
 原著

Myelin-associated Glycoprotein (MAG) 遺伝子の Alternative Splicing に関する分子生物学的研究

新潟大学脳研究所神経内科学部門（主任：宮武 正教授）

藤田信也

Alternative Splicing in Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) Gene

Nobuya FUJITA

Department of Neurology, Brain Research Institute,

Niigata University, Niigata

(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)

The structures of three forms of mouse myelin-associated glycoprotein (MAG) mRNAs were determined from full-length cDNA clones. Two forms of mRNAs have been reported to be different by alternate inclusion of exon 2 and 12 portions in the rat brain. One of the three forms of clones obtained here appeared to be a novel mRNA which lacked both the exon 2 and 12 portions, although others were identical splicing patterns to those of rat.

Two polypeptide isoforms of MAG with molecular masses of 72 and 67 kDa are produced by alternative splicing of the exon 12 portion containing a termination codon. Evidence was presented that expression of the two MAG mRNAs was developmentally regulated in the mouse brain. In the quaking mouse, the mRNA without the exon 12 portion coding the large MAG isoform was scarcely expressed throughout development.

Specific antibodies to L-MAG and S-MAG respectively were prepared, and immunoblots showed that the L-MAG band was scarcely detectable in the quaking mouse brain, whereas the S-MAG had a higher apparent molecular mass than in the normal control. Immunohistochemical study also showed that L-MAG was not stained in the quaking mouse brain. These results seemed to reflect a reduction in the L-MAG mRNA and abnormal glycosylation in the quaking mouse brain.

Key words: myelin-associated glycoprotein, alternative splicing, quaking mouse.

髓鞘関連糖蛋白、選択的スプライシング、髓鞘形成不全マウス

Reprint requests to: Nobuya FUJITA,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University, Asahimachi-
Dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通り 1-757

新潟大学脳研究所神経内科

藤田信也

緒 言

中枢神経の髓鞘は、オリゴデンドロサイトの細胞膜より形成されている。この構成蛋白は比較的単純で myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP), 2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP), myelin-associated glycoprotein (MAG) などからなる。一方、髓鞘形成不全マウスがいくつか知られており、それらの病態を解析することはヒトの髓鞘形成不全症を考えるうえでも重要である。これらの髓鞘形成不全マウスのうち、MBP 遺伝子の欠損である shiverer マウスや PLP 遺伝子の splicing 異常による jimpy マウスなど、分子レベルでの病態解析が進んできた¹⁾。

MAG は分子量約10万の30%の糖鎖を含む糖蛋白で神經軸索周囲に限局して存在し、軸索と髓鞘の接着分子の役割を果たしていると考えられている²⁾。ラットの MAG の cDNA クローニングによるアミノ酸の一次構造と遺伝子の構造の一部が明らかにされている³⁾⁴⁾⁵⁾。ラット MAG の遺伝子は全長 16 kbp で 13 個のエクソンが 12 個のイントロンにより分断されている⁵⁾。この遺伝子は、エクソン 2 とエクソン 12 の alternate な挿入により 2 種類の mRNA を生じるとされていた。ひとつの mRNA はエクソン 2 を含みエクソン 12 を含まないもので、もう 1 つの mRNA はエクソン 2 を含まずエクソン 12 を含むものである¹⁾⁵⁾。エクソン 12 には終止コドンが含まれており、エクソン 12 を含む mRNA より翻訳されるポリペプチドは 67kDa のもの (small MAG: S-MAG) で、含まない mRNA から翻訳される 72kDa のポリペプチド (large MAG: L-MAG) より小さい。一方、エクソン 2 は 5' 側非翻訳領域にあり、アミノ酸の構造に差を生じない⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

Quaking マウスは、生後 12 日ごろより始まる体幹の振戦を主徴とする髓鞘形成不全マウスである。常染色体劣性の遺伝形式をとり、染色体 17番にその異常があるとされている。Quaking マウスでは髓鞘の compaction が不良であり⁷⁾、正常マウスより分子量の大きな MAG が存在することなどより、MAG にその病態の原因があるのではないかと考えられていた⁸⁾⁹⁾。

本研究において、マウスの MAG の cDNA クローニングを行い、quaking マウスを中心に MAG の分子生物学的検討を行い、alternative splicing により生じる L-MAG, S-MAG の存在意義について考察した。

研究材料及び方法

1. マウス MAG の cDNA クローニング

Clontech Laboratories のマウス脳 cDNA ライブライマーを、犬塚らによって作製されたマウス MAG ポリクローナル抗体で immunoscreening を行った。一方、Gubler and Hoffman らの方法¹⁰⁾で生後 15 日齢のマウス脳から cDNA ライブライマーを作製した。前者のライブライマーで得られたマウス MAG の cDNA の断片を使って、後者のライブライマーをスクリーニングした。得られた cDNA は、pUC118 プラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列を Sanger 法¹¹⁾で決定した。

2. プローブの作製

エクソン 12 を含む mRNA と含まない mRNA に特

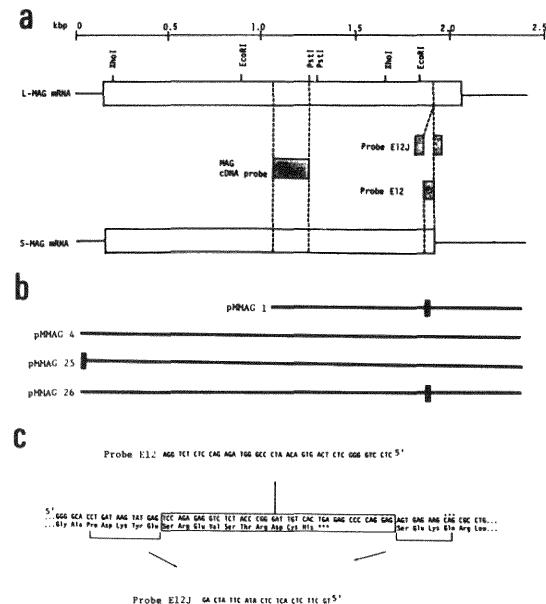


Fig. 1 Mouse MAG cDNAs and probes

- a: Restriction map of cDNAs to mouse MAG mRNA and the location of synthetic probes. The outlined boxes indicate the coding region.
- b: The four mouse MAG cDNA clones, pMMAG 1, pMMAG 4, pMMAG 25, and pMMAG 26 are shown. The exon 2 and 12 portions are indicated by black boxes.
- c: cDNA sequence of the exon 12 and adjacent portions. Probe E12 is 45 nt length complementary to the sequence of the exon 12 portion and Probe E12J is 25 nt length complementary to the sequences of both sides adjacent to the exon 12 portion.

異的に反応する合成プローブを、Applied Biosystems Inc. (ABI) の DNA 合成機を用いて作製した (Probe E12, Probe E12J). その部位と配列を Fig. 1 に示す。プローブのラベルは T4 polynucleotide kinase により [γ -³²P] ATP を用いた。cDNA の断片を Fig. 1 のように切り出し、[α -³²P] dCTP で Random Primed DNA Labelling Kit によりラベルを入れ、両方の mRNA を共通に認識するプローブとした。MBP に特異なプローブはエクソン 5 部分¹²⁾ の合成プローブを、また CNP に特異なプローブはマウス CNP cDNA フラグメント¹³⁾ を用いた。

3. マウス脳 MAG の mRNA の発現の検討

各発育段階の正常及び quaking マウス脳より total RNA を guanidine thiocyanate/cesium chloride 法¹⁴⁾ により調製した。さらに poly (A)⁺RNA を oligo (dT)-cellulose chromatography で調製し、Northern blotting 及び前述の cDNA ライブラーの作製に用いた。Northern blotting は、2.2M のホルマリンを含む 1.5 % のアガロースゲルを用いた。Slot blotting には、total RNA を使用した。ハイブリダイゼーションは cDNA プローブ及び Probe E12 の場合は、50% ホルムアミド存在下 42°C で、他の合成プローブは、ホルムアミド非存在下 65°C で行った。

4. L-MAG 及び S-MAG 特異抗体の作製とその免疫組織化学的検討

MAG cDNA の塩基配列から予測される L-MAG の C 末端 21 個のアミノ酸から成るペプチド及びエクソン

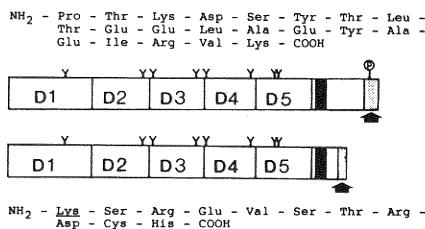


Fig. 2 The primary structures of the synthetic peptides and these location to L-MAG and S-MAG. The panel represents the scheme of L-MAG and S-MAG. D1-D5 are the five Ig-like domains containing the disulfide bounded loops. The trans-membrane portion is indicated by the black box, and the oligosaccharide site (Y) and phosphorylation site (P) are indicated. Location of the synthesized peptides are indicated by the box and arrow.

12 に相当する部分の 10 個のアミノ酸の N 末端に Lys を付加したペプチドを、ABI のペプチド合成機を用いて作製した (Fig. 2)。これらのペプチドの牛血清アミブミンを 1 % グルタルアルデヒドの存在下で搅拌し、Freund の完全アジュバントと共に家兎に数回免疫した。得られた血清をそれぞれ anti-L-MAG 抗体及び anti-S-MAG 抗体とし、immunoblotting と免疫組織染色に用いた。免疫染色は 2 次抗体に抗ウサギ IgG を用い、Avidin biotin peroxidase complex (ABC) 法を用いて発色した。

5. Quaking マウスにおける MAG 遺伝子の解析

正常及び quaking マウスの肝より DNA を抽出し、EcoRI で切り出されるエクソン 12 を含む 600bp の cDNA 断片のプローブで Southern blotting を行った。また、エクソン 11 とエクソン 13 部分をプライマーにして遺伝子に polymerase chain reaction (PCR) を用い¹⁵⁾、その産物を直接シーケンスし、エクソン 12 周辺の塩基配列を比較検討した。

結果

1. マウス MAG の cDNA クローニング

最初のスクリーニングで得られたクローニングは、EcoRI で 750bp と 600bp に分かれるもの (pMMAG 1)，600bp 断片は、cDNA の 3' 側末端を含むものであった。このクローニングを用いて、マウス 15 日齢の脳から作った cDNA ライブラーをスクリーニングし、3 種類の全長を含む cDNA を得た (Fig. 1)。エクソン 2 を含みエクソン 12 を含まないもの (pMMAG 25)，エクソン 2 を含まずエクソン 12 を含むもの (pMMAG 26)，及びエクソン 2 もエクソン 12 も含まないもの (pMMAG 4) の 3 種類である。45bp の長さからなるエクソン 12 の部分は、既報のラットと全く同じ塩基配列であったが、53bp の長さからなるエクソン 2 の部分は、ラットと 12 塩基が異なっていた。翻訳領域の塩基配列とアミノ酸配列のラットとの相同性は、それぞれ 95.4 % と 98.3 % であった。これらの全塩基配列とアミノ酸配列を Fig. 3 に示す。マウス S-MAG ポリペプチドは 582 アミノ酸からなり、ラットのそれと 9 個のアミノ酸の置換があった。エクソン 12 を含まない mRNA から翻訳される L-MAG ポリペプチドは 627 アミノ酸からなり、ラットに比べ 1 個多く、さらに 10 個のアミノ酸の置換があった。

2. 正常発育における MAG mRNA の発現

L-MAG, S-MAG をコードする mRNA は、終止コドンを含むエクソン 12 の alternative splicing によ

-141 -131 -121
GTCAGATGCTCCAATCTCTGTGTTAGCG

-111 -101 -91 -81 -71 -61 -51 -41 -31 -21 -11 -1
TCCCTGAGCTCTATTGAGTCTCCGAAAGACCTTGTTGAAGGGCACTTCAGTGGAAATCAGGAGACATCCCCAATCAGGGAGACTAACGCCCTAGDCTAATCCTGCTAAACAG
-10 -1
ATGATATTCCTCCGACCCCTGGCGCTTITGATAATGATTTCAGCTTCGAGGGGCCACTTCAGTGGGCTCCGATGCGCTCCGACCATCTCAGGCTTCCGGACCTGCTCCATT
M I F L A T L P L F W I M I S A R G R G H W G A W M P S T A T I S A F E G T C V S I
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
P C R F D F F D E L R P A Y V H G V W Y F N S P Y P K H Y P P V V F K S R T Q
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
CCCCCTGGTTGAGACTTCGGGATACGGCTCAAGCCGGCTTCTGGTACATGGCTCTGCTGATTCATAGCTCCATACCCAAAGACTACCCGGCTGGGAGCCACAACTT
P C R F D F F D E L R P A Y V H G V W Y F N S P Y P K H Y P P V V F K S R T Q
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
GTCCATGAGATTTCCAGGGGGCCAGGGGCTTGGAGACCTGGGCTACAAACTGACCTCTGGACACAGCTGGGAGGCTGGGAGCCACTGGGCTGGGAGGCAAAACTT
H E S F Q G R S R L L G D L R *
L G O Y N Q T F S E H S V L D I V A N T P H N I V Y P P E V Y V A G T E V E V S C M
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
CTGGGTGGCTAACACAGTACACCTTCTGGGACACGGCTCTGGACATCTGCAACACCCCAAATCTGGGCTCCGGGAAGTGCTGGCAGGAACGGAGCTGGAGGTCACTGTTAG
L G O Y N Q T F S E H S V L D I V A N T P H N I V Y P P E V Y V A G T E V E V S C M
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
CTGGGTGGCTAACACAGTACACCTTCTGGGACACGGCTCTGGACATCTGCAACACCCCAAATCTGGGCTCCGGGAAGTGCTGGCAGGAACGGAGCTGGAGGTCACTGTTAG
L G O Y N Q T F S E H S V L D I V A N T P H N I V Y P P E V Y V A G T E V E V S C M
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
GTCCCGGCAACACTGCCAACGGCTGGGCAAGCTGGCTGGGCAACGGGGCTGGGAGAGCCCAGTCTGGCTGGGCTGGGAGGCTGGGAGCTGGGCTGGGAGGATGAGCC
V P D N C P E L R P E L S W L G H E G L G E P T V L G R L R E D E G T V V Q V
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
.CTGCTACACTCTGGCTCTAGAGACCCAAACGGCCACGGCTGGCTGGGCTGGGCAACACCCACCTGGCTGGGAGGCTGGGAGCTGGGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGG
L L H F V P T R E A N G H R L G C Q A A F P N T T L Q K F E G Y A S L D V K Y P C C
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
CTGATTCCTGGAGATTAATCTCTGAGGGCCATGGGGCTCCATGGCTGGCTCTGGCTGGGCTGACAGCAACCCGGCCGGCGCTGACTTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
V I V E M S S V E A I T E G S H V S L L C G A D S N P P L L T W M R D G M V L
850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
AGGGAGGCACTGGGAAAGAGCTGACTCTGGATCTGGAGGGTGAACGGAGGGTGAACGGAGGGCTGACTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
R E A V A K S L Y L D L E E V T P F G A N G Y A C L A E N A Y G Q B D * R T V E L
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
AII:TGTCTAGTATGCACTTGAAGGCAACAGTGAATGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
S V M Y A P W K P T V N G T V V A V E G E T V S I L C S T Q S N P D P I L T I F
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
AAGGAGAACGAGCTTCTGGCCACGGTCACTCATAGAGTCAGCTGGAGCTGGGAGACCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
K E K Q I L A T V Y E S Q L Q G L E P F A V T P E D G Y T W C V A E H N Q Y G
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
AGAGCCACTGGCTCACTCTGGCTGGGAGTTGGCCCTCATTCCTCTGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
R A T A F N L S V E F A P I I L L E S H C A A A R D T V Q C L C L V V K S N P E P
1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
TCTGTGGCTTGTGGCTGGCTCCGGACGGTACTGAACTGAGCAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
S V A F E L P S R N V T V H E T E R E F V Y S E R S G L L L T S I L T A R Q Q A
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
CAAGGGCCCCCCCCCGCATGGCTGGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
Q A P P R V I C T S R N L Y G T Q S L E L P F Q G A H R L M W A K I G P V G A
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
GTCTGGCTTGTGGCTGGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
V A F A I L I A I V C Y I T Q T R R K K H Y T E S S A S F S G Q G D R P H V L Y S
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
GAATTCAGAAATCTGGGAGCTGGTAAATGAGTCAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
E F R I S G A P D K Y V E S R E V S T R D C H * S E K P A T L E X A E I R
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
GGCCAGGGGGAACTCCCAAGACTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
G L R G E S A P E L D U S Y S H S D L G K R P T K D S Y T L T E X A E I R
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
GTCAGACTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
V K *2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
GGAGGGGGAACTCCCAAGACTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
G L R G E S A P E L D U S Y S H S D L G K R P T K D S Y T L T E X A E I R

Fig. 3 The sequences of nucleotide and amino acid of mouse MAG. The nucleotide number begins with the first nucleotide of an initiation codon, ATG, and the nucleotides in the 5' noncoding region are indicated by negative numbers. Amino acids are indicated in standard one letter code. Replaced amino acids in rat MAG are shown by (Δ), and three nucleotides added in the mouse are underlined. The transmembrane region is underlined. Potential asparagine-linked glycosylation sites (●) and the potential tyrosine phosphorylation site (\blacktriangle) are indicated. The fibronectin recognition sequence RGD and the exon 2 and 12 portions are boxed in.

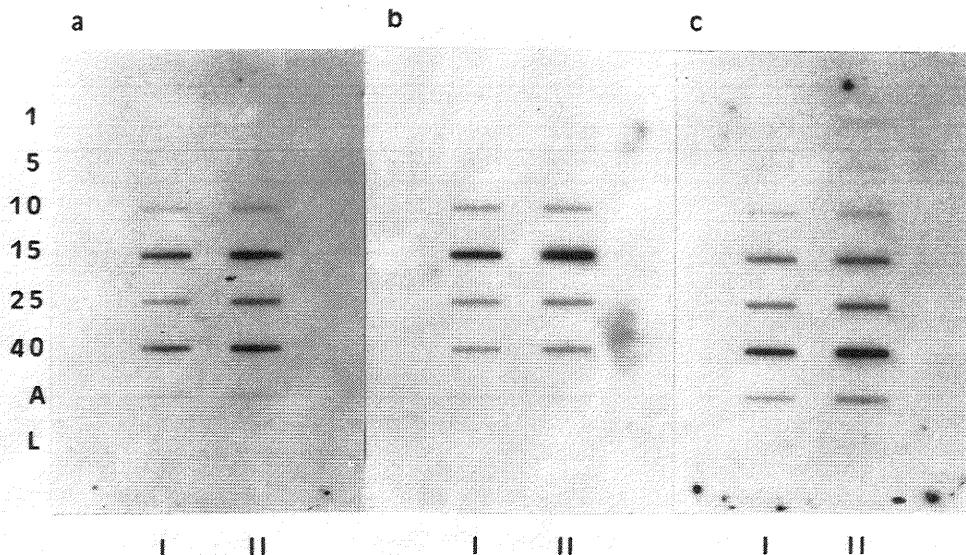


Fig. 4 Slot blot analysis of MAG mRNA in the normal mouse. Total RNA (15 µg each in I and 40 µg each in II) from 1, 5, 10, 15, 40 days old and adult (A) ddY mouse brain was blotted; total RNA from adult ddY mouse liver (L) was also blotted. The filter was probed first with Probe E12J (b), second with Probe E12 (c), and finally with the cDNA probe (a).

り作られると考えられ、この mRNA の発育過程での発現を検討した。Probe E12 はエクソン 12 に相当する mRNA の相補配列で、S-MAG をコードする mRNA に特異的に反応する。Probe E12J は、エクソン 12 に相当する部分の両側を合わせた 25 塩基からなる部分の相補配列で、このプローブは、L-MAG をコードする mRNA に特異的に反応する (Fig. 1)。各発育段階の正常マウス脳より total RNA を調整して slot blotting を行うと、Probe E12J は生後 15 日頃最も強い発現を認め、Probe E12 ではそれより遅れた生後 40 日頃最も強いバンドを認めた。S-MAG, L-MAG をコードする mRNA 両方を認識する cDNA のプローブ (total MAG) では、その両者を合わせたパターンの発現を認めた (Fig. 4)。

3. Quaking マウスにおける MAG, CNP, MBP mRNA の発現

Quaking マウス脳より調製した poly (A)⁺RNA を用い、前述のプローブを使って Northern blotting で、正常マウスと mRNA の発現を比較した。Total MAG の mRNA の発現は、発育を通じて正常マウスに比べ増加していたが、L-MAG をコードする mRNA は、ほとんど検出できなかった。他のミエリンの蛋白の mRNA

の発現は、quaking マウスで減少していた (Fig. 5)。

4. 正常発育及び Quaking マウスにおける L-MAG, S-MAG 抗体の免疫組織化学的検討

L-MAG, S-MAG をそれぞれ特異的に認識する抗体と両方の MAG を認識する抗体を用いて、immunoblotting と免疫組織学的検討を行った。正常の発育において、L-MAG の発現は 15 日目をピークにしてその発現は持続した。一方、S-MAG の発現はそれより遅れ、40 日目でピークに達した (Fig. 6)。Quaking マウスにおける immunoblotting では、S-MAG を認識する抗体で、より大きな分子量の MAG のバンドを認めた。一方、L-MAG を認識する抗体では、quaking マウスでほとんどバンドが検出されなかった (Fig. 7)。免疫組織染色においても、L-MAG 抗体では quaking マウスの小脳の髓鞘はほとんどは染色されなかった (Fig. 8)。

5. Quaking マウスにおける MAG 遺伝子の解析

Southern blotting では、正常と quaking マウスでバンドの差を認めなかった (Fig. 9)。更に、PCR によるエクソン 12周辺の遺伝子の解析でも、インtron とエクソンの間にコンセンサスな配列にちがいを認めなかっ

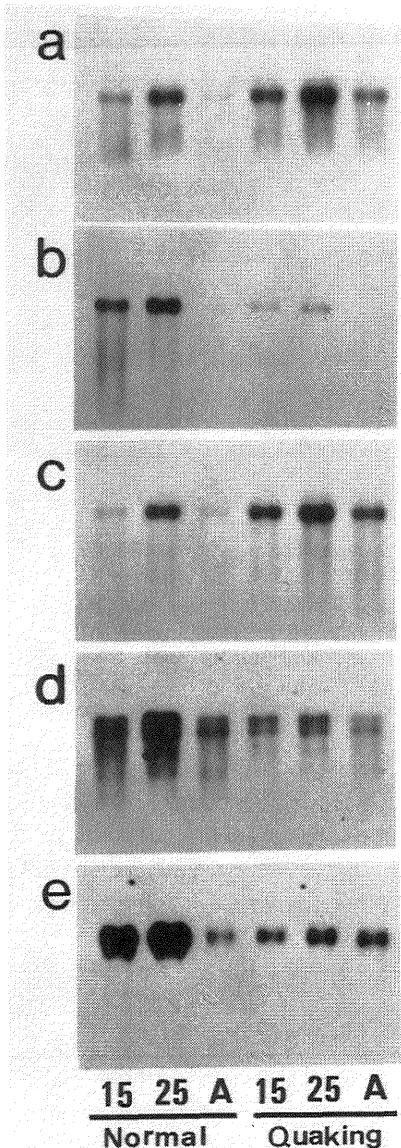


Fig. 5 Northern blot analysis of MAG mRNA in the quaking mouse. Poly (A)⁺ RNA (6 μg each) from 15, 25 days old and adult (A) quaking and ddY mouse brain was electrophoresed. The filter was probed with MAG cDNA fragment (a), Probe E12J (b), Probe E12 (c), CNP cDNA fragment (d), and MBP synthetic probe (e).

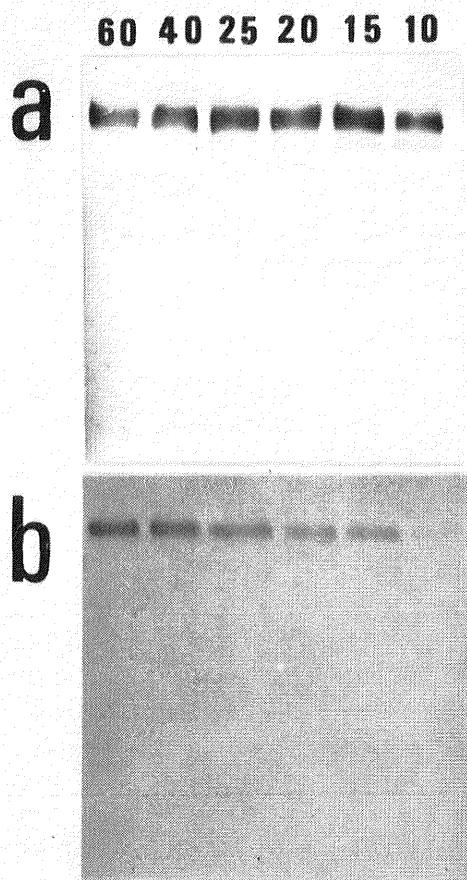


Fig. 6 Immunoblots of the normal mouse brain myelin stained with the anti-L-MAG antiserum (1: 2000) (a) and anti-S-MAG antiserum (1: 200) (b). Twenty microgram of myelin protein from the 10, 15, 20, 25, 40 and 60 days old ddY mouse brain myelin were loaded.

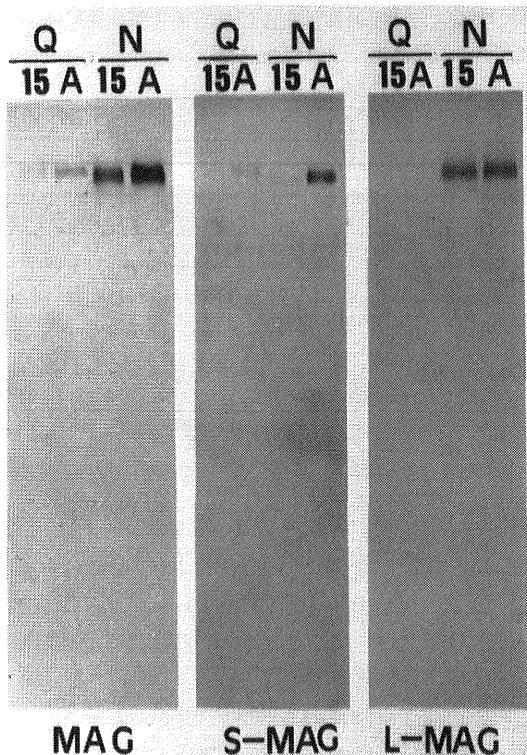


Fig. 7 Immunoblots of the quaking and control mouse brain myelin stained with the anti-mouse MAG antiserum (1: 500) (a), anti-S-MAG antiserum (1: 500) (b) and anti-L-MAG antiserum (1: 2000) (c). Twenty micrograms of myelin protein from the brains of 15 days old quaking (Q) and control (N) and adult quaking (QA) and control (NA) mice were loaded.

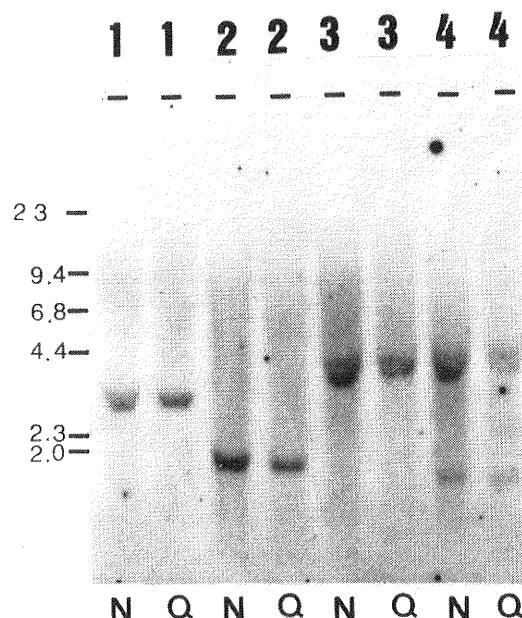


Fig. 9 Southern blot analysis of MAG gene of the quaking and control mouse. Ten micrograms of genomic DNA from quaking (Q) and normal (N) mouse digested by the restriction enzyme of EcoR I (1), Pst I (2), Hind III (3) and Pvu II (4) were electrophoresed. The filter was probed with 600bp MAG cDNA fragment containing the exon 12 portion.



Fig. 8 Cerebellum of a 15 days old quaking mouse immunostained with the anti-mouse MAG antiserum (1: 100) (A) and the anti-L-MAG antiserum (1: 500) (B). Bars represent 100 μm.

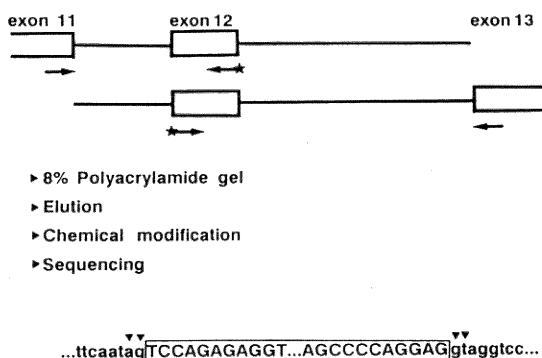


Fig. 10 Genomic sequence around exon 12 determined by PCR. The strategy and the sequence are shown.

た (Fig. 10).

考 按

ラットでは、分子量の違う2種類のMAGが存在することが以前からimmunoblotting知られており、in vitro translationによっても67kDaと72kDaの2種類のポリペプチドが存在することが報告されていた⁶⁾。ラットのMAG cDNAクローニングにより、この2種類のポリペプチドは終止コドンを含むエクソン12のalternative splicingによるものであることが明らかにされた^{4,5)}。一方、エクソン2は5'側非翻訳領域にあり、そのalternative splicingはアミノ酸の構造に影響を与えないが、ラットのMAG mRNAではエクソン12とalternateの挿入関係にあるため、エクソン12のalternative splicingに影響を及ぼしている可能性があった^{1,5)}。今回のマウスMAGのcDNAクローニングでは、従来報告されていた、エクソン2を含みエクソン12を含まないもの及びその逆のもの他に、新たに両方とも含まないもの(pMMAG 4)を得ることができた(Fig. 1)¹⁶⁾。このエクソン2の部分の発現の検討を含め、エクソン12は独立したスプライシング調節を受けているものと思われる¹⁶⁾。3種類のクローンの他の塩基配列は、polyAシグナル部位を含め同配列であった。

エクソン12のalternative splicingにより作られる2種類のMAGの異なる部分は、C末端側の細胞内の配列に相当し、23個の疎水性に富むアミノ酸からなる膜貫通部分と513個のアミノ酸からなる細胞外部分は両者とも共通であった。細胞外は5つのドメインから成り、その構造は免疫グロブリンのドメイン構造に類似してい

た (Fig. 3)。これらの構造はラットと強い相同意があり、ラット同様マウスMAGもneural cell adhesion molecule (N-CAM)などと共に免疫グロブリンスーパー・ファミリーに属すると考えられる。細胞接着分子と免疫系の認識分子が進化上に共通性があるらしいことは、興味深く思われる。

N末端寄りに、Arg-Gly-Aspからなる配列が存在していた。これは、フィプロネクチンに最初に見いだされた細胞接着機能を持つ配列と考えられており¹⁷⁾、MAGが細胞認識に関わる役割を果たす上で機能していると思われる。細胞外には、8個の糖鎖が付く可能性のある部位があった(Asn-X-Ser/Thr)。

S-MAGとL-MAGはC末端に差があり、L-MAGの方が45アミノ酸長くなっていた。このS-MAGとL-MAGの存在意義、あるいはalternative splicingの意義は何なのであろうか。正常マウスの発育に伴うそれぞのmRNAの発現はL-MAGのmRNAが先に誘導され、S-MAGのmRNAがそれより遅れて発現した(Fig. 4)。L-MAGのmRNAは、生後15日という最も髓鞘形成の盛んな頃に多く発現していた¹⁸⁾。Cuprizoneという薬剤を用いてマウスに脱髓を生じさせ、その後の再生脳で、このMAGのalternative splicingの発現を検討すると、再生初期にL-MAG mRNAが特徴的に発現していた¹⁹⁾。一方、蛋白のレベルの発現時期もmRNAのそれとほぼ同じであったが、L-MAGもS-MAGもその発現はmRNAに比べて長く持続していた(Fig. 6)。L-MAGは、髓鞘が軸索と接し、髓鞘が積極的に形成させる時に必要とされ、そのmRNAも優先的に発現すると考えられる。

Quakingマウスでは、髓鞘のcompactionが不良である⁷⁾。更にimmunoblottingで、分子量の大きなMAGの存在が指摘されていた^{8,9)}。Quakingマウスマウス脳ではtotalのMAGのmRNAの発現はむしろ増加していたが、それはS-MAG mRNAの増加を反映するもので、L-MAG mRNAはほとんど検出されなかった(Fig. 5)¹⁸⁾。他の髓鞘蛋白のmRNAは、quakingマウスマウス脳で減少しており、このalternative splicingの異常は、MAGに特異な現象と思われる^{13,20)}。更にエクソン2の部分のalternative splicingは正常マウスと変わらなかつた¹⁶⁾。Immunoblottingや免疫組織学的検討により蛋白レベルでもL-MAGはquakingマウスではほとんど発現されていないことがわかった(Fig. 7, 8)²⁹⁾。抗マウスマウスMAG抗体で染まる分子量の大きなMAGはS-MAGで、異常な糖鎖を持ったものであると考えら

れる。

以上のように、quaking マウス脳では、MAG のエクソン12の alternative splicing の異常があると考えられる。このことは、in vitro translation による実験で、分子量の小さなポリペプチドの方が過剰に作られているという報告と矛盾しない²¹⁾。過剰な S-MAG mRNA の発現は、足りない L-MAG mRNA の発現の代償機構かもしれない。そしてこの過剰な mRNA の発現は、翻訳過程でなんらかの作用を受けて、蛋白としてはその発現の量を減じているらしい。

Quaking マウスの遺伝子の解析を Southern blot と PCR により行ったが、異常を見いだせなかった。スプライシング異常に基づく髓鞘形成不全マウスとしては、jimpy マウスが知られている。このマウスでは、PLP 遺伝子のエクソン5とイントロンの間のコンセンサスな配列 AG から GG への突然変異があり、スプライシングの異常が起こる²²⁾。Quaking マウスでは、エクソン12とイントロンとの間にコンセンサスな配列は保存されていた (Fig. 10)。

MAG の遺伝子は、マウスでは染色体7番にマップされている²³⁾。Quaking マウスの遺伝子の異常は染色体17番にあり、MAG と異なっている。近年、N-CAM の3つのポリペプチドのうち一番大きな 180kDa の N-CAM180 が、quaking マウスで減少しているという報告がなされた²⁴⁾。N-CAM は、MAG 同様免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、マウスの染色体9番にマップされている²⁵⁾。PolyA シグナルを含むエクソン15の alternative splicing で、分子量の異なる N-CAM が作られる²⁶⁾。染色体17番のトランスに働く因子が、染色体7番や9番に影響を及ぼし、MAG のエクソン12や N-CAM のエクソン15を幼若期の間だけ splice out しておくという複雑な調節機構を担っているのかもしれない。

ヒトの MAG の cDNA クローニングもされ、ヒトでは、現在のところ L-MAG mRNA しか見つかっていない²⁷⁾²⁸⁾。髓鞘の形成や再生、又は髓鞘形成不全マウスでの MAG の alternative splicing による発現の検討から、L-MAG が髓鞘の形成初期に重要な役割を果たしていると推察される。L-MAG は S-MAG より C 末端が45アミノ酸長いが、この中に phosphorylation site が含まれている。L-MAG は細胞内のセカンドメッセンジャーへ情報を伝える受容体として、シグナル伝達の機能も担っていると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました宮武正教授に心から感謝の意を表します。また直接御指導をいただいた佐藤修三講師、神経薬理学部門高橋康夫名誉教授及び栗原正助教授に深くお礼申し上げます。更に、神経薬理学部門桑野良三助手、崎村建司助手、荒木一明技官、櫛谷悦子技官、神経内科学部門犬塚貴助手、辻省次助手、石黒英明先生、馬場広子先生、長沢達子嬢、諸橋イネ子嬢、第一内科学教室伊藤正毅講師、古川達雄先生らの諸兄に御指導、御助言を賜りましたことを深謝いたします。尚、本研究の概要は、第19回アメリカ神経化学会(ニューオリンズ、1988)、第12回国際神経化学会(ボルトガル、1989)、第21回アメリカ神経化学会(フェニックス、1990)等において発表した。

参考文献

- 1) Campagnoni, A.T.: Molecular biology of Myelin proteins from the central nervous system. *J. Neurochem.*, **51**: 1~14, 1988.
- 2) Quarles, R.H.: Myelin-associated glyco-protein in development and disease. *Dev. Neurosci.*, **6**: 285~303, 1984.
- 3) Arquint, M., Roder, J., Chia, L.-S., Down, J., Wilkinson, D., Bayley, H., Braun, P. and Dunn, R.: Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 600~604, 1987.
- 4) Salzer, J.L., Holmes, W.P. and Colman, D.R.: The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J. Cell Biol.*, **104**: 957~965, 1987.
- 5) Lai, C., Brow, M.A., Nave, K.-A., Noronha, A.B., Quarles, R.H., Bloom, F.E., Milner, R.J. and Sutcliffe, J.G.: Two forms of 1B236/myelin-associated glycoprotein, a cell adhesion molecule for postnatal neural development, are produced by alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4337~4341, 1987.
- 6) Frail, D.E. and Braun, P.E.: Two developmentally regulated messenger RNAs differing in their coding region may exist for the myelin-associated glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **259**: 14857~14862, 1984.

- 7) **Wisniewski, H. and Morell, P.**: Quaking mouse: ultrastructural evidence for arrest of myelinogenesis. *Brain Res.*, **29**: 63~73, 1971.
- 8) **Matthieu, J.-M., Brady, R.O. and Quarles, R.H.**: Anomalies of myelin-associated glycoproteins in 'Quaking' mice. *J. Neurochem.*, **22**: 291~296, 1974.
- 9) **Inuzuka, T., Johnson, D. and Quarles, H.**: Myelin-associated glycoprotein in the central and peripheral nervous system of quaking mice. *J. Neurochem.*, **49**: 597~602, 1987.
- 10) **Gubler, U. and Hoffmann, B.J.**: A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25**: 263~269, 1983.
- 11) **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.**: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463~5467, 1977.
- 12) **de Ferrer, F., Engh, H., Hudson, L., Kamholz, J., Puckett, C., Molineaux, S. and Lazzarini, R.A.**: Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein. *Cell*, **43**: 721~727, 1985.
- 13) **Kurihara, T., Takahashi, Y., Fujita, N., Sato, S. and Miyatake, T.**: Developmental expression of 2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase mRNA in brains of normal and quaking mice. *Mol. Brain Res.*, **5**: 247~250, 1989.
- 14) **Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J.**: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**: 5294~5299, 1979.
- 15) **Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.**: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350~1354.
- 16) **Fujita, N., Sato, S., Kurihara, T., Kuwano, R., Sakimura, K., Inuzuka, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: cDNA cloning of mouse myelin-associated glycoprotein: a novel alternative splicing pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 1162~1169, 1989.
- 17) **Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D.**: Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, **44**: 517~518, 1986.
- 18) **Fujita, N., Sato, S., Kurihara, T., Inuzuka, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: Developmentally regulated alternative splicing of brain myelin-associated glycoprotein mRNA is lacking in the quaking mouse. *FEBS Lett.*, **232**: 323~327, 1988.
- 19) **Fujita, N., Ishiguro, H., Sato, S., Kurihara, T., Kuwano, R., Sakimura, K., Takahashi, Y. and Miyatake, T.**: Induction of myelin-associated glycoprotein mRNA in experimental remyelination. *Brain Res.*, **513**: 152~155, 1990.
- 20) **Konat, G., Trojnowska, M., Gantt, G. and Hogan, E.L.**: Expression of myelin protein genes in quaking mouse brain. *J. Neurosci. Res.*, **20**: 19~22, 1988.
- 21) **Frail, D.E and Braun, P.E.**: Abnormal expression of the myelin-associated glycoprotein in the central nervous system of dysmyelinating mutant mice. *J. Neurochem.*, **45**: 1071~1075, 1985.
- 22) **Nave, K.-A., Bloom, F.E. and Milner, R.J.**: A single nucleotide difference in the gene for myelin proteolipid protein defines the jimpy mutation in mouse. *J. Neurochem.*, **49**: 1873~1877, 1987.
- 23) **D'Eustachio, P., Colman, D.R. and Salzer, J.L.**: Chromosomal location of the mouse gene that encodes the myelin-associated glycoproteins. *J. Neurochem.*, **50**: 589~593, 1988.
- 24) **Bhat, S. and Silberberg, D.H.**: NCAM-180, the largest component of the neural cell adhesion molecule, is reduced in dysmyelinating quaking mutant mouse brain. *Brain Res.*, **452**: 373~377, 1988.
- 25) **D'Eustachio, P., Owens, G.C., Edelman, G.M. and Cunningham, B.A.**: Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7631~7635, 1985.
- 26) **Small, S.J., Haines, S.L. and Akeson, R.A.**: Polypeptide variation in an N-CAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally

- regulated through alternative splicing. *Neuron*, **1**: 1007~1017.
- 27) Sato, S., Fujita, N., Kurihara, T., Kuwano, R., Sakimura, K., Takahashi, Y. and Miyatake, T.: cDNA cloning and amino acid sequence for human myelin-associated glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**: 1473~1480, 1989.
- 28) Spagnol, G., Williams, M., Srinivasan, J., Golier, J., Bauer, D., Lebo, R.V. and Latov, N.: Molecular cloning of human myelin-associated glycoprotein. *J. Neurosci. Res.*, **24**: 137~142, 1989.
- 29) Fujita, N., Sato, S., Ishiguro, H., Inuzuka, T., Baba, H., Kurihara, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.: The large isoform of myelin-associated glycoprotein is scarcely expressed in the quaking mouse brain. *J. Neurochem.*, **55**: 1056~1059, 1990.

(平成2年2月21日受付)