

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 12 年度博士課程 入学

氏名 道下 正貴

指導教官名 土井 邦雄

論文題目 Molecular biological characterization of *Btcl* gene family members
Btcl 遺伝子ファミリーの分子生物学的解析

[目的]

中枢神経系の複雑かつ正確な機能には、適切な神経回路形成が必須である。発達期から成熟期に至るまで、神経回路形成は軸索ガイダンス、シナプス形成あるいは回路修復などの諸過程で重要な役割を果たす。軸索ガイダンスは反発性と誘因性に大別される。例えば、反発性軸索ガイダンス分子の一つである分泌型セマフォリンは膜受容体と結合する。受容体はニューロピリン(Np)およびプレキシン複合体からなり、Np はリガンド結合、プレキシンは細胞内シグナル伝達として機能し、正確な軸索投射のために反発性成長円錐崩壊を生じる。それらは低分子量 G タンパク質などを介して成長円錐内のアクチンの伸張・収縮を誘導することが知られている。これらの現象を司る数多くのタンパク質が同定され、その機能解析が進められているが、その全体像は未だ明らかではない。

神経回路形成の基盤となる細胞間相互作用を仲介するのは、分泌性および膜タンパク質である。これらのタンパク質はアミノ末端領域に疎水性アミノ酸残基群からなる特徴的なシグナルシークエンスをもつ。シグナルシークエンスを持つタンパク質、すなわち分泌性および膜タンパク質を特異的に分離するシグナルシークエストラップ (SST) 法を用いて、神経回路形成に関わる新規遺伝子の同定・機能解析を遂行することは、神経回路形成の分子機構解明に必須である。本研究では、SST 法を用いて、分泌性および膜タンパク質の網羅的な単離同定を行った。さらに、脳特異的に発現する新規 *Btcl* (brain-specific transmembrane protein containing CUB and LDLa domains) 遺伝子ファミリーメンバー、*Btcl1* および *Btcl2* cDNA に着目して、分子生物学的に解析をおこなった。

[方法と結果]

SST 法を用いた分泌性および膜タンパク質をコードする遺伝子の単離

神経回路形成に重要な分泌性および膜タンパク質をコードする新規遺伝子を同定するために、マウス小脳 cDNA ライブラリーを用いて、酵母を利用した SST 法を行った。酵母は、多糖類のみを供給した培養条件下では、多糖類を単糖類に分解する酵素インベルターゼを分泌して生育する。そこで、マウス遺伝子とシグナルシーケンスを欠く酵母由来のインベルターゼ遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製し、それらを酵母（インベルターゼ欠損株）にトランスフェクションし、多糖類のみが存在する条件下で培養を行った。酵母はマウス由来のタンパク質とインベルターゼタンパク質の融合タンパク質を合成する。マウス由来のタンパク質にシグナルシーケンスが含有されている場合は、酵母から融合タンパク質として分泌され、酵母の成長を可能にするが、シグナルシーケンスを含有しない場合は、融合タンパク質は分泌されず、酵母の成長は観察されない。成長した個々のコロニー（クローン）から、cDNA が組み込まれたプラスミドを回収し、全クローンの DNA シークエンシングを行い、1700 クロオンを単離した。これらのクローンの中には多数の既知のタンパク質（72%、GABA レセプターおよびクロモグラニンなど）や新規タンパク質（28%）をコードする cDNA が含まれていた。新規遺伝子について、断片化 cDNA を用いてライブラリースクリーニングを行い、脳特異的に発現する cDNA (*Btcl1* および *Btcl2*) を単離した。これらはこれまでに報告のない新規の遺伝子である。

Btcl1 および *Btcl2*cDNA の特徴付け

単離された *Btcl1* および *Btcl2* cDNA は、アミノ酸 533 個および 553 個のタンパク質をコードしており、細胞外領域に 2 つの CUB ドメイン、1 つの LDLa ドメイン、膜貫通領域および細胞質内ドメインを持つと推定された。それらはアミノ酸レベルで 51% の相同性を示し、細胞外ドメイン間の相同性は CUB1 では 63%、CUB2 では 72%、LDLa では 83% であった。また、BTCL1/2 の CUB ドメインは、反発性軸索ガイダンス、クラス 3 セマフォリンレセプターである Np1 および Np2 の CUB ドメインに高い相同性を示した。また、複数の CUB および LDLa ドメインをもつタンパク質は、LRP3、LRP9、ST7 など数多く存在するが、BTCL1/2 のドメイン構造の組み合わせ（2 つの CUB ドメインと 1 つの LDLa ドメイン）を持つタンパク質は初めての発見である。

Btcl1 および *Btcl2* 転写産物の発現分布

生体組織のノーザンブロット解析では、*Btcl1* および *Btcl2* 転写産物は、脳特異的に 3.7 kb および 6 kb の単一バンドとしてそれぞれ発現していた。さらに、胎生から成体までのマウス脳神経組織を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析では、それらの転写産物は少なくとも胎生 13 日齢から発現し始め、成体でも発現していた。*Btcl1* および *Btcl2* 転写産物の特徴的な発現パターンは、神経組織発達期において、橋核、大脳皮質、海馬、小脳等で観察された。橋小脳神経回路の顕著な発達時期（胎生後期から出生初期）では、両転写産物は橋核で高発現を示した。胎生期の大脳皮質では、*Btcl1* 転写産物は辺縁層およびサブプレート層で、*Btcl2* 転写産物はそれらに挟まれる皮質板でみられ、相補性発現を示した。また、*Btcl1* 転写産物の海馬における発現は、生後から CA3 領域に高くなり、小脳ではその神経回路形成の樹立（生後三週）後から劇的に減少する。これらの発現時期が神経回路の樹立に一致していることから、BTCL1/2 は神経回路形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、胎生期の後根神経節や三叉神経節などの末梢神経系組織においてもそれらの転写産物の発現が観察され、末梢

神経回路の形成にも関与する可能性も考えられる。

BTCL1/2 間の相互作用

BTCL1/2 分子が独特なドメイン構造をもつことに注目した。BTCL1/2 は細胞外領域に 2 つの CUB ドメインを持つ。CUB ドメインは、タンパク質間または CUB ドメイン間の相互作用に関与することが知られている。そこで、BTCL1/2 が同種間および異種間親和性を有するかどうかを免疫沈降法および免疫プロット法により解析した。HA あるいは myc タグ付き BTCL1 と HA タグ付き BTCL2 を組み込んだ発現ベクターを作製し、COS-7 細胞に発現させ、HA あるいは myc タグに対する抗体を用いて免疫沈降した。それぞれ共沈したタンパク質に対して HA タグおよび myc タグに対する抗体で免疫プロット法を行ったところ、BTCL1 は同種間および異種間相互作用を示し、BTCL2 は少なくとも異種間相互作用を示した。BTCL1/2 のドメイン構造からも予想できるように、BTCL1/2 は CUB ドメインを介して相互作用することが示唆された。

BTCL1/2 と Np1 間の相互作用

BTCL1/2 の CUB ドメインがクラス 3 セマフォリンのレセプターである Np1 の CUB ドメインと相同性を示すことから、BTCL1/2 と Np1 との相互作用を解析した。myc タグ付き Np1 を組み込んだ発現ベクターと HA タグ付き BTCL1 あるいは BTCL2 発現ベクターを COS-7 細胞に発現させ、それぞれのタグに対する抗体を用いて免疫沈降および免疫プロット法により解析した。それらの結果から、BTCL1 および BTCL2 は Np1 と相互作用することが明らかとなった。

BTCL1/2 とプレキシン A 間の相互作用

クラス 3 セマフォリンと結合する Np1 はプレキシン A メンバー (A1~A4) とレセプター複合体を形成することが知られているが、Np1 とプレキシン A との結合部位は明らかではない。BTCL1/2 がプレキシン A1~A4 と相互作用するかの解析を行ったところ、Np1 同様に、BTCL1/2 はすべてのプレキシン A メンバーと相互作用することが明らかとなった。

以上の結果から、BTCL1/2 はセマフォリンレセプターを形成する分子と相互作用し、セマフォリンシグナルを介した反発性の軸索ガイダンスに関与する可能性が示唆された。

Np1 およびプレキシン A1 に対する BTCL1 の相互作用部位の決定

次に、BTCL1 の各種ドメイン変異体と Np1 あるいはプレキシン A1 の相互作用について詳細に検討した。BTCL1 ドメイン変異体 (細胞質ドメイン欠失、CUB1 ドメイン欠失、CUB2 ドメイン欠失、CUB1 と CUB2 の両ドメイン欠失; すべて HA タグ付き) を組み込んだ発現ベクターを作製し、それらの変異体をそれぞれ myc タグ付き Np1 あるいはプレキシン A1 とともに COS-7 細胞に発現させ、Np1 あるいはプレキシン A1 に対する BTCL1 の相互作用部位を決定した。BTCL1 細胞質ドメイン欠失変異体は Np1 およびプレキシン A と相互作用したので、細胞外ドメインを介した結合が示唆された。さらに、BTCL1 の CUB1 と CUB2 ドメイン欠失変異体は、Np1 とプレキシン A1 のいずれとも相互作用しない。しかし、CUB ドメインの片方のみを欠失した変異体は、Np1 あるいはプレキシン A と相互作用した。これらの結果より、BTCL1 と Np1 および BTCL1 とプレキシン A1 との相互作用は CUB ドメインを介して行われ、さらに 1 つの CUB ドメインがその相互作用に十分な役割を担っていることが示唆された。

[総括]

BTCL1/2 は細胞外領域に 2 つの CUB ドメインを持つ、他のタンパクには見られない独特なドメイン構造をもつ新規ファミリーを形成する。*Btcl1/2* mRNA の発現は、Np1 および Np1 とセマフォリンレセプター複合体を形成する分子プレキシシン A メンバーの発現パターンと類似していた。さらに、BTCL1/2 は Np1 およびプレキシシン A と相互作用することを明らかにした。これらの結果は BTCL1/2 が発達期の神経組織、とくに神経回路形成においてその役割を果たす可能性を示唆する。

神経系、とくに軸索ガイダンスにおける BTCL の役割に対する次の仮説を提案する。第一に、BTCL1/Np1/プレキシシンの三者の発現に応じて、特定の領域において、特定の時期に軸索ガイダンスに影響する、あるいは、3 者の組み合わせが Np1/プレキシシンだけでは不可能なシグナルを供給する。第二に、Np1 に対するセマフォリンの結合は、Np1 に対する BTCL1 の親和性に応じて反発性軸索反応を調節する。第三に、BTCL1/2 がクラス 3 セマフォリンの直接のレセプターである。

上記に述べた仮説を明らかにするためには、BTCL1/2 の生理機能、すなわち、セマフォリンレセプターとしての BTCL1/2 の役割、軸索反応における BTCL1/2 の細胞質領域の役割および細胞質領域が誘起する細胞内シグナル伝達系の役割を解明することが必須である。本研究は BTCL1/2 介在性軸索ガイダンスの分子機構を解明する基礎となるものである。また、BTCL1/2 の生理機能の研究は、軸索ガイダンス機構の解明だけでなく、中枢神経系の各種疾患や障害の理解やその治療にも重要な役割を果たす可能性がある。