

海馬ニューロンの形態形成における
Rac 活性化因子 Dock4 の役割

上田 修平

目次

要旨	3
第1章 序論	6
第2章 (第1部)	
Rac 活性化因子 Dock4 による海馬ニューロン樹状突起の発達制御	
2-1 結果	12
2-2 考察	20
第3章 (第2部)	
Rac 活性化因子 Dock4 による海馬ニューロン樹状突起スパイン形成の制御	
3-1 結果	24
3-2 考察	34
第4章 結論	38
実験方法	40
論文目録	47
参考文献	48
謝辞	55

要 旨

脳神経系の構成単位であるニューロンは特徴的な極性構造を持っており、多くのニューロンは細胞体から、情報の出力を行う一本の軸索と、入力を受ける複数の樹状突起を伸ばしている。これらの神経突起が適切なニューロン間でシナプスを形成し、複雑かつ緻密な神経回路を形成することが、認知、記憶、思考、情動、運動といった高次脳機能の発現に不可欠である。Rhoファミリー低分子量G蛋白質の一つであるRacは、アクチン細胞骨格系の制御を行う分子であり、ニューロンの形態形成に重要な役割を果たすことが知られている。したがって、Racの時間的、空間的な活性調節機構を明らかにすることは、特徴的なニューロンの形態形成、さらには精緻な神経回路形成のメカニズムを解明していく上で重要であると考えられる。

私の所属する研究室では、Rhoファミリー低分子量G蛋白質の活性化因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 群であるDockファミリー蛋白質の一つ、Dock4がRacを特異的に活性化することをこれまでに明らかにした。また、近年のゲノムワイド関連解析の研究から、*DOCK4* 遺伝子が自閉症、統合失調症、失読症などの神経発達障害の感受性遺伝子である可能性がいくつか報告されている。本研究の始めに、私は、Dock4がラットの海馬ニューロンに強く発現していること、さらに初代培養海馬ニューロンにおいて樹状突起の伸長の始まる発達後期からその発現量が上昇することを発見したことから、樹状突起伸長期以降の海馬ニューロンの形態形成におけるDock4の機能解明に焦点を当て、研究を進めた。

第1章では、樹状突起形成期におけるDock4の細胞機能を明らかにした。培養海馬ニューロンにおいてRNA干渉により内在性のDock4をノックダウンすると、樹状突起の成長が抑制された。これまでの研究から、Dock4はELMOと安定な複合体を形成し、ELMO-Dock4複合体としてRacに対する機能的なGEFとして働くことが知られているため、海馬ニューロンにELMO2とDock4を共発現させたところ、樹状突起の分枝が増加した。一方で、Racに対するGEF活性を失ったDock4の変異体を発現させても樹状突起の分枝は増加しなかった。従って、Dock4はRacを活性化することで樹状突起の成長に促進的に働いていることが示唆された。

第2章では、興奮性シナプス後部構造体である樹状突起スパインの形成におけるDock4の機能と、その制御メカニズムを明らかにした。私は、Dock4の新規結合蛋白質としてアクチン重合制御分子であるcortactinを同定し、Dock4とcortactinが樹状突起スパインで強く共局在していることを明らかにした。さらに、Dock4は樹状突起スパイン形成に重要な役割を果たしており、Dock4によるスパイン形成の制御には、Racの活性化、およびcortactinとの結合が不可欠であることを明らかにした。従って、Dock4はcortactinと樹状突起スパインにおいて結合し、Racの活性化を介して樹状突起スパイン形成に促進的に働いていることが示唆された。

以上のことから、私は本研究において、Rhoファミリー低分子量G蛋白質Racの活性化因子Dock4が、海馬ニューロンの形態形成に果たす役割と、その制御メカニズムを明らかにした。

第 1 章

序論

生物は周囲の環境の様々な情報を知覚し、それらの情報を処理して外界に応答する。この生物の情報処理機能、即ち、認知、記憶、思考、情動、運動などの高次機能に脳神経系は必須である。脳神経系の構成単位であるニューロンは特徴的な極性を持ち、多くの場合、細胞体から一本の長い軸索と複数の短く分枝化した樹状突起を伸ばしている。情報は樹状突起や細胞体でシナプスを介して別のニューロンから受け取られ、細胞体を通して軸索から、さらに別のニューロンへと伝達される。神経機能の発現には、ニューロンが神経突起を介して互いに接続し、複雑かつ精緻な神経回路を形成することが不可欠である。

神経回路は、さまざまな段階を経て形成される。ニューロンは神経幹細胞から分化した後、適切な場所へと移動し、神経突起を投射させ、標的となる相手とシナプスを形成する (Fig. 1-1A)。この複雑に統制された神経回路はニューロンの形態が精密に制御されることによって形成される。この回路形成が正確に行われないと、脳神経系は正常に機能するこ

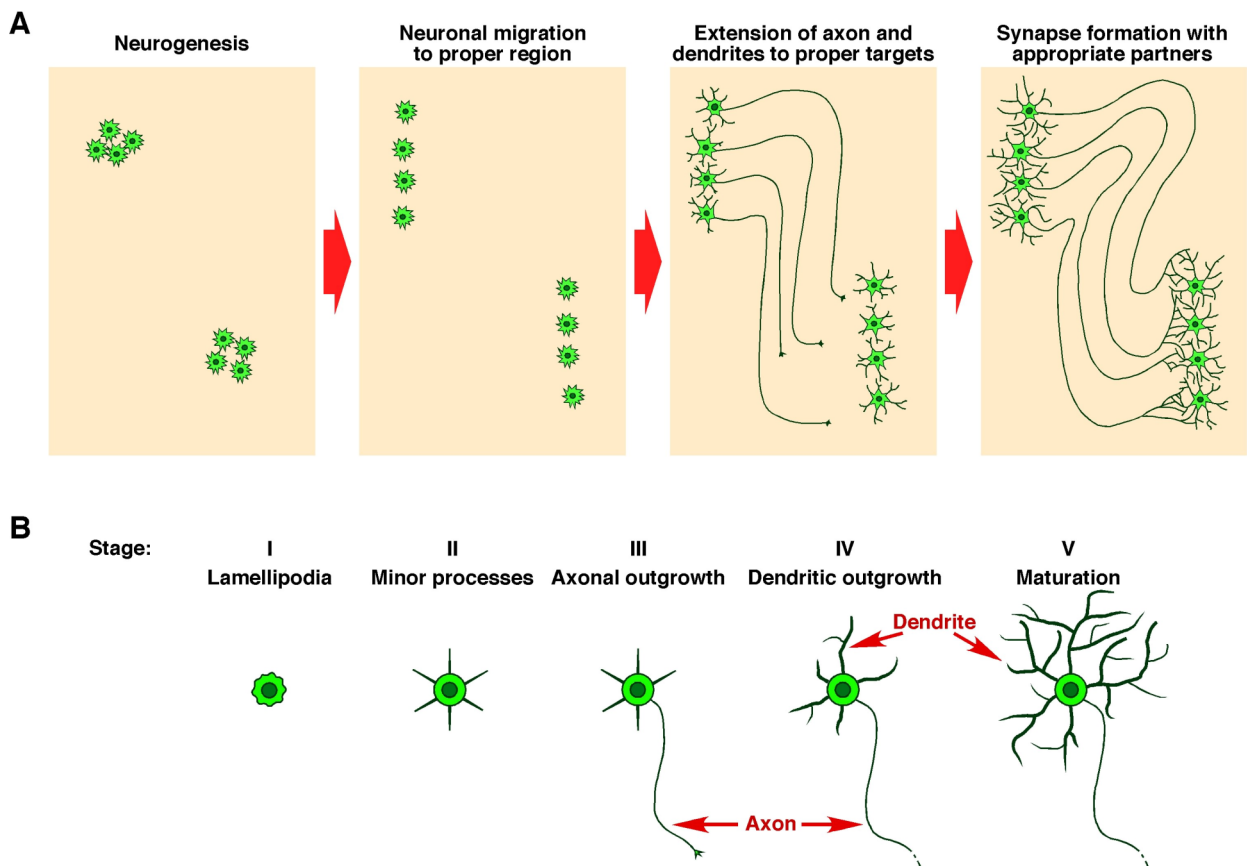


Fig. 1-1 神経回路形成と培養海馬ニューロンの発達過程

(A) 神経回路形成過程の概略図。(B) 初代培養海馬ニューロンの成長過程に伴う形態変化。

とが出来ない。すなわち、ニューロンの形態制御機構は、脳神経系の制御メカニズムを理解する上で非常に重要な要素であると言える。

ニューロンの形態形成の研究には、海馬ニューロンの初代培養系が広く用いられている (Goslin et al., 1998)。海馬ニューロンが基質に接着すると、細胞辺縁にラメリポディアを形成する (stage I)。しばらくすると、細胞体から極性を持たない複数本の短い突起を伸展させる (stage II)。そのうちの 1 本の突起が長く伸長し始め軸索となる (stage III)。その間、軸索となる突起以外の突起はほとんど伸長しないが、軸索が伸びていくにつれその他の突起も伸展が起こり、先が細く分枝化したパターンが特徴的な複数本の樹状突起を形成する (stage IV)。この樹状突起はさらに複雑に分枝化し、別のニューロンの軸索と相互作用しシナプスを形成して、成熟したニューロンとなる (stage V; Fig. 1-1B)。海馬ニューロンのこのような形態変化は、主に細胞骨格の構築により決定づけられる。

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、細胞骨格の制御を介して細胞の運動や形態変化を調節する分子である (Hall, 1998)。Rho ファミリー G 蛋白質は、他の低分子量 G 蛋白質と同様に、不活性状態の GDP 結合型と活性状態の GTP 結合型が存在し、細胞内シグナル伝

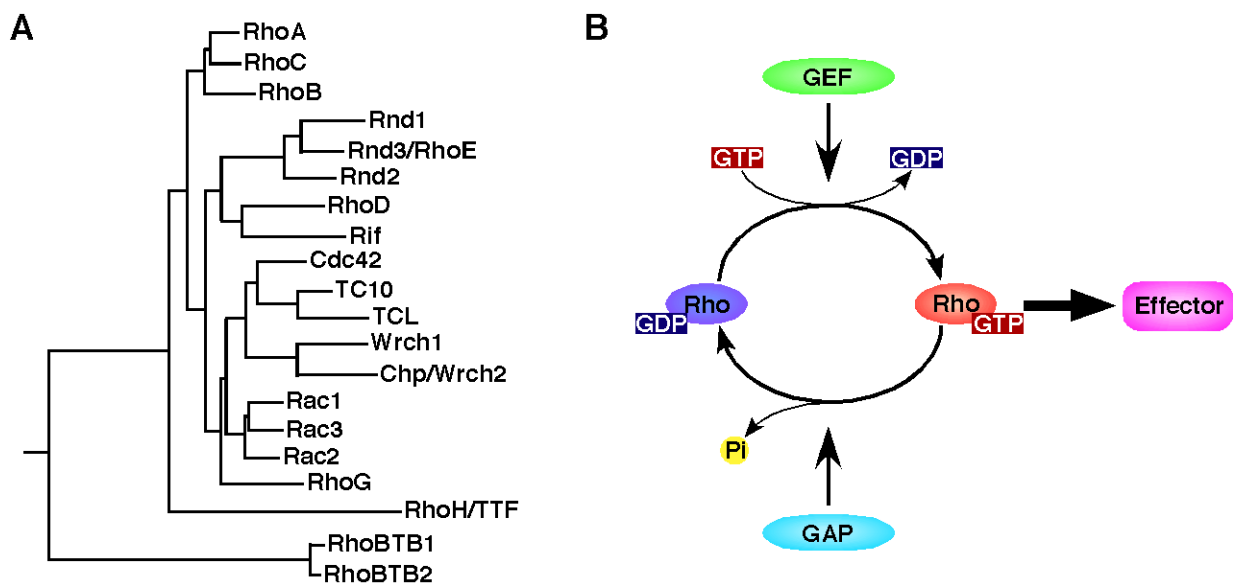


Fig. 1-2 Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質

(A) Rho ファミリーに属する 20 種の蛋白質の系統樹 (Burrige and Wennerberg, 2004)。 (B) Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、不活性型の GDP 結合型と活性型の GTP 結合型をサイクルすることで分子スイッチとして働く。GEF (guanine nucleotide exchange factor) は GDP-GTP 交換反応を促進することで Rho ファミリー G 蛋白質を活性化する。活性化された Rho ファミリー G 蛋白質はそれぞれ特異的なエフェクターに作用して、多様な生理機能を発揮する。一方で、GAP (GTPase activating protein) は内在性の GTP 加水分解反応を促進することで Rho ファミリー G 蛋白質を不活性化する。

達において分子スイッチとして働く (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Fig. 1-2B)。Rho ファミリーG 蛋白質は不活性型から活性型に変換されると、その特異的なエフェクターに作用して多様な生理的機能を発揮する。Rho ファミリーG 蛋白質の活性化は、GDP-GTP 交換反応を促進する様々な GEF (guanine nucleotide exchange factor) により制御される。一方で、活性化された Rho ファミリーG 蛋白質は、内在性の GTPase 活性を触媒する GAP (GTPase activating protein) によって不活性化が促進される。このような活性制御因子により、Rho ファミリーG 蛋白質の活性は、細胞内で時間的、空間的に厳密に制御されている。

現在までに哺乳類において Rho ファミリーに属する低分子量 G 蛋白質は 22 種類同定されており、多様な細胞機能に関する研究が行われている (Fig. 1-2A)。中でも、RhoA、Rac1、Cdc42 は特に研究が進んでおり、線維芽細胞などの培養細胞において RhoA はストレスファイバー (stress fiber) を、Rac1 はラメリポディア (lamellipodia) を、Cdc42 はフィロポディア (filopodia) をそれぞれ形成し、細胞運動や細胞接着、極性形成などを制御することが知られている。これらは脳の広範な領域に発現しており、ニューロンにおいても、移動や神経突起の伸長、シナプス形成に関与していることがこれまでに多数報告されている (Kawauchi et al., 2003; Konno et al., 2005; Luo, 2000; Negishi and Katoh, 2002; Govek et al., 2005)。また近年の研究により、TC10 や Rnd1 といった他の Rho ファミリー蛋白質も神経突起形成に関与していることが次第にわかってきており、Rho ファミリーに属する様々な分子がニューロンの形態調節に関与していることが示唆される (Tanabe et al., 2000; Ishikawa et al., 2003; Ishikawa et al., 2006)。

Rho ファミリーG 蛋白質の GEF としては、Dbl-homology (DH) ドメインをもつ Dbl ファミリー蛋白質が知られており、これまでにヒトで約 70 種類同定されてきた (Rossman et al., 2005)。ところが近年、Dock180 を代表とする DH ドメインを持たない GEF ファミリー、Dock ファミリー蛋白質が同定された (Brugnera et al., 2002; Meller et al., 2002; Côté and Vuori, 2002)。Dock ファミリーに属する蛋白質は植物や酵母においてもその存在が確認され、線虫やショウジョウバエでは形態形成における細胞の移動やアポトーシス細胞の貪食作用に不可欠であることが知られている (Wu and Horvitz, 1998; Nolan et al., 1998; Fig. 1-3A)。このように Dock ファミリー蛋白質は進化の過程で古くから保存されており、様々な生物種において重要な役割を担っていると考えられる。Dock ファミリー蛋白質はヒトでは 11 種類存在し、その相同性から 4 つのサブファミリーに分類される (Fig. 1-3A)。Dock180/Dock1、Dock2、Dock5 は Dock-A サブファミリーに、Dock3/MOCA、Dock4 は Dock-B サブファミリーに、Dock6、Dock7、Dock8 は Dock-C サブファミリーに、Dock9/Zizimin1、Dock10/Zizimin3、Dock11/Zizimin2 は Dock-D サブファミリーに属する。Dock ファミリー蛋白質には共通に保存された 2 つの領域、DHR-1 (Dock-homology region-1, CZH1 と呼ばれる) および DHR-2 (Docker または CZH2 と呼ばれる) が存在しており、DHR-2 ドメインが Rho ファミリーG 蛋白質と直接結合し、活性化を行う GEF ドメインとして機能する

A

	<i>Homo sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Dock-A	Dock180	Myoblast City	CED-5	SPIKE1	YLR422W
	Dock2 Dock5				
Dock-B	Dock4 Dock3/MOCA	CG11754			
	Dock6 Dock7 Dock8	CG11376	F46H5.4		
Dock-D	Dock9/Zizimin1 Dock10/Zizimin3 Dock11/Zizimin2	CG6630	F22G12.5		

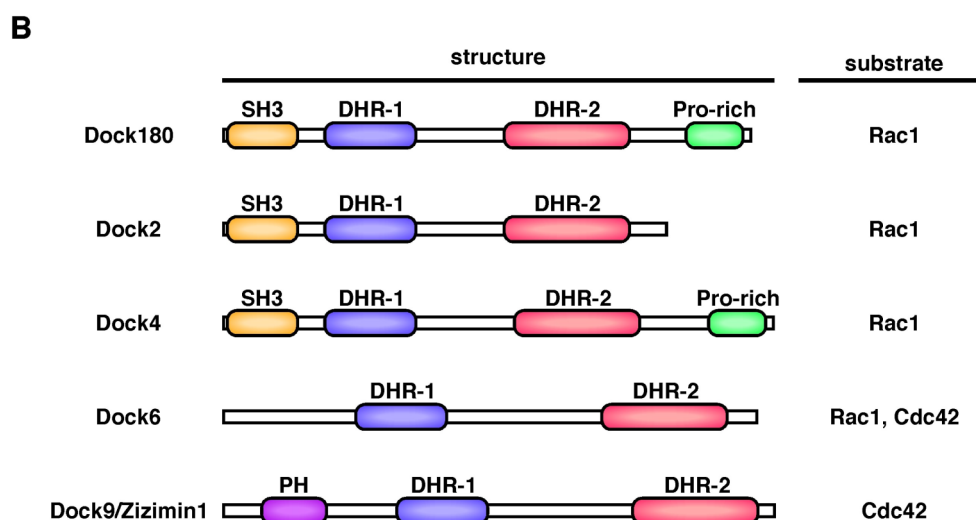


Fig. 1-3 Dock ファミリー蛋白質は進化的に保存されている

(A) ヒトの Dock ファミリー蛋白質の 4 つのサブファミリーへの分類 (Côté and Vuori, 2002) と、その他の生物種における相同分子種。(B) Dock ファミリー蛋白質のドメイン構造 (SH3, Src-homology 3 domain; DHR, Dock-homology region; Pro-rich, proline-rich region; PH, Pleckstrin-homology domain)。

ことが明らかになっている (Brugnera et al., 2002; Côté and Vuori, 2002; Fig. 1-3B)。Rho ファミリーG蛋白質は、このような多数の活性調節分子から多様な活性制御を受けることで、時間的、空間的に複雑かつ厳密な機能発現を可能にしていると考えられ、その活性調節の分子機構を明らかにしていくことは、神経ネットワーク形成をはじめとする生命現象を解明していく上で非常に重要であると考えられる。

私の所属する研究室では、Dock ファミリー蛋白質の一つ Dock4 が、その結合分子である ELMO と複合体を形成し、Rho ファミリーG蛋白質 Rac1 の GEF として働くことを明らかにした (Hiramoto et al., 2006)。Rho ファミリーG蛋白質の一つである RhoG が活性化さ

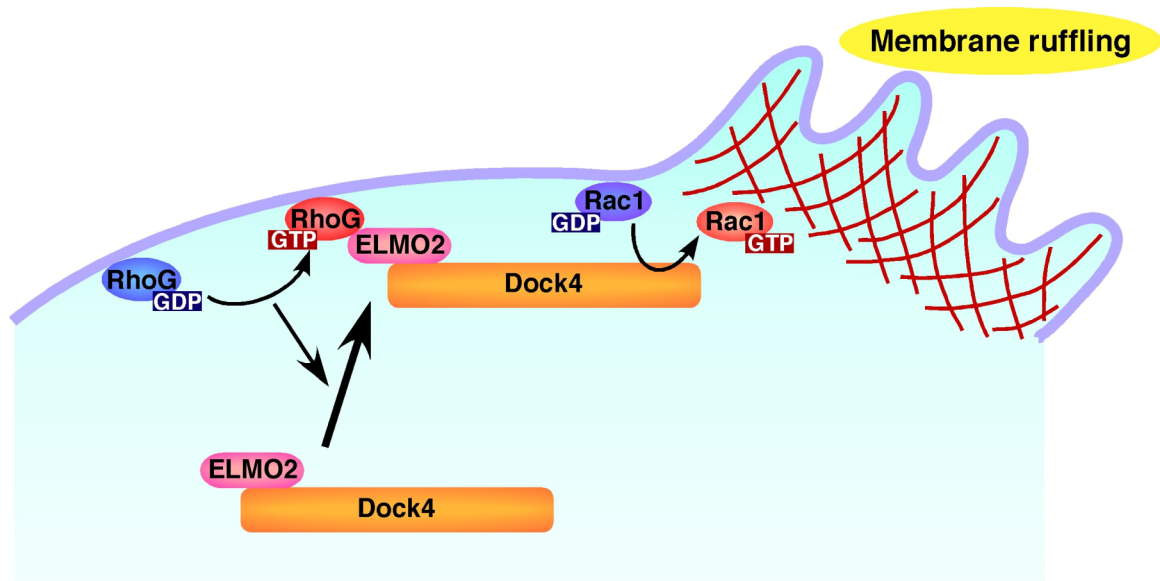


Fig. 1-4 RhoG-ELMO-Dock4 シグナル伝達のモデル図

ELMO-Dock4 複合体は活性型 RhoG によって細胞膜へと移行し Rac1 を活性化することで、細胞膜のラッフリングや細胞運動の促進を引き起こす (Hiramoto et al., 2006)。

れると、ELMO-Dock4 複合体と結合して細胞膜へ移行し Rac1 を活性化させ、細胞膜の伸展、細胞運動の促進を引き起こす (Fig. 1-4)。また、Dock4 は様々な組織に発現しているが、脳においても発現していることが報告されており (Yajnik et al., 2003)、近年のゲノムワイド関連解析の結果から、*DOCK4* 遺伝子が自閉症、統合失調症、失読症といった神経発達障害の感受性遺伝子である可能性もいくつか報告されている (Maestrini et al., 2010; Pagnamenta et al., 2010; Alkelai et al., 2012)。本研究において、私は Dock4 の神経回路形成における役割の解明を試みた。第 1 章では、Dock4 が脳の海馬に高発現しており、初代培養海馬ニューロンを用いた解析から樹状突起の成長を制御することを明らかにした。第 2 章では、Dock4 の新規結合蛋白質としてアクチン重合制御分子の cortactin を同定し、シナプス形成期の海馬ニューロンにおいて Dock4 と cortactin が相互作用して、樹状突起スパインの形成を制御することを明らかにした。これらの結果は、Dock4 が神経回路形成において、Rac の活性調節を行うことでニューロンの形態制御に関与していることを示唆するものであり、近年社会的にも重要度の高まっている精神疾患の病因学研究や新規治療法の開発に寄与する可能性もある。

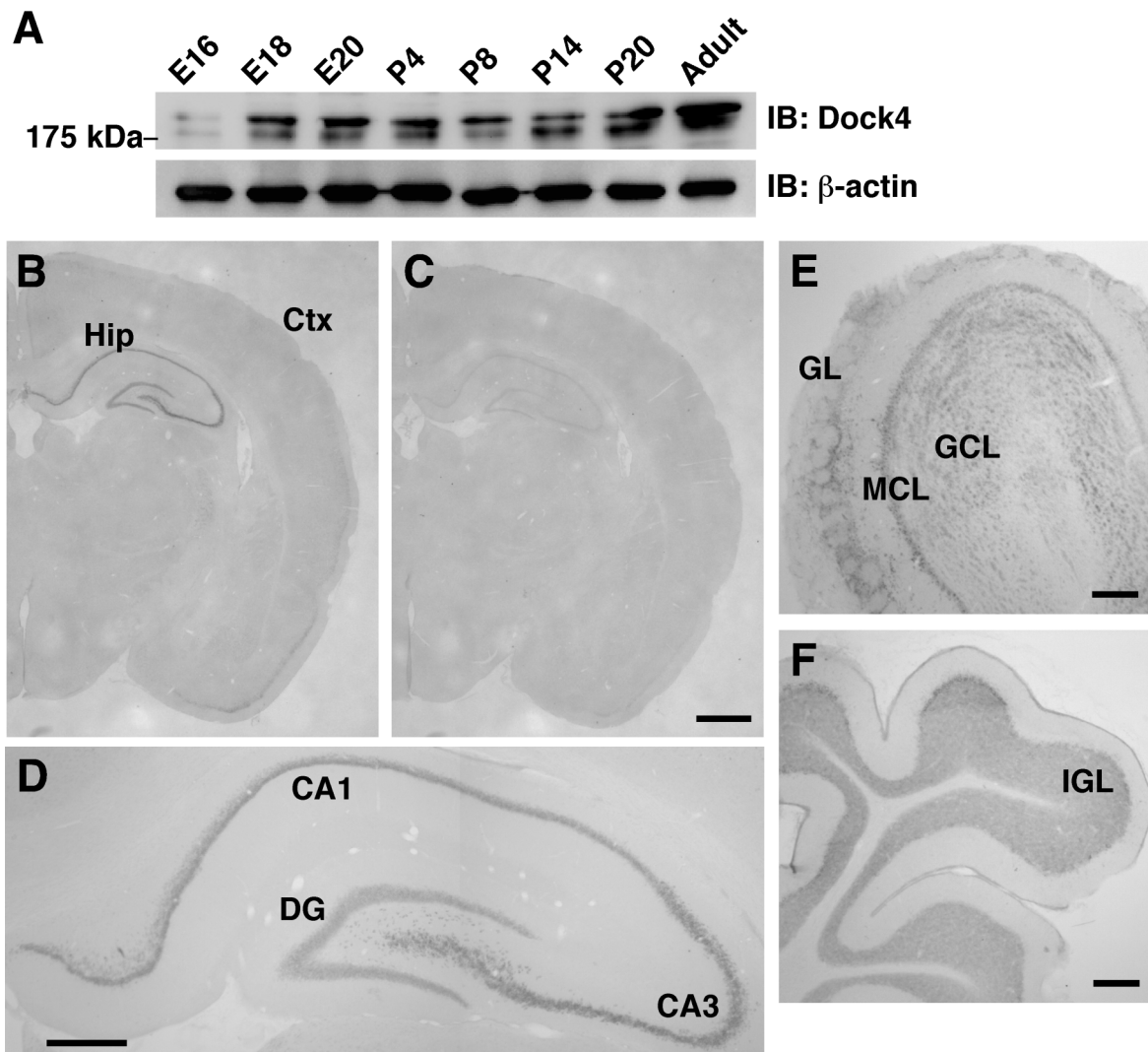
第2章 (第1部)

Rac 活性化因子 Dock4 による海馬ニューロン樹状突起の発達制御

2-1 結果

Dock4 は発達期のラットの脳に強く発現している

まず始めに、Dock4 の発現パターンを明らかにするため、ラットの脳の発達に伴う Dock4 の発現量の変化を調べた。胎生 16 日齢 (E16) から成体までのラットの全脳ホモジネートをイムノブロッティングで解析したところ、Dock4 は胎生 18 日齢 (E18) から発現が認められ、成体になってもその発現は持続することが明らかになった (Fig. 2-1A)。さらに、ラットの脳内での Dock4 mRNA の発現分布を明らかにするため、Dock4 mRNA に対する DIG 標識アンチセンス RNA プロブを用いて、生後 20 日齢 (P20) のラットの脳切片に対し *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。すると、大脳において Dock4 mRNA は



海馬のアンモン角 (CA1 から CA3 領域) の錐体細胞層と歯状回 (DG) の顆粒細胞層に強い発現が見られた (Fig. 2-1B, D)。また、嗅球の嗅状層 (GL)、僧帽細胞層 (MCL)、顆粒細胞層 (GCL)、および小脳の内顆粒層 (IGL) でも Dock4 mRNA の発現は確認された (Fig. 2-1E, F)。一方、対照実験として用いたセンス RNA プローブではシグナルは検出されな

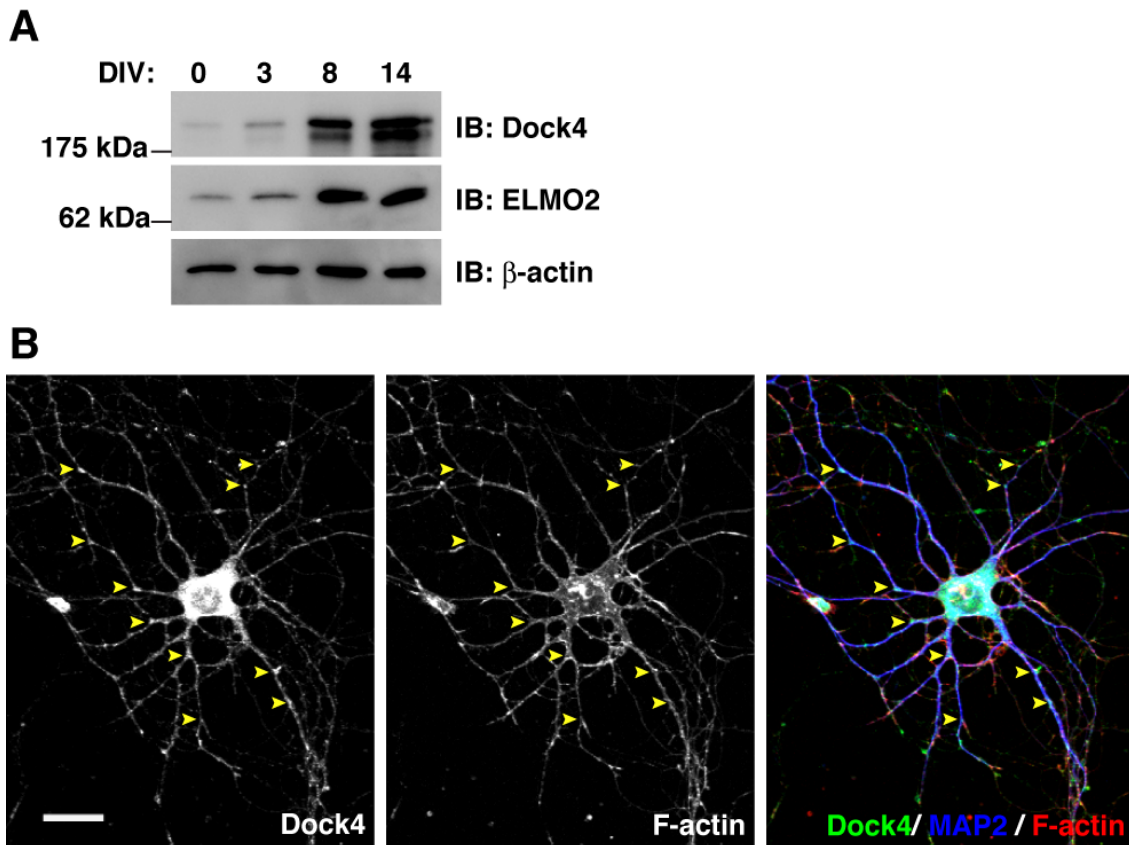


Fig. 2-2 Dock4 の発現は樹状突起形成期に上昇する

(A) 初代培養海馬ニューロンを培養 0、3、8、14 日目 (DIV, days in vitro) に回収し、細胞溶解物を SDS-PAGE およびイムノブロッティングを行い、抗 Dock4 抗体および抗 ELMO2 抗体により検出した。内部標準として抗 β -actin 抗体を用いた。(B) 初代培養海馬ニューロンを培養 8 日目に固定し、抗 Dock4 抗体 (green) および抗 MAP2 抗体 (blue) を用いて免疫染色を行った。細胞の形態はフェロイジンによる F-actin の染色 (red) で可視化した。矢頭は樹状突起の分枝点を示す。スケールバー: 20 μ m。

Fig. 2-1 Dock4 は発達期のラットの海馬に強く発現している

(A) 胎生 16 日齢 (E16) から成体までのラットの全脳をホモジネートし、SDS-PAGE およびイムノブロッティングを行い、抗 Dock4 抗体により検出した。内部標準として抗 β -actin 抗体を用いた。(B-F) 生後 20 日齢 (P20) ラットの脳の冠状切片に対して Dock4 mRNA に対するアンチセンスプローブ (B, D-F) あるいはセンスプローブ (C) を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。(B, C) 大脳 (Ctx, 大脳皮質; Hip, 海馬)、(D) 海馬 (CA, アンモン角; DG, 歯状回)、(E) 嗅球 (GL, 嗅状層; MCL, 僧帽細胞層; GCL, 顆粒細胞層)、(F) 小脳 (IGL, 内顆粒層)。スケールバー: (C), 1 mm; (D), 500 μ m; (E, F), 200 μ m。

った (Fig. 2-1C)。以上の結果から、Dock4 はラットの脳、特に海馬で強く発現しており、神経回路の形成や維持に何らかの役割を担っていることが予想される。

初代培養海馬ニューロンにおいて樹状突起形成期に Dock4 の発現は増加する

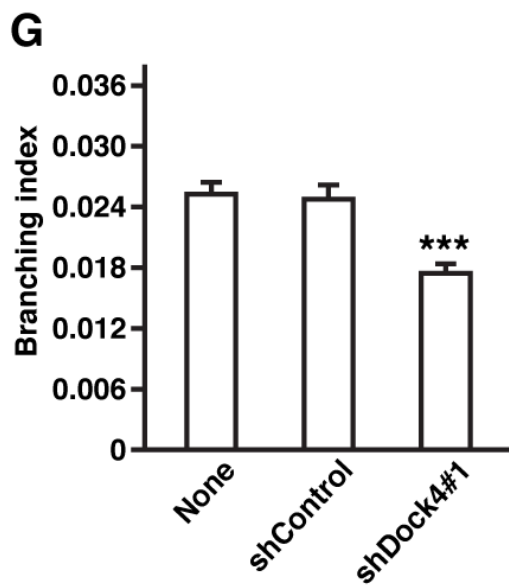
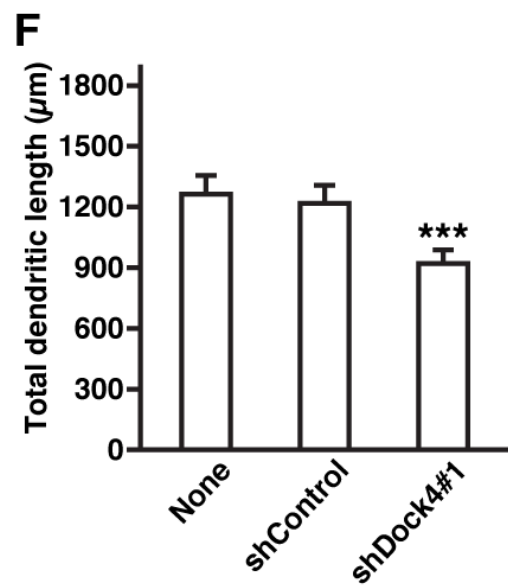
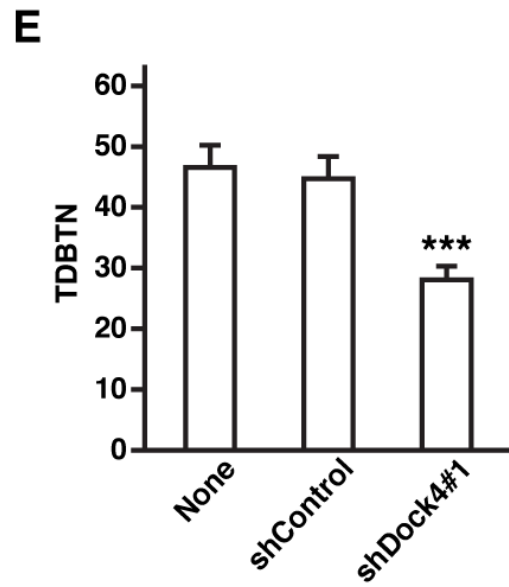
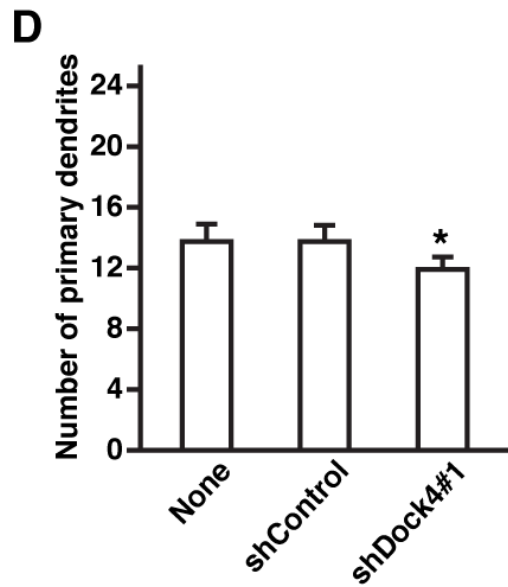
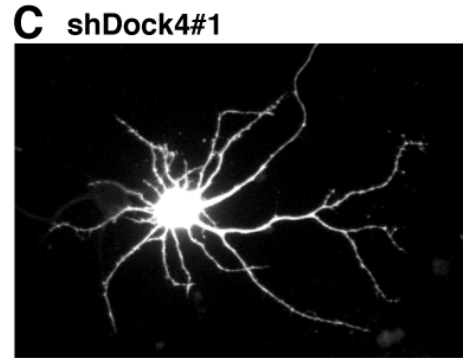
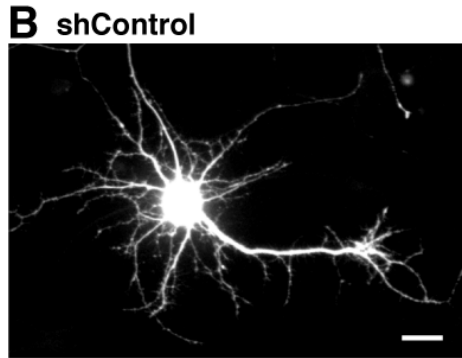
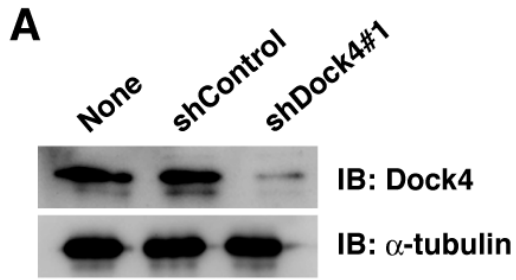
続いて、海馬ニューロンの形態形成における Dock4 の機能を調べるため、ラットの初代培養海馬ニューロンを用いて実験を行った。培養海馬ニューロンにおける Dock4 の成長に伴った発現量の変化を、イムノブロットイングにより解析したところ、培養 3 日目から 8 日目の間に急激な発現量の上昇が見られた (Fig. 2-2A)。これは、樹状突起の伸展の始まる stage III から stage IV にあたる (Fig. 1-1B)。次に、培養 8 日目の海馬ニューロンにおける Dock4 の細胞内局在を調べた。抗 Dock4 抗体を用いて免疫細胞染色を行ったところ、細胞体から MAP2 陽性な樹状突起にかけて Dock4 のシグナルが認められた (Fig. 2-2B)。特に樹状突起の分枝点でより強いシグナルが検出された (Fig. 2-2B; 矢頭)。以上の結果から、Dock4 が海馬ニューロンの樹状突起に局在し、樹状突起の形態形成に関与していることが示唆される。

内在性 Dock4 のノックダウンは海馬ニューロンの正常な樹状突起形成を阻害する

次に、樹状突起の形態形成における Dock4 の関与を調べるため、ショートヘアピン RNA (shRNA) を用いた RNA 干渉による内在性 Dock4 のノックダウンを行った。Dock4 cDNA の 2 つの異なる配列をターゲットとする shRNA を設計したところ、1 つは内在性の Dock4 の発現を効果的に抑制したが、もう 1 つは発現量に影響しなかったため、それぞれ shDock4#1、shControl として用いた (Fig. 2-3A)。培養 4 日目の海馬ニューロンに EYFP と shRNA の発現ベクターを導入し、樹状突起の発達が著しい 8 日目に固定し観察した。shControl を発現させた海馬ニューロンでは、EYFP 発現ベクターのみ遺伝子導入したニューロンと比較して、樹状突起の形態に大きな変化は見られなかった (Fig. 2-3B)。一方、shDock4#1 を発現させた海馬ニューロンでは、樹状突起の分枝が減少した (Fig. 2-3C)。実際に樹状突起形成への影響を定量的に解析するため、細胞体から伸びる樹状突起の本数

Fig. 2-3 Dock4 のノックダウンは正常な樹状突起形成を阻害する

(A) shRNA 発現ベクターを導入した海馬ニューロンを培養 6 日目に回収し、細胞溶解物を SDS-PAGE およびイムノブロットイングを行い、抗 Dock4 抗体により検出した。内部標準として抗 α -tubulin 抗体を用いた。(B, C) 培養 4 日目の海馬ニューロンに EYFP および shRNA の発現ベクターを導入し、培養 8 日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、EYFP の蛍光で形態を観察した。(D-G) 同様の条件で、EYFP および shRNA の発現ベクターを導入した海馬ニューロンの樹状突起の形態を定量した。それぞれの処理群に対して、3 回の独立した実験から合計 60 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。 $*P < 0.05$; $***P < 0.001$ (vs. shControl; Dunnett test)。スケールバー: 20 μ m。



(Number of primary dendrite)、樹状突起の分枝の数 (TDBTN, total dendritic branch tip number)、樹状突起の長さの総計 (Total dendritic length) を測定したところ、Dock4 をノックダウンしたニューロンではいずれも有意に減少していた (Fig. 2-3D-F)。さらに、樹状突起の分枝の頻度の指標である単位長さあたりの分枝数 (Branching index) も Dock4 をノックダウンしたニューロンでは低下していた (Fig. 2-3G)。以上の結果から、Dock4 が海馬ニューロンの正常な樹状突起形成に必要であることが示唆された。

海馬ニューロンにおいて Dock4 は ELMO2 と結合する。

Dock4 は他の Dock ファミリー蛋白質と同様に、DHR-1 ドメインと DHR-2 ドメインの2つの保存された領域を持つ。私の所属する研究室では、Dock4 の DHR-2 ドメインが、Rho ファミリーG 蛋白質の Rac1 と結合し、活性化する GEF ドメインであることを明らかにした (Fig. 2-4A; Hiramoto et al., 2006)。また、Dock4 は N 末端側の SH3 ドメインを含む領域で ELMO と結合して複合体を形成し、この ELMO-Dock4 複合体が Rac1 に対する機能的な GEF として働くことが明らかになっている (Lu et al., 2005; Hiramoto et al., 2006)。ELMO は脳では ELMO1 と ELMO2 の2つのサブタイプが存在することが報告されているが、発達期の海馬ニューロンにおいては ELMO2 が主に発現している (Katoh et al., 2006a)。初代培養海馬ニューロンにおける、成長に伴った ELMO2 の発現量の変化を、抗 ELMO2 抗体を用いてイムノブロッティングにより解析したところ、Dock4 と同様に、培養3日目から

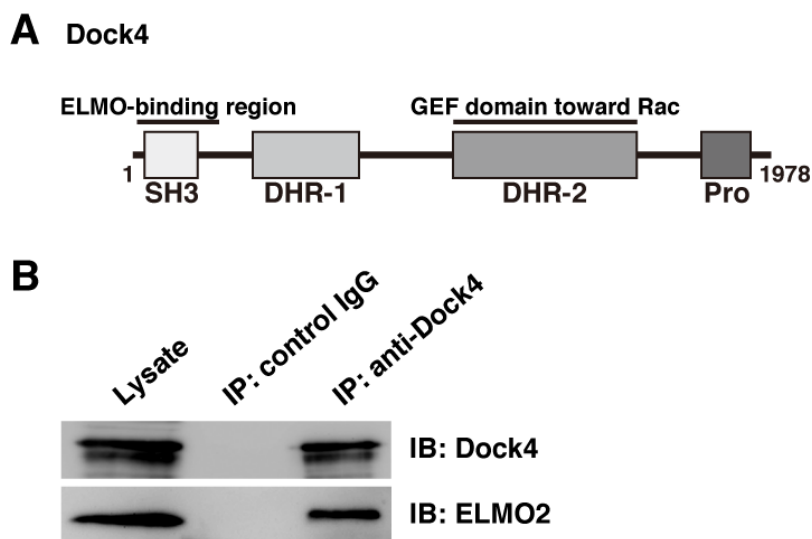


Fig. 2-4 Dock4 は ELMO2 と複合体を形成している

(A) Dock4 のドメイン構造 (SH3, Src-homology 3 domain; DHR, Dock-homology region; Pro, proline-rich region)。数字はアミノ酸配列の番号を示す。(B) 培養 8 日目の海馬ニューロンの細胞溶解物を、抗 Dock4 抗体を用いて免疫沈降を行った後、結合蛋白質を SDS-PAGE、抗 Dock4 抗体および抗 ELMO2 抗体によるイムノブロッティングで検出した。

8日目の間に発現量の上昇が見られた (Fig. 2-2A)。また、海馬ニューロンを培養8日目に回収し、抗 Dock4 抗体による免疫沈降を行ったところ、Dock4 と ELMO2 の結合が確認された (Fig. 2-4B)。以上の結果から、Dock4 と ELMO2 は海馬ニューロンでも複合体を形成しており、ELMO2-Dock4 複合体として樹状突起形成に関与していると考えられる。

Dock4 と ELMO2 を過剰発現させると樹状突起の分枝が増加する

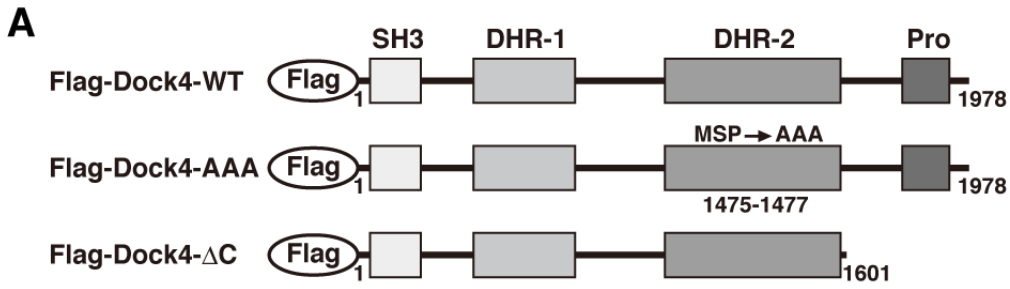
樹状突起形成への Dock4 の関与をさらに詳しく調べるため、培養海馬ニューロンに Dock4 を過剰発現させ、樹状突起の形態を解析した。海馬ニューロンには培養3日目に遺伝子導入を行い、培養7日目に固定、観察した。Dock4 の結合分子である ELMO2 を単独で発現させたニューロンでは、樹状突起の形態に大きな変化は見られなかった (Fig. 2-5B)。しかし、ELMO2 と野生型 Dock4 (Dock4-WT) を共発現させたニューロンでは、樹状突起に細かい分枝の増加が見られた (Fig. 2-5C)。実際に樹状突起の形態を定量的に解析したところ、樹状突起の本数 (Number of primary dendrites; Fig. 2-5F)、分枝の数 (TDBTN; Fig. 2-5G)、長さの総計 (Total dendritic length; Fig. 2-5H)、および分枝の頻度 (Branching index; Fig. 2-5I) に有意な増加が見られた。Dock4-WT を単独で発現させたニューロンでは、Dock4 の発現が非常に弱く、このような樹状突起の形態の変化はほとんど見られなかった (data not shown)。これは、以前に Dock180 に関して報告があるように、Dock4 が ELMO と結合していない状態では、ユビキチン化され分解されてしまうためだと考えられる (Makino et al., 2006)。以上の結果から、Dock4-ELMO2 複合体が海馬ニューロンの樹状突起の分枝を促進していることが示唆された。

Dock4 は Rac1 の活性化を介して樹状突起分枝を制御する

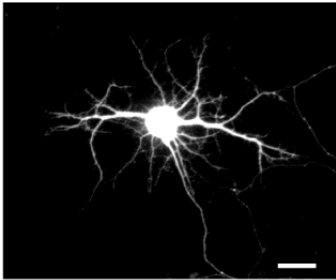
次に、Dock4 による Rho ファミリーG 蛋白質 Rac1 の活性化が、海馬ニューロンの樹状突起の形態制御に必要であるかを調べるため、Rac1 を活性化できない変異体である Dock4-AAA を用いて実験を行った (Fig. 2-5A; Hiramoto et al., 2006)。培養海馬ニューロンに Dock4-AAA と ELMO2 を共発現させたところ、Dock4-WT と ELMO2 の共発現によって見られた樹状突起の分枝の増加は見られなかった (Fig. 2-5D)。定量的結果、Dock4-AAA と ELMO2 を共発現させたニューロンは、Dock4-WT と ELMO2 を共発現させたニューロンと比較して、樹状突起の本数、分枝の数、長さ、分枝の頻度のいずれも有意に減少していた (Fig. 2-5F-I)。このことから、Dock4-ELMO2 複合体による海馬ニューロンの樹状突起分枝の制御には、Rac1 の活性化が必要であることが示された。

Dock4 の C 末端側にあるプロリンリッチ領域が樹状突起分枝制御に重要である

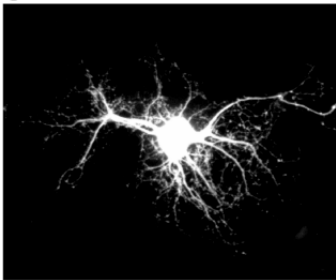
Dock4 は N 末端側の ELMO 結合領域に含まれる SH3 ドメイン、Dock ファミリー蛋白質に共通な DHR-1、DHR-2 ドメインの他に、特徴的な機能ドメインとして C 末端側にプロ



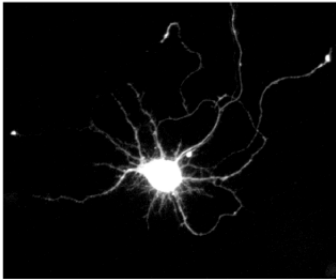
B ELMO2



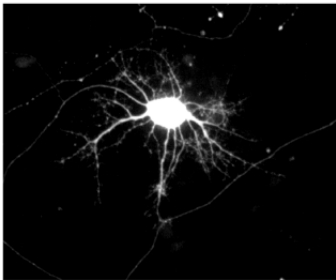
C ELMO2 + Dock4-WT



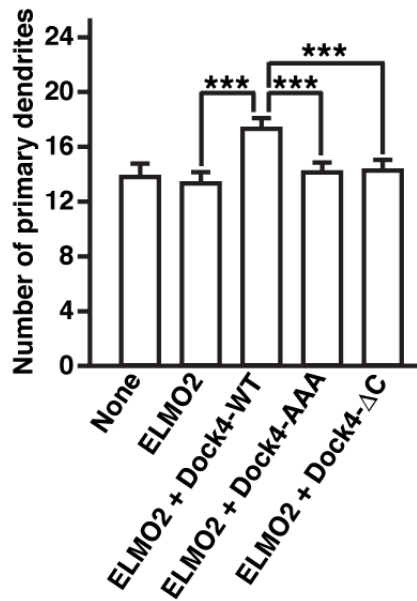
D ELMO2 + Dock4-AAA



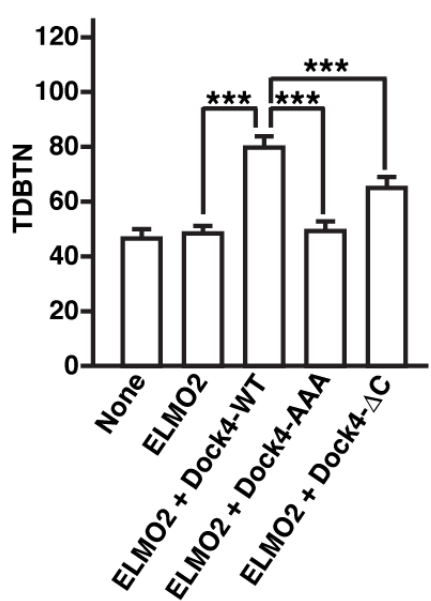
E ELMO2 + Dock4- Δ C



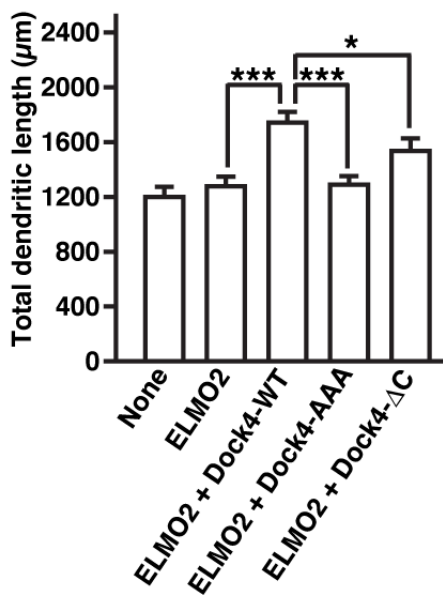
F



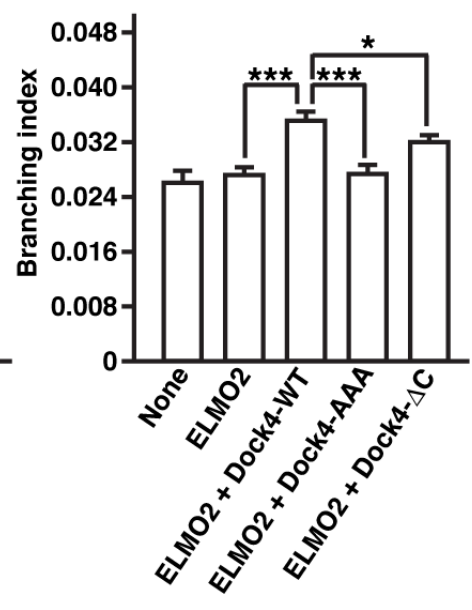
G



H



I



リンリッチな領域を持つ (Fig. 2-4A)。このプロリンリッチ領域が Dock4 による樹状突起分枝の制御に必要であるかを調べるため、プロリンリッチ領域を含む C 末端領域を欠損した Dock4 の変異体 Dock4- Δ C を用いて実験を行った (Fig. 2-5A)。培養海馬ニューロンに Dock4- Δ C と ELMO2 を共発現させたところ、Dock4-WT と ELMO2 を共発現させた際に見られた樹状突起分枝の増加が抑制された (Fig. 2-5E)。実際に定量を行ったところ、Dock4- Δ C と ELMO2 を共発現させたニューロンは、Dock4-WT と ELMO2 を共発現させたニューロンに比べ、樹状突起の本数、分枝の数、長さ、分枝の頻度のいずれも低い値を示した (Fig. 2-5F-I)。この結果から、Dock4 による海馬ニューロンの分枝の増加に、プロリンリッチ領域が関与していることが示唆された。

Fig. 2-5 野生型 Dock4 と Dock4 変異体の過剰発現による樹状突起形態の変化

(A) 本研究に用いた Dock4 のコンストラクト。数字はアミノ酸配列の番号を示す。(B-E) 培養 3 日目の海馬ニューロンに EYFP および表示された遺伝子の発現ベクターを導入し、培養 7 日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、EYFP の蛍光で形態を観察した。(F-I) 同様の条件で遺伝子導入した海馬ニューロンの樹状突起の形態を定量した。それぞれの処理群に対して、3 回の独立した実験から合計 60 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (vs. shControl; Dunnett test)。スケールバー: 20 μ m。

2-2 考察

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、細胞骨格の制御を行うことでニューロンの形態変化に重要な役割を担っている。初代培養ニューロンを用いた研究によって、Rho ファミリー G 蛋白質の、樹状突起の形成を含めたニューロンの形態制御における役割が明らかにされてきた (Van Aelst and Cline, 2004; Govek et al., 2005, Negishi and Katoh, 2005)。本章で私は、Rac 活性化因子である Dock4 が海馬ニューロンに強く発現しており、Rac の活性化を介して樹状突起の発達を促進的に制御していることを明らかにした。Dock4 と ELMO2 を過剰発現させることで、培養海馬ニューロンの樹状突起の分枝は増加し、逆に、内在性の Dock4 をノックダウンすることで樹状突起の正常な発達、分枝形成は阻害された。これらの結果は、海馬ニューロンの樹状突起の形態形成期における、Dock4 による新たな Rac の活性調節機構を示唆するものである。

ニューロンの成長に伴う発現量の変化を調べた研究から、Dock4 は樹状突起形成の始まる時期 (stage IV) から発現が上昇し、樹状突起の成熟やシナプス形成の行われる発達後期 (stage V)、さらにその後も発現が持続していることが確認された。このことから、Dock4 は樹状突起の形態形成の制御、シナプス形成や樹状突起スパイン形成の制御、さらには形成された神経回路の維持などにも関わっていることが予測される。そこで本章では樹状突起形成期における Dock4 の機能に焦点をあて研究を進めた。シナプス形成期における Dock4 の機能については、第3章で報告している。また、脳での発現分布を調べた実験において、Dock4 は嗅球や小脳でも発現が確認された。このことから、海馬以外のこれらの領域のニューロンにおいても、Dock4 は形態形成に関与していることが考えられる。

これまで Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の GEF としては、DH-PH ドメイン (Dbl homology-pleckstrin homology tandem domain) を持つ、Dbl ファミリー蛋白質が知られてきた。ところが近年、Dock180 を代表とする DH-PH ドメインを持たない GEF ファミリー、Dock ファミリー蛋白質が同定された (Brugnera et al., 2002; Meller et al., 2002; Côté and Vuori, 2002)。Dock ファミリー蛋白質は DH-PH ドメインの代わりに DHR-2 ドメインを持っており、この DHR-2 ドメインが Rho ファミリー G 蛋白質に対して GEF 活性を示すことが知られている。これまでの研究で、Dock4 は *in vitro* で Rac と直接結合し活性化する GEF であるということが報告されてきた (Lu et al., 2005; Hiramoto et al., 2006)。本研究では、野生型の Dock4 と ELMO2 を過剰発現させることで樹状突起の発達が促進されるが、一方で、DHR-2 ドメインに変異を入れ、Rac に対する GEF 活性をなくした Dock4-AAA 変異体では樹状突起の発達を促進しないことを明らかにした。このことは、Dock4 が Rac の活性化を介して、海馬ニューロンの樹状突起の形態制御を行っていることを示唆するものである。これまでの初代培養ニューロンを用いた研究から、Rac は樹状突起の発達に促進的に働くことが言われてきた。優性阻害型の Rac1 は、樹状突起の伸長や分枝を著しく減少させ、

逆に Rac1 の活性を高めることで、樹状突起の伸長や分枝は促進される (Threadgill et al., 1997; Li et al., 2000; Wong et al., 2000; Hayashi et al., 2002; Sin et al., 2002; Rosso et al., 2005)。Rac1 は活性化されるとアクチン重合を引き起こし、ラメリポディアを形成する (Jaffe and Hall, 2005)。アクチン骨格制御に関わる Rac の下流シグナルとしては、Arp2/3 複合体を活性化する IRSp53 (insulin receptor substrate p53)–WAVE2 (WASP family Verprolin-homologous protein) シグナル経路が知られている (Takenawa and Miki, 2001)。Arp2/3 複合体は活性化されると、アクチン重合およびアクチンフィラメントの分枝化を促進し、ラメリポディアを形成する (Welch and Mullins, 2002; Pollard and Borisy, 2003)。また別の下流シグナルとして、cofilin をリン酸化する PAK (p21-activated kinase)–LIM kinase も知られている (Bokoch, 2000)。Cofilin はアクチンフィラメントの脱重合を行うが、リン酸化されると活性が阻害され、結果としてアクチン重合が促進される (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998; Edwards et al., 1999)。また PAK は、微小管を不安定化する分子である stathmin をリン酸化し阻害することで、微小管の再構築も制御する (Daub et al., 2001; Wittmann et al., 2003)。以上のことから、Dock4 によって活性化された Rac が、アクチンフィラメントや微小管を制御し細胞骨格の再構築を行うことで、樹状突起の発達に関与していることが考えられる。

本研究で私は、培養海馬ニューロン樹状突起の形成、発達が進む stage IV において、Dock4 が ELMO2 と複合体を形成していることを明らかにした。ELMO は Dock180 の結合蛋白質として同定された分子であり、近年の研究から Dock180 による Rac の活性化には ELMO との結合が必要であるということが報告されている (Gumienny et al., 2001; Brugnera et al., 2002; Grimsley et al., 2004; Lu et al., 2004; Lu et al., 2005)。Dock180 と同様に、Dock4 による Rac の活性化や細胞運動の促進にも ELMO との結合は必要である (Hiramoto et al., 2006)。このことから、本研究の培養海馬ニューロンにおいても、Dock4 は ELMO2 と複合体を形成することで樹状突起の分枝を促進していると考えられる。また、私の所属する研究室では以前に、Dock180、Dock4 の結合分子である ELMO が Rho ファミリー G 蛋白質の 1 つである RhoG のエフェクターであることを明らかにした (Katoh and Negishi, 2003; Hiramoto et al., 2006)。活性型である GTP 結合型 RhoG は ELMO と直接結合し複合体を形成することで、ELMO–Dock180 複合体を細胞質から細胞膜へと移動させ、そこで Rac を活性化させる。よって RhoG は、Dock180 がアポトーシス細胞の貪食や細胞移動などの機能を発揮する上で、重要な上流因子であると言える (deBakker et al., 2004; Katoh et al., 2006b; Tosello-Tramont et al., 2007)。活性型の RhoG は ELMO–Dock4 複合体に対しても細胞質から細胞膜への移行を行い、細胞運動やがん細胞の浸潤を促進することが報告されているので (Hiramoto et al., 2006; Fig. 1-4)、本研究の Dock4 による樹状突起の制御にも RhoG が上流因子として関与していることが考えられる。実際に近年、RhoG–ELMO–Dock180 シグナルによる Rac の活性化が海馬ニューロン樹状突起の形態形成に関与しているということが報告された (Franke et al., 2012)。また、RhoG–ELMO–Dock3 シグナルによる Rac の活性化

が PC12 細胞の神経突起伸長を促進するということが報告された (Namekata et al., 2012)。しかし私は、培養した海馬ニューロンにおいて、内在性の RhoG 蛋白質を検出することができなかった (data not shown)。また、私の所属する研究室では以前に、発達期のラットの脳では RhoG がニューロンではなくオリゴデンドロサイトに主に発現していることを報告している (Ishikawa et al., 2002)。本研究での Dock4 による樹状突起形成の上流に RhoG が関与しているかどうかは、さらに調査していく必要がある。

Dock4 は、Dock ファミリー蛋白質に共通の DHR-1、DHR-2 ドメイン、N 末端側の ELMO 結合領域に含まれる SH3 ドメインの他に、C 末端側に特徴的な機能ドメインとしてプロリンリッチな領域を持つ (Fig2-4A)。本研究では、野生型 Dock4 と ELMO2 の共発現によって樹状突起の分枝が増加したが、C 末端領域を欠損した Dock4 変異体では野生型 Dock4 と比較して樹状突起の分枝の増加は少なかった。この結果から、Dock4 による樹状突起の形態形成制御にプロリンリッチ領域が重要な役割を担っていると考えられる。これまでの報告から、Dock4 のプロリンリッチ領域には、アダプター蛋白質の Crk が結合することが知られている (Yajnik et al., 2003)。Crk ファミリーに属する蛋白質は、成長因子やインテグリンなどの様々な細胞外からの刺激に対して、p130Cas などと複合体を形成することで細胞内にシグナルを伝達する分子である (Feller, 2001)。Crk ファミリー蛋白質は、細胞の形態変化や運動性などに関与していることが知られており、樹状突起の発達を含めたニューロンの形態制御にも関わっている (Matsuki et al., 2008)。このことから、Dock4 による樹状突起の形態制御に Crk との結合が関与している可能性もある。一方で、Crk は Dock180 とプロリンリッチ領域を介して結合することが知られているが (Hasegawa et al., 1996)、Dock180 と ELMO2 を共発現させても、樹状突起の形態に大きな変化は見られなかった (data not shown)。Dock4 は Dock180 とドメイン構造が似ており、共通するシグナル伝達経路も多く持つが、このような表現系の違いから、Dock4 特異的なシグナル経路の存在が考えられる。そのため、Dock4 の新規結合分子の探索を行い、樹状突起形態制御へのその他の分子の関与も検討していかなければならない。

まとめとして本章では、Dock4 が Rac1 の活性化を介して海馬ニューロンの樹状突起の発達を制御していることを明らかにした。今後は、上流のシグナル伝達経路や、他の Rac の活性調節因子との制御機構の違いを明らかにしていくことで、複雑な神経回路形成における時間的、空間的な Rac の活性調節が明らかになると考えられる。

第3章 (第2部)

Rac 活性化因子 Dock4 による

海馬ニューロン樹状突起スパイン形成の制御

3-1 結果

Dock4 はシナプス形成期に樹状突起スパインに強く局在している

始めに、海馬ニューロンのシナプス形成期における Dock4 の細胞内局在を調べた。生後 20 日齢 (P20) のラットの脳切片に対し、抗 Dock4 抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、海馬において、アンモン角の錐体細胞および歯状回の顆粒細胞に強いシグナルが認められた (Fig. 3-1A)。これは Dock4 mRNA の発現分布と一致する (Fig. 2-1B)。CA1 領域の錐体細胞に注目すると、樹状突起のマーカーである MAP2 のシグナルに沿って、点状に Dock4 のシグナルが認められた (Fig. 3-1B, C)。さらに詳しく Dock4 の細胞内局在を調べるため、培養 15 日目の海馬ニューロンに対し、抗 Dock4 抗体を用いて免疫細胞染色を行ったところ、細胞体から樹状突起にかけて Dock4 のシグナルが認められた (Fig. 3-2A)。樹状突起を高倍率で観察すると、Dock4 は F-actin やポストシナプスのマーカーである PSD95 と共局在していることがわかった (Fig. 3-2B, C; 矢頭)。一方で、Dock4 はプレシナプスのマーカーである synaptophysin とは共局在せず、隣接したシグナルが認められた (Fig. 3-2D;

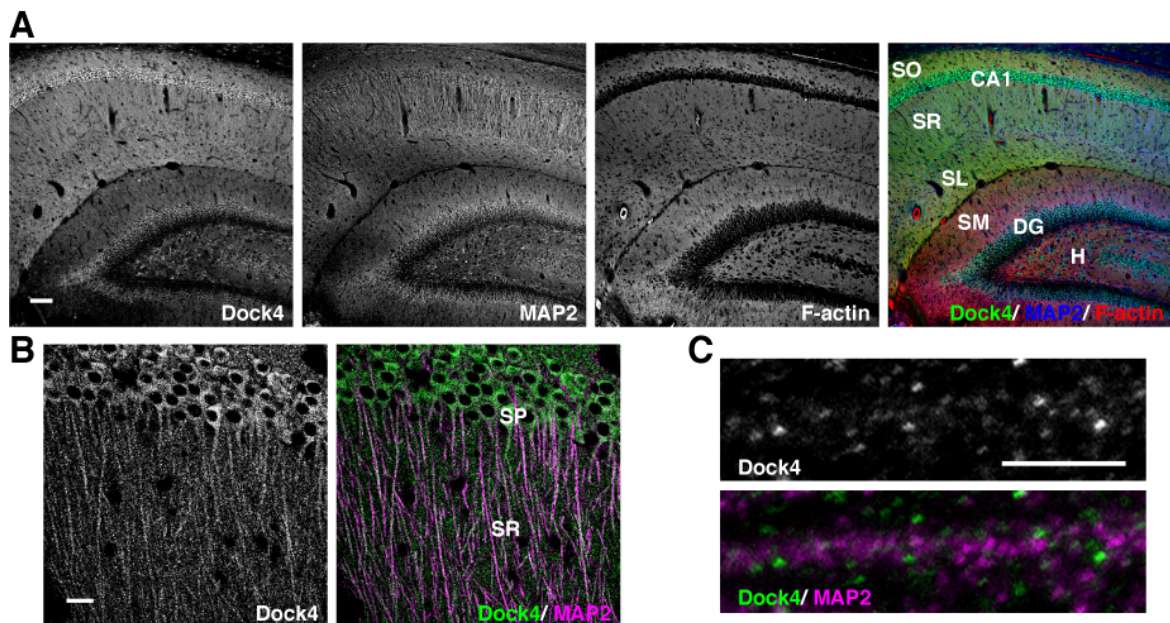


Fig. 3-1 Dock4 はシナプス形成期の海馬ニューロンに発現している

(A) 生後 20 日齢 (P20) ラットの脳の冠状切片に対し、抗 Dock4 抗体および抗 MAP2 抗体を用いて免疫組織染色を行った。F-actin はファロイジン染色によって可視化した。(B) CA1 領域の錐体細胞。(C) CA1 領域の錐体細胞の樹状突起。CA, アンモン角; DG, 歯状回; H, 門; SO, 上行層; SR, 放射層; SL, 網状層; SM, 分子層; SP, 錐体細胞層。スケールバー: (A), 100 μ m; (B), 20 μ m; (C), 5 μ m。

矢頭)。実際に水色の線に沿った蛍光強度の解析したところ、Dock4 のシグナルのピークは F-actin や PSD95 のシグナルのピークと重なったが、synaptophysin のシグナルのピークは重ならなかった (Fig. 3-2D-F)。以上の結果から、シナプス形成期の海馬ニューロンにおいて、Dock4 はシナプス後部構造体である樹状突起スパインに強く局在していることが明らかになった。

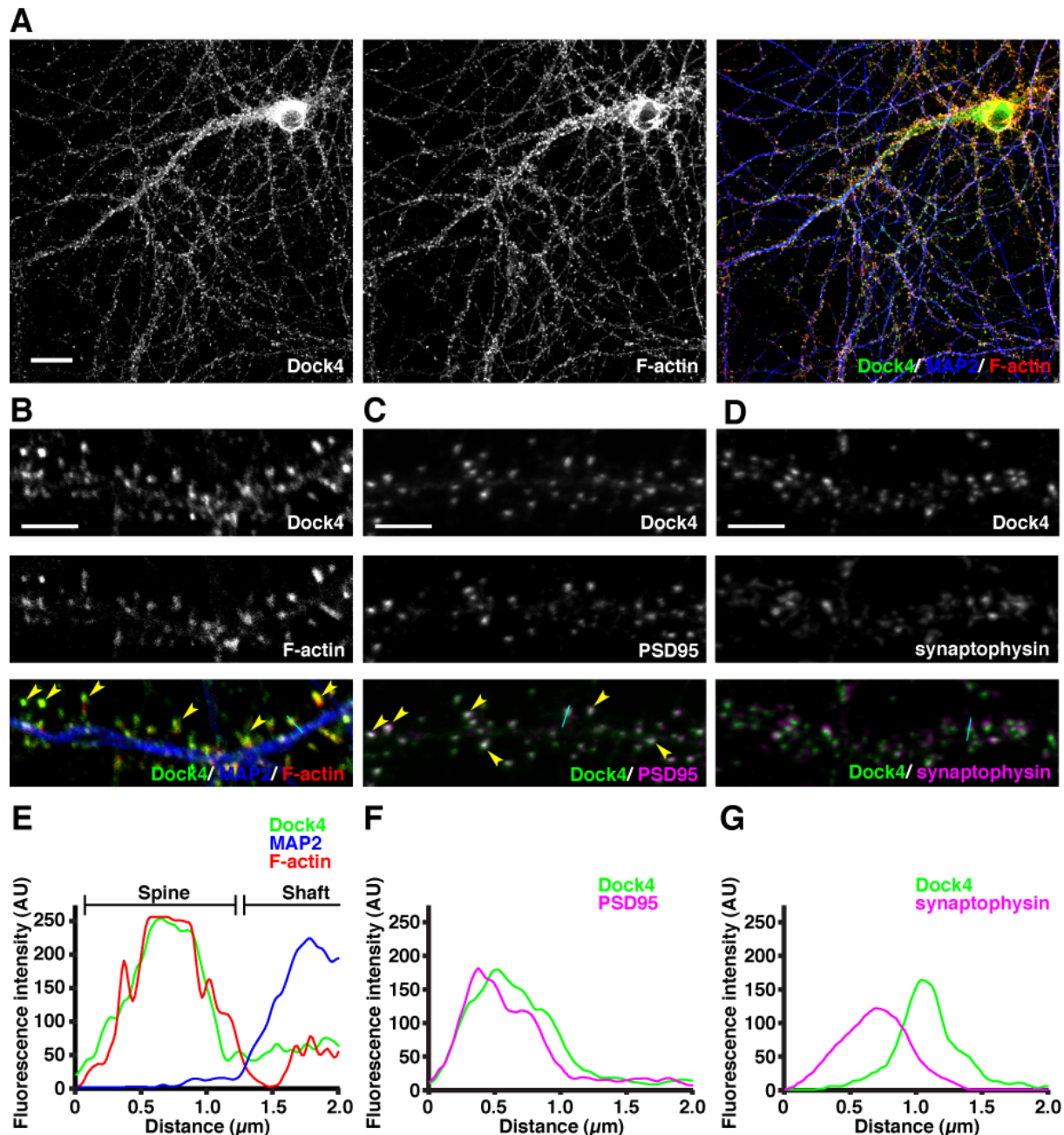


Fig. 3-2 Dock4 は樹状突起スパインに強く局在している

(A-D) 初代培養海馬ニューロンを培養 15 日目に固定し、抗 Dock4 抗体、抗 MAP2 抗体 (樹状突起マーカー)、抗 PSD95 抗体 (ポストシナプスマーカー)、抗 synaptophysin 抗体 (プレシナプスマーカー) を用いて免疫染色を行った。F-actin はファロイジン染色によって可視化した。黄色の矢頭は (B) Dock4 と F-actin、(C) Dock4 と PSD95 が共局在している場所を指している。スケールバー: (A), 20 μm ; (B-D), 5 μm 。(E-G) それぞれ B-D の染色における水色のライン上の蛍光強度を定量し、グラフに表した。

内在性 Dock4 のノックダウンは樹状突起スパインの形成を阻害する

次に、樹状突起スパインに局在する Dock4 の生理的機能を解析するため、shRNA を用いた内在性 Dock4 のノックダウンを行った。第 2 章で用いた shRNA に加え、新たに Dock4 の異なる配列をターゲットとする shRNA (shDock4#2) を作製した。これらの shRNA の有効性を検証するため、HEK293T 細胞に Flag タグを付加した Dock4 と共発現させ、免疫ブロットニングにより確認した。shDock4#1、shDock4#2 は、ともに Dock4 の発現を効果的に抑制するが、shControl は Dock4 の発現に影響を与えないが確かめられた (Fig. 3-3A)。抗 Dock4 抗体を用いた免疫細胞染色の結果から、培養海馬ニューロンの内在性 Dock4 の発現に対しても、同様の効果が確認された (Fig. 3-3B)。これらの shRNA と EYFP の発現ベクターを培養 11 日目の海馬ニューロンに導入し、樹状突起スパイン形成の顕著な 15 日目に固定し形態を観察した。shControl を発現させた海馬ニューロンでは、EYFP 発現ベクターのみ遺伝子導入したニューロンと比較して、樹状突起スパインの形成に大きな変化は見られなかった (Fig. 3-3C, D)。一方で、shDock4#1、shDock4#2 を発現させた海馬ニューロンでは、樹状突起スパインの数が減少した (Fig. 3-3E, F)。実際に樹状突起上のスパインの密度を定量したところ、Dock4 をノックダウンしたニューロンではどちらも有意に減少していた (Fig. 3-3G)。マッシュルーム型のスパイン頭部を持たない樹状突起フィロポディアは、樹状突起スパインの前駆体であると考えられているが (Yuste and Bonhoeffer, 2004)、フィロポディアの密度においても、shDock4#1 では有意に減少し、shDock4#2 でも減少の傾向が見られた (Fig. 3-3G)。以上の結果から、Dock4 が海馬ニューロンの樹状突起スパインの形成に必要であることが示唆された。

Dock4 は Rac1 の活性化を介して樹状突起スパイン形成を制御する

さらに樹状突起スパイン形成における Dock4 の機能を詳しく調べるため、shDock4#1 のターゲット配列にサイレント変異を入れた、Dock4 の RNA 干渉耐性変異体 (Dock4-res) を作製した (Fig. 3-4A)。HEK293T 細胞に shDock4#1 と Flag タグを付加した Dock4-res を共発現させ、免疫ブロットニングを行ったところ、shDock4#1 によってノックダウンされないことが確認された (Fig. 3-3A)。また、海馬ニューロンでの免疫細胞染色の結果から、Dock4-res を共発現させることで shDock4#1 による Dock4 の発現の減少が回復することも確認された (Fig. 3-4B)。培養海馬ニューロンに shDock4#1 と野生型 Dock4-res (Dock4-res-WT) を導入し、形態を観察したところ、shDock4#1 による樹状突起スパインの減少がコントロールと同程度まで回復した (Fig. 3-4C-E, H)。この結果から、shDock4#1 による樹状突起スパインの減少が、オフターゲットの効果である可能性が否定された。

続いて、Rac に対する GEF 活性をなくした Dock4-res の変異体 (Dock4-res-AAA; Fig. 2-5A) を shDock4#1 と共発現させ、形態を観察したところ、shDock4#1 による樹状突起スパインの減少は回復しなかった (Fig. 3-4F, H)。このことから、樹状突起スパインの形成に

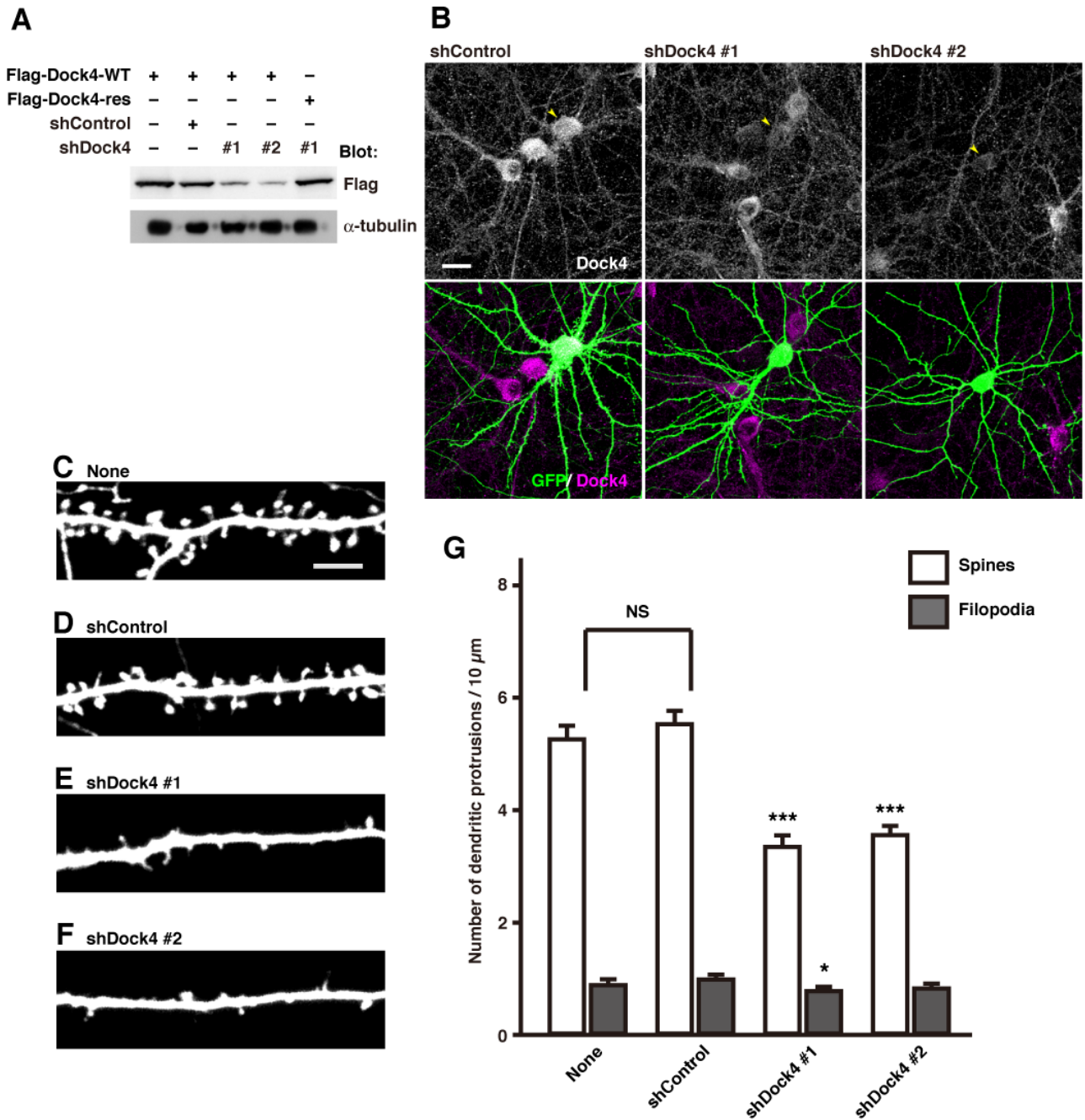


Fig. 3-3 Dock4 のノックダウンは樹状突起スパイン形成を阻害する

(A) Flag-Dock4 および shRNA 発現ベクターを導入した HEK293T 細胞を回収し、細胞溶解物を SDS-PAGE およびイムノブロッティングを行い、抗 Flag 抗体により検出した。内部標準として抗 α -tubulin 抗体を用いた。(B) 海馬ニューロンを培養 11 日目に EGFP および shRNA の発現ベクターを導入、培養 15 日目に固定し、抗 Dock4 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。スケールバー: 20 μ m。(C-F) 培養 11 日目の海馬ニューロンに EYFP および shRNA の発現ベクターを導入し、培養 15 日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、EYFP の蛍光で形態を観察した。スケールバー: 5 μ m。(G) 同様の条件で、EYFP および shRNA の発現ベクターを導入した海馬ニューロンの樹状突起スパインおよびフィロポディアの密度を定量した。それぞれの処理群に対して、3 回の独立した実験から合計 45 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (vs. shControl; Tukey's test)。

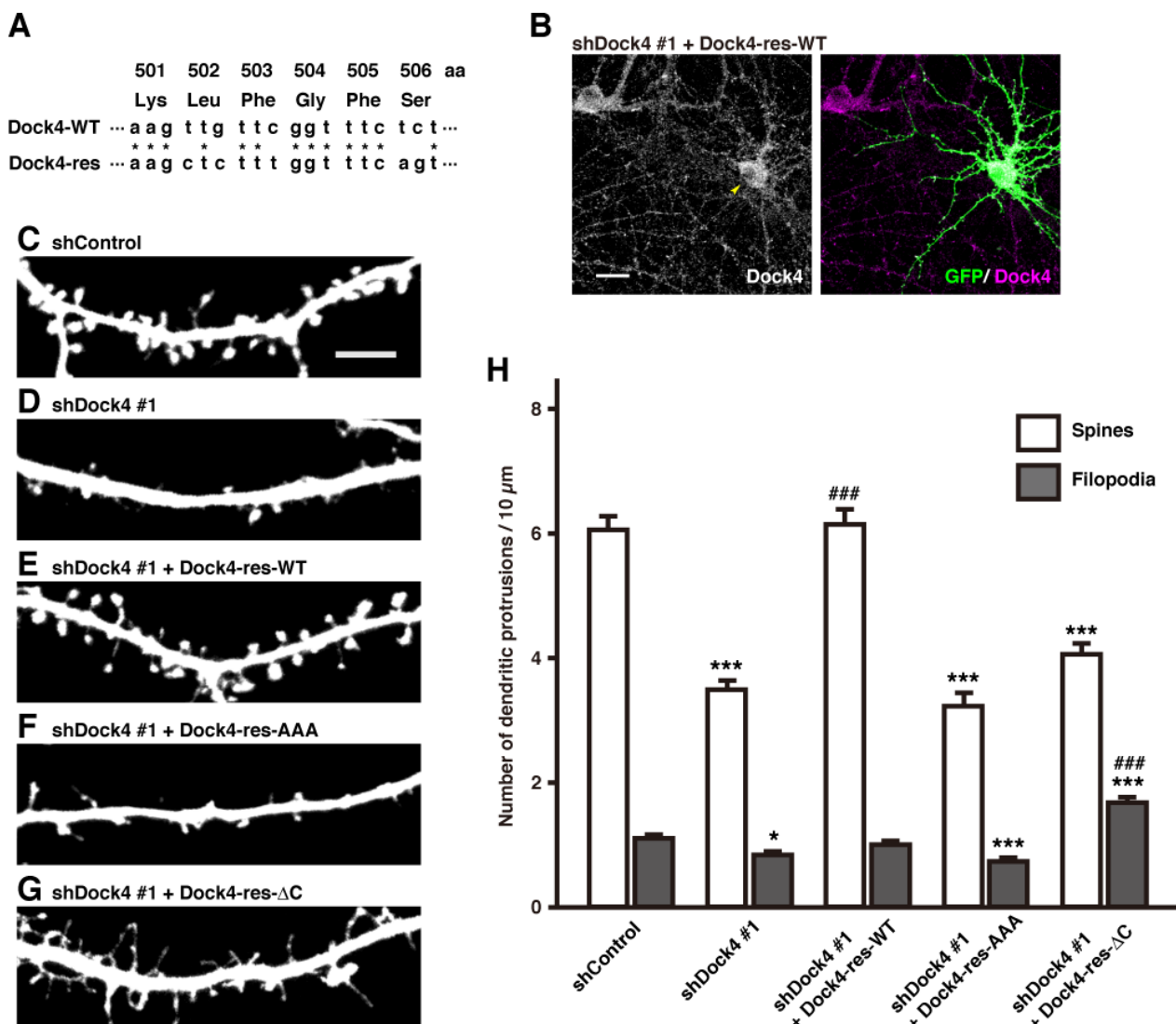


Fig. 3-4 Dock4による樹状突起スパイン形成の制御には Rac への GEF 活性およびプロリンリッチ領域が重要である

(A) shDock4#1 のターゲット配列に対する RNA 干渉耐性変異体 (Dock4-res) のサイレント変異。数字はアミノ酸配列の番号を示す。(B) 海馬ニューロンを培養 11 日目に EGFP、shDock4#1、および Dock4-res の発現ベクターを導入、培養 15 日目に固定し、抗 Dock4 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。スケールバー: 20 μm。(C-G) 培養 11 日目の海馬ニューロンに EYFP と共に表記の発現ベクターを導入し、培養 15 日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、EYFP の蛍光で形態を観察した。スケールバー: 5 μm。(H) 同様の条件で、EYFP および表記の発現ベクターを導入した海馬ニューロンの樹状突起スパインおよびフィロポディアの密度を定量した。それぞれの処理群に対して、3 回の独立した実験から合計 45 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (vs. shControl), ### $P < 0.001$ (vs. shDock4#1; Tukey's test)。

は、Dock4 による Rac1 の活性化が必要であることが示された。

Dock4 のプロリンリッチ領域が樹状突起スパイン形成に重要である

さらに Dock4 によるスパイン形成の制御機構を明らかにするため、プロリンリッチ領域を含む C 末端領域を欠損した Dock4-res の変異体 (Dock4-res- Δ C; Fig. 2-5A) を shDock4#1 と共発現させ、形態を観察した。その結果、Dock4 ノックダウンによる樹状突起スパインの減少は回復しなかったが、樹状突起フィロポディアが有意に増加した (Fig. 3-4G, H)。このことから、Dock4 による樹状突起スパインの形成制御に、プロリンリッチ領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Dock4 はプロリンリッチ領域でアクチン重合制御分子 cortactin と結合する

Dock4 の機能にプロリンリッチ領域が重要であることがわかったので、プロリンリッチ領域に結合する蛋白質を探索した。Dock4 のプロリンリッチ領域を含む C 末端領域 (アミノ酸配列 1602–1978 番目) をベイト蛋白質として、成体ラットの cDNA ライブラリから、酵母 two-hybrid 法を用いて結合蛋白質を探索したところ、いくつかの結合候補分子が得られた。その中の一つで、アクチン結合分子として知られる cortactin の SH3 ドメインを含む C 末端側のフラグメント (アミノ酸配列 403–546 番目、cortactin-CT; Fig. 3-5A) に着目した。Cortactin はアクチンの重合や安定化を制御する分子としてよく知られており (Wu and Parsons, 1993; Uruno et al., 2001; Weaver et al., 2001)、ニューロンでも樹状突起スパイン形成に関与することも報告されている (Hering and Sheng, 2003)。Dock4 と cortactin の結合を確認するため、野生型 cortactin および cortactin 変異体の GST 融合蛋白質を作製し (Fig. 3-5A)、プルダウンアッセイにより Flag-Dock4 との結合を調べたところ、野生型 cortactin (cortactin-WT) および cortactin の SH3 ドメイン (cortactin-SH3) は結合が見られた。一方で、SH3 ドメインを欠損した cortactin (cortactin- Δ SH3)、および SH3 ドメインに変異を入れプロリンリッチ領域を持つ蛋白質との結合をなくした変異体 (cortactin-W525K; Kinley et al., 2003) とは結合しなかった (Fig. 3-5B)。以上の結果から、Dock4 のプロリンリッチ領域が cortactin の SH3 ドメインと結合することがわかった。

これまでの研究から、Dock4 は Dock ファミリー蛋白質のメンバーの一つである Dock180 と共通のシグナル伝達経路を持っており、共に Rac に対する GEF として働くなど、共通した機能も持つことが知られている (Katoh and Negishi, 2003; Katoh et al., 2006b; Hiramoto et al., 2006)。またドメイン構造も似ており、共に C 末端側にプロリンリッチ領域を持っている (Fig. 1-3B)。そこで、Dock180 も Dock4 と同様に cortactin と結合するのかを調べた。Flag-Dock4 または Flag-Dock180 を、HA-ELMO2 および Myc-cortactin-CT と共に HEK293T 細胞に発現させ、抗 Myc 抗体で免疫沈降を行ったところ、cortactin は Dock4 とのみ結合し、Dock180 とは結合しないことがわかった (Fig. 3-5C)。このことは、以前に報告がある

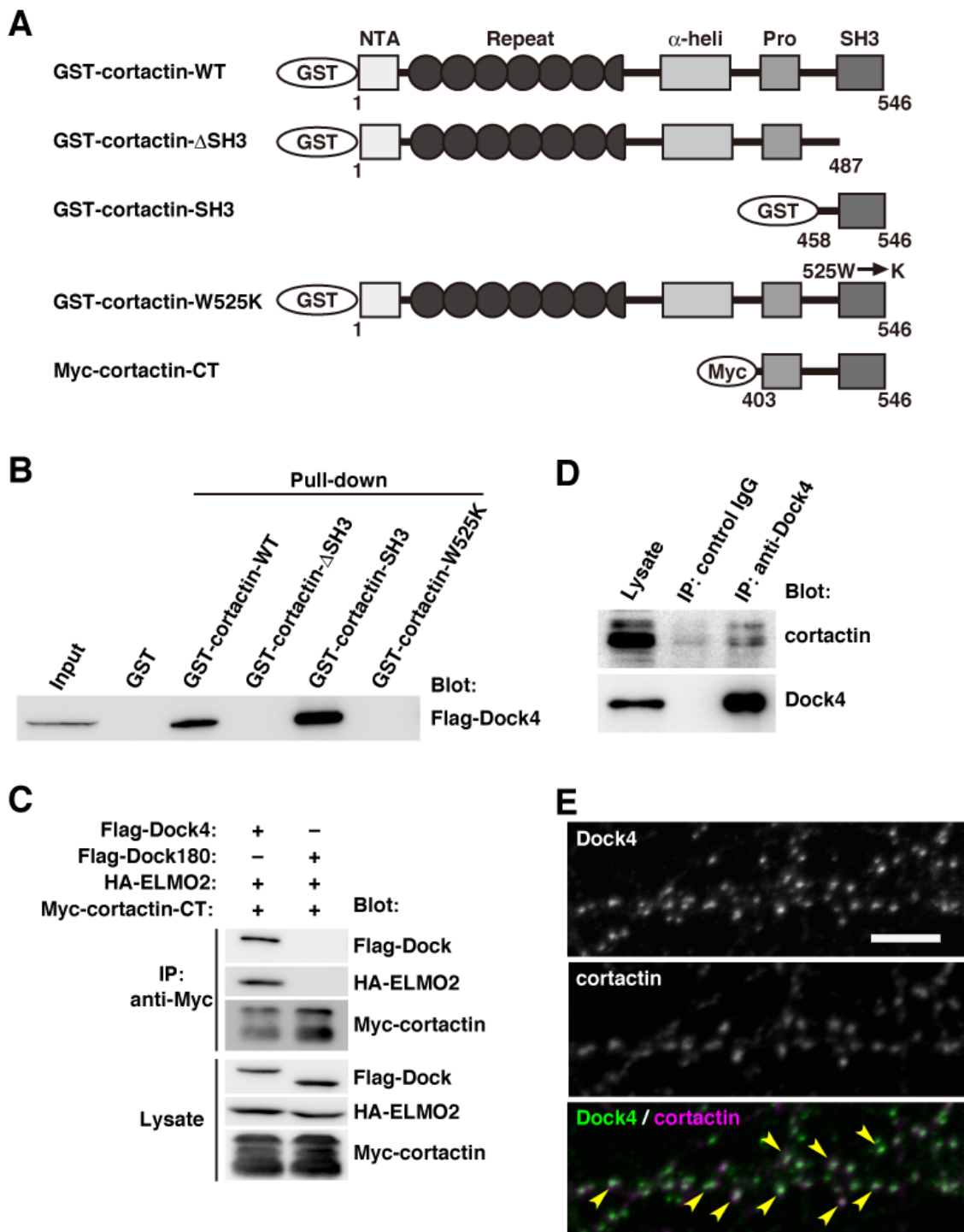


Fig. 3-5 Dock4 はアクチン重合制御分子 cortactin と結合する

(A) 本研究に用いた cortactin のコンストラクト (NTA, N-terminal acidic region; Repeat, tandem repeat of 37-amino acid actin-binding domain; α -heli, α -helical region)。数字はアミノ酸配列の番号を示す。(B) Flag-Dock4 を発現させた HEK293T 細胞の細胞溶解物に対し、GST 融合蛋白質でプルダウンアッセイを行った。結合蛋白質は抗 Flag 抗体による免疫ブロッティングで検出した。(C) HEK293T 細胞に表記の発現ベクターを導入し、細胞溶解物に対し、抗 Myc 抗体による免疫沈降を行った。結合蛋白質は表記のタグに対する抗体による免疫ブロッティングで検出した。(D) 培養 16 日目の海馬ニューロンの細胞溶解物を、抗 Dock4 抗体を用いて免疫沈降を行った後、結合蛋白質を SDS-PAGE、抗 Dock4 抗体および抗 cortactin 抗体による免疫ブロッティングで検出した。(E) 培養 15 日目の海馬ニューロンを固定後、抗 Dock4 抗体および抗 cortactin 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。黄色の矢頭は Dock4 と cortactin が共局在している場所を指している。スケールバー: 5 μ m

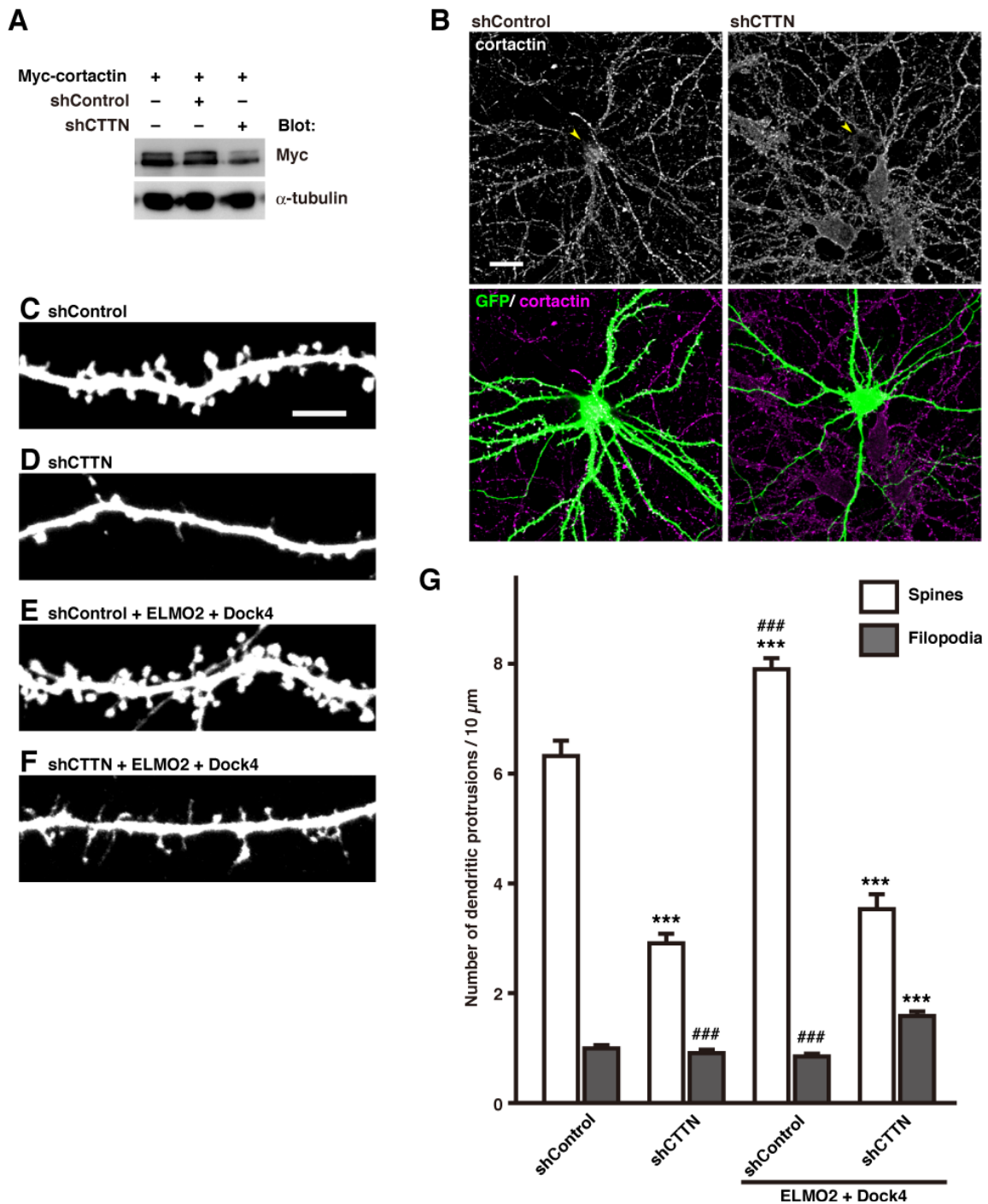


Fig. 3-6 Dock4 による樹状突起スパイン形成の制御には cortactin が必要である

(A) Myc-cortactin および shRNA 発現ベクターを導入した HEK293T 細胞を回収し、細胞溶解物を SDS-PAGE およびイムノブロッティングを行い、抗 Myc 抗体により検出した。内部標準として抗 α -tubulin 抗体を用いた。(B) 海馬ニューロンを培養 11 日目に EGFP および shRNA の発現ベクターを導入、培養 15 日目に固定し、抗 cortactin 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。スケールバー: 20 μm 。(C-F) 培養 11 日目の海馬ニューロンに EYFP と共に表記の発現ベクターを導入し、培養 15 日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、EYFP の蛍光で形態を観察した。スケールバー: 5 μm 。(G) 同様の条件で、EYFP および表記の発現ベクターを導入した海馬ニューロンの樹状突起スパインおよびフィロポディアの密度を定量した。それぞれの処理群に対して、3 回の独立した実験から合計 45 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.001$ (vs. shControl), ### $P < 0.001$ (vs. shCTTN + ELMO2 + Dock4 ; Tukey's test)。

cortactin の SH3 ドメインに結合する蛋白質に共通のアミノ酸配列 (+PPXPPXKP; Sparks et al., 1996) を、Dock ファミリーの中で Dock4 のみが持つ (アミノ酸配列 1796–1803: SPPVPPRP) こととも一致する。

続いて、海馬ニューロンにおいても Dock4 と cortactin が結合するのかを調べた。培養 16 日目の海馬ニューロンを回収し、抗 Dock4 抗体で免疫沈降を行ったところ、内在性の Dock4 と cortactin の結合も確認された (Fig. 3-5D)。さらに、培養 15 日目の海馬ニューロンに対して免疫細胞染色を行ったところ、cortactin は以前にも報告のあるように、樹状突起スパインに強く局在しており (Hering and Sheng, 2003)、Dock4 と共局在していることが確認された (Fig. 3-5E)。これらの結果から、Dock4 と cortactin との相互作用が、樹状突起スパインの形成に重要な働きを担っていることが考えられる。

Dock4 による樹状突起スパイン形成の制御に cortactin は必要である

Dock4 による樹状突起スパイン形成の制御に cortactin が関与しているかどうかを調べるため、cortactin を効果的にノックダウンする shRNA (shCTTN) を作製した (Fig. 3-6A, B)。培養 11 日目の海馬ニューロンに shRNA と EYFP の発現ベクターを導入し、15 日目に固定し形態を観察したところ、shCTTN を発現させた海馬ニューロンでは、shControl と比較して、樹状突起スパインが有意に減少した (Fig. 3-6C, D, G)。続いて、Dock4 を過剰発現させた時のスパイン形成への影響を見た。Dock4 と ELMO2 を、shControl と共発現させたニューロンでは、樹状突起スパインが有意に増加した (Fig. 3-6E, G)。一方で、shCTTN を Dock4 および ELMO2 と共発現させたニューロンでは、Dock4 の過剰発現で見られたような樹状突起スパインの増加は見られず、代わりに樹状突起フィロポディアの増加が認められた (Fig. 3-6E, G)。これは、Dock4 をノックダウンしたニューロンに、Dock4-res- Δ C を発現させた際の表現系 (Fig. 3-4G) と類似している。これらの結果から、cortactin との結合が Dock4 による樹状突起スパインの形成制御に必要であることが示唆された。

Dock4 のプロリンリッチ領域がスパインへの局在に重要である

さらに Dock4 のプロリンリッチ領域の機能を解析するため、Dock4-WT と Dock4- Δ C の細胞内局在を調べた。培養 14 日目の海馬ニューロンに、Flag-Dock4-WT または Flag-Dock4- Δ C を発現させ、15 日目に固定し、抗 Flag 抗体による免疫細胞染色で局在を明らかにした。その結果、Flag-Dock4-WT は内在性の Dock4 と同様に樹状突起スパインに強い局在が見られたが、Flag-Dock4- Δ C はスパインへの局在が見られなかった (Fig. 3-7A, B)。樹状突起のシャフト部分とスパインの頭部での Flag 染色の蛍光強度の比 (spine/shaft fluorescence intensity ratio) を定量した結果からも、Dock4-WT は樹状突起スパインに強く局在しているが、Dock4- Δ C ではこの局在が失われていることが確認された (Fig. 3-7C)。以上の結果から、プロリンリッチ領域が Dock4 の樹状突起スパインへの局在に必要であり、

この局在がスパイン形成に重要であることが示唆された。

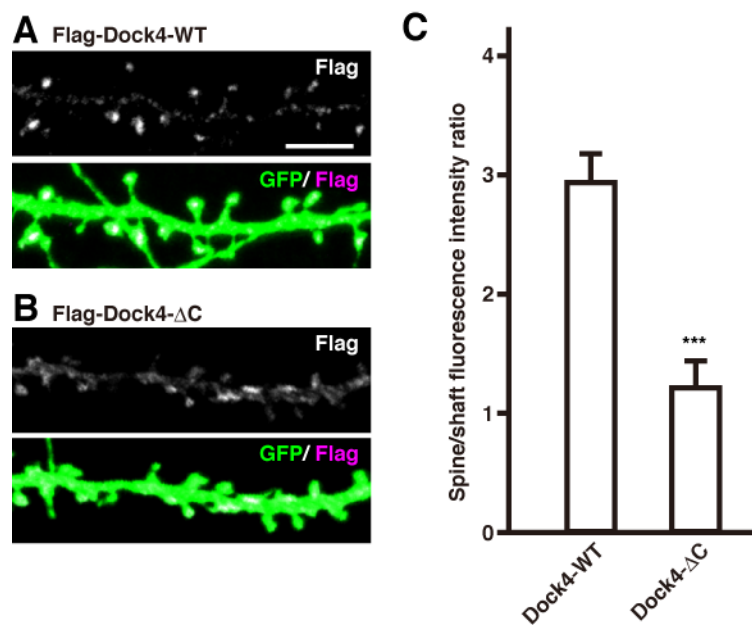


Fig. 3-7 Dock4 の樹状突起スパインへの局在にプロリンリッチ領域が必要である

(A, B) 培養 14 日目の海馬ニューロンに EGFP と共に、ELMO2 と Flag-Dock4-WT または Flag-Dock4-ΔC を導入し、培養 15 日目に固定した。その後、抗 Flag 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。スケールバー: 5 μ m。 (C) 同様の条件で、取得した画像のスパイン頭部と樹状突起シャフト部分の Flag 染色の蛍光強度の平均値の比を定量した。それぞれの処理群に対して、合計 10 個の細胞から Dock4-WT については 372 個のスパイン、Dock4-ΔC については 270 個のスパインを解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.001$ (Student's t test)。

3-2 考察

樹状突起スパインは中枢神経系の興奮性ニューロン樹状突起のシナプス後部に見られるアクチンリッチな構造体であり、アクチン骨格の制御は樹状突起スパインの形成や可塑性に非常に重要であることが知られている (Harris and Kater, 1994; Fischer et al., 1998)。Rhoファミリー低分子量G蛋白質 Rac は、アクチン骨格の制御を主とした細胞内シグナル伝達における分子スイッチとして働くことが知られており (Hall, 1998)、樹状突起スパインの形態形成においても重要な役割を担っている (Nakayama et al., 2000; Tashiro et al., 2000)。本章で私は、海馬ニューロンの発達後期であるシナプス形成期において、Rac の活性化因子である Dock4 が樹状突起スパインに強く局在しており、Rac を活性化することでスパイン形成を促進的に制御していることを明らかにした (Fig. 3-8)。内在性の Dock4 をノックダウンすることで、樹状突起スパイン形成は阻害され、逆に Dock4 と ELMO2 を過剰発現させることで、スパインの数が増加した。また、Dock4 の新規結合分子として、アクチン重合制御分子である cortactin を同定し、Dock4 と cortactin の結合が樹状突起スパインの形成に重要であることも明らかにした。これらの結果は、海馬ニューロンのシナプス形成期での、Dock4 の新たな機能を明らかにしたものであり、樹状突起スパイン形成における Rac の新しい活性調節機構を示唆するものである。

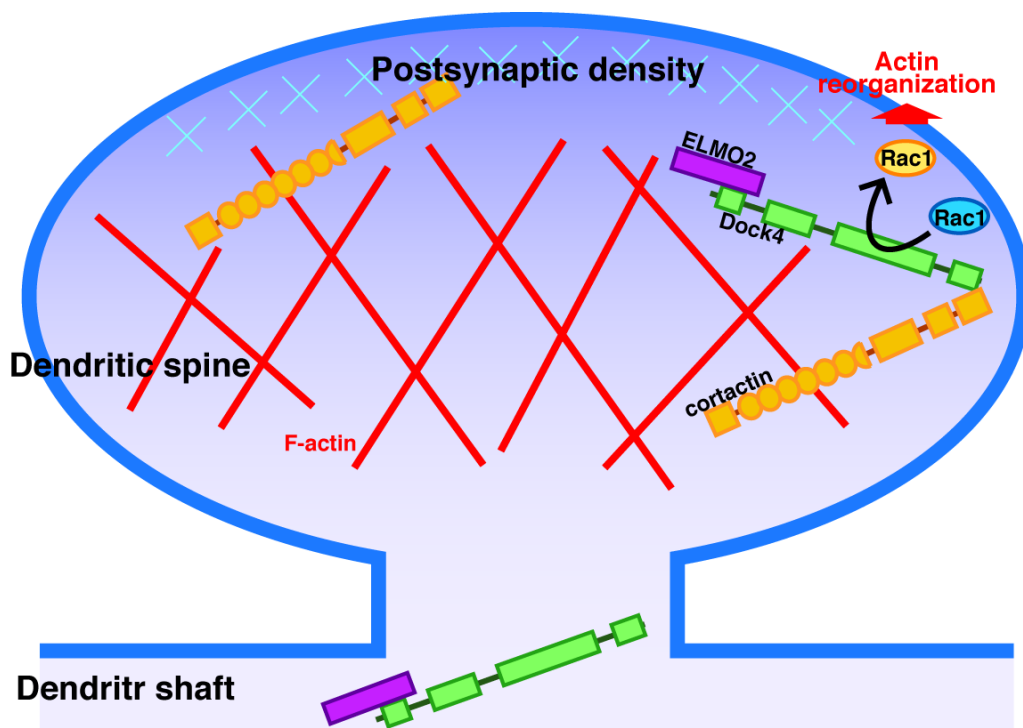


Fig. 3-8 Dock4 による樹状突起スパイン形成制御のモデル図

近年の研究から、複数の Rac に対する GEF が樹状突起スパインに局在し、スパイン形成に関与していることが報告されている (Tolias et al., 2011)。代表的なものとしては、Kalirin-7、Tiam1、 β PIX が挙げられる。Kalirin-7 と Tiam1 はそれぞれ NMDA 型グルタミン酸受容体の異なるサブユニットと結合しており、グルタミン酸刺激が入ると CaMKII (calcium/calmodulin-dependent kinase II) によってリン酸化され、Rac に対する GEF 活性が上昇する (Xie et al., 2007; Tolias et al., 2005)。さらに Kalirin-7 と Tiam1 は ephrinB のリガンド刺激を受けた EphB 受容体と結合することで、ポストシナプス領域へと移行し Rac を活性化する (Penzes et al., 2003; Tolias et al., 2007)。 β PIX は GIT1 (G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1) と結合することでポストシナプス領域に局在し、CaMKI によってリン酸化されることで Rac に対する GEF 活性が上昇する (Zhang et al., 2003; Saneyoshi et al., 2008)。いずれの GEF も、NMDA 型グルタミン酸受容体と直接、または間接的に結合していることから、樹状突起スパインの中でも PSD (postsynaptic density) 領域に局在していると考えられ、またグルタミン酸刺激によって GEF 活性が調節される。一方、本研究で Rac の GEF である Dock4 が、樹状突起スパインでアクチン結合蛋白質の cortactin と結合し、Rac の活性化を介してスパイン形成を制御していることを明らかにした。Cortactin は PSD 蛋白質の一つである Shank と結合することが知られているが (Naisbitt et al., 1999)、cortactin の Dock4 および Shank との結合領域 (SH3 ドメイン) が競合すること、また、電子顕微鏡による局在の解析から、大部分の cortactin がスパイン内で PSD 領域ではなく、アクチンリッチなスパインの中心部に局在しているという報告があることから (Racz and Weinberg, 2004)、Dock4 もアクチンリッチなスパイン中心部に局在している可能性が高い。このことから、Dock4 は樹状突起スパイン内でも他の GEF とは異なる局在をしており、空間的に多彩な Rac の活性制御を可能にしていると考えられる。リン酸化による GEF 活性の変化など、細胞外刺激に伴う活性調節機構が存在するのかは、引き続き調査していく必要がある。

Cortactin は N 末端側の NTA (N-terminal acidic region) ドメインで Arp2/3 複合体と、中心部のタンデムリピート領域でアクチンフィラメントと結合し、アクチンの重合や分枝の促進、安定化などに関わっていることが知られている (Weed et al., 2000; Uruno et al., 2001; Weaver et al., 2001)。また、cortactin は樹状突起スパインでもアクチンフィラメントと共局在し、スパイン形成に促進的に働いていることが報告されている (Hering and Sheng, 2003; Chen and Hsueh, 2012)。本研究では、Dock4 も樹状突起スパインでアクチンフィラメントおよび cortactin と共局在しており、Dock4 によるスパイン形成には cortactin が必要であることを明らかにした。Dock4 は C 末端側のプロリンリッチ領域で cortactin の SH3 ドメインと結合するが、この C 末端領域を欠損した Dock4 の変異体は、樹状突起スパインに局在できなかった。この結果から、Dock4 は cortactin と結合することでスパインに局在していると考えられる。これまでの研究から、cortactin は SH3 ドメインを介して N-WASP、WIP、

Fgd1、ZO-1、Dynamin といった様々なシグナル分子と結合し、細胞運動、細胞接着、エンドサイトーシスなどの多様な細胞機能に関与していることが報告されている (Daly, 2004; Ammer and Weed, 2008; Kirkbride et al., 2011)。このことから、cortactin はこれらのシグナル分子において、アクチン骨格への足場蛋白質として働いていると考えることができ、Dock4 の樹状突起スパインへの局在も、cortactin が制御していると考えられる。また逆に、cortactin の細胞内局在が Rac の活性によって制御されるという報告もある (Weed et al., 1998)。これらをまとめると、Dock4 は cortactin との結合によって、アクチンリッチな樹状突起スパインへと移動し、Rac を活性化することでさらなるアクチン重合を促進し、新たに重合したアクチン骨格へさらに cortactin および Dock4 が移動するという、ポジティブフィードバック機構が存在すると推測できる。樹状突起スパインにおけるアクチン重合と、Dock4 および cortactin の局在の経時的な変化についてはさらなる調査が必要である。

また、第2章において、Dock4 による樹状突起の形態形成にもプロリンリッチ領域が重要な役割を担っていることを明らかにしたが、この樹状突起形成期の制御にも cortactin が関与している可能性が考えられる。実際に cortactin は神経突起の分枝に関与していることも報告されている (Mingorance-Le Meur and O'Connor, 2009)。樹状突起形成期の Dock4 の機能に、cortactin との結合が必要であるかも、今後調査していく必要がある。

シナプス形成期の樹状突起に見られるマッシュルーム型のスパイン頭部を持たない細長い突起は、樹状突起フィロポディアと呼ばれ、シナプス接続の形成に重要な、樹状突起スパインの前駆体であると考えられている (Ziv and Smith, 1996; Yuste and Bonhoeffer, 2004)。本研究では、cortactin との結合領域を欠損した Dock4 の変異体の発現や、cortactin 非存在下での Dock4 の過剰発現によって、樹状突起スパインの減少と樹状突起フィロポディアの増加が見られた。この結果から Dock4 と cortactin の相互作用が、スパインの成熟、もしくは成熟したスパインの維持に必要であることが示唆される。これは、Dock4 との結合領域である SH3 ドメインを欠損した cortactin の変異体を発現させると、樹状突起スパインには局在できるものの、スパイン頭部が小さくなるという報告からも支持される (Hering and Sheng, 2003)。一方で、Dock4 と cortactin の相互作用がなくても樹状突起フィロポディアは形成されることから、Dock4 は cortactin 非依存的にシナプス接続の新生に関与している可能性もある。樹状突起スパインの形態形成のどの段階で Dock4 が機能しているか、また他の Rac の GEF との使い分けを明らかにしていくことが、Rac の時間的な活性制御を理解していく上での今後の課題である。

近年行われている、ゲノムワイド相関解析の結果から、*DOCK4* 遺伝子が自閉症、失読症、統合失調症といった神経発達障害の感受性遺伝子である可能性が報告されている (Maestrini et al., 2010; Pagnamenta et al., 2010; Alkelai et al., 2012)。これらの疾患は、いずれも発達期における神経回路形成の異常が関係していると考えられている (Penzes et al., 2011)。自閉症は、視覚的に目立った特徴が見られることは少なく、対人相互反応の障害、

コミュニケーションの欠落、興味の限局と同一行動の反復などの行動学的特徴から診断される (Lord et al., 2000)。幼児期の 2~3 歳時に発症することが多く、神経疾患の中でも非常に発症率の高い障害である (Cox et al., 1999)。一方で、統合失調症は、幻覚や幻聴、妄想、感情鈍麻、意欲消失、引きこもりなどの特徴が見られる精神疾患で、思春期から青年期に発症することが多く、発症率も非常に高い障害である (Lewis and Lieberman, 2000)。解剖学的研究から、自閉症患者で海馬ニューロン樹状突起の複雑性の減少、統合失調症患者で海馬ニューロンの樹状突起スパインの減少とスパイン頭部の萎縮等の報告もある (Raymond et al., 1996; Kolomeets et al., 2005)。本研究を通して、Dock4 は樹状突起の成長と分枝、樹状突起スパインの形成を制御することを明らかにしたが、発達期の Dock4 の機能不全がこれらの疾患の発症に関与している可能性が考えられる。

まとめとして本章では、Dock4 が cortactin と樹状突起スパインにおいて結合し、Rac の活性化を介してスパイン形成を制御していることを明らかにした。

第 4 章

結論

本研究により得られた結果をまとめると、以下の通りである。

- Dock4 は発達期のラットの海馬ニューロンに発現している。
- Dock4 は Rac を活性化することで樹状突起の成長、分枝を促進的に制御する。
- Dock4 は Rac を活性化することで樹状突起スパインの形成を促進的に制御する。
- Dock4 は樹状突起スパインで cortactin と結合している。
- Dock4 によるスパイン形成の制御には cortactin との結合が必要である。

本研究により、Dock4 の新規の生理的機能として発達期の海馬ニューロンにおける形態制御を解明しただけでなく、神経回路形成における Rac の時間的、空間的な活性調節機構の理解に貢献した。

実験方法

プラスミドベクターの構築

本研究で行ったすべての RNA 干渉によるノックダウン実験は、shRNA 発現ベクターである pSilencerTM2.1-U6-hygro (Ambion) を用いて行った。本研究で用いた shRNA のマウス Dock4 およびマウス cortactin に対する標的塩基配列は以下の通りである。

shControl: 標的配列 Dock4 114–132, 5'–GTGCGACGGCTGGTACAGA–3'

shDock4#1: 標的配列 Dock4 1500–1518, 5'–GAAGTTGTTTCGGTTTCTCT–3'

shDock4#2: 標的配列 Dock4 3685–3705, 5'–GCCTACACTCTCCTGTTGTAT–3'

shCTTN: 標的配列 cortactin 330–348, 5'–GCACTGCTCACAAGTGGAC–3'

Flag エピトープタグを付加したヒトの野生型 Dock180 発現ベクター (pCXN2-Flag) は、京都大学の松田道行に提供していただいた。マウス由来の Dock4 をコードする cDNA は、かずさ DNA 研究所より提供されたものを用いて pCXN2-Flag ベクターに組み込んだ。Flag タグで標識した Dock4 の変異体 (Dock4-AAA; M1475A, S1476A, P1477A、及び Dock4-DC; アミノ酸 1-1601) の構築は以前の報告の通りである (Hiramoto et al., 2006)。shDock4#1 の標的配列にサイレント変異を入れた Dock4 の RNA 干渉耐性変異体 (Dock4-res) は PCR 法により作製し、pCXN2-Flag ベクターに組み込んだ。ラット由来の ELMO2 をコードする cDNA は、以前に得られたもの (Katoh and Negishi, 2003) を、大阪大学の宮崎純一博士および千葉大学の斎藤哲一郎博士に提供していただいた pCAG-EYFP-CAG (Saito and Nakatsuji, 2001) ベクターに組み込み、ELMO2 と EYFP を同一細胞に共発現できるようにした。また、pCAG-EYFP ベクターも宮崎純一博士および斎藤哲一郎博士に提供していただいた。EGFP は pCXN2 ベクターに組み込んだ。マウス cortactin の cDNA は、マウス脳から精製した RNA を鋳型にして RT-PCR 法によりクローニングし、pCMV-Myc (Clontech) および pGEX-4T-2 (GE Healthcare) に組み込んだ。また、cortactin の変異体 (cortactin-DSH3; アミノ酸 1-487、cortactin-SH3; アミノ酸 458-546、cortactin-W525K) は PCR 法により作製し、pGEX-4T-2 ベクターに組み込んだ。すべての作製した cDNA の塩基配列は、ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて正しいことを確認した。

抗体および試薬

Dock4 に対する抗体については、ヒト Dock4 の 1666-1729 番目のアミノ酸配列に対応するペプチドを GST (glutathione *S*-transferase) に融合させた蛋白質を大腸菌から精製し、抗 Dock4 ウサギポリクローナル抗体を得た (Hiramoto et al., 2006)。この抗体は免疫沈降およ

び第2章でのイムノブロッティング (希釈濃度: 2 μ g/ml) に用いた。その他の抗体は以下の購入品を用いた。IB, イムノブロッティング; ICC, 免疫細胞染色; IHC, 免疫組織染色。

1次抗体	希釈倍率	製造元
マウス抗 Dock4 モノクローナル抗体 (R6Y)	IB: 1/200, ICC: 1/100, IHC: 1/100	Santa Cruz Biotechnology
ヤギ抗 ELMO2 ポリクローナル抗体	IB: 1/1000	Abcam
マウス抗 β -actin モノクローナル抗体 (AC-15)	IB: 1/10000	Sigma-Aldrich
マウス抗 α -tubulin モノクローナル抗体 (B-5-1-2)	IB: 1/1000	Sigma-Aldrich
ウサギ抗 MAP2 ポリクローナル抗体	ICC: 1/500, IHC: 1/500	Abcam
マウス抗 Myc モノクローナル抗体 (9E10)	IB: 1/500	Santa Cruz Biotechnology
マウス抗 Flag モノクローナル抗体 (M2)	IB: 1/1000, ICC: 1/1000	Sigma-Aldrich
ラット抗 HA モノクローナル抗体 (3F10)	IB: 1/1000	Roche
マウス抗 cortactin モノクローナル抗体 (4F11)	IB: 1/1000	Millipore
ウサギ抗 cortactin ポリクローナル抗体 (H-191)	ICC: 1/300	Santa Cruz Biotechnology
ウサギ抗 PSD95 モノクローナル抗体 (EP2652Y)	ICC: 1/500	Abcam
ウサギ抗 synaptophysin モノクローナル抗体 (YE269)	ICC: 1/300	Abcam
2次抗体		
HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	IB: 2000	DAKO
HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	IB: 1000	DAKO
HRP 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体	IB: 1000	DAKO
HRP 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体	IB: 1000	DAKO
Alexa Fluor 488, 555 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	ICC: 1/2000, IHC: 1:2000	Molecular Probes
Alexa Fluor 555, 647 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	ICC: 1/1000, IHC: 1:1000	Molecular Probes
その他の試薬		
Rhodamin 標識ファロイジン	ICC: 1/500, IHC: 1/500	Molecular Probes

海馬ニューロンの初代培養と遺伝子導入

動物の取り扱い、京都大学における動物実験の実施に関する規定に従った。本研究で用いた Wistar ラットはすべて Japan SLC より購入し、海馬ニューロン初代培養には胎生 19 日齢のラットの海馬を用いた。まず、母ラットを麻酔下断頭し、胎児を摘出し、氷冷 HBSS (Hanks' balanced salt solution; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 無添加) 中に回収した。その胎児の脳から海馬を摘出し、HBSS で洗浄した後、0.25% trypsin と 0.1% DNase を含む HBSS で 10 分間、37°C でインキュベートした。その海馬を HBSS で洗浄した後、パスツールピペットでピペッティングすることにより海馬を分散し細胞懸濁液を得た (Ishikawa et al., 2003; Kakimoto et al., 2006)。分散した細胞を、24-well プレートに 1 ウェルあたり 3×10^4 個の濃度で、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; 10% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 及び 0.1 mg/ml streptomycin を含む) 中に据えた poly-L-lysine コートしたカバーガラス (直径 13 mm) 上にまき、37°C、5% CO_2 のインキュベータ内で培養した。5 時間後、Neurobasal medium (Invitrogen) [2% B-27 supplement (Invitrogen)、0.5 mM GlutaMAX (Invitrogen)、50 units/ml penicillin, 及び 0.05 mg/ml streptomycin を含む] に培養液を交換した。海馬ニューロンへの遺伝子導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、その添付文書に従って行った。第 2 章の shDock4#1 の効果を評価した実験では、分散した海馬ニューロンに、Rat Neuron Nucleofector Kit (Amaxa Biosystems) を用いて添付文書に従って遺伝子導入した後、培養ディッシュにまき 24-well プレートと同様の条件で培養した。

HEK293T 細胞の培養と遺伝子導入

HEK293T 細胞は DMEM (10% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 及び 0.1 mg/ml streptomycin を含む) を用いて、37°C、5% CO_2 のインキュベータ内で培養した。遺伝子導入は Lipofectamine Plus (Invitrogen) を用いて、その添付文書に従って行った。

ラット脳のリホジナイズ

Wistar ラットの脳を摘出後、homogenizing buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.32 M Sucrose、10 mM MgCl_2 、1 mM EDTA、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、0.1 mM benzamide、0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 中に入れ、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした (Ishikawa et al., 2003; Kakimoto et al., 2006)。

イムノブロッティング法

SDS-PAGE により蛋白質を分離し、polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore) に電気泳動によって転写した。その膜を、3% low fat milk を含む Tris-buffered saline でブロッキングし、1 次抗体反応を行った。1 次抗体の認識には HRP 標識 2 次抗体 (DAKO) を用い、化学発光検出キット (Chemi-Lumi One; Nacalai Tesque または ECL Prime; GE Healthcare) を用いて

検出した。

***In situ* ハイブリダイゼーション法**

成体ラット脳由来 RNA の逆転写産物から、マウス Dock4 cDNA の 697 番目-1361 番目の配列に相当するラット Dock4 の cDNA を PCR 法にて増幅し、それを pCR2.1 ベクター (Invitrogen) に挿入した。その DNA 配列を確認した後、Dock4 をコードする領域を pBluescript SK(+) ベクター (Stratagene) に組み換えた。ラット Dock4 の配列に対する digoxigenin (DIG) 標識 antisense RNA プロブは、*SalI* 制限酵素で切断した Dock4/pBluescript SK(+) プラスミドを鋳型として、T3 RNA ポリメラーゼと DIG RNA labeling mix (Roche) を用いた *in vitro* 転写により合成された。同様に、sense RNA プロブは *NotI* 制限酵素で切断したプラスミドから、T7 ポリメラーゼを用いて合成された。

生後 20 日齢の Wistar ラットは 10% Nembutal にて深く麻酔をかけた後、PBS にて灌流脱血し、4% paraformaldehyde を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて灌流固定した。それから脳全体を摘出し、同じ固定液で一晩 4°C にて後固定反応を行った。その後、30% sucrose を含む 0.1 M リン酸緩衝液で一晩 4°C にてインキュベートした。ドライアイスを用いて組織を凍結後、-20°C のクリオスタット (CM3050 S; Leica) 内で 40 μ m 厚の冠状切片を作成し、PBS 中に回収した。この漂白切片は 0.5 μ g/mL の proteinase K (Roche) で室温にて 5 分間処理した後、0.25 μ g/mL 無水酢酸を含む triethanolamine-HCl にてアセチル化処理を行った。ハイブリダイゼーション反応は、hybridization buffer (50% deionized formamide, 5 x SSC, 5 x Denhardt's solution, 250 μ g/mL salmon sperm DNA, 250 μ g/mL yeast tRNA) で 2 時間インキュベートした後、500 ng/mL DIG 標識 RNA プロブを含む hybridization buffer で 55°C の条件下一晩インキュベートすることにより行われた。ハイブリダイゼーション後の切片は、2 x SSC にて 55°C で 1 時間洗浄するという過程を 3 回繰り返した。その後、切片を alkaline phosphatase 標識抗 DIG 抗体 (Roche) と一晩 4°C にてインキュベートし、alkaline phosphatase による 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate と nitroblue tetrazolium の発色反応により DIG 標識 RNA プロブを検出した (Ishikawa et al., 2002; Katoh et al., 2006a)。

免疫細胞染色

カバーガラス上の培養海馬ニューロンは、4% paraformaldehyde を含む PBS で 15 分間固定した。50 mM NH₄Cl を含む PBS で残存した paraformaldehyde を除去した後、細胞を 0.2% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間透過処理を行い、10% fetal bovine serum を含む PBS で 30 分間インキュベートしてブロッキングした。続いて、1 次抗体を希釈した 10% fetal bovine serum を含む PBS、または Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) で室温 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、さらに 2 次抗体を希釈した 10% fetal bovine serum を含む PBS、または Can Get Signal Immunostain

Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) で室温 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、0.1% *p*-phenylenediamine dihydrochloride を含む 90% グリセロール溶液、または ProLong Golg Antifade Reagents (Molecular Probes) で封入した。

免疫組織染色

凍結させたラットの脳をクリオスタットで 30 μm の厚さに切り、その切片を 0.3% Triton X-100 を含む PBS で室温 15 分間透過処理し、2% goat serum および 0.15% Triton X-100 を含む PBS で室温 1 時間ブロッキングした。1 次抗体を希釈した溶液に切片を浸し、4°C で 24 時間インキュベートした後、0.1% Tween 20 を含む PBS で洗浄し、さらに 2 次抗体を希釈した溶液に切片を浸し、4°C で 24 時間インキュベートした。再び 0.1% Tween 20 を含む PBS で洗浄し、ProLong Golg Antifade Reagents で封入した。

データ解析

海馬ニューロンの形態は、遺伝子導入された細胞の EYFP の蛍光像を取得して、Image J software (National Institute of Health) を用いて測定した。

樹状突起の定量は、細胞体から伸びる樹状突起の本数 (number of primary dendrites)、全分枝数 (TDBTN; total dendritic branch tip number)、樹状突起の長さ (total dendritic length) を測定した (Yu and Malenka, 2003; Rosso et al., 2005; Ishikawa et al., 2006)。また、branching index は分枝の頻度を現す指標であり、 $(\text{TDBTN} - \text{number of primary dendrites}) / \text{total dendritic length}$ を計算し、1 μm あたりの分枝数を求めた (Redmond et al., 2000)。樹状突起に存在する 5 μm 以上の突起を分枝と定義した (Yu and Malenka, 2003)。3 回の独立した実験から各処理群につき 60 個のニューロンの画像を取得して解析に用いた。統計的有意差の検定には SPSS software (version 16.0; SPSS Inc) を用いて一元配置分散分析と Dunnett 検定を行った。

樹状突起スパインの定量は、1 細胞あたり合計 250 μm 以上の樹状突起を計測し、その樹状突起上のスパインおよびフィロポディアの数を数えた。本研究では、マッシュルーム型の頭部および細い首部を持つもの、もしくは首部を持たない樽型のものをスパインとし、頭部を持たない細長い突起をフィロポディアとして数えた。3 回の独立した実験から各処理群につき 45 個のニューロンの画像を取得して解析に用いた。統計的有意差の検定には SPSS software を用いて一元配置分散分析と Tukey 検定を行った。

スパインとシャフトの Flag 染色の蛍光強度の比 (spine/shaft fluorescence intensity ratio) は、未熟なスパインを除外するため 1 μm^2 以上のスパイン頭部を持つものを選び、スパイン頭部とシャフト部分の抗 Flag 抗体染色および EGFP の平均の蛍光強度を測定した。その後、EGFP の蛍光強度で標準化した抗 Flag 抗体染色強度の比を計算した。各処理群につき 10 個のニューロンの画像を取得して解析に用い、統計的有意差の検定には SPSS software

を用いて Student's *t* 検定を行った。

免疫沈降法

培養海馬ニューロンもしくは遺伝子導入した HEK293T 細胞を、氷冷した cell lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、2 mM MgCl₂、10 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1% Triton X-100、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、10 μg/mL aprotinin、10 μg/mL leupeptin] で溶解し、細胞溶解物を 4°C、16,000 x *g* で 10 分間遠心した。上清に目的の抗体を加えて 1 時間インキュベートした後、protein G Sepharose (GE Healthcare) を加えてさらに 1 時間インキュベートした。ビーズを氷冷した cell lysis buffer で洗浄した後、結合した蛋白質を SDS-PAGE 及びイムノブロッティング法により解析した。

プルダウンアッセイ

GST および GST を融合させた cortactin は、以前の報告に基づき *E. coli* より精製した (Kato et al., 1998)。Flag-Dock4 を発現させた HEK293T 細胞を、氷冷した cell lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、2 mM MgCl₂、10 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1% Triton X-100、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM DTT、10 μg/mL aprotinin、10 μg/mL leupeptin] で溶解し、細胞溶解物を 4°C、16,000 x *g* で 10 分間遠心した。上清に 10 μg の GST または GST 融合 cortactin を加えて 10 分間インキュベートした後、glutathione-Sepharose ビーズ (GE Healthcare) を加えてさらに 1 時間インキュベートした。ビーズを氷冷した cell lysis buffer で洗浄した後、結合した蛋白質を SDS-PAGE 及びイムノブロッティング法により解析した。

論文目録

第1章の主要部分は以下の論文に公表した。

Shuhei Ueda, Satoshi Fujimoto, Kiyoo Hiramoto, Manabu Negishi, and Hironori Katoh. (2008)
Dock4 Regulates Dendritic Development in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience Research* 86, 3052-3061

第2章の主要部分の公表の方法、時期は未定である。

参 考 文 献

- Alkelai A, Lupoli S, Greenbaum L, Kohn Y, Kanyas-Sarner K, Ben-Asher E, Lancet D, Macciardi F, Lerer B (2012) *DOCK4* and *CEACAM21* as novel schizophrenia candidate genes in the Jewish population. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 459-469
- Ammer AG, Weed SA (2008) Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil. Cytoskeleton* 65, 687-707
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809
- Bokoch GM (2000) Regulation of cell function by Rho family GTPases. *Immunol. Res.* 21, 139-148
- Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Tramont AC, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS (2002) Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 574-582
- Burridge K, Wennerberg K (2004) Rho and Rac Take Center Stage. *Cell* 116, 167-179
- Chen YK, Hsueh YP (2012) Cortactin-binding protein 2 modulates the mobility of cortactin and regulates dendritic spine formation and maintenance. *J. Neurosci.* 32, 1043-1055
- Côté JF, Vuori K (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J. Cell Sci.* 115, 4901-4913
- Cox A, Klein K, Charman T, Baird G, Baron-Cohen S, Swettenham J, Drew A, Wheelwright S (1999) Autism spectrum disorders at 20 and 42 months of age: stability of clinical and ADI-R diagnosis. *J. Child Psychol. Psychiatry* 40, 719-732
- Daly RJ (2004) Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem. J.* 382, 13-25
- Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A (2001) Rac/ Cdc42 and p65PAK regulates the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J. Biol. Chem.* 276, 1677-1680
- deBakker CD, Haney LB, Kinchen JM, Grimsley C, Lu M, Klingele D, Hsu PK, Chou BK, Cheng LC, Blangy A, Sondek J, Hengartner MO, Wu YC, Ravichandran KS (2004) Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr. Biol.* 14, 2208-2216
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1, 253-259
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635
- Feller SM (2001) Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20, 6348-6371
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847-854
- Franke K, Otto W, Johannes S, Baumgart J, Nitsch R, Schumacher S (2012) miR-124-regulated

- RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling. *EMBO J.* 31, 2908-2921
- Goslin K, Asmussen H, Banker G (1998) Rat hippocampal neurons in low-density culture. In *Culturing Nerve Cells*, 2nd edition (ed. Banker G and Goslin K), pp. 339-370 The MIT Press, Cambridge, MA.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1-49
- Grimsley CM, Kinchen JM, Tosello-Trampont AC, Brugnera E, Haney LB, Lu M, Chen Q, Klingele D, Hengartner MO, Ravichandran KS (2004) Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J. Biol. Chem.* 279, 6087-6097
- Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, Walk SF, Nemergut ME, Macara IG, Francis R, Schedl T, Qin Y, Van Aelst L, Hengartner MO, Ravichandran KS (2001) CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107, 27-41
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371
- Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, Matsuda M (1996) DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol. Cell Biol.* 16, 1770-1776
- Hayashi K, Ohshima T, Mikoshiba K (2002) Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 20, 579-594
- Hering H, Sheng M (2003) Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J. Neurosci.* 23, 11759-11769
- Hiramoto K, Negishi M, Katoh H (2006) Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. *Exp. Cell Res.* 312, 4205-4216
- Ishikawa Y, Katoh H, Nakamura K, Mori K, Negishi M (2002) Developmental changes in expression of small GTPase RhoG mRNA in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 106, 145-150
- Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M (2003) A Role of Rnd1 GTPase in Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 23, 11065-11072
- Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M (2006) Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 400, 218-223
- Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247-269
- Kakimoto T, Katoh H, Negishi M (2006) Regulation of Neuronal Morphology by Toca-1, an F-BAR/EFC Protein That Induces Plasma Membrane Invagination. *J. Biol. Chem.* 281, 29042-29053
- Katoh H, Fujimoto S, Ishida C, Ishikawa Y, Negishi M (2006a) Differential distribution of

- ELMO1 and ELMO2 mRNAs in the developing mouse brain. *Brain Res.* 1073-1074, 103-108
- Katoh H, Hiramoto K, Negishi M (2006b) Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J. Cell Sci.* 119, 56-65
- Katoh H, Negishi M (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* 424, 461-464
- Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima Y, Hoshino M (2003) The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J.* 22, 4190-4201
- Kinley AW, Weed SA, Weaver AM, Karginov AV, Bissonette E, Cooper JA, Parsons JT (2003) Cortactin Interacts with WIP in Regulating Arp2/3 Activation and Membrane Protrusion. *Curr. Biol.* 13, 384-393
- Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM (2011) Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh. Migr.* 5, 187-198
- Kolomeets NS, Orlovskaya DD, Rachmanova VI, Uranova NA (2005). Ultrastructural alterations in hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia: a postmortem morphometric study. *Synapse* 57, 47-55
- Konno D, Yoshimura S, Hori K, Maruoka H, Sobue K (2005) Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/rac1 and cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 5082-5088
- Lewis DA, Lieberman JA (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28, 325-334
- Li Z, Van Aelst L, Cline HT (2000) Rho GTPases regulates distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat. Neurosci.* 3, 217-225
- Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook EH Jr, Leventhal BL, DiLavore PC, Pickles A, Rutter M (2000) The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J. Autism Dev. Disord.* 30, 205-223
- Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, deBakker C, Brugnera E, Tosello-Tramont AC, Haney LB, Klingele D, Sondek J, Hengartner MO, Ravichandran KS (2004) PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 756-762
- Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, Hall M, Sondek J, Hengartner MO, Yajnik V, Ravichandran KS (2005) A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Curr. Biol.* 15, 371-377
- Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 173-180
- Maestrini E, Pagnamenta AT, Lamb JA, Bacchelli E, Sykes NH, Sousa I, Toma C, Barnby G, Butler H, Winchester L, Scerri TS, Minopoli F, Reichert J, Cai G, Buxbaum JD, Korvatska O, Schellenberg GD, Dawson G, de Bildt A, Minderaa RB, Mulder EJ, Morris AP, Bailey AJ, Monaco AP; IMGSAC. (2010) High-density SNP association study and copy number variation analysis of the *AUTS1* and *AUTS5* loci implicate the *IMMP2L-DOCK4* gene region in autism susceptibility. *Mol. Psychiatry* 9, 954-968
- Makino Y, Tsuda M, Ichihara S, Watanabe T, Sakai M, Sawa H, Nagashima K, Hatakeyama S,

- Tanaka S (2006) Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180. *J. Cell Sci.* 119, 923-932
- Matsuki T, Pramatarova A, Howell BW (2008) Reduction of Crk and CrkL expression blocks reelin-induced dendritogenesis. *J. Cell Sci.* 2008 121, 1869-1875
- Meller N, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Del Pozo MA, Schwartz MA (2002) Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat. Cell Biol.* 4, 639-647
- Mingorance-Le Meur A, O'Connor TP (2009) Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *EMBO J.* 28, 248-260
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron.* 23, 569-82
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 20, 5329-5338
- Namekata K, Watanabe H, Guo X, Kittaka D, Kawamura K, Kimura A, Harada C, Harada T (2012) Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG. *Genes Cells* 17, 688-697
- Negishi M, Katoh H (2002) Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J. Biochem.* 132, 157-166
- Negishi M, Katoh H (2005) Rho family GTPases and dendrite plasticity. *Neuroscientist* 11, 187-191
- Nolan KM, Barrett K, Lu Y, Hu KQ, Vincent S, Settleman J (1998) Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev.* 12, 3337-3342
- Pagnamenta AT, Bacchelli E, de Jonge MV, Mirza G, Scerri TS, Minopoli F, Chiochetti A, Ludwig KU, Hoffmann P, Paracchini S, Lowy E, Harold DH, Chapman JA, Klauck SM, Poustka F, Houben RH, Staal WG, Ophoff RA, O'Donovan MC, Williams J, Nöthen MM, Schulte-Körne G, Deloukas P, Ragoussis J, Bailey AJ, Maestrini E, Monaco AP; IMGSAC (2010) Characterization of a family with rare deletions in CNTNAP5 and DOCK4 suggests novel risk loci for autism and dyslexia. *Biol. Psychiatry* 68, 320-328
- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Haganir RL (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37, 263-274
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 14, 285-293
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465
- Racz B, Weinberg RJ (2004) The subcellular organization of cortactin in hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 10310-10317
- Raymond GV, Bauman ML, Kemper TL (1996) Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol.* 91, 117-119
- Redmond L, Oh SR, Hicks C, Weinmaster G, Ghosh (2000) A Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat. Neurosci.* 3, 30-40

- Rossmann KL, Der CJ, Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 167-180
- Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A, Salinas PC (2005) Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat. Neurosci.* 8, 34-42
- Saito T, Nakatsuji N (2001) Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Dev. Biol.* 240, 237-246
- Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR (2008) Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/ β PIX signaling complex. *Neuron* 57, 94-107
- Sin WC, Haas K, Ruthazer ES, Cline HT (2002) Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature* 419, 475-480
- Sparks AB, Rider JE, Hoffman NG, Fowlkes DM, Quilliam LA, Kay BK (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLC γ , Crk, and Grb2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1540-1544
- Takenawa T, Miki H (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* 114, 1801-1809
- Tanabe K, Tachibana T, Yamashita T, Che YH, Yoneda Y, Ochi T, Tohyama M, Yoshikawa H, Kiyama H (2000) The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J. Neurosci.* 20, 4138-4144
- Tashiro A, Minden A, Yuste R (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex* 10, 927-938
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19, 625-634
- Tolias KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, Tavazoie S, Weinberg RJ, Greenberg ME (2005) The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* 45, 525-538
- Tolias KF, Bikoff JB, Kane CG, Tolias CS, Hu L, Greenberg ME (2007) The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7265-7270
- Tolias KF, Duman JG, Um K (2011) Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Prog. Neurobiol.* 94, 133-148
- Tosello-Tramont AC, Kinchen JM, Brugnera E, Haney LB, Hengartner MO, Ravichandran KS (2007) Identification of two signaling submodules within the CrkII/ELMO/Dock180 pathway regulating engulfment of apoptotic cells. *Cell Death. Differ.* 14, 963-972
- Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Yx, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat. Cell Biol.* 3, 259-266
- Van Aelst L, Cline HT (2004) Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 297-304

- Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT, Cooper JA (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* 11, 370-374
- Weed SA, Du Y, Parsons JT (1998) Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J. Cell Sci.* 111, 2433-2443
- Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, Parsons JT (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 151, 29-40
- Welch MD, Mullins RD (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 247-288
- Wittmann T, Bokoch GM, Waterman-Storer CM (2003) Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* 161, 845-851
- Wong WT, Faulkner-Jones BE, Sanes JR, Wong RO (2000) Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J. Neurosci.* 20, 5024-5036
- Wu H, Parsons JT (1993) Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J. Cell Biol.* 120, 1417-1426
- Wu YC, Horvitz HR (1998) *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392, 501-504
- Xie Z, Srivastava DP, Photowala H, Kai L, Cahill ME, Woolfrey KM, Shum CY, Surmeier DJ, Penzes P (2007) Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* 56, 640-656
- Yajnik V, Paulding C, Sordella R, McClatchey AI, Saito M, Wahrer DC, Reynolds P, Bell DW, Lake R, van den Heuvel S, Settleman J, Haber DA (2003) DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell* 112, 673-684
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809-812
- Yu X, Malenka RC (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat. Neurosci.* 6, 1169-1177
- Yuste R, Bonhoeffer T (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 24-34
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Horwitz AF (2003) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J. Cell Biol.* 161, 131-142
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91-102

謝 辞

京都大学大学院生命科学研究科教授 根岸学先生には、薬学部4回生時から7年間、生体システム学分野に所属させていただきました。本研究の機会を与えていただき、常に有益な御助言をくださったこと、深く感謝いたします。

同准教授 加藤裕教先生には、本研究の全般を通じて直接の御指導を賜りました。常に私の考えを尊重していただきながらも、困難に直面した時には適切な方向に導いてくださったこと、感謝いたします。

同助教 生沼泉先生には、研究だけでなく進路に関しても御助言と激励をいただきました。感謝いたします。

また本研究室での生活を通して、常に励まし、助けていただいた、生体システム学分野の皆様にも深く感謝致します。

最後に、私が研究に専念できる環境を整えてくれ、常に温かく見守ってくれた、父 洋一、母 節子に感謝し、この学位論文を捧げます。

