

博士論文番号:1181030

Doublecortin-like kinase 1 の新規基質 MAP7D1 を介した
軸索伸長制御

藤岡洋美

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学研究室

(河野憲二 教授)

平成 28 年 12 月 13 日

目次

序論

実験材料と方法

結果

1. MAP7D1 は DCLK1 の新規基質である
2. MAP7D1 は発達期のマウスの脳において強く発現している
3. MAP7D1 は神経細胞において細胞体と軸索の細胞体に近い部位に局在している
4. 単離した大脳皮質神経細胞における MAP7D1 のノックダウンは軸索伸長を阻害する
5. 大脳皮質 2/3 層の神経細胞における MAP7D1 のノックダウンは脳梁の軸索伸長を阻害する
6. MAP7D1 の非リン酸化体の過剰発現は軸索伸長阻害を引き起こす
7. MAP7D1 は脳において KIF5 と複合体を形成している
8. MAP7D1 と KIF5 の結合には C 末のコイルドコイルドメインが必要である

考察

謝辞

参考文献

序論

脳の高次機能をつかさどる大脳皮質が正常に機能するためには、神経細胞が脳内の正しい位置に移動して 6 層構造を形成し、さらに適切な方向へと神経突起を伸ばして神経回路を形成することが重要である。

神経細胞に分化する神経芽細胞は脳室帯 (Ventricular zone、VS) において神経幹細胞より分裂し、発生時期により決められた位置へと移動する。大脳皮質の主要な神経細胞である錐体細胞は、放射状グリア (radial glia) の突起に沿って放射方向へ移動することにより皮質層に到達する (radial migration)。この際、脳室帯から移動を開始した神経細胞は、早生まれのものほど大脳皮質板 (Cortical plate) 内で下の層に位置し、遅生まれの細胞ほど、皮質板内で上の層へ到達する “inside-out” の配列パターンをとる。正しい位置にたどり着いた神経芽細胞は、形態的にも機能的にも大きく異なった2種類の神経突起 (軸索と樹状突起) を伸長する。軸索は他の細胞から伝えられた電気的興奮を神経伝達物質に置き換え、標的細胞へシグナルを伝達する役割を担っている。一方、樹状突起は軸索末端から放出された神経伝達物質を受け取り、電気的興奮へと交換する。軸索と樹状突起が適切な方向へと伸長し、標的細胞とシナプスを形成することにより、正しいネットワークが構築される。

このような、脳の正常な発達が行われない疾患の1つに滑脳症がある。ダブルコルチン (Doublecortin、DCX) は重度の精神遅滞および難治性てんかんを伴う X 染色体連鎖性滑脳症やダブルコルテックス・皮質下帯状ヘテロトピアの原因遺伝子産物として同定された[1]。男性患者では大脳皮質形成過程における神経細胞移動の異常により正常な6層構造とは異なる、大部分の神経細胞が最脳室側の層に存在する4層構造を示す。その結果、脳の表面に脳回のみられない滑脳症を生じる。一方、ヘテロ変異を持つ女性患者では、X 染色体のランダムな不活性化により、正常遺伝子を発現する細胞群および変異遺伝子を発現する細胞群がみられ、その結果、正常な6層構造の皮質下の灰白質に異所性の神経細胞を生じる[2]。

Dcx 遺伝子欠損マウスは、滑脳症発症メカニズムや治療法確立にとって有用なモデル動物として期待されたが、海馬の層形成に異常が見られるのみで、ヒトに見られるような大脳皮質の層形成に異常は見られなかった[3]。一方、ほ乳

類において、DCXファミリー遺伝子である*DCLK1* (Doublecortin like-kinase 1) も発達段階の脳において高い発現を示すことから、DCXと相補的に機能していると予想され、これまでに*Dclk1*遺伝子欠損マウスを用いて、DCXとの相補機能について調べられている。

*Dclk1*遺伝子欠損マウスは、大脳皮質の層形成異常は示さなかったが、左右の脳をつなぐ長い軸索により形成される脳梁および海馬交連の形成不全を示した[4]。さらに、興味深いことに、*Dclk1*と*Dcx*の両遺伝子を欠損したマウスは、ヒト滑脳症患者にみられるような大脳皮質の層形成異常および脳梁、海馬交連、前交連の重度の形成不全を示し[4] (図1B)、DCXと相補的に神経細胞の移動や軸索伸長において機能していることが明らかになった。

DCLK1は、N末側にDCXと70%のアミノ酸相同性を有するDCXドメインおよびセリン-プロリンリッチドメインを持ち、さらに、C末側にDCXにはないCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼとよく似たセリン/スレオニンプロテインキナーゼドメインを持つ (図1A)。DCXドメインは微小管結合能を有するタンデムナリピート構造から成り、微小管の重合促進、安定化および微小管同士の束形成の促進により、移動している神経細胞の先端突起や伸長している軸索の先端部分の安定化に機能していることが報告されている[5]。さらに、DCXドメインの微小管結合能はリン酸化/脱リン酸化により制御され、リン酸化により微小管への親和性が低下することも報告されている[6-8]。滑脳症患者にみられるアミノ酸のミスセンス変異はDCXドメインにクラスター状に分布しており[9]、微小管結合能がこのタンパク質の機能発現に必要であることが示唆される。

興味深いことに、DCLK1はDCXドメインとセリン/スレオニンプロテインキナーゼドメインを持つアイソフォームの他、DCXドメインのみを持つDCL (doublecortin-like)およびキナーゼドメインのみ持つCPG16 (candidate plasticity-related gene) の3つのスプライシングアイソフォームを有する[10, 11]。DCLK1およびDCLは胎児期の脳に発現しており、大脳皮質においては移動している神経細胞や神経軸索、神経突起の先端に発現している[12, 13]。一方、CPG16は胎生期には発現しておらず、細胞の移動や軸索伸長には関与していないと考えられる[4]。我々が作成した*Dclk1*遺伝子欠損マウスはN末をターゲットとしており、DCX、DCLK1共に欠損している。一方、Deuelらにより、DCLK1のキナーゼアイソフォームのみを欠損したマウスが作成さ

れており、このマウスにおいても軸索の形成異常が見られる[14]。これらのことから、キナーゼドメインも軸索伸長に重要な役割を果たしていると考えられる。

以上のように、**DCLK1** は神経細胞移動および軸索伸長において **DCX** と協調的に機能しており、**DCX** ドメインについては微小管骨格の重合や安定化を介して、神経細胞移動および軸索伸長に関与していることが明らかにされている。一方、**DCLK1** にのみ存在するプロテインキナーゼドメインについては、ターゲット因子のリン酸化を介して神経細胞移動や軸索伸長に機能していると予想されているが、これまでに神経細胞移動や軸索伸長に機能するターゲットは明らかになっていない。そこで、本研究では **DCLK1** の新規基質の同定、および新規基質の軸索伸長における機能解析を行った。

実験材料と方法

1. 実験動物及び培養細胞

1-1. 実験動物

業者によるプラグ確認日を胎生 0.5 日とした、妊娠 15.5 日の C57BL/6J Jcl マウスを日本クレアより購入、妊娠 11.5、13.5、15.5、17.5 日及び出生 0 日、5 日、14 日、21 日、9 週の ICR マウスを日本 SLC より購入、使用した。

1-2. 使用細胞

大脳皮質の初代培養細胞

胎生 15.5 日目のマウス大脳皮質から神経細胞を単離し、血清非存在下で 2 日間もしくは 5 日間培養後、各種アッセイに用いた。

MAP7D1 の欠損変異体を用いた結合実験

マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いた。

1-3. 細胞の単離・培養

大脳皮質初代培養細胞

＜スライドガラス及び培養皿のコーティング＞

大脳皮質初代培養細胞の培養には、以下の方法で作製した poly-D-lysine (sigma) コートを施したガラススリップ (MATSUNAMI MICRO COVER GLASS 18mm THICKNESS NO.1) 及び培養皿を用いた。

① ガラススリップの親水処理

1N の HCL 溶液中へガラススリップを浸け、3 時間室温にて振とうした後、PBS へ置換し 6 時間室温にて振とうした。その後、70%のエタノールにて 3 時間振とうを 3 回繰り返した後、滅菌蒸留水で 3 時間振とうを 3 回行い、滅菌蒸留水中で保存した。

② poly-D-lysine コート

Poly-D-lysine 溶液（0.1 N ほう酸バッファーに 1 mg/ml で溶解、 -30°C 保存）を 0.1 N ほう酸バッファーで 10 倍希釈し、親水処理を施したガラススリップを敷いた 12 ウェル培養皿に加え、室温で 2 時間静置した。Poly-D-lysine 溶液を吸引除去し、滅菌蒸留水で 3 回洗浄後、播種用培地を加え、 37°C 、 CO_2 濃度 5% に調整した培養器内で一晩インキュベートし、使用した。60 mm 培養皿も同様にコーティング処理を行った。

0.1 N ほう酸バッファーは、滅菌蒸留水に 0.05 M ほう酸、0.0125 M 四ほう酸ナトリウム十水和物を添加し、pH8.4 であることを確認した後、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターで濾過した。

< 単離用試薬 >

大脳皮質の初代培養細胞の単離には以下の方法で作製した溶液を用いた。

① EBSS

以下の試薬を混合し、milli-Q で 1 L にメスアップ後、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター (IWAKI) で濾過し、 4°C で保存した。

【添加した試薬】

CaCl ₂ (無水)	0.2 g
KCl	0.4 g
MgSO ₄ （無水）	0.097 g
NaCl	6.8 g
NaHCO ₃	2.2 g
NaH ₂ PO ₄ ・H ₂ O	0.14 g
30% グルコース	3.33 ml
0.5% phenol Red	2 ml (0.01 g)

② パパイン溶液

6 ml の EBSS へ以下の試薬を添加した後、 CO_2 でバブルし、水溶液中 37°C で 20 分間静置した後、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターを用いて濾過した。濾過後、氷上に置いておき、30 分以内に使用した。

【添加した試薬】

500 mM EDTA pH7.0	6 μ l
Papain stock sol (Worthington Biochemical Corporation)	60 μ l
Cyctein	0.8 mg

③ 10/10 溶液

50 ml の EBSS へ以下の試薬を添加した後、0.22 μ m のフィルターで濾過し、水浴中で 37°C、1 時間静置し、4°C で保存した。

【添加した試薬】

BSA (BOEHRINGER MANNHEIM)	500 mg
trypsin inhibitor (SIGMA)	50 mg

④ 1/1 溶液

9 ml の EBSS へ 1 ml の 10/10 溶液を混合した後、0.22 μ m のフィルターで濾過した 200 μ l の DNase を添加し、氷上に置いておいた。(パパイン処理中に作製)

<培養液>

① 播種用培地

48 ml の Neurobasal medium (gibco) へ以下の試薬①を添加した後、0.22 μ m のフィルターで濾過し、2.5 ml を培養用培地として回収した後、試薬②を加え、4°C で保存した。

【添加した試薬①】

B27 (gibco)	1 ml
GlutaMAX (gibco)	500 μ l
Penicillin-Streptomycin (gibco)	500 μ l

【添加した試薬②】

Fetal bovine serum (biowest)	2.5 ml
------------------------------	--------

② 培養用培地

48 ml の Neurobasal medium へ以下の試薬を添加した後、0.22 μm のフィルターで濾過し、4°Cで保存した。

【添加した試薬】

B27	1 ml
GlutaMAX	500 μl
Penstep	500 μl

< 大脳皮質初代培養細胞の調整 >

胎生 15.5 日目のマウスのからピンセットにて大脳皮質を取り出し、50 ml チューブへ移した。冷 HBSS で 1 回洗浄後、パパイン溶液を 600 μl /個体加え、メスピペットで懸濁し、水浴中で 37°C、20 分間静置した（パパイン処理中に 1/1 溶液を作製した）。上清を吸引除去し、1/1 溶液を 600 μl 個体加え、6 分間室温で静置することにより、パパインによる消化反応を停止した。ガスバーナーで焙り先を丸くしたパストゥールピペットにて、7 回懸濁し、0.2 μm セルストレイナー（BD-Falcon）を通し 50 ml のチューブへ移した。600 μl /個体の 10/10/溶液を優しく層状に重ね、遠心した（1500 rpm、5 分、室温）。上清を取り除き、10 ml の Opti-MEM（gibco）を加えて再懸濁したのち、遠心した（1500 rpm、5 分、室温）。上清を取り除き、1 ml の Opti-MEM に懸濁したのち、一部の細胞を用いてトリパンブルー染色し、細胞数を数えた。

< 大脳皮質初代培養細胞の培養 >

37°C、CO₂ 濃度 5%に調整した培養器内で一晩インキュベートしておいた poly-D-lysine コートを施した播種用培地入りの培養皿へ 1×10^4 cells/cm² 播種した。細胞が接着するまで 37°C、CO₂ 濃度 5%で 2 時間静置した後、培養用培地に全量培地交換した。

【Neuro 2A】

培養するための培地としては、10% fetal bovine serum、1% penstep、1% GlutaMAX を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (gibco)を用いた。37°C、CO₂ 濃度 5%に調整した培養器内で培養した。

2. プラスミド

pcDNA3.1/myc-6xHis の Kpn I site の DCLK1 の全長は BamH I – Pme I で pGEX4T-1 expression vector の BamH I - Sma I site にサブクローニングした。MAP7D1 cDNA は MGC Mouse Mtap7d1 cDNA (clone ID: 5354497)より PCR により増幅し、pET28b(+), pEGFP と pCAGIG を改変した pCAG-IRES-tdTomato にサブクローニングした。一連の pCAG-EmGFP-miRNA は Block-iT miRNA (Invitrogen)から PCR により増幅した DCX、DCLK1、MAP7D1 の EmGFP-miRNA fragments を pCAG vector へサブクローニングすることにより作製した。

<ターゲットシーケンス>

DCX

TCAAGTGACCAACAAGGCTAT

DCLK1

kinase site #1; GTGGACTTTCCATCTCCGTAT (target DCLK1 and CPG16)

kinase site #2; TTCTGCTAAGGAGCTCATCAA (target DCLK1 and CPG16)

MAP7D1

#1; TCCTGCCAAGCAAGATGTAAA

#2; GAGCAGCATTGTGGATCGTCT

3. GST アフィニティーカラムによる精製

アフィニティーカラムによる精製は Kuroda らの論文[15]に従った。胎生 17.5 日目のマウス脳を buffer A (20 mM Tris / HCl (pH7.4), 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA with phosphatase inhibitors and protease inhibitors)内でホモジナイズし 100000 x g で 1 時間、4℃で遠心し、上清を回収した。可溶性画分を GST-myc-6xHis および GST-DCLK1-myc-6xHis 結合グルタチオンビーズに添加した。カラムを洗浄し、結合画分を 0.5 M NaCl in buffer A により結合画分を溶出した。

GST 結合画分および GST-DCLK1 結合画分を TCA/アセトンにより沈殿後、水に溶かし、トリプシンで処理した。このサンプルを LC-MS/MS（液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計）を用いたショットガンプロテオミクスにより（スクリプス研究所の James Thompson さんおよび John Yates III 教授との共同研究）、網羅的に相互作用する候補タンパク質の探索を行った。

4. リコンビナントタンパク質の作製

Escherichia coli BL21 (DE3)株を用いてリコンビナントタンパク質を作製した。GST-myc-6xHis, GST-DCLK1-myc-6xHis および GST-DCLK1 D511A (kinase dead)-myc-6xHis リコンビナントタンパク質は GSTrap4B (GE Healthcare)を用いてアフィニティー精製した。Asp 511 のキナーゼの不活化は D527A 変異体を用いることで対応したが、これはスプライシングアイソフォームである[10]。His GraviTrap (GE Healthcare)を用いて 6xHis-T7 tag-MAP7D1-6xHis を精製した。これらのリコンビナントタンパク質は後の実験の為に PD-10(GE Healthcare) column を用いて phosphate-buffer saline (PBS)へ置換しておいた。

5. *In vitro* キナーゼ解析

In vitro kinase 解析は silverman らの論文[16] に従った。GST-DCLK1-myc-Hisx6 もしくは GST-DCLK1 D511A-myc-Hisx6 を Hisx6-MAP7D1-Hisx6 もしくは他のリコンビナントタンパク質と 30℃の buffer（50 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin 50 mM b-glycerophosphate, 100 mM orthovanadate, 20 mM -³²P[ATP] (20 cpm/fmol)）内でインキュベートした。2xSDS-PAGE sample buffer を加えて反応を停止し、5 分ボイルした。反応液を SDS-PAGE により分離し、ゲルを CBB 染色した。-80℃で乾かしたゲルを BioMax MR autoradiography film (Kodak)へ露光し、リン酸化されているタンパク質を検出した。

6. 質量分析によるリン酸化部位の同定

in vitro キナーゼ解析の後、SDS-PAGE により分離し、CBB 染色した。バンドをゲルから切り出し、トリプシン処理を行った。MALDI-TOF/MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析)を用いて、トリプシン処理したペプチドの探索を行った (UCSD Mass spectrometry facility との共同研究)。MASCOT (測定によって得られたスペクトルと、理論的に得られるはずのスペクトルを統計的手法によって比較するアルゴリズム) によりペプチドを同定した。

7. 抗体

MAP7D1 N-terminal と C-terminal に対するポリクローナル抗体は精製した。GST-MAP7D1-N (a.a. 1-71) と GST-MAP7D1-C (a.a. 807-846) リコンビナントヒュージョントタンパク質(>90% purify) (Pocono Rabbit Farm & Laboratory)をウサギに免疫し作製した。

8. 免疫染色

4% paraformaldehyde (PFA)で細胞を固定し、室温で 20 分間静置 (AnkyrinG の染色のみ固定時間 10 分) した後、PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液 (0.1% triton-X100、3% Normal Donkey Serum (Jackson immuno research) /PBS)を加え、室温で 1 時間静置後、ブロッキング溶液で希釈した 1 次抗体液を添加し、室温で 2 時間もしくは 4℃で一晩 1 次抗体反応を行った。1 次抗体反応後、0.1% tritonX-100/PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液で 2000 倍希釈した 2 次抗体を用いて、室温で 1 時間反応を行った。2 次抗体反応後、0.1% tritonX-100/PBS で 3 回洗浄し、VECTASHIELD Hard・Set Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, INC) で包埋した。作成したスライドは、蛍光顕微鏡(KEYENCE 社の BZ-9000) または共焦点レーザー顕微鏡 (leica 社の SP8) を用いて観察した。

【使用した抗体】

<1 次抗体>

MAP7D1 [Rabbit IgG C 末抗体 1:1000 (作製)]

DCLK1 [Sheep IgG N 末抗体 1:50 (Roche)]

EGFP [Rabbit IgG 1:1000 (GENETEX)]

AnkyrinG [mouse IgG 1:100 (neuroMAB)]

<2 次抗体>

Alexa Fluor® 488 Rabbit Anti-goat IgG

Alexa Fluor® 555 Sheep Anti-goat IgG

Alexa Fluor® 555 mouse Anti-goat IgG

9. ウェスタンブロッティング

胎生 11.5、13.5、15.5、17.5 日および出生 0 日、5 日、14 日、21 日、成体 (9 週齢) の ICR マウスより摘出した全脳より IP buffer (1% tritonX-100、0.15 M NaCl、0.05 M Tris-HCl pH7.4、1 mM EDTA) を用いてタンパク質を抽出した。この際タンパク質の分解及び脱リン酸化を抑えるために protease inhibitor カクテル (complete mini : Roche) と phosphatase inhibitor カクテル (phosstop : Roche) を加えた IP buffer を使用した。タンパク質抽出液をエッペンチューブに回収し、15000 rpm、20 min、4℃で遠心分離し、上清 (可溶性画分) を回収した。可溶性画分を 4×SDS sample buffer へ溶解し、SDS 用のサンプルとした。その後、20 µg のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、抗体によるウェスタンブロットにより MAP7D1、DCLK1 のバンドを検出した。ローディングコントロールとして Actin の検出も行った。

【使用した抗体】

<1 次抗体>

MAP7D1 [Rabbit IgG N 末抗体 1:2000 (作製)]

DCLK1 [Rabbit IgG N 末抗体 1:3000 (作製)]

Actin [Rabbit IgG 1: (Cell signaling)]

<2 次抗体>

Rabbit HRP [1:10000 (Jackson)]

10. 免疫共沈降

10-1. MAP7D1 と KIF5 の結合解析

<サンプルの調整>

ウェスタンのサンプル調整と同様の方法で、出生 0 日の ICR マウスより摘出した全脳より可溶性画分を回収した。

<免疫沈降>

上記のように調整したサンプルのpreclearを行うために、可溶性画分に10 µlのprotein G (GE Healthcare) を加え、4°Cで1時間インキュベートした。その間、エッペンを上下にゆっくり回転させた。その後、15000 rpm、20 min、4°Cで遠心分離し、上清を新しいエッペンへ回収した。サンプルのpreclearと平行して、抗体が結合したprotein Gを作製するために10 µlのprotein Gに1 µlの抗体を加え、4°Cで1時間インキュベートした。その間、チューブを上下にゆっくり回転させた。preclear済みサンプルと抗体が結合したprotein Gを混合し、4°Cで1時間インキュベートした。その間、チューブは上下にゆっくりと回転させた。その後、15000 rpm、20 min、4°Cで遠心分離し、上清を吸引除去し、非特異にprotein Gに結合しているタンパク質を除くために、IP bufferで 3 回洗浄した。Protein Gを4×SDS sample bufferへ溶解し、SDS-PAGE用のsampleとした。

<MAP7D1に結合しているKIF5の検出>

上記の免疫沈降サンプル 20 µgを8%のポリアクリルアミド&ビスゲル（北里メディカルサービス）を用いたSDS-PAGEにより分離し、rabbit抗MAP7D1抗体及びrabbit抗KIF5抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

【使用した抗体】

<免疫沈降>

MAP7D1[Rabbit IgG C 末抗体（作製）]

<ウェスタンブロット>

1 次抗体

MAP7D1[Rabbit IgG N 末抗体 1:2000（作製）]

KIF5[Rabbit IgG（東京大学の廣川教授より譲受）]

2 次抗体

Rabbit HRP [1:10000（Jackson）]

10-2. MAP7D1 と KIF5 の結合部位解析

<サンプルの調整>

Neuro 2A 細胞を 100 mm プレートに播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。翌日、培養ディッシュの 80%が細胞で被われていることを確認した後、polyethyleneimine“MAX”（polysciences）を用いて、GFP-MAP7D1 及び KIF5(a.a.1-560)-tdTomato を導入した。24 時間培養後、細胞を PBS で洗浄した後、IP buffer（1% tritonX-100、0.15 M NaCl、0.05 M Tris-HCl pH7.4、1 mM EDTA）をディッシュへ加え、セルスクレイパーを用いて細胞を懸濁した。タンパク質の脱リン酸化を抑えるために phosphatase inhibitor カクテル(phosstop:Roche)を加えた PBS、およびタンパク質の分解および脱リン酸化を抑えるために protease inhibitor カクテル(complete mini:Roche)と phosphatase inhibitor カクテル(phosstop:Roche)を加えた IP buffer を使用した。細胞懸濁液を 30 分間氷上でインキュベートした後、15000 rpm、20 min、4°Cで遠心分離し、上清（可溶性画分）を回収した。

<免疫沈降>

10-1と同じ方法で行った。

<MAP7D1に結合しているKIF5の検出>

上記の免疫沈降サンプル 20 µgをSDS-PAGEにより分離し、rabbit抗EGFP抗体及びrabbit抗RFP抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

【使用した抗体】

＜免疫沈降＞

EGFP [Rabbit IgG (GENETEX)]

＜ウェスタンブロット＞

1 次抗体

EGFP [Rabbit IgG 1:1000 (GENETEX)]

RFP [Rabbit IgG 1: 5000 (ROCKLAND)]

2 次抗体

Rabbit HRP [1:10000 (Jackson)]

11. MAP7D1の軸索における機能解析

＜大脳皮質初代培養細胞への遺伝子導入＞

胎生 15.5 日目のマウスより大脳皮質初代培養細胞を調整した後、1mm gap キュベットへ 5×10^5 cells とプラスミド DNA (β アクチンのプロモーターの制御下に GFP および miRNA を発現するノックダウンプラスミド) 2 μ g を加え、スーパーエレクトロポレーター NEPA21 (NEPAGENE) を用いて遺伝子導入した。キュベットから回収した細胞を 37°C、CO₂ 濃度 5% に調整した培養器内で一晩インキュベートしておいた PDL コートを施した播種用培地入りの培養皿へ 1×10^4 cells/cm² 播種した。細胞が接着するまで 37°C、CO₂ 濃度 5% で 2 時間静置した後、培養用培地に全量培地交換した。

【エレクトロポレーションの条件】

poring pulse

電圧 140v、パルス幅 0.5msec、パルス間隔 50msec、回数 2、減衰率 10%、極性+

transfer pulse

電圧 10v、パルス幅 50msec、パルス間隔 50msec、回数 5、減衰率 40%、極性+/-

<神経細胞の軸索の長さの解析法>

エレクトロポレーション法によりプラスミドを導入した神経細胞において、GFP陽性である細胞の形態を観察した。

1番長い突起を選び、ImageJのプラグインであるNeuronJ (image science) を用いて軸索をなぞり、その長さを測定した。

12. 生体内における MAP7D1 の軸索における機能解析

<in utero エレクトロポレーション>

スーパーエレクトロポレーターNEPA21 (NEPAGENE) を用いて胎生 15.5 日目のマウス胎児の脳へプラスミド (β アクチンのプロモーターの制御下に GFP および miRNA を発現するノックダウンプラスミド もしくは β アクチンのプロモーターの制御下に tdTomato (RFP) および MAP7D1 Ser315 を Ala に置換した非リン酸化体を発現するプラスミド) を導入した。

【エレクトロポレーションの条件】

poring pulse

電圧 50v、パルス幅 50msec、パルス間隔 50msec、回数 2、減衰率 10%、極性+
transfer pulse

電圧 7v、パルス幅 50msec、パルス間隔 50msec、回数 3、減衰率 40%、極性+/-

<軸索の長さの解析法>

脳梁を形成する軸索の長さを定量するために、*in utero* エレクトロポレーションによりプラスミドを導入した個体において、出生 3 日目に 4% PFA を使用して灌流固定し、固定液中で一晩固定した。固定脳は 10% (W/V), 20%(W/V), and 30%(W/V) sucrose in PBS に系列置換した。脳の冠状断切片(50 μ m 厚)は freezing-sliding microtome (Yamato, REM-710)を用いて作成し、Bregma より -1mm の位置の切片を選択した。シグナル増強のため GFP および RFP に対する抗体を用いて免疫染色を行った。標識されている軸索のうち、長いものから 20 本の軸索の先端を選び、中心線からの距離を imageJ を用いて測定した。

結果

1. MAP7D1 は DCLK1 の新規基質である

まず始めに、DCLK1 の新規基質を同定するために、GST-DCLK1 を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーにより、マウス胎児の脳の可溶性画分から DCLK1 と相互作用する結合タンパク質を精製した。アフィニティカラム法は大量のタンパク質を結合させる手法であるため、キナーゼ基質のような一過的な結合で、安定な複合体を形成しないような場合でも、結合タンパク質を捕まえられる可能性がある。さらに、質量分析により網羅的に結合蛋白質の同定を行うことにより、その微量に結合したタンパク質を同定することが可能であるので、今回この方法を選択した。また、DCLK1 は神経細胞の移動および軸索伸長に関連していることから、それらに機能するターゲットが見つかることを期待し、胎生 17.5 日目のマウスの脳の可溶性画分を用いた。GST-DCLK1 結合画分を SDS-PAGE で分離し、銀染色した結果、GST のみの結合画分と比較し、特異的なバンドが多数観察された (図 2A 矢印)。GST-DCLK1 結合画分および GST 結合画分は TCA/アセトンにより沈殿後、水に溶かし、トリプシンで処理をした。このサンプルを LC-MS/MS (液体クロマトグラフータンデム型質量分析計) を用いたショットガンプロテオミクスにより解析した結果、それぞれ GST-DCLK1 結合画分より 1356、GST 結合画分より 1434 (ただしそれぞれ重複した蛋白質があるために実際には 1000 程度) の蛋白質を同定した。このうち、GST 結合画分には見られず、GST-DCLK1 結合画分にもみ見られるタンパク質、あるいは GST 結合画分にも見られるが、GST-DCLK1 結合画分に特に多く見られるタンパク質を相互作用タンパク質候補とした。(図 2B)

次に、基質をスクリーニングするために、候補タンパク質のリコンビナントタンパク質を大腸菌を用いて作製し、*in vitro* キナーゼ解析を行った。DCLK1 は微小管結合能を持つ DCX ドメインを有する (図 1A) ことから、細胞内において特に微小管近傍で基質をリン酸化していると考え、微小管結合タンパク質である MAP7D1(microtubule-associate protein 7 domain containing 1) と EML4(echinoderm microtubule associated protein like 4)に着目した。その結果、MAP7D1 は ^{32}P をラベルした ATP の存在下で GST-DCLK1 と反応させた時はリン酸化されるが、キナーゼ非活性変異型である GST-DCLK1 D511A と反応させ

た時はリン酸化されなかった。一方、EML4 についてはリコンビナントタンパク質が分解されてしまい精製できず、基質かどうか検証することができなかった。

次に、リン酸化部位を同定するために、DCLK1 と MAP7D1 のリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼ反応の結果得られた反応液を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色し、MAP7D1 に相当するバンドをゲルより切り出しトリプシン処理後、質量分析 MALDI-TOF/MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析)を用いてペプチドの検出を行った (UCSD Mass spectrometry facility との共同研究)。検出したペプチドは MASCOT (測定によって得られたスペクトルと、理論的に得られるはずのスペクトルを統計的手法によって比較するアルゴリズム) により同定した。

その結果、MAP7D1 の全アミノ酸配列のうち 49% のアミノ酸配列がカバーでき、6 カ所のリン酸化ペプチドが検出できた。(Ser275, Ser296, Ser308, Ser315, Ser344, Thr455) 特に他のリン酸化部位に比べ Ser315 のリン酸化率が高く (96% ; 検出できた 28 ペプチド中 27 ペプチドがリン酸化) (図 3B) されており、Ser315 が少なくとも *in vitro* において主要なリン酸化部位であることが示唆された。これを確かめる為、これらのリン酸化候補部位の Ser/Ala 変異体を作製し、*in vitro* キナーゼ解析を行った。その結果、MAP7D1 Ser315 を Ala に置換した変異体 (MAP7D1 S315A) において、リン酸化された MAP7D1 が全く見られなくなった。さらに、Ser275 を Ala に置換した変異体及び Ser308 を Ala に置換した変異体でもリン酸化された MAP7D1 の減少が見られたことから、これらのアミノ酸も弱くリン酸化される可能性が示唆された。

先行研究において DCLK1 のリン酸化モチーフ (LXRXXpS) が報告されているが、Ser315 のまわりの配列 (LARSRSSAVTLP) はこのリン酸化モチーフと一致しており、種間で高く保存されていた (図 3C)。また、Ser315 のリン酸化はマウスの脳の大規模リン酸化プロテオミクス解析でみつかっている[17]。これらのことから、DCLK1 が MAP7D1 の Ser315 をリン酸化することが示唆された (図 3)。MAP7D1 は MAP7 のファミリータンパク質であるが、その機能は明らかにされていない。そこで、神経系における MAP7D1 の性状解析を行った。

2. MAP7D1 は発達期のマウスの脳において強く発現している

MAP7D1 は MAP7 ファミリータンパク質の 1 つであり、上皮細胞で微小管結合タンパク質として同定された MAP7 のパラログである。ほ乳類には 4 つの MAP7 ファミリータンパク質 (MAP7, MAP7D1, MAP7D2, MAP7D3) が報告されており、N 末と C 末にコイルドコイルドメインを含む特殊な構造を有する

(図 3C)。MAP7 についてはこれまでに遺伝子欠損マウスが作製され、仙骨の形成不全が起こること[18]や、精細胞およびセルトリ細胞の微小管構造に異常が生じることにより、精子形成異常を示すことが報告されている[19,20]。

MAP7 は腸、腎臓、胃、肺、気管、精巣などの上皮系細胞の他、胎生期 (マウス E14.5) の後根神経節 (DRG) や三叉神経節に特に強く発現している [19,21] が、神経系における機能は報告されていない。また、MAP7 は N 末のコイルドコイルドメインで微小管と結合することがわかっている[22]。一方、MAP7D1 も胎生期 (マウス E14.5) の後根神経節 (DRG) や三叉神経節、脳に特異的に強い発現がみられる[23]

(http://www.eurexpress.org/ee/databases/assay.jsp?assayID=euxassay_016402)が、その機能については明らかになってはいなかった。そこでまず、MAP7D1 の機能を類推するためには、その発現パターンについて知ることが大切であると考え、N 末 (アミノ酸 1-71) と C 末 (アミノ酸 807-846) (図 3D) の GST-融合タンパク質を作製し、兎に免疫し、ポリクローナル抗体を作製した。どちらの抗体も、発現させた MAP7D1 を認識し、また、ノックダウン細胞において MAP7D1 の発現を抑制することから、ウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色において使用できることを確認している。この抗体を用いて、まずマウスの脳の発達に伴う MAP7D1 の発現を調べた。胎生 11.5 日 (E11.5)、胎生 13.5 日 (E13.5)、胎生 15.5 日 (E15.5)、胎生 17.5 日 (E17.5)、出生 0 日 (P0)、出生 5 日 (P5)、出生 14 日 (P14)、出生 21 日 (P21) および成体マウスの脳から可溶性画分を回収し、発生段階における MAP7D1 の発現量をウェスタンブロットにより解析した。その結果、MAP7D1 は胎生期から発現が認められ、E17.5 から P5 まで発現が高く、P14 以降からおだやかに低下していた (図 4)。一方、DCLK1 は E15.5 から P5 まで発現が高かった。成体においても両タンパク質の発現が見られた。

この結果より、MAP7D1 は神経突起の伸長が盛んな時期に強く発現しており、また、この時期に DCLK1 も発現が高いことから、DCLK1 によって MAP7D1 が

リン酸化されている可能性が示唆された。次に、神経細胞における、MAP7D1 の局在を解析した。

3. MAP7D1 は神経細胞において細胞体および軸索の細胞体に近い部位に局在している

神経細胞における MAP7D1 の細胞内局在を調べるために、胎生 15.5 日目のマウスより大脳皮質の神経細胞を調整し、培養 12 時間後（軸索形成前）、培養 2 日目（軸索形成初期）および培養 5 日目（軸索および樹状突起形成期）に 4%PFA 溶液を用いて固定し、抗 MAP7D1 抗体により免疫染色を行った。その結果、MAP7D1 は培養 12 時間後の細胞では細胞体に局在し、培養 2 日目の細胞では細胞体および軸索の細胞体に近い部分に局在しており、培養 5 日目の細胞では軸索および樹状突起を含む細胞全体に局在していることがわかった（図 5A）。この染色パターンは MAP7D1 をノックダウンした細胞では薄くなっていることから、抗 MAP7D1 抗体は内在性の MAP7D1 を認識していることを明らかにしている。

次に、培養 2 日目の神経細胞において DCLK1 と MAP7D1 の二重免疫染色を行った。その結果、この時期の神経細胞において、MAP7D1 と DCLK1 が軸索の細胞体に近い部位および細胞体において共に局在していることがわかった（図 5B）。なお、軸索先端部においては DCLK1 は局在しているが、一方 MAP7D1 の発現は軸索先端部位にいくにつれ顕著に弱くなった。軸索の根元の部分、および細胞体において DCLK1 と MAP7D1 は共に局在しているので、軸索形成初期にここで相互作用している可能性が示唆された。一方、DCLK1 は軸索の先端部分にも局在しており、ここでは MAP7D1 を介さず機能している可能性がある。*Dclk1* 遺伝子欠損マウスでは神経細胞の軸索伸長阻害が見られることから、次に単離した大脳皮質神経細胞において MAP7D1 が軸索伸長に関与しているかどうか解析を行った。

4. 単離した大脳皮質神経細胞における MAP7D1 のノックダウンは軸索伸長を阻害する

軸索における MAP7D1 の機能を解析するために、MAP7D1 をノックダウンした神経細胞の形態観察を行った。胎生 15.5 日目のマウスより単離した大脳皮質神経細胞へエレクトロポレーション法を用いて、 β アクチンのプロモーターの制御下に GFP および miRNA を発現するノックダウンプラスミドを導入し、培養 2 日目に 4%PFA を用いて固定し、抗 GFP 抗体により免疫染色を行った。MAP7D1 に対する miRNA を遺伝子導入した神経細胞において、GFP 陽性であり、かつ MAP7D1 がノックダウンされている神経細胞の軸索を観察した。(図 6A) その結果、コントロールの miRNA を遺伝子導入した細胞(中央値=61.5 μ m)に比べ、MAP7D1 に対する miRNA を遺伝子導入した細胞(中央値=50 μ m)は軸索の長さが短くなっていた(Conover-Inman 検定、 $p < 0.01$: 図 6B)。この結果より、MAP7D1 は軸索伸長を促進している可能性が示唆された。DCLK1 のノックダウンでは、DCLK1 のノックアウトマウスの表現型と同様に、軸索伸長が阻害されていた。

5. 大脳皮質 2/3 層の神経細胞における MAP7D1 のノックダウンは脳梁の軸索伸長を阻害する

in vitro において MAP7D1 が軸索伸長を促進している可能性が示唆されたので、生体内においても軸索伸長に機能しているか明らかにするために、胎生 15.5 日目のマウスの脳室に *in utero* エレクトロポレーション法を用いて蛍光タンパク質を発現するプラスミドを導入した (図 7A)。この方法では、胎生 15.5 日目に脳室壁に存在している神経芽細胞にプラスミドが導入され、将来、大脳皮質の 2/3 層になる神経細胞がラベルされる。2/3 層の神経細胞の軸索は、胎生 17 日目には中心線を越え、反対側の脳半球へと伸長する。生後 3 日目に脳を 4%PFA-PBS で灌流固定し、脳取り出して固定し、切片を作製して、軸索の観察を行った (図 7B)。この系を用いて、GFP を発現するコントロール miRNA 及び MAP7D1 に対する miRNA を遺伝子導入し、軸索の伸長を観察した。定量は GFP で標識されている軸索の midline から軸索先端までを測定した。その結果、コントロール miRNA を発現させた脳の脳梁を通る軸索 (中央値 = 1440.5 μ m, N=60) に比べ、脳梁を通る軸索の長さ (中央値 = 819.8 μ m, N=80) が有意に短くなっていた。(Conover-Inman 検定、 $p < 0.001$: 図 7C)

この結果より、生体内においても MAP7D1 が軸索伸長を促進していることが明らかになった。そこで、次に、MAP7D1 Ser315 のリン酸化が軸索伸長の促進に関与しているか同様の系を用いて検証した。

6. MAP7D1 の非リン酸化体の過剰発現は軸索伸長阻害を引き起こす

MAP7D1 Ser315 のリン酸化が軸索伸長の促進に関与するかを明らかにするために、蛍光タンパク質 tdTomato と共に MAP7D1 および MAP7D1 の非リン酸化体 MAP7D1 S315A を発現するベクターを大脳皮質 2/3 層の神経細胞に *in utero* エレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入した。tdTomato で標識されている脳の脳梁を通る軸索の *midline* から軸索先端までの長さを測定したところ、MAP7D1 を過剰発現させた軸索（中央値＝1149.2 μ m, N=180）はコントロール（中央値＝1261 μ m, N=180）に比べ有意な差は見られなかった。一方、MAP7D1 を過剰発現させた軸索に比べ、MAP7D1 S315A を過剰発現させた軸索（中央値＝408.5 μ m, N=200）は有意に短くなっていた（Conover-Inman 検定、 $p < 0.001$: 図 8B）。

この結果より、MAP7D1 Ser315 のリン酸化が MAP7D1 の軸索伸長に必要であることが示唆された。MAP7D1 S315A はドミナントネガティブとして機能することにより MAP7D1 の正常な機能を阻害しているのではないかと考えられる。

7. MAP7D1 は脳において KIF5 と複合体を形成している

DCLK1 による MAP7D1 のリン酸化を介した軸索伸長の分子メカニズムを解明するために、MAP7D1 と相互作用する因子を探索し、微小管上を動くモータータンパクであるキネシン (KIF5 : コンベンショナルキネシン) に着目した。KIF5 についてはこれまでに、MAP7D1 のショウジョウバエホモログである Ensconsin 遺伝子の欠損が、KIF5 の微小管への結合頻度を著しく阻害すること [24]や DCLK1 の相互作用候補因子の探求のために行った GST-DCLK1 を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにおいて、KIF5 が検出されたこと (図 2B)、そして、KIF5 は軸索伸長時にチューブリンなどの軸索伸長に必要な因子を運搬しており、KIF5 の遺伝子を阻害した神経細胞において軸索伸長阻害が報告されていること [25]から、MAP7D1 が KIF5 を介して軸索伸長に機能していることが考えられた。そこでまず、KIF5 が MAP7D1 と実際に結合しているか検証するために、野性型マウスの脳からタンパク質を回収し、抗 MAP7D1 抗体を用いて免疫沈降を行った。次に、MAP7D1 と共沈降してくる KIF5 を抗 KIF5 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、MAP7D1 の抗体で KIF5 が共沈降した (図 9 ピンク枠)。この結果より、MAP7D1 と KIF5 が複合体を形成していることが明らかになった。

8. MAP7D1 と KIF5 の結合には C 末のコイルドコイルドメインが必要である

MAP7 は C 末のコイルドコイルドメインで KIF5 と結合していることが報告されている[24,26]。そこで、MAP7D1 も同様に C 末のコイルドコイルドメインで KIF5 と結合しているか検証するために、GFP を融合させた MAP7D1 の C 末のコイルドコイルドメインの欠損変異体(図 10A)と tdTomato を融合させた KIF5 を Neuro2A へ遺伝子導入し、タンパク質を回収して、抗 GFP 抗体で免疫共沈降を行った。その後、GFP-MAP7D1 欠損変異体と共沈降してくる KIF5 を抗 RFP 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、MAP7D1 全長および C 末のコイルドコイルドメイン (CC2) は KIF5 との共沈降が見られたが、C 末のコイルドコイルドメイン欠損体 (Δ CC2) は KIF5 との共沈降がみられなかった。(図 10B 赤枠) これらの結果より、MAP7D1 と KIF5 との結合には C 末のコイルドコイルドメインが必要であることが明らかになった。

考察

本研究において私は 1)MAP7D1はDCLK1と結合しており、Ser315を主にリン酸化すること。2)単離した大脳皮質神経細胞におけるMAP7D1、DCLK1のノックダウンは軸索伸長を阻害すること。3)大脳皮質2/3層の神経細胞におけるMAP7D1、DCLK1のノックダウンは脳梁の軸索伸長を阻害すること。4)大脳皮質2/3層の神経細胞におけるMAP7D1の過剰発現は顕著な影響は示さないが、MAP7D1 S315A (セリンをアラニンに変えたもの) の過剰発現は軸索伸長を阻害することを明らかにした。以上より、DCLK1によるMAP7D1のSer315のリン酸化が軸索伸長を促進している可能性が示唆された。これを証明するためには、さらに、DCLK1のノックアウト細胞やノックダウンした細胞においてみられる軸索伸長の阻害がMAP7D1の発現ではレスキューされないが、MAP7D1の擬似リン酸化体S315DやS315Eを発現させることによりレスキューされるかといった実験が必要であろう。(本博士論文最終提出時には、大脳皮質2/3層の神経細胞におけるDCLK1のノックダウンによる脳梁の軸索伸長の阻害は、MAP7D1 S315E (セリンをグルタミン酸に変えたもの) を発現させることによりほぼレスキューできることが明らかになった。一方、MAP7D1では完全にはレスキューできなかった。)

MAP7D1はDCLK1と結合しており、少なくとも*in vitro*でSer315をリン酸化することは明らかになったが、*vivo*においてDCLK1がSer315のリン酸化を行っているかは今後リン酸化抗体を作成し、DCLK1ノックアウトマウスにおいてMAP7D1のリン酸化が消失または減少するかを見ないといけないであろう。(本博士論文最終提出時にはDCLK1ノックアウトの大脳皮質神経細胞ではリン酸化抗体を用いることによりMAP7D1 Ser315のリン酸化が50%ほど減少していることが明らかになった。)

DCLK1は大脳皮質の神経細胞の移動にも関与しているが[4,14]、*in utero* エレクトロポレーション法を用いたMAP7D1のノックダウンでは、神経細胞の層構築には顕著な異常が見られないことを確認しており、DCLK1は他の基質を介して神経細胞の移動に関与している可能性も示唆される。今後、例えば GST-DCLK1 結合画分に対して、DCLK1 (対照としてDCLK1のキナーゼ活性をつぶしたもの) を混ぜ、³²PでラベルされたATPを用いて*in vitro* キナーゼ反応を行えば、DCLK1結合画分に含まれるDCLK1の全ての基質が放射ラベルされるため、MAP7D1以外の基質があるかわかる可能性もある。

神経細胞において、MAP7D1 は細胞体と細胞体に近い軸索部位に局在していることを明らかにしたが、他の微小管結合タンパク質である Tau や MAP1B は軸索先端部で発現が高く、これらが微小管の安定化を通じて軸索の伸長や維持に関与していること[27]を考慮すると、MAP7D1 は微小管に対し、微小管の安定化ではなく、他の機能を介して軸索伸長を促進しているのかもしれない。興味深いことに私はこれまでに、MAP7D1 が KIF5 と結合することを明らかにした。また、先行研究より、KIF5 は神経細胞の軸索形成時に軸索伸長に必要なチューブリンなどの因子を運ぶことにより軸索伸長に関与していることが報告されている。これらのことを考慮すると、MAP7D1 はモータータンパク質 KIF5 の軸索輸送を促進することにより、軸索伸長を促進している可能性がある。これを検証するためには、MAP7D1 をノックダウンした神経細胞において、KIF5 による輸送に異常がないかを解析すれば良いであろう。ハエの MAP7 ホモログである *ensconsin* は KIF5 の微小管上への集積を促進することが報告されているので、培養細胞において MAP7D1 を発現させた際に KIF5 の微小管上への集積が促進されるか調べる。Ser315 のリン酸化が KIF5 の微小管上への集積に関与しているのであれば、擬似リン酸化体を発現させた際の KIF5 の動態を見れば良い。

これまでに、DCLK1 による MAP7D1 Ser315 のリン酸化が KIF5 との結合に関与しているのではないかと考え、非リン酸化体 MAP7D1 S315A、擬リン酸化体 MAP7D1 S315E および MAP7D1 S315D を作製し、Neuro2A 細胞に過剰発現させ、KIF5 と免疫共沈降を行った。その結果、少なくともこの系では Ser315 のリン酸化は MAP7D1 と KIF5 の結合に影響を及ぼさなかった。しかし、この実験系は変異体を過剰発現させた系であり、内在性の MAP7D1 の性状を反映しない可能性が考えられるため、*Dclk1* 遺伝子欠損マウスの脳の可溶性画分を用いて、MAP7D1 および KIF5 による免疫共沈降を行う必要がある。

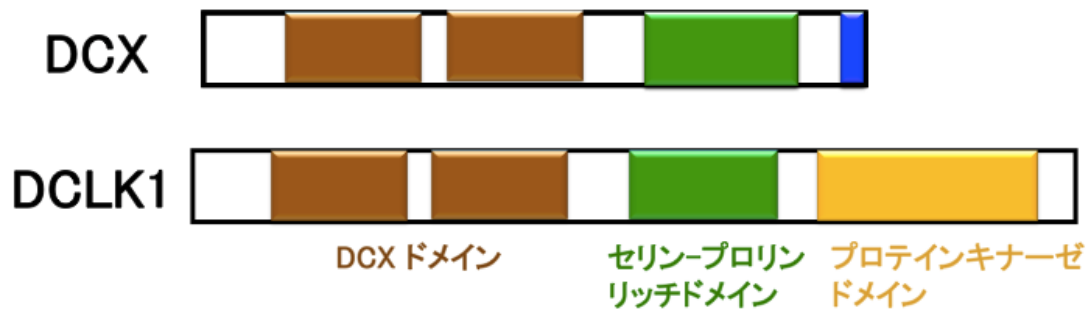
一方、GFP を融合させた MAP7 を用いて、微小管との結合のダイナミクスを観察したところ、tau や MAPB1 に比べ高いターンオーバー ($t_{1/2}=4$ 秒) を示し、また、そのダイナミクスはタンパク質キナーゼの阻害であるスタウロsporin 処理により阻害されることが報告されている[28]。さらに、MAP7 の高リン酸化が微小管との結合活性を下げることが報告されている[29]、従って、MAP7 も他の MAP のように、リン酸化により微小管結合能が制御されている可能性が考えられる。MAP7D1 の Ser315 は微小管結合ドメインである N 末のコイルドコイルドメイン近傍にあることから、Ser315 のリン酸化が MAP7D1 と微小管の親和性

の制御に機能している可能性も考えられる。MAP7D1 および MAP7D1 S315A を Neuro2A 細胞に発現させて、微小管画分を回収し、MAP7D1 の発現を検出することによって、MAP7D1 の微小管との結合に Ser315 のリン酸化が寄与しているか検証する必要があると考えている。なお、興味深いことに、MAP7 にも MAP7D1 の Ser315 に当たる配列が保存されており（MAP7 Ser245 FLARSKSTAALS vs MAP7D1 Ser315 FLARSRSAVTLP）、MAP7 も DCLK1 の基質であるかもしれない。

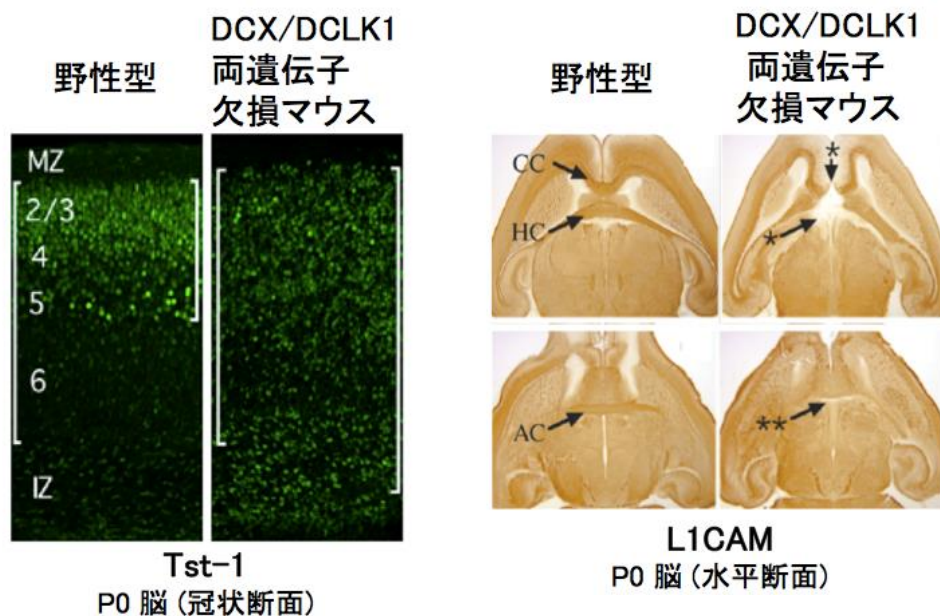
本研究で得られた知見をもとに、DCLK1によるMAP7D1のリン酸化を介した軸索伸長に関わる分子メカニズムの全容が解明されれば、滑脳症患者に見られるような軸索伸長不全に対する有用な治療法の確立が期待出来る。また、DCLK1 の遺伝子の多型は認知能力や統合失調症、ADHD（注意欠陥・多動性障害）、双極性障害に関連することが示唆されており[30,31]、MAP7D1の機能不全も神経疾患に関連するかもしれない。

図表

A



B



(文献4より引用)

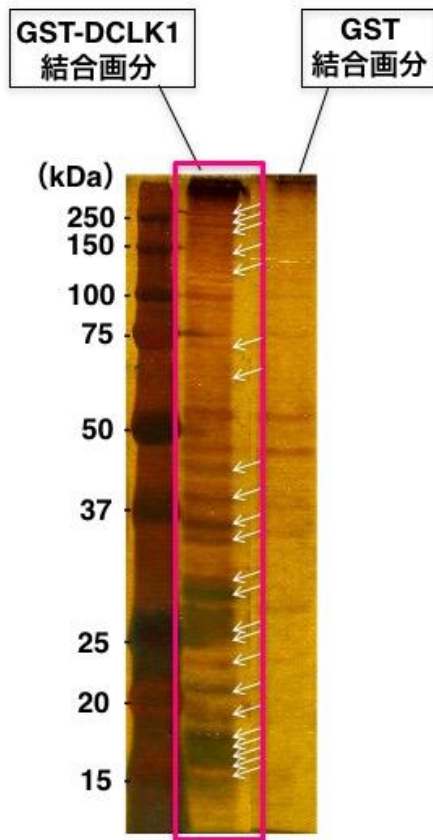
図1. DCLK1の構造及び機能

(A) DCXとDCLK1の構造図。N末の相同性が70%。

DCLK1はC末にセリン／スレオニンプロテインキナーゼドメインを有する。

(B) *Dcx*と*Dclk1*の両遺伝子欠損マウスは神経細胞の移動と軸索伸長に障害が見られる[4]。*Dcx/Dclk1*両遺伝子欠損マウスでは、2/3層、5層のマーカであるTst-1陽性細胞が深層にまで見られる (左)。*Dcx/Dclk1*両遺伝子欠損マウスでは、左右の脳半球をつなぐ脳梁 (CC)、海馬交連 (HC)、前交連 (AC) が形成不全となる (右)。

A



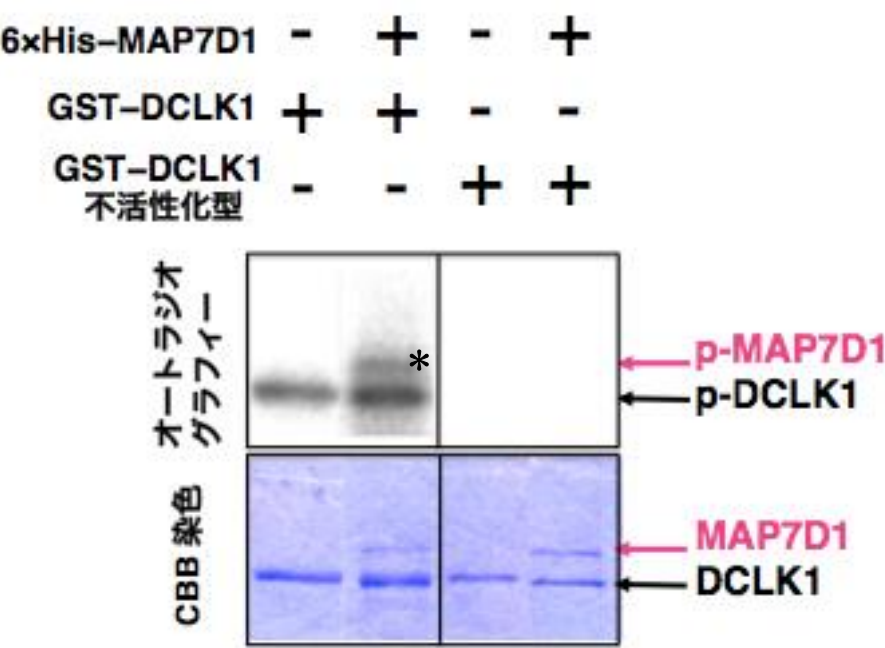
B

MAP7D1	Microtubule-associated protein 7 domain containing-1	
EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4	
TUBA8	Tubulin alpha-8 chain	
KIF5A	Kinesin heavy chain isoform 5A	
KIF2A	Kinesin-like protein 2A	微小管結合／微小管輸送関連
PP1 beta	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	
ERK2/MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	
MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	
FAK	Focal adhesion kinase 1 (pp125FAK)	
CKI epsilon	Casein kinase I isoform epsilon	
CKII beta	Casein kinase II subunit beta	
AKAP8	A-kinase anchor protein 8	
CacyBP	Calcyclin-binding protein	
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	
RAC3	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	シグナル伝達 (リン酸化／脱リン酸化酵素など)
14-3-3 zeta/delta, theta, alpha, eta, gamma		
Musashi-1, -2	Musashi homologs	
Staufen-1, -2	Staufen homologs	
Fxr1p	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	RNA結合
COPA, COPB, COPB2, COPD, COPE, COPG2	Coatomer protein complex subunits	
AP3B2, AP3D1, AP3M1, AP3M2	Adapter-related protein complex 3 subunits	小胞輸送関連

図2. アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いたDCLK1相互作用因子の同定

- (A) GST-DCLK1結合画分の分離結果。GST-DCLK1を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより、マウス胎児の脳の可溶性画分からDCLK1結合画分を得て、泳動分離した。矢印はGST-DCLK1画分に特異的なバンドを示す。
- (B) DCLK1と相互作用する候補因子の主なもの。
DCLK1結合画分を分取し、LC-MS/MSにより網羅的に解析した。

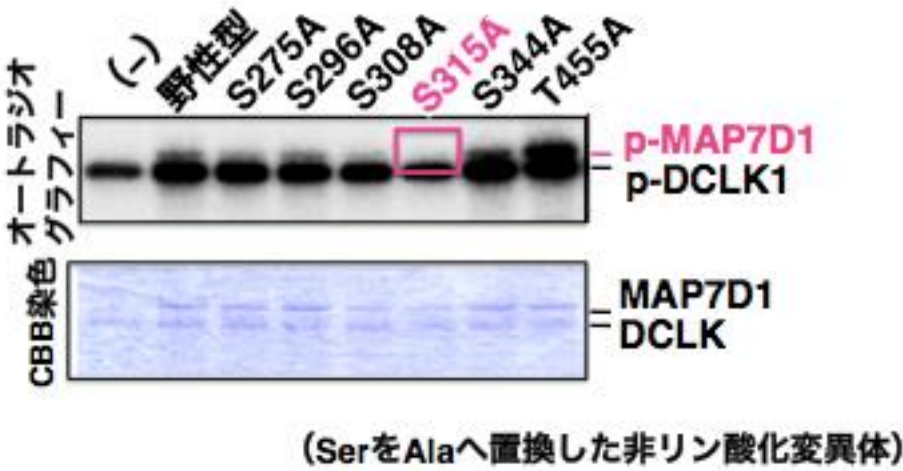
A



B

Peptide Sequences	Position	Stoichiometry	
LSK S SATLWNPSR	S275	45%	9/20
SLQLSAW E SSIVDR	S296	15%	4/26
LMTPTL S FLAR	S308	33%	4/12
SR S AVTLPR	S315	96%	27/28
AGA S LAPGPHPDR	S344	3%	1/38
LS T GSELSPK	T455	31%	9/29

C



D

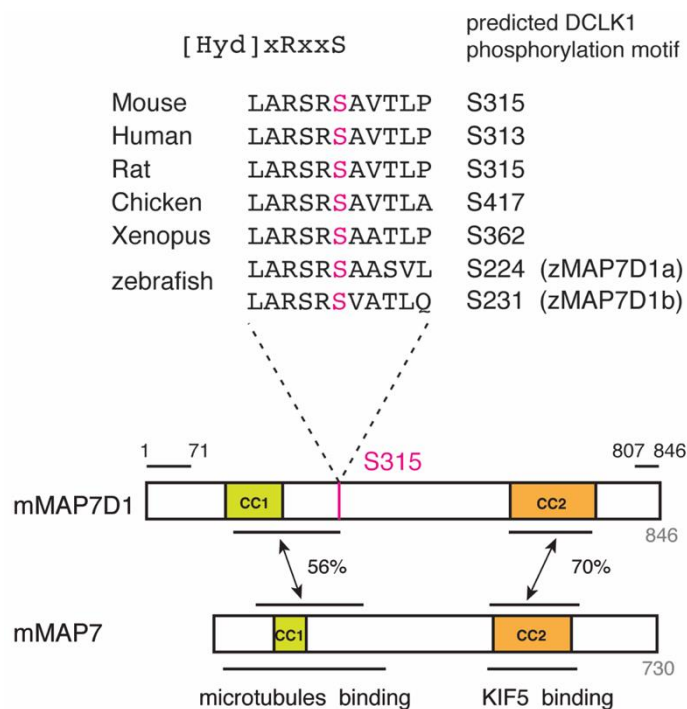


図3. DCLK1の新規基質MAP7D1の同定

(A) MAP7D1とDCLK1のリコンビナントタンパク質を用いた*in vitro* キナーゼ反応のSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィー。ピンク*は DCLK1によりリン酸化されたMAP7D1のバンドを示す。p-DCLK1は自己リン酸化されたDCLK1のバンドを示す。

(B) *in vitro* キナーゼ反応を行ったMAP7D1を質量分析により解析し、同定された6つのリン酸化ペプチド。

(C) MAP7D1の様々なリン酸化候補のSer/ThrをAlaへ置換した変異体のリコンビナントタンパク質とDCLK1のリコンビナントタンパク質を用いた*in vitro* キナーゼ反応のSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィー。MAP7D1 S315Aがほとんどリン酸化されなかった（ピンクの四角）。MAP7D1 S275AとS308Aはリン酸化の減少がみられた。

(D) マウスのMAP7D1とMAP7の構造図。これらは高く保存された2つの領域（アミノ酸同一性はN末側が56%、C末側が70%）を有する。N末とC末のコイルドコイルドメインをCC1、CC2と示す。これまでにMAP7の微小管結合ドメインおよびKIF5と相互作用するドメインが同定されている[24]。アミノ酸配列1-71と

807-846をN末とC末の抗体作製に用いた。MAP7D1 Ser315のまわりのアミノ酸配列は脊椎動物において高く保存されている。

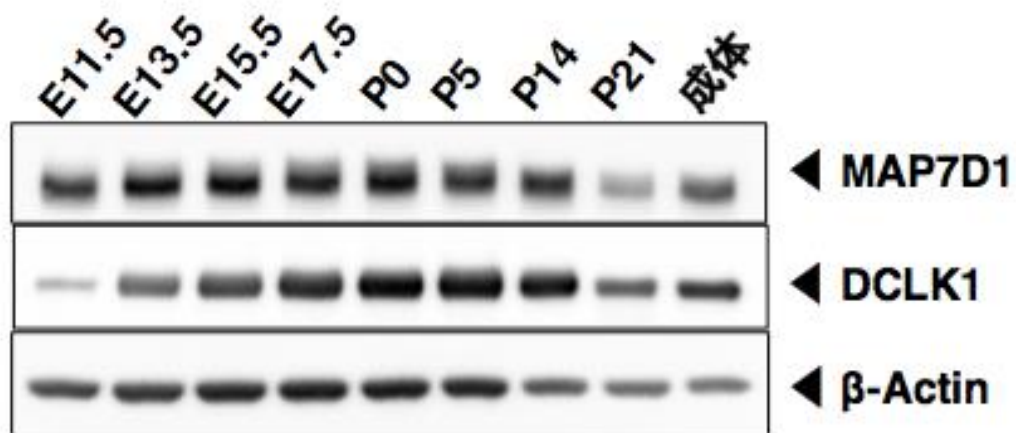
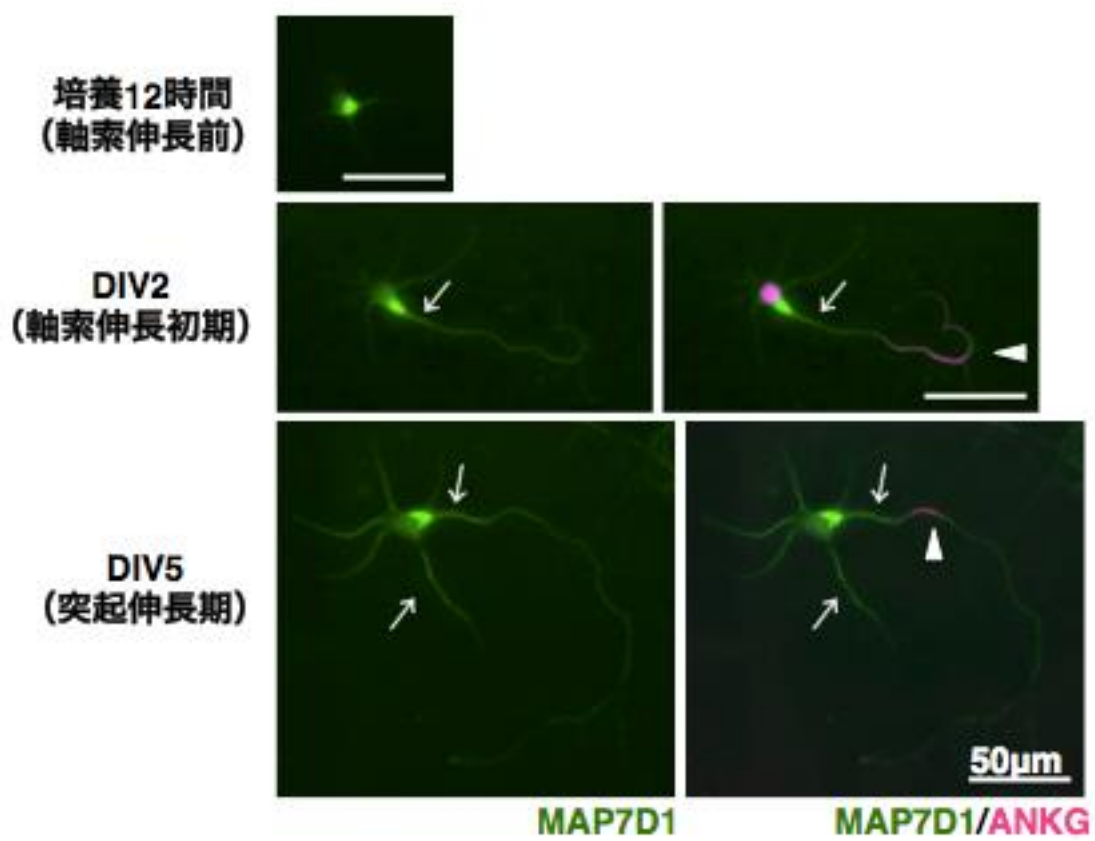


図4. MAP7D1の発現解析

マウスの脳における、発生に伴うMAP7D1、DCLK1の発現量の推移。

各時期のマウスの脳の可溶性画分をサンプルとし、抗MAP7D1抗体および抗DCLK1抗体を用いて、発現解析を行った。

A



B



図5. 大脳皮質初代培養細胞における内在性MAP7D1の分布

- (A) 培養12時間後、培養2日目 (DIV2:day *in vitro*) および培養5日目 (DIV5:day *in vitro*) におけるMAP7D1 (緑) と AnkyrinG (赤) による染色。mergeした図を左に示す。ANKGは軸索マーカーAnkyrinG。矢頭はAnkyrinGの染色。矢印はMAP7D1の局在を示す。(bar: 50μm)
- (B) DIV2におけるMAP7D1 (緑) とDCLK1 (赤) による染色。mergeした図を左に示す。矢印はMAP7D1とDCLK1が共局在する部位を示す。

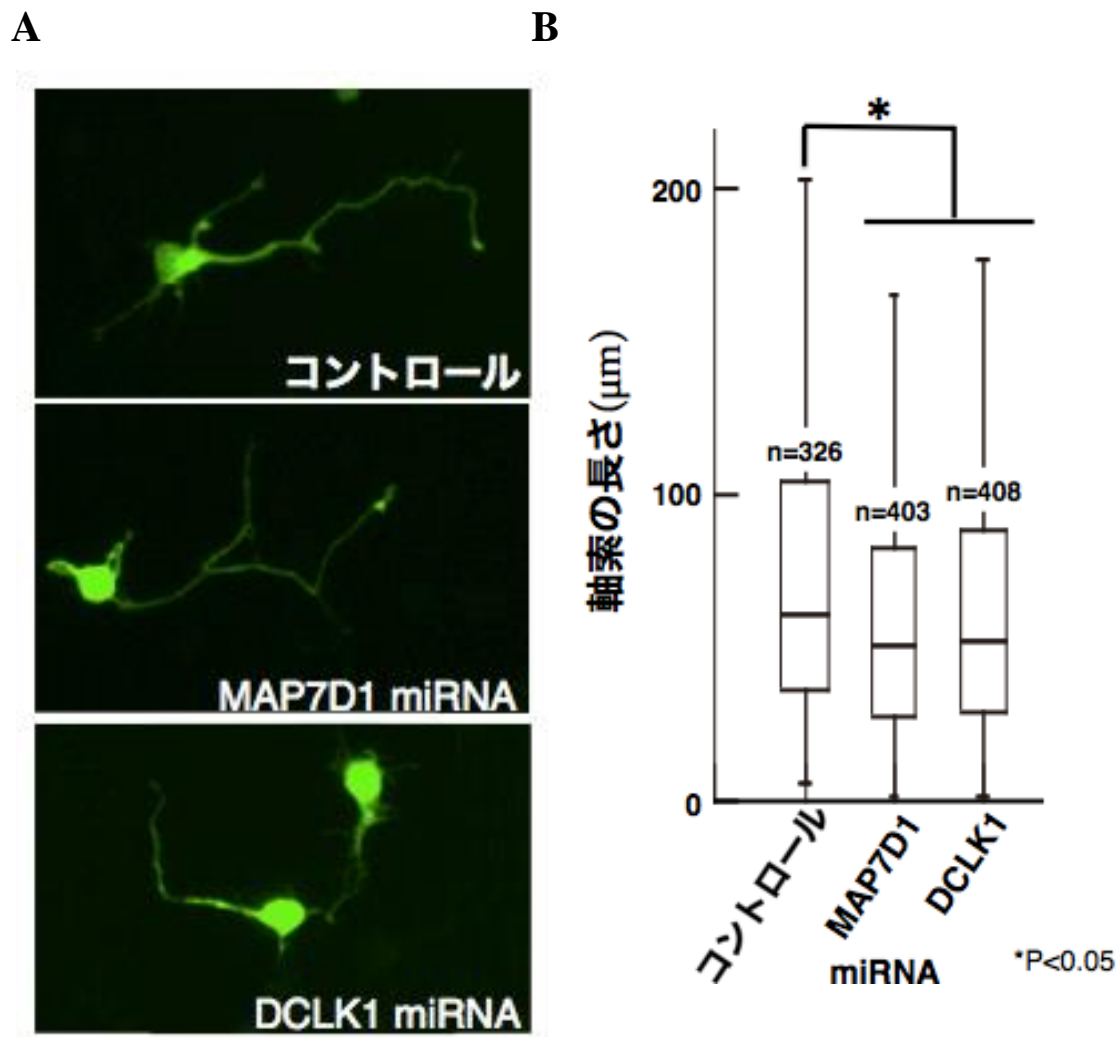
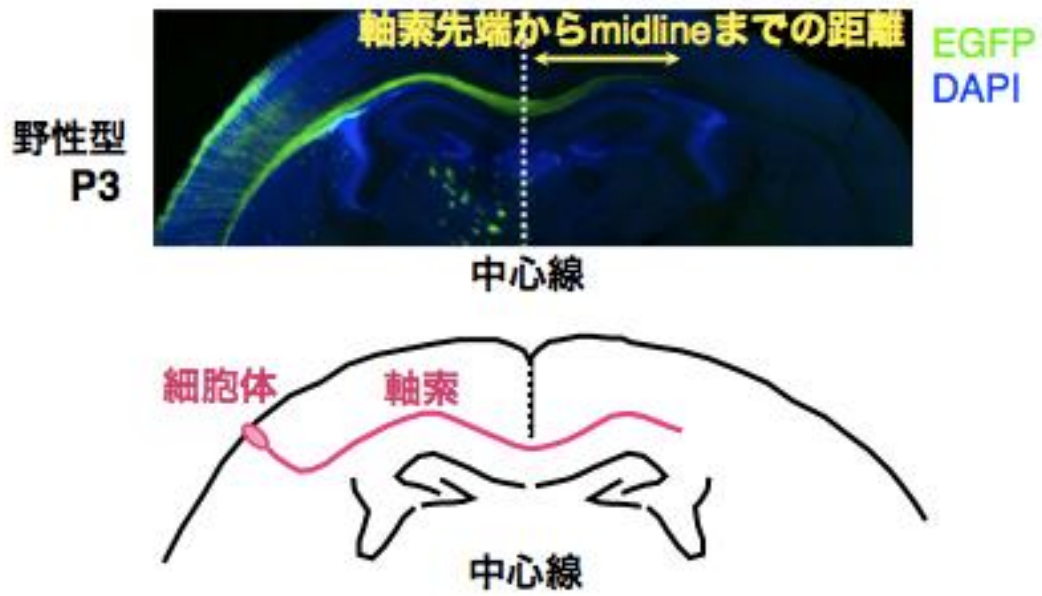
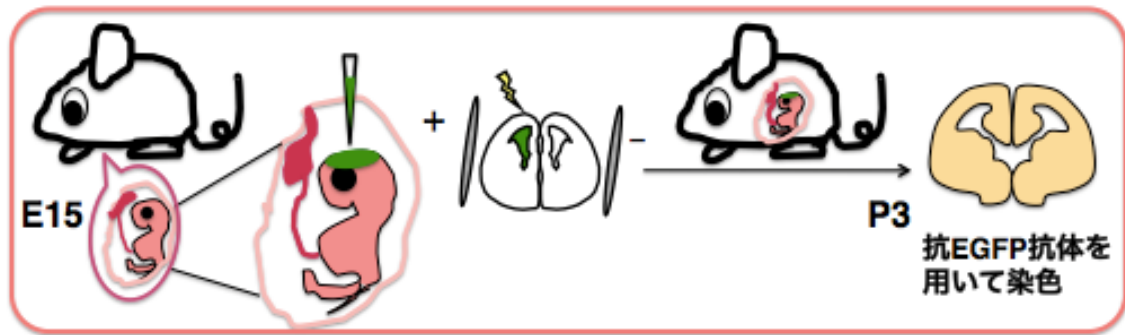


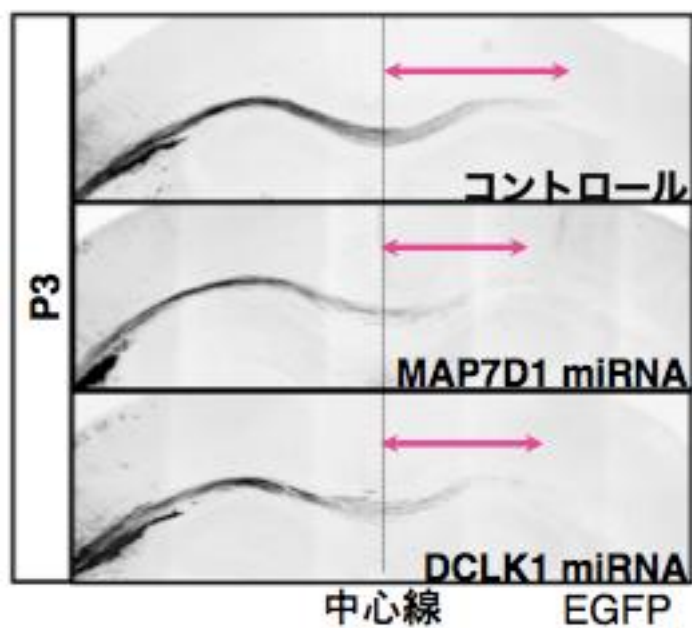
図6. MAP7D1の発現を抑制すると軸索伸長が阻害される

- (A) miRNAを遺伝子導入した細胞 (GFP陽性)
- (B) miRNAを遺伝子導入した神経細胞において、GFP陽性である細胞の軸索の長さのグラフ。コントロールのmiRNAを遺伝子導入した細胞の軸索の長さ (中央値=61.5μm) とMAP7D1に対するmiRNAを遺伝子導入した細胞の軸索の長さ (中央値=50μm) (Conover-Inman検定、 $p < 0.01$) およびDCLK1に対するmiRNAを遺伝子導入した細胞の軸索の長さ (中央値=51.9μm) (Conover-Inman検定、 $p < 0.01$) の間に差が見られた。

A



B



C

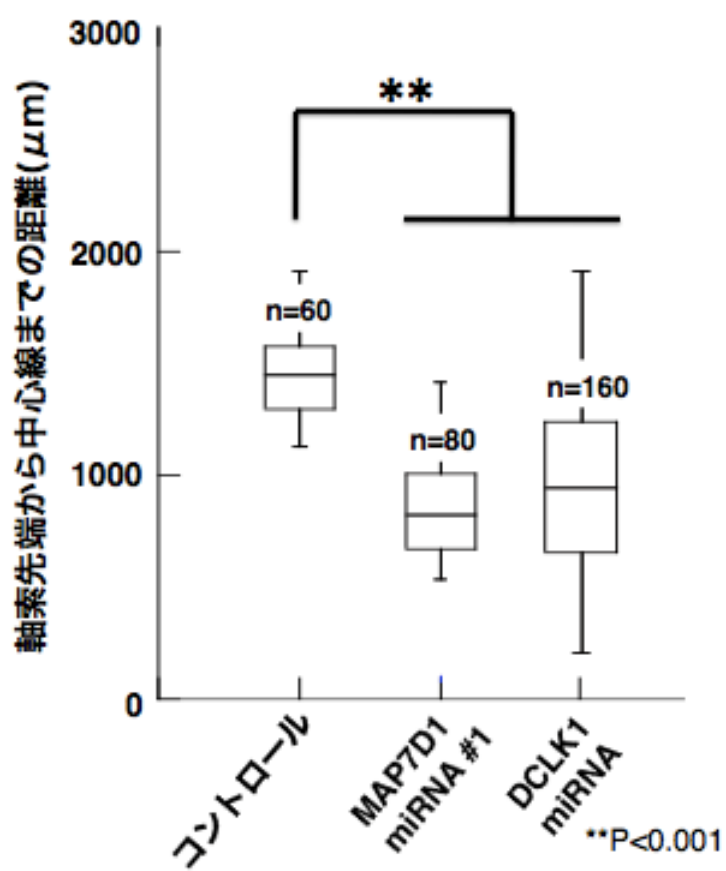
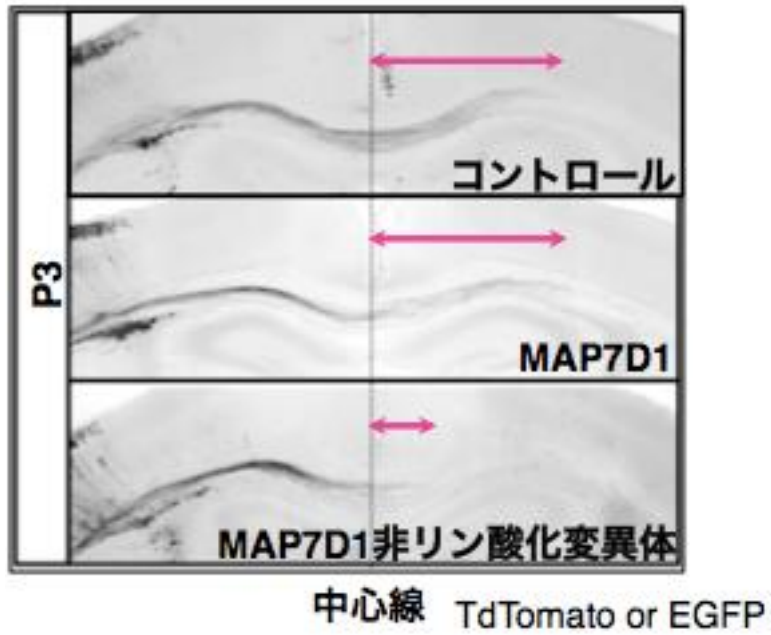


図 7. 大脳皮質 2/3 層の細胞における MAP7D1 の発現抑制は脳梁を通る軸索伸長を阻害する

- (A) *In utero* エレクトロポレーションを用いて左右の脳をつなぐ脳梁の軸索を観察する方法。胎生 15.5 日目のマウスの脳質へ GFP を発現するプラスミド DNA を注入し、脳を電極で挟み電圧を与えることにより遺伝子導入する。出生 3 日目に脳を取り出し、切片を作製すると、GFP で標識された細胞の軸索を観察することができる。
- (B) 上記の手法を用いて胎生 15.5 日目の野生型マウスの脳にコントロール miRNA、MAP7D miRNA および DCLK1 miRNA を導入し、出生 3 日目で切片を作製し、抗 EGFP 抗体で染色した結果。
- (C) GFP により標識された軸索の先端から midline までの長さのグラフ。コントロール miRNA を遺伝子導入した脳の脳梁を通る軸索（中央値＝1440.5 μ m）に比べ、MAP7D1 に対する miRNA を遺伝子導入した脳の脳梁を通る軸索の長さ（中央値＝819.8 μ m）および DCLK1 に対する miRNA を遺伝子導入した脳の脳梁を通る軸索の長さ（中央値＝936.2 μ m）は有意に短くなっていた。（Conover-Inman 検定、 $p < 0.001$ ）

A



B

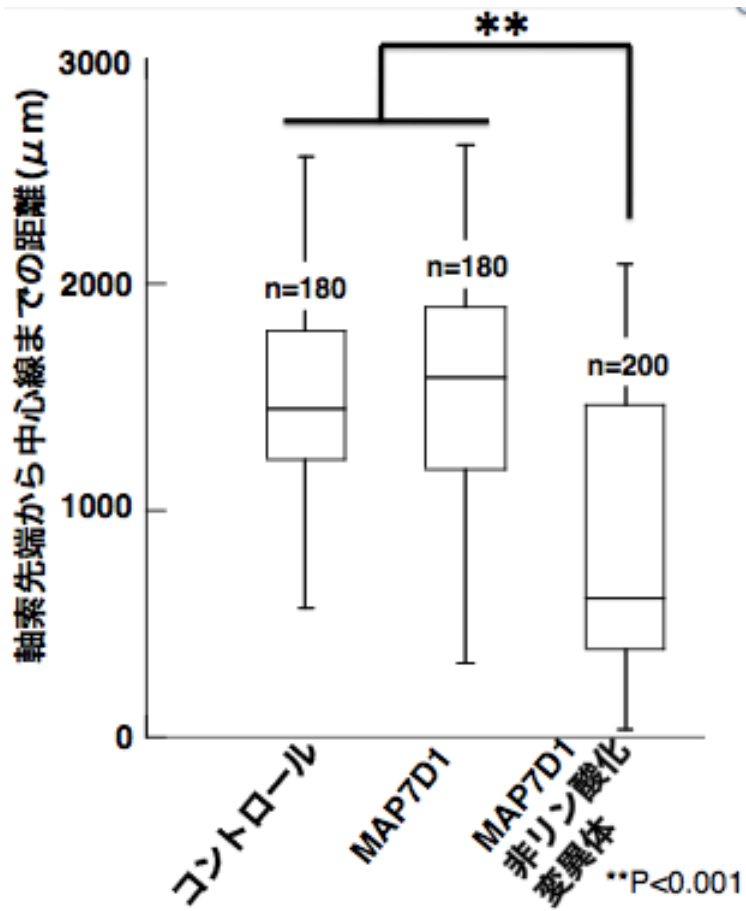


図8. 大脳皮質2/3層の細胞におけるMAP7D1非リン酸化体の過剰発現は脳梁を通る軸索伸長を阻害する

- (A) 胎生 15.5 日目の野性型マウスの脳に tdTomato もしくは GFP を発現するコントロール、MAP7D1 および MAP7D1 S315A（非リン酸化体）のプラスミドを発現させ、出生 3 日目で切片を作製した結果。
- (B) tdTomato もしくは GFP により標識された軸索の先端から midline までの長さのグラフ。コントロールを遺伝子導入した脳の脳梁を通る軸索の長さ（中央値＝1261 μ m）および MAP7D1 を遺伝子導入した脳の脳梁を通る軸索の長さ（中央値＝1149.2 μ m）に比べ、MAP7D1 S315A を遺伝子導入した脳の脳梁を通る軸索長さ（中央値＝408.5 μ m）は有意に短くなっていた。
（Conover-Inman 検定、 $p < 0.001$ ）

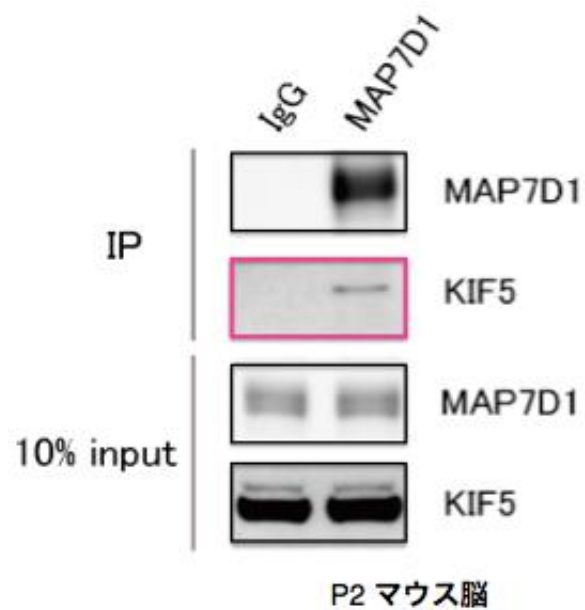
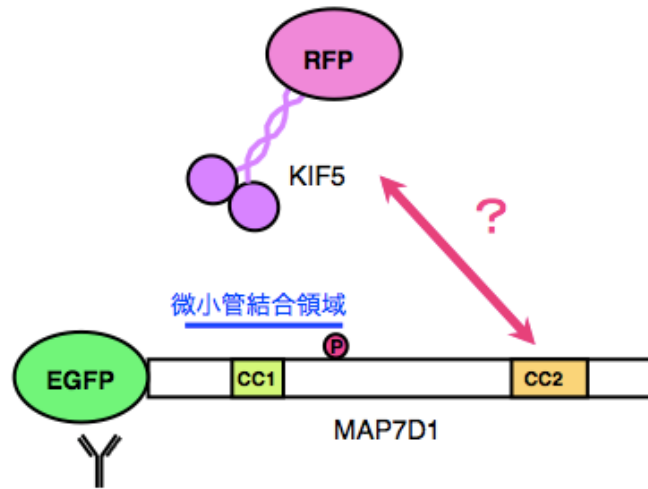


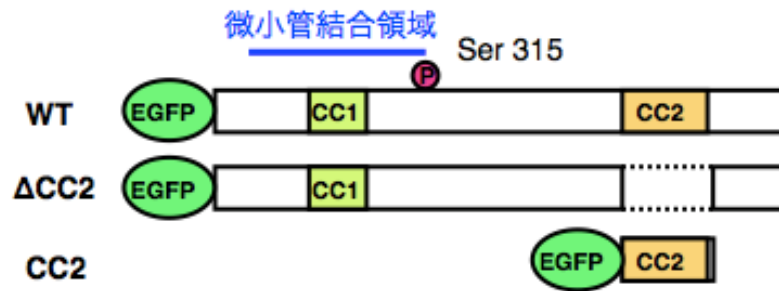
図 9. MAP7D1 は脳において KIF5 と結合している

出生 2 日目マウスの脳からタンパク質を回収し、抗 MAP7D1 抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗 KIF5 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ピンクの四角は MAP7D1 の免疫沈降により KIF5 が共沈したことを示す。

A



B



C

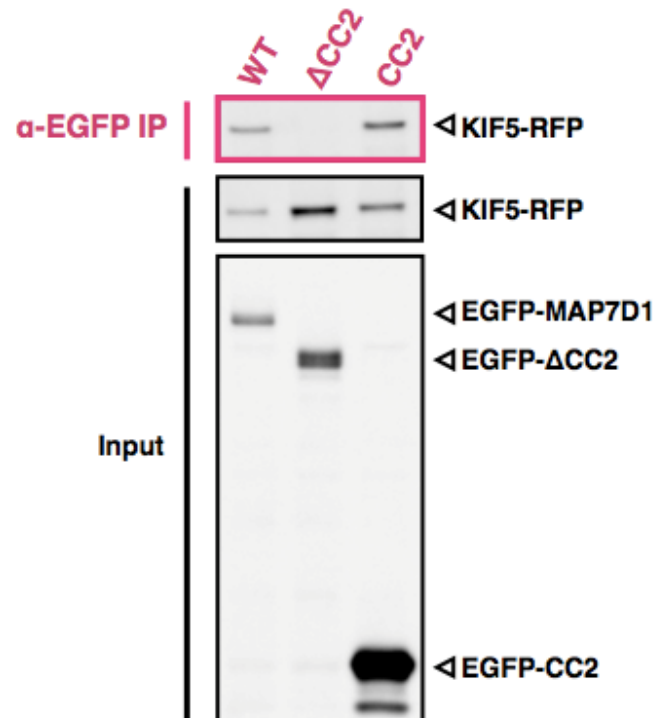


図 10. MAP7D1 と KIF5 の結合には C 末のコイルドコイルドメインが必要である

- (A) 想定されるモデル図。
- (B) MAP7D1 の欠失変異体の構造図。
- (C) Neuro 2A に EGFP-MAP7D1 の各欠損変異体と KIF5-tdTomato を発現させ、タンパク質を回収して、抗 EGFP 抗体にて免疫沈降を行った後、抗 RFP 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。ピンクの四角は抗 EGFP 抗体による免疫沈降サンプルを抗 RFP 抗体にてウェスタンブロットし、検出されたバンドを示す。

謝辞

本研究を行うにあたり、何時も丁寧にご指導くださった大阪バイオサイエンス研究所 神経ネットワーク形成学研究室（現 東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 脳機能学分野）榎本和生教授、古泉博之助授に心から感謝申し上げます。博士後期過程の3年間のみならず、卒業後も、研究はもとより人生において大切なことをたくさんご教授頂きました。成長の機会を与えてくださり、本当にありがとうございました。

また、ラボセミナーにおいて、研究室の皆様が鋭いご指摘や適切なご助言をくださったことにより、自信を持って発表に臨むことができました。研究者として必要な論理的思考やプレゼンテーション技術も学ばせて頂きました。3年間同じ研究室に所属させて頂いたことを誇りに思っております。ありがとうございました。

動物細胞工学研究室の河野憲二教授には、主指導教員として修士の2年を含める5年間お世話になりました。博士課程においても、研究を積み重ねるにあたり、根幹となる基本的な実験についてアドバイスを頂いたこと、さらに、本論文の提出にあたり、ご尽力くださったことに深く感謝しております。

動物遺伝子機能研究室の川市正史教授には、5年間アドバイザーとしてご助言いただきました。特に、博士後期課程3年時のアドバイザーヒアリング時に、研究室のセミナーの時間を私の発表に当ててくださったことに、深く感謝しております。研究員の方や学生の方がご質問くださったことで、研究に対する知識の幅が広がるきっかけになりました。

遺伝子発現制御研究室の別所康全教授には、本論文の修正に関するアドバイスをいただきました。本論文作成にあたりお力添えくださったことに深く感謝しております。

スクリプス研究所の James Thompson さん および John Yates III 教授、UCSD Mass spectrometry facility には、質量分析を行って頂きました。本研究を始めるにあたり重要な結果を与えてくださったことに、深く感謝しております。また、東大の廣川先生には KIF5 の抗体を譲受頂きました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

最後に、日々の生活を支えてくれた両親、祖父母に感謝致します。5年間、NAISTで研究に従事させてくださり、誠にありがとうございました。

参考文献

1. Reiner O., LIS1 and DCX: Implications for Brain Development and Human Disease in Relation to Microtubules. *Scientifica (Cairo)*, 2013. **2013**: p. 393975.
2. Gleeson JG, Minnerath SR, Fox JW, Allen KM, Luo RF, Hong SE, Berg MJ, Kuzniecky R., et al., Characterization of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Ann Neurol.* 1999 Feb;45(2):146-53.
3. Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, Walsh CA, et al., Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci.* 2002 Sep 1;22(17):7548-57.
4. Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG, Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron.* 2006 Jan 5;49(1):55-66.
5. Lin PT, Gleeson JG, Corbo JC, Flanagan L, Walsh CA., DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J Neurosci.* 2000 Dec 15;20(24):9152-61.
6. Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG., Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron.* 2004 Jan 22;41(2):215-27.
7. Bielas SL, Serneo FF, Chechacz M, Deerinck TJ, Perkins GA, Allen PB, Ellisman MH, Gleeson JG., Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell.* 2007 May 4;129(3):579-91.
8. Schaar BT, Kinoshita K, McConnell SK., Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of

migrating neurons. *Neuron*. 2004 Jan 22;41(2):203-13.

9. Taylor KR, Holzer AK, Bazan JF, Walsh CA, Gleeson JG., Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34442-50.
10. Burgess HA, Reiner O., Alternative splice variants of doublecortin-like kinase are differentially expressed and have different kinase activities. *J Biol Chem*. 2002 May 17;277(20):17696-705.
11. Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F., Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex*. 2003 Jun;13(6):620-6.
12. Burgess HA, Reiner O., Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones. *Mol Cell Neurosci*. 2000 Nov;16(5):529-41.
13. Omori Y, Suzuki M, Ozaki K, Harada Y, Nakamura Y, Takahashi E, Fujiwara T., Expression and chromosomal localization of KIAA0369, a putative kinase structurally related to Doublecortin. *J Hum Genet*. 1998;43(3):169-77.
14. Deuel TA, Liu JS, Corbo JC, Yoo SY, Rorke-Adams LB, Walsh CA., Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron*. 2006 Jan 5;49(1):41-53.
15. Kuroda Y, Kaneko S, Matsuda Y, Akihama S, Nozawa S., Selective isolation of acrosome-reacted human spermatozoa with progressive motility by using cell affinity chromatography on concanavalin A Sepharose. *Andrologia*. 1996 Jan-Feb;28(1):7-13.
16. Silverman J, Vazquez JA, Sobel JD, Zervos MJ., Comparative in vitro activity of antiseptics and disinfectants versus clinical isolates of *Candida* species. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999 Oct;20(10):676-84.

17. Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, Villén J, Haas W, Sowa ME, Gygi SP. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*. 2010 Dec 23;143(7):1174-89.
18. Sood R, Bader PI, Speer MC, Edwards YH, Eddings EM, Blair RT, Hu P, Faruque MU, et al., Cloning and characterization of an inversion breakpoint at 6q23.3 suggests a role for Map7 in sacral dysgenesis. *Cytogenet Genome Res*. 2004;106(1):61-7.
19. Komada M, McLean DJ, Griswold MD, Russell LD, Soriano P., E-MAP-115, encoding a microtubule-associated protein, is a retinoic acid-inducible gene required for spermatogenesis. *Genes Dev*. 2000 Jun 1;14(11):1332-42.
20. Penttilä TL, Parvinen M, Paranko J., Microtubule-associated epithelial protein E-MAP-115 is localized in the spermatid manchette. *Int J Androl*. 2003 Jun;26(3):166-74.
21. Fabre-Jonca N, Allaman JM, Radlgruber G, Meda P, Kiss JZ, French LE, Masson D. The distribution of murine 115-kDa epithelial microtubule-associated protein (E-MAP-115) during embryogenesis and in adult organs suggests a role in epithelial polarization and differentiation. *Differentiation*. 1998 Aug;63(4):169-80.
22. Masson D, Kreis TE., Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *J Cell Biol*. 1993 Oct;123(2):357-71.
23. Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, Geffers L, Anand S, Rozado D, Magen A, Canidio E, et al., A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol*. 2011 Jan 18;9(1):e1000582.
24. Sung HH, Telley IA, Papadaki P, Ephrussi A, Surrey T, Rørth P., *Drosophila*

- ensconsin promotes productive recruitment of Kinesin-1 to microtubules. *Dev Cell*. 2008 Dec;15(6):866-76.
25. Ferreira A, Niclas J, Vale RD, Banker G, Kosik KS., Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides. *J Cell Biol*. 1992 May;117(3):595-606.
 26. Metzger T, Gache V, Xu M, Cadot B, Folker ES, Richardson BE, Gomes ER, Baylies MK., MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature*. 2012 Mar 18; 484(7392):120-4.
 27. Black MM, Slaughter T, Fischer I. Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J Neurosci*. 1994 Feb;14(2):857-70.
 28. Bulinski JC, Odde DJ, Howell BJ, Salmon TD, Waterman-Storer CM., Rapid dynamics of the microtubule binding of ensconsin in vivo. *J Cell Sci*. 2001 Nov;114(Pt 21):3885-97.
 29. Masson D, Kreis TE., Binding of E-MAP-115 to microtubules is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation. *J Cell Biol*. 1995 Nov;131(4):1015-24.
 30. Le Hellard S, Håvik B, Espeseth T, Breilid H, Løvlie R, Luciano M, Gow AJ, Harris SE, et al., Variants in doublecortin- and calmodulin kinase like 1, a gene up-regulated by BDNF, are associated with memory and general cognitive abilities. *PLoS One*. 2009 Oct 21;4(10):e7534.
 31. Meyre D, Froguel P, Horber FF, Kral JG., et al., DCLK1 variants are associated across schizophrenia and attention deficit/hyperactivity disorder. *PLoS One*. 2014 Mar 31;9(3):e93324.