

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

みちした まさき
申請者氏名 道下 正貴

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。その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り、それらはアミノ末端領域にシグナルシーケンスをもつ。シグナルシーケンスを持つタンパク質を特異的に分離するシグナルシーケンストラップ（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重要である。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。

SST 法を用いた分泌性および膜タンパク質遺伝子の単離

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。SST 法により単離された断片化 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新規遺伝子 (*Btcl1* および *Btcl2*) を単離した。

Btcl1 および *Btcl2* cDNA の特徴

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、細胞外ドメインの 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、Neuropilin(Np) の CUB ドメインに高い相同性を示した。

Btcl1/2 転写産物の発現分布

生体組織のノーザンプロット解析では、*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検出された。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、*Btcl1/2* 転写産物は胎生中期から発現し始め、成体でも発現していた。特に、*Btcl1/2* 転写産物の特徴的な発現パターンは、神経組織発達期の橋核、大脳皮質、海馬、小脳、末梢神経組織等で観察された。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 の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。

BTCL1/2 間の相互作用

BTCL1/2 はタンパク質相互作用に関与する CUB ドメインをもつ。BTCL1/2 が同種間および異種間親和性を有するかどうか免疫沈降法により解析した。BTCL1 + HA あるいは BTCL2 + myc と BTCL1 + myc を、COS 細胞に共発現させ、それぞれのタグに対する抗体を用いて免疫沈降した。そ

それぞれ共沈したタンパク質に対して HA および myc タグに対する抗体で免疫プロットを行ったところ、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。

BTCL とセマフォリンレセプター間の相互作用

BTCL1/2 の CUB ドメインがセマフォリンレセプターである 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。さらに、Np1 と複合体を形成する Plexin-A (A1-A4) についても解析した。Np1 · myc あるいは Plexin-A · myc と BTCL1 · HA あるいは BTCL2 · HA をそれぞれ COS 細胞に共発現させ、それぞれのタグに対する抗体を用いて免疫沈降を行った。それらの結果から、BTCL1/2 は Np1 および Plexin-A と相互作用することが明らかとなり、セマフォリンレセプターを形成する可能性が示唆された。

Np1 および Plexin-A1 に対する BTCL1 の相互作用部位の決定

BTCL1 の各種ドメイン変異体と Np1 あるいは Plexin-A1 の相互作用について詳細に検討した。BTCL1 ドメイン変異体をそれぞれ Np1 あるいは Plexin-A1 とともに COS 細胞に発現させ、Np1 あるいは Plexin-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 Plexin-A と相互作用し、BTCL1 の両 CUB ドメイン欠失変異体は、いずれとも相互作用しなかった。いずれかの CUB ドメイン欠失変異体は、両者と相互作用を示した。これらの結果より、Np1 および Plexin-A1 に対する BTCL1 の相互作用は CUB ドメインを介して行われ、少なくとも 1 つの CUB ドメインが十分な役割を担っていることが示唆された。

本研究により新規遺伝子 BTCL1/2 が発達期の神経組織、とくに神経回路形成において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これは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中枢神経系の各種疾患や障害の理解および治療にも重要な情報を提供する可能性がある。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。