

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：22604  
 研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2007～2011  
 課題番号：19057007  
 研究課題名（和文）神経細胞における Cdk5/p35 の活用戦略とシグナル伝達抑制因子としての役割  
 研究課題名（英文）Utilization of Cdk5/p35 and its role as a negative modulator in signal transduction pathways in neurons.  
 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

### 研究成果の概要（和文）：

Cdk5 が神経細胞内で発現しても細胞死が誘導されない理由として細胞内局在が考えられた。Cdk5 は p35 のミリスチル化を介して細胞質の膜構造に結合していること、Cdk5 活性は Cdk5 の核外輸送を促進していること等が示された。Cdk5 が神経興奮を抑制していることが確認され、その一つとしてセプチン5のリン酸化が関与していることが示された。Cdk5 の神経活動抑制効果の一つとして、LMTK1 という新規キナーゼを介した軸索伸長抑制が見つかった。

### 研究成果の概要（英文）：

Subcellular localization of Cdk5 is a molecular mechanism that prevents cell death of neurons even when Cdk5 is expressed in post-mitotic neurons. It was shown here that Cdk5 bound to membrane organelles in the cytoplasm through myristoylated p35 Cdk5 activator and Cdk5 activity promoted export of the active Cdk5-p35 complex from the nucleus. We confirmed that Cdk5 suppressed excitation of neurons. One of the molecular mechanisms is phosphorylation of Sept5, which inhibited interaction with syntaxin1 SNARE protein. We also found a novel function of Cdk5, which was suppression of neurite outgrowth through LMTK1 neuron abundant novel Ser/Thr protein kinase.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	28,800,000	0	28,800,000
2008 年度	17,300,000	0	17,300,000
2009 年度	12,600,000	0	12,600,000
2010 年度	12,100,000	0	12,100,000
2011 年度	12,100,000	0	12,100,000
総 計	82,900,000	0	82,900,000

研究分野：神経生化学

科研費の分科・細目：脳神経科学

キーワード：サイクリン依存性キナーゼ，分化，増殖，神経細胞，細胞死，シグナル伝達

#### 1. 研究開始当初の背景

Cdk5 は最終分化した神経細胞において、p35 との結合で活性化されるサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) である。p35 のカルパイン

による p25 への限定分解は Cdk5 を異常活性化させ、細胞死を誘導する。神経細胞はこのような死のリスクにも関わらず、Cdk5/p35 を巧妙に利用している。Cdk5 は脳形成やシナプ

ス可塑性など多様な機能に関与するが、その特徴は PKA、CaMKII、PKC などのセカンドメッセンジャー依存性キナーゼとの拮抗性にある。即ち、Cdk5 はシグナル伝達の負の制御因子として、過剰な反応や興奮を抑えていると推測された。しかし、本研究課題のような観点からは研究された報告はなく、どのような仕組みで Cdk5 が神経機能に働いているかは未解決であった。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の 5 つの課題について研究を行い、最終的には細胞の増殖と分化との関連を明らかにすることである。(1)と(2) Cdk5/p35 が持つ細胞死誘導活性を回避する機構、および、その破綻と細胞死実行機構、(3)と(4) 非興奮時の神経細胞で、Cdk5/p35 が CaMKII の活性化を抑えている仕組み、及び、興奮時に Cdk5/p35 が不活性化して、抑制効果を解除する仕組み、そして(5) Cdk5 の興奮抑制作用を細胞から個体レベルで検証すること(6) Cdk5 の活性制御機構などである。

## 3. 研究の方法

いずれも、実験材料として株化培養細胞、初代神経細胞、マウス個体を用いる。Cdk5、その活性化サブユニットである p35 と p39、また、Cdk5 の基質となるタンパク質をそれぞれの細胞に発現させ、Cdk5 の活性化、不活性化が基質タンパク質の活性や細胞機能にどのような影響を及ぼすかを検討する。個体レベルでは、Cdk5 活性に影響を与える薬物投与、または p35 ノックアウトマウスなどを用いて Cdk5 機能を検証する予定である。

## 4. 研究成果

(1)と(2);増殖細胞では Cdk は核内に存在し、細胞周期進行反応を制御している。それに対して細胞分裂をしない神経細胞では、Cdk5 は主に細胞質に存在していた。その理由は、Cdk5 活性化サブユニット p35 がミリスチル化され、それを介して細胞質の膜構造に結合していることが明らかとなった。さらに、Cdk5 活性自身も活性型 Cdk5 が核内に残らないように、核からの排出を促進していることが示された。一方、もう一つの活性化サブユニットである p39 もミリスチル化され、細胞質にも存在するが、核に存在する量も p35 よりは多く、核内での役割を持っているようであった。Cdk5-p39 は Cdk5-p35 に比べて不安定である。核内に存在できるのはそのような不安定性によるものと考えられた。Cdk5 の過度な安定性は細胞死を導くことが Cdk5-p25 の例で知られている。そのため、p35 はターンオーバーの早い性質を持つ。短寿命であるためには細胞膜近傍に局在すること

が必要であった。P35 の分解にはユビキチン化が必要と考えられていたが、細胞死が起こる時には必ずしも、ユビキチン化が起こり易い状況ではない。脳虚血などで細胞死を誘導させた時に、ユビキチン化非依存的なプロテアソーム分解が起こることが判明した。

(3)と(4):Cdk5 は興奮性神経伝達物質グルタミン酸処理で活性が低下する。そのため神経興奮がより促進されることが考えられる。通常はシナプス活動を抑えていると考えられる。実際に Cdk5 の阻害剤で神経細胞を処理すると CaMKII の活性化が容易に見られた。Cdk5 による CaMKII の抑制を調べたが、明確な結果は得られなかった。その代り、CaMKII による p35 のリン酸化が新たに同定された。このリン酸化も p35 の安定性に関わっているようであった。シナプス領域における Cdk5 の基質を探索したところ、Septin5 が新しく同定された。Septin5 の Cdk5 によるリン酸化は Syntaxin1 との相互作用を制御しており、シナプス活動後のエンドサイトーシスを制御している可能性が考えられた。

(5);Cdk5 の活性を個体レベルで制御できる薬物を検索したところ、バルプロ酸が見つかった。バルプロ酸は培養神経細胞での Cdk5 活性を p35 の合成を抑制することにより低下させた。P35 に特異的であり、p39 には効果が見られなかった。バルプロ酸は p35 の転写を抑制していた。マウス個体でも急性投与ではその効果が見られなかったが、2 週間の長期投与で p35 の減少が見られ、その時にマウスの不安行動が増加しているようであった。

(6)Cdk5 の情報伝達シグナル抑制因子活性として、新たな基質 LMTK1 を介したリサイクリングエンドソームの輸送抑制および軸索伸長抑制活性が見つかった。この結果は、Cdk5 が軸索伸長抑制をするという初めての結果であり、また、軸索伸長に関わる膜供給の分子機構に関わる重要な結果である。

## 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 21 件)

(1)と(2):

- ① Asada, A., Saito, T., and Hisanaga, S. Subcellular localization of active Cdk5 is determined by its own kinase activity. J. Cell Sci., in press
- ② Shahpasand, S., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M., and Hisanaga, S. Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's

- disease. *J. Neurosci.*, 32, 2430-2441, 2012.
- ③ Sato, K., Minegishi, S., Takano, J., Plattner, F., Saito, T., Asada, A., Kawahara, H., Iwata, N., Saido, T. C., Hisanaga, S. Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25. *J. Neurochem.* 117, 504-515, 2011.
- ④ Hisanaga, S., and Endo, E. Regulation and role of Cdk5 kinase activity in neuronal survival and death. *J. Neurochem.*, 115, 1309-1321, 2010.
- ⑤ Minegishi, S., Asada, A., Miyauchi, S., Fuchigami, T., Saito, T., and Hisanaga, S. Membrane association facilitates degradation and cleavage of the cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39. *Biochemistry*, 49, 5482-5493, 2010
- ⑥ Endo, R., Saito, T., Asada, A., Kawahara, H., Ohshima, T. and Hisanaga, S. Commitment of MPP<sup>+</sup>-induced neuronal cell death by proteasome-mediated degradation of p35 Cdk5 activator. *J. Biol. Chem.*, 284, 26029-26039, 2009.
- ⑦ Yotsumoto, K., Saito, T., Asada, A., Oikawa, T., Kimura, T., Uchida, C., Ishiguro, K., Uchida, T., Hasegawa, M., and Hisanaga, S. Effect of pin1 or microtubule binding on dephosphorylation of FTDP-17 mutant tau. *J. Biol. Chem.* 284, 16840-16847, 2009.
- ⑧ Kaminosono, S., Saito, T., Oyama, F., Ohshima, T., Asada, A., Nagai, Y., Nukina, N., and Hisanaga, S. Suppression of mutant huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. *J. Neurosci.* 28, 8747-8755, 2008.
- ⑨ Asada, A., Yamamoto, N., Gohda, M., Saito, T., Hayashi, N., and Hisanaga, S. Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) complexes. *J. Neurochem.* 106, 1325-1336, 2008.
- ⑩ Saito, T., Konno, T., Asada, A. and Hisanaga, S. p25/Cdk5 promotes the progression of cell death in nucleus of ER-stressed neurons. *J. Neurochem.* 102, 133-140, 2007.
- (2) と (3) :
- ① Hosokawa, T., Saito, T., Asada, A., Fukunaga, K., and Hisanaga, S. Quantitative Measurement of *In Vivo* Phosphorylation States of Cdk5 Activator p35 by Phos-tag SDS-PAGE. *Mol. Cell. Proteomics.* 9, 1133-1143, 2010.
- ② Sato, Y., Taoka, M., Sugiyama, N., Kubo, K., Fuchigami, T., Asada, A., Saito, T., Nakajima, K., Isobe, T. and Hisanaga, S. Regulation of the interaction of Disabled-1 with CIN85 by phosphorylation with Cyclin-dependent kinase 5. *Genes Cells* 12, 1315-1327, 2007.
- ③ Sato, K., Zhu, Y-S., Saito, T., Yotsumoto, K., Asada, A., Hasegawa, M. and Hisanaga, S. Regulation of the membrane association and kinase activity of Cdk5-p35 by phosphorylation of p35. *J. Neurosci. Res.* 85, 3071-3078, 2007.
- ④ Taniguchi, T., Taoka, M., Itakura, M., Asada, A., Saito, T., Kinoshita, M., Takahashi, M., Isobe, T., and Hisanaga, S. Phosphorylation of adult type sept5 (cdcrel-1) by cyclin-dependent kinase 5 inhibits interaction with syntaxin-1. *J. Biol. Chem.*, 282, 7869-7876, 2007.
- (6) :
- ① Takano, T., Tomomura, M., Yoshioka, N., Tsutsumi, K., Terasawa, Y., Saito, T., Kawano, H., Kamiguchi, H., Fukuda, M., Hisanaga, S. LMTK1/AATYK1 Is a Novel Regulator of Axonal Outgrowth That Acts via Rab11 in a Cdk5-Dependent Manner. *J. Neurosci.* In press.
- ② 久永眞市. Phos-tag を用いた Cdk5 制御サブユニット p35 の in vivo リン酸化の定量的解析. *生物物理化学.* 56, s9, 2012.
- ③ Takano, T., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Tomomura, M., Fukuda, M., Hisanaga, S. AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. *Genes Cells* 15, 783-797, 2010.
- ④ Tsutsumi, K., Takano, T., Endo, R., Fukuda, M., Ohshima, T., Tomomura, M., and Hisanaga, S. Phosphorylation of AATYK1 by Cdk5 suppresses its tyrosine phosphorylation. *PLoS ONE*, 5, e10260, 2010.
- ⑤ Sasaki, T., Ishiguro, K., and Hisanaga, S. Novel axonal distribution of neurofilament-H phosphorylated at the GSK3 $\beta$ -phosphorylation site in its E-segment. *J. Neurosci. Res.* 87:3088-3097, 2009.
- ⑥ Tsutsumi, K., Tomomura, M., Furuichi, T., and Hisanaga, S. Palmitoylation-dependent endosomal localization of AATYK1A and its interaction with Src. *Genes to Cells* 13, 949-964, 2008.

⑦ Kamei, H., Saito, T., Ozawa, O., Fujita, Y., Asada, A., Bibb, J. A., Saido, T. C., Sorimachi, S., and Hisanaga, S. Suppression of calpain-dependent cleavage of the cdk5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 1687-1694, 2007.

[学会発表] (計 16 件)

- (1) Hisanaga, S. Regulation of the kinase activity and function of Cyclin-dependent kinase 5 in post-mitotic neurons. 第 23 回国際神経化学学会シンポジウム, 2011年8月、アテネ
- (2) 久永真市. Phos-tag SDS-PAGEによって新しく出来たこと。日本生化学会フォーラム、2011年9月、京都
- (3) Hisanaga, S., Asada, A., and Saito, T. Cdk5 and neuron cell death. Pep Con-2010, 2011年3月、北京
- (4) Hisanaga, S. Normal and abnormal phosphorylation of Tau by Cyclin-dependent kinase 5. *Aging, Tau Protein and Dementias.* 2010年10月、東京
- (5) Hisanaga, S. Reconsideration of the activation mechanism of Cdk5 by p35 and p39. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Cdk5. 2009年6月、東京
- (6) Hisanaga, S. Effect of PIN1 and microtubules binding on dephosphorylation of FTDP-17 mutant Tau. 2009 International Conference on Alzheimer's Disease. 2009年7月、ウィーン
- (7) 久永真市, 細川智永, 浅田明子, 斎藤太郎. フォスタグSDS-PAGEを用いたタンパク質リン酸化の解析-Cdk5 活性化サブユニットp35 の場合- 第7回ヒトプロテオーム学会 (7月 東京)
- (8) 久永真市. サイクリン依存性キナーゼ5 (Cdk5) の異常活性化と神経変性疾患。「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班のワークショップ (7月, 東京)
- (9) Hisanaga, S. Neuronal development and neurodegeneration on Cdk5 and related signaling. 第32回日本神経科学大会 (9月, 名古屋)
- (10) 久永真市, 斎藤太郎. アルツハイマー病でみられるタウの異常リン酸化とプロテインフォスファターゼ. 第82回日本生化学会 (10月, 神戸)
- (11) 久永真市, 細川智永, 浅田明子, 斎藤太郎, タンパク質リン酸化研究へのフォスタグ SDS-PAGEの応用. 第4回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2009年11月、熊本
- (12) Hisanaga, S. Pro-survival and

pro-apoptotic activity of neuron-specific protein kinase Cdk5. 27th Annual conference of Indian Academy of Neuroscience、2009年12月、インド

- (13) Hisanaga, S. Cdk5 and Microtubules in Neurodegenerative Diseases. The International Symposium on "Cell Cycle and Cell Architecture". 2009年2月26日、名古屋
- (14) 久永真市, 浅田明子, 斎藤太郎. サイクリン依存性キナーゼ5の活性制御と神経変性疾患. 第31回日本分子生物学会シンポジウム、2008年12月、神戸
- (15) Hisanaga, S., Gotow, T., Shiozaki, M., Sasaki, T., Asada, A., Saito, T., Uchiyama, Y., Yasuki, J. Filament assembly abnormality of neurofilament-L with Charcot-Marie-Tooth disease mutation. 第31回日本神経科学大会、2007年7月、東京
- (16) 久永真市, 浅田明子, 斎藤太郎. (2007) 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

[図書] (計 4 件)

- (1) Minegishi, S., Hisanaga, S. Cyclin-dependent kinase 5: preparation and measurement of kinase activity. In *Protein kinase technologies. Neuromethods* (Ed., H. Mukai), Springer, in press.
- (2) 久永真市. 細胞機能。「第3版分子生物学」第12章 pp141-154。田沼靖一編、丸善、2011.
- (3) Hisanaga, S., Sasaki, T., and Uchida, A. Neurofilaments in aged animals. *Cytoskeleton of the Nervous System.* pp325-345. *Advances in Neurobiology* 3. Eds. By R. Nixon and A Yuan. Springer. 2011
- (4) 久永真市, 遠藤良. 神経細胞におけるCdk5-p35の活用戦略。「細胞周期フロンティア」佐方功幸・稲垣昌樹・岸本健雄 編集 共立出版、pp242-247、2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/mnc/>

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

プレスリリース

[http://www.excite.co.jp/News/release/Dp\\_rp\\_975.html](http://www.excite.co.jp/News/release/Dp_rp_975.html)

<http://must6.somee.com/surf.aspx?dec=1&url=uh4QwdELmS4FtSBQsqNMw8VGwcZOmPAT03>=B6X!>

など

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