Cell Adhesion Molecules and Signal Transduction

細胞接着分子とシグナル伝達

Jaramillo, Maria L.; and Bell, J.C.

Departments of Medicine and Biochemistry, University of Ottawa
Ottawa, Ontario, Canada K1H 8M5, FAX: 1-613-247-6897**Key Words:** cell adhesion molecules, myelin associated glycoprotein, nervous system, signal transduction**Abstract**

Cell adhesion molecules (CAM) play key roles in the fundamental processes of growth and development, particularly in the nervous system. This review focuses on the evidence implicating the cadherin, integrin and immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules in various signal transduction pathways. In addition to modulating cell adhesion and migration, CAMs also serve to directly regulate the response to growth and differentiation factors. This review focuses on the role of CAMs and their signal transduction pathways, where known, in several developmentally regulated processes in the nervous system such as the induction of neural tissue, neuroblast migration, axon growth and guidance, and myelination.

要 約

細胞接着分子(CAM)は、細胞増殖や個体発生の重要な過程で、特に神経系において重要な役割を果たしている。この総説では、細胞接着分子であるカドヘリン、インテグリンおよび免疫グロブリンスーパーファミリーとさまざまなシグナル伝達系との関係に関する証拠を対象とする。また、CAMの働きは細胞接着や移動を調節するだけでなく、細胞増殖や分化因子に対する応答も直接調節する。この総説は神経誘導、神経芽細胞の移動、軸索の成長と誘導およびミエリン化のような、神経系における多くの発生過程の調節で、CAMとそのシグナル伝達系の果たしている役割に関する知見に焦点を合わせている。

A. Introduction

Cell adhesion molecules or CAMs comprise a category of macromolecules which share a common feature of providing a physical link between adjacent cells or cells and the extracellular matrix. In addition to this basic function, CAMs also serve to couple signalling pathways involved in information transfer from the extracellular milieu to the cell. CAMs serve an essential role in several primary processes in development. The organization of form and pattern is conditional upon initial cell-to-cell interactions established early during development(1), particularly in the nervous system (2–4).

This review focuses on three major classes of CAMs (cadherins, integrins and CAMs belonging to the immunoglobulin (Ig) supergene family) and the roles that they play in development of the nervous system. This includes several developmentally regulated processes including the induction of neural tissue, neuroblast migration, axon growth and guidance, and myelination. Although the nature of how such cell-cell interactions are transduced into these complex morphological responses is not fully clear, wherever possible the signal transduction pathways involved will be emphasized. Examples of signal transduction pathways will involve inside-out signalling

A. はじめに

細胞接着分子、すなわちCAMは、隣接した細胞-細胞間や細胞-細胞外基質間を物理的に結合させることを共通の性質とする巨大分子に分類される。CAMはこの基本的な機能に加え、細胞外環境から細胞へのシグナル伝達経路を仲介する働きもある。CAMは個体発生のさまざまな初期過程において非常に重要な役割を果たしている。形態形成やパターン形成は、初期発生過程(1)、特に神経系(2–4)において確立される初期の細胞-細胞間相互作用に依存している。

この総説は、3種類の主要なCAM(カドヘリン、インテグリンおよび免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属するCAM)の、特に神経系の発生におけるCAMの役割に焦点を絞った。これには神経誘導、神経芽細胞の移動、軸索の成長と誘導及びミエリン化などの、発生過程において調節されるさまざまな過程がある。どのようにして細胞-細胞間相互作用がその複雑な形態的な応答へと伝達されるのかについての本態は、あまり明確になっていないが、分かっている限りのシグナル伝達経路のかかわりを述べるつもりである。シグナル伝達経路の例として、次のようなものがある。細胞内から細胞外へのシグナル伝達では細胞内のできごとにより細胞外のリガンドの結合が調節される

Abbreviations: CAM, cell adhesion molecule; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; NGF, nerve growth factor; FAK, focal adhesion kinase; N-CAM, neural cell adhesion molecule; MAG, myelin-associated glycoprotein.

in which binding to extracellular ligands can be modulated by intracellular events, and outside-in signalling in which the extracellular ligand and/or environment influences gene regulation and cell growth or differentiation.

B. Cadherins and Early Embryonic Development

Cadherins are a family of calcium-dependent cell-cell adhesion molecules which are found on the surface of most cell types [reviewed in (5–7)]. These molecules mediate homophilic (like-with-like) adhesion between cells. At a given developmental stage, most tissues express only a single cadherin subtype. The three best characterized members of the family include E (epithelial)-cadherins, N (neural) cadherins and P (placental) cadherins, named from the tissue type in which they were originally detected. Numerous (more than 15) different cadherin molecules are now known [see (7, 8)]. In addition to R (retinal)-cadherin (9) and B-cadherin (10), several cDNAs encoding novel cadherins have been identified by RT-PCR from brain RNA (11). Cells that express different cadherins are capable of adhering preferentially to their own cell class (12). As a result of their role in cell sorting, cadherins are considered to be important regulators of morphogenesis and tissue morphology (5, 13).

Different members of the cadherin family have distinct spatial and temporal patterns of expression during embryonic development (13, 14). E-Cadherin is expressed when embryonic transcription starts and is responsible for compaction of the morula (15). N-Cadherin, (as well as P-cadherin or R-cadherin in some cell types) becomes the major cell adhesion molecule expressed following differentiation of the CNS from the neural tube. N-Cadherin expression is lost as neural crest cells begin migration, however, upon reaching their final destination, they differentiate into various cell types, including neurons and glia, and regain N-cadherin expression.

B-1. Cadherins Require an Extracellular and Cytoplasmic Domain

Cadherins are integral membrane glycoproteins which contain a large extracellular domain responsible for calcium-dependent binding and recognition as well as a highly conserved cytoplasmic tail [see Fig. 1, ref (16)]. The classical cadherins have an ectodomain composed of four homologous structural repeats, with binding specificity localized to the most distal repeat (17). The cytoplasmic tail is necessary for cell-cell binding (18) and links cadherins to the actin cytoskeleton by binding catenins (19, 20). The importance of both the extracellular and intracellular domain in cell adhesion during embryonic development is supported by microinjection studies in *Xenopus laevis* embryos. Ectodermal lesions were observed in early *Xenopus* embryos following expression of a dominant-negative mutant of E-cadherin which lacked the cytoplasmic tail (21). This phenotype was in contrast to that obtained upon

し、また、細胞外から細胞内へのシグナル伝達においては細胞外のリガンドや環境が遺伝子の制御、細胞増殖や分化に影響を与える。

B. カドヘリンと初期発生

カドヘリンはほとんどの型の細胞表面に見られるカルシウム依存性細胞-細胞間接着因子ファミリーに属している(総説参照(5–7))。これらの分子は、細胞どうしをホモフィリック(仲間どうしの結合)な接着によって仲介する。発生過程のそれぞれの段階において、ほとんどの組織はただ1種類のカドヘリンを発現している。最も詳細に研究されているカドヘリンファミリーに属する3種類の分子は、それぞれ発見された組織(臓器)にちなんで、E(上皮)-カドヘリン、N(神経)-カドヘリン、P(胎盤)-カドヘリンと名付けられている。多く(15種類以上)のカドヘリンが今では知られている((7, 8)を参照)。さらに、R(網膜)-カドヘリン(9)、B-カドヘリン(10)をはじめ数種類の新規なカドヘリンのcDNAが、脳のRNAからRT-PCR法によって同定されている(11)。何種類かのカドヘリンを発現している細胞を混合すると、同種のカドヘリンを発現する細胞どうしが選択的に接着する(12)。細胞選別における役割からわかるように、カドヘリンは形態形成や組織構築の重要な調節因子であると考えられる(5, 13)。

カドヘリンのそれぞれの種類は、胚の発生過程において時間的、空間的に特徴的な発現パターンを示す(13, 14)。E-カドヘリンは胚性の転写が始まる時から発現し、桑実胚のコンパクションを引き起こす(15)。N-カドヘリン(一部の細胞においては、P-カドヘリンやR-カドヘリンも同様である)は神経管から中枢神経系への分化にともなって発現する主要な細胞接着分子である。N-カドヘリンの発現は神経堤細胞の移動が始まるとともに消失するが、しかるべき場所に到達して、神経細胞やグリアのようなさまざまな細胞に分化すると、再びN-カドヘリンを発現するようになる。

B-1. カドヘリンには細胞外と細胞内ドメインが必要である

カドヘリンは膜貫通型の糖タンパク質で、カルシウム依存性の結合をつかさどる大きな細胞外ドメインと、非常に良く保存されている細胞質ドメインから構成されている[図1参照、(16)]。典型的なカドヘリンは4つの繰り返し構造から構成される外部ドメインを有し、その結合特異性は最も外側の繰り返し単位に存在する(17)。細胞質ドメインは細胞-細胞間の結合に必須であり(18)、カテニンによってアクチン細胞骨格とカドヘリンをつなぎとめる(19, 20)。胚発生過程におけるカドヘリンの細胞外ドメインおよび細胞内ドメインの重要性は、アフリカツメガエル胚を用いたマイクロインジェクション法による研究によって支持されている。初期発生過程のアフリカツメガエル胚に、細胞質ドメインを欠損したドミナントネガティブE-カドヘリン変異体を発現させると、外胚葉に欠陥が生じた(21)。この

Fig. 1. Structural features of cell adhesion molecules and their binding properties (table above). The role of the cytoplasmic tail (where known) is marked. Immunoglobulin-related CAMs contain Ig domains (open circles) flanked by disulfide bridges and may contain fibronectin type III repeats (hatched rectangles) in their extracellular domain. Ig-like CAMs may also contain transmembrane and cytoplasmic domains (dotted line), or be linked to the plasma membrane by a phosphatidylinositol linkage. *Additional structural diversity can be generated by alternative splicing. Cadherins are cell-cell adhesion molecules which contain three to five homologous repeats (hatched rectangles) in their extracellular domain, of which the most distal is involved in binding specificity, as well as a conserved cytoplasmic domain. Integrins are composed of heterodimers which recognize extracellular matrix glycoproteins. See text for details [adapted from ref (2)].

injection of the highly conserved cytoplasmic tail and transmembrane domain of N-cadherin which resulted in a dramatic inhibition of cell adhesion in the resultant embryo (22), presumably by competition for cytoplasmic factors which recognize the cytoplasmic tail and are necessary for cell adhesion by all cadherin subtypes.

B-2. Outside-in Signalling in Cadherins

Upon cell adhesion, the signal obtained following binding of the extracellular domain is transferred to the cytoplasmic domain, resulting in the assembly of a multi-component complex [reviewed in (16, 23)]. One of the cytoplasmic factors which associates with cadherins is α -catenin, a molecule related to vinculin. Its importance in mediating cadherin function is demonstrated by the fact that cells expressing cadherin but lacking α -catenin are non-adherent (24). Other molecules include β -catenin which is related to *armadillo* (*arm*) (25), an epidermal gene product involved in segment polarity of the *Drosophila* cuticle via the *wingless* (*wg*) signalling pathway (26, 27). Although the mechanism by which (β -catenin and) *arm* function as intracellular developmental signalling molecules is not clear, it appears that the response to Wnt (a mammalian homolog of *wg*) results in modulation of cell adhesion in cultured cells (28). Another molecule loosely associated with

表現型は、N-カドヘリンの非常に良く保存された細胞質ドメインと膜貫通ドメインを注入した結果として、細胞接着が劇的に阻害された胚の表現型と対照的である(22)。おそらく、細胞質ドメインを認識し、すべての種類のカドヘリンで細胞接着に必要な細胞質因子との競合によって起きたのだろう。

B-2. カドヘリンによる細胞外から細胞内へのシグナル伝達

細胞接着において細胞外ドメインの結合によって生じたシグナルは細胞質ドメインへと伝達され、多分子複合体の形成が起こる(総説参照16、23)。カドヘリンと結合している細胞質因子の一つは、ピンキュリンに類似した分子、 α カテニンである。カドヘリンを発現している細胞、 α カテニンを欠損する細胞は非接着性であることから、カドヘリンの機能を介在するカテニンの重要性が証明された(24)。その他の分子として、アルマジロ(*arm*)と類似する β カテニンが存在する(25)。これは、クチクラの遺伝子産物で、ウイングレス(*wg*)のシグナル伝達経路を経てショウジョウバエのクチクラの体節の細分化に必要である(26、27)。Wnt(*wg*の哺乳類のホモログ)と反応して培養細胞では細胞接着が調節されるが、細胞内の発生シグナル伝達分子としての β カテニンと*arm*の機能を説明しうる機構は明らかではない(28)。カドヘリンとゆるく結合する他の分子として γ カテニンが存在する。 γ カテニンは、デスモソーム接着分子と結合し

cadherins is γ -catenin, a protein similar, if not identical to plakoglobin, which is known to associate with desmosomal adhesion molecules.

Other proteins have been found to be associated with catenins, including the APC gene product, a tumor suppressor gene linked to familial adenomatous polyposis (29, 30). Since mutations of this gene are believed to be involved in progression of sporadic colorectal and gastric tumors, it may be that cadherins regulate cell proliferation and differentiation as well as cell adhesion (31).

B-3. Inside-out Signalling in Cadherins

The ability of cadherins to function as cell adhesion molecules can be regulated under certain conditions. It appears that β -catenin is frequently a target for signal transduction pathways [see (26)]. In responsive cells, treatment with Wnt-1, results in increased cell adhesion, presumably by stabilizing cadherin/ β -catenin complexes (28). Cadherin mediated adhesion can also be increased, resulting in premature compaction at the four cell stage, following treatment of embryos by activators of protein kinase C (32). In contrast, cadherin-mediated adhesion and cell mobility is decreased as a result of the tyrosine phosphorylation of cadherins and catenins by v-src (33, 34). Tyrosine phosphorylation of catenins was also observed in cells treated with hepatocyte growth factor and epidermal growth factor (EGF) (35). Recently, the EGF receptor was shown to associate with cadherin-catenin complex and result in the tyrosine phosphorylation of β and γ -catenin (36). Although the biological significance of this is not clear, tyrosine phosphorylation resulted in an altered distribution (36), suggestive of a disassembly of the cadherin-catenin complex from the actin filament network.

C. Integrins and the Extracellular Matrix in Neuronal Development

Integrins are another major class of adhesion molecules. These receptors consist of heterodimers composed of an α and a β subunit (Fig. 1). Unlike the cadherin and immunoglobulin supergene family members, the majority of integrins are involved in cell-matrix interactions during cell adhesion to basement membrane and extracellular matrix (ECM)[reviewed in (37, 38)]. In certain cell types, however, integrins mediate heterophilic adhesion (like-with unlike, or adhesion between different CAM members) with receptors of the Ig superfamily (ICAM-1 or -2, VCAM) on the surface of lymphoid cells (39).

The specificity of the integrin interaction with various ECM components is defined by the particular α and β combination. Over 20 α/β combinations are presently known for the eight β and fourteen α subunits described to date (38), although several integrins are capable of recognizing the same ECM molecule, albeit at different sites (40). The large extracellular domains in both α and β subunits together form the divalent

ていることが知られているプラコグロビンと類似しているが、別の分子である。

カテニンと結合するタンパク質がいくつか発見されており、その一つであるAPC遺伝子産物は家族性腺腫性茸腫症に関係する癌抑制遺伝子である(29, 30)。この遺伝子の変異が散发性結腸癌と胃癌の進行にかかわっていると考えられていることから、カドヘリンは細胞接着と同様に細胞の増殖や分化をも調節しうる可能性がある(31)。

B-3. カドヘリンによる細胞内から細胞外へのシグナル伝達

細胞接着分子として機能するカドヘリンの能力は、ある状態の下では制御されている。 β カテニンはいしばしばシグナル伝達経路の標的となると思われる(26)。Wnt-1処理によって細胞接着が増加するが、おそらくカドヘリン/ β カテニン複合体の安定化によるものであろう(28)。プロテインキナーゼCの活性化因子を胚に作用させると、カドヘリンを介した細胞接着が増加し、4細胞期に不完全なコンパクションを引き起こす(32)。対照的に、v-srcによってカドヘリンとカテニンのチロシンがリン酸化されると、カドヘリン依存的な細胞接着や細胞運動能が減少する(33, 34)。カテニンのチロシンリン酸化は、肝細胞成長因子(HGF)や上皮成長因子(EGF)で処理された細胞において観察されている(35)。最近、EGFレセプターがカドヘリン-カテニン複合体と会合することで、 β -及び γ -カテニンがチロシンリン酸化されることが示された(36)。その生物学的な意義は明確でないが、チロシンリン酸化がさまざまな分布を示すこと(36)から、アクチン繊維のネットワークからカドヘリン-カテニン複合体を解離させることを示唆する。

C. 神経発生におけるインテグリンと細胞外基質

インテグリンもまた主要な細胞接着分子の一つである。この分子は α と β サブユニットのヘテロダイマーから構成されている(図1)。カドヘリンや免疫グロブリンスーパーファミリーの分子とは異なり、主要なインテグリンは基底膜や細胞外基質(ECM)に対する細胞接着の過程において細胞-基質間の相互作用に必要である(総説参照37, 38)。しかし、ある細胞種におけるインテグリンは、リンパ細胞の細胞膜に存在する免疫グロブリンスーパーファミリーのレセプター(ICAM-1/-2, VCAM)とヘテロフィリック(異なる分子間の結合)な接着を形成する(39)。

さまざまなECM成分とインテグリンとの相互作用の特異性は、特定の α サブユニットと β サブユニットの組合せによって規定される。今までに、8種類の β サブユニットと14種類の α サブユニットから、20種類以上の α/β サブユニットの組合せが構成されることが明らかとなっており(38)、多くのインテグリンは、異なる部位ではあるが、同じECM分子を認識しうる(40)。 α と β サブユニットの大きな細胞外ドメインどうしは、ECM分

cation-dependent (Ca^{++} , Mg^{++} or Mn^{++} , depending on the sub-type) binding domain for the ECM molecule or Ig-like cell surface receptor. Since most cells recognize more than one ECM protein, the adhesiveness for selective ECM components is regulated in part by the relative expression levels of their corresponding receptors. These adhesive extracellular components include molecules such as fibronectins and laminins. For several ECM components, including fibronectin, recognition of the tripeptide of the sequence Arg-Gly-Asp (RGD) on the ECM molecule (or other short peptide sequence) is important for binding to integrins to occur (40-42).

In addition to the role that cell-cell adhesion molecules, such as N-cadherin and N-CAM (discussed later) play in regulating interactions between neuronal cells during development, many ECM molecules also play important roles in development (43, 44), primarily in cell migration and differentiation, through the interaction of integrins. The ECM matrix glycoproteins, especially fibronectin and laminin, promote the adhesion and migration of neural cells, in particular those of the neural crest. ECM molecules and their receptor integrins have also been implicated in the regulation of neurite outgrowth and guidance (3, 45).

C-1. Inside-out Signalling in Integrins

Integrin function can be regulated by several mechanisms. As well as the modulation of subunit expression levels, integrins can exist in different extracellular ligand affinity states which can be modified by intracellular signals. Treatment of platelets with activating agents such as thrombin, epinephrine or ADP, induces a conformational change in the integrin GPIIb-IIIa (also known as $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$), which confers high-affinity plasma fibrinogen binding and subsequent aggregation of platelets [reviewed in (46, 47)]. The nature of the change that confers high-affinity ligand binding to a low-affinity state is not clear, however, it appears that the cytoplasmic region of the α subunit is necessary for the constitutive inactive state. Similarly, activation of β_2 leukocyte integrins by immune or inflammatory mediators involves ligand affinity changes through altered conformation of the integrin extracellular domain (48). The conformational changes induced by ligand binding may involve release of the β subunit cytoplasmic domain from an inhibitory effect caused by the α subunit (49). Although the affinity modulation of integrin receptors is not well understood, factors that have been implicated in this process include intracellular Ca^{++} , G proteins and protein kinases.

C-2. Outside-in Signalling in Integrins

The intracellular domain of the β subunit has been shown to be associated with the actin cytoskeleton and is responsible for the localization of integrins to focal adhesions (23, 50), specialized junctions between cells and the substratum featuring clustering of integrins. Components of the focal adhesion plaques include vinculin, α -actinin and talin, of which

子やIg様細胞表層レセプターに対する二価陽イオン(Ca^{++} , Mg^{++} , および Mn^{++} , インテグリンの種類に依存する)依存性結合ドメインを形成する。ほとんどの細胞は1種類以上のECMタンパク質を認識し、特定のECM成分との接着性はそれぞれに対応したレセプター間の相対的な発現量によって調節されている。これらの接着性細胞外成分として、ファイブロネクチンやラミニンなどの分子が存在する。ファイブロネクチンをはじめ多くのECM成分において、ECM分子(もしくはその他の短い配列)上に存在するArg-Gly-Asp(RGD)配列トリペプチドの認識は、インテグリンに結合するために重要である(40-42)。

N-カドヘリンとN-CAMのような細胞-細胞接着分子は、発生過程における神経細胞間の相互作用の調節で果たしている役割(後述)のほか、多くのECM分子はインテグリンとの相互作用を介して、発生系の、特に細胞の移動や分化において重要な役割を果たしている(43, 44)。細胞外マトリックス糖タンパク質、特にファイブロネクチンやラミニンは、神経細胞、特に神経堤細胞の接着や移動を促進する。ECM分子やそのレセプターであるインテグリンは、神経突起の伸長や誘導の調節にも関与している(3, 45)。

C-1. インテグリンによる細胞内から細胞外へのシグナル伝達

インテグリンの機能はさまざまな機構によって調節される。サブユニットの発現量による調節だけではなく、インテグリンには細胞内のシグナルによって修飾される細胞外リガンドに対するさまざまな親和状態が存在する。トロンビン、エピネフリンやADPのような活性化物質で処理された血小板は、インテグリンGPIIb-IIIa($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ としても知られている)の構造変化を引き起こす(総説参照46, 47)。このインテグリンは、高親和性血漿ファイブロネクチンの結合と、それに引き続く血小板の凝集を引き起こす。高親和性リガンドが低親和性状態に結合することの変化の本質は明らかでないが、 α サブユニットの細胞質ドメインは持続的な不活性な状態の維持に必要であることが明らかとなっている。同様に、免疫や炎症の誘起物質によって β_2 リンパ性インテグリンの活性化は、インテグリンの細胞外ドメインを別のコンフォメーションにしてリガンドとの親和性を変化させるために必要である(48)。リガンドの結合によって引き起こされる高次構造の変化は、 α サブユニットによる阻害効果から β サブユニットの細胞質ドメインを遊離させるのに必要らしい(49)。インテグリンの親和性の調節はよくわかっていないが、この過程にかかわる因子には、細胞内カルシウムイオン、Gタンパク質やタンパク質キナーゼがあるだろう。

C-2. インテグリンによる細胞外から細胞内へのシグナル伝達

β サブユニットの細胞質ドメインはアクチン骨格と結合しており、接着斑へのインテグリンの局在に対応していることが示されている(23, 50)。接着斑とは細胞-基質間の特別な結合部位で、インテグリンの集合体が存在する。接着斑の成分には、ビンキュリン、 α -アクチニンおよびタリンが存在するが、タリ

talins and α -actinin have been shown to bind to the integrin $\beta 1$ subunit and mediate attachment to actin filaments. Protein tyrosine phosphorylation has been implicated in the regulation of the assembly of focal adhesions, since focal adhesions contain elevated levels of phosphotyrosine and tyrosine kinase inhibitors have been shown to inhibit focal adhesion assembly and actin stress fiber formation which occur as a result of cell attachment (51). Analysis of focal adhesion following adhesion and spreading on ECM substrate reveals the presence of several tyrosine phosphorylated proteins, including paxillin (a vinculin binding protein) and a tyrosine kinase called FAK, both of which are implicated in the association of integrins to the actin cytoskeleton in the focal contacts (51, 52).

Integrins can transduce growth and differentiation signals from the ECM, presumably through the intracellular proteins FAK and paxillin [reviewed in (53-56)]. Paxillin has been shown to interact with c-crk (57), an SH2-SH3 adaptor molecule which is involved in other signalling pathways mediated by growth factor receptors for nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (58). In addition to being a substrate for v-src, focal adhesion kinase (or FAK), a member of the src family of tyrosine kinases, is also tyrosine phosphorylated in response to various growth factors including bombesin, endothelin and vasopressin (59, 60). Activation of FAK kinase activity as a result of its tyrosine phosphorylation, is implicated in the phosphorylation of paxillin and other substrates involved in either differentiation or cell cycle events.

Adhesion to an extracellular matrix is required for progression through the G1 phase of the cell cycle (61), a phenomenon called anchorage dependence. Recent findings have implicated integrin-mediated signalling and the activation of FAK as key regulators in the prevention of apoptosis which ensues when anchorage-dependent cells are denied an ECM substrate (62). FAK and other effector molecules may act to integrate the signalling pathways initiated by both integrins and growth factors. Fibronectin stimulation of NIH3T3 cells was shown to promote FAK tyrosine phosphorylation and its association with signalling molecules, including c-src and the ras exchange factor GRB2 and activation of MAP kinase (63). The activation of MAP kinases has been shown to be dependent on the integrity of the actin cytoskeleton (64).

The mechanism by which FAK activation occurs is not clear, since the cytoplasmic domains of integrins do not contain tyrosine kinase or other catalytic domains. It has been suggested that integrin engagement may reveal a latent cytoplasmic binding site for FAK which would result in its association and activation (49). Alternatively, upon ligand binding, integrins may interact with or activate other transmembrane or cytoplasmic effector molecules capable of activating FAK. In platelets, binding of fibrinogen to the activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin results in tyrosine phosphorylation of a number of proteins, in-

cluding α -actinin, which is shown to bind to the integrin $\beta 1$ subunit and mediate attachment to actin filaments. Protein tyrosine phosphorylation has been implicated in the regulation of the assembly of focal adhesions, since focal adhesions contain elevated levels of phosphotyrosine and tyrosine kinase inhibitors have been shown to inhibit focal adhesion assembly and actin stress fiber formation which occur as a result of cell attachment (51). Analysis of focal adhesion following adhesion and spreading on ECM substrate reveals the presence of several tyrosine phosphorylated proteins, including paxillin (a vinculin binding protein) and a tyrosine kinase called FAK, both of which are implicated in the association of integrins to the actin cytoskeleton in the focal contacts (51, 52).

Integrins are known to transduce growth and differentiation signals from the ECM, presumably through the intracellular proteins FAK and paxillin [reviewed in (53-56)]. Paxillin has been shown to interact with c-crk (57), an SH2-SH3 adaptor molecule which is involved in other signalling pathways mediated by growth factor receptors for nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (58). In addition to being a substrate for v-src, focal adhesion kinase (or FAK), a member of the src family of tyrosine kinases, is also tyrosine phosphorylated in response to various growth factors including bombesin, endothelin and vasopressin (59, 60). Activation of FAK kinase activity as a result of its tyrosine phosphorylation, is implicated in the phosphorylation of paxillin and other substrates involved in either differentiation or cell cycle events.

細胞外基質への接着は細胞周期がG1期に進行するために必要であり(61)、この現象は「接着依存」と呼ばれている。最近の知見によると、接着依存性細胞がECM基質を与えられていない時に起こるアポトーシスの誘導において鍵となる調節因子であるFAKの活性化と、インテグリンを介したシグナル伝達は関係しているらしい(62)。FAKと他の効果分子は、インテグリンや成長因子によって生じるシグナル伝達の統合に働く可能性がある。NIH3T3細胞のファイブロネクチンによる刺激によって、FAKのチロシンリン酸化を誘導し、シグナル伝達分子であるc-srcおよびras変換因子(GRB2)との結合やMAPキナーゼの活性化が誘導される(63)。MAPキナーゼの活性化は、アクチン骨格の重合に依存している(64)。

FAKの活性化が起こる機構は明確でない。インテグリンの細胞質ドメインには、チロシンキナーゼなどの触媒ドメインが存在しないのである。潜在的なFAKの細胞質結合部位が現われる結果、インテグリンにFAKが結合してFAKが活性化される可能性が示唆されている(49)。これとは別に、リガンドが結合するとインテグリンがFAKを活性化しうる膜貫通型分子や細胞質分子と相互作用する可能性、もしくはそれらの分子を活性化する可能性がある。血小板において、フィブリノーゲンが活性化 $\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリンへ結合すると、FAKをはじめ非常に多くのタンパク質のリン酸化が起こる(47)。トロンボスポンジンのレ-

cluding FAK (47). Following aggregation, coclustering of integrins with other cell membrane proteins, such as the thrombospondin receptor, results in the activation of their associated cytoplasmic tyrosine kinases, leading to the phosphorylation and activation of FAK. Initiation of tyrosine phosphorylation cascades may entail the interaction of integrin receptors with other receptors concomitant with their clustering and association with the cytoskeleton. This may explain why many of the early responses of integrin binding to the ECM are the same as those triggered by growth factors, such as stimulation of Ca^{++} influxes, cytoplasmic alkalinization and protein tyrosine phosphorylation (65, 66). This is similar in mechanism to that observed upon stimulation of the T-cell antigen receptor (67) and may represent a common theme of cellular signalling.

D. Immunoglobulin Supergene Family of CAMs

The other major class of cell-cell adhesion molecules consists of members of the immunoglobulin supergene family, characterized by the presence of immunoglobulin (Ig) domains. Each domain encodes a conserved protein structure approximately 100 amino acids in length with two highly conserved regions surrounding cysteine residues about 50–60 amino acids apart. Initially observed on immunoglobulins, these domains are found in a variety of molecules involved in cell surface recognition [Fig. 1, reviewed in (68–70)]. In addition to the Ig domains, members of the Ig superfamily may also contain fibronectin type III repeats, first detected in fibronectin and subsequently identified in a number of cell surface receptors and ECM proteins. Binding typically occurs in a Ca^{++} -independent and homophilic fashion, however, certain Ig-like CAMs are capable of binding heterotypically to other CAMs (*e.g.* ICAM binding to integrin receptors on endothelial cells) and components of the ECM. The cytoplasmic domains of these molecules vary in length and structure as a result of alternative splicing. Not all Ig CAMs are transmembrane; some are bound to the cell surface through phosphatidyl inositol linkages.

The prototype of Ig-like CAMs, N-CAM was the first CAM isolated from the brain (71)[reviewed in (72)]. The patterns of expression of N-CAM and N-cadherin are alike during early development (73, 74). Recently, it has been shown that products of homeobox genes may directly modulate the transcription of the N-CAM gene (75). N-CAM expression can be first detected on neural epithelial cells soon after neural induction and is succeeded shortly by uniform expression in the early neural tube. As with N-cadherin, N-CAM disappears from the surface of neural crest cells before their migration and reappears on sensory precursors during gangliogenesis. N-CAM can subsequently be identified on developing neurons and glia as well as muscle and a variety of other tissues (in the adult). Perturbation experiments *in vivo* and *in vitro* have suggested a variety of roles for N-CAM in such neural interactions such as

セプターのよう、他の細胞膜タンパク質とともに、インテグリンが凝集してクラスター形成が生じると、FAKのリン酸化と活性化に引き続いてそれらの分子と結合しているチロシンキナーゼの活性化が起こる。チロシンリン酸化のカスケードが流れ始めることは、インテグリンとその他のレセプターとが結合することと同時に、クラスターを形成し、細胞骨格と結合するために必要とされる。これで、なぜECMにインテグリンが結合した結果生じる多くの初期の応答は、例えば、カルシウムイオンの流入や細胞質のアルカリ化やタンパク質のチロシンリン酸化を刺激するような成長因子により引き起こされる初期の応答と類似しているのかを説明できるだろう(65,66)。これは、T細胞の抗原レセプターの刺激(67)や、今までに知られている多くの細胞のシグナル伝達の共通の主題に見られる機構と類似している。

D. CAMである免疫グロブリンスーパーファミリー

その他の細胞-細胞間接着分子として、免疫グロブリン(Ig)ドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリーに属するものがある。それぞれのドメインは、2つの非常に良く保存されたシステイン残基を取り囲む約50–60残基のアミノ酸領域を含む、およそ100アミノ酸残基から構成される保存されたタンパク質をコードする。Igドメインがさまざまな細胞表層の認識分子に見い出されることは、以前より知られていた[図1、総説参照(68–70)]。さらに、Igスーパーファミリーの分子に存在するIgドメインには、ファイブロネクチンタイプIIIリピートがある。このリピートは最初にファイブロネクチンに存在することが見付き、その後、多くの細胞表層のレセプターやECMのタンパク質に含まれていることがわかってきた。Ig様CAMは主にカルシウム非依存性のホモフィリックな結合様式を示すが、他のCAM(例えば、ICAMは、内皮細胞のインテグリンと結合する)やECMの構成成分とヘテロフィリックに結合しうる。それらの分子の細胞質ドメインは、オルタナティブスプライシングによって多様な長さや構造を形成する。すべてのIg CAMが膜貫通型ではなく、そのいくつかはフォスファチジルイノシトール結合を介して細胞表層に結合している。

Ig様CAMの原型であるN-CAMは、脳から単離された最初のCAMである(71)[総説参照(72)]。N-CAMとN-カドヘリンの発現パターンは、初期発生の過程で良く似ている(73, 74)。最近、ホメオボックス遺伝子産物がN-CAM遺伝子の転写を直接調節しうることが示された(75)。N-CAMの発現は神経誘導の直後の神経上皮細胞に最初に検出され、引き続き短時間の均一な発現が初期の神経管にみられる。N-カドヘリンと共に、N-CAMは移動をはじめの神経堤細胞の表層から消失し、感覚神経へ分化する時に再び現われる。N-CAMはその後、発生過程の神経やグリアをはじめ、(成体の)筋肉やさまざまな組織に発現する。*in vivo*や*in vitro*の攪乱実験から、神経繊維束発生における繊維形態の維持のような神経の相互作用(76)や、さまざまな神経細胞

maintenance of fiber topography in developing axon tracts (76), stimulation of neurite outgrowth of a variety of neuronal cell types (see below) and stabilization of cellular and synaptic junctions (77).

Modifications of N-CAM structure may contribute to these various developmental functions (72). Diversity of N-CAM structure is generated by alternative splicing which results in the production of several isoforms (78,79). In brain, three major N-CAM polypeptides are produced (N-CAM-180, N-CAM-140 and N-CAM-120) which have identical extracellular domains but differ in the length of their cytoplasmic domains. Whereas N-CAM-180 and N-CAM-140 are integral proteins containing progressively shorter cytoplasmic domains, N-CAM-120 is linked to the plasma membrane by a phospholipid linkage. The expression of these isoforms is developmentally regulated with N-CAM-180 expression appearing only on postmitotic and postmigratory cells. When expressed in 3T3 cells, this isoform has reduced lateral mobility compared to the smaller isoforms (80, 81), perhaps due to a specific interaction with a cytoskeletal component. Although this isoform is capable of functioning as a cell adhesion molecule, it exhibits poor ability to promote neurite outgrowth of neurons in culture (82), suggesting functional differences occur as a result of alternative cytoplasmic structures. Cytoskeletal association through ankyrin to the spectrin-based membrane skeleton has been demonstrated for several Ig-like CAMs, namely, neurofascin, L1 and NrCAM (83).

Alternative splicing can also change the extracellular domain of N-CAM. N-CAM contains five immunoglobulin domains and two fibronectin type III repeats in its extracellular domain (79). Up to four small exons can alter the structure between the FN III repeats, and a 30 bp exon named VASE (variable alternatively spliced exon) can interrupt the two exons which normally encode the fourth Ig domain of N-CAM. The levels of the VASE containing transcript increase during CNS development, reaching up to 50% of all N-CAM transcripts in the adult CNS. The extracellular domain is also modified by post-translational modifications. The amount of polysialic acid (PSA) on N-CAM at a given time during development varies among different parts of the nervous system and decreases during development (84). Changes in the state of N-CAM sialylation may account for, in part, the enhanced migration and axon outgrowth properties of N-CAM during embryonic development. Both the use of the VASE exon in N-CAM and a low degree of sialylation, conditions which do not affect or even ameliorate cell adhesion (85), substantially inhibits the ability of N-CAM to promote neurite outgrowth (86). The reciprocal patterns of PSA and VASE expression during development suggest that these alterations may change the function of N-CAM from one that promotes plasticity (migration, neuron outgrowth) to one that promotes stability (adhesion) (87).

種の神経突起伸長の刺激(後述)、細胞間やシナプス間結合の安定化(77)など、さまざまなN-CAMの役割が示唆されている。

N-CAM構造の修飾はさまざまな発生において発揮する異なる機能に寄与しうる(72)。N-CAM構造の多様性はオルタナティブスプライシングによって生じ、その結果、いくつかの多型を生じる(78, 79)。脳においては、細胞外ドメインは同一であるが細胞質ドメインは長さが異なる3種類のN-CAM(N-CAM-180、N-CAM-140、N-CAM-120)が主に産生されている。N-CAM-180とN-CAM-140が非常に短い細胞質ドメインを有する膜貫通タンパク質であるのに対して、N-CAM-120はリン脂質結合によって細胞膜に結合している。これらの多型の発現は分裂や移動を終了した細胞にのみN-CAM-180を発現することで、発生過程的な調節を受けている。N-CAM-180を3T3細胞に発現させた場合、N-CAM-140やN-CAM-120が発現した時と比較すると側面への移動能が減少するが(80, 81)、おそらく、細胞骨格の構成成分と特異的な相互作用をするからであろう。N-CAM-180は細胞接着分子として機能しうるにもかかわらず、培養下において神経の神経突起伸長の促進能がわずかしかなことは(82)、細胞質ドメインの構造多型の結果として機能の違いが生じたことが示唆される。スペクトリン系膜骨格とのアンキリンを介した結合は、多くのIg様CAM、すなわちニューロファシン、L1やNrCAMによって行われている(83)。

オルタナティブスプライシングはN-CAMの細胞外ドメインも変化させる。N-CAMはその細胞外ドメインに、5個の免疫グロブリンドメインと2個のファイブロネクチンタイプIIIリピートを有する(79)。4個以下の小さいエクソンが、ファイブロネクチンタイプIIIリピートの間の構造を変化させる。また、VASE(多様にスプライシングするエクソン)と命名された30塩基対から成るエクソンは、通常N-CAMの4番目のIgドメインをコードする2個のエクソンを中断させる。VASEを含む転写物の量は中枢神経系の発生に伴って増加し、成体の中枢神経系においてはすべてのN-CAMの50%に達する。細胞外ドメインは転写後修飾によっても修飾される。発生の時期におけるN-CAMのポリシアル酸(PSA)含量は神経系の領域によって異なり、発生が進むにつれて減少する(84)。N-CAMのシアル化状態の変化は、胚発生の過程のN-CAMによる細胞の移動と神経突起の伸長をある程度説明できるだろう。N-CAM中にVASEエクソンが発現することと、低度のシアル化では、細胞接着に全く影響を与えないか、同等の接着を維持するが(85)、神経突起の伸長促進におけるN-CAMの能力を十分に阻害する(86)。発生におけるポリシアル酸とVASEの相反する発現パターンは、可塑性(移動、神経突起伸長)の促進から、安定性(接着)の促進へと、N-CAMの機能を変換させることを示唆する(87)。

E. Signal Transduction Pathways Involved in CAM-Dependent Axonal Growth

Subsequent to the directed migration of neuronal and glial cells, nervous system development also requires the proper guidance of axons to their correct targets. Navigational decisions in axon targeting are made by the growth cone, the growing tip of the axon. During development of the nervous system, axons reach their target in an appropriate manner, largely governed by CAMs on the neuronal growth cone that bind to CAMs on the surface of other axons or non-neuronal cells, such as astrocytes, muscle cells or Schwann cells (4, 88). Originally identified by antibody perturbation experiments, several CAMs, including N-CAM, N-cadherin and the L1 glycoprotein have been implicated in cell-cell contact mediated axonal growth. L1 and N-CAM are both members of the Ig superfamily of CAMs with L1 containing six Ig-like domains and five FN III repeats. In contrast to the broad distribution of N-CAM, L1 expression is restricted to subpopulations of postmitotic neurons in the CNS. L1 is similar to the Ig-like member NgCAM with respect to structure, distribution and neurite outgrowth promoting activity (89). Whereas neurite outgrowth mediated by N-CAM and L1 are likely to be mediated by homophilic interactions, neurite outgrowth on NgCAM appears to involve both heterophilic and homophilic mechanisms.

The first insight into the signal transduction mechanisms underlying CAM-dependent neurite outgrowth extended from studies in which cell surface receptors were triggered using specific antibodies directed against N-CAM and L1 on the pheochromocytoma PC12 cell line. Antibody binding resulted in changes in internal pH, intracellular levels of inositol phosphates and a transient increase in intracellular calcium levels (90, 91). This Ca^{++} influx occurred in a pertussis toxin-inhibitable manner, suggesting the involvement of a G protein in the transduction process. Currently, pathways involved in CAM signal transduction are being defined by using enhanced neurite outgrowth on a monolayer of CAM transfected or non-transfected fibroblasts as a model system. This technique is more physiologically relevant since the CAM is expressed in appropriate levels, orientation and environment to allow the proper homophilic binding between the CAM on the surface of the neuron and the cell substratum (88, 92). A consistent pattern of results emerges using this approach on a variety of neuronal cell types including PC12 cells as well as primary neurons. CAM-dependent neurite outgrowth stimulated by N-CAM, L1 or N-cadherin all involve Ca^{++} as a common second messenger pathway (93-95). Neurite outgrowth on these CAMs can be inhibited by antagonists of L- and N-type Ca^{++} channels or by altering intracellular or extracellular Ca^{++} concentrations. Calcium influx into PC12 and cerebellar neurons by potassium de-

E. CAM 依存性軸索伸長に必要なシグナル伝達経路

神経細胞とグリア細胞の指向性のある移動に引き続き、神経系の発生においては正しい標的に対して神経突起の正確な誘導を行うことが必要である。神経突起の標的への道筋の決定は、神経突起の成長端に存在する成長円錐によってなされる。神経系の発生過程において、神経突起は適切な方法で標的に到達するが、神経の成長円錐に存在するCAMが、他の神経突起や、アストロサイト(星状膠細胞)、筋細胞やシュワン細胞などの非神経細胞のCAMと結合することで、多大に支配される(4, 88)。抗体による攪乱実験によって、N-CAM、N-カドヘリンやL1糖タンパク質などの多くのCAMは、神経突起の成長を仲介する細胞-細胞間接着にかかわっていることが明らかとなっている。L1とN-CAMはどちらもCAMのIgスーパーファミリーに属し、L1は6個のIg様ドメインと5個のファイブネクチンタイプIIIリピートを有する。N-CAMの広い分布に対して、L1は中枢神経系においては分裂を終了した神経細胞の一部に限定して発現する。L1は、構造、分布、神経突起伸長増進活性に関して、Ig様分子の間であるNgCAMと類似している(89)。N-CAMとL1による神経突起伸長は、ホモフィリックな相互作用を介しているのに対して、NgCAMによる神経突起伸長は、ヘテロフィリックとホモフィリックの両方の機構を必要とする可能性がある。

CAM依存性神経突起伸長の基礎をなすシグナル伝達の機構の最初の洞察は、クロム親和性細胞腫PC12細胞株のN-CAMとL1に対する特異的な抗体による処理による研究から発展した。抗体による処理は、細胞内のpHとイノシトールリン酸量の変化、細胞内カルシウム量の一過的上昇を引き起こした(90, 91)。このカルシウムイオンの流入は、百日咳毒素で阻害されることから、シグナル伝達にGタンパク質の必要性が示唆された。一般にCAMのシグナル伝達は、モデルシステムとしてCAMを導入した繊維芽細胞と、導入していない繊維芽細胞の単層培養上での神経突起伸長の増強を利用して明らかにされているこの解析法は、CAMを適切な量、配向、神経と細胞基質の細胞表面のCAM間の適切なホモフィリックな結合をさせる環境にするように発現させるので、より生理学的に適切である(88, 92)。PC12細胞をはじめ、さまざまな神経細胞種や初代神経細胞でも同様に、矛盾のない結果がこの方法を用いて得られている。N-CAM、L1やN-カドヘリンによるCAM依存性神経突起伸長は、すべて共通のセカンドメッセンジャーとしてカルシウムイオンを必要とする(93-95)。これらのCAMによる神経突起伸長は、L型とN型カルシウムイオンチャネルのアンタゴニストによって、もしくは細胞内や細胞外のカルシウムイオンの濃度の変化によって阻害される。カリウム脱分極によるPC12細胞と小脳神

polarization can fully mimic the CAM-dependent neurite outgrowth. Pertussis toxin sensitive G proteins may be involved in regulating Ca^{++} channel function since this agent is capable of inhibiting CAM-dependent neurite outgrowth caused by treatment with CAMs but not that caused by the direct activation of Ca^{++} channels. This suggests that Ca^{++} influx through L- and N-type Ca^{++} channels is necessary and sufficient for CAM mediated neurite outgrowth. This pathway appears to be specific for CAM-mediated neurite outgrowth (mediated by N-CAM and N-Cadherin or L1) since the above treatments are not capable of inhibiting neurite outgrowth promoted by other CAMs, namely integrins, or other factors such as nerve growth factor (NGF) or cAMP. Interestingly, treatment with physiological levels of NGF in PC12 cells results in induction of both N-CAM (96) and N-cadherin (93).

The fact that all three CAMs appear to be capable of activating the same pathway suggest that they may activate a common adaptor or effector molecule upon ligand stimulation. A common element to this pathway is the requirement for a tyrosine kinase(s). In addition to receptor tyrosine kinases for such neurotrophins as FGF and NGF (97), cytoplasmic tyrosine kinases such as c-src have been localized to the growth cone and are expressed at high levels during axon extension (98). N-CAM and N-Cadherin mediated neurite outgrowth can be distinguished from that promoted by other means, such as integrins, by its selective sensitivity to the erbstatin analog tyrosine kinase inhibitor (99). Recently, it has been demonstrated that stimulation of neurite outgrowth elicited by basic FGF involves the activation of a signal transduction pathway that appears to be indistinguishable from that caused by N-CAM, N-cadherin and L1 (100). This pathway is pharmacologically similar to CAM-mediated neurite outgrowth by its sensitivity to erbstatin, by a variety of L- or N- type calcium channel blockers, and by its sensitivity to a diacylglycerol (DAG) lipase inhibitor. An important event downstream of kinase activation appears to be the conversion of DAG to arachidonic acid by DAG lipase. Arachidonic acid has been shown to activate calcium channels in certain systems and is capable of mimicking the neurite outgrowth response prompted by the effects of treating with N-CAM, N-cadherin and L1. The FGF receptor may be one of the primary effector molecules activated upon CAM binding (101). Binding of CAMs appears to induce the activation of FGF receptor since treatment with either soluble CAM or FGF increases the level of phosphotyrosine in an identical subset of proteins, including the FGF receptor. Interestingly, certain antibodies directed against the FGF receptor are capable of blocking the neurite outgrowth response to CAMs, although neutralizing antibodies or peptides which prevent FGF binding do not. Furthermore, a synthetic peptide directed against a region of the FGF receptor located between the first and second Ig domain, which shares some homology to sequences found in

経へのカルシウム流入は、CAM依存性神経突起伸長をほぼ完全に模倣できる。百日咳毒素感受性Gタンパク質はCAMの処理によって引き起こされるCAM依存性神経突起伸長を阻害しうが、カルシウムイオンチャンネルの直接活性化によって阻害されないことから、カルシウムイオンチャンネル機能の調節に必要であると考えられる。このことより、L型とN型カルシウムイオンチャンネルを介したカルシウムイオンの流入は、CAMを介する神経突起伸長に必要かつ十分であることが示唆される。インテグリンや神経成長因子(NGF)やcAMPによる神経突起伸長促進については、同様な処理を施しても阻害しえないことから、この経路はCAMを介する神経突起伸長(N-CAM、N-カドヘリンもしくはL1を介する)に特異的である。興味深いことに、PC12細胞を生理学的な濃度のNGFで処理すると、N-CAM(96)とN-カドヘリン(93)の両方が誘導される。

すべて3種類のCAMが、同じ経路を活性化することが事実ならば、共通のアダプターかエフェクター分子がリガンドによる刺激で活性化されるだろう。この経路の共通の要素はチロシンキナーゼを必要とすることである。FGFやNGF(97)のようなニューロトロフィンのレセプターチロシンキナーゼに加えて、c-srcのような細胞質チロシンキナーゼが成長円錐に局在しており、神経突起の伸長時に高い発現がみられる(98)。N-CAMとN-カドヘリンを介する神経突起伸長は、インテグリンなどによる神経突起伸長とは、チロシンキナーゼの阻害剤であるアープスタチンのアナログに撰択的感受性があることで識別されう(99)。最近、塩基性FGFによって引き起こされる神経突起伸長の刺激は、N-CAM、N-カドヘリンやL1によって生じるのと区別できないシグナル伝達経路の活性化を必要としていることが示された(100)。この経路は、アープスタチン感受性、L型もしくはN型カルシウムチャンネルインヒビターによる変化、ジアシルグリセロール(DAG)リパーゼ阻害剤感受性に関して、CAMを介する神経突起伸長と類似している。キナーゼ活性化の下流に存在する重要な事象は、DAGリパーゼによってDAGからアラキドン酸に変換することであると思われる。アラキドン酸はある系においてはカルシウムチャンネルの活性化を引き起こし、N-CAM、N-カドヘリンやL1処理による効果によって誘導される神経突起伸長を模倣することができる。FGFレセプターは、CAMの結合によって活性化される初期に働く分子の一つらしい(101)。可溶性CAMもしくはFGFの処理によって、FGFレセプターのような同一のタンパク質群におけるリン酸化チロシン量が増加することから、CAMの結合によってFGFレセプターの活性化が引き起こされるようである。興味深いことに、FGFレセプターに対する抗体の幾つかは、CAMによる神経突起伸長を阻止しうが、FGF抗体を中和したりペプチドを加えてFGF結合を阻害しても伸長は阻止できない。さらに、CAMホモロジドメイン(CHD)と呼ばれるN-CAM、N-カドヘリンやL1の細胞外ド

Fig. 2. Schematic of the proposed signal transduction pathway underlying CAM-mediated neurite outgrowth [adapted from ref (88)]. Transinteraction of homophilic CAMs on opposing surfaces leads to a cis-interaction between the CAM and the FGF receptor. This results in activation (tyrosine phosphorylation) of the FGF receptor and downstream activation of downstream effector molecules such as PLC, DAG lipase, heterotrimeric G proteins and phospholipase A2. The final second messenger of CAM binding is believed to be calcium influx, mediated by L- and N-type calcium channels. The role of cytoplasmic tyrosine kinases (PTK), in such a pathway is currently unclear. See text for details.

the extracellular domains of N-CAM, N-cadherin and L1 called the CAM Homology Domain (CHD) is also capable of blocking the neurite outgrowth response to CAMs. This suggests that FGF receptor, but not FGF, is required for cell-contact dependent neurite outgrowth. The binding of CAMs from the surface of the growth cone to another cell would lead to clustering of CAMs and direct or indirect binding and activation of the FGF receptor (see model, Fig. 2). In addition cytoplasmic tyrosine kinases such as *fyn* and *src* are implicated in CAM-directed neurite outgrowth, since cerebellar and dorsal root ganglion neurons obtained from *fyn*-deficient mice are incapable of extending neurites on N-CAM transfected cells (102). Similarly, cerebellar granule cells from *src*- mice are impaired in their ability to extend neurites on a L1 substrate (103).

F. MAG and Myelination

Myelination is responsible for the rapid saltatory conduction necessary for efficient nerve transmission in vertebrates. The myelin sheath is formed by Schwann cells in the PNS and oligodendrocytes in the CNS as a specialized extension of the glial cell membrane and results in a concentric multilamellar spiral surrounding the axon [reviewed in ref. (104,105)]. Myelin contains relatively few proteins. The major protein components of CNS myelin are proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP). Whereby MBP mediates compaction between adjacent cytoplasmic surfaces to form the major dense line. PLP, an integral membrane protein is be-

メインに見い出される配列とホモロジーのあるFGFレセプターの第一および第二Igドメインの間に位置する領域に相当する合成ペプチドは、CAMによる神経突起伸長を阻害する。これは、FGFレセプターは細胞間接着依存性神経突起伸長に必要であるが、FGFは必要でないことを示唆する。成長円錐の細胞表面から他の細胞へのCAMの結合は、CAMのクラスター形成とFGFレセプターの直接もしくは間接的な結合と活性化を引き起こす(図2のモデルを参照せよ)。さらに、*fyn*欠損マウスから得た小脳や後根神経節の神経細胞は、N-CAMを導入した細胞上で神経突起を伸長できないこと(102)、また、*src*欠損マウスから得た小脳の顆粒細胞は、L1基質上で神経突起の伸長能力が損なわれていること(103)からわかるように、*fyn*や*src*のような細胞質チロシンキナーゼは、CAMによる神経突起伸長にかかわっていることが示唆される。

F. MAGとミエリン化

ミエリン化によって、脊椎動物において有効な神経伝達を行うために必要な躍進的な伝導が可能となる。ミエリン鞘は、グリア細胞膜が特徴的に伸長して神経突起の周辺を緻密な多層状の螺旋で取り囲む膜のことで、末梢神経ではシュワン細胞、中枢神経ではオリゴデンドロサイト(希突起膠細胞)が形成する[総説参照(104, 105)]。ミエリンは比較的少数のタンパク質から構成される。中枢神経系のミエリンの主要構成タンパク質は、プロテオリピドタンパク質(PLP)とミエリン塩基性タンパク質(MBP)である。MBPは隣接する細胞質の表面どうしをきっちり

lieved to mediate interactions between opposing extracellular membranes in the formation of the intraperiod line. In myelin of the PNS, P zero (P0), a member of the Ig superfamily, is the major component and is involved in the associations of extracellular membrane surfaces. MBP is also present, although at lower levels than in the CNS. Several myelination-defective mouse strains (106), such as *Jimpy* and *Shiverer*, have been shown to be caused by mutations in PLP and MBP respectively.

In addition to these major proteins which mediate myelin wrapping and compaction, a variety of less abundantly expressed proteins are expressed which participate in the differentiation of glial cells and the initial induction of myelination. Temporal and spatial expression studies suggest that MAG or myelin-associated glycoprotein plays an important role in mediating axon-glia recognition events that precede myelination and define its initiation (107, 108). This is supported by studies in which antisense MAG mRNA was shown to inhibit the ensheathment and myelination of neurons in culture (109). However, the phenotype of mice in which the gene for MAG is ablated show only subtle changes in myelin morphology (110, 111), perhaps due to redundancy of MAG function or compensatory mechanisms (112).

MAG is a type I integral membrane protein, with an amino-terminal extracellular domain, a single transmembrane domain, and a cytoplasmic carboxyl-terminus (113-116). MAG is a member of the immunoglobulin (Ig) supergene family and is restricted in expression to oligodendrocytes in the central nervous system and Schwann cells in the peripheral nervous system (117). In its extracellular domain MAG contains five Ig domains and most closely resembles N-CAM. Previous studies have shown that MAG is capable of binding to neurons in culture when reconstituted into liposomes (118, 119). Subsequently, work from this laboratory has demonstrated MAG is capable of functioning as a heterophilic cell adhesion molecule when expressed in L-cell fibroblasts (120). Since MAG is not expressed on neurons, binding is believed to be heterophilic, although, the nature of the receptor is not known.

MAG is encoded by a single gene as two developmentally regulated alternatively spliced isoforms (113, 114, 116, 121). They are designated L-MAG (for large MAG) and S-MAG (for small MAG) and have molecular masses of 72 kDa and 67 kDa, respectively, in their nonglycosylated forms. The MAG isoforms are identical in their extracellular and transmembrane domains and share a common region in their cytoplasmic domain, but are distinct at their carboxyl termini. *In vivo* and *in vitro* studies show that MAG is phosphorylated mainly on serine, but also to some extent on threonine and tyrosine residues (122, 123). We have previously shown that both L-MAG and S-MAG isoforms are phosphorylated when expressed in heterologous cells in culture (123). Whereas L-MAG is phosphorylated on serine and tyrosine residues, S-

と綴じ合わせて主要な層とし、膜貫通タンパク質であるPLPは中間層の形成において対をなす細胞外の膜の間の相互作用を仲介すると考えられている。Igスーパーファミリーに属するPゼロ(P0)は末梢神経系ミエリンの主要成分であり、細胞膜表層の結合に必要である。MBPは末梢神経系にも存在するが、中枢神経系と比較するとその量はわずかである。*Jimpy*や*Shiverer*のようなミエリン化欠損マウスは、PLPとMBPの変異によって引き起こされることが示されている(106)。

ミエリンによる包み込み(ラッピング)と圧縮(コンパクション)を媒介する上記の主要なタンパク質に加えて、発現は多くはないがグリア細胞の分化とミエリン化の初期誘導にかかわる沢山のタンパク質が発現する。時間的、空間的な発現解析の結果、MAG、すなわち、ミエリン結合性糖タンパク質は、ミエリン化に先立ち、その開始を明確にする軸索-グリア認識過程において重要な役割を担っていることが示唆された(107, 108)。これは、アンチセンスMAGmRNAが、培養神経細胞の鞘での被覆とミエリン化を阻害することを示した研究から支持される(109)。しかし、MAGの遺伝子を除去されたマウスの表現型では、ミエリンの形態が微妙に変化しただけだった(110, 111)。これはおそらく、MAGの機能が過剰であるか、補償する機構があるためであろう(112)。

MAGはI型膜貫通タンパク質で、アミノ末端である細胞外ドメイン、1つの膜貫通ドメイン、細胞質のカルボキシ末端から構成される(113-116)。MAGは免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属し、中枢神経系ではオリゴデンドロサイト、末梢神経系ではシュワン細胞に発現が限局している(117)。MAGの細胞外ドメインは5個のIgドメインを含み、N-CAMと非常に良く類似している。以前の研究より、MAGをリボソームに再構成すると、培養神経細胞に結合しうることが示されている(118, 119)。その後の当研究室の研究で、MAGをL繊維芽細胞に発現させると、ヘテロフィリックな細胞接着分子として機能しうることが示された(120)。MAGは神経細胞に発現していないことからこの結合はヘテロフィリックと考えられるが、そのレセプターの正体はわかっていない。

MAGでは、2つの発生過程で制御されるスプライシングアイソフォームが、1つの遺伝子上にコードされている(113, 114, 116, 121)。その糖の付いていないアイソフォームは、72 kDaの分子が、L-MAG(大型MAG)、67 kDaの分子がS-MAG(小型MAG)と名付けられている。MAGのアイソフォームはその細胞外と膜貫通ドメインは同一であり、細胞質ドメインの一部は共通の領域があるが、そのカルボキシ末端で異なっている。*in vivo*と*in vitro*の研究によって、MAGは主にセリンがリン酸化されるが、スレオニンやチロシン残基もある程度リン酸化される(122, 123)。以前に我々は、L-MAGとS-MAGのアイソフォームが、異種の培養細胞に発現させたときにリン酸化されることを示した(123)。L-MAGではセリンとチロシン残基がリン酸化され

MAG is constitutively phosphorylated only on serine. The early appearance of L-MAG at the onset of myelination and its differential phosphorylation suggest a role for tyrosine phosphorylation in the initial process of neuron recognition and signal transduction.

We have identified Tyr 620 as the major tyrosine phosphorylation site of MAG expressed in oligodendrocytes (124). The site, which is not present in S-MAG, when phosphorylated is capable of binding the SH2 domains of PLC *in vitro*. This association occurs between endogenously (from brain extracts) or exogenously (in transfected cells) expressed L-MAG and, PLC γ suggesting that such an association is physiologically significant *in vivo*. L-MAG may function in an analogous fashion to a growth factor receptor. Tyrosine phosphorylation of L-MAG and its subsequent association with SH2 containing proteins, such as PLC, may act to transduce an extracellular signal necessary for the initiation of myelination.

Analysis of this sequence reveals an interesting homology with other Ig related cell adhesion molecules. As shown in Table I, the carboxyl terminal 8 amino acids, EYAEIRVK, are identical to the terminal residues identified in the recently cloned Schwann cell myelin protein (SMP)(125) and highly homologous to carboxyl regions in other molecules such as CD22(126, 127), CD33 (128), CD31 [platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 or PECAM-1 (129)]and BGP [biliary glycoprotein (130)]. Of these molecules, BGP(130) and CD22 (131) have been shown to be phosphorylated on tyrosine residues thus far. Other cell surface adhesion molecules are known to interact with cytoplasmic PTKs in well characterized transmembrane signalling pathways. The *in vivo* significance of this finding is currently unknown, however, MAG, BGP, SMP, CD33, CD22 and CD31 may encompass a group of cell adhesion molecules that are involved in a signal transduction system, possibly involving PLC γ . In the case of MAG, this signalling pathway is regulated by differential isoform expression

ているのに対して、S-MAGではセリン残基のみが構造的にリン酸化されている。ミエリン化の開始に伴うL-MAGの出現とそのリン酸化の変化は、神経細胞の認識とシグナル伝達の初期段階におけるチロシンリン酸化の役割を示唆する。

我々は、オリゴデンドロサイトに発現するMAGの主要なチロシンリン酸化部位は620残基目のチロシンであることを同定した(124)。S-MAGには存在しないこのリン酸化部位がリン酸化されていると、*in vitro*においてPLC γ のSH2ドメインと結合する。この結合は内在性(脳の抽出物)や外来性(遺伝子導入細胞)に発現したL-MAGとPLC γ との間に起こるので、このような結合は*in vivo*における生理学的な意義を示唆している。L-MAGは成長因子レセプターと似た様式で機能するらしい。L-MAGのチロシンリン酸化と、それに引き続くPLCのようなSH2ドメインを含むタンパク質との結合は、ミエリン化の開始に必要な細胞外シグナルの伝達として働くであろう。

L-MAGの構造解析の結果、他のIg関連細胞接着分子と興味深い相同性の存在が明らかとなった。表Iに示す通り、カルボキシ末端の8アミノ酸(EYAEIRVK)は最近クローン化されたシュワン細胞ミエリンタンパク質(SMP)(125)のカルボキシ末端と同一であり、CD22(126, 127)、CD33(128)、CD31 [血小板-上皮細胞接着分子-1もしくはPECAM-1(129)]そしてBGP [胆汁糖タンパク質(130)]のような他の分子のカルボキシル末端部位と高い相同性を示した。このうちBGP(130)やCD22(131)ではチロシン残基がリン酸化されていることが示されている。その他の細胞接着分子は、詳細に記述されている膜貫通シグナル伝達経路に存在する細胞質PTKと相互作用することが知られている。しかし、この知見の*in vivo*における重要性は今のところ解からないが、MAG、BGP、SMP、CD33、CD22やCD31は、PLC γ をおそらく含むシグナル伝達系を必要とする細胞接着分子群に属すると思われる。MAGの場合このシグナル伝達経路は、発生過程にお

Table I. Homologies of carboxyl terminal amino acids in several Ig related CAMs.

Molecule	Carboxy terminal amino acid sequence
L-MAG	EYAEIRVK
SMP	EYAEURVK
BGP	IYSEVKKQ
CD22	HYSELIQ
CD33	EYSEVRTQ
CD31	VYSEVRKA

Amino acid residues 619–626 in L-MAG were compared to residues: 614–621 in SMP (125); 520–527 in BGP(130); 821–828 in CD22 (126,127); 357–364 in CD33 (128); 685–692 in CD31 (129).

Fig. 3. Schematic for proposed model of MAG activation of myelination. Fyn binds constitutively to MAG in a latent form. Binding to the MAG receptor on the surface of an axon would transduce a conformational change in L-MAG, resulting in activation of Fyn kinase and phosphorylation of Tyr 620. Binding and activation of PLC γ (and/or other effector molecules) would contribute to the signalling pathway involved in the regulation of myelination. See text for details.

during development(115, 132).

Another signal transducing molecule which binds to MAG is the Fyn tyrosine kinase. We found that, unlike PLC γ , Fyn is capable of interacting with both L- and S-MAG isoforms. Although both SH2 and SH3 domains appear to be necessary for high affinity Fyn binding (124) and kinase activity (133), binding can also occur in an SH2-independent manner. This is reminiscent of the B-cell receptor-Fyn kinase interaction, in which association of the tyrosine phosphorylated and non-phosphorylated forms of Ig- α occurs via distinct regions of the Fyn kinase (134). Moreover, it has been documented that only the high affinity SH2-mediated interaction of Fyn with Ig- α stimulates kinase activity (135). It may be that although Fyn can bind both MAG isoforms, it becomes activated only when complexed to L-MAG. Consistent with this is the observation that antibody cross-linking of L-MAG but not S-MAG causes an increase in Fyn kinase activity (133). Fyn association is believed to be physiologically relevant since mice in which the gene for fyn is ablated have impaired myelination (133).

These results demonstrate that MAG interacts with PLC γ and Fyn through different sites. Taken together, these observations as well as those of others (133), suggest a model (Fig. 3) wherein Fyn binds constitutively to MAG in a latent form. Ligand stimulation of L-MAG would result in activation of Fyn kinase and phosphorylation of Tyr 620. Binding and activation of PLC γ through this phosphotyrosine residue would contribute to the signalling pathway involved in the regulation of myelination.

けるアイソフォームの発現の違いによって制御されている(115, 132)。

MAGに結合する別のシグナル伝達分子はFynチロシンキナーゼである。Fynは、PLC γ とは異なり、L-MAGとS-MAGの両方と相互作用しうることが我々は発見した。SH2とSH3ドメインの両方が、高親和性Fyn結合(124)とキナーゼ活性(133)のために必要であるにもかかわらず、SH2非依存性の結合も起こり得る。これは、B細胞レセプター-Fynキナーゼ相互作用における、Fynキナーゼの特定の領域を介して起こるIg- α のチロシンリン酸化と非リン酸化型の結合を暗示する(134)。さらに、高親和性SH2を介在するFynとIg- α の相互作用だけが、キナーゼ活性を刺激することが証明されている(135)。FynはMAGの両方のアイソフォームと結合しうが、L-MAGと複合体を形成したときのみ活性化するのだろう。L-MAGをクロスリンクさせる抗体はFynキナーゼ活性を上昇させるが、S-MAGの場合そのようなことは起こらないことは、先の結果と矛盾しない(133)。Fynの遺伝子を除去したマウスではミエリン化が損なわれることから、Fynの結合は生理学的に意味のあるものと考えられている(133)。

これらの結果は、MAGは異なる部位でPLC γ とFynと相互作用していることを証明するものである。これらの知見とそれ以外の結果(133)と合わせて考えると、Fynが潜在型MAGと構成的な結合をすることに関するモデルが示唆される(図3)。L-MAGのリガンドの刺激の結果、Fynキナーゼを活性化し、620残基目のチロシンのリン酸化を引き起こす。このリン酸化チロシンを介したPLC γ の結合と活性化が、ミエリン化の調節に必要なシグナル伝達経路に寄与しているのだろう。

Acknowledgments

Thanks to Peter Duncan and Ninan Abraham for helpful suggestions in writing this manuscript. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada and the National Cancer Institute of Canada (NCIC). J.C.B. is an NCIC Senior Scientist. M.L.J. is a postdoctoral fellow of the Medical Research Council of Canada.

東京工業大学・生命理工学部・生体分子工学科
糖鎖生命科学講座
日向 昌司 記

References

1. Greenwald, I., and Rubin, G.M. (1992) *Cell* **68**, 271–281
2. Jessel, T.M. (1988) *Neuron* **1**, 3–13
3. Hynes, R.O., and Lander, A.D. (1992) *Cell* **68**, 303–322
4. Goodman, C.S., and Shatz, C.J. (1993) *Cell* **72**, 77–98
5. Takeichi, M. (1991) *Science* **251**, 1451–1455
6. Hynes, R.O. (1992) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**, 621–624
7. Grunwald, G.B. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 797–805
8. Rathjen, F.G. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 992–1000
9. Inuzuka, H., Miyatani, S., and Takeichi, M. (1991) *Neuron* **7**, 69–79
10. Napolitano, E.W., Venstrom, K., Wheeler, E.F., and Reichardt, L.F. (1991) *J. Cell Biol.* **113**, 893–905
11. Suzuki, S., Sano, K., and Tanihara, H. (1991) *Cell Regulation* **2**, 261–270
12. Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988) *Cell* **54**, 993–1001
13. Takeichi, M. (1988) *Development* **102**, 639–655
14. Ranscht, B. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 740–746
15. Fleming, T.P., and Johnson, M.H. (1988) *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 459–485
16. Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1993) *Seminars in Cell Biol.* **4**, 175–181
17. Nose, A., Tsuji, K., and Takeichi, M. (1990) *Cell* **61**, 147–155
18. Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988) *EMBO J.* **7**, 3679–3684
19. Ozawa, M., Ringwald, M., and Kemler, R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4246–4250
20. Ozawa, M., and Kemler, R. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 989–996
21. Levine, E., Lee, C.-H., Kintner, C., and Gumbiner, B.M. (1994) *Development* **120**, 901–909
22. Kintner, C. (1992) *Cell* **69**, 225–236
23. Gumbiner, B. (1993) *Neuron* **11**, 551–564
24. Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S., and Takeichi, M. (1992) *Cell* **70**, 293–301
25. McCrea, P.D., Turck, C.W., and Gumbiner, B. (1991) *Science* **254**, 1359–1361
26. Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 538–542
27. Klingensmith, J., and Nusse, R. (1994) *Dev. Biol.* **166**, 396–414
28. Hinck, L., Nelson, W.J., and Papkoff, J. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 729–741
29. Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993) *Science* **262**, 1731–1734
30. Su, L.-K., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993) *Science* **262**, 1734–1737
31. Hulsken, J., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 711–716
32. Edelman, G.M. (1994) *Progress in Brain Research* **101**, 1–14
33. Hamaguchi, M., Matsuyoshi, N., Ohnishi, Y., Gotoh, B., Takeichi, M., and Nagai, Y. (1993) *EMBO J.* **12**, 307–314
34. Matsuyoshi, N., Hamaguchi, M., Taniguchi, S., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 703–714
35. Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M., and Ito, F. (1994) *Cell Adhesion Commun.* **1**, 295–305
36. Hoschuetzky, H., Aberle, H., and Kemler, R. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 1375–1380
37. Hynes, R.O. (1987) *Cell* **48**, 549–554
38. Hynes, R.O. (1992) *Cell* **69**, 11–25
39. Springer, T.A. (1990) *Nature* **346**, 425–434
40. Yamada, K.M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12809–12812
41. Haas, T.A., and Plow, E.F. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 656–662
42. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. (1987) *Science* **238**, 491–497
43. DeSimone, D.W. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 747–751
44. Adams, J.C., and Watt, F.M. (1993) *Development* **117**, 1183–1198
45. Letourneau, P.C., Condit, M.L., and Snow, D.M. (1992) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**, 625–634
46. Ginsberg, M.H., Du, X., and Plow, E.F. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 766–771
47. Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., and Brugge, J.S. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 695–704
48. Larson, R.S., and Springer, T.A. (1990) *Immunol. Rev.* **114**, 181–217
49. O'Toole, T.E., Mandelman, D., Forsyth, J., Shattil, S.J., Plow, E.F., and Ginsberg, M.H. (1991) *Science* **254**, 845–847
50. Turner, C.E. and Burridge, K. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 849–853
51. Burridge, K., Turner, C.E., and Romer, L.H. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 893–903

52. Guan, J.-L., and Shalloway, D. (1992) *Nature* **358**, 690–692
53. Giancotti, F.G., and Mainiero, F. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1198**, 47–64
54. Damsky, C.H., and Werb, Z. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 772–781
55. Juliano, R.L., and Haskill, S. (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 577–585
56. Sastry, S.K., and Horwitz, A.F. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 819–831
57. Birge, R.B., Fajardo, J.E., Reichman, C., Shoelson, S.E., Songyan, Z., Cantley, L.C., and Hanafusa, H. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4648–4656
58. Hempstead, B.L., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Glassman, R., Mahadeo, D., Kraemer, R., and Hanafusa, H. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1964–1971
59. Schaller, M.D., and Parsons, J.T. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 705–710
60. Zachary, I., and Rozengurt, E. (1992) *Cell* **71**, 891–894
61. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., and Assoian, R.K. (1993) *Science* **262**, 1572–1575
62. Ruoslahti, E., and Reed, J.C. (1994) *Cell* **77**, 477–478
63. Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994) *Nature* **372**, 786–791
64. Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Tobe, K., Ueki, K., Kikuchi, K., Takehara, K., Kadowaki, T., Yazaki, Y., and Nojima, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 269–273
65. Schwartz, M.A. (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 1003–1010
66. McNamee, H.P., Ingber, D.E., and Schwartz, M.A. (1993) *J. Cell Biol.* **121**, 673–678
67. Weiss, A. (1993) *Cell* **73**, 209–212
68. Williams, A.F. (1987) *Immunol. Today* **8**, 298–303
69. Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988) *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 381–405
70. Buck, C.A. (1992) *Seminars in Cell Biol.* **3**, 179–188
71. Hoffman, S., Sorkin, B.C., White, P.C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7720–7729
72. Goridis, C., and Brunet, J.-F. (1992) *Seminars in Cell Biol.* **3**, 189–197
73. Edelman, G.M. (1986) *Annu. Rev. Cell Biol.* **2**, 81–116
74. Rutishauser, U. (1986) *Trends in Neurosci.* **9**, 374–378
75. Jones, F.S., Prediger, E.A., Bittner, D.A., DeRobertis, E.M., and Edelman, G.M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2086–2090
76. Fraser, S.E., Carhart, M.S., Murray, B.A., Chuong, C.M., and Edelman, G.M. (1988) *Dev. Biol.* **129**, 217–230
77. Rutishauser, U., Grumet, M., and Edelman, G.M. (1983) *J. Cell Biol.* **97**, 145–152
78. Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., and Edelman, G.E. (1987) *Science* **236**, 799–806
79. Walsh, F.S., and Doherty, P. (1991) *Semin. Neurosci.* **3**, 271–284
80. Pollerberg, G.E., Schachner, M., and Davoust, J. (1986) *Nature* **324**, 462–465
81. Pollerberg, G.E., Burrige, K., Krebs, K.E., Goodman, S.R., and Schachner, M. (1987) *Cell Tissue Res.* **250**, 227–236
82. Doherty, P., Rimon, G., Mann, D.A., and Walsh, F.S. (1992) *J. Neurochem.* **58**, 2338–2341
83. Davis, J.Q., and Bennett, V. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27163–27166
84. Rothbard, J.B., Brackenbury, R., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11064–11069
85. Hoffman, S., and Edelman, G.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5762–5766
86. Doherty, P., Moolenaar, C.E.C.K., Ashton, S.V., Michalides, R.J.A.M., and Walsh, S. (1992) *Nature* **356**, 791–793
87. Doherty, P., and Walsh, F.S. (1992) *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 595–601
88. Doherty, P., and Walsh, F.S. (1994) *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 49–55
89. Grumet, M. (1992) *J. Neurosci. Res.* **31**, 1–13
90. Schuch, U., Lohse, M.J., and Schachner, M. (1989) *Neuron* **3**, 13–20
91. Von Bohlen und Halbach, F., Taylor, J., and Schachner, M. (1992) *Eur. J. Neurosci.* **4**, 896–909
92. Walsh, F.S., and Doherty, P. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 791–796
93. Doherty, P., Ashton, S.V., Moore, S.E., and Walsh, F.S. (1991) *Cell* **67**, 21–33
94. Saffell, J.L., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 663–670
95. Williams, E.J., Doherty, P., Turner, G., Reid, R.A., Hemperly, J.J., and Walsh, F.S. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 883–892
96. Doherty, P., Mann, D.A., and Walsh, F.S. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 333–340
97. Chao, M.V. (1992) *Neuron* **9**, 583–593
98. Maness, P.F., and Cox, M.E. (1992) *Sem. Cell Biol.* **3**, 117–126
99. Williams, E.J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 1029–1037
100. Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1994) *Development* **120**, 1685–1693
101. Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1994) *Neuron* **13**, 583–594
102. Beggs, H.E., Soriano, P., and Maness, P.F. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 825–833
103. Ignelzi, M.A., Miller, D.R., Soriano, P., and Maness, P.F. (1994) *Neuron* **12**, 873–884
104. Doyle, J.P., and Colman, D.R. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 779–785
105. Lemke, G. (1988) *Neuron* **1**, 535–543
106. Nave, K.-A. (1994) *J. Neurosci. Res.* **38**, 607–612
107. Trapp, B.D. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 675–685
108. Trapp, B.D. (1990) *Ann. New York Acad. Sci.* **605**, 29–43
109. Owens, G.C., and Boyd, C.J. (1991) *Development* **112**, 639–649
110. Montag, D., Giese, K.P., Bartsch, U., Martini, R., Lang, Y., Blüthmann, H., Karthigasan, J., Kirschner, D.A., Wintergerst, E.S., Nave, K.-A., Zielasek, J., Toyka, K.V., Lipp, H.-P., and Schachner, M. (1994) *Neuron* **13**, 229–246
111. Li, C., Tropak, M.B., Gerlai, R., Clapoff, S., Abramow-Newerly, W., Trapp, B., Peterson, A., and Roder, J. (1994) *Nature* **369**, 747–750

112. Meyer-Franke, A., and Barres, B. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 847–850
113. Arquint, M., Roder, J., Chia, L.-S., Down, J., Wilkinson, D., Bayley, H., Braun, P.E., and Dunn, R. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 600–604
114. Lai, C., Brow, M.A., Nave, K.-A., Noronha, A.B., Quarles, R.A., Bloom, F.E., Milner, R.J., and Sutcliffe, J.G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4337–4341
115. Pedraza, L., Frey, A.B., Hempstead, B.L., Colman, D.R., and Salzer, J.L. (1991) *J. Neurosci. Res.* **29**, 141–148
116. Salzer, J., Holmes, P.W., and Colman, D.R. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 957–965
117. Higgins, G.A., Schmale, H., Bloom, F.E., Wilson, M.C., and Milner, R.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2074–2078
118. Poltorak, M., Sadoul, R., Keilhauer, G., Landa, C., Fahrig, T., and Schachner, M. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 1893–1899
119. Sadoul, R., Fahrig, T., Bartsch, U., and Schachner, M. (1990) *J. Neurosci. Res.* **25**, 1–13
120. Afar, D.E.H., Marius, R.M., Salzer, J.L., Stanners, C.P., Braun, P.E., and Bell, J.C. (1991) *J. Neurosci. Res.* **29**, 429–436
121. D'Eustachio, P., Colman, D.R., and Salzer, J.L. (1988) *J. Neurochem.* **50**, 589–593
122. Edwards, A.M., Arquint, M., Braun, P.E., Roder, J.C., Dunn, R.J., Pawson, T., and Bell, J.C. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2655–2658
123. Afar, D.E.H., Salzer, J.L., Roder, J., Braun, P.E., and Bell, J.C. (1990) *J. Neurochem.* **55**, 1418–1426
124. Jaramillo, M.L., Afar, D.E.H., Almazan, G., and Bell, J.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27240–27245
125. Dulac, C., Tropak, M.B., Cameron-Curry, P., Rossier, J., Marshak, D.R., Roder, J., and Le Douarin, N.M. (1992) *Neuron* **8**, 323–334
126. Stamenkovic, I., and Seed, B. (1990) *Nature* **345**, 74–77
127. Wilson, G.L., Fox, C.H., Fauci, A.S., and Kehrl, J.H. (1991) *J. Exp. Med.* **173**, 137–146
128. Simmons, D., and Seed, B. (1988) *J. Immunol.* **141**, 2797–2800
129. Kaplan, D.R., Morrison, D.K., Wong, G., McCormick, F., and Williams, L.T. (1990) *Cell* **61**, 125–133
130. Afar, D.E.H., Stanners, C.P., and Bell, J.C. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 46–52
131. Schulte, R.J., Campbell, M.A., Fischer, W.H., and Sefton, B.M. (1992) *Science* **258**, 1001–1004
132. Tropak, M.B., Johnson, P.W., Dunn, R.J., and Roder, J.C. (1988) *Mol. Brain Res.* **4**, 143–155
133. Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S., and Yamamoto, T. (1994) *Nature* **367**, 572–576
134. Pleiman, C.M., Abrams, C., Timson Gauen, L., Bedzyk, W., Jongstra, J., Shaw, A.S., and Cambier, J.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4268–4272
135. Clark, M.R., Johnson, S.A., and Cambier, J.C. (1994) *EMBO J.* **13**, 1911–1919

Received on March 10, 1995, accepted on March 21, 1995