3. *W* 遺伝子変異の細胞増殖・分化に与える影響

仁 科 行 雄¹⁾ 西 宗 義 武¹⁾ 北 村 幸 彦²⁾

大阪大学 微生物病研究所 動物実験¹⁾
同 医学部 病理²⁾

Effect of *W* mutant Gene for Cell Growth and Differentiation

Yukio NISHINA,¹⁾ Yoshitake NISHIMUNE¹⁾ and Yukihiro KITAMURA²⁾

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka¹⁾
Department of Pathology, Osaka University Medical School, Osaka²⁾

Summary

Many spontaneous, chemical-induced, and radiation induced dominant white spot (*W*) and steel (*Sl*) mutation have been identified in the mouse. *W* and *Sl* mutations have been similar phenotypic effects including deficiencies in pigment cells, germ cells, hematopoietic stem cells, and mast cells. Numerous studies have suggested that *W* acts within the affected cell while *Sl* instead exerts its effects in the extracellular environment. Recently findings demonstrating that *W* encodes the c-kit prot-oncogene, a tyrosine kinase membrane receptor, have suggested that *Sl* encodes a ligand for c-kit. We studied the expression of c-kit mRNA in various tissues and cell lines of mouse. And then, we have partially purified c-kit ligand from conditioned medium of BALB/3T3 fibroblasts. We investigated the effect for proliferation and differentiation to c-kit expressing cells, mast cell, Leydig cell by the partially purified ligand.

緒 言

W (dominant white spotting) 遺伝子座に突然変異をもつマウス (*W*マウス) は、野生型とのヘテロ個体では白斑を生じ、ホモ個体、あるいは二重ヘテロ変異体では白色黒目、強い貧血、不妊およびマスト細胞の欠損の4症状が見られる。一方、*Sl* (Steel) 遺伝子座の突然変異体 (*Sl* マウス) は、野生型のヘテロ個体では鋼色の体色を呈し、ホモ個体、二重ヘテロ変異体では、*W*突然変異と同様の4症状を呈する¹⁾。

これらの症状は、皮膚色素細胞、造血細胞、生殖細胞およびマスト細胞における増殖・分化が、*W*, *Sl* 遺伝子により障害された事によるものと考えられる。このように両者は見かけ上よく似た変異体であるが、*W* 遺伝子は第5染色体に、*Sl* 遺伝子は第10染色体に位置し、明らかに異なる遺伝子の変異である。また、造血系幹細胞の脾コロニー法²⁾ や、キメラマウスでの解析³⁾ などから、*W* 遺伝子変異においては増殖・分化する細胞それ自身に影響が現れ、*Sl* 遺伝子変異では増殖・分化する細胞自身ではなく、その増殖・分化を支える微小環境に現れていることが細胞レベルで証明され、これらの細胞の増殖・分化には *W*, *Sl* 遺伝子

産物が重要な役割を演じていることが示唆された。最近2, 3年の間にこの点は分子レベルでの解析がなされたので、今回マスト細胞および生殖細胞の増殖・分化における *W*, *Sl* 遺伝子の作用について、最近の知見を総括し、我々の得ている結果も含めて報告したい。

実験材料と方法

初代培養マスト細胞は、WB B6 F₁・+/+, *W*/*W*⁺ から得た骨髓細胞を PWM-SCM 10%, FBS 10% 含有 α -MEM で4週間培養することにより得た⁴⁾。マスト細胞株としては MC/9⁵⁾, IC-2⁶⁾ を使用し、同様の培地で培養した。線維芽細胞として、BALB/3T3-A 31/1-1 を用い、FBS 10% 含有イーグル MEM で培養した。Leydig 細胞株として B-1F⁷⁾ を使用し、イーグル MEM とハム12とを1:1に混合し、0.1% BSA を加えたものを培地とした。

各組織からの RNA の抽出は AGPC 法⁸⁾ で行い、常法に従ってノーザンブロット法により c-kit mRNA の発現を調べた。c-kit 蛋白の解析は、細胞を ³⁵S-メチオニンでラベルし、抗 c-kit モノクローナル抗体 ACK-2 を用い免疫沈降を行い、SDS/PAGE で展開

Table 1 Proto-oncogene c-kit characteristics in mast cells in *W^{*}/W^{*}* mutant mice

Genotype	RNA (level)	Protein (size)	Cell surface expression	Kinase activity	Mutation
<i>W⁴²</i>	++	++	++	—	kinase (D-N, pos. 790)
<i>W³⁷</i>	++	++ acc. turnover	+	—	kinase (E-K, pos. 582)
<i>W^V</i>	++	++	++	±	kinase (T-M, pos. 660)
<i>W⁴¹</i>	++	++	++	+	kinase (V-M, pos. 831)
<i>W</i>	+(1/4) (5.4 kb)	trunc. 124 kd process. def.	—	—	78 aa del. (incl. TMS)
<i>W^{19H}</i>	—	—	—	—	c-kit gene deleted
+/+	++	++	++	++	—

文献 16, 17) を改変

後、オートラジオグラフィを行った。³H-チミジンの取り込みは、任意の数の細胞に試料を加え培養後、³H-チミジンを与えさらに培養を行ったのち酸不溶性画分の放射活性を測定した。

結果・考察

従来より、移植実験、融合キメラ、共生培養⁹⁾の結果などから、*W*遺伝子座はレセプターの遺伝子をコードしているのではないかと考えられていた。また*W*遺伝子座は第5染色体上で、ホスホグルコミューテース-2遺伝子 (*Pgm-2*)、アルファフェトグロブリン遺伝子 (*Agf*)、アルブミン (*Alb*) の近傍であることが知られていた。一方ヒトの c-kit プロトオンコジーンは第4染色体上にマップされたが、その近傍にも *Pgm-2*, *Afg*, *Alb* 遺伝子が存在し¹⁰⁾、さらにヒトの第4染色体上のこの領域とマウス第5染色体上の *Pgm-2* などが存在する領域はよく保存されていることが知られていたので、*W*遺伝子座と c-kit プロトオンコジーンとの関係が注目された。Chabot ら¹¹⁾ と Geissler¹²⁾ らによって *W^{19H}* では c-kit 遺伝子そのものの欠失が、*W^{*}* と *W⁴⁴* では c-kit mRNA の構造異常が認められ、*W*遺伝子が c-kit であることが判明した。

プロトオンコジーン c-kit は、ネコ白血病ウイルス由来のオンコジーン v-kit の細胞内ホモログであり、RNA としては約 5.5 kbp、アミノ酸にして 976 A.A のタンパク質である。予想されるアミノ酸配列からして、c-kit は膜貫通部位をもち、細胞内にチロシンキナーゼ部位をもつレセプター型の蛋白質であることが推定された。さらに c-kit は PDGF や CSF-1 などの増殖因子のレセプターに類似した構造を示し、細胞外にはリガンドを認識する部位、細胞内にはチロシンキナーゼを有することから、何らかのシグナル伝達機

構に関与するものと思われる¹³⁻¹⁵⁾。Bernstein らと Besmer らのグループの解析により現在7種の*W*亜系が分子遺伝学的に解析された^{16,17)}。*W*では細胞膜貫通部が形成されず、c-kit 遺伝子がコードするレセプター分子の細胞外ドメインが発現しない。また、*W³⁷*, *W^V*, *W⁴²*, *W⁴¹* ではチロシンキナーゼドメインの点突然変異であり、アミノ酸置換のためにチロシンキナーゼ活性が種々の程度に低下している (Table 1)。以上のように*W*遺伝子変異では、c-kit プロトオンコジーンの欠損あるいは点突然変異により c-kit 分子を介しての情報伝達機構に障害がおり、貧血や色素沈着不全や不妊、マスト細胞欠損症が生ずると考えられた。

次に、*W*遺伝子産物 c-kit と相互作用すると考えられる *Sl* 遺伝子産物は、c-kit のリガンドそのものであると考えられた。というのも、レセプターに欠陥があっても、リガンドに欠陥があっても結果として現れる表現型は同じと考えられるからである。従来より、北村らは培養マスト細胞は、IL-3, IL-4 の非存在下でも正常マウス由来の線維芽細胞との共生培養では増殖が維持され、*Sl/Sl^d* マウス由来の線維芽細胞では維持されないことを報告してきた⁹⁾。培養マスト細胞では c-kit を発現しているので、正常線維芽細胞でそのリガンドを発現しているものと考えられた。Jarboe ら¹⁸⁾は BALB/3T3 線維芽細胞株が、+/+ マスト細胞を増殖させるが、*W/W^V* マスト細胞を増殖させないような因子を培養上清に分泌していることを示した。Huang ら¹⁹⁾は、そのマスト細胞増殖因子を精製し、その因子をコードしている遺伝子を同定し、その遺伝子が *Sl* 遺伝子座と一致することを示した。また、Zsebo らは²⁰⁾ BRL 細胞の上清より、マウス造血前駆細胞に軟寒天中でコロニーを作らせる因子を精製

Table 2 Purification of the ligand for c-kit from BALB/3T3 conditioned medium

Purification step	Total vol. (ml)	Total protein (μ g)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/ μ g)	Purification (fold)	Yield (%)
CM (61) 12 x						
Concentrated	488	42,674	1,463	3.4×10^{-2}	1.0	100
Q-Sepharose	411	7,809	1,233	1.6×10^{-1}	4.6	84
Hydroxylapatite	100	6,000	500	8.3×10^{-2}	2.4	34
(NH ₄) ₂ SO ₄ sup.	136	224	408	1.82	53.5	28
Phenyl-5PW	21	35	320	9.14	268.9	22

Fig.1. Method of purification for conditioned medium.

し、*Sl* 遺伝子座がその因子をコードしていることを示した。c-kit のリガンドである *Sl* 遺伝子は、分子量 30~35 kd, アミノ酸で約 270 残基でありシグナル配列をもつ分泌型の糖タンパク質で、細胞膜貫通部位を持っており、通常は細胞膜に結合したまま作用する増殖因子であると考えられる。このように、*W*, *Sl* 遺伝子産物は、マスト細胞をはじめ生殖細胞、造血細胞、色素細胞の幹細胞の増殖・分化において支持細胞との相互作用を行う、リセプター⇄リガンドの役割を果たすと思われる。今後、これらの細胞において c-kit より核への情報伝達がどのようになされ、反応していくかが問題であろう。

そこで、まずマスト細胞において、リセプター⇄リガンドの相互作用について調べてみた。BALB/3T3 を無血清培地で培養し、2~3 週間の培養上清を集めて精製の材料とした。約 61 の培養上清を限外ろ過フィルターで約 12 倍に濃縮し、分子量 1 万以上の画分を得た。この液を基準として以下の過程における収率を求めた。活性の指標としては、初代マスト細胞の増殖促進活性を測定し、カラムによる精製を行った (Fig.1)。また、総蛋白質量に対する増殖促進活性を求め純度と

した (Table 2)。濃縮液を Q-Sepharose によるイオン交換クロマトグラフィーを行い 4.6 倍精製し、次に Hydroxylapatite による吸着クロマトグラフィーを行い、この溶出画分に硫酸を 50% 飽和になるように加え、遠心により上清を回収した。この段階で純度は 53.5 倍であった。更に phenyl-5PW による疎水性クロマトグラフィーを行い最終精製液とした。最終精製品の一部を用い、ゲルろ過によりリガンドの分子量を推定したところ約 40 kd で、Nocka ら²¹⁾の報告する同様の活性をもつ分子量 28-35 kd の糖蛋白質とほぼ同一であると思われる。

次に、今回精製した c-kit リガンドを用いて、マスト細胞株 MC/9 及び IC-2 について増殖促進活性を調べてみた (Fig.2)。MC/9 では図のように有意な ³H-チミジンの取り込みがあり増殖促進活性がみられるのに対し、IC-2 では有意な効果はみられなかった。そこで、これらの細胞における c-kit 蛋白の発現について調べてみた。マスト細胞株 MC/9、IC-2 及び骨髓由来の初代マスト細胞 (P cell) をそれぞれ ³⁵S-メチオニンでラベルし、c-kit に対するモノクローナル抗体 ACK-2 を用いて免疫沈降を行った (Fig.3)。リガンドに対し増殖促進活性のみられた MC/9 では 160 kd (カルボキシル型)、130 kd (高マンノース型) 及びグリコシレーションされていない 106 kd の c-kit 蛋白の発現が認められた²²⁾。一方、反応のみられなかった IC-2 ではやはり c-kit 蛋白の発現は認められなかった。またリガンドに対して反応を示す骨髓由来の初代マスト細胞でも、同様の c-kit 蛋白の発現がみられた。今後、この系を用いてチロシンキナーゼ活性を有する c-kit の細胞増殖シグナルの伝達機構について、リン酸化を含めての解析が必要であろう。

次に、正常成体マウスにおける c-kit の役割を知るために、c-kit の各組織における発現を調べてみた。各組織より RNA を抽出し、c-kit プロブによりノ

Fig.2. Stimulation of ^3H -Thymidine incorporation by partially purified conditioned medium.

Fig.3. Analysis of the c-kit protein products in mast cell lines.

ーザンプロットを行ったところ、肺、小脳、および卵巣で強く発現がみられ、精巣においても発現がみとめられた (Fig.4)。肺でのシグナルは、肺組織に多数存在するマスト細胞によるものと思われる。そこで、脳における c-kit の発現をさらに詳しく調べてみた。まず脳を、嗅脳、大脳、小脳、延髄、視床下部、脊髄に細分し、ノーザンプロットを行った。(Fig.5) のようにやはり小脳において強い発現がみられた。なお、*in situ* hybridization においても、小脳の神経細胞にシグナルが認められた (未発表)。従来、*W*、*SI* 突然

Fig.4. Expression of c-kit RNA transcripts in normal mouse tissues.

Fig.5. Expression of c-kit RNA transcripts in mouse brain.

変異マウスにおいて神経系に対する症状は報告されておらず、その機能は不明である。ただ *ligand* も脳での発現が報告されており²³⁾、その意味も含め c-kit の小脳における機能の解明は今後の課題であると思われる。

また成熟精巣でも c-kit の発現がみられたので、精子形成過程への関与について調べてみた。*in situ* hybridization を行ってみたところ、成熟精巣では *Leydig* 細胞に c-kit RNA の発現がみとめられた (未発表)。そこで、まず *Leydig tumor* 由来の細胞株 B-1F を用いて c-kit 蛋白の発現を ACK-2 抗体によ

Fig.6. Analysis of c-kit protein products in mast cell line and Leydig cell line.

る免疫沈降法で調べてみた。(Fig.6)のように、Leydig細胞株 B-1F では MC/9 と同様に 160 K, 130 K の c-kit 蛋白の発現がみとめられた。この B-1F にリガンドの最終精製液を与えてチミジンの取り込み量を調べたが、増殖促進活性は見られなかった。成熟精巣の精細管内には、さまざまな精子形成過程の精細胞が存在し、そのまわりをセルトリ細胞が支持している。精細管のまわりには間質繊維芽細胞があり、Leydig細胞は精細管と精細管の間隙に存在している。従来、Leydig細胞は LH ホルモンの刺激によりテストステロンを分泌し、セルトリ細胞や間質繊維芽細胞に作用する。セルトリ細胞は何らかの成長因子を分泌し、精細胞の増殖・分化を促進させると考えられている。成熟個体では Leydig細胞の増殖は停止しており、c-kit は Leydig細胞の増殖には直接関与しないと考えられる。また、W, Sl マウスではテストステロンの血中濃度に異常が見られないことから、Leydig細胞のホルモン産生能にも大きな影響は持たないものと考えられる。今回、Leydig細胞において c-kit 蛋白の発現が認められたので、今後 c-kit とリガンドが、精子形成過程における Leydig細胞の機能にどのような役割を果たしているのか検討を加えてゆく必要がある。

文 献

- 1) Silvers, W.K. : *In the Coat Colors of Mice : A Model for Gene Action and Interaction*, Springer-Verlag, New York, pp.206-241 (1979)
- 2) Russell, E.S. : *Adv. Genet.*, **20**, 357 (1979)
- 3) Nakayama, H., Kuroda, H., Fujita, J. *et al.* : *Development*, **102**, 107 (1988)
- 4) Nakahata, T., Spicer, S.S., Cantey, J.R. and Ogawa, M. : *Blood*, **60**, 352 (1982)
- 5) Nabel, G., Galli, S.J., Dvorak, H.F. and Cantor, H. : *Nature*, **291**, 332 (1981)
- 6) Koyasu, S., Nakauchi, H., Kitamura, K., Yonehara, S., Okumura, K., Tada, T. and Yahara, I. : *J. Immunol.*, **134**, 3130 (1985)
- 7) Nishizawa, Y., Nichii, K., Nishizawa, Y., Koga, M., Kishimoto, S., Matsumoto, K. and Sato, B. : *Cancer Res.*, **50**, 3866 (1990)
- 8) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : *Anal. Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 9) Kitamura, Y. : *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 59 (1989)
- 10) Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T. *et al.* : *EMBO J.*, **6**, 3341 (1987)
- 11) Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. and Bernstein, A. : *Nature*, **335**, 88 (1988)
- 12) Geissler, E.N., Ryan, M.A. and Housman, D.E. : *Cell*, **55**, 185 (1988)
- 13) Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., Qui, F., Bergold, P.J., Lederman, L., Snyder, Jr., H.W. and Brodeur, D. : *Nature*, **320**, 415 (1986)
- 14) Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U. and Ullrich, A. : *EMBO J.*, **6**, 3341 (1987)
- 15) Yarden, Y. and Ullrich, A. : *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 443 (1988)
- 16) Reith, A.D., Rottapel, R., Giddens, E., Bradry, C., Forrester, L. and Bernstein, A. : *Gene Dev.*, **4**, 390 (1990)
- 17) Nocka, K., Tan, J.C., Chiu, E., Chu, T.Y., Ray, P., Traktman, P. and Besmer, P. : *EMBO J.*, **9**, 1850 (1990)
- 18) Jarboe, D.L., Marshall, J.S., Randolph, T.R., Kukolja, A. and Huff, T.F. : *J. Immunol.*, **142**, 2405 (1989)
- 19) Huang, E., Nocka, K., Beier, D.R. *et al.* : *Cell*, **63**, 225 (1990)
- 20) Zsebo, K.M., Wypych, J., Mcniece, I.K. *et al.* : *Cell*, **63**, 213 (1990)
- 21) Nocka, K., Buck, J., Levi, E. and Besmer, P. : *EMBO J.*, **9**, 3287 (1990)
- 22) Nocka, K., Majumder, S., Chabot, B., Ray, P., Cervone, M., Bernstein, A. and Besmer, P. : *Gene Dev.*, **3**, 816 (1989)
- 23) Matsui, Y., Zsebo, K.M. and Hogan, B.L.M. : *Nature*, **347**, 667 (1990)