

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15751

研究課題名(和文)レット症候群原因遺伝子CDKL5の神経細胞分化時におけるリン酸化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the phosphorylation mechanism of the Rett syndrome-causing gene CDKL5 during neuronal differentiation

研究代表者

片山 将一 (KATAYAMA, Syouichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・助教

研究者番号：60779049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)はセリン/スレオニンタンパク質リン酸化酵素である。CDKL5遺伝子の変異は出生後早期よりてんかん発作を伴う精神・神経疾患を発症させる。かつてこの疾患はMethyl-CpG2-binding protein 2を原因遺伝子とするレット症候群の亜型と認識されていたが、最近ではCDKL5欠損症とその名称を改められている。本研究ではCDKL5欠損症発症機構の解明に向けて、分子レベルの解析に取り組んだ。その結果、CDKL5のリン酸化状態が神経細胞分化過程で変動する事を見出し、さらにこのリン酸化の責任キナーゼを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CDKL5欠損症を発症させるその分子機序の解明には、CDKL5がどのような分子と相互作用するかを見出すことが必須の課題となる。しかしながら、CDKL5がリン酸化する基質やCDKL5の機能を制御するタンパク質の情報はほとんど明らかにされていないのが現状であった。研究代表者が見出したCDKL5の神経細胞分化過程におけるリン酸化状態の変動は、CDKL5の制御機構と神経細胞分化の関係を明らかにするための重要な知見であり、今後CDKL5欠損症の発症機構を解明するための手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) is a serine/threonine protein kinase. Mutations in the CDKL5 gene cause psychiatric and neurological disorders associated with epileptic seizures early after birth. This disorder has historically been recognized as a subtype of Rett syndrome, but recently identified as a unique disorder called "CDKL5 deficiency disorder." In this study, we worked on molecular level analysis to elucidate the onset mechanism of CDKL5 deficiency. As a result, we clarified that the phosphorylation state of CDKL5 changes during neuronal differentiation. Moreover, we identified the kinase responsible for this phosphorylation.

研究分野：生化学

キーワード：CDKL5 CDKL5欠損症 神経細胞分化 シグナル伝達 P19細胞 Phos-tag SDS-PAGE タンパク質リン酸化 Rett症候群

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

CDKL5 は主に脳に発現するタンパク質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ)である。CDKL5 遺伝子の変異はてんかん発作や精神発達の遅延を主症状とする疾患を発症させる。この疾患はかつて Methyl-CpG-binding protein 2 を原因とするレット症候群の亜型としてみなされていたが、現在は CDKL5 欠損症と呼ばれる特有の疾患と認識されている。これまでに CDKL5 欠損症の根本的な治療方法は存在せず、対症療法が行われている。CDKL5 欠損症の根本的な治療法開発のためには CDKL5 を取り巻くシグナル伝達経路を明らかにすることが必須の課題である。しかしながら、研究開始当初 CDKL5 は神経系の発達に必須であることは明らかにされていたものの(Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2012)、その過程において CDKL5 自身がどのように機能制御されるかは全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

MAP キナーゼを始めとした様々なプロテインキナーゼが自己あるいは他のプロテインキナーゼによってリン酸化され、その機能を調節されることから、CDKL5 もリン酸化を介した機能制御を受けることで神経細胞分化の進行に関わる可能性がある。CDKL5 の機能制御機構と神経細胞分化との関係性を明らかにできれば、CDKL5 欠損症の発症機構について分子レベルで新たな知見を提示することが可能となる。そのため研究代表者は多能性細胞である P19 細胞をモデルとして、当該細胞が神経細胞分化する過程における、CDKL5 のリン酸化状態の変化に着目した。この着眼点より、CDKL5 自身がリン酸化を介してどのように機能制御されるか、また神経細胞分化に関与するかを明らかにすることを目的と定めた。

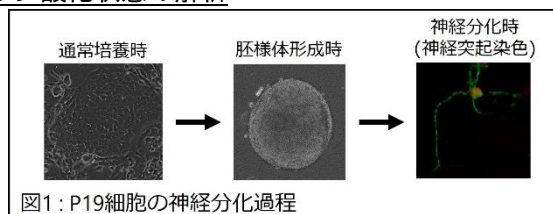
3. 研究の方法

CDKL5 自身が受けるリン酸化の解析には Phos-tag SDS-PAGE を使用した。Phos-tag SDS-PAGE はリン酸化タンパク質を上方へのシフトバンドとして検出する手法であり(Kinoshita et al. Mol Cell Proteomics. 2006)、タンパク質リン酸化研究に汎用されている。この手法を利用して P19 細胞の神経細胞分化各段階における CDKL5 のリン酸化状態を解析した。また、プロテインキナーゼの阻害剤を利用して CDKL5 をリン酸化するプロテインキナーゼの特定を試みた。さらに LC-MS/MS 法を用いて CDKL5 のリン酸化がどのアミノ酸残基に起こるかを同定し、そのリン酸化と神経細胞分化との関係を解析した。

4. 研究成果

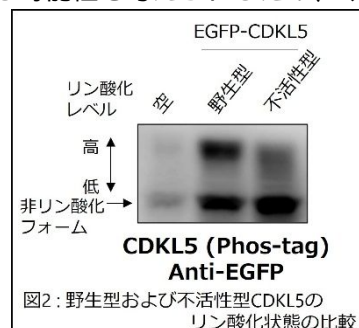
(1) P19 の神経細胞分化時における CDKL5 のリン酸化状態の解析

P19 細胞の神経細胞分化過程における CDKL5 のリン酸化状態を確認した。P19 細胞は胚様体と呼ばれる凝集塊を介して神経細胞分化する(図 1)。CDKL5 はこの胚様体形成過程において顕著に脱リン酸化されることを明らかにした。



(2) CDKL5 がリン酸化されるメカニズムの解明

一般にプロテインキナーゼが受けるリン酸化には自己リン酸化と上流キナーゼによるリン酸化の2パターンが想定される。そこで本研究では野生型 CDKL5 と不活性型 CDKL5 を P19 細胞に発現させ、CDKL5 が自己リン酸化するかを検討した。その結果、CDKL5 は一部自己リン酸化するが上流キナーゼによってもリン酸化されることが明らかになった(図 2)。上流キナーゼによるリン酸化によって CDKL5 自身の酵素活性が制御される可能性も考えられるため、今後は上流キナーゼによるリン酸化に着目することとした。



(3) CDKL5 をリン酸化する上流キナーゼの探索

プロテインキナーゼの阻害剤ライブラリーを使用し、CDKL5 の上流キナーゼを探索したところ、とあるキナーゼの阻害剤を添加した際に、CDKL5 のリン酸化状態が低下することを明らかにした。また、当該キナーゼによって CDKL5 が in vitro でリン酸化されることを明らかにした。

(4) CDKL5 のリン酸化部位の同定

CDKL5 を細胞内より免疫沈降し、そのリン酸化部位を LC-

MS/MS 法で解析した。その結果 CDKL5 の触媒領域近傍にリン酸化部位の存在が示唆された。しかしながら、同定した推定リン酸化部位をリン酸化されないアミノ酸である Ala に置換した変異体のリン酸化状態に変化は見られなかったため、今後正確なリン酸化部位の同定を試みる必要がある。

(5)P19 細胞における CDKL5 の機能解析

CDKL5 が受けるリン酸化の意義を解析するための予備実験として、P19 細胞における CDKL5 の機能解析を行った。CRISPR-Cas9 法によって CDKL5 をノックアウトした P19 細胞を樹立し、その解析を行ったところ、CDKL5 のノックアウトにより細胞死に抵抗性を示すことが明らかになった。今後は CDKL5 が受けるリン酸化と細胞死の関係を解明する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Syouchi Katayama, Noriyuki Sueyoshi, Tetsuya Inazu, Isamu Kameshita	4. 巻 2020
2. 論文標題 Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 (CDKL5): Possible Cellular Signalling Targets and Involvement in CDKL5 Deficiency Disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Plasticity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/6970190.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片山将一, 城 裕己, 山崎哲男
2. 発表標題 Phos-tag SDS-PAGEを利用したcyclin-dependent kinase-like 5の基質リン酸化検出法の開発
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山将一, 城 裕己, 山崎哲男
2. 発表標題 人工基質を用いたcyclin-dependent kinase-like 5 の基質リン酸化活性を検出する手法の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Syouchi Katayama
2. 発表標題 Establishment a straightforward method for detecting catalytic activity of CDKL5 using phos-tag SDS-PAGE
3. 学会等名 Current Topics in Basic and Translational Research for Development of Innovative Drugs (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山将一
2. 発表標題 CDKL5欠損症の発症機構解明と治療法確立を目指して
3. 学会等名 徳島大学薬学部 操薬シンポジウム『インタラクティブYAKUGAKUJIN』講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山将一, 城 裕己, 山崎哲男
2. 発表標題 Cyclin-dependent kinase-like 5の酵素活性をin celluloにおいて検出する手法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山将一, 城 裕己, 山崎哲男
2. 発表標題 Cyclin-dependent kinase-like 5のin vitro神経細胞分化における役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------