

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：骨肉腫の増悪化に関する Ror2 チロシンキナーゼの基質同定とその治療標的としての応用

2. 研究開発代表者： 林 真琴 (国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科)

3. 研究開発の成果

平成 27 年度

### MiD-Ror2 ICD の実験系

Ror2 は Wnt5a をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼであり、Wnt5a 刺激により Ror2 は二量体化を形成し、自己リン酸化により活性化すると考えられる。まず、MiD-Ror2 ICD 発現ベクターを 293T および骨肉腫細胞に一過性遺伝子導入した実験系を用いて 1)MiD-Ror2 ICD の発現確認、2)二量体化誘導試薬による MiD-Ror2 ICD の二量体化の確認、3)二量体化 Ror2 ICD の自己リン酸化について検討を行った。1)MiD-Ror2 ICD 発現ベクターを遺伝子導入した 293T 細胞を用いたウェスタンブロッティングにより MiD-Ror2 ICD タンパク質の発現が確認できた。また、骨肉腫細胞 (SaOS2 細胞) を用いた実験では、プラスミド発現ベクターの導入効率が低く確認できなかった。2)HA タグまたは Flag タグを付加した MiD-Ror2 ICD 発現ベクターを 293T 細胞に一過性に同時遺伝子導入し、その細胞溶解液を用いて免疫沈殿・ウェスタンブロッティング (抗 HA 抗体による免疫沈降した試料を抗 Flag 抗体でプロッティング) を行った。二量体誘導試薬を投与した遺伝子導入 293T 細胞の試料において、HA タグ付加と Flag タグ付加 MiD-Ror2 ICD タンパク質の結合が検出された。この結果から誘導二量体システムは機能していると考えられる。3)二量体化した MiD-Ror2 ICD 野生型 (WT) および MiD-Ror2 ICD のチロシンキナーゼ活性を欠失させた変異体 (DK 変異体; dead kinase 変異体) における自己リン酸化をウェスタンブロッティングに検出した。その結果、二量体 MiD-Ror2 ICD WT は単量体 MiD-Ror2 ICD WT と比較して自己リン酸化の増強が確認できた。

### MiD-Ror2 ICD 結合タンパク質の同定

MiD-Ror2 ICD の実験系から直接的に Ror2 のリン酸化タンパク質を同定することは困難であると考えられたため、まず二量体化した MiD-Ror2 ICD の結合タンパク質を同定し、その後に *in vitro* の実験を用いて基質であるか否かを検討することにした。また、実験に使用する細胞をヒト骨肉腫細胞株 SaOS2 細胞から同じく Ror2 が高発現しており Ror2 依存的に invadopodia の形成が見られるヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞に変更した。143B 細胞は SaOS2 細胞と比較して増殖が速く、また外来遺伝子の導入効率が良いことで実験を効率良く行えるという利点がある。MiD-Ror2 ICD WT-HA を導入した 143B 細胞に二量体化誘導剤を添加したサンプルまたは無添加のサンプルを用意し、またコントロールとして空ベクターを導入した 143B 細胞についても同様に二量体化誘導剤の添加有りまたは無しの細胞を用意した。それぞれのサンプルについて抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、SDS-PAGE によりタンパク質の分離をし、最後に銀染色によりタンパク質を検出した。その結果、MiD-Ror2 ICD WT-HA を導入した 143B 細胞において、二量体化誘導剤の添加により誘導されるバンドを再現性良く検出できた。この結果は、二量体化した MiD-Ror2 ICD WT に特異的に結合するタンパク質が存在することを示唆している。当大学の質量分析総合センターの協力のもとで MiD-Ror2 ICD WT の結合タンパク質を質量分析により同定を検討するところまで至った。