

## ニワトリ胚網膜色素上皮に発現する線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子

—第1報 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法による検討—

藤原美樹

岡山大学医学部眼科学教室

## 要約

線維芽細胞増殖因子 (FGF) の網膜色素上皮に対する作用を解明する目的でニワトリ胚 7.5 日胚を用いて、網膜色素上皮に発現する FGF レセプター (FGFR) 遺伝子のサブタイプを reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検討した。ニワトリ胚網膜色素上皮から得られた RNA からチロシンキナーゼ領域の相補的 DNA (cDNA) を増幅し、塩基配列を決定したところ 3 つの異なったクローンを得た。1 クローンは cek 2 (FGFR 3), 1 クローンは cek 3 (FGFR 2) の cDNA の一部であった。他の 1 クローンは今までの報告にはない未知の遺伝子で、chick pigment epithelium derived FGFR (CPE-FGFR) と命名した。

CPE-FGFR は既知の FGFR 遺伝子とアミノ酸レベルで 70% 以上の相同性を有し、新しい FGFR であると考えた。ニワトリ胚 7.5 日胚網膜色素上皮には少なくとも 3 種類の FGFR 遺伝子が発現していた。網膜色素上皮において、FGF は複数のサブタイプの FGFR を介して作用していることが示唆された。(日眼会誌 98: 625-629, 1994)

キーワード: FGF レセプター, Reverse transcription polymerase chain reaction, 網膜色素上皮, ニワトリ胚

### Analysis of Fibroblast Growth Factor Receptor Genes Expressed in the Retinal Pigment Epithelium of Chick Embryos by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Miki Fujiwara

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

## Abstract

To characterize the mechanism by which retinal pigment epithelial cells (RPE) respond to fibroblast growth factors (FGFs), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on 7.5-day chick embryonic RPE. We amplified and cloned tyrosine kinase related sequences from chick embryonic RPE messenger RNA and characterized the partial complementary DNA (cDNA) by nucleic acid sequencing. Three different FGF receptor (FGFR) genes were found to be expressed in 7.5-day chick embryonic RPE; two of them were cek 2 (FGFR3) and cek 3 (FGFR2), and the third

one, named chick pigment epithelium derived FGFR (CPE-FGFR), has not been previously identified. The deduced amino acid sequence of CPE-FGFR is more than 70% identical with each previously characterized FGFR. It appears that the effect of FGFs on differentiation of RPE are mediated by several types of FGFRs. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 625-629, 1994)

Key words: FGF receptor, Reverse transcription polymerase chain reaction, Retinal pigment epithelium, Chick embryo

別刷請求先: 700 岡山県岡山市鹿田町 2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 藤原 美樹  
(平成5年12月21日受付, 平成6年3月2日改訂受理)

Reprint requests to: Miki Fujiwara, M.D. Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama-shi, Okayama-ken 700, Japan

(Received December 21, 1993 and accepted in revised form March 2, 1994)



## I 緒 言

線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor, FGF)は、血管新生、創傷治癒、腫瘍化、形態形成など生物の様々な側面に関わる重要な因子として知られている。眼科臨床領域でも、増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症において、FGFが増殖膜や新生血管周囲の間葉組織、線維芽細胞、網膜色素上皮由来の細胞に強く局在することが確かめられ、増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症の発症において、FGFの網膜色素上皮への関与が示唆されている<sup>1)2)</sup>。一方、ニワトリ胚では、培養網膜色素上皮がbasic FGF (bFGF)の存在下で、水晶体細胞や神経網膜へ分化転換することが知られている<sup>3)4)</sup>。

このように、眼においてFGFは網膜色素上皮に存在するFGFレセプター(FGFR)を介して眼内に増殖性変化を起こしたり、水晶体細胞や網膜細胞への分化転換を促していると考えられる。しかし、FGFRには4種類のサブタイプが存在し<sup>5)</sup>、各々のmessenger RNA (mRNA)の発現パターンや相違からサブタイプごとに異なる機能を有していることが推察されている<sup>6)</sup>。

そこで、著者はFGFの網膜色素上皮に対する作用をさらに解明するために、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて網膜色素上皮に存在するFGFR遺伝子のサブタイプを同定した。

## II 実験方法

### 1. RNAの抽出

実験材料にはニワトリ(white leghorn)ふ卵7.5日胚を使用した。

ニワトリ胚より摘出した20眼から、林<sup>7)</sup>の方法を用い0.02% EDTAで37°C 60分処理した後、実体顕微鏡下に網膜色素上皮を脈絡膜から剝離し採取した。常法により塩化セシウム密度勾配超遠心法によってRNAを抽出した<sup>8)</sup>。

対照実験として、ニワトリ胚頭部、ニワトリ胚体部から同様にRNAを抽出した。

### 2. RT-PCR法

各々1 $\mu$ gのRNAをoligo dT (Pharmacia社) 100ng, dNTPs各750 $\mu$ M, 逆転写酵素(BRL社)200単位、逆転写酵素緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 8.4), 175 mM KCl, 10 mM dithiothreitol (DTT), 3 mM MgCl<sub>2</sub>)を含む20 $\mu$ l反応液中で37°C 60分反応させ、相補的DNA(cDNA)を合成した。このうち、5 $\mu$ lをテンプレートとして5'-プライマーおよび3'-プライマー400 ng, dNTPs各200 $\mu$ M, Taq polymerase(Ampli Taq, Perkin Elmer Cetus社)1単位, PCR緩衝液(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% セラチン)を含む50 $\mu$ lの反応液を調整しPCR法を行った。PCR

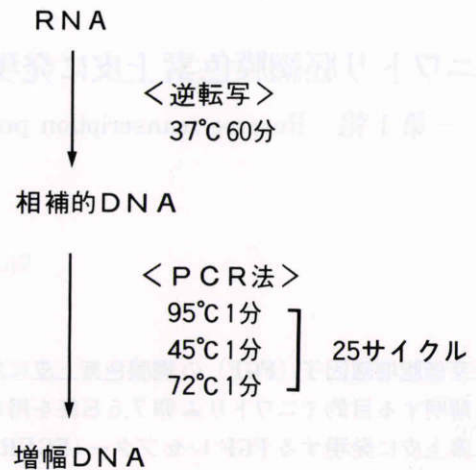


図1 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法。

法のプライマーとしては異なったサブタイプのFGFR cDNAを同時に増幅できるように、サブタイプ間で最も相同性の高いチロシンキナーゼ領域に設定した混合プライマー<sup>9)</sup>を用いた。RT-PCR法の反応条件を図1に示す。増幅にはDNA thermal cycler(Perkin Elmer Cetus社)を用いた。

### 3. 塩基配列の決定

増幅されたPCR産物419塩基対をT4 polynucleotide kinase(宝酒造)を用い、37°C 1時間反応させ5'末端をリン酸化し、T4 ligase(宝酒造)と4°Cで一晩反応させpGEM 7<sup>®</sup>(Promega社)ベクターのSma I部位に挿入した。Competent cell, XL 1-Blue(Stratagene社)に移入しいくつかのクローンをとりだし、dideoxy-chain termination法<sup>10)</sup>により塩基配列を決定した。

## III 結 果

ニワトリ胚網膜色素上皮、ニワトリ胚頭部、ニワトリ胚体部から得られたRNAすべてからRT-PCR法により419塩基対の目的の大きさのDNAバンドが検出された(図2)。

サブクローニングにより得られた5つのクローンの塩基配列を比較したところ、2クローンはcek 2 (FGFR 3)、1クローンはcek 3 (FGFR 2)のcDNAの一部であった。他の2クローンは互いに同一であったが、今までの報告にはない未知の新しいFGFRであった。このクローンをCPE-FGFR(chick pigment epithelium derived FGFR)と名付けた。CPE-FGFRのアミノ酸配列と既知のクローンとの比較を図3に示す。アミノ酸レベルでの比較でCPE-FGFRはcek 1<sup>11)</sup>(FGFR 1)と79.0%、cek 2<sup>12)</sup>(FGFR 3)と81.9%、cek 3<sup>12)</sup>(FGFR 2)と79.0%、ヒトFGFR 4<sup>13)</sup>と79.7%、イモリPFR 4<sup>14)</sup>と87.7%の相同性を認めた。



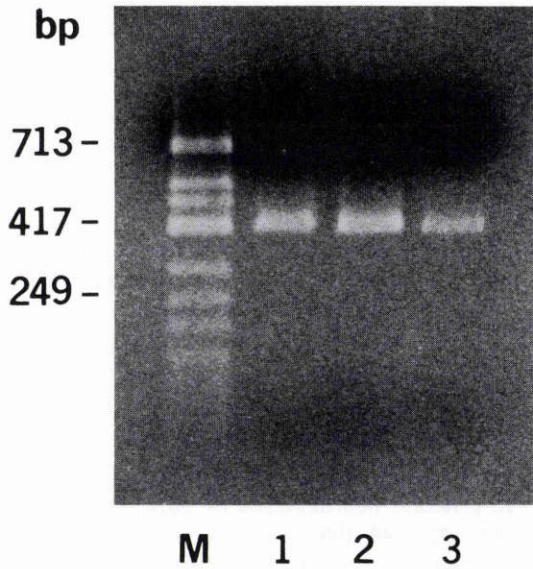


図 2 2.5%アガロースゲルによる電気泳動の写真。  
ニワトリ胚網膜色素上皮(レーン1), ニワトリ胚頭  
部(レーン2), ニワトリ胚体部(レーン3)から得  
られた RNA から RT-PCR 法により目的の大き  
さの cDNA が増幅されている。M: DNA マー  
カー, bp: 塩基対

#### IV 考 按

1. 網膜色素上皮に存在する FGFR のサブタイプにつ  
いて

現在までに FGF ファミリーは acidic FGF (aFGF), bFGF, INT 2, HST 1, FGF 5, HST 2, KGF, FGF 8, FGF 9 の 9 種<sup>15)~17)</sup>, FGFR は哺乳類では FGFR 1, FGFR 2, FGFR 3, FGFR 4 の 4 種<sup>5)</sup>, ニワトリでは cek 1 (FGFR 1), cek 2 (FGFR 3), cek 3 (FGFR 2) の 3 種<sup>11)12)</sup> がクローニングされている。各々の FGFR は、リガンドである FGF と 1 対 1 の対応ではなく、複数のリガンドと結合することが明らかとなっているが、種々のサブタイプ間の生理作用の違いは明らかではない。

Patstone ら<sup>18)</sup>は、ニワトリ胚において FGFR 遺伝子がサブタイプにより異なった部位に発現することから、細胞特異的に FGFR が発現している可能性について考察していた。しかし、著者の結果では、同一の細胞から成る網膜色素上皮に少なくとも 3 種以上の複数のサブタイプの FGFR 遺伝子が発現していた。したがって、組織によっては複数のサブタイプの FGFR が発現していることが考えられる。

bFGF は FGFR 1, FGFR 2 に高親和性をもって結合するとされている。大内<sup>9)19)</sup>は、in situ hybridization 法によって網膜色素上皮に FGFR 1 遺伝子が発現し、

CPE-FGFR	EMEVMLMDKHKNI★ INLLGVCTQDGPLYVIVEFAAKGNLR
cek1	· · · M · · M I G · · · · · A · · · · · Y · S · · · ·
cek2	· · · M · · M I G · · · · · A · · · · · L · Y · S · · · ·
cek3	· · · M · · M I G · · · · · A · · · · · Y · S · · · ·
FGFR4	· · · · · I G R · · · · · E · · · · · C · · · · ·
PFR4	· · · L · · · G · · · · · Y · S · · · ·
CPE-FGFR	EYLRARRLP—PDYTFDITELHEEQQLCFKDLVSCVYQVARG★
cek1	· · · Q · · · P · ME · CYNP · RIP · · · · S · · · · · A · · · · ·
cek2	· · · · · P · M · S · TCK · P · · · · T · · · · · A · · · · ·
cek3	· · · · · P · ME · S · NRVP · · MT · · · · · T · L · · ·
FGFR4	· F · · · · P · · LSP · GPRSS · GP · S · PV · · · · A · · · ·
PFR4	· · · · · P · · · · · M · KVP · · · · S · Q · · · · A · · · · ·
CPE-FGFR	MEY★LES★RRCI★HRDLRA—NV★LV★TAENVMK★I★AD★F★GLARDV★H★
cek1	· · · · A · KK · · · · · A · · · · · ED · · · · · I · H
cek2	· · · · A · QK · · · · · A · · · · · ED · · · · · N
cek3	· · · · A · QK · · · · · A · · · · · EN · · · · · I · NN
FGFR4	· Q · · · · K · · · · · A · · · · · ED · · · · · G · · H
PFR4	· A · · · · K · · · · · A · · · · · G · · · · · G · · ·
CPE-FGFR	I D Y Y K K T S N G R L P ★ V K ★ W M A P E ★
cek1	· · · · · T · · · · ·
cek2	· · · · · T · · · · ·
cek3	· · · · · T · · · · ·
FGFR4	· · · · ·
PFR4	· · · · ·

図 3 CPE-FGFR のアミノ酸配列と cek 1, cek 2, cek 3, FGFR 4, PFR 4 のアミノ酸配列との比較。  
丸: 介在アミノ酸配列, 黒星印: チロシンキナーゼ領域で保存されるアミノ酸, 黒三角: リン酸化部位



FGFR 2 遺伝子は発現していないことを報告し, bFGF の網膜色素上皮への作用は FGFR 1 を介すると述べているが, 著者の結果では FGFR 2 (cek 3) も網膜色素上皮に発現していた。したがって, bFGF は FGFR 2 も介して網膜色素上皮に作用していると考えられる。このような結果の違いは, PCR 法が *in situ* hybridization 法より微量の遺伝子を検出できるため, 発現量の少ないサブタイプの遺伝子を検出できたものと考えられる。大内<sup>9)</sup>が 5.5 日胚以前の早期胚を使用しているのに対し, 著者は 7.5 日胚を使用しており, 発生段階においてサブタイプの発現量に変化が生じてくるのかも知れない。また, 今回用いた方法で採取される網膜色素上皮の純度は 99.9% といわれているが<sup>7)</sup>, 脈絡膜組織が混入している可能性は完全には否定できない。一方, 今回の結果では FGFR 1 (cek 1) 遺伝子は検出されなかった。しかし, 得られたクローンが 5 つのみであるので, 網膜色素上皮における FGFR 1 (cek 1) 遺伝子の発現については, この結果のみでは結論できない。今後, FGFR 1 (cek 1) に特異的なプライマーを作成し検討する必要があると考える。

## 2. 網膜色素上皮に発現していた新しい FGFR について

FGFR は細胞外免疫グロブリン領域, 膜貫通領域, 細胞内チロシンキナーゼ領域の 3 つの領域から成るレセプターで, 中でも細胞内チロシンキナーゼ領域が FGFR の各々のサブタイプ間において構造が最もよく保存されているといわれている。また, FGFR ではチロシンキナーゼ領域の中央部に 14 個の介在アミノ酸配列を有することが特徴とされる<sup>5)</sup>。今回, この介在アミノ酸配列の部位をはさんだ 419 塩基対のキナーゼ領域を増幅し検討したが, 新しくクローニングした CPE-FGFR では既知のどの FGFR とも 70% 以上の相同性を持っていた。また, 通常チロシンキナーゼ活性をコードする領域で保存されるアミノ酸がどのサブタイプの FGFR とも完全に一致し, リン酸化部位と推定されるチロシンを FGFR の定位置に保ち, 14 個の介在アミノ酸配列を有することから, 今までの報告にはない新しいタイプの FGFR であると考えた。

CPE-FGFR は現在までに報告された遺伝子の中ではイモリの PFR 4 と最も高い相同性を認めた。PFR 4 はヒト FGFR 4 に最も相同性が高く, イモリの FGFR 4 としてクローニングされた遺伝子で, 胚発生早期の神経組織に主に発現していると報告されている<sup>14)</sup>。現在までにニワトリでは cek 1, cek 2, cek 3 の 3 種しかクローニングされていないが, CPE-FGFR がニワトリにおける 4 番目の FGFR である可能性があると考えている。

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました松尾信彦教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第 58 回日本中部眼科学会で発表した。

本論文は岡山大学審査学位論文である。

## 文 献

- Hanneken A, Juan E, Luty GA, Fox GM, Schiffer S, Hjelmeland LM: Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 109: 1005-1011, 1991.
- Reygrobellet DF, Baudouin C, Negre F, Caruelle JP, Gastaud P, Lapalus P: Acidic FGF and other growth factors in preretinal membranes from patients with diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 23: 154-161, 1991.
- Pittack C, Jones M, Reh TA: Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development* 113: 577-588, 1991.
- 阿形清和, 江口吾朗: 分子転換の分子機構. 村松喬, 他(編): 実験医学増刊, 第 9 巻, 第 7 号, 羊土社, 東京, 686-691, 1991.
- 服部 豊: ヘパリン結合性増殖因子受容体 (FGF 受容体) の構造と機能. 寺田雅昭, 他(編): 実験医学, 第 10 巻, 第 1 号, 羊土社, 東京, 25-31, 1992.
- Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT: Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 114: 233-243, 1992.
- 林 倫子: 網膜色素上皮の組織培養に関する研究. —正常ニワトリ胚網膜色素上皮の培養細胞について—. *日眼会誌* 81: 692-700, 1977.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299, 1979.
- 大内淑代: 眼の発生分化にともなう線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子発現. 第 1 報. FGF レセプター 1 遺伝子の発現パターンについて. *日眼会誌* 97: 304-309, 1992.
- Sanger F, Miklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463-5467, 1977.
- Pasquale EB, Singer SJ: Identification of a developmentally regulated protein-tyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci* 86: 5449-5453, 1989.
- Pasquale EB: A distinctive family of embryonic protein-tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci* 87: 5812-5816, 1990.
- Partanen J, Mäkelä TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Welsh LC, et al: FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J* 10: 1347-1354, 1991.
- Shi DL, Feige JJ, Riou JF, Desimone DW, Boucaut JC: Differential expression regulation of two distinct fibroblast growth factor receptors

- during development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Development* 116: 261-273, 1992.
- 15) 坂本裕美: ヘパリン結合性増殖因子ファミリーの構造と機能. 寺田雅昭, 他(編): 実験医学, 第10巻, 第1号, 羊土社, 東京, 19-24, 1992.
- 16) **Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, et al:** Cloning and characterization of androgen-induced growth factor essential for the androgen dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 89: 8928-8932, 1992.
- 17) **Miyamoto M, Naruo K, Seko C, Matsumoto S, Kondo T, Kurokawa T:** Molecular cloning of novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol Cell Biol* 13: 4251-4259, 1993.
- 18) **Patstone G, Pasquale EB, Maher PA:** Different members of the fibroblast growth factor receptor family are specific to distinct cell types in developing chicken embryo. *Dev Biol* 155: 107-123, 1993.
- 19) 大内淑代: 眼の発生分化にもなう線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子発現. 第2報. FGFレセプター2遺伝子の発現パターンについて. 日眼会誌 97: 563-568, 1992.