

論文内容の要旨

申請者氏名 藤岡 洋美

Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) は神経細胞に発現する微小管結合領域を持つセリンスレオニンプロテインキナーゼであり、神経細胞の移動障害により生じる脳形成異常の原因遺伝子にコードされるDoublecortin (DCX) のパラログである。*Dclk1/Dcx*二重欠損マウスは大腦皮質の神経細胞の層構築異常を呈し、また*Dclk1*欠損マウスは左右の大腦半球を繋ぐ軸索線維である脳梁や海馬交連の形成異常を示すことから、DCLK1は神経細胞移動や軸索伸長の過程において機能していることが明らかにされている。DCLK1のキナーゼ領域はターゲットを介し機能すると考えられたが、その標的分子は未同定であった。本研究ではDCLK1のターゲットを同定し、その脳形成における機能を明らかにすることを試みた。

まず胎生16日のマウス胎児の脳可溶性画分よりDCLK1相互作用蛋白質をアフィニティークロマトグラフィー及び質量分析を用いて網羅的に同定した。次に*in vitro*キナーゼアッセイを用いてMAP7D1 (microtubule-associated protein 7 domain containing 1) を新規基質として同定し、さらに315番目のセリンがリン酸化部位であることを同定した。

MAP7D1の抗体を作製し、免疫染色により発現パターンを調べたところ、移動や軸索伸長の起こっている神経細胞においてDCLK1とともに発現していることを明らかにした。単離した大腦皮質神経細胞においてエレクトロポレーション法により遺伝子導入を行いMAP7D1のノックダウンを行った結果、MAP7D1やDCLK1のノックダウンではコントロールに比べ有意に軸索伸長が阻害されることを明らかにした。次にMAP7D1が生体内においても軸索伸長に関与するか否か明らかにするため、子宮内エレクトロポレーション法により胎生15日のマウス子宮内胎児の脳室帯の神経前駆細胞へ遺伝子導入を行い、脳梁を構築する軸索を伸ばす大腦皮質2/3層の神経細胞においてMAP7D1のノックダウンを行ったところ、MAP7D1やDCLK1のノックダウンではコントロールに比べ有意に軸索伸長が阻害されることを明らかにした。

最後にMAP7D1のリン酸化が脳梁の軸索伸長に関与するか否か明らかにするため、MAP7D1の野生型や非リン酸化変異体 (S315A、315番目のセリンをアラニンに置換したもの) を大腦皮質2/3層の神経細胞に過剰発現させた。その結果、野生型ではコントロールと比較し脳梁の軸索伸長に有意な差はみられなかったが、S315Aの過剰発現では軸索伸長が有意に阻害された。このことからS315Aがドミナントネガティブに作用し、本来のMAP7D1の機能を阻害してしまうことにより軸索伸長が阻害されたことが考えられた。

以上のように、本研究はDCLK1の新規基質MAP7D1を初めて同定し、さらにその315番目のセリンのリン酸化が軸索伸長に必要である可能性を初めて示した。本研究の成果はDCLK1の脳形成における分子機構を明らかにする上で重要なものと位置付けられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 藤岡 洋美

Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) は神経細胞に発現するセリンスレオニンプロテインキナーゼであり、遺伝子欠損マウスの解析から脳神経系の形成の際、神経細胞の移動や軸索伸長において機能することが明らかにされてきた。申請者はDCLK1がターゲット分子をリン酸化することによりこれらの脳神経系の発生において機能しているのかを明らかにするため、DCLK1のターゲットを同定し、神経細胞の軸索の伸長において機能するか解析を行った。

申請者はまずDCLK1のターゲットを同定するために、マウス胎児の脳可溶性画分より相互作用蛋白質をアフィニティークロマトグラフィー法を用いて単離し、さらにin vitro キナーゼアッセイによりMAP7D1を新規基質として同定した。次にMAP7D1の機能についてCRNAiによるノックダウンを用いて解析した。免疫染色により発生中の大脳皮質神経細胞に発現していることが分かったので、まず単離した大脳皮質神経細胞においてノックダウンを行ったところ、軸索伸長が阻害されることを明らかにした。さらに申請者は生体内においても軸索の伸長に関与するのか明らかにするため、子宮内エレクトロポレーション法を用いてマウスの胎仔脳の大脳皮質2/3層の神経細胞においてMAP7D1のノックダウンを行い、軸索伸長の様子を観察した。その結果、MAP7D1のノックダウンでは、DCLK1ノックダウンや*Dclk1*欠損マウスで見られるのと同様に、大脳皮質神経細胞の脳梁を構築する軸索の伸長が阻害されることを明らかにした。またMAP7D1のリン酸化部位を質量分析およびセリン-アラニン変異体を用いて決定した。さらにMAP7D1の野生型や非リン酸化変異体S315A (315番目のセリンをアラニンに置換したもの) を大脳皮質2/3層の神経細胞に過剰発現させ、野生型ではコントロールに対し脳梁の軸索伸長に有意な差はみられないが、S315Aではおそらくドミナントネガティブに作用し、軸索伸長が有意に阻害されることを明らかにした。

これまでDCLK1のキナーゼのターゲットは、いくつか提示されていたが、その機能についてはまだよくわかっていなかった。以上のように本論文はDCLK1の新規基質MAP7D1を明らかにしただけでなく、神経細胞の軸索の伸長において機能しており、さらにDCLK1によるリン酸化が軸索伸長において必要である可能性を初めて明らかにしたものである。また近年DCLK1はADHD(注意多動性障害)や統合失調症、双極性障害といった精神障害に関与することが報告されており、その病態理解の点でも、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。