

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 12 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500381

研究課題名(和文) 発達障害原因遺伝子CDKL5のプロテオミクスとKOマウス解析による包括的機能解明

研究課題名(英文) Multidimensional analyses of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders, by proteomic and LOF approaches

研究代表者

田中 輝幸 (Tanaka, Teruyuki)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10246647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経発達障害の原因遺伝子CDKL5の生体内分子機能と遺伝子変異による病態機序の解明を目的として、私はCdk15 ノックアウト(KO)マウスを独自に作製し、神経科学的表現型解析を行った。その結果Cdk15 KOマウスにおいて、海馬神経細胞樹状突起スパインの形態・密度異常、情動・記憶障害等の行動異常、易痙攣性、更にシナプス機能・蛋白質の異常を同定した。酵母ツーハイブリッド法とプロテオミクス解析を用いたリン酸化基質スクリーニングによって、複数のシナプス関連蛋白質を同定した。以上の結果から、ヒトのCDKL5変異に伴う病態がシナプス機能異常である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) gene encodes for a serine-threonine kinase sharing homology to Mitogen-activated kinases (MAPKs) and Cyclin-dependent kinases (CDKs). Recently, mutations in the CDKL5 gene have been identified in the patients with neurodevelopmental disorders associated with intractable epilepsies. However, neither its molecular functions or pathomechanisms caused by its mutations are largely unknown. Aiming to elucidate these problems, I have taken multidimensional strategies, combining an unbiased interactome approach and a targeted loss-of-function (LOF) approach. For the LOF approach, we have generated the Cdk15 knockout mouse and identified various neurological abnormalities. For the interactome approach, we performed the yeast two-hybrid screening and proteomic screening, and identified several CDKL5 interacting proteins. The combination of these approaches suggested possible mechanisms of CDKL5 regulating neural functions during development.

研究分野：総合領域

キーワード：発達障害 てんかん シナプス ノックアウトマウス プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

「点頭てんかん」は、乳児期発症の重篤なてんかん症候群で、極めて重度の発達障害を来す。一方「Rett 症候群」は、若年女児発症の重度の精神遅滞と行動異常を主徴とする発達障害で、約 80%が Xq28 上の *MECP2* 遺伝子変異により生じる。2004 年、Xp22.3 上の *Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)* 遺伝子変異が、点頭てんかんと、*MECP2* 変異のない早発型 Rett 症候群で報告された。CDKL5 は、cyclin-dependent kinase (CDK) ファミリーとホモロジーを持つ、核・細胞質内キナーゼである。マウスでは大脳皮質・海馬・小脳で *MECP2* と共発現し、そのリン酸化基質として *MECP2*、DNA methyltransferase 1 (DNMT1)、及び自己自身が確認され、RNAi 実験により、CDKL5 は神経細胞の樹状突起形成と、BDNF による Rac1 の活性化に必要である事が報告されたが、その他の機能、及び遺伝子変異に伴う病態は、未解明であった。

私は既に、CDKL5 の分子機能と遺伝子変異による病態機序解明の目的で、yeast two-hybrid 法による相互作用分子の同定と、*Cdk15* ノックアウト (KO) マウス作製を行い、本研究を開始する準備を整えた。

2. 研究の目的

本研究では、yeast two-hybrid 法及びプロテオーム解析という網羅的アプローチと、*Cdk15* KO マウスの神経科学的解析アプローチを多次的に組み合わせ、CDKL5 の分子機構と loss-of-function (LOF) による分子病態機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロテオミックアプローチによる CDKL5 作用ネットワークの解明

① アフィニティーカラムクロマトグラフィーとショットガン LC-MS/MS によるインタラクトーム解析：

(M. Amano *et al.*, *PLoS One* 5, e8704, 2010) の手法に従い、マウス CDKL5 の N 末端側キナーゼドメイン (野生型、及び活性欠失変異体) を GST 標識し、固定化したグルタチオンセファロース・アフィニティーカラムに、マウス脳サイトゾル分画、膜分画、を添加し、溶出する。変性、還元、アルキル化、脱塩の後、トリプシン消化を行い、高速液体クロマトグラフィー+質量分析 (LC-MS/MS) を行う。

② リン酸化の *in vitro*, *in vivo* での検証：スクリーニングにより得られた蛋白を、既知の情報、バイオインフォマティクス等を元に分類し、重要と考えられるものから、GST 組換え蛋白と *in vitro* kinase assay 系などを用いて、CDKL5 によるリン酸化を検証する。マウス脳を用いて Phos-tag、リン酸化抗体などによる *in vivo* 系での検証を行う。更に *Cdk15* KO マウス脳を用い、リン酸化状態の野生型との比較解析を行う。

(2) CDKL5 loss-of-function (LOF) 分子機構の多次的な解明

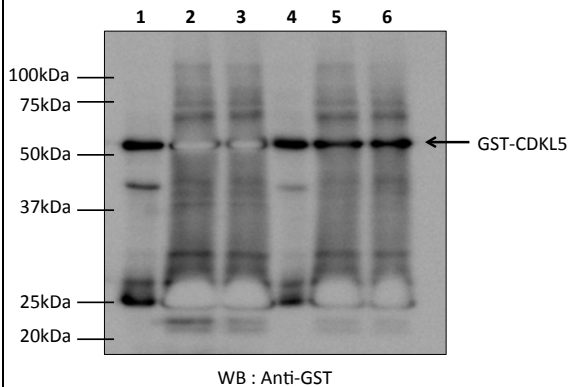
- ① *Cdk15* KO マウスのシナプス解析
- ② *Cdk15* KO マウスの易痙攣性解析
- ③ *Cdk15* KO マウスの電気生理学的解析
- ④ *Cdk15* KO マウスの行動学的解析

4. 研究成果

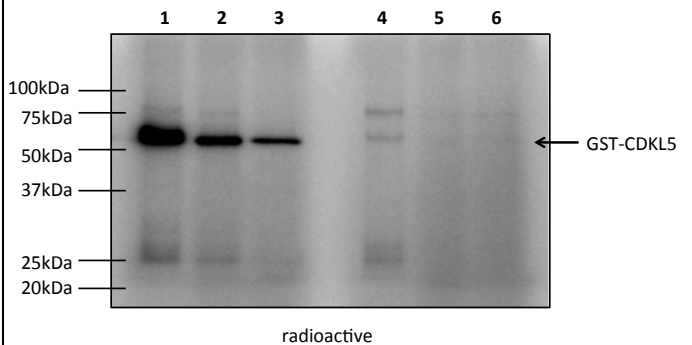
(1) プロテオミックアプローチによる CDKL5 作用ネットワークの解明

baculovirus 発現系を用い GST 標識 CDKL5 キナーゼドメインを発現・精製した (下図に GST-CDKL5 ドメインの western blotting 及び、*in vitro* kinase assay 結果を示す)。GST 標識 CDKL5 キナーゼドメイン (野生型、及び活性欠失変異体) をグルタチオンセファロース・アフィニティーカラムに固定化した上に、マウス脳サイトゾルを添加、溶出し、高速液体クロマトグラフィー+質量分析 (LC-MS/MS) を行った。

初回スクリーニングにより、複数の結合蛋白候補を得、再現性確認のため、2 回のスクリーニングを行った結果、リン酸化基質候補として複数のシナプス関連蛋白、微小管関連蛋白、モーター蛋白を検出した。



- 1, lysate of High-Five cell expressing GST-CDKL5
- 2, purified GST-CDKL5 before dialysis (500ng)
- 3, purified GST-CDKL5 after dialysis (500ng)
- 4, lysate of High-Five cell expressing GST-CDKL5-KD (kinase dead)
- 5, purified GST-CDKL5-KD before dialysis (500ng)
- 6, purified GST-CDKL5-KD after dialysis (500ng)

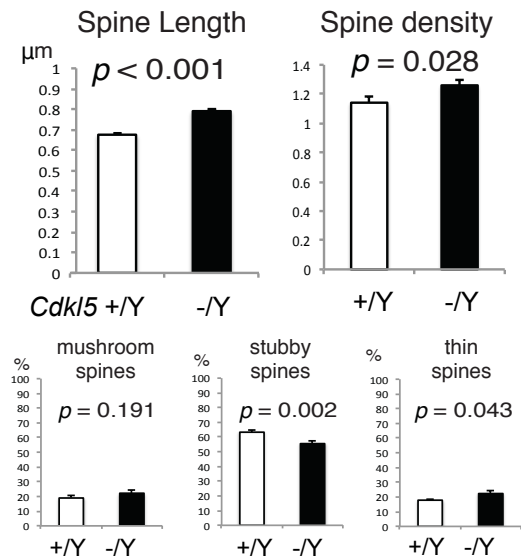


- 1, GST-CDKL5 2.6µg
- 2, GST-CDKL5 1.3µg
- 3, GST-CDKL5 0.65µg
- 4, GST-CDKL5-KD (kinase dead) 2.6µg
- 5, GST-CDKL5-KD (kinase dead) 0.65µg
- 6, GST-CDKL5-KD (kinase dead) 1.3µg

(2) CDKL5 loss-of-function (LOF) 分子機構の多角的な解析

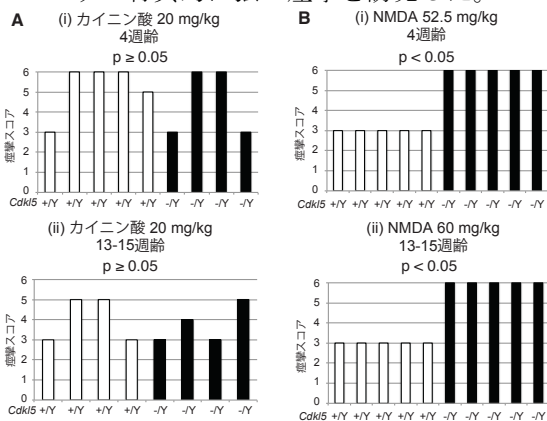
*Cdk15* KO マウスは、外見上正常で、生命機能、妊孕性に異常は認められなかった。脳重と、大脳皮質、海馬構築に明らかな異常は認められなかった。

*Cdk15* KO マウスの海馬錐体細胞樹状突起の分枝、長さ、スパイン形態に異常が認められた。



テストバッテリーを用いた網羅的行動解析により、KO マウスにおける不安様行動とうつ様行動の亢進等の情動異常、記憶障害、社会性の異常、日内行動の異常等を同定した。

痙攣誘発薬カイニン酸の投与は、KO マウスと野生型マウスに同等の痙攣を誘発したが、NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) の投与は、KO マウス特異的に強い痙攣を誘発した。



海馬スライスの電気生理学的解析により、KO マウスにおける長期増強 (LTP) の亢進、興奮性シナプス後電流 (EPSC) の亢進等を同定した。

生化学的手法、免疫電子顕微鏡を用いた KO マウスのシナプス解析により、シナプス後部における NMDA 型グルタミン酸受容体蛋白の異常集積を同定した。

以上の結果から、*Cdk15* KO マウスの海馬においては、シナプス後部に NMDA 受容体が過剰集積し、痙攣感受性を顕著に亢進する事が

明らかとなった。

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 3 件)

① K. Okuda, S. Kobayashi, M. Fukaya, A. Watanabe, T. Murakami, M. Hagiwara, T. Sato, H. Ueno, N. Ogonuki, S. Komano-Inoue, H. Manabe, M. Yamaguchi, A. Ogura, H. Asahara, H. Sakagami, M. Mizuguchi, T. Manabe, and T. Tanaka. (2017) CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility, *Neurobiol Dis* 106, 158-170. (査読あり)

② 奥田耕助, 田中輝幸. (2015) 難治性てんかんを伴う神経発達障害の原因遺伝子 CDKL5 のシナプス伝達調節機構の解明に向けて, *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)* 145, 183-186. (査読なし)

③ 田中輝幸, 奥田耕助. (2013). 小児の難治性てんかんと CDKL5. *Clinical Neuroscience* 31, 699-702. (査読なし)

[学会発表] (計 15 件)

① 田中輝幸, CDKL5 の多角的アプローチによる機能解析 (シンポジウム: 脳形成障害とオミックス), 第52回 日本神経病理学会総会学術研究会 (招待講演), 2011年6月3日, 京都市

② 田中輝幸, 神経発達障害原因遺伝子 CDKL5 変異マウスの網羅的行動解析, 2011年度 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ (招待講演), 2011年8月23日, 神戸市

③ 奥田耕助, Identification and Characterization of Interacting Proteins of CDKL5, a Gene Product Responsible for West Syndrome or Atypical Rett Syndrome, 第34回 日本神経科学大会, 2011年9月17日, 横浜市

④ 奥田耕助, Identification and characterization of interacting proteins of Cdk15, a gene product responsible for West syndrome or atypical Rett syndrome, Society for Neuroscience Annual Meeting 2011, 2011年11月12日, ワシントンDC (アメリカ合衆国)

⑤ 田中輝幸, 発達障害原因遺伝子の多角的アプローチによる機能解析, 第23回 産業神経・行動学研究会 (招待講演), 2011年12月2日, 名古屋市

⑥ 田中輝幸, Multidimensional approach to functional analysis of Cyclin-dependent kinase-like 5, the causative gene for atypical Rett syndrome, Rett Syndrome Symposium in Fukuoka (招待講演), 2012年4月12日, 福岡市

⑦ 田中輝幸、West症候群・非典型Rett症候群の原因遺伝子CDKL5の多元的アプローチによる分子機能・病態機序解析、第54回日本小児神経学会総会、2012年5月17日、札幌市

⑧ 田中輝幸、遺伝子改変動物モデルによる神経発達障害研究と今後の展望、第85回日本産業衛生学会(招待講演)、2012年6月2日、名古屋市

⑨ 田中輝幸、発達障害原因遺伝子CDKL5ノックアウトマウスの表現型解析、第53回日本神経病理学会総会学術研究会、2012年6月29日、新潟市

⑩ 田中輝幸、神経発達障害原因遺伝子CDKL5ノックアウトマウスの作製と表現型解析、第52回日本先天異常学会学術集会、2012年7月8日、東京都

⑪ 奥田耕助、Multidimensional analyses of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders、第35回日本神経科学大会、2012年9月12日、名古屋市

⑫ 奥田耕助、Multidimensional analysis of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders、Annual Meeting of Society for Neuroscience 2012、2012年10月14日、ニューオーリンズ(アメリカ合衆国)

⑬ 田中輝幸、難治性てんかん・発達障害原因遺伝子CDKL5の生体内分子機能・病態機序解析、第54回日本神経病理学会総会学術研究会、2013年4月24日、東京都

⑭ 田中輝幸、West症候群・非定型Rett症候群の原因遺伝子CDKL5のノックアウトマウス作製・解析による病態機序の解明、第55回日本小児神経学会、2013年5月29日、大分市

⑮ 奥田耕助、Functional Studies of CDKL5, a causative gene of neurodevelopmental disorder, by interactome screening and loss-of-function analysis、第36回日本神経科学大会、2013年6月20日、京都市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 輝幸 (TANAKA, Teruyuki)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 10246647

(2) 研究分担者

天野 睦紀 (AMANO, Mutsuki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90304170

水口 雅 (Mizuguchi, Masashi)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20209753

(3) 連携研究者

貝淵 弘三 (KAIBUCHI, Kozo)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00169377