

平成21年 4月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：平成19年～平成20年

課題番号：19700344

研究課題名 (和文) 神経細胞における Cdk5/p25 の細胞死促進機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of neuronal death-promoting mechanism of Cdk5/p25

研究代表者

斎藤 太郎 (SAITO TARO)

首都大学東京・理工学研究科・助教

研究者番号：70301413

研究成果の概要：

小胞体ストレスによる神経細胞死の過程でCdk5/p25が細胞質から核内に移行・蓄積して細胞死を促進しているとする申請者らの発見をもとに、神経細胞死におけるCdk5の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。分子生物・生化学的研究から、Cdk5/p25の核内蓄積と細胞死促進には、p35の限定分解によるp25の生成だけでなく小胞体ストレスが必要であることが示唆された。さらに、小胞体ストレス以外の原因による神経細胞死でCdk5の役割を検討したところ、ハンチントン病の原因遺伝子産物、変異ハンチンチンの細胞内凝集体の形成をCdk5が阻害することがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,900,000	0	1,900,000
平成20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：Cdk5、神経細胞死、プロテインキナーゼ、小胞体ストレス、神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は細胞内外の様々なストレスによって細胞死が誘導される。Cdk5/p35は分化した神経細胞で機能するSer/Thrキナーゼである。活性化サブユニットp35の限定分解産物であるp25がアルツハイマー病患者脳で蓄積していることが報告されて以来、神経変性・細胞死におけるCdk5の機能について関心が高まっているが、いまだよくわかっていない。申請者らはカルパインによりp35がp25へ限定分解されることを見つけた。生化学的な研究からCdk5はp35を介して細胞質内の膜構造に結合しているが、p25への限定分解によりCdk5は膜から遊離し、生理的な基質から細胞死に関係した基質へ標

的をシフトさせているのではないかと考えられているが、その標的などわかっていない。申請者らは最近、小胞体ストレスによる神経細胞死で、1. カルパインによるp35からp25への限定分解が見られること、2. Cdk5の阻害により細胞死が抑制されること、3. 限定分解されたp25が核へ移行することを見つけた。小胞体ストレスは小胞体に構造異常タンパク質が蓄積して起きるストレスである。細胞は小胞体ストレス応答と呼ばれる機構でストレスを解決しようとするが、ストレスが持続するとアポトーシスの経路が活性化し細胞死に至る。近年、小胞体ストレスによる神経細胞死とアルツハイマー病発症との関係が示唆されている。

2. 研究の目的

小胞体ストレスによる神経細胞死をモデル系として、神経細胞死における Cdk5/p25 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

分子生物・生化学的研究により、1. 小胞体ストレスにより活性化するカスパーゼ経路における Cdk5 の機能、2. 神経細胞核内から細胞死に関与した Cdk5 の新規基質の探索、3. 他の原因による神経細胞死への適用の検討を計画した。

4. 研究成果

小胞体ストレスによる神経細胞死で Cdk5 を阻害するとカスパーゼ3の活性化が抑制された。Cdk5 とカスパーゼ経路が関係していると考えられた。Cdk5/p25 の核内蓄積とカスパーゼの活性化を調べるため、培養神経細胞にアデノウイルスを用いて p25 を発現させたところ、Cdk5/p25 の核内蓄積、カスパーゼ3の活性化はいずれも見られなかった。そこで p25 を発現させた神経細胞に小胞体ストレスを加えたところ、p25 の核内蓄積が見られた。Cdk5/p25 の核内蓄積と細胞死促進には小胞体ストレスが必要であることが示唆された。

神経細胞死における Cdk5 の役割について、小胞体ストレス以外の原因による神経細胞死で検討した。神経変性疾患の一つであるハンチントン病は、原因遺伝子ハンチンチンの変異により線条体の中型有刺細胞で神経細胞死が誘導される。変異ハンチンチンは神経細胞内で疾患の病理学的特徴である細胞内凝集体を形成し、神経細胞死を誘導すると考えられている。変異ハンチンチンの凝集体形成における Cdk5 の働きを検討したところ、Cdk5 は凝集体形成を阻害することがわかった。この Cdk5 の働きは細胞内微小管の重合安定性を変化させることが考えられた。

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 21 件)

- 1) Kaminosono*, S., Saito*, T., Oyama, F., Ohshima, T., Asada, A., Nagai, Y., Nukina, N. and Hisanaga, S. (2008) Suppression of mutant Huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. *J Neurosci.* 28, 8747-8755 (*equal contribution)
- 2) Asada, A., Yamamoto, N., Gohda, M., Saito, T., Hayashi, N. and Hisanaga, S. (2008) Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear

localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes. *J Neurochem.* 106, 1325-1336

- 3) Sato, Y., Taoka, M., Sugiyama, N., Kubo, K., Fuchigami, T., Asada, A., Saito, T., Nakajima, K., Isobe, T. and Hisanaga, S. (2007) Regulation of the interaction of Disabled-1 with CIN85 by phosphorylation with Cyclin-dependent kinase 5. *Genes Cells* 12, 1315-1327
- 4) Sato, K., Zhu, Y.S., Saito, T., Yotsumoto, K., Asada, A., Hasegawa, M. and Hisanaga, S. (2007) Regulation of membrane association and kinase activity of Cdk5-p35 by phosphorylation of p35. *J Neurosci Res.* 85, 3071-3078
- 5) Ishii, A., Nonaka, T., Taniguchi, S., Saito, T., Arai, T., Mann, D., Iwatsubo, T., Hisanaga, S.I., Goedert, M. and Hasegawa, M. (2007) Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. *FEBS Lett.* 581, 4711-4717
- 6) Yamada, M., Saito, T., Sato, Y., Kawai, Y., Sekigawa, A., Hamazumi, Y., Asada, A., Wada, M., Doi, H. and Hisanaga S. (2007) Cdk5-p39 is a labile complex with the similar substrate specificity to Cdk5-p35. *J Neurochem.* 102, 1477-1487
- 7) Saito, T., Konno, T., Hosokawa, T., Asada, A., Ishiguro, K. and Hisanaga, S. (2007) p25/cyclin-dependent kinase 5 promotes the progression of cell death in nucleus of endoplasmic reticulum-stressed neurons. *J Neurochem.* 102, 133-140
- 8) Taniguchi, M., Taoka, M., Itakura, M., Asada, A., Saito, T., Kinoshita, M., Takahashi, M., Isobe, T. and Hisanaga, S. (2007) Phosphorylation of adult type Sept5 (CDCrel-1) by cyclin-dependent kinase 5 inhibits interaction with syntaxin-1. *J Biol Chem.* 282, 7869-7876
- 9) Kamei, H., Saito, T., Ozawa, M., Fujita, Y., Asada, A., Bibb, J. A., Saido, T. C., Sorimachi, H. and Hisanaga, S. (2007) Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25

by site-specific phosphorylation. *J Biol Chem.* 282, 1687-1694

[学会発表] (計3件)

- 1) 細川智永、斎藤太郎、浅田明子、久永真市
後シナプス領域における Cdk5 と CaMKII の
相互作用 第51回日本神経化学学会大会
2008年10月 富山
- 2) 斎藤太郎、上之菌紗有子、小山文隆、浅田
明子、永井義隆、貫名信行、久永真市
Cdk5/p35によるハンチントン病原因タン
パク質ハンチンチンの凝集阻害 第31回
日本神経科学大会 2008年7月 東京
- 3) 斎藤太郎、遠藤 良、浅田明子、久永真市
神経細胞死における p25/Cdk5 の核移行
第50回日本神経化学学会大会 2007年9月
横浜
- 4) Sato, Y., Taoka, M., Sugiyama, N., Kubo,
K., Fuchigami, T., Asada, A., Saito, T.,
Nakajima, K., Isobe, T., Hisanaga, S.
Regulation of the interaction of Dab1
with CIN85 by phosphorylation with
Cyclin-dependent kinase 5. 細胞生物学会
2007年5月 福岡
- 5) 遠藤良、斎藤太郎、浅田明子、久永真市 パ
ーキンソン病モデル神経細胞におけるCdk5
活性化サブユニットp35の分解制御と細胞
死 病態と治療におけるプロテアーゼとイ
ンヒビター学会 2007年8月 大阪
- 6) 嶺岸正治、浅田明子、宮内伸也、瀧上孝裕、
斎藤太郎、久永真市 膜結合に依存した
Cdk5活性化サブユニットp35とp39の分解制
御機構の解析。病態と治療におけるプロテ
アーゼとインヒビター学会 2007年8月
大阪
- 7) 遠藤良、斎藤太郎、浅田明子、久永真市
MPP+又は6-OHDAによるCdk5/p35の分解制御
と細胞死 第50回日本神経化学学会大会
2007年9月 横浜
- 8) 斎藤太郎、遠藤 良、浅田明子、久永真市
神経細胞死におけるp25/Cdk5の核移行 第
50回日本神経化学学会大会 2007年9月 横
浜
- 9) 上之菌紗有子、斎藤太郎、小山文隆、浅
田明子、永井義隆、貫名信行、久永真市
Cdk5/p35による変異型ハンチンチンの凝集
抑制 第50回日本神経化学学会大会 2007年
9月 横浜
- 10) Sato, K., Zhu, Y-S., Saito, T.,
Yotsumoto, K., Asada, A., Hasegawa, M.,
Hisanaga, S. Regulation of the membrane
association and kinase activity of
Cdk5-p35 by phosphorylation of p35. 第
50回日本神経化学学会大会 2007年9月 横
浜
- 11) Endo, R., Saito, T., Asada, A.,
Hisanaga, S. Deregulation of p35 Cdk5
activator metabolisms in MPP+-induced
neuronal cell death. 第37回北米神経科学
会 2007年11月 サンディエゴ
- 12) Hosokawa, T., Saito, T., Asada, A.,
Hisanaga, S. Crosstalk between Cdk5 and
CaMKII in the postsynaptic region. 第37
回北米神経科学会 2007年11月 サンディ
エゴ
- 13) Saito, T., Konno, T., Hosokawa, T.,
Asada, A., Ishiguro, K., Hisanaga, S.
p25/cyclin-dependent kinase 5 promotes
the progression of cell death in nucleus
of endoplasmic reticulum-stressed
neurons. 第37回北米神経科学会 2007年
11月 サンディエゴ
- 14) Kaminosono, S., Saito, T., Oyama, F.,
Asada, A., Nukina, N., Hisanaga, S.
Inhibition of mutant huntingtin
aggregate formation by Cdk5/p35. 第37

- 回北米神経科学会 2007年11月 サンディエゴ
- 15) Minegishi, S., Asada, A., Miyauchi, S., Fuchigami, T., Saito, T., Ishiguro, K., Hisanaga, S. Proteolysis of Cdk5 activators p35 and p39 on membranes. 第37回北米神経科学会 2007年11月 サンディエゴ
- 16) 細川智永、斎藤太郎、浅田明子、久永真市 Crosstalk between Cdk5 and CaMKII in the postsynaptic region. 第30回分子生物学会年会 2007年12月 横浜
- 17) 堤弘次、浅田明子、斎藤太郎、久永真市 AATYKキナーゼによる神経特異的Cdk、Cdk5の活性化 第30回日本分子生物学会 2007年12月 横浜
- 18) 浅田明子、小澤美来、斎藤太郎、久永真市 p35/Cdk5とp39/Cdk5の細胞内局在に及ぼすCdk5キナーゼ活性の影響 第30回分子生物学会年会 2007年12月 横浜
- 19) 久永真市、浅田明子、斎藤太郎、神経細胞の生死を決めるCdk5の膜結合と核移行 第30回分子生物学会ワークショップ 2007年12月 横浜
- 20) 嶺岸正治、浅田明子、渕上孝裕、宮内伸也、斎藤太郎、久永真市 Cdk5活性化サブ

- ユニットp35とp39は膜上で選択的に分解されている 第30回分子生物学会年会 2007年12月 横浜
- 21) Yotsumoto, K., Sakaue, F., Oikawa, T., Ishiguro, K., Saito, T., Asada, A., Hasegawa, M., Hisanaga, S. Dephosphorylation of Cdk5-phosphorylated FTDP-17 mutant tau. 認知症学会 2007年9月 大阪
6. 研究組織
(1) 研究代表者
斎藤 太郎 (SAITO TARO)
首都大学東京・理工学研究科・助教
研究者番号：70301413