

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 細胞極性を制御するリン酸化酵素 Par1b/MARK2 による
ラット海馬神経細胞からの樹状突起伸長制御機構の解明

指導教員 三木 裕明助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 寺林 健

神経細胞は高度に極性を有した細胞のひとつである。神経細胞の極性を理解するうえでラット海馬神経初代培養がよく使われている。通常、海馬神経細胞は細胞体から1本の軸索と複数の樹状突起と呼ばれる、異なる2種類の突起を有することで極性を形成している。軸索や樹状突起の伸長には微小管の重合が重要であり、実際に軸索、樹状突起では微小管の重合が促進されており、微小管が密に張り巡らされている。しかし、軸索の形成やガイダンス機構などについてこれまで多くの報告がなされているが、樹状突起の形成や伸長については未だ知見が乏しい。

セリン・スレオニンキナーゼである Par1b/MARK2 は細胞の極性を制御するタンパク質である。また MAP2 や Tau などの微小管結合タンパク質(microtubule-associated proteins, MAPs)をリン酸化することも報告されている。近年、Par1b/MARK2 が極性決定前のラット初代培養海馬神経細胞において軸索の決定に重要な役割を果たしていることが報告された。Par1b/MARK2 の強制発現は軸索の形成を阻害し、また内在性の Par1b/MARK2 の発現抑制により神経細胞は何本もの軸索を有するようになる。こ

これらの結果から Par1b/MARK2 が軸索決定に大きく関わっていると考えられるが、極性決定後の神経細胞においてどのような役割を持つのかは不明なままである。

そこで本研究では、極性決定後の神経細胞での Par1b/MARK2 の機能を、ラット初代培養海馬神経細胞を用いて解析した。

まず、極性決定後のラット海馬神経細胞において野生体 Par1b/MARK2 を過剰発現させた。このとき野生体 Par1b/MARK2 を発現している神経細胞では、コントロールに比べて、樹状突起の退縮と分岐端の減少が見られた。しかし、この現象はキナーゼ活性を持たない変異体 Par1b/MARK2 を発現している神経細胞では見られなかった。これらのことから、Par1b/MARK2 は極性決定後の神経細胞において樹状突起の伸長を負に制御していること、またそれには Par1b/MARK2 のキナーゼ活性が関わっていることが示唆された。

次に極性決定後の神経細胞の樹状突起伸長における内在性 Par1/MARK2 の役割を調べるために、RNA 干渉法により内在性の Par1b/MARK2 の発現抑制を試みた。神経細胞にラット Par1b/MARK2 に対する siRNA を導入し細胞の形態を観察すると、Par1b/MARK2-siRNA を導入した神経細胞は、コントロールに比べ、より長く、より分岐した樹状突起を有していた。さらに Par1b/MARK2-siRNA とヒト Par1b/MARK2 プラスミドを同時に導入した場合、Par1b/MARK2-siRNA の効果による樹状突起の伸長はみられず、コントロールの神経細胞と同等の樹状突起が観察された。過剰発現の結果と合わせると、これらの結果は Par1b/MARK2 が極性決定後の神経細胞において樹状突起の伸長を負に制御していることを示している。

極性決定後の神経細胞で Par1b/MARK2 が樹状突起の伸長を負に制御することが明らかになったことから、続いて Par1b/MARK2 の制御機構の検証を行なった。Dishevelled (Dvl)は Wnt シグナル情報伝達経路においてシグナルの分岐点として非常に重要な機能を有するタンパク質である。ラット海馬初代培養神経細胞において Dvl の強制発現により樹状突起が促進されること、また *Dvl-1* 遺伝子のノックアウトマウスの海馬初代培養神経細胞では正常な樹状突起の発達が起こらないことが報告されている。また、ショウジョウバエの Dvl である Dsh は Par1 と結合することが知られていることから、樹状突起伸長において Dvl と Par1b/MARK2 は機能的に競合する可

能性が考えられたため、その検証を行なった。

以前に報告されているように、Dvl を神経細胞に発現させた場合、神経細胞はコントロールに比べてより長く、より分岐した樹状突起を有するようになった。しかし、野生体 Par1b/MARK2 を Dvl と共発現させた場合、神経細胞には Dvl の過剰発現による効果は現れず、細胞はコントロールと同等の形態を示した。一方、キナーゼ活性を不活性化した変異体 Par1b/MARK2 は Dvl の効果を抑制しなかった。これらの結果から、樹状突起の伸長時において Par1b/MARK2 は Dvl に対して機能的に競合することが示唆された。

さらにこの機能的競合を分子レベルで解析した。Par1b/MARK2 による樹状突起伸長制御には Par1b/MARK2 のキナーゼ活性が重要であることが示唆されたことから、Dvl が Par1b/MARK2 のキナーゼ活性を阻害する可能性が考えられた。そこで Cos7 細胞において発現させた Par1b/MARK2 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行なったが、Dvl の発現による Par1b/MARK2 のキナーゼ活性の阻害はみられなかった。しかし Cos7 細胞に発現させた Par1b/MARK2 を細胞画分に分離したときに、Dvl と共発現した Par1b/MARK2 は膜画分に移行することが見出された。このことから Par1b/MARK2 の膜移行について検証することにした。

Dvl が Wnt シグナル伝達経路で働く因子であることから、Wnt 刺激に対して Par1b/MARK2 の局在変化が起こる可能性を考えた。神経細胞を Wnt3a で処理し細胞抽出液を細胞質、細胞膜の画分に分離すると、内在性の Par1b/MARK2 は膜画分に移行していた。またこのとき内在性の Dvl も膜画分に移行していた。これらの結果は Dvl が Par1b/MARK2 の膜画分への移行を促進すること、またそれが Wnt シグナルにより制御されていることを強く示唆している。

Wnt シグナルが樹状突起の伸長に関わっていることから、細胞質中に存在する Par1b/MARK2 が樹状突起の伸長を負に制御していると考えられる。そこで、ミリスチン酸付加配列を付加し恒常的に膜に局在するようにした膜局在変異体 Par1b/MARK2 を作製した。この変異体を神経細胞に発現させると、樹状突起の退縮は見られなかった。この結果は Par1b/MARK2 の細胞内局在の制御が Wnt による樹状突起伸長に重要であることを示唆するものである。

神経突起の伸長には微小管が安定的に伸長することが不可欠である。Dvl は微小管の安定化に関与しているとの報告があることから、次に微小管の安定化における Dvl と Par1b/MARK2 の関係を検証した。NIH3T3 細胞を微小管重合阻害剤であるノコダゾールで処理すると、細胞中の微小管構造は消失する。しかし Dvl を発現している細胞では、報告の通りに、ノコダゾール処理を行なっても微小管の消失は抑えられていた。さらに Dvl と野生体 Par1b/MARK2 を共発現させたとき、Dvl による微小管安定化は Par1b/MARK2 の発現により阻害されていた。またこの阻害効果は Par1b/MARK2 のキナーゼ活性に依存していた。これらの結果から、樹状突起の伸長には Dvl と Par1b/MARK2 による微小管の安定化制御が必要であると考えられる。

これまでの結果から Par1b/MARK2 は微小管の安定性を負に制御する因子であることが明らかとなったが、それでは何故 Par1b/MARK2 は樹状突起の伸長だけを選択的に抑制し、軸索の伸長には何も影響を与えないのだろうか。Par1b/MARK2 の基質となる Tau や MAP2 は、神経細胞においてそれぞれ主に軸索、樹状突起に局在している。これらのことから、Par1b/MARK2 が MAPs の中で MAP2 を優先的にリン酸化することにより樹状突起の伸長を選択的に抑制しているのではないかと考えられた。そこで、豚脳から精製した Tau と MAP2 を基質として、組み換えタンパク質 Par1b/MARK2 によるリン酸化を比較すると、MAP2 は Tau よりも優位にリン酸化されていた。この結果は Par1b/MARK2 が樹状突起の伸長だけを特異的に負に制御することを支持するものである。

以上、本研究において Par1b/MARK2 は極性形成後の神経細胞の樹状突起を負に制御していることが明らかになった。Par1b/MARK2 は樹状突起の細胞質に存在する MAP2 を優先的にリン酸化することにより、樹状突起の伸長を特異的に抑えていると考えられる。恒常的に膜に局在する変異体 Par1b/MARK2 は樹状突起伸長を阻害しなかったことから、樹状突起が伸長するには Par1b/MARK2 が細胞質から排除されることが重要であると考えられ、この Par1b/MARK2 の細胞内局在の制御には Wnt シグナルの関与が示唆された。

Wnt シグナルは樹状突起の伸長に深く関わっていることが知られている。しかし軸索ではなく、樹状突起特異的に伸長を引き起こす分子機構はこれまで明らかにされていなかった。本研究は極性決定後の神経細胞の樹状突起伸長における Par1b/MARK2 の機能を示すとともに、Wnt シグナルが何故樹状突起の伸長のみを促進するのかを説明する一助になるものである。このことから本研究は神経細胞の極性の獲得・維持を理解する上で新たな知見を与えられられる。