

[別紙2]

審査結果の要旨

氏名 寺林 健

本研究は、細胞の極性制御において重要な役割を果たしているセリン・スレオニンキナーゼ Par1b/MARK2 の極性決定後の神経細胞における機能解析をラット海馬初代培養神経細胞を用いて行なったものであり、下記の結果を得ている。

1. Par1b/MARK2 を発現させた極性決定後のラット海馬初代培養神経細胞の形態を観察することにより、Par1b/MARK2 の発現により樹状突起の伸長が抑制されることが見出された。またこの伸長抑制は Par1b/MARK2 のキナーゼ活性依存的に行なわれていることも明らかされた。さらに RNA 干渉法を用いて内在性の Par1b/MARK2 の発現を抑制することにより樹状突起の伸長が促進されたことから、極性決定後のラット海馬初代培養神経細胞において Par1b/MARK2 は樹状突起の伸長を負に制御していることが示された。
2. Wnt シグナル情報伝達経路の構成因子である Dvl はラット海馬初代培養神経細胞の樹状突起伸長を促進することが知られている。Dvl と Par1b/MARK2 を共発現させたラット海馬初代培養神経細胞の形態を観察することにより、Par1b/MARK2 は Dvl による樹状突起伸長を抑制することが見出された。このことは樹状突起伸長において Par1b/MARK2 は Dvl に対して競合的に機能することを示唆している。
3. *in vitro* において、Cos7 細胞に発現させた Par1b/MARK2 の MBP に対するキナーゼ活性の測定を行なったところ、Dvl の共発現により Par1b/MARK2 のキナーゼ活性は抑制されないことが示された。
4. Cos7 細胞に発現させた Par1b/MARK2 を低張液を用いて細胞画分に分離することにより、Par1b/MARK2 が Dvl 依存的に細胞質から細胞膜へと移行することが示された。またこのとき、Par1b/MARK2 は細胞膜において Dvl 依存的にリン酸化を受けられることも見出された。このリン酸化については、リン酸化残基の同定は果たされたが、生理的条件下におけるリン酸化の存在は示されていない。
5. Wnt 刺激をしたラット海馬初代培養神経細胞を細胞画分に分離することにより、内在性の Par1b/MARK2 は刺激依存的に細胞質から細胞膜へと移行することが示された。
6. src のミリストイル酸付加配列を付加した常膜局在型 Par1b/MARK2 を作製し、ラット海馬初代培養神経細胞に発現させたところ、樹状突起伸長の抑制は認められな

かった。このことから Par1b/MARK2 が細胞質に存在することが樹状突起伸長の抑制に必要であることが見出された。

7. Dvl は微小管重合阻害剤ノコダゾールに対して微小管を安定化することが知られている。Dvl の欠失変異体を作製しその微小管安定化能の検証を行なったところ、微小管安定化には PDZ ドメインとその周辺配列が必要であることが示された。また免疫沈降法により、この部位が Par1b/MARK2 との結合にも必要であることが示され、微小管安定化と Par1b/MARK2 との結合の相関性が見出された。
8. *in vitro* において、豚脳より精製した Tau、MAP2 に対する Par1b/MARK2 のキナーゼ活性の測定を行なったところ、Par1b/MARK2 は Tau よりも MAP2 を強くリン酸化することが示された。このことは神経細胞において Par1b/MARK2 が樹状突起の伸長を特異的に抑制することの一因であると考えられる。

以上、本論文は極性決定後のラット海馬初代培養神経細胞において、Par1b/MARK2 の機能、及びその制御機構を明らかにした。本研究は、これまで詳細に解析されていなかった Wnt シグナルによる樹状突起特異的伸長促進機構を明らかにしたことから、神経細胞の機能獲得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。