

論文の内容の要旨

癌遺伝子 ALK (anaplastic lymphoma kinase) と 相互作用する分子の同定と機能解析

指導教官 山本 雅

東京大学大学院医学系研究科

平成9年入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

近森 穰

研究背景

非ホジキン型リンパ腫の1つである未分化大細胞型リンパ腫(Anaplastic large cell lymphoma: ALCL)では、約64%の割合で染色体転座 t(2;5)が観察される。本リンパ腫において、恒常的にキナーゼ活性をもつ約80 kDaのタンパク質 p80が見い出された。後の解析で、p80はリンパ腫 ALCLの発症の主因となることが示された。p80は、核内分子 nucleophosmin (NPM)のN末端部分と新規チロシンキナーゼの細胞内領域のアミノ酸配列から構成された融合蛋白質であり、679アミノ酸からなる。この新規のチロシンキナーゼは ALK (anaplastic lymphoma kinase)と名付けられ、また p80は NPM-ALKと命名された。NPMのオリゴマードメインによって NPM-ALKが二量体化し、その結果としておこるキナーゼ活性の抗進が細胞癌化を促す。正常細胞における ALKの機能を解析するため、ALK遺伝子の全長 cDNA クローニングや in situ hybridizationが行なわれた。その結果、ヒト ALKは1619アミノ酸からなる受容体型チロシンキナーゼで、脳や脊髄で発現することが明らかにされた。これにより、他の受容体型チロシンキナーゼ TrkA や RETと同様、ALKも神経細胞の分化、増殖、生存などの現象に関与していることが予想された。また癌化反応における NPM-ALKの機能解析から、NPM-ALKに結合する分子として IRS-1 と Shcが同定された。IRS-1や

Shc が細胞増殖シグナル伝達に関与することから、IRS-1 や Shc の結合部位の欠失は NPM-ALK のトランスフォーム活性を阻害することが予想された。しかしながら、この欠失がトランスフォーム活性を阻害しないことから、NPM-ALK の活性化に伴う細胞増殖シグナル伝達には IRS-1 や Shc 以外の未同定の分子が関与することが示唆された。

研究内容

IRS-1 や Shc の結合部位の欠失でも NPM-ALK のトランスフォーム活性を阻害しないことから、NPM-ALK に相互作用する分子が IRS-1 や Shc 以外に存在している可能性が高い。そこで、本研究では NPM-ALK のトランスフォーム活性における未知のシグナル伝達分子の同定を目標にし、酵母 Two-hybrid 法を用いて ALK と相互作用する分子を探索した。マウス ALK が出生直後の脳内で発現するという知見に基づき、ヒト胎児脳由来の 1.8×10^7 個の cDNA クローンからなるライブラリーをスクリーニングし、6 個の陽性クローンを得た。DNA シーケンス解析により、6 個のうち 2 個の陽性クローンが SNT2 をコードする遺伝子に由来することを示した。SNT2 の発現や機能解析を進め、以下の(1)から(4)に記す結果を得た。

(1) Northern Blot 法によるマウス各組織での発現解析から、約 2.2 kb の SNT2 mRNA が脳、脊髄、精巣で高発現し、腎臓でもわずかながら発現していることがわかった。ALK mRNA は脳や脊髄といった中枢神経系の組織で発現しており、ALK と SNT2 が脳組織で共存し相互作用しうると考えられた。

(2) NPM-ALK と SNT2 を 293T 細胞に発現させて細胞内での結合を免疫沈降法で調べ、NPM-ALK と SNT2 が結合していることを示した。またキナーゼ活性をもたない NPM-ALK 変異体 (NPM-ALK KN) も SNT2 と弱く結合することが示された。これまで、SNT のファミリー分子である SNT1 が TrkA のリン酸化チロシンを含む NPXpY モチーフ内に結合すると共に、その一方で FGF 受容体のリン酸化チロシン残基を含まない特定のアミノ酸配列に結合することが報告されている。NPM-ALK のキナーゼ活性の影響により NPM-ALK と SNT2 の結合が著しく促進されることから、SNT2 がキナーゼ活性に依存した結合様式とキナーゼ活性に依存しない結合様式をとることが推測された。

(3) まず、NPM-ALK のキナーゼ活性に非依存的な SNT2 の結合領域を同定するため、NPM-ALK KN 変異体をもとにして、その C 末端のアミノ酸配列を様々な欠損した変異体を作成した。これらの欠損変異体と SNT2 の結合を調べた結果、640 から 649 番目内のアミノ酸残基が NPM-ALK のキナーゼ活性に非依存的な SNT2 の結合領域であることを示した。次に NPM-ALK のキナーゼ活性に依存的な SNT2 の結合領域の検討を行った。NPM-ALK の Tyr156 と Tyr567 はと

もに NPXY モチーフを構成し、IRS-1 や Shc の PTB ドメインに認識される。SNT2 が PTB ドメインを含むことから、SNT2 が Tyr156 と Tyr567 に結合すると予想された。そこで、Tyr156 と Tyr567 を Phe に変異した NPM-ALK Y156/567F (2F) 変異体と SNT2 の結合について調べた。その結果、Tyr156 と Tyr567 から Phe への変異は SNT2 の結合に顕著な影響を与えなかった。同様に、キナーゼ活性に非依存的な結合領域を含む C 末端 50 アミノ酸配列の欠損も、NPM-ALK と SNT2 の結合に影響を与えなかった。しかしながら、Tyr156 と Tyr567 を Phe に変異し、かつ 631 から 679 番目のアミノ酸配列を欠損した NPM-ALK 2F Δ631-679 変異体は SNT2 と結合しないことが示された。その上、酵母 Two-hybrid 法から NPM-ALK が Tyr156 と Tyr567 で SNT2 と相互作用しないことが示された。この結果により、キナーゼ活性に依存した SNT2 の結合部位は 631 から 679 番目内のアミノ酸配列中に存在していることが示唆された。SNT2 が 631 から 679 番目内のどのアミノ酸残基と結合するのか NPM-ALK 2F に種々の欠損を導入した変異体を用いて調べた。その結果、631 から 639 番目内のアミノ酸残基がキナーゼ活性の依存した SNT2 の結合に重要であると示された。しかも、キナーゼ活性に依存して SNT2 と結合しているにも関わらず、このアミノ酸配列内にはチロシン残基が含まれていないことが特徴的であった。

(4)上記の知見から、キナーゼ活性に依存的な結合領域である 631 から 639 番目内のアミノ酸配列と SNT2 の結合が細胞の癌化に重要であることが予想された。そこで、631 から 639 番目内のアミノ酸配列を欠損し、かつ Tyr156 と Tyr567 を Phe に変異した NPM-ALK 2F Δ631-639 変異体をコードする発現ベクターを NIH3T3 細胞に導入しフォーカスアッセイを行った。IRS-1 や Shc の結合部位である Tyr156 と Tyr567 を Phe に変異した NPM-ALK 2F 変異体のトランスフォーム活性は野生型と比較して約 50%程度であるが、NPM-ALK 2F Δ631-639 変異体では野生型の約 10%程度まで減少した。したがって、SNT2 と NPM-ALK の 631 から 639 番目のアミノ酸配列への結合がトランスフォーム活性に重要であることが示唆された。これまで PLCγの結合が NPM-ALK のトランスフォーム活性に重要であると報告されているが、本研究の結果は SNT2 の結合部位が NPM-ALK のトランスフォーム活性に重要であることを示している。

考察

本研究では、NPM-ALK のトランスフォーム活性における未知のシグナル伝達分子の同定を目標にし、酵母 Two-hybrid 法を用いて ALK と相互作用する分子として SNT2 を同定した。そして、NPM-ALK の Tyr156 と Tyr567 の他に 631 から 639 番目内のアミノ酸残基がキナーゼ活性に依存した SNT2 との結合に重要であること、また 640 から 649 番目内のアミノ酸残基がキナーゼ活性に

関係なく弱いながらも SNT2 と結合することを見い出した。特に、631 から 639 番目のアミノ酸配列がチロシン残基を含まないことから、SNT2 が新しい様式で NPM-ALK と結合すると示唆される。さらに、キナーゼ活性に依存的な SNT2 の結合部位を欠失した NPM-ALK 変異体のトランスフォーム活性が野生型と比較して約 10%程度しかみられなかった。これまで、PLC γ の結合部位である Tyr664 を Phe に変異した NPM-ALK 変異体がトランスフォーム活性をもたないことが報告されている。しかしながら私は PLC γ の結合部位を含む 631 から 679 番目のアミノ酸配列を欠損した NPM-ALK Δ 631-679 変異体が高いトランスフォーム活性をもつことを確認した。これらの結果は、PLC γ の結合部位よりも、むしろ SNT2 の結合部位が NPM-ALK のトランスフォーム活性に重要であることを示している。以上より、NPM-ALK のトランスフォーム活性における SNT2 の重要性が指摘された。