

Gタンパク質シグナルによるダブルコルチンの
リン酸化を介した神経前駆細胞の遊走制御機構の解明

鳥山 真奈美

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子情報薬理学 講座

(伊東 広 教授)

平成24年3月31日提出

目次

序論	3
材料と方法	7
結果	18
図	26
考察	53
謝辞	60
参考文献	61

序論

大脳皮質の発生時期における神経細胞の増殖、移動、分化は、様々なシグナル伝達経路により厳密に制御されている。大脳皮質の神経細胞は規則正しく分布されることで六層の層構造を形成している。この六層の層構造が正しく形成されるには神経前駆細胞の遊走が適切に起こることが不可欠である (Nadarajah and Parnavelas, 2002; Bielas *et al.*, 2004)。

六層構造の最下層である脳室帯 (ventricular zone、VZ) では神経幹細胞が増殖を繰り返しているが、非対称分裂により産生された神経前駆細胞は皮質表層へと垂直方向に遊走し (Radial migration)、決まった位置に配置することでそれぞれの層構造を形成したあと、最終的にニューロンへと分化することで、緻密な神経回路網が構築される (Levison and Goldman, 1993、Suzuki and Goldman, 2003、Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001; Solecki *et al.*, 2004) (図 1)。Radial migration は細胞体トランスロケーションと呼ばれる様式、ロコモーションと呼ばれる様式、更に多極性移動の三つの様式が観察されている。細胞体トランスロケーションとは、脳室帯に存在する一部の神経前駆細胞が脳表面にまで突起を伸長し接着させ、脳表面との接着を維持したまま突起を収縮させることによって細胞体を皮質表層へと移動させる様式である (Nadarajah *et al.*, 2001)。一方、ロコモーションと呼ばれる様式は放射状グリア細胞を足場にして移動する様式であり、先端突起の伸長と核移動が続けて起こることで遊走を完了させる (LoTurco and Bai, 2006)。多極性移動はタイムラプス顕微鏡により最近明らかとなった、先の二種とは異なる移動方式である。トランスロケーション様式により細胞体が中間帯 (intermediate zone、IZ) 付近に移動したあと、伸長していた突起を収縮させることで多極性の細胞となる。この多極性細胞は中間帯に数日間停滞した後、再び双極性となり、放射状グリア細胞に沿って移動する (Tabata and Nakajima, 2003、Noctor *et al.*, 2004)。このように、神経前駆細胞の遊走は非常に複雑かつ厳密的に、時空間的に制御されているが、遊走を制御する詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。

大脳皮質発生時、特に神経前駆細胞の遊走に異常が生じる遺伝子疾患は多数知られている。しかし、神経前駆細胞の遊走に関与するとされる種々のタンパク質の詳細な機能や大脳皮質の発生メカニズムは、未だ不明な点が多い (Kerjan and Gleeson, 2007)。ダブルコルチン (Doublecortin, DCX) は X 染色体連鎖性滑脳症/皮質下帯状異所性灰白質 (subcortical band heterotopia、SBH) の原因遺伝子として、連鎖解析により同定された遺伝子である (Ross *et al.*, 1997)。滑脳症患者では、DCX のアミノ酸のミスセンス変異が確認されており (Taylor *et al.*, 2000:

Leger *et al.*, 2008)、てんかんや精神遅滞といった症状が見られる。女性患者の場合は大脳皮質の白質内の一部にもう一層の灰白質が存在するという **Subcortical band heterotopia (SBH)** の症状が見られるが、一方で男性患者の場合は女性患者よりもさらに重篤な症状が観察され、大脳皮質の層構造が破綻し、平滑な脳表となる。このような大脳皮質の層構造の異常は神経前駆細胞の遊走が正常に起こらないために生じると考えられているが、詳細な疾患の発症メカニズムや有効な治療法は確立されていない。

DCX のノックアウトマウスは大脳皮質の層構造および細胞の放射状移動に異常は観察されない (Corbo *et al.*, 2002、Kappeler *et al.*, 2006)。しかしながら *in utero* の系で shRNA 発現プラスミドを脳室体に導入し DCX を発現抑制したラットでは神経前駆細胞の遊走が中間帯付近で停止する (Bai *et al.*, 2003)。また、DCX と類似したアミノ酸配列をもつ DCX 様キナーゼ (DCLK) と DCX のダブルノックアウトマウスでは滑脳症様の遊走異常を示す (Deuel *et al.*, 2006)。これらのことから、DCX が神経前駆細胞の細胞骨格を調節しその遊走を制御することで、大脳皮質の発生に重要な役割を担っていると考えられている。

DCX は微小管結合タンパク質のひとつであり、微小管の安定化、束状化、また微小管の形成促進に関わっていることが報告されている (Horesh *et al.*, 1999、Greeson *et al.*, 1999、Moores *et al.*, 2004、Moores *et al.*, 2006)。DCX は進化的によく保存された二つの微小管結合配列 (DCX ドメイン) を持ち、この二つの配列が協働的に作用して機能を発揮していると示唆されている (Taylor *et al.*, 2000、Kim *et al.*, 2003) (図 2)。また、DCX は遊走している培養神経前駆細胞内において、核周囲、先端突起、成長円錐に存在する微小管に強く局在しており (Tanaka *et al.*, 2004(2))、神経前駆細胞の微小管の動態を複雑に調節することで遊走を制御していると考えられている。

DCX は数種のタンパク質リン酸化酵素や脱リン酸化酵素によりリン酸化、脱リン酸化される。DCX は Protein kinase A (PKA) / Microtubule affinity regulatory kinase (MARK) によって 47 番目のセリン (Ser47) がリン酸化され、protein phosphatase 2A (PP2A) によって脱リン酸化を受ける (Schaar *et al.*, 2004)。また、Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) により 297 番目のセリン (Ser297) がリン酸化され (Tanaka *et al.*, 2004 (1))、protein phosphatase 1 (PP1) により脱リン酸化される (Bielas *et al.*, 2007)。PKA や Cdk5 によるリン酸化は、DCX の微小管への親和性を減少させることが明らかにされている。一方、c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) によって 321 番目と 331 番目のスレオニン (Thr321、Thr331)、334 番目のセリン (Ser334) がリン酸化され (Gdalyahu *et al.*, 2004)、PP1 によって脱リン酸化されることが明らかにされた (Shmueli *et al.*, 2006、Tsukada *et al.*, 2006)。その他に、Rho kinase や GSK3 β によってもリン酸化されることが報告されている

(Amano *et al.*, 2010; Bilimoria *et al.*, 2004)。これらの報告より、DCX が異なるリン酸化酵素により異なる部位がリン酸化されることでその機能が制御されていると考えられるが、発生時期にこれらのリン酸化酵素がどのように使い分けられているのか、またこれらのリン酸化酵素の上流のシグナル伝達経路については明らかではない。

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は細胞膜を七回貫通する特徴的な構造を持ち、ホルモンをはじめとした生理活性物質などのシグナルを細胞外から細胞内へと伝達する機能をもつ。これまでに非常に数多くの GPCR が明らかとなっており、これらはスーパーファミリーを形成している。GPCR は三量体 G タンパク質と共役しており、三量体 G タンパク質を介したシグナルは様々な生体応答を誘導する (Marinissen and Gutkind, 2001)。

三量体 G タンパク質は $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ の三種類から構成されており、刺激が入っていない定常状態では $G\alpha$ は GDP と結合しており、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ とともにヘテロ三量体を形成している。しかし、GPCR にリガンドが結合すると、GPCR は構造変化を起こし、 $G\alpha$ に結合している GDP を解離して、GDP の代わりに細胞内に多量存在している GTP と結合した $G\alpha$ に変換する。また、この GDP-GTP 交換反応により三量体 G タンパク質は $G\alpha$ サブユニットと $G\beta\gamma$ 複合体に解離し、 $G\alpha$ 及び $G\beta\gamma$ 複合体は各々のエフェクターを調節し、下流へとシグナルを伝達する (Kaziro *et al.*, 1991)。 $G\alpha$ は $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{12/13}$ の 4 つのファミリーに分類されるが、これらの $G\alpha$ が伝達するシグナル経路は異なっている。 $G\alpha_s$ はアデニル酸シクラーゼを活性化させることにより cAMP の産生を促し、PKA を活性化するシグナルを伝達する。一方、 $G\alpha_i$ は $G\alpha_s$ とは逆に、cAMP の産生を抑制する。 $G\alpha_q$ はホスホリパーゼ $C\beta$ を活性化することでジアシルグリセロール及びイノシトール三リン酸 (IP3) の産生を誘導し、IP3 は小胞体からの Ca^{2+} イオンの流出を促す。 $G\alpha_{12/13}$ は Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の活性化を介して Rho を制御することにより、アクチン細胞骨格の編成を制御する (Milligan and Kostenis, 2006)。

個々の GPCR によって共役する $G\alpha$ のサブタイプは異なり、GPCR が伝達するシグナルは多岐にわたる。例えば、免疫系や内分泌系、また循環器系などの恒常性維持に関わるだけでなく、発生時期の細胞の増殖、分化、遊走などにも関与していることが知られている。大脳皮質の発生においても例外ではなく、数種類の GPCR が大脳皮質発生の制御に関わるということが報告されている。Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は GPCR である PAC1 を活性化するリガンドとして知られており、 G_s -PKA を活性化するシグナルと G_q -PLC β を活性化するシグナルを伝達することが知られる (Spengler *et al.*, 1993)。また、PACAP ノックアウトマウスの大脳皮質は野生型マウスに比べて薄くなることが

報告がされており、PACAP が大脳皮質の発生、特に神経前駆細胞の遊走に関与していることが示唆されていた (Botia *et al.*, 2007)。一方、当研究室では大脳皮質のスライス培養系を用いて、血管収縮物質である Endothelin-1 (ET-1) による刺激が、GPCR である B-type Endothelin receptor (ETRB) とこれに共役する Gq を介して JNK を活性化することで、神経前駆細胞の radial migration を抑制することを明らかにした (Mizuno *et al.*, 2005)。更に、大脳脳室の拡大や大脳皮質の層構造に異常が生じる疾患である、両側性前頭登頂多少脳回の原因遺伝子として発見された GPR56 が G12/13、またこの下流分子である Rho GEF を介して Rho の活性化を誘導し、神経前駆細胞の遊走を抑制することを見出した (Iguchi *et al.*, 2008)。これまでは GPR56 はリガンド未知のオーファン受容体として知られていたが、2011 年に、GPR56 のリガンドとしてコラーゲンⅢが同定され (Luo *et al.*, 2011)、生体内における GPR56 による神経前駆細胞の遊走調節機構が明らかにされつつある。

一方、当研究室では、PACAP が cAMP と PKA を介して神経前駆細胞の放射状移動を促進するという結果を得ていた。しかし、PKA より下流のシグナル伝達分子は特定されておらず、どのようなメカニズムで PACAP が神経前駆細胞の遊走を促進させているのか明らかではなかった。

そこで私は、神経前駆細胞の遊走制御に関与し、更に PKA によってリン酸化される分子である DCX に着目し、PKA による DCX のリン酸化が神経前駆細胞の遊走調節に関わるのか、更に、G タンパク質シグナルが神経前駆細胞の遊走制御、あるいは大脳皮質の形成に寄与しているのかを明らかにするために研究を行った。その結果、PACAP 刺激によって、DCX のリン酸化が亢進されること、更に、PKA リン酸化部位である Ser47 をグルタミン酸置換した変異体 (疑似リン酸化型変異体、S47E) は神経前駆細胞の遊走を促進させることを見出した。また、S47E 変異は微小管への親和性を減弱させ、DCX による微小管の動態調節を変化させるだけでなく、低分子量 GTP 結合タンパク質である Rac1 の活性化を介してアクチン骨格の制御にも関わることを明らかにした。これらの結果は DCX が関与する様々な神経機能のメカニズムを説明する際のブレイクスルーとなると考えられる。

材料と方法

マウス胎仔脳由来神経前駆細胞の調製と培養

胎生 11.5 日マウスから大脳を採取し、0.05 % トリプシン, 0.67 mg/ml ヒアルロニダーゼ, 0.1 mg/ml DNase を含む Low Ca & High Mg aCSF 培地 (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 3.2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM D-グルコース) で細胞を懸濁し、37 °C で 15 分間インキュベートした。1.4 mg/ml オボムコイドを加えトリプシンの反応を停止させた後、ピペッティングすることで個々の細胞に分離させた。1,000 rpm で 3 分間遠心後に上清を取り除き、5 ml の aCSF 培地 (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM D-グルコース) で沈殿を懸濁し 70 µm nylon cell strainer (BD Falcon) を用いて細胞をろ過した。ろ過した細胞懸濁液を 180×g で 3 分間遠心し、上清を取り除いて沈殿を D/F 培地 (Doublecco's modified eagle's medium : Nutrient mixture F12 (1:1), Gibco) に懸濁し、細胞数を 2×10⁶ cells/dish となるように調製して 20 mg/ml poly-HEMA であらかじめコートした 10 cm ディッシュにまいた。更にサプリメントとして培養液に 1 mg/ml BSA (Sigma), 2 µg/ml ヘパリン, 1×B27 supplement (Invitrogen), 20 ng/ml mouse EGF (Roche), 20 ng/ml Human basic FGF (Peprotech) を加えた。37 °C, 5% CO₂ の条件下で 3 日間培養し、ニューロスフェアを形成させた。また、継代は三日ごとに行った。

株化細胞の培養

ヒト胎児腎臓由来である HEK293T 細胞及びアフリカミドリザル腎臓由来である COS7 細胞は、10 % のウシ胎児血清 (MP Biomedicals) 及びペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む Doublecco's modified eagle's medium (DMEM; Sigma) 中で、37 °C, 5 % CO₂ の条件下で培養した。HEK293 細胞は 10 % のウシ胎児血清 (Collect) 及びペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む DMEM 培地で培養した。

これらの細胞は培養皿中でコンフルエントに達する前に 0.25 % トリプシン溶液で細胞をはがし、細胞を 10 倍に希釈して新しい培養皿に継代した。

ウェスタンブロット

調製したサンプルを、12 % アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、その後 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Millipore) に転写した。

メンブレンを 5 %スキムミルクを含む PBST (137 mM NaCl, 8 mM NaHPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.5 % (w/v) Tween-20) に 1 時間浸し、ブロッキングを行った。5 %スキムミルクを含む PBST で希釈した一次抗体でメンブレンを浸し 2 時間静置した。その後、5 分毎に 3 回 PBST で洗浄し、5 %スキムミルクを含む PBST によって希釈した HRP 標識二次抗体でメンブレンを浸し、1 時間静置した。PBST で 3 回洗浄し、ECL 試薬 (GE Healthcare) を用いて検出を行った。

なお、用いた一次抗体とその希釈率は次の通りである。

一次抗体：

ヤギ抗ダブルコルチン抗体 (C18), 1/1000 希釈 (Santa Cruz biotechnology)

マウスモノクローナル抗β-チューブリン抗体, 1/1000 希釈 (Sigma)

マウス抗 FLAG 抗体 (M2), 1/1000 希釈 (Sigma)

マウス抗 Myc 抗体 (9E10), 1/2000 希釈 (Covance)

マウス抗アクチン抗体, 1/1000 希釈 (Santa cruze biotechnology)

マウス抗 Rac1 抗体, 1/500 希釈 (Upstate Biotechnology (UBI))

DCX リン酸化部位変異体の作製

pCMV5-FLAG-DCX -WT を鋳型とし、以下のプライマーを使用し QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、各変異体を作製した。

pCMV5-FLAG-DCX A-S47A)

5'-GAACCTTGCAGGCATTAGCTAATGAGAAGAAGGCCAAG-3'

5'-CTTGGCCTTCTTCTCATTAGCTAATGCCTGCAAGGTTC-3'

pCMV5-FLAG-DCX -S47E

5'-GAACCTTGCAGGCATTAGAGAATGAGAAGAAGGCCAAG-3'

5'-CTTGGCCTTCTTCTCATTCTCTAATGCCTGCAAGGTTC-3'

pCMV5-FLAG-DCX -T331A/S334A

5'-GCAGTCTCCTATCTCTGCACCCACAGCCCCTGGAAGTCTGC-3'

5'-GCAGACTTCCAGGGGCTGTGGGTGCAGAGATAGGAGACTGC-3'

pCMV5-FLAG-DCX-T331E/334E

5'-GCAGTCTCCTATCTCTGAACCCACAGAGCCTGGAAGTCTGC-3'

5'-GCAGACTTCCAGGCTCTGTGGGTTCAGAGATAGGAGACTGC-3'

アデノウイルスの作製

DCX をノックダウンする 4 種類の siRNA (Dharmacon) のうち、神経前駆細胞において DCX の発現抑制効率の高かった①と④の配列を基にこれらの shRNA を産生するアデノウイルス及び 3' UTR 配列を標的とした shDCX 3'UTR (Bai *et al.*,2003) のアデノウイルスを構築した。

センスオリゴ DNA とアンチセンスオリゴ DNA をそれぞれ 1 µg ずつ 23 µl のアニーリングバッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 5 mM MgCl₂) に溶解し、ヒートブロックで 90 °C, 3 分間熱変性させた。ヒートブロックを室温に置き温度を徐々に下げアニーリング後、HindIII 及び Mlu I で処理した siRNA expression vector pRNAT-H1.1 / Adeno (GenScript Corporation) に挿入した。正常に挿入されたかどうかはシーケンスを読むことで確認した。これらを Pme I により切断し、pAdEasy-1 Vector をもつ組み換え用 BJ5183-AD-1 electroporation competent cell (Stratagene) にエレクトロポレーション法によって導入した。続いてカナマイシンを含んだ LB 培地に播種し、約 20 時間後に形成された小さいコロニーを選択し siRNA expression vector pRNAT-H1.1 / Adeno と pAdEasy-1 vector との間に組換えが起こったことを Pac I による制限酵素マッピングにより確認した。3.0 kbp もしくは 4.5 kbp の位置に切り出されたバンドが存在するサンプルを、組換えが正常に起こった DNA と判断した。続いて組換えが起こったプラスミドを XL10-GOLD ultracompetent cells (Stratagene) に導入し、増幅させ精製した。0.3 mg/ml コラーゲン (新田ゼラチン) でコーティングした 6 cm ディッシュに HEK293 細胞を播種し、これに Pac I 処理によって線状化したプラスミドをリン酸カルシウム法によって導入した。この HEK293 細胞を回収し凍結融解を繰り返すことで細胞を破碎し、1,600×g で 15 分遠心することで上清を 1 次シードウイルス液として回収した。1 ml の上清をコラーゲンコートした 6 cm ディッシュに播種した HEK293 細胞にかけ、翌日 FBS を含む DMEM 培地を足した。一次シードウイルス液回収時と同様に二次シードウイルス液を回収し、以上の操作を四次シードウイルスを回収するまで続けた。

設計した siRNA の配列を以下に示す。

siDCX① センス

5'-GGAGUGC GCGUACA UUUUAU AUU-3'

siDCX① アンチセンス

5'-UAUAAAUGUAGCGCACUCCUU-3'

siDCX② センス

5'-GGAAACCGGAGUUGUCAAAUU-3'

siDCX② アンチセンス

5'-JUUGACAACUCCGGUUUCCUU-3'

siDCX③ センス

5'-GCAGAGUCAUGAAAGGGAAUU-3'

siDCX③ アンチセンス

5'-JUCCCUUUCAUGACUCUGCUU-3'

siDCX④ センス

5'-GUACGUUUCUACCGCAAUGUU-3'

siDCX④ アンチセンス

5'-CAUUGCGGUAGAAACGUACUU-3'

また、コントロールに用いた siLuciferase 配列を以下に示す。

5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA-3'

また、shRNA 産生アデノウイルスシャトルベクターに挿入したオリゴ DNA 配列を以下に示す。

shDCX ① sense

5'-CGCGTCCGGAGTGCGCTACATTTATATTTTCAAGAGAAATATAAATGTAGCGCACTC
CTTTTTTA-3'

shDCX ① anti sense

5'-AGCTTAAAAAGGAGTGCGCTACATTTATATTTCTCTTGAAAATATAAATGTAGCGCA
CTCCGGA-3'

shDCX ④ sense

5'-CGCGTCCGTACGTTTCTACCGCAATGTTTTCAAGAGAAACATTGCGGTAGAAACGTA
CTTTTTTA-3'

shDCX ④ anti sense

5'-AGCTTAAAAAGTACGTTTCTACCGCAATGTTTCTCTTGAAAACATTGCGGTAGAAAC
GTACGGA-3'

shDCX 3' UTR sense

5'-CGCGTCCGCTCAAGTGACCAACAAGGCTATAGACACAATAGCCTTGTTGGTCACTTG
AGCTTTTTTA-3'

shDCX 3' UTR anti sense

5'-AGCTTAAAAAGCTCAAGTGACCAACAAGGCTATTGTGTCTATAGCCTTGTTGGTCAC
TTGAGCGGA-3'

レトロウイルスの作製

DCX とその変異体の cDNA を pMYs-IRES-GFP レトロウイルスベクターの BamH I /Xho I サイトに挿入した。また、HEK293T 細胞を 6cm ディッシュに培養し、24 時間後、培地を Opti-mem 培地 (Invitrogen) に交換した。その後 lipofectamine2000 を用いてレトロウイルスベクターを導入し、リポフェクションの 6 時間後に血清が入った DMEM 培地 1.5 ml に置き換えた。リポフェクションの 36 時間後から 48 時間後までの間、計 5 回ウイルスが分泌された細胞培養液を 1.5 ml ずつ回収、交換することでウイルス溶液を回収し、得られたウイルス液を 4,000×g、4 °C で一晩遠心した。上清を取り除き、75 μl の滅菌 PBS にウイルスを再懸濁することで、100 倍濃縮ウイルス溶液を調製した。

DCX タンパク質の精製

pCMV5-FLAG ベクターに挿入された DCX コンストラクトをそれぞれ Bgl II、HindIII で切り出し、これを pCold-GST ベクターの BamH I、HindIII サイトに挿入し、大量精製を行った。それぞれのプラスミドを導入した BL21 (DE3) codon plus を 500 ml の LB 培地にて 30°C で培養し、OD₆₀₀=0.5 となったときに 0.1 mM IPTG を添加して 15 °C で 24 時間振蕩培養することで DCX タンパク質を発現させた。以下の操作からは全て低温室で行った。菌体を回収し 40 ml の PBS に懸濁後、菌体をソニケーターで破碎してから 9,000 ×g で 15 分間、4 °C で 2 回遠心し上清を回収した。上清に Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を 500 μl 加え 2 時間攪拌させることでレジンに GST-DCX タンパク質を結合させた。直径 0.8 cm、高さ 4 cm のカラム (BIO RAD) を用いてレジンを回収し、5 ml の洗浄バッファー (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 1

μg/ml ロイペプチン, 1 mM PMSF)で3回洗浄し、さらに5 mlの溶出バッファー(40 mM グルタチオン, 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 μg/ml ロイペプチン, 1 mM PMSF) をカラムに加えた。溶出液を500 μl ずつ10 フラクションで分注し、GST-DCX タンパク質を回収した。回収後、SDS-PAGE で GST-DCX タンパク質を分離し、アクリルアミドゲルをCBB染色することによってGST-DCX タンパク質が多く含まれている画分を確認し、この画分を40 mM グルタチオンを含まない2 Lの溶出バッファーで3回透析しグルタチオンを除いた。得られたDCX タンパク質溶液は-80°Cにて保存した。

in vitro キナーゼアッセイ

GST タグはPKAによってリン酸化されるので、上記の様に精製したGST-DCX タンパク質1 mgあたり5 unitのPreScission protease (GE Healthcare) によってGST タグを4 °C、一晩かけ切断した後、GST タグをNi-NTA レジンで除去した。2 μg (50 pmol) のDCX タンパク質と100 unitのPKA (New England BioLabs)をPKA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 2 mM [γ-³²P]-ATP, 1 μg/ml ロイペプチン, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 20 mM β-グリセロホスフェート) 中で、37 °Cにて反応させた。なお、反応は20 μlの溶液で行った。2×Laemmli サンプルバッファーを10 μl加え煮沸することで反応を停止させ、その後12 % アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEによりタンパク質を分離した。SDS-PAGE後のゲルをCBB染色し、ゲルドライヤーで乾燥させ放射活性をイメージングプレートに記録し、イメージングアナライザー (BAS-2500 ; 富士フィルム) を用いて画像データを読み込んだ。読み込んだ画像データはバンドの濃淡を数値化し、相対値を算出した。

二次元電気泳動法によるリン酸化DCXの検出

20 MOIのアデノウイルスを用いて、 1.0×10^6 個の培養神経前駆細胞に野生型DCXとS47A変異体を発現させた。感染2日後に、細胞を10 nM PACAPで1時間刺激した。1 μM PACAPアンタゴニスト、1 μM KT5720はPACAP刺激の30分前に加えた。コントロールの細胞には2.5 % DMSOを添加した。100 μM カリキュリンAは1時間処理した。薬剤処理後、細胞を回収し溶解バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5 % NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 20 mM β-グリセロホスフェート, 1 μg/ml ロイペプチン, 1 mM PMSF) で溶解した後、15,000×gで5分間遠心し、その上清をライセートとした。λホスファターゼ (400 U) を調製したライセートに加え、30分間氷上でイ

ンキュベートした。酵素処理および未処理のライセートを用いて、二次元電気泳動法によってDCXのバンドを分離した。一次元目はImmobiline Dry Strip 18 cm, pH6-11 (GE Healthcare) を用い、二次元目は10% アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行うことで、タンパク質を分離した。SDS-PAGE後は上記のウエスタンブロットの方法に従い実験を行い、DCXタンパク質を検出した。

ボイデンチャンバー法を用いた細胞遊走能の測定

ボイデンチャンバー法とは、8 μm の穴の空いたメンブレンを持つチャンバーの上層に細胞懸濁液を入れ、一定時間経過後に穴を通過してメンブレンの下層に遊走した細胞数を測定するアッセイであり、定量的に細胞遊走能を評価する方法である (図 3)。

1×10^6 個の培養神経前駆細胞にDCXをノックダウンするためのアデノウイルスを20 MOI感染させ、2日間培養した。感染2日後にニューロスフェアを回収し、トリプシンで細胞を分散させた後、DCXを過剰発現するためのアデノウイルスを10 MOI再感染させた。24時間後細胞を回収し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリエチレンイミンでコーティングしたCell culture insert (8.0 μm pore size, PET track-etched membrane 24 well format) (BD FALCON) の上層に 1×10^5 cells/mlに調製した細胞懸濁液を500 μl 加えた。

HEK293T細胞を35 mm ディッシュに8割の密度になるまで培養し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて野生型DCXとS47変異体を導入した。1 mM HCl (pH3.0) 溶液に溶解した0.3 mg/ml コラーゲン Type I -A (新田ゼラチン) を用いて Cell culture insert (8.0 μm pore size, PET track-etched membrane 24 well format) (BD FALCON) をコーティングした。これをPBSで3回洗浄し、500 μl の10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地を入れた24穴ディッシュにセットし、 1×10^5 cells/mlに調製したHEK293T細胞の懸濁液を500 μl 加えた。HEK293T細胞の懸濁液を作る際、血清を含まない培地を使用した。

細胞懸濁液を加えたチャンバーを37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 の条件下で静置し9時間後にメンブレンを回収した。メンブレンをメタノールに浸し細胞を固定後、メンブレン上層の細胞を綿棒で掻き取り、下層に移動した細胞をギムザ染色液で染色した。これらの細胞を顕微鏡で観察し数を測定した。また、アッセイを行う前の残った細胞懸濁液の一部を溶解バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 3 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0.5% NP-40, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 20 mM β -グリセロホスフェート, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン, 1 mM PMSF) に溶解してセルライセートとし、ウエスタンブロット法を用いてDCXの発現量がサンプル間で違いがないことを確認した。

in utero 感染による細胞遊走能の評価

Avertin を用いて E14 母マウスを麻酔し、その後マウス胎児を含む子宮を母マウスより一時的に露出した。子宮壁を通して見える胎仔に Fast Green (Sigma) で着色した DCX 及び EGFP を同時に発現するレトロウイルス溶液をガラスキャピラリーに吸引して、これを側脳室の両方に注入した。片方の側脳室あたり 1 μ l 程度を注入した。乾燥を防ぐため、常時子宮に PBS をかけながら操作を行った。注入後は即座に子宮を母マウスに戻し、滅菌済みブレードシルク (秋山製作所) と外科用強弯角針 (エルプ) を用いて傷口を縫合した。麻酔が覚めるまでの間、小動物用電気ヒーターを用いて母マウスを温め、覚醒後ゲージに入れ、4 日間飼育した。胎生 18 日マウスから大脳を摘出し、4 % パラホルムアルデヒド (PFA)、4 $^{\circ}$ C で 12 時間固定して、その後大脳が沈降するまで 10 % スクロース溶液に浸した。さらに 20 %、30 % スクロース溶液にそれぞれ 12 時間浸した後、O.C.T compound (サクラ精機) に包埋し、ドライアイス上で凍結した。大脳皮質の凍結切片をクリオスタットで作製後、ウサギ抗 GFP 抗体 (MBL) を用いて EGFP 陽性細胞を検出し、観察した (図 4)。

また、大脳皮質の層構造を可視化するために 1 % チオニンを用いてニッスル染色法を行った。層構造を 3 つの領域に分け、これらの領域に存在している EGFP 陽性細胞の数を定量することで、DCX が導入された神経前駆細胞の遊走能を評価した。

細胞内微小管分画法

遊離チューブリン画分、微小管画分の調製法は Solomon らの方法に準じて行った (Solomon *et al.*, 1986)。これは、細胞内に存在する、重合していないチューブリン (遊離チューブリン) と微小管を分離し、それぞれの画分に含まれる微小管結合タンパク質やチューブリンの存在量を調べる方法である (図 5)。

培養神経前駆細胞を用いたアッセイでは、ニューロスフェアをトリプシンを用いて分散し、10 nM PACAP で細胞を 1 時間刺激した。PACAP 刺激の 30 分前に 2.5 % DMSO もしくは 1 μ M KT5720、1 μ M PACAP アンタゴニストで処理した。刺激後、細胞を回収し、遊離チューブリンと微小管画分を下記に示す方法に従って分離した。

HEK293T 細胞を用いたアッセイの場合、6 cm ディッシュに培養した 7 割の密度の細胞にリン酸カルシウム法を用いて DCX を導入した。導入して 36 時間後、トリプシンを用いて細胞をディッシュからはがし、PM-2G バッファー (0.1 M PIPES (pH6.9), 2 M グリセロール, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) で細胞を一度洗浄

し、全細胞量のうち半量をチューブリンアッセイに用いた。残りの半量は 100 μ l の溶解バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 0.5 % NP-40, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 20 mM β -グリセロホスフェート, 1 μ g/ml ロイペプチン, 1 mM PMSF) に溶解し、DCX の発現を確認した。

チューブリンアッセイ用のサンプルを 700 \times g で 5 分間、室温で遠心し、沈殿に 0.1 % NP-40 を含む PM-2G Buffer を 100 μ l 加え、ローテーターで 15 分間、30 $^{\circ}$ C にてゆっくり攪拌した。さらに 700 \times g で 5 分、室温で遠心し、上清を回収して遊離チューブリン画分とした。また、沈殿に 0.1 % NP-40 を含む PM-2G バッファーを 500 μ l 加え、ローテーターで 5 分間、30 $^{\circ}$ C にて攪拌し洗浄した。洗浄後に 700 \times g で 5 分、室温で遠心して回収した沈殿に 50 mM $CaCl_2$ を含む PM-2G バッファーを 100 μ l 加え、ローテーターで 15 分間、30 $^{\circ}$ C にてゆっくり攪拌した。その後 700 \times g で 5 分、室温で遠心し上清を回収して微小管画分とした。沈殿に 50 mM $CaCl_2$ を含む PM-2G バッファーを 500 μ l 加えローテーターで 5 分間、30 $^{\circ}$ C にて攪拌し洗浄した後に 700 \times g で 5 分、室温で遠心し、沈殿に溶解バッファーを 100 μ l 加え 10 分間氷上に静置した。15,000 \times g で 5 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心し上清を回収し溶解画分とした。この方法によって得た遊離チューブリン画分及び微小管画分に含まれる DCX 及びチューブリンをウエスタンブロット法で確認した。

微小管再構成の解析

このアッセイは精製チューブリンタンパク質を 37 $^{\circ}$ C 条件下で 1 時間、DCX と共にインキュベートし、重合した微小管量を蛍光色素の蛍光強度を経時的に定量することで測定する方法である (図 6)。

微小管再構成の解析には Tubulin Polymerization Assay Kit (Porcine tubulin and Fluorescence based ; Cytoskeleton Inc.) を用いた。測定を行う前に 96 穴プレート を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間プレインキュベートした。その後 Tubulin glycerol buffer (80 mM PIPES, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA (pH6.9), 1 mM GTP, 10 % グリセロール, 10 μ M fluorescent reporter) に溶解した 50 μ l の 2 mg/ml 精製チューブリンタンパク質溶液と DCX タンパク質を混ぜ、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートすることでチューブリンタンパク質を重合させた。チューブリンタンパク質の重合度合いを示す蛍光強度は、プレートリーダー ARVO MX (Perkin Elmer) を用いて経時的に測定した。なお、蛍光波長は excitation は 355 nm、emission は 460 nm で測定し、1 分毎に蛍光強度を測定した (図 6)。

免疫染色法

細胞内に DCX 変異体を発現させ、DCX の局在変化や細胞骨格に対する効果を調べるために、EGFP 融合 DCX の発現ベクターを構築した。Bgl II、Hind III を用いて pCMV5-FLAG-DCX から各 DCX 配列を切り出し、切り出した DCX 配列は pEGFP C1 ベクター (Clontech) の Bgl II、Hind III サイトに挿入した。COS7 細胞を 35 mm ディッシュに 8 割の密度になるまで培養し、2 μ g の EGFP-DCX プラスミド DNA をリン酸カルシウム法で細胞に導入した。導入してから 36 時間後に 15 mm カバーグラスに細胞を接着させた。12 時間培養後、適当な大きさのディッシュに置き PBS で 1 回洗浄した後、15 分間、4 % PFA に浸して細胞を固定した。5 分毎に 3 回 PBS で洗浄した後、ブロッキングバッファー (0.1 % Triton-X100, 10% FBS を含む PBS) に浸し、1 時間放置した。次に抗チューブリン抗体をブロッキングバッファーで 1/250 に希釈した溶液を細胞の上へのせ、室温に 1 時間放置した。5 分毎に 3 回 PBS で洗浄した後、Alexa594 が結合した抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) をブロッキングバッファーで 1/1000 に希釈し、この溶液を細胞の上へのせ 30 分間放置した。その後 PBS で 3 回洗浄し、マウント剤を用いて封入した。その後、蛍光顕微鏡 (Axio Observer: Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

タイムラプスイメージング解析

ニューロスフェアをトリプシンによって個々の細胞に分散させた後、 2×10^7 cells/ml の濃度になるように PBS に懸濁した。このうち 10 μ l の細胞懸濁液を用いてエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行った。1 μ g の pEGFP-アクチンと pmCherry-DCX プラスミドを細胞懸濁液に混ぜ、Neon (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入の際は 13 番のプログラムを使用した。遺伝子導入後はサプリメントが入った DF 培地で 2 日間培養し、ニューロスフェアを形成させた。その後 100 μ g/ml poly-D-リジン、10 μ g/ml ラミネンコーティングしたガラスボトムディッシュにトリプシン処理した細胞を接着させ、接着 1 時間後に観察を開始した。10 秒ごと計 30 枚の写真を撮ることでムービーを作製した。

GTP 結合型 Rac1 の検出

pET42a-GST-PAK-CRIB を導入した大腸菌 BL21 (DE3) codon Plus を 30 °C で培養し、OD₆₀₀=0.5 となったときに 0.1 mM IPTG を添加して 3 時間 GST-PAK-CRIB ドメインを発現させた。菌体を回収して 40 ml の PBS に懸濁後、菌体をソニケ

ーターで破碎し Glutathione Sepharose 4B (GSH4B) を 500 μ l 加え 2 時間攪拌させることでレジンに GST-PAK-CRIB タンパク質を結合させた。直径 0.8 cm、高さ 4 cm のカラム (BIO RAD) を用いてレジンを回収し、5 ml の洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) で 3 回洗浄後、5 ml の溶出バッファー (20 mM グルタチオン, 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を加え、溶出液を 500 μ l ずつ 10 フラクション回収し GST-PAK-CRIB タンパク質を回収した。回収後、SDS-PAGE で GST-PAK-CRIB タンパク質を分離し、アクリルアミドゲルを CBB 染色することによって GST-PAK-CRIB タンパク質が多く含まれている画分を確認し、この画分をグルタチオンを含まない 3 L の溶出バッファーで 2 回透析しグルタチオンを除いた。得られた GST-PAK-CRIB タンパク質溶液は -80 $^{\circ}$ C で保存した。なお、精製は全て低温室で行った。

精製した PAK-CRIB を用いて Rac1 のプルダウンアッセイを行った。1 μ g の GST あるいは GST-PAK-CRIB を GSH4B レジンと 1 時間、4 $^{\circ}$ C でインキュベートすることでレジンに結合させた。4 $^{\circ}$ C に冷やした 500 μ l の GST-FISH バッファー (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 % NP-40, 10 % グリセロール) を用いて細胞を懸濁し、15,000g で 5 分間遠心し、上清を回収した。得られた細胞溶解液をタンパク質定量し、750 μ g のタンパク質を含む抽出液に 1 μ g の GST-PAK-CRIB が結合したレジンを加えることでプルダウンアッセイを行った。1.5 時間のインキュベート後、レジンを 500 μ l の GST-FISH バッファーで 3 回洗浄し、その後 2 \times Laemmli サンプルバッファーを加えてボイルすることで、レジンに結合しているタンパク質を溶出した。溶出後、ウエスタンブロッティング法によって Rac1 を検出した。

Asef2 と DCX の相互作用の解析

FLAG-DCX と myc-Asef2 をそれぞれ発現させた HEK293T 細胞から溶解バッファーを用いてライセートを調製し、そのライセートに 1 μ g の抗 FLAG 抗体 (M2, Sigma) を加えて免疫沈降を行った。1 時間、4 $^{\circ}$ C でインキュベートした後、抗体が結合した Protein G Sepharose (GE Healthcare) を 500 μ l の溶解バッファーで 6 回洗浄し、次にレジンに 2 \times Laemmli サンプルバッファーを加えてボイルすることでサンプルを調製した。得られたサンプルを 10 % SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロッティング法により抗 myc 抗体 (9E10, covance) と抗 DCX 抗体 (Santa cruz biotechnology) あるいは抗 FLAG 抗体を用いて myc-Asef2 及び FLAG-DCX を検出した。

結果

in vitroにおけるDCXのリン酸化の解析

DCXのPKAリン酸化部位であるSer47はPKA認識配列とSerを含むペプチドのMass spectroscopyの解析からPKAによりリン酸化されると示唆されたが(Schaar *et al.*, 2004)、本当にSer47にリン酸が付加されるか、ラジオアイソトープとSer47をアミノ酸置換した変異体を用いた生化学的解析は行われていなかった。

そこで、DCXのSer47がPKAによって直接リン酸化されるのか、*in vitro* キナーゼアッセイにより検討した。まず、GST融合DCXタンパク質を大腸菌発現系を用いて大量精製した。また、GSTはPKAによって直接リン酸化されるので、PreScission proteaseを用いてGSTを切断した後、除去した。その後 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 存在下でPKAによるDCXのリン酸化反応を行い、DCXに取り込まれた ^{32}P の量を定量することでリン酸化の程度を検討した。

この解析の結果、PKAを加えると、野生型DCX(DCX-WT)においては60分まで時間依存的な ^{32}P の取り込みが見られた。一方DCXのPKAリン酸化部位と予想されるSer47をアラニンに置換した非リン酸化型変異体(DCX-S47A)(図2)では、60分経過しても ^{32}P の取り込み量はほとんど増加しなかった(図7)。この結果より、DCXのSer47がPKAによってリン酸化される部位であることが強く示唆された。

二次元電気泳動法を用いたリン酸化DCXの解析

DCXのSer47がPKAによって直接リン酸化されることが強く示唆されたため、次に細胞においてPKAを活性化する細胞外シグナル、特にGタンパク質共役受容体を介したシグナルがDCXをリン酸化し得るのか、二次元電気泳動法を用いて解析した。

当研究室の先行研究より、pituitary adenylate cyclase activating polypeptide(PACAP)が細胞内cAMPの蓄積を促進するとともに、神経前駆細胞の遊走を促進することが明らかとなっている。従って、PACAPがcAMP/PKAを介してDCXをリン酸化することで神経前駆細胞の遊走を制御している可能性が考えられたため、PACAPによりDCXのリン酸化が亢進するかどうか調べた。

培養神経前駆細胞にアデノウイルスを用いてDCX-WT及びDCX-S47A変異体を発現させ、感染2日後に細胞を10 nM PACAPで1時間刺激した。セルライセ

ートを回収後、二次元電気泳動法によりタンパク質を分離し、ウェスタンブロッティング法によって DCX のバンドを検出した。なお、二次元電気泳動を行う前に、それぞれのセルライセートにリコンビナント GST-DCX タンパク質 (pI 8.79) をインターナルコントロールとして加えてから泳動して検出することで、GST-DCX のバンドをマーカーとした。

二次元電気泳動法による解析の結果、PACAP 刺激によって DCX -WT のバンドがコントロールよりも酸性側にシフトしていた。また、酸性側へのシフトはλ フォスファターゼ処理や PACAP アンタゴニストを処理することによって解除された (図 8 A)。一方、S47A を過剰発現させた場合、PACAP 刺激してもバンドは酸性側にシフトしなかったことから、PACAP が活性化する Gs-PKA シグナルによって DCX の Ser47 がリン酸化されることが示唆された (図 8 B)。

DCX のリン酸化による細胞遊走への効果

DCX は PKA によってリン酸化され、その機能が制御されていることが示唆されているが (Schaar *et al.*, 2004)、PKA によるリン酸化が細胞遊走にどのような影響を与えるのかは明らかではない。そこでリン酸化 DCX が神経前駆細胞の遊走にどのような影響を与えるのか定量的に解析するために、ボイデンチャンバーを用いた細胞遊走能の測定を行った。

まず初めに、PACAP 刺激によって培養神経前駆細胞の遊走が促進されるのかどうか検討した。解析の結果、PACAP 刺激によって遊走能が約 2 倍上昇したが、この促進効果は PACAP アンタゴニストと PKA 阻害剤である KT5720 によって解除された (図 9)。この結果より、PACAP によって活性化された Gs-PKA シグナルは神経前駆細胞の遊走を促進させることが明らかとなった。

次に、PKA の活性化による遊走促進効果は DCX 依存적であるのか調べた。DCX に対する shRNA を産生する 3 種のアデノウイルスを用いて培養神経前駆細胞の内在性 DCX をノックダウンし、これらの細胞の遊走能を測定した。DCX のノックダウンは胎児脳内での神経前駆細胞の遊走を抑制することが報告されているが (Bai *et al.*, Ocbina *et al.*)、その報告同様、ボイデンチャンバー法を用いた解析において DCX のノックダウンは遊走抑制効果を示した。興味深いことにアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリン処理によって遊走が促進され、その効果も DCX のノックダウンで抑制されることが分かった (図 10 A)。すなわち、PKA 活性化による培養神経前駆細胞の遊走促進効果は DCX 依存적であることが示唆された。

次に、DCX の PKA リン酸化部位変異体が培養神経前駆細胞の遊走にどのような影響を与えるのか調べた。まず DCX mRNA の 3' 非翻訳領域の配列に対する

shRNA を発現するアデノウイルスを用いて内在性 DCX をノックダウンした。続いて DCX の翻訳領域のみの cDNA を有するアデノウイルスを感染させ、野生型および各種変異体の効果を調べた (図 10 B)。外来性の野生型 DCX を発現させた細胞では、ノックダウンの効果はコントロール同様にまで回復した。一方で、DCX-S47E を発現させた細胞では遊走の亢進が見られ、PKA 阻害剤で処理してもこの効果は抑制されなかった。DCX-S47A を発現させてもノックダウンの効果は回復しなかった (図 10 C)。

一方、非神経細胞である HEK293T 細胞に野生型 DCX を導入し、フォルスコリン処理した場合においても遊走の促進が見られ、この促進効果は PKA 阻害剤である KT5720 によって抑制された (図 11 A,B)。また、S47E 変異体を過剰発現した HEK293T 細胞は野生型を過剰発現させたときよりも遊走能が著しく上昇した。また、S47A 変異体の過剰発現は遊走能を減少させた (図 11 C,D)。これらの結果より、DCX の Ser47 が細胞外シグナルにより活性化された PKA によってリン酸化され、DCX の Ser47 のリン酸化依存的に神経前駆細胞の遊走を促進することが示唆された。

次に、生体内の脳皮質形成過程における DCX リン酸化の意義を調べるために、*in utero* インフェクション法を用いて神経前駆細胞に DCX 遺伝子を導入し、この細胞の遊走能を評価した (図 4)。また、脳皮質の層構造を可視化するためにニッスル染色法により神経細胞を染色し、脳皮質を 3 つの領域 (皮質板、中間体、脳室体) に分類した (図 12 A-E 写真右)。それぞれの領域に存在する EGFP 陽性細胞の数を数えた結果、コントロールである EGFP を発現した神経前駆細胞は、約 15 % の細胞が皮質板 (CP) へと到達していた。一方で、野生型 DCX 及び疑似リン酸化型変異体 S47E を過剰発現したサンプルではコントロールに比べ約二倍であるおよそ 30 % の細胞が皮質板へと到達していた。S47A 変異体や滑脳症患者で同定された S47R 変異体を過剰発現しても、コントロールに比べ遊走の促進は見られなかった (図 12)。野生型 DCX と S47E 変異体の過剰発現が神経前駆細胞の遊走を促進したことから、Ser47 がリン酸化された DCX は脳皮質の神経前駆細胞の遊走を促進すること、また野生型 DCX の Ser47 は脳内においてリン酸化される可能性があることが示唆された。

リン酸化 DCX の微小管への親和性とその機能

今までに、DCX の Ser47 が PKA/MARK によってリン酸化されることで、DCX の微小管への親和性が減少することが *in vitro* におけるチューブリン沈降実験や免疫染色法を用いた解析により報告されている (Schaar *et al.*, 2004; Tsukada *et al.*, 2005)。そこで、細胞外シグナルにより DCX の親和性が調節されるのか、微

小管分画アッセイを行い検討した (図 5)。まず初めに、微小管脱重合阻害剤であるタキソールと微小管重合阻害剤であるコルヒチンを用いて画分が目的通り調製されているか確かめた。タキソールで処理した細胞では微小管チューブリンがコントロールに比べてより多く得られた。一方、コルヒチン処理によってより多くの遊離チューブリンが得られたことから、この分画法が目的通り行われていることが確かめられた (図 13)。

次に、培養神経前駆細胞を 10 nM PACAP で刺激し、その後遊離チューブリン画分と微小管画分にそれぞれ分画した。続いてこれらの画分に含まれる DCX 及びチューブリンの量をウェスタンブロット法により検出した。その結果、PACAP 刺激により微小管画分に存在する DCX の量は減少していたが、この効果は PACAP アンタゴニストや PKA 阻害剤を事前に添加しておくことで減弱していた (図 14 A,B)。アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリンを用いた時も PACAP と同様の結果が得られた (図 14 C,D)。フォルスコリンは強力なアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるため、PACAP よりも強い効果を示した。フォルスコリン添加前に PKA 阻害剤である KT5720 を処理することによって、KT5720 単独処理と同様のレベルまで微小管画分に存在する DCX の量が回復した。なお、遊離チューブリン画分と微小管画分に含まれるチューブリンの総量は全ての細胞において差が見られなかった。また、DCX の PKA リン酸化部位変異体を HEK293T 細胞に発現させ、これら変異体の微小管への親和性を微小管分画アッセイにより確認した。微小管画分に含まれる DCX の量が野生型、S47A、S47R 変異体間でほぼ同量であったことから、S47A と S47R 変異体の微小管への親和性は野生型と同様であることが分かった。一方、微小管画分に含まれる S47E 変異体の量は野生型に比べて減少していた (図 15)。これらの結果より、DCX は PKA を活性化する細胞外シグナルにより Ser47 がリン酸化され、リン酸化されることで微小管への親和性が減少することが示された。

DCX は微小管の安定化、形成、さらに微小管の束状化に関わっているという報告がある (Greenson *et al.*, 1999; Moores *et al.*, 2004, 2006)。そこで、微小管の束状化や形成に DCX のリン酸化が影響するのか調べた。*in vitro* における微小管再構成解析を行うために、大腸菌発現系を用いて GST 融合 DCX タンパク質を大量発現、精製し、アッセイを行った。まず初めに、微小管脱重合阻害剤であるタキソールと重合阻害剤であるコルヒチンを用いて、この *in vitro* 微小管再構成系を確認した。チューブリンはインキュベーション開始後ゆっくりと重合し、60 分で蛍光強度がほぼ一定になった。タキソールを加えると、添加直後に蛍光強度の増加がみられた。一方、コルヒチンを加えた場合はチューブリンの蛍光強度の変化は見られなかった (図 16)。このアッセイがチューブリンの重合を解析するのに適していることが確認されたので、DCX タンパク質を用いてチュー

ブリンの重合に対する DCX の効果を検討した。その結果、野生型 DCX の場合、DCX の濃度依存的に微小管の重合の促進が観察された (図 17A)。更に、S47A、S47E 変異体タンパク質を用いて同様のアッセイを行ったところ、S47A 変異体では野生型とほぼ同様の微小管重合促進効果が見られたが、S47E は野生型に比べ顕著に重合促進作用が減弱していた (図 17 B)。この結果より、リン酸化された DCX は微小管への親和性が減弱しているために、チューブリンの重合促進活性が低いことが確認できた。

続いて、細胞内での DCX の局在と束状化微小管の形成における PKA リン酸化部位変異体の効果を調べた。野生型 DCX を COS7 細胞で過剰発現させると束状化した微小管が形成されることが報告されている (Kim *et al.*, 2003)。そこで COS7 細胞に GFP 融合 DCX を過剰発現し、細胞内でのチューブリンの重合状態の変化ならびに DCX の局在を免疫染色法によって観察した。野生型、S47A、S47R を発現させた細胞では束状化した微小管が細胞膜辺縁部に観察されたが、DCX 未発現 (コントロール) 細胞及び S47E 発現細胞においては、微小管の束状化は観察されなかった。また、野生型で観察された束状化微小管はフォスコリン処理により見られなくなったが、このフォスコリンの効果は PKA 阻害剤により抑制された。一方、S47A、S47R 変異体はフォスコリンの効果に抵抗性を示した。また、この束状化した微小管上に GFP-DCX が局在していることが観察された (図 18)。この結果より、DCX は細胞内で微小管を束状化させる働きがあり、PKA により Ser47 がリン酸化され微小管への親和性が減少すると微小管に対する束状化作用が減弱することが示唆された。

神経前駆細胞内における DCX のダイナミクスと DCX が細胞骨格に及ぼす影響

遊走細胞内の細胞骨格は非常にダイナミックな挙動を示し、複雑なシグナル伝達経路によって制御されている (Heng *et al.*, 2009)。特に、アクチンフィラメントと微小管は細胞の極性 (細胞の方向性) を決定し、細胞遊走に関与することが知られている (Zhou *et al.*, 2004)。そこで、遊走している神経前駆細胞内での DCX とチューブリンのダイナミクス、DCX の機能を可視化するために、mCherry 融合 DCX と GFP 融合チューブリンを発現するプラスミドを培養神経前駆細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入し、2 日後にこれらの動態をタイムラプス顕微鏡により観察した。その結果、野生型 mCherry-DCX の過剰発現は細胞辺縁部に束状化微小管を形成し、mCherry-DCX はチューブリンと共局在していた。mCherry-DCX-S47A や mCherry-DCX-S47R のダイナミクスは野生型とほぼ同様であった。一方、mCherry-DCX-S47E を過剰発現させると、束状化微小管の形成は観察されず、mCherry-DCX-S47E は主に細胞質全体に局在していた。また、予

想外なことに、細胞辺縁部において、細胞質もしくは細胞膜が非常に激しく動く様子が観察された (図 19)。この細胞質もしくは細胞膜の動きはラメリポディアと似ていたため、S47E 変異体がラメリポディアの形成を促進しているのではないかと考え、次の実験を行った。

ラメリポディアはメッシュ状のアクチン繊維から成る構造体であり、細胞膜を前方に押しやることで細胞に推進力を生みだすことが知られる (Parsons *et al.* 2010)。また、ラメリポディアは低分子量 GTP 結合タンパク質である Rac によって形成が促進されることが知られる (Nobes *et al.*, 1995)。そこで、Gs-PKA シグナルおよび S47E 変異体がアクチンの動態調節に関わっているのかを調べるために、培養神経前駆細胞に GFP 融合アクチンと mCherry 融合 DCX を過剰発現し、これらの動態を観察した。mCherry 単独もしくは野生型 mCherry-DCX を過剰発現させると、細胞突起の先端で GFP-アクチンがラメリポディア様に動く様子が観察された。mCherry-DCX-S47A や mCherry-DCX-S47R を発現させた場合も野生型 DCX と違いは見られなかった。一方で、mCherry-DCX-S47E を過剰発現させると細胞全体で GFP-アクチンのダイナミックな動きを伴うラメリポディアが観察され、Rac1 活性化型変異体 (Rac C.A.) を過剰発現させた時と同様の形態を示した (図 20)。また、野生型 mCherry-DCX と EGFP-アクチンを過剰発現させた細胞に PACAP で 1 時間刺激した場合にもラメリポディアの形成が促進され、この効果は PACAP アンタゴニストや PKA 阻害剤である KT5720 を前処理することで抑制された (図 21)。さらに mCherry-DCX-S47E と EGFP-アクチン、更に Rac1 のドミナントネガティブ体 (Rac1 D.N.) を過剰発現させ、タイムラプスイメージング解析を行ったところ、S47E 変異体が誘導するラメリポディアの形成は Rac1 D.N. で完全に抑制された。また、低分子量 GTP 結合タンパク質である Cdc42 のドミナントネガティブ体 (Cdc42 D.N.) を発現させてもラメリポディアの形成は抑制された (図 22)。さらに、mCherry-DCX と EGFP-アクチンを過剰発現させた細胞に微小管の動態を変化させる薬剤(微小管脱重合阻害剤：タキソール、微小管重合阻害剤：コルヒチン)で処理してもラメリポディアの形成に影響を与えなかった (図 23)。これらの結果から、DCX の Ser47 が PKA によってリン酸化されると、微小管に対する効果とは別に Rac1 を活性化するシグナル伝達経路を活性化し、その結果ラメリポディアの形成が誘導されることが明らかとなった。

S47E 変異体による Rac1 GEF の機能調節

タイムラプスイメージングの結果より、DCX-S47E の過剰発現が Rac1 の活性化を介してラメリポディアを誘導することが明らかとなったので、次に DCX-S47E が GTP 結合活性型 Rac1 を増加させるのか検討した。GTP 結合型 Rac1

を検出するために、GST 融合 PAK-CRIB ドメインを用いたプルダウン解析を行った。PAK とは p21-activated kinase の略称であり、Rac1 のエフェクター分子である。GTP 結合型 Rac1 は PAK1 の CRIB ドメインを介して相互作用することが知られる (Burbelo et al., 1995)。そこで、PAK1 の CRIB ドメインに GST タグを付加したペプチドを大腸菌内で作製し、このペプチドを用いてプルダウン解析を行った。

まず初めに、培養神経前駆細胞を 10 nM PACAP で 30 分間刺激し、その後プルダウン解析を行ったところ、コントロールに比べて GTP 結合型 Rac1 の量が有意に増加していた。また、この効果は PACAP アンタゴニストや PKA 阻害剤を添加することにより阻害された (図 24 A)。更に、培養神経前駆細胞の内在性 DCX を DCX の shRNA を産生するアデノウイルスを用いてノックダウンすると、PACAP 刺激による GTP 結合型 Rac1 の増加が阻害された (図 24 B)。この結果より、PKA シグナルによる GTP 結合型 Rac1 の増加は DCX 依存的であることが分かった。更に、Rac1 活性化における S47 変異体の効果を調べるために、HEK293T 細胞に DCX を発現させプルダウン解析を行った。その結果、DCX-S47E を過剰発現させると GTP 結合型 Rac1 の量が著しく増加した (図 24 C)。これらの結果から、Ser47 のリン酸化が Rac1 の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

低分子量 GTP 結合タンパク質は一般的にグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって活性化され、反対に GTPase 活性化因子 (GAP) によって不活性化される (Hall, 1998; Ridley et al., 2001)。そこで、DCX (S47E) が Rac1 の GEF を活性化することで Rac1 の活性を制御しているのではないかと考えた。Rac1 の GEF は数多く知られるが、図 20 より低分子量 GTP 結合タンパク質である Cdc42 のドミナントネガティブ体を過剰発現させると DCX-S47E が誘導するラメリポディアの形成が抑制されたことから、DCX-S47E が制御する GEF は Rac1 と Cdc42 の両分子と相互作用する可能性が考えられた。Rac1 と Cdc42 の両分子に作用する GEF は 10 種類ほど知られているが、なかでも APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor (Asef2) と呼ばれる GEF は発生時期の脳皮質に発現しており (Yoshizawa et al., 2003)、微小管結合タンパク質でありガン抑制遺伝子としても知られる Adenomatous polyposis coli (APC) が直接結合することで活性化される (Kawasaki et al., 2007; Hamann et al., 2007)。更に、DCX-S47E はアクチン結合タンパク質である Neurabin II と相互作用することが報告されているが (Tsukada et al., 2005)、一方で Asef2 も Neurabin II と結合することが報告された (Sagara et al., 2009)。これらの報告より DCX-S47E が Neurabin II を介して、もしくは直接 Asef2 と相互作用することで Asef2 の GEF 活性を調節しているのではないかという仮説を立てた。そこで、まず DCX-S47E と Asef2 が相互作用し得るのかを確かめるた

めに、HEK293T 細胞に DCX 及び Asef2 を過剰発現し、免疫沈降法を行った。その結果、DCX-S47E は Asef2 と共沈降することが明らかとなった。一方、野生型 DCX や S47A、S47R 変異体では Asef2 との共沈降は見られなかった (図 25)。

更に、Asef2 が誘導する Rac1 の活性化に対する DCX-S47E の効果を検討した。S47E 変異体や Asef2 を単独で発現させた場合に比べて、DCX-S47E と Asef2 を共発現させたときの GTP 結合型 Rac1 の量が著しく増加していたことから、DCX-S47E は Asef2 が誘導する Rac1 の活性化を増強することが判明した (図 26 A)。

最後に、GEF 活性を担う領域である DH ドメインを欠失した変異体 (Asef2 Δ DH) が全長の Asef2 と拮抗することで DCX-S47E が誘導する Rac1 の活性化を阻害するのではないかと考え、この変異体を作製した。HEK293T 細胞に全長の Asef2、DCX-S47E、そして Asef2 Δ DH を発現させ、プルダウン解析により GTP 結合型 Rac1 の量を解析した。その結果、DCX-S47E の過剰発現は GTP 結合型 Rac1 の量を著しく増加させたが、Asef2 Δ DH を共発現することでこの増加は見られなくなった (図 26 B)。これらの結果より、DCX-S47E は Asef2 と相互作用することで、Asef2 の GEF 活性を高めることが考えられた。

今まで得られた結果をまとめると、Gs-PKA シグナルを活性化する細胞外シグナルにより、DCX の Ser47 がリン酸化され、微小管への親和性を減少させる。微小管から離脱した DCX は Rac1 の GEF である Asef2 と相互作用し、Asef2 の GEF 活性を調節することによってラメリポディアを誘導する。そして、リン酸化された DCX が誘導するラメリポディアの形成により細胞の駆動力が生じ、神経前駆細胞の遊走を促進させることが強く示唆された (図 27)。今回明らかとなった微小管結合タンパク質によるアクチンの動態調節機構は、細胞骨格のダイナミクスがより複雑な制御メカニズムによって調節されていることを示している。

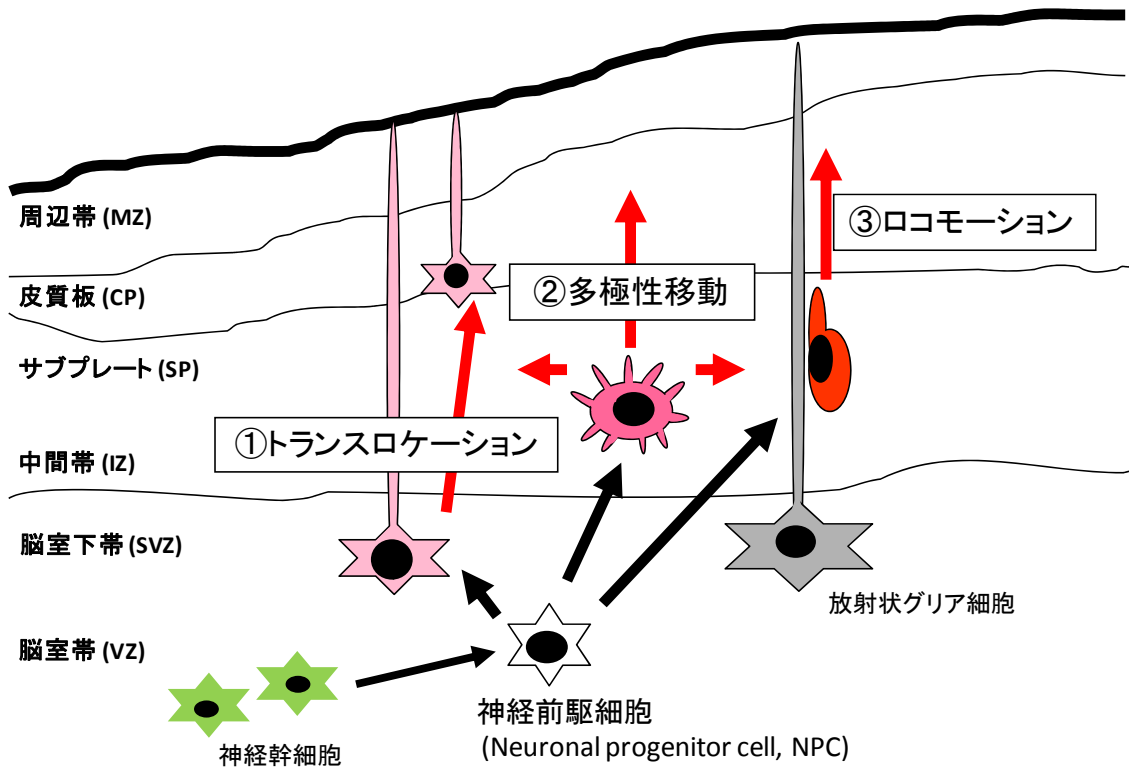
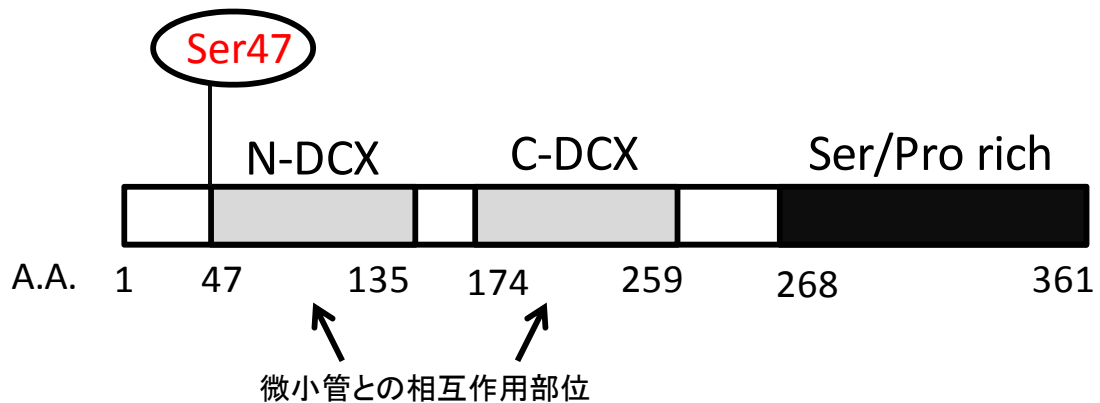


図 1 : 大脳皮質発生過程における神経前駆細胞の放射状移動 (radial migration) の概略

脳室帯 (VZ) に存在する神経幹細胞は最終分裂を終え、神経前駆細胞に分化する。神経前駆細胞は脳室帯付近から垂直方向に移動し、皮質板 (CP) へと到達する。この垂直方向の移動においては①トランスロケーション、②多極性移動、③ロコモーションと呼ばれる 3 つの様式が観察されている。神経前駆細胞の遊走は厳密に制御されているが、それぞれの移動様式の詳細な分子メカニズムは未だ明らかではない。

A



Ser47: PKAリン酸化部位

DCX (S47A): PKA非リン酸化変異体

DCX (S47E): PKA疑似リン酸化型変異体

DCX (S47R): 滑脳症患者で同定された変異体

B

Human TLQALSNEKKA
Mouse TLQALSNEKKA
Chick TLQALSNEKKA
Xenopus TLQALSNEKKA
Zebrafish TLQALSSEKRA
(DCLK2-like)

図 2 : DCX の領域構造

A. DCX は微小管結合配列である DCX ドメインを 2 つ持ち、C 末端側にセリン/プロリンリッチ領域が存在する。N 末端側の DCX ドメインはアミノ酸 47-135 の領域、C 末端側の DCX ドメインは アミノ酸 174-259 の領域からなる。N 末端側の DCX ドメインの境界に存在する Ser47 は PKA によってリン酸化されると考えられている。また、滑脳症患者では、Ser47 がアルギニンに置換している変異が同定されている。PKA によってリン酸化されない S47A 変異体、PKA 疑似リン酸化型である S47E 変異体を作製し、実験に使用した。滑脳症患者では両 DCX ドメイン中にミスセンス変異が確認されている。微小管への結合においては、2 つの DCX ドメインが相乗して働いていると示唆されている。B. Ser47 (赤字) は脊椎動物間で進化的によく保存されている。

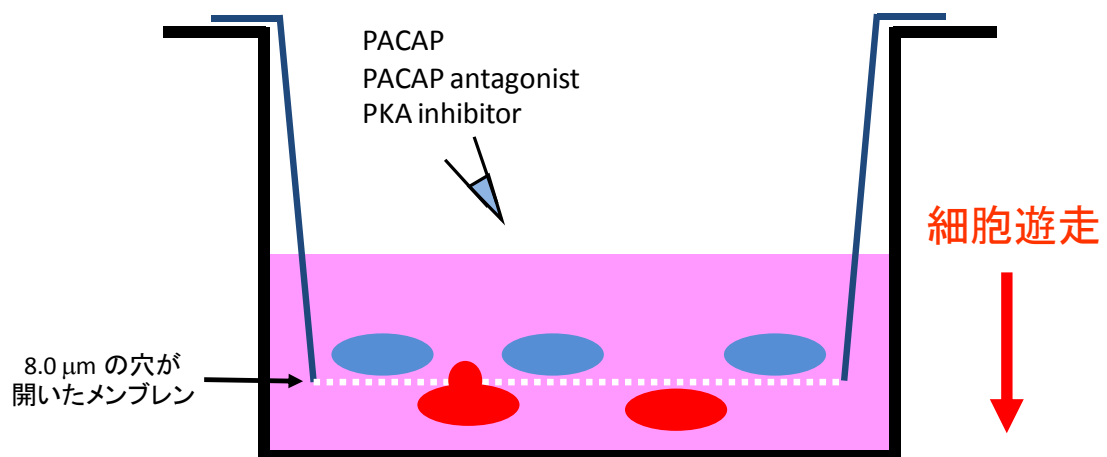


図 3 : ボイデンチャンバー法を用いた細胞遊走能の測定原理

ボイデンチャンバーとは 8 μm の穴が開いたメンブレンを持つ チャンバーのことである。チャンバーの上層に細胞懸濁液を入れ、一定時間後に細胞遊走能を測定した。上層に残っている細胞をスクレイパーで掻き取り、下層に遊走した細胞をメンブレンごと回収し、ギムザ染色法を用いて細胞を染色した。更に、細胞数を測定することで、定量的に細胞遊走能を評価した。

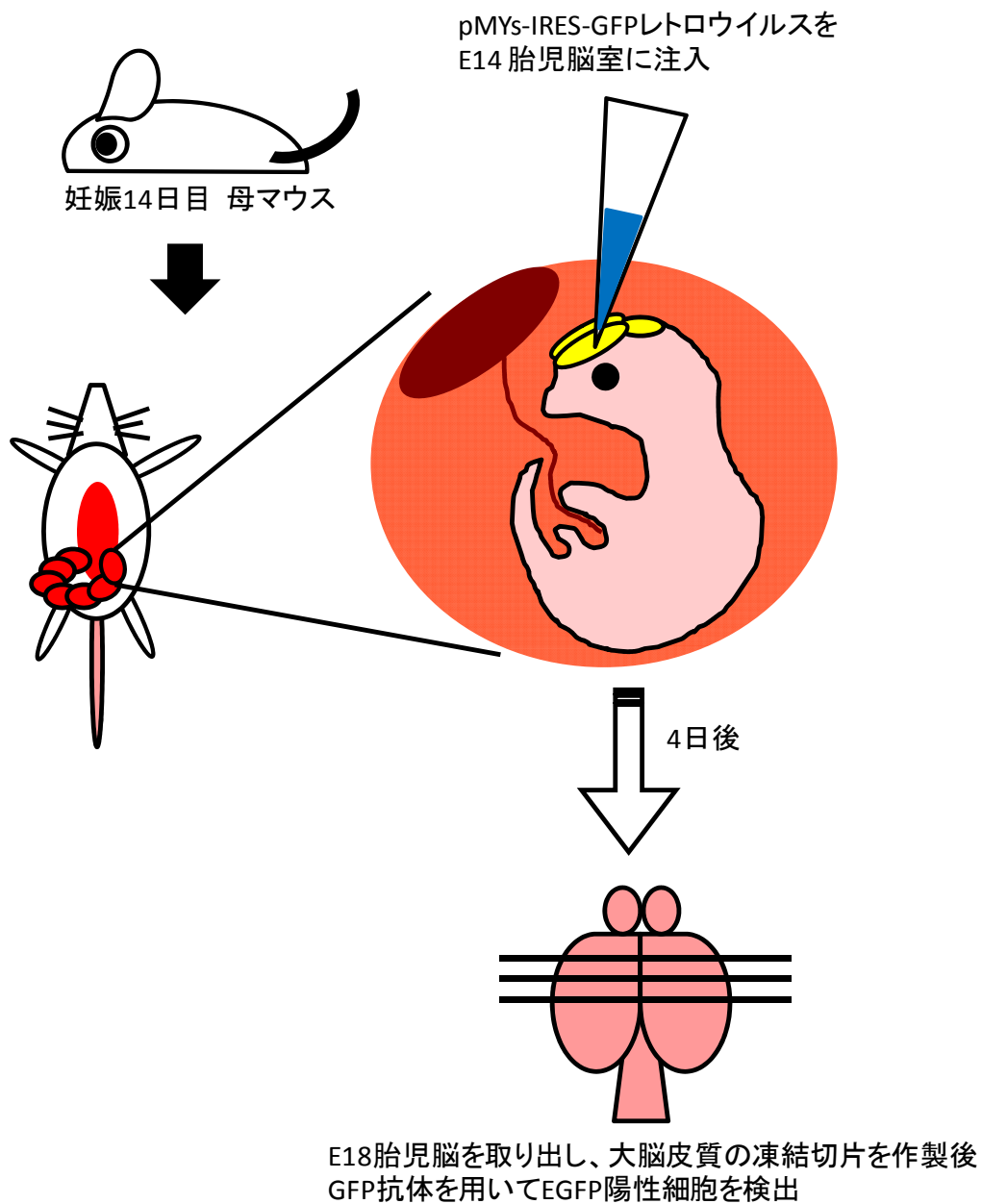


図4: *in utero* インフェクションの方法

妊娠14日目マウスから、麻酔下で外科的に子宮を取り出し、子宮内の胎児脳室にガラスキャピラリーを用いてレトロウイルスを注入した。導入後は再び母親胎内に子宮を戻し、4日後に胎児脳を取り出して凍結切片を作製した。EGFP陽性細胞はGFP抗体を用いて検出した。

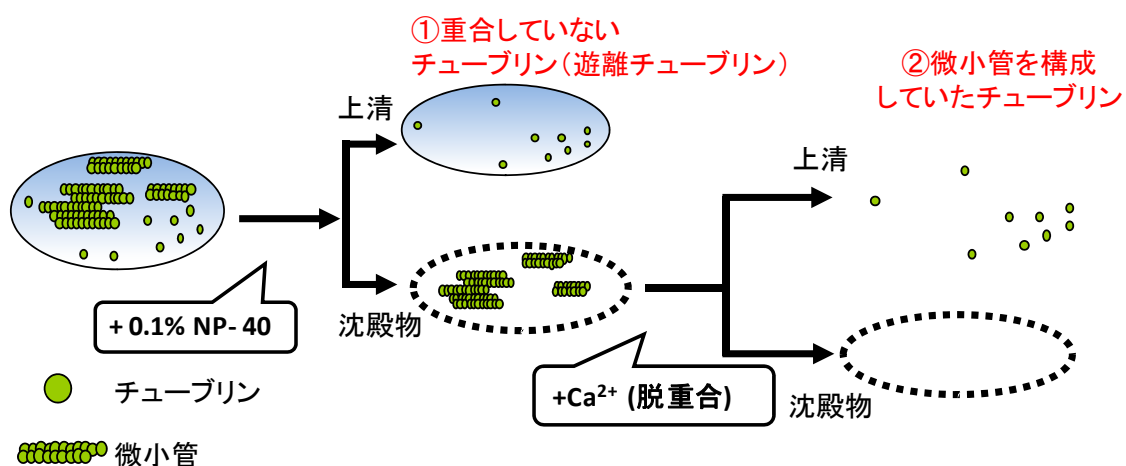


図 5 : 微小管分画アッセイの方法

細胞内には重合していないチューブリン (遊離チューブリン) と重合したチューブリンから成る微小管が存在している。そこで、両者を分画するために Solomon らの文献を元にチューブリン分画アッセイを行った。

細胞膜を 0.1% NP-40 で可溶化し、遠心分離することで上清に遊離チューブリンを得た。一方、微小管はカルシウムイオンを加えると脱重合することが知られているので、得られた沈殿物に 50 mM CaCl₂ を加え、脱重合させた後に遠心分離することで上清に微小管チューブリンを得た。

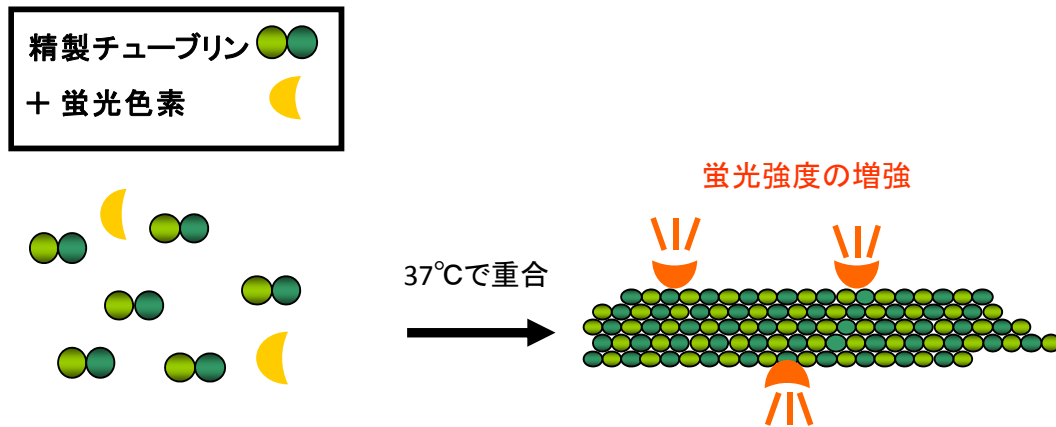
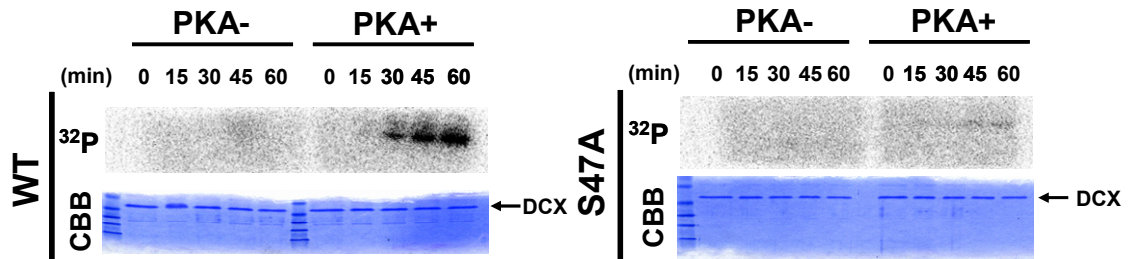


図 6 : *in vitro* 微小管再構成アッセイの方法

精製チューブリンタンパク質は 37 °C 条件下で重合する。蛍光色素は重合したチューブリンに結合し、その蛍光強度を増す。よって、蛍光色素の蛍光強度を経時的に定量することで、重合したチューブリン量を定量的に測定することができる。

A



B

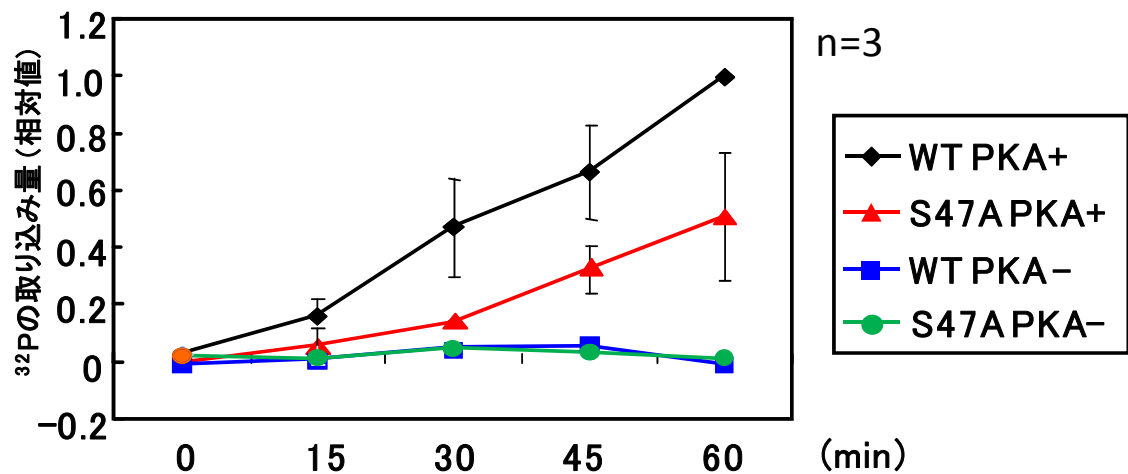
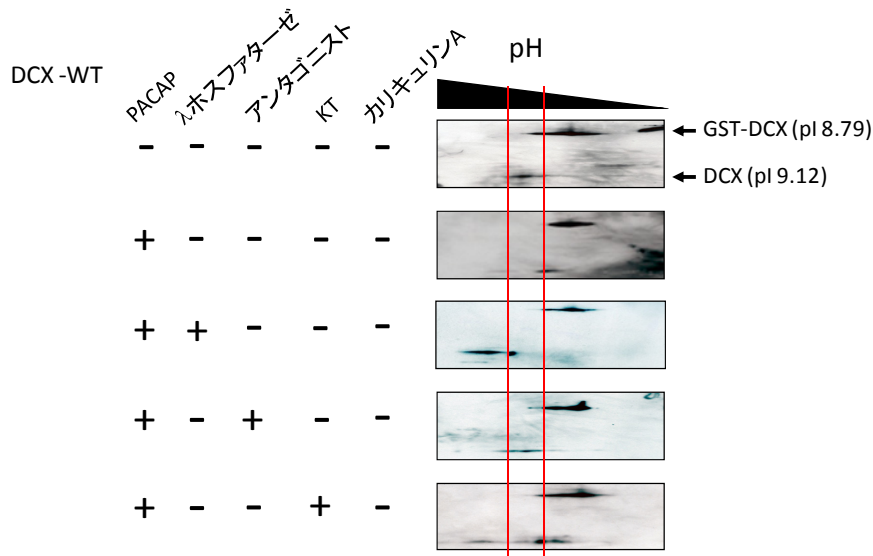


図 7 : *in vitro* における PKA による DCX のリン酸化の解析

A. DCX-WT (左) と DCX-S47A (右) を PKA 存在下あるいは非存在下で、図に示した時間インキュベートした。SDS-PAGE 後、 ^{32}P から放出された β 線をイメージングアナライザーを用いて画像化したもの (上) とアクリルアミドゲルを CBB 染色したもの (下)。B. *in vitro* において、PKA と DCX を $[\text{g-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 存在下でインキュベートし、DCX に取り込まれた ^{32}P の量を定量し、1 時間経過時の PKA 存在下 DCX (WT) への ^{32}P の取り込み量を 1 として、相対値を算出した。

A



B

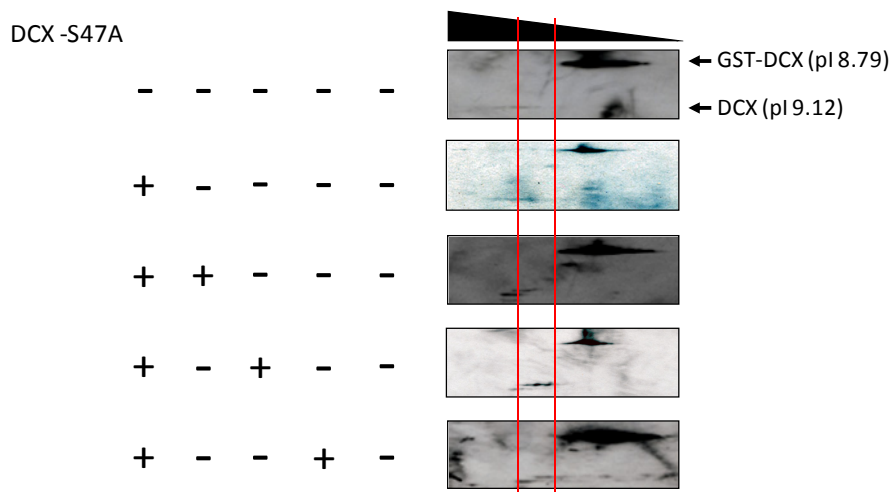


図 8 : 二次元電気泳動法によるリン酸化 DCX の解析

培養神経前駆細胞に DCX を過剰発現させ、2 日後に 10 nM PACAP による刺激を 1 時間行った。1 μ M PACAP アンタゴニスト (アンタゴニスト) と 1 μ M KT5720 (KT) は PACAP 刺激の 30 分前に添加した。コントロールの細胞の培養液には 2.5 % DMSO を添加した。100 μ M カリキュリン A は 1 時間添加した。ライセートを回収し、二次元電気泳動法によって DCX を分離し、ウエスタンブロット法によりバンドを検出した。λホスファターゼはライセートに 400 unit 加え、氷上で 30 分間インキュベートした。また、それぞれのライセートサンプルに GST-DCX 精製タンパク質 (pI 8.79) をマーカーとして加えて泳動した。赤い線は DCX-WT を発現させた、PACAP 未刺激の細胞から調製したサンプルで検出された DCX のバンドの位置を示している。

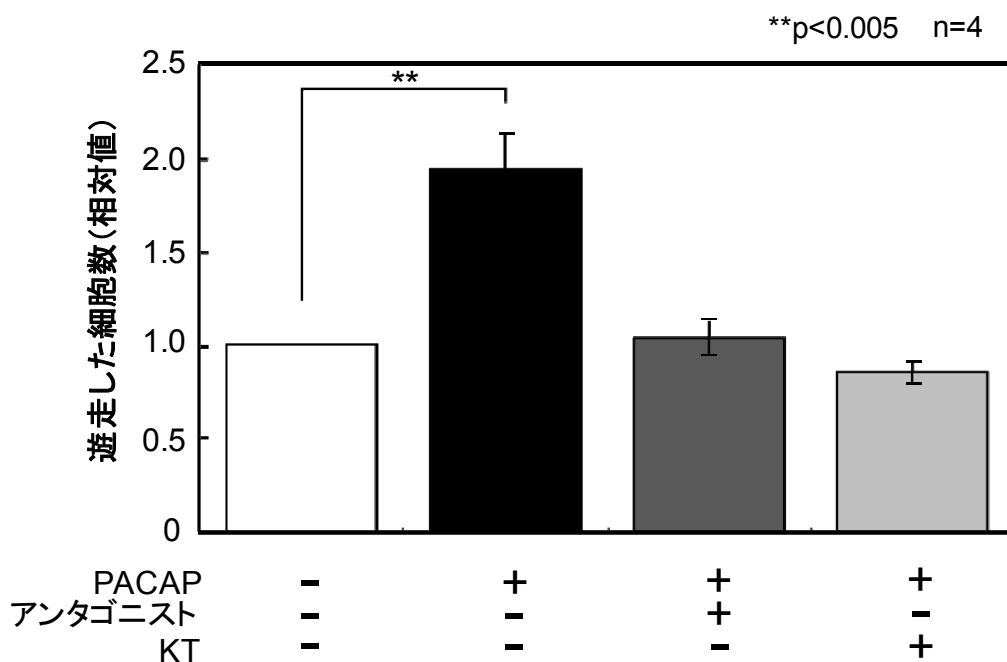
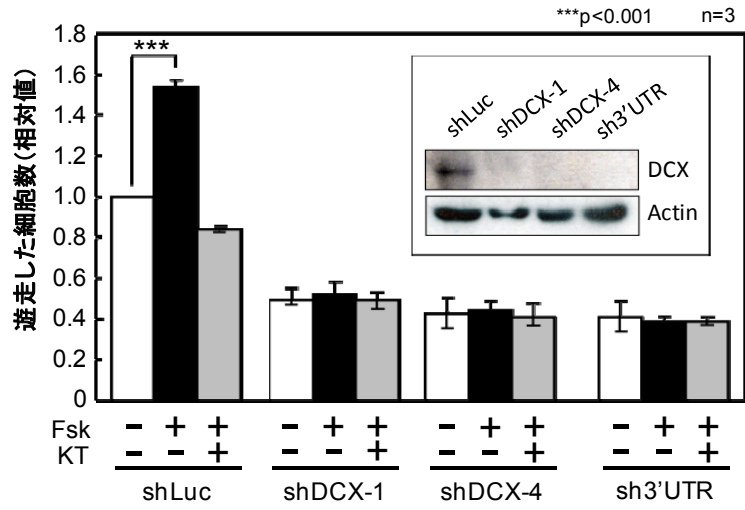


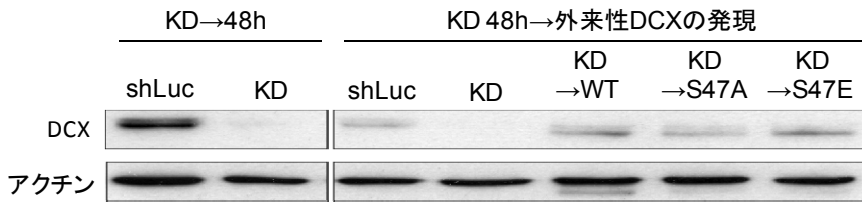
図 9 : PACAP を用いた培養神経前駆細胞の遊走能の測定

培養神経前駆細胞を 10 nM PACAP で刺激し、ボイデンチャンバー法により細胞遊走能を測定した。PACAP アンタゴニストは、1 μ M PACAP 6-38 を、PKA 阻害剤は 1 μ M KT5720 (KT) を用いた。いずれの薬剤も、チャンバーの上層、下層両方に添加した。細胞懸濁液をチャンバーに入れ 16 時間培養後、チャンバーのメンブレンを回収しギムザ染色液を用いてメンブレンの下層に遊走した細胞を染色した。コントロールとして PBS と 2.5 % DMSO で処理した細胞の遊走した数を 1 として比較した。

A



B



C

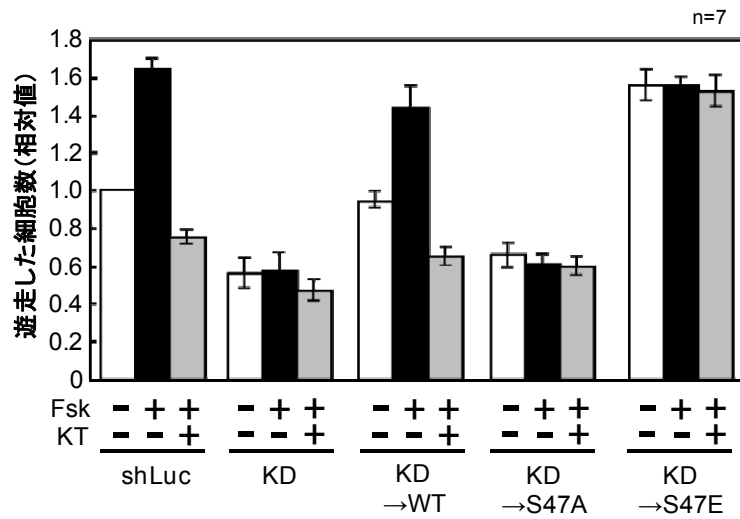


図 10 : 培養神経前駆細胞の遊走における DCX リン酸化の効果

A. 培養神経前駆細胞の内在性 DCX を、DCX の shRNA を産生するアデノウイルスを用いてノックダウンし、更に細胞遊走能をボイデンチャンバーを用いて測定した。1 μ M フォルスコリン (Fsk)、1 μ M KT5720 (KT) は細胞をチャンバーに入れた直後に加え、16 時間培養した。B. 培養神経前駆細胞の内在性 DCX をノックダウンした後、DCX の S47 変異体を内在性レベルになるよう外来的に発現させた。C. B. の細胞の細胞遊走能をボイデンチャンバー法により測定し、グラフ化した。

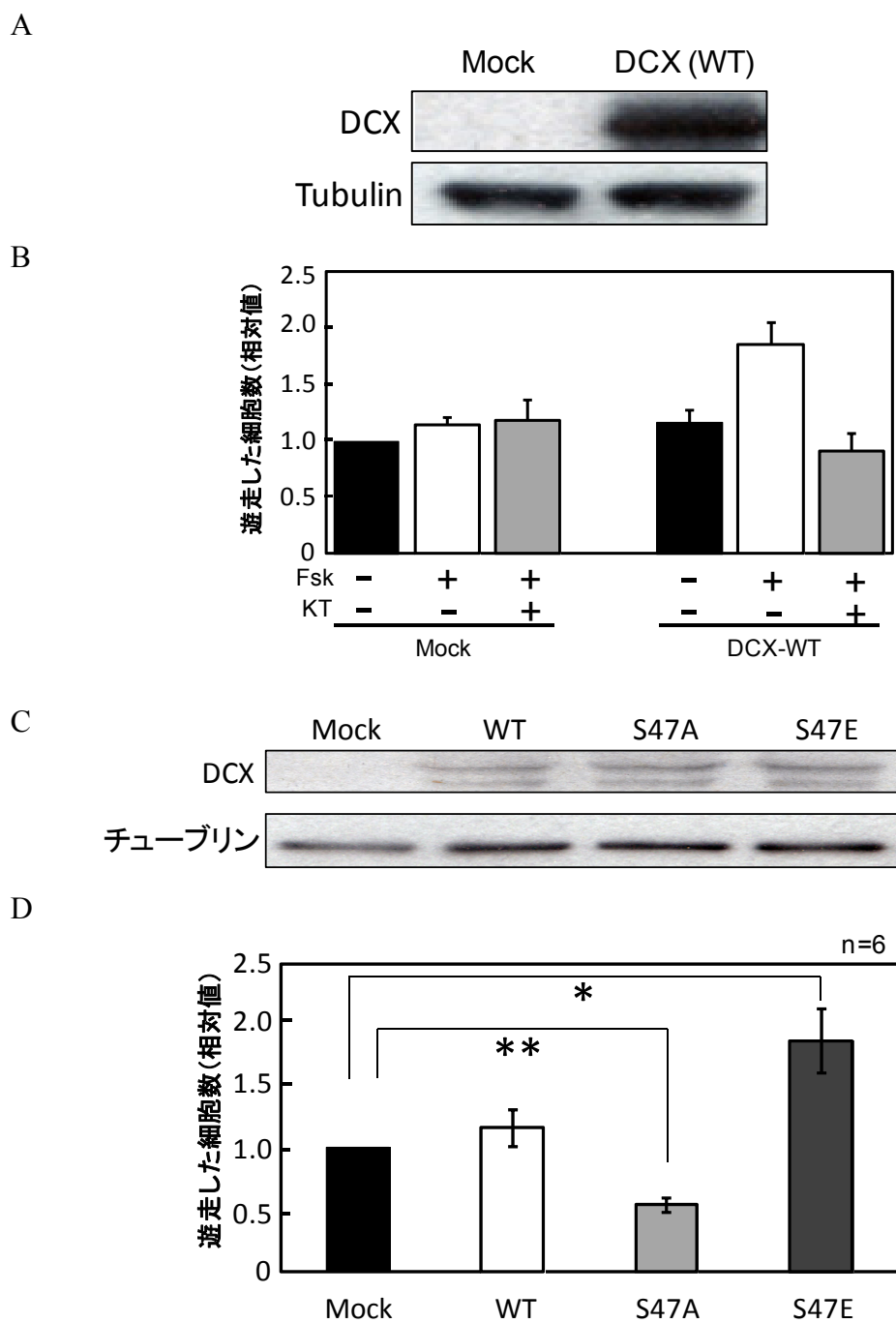


図 11 : ボイデンチャンバーを用いた遊走能の測定

A. HEK293T 細胞に野生型 DCX を過剰発現させ、チューブリン及び DCX に対する抗体を用いて発現を確認した。B. A の細胞遊走能をボイデンチャンバー法により測定した。C. HEK293T 細胞に野生型 DCX 及び S47 変異体を過剰発現させ、その発現をウエスタンブロットで確認した。D. C. の細胞遊走能をボイデンチャンバーを用いて測定した。

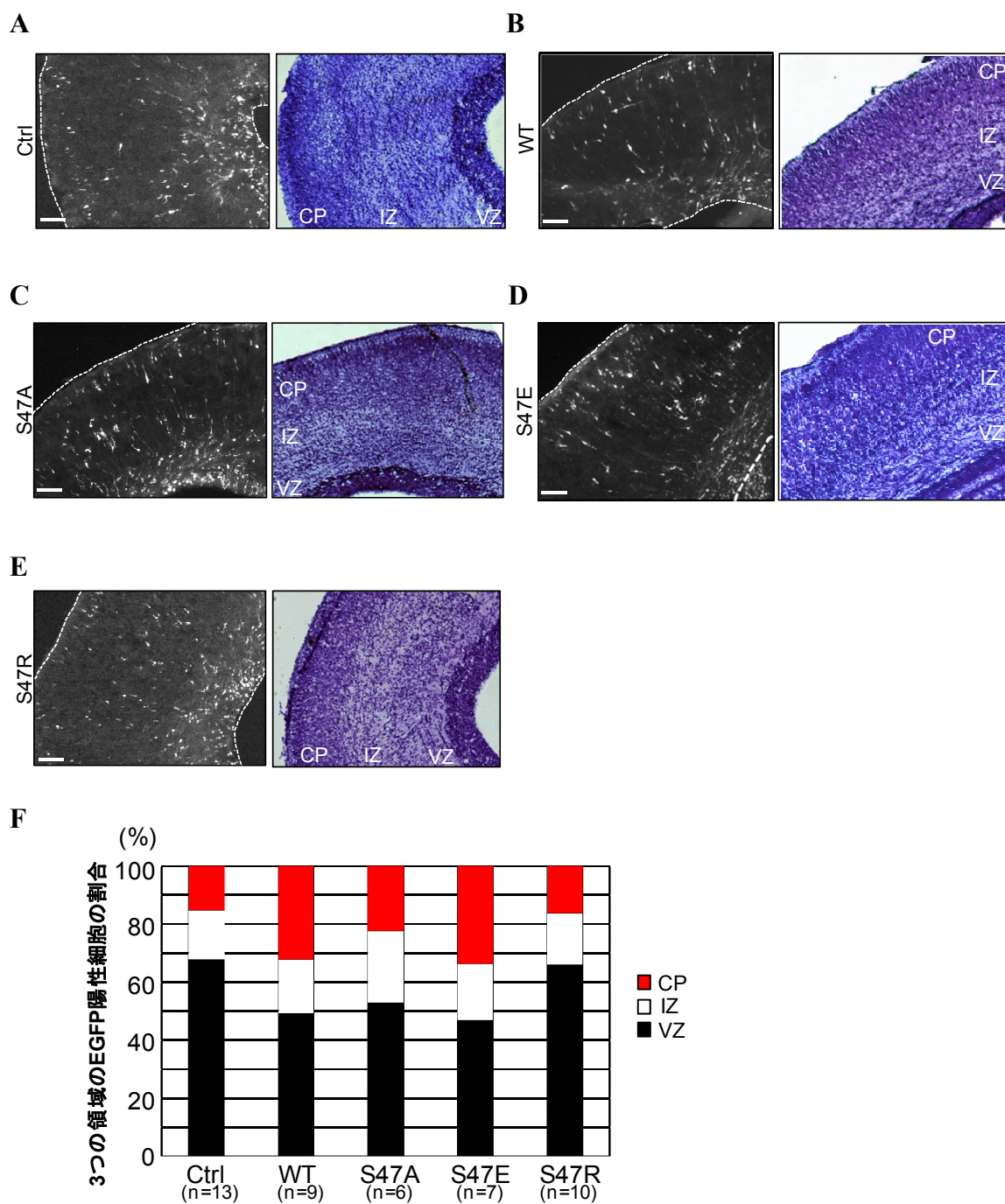


図 12 : 大脳皮質における DCX 変異体の遊走に対する効果

A-E. EGFP のみ (A)、野生型 DCX (B)、S47A 変異体 (C)、S47E 変異体 (D)、そして S47R 変異体 (E) をレトロウイルスを用いて過剰発現させたマウス胎児の大脳皮質を回収し、凍結切片を作製後、GFP 抗体を用いて EGFP 発現細胞を検出した (左)。ニッスル染色法を用いて大脳皮質を染色し、層構造を可視化した (右)。スケールバー : 100 μm F. それぞれの大脳皮質の領域に存在する EGFP 発現細胞を定量し、グラフ化した。

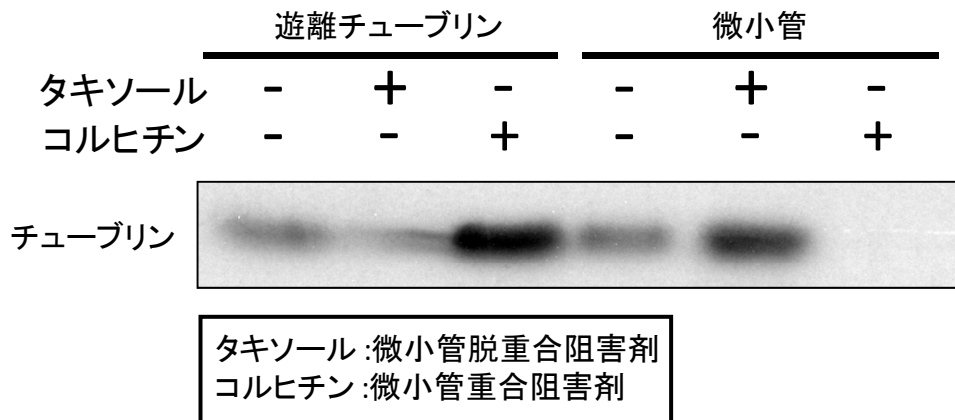


図 13 : 微小管分画アッセイの確認

細胞内には重合していないチューブリン (遊離チューブリン) と重合したチューブリンから成る微小管を分画するために微小管分画アッセイを行った (図 5)。目的通りの分画が得られていることをタキソールやコルヒチンを用いて確認した。コントロールの細胞には 2.5 % DMSO を添加した。

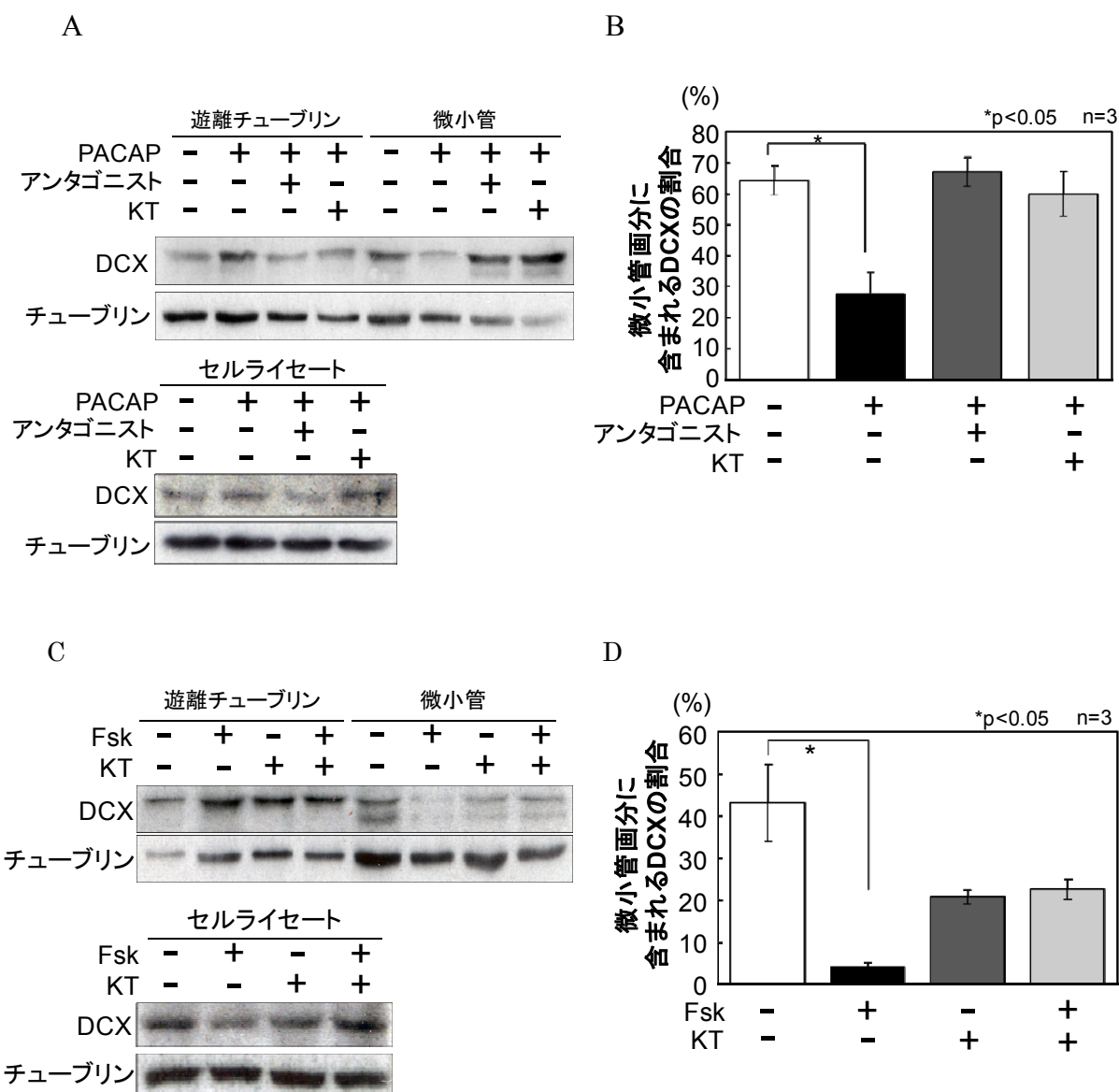
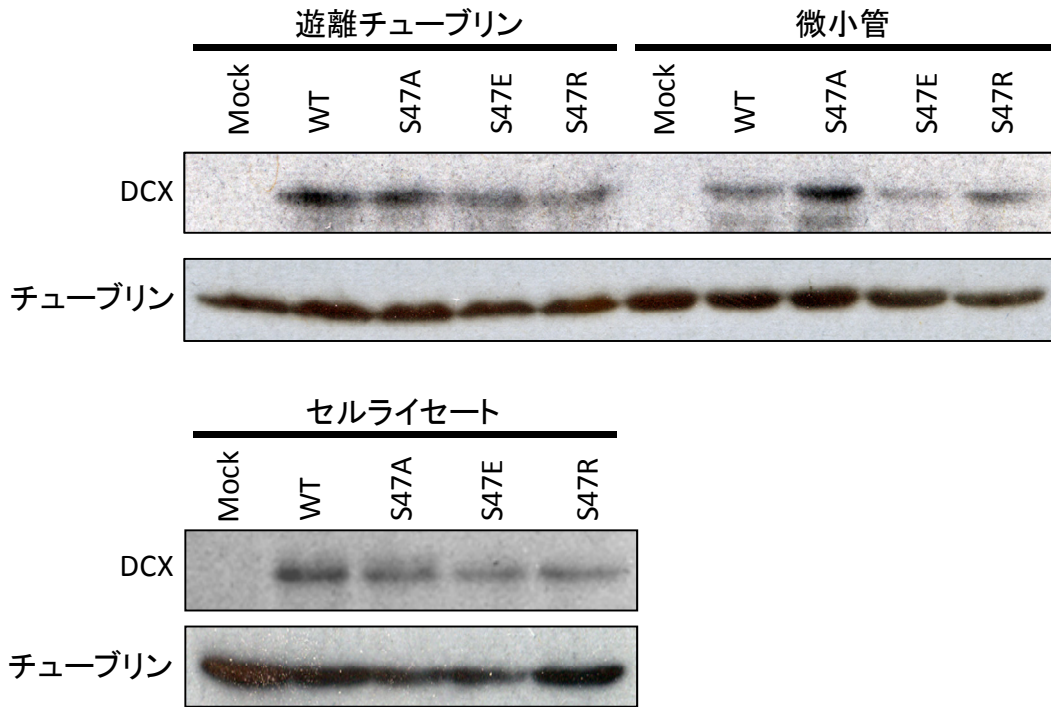


図 14 : PKA を活性化させるシグナルによる、DCX の微小管への親和性に及ぼす影響

A. 培養神経前駆細胞を PACAP で 1 時間刺激した後、細胞内の遊離チューブリン及び微小管チューブリン画分を分画して、これらの画分に含まれる DCX とチューブリンをウエスタンブロット法により検出した。なお、PACAP アンタゴニストと KT5720 (KT) は、PACAP 刺激 30 分前に処理し、コントロール細胞は 2.5 % DMSO で 30 分間処理後 PBS を加えた。 B. A で得られた結果をグラフ化した。結果は 3 回の平均を示した。 C. フォルスコリン (Fsk) で 1 時間刺激した培養神経前駆細胞から遊離チューブリン及び微小管チューブリン画分を分画後、これらの画分に含まれる DCX とチューブリンをウエスタンブロット法により検出した。 D. C. で得られた結果をグラフ化した。結果は 3 回の平均を示した。

A



B

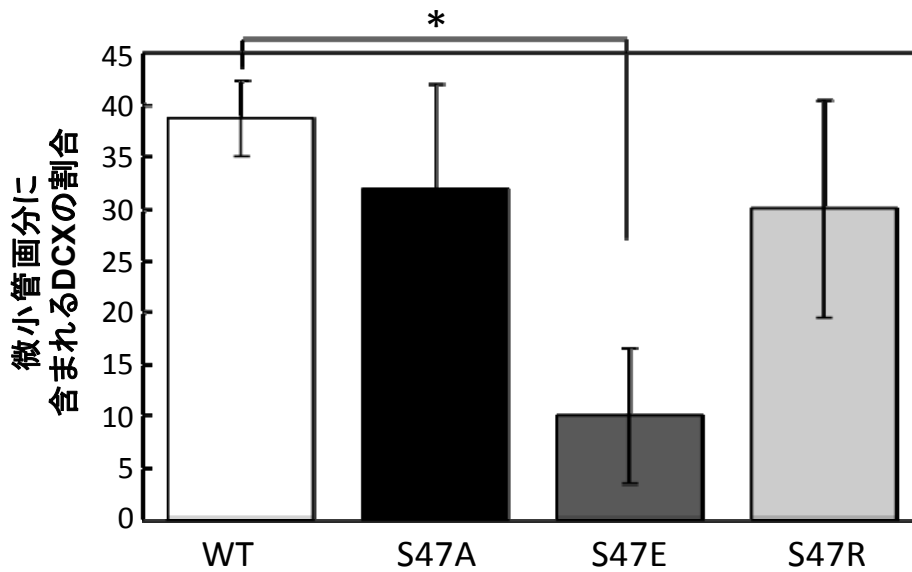


図 15:DCX 変異体の微小管への親和性

A. HEK293T 細胞に DCX をトランスフェクションし、2 日後に遊離チューブリン及び微小管チューブリン画分を分画してこれらの画分に含まれる DCX とチューブリンをウエスタンブロット法を用いて検出した。B. A で得られた結果をグラフ化した。結果は 3 回の平均を示している。

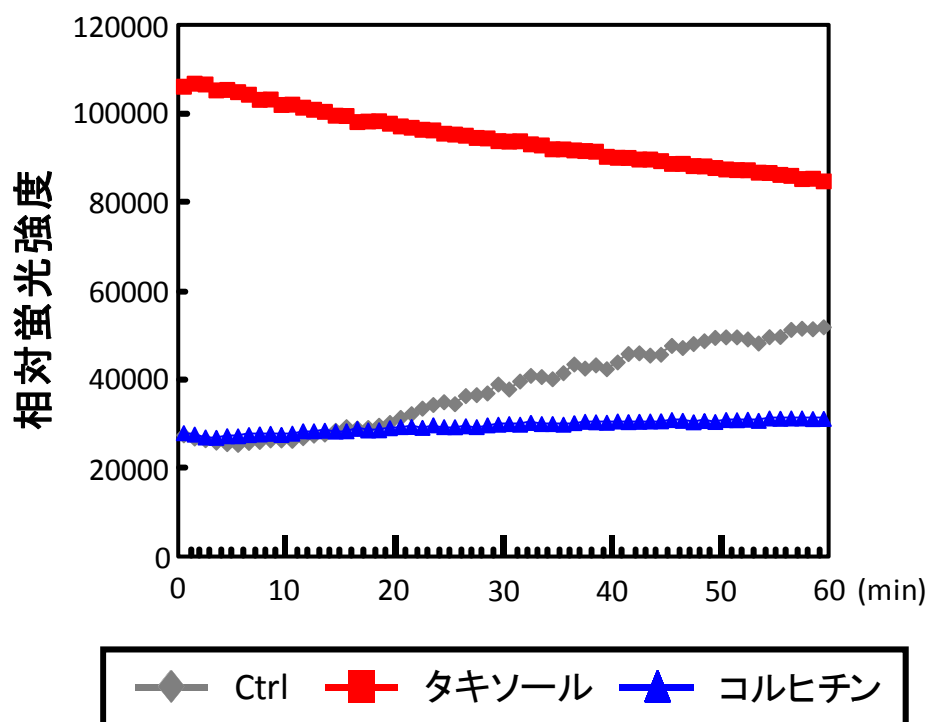
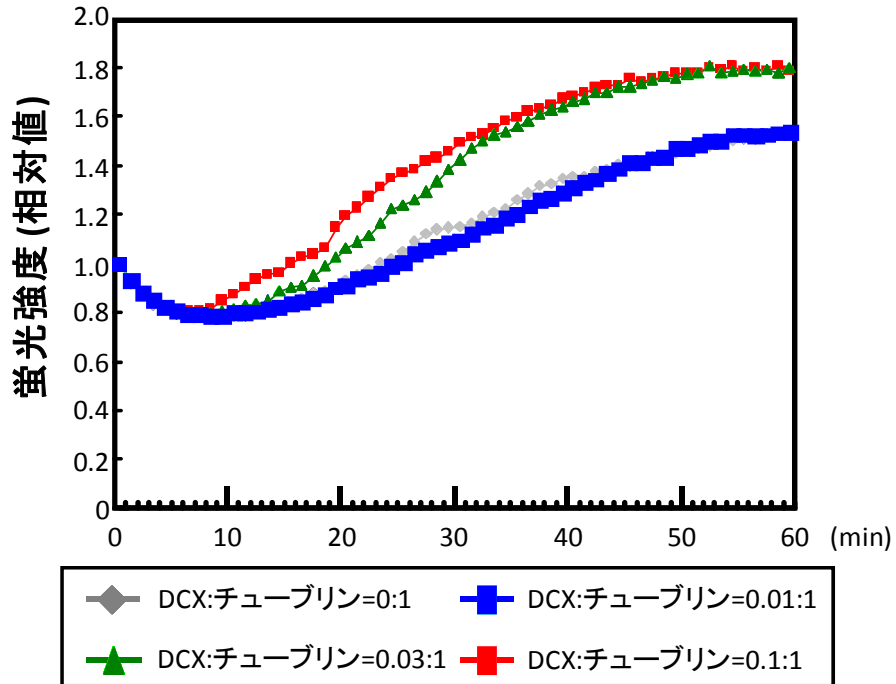


図 16 : *in vitro* 微小管再構成アッセイを用いた、DCX のチューブリン重合能の解析

A. *in vitro* における微小管再構成アッセイの原理。B. アッセイ開始前に微小管脱重合阻害剤であるタキソールと微小管重合阻害剤であるコルヒチンを添加し、添加直後に蛍光強度の測定を開始した。タキソール添加時は即座に蛍光強度が上がり、チューブリンが重合したことが分かった。一方コルヒチン添加時は蛍光強度が上がらず、チューブリン重合が起こらないことを確認した。なおコントロール (Ctrl) のサンプルには DMSO を加えた。

A



B

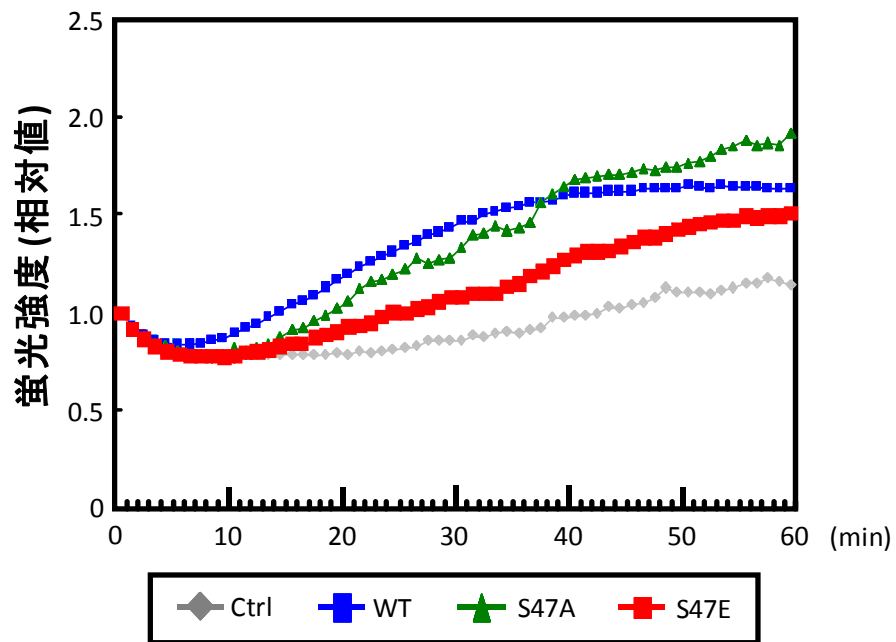


図 17: *in vitro* 微小管再構成アッセイを用いた、DCX のチューブリン重合能の解析

DCX のチューブリン重合能を微小管再構成アッセイによって測定した。

A. チューブリンに対する DCX のモル比を変え、チューブリン重合促進に必要な DCX の濃度を検討した。B. DCX:チューブリン= 0.03 :1 のモル比条件で解析を行った。

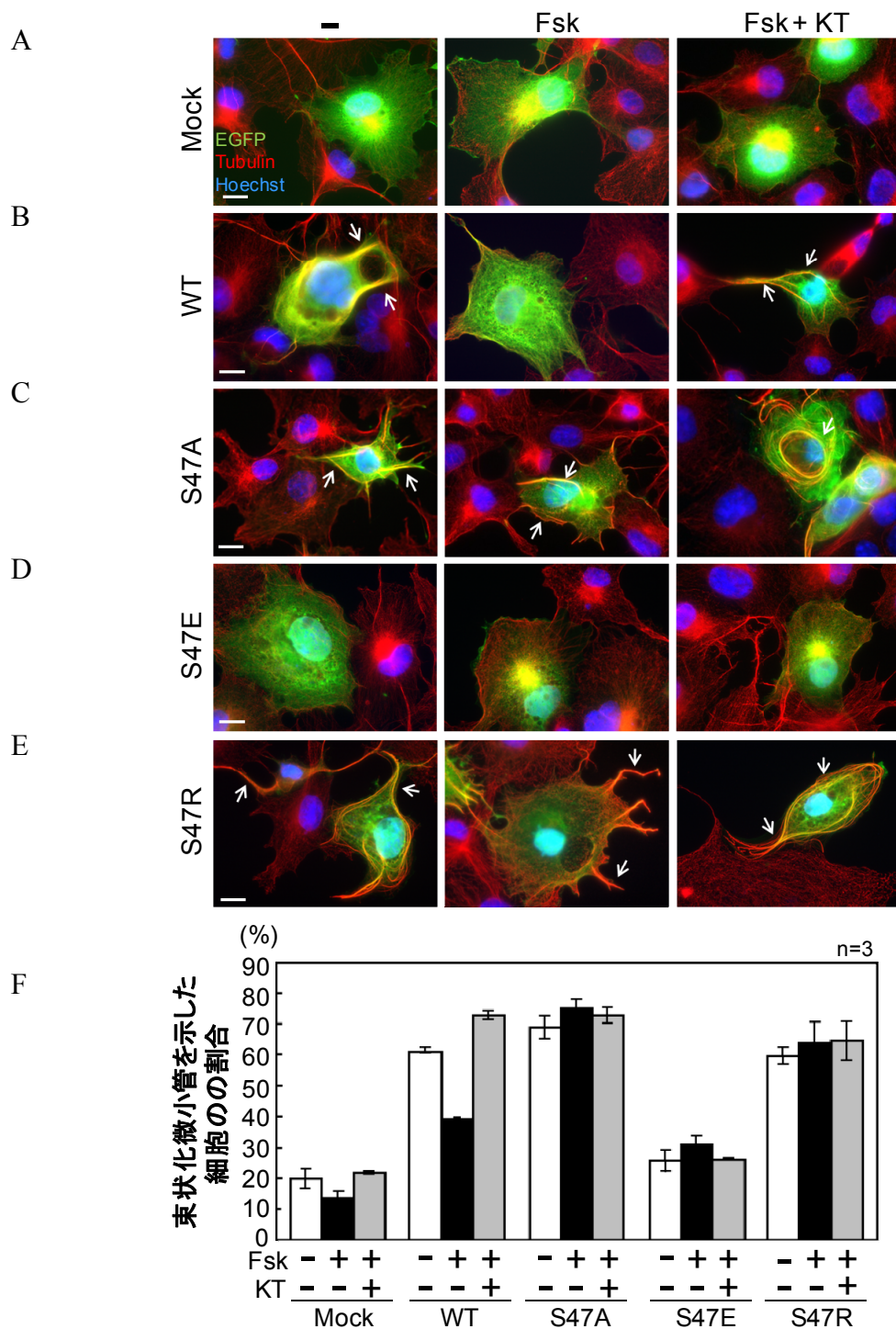


図 18 : COS7 細胞における免疫染色

A-E. EGFP 融合 DCX を COS7 細胞に過剰発現し、束状化した微小管 (矢印) を観察した。コントロール細胞には EGFP を導入した。微小管は抗チューブリン抗体を用いて検出した。また、フォルスコリン (Fsk) は 1 時間処理し、KT5720 (KT) はフォルスコリン添加前に 30 分間処理した。スケールバー: 10 μm F. 束状化微小管を有する細胞の数を測定し、グラフ化した。

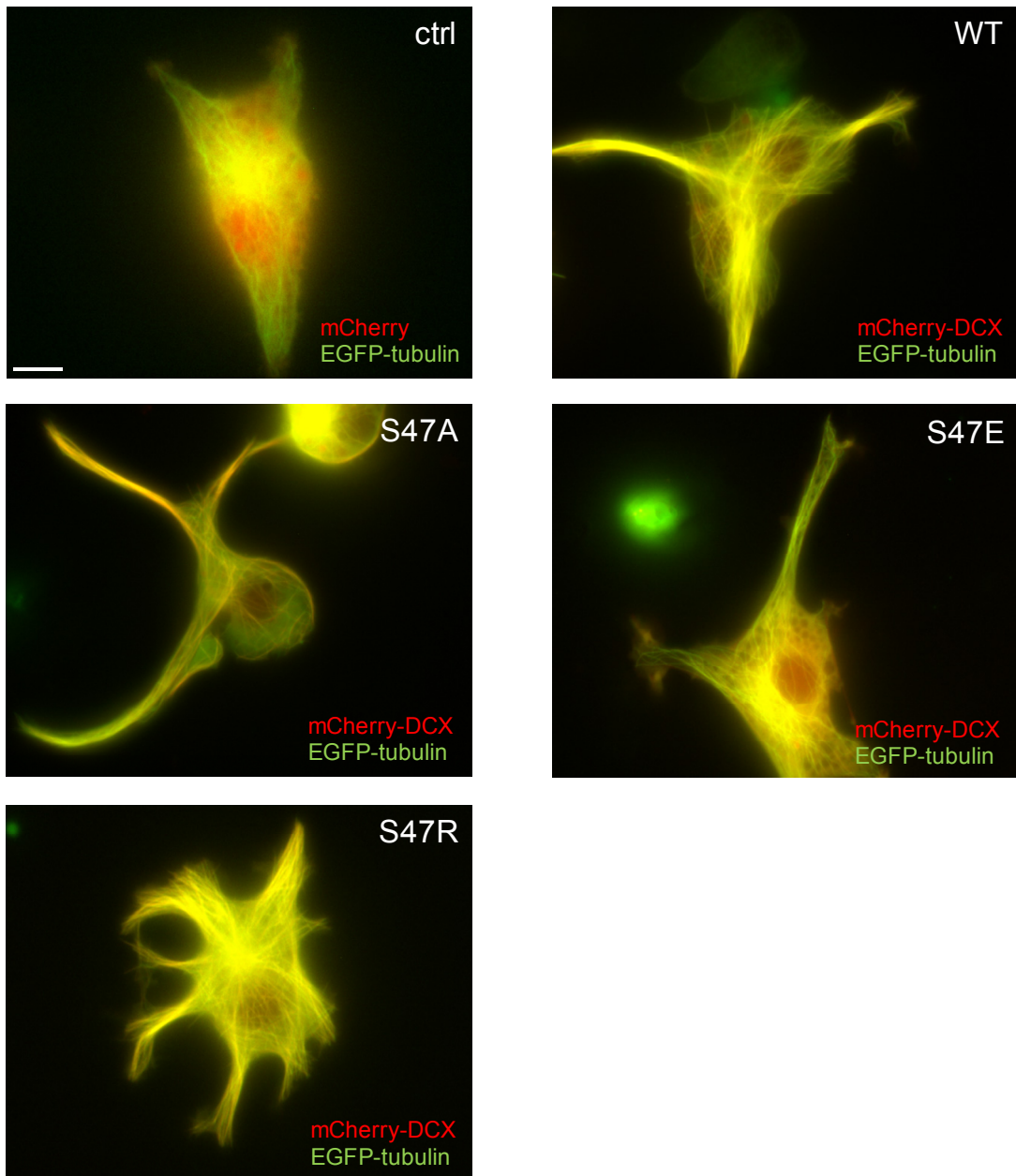


図 19：培養神経前駆細胞内での DCX 変異体及びチューブリンの挙動

培養神経前駆細胞に mCherry 融合 DCX と GFP 融合チューブリンをそれぞれ導入し、PDL/ラミニンでコートしたディッシュに接着させた。コントロール (ctrl) の細胞には mCherry と GFP-チューブリンを発現させた。接着して 2 時間後に、DCX 及びチューブリンの細胞内での挙動をタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー：10 μm

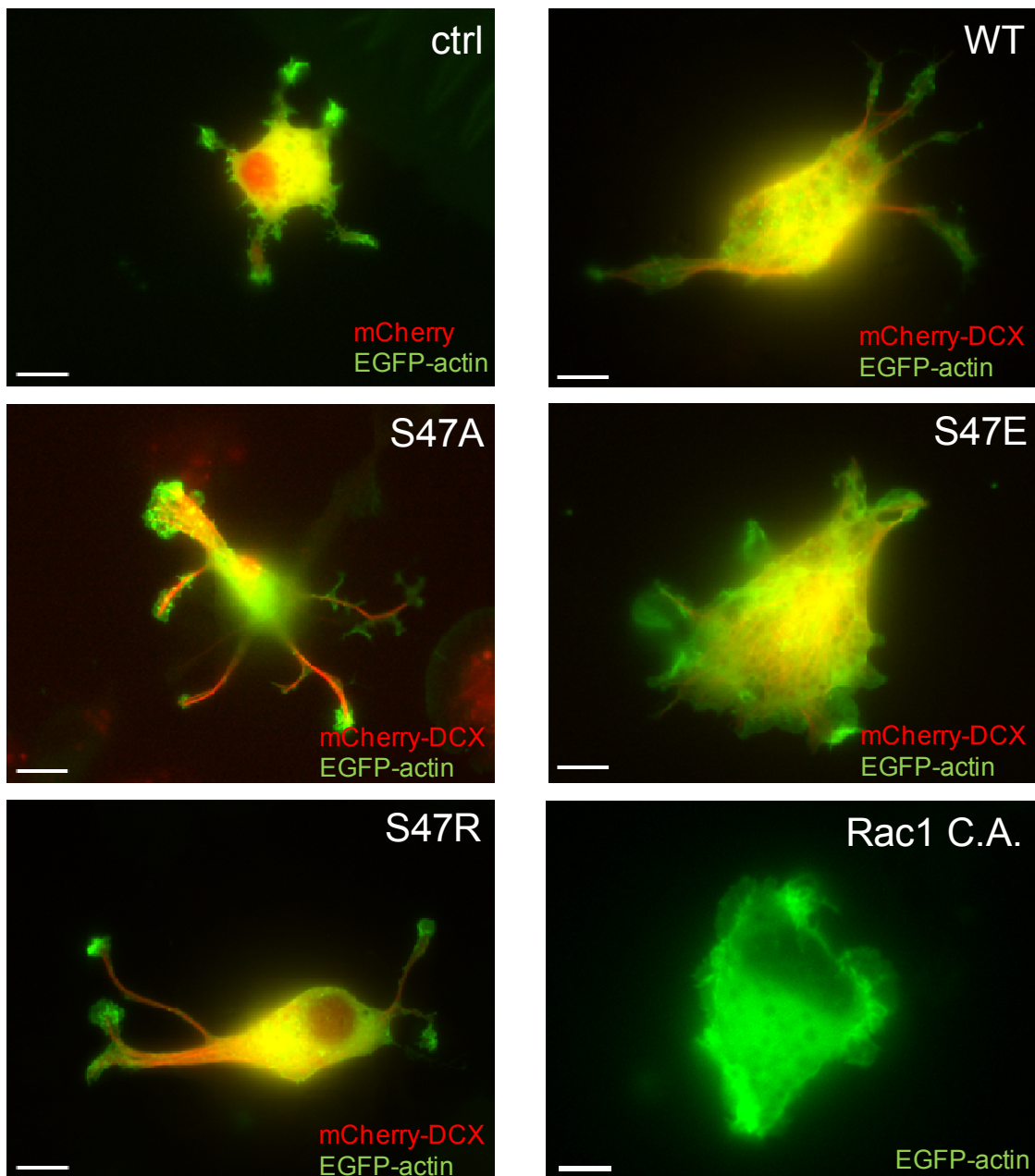


図 20 : 培養神経前駆細胞内での DCX 変異体及びアクチンの挙動

培養神経前駆細胞に mCherry 融合 DCX と EGFP 融合アクチンをそれぞれ導入し、PDL/ラミニンでコートしたディッシュに接着させ、2 時間後に細胞内の DCX 及びアクチンをタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて観察した。コントロール (ctrl) の細胞には mCherry と EGFP-アクチンを発現させた。スケールバー : 10 μ m

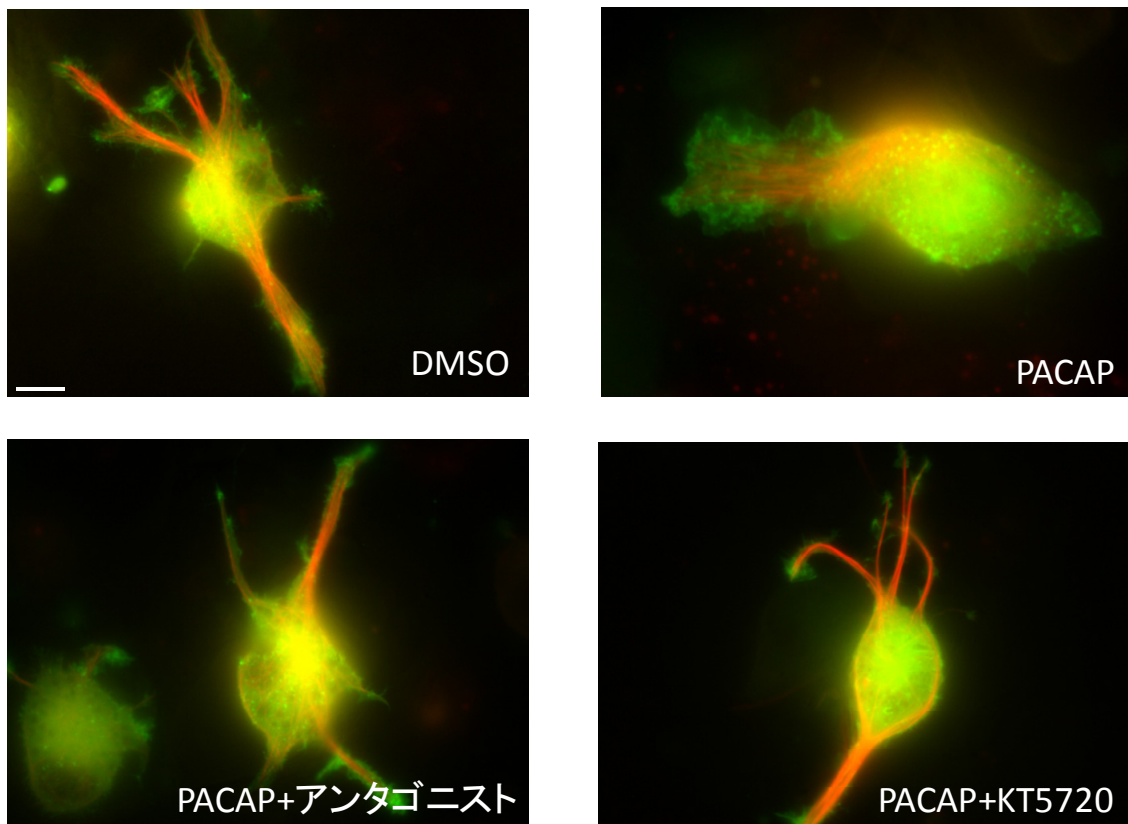


図 21：培養神経前駆細胞内での DCX 及びアクチンの挙動

培養神経前駆細胞に mCherry 融合 DCX-WT と EGFP 融合アクチンをそれぞれ導入し、PDL/ラミニンでコートしたディッシュに接着させ、2 時間後に細胞を観察した。接着後に 10 nM PACAP で 1 時間刺激し、細胞内の DCX 及びアクチンをタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて観察した。PACAP アンタゴニストと KT5720 は PACAP 刺激 30 分前に加えた。コントロール細胞には 2.5 % DMSO を加えた。スケールバー：10 μ m

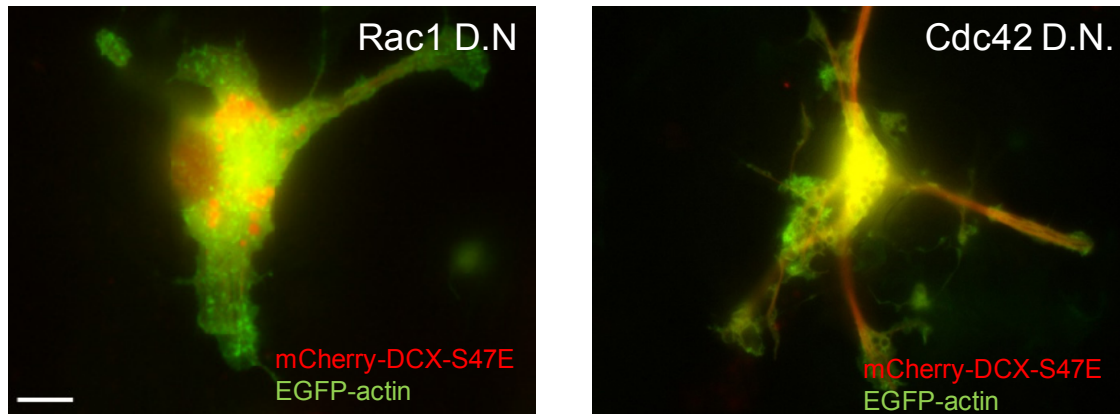


図 22 : 神経前駆細胞内での DCX 変異体及びアクチンの挙動

培養神経前駆細胞に mCherry 融合 DCX (S47E) と EGFP 融合アクチン、更に Rac1、Cdc42 のドミナントネガティブ体 (D.N.) を導入し、PDL/ラミニンコートしたディッシュに接着させ、2 時間後に細胞内の DCX 及びアクチンをタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー : 10 μ m

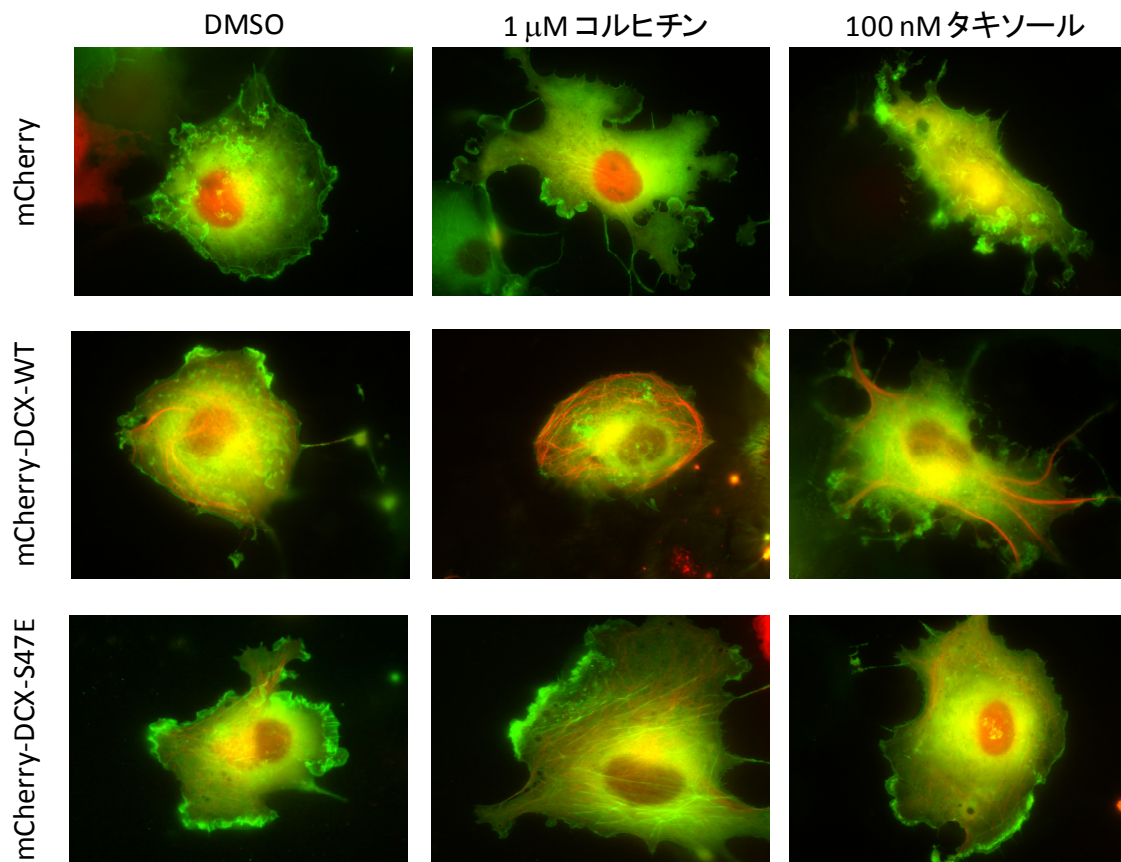
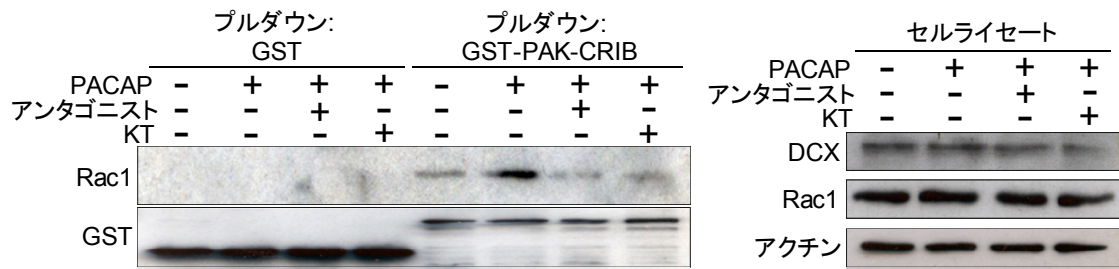


図 23 : COS7 細胞内での DCX S47E 変異体及びアクチンの挙動

mCherry 融合 DCX と EGFP 融合アクチンを導入した COS7 細胞を、ディッシュに 2 時間接着させた。接着後、100 nM タキソール、1 μ M コルヒチンを添加してから 30 分後、細胞内の DCX 及びアクチンをタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて観察した。

A



B



C

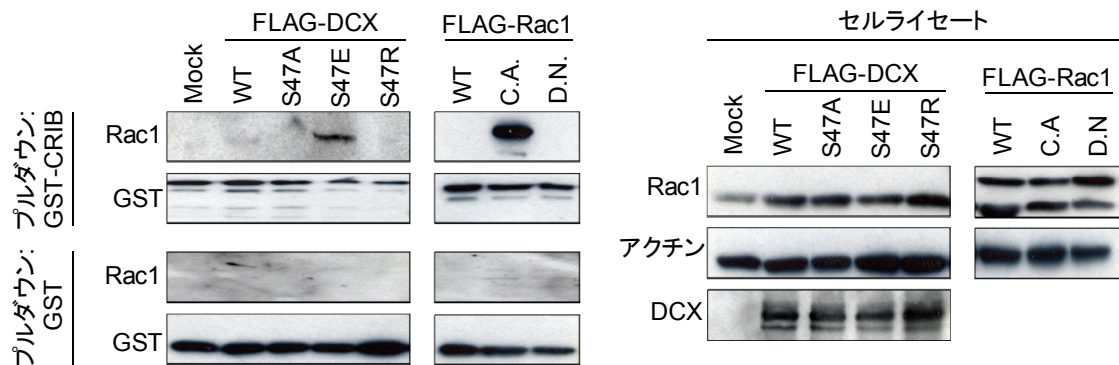


図 24 : リン酸化 DCX による Rac1 の活性化

A. 培養神経前駆細胞を 10 nM PACAP で 30 分間刺激し、GST 融合 PAK CRIB ドメインを用いたプルダウン法により GTP 結合型 Rac1 を特異的に検出した。なお、PACAP アンタゴニスト (アンタゴニスト) 及び KT5720 (KT) は PACAP 刺激 30 分前に添加した。B. shDCX を産生するアデノウイルス (shDCX1) を用いて培養神経前駆細胞の内在性 DCX をノックダウンした。更に 10 nM PACAP を用いて刺激し、GST 融合 PAK CRIB ドメインを用いたプルダウン法により GTP 結合型 Rac1 を特異的に検出した。C. HEK293T 細胞に野生型 DCX 及び S47 変異体を過剰発現し、GST 融合 PAK CRIB ドメインを用いたプルダウン法により GTP 結合型 Rac1 を特異的に検出した。

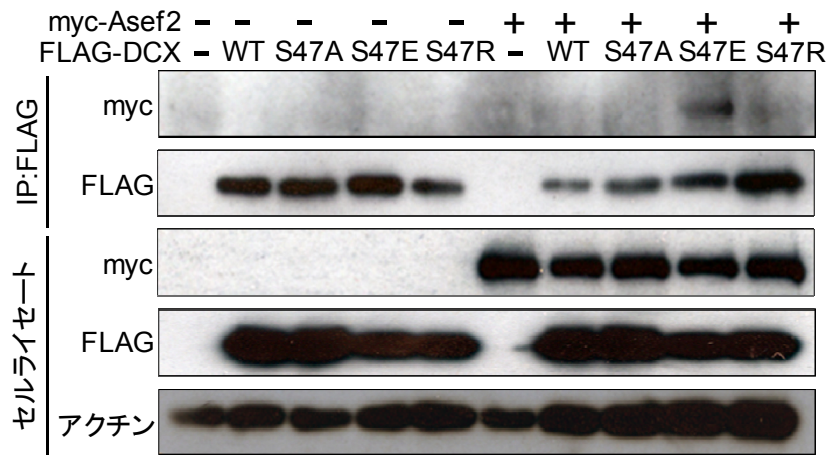


図 25 : Asef2 と DCX S47E の相互作用

HEK293T 細胞に野生型 DCX 及び S47 変異体、Asef2 をそれぞれ過剰発現し、FLAG (M2) 抗体を用いて DCX を免疫沈降し、DCX と共沈降する Myc-Asef2 を検出した。

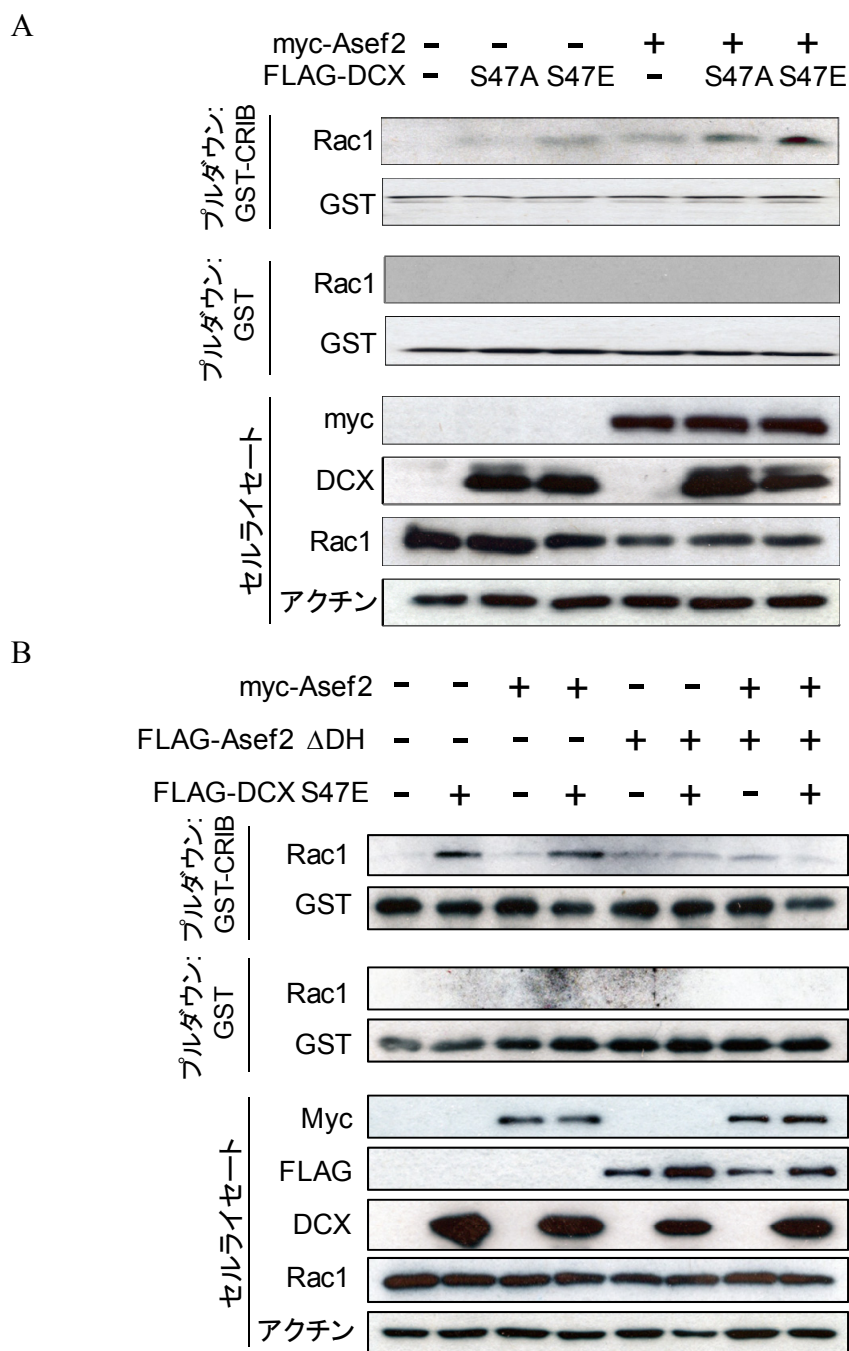


図 26 : Asef2 と DCX S47E による Rac1 の活性化

A. HEK293T 細胞に S47A 及び S47E 変異体、Asef2 をそれぞれ過剰発現し、GST 融合 PAK-CRIB ドメインを用いたプルダウン法を行った。プルダウン法により沈殿した GTP 結合型 Rac1 を、抗 Rac1 抗体を用いて検出した。B. 全長の Myc-Asef2、DH ドメインを欠失した Asef2 Δ DH 及び S47E 変異体を HEK293T 細胞に発現させ、GST 融合 PAK CRIB ドメインを用いたプルダウン法により GTP 結合型 Rac1 を特異的に検出した。

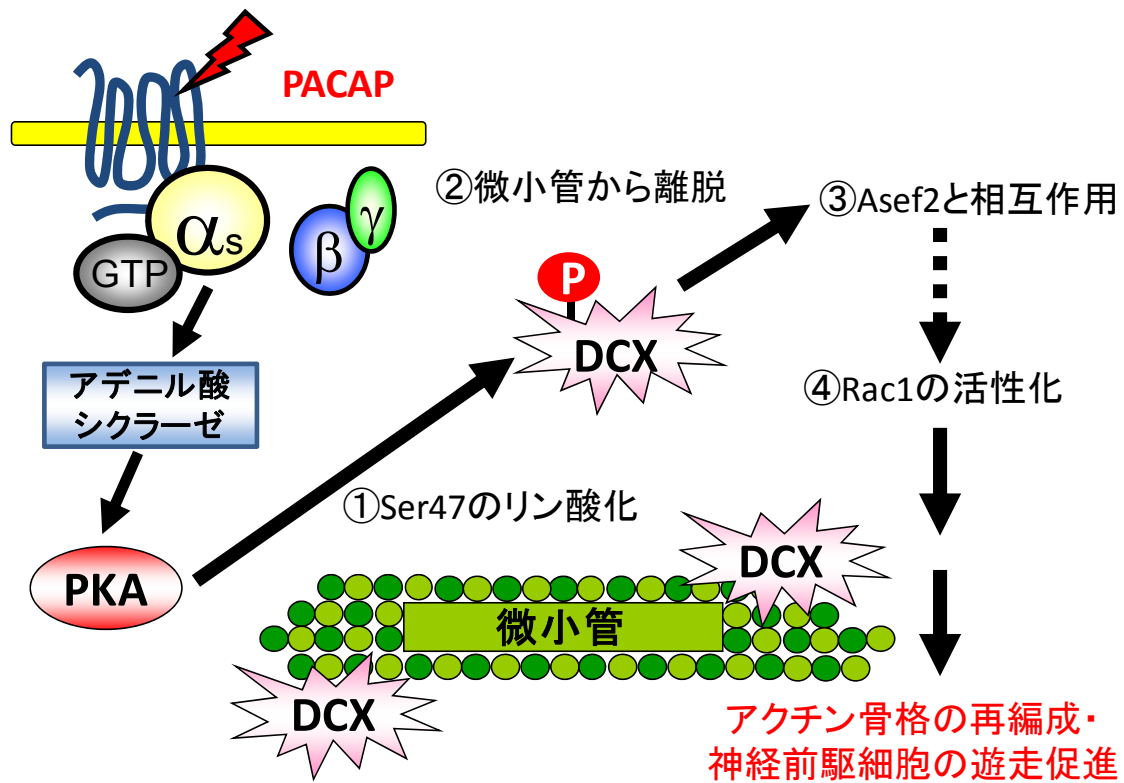


図 27 : Gs-PKA シグナルによる神経前駆細胞の遊走制御機構

PACAP は G タンパク質共役受容体を介して Gs、PKA を活性化し、活性化された PKA は DCX の Ser47 をリン酸化する。リン酸化された DCX は微小管から離脱し、Rac1 の GEF である Asef2 と相互作用する。破線矢印で示したシグナル伝達経路は未だ明らかではないが、Asef2 と DCX-S47E 変異体が相互作用することで Rac1 が活性化され、アクチン骨格の再編成が起こり神経前駆細胞の遊走が促進されると考えられる。

考察

PKA による DCX の Ser47 リン酸化の解析

in vitro キナーゼアッセイの結果より、DCX は PKA によって直接リン酸化されることが示された。また、Ser47 をアラニン置換した非リン酸化変異体は ^{32}P の取り込みが著しく減少していた (図 7)。このことから、過去の報告で示唆されていたように、47 番目のセリンは PKA によって直接リン酸化されることが明らかとなった。更に、PACAP 刺激した培養神経前駆細胞の細胞抽出液を二次元電気泳動法によって分離し抗 DCX 抗体を用いてバンドを検出した。野生型 DCX を発現させたサンプルではバンドが PACAP 刺激により酸性側に有意にシフトしたのに対し、S47A 変異体を発現させても野生型のように見られたようなバンドシフトが見られなかった。また、野生型 DCX のときに見られたバンドシフトは λ フォスファターゼ処理をすることにより元の位置に戻ることから、酸性側へのバンドシフトはリン酸化によるものであることが示された (図 8)。刺激に用いた PACAP の濃度は 10 nM であり、この濃度は細胞遊走を促進する濃度であり、DCX をリン酸化させるのに十分であることが示された。

一方、Ser47 のリン酸化を特異的に認識する抗体の作製を試みたが、現在のところ特異性の高い抗体を作製することができなかった。また、リン酸化された PKA 基質を認識する抗体を用いて、DCX の Ser47 のリン酸化を認識できるか DCX を免疫沈降したサンプルを用いて検討したが、DCX の Ser47 リン酸化の亢進を示す結果を得ることができなかった。これらの理由により大脳皮質発生時期における Ser47 リン酸化の時空間的な変化については確認できなかった。一方、PACAP の mRNA は少なくとも胎生 13 日には発現しており、生後もその発現が持続する (Skoglösa *et al.*, 1999) ことから、少なくとも PACAP により誘導される Gs-PKA シグナルは大脳皮質発生時期を通して活性が持続されていると考えられる。

DCX のリン酸化による細胞遊走への効果の検討

PKA のリン酸化部位変異体を HEK293T 細胞に発現させ、その遊走能をボイデンチャンバー法により測定したところ、S47E 変異体の過剰発現は遊走を促進し、反対に S47A 変異体を過剰発現させると遊走が抑制された (図 11)。このことから、遊走促進効果は DCX 依存的であり、非神経細胞も神経細胞と同様の遊走促進機構を持っていることが示唆された。Asef2 や Neurabin II が HEK293T 細

胞に発現しているという報告もあることから、神経特異的な DCX を外来的に発現させることで、Asef2 を介した遊走制御機構が働いた可能性が考えられる。

大脳皮質に野生型もしくは DCX-S47E を過剰発現すると、培養神経前駆細胞の遊走がコントロール、S47A や S47R 変異体を過剰発現させた時と比較して有意に促進された (図 12)。S47A や S47R 変異体は PKA によってリン酸化されない。また、Ser47 は進化的に脊椎動物間で保存されていることから (図 2 B)、Ser47 のリン酸化が重要な役割を果たすこと、特に正常な大脳皮質の発生には DCX の Ser47 のリン酸化が不可欠であり、遊走に重要な役割を果たしていることが考えられた。

一方、cAMP-PKA シグナル経路は繊維芽細胞等の細胞遊走を抑制することが知られている (Howe, 2004)。更にカハール・レチウス細胞等といった脳内の神経細胞においても、cAMP の産生を抑制する G α i と共役する GPCR である CXCR4 や、このリガンドである CXCL12 (SDF1 と呼ばれる) をノックアウトした場合、遊走能が減少することが報告されている (Tiveron and Cremer, 2008)。これまでに報告されていた、cAMP-PKA シグナルが細胞遊走を抑制するという結果は今回得た結果と矛盾するが、DCX の発現量や PKA を活性化させるリガンドに対する感受性、また細胞内における cAMP-PKA シグナルの活性化される部位などの違いが遊走能の調節結果に違いを生じているのではないかと考えている。また、当研究室では GPCR である Endothelin receptor type B (ETRB) と G α q を介した Endothelin1 (ET-1) からの刺激により JNK が活性化され、神経前駆細胞の radial migration が抑制されることを報告している (Mizuno *et al.*, 2005)。PACAP は高濃度条件下では Gs-PKA シグナルだけでなく Gq シグナルも活性化することが知られているので、PACAP がより多く発現している皮質板付近に到達した細胞は Gs シグナルから Gq シグナルにスイッチすることで、遊走を停止する能力を獲得し、overmigration するのを防ぐ役割を果たしているかもしれない。

一方、これまでに、DCX をノックアウトさせたマウスでは大脳の層構造及び放射状移動に異常は観察されないが (Corbo *et al.*, 2002、Kappeler *et al.*, 2006)、DCX をノックダウンさせたラットでは多極性神経前駆細胞の遊走が中間帯付近で停止することが報告されている (Bai *et al.*, 2003)。微小管結合部位である DCX ドメインは進化的によく保存されており、DCX ドメインを含むタンパク質は DCX スーパーファミリーを形成している (Reiner *et al.*, 2006、Coquelle *et al.*, 2006)。DCX ノックアウトマウスにおいて大脳構造の異常が観察されないのは、DCX スーパーファミリーに属する Doublecortin-like kinase (DCLK) がノックアウトされた DCX の代償を行っており、RNAi 法による mRNA の急激な分解には代償機構が働かないからであると考えられている。DCX と DCLK のダブルノックアウトマウスでは大脳皮質の層構造が薄くなり、また軸索の伸長、投射も正常

でなくなる報告もあり、DCX と DCLK の遺伝学的な相互作用が強く示唆されている (Deuel *et al.*, 2006)。これらの報告を踏まえ、shRNA を用いたノックダウンによって培養神経前駆細胞における内在性の DCX を発現抑制すること、更に発現抑制後に DCX 変異体を過剰発現させ、変異体の機能を評価することは非常に有効的であると考えられた。

一方、DCX は Cdk5 などの様々なキナーゼによってリン酸化されることが報告されている (Tanaka *et al.*, 2004 (1))。特に Cdk5 のノックアウトマウスでは大脳皮質の層構造に異常が生じることが報告されている (Jessberger *et al.*, 2009)。現在までに Cdk5 による DCX のリン酸化は微小管への親和性を減少させることが報告されているが (Tanaka *et al.*, 2004 (1))、このリン酸化が細胞遊走や神経機能の獲得においてどのような役割を果たすのかについては、未解明な点が非常に多い。今後は様々なキナーゼによる DCX のリン酸化が与える影響、例えば Cdk5 によるリン酸化が PKA によるリン酸化とどのような関係にあるか解析を行う必要があると考えている。

リン酸化 DCX が微小管の動態に与える影響

これまでに *in vitro* の系を用いた解析により、精製チューブリンタンパク質とリコンビナントの野生型 DCX を PKA あるいは MARK を共にインキュベートした後に遠心し、重合したチューブリンを沈降させると、上清に DCX が確認されること、一方 S47A 変異体を用いた場合には上清に DCX の存在が確認されないと報告されており、DCX は PKA もしくは MARK によるリン酸化によってチューブリンへの親和性が減少することが示唆されていた (Schaar *et al.*, 2004)。また、GFP 融合 S47E 変異体を COS7 細胞に過剰発現させ、免疫染色法を用いて検討した実験では、微小管への親和性が減少することが報告されている (Tsukada *et al.*, 2005)。しかし、これまで細胞外のシグナルによる調節については証明されていなかった。今回得られた結果より、PACAP による刺激が DCX のリン酸化を増加させることが分かったので、PACAP が DCX の機能を調節しているのか検討した。細胞内シグナルを活性化させた細胞を用いた微小管分画実験より、PACAP 刺激が DCX の微小管への親和性を減少させること、細胞内において S47E 変異体の微小管への親和性が減弱していることを、ウエスタンブロット法を用いた定量的解析により明らかにすることができた (図 14、15)。さらに、免疫染色法を用いた実験においても、PKA シグナルが DCX の Ser47 をリン酸化することで束状化された微小管を減少させることを明らかにすることができた (図 18)。これらの結果は、PKA によって DCX の Ser47 がリン酸化されることで微小管への親和性が減少するという他のグループの結果とよく一致している。

また、DCX はチューブリンが重合する際の重合核となることで重合を促進させるという報告がある (Moore *et al.*, 2006)。このことから、Ser47 のリン酸化が微小管への親和性を減少させることで重合核となりにくくなり、チューブリン重合能にも影響を与えるのではないかと考え、実験を行った。微小管分画実験では、野生型 DCX や S47 変異体による微小管分画と遊離チューブリン分画のチューブリン量の有意な変化は見られなかった。しかし、*in vitro* における微小管再構成解析の結果、DCX の濃度依存的に微小管の重合が促進されること、更に S47E 変異体は野生型や S47A 変異体に比べ顕著に重合促進作用が弱まっていることが分かった (図 17)。Cdk5 や JNK によるリン酸化においても DCX の微小管に対する親和性を減弱させることが報告されているので、これらのキナーゼによる疑似リン酸化型変異体を用いて細胞内の微小管分画実験を行い、微小管への親和性を検討したが S47E 変異体のような、有意な微小管への親和性の減少は見られなかった。今後は Cdk5 あるいは JNK によるリン酸化部位と PKA によるリン酸化部位 Ser47 の両方に変異を入れたコンストラクトを用いて微小管への親和性がどのように変化するのか解析を行う予定である。

一方、遊走細胞を微小管脱重合阻害剤であるタキソール処理、もしくは微小管重合阻害剤であるコルヒチン処理すると、どちらも遊走能が減少することが報告されている (Schiff and Horwitz, 1980, Hasskarl *et al.*, 1973)。また、様々な知見より、遊走細胞における微小管の動態は非常に厳密に調節されていることが示唆されている (Small *et al.*, 2002, Gundersen, 2002)。特に神経前駆細胞が遊走する際は、一般に双極性の細長い形態をとり、移動方向の前後にそれぞれ先導突起と尾突起を形成することが知られている。移動方向に向かって先導突起が伸長した後、続いて細胞核ならびにその他の細胞内小器官が先導突起内部へ移動するというしゃくとり虫のような運動様式をとり、先導突起の伸長と核の移動は神経前駆細胞の遊走に重要であると考えられている (Ridley *et al.*, 2003, Samuels *et al.*, 2004)。先導突起の内部では微小管が高度に束状化していることが報告されているが (Geraldo and Gordon, 2009)、遊走している細胞内では、部位によって微小管のダイナミクス制御法が異なることが考えられる。そこで、遊走している培養神経前駆細胞中の DCX 及びチューブリンの局在やダイナミクスを観察したところ、野生型 DCX は細胞辺縁部に強く局在しており、束状化微小管が形成されていた (図 19)。一方、驚いたことに、S47E 変異体を発現させると、S47E 変異体は細胞質全体に分布しており束状化微小管が観察されないだけでなく、細胞辺縁部が非常にダイナミックに動く様子が観察された。この動きはアクチンにより形成されるラメリポディアと同様であったため、PKA によりリン酸化された DCX がアクチン骨格の制御に関わるのではないかと考えられた。

リン酸化 DCX によるアクチン細胞骨格の動態調節

神経細胞の成長円錐は、アクチンが密に存在してメッシュ状の構造体を形成している Peripheral domain (P ドメイン) と、微小管が高度に重合している Central domain (C ドメイン) とに区別される。P ドメインでは Rac1 の活性化を介したラメリポディアの形成が頻繁に観察される。ラメリポディア内では L1 や Neural cell adhesive molecules (NCAM) などの接着分子が多く局在しており、神経前駆細胞が動く際には、これら接着分子が推進力を生みだすのに関与していると考えられている (Maness and Schachner, 2007)。一部の微小管は C ドメインに存在するだけでなく P ドメインにも侵入しており、微小管とアクチンが非常に近い場所で存在していることが報告されている (Zhou *et al.*, 2002)。また、非常に興味深いことに、P ドメインに侵入している微小管に DCX が局在しているという報告があることから (Tint *et al.*, 2009)、DCX がアクチンと相互作用している可能性も考えられた。S47E 変異体を発現、あるいは PACAP で刺激した培養神経前駆細胞ではラメリポディアの形成が観察された (図 20、21)。またタキソールやコルヒチンを用いて、ラメリポディアの形成が微小管の動態変化によるものではないことを示した (図 23)。DCX-S47E の発現によるラメリポディアの形成は Rac1 の活性化依存的であり、PKA によってリン酸化された DCX は特に成長円錐などで Rac1 を活性化し、アクチン骨格のダイナミクス制御をしている可能性が考えられる。

Rac1 などの低分子量 GTP 結合タンパク質は神経前駆細胞の遊走制御に関与すること、また微小管とアクチン骨格のクロストークは適切な細胞遊走か接着、またシナプス形成に必要であることから (Heng *et al.*, 2009)、DCX による微小管、アクチン両者の細胞骨格の制御は神経前駆細胞の遊走はもちろん、神経細胞の軸索あるいは樹状突起の伸長や形態変化においても重要な働きをし、正常な大脳皮質の発生に不可欠であると考えられる。

それでは、PKA によってリン酸化された DCX はどのようにして Rac1 を活性化するのだろうか。Rac1 を初めとする低分子量 GTP 結合タンパク質は、G α サブユニットと同様に、定常状態では GDP と結合しており、GTP と結合することにより活性状態となる。GDP から GTP への交換反応はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって調節されることが知られている (Ramakers, 2002)。図 25 に示すように、S47E 変異体は Rac1 の GEF である Asef2 と相互作用すること、また Asef2 と S47E 変異体の共発現は GTP 結合活性型 Rac1 を著しく増加させることが明らかとなった (図 26)。さらに DH ドメインを欠失した変異体を発現すると、Asef2 と S47E が誘導する Rac1 の活性化が抑えられたことから、S47E 変異体は Asef2 の GEF 活性を活性化することで、アクチン骨格の制御を行っている

ることが示唆された。Asef2 の mRNA は E13.5 マウス脳の前室体中に発現しているという報告があり (Yoshizawa *et al.*, 2003)、発生時期の大脳皮質内においても Asef2 とリン酸化 DCX が相互作用している可能性がある。さらに、Asef2 は Rac1 だけでなく Cdc42 に対しても GEF 活性を示すことが報告されている (Kawasaki *et al.*, 2007; Hamann *et al.*, 2007)。Cdc42 のドミナントネガティブ体の過剰発現は S47E 変異体が誘導するラメリポディアの形成を抑制した (図 22)。これらのことは Asef2 がリン酸化 DCX の標的であることをより強く示唆している。しかし、DCX-S47E と Rac1 のリコンビナントタンパク質と S³⁵ でラベルされた GTP- γ S を用いた、*in vitro* における Asef2 の GEF 活性は測定することができなかつたので、今後さらにアッセイ系を検討し、DCX 存在下での Asef2 の GEF 活性を測定する必要がある。既述の neurabin II や APC などさらなる分子の関与も考えながら系を構築していく必要があるかもしれない。

DCX は遊走だけでなく、神経軸索の伸長や投射に重要な役割を果たすことが報告されている。特に神経軸索の内部には、非常に安定化された微小管が密に存在している。Cdk5 による DCX のリン酸化は微小管への親和性を減少させることが知られているが、Cdk5 による DCX のリン酸化を特異的に認識するペプチド抗体を用いた解析より、Cdk5 によってリン酸化された DCX は成長円錐や神経突起で減少していることが明らかとなっている。つまり、神経軸索の形成や伸長には DCX による微小管の安定化が必要であると考えられている (Bielas *et al.*, 2007)。

一方、神経細胞が遊走する際、微小管やアクチンなどの細胞骨格の編成だけでなく、細胞核の動きも厳密に制御されていることが知られている。先端突起は連続的に伸長するのに対し、細胞核は急速な前進と停止を断続的に繰り返すことから、先端突起の伸長と細胞核の移動は、ある意味独立に制御されている可能性がある。中心体は微小管形成中心とも呼ばれ、微小管が伸長する際の開始点となる。中心体は細胞分裂に重要であるが、神経前駆細胞の遊走においても大事な役割を果たす。中心体と核は微小管を介して連結しており、中心体が前方方向に移動した後に核が中心体の近くに移動することで、核が前方方向へと移動する (Solecki *et al.*, 2004)。DCX は先端突起だけでなく、核と中心体を結ぶ微小管にも局在する。また、DCX 同様に滑脳症の原因遺伝子である Lis I +/- の神経細胞、もしくはダイナミンの構成分子であるダイナミチンの過剰発現によって微小管モータータンパク質であるダイニンを機能阻害した神経細胞に DCX を過剰発現すると、遊走抑制が部分的に正常化することが示されている

(Tanaka *et al.*, 2004. (2)). Lis I は中心体に存在し、微小管を制御すること、さらにダイニンのモーター活性を制御していることが明らかとなっている (Kerjan *et al.*, 2007)。このことから、DCX は Lis I、ダイニンとともに微小管上に存在し、神経前駆細胞の遊走を制御していることが示唆される。これらの報告より、DCX が微小管に結合し安定化することは、大脳皮質の正常な発生に不可欠であることは言うまでもない。

今回得られた結果は、微小管結合タンパク質である DCX がアクチン骨格の動態も調節することで神経前駆細胞の遊走を正に制御するという、まったく新しい知見であるが、滑脳症発症のメカニズムや大脳皮質の発生過程、特に神経前駆細胞の遊走制御メカニズムが全て明らかになったわけではない。今後さらに研究が進み、大脳皮質の発生メカニズムの全貌が解明され、滑脳症の治療法が開発されることが期待される。

謝辞

本論文は、著者が奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・メディカル生物学専攻・分子情報薬理学研究室に、博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

同研究室の教授である伊東 広 先生には指導教官として本研究の機会を与えていただきました。研究の遂行にあたり 5 年間、終始きめ細やかなご指導、ご助言を賜りました。また今後研究を続ける上で骨子となる、研究に対する心構えといった精神面の在り方に関してもご指南いただきましたことを深謝致します。

また、同専攻の教授である塩坂 貞夫 先生、川市 正史 先生、加藤 順也 先生には副査として 5 年間もの間ご助言いただき、細部に渡りご指導いただきました。ここに厚く感謝申し上げます。

日頃の研究全般において様々な視点からご助言、ご指導いただきました稲垣直之 先生、水野 憲一 先生、多胡 憲治 先生には心より感謝致します。研究に行き詰った際、先生方に解決方法を具体的に御指示いただいた結果、研究を成し遂げることができました。

東京大学・医科学研究所の教授である北村 俊夫 先生にはレトロウイルスベクターを供与いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

最後に、どんなに辛いときも励ましながら大学院進学の道を援助してくれた両親と、日頃の研究方法について解決法を提示してくれた夫に、感謝の意を申し上げます。

参考文献

Amano M., Tsumura Y., Taki K., Harada H., Mori K., Nishioka T., Kato K., Suzuki T., Nishioka Y., Iwamatsu A., and Kaibuchi K. **A proteomics approach for comprehensively screening substrates of protein kinases such as Rho-kinase.** PLoS One. 5. e8704. (2010)

Bai J, Ramos R.L, Ackman J.B, Thomas A.M, Lee R.V, and LoTurco J.J. **RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex.** Nat. Neurosci. 6. 1277-1283. (2003)

Bielas S., Higginbotham H., Koizumi H., Tanaka T., and Gleeson J.G. **Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20. 593-618. (2004)

Bielas S.L, Serneo F.F, Chechlac M, Deerinck T.J, Perkins G.A, Allen P.B, Ellisman M.H, and Gleeson J.G. **Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist.** Cell. 129. 579-591. (2007)

Billimoria P.M., de la Torre-Ubieta L., Ikeuchi Y., Becker E.B., Reiner O., and Bonni A. **A JIP3-regulated GSK3 β /DCX signaling pathway restricts axon branching.** J. Neurosci. 30. 16766-13776. (2010)

Botia B., Basille M., Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez B.J, and Vaudry D. **Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex.** Peptides. 28. 1746-52. (2007)

Burbelo P.D., Drechsel D., and Hall A. **A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases.** J. Biol. Chem. 270. 29071-29074. (1995)

Coquelle F.M, Levy T, Bergmann S, Wolf S.G, Bar-El D, Sapir T, Brody Y, Orr I, Barkai N, Eichele G, and Reiner O. **Common and divergent roles for members of the mouse DCX superfamily.** Cell Cycl. 5. 976-983. (2006)

Corbo J.C, Deuel T.A, Long J.M, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, and Walsh CA. **Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex.** *J. Neurosci.* 22. 7548–7557. (2002)

Deuel T.A, Liu J.S, Corbo J.C, Yoo S.Y, Rorke-Adams L.B, and Walsh CA. **Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth.** *Neuron.* 49. 41-53. (2006)

Gdalyahu A, Ghosh I, Levy T, Sapir T, Sapoznik S, Fishler Y, Azoulay D, and Reiner O. **DCX, a new mediator of the JNK pathway.** *EMBO J.* 23. 823–832. (2004)

Geraldo S, and Gordon-Weeks P.R. **Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering.** *J. Cell Sci.* 122. 3595-604. (2009)

Gleeson J.G., Lin P.T., Flanagan L.A., and Walsh C.A. **Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons.** *Neuron.* 23. 257-271. (1999)

Gundersen G.G. **Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3. 296-304. (2002)

Hall A. **Rho GTPases and the actin cytoskeleton.** *Science.* 279. 509-514. (1998)

Hamann M.J., Lubking C.M., Luchini D.N., and Billadeau D.D. **Asef2 functions as a Cdc42 exchange factor and is stimulated by the release of an autoinhibitory module from a concealed C-terminal activation element.** *Mol. Cell. Biol.* 27. 1380-1393. (2007)

Hasskarl E, Oberlander H, and Stephens R.E. **Microtubules and tracheole migration in wing disks of *Galleria mellonella*.** *Dev. Biol.* 33. 334-343. (1973)

Heng J.I., Chariot A., and Nguyen L. **Molecular layers underlying cytoskeletal remodeling during cortical development.** *Trends. Neurosci.* 33. 38-47. (2009)

Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf S.G, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, and Reiner O. **Doublecortin, a stabilizer of microtubules.** *Hum.Mol.Genet.* 8. 1599-1610. (1999)

- Howe A.K. **Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1692. 159-74. (2004)
- Iguchi T, Sakata K, Yoshizaki K, Tago K, Mizuno N, Itoh H. **Orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulates neural progenitor cell migration via a G alpha 12/13 and Rho pathway.** *J Biol Chem.* 283. 14469-14478. (2008)
- Jessberger S, Gage F.H, Eisch A.J, and Lagace D.C. **Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis.** *Trends. Neurosci.* 32. 575-82. (2009)
- Kappeler C., Saillour Y., Baudoin J.P., Tuy F.P., Alvarez C., Houbron C., Gaspar P., Hamard G., Chelly J., Métin C., and Francis F. **Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice.** *Hum. Mol. Genet.* 15. 1387-1400. (2006)
- Kawasaki Y., Sagara M., Shibata Y., Shirouzu M., Yokoyama S., and Akiyama T. **Identification and characterization of Asef2, a guanine-nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42.** *Oncogene.* 26. 7620-7627. (2007)
- Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Nakafuku M., and Satoh T. **Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins.** *Annu. Rev. Biochem.* 60. 349-400. (1991)
- Kerjan G. and Gleeson J.G. **Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly.** *Trends Genet.* 23. 623-630. (2007)
- Kim M.H, Cierpicki T, Derewenda U, Krowarsch D, Feng Y, Devedjiev Y, Dauter Z, Walsh C.A, Otlewski J, Bushweller J.H, and Derewenda Z.S. **The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase.** *Nat. Struct. Biol.* 10. 324-333. (2003)
- Lambert de Rouvroit C., and Goffinet A.M. **Neuronal migration.** *Mech. Dev.* 105. 47-56. (2001)
- Leger P.L, Souville I, Boddaert N, Elie C, Pinard J.M, Plouin P, Moutard M.L, des Portes V, Van Esch H, Joriot S, Renard J.L, Chelly J, Francis F, Beldjord C, and Bahi-Buisson N. **The location of DCX mutations predicts malformation severity in**

X-linked lissencephaly. Neurogenetics. 9. 277-285. (2008)

Levison S.W and Goldman J.E. **Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain.** Neuron. 10. 201-212. (1993)

LoTurco J.J and Bai J. **The multipolar stage and disruptions in neuronal migration.** Trends Neurosci. 29. 407-413. (2006)

Luo R, Jeong S.J, Jin Z, Strokes N, Li S, Piao X. **G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination.** Proc Natl Acad Sci U S A. 108. 12925-12930. (2011)

Maness P.F., and Schachner M. **Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration.** Nat. Neurosci. 10. 19-26. (2007)

Marinissen M.J., and Gutkind J.S. **G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms.** Trends. Pharmacol. Sci. 22. 368-376. (2001)

Milligan G., and Kostenis E. **Heterotrimeric G-proteins: a short history.** Br. J. Pharmacol. 147. Suppl1: S46-S55. (2006)

Mizuno N, Kokubu H, Sato M, Nishimura A, Yamauchi J, Kurose H, and Itoh H. **G protein-coupled receptor signaling through Gq and JNK negatively regulates neural progenitor cell migration.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102. 12365-12370. (2005)

Moore C.A, Perderiset M, Francis F, Chelly J, Houdusse A, and Milligan R.A. **Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin.** Mol. Cell. 14. 833-839. (2004)

Moore C.A, Perderiset M, Kappeler C, Kain S, Drummond D, Perkins SJ, Chelly J, Cross R Houdusse A, and Francis F. **Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton.** EMBO J. 25. 4448-4457. (2006)

Nadarajah B, and Parnavelas J.G. **Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex.** Nat. Rev. Neurosci. 3. 423-432. (2002)

Nadarajah B, Brunstrom J.E, Grutzendler J, Wong R.O, and Pearlman A.L. **Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex.** Nat. Neurosci. 4. 143-150. (2001)

Nobes C.D., and Hall A. **Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.** Cell. 81. 53-62. (1995)

Noctor S.C, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, and Kriegstein A.R. **Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases.** Nat. Neurosci. 7. 136-144. (2004)

Ocbina P.J., Dizon M. L., Shin L., and Szele F. Z. **Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres.** Mol. Cell. Neurosci. 33. 126-135. (2006)

Parsons J.T., Horwitz A.R., and Schwartz M. **Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11. 633-643. (2010)

Ramakers G.J. **Rho proteins, mental retardation and cellular basis of cognition.** Trends. neurosci. 25. 191-199. (2002)

Reiner O, Coquelle F.M, Peter B, Levy T, Kaplan A, Sapir T, Orr I, Barkai N, Eichele G, and Bergmann S. **The evolving doublecortin (DCX) superfamily.** BMC Genomics. 7. 188. (2006)

Ridley A.J. **Rho GTPases and cell migration.** J. Cell Sci. 114. 2713-2722. (2001)

Ridley A.J, Schwartz M.A, Burridge K, Firtel R.A, Ginsberg M.H, Borisy G, Parsons J.T, and Horwitz A.R. **Cell migration: integrating signals from front to back.** Science. 302. 1704-1709. (2003)

Ross M.E, Allen K.M, Srivastava A.K, Featherstone T, Gleeson J.G, Hirsch B, Harding B.N, Andermann E, Abdullah R, Berg M, Czapansky-Bielman D, Flanders D.J, Guerrini R, Motté J, Mira A.P, Scheffer I, Berkovic S, Scaravilli F, King R.A, Ledbetter D.H,

Schlessinger D, Dobyns W.B, and Walsh C.A. **Linkage and physical mapping of X-linked lissencephaly/SBH (XLIS): a gene causing neuronal migration defects in human brain.** Hum. Mol. Genet. 6. 555-562. (1997)

Sagara M., Kawasaki Y., Iemura S., Natsume T., Takai Y., and Akiyama T. **Asef2 and Neurabin II cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration.** Oncogene. 28. 1357-1365. (2009)

Samuels B.A and Tsai L.H. **Nucleokinesis illuminated.** Nat. Neurosci. 7, 1169-1170. (2004)

Schaar B.T, Kinoshita K, and McConnell S.K. **Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons.** Neuron. 41. 203-213. (2004)

Schiff P.B and Horwitz S.B. **Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 77. 1561–1565. (1980)

Shmueli A, Gdalyahu A, Sapoznik S, Sapir T, Tsukada M, and Reiner O. **Site-specific dephosphorylation of doublecortin (DCX) by protein phosphatase 1 (PP1).** Mol. Cell. Neurosci. 32. 15-26. (2006)

Skoglösa Y, Takei N, Lindholm D. **Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain.** Brain Res. Mol. Brain Res. 65. 1-13. (1999)

Small J.V, Geiger B, Kaverina I, and Bershadsky A. **How do microtubules guide migrating cells?** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3. 957-964. (2002)

Solecki D.J, Model L, Gaetz J, Kapoor T.M, and Hatten M.E. **Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration.** Nat. Neurosci. 7. 1195-1203. (2004)

Solomon, F. **Direct identification of microtubule-associated proteins by selective extraction of cultured cells.** Methods Enzymol 134. 139-147. (1986)

Spengler D., Waeber C., Pantaloni C., Holsboer F., Bockaert J., Seeburg P.H., and

Journot L. **Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor.** Nature. 365. 170-175. (1993)

Suzuki S.O and Goldman J.E. **Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration.** J. Neurosci. 23. 4240–4250. (2003)

Tabata H and Nakajima K. **Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex.** J.Neurosci. 23. 9996-10001. (2003)

(1).Tanaka.T, Serneo F.F, Tseng H.C, Kulkarni A.B, Tsai L.H, and Gleeson J.G. **Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration.** Neuron. 41. 215-227. (2004)

(2).Tanaka T, Serneo F.F, Higgins C, Gambello M.J, Wynshaw-Boris A, and Gleeson J.G. **Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration.** J. Cell Biol. 165. 709-721. (2004)

Taylor K.R, Holzer A.K, Bazan J.F, Walsh C.A, and Gleeson J.G. **Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain.** J. Biol. Chem. 275. 34442-34450. (2000)

Tint I., Jean D., Baas P.W., and Black M.M. **Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of axon displaying actin-rich protrusive structures.** J. Neurosci. 29. 10995-11010. (2009)

Tiveron M.C., and Cremer H. **CXCR12/CXCR4 signaling in neuronal cell migration.** Curr. Opin. Neurobiol. 18. 237-244. (2008)

Tsukada M., Prokscha A., Ungewickell E., and Eichele G. **Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II.** J. Biol. Chem. 280. 11361-11368. (2005)

Tsukada M, Prokscha A, and Eichele G. **Neurabin II mediates doublecortin -dephosphorylation on actin filaments.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 343. 839–847. (2006)

Yoshizawa M., Sone M., Matsuo N., Nagase T., Ohara O., Nabeshima Y., and Hoshino M. **Dynamic and coordinated expression profile of dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain.** Gene Expr. Patterns. 3. 375-381. (2003)

Zhou F.Q., Waterman-Storer C.M., and Cohan C.S. **Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning.** J. Cell Biol. 157. 839-849. (2002)

Zhou F.Q., and Cohan C.S. **How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets.** J. Neurobiol. 58. 84-91. (2004)