
 原 著

ヒトがん培養細胞株における *c-erbB-2* mRNA の 発現および *c-erbB-2* 関連蛋白の性状

新潟大学第一病理学教室 (主任: 渡辺英伸教授)

人見次郎

Expression of *c-erbB-2* mRNA in Cultured Human Cancer Cell Lines
and Characterization of *c-erbB-2*-Related Protein

Jiro HITOMI

*First Department of Pathology, Niigata University
School of Medicine, Niigata, Japan*

(*Director: Prof. Hidenobu WATANABE*)

Expression of *c-erbB-2* mRNA was examined in 33 cultured human cell lines using two synthetic oligonucleotide probes hybridizable to *c-erbB-2* mRNA at the portions coding the extracellular and transmembrane domains. The mRNA with molecular size of 5.0 kb was detected in 28 out of 33 cell lines examined, suggesting that cancer cells frequently produce *c-erbB-2* protein. Additionally, in three cancer cell lines expressing a large amount of the 5.0 kb mRNA, an aberrant mRNA with molecular size of 2.5 kb was detected, which reacted with the probe corresponding to the extracellular domain, but did not with another probe.

The biochemical characteristics of *c-erbB-2* protein were examined in a gastric carcinoma cell line, MKN 7 cells, expressing a large amount of *c-erbB-2* mRNA. When the cells were radiolabelled with ^{32}P i, lysed and then labelled proteins were immunoprecipitated with three different antibodies recognizing extracellular, kinase and carboxyl-terminal domains, phosphorylated *c-erbB-2* protein with molecular size of 185 kD (p185) was immunoprecipitated by all of these three antibodies. When the cells were radiolabelled with [^{35}S] cysteine, p185 was detected with three antibodies, moreover, a large amount of [^{35}S]-labelled protein with molecular size of 95 kD (p95)

Reprint requests to: Jiro HITOMI,
First Department of Pathology, Niigata
University School of Medicine, Ichiban-cho
757, Asahimachi-dori, Niigata City, Niigata
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学第一理学教室

人見次郎

was also detected by using the antibody recognizing the extracellular domain. Other two antibodies did not immunoprecipitate this molecule, suggesting that p95 possesses the structure identical to the extracellular domain of p185. Pulse chase experiments suggest that p95 is not likely to be a degenerating protein of p185. Accordingly, it is reasonable to postulate that two types of *c-erbB-2*-related protein were present in MKN7 cells with molecular size heterogeneity. Further studies are required to clarify the actual biological roles of *c-erbB-2* protein produced by cancer cells.

Key words: *c-erbB-2*, growth factor, receptor, cancer, oncogene

c-erbB-2, 増殖因子, レセプター, がん, がん遺伝子

略 語

mRNA: messenger RNA

cDNA: complementary DNA

EGF: epidermal growth factor

poly (A)⁺ RNA: poly adenylic acid RNA

はじめに

c-erbB-2 は *erbB* との cross-hybridization によってヒトゲノムに見出された遺伝子で¹⁾, cDNA クローンの塩基配列から EGF レセプターと極めて類似した蛋白をコードしていると推測されている²⁾. 一方, エチルニトロソウレアを投与し誘発したラットの神経/神経膠芽腫細胞にみだされたがん遺伝子 *neu*³⁾ は, ラット *erbB-2/HER-2* 遺伝子であり, ラット *c-erbB-2* 遺伝子の点突然変異によって活性化されたものである⁴⁾. さらに, *c-erbB-2* 遺伝子をトランスフェクトし *c-erbB-2* 蛋白を過剰発現させた NIH3T3 細胞ががん化することも報告されている⁵⁾. 抗体を用いた解析により, *c-erbB-2* 蛋白は, チロシンキナーゼ活性を有する 185KD の膜糖蛋白で⁶⁾, ある種の増殖因子レセプターと考えられているが, その ligand はまだ発見されていない. ヒトのがんでも, 乳がん, 胃がんを始めとする腺がんで, *c-erbB-2* 遺伝子の増幅, 発現増大が比較的高頻度に観察されている⁷⁾. 特に, *c-erbB-2* 遺伝子増幅を伴う乳がん患者では, 治療後の再発率・生存率が, それを伴わない患者に比べて有意に高いと言われている⁸⁾.

このように *c-erbB-2* 遺伝子及び *c-erbB-2* 蛋白は, 発がん, そしてがんの発育・進展に深くかかわっていると考えられており, 各種腫瘍組織中の *c-erbB-2* 蛋白の検索が始められつつある⁹⁾. しかし, 現時点では, がん細胞内の *c-erbB-2* 蛋白の構造及び発現様式に関する解析は必ずしも十分とはいえない. そこで, 本研究で

は *c-erbB-2* mRNA が, どのようなヒトがんに発現しているのかを各種がん培養細胞株を用いて検討し, 特に, *c-erbB-2* mRNA の過剰発現を認めたがん培養細胞株について, 3種の抗体を用い, *c-erbB-2* 蛋白の特性を解析した. その結果, *c-erbB-2* mRNA は, 上皮性腫瘍細胞株のみならず, 悪性黒色腫や Wilms 腫瘍の細胞株にも発現していること, さらに, *c-erbB-2* 蛋白様免疫活性が, 従来報告されてきた 185kD の分子以外に, 約 95kD と 110kD の分子として存在することを見出したので報告する.

材料と方法

1. 細胞株

対象細胞株は33種で, 内訳は32種のヒトがん培養細胞株 (乳がん; 4, 胃がん; 2, 大腸がん; 1, 膵がん; 4, 肝がん; 3, 肺がん; 10, 悪性黒色腫; 4, 前骨髄性白血病; 1, 外陰部がん; 1, Wilms 腫瘍; 2) と, 1種のヒト乳腺上皮培養細胞株である¹⁰⁻¹⁷⁾. 詳細は別表 (Table 1) に記した. いずれの培養細胞株も供給者により添付された報告書と同様の条件下にて培養した.

2. *c-erbB-2* mRNA に対するノーザンブロット分析

いずれの細胞株においても, 増殖サイクルの定常期の細胞を回収し, RNA の抽出をおこなった. 全 RNA の抽出は Guanidinium/cesium chloride 法を用いた¹⁸⁾. さらに oligo (dT) cellulose affinity chromatography¹⁹⁾ により Poly (A)⁺ RNA を回収した. *c-erbB-2* mRNA の検出には, 既に報告されている mRNA の構造²⁾ をもとにして phosphoramidite 法²⁰⁾²¹⁾ で合成した mRNA に相補的な DNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製²²⁾の後, 合成 DNA プローブとして用いた. 今回用いた合成 DNA プローブは *c-erbB-2* 蛋白の細胞外領域をコードしていると考えられている部

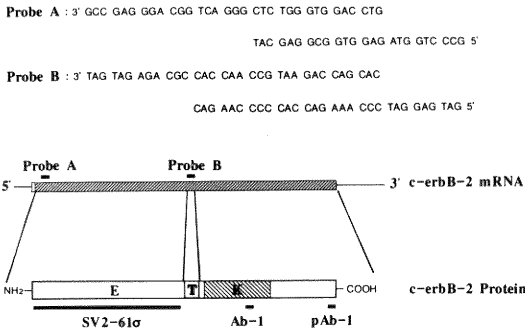


Fig. 1 Structure of *c-erbB-2* mRNA and *c-erbB-2* protein.

In the scheme of *c-erbB-2* mRNA, the coding region and the untranslated region are shown by the box and by the solid line, respectively. The black rectangles above the mRNA structure represent the portions of mRNA where the two probes can hybridize; probe A recognizes the portion related with the extracellular domain, and probe B, transmembrane domain. In the scheme of *c-erbB-2* protein, three domains were demonstrated; these are extracellular (E), transmembrane (T) and kinase (K) domains. The black rectangles below the protein structure show the sites where the three antibodies, SV2-61σ, Ab-1 and pAb-1, can recognize.

分の57塩基と細胞膜貫通領域をコードしていると考えられている部分の66塩基よりなり、いずれも EGF レセプターの塩基配列²³⁾とは相同性を示さないものである (Fig. 1)。同時に、各細胞株における mRNA の保存と抽出状態を、 β -actin に対する合成 DNA プローブを用い検討した。各合成プローブは5'末端を [γ -³²P] ATP (New England Nuclear 社)を用い、T₄ polynucleotide kinase により標識した¹⁸⁾。その specific activity はいずれも約 4×10^6 cpm/pmol であった。各細胞株は、5 μ g の Poly (A)⁺RNA を 1.2%アガロース・ホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした後、合成 DNA プローブとノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った¹⁸⁾。

3. 抗体

c-erbB-2 蛋白は、その遺伝子配列より、EGF レセ

プターなどの成長因子受容体と同様に3つの主要構造部分よりなると考えられている。すなわち、細胞外の糖鎖を有するリガンド結合領域、1カ所の細胞膜貫通領域および細胞内チロシンキナーゼ領域である。そこで今回、*c-erbB-2* 蛋白の同定のため、*c-erbB-2* 蛋白の異なる部位を認識する3種の抗体、1)細胞外領域を認識するモノクローナル抗体 (sv2-61 γ :ニチレイ)²⁴⁾、2)遺伝子配列から予測された細胞内チロシンキナーゼ領域のアミノ酸配列の一部 (866番目より880番目の残基)と相同する合成ペプチドに対するポリクローナル抗体 (*c-neu* (Ab-1): Oncogene Science)、3)*c-erbB-2* 遺伝子配列より予測されるカルボキシル基末端14個のアミノ酸配列と相同する合成ペプチドに対するポリクローナル抗体 (pAb-1: Triton Bioscience Inc.)を用いた。それぞれの抗体の *c-erbB-2* 蛋白上の認識部位を、Fig. 1に示した。

4. アイソトープを用いた細胞標識

標識に用いた MKN7 細胞は、35mm dish で培養し、定常期の細胞を各種アイソトープにより標識した。dish 当りの細胞数は、 1.25×10^6 であった。また、標識前後において細胞数の変化は認められなかった。

1) [³⁵S] システインによる細胞標識²⁵⁾

定常期の細胞をまずシステイン及びメチオニンを欠く RPMI1640 (FCS を含まない) で1時間培養し、つぎに、1/10容量のシステイン及び全量のメチオニンを含む RPMI1640 に 1.85MBq/ml (1ml medium/35mm dish) 濃度の [³⁵S] システイン (New England Nuclear 社)及び 5%FCS (Boeringer Mannheim 社)を添加し、所要時間インキュベートした。また、同時にパルス・チェイス標識を行った。プレインキュベーションの後、37.5 MBq/ml の [³⁵S] システインを添加したシステイン及びメチオニンを欠く RPMI 1640 (200 μ l/dish) で1時間インキュベートし、その後 5%FCS を含む通常の RPMI 1640 に交換し、チェイスを行った。1時間後、2時間後、4時間後及び8時間後に細胞を溶解し、溶解液及び培養上清を免疫沈降に処した。

2) [³²P] 正リン酸による細胞標識²⁵⁾

定常期の MKN7 細胞を、リン酸を欠く DMEM (5%FCS を含む) に 9.25MBq/ml 濃度の [³²P] 正リン酸 (New England Nuclear 社)を加え、8時間インキュベートし、その後、細胞を溶解し免疫沈降した。

3) [¹²⁵I] による細胞表面蛋白の標識

定常期の MKN7 の細胞表面蛋白をヨードゲン (Pierce 社)を用いて標識した。方法は Maarkwall²⁶⁾の方法

に準じた。ヨードゲンをコーティングしたカバーガラスを細胞表面を覆った 200 μ l の 5 mM glucose を含む CMF-PBS (Calcium and Magnesium free phosphate buffered saline) 上に浮かせ、3.75MBq の Na^{125}I (New England Nuclear 社) を添加し、室温にて15分間反応させた。反応終了後、カバーガラスを取り除くとともに CMF-PBS で洗浄し、直ちに lysis buffer を加え、細胞を溶解した。

5. 免疫沈降法

アイソトープによる標識が終了した後、直ちに培養上清を回収し、次いで培養上清と等量の lysis buffer²⁷⁾ (40 mM HEPES pH 7.4, 1% TritonX-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 4 mM EDTA, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10% glycerol) で細胞を溶解した。4℃にて30分間静置した後、細胞溶解液を集め、15,000 \times g で60分間遠心し、上澄を回収した。次に、その上澄を、protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia 社) に結合した抗体と3時間インキュベートした。あらかじめ抗体 (1 μ g) またはマウス正常血清 (1 μ l) と protein A-Sepharose (20 μ l) とは、混合し、室温にて1時間結合させておいた。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

蛋白、抗体、及びプロテインA複合体を洗浄後、沈降

し、2倍濃度の Sample buffer²⁸⁾ (0.1 M Tris HCl pH 6.8, 8% SDS, 4% mercaptoethanol, 24% glycerol, 0.03% bromophenol blue) 50 μ l を加え、5分間 100℃で加熱後、上澄みの電気泳動を行った。ゲルは不連続ゲルを用い、5.5%アクリルアミド、0.17% ビスアクリルアミド濃度で調整した。調整法は Schagger らの方法に準じた²⁸⁾。泳動終了後、ゲルを固定、乾燥し Kodak-X-Omat R film を用いオートラジオグラフィを行った。

成 績

1. 各種培養細胞株における *c-erbB-2* mRNA の発現

合成 DNA プローブAでは、細胞株33種中28種で約 5.0kb の通常型の *c-erbB-2* mRNA と考えられるバンドが検出された (Table. 1)。一方、*c-erbB-2* mRNA の発現を検出しえなかった細胞株は、3例の肺小細胞がん細胞株、1例の肝細胞がん株及び1例の白血病細胞株であった。

β -actin mRNA の発現量との比較から *c-erbB-2* mRNA の発現がとくに著明であったのは、3例の乳がん細胞株、SK-BR-3, ZR-75-30, ZR-75-1 及び胃がん細胞株 MKN7 であった。また、MKN7, SK-BR-3, ZR-75-30 の細胞株では、5.0kb の通常サイズの *c-erbB-2* mRNA 以外に2.5kb 付近に小さな分子量の mRNA

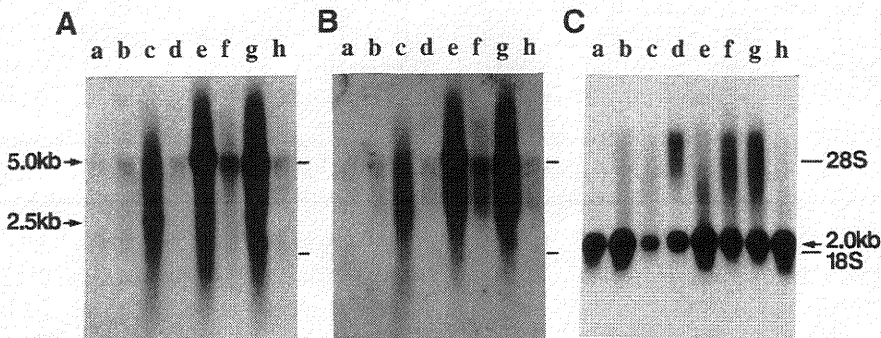


Fig. 2 Northern blot studies for cancer cell lines.

(A) Results with the probe A; (B) Results with the probe B; (C) Results with the probe for β -actin. The cell lines examined were a vulvar carcinoma, A431 (lane a); two gastric carcinomas, KATO-III (lane b) and MKN7 (lane c); a mammary epithelial cell line, HBL-100 (lane d); four mammary carcinomas, SK-BR-3 (lane e), ZR-75-1 (lane f), ZR-75-30 (lane g) and MCF-7 (lane h).

Table 1 Expression of *c-erbB-2* mRNA in Cultured Human Cell Lines

Origin	Cell lines	Histology	<i>c-erbB-2</i> mRNA	Ref.
breast	SK-BR-3	adenocarcinoma	+++	9
	ZR-75-1	adenocarcinoma	++	9
	ZR-75-30	adenocarcinoma	+++	9
	MCF-7	adenocarcinoma	+	9
	HBL-100	mammary epithelial cells	+	9
stomach	MKN7	adenocarcinoma	+++	10
	KATO-III	signet-ring cell carcinoma	+	10
colon	HT-29	adenocarcinoma	+	9
pancreas	MIA PaCa-2	adenocarcinoma	+	9
	ASPC-1	adenocarcinoma	+	9
	PANC-1	adenocarcinoma	+	9
	BxPC-3	adenocarcinoma	+	9
liver	Li-7	hepatocellular carcinoma	n.d.	11
	PCL/PRF/5	hepatocellular carcinoma	+	12
	HLF	hepatocellular carcinoma	+	12
lung	A549	adenocarcinoma	+	9
	PC7	adenocarcinoma	+	13
	PC9	adenocarcinoma	+	13
	PC14	adenocarcinoma	+	13
	Lu24	small cell carcinoma	n.d.	14
	Lu61	squamous cell carcinoma	+	15
	Lu65	large cell carcinoma	+	15
	Lu99	large cell carcinoma	+	15
	Lu134	small cell carcinoma	n.d.	14
	Lu135	small cell carcinoma	n.d.	14
kidney	SCMC-W-1	Wilms tumor, epithelioid	+	12
	SCMC-W-2	Wilms tumor, fibrous	+	12
skin	SEKI	malignant melanoma	+	16
	A375	malignant melanoma	+	9
	G361	malignant melanoma	+	9
	Mevo	malignant melanoma	+	9
vulva	A431	squamous cell carcinoma	+	12
blood	HL60	acute promyelocytic leukemia	n.d.	9

Ref.: reference No., n.d.: not detectable

++, +++: levels of expression more than 5 and 10 times as higher as that of HBL-100, respectively.

のバンドが認められた (Fig. 2). しかし, 合成 DNA プローブ B を用いたハイブリダイゼーションでは, 5.0 kb の mRNA は, 検出されたが, 2.5kb の mRNA は, 認められなかった.

2. MKN7 細胞における *c-erbB-2* 蛋白質の性状
c-erbB-2 mRNA の発現が著明で, 通常の 5.0kb の

c-erbB-2 mRNA 以外に約 2.5kb の mRNA の存在が確認された MKN7 における *c-erbB-2* 蛋白質の性状を抗 *c-erbB-2* 蛋白質抗体を用いて検討した.

1) [³⁵S] システインによる細胞標識

[³⁵S]システインで標識した細胞を溶解し, *c-erbB-2* 蛋白質の細胞外領域, キナーゼ領域, 及びカルボキシル基

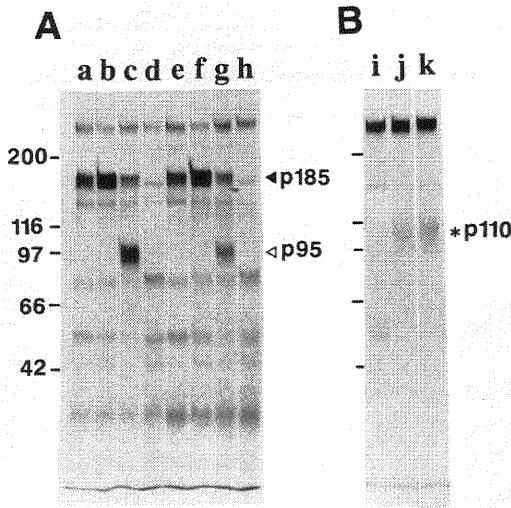


Fig. 3 [^{35}S] cysteine-labelled *c-erbB-2*-related protein immunoprecipitated from cell lysate (A) and the culture medium (B) of MKN7 cells. Cell lysate prepared from cells labelled for 24 h (lanes a-d) and 48 h (lanes e-h) and the culture media prepared from cells labelled for 24 h (lanes i and j) and 48 h (lane k). The immunoprecipitation was achieved by using Ab-1 (lanes a and e), pAb-1 (lanes b and f) and SV2-61r (lanes c, g and k) and normal mouse serum (lanes d, h and i).

末端領域を認識する3種の異なる抗体により免疫沈降した。3種の抗体いずれによっても、分子サイズ約185kDの蛋白(p185)が特異的に免疫沈降された(Fig. 3)。デンストメーター分析より、24時間標識、48時間標識細胞いずれから、ほぼ同量のp185が免疫沈降された。

一方、24時間及び48時間標識したいずれの細胞からも、*c-erbB-2*蛋白の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体により約95kDの分子サイズの蛋白(p95)が免疫沈降された(Fig. 3)。デンストメーター分析の結果から、24時間標識細胞においてp95はp185に比較してほぼ2倍量免疫沈降された。しかし、48時間標識した細胞では、p95は、p185に比較して相対的に減少していた。

[^{35}S] システインによるパルス・チェイス標識では、*c-erbB-2*蛋白の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体を用いて検討を行なった。パルス標識(1時間)直

後より、4時間後まで約155kDの分子サイズのパンド(p155)が認められた(Fig. 4)。p155は、チェイス2時間目にもっとも顕著であったが、4時間目より、消退しそれとともにp185が出現した。p185は、8時間目で最も強いパンドとして認められた。

一方、p95は、MKN7細胞において、パルス標識直後から認められ、以後チェイス8時間目まで徐々に増加した(Fig. 4)。

ところで、今回細胞中の*c-erbB-2*蛋白の検討と同時に、培養上清中の*c-erbB-2*蛋白免疫活性についても、同じ抗体により、免疫沈降法を用いて検討した。その結果、分子量約110kDの蛋白(p110)が、3種の抗体のうち細胞外領域を認識するモノクローナル抗体によってのみ、免疫沈降された。p110の量は標識時間に依存的に増加し(Fig. 3)、またパルス・チェイス標識においてはチェイス4時間目以降より出現し、以後増加した(Fig. 4)。

2) [^{32}P] 正リン酸による細胞標識

[^{32}P] 正リン酸標識においては、3種の抗体いずれによっても、MKN7細胞から、分子量約185kDの蛋白(p185)が免疫沈降された。しかし、95kD付近にモノクローナル抗体による免疫沈降物のパンドを検出することができなかった(Fig. 5)。

3) [^{125}I] による細胞表面蛋白の標識

^{125}I でMKN7細胞の細胞表面上に存在する蛋白を標識し、3種の抗体により免疫沈降した。いずれの抗体によってもp185は検出できたが、p155及びp95は検出し得なかった(Fig. 5)。

考 案

ヒト培養細胞株の*c-erbB-2*遺伝子の発現を検討した結果、*c-erbB-2* mRNAは、腺がん由来の培養細胞株に限らず、悪性黒色腫やWilms腫瘍由来の細胞株でも発現していることが明らかとなった。また、その発現が著明なものは、乳がん細胞株の3例と胃がん細胞株の1例であった。これは、外科手術例で乳がん及び胃がんには*c-erbB-2*遺伝子の増幅、過剰発現の頻度が高いとする報告と一致する結果であった⁵⁾。

Quirkeらは、ヒト胎児における*c-erbB-2*遺伝子の発現を検討した結果、*c-erbB-2*蛋白が胎生期初期に、三胚葉にわたり広範囲に各器官及び組織で検出されるとし、胎生期の細胞増殖及び分化における*c-erbB-2*蛋白の重要性を示している²⁹⁾。各種腫瘍細胞株において*c-erbB-2* mRNAの発現が認められたことは、腫瘍細

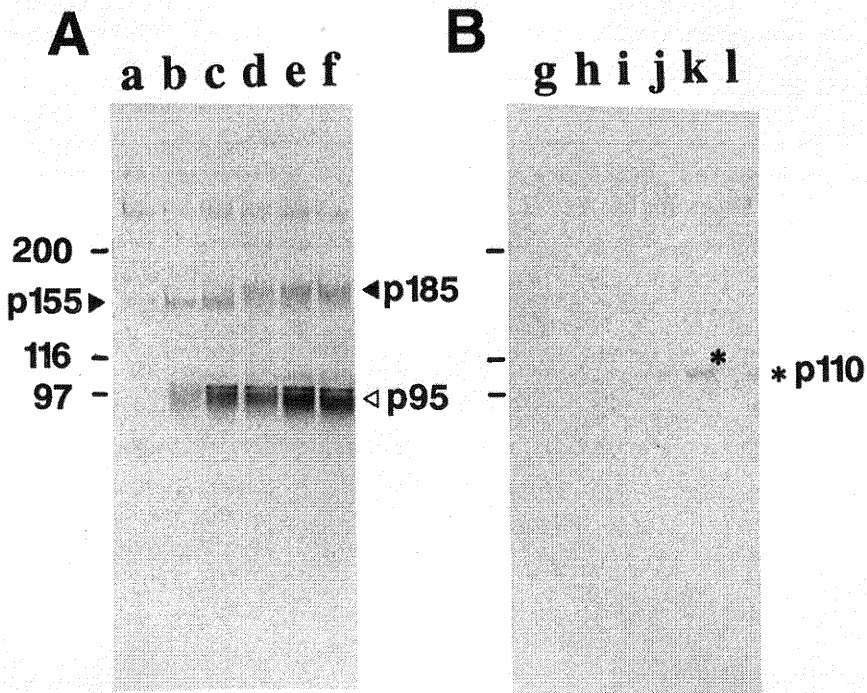


Fig. 4 Pulse-chase analysis of biogenesis of *c-erbB-2*-related proteins in cell lysate (A) and culture medium (B) prepared from [³⁵S] cysteine-labelled MKN7 cells. Cells were labelled for 1h with [³⁵S] cysteine and then chased for 0h (lanes b and g), 1h (lanes c and h), 2h (lanes a, d and i), 4h (lanes e and j) and 8h (lanes f, k, and l). Immunoprecipitation was achieved with normal mouse serum (lanes a and l) and with SV2-617 (lanes b-k).

胞の胎生期的性格の獲得と考えられると共に、*c-erbB-2* 遺伝子が、上皮系及び非上皮系組織由来を問わず、がんの増殖あるいは発生に関与している可能性を示すものであろう。

MKN7, SK-BR-3, 及び ZR-75-3 細胞で認められた、2.5kb *c-erbB-2* mRNA は、プローブBとハイブリダイズしないことから、*c-erbB-2* 蛋白の細胞膜貫通領域の配列はコードしていないと考えられる。この小さな *c-erbB-2* mRNA の発現が著明であった MKN7 細胞の *c-erbB-2* 蛋白の検討を行ったところ、185kD (p185), 95kD (p95) の蛋白が細胞から、110kD (p110) の蛋白が培養上清から免疫沈降された。

185kD の蛋白は、[³⁵S] システイン、あるいは [¹²⁵I] で標識した細胞から、3種の抗体いずれによっても特異的に免疫沈降され、さらに [³²P] 正リン酸により標識

した細胞からも 185kD のリン酸化蛋白が全ての抗体により免疫沈降された。従来の報告⁷⁾²⁵⁾ においても、*c-erbB-2* 蛋白の分子量は、185kD ないし 190kD であるとされ、この p185 は、成熟型の *c-erbB-2* 蛋白と思われる。p95 は、抗体との反応性と、[³²P] 正リン酸及び [¹²⁵I] 標識の結果より、*c-erbB-2* 蛋白の細胞外領域部分より構成され、自己リン酸化能を持たず、かつ細胞表面にはない *c-erbB-2* 関連蛋白と考えられる。また、p110 も、その抗体との反応性より、*c-erbB-2* 蛋白の細胞外領域のみから構成された MKN7 細胞の分泌蛋白の可能性はある。一方、パルス・チェイス標識で検出された 155kD の蛋白 (p155) は、それが、パルス標識直後から認められ、その消退に伴って、p185 が出現してくることから、p185 の前駆体と考えられる。

デンスitomーターにより p95 と p185 の産生動態を比

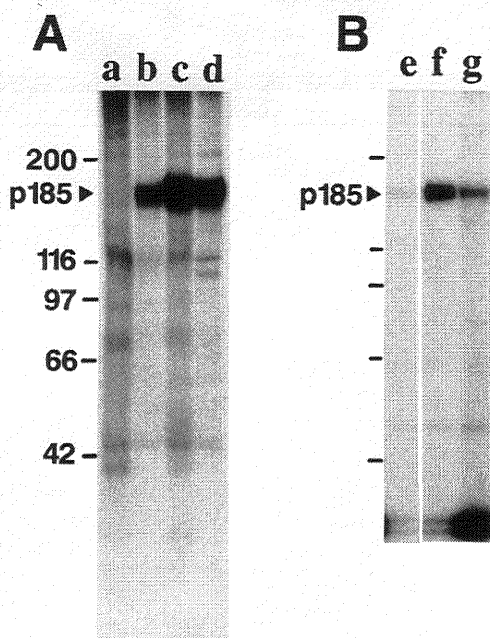


Fig. 5 Immunoprecipitation of ^{32}P i-labelled (A) and ^{125}I -labelled (B) *c-erbB-2*-related protein prepared from cell lysate of MKN 7 cells.

^{32}P i-labelled proteins were immunoprecipitated with normal mouse serum (lane a), SV 2-61r (lane b), pAb-1 (lane c) and Ab-1 (lane d).

^{125}I -labelled proteins were immunoprecipitated with SV 2-61r (lane e), pAb-1 (lane f) and (lane g).

較すると、各標識時間において p185 の産生は、ほぼ一定であるが、p95 は、48時間標識では減少しており、その産生は、平衡に達していない。また、パルス・チェイス標識では、p95 は、パルス標識直後から認められ、チェイス 8 時間目まで徐々に増加した。このような p95 の産生動態は、p185 や p155 と異なり、p95 が p185 の前駆体あるいは分解産物とは考えにくい。p95 は、MKN7 細胞において p185 とは別の過程で産生されている可能性が考えられる。

ところで、*c-erbB-1* 遺伝子の増幅及び過剰発現を伴う EGF レセプター高産生細胞株 A431 細胞は、細胞内において EGF レセプターの細胞外領域から成る分子量約 90kD の蛋白を産生し、糖鎖形成の後、分子量約 105kD の糖蛋白として細胞外に放出している³⁰⁾³¹⁾。そして、EGF レセプターの細胞外領域のプロープとの

みハイブリダイズし、通常サイズの *c-erbB-1* mRNA とは異なる小さな分子サイズの 2.8kb mRNA が、この蛋白をコードしていると考えられている²³⁾。細胞外に分泌されたこの蛋白の機能は明らかではないが、EGF に対する結合能を有する³⁴⁾ と共に、この蛋白自体が、EGF レセプター相互の homodimer 形成を抑制することで、EGF レセプターのチロシンキナーゼ活性を阻害すると考えられている³²⁾。

c-erbB-2 蛋白の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体により MKN7 細胞から免疫沈降された p95、及び培養上清から免疫沈降された p110 の存在様式は、2.5kb の *c-erbB-2* mRNA の発現と併せて考慮すると、A431 細胞における 105kD-EGF レセプター関連糖蛋白の発現に非常に類似している。p95 及び p110 が、分泌型 *c-erbB-2* 蛋白であるならば、その発現機構及び機能は、大変に興味深い。MKN7 細胞と同様に 2.5 kb mRNA の発現が認められた SK-BR-3、ZR-75-30 細胞についても、その存在を検討する必要がある。

現時点では、p95 及び p110 が、確かに *c-erbB-2* 遺伝子関連蛋白であるとはいえず、単にモノクローナル抗体の交差反応の結果という可能性も否定できない。しかし、一部の *c-erbB-2* mRNA の過剰発現を認める細胞において、通常の 185kD の分子サイズの *c-erbB-2* 蛋白以外に異なる分子サイズの *c-erbB-2* 蛋白様免疫活性が存在し、しかも細胞外領域を認識する抗体によってのみ検出された事実は、これまで *c-erbB-2* 蛋白の解析が、Quirke らの報告も含めて、細胞内領域を認識する抗体によりなされたものが多いことから、今後、*c-erbB-2* 蛋白の免疫学的検討を行う際に、その抗体の選択に注意を促すものである。

本研究は、国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部において行なったものであり、直接御指導いただいた山口建部長に深くお礼申し上げます。さらに、御協力いただいた研究員のみなさまに感謝いたします。また、御指導、御校閲を賜りました恩師 渡辺英伸教授に心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. and Yamamoto, T.: A *v-erbB*-related protooncogene, *c-erbB-2*, is distinct from the *c-erbB-1*/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. Proc.

- Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 6497~6501, 1985.
- 2) **Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, Saito, T. and Toyoshima, K.**: Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*, **319**: 230~234, 1986.
 - 3) **Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I. and Weinberg, R.A.**: The *neu* oncogene: an *erbB*-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, **312**: 513~516, 1984.
 - 4) **Bargmann, C.I., Hung, M.C. and Weinberg, R.A.**: Multiple independent activations of the *neu* oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*, **45**: 649~657, 1986.
 - 5) **DiFore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R. and Aaronson, S.A.**: *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cell. *Science*, **237**: 178~182, 1987.
 - 6) **Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K. and Yamamoto, T.**: The product of the human *c-erbB-2* gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, **232**: 1644~1646, 1986.
 - 7) **Yokota, J., Yamamoto, T., Toyoshima, K., Terada, M., Sugimura, T., Battifora, H. and Cline, M.J.**: Amplification of *c-erbB-2* oncogene in human adenocarcinomas *in vivo*. *Lancet* **i**: 765~766, 1986.
 - 8) **Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L.**: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2/neu* oncogene. *Science*, **235**: 177~182, 1987.
 - 9) **Gullick, W.J., Berger, M.S., Bennett, P.L.P., Rothbard, J.B., and Waterfield, M.D.**: Expression of the *c-erbB-2* protein in normal and transformed cells. *Int. J. Cancer*, **40**: 246~254, 1987.
 - 10) **Hay, R., Macy, M., Corman-Weiblat, A., Chen, T.R. and McClintock, P. (eds.)**: Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, Ed. 5th, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, 1985.
 - 11) **北条晴人**: ヒト胃癌培養株の樹立とその形態学的特性. 新潟医学会雑誌, **9**: 737~752, 1977.
 - 12) **Hirohashi, S., Shimosato, Y., Kameya, T., Koide, T., Mukojima, T. and Taguchi, Y.**: Morphological and functional aspects of human liver cell carcinomas transplanted in nude mice. In: Nomura, T., Ohsawa, N., Tamaoki, N., and Fujiwara, K. (eds.), Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice, pp.427~434, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977.
 - 13) **Ishidate, M. (ed.)**: Japanese Cancer Research Resources Bank NEWSLETTER, Foundation for Promotion of Cancer Research, Tokyo, Japan, 1989.
 - 14) **Lee, Y.C., Saijio, N., Sasaki, Y., Takahashi, H., Sakurai, M., Ishihara, J., Hoshi, A., Chen, K.M. and Hamburger, A.W.**: Clonogenic patterns of human pulmonary adenocarcinoma cell lines (PC-9, PC-13, and PC-14) and how they influence the results of test for chemosensitivity to cisplatin in human tumor clonogenic assay. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **15**: 637~644, 1985.
 - 15) **Terasaki, T., Shimosato, Y., Nakajima, T., Tumuraya, M., Morinaga, S., Hirohashi, S., Yamaguchi, K., Kato, K., Ichinose, H. and Nagatsu, T.**: Changes in cell characteristics due to culture conditions in cell lines from human small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **16**: 203~212, 1986.
 - 16) **Yamada, T., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Kodama, T., Hayashi, S., Ogura, T., Gamou, S. and Shimizu, N.**: Giant cell carcinomas of the lung producing colony-stimulating factor in vitro and in vivo. *Jpn. J. Cancer Res.*, **76**: 967~976, 1985.
 - 17) **Shimoyama, M. SEKI strain**. In: Oboshi, S. and Sugano, H. (eds.), In vitro culture of human cancer cells (in Japanese), pp.208~215, Asakura Shoten, Tokyo, Japan, 1975.
 - 18) **Suzuki, M., Yamaguchi, K., Abe, K., Adachi, N., Nagasaki, K., Asamura, F., Terada, M., Taya, Y., Matsuzaki, J. and Miki, K.**:

- Detection of gastrin-releasing peptide mRNA in small cell lung carcinomas and medullary thyroid carcinomas using synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **17**: 157~163, 1987.
- 19) **Aviv, H. and Leder, P.**: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 1408~1412, 1972.
- 20) **Matteucci, M.D. and Caruthers, M.H.**: Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**: 3185~3191, 1981.
- 21) **Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H.**: Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **22**: 1859~1862, 1981.
- 22) **Maniatis, T., Jeffrey, A. and Van deSande, H.**: Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, **14**: 3787~3794, 1975.
- 23) **Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D. and Seeburg, P.H.**: Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**: 418~425, 1984.
- 24) **Masuko, T., Sugahara, K., Kozono, M., Otsuki, S., Akiyama, T., Yamamoto, T., Toyosima, K. and Hashimoto, Y.**: A murine monoclonal antibody that recognizes an extracellular domain of the human *c-erbB-2* protooncogene product. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**: 10~14, 1989.
- 25) **Stren, D.F., Heffernan, P.A. and Weinberg, R.A.**: p185, a product of the *neu* protooncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1729~1740, 1986.
- 26) **Markwell, M.K. and Fox, C.F.**: Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycoluril. *Biochemistry*, **17**: 4807~4817, 1978.
- 27) **Kadowaki, T., Kasuga, M., Tobe, K., Takaku, F., Nishida, E., Sakai, H., Toyoshima, K., Yamamoto, T. and Akiyama, T.**: A Mr=190,000 glycoprotein phosphorylated on tyrosine residues in epidermal growth factor stimulated KB cells is the product of the *c-erbB-2* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**: 699~704, 1987.
- 28) **Schagger, H. and von Jagow, G.**: Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368~379, 1987.
- 29) **Quirke, P., Pickles, A., Tuzi, N.L., Mohamdee, O. and Gullick, W.J.**: Pattern of expression of *c-erbB-2* oncoprotein in human fetuses. *Br. J. Cancer*, **60**: 64~69, 1989.
- 30) **Mayes, E.L.V. and Waterfield, M.D.**: Biosynthesis of the epidermal growth factor receptor in A431 cells. *EMBO J.*, **3**: 531~537, 1984.
- 31) **Weber, W. Gill, G.N. and Spiess, J.**: Production of an epidermal growth factor receptor-related protein. *Science*, **224**: 294~297, 1984.
- 32) **Basu, A., Raghunath, M., Bishayee, S. and Das, M.**: Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: Role for interreceptor interaction in kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 671~677, 1989.

(平成2年3月5日受付)