

Cdk5 および p27^{kip1} による大脳皮質形成の制御機構： 増殖停止細胞における細胞周期関連分子の役割

川内 健史

1. はじめに

脳を構成する神経細胞は、神経上皮に由来する神経前駆細胞から作られる。脳形成の初期において、神経前駆細胞は活発に自己増殖するが、その後、非対称分裂（神経前駆細胞+神経細胞）もしくは対称分裂（神経細胞+神経細胞）により、神経細胞を産生する。これらの細胞増殖には、サイクリン依存性キナーゼ（cyclin-dependent kinase: CDK）を中心とした多くの細胞周期制御分子が関与する。これに対して、産生された神経細胞は、分化と同時に細胞周期から離脱し、増殖を停止する。このとき、CDKの活性は、CDK阻害タンパク質などによって抑制される。

サイクリン依存性キナーゼ5（Cdk5）は、一次配列上はCDKファミリーに属するが、増殖を停止した神経細胞などにおいて強く活性化しており、一般的なサイクリンではなく、p35やp39など独自の活性化因子によってキナーゼ活性が付与される^{1,2)}。また、Cdk5は、CDK阻害タンパク質による活性阻害を受けないことから、CDK阻害タンパク質が高発現している増殖停止した神経細胞においても、キナーゼ活性を発揮できる。以前に我々は、CDK阻害タンパク質の一つであるp27^{kip1}が、Cdk5によってリン酸化されることにより、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を見いだした。すなわち、細胞周期制御に関わる通常のCDK（Cdk2, Cdc2/Cdk1, Cdk4など）の活性を上流から負に制御しているp27^{kip1}が、Cdk5の下流で正に制御されていることがわかった。Cdk5は、神経細胞の増殖停止の維持にも部分的に関与する可能性が示唆されているが、むしろ、神経細胞の移動や成熟などにおいて中心的な役割を果たすことが次々に報告されている²⁾。さらに、我々を含むいくつかの研究グループによ

り、p27^{kip1}も細胞骨格制御など、細胞周期非依存的な機能を持つことが明らかとなりつつある。本稿では、増殖停止後の神経細胞における、Cdk5およびp27^{kip1}を中心とした細胞周期関連分子の役割について、特に細胞周期非依存的な機能に焦点を当てて概説したい。

2. 未成熟神経細胞の形態変化における細胞周期関連分子の役割

発生期の脳皮質において、最終分裂を終えた興奮性神経細胞は、まず多極性の形態を示す。その後、多極性の神経細胞は、1本の太い先導突起と軸索を形成して双極性の細胞（ロコモーション細胞と呼ばれる）へと形態変化し、脳の表層へ向けて長い距離を移動する。Cdk5もしくはp27^{kip1}をノックダウンした興奮性神経細胞は、多極性の形態を示すことができず、突起をほとんど持たない丸い形態になることから、Cdk5とp27^{kip1}は多極性細胞の突起形成に必要であることがわかった³⁾。さらに我々は、Cdk5-p27^{kip1}経路は、低分子量Gタンパク質RhoAの活性抑制を介して、アクチン結合タンパク質Cofilinの活性を上昇させ、多極性細胞の突起内におけるアクチン細胞骨格の再編成を促進することにより、この突起形成を促進することを明らかにした³⁾。

多極性細胞からロコモーション細胞への変換過程は、滑脳症など多くの脳疾患と関連することが示唆されている。Cdk5は、この変換過程にも必要であることが知られていたが⁴⁾、近年、Daniella Magenらによって、Cdk5が滑脳症の原因遺伝子の一つであることが報告された。しかし、p27^{kip1}をノックダウンしても、多極性細胞からロコモーション細胞への変換は正常に起きることから、p27^{kip1}以外の基質がCdk5の下流で働くことが予想された。最近、Nancy Ipらにより、Cdk5はRapGEF2やMst3キナーゼのリン酸化を介して、多極性細胞からロコモーション細胞への変換を制御していることが報告された。Cdk5によってリン酸化されたRapGEF2は、低分子量Gタンパク質Rap1を強く活性化し、細胞接着分子N-カドヘリンの細胞表面量を上昇させる⁵⁾。Rap1は、移動の最終段階においても重要な役割を果たすが、この場合は、Rap1は、C3G（RapGEF1とも呼ばれる）という別の分子によって活性化され、細

公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター研究所・医薬品開発研究グループ；慶應義塾大学・医学部・生理学教室（〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2）

Beyond the cell cycle regulation: novel functions of cell cycle-related proteins in brain development

Takeshi Kawauchi (Laboratory of Molecular Life Science, Institute of Biomedical Research and Innovation, 2-2 Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870485

© 2015 公益社団法人日本生化学会

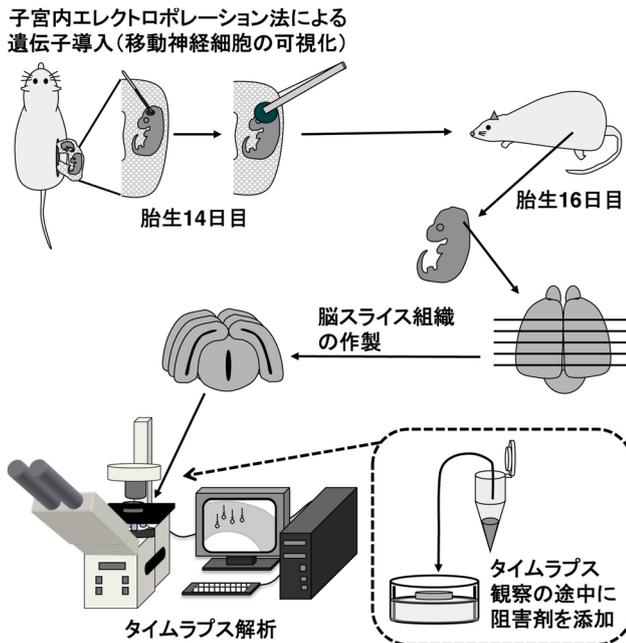


図1 *ex vivo* 阻害剤実験法の概略

移動の初期段階の影響を排除して、ロコモーション細胞の移動を直接解析することができる。簡便に個体への遺伝子導入ができる子宮内エレクトロポレーション法⁹⁾を用いて、胎生14日目のマウスにEGFP(高感度緑色蛍光タンパク質)と核移行シグナルを付加したDsRed(赤色蛍光タンパク質)を発現する発現ベクターを導入する。遺伝子導入細胞がロコモーション細胞へと変換し始める時期である胎生16日目に脳を取り出し、組織スライスを作製する。これをタイムラプス顕微鏡下で培養し、タイムラプス観察途中に、特定の分子に対する機能阻害剤を培地中に添加することにより、阻害剤の影響を経時的に観察できる。

胞-基質間接着分子 $\alpha 5\beta 1$ -インテグリンの活性化に寄与する⁶⁾。

3. 神経細胞の長距離移動における細胞周期関連分子の役割

ロコモーション細胞へと形態変化した興奮性神経細胞は、脳の表層に向かって長い距離を移動する。前述のとおり、神経細胞は移動の初期段階において複雑な形態変化を示すことから、多くの場合、細胞骨格制御分子やキナーゼの機能阻害を行うと、移動の初期段階で異常が起きてしまい(もしくは何も異常がみられない)、その後に行われるロコモーション細胞の移動を解析することは困難であった。この問題を克服するため、我々は、簡便に個体への遺伝子導入を行える子宮内エレクトロポレーション法、大脳皮質のスライス組織培養法、タイムラプスイメージングを組み合わせた、新規の実験系(*ex vivo* 阻害剤実験法)を確立した⁷⁾(図1)。この手法を用いることにより、我々は、ロコモーション移動にCdk5やSrcファミリーキナーゼが関

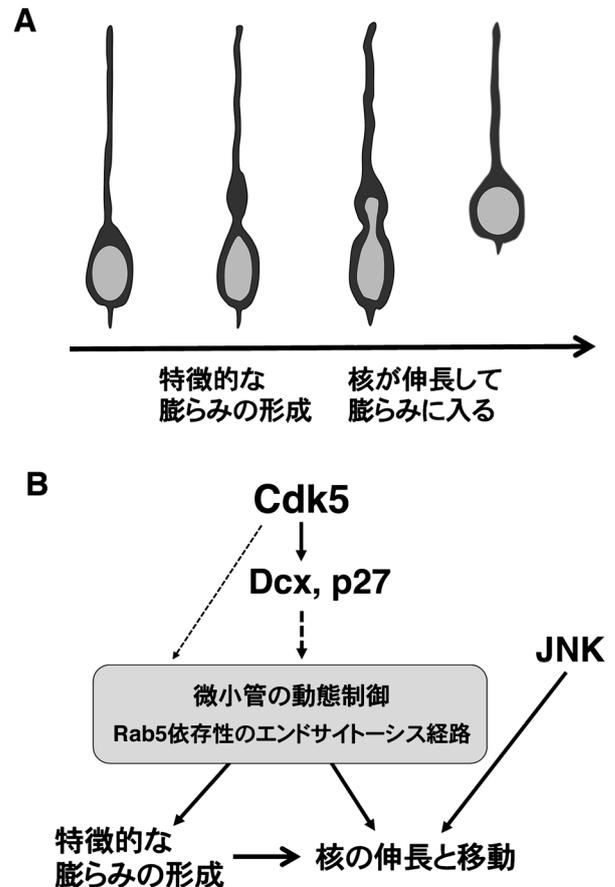


図2 神経細胞に特徴的な移動様式とその制御機構

(A)ロコモーション細胞は、他の細胞にはみられない特徴的な移動様式を示す。(B)ロコモーション細胞の移動における、先導突起の根元の特徴的な膨らみの形成と、核の伸長を制御する分子経路(詳細は本文参照)。

与することを示した。

ロコモーション細胞は、(1)先導突起の根元に特徴的な膨らみを形成し、(2)核が細長く伸長し、その膨らみの中に入り込む、といった、他の移動細胞にはみられない特徴的な移動様式を示す(図2A)。我々は、Cdk5が、この(1)と(2)の両方の過程に必要なことを明らかにした⁸⁾。これに対して、先導突起の形成に必要なことが知られているJNK(c-jun-N-terminal kinase)は⁹⁾、(2)の核の伸長には必要であったが、(1)の特徴的な膨らみの形成には必ずしも必要ないことがわかった(図2B)。

Cdk5の基質の一つであるDcx(Doublecortin)の遺伝子変異は、男性ではX連鎖性の滑脳症、女性では皮質下異所性灰白質を引き起こすことから、Dcxは多極性細胞からロコモーション細胞への変換過程に必要なことが示唆されていた。しかし、Christopher Walshらによって作製されたDcxのノックアウトマウスでは、この過程に異常がみられないことも報告されていた。我々は、マウス大脳皮質においてDcxをノックダウンしたロコモーション細胞は、コ

ントロールと比較して、平均移動速度が約66%に低下することを見だし、これは、Dcxのノックアウトマウスにおける神経細胞の移動速度の低下（野生型の約69%）¹⁰とほぼ一致したことから、少なくともマウスにおいてDcxはロコモーション細胞の移動に何らかの役割を果たしていることが示唆された。一方、Dcxを過剰発現させた場合にも神経細胞の移動は抑制され、Dcxをノックダウンしても過剰発現させても、先端突起の根元の特徴的な膨らみの形成と、核の伸長が抑制されることがわかった⁸。DcxはCdk5の基質であり、Cdk5によって負に制御されていること、DcxをノックダウンすることによりCdk5をノックダウンした表現型を部分的にレスキューできたことから、Cdk5によるリン酸化を通じDcxの活性が適切に制御されることが神経細胞に特異的な移動様式に必要である可能性が示唆された（図2B）。

Dcxは、微小管結合タンパク質であり、エンドサイトーシス経路の制御にも関与することが知られているが、*ex vivo*阻害剤実験法を用いて、ノコダゾールによる微小管重合阻害実験や、エンドサイトーシスに必須であるダイナミンの阻害剤Dynasoreの添加実験を行ったところ、どちらもDcxをノックダウンした場合と同様に、ロコモーション細胞において、先端突起の特徴的な膨らみの形成と核の伸長が抑制された。さらに我々は、エンドサイトーシス経路によるN-カドヘリンの制御が、ロコモーション細胞の移動に重要なことも報告している¹¹。

抑制性の介在神経細胞の移動において、p27^{kip1}は微小管結合因子としても機能することが、Laurent Nguyenらによって報告されている¹²。そこで、p27^{kip1}がロコモーション細胞の形態変化に関与するかを検討したところ、p27^{kip1}の機能阻害も、先端突起の根元における特徴的な膨らみ

の形成と核の伸長の両方を阻害した（図2B）。Zhiheng Xuらにより、先端突起の特徴的な膨らみの形成には、POSHおよびRac1を介したアクチン細胞骨格の再編成が必要であることが報告されていることから、p27^{kip1}の下流において、微小管とアクチン細胞骨格のどちらの制御が重要であるかは、今後の課題であろう。

4. 神経成熟における細胞周期関連分子の役割

長距離移動を終えたロコモーション細胞は、移動の最終段階において、ターミナル・トランスロケーションという別の移動様式に変換し、樹状突起の成熟を開始しつつ、移動を終了する。Peter Baasらは、細胞分裂期の紡錘体の制御に関わるキネシン5（Eg5）が樹状突起形成に必要であること、キネシン5と微小管の結合には、Cdk5によるキネシン5のリン酸化が重要であることを明らかにした。さらに、早稲田大学の島登志男らにより、Cdk5が大脳皮質および海馬の興奮性神経細胞の樹状突起スパインの形成に関与し、Cdk5の活性を低下させたマウスは、空間学習が低下することが示された。また、Cdk5は、セロトニン受容体5-HT6Rのリガンド非依存的機能などを介して、神経突起伸長を制御することも報告され、神経成熟においても重要な役割を果たすことが明らかになっている。

Cdk5は、NMDA受容体のNR2Bサブユニットをリン酸化するなど、シナプスにおいても機能することが知られている。興味深いことに、シナプスにおけるCdk5の機能の少なくとも一部は、サイクリンEによって制御されていることが報告された¹³。Cdk5は、サイクリンEとの結合能は有するが、他の一般的なCDKとは異なり、サイクリンEによって活性化されることはない。サイクリンEは、他

表1 増殖停止細胞における細胞周期関連分子の機能

分子名	増殖細胞での機能	増殖停止した神経細胞での機能	参考文献
p27(kip1)	増殖停止の促進・G1期の長さの調節	興奮性および抑制性神経細胞の移動（アクチン細胞骨格および微小管の制御）	*1
p57(kip2)	増殖停止の促進	興奮性神経細胞の移動	*2
Rb	G1～S期の移行	抑制性神経細胞の移動	*3
E2F3	G1～S期の移行	抑制性神経細胞の移動	*4
サイクリンE	G1～S期の移行	シナプス形成（Cdk5の抑制）	*5
APC/C-Cdc20	M期の制御	樹状突起の伸長	*6
APC/C-Cdh1	M期の制御	軸索伸長を抑制的に制御	*7
Aurora-A	M期の制御	興奮性神経細胞の移動・神経突起伸長	*8

Cdk5は多機能のため、本文参照。*1 Kawauchi T, et al. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 17–26; Godin J.D. et al. (2012) *Dev. Cell*, **23**, 729–744. *2 Itoh Y, et al. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 390–396. *3 Ferguson, K.L., et al. (2005) *EMBO J.*, **4**, 4381–4391. *4 McClellan, K.A., et al. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 4825–4843. *5 Odajima, J., et al. (2011) *Dev. Cell.*, **21**, 655–668. *6 Kim, A.H., et al. (2009) *Cell*, **136**, 322–336. *7 Konishi, Y., et al. (2004) *Science*, **303**, 1026–1030. *8 Mori, D., et al. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1057–1068; Takitoh, T., et al. (2012) *J. Neurosci.*, **32**, 11050–11066.

の一般的なCDKの発現が低下した成体脳でも高い発現を維持しており、成熟した神経細胞においてCdk5と結合し、その活性を抑制することにより、シナプス形成を促進している(表1)。

このように、Cdk5は神経発生のさまざまな段階で異なる基質をリン酸化することにより、多彩な機能を示す。Cdk5の基質については多くの報告があるのに対して、その上流制御機構はほとんどわかっていない。今後、Cdk5の活性がどのように制御され、どのようにして神経発生の各段階で異なる機能を発揮するかを明らかにしなければならない。

5. おわりに

本稿では、増殖停止細胞におけるCdk5およびp27^{kip1}の役割を中心に紹介したが、近年の研究により、他の細胞周期関連分子も「細胞周期非依存的な機能」を持つことが報告されている¹⁴⁾(表1)。細胞周期のG1期からS期への移行に関わるRbタンパク質とその下流のE2Fファミリーの転写因子が、抑制性の介在神経細胞の移動に関わることが、Ruth Slackらによって示されている。また、主にM期に働くAurora-Aキナーゼが神経突起伸長に必要であることや、同じくM期における紡錘体(スピンドル)チェックポイントなどに必要なE3ユビキチンリガーゼAPC/Cが軸索および樹状突起形成に関与することも報告されている(表1)。このように、いくつかの細胞周期関連分子が、増殖を停止した神経細胞において新たな機能を持つことが明らかとなりつつある。しかし、これらの分子が細胞周期を進行する可能性は低いと考えられる。なぜなら、神経細胞が細胞周期を再開し、S期へ進入することは、神経細胞死の引き金となることが知られており、実際、アルツハイマー病の患者脳において、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)などの細胞周期関連分子が異常に発現していることも報告されているからである¹⁵⁾。「増殖停止細胞」と「細胞周期関連分子の細胞周期非依存的な機能」が、細胞

周期分野・神経科学分野の新たな研究対象として発展していくことに期待したい。

文 献

- 1) Hisanaga, S. & Saito, T. (2003) *Neurosignals*, **12**, 221–229.
- 2) Kawauchi, T. (2014) *Dev. Growth Differ.*, **56**, 335–348.
- 3) Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 17–26.
- 4) Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itoharu, S., Hashimoto, M., Nakajima, K., Ogawa, M., Kulkarni, A.B., & Mikoshiba, K. (2007) *Development*, **134**, 2273–2282.
- 5) Ye, T., Ip, J.P., Fu, A.K., & Ip, N.Y. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 4826.
- 6) Sekine, K., Kawauchi, T., Kubo, K., Honda, T., Herz, J., Hattori, M., Kinashi, T., & Nakajima, K. (2012) *Neuron*, **76**, 353–369.
- 7) Nishimura, Y.V., Sekine, K., Chihama, K., Nakajima, K., Hoshino, M., Nabeshima, Y., & Kawauchi, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 5878–5887.
- 8) Nishimura, Y.V., Shikanai, M., Hoshino, M., Ohshima, T., Nabeshima, Y., Mizutani, K., Nagata, K., Nakajima, K., & Kawauchi, T. (2014) *Development*, **141**, 3540–3550.
- 9) Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4190–4201.
- 10) Pramparo, T., Youn, Y.H., Yingling, J., Hirotsune, S., & Wynshaw-Boris, A. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 3002–3012.
- 11) Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2010) *Neuron*, **67**, 588–602.
- 12) Godin, J.D., Thomas, N., Laguesse, S., Malinouskaya, L., Close, P., Malaise, O., Purnelle, A., Raineteau, O., Campbell, K., Fero, M., Moonen, G., Malgrange, B., Chariot, A., Metin, C., Besson, A., & Nguyen, L. (2012) *Dev. Cell*, **23**, 729–744.
- 13) Odajima, J., Wills, Z.P., Ndassa, Y.M., Terunuma, M., Kretschmannova, K., Deeb, T.Z., Geng, Y., Gawrzak, S., Quadros, I.M., Newman, J., Das, M., Jecrois, M.E., Yu, Q., Li, N., Bienvenu, F., Moss, S.J., Greenberg, M.E., Marto, J.A., & Sicinski, P. (2011) *Dev. Cell*, **21**, 655–668.
- 14) Kawauchi, T., Shikanai, M., & Kosodo, Y. (2013) *Genes Cells*, **18**, 176–194.
- 15) Yang, Y. & Herrup, K. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1772**, 457–466.

著者寸描

●川内 健史 (かわうち たけし)



先端医療センター研究所・上席研究員、慶應義塾大学医学部・訪問准教授、博士(医学)。

■**略歴** 1974年兵庫県に生る。98年京都大学農学部卒業、2000年同大学院農学研究科修士課程修了、04年京都大学医学研究科博士課程修了(鍋島陽一研究室)。京都大学大学院医学研究科助手、慶應義塾大学医学部特任講師、JSTさきがけ専

任研究者などを経て現職。

■**研究テーマと抱負** 大脳皮質形成のメカニズムを「細胞生物学的な観点から」「in vivoで」理解することを目指している。生化学、細胞生物学、神経科学などを含めた、広い分野の人から興味を持ってもらえる研究成果を出していきたい。

■**ウェブサイト** <http://tkawauchi.web.fc2.com>

■**趣味** ギター演奏、激しい音楽を聴くこと。