

頻繁に起こるものであることを示している。このことから、筆者らは、生物の左右非対称性は、いくつかの異なる機構によって形成される可能性が高いと考えている。

動物界における左右非対称性の形成機構の多様性に加えて、普遍性の高い左右非対称性の形成機構が存在している可能性もある。たとえば、線形動物に属する線虫においては、卵割初期の極性形成にアクチン細胞骨格の再編が重要な役割を果たしている。6細胞期における細胞の配置に左右非対称性が観察され、顕微操作により細胞の配置を逆転させると、以降の卵割は鏡像になり、左右性が逆転した個体が発生する<sup>11)</sup>。また、軟体動物に属するモノアラガイでは、2細胞期の紡錘体の傾きに左右非対称性が観察されることが知られている<sup>12)</sup>。この紡錘体の左右非対称な傾きは、アクチン細胞骨格に依存して誘発されていることが示されている<sup>13)</sup>。したがって、本稿で紹介したモータータンパク質であるミオシンIとアクチン細胞骨格による左右非対称性の形成機構は、線虫やモノアラガイなどの旧口動物における左右非対称性の形成にも関わっている可能性がある。これは、ノード流に依存した脊椎動物の左右非対称性の形成機構とは異なっていると考えられる。

筆者らは、Myo31DFとMyo61Fが拮抗した機能をもっていると考えているが、この拮抗作用が起こる分子レベルの機構に関してはいまだ不明なままである。今後、これらミオシンIの機能的な差を生み出している要因を明らかにすることで、旧口動物における左右非対称性の形成機構を理解することができるのではないかと考えている。

- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., & Takeda, S. (2006) *Cell*, 125, 33–45.
- Mercola, M. & Levin, M. (2001) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17, 779–805.
- Hayashi, T. & Murakami, R. (2001) *Dev. Growth Differ.*, 43, 239–246.
- Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi, K., Kanai, M., Shirakabe, S., Sasamura, T., Spéder, P., Noselli, S., Aigaki, T., Murakami, R., & Matsuno, K. (2006) *Nature*, 440, 798–802.
- Spéder, P., Ádám, G., & Noselli, S. (2006) *Nature*, 440, 803–807.
- Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., & Hamada, H. (1998) *Cell*, 94, 287–297.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A., Jr., & Crews, S.T. (1991) *Cell*, 67, 1157–1167.
- Maeda, R., Hozumi, S., Taniguchi, K., Sasamura, T., Murakami, R., & Matsuno, K. (2007) *Mech. Dev.*, 124, 204–217.
- Boorman, C.J. & Shimeld, S.M. (2002) *Bioessays*, 24, 1004–1011.
- Palmer, A.R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14279–

14286.

- Wood, W.B. (1991) *Nature*, 349, 536–538.
- Crampton, H. (1894) *Ann. NY Acad. Sci.*, 8, 167–170.
- Shibasaki, Y., Shimizu, M., & Kuroda, R. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 1462–1467.

前田 礼男, 穂積 俊矢, 谷口 喜一郎,  
奥村 高志, 松野 健治  
(東京理科大学基礎工学部生物工学科)

A genetic analysis of left-right asymmetry in *Drosophila melanogaster*

Reo Maeda, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Takashi Okumura and Kenji Matsuno (Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278–8510, Japan)

## 脳形成における DCX ファミリーの機能

大脳皮質は厳密に制御された神経細胞の増殖、移動、成熟過程により形成される。脳室帯において神経幹細胞である放射状グリア (radial glia) や transient amplifying cell より分裂し誕生した神経芽細胞は、その発生時期により、決められた位置へと移動する。大脳皮質主要構成神経細胞である錐体細胞などは放射状グリアの放射状突起にそって放射方向へ移動することによって皮質層に到達する (radial migration)。この際、分裂時期のより遅い神経細胞は脳表層側に順に位置し、inside-out の配列パターンをとる。一方、GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) 陽性神経細胞は大脳基底核原基の脳室帯で誕生し、接線方向への移動により大脳皮質へ到達する (tangential migration)。定位置にたどり着いた神経芽細胞は軸索や樹状突起を形成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。本稿では doublecortin (DCX) およびその類縁分子の脳形態形成における様々な機能について最近の知見を概説する。

### 1. DCX と神経細胞移動

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。男性患者では大脳皮質形成過程における神経細胞移動異常により、

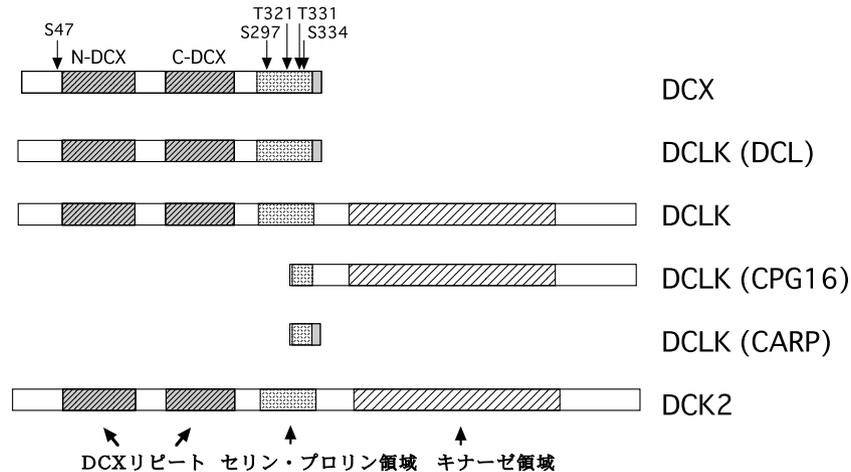


図1 DCXファミリー

DCX, DCLK, DCK2のN末端は互いに70%のアミノ酸相同性を有する。DCLKには主に四つのスプライシングアイソフォームが存在する。このほかDCLK, DCK2にはC末端の違うスプライシングアイソフォームも存在する。DCL, CARPのC末端はDCLKやCPG16とは違うエキソンに由来し、DCXのC末端と高い相同性を有する。矢印はDCXのリン酸化部位を示した。

正常な6層構造とは何の関連もなく、大部分の神経細胞が最脳室側の層に存在する4層構造を示し、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神経細胞群がみられ、その結果、正常な6層構造の皮質下の灰白層に異所性の神経細胞を生じる。

## 2. DCXと微小管

DCXは微小管結合タンパク質であり、N末端側に微小管結合能を有するタンデムなリピート構造(N-DCX, 49-138aa, C-DCX, 175-263aa)を持ち、C末端にはセリン・プロリン(SP)リッチ領域を持つ(図1)。他のMAP2/tauなどの微小管結合タンパク質の微小管結合部位とはアミノ酸配列の相同性はない。滑脳症患者にみられるミスセンス変異はDCX領域にクラスター状に分布しており、これらの変異DCXは微小管結合能を持たない。微小管は $\alpha$ および $\beta$ チューブリンからなるヘテロな二量体により構成され、このチューブリンダイマーが一列に重合してプロトフィラメントを作り、これが13本側面で管状に結合している。DCXは、四つのチューブリンモノマーのジャンクション部分にN-DCXが埋まるように結合して隣り合うプロトフィラメントを架橋することにより微小管を安定化する(図2)<sup>1)</sup>。また微小管重合初期過程ではチューブリンダ

イマー同士の側面方向への結合を安定化することにより、重合核を形成できる。またタンデムなDCXリピートのみが微小管の束形成を促進できる。

## 3. DCXファミリー

DCLK/DCAMKL1(doublecortin-like kinase 1)およびDCK2(doublecortin-like kinase 2)は、N末端側にDCXと70%のアミノ酸相同性を有するタンデムなDCX領域およびSPリッチ領域を持ち、さらにC末端には $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼとよく似たキナーゼ領域を持つ(図1)。興味深いことにDclkはDCX領域およびキナーゼ領域を持つアイソフォームの他、DCX領域とDCXに非常によく似たC末端部分を持つDCL(doublecortin-like)、キナーゼ領域のみのCPG16(candidate plasticity-related gene)、さらにCPG16のN末端およびDCLのC末端を有する短いペプチドCARP(CaMK-related peptide)をコードする。DCX, DCLKおよびDCL, DCK2は発達段階の中枢神経系や末梢神経系に特異的に発現しており、大脳皮質においては移動している神経細胞や神経軸索、神経突起先端に発現している。また、DCLKおよびDCL, DCK2は脳室壁の神経上皮細胞にも発現がみられる。CPG16およびCARPは、カイニン酸を投与したラット海馬において発現誘導される遺伝子として発見された。胎児期の脳には発現しておらず、むしろシナプス可塑性などに関与するの

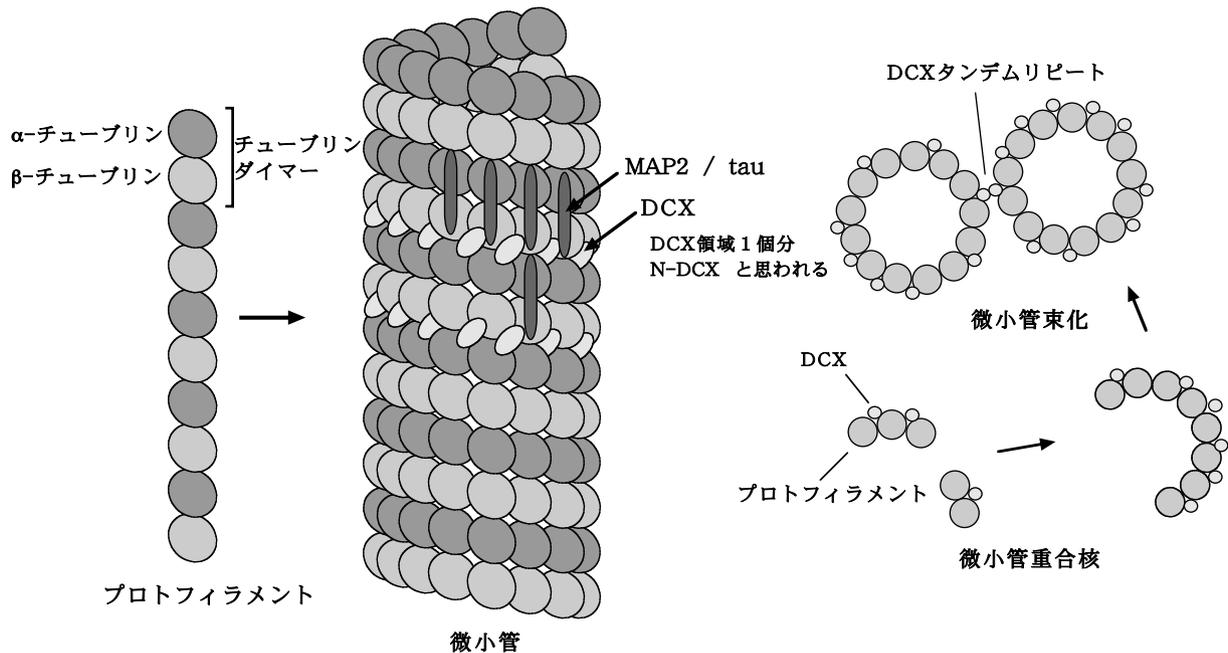


図2 DCXの微小管結合の様子

MAP2/tauが縦方向に結合するのに対し、DCXは微小管のプロトフィラメントを架橋するように結合し微小管を安定化する。またチューブリンダイマーの側面方向の結合を促すことにより微小管重合核を形成できる。タンデムなDCXリピートは微小管束形成能を持つ。

かもしれない。

#### 4. DCXファミリーの脳形成における機能

*Dcx* 欠損マウスは海馬に軽度の層形成異常を示す以外、ヒト患者でみられるような大脳皮質層構築異常はみられなかった<sup>2)</sup>。一方、RNAiを用いたノックダウンにより *Dcx* の発現を低下させると、ラットやマウスでは radial migration が抑制された<sup>3)</sup>。以上より、マウスにおいては他の *Dcx* 関連遺伝子が大脳皮質神経細胞の radial migration を機能的に補っていることが予想された。我々、および Deuelらのグループによりそれぞれ *Dclk* 欠損マウスが作製され、その機能が解析された<sup>4,5)</sup>。それぞれターゲットエキソンの違いにより前者では DCLK および DCL を、後者は DCLK および CPG16 を欠損している。いずれの *Dclk* 欠損マウスも脳梁の形成不全を示したが、顕著な大脳皮質の形成異常は示さなかった。一方 *Dcx Dclk* ダブル欠損マウスは出生直後に致死となり、脳梁、海馬交連、前交連の神経軸索伸展異常がみられ、また大脳皮質、海馬において重度の層構築異常が観察された。*Dclk* および *Dcx* を欠損した神経細胞は樹状突起発達、軸索伸張、そしてシナプス小胞の軸索輸送に異常がみられた<sup>4)</sup>。また詳細な解析により *Dcx* 欠損

マウスでも大脳皮質より脳梁や視床にのびる軸索伸展に遅れがみられた<sup>6)</sup>。実際、*DCX* 変異を持つ滑脳症患者において脳梁形成不全はMRIにより確認されている。以上より、*DCX* ファミリーが相補的に神経細胞移動や神経軸索伸展に関与していることが明らかとなった。

一方、*DCX* ファミリーは tangential migration を行う神経細胞にも発現している。大脳基底核原基より大脳皮質へ移動する神経細胞は、*Dcx* を欠損すると移動速度に大きな変化はないものの、先導突起の枝分かれが頻繁に起こり、また核移動の異常を示した<sup>7)</sup>。また成体脳における側脳室壁から rostral migratory stream (RMS) を介し嗅球に移動する神経細胞では、*Dcx* を欠損するとやはり先導突起の枝分かれや核移動異常を示す結果、移動速度が遅くなり、欠損マウスでは神経細胞が RMS の部分に蓄積することにより、正常より太い RMS が見られた<sup>8)</sup>。我々は *Dcx* <sup>-/-</sup> ; *Dclk* <sup>+/-</sup> や *Dcx Dck2* ダブル欠損マウスではさらに重度の RMS 形態異常がみられることを確認しており、*DCX* ファミリーは tangential migration を行う神経細胞においても相補的に機能していると考えられる。

DCLK や DCL は DCX とは異なり、脳室層や脳室下帯の放射状グリアや分裂中の神経細胞にも発現がみられる。

RNAiを用いたノックダウンにより、DCLKおよびDCLは放射状グリアの突起形態維持や分裂期紡錘体形成にも関与することが示された<sup>9,10</sup>。DCXファミリーの唯一の線虫ホモログであるZYG-8は、1細胞期胚の非対称性分裂の際、微小管集合を促進し、紡錘体の形成、配置決定に関与する<sup>11</sup>。キナーゼ活性を持たない*zyg-8*変異体も同様の表現型を示すことから、キナーゼ活性もZYG-8の機能発現に関与していることが示唆されている。以上より、DCLKおよびDCLはDCXよりもさらに広範な機能を持つことが示唆される。我々の解析した*Dclk*や*Dcx Dclk*ダブル欠損マウスでは顕著な放射状グリアの形態異常や神経細胞分裂異常は観察されなかったが、DCK2が機能的にこれを補っている可能性が考えられる。

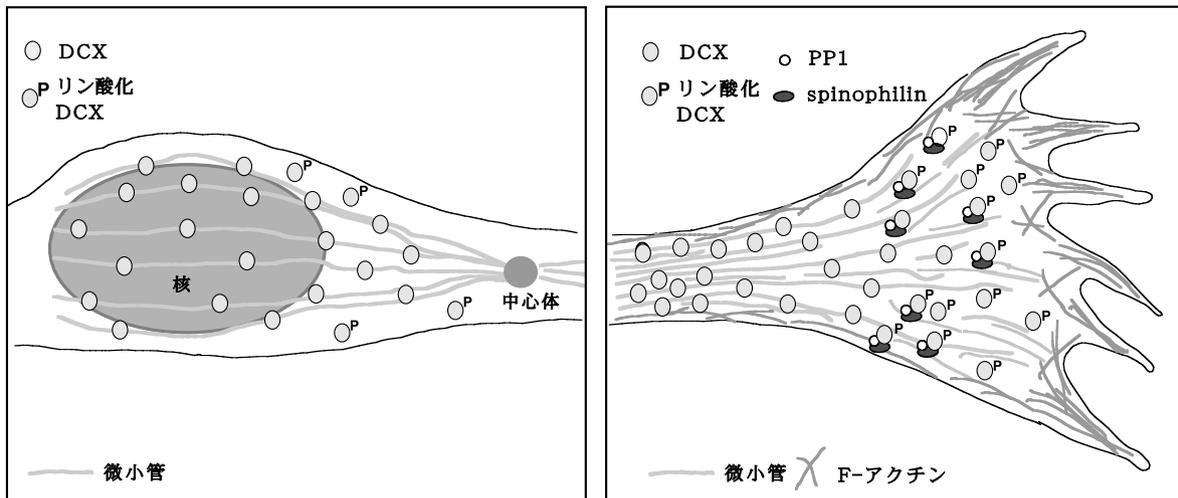
我々はさらに*Dck2*欠損マウスおよび*Dcx Dck2*ダブル欠損マウスを作製し、ともに大脳皮質構造に顕著な異常は見られないが、ダブル欠損マウスでは海馬において*Dcx*欠損マウスと比較し重度の層形成異常が見られることを発見した。このマウスはてんかん発作を示し、離乳前後から7, 8週齢のうちにほとんどが致死を示した。てんかんは抑制性および興奮性シナプスの障害、あるいは両者のバランスが崩れることにより生じることから、DCXファミリーが樹状突起やシナプス形態形成に関与している可能性

を考え、現在詳しい解析を行っている。

## 5. DCXファミリーの機能メカニズムについて

DCXの微小管結合能はリン酸化、脱リン酸化により調節されていることが明らかとなってきた。Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) は主にDCXのSer 297を、JNK (c-Jun N-terminal kinase) は少なくともThr 321, Thr 331およびSer 334を、PKA (protein kinase A) またはMARK/PAR-1ファミリーのキナーゼはSer 47を主にリン酸化することにより、微小管結合能を減少させる<sup>12-14</sup>。これらのリン酸化部位はDCXファミリーで保存されており、DCLKやDCK2も同じような修飾を受けていることが考えられる。

DCXに結合するアクチン結合タンパク質であるspinophilin (SPN)/neurabin IIは、PP1 (protein phosphatase 1) を伸張している軸索の成長円錐の根元部分に局在化させ、DCXのSer 297を脱リン酸化することにより、この部分での微小管束形成を促進し軸索伸張に関与している(図3)<sup>6</sup>。DCXやSPN欠損神経細胞は軸索内での微小管束形成がうまくいかず、その結果、枝分かれの多い神経突起を持つ細胞を生じる。移動しているDCX欠損SVZ神経細胞でも先端突起の枝分かれが多くみられたことから考えると、軸索の成長円錐や移動神経細胞の先端突起でのDCXのリン酸



移動している神経細胞の核-中心体周辺においてはDCXは核の周りの“籠状”微小管に結合しこれを安定化させることにより核の中心体方向への移動を制御する。

伸張している軸索の成長円錐では、この部分に局在するアクチン結合能を持つspinophilin-PP1 (protein phosphatase 1) によりDCXのSer 297が脱リン酸化され、DCXは微小管に結合し、この部分での微小管重合、束形成を促進し、軸索伸張に関与する。移動している神経細胞の先端突起先端においても同様に機能する。

図3 DCXの機能

化, 脱リン酸化による微小管結合能の調節が軸索伸張や神経細胞移動に重要であると考えられる. また DCX-SPN はアクチン細胞骨格と微小管骨格を結びつける役割を持っており非常に興味深い.

*Cdk5* を脳特異的に欠損したマウスでは, 最終分裂を終えた神経細胞が, 皮質下の脳室下帯や中間層において多数の突起を有する多極性から双極性への形態変化を起さないとともに, 移動できないことが示された<sup>15)</sup>. 正常な脳ではこれら一時的に多極性を示す細胞は双極性になることにより radial migration を開始し皮質板に侵入する. 興味深いことに DCX の RNAi によるノックダウンにより, 同じように多極性の形態を示す神経細胞が蓄積する<sup>3)</sup>. *Cdk5* による DCX 調節が神経細胞の多極性から双極性へという形態変化を制御している可能性も考えられる.

また JNK の活性化を誘導する MAPKKK として機能する DLK (dual leucine zipper kinase) の欠損マウスは *Dcx Dclk* ダブル欠損マウスと似た神経軸索伸張, 神経細胞移動の異常を示し, また脳における DCX の Thr 331, Ser 334 のリン酸化の減少がみられる<sup>16)</sup>. JNK による DCX を介した軸索伸張, 移動の制御が示唆される.

また我々は DCX が DCLK によりリン酸化されることを確認している. DCLK や DCK2 は自己リン酸化されることが知られており, 三つの分子に共通なリン酸化部位が存在するのかもしれない. 自己リン酸化の微小管結合能やキナーゼ活性に対する関与が示唆されているが, さらに詳しい解析が必要と思われる.

DCX は上に示したリン酸化修飾により調節される他にも, 様々なタンパク質との相互作用により機能していることが示唆される. そのうちの一つは滑脳症の原因遺伝子産物である LIS1<sup>17)</sup>である. 神経細胞はまず先導突起を伸張し, 続いて中心体とその先導突起の中に移動し, 最後に核がその周りを覆う“籠状”の微小管により中心体方向に引っ張られる. LIS1 はダイニンモータータンパク質と共に核を中心体の方向に引っ張る働きを持つ. これに対し DCX は核の周りの“籠状”微小管を安定化させる働きを持つ (図 3). LIS1 と DCX の相互作用がどのような意味を持つのか, リン酸化, 脱リン酸化による DCX の調節がここでも働いているのかは今後の課題である.

## 6. 今後の課題

DCX ファミリーが神経細胞の分裂, 移動や軸索伸張において相補的に機能していることが明らかとなり, DCX については微小管調節機能メカニズムも少しずつ明らかに

なってきた. しかし DCX および DCLK, DCK2 がどのように相互作用をして機能しているのかは全く分かっていないといつてよい. 特に DCLK, DCK2 はプロテインキナーゼ活性を持ち, 自己リン酸化 (DCX のリン酸化) や他のタンパク質のリン酸化を介し, その機能発現に関与すると考えられる. 今後, 自己リン酸化の意義や基質タンパク質が同定され, それぞれの基質タンパク質の機能が細胞, 個体レベルで解明されることにより新たなメカニズム解明がなされるであろうと思われる.

- 1) Moores, C.A., Perderiset, M., Kappeler, C., Kain, S., Drummond, D., Perkins, S. J., Chelly, J., Cross, R., Houdusse, A., & Francis, F. (2006) *EMBO J.*, 25, 4448-4457.
- 2) Corbo, J. C., Deuel, T.A., Long, J.M., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A., & Walsh, C.A. (2002) *J. Neurosci.*, 22, 7548-7557.
- 3) Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V., & LoTurco, J.J. (2003) *Nat. Neurosci.*, 6, 1277-1283.
- 4) Deuel, T.A., Liu, J.S., Corbo, J.C., Yoo, S.Y., Rorke-Adams, L. B., & Walsh, C.A. (2006) *Neuron*, 49, 41-53.
- 5) Koizumi, H., Tanaka, T., & Gleeson, J.G. (2006) *Neuron*, 49, 55-66.
- 6) Bielas, S.L., Serneo, F.F., Chechlacz, M., Deerinck, T.J., Perkins, G.A., Allen, P.B., Ellisman, M.H., & Gleeson, J.G. (2007) *Cell*, 129, 579-591.
- 7) Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J.P., Tuy, F.P., Alvarez, C., Houbron, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Metin, C., & Francis, F. (2006) *Hum. Mol. Genet.*, 15, 1387-1400.
- 8) Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B.C., & Gleeson, J.G. (2006) *Nat. Neurosci.*, 9, 779-786.
- 9) Shu, T., Tseng, H.C., Sapir, T., Stern, P., Zhou, Y., Sanada, K., Fischer, A., Coquelle, F.M., Reiner, O., & Tsai, L.H. (2006) *Neuron*, 49, 25-39.
- 10) Vreugdenhil, E., Kolk, S.M., Boekhoorn, K., Fitzsimons, C.P., Schaaf, M., Schouten, T., Sarabdjitsingh, A., Sibug, R., & Lucassen, P.J. (2007) *Eur. J. Neurosci.*, 25, 635-648.
- 11) Gonczy, P., Bellanger, J.M., Kirkham, M., Pozniakowski, A., Baumer, K., Phillips, J.B., & Hyman, A.A. (2001) *Dev. Cell*, 1, 363-375.
- 12) Schaar, B.T., Kinoshita, K., & McConnell, S.K. (2004) *Neuron*, 41, 203-213.
- 13) Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D., & Reiner, O. (2004) *EMBO J.*, 23, 823-832.
- 14) Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L. H., & Gleeson, J.G. (2004) *Neuron*, 41, 215-227.
- 15) Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itoharu, S., Hashimoto, M., Nakajima, K., Ogawa, M., Kulkarni, A.B., & Mikoshiba, K. (2007) *Development*, 134, 2273-2282.
- 16) Hirai, S., Cui de, F., Miyata, T., Ogawa, M., Kiyonari, H., Suda, Y., Aizawa, S., Banba, Y., & Ohno, S. (2006) *J. Neuro-*

sci., 26, 11992-12002.

- 17) Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., & Gleeson, J.G. (2004) *J. Cell Biol.*, 165, 709-721.

古泉 博之

(カリフォルニア大学サンディエゴ校神経科学講座)

Physiological function of the DCX family in brain development

Hiroyuki Koizumi (Department of Neurosciences, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0691, USA)

スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の転写調節機序

はじめに

近年、スフィンゴ脂質代謝産物は単なる細胞膜構成成分ではなく、細胞の情報伝達物質としての機能が認知されてきた。特にスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) はその細胞膜受容体が同定され、生理機能、作用機序が明らかにされつつある。S1Pはスフィンゴミエリン (SM) の代謝産物セラミド (CER) がさらにスフィンゴシン (SPG) となり、それにリン酸基が付加され産生される (図1)。S1P受容

体下流シグナル伝達は、血管内皮の増殖や移動、血管壁の透過性、肥満細胞の活性化、リンパ球のホーミング、抗がん剤への耐性機序、中枢神経の発育などで詳しく調べられている<sup>1,2)</sup>。CERに関しても、1989年に岡崎らによりヒト白血病細胞株 HL60 のビタミン D<sub>3</sub> による分化に際して、SM が分解され CER の増加が起こることが報告されてから、細胞内機能物質としての役割が注目されるようになった。多くの報告では CER は pro-apoptotic factor として位置づけられている (図1)。Spiegel らは CER, SPG と S1P の細胞内の量的バランスが細胞の運命を決定するとして sphingolipid rheostat model を提唱した<sup>1)</sup>。この説によれば、スフィンゴ脂質代謝酵素系の活性変化ないし酵素タンパク質量の変化によってスフィンゴ脂質中間代謝産物の量的変化が生じ、細胞の生存や増殖動態が影響されることになる。一般的に細胞外刺激によるシグナル伝達は大きく分けて初期相と後期相の二つがある。前者は秒~分の迅速応答であり、後者は時間~日の単位の現象である。初期相は細胞の速やかな形態変化、運動、分泌などであり、後者はもう少し長期的な現象の細胞の分化、増殖、細胞死などである。前者は既存酵素あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などの修飾により活性、機能あるいは局在が変化して起こると考えられる。後者はタンパク質の量的変化を伴うことが多いと考えられており、転写および翻訳過程が調節機序として重要となる。本稿では我々の最近の研究をもとにこれらスフィンゴ脂質代謝系酵素の転写調節について紹介する。

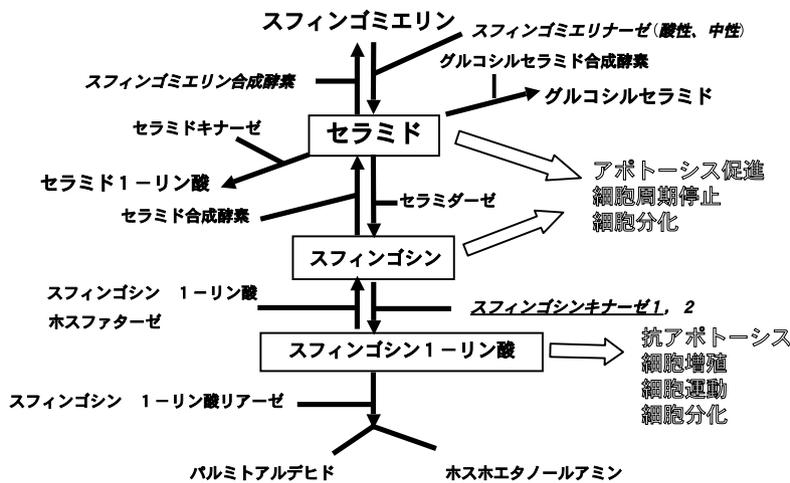


図1 スフィンゴ脂質代謝経路中間産物と関連する酵素群 SMase および SPHK1 を中心に図示した。代表的な代謝産物 (CER, SPG および S1P) のこれまでに報告された主要な機能も併せて示した。