

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 月 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500356

研究課題名（和文） 活性化サブユニット p35 コンディショナル KO を用いた Cdk5 の機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of Cdk5 by using conditional KO of its activating subunit p35

研究代表者

大島 登志男（OHSHIMA TOSHIO）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20311334

研究成果の概要（和文）：

神経細胞特異的セリン・スレオニンキナーゼ Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)の機能を、活性化サブユニット p35 のコンディショナルノックアウト(KO)マウスを作製し、空間学習課題や恐怖条件付け課題などの行動解析、電気生理学的解析、生化学的解析を行なう事で明らかにする事を本研究の目的とした。本研究では p35 遺伝子座に 2 つの loxP を挿入した (p35-flox) マウスを作成した。脳形成が終了してから p35 遺伝子を破壊するために、タモキシフェン(TM)で Cre 活性を誘導できる CreER マウスと交配して、誘導型 p35 コンディショナル KO を作成した。2mg TM の経口投与 3 日間連続で p35 の 80%以上の量的低下が確認された。また、生後約 3 週 of 海馬 CA1 特異的に Cre が発現する CaMKII-Cre マウスとの交配で、CA1 特異的 p35 コンディショナル KO を作成し、Cre 発現後に p35 タンパク質量が海馬で低下していることが確認できた。CA1 特異的 p35 コンディショナル KO マウスにおいては、海馬 CA1 錐体神経細胞のスパイン数の減少が観察されている。これらの p35 コンディショナル KO について、現在行動解析を行なっている。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to analyze the function of neuron-specific serine/threonine kinase Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) by using conditional KO mice of its activating subunit p35 through the behavioral analysis such as spatial learning and fear conditioning test, and electrophysiological analysis and biochemical analysis. In this study we generated p35-flox mice in which two loxP sequences were inserted in p35 gene allele. We generated inducible p35 conditional KO by crossing p35-flox and CreER mice in which Cre is activated by Tamoxifen (TM) and p35 gene was destructed after brain formed. We confirmed decrease of p35 protein by p.o. administration of 2 mg TM for three days. We also generated CA1-specific p35 conditional KO mice by crossing CaMKII-Cre mice, and confirmed decreased level of p35 protein in hippocampus. We observed decreased numbers of dendritic spines in the hippocampal CA1 pyramidal neurons in CA1-p35 cKO mice. Using these p35 conditional KO mice, we currently conduct behavioral analysis of p35 cKO mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学

キーワード：キナーゼ、リン酸化、コンディショナルKO

### 1. 研究開始当初の背景

我々の脳がどのように記憶・学習を行ない、恐怖などの情動がどのように記憶されるか、そのメカニズムの解明は、神経・精神疾患の病態を理解し、治療に結びつける上で、重要な脳科学の研究テーマであり、多くの研究者が取り組んでいる課題である。研究アプローチの対象としては、神経細胞レベルから、神経回路レベル、1つのシステムとしての脳、と様々であるが、神経細胞のレベルでの分子メカニズムの解明が急速に進んでいる。神経細胞内で刺激依存的に起きる細胞内シグナル伝達の解明は、神経細胞レベルで研究を進める上で重要である。

我々はこれまで、シグナル伝達の中でも特に神経細胞特異的セリン・スレオニンキナーゼ Cdk5 によるタンパク質リン酸化に着目して研究を進めてきた。Cdk5 は Cdk5 と活性化のサブユニット p35 または p39 がヘテロダイマーを形成してはじめて活性型となるが、p35 と p39 が神経細胞特異的に発現しているため、主に神経細胞で活性が検出されるユニークな Cdk メンバーである。

我々は Cdk5 欠損マウスを作製し、その解析を通じて、Cdk5 の脳形成における役割を明らかにしてきたが、Cdk5 欠損マウスが胎生致死のため、Cdk5 の脳機能に関する役割を p35 欠損マウスで解析し、LTP が誘発され易く、LTD が誘発されない事と、空間学習に障害があることを明らかにし

てきた (Wei ら 2005, Ohshima ら 2005)。しかしながら、p35 欠損マウスには軽度であるが、脳構造に異常があり、こうした学習の障害が機能的障害によるものか結論を得ていない。また昨年、米国の Bibb 博士らの研究グループが、CreER™ を用いた Cdk5 の誘導型コンディショナル KO マウスを解析した結果、シナプス後膜での NR2B のタンパク質量が増加し、NR2B overexpression マウスと同様に LTP が増強し、学習・記憶が野生型に比べ増強したと報告した (Nat. Neurosci. 10:880-886, 2007)。Cdk5 が Calpain や NR2B と complex を作り、Calpain による NR2B の限定分解に寄与し、Cdk5 の喪失により Calpain の NR2B 分解が減少し、結果として NR2B 量が増加した結果である。即ち、Cdk5 のリン酸化酵素としての機能的意義に関しては、解明されないままである。

### 2. 研究の目的

Cdk5 のリン酸化酵素としての機能を明らかにするためには、p35 コンディショナル KO マウスの作成が必要であり、p35 コンディショナル KO マウスの解析により、Cdk5 のキナーゼとしての脳機能の役割が明らかになる事が期待される。p35 欠損マウスを用いた検討から、空間学習に加えて、恐怖条件づけ課題の検討から、Cdk5/p35 が扁桃体依存的恐怖記憶の形成や、消去に関与している可能性が示唆されている (未発表データ)。従って、空間学

習課題に加え、恐怖条件付け課題などの行動解析、電気生理学的な解析を行なう事で、LTP, LTD のシナプス可塑性の変化と行動解析の結果を関連付けて検討する事を目的として研究を開始した。

### 3. 研究の方法

#### Cdk5/p35 の脳高次機能における役割の解明

① p35 コンディショナル KO (cKO) マウスラインの作成

a) p35-flox マウスの作成

b) CreER line: 誘導型 p35 cKO マウスの作成

c) CaMKII $\alpha$ -Cre line: 海馬 CA1 特異的 p35 cKO マウスの作成

② p35 コンディショナル KO マウスラインの解析

a) 組織学的、p35-flox の脳形成の評価

b) 生化学的解析 p35 タンパク質量の低下の確認

c) 行動解析 空間学習、恐怖条件付け、など

d) 電気生理学的、CA1-LTP, LTD などの検討

#### Cdk5/p35, p25 の神経変性疾患での役割の解明

p35KO マウスと神経変性疾患モデルマウスとのダブルTg マウスの作成と解析

### 4. 研究成果

#### ①p35-flox マウスラインの確立

C57BL/6 由来 ES 細胞をにおいて、p35 遺伝子と相同組換えを起こすことにより、2つの loxP を挿入した。Neo カセットは FLP-frt 組換えを利用して取り除いた。これにより、p35-flox マウスが作成された。組織学的に、脳構造には異常がなく、生化学的にも、脳各部位の p35 タンパク質量は野生型と同量であった。従って、組換えを起こす前の p35 タンパク質量に変化はなく、flox 配列の挿入により脳発達に影響はないことが確認できた。

#### ②CreER p35cKO line の確立

p35-flox マウスと CAG-CreER マウスを交配し、誘導型の p35 コンディショナル KO (cKO) マウスラインを確立した。タモキシフェン(TM)の投与法を

検討し、2mg TM の経口投与 3 日間連続で p35 の 80% 以上の量的低下が確認された。

#### ③CaMKII $\alpha$ -Cre p35cKO line の確立

CaMKII $\alpha$ -Cre マウスを用いて、海馬 CA1 特異的 p35 cKO マウスの作成を行なった。Cre の発現は P14-17 以後に海馬 CA1 特異的に起きるので、3-4 週齢のマウス海馬の p35 タンパク質量を検討し、海馬 CA1 特異的 p35cKO マウスにおいて、p35 タンパク質量の低下が確認された。

#### ④p35cKO マウスの組織学的解析

誘導型、海馬 CA1 特異的 p35cKO マウスともに、脳の組織構築に異常はないことを確認した。

Golgi 染色法により、海馬 CA1 錐体神経細胞の樹状突起 spine の数を p35-flox マウスと比較して、数の減少を確認した。

#### ⑤p35cKO マウスの行動解析、電気生理学的解析

現在、一連の行動解析及び海馬の電気生理学的解析を行なっている。

#### ⑥p35KO マウスとアルツハイマー病モデルマウスとのダブルTg マウスの作成と解析

p35cKO マウスとの交配に先立って、p35KO マウスを用いた研究を行なった。アルツハイマー病においては、p35 から p25 の産生が起こることが、病態の悪化につながるとの考えから、p35 欠損によりアルツハイマー病モデルマウスにおける病態の改善が期待されたが、組織学的及び記憶学習の評価において、ダブルトランスジェニックにおいて病態の進行が認められ、仮説に反する結果となった。現在、さらに解析を進めている。

### 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 6 件)

1. Yamashita N, Ohshima T, Nakamura F, Kolattukudy P, Honnorat J, Mikoshiba K, Goshima Y. Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper dendritic field organization. *J. Neurosci.* 32, 1360-1365, 2012. (査読あり)
2. He X, Takahashi S, Suzuki H, Hashikawa T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, Ohshima T. Hypomyelination Phenotype Caused by Impaired Differentiation of Oligodendrocytes in Emx1-cre Mediated Cdk5 Conditional Knockout Mice. *Neurochem Res.* 36, 1293-1303, 2011. (査読あり)
3. Tsutsumi K, Takano T, Endo R, Fukuda M, Ohshima T, Tomomura M, Hisanaga S. Phosphorylation of AATYK1 by Cdk5 suppresses its tyrosine phosphorylation. *PLoS ONE* 5(4): e10260, 2010. (査読あり)
4. Takahashi S, Ohshima T, Hirasawa M, Pareek TK, Bugge TH, Morozov A, Fujieda K, Brady RO, Kulkarni AB. Conditional deletion of neuronal cyclin-dependent kinase 5 in developing forebrain results in microglial activation and neurodegeneration. *American J. Pathology.* 176, 320-329, 2009. (査読あり)
5. Nakamura F, Ugajin K, Yamashita N, Okada T, Uchida Y, Taniguchi M, Ohshima T, Goshima Y. Increased proximal bifurcation of CA1 pyramidal apical dendrites in sema3A mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 516, 360-375, 2009. (査読あり)
6. Endo R, Saito T, Asada A, Kawahara H, Ohshima T, Hisanaga S. Commitment of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neuronal cell death by proteasome-mediated degradation of p35 Cyclin-dependent kinase 5 activator. *J. Biol. Chem.* 284, 26029-39, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. Niisato E, Nagai, J, Yamashita N, Nakamura F, Goshima Y, and Ohshima T. Collapsin response mediator proteins regulate bifurcation of apical dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons during the brain development. 2011 SFN annual meeting, Washington DC, USA Nov. 13, 2011.
2. Niisato E, Yamashita N, Nakamura F, Goshima Y, Ohshima T. "Role of collapsin

response mediator proteins for dendritic development in hippocampal CA1 pyramidal neurons". *Neuro* 2010, September 2-4.

3. He X, Takahashi S, Suzuki H, Hashikawa T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, Ohshima T. Hypomyelination phenotype caused by impaired differentiation of oligodendrocytes in Emx1-cre mediated Cdk5 conditional knockout mice. BMB2010, Kobe, Japan, Dec.7

[図書] (計 1 件)

大島 登志男. 神経特異的キナーゼ Cdk5 の神経発達と神経変性への関与. *Brain Science Review* 2010, クバプロ, 61-79.

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.ohshima.biomed.sci.waseda.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 登志男 (Ohshima Toshio)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20311334