

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370047

研究課題名（和文）：神経細胞におけるエンドソーム形成とリサイクリンの Cdk5/p35 による制御

研究課題名（英文）：Regulation of endosome formation and recycling by Cdk5/p35 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 の新規基質 CIN85 と AATYK1 について、それらのエンドサイトーシスやエンドソームの輸送における役割について検討した。AATYK1 はリサイクリングエンドソームに局在し、その形成を制御していた。神経細胞の形成時には軸索伸長の抑制因子として機能し、その機能は Cdk5 によって制御されていた。CIN85 については特異抗体を作成し、神経細胞内の局在からエンドサイトーシス直後の小胞で機能することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：CIN85 is an adapter protein involved in endocytosis and AATYK1 is a Ser/Thr kinase expressed highly in neurons. We found recently that both were phosphorylated by Cdk5. We studied roles of their Cdk5 phosphorylation in neurons. AATYK1 was shown to regulate recycling endosomal trafficking and the activity was suppressed by phosphorylation with Cdk5. AATYK1 activity is involved in axonal elongation. The function of CIN85 is not known. We generated a specific antibody to investigate endogenous CIN85 localization in neurons. CIN85 was present as small particles in neuronal soma and process, which were thought to be very early endocytic structures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：神経生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：CIN85、AATYK、Cdk5、エンドソーム、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景
Cdk5（Cyclin-dependent kinase 5）は制御

サブユニット p35 または p39 によって活性化される神経細胞特異的なセリン/スレオニン

キナーゼである。Cdk5/p35 は脳形成期の神経細胞移動、シナプス可塑性、神経変性疾患における神経細胞死などに関与していることが示されている。世界中の Cdk5 に関する研究もこの三つの機能を中心に進められており、また、申請者らもそれらに関連して Cdk5 の活性調節機構についての研究を続けていた。研究開始当初、申請者らは Cdk5/p35 の下流因子を新たに二つ同定した。それらは CIN85 (Cbl-interacting protein 85) というアダプタータンパク質と AATYK (apoptosis-associated tyrosine kinase) である。CIN85 は EGF 受容体のエンドサイトーシスなどに関わることが報告されていたが、神経細胞での解析は殆ど行なわれていなかった。面白いことに、CIN85 を高発現させると細胞内に非常に大きなエンドソーム様小胞 (巨大エンドソーム) が形成される。AATYK はキナーゼ配列を有する機能不明のタンパク質である。ミエローム細胞のアポトーシス誘導時に発現することから、上記のような名前をつけられた。申請者らは Cdk5 制御サブユニット p35 に結合するタンパク質としてヒト脳 cDNA から分離した (BBRC, 2003) が、本研究開始当初はリサイクルエンドソームを細胞内に分散させることを新たに見つけたばかりであった。これらの結果は、Cdk5 が CIN85 や AATYK という因子を介してエンドソームの形成、リサイクリング等を制御している可能性を示していた。Cdk5 とエンドソームについての研究はなく、Cdk5 の新しい役割となる。神経細胞におけるエンドソームの形成とリサイクリングの制御は、生存や極性の維持等において重要と考えられたが、殆どの研究は株化培養細胞で研究されているのが現状であった。

2. 研究の目的

エンドソームの形成とリサイクリング機構についての神経細胞での研究はあまり進んでいない。その理由は神経細胞の機能および形態的特殊性に由来するエンドソーム系の複雑さによるものと考えられる。神経細胞ではシナプス前部における神経伝達物質の再取り込み、シナプス後部の神経伝達物質受容体のリクルート、細胞体・樹状突起間での古典的リサイクリングに関わるエンドソ

ムなどが共存する。本研究では申請者らが分離した CIN85、AATYK という因子がどのようなエンドソームの、どのような過程に関わるか、それらが Cdk5 によってどのように調節を受けているかをまずは株化細胞を用いて検討し、その後神経細胞内における生理的意義を明らかにする。特に、AATYK1 についてはリサイクリングエンドソームの関わる軸索伸長との関連、CIN85 については、神経細胞の移動と脳内での位置決定にどのように関わっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

AATYK1 が結合するエンドソームを、各種エンドソームマーカーである Rab5、Rab7、Rab11 などと共発現させて、蛍光抗体法を用いて調べた。AATYK1 のエンドソームへの結合領域については、N 末、または C 末からの欠損変異体を作成し、エンドソームへの集合に変化の見られる変異体から決定した。AATYK によるエンドソーム形成に対する影響は、AATYK を発現させた細胞に蛍光ラベルしたトランスフェリンを取り込ませ、その動態を観察し、どのステージのエンドソームに AATYK が集積するかを調べた。AATYK が結合するタンパク質については、AATYK1 の免疫沈降法により回収し、質量分析法で解析した。エンドソームの輸送に対する AATYK1 の Tyr キナーゼによるリン酸化、Cdk5 によるリン酸化などは、リン酸化部位を同定した後、リン酸化されない、または、リン酸化を模倣する変異体を作成し、その効果を調べることにより解析した。エンドソーム輸送を制御する仕組みをとの関連、即ち、Rab の上流と下流どちらの因子であり、Rab に対してどのような活性を示すかを、Rab の活性型、不活性型を用いて調べた。最後に、培養神経細胞の AATYK をノックダウンまたは過剰発現させて、軸索突起の伸長に対する影響を調べた。

CIN85 についても、タンパク質分子の解析は株化細胞で行い、機能を神経細胞で探った。巨大エンドソームの実体や形成機構については、まずは形成の時間経過を詳しく観察し、各種エンドソームマーカーや膜タンパク質が取り込まれるかどうかを検討した。また、FM1-43 などの蛍光色素の取り込みについても調べた。巨大エンドソーム形成に関わる

CIN85のアミノ酸領域については、N末、C末の各領域からなる断片を作成し、それらの巨大エンドソーム形成能を調べる。CIN85と結合するDab1はApoER2と結合し、Reelinのシグナルを細胞内に伝える。CIN85がDab1を介してApoER2と結合するかを検討した。神経細胞内における内在性CIN85の正確な局在さえ判っていない。特異的抗体を作成し、内在性CIN85の細胞内局在を調べた。

4. 研究成果

AATYK1を初期、後期、リサイクルの各エンドソームのマーカであるRab5, Rab7, Rab11とともにCOS-7細胞に発現したところ、大部分のAATYK1はRab11と共局在を示し、リサイクリングエンドソームに存在していることが判明した。AATYKはアミノ酸1317からなる巨大なタンパク質である。N末側のCysをAlaにするとRab11との共局在が見られなくなることから、Cysのパルミトイル化を介してリサイクリングエンドソームに結合していることが示された。CHO-K1細胞では中心体近傍のリサイクリングエンドソーム(ERC)が形成される。AATYK1野生型を発現させたところ、ERCの形成が促進された。AATYK1におけるCdk5によるリン酸化部位はSer34, Srcによるリン酸化部位はTyr25とtyr46であった。Tyr25, 47のリン酸化はリサイクリングエンドソームへ結合できなくなる(パルミトイル化部位の変異体)と消失した。Ser34のリン酸化はリサイクリングエンドソーム形成過程に対して、抑制的に働いていることが示された。AATYK1はRab11とは直接結合しなかった。Rab11のGTPase活性に対しても影響を与えなかった。しかし、Rab11のグアニンヌクレオチドの代謝には影響を与えているようであった。恐らく、Rab11のGDIを介した調節に関わっているのではないかと考えられる。AATYK1は神経細胞での細胞体の核近傍と神経突起にドット状に存在していた。それらの局在はRab11と一致していた。神経細胞のAATYK1をノックダウンすると軸索の伸長が増加し、Cdk5によってリン酸化されないS34A変異体を過剰発現させると抑制された。以上のことから、AATYK1はリサイクリング

エンドソームの輸送を介して軸索の形成を制御していること、AATYK1のこの活性はCdk5によるSer34のリン酸化で制御されていることが判明した。

COS-7細胞等にCIN85を強制発現させると、巨大なエンドソーム様構造が形成される。形成の時間経過を観察すると、基底側で小さなエンドソームとして形成されて、細胞上部に移行しながら巨大化しているようである。各種エンドソームマーカとの共局在を観察したが、初期、後期、リサイクリングエンドソームには局在しないようであった。また、EGFRなどの膜タンパクとの共局在を調べたが、それらとも局在は一致しなかった。但し、ApoER2については、Dab1を共発現させておけば、CIN85と一致した局在も観察された。さらにFM1-64などエンドサイトーシスされる蛍光物質を用いて取り込みをみたが、形成される構造の内部には観察されなかった。巨大エンドソーム様構造の実体については未だ不明である。CIN85のN末断片、C末断片を作成し、COS-7細胞に発現させたが、それら単独では巨大エンドソーム様構造は形成されなかった。現在はC末のcoiled-coil領域がその構造の形成に必要ではないかと考えて変異体を作成している。神経細胞内における内在性CIN85を検出するために抗体を作成した。N末抗体はミトコンドリアのタンパクとも反応してしまっていたが、C末に対しては特異的な抗体が作成された。神経細胞でも内在性CIN85は顆粒状の構造として、細胞体や突起ないで観察された。エンドソームマーカとの染色から、エンドサイトーシスされたばかりの小胞に存在しているのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計15件)

- (1) Sato, K., Minegishi, S., Takano, J., Plattner, F., Saito, T., Asada, A., Kawahara, H., Iwata, N., Saido, T. C., and Hisanaga, S. Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25. *J. Neurochem.* In press. 査読あり
- (2) Hisanaga, S., and Endo, E. Regulation

- and role of Cdk5 kinase activity in neuronal survival and death. *J. Neurochem.*, 115, 1309-1321, 2010. 査読あり
- (3) 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. 査読あり
- (4) Takano, T., Tsutsumi, K., Saito, T., Asada, A., Tomomura, M., Fukuda, M., and Hisanaga, S. AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. *Genes Cells* 15, 783-797, 2010. 査読あり
- (5) 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. 査読あり
- (6) 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. 査読あり
- (7) Asada, A., Takahashi, J., Taniguchi, M., Yamamoto, H., Kimura, T., Saito, T., and Hisanaga, S. Neuronal expression of two isoforms of mouse Septin 5. *J. Neurosci. Res.* 88,1309-1316, 2010. 査読あり
- (8) 細川智永、久永真市. Cdk5—シナプスにおけるネガティブレギュレーター. 生体の科学特集号「シナプスをめぐるシグナリング」61, 470-471, 2010. 査読なし
- (9) Endo, R., Saito, T., Asada, A., Kawahara, H., Ohshima, T. and Hisanaga, S. Commitment of MPP+-induced neuronal cell death by proteasome-mediated degradation of p35 Cdk5 activator. *J. Biol. Chem.*, 284, 26029-26039, 2009. 査読あり
- (10) Sasaki, T., Ishiguro, K., and Hisanaga, S. Novel axonal distribution of neurofilament-H phosphorylated at the GSK3 β -phosphorylation site in its E-segment. *J. Neurosci. Res.* 87:3088-3097, 2009. 査読あり
- (11) 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. 査読あり
- (12) 久永真市. 多様な神経機能を制御するキナーゼCdk5. 蛋白質核酸酵素 54, 2009. 査読なし
- (13) 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. 査読あり
- (14) 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. 査読あり
- (15) 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. 査読あり
- [学会発表] (計24件)
- (1) Hisanaga, S. Cdk5 and neuron cell death. Pep Con-2010 (2010年、3月、北京)
- (2) Takano, T. AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. 第62回日本細胞生

- 物学会 (2010年、5月、大阪)
- (3) Takano, T. AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. 第53回日本神経化学会 (2010年、9月、神戸)
- (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) Takano, T. AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway -A role of AATYK1 in axon outgrowth-. アメリカ神経科学会 (2010年、1月、サンディエゴ)
- (6) Takano, T. AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the neurite outgrowth via recycling endosome pathway. 第33回日本分子生物学会 (2010年、12月、神戸)
- (7) 浅田明子. 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33回日本分子生物学会年会 (2010年、12月、神戸)
- (8) 堤弘次. AATYK のエンドソーム局在と神経突起伸張作用に対する Cdk5 の影響. 第61回日本細胞生物学会 (2009年、6月、名古屋)
- (9) Hisanaga, S. Reconsideration of the activation mechanism of Cdk5 by p35 and p39. 2nd International Symposium on Cdk5. (2009年、6月、東京)
- (10) 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)
- (11) 久永眞市. 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 (2009年、7月 東京)
- (12) 久永眞市. 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 (2009年、7月、東京)
- (13) Hisanaga, S. Neuronal development and neurodegeneration on Cdk5 and related signaling. 第32回日本神経科学大会 (2009年、9月、名古屋)
- (14) 久永眞市, 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)
- (15) 高野哲也. AATYK1A のリサイクリング エンドソーム輸送活性は Cdk5-p35 によって制御される. 第32回日本分子生物学会 (2009年、12月、横浜)
- (16) Hisanaga, S. Pro-survival and pro-apoptotic activity of neuron-specific protein kinase Cdk5. 27th Annual conference of Indian Academy of Neuroscience (12月、インド)
- (17) Hisanaga, S. Cdk5 and Neuron Cell Death. 3rd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2010) (2009年、3月北京)
- (18) Hisanaga, S. Cdk5 and Microtubules in Neurodegenerative Diseases. The International Symposium on "Cell Cycle and Cell Architecture". (2009. 2. 26-28, Nagoya)
- (19) 久永眞市. 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 (2009年、12月; 神戸)
- (20) Hisanaga, S. Filament assembly abnormality of neurofilament-L with Charcot-Marie-Tooth disease mutation. 第31回日本神経科学大会 (2008年、7月、東京)
- (21) 浅田明子. 前頭側頭葉認知症(FTDP-17) 変異型タウの脱リン酸化. 第31回日本神経科学大会 (2008年、7月、東京)
- (22) Tsutsumi K. Regulation of endosomal localization of AATYK1A and its interaction with Src by palmitoylation. 第51回日本神経化学会大会 (2008年、9月、富山)
- (23) 浅田明子. 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31回日本分子生物学会大会(2008年、12月、神戸)

- (24) 瀧上孝裕. CIN85 の神経細胞における発現及び Dab1 との相互作用について。第31回分子生物学会年会(2008年、12月、神戸)

[図書] (計4件)

① 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.

② 久永真市. 細胞機能. 「第3版 分子生物学」の第12章. 田沼靖一編、丸善、2011.

③ 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.

④ Hisanaga, S. and Ishiguro, K. The Kinase Activity of Cdk5 and Its Regulation. In Cdk5 book, eds. Ip, N. and Tsai, L-H. Springer, NY. 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久永 真市 (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

(2) 研究分担者

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