

## 論文内容の要旨

論文題目     A dual role of doublecortin-like kinase for dendritic morphology and synaptic function

和訳           樹状突起の形態及びシナプス機能におけるdoublecortin-like kinaseの二重の役割

指導教員     岡部 繁男 教授

                  東京大学大学院医学系研究科

                  平成20年4月編入学

                  医学博士課程

                  分子細胞生物学専攻

氏名           申 義庚

神経細胞が分化や細胞移動、形態形成過程を通しその機能を果たせるようになるため、微小管による細胞の形態構築はとても重要である。微小管のダイナミクス、及びその機能を制御している分子としてよく知られているのが、MAP1A、MAP1B、MAP2、また、tau といった微小管結合蛋白質 (MAPs)である。しかし、近頃の遺伝子解析の研究から、既存の MAPs とは異なる新たな遺伝子が同定されつつあり、その一つが Doublecortin (DCX) と言った滑脳症原因遺伝子である。DCX は、二つの微小管結合ドメインを持ち、MAP2 や

tau などが持つ結合機構とは異なる形で、微小管に結合し Lis1 とともに発生期の細胞移動に重要な役割を果している。DCX には、Doublecortin-like kinase1 (DCLK1) や Doublecortin-like kinase2 (DCLK2) といった二つのホモログ蛋白質が報告されており、胎生期から成体にわたって神経系で広く発現していることが確認されている。

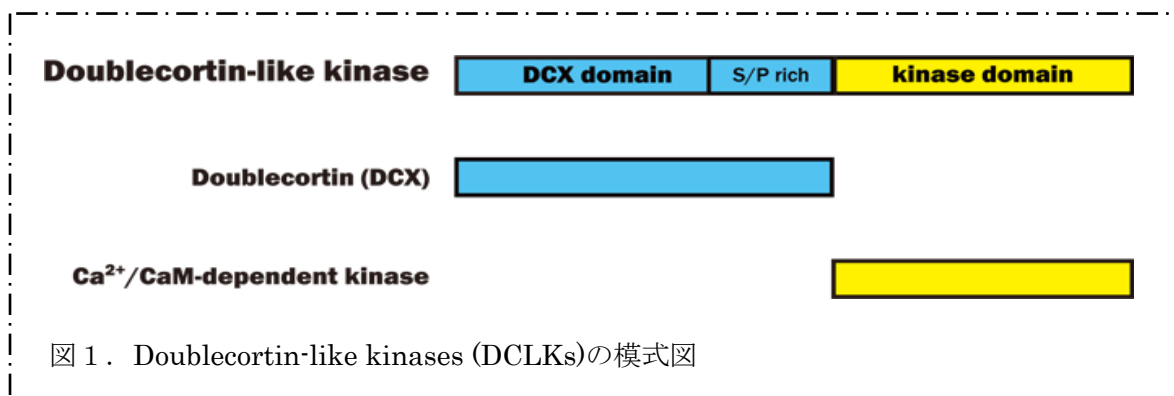
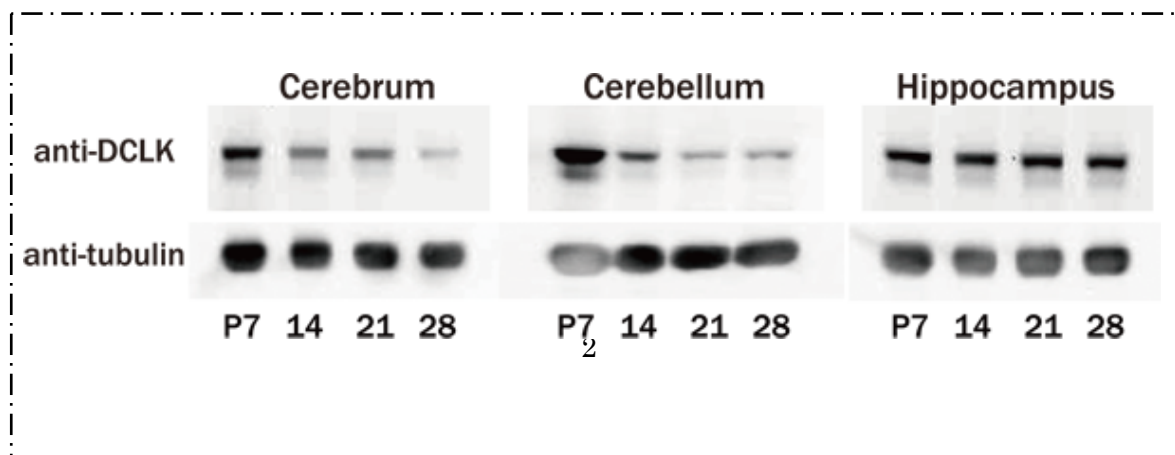


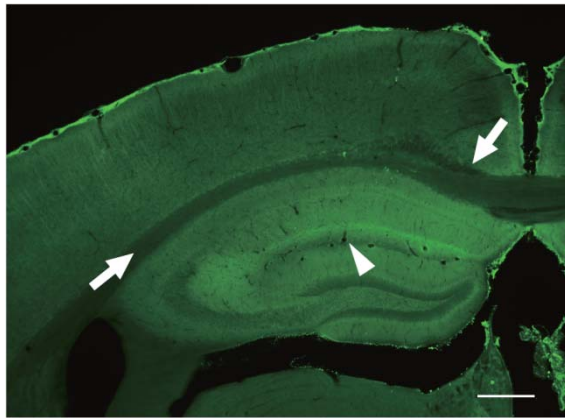
図 1. Doublecortin-like kinases (DCLKs)の模式図

DCLKs は、N-端側の Doublecortin (DCX) と類似した DCX domain と、C-端側の Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases (CaMKs) と類似した kinase domain の二つのドメインからなるキメラタンパク質である (図 1)。DCLKs は、DCX 同様、微小管結合蛋白として、細胞移動による脳の層構造形成に関与しているが、胎生期に限局して発現する DCX とは異なる発現パターンを持っていることから、生後の脳内での機能に注目が集まっている。そこで、本研究では、神経細胞の成熟過程において DCLK が持つ機能を明らかにすることを目標に以下の実験を行った。



## 図 2. 抗-DCLK 抗体による Western blot

DCLK の細胞内機能を調べるため最初に行ったのは、DCLK 特異的な抗体を制作し、その抗体を用いて、DCLK の発現部位や発現時期の評価することだった。マウスの脳組織（大脳、小脳、海馬）を用いてサンプルを抽出したうえで、抗-DCLK 抗体でウェスタンブロットを行ったところ、生後 7 日から生後 28 日までの全てのサンプルで DCLK の発現を確認することができた（図 2）。また、成体のマウスの脳切片を用いて免疫染色を行った結果、灰白質や海馬を含む多くの領域で DCLK の発現を確認することができた（図 3）。



DCLK / MAP2

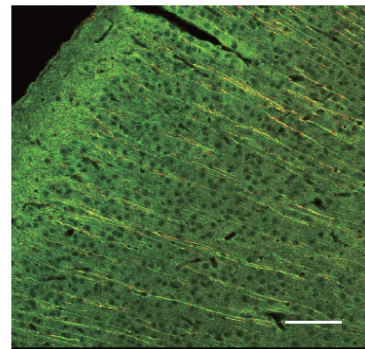
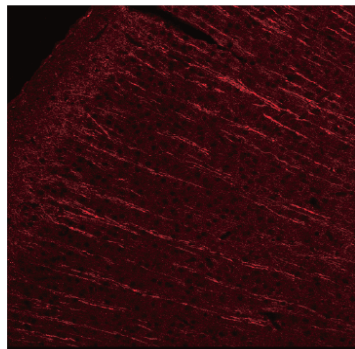
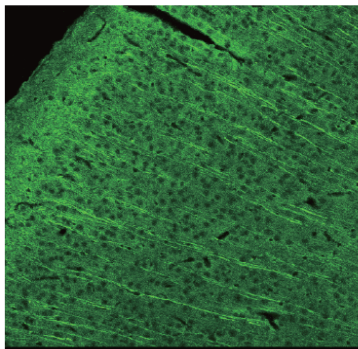
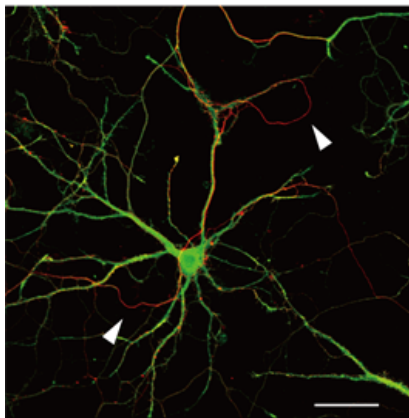


図3. 抗-DCLK 抗体による脳切片の免疫染色

DCLK / Tau



anti-DCLK / anti-MAP2

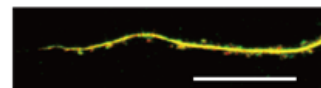
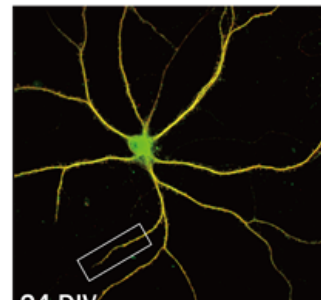
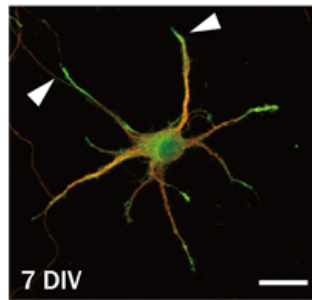


図4. DCLK の免疫染色

DCLK の細胞内局在をより詳細に調べるため、マウスの海馬分散培養を用いて免疫染色を行った。まず、培養 15 日目の成熟神経細胞を軸索のマーカー蛋白である tau と一緒に二重染色をしたところ、DCLK は樹状突起上に多く存在し、軸索での発現は少ないことが確認できた (図 4 左)。神経細胞の成熟による DCLK の分布変化をみるため、培養初期と培養後期の細胞を、樹状突起の微小管マーカーである MAP2 とともに染色し DCLK の局在を観察した。シナプス形成前の幼弱な細胞の場合 (培養 7 日目)、DCLK は樹状突起の先端部分に多く発現していた (図 4 中央)。しかし、シナプス形成がほぼ終了している培養後期の細胞 (培養 24 日目) では、先端での強い発現は見られなくなっていた (図 4 右)。これは、DCLK が突起の先端に局在し、幼弱なニューロンの突起伸長を促している可能性を示唆する結果である。

そこで、DCLK の樹状突起伸長への関与を確認するため、外来性の DCLK1-GFP を成熟した神経細胞に過剰発現して、DCLK1-GFP による樹状突起の長さの変化を観察した。その結果、コントロールの GFP では見られない急激な樹状突起の伸長が DCLK1-GFP の発現細胞で見られた (図 5)。

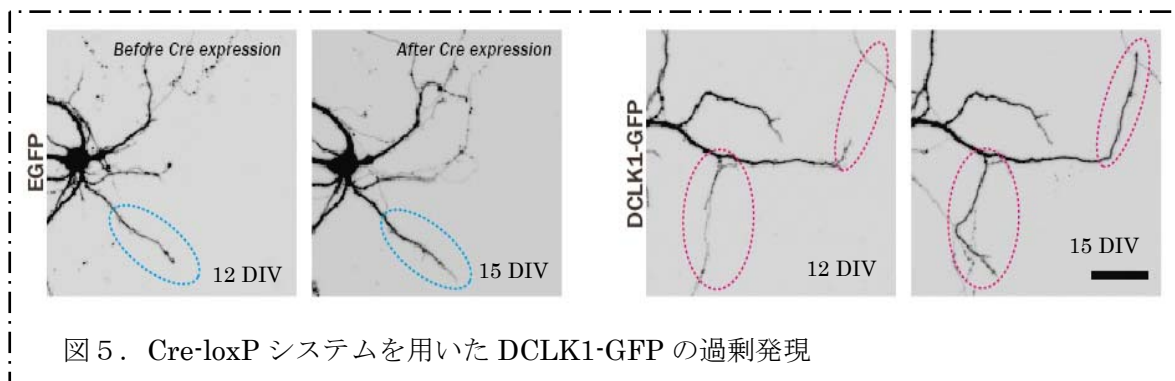
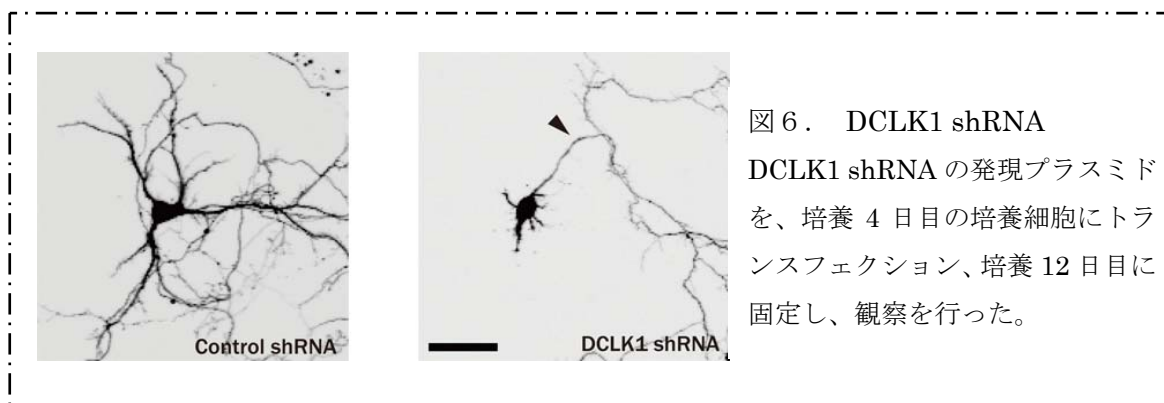
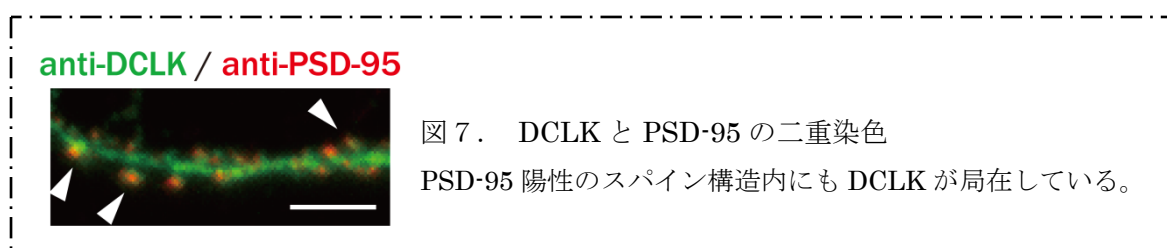


図 5. Cre-loxP システムを用いた DCLK1-GFP の過剰発現

一方、幼弱な神経細胞の DCLK1 の発現を、shRNA を用いて抑制すると、樹状突起の伸長がほぼ完全に抑制され、軸索だけが残った神経細胞が形成された。(図 6)

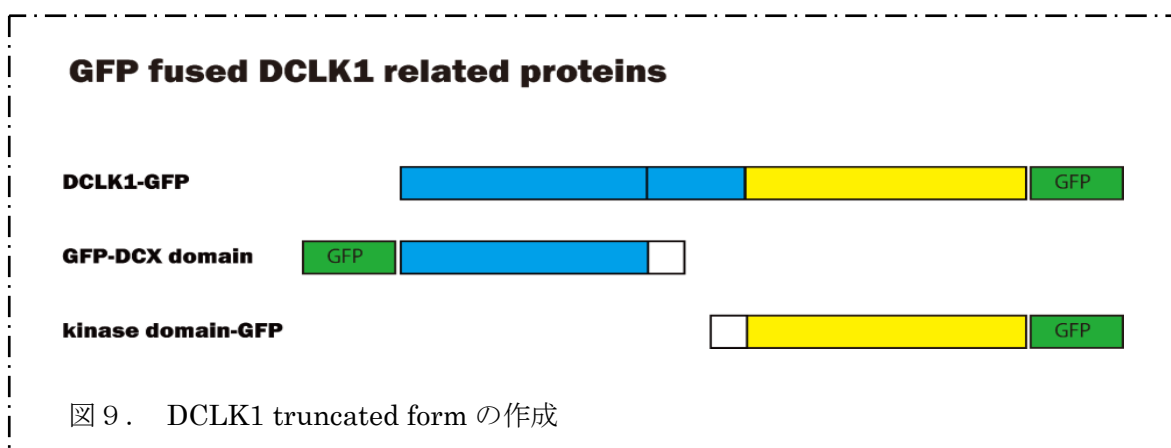
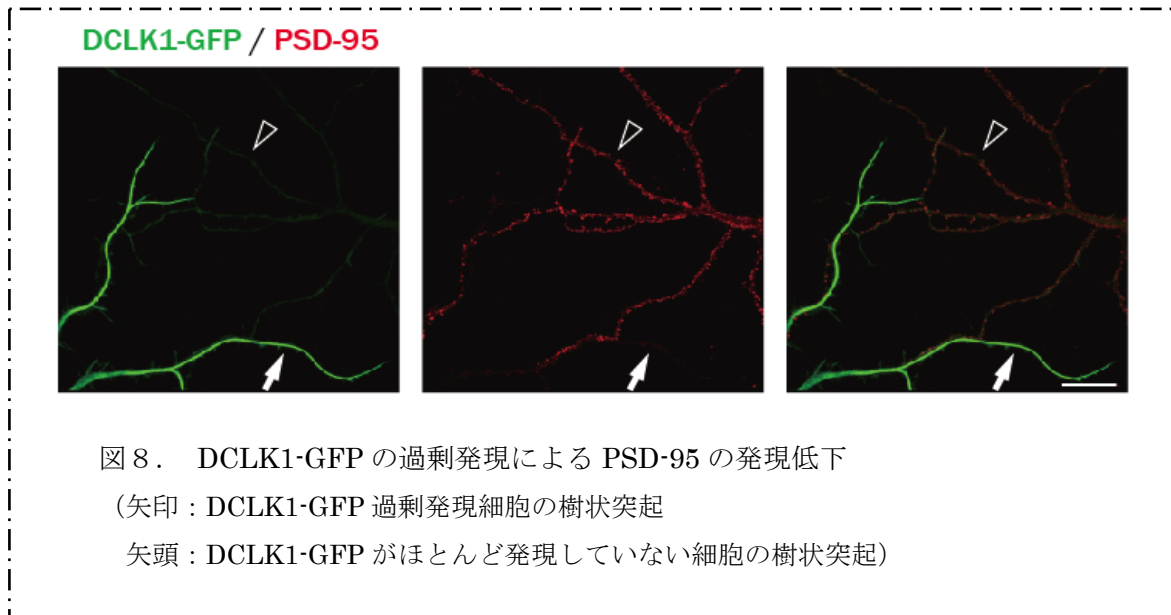


これらの結果から、DCLK は、神経細胞の成熟過程において、樹状突起の遠位側に局在し、樹状突起の伸長を促進する機能があることが明らかになった。



DCLK の局在をより細かく見ていくと、成熟した神経細胞のスパイン構造内でもその発現を確認することができた (図 7)。実際、生化学的分画法を用いて、脳組織から PSD 分画を精製し、抗-DCLK 抗体でウェスタンブロットを行うと、PSD 分画内に DCLK が存在することが明らかになった。また、PSD-95 を用いて免疫沈降実験を行ったところ、DCLK と PSD-95 との結合が確認できた。これらの結果は、DCLK が樹状突起上のスパイン構造に局在しながら、PSD タンパク質の機能に関与している可能性を示唆するものである。そこで、

アデノウィルスを用いて DCLK を過剰発現して、シナプス蛋白に発現変化がみられるか、免疫染色で確認を行った。その結果、DCLK1-GFP の過剰発現により、PSD-95 発現レベルが著しく低下することが確認できた (図8)。



DCLK が持つ二つのドメインの内どちらが PSD-95 の発現調節に関与しているかを確かめるため、DCLK1 の truncated form (GFP-DCX domain, kinase domain-GFP) を作成し、全長と同様に PSD-95 の発現レベルを測定したところ、キナーゼドメインを過剰発現した神経細胞で著しい PSD-95 の発現変化がみられた (図 10)。これは、DCLK 内の C-端のキナーゼドメインが PSD-95 の発現を抑制していることを示す結果である。

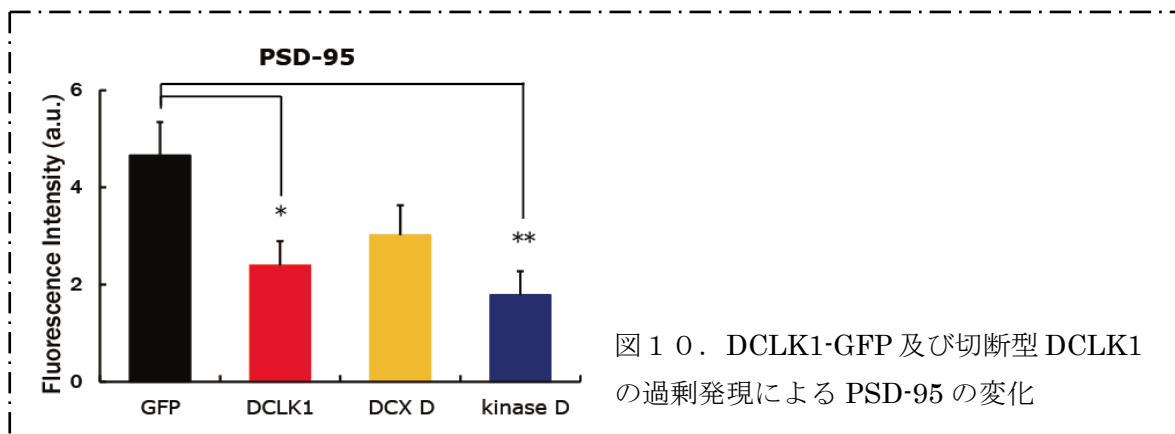


図 10. DCLK1-GFP 及び切断型 DCLK1 の過剰発現による PSD-95 の変化

しかし、N-端の DCX ドメインのみを発現させた場合も、有意差は認められなかったものの、PSD-95 の減少傾向が観察されている。これは DCX ドメインの過剰発現が、間接的にスパイン内の PSD-95 発現を減少させている可能性を示唆する結果である。そこで、DiI 染色を用いて、これらの過剰発現細胞のスパイン形態の観察を行ったところ、DCLK1 の全長と DCX domain の過剰発現細胞で、通常より長いフィロポディア状の突起が多く観察された (図 11)。これは、DCLK が N-端側の DCX domain を介しスパインの形態形成に関与していることを意味する。



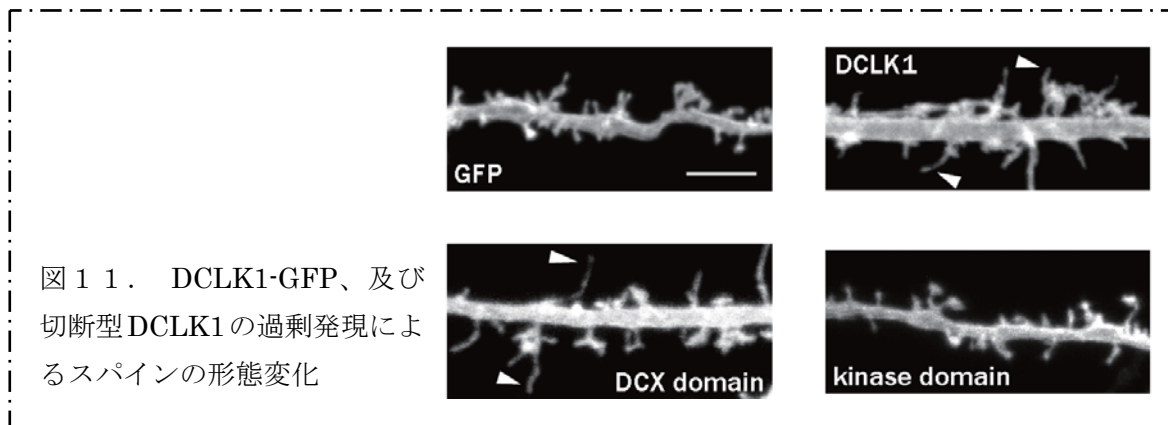


図 1 1. DCLK1-GFP、及び  
切断型DCLK1の過剰発現によ  
るスパインの形態変化

DCLK の過剰発現によって、スパインの PSD 蛋白の発現低下や、スパインそのものの形態変化が起こるとしたら、それは神経細胞のシナプス活動に影響を与えると考えられる。

そこで、DCLK1-GFP 過剰発現細胞の mEPSC を測定した。その結果、DCLK1-GFP の過剰発現により、mEPSC の振幅の低下及びイベント間隔の上昇が確認できた (図 1 2)。

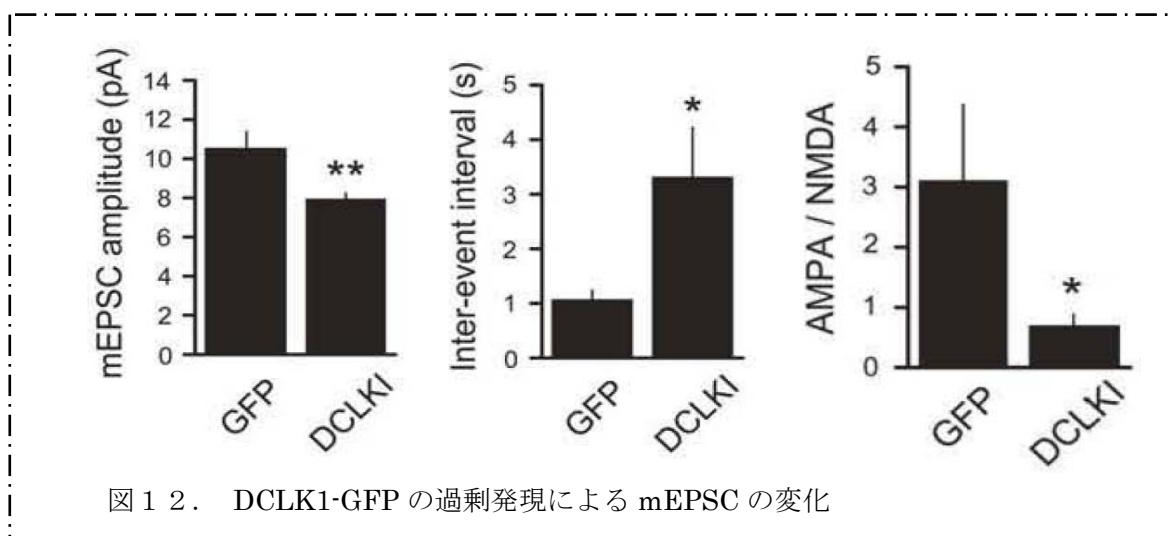


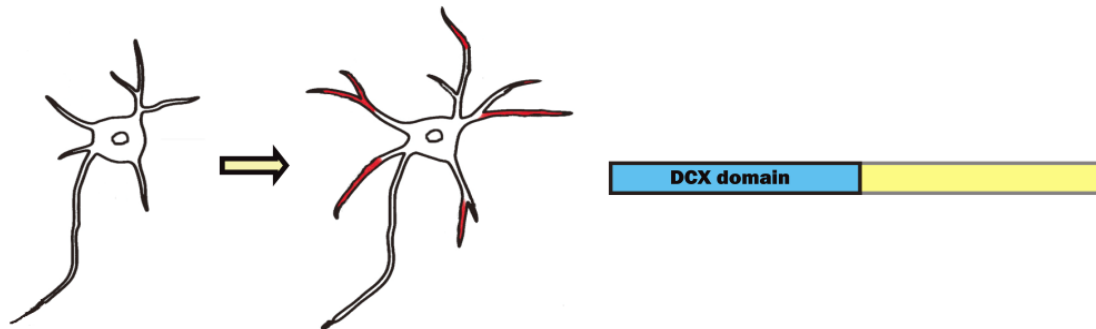
図 1 2. DCLK1-GFP の過剰発現による mEPSC の変化

これは、神経細胞のシナプス活動が低下していることを意味する。前述の DCLK の免疫染色や免疫沈降の結果から、DCLK はシナプス後部のスパイン内に局在することが考えられる。そこで、我々は DCLK によるシナプス活動の低下はシナプス後部側の変化によるものだと仮定し、その確認のため evoked EPSC の測定を行った。予想通り、DCLK1-GFP の過剰発現細胞では AMPA/NMDA 比が著しく低下していることが確認できた。

これらの結果から、DCLK はキナーゼドメインを介し PSD-95 発現を調節、またその DCX ドメインを介しスパインの形態形成に関与することで、機能的なグルタミン酸作動性シナプスの数及び伝達効率を調節する機能を持つことが明らかになった。

本研究は、今まで知られていた幼弱神経細胞の層構造形成とは異なる、成熟ニューロンにおける DCLK の二つの機能を明らかにした。

1. DCLK は樹状突起の伸長を促進する機能を持つ。



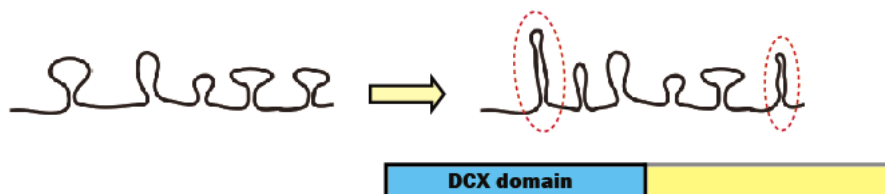
DCLKs は樹状突起の遠位側に局在しながら、微小管の束化によって樹状突起の伸長を促進することが我々の研究によって確認できた。

2. DCLK は、多様な経路を介し、グルタミン酸作動性シナプスの成熟を抑制する。

2-1. C-端のキナーゼドメインを介しシナプス後部の PSD-95 発現を抑制、



2-2. N-端の DCX ドメインによりスパインの形態変化を起こし、結果的にグルタミン酸作動性シナプスの活動を低下させる



これらの結果から、DCLKs は樹状突起に特異的に局在し、突起の先端で樹状突起の伸長を

促進しながら、シナプス形成を制御する多機能性蛋白であることが明らかになった。