

28. 細胞周期関連分子による神経成熟と環境応答の制御機構

川内 健史

先端医療振興財団 先端医療センター研究所 医薬品開発研究グループ

Key words : 細胞周期関連分子, Cdk5, p27^{kip1}, 神経変性疾患

緒言

多細胞生物の形態形成および機能維持には、細胞が適切に分裂してその数を増やし、維持することが必須である。このため、細胞周期関連分子の活性は厳密に制御されている。細胞周期の進行に中心的な役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ (CDK) は、サイクリンの結合やリン酸化などの翻訳後修飾によって活性が制御されており、さらに p27^{kip1} などの CDK 阻害タンパク質の結合により不活性化する。

発生期の脳皮質において、p27^{kip1} は神経前駆細胞の細胞周期 G1 期の長さの調節や細胞周期からの離脱に必要であることが知られている。これまでに我々は、神経細胞に発現する p27^{kip1} は、核だけではなく細胞質にも局在し、細胞骨格の再編成などを介して神経細胞の形態変化や移動を制御していることを見出した¹⁻³⁾。微小管などの細胞骨格系の適切な制御は、脳の様々な領域における神経細胞の移動や形態変化に必要である^{4,5)}。また、p27^{kip1} は特殊な CDK である Cdk5 によって 10 番目のセリン残基 (Ser10) をリン酸化され、このリン酸化によりプロテアソーム依存性のタンパク質分解から逃れて安定化することも明らかにし、増殖停止細胞においても細胞周期関連分子が機能していること、細胞周期関連因子は細胞骨格制御など細胞周期とは異なる機能をもつことが示された^{1-3,6)}。

Cdk5 は、p35 という独自の活性化因子をもつが、神経変性疾患の患者脳では p35 が限定分解を受けて、より強い活性をもつ p25 に変換する。我々は、正常脳型の Cdk5/p35 と病態脳型の Cdk5/p25 は基質特異性が異なることを報告しているが^{7,8)}、どのような刺激で p25 への限定分解が起きるのかについては議論が分かれており、Cdk5/p35 と Cdk5/p25 の機能的差異についても知見が乏しい。神経変性疾患の発症までには長い期間を要することから、本研究では、神経変性疾患に加えてストレス (環境要因) の初期応答に着目し、p35 の限定分解への影響と Cdk5/p25 の基質特異性変化を明らかにすることを目的として研究を行った。

方法

健常者とアルツハイマー病患者の脳のタンパク質抽出液を購入し、ウエスタンブロッティングによって p35 と p25 の比率や p27^{kip1} のリン酸化状態および発現量を解析した。また、拘束ストレスを 0、5、10、20、30 分与えたマウスの脳 (大脳皮質、海馬、小脳、中脳、嗅球) のタンパク質抽出液を作製し、細胞周期関連分子などの発現量やリン酸化状態をウエスタンブロッティングによって解析した。

結果および考察

加齢や神経変性疾患によって Cdk5 の活性化因子である p35 が p25 へと限定分解を受けるのかどうかについては、これを支持する結果と否定的な結果の両方が報告されている。そこで、我々の研究で用いる健常者とアルツハイマー病患者の脳のタンパク質抽出液でこの点を確認するため、このタンパク質抽出液を、抗 p35 抗体 (p25 も認識) を用いてウエスタンブロッティングした。その結果、加齢脳 (健常者) でも p25 の産生が確認できたが、p25 と p35 の比率はアルツハイマー病患者の方が高く、我々が入手したヒトの脳サンプルでは、神経変性疾患により p25 の産生が促進されていることが分かった (図 1)。

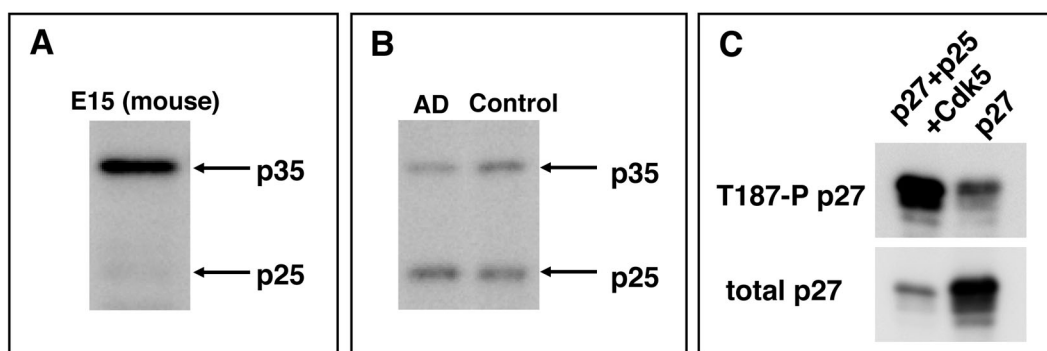


図 1. 神経変性疾患における細胞周期関連分子

(A) 胎生 15 日目のマウス胚の大脳皮質から作製したタンパク質抽出液を抗 p35 抗体でウエスタンブロッティングした。(B) アルツハイマー病患者 (80 歳) および健常者 (82 歳) の脳から作製したタンパク質抽出液を抗 p35 抗体 (Santa Cruz) でウエスタンブロッティングした。(C) COS7 細胞に p27^{kip1} のみ、もしくは p27^{kip1} と Cdk5/p25 を発現させ、そのタンパク質抽出液を p27^{kip1} もしくは Thr187 がリン酸化された p27^{kip1} に対する抗体でウエスタンブロッティングした。

次に、発生期の脳における Cdk5/p35 の基質として同定した p27^{kip1} が Cdk5/p25 によってもリン酸化されるかを調べたところ、発生期の脳においてリン酸化されている Ser10 のリン酸化を大きく促進することはなかった。よって、p27^{kip1} の Ser10 は、Cdk5/p35 によって強くリン酸化されるが、Cdk5/p25 にはあまりリン酸化されないことが示唆された。しかし、予想外なことに、Cdk5/p25 は、p27^{kip1} の別の残基 (187 番のスレオニン残基質: Thr187) をリン酸化することが分かった (図 1C)。我々の以前の研究から、Cdk5/p35 は p27^{kip1} の Thr187 をリン酸化しないことが示されている¹⁾。また、この Thr187 のリン酸化は、Ser10 のリン酸化とは異なり、p27^{kip1} のタンパク質量を減少させることが知られている。実際、Cdk5/p25 を発現させた細胞群では、p27^{kip1} のタンパク質量が減少していた (図 1C)。以上より、Cdk5/p35 と Cdk5/p25 は、基質特異性が異なるだけではなく、同じ基質に対するリン酸化部位特異性も異なることが示された (図 3)。リン酸化部位特異性が異なるメカニズムの詳細は今後の課題だが、Cdk5/p35 と Cdk5/p25 が異なる様式 (構造) で p27^{kip1} と結合している可能性も考えられ、興味深い。

神経変性疾患や加齢によって、神経細胞内でどのような分子的变化が起きているのかは重要な問題だが、どちらも長い時間をかけた結果として起きる現象であるため、何が原因で何が結果なのかが分かりにくい。そこで、短期間で p35 から p25 への変換過程を解析できる実験系を模索した。最近、ストレスを与えたマウス脳の高馬において p25 が産生し、Cdk5 依存的にグルコシルコリド受容体の 211 番目のセリン残基 (Ser211) のリン酸化が亢進することが報告された。しかし、ストレスがどのように受容されるのかについては不明であるため、ストレス応答の初期に何が起きるのかはあまり分かっていない。そこで、まずストレス応答に初期においても、グルコシルコリド受容体の Ser211 のリン酸化が亢進するかどうかを確認するため、急性の拘束ストレス (0~30 分) を与えたマウスの脳 (大脳皮質、高馬、小脳、中脳、嗅球) におけるグルコシルコリド受容体の発現量とリン酸化状態を調べた。その結果、どの脳領域においても、30 分の拘束ストレスでは、グルコシルコリド受容体の Ser211 のリン酸化は変化しないことが分かった (図 2A)。次に、同様の拘束ストレスを与えたマウスの脳における p25 の産生量を調べたところ、p25 はわずかに産生されていたものの、その量はコントロールと比較して有意な変化はなかった (図 2B)。また、p27^{kip1} の Thr187 のリン酸化および総タンパク質量についても、ストレス応答の初期において有意な変化は確認できなかった (図 2B)。以上のことから、ストレスの初期応答には Cdk5/p25 は関与していないことが示唆された (図 3)。これに対して、Cdk5 と基質特異性の近い JNK などの MAP キナーゼファミリーについては、ストレス応答の初期に変化が起きるというプレリミナリーな結果が得られたことから、今後は MAP キナーゼファミリーと Cdk5 の関連性について解析を続ける予定である。

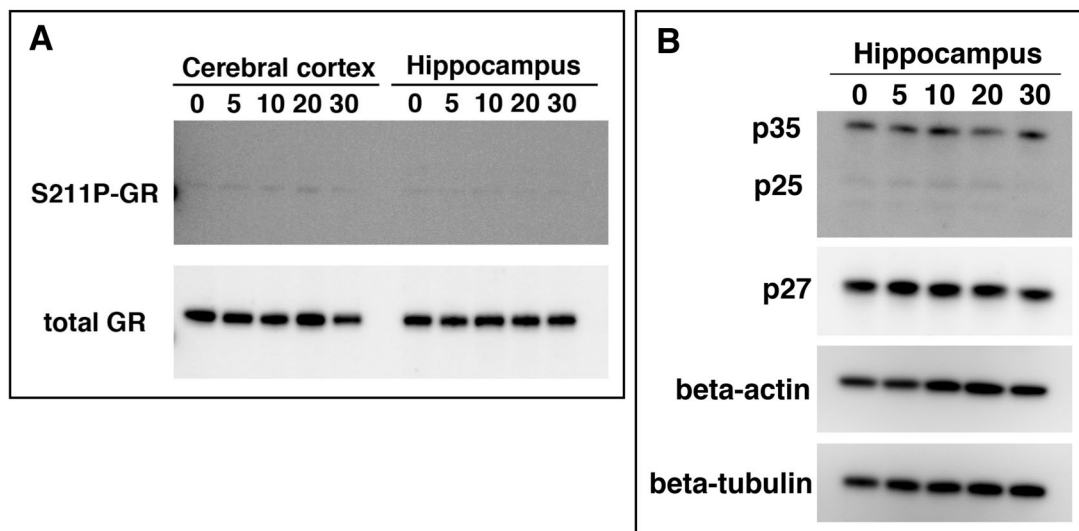


図 2. 拘束ストレスの初期応答における細胞周期関連分子

(A, B) 拘束ストレス (0、5、10、20、30 分) をかけたマウスの脳から作製したタンパク質抽出液を、図に示した抗体でウエスタンブロッティングした。GR: グルココルチコイド受容体。

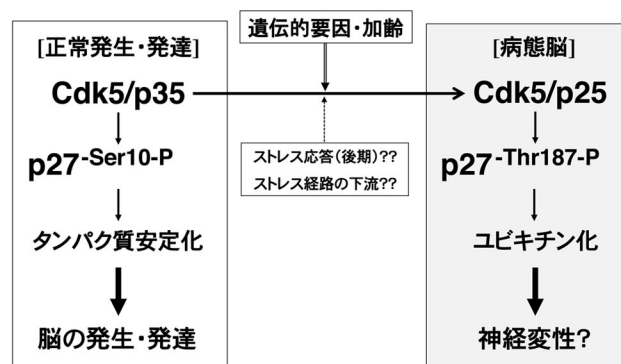


図 3. 正常脳および病態脳における細胞周期関連分子の活性変化

神経変性疾患の患者脳において p35 から p25 への変換が観察され、下流分子 p27^{kip1} に対するリン酸化様式も変化した。これに対して、ストレスの初期応答においては、p25 への変換は観察されなかった。

増殖停止細胞における細胞周期関連分子の生理機能および疾患におけるその役割に関する研究は、まだ緒についたばかりである。しかし、細胞周期関連分子が、細胞周期以外の機能を持つことは、我々以外にも、近年いくつかの研究グループが報告している⁸⁾。今後、この新たな分野をより発展させるべく、研究を続けたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、先端医療振興財団先端医療センター研究所医薬品開発研究グループの櫻井美和、安倍千秋および鍋島陽一である。

文 献

- 1) Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima Y, Hoshino M. Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat Cell Biol.* 2006 Jan;8(1):17-26. Epub 2005 Dec 11. PubMed PMID: 16341208.
- 2) Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima Y, Mizutani K, Nagata K, Nakajima K, Kawauchi T. Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development.* 2014 Sep;141(18):3540-50. doi: 10.1242/dev.111294. PubMed PMID: 25183872.
- 3) Nishimura YV, Nabeshima YI, Kawauchi T. Morphological and Molecular Basis of Cytoplasmic Dilation and Swelling in Cortical Migrating Neurons. *Brain Sci.* 2017 Jul 19;7(7). pii: E87. doi: 10.3390/brainsci7070087. Review. PubMed PMID: 28753911; PubMed Central PMCID: PMC5532600.
- 4) Kawauchi T. Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. *Front Cell Neurosci.* 2015 Oct 7;9:394. doi: 10.3389/fncel.2015.00394. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26500496; PubMed Central PMCID: PMC4595654.
- 5) Kawauchi T. Tubulin isotype specificity in neuronal migration: Tuba8 can't fill in for Tubal1. *J Cell Biol.* 2017 Aug 7;216(8):2247-2249. doi: 10.1083/jcb.201705172. Epub 2017 Jul 7. PubMed PMID: 28687668; PubMed Central PMCID: PMC5551719.
- 6) Nishimura YV, Sekine K, Chihama K, Nakajima K, Hoshino M, Nabeshima Y, Kawauchi T. Dissecting the factors involved in the locomotion mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Biol Chem.* 2010 Feb 19;285(8):5878-87. doi: 10.1074/jbc.M109.033761. Epub 2009 Dec 18. PubMed PMID: 20022952; PubMed Central PMCID: PMC2820813.
- 7) Kawauchi T, Chihama K, Nishimura YV, Nabeshima Y, Hoshino M. MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 May 27;331(1):50-5. PubMed PMID: 15845356.
- 8) Kawauchi T, Shikanai M, Kosodo Y. Extra-cell cycle regulatory functions of cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitor proteins contribute to brain development and neurological disorders. *Genes Cells.* 2013 Mar;18(3):176-94. doi: 10.1111/gtc.12029. Epub 2013 Jan 7. Review. PubMed PMID: 23294285; PubMed Central PMCID: PMC3594971.