

審査の結果の要旨

氏名 河 成鎮

本研究は神経機能におけるリン酸化反応の役割を分子生物学的に解析する一環として、脳特異的新規キナーゼの解析を試みたものであり、データベース検索により見出した新規キナーゼ BREK (Brain-Enriched Kinase) について分子・細胞及び個体レベルでの機能解析を進め、下記の結果を得ている。

1. BREK のファミリー分子である AATYK1 は抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロット法によりチロシンキナーゼであると報告されている。しかし本研究では、BREK およびそのファミリー分子である AATYK1, AATYK3 のキナーゼドメインを用いた *in vitro* キナーゼアッセイおよびリン酸化アミノ酸分析により、これらのキナーゼはセリン・スレオニンキナーゼであることを示した。

2. マウス組織に対するノーザンブロット法により BREK は脳特異的な発現を示す事確かめた。さらに、マウス成体脳切片に対する *in situ* hybridization 法の結果、*aatyk1* が広範な発現パターンを示すのに対し、BREK, *aatyk3* は特に前脳部分の神経細胞層で限局的に高い発現を示すことが明らかとなった。また、抗 BREK ウサギポリクローナル抗体を作製し、マウス脳における BREK 蛋白質の発現レベルおよびリン酸化レベルの経時的変化を調べた結果、BREK の発現レベル、リン酸化レベルともに生後 0-2 週間をピークとしており、この時期に BREK が最も活性化していることが示唆された。

3. NGF 刺激により早期 (5 分以内) に、内在性の BREK がリン酸化されることを見出した。このリン酸化は Trk キナーゼの阻害剤である k252a により抑えられたことから、BREK が NGF 受容体である TrkA の下流でリン酸化されることが確認された。さらに、種々のキナーゼ阻害剤の効果を検討した結果、Chelerythrine (PKC 阻害剤) が特

異的に NGF 刺激に伴う BREK のリン酸化を抑制することが明らかとなった。また、*novel, classical* PKC を活性化する PDBu 刺激により BREK のリン酸化が起こることからも、NGF 刺激に伴う BREK のリン酸化は PKC 活性に依存していることが強く示唆された。

4. レトロウイルス発現系により BREK のキナーゼ不活型変異体を導入した PC12 細胞においては、NGF 刺激に伴う Erk 経路の活性化が増強されていた。さらに、BREK のキナーゼ不活型変異体を導入した PC12 細胞においては、NGF 刺激後 2 日における神経突起の伸張が有意に増強されていた。以上の結果から、BREK が NGF 刺激による神経突起伸張反応を抑制することが示された。一方、NGF 刺激により分化した PC12 細胞において、BREK のキナーゼ活性は LPA 刺激に伴い活性化していた。レトロウイルス発現系を用いた同様の実験により、BREK の活性は LPA 刺激に伴う PC12 細胞の神経突起退縮を正に制御することが明らかとなった。

5. *BREK* 遺伝子座のキナーゼドメインをコードするエクソンをネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより、BREK ノックアウトマウスを作製した。BREK ノックアウトマウスは見かけ上正常に成育し、種々の染色による形態学的観察からは、脳を含む全身の臓器についての異常は発見できなかった。BREK ノックアウトマウス嗅球の糸球体近傍では軸策マーカの免疫反応性が高くなっていることから、嗅球内における軸策投射の異常が示唆されている。

以上、本論文は脳特異的キナーゼ BREK について、生化学的特性及び発現プロファイルの解析を行うことにより、BREK は生後初期の脳に発現するセリン・スレオニンキナーゼであることを明らかにした。さらに PC12 細胞における NGF-TrkA シグナルおよび LPA シグナルの新たな制御因子としての生理機能を明らかにしたことから、BREK は神経突起の発達を制御することにより、神経回路の形成に寄与することが示唆された。本研究は神経機能におけるリン酸化反応の意義の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。