

財団法人日中医学協会  
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

平成18年 3月 10日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 丁 建民 

指導責任者名： 小松 弘和 職名： 助手

所属機関名： 名古屋市立大学臨床分子内科  
〒467-8601

所在地： 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1

電話： (052)851-5511 内線： 8216

1. 助成金額： 500,000 円

2. 研究テーマ

家族血小板増多症の発症原因である血小板増加因子ター c-Mpl 遺伝子変異の自律性活化機序の解明

3. 成果の概要 (100字程度)

家族性血小板増多症の原因遺伝子変異として同定したc-mpl遺伝子の膜貫通領域のAsn505の機能を解析した。その結果、変異基であるアスパラギンの持つ強い極性により誘導される水素結合により、リガンドなしでも二量体形成を獲得することで、血小板増多の細胞内シグナルが活性化されることを証明し得た。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・  (有) (学会名・演題)

第67回日本血液学会 WS-17-2 「Asn505変異を有するc-mplはTPO非依存性にホモダイマーを形成する」 2005年9月17日～19日

(2) 発表した論文 無 ・  (有) (雑誌名・題名)

Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. Blood. 2004 Jun 1;103(11):4198-200.

## 家族血小板増多症の発症原因である血小板増加因子レセプター c-mpl 遺伝子変異の自律性活性化機序の解明

研究者氏名 丁 建民  
日本研究機関 名古屋市立大学医学研究科  
臨床分子内科学  
指導責任者 助手 小松 弘和

### 要旨

我が国でも数家系しか報告のない貴重な家族性血小板血症を見出し、その病因を分子生物学的に明らかにすべく、血小板産生に関わる既知の分子の変異の有無をスクリーニングした結果、血小板増多因子トロンボポエチン (TPO) のレセプターである c-mpl 遺伝子内膜貫通ドメインにアミノ酸置換を伴う Ser505Asn 変異を見出した。本活性化変異候補 Asn505 が機能的に直接に FET 患者の血小板増多を惹起しているかどうかを明らかにするために、本変異アレルを含む c-mpl cDNA を BAF/3 細胞へ発現導入し、本来もつ BAF/3 細胞のサイトカイン (IL3) 依存性増殖が非依存性となること、細胞内シグナルである ERK1/2 と STAT5 がサイトカイン (IL3) 非依存性に磷酸化されていることを見出し、本変異 Asn505 は細胞内シグナル活性化をひきおこし細胞の自律性増殖を惹起していることを示し、本 FET 発症の責任遺伝子異常である事を証明した。

次に Asn505 変異の機能解明として、c-mpl レセプターの自律性の多量体 (二量体) 形成能の実験を進め、cross linking 法を用いて検討した結果、変異体では ligand 非存在下でも多量体 (二量体) 形成し、細胞増殖、そして細胞内シグナル活性化を誘導していることを明らかにした。また、変異部位を様々な塩基に置換した変異体を作成し、二量体形成能、細胞内シグナル活性化のついて検討したところ、Asn を含めて極性の強いアミノ酸残基を有する変異体において二量体形成とシグナル活性化が確認できた。以上より、Asn505 は、アミノ酸残基として有するその強い極性に伴う水素結合力により二量体を形成し、細胞内シグナルを活性化し、巨核球増生、そして血小板増多症を成立させていることを示すことができた。

Key Words : Essential thrombocythemia, c-mpl, mutation, homodimerization, polarity

### 緒言

本態性血小板血症 (Essential thrombocythemia; ET) は一般に孤発例を指し、家族内発症例は家族性血小板血症 (Familial ET, FET) として呼ばれている。FET は世界的にみても極めてまれな疾患であるが、臨床所見、合併症を含めた予後は ET と共通している点が多く、その原因遺伝子を始めとする分子生物学的解明は ET の解明に大きく寄与する可能性が高い。本研究では、当大学病院で発見した FET の病因である c-mpl 遺伝子の Asn505 変異に関してその機能について分子生物学的に解明し、ET、さらには骨髓増殖症候群の解明に寄与することを目的とする。

### 対象と方法

説明と同意のもと、当大学病院で経験した FET 患者の末梢血リンパ球を用いて遺伝子 DNA 変異解析を行った。見出した遺伝子変異の機能解析として変異体発現 BAF/3 細胞を作製し、細胞増殖への影響を MTT アッセイにて解析、さらに細胞内シグナル活性化の有無を ERK1/2 と STAT5 分子のリン酸化誘導能をウエスタン法によって評価した。また、その二量体形成能をクロスリンキング法により評価した。さらに、変異部位を様々な塩基に置換し、二量体形成、細胞増殖能、シグナル活性化の評価を行った。

## 結果及び考察

血小板産生に関わる分子の変異解析の結果、血小板産生因子トロンボポエチンの受容体であるc-mpl遺伝子の膜貫通領域に血小板増多患者8例全例に特異的な変異(Ser<sup>505</sup>→Asn<sup>505</sup>)を見出した。本変異Asn<sup>505</sup>では強制発現させることでBAF/3細胞株が、サイトカイン(IL3)非依存性に増殖できることを確認できた。さらに、c-mplの細胞内シグナル経路が自律性に活性化しているかどうかを明らかにするためその主要経路であるERK1/2とSTAT5の磷酸化を調べたところ、ERK1/2とSTAT5ともにサイトカイン(IL3)非依存性に磷酸化されていることを見出した。同時に、患者血小板自体も血小板増多因子(トロンボポエチン)の刺激なしでERK1/2、STAT5はリン酸化されていることを確認した。これらの結果より、本c-mpl変異Asn<sup>505</sup>は細胞内シグナル活性化と細胞の自律性増殖を惹起し、本FET発症の責任遺伝子異常である事を初めて証明した。

また、c-mpl変異(Asn505)の細胞増殖シグナルの活性化機構として、サイトカイン(IL3)非依存性にc-mpl分子の二量体が形成され、細胞内シグナルが活性化されることが示された。さらに、この二量体形成は細胞外ドメインの欠失体においても誘導され、細胞外ドメインのジスルフィド結合の関与を否定し得た(Figure 1)。

次に、Asn505の変異部位に様々な塩基置換体を作成し、二量体形成能、細胞内シグナル活性、細胞増殖能を調べた。その結果、Asnの他、Asp, Gln, Glu等の強い極性を持つアミノ酸置換体のみに二量体形成、細胞内シグナル活性、細胞生存能の亢進が確認できた。極性の強いアミノ酸残基は強い水素結合能を有しており、その水素結合能により変異部位間に結合力がもたらされc-mpl分子の二量体が形成されることで細胞内シグナルの活性化、そして細胞増殖へとつながり、本FETの発症につながる機構が明らかにされた(Figure 2)。

このようにFET発症ヒトモデルの構築とその分子生物学的機構が解明できたことで、細胞増殖因子に関わる受容体の病的変異がもたらす機能的特徴の解明、さらには、ET含めた骨髄増殖症候群の分子解明に寄与したものと考えられる。

Fig. 1

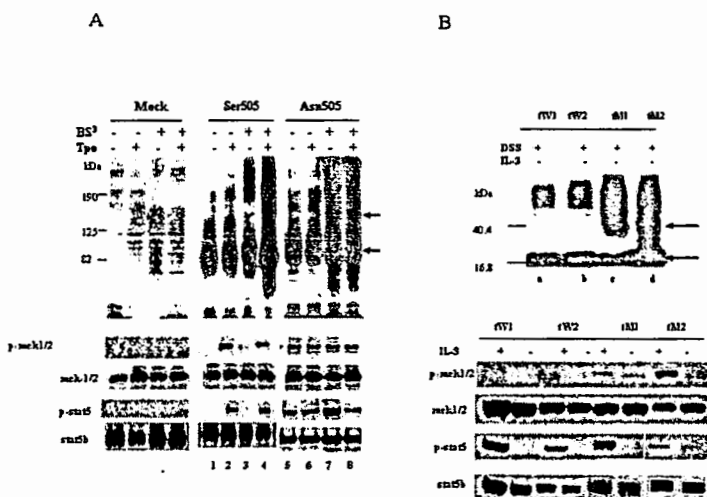
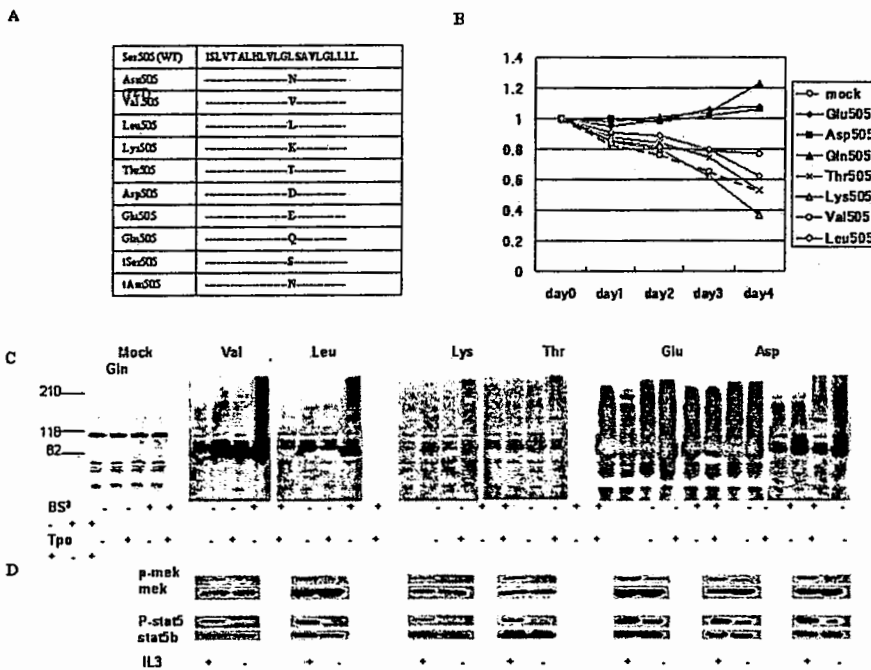


Figure 1. Asn505 drives autohomodimerization and activates the downstream signals. (A) Upper: dimmer detection of SDS-PAGE with crosslinking and immunoblotting. IL-3 starved transfectant Ba/F3 cells were separated into 2 aliquots, stimulated with or without 100ng/ml hTpo (Diacclone Research, France) for 2 hours at 4 °C. Cells were washed with ice-cold PBS containing 100uM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, sub-separated into 2 aliquots, incubated with or without 50mM cross-linker BS<sup>3</sup>/PBS (Pierce, IL) for

another 2 hours at 4°C. Reactions were quenched by 1M Tris.HCL. Cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 25 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate), supplemented with the proteinase inhibitors cocktail (complete mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), insoluble substance was removed by centrifuge 14000g for 10 minutes, lysates were kept at -80 °C. Arrows indicate c-Mpl monomer (~82kDa) and dimer (~164kDa) respectively. Lower: signal phosphorylation of mek1/2 and stat5. (B) Truncate c-Mpl protein (tSer505 and tAsn505) deleted the extracellular domain. Upper: Auto-homodimer induced by tAsn505. lysate making was same as A except omitted the Tpo stimulation. Arrows show the monomer (20kDa) and dimer (40kDa). Lower: auto-phosphorylation of mek1/2 and stat5. 10% WEHI as a source of IL-3, stimulated the factor-starved transfectants for 90 min as a positive control.

Fig. 2



**Figure 2. Results of 505 mutants of c-Mpl TM domain.** (A) Peptide sequences in c-mpl TM domain. The solid letters show the residues in position 505 of c-Mpl. (B) Survival trait (MTT) assay of the 505 mutants. PBS(-) washed c-mpl505 Ba/F3 cells were resuspended in RPMI medium containing 10% FBS,  $5 \times 10^4$  cells in 100ul medium were located in 96 well plate, Thiazolyl Blue tetrazolium Bromide (Sigma, MO) assays were used to evaluate relative viable cell value everyday (same experiment repeated at least 3 times). (C) Dimmerization trait of non-polar residues (Val, Leu), 1-polar residues (Thr, Lys) and 2-polar residues (Glu, Asp, and Gln). Lysates making were as Figure 1A. Arrows showed the monomer (~82kDa) or dimer (~164kDa) of the c-Mpl. (D) The phosphorylation of mek1/2 and stat5 of 505 mutants in c-mpl. IL-3 (+) as positive control.

## 参考文献

1. Heldin C. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995;80:213-223.
2. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103:4198-42007.
3. Smith SO, Smith CS, Bormann BJ. Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat Struct Biol*. 1996;3:252-258.
4. Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J*. 1996;15:520-527.
5. Forbes LV, Gale RE, Pizzey A, Pouwels K, Nathwani A, Linch DC. An activating mutation in the transmembrane domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2002;21:5981-5989.
6. Jenkins BJ, D'Andrea R, Gonda TJ. Activating point mutations in the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors suggest the involvement of beta subunit dimerization and cell type-specific molecules in signalling. *Embo J*. 1995;14:4276-4287.
7. Kuwashansky K and Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene*. 2002;21:3359-3367.
8. Kitayama H, Kanakura Y, Juritsu t. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*. 1995;85:790-798.
9. Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. Polar residues drive association of poly-leucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2250-2255.
10. Kubatzky KF, Ruan W, Gurezka R, et al. Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol*. 2001;11:110-115.
11. Zhou FX, Cocco MJ, Russ WP. Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Bio*. 2000;7:91-94.
12. Sabath DF, Kaushansky K, Broudy VC. Deletion of the extracellular membrane-distal cytokine receptor homology module of Mpl results in constitutive cell growth and loss of thrombopoietin binding. *Blood*. 1999;94:365-367.
13. D'Andrea RJ, Barry SC, moretti PA. Extracellular truncations of h beta c, the common signaling subunit for interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and IL-5, lead to ligand-independent activation.
14. Alexander WS, Metcalf D, Dunn AR. Point mutations within a dimer interface homology domain of c-Mpl induce constitutive receptor activity and tumorigenicity. *Embo J*. 1995;14:5569-5578.
15. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*. 1999;283:987-990.
16. Remy I, Wilson LA and Michnick SW. erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*. 1999;283:990-992
17. Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4379-4384.
18. Vos de AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. *Science*. 1992;255:306-312
19. Choma C, Gratkowski H, Lear JD, DeGrado WF. Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol*. 2000;7:161-166.
20. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. A mutation data matrix for transmembrane proteins. *FEBS Lett*. 1994;339:269-275.
22. Partridge AW, Therien AG, Deber CM. Missense mutations in transmembrane domains of proteins: phenotypic propensity of polar residues for human disease. *Proteins*. 2004;54:648-65

注：本研究は、2005年9月18日日本血液学会口演発表  
作成日：2006年2月28日