルカスケードの一点一点に存在と思われる蛋白質に関する情報はかなり集積してきたが、それらのどれが重要であり、またいかにしてつながっているかに関しては、最近まではほとんど情報がなかった。しかし、受容体型チロシンキナーゼよりのシグナルがつぎに何に伝わるのかについて、最近ようやく基質となるエフェクター分子として重要な候補がうかびあがってきた(Reviewed in 34,38,39)。

1989年、リガンド刺激により直ちにリン酸化されてくる蛋白質、P-hospholipase C- γ_1 (PLC- γ_1) (40,41,42,87,108)、ras-GTPase activating protein (ras-GAP) (43,72,100,101)、Phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) (46)、c-raf(45)などが同定され、しかも前3者は、分子内にSrc homology-2 (SH-2)ドメインをもつことが明らかにされた。このSH2ドメインがチロシンリン酸化されたアミノ酸配列を認識することにより、受容体型キナーゼの自己リン酸化部分を認識し、結合することを示唆する証拠があげられてきた(46,47,48)。最近では、Protein tyrosine phosphatase-1 C (PTP-1C) (49)、Growth factor binding protein-2 (GRB-2) / Ash/Sem5(50)、vavそしてSHC(51)も分子内にSH2ドメインをもち、EGF-Rの自己リン酸化部位に結合しうることが示されている。しかし、現在のところ、これらの分子がシグナル伝達にどの程度重要な役割

を担っているのか、またシグナル伝達分子相互のクロストークはいかなるものであるのかという点に関して、十分解明されてはいない。

私はEGF-Rを介するシグナル伝達に興味をもち、EGF-Rを過剰発現したNIH3T3細胞は、リガンド刺激により細胞増殖を開始し、しかも癌化に似た形態学的変化も示すという性質を利用し(52,53,54)、各種変異体EGF-Rを過剰発現することにより、いかなる効果を生じるかについて解析した。

第1章では、キナーゼ間で非常にホモロジーの高い触媒領域に注目した。すべてのチロシンキナーゼに保存されているsrc-416チロシン残基相同部位であるEGF-R 845チロシン残基は、他のチロシンキナーゼとは対照的に、十分な生物学的活性、キナーゼ活性を呈するためには必須ではないことを示し、触媒領域の多様性を示した。

第2章では、キナーゼ間で最も多様性のあるカルボキシル領域に注目し、変異を加えて生物学的及び生化学的性質を検討した。その結果、カルボキシル領域は、トランスフォーム能を正に制御すること、また992チロシン残基は、これを残してカルボキシル領域を欠失させるとトランスフォーム能を負に制御することがわかった。そして、この領域はEGF刺激にて誘導されるGAP複合体構成成分と考えられるp62がチロシンリン酸化されるために必須であることが明らかになった。更に、GAP複合体内部p62のチロシンリン酸化は、EGF-Rを介する増殖やトランスフォーメーションへのシグナル伝達には必要ではないということが強く示唆された。

第一章 上皮成長因子受容体 (EGF-R) チロシンキナーゼ触媒領域内に高く保存された845チロシン残基の生物学的意義に関する解析

1-1 序論

チロシンキナーゼ、セリンスレオニンキナーゼの触媒領域は、種を越え、またキナーゼ間で非常によく保存されている。特に触媒領域の後半にあるsrc416チロシン相同部位は、すべてのチロシンキナーゼにおいて保存され(8,9)、また多くの場合に自己リン酸化を受け、そのキナーゼ活性また生物学的活性を調節するうえで重要な役割を担っていることがわかっている(50-60,62)。上皮成長因子受容体 (EGF-R) ではチロシン845がその部位に相当する(6,8,9)が、その触媒活性にどんな影響をもつかわかっておらず、興味をもたれるところである。この部位の自己リン酸化は、EGF-Rの場合には報告されていないが、チロシン特異的脱リン酸化酵素により脱リン酸化されやすいために検出できていない可能性等考えられるので、我々は直接この部位をフェニルアラニンに変えることによりリン酸化を受ける可能性をまったく廃した変異体をつくり、NIH3T3細胞に導入し、触媒活性としてチロシンのリン酸化、生物学的活性の総体としてDNA合成能、トランスフォーム能について如何なる効果を呈するかを検討した。

1-2 研究材料と方法

1-2-1. 研究材料

ヒトEGF、マウスEGFは、TOYOBOより購入した。 $[^{125}\text{I}]$ -EGF ($>750\text{Ci}/\text{mmol}$)、 $[^3\text{H}]$ -Thymidine ($25\text{Ci}/\text{mmol}$)、 $[^{125}\text{I}]$ -Protein A ($30\text{mCi}/\text{mg}$)、 $[^{125}\text{I}]$ -anti-mouse IgF(ab')₂ fragment (500 - $2000\text{Ci}/\text{mmol}$)は、Amersham Corp.より購入した。抗EGF-R抗血清は、秋山博士（阪大・微研）より、抗ホスホチロシン抗血清は、浜口博士（名大・医）より供与を受けた。

1-2-2 動物細胞発現ベクターと変異EGF-Rの作成

動物細胞発現ベクターとしては、骨髓増殖肉腫ウイルス (Myeloproliferative sarcoma virus) を基本骨格とし、ネオマイシン耐性遺伝子、サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus; CMV) 初期プロモーター、PUC19由来複製開始領域を含むレトロウイルスベクターpTJNeoを用いた。pTJNeoのCMVプロモーターの下流にはヒトEGF-R cDNA全長を含む3.8kb SacI-BamHI断片を挿入し (pTJNeo-EGF-R)、これをトランスフェクションに用いた (図1-1)。チロシン残基845をフェニルアラニンに置換した点突然変異は、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; PCR) により作成した (63)。EGF-RcDNA ヌクレオチド2686 から 2951 はほぼ中央にチロシン845に相当するヌクレオチド残基を含み、その両側にはApaLI、BglII制限酵素部位が位置する。まず、ApaLIを含むセンス鎖プライ

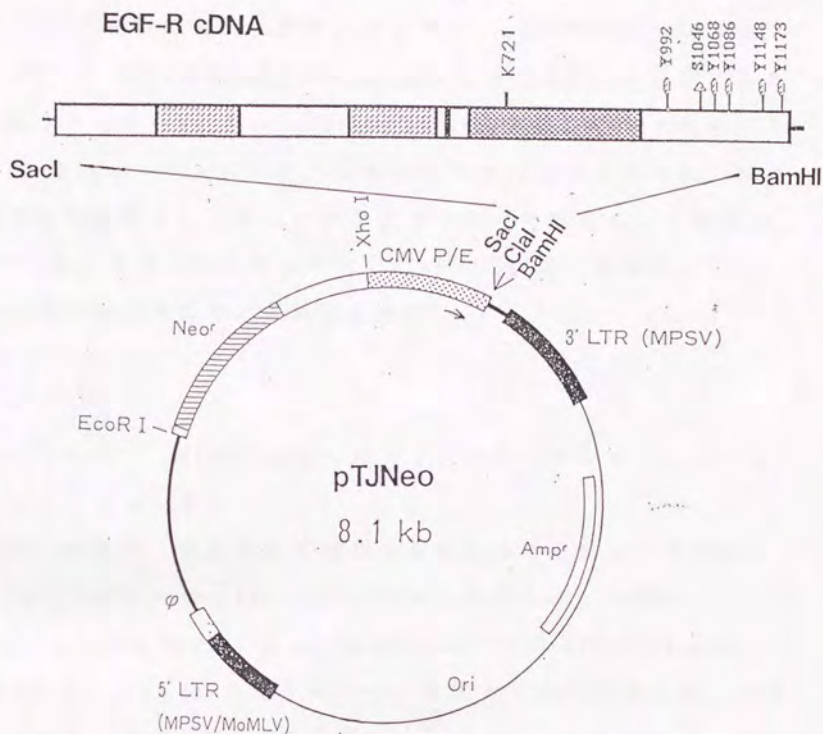


図1-1 動物発現ベクター pTJNeo。Myeloproliferative sarcoma virusを基本骨格とし、そのLong terminal repeat (LTR)の間にネオマイシン耐性遺伝子、Cyromegalovirus(CMV) immediate/early promoter、その3'側にcDNAクローニング部位をもち、PUC19由来の複製開始点をもつ。EGF-R cDNAは、その全長を含むSacI-BamHI断片としてcDNAクローニング部位へクローニングした。細い線はPUC19由来配列、矢印はCMVプロモーターより開始する転写方向を表した。

マーAと845フェニルアラニン変異を含むアンチセンス鎖プライマーB (5'-CCTTCTGCATGGAATTCCTTCTC-3') (下線に変異をいれた。それによりEcoRI制限酵素部位が新にできた。)、またそのセンス鎖プライマーC (5'-GAGAAAGAATTCATGCAGAAGG-3')とBglIIを含むアンチセンス鎖プライマーDを用い、pTJNeo-EGF-Rを鋳型とし、それぞれ1回目のPCRを25サイクル行った。つぎにその反応液のそれぞれ1/10を混合しこれを鋳型とし、新たにプライマーAとDを加えて、2回目のPCRを行った。増幅したDNA断片をApaLIとBglIIで消化し、pTJNeo-EGF-Rの相同部位と入れ換えた。

1-2-3 NIH3T3細胞へのトランスフェクションとトランスフォーメーションアッセイ

NIH3T3細胞は、熱処理にて補体を非働化させた新生子牛血清 (New born calf serum;NBCS) を5%加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM GIBCO) に2mM L-glutamineと90 μ g/mlのカナマイシンを加えて継代維持した。トランスフェクションは、 1.5×10^5 個の細胞を6cmプレートにまき、翌日、1プレート当たり5 μ gのプラスミドDNAをもちい、ポリブレンジメチルスルフォキサイド (polybrene-DMSO) 法(64)にて行った。2日後より、10ng/mlのEGF存在、非存在下に0.2mg/mlのG418を加えた培地に交換し、3日ごとに新鮮な培地に交換した。約2週間後、G418耐性コロニーとそのうちで形質転換しフォーカスを形成しているコロニーの数をそれぞれ数えた。コロニーをいくつか拾い、 $[^{125}\text{I}]$ -EGF結合実験にてEGF-Rを高発現しているクローンを選んだ。

1-2-4 $[^{125}\text{I}]$ -EGF 結合実験(65)

5×10^4 個/ml の濃度の細胞を24穴プレートにまき、翌日、 Ca^{++} Mg^{++} 不含リン酸緩衝食塩水「Phosphate buffered saline [PBS(-)]」及び結合実験用緩衝液[DMEM, 20mM HEPES (pH 7.5), 0.1% BSA]にて洗浄後、結合実験用バッファー500 μl 中に0.05 μCi の $[^{125}\text{I}]$ -EGF を加え、4°C, 60分ふ置し反応させた。反応後、細胞を氷冷したPBS(-)にて2回洗浄し、1N のNaOH を加えて溶かし、結合した放射活性をγ-カウンターにて計測した。非特異的結合は、100倍の非標識EGF存在下にて結合した放射活性を計測し、それを全活性より差し引いた。

1-2-5 ウエスタンブロット解析(67,68)

細胞を10cmプレート上80%飽和になるまで増殖させた後、0.5% NBBS DMEM に交換した。翌日、100ng/ml EGFにて37°C、5分間処理後また処理しないプレートを液体窒素中にいれ凍結させて反応を止め、PBS(-)にて1回洗浄後、溶解バッファーA[50mM HEPES(pH 7.5) 1% Triton X-100, 0.5% デオキシコール酸, 0.1% SDS, 1mM EGTA, 50mM フッ化ナトリウム, 10mM ジピロリン酸ナトリウム, 2mM バナジル酸ナトリウム, 10 $\mu\text{g/ml}$ アプロチニン, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)]にて細胞を可溶化した。氷上15分静置後、遠心(15,000g 10分、4°C)し、上清を回収し、Bradford法(BioRad)にて蛋白濃度を測定した。1レーンあたり25 μg の蛋白を含むサンプルを8% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動ゲルの組成は、8%ポリアクリルアミド[アクリルアミド: アクリルエー

ド(FMC)=32:1]、0.1% SDS、0.56M Tris-HCl(pH 8.8)、濃縮ゲルの組成は、6.4%ポリアクリルアミド、0.1% SDS、0.384M Tris-HCl(pH 6.8)である。転写用緩衝液(0.1M Tris-HCl、0.192M グリシン、20% メタノール)中で電気的にゲル中の蛋白質をイモビロンフィルター(Millipore)に吸着させた。イモビロンフィルターをブロッキング用緩衝液-1(2.5% 脱脂粉乳、0.1% Tween-20を含むPBS: 抗EGF-R抗血清にて検出する場合)あるいはブロッキング用緩衝液-2[5% 牛血清アルブミン フラクション5(生化学工業)、0.1% Tween 20を含むTris buffered saline(TBS): 抗ホスホチロシン抗血清にて検出する場合]中で4°C、1晩軽く振とうすることにより抗体反応の際の非特異的吸着を防いだ後、それぞれのブロッキング用緩衝液で希釈した抗EGF-R抗血清(1/500)あるいは抗ホスホチロシン抗血清(1/2000)中で室温3時間軽く振とうし、洗浄用緩衝液-1(0.1% Tween-20を含むPBS: 抗EGF-R抗血清用)あるいは洗浄緩衝液-2(0.05% Tween-20を含むTBS: 抗ホスホチロシン抗血清用)で10分、3回洗浄した。つぎに標識用緩衝液-1(2.5% 脱脂粉乳、0.1% Tween-20、0.15M NaCl、20mM Tris-HCl: 抗EGF-R抗血清用)あるいは標識用緩衝液-2(2% 牛血清アルブミン、0.05% Tween-20を含むTBS)中で20分平衡化した後それぞれ $1\mu\text{Ci/ml}$ の ^{125}I -protein A(30mCi/mg;Amersham)を加え、室温1時間軽く振とう後、洗浄用緩衝液で10分、5回洗浄したのちフィルターを乾燥させ、オートラジオグラフィーにて検出した。

1-2-6 ^3H -チミジン取り込み実験(66)

2×10^4 個の細胞を24穴プレートにまき、0.5% NBSC 中に2日間おい

た後、種々の濃度のEGFを含む0.5% NBCS DMEM に交換し、20時間後、 $1\mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ -チミジンをくわえ、4時間パルス標識した。標識した細胞を0.2N NaOH、5mM EDTAを1mlにて可溶化後、氷冷した10% トリクロロ酢酸6ml中にいれて30分氷上静置、生じた沈殿をGF/Cフィルター (Whatman) 上に回収し、これをよく乾燥させた後、シンチレーション バイアルにいれ、シンチレーターを1mlくわえ、液体シンチレーション カウンターで回収された放射活性を計測した。

1-3 結果

1-3-1 845フェニルアラニン変異体 (F845EGF-R) の構築
野生型EGF-R (Y845EGF-R) のドメイン構造と1-2-2に記述したごとく作成した変異体の構造を図1-2-Aに示す。作成したF845EGF-Rは、部位突然変異を導入した箇所に、EcoRI 制限酵素部位があらたにできているため (図1-2-B)、このプラスミドをもつ大腸菌を選択する際に容易であった。更に、PCRにて増幅させたヌクレオチド配列は、Sequenase version 2.0 (USB) を用いてジデオキシ法により決定し、目的の箇所の塩基配列以外に変異がはいっていないことを確認した。

1-3-2 トランスフォーメーション アッセイ

Y845EGF-R、F845EGF-RをNIH3T3細胞にトランスフェクション、G418にて選択することにより、約2週間後には、EGF存在非存在下共に、1プレート当り数十のG418耐性コロニーが出現した。1987年FireとAaronsonにより初めて報告されたごとく(52,53,54)、EGF存在下に培養した細胞より出現したコロニーの中には、形質転換したフォーカスを形成するものがあった。このEGF依存性の形質転換能を比較するために、各々の数を計測し、実験を3回行い、その全G418耐性コロニー数に対する形質転換フォーカス数を比率で表した。表1-1に示すごとく、牛DNA 5 μ gのみをトランスフェクションした細胞

(Mock) 中で、形質転換フォーカスを形成したものは0であり、またEGF非存在下に培養した細胞より出現したコロニー中での形質転換フ

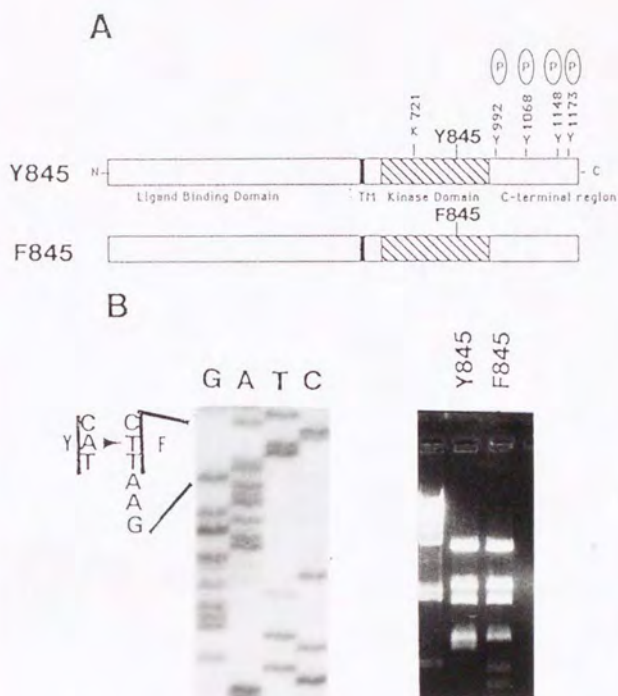


図1-2 ヒトY845変異EGF-Rの構造。(A) 野生型Y845と変異F845 EGF-Rのコード領域の構造：細胞外領域（リガンド結合領域）、膜通過領域（TM）、キナーゼドメイン、そしてC末領域。自己リン酸化チロシン（Y992、Y1068、Y1148、Y1173）は、(P)として表記した。F845は、845アミノ酸残基のチロシン（Y）をフェニルアラニン（F）に置換した点突然変異をもつ。(B) F845のヌクレオチド配列と野生型Y845そしてF845のEcoRI消化パターン。

Table 1. Transforming activity of Y845 and F845 EGF-R

cDNA	EGF	Transformed foci/G418-resistant colonies				
		Exp.1	Exp.2	Exp.3	Total	%
Y845	-	0/16	1/53	0/77	1/146	0.6
	+	2/40	2/61.5	3/69	7/170.5	4.1
F845	-	1/27	0/48	0/68	1/143	0.7
	+	6/35	3.5/35	3/72.5	12.5/142.5	8.8
Mock	-	0/56	0/101	0/94	0/251	0
	+	0/38	0/112	0/109	0/259	0

NIH3T3 cells were transfected with 5 μ g of the plasmid DNA per dish by the polybrene-dimethyl sulfoxide method. The transfected cells were grown in the presence of 0.2mg/ml of G418 with or without 10ng/ml EGF. After two weeks the number of G418 resistant colonies and transformed foci were counted, respectively. Three independent experiments were done. The results indicated the mean of the two transfections in Exp.2 and 3.

表1-1 NIH3T3細胞へのトランスフェクションは、polybrene-DMSO法により1プレートあたり5 μ gのプラスミドDNAを用いて行った。その後、10ng/mlのEGF存在、非存在下に0.2mg/mlのG418を含む培地中で増殖させた。2週間後、G418耐性コロニーとトランスフォームしたフォーカスの数をそれぞれ計数した。独立した実験を3回行った。実験2と3は、doubleで行った実験の平均を示した。

フォーカスの比率は、Y845EGF-R、F845EGF-Rとも1%未満であった。一方、EGF存在下での形質転換フォーカスの比率は、Y845EGF-Rで4.1%、F845EGF-Rで8.8%であり、変異体の方にむしろ高い傾向が認められた。

1-3-3 変異EGF-RのNIH3T3細胞上での発現とリガンド刺激による自己リン酸化

1-3-2で記述したG418耐性コロニーをいくつか拾い、 $[^{125}\text{I}]$ -EGF結合実験により、レセプターを高発現している細胞クローンを数個ずつ選んだ。図1-3-Aに、典型的な実験データを示す。実験はtriplicateで行い、データはその平均値 \pm 標準偏差で表した。既に報告されているように(52)、親株のNIH3T3細胞(Parent)には、EGF特異的結合部位はほとんど検出されなかったが、Y845EGF-R、F845EGF-Rをトランスフェクションした細胞には、EGF特異的結合部位が検出され、後者には前者の約3倍の結合部位が存在した。これらの細胞株を用いて以下の実験を行った。

まず、レセプターの発現をさらに確認するため、細胞を可溶化、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて展開した後、抗EGF-R抗血清でウェスタンブロッティングを行った。図1-3-Bに示すごとく、Y845EGF-R、F845EGF-R共に、報告されているEGF-Rの分子量に相当する170kDにバンドが認められた(68)。シグナルの強さは、F845EGF-Rの方がF845EGF-Rより強く、これは結合部位の量の差と一致した。

EGF刺激によるvivoでのチロシンリン酸化を調べるために、それぞれの細胞を37°C、5分間EGF処理した後、その可溶化物をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて展開し、抗ホスホチロシン抗血清を用いてウェスタンブロッティングをおこなった。

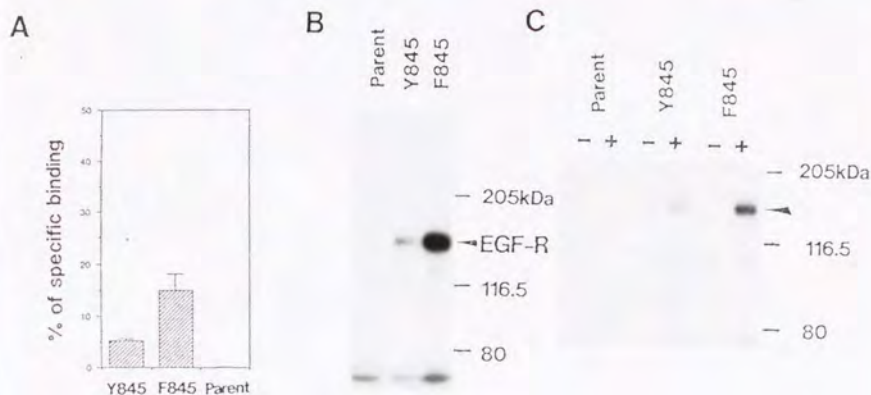


図1-3 野生型Y845と変異体F845 EGF-Rの発現とチロシンリン酸化。

(A) $[^{125}\text{I}]$ -EGF結合実験。野生型及び変異体EGF-Rを導入した細胞をそれぞれまいて一晚増殖させた。その後、細胞を無血清培地中で2.5時間インキュベート後、 $[^{125}\text{I}]$ -EGFを加え、 4°C 、1時間インキュベートした。細胞に結合した放射活性を計測し、非特異的結合を差し引いて、加えた全放射活性で割った値を%表示した。実験はtriplicateで行い、データは平均値 \pm 標準偏差で表した。

(B) 抗EGF-R抗血清によるウエスタンブロッティング。野生型及びF845 EGF-Rを発現したNIH3T3細胞を可溶化し、それぞれ $25\mu\text{g}$ の蛋白量をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開した。サンプルはImmobilon (Milipore)へ電気的に吸着させ、抗EGF-R抗血清をかけ、 $[^{125}\text{I}]$ -protein Aにて検出した。

(C) 生細胞内でのEGF-Rのチロシンリン酸化。静止した細胞を 100 ng/ml のEGFで5分処理、また処理せずに、可溶化し、それぞれ $25\mu\text{g}$ のサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲルにて展開した後、抗ホスホチロシン抗血清にてウエスタンブロッティングを行った。

図1-3-Cに示すごとく、Y845EGF-R、F845EGF-R共に、EGF刺激により急速にチロシンリン酸化される170kDの蛋白質が認められ、これは既に報告されている自己リン酸化のバンドである可能性が最も考えられた。シグナルの強さは、F845EGF-Rの方がY845EGF-Rより強いが、その発現レベルの違いを考慮すると、両者ともにほぼ同レベルのチロシンリン酸化がおきていることがわかった。

1-3-4 DNA合成能

EGFの本来の機能を最も反映すると考えられる増殖能の指標としてEGF依存性に起こるDNA合成能を、 $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み量によりY845EGF-RとF845EGF-Rとで比較した。実験はtriplicateで行い、データは平均 \pm 標準偏差で表し、3回行った実験の最も代表的なデータを図1-4に示した。親株NIH3T3細胞ではEGFの濃度をあげてもDNA合成は誘導されなかったが、Y845EGF-R、F845EGF-Rでは、EGFの濃度依存性の容量反応曲線が得られた。50%effective dose (ED_{50})はY845EGF-Rでは0.017ng/ml、F845EGF-Rでは0.030ng/mlであった。誘導されたDNA合成の最大レベルについてはF845EGF-RはY845EGF-Rの1.5倍であり、これはそのレセプターの発現量の違いに反映していることが最も考えられた。

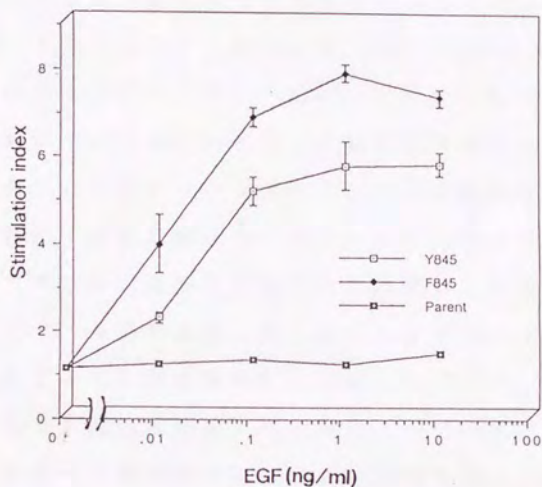


図1-4 EGF刺激による $[^3\text{H}]$ -thymidineの取り込みの誘導。
 静止した細胞を種々の濃度のEGFで24時間刺激し、その最後の4時間を $[^3\text{H}]$ -thymidineにてパルスした。実験はtriplicateで行い、結果は平均値 \pm 標準偏差で表示した。以下に取り込まれた放射活性の最大値と最小値について、代表的な実験データを表した。(Y845: 最小値 5783 ± 422 , 最大値 32980 ± 1559 ; F845: 最小値 3424.5 ± 205 , 最大値 32853.5 ± 1779 ; Parent: 最小値9105, 最大値10293)

1-4 考案

EGF-Rチロシンキナーゼにおいて報告されているすべての自己リン酸化部位は前述のごとく、触媒領域より下流のカルボキシル領域にクラスターをなして存在するとされている(チロシン残基1068、1148、1173は主要な自己リン酸化部位、992、1086は少量のリン酸化がおこるとされる部位である)(20,21,22)。これら自己リン酸化の生物学的意義についてはこれまでに多数の研究者により研究されてきたが、他のチロシンキナーゼのように明解な結論はでておらず、現在のところ統一的な見解は得られていない。各々のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した種々の変異体は、決定的な効果を及ぼすには至らず、外来の基質に対するリン酸化反応においてむしろ低いKm値を呈することが報告されている(24,25,66)。これら報告されている自己リン酸化部位は、リン酸化されていない状態すなわちリガンドが結合せず活性化されていない状態では、この部分が触媒領域をマスクするコンフォメーションをとり、外来基質に対して競合的基質として作用し(24,25,26)、リン酸化された状態すなわちリガンドが結合し、活性化された状態では、マスクは取り去られ、最大の生物学的活性を呈するために必要であるとされている(69-71)。

しかし、またひとつの可能性として議論されてきたことは、EGF-Rチロシンキナーゼの活性化において重要な役割を果たす自己リン酸化部位は、現在までに報告されているものとは別の部位にあり、リガンドが結合し活性化されて自己リン酸化が起こるとすぐに、脱リン酸化酵素によりリン酸基がはずれてしまうために、これまで検出されていなかったかもしれないということである(21)。EGF-Rチロ

シンキナーゼY845は、そういった可能性のあるチロシン残基の候補のひとつであった。しかし、以上の結果より、私は、845フェニルアラニンEGF-Rを発現したNIH3T3細胞が、EGF依存性の形態学的トランスフォーム能またDNA合成能を保持していることを明解に示すことができた。すなわち、Y845は、EGF-Rチロシンキナーゼの活性化において、決定的な役割を果たしているわけではないと結論することができた。

更に、フェニルアラニン845EGF-Rは、野生型EGF-Rに比し、約2倍のトランスフォーム能を示し、むしろ高い生物学的活性を呈したことは、他のチロシンキナーゼと比較すると興味深い対照をなしている。Y845相同部位は、c-srcではY416(55,56)、ヒトインスリン受容体ではY1162/Y1163(58)、マウスコロニー刺激因子-1受容体(Colony stimulating factor-1 receptor;CSF-1R)ではY807(62)であるが、これらのチロシンキナーゼにおいてはこの部位をフェニルアラニンに変えることにより、触媒活性、生物学的活性ともに減少する。また、ヒトCSF-1RではY809(59)、血小板増殖因子受容体(Platelet derived growth factor receptor;PDGF-R)ではY825(60,61)が相同部位であり、フェニルアラニンに変えることにより、触媒活性には影響を与えないが、生物学的活性は減少する。後者の場合、このチロシン残基が、基質蛋白質の認識に関わっていることが示唆され興味深い。今回のデータより、チロシンキナーゼの触媒領域にあり、すべてに保存されたチロシン残基の役割は、キナーゼにより多様であることがわかった。

第二章 上皮成長因子受容体 (EGF-R) チロシンキナーゼ内 カルボキシル領域の生物学的意義に関する解析

2-1 序論

EGF-Rチロシンキナーゼの細胞質領域は、細胞膜側の触媒領域とカルボキシル領域に分けられる。このカルボキシル領域には、現在報告されている5つの自己リン酸化部位（主要な自己リン酸化部位は、Y1068, Y1148, Y1173の3つ、少量のリン酸化のおこる部位は、Y992, Y1086の2つである）(20-22)のすべてとセリンリン酸化部位S1046/7が存在し(29-31)、キナーゼ活性を調節するうえで重要であることを示唆する報告がいくつかみられる(23-25, 30, 31, 71)。しかしながら、主要な自己リン酸化部位を各々フェニルアラニンに変化させた変異体を作成し、調べられた研究で、顕著な効果がみられなかった(24, 25, 66)。一方、992チロシン残基は、最近自己リン酸化を受けることが報告された部位で(22)、この意義についてもまだはっきりしたことはわかっていない。

そこで、私は、チロシン・セリンリン酸化部位を含むカルボキシル領域と992チロシン残基の生物学的役割を明かにする目的で、カルボキシル末端よりの欠失変異体と992チロシン残基をフェニルアラニンに変化させた変異体を作成し、これらがEGF-Rキナーゼを介して誘起されるDNA合成能と細胞増殖能、さらにはトランスフォーミング活性に対していかなる効果を及ぼすかを検討した。

更に、このカルボキシル領域により調節されるEGF-Rキナーゼの細胞内シグナル伝達を更に解明していく手がかりを得る目的で、最

近EGF-Rの基質エフェクター分子として有力な候補のひとつとしてあげられているras-GAPとその共沈蛋白質 (Reviewed in 75-77) (72-74) に対するキナーゼ活性に関して、EGF-Rカルボキシル領域の欠失による効果を調べた。その結果、EGF刺激によるras-GAP複合体のチロシンリン酸化は、EGFを介したDNA合成やトランスフォーメーションに必須ではないことを強く示唆する結果を得た。

第2章

2-2 研究材料と方法

2-2-1 研究材料

1-2-1に加えて、以下のものを用いた。

抗ホスホチロシン抗体PY-20(78)は、ICN社より、 $[^{125}\text{I}]$ -anti-mouse IgF(ab')₂ fragmentは、Amersham社より購入した。抗EGF-R抗体225IgG(79)は、河本博士(岡山大・医)より、抗GAP抗血清は、服部博士(国立精神・神経センター)より供与を受けた。

2-2-1 動物細胞発現ベクターと変異EGF-Rの作成

1-2-2に記したごとくにヒトEGF-R cDNA全長を含む発現ベクターpTJNeo-EGF-Rを作成した。

・チロシン992をフェニルアラニンに置換した変異EGF-R cDNAは以下のごとく丸山らにより開発されたPCR変異導入法を用いて作成した(図2-1)(109)。まず、EGF-R cDNA ClaI-BamHI断片(3008bpより3986bp)をpSP73(Promega)マルチクロニングサイトへ挿入した後、その3'方向にあるHpaIにClaIリンカーをいれ、これをClaIで消化することによりEGF-R cDNA 3008bpより3986bpをClaI-ClaI断片として取り出せるようにした(pSP73-C/C)。つぎに、pTJNeo-EGF-Rより、EGF-R cDNA 2958bpより295bpを含むBglIII-SacI断片を、PUC18由来の1.8kbのベクターpXM18の多クロニング領域内BamHI、SacIへサブクロニングした(pXM-18-E)。チロシン992をフェニル

Construction of F992 point mutation using PCR

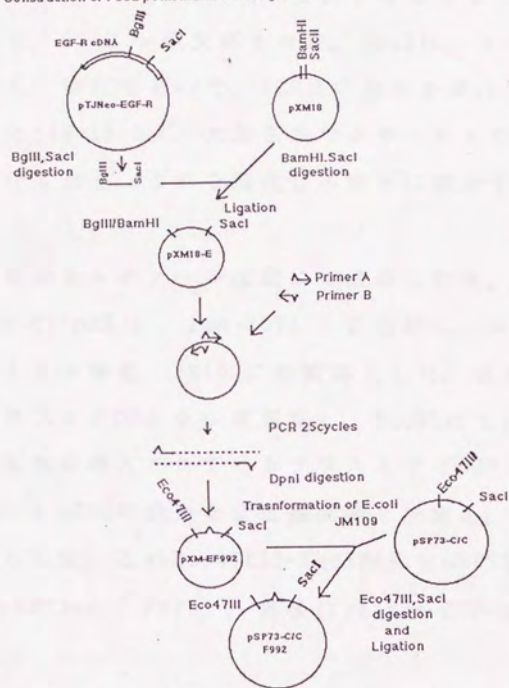


図2-1 PCRを用いた点突然変異F992の作成。

アラニンに置換するような変異を含むプライマー-A (センス鎖、5'-CGAATTCCTCATCCACAGCAGGGCTTC) とプライマー-B (アンチセンス鎖、5'-TGAGGAATTCGTCGGCATCCACCACGTC) (下線に変異を導入し、EcoRI制限酵素部位をも作成してある。)を用い、pXM-18-Eを鋳型として、PCRを25サイクル行い、ベクターDNA全長を増幅させた。そのPCR反応液にDpnIを加え、37°C 一晚反応させた。DpnIは、メチル化された配列のみを認識し、消化するので、PCR反応産物を消化しないが、鋳型としてもちいたpXM-18-Eは、大腸菌内でふやしたものであるため、メチル化を受けており、これを消化し小断片に細分することができる。

DpnI消化産物をエタノール沈殿にて濃縮した後、50 μ lのTE緩衝液 (10mM Tris-Cl pH7.4、1mM EDTA) に溶解し、エレクトロポレーション法により大腸菌 JM109に形質導入した。生じたコロニーを数個拾い、プラスミドDNAを少量調製し、EcoRIにて消化することにより、求める変異が導入されているプラスミド (pXM-EF992)を選んだ。更に、EGF-R cDNAの部分全塩基配列を決定し、他に変異のないことを確認した後、このEco47III-SacI断片をpSP73-C/Cの相同部位と交換し (pSP73-C/C F992)、最後にpTJNeo-EGF-Rの相同部位と交換した。

・EGF-R cDNAの種々の欠失変異は、以下のごとくに作成した。
pSP73-C/Cを用い、EGF-R アミノ酸残基1167 (PvuII)、1123 (HincII)、そして1011 (SacI) の部位をそれぞれカッコ内に示した制限酵素で消化、またSacIで消化した場合には更にT4ポリメラーゼによりここを平滑末端にした後、終止コドンリンカー (CTAGCTAGCTAG リンカー内にNheIを含む: Pharmacia) を結合させた。
DEL1011+F992については、pSP73-C/C F992のアミノ酸残基1011の部

分を同様に処理し、作成した。リンカーをいれることにより、1個から3個のアミノ酸残基が余分についたうえで、終止コドンがくるようになった。アミノ酸残基1167のあとにはAlaとSer、1123のあとにはLeu、Ala、Ser、そして1011のあとにはSerが余分につく。これらリンカーをいれた部位は、シーケンスを行い、塩基配列を確かめた。最後に各々のプラスミドのClaI-ClaI断片をpTJNeo-EGF-Rの相同部位と交換した。

2-2-2 NIH3T3細胞へのトランスフェクションとフォーカスフォーメーションアッセイ

1-2-3 に記述したごとくに行った。

2-2-3 [125 I]-EGF 結合実験

1-2-4 に記述したごとくに行った。

2-2-4 軟寒天培地中コロニー形成能(70)

細胞 5×10^4 個を、100ng/ml EGF存在非存在下に10% NBCS、0.34% 寒天を含むDMEM 2ml中に混合し、同様にEGF存在非存在下に10% NBCS、0.72% 寒天を含むDMEM 2mlを下層にした3.5cmプレート上に蒔き、これを上層とした。1週間後、上層の組成の混合液を2ml重層した。コロニー形成能の判定とその写真撮影は、20日後に行った。

2-2-5 低濃度血清存在下での細胞増殖能(80)

細胞 2×10^4 個を、20ng/ml EGF存在非存在下に0.5% NBCSを含むDMEM中、3.5cmプレートに蒔いた。3日目に培地を交換し、5日目に20ng/mlのEGFを加えた。細胞数はチュルク計数板を用いて計数した。

2-2-6 [35 S]-メチオニンによる代謝標識と免疫沈降実験

細胞を6cmプレート上80%飽和状態になるまで増殖させた後、透析にてアミノ酸を除去した5% NBCSを含むメチオニン非含有DMEM中に37°C、1時間前ふ置し、つぎに200 μ Ciの[35 S]-メチオニン/システイン(1176Ci/mmol; ICN)を加え、37°C、12時間標識した。標識後の細胞は、5mlのPBS(-)で2回洗浄した後、300 μ lの改変RIPA緩衝液(50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% デオキシコール酸, 0.1% SDS, 20mM EDTA, 1mM PMSF, 10 μ g/ml アプロチニン, 500 μ M パナジル酸ナトリウム, 1mM EGTA, 1.5mM MgCl_2)にて可溶化した。氷上15分静置後、遠心(15,000g 10分、4°C)し、上清を回収した。上清20 μ lをGF/Cフィルター上にのせ、これを氷冷した10% TCA溶液中にいれ、氷上30分静置した後、100%エタノール中に室温10分間おき、よく乾燥させ、フィルター上に残った沈殿中の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて計測した。 2×10^7 cpm相当量の細胞可溶化物に2.4 μ gの#225IgG(ヒトEGF-R 細胞外ドメイン特異的モノクローナル抗体)を加え、氷上2時間インキュベート後、ウサギ抗マウスIgGを吸着させた50/50 (w/v) プロテインAセファロースビーズ(Pharmacia)を20 μ l加え、4°C 1時間振とうした後、形成された免疫複合体を1mlのmodified RIPA緩衝液にて3回洗浄し、20 μ lのLaemmli サンプルバッファーを加えて可溶化し、95°C 5分

間熱変性させ、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルを7%酢酸、30%メタノール中で15分軽く振とう後、enlightening(Biotechnology systems)中で30分軽く振とうし、フルオログラフィーを行い、オートラジオグラフィーにて検出した。

2-2-7 $[^3\text{H}]$ -チミジンとりこみ実験

1-2-5のごとくに行った。

2-2-8 生細胞内チロシンリン酸化(67,68)

細胞を10cmプレート上80% 飽和状態になるまで増殖させた後、0.5% NBCS DMEMに交換した。翌日、100ng/ml EGFまたは培地のみで37°C、5分間処理したプレートを液体窒素中にいれ、凍結させて反応を止め、5mlのPBS(-)にて1回洗浄後、溶解バッファーA (1-2-6に記載)あるいは直接Laemmli サンプルバッファー (2% SDS, 100mM DTT, 60mM Tris-HCl pH6.8, 5mM EDTA, 1mM EGTA, 10% glycerol) にて細胞を可溶化し、95°C、5分間熱変性し、Bradford法(BioRad)にて蛋白濃度を測定した。1レーンあたり20 μ gの蛋白を含むサンプルあるいは同濃度のレセプターを含むサンプルを8%または10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、ゲル中の蛋白質をイモビロンへ電氣的に吸着させ、1次抗体としてモノクローナル抗ホスホチロシン抗体PY-20(ICN)、2次抗体として $[^{125}\text{I}]$ -抗マウスIgF(ab')₂断片(500-2000Ci/mmol; Amersham)を用い、1-2-6に記したごとくにウエスタンブロッティングを行

った。

2-2-9 GAP共沈蛋白質のリン酸化

細胞を10cmプレートに飽和状態になるまで増殖させ、0.5% NBCSへ血清濃度を下げた培地に交換した。18時間後、100ng/ml EGFにて37°C、5分間処理後また未処理のプレートを液体ちっそ中にいれ凍結させて反応を止め、5mlのPBS(-)にて2回洗浄後、Margolisらの溶解バッファーB(81,82)[50mM HEPES(pH7.5), 150mM NaCl, 10% グリセロール, 1% TritonX-100, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 10mM ジピロリン酸ナトリウム, 500μM パナジル酸ナトリウム, 100mM フッ化ナトリウム, 30mM p-nitrophenylphosphate, 10μg/ml アプロチニン, 10μg/ml leupeptin, 1mM PMSF] 500μl/dishにて細胞を可溶化、氷上20分静置し、遠心(15,000xg, 5分、4°C)し、上清を回収、Bradford法(BioRad)にて蛋白濃度を測定した。各々500μgの細胞抽出液に、抗GAP抗血清1μlを加え、氷上2時間インキュベートした後、50/50(w/v)プロテインAセファロースビーズを20μl加え、4°C、1時間振とうした後、形成された免疫複合体を洗浄バッファーB (TritonX-100の濃度を0.1%にし、p-nitrophenylphosphateをのぞいた溶解バッファーB)で3回洗浄し、20μlのLaemmli サンプルバッファーを加えて可溶化し、95°C、5分間熱変性させ、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開した。ゲル中の蛋白質を電氣的にイモビロンへ吸着させた後、PY-20を用いて、1-2-6、2-2-8に記したごとくにウエスタンブロッティングを行った。

2-3 結果

2-3-1 EGF-R変異体の構築

作成した変異体の構造を図2-2に示す。野生型EGF-RのcDNAを用い、そのカルボキシル末端より徐々に欠失させた変異体を構築した。EGF-R cDNA 1167アミノ酸残基まで欠失したものをDEL.1167、1123残基まで欠失したものをDEL.1123、1011残基まで欠失したものをDEL.1011と表記し、992チロシン残基をフェニルアラニンに置換したものをF992、1011残基までの欠失をもち、更に992チロシン残基をフェニルアラニンに置換したものをDEL.1011+F992と表記した。これらの変異体を1-2-2に記したごとく、CMV プロモーターの制御のもとに細胞内で発現するようにした。これらのEGF-R cDNAを5 μ g等量ずつNIH3T3細胞へ導入した。

2-3-2 フォーカス形成能と形態学的トランスフォーム能

EGF-R cDNAをNIH3T3細胞へ導入した後、G418(0.2mg/ml)にて耐性細胞を選択しながら、10ng/mlのEGF存在、非存在下に培養すると、約2週間後、G418耐性のコロニーが出現し、1-3-2に記したごとくEGF存在下に培養したプレート中に形質転換クローン由来のフォーカス出現してきた。EGF非存在下に培養したプレートと、ベクターのみを導入した細胞のプレートには、フォーカスは形成されなかった。EGF依存性の形質転換能を比較するために、各々の数を計測し、実験を3回行い、その全G418耐性コロニー数に対するフォーカス数を比率で表した。表2-1に示すごとく、野生型とはほぼ同等のEGF依存

Constructions of EGF-R mutants

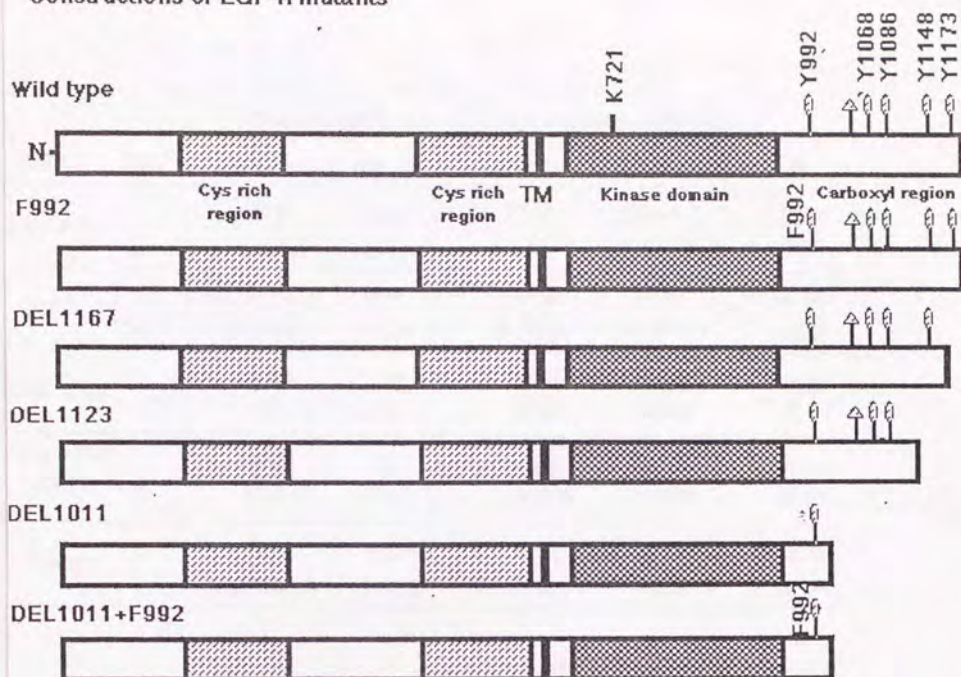


図2-2 EGF-R変異体の構築

カルボキシル領域を徐々に欠失させた変異体をそれぞれDEL.1167、DEL.1123、DEL.1011と表記し、そしてY992をフェニルアラニンに替えた変異体をF992、F992+Del.1011と表記した。触媒領域内のリジン (K) 721はATP結合部位である。

Transformed foci/G418-resistant colonies						
cDNA	EGF	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Total	%
Wild type	-	0/80	0/108	0/56	0/244	0.00
	+	3.5/76	5.5/107	2.5/65.5	11.5/248.5	4.63
992F	-	0/76	0/94	0/60	0/230	0.00
	+	3.5/68.5	5.5/85.5	2.5/60	11.5/214	5.37
Del. 1011	-	0/75	0/87	0/55	0/217	0.00
	+	0/67.5	0/102.5	0/58	0/228	0.00*
Del. 1011 +992F	-	0/68	0/75	0/62	0/205	0.00
	+	3/70.5	4/100.5	3/59.5	10/230.5	4.34
Vector	-	0/88	0/108	0/95	0/291	0.00
	+	0/110.5	0/160	0/90	0/360.5	0.00

表2-1 フォーカス形成能

それぞれ5 μ gのプラスミドDNAを用い、Polybrene-DMSO法により、NIH3T3細胞へ導入した。EGF (10ng/ml) 存在、非存在下で、G418 (0.2mg/ml) を加えた培地にて培養した。2週間後、G418耐性細胞と典型的な形質転換フォーカスの数を各々計数し、実験を3回行い、その合計を比率で表した。

*典型的な形質転換フォーカスは認められなかったが、弱く形質転換したと思われるフォーカスは数個みられた。

性フォーカス形成能が、F992、DEL.1011+F992に認められた。一方、DEL.1011には、明かなフォーカスは形成されず、弱い形質転換したフォーカスととれるものは認められたが、これは計測しなかった。これらフォーカスを形成したG418耐性コロニーを10個ずつ拾い、ふやした。図2-3にしめすごとく、野生型EGF-RとF992を導入したプレートより生じた半数以上のコロニー由来の細胞が、EGF依存性に、典型的なトランスフォームした形態を示した。一方、DEL.1011+F992の場合は、明かなフォーカスより拾ったコロニーであったが、すべてがやや弱くトランスフォームした形態を示した。これは、フォーカス形成能と形態学的トランスフォーム能という解析条件のちがいが、あるいは強くトランスフォームした細胞中では変異体EGF-Rの過剰発現がむしろ細胞傷害性に作用し、やや弱いトランスフォーメーションを呈する細胞が優位に増殖したため等考えられるが、確かな原因は不明であり、今後の解析が必要である。DEL.1011は、弱い形質転換フォーカスととれるコロニーより拾ったが、同様に弱くトランスフォームした形態を示した。

2-3-3 $[^{125}\text{I}]$ -EGF結合実験

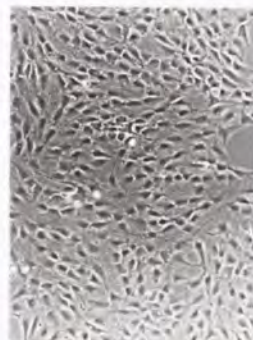
2-3-2に記したように拾ったコロニー由来の細胞が、それぞれレセプターを発現していることを確認するために、 $[^{125}\text{I}]$ -EGF結合実験を行った(表2-2)。実験はtriplicateで行い、データはその平均値 \pm 標準偏差で表し、少なくとも3回行った実験の典型的なデータを示した。1-3-3と同様に、親株NIH3T3細胞にはEGF特異的結合部位は検出限界以下であったが、形質転換フォーカス由来の細胞は、すべてにEGF特異的結合部位が検出され、その中でEGF結合部位の高発現しているものを数個選び、以下の実験に用いた。

Photograph of EGF-R mutants

NIH3T3(EGF+)



NIH3T3(EGF-)



Wild type(EGF+)



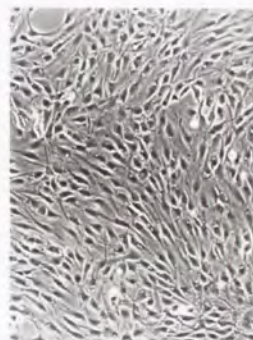
Wild type(EGF-)



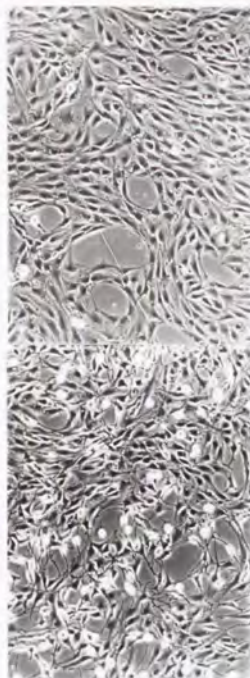
F992(EGF+)



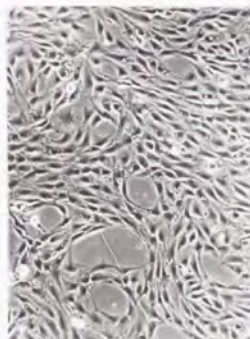
F992(EGF-)



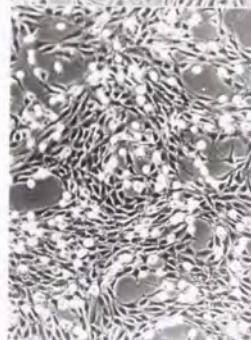
DEL 1011(EGF+)



DEL 1011(EGF-)



DEL 1011.F992(EGF+)



DEL 1011.F992(EGF-)

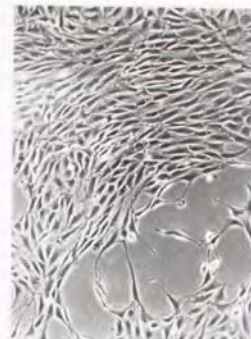


図 2-3 野生型及び変異EGF-R発現細胞の形態

cpm. of 5×10^5 cells		/cpm. of total (%)
NIH3T3		0.845+0.018
Wild type	Clone-1	22.5+0.92
	Clone-2	11.3+0.62
F992		15.9+0.73
Del.1167		42.05+4.69
Del.1123		14.25+0.345
DEL.1011		24.3+2.09
DEL.1011+F992		15.7+0.885

表2-2 $[^{125}\text{I}]$ -EGF結合実験

5×10^4 個の細胞を24穴プレートにまき、翌日、PBS(-)で2回洗った。つぎに0.5% NBCSを含む氷冷したDMEMを0.5mlいれ、氷上0.05 μ Ciの $[^{125}\text{I}]$ -EGFを加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 60分ふ置した。反応後、細胞を氷冷したDMEMにて3回洗い、結合した放射活性を γ カウンターで測定した。非特異的結合は、100倍の非標識EGF存在下にて結合した放射活性を測定し、それを全活性より差し引いた。Triplicateで行った実験を少なくとも3回行い、その代表的なデータを示した。

質の同定

EGF結合実験により選択した細胞を $[^3\text{H}]\text{-メチオニン}$ 標識した後、ヒトEGF-R細胞外ドメイン特異的モノクローナル抗体#225IgGを用いて免疫沈降し、レセプターの発現をみた。図2-4に示すごとく、野生型EGF-R、F992は、170kDに他のレーンには存在しないバンドが認められ、レセプターであることが最も考えられた。そしてDEL.1173、DEL.1123(150kD)、DEL.1017とDEL.1011+F992(130kD)の順に少しずつ移動度が早くなり、カルボキシル領域の欠失による分子量の変化に対応した。発現レベルは、EGF結合実験のデータと一致した。

2-3-5 軟寒天培地中コロニー形成能

それぞれレセプターを発現していることを確認した細胞の軟寒天培地中でのコロニー形成能を調べた。図2-5、表2-3に示すごとく、EGF非存在下、またNIH3T3細胞ではEGF存在下であってもコロニーは形成されなかった。野生型EGF-R、F992は、EGF存在下に多くのコロニーが形成された。一方、DEL.1011とDEL.1011+F992は、コロニーは形成されたが、前2者に比較すると、その数は少なかった。DEL.1011+F992は、DEL.1011に比較し、コロニーの大きさがやや大きい傾向があった。

2-3-6 DNA合成能

EGF依存性におこる増殖シグナルの伝達を調べるために、血清飢餓状態にし、静止したそれぞれの細胞に対してEGF刺激により誘導さ

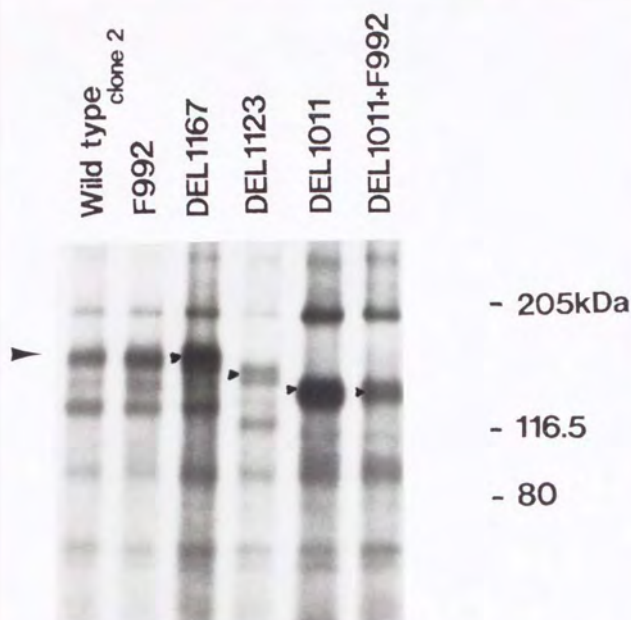


図2-4 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン代謝標識によるレセプター発現の確認
細胞を200 μCi の $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン/システイン (1176Ci/mmol; ICN)にて12時間標識した。その後、PBS(-)で2回 洗い、改変RIPA緩衝液にて可溶化した。放射活性を合わせた細胞可溶化物に#225IgGを加え、免疫沈降し、Lammeli サンプルバッファーで可溶化、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにて検出した。

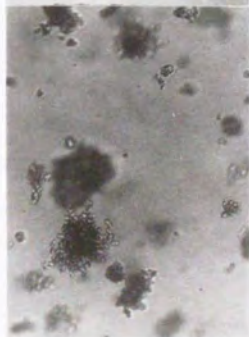
NIH3T3(EGF+)

Colonies in soft agar

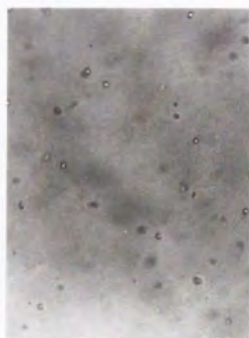
NIH3T3(EGF-)



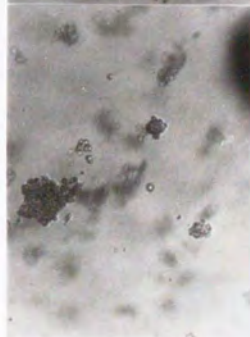
Wild type(EGF+)



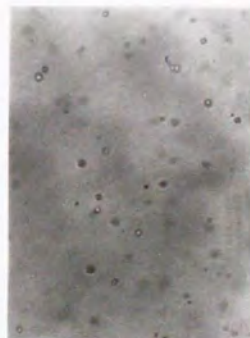
Wild type(EGF-)



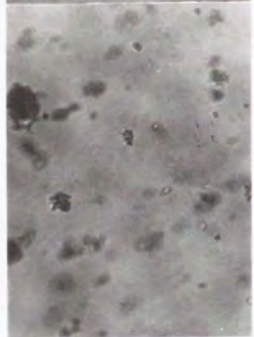
F992(EGF+)



F992(EGF-)



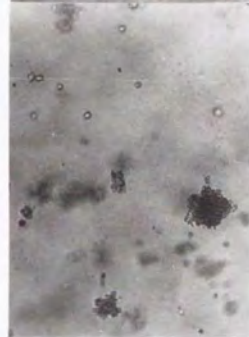
DEL1011(EGF+)



DEL1011(EGF-)



DEL1011-F992(EGF+)



DEL1011-F992(EGF-)



図 2-5 軟寒天培地中コロニー形成能

Growth in soft agar			
EGF	+	-	-
NIH3T3	-	-	-
Wild type	+++	-	-
F992	+++	-	-
Del.1011	++	-	-
Del.1011+F992	++	-	-

表2-3 軟寒天培地中コロニー形成能

細胞 5×10^4 個を、100ng/ml EGF存在下、非存在下に10% NBCS 0.34%寒天を含むDMEM 2ml中に混合し、同様にEGF存在下、非存在下に10% NBCS 0.72% 寒天を含むDMEM 2mlを下層にした3.5cm プレート上に蒔き、これを上層とした。1週間後、上層の組成の混合液を2ml重層した。コロニー形成能の判定とその写真撮影は、20日後に行った。

れるDNA合成能を $[^3\text{H}]$ -チミジンのとりこみ量を計測することにより調べた。

実験は、少なくとも2つの独立した細胞株で3回行い、同様の結果を得、無刺激時の放射活性を差し引き、得られたすべての平均のデータを図2-6に示した。値は、平均値 \pm 標準偏差で表した。親株NIH3T3細胞は、EGF刺激により、DNA合成はほとんど誘導されなかった。一方、野生型EGF-RはEGF容量依存性にDNA合成が誘導された。DEL.1123、DEL.1011、DEL.1011+F992、F992ともすべて、EGF容量依存性に著明にDNA合成が誘導された。その最大レベルはどの変異体でも、野生型とほぼ同等であった。容量依存性曲線は、DEL.1123とF992は野生型とほぼ同じであったが、DEL.1011はややEGF濃度の高い方へシフトしており、DEL.1011+F992はより強くその傾向が認められた。 ED_{50} は、野生型EGF-Rでは、 $3.0 \times 10^{-2} \text{ ng/ml}$ 、F992では $1.5 \times 10^{-2} \text{ ng/ml}$ 、DEL.1011では $7.0 \times 10^{-2} \text{ ng/ml}$ 、DEL.1011+F992では $20.0 \times 10^{-2} \text{ ng/ml}$ であった。

以上、EGF依存性DNA合成能に関しては、主要な自己リン酸化部位を欠失あるいは992チロシン残基をフェニルアラニンに変化させてもその最大レベルは変わらない。しかし、主要な自己リン酸化部位を欠失させた場合には、DNA合成の最大の活性をえるために、より高濃度のEGFが必要となることを示唆する結果を得た。

2-3-7 低濃度血清存在下細胞増殖能

低濃度血清存在下(0.5%NBCS)、最大のDNA合成を誘導するのに十分な濃度(20ng/ml)のEGFによる細胞増殖速度に対する効果を調べた(図2-7)。実験は、それぞれのレセプターを発現した2つの

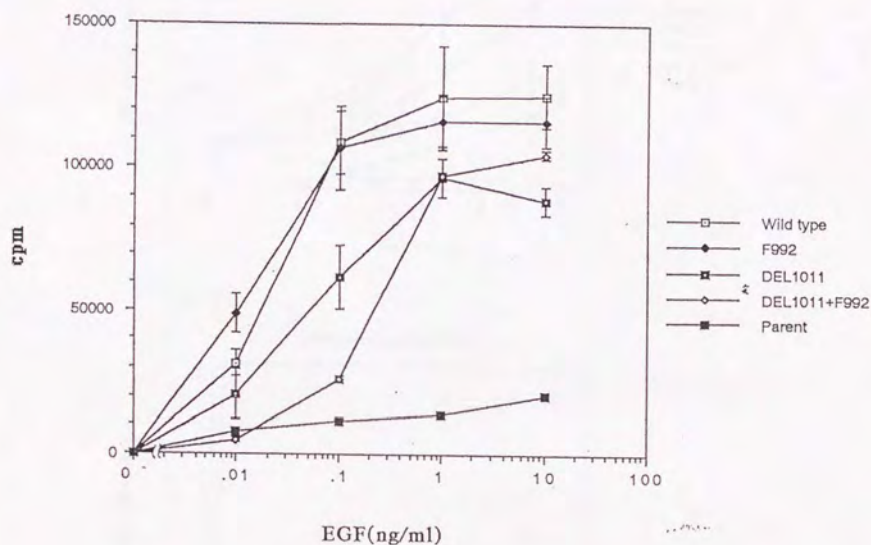


図2-6 $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込み実験

2×10^4 個の細胞を24穴プレートにまき、0.5% NBCS 中に2日間おいた後、種々の濃度のEGFを含む0.5% NBCS DMEMに交換し、20時間後、1 μCi の $[^3\text{H}]$ -チミジンをくわえ、4時間パルスラベルした。標識した細胞を可溶化後、10% トリクロロ酢酸中にいれ、生じた沈殿中の放射活性を測定した。少なくとも2つの独立した細胞株で3回行い、その平均値を示した。値は、平均値 \pm 標準偏差で表した。

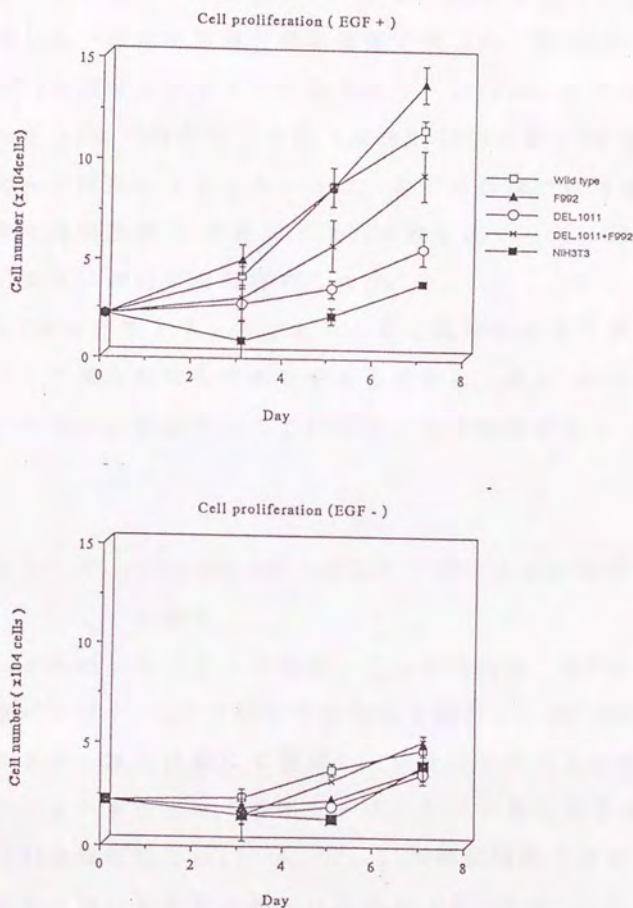


図2-7 低濃度血清存在下での細胞増殖能
細胞 2×10^4 個を、20ng/ml EGF存在下、非存在下に0.5% NBCSを含むDMEM中、3.5cmプレートに蒔いた。3日目に培地を交換した。5日目に20ng/ml EGFを加えた。細胞数はチュルク計数板を用いて計数した。

独立した細胞株について2回行い、同様の結果を得、その平均のデータを示した。値は平均値 \pm 標準偏差で表した。EGF非存在下では、親株NIH3T3細胞はじめすべての細胞株で、0.5%NBCS中ではほとんど増殖しなかった。EGF存在下では、親株NIH3T3細胞はEGF非存在下と同様ほとんど増殖しなかった一方で、他の細胞株では増殖活性がみられ、その増殖速度は野生型とF992が最も速く、DEL.1011+F992、DEL.1011の順に遅延傾向が認められた。

以上EGF依存性トランスフォーム能と細胞増殖能に関しては、主要な自己リン酸化部位を欠失させると減少し、更に992チロシンをフェニルアラニンに置換することにより、やや回復のみられる傾向があった。

2-3-8 vivoでのEGF-R自己リン酸化と生細胞内チロシンリン酸化

それぞれのレセプターを発現している細胞を、EGFにて5分刺激し、溶解バッファーAにて細胞可溶化物を調製し、8% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、抗ホスホチロシン抗体でウェスタンブロットを行った。著明なチロシンリン酸化蛋白質が、野生型及びF992発現細胞では170kD、DEL.1123発現細胞ではそれよりわずかに移動度の早い分子量の部分に現れた(図2-8-A)。これは、今までに報告されてきたEGF-Rの自己リン酸化であると考えられた。一方、DEL.1011及びDEL.1011+F992発現細胞では、相当する自己リン酸化は検出されなかった。同様にして、細胞をEGFにて刺激し、Laemmliサンプルバッファーにて細胞可溶化物を調製し、EGF結合実験のデータをもとに1サンプルあたりのレセプター濃度を一定にして、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、抗ホスホチロシン

A

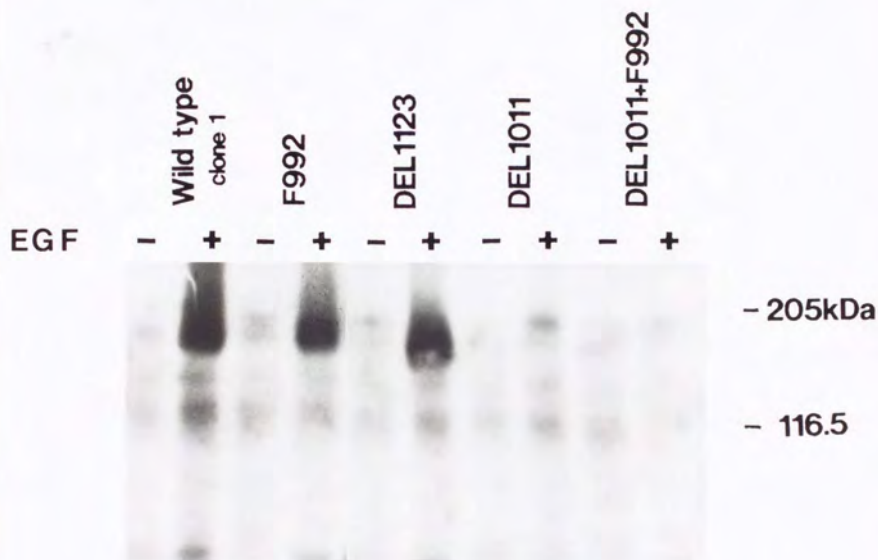
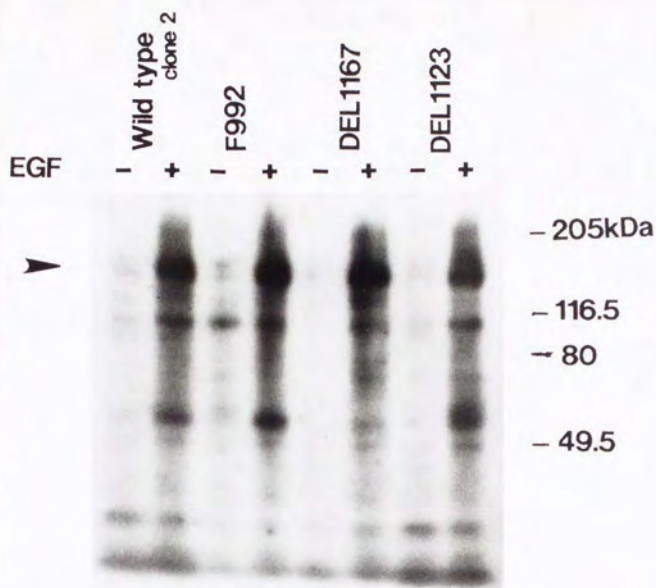


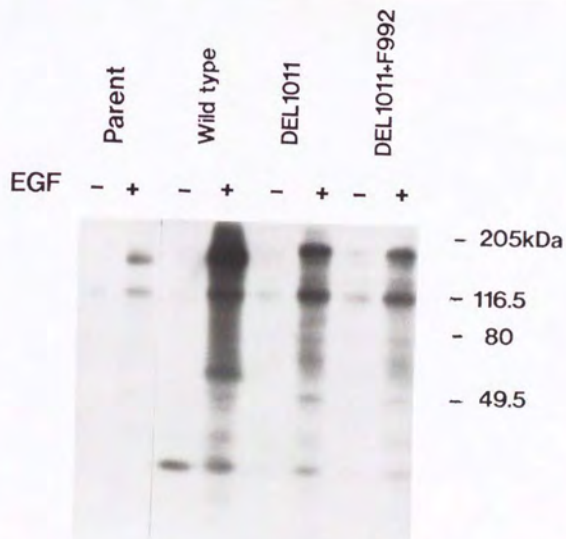
図2-8 生細胞内チロシンリン酸化

静止した細胞を100ng/ml EGF で37・C、 5分処理また未処理のまま溶解バッファーA (A) あるいはLaemmli サンプルバッファー (B,C) で可溶化し、8% (A) あるいは10% (B,C) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、PY-20を用いてウエスタンブロッティングを行った。

B



C



抗体でウェスタンブロットを行った

(図2-8-B, C)。野生型、F992、DEL.1167、DEL.1123 発現細胞では、自己リン酸化を受けたEGF-R 蛋白質が検出された。そのチロシンリン酸化のレベルは、各レセプター間ではほぼ一定であった。DEL.1123EGF-Rは、主要な自己リン酸化部位であるY1148, Y1173を欠いているため、カルボキシル領域が完全に保たれている状態ではリン酸化が少量しか起こらないY1086等の部位に、かなりの量のリン酸化が起こるようになっている可能性等考えられる(83)。このことは、3つの主要自己リン酸化部位を含む領域は、チロシンリン酸化のレベルにおいてその欠失を代償しうるということが示唆される。一方、DEL1011EGF-Rは、主要な自己リン酸化部位を3つとも欠失しており、この場合は自己リン酸化は検出限界以下であった。Laemmli サンプルバッファーによって細胞可溶化物を調製した場合には、溶解バッファーAによって調整した際に検出できなかったチロシンリン酸化蛋白質がいくつか認められた。これは、溶解バッファーAにては不溶性となる画分(例えば核等)中にチロシンリン酸化される蛋白質が含まれていることが考えられる。野生型、F992、DEL.1167、DEL.1123 発現細胞では、116kDと60kDにリン酸化蛋白質が認められた。DEL.1011とDEL.1011+992Fでは、116kDは認められるものの、60kDは認められなくなったかわりに、190kDの蛋白質のリン酸化が著明になり(68, 92)、リン酸化される蛋白質あるいはその程度が、前4者とは異なっている可能性が示唆された。

2-3-9 ras-GAP共沈蛋白質のチロシンリン酸化

EGF刺激によるras-GAP及びras-GAP結合蛋白質のチロシンリン酸化を調べるために、それぞれのレセプターを発現した細胞を、血清

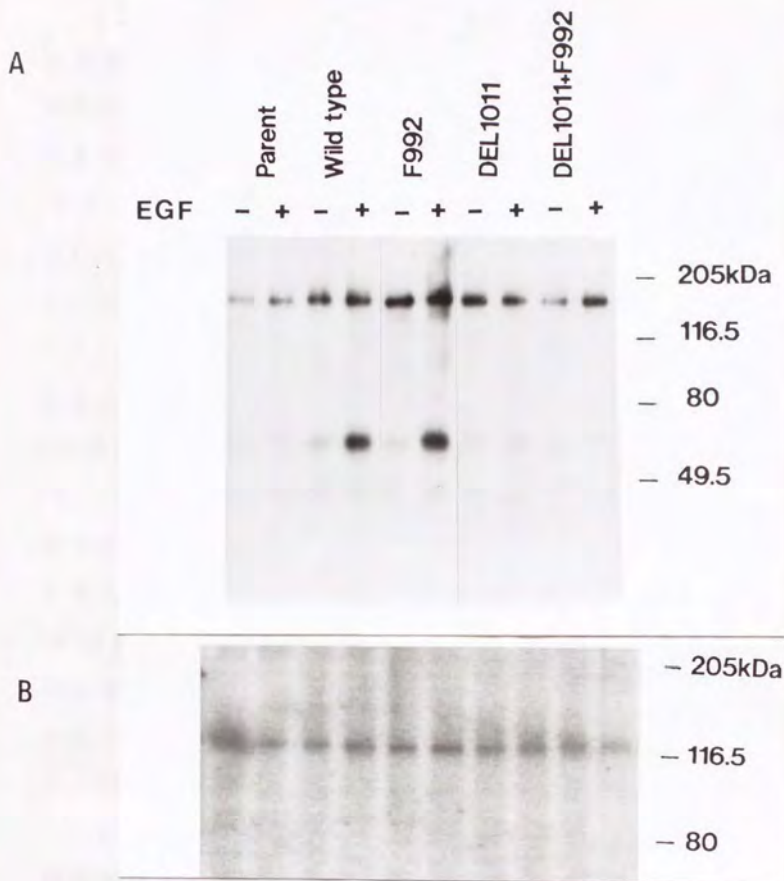


図2-9 GAP共沈蛋白質のチロシンリン酸化

細胞を飽和状態まで増殖させた後、0.5% NBCSへ血清濃度をおとした。18時間後、100ng/ml EGFにて37°C 5分処理後、また処理せずに、細胞を可溶化し、蛋白量を測定した。500 μ gの細胞可溶化物に、抗GAP抗血清を加え、免疫沈降し、Laemmli サンプルバッファーを加えて可溶化後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、PY-20を用いてウエスタンブロッティングを行った(A)。また細胞可溶化物25 μ gはそのままSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、抗GAP抗血清を用いてウエスタンブロッティングを行った(B)。

飢餓状態にし、静止させた状態でEGFにより37°C、5分刺激した後、可溶化し、一部はそのままSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、抗ras-GAP抗血清にてウエスタンブロットを行った(図2-9-B)。残りのサンプルは、蛋白量を一定に調製した後、抗GAP抗血清にて免疫沈降し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、抗ホスホチロシン抗体によりウエスタンブロットを行った(図2-9-A)細胞内ras-GAPの量は、どの細胞株でも等量であり、また刺激前後で変化はなかった。ところが、野生型とF992発現細胞では、EGF依存性に著明にリン酸化される62kDの蛋白質が検出された一方、DEL.1011とDEL.1011+F992発現細胞では、検出されなかった。この蛋白質は、EGF等の刺激により強くリン酸化されるp62であることが最も考えられた。

GAPと共沈されることが知られているもうひとつのチロシンリン酸化蛋白質p190は、もともと親株のNIH3T3細胞でも刺激前よりリン酸化されており、どの細胞でも刺激前後で変化は認められなかった。また、GAP自体のリン酸化も検出限界以下であった。

以上の実験結果より、カルボキシル領域を欠失させ、p62のリン酸化がほとんど起こらなくなった状態でも、DNA合成能は保持され、トランスフォーム能は弱いながらも認められているため、GAPと共沈してくるp62のチロシンリン酸化は、これらの生物学的活性を呈するに必須ではないことが明かになった。また、p190のチロシンリン酸化についても、生物学的活性の変化に相応する変化がみられなかった。

2-4 考案

EGF-Rのカルボキシル領域は、同定されているすべての自己リン酸化部位がクラスターをなして存在しており、この領域はEGF-Rを介するシグナル伝達に重要であると考えられてきた。

この領域の研究は、トリ赤芽球症のoncogene v-erbBが、カルボキシル領域を欠失させた形でトランスフォーム能をもっていたため、この領域の種々の変異体を用いて赤芽球系細胞や線維芽細胞に発現させて、そのトランスフォーム能をみたり、in vivoで感染させた時の組織特異的な腫瘍原性をみたことに端を発する(88, 89, 103-106)。このような研究により、カルボキシル領域は、EGF-Rの下流に位置するシグナルの組織特異性を決定する調節領域であろうと考えられた。その後、インスリン受容体等の受容体チロシンキナーゼの研究より得られた知識も統合されて、レセプターキナーゼの自己リン酸化がシグナル伝達において重要であることがわかってきた(23-26, 66)。しかし、EGF-Rについては、主要な自己リン酸化部位であるY1068, Y1148, Y1173を各々フェニルアラニンに置換させた変異体を用いて検討されたが、顕著な効果がみられなかった(24, 25, 66)。Y992は最近、少量のリン酸化を受けることが報告された(22)が、この意義についてまだはっきりしたことはわかっていない。

Helinらは、カルボキシル末端から1062アミノ酸残基まで欠失させるとトランスフォーム能が減少すると報告している(70)。それとは対照的に、Wellsらは、更に973アミノ酸残基まで欠失させるとトランスフォーム能は、野生型以上に上昇すると報告している(85)。

彼らは、973-1022アミノ酸残基までの部位をインターナリゼーションに必要なドメインとして提起し、これが失われるために上記現象がおけると説明している(68,86)が、その後Deckerらは、Wellsらの変異体は、彼らの条件では50%のインターナリゼーション活性を保持していると報告した(82)。一方、最近、Therouxらは、1046/7セリン残基(1046/7 S)のリン酸化がシグナル伝達を負に制御し、ここを他のアミノ酸に変化させると、erbBのトランスフォーム活性が上昇することを報告している(30,31,72,110)。

私は、EGF-Rのカルボキシル領域のシグナル伝達における意義を調べるため、上述のS1046/7をも欠失させた1011アミノ酸残基まで欠失させた変異体(DEL1011)を作成し、NIH3T3細胞へ導入し、その生物学的効果をみた。また、Y992の生物学的意義を調べるため、ここをフェニルアラニンに替え(F992)、また他の自己リン酸化部位の影響を排除するために1011アミノ酸残基までの欠失とF992を組み合わせた変異体(DEL1011+F992)を作成した。

その結果を表2-4にまとめた。

まず、DNA合成能についてその最大刺激レベルは、F992、DEL1011、DEL1011+F992とも野生型とほぼ同等であることがわかった。ED₅₀については、DEL1011とDEL1011+F992において、わずかではあるが、高くなっていた。これは、変異体において、EGFに対する親和性がやや低下しているためである可能性、あるいはその下流のシグナル伝達における影響等が考えられる。

一方、トランスフォーム能、細胞増殖能については、DEL1011は、野生型に比較し、明かに低下していた。すなわち、1011アミノ酸残基よりカルボキシル末端の配列は必ずしもEGF-Rのシグナル伝達において不可欠なものではないが、シグナル伝達を正に制御していると

Constructions of EGF-R mutants

Wild type	Cellular transformation	Colonies in soft agar	Cell growth in low serum	DNA synthesis	Autophosphorylation	Tyrosine phosphorylation of p62-GAP
	+++	++	+++	++	++	+
	+++	++	+++	++	++	+
	ND	ND	ND	ND	++	ND
	ND	ND	ND	ND	++	ND
	+/ -	+	+	++	+/ -	-
	++	+	++	++	+/ -	-

ND: not determined

考えられる。1046セリン残基のリン酸化による負の影響については、著明なものではなく、カルボキシル領域の正の制御機構を強く示唆する結果を得た。

そして驚いたことに、DEL1011+F992において、飽和濃度のEGF存在下でのトランスフォーム能、細胞増殖能に、ある程度の回復がみられた。EGF-Rの自己リン酸化されうるチロシン残基が負の効果を呈したのは、これが初めてであり、興味深い。しかし、992チロシン残基のみをフェニルアラニンに変えたF992の生物学的活性は野生型と同等であった。すなわち、他の自己リン酸化を含むドメインをすべて欠失させた場合にのみ992チロシン残基の効果を観察することができた。これは、Sorkinらが指摘したように(91)、リン酸化された992チロシン残基は、主要な自己リン酸化部位がすべてない状態でのみ、リン酸化の機能を代償するという仮説を支持する。Changらにより同様の欠失変異体で、992チロシン残基をフェニルアラニンに変えても、インターナリゼーションは同等であることが確認されている(86)ので、この違いにインターナリゼーションによる効果は寄与していないと考えられる。ひとつの可能性として考えられるのは、リン酸化された992チロシン残基には、負の効果をもつ基質エフェクター分子が近接しやすいのではないかということである。事実、チロシンキナーゼの逆反応を触媒するチロシンホスファターゼ活性をもつ分子PTP1Cは、SH2ドメインをもち、EGF-Rに結合しうる(49)ことが報告されており、負の効果をもつ基質エフェクター分子が実際に存在することが報告されている。

*in vivo*でのチロシンリン酸化蛋白質のパターンにおいて、2種の1011欠失変異体(DEL1011とDEL1011+F992)は、主要な自己リン酸化部位を少なくともひとつ残した変異体(DEL1167、DEL1123)及び

野生型と、若干の違いを呈し、リン酸化される基質が異なっている可能性が指摘できる。これが、生物学的活性の違いに結び付いているのかもしれない。

最近有力な基質エフェクター分子の候補として、SH2ドメインをもつ種々の蛋白質があげられている(34, 38, 39)。これらの分子は、リン酸化チロシンを認識し、活性化したチロシンキナーゼの自己リン酸化部位に結合するというモデルが考えられているが、いくつかの分子についてこの現象が実際に確かめられている(102)。EGF-Rに関しては、このようなエフェクター分子の有力候補と考えられているのは、PLC- γ (47, 87, 90)と ras-GAP (47, 72, 74)である。

PLC- γ は、カルボキシル領域に結合しうることが、*in vitro*での共沈実験で示されている(47, 81, 90)。Sorkinらは、主要な自己リン酸化部位をすべて欠失させた変異体ではEGF刺激による起こるPLC- γ のリン酸化が著明に低下することを報告している(91)。

ras-GAPは、活性型であるGTP結合型p21rasを不活性型であるGDP結合型へ転換する反応を触媒し、rasを介するシグナル伝達を減衰させると共に、rasのエフェクター分子そのものである可能性が示唆されている(97)。最近EGFやPDGF刺激を受けた細胞や、またv-fps、v-src、v-fms、v-ablによりトランスフォームした細胞中に、GAPと共沈されてくるチロシンリン酸化蛋白質p62、p190が存在することがわかったため、これが増殖シグナルやトランスフォーメーションにおいて、いかなる役割を果たしているのかが、興味深い問題点となっている(73, 93-96, 98-101)。特に、p62のチロシンリン酸化は、トランスフォーメーションと相関するということが指摘されていて、これらのチロシンリン酸化されたp62/p190-GAP複合体がRasに対する調節蛋白質、あるいは直接の標的である可能性が指摘されていた

(94-96, 98)。EGF-Rとの相互作用については、大腸菌を用いて作成したGAPのSH2ドメインが、*in vitro*でカルボキシル領域に結合しうることが報告されているにとどまり(47)、*in vivo*において本当にこの領域における相互作用が、EGF-Rを介するシグナル伝達に必要なのかまったくわかっていない。そこで私は、種々の変異体を用いて、これらras-GAP共沈蛋白質のリン酸化がEGF依存性におこっているのかどうかを調べた。まずGAP自体は、EGF刺激にてもほとんどリン酸化は起こらなかった。これは、Deckerらが、NIH3T3細胞に過剰発現したEGF-Rについて同様の実験を行った報告と一致する(82)。p190は、親株NIH3T3細胞で構成的にリン酸化されており、EGF刺激でも変化しなかった。一方、p62は、野生型とF992発現細胞では、EGF依存性に著明にリン酸化が起こった。更に興味深いことに、DEL1011及びDEL1011+F992発現細胞では、EGF刺激にても、GAPと共沈されるチロシンリン酸化蛋白質p62は、ほとんど検出されなかった。すなわち、GAP複合体構成成分と考えられるp62のチロシンリン酸化には、1011アミノ酸以下のカルボキシル領域が必須であることが明らかになり、992チロシン残基は関与しないことが明らかになった。

しかし、DEL1011あるいは、すべての自己リン酸化部位を排除したDEL1011+F992でも、EGF刺激により、DNA合成は誘導され、EGF依存性のトランスフォーム能や細胞増殖活性は、低下しているものの存在していることは前述のとおりを確認している。これらのことから、GAP複合体内部p62のチロシンリン酸化は、トランスフォーム能や細胞増殖能には必須ではないことが明らかになった。すなわち、EGF-Rを介するシグナル伝達において、チロシンリン酸化されたp62/p190-GAP複合体は、エフェクター分子として必須ではないということが強く示唆された。

まとめ

上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor; EGF-R) は、リガンドである上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) の結合により活性化する受容体型チロシンキナーゼである。

EGF-Rの報告されている自己リン酸化部位は、すべてカルボキシル領域にクラスターをなして存在しており (主要な部位は、Y1068、Y1148、Y1173の3箇所、少量のリン酸化が起こるとされる部位は、Y992、Y1086の2箇所である) EGF-Rチロシンキナーゼを介すシグナル伝達において、触媒活性や基質特異性を決定する重要な役割を果たすことを示唆する研究がこれまでになされてきたが、未だ十分な理解へはほど遠い状況にある。

私は、この自己リン酸化部位に着目したEGF-R変異体を作成し、NIH3T3細胞へ導入して、過剰発現させ、EGF依存性に生ずる細胞増殖とトランスフォーメーションの程度の変化を観察した。更に、それに伴う細胞内の生化学的反応を解析し、EGF-R内チロシン自己リン酸化のシグナル伝達における意義を検討した。

第1章では、触媒領域後半部分にあり、すべてのチロシンキナーゼに保存されているsrc 416チロシン (Y) 相同部位であるY845に着目し、これをフェニルアラニンに替え、チロシンリン酸化される可能性をまったく排した変異体を作成し、その効果をみた。その結果、他のチロシンキナーゼとは対照的に、Y845は、十分な生物学的活性、キナーゼ活性をもつためには必須ではないことが明かとなり、触媒領域の多様性が示された。

第2章では、キナーゼ間で最も多様性のあるカルボキシル領域に注目し、変異を加えて検討した。その結果、1011アミノ酸残基以下

のカルボキシル領域は、トランスフォーム能を正に制御すること、また992チロシン残基は、これを残して1011アミノ酸以下を欠失させるとトランスフォーム能を負に制御することが明かになった。

そして、カルボキシル領域は、EGF刺激にて起こるGAP複合体内p62蛋白質のチロシンリン酸化に必要であり、Y992は関与しないことが明かになった。GAP複合体内p62のチロシンリン酸化が生じないEGF-R変異体 (DEL.1011、 F992+DEL1011) においても、EGFにより細胞増殖、トランスフォーメーションが誘起されることから、これらの生物学的反応には、GAP複合体内p62のチロシンリン酸化は必須ではないことが強く示唆された。

謝 辞

本研究の機会を与えてくださいました東京大学教授 矢崎義雄博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めるうえでの直接の御指導を賜りました東京大学医科学研究所教授 渋谷正史博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究に際しまして種々御教示くださいました東京大学医科学研究所助手 東條有伸博士、東京大学助教授 福井泰久博士をはじめ東京大学医科学研究所細胞遺伝学研究部の皆様、並びに親しくさせていただいた方々に厚く感謝致します。

参考文献

1. Carpenter, G. Epidermal growth factor. Ann. Rev. Biochem. 48: 193-216, 1979.
2. Carpenter, G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914, 1987.
3. Harvey, J. J. Nature 204: 1104-1105,
4. DeFeo, D., Gonda, M. A., Young, H. A., Chang, E. H., Lowy, D. R., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3328-3332, 1981.
5. Carpenter, G. and Cohen, S. Epidermal growth factor. J. Biol. Chem. 265: 7709-7712, 1990.
6. Hunter, T. and Cooper, J. A. Protein tyrosine kinases. Ann. Rev. Biochem. 54: 897-930, 1985.
7. Hunter, T. A thousands and one protein kinases. Cell 50: 823-829, 1987.
8. Hunks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 241: 42-52, 1988.
9. Yarden, Y. and Ullrich, A. Growth factor receptor tyrosine kinases. Ann. Rev. Biochem. 57: 443-478.
10. Aaronson, S. A. Growth factor and cancer. Science 254: 1146-1153. 1991.
11. Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. and Todaro, G. J. Science 223: 1079-1082.
12. Stroobant, P., Rice, A. P., Gullich, W. J., Cheng, D. J., Kerr, I. M., et al. Cell 42: 383-393, 1985.
13. Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G. E., Abraham, J. A. and Klagsbrun, M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor.

- J. Biol. Chem. 267: 6205-6212. 1992.
14. Lax, I., Burgess, W.H., Bellot, F., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Givol, D. Localizatin of a major receptor-binding domain for EGF by affinity labeling. Mol. Cell. Biol. 8: 1831-1834, 1988.
 15. Greenfield, C., Hiles, I., Waterfield, M.D., Federwisch, M., Wollmer, A., Blundell, T.L., and McDonald, N. Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. EMBO J. 8: 4115-4123, 1989.
 16. Lax, I., Mitra, A.K., Ravera, C., Hurwitz, D.R., Rubinstein, M., Ullrich, A., Stroud, R.M., and Schlessinger, J. Epidermal growth factor (EGF) induces oligomerization of soluble, extracellular, ligand-binding domain of EGF receptor. J. Biol. Chem. 266: 13828-13833, 1991.
 17. Schlessinger, J. Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. TIBS 13: 443-447. 1988.
 18. Ullrich, A., and Schlesinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61: 203-212, 1990.
 19. Schlessinher, J. Allosteric regulation of the epidermal growth factor receptor kinase. J. Cell Biol. 103: 2067-2072, 1986.
 20. Downward, J., Parker, P., and Waterfield, M.D. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. Nature 311: 483-485.
 21. Margolis, B.L., Lax, I., Kris, R., Dombalagian, M., Honegger, A.M., Howk, R., Givol, D., Ullrich, A., and Schlessinger, J. All autophosphorylation ites of epidermal growth factor receptor and HER/neu are located in their carboxy-terminal tais. J. biol. Chem. 264: 10667-10671, 1989.
 22. Walton, G.M. Chen, W.S., Rosenfeld, M.G., and Gill, G.N. Analysis of deletions of the carboxy terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and

- enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates. J. Biol. Chem. 265: 1750-1754, 1990.
23. Bertics, P. J., and Gell, G. N. Self-phosphorylation enhances the protein-tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 260: 14642-14647, 1988.
24. Bertics, P. J., Chen, W. S., Hubler, L., Lazar, C. S., Rosenfeld, M. G., and Gill, G. N. Alteration of epidermal growth factor receptor activity by mutation of its primary carboxyl-terminal site of tyrosine self-phosphorylation. J. Biol. Chem. 263: 3610-3617, 1988.
25. Honegger, A., Dull, T. J., Szapary, D., Komoriya, A., Kris, R., Ullrich, A., and Schlessinger, J. Kinetic parameters of the protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites. EMBO J. 7: 3053-3060, 1988.
26. Lin, C. R., Chen, W. S., Lazar, C. S., Carpenter, C. D., Gill, G. N., Evans, R. M., and Rosenfeld, M. G. Protein kinase C phosphorylation at Thr654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms. Cell 44: 839-848, 1986.
27. Takishima, K., Griswold-Prenner, I., Ingebritsen, T., and Rosner, M. R. Epidermal growth factor (EGF) receptor T669 peptide kinase from 3T3-L1 cells is an EGF-stimulated "MAP" kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2520-2524, 1991.
28. Northwood, I. C., Gonzalez, F. A., Wartmann, M., Raden, D. L., and Davis, R. J. Isolatin and characterization of two growth factor-stimulated protein kinase that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at T669. J. Biol. Chem. 266: 15266-15276, 1991.
29. Countaway, J. L., McQuilkin, P., Girones, N., and Davis, R. J.

- Multisite phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 265: 3407-3416, 1990.
30. Countaway, J. L., Nairn, A. C., and Davis, R. J. Mechanism of desensitization of the EGF-R protein-tyrosine kinase. J. Biol. Chem. 267: 1129-1140, 1990.
31. Theroux, S. J., Latour, D. A., Stanley, K., Raden, D. L., and Davis, R. J. Signal transduction by the COOH-terminal domain serine phosphorylation site. J. Biol. Chem. 267: 16620-16626, 1992.
32. Heisermann, G. J., and Gill, G. N. Epidermal growth factor receptor threonine and serine residues phosphorylated in vivo. J. Biol. Chem. 263: 13152-13158, 1988.
33. Decker, S. J., Ellis, C., Pawson, T., and Velu, T. Effects of substitution of T654 of the EGF-receptor on EGF-mediated activation of phospholipase-C. J. Biol. Chem. 265: 7009-7015, 1990.
34. Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., and Pawson, T. SH2 and SH3 domains : Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. Science 252: 668-674, 1991.
35. Carpenter, J.-L., White, M. F., Orci, L., and Kahn, R. C. Direct visualization of the phosphorylated epidermal growth factor receptor during its internalization in A431 cells. J. Cell Biol. 105: 2751-2762, 1987.
36. Kuppuswamy, D., and Pike, L. J. Ligand-induced desensitization of 125 I-EGF internalization. J. Biol. Chem. 264: 3357-3362, 1989.
37. Beguinot, L., Lyall, R. M., Willingham, M. C. and Pastan, I. Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2384-2388, 1984.
38. Margolis, B. Proteins with SH2 domains : Transducers in the

- tyrosine kinase signaling pathway. Cell Growth & Differentiation 3: 73-80, 1992.
39. Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Dckworth, B., Graziani, A. Kapeller, R., and Soltoff, S. Oncogene and signal transduction. Cell 64: 281-302, 1991.
 40. Nishibe, S., Wahl, M.I., Wadegaertner, P.B., Kim, J.J., Shee, S.G. and Carpenter, G. Selectivity of phospholipase C phosphorylation by the epidermal growth factor receptor, the insulin receptor and their cytoplasmic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 424-428, 1990.
 41. Wahl, M.I., Daniel, T.O., and Carpenter, G. Antiphosphotyrosine recovery of phospholipase-C activity after EGF treatment of A431 cells. Science 241: 968-970,
 42. Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A., and Schlessinger, J. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanisms for EGF-receptor signaling. Cell 57: 1101-1107, 1989.
 43. Molloy, C.J., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Marshall, M.S., Gibbs, J.B., and Aaronson, S.A. PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. Nature 342: 711-714, 1989.
 44. Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E.Y., Lammers, R., Ullrich, A. and Schlessinger, J. Interaction of phosphatidyl inositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet derived growth factor receptors. Mol. Cell Biol. 12: 981-990, 1992.
 45. Rapp, V.P. Role of raf-1 serine/threonine proteine kinase in growth factor signal transduction. Oncogene 6: 495-500, 1991.
 46. Skolnik, E.Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fisher, R., Drepps, A., Ullrich, A., and Schlessinger, J. The tyrosine

- phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC- γ . Cell 65: 83-90, 1991.
47. Margolis, B., Koch, A., Li, N., Mohammadi, M., Hurwitz, D. R., Ziberstein, A., Ullrich, A., Pawson, T., and Schlessinger, J. EMBO J. 9: 4375-4380, 1990.
48. Anderson, D., Koch, A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M. F., and Pawson, T. Binding of SH2 domain of phospholipase C- γ_1 , GAP, and Src to activated growth factor receptors. Science 250 : 979-982, 1990.
49. Sheu, S. H., Bastein, L., Posner, B. I., and Chretien, P. A protein-tyrosine kinase phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. Nature 352: 736-739, 1991.
50. Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Margolis, W. Li., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. Cell 70: 431-442, 1992.
51. Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Pawson, T., and Pelicci, P. G. A novel transfforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. Cell 70: 93-104, 1992.
52. Fiore, P. P. D., Pierce, J. H., Fleming, T. P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C. R., Schlessinger, J., and Aaronson, S. A. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH3T3 cells. Cell 51: 1063-1070, 1987.
53. Velu, T. J., Beguinot, L., Vass, W. C., Willingham, M. C., Merlino, G. T., Pastan, I., and Lowy, D. R. Epidermal growth factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. Science 238: 1408-1410, 1987.
54. Riedel, H., Massoglia, S., Schlessinger, J., and Ullrich, A.

- Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptor transforms NIH3T3 mouse fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 1477-1481, 1988.
55. Piwnicka-Worms, H., Saunders, K.B., Roberts, T.M., Smith, A.E., and Cheng, S.H. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60^{src}. Cell 49: 65-73.
 56. Kmiecik, T.E., and Shalloway, D. Cell 49: 65-73.
 57. Weinmaster, G., Zoller, M.J., Smith, M., Hintze, E., and Pawson, T. Mutagenesis of fujinami sarcoma virus: Evidence that tyrosine phosphorylation of p130^{cas} modulates its biological activity. Cell 37: 559-568.
 58. Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D.O., Edery, M., Roth, R.A., and Rutter, W.J. Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163, compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. Cell 45: 721-732.
 59. Roussel, M.F., Shurtleff, S.A., Downing, J.R., and Sherr, C.J. A point mutation at tyrosine-809 in the human colony-stimulating factor 1 receptor impairs mitogenesis without abrogating tyrosine kinase activity, association with phosphatidylinositol 3-kinase, or induction of c-fos and junB genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6738-6742.
 60. Fantl, W.J., Escobedo, J.A., and Williams, L.T. Mutations of the platelet-derived growth factor receptor that cause a loss of ligand-induced conformational change, subtle changes in kinase activity, and impaired ability to stimulate DNA synthesis. Mol. Cell Biol. 9: 4473-4478, 1989.
 61. Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Rhee, S.G., and Williams, L.T. Platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent association of phospholipase C- γ with the PDGF receptor signaling complex. Mol. Cell Biol. 10: 2359-2366, 1990.

62. Geer, P., and Hunter, T. Tyrosine 706 and 807 phosphorylation sites mutants in the murine colony-stimulating factor1 bind or phosphorylate phosphatidylinositol-3 kinase but show differential defects in their ability to induce early response gene transcription. Mol. Cell Biol. 11: 1172-1174. 1991.
63. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77: 51-59, 1989.
64. Kawai, S., and Nishizawa, M. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. Mol. Cell. Biol. 4: 1172-1174, 1984.
65. Honegger, A. M., Dull, T. J., Felder, S., Obberghen, E. V., Bellot, F., Szapery, D., Schmidt, A., Ullrich, A., and Schlessinger, J. Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alter cellular routing. Cell 51: 199-209,
66. Honegger, A. M., Dull, T. J., Bellot, F., Obberghen, E. V., Szapery, D., Schmidt, A., Ullrich, A., and Schlessinger, J. Biological activities of EGF-receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites. EMBO J. 7: 3045-3052, 1988.
67. Glenny, Jr. J. R., Chen, W. S., Lazar, C. S., Walton, G. M., Zokas, L. M., Rosenfeld, M. G., and Gill, G. N. Ligand-induced endocytosis of the EGF receptor is blocked by mutational inactivation and by microinjection of anti-phosphotyrosine antibodies. Cell 52: 675-684,
68. Chen, W. S., Lazar, C. S., Lund, K. A., Weish, J. B., Chang, C. P., Walton, G. M., Der, C. J., Wiley, H. S., Gell, G. N., and Rosenfeld, M. G. Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. Cell 59: 33-43, 1989.

69. Velu, T. J., Vass, W. C., Lowy, D. R., and Beguinot. Functional heterogeneity of proto-oncogene tyrosine kinases : the C terminus of the human epidermal growth factor reeptor facilitates cell proliferation. Mol. Cell. Biol. 9: 1772-1778, 1989.
70. Helin, K., Velu, t., Martin, P., Vass, W. C., Allevato, G., Lowy, D. R., and Beguinot, L. The biological activity of the human epidermal growth factor receptor is positively regulated by its C-terminal tyrosines. Oncogene 6: 825-832, 1991.
71. Sorkin, A., Helin, K., Warers, C. M., Carpenter, G., and Beguinot, L. Multiple autophosphorylation sites of the epidermal growth factor receptor are essential for receptor kinase activity and internalization. J. Biol. Chem. 267: 8672-8678, 1992.
72. Ellis, C., Moran, M., McCormick, F., and Pawson, T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated protein by transforming and mitogenic tyrosine kinases. Nature 343: 377-381, 1990.
73. Bouton, A. H., Kanner, S. B., Vines, R. R., Wang, H. C. R., Gibbs, J. B., and Pawson, T. Transformation by pp60^{src} or stimulation of cells with EGF induces the stable association of tyrosine-phosphorylated cellular proteins with GTPase activating protein. Mol. Cell. Biol. 11: 945-953, 1991.
74. Moran, M. F., Koch, C. A., Anderson, D., Ellis, C., England, L., Martin, G. S., and Pawson, T. Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8622-8626, 1990.
75. McCormick, F. The world according to GAP. oncogene 5: 1281-1283, 1990.
76. McCormick, F. ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. Cell 56: 5-8, 1989.
77. Hall, A. ras and GAP-Who's controlling whom? Cell 61: 921-923,

1990.

78. Glenney, J.R., Zilas, S., and Kamps, M.P. Monoclonal antibodies to phosphotyrosine. Journal of Immunological Methods 109: 277-285,
79. Gill, G.N., Kawamoto, T., Cochet C., Le, A., Sato, J.D., Masui, H., MeLeod, C., and Mendelsohn, J. Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine pretein kinase activity. J. Biol. Chem. 259 : 7755-7760, 1984.
80. Massoglia, S., Gray, A., Dull, T.J., Munemitsu, S., Kung, H.-J., Schlessinger, J., and Ullrich, A. Epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain mutations trigger ligand-independent transformation. Mol. Cell. Biol. 10: 3048-3055, 1990.
81. Margolis, B., Honegger, A.M., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Zilberstein, A. Tyrosine kinase activity is essential for the association of phospholipase C- γ with EGF-R. Mol. Cell. Biol. 10: 435-441, 1990.
82. Decker, S.J., Alexander, C., and Habib, T. Epidermal growth factor (EGF)-stimulated tyrosine phosphorylation and EGF receptor degradation in cells expressing EGF receptor, truncated at residue 973. J. Biol. Chem. 267: 1104-1108, 1992.
83. Magni, M., Pandiella, A., Helin, K., Meldlesi, J., and Beguinot, L. Biochemical J. 277: 305-311, 1991.
84. Davis, R.J. Independent mechanism account for the regulation by protein kinase C of the EGF-R affinity and tyrosine-protein kinase activity. J. Biol. Chem. 263: 9462-9469, 1988.
85. Wells, A., Welsh, J.B., Lazar, C.S., Willy, H.S., Gill, G.N., and Rosenfeld, M.G. Science 247: 962-964, 1989.
86. Chang, C.-P., Kao, J.P.Y., Lazar, C.S., Walsh, B.J., Wells, A., Wiley, H.S., Gill, G.N., and Rosenfeld, M.G. Ligand-induced

- internalization and increased cell calcium are mediated via distinct structural elements in the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 266: 23467-23470, 1991.
87. Meisenhelder, J., Suh, P.-G., Rhee, S.G., and Hunter, T.
Phospholipase C- γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor pretein-tyrosine kianses in vivo and in vitro. Cell 57: 1109-1122, 1989.
 88. Shu, H.-K.G., Pelly, R.J., and Kung, H.-J. Tissue-specific transformation by EGF-R: A single point mutation within the ATP-binding pocket of the erbB product increases its intrinsic kinase activity and activates its sarcomagenic potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9103-9107.
 89. Khazie, K., Dull, T.J., Graf, T., Schlessinger, J., Ullrich, A., Beug, H., and Vennstrom, B. Truncation of the human EGF receptor leads to differential transforming potentials in primary avian fibroblasts and erythroblasts. EMBO J. 7: 3061-3071, 1988/
 90. Rotin, D., Margolis, B., Mohammadi, M., Daly, R.J., Daum, G., Li, N., Fischer, E.H., Burgess, W.H., Ullrich, A., and Schlessinger, J. SH2 domains prevent tyrosine dephosphorylation of the EGF receptor : identification of Y992 as the high-affinity binding site for SH2 domain of phospholipase C γ . EMBO J. 11: 559-567, 1992.
 91. Sorkin, A., Waters, C., Overholser, K.A., and Carpenter, G. Multiple autophosphorytion site mutations of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 266: 8355-8362, 1991.
 92. Kadowaki, T., Koyasu, S., Nishida, E., Tobe, K., Izumi, T., Takaku, F., Shai, H., Yahara, I., and Kasuga, M. Tyrosine phosphorylation of common and specific sets of cellular proteins rapidly induced by insulin, IGF-I and EGF in an intact cell.

- J. Biol. Chem. 262: 7342-7350, 1987.
93. Kazlauskas, A., Ellis, C., Pawson, T., and Cooper, J. A.
Binding of GAP to activated PDGF receptors. Science 247: 1578-1581, 1990.
 94. Koch, C. A., Moran, M., Sadowski, I., and Pawson, T. The common src homology region 2 domain of cytoplasmic signaling proteins is a positive effector of v-fps tyrosine kinase functions. Mol. Cell. Biol. 9: 4131-4140, 1989.
 95. Moran, M., Polakis, P., McCormick, F., Pawson, T., and Ellis, C.
Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21^{ras} GTPase-activating protein. Mol. Cell. Biol. 11 : 1804-1812, 1991
 96. Brott, B. K., Decker, S., O'Brien, M., and Jove, R. Molecular features of the viral and cellular src kinases involved in interactions with the GTPase-activating protein. Mol. Cell. Biol. 11: 5059-5067, 1991.
 97. Adari, H., Lowy, D. R., Willumsen, B. M., Der, C. J., and McCormick, F.
Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. Science 240: 518-523, 1988.
 98. Brott, B. K., Decker, S., Shafer, J., Gibbs, J. B., and Jone, R.
GTPase-activating protein interactions with the viral and cellular src kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 755-759, 1991.
 99. Reedijk, M., Liu, X., and Pawson, T. Interactions of phosphatidyl inositol kinase, GTPase-activating proteins (GAP), and GAP-associated proteins with the Colony-Stimulating Factor 1 receptor. Mol. Cell. Biol. 10: 5601-5608, 1990.
 100. Kaplan, D. R., Morrison, D. K., Wong, G., McCormick, F., and Williams, L. T. PDGF β -receptor stimulates tyrosine phosphorylation of GAP and association of GAP with a signaling

- complex Cell 61: 125-133, 1990.
101. Molloy, C. J., Bottaro, D. P., Fleming, T. P., Marshall, M. S., Gibbs, J. B., and Aaronson, S. A. PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating proteins. Nature 342: 711-714, 1989.
 102. Anderson, D., Koch, C. A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M. F., and Pawson, T. Binding of SH2 domains of phospholipase C γ_1 , GAP, and src to activated growth factor receptors. Science 250: 979-982, 1990.
 103. Raines, M. A., Maihle, N. J., Moscovici, C., Moscovici, M. G., and Kung, H.-J. Molecular characterization of three erbB transducing virus generated during avian leukosis virus-induced erythroleukemia: extensive internal deletion near the kinase domain activates the fibrosarcoma-and hemangioma inducing potentials of erbB. J. of Virology 62: 2444-2452, 1988.
 104. Pelly, R. J., Maihle, N. J., Boerkoel, C., Shu, H.-K., Carter, T. H., Moscovici, C., and Kung, H.-J. Disease tropism of c-erbB: Effects of carboxyl-terminal tyrosine and internal mutations on tissue-specific transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7164-7168, 1989.
 105. Wells, A., and Bishop, M. Genetic determinants of neoplastic transformation by the retroviral oncogene v-erbB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7597-7601, 1988.
 106. Gamett, D. C., Tracy, S. E., and Robinson, H. L. Differences in sequences encoding the carboxyl-terminal domain of the epidermal growth factor receptor, correlate with differences in the disease potential of viral erb B gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6053-6057, 1986.
 107. Yamazaki, F., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., and Shibuya, M. Amplification of the structurally

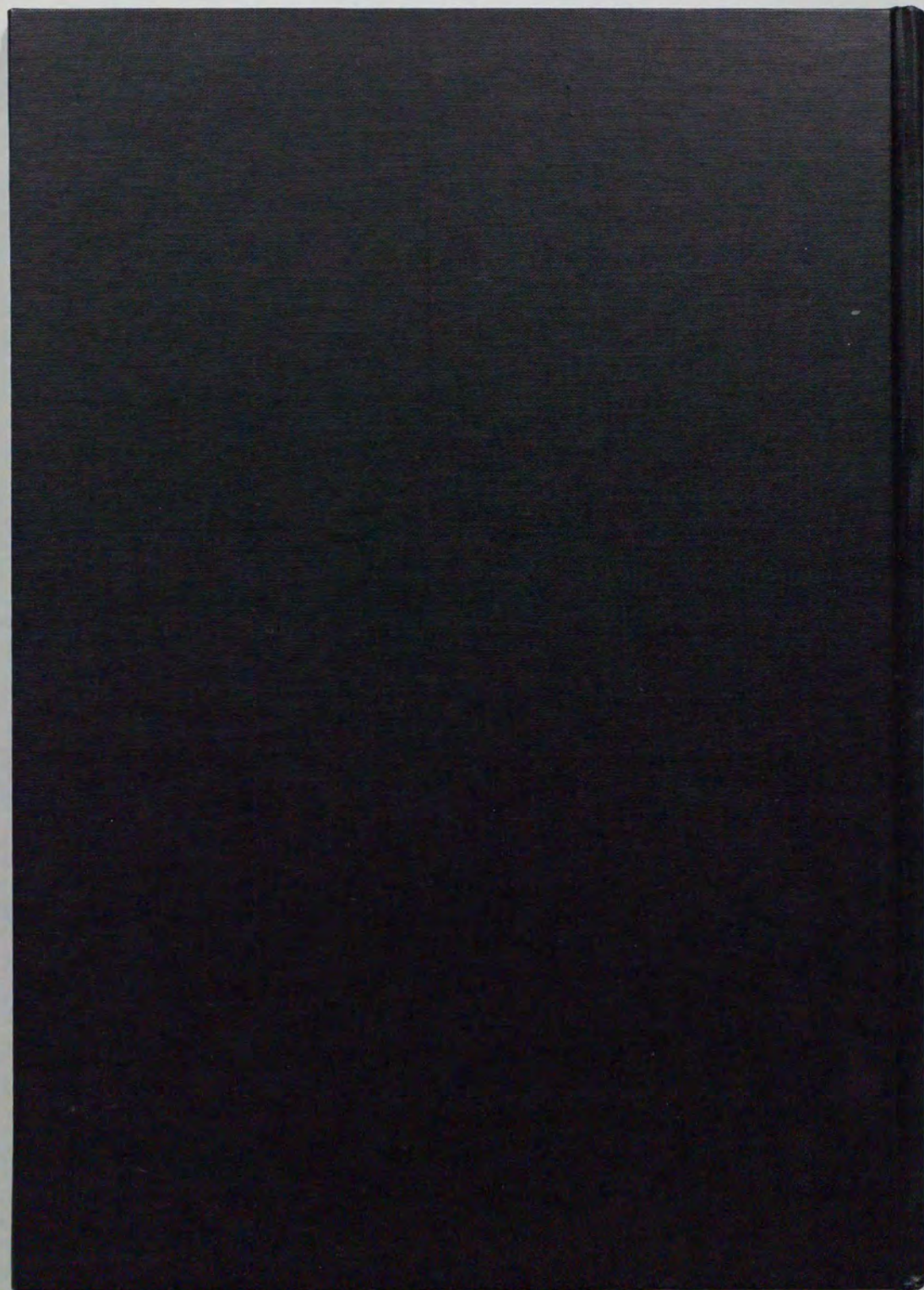
- and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (erbB) in human brain tumors. Mol. Cell. Biol. 8: 1816-1820, 1988.
108. Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A., and Schlessinger, J. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanism for EGF-R signaling. Cell 57: 1101-1107, 1989.
109. 高橋郁子、丸山和夫 PCRを利用した効率のよい遺伝子変異導入法
第14回 日本分子生物学会年会 抄録集 1991.

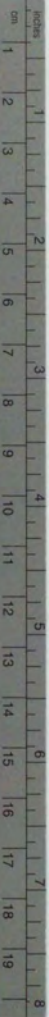
発表論文

Gotoh, N., Tojo, A., Hino, M., Yazaki, Y., and Shibuya, M.

A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor.

Biochem. Biophys. Res. Com. 186, 768-774, 1992.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
Patch 1	Patch 2	Patch 3	Patch 4	Patch 5	Patch 6	Patch 7	Patch 8	Patch 9

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

