

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：74415

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680035

研究課題名(和文) 脳形態形成を制御するダブルコルチンファミリーの作動機序の解明

研究課題名(英文) Molecular and cellular mechanisms of DCX family proteins in brain development

研究代表者

古泉 博之(Koizumi, Hiroyuki)

公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・神経細胞生物学部門・研究員

研究者番号：10334335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,900,000円、(間接経費) 6,570,000円

研究成果の概要(和文)：ダブルコルチン(Dcx)およびダブルコルチン様キナーゼ(Dclk1, Dclk2)は、大脳皮質の神経細胞の層構築および神経細胞間のネットワークである軸索、樹状突起の形成に関与し、その機能の破綻はてんかん症状を引き起こす。本研究では、分子メカニズムの解明を目指し、DCLK1によるリン酸化のターゲット蛋白質としてMAP7D1を同定した。大脳皮質の神経細胞においてMAP7D1の発現を抑制させたり、リン酸化されないMAP7D1を過剰発現させることにより、脳梁を通る軸索の伸長が抑制されたことから、DCLK1がMAP7D1をリン酸化することにより軸索伸長に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Doublecortin (Dcx) and Doublecortin-like kinases (Dclk1, Dclk2) function cooperatively in cortical layer formation and axon and dendrite formation that is required for the proper neural circuit formation. DCX family proteins deficiency is associated with epilepsy. In this project, we identified a novel target of DCLK1, MAP7D1. Depletion of MAP7D1 in cortical layer 2/3 pyramidal cells resulted in impaired axon elongation in the corpus callosum. Overexpression of unphosphorylated mutant MAP7D1, but not wild-type MAP7D1, also impaired callosal axon elongation. These results suggested that phosphorylation of MAP7D1 by DCLK1 regulate axon elongation in neurons.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：軸索伸長 神経細胞移動

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいてダブルコルチン(DCX)の変異は発生期に大脳皮質の神経細胞層の構築異常を引き起こし、患者はてんかん症状を伴う。研究代表者はこれまでにマウスにおいては、*Dcx* および、2つの*Dcx*に似た遺伝子であるダブルコルチン様キナーゼ*Dclk1*, *Dclk2*をそれぞれ二重欠損させることにより初めてヒトに見られる大脳皮質の形成異常やてんかん症状を示すことを明らかにしてきた。これらの結果により初めてヒト滑脳症を模倣したモデルマウスの樹立に成功し、本マウスを用いて病態発症メカニズムに迫ることが初めて可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、脳形態形成におけるDCXファミリーの分子、細胞メカニズムを解明するために、微小管結合及び微小管骨格制御に関わるDCXドメインにさらに機能未知のプロテインキナーゼ部位をあわせ持つDCLK1に注目し、その基質の探索を行い、そのターゲット分子の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) GST アフィニティカラムおよび質量分析器を用いて DCLK1 の結合タンパク質を網羅的に解析し、結合タンパク質の中から基質分子を *in vitro* キナーゼ反応を用いて同定する。

2) 子宮内エレクトロポレーションを用いて大脳皮質神経細胞において1)で得られた基質を発現させたり、発現を抑制したりすることにより脳形成における機能を明らかにする。

4. 研究成果

胎生17日目のマウス脳可溶性画分より、DCLK1 全長のGST融合タンパク質およびGSTタンパク質単独に結合する画分をそれぞれ精製し、精製画分に含まれるタンパク質をLC-MS/MS(質

量分析器)を用いて網羅的なタンパク質同定を行った。その結果、GST結合画分には見られず、GST-DCLK1結合画分に特異的に見いだされたDCLK1結合タンパク質候補を得た。DCLK1が微小管細胞骨格に結合するドメインを持つプロテインキナーゼであることから、我々はDCLK1結合タンパク質候補のうち微小管に関与するタンパク質に注目し、MAP7D1

(microtubule-associated protein 7 domain containing 1)が *in vitro* においてDCLK1の基質であることを見出した。MAP7D1の抗体を作製しMAP7D1の発現を調べた結果、MAP7D1は胎児期の脳に強く発現しており、大脳皮質の皮質板や中間層を走る軸索神経線維において強く発現することが明らかとなった。また単離した大脳皮質神経細胞(単離2日後)においては、軸索の細胞体に近い側および細胞体において発現しており、DCLK1も共局在することが明らかとなった。

胎生15日目のマウス胎児脳に子宮内エレクトロポレーション法を用いて、大脳皮質、2/3層の神経細胞に遺伝子導入を行い、脳梁を通る軸索の伸長を観察した。MAP7D1の発現抑制を行うと、軸索伸長が抑制された。またDCLK1のMAP7D1の主要リン酸化部位として315番目のセリン残基を同定した。MAP7D1の非リン酸化体(315番目のセリンのアラニン置換体)を過剰発現させると軸索伸長が抑制され、一方野生型では影響はみられなかった。DCLK1のノックアウトマウスやDCLK1のノックダウンによっても同様の脳梁を通る軸索伸長の阻害がみられることから、DCLK1によるMAP7D1の315番目のセリンのリン酸化が軸索の伸長に寄与していることが示唆された。

さらにMAP7D1は軸索輸送に関わるモータータンパク質であるキネシンの一種(KIF5)と相互作用することを明らかにした。KIF5との結合領域を欠失させたMAP7D1の非リン酸化体では軸索伸長の抑制効果はみられなくなった。よってMAP7D1の非リン酸化体による軸索伸

長の抑制はKIF5との相互作用を介して起きていることが予想された。KIF5は軸索伸長において必要な分子を軸索の先端へと輸送していることが知られており、この輸送を阻害すると軸索伸長が阻害されることが明らかとなっている。以上よりDCLK1によるMAP7D1のリン酸化はKIF5への何らかの制御を介し軸索輸送や軸索伸長に寄与していることが予想された。

この研究成果により神経細胞の形態形成にかかわる DCLK1 において、これまで機能の分かっていなかったプロテインキナーゼ部位も神経細胞の軸索の伸長において重要な役割を持つことが初めて示された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Shin, E., Kashiwagi, Y., Kuriu, T., Iwasaki, H., Tanaka, T., Koizumi, H., Gleeson, J.G., & Okabe, S. *Nat. Commun.* **4**, 1440 (2013). 査読あり

[学会発表](計 6件)

Hiromi Fujioka, Hiroyuki Koizumi, Kazuya Togashi, Yasushi Okada, Joseph G Gleeson, Kazuo Emoto
Identification of potential substrates of Doublecortin-like kinase 1 in axon outgrowth
Society for Neuroscience Annual Meeting 2013, 2013年11月12日, San Diego

古泉博之、藤岡洋美、富樫和也、岡田康志
Gleeson G. Joseph、榎本 和生 : ダブルコルチンキナーゼ 1 による MAP7D1 のリン酸化の軸索輸送における役割
Neuro2013(第 36 回日本神経科学大会) 2013年6月20日、京都

古泉博之、藤岡洋美、Gleeson G. Joseph、榎本 和生 : ダブルコルチンキナーゼの新規基質 MAP7D1 は神経突起伸長に關与する
Neuroscience2012(第 35 回日本神経科学大会) 2012年9月20日、名古屋

古泉博之、藤岡洋美、Gleeson G. Joseph、榎本和生
Molecular Mechanisms underlying Doublecortin-like Kinase-mediated Neurite Outgrowth
第 5 回神経発生討論会
2012年3月16日、福井

古泉博之、藤岡洋美、Gleeson G. Joseph、榎本和生
Molecular Mechanisms underlying Doublecortin-like Kinase-mediated Neurite Outgrowth
The 59th NIBB Conference
2012年3月10~13日、岡崎

古泉博之、Gleeson G. Joseph、榎本和生
ダブルコルチン様キナーゼはダブルコルチンとともに神経細胞移動や神経回路形成において機能する
Neuroscience2011(第 34 回日本神経科学大会) 2011年9月17日、横浜

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古泉 博之 (HIROYUKI KOIZUMI)
大阪バイオサイエンス研究所・神経細胞
生物学部門・研究員
(2014年3月まで 2014年4月より 東
京大学大学院理学系研究科・生物科学専
攻・脳機能学研究室・助教)
研究者番号：10334335

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし