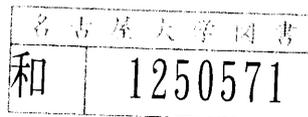


主論文

マウス神経系に発現する
プレキシンファミリー分子群の単離同定



名古屋大学大学院
理学研究科 生物学専攻
亀山俊樹

目次	頁
I. 要旨	3
II. 序論	5
III. 材料と方法	11
IV. 結果	
1. マウスプレキシンファミリー分子群の cDNA クローニング	14
2. ノーザンブロッティング	15
3. プレキシンファミリー分子のアミノ酸配列の特徴	15
3-1. マウスプレキシン 1	
3-2. マウスプレキシン 2	
3-3. マウスプレキシン 3	
4. プレキシンファミリー分子の一次構造の比較	18
5. プレキシンファミリー分子の発現	19
V. 考察	
1. プレキシンファミリーの同定とその構造	21
2. プレキシンファミリー分子の予測される機能	23
VI. 参考文献	26

I. 要旨

プレキシシン (plexin) はアフリカツメガエルの神経系において発見された分子量 220kd の膜蛋白である。アフリカツメガエルにおいてプレキシシンはカルシウムイオン依存性のホモフィリックな細胞接着分子であり、神経細胞間の相互作用に関与していると考えられている。プレキシシンの生体内での機能を解明するために、ジーンターゲットングやトランスジェニック法により個体レベルで遺伝子操作の可能なマウス神経系で発現するプレキシシン相同分子の検索を試みた。マウス胎児脳の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、プレキシシン類似分子を 3 種類単離同定することができた。マウスプレキシシン 1 はアフリカツメガエルプレキシシンと全体で 84% のアミノ酸配列のアイデンティティーがあり、アフリカツメガエルプレキシシンと同様に細胞外領域に c-Met 蛋白質と相同性の高い 3 つのシステインリッチドメインを持っていた。また、マウスプレキシシン 2 及びマウスプレキシシン 3 も細胞外領域の 3 つのシステインリッチドメインは保存されていた。マウスプレキシシン 1 とマウスプレキシシン 2 の間では 62%、マウスプレキシシン 1 とマウスプレキシシン 3 の間では 66%、マウスプレキシシン 2 とマウスプレキシシン 3 の間では 59% のアミノ酸配列の相同性があった。このように、プレキシシンは脊椎動物の種を越えて広く存在する分子であり、マウスにおいては、プレキシシンは類似した 3 種類の分子からなる分子ファミリー (プレキシシンファミリー) を構成していることが明らかとなった。また、ホモロジー検索の結果、これらプレキシシンファミリー分子は c-Met 受容体型チロシンリン酸化酵素ファミリー以外には既知の蛋白質との類似性は見られず、新しいタイプの膜蛋白質ファミリーであることが明らかとなった。

ノーザンブロットングの結果、マウスプレキシシン 1、マウスプレキシシン 2、マウスプレキシシン 3 の転写産物は発生期の脳で強く検出され、成体脳では低かった。また、神経系以外の組織のノーザンブロットングを行ったところ、3 種のプレキシシンはそれぞれ違った組織で発現していることが明らかとなった。

しかしながら、神経系に比べ非神経組織での発現レベルは低かった。

これらの結果から、マウス神経系においてプレキシンは多様な分子ファミリーを構成しており、特異的な神経回路網の形成や維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

II. 序論

我々ヒトをはじめとする動物の脳神経系は非常に複雑でかつ、秩序だった神経回路網を持っている。この複雑でかつ、秩序だった神経回路網が動物の行動を生み出す基礎となっていることは言うまでもない。神経回路網の形成機構を知るうえで、1) 多種多様でかつ必要な数の神経細胞はいかにして生み出されるのか、2) 神経細胞が正しい位置にまでどのようにして移動していくのか、3) 神経軸索はいかにして正しい経路を選択するのか、4) 神経細胞はいかにして正しい標的細胞を見つけることができるのか、5) 正しいシナプス結合はいかにして形成、維持されるのか、が解明されなければいけない課題である。なかでも、神経細胞がいかにして正しい経路を選択し、正しい標的細胞を認識してシナプス結合を形成するのかという問題は、完成した神経回路の機能と直結する問題であり、神経発生学のなかでも最も中心的な研究課題である。

1963年にSperryは (Sperry, 1963) 「生化学的な親和性に基づいて神経細胞間の特異的な結合が生み出される」という化学親和性仮説を提唱した。神経細胞間の親和性は神経細胞表面に存在する分子によって生ずると考えられ、その検索が進められてきている。

これまでに細胞培養を用いた解析、あるいは分子遺伝学的な解析により神経軸索の伸長誘導、あるいは神経細胞間の接着や相互認識に関与する多くの液性因子、膜結合型分子が見いだされている(for review, Goodman and Shatz, 1993; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996)。

脊髄の交連神経細胞を底板 (floor plate) と共培養すると、神経軸索が底板に向かって伸長する(Tessier-Lavigne et al, 1988; Placzek et al, 1990)ことが示され、底板が脊髄交連神経線維に対し正の誘因因子を分泌していることが明らかとなった。Tessier-Lavigneらは (Serafini et al, 1994) 脊髄交連線維の伸長を促進する因子の精製とcDNAのクローニングに成功し、この因子をネトリン (netrin) と名付け、COS細胞にネトリンを発現させ交連線維と共培養することで、これが

実際に軸索の誘因を引き起こすことを証明した (Kennedy et al, 1994)。さらに最近、マウスネトリン1 遺伝子のノックアウトマウスが作成され、脊髓交連線維の形成、中枢の交連線維の形成に異常が観察され、生体内でネトリンが交連線維の軸索誘導に関与していることが証明された (Serrafini et al, 1996)。一方、軸索の伸長を正の方向に誘因する因子ばかりでなく、軸索を反発させる因子も多く明らかにされてきている。上述のネトリンも滑車神経の軸索に対しては反発因子としての作用を示す (Colamarino et al, 1995)。また、腹側脊髓に脊髓神経節に対して分泌性の軸索伸長抑制因子が存在することが示されている (Fitzgerald et al, 1993)。さらに、Raper ら (Kapfhammer and Raper, 1987) は網膜神経節細胞と交感神経節細胞を共培養する方法で、軸索の先端の成長円錐が異種の神経の軸索と接触すると成長円錐の退縮が引き起こされることを見いだした、成長円錐退縮活性を持つ蛋白質をニワトリ脳の膜の抽出物より精製し、コラプシンと名付けた (Luo et al, 1993)。コラプシンはショウジョウバエからマウス、ヒトに至るまで幅広く種を越えて存在する分子ファミリー (コラプシン/セマフォリンファミリー) を形成し、それぞれが軸索の伸長に抑制的に作用することが明らかとなっている (Kolodkin et al, 1993; Puschel et al, 1995; Messersmith et al, 1995; Matthes et al, 1995; Luo et al, 1995)。

Bonhoffer ら (Baier and Bonhoffer, 1992) はニワトリの網膜-視蓋投射系で、O'Leary ら (Roskins and O'Leary, 1994) はラットの網膜-上丘投射系で、尾側の視蓋 (上丘) の細胞表面には網膜耳側からの神経節細胞の軸索 (視神経) の伸長を阻害する作用を持つ分子が存在し、それがグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型の膜蛋白質であることを示した。さらに、Bonhoffer ら (Drescher et al, 1995) はこのような軸索伸長阻害活性を持つ GPI アンカー型の膜蛋白質 RAGS を、Flanagan ら (Cheng et al, 1995) は Eph 受容体型チロシンキナーゼファミリーの一員である Mck-4 のリガンド ELF-1 を見いだした。RAGS は ELF-1 と相同性を持ち Eph リガンドファミリーの一員である。ELF-1 は視蓋の吻尾軸に沿って尾側に強い濃度勾配を持って発現する。一方、ELF-1

の受容体である Mek-4 の発現は網膜の鼻側-耳側の軸に沿って耳側の視神経で強い濃度勾配を持って発現している。視神経と視中枢の神経結合には、耳側の視神経は吻側の視蓋に投射するという2次元的な網膜視蓋投射パターンが形成されるが、このような相補的な視中枢のリガンドの分布パターンと視神経での受容体の分布パターンから、Mek-4 と ELF-1 は視神経と視中枢との2次元的な結合パターンの形成に関与していると考えられた。さらに、レトロウイルスを用いて ELF-1 を視蓋で異所的に発現させる実験を行った結果、耳側の視神経の軸索は異所的な ELF-1 の発現部位をさけることが示された。これらの結果から、ELF-1 が耳側の視神経に対し反発的に機能する神経細胞膜表面にある因子であり、網膜視蓋投射系での2次元的な結合パターンの形成に関与していることが証明された(Nakamoto et al, 1996)。

神経細胞膜表面上にある細胞接着分子も神経回路網形成に重要な役割を果たしていると考えられている(for review, Goodman and Shatz, 1993; Redies and Takeichi, 1996; Chiba and Keshishian, 1996)。免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であるシヨウジョウバエのファシクリンIIを過剰発現させると軸索束形成や軸索伸長が異常を示す (Lin and Goodman, 1994)。また、同じ免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であるシヨウジョウバエのファシクリンIIIはシヨウジョウバエの RP3 と呼ばれる神経細胞とその標的筋細胞に発現しているが、標的以外の筋細胞にファシクリンIIIを強制発現させると、RP3 ニューロンがこの筋細胞にも投射するようになり、ファシクリンIIIが標的認識分子であることが証明された (Chiba et al, 1995)。シヨウジョウバエでエンハンサートラップにより見いだされたロイシンリッチリピート構造を持ち、ホモフィリックな細胞接着活性を持つコネクチン(Nose et al, 1992)は、SNa と呼ばれる運動神経とその標的細胞に特異的に発現し、誘因的な作用を持つ因子として考えられているが、コネクチンを発現しない別の運動神経がシナプス結合をする筋肉細胞に強制的に発現させると、その運動神経は異所的にコネクチンを発現するようになった筋肉細胞をさけてしまい、本来の投

射ができなくなる。このことから、コネクチンは、コネクチンを発現しない神経細胞にとっては反発性の作用をもっているということが示された (Nose et al, 1994)。

一方、脊椎動物神経系でも多くの免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子 (Edelman and Cunningham, 1990)やカドヘリンファミリーに属する細胞接着分子 (Takeichi et al, 1990; Redies and Takeichi, 1996) が見いだされている。N-CAM や LI、Nカドヘリンといった細胞接着分子が視神経線維の伸長を促進することが明らかとなっている (Doherty et al, 1990; Lemmon et al, 1989; Matsunaga et al, 1988)。またこれらの細胞接着分子がそれぞれ違った脳の領域 (ニューロメア) に発現し、その領域特異的な細胞接着に関与していることなどが明らかになっている (Matsunami and Takeichi, 1995)。

以上の例に示されるように、神経細胞間の相互作用に関与する分泌性の因子や膜分子は軸索の伸長、束形成、標的細胞の認識と結合など神経回路形成の様々な局面で重要な働きを担っている。しかしながら、神経細胞の多様さ、神経回路の多様さを考えると、さらに多くの神経細胞間の認識や相互作用に関与する膜分子の存在が予測され、それら新規膜分子の検索と、生体内での機能の解析は、多様でかつ複雑な神経回路網の形成機構を明らかにする上で非常に重要な研究課題である。

Takagi ら (Takagi et al, 1987) は、アフリカツメガエル幼生の視蓋を抗原にしてモノクローナル抗体を作成し、網膜や視蓋の神経叢 (plexus) を特異的に認識する B2 と名付けられた抗体 (MAb-B2) を見いだした。cDNA クローニングにより、MAb-B2 が認識する抗原分子が新規な膜蛋白質であることが明らかとなり、プレキシシンと名付けられた (Ohta et al, 1995)。プレキシシンはタイプ I 型膜蛋白質であり、その細胞外領域には癌原遺伝子 *c-met* の転写産物 c-Met (Chan et al, 1988; Park et al, 1987; Bottaro et al, 1991) や c-Met 様受容体型チロシンキナーゼである *c-sea* (Huff et al, 1993)や、Ron (Ronsin et al, 1993)に見られる特徴的なシステインの繰り返し配列を持つシステインリッチドメインが3カ所存在する。

現在までにアフリカツメガエルを用いた実験系で次のようなことが明らかとなっている。

1) プレキシシン cDNA を株細胞 (マウス L 細胞) に強制発現させ、この細胞を旋回培養を行うことにより、プレキシシンがカルシウムイオン存在下で細胞接着活性を示した。また、プレキシシン発現細胞が精製したプレキシシン蛋白質に特異的に接着した。これらのことから、プレキシシンはカルシウムイオン依存的なホモフィリックな細胞接着分子 (Ca^{++} -dependent homophilic cell adhesion molecule) であることが明らかとなった (Ohta et al, 1995)。

2) アフリカツメガエル網膜ではアマクリン細胞と神経節細胞がシナプス結合をする内網状層にプレキシシンが局在する。発生初期の網膜を抗プレキシシン抗体存在下で培養すると内網状層の形成が阻害されることから、プレキシシンが網膜内網状層においてアマクリン細胞の突起と神経節細胞の樹状突起との接着に関与していると推察される (Ohta et al, 1992)。

3) アフリカツメガエル幼生の嗅神経では、プレキシシンを発現する嗅神経のサブセットと、ニューロピリンを発現する嗅神経のサブセットが存在し、これら膜分子の違いにより嗅神経が選別されるようになり、それぞれ嗅球の異なった部位に投射している。このことからプレキシシン及びニューロピリンが選択的な軸索束形成に関与していることを示唆している (Satoda et al, 1995)。

4) アフリカツメガエルの側線神経系、聴覚、平衡覚神経回路ではこれらの神経回路を構成する刺激受容細胞、感覚神経細胞、中枢神経核のすべてにプレキシシンが発現する。プレキシシンがホモフィリックな細胞接着分子であることをあわせて考えると、プレキシシンがこれらの神経回路の形成や維持に関与していると推測できる (Ohta et al, 1995)。

アフリカツメガエルで得られているこれらの結果は、プレキシシンが軸索束形成や神経細胞間の接着に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかしながら、上記 1) はあくまでも *in vitro* でのモデル実験系での結果であり、3) と 4) はプレキシシンの発現パターンにもとづいた推測の域をでない。また、

抗体による阻害実験（上記2）もプレキシシン分子の機能を正しく反映している保証はない。

プレキシシンの生体内での機能を解析するためにはマウスを用いた実験系が有効であると考えられる。その最も大きな理由の一つは、マウスでは発生工学的手法によるリバースジェネティクスが可能であるという点である。胚性幹細胞(ES細胞)を利用して、相同的組み換えにより目的遺伝子を破壊する手段や、プロモーターを用いて目的遺伝子を異所的、強制的に発現する手段があり、これによって目的分子の生体内での機能を解析することが可能である。また、アフリカツメガエルに比べ、マウスでは神経解剖学的な知見や神経生理学的知見が集積されており、プレキシシンの発現パターンや、脳の高次機能の発現とプレキシシン分子の関わりについての詳細な解析が可能となる。

そこで、本研究ではマウスでのプレキシシン相同分子の単離を試みた。アフリカツメガエルプレキシシン cDNA をプローブにしてマウス胎児脳 cDNA ライブラリーを検索した結果、プレキシシン相同分子（マウスプレキシシン1）の単離同定に成功し、プレキシシンが脊椎動物の種を越えて保存された分子であることを明らかにした。さらに、クローニングの過程で、アフリカツメガエルプレキシシンと相同性は認められるものの、マウスプレキシシン1とは異なった配列を持つ2種類のプレキシシン類似分子（マウスプレキシシン2、マウスプレキシシン3）を同定することができた。これにより、マウスにおいてはプレキシシンは多様な分子ファミリーを形成していることが明らかとなった。

III. 材料と方法

cDNA クローニングとシーケンス

アフリカツメガエルプレキシンのコーディング領域全長を含む 6.2kb cDNA インサートをプローブに用い、マウス 17.5 日胚脳および生直後マウス脳より調整し、ランダムプライマーにより合成した cDNA ライブラリー (Kawakami et al, 1996) のスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、 $6\times$ SSC、 $10\times$ Denhard's 液、0.5% SDS、20mM Sodium Phosphate (pH 7.2)、 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子 DNA、 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 酵母 tRNA、 50°C の条件で行った。フィルターの洗いは、 $2\times$ SSC、0.1% SDS、 50°C 、30 分の条件で 3 回行った。その結果、1 つの陽性クローン (mb92, Fig. 1) を単離し、以後、これをプローブとして用いた。

最初に用いた cDNA ライブラリーでは、mb92 以外のクローンを得ることができなかった。そこで、全長の cDNA クローンを得るため、新たにランダムプライマー、及び、Oligo(dT)プライマーによる 17.5 日胚 ICR マウス脳の cDNA ライブラリーを SUPERScript Choice System (GIBCO BRL) を用いて調整し、 λ ZAP II ベクターに挿入した。cDNA ライブラリーは増幅を行うとファージ粒子が均一に増えず、特にインサートの長いクローンのライブラリー中での比率が落ちることが懸念された。そこで、未増幅の cDNA ライブラリーを mb92 クローンの cDNA インサートをプローブにして、強い条件下 (ハイブリダイゼーション液は上述の組成の溶液、 65°C で、洗いは $0.2\times$ SSC、0.1% SDS、 65°C) でスクリーニングし、複数個の陽性クローンを得た。さらに、5'末端を得るために、Oligo(dT)-cDNA ライブラリーのスクリーニングで得た cDNA クローンのインサートをプローブに用いて、未増幅のランダムプライマー-cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。cDNA インサートは pBluescript にサブクローニングし、サンガー法 (Sanger et al, 1977) にもとずき ALF II オートシーケンサー (Pharmacia) を用いて行った。DNA ならびにアミノ酸配列の解析は Gene

Works (Intelli Genetics)プログラムを用いた。

ノーザンブロットイング

12.5日胚脳、16.5日胚脳、生後1日新生マウス脳、成体脳、ならびに生後1日マウスの胸腺、心臓、肝臓、腎臓、骨格筋を用いた。全RNAはAGPC法(Chomczynski and Sachi, 1987)に従い精製した。Poly(A)⁺RNAの精製はmRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いた。20 μ gの全RNAまたは0.5 μ gのPoly(A)⁺RNAを1%アガロース-6%ホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、Hybond-N⁺ナイロンメンブレン (Amersham) に転写した。プレキシシン1の784-3057bpの領域、プレキシシン2の2790-3497bpの領域、プレキシシン3の1626-2716bpの領域をそれぞれBcaBESTラベリングキット (TaKaRa) をもちいて [³²P] dCTPでラベルし、プローブとして用いた。ハイブリダイゼーションは30%ホルムアミドを含むバッファー中で42°Cで行った。ハイブリダイゼーション後の洗いは、2×SSC、0.1% SDS、室温30分を2回行った後、0.2×SSC、0.1% SDS、65°C、30分を2回行った。

RT-PCR

プレキシシン3のcDNAのクローニング過程で、一部欠失を含んだクローンが単離されてきた(結果の項を参照)。それらのcDNAの不一致がクローニングアーティファクトでなく実際のmRNAレベルでの塩基配列の欠失を反映しているのか否かを確かめるためにRT-PCRを行った。

PCRは17.5日胚マウス脳より抽出したmRNAから逆転写させたcDNAをテンプレートに用いた。欠失部分を挟むように5'側のプライマーとして5'-GGCCCCAGTCAGAGCCCTATCACC-3' (3129-3152bp)と3'側のプライマーとして5'-GCGGTCTGCATCCTGAGTCTTACG-3' (3876-3899bp)を用いた。PCRの

条件は、95℃で5分の後、95℃で30秒、60℃で60秒、72℃で90秒を45サイクル行った。

IV. 結果

1. マウスプレキシンファミリー分子群の cDNA クローンの単離

まず、アフリカツメガエルプレキシン cDNA をプローブに用いてマウス胎児脳の cDNA ライブラリー (ランダムプライマー、 0.9×10^6 plaques) のスクリーニングを行った。その結果、1つの陽性クローン (mb92, Fig. 1) を単離した。部分的に塩基配列を決定したところアフリカツメガエルプレキシン cDNA の一部との相同性が認められた。クローン mb92 は予測されるマウスプレキシン蛋白質の細胞外領域の一部、及び、細胞膜貫通部、細胞内領域の一部に相当しており、プレキシンの全長をコードするものではなかった。

最初に用いた cDNA ライブラリーでは mb92 以外のプレキシンをコードしている cDNA クローンを単離する事ができなかった。そこで、新たに Oligo(dT) プライマーによる cDNA ライブラリーとランダムプライマーによる cDNA ライブラリーを作成し、mb92 の cDNA インサート全長をプローブに用いてスクリーニングを行った。未増幅の Oligo(dT) プライマーによる cDNA ライブラリーのスクリーニングを厳しい条件下で行ったところ、a1、b2、b11、c26 と名付けた4個の陽性クローンを単離することができた。(Fig. 1) これらのクローンの塩基配列を部分的に決定したところ、どのクローンもアフリカツメガエルプレキシンと高い塩基配列の相同性を示した。しかしながら、いずれのクローンの塩基配列もお互いに異なっていた。

これらの内、クローン a1 がコードする蛋白質が最もアフリカツメガエルプレキシンと類似しており、マウスプレキシン 1 と名付けた。後述するようにクローン b2 と b11 も同一のプレキシン様蛋白質をコードしていると考えられ、マウスプレキシン 2 と命名した。また、クローン c26 もプレキシン様蛋白質をコードしており、マウスプレキシン 3 と名付けた。a1、b2、b11、c26 のどのクローンも poly(A) 付加シグナル及び、poly(A) 配列を持つ。しかしながら、いずれの

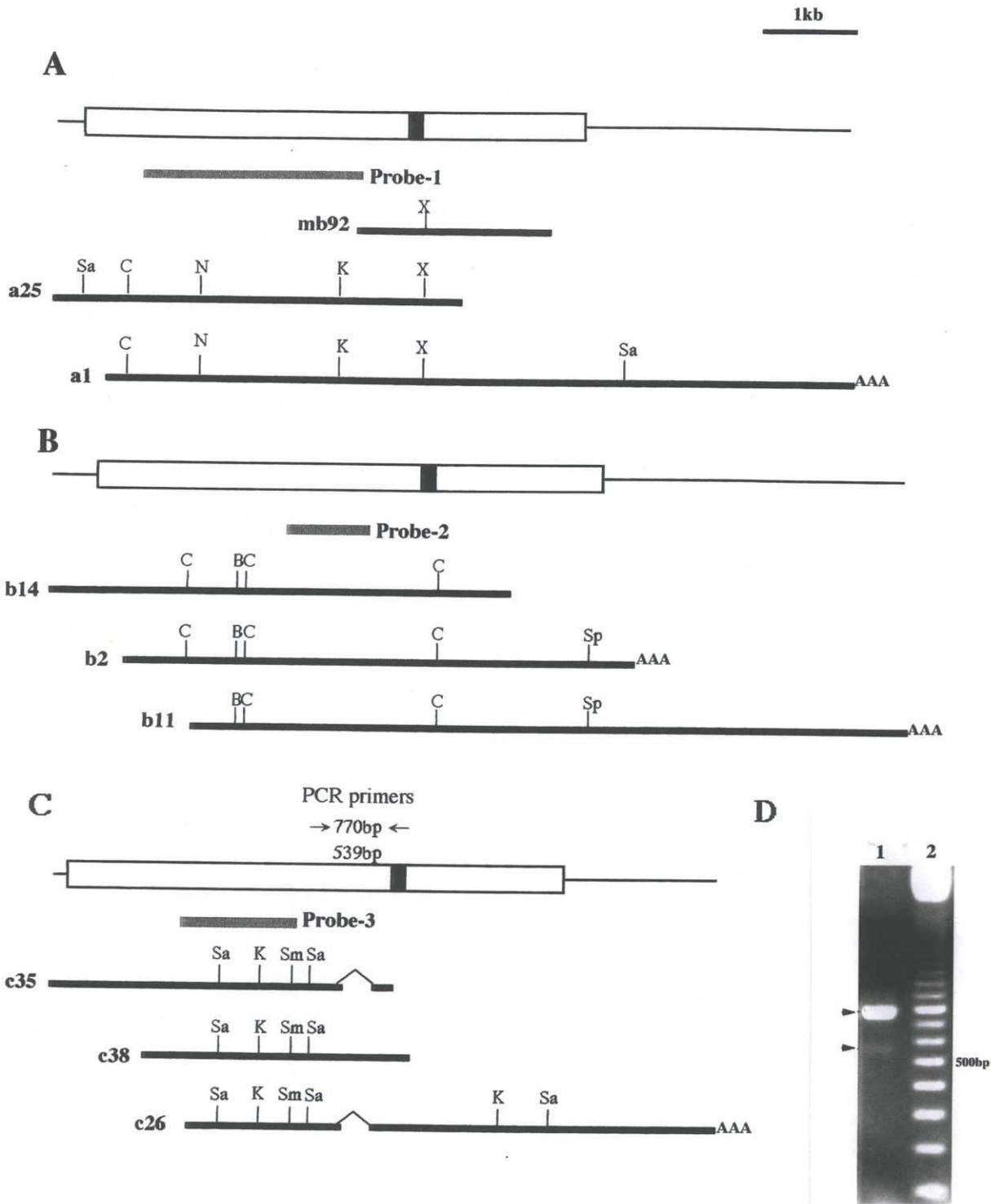


Fig. 1 マウスプレキシシン1 (A)、マウスプレキシシン2 (B)、マウスプレキシシン3 (C) の cDNA の模式図及び塩基配列を決定したcDNAクローン 蛋白質コード領域をオープンボックスで、非翻訳領域は実線で示した。細胞膜貫通部を黒塗りのボックスで示した。制限酵素サイト: B, BamHI; C, ClaI; K, KpnI; N, NotI; Sa, SacI; Sm, SmaI; Sp, SphI; X, XhoI。Probe-1, Probe-2, Probe-3はそれぞれノーザンプロットに用いたプローブの位置を示している。

(D)プレキシシン3の細胞外領域の欠失部位付近のRT-PCR解析 レーン1は17.5日胚 mRNAを鋳型にしたRT-PCR産物。レーン2は100bpラダーである。

クローンもプレキシシン蛋白質の全長をコードするものではなかった。そこで、さらにこれらのクローンの5'側の cDNA 断片をそれぞれプローブにしてランダムプライマーによる cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、プレキシシン 1 に相当するものとしてクローン a25 を、プレキシシン 2 に相当するものとしてクローン b14、プレキシシン 3 に相当するものとしてクローン c35 とクローン c38 を得た。

2. ノーザンブロットィング

単離したこれらのプレキシシン cDNA が、別々の遺伝子であるのか、また、違った遺伝子であるならばその転写産物の大きさはどのくらいであるのかを確かめるために、それぞれのプレキシシンに特異的なプローブを用いてノーザンブロットィングを行った。その結果、プレキシシン 1 のプローブが 9.5kb の mRNA を、プレキシシン 2 のプローブが 10.5kb の主要なバンドと 9kb、7.2kb の弱いバンドを、プレキシシン 3 のプローブがおよそ 7.5kb のややブロードなバンドを認識した (Fig. 2)。mRNA の大きさの上からも得られた 3 種のプレキシシンは違った遺伝子であると結論づけられた。

3. プレキシシンファミリー分子のアミノ酸配列とその特徴

3-1. プレキシシン 1

クローン a1、及び、クローン a25 の塩基配列を解析したところ、これら 2 つのクローンのオーバーラップしている領域の塩基配列は一致していた。そこでこの 2 つのクローンをつなげ、プレキシシン 1 の塩基配列を決定した [塩基配列は DNA データベース (DDBJ/EMBL/ GeneBank accession number D86948) を参照]。265-267 塩基の位置にある ATG コドンは Kozak のコンセンサス配列 (Kozak, 1989) を満たしており、また、それに続き疎水性の 20 アミノ酸残基が存在し、

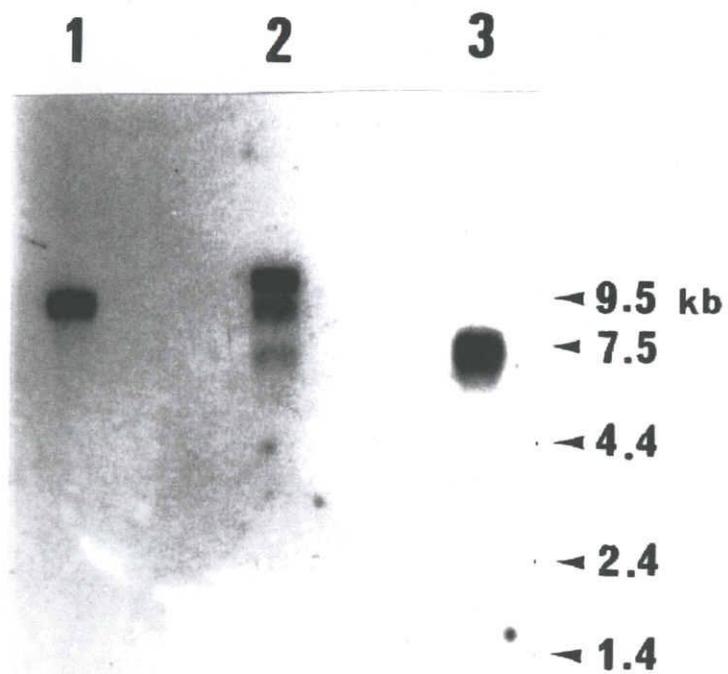


Fig. 2 ノーザンブロットによる各プレキシンの mRNA の長さの比較
 Poly(A)+RNA(0.5 μ g)を電気泳動し、それぞれマウスプレキシシ1 (レーン
 1) マウスプレキシシ2 (レーン2) マウスプレキシシ3 (レーン3) に特異
 的なプローブでハイブリダイズさせた。

	MPLPPLSSRT LLLLLLLLR GVWIAISSPP AGLGPQPAFR TFVASDWGLT	50
	HLVVHEQTGE VYVGAVNRIY KLSGNLTLLR AHVTGPVEDN EKCYPPPSVQ	100
	SCPHGLGSTD NVNKLLEDY AANRLLAGCS ASQGICQFLR LDDLFLKGEF	150
	HHRKEHYLSS VREAGSMAGV LIAGPPGQGG AKLFVGTPID GKSEYFPTLS	200
	SRRLMANEED ADMFGFVYQD EHVSSQLKIP SDTLSKFPAP DIYVVSFRS	250
	EQFVYYLTLQ LDTQLTSPDA AGEHFFTSKI VRLCVNDPKF YSYVEFPIGC	300
	EQAGVEYRLV QDAYLSRPGQ ALAKQLGLAE DEEVLFVFA QGQKNRVKPP	350
	KESALCLFTL RAIKEKIKER IQSCYRGECK LSLPWLLNKE LGCINSPLQI	400
	DDDFCGQDFN QPLGGTVTIE GTPLFVDKED GLTAVAAVDY QGRTVVFAQT	450
	RSGRIRKILV DLANPSGRPA LAYESVVAQE GNPILRDLVL SPNRQYLYAM	500
	TEKQVTQVPV ESVQYTSCE LCLGSRDPHC GWCVLHSICS RQDAEFAAE	550
C1	QRFASDLQ VQLTVQPRN VSVTMSQVPL VLQAWNVPDL SAGVNCSEFED	600
	FTETESILED GRIHCHSPSA REVAPITQGG GDQRVVKLYL KSKETGKKFA	650
C2	SVDFVFYNS VHQSLACYN GSRPCHWCKY RHVCTNNAAD CAFLEGRVNS	700
	EDDPQILPS THIVPVGVV KPITLAARNL PQQSGQGRGY ECLFHIPGSP	750
	ARVTALRFNS SSLQCONSSY SYEGNDVSDL PVNLSVWVWG NFVIDNPQNI	800
C3	QAHLYSKAL RQSCGLCLKA DPRFECCGVCV AERRCSLRHH CPADSPASW	850
	IAHHSRRT DPKILKLSPE TGPRQGGTRL TITGENLGLR FEDVRLGVHV	900
	GKVLCSPEVES EYISAEQIVC EIGDASTLRA HDALVEVCVR DCSLHYRALS	950
	PKRFTFVTPY FYRVSPSRGP LSGGTWIGIE GSHLNAGSDV AVSIGGRPCS	1000
	FSWRNSREIR CLTPPGHTPG SAPIVININR AQLSNPEVKY NYTEDPTILR	1050
	IDPEWSINSG GLLTVTGTN LATVREPRIR AKYGGIEREN SCMVYNDTTM	1100
	VCRAPSIDNP KRSPPELGER PDEIGFIMDN VRTLLVLNNS SFLYYPDPVL	1150
	EPLSPTGLLE LKPSPLILK GRNLLPPAPG NSRLNYTVLI GSTPCILTVS	1200
	ETQLLCEAPN LTGQHKVTVR AGGFEFSPGM LQVYSDS LLT LPAIVGIGGG	1250
	GGLLLVIVA VLIAYKRKSR DADRTLKRLQ LQMDNLESRV ALECKEAFAE	1300
	LQTDIHELTS DLDGAGIPFL DYRTYAMRVL FPGIEDHPVL KEMEVQANVE	1350
	KSLTLFGQLL TKKHFLTFI RTLEAQRSFS MRDRGNVASL IMTALQGEME	1400
	YATGVLKQLL SDLIEKNLES KNHPKLLLR TESVAEKMLT NWFTFLLYKF	1450
	LKECAGEPLF MLYCAIKQQM EKGPIDAITG EARYSLSEDK LIRQQIDYKT	1500
	LTLNCVNPEH ENAPEVPVKG LNCDTVTVK EKLLDAVYKG VPYSQRPKAG	1550
	DMDLEWRQGR MARIILQDED VTKIDNDWK RLNTLAHYQV TDGSSVALVP	1600
	KQTSAYNISN SSTFTKLSLR YESMLRTASS PDSLSRSTPM ITPDLESGTK	1650
	LWHLVKNHDH LDQREGDRGS KMVSEIYLTR LLATKGTLOK FVDDLFEFIF	1700
	STAHRSALP LAIKYMFDFL DEQADKHQIH DSDVRHTWKS NCLPLRFWVN	1750
	VIKNPQFVFD IHKNSITDAC LSVVAQTFMD SCSTSEHKLK KDSPSNKLLY	1800
	AKDIPNYKSW VERYYADIAK MPAISDQDMS AYLAEQSRLH LSQFNMSAL	1850
	HEIYSYIAKY KDEILVALEK DEQARRQLR SKLEQVVDTM ALSS	1894

Fig. 3 マウスプレキシン1のアミノ酸配列 N末端の青色で囲まれた領域はシグナル配列を示し、3カ所の緑色の領域はシステインリッチドメインを、赤色の領域は膜貫通領域を示している。システイン残基の位置は○で示し、アスパラギン結合型糖鎖結合部位は◆で示している。細胞内領域のチロシンリンキナーゼの基質となりうるチロシン残基を▼で示す。

それは von Heijne の “(-3,-1)ルール” (von Heijne, 1986)に従いシグナル配列であると予測される。従って、265-267 塩基の ATG コドンが翻訳開始コドンであると推定される。終止コドンである TGA は 5947-5949 塩基の位置に存在した。

翻訳領域は 5682 塩基対存在し、それから推定されるポリペプチドは 1894 アミノ酸残基である (Fig. 3)。Kyte と Doolittle 法 (Kyte and Doolittle, 1982)によるマウスプレキシシン 1 のアミノ酸配列の疎水性解析の結果 (Fig. 6A)、1238-1264 アミノ酸残基の位置で疎水性の高いアミノ酸残基が続く細胞膜貫通ドメインが存在した。予測細胞外領域には 14 個のアスパラギン結合型糖鎖結合部位 (Asn-X-Ser/Thr, X≠Pro)が存在した。アフリカツメガエルプレキシシンの細胞外領域には 8 個のシステイン残基が Cys-X(5,6)-Cys-X(2)-Cys-X(6,7,8)-Cys-X(2)-Cys-X(5)-Cys-X(5,6)-Cys-X(12,15,16)- Cys の様に繰り返し配列するシステインリッチドメインが 3カ所 (C1,C2,C3) 存在する (Ohta, et al, 1995)。マウスプレキシシン 1 の細胞外領域においてもこの 3 個のシステインリッチドメインが存在する (Fig. 3)。また、アフリカツメガエルプレキシシンのシステインリッチドメインは *c-met* 癌原遺伝子産物 (c-Met 蛋白質) (Chan, et al, 1988; Park, et al, 1987; Bottaro et al, 1991)、あるいは、c-Met 様受容体型チロシンキナーゼである *c-sea* (Huff, J. L., et al, 1993)や Ron (Ronsin, C., et al, 19993)に存在するシステインリッチドメインと相同性があることが明らかになっている (Ohta, et al, 1995)。マウスプレキシシン 1 のシステインリッチドメインについても同様に c-Met 蛋白質のシステインリッチドメインとの相同性が認められた。プレキシシン 1 の細胞内領域は 630 アミノ酸残基からなり、アフリカツメガエルプレキシシンの細胞内領域と非常に高い相同性を有していた (アミノ酸配列のアイデンティティーで 94%)。アフリカツメガエルプレキシシンの場合 (Ohta, et al, 1995)と同様に、マウスプレキシシン 1 の細胞内領域にも c-Met 蛋白質の細胞内領域で見られるチロシンキナーゼドメインは存在していなかった。

3-2. プレキシシン 2

	MQADNLSVVL LSVAVLLLAR GTTGMPQYST FHSENRDWTF NHLTVHRRRTG	50
	AVYVGAINRV YKLTGNLTIQ VAHKTGPEED NKACYPLIV QPCSEVLTLT	100
	NNVNKLLIID YSENRLLAG SLYQGVCKLL RLDDLFIIVE PSHKKEHYLS	150
	SVNKTGTMYG VIVRSEGEDG KFIGTAVDG KQDYFPTLSS RKLPRDPSS	200
	AMLDYELHSD FVSSLIKIPS DTLALVSHFD IFYIYGFAST GFVYFLTVQP	250
	ETPDGMAINS AGDLFYTSRI VRLCKDDPKF HSYVSLPFGC TRAGVEYRLL	300
	QAAYLAKPGE ALAQAFNISS DEDVLFAIFS KGQKQYHHP DDSALCAFPI	350
	RAINLQIKER LQSCYHGEEN LELNWLKGD VQCTKAPVPI DDNFCGLDIN	400
	QPLGGSTPVE GLTLYTTSRD RLTSVASYVY NGYSVVFVGT KSGKCLKIRA	450
	DGPPHGGVQY EMVSVFKDGS PILRDMAFSI NQLYLYVMSE RQVTRVPVES	500
C1	QVYITIGEC LSSGPHCGV CALHNCRRR DKCRANEAN RFAASIQM	550
	SLEVHPNSIS VSDHSRLLSL VVNDAPNLSE GIACAFGNLT EVEGQVSGSQ	600
C2	VICISPGPKD VPIPLDQDW FGLELQLRSK ETGKIFVSTE FKFYNSAN	650
	PLSCYNSAE RCHICKYRN CTNDPTCSF QEGRTVSRD IPQLVPTTEEI	700
	LIPVGEVKPI TLKARNLPQ QSGQRGYECV LSIQGAHVHRV PALRFNSSSV	750
C3	QCQNSSYQYD GMDISNLAVD FAVVWNGNFI IDNPQDLKVH LYKSAKRE	800
	GLCLADHA FEGGCSGER RCLHCHCPS TSSPWLWSS HNYKSNPQI	850
	TEILTVSGPP EGGTRVTIHG VNLGLDFSEI AHHVQVAGVP CTPIPGEYII	900
	AEQIVCEMGE AVIGTTSQPV RLCIGECKPE FMTKSHQQYT FVNPSVLSLS	950
	PIRGPEGGT MVTITGHYLG AGSSVAVYLG NQTCIFYGRS MNEIVCVSPP	1000
	SSNGLGPVPV SVSVDRARVD SSLQFEYIDD PRVQRIEPEW SITSGHTPLT	1050
	ITGFNLVDIQ EPRVRVKFNG KESVNVCTVV NTTTTCLAP SLTSDYRPLG	1100
	DTVERPDEFG FLFNNVQSLI IYNDTKFIYY PNPTFELLSP TGILDQKPGS	1150
	PIILKGKNLC PPASGGAKLN YTVMIGETPC TTVVSETQLL CEPPNLTGQH	1200
	KVMVHVGGMV FSPGSVSVIS DSI LLTLP AI I SIAAGGSLLL IIVII V LIAY	1250
	KRKSRENDLT LKRLQMMDN LESRVALECK EFAELQTDI NELTSDLDRS	1300
	GIPYLDYRTY AMRVLFPGIE DHPVLRELEV QGNGQQHVEK ALKLFQALIN	1350
	NKVFLLTfir TLELQRSFSM RDRGNVASLI MTGLQGRLEY ATDVLKQLLS	1400
	DLIDKNLENK NHPKLLLRRT ESVAEKMLTN WFAFLHKLFL KECAGEPLFM	1450
	LYCAIKQOME KGPIDAITGE ARYSLSEDKL IRQQIEYKTL ILNCVNPDNE	1500
	NSPEIPVKVL NCDTITQVKE KILDAVYKNV PYSQRPRVD MDLEWRQGRI	1550
	ARVVLQDEDI TTKIEGDWKR LNTLMHYQVS DRSVVALVPK QTSSYNIPAS	1600
	ASISRTSISR YDSSFRTYGS PDSLRSRVP ITPDLESGVK VVHLVKNHDH	1650
	GDQKEGDRGS KMVSEIYLTR LLATKGLTQK FVDDLFEFLF STVHRGSALP	1700
	LAIKYMDFDL DEQADRHSIH DTDVRHTWKS NCLPLRFWVN VIKNPQVFVD	1750
	IHKGSITDAC LSVVAQTFMD SCSTSEHRLG KDSPSNKLLY AKDIPSYKNW	1800
	VERYYADIAK LPAISDQDMN AYLAEQSR LH ATEFNLSAL NEIYSYVSKY	1850
	SEELIGALEQ DEQARRQLA YKVEHLINAM SIES	1884

Fig. 4 マウスプレキシンのアミノ酸配列 N末端の青色で囲まれた領域はシグナル配列を示し、3カ所の緑色の領域はシステインリッチドメインを、赤色の領域は膜貫通領域を示している。システイン残基の位置は○で示し、アスパラギン結合型糖鎖結合部位は◆で示している。細胞内領域のチロシンリンキナーゼの基質となりうるチロシン残基を▼で示す。

マウスプレキシシン 2 の全長の塩基配列はクローン b2 とクローン b14 をつなげることで決定した [塩基配列は DNA データベース (DDBJ / EMBL / GeneBank accession number D86949) を参照]。翻訳領域は、580-6231bp の 5652 塩基対を含み、これから推定されるポリペプチド鎖は 1884 アミノ酸残基であった。クローン b2 は 5413bp (819-6231bp) の翻訳領域と 432bp の 3' 非翻訳領域を含み、poly(A) 付加シグナル及び、poly(A) 配列を持っていた。cDNA クローン b11 の 5' 端は翻訳領域内にあり、翻訳領域内の塩基配列はマウスプレキシシン 2 の塩基配列と一致していた。このクローン b11 は 3' 末端に poly(A) 配列の存在する 3kbp の 3' 非翻訳領域を持っていた。疎水性解析の結果 (Fig. 6B)、マウスプレキシシン 2 はシグナル配列と細胞膜貫通ドメイン (1223-1249 アミノ酸残基) を有していることが明らかとなった。

Fig. 4 に示すように、マウスプレキシシン 2 もその細胞外領域に 3 回のシステイン繰り返し配列を持っている。それぞれのシステインリッチドメインは 8 個のシステイン残基を有し、先に述べたような特徴的な繰り返し配列をとっていた。また、プレキシシン 2 では 14 カ所のアスパラギン結合型糖鎖結合部位が細胞外領域に存在していた。マウスプレキシシン 1 と同様に、マウスプレキシシン 2 もその細胞内領域にはチロシンキナーゼドメインは持っていなかった。

3-3. プレキシシン 3

マウスプレキシシン 3 の全長の塩基配列は、クローン c26、クローン c35、クローン c38 の塩基配列にもとづき決定した [塩基配列は DNA データベース (DDBJ / EMBL / GeneBank accession number D86950) を参照]。シーケンシングの結果、クローン c26 及び c35 には翻訳領域内に 231 塩基対の欠失があることが明らかとなった (Fig. 5 黄色部分; 3358-3588bp、マウスプレキシシン 3 蛋白質の 1072-1148 アミノ酸残基に相当する)。この領域以外では、クローン c26、c35、c38 の塩基配列は完全に一致していた。17 日胚マウス脳の RNA をテンプレートにした RT-PCR の結果、上述の欠失を伴うものも増幅されてきた。しかしな

	MPTVCLLPLL FFTIGGCLG	SRPFRTFVVT	DTTLTHLAVH	RVTGEVFGA	50		
	VNRVFKLAPN	LTELRAHVTG	PIEDNARCYP	PPSMRVCSHR	LVPVDNVNKL	100	
	LLIDYAARRL	VACGSIWQGI	QFLRLDDL	KLGEPHHRKE	HYLSGAQEPD	150	
	SMAGVIVEQV	QGPKSLFVGT	AVDGKSEYFP	TLSSRKLIDD	EDSGDMFSLV	200	
	YQDEFVSSQI	KIPSDTLSLY	PAFDIYYIYG	FVSASFVYFL	TLQLDTQQT	250	
	LDTAGEKFFT	SKIVRMCAGD	SEFYSYVEFP	IGCSWRGVEY	RLVQSAHLAK	300	
	PGLLLAQALG	VPADEDVLF	IFSQQKNRA	NPPRQTILCL	FTLSSINAHI	350	
	RRRIQSCYRG	EGTLALPWL	NKELPCINTP	LQINGNFCGL	VLNQLGGLH	400	
	VIEGLPLLAD	STDGMASVAA	YTYHQHSVVF	IGTRSGNLKK	VRVDGSQDAQ	450	
C1	LYETVSVVQG	SPILRDLLFS	PDHRHIYLLS	EKQVSQLPVE	T	500	
						550	
	SVTSSGVQLT	VAMRNVPLD	VGVSCEFEEV	TESEAILLPS	GELRCPSPSL	600	
C2	QELQTLTRGH	GATHTVRLQL	LSMETGVRFA	GVDFVFYN		650	
						700	
	QPLTLRAKNL	PQPQSGQKNY	ECVVRVQGRQ	HRVPAVRFNS	SSVQCQNASY	750	
C3	FYEGDEFQDT	ELDFSVVWDG	DFPIDKPPSF	RALLYK		800	
						850	
	GPKEGGTRVT	IVGENLGLTS	REVGRLVAGV	RCNSIPTEYV	SAERIVCEME	900	
	ESLVPSPPPG	PAELCVGDCS	ADFRTQSQQL	YSFVTPTFDR	VSPSRGPASG	950	
	GTRLTISGIS	LDAGSRVTVI	IRDGECQFVR	RDAEAIVCIS	PVSTLGPSQS	1000	
	PITLAIDHAN	ISNTGVIYTY	TQDPTVTHLE	PTWSIINGST	SITVSGTHLL	1050	
	TVQEPRVRAK	YRGIETTNTC	QVINDTAMLC	KAPGIFLGHP	QPRAQGEHPD	1100	
	EFGLLDHVQ	AARSLNRSSF	TYYPDPSFEP	LGPSGVLDVK	PGSHVVLK GK	1150	
	NLIPAAAGSS	RLNYTVLIGG	QPCALTVSDT	QLLCDSPSQT	GRQPVMVLVG	1200	
	GLEFWLGLTH	ITADR	ALTLP	AMVGLAAGGG	LLLLAITVVL	VAYKRKTQDA	1250
	DRTLKRLQLQ	MDNLESRVAL	ECKEAFaelQ	TDINELTNHM	DGVQIPFLDY	1300	
	RTYAVRVLFP	GIEAHPVLKE	LDTPPNVEKA	LRLFGQLLHS	RAFLLTFIHT	1350	
	LEAQSSFSMR	DRGTVASLTM	VALQSRLDYA	TGLLKQLLAD	LIEKNLESKN	1400	
	HPKLLLRTE	SVAEKMLTNW	FTLLHKFLK	ECAGEPLFLL	YCAIKQMEK	1450	
	GPIDAITGEA	RYSLEDKLI	RQIDYKTLT	LHCVCPESEG	SAQVPVKVLN	1500	
	CDSITQAKDK	LLDTVYKGIP	YSQRKAEDM	DLEWRQGRMA	RIILQDEDIT	1550	
	TKIECDWKR	NSLAHYQVTD	GSLVALVPKQ	VSAYNMANSF	TFTRSLSRYE	1600	
	SLLRAASSPD	SLRSRAPMLT	PDQEAGTKLW	HLVRNHDHTD	HREGDRGSKM	1650	
	VSEIYLTRLL	ATKGTLQKFV	DDLFTVFST	AHRGSALPLA	IKYMFDFLDE	1700	
	QADQRQISDP	DVRHTWKSNC	LPLRFVVNVI	KNPQFVFDIH	KNSITDACLS	1750	
	VVAQTFMDSC	STSEHRLGKD	SPSNKLLYAK	DIPNYKSWVE	RYYRDIKMA	1800	
	SISDQMDAY	LVEQSRLHAN	DFNVLSALSE	LYFYVTKYRQ	EILTSLDRDA	1850	
	SCRKHKLRQK	PEQIITLVSS	SS			1872	

Fig. 5 マウスプレキシシンのアミノ酸配列 N末端の青色で囲まれた領域はシグナル配列を示し、3カ所の緑色の領域はシステインリッチドメインを、赤色の領域は膜貫通領域を示している。また、膜貫通領域付近の黄色で示された領域はクローンC26及びクローンC35において欠失されている部位を示す。システイン残基の位置は○で示し、アスパラギン結合型糖鎖結合部位は◆で示している。細胞内領域のチロシンリンキナーゼの基質となりうるチロシン残基を▼で示す。

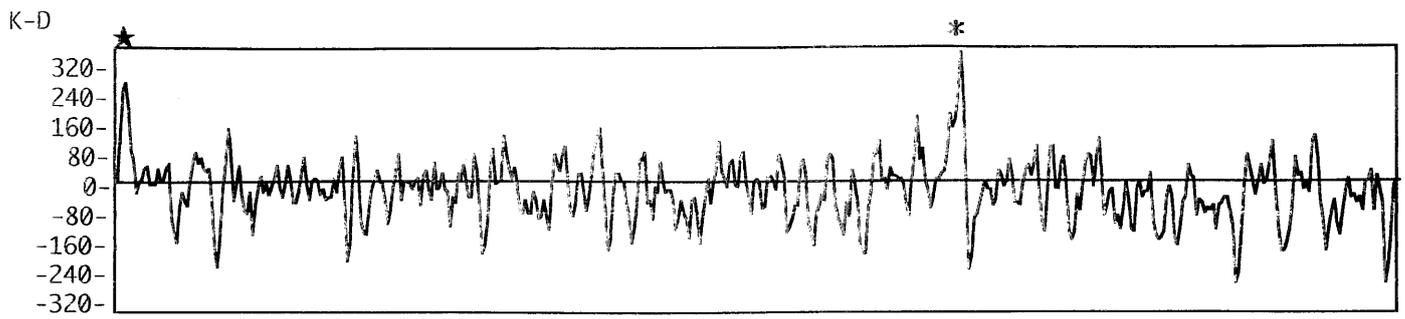
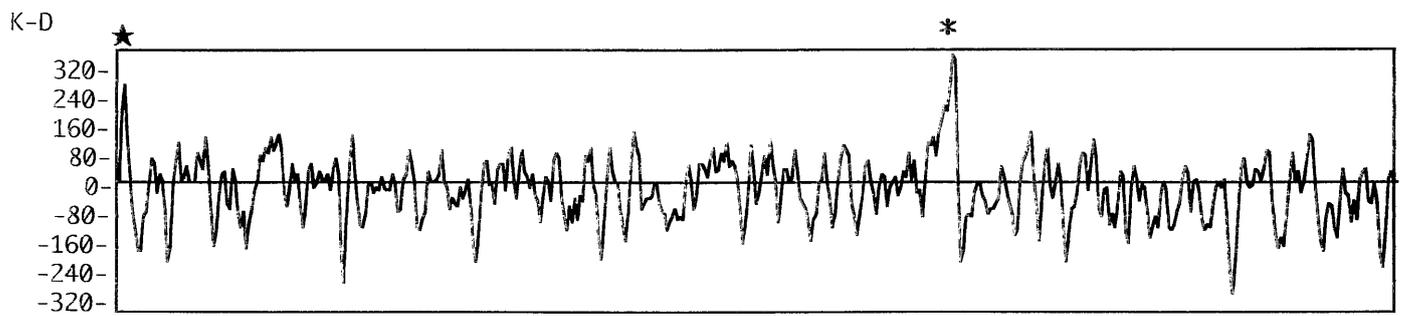
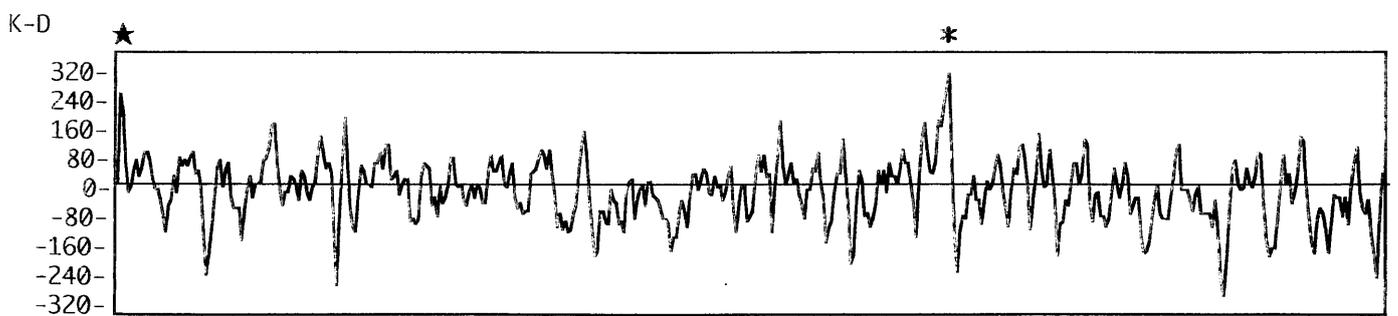
A**B****C**

Fig. 6 プレキシシン1 (A)、プレキシシン2 (B)、プレキシシン3 (C)のKyteとDoolittle法による疎水性解析。シグナル配列は★で示し、膜貫通領域を*で示した。

がら欠失を伴わない 770 塩基対の PCR 産物の方が、欠失を伴う 539 塩基対の PCR 産物に比べ数倍以上多かった (Fig. 1D)。このことから、231 塩基対の欠失を伴わない mRNA 由来のものをマウスプレキシシン 3 とした。マウスプレキシシン 3 は 144-5759bp にわたる 5616 塩基対の翻訳領域を持ち、推定されるポリペプチド鎖は 1872 アミノ酸残基である。疎水性解析の結果 (Fig. 6C)、マウスプレキシシン 3 もシグナル配列及び細胞膜貫通ドメイン (プレキシシン 3、1216-1242 アミノ酸残基) を持っていた。

Fig. 5 に示すように、マウスプレキシシン 3 においてもその細胞外領域に 3 回のシステイン繰り返し配列を持っている。C1 を除きほかのシステインリッチドメインは 8 個のシステイン残基を有し、既に述べたような特徴的な繰り返し配列をとっていた。マウスプレキシシン 3 の C1 ドメインでは 9 個のシステイン残基をその領域内に含んでいた。10カ所のアスパラギン結合型糖鎖結合部位が細胞外領域に存在していた。マウスプレキシシン 1、マウスプレキシシン 2 と同様に、マウスプレキシシン 3 もその細胞内領域にはチロシンキナーゼドメインは無い。

4. プレキシシンファミリー分子の構造比較

アフリカツメガエルプレキシシン、及び、マウスプレキシシン 1 はその全長のアミノ酸配列のレベルにおいて 84% のアイデンティティーを持っていた (Fig. 7)。細胞外領域の 3 カ所のシステインリッチドメインにおいてはそのアミノ酸配列は高く保存されており、62-91% のアミノ酸配列の相同性を有していた。さらに、細胞内領域においてはアフリカツメガエルプレキシシンとマウスプレキシシン 1 でおよそ 630 アミノ酸にわたって 94% と非常に高い相同性を持っていた。また、システインリッチドメインにおけるマウスプレキシシン 1 とマウス c-Met 蛋白のアミノ酸配列を比較すると、C3 ドメインが最も相同性が高く、32% のアイデンティティーがあった。

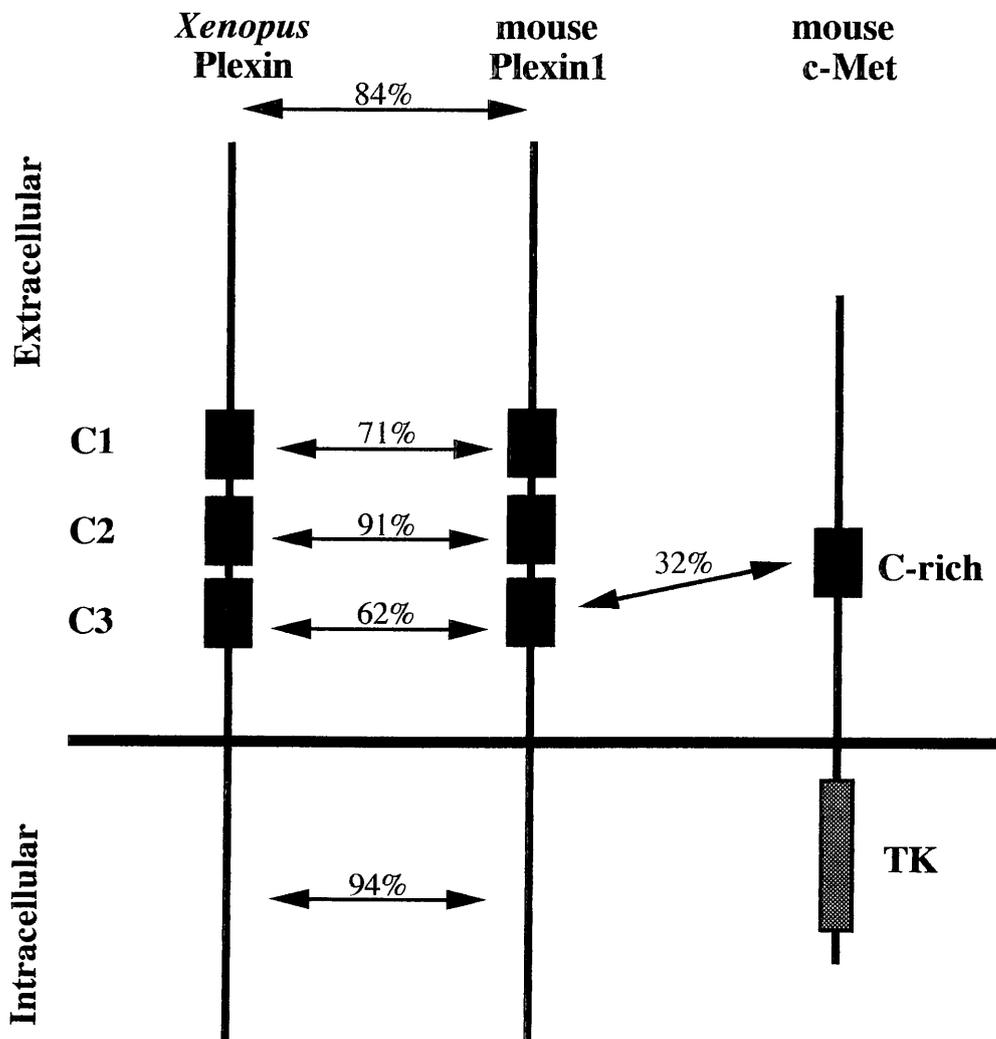


Fig. 7 マウスプレキシシン1とアフリカツメガエルプレキシシン、マウスc-Metの1次構造の比較。細胞外領域のシステインリッチドメインは、黒色の視覚で示す。(プレキシシンにおいては、C1, C2, C3, c-MetではC-rich) マウスc-Metは細胞内領域にチロシンキナーゼドメイン (TK) を有する。パーセントは、全長、あるいは、システインリッチドメイン、細胞内領域でのアミノ酸の相同性を示している。

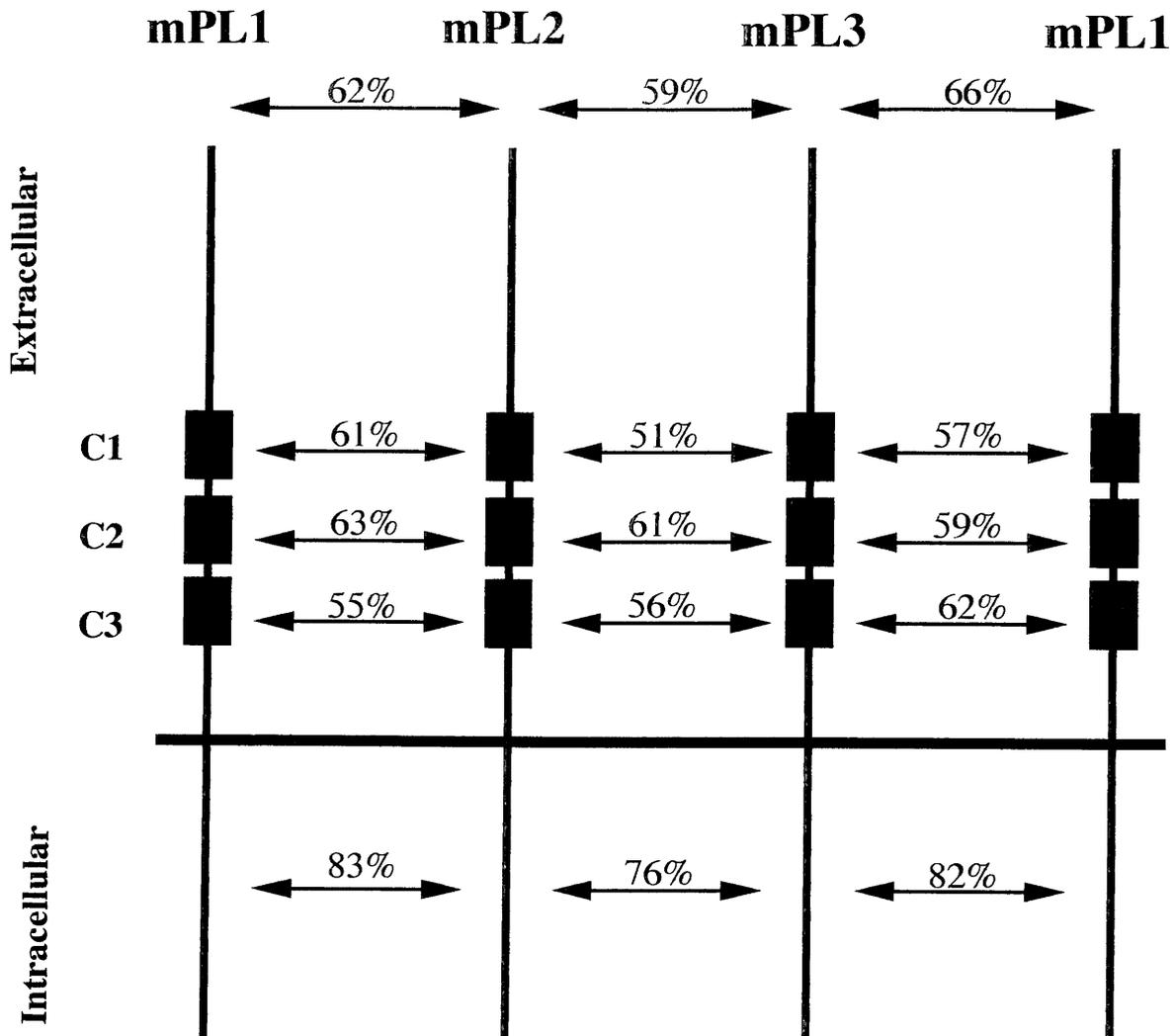


Fig. 8 マウスの各プレキシシン蛋白質の1次構造の比較。マウスプレキシシン1 (mPL1)、マウスプレキシシン2 (mPL2)、マウスプレキシシン3 (mPL3)。細胞外領域のシステインリッチドメインは、黒色ボックスで示す (C1, C2, C3)。パーセントは、全長、あるいは、システインリッチドメイン、細胞内領域でのアミノ酸の相同性を示している。

マウスのプレキシシンファミリー間でアミノ酸配列の相同性を比較すると (Fig. 8)、蛋白質の全長にわたって 59-66%であり、アフリカツメガエルプレキシシンとマウスプレキシシン 2、マウスプレキシシン 3 との相同性はそれぞれ 62%、65%であった。また、細胞外領域の 3 カ所のシステインリッチドメインはマウスプレキシシンファミリー分子間で 51-63%、細胞内領域は 76-83%と非常に高いアミノ酸配列のアイデンティティーを示していた。

5. プレキシシンファミリー分子の発現

プレキシシンファミリー分子の発現様式を明らかにするため、発生期、及び、生直後のマウスの脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、骨格筋より全 RNA を抽出し、ノーザンブロッティングを行った (Fig. 9)。マウスプレキシシン 1 は 9.5kb のバンドを、マウスプレキシシン 2 は 10.5kb のバンドを、マウスプレキシシン 3 は 7.5kb のバンドをそれぞれ認識していた。マウスプレキシシン 2 で Poly(A)⁺RNA のノーザンブロットで検出された 9kb と 7.2kb のバンド (Fig. 2) は検出されなかったが、これは検出限度以下であったためであると考えられる。

生後 1 日目のマウスの各組織における発現はそれぞれ次のようであった。プレキシシン 1 は脳で圧倒的に優勢に発現し、そのほかの組織では腎臓、胸腺、心臓、骨格筋で発現し、肝臓での発現は検出できなかった。プレキシシン 2 も特に脳に強く発現しており、そのほかの組織では心臓、骨格筋、腎臓、肝臓で非常に弱いながら発現していた。プレキシシン 3 も脳で強く発現がみられ、脳以外では腎臓で弱く発現していた。

発生段階を追って脳での発現をみると、プレキシシン 1 は神経前駆細胞が最終分裂を行い神経細胞の分化が起り始めている 1 2 日目胚で既に強い発現が認められた。その後、後期胚から生後に至るまで発生が進行している間は強い発現を維持しているが、成体になるとその発現は弱まる。プレキシシン 2 及び 3 もプレキシシン 1 とほぼ同様の発現動態を示し、発生中の脳で強い発現を示し、

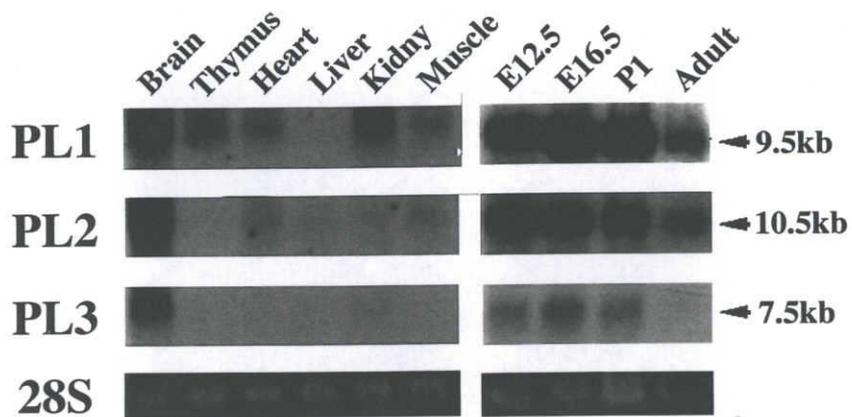


Fig. 9 ノーザンブロットイングでの各プレキシシンの mRNA の発現。マウスプレキシシン 1 (PL1)、マウスプレキシシン 2 (PL2)、マウスプレキシシン 3 (PL3)。全 RNA (20 μ g/レーン) を泳動し、それぞれ特異的なプローブでハイブリダイズさせた。下段のパネルは、コントロールとして 28S リボソーム RNA の量を示している。

成体の脳ではその発現が弱くなっていた。

V. 考察

プレキシシンファミリーの同定とその構造

本研究では、アフリカツメガエルで見いだされた膜蛋白質プレキシシンの相同分子がマウスにおいても存在することを明らかにしたばかりでなく、マウスにおいてはプレキシシンが分子ファミリー (Plexin Family) を構成していることを明らかにした。当研究室の須藤によるゲノムサザンプロットによる解析の結果、マウスではさらに多くのプレキシシンファミリー分子が存在することが示唆されている。本研究ではアフリカツメガエルプレキシシン cDNA をプローブに用いてマウス胎児脳 cDNA ライブラリーを検索することで、プレキシシン 1、プレキシシン 2、プレキシシン 3 の 3 種類の分子を同定したが、最近、須藤により、RT-PCR 法で脳に発現する新たなプレキシシン分子 (プレキシシン 4) も同定されている。このようにマウス神経系では少なくとも 4 種類のプレキシシンが発現しており、多様な神経回路の形成に関与しているものと推察できる。

プレキシシン 2 ではノーザンブロッティングで 3 つの長さの異なる mRNA が検出された (Fig. 2 参照)。一方、本研究では 3'非翻訳領域の長さの異なる 2 個のプレキシシン 2 cDNA クローン (クローン b2、クローン b11) を単離している (Fig. 1 参照)。これら 2 つのクロンの翻訳領域内での塩基配列は一致しており、それぞれの 3'末端には poly(A) 付加シグナルと poly(A) 配列が存在する。クローン b11 とクローン b14 を組み合わせるとその長さはおよそ 10 kb になり、クローン b2 とクローン b14 を組み合わせるとその長さはおよそ 7kb になる。このことから、主要な 10.5kb の mRNA と 7.2kb の mRNA は、poly(A) 付加サイトの違いによって生じた 3'非翻訳領域の長さの違いと考えることができる。しかしながら、本研究では 9kb の mRNA に相当する cDNA クローンが得られていないため、翻訳領域内でのスプライシングによるアイソフォームが存在する可能性が残されている。

プレキシシン 3 では RT-PCR 及び cDNA クローンの解析の結果から 2 種類のアイソフォームが存在することが明らかとなった。ノーザンブロットングでプレキシシン 3 に相当するバンドがブロードであったのはこのためであると考えられる。プレキシシン 3 のアイソフォームが時間的空間的にどのように制御された発現を示すのか、アイソフォームによる機能的な差は存在するのかは、今後、解明されなければならない問題である。

アフリカツメガエルプレキシシン及びマウスプレキシシンファミリー分子間で、細胞外のシステインリッチドメインは非常によく保存されていた。3 種のプレキシシンすべてにおいて、それぞれのシステインリッチドメインは 8 個の（マウスプレキシシンの C 1 のみ 9 個）のシステイン残基の繰り返し配列からなり、それは HGF（肝細胞増殖因子）受容体（Bottaro et al., 1991）である c-Met との相同性が認められた。細胞成長因子受容体の細胞外領域に存在するシステイン残基の繰り返し配列は一般的にリガンドとの結合に重要であると考えられている（Ullrich et al., 1984, 1985; Park et al., 1987; Bottaro et al., 1991）。プレキシシン蛋白質と c-Met 蛋白質のシステインリッチドメインにおける構造上の類似から、プレキシシンが成長因子受容体としての機能をはたしている可能性も考えられる。しかしながら、プレキシシンの細胞内領域はファミリー間で非常によく保存されているにも関わらず、そこには成長因子受容体の最も重要な機能ドメインであるチロシンキナーゼドメインは存在しない。また、c-Met 様細胞成長因子受容体に特徴的な蛋白質の分解を生じるプロセッシング部位の配列（Lys-Arg-Arg-Lys-Arg-Ser; Chan et al, 1988）はプレキシシンの細胞外領域には存在しない。このようなことから、プレキシシンは細胞成長因子の受容体であるとは考えにくい。

プレキシシンの細胞内領域はおよそ 630 アミノ酸残基からなり、アフリカツメガエルプレキシシンとマウスプレキシシン 1 の間でアミノ酸配列のレベルで 94% のアイデンティティーを示し種間を越えて非常によく保存されている（80% 前後のアミノ酸配列のアイデンティティー）。またマウスプレキシシンファミリー分子間でも非常によくその配列が保存されている。また、C 末端付近には 2 カ

所チロシンキナーゼ [Fig. 3~5, ▼印 ; コンセンサス配列 (Arg/Lys-X(2,3)-Asp/Glu-X(2,3)-Tyr); Hunter, 1982; Cooper et al, 1984] の基質となりうる配列がすべてのプレキシンファミリー分子において保存されている。このようにプレキシンファミリーの細胞内領域は非常に高く保存されているにも関わらず、既知の分子とのホモロジーは全く見いだせない。そのため、プレキシンの細胞内領域がどのような役割を担っているのか不明である。

本研究によりマウスにおいてプレキシン1、プレキシン2、プレキシン3と3種類のプレキシンファミリー分子が存在することを示したが、アフリカツメガエルにおいてマウスのプレキシン2及びプレキシン3に相当する分子が存在するのかは不明である。最近、ヒトにおいてプレキシンに相当する分子群 (Met 関連分子群) が存在することが報告された (Maestrini et al, 1996)。ヒトの Met 関連分子 NOV は、その全長の塩基配列及びアミノ酸配列は明らかになっていないが、プレキシン1のC末端側約半分 (アミノ酸残基 769-1530) と 96%アミノ酸配列のアイデンティティーがあり、プレキシン1のヒト相同分子であると考えられる。また、ヒト Met 関連分子 OCT 及び SEX はそれぞれプレキシン2及びプレキシン3と同一の分子であると考えられる。OCT の cDNA 断片 (マウスプレキシン2のアミノ酸 1126-1561 に相当する) がクローニングされており、マウスプレキシン2と98%のアミノ酸配列の相同性があることが明らかとなっている。SEX についてはその全長の配列が報告されており、マウスプレキシン3と全長のアミノ酸配列が94%同一である。

これらのことは、プレキシンがアフリカツメガエル、マウス、ヒトを含む脊椎動物で進化的に広く分布している膜蛋白質であり、少なくともマウスとヒトにおいては分子ファミリー (Plexin/SEX family) を構成していることを示している。

プレキシンファミリー分子の予測される機能

アフリカツメガエルにおける研究から、1) プレキシンはカルシウムイオン依存的なホモフィリックな細胞接着分子であること (Ohta et al, 1995)、2) プレキシンはアマクリン細胞と神経節細胞がシナプス結合をする内網状層に局在して発現し、アマクリン細胞の突起と神経節細胞の樹状突起との接着に関与していること (Ohta et al, 1992)、3) プレキシンは嗅神経線維の選択的な軸索束形成に関与していること (Satoda et al, 1995)、4) プレキシスが特定の神経回路を構成するすべての神経要素において発現する (Ohta et al, 1995)ことが明らかとなっている。このようなことから、プレキシンはホモフィリックな細胞接着性により、軸索の束形成や神経細胞相互の接着、あるいはシナプス結合の形成や維持に関与している可能性が考えられる。

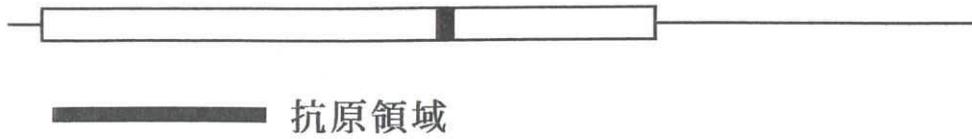
本研究におけるノーザンブロット解析の結果、プレキシン1、プレキシン2、プレキシン3はともに発生期のマウス脳において強い発現が認められた。ノーザンブロット解析では脳全体でのプレキシンの発現消長しか追跡することはできない。個々のプレキシン分子が発生途上の神経系のどこで発現するのかを明らかにするためには *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析が不可欠である。当研究室の村上との共同研究により、*in situ* ハイブリダイゼーションによる各プレキシンの mRNA の発現の解析が進行している。マウスプレキシン1は副嗅覚系と聴覚系において、この神経回路を構成する感覚器官から中枢の神経核などすべての神経要素で mRNA が検出されている。マウスプレキシン2は、一般体性感覚系を構成するすべての神経要素に発現が認められる。マウスプレキシン3では末梢の神経節において強い発現が認められている。このように発生途上の神経系で、個々のプレキシン分子が違った神経回路に選択的に発現していることから、プレキシスが特定の神経細胞間の相互認識や接着に関与し、特定の神経回路の形成や維持に重要な役割を果たしているものと推察される。

本研究ではマウス神経系で複数のプレキシンファミリー分子が発現することを明らかにしたが、プレキシンの機能については不明である。アフリカツメ

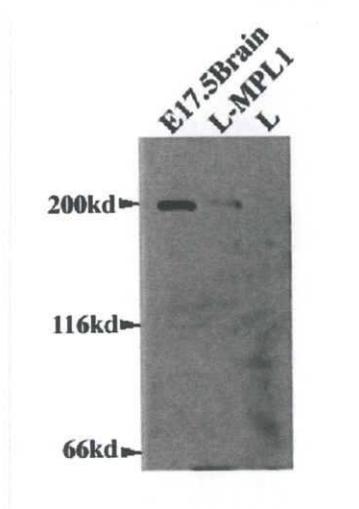
ガエルでは、プレキシンはカルシウム依存性のホモフィリックな細胞接着分子であることが明らかとなっている (Ohta et al, 1995)。従って、マウス神経系でのプレキシン分子の機能を理解するうえで、マウスプレキシンが細胞接着能を持っているのか、また、異なるタイプのプレキシンで細胞接着の特異性はあるのかを明らかにすることは重要である。細胞接着性を解析するためには株細胞にそれぞれのプレキシンを強制発現させ、旋回培養する手段が有効である。このためには、プレキシンを発現する細胞を識別するための抗体 (抗プレキシン抗体) を作製することが不可欠である。既に、附图 1A に示すように、プレキシン 1 の細胞外領域の一部を大腸菌で発現させ、それを抗原にしてポリクローナル抗体を作製した。さらに、この抗体を用いてマウスプレキシン 1 を強制発現させた細胞株の確立を試み、附图 1B に示すように、脳内に存在するプレキシン 1 とほぼ同じ分子量のプレキシン 1 蛋白質を発現する株細胞を分離している。今後、このような強制発現細胞株を用いてプレキシン 1 については細胞接着性を明らかにすることが可能であると考えられる。神経系の膜蛋白質は神経細胞上の特定の部位に局在して機能していることが多く、プレキシンの機能を理解するうえには、それぞれのプレキシンを特異的に認識する抗体を作製し、プレキシン蛋白質の局在を正確に把握することも重要である。

さらに、プレキシンの機能を明らかにするためには標的遺伝子破壊、トランスジェニックマウスの作出などの手段が不可欠である。本研究でマウス神経系に発現するプレキシン分子ファミリーが同定されたことで、このような発生工学的、遺伝子工学的な解析の道が開けたものが考えられる。今後、生体内でプレキシンの機能を改変し、その機能を明らかにしていくことを通して、多様な神経回路網の形成機構の一端が明らかにされると考えられる。

A MPL1



B



附図1 抗マウスプレキシシン1抗体の作成に用いた抗原領域と得られた抗体によるウエスタンブロット
17日胚脳とプレキシシン1発現細胞をSDS-PAGEしたもの。

VI. 引用文献

Baier, H., and Bonhoffer, F. (1992). Axon guidance by gradients of a target-derived component. *Science* 255, 472-475.

Bottaro, D.P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M.-L., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.

Chan, A. M.-L., King, H. W. S., Deakin, E. A., Tempest, P. R., Hilkens, J., Kroezen, V., Edwards, D. R., Wills, A. J., Brookes, P., and Cooper, C. S. (1988). Characterization of the mouse *met* proto-oncogene. *Oncogene* 2, 593-599.

Cheng, H.-J., Nakamoto, M., Bergman, A. D., and Flanagan, J. G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek-4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82, 371-381.

Chiba, A., Snow, P., Keshishian, H, and Hotta, Y.(1995). Fasciclin III as synaptic target recognition molecule in *Drosophila*. *Nature* 374, 166-168.

Chiba, A., and Keshishian, H. (1996). Neuronal pathfinding and recognition: Roles of cell adhesion molecules. *Dev. Biol.* 180, 424-432.

Colamarino, S. A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trpachler motor axons. *Cell* 81, 621-629.

- Comczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Cooper, J. A., Fred, S., Esh, S., Taylor, S., and Hunter, T. (1984). Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosin protein kinases *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 259, 7835-7841.
- Doherty, P., Cohen, J., and Walsh, F. S. (1990). Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 5, 209-219.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loeschinger, J., Noda, M., and Bonehoeffer, F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25kDa tectal protein related ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82, 359-370.
- Edelman, G. M., and Cunningham, B. A. (1990). Place-dependent cell adhesion, process retraction, and spatial signaling in neural morphogenesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 303-318.
- Fitzgerald, M., Kwiat, G. C., Middleton, J., and Pini, A. (1993). Ventral spinal cord inhibition of neurite outgrowth from embryonic rat dorsal root ganglia. *Development* 117, 1377-1384.
- Gennarini, G., Durbec, P., Bond, A., Rougon, G., and Goridis, C. (1991). Transfected F3/F11 neuronal cell surface protein mediates intercellular adhesion and promotes neurite outgrowth. *Neuron* 6, 595-606.

Goodman, C. S. and Shatz, C. J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72/Neuron 10 (Suppl), 77-98.

Huff, J. L., Jelinek, M.A., Borgman, C. A., Lansing, T. J., and Parsons, J.T. (1993). The proto-oncogene *c-sea* encodes a transmembrane protein-tyrosine kinase related to the Met/hepatocyte growth factor/ scatter factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6140-6144.

Hunter, T. (1982). Synthetic peptide substrates for tyrosin protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257, 4843-4848.

Kapfhammer, J. P., and Raper, J. A. (1987). Collapse of growth cone structure on contact with soecific neurites in culture. *J. Neurosci.* 7, 201-212.

Kawakami, A., Kitsukawa, T., Takagi, S., and Fujisawa, H. (1996). Developmentally regulated expression of a cellsurface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.* 29, 1-17.

Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., and Tessier Lavign, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.

Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., and Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108, 229-241.

Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

Lemmon, V., Farr, K. L., and Lagenaur, C. (1989). L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603.

Lin, D. M., and Goodman, C. S. (1994). Ectopic and increased expression of fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13, 507-523.

Luo, Y. L., Raible, D., and Raper, J. A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.

Luo, Y., Shepherd, I., Renzi, J. L. M. J., Chang, S., and Raper, J. A. (1995). A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 14, 1131-1140.

Maestrini, E., Tamagnone, L., Longati, P., Cremona, O., Gulisano, M., Bione, S., Tamanini, F., Neel, B. G., Toniolo, D., and Comoglio, P. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 674-678.

Matsunaga, M., Hatta, K., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). Guidance of optic nerve fibers by N-cadherin adhesion molecules. *Nature* 334, 62-64.

Matsunami, H., and Takeichi, M. (1995). Fetal brain subdivisions defined by R- and E-cadherin expressions: Evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* 172, 466-478.

Matthes, D. J., Sink, H., Kolodkin, A. L., Goodman, C. S. (1995). Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. *Cell* 81, 631-639.

Messersmith, E. K., Leonardo, E. D., Shatz, C. J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., and Kolodkin, A. L. (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14, 949-959.

Nakamoto, M., Cheng, H.-J., Friedman, G. C., McLaughlin, T., Hansen, M.J., Yoon, C. H., O'Leary, D.D.M., and Flanagan, J. G. (1996). Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* 86, 755-766.

Nose, A., Mahajan, V. B., and Goodman, C. S. (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscle and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* 70, 553-567.

Nose, A., Takeichi, M., and Goodman, C. S. (1994). Ectopic expression of connectin reveals a repulsive function during growth cone guidance and synapse formation. *Neuron* 13, 525-539.

Ohta, K., Takagi, S., Asou, H., and Fujisawa, H. (1992). Involvement of neuronal cell surface molecule B2 in the formation of retinal plexiform layers. *Neuron* 9, 151-161.

Ohta, K., Mizutani, A., Kawakami, A., Murakami, Y., Kasuya, Y., Takagi, S., Tanaka, H., and Fujisawa, H. (1995). Plexin: a novel neuronal cell surface molecule that mediates cell adhesion via a homophilic binding mechanism in the presence of calcium ions. *Neuron* 14, 1189-1199.

Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Woude, G. V. (1987). Sequence of *MET* protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosin kinase family of growth-factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6379-6383.

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T., and Dodd, J. (1990). Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development* 110, 19-30.

Puschel, A. W., Adams, R. H., and Betz, H. (1995). Murine semaphorin D/Collapsin is a member of a diverse gene family creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 14, 941-948.

Redies, C. and Takeichi, M. (1996). Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Dev. Biol.* 180, 413-423.

Ronsin, C., Muscatelli, F., Mattei, M.-G., and Breathnach, R. (1993). A novel putative receptor protein tyrosin kinase of the met family. *Oncogene* 8, 1195-1202.

Roskies, A. L., and O'Leary, D. D. M. (1994). Control of topographic retinal axon branching by inhibitory membrane-bound molecules. *Science* 265, 799-803.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Satoda, M., Takagi, S., Ohta, K., Hirata, T., and Fujisawa, H. (1995). Differential expression of two cell surface proteins, neuropilin and plexin, in *Xenopus* olfactory axon subclasses. *J. Neurosci.* 15, 942-955.
- Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., and Tessier-Lavign, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.
- Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C., Tessier-Lavign, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 1001-1014.
- Sperry, R. W. (1963). Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 703-710.
- Takagi, S., Tsuji, T., Amagai, T., Takamatsu, T., and Fujisawa, H. (1987). Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 122, 90-100.
- Takeichi, M., Inuzuka, H., Shimamura, K., Fujimori, T., and Nagafuchi, A. (1990). Cadherin subclass: Differential expression and their roles in neuronal morphogenesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 319-325.

Tessier-Lavign, M., Placzek, M., Lumsden, A. G. S., Dodd, J., and Jessell, T.(1988).
Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system.
Nature 336, 775-778.

Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of the axon
guidance. Science 274, 1123-1133.

von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites.
Nucl. acids Res. 14, 4683-4690.

謝辞

本研究の遂行にあたりご指導くださりました名古屋大学理學部分子生物學科第7講座の藤澤肇教授に心より感謝申し上げます。

また、研究の途上で数多くの有益な御助言をいただきました、高木新助教授、川上厚志助手、平田たつみ助手をはじめ、終始御協力、御配慮をしてくださりました第7講座の諸氏に感謝申し上げます。