

MAPキナーゼ制御因子Spredの遺伝性疾患における解析と造血幹細胞における機能

1. はじめに

MAP kinase ファミリーの一つ、ERK (Extracellular stimulus-activated kinase) は、様々な細胞反応を制御する重要な役割を果たしており、ほとんどのあらゆる細胞外刺激により活性化を受ける。基本的には活性化された Ras が Raf (Raf1 および B-Raf) を、Raf が MEK (MEK1, MEK2) を、MEK が ERK をリン酸化して活性化する。Ras は GEF (GDP/GTP exchange factor) のひとつである SOS (son of sevenless) によって活性化 (GTP 型に変換) され、逆に RasGAP (GTPase activating protein) によって不活性化 (GDP 型に変換) される。RasGAP は何種類か知られているが、神経線維腫症 1 型 (Neurofibromatosis Type 1; NF1) の原因タンパク質である neurofibromin もそのひとつで、この経路の負の制御因子である。一方、Sprouty/Spred ファミリーはショウジョウバエから哺乳類まで保存された ERK シグナルの負の調節因子である。Sprouty はショウジョウバエの遺伝学的解析により FGF シグナルを負に調節する分子として 1998 年に同定された。Spred (Sprouty-related EVH-1 domain containing protein) は我々が 2001 年にチロシンキナーゼ型の受容体である c-kit (SCF 受容体) に会合する Sprouty に似た分子として発見し、Ras/ERK 経路の抑制因子として報告した遺伝子である (1)。哺乳類では Sprouty は 4 種類、Spred は 3 種類のホモログが報告されている。我々はこれまで Sprouty2, Sprouty4, Spred1, Spred2 の欠損マウスの作製を行い、解析を行ってきた (2-7)。Spred1 欠損マウスの解析から、Spred1 が生理的に SCF や IL-3, IL-5 のシグナルを抑制し、造血系を負に制御することを明らかにした (2, 3)。しかしヒト疾患との関係はこれまで不明であった。昨年度および本年度の研究ではじめてヒトにおいて SPRED1 の変異が発見された (8)。本年度は大規模なスクリーニングを行い、NF-1 様患者のおよそ 2.6% が SPRED1 が原因であることを明らかにした (9)。またそのなかでミスセンス変異によるアミノ酸置換の影響について詳細に検討した。

2. 方法

①ベルギー、フランス、アメリカとの国際共同研究において、カフェオレ斑を持つが、NF1 遺伝子に変異を認めない NF1 様患者での大規模な塩基配列決定を行い、実際に変異が複数発見された。また孤発例で NF1 に変異のない例についてもシーケンシングを行った。これらの変異体 cDNA を発現ベクターにクローニングし機能解析を行った。

②Ras-ERK 経路の活性化抑制効果は 293T 細胞を用いて Elk-レポーター (Clontech), in vitro Raf キナーゼアッセイ, Raf-1 の自己リン酸化アッセイを用いて評価した。In vitro kinase assay は 293T 細胞に Spred1 cDNA, HA-Raf-1 を co-transfect したのち FGF で刺激後 Raf1 を回収後、組み替え体不活性化型 MEK と ATP を加えてを用いて incubation し、MEK のリン酸化を抗リン酸化 MEK 抗体による Western-blotting によって評価した。

さらに鋭敏なバイオアッセイとしてPC12のERKに依存した神経細胞様の突起形成の抑制能を検討した。これはPC12細胞にGFPと変異SPRED1遺伝子cDNAを導入しNGF刺激による神経突起形成の抑制でSPRED1のERK抑制機能を判定するもので、現在のところ最も鋭敏な方法である。

3. 結果

① 2432のNF-1様患者を調べたところ、1318人にNF-1の変異が認められなかった。そこでSPRED1の塩基配列を決定したところ34人に

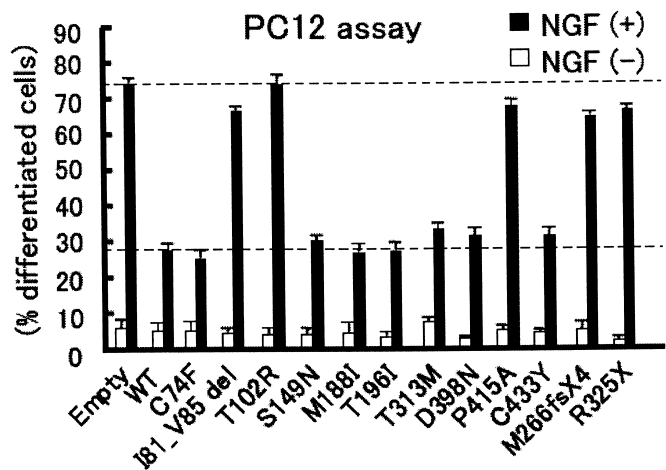
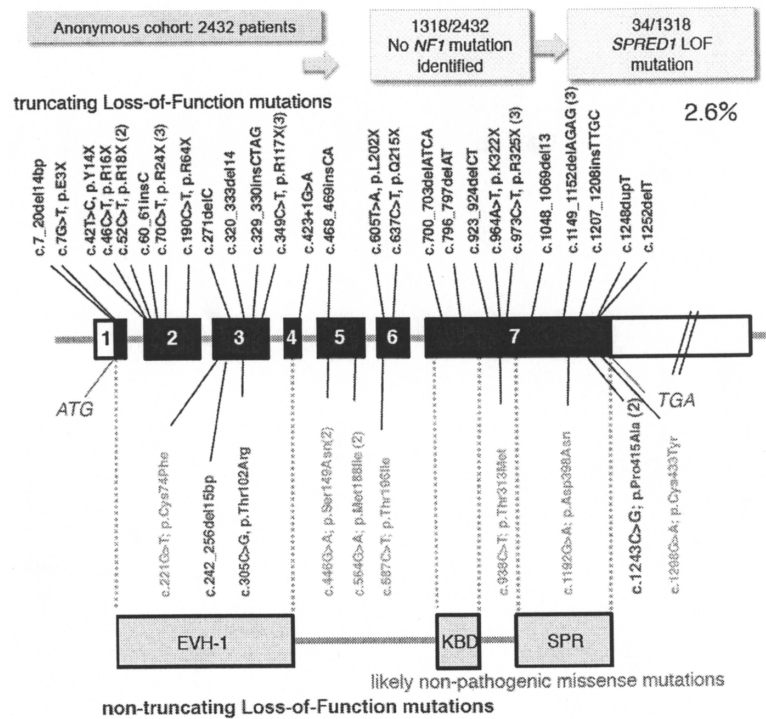
LOFの変異が認められた(右図)。ほとんどはナンセンス変異によるC末側欠失変異である(図上部)。NF1様患者の2.6%にSPRED1遺伝子の変異が認められる。SPRED1に変異を持つ患者は、カフェオレ斑、腋窩の雀卵斑、そばかす、知能障害、腱しろう巨細胞腫、乳がん、卵巣がん、脂肪腫、骨髓性白血病などを示していた。一方10例でミスセンス変異(一部数アミノ酸の欠失)が認められた。

② 見つかった変異型SPRED1が機能喪失型であるかどうかを検討するために、野生型SPRED1(WT)と変異型SPRED1を用いて、生化学的な機能解析を行った。293T細胞においてin vitro Raf1 キナーゼアッセイ、Elk レポーターアッセイを行ったところ、ナンセンス変異体はFGFおよびEGFによるERK経路の活性化を全く抑制できなかった。一方ミスセンス変異体10例のうち7例では、

ERK活性化の抑制効果は野生型と変わらなかった。しかしEVH1ドメインに5アミノ酸が欠失されるc242_256delおよびT102R置換体、さらにC末端SPRドメインのP415A変異体では活性の低下が認められた(右図)。SRPドメインのdeletion mutantではC末端26アミノ酸を削っただけでSpred1分子の細胞膜マイクロドメイン(lipid raft)への移行が著減した(10)。したがってPro415はC末端の脂質修飾に必要な構造に関連しているものと思われる。さらに立体構造の検討からThr102はEVH1ドメインのリガンド結合ポケットに位置することが判明した。この変異体は未知のEVH1ドメイン結合分子の検索に有用と考えられた。

4. 考察

'neuro-cardio-facial-cutaneous'(NCFC)症候群とは2006年にB. Neelらによって提唱されたRas-Raf-ERK経路



の異常によって起こる表現型が重複する先天性遺伝性疾患の総称である。NCFC症候群にはNF1、ヌーナ
ン (Noonan) 症候群、LEOPARD症候群、Costello症候群、Cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群が含まれ
る。すべて常染色体優性遺伝形質を示す疾患で、現在わかっている原因遺伝子はすべてRas-Raf-ERK経路
の分子 (SOS, SHP2, Ras, B-Raf, MEKなどの機能獲得型変異) もしくはその負の制御因子 (neurofibromin
(NF1))である。今回Spred1の変異がNF1様疾患で見つかったことでSpred1がRas-Raf-ERK経路の負の制御因
子であることが改めて確認された。

Spred欠損マウスの表現型が多彩である。Spred1ホモ欠損マウスでは顔面の変形、低成長、メラニン色
素の異常蓄積、学習障害などが認められ、ヒトでのSPRED1変異による症状をよく再現している。さらにわ
れわれはSpred1ホモ欠損マウスの学習能力が低いことを報告している(11)。またNF1ヘテロ欠損マウスや
変異SHP2ノックインマウスと同様にSpred1ホモ欠損マウスは骨髄増殖性疾患を呈する。実際に骨髄移植を
行くと、Spred1変異マウス由来の骨髄幹細胞のほうが野生型よりもより生着しやすく骨髄再建能も高かつ
た (未発表データ)。この結果はSpred1の造血幹細胞において何らかの負の制御にかかわるものであるこ
とを示唆している。またSprouty/Spredファミリー遺伝子はいくつかの癌で発現の低下が報告されつつあ
る(12)が、癌でのこれらの遺伝子の変異は未だ報告されていない。今回SPRED1に機能欠失のミスセンス変
異が見つかったことで、癌や他の遺伝性疾患においてもSprouty/Spredファミリー遺伝子の変異が見つか
る可能性は高いと思われる。

しかし何故 10 例中 7 例のミスセンス変異では ERK 活性の抑制効果に影響がないのか、その原因は不
明である。NCFC 症候群の原因は胎児期のある時期に適性に ERK 活性が制御されなかったために起こると
考えられている。よって生化学的なアッセイで検出されない程度の活性変化も形態形成や神経分化に影
響を与える可能性がある。今後ノックインマウスなどの作成によってこの点を明らかにしたい。

5. 発表論文、参考文献

1: Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling.

Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S,
Baron R, Yoshimura A.
Nature. 2001 Aug 9;412(6847):647-51.

2: Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness.

Inoue H, Kato R, Fukuyama S, Nonami A, Taniguchi K, Matsumoto K, Nakano T, Tsuda M,
Matsumura M, Kubo M, Ishikawa F, Moon BG, Takatsu K, Nakanishi Y, Yoshimura A.
J Exp Med. 2005 Jan 3;201(1):73-82.

3: Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells.

Nonami A, Kato R, Taniguchi K, Yoshiga D, Taketomi T, Fukuyama S, Harada M, Sasaki A,
Yoshimura A.
J Biol Chem. 2004 Dec 10;279(50):52543-51.

4: Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia.

Taketomi T, Yoshiga D, Taniguchi K, Kobayashi T, Nonami A, Kato R, Sasaki M, Sasaki A,
Ishibashi H, Moriyama M, Nakamura K, Nishimura J, Yoshimura A.
Nat Neurosci. 2005 Jul;8(7):855-7.

5: Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling.

Taniguchi K, Ayada T, Ichiyama K, Kohno R, Yonemitsu Y, Minami Y, Kikuchi A, Maehara Y, Yoshimura A.

Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 26;352(4):896-902.

6: Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation.

Nobuhisa I, Kato R, Inoue H, Takizawa M, Okita K, Yoshimura A, Taga T.

J Exp Med. 2004 Mar 1;199(5):737-42.

7: Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling.

Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, Kato R, Ichiyama K, Morisada T, Oike Y, Yonemitsu Y, Maehara Y, Yoshimura A.

Mol Cell Biol. 2007 Jun;27(12):4541-50.

8: Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype.

Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L, De Schepper S, Fryns JP, Cools J, Marynen P, Thomas G, Yoshimura A, Legius E.

Nat Genet. 2007 Sep;39(9):1120-6.

9. Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1-like syndrome.

Messiaen L, Yao S, Brems H, Callens T, Sathienkijkanchai A, Denayer E, Spencer E, Arn P, Babovic-Vuksanovic D, Bay C, Bobele G, Cohen BH, Escobar L, Eunpu D, Grebe T, Greenstein R, Hachen R, Irons M, Kronn D, Lemire E, Leppig K, Lim C, McDonald M, Narayanan V, Pearn A, Pedersen R, Powell B, Shapiro LR, Skidmore D, Tegay D, Thiese H, Zackai EH, Vijzelaar R, Taniguchi K, Ayada T, Okamoto F, Yoshimura A, Parret A, Korf B, Legius E.

JAMA. 2009 Nov 18;302(19):2111-8.

10. The Sprouty-related protein, Spred-1, localizes in a lipid raft/caveola and inhibits ERK activation in collaboration with caveolin-1.

Nonami A, Taketomi T, Kimura A, Saeki K, Takaki H, Sanada T, Taniguchi K, Harada M, Kato R, Yoshimura A.

Genes Cells. 2005 Sep;10(9):887-95.

PMID: 16115197 [PubMed - indexed for MEDLINE]

11. Spred1 is required for synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning.

Denayer E, Ahmed T, Brems H, Van Woerden G, Borgesius NZ, Callaerts-Vegh Z, Yoshimura A, Hartmann D, Elgersma Y, D'Hooge R, Legius E, Balschun D.

J Neurosci. 2008 Dec 31;28(53):14443-9.

12: Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors.

Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, Koga H, Nakamura K, Tokunaga Y, Hanada S, Kumemura H, Maeyama M, Harada M, Ogata H, Yano H, Kojiro M, Ueno T, Yoshimura A, Sata M.

Oncogene. 2006 Oct 5;25(45):6056-66.