

令和元年5月24日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07060

研究課題名(和文)新規脳キナーゼLMTK1の生理機能と神経病理に関する先駆的な研究

研究課題名(英文) Studies on physiological function and neuropathology of novel brain protein kinase LMTK1

研究代表者

久永 眞市 (Hisanaga, Shin-ichi)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：20181092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：LMTK1は脳の新規キナーゼである。LMTK1Aは軸索伸長やスパイン形成などを制御する。本研究では、LMTK1Aによる軸索伸長の分子機構、LMTK1Bの役割、LMTK1ノックアウトマウスの性質を調べた。その結果、LMTK1AはRab11活性をTBC1D9B GAPを介して制御していること、LMTK1Bは軸索伸長やスパイン形成に関わっていないこと、LMTK1の欠失は行動を活発化することを見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の軸索伸長やスパイン形成には細胞骨格構造が重要な役割を果たしていることは知られていたが、細胞膜成分がどのようにして供給されるかは殆どわかっていなかった。本研究により、LMTK1という新規キナーゼが過剰な小胞輸送を抑えていること、その仕組みとしてRab11をそのGAPを介して、制御していることが明らかになった。さらにLMTK1の欠失は自閉症様の症状を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lemur kinase 1 (LMTK1) is a novel Ser/Thr protein kinase expressed highly in mammalian brains. We reported previously that LMTK1 plays a role in axon outgrowth and spine formation in primary neurons. Here, we investigated the molecular mechanism of LMTK1 regulation of axon outgrowth, and a function of LMTK1B, another isoform of LMTK1 different from LMTK1A, and properties of LMTK1 knockout mouse. We found that (1) LMTK1 regulated Rab11 small GTPase by activating TBC1D9B Rab11 GAP, (2) the kinase negative form of LMTK1B was different from kinase negative LMTK1A in the axon outgrowth and spine formation whereas wild types of them localized at the perinuclear region, and (3) LMTK1 KO mice exhibited hyper locomotive activity, reduced anxiety and anti-depressant behaviors.

研究分野：神経生化学

キーワード：神経細胞 軸索 スパイン 小胞輸送 自閉症 リン酸化 マウス エンドソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は軸索や樹状突起などの神経突起を介して、神経細胞間の連絡をしている。神経細胞間のシグナル伝達はシナプスで行われ、特に興奮性シナプスの後シナプスはスパインという突起を形成している。軸索、樹状突起、スパインはいずれも神経細胞の一部が突出した特殊な構造である。これらの形成には細胞骨格が重要な役割を果たしていることはよく知られている。これらの突起形成には細胞表面が増大するため、細胞膜の脂質成分や膜タンパク質の供給が必要であるが、その仕組みについては殆どわかっていなかった。我々は哺乳動物脳で高発現する新規キナーゼ Lemur kinase 1 (LMTK1)を、やはり脳で機能するキナーゼ Cdk5 に結合するタンパク質として単離した。長らく機能が不明であったが、最近、LMTK1 活性の低下(ノックアウト、ノックダウン、不活性型の発現など)が軸索や樹状突起の過形成を引き起こすことから、軸索や樹状突起の伸長をネガティブに制御している因子であることを明らかにした。しかし、LMTK1 がどのような仕組みで軸索や樹状突起の形成を制御しているかは不明であった。

2. 研究の目的

我々が見つけた LMTK1 は軸索、樹状突起やスパインの形成を制御している。しかし、制御の分子機構については解っていない。制御機構について、次の三つの課題を設定して、LMTK1 の機能を分子レベルと個体レベルで明らかにする。

(1) LMTK1 には膜貫通領域の有無によって、LMTK1A (膜貫通配列なし)と LMTK1B (膜貫通配列あり)の二つのアイソフォームが存在する。しかし、これまでの研究のほとんどは LMTK1A で行われてきており、LMTK1B については殆ど解っていない。LMTK1B について、その神経細胞での発現と機能を明らかにする。

(2) LMTK1A はエンドソーム輸送を制御する Rab11 活性を調節して、突起の伸長に関与している。しかし、LMTK1A と Rab11 は直接には相互作用していない。LMTK1A がどのようにして、Rab11 活性を制御しているかを明らかにする。

(3) これまで LMTK1 の研究は培養神経細胞レベルで主に行ってきた。LMTK1 の軸索伸長、樹状突起の枝分かれ、スパインの形成などの多くは培養細胞レベルの結果である。動物の個体レベルでの LMTK1 の役割をノックアウトマウスで明らかにする。

3. 研究の方法

(1)LMTK1A と LMTK1B を区別して検出できる抗体はない。よって、それらの発現解析は PCR 法を用いて転写レベルで検討した。脳内の発現については *in situ hybridization* を用いた。LMTK1A と LMTK1B の細胞内局在は培養細胞へそれぞれの発現ベクターを導入し、タグに対する蛍光抗体染色により解析した。それらの機能については、それぞれのキナーゼ不活性型を発現させ、その影響を調べることによって明らかにした。

(2)LMTK1A による Rab11 の不活性化については、Rab11 の活性化因子(GEF)と不活性化因子(GAP)で同定されているものについて、LMTK1 との相互作用を免疫沈降法で調べた。その結果、GAP である TBC1D9B が検出されたので、それについてスパイン形成や Rab11、LMTK1A との関連について、神経細胞に強制発現させて検討した。

(3)LMTK1 の *in vivo* の機能については、LMTK1 のノックアウトマウスを用いて調べた。特に脳の構造を顕微鏡で観察するとともに一連の行動実験により高次脳機能への影響を明らかにした。

4. 研究成果

(1) LMTK1 には A と B の二つのアイソフォームがある。LMTK1A は 1317 アミノ酸からなり、LMTK1B は 1374 アミノ酸からなる。その違いは膜貫通配列の有無による。非膜貫通型の LMTK1A

と膜貫通型の LMTK1B である。ただし、非膜貫通型の LMTK1A もパルミトイル化を介して膜に結合している。両者のアミノ酸配列からの予測分子量は 140kDa 程度であるが、両者とも SDS-PAGE では 250kDa 付近とかなり大きな位置に現れ、ウェスタンブロットでは区別できない。それらを別々に検出できるプライマーを作成して定量的 PCR を行なったところ、マウス脳内では LMTK1A と LMTK1B がほぼ同じ割合で発現していることが判った。LMTK1A、LMTK1B とともに発生直後の脳で検出されたが、発達に伴い量は増加していた。培養細胞に発現させて、細胞内局在を調べたところ、ともに Rab11 が局在するリサイクリングエンドソームに存在していた。しかしキナーゼ不活性型を発現させたところ、LMTK1A は細胞全体に分散したのに対して、LMTK1B は核の近傍に存在していた。キナーゼ不活性型を神経細胞に発現させた時に、LMTK1A の不活性型では軸索の伸長やスパインの密度増加が見られたのに対して、LMTK1B の不活性型は何の変化も示さなかった。LMTK1A と LMTK1B は機能的違いがあることが示された。

(2)LMTK1A は Rab11 活性を抑えて、軸索伸長などを適切な速度に調節をして、正しい神経回路の形成に寄与していると予測される。しかし、LMTK1A がどのように Rab11 活性を制御しているか不明であった。これは LMTK1 の機能を解明する上での最も大きな課題であった。Rab11 は低分子量 GTPase である。その活性はヌクレオチド交換因子 (GEF) によって活性化され、GTPase 活性化タンパク質 (GAP) によって不活性化される。Rab11 の GEF や GAP は最近いくつか同定されたばかりである。それらと LMTK1A との相互作用を免疫沈降法で調べたところ、GAP である TBC1D9B が結合した。TBC1D9B もスパイン形成に関しては抑制的に作用し、しかも、その活性は LMTK1A によって制御されることが明らかとなった。Rab11 の GAP の生理的な役割が明らかにされた初めての例である。これにより Cdk5 から、LMTK1 TBC19B Rab11 recycling endosome というエンドソーム制御のシグナル伝達のカスケードが確立された。

(3)LMTK1 の神経突起伸長の抑制作用は培養神経細胞の実験から得られた結果である。脳内での LMTK1 の機能については、まだ明らかにされていない。LMTK1 のノックアウトマウスを用いて、その機能を解析した。まず、脳の構造を調べたところ、組織レベルでは大きな異常は観察されなかったが、シナプスタンパク質に対する抗体で脳を染色した時、シナプスの数が増加していることが判明した。電子顕微鏡で小脳プルキンエ細胞のシナプス部位を観察したところ、プレシナプス領域が増大している傾向が見られた。しかし、電気生理学的には異常は検出できなかった。LMTK1 KO マウスは空間記憶や恐怖記憶には異常が認められなかったが、いくつかの行動異常も観察された。LMTK1 KO マウスではオープンフィールドテストで行動量が増加しており、壁にアタックする頻度が有意に増加していた。また、高架十字路迷路ではオープンアームに野生型より長時間滞在し、不安を感じにくくなっていることが示された。また、強制水泳などでも静止時間が短く抑うつ行動も過剰になっていた。これらは自閉症の特徴とも一致しており、LMTK1 KO マウスは自閉症モデルマウスとして利用できる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Takahashi M, Kobayashi Y, Ando K, Saito, Y, Hisanaga S. Cyclin-dependent kinase 5 promotes proteasomal degradation of the 5-HT_{1A} receptor via phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 510:370-375, 2019

Tarutani A, Murayama S, Hisanaga S, Hasegawa, M. Potent prion-like behaviors of pathogenic α -synuclein and evaluation of inactivation methods. *Neuropathol Commun.* 2018 Apr 18;6(1):29.

Tuerde D, Kimura T, Miyasaka T, Furusawa K, Shimozawa A, Hasegawa M, Ando A, Hisanaga S. Isoform-independent and phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mouse brain during postnatal development. *J. Biol. Chem.* 293: 1781-1793, 2018

Kimura T, Sharma G, Ishiguro K, Hisanaga S. Phospho-tau bar code: analysis of phosphoisotypes of tau and its application to tauopathy. *Fron. Mol. Neurosci.*, 12, 44, 2018.

Krishnankutty A, Kimura T, Saito T, Aoyagi K, Asada A, Takahashi S, Ando K, Ohara-Imaizumi M, Ishiguro K, Hisanaga S. *In vivo* regulation of glycogen synthase kinase 3 β activity in neurons and brains. *Sci. Rep.* 7, 8602, 2017.

Furusawa K, Asada A, Urrutia P, Gonzalez-Billault C, Fukuda M, Hisanaga S. Cdk5 regulation of the GRAB-mediated Rab8-Rab11 cascade in axon outgrowth. *J. Neurosci.* 37:790-806, 2017.

Kimura T, Hosokawa T, Taoka M, Tsutsumi K, Ando K, Ishiguro K, Hosokawa M, Hasegawa M, Hisanaga S. Quantitative and combinatory determination of *in situ* phosphorylation of tau and its FTDP-17 mutants. *Sci. Rep.* 6:33479, 2016.

Sharma S, Tsutsumi K, Saito T, Asada A, Ando K, Tomomura T, Hisanaga S. The kinase activity of endosomal kinase LMTK1A regulates its cellular localization and interactions with cytoskeletons. *Genes Cells.* 21: 1080-1094. 2016.

Tarutani A, Suzuki G, Shimozawa A, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S, Hasegawa M. Effect of Fragmented Pathogenic α -Synuclein Seeds on Prion-like Propagation. *J. Biol. Chem.*, 291:18675-18688. 2016.

Oikawa T, Nonaka T, Hisanaga S, Hasegawa M. α -Synuclein fibrils exhibit gain-of-toxic-function, promoting tau aggregation and inhibiting microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 291:15046-15056, 2016

Shimonaka S, Nonaka T, Suzuki G, Hisanaga S, Hasegawa M. Templated Aggregation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Seeding with TDP-43 Peptide Fibrils. *J Biol Chem.* 291:8896-907. 2016

Takasugi T, Minegishi S, Asada A, Saito T, Kawahara H, Hisanaga S. Two degradation pathways of the p35 Cdk5 activation subunit, dependent and independent of ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 291:4649-4657, 2016.

〔学会発表〕(計 20件)

西野尋紀, 堤弘次, 浅田明子, 斎藤太郎, 久永眞市. 樹状突起スパイン形成における Lemur kinase1A (LMTK1A) の役割. 第 68 回日本細胞生物学会大会 (6 月、京都)

Tuerde, D., Kimura, T., Miyasaka, T., Asada, A., Saito, T., Ando, K., Hisanaga, S. Phosphorylation and Isoform Expression of Microtubule-Associated Protein Tau are Regulated Independently during Brain Development. Asian-Pacific Society for Neurochemistry. (Aug. Kuala Lumpur, Malaysia)

Kimura, T., Ishiguro, K., Hasegawa, M., Hisanaga, S. Heterogeneous phosphorylation of microtubule-associated protein tau in cultured cells. 14th meeting of APSN, (Aug. Kaula Lumpur, Malaysia).

Krishnankutty, K., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., Ando, K., Ohara-Imaizumi, M., Ishiguro, K., Hisanaga, S. *In vivo* regulation of GSK3 β activity unveiled by the quantitative

measurement of its phospho-isotypes. 46th annual meeting of Society for Neuroscience (Nov. San Diego, USA)

Furusawa, K., Asada, A., Urrutia, P., Gonzalez-Billault, C., Fukuda, M., Hisanaga, S. Cdk5-dependent phosphorylation of GRAB, a guanine nucleotide exchange factor for Rab8, regulates axon outgrowth by directing Rab8A to Rab11A-positive endosomes. American Society for Cell Biology 2016 (12月、サンフランシスコ)

杉山亜梨華、高橋路佳、魏冉、福田公子、友村美根子、安藤香奈絵、久永眞市. 小胞体輸送を制御する脳キナーゼ LMTK1 の膜貫通型と非膜貫通型アイソフォームの発現と機能解析 第39回日本分子生物学会年会 (12月、横浜)

Takasugi, T., Minegishi, S., Asada, A., Saito, T., Hiroyuki K., Hisanaga, S. Ubiquitin-dependent and -independent degradation of p35 activation subunit of neuronal Cdk, Cdk5. ASBMB Exp Biol 2017 (Apr. Chicago, IL)

魏冉, 杉山亜梨華, 福田光則, 安藤香奈絵, 久永眞市. Deferent cellular localization and functions of LMTK1 isoforms; lipid-anchored and transmembrane types. 第69回日本細胞生物学会大会(6月、仙台)

久永眞市. エンドソームのトラフィック制御と軸索形成及び維持. SAM 研究会シンポジウム (7月、岐阜)

Takahashi, M., Sugiyama, A., Takahashi, R., Fukuda, K., Tomomura, M., Ando, K., Hisanaga, S. LMTK1 is a novel membrane bound kinase involved in anxiety and depression. The 2017 ISN-ESN Meeting, (Aug. Paris, France).

Nishino, H., Takano, T., Tsutsumi, K., Asada, A., Saito, T., Ando, K., Hisanaga, S. Dendritic spine formation is regulated by Lemur kinase 1A (LMTK1A) via Rab11A-positive endosome trafficking. ISN-ESN meeting 2017, (Aug. Paris, France)

Tuerde, D., Kimura, T., Miyasaka, T., Furusawa, K., Shimozawa, A., Hasegawa, M., Ando, K., Hisanaga, S. Isoform-independent and -dependent phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mouse brain during postnatal development. ISN-ESN, 20-24 August, Paris, France

Hisanaga, S. Cyclin-dependent kinase 5, its role in neuronal differentiation, synaptic activity and neurodegeneration. Royan International Conference, Tehran, Iran, Sep.

Hisanaga, S. Axon and dendrite formation, the molecular mechanism viewed from membrane trafficking. Royan International Conference, Tehran, Iran, Sep.

木村妙子、久永眞市. 複雑怪奇なリン酸化タンパク質タウのPhos-tag解析。電気泳動学会シンポジウム (9月、広島)

Tuerde, D., Kimura, T., Miyasaka, T., Furusawa, K., Shimozawa, A., Hasegawa, M., Ando, K., Hisanaga, S. Isoform-independent and -dependent phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mouse brain during postnatal development. 第3回日本—台湾プロテインホスファターゼ学術集会、第8回日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会 (10月、仙台)

西野尋紀, 高野哲也, 堤弘次, 浅田明子, 斎藤太郎, 安藤香奈絵, 久永眞市. Lemur kinase 1A (LMTK1A)は Rab11A 依存的なリサイクリングエンドソームの輸送を介して樹状突起スパインの形成を制御する. 2017年度生命科学系合同年次大会(12月、神戸)

久永眞市. Phospho-tau bar code - 死後脳でのタウリン酸化解析はタウオパチーの診断に役立つか? 新学術領域研究「コホート・生体試料支援プラットフォーム」研究者対象シンポジウム (12月、東京)

Nishino, H., Saito, T., Takano, T., Tsutsumi, K., Ando, K., Tomomura, M., Fukuda, M., Hisanaga, S. Lemur kinase 1 (LMTK1A) regulates dendritic spine formation through the TBC1D9B Rab11 GAP and Rab11 cascade. 第 69 回日本細胞生物学会、東京、6 月 5-8 日、2018。

Zhu, Y., Kimura, T., Kikuchi, C., Wei, R., Ando, K., Hisanaga, S. The role of Thr231 phosphorylation of tau on its localization into the nucleus. 15 meeting of APSN. Macau, China. Aug. 27-29, 2018

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。