

受容体型チロシンホスファターゼ
PTP ζ アイソフォームの構造、発現
および糖鎖修飾の解析

西脇 妙子

博士（理学）

総合研究大学院大学
生命科学研究科
分子生物機構論専攻

平成9年度
(1997)

博士論文の要旨

平成 10 年 1 月 8 日

出願者

生命科学研究科分子生物機構論専攻

氏名 西脇 妙子

(学籍番号) 943205



博士論文

題目 受容体型チロシンホスファターゼ PTP ζ アイソフォームの構造、発現
および糖鎖修飾の解析

発生期の脳には、多種多様なプロテオグリカンが豊富に存在し、脳の形態形成において重要な役割を果たしていると考えられている。モノクローナル抗体 MAb6B4 の抗原分子である 6B4 プロテオグリカンは、分子量約 300 kDa のコアタンパク質を持つ可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。MAb6B4 を用いた免疫組織化学的研究から、本分子は層構造形成時の大脳皮質においては、移動中の神経芽細胞およびその移動の足場となる放射状グリア細胞上に、また後脳部においては、苔状線維と、その標的であるプルキンエ細胞、ゴルジ細胞、および小脳深部核の神経細胞がシナプスを形成する時期に一致して、これらの神経細胞および苔状線維上に観察される。

著者は精製 6B4 プロテオグリカンのコアタンパク質の一次構造を明らかにするため、6B4 プロテオグリカンに対するポリクローナル抗体（抗 6B4 プロテオグリカン抗体）を用いてラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、以下の 3 種類の分子をコードする cDNA が単離された。

(1) ヒト PTP ζ のラットホモログと考えられる分子；細胞外に carbonic anhydrase 様ドメインとフィブロネクチンタイプ III 様ドメイン、そして Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に富む領域を持ち、膜貫通ドメインを経て、細胞内に 2 つの隣接するチロシン

ホスファターゼ (PTP)ドメインを有する。

(2) (1)の分子の Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に富む領域の大部分を欠いた分子。

(3) (1)の分子の膜貫通領域以下ををもちない分泌型の分子。

このことは、PTP ζ 遺伝子から選択的スプライシングによって 3 つの異なる分子が生成すること、そのうち(3)の分子が 6B4 プロテオグリカンに相当する分子であることを意味している。以後(1)、(2)および(3)の分子をそれぞれ PTP ζ -A、-B および-S、またこれらの分子を総称して PTP ζ と呼ぶ。

これまでプロテオグリカン型の PTP の存在は知られていなかったが、PTP ζ -S がプロテオグリカンであることから、PTP ζ -A および-B もコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在する可能性が考えられる。そこで著者は、生後 0 および 20 日令ラット脳より得られた膜画分の CHAPS 抽出物よりプロテオグリカン画分を調製し、PTP 活性を測定した。その結果、膜結合型プロテオグリカン画分に PTP 活性が存在すること、PTP 活性のピークから PTP ζ -A および-B が検出されたことにより、この活性が両分子に由来することが明らかとなった。

次に、胎生 13 日から生後 52 日までの発生段階における、PTP ζ 分子種の発現とコンドロイチン硫酸鎖による修飾の変動を解析した。PTP ζ -A は常にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在し、発現量は胎生 13 日から生後 0 日までほとんど変化がないが、その後急激に減少した。これに対し PTP ζ -B は胎生 13 日から生後 52 日までほぼ一定の発現量を示すが、胎生 13 日から生後 0 日までコンドロイチン硫酸鎖によって修飾されていない PTP ζ -B 分子が存在した。PTP ζ -S は PTP ζ -A と同様、常にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在した。PTP ζ -S は PTP ζ -A および PTP ζ -B と比べると約 10 倍量発現しており、その発現量は胎生期に徐々に増加し、生後 8 日目以降徐々に減少した。このように PTP ζ はそれぞれのアイソフォームによって異なった発現およびコンドロイチン硫酸鎖の修飾の制御を受けていることが示された。またコンドロイチン硫酸以外の糖鎖の修飾についても、アイソフォームによる違いが見られた。PTP ζ -A と PTP ζ -S は HNK-1、LewisX およびケラタン

硫酸によって修飾されているのに対し、PTP ζ -B はこれらの糖鎖によって修飾されていない。このことは、PTP ζ -B において欠失しているコアタンパク質部分がこれらの糖鎖の修飾部位であることを示唆している。

PTP ζ は HB-GAM/pleiotrophin, tenascin, N-CAM, L1, Nr-CAM, TAG-1 および contactin と結合することが報告されているが、PTP ζ -A、-S および-B におけるコアタンパク質の一次構造あるいは糖鎖修飾の違いは、これらの分子の細胞外領域に結合するリガンドが異なっている可能性を示唆している。特に PTP ζ -B はコンドロイチン硫酸鎖の修飾が胎生期に変動しており、PTP ζ -B のリガンドの種類、あるいはリガンドとの結合の親和性が各発生段階において異なっている可能性がある。

また、PTP ζ -A および-B の機能に関する知見を得るため、マウス繊維芽細胞である L 細胞に PTP ζ -A および-B を強制発現し、細胞内局在を解析した。PTP ζ -A および-B は L 細胞において、ともに PTP 活性を持ったコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして発現した。そして両者ともに細胞周縁部のラッフル膜上や突起上に局在し、F-アクチン、cortactin、および talin と一致した局在を示した。また初代培養大脳神経細胞においては、抗 6B4 プロテオグリカン抗体による染色が成長円錐や糸状仮足に観察された。これらの知見から、PTP ζ -A および-B が細胞骨格系が関与する現象において何らかの役割を果たしていることが推測される。

目次

序論	1
材料および方法	8
実験結果	19
考察	30
参考文献	40
謝辞	47

序論

細胞外マトリックスは、組織中の細胞間の間隙を満たしている生体高分子の複雑な集合体であり、組織の支持、結合といった物理的役割のみならず、細胞増殖、細胞分化、細胞移動などの現象を調節する機能を有することが近年明らかになってきており、哺乳類の中枢神経系の発生においても重要な役割を果たしていると考えられている (1)。一般に、細胞外マトリックスはコラーゲン、エラスチン等の繊維性タンパク質、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性糖タンパク質、様々なプロテオグリカン、そしてヒアルロン酸などの多糖から構成されている。脳の細胞外マトリックスには例外的に I、II 型コラーゲンのような線維形成コラーゲンが存在せず、プロテオグリカンやヒアルロン酸が大部分を占めている (1)。

プロテオグリカンは、硫酸化グリコサミノグリカンがタンパク質に共有結合した分子である (2)。硫酸化グリコサミノグリカンは基本的に、硫酸化された 2 糖の繰り返し単位が直鎖状に連結した高分子で、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸の 5 種類が存在し、それぞれ 2 糖繰り返し単位が異なっている。また、プロテオグリカンのタンパク質部分をコアタンパク質と呼んでいる。近年、多くのコアタンパク質のクローニングが進み、デコリンファミリー (3)、アグリカンファミリー (4, 5)、シンデカンファミリー (6)、グリピカンファミリー (7) などいくつかのファ

ミリーを形成していることがわかってきた。アグリカンは軟骨に豊富に存在する可溶性のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることが知られている(8)。またシンデカンは膜貫通型のヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、bFGF などのヘパリン親和性成長因子を結合し、FGF レセプターの co-receptor としての役割が示されている(9)。

近年、哺乳類の脳に多様なプロテオグリカンが存在することが明らかにされ、その機能的重要性に注目が集まっている(10、11)。前田らは脳に存在する可溶性のプロテオグリカンに対するモノクローナル抗体を作製し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質を認識するものをスクリーニングした(12)。それらの内の一つである MAb6B4 は、分子量 300 kDa のコアタンパク質を持つコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを認識した。免疫組織化学的方法により MAb6B4 の抗原分子の発現は神経系の発生期において、時間的、領域的に制御されていることが示された。大脳皮質の層構造は脳室の周囲 (ventricular zone) で生まれた神経芽細胞が垂直方向に放射状グリア細胞を足場にして移動し、移動先で分化することによって作られる。ラットの大脳皮質においては、胎生 12 日目ごろから ventricular zone で生まれた神経芽細胞が移動を開始する。その後も神経幹細胞は活発に分裂を続け出生直前の胎生 21 日目ごろまでに分裂が終了する。後から生まれた細胞はすでに移動した細胞を乗り越えてより外側に移動し、内側から外側方向に順次層構造を形成することになる。この移動は生後 10 日目ごろに完了する(13)。MAb6B4 の抗原分子は移動中の神経芽細胞および放射状グリア細胞に発現していることから神経細

胞の移動に関与していることが推測される (14)。また後脳においては、小脳への主要な入力線維である苔状線維が、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞、そして小脳深部核の神経細胞との間にシナプスを形成する時期に、これらの細胞と苔状線維が染色される (苔状線維、胎生 20 日から生後 30 日；プルキンエ細胞、生後 10 日以降；ゴルジ細胞、生後 20 日以降；小脳深部核、生後 20 日以降) (12)。

さらに前田らは MAb6B4 の抗原分子 (6B4 プロテオグリカン) の精製を試みた。生後 20 日令のラット脳から PBS 可溶性のフラクションを調製し、陰イオン交換クロマトグラフィー、CsCl 密度勾配遠心およびゲル濾過クロマトグラフィーによって抗原分子を精製した (14)。6B4 プロテオグリカンは約 500 から 1000 kDa の巨大な分子であり、コンドロイチナーゼ ABC 処理によってコンドロイチン硫酸を除いたコアタンパク質は、SDS-PAGE により 300 kDa の分子量を示す (14)。

著者は本研究において、まず 6B4 プロテオグリカンのコアタンパク質の構造を明らかにする目的で、精製 6B4 プロテオグリカンに対するポリクローナル抗体を用いて、ラット脳 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果以下の 3 種類の分子をコードする cDNA が得られた。

(1) 細胞外に carbonic anhydrase 様ドメインとフィブロネクチンタイプ III 様ドメイン、そして Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に富む領域を持ち、膜貫通ドメインを経て、細胞内に 2 つの隣接するチロシンホスファターゼ (PTP) ドメインを持つ、ヒト PTP ζ のラットホモログと考えられる分子。

(2) (1)の分子の Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に富む領域の大部分を選択的スプライシングにより欠いた分子。

(3) (1)の分子の細胞外領域と同一な膜貫通領域をもたない分泌型の分子。

この結果は PTP ζ 遺伝子から選択的スプライシングの違いによって、3 種類の異なる分子種が生成すること、そのうちの(3)に相当する分子が脳の可溶性プロテオグリカンである 6B4 プロテオグリカンであることを示している。

以後(1)、(2)および(3)の分子をそれぞれ PTP ζ -A、-B および-S、また、これらの分子を総称して PTP ζ と呼ぶ。 PTP ζ -A および-B の細胞外領域が 6B4 プロテオグリカンの全体あるいはその一部であることから、これら自身もプロテオグリカンである可能性が考えられた。そこで、PTP ζ -A と-B をラット脳より部分精製し、その糖鎖を解析した結果、両者ともに、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることが判明した。

タンパク質のチロシンリン酸化は、細胞の増殖、分化、代謝、細胞周期、細胞接着などの現象において重要な役割を果たしており、チロシンキナーゼ (PTK)と PTP の活性のバランスにより制御されている (15-19)。1980 年代に多くの PTK が癌遺伝子産物あるいは増殖因子受容体として同定された (20、21)。従来、チロシンリン酸化を調節しているのは主に PTK であり、PTK によりリン酸化されたタンパク質は比較的少数のハウスキーピング的な PTP によって受動的に脱リン酸化されていると考えられてきた。しかし 1988 年に Tonks らによって初めてヒト胎盤から細胞質型 PTP である PTP1B が精製され (22、23)、

Charbonneau らによってアミノ酸配列が決定されて以来 (24)、触媒領域の塩基配列をもとにしたクロスハイブリダイゼーションや RT-PCR 法により、驚くほど多様な PTP が同定されてきている。また Src ファミリー PTK においては特定のチロシン残基が脱リン酸化することによって活性が調節されている (25-27) ことが明らかになるに至って、現在は PTP も PTK と同様に積極的にチロシンリン酸化の制御にかかわっていることが認識されている (15-19)。

PTP には比較的低分子量の細胞質型 PTP (16、17、19) と、高分子量の受容体型 PTP (16-19) とがある。酵素活性を担う PTP ドメインは約 250 アミノ酸より成り、異なる PTP ドメインの間には 25% から 50% のアミノ酸配列の相同性がみられる。とくによく保存されているのは活性中心のシステイン残基周辺の 11 アミノ酸からなる配列 $[(I/V)HCXAGXXR(S/T)G]$ である。細胞質型 PTP は 1 個の PTP ドメインを持ち、PTP ドメインの N 末端側あるいは C 末端側の領域の構造に多様性が認められる。これらの領域は細胞内局在、基質特異性、酵素活性の制御などに関わっていると考えられる。

受容体型 PTP は 1 個または 2 個の PTP ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外領域から成っている。細胞外領域は多様性に富んでおり、さまざまなモチーフの組み合わせで構成されている。免疫グロブリン様ドメイン、フィブロネクチンタイプ III 様ドメインなどの細胞接着分子様の構造を持つものも多い (図 1)。それぞれの受容体型 PTP の細胞外の構造の違いにより結合するリガンドが異なっているものと考えられる。

このような多様な受容体型 PTP の中でも PTP ζ は、プロテオグリカン型

受容体であるという点で極めて特異である。プロテオグリカンには糖鎖部分あるいはタンパク質部分を介して様々な分子が結合することが知られている。従って、PTP ζ アイソフォームの糖鎖修飾様式を詳細に解析することは、本分子の機能を明らかにする上で重要であると考えられる。そこで次に、PTP ζ -A、-B、および-S の発現量とコンドロイチン硫酸をはじめとする各種糖鎖による修飾の変化を発生段階を追って解析した。その結果、PTP ζ は脳の発達過程においてアイソフォーム特異的に異なった糖鎖修飾および発現調節を受けていることが明らかになった。このことは、PTP ζ のアイソフォームは互いに異なった分子をリガンドとして、脳の発達過程において異なった機能を果たしている可能性を示唆している。さらに PTP ζ -A と PTP ζ -B の機能と密接な関係があると考えられる細胞内局在についても検討を加え、その神経分化、細胞移動、神経回路形成における役割を推定した。

本文中あるいは図表中で使用した略号および試薬の化学名は以下の通りである。

Le ^x	Lewis X
PBS	phosphate buffered saline
PTP	protein tyrosine phosphatase
PTK	protein tyrosine kinase
GST	glutathione S-transferase
FITC	fluorescein isothiocyanate
P	postnatal day
E	embryonic day
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	sodium lauryl sulfate
PAGE	polyacrylamide electrophoresis
TBS	Tris buffered saline
NBT	nitro blue tetrazolium
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
HBS	HEPES buffered saline
BSA	bovine serum albumin
TCA	trichloroacetic acid
DTT	dithiothreitol
CMF-HBSS	calcium magnesium free-Hanks' balanced salt solution
HB-GAM	heparin binding growth associated molecule
GPI	glycosylphosphatidyl inositol

材料および方法

材料

抗 6B4 プロテオグリカン抗体は精製 6B4 プロテオグリカンを抗原にして、抗血清 31-5 は PTP ζ の 1360 から 1643 アミノ酸残基の部分 GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させたものを抗原にして、ウサギを免疫し作製した。Sprague-Dawley ラットは中部科学資材より購入した。adult Sprague-Dawley rat brain λ gt11 cDNA library は Clontech 社より購入した。その他の材料の入手先は以下の通りである。pBluescript KS(+) (Stratagene); pcDNAI (Invitrogen); ULTRASPEC RNA (BIOTEX); DEAE-Toyopearl 650M (東ソー); protein G Sepharose 4FF (Pharmacia); Immobilon transfer membrane (Millipore); コンドロイチナーゼ ABC、抗 Le^x モノクローナル抗体、抗ケラタン硫酸モノクローナル抗体 5-D-4(生化学工業); HNK-1 モノクローナル抗体 (Serotec); ダルベッコ変法イーグル培地、F-12 培地、B-27 supplement (Life Technologies Inc); G418、soybean trypsin inhibitor、poly-L-Lysine (MW>300,000)、抗 talin (Sigma); DNAaseI (Boehringer Mannheim); Raytide (Oncogene Science); 抗 RPTP β (Transduction Laboratories); 抗 cortactin (Upstate Biotechnology); [γ -³²P]ATP、[α -³²P]CTP、Hybond N メンブレン、ビオチン化抗マウス Ig、ビオチン化抗ウサギ Ig、Texas Red Avidin D、streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Amersham); FITC 標識抗マウス IgG(Jackson Immunoresearch); Texas-Red 標識抗ウサギ IgG (Oreganon Teknika Corporation);

6B4 プロテオグリカン cDNA の単離

18 日令 Sprague-Dawley ラットより poly(A)⁺RNA を調製し、ランダムプライマー法により λ gt11 cDNA library を作製した。これを、抗 6B4 プロテオグリカン抗体を用いてスクリーニングし、 10^6 のプラークより 2 個の positive clone を得た。これらをランダムプライマー法により [³²P]dCTP で標識し、プローブとして adult Sprague-Dawley rat brain cDNA library をスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは 60°C で一晩、0.1% SDS/ 100 μ g/ml salmon sperm DNA/ solution A (1 M NaCl/ 10 mM EDTA/ 10 X Denhardt's solution/ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) 中に行った。メンブレンを 3 X SSC, 0.1% SDS で 60°C/ 60 分、1 X SSC, 0.1 % SDS で 60°C/ 60 分、0.3 X SSC, 0.1 % SDS で 60°C/ 60 分の条件で洗った後、X 線フィルムに -80°C で 8 時間感光させた。約 5×10^5 のプラークをスクリーニングし、8 個の独立のクローンを得た。これらのクローンを pBluescript KS(+) にサブクローニングし、Pharmacia ALFRed DNA sequencer を用いて配列を決定した。

プロテオグリカン型チロシンホスファターゼの部分精製

生後 0 日(P0)あるいは 20 日目(P20)のラット全脳 8 g を 50 ml の 0.32 M sucrose/bufferA (5 mM EDTA/ 1 mM DTT/ 0.1 mM PMSF/ 10 μ M leupeptin /10 μ M pepstatin A/1 mM benzamidine/ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)でホモジナイズした後、1000 X g、 2°C で 5 分遠心し、上清を分取した。 沈殿を同様にホモジナイズし、遠心して得た上清と最初の上清とを合わせて 105,000 X g、 2°C で 60 分遠心し、膜画分を沈殿させた。 沈殿を 0.1 M NaCl/buffer A で再度ホモジナイズした後、ここに終濃度 1%になるように CHAPS を加え、氷中で攪拌しながら可溶化した。 不溶性の物質を 20,000 X g、2°C で 60 分遠心することによって除いた後、上清を 0.1 M NaCl/ buffer B (0.5% CHAPS/ 1 mM EDTA/ 1 mM DTT/ 0.1 mM PMSF/ 10 μ M leupeptin/ 10 μ M pepstatin A/ 1 mM benzamidine/ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)で平衡化した 10 ml の DEAE-Toyopearl カラムにかけ、80 ml の 0.25 M NaCl/ buffer B で洗浄した後、タンパク質を 0.6 M NaCl/ buffer B で溶出した。 CsCl により密度を 1.43 g/ml に合わせた後、Beckman TLA 100.4 ローターを用いて 77,000 rpm で 36 時間 4°C で遠心した。 サンプルは密度の違いにより、10 本のフラクションに分取した。

全脳ホモジネート および膜画分の調製

胎生 13、15、18 日令(E13、E15、E18)および生後 0、8、20、52 日令(P0、P8、P20、P52)ラットの全脳を 5 倍量の 0.32 M sucrose/ buffer A でホモジナイズし、ホモジネートを得た。ホモジネートを 1,000 X g、2 °C で 5 分遠心して、得られた上清を、105,000 X g、2 °C で 60 分遠心し、膜画分を得た。膜画分は buffer C (0.2 % Triton X-100/ 0.1% sodium deoxycholate/ 1 mM PMSF/ 10 μ M pepstatin A/ 10 μ M leupeptin/ 1mM EDTA/ 20 mM Tris-HCl, pH7.4/ 0.15 M NaCl)で可溶化した後、20,000 X g、2 °C で 60 分遠心し、この上清を免疫沈降実験に使用した。

免疫沈降法

タンパク質濃度を 50 μ g/ml にあわせたサンプル 400 μ l にまず、protein G Sepharose 4FF を 40 μ l 加え、4 °C で 2 時間回転しながらインキュベートした後、遠心によりビーズを沈降させ、本ビーズに非特異的に吸着する物質を除いた。上清に 5 μ g の抗 6B4 プロテオグリカン抗体を加え、4 °C で 3 時間回転しながらインキュベートした。そこへ 25 μ l の protein G Sepharose 4FF を加え、さらに 4 °C で 3 時間回転しながらインキュベートした。protein G Sepharose 4FF を buffer C で 2 回、PBS で 2 回洗った後、ビーズに結合しているタンパク質をコンドロイチナーゼ消化した。ビーズに SDS-PAGE サンプルバッファーを加えてタンパク質を溶出し、イムノブロッティングを行った。

コンドロイチナーゼ消化

タンパク質サンプルに、5 mM EDTA/ 1 mM PMSF/ 0.1 mM pepstatin A/ 30 mM sodium acetate/ 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 のバッファー条件で、終濃度 0.4U/ ml になるようにコンドロイチナーゼ ABC を加え、37°C で 1 時間反応させた。

イムノブロットイング

5% SDS-PAGE は Laemmli の方法 (28) に従った。タンパク質を Immobilon PVDF メンブレンにブロットイングした後、メンブレンを 5% スキムミルク/TBS で 30 分、室温でブロッキングした。次に 5% スキムミルク/TBS で希釈した一次抗体 (抗 6B4 プロテオグリカン抗体は 1:1000、抗血清 31-5 および抗 RPTP β は 1:100 に希釈) と室温で 1 時間反応させた後、ビオチン化 2 次抗体 (抗ウサギ Ig は 1:200、抗マウス Ig は 1:100 に希釈) と室温で 30 分反応させた。streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (1:1000 に希釈) と室温で 30 分反応させた後、メンブレンを 0.33 mg/ml nitroblue tetrazolium/ 0.165 mg/ml bromochloroindoyl phosphate/ 0.1 M NaCl/ 5 mM MgCl₂/ 0.1 mM Tris-HCl, pH 9.5 と反応させることによって、抗原を検出した。

ノーザン・ブロッティング

E13、E15、E18 および P0、P8、P20、P52 ラット脳より、ULTRASPEC RNA を用いて全 RNA を抽出した。各 20 μ g の RNA を 2M ホルムアルデヒド、1% アガロースゲルにて泳動し、Hybond N ナイロンメンブレンに一晩トランスファーした。クローニングによって得られた cDNA (-115-1291) をプローブとし、ランダムプライマー法により [32 P]dCTP で標識した。ハイブリダイゼーションは 42°C で一晩 50% ホルムアミド、6 X SSC、5 X Denhardt's solution、0.5 % SDS、100 μ g/ml salmon sperm DNA 中に行った。メンブレンを 1 X SSC、0.5% SDS で室温/20 分、1 X SSC、0.5% SDS で 42°C/20 分、0.2 X SSC、0.1% SDS で 68°C/60 分、0.1 X SSC、0.5% SDS で 68°C/60 分の条件で洗った後、X 線フィルムに -80°C で 48 時間感光させた。

PTP ζ を強制発現する細胞株のクローニング

ラット PTP ζ -A あるいは -B の全長をコードする cDNA を、cytomegalovirus のプロモーターをもった発現ベクター pcDNA1 にサブクローニングした。マウスの織

維芽細胞株である L 細胞を 5×10^5 cells/ 60 mm dish の密度で、10%牛胎仔血清を含むダルベッコ変法イーグル培地中で一晚培養した。翌日、リン酸カルシウム法によりトランスフェクションを行った。25 μ g の cDNA プラスミドと 2.5 μ g のネオマイシン耐性遺伝子をコードする pSTneoB を 1 ml の H₂O に溶解し、250 μ l の 1 M CaCl₂ を加えた。そこへ 1250 μ l の 2 X HBS (1.6% NaCl/ 0.074% KCl/ 0.054% Na₂HPO₄ · 12H₂O/ 0.2% glucose/ 1% HEPES, pH 7.05) を攪拌しながら滴下した。室温で 30 分インキュベートすることによって DNA/CaPO₄ 複合体を形成させた溶液を、細胞を 1 X HBS で洗った後に加え、室温で 15 分インキュベートした。更に、培地を 12.5 ml 加え 37°C で 8 時間インキュベートした後、培地を除き、2.5 ml の 1.5% glycerol/1 X HBS を加え室温で 90 秒インキュベートした。培地で細胞を洗った後、新しい培地を加え 37°C で培養を続けた。24 時間後に、400 μ g/ml の G418 を含む培地に変え、2-3 週間後に PTP ζ -A あるいは -B の発現を抗 6B4 プロテオグリカン抗体を用いて免疫組織化学的に染色することによって確かめた。

PTP ζ を強制発現する L 細胞の解析

PTP ζ を強制発現する L 細胞を 1×10^6 /100 mm dish の細胞密度で 12 時間培養した。細胞層を、氷冷した PBS で洗った後、1 ml の buffer D (1% CHAPS/ 0.1 mM PMSF/

10 μ M pepstatin A/ 10 μ M leupeptin/ 5 mM EDTA/ 0.15 M NaCl/ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) を加え、4°C で 30 分ゆっくり振盪しながら、タンパク質を抽出した。15,000 X g で 15 分遠心し、上清を 200 μ l の DEAE-Toyopearl カラムにかけた。カラムを 0.25 M NaCl/ buffer E (0.2% CHAPS/ 1 mM EDTA/ 1 mM PMSF/ 0.1 mM pepstatin A/ 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) で洗浄した後、タンパク質を 0.6 M NaCl/ buffer E で溶出した。これに 3 倍量の 1.3% KOAc/ 95 % エタノールを加えて、0°C で 30 分インキュベートした後、遠心によってタンパク質を沈殿させた。沈殿物を、前述の方法によりコンドロイチナーゼ消化した後、イムノブロッティング法により解析した。

PTP アッセイの基質の標識

PTP アッセイの基質には、ガストリンに類似した人工ペプチドである Raytide を [³²P]標識したものをを用いた。Raytide のチロシンリン酸化には、成体ラット脾臓膜画分より DEAE-Sepharose カラムおよび heparin-Sepharose カラムを用いて部分精製したチロシンキナーゼフラクション BI (5.4 U/ml; 1 U は、30°C で 1 分あたり 1 nmol のリン酸を取り込む活性と定義する。) を用いた (29)。1 μ g の Raytide を 10 μ l の 50 μ M ATP/ 10 mM MgCl₂/ 1 mM Na₃VO₄/ 1 mM 2-mercaptoethanol/ 0.03 % Triton X-100/ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に溶解し、BI フラク

シオン 3 μ l および $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を 10 μCi 加えて、30°C で 1.5 時間インキュベートした。80 μ l の H_2O 、10 μ l の 5 mg/ml アセチル化 BSA、100 μ l の 20% TCA/20 mM NaH_2PO_4 を加え、0°C で 5 分インキュベートし、沈殿を形成させた。遠心により沈殿を回収し、5% TCA 次いで 0.1% TCA で洗った後、100 μ l の 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 に溶解した。

PTP 活性の測定

CsCl 密度勾配遠心のフラクションの PTP 活性は、10 倍に希釈したそれぞれのフラクション 1 μ l に、50 μ l の 1 mM EDTA/1 mM DTT/20 mM Tris-HCl, pH7.5 と 1 μ l の標識した Raytide を加え、30°C で 10 分インキュベートした。サンプルに、750 μ l の 4% Norit A/0.9 M NaCl/90 mM sodium pyrophosphate/2 mM NaH_2PO_4 を加えて 1 分静置した後遠心し、上清の放射能を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。PTP ζ を強制発現する L 細胞については、細胞を 1×10^6 /100mm dish の細胞密度で 12 時間培養し、氷冷した PBS で洗った。buffer F(1% CHAPS/1 mM DTT/0.1 mM PMSF/10 μ M pepstatin A/10 μ M leupeptin/5 mM EDTA/0.15 M NaCl/50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 1 ml を加え、4°C で 30 分ゆっくり振盪しながら細胞を可溶化した。15,000 X g で 15 分遠心して得た上清に、5 μ g の抗 6B4 プロテオグリカン抗体またはウサギ IgG を加え、4°C で 2 時間インキ

ュベートした。 30 μ l の Protein G Sepharose 4FF を加え、さらに 4°C で 1 時間インキュベートした。 Protein G Sepharose 4FF を buffer F で 3 回洗った後、500 μ l の 1 mM EDTA/ 1 mM DTT/ 20 mM Tris-HCl, pH7.5 と 5 μ l の標識した Raytide を加え、30°C で 1 時間インキュベートした。 遊離した [32 P]リン酸の放射能は上述の方法で測定した。

大脳皮質神経細胞の初代培養

E17 のラットより大脳を取り出し、軟膜を取り除いた後、組織を 0.1% trypsin/ CMF-HBSS 中で、37°C で 15 分消化した。 CMF-HBSS で 3 回洗った後、組織を 0.025% DNAase I/ 0.4 mg/ ml soybean trypsin inhibitor/ 3 mg/ml BSA/ 12 mM MgCl₂ 中でパスツールピペットによりほぐし、細胞懸濁液を調製した。 これを 160 X g で 5 分、4°C で遠心し、さらに CMF-HBSS で一回洗った。 細胞をダルベッコ変法イーグル培地と F12 培地を 1:1 で混合し、2% B27 を加えた培地に懸濁し、0.1 mg/ml の poly-L-lysine で 3 時間コートしたカバーガラス上に播いた。 一晚培養後、免疫二重染色を行った。

免疫二重染色

PTP ζ を強制発現する L 細胞を PBS で洗ったのち、4% paraformaldehyde/ 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5 を用いて、4°C で 20 分固定した。固定した細胞を PBS で 3 回洗い、0.1% Triton X-100/ PBS 中で 15 分インキュベートした後、5% スキムミルク/ PBS で 30 分ブロッキングした。次に抗 6B4 プロテオグリカン抗体 (1:500 希釈) と、抗 cortactin (1:100 希釈) または FITC 標識ファロイジン (5 U/ml) を加えて 2 時間インキュベートした。続いて Texas Red 標識抗ウサギ IgG (1:200 希釈) と FITC 標識抗マウス IgG (1:100 希釈) を加えてさらに 2 時間インキュベートした。このとき、抗 6B4 プロテオグリカン抗体と FITC 標識ファロイジンを加えてインキュベートしたものは、Texas Red 標識抗ウサギ IgG のみを加えた。大脳皮質神経初代培養については一次抗体反応までは上記と同様に行った。次にビオチン化抗ウサギ Ig (1:200 希釈) および FITC 標識抗マウス IgG (1:100 希釈) を加えて 30 分インキュベートし、さらに Texas Red Avidin D (1:1000 希釈) を加えて 30 分インキュベートした。これらの反応はすべて室温で行った。細胞を封入後、Zeiss 蛍光顕微鏡で観察した。

実験結果

PTP ζ アイソフォームのクローニング

著者は精製 6B4 プロテオグリカンに対するポリクローナル抗体 (抗 6B4 プロテオグリカン抗体) を用いて、18 日令 Sprague-Dawley ラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、2 個のポジティブクローン λ rPG-9 および λ rPG-10 を得た。これらをプローブとして成体 Sprague-Dawley ラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、さらに 8 個の独立のクローンを得た (図 2)。これらのクローンの配列を決定したところ、以下(1)から(3)で述べる 3 種類の分子をコードする cDNA が存在することが明らかとなった。

(1) PTP ζ のラットホモログ (mRNA サイズ約 7.8 kb、2316 アミノ酸)

この分子の細胞外領域および細胞内領域はそれぞれヒト PTP ζ のそれと 76% および 96% の相同性を示し、PTP ζ のラットホモログであると考えられる。PTP ζ は Kruiger らによって最初に報告されたヒト受容体型 PTP (30) であり、細胞外領域には carbonic anhydrase 様ドメイン、フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン および Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に富んだ領域が存在する。一個の膜貫通領域を経て、細胞内領域は 2 個の隣接する PTP ドメインで構成されている。

(2) dvPTP ζ /dvRPTP β のラットホモログ (mRNA サイズ約 5.1 kb、1468 アミノ酸)

この分子は PTP ζ の Ser-Gly および Gly-Ser の配列に富んだ領域中の 853 アミノ酸が選択的スプライシングにより欠失したものであり、Levy らによって最初に報告された (31)。

(3) PTP ζ の細胞外領域に相当する分子 (mRNA サイズ約 5.3kb、1616 アミノ酸) この分子は N 末端のシグナルペプチド以外に疎水性アミノ酸がクラスターを形成している領域を持たないことから、分泌型であると考えられる。これは著者 (32) および Maurel ら (33) によって、独立に初めて報告された分子である。

この結果は、PTP ζ 遺伝子から RNA スプライシングの違いによって、3 つの分子種が生成していることを示している。6B4 プロテオグリカン は分泌型の分子であることから (3) の分子に相当するものと考えられる。以後 (1)、(2)、(3) で述べた分子をそれぞれ PTP ζ -A、PTP ζ -B および PTP ζ -S と呼ぶこととする。またこれらのアイソフォームを総称して PTP ζ と呼ぶこととする。これらの cDNA の塩基配列および cDNA がコードするアミノ酸配列を図 3 に示す。

発生段階における PTP ζ mRNA の発現

次に E13 から P52 までのラット脳における、PTP ζ アイソフォームの mRNA の発現をノーザンブロッティングにより解析した。全アイソフォームの mRNA を検出するため、carbonic anhydrase 様ドメインおよびフィブロネクチ

ンタイプ III 様ドメインを含む領域の cDNA (λ rPG-51) をプローブとし、ノーザンブロッティングを行ったところ、9.5 kb、8.4 kb および 6.4 kb の 3 種類のバンドが検出された (図 4)。PTP ζ -B で欠失している部分をコードする cDNA (λ rPG-10) でノーザンブロッティングを行うと、9.5 kb と 8.4 kb の 2 本のバンドが検出される (データ省略)。また、Maurel らは、細胞内領域をコードする部分の cDNA をプローブとしてノーザンブロッティングを行った結果、9.5 kb および 6.4 kb のシグナルが検出されたことを報告している (33)。したがって 9.5 kb、8.4 kb および 6.4 kb のバンドはそれぞれ PTP ζ -A、-S および -B に対応していると考えられる。3 種類のアイソフォームの mRNA の存在量は胎生期から P8 まで増加し、その後減少した。PTP ζ -S の mRNA の発現量が最も多く、次いで PTP ζ -A のものが多かった。PTP ζ -B の mRNA は 3 種類の中で最も少なく、発生段階を通じて PTP ζ -S の mRNA の 1/10 から 1/20 程度の発現量を示した。

ラット PTP ζ アイソフォームの部分精製とコアタンパク質の同定

PTP ζ -A および -B が PTP ζ -S と同様にプロテオグリカンとして存在する可能性を検討するために、ラット脳より両分子を精製することを試みた。ラット脳より調製した膜画分を CHAPS で可溶化し、これを DEAE-Toyopearl カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーおよび CsCl 密度勾配遠心によって

分画した。プロテオグリカン¹は CsCl 溶液中で大きな密度を持つため、CsCl 密度勾配遠心によって一般タンパク質と分離することができる。このとき分子中にグリコサミノグリカン鎖の占める割合が高い分子ほど高密度のフラクションに回収される。生後 0 日令(P0)および生後 20 日令 (P20) のラット脳から調製した密度が 1.35 g/ml 以上のプロテオグリカン画分に、多量の PTP 活性が検出された(図 5)。また発生段階の違いにより、沈降パターンに変化があることが観察された。P20 においてはプロテオグリカン画分の PTP 活性が P0 に比べ約 1/5 に減少しており、さらに PTP 活性のピークも P0 ではフラクション 4、P20 ではフラクション 6 となっており、発生が進むにつれ、より低密度のフラクションに移行している。

プロテオグリカン画分中の PTP 活性が PTP ζ -A あるいは-B に由来する可能性を検討するため、P0 ラットの PTP 活性のピークにあたるフラクション 4 から 6 を用いて抗 6B4 プロテオグリカン抗体により免疫沈降を行った(図 6B)。一般に、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン²をコンドロイチナーゼ消化せずに SDS-PAGE により分離すると、様々な長さおよび数のコンドロイチン硫酸鎖が結合しているため、高分子のスミアとして検出される。コンドロイチナーゼ消化をするとスミアが低分子量化し、コアタンパク質のバンドが現れる。コンドロイチナーゼで消化した、あるいは未消化の免疫沈降物を 5% SDS-PAGE により分離し、抗 6B4 プロテオグリカン抗体を用いてイムノブロッティングを行った。未消化の場合、コアタンパク質より高分子量のスミアがみられたが、コンドロイチナーゼで消化すると 220、300、380 kDa の 3 本のコアタンパク質バ

ンドが検出された。これらのバンドが PTP ζ アイソフォームのコアタンパク質に対応することを示すために、さらに2種類の抗体により解析した。抗血清 31-5 は PTP ζ -S の C 末端部分を認識し、PTP ζ -A とは反応するが、この部分が選択的スプライシングにより欠失している PTP ζ -B とは反応しない。抗 RPTP β は PTP ζ /RPTP β の D2 ドメインを認識するモノクローナル抗体である(図 6A)。抗血清 31-5 によって 380 および 300 kDa のバンドが検出されたが、220 kDa のバンドは検出されなかった。また 380 および 220 kDa のバンドが抗 RPTP β によって検出されたが、300 kDa のバンドは検出されなかった。したがって 380、300、220 kDa のバンドはそれぞれ PTP ζ -A、PTP ζ -S、PTP ζ -B のコアタンパク質に対応することが示された。

次に P0 ラット脳の CsCl 密度勾配遠心の全フラクションを3種類の抗体によって解析し、各アイソフォームの沈降パターンを解析した(図 7A-C)。3種類のアイソフォームのピークはそれぞれ異なっており、PTP ζ -S はフラクション 2、PTP ζ -A はフラクション 4、そして PTP ζ -B はフラクション 6 がピークとなっている。従って、PTP ζ -A および PTP ζ -B は PTP ζ -S と同様にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在し、これらの分子中のグリコサミノグリカン鎖の占める割合はそれぞれ異なっている (PTP ζ -S > PTP ζ -A > PTP ζ -B) と考えられる。さらに、P20 ラット脳の CsCl 密度勾配遠心の各フラクションを抗 RPTP β によって解析した(図 7D)。380 kDa の PTP ζ -A のバンドはごく少量しか検出されないが、P0 と同様にピークの位置はフラクション 4 であった。一

方、PTP ζ -B の 220 kDa のバンドは P0 の場合と同様にフラクション 6 をピークに多量に検出された。図 5 に示したように、PTP 活性のピークは P0 においてはフラクション 4 であるのに対し、P20 になるとフラクション 6 に移動しており、それと共に活性自体も低下している。このようなピークの位置の変化と活性の減少は、P20 における PTP ζ -A の存在量の減少によると考えられる。

PTP ζ アイソフォームの発現量およびコンドロイチン硫酸鎖による修飾の発生段階による違い

上述の結果は、脳の発達過程において PTP ζ の発現が、アイソフォーム特異的にダイナミックに制御されていることを示唆している。そこで、E13 から P52 までの発生段階を追って、PTP ζ アイソフォームの発現を解析した。まず PTP ζ -A と PTP ζ -S の発現量およびコンドロイチン硫酸鎖による修飾を調べるため、各発生段階のラット脳より調製したコンドロイチナーゼ消化および未消化の脳ホモジネートを 5% SDS-PAGE により分離し、抗血清 31-5 を用いたイムノブロッティングにより解析した（図 8A）。コンドロイチナーゼ消化したサンプルのみで、すべての発生段階において PTP ζ -S の 300 kDa のバンドが検出されたが、PTP ζ -A の 380 kDa のバンドは検出されなかった。これは脳において、PTP ζ -S の発現が PTP ζ -A と比較して約 10 倍程度多い（図 6B および 7B 参照）

ためと考えられる。また PTP ζ -S は常にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして発現しており、発現量は E13 から P8 にかけて徐々に増加し、その後ゆっくり減少することが明らかになった。

次に PTP ζ -A と PTP ζ -B の発現を調べた。各発生段階のラット脳より調製した膜画分を可溶化し、抗 6B4 プロテオグリカン抗体で免疫沈降することにより、PTP ζ アイソフォームを濃縮した。コンドロイチナーゼで消化した、あるいは未消化の免疫沈降物を 5% SDS-PAGE で分離し、抗 RPTP β でイムノブロットィングを行った (図 8B)。PTP ζ -A の発現量は E13 から P0 にかけてほとんど変化がないが、その後急激に減少し P20 以降ではほとんど検出できなくなる。また、これらの時期において、PTP ζ -A は常時コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在する。PTP ζ -A とは対照的に PTP ζ -B の発現レベルは E13 から P52 までを通じてほぼ一定に保たれている。しかも出生前の時期に非プロテオグリカン型の PTP ζ -B の存在が認められた。非プロテオグリカン型の PTP ζ -B は E13 から P0 にかけて徐々に減少していき、P0 以降においてはほぼすべての PTP ζ -B がコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして検出された。これらの結果より、脳の発生過程において、PTP ζ アイソフォームの発現量とコンドロイチン硫酸鎖による修飾はアイソフォーム特異的に制御されていると考えられる。

図 4 と図 8A とを比較するとわかるように、PTP ζ -S の mRNA の発現量の変化はタンパク質の発現量の変化とほぼ対応していた。また、PTP ζ -S の

mRNA の発現量は、3 種類のアイソフォーム中で最も多く、このアイソフォームが最も多量にタンパク質として発現していることと一致する。しかしながら、PTP ζ -A の mRNA の発現パターンと図 8B で示されているタンパク質の発現パターンは一致していなかった。PTP ζ -A のタンパク質の発現量は、E13 から P0 までほぼ一定で、その後は減少に転じて、P20 以降ではほとんど検出できないのに対し、mRNA 量は P8 で最大となり、その後も発現が認められる。また PTP ζ -B のタンパク質の発現量は PTP ζ -A よりも多いが、mRNA の発現量は PTP ζ -A に比べて少なかった。このことは PTP ζ -A と-B のタンパク質量の調節が翻訳以降の段階で行われている可能性を示唆している。

コンドロイチン硫酸以外の糖鎖による修飾の違い

PTP ζ -S にはコンドロイチン硫酸以外にも、ケラタン硫酸、Le^x、HNK-1 糖鎖が結合していることが明らかになっている (12, 14, 34)。そこで PTP ζ -A と-B について、これらの糖鎖による修飾を解析した。P0 ラット脳の CsCl 密度勾配遠心のフラクション 5 と 6 を抗 6B4 プロテオグリカン抗体により免疫沈降し、免疫沈降物を各糖鎖に対するモノクローナル抗体で分析した (図 9)。PTP ζ -A は Le^x、HNK-1 糖鎖、およびケラタン硫酸に対するモノクローナル抗体で認識されるが、PTP ζ -B はこれらのいずれによっても認識されなかった。同

様の結果が P8 脳についても得られた（データ省略）。これらの結果より、PTP ζ -A には PTP ζ -S と同様に Le^x、HNK-1 糖鎖、および ケラタン硫酸が付加しているが、PTP ζ -B には付加していないことが明らかになった。従って、これらの糖鎖は PTP ζ -B において欠失している 853 アミノ酸の部分に結合しているものと考えられる。

PTP ζ を構成的に発現するマウス繊維芽細胞（L 細胞）の解析

上述のデータは、PTP ζ -A と-B が、翻訳以降の段階で異なった調節を受けていることを示唆している。そこで内在性の PTP ζ を発現していないマウス L 細胞に cDNA 由来の PTP ζ -A または-B を構成的に発現させ、その細胞内局在を解析した。各トランスフォーマントに、cDNA 由来の分子が発現しているかどうかを確かめるため、細胞抽出液を DEAE-Toyopearl によって濃縮し、PTP ζ -A または-B を抗 6B4 プロテオグリカン抗体で検出することを試みた（図 10A）。脳における場合と同様、L 細胞に発現させたこれらの分子も、コアタンパク質の分子量がそれぞれ 380 または 220 kDa のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであった。PTP ζ -A 発現細胞においては、コンドロイチン硫酸によって修飾されていない大量の 125-150 kDa のタンパク質も検出された（図 10A、矢尻）。これは PTP ζ -B を発現させた細胞あるいはベクターのみをトランスフェクションした細胞においては検出されないため、タンパク質合成途上の、あるいはプロ

テアーゼにより分解された産物であると考えられる。 PTP ζ -A または PTP ζ -B を発現する細胞とベクターのみをトランスフェクションした細胞において、形態や増殖率に差は認められなかった。

次に、これらの細胞の CHAPS 抽出物を抗 6B4 プロテオグリカン抗体で免疫沈降し、PTP 活性を測定したところ、両者において有意な PTP 活性が検出された (図 10B)。 PTP ζ -B 発現細胞においては、再現性よく PTP ζ -A 発現細胞より 3 から 10 倍程度高い活性が検出された。このことから L 細胞内で、機能を持つタンパク質が合成されていることがわかる。

PTP ζ -A と PTP ζ -B の細胞内分布を調べるために、これらの発現細胞を抗 6B4 プロテオグリカン抗体で免疫組織化学的方法により染色した (図 11)。 PTP ζ -B 発現細胞においては強い染色が突起やラッフル膜上に観察された (図 11 A,C,E)。 アクチン結合タンパク質である cortactin は糸状仮足やラッフル膜上に豊富に存在することが知られている (35)。そこで、抗 6B4 プロテオグリカン抗体と抗 cortactin で免疫二重染色を行った。 PTP ζ -B と cortactin はラッフル膜や突起上で共存した (図 11 A,B)。 またフォーカルアドヒージョンとラッフル膜に局在することが知られている細胞膜裏打ちタンパク質である talin (36)とも同様な共存を示した (図 11 C,D)。 抗 6B4 プロテオグリカン抗体と FITC-phalloidin による二重染色により、F-アクチンと PTP ζ -B もラッフル膜や突起上で共存することが観察されたが、ストレスファイバー上では共存しなかった (図 11 E,F)。 PTP ζ -A 発現細胞においては PTP ζ -B 発現細胞に比べるとシ

グナルが弱いものの、同様にラッフル膜や突起が抗 6B4 プロテオグリカン抗体で染色された (図 11H)。また細胞質にも顆粒状の強い染色がみられた。おそらくこの染色はイムノブロッティングによって PTP ζ -A 発現細胞の抽出物中に検出された 125-150 kDa のバンドに対応するものと思われる。

初代大脳皮質神経培養細胞においても、抗 6B4 プロテオグリカンの抗原分子の発現が成長円錐や糸状仮足、細胞周縁部に観察され、さらにそれらの分布は cortactin の分布と一致した (図 12 A,B)。しかしながら、この場合 PTP ζ のどのアイソフォームが発現しているのかについては不明である。

考察

本研究において、6B4 プロテオグリカンを受容体型 PTP である PTP ζ の分泌型のアイソフォーム、PTP ζ -S であることが、cDNA クローニングおよび抗体を用いた解析により明らかとなった（図 2、3、6）。また膜結合型のアイソフォームである PTP ζ -A、および PTP ζ -A の細胞外領域の一部を選択的スプライシングによって欠失した PTP ζ -B も、PTP ζ -S 同様コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在していた（図 6、7）。これはプロテオグリカンが情報伝達受容体であることが明らかとなった最初の例である。PTP ζ は細胞外領域に carbonic anhydrase 様ドメイン、フィブロネクチンタイプ III 様ドメインおよび Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に富んだ領域を持つ。また細胞内領域には 2 個の隣接する PTP ドメイン D1 および D2 が存在する（図 2）。

PTP ζ において、多くの PTP に共通な活性中心のアミノ酸配列である [I/V]HCXAGXXR[S/T]G が、N 末端側の D1 ドメインでは VHCSAGVGRTG とすべて保存されているのに対し、C 末端側の D2 ドメインでは VHDEHGGVIAG となっており（下線は保存されていないアミノ酸を示す。）、システイン残基を含め 4 つのアミノ酸が保存されていない（図 3A、二重下線部）。このシステイン残基は、PTP 活性に必須の役割を果たしていることから、PTP 活性を持つのは D1 ドメインのみであると考えられる。D2 ドメインの機能は不明である

が、受容体型チロシンホスファターゼである LAR の D2 ドメインに結合するタンパク質がこれまでに二つ同定されており、この部位が細胞内の他のタンパク質との結合部位として働く可能性が示唆されている。一つは LIP.1 という細胞骨格タンパク質で coiled-coil 構造によって二量体化することにより間接的に LAR を二量体化していると考えられている (37)。LAR/LIP.1 複合体はフォーカルアドヒージョンに局在し、フォーカルアドヒージョンの形成、分解にかかわるシグナルを制御している可能性がある。もう一つは TRIO で Rac や Rho などの細胞骨格系を制御する低分子量 G タンパク質の活性を調節するグアニンヌクレオチド交換因子ドメインを有している (38)。したがって LAR は TRIO と結合することによって間接的に低分子量 G タンパク質と結合していると考えられる。

carbonic anhydrase は組織中で産生される CO_2 を水和して、 HCO_3^- とし、肺においてこれを脱水して再び CO_2 とする酵素である。PTP ζ の細胞外領域の carbonic anhydrase 様ドメインは、活性に必須な 3 つのヒスチジン残基のうちの 2 つが保存されていないので、おそらく酵素活性は持たないと考えられる。しかし、ラット carbonic anhydrase II-V のアミノ酸配列と比較してみると、これらのヒスチジン残基周囲のアミノ酸がよく保存されており、ここに存在するポケットがリガンド分子の結合部位として働く可能性がある。Peles らは発現クローニングによって carbonic anhydrase 様ドメインに結合する分子を探索し、contactin を同定した (39)。contactin は 6 個の免疫グロブリン様ドメインと 4 個のフィブロネクチンタイプ III 様ドメインを持つ GPI アンカー型の分子である。

carbonic anhydrase 様ドメインは培養の基質として用いると、神経細胞の接着と突起伸長を促進するが、contactin の抗体によってこれが阻害されるため、神経細胞に発現している contactin が carbonic anhydrase 様ドメインに結合することによって、この効果がもたらされるものと解釈されている。

フィブロネクチンタイプ III 様ドメインは最初、細胞外マトリックスタンパク質であるフィブロネクチンに存在する繰り返し配列として見出された (40) 。 フィブロネクチンはこのドメインを 15 個持つが、そのうちの一つである III₁₀ に $\alpha 5 \beta 1$ および $\alpha v \beta 3$ インテグリンによって認識される RGD 配列が存在し、細胞基質間接着に関与していることが知られている。 しかしながら他の多くのタンパク質に存在するフィブロネクチンタイプ III 様ドメインにはこの配列は見出されておらず、このドメインを介した細胞接着のメカニズムは不明であったが、最近、活性化された $\beta 1$ インテグリンとフィブロネクチンタイプ III 様ドメインの相互作用によって、RGD 配列が存在しない場合にも細胞接着が起こるという報告がなされた (41) 。 PTP ζ のフィブロネクチンタイプ III 様ドメインには RGD 配列は見出されなかったが、このようなメカニズムにより細胞接着に関与している可能性がある。 PTP κ および μ はホモフィリックな結合を介して、細胞間接着に関与しているが、この結合に関わっているのは MAM ドメインおよび免疫グロブリン様ドメインであると考えられている (42、43) 。

本研究において次に、PTP ζ アイソフォームの発現量およびコンドロイチン硫酸鎖やその他の糖鎖の修飾の発生段階における変化を解析した。 その

結果を図 13 に示す。

(1) PTP ζ -A は E13 から P0 にかけてほぼ一定量の発現を示したが、生後急激に減少し P20 以降はほとんど検出できなかった。一方 PTP ζ -B の発現量は E13 から P52 にかけてほぼ一定であった。PTP ζ -S は E13 から P8 にかけて増加しその後徐々に減少した (図 8)。

(2) PTP ζ アイソフォームの mRNA の発現量は、いずれも胎生期から周生期にかけて増加し、その後減少するというパターンを示し、タンパク質の発現パターンとは特に PTP ζ -A と-B について一致していない。このことは PTP ζ -A および-B のタンパク質量は翻訳以降の段階においても調節を受けていることを示唆する (図 4、8)。

(3) PTP ζ -A と-S は常にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在するのに対し、非プロテオグリカン型の PTP ζ -B が胎生期に検出された。非プロテオグリカン型の PTP ζ -B は発生が進むにつれ減少し、生後はほとんどすべての PTP ζ -B がコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして検出された。(図 8)。

(4) PTP ζ -A、-S はコンドロイチン硫酸鎖以外にも HNK-1 糖鎖、Le^x、およびケラタン硫酸によって修飾されていた。これに対し PTP ζ -B にはこれらのいずれの糖鎖も付加していなかった (図 9)。

Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に富んだ領域に、コンドロイチン硫酸が付加していると推定されている。コンドロイチン硫酸鎖は、コアタンパク質の Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列に、O-グリコシド結合により付加する。ま

た実際にコンドロイチン硫酸が付加しているこれらの配列の周囲には酸性アミノ酸が存在することが多い。 PTP ζ -A はこの領域に Ser-Gly あるいは Gly-Ser の配列を 26 個持つ。 PTP ζ -B は選択的スプライシングによりこの領域の大部分を欠失しているが、スプライシングされずに残った部分に、これらの配列が 10 個存在しており、発生段階に依存してコンドロイチン硫酸鎖による修飾を受けるものと考えられる。 また Sakurai らによって、C6 グリオーマ細胞で発現している PTP ζ -B はコンドロイチン硫酸鎖によって修飾されていないという報告がなされた (44)。 著者も Neuro2a 神経芽細胞腫株に強制発現させた PTP ζ -B、および B103 神経芽細胞腫株の内在性の PTP ζ -B がコンドロイチン硫酸鎖によって修飾されていないことを見いだしている (データ省略)。 従って、PTP ζ -B のコンドロイチン硫酸鎖の付加は、発生過程においても細胞の種類に依存していると推測される。 また PTP ζ -A および-S のみに存在する 16 個の配列は、定常的なコンドロイチン硫酸鎖の付加に関わっているものと推定される。

現在までに PTP ζ の細胞外領域に結合する分子がいくつか明らかになっているが、これらはコンドロイチン硫酸鎖に依存的に結合するものと、非依存的に結合するものに分類される (図 14)。 前田らは PTP ζ -S は高い親和性でヘパリン結合性の成長因子である HB-GAM/pleiotrophin と結合することを見出した (45)。 PTP ζ -S をコンドロイチナーゼ消化すると pleiotrophin との親和性が低下し、結合量も 40%減少することから、コンドロイチン硫酸鎖は pleiotrophin の結合部位を部分的に形成しているものと考えられる。 また大脳皮質神経細胞

を、pleiotrophin をコートしたカバーガラス上で培養すると神経突起の伸長が促進されるが、この効果が抗 6B4 プロテオグリカン抗体によって阻害されることから、pleiotrophin と神経細胞上の PTP ζ との結合が神経突起伸長のシグナルを受容、伝達していると考えられる。

また Milev らは TAG-1/axonin-1 と PTP ζ -S の結合がコンドロイチナーゼ消化により 70 %低下することを報告している (46) 。 PTP ζ -B がこれらの分子と結合することはまだ証明されていないが、PTP ζ -B は脳の発生過程においてこれらの分子あるいは未知のリガンドとの親和性をコンドロイチン硫酸量の変化によって制御している可能性が考えられる。 Milev らは、PTP ζ -S が、TAG-1/axonin-1 同様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 Ng-CAM/L1 および N-CAM と結合することを報告している (47) 。 TAG-1/axonin-1 の場合と異なり、コンドロイチナーゼ消化によって Ng-CAM/L1 および N-CAM と PTP ζ -S の結合の親和性は 15%ほどしか減少せず、またフリーのコンドロイチン硫酸鎖によって結合が完全には阻害されなかった。 従って、これらの分子との結合は主にコアタンパク質を介して行われていると考えられる。 また細胞外マトリックスに存在し、細胞接着を阻害する分子として知られている tenascin と PTP ζ -S が結合することが知られているが (45、48、49) 、この場合もコンドロイチナーゼ消化による結合の親和性の変化は認められなかった。 従って、PTP ζ はコンドロイチン硫酸鎖を認識するリガンドとコアタンパク質のみを認識するリガンドの両方を使い分けることによって、細胞外からの複雑な

情報伝達の制御を行っているものと予想される。

新谷らによってクローニングされたラット RPTP γ (50) は PTP ζ と同様細胞外に carbonic anhydrase 様ドメインとフィブロネクチンタイプ III 様ドメインを持ち、PTP ζ とともに受容体型 PTP のサブファミリーを形成している。しかしながら、COS7 細胞で発現させた RPTP γ は、PTP ζ と異なりコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在しなかった。 PTP ζ と RPTP γ は相同性が高いため、両者に共通なリガンドが存在する可能性があるが、コンドロイチン硫酸鎖依存的なリガンドの結合の親和性は両者において異なっていると考えられる。

HNK-1 糖鎖、ケラタン硫酸および Le^x は、常にほぼ一定の発現量を示す PTP ζ -B ではなく、胎生期に主に発現する PTP ζ -A に発現していることから、これらの糖鎖が発生段階において機能をもつことが予想される。 HNK-1 モノクローナル抗体はヒトのナチュラルキラー細胞を認識する抗体として単離されたが、神経系においても様々な分子に HNK-1 エピトープの存在が確認されている。前述の N-CAM、Ng-CAM/L1、Nr-CAM、TAG-1 および contactin などの免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子にも HNK-1 糖鎖が存在しており、これらの分子の細胞接着活性や神経突起伸展活性の発現に何らかの役割を果たしていると考えられている (51)。 また、同じく免疫グロブリンスーパーファミリーに属するミエリン関連タンパク質である MAG や P0 にも HNK-1 糖鎖が見出されており、ミエリンの形成に関与しているものと考えられている (51)。

ケラタン硫酸は神経細胞の接着や神経突起の伸長を阻害することが知

られている (52、53)。濱中らはニワトリの中脳と後脳の境界部がケラタン硫酸に対する抗体で染色されること、およびこのケラタン硫酸鎖が PTP ζ -A に付加していることを示し、これらの領域の脳の区画化にケラタン硫酸が関与している可能性を示した (54)。また Allendoerfer らは Le^x が PTP ζ -S に結合していることを最初に報告し、Le^x が前脳における脳の区画化に関与しているものと考えている (34)。

本研究においてはさらに、PTP ζ の機能に関する知見を得るため PTP ζ の細胞内局在の解析を行った。L 細胞に構成的に発現させた PTP ζ -A および-B は細胞周縁部のラッフル膜や突起に存在し、F-アクチン、cortactin、talin と分布が一致することが明らかとなった。また大脳皮質神経初代培養細胞においても抗 6B4 プロテオグリカンエピトープが成長円錐や糸状仮足および細胞周縁部に存在し、これらの構造において cortactin と分布が一致していた (図 11、12、14)。これまでに、さまざまな PTP に特徴的な細胞内局在性が報告されており、個々の PTP の機能を反映しているものと考えられている。LAR はフォーカルアドヒージョンに局在しており、細胞と細胞外マトリックスとの接着の制御に関わっているものと予想されている (37)。また細胞間接着に関与している RPTP κ と RPTP μ は細胞と細胞が接触する領域に発現している (55、56)。RPTP κ は、カドヘリン/カテニン複合体と直接結合していることが知られている (56)。また RPTP μ はカドヘリン/カテニン複合体と直接結合しているという報告 (55) と、結合はないという報告 (57) がある。アクチン結合タンパク

質である cortactin は、v-src によってトランスフォームされた細胞内で高度にチロシンリン酸化をうけており、細胞外からのシグナルを細胞骨格に伝える機能を持つと考えられている (35、58)。cortactin は、SH3 ドメインを C 末端に有する (59)。SH3 は PXXP モチーフをもったプロリンに富む配列を含むタンパク質を認識し結合するドメインである。PTP ζ は 1686 から 1693 番目のアミノ酸残基にこのモチーフを持ち (PPTPIFPI)、これを介して cortactin と結合する可能性があるが、免疫沈降法によっては PTP ζ と cortactin を共沈させることはできなかった。talin はフォーカルアドヒージョンおよびラッフル膜に存在するタンパク質であり (36)、アクチン繊維 (60)、ビンキュリン (61)、およびインテグリン (62) と結合している。またニワトリの脳の発生時に、talin が他の細胞骨格系のタンパク質とともに成長円錐に存在することが報告されている (63)。繊維芽細胞のラッフル膜および突起においては、細胞が基質に接着し移動する際に、また神経細胞の細胞周縁部や成長円錐、糸状仮足においては神経細胞が移動および軸索を伸長する際に、細胞骨格の動的な再構成が起こっている。PTP ζ はリガンド分子の情報を、タンパク質の脱リン酸化を介してこれらのアクチン結合タンパク質に伝達し、細胞骨格の形成、分解を制御することによって、神経系の発生における細胞移動や軸索伸長などを調節している可能性が考えられる (図 14)。

受容体型 PTP の中で神経系の発生における機能が解明された分子の例として、ショウジョウバエの受容体型 PTP である DLAR が挙げられる。DLAR

はショウジョウバエにおける LAR のホモログである。この分子を欠損したショウジョウバエにおいては、SNb 運動神経が通常ではあり得ない筋とのシナプスを形成するか、またはどの筋ともシナプスを形成しないという表現形が見られた (64)。PTP ζ は、橋核や前庭核から小脳への入力線維である苔状線維が、ゴルジ細胞、プルキンエ細胞および小脳深部核の神経細胞とシナプスを形成する時期に、苔状線維およびこれらの細胞に発現が見られることから、軸索と標的細胞の特異的な結合の形成に関わっていると考えられる。しかし DLAR は標的である筋には発現が見られない点が PTP ζ と異なっており、両者で違ったメカニズムが働いている可能性もある。

今後の課題として、two-hybrid 法や Far-western 法あるいはアフィニティークロマトグラフィーなどの方法で PTP ζ の基質分子を探索することが重要であると考えられる。また脳形成における PTP ζ の *in vivo* での役割を知る上で、PTP ζ の活性を遺伝子ノックアウトにより無くした場合、あるいは dominant-negative 型分子の強制発現などの方法で攪乱、あるいは PTP ζ の活性を本分子の過剰発現により上昇させた場合、中枢神経系の細胞にどのような現象が起こるかについても興味を持たれる。

参考文献

- 1 Rauch, U. (1997) Modeling an extracellular environment for axonal pathfinding and fasciculation in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* **290**, 349-356
- 2 鈴木旺、菅原一幸、山田修平、糖鎖工学 (1992) 253-315、糖鎖工学編集委員会編、産業調査会
- 3 Sandell, L. J. and Hering, T. M. (1993) Small leucine-rich proteoglycans: prelude to a function. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **5**, 13-22
- 4 Margolis, R. U. and Margolis, R. K. (1994) Aggrecan-Versican-Neurocan Family of Proteoglycans. *Methods Enzymol.* **245**, 105-126
- 5 Yamaguchi, Y. (1996) Brevican: a major proteoglycan in adult brain. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **3**, 307-317
- 6 Carey, D. J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327**, 1-16
- 7 Lander, A. D., Stipp, C. S. and Ivins, J. K. (1996) The glypican family of heparan sulfate proteoglycans: major cell-surface proteoglycans of the developing nervous system. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **3**, 347-358
- 8 Kimata, K., Okayama, M., Oohira, A. and Suzuki, S. (1974) Heterogeneity of proteochondroitin sulfates produced by chondrocytes at different stages of cytodifferentiation. *J. Biol. Chem.* **249**, 1646-1653
- 9 Steinfeld, R., Van Den Berghe, H. and David, G. (1996) Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J. Cell. Biol.* **133**, 405-416
- 10 Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1993) Nervous tissue proteoglycans. *Experientia* **49**, 429-446
- 11 Oohira, A., Katoh-Semba, R., Watanabe, E. and Matsui, F. (1994) Brain development and multiple molecular species of proteoglycan. *Neurosci. Res.* **20**, 195-207
- 12 Maeda, N., Matsui, F. and Oohira, A. (1992) A chondroitin sulfate proteoglycan that is developmentally regulated in the cerebellar mossy

- fiber system. *Dev. Biol.* **151**, 564-574
- 13 Jacobson, M. (1978) *Developmental Neurobiology*, 57-75, Plenum Press, New York and London
 - 14 Maeda, N., Hamanaka, H., Oohira, A. and Noda, M. (1995) Purification, characterization and developmental expression of a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, 6B4 proteoglycan/phosphacan. *Neuroscience* **67**, 23-35
 - 15 Hunter, T. (1989) Protein-tyrosine phosphatases: the other side of the coin. *Cell* **58**, 1013-1016
 - 16 Tonks, N. K., Yang, Q. and Guida, P. J. (1991) Structure, regulation, and function of protein tyrosine phosphatases. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **56**, 265-273
 - 17 Charbonneau, H. and Tonks, N. K. (1992) Protein phosphatases? *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**, 463-493
 - 18 Brady-Kalnay, S. M. and Tonks, N. K. (1995) Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 650-657
 - 19 Neel, B. G. and Tonks, N. K. (1997) Protein tyrosine phosphatase in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 193-204
 - 20 Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**, 383-391
 - 21 Rodrigues, G. A. and Park, M. (1994) Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 15-24
 - 22 Tonks, N. K., Diltz, C. D. and Fischer, E. H. (1988) Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 6722-6730
 - 23 Tonks, N. K., Diltz, C. D. and Fischer, E. H. (1988) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 6731-6737
 - 24 Charbonneau, H., Tonks, N. K., Walsh, K. A. and Fischer, E. H. (1988) The leukocyte common antigen (CD45): A putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7182-7186

- 25 Cooper, J. A. and Kings, C. S. (1986) Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60^{c-src}. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4467-4477
- 26 Cheng, S. H., Piwnica-Worms, H., Harvey, R. W., Roberts, T. M. and Smith, A. E. (1988) The carboxy terminus of pp60^{c-src} is a regulatory domain and is involved in complex formation with middle-T antigen of polyomavirus. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4467-4477
- 27 Davidson, D., Fournel, M. and Veillette, A. (1994) Oncogenic activation of p59^{lyn} tyrosine protein kinase by mutation of its carboxyl-terminal site of tyrosine phosphorylation, tyrosine 528. *J. Biol. Chem.* **269**, 10956-10963
- 28 Canoll, P. D., Petanceska, S., Schlessinger, J. and Musacchio, J. M. (1996) Three forms of RPTP- β are differentially expressed during gliogenesis in the developing rat brain and during glial cell differentiation in culture. *J. Neurosci. Res.* **44**, 199-215
- 28 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- 29 Guan, K., Broyles, S. S. and Dixon, J. E. (1991) A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**, 359-362
- 30 Krueger, N. X. and Saito, H. (1992) A human transmembrane protein-tyrosine phosphatase, PTP ζ , is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7417-7421
- 31 Levy, J. B., Canoll, P. D., Silvennoinen, O., Barnea, G., Morse, B., Honegger, A. M., Huang, J.-T., Cannizzaro, L. A., Park, S.-H., Druck, T., Huebner, K., Sap, J., Ehrlich, M., Musacchio, J. M., Schlessinger, J. (1993) The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* **268**, 10573-10581
- 32 Maeda, N., Hamanaka, H., Shintani, T., Nishiwaki, T. and Noda, M. (1994) Multiple receptor-like protein tyrosine phosphatases in the form of chondroitin sulfate proteoglycan. *FEBS Lett.* **354**, 67-70
- 33 Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1994) Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that

- interacts neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**,2512-2516
- 4 Allendoerfer, K. L., Maynani, J. L. and Patterson, P. H. (1995) FORSE-1, an antibody that labels regionally restricted subpopulation of progenitor cells in the embryonic central nervous system, recognizes the Le(X) carbohydrate on a proteoglycan and two glycolipid antigens. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**,381-395
 - 35 Wu, H. and Parsons, J. T. (1993) Cortactin, an 80/85-Kilodalton pp60^{src} substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J. Cell. Biol.* **120**, 1417-1426
 - 36 Burridge, K. and Connell, L. (1983) A New Protein of Adhesion plaques and ruffling membranes. *J. Cell. Biol.* **97**, 359-367
 - 37 Serra-Pagès, C., Kedersha, N. L., Fazikas, L., Medley, Q., Debant, A. and Streuli, M. (1995) The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *EMBO J.* **14**,2827-2838
 - 38 Debant, A., Serra-Pagès, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S. H. and Streuli, M. (1996) The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**,5466-5471
 - 39 Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D., Grumet, M. and Schlessinger, J. (1995) The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase β is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* **82**,251-260
 - 40 Potts, J. R. and Campbell, L. D. (1994) Fibronectin structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 648-655
 - 41 Chi-Rosso, G., Gotwals, P.J., Yang, J., Ling, L., Jiang, K., Chao, B., Baker, D.P., Burkly, L.C., Fawell, S.E. and Kotliansky, V.E. (1997) Fibronectin type III repeats mediate RGD-independent adhesion and signaling through activated β 1 integrins. *J.Biol.Chem.* **272**,31447-31452

- 42 Brady-Kalnay, S. and Tonks, N. K. (1994) Identification of the homophilic binding site of the receptor protein tyrosine phosphatase PTP μ . *J. Biol. Chem.* **269**, 28472-28477
- 43 Zondag, G. C. M., Koningstein, G. M., Jiang, Y. P., Sap, J., Moolenaar, W. H. and Geubbink, M. F. B. G. (1995) Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases μ and κ . *J. Biol. Chem.* **270**, 14247-14250
- 44 Sakurai, T., Friedlander, D. R. and Grumet, M. (1996) Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase b: The secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. *J. Neurosci. Res.* **43**, 694-706
- 45 Maeda, N., Nishiwaki, T., Shintani, T., Hamanaka, H. and Noda, M. (1996) 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase ζ /RPTP β , binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J. Biol. Chem.* **271**, 21446-21452
- 46 Milev, P., Maurel, P., Häring, M., Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1996) TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase- $\zeta\beta$, and N-CAM. *J. Biol. Chem.* **271**, 15716-15723
- 47 Milev, P., Friedlander, D. R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R. K., Grumet, M. and Margolis, R. U. (1994) Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J. Cell. Biol.* **127**, 1703-1715
- 48 Grumet, M., Milev, P., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Bourdon, M., Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1994) Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J. Biol. Chem.* **269**, 12142-12146
- 49 Barnea, G., Grumet, M., Milev, P., Silvennoinen, O., Levy, J. B., Sap, J. and Schlessinger, J. (1994) Receptor tyrosine phosphatase β is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular



- matrix protein tenascin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14349-14352
- 50 Shintani, T., Maeda, N., Nishiwaki, T. and Noda, M. (1997) Characterization of rat receptor-like protein tyrosine phosphatase ζ isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 419-425
 - 51 Schachner, M. and Martini, R. (1995) Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* **18**, 183-191
 - 52 Snow, D. M., Steindler, D. A. and Silver, J. (1990) Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: A possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier. *Dev. Biol.* **138**, 359-376
 - 53 Cole, G. J. and McCabe, C. F. (1991) Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth. *Neuron* **7**, 1007-1018
 - 54 Hamanaka, H., Maeda, N. and Noda, M. (1997) Spatially and temporally regulated modification of the receptor-like protein tyrosine phosphatase ζ/β isoforms with keratan sulfate in the developing chick brain. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2297-2308
 - 55 Brady-Kalnay, S. M., Rimm, D. L. and Tonks, N. K. (1995) Receptor protein tyrosine phosphatase RPTP μ associates with cadherins and catenins in vivo. *J. Cell. Biol.* **130**, 977-986
 - 56 Fuchs, M., Müller, T., Lerch, M. M. and Ullrich, A. (1996) Association of human protein-tyrosine phosphatase κ with members of the armadillo family. *J. Biol. Chem.* **271**, 16712-16719
 - 57 Zondag, G. C. M., Moolenaar, W. H. and Gebbink, M. F. B. G. (1996) Lack of association between receptor protein tyrosine phosphatase RPTP μ and cadherins. *J. Cell. Biol.* **134**, 1513-1517
 - 58 Wu, H., Reynolds, A. B., Kanner, S. B., Vines, R. R. and Parsons, J. T. (1991) Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60^{src} substrate. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5113-5124
 - 59 Alexandropoulos, K., Cheng, G. and Baltimore, D. (1995) Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3110-3114

- 60 Muguruma, M., Matsumura, S. and Fukazawa, T. (1990) Direct interaction between talin and actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1217-1223
- 61 Burridge, K. and Mangeat, P. (1984) An interaction between vinculin and talin. *Nature* **308**, 744-746
- 62 Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M. C. and Burridge, K. (1986) Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. *Nature* **320**, 531-533
- 63 Cypher, C. and Letourneau, P. C. (1991) Identification of cytoskeletal, focal adhesion, and cell adhesion proteins in growth cone particles isolated from developing chick brain. *J. Neurosci. Res.* **30**, 259-265
- 64 Krueger, N. X., Van Vactor, D., Wan, H. I., Gelbart, W. M., Goodman, C. S. and Saito, H. (1996) The transmembrane tyrosine phosphatase DLAR controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* **84**, 611-622

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始暖かい御指導を賜りました野田昌晴教授に心より感謝いたします。また適切な御助言をいただきました前田信明助教授に深謝いたします。そして有益な御指摘をいただきました山形方人助手、渡辺英治助手、技術的な御助力をいただきました溝口正枝博士、ならびに感覚情報処理研究部門の皆様に厚く御礼申し上げます。

図 1. 受容体型 PTP の模式図

■、PTP ドメイン；▨、フィブロネクチンタイプ III ドメイン；、免疫グロブリン様ドメイン；、carbonic anhydrase 様ドメイン；●、MAM ドメイン

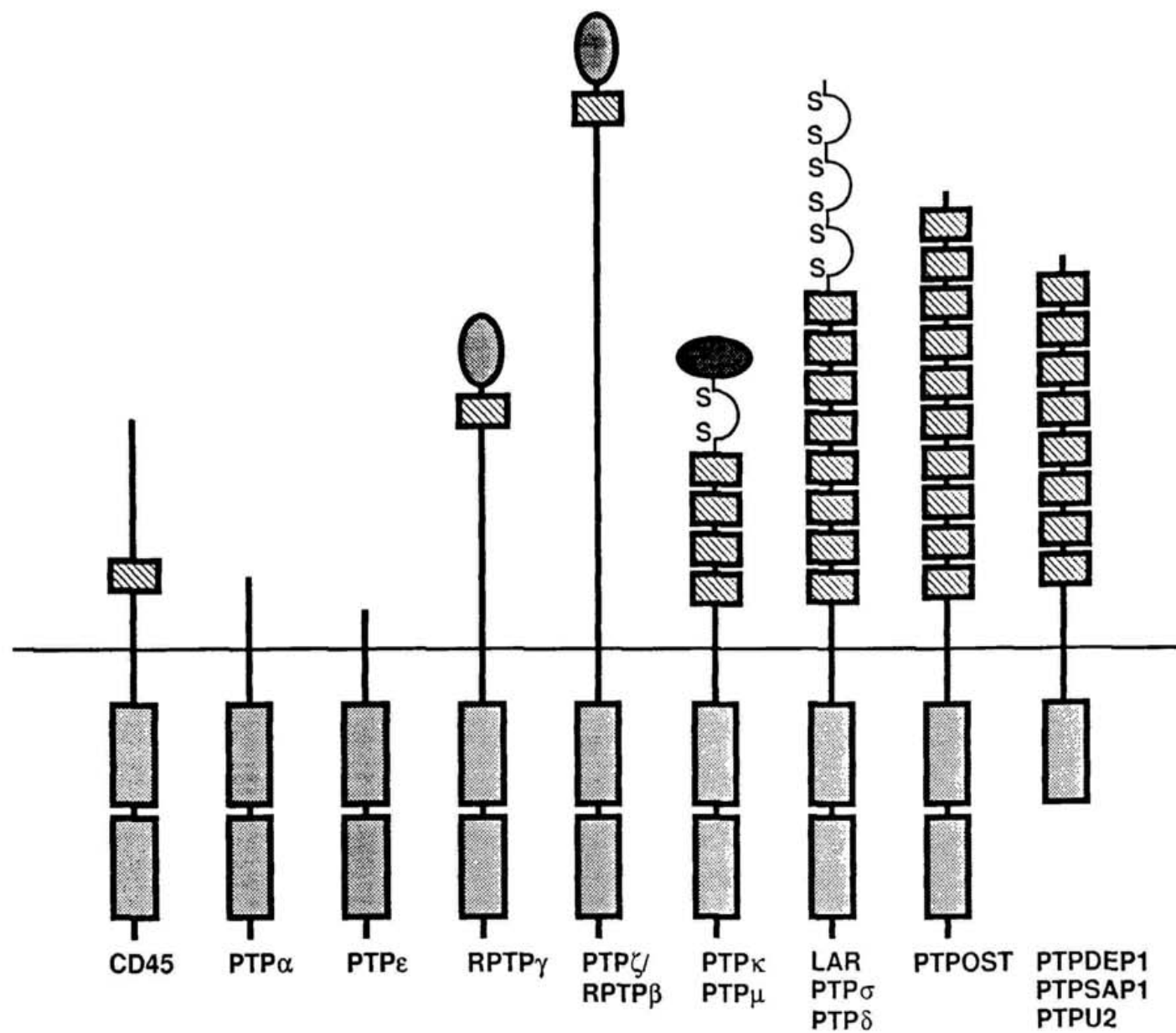


図 2. 3 種の $PTP\zeta$ アイソフォームをコードする cDNA の模式図

CAH、carbonic anhydrase 様ドメイン；FNIII、フィブロネクチンタイプ III ドメイン；SG、セリン、グリシンに富む領域；TM、膜貫通領域；D1、D2、PTP ドメイン

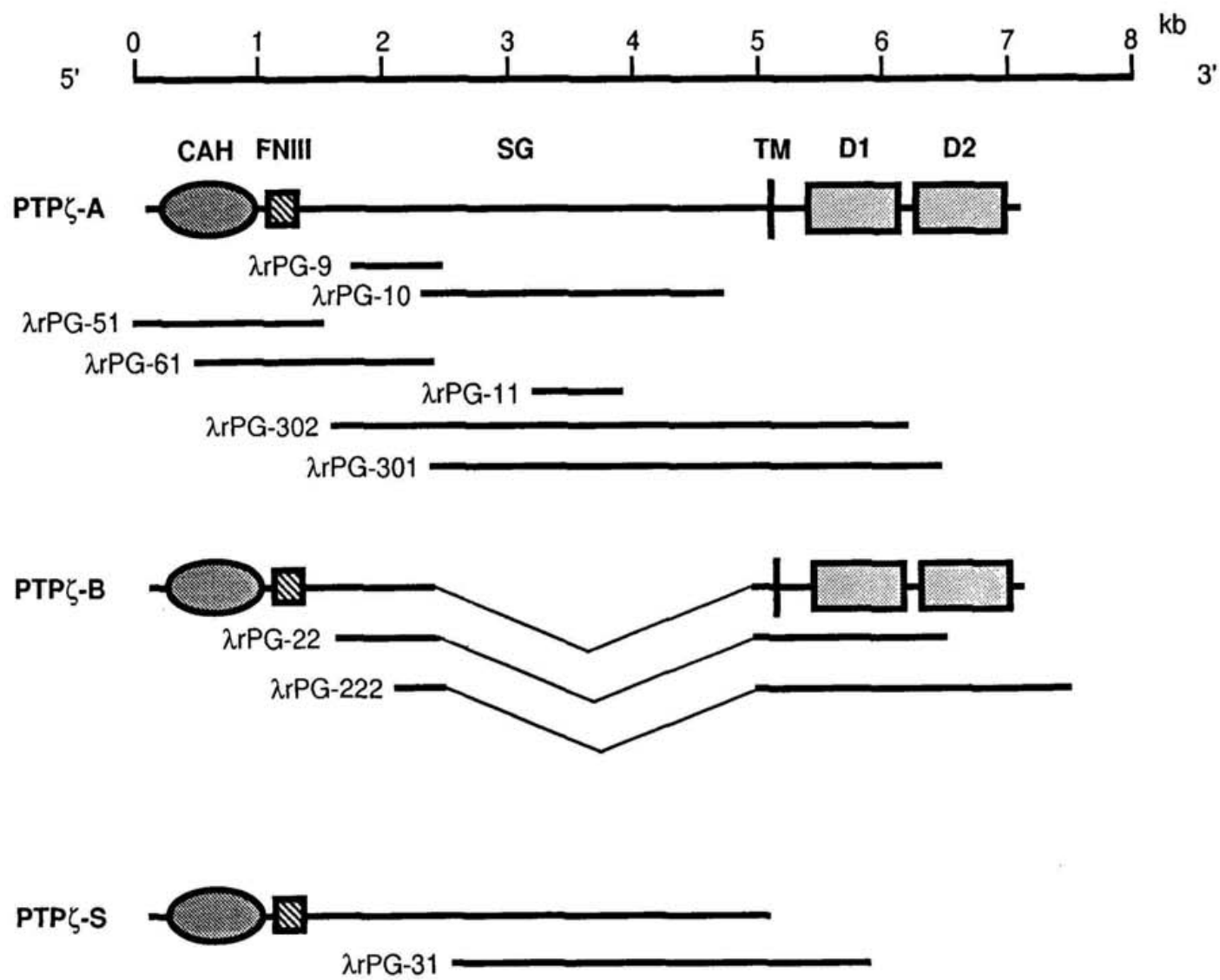


図 3. *PTP ζ* cDNA の塩基配列

A. *PTP ζ* -A および-B の塩基配列より推定されるアミノ酸配列を塩基配列の下に示した。図左側の数字は最初のメチオニンコドンの開始を 1 とした塩基配列の番号、図右側の数字はアミノ酸配列の番号を表す。点線はシグナルペプチドを、実線は *PTP ζ* -B において選択的スプライシングにより欠失している領域を、四角形で囲んだ領域は膜貫通領域を示している。また、二重下線は D1 ドメインにおける活性中心付近の 11 アミノ酸から成る配列、および対応する D2 ドメインの配列を示している。

B. *PTP ζ* -S の C 末端付近の塩基配列およびアミノ酸配列を示した。下線を施したアミノ酸は *PTP ζ* -S と *PTP ζ* -A で異なっている。

A

-115 cacacgtccacctagaccctggccagtcaccggcggtcccctgtctcggtgttccc
 -60 actctctgcaccctaagctgtacccctgcggctggcgaggggcccgggaccgggctggag
 1 atgcgaatcctgcagagcttcctcgctgcgttcagctactgtgcgtgtgtcgccctggac
 M...R...I...L...Q...S...F...L...A...G...V...Q...L...H...G...V...Q...R...L...D... 20
 61 tgggcttatggatactacagacaacagagaaaacttgttgaagagattggctggctcctat
 W...A...Y...G...Y...Y...R...Q...Q...R...K...L...V...E...E...I...G...W...S...Y 40
 121 acaggagcactaaatcaaaaaaattggggaagaaatccaatatgtaatagcccaaaag
 T G A L N Q K N W G K K Y P I C N S P K 60
 181 cagtctcctattaatattgatgaagatcttacacaagtaaatgtgaatcttaagaaactg
 Q S P I N I D E D L T Q V N V N L K K L 80
 241 aaatttcagggttgggaaaaaccatccttggaaaaacacgtttattcacacactgggaaa
 K F Q G W E K P S L E N T F I H N T G K 100
 301 acagtggaaataaatctaccaatgactactatctcagtggaggactttcagaaaaagtc
 T V E I N L T N D Y Y L S G G L S E K V 120
 361 ttcaaggcaagcaaatgacttttactggggaaatgcaatgtgtcatcggaaggatcg
 F K A S K M T F H W G K C N V S S E G S 140
 421 gaacacagcttagaagggcagaagtttccactcgagatgcaaatctactgcttcgagcg
 E H S L E G Q K F P L E M Q I Y C F D A 160
 481 gaccgattttcaagttttgaggaaacagttaaaggaaaaggaagggttaagggtcttatcc
 D R F S S F E E T V K G K G R L R A L S 180
 541 attttatttgagattggagttgaagaaaatttggattacaaagccattattgatgggact
 I L F E I G V E E N L D Y K A I I D G T 200
 601 gaaagtgttagtgcgttttggaaagcaggctgccttagatccgttcactctgcagaacctc
 E S V S R F G K Q A A L D P F I L Q N L 220
 661 ctgccaaactccactgacaagtactacattacaacggatcactgacatcccctccctgc
 L P N S T D K Y Y I Y N G S L T S P P Y 240
 721 acagacaccgtcgaatggattgtttttaaggatacagtttagcatctctgaaagccagctg
 T D T V E W I V F K D T V S I S E S Q L 260
 781 gctgtattttgtgaagttctcacaatgcaacagtcgggtatgtcatgttgatggattac
 A V F C E V L T M Q Q S G Y V M L M D Y 280
 841 ttacaaaacaatttccgagaacaacagtagacaagttttccaggcagggtgttttctctgac
 L Q N N F R E Q Q Y K F S R Q V F S S Y 300
 901 actgggaaggaagagattcatgaagcagtggtgcagttcagaaccagaaaatgtgcaagct
 T G K E E I H E A V C S S E P E N V Q A 320
 961 gaccctgagaattacaccagccttctgatacagtggaagggcctcggtgtttatgac
 D P E N Y T S L L I T W E R P R V V Y D 340
 1021 acaatgattgagaagtttgcggttctgtaccagccactggagggaacgaccaaaccaag
 T M I E K F A V L Y Q P L E G N D Q T K 360
 1081 catgagtttttaacagatggctatcaggacttgggtgccattctcaataacttaatacct
 H E F L T D G Y Q D L G A I L N N L I P 380
 1141 aacatgagttatgtgctccaaatagtggccatagctctaatggcctttatggaaagtac
 N M S Y V L Q I V A I C S N G L Y G K Y 400
 1201 agtgaccaattgatagtcgacatgcctactgaggatgctgaacttgacctcttctcctgaa
 S D Q L I V D M P T E D A E L D L F P E 420
 1261 ttaatttggaaactgaagaaataatcaaggaggaataactatggaaaaggcaatgaagaagac
 L I G T E E I I K E E N Y G K G N E E D 440
 1321 actggcttgaatcccggtagagacagtgccacaaaccaaataaggaaaaaggaaaccccag
 T G L N P G R D S A T N Q I R K K E P Q 460
 1381 gtttctaccacaactcactataatcacatggggactaaatataatgaagccaagactaac
 V S T T T H Y N H M G T K Y N E A K T N 480
 1441 cgatctccaacgagaggatctgaattctctggaagagtgatgttctcaacacatccctg
 R S P T R G S E F S G K S D V L N T S L 500
 1501 aatcctacttcccacagggttgcgtgaattcaatccagaaagagaaatgtccttgccttct
 N P T S Q Q V A E F N P E R E M S L P S 520
 1561 cagatttggaaactaacctgccaccacacagtggtggaaggcacctcagcctccttaacagt
 Q I G T N L P P H S V E G T S A S L N S 540
 1621 ggctctaaaactctccttgccttcccacagatgaacttgcctgggactgcagaatcctta
 G S K T L L V F P Q M N L S G T A E S L 560
 1681 aatatgggtttccataacagagtagcaaaagggtgtctgctgacctcagtgaggaagaaaac
 N M V S I T E Y K E V S A D L S E E E N 580
 1741 ttactgactgatttcaagctcgatagtgaggacagatgattcgtcaggctctagccctgca
 L L T D F K L D S G A D D S S G S S P A 600
 1801 tctctcactgtccccttttccacagataatctatccatggatatacgtcttctcagac
 S S T V P F S T D N L S H G Y T S S S D 620
 1861 acgcccaggcggtcagctatgatgtccttaggccagaatctacgagaaatgctctagag
 T P E A V T Y D V L R P E S T R N A L E 640
 1921 gattcggctccatcagggttcagaagaatcactaaaggatccctctcttgaaggagtggtg
 D S A P S G S E E S L K D P S L E G S V 660

1981	tggttccctggatccacagacctaacaacacagctctgagactggatctgggagagagggc	
	W F P G S T D L T T Q S E T G S G R E G	680
2041	tttctccaagttaactccacggaacttccaagttgatgaatcgaggagacaactgagaca	
	F L Q V N S T D F Q V D E S R E T T E T	700
2101	ttttctccagatgctaccgcgtcccggttccgttcacagatatggaaatgccacat	
	F S P D A T A S R G P S V T D M E M P H	720
2161	tattctacctttgcctacccccgactgaagtaacatcacatgctttcactccgtcctcc	
	Y S T F A Y P P T E V T S H A F T P S S	740
2221	agaccacttgatttggctcccactagcaacatcctccattcgcagacaactcaaccagta	
	R P L D L A P T S N I L H S Q T T Q P V	760
2281	tacaatggtgagacacctcttcaaccttctacagtagtgaagtctttcctctagtacc	
	Y N G E T P L Q P S Y S S E V F P L V T	780
2341	cctttgttgctgacaatcagacctcaacactaccctgctgcttcaagtagtgattcg	
	P L L L D N Q T L N T T P A A S S S D S	800
2401	gccttgcatgctacgcctgtattccccagtggttggtgtgctatttgactccatcctgtct	
	A L H A T P V F P S V G V S F D S I L S	820
2461	tcctatgatgatgcacctctgctcccattttctctgcttccctcagtagtgactgttt	
	S Y D D A P L L P F S S A S F S S D L F	840
2521	caccatctgcatacggtttctcaaaccctccgcaagttacttcagctgctgagagggat	
	H H L H T V S Q T L P Q V T S A A E R D	860
2581	gagctgtctttgcatgcttctctgctggtgggtgggggtgatttgcgtgttagagcccagc	
	E L S L H A S L L V A G G D L L L E P S	880
2641	cttggttcagatattctgatgtgatgtcacatcaggtcactattcatgctgcttcggacaca	
	L V Q Y S D V M S H Q V T I H A A S D T	900
2701	ttggaatttgtagtgagctgctgctcttataaaacgtctatggtttctcaaatcgaa	
	L E F G S E S A V L Y K T S M V S Q I E	920
2761	tcacccagcagtgatgtcggttatgcatgcatattcgtcagggcctgaaacttcttatgcc	
	S P S S D V V M H A Y S S G P E T S Y A	940
2821	attgagggctcccaccacgtgctcactgtttcttccagttctgcaataacctgtgcatgat	
	I E G S H H V L T V S S S A I P V H D	960
2881	ctgtgcggtgtagctgatcaggggtccttacttatcaatcctagccatatatcactgcct	
	S V G V A D Q G S L L I N P S H I S L P	980
2941	gagtcctcatttattactccaactgcatcattactgcagcttccctcctgcctctctggt	
	E S S F I T P T A S L L Q L P P A L S G	1000
3001	gatggggagtggtctggagcctcctctgatagtgaaattgctttacctgacacagatggg	
	D G E W S G A S S D S E L L L P D T D G	1020
3061	ctgagaactcttaacatgtcttcacctgtttctgtagctgattttacatacacgacatct	
	L R T L N M S S P V S V A D F T Y T T S	1040
3121	gtgtctggcgatgatattaagccgctttctaaaggtgaaatgatgtatggaaatgagacc	
	V S G D D I K P L S K G E M M Y G N E T	1060
3181	gaactgaaaatgtcttcttccagtgacatggcatacccttctaaaagcacagtcgtgcca	
	E L K M S S F S D M A Y P S K S T V V P	1080
3241	aagatgtctgatattgtaataagtgagtgatgaatctttaaaagaaacctctgtttccgta	
	K M S D I V N K W S E S L K E T S V S V	1100
3301	tctagcataaaacagcgtgtttacagagtctcttgtttatcccataactaagggttttgat	
	S S I N S V F T E S L V Y P I T K V F D	1120
3361	caggagatttagtcgagttccagagattatcttcccagttaaacctacacacacagcatct	
	Q E I S R V P E I I F P V K P T H T A S	1140
3421	caagcatctggtgacacttggcttaaacccgggttagcacaaaactcagagcctgcgctc	
	Q A S G D T W L K P G L S T N S E P A L	1160
3481	tctgacactgcttctagtgaagtatcacacccttcaacacagcccttgctctatgagcc	
	S D T A S S E V S H P S T Q P L L Y E A	1180
3541	gcattctccttttaatacgaagcattgtgcaaccttcccttccggcttctgatgttgac	
	A S P F N T E A L L Q P S F P A S D V D	1200
3601	accttgcttaaaactgccttccctctgggcctcgatccagtgctgactgaaaccccc	
	T L L K T A L P S G P R D P V L T E T P	1220
3661	atggttgagcaaaagtagctcttccgtatctcttccctggcatcagagtctgcttcaagc	
	M V E Q S S S S V S L P L A S E S A S S	1240
3721	aaaagcacgctgcactttacatctgtaccagttctcaatatgtcaccttctgatgtgcac	
	K S T L H F T S P V L N M S P S D V H	1260
3781	cccacttcacttcaacgcttaacagttcctcactcgaggagggaatatatttgaacaaggt	
	P T S L Q R L T V P H S R E E Y F E Q G	1280
3841	ttgcttaagagcaaaagtccccagcaagtcctgcccgtccttgacagccatgacgagttt	
	L L K S K S P Q Q V L P S L H S H D E F	1300
3901	ttccaaactgcacatctggacattagccaggcctaccctccaaaaggaaggcatgcat	
	F Q T A H L D I S Q A Y P P K G R H A F	1320

3961 gctactcctatatttatcaatcaatgaaccacaaaatacacttataaacaggcttggtat
A T P I L S I N E P Q N T L I N R L V Y 1340
4021 tctgaggacattttcatgcaccctgaaatttctattactgataaggcacttactggtcta
S E D I F M H P E I S I T D K A L T G L 1360
4081 ccaacgaccgtttctgatgtactttagctactgaccattctgttccattaggaagtggg
P T T V S D V L I A T D H S V P L G S G 1380
4141 cccatttccatgacaactgtttctcccaacagagatgattctgtgaccacaaccaagttg
P I S M T T V S P N R D D S V T T T K L 1400
4201 cttcttctcttctaaagctacttctaaagccgactcatagtgcagatctgatgccgattta
L L P S K A T S K P T H S A R S D A D L 1420
4261 gtaggaggtggtgaagatggtgatgactatgatgatgattatgatgacatagatagt
V G G G E D G D D Y D D D D Y D D I D S 1440
4321 gatcgctttcccgtaataaagtgtatgtcatgttcaccctatagagaatcacaggaaaag
D R F P V N K C M S C S P Y R E S Q E K 1460
4381 gtaatgaatgactcggacacccaagaaagcagtgcttgtggatcagagtgaaccaatttca
V M N D S D T O E S S L V D O S D P I S 1480
4441 catttgctctctgagaataccgaagaagaaagggagggcacgggtgtaactagggtggat
H L L S E N T E E N G G T G V T R V D 1500
4501 aaaagtcctgataaagtcaccaccaccaagtatgctacccagaagcacaaatgatggaaga
K S P D K S P P P S M L P O K H N D G R 1520
4561 gaggaccgtgacattcagatgggtagtgtgtcttctcaccacccaggatctaaagca
E D R D I Q M G S A V L P H T P G S K A 1540
4621 tgggcagttttgacaagtgatgaagagagtggtcagggcaaggcacctcagatagcctt
W A V L T S D E E S G S G O G T S D S L 1560
4681 aatgataatgagacttccacagatttccagtttccagatgttaatgaaaaggatgtgat
N D N E T S T D F S F P D V N E K D A D 1580
4741 ggtgtcctggaagcagatgacacaggcatagctccgggatctccacggctcctccacca
G V L E A D D T G I A P G S P R S S T P 1600
4801 tctgttactagtgggcattcaggagatccaacagttcagaggcagaggccagtaaatagt
S V T S G H S G V S N S S E A E A S N S 1620
4861 agccatgagtcctcgtattggctagtctgaggggttgagtcgagaagaaggcgggtata
S H E S R I G L A E G L E S E K K A V I 1640
4921 ccccttgatcgtgtctgcccgtgacttttatctgtctagtgggtccttgggtgttctc
P L V I V S A L T F I C L V V L V G I L 1660
4981 atctactggagaaaatgcttccagacggctcacttttatttagaagacaatacatccct
I Y W R K C F Q T A H F Y L E D N T S P 1680
5041 cgagtaatatctacaccaccaacaccatctttccaatttcagatgatattggagcaatt
R V I S T P P T P I F P I S D D I G A I 1700
5101 ccaataaagcattttccaaagcagtagcagacttacatgcaagtaatgggttccactgaa
P I K H F P K H V A D L H A S N G F T E 1720
5161 gaatttgagacactgaaagagttttaccaggaagtgcagagctgcactgttgacttaggt
E F E T L K E F Y Q E V Q S C T V D L G 1740
5221 attacagcagacagctccaatcacccagacaacaagcacagaacagatatgtcaacatc
I T A D S S N H P D N K H K N R Y V N I 1760
5281 gtagcctatgatcatagcagggttaagctcacacaacttgctgaaaaagatggaaaactg
V A Y D H S R V K L T Q L A E K D G K L 1780
5341 actgattacatcaatgccattatgttgatggttacaacaggccaaaggcttacattgct
T D Y I N A N Y V D G Y N R P K A Y I A 1800
5401 gccagggtccactgaagtccacagcagaagatttctggagaatgatatgggagcataat
A Q G P L K S T A E D F W R M I W E H N 1820
5461 gtggaagtcacgttatgataacaaacctcgtggagaaaggaagaagaaatgtgaccag
V E V I V M I T N L V E K G R R K C D Q 1840
5521 tactggcctactgatggcagtgaaagaatcgggagcttctggtcaaccagaagaatgtt
Y W P T D G S E E Y G S F L V N Q K N V 1860
5581 cagggtgcttgcttattatactgtgaggaatttcaccctaagaacacaaaagataaaaaag
Q V L A Y Y T V R N F T L R N T K I K K 1880
5641 ggctctcagaaaggaagatccagtggacgcctagtctactcagtatcattacaccagtg
G S Q K G R S S G R L V T Q Y H Y T Q W 1900
5701 cctgatattgggtgttcccgagtactccctaccgctgctggccttctgtgaggaagactgct
P D M G V P E Y S L P V L A F V R K T A 1920
5761 caggccaagcgacatgcagtcgggacagttgttgcactgcagcgtggcgtggggaga
Q A K R H A V G P V V V H C S A G V G R 1940
5821 acgggcacatacattgtactagacagtatgctacagcagattcaacacgaaggaaccgtc
T G T Y I V L D S M L Q Q I Q H E G T V 1960
5881 aacatatttgggttcttaaaacacattcgttctcaaaggaattatttgggtgcaaacagag
N I F G F L K H I R S Q R N Y L V Q T E 1980

5941 gagcaatacgtcttcatttcacgacacactgggttgaggccatactcagcaaagagacagag
 E Q Y V F I H D T L V E A I L S K E T E 2000
 6001 gtgcctgacagccacatccattctctatgttaatacactcctcataccggaccatcaggc
 V P D S H I H S Y V N T L L I P G P S G 2020
 6061 aagacaaaactagagaaacaattccagcttctgagtcagtcaaaatattcttcagagtgac
 K T K L E K Q F Q L L S Q S N I L Q S D 2040
 6121 tactccacggccctgaagcagtgtaacaggggagaagaacagaacatcctccatcatcccc
 Y S T A L K Q C N R E K N R T S S I I P 2060
 6181 gtggaaagatcgagggtgggcatttcctcctgagtgagggaaggcacagactacatcaat
 V E R S R V G I S S L S G E G T D Y I N 2080
 6241 gcatcctatattatgggttattaccagagcaatgaattcatcatcaccagcaccctt
 A S Y I M G Y Y Q S N E F I I T Q H P L 2100
 6301 ctacacaccatcaaggacttctggagaatgatatgggatcataatgccagctgggtggtt
 L H T I K D F W R M I W D H N A Q L V V 2120
 6361 atgattccagatggtcaaaacatggcagaggatgaatttgtttactggccaaataaagat
 M I P D G Q N M A E D E F V Y W P N K D 2140
 6421 gagcccataaattgcgagagcttcaaaagtcacgcttatgtctgaagaacacaaaatgtctt
 E P I N C E S F K V T L M S E E H K C L 2160
 6481 tcgaatgaggaaaaactgatagttcaagacttcatcttggaaagcgacacaggatgattat
 S N E E K L I V Q D F I L E A T Q D D Y 2180
 6541 gtgctggaagtaaggcattttcagtgcccgaatggccaaatccagatagtccttagt
 V L E V R H F Q C P K W P N P D S P I S 2200
 6601 aaaacatttgaacttataagtattatcaaagaagaagctgtaacagagatgggcccattg
 K T F E L I S I I K E E A A N R D G P M 2220
 6661 attgttcacgatgagcatggaggagtaacagaggacattttgtgctctcacaccctt
I V H D E H G G V T A G G T F C A L T T L 2240
 6721 atgcaccaactagaaaaaagaaaactccatggatgtttaccaagtagccaagatgatcaat
 M H Q L E K E N S M D V Y Q V A K M I N 2260
 6781 ttgatgaggccgggagtgcttccactgacattgagcagtagcagtttctctacaaagtggc
 L M R P G V F T D I E Q Y Q F L Y K V V 2280
 6841 ctcagcctggtcagcacaaggcaggaagagaatccatccacctccctggatagtaagggt
 L S L V S T R Q E E N P S T S L D S N G 2300
 6901 gcagctttgcctgatggaaatatagctgaaagcctggagtcctttagtctgacgcagaaag
 A A L P D G N I A E S L E S L V * 2316
 6961 ggtgtaggaccacctcatccaagcagtgctctcttctctaaacttagaaaaatgagtcag
 ttctgttatctgtttacttcccatgacctgacggtaactcattctgctgccaaattgaca
 7021 ccattaacaacgtgtgcctttttgaaagacttcttgtaatccacttattatgtttgaact
 7081 aaaatgattgaattttacaatgtttctaagaattgaattgtggcattttttccatattg
 7141 attttaacaacaacaacaaaaaaattttagtagataataggaaacaccaaccttgggagat
 7201 atttgttcttaagtgtcaaattttttagctgtattttagcaatcatcaggtttgctagaa
 7261 atataacttttaatatagtagattgtaagtaaacactttatccccgatgatattcaaca
 7321 ttttacaactgcagattcacctgaagtaggagtgacagtaacttatgtaataactgcc
 7381 tgggtgtctccatggaccaaatttatatttataattgtagatttttatattttactactgt
 7441 gtgagttttctagtgggtgacttgagtttaattagcttactctctggctttaaacttactc
 7501 taaatgtcttctaaaactgtactgtgtatccaagaaactaaccttcttctgcatgtca
 7561 ttttaacttttgtgaaaataggaaaccacttgttttaaagatgtttttatgagaataac
 7621 acottaccaaacattccttaaatggtttttatctgagaagttgcaaaaataaatataaat
 7681 attgcc
 7741

B

4807	actagtgggcattcaggagtatccaacagttcagagggcagggttagttatgagcaaaggga	
	T S G H S G V S N S S E A <u>G</u> *	1616
4867	tagaacgagatgtgctgattttcttgctatgaaagtaaaaatagaagagtcacggaagaa	
4927	aagaattc	

図 4. 発生段階における *PTP ζ* mRNA の発現の解析

E13 から P52 までのラット脳より抽出したトータル RNA 各 20 μ g を 2M ホルムアルデヒド、1%アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブランにブロッティングした。 [32 P]でラベルした、3 種類のアイソフォームを認識する cDNA (λ rPG-51) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィにより mRNA を検出した。

図 5. プロテオグリカン型 PTP の部分精製

P0 および P20 のラット脳より調製した膜画分を CHAPS で可溶化し、これを DEAE-Toyopearl カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーおよび CsCl 密度勾配遠心によって 10 本のフラクションに分画した。それぞれのフラクションの密度 (---) および PTP 活性 (□、P0；■、P20) を測定した。1 U は、30°C で 1 分あたり 1 nmol のリン酸を放出する活性と定義する

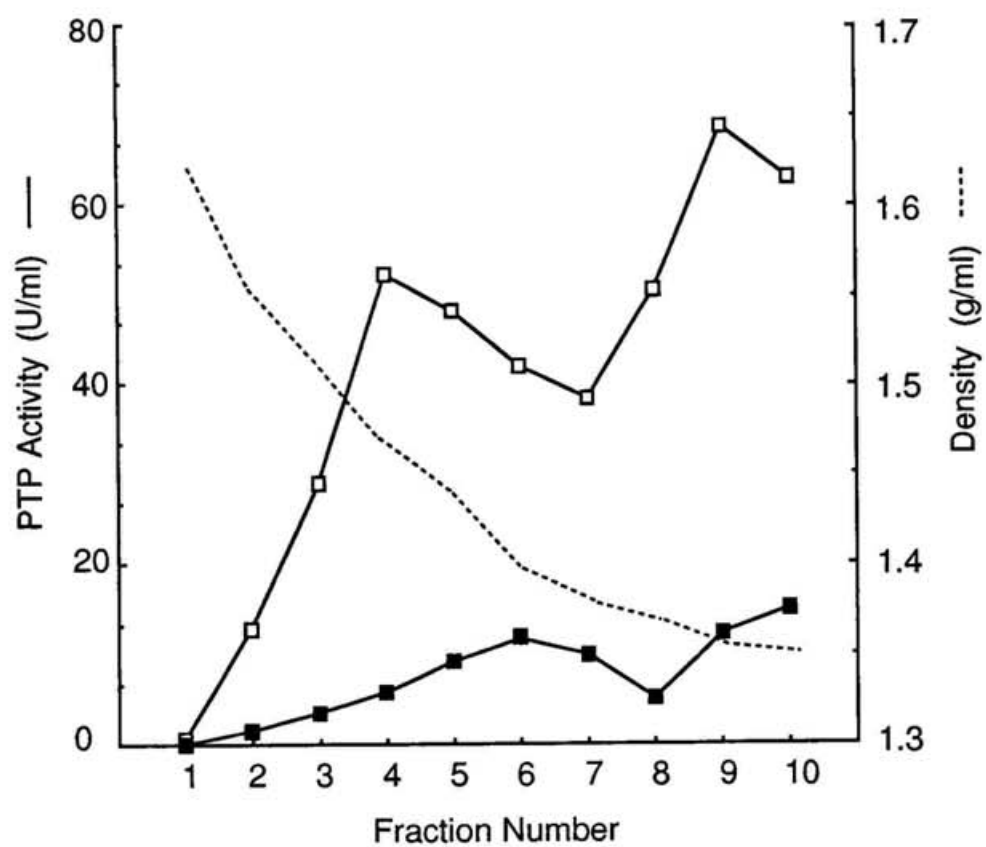


図 6.

A. 3 種類の $PTP\zeta$ アイソフォームと各抗体の抗原部位

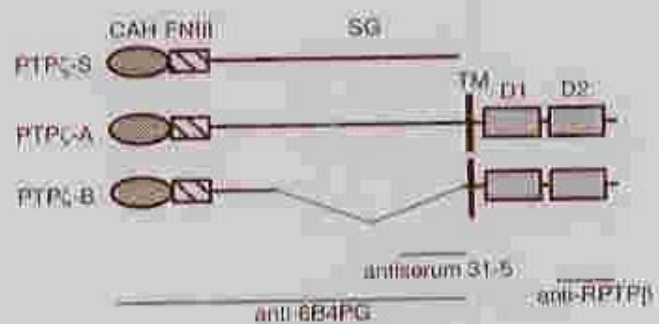
anti-6B4PG、抗 6B4 プロテオグリカン抗体抗原部位；antiserum 31-5、抗血清 31-5 抗原部位；anti-RPTP β 、抗 RPTP β 抗原部位

その他の略号は図 2 参照。

B. 3 種類の $PTP\zeta$ アイソフォームのコアタンパク質の同定

P0 ラット脳より調製した CsCl 密度勾配遠心のフラクション 4 から 6 を抗 6B4 プロテオグリカン抗体で免疫沈降した。免疫沈降物をコンドロイチナーゼ ABC で消化した後、あるいは未消化のまま抗 6B4 プロテオグリカン抗体、抗血清 31-5 および抗 RPTP β を用いたイムノブロットティングにより解析した。コアタンパク質の分子量はレーン左に kDa で示した ($PTP\zeta$ -A、380 kDa； $PTP\zeta$ -S、300 kDa； $PTP\zeta$ -B、220 kDa)。+はコンドロイチナーゼ ABC 消化をしたサンプル、-は未消化のサンプルを示す。

A



B

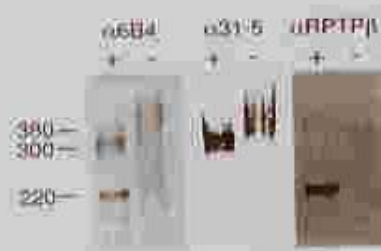


図 7. CsCl 密度勾配遠心フラクション中の PTP ζ アイソフォームの解析 (P0 および P20)

P0 (A-C)と P20 (D)の各フラクションの一部を、5% SDS-PAGE により分離し、抗 6B4 プロテオグリカン抗体(A)、抗血清 31-5(B) および抗 RPTP β (C、D)を用いてイムノブロッティングにより解析した。コアタンパク質の分子量はレーン左に kDa で示した (PTP ζ -A、380 kDa ; PTP ζ -S、300 kDa ; PTP ζ -B、220 kDa) 。+はコンドロイチナーゼ ABC 消化をしたサンプル、-は未消化のサンプルを示す。

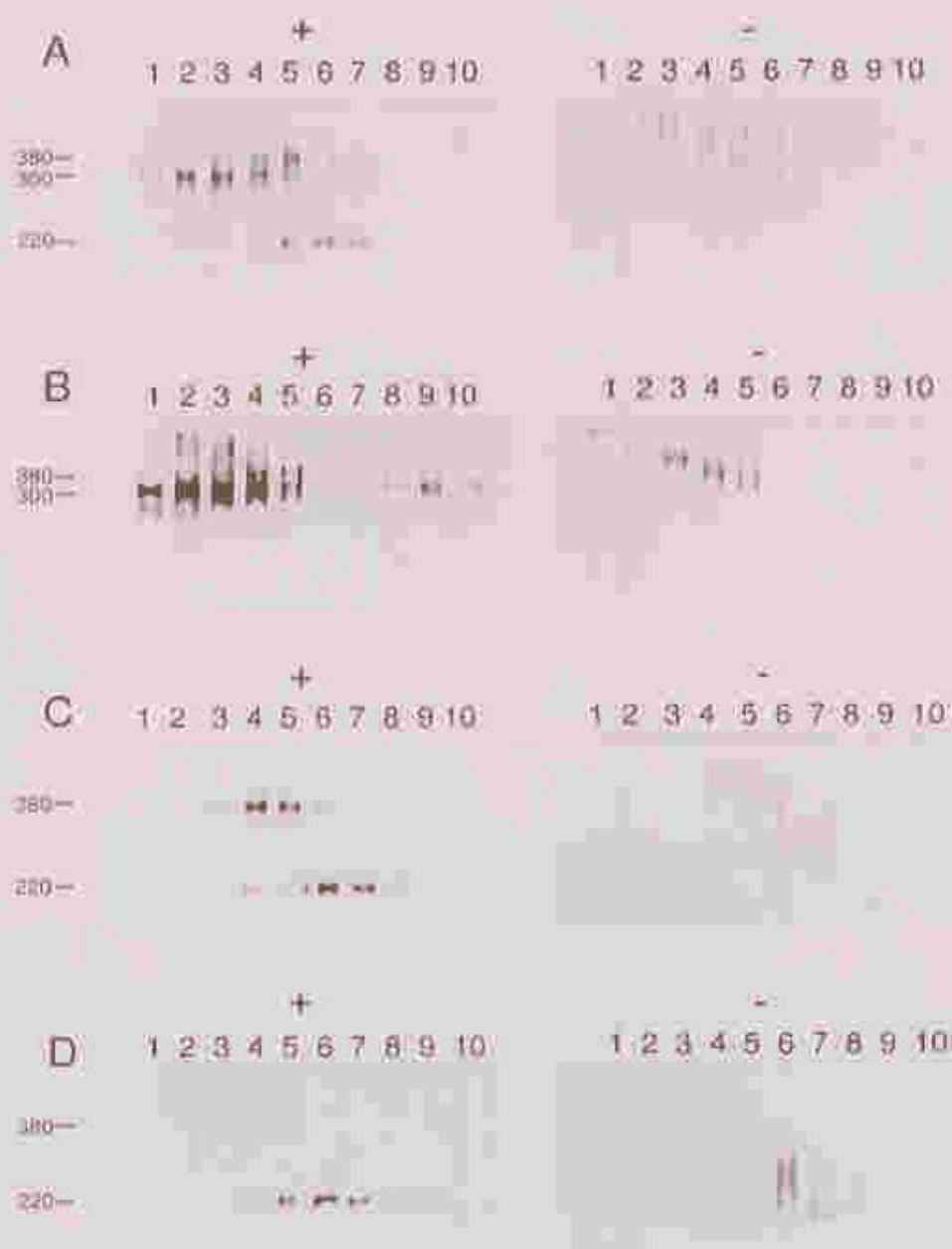


図 8. 発生段階における PTP ζ アイソフォームの発現とコンドロイチン硫酸鎖による修飾の解析

A. E13 から P52 までのラット脳抽出物を 0.2 % TritonX-100 と 0.1 % sodium deoxycholate で可溶化し、抗血清 31-5 を用いたイムノブロットティングにより解析した。

B. E13 から P52 までのラット脳から得た膜画分を 0.2 % TritonX-100 と 0.1 % sodium deoxycholate で可溶化した後、抗 6B4 プロテオグリカン抗体で免疫沈降した。免疫沈降物を抗 RPTP β を用いたイムノブロットティングにより解析した。

コアタンパク質の分子量はレーン左に kDa で示した (PTP ζ -A、380 kDa ; PTP ζ -S、300 kDa ; PTP ζ -B、220 kDa) 。+はコンドロイチナーゼ ABC 消化をしたサンプル、-は未消化のサンプルを示す。



図 9. $PTP\zeta$ -A および-B の HNK-1 糖鎖、 Le^x 、およびケラタン硫酸による修飾の解析

P0 ラット脳より調製した CsCl 密度勾配遠心のフラクション 5 および 6 を抗 6B4 プロテオグリカン抗体で免疫沈降した。免疫沈降物を抗 RPTP β (A)、抗 HNK-1(B)、抗 Le^x (C)、抗ケラタン硫酸(D)を用いてイムノブロッティングにより解析した。+ はコンドロイチナーゼ ABC 消化をしたサンプル、-は未消化のサンプルを示す。



図 10. L 細胞に強制発現させた PTP ζ -A および-B の解析と PTP 活性の測定

A. PTP ζ 発現 L 細胞の CHAPS 抽出物を DEAE-Toyopearl で濃縮した後、5% SDS-PAGE により分離し、抗 6B4 プロテオグリカン抗体を用いてイムノブロッティングを行った。P8 ラット脳より調製した CsCl 密度勾配遠心のフラクション 5 および 6 をポジティブコントロールとした。コアタンパク質の分子量はレーン左に kDa で示した (PTP ζ -A、380 kDa；PTP ζ -S、300 kDa；PTP ζ -B、220 kDa)。+はコンドロイチナーゼ ABC 消化をしたサンプル、-は未消化のサンプル、矢尻は PTP ζ -A 発現細胞より検出された 125-150 kDa のタンパク質を示す。

B. PTP ζ -A または-B を発現する、あるいはベクターのみを導入した L 細胞を CHAPS で抽出し、抗 6B4 プロテオグリカン抗体またはウサギ正常血清由来の IgG を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を、 $[^{32}\text{P}]$ リン酸でチロシン残基を標識した Raytide と共に 30 °C で 60 分インキュベートした。PTP ζ -A または-B を発現する細胞の PTP 活性は抗 6B4 プロテオグリカン抗体で免疫沈降したサンプルとウサギ正常血清由来の IgG で免疫沈降したサンプルにより放出されたリン酸の放射能の差によって求めた(n=3)。

A



B

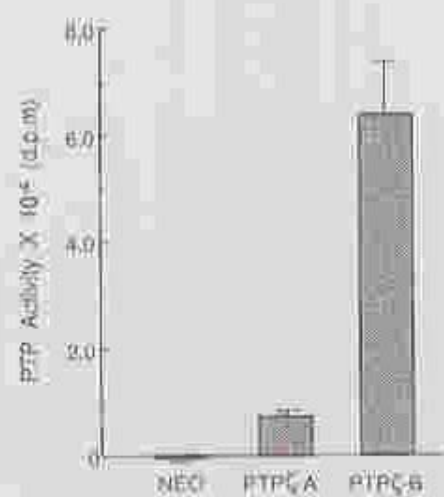


図 11. PTP ζ 発現 L 細胞における PTP ζ の細胞内局在の解析

PTP ζ -B を発現する L 細胞を抗 6B4 プロテオグリカン抗体(A、C、E)および抗 cortactin (B)、抗 talin (D)、FITC-ファロイジン (F)で二重染色した。PTP ζ -B と cortactin および talin は突起(A-D の矢印)や、ラッフル膜(A-D の矢尻)で共存した。PTP ζ -B は細胞周縁部で F-アクチンに沿って分布したが (E、F の矢印)、ストレスファイバー上には見いだされなかった (F の矢尻)。ウサギの正常血清を一次抗体として使用した場合には弱いバックグラウンドの染色しか観察されなかった(G)。PTP ζ -A を発現する L 細胞(H)においては突起や(矢印)ラッフル膜(矢尻)が染色されたが、より強い染色が細胞内部に観察された。

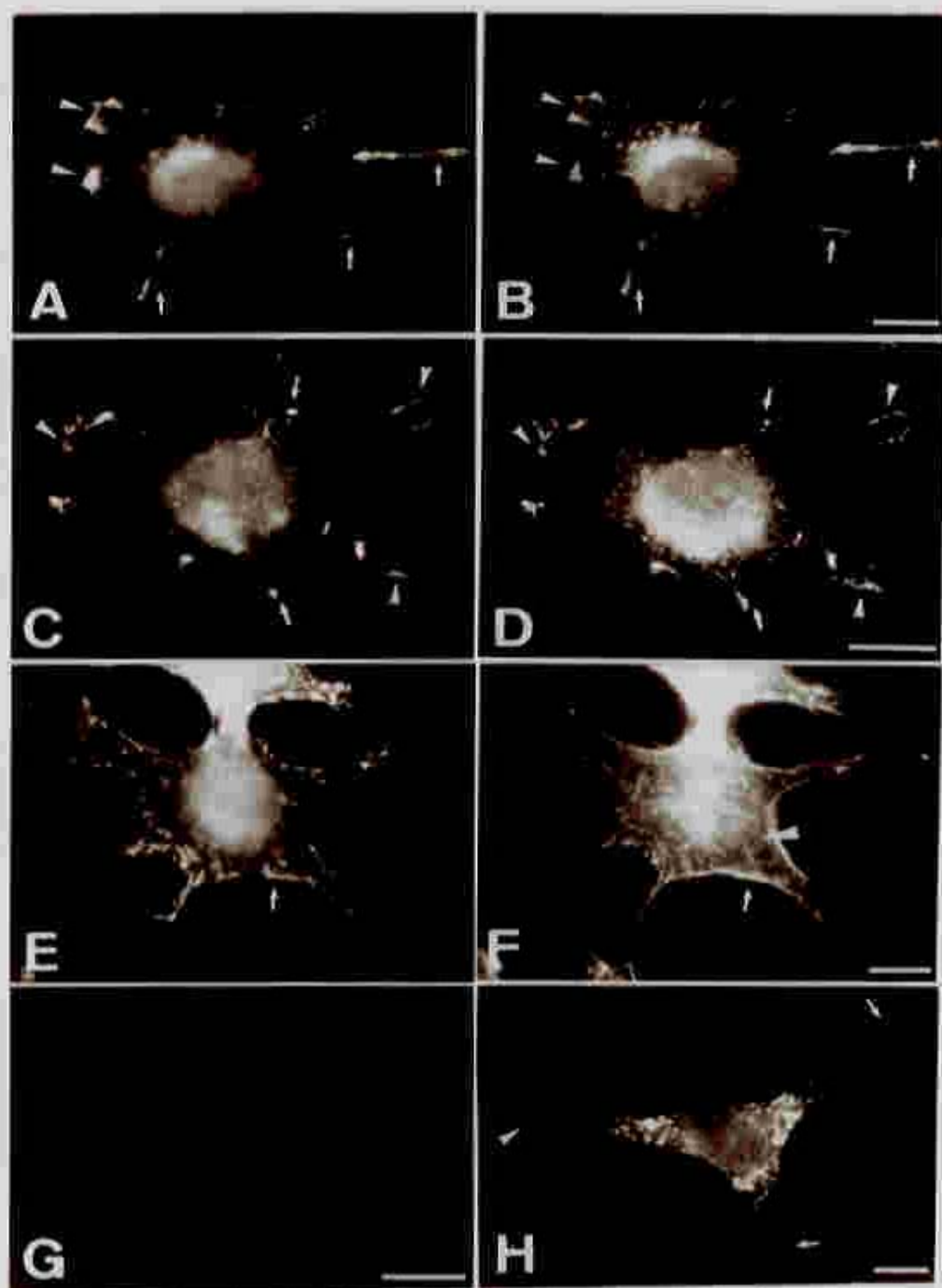


図 12. 初代大脳皮質神経培養細胞における PTP ζ の細胞内局在の解析

poly-L-lysine でコートしたカバーガラス上で一晩培養した E16 ラット大脳皮質神経細胞を抗 6B4 プロテオグリカン抗体(A)および抗 cortactin (B)で二重染色した。抗 6B4 プロテオグリカンの抗原分子と cortactin は成長円錐(矢尻)、糸状仮足(矢印小)、細胞周縁部(矢印大) で共存した。写真下の線は 20 μ m を示す。

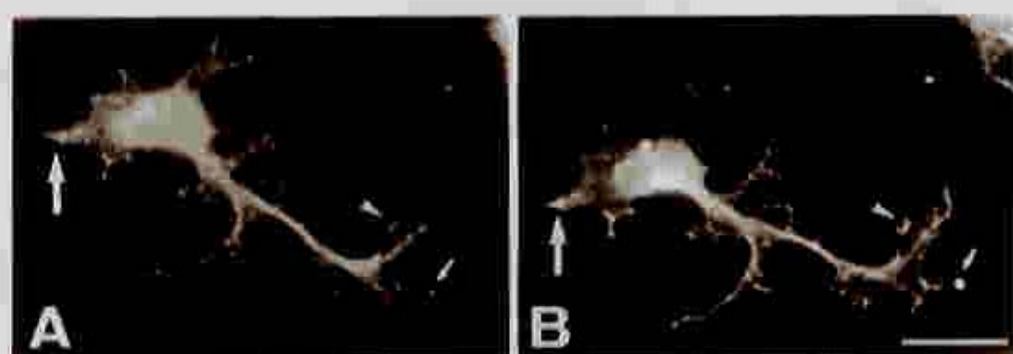
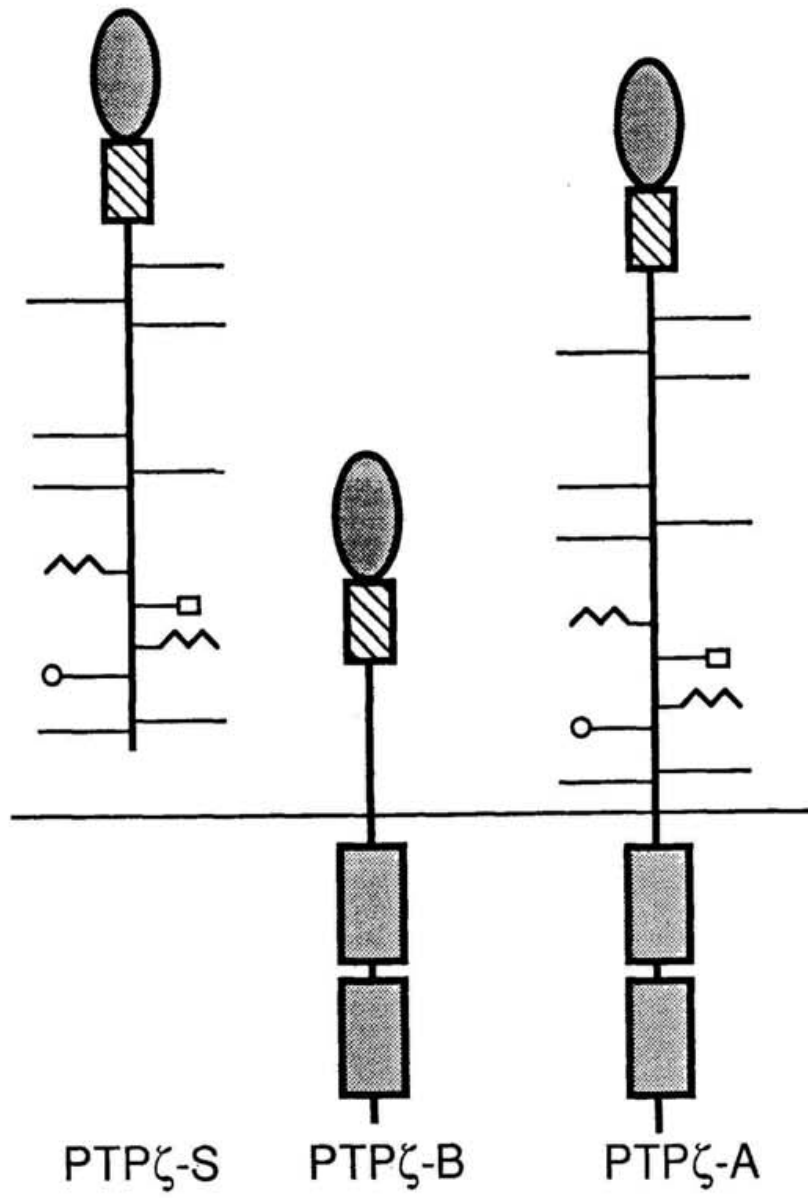


図 13. 発生段階における PTP ζ アイソフォームの発現および糖鎖修飾の変化

Embryonic stage



Postnatal stage

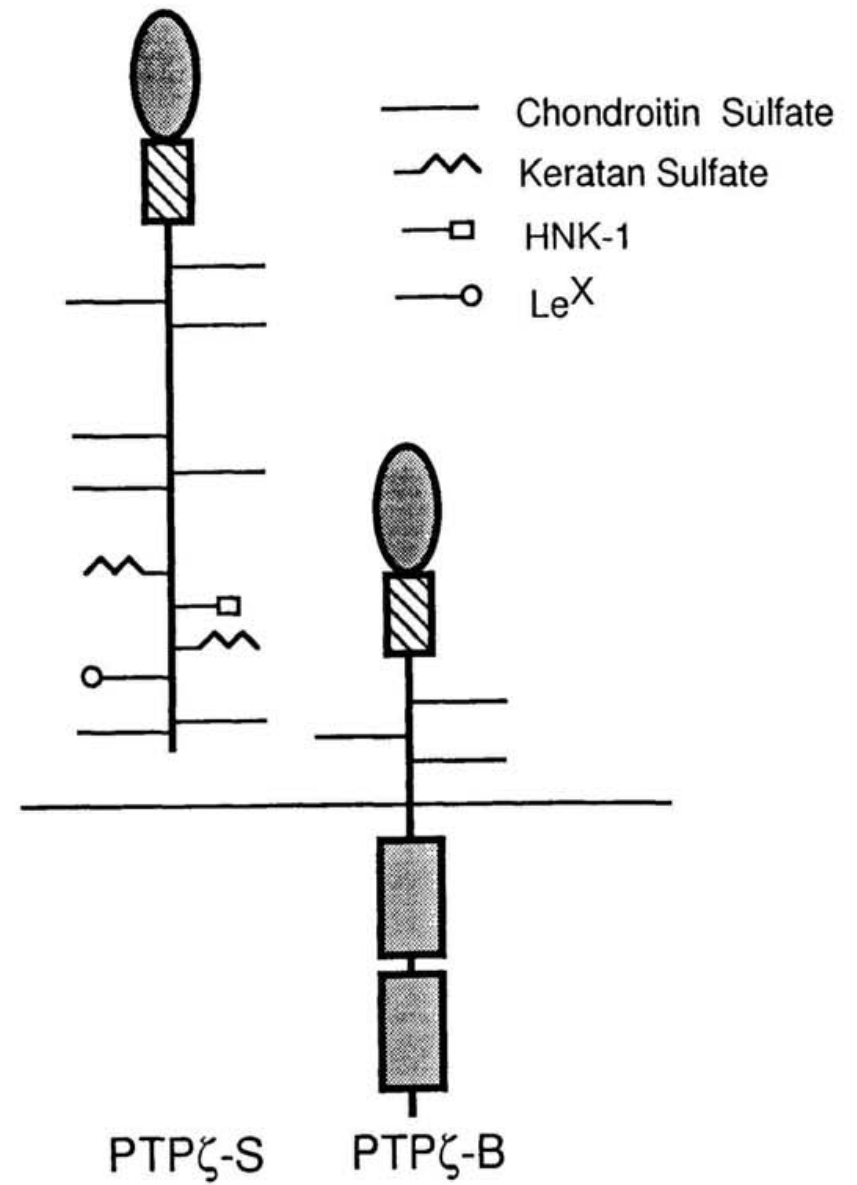


図 14. PTP ζ の分子機能に関するモデル

PTP ζ は細胞周縁部、細胞突起、成長円錐に分布し、種々の細胞外リガンドの情報を、タンパク質の脱リン酸化を介して細胞骨格関連タンパク質に伝達することによって細胞骨格形成を調節し、細胞移動、神経突起伸長などの現象を制御しているものと考えられる。

