

ラット上皮成長因子(EGF)受容体に関する研究  
 —RACE法によるEGF受容体3'末端cDNAのクローニング—

鳥取大学医学部生体情報学教室 (主任 西連寺 剛教授)

佐藤幸夫・大前美加・一井昭五

Studies on rat epidermal growth factor (EGF) receptor: Rapid amplification and cloning of cDNA ends corresponding to 3' termini of full-length EGF receptor mRNAs.

Yukio SATOH, Mika OOMAE, Shogo ICHII

*Department of Biosignaling, School of Life Science, Faculty of Medicine,  
 Tottori University, Yonago 683, Japan*

**ABSTRACT**

AH66 ascites hepatoma cells contain 9.9, 7.5 and 5.4 kilobase (kb) epidermal growth factor (EGF) receptor mRNAs which code for full-length form of rat EGF receptor. cDNA corresponding to 3' termini of these mRNAs was cloned by rapid amplification of cDNA ends. Deduced amino acid sequence of cDNA contained transmembrane and tyrosine kinase domains and carboxy terminal autophosphorylation sites that were very similar to those of human EGF receptor. (Accepted on May 9, 1996)

**Key Words :** rat hepatoma cells, EGF receptor, EGF receptor mRNA, cDNA cloning, tyrosine kinase

はじめに

上皮成長因子(EGF)によるその受容体(EGFR)の刺激は標的細胞の増殖を導く種々の生理学的細胞応答を引き起こす。早期の応答としては、蛋白のチロシン残基のリン酸化、輸送系の活発化、そして或る種の細胞においてはホスホイノシタイドの代謝昂進があげられ、これに続いて数時間後に特異的な蛋白とRNAの合成が起こり、

また、その後12~18時間にDNA合成が誘起され、細胞が成長または増殖する<sup>3,19,21</sup>。しかし、EGFがDNA合成と細胞増殖を誘起する機構は未だ十分には解明されていない。

EGFRのcDNAは、初めヒトの細胞より単離された<sup>11,12,18,20</sup>。そのサイズは、5.5 kbでその中に3.8 kbのコード領域が含まれ、その塩基配列から推定されたアミノ酸配列より、①N末のシグナルペプチド、②細胞外のリガンド結合ドメイン、

③膜貫通ドメイン, ④細胞内のチロシンキナーゼドメイン, ⑤リン酸化されるチロシン残基を含むC末端の部分の計5つの機能領域の存在が推定された。さらに, 2.7 kbのcDNAも単離された。この短いcDNAは細胞外リガンド結合ドメインのみをコードしている。その蛋白産物は分泌され, 生理的なレセプターとしての作用はないと考えられ, truncated EGFRと呼ばれている (図1a-b)。ラットにおいてもヒトと同様なtruncated EGFRをコードする2.3 kbのcDNAが単離された<sup>13)</sup>。ラットの全長型EGFRについても, ラットの肝臓より2.2 kbと0.7 kbのcDNAが単離された。2.2 kbのcDNAは, EGFRの細胞外ドメインの全てと膜貫通ドメインの一部をコードしている。それはtruncated EGFRと比較すると膜貫通ドメインの直前から異なった配列をしている。0.7 kbのcDNAはチロシンキナーゼドメインをコードするらしいがその配列は明らかでない。ラットの全長型EGFRのチロシンキナーゼドメインをコードする3'側のC末領域 (上記⑤) からポリAまでの配列に関しては全く報告されていない (図1c)。本研究は, ラットEGFRの未知C末端部分のアミノ酸配列を明らかにすることを目的とし, 既知のリガンド結合ドメインの3'末端付近の配列をプライマーとしてRACE法<sup>5)</sup>を用いて, ラットの全長型cDNAの3'末端のクローニングを試みた。

### 材料および方法

#### 1. 細胞株と培養方法

AH66細胞 (細胞バンク; JCRB041, AH66tc。ドンリュウラットのヨシダ腹水癌に由来細胞<sup>9)</sup>, 鳥取大学生命科学科分子生物学教室の佐藤建三教授から供与) は, 10%新生仔牛血清 (フィルトロン) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (ニッスイ) 中で, 5%のCO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃で培養した。

#### 2. ラット

雄の成熟ウィスターラットを用いた。肝臓は, 門脈からの氷冷生理食塩水の灌流により血液を除去し, 取り出して結合組織を除去した後, 直ちに液体窒素で凍らせ, 使用するまで-80℃で保存した。

#### 3. RNAの分離

RNAは, 酸性チオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム法<sup>4, 14)</sup>で, AH66細胞あるいはラット肝から単離した。

#### 4. ノーザンプロット解析

RNA (20μg) は, 変性 (50% ホルムアミド/2 Mホルムアルデヒド, 65℃, 5分) させ, 2Mホルムアルデヒドを加えた1%アガロースゲルで電気泳動した<sup>10)</sup>。ナイロンメンブレンフィルター (ハイボンドN+, アマシャム) にRNAをプロットし固定した<sup>15)</sup>。EGFRのmRNAを検出するプローブのcDNA (図1d, EGFR probe) は, Dr. Earp HS (University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) より供与されたClone 4.2 DNAの2.2 kb EcoRI断片で, ラットEGFRの細胞外ドメインを全てコードしている<sup>13)</sup>。DNA プローブは, ランダムプライマーラベリングキット (宝酒造) を用いて1.85 MBqの $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (比活性111 TBq/mmol, ICN) で標識した。フィルターは, 10%ポリエチレングリコール<sup>2)</sup>を含む42℃の溶液中で標識プローブとハイブリダイゼーション<sup>17)</sup>の後, 50℃の0.1XSSC/0.1% SDSで洗い<sup>17)</sup>, 増感紙を用いて-80℃でX線フィルムに露光させた。mRNAサイズマーカーとして0.24-9.49 kb Ladder (GIBCO BRL) を用いた。フィルターは, 95℃の0.1% SDSによりプローブを剝し, 別のプローブとのハイブリダイゼーションに用いた。

#### 5. サザンプロット解析

DNAは, 1%アガロースゲルで電気泳動の後, ナイロンメンブレンフィルターにプロットし固定した<sup>15)</sup>。EGFRのチロシンキナーゼドメインのcDNAを検出するプローブ (図1d, ヒトTK probe) cDNAは, Dr. Merlino GT (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA) より供与されたpE7の0.72 kb EcoRI断片で, これはヒトEGFRのチロシンキナーゼドメインをコードしている<sup>12)</sup>。プローブの標識とハイブリダイゼーションは, ノーザンプロット解析と同じ方法で行なった。DNAのサイズは,  $\lambda$ DNAのHindIII断片を用いて決定した。

#### 6. RACE法

RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法<sup>5)</sup>は, 3'RACE System (GIBCO BRL) を用いた。AH66細胞のRNA (1μg) からプライマーP [5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)<sub>17</sub>V-3'] を用いて一本鎖cDNAを合成した。アンチセンスプライマーI (プライマーPに特異的) とセンスプライマーQ (図1e, ラットEGFR<sup>13)</sup>の塩基配列2021-2042に対応) を用いてTaKaRa Ex Taq DNAポ

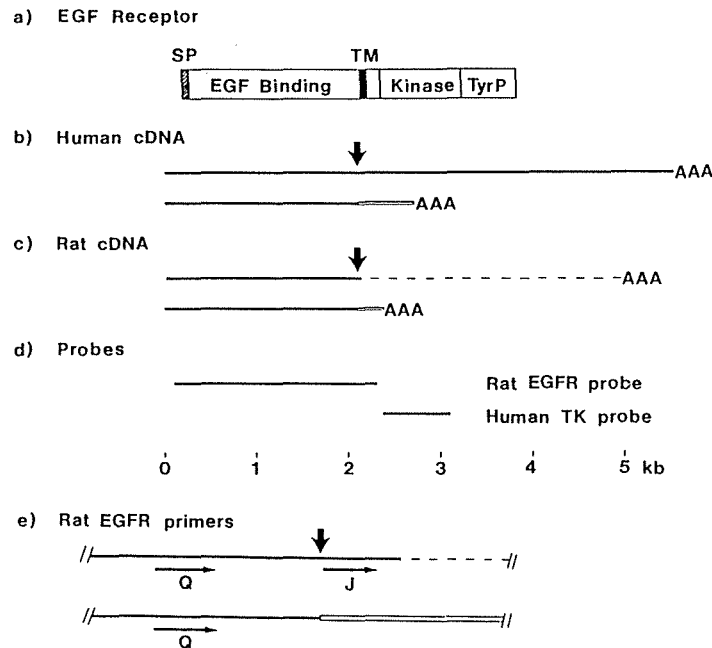


図1 EGFR cDNAの模式図。(a)全長型ヒトEGFRタンパク。SP;シグナルペプチド。EGF Binding;EGF結合ドメイン。TM;膜貫通ドメイン。Kinase;チロシンキナーゼドメイン。TyrP;C末端の自己リン酸化領域。(b)ヒトEGFR cDNA。EGFRタンパクに対応させて示す。黒線;全長型EGFRのcDNA。矢印;全長型EGFRとtruncated EGFRの配列の分岐点。白線;全長型EGFRと異なるtruncated EGFR配列。AAA;ポリAテール。(c)ラットEGFR cDNA。点線;全長型EGFRのcDNAの未知の配列(長さも未知)。白線;全長型EGFRと異なるtruncated EGFR配列(ヒト配列と異なる)。(d)本研究に用いたcDNAプローブ。TK;チロシンキナーゼ。(e)ラットEGFR cDNAの増幅に用いたセンスプライマーQとJの位置。図1cの一部を拡大して示す。Qは全長型EGFRとtruncated EGFRに共通。Jは全長型EGFRに特異的。

リメレースにより第一段階の増幅を行なった。プライマーIと内側のプライマーJ(図1e, ラットEGFR塩基配列2076-2095に対応)を用いて第二段階の増幅を行なった。

#### 7. cDNAクローニングとコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニング

増幅産物は、プラスミドベクターpBluescript II SK+ (Stratagene)に連結し、大腸菌JM109の形質転換<sup>7)</sup>に用いた。形質転換体のクローンは、LB/Amp/IPTG/X-Galプレート<sup>15)</sup>上の白いコロニーとして同定した。コロニーの一部をナイロンメンブレンフィルターに移し、コロニーのDNAを変性しフィルターに固定した。フィルターは、サザンブロット解析と同じ手法で、<sup>32</sup>P標識TK probeとのハイブリダイゼーションを行なった。EGFR cDNAを含むクローンを同定し、それらのプラスミドDNAを調製<sup>15)</sup>した。

#### 8. 塩基配列決定

クローン化したEGFR cDNAを含む約2.4 kbのBstXI-KpnIないしSalI断片をHaeIIIないしAluI消化により断片化し、プラスミドベクターに連結して大腸菌を形質転換してcDNA断片を含むクローンを単離し、各クローンのプラスミドDNAを調製した<sup>1)</sup>。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP用BcaBESTジデオキシシークエンシングキット(宝酒造)またはAL-Fred DNAシークエンサー用Cy5オートリードシークエンシングキット(ファルマシア)を用いて、各クローンのプラスミドDNAの塩基配列を決定した。これらの配列をつなぎ合わせて元のcDNAの塩基配列を決定した。

#### 結 果

##### 1. AH66細胞の4種のEGFR mRNA

AH66細胞のRNAからのEGFR mRNAをノーザ

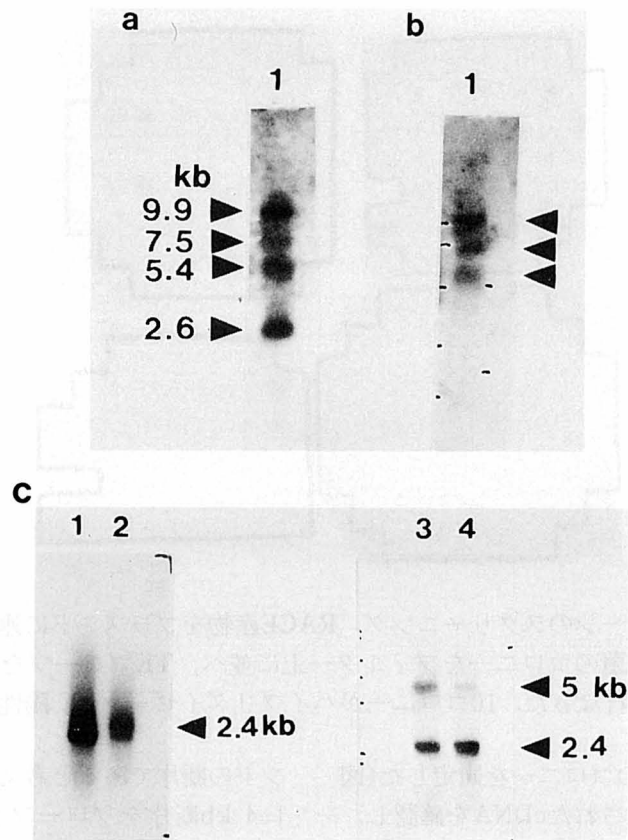


図2 AH66細胞からのEGFR mRNAとEGFR cDNAの増幅. (a)EGFR mRNAの発現. AH66細胞のRNA (20 $\mu$ g)をEGFR cDNAプローブを用いてノーザンブロット解析した. mRNAのサイズ (kb)を左に示す. (b)aのフィルターよりプローブを剥し, 1.4 kbのDNA断片 (図4cに後述)をプローブとして検出した. (c)増幅したEGFR cDNAの検出. PCR増幅産物をTKプローブを用いてサザンブロット解析した. レーン1と2;第一段階RACEの産物. レーン3と4;第二段階RACEの産物. サイズ (kb)を右に示す.

ンブロット解析により検討した (図2a). ラットEGFRの細胞外ドメインをコードするcDNAプローブを用いて4つのバンドが検出された. そのサイズは9.9, 7.5, 5.4, 2.6 kbであった. これらのサイズは, ラット肝のEGFR mRNAのサイズ<sup>6,8,13,16</sup>と一致していた. 従って, AH66細胞は, ラット肝と同様な全長型EGFRのmRNA (9.9, 7.5, 5.4 kb)とtruncated EGFRのmRNA (2.6 kb)を発現しており, cDNAクローニングの材料とした.

## 2. RACE法によるmRNAのポリA末端と内部のEGFR配列を用いたPCR増幅

検出された2.6 kbのmRNAは, truncated EGFRのmRNAである (図1c). 全長型EGFRの3'側の未知の部分のcDNAをクローニングする目的で3'

RACE法を行なった (方法参照). AH66細胞のRNAより一本鎖cDNAを合成し, 二段階のPCR増幅を行なった. 増幅産物中にEGFR cDNAを検出するためにサザンブロット解析を行なった. 第一段階と第二段階のPCR増幅産物中にそれぞれ約2~3 kb (図2c, レーン1-2) と約5 kb付近と2.4 kbのサイズをもつバンド (図2c, レーン3-4)が検出された. 従って, 目的とする全長型EGFRのチロシンキナーゼドメインをコードするcDNAが増幅されたものと推定された.

## 3. cDNAのクローン化

検出したcDNAをプラスミドベクターに連結し, 大腸菌を形質転換した. 203個の形質転換大腸菌コロニーより目的とするEGFR cDNAを検出するために, コロニーハイブリダイゼーションを行

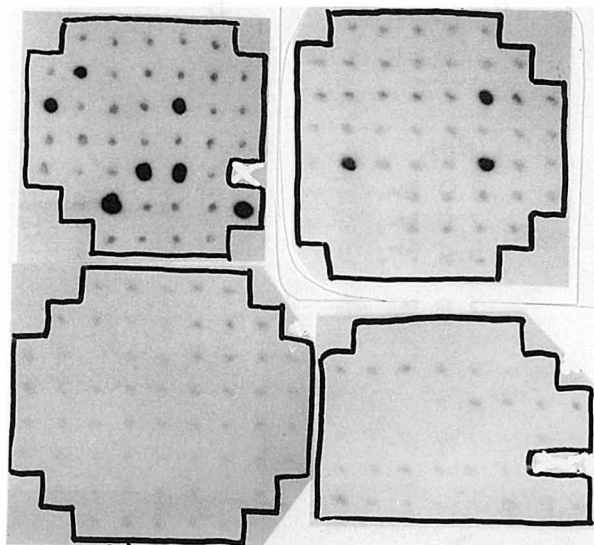


図3 EGFR cDNAクローンのスクリーニング. RACE産物をプラスミドに連結し, 大腸菌を形質転換し, 形質転換した菌のコロニーをフィルター上に並べ, TKプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行なった. 10コロニーがハイブリダイゼーション陽性を示した.

なった. 陽性を示す10個のコロニーを同定した(図3). これらのクローン化されたcDNAを確認し, そのサイズを知るために, 陽性クローンのプラスミドを調製し, 制限酵素 (SalI, SacI) で二重消化し電気泳動した(図4a). 大部分のクローンについて, 1.4 kbと1.0 kbの二本のバンドが検出された. ただし, クローン7および90は, 1.4 kbより少し短いサイズのバンドを示した. またクローン35は, おそらく不完全消化によると思われる2.4 kbのうすいバンドも見られた. 以上のことから, このクローン化されたcDNAは2.4 kbの長さを有し, SalIないしSacIによって切られて1.4 kbと1.0 kbの断片を生じるものと考えられた. それを確認するためにTKプローブを用いてサザンブロット解析を行なった(図4b). 1.0 kbと2.4 kbのバンドにはチロシンキナーゼの配列が含まれることが確認された. 1.0 kbバンドは全てのクローンにおいて観察された. 2.4 kbのバンドは大部分のクローンにおいて観察された. しかし, クローン7と90においては2.4 kbより少し短いサイズのバンドが観察され, クローン17においては1.0 kb以外のバンドは全く観察されなかった. 1.4 kbバンド(図4a)には, いずれのクローンでも, チロシンキナーゼの配列が全く検出されなかった(図4b). 1.4 kbバンドは2.4 kbバ

ンドの断片であると考えられたので, 確認のため, 1.4 kb断片をプローブとしたサザンブロット解析を行なった(図4c). その結果, 大部分のクローンについて, 1.4 kbと2.4 kbのバンドが, プローブとした1.4 kb DNAの配列を有することが確認された. クローン7と90では, 1.4 kbと2.4 kbより少し短いサイズのバンドが検出された. クローン17では, 1.4 kbや2.4 kbのバンドは観察されず, かわりに0.4 kbと1.0 kbの強いバンドと2.0 kbの弱いバンドが観察された. これらの結果より, クローン化したcDNAは, 大部分が約2.4 kbのサイズであり, SalI/SacI消化により1.0 kbと1.4 kbの断片を生じるものと結論された. ただし, クローン7と90では, 2.4 kbより少し短いサイズであり, 1.0 kbと1.4 kbより少し短い消化産物を生じた. クローン17では, 2.4 kbのサイズであるが, 消化により二本の1.0 kb断片と一本の0.4 kb断片を生じた. いずれのクローンも一本の1.0 kb断片はチロシンキナーゼドメインに対応していた.

#### 4. 1.4 kb断片をプローブに用いたノーザン解析による全長型EGFR mRNAの検出

我々がクローン化した, 2.4 kbのcDNAが, 本来にラットEGFRのmRNAより由来したものであることを確認するために, 図2aのフィルターを,

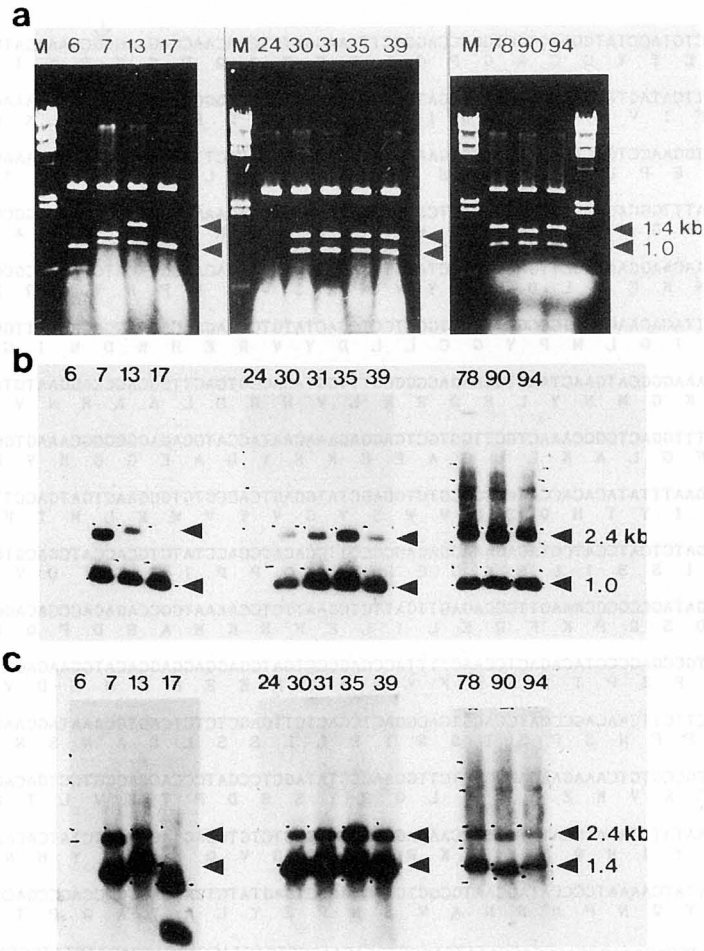


図4 陽性クローンのプラスミドDNAの解析。(a)制限消化後の電気泳動像。プラスミドDNAをSalI/SacI消化後、1%アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロミドで染色した。M; $\lambda$ /HindIII。レーンの上の数字;クローンの名。クローン6と24;陰性クローン。DNAのサイズ(kb)は右に示す。2.9 kbバンドはベクターである。(b)チロシンキナーゼ配列の検出。aのサンプルを解析した。TKプローブを用いた。(c)1.4 kbのDNA断片をプローブとするサザンブロット。aのクローン30の1.4 kb DNA断片を回収してプローブとし、bのフィルターを解析した。

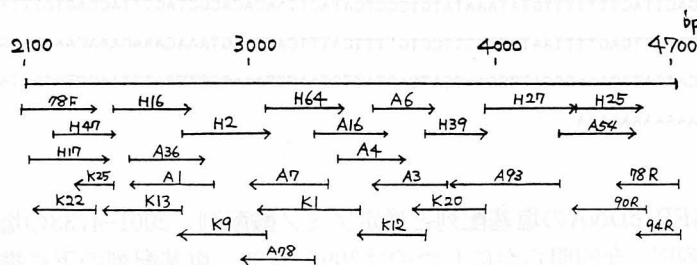


図5 塩基配列決定の概略。上の線;ラットEGFR cDNA(決定した2096-4733の2638 bp)。H;HaeIII/SalI断片。A;AluI/SalI断片。K;KpnI/HaeIII断片。数字;断片のクローンの名。矢印;配列決定した方向と長さ。

CTGCCACCTCTGCCATGCAAACGTACCTATGGATGTGCTGGGCCAGGCCTTAAAGGATGTCAACAACCAGAAGGGCCAAAGATCCCATCCATCGCCACT	2100
C H L C H A N C T Y G C A G P G L K G C Q Q P E G P K I P S I A T	
GGGATTGTGGGTGGCCCTCCTCTTCATAGTAGTGGTGGCCCTTGGGATCGGCCTTTCATGCGAAGGCGTCACATTGTCCGAAAACGTACACTACGGCGCC	2200
G I V G G L L F I V V V A L G I G L F M R R R H I V R K R T L R R L	
TGCTTCAAGAGAGAGCTCGTGGAACTCTCACACCAGCGGAGAAGCTCGGAACCAAGCCCACTTGAGGATATTAAGGAAACAGAAATCAAAAAGAT	2300
L Q E R E L V E P L T P S G E A P N Q A H L R I L K E T E F K K I	
CAAAGTCTGGGTTCCAGGAGCATTGGCACAGTGATAAGGGTCTGGATCCAGAAAGCGAGAAAGTGAAAATCCCTGTGGCCATCAAGGAGTTAAGA	2400
K V L G S G A F G T V Y K G L W I P E G E K V K I P V A I K E L R	
GAAGCCACATCTCCAAAGCCAACAAGGAAATCCTTGTATGAAGCCTACGTGATGGCCAGTGGGACACCCCTCATGTATGCCGCTCTGGGCATCTGTG	2500
E A T S P K A N K E I L D E A Y V M A S V D N P H V C R L L G I C L	
TGACCTCCACTGTCCAGCTATTACACAACCTATGCCCTATGGTGGCTCTGGACTATGTCGAGAAACATAAGGACAACATGGCTCCAGTACCTACT	2600
T S T V Q L I T Q L M P Y G C L L D Y V R E H K D N I G S Y A C L L	
CAACTGGTGTGTGCAGATTGCAAAGGCGATGAACCTACCTGGAAAGACCGCGTTGGYACCCGTGACTTGGCAGCCAGGAATGTACTGGTAAGACACCA	2700
N W C V Q I A K G M N Y L E D R R L V H R D L A A R N V L V K T P	
CAGCATGTCAAGATCAGAGATTTGGACTGGCCAAACTGCTTGGTGTGAGGAGAAAGAATACCATGCAGAGGGGGCAAAGTGCCTATCAAGTGGATGG	2800
Q H V K I T D F G L A K L L G A E E K E Y H A E G G K V P I K W M A	
CTTTGGAATCAATTTTACACCGAATTTATACACACCAAGCGAGCTGAGGATGAGTACCCGTGGGAACTGATGACCTTTGGTCCAAGCCTTA	2900
L E S I L H R I Y T H Q S D V W S Y G V T V W E L M T F G S K P Y	
TGATGGGATCCCTGCAAGTGAATCTCATCCATCCTAGAGAAAGGAGAGCGCCTTCCACAGCCACCTATCTGCACCATCGAGCTCATATGATCATGGTC	3000
D G I P A S E I S S I L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V	
AAGTGTGGATGATAGTGTGATAGCCGCCAAAGTCCGAGAGTTGATCTCGAAATCTCCAAAATGGCCAGAGACCCACAGCGCTACCTTGTATCC	3100
K C W M I D A D S R P K F R E L I L E F S K M A R D P Q R Y L V I Q	
AGGGGGATGAAAGGATGCATTTCGGAGCCCTACAGACTCCAACCTTTTACCGAGCCCTGATGGAGGAGGAGACATGGAAGACGTAGTTGATGCTGATGA	3200
G D E R M H L P S P T D S N F Y R A L M E E E D M E D V V D A D E	
ATACCTCATCCCACAGCAAGGCTTCTTCAACAGCCCATCCACGTACGGACTCCACTCTTGAGCTCTCTGAGTGCAAAATAGCAACAGTTCCACTGTGGCT	3300
Y L I P Q Q G F F N S P S T S R T P L L S S L S A N S N S S T V A	
TGCATTAATAGAAAATGGGAGCTGCCGTGTCAAAGAAGACGCCTTCTTGCAACGGTATAGTCCGATCCCACCAGCGTCCCTGACAGAGGACAACATAGATG	3400
C I N R N G S C R V K E D A F L Q R Y S S D P T S V L T E D N I D D	
ACACATTCCTCCCGTGCCTGAATATATAAACCAATCTGTTCCCAAGAGGCGCGTGGCTCTGTGCAGAACCAGTCTATCACAATCAGCCCCTGCATCC	3500
T F P P V P E Y I N Q S V P K R P A G S V Q N P V Y H N Q P L H P	
AGCTCTGGAAGAGACCTGCATTATCAAAAATCCCATAGCAATGCGGTGAGCAACCCCTGAGTATCTCAACACTGCCAGCCAGCTGCCTCAGTAGTGGG	3600
A P G R D L H Y Q N P H S N A V S N P E Y L N T A Q P T C L S S G	
TTTGACAGCTCTGCCCTCTGGATCCAGAAAGGACGCCACCAATGAGCCTGGACAACCCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCCAAAGAAGCCAAGCCGA	3700
F D S S A L W I Q K G S H Q M S L D N P D Y Q Q D F F P K E A K P N	
ATGGCATCTTTAAGGGCCCCACAGCTGAAAAATGACAGTACCTGGGGTGGCACCCGCAAGCAGTGAATTTATGGAGCATGACATTGAAGAGGCATTGT	3800
G I F K G P T A E N A E Y L R V A P P S S E F I G A	
ACCAGCTACAAAACCGGACTTCCAGAAAGCCAGGACCAAGCCATGGCAGCACCTCTGCTCTGACAGCCATGTCCACATTTGTCAAAATGTCAAAACCTC	3900
AGACTGGCTTTAAGCATAAATCTGACGGGCTTTGTCACTGAGCCAAGAAGTGGGCCCTCCCTGTATGCTCTTTGGGAAGTTGAAGGTATATCTATTGGT	4000
CTTCAACTGTGAAGATCCACTGAAAGGTATCCATCGAGAACATTTGCTTTTGAACAGAAGTTGCCGTATGGTGAGGTACATAGGGGAAAAAAA	4100
ACAGACCTATGGCGCTTGCTGCATAGGAACTCTGGGATCTTGTCTTTATTGATTTCATGCACTCTTCCATAAAGGAAGAAGCTTCCCGTAGCG	4200
TGTATTACACAGAGTTGCCTGGAGCCAACCTGACCAGACAGTTGGTCTAGCAGCTCTGCATCAAGACACTTCCATGGCAAGATAACTACATGCACAAGAA	4300
GTCTGGATGTGCTCAGCAGGCCACACTTGTACAGCATTAAACCATGGCAGGTACAATTGGATAAGCCACTTTGTTACTTACTGGGACTGGGAGAAGAA	4400
GACTGGGTAGAATTTCCCTCAGACTTACTTTTTTTGTATAAATATGTCCTGATACTTAACACACGCTAGTTTACCAGTGTTTTCTGACTATTAGACTA	4500
CCTTTTATGTTTTCTGTTTCAATGTTTTGAGTTTTAATATGCTTTCTGTTTTTCATTTTCATGAAGTAAACAAACAAACAAAGCAAAAAA	4600
AGTATTATTATCAAAGAACAACCATGATTCAAACCCATTGCAACCATCAGTATTGTAACCCAAAGCCTTTATCTAAGCTGGAGTAACCATGCAAAAATTC	4700
CTAGAAGAAATTTAACCCAAAAA	4733

図6 全長型ラットEGFR cDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列。2001-4733の塩基配列を示す。2103までは既知の配列<sup>13)</sup>。今回明らかにしたのは2096-4733。塩基配列の下に推定されるアミノ酸配列を示す。下向きの矢印;truncated EGFRと異なる配列が始まる点。





### 推定アミノ酸配列

クローン化した2.4 kbのEGFR cDNAを、制限消化により断片化し、断片をプラスミドベクターによりクローン化した。各クローンのプラスミドDNAの塩基配列を決定し、これらの配列をつなぎ合わせてEGFR cDNAクローンの塩基配列を決定した(図5)。今回明らかにした配列(2096-4733)は、既知の配列(1-2103)<sup>13)</sup>にin-frameで接続する2630 bp長の新しい配列を含んでいた(図6)。それは559残基(651I-1209A)のアミノ酸配列をコードしており、膜貫通ドメインの一部、チロシンキナーゼドメイン、および6個のチロシリン酸化部位を含むC末領域であった(図7)。この配列を全長型ヒトEGFRのそれ<sup>18)</sup>と比較すると、ラットEGFRに2アミノ酸(1056-1057)のギャップが見いだされ、94.1%のアミノ酸配列が一致した。この配列をコードする塩基配列(2104-3783)は、ヒトと比べ、上記2アミノ酸ギャップに対応する6 bpのギャップが見いだされ、86.0%の一致を示した。一方、3'非翻訳領域の塩基配列(3784-4733)は、ヒトと比べ59.8%の一致しか示さなかった。合わせて2104-4733の配列はヒトと比べ76.3%が一致していた。これらの結果より、我々はラットEGFRの細胞内のドメインの全てをコードするcDNAクローンを単離出来たと考える。

### 考 察

我々の研究の目的は、ラットのEGFRの未知のC末端のアミノ酸配列を明らかにすることであった。そのアプローチとして、3'RACE法を用い、目的のcDNAを増幅した。クローン化したcDNAは、2.4 kbのサイズであり、制限酵素消化によって1.0 kbと1.4 kbの断片に分けられた。1.0 kbの断片は、チロシンキナーゼに特異的なcDNAプローブとハイブリダイズしたので、チロシンキナーゼ特異的cDNA配列を含むものと思われる。1.4 kb断片は、全長型EGFRの3つのサイズのmRNA(10, 7.5, 5.4 kb)を検出したのでこれらの全長型EGFRのmRNAに共通な3'末端の配列を含むものと考えられる。今回明らかにしたcDNAの配列は2630 bpであり、推定アミノ酸配列は全長型ヒトEGFRの膜貫通ドメインよりC末端部分までの配列とよく似ている。ラットEGFRの既知の部分的アミノ酸配列<sup>13)</sup>と合わせると、ラット

EGFRの全長は1209アミノ酸残基となる。この全長型EGFRをコードするcDNAは長さが合計4.7 kbとなり、サイズ的に見て5.4 kbのmRNAにはほぼ完全に対応する可能性が考えられる。一方、9.9 kbと7.5 kbのmRNAは、この配列も含むものの他に未知の配列も含むものと思われる。

### 結 語

ラット腹水肝癌由来AH66細胞より全長型EGF受容体のmRNAに対応するcDNAの3'末端の約2.6 kbの部分RACE法により単離した。その塩基配列は、ヒトEGF受容体の膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼドメイン、C末自己リン酸化領域と類似したアミノ酸配列をコードしていた。

本論文の概要は、平成7年度生命科学科卒業研究として発表した。西連寺剛教授のご校閲に感謝いたします。

### 文 献

- 1) Akiyama H, Kawai S(1995) A strategy for one week sequencing. *Protein, Nucleic acid and Enzyme* 40, 173-178.
- 2) Amasino RM(1986) Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal Biochem* 152, 304-307.
- 3) Carpenter G, Cohen S(1990) Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 265, 7709-7712.
- 4) Chomczynski P, Sacchi N(1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- 5) Frohman MA, Dush MK, Martin GR(1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8998-9002.
- 6) Ichii S, Satoh Y, Hoshikawa Y, Yoshida A(1991) Re-investigation of ontogenesis of epidermal growth factor receptor mRNA in the liver of rats: Quantitative evaluation of Northern blot analysis. *Endocrinol Japon* 38, 511-516.
- 7) Inoue H, Nojima H, Okayama H(1990) High efficiency transformation of Es-

- cherichia coli with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- 8) Johnson AC, Garfield SH, Merlino GT, Pastan I(1988) Expression of epidermal growth factor receptor proto-oncogene mRNA in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 412-418.
  - 9) Katuta H, Takaoka T, Yasumoto S(1973) Toxic metabolites released from hepatoma cells in culture. I. effects of metabolites of hepatomas on various cells. *J Natl Cancer Inst* 51, 1841-1844.
  - 10) Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H(1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751.
  - 11) Lin CR, Chen WS, Krueger W, Stolarsky LS, Weber W, Evans RM, Verma IM, Gill GN, Rosenfeld MG(1984) Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells. *Science* 224, 843-848.
  - 12) Merlino GT, Ishii S, Whang-Peng J, Knutsen T, Xu YH, Clark AJL, Stratton RH, Wilson RK, Ma DP, Roe BA, Hunts JN, Shimizu N, Pastan I(1985) Structure and localization of genes encoding aberrant and normal epidermal growth factor receptor RNAs from A431 human carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 5, 1722-1734.
  - 13) Petch LA, Harris J, Raymond VW, Blasband A, Lee DC, Earp HS(1990) A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. *Mol Cell Biol* 10, 2973-2982.
  - 14) Puissant C, Houdebine LM(1990) An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* 8, 148-149.
  - 15) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T(1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
  - 16) Satoh Y, Hoshikawa Y, Ichii S(1990) Epidermal growth factor mRNA in livers from newborn, adult and partially hepatectomized rats. *Endocrinol Japon* 37, 430-435.
  - 17) Thomas PS(1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 5201-5205.
  - 18) Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield MD, Seeburg PH(1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.
  - 19) Ullrich A, Schlessinger J(1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 206, 203-212.
  - 20) Xu YH, Ishii S, Clark AJL, Sullivan M, Wilson RK, Ma DP, Roe BA, Merlino GT, Pastan I(1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells. *Nature* 309, 806-810.
  - 21) Yarden Y, Ullrich A(1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem* 57, 443-478.