

Fibroblast Growth Factor-5の  
脳内発現に関する研究

1999

服部 喜之

# 目次

序論 .....	1
第一章 FGF-5の生後の脳内発現に関する研究 .....	6
実験結果	
第一節 成体ラット脳内におけるFGF mRNAの発現 .....	6
第二節 生後の脳発達過程におけるFGF mRNAの発現 .....	21
第三節 小脳におけるFGF-5 とFGFR-4 mRNAの一過性発現 .....	22
第四節 FGF-5とFGFR-4の相互作用 .....	24
考察 .....	27
実験方法 .....	29
第二章 FGF-5の欠失型アイソフォームに関する研究 .....	34
実験結果	
第一節 欠失型FGF-5 cDNAの単離及び、 欠失型FGF-5 mRNAの生成機構 .....	34
第二節 欠失型FGF-5 mRNAの組織分布 .....	37
第三節 欠失型FGF-5の生理活性 .....	38
考察 .....	41
実験方法 .....	42
総括及び結論 .....	45
謝辞 .....	46
発表論文目録 .....	47
引用文献 .....	48

## 序論

脳の機能は個体の機能の中心であるが、多くの部分は謎に包まれており、その解明は生命科学の究極の目標といってもよい。近年、遺伝子工学の手法を取り入れた分子生物学の飛躍的な発展により神経細胞の分子レベルでの機能が次々に明らかになってきた。そして遺伝子クローニングやパッチクランプ法などにより脳に存在する様々な因子が単離されてきた。線維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor, 以下FGFと略す)は、本来脳や脳下垂体から単離された増殖因子であるが、近年遺伝子クローニングにより多くのメンバーが発見され、脳の発達、機能維持に重要な役割を果たしていると期待される因子の一つである。

現在、FGF familyのメンバーは、少なくともFGF-1からFGF-18までの18種類が同定されており (Fig. 1-1)、アミノ酸配列の相同性は30~79%である(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)。18種類のFGFの中でもプロトタイプであるacidic FGF(aFGF)とbasic FGF (bFGF)は胎児及び成体の様々な臓器に発現しているが、FGF-3、FGF-4、FGF-5及びFGF-6は胎児や腫瘍細胞において、FGF-7は腎臓、結腸、回腸などの一部の成体組織において主に発現している(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)。又、FGF-8とFGF-9はそれぞれマウス乳癌細胞とヒトグリオーマ細胞から、FGF-10はラット胎児から単離されている(8, 9,10)。FGF-11からFGF-14 (FHF-1~FHF-4)はヒト網膜から、FGF-16はラット心臓からそれぞれ単離されている(11, 13)。FGF-15はE2A-Pbx1の下流標的因子として同定され、FGF-17、FGF-18はラット胎児から単離されている(12, 14, 15)。これら18種類のFGFの中ではaFGF、bFGF、FGF-5、FGF-9、FGF-10及びFGF-11~FGF-14が成体の中枢神経系において発現している。中でもaFGF、bFGFにおいては神経栄養作用、神経分化作用などを示すことが報告されており、FGFの脳内における作用が注目されている(16, 17, 18)。又、FGFは細胞表面上の特異的なレセプターを介してその作用を発現しており、現在までにFGFレセプターは、FGFR-1からFGFR-4の4種類が同定されている(Fig. 1-2)(19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27)。これらはいずれも細胞外にイムノグロブリン様ドメインを持ち、細胞内にチロシンキナーゼドメインを持つ構造を示し、互いに55~70%の相同性を持っている(28, 29)。

著者は脳内における神経細胞の分化や機能維持に対するFGFの役割を解明するた

めに、まず初めに脳内におけるFGFの発現領域、発現細胞を同定することが重要であると考えた。そこで脳について生理学的、解剖学的に知見が豊富なラットを用いて、in situ hybridization法により生後の脳内におけるFGF mRNAの発現分布を、著者が研究していた当時報告されていた10種類のFGFについて詳細に検討した。その結果、成体の脳内においては10種類のFGFの中でもaFGF、bFGF、FGF-5、FGF-9、FGF-10 mRNAが発現しており、aFGF mRNAは広い領域の神経細胞に強く、bFGF mRNAは海馬の神経細胞に強く、広い領域のグリア細胞に弱く、FGF-5 mRNAは海馬、視床、大脳皮質の神経細胞に弱く、FGF-9 mRNAは広い領域の神経細胞に強く、FGF-10 mRNAは広い領域の神経細胞に強く発現していることを明らかにした。又、当研究室においてFGFレセプターについても脳内発現を調べており、FGFR-1 mRNAは広い領域の神経細胞に、FGFR-2 mRNAは広い領域のオリゴデンドロサイトに、FGFR-3 mRNAは広い領域のアストロサイトに、FGFR-4 mRNAは内側網核の神経細胞にのみ発現していることを明らかにしている(30, 31, 32)。

さらに、著者は生後の脳発達過程における10種類のFGF mRNAの発現を、生後2日、7日、11日、15日、49日齢のラット脳を用いて検討を行った。その結果、ほとんどのFGF mRNAは成体での発現領域と同じ領域で生後間もなくから成体まで持続的に発現していたが、FGF-5 mRNAのみが生後11日目前後に、小脳皮質の内顆粒層で一過性に発現していた。そしてFGFレセプターについても同様に調べたところ、FGFR-4 mRNAがFGF-5 mRNAの高発現するのと同じ時期に小脳皮質の外顆粒層で一過性に高発現していたため、著者はFGF-5がFGFR-4と結合可能かどうか検討を行い、FGF-5はFGFR-4に結合することを明らかにした。

さらに著者はFGF-5の研究の過程において、脳内で発現しているFGF-5のC末端欠失型のアイソフォームをコードしているcDNAを単離した。そしてこの欠失型FGF-5アイソフォームの発現分布、生理活性についてFGF-5と比較しながら検討を行い、FGF-5の欠失型アイソフォームがFGF-5のアンタゴニストとして働くことを明らかにした。

以下、これらの知見について二章に分けて論述する。

なお本文中あるいは図表中で使用した略号は以下の通りである。

aFGF	acidic fibroblast growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
cDNA	complementary DNA
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GST	glutathione S-transferase
ISH	in situ hybridization
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate-buffered saline
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
tRNA	transfer RNA
UTP	uridine-5' -triphosphate

[GENETYX-MAC: Evolutionary tree]

Method: UPGMA

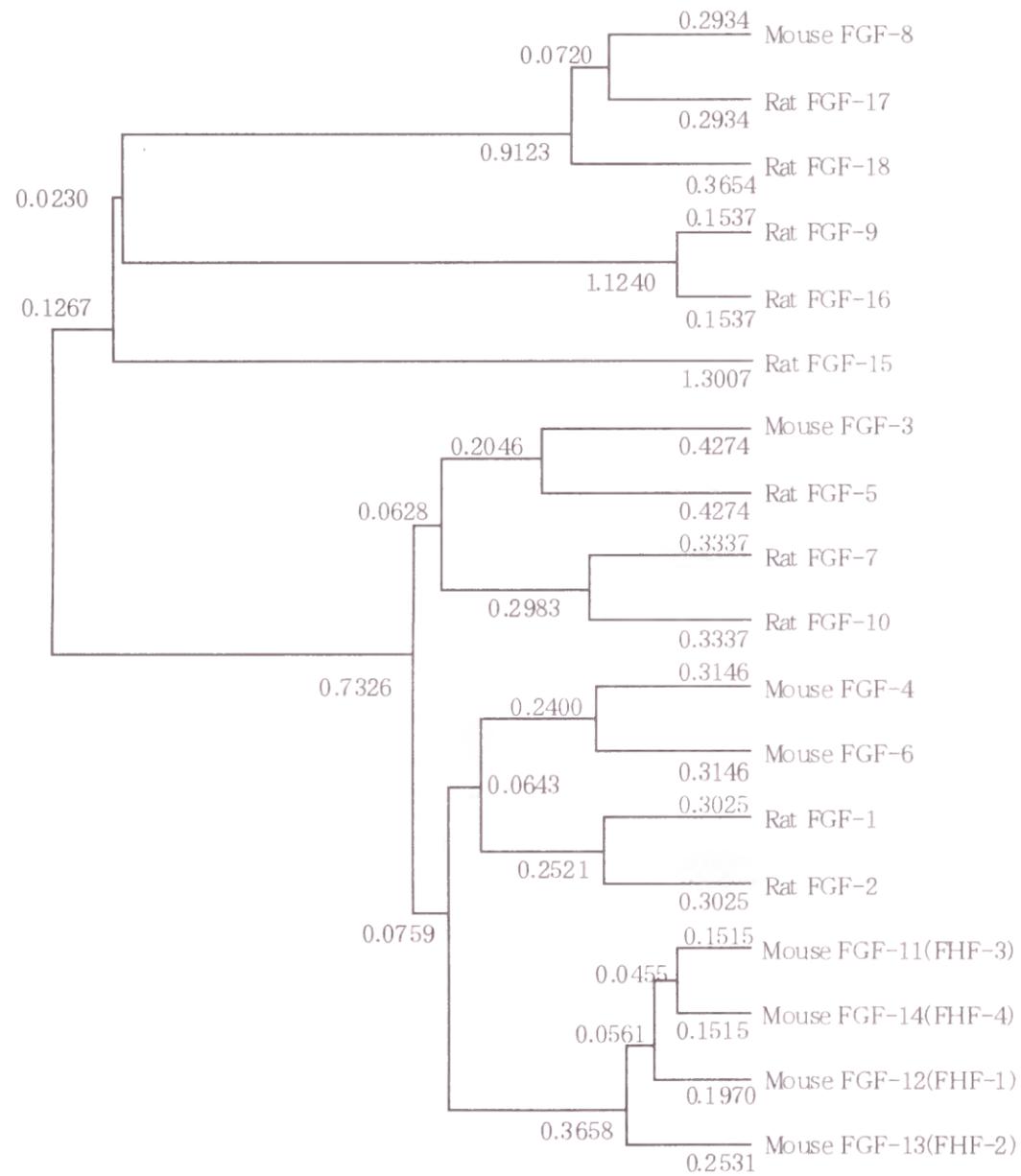


Figure 1-1. FGF family

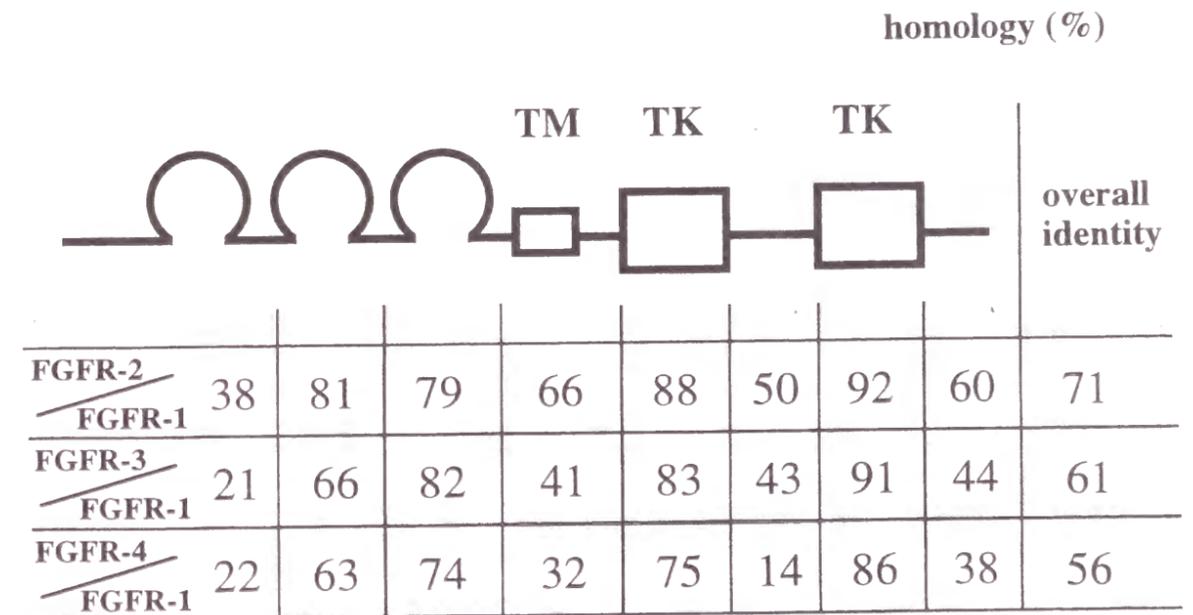


Figure 1-2. Structures of FGFR-1~FGFR-4

## 第一章 FGF-5の生後の脳内発現に関する研究

近年、FGFは増殖因子のみならず、中枢神経系の分化因子、栄養因子として注目されている。中でも特に、脳神経系に対する作用の研究が進んでいるのはaFGF、bFGFであり、これらは神経細胞の初代培養系における生存促進作用、海馬神経細胞のグルタミン酸毒性に対する拮抗作用、神経切除した前脳基底野のコリン作動性神経細胞に対する回復促進作用などを示すことが報告されている(16, 17, 18, 33, 34)。しかしその他のFGFの脳内における生理的役割はほとんど明らかになっていない。そこで、FGF familyの脳内における役割を解明するためには、まず初めにFGFの脳内における発現分布を調べることに重要であると考えた。そこで著者が研究していた当時報告されていたaFGFからFGF-10までの10種類のcDNAをクローニングし、ISHにより成体の脳及び生後の脳発達過程におけるFGF mRNAの発現領域、発現細胞の同定を行った。その結果、成体の脳においては、aFGF、bFGF、FGF-5、FGF-9、FGF-10 mRNAがそれぞれ特異的な領域で発現していた。又、ほとんどのFGFは生後間もなくから成体まで成体での発現領域と同じ領域で持続的に発現していたが、FGF-5 mRNAにおいてのみ生後の脳発達過程において小脳皮質で一過性に発現していた。そして4種類のFGFレセプターについても同様に調べたところ、FGFR-4 mRNAのみがFGF-5 mRNAの一過性に発現するのと同じ時期に小脳皮質で一過性に発現していたことから、FGF-5とFGFR-4の相互作用についても検討を行った。

### 実験結果

#### 第1節 成体ラット脳内におけるFGF mRNAの発現

FGF family mRNA の脳内での発現について調べるために、ラットのaFGF～FGF-10の10種類のcDNAを単離し、ラット脳のcoronal sectionを用いて、ISHを行った。

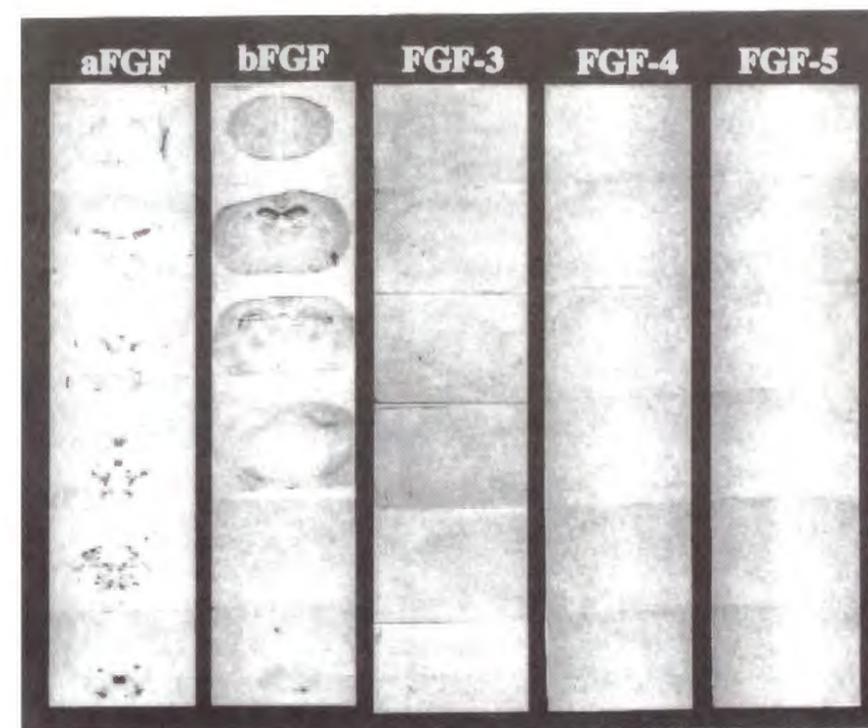


Figure 2-1. Localization of aFGF~FGF-10 mRNAs in consecutive coronal sections of the rat brain. Coronal sections were hybridized with a <sup>35</sup>S-labeled antisense RNA probe for each mRNA, and exposed to X-ray film for 10 days. Cx, cerebral cortex; Th, thalamus; Hy, hypothalamus; Hi, hippocampus; Md, midbrain; Cb, cerebellum; Bs, brainstem. Scale bar = 1cm.

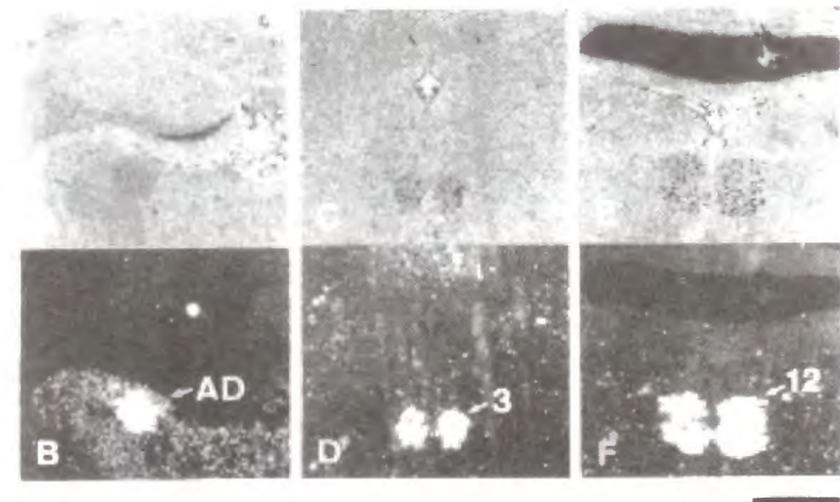
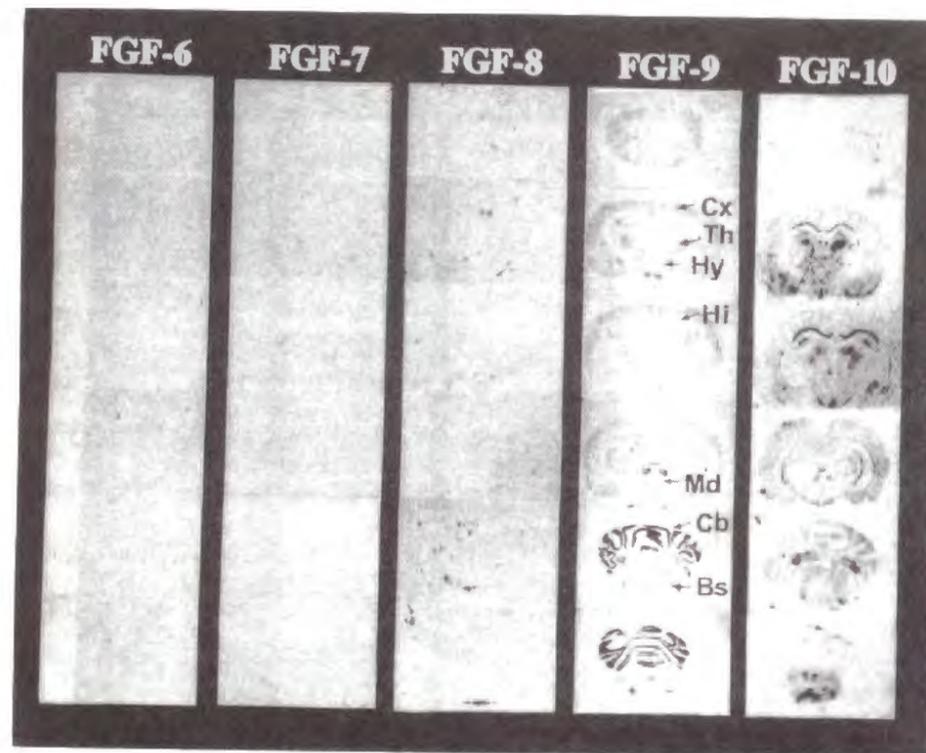


Figure 2-2. Localization of aFGF mRNA in the rat brain. Bright-field (A, C, E) and dark-field (B, D, F) photomicro-graphs. Coronal sections labeled with a <sup>35</sup>S-labeled aFGF antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. AD, anterodorsal thalamic nucleus; 3, oculomotor nucleus; 12, hypoglossal nucleus. Scale bar=1mm.

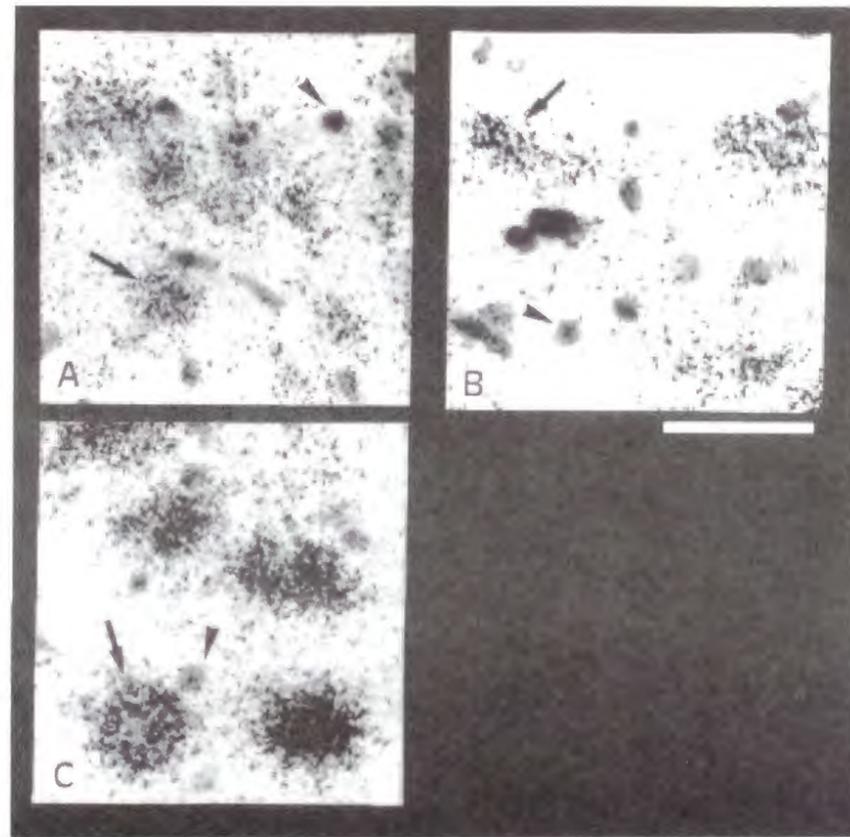


Figure 2-3. Cellular localization of aFGF mRNA in the anterodorsal thalamic nucleus (A), oculomotor nucleus (B) and hypoglossal nucleus (C). Bright-field photomicrographs. Coronal sections labeled with a  $^{35}\text{S}$ -labeled aFGF antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Black grains in the photomicrographs show the localization of aFGF mRNA. Arrows and arrowheads indicate neurons and glial cells, respectively. Scale bar =  $40\ \mu\text{m}$ .

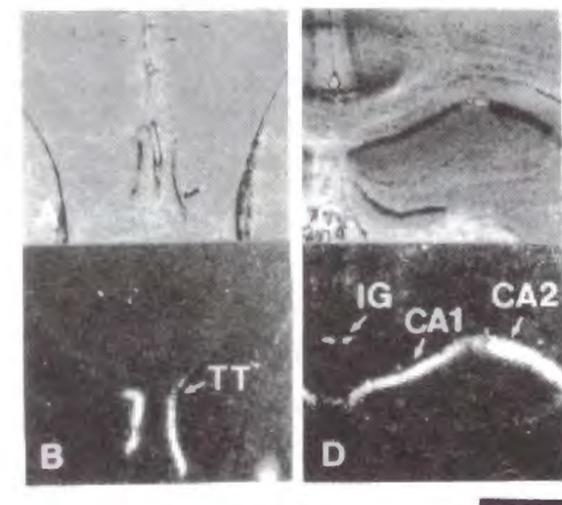


Figure 2-4. Localization of bFGF mRNA in the rat brain. Bright-field (A, C) and dark-field (B, D) photomicrographs. Coronal sections labeled with a  $^{35}\text{S}$ -labeled aFGF antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. TT, tenia tecta; IG, indusium griseum; CA1 and CA2, CA1 and CA2 fields of the hippocampus; Scale bar = 1mm.

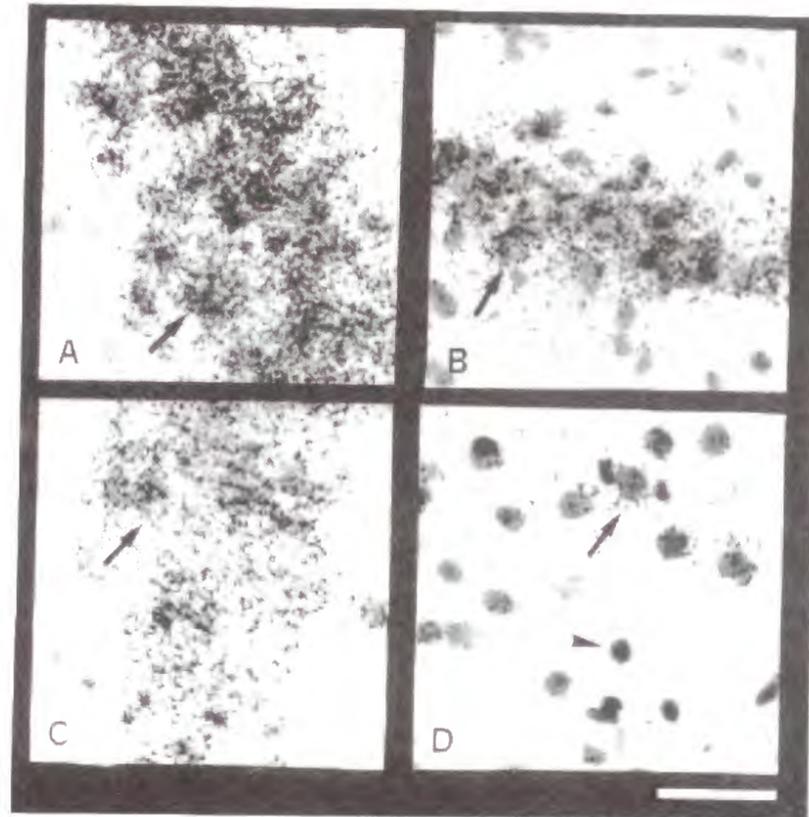


Figure 2-5. Cellular localization of bFGF mRNA in the tenia tecta (A), indusium griseum (B), CA1 region of the hippocampus (C) and cerebral cortex (D). Coronal sections labeled with a  $^{35}\text{S}$ -labeled bFGF antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Black grains in the photomicrographs show the localization of bFGF mRNA. Arrows and arrowheads indicate neurons and glial cells, respectively. Scale bar =  $40\ \mu\text{m}$ .

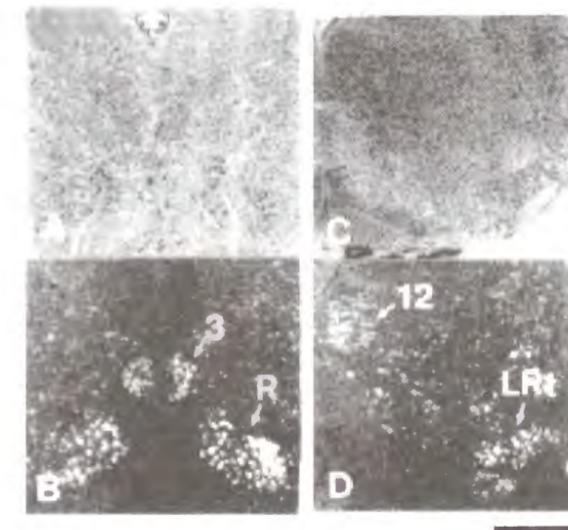


Figure 2-6. Localization of FGF-9 mRNA in the rat brain. Bright-field (A, C) and dark-field (B, D) photomicrographs. Coronal sections labeled with a  $^{35}\text{S}$ -labeled FGF-9 antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. 3, oculomotor nucleus; R, red nucleus; 12, hypoglossal nucleus; LRt, lateral reticular nucleus. Scale bar = 1mm.

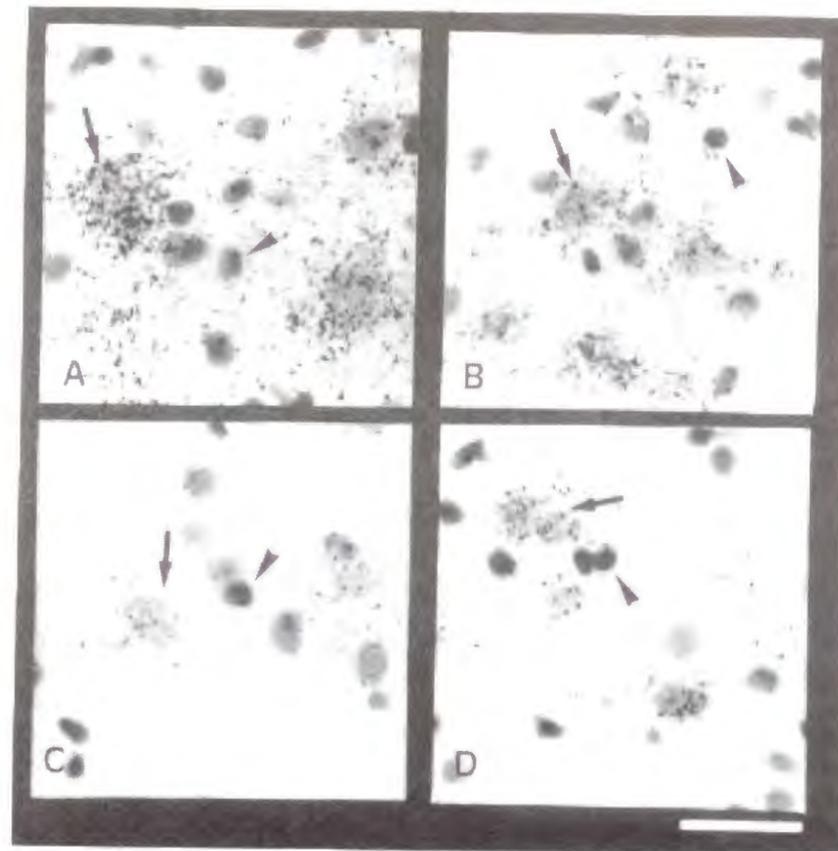


Figure 2-7. Cellular localization of FGF-9 mRNA in the red nucleus (A), lateral reticular nucleus (B), cerebral cortex (C) and thalamus (D). Bright-field photomicrographs. Coronal sections labeled with a  $^{35}\text{S}$ -labeled FGF-9 antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Black grains in the photomicrographs show the localization of FGF-9 mRNA. Arrows and arrowheads indicate neurons and glial cells, respectively. Scale bar =  $40\ \mu\text{m}$ .

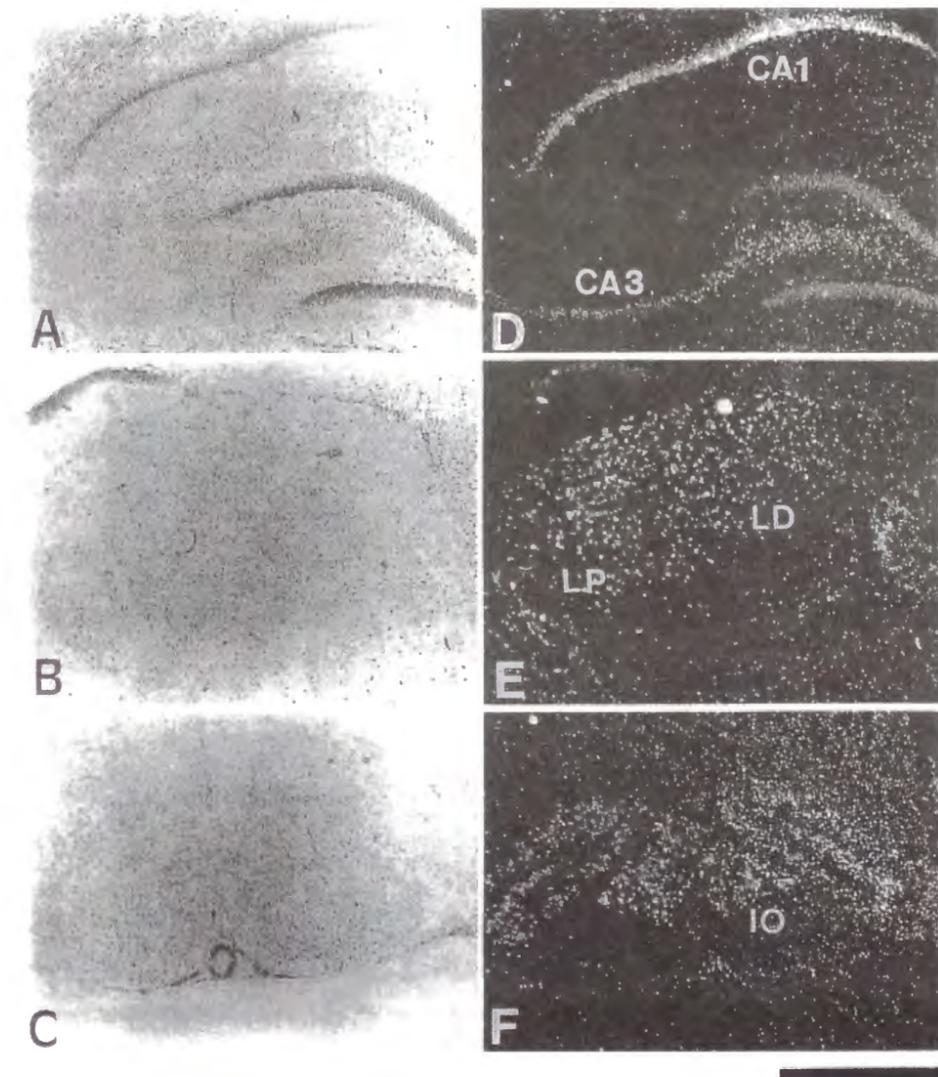


Figure 2-8. Localization of FGF-10 mRNA in the rat brain. Bright-field (A, B, C) and dark-field (D, E, F) photomicrographs. Coronal sections labeled with a  $^{35}\text{S}$ -labeled FGF-10 antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. CA1 and CA3, CA1 and CA3 fields of the hippocampus; LD, laterodorsal thalamic nucleus; LP, lateral posterior thalamic nucleus; IO, inferior olive. Scale bar =  $1\text{mm}$ .

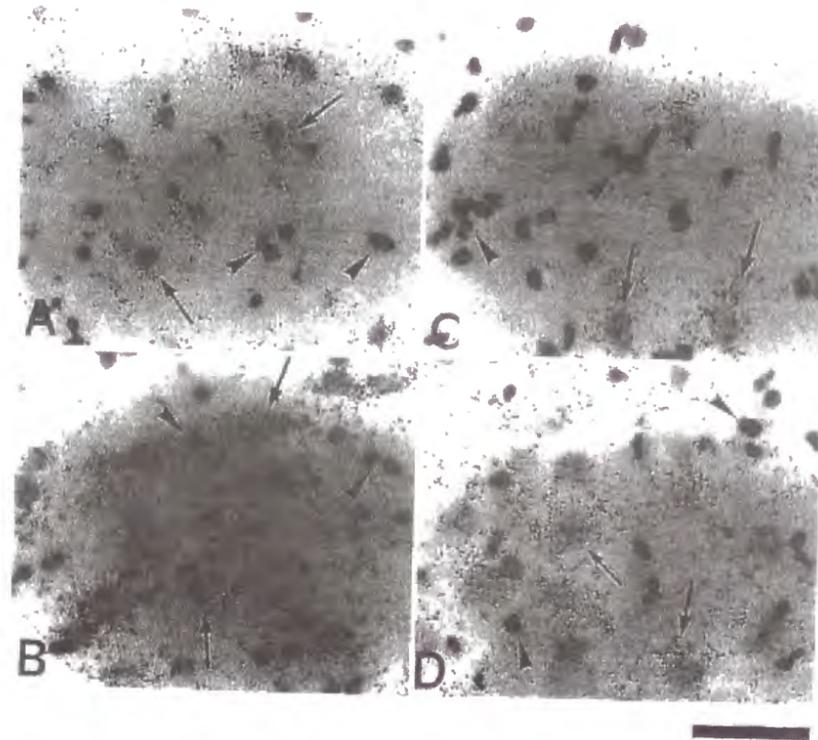


Figure 2-9. Cellular localization of FGF-10 mRNA in the laterodorsal thalamic nucleus (A), the dorsal motor nucleus of the vagus (B), the inferior olive (C) and the locus coeruleus (D). Bright-field photomicrographs. Coronal sections labeled with a  $^{35}\text{S}$ -labeled FGF-10 antisense RNA probe were dipped in liquid emulsion, and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Arrows and arrowheads indicate neurons and glial cells, respectively. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

#### aFGF mRNA

aFGF mRNAの中程度あるいは強度の発現は、視床では様々な視床核に、中脳では黒質、動眼神経核などの神経核に、脳幹では舌下神経核、三叉神経核などの神経核に、小脳では小脳核に認められ、その発現は全て神経細胞で観察された (Fig. 2-1, 2-2, 2-3)。aFGF mRNAは他にも終脳、視床、視床下部、中脳などの特定の領域の神経細胞にも弱いながら発現していた。

#### bFGF mRNA

bFGF mRNAは脳全般にわたって弱く発現していた (Fig. 2-1)。特にbFGF mRNAは、海馬のCA1, CA2領域、Tenia tecta, Indusium griseumなどの限られた領域で強く発現していた (Fig. 2-4)。そしてこれらの領域での発現は、神経細胞で観察された (Fig. 2-5)。皮質の神経細胞でも弱いながらその発現が観察された。しかし、その他の領域でのbFGF mRNAの発現はグリア細胞に観察された。

#### FGF-5 mRNA

FGF-5 mRNAは海馬のCA1, CA2領域やTenia tecta, 視床, 大脳皮質において弱く発現していた (Fig. 2-1)。そしてその発現は神経細胞で観察された。

#### FGF-9 mRNA

FGF-9 mRNAは脳全般にわたって発現していた (Fig. 2-1)。特にFGF-9 mRNAの中程度あるいは強度の発現は、海馬ではCA2, CA3領域に、視床では様々な視床核に、中脳では動眼神経核、赤核などの神経核に、脳幹では舌下神経核、三叉神経核などの神経核に、小脳では小脳核、顆粒層などに認められ、その発現は全て神経細胞で観察された (Fig. 2-6, 2-7)。また皮質、視床の神経細胞でもFGF-9 mRNAの弱い発現が観察された。

FGF-10 mRNA

FGF-10 mRNAの中程度あるいは強度の発現は、海馬ではCA1、CA3領域に、視床では様々な視床核に、中脳では動眼神経核、赤核などの神経核に、脳幹では舌下神経核、オリープ核などの神経核に、小脳では小脳核に認められ、その発現は全て神経細胞で観察された(Fig. 2-1, 2-8, 2-9)。

FGF-3, 4, 6, 7, 8 mRNA

FGF-3, 4, 6, 7, 8 mRNAの発現は、脳では観察されなかった(Fig. 2-1)。

以上、脳内で発現しているaFGF、bFGF、FGF-5、FGF-9、FGF-10 mRNAの発現領域をまとめたものをTable 2-1に示す。

**Table 2-1.**  
**Localization of aFGF, bFGF, FGF-5, FGF-9, FGF-10 mRNAs in the rat brain**

Location	aFGF mRNA	bFGF mRNA	FGF-5 mRNA	FGF-9 mRNA	FGF-10 mRNA
<b>Hippocampus</b>					
tenia tecta		+			+
CA1 region		+	+		+
CA2 region		+		+	
CA3 region		+		+	
Indusium griseum		+	+		
<b>Epithalamus</b>					
Medial habenular nucleus					+
<b>Thalamus</b>					
Thalamic nucleus, Anterodorsal	++				+
Anteroventral	+			+	+
Anteromedial	+				+
Laterodorsal	+				+
Lateral posterior					+
Mediodorsal					+
Paraventricular	+				
Paratenial	+				
Ventrolateral					
Ventral posterolateral					
Ventral posteromedial					
Ventrromedial					
Centrolateral					
Central medial					
Gelatinosus					
<b>Hypothalamus</b>					
Ventromedial hypothalamic nucleus				+	
<b>Midbrain</b>					
Substantia nigra	++				
Peripeduncular nucleus	+				
Oculomotor nucleus	+				

Brain region	P2	P7	P11	P15	P49
Dorsal raphe nucleus	+	+	+	+	+
Pineal gland	+	+	+	+	+
Red nucleus	+	+	+	+	+
Mesencephalic trigeminal nucleus	+	+	+	+	+
Sensory root of the trigeminal nerve	+	+	+	+	+
<b>Brainstem</b>					
Dorsal motor nucleus of vagus	+	+	+	+	+
Inferior olive	+	+	+	+	+
Prepositus hypoglossal nucleus	+	+	+	+	+
Ambiguus nucleus	+	+	+	+	+
Locus coeruleus	+	+	+	+	+
Motor trigeminal nucleus	+	+	+	+	+
Facial nucleus	+	+	+	+	+
Parabrachial nucleus, lateral	+	+	+	+	+
medial	+	+	+	+	+
Pontine nucleus	+	+	+	+	+
Reticulotegmental nucleus of the pons	+	+	+	+	+
Ventrolateral tegmental nucleus	+	+	+	+	+
Vestibular nucleus, Medial	+	+	+	+	+
Spinal	+	+	+	+	+
Reticular nucleus, Gigantocellular	+	+	+	+	+
Lateral	+	+	+	+	+
Intermediate	+	+	+	+	+
Spinal trigeminal nucleus, Oral part	+	+	+	+	+
Dorsomedial	+	+	+	+	+
Hypoglossal nucleus	+	+	+	+	+
Cuneate nucleus	+	+	+	+	+
<b>Cerebellum</b>					
Cerebellar nucleus, Medial	+	+	+	+	+
Interposed	+	+	+	+	+
Lateral	+	+	+	+	+
<b>Granular cell layer</b>					

Relative intensity of labeling was determined by the number of the grains for each region. Each area was grouped into one of three categories (strong, + + +; moderate, + +; week, +).

## 第二節 生後の脳発達過程におけるFGF mRNAの発現

生後の脳発達過程における10種類のFGF mRNAの発現分布を調べるため、生後2日、7日、11日、15日、49日齢のラット脳を用いてISHにより検討を行った。その結果、ほとんどのFGFにおいてすでに生後2日目から成体での発現分布と同様の分布を示しており、その発現は成体まで持続していた。しかし、FGF-5 mRNAにおいては成体で発現が認められた海馬、視床では生後間もなくから持続的に成体までその発現が認められたが、それ以外に小脳において一過性の強い発現が見られた。FGF-5 mRNAは、生後間もなくから小脳皮質で弱い発現が見られ、生後11日目において最も強い発現が観察された。しかしその後FGF-5 mRNAの発現は弱まり、生後49日目ではその発現は認められなかった(Fig. 2-10A)。又、FGFレセプターについても同様に調べたところFGFR-1からFGFR-3の3種類のmRNAは生後2日目から成体まで成体と同じ発現分布を示していたが、FGFR-4 mRNAにおいてはFGF-5 mRNAが一過性に発現するのと同じ時期に小脳皮質で一過性に発現しているのが確認された(Fig. 2-10B)。

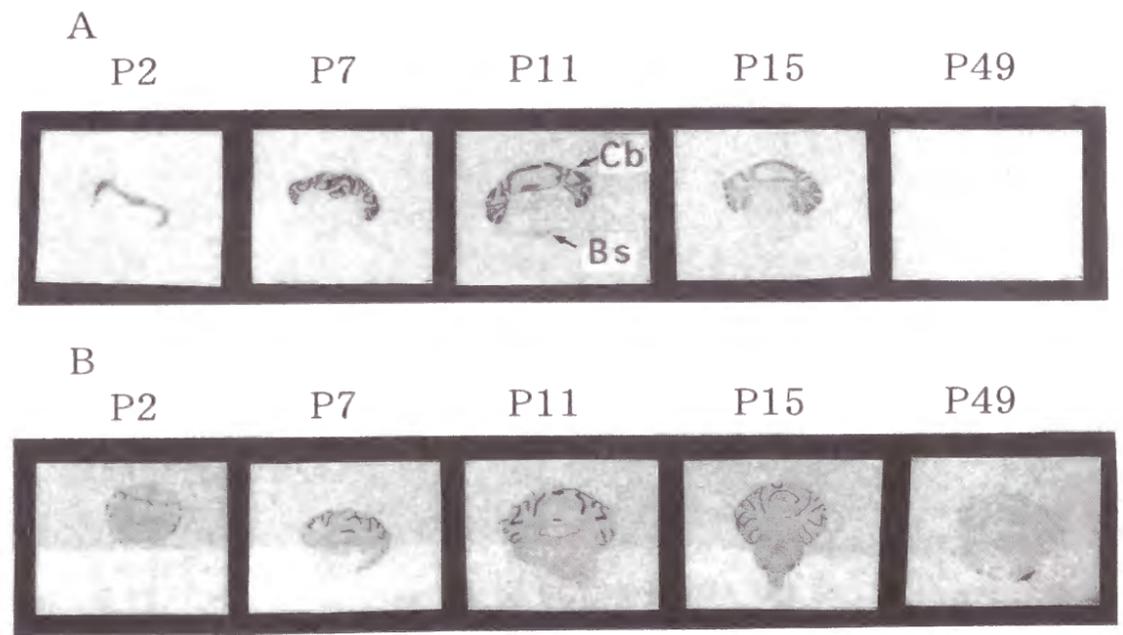


Figure 2-10. Localization of FGF-5 (A) and FGFR-4 (B) mRNAs in coronal sections of the rat cerebellum at different stages of post-natal development (P2, P7, P11, P15 and Adult). Coronal sections of the rat cerebellum were hybridized with <sup>35</sup>S-labeled FGF-5 or FGFR-4 antisense RNA probes and exposed to X-ray film. Cb, cerebellum; Bs, brainstem.

### 第三節 小脳におけるFGF-5とFGFR-4 mRNAの一過性の発現

第二節でFGF-5とFGFR-4 mRNAの強い発現が見られた生後11日目の小脳皮質を高倍率で検討したところ、FGF-5 mRNAは小脳皮質の内顆粒層の顆粒細胞の広い領域で、FGFR-4 mRNAは小脳皮質の外顆粒層の最外層にある増殖領域の顆粒細胞で発現していた (Fig. 2-11, 12)。

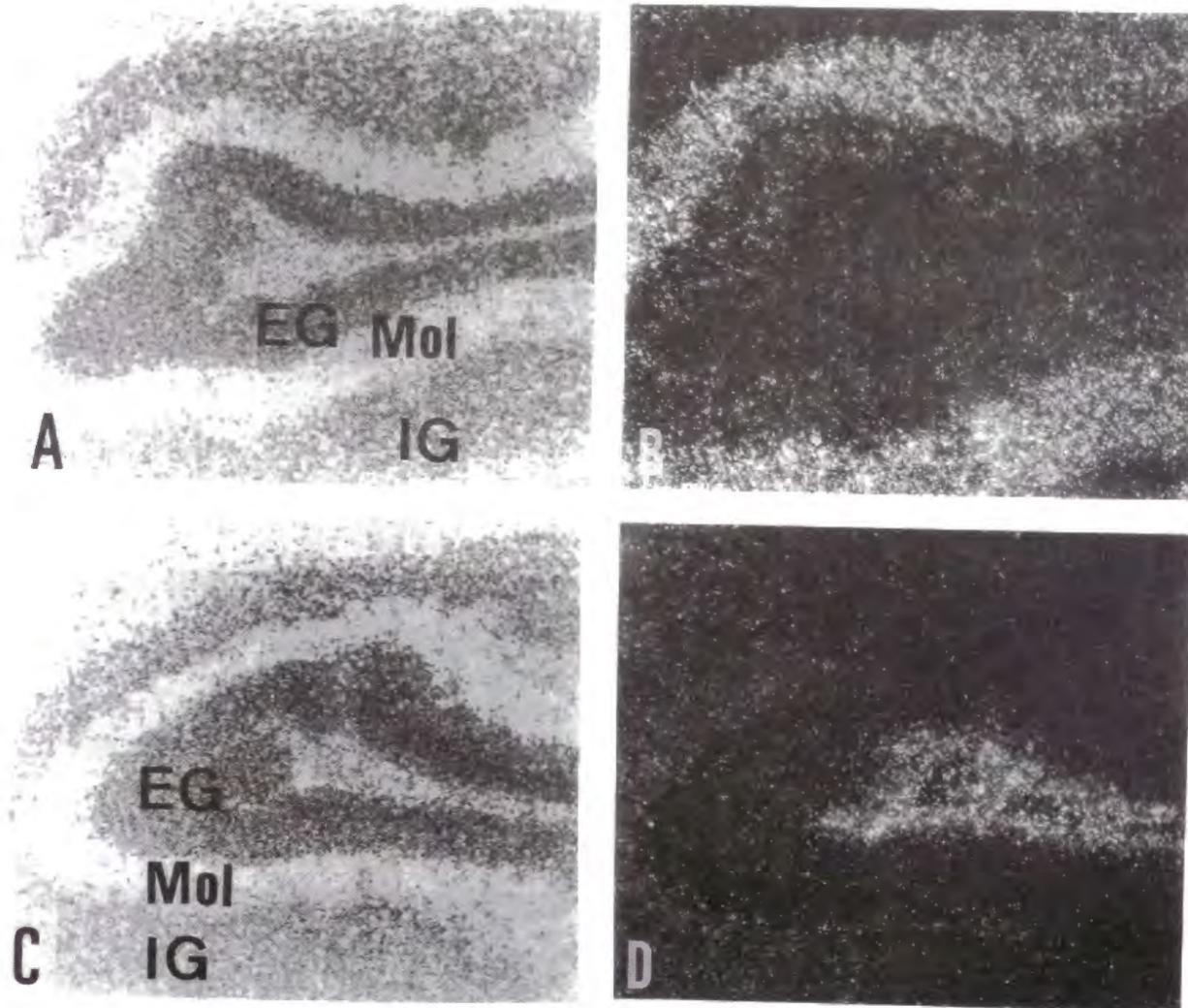


Figure 2-11. Localization of FGF-5 (A, B) and FGFR-4 (C, D) mRNAs in coronal sections of the rat cerebellum (P11). Coronal sections of the rat cerebellum were hybridized with  $^{35}\text{S}$ -labeled FGF-5 or FGFR-4 antisense RNA probes. The labeled sections were counterstained with Cresyl violet. Bright- (A, C) and dark- (B, D) field photomicrographs. White grains show localizations of FGFR-4 mRNA and FGF-5 mRNA, respectively. EG, external granule layer; Mol, molecular layer; IG, internal granule layer. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .

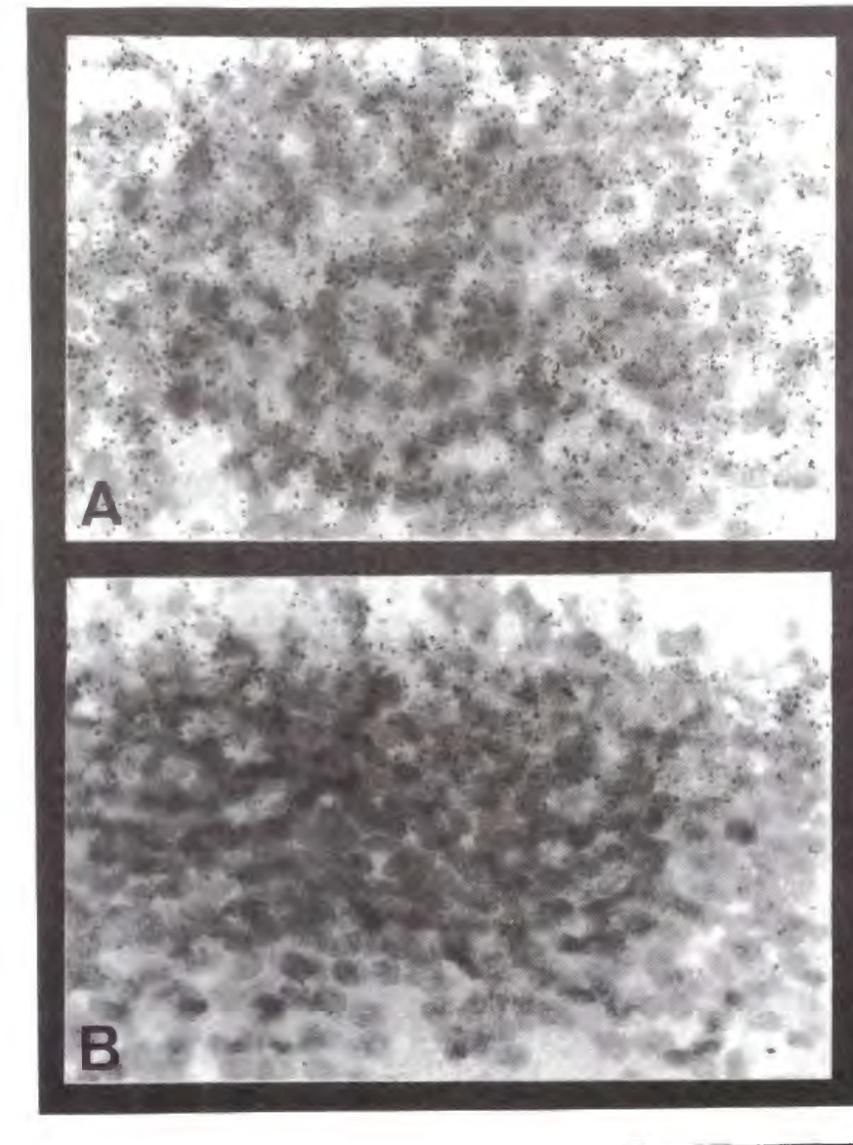


Figure 2-12. Cellular localization of FGF-5 mRNA (A) in the internal granule layer and FGFR-4 mRNA (B) in the external granule layer of the rat cerebellum (P11). Coronal sections of the rat cerebellum were hybridized with  $^{35}\text{S}$ -labeled FGF-5 or FGFR-4 antisense RNA probes. The labeled sections were counterstained with Cresyl violet. Black grains show the localization of FGF-5 (A) and FGFR-4 (B) mRNAs.

#### 第四節 FGF-5とFGFR-4の相互作用

FGFがその生理活性を示すためにはFGFレセプターとの結合が必要不可欠である。現在までにFGF-5はFGFR-1及びFGFR-2に結合し、FGFR-3には結合しないことが報告されている(35, 36)。しかしFGFR-4についてはFGF-5との結合性が明らかになっていないため、この一過性に発現するFGF-5がFGFR-4と結合できるのかどうかは不明である。そのためFGF-5、FGFR-4をそれぞれタンパク質として発現させ、FGF-5のFGFR-4に対する親和性を調べた。

FGF-5は大腸菌により作製しても生理活性を保持していることが報告されている(35)。そのためFGF-5を大腸菌を用いてGST融合タンパク質として発現させることを試みた。又、FGFR-4は細胞外ドメインをコードする領域のC末端に検出用のEpitope tag、精製用のHis tagを融合させた可溶性レセプターとしてバキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いて発現を行った(Fig. 2-13)。この系を用いた理由はプロモーターが強力なため哺乳細胞由来の培養細胞に比べ目的とするタンパク質を比較的大量に高次構造を維持したまま得ることが可能であるからである。

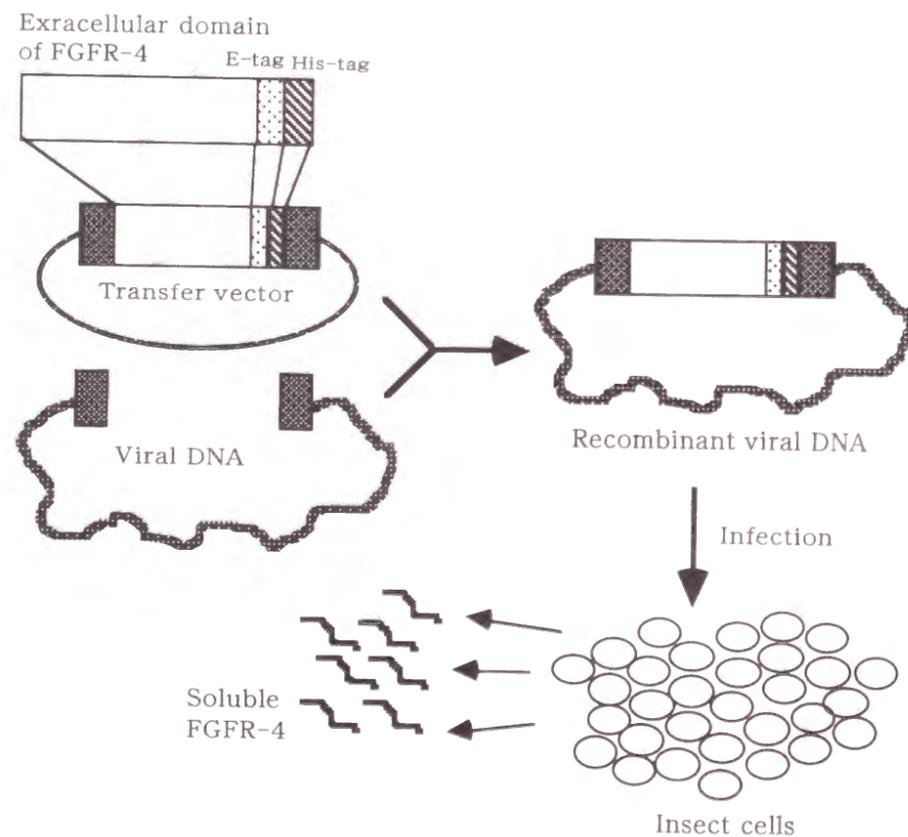


Figure 2-13. Baculovirus expression system

#### GST融合FGF-5の発現

大腸菌により発現させたGST融合FGF-5は、GSTに対して親和性のあるグルタチオンアフィニティーカラム及びFGFに親和性のあるヘパリンアフィニティーカラムで精製後、Superdex 75を用いてゲル濾過を行い、目的のサイズである53KDaのタンパク質を得た(Fig. 2-14 A)。そしてこのタンパク質がGST融合FGF-5であることをGST抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した(Fig. 2-14 B)。

#### 可溶性FGFR-4の発現

昆虫細胞で発現させた可溶性FGFR-4は、His tagを利用してNi-NTA アフィニティーカラムにより精製し、目的のサイズである56KDaのタンパク質を得た(Fig. 2-15 A)。そしてこのタンパク質が可溶性FGFR-4であることをE-tag 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した(Fig. 2-15 B)。

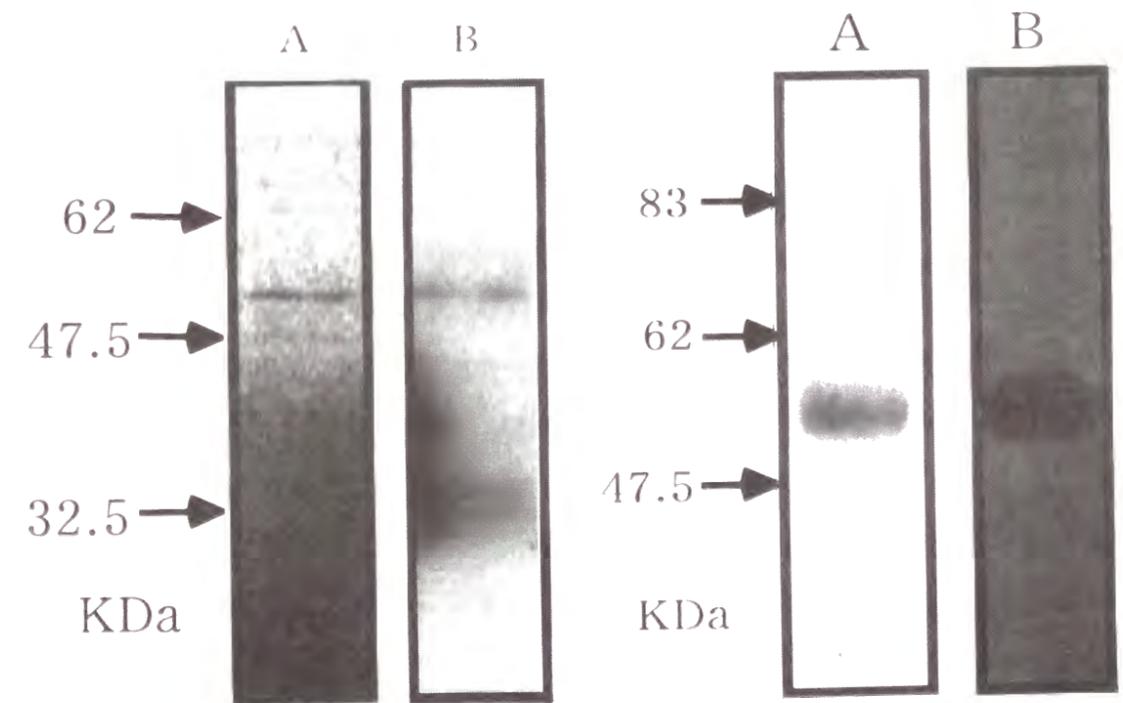


Figure 2-14. (A) Coomassie blue protein staining and (B) immunoblotting analysis to show the expression of the FGF-5 in *E. coli*.

Figure 2-15. (A) Coomassie blue protein staining and (B) immunoblotting analysis to show the expression of the soluble FGFR-4 in culture supernatant of High Five insect cells.

### BIA coreを用いたFGF-5とFGFR-4の反応速度定数の算出

得られたGST融合FGF-5、可溶性FGFR-4をBIAcoreを用いて反応速度定数の算出を行った。BIAcoreは表面プラズモン共鳴という光学現象を測定原理により生体分子間の相互作用をラベルなしでリアルタイムに測定することが可能な装置である。その結果、FGF-5はFGFR-4に対し解離速度平衡定数  $4.65 \times 10^{-8}$ (M)の親和性を示し、その結合速度定数は  $1.73 \times 10^{-2}$ (M)、解離速度定数は  $3.73 \times 10^{-5}$ (M)であった (Table 2-2)。又、コントロールとしてFGFR-4と高親和性を示すことが報告されているaFGFについてもFGFR-4との親和性を同様にして調べたところ(37)、aFGFはFGFR-4に対し解離速度平衡定数  $2.54 \times 10^{-8}$ (M)の親和性を示し、その結合速度定数は  $5.77 \times 10^{-3}$ (M)、解離速度定数は  $2.27 \times 10^{-5}$ (M)であった。この結果よりFGF-5はFGFR-4に対しaFGFの半分ほどの親和性を持っていることが判り、FGF-5はFGFR-4と結合できることが明らかになった。

	Association constant (M)	Dissociation constant (M)	Equilibrium dissociation constant (M)
aFGF	$2.27 \times 10^{-5}$	$5.77 \times 10^{-3}$	$2.54 \times 10^{-8}$
FGF-5	$3.73 \times 10^{-5}$	$1.73 \times 10^{-2}$	$4.65 \times 10^{-8}$

Table 2-2. Kinetics parameters and calculated equilibrium for FGFR-4.

### 考察

本研究で、著者は成体及び生後の脳発達過程におけるaFGFからFGF-10までの10種類の mRNAの発現領域、発現細胞について同定を行った。その結果、10種類のFGFの中ではaFGF、bFGF、FGF-5、FGF-9、FGF-10 mRNAが成体の脳で発現し、それぞれ特異的な発現パターンを示していた。そしてこれらの多くのものが神経細胞で発現していた。さらに当研究室でFGFレセプターについても同様に脳内発現領域・発現細胞を調べ、FGFR-1 mRNAは広い領域の神経細胞に、FGFR-2 mRNAは広い領域のオリゴデンドロサイトに、FGFR-3 mRNAは広い領域のアストロサイトに、FGFR-4 mRNAは内側網核の神経細胞にのみ発現していることを明らかにしている(30, 31, 32)。

脳内で発現している5種類のFGFの内、bFGF、FGF-5、FGF-9、FGF-10 mRNAが海馬で高発現しているが、海馬で発現しているレセプターはFGFR-1 mRNAだけである。海馬においてはこれらFGFの作用はFGFR-1を介して行われるものと考えられる。さらに脳内の神経細胞に発現しているFGFレセプターは主にFGFR-1 mRNAであることから、FGFの神経細胞に対する作用はFGFR-1を介するものと考えられる。又、グリア細胞のオリゴデンドロサイト、アストロサイトではそれぞれFGFR-2、FGFR-3 mRNAが発現していることから、FGFのこれらのグリア細胞に対する作用は両受容体を介するものと考えられた。

さらに著者は生後の脳発達過程において、FGF-5 mRNAのみが成体での発現領域とは別に小脳皮質の内顆粒層の顆粒細胞で一過性に高発現していることを明らかにした。又、FGFレセプターについても同様に調べたところ、FGF-5 mRNAが高発現するのと同じ時期にFGFR-4 mRNAのみが小脳皮質の外顆粒層の最外層の増殖領域の顆粒細胞で高発現しており、さらにFGF-5とFGFR-4の結合性を検討した結果、FGF-5がFGFR-4と結合できることを示した。

小脳皮質の顆粒細胞は生後直後では小脳皮質の表面に存在し、活発に増殖して外顆粒層を形成する。そして生後7日目頃から分化が起こり、平行繊維を出しながら外顆粒層からプルキンエ細胞層下に移動し内顆粒層を形成する。この顆粒細胞の増殖と移動は生後11日目にピークを迎え、平行繊維は分子層としてプルキンエ細胞層上に残る。そして、生後21日目には外顆粒層は完全に消失し、小脳の形態形成が完成すると報告されている(38)。この小脳皮質の顆粒細胞の増殖と移動の盛んな

## 第1章 実験方法

### 第一節の実験

#### [1] ラット組織中からのRNAの調製

RNAは、wistarラットの様々な組織よりguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform抽出法によって単離した(43)。Poly (A)<sup>+</sup>は、oligo (dT)セルロース (Collaborative Reserch Inc. Type 2)を用いて調製した。

#### [2] ラットaFGF~FGF-10 cDNAの単離

ラット胎児、腎臓のcDNAは、それぞれ5 $\mu$ gのPoly (A)<sup>+</sup>を300 unitのMoloney murine leukemia virus由来の逆転写酵素 (GIBCO-BRL)、15 unitのhuman胎盤由来のRNase inhibitor (Wako Pure Chemicals, Japan) 及び0.5 $\mu$ gの6塩基からなるランダムプライマーを含む反応液中に加え、37 $^{\circ}$ C、60分間反応を行い合成した。aFGF 及びbFGF cDNA(508, 442 bp) は報告されている配列を元に特異的なプライマーを作製し(aFGF, CATCGACAGTTGCTGCTGAG, GCACCCAGAACAACACTCC-TTAGTC; bFGF, GCAGCATCACTTCGCTTCCC, GACATTGGAAGAAACA-GTAT)、ラット胎児cDNAからPCR増幅した (44, 45)。FGF-9 cDNA(396bp)は報告されている配列を元に特異的なプライマー(GCAGCTGTACTGCAGGACTG, TTGTCAGGGTCCACTGGTCT)を作製し、ラット腎臓からPCR増幅した(9)。FGF-10 cDNA(750bp)は報告されている配列を元に特異的なプライマー(CTTCAAGTA-TGTTCTTCTG, GGCAAAGAGTCATTGGTTGT) を作製し、ラット胎児 cDNAからPCR増幅した(10)。ラットFGF-3 cDNA (289bp)はマウスとヒトのアミノ酸配列の相同性が高い領域 (YLAMNK, DHEMVR)から縮重プライマーを作製し、ラット胎児 cDNAからPCR増幅した(46, 47)。FGF-7 cDNA(625bp)はFGF-7に特異的なプライマー(CCAGAATCAGTTCTTTGAAGTT)とオリゴdT-アダプター(GCGAGCTCAAGCTTTTTT)を用いて5' RACE法によりラット胎児cDNAから増幅した(48, 49)。FGF-8 cDNA(487bp)は、マウスとヒトのFGF-8のアミノ酸配列で相同性が高い領域から FGF-8 プライマー (AGCATGTGAGGGAGCAGAG, TAGTT-GAGGAACTCGAAGCG)を作製し、ラット胎児 cDNAからPCR増幅した(8, 50)。それらのcDNA断片は、pGEM-T DNA vector (Promega Co.)にクローン化した。ラット FGF-4, FGF-5, FGF-6 cDNA (328, 352, 346 bp)は、報告されて

時期である生後11日目にFGF-5及びFGFR-4 mRNAがそれぞれ内顆粒層、外顆粒層の顆粒細胞で一過性に発現し、さらにFGF-5はFGFR-4に結合できることから、内顆粒層の顆粒細胞で発現したFGF-5が外顆粒層の顆粒細胞で発現しているFGFR-4に作用し、小脳の分化に関与しているのではないかと考えられる。

生後の脳発達過程の小脳皮質における他のFGF mRNAの発現については、FGF-5 mRNA以外にもFGF-9 mRNAが小脳の顆粒細胞で発現している。しかしFGF-9 mRNAは生後の脳発達過程にわたって著しい発現の変化を示さず、さらにFGF-9はFGFR-4に結合しないことが報告されていることから(39)、FGF-9はFGFR-4を介する小脳の分化には関係していないのではないかと考えられる。さらに最近同定されたFGF-11~14 mRNAについては、脳で発現していることが報告されているが、詳しい発現領域、発現細胞については不明である(11)。

FGFによるFGFR-1、-2、-3の活性化は、様々なタイプの細胞の増殖を誘導するが、FGFR-4を介する細胞増殖の報告は現在のところない。FGFR-4のシグナル伝達に関与している分子は他のFGFレセプターのものとは異なることが報告されている(40, 41)。又、FGFR-1あるいはFGFR-4を筋芽細胞に発現させた後、bFGFによりFGFR-1を活性化させると筋芽細胞の増殖及び分化が促進されるのに対し、FGFR-4を活性化させたときには筋芽細胞の分化が抑制されることも報告されている(42)。増殖領域の顆粒細胞は分化することによりその増殖性を失うことから、FGFR-4が筋芽細胞と同様に小脳の顆粒細胞に対しても同様な作用を示すのであれば、FGFR-4は増殖領域の顆粒細胞の分化を抑制し、増殖可能な状態を維持することにより増殖を促進し、小脳皮質の形態形成に関与しているのではないかと考えられる。

いたマウスのFGF-4(51), FGF-5 (52), FGF-6 (53)のアミノ酸配列の相同性が高い領域( VGIGF, THFLP )から縮重プライマーを作製し、ラット胎児 cDNAからPCR増幅し、得られたcDNA断片をpGEM-3Zf+にクローン化した。得られたクローンの塩基配列はdideoxy法(54)により解析した。

### [3] aFGF~FGF-10のRNAプローブの調製

<sup>35</sup>S標識RNAプローブは、クローン化したDNAより [ $\alpha^{35}$ S] UTP (Boehringer Mannheim)の存在下でT7 RNA Polymerase、T3 RNA PolymeraseあるいはSP6RNA Polymeraseにより合成した。これらのRNAプローブは、アルカリにより200 basesまで分解した。

### [4] ISH

8週齢の雄のwistar ラットより脳を摘出しすぐさま粉末ドライアイスにより凍結させた。クリオスタットにより厚さ16  $\mu$ mの連続切片を作製し、poly-L-lysineでコートしたスライドガラス上に張り付けた。組織切片の前処理として4% formaldehyde/PBS (pH 7.5)にて15分間固定を行い、PBSで3分間洗浄した。次に1  $\mu$ g/ml proteinase K処理を、37°Cで10分を行い、再びPBSで洗浄後0.25%酢酸を含む0.1M triethanolamine/0.9% NaClで10分間処理した。最後にアルコール系列による脱水とchloroformによる脱脂を行い、前処理を終了した。プレハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーションバッファー(50% formamide, 4 $\times$ SSC (1 $\times$ SSC : 0.15M NaCl/0.015M sodium citrate, pH 7.0), 2.5 $\times$ Denhardt's solution (0.05% polyvinylpyrrolidone, 0.05% bovine albumin, 0.05% Ficoll), 5mM EDTA, pH 8.0, 500  $\mu$ g/ml yeast tRNA, 500  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA及び20mM dithiothreitol)にて、55°Cで1時間行った。プレハイブリダイゼーションバッファーに最終濃度10%になるようにdextran sulfateを加えたものをハイブリダイゼーションバッファーとして用い、これに<sup>35</sup>Sで標識したRNAプローブを加えたものを切片にのせ、55°Cで18時間反応させた。ハイブリダイゼーション終了後2 $\times$ SSC/10mM 2-mercaptoethanolにて55°C10分間4回洗浄した。次に50  $\mu$ g/ml RNaseを含むRNase Aバッファー(0.5M NaCl, 10mM Tris/HCl及び1mM EDTA, pH 8.0)で37°Cで30分間反応を行い、50% formamide/2 $\times$ SSC/10mM 2-mercaptoethanolにて55°C10分間2回洗浄した。その後アルコール系列による脱水

を行い、室温にて乾燥させた。マイクロオートラジオグラフィーは、マイクロオートラジオグラフィー終了後切片にて水で1:1に希釈した乳剤 (NTB-3, Eastmann Kodak)を塗布し、3週間露光後D-19にて現像することにより行った。マイクロオートラジオグラフィーを行った切片は、対比染色としてクレシルバイオレットにより染色を行った。

## 第二・三節の実験

### [1] FGFR-4 cDNAのクローニング

ラットFGFR-4 cDNAは、FGFR-1~4までの4種類のレセプターでアミノ酸配列の相同性が高い領域 (EDAGEY, EMEMMK) から縮重プライマーを作成し(21, 22, 23, 24, 25, 26, 27)、Homology-based PCR法により、M13 DNA vectorにクローニングした。得られたクローンの塩基配列はdideoxy法(54)により解析した。

### [2] FGF 及びFGFレセプターのRNAプローブの調製

第一節の実験方法 [3] に準じて行った。

### [3] ISH

Wistar ラットの雄 (2日、7日、11日、15日、49日齢)の脳を用いた。以下第一節の実験方法 [4] に同じ。

## 第四節の実験

### [1] 大腸菌を用いたFGF-5タンパク質の発現及び精製

シグナル配列であるN末端から20番目までのアミノ酸残基を除いたラットFGF-5 cDNAを CGCCTCGAGCATCATCCGAAGCGAA, CGCCTCGAGTCATCTGTA-AATTTGGCTTの2種類のプライマーを用いてラット生後11日齢の小脳 cDNAからPCR増幅し、大腸菌発現ベクターであるpGEX-4T-1 DNA (Pharmacia Biotech)にクローニングした。この組み換えベクターを大腸菌にトランスフェクトした後、tacプロモーターの誘導物質であるIPTGを用いてGST融合FGF-5タンパク質を大腸菌に発現誘導させた。そして大腸菌を可溶化後、Glutathione Sepharose 4B affinity column (Pharmacia Biotech)、Heparin Sepharose affinity column (Pharmacia Biotech)を用いて精製を行い、さらにSuperdex 75 (Pharmacia Biotech)を用い

てゲルろ過を行った。

## [2] 昆虫細胞を用いた可溶性FGFR-4タンパク質の発現及び精製

FGFR-4の細胞外ドメインをコードするcDNAは、生後11日齢のラット小脳のcDNAを鋳型として0.05 unit/ $\mu$ lのEx Taq DNA polymerase (Takara, Japan)と0.4pmol/ $\mu$ lのセンスプライマー(CCGGAATTCACCATGTGGCTGCTGTTGGCT)とアンチセンスプライマー(CCATGCGGCCGCCTCCGATGTTGCTGTTGT)を含む反応液中でPCR増幅した。細胞外ドメインをコードするFGFR-4 cDNAにEpitope tag (GAPVPYPDPLEPR)及び6×His tag (HHHHHH)をコードする75bpのDNA断片を結合させた可溶性FGFR-4 cDNAを、トランスファーベクターであるpBac PAK9 (Clontech)に組み込んだ。次にこの組み換えトランスファーベクターとBsu36で消化された発現ベクターであるpBac PAK6 (Clontech)とを、Sf9細胞にコトランスフェクションし、組み換えバキュロウイルスを作製した。可溶性FGFR-4は、組み換えウイルスをEX-CELL 400 昆虫細胞用培地 (JRH BIOSCIENCES) 中でHigh fiveに感染させ、27°Cで72時間培養して発現させた。その後培養上清を回収し、一晚PBSで透析を行った。これにNaCl及びimidazoleをそれぞれ最終濃度0.5M及び20mMになるように加え、His tagに親和性を有するNi-NTAカラム(QIAGEN)を用いて可溶性FGFR-4を精製した。

## [3] SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

精製した可溶性FGFR-4及びGST融合FGF-5を還元下SDS-polyacrylamide gel (8%)を用いた電気泳動により分離した。泳動後のゲルはクルマシーブリリアントブルーR-250 (和光純薬)で染色した。

## [4] Western blotting

精製した可溶性FGFR-4及びGST融合FGF-5を還元下SDS-polyacrylamide gel (8%)を用いた電気泳動により分離し、ニトロセルロース膜(Hybond-ECL, Amersham)に転写した。次にこのニトロセルロース膜を0.1% Tween 20と5% nonfat dry milkを含むPBSを用いてblockingを行い、可溶性FGFR-4を転写した膜にはE-tag抗体 (Pharmacia Biotech)を、GST融合FGF-5を転写した膜にはGST抗体 (Pharmacia Biotech)をそれぞれPBSで1/500倍希釈し、室温で1時間反応させた。

PBS-Tで洗浄後、E-tag抗体を反応させた膜にはhorseradish peroxidaseを結合させたgoat anti-rabbit IgG (Cappel)を、GST抗体を反応させた膜にはhorseradish peroxidaseを結合させたrabbit anti-goat IgG (Southern Biotechnology Associates, Inc)をそれぞれPBSで1/2000倍希釈し、室温で一時間反応させた。そしてこの膜をPBS-Tで4回洗浄し、chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (ECL, Amersham)を反応させた。発光反応は、X線フィルム(RX Medical, Fuji Film Co.)に露光し可視化した。

## [5] BIAcoreによる反応速度定数の測定

可溶性FGFR-4のC末端に付加した6×His-tagを介して、Ni-NTAセンサーチップ (Pharmacia Biotech)に固相化し、アナライトとしてaFGF (Amgene)あるいはGST融合FGF-5を用いて反応速度定数を測定した。

## 第二章 FGF-5の欠失型アイソフォームに関する研究

FGF-5はシグナル配列をもった分泌型タンパク質であり、その発現は胎児期全般にわたって見られ、成体では中枢神経系において弱く発現している(5, 55)。又、FGF-5の作用として、胎児期における分化作用、運動神経に対する栄養因子、hair growth cycleのレギュレーターなどが現在までに報告されている(56, 57, 58)。著者はFGF-5 cDNAを胎児 cDNAから縮重プライマーを用いてHomology based PCR法により単離する際に、FGF-5とは構造の異なるcDNAを単離した。その構造を詳しく調べたところFGF-5の欠失型アイソフォームをコードしていることが明らかになった。第二章ではこの欠失型FGF-5の発現分布、生理作用についてFGF-5と比較しながら検討を行った。

### 実験結果

#### 第一節 欠失型FGF-5 cDNAの単離及び、欠失型FGF-5 mRNAの生成機構

##### 欠失型FGF-5 cDNAの単離及びFGF-5 cDNAとの構造比較

著者はFGF-5 cDNAを単離するためにFGF-4, 5, 6のアミノ酸配列の中で相同性の高い領域に縮重プライマーを作製し、FGF-5 cDNAの単離を試みた。その過程においてFGF-5とは構造の少し異なるcDNA断片を得た。このcDNA断片をもとに、RACE法によりそのコーディング領域の全塩基配列を調べた。その結果、FGF-5 cDNAは266個のアミノ酸残基をコードしているのに対し、このcDNAは121個のアミノ酸残基をコードしており、このcDNAのN末端から117個のアミノ酸残基をコードする塩基配列は、FGF-5と同じであった (Fig. 3-1)。このことからこのcDNAは、FGF-5のC末端を半分ほど欠失した欠失型FGF-5をコードしているものと考えられた。

```

FGF-5          1                               40
Truncated FGF-5 MSLSLLFLIFCSHLILSAPAQGEKRLTPEGQPAPPRNPGD
                  MSLSLLFLIFCSHLILSAPAQGEKRLTPEGQPAPPRNPGD

                  60                               80                               100
SSGSRGRSSATFASSSASSPVAASPGSQSGSEHSSFQWSPSGRRRTGSLYCRVGIGFHLQ
SSGSRGRSSATFASSSASSPVAASPGSQSGSEHSSFQWSPSGRRRTGSLYCRVGIGFHLQ

                  120                               140                               160
IYPDGKVNGSHEASVLSILEIFAVSQGIIVGIRGVFSNKFLAMSKKGLHASAKFTDDCKF
IYPDGKVNGSHEASVLSQIYR*

                  180                               200                               220
RERFQENSYNTYASAIHRTEKTGREWYVALNKRKGRGCSPRVKPQHVSTHFLPRFKQS

                  240                               260
EQPELSFTVTVPKPKPRPWKPKVPLSPSRRSPSPVKYRLKFRFG*
  
```

Figure 3-1. Amino acid sequences of rat FGF-5 and its truncated form. Numbers indicate amino acid positions of rat FGF-5 and its truncated form. Asterisk indicate the termination sites of translation.

##### FGF-5遺伝子の構造決定

欠失型FGF-5が生成する機構を調べるため、現在までに報告されているヒト FGF-5遺伝子の構造を参考にしてラットFGF-5遺伝子の構造について調べた(59)。その結果、ラットFGF-5遺伝子は、エキソン1からエキソン3の3つのエキソンにより構成されており、それぞれのイントロンの大きさは、6Kb、15Kbの大きさであった(Fig. 3-2)。そして、どちらのイントロンも、GT-AG ruleに従っていた。

```

                                Exon 1
FGF-5          Y P D G K V N G S H E A S V
FGF-5 gene    ---TACCGGATGGCAAAGTCAATGGATCCCACGAAGCCAGTGT
Truncated FGF-5 Y P D G K V N G S H E A S V

    117                               118
L S          I L E I F A V S Q
GTTAAgtaagttgc--- 6 kb ---gtcatcctagGTATTTTGAAATATTTGCTGTCTCAG
L S          - - - - -

                                Exon 2
G I V G I R G V F S N K F L A M S K K G K L
GGGATTTGTAAGAAACAGGAGTTTTTCAGCAACAAATTTTAGCGATGTCAAAAAAGGAAACT
- - - - -

    151                               152                               Exon 3
H A S          A K F T D D C K
CCATGCAAGTgtaagtagaa--- 15 kb ---ccacctctagGCCAAATTTACAGATGACTGTA
- - - - -          Q I Y R *

F R E R
AGTTCAGGGAGAGA---
  
```

Figure 3-2. Nucleotid sequences of exon/intron boundaries of the rat FGF-5 gene. Exon and intron sequences are indicated by capital letters and lower case letters, respectively. Numbers above amino acids indicate the positions of rat FGF-5 . An asterisk indicates a termination site of translation.

### 欠失型FGF-5 mRNAの生成機構

FGF-5 cDNA, 欠失型 FGF-5 cDNAをFGF-5遺伝子と比較したところ、FGF-5 mRNAがエクソン1~3の3つのエクソンにより構成されているのに対し、欠失型 FGF-5 mRNAは、エクソン1とエクソン3の2つのエクソンにより構成されていた (Fig. 3-3)。このことから欠失型 FGF-5 mRNAは、FGF-5遺伝子よりalternative splicingによって生成されるものと考えられた。そして欠失型 FGF-5 mRNAは、エクソン2を欠失していることからエクソン3 のreading frameがずれ、エクソン3 の5番目のアミノ酸に終始コドンが生じる。その結果、本来114個のアミノ酸をコードしているエクソン3は、4個のアミノ酸だけをコードすることになり、欠失型 FGF-5 mRNAは、FGF-5の半分ほどの大きさのタンパクをコードしていた。

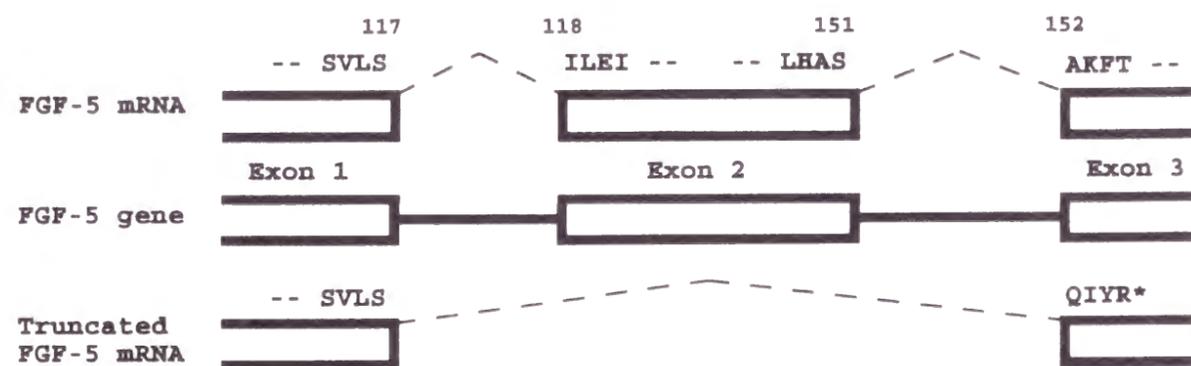


Figure 3-3. Schematic representation of the mechanism of the rat FGF-5 variant mRNA generation. Open-boxes and black bars represent exons and introns, respectively. The corresponding amino acids are also indicated and numbered according to the sequence of rat FGF-5.

### 第二節 FGF-5と欠失型 FGF-5 mRNAの組織分布

FGF-5と欠失型FGF-5との共通配列であるエクソン1と3にそれぞれプライマーを作成し、様々な臓器のmRNAを用いてRT-PCR法によりFGF-5と欠失型 FGF-5 mRNAの発現を調べた。このプライマーを用いるとFGF-5と欠失型 FGF-5 cDNAはそれぞれ385bp、281bpのサイズで増幅される。FGF-5 及び欠失型 FGF-5 mRNAは共に胎児、成体の脳で発現していた (Fig. 3-4 A)。しかし、欠失型FGF-5 mRNAの発現量は、FGF-5 mRNAと比較すると少なかった。成体の筋、心、肺、肝、腎、腸には発現は見られなかった。又、 $\beta$ -Actin mRNAは使用した臓器において、同程度の発現(523bp)が見られた (Fig. 3-4 B)。

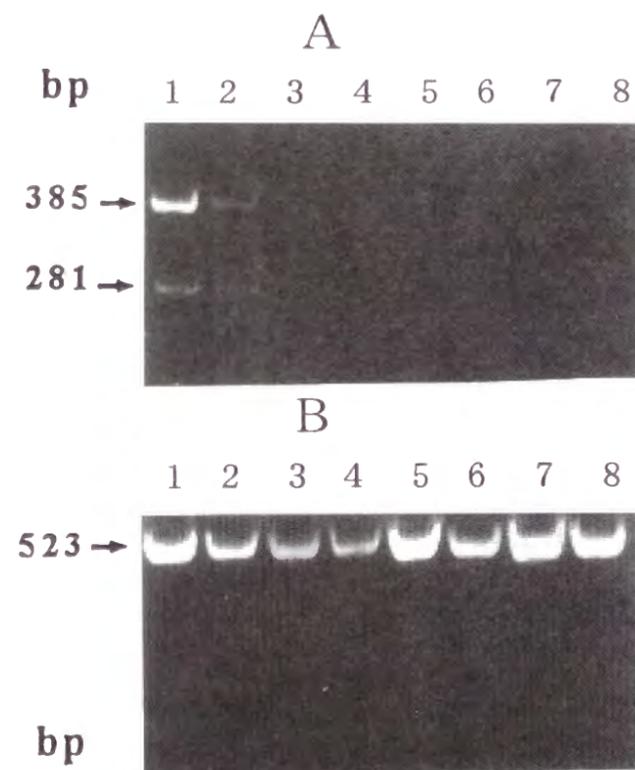


Figure 3-4. Expression of the rat FGF-5 mRNA and its variant (A) and the rat  $\beta$ -actin mRNA (B). cDNAs were synthesized from the rat embryo and adult tissue RNAs. The FGF-5 cDNA, its variant and the  $\beta$ -actin cDNA were amplified from the cDNAs by PCR. The amplified products were fractionated by electrophoresis on polyacrylamide gel (8%), and stained with ethidium bromide. 1 embryo; 2, brain; 3, muscle; 4, heart; 5, lung; 6, liver; 7, kidney; 8, small intestine.

### 第三節 欠失型FGF-5の生理活性

欠失型FGF-5がFGFレセプターに結合できるかどうかを調べるため、FGF-5に結合することが報告されているFGFR-1と欠失型FGF-5をタンパク質として発現させ、これらの親和性をFGF-5と比較し検討した。同様にFGFR-4に対する親和性も調べた。又、欠失型FGF-5のNIH3T3線維芽細胞に対する増殖活性も検討した。

#### GST融合欠失型FGF-5と可溶性FGFR-1の発現

欠失型FGF-5は、第一章で述べたようにFGF-5と同様に大腸菌を用いてGST融合タンパク質として発現させた。GST融合欠失型FGF-5はGST融合FGF-5と同様の方法により精製を行い、34KDaのサイズのタンパク質を得た(Fig. 3-5)。FGFR-1はFGFR-4と同様、バキュロウイルス昆虫細胞発現系を用い、FGFR-1の細胞外ドメインのC末端にEpitope tag、His tagを融合させた可溶性レセプターとして発現させた。可溶性FGFR-1は可溶性FGFR-4と同様の方法により精製を行い、60KDaのサイズのタンパク質を得た(Fig. 3-6)。

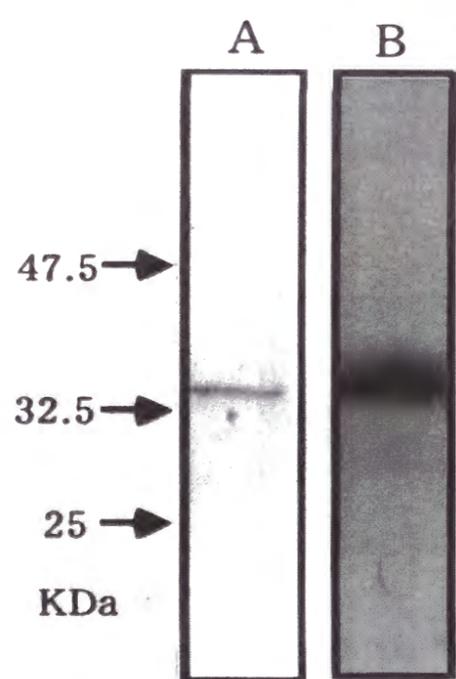


Figure 3-5. (A) Coomassie blue protein staining and (B) immunoblotting analysis to show the expression of truncated form FGF-5 in *E. coli*.

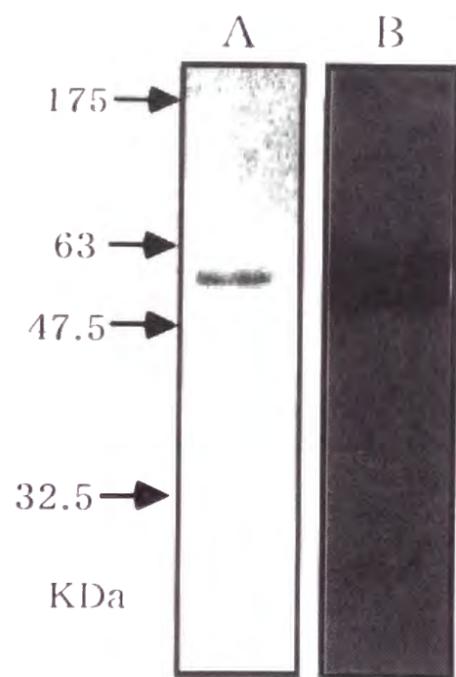


Figure 3-6. (A) Coomassie blue protein staining and (B) immunoblotting analysis to show the expression of soluble FGFR-1 in culture supernatant of High Five insect cells.

#### BIA coreを用いたFGF-5アイソフォームとFGFレセプターとの反応速度定数の算出

リガンドとしてGST融合欠失型FGF-5とGST融合FGF-5、レセプターとして可溶性FGFR-1と可溶性FGFR-4をBIA coreを用いて結合実験を行い、反応速度定数の算出を行った(Table 3-1)。その結果、欠失型FGF-5はFGFR-1に対し解離速度平衡定数  $6.43 \times 10^{-8}$  (M)の親和性を示した。又、FGF-5はFGFR-1に対し解離速度平衡定数  $4.36 \times 10^{-8}$  (M)の親和性を示したことから、欠失型FGF-5はFGF-5と比較し同程度の親和性を持っていることが判った(Table 3-1A)。FGFR-4についても同様に調べたところ、欠失型FGF-5はFGFR-4に対し解離速度平衡定数  $1.02 \times 10^{-7}$  (M)の親和性を示し、FGF-5はFGFR-4に対し解離速度平衡定数  $4.65 \times 10^{-8}$  (M)の親和性を示した。欠失型FGF-5はFGFR-4に対してはFGF-5より半分ほど弱い親和性しか持っていなかった(Table 3-1B)。このことより欠失型FGF-5は、FGF-5とレセプターの結合特異性が異なることが判った。

A. FGFR-1			
	Association constant (M)	Dissociation constant (M)	Equilibrium dissociation constant (M)
FGF-5	$1.34 \times 10^5$	$5.84 \times 10^{-3}$	$4.36 \times 10^{-8}$
truncated form FGF-5	$1.13 \times 10^5$	$7.27 \times 10^{-3}$	$6.43 \times 10^{-8}$
B. FGFR-4			
	Association constant (M)	Dissociation constant (M)	Equilibrium dissociation constant (M)
FGF-5	$3.73 \times 10^5$	$1.73 \times 10^{-2}$	$4.65 \times 10^{-8}$
truncated form FGF-5	$2.09 \times 10^5$	$2.14 \times 10^{-2}$	$1.02 \times 10^{-7}$

Table 3-1. Kinetics parameters and calculated equilibrium for FGFR-1 (A) and FGFR-4 (B).

#### FGF-5アイソフォームのNIH3T3細胞に対する増殖活性の検討

欠失型FGF-5がFGFレセプターと結合可能なことから、NIH3T3線維芽細胞に対する増殖活性をWST-1アッセイにより調べた。WST-1は細胞上精に添加すると細胞に取り込まれ、ミトコンドリアに存在する脱水素酵素により還元され400~450nmに吸収波長を持つ物質に変化するため、細胞数に比例してこの吸光波長が増大する。そのため吸光度を測定することにより細胞の数の定量が可能である。FGF-5あるいは欠失型FGF-5をNIH3T3線維芽細胞に作用させ、WST-1アッセイ

を行った結果、FGF-5は濃度依存的に細胞増殖活性を示したのに対し、欠失型FGF-5は細胞増殖活性を示さなかった(Fig. 3-7A, B)。さらにFGF-5により誘導される細胞増殖に与える欠失型FGF-5の影響を調べるため、FGF-5一定濃度存在下欠失型FGF-5を作用させた。その結果、欠失型FGF-5はFGF-5により誘導される細胞増殖を濃度依存的に抑制した(Fig. 3-7C)。

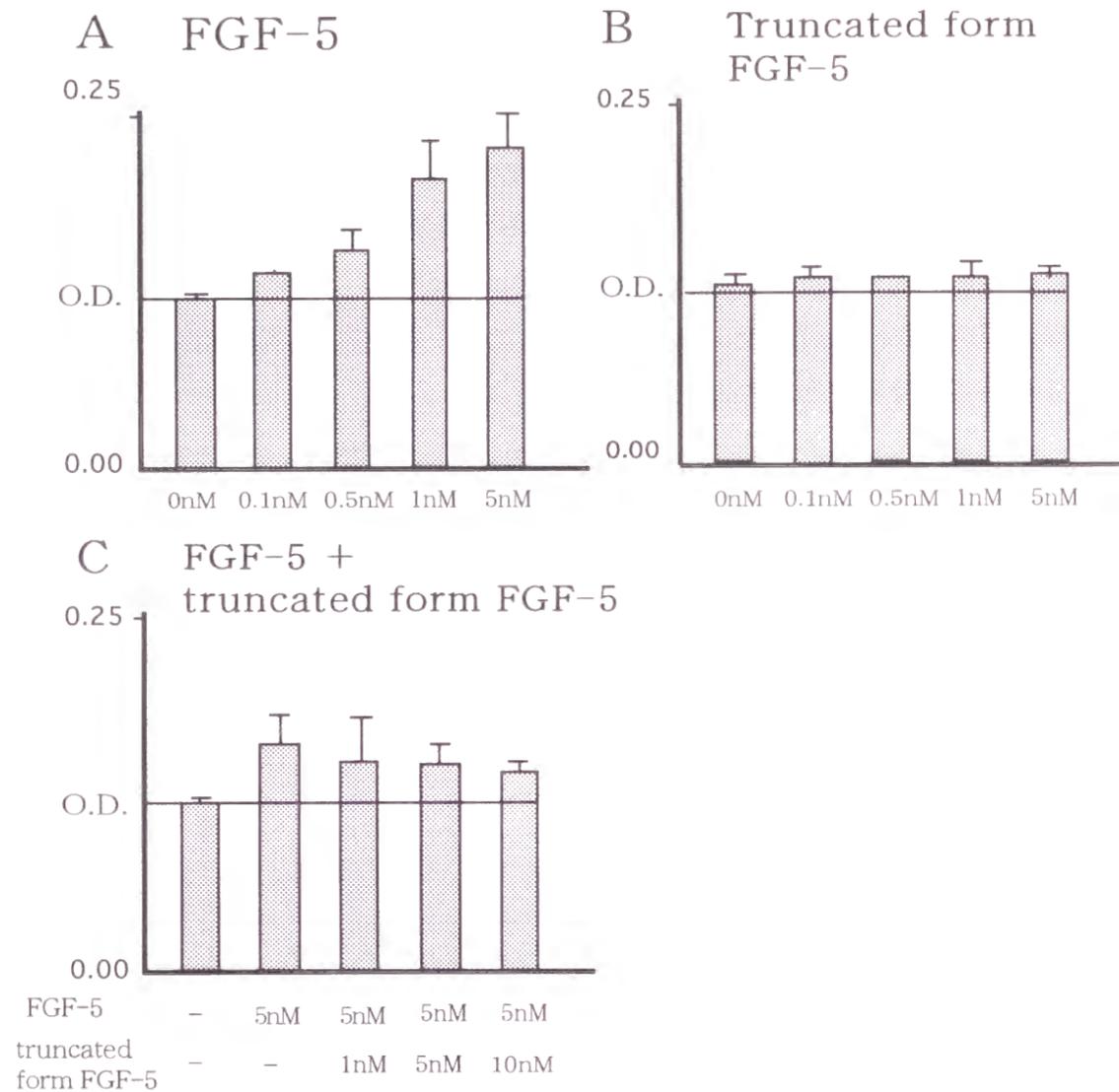


Figure 3-7. Effects of increasing amounts of FGF-5 alone (A) and truncated form FGF-5 alone (B) on NIH fibroblast mitogenesis as assessed by WST-1 assay. (C) Effects of increasing amounts of truncated form FGF-5 on NIH fibroblast mitogenesis inducing by 5nM FGF-5 as assessed by WST-1 assay.

## 考察

著者は、ラットにおいてFGF-5遺伝子よりalternative splicingにより生成されるFGF-5とは異なるmRNAの発現を確認し、それはFGF-5の欠失型をコードしていることを明らかにした。そしてこの欠失型FGF-5 mRNAは、FGF-5 mRNAと同様に胎児期及び成体の脳で発現していた。さらに欠失型FGF-5とFGF-5のFGFレセプター結合特異性を比較検討したところ、欠失型FGF-5はFGFR-1にはFGF-5と同程度の親和性を示したものの、FGFR-4にはFGF-5より弱い親和性しか示さなかった。又、欠失型FGF-5の線維芽細胞に対する細胞増殖活性を検討したところ、欠失型FGF-5は細胞増殖活性を示さず、FGF-5の細胞増殖活性に対しアンタゴニストとして働いた。これらのことから欠失型FGF-5は、胎児期、成体の脳で発現しているFGF-5の生理活性をレセプター特異的に調節している可能性が示唆された。

FGF-5以外にもaFGFにおいて、FGF-5と同様の機構により欠失型アイソフォームが発現していることが報告されている(60)。この欠失型aFGFもまたaFGFに対しアンタゴニストとして働くことが明らかになっている。

FGFはその多様な生理作用から、将来、医薬品として利用される可能性が高い。ガン細胞の多くにFGFの高発現が見られ、ガン細胞の増殖を促進していると考えられていることから、欠失型FGF-5が高親和性を示めずFGFレセプターに対し、様々なFGFのアンタゴニストとして働き、FGFによるガン細胞の増殖を抑制できるのではないかと考えられる。さらにガン細胞の中には欠失型FGFの発現が異常をきたし欠失型FGFによるFGFの活性の調節ができなくなるためにガンになる可能性も考えられる。今後更なる研究により胎児、成体の脳で発現する欠失型FGF-5及びFGF-5の生理的役割が明らかになることと共に、医薬品として利用されることが期待される。

## 第2章 実験方法

### 第一節の実験

#### [1] FGF-5及び欠失型FGF-5 cDNAのクローニング

欠失型FGF-5 cDNAは、FGF-4, 5, 6のアミノ酸配列の相同性が高い領域(VGIGFH, THFLPR)の縮重プライマーを用いてをラット胎児よりPCR増幅した。得られたcDNA断片をpGEM-T DNA vectorにクローン化し、dideoxy法(54)により塩基配列の決定を行った。さらにその塩基配列を元に、3' ノンコーディング領域は3' RACE法(49)により胎児cDNAよりPCR増幅し、上記と同様に塩基配列を決定した。全長をコードするFGF-5及び欠失型FGF-5cDNAは、マウスの5' ノンコーディング領域のプライマー(GCTCGGGTGGCCTCTTCTCT)とラットの3' コーディング領域のプライマー(CATCCGAAGCGAAACTTCAG)と用いてPCR増幅し得られた。

#### [2] ラット FGF-5の遺伝子の構造決定

ヒトFGF-5遺伝子の構造を元にexon1とexon2およびexon2とexon3に相当する領域にプライマーを作製し(intron 1, ATCTGCAGATCTACCCGGAT, AGTTG-CATGGAGTTTTCTTT; intron 2, GGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGG-GATTGT, AAGTGGGTGGAGACGTGCTGGGGTTTGA)、LA Taq polymerase (Takara, Japan)を用いて、ラット FGF-5のイントロンcDNAをPCR増幅した。これを鋳型としてエキソン/イントロンの境界領域の配列をdideoxy法(54)により決定した。

### 第二節の実験

#### FGF-5及び欠失型FGF-5 mRNAの組織分布

第1章1節の実験方法 [1], [2] に準じて、ラットの各組織から得たpoly (A)<sup>+</sup> RNAよりcDNAを作製した。これらを鋳型として、次のプライマー、CGACGTTTGCTTCGTCTTCT及びTCTGTGAATCGCTGACGCATを用いてPCRを行い、385bp、281bpのFGF-5、欠失型FGF-5 cDNAを増幅した。又、コントロールとして $\beta$ -actinプライマー(61)を用いて同様にPCR増幅した。増幅したDNAは8% polyacrylamide gelにより電気泳動を行い目的とするDNAを検出した。

### 第三節の実験

#### [1] 欠失型FGF-5タンパクの発現及び精製

シグナル配列であるN末端から20番目までを除いたラット 欠失型FGF-5のアミノ酸残基をコードするcDNAをCGCCTCGAGCATCATCCGAAGCGAA, CGCCTCGAGTCATCTGTAAATTTGGCTTの2種類のプライマーを用いて増幅し、発現ベクターであるpGEX-4T-1 DNA にクローニングした。以下、第1章4節の実験方法 [1] に準じて、GST融合欠失型FGF-5を得た。

#### [2] 昆虫細胞を用いた可溶性FGFR-1タンパク質の発現及び精製

細胞外ドメインをコードするFGFR-1 cDNAはラット胎児cDNAを鋳型として0.05 unit/ $\mu$ lのEx Taq DNA polymerase (Takara, Japan)と0.4pmol/ $\mu$ lのセンスプライマー(CCGAGCTTGACCATGTGGGGCTGGAGGGGCCT)とアンチセンスプライマー(CCATGCGGCCGCCACGGCTGGTCTCTCTTC)を含む反応液中でPCR増幅した。細胞外ドメインをコードするFGFR-1 cDNAにE-tag (GAPVPYPDPLEPR)及び6 $\times$ His tag (HHHHHH)をコードする75bpのDNA断片を結合させた可溶性FGFR-1 cDNAを、トランスファーベクターであるpBac PAK9 (Clontech)に組み込んだ。以下、第1章3節の実験方法 [1] に準じて、可溶性FGFR-1を得た。

#### [3] SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

第一節の実験方法 [3] に準じて行った。

#### [4] Western blotting

第一節の実験方法 [3] に準じて行った。

#### [5] BIA coreによる反応速度定数の測定

可溶性FGFR-1あるいは可溶性FGFR-4のC末端に付加した6 $\times$ His-tagを介して、Ni-NTAセンサーチップ(Pharmacia Biotech)に固相化し、アナライトとしてGST融合FGF-5あるいはGST融合欠失型FGF-5を用いて反応速度定数を測定した。

#### [6] WST-1アッセイによるFGF-5及び欠失型FGF-5の細胞増殖活性の測定

3×10<sup>3</sup>個のNIH3T3細胞を96 ウェルプレートに、10% fetal bovin serum含有D-MEM培地 (Gibco BRL) で24時間培養後、0.1% fetal bovin serum含有D-MEM培地に置換した。更に24時間培養後、種々の濃度のGST融合FGF-5あるいは欠失型FGF-5を添加した1 μg/ml Heparin及び、0.1% fetal bovin serum含有D-MEM培地に置換した。更に48時間培養後、WST-1 (DOJINDO)を添加し、4時間後405nmの波長を測定することにより細胞数を計測した。

## 総括及び結論

本研究において著者は、FGF-5の脳内発現に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

1. aFGFからFGF-10の10種類のFGF mRNAのラット脳内発現分布を調べたところ、aFGF、bFGF、FGF-5、9、10 mRNAが脳内においてそれぞれ特異的な発現分布を示し、多くのものが神経細胞で発現していることを明らかにした。脳内で発現しているFGFレセプターは、神経細胞ではFGFR-1、FGFR-4 mRNA、グリア細胞のオリゴデンドロサイトではFGFR-2 mRNA、グリア細胞のアストロサイトではFGFR-3 mRNAが発現していることから、FGFはこれら受容体を介しそれぞれの細胞に作用するものと考えられる。
2. 生後の脳発達過程において10種類の FGF mRNA の発現分布を調べた結果、FGF-5 mRNAのみが小脳皮質の内顆粒層の顆粒細胞で一過性に発現していた。さらにFGFレセプターについても同様に調べたところ、FGFR-4 mRNAのみが小脳皮質の外顆粒層の最外層の増殖領域の顆粒細胞で一過性に発現していた。さらにFGF-5とFGFR-4の結合性を検討したところ、FGF-5はFGFR-4に結合した。これらのことより小脳形成時に内顆粒層の顆粒細胞で発現したFGF-5が、外顆粒層の顆粒細胞で発現しているFGFR-4に作用して、顆粒細胞の分化に関与しているものとも考えられる。
3. FGF-5のアイソフォームである欠失型FGF-5 cDNAをラット胎児cDNAよりクローニングした。この欠失型FGF-5 mRNA はFGF-5遺伝子よりalternative splicingにより生成され、FGF-5 mRNAと同様、胎児期、成体の脳に発現していた。そして欠失型FGF-5はFGFR-1に結合できるものの、FGFR-4には弱い親和性しか示さなかった。さらに欠失型FGF-5は線維芽細胞に対し増殖活性を示さず、FGF-5の細胞増殖活性に対しアンタゴニストとして働くことを明らかにした。これらのことから欠失型FGF-5は、レセプター特異的にFGF-5の活性を調節する因子として働いているものと考えられる。

本研究の成果は、FGF-5の生理作用の解明に有用な知見となるものである。

## 謝辞

本研究の終わりに挑み、本研究の機会を与えていただき、始終御指導並びに御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科伊藤 信行教授に深く感謝致します。また、多くの重要な知見を賜りました京都大学大学院薬学研究科尾崎 恵一助手に心からの感謝の意を表します。

更に、本研究にご協力いただきました京都大学薬学部遺伝子薬学講座の方々に深く感謝いたします。

## 発表論文目録

本研究の一部は以下の論文に公表した。

- 1) Yoshiyuki Hattori, Masahiro Yamasaki, Nobuyuki Itoh  
” The rat FGF-5 mRNA variant generated by alternative splicing encodes a novel truncated form of FGF-5”  
Biochimica et Biophysica Acta 1306, 31-33 (1996)
- 2) Yoshiyuki Hattori, Masahiro Yamasaki, Morichika Konishi, Nobuyuki Itoh  
” Spatially restricted expression of fibroblast growth factor-10 mRNA in the rat brain”  
Molecular Brain Research 47, 139-146 (1997)
- 3) Yoshiyuki Hattori, Ayumi Miyake, Tadahisa Mikami, Mitsuhiro Ohta, Nobuyuki Itoh  
” Transient expression of FGF-5 mRNA in the rat cerebellar cortex during post-natal development”  
Molecular Brain Research 47, 262-266 (1997)

## 引用文献

1. Baird, A. and Klagsbrun, M. *Cancer Cells* 3, 239-243 (1991)
2. Burgess, W. H. and Maciag, T. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 575-606 (1989)
3. Dickson, C., Fuller-Pace, F., Kiefer, P., Acland, P., MacAllan, D. and Peters, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 18-26 (1991)
4. Yoshida, T., Sakamoto, H., Miyagawa, K. and Sugimura, T. and Takeda, M. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 27-37 (1991)
5. Goldfaub, M., Bates, B., Ducker, B., Hardin, J. and Haub, O. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 38-52 (1991)
6. Coulier, F., Ollendorff, V., Marics, I., Rosnet, O., Botoz, M., Plamche, J., Marchetto, S., Pebusque, M-J., deLapeyriere, O. and Birnbaum, D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 53-61 (1991)
7. Aaronson, S. A., Bottaro, D. P., Miki, T., Ron, D., Finch, P. W., Fleming, T. P., Ahn, J., Taylor, W. G. and Rubin, J. S. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 62-77 (1991)
8. Tanaka, A., Miyamoto, K., Minamino, N., Takeda, M., Sato, B., Matuo, H. and Matsumoto, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8928-8932 (1992)
9. Miyamoto, M., Naruo, K., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T. and Kurokawa, T. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4251-4259 (1993)
10. Yamasaki, M., Miyake, A., Tagashira, S. and Itoh, N. *J. Biol. Chem.* 271, 15918-15921 (1996)
11. Smallwood, P. M., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, J. P., Hendry, S. H., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nathans, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9850-9857 (1996)
12. McWhirter, J. R., Goulding, M., Weiner, J. J. A., Chun, J. and Murre, C. *Development* 124, 3221-3232 (1997)
13. Miyake, A., Konishi, M., Martin, F. H., Hernday, N. A., Ozaki, K., Yamamoto, S., Mikami, M., Arakawa, T. and Itoh, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 243, 148-152 (1998)
14. Hoshikawa, M., Ohbayashi, N., Yonamine, A., Konishi, M., Ozaki, K., Fukui, S. and Itoh, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 244, 187-191 (1998)
15. Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Kimura, M., Kimura, S., Yamasaki, M., Fukui, S. and Itoh, N. *J. Biol. Chem.* in press
16. Morrison, R. S., Sharma, A., De, Vellis, J. and Bradshaw, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 7537-7541 (1986)
17. Unsicker, K., Reichert-Preibsch, H., Schmidt, R., Pettmann, B., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5459-5463 (1987)
18. Walicke, P. A. *J. Neurosci.* 8, 2618-2627 (1988)
19. Ruta, M., Howk, R., Ricca, G., Drohan, W., Zabelshansky, M., Laureys, G., Barton, D. E., Francke, U., Schlessinger, J. and Givol, D. *Oncogene* 3, 9-5 (1988)
20. Isacchi, A., Bergonzoni, L. and Sarmientos, P. *Nucleic Acids Res.* 18, 1906(1990)
21. Itoh, N., Terachi, T., Ohta, M. and Kurokawa-Seo, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 680-685 (1990)
22. Johnson, D.E., Lee, P. L., Lu, J. Williams, L. T. *Mol. Cell. Bio.* 10, 4728-4736 (1990)
23. Dionne, C. A., Crumly, G., Bellot, F., Kaplow, J. M., Serfoss, G., Ruta, M., Burgess, W. H., Jaye, M. and Schlessinger, J. *EMBO J.* 9, 2685-2692 (1990)
24. Hattori, Y., Odagiri, H., Nakatani, H., Miyagawa, K., Naito, K., Sakamoto, H., Katoh, O., Yoshida, T., Sugimura, T. and Terada, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5983-5987 (1990)

25. Keegan, K., Johnson, D. E., Williams, L. T. and Hayman, M. J. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1095-1099 (1991)
26. Wanaka, A., Johnson, Jr., E.M. and Milbrandt, J. *Nature* **332**, 369-361 (1988)
27. Partanen, J., Makela, T. P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson-Welsh, L. and Alitalo, K. *EMBO J.* **6**, 1347-1354 (1991)
28. Jaye, M., Schlessinger, J. and Dionne, C. A. *Biochim. Biophys Acta* **1135**, 1135, 185-199 (1992)
29. Partanen, J., Vainikka, S., Korhonen, J., Aemstrong, E. and Alitalo, K. *Prog. Growth Factor Res.* **4**, 69-83 (1992)
30. Yazaki, N., Hosoi, K., Kawabata, K., Miyake, A., Minami, M., Satoh, M., Ohta, T., Kawasaki, T. and Itoh, N. *J. Neurosci. Res.* **37**, 445-452 (1994)
31. Miyake, A. and Itoh, N. *Neuroscience Letter* **203**, 101-104 (1996)
32. Miyake, A., Hattori, Y., Ohta, M. and Itoh, N. *J. Neurosci. Res.* **45**, 534-541 (1996)
33. Mattson, M. P., Murrain, M., Guthrie, P. B. and Kater, S. B. *J.Neurosci.* **9**, 3728-3740 (1989)
34. Anderson, KJ., Dam, D., Lee, S. and Cotman, CW. *Nature* **332**, 360-361(1988)
35. Clements, D.A., Wang, C. A., Dionne, C. A. and Goldfarb, M. *oncogene* **5**, 1311-1316 (1993)
36. Ornitz, M.O., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb. M. *J. Biol. Chem.* **271**, 15292-15297 (1996)
37. Dina, R., Ronit, R. Marcio, C., Carole, L., Orit, E. C., Andrew, M. -L. C., Gera, N., Toru, M. and Steven R. T. *J. Biol. Chem.* **268**, 5388-5394 (1993)
38. Altman, J. *J. Comp. Neuro.* **145**, 353-397 (1972)

39. Dalit, H, Nives, Z., Mark, B., Aaron, A. and Avner Y. *Growth Factor* **12**, 223-233 (1995)
40. Vainikka, S., Partanen, J., Bellosta, P., Coulier, F., Basilico, C., Jaye, M. and Alitalo, K. *EMBO J.* **11**, 4273-4280 (1992)
41. Shaoul, E., Reich-Slotky, R., Berman, B. and Ron, D. *Oncogene* **10**, 1553-1561 (1995)
42. Ester, S., Ronit, R. S., Bluma, B. and Dina, R. *Oncogene* **10**, 1553-1561 (1995)
43. Chomocznski, P. and Sacchi, N. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987)
44. Goodrich, SP., Yan, GC., Bahrenburg, K. and Mansson, PE. *Nucleic-Acids-Res.* **11**, 17(7) 2867(1989)
45. Shimasaki, S., Emoto, N., Koba, A., Mercado, M., Shibata, F., Cooksey, K., Baird, A. and Ling, N. *Biochem Biophys Res. Commun.* **157**, 256-263(1988 )
46. Brook, S., Smith, R., Casey, G., Dickson, C. and Peters, G. *Oncogene* **4**, 429-436 (1989)
47. Moore, R., Casey, G., Brooke, S., Dixon, M., Peters, G. and Dickson, C. *EMBO J.* **5**, 919-924 (1986)
48. Yan, G. C., Nikolaropoulos. S., Wang, F. and McKeegan, W. L. *Cell Dev. Bio.* **27A**, 437-438 (1991)
49. Shier, P., Willard, H. F. and Watt, V. M. *Cytogenet. Cell Genet.* **54**, 80-81 (1990)
50. Tanaka, A., Miyamoto, K., Matsuo, H., Matsumoto, K., Yoshida, H. *FEBS Lett.* **363**, 226-230 (1995)
51. Casey R. M, Brookes S, Dixon, M., Peter, G., Dickson, C. *EMBO J.* **5**, 919-924 (1986)
52. Haub, O. Ducker. B. and Goldfarb, M. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8022-8026 (1990)

53. deLapeyriere, O., Rosenet, O., Benharroch, D., Raybaud, F., Marchetto, S., Planche, J., Galland, F., Mattei, M., Gopeland, NG., Jenkins, NA, Coulier, F. and Birnbaum *Oncogene* 5, 823–831 (1990)
54. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467 (1977)
55. Haub, O., Ducker, B. and Goldharb, M. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8022–8026 (1990)
56. Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S. Levy, Z. and Yaffe, D. *Nucleic-Acids Res.* 11, 1759–71 (1983)
57. Lindholm, D., Hartikka, J., Berzaghi, M. P., Castren, E., Trimagiorgis, G., Hughes, R. A. and Thoenen, H. *Eur. J. Neurosci.* 6, 244–252 (1994)
58. Hughes, A. R., Sendtner, M., Goldharb, M., Lindholm, D. and Thoenen, H. *Neuron* 10, 369–377 (1993)
59. Zhan, X., Bate, B., Hu, X. and Goldfarb, M. *Mol. Cel. Biol.* 8, 3487–3495 (1988)
60. Hebert, J. M., Rosenquist, T., Gotz, J. and Martin, G. R. *Cell* 78, 1017–1025 (1994)
61. Yong-Li, Y., Hue, K., Jeffrey, A. G., Alexandra, A. J. M., Edward. J. G., and Christoph, W. T. *J. Exp. Med.* 175, 1073–1080 (1992)