

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290024

研究課題名(和文) 神経細胞におけるエンドサイトーシスとリサイクリング輸送の生理と病理に関する研究

研究課題名(英文) Physiology and pathology of endocytosis and recycling transport in neurons

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Cdk5は神経細胞特異的な膜結合性キナーゼである。本研究ではCdk5の基質であるLMTK1という脳の新規Ser/ThrキナーゼとGRABというRab8の活性化因子(GEF)について、それらの神経突起伸長における役割を解析した。LMTK1とGRABはともにCdk5によってリン酸化され、リン酸化されたLMTK1はRab11の活性化を抑制し、リン酸化されたGRABはRab8の活性化が出来なくなった。不活性化型のRab11とRab8は伸長する突起の先端に膜成分を供給できないために突起の伸長が抑制されるという突起伸長抑制機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cdk5 is a brain specific membrane-bound protein kinase. We have analyzed a role of Cdk5 in neurite outgrowth in mouse primary neurons. Cdk5 phosphorylates LMTK1, a novel Ser/Thr kinase in brains, and GRAB, an activator of Rab8. Phosphorylated LMTK1 suppressed activation of Rab11 and phosphorylated GRAB lost the Rab9 activation activity. Rab11 and Rab8 are major regulators in endosome transport, supplying membrane components to the tip of axon or dendrites. Thus, their inactivation results in the reduced neurite outgrowth. This signaling cascade is negative regulatory mechanism of neurite outgrowth.

研究分野：神経生化学

キーワード：タンパク質 酵素 神経科学 発生・分化 Cdk5 LMTK1 Rab GRAB

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では様々な細胞内膜小器官が存在し、細胞機能を分担している。各細胞内小器官が正しく機能することが細胞の生存にとっては必要なことである。各細胞内小器官への膜タンパク質の輸送は Rab 低分子量 GTPase によって精緻に制御されている。しかし、Rab 活性を制御する仕組みについては判っていないことが多い。我々は脳に特異的な膜結合性プロテインキナーゼ Cdk5 の活性制御と機能について研究を続けている。Cdk5 の機能の一つは膜輸送制御がある。神経細胞は軸索と樹状突起という長い2種類の突起を持つ特徴的な形態をしており、それぞれの突起の先端で利用される膜成分を正しく分配、輸送する制御機構は重要である。具体的な Cdk5 の膜輸送における役割は、エンドサイトーシスとエンドソーム輸送の制御である。最近、我々は Cdk5 の新規基質 LMTK1 を同定した。LMTK1(以前は AATKY1 と呼ばれていた)は脳に高発現する機能未知の Ser/Thr キナーゼである LMTK1 をノックアウトまたはノックダウンすると軸索伸長が促進された。LMTK1 は Rab11 依存性のリサイクリングエンドソーム輸送を抑制し、軸索伸長に必要なメンブレン供給を制限していた。しかし、その詳しい機構については解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では神経細胞の軸索、樹状突起の形成に関わる膜輸送系の新規シグナル伝達経路の制御機構を明らかにする。しているかは不明である。特に、LMTK1A が軸索や樹状突起伸長を制御する分子機構および新たに Cdk5 基質として見つかった GRAB の軸索伸長への関与について分子レベルで明らかにする実験を行った。

3. 研究の方法

(1) LMTK1 による樹状突起形成制御

LMTK1 が軸索形成を制御していることはすでに報告している。ここでは樹状突起伸長を対象とした。培養神経細胞は培養3-5日にかけて軸索伸長し、培養7-10日で樹状突起をする。軸索伸長後に遺伝子導入し、樹状突起伸長に対する効果を検討する。

大脳皮質神経細胞に LMTK1 (野生型、キナーゼ欠損型、Cdk5 リン酸化型、Cdk5 非リン酸化型)を過剰発現させ、樹状突起の形成(長さ、本数、枝分かれなど)を測定する。

大脳皮質神経細胞内の LMTK1 を shRNA によりノックダウンし、樹状突起の形成を観察する。

神経細胞ヘリサイクリングエンドソームマーカーである Rab11-GFP を発現させ、リサイクリングエンドソームの樹状突起内での輸送をタイムラプスで観察する。

LMTK1 を Rab11 の活性型、不活性型、野生型と共発現させ、樹状突起内のリサイクリングエンドソーム輸送を観察する。

LMTK1 ノックアウトマウスの大脳皮質神経細胞を培養し、樹状突起の形成を観察する。

ノックアウトマウス神経細胞に各種 LMTK1 を発現させ、レスキュー実験を行う。

以上により、LMTK1 の樹状突起形成における役割を明らかにする。

(2) LMTK1A キナーゼ活性の膜輸送における役割

LMTK1A はプロテインキナーゼであるが、活性が弱いためか、活性自身およびその基質についても判っていない。キナーゼ不活性型の変異体を用いてキナーゼ活性のエンドソーム輸送における役割を神経系株化細胞 Neuro2A や PC12 を用いて調べた。

LMTK1A と細胞骨格の相互作用

小胞輸送は微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格とそれらと協働するモータータンパク質によって行われている。野生型(wt)と不活性型(kn)の LMTK1 との細胞骨格との関連を共染色法により確認する。

PC12 細胞を用いて突起伸長に対するキナーゼ活性の役割を調べる

PC12 細胞に wt と knLMTK1A を遺伝子導入し、NGF により突起伸長を誘導した後、突起の長さを計測する。

(3)新規 Cdk5 基質 GRAB による軸索伸長制御

Cdk5 が軸索の伸長を制御する経路は複

数あると予想される。新規因子 GRAB による軸索伸長制御を検討する

GRAB は Rab8 の活性化因子 (GEF) である。GRAB が Cdk5 によってリン酸化されるか、された場合のリン酸化部位を同定する。

GRAB の軸索伸長における役割を GRAB を RNAi によりノックダウンして明らかにする。

GRAB およびそのリン酸化部位変異体を神経細胞に発現させ、リン酸化の軸索伸長における役割を明らかにする。

リン酸化 GRAB の Rab8GEF 活性に対する影響、Rab11 結合に対する影響を調べる。

4. 研究成果

(1) LMTK1 による樹状突起形成制御

軸索伸長後に LMTK1 をノックダウンまたは過剰発現させて、樹状突起伸長における役割を調べたところ、ノックダウンをすると樹状突起の伸長および分岐が増加した。LMTK1 は樹状突起の抑制因子であることが示された。軸索伸長と同様に、Cdk5 非リン酸化型変異体で同様に樹状突起の促進がみられた。LMTK1 ノックアウトマウスでも発達初期 (生後 7 日目) に樹状突起の過剰形成が一過的に観察された。LMTK1 がどのような仕組みで樹状突起伸長を抑制しているのかを Rab11 の結合したリサイクリングエンドソームの輸送に注目して調べた。LMTK1 を不活性化すると、軸索や樹状突起内における Rab11 結合小胞の軸索末端側への移動が促進されていた。特に連続した移動距離が長くなり、逆方向への反転が少なくなっていた。以上の結果から LMTK1 は Rab11 の活性化を抑制し、軸索輸送を適度の早さにしていることが明らかとなった。

(2) LMTK1A キナーゼ活性の膜輸送における役割

LMTK1A は Rab11 で標識されるリサイクリングエンドソームに結合し、核近傍に集積する。その集積に微小管が関与するかを微小管重合阻害剤ノコダゾールで処理した。微小管の脱重合とともに、LMTK1 は核近傍から細胞全体へと分散し、核近傍へ

の集積が微小管依存的であることが示された。LMTK1 と微小管との結合を調べるために、wt または knLMTK1 を発現している細胞の微小管の分布を蛍光染色で観察した。LMTK1 は wt も kn も微小管上に存在していた。しかし、wt と knLMTK1A 存在下では微小管の分布が異なっていた。knLMTK1A を発現させると微小管が細胞周囲へ移動した。微小管形成中心 (MTOC) の位置を α -tubulin で調べたところ、wtLMTK1A 存在下では核の下側にあった α -tubulin が核の横に移動していた。

アクチンフィラメントとの関連について調べた。wtLMTK1 は主に微小管と共同存在を示したが、knLMTK1A はアクチンフィラメントの多い領域に存在していた。特に PC12 細胞の突起の先端ではその傾向が強く観察された。knLMTK1A は Rab11 活性を抑制して、突起先端へ向かう輸送を阻害する。Rab11 活性が弱い状態では微小管の先端からアクチンフィラメントへ乗り換えることができないと考えられた。

(3) 新規 Cdk5 基質 GRAB による軸索伸長制御

GRAB のアミノ酸配列を調べたところ、GEF 領域の C 末側に Cdk5 のリン酸化部位と想定される配列が 3 か所見つけた。リン酸化部位を解析したところ、Ser169 と Ser180 がリン酸化部位として同定された。GRAB をノックダウンすると軸索の伸長は抑制され、リン酸化によりその活性がなくなることが示された。即ち、GRAB の軸索伸長活性は Cdk5 によるリン酸化で抑制されることになる。リン酸化の GEF 活性に対する影響を調べたところ、リン酸化は GEF 活性を抑えることが判明した。しかし、GRAB の Rab11 との結合はリン酸化によって影響を受けなかった。実際に GRAB は Rab11 リサイクリングエンドソームと結合して、軸索内を輸送され、軸索末端で脱リン酸化され、Rab8 を活性化し、輸送小胞が細胞膜と融合するのを制御してい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 15 件)

- (1) 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. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M115.692871.
- (2) Kimura, T., Hatsuta, H., Masuda-Suzukake, M., Hosokawa, M., Ishiguro, K., Akiyama, H., Murayama, S., Hasegawa, M., Hisanaga, S. The abundance of nonphosphorylated tau in mouse and human tauopathy brains revealed by the use of Phos-tag method. *Am. J. Pathol.* 186: 398-409, 2016. 査読有
doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.009.
- (3) Takada, S., Mizuno, K., Saito, T., Asada, A., Giese, K. P., Hisanaga, S. Effects of p35 mutations associated with mental retardation on the cellular function of p35-CDK5. *PLOS ONE*, 10: e0140821, 2015. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0140821.
- (4) Takahashi, M., Miyata, H., Kametani, F., Nonaka, T., Akiyama, H., Hisanaga, S., Hasegawa, M. Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathol.* 129, 893-907, 2015. 査読有
doi: 10.1007/s00401-015-1415-2.
- (5) Kimura, T., K. Ishiguro, Hisanaga, S. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Frontiers Mol. Neurosci.* 7, 65, 2014. 査読有
doi: 10.3389/fnmol.2014.00065
- (5) Kobayashi, H., Saito, T., Sato, K., Furusawa, K., Hosokawa, T., Tsutsumi, K., Asada, A., Kamada, S., Ohshima, T., Hisanaga, S. Phosphorylation of Cdk5 at Tyr15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *J. Biol. Chem.* 289, 19627-19636, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.mcn.2014.05.006.
- (6) Ito, Y., Asada, A., Kobayashi, H., Takano, T., Sharma, G., Saito, T., Ohta, Y., Amano, M., Kaibuchi, K., Hisanaga, S. Preferential targeting of p39-activated Cdk5 to Rac1-induced lamellipodia. *Mol Cell Neurosci.* 61, 34-45, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.mcn.2014.05.006
- (7) Furusawa, K., Asada, A., Saito, T., Hisanaga, S. The effect of Cyclin-dependent kinase 5 on voltage-dependent calcium channels in PC12 cells varies according to channel type and cell differentiation state. *J. Neurochem.* 130, 498-506, 2014. 査読有
doi: 10.1111/jnc.12746
- (8) Takahashi, M., Ishida, M., Saito, T., Ohshima, T., Hisanaga, S. Valproic acid downregulates Cdk5 activity via transcription of p35 mRNA. *Biochem. Biophys Res Commun.* 447, 678-682, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.072.
- (9) Takano, T., Urushibara, T., Yoshioka, N., Saito, T., Fukuda, M., Tomomura, M., Hisanaga, S. LMTK1 regulates dendritic formation by regulating movement of Rab11A-positive endosomes. *Mol Biol. Cell*, 25, 1755-1768, 2014. 査読有
doi: 10.1091/mbc.E14-01-0675
- (10) Tanabe, K., Yamazaki, H., Inaguma, Y., Asada, A., Kimura, T., Takahashi, J., Taoka, M., Ohshima, T., Furuichi, T., Isobe, T., Nagata, K., Shirao, T., Hisanaga, S. Phosphorylation of drebrin by cyclin-dependent kinase 5 and its role in neuronal migration. *PLOS ONE*, 9, e92291, 2014. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0092291
- (11) Asada, A., Yamazaki, R., Kino, Y., Saito, T., Kimura, T., Miyake, M., Nobuyuki Nukina, N., Hisanaga, S. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2. *Neurosci. Lett.* 563, 112-117, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2014.01.046
- (12) Saito, T., Yano, M., Kawai, Y., Asada, A., Wada, M., Doi, H., Hisanaga, S. Structural basis for the different stability and activity between the Cdk5 complexes with p35 and p39 activators. *J. Biol. Chem.* 288: 32433-32439, 2013. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.512293
- (13) Nagano, T., Hashimoto, T., Nakashima, A., Hisanaga, S., Kikkawa, U., Kamada, S. Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression. *Cell Cycle* 12, 2617-2624, 2013. 査読有

DOI: 10.4161/cc.25623

(14) Fuchigami, T., Sato, Y., Tomita, Y., Takano, T., Miyauchi, S., Tsuchiya, Y., Saito, T., Kubo, K., Nakajima, K., Fukuda, M., Hattori, M. and Hisanaga, S. Dab1-mediated colocalization of multi-adaptor protein CIN85 with Reelin-receptors, ApoER2 and VLDLR, in neurons. *Genes to Cells*, 18, 410-424, 2013. 査読有

Doi; 10.1111/gtc.12045

(15) Kimura, T., Tsutsumi, K., Taoka, M., Saito, T., Masuda-Suzukake, M., Ishiguro, K., Plattner, F., Uchida, T., Isobe, T., Hasegawa, M., and Hisanaga, S. Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *J. Biol. Chem.* 288, 7968-7977, 2013. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M112.433326

〔学会発表〕(計 15件)

(1) Hisanaga, S. Neuronal protein kinase LMTK1 regulates neurite outgrowth through Rab11-dependent endosomal trafficking in a Cdk5-dependent manner. EMBO Workshop, プエルトモン(チリ), 2015年3月23-26日.

(2) Furusawa, K., Asada, A., Saito, T., Fukuda, M., Hisanaga, S. Axon growth activity of GRAB, a guanine nucleotide exchange factor for Rab8, is regulated by Cdk5. 第67回日本細胞生物学会大会、江戸川(東京) 2015年6月30日-7月2日.

(3) Hisanaga, S., Kimura, T. Reevaluation of physiological and pathological phosphorylation of tau in vitro to human brains 25th ISN meeting, ケアンズ(オーストラリア) 2015年8月23-25日.

(4) Takasugi, T., Minegishi S., Kawahara, H., Saito, T., Hisanaga, S. Cdk5 activator, p35 is degraded by proteasome via two pathways. 25th biennial meeting . ケアンズ(オーストラリア) 2015年8月23-25日

(5) Takahashi, M., and Hisanaga, S. Phosphorylation of serotonin 1A receptor (5HT1AR) by Cdk5 activity. 25th biennial meeting .ケアンズ(オーストラリア) 2015年8月23-25日

(6) Takano, T., Tsutsumi, K., Fukuda, M.,

Tomomura, M., Hisanaga, S. PP1-binding neuronal protein kinase LMTK1 suppresses neurite outgrowth through the regulation of Rab11-dependent endosomal trafficking. **国際フォスファターゼコンフェレンス、仙台(宮城) 2014年11月12-14日**

(7) Tanabe, K., Yamazaki, H., Inaguma, Y., Asada, A., Kimura, T., Takahashi, J., Taoka, M., Ohshima, T., Furuichi, T., Isobe, T., Nagata, K., Shirao, T., Hisanaga S. Phosphorylation of Drebrin by Cyclin-dependent kinase 5 and Its Role in Neuronal Migration. APSN, 高雄(台湾), 2014年8月23-26日

(8) 久永眞市. 脳特異的キナーゼ Cdk5 の活性制御と生理および病理. 第4回メトロポリタン脳の老化・認知症フォーラム、新宿(東京) 2014年12月4日

(9) Kimura, T., Hosokawa, T., Tsutsumi, K., Hatsuta, H., Masuda-Suzukake, M., Hosokawa, M., Fukushima, H., Ishiguro, K., Akiyama, H., Murayama, S., Hasegawa, M., Hisanaga, S. Analysis of Tau phosphorylation in Tauopathy using Phos-tag SDS-PAGE. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会、千代田(東京)、2014年6月5-7日

(10) Sharma, G., Tsutsumi, K., Asada, A., Saito, T., Tomomura, M., Hisanaga, S. A role of Lemur Kinase 1A (LMTK1A) in growth cone. The 37th the Molecular Biology Society of Japan、横浜(神奈川) 2014年12月1-4日

(11) Takano, T., Ogura, T., Saito, T., Asada, A., Fukuda, M., Tomomura, M., Hisanaga, S. LMTK1/AATYK1 negatively regulates dendritic arborization of cortical neurons through endosomal trafficking. 第24回国際神経化学会、カンクン(メキシコ) 2013年4月20-24日

(12) Kimura, T., Hosokawa, T., Fukushima, H., Tsutsumi, K., Masuda-Suzukake, M., Hatsuta, H., Akiyama, H., Ishiguro, K., Murayama, S., Hasegawa, M., Hisanaga, S. Analysis of Tau phosphorylation in Tauopathy neurodegeneration using Phos-tag SDS-PAGE. Neuro2013 第56回日本神経化学会大会、京都(京都)、2013年6月20-23日

(13) Hisanaga, S. Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphory-

lated in Alzheimer's disease. 第11回世界生物学的精神医学会国際会議、京都、2013年6月23-27日

(14) Hisanaga, S., Urushibara, T., Saito, T., Asada, A., Fukuda, M., Tomomura, M., Takano, T. LMTK1 regulates dendritic arborization by regulating movement of Rab11A-positive endosomes. The 43th SFN、サンディエゴ(アメリカ)、2013年11月9-13日

(15) 古澤孝太郎, 浅田明子, 斎藤太郎, 久永眞市 The effect of Cdk5 on voltage-dependent calcium channel activity in PC12 cells. 第36回日本分子生物学会, 神戸(兵庫)、2013年12月3-6日

〔図書〕(計 2件)

(1) 斎藤太郎, 久永眞市. サイクリン依存性キナーゼ5の活性制御機構と神経細胞死における役割. 生体の科学, 65, 266-270, 2014.

(2) 斎藤太郎, 久永眞市. 神経細胞におけるCDK5の機能とその異常活性化による神経変性疾患. 細胞周期 2013. 実験医学(羊土社), 31, 265-270, 2013.

〔その他〕

ホームページの URL

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=neu mol>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久永 眞市 (HISANAGA SHIN-ICHI)
首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：20181092

(3) 連携研究者

斎藤 太郎 (SAITO TARO)
首都大学東京・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：70301413

浅田 明子 (ASADA AKIKO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：00336512