

中枢神経系のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトに に発現する未知の遺伝子の同定

新潟大学脳研究所神経内科学分野（主任：辻 省次教授）

馬場 広子

Identification of Novel mRNAs Expressed in Oligodendrocytes

Hiroko BABA

*Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University, Niigata
(Director: Prof. Shoji Tsuji)*

1. はじめに

ミエリンは神経軸索の周囲を幾重にも取り巻く膜様構造物であり、中枢神経系ではオリゴデンドロサイト、末梢神経系ではシュワン細胞によって形成される。ミエリンとミエリンの間は神経軸索の露出するランヴィエ絞輪とよばれる部分があり、ミエリンによる絶縁とこのランヴィエ絞輪構造によっていわゆる跳躍伝導を生じ、軸索の電気的興奮をより早くかつ効率的に末梢に伝えるのに役立っている。このようなミエリンの異常によってさまざまなヒトの疾患あるいはミュータント動物が生じることが知られている。

ミエリンはその構成成分の約70%が脂質であり、残りの約30%を蛋白質が占める。中枢神経系の発生段階においてはミエリン膜は比較的急速に形成され、マウスやラットなどのげっ歯類では生後20日前後の数日間で大部分が形成されることが知られている。このため、ミエリンの形成に際して、オリゴデンドロサイトではミエリン構成蛋白質および脂質合成にかかわる酵素類が短期間に時期を同じくして発現する。主要なミエリン構成蛋白質とし

ては、現在までに proteolipid protein (PLP), myelin basic protein (MBP), 2', 3' cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP), myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG), myelin-associated glycoprotein (MAG) が知られており、近年それぞれの遺伝子がクローニングされたことによってその構造上の特徴が明らかにされ、ミエリンにおける各々の蛋白質の機能が明らかになってきている¹⁾。しかしながら、脳の発達段階あるいは何らかの原因でいったん形成されたミエリンが破壊された場合(脱髄)において、これらのオリゴデンドロサイトに特異的な蛋白質の発現がどのように調節され、ミエリンの形成あるいは再生が起きるのか、というメカニズムに関しては未だに明らかにされていない。

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) は中枢神経系における代表的な脱髄疾患である。病因は細胞障害性T細胞の活性化に伴う自己免疫によってミエリン膜が破壊されるが、この自己免疫を引き起こす引き金はいまだに明らかではない。かねてから MBP を抗原としてマウスで脱髄病変を生じる実験性アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) と MS との類似性から、MS においても MBP

Reprint requests to: Hiroko BABA,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科学分野
馬場 広子

の自己抗原性が指摘されているが、これまでに明らかな因果関係は認められていない²⁾。MBP の他に抗原となる可能性のあるミエリン構成蛋白質として、PLP、MOG、および MAG が報告されており²⁾、MS における免疫異常は EAE のような単一抗原によってもたらされるのではなく、未知のミエリン構成成分を含むいろいろなミエリン蛋白質に対する免疫応答が脱髄に関係しているものと思われる。MS 患者においては、脱髄を生じた後でミエリンの再生を促すことは後遺症を防ぐ上で重要であるが、このためにはオリゴデンドロサイトにおいてミエリン形成（再生）がどのような機序で行われるかを明らかにすることが重要である。この過程では他のミエリン構成成分、オリゴデンドロサイトと軸索相互の認識に関与する分子、ミエリン蛋白質遺伝子の活性調節に関わる因子、あるいはミエリン形成やミエリンの再生の過程における細胞の形状に関わる因子など、まだ同定されていない未知の分子が多く関わっていると思われる。今回はこのようなこれまでにわかっていない分子を同定し、ミエリン形成や維持におけるこれらの機能を明らかにしていくことを目的として研究を行った。

このような未知の遺伝子を同定していくには、サブトラクション法やディファレンシャルスクリーニング法³⁾ および最近一般的になった differential display が有用である。これらの方法は 1) 特定の細胞や組織にのみ発現される遺伝子、2) 発生過程で特定の時期にのみ発現されている遺伝子、3) 細胞や組織にある処理を加えた際に誘導されてくる遺伝子など、2種類の細胞あるいは組織でそれぞれに発現の異なる遺伝子をクローニングする目的に用いられる。特にサブトラクション法によって、これまでに Charcot-Marie-Tooth 病の病因遺伝子である PMP22⁴⁾ を初めとして数々の新しい遺伝子が同定されてきた⁵⁾⁶⁾。私はこの手法を用いてオリゴデンドロサイトに発現するいくつかの遺伝子を新たに同定し、それらの遺伝子のコードする蛋白質の中枢神経系における分布を明らかにし、その役割を考察した。

2. 実験方法

1) オリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーの作製

新生仔ラットの大脳半球から脳初代培養を行い、培養10日から11日後に McCarthy と DeVellis らの方法⁷⁾ に基づいてオリゴデンドロサイトを単離し、poly-lysine 処理したディッシュに培養した。この後3日から7日培養した後、トリプシン処理によってオリゴデンドロサイトを

集め、全 RNA を抽出し、oligo (dT) カラムによって poly A⁺ RNA を精製した。この poly A⁺ RNA から Superscript kit (GIBCO BRL) を用いて、Oligo (dT) プライマーにより逆転写酵素反応を行ない cDNA を作製した。その後 EcoRI アダプターをライゲーションし、λZAP II (Stratagene) に挿入することによってラットオリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーを作製した。サブトラクションプローブを用いたスクリーニングのため、Stratagene の用法に従ってオリゴデンドロサイト cDNA ライブラリー・λZAP II からインサートを含む pBluescript cDNA ライブラリーを得た。

2) ディファレンシャルスクリーニング法によるオリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーのスクリーニング

ライブラリースクリーニングのストラテジーは図 1 に示すように、古典的なディファレンシャルスクリーニング法と、サブトラクションプローブを用いた方法の2種類を行った。

a. 古典的ディファレンシャルスクリーニング法

生後3日齢のラットの脳および肝から抽出した poly A⁺ RNA から M-MLV 逆転写酵素 (GIBCO BRL) を用いて一本鎖 cDNA を作製したのち、ランダムプライム法を用いてこれらの cDNA を ³²P で標識してプローブとした。プレートあたり 1,500 プラークの密度で生育させたオリゴデンドロサイト cDNA・λZAP II ライブラリーから各プレートあたり 2 枚づつフィルターを作製し、標識した脳あるいは肝の cDNA をプローブとしてそれぞれのフィルターのハイブリダイゼーションを行った。この結果脳 cDNA プローブ陽性かつ肝 cDNA プローブ陰性のプラークを選び、その後のスクリーニングに用いた (図 1)。2次スクリーニングには前述の脳および肝 cDNA の他に既知のミエリン蛋白質の混合 cDNA (MBP, PLP, CNP, MAG) をプローブとして、これらに関連する cDNA プラークをのぞいた。同様にスクリーニングを繰り返し、最終的に脳 cDNA プローブ陽性かつ肝 cDNA 陰性、ミエリン cDNA 陰性のプラークを選択した。

b. サブトラクションプローブを用いたディファレンシャルスクリーニング

ディファレンシャルスクリーニングの感度を上げる目的で Phenol emulsion-enriched DNA-driven subtractive cDNA cloning (PERT) を用いてサブトラクションプローブを作製した⁸⁾¹⁰⁾。生後30日齢ラットの脳から抽出した poly A⁺ RNA からオリゴ (dT) プライマー

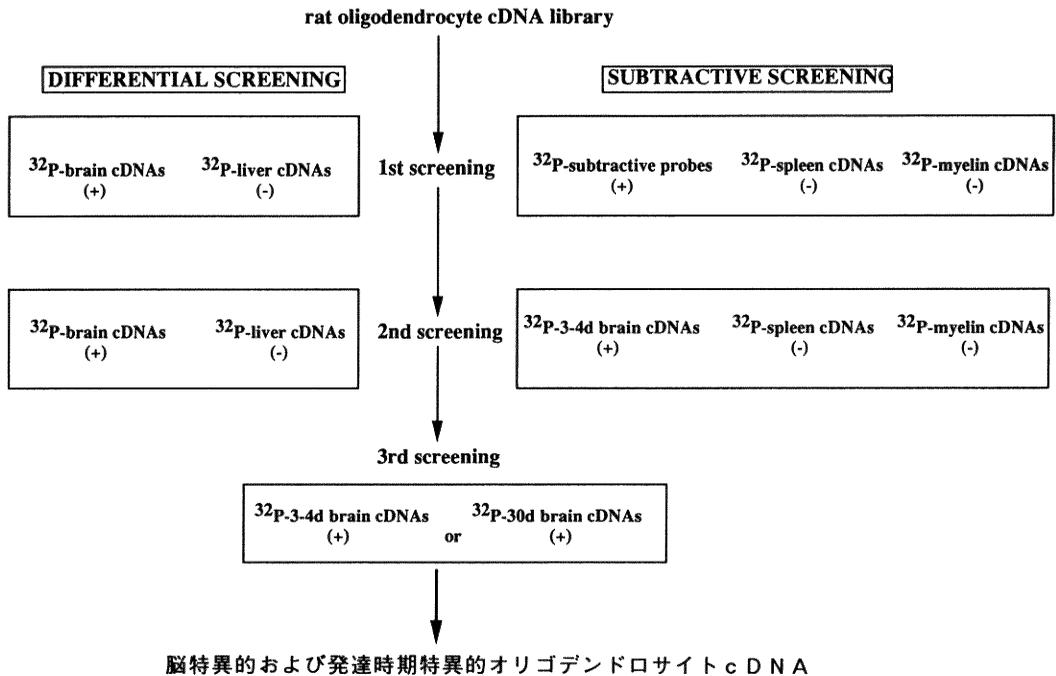


図1 スクリーニング方法の概略

ラットオリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーは図に示すようなプローブを用いてスクリーニングを行った。

を用いて 1 mCi ^{32}P - α -dCTP 存在下で1本鎖脳 cDNA を作製した。2M NaSCN と12% フェノール存在下でこの標識された cDNA を100倍量の熱変性した脾臓 cDNA ライブラリープラスミド (*EcoRI* で切断) と混合し、激しく振盪させながらハイブリダイゼーションさせることによって、共通に存在する cDNA をサブトラクションした。ハイブリダイゼーションの後ハイドロキシアパタイトカラムを用いて脳1本鎖 cDNA を単離し、プローブとした。オリゴデンドロサイト cDNA ライブラリー (pBluescript) をプレートあたり1,500コロニーまき、フィルターに転写し、これを ^{32}P 標識したサブトラクションプローブ、あるいは標識1本鎖脾臓 cDNA プローブ、標識ミエリン蛋白質 cDNA プローブでそれぞれハイブリダイゼーションを行った。サブトラクションプローブ陽性、脾臓 cDNA 陰性、ミエリン蛋白質 cDNA 陰性のコロニーを選択し、その後のスクリーニングを行った。2次スクリーニングはフィルターを3枚用意し、それぞれ脳 cDNA、脾臓 cDNA あるいはミエリン蛋白質 cDNA でディファレンシャルスクリーニングを行った。脳 cDNA のみで陽性のコロニーを選択した。3次スクリーニングでは生後3日齢のラット脳 cDNA およ

び30日齢脳 cDNA でそれぞれスクリーニングを行い、これらの2つの中でディファレンシャルシグナルを示すものを選んだ。

3) サザンブロット法を用いたスクリーニング

上記のようにして選択したクローンを *EcoRI* で切断し、アガロースゲルで電気泳動を行った後サザンブロットを作製し、 ^{32}P 標識脳 cDNA、脾臓 cDNA、肝 cDNA をプローブとしてそれぞれハイブリダイゼーションを行い¹¹⁾、脳 cDNA とのみハイブリダイズするクローンを選択した。

4) スロットブロット法あるいはノーザンブロット法を用いたスクリーニング

成熟ラットおよび発育段階のラット脳および各組織から全 RNA および poly A⁺ RNA を調整した。10 μg の全 RNA あるいは 2 μg の poly A⁺ RNA をスロットブロットあるいはノーザンブロットしたフィルターに、 ^{32}P 標識した cDNA インサートをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った (1 mM EDTA, pH 7.0/5% SDS/50% formamide/0.5 M Phosphate buffer, 42°C)¹²⁾。これらのブロットは洗浄バッファー (1X SSC/0.1% SDS) で室温30分2回、0.1X SSC/0.1% SDS 溶

液で42℃、30分2回洗浄した後オートラジオグラフィを行った。脳において特に発現の多いクローンを選択してその後の解析に用いた。

5) 培養細胞における *in situ* ハイブリダイゼーション

新生仔ラット大脳から脳初代培養を行い、poly-lysine処理したチャンバースライド (Nunc) 上で培養した。培養14日後、細胞を PBS で洗った後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて室温で1時間固定した。固定後 PBS で洗浄し、以下の操作に移るまで4℃で保存した。プラスミドから分離抽出した各 cDNA インサート 500 ng を、Genus kit (Boeringer Mannheim Biochemicals) を用いて digoxigenin (DIG) 標識した。Amur-Umarjee らの方法¹³⁾に従って以下のように *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。スライドガラスを70%エタノールで4℃1時間処理した後0.2N HCl で室温15分、引き続いて65℃、30分処理して内因性アルカリフォスターゼ (Al-P) を失活させた後、2X SSC で5分間洗浄した。プレハイブリダイゼーション液 (40% formamide, 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 100 µg/ml 変性サーモン DNA) で室温1時間インキュベーションし、20 ng の DIG 標識 cDNA プローブを含むハイブリダイゼーション液 (45% formamide, 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate) 中で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後45% formamide/6X SSC 液で42℃15分2回、2X SSC 室温5分2回、0.2X SSC 50℃15分づつ2回洗浄した。細胞を0.5%ブロッキング液 (Genus kit) 中でブロッキングした後 Al-P を結合した抗 DIG 抗体でインキュベーションした。数回リンスした後、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)、4-nitroblue tetrazolium salt (NBT) を混合した発色液を加えて遮光下で一晩発色させ、TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA) で反応を停止し、水溶性封入剤を用いて封入、検鏡した。

in situ ハイブリダイゼーションと抗体を用いた二重染色は Amur-Umarjee らの方法に従った¹³⁾。細胞は4% PFA で固定した後0.25%ブロッキング液 (Genus kit) で処理し、オリゴデンドロサイトに特異的なガラクトセレブロシドの抗体である R-mAb¹⁴⁾ で一時間室温でインキュベーションした。Tris-buffered saline (TBS) で3回洗浄した後上記のようにして DIG 標識した cDNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。発色には、ローダミン標識抗 DIG 抗体および Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス IgG

抗体を用いた。細胞は TBS で3回洗った後水溶性封入剤で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-Rad MRC-500, Richmond, CA) で観察した。

6) 脳切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション

DIG 標識した cRNA プローブを Genus kit の用法に従って準備し、アルカリ処理によって約 250 bp 程度の長さに分解した。生後17日齢のマウス脳の凍結切片を作製した。ハイブリダイゼーションは Bartsch らの方法¹⁵⁾¹⁶⁾に従った。切片を 0.1M HCl で処理した後0.25%酢酸を含む 0.1M トリエタノールアミン (pH 8.0) で処理し、アルコール脱水した。50%ホルムアミド存在下55℃でプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを行った。結合した cRNA は上述した培養細胞の *in situ* ハイブリダイゼーションと同様に、Al-P 結合抗 DIG 抗体でインキュベートした後レバミゾールを含む NBT と BCIP の発色液で発色させた。

7) DNA 塩基配列の決定

2本鎖 pBluescript DNA に入った cDNA の塩基配列の決定は dideoxynucleotide 法を用いて行った (Sequenase kit, U.S. Biochemical)¹⁷⁾。既知の遺伝子配列と比較するため、得られた塩基配列を BLAST ネットワークサービスを経由し National Center for Biotechnology Information (NCBI) で検索した。アラインメント検索には The Align Plus (Scientific & Educational Software) を用いた。

8) GTPase-activating protein (GAP) 活性の測定

図 12 に示すように5つの GapIII cDNA, GapIII-1 から GapIII-5 を pKT10 ベクターにクローニングした。pKT10 ベクターは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子のプロモーターおよび翻訳開始点を持つ酵母発現ベクターである¹⁸⁾。酵母 *iral* ミュータントである KT27-2D (*MATa ura3 leu2 trp1 his3 iral::LEU2*) に酢酸リチウム法を用いてこれらの DNA を導入した¹⁹⁾。pKT10 ベクターあるいは neurofibromatosis type1 遺伝子 (NF1) の GAP-related domain (GRD) を挿入した pKT10 ベクター (pKP22) をコントロールとして用いた¹⁸⁾。これらの遺伝子を導入した酵母は30℃で一晩生育させ、波長 600 nm における吸光度 0.2 の濃度の酵母をそれぞれ 100 µl の YPD 液 (Yeast extract, Peptone, Dextrose) に混合した。53℃で熱処理した後 10 µl ずつ YPD プレートにまき、再び30℃で2日から3日間インキュベートした。それぞれの遺伝子導入酵母

の熱処理に対する感受性の変化を指標として、導入した遺伝子による形質転換の有無を調べた。

3. 結 果

1) オリゴデンドロサイトに発現する cDNA クロウン

中枢神経系ミエリンの形成や再生過程に関わる新しい分子の同定を目的として、古典的ディファレンシャルスクリーニングあるいはサブトラクションプローブを用いたディファレンシャルスクリーニングを行った。ラットオリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーの中で脳に特異的に発現している cDNA のみを得るために、肝あるいは脾臓で発現する cDNA をディファレンシャルスクリーニングで除いた。また、ミエリン形成時期特異的に発現する分子を同定するため、ミエリン形成のまだなされていない生後3日齢とミエリン形成の盛んな30日齢の脳それぞれから合成した cDNA をプローブとしてスクリーニングした結果、29個の脳 cDNA プローブ陽性クローンを得た。これらのクローンはいずれも生後3日齢および30日齢脳 cDNA プローブでシグナルの強さが異なり、また、スロットプロットあるいはノーザンプロットによって特に脳においてその mRNA の発現量が多いことが確認された。この中の2つのクローンの塩基配列を調べたところ、これらがそれぞれアルファおよびベータチュブリン関連 cDNA であることが判明した。これらのチュブリン cDNA をプローブとして用いて残りの cDNA をサザンプロットで調べたところ、さらに17個のクローンがアルファあるいはベータチュブリン関連 cDNA であった。残りの10クローンに関してはいずれもクロス

ハイブリダイゼーションを認めず、独立したクローンであることがわかった(表1)。クローンのインサートサイズは500 bp から約3 kb であった。これらの10クローンに対して、まず脳初代培養細胞を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、いずれの cDNA もアストロサイトとは反応せず、オリゴデンドロサイト様の小形円形細胞のみに特異的にハイブリダイズすることが確認された(図2)。p362.HB/GapIII をプローブとした *in situ* ハイブリダイゼーションおよびオリゴデンドロサイトの特異的マーカーであるガラクトセレブロシド(GC)抗体(R-mAb)による二重染色を行ったところ、これらの小円形細胞はGC陽性のオリゴデンドロサイトであることが確認された(図3)。

10個のオリゴデンドロサイトに発現するクローンの一部の塩基配列を決定し、GenBank サーチによって既存の配列と比較した。結果、表1に示すようにその全部あるいは一部が既知の遺伝子とホモロジーを示すもの6個と、全くホモロジーを認めないもの4個であった。これらのクローンのうち今回新たにオリゴデンドロサイトに特異的に存在することが明らかになった p421/Phosphodiesterase I (PD-I α)、pCH26.H2/Stearoyl-CoA desaturase 2 (SCD2)、および癌遺伝子 ras の調節蛋白質の1つとして新たに同定された p362/GapIII に関して、脳における mRNA の分布およびコードする蛋白質の構造を解析し、これによって推測される蛋白質の機能について考察した。

2) p421/PD-I α

ノーザンプロットハイブリダイゼーション解析によって、p421 は脳に発現する約1.6 kb の mRNA を認識

表1 オリゴデンドロサイト cDNA クロウン

CLONE	INSERT SIZE	mRNA SIZE	HOMOLOGY
p362.HB	1.25 kb	4.2 kb	Ras GTPase activating protein*
p262.A4	1.2	4.5	
p271.HB	1.8	2.4	Amyloid precursor-like protein ⁵¹⁾
p272.F9	3.0	4.2/4.5	Insulin-like growth factor binding protein ⁵²⁾⁵³⁾
pC26.H2	0.47	5.0	Stearoyl-CoA desaturase 1 & 2*
p421.HB	1.6	2.4	Phosphodiesterase I*
p1371.HB	2.0	4.0	
p502.HB	1.9	2.6	
p1008.HB	1.0	2.0	Human MG1
p973.HB	1.6	2.6	

* 本文参照。Human MG1: unpublished cDNA のため詳細は不明。

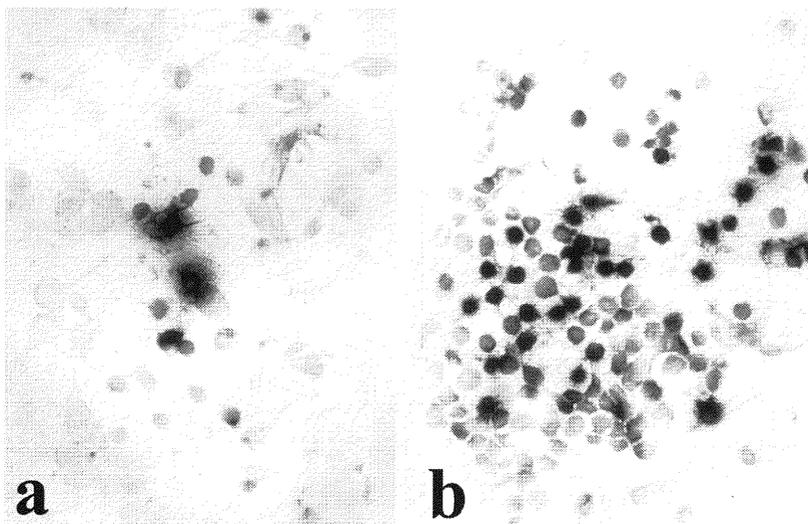


図 2 オリゴデンドロサイト cDNA クローン p973.HB 関連 mRNA の培養グリア細胞における発現

p973.HB (a) およびオリゴデンドロサイトに特異的な PLP cDNA (b) をそれぞれプローブとしてラットグリア細胞培養系で *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。どちらの cDNA プローブ共、単層に広がるアストロサイトの上ののっている小円形細胞とのみ反応した。

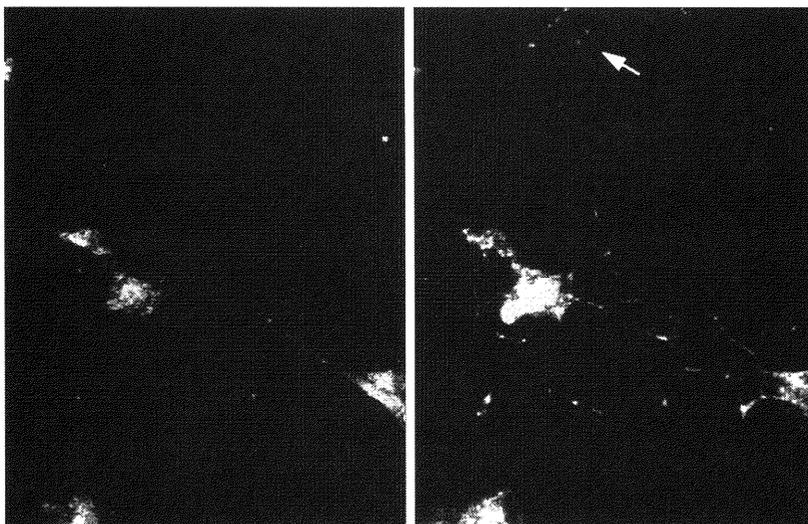


図 3 オリゴデンドロサイト cDNA クローン p362.HB 関連 mRNA の培養オリゴデンドロサイトにおける発現

培養オリゴデンドロサイトに、p362cDNA を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション (右) とオリゴデンドロサイトのマーカーである R-mAb 抗体による免疫染色 (左) の 2 重染色を行った。p362cDNA の mRNA はオリゴデンドロサイトに発現しているが、矢印に示すように p362mRNA 陰性のオリゴデンドロサイト (矢印) も認めた。

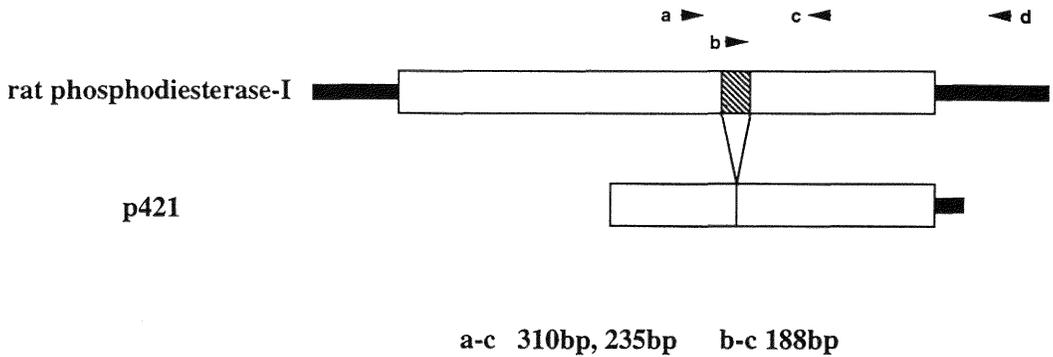
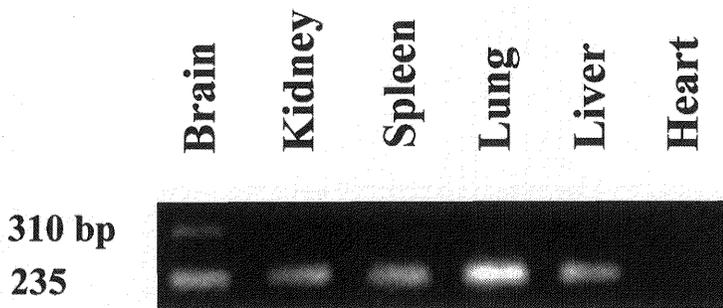
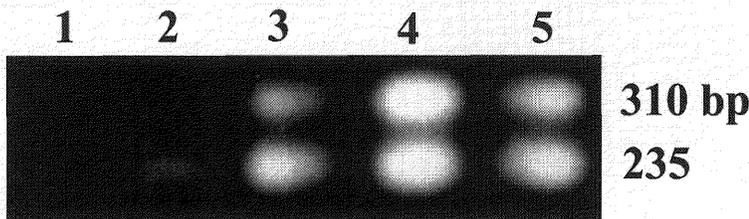


図 4 p421/PD-I α mRNA の分布

- a. p421cDNA とラット PD-I α mRNA の比較および RT-PCR 用合成オリゴヌクレオチドプライマー.
 プライマー d を用いて逆転写酵素反応を行った. a-c, b-c はそれぞれのプライマーセットで得られる PCR 産物のサイズを表す.



- b. ラット各組織におけるプライマー a-c による RT-PCR. 75 bp 部分がスプライシングされた産物 (235 bp) は脳以外の各組織にも存在するのに対して, 310 bp の産物は脳特異的に存在した.



- c. ラット脳各発達段階におけるプライマー a-c を用いた RT-PCR. 1, E17, 2, P3, 3, P10, 4, P25, 5; 成体ラット脳から抽出した RNA を用いた. どちらの PCR 産物も発達に伴って増加傾向を認めた.

することが示された. このクローンの塩基配列を決定し, GenBank によって既知の遺伝子と比較した結果, p421 cDNA は脳特異的なアイソフォームである Phosphodiesterase I /Pyrophosphatase (PD-I α ; GenBank D28560)²⁰⁾ と極めて類似しているが, すでに報告のある PD-I α 蛋白質のコーディング領域のうち 75 bp が欠けている新たなスプライシング産物であることがわかった (図 4-a). これらの 2 つのスプライシング産物がそれぞれどのような発現調節をされているのか明らかにするため, 図 4-a に示すように a から d のような 4 つのオリゴヌクレオチドプライマーを合成し, 脳および各組織から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR を行った. 結果, これらの 2 種類の RNA がどちらも脳に存在すること, p421 に由来する 231 bp の PCR 産物は脳では 310 bp の産物に比べてより多く発現していること, またこの短い PCR 産物が心臓以外の検索組織に広く分布するのに対

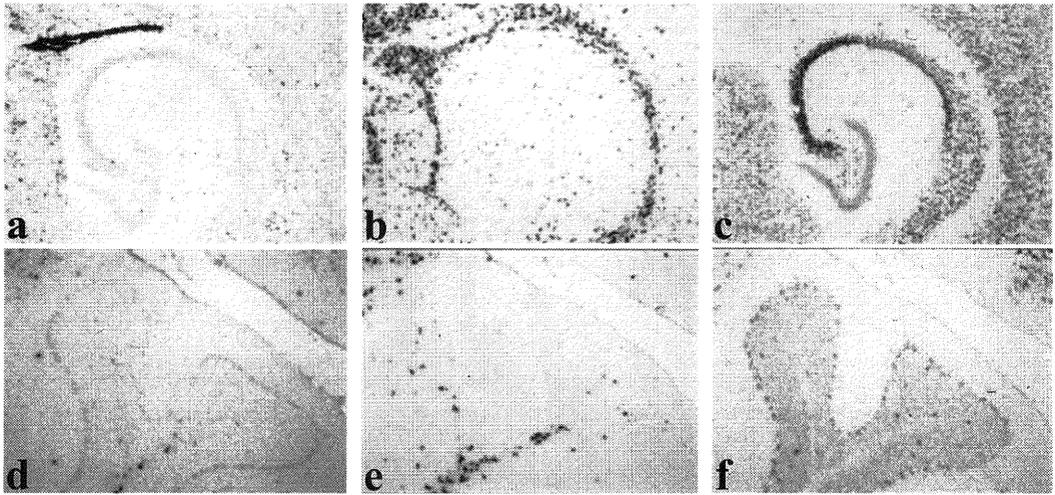


図 5 p421/PD-I α mRNA の脳における局在

DIG 標識した p421 (a, d), PLP (b, e), および NSE (c, f) cRNA を用いて p17日齢マウス脳の凍結切片の in situ ハイブリダイゼーションを行った. 海馬周辺 (a, b, c) および小脳 (c, d, e) において p421/PD-I α mRNA は脈絡叢上皮細胞とオリゴデンドロサイトに発現していた.

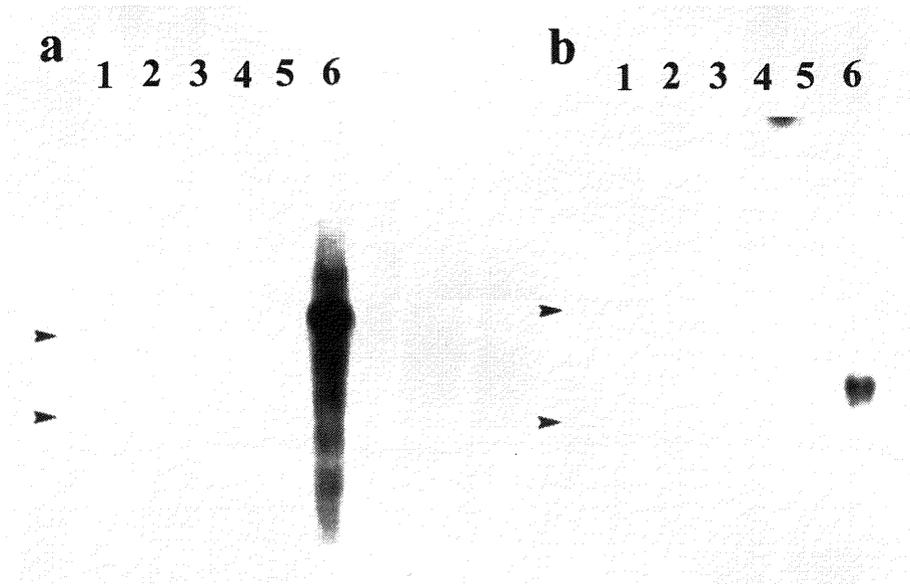


図 6 各組織における pC26.H2 および p973.HB mRNA の発現

成体ラット各組織から抽出した RNA を用いて作製したノーザンブロットを ^{32}P 標識した pC26.H2/SCD2 cDNA (a) および p973.HB cDNA (b) でハイブリダイゼーションした. どちらの mRNA も脳に特異的に発現していた. lane 1, 肝, lane 2, 心臓, lane 3, 肺, lane 4, 脾臓, lane 5, 腎臓, lane 6, 脳. 矢頭はそれぞれリボソーム RNA の位置を示す.

して、75 bp の挿入のある 310 bp の産物は脳に特異的に存在していること (図 4-b) が示された。どちらの RNA も脳の発達に伴って増加傾向を認め、ミエリン形成とほぼ同じ時期に発現量のピークがあった (図 4-c)。脳凍結切片の *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた PD-I α mRNA の分布は、白質と脈絡叢のみに局限されて

おり、この蛋白質がミエリン形成調節に関わる蛋白質であることが示唆された (図 5)。

3) pC26.H2/SCD2

pC26.H2 クローンは脳において約 5 kb の mRNA を認識した (図 6-a)。インサートの塩基配列を決定し、GenBank で既知の配列と比較したところ、図 7 に示

C26H2	1	GGACACCGGTGGCTGCAAGCTGCGCTTTT-GGCGTCTCTCATTTCATCC
SCD2	13A...A.....-.....
C26H2	53	TTATCTCCGTCGCGGCTGCCTTGGCCAGCCAGTTTTTGGATTTTTATCTTGT
SCD2	65C.....C.....TGA.....G
C26H2	106	TCCTTGATCGATACAAGAACCTAAGGACATACAGGACATTAATACCCAACGT
SCD2	118	..A.....A...T..C.....T...-.....C....
C26H2	159	CCAGCTCTGGCCAGGGCTTGTACTGTGCAGCGGGCTGGCTCGAGAAACTAG
SCD2	170A.....-..C.....-.....
SCD1	1	CT.AA.ACCC.T.CGGT.
C26H2	212	TCATAACACTCTTTG-CGCTGAGGTCTGAAGCTCTCTG-ACGTTCTCATCCCT
SCD2	218G...C....T.....G...C.....
SCD1	19	AG.C.GG.GGGCAG.TTT.CA..CG.C.CTC.G.CACACTT.A....G.G..

C26H2	263	GGGAACGTGACCCAGCATCCGAC-GCCAAGATGCCGGCTCACATACTGCAAG
SCD2	271-.....C.....
SCD1	72A....AG.G....A....A....C.....C....G..C....
C26H2	315	AGATCTCTGGCTCTTACTCGGCCACCACCACAATCACAGCGCCACCTTCTGGG
SCD2	323G.....A.....
SCD1	125CA.T..C...A..A.....T..C.....A...T....C..A
C26H2	368	GGACAGCAGAATGGAGGAGAGAAGTTTGAAAAGAATCCTCACCCTGCGGAGC
SCD2	376C.....G.T.....
SCD1	178	AAC.T.....C.....A.GA.G...GTG..C.T.T.TCT..A..A
C26H2	421	AGATGTTGCGCCCTGAAATTAAGATGACCTATACGCCCCAGCTACCAGGATG
SCD2	429C.A.....T....T.....C...T.....
SCD1	231	..CA.C..T.....G.G...A..TA.CC.....
C26H2	1	MPAHILQEISGYSATTTITAPPSGGQQNGGEKFEKPNPHHWGADVRPEIKDDL
SCD2	1A.....SS.....L....
SCD1	1	...M....S..TT....E....NL...R..MK.V.LYLEE.I...MRE.I
C26H2	54	YDPSYQD
SCD2	54	...T...
SCD1	54	H.....

図 7 pC26.H2 cDNA と報告されているラット SCD1⁴⁰⁾ およびマウス SCD2⁴¹⁾ の塩基およびアミノ酸配列の比較

ラット cDNA クローンは pC26.H2 とマウス SCD2 は塩基配列で 92%、アミノ酸配列で 91.7% の一致性を認めた。

すように、不飽和脂肪酸合成の中心的酵素であるマウス SCD2 mRNA の塩基配列と92%の同一性を示した。SCD1 は SCD2 と共に SCD アイソザイムとして知られており、pC26.H2 クローンはこのラット SCD1 とも高いホモロジーを示した。しかし、SCD2 と塩基配列 (92%) およびアミノ酸配列 (91.7%) の同一性が高いこと、組織分布がこれまでの報告と類似していることから pC26.H2 クローンはラット SCD2 であると結論した。

各組織から抽出した RNA によるノーザンブロット解析を用いてラット pC26.H2/SCD2 mRNA の発現を検討した結果、pC26.H2/SCD2 mRNA は主に脳で発現していた。生後17日齢マウスの脳凍結切片を DIG 標識した pC26.H2 cRNA プローブで *in situ* ハイブリダイゼーションした結果、PLP プローブと同じく主に白質の細胞に陽性のシグナルを認めた (図 8, aとbを比較)。しかしこれら2つの染色像を比較すると PLP

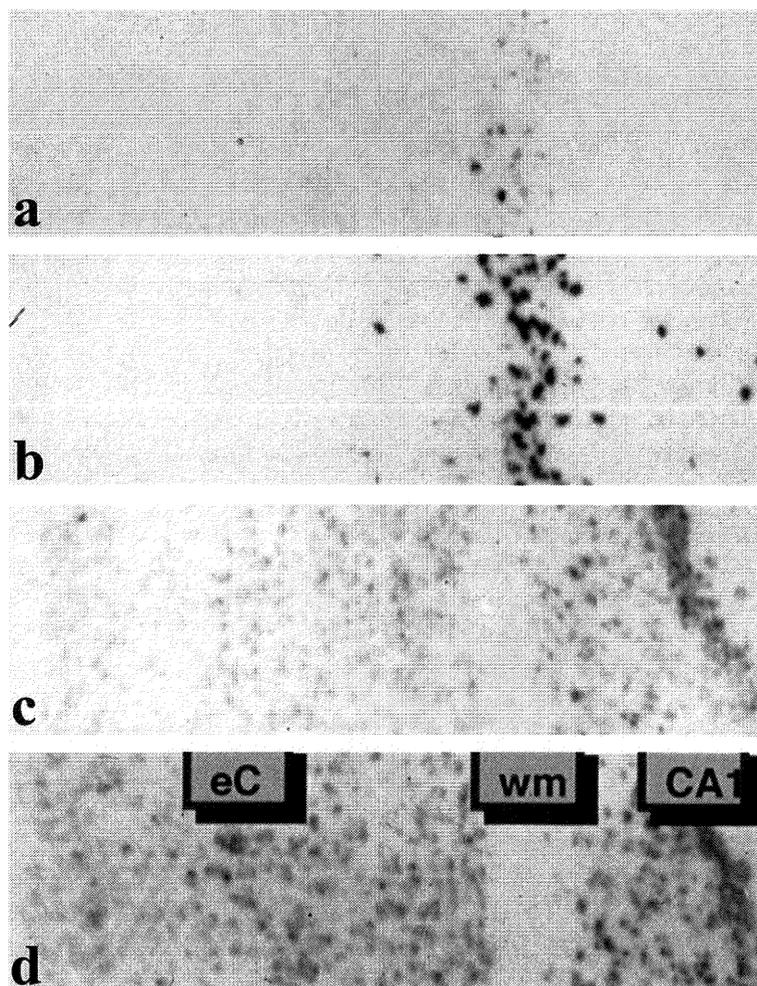


図 8 pC26.H2/SCD2 mRNA の脳における局在

pC26.H2 (a) および p973.HB (c) mRNA の脳における分布を PLP (b), NSE (d) と比較した。pC26.H2 mRNA は PLP mRNA の分布に類似して、白質に認められた。これに対して p973.HB mRNA は NSE に類似して、主に灰白質ニューロンに発現していた。

eC, entorhinal cortex, CA1, hippocampal CA1 region, wm, 白質.

陽性細胞数の方が多く、また個々のシグナルも PLP の方が強いことから、SCD2 は PLP と同様にオリゴデンドロサイトに発現するが、そのメッセージ量は PLP に比較して少量であると推測された。また、オリゴデンドロサイトに比較して明らかに弱い、一部のニューロンにもシグナルを認めた。

4) p973.HB

p973.HB クローンは約 1.6 kb のインサートを持っていた。Genbank による塩基配列の検索ではこれまでの既存の配列とは全く一致しなかった。このクローンは脳特異的に発現する約 2.4 kb の mRNA を認識した (図 6-b)。脳培養細胞で行った *in situ* ハイブリダイゼーションではこの mRNA はアストロサイトには存在せず、オリゴデンドロサイトに存在した (図 2)。これに対して DIG 標識した p973.HB cRNA をプローブとした脳切片における *in situ* ハイブリダイゼーションでは、大脳皮質や小脳および嗅球の特に灰白質部分にシグナルを認めた (図 8-c)。この染色パターンは neuron-specific enorase (NSE)²¹⁾ と極めて類似しており (図 8, c と d を比較)、p973 mRNA が中枢神経系ではニューロンに特に多く発現していると推測された。海馬、海馬采および脳弓においては白質にも弱いシグナルが認められ、オリゴデンドロサイトでも少量発現していることが示唆された。

5) p362/Gap III

p362.HB (1.2 kb) をプローブとした培養細胞の *in situ* ハイブリダイゼーションにおいてシグナルがオリゴデンドロサイトに局限して存在したこと (図 3)、1.2 kb のインサートの塩基配列を検索した結果、この一部の領域が rasGAP ファミリー蛋白質に共通の GAP-related domain (GRD)²²⁾²³⁾ に極めて類似しているが、他の部分が既知の GAP とは異なっていたことから、以後このクローンに注目し、哺乳類の 3 番目の GAP、すなわち Gap III と命名し、この cDNA がコードする蛋白質分子の特徴、分布、機能を明らかにすることを目的としてさらに実験をすすめた。まず、p362.HB インサートをプローブとしてラットオリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーを再度スクリーニングし、部分的 cDNA クローン (1,788 bp) を得た。ラットのライブラリーから全長 cDNA を得ることが困難であったため、同じプローブを用いてマウス脳 cDNA ライブラリー (λ gt10) をスクリーニングし、全長 cDNA (4,116 bp) を単離した (図 9)。Gap III cDNA は 834 アミノ酸残基からなる分子量 96 kDa の蛋白質をコードしていた。ラッ

トの部分塩基配列およびマウスの塩基配列では 94.6% のアミノ酸が一致していた (図 9)。この蛋白質のアミノ酸配列から推測される機能ドメインを図 10 に示す。アミノ酸残基 281 から 563 の部分は先に示した GRD に類似した領域であり、この cDNA が rasGAP 活性を持つことが推測された。rasGAP に共通してみられるアミノ酸配列である F-L-R-x(3)-P-A-x(3)-P²⁴⁾ および rasGAP の活性に重要なリジン残基²⁵⁾²⁶⁾ はそれぞれアミノ酸 483 から 494 残基、および 517 残基の部分に認められた。GRD 領域のアミノ末端側にはリン脂質に対する Ca²⁺-依存性の結合に関与する C2 ドメイン²⁷⁾ とよばれる構造が 2 つ認められた。また GRD のカルボキシル末端側には情報伝達系に関わる蛋白質によく見られる Pleckstrin homology (PH) ドメイン²⁸⁾²⁹⁾ や、ヒト伴性無ガンマグロブリン血症に関与する Btk モチーフからなる PH/Btk ドメイン構造³⁰⁾⁻³²⁾ を有していた。

哺乳類における GAP は図 10 に示すようにこれまでに p120GAP²²⁾²³⁾、タイプ 1 神経線維腫症 (Neurofibromatosis type 1) の責任遺伝子として知られる NF1³³⁾⁻³⁶⁾ が知られている。これらはいずれも GRD 部分で高いホモロジーを示しているが、その他の部分ではその構造は全く異なっている。今回オリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーからクローニングした p362/Gap III cDNA がコードする蛋白質 GRD の両端に C2 ドメインと PH/Btk ドメインを持ち、構造の上では同じ時期に Maekawa ら³⁷⁾ が報告した Gap1^m と類似していた。一方、p120GAP は C2 ドメイン、PH ドメインの他に、リン酸化されたチロシン残基を認識する SH2/SH3 ドメインを持ち、NF1 はこれらのいずれの構造も持たず、GRD の両側に酵母の GAP として知られる IRA1 あるいは IRA2 ときわめてホモロジーの高い領域を持っている。このような構造上の違いから、これらの異なる rasGAP の間では、ras の活性調節に際してそれぞれに異なった機序で調節していることが推測された。Gap1^m と Gap III では蛋白質の構造上は極めて類似しているが、実際の塩基およびアミノ酸配列を比較するとそのホモロジーは 59.7% ときわめて高いが全く同一ではないこと (図 11) から、これらが異なった遺伝子にコードされた蛋白質であり、哺乳類においてはこの 2 種類の GAP が 1 つのファミリーをつくっていることが示唆された。この Gap III ファミリーは *Drosophila* の網膜光受容体の発生において神経細胞とそれ以外の細胞の運命決定に関与する Gap1 蛋白質³⁸⁾ と類似性が高く、哺乳類における Gap1 のホモログであると思われた (図 10 および 11)。

```

1  GCGAGCGGGGGGGCTCTGGGGCATCCGACGTCGGCTCCGTCGCGGCTTCTCCCC
61  TGTCTTGTCCCTTCTGGGGCGGGTGGCGGGTCCGGCGTGGCGAGTCCGACAA
121  GCAGCTGGGGTGGAGAGAGGGAGCTGGGGTCTCCGAGCGTGGAGTCAAGATTG
1  H A V E S E G L R V E Q S V R I K I
181  GTGAAGCCAAGATCTTCTTCTACCGGGGCAAAACAGATGAGGGAATGCTACTGCA
19  G E A K N L P S Y P G P N K M R D C Y C
241  CTGTGAACCTGGACCAGGAGGCTTTTCCGACCAAAATTTGGAGAGTCACTCTGCC
39  T V N L D Q Q E B E V F R T K I V E K S L
301  CCTTTACGGAGAGGACTTTTACTGTGAAATCCCTCGGAGTTTCGGCCACTGTCTTTT
59  F F Y G G E D F Y C E I P R S F R H L S F
361  ACATTTTGTATGAGAGCTTTTCCGAGGAGTTCCATCATAGGCAAGGTGGCCATCCAGA
79  Y I F D R D V F R R D S I I G K V A I Q
421  AGGAAGACTGCAAAGGTACCAACACAGGACACATGGTCCAGCTCCAGCATGTGGATG
99  K E D L Q R Y H N R D T W F Q L Q H V D
481  CTGACTCAGAGTQGGKCGACAGGTCCACCTGGAGCTGAGACTGAGTGGAGTCACTC
119  A D S E V Q Q G G K V H L E L R L S E V I T
541  ACACCTGGTCTGCTGCCCAAACTCGCTGCACGCTCTTCCAGTGCAGGGTCTCCCCA
139  H T G V V C H K L A A R I F E C Q G L P
601  TTGTGAACGGGAGTGTGACCTTACCGCAGTGCAGTGGCGGGACCTTCCAGTCTG
159  I V N G Q C D P Y A T V T L A G A F P R S
661  AAGCAAGAAAACGAGGTGAAGAAGAAAACCAACCCCGAGTTTGACGAGGTGTTTT
E A K K T K V K K K T N N P Q D E V F
721  ATTTGAGGTGACACAGCTCGAGCTCAGCAAAAAGTCCCACTTGCATTTGAGGAAG
199  Y F E V T R P C S Y S K K S H F D F E
781  AGGACGTGGCAAACTGAAATCCGAGTTGACCTCTGGAAGCGCAGCACTGAAGTTG
E D V D L K L E I R V D L W N A S N L K F
841  GGGATGATTTCTGGGAACTGAGGGTCTCTCAAGATTCTGGACACTGGAGCTCTT
G D E F L G E L R L P L K I L R H S S S
901  ATGAAGCTGGTACTTCTCCAGCCCGAGCAACGCAATAGAGCCTGAAGCCAGATG
Y E A W Y F L Q P R D N G W K S L K P D
961  ACTTGGGGTCTCTGAGTTAAATGCTGTTATACAGAAAGCAATGTCTCTCTGAGT
D L G S L R L N V Y T E D H V F S S E
1021  ACTACAGCCACTGGTCACTTCTGAAGTCTGCAGATGTGGAGCCTGTCTCAGCCT
299  Y Y S P L R D L L K S A D V E F V S A
1081  CAGCAGCTCACATCTCGGTGAGGTGTGGAGAGCAAGGAGGCACTCCCGCTGG
S A A H I L G E V C R D K Q E A A I P L
1141  TACGGCTCTGCTGCACTATGGCGAGTGGCTCTCATCACTGGCATGGTAGGGCAG
339  V R L L L H Y G R V V P F I S A I A S A
1201  AGGTGAAGAGGACCCAGGACCCCAATACCATCTTCCGAGAAACTCAGTCACTCCAAT
359  E V K R T Q D P N T I F R G N S L T S K
1261  GCATAGATGAGAGGATGAGCGAGGACGACATCTCCATGACCTGAAGCCCA
379  C I D E S L V L K L A G M H Y L H V T L K P
1321  CCATTGAGGAGATCTGCCAGAGCCCAAGTCTCTGAGATGACCTGTGAAGTGAAG
399  T I E E I C Q S H K S C E I D P V K L K
1381  ACGGCAAACTCGGAGAACACATGGAGAGCTGAGGCAATGTGGATGACATCTTCA
419  D G E N L E N N M E S L R Q Y V D R I F
1441  CTGTCACTCACCAAGTCGGGGTAGCTGCCCCACCGTCACTGTGACATCTTTTCTCCT
439  T V I T K S G V S C P T V M C D I F F S
1501  TCGGGAGGGCGGTCGCAAGCTTCCAAGATGATGTGAGGTACACGGCCGCTGA
459  L R E A A A K R F Q D D L D V R Y T A V
1561  GCAGCTTCACTCTCAGTCTTCTGCCCTGCCATCTGTCCCAACCTTTCCAGC
479  S S F I E L R F F A P A I L S P N L F Q
1621  TGACACCCACCACAGGATCCACAGACTCTAGAACCCTGACACTTATCTCAAGACGA
499  L T P H H T D P Q T S R T L L T I S K T
1681  TCCAGACCTCGGACGTTGTCCAAGTCCAAGTCTGCCAGTTTAAAGAGTGGTACATGG
519  I Q T L G S L S K S A S F K E S Y H
1741  CGACATTCTATGAATCTTCAATGAGCAGAGTATGAGATGCTGTAAAAATTTCTGG
539  A T F Y E F F N Q K Y A D A V A K N F L
1801  ATTTGATCTCATCTCGGGGAGAGGGACCCCAAGAGCATAGAGGAGCCCATCTGCTTA
559  D L I S S S G R R D P K S I E Q P I L L
1861  AAGAAGGGTTCATGATCAAGCGGGCCAGGAAAGAAACCGTTTGAAGTGAAGATTTCA
579  K E G F M I K R A Q G R K R F G M K N F
1921  AGAAGAGGTGGTTCCGCTGACCAACCAGGTTCCACTACCAGAAAAGCAAAGGTGATC
599  K K R M F R L T N H E F T Y Q K S K G D
1981  AGCCACTCTGCAAACTCCCACTGGAGAACATCTGGCTGTGGAGAGGCTAGAGGAGGAT
619  Q P L C N I P I E N I L A V E R L E E E
2041  CCTTCCGAATAAAAACATGTTCCAGGTCTCCAGCCAGAGCGTCCCTGTACATCCAGG
639  S F R H K M H F Q V Y I Q P E R A L Y I Q
2101  CCAACAACTGTGGAGGCAAGGATGATCGACATCTCACCAAAATGAGCCAGTGA
659  A N N C V E A K D W I D I L T K V S Q C
2161  ACCAGAAGCGGCTCACCTCTTCCACCGTGGGCTCACTGAAGCCCACTGGCTCTGT
679  N Q K R L T V F H P S A Y L N G H W L C
2221  CAGGGGCTCCTCAGACCGGCTGGCTGCTCACTCCCTGCACTGGGCTCCGGGCA
699  C R A S S D T A A G C T P C T T G G L P A
2281  ACATCCAGTGGACATGATGGGACCGTGAAGACGGCATCTACTCTCTTAAACC
719  N I Q L D I D G D R E T E R I Y S L F N
2341  TGTACATGGGCAAGTGAAGAAGATGACAGGAGGCTCCGGCAGCAAGTCTGTGTATGAGC
739  L Y M G K L E A C M Q T G E A C G S K S V Y D
2401  CGCCTGAGCGAGGAGTACTCAAGTTCGTCATCGAGACCCCGAGGAGTCTACAGA
759  G P E Q E E Y S T F V I D D P Q E T Y K
2461  CGCTGAAGCAGTCTACGCTGGGTTGGGACCCCTTGAGCCAGGACCCAGTACAGGA
779  T L K Q V I A G V G T L E Q E H A Q Y R
2521  GAGCAAGTTCAGAGAGCATACCGGGCCAGGAGCCCTATTTGGAGCAAGAGCT
799  R D K K F K T R Y G S Q E H P I G D K S
2581  TCCAGAACTACATCCGGCAGGCTGTGAGATCTCCACCCATTCCATTAGGCTCACAGCA
819  F Q N:Y I R Q Q S E I S T H S I -
2641  CCTCCAGATCAGGCTGTTGACCCAGCAGGGGGAAAAAGCAGATAAAAAGGCGAGA
2701  AGGCATACATGGAGGAAACATGTTCCCGGTTCCAGCGGGTCTCAAGAGCTGGGG
2761  GCCACCAGGATCAAGCATGCTTCCCGGCGAGGAAGTGTGCTGGGCTGTGCACTCC
2821  CCTTACTGCGCAGCAGGAGGTTGGTTCAGGCACTCTGGAAATGATGCTCATCTGCTTCT
2881  ACTCTTCACTGTATGGGATCCAGGATCTGTTAAATATAGGAGACTATGCACTTGG
2941  TCTAAAGCTGTTCCGTCGACCCCGGTCGGCTCTCCAAAGGACCGCTGCTGCTT
3001  ATGCGAGGCGCAGCTTCTCAGTGTGCACTTGTCCCTTGGCTGCTGCTGCTGCTG
3061  TCCGTACACATGTAGCAGTCTGGCCCTAGCCTTAGAGCTACAGGAAATCCTGCGTGTG
3121  TCCAGGAAATCCCTGTCTGAAGGTGAGAGCAGTATCCCTGGCAGCAGCAGGCGAGG
3181  AGCCTTTCTCTGAGCTTATGTTGTTGTTCTGGCTAAGGGTCAATTTTTTGGGCTG
3241  GATGGACAGGATGTTACAGAACTCCCTTATCTGAGAGGACATGGGGTCCCTTTCTA
3301  GAGTCCCTGGAGAGGAGGGCTGTGAGCCAGTCTCTCGGAGCAGCATCAGCCCTGAG
3361  TTCAACACAGGCTTGGATGATAGGTTTCAAAGTAACTCCACAGGCTTGTGCTGCC
3421  TCGATGAAGTCTGGGAAGATTTTTAAAGGCTGTGCAATTTTCAAGCTGTCTTCTAA
3481  TGTTTTTAAAGGCTTTTTAAATAGCATTTTGATATAGGCGAGTGGATACAGCA
3541  TCTATGTGATTAGGGGGTGGCCAGGAAATCCCAAGGAGCAAGTATGATTTTCTC
3601  ACAAAGCAAGGCTGCTGGGAGTACAGTATGCTGAGAGGAGGCTGACCGGACGAA
3661  AAGGCCAAAGCTGGTATCCACATGCTGTGCTCTGTGAGCCCAAGGCAACAGTGC
3721  CAATGTGGAAGCACTTTGATGGGTTGGGAGGCTCTGAAACAGCAAGACAGAGCT
3781  TACCAGCTTAGCCCCACAGTACTGCTGGAGCCTTATGCAAACTGATTCCAGAGGCT
3841  GAGAGAGGGGCACTCTATGGCAGATGTTGCTGAAGGACAAACCAAGCATCTGCTGAC
3901  CTTTCTCTTCTTCTGTTGGGAGGTTTTATCTGATCTAGAGCCATAGTAGCAGAG
3961  ATGGAAACAAAGTCTGGGACAGAGGAGGCTGTTACTGAGTCTTTTAACT
4021  GGATTTGAACTTAAATGTTCTGTTTAAAGTACTAAGCATTTGCAATGATTTTAAATG
4081  GGCATTAAGAGCAGATGTTTTTCTTAAAAA

```

図9 p362.HB/GapⅢ の塩基およびアミノ酸配列

ラットのアミノ酸配列は、マウスと異なる部分のみマウスの配列の下に記載した。翻訳開始コドン ATG と停止コドン TAA は斜体および下線を用いて示した。ポリAシグナルには2重下線を引いた。GAP に特徴的な配列である F-L-R-x(3)-P-A-x(3)-P²⁴ 部分は下線で示した。また、GAP 活性化に必要なリジン残基²⁵⁾²⁶⁾には下に*をつけた。

これまで rasGAP として報告されている P120GAP および NF1 では、GAP 活性を持つ GRD 部分を酵母の GAP である *ira* のミュータントに導入することによって、このミュータントに特徴的な熱ショック感受性を正常化することが知られている。このことは哺乳類の GAP 活性部分が、酵母においても ras の GTPase 活

性を調節することができることを示している。GapⅢ におけるこのような活性の有無およびその反応部位を調べるため、図 12-a に示すようなコンストラクト GapⅢ-1 から -5 を作製し、それぞれ IRA1 遺伝子のミュータントを持つ酵母 *iral* に遺伝子導入し、熱ショックに対する感受性の変化を調べた。その結果図 12-b に示すよ

GAP STRUCTURAL RELATIONSHIPS

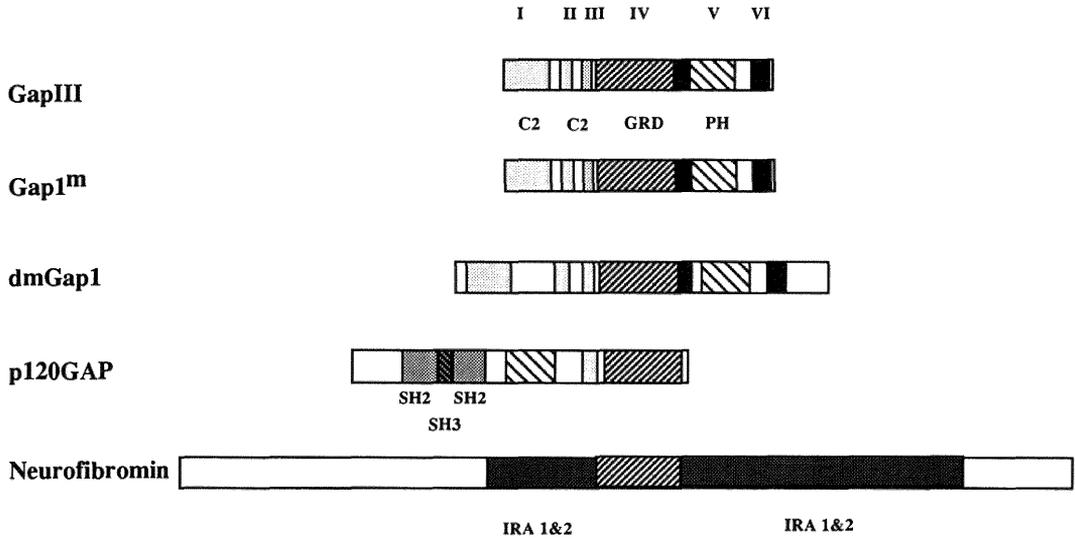


図 10 p362.HB/GapⅢ および既知の GAP ファミリーメンバーの蛋白質構造の比較

C2, Ca²⁺-dependent phospholipid binding domain ; GRD, GTPase-activating protein related domain ; IRA1 and IRA2, homology regions with IRA1 and IRA2 in neurofibromin.

	I	II	III	IV	V	VI
	C2	C2	GRD	PH/Btk		
	I	II	III	IV	V	VI
GapIII	100%	100%	100%	100%	100%	100%
GapI ^m	65.4%	81.0%	66.7%	61.8%	64.9%	35.6%
DmGap1	49.2%	40.5%	45.5%	52.7%	43.9%	22.4%

図 11 CapⅢ ファミリーにおけるアミノ酸配列の類似性

マウス p362/GapⅢ, ラット Gap1^{m37)}, ショウジョウバエ (Dm) の DmGap1³⁸⁾ のアミノ酸配列を, 特に類似性の高い I から VI までの各部分に関して比較した. p362/GapⅢ, Gap1^m 共哺乳類に存在し, 共通のドメイン構造をとるが, 塩基配列の比較からこの2つが全く異なった蛋白質であることが示された (ラット GapⅢの部分的アミノ酸配列は図 9 参照).

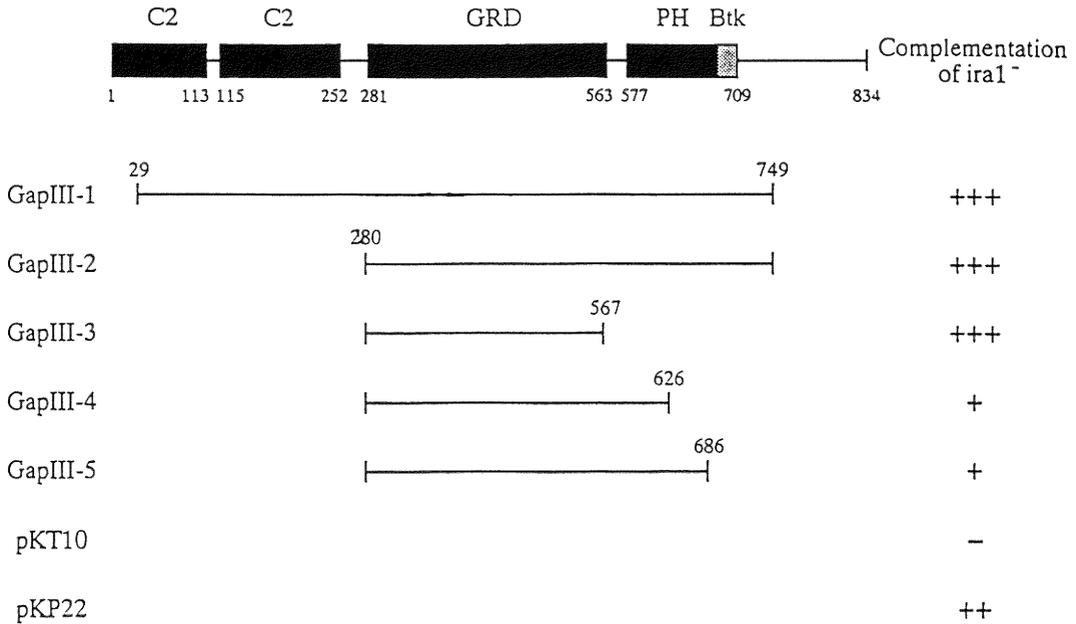
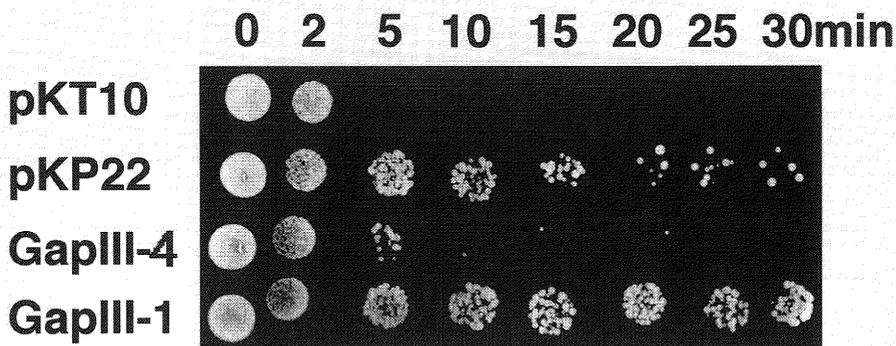


図 12 p362/Gap III 関連蛋白質の GAP 活性の測定

- a. GAP 活性は *iral* ミュータント酵母の形質転換の有無によって検討した. Gap III の 5 つの異なる部分をそれぞれに酵母の発現ベクターである pKT10 に入れた Gap III-1 から Gap III-5 を作製した. 数字はアミノ酸残基を表す. これらの DNA をミュータント酵母に導入し, それぞれの熱ショックに対する感受性の変化を調べ, その程度によって GAP 活性を-から++++まで半定量的に表した. pKT10 はベクターのみ, pKP22 は NF1 の GRD 部分を同じベクターに組み込んだものをそれぞれコントロールとして用いた.



- b. Gap III DNA を導入したことによるミュータント酵母の熱感受性の変化を示す. ミュータント酵母は53℃の熱処理に対してあきらかな感受性を示す (pKT10) が, NF1 の GRD 部分 (pKP22) あるいは Gap III ほぼ全長 (Gap III-1) を導入すると, 熱感受性は正常化する. これに対して Gap III-4 あるいは Gap III-5 のように, GRD 部分に一部の PH/Btk 配列が加ったものではミュータントによる形質変化を完全には補正できない.

うに、GapⅢ 蛋白質全長 (GapⅢ-1) および GRD 領域 (GapⅢ-2, 3) が IRA1 ミュータント酵母における熱ショック感受性を正常化した。さらに、酵母内へのグリコーゲンの蓄積をみることによってこれらのトランスフォーマントで ras 自体が確かに不活化されていることを確認した。

ノーザンプロット解析によって、4.2 kb GapⅢ mRNA は脾臓および肺に少量の発現を認めるが、主に脳に多く発現していることがわかった (図 13-a)。脳の部位別では、大脳皮質、海馬、小脳に多く存在し、視床や脳幹部分ではその発現が比較的少なかった。また、脳の発達に伴って GapⅢ mRNA の発現は増加した (図 13-b)。

脳内のどのような細胞に GapⅢ 遺伝子が発現しているのかを明らかにするために、脳切片および培養細胞を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。他の GAP 蛋白質とのクロスハイブリダイゼーションを防ぐため、GapⅢ cDNA のうち、特にユニークと思われる 3'-UTR の部分を用いて cRNA プローブを作製した。コントロールとして、隣接切片をそれぞれニューロンの特異的マーカーである NSE とオリゴデンドロサイトの特異的マーカーである PLP cRNA でハイブリダイゼーションを行って比較した。その結果、生後19日齢のマウス脳凍結切片における GapⅢ mRNA の分布は NSE ときわめて類似の分布を示していた (図 14)。部位別には、海馬において CA 領域の錐体細胞、歯状回の顆粒細胞に発現していた。隣接する白質部分では弱い発現をみるのみであった。小脳においてはプルキンエ細胞、顆粒細胞でシグナルを認めたが、小脳白質では明らかなシグナルは認めなかった。このように、少なくとも生後19日齢のマウスにおいては GapⅢ の mRNA は主にニューロンに発現していることが示唆された。成熟マウスの脳切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにおいても同様の傾向を認めた。

新生仔ラット脳から調整したグリア培養細胞は主に2種類の細胞からなる。すなわち一層にひろがるアストロサイトとその上にのった比較的小円形のオリゴデンドロサイトである。この培養系で行った *in situ* ハイブリダイゼーションでは GapⅢ プローブはアストロサイトとは反応せず、小円形細胞のみを染色した。これらの細胞がオリゴデンドロサイトかどうかを確認する目的で、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った標本に同時にオリゴデンドロサイトの特異的マーカーであるガラクトセレブロンド (GC) 抗体を用いた免疫染色をおこなった。図 3 に示すように、GapⅢ mRNA を持つ細胞はすべ

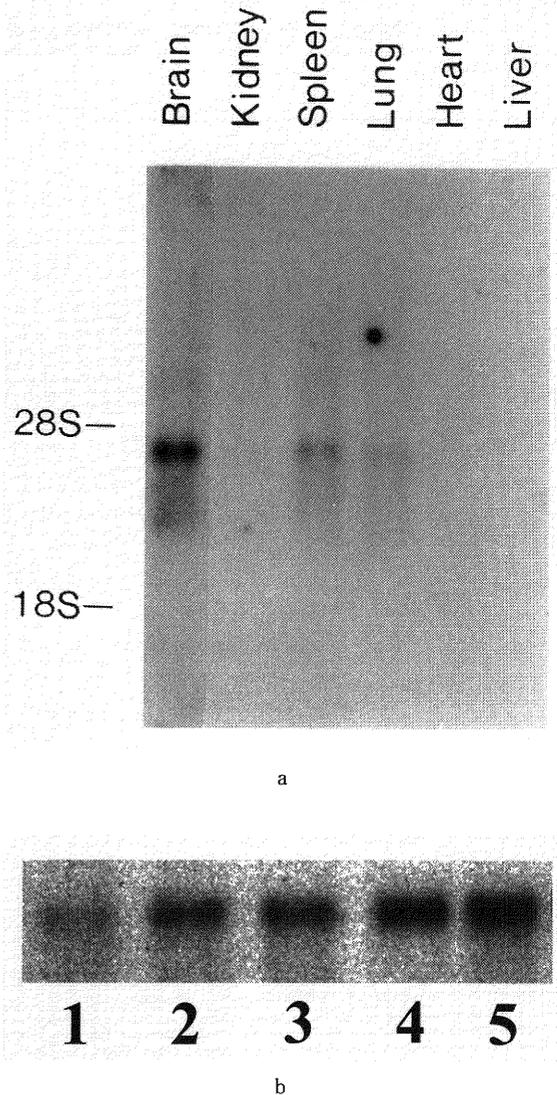


図 13 p362/GapⅢ mRNA の発現

p362/GapⅢ mRNA の発現をラットの各組織 (a) およびラット各発達段階の脳 (b) から抽出した RNA を用いたノーザンプロット解析によって示した。この mRNA は主に脳に発現しており、発達によってその発現量が増加することが示された。b の 1 から 5 はそれぞれ生後 4, 7, 10, 17, 25 日齢ラットの脳全 RNA を用いた。

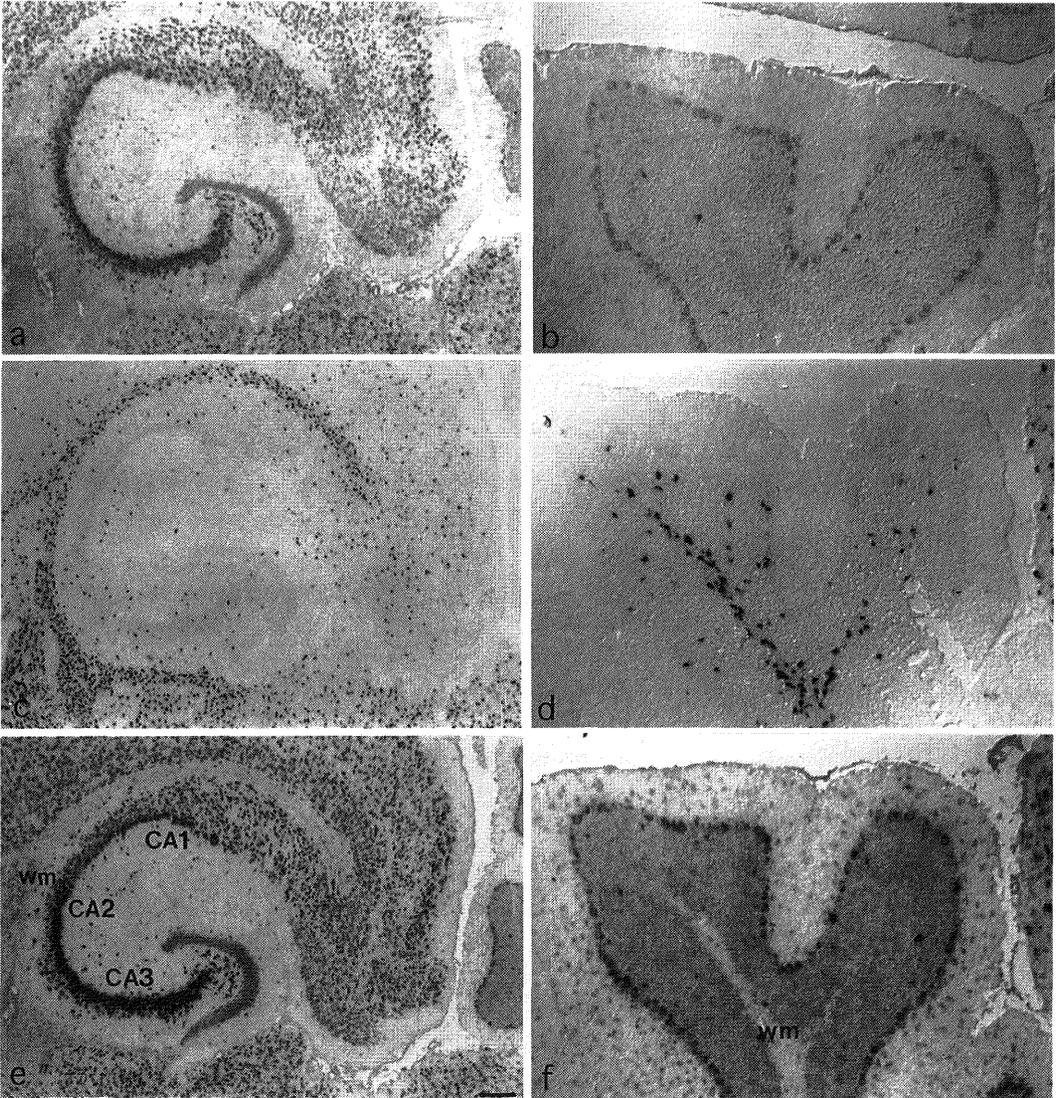


図 14 p362/Gap III mRNA の脳における局在

17日齢マウスの脳凍結切片を用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った。海馬および小脳部分のどちらにおいても、Gap III mRNA の分布 (a, b) はニューロンのマーカーである NSE mRNA の分布 (e, f) に類似していた。c と d はオリゴデンドロサイトのマーカーである PLP mRNA の分布を表す。CA1-CA3, 海馬 CA1 から CA3 領域を示す。wm, 白質。

て GC 抗体陽性のオリゴデンドロサイトであった。しかし、かならずしもすべての GC 陽性細胞が Gap III mRNA を持っているわけではなく、オリゴデンドロサイトの系譜上のある一時期のみにこの Gap III が発現すると思われた。

5. 考 察

今回オリゴデンドロサイトに発現する未知の遺伝子をクローニングし、それらのオリゴデンドロサイトにおける機能を明らかにすることを目的にディフェレンシャル

スクリーニングを行った結果、既知の遺伝子となんらかのホモロジーを認めたクローン (p362.HB/Gap III, p421.HB/PD-I α , p272.F9/Insulin-like growth factor binding protein 5, p271.HB/Amyloid precursor-like protein, p1008.HB/human MG1, pC26.H2/SCD2), 全くホモロジーを認めなかったクローン (p262.A4, p502.HB, p1371.HB, p973.HB) の合計10個のクローンを得た。これら10クローンの関連する mRNA はすべて脳に多く分布し、特に培養細胞で行った *in situ* ハイブリダイゼーションではアストロサイトには発現せず、オリゴデンドロサイトにその存在を認めたことから、ストラテジーとしては目的にかなっていたと思われる。実際に、脳凍結切片で *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったクローンのうち、p421/PD-I α および pC26.H2/SCD2 は *in vivo* でも明らかにオリゴデンドロサイトに発現していた。このうち p421/PD-I α は最近 Narita らによって報告されたラット脳特異的 phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I α)³⁹⁾ とほとんど同一の塩基配列を示すが、phosphodiesterase 活性に関与する部分よりカルボキシル末端側のコーディング領域で 75 bp が欠除した配列をとる新たなスプライシング産物であると思われた。Narita らはこの mRNA が脳では脈絡叢上皮に多く存在していると報告しているが、今回の *in situ* ハイブリダイゼーションにおいても脈絡叢上皮に強いシグナルを認めた。さらに、大脳および小脳白質部分にも明らかなシグナルを持つ細胞が数多く存在し、しかも PLP プローブを用いた隣接切片のシグナルと同様の分布を示すことから、この白質の細胞はオリゴデンドロサイトであると示唆された。PD-I α の脈絡叢上皮における役割はまだ明らかではないが、脳脊髄液の分泌になんらかの関わりを持っているものと思われる。

もう1つのオリゴデンドロサイトに発現するクローン pC26.H2 は不飽和脂肪酸の合成における重要な酵素である SCD1 および SCD2 と高いホモロジーを持つ。SCD1 は飢餓状態で肝に誘導される酵素であり、平常状態では脂肪組織に多く存在する⁴⁰⁾。これに対して、SCD2 は脳に多く存在し、肝には誘導されない⁴¹⁾。これら2つの酵素は構造上きわめて類似しているが、別々の異なる遺伝子からの産物であることが知られている⁴²⁾。塩基配列に関してはこれまでにラット SCD1 とマウス SCD2 の報告があるが、今回クローニングされた pC26.H2 はその mRNA の分布が脳に局在していること、および塩基配列上のホモロジーから、SCD2 のラットホモロ

グであると結論した。SCD2 の脳における機能は、膜リン脂質の合成のための不飽和脂肪酸の供給であると考えられる。ミエリンは飽和および不飽和脂肪酸に富み、特にオレイン酸はミエリンの主要構成脂肪酸であることから、これまでに脳における SCD 活性の大部分はオリゴデンドロサイトに由来するであろうと予測されていた。今回 *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことによって、脳では推測どおり SCD2 が主にオリゴデンドロサイトに存在することを明らかにした。脳以外では脂肪組織やリンパ球にも存在するが、中枢神経系においては SCD2 はオリゴデンドロサイトのマーカーになると思われる。

一方において、p973.HB あるいは p362.HB/Gap III の mRNA のように、培養オリゴデンドロサイトには明らかに発現するのにもかかわらず、凍結脳切片で行った *in situ* ハイブリダイゼーションでは主にニューロンに発現しており、白質のオリゴデンドロサイトにはごく少量の発現しか認めないものもクローニングされた。もともとオリゴデンドロサイト cDNA ライブラリーからクローニングしてきたにもかかわらず、このようなことが生じてきた原因としては、サブトラクションあるいは古典的ディファレンシャルスクリーニングに際して脳 cDNA をプローブとして用いたため、オリゴデンドロサイトでは少量の発現しかしていない希なクローンがとれてきた可能性が考えられる。他の可能性としては、これらの mRNA が発達段階の一時期のオリゴデンドロサイトにのみ発現していることが考えられる。この場合は様々な発達段階の脳切片において *in situ* ハイブリダイゼーションを行ってみると、オリゴデンドロサイトの分化に伴う mRNA の発現がみられるかもしれない。また、もう1つの可能性として、これらの mRNA の発現が培養下のオリゴデンドロサイトにのみ誘導されることも考えられる。この場合、先にも述べたようにアストロサイトでは誘導されていないため、ある種の細胞特異的な誘導機序があるのかもしれない。このような現象は他の mRNA の発現でも報告されており、*in vivo* では主にニューロンに発現する MAP1B⁴³⁾ が、培養下ではオリゴデンドロサイトにも存在することが報告されている⁴⁴⁾。

今回特に詳細に検討を行った p362/Gap III では、生後19日齢のマウス脳における mRNA の分布はニューロンに特に多く局在していたが、その蛋白質分子としての役割は極めて興味深い。癌遺伝子の1つである ras は GTP 結合した活性型と GDP に結合した不活性型の2種類からなり、一方から他方へ変換することによってい

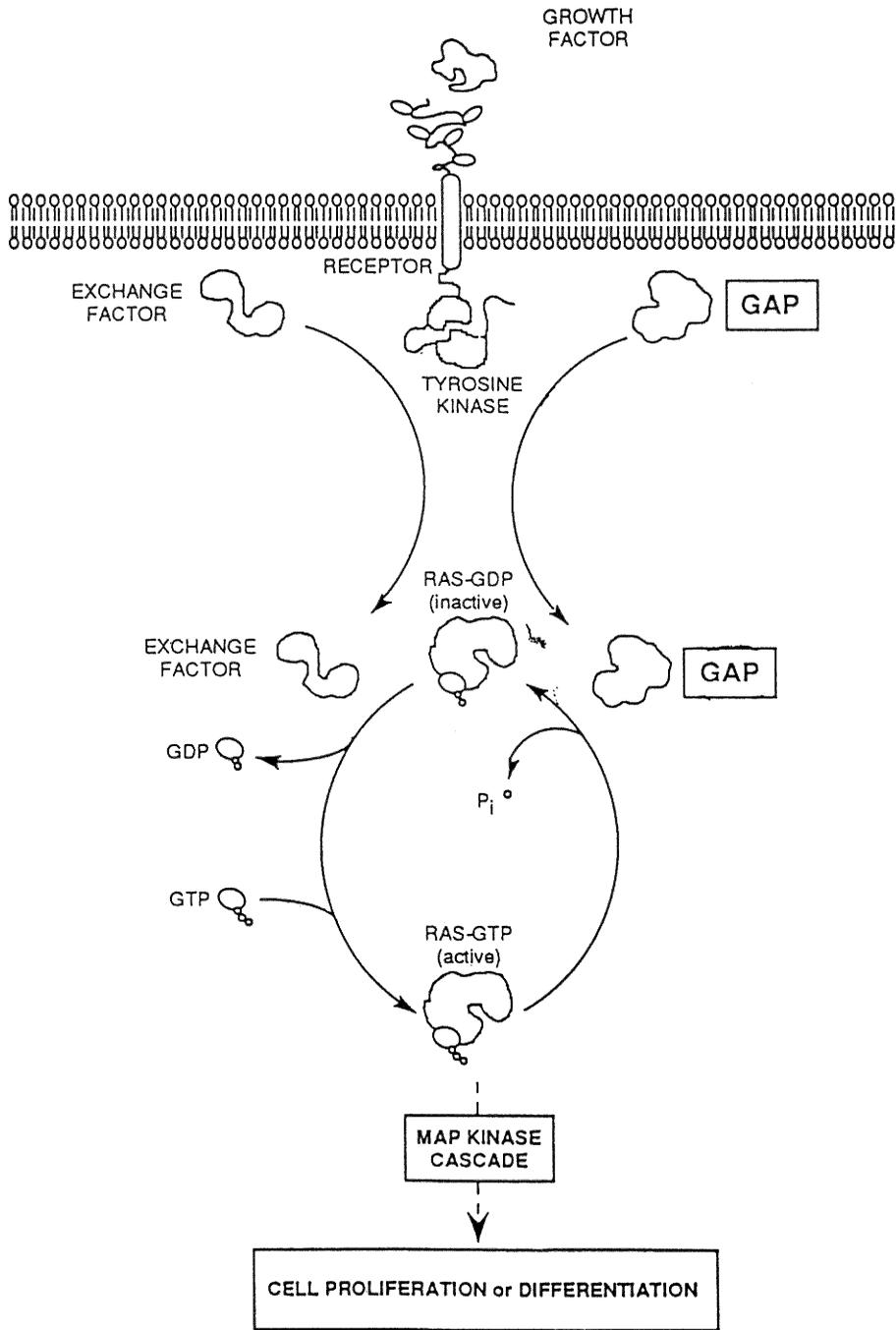


図 15 ras を介したシグナル伝達系

わゆる分子スイッチとしての役割を果たしている⁴⁵⁾。成長因子などによる細胞外からの刺激が受容体を経て ras 蛋白質を活性化させ、MAP キナーゼ系を経て核に伝わり、細胞の増殖あるいは分化に影響する (図 15)。GAP はこの ras の内在性 GTPase を活性化して rdas に結合した GTP を GDP に加水分解することによって ras を不活化する働きを持っている。GAP にはこれまでに哺乳類で報告されている p120GAP あるいは NF1 の他に *Drosophila* で網膜光受容体細胞の分化に重要な役割を果たす Gap1, 酵母における IRA1 および IRA2⁴⁶⁾ が知られている。今回クローニングした GapⅢ は、これとほぼ同じ時期に公表された Gap1^m と同じく *Drosophila* の Gap1 ときわめて類似した蛋白質構造をとるが、この2つのアミノ酸配列の一致率は 59.7% しかないため、これら2つは進化学上おそらく共通の遺伝子から別れて長い進化の過程で異なる配列を呈してきたものと推測される。このような関係は IRA1 と IRA2 にも認められている。GapⅢ と Gap1^m の mRNA の発現を比較すると、GapⅢ の発現パターンと Gap1^m の発現パターンには違いを認める。GapⅢ はノーザンプロット解析で示したとおり、脳に多く発現し、その他脾臓、肺にも少量の発現を認める。これに対して、Gap1^m は Maekawa らが RT-PCR 法を用いて解析した結果脳にやはり多く発現している他、胎盤、腎臓にもその発現を認めている³⁷⁾。また、今回結果は示さなかったが、GapⅢ の ras 蛋白質に対するアフィニティはニューロフィブロミン (NF1 遺伝子産物) に比較して極めて弱いものに対して、報告されている Gap1^m の ras アフィニティはニューロフィブロミンとほぼ同一である。このことから、この2つの類似の蛋白質は、その分布のみでなく ras に対するアフィニティも異なっていると推測される。

最近 GapⅢ ファミリー (GapⅢ, Gap1^m) に極めて類似した構造を持つヒトの蛋白質遺伝子が報告され、Gap1^{IP4BP} と名付けられた⁴⁷⁾。これはもともとイノシトール 4 リン酸 (IP4) 結合蛋白質として血小板から精製された蛋白質の部分アミノ酸配列をもとにクローニングされた因子で、実際に IP4 結合活性を有し、他のリン脂質による GAP 活性の阻害が IP4 の添加によって解除されることが報告されている。Gap1^m や GapⅢ に IP4 が結合するか否かは不明であるが、IP4 結合に関係あると思われる残基が良く保存されているため、IP4 との結合が GapⅢ ファミリーの特徴である可能性が高い。

前述したように、哺乳類の rapGAP には p120GAP, NF1, GapⅢ ファミリーの3つに大別できる。これら

の機能的な差異はまた不明であるが、これらの構造上の共通点は GRD のみであるので、rasGAP 以外の機能や細胞内の局在、組織特異性などはかなり異なることが予測される。たとえば、これらの3種の GAP は細胞内局在に関してもそれぞれに異なっている。p120GAP は細胞質画分に存在する⁴⁸⁾ が、これに対して NF1 は細胞骨格系、特に微小管と結合していることが知られている⁴⁹⁾。また、Gap1^m の活性はこのどちらの画分でも存在することが報告されている⁵⁰⁾。このように、細胞内局在も、ras 不活化以外の機能も全く異なる3種類の GAP がどのようにそれぞれの機能分担を行っているのかを明らかにしていくことが、ras を介した情報伝達系を理解する上で重要である。特に、ras はさまざまな成長因子やサイトカインなどの細胞外からの刺激を受けて、細胞の増殖あるいは分化をオン、オフする分子スイッチであり、GAP はこのスイッチをオフにする働きをしている。はたして GapⅢ がニューロンやオリゴデンドロサイトのように増殖能を持たない細胞の中でどのような働きをしているのかはきわめて興味深い。また、NF1 と同様に、グリオーマなどの中枢神経系腫瘍発生と GapⅢ の関係も今後の興味深い課題である。

10クローンのうち4つのクローンでみられたように既知の塩基配列と全くホモロジーを認めなかったクローンに関しては、そのコードする蛋白質の構造や機能をさぐっていく上で、予測がたちにくく、困難が予想される。しかしながら、これらはこれまでに報告のない未知の遺伝子産物である可能性が高く、今後解析を進めていく予定である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました辻 省次教授に心から感謝申し上げます。また、終始御指導いただいた Wendy B. Macklin 教授 (UCLA) に深くお礼申し上げます。この論文をまとめるための時間をくださいました国立生理学研究所神経情報部門、池中一裕教授に深く感謝致します。この研究をすすめるにあたって、Dr. Babette Fuss, Dr. Joseph B. Watson, Dr. Fuyuhiko Tamanoi, Dr. P. Pouillet, Dr. Shashi Amur-Umarjee, Dr. Cinthia Duchala (UCLA) には技術的な御指導を頂きましたこと、感謝致します。また、常に適切なアドバイスと援助をくださった新潟大学脳研究所神経内科部門、犬塚 貴講師、国立生理学研究所神経情報部門、鹿川哲史助手、および Dr. Ayako Watabe

(UCLA) に心からお礼申し上げます。この研究は米国国立多発性硬化症協会および米国国立衛生研究所の援助によって行われました。

参 考 文 献

- 1) Mikoshiba, K., Okano, H., Tamura, T. and Ikenaka, K.: Structure and function of myelin protein genes. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**: 201~217, 1991.
- 2) Steinman, L.: Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, **85**: 299~302, 1996.
- 3) Watson, J.B. and Margulies, J.E.: Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. *Dev. Neurosci.*, **15**: 77~86, 1993.
- 4) Patel, P.I., et al.: The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat. Genet.*, **1**: 159~165, 1992.
- 5) Watson, J.B., Battenberg, E.F., Wong, K.K., Bloom, F.E. and Sutcliffe, J.G.: Subtractive cDNA cloning of RC3, a rodent cortex-enriched mRNA encoding a novel 78 residue protein. *J. Neurosci. Res.*, **26**: 397~408, 1990.
- 6) Travis, G.H., Brennan, M.B., Danielson, P.E., Kozak, C.A. and Sutcliffe, J.G.: Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds). *Nature*, **338**: 70~73, 1989.
- 7) McCarthy, K.D. and de Vellis, J.: Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell. Biol.*, **85**: 890~902, 1980.
- 8) Kohne, D.E., Levison, S.A. and Byers, M.J.: Room temperature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousandfold: the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry*, **16**: 5329~5341, 1977.
- 9) Travis, G.H. and Sutcliffe, J.G.: Phenol emulsion-enhanced DNA-driven subtractive cDNA cloning: isolation of low-abundance monkey cortex-specific mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 1696~1700, 1988.
- 10) Travis, G.H., Milner, R.J. and Sutcliffe, J.G.: Preparation and use of subtractive cDNA cloning: isolation of low-abundance monkey cortex-specific mRNAs. in *Neuromethods: Molecular Neurobiological Techniques*. (eds. Boulton, A.A., Baker, G.B. and Campagnoni, A.T.) 49~78 (The Humana Press, Clifton, 1988).
- 11) Wight, P.A., Duchala, C.S., Readhead, C. and Macklin, W.B.: A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J. Cell. Biol.*, **123**: 443~454, 1993.
- 12) Asotra, K. and Macklin, W.B.: Protein kinase C activity modulates myelin gene expression in enriched oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.*, **34**: 571~588, 1993.
- 13) Amur Umarjee, S., Phan, T. and Campagnoni, A.T.: Myelin basic protein mRNA translocation in oligodendrocytes is inhibited by astrocytes in vitro. *J. Neurosci. Res.*, **36**: 99~110, 1993.
- 14) Ranscht, B., Clapshaw, P.A., Price, J., Noble, M. and Seifert, W.: Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2709~2713, 1982.
- 15) Bartsch, S., et al.: Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J. Neurosci.*, **12**: 736~749, 1992.
- 16) Fuss, B., Wintergerst, E.S., Bartsch, U. and Schachner, M.: Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *J. Cell. Biol.*, **120**: 1237~1249, 1993.
- 17) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463~5467, 1977.
- 18) Tanaka, K., et al.: IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 4303~4313, 1990.
- 19) Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A. and

- Schiestl, R.H.:** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 1425, 1992.
- 20) **Narita, M., Goji, J., Nakamura, H. and Sano, K.:** Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha) from rat brain. *J. Biol. Chem.*, **269**: 28235~28242, 1994.
- 21) **Forss Petter, S., Danielson, P. and Sutcliffe, J.G.:** Neuron-specific enolase: complete structure of rat mRNA, multiple transcriptional start sites, and evidence suggesting post-transcriptional control. *J. Neurosci. Res.*, **16**: 141~156, 1986.
- 22) **Trahey, M., et al.:** Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science*, **242**: 1697~1700, 1988.
- 23) **Vogel, U.S., et al.:** Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature*, **335**: 90~93, 1988.
- 24) **Wang, Y., Boguski, M., Riggs, M., Rodgers, L. and Wigler, M.:** sar1, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* encoding a protein that regulates ras1. *Cell. Regul.*, **2**: 453~465, 1991.
- 25) **Li, Y., et al.:** Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell*, **69**: 275~281, 1992.
- 26) **Poullet, P., Lin, B., Esson, K. and Tamanoi, F.:** Functional significance of lysine 1423 of neurofibromin and characterization of a second site suppressor which rescues mutations at this residue and suppresses RAS2Val-19-activated phenotypes. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 815~821, 1994.
- 27) **Clark, J.D., et al.:** A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, **65**: 1043~1051, 1991.
- 28) **Musachio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. and Saraste, M.:** The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends. Biochem. Sci.*, **18**: 343~348, 1993.
- 29) **Lemmon, A.A., Ferguson, K.M. and Schlessinger, J.:** PH domains: Diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell*, **85**: 621~624, 1996.
- 30) **Tukada, S., et al.:** Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*, **72**: 279~290, 1993.
- 31) **Vetrie, D., et al.:** The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, **361**: 226~233, 1993.
- 32) **Rawlings, D.J., et al.:** Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, **261**: 358~361, 1993.
- 33) **Ballester, R., et al.:** The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell*, **63**: 851~859, 1990.
- 34) **Martin, G.A., et al.:** The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell*, **63**: 843~849, 1990.
- 35) **Xu, G.F., et al.:** The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*, **62**: 599~608, 1990.
- 36) **Xu, G.F., et al.:** The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell*, **63**: 835~841, 1990.
- 37) **Maekawa, M., et al.:** A novel mammalian Ras GTPase-activating protein which has phospholipid-binding and Btk homology regions. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 6879~6885, 1994.
- 38) **Gaul, U., Mardon, G. and Rubin, G.M.:** A putative Ras GTPase activating protein acts as a negative regulator of signaling by the Sevenless receptor tyrosine kinase. *Cell*, **68**: 1007~1019, 1992.
- 39) **Narita, M., Goji, J., Nakamura, H. and Sano, K.:** Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I α) from rat brain. *J. Biol. Chem.*, **269**: 28235~28242, 1994.
- 40) **Thiede, M.A., Ozols, J. and Strittmatter, P.:** Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J. Biol. Chem.*, **261**: 13230~13235, 1986.

- 41) **Kaestner, K.H., Ntambi, J.M., Kelly, T.J., Jr. and Lane, M.D.**: Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 14755~14761, 1989.
- 42) **Ntambi, J.M., et al.**: Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.*, **263**: 17291~17300, 1988.
- 43) **Schoenfeld, T.A., McKerracher, L., Obar, R. and Vallee, R.B.**: MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J. Neurosci.*, **9**: 1712~1730, 1989.
- 44) **Fischer, I., Konola, J. and Cochary, E.**: Microtubule associated protein (MAP1B) is present in cultured oligodendrocytes and co-localizes with tubulin. *J. Neurosci. Res.*, **27**: 112~124, 1990.
- 45) **Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F.**: The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**: 117~127, 1991.
- 46) **Tanaka, K., et al.**: *S. cerevisiae* genes IRA1 and IRA2 encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein. *Cell*, **60**: 803~807, 1990.
- 47) **Cullen, P.J., et al.**: Identification of a specific Ins (1,3,4,5) P4-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature*, **376**: 527~530, 1995.
- 48) **Gibbs, J.B., Schaber, M.D., Allard, W.J., Sigal, I.S. and Scolnick, E.M.**: Purification of ras GTPase activating protein from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5026~5030, 1988.
- 49) **Gregory, P.E., et al.**: Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **19**: 265~274, 1993.
- 50) **Maekawa, M., Nakamura, S. and Hattori, S.**: Purification of a novel ras GTPase-activating protein from rat brain. *J. Biol. Chem.*, **268**: 22948~22952, 1993.
- 51) **Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gussella, J.F., Tanzi, R.E. and Solomon, F.**: Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 10758~10762, 1992.
- 52) **Bondy, C. and Lee, W.H.**: Correlation between insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 and IGF-I gene expression during brain development. *J. Neurosci.*, **13**: 5092~5104, 1993.
- 53) **Stenvers, K.L., Zimmermann, E.M., Gallagher, M. and Lund, P.K.**: Expression of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 mRNAs in adult rat forebrain. *J. Comp. Neurol.*, **339**: 91~105, 1994.

(平成8年12月25日受付)