

## ゼブラフィッシュ cyclin-dependent kinase-like 5 による amphiphysin 1 のリン酸化

片山将一・千賀由佳子・杉山康憲・末吉紀行・亀下 勇

### Phosphorylation of amphiphysin 1 by zebrafish cyclin-dependent kinase-like 5

Syouichi Katayama, Yukako Senga, Yasunori Sugiyama, Noriyuki Sueyoshi and Isamu Kameshita

#### Abstract

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) is a Ser/Thr protein kinase. Mammalian CDKL5 is predominantly expressed in brain and mutation in mammalian CDKL5 gene causes neurodevelopmental disorders. However, in fishes, functional role of CDKL5 is currently unknown. In this study, we investigated kinase activity and intracellular localization of zebrafish CDKL5. Two splice variants of zCDKL5, zCDKL5-Long (zCDKL5-L) (1081 aa) and zCDKL5-Short (zCDKL5-S) (1040 aa), were cloned from zebrafish adult brain cDNA library. In our previous studies, mammalian CDKL5 significantly phosphorylated amphiphysin 1 (Amph1) *in vitro*. Consequently, we cloned zAmph1 as a substrate of zCDKL5 from zebrafish embryo cDNA library. zCDKL5 colocalized with a part of zAmph1 in the cytoplasm of COS-7 cells. Moreover, GST pull-down analysis indicate that zCDKL5 bound to zAmph1. In addition, constitutively active zCDKL5(1-350) efficiently phosphorylated zAmph1.

**Key word :** cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5), amphiphysin 1 (Amph1), Rett syndrome, neurodevelopmental disorders, zebrafish

#### 緒 言

哺乳動物の cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) は主に脳に発現する Ser/Thr プロテインキナーゼであり<sup>(1,2)</sup>, その遺伝子の変異は Rett 症候群の発症と密接に関与する<sup>(3)</sup>. Rett 症候群は主に女兒に発症する遺伝子疾患であり, 精神発達遅延やてんかん等の症状を示す. 哺乳動物の CDKL5 は神経細胞において軸索の形成やスパインの形成に関わることが明らかにされている<sup>(4,5)</sup>. さらに, CDKL5 ノックアウトマウスにおいて, Rett 症候群患者に見られる手もみ動作が確認されるほか, 社会性の欠如を示すことが報告されている<sup>(6)</sup>.

CDKL5 遺伝子の変異が引き起こす Rett 症候群の発症メカニズムを明らかにするためには, CDKL5 のリン酸化基質を同定する必要がある. これまでに, CDKL5 によってリン酸化される基質として methyl-CpG-binding protein 2<sup>(7,8)</sup> および DNA methyltransferase 1<sup>(9)</sup> が知られているが, そのリン酸化の程度は低い. そこで我々は, 液相等電点電気泳動を用いた独自の基質探索法<sup>(10)</sup>

を利用して, CDKL5 によって非常に良くリン酸化される基質として, amphiphysin 1 (Amph1) を同定した<sup>(11)</sup>. Amph1 はエンドサイトーシスに関わるタンパク質として知られている. さらに我々は, CDKL5 が Amph1 のリン酸化部位周辺のアミノ酸配列だけでなく CLAP ドメインを認識する, 厳密な基質特異性を示すプロテインキナーゼであることを明らかにした<sup>(12)</sup>.

このように, 哺乳動物の CDKL5 の機能については多数の報告がある. その一方で, 哺乳動物以外の生物種における CDKL5 の機能についてはほとんど分かっておらず, その中でも魚類の CDKL5 の報告は全く無い. そこで本研究では, 魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュの CDKL5 (zCDKL5) およびゼブラフィッシュの Amph1 (zAmph1) をクローニングし, zCDKL5 の細胞内局在やリン酸化活性について研究を行った.

## 材料と方法

### 材料

抗His6タグ抗体, 抗mycタグ抗体はそれぞれ和光純薬工業, インビトロジェンより購入した. pEGFP-mCDKL5の発現ベクターは以前構築したもの<sup>(9)</sup>を使用した. Prime STAR HS DNAポリメラーゼはタカラバイオより購入した.

### zCDKL5のクローニング

ゼブラフィッシュ脳3'-RACE cDNAライブラリーを鋳型に, zCDKL5-SおよびzCDKL5-AS/XhoI+2のプライマーを使用してPCRを行うことで, zCDKL5のコーディング領域を増幅し, pGEM-T-easy (プロメガ) に導入した. 得られた2つの異なるサイズのクローンのうち, 長いものをzCDKL5-L, 短いものをzCDKL5-Sと命名した. 使用したプライマーの塩基配列を表1に記す.

### プラスミドの構築

pGEM-zCDKL5-SとpGEM-zCDKL5-LをEcoRIおよびXhoIによって処理し, 得られたzCDKL5-SとzCDKL5-Lの遺伝子をpEGFP-C1 (BD バイオサイエンスクロンテック) のEcoRI-SalIサイトに組み込むことで, 動物細胞用zCDKL5発現ベクター (pEGFP-zCDKL5-S, pEGFP-zCDKL5-L) を構築した. pGEM-zCDKL5-SまたはpGEM-zCDKL5-Lを鋳型として, zCDKL5-S/NheIとzCDKL5-AS/XhoIのプライマーを使用してPCRを行い, 得られた増幅産物をpET-23a (ノバジェン) のNheI-XhoIサイトに導入することで, 大腸菌用zCDKL5発現ベクター (pET-zCDKL5-S, pET-zCDKL5-L) を構築した. また, pET-zCDKL5-Sを鋳型に2つのプライマー (zCDKL5-inv-SおよびzCDKL5-AS/350) を用いてインバースPCR法<sup>(13)</sup>を行なうことによってpET-zCDKL5(1-350)を構築した.

ゼブラフィッシュ胚5'-RACE cDNAライブラリーよ

りzAmph1-S/BamHIとzAmph1-AS/XhoIのプライマーを使用してPCRを行うことによってzAmph1の遺伝子を増幅した. 得られた増幅産物をpGEX-4T-1 (GEヘルスケア) またはpET-23aのBamHI-XhoIサイトに組み込んだ. さらに, pET-zAmph1を鋳型として, zAmph1-S/BamHIとzAmph1-AS/XhoI+2のプライマーを使用してPCRを行い, 得られた増幅断片をpcDNA3.1/myc-His B (インビトロジェン) のBamHI-XhoIサイトに導入することで, pcDNA-zAmph1を作製した. 実験に使用したプライマーの一覧を表1に示す.

### タンパク質の発現と精製

zCDKL5(1-350) はmCDKL5(1-352) の手法<sup>(9)</sup>に準じて発現, 精製した. zAmph1はmAmph1と同様の方法<sup>(11)</sup>で発現, 精製した.

### 動物細胞の培養, トランスフェクション, 免疫染色, 蛍光観察

COS-7細胞の培養, 形質転換は従来<sup>(14)</sup>に準じて行った. COS-7細胞を非働化済の10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, シグマアルドリッチ) によって培養した. 細胞 ( $2 \times 10^5$ 個) を35 mm ディッシュに蒔き, 24時間培養後, 4 $\mu$ lのLipofectamine 2000 (インビトロジェン) を使用して2 $\mu$ gのプラスミドDNAをトランスフェクトした.

免疫染色および蛍光観察は従来<sup>(15)</sup>に従って行った. COS-7細胞を10%ホルマリン含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で処理することによって固定した. 次に, 0.1% Triton X-100を含むPBSを用いて細胞膜の透過処理を行った. さらに, 細胞を1%ウシ血清アルブミン含有のPBSで処理後, 1000倍希釈した抗mycタグ抗体と反応させた. 次に, Cy3ラベルされた二次抗体と反応させた. その後, 1000倍希釈した4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で核を対比染色した. 観

表1 実験に使用したプライマーの配列

プライマー名	配列 (5'→3') 下線部は制限酵素サイト
zCDKL5-S	ATG AAG ATT CCT GAC ATC GGT AAT G
zCDKL5-S/NheI	<u>GCT AGC</u> ATG AAG ATT CCT GAC ATC GGT AAT G
zCDKL5-AS/XhoI	<u>CTC GAG</u> AAG GGC CGT TTC TTT CAG ATC A
zCDKL5-AS/XhoI+2	<u>CTC GAG</u> CCA AGG GCC GTT TCT TTC AGA TCA
zCDKL5-inv-S	CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC
zCDKL5-AS/350	AGA GGA GCA GTC TTT GCT GTT CG
zAmph1-S/BamHI:	AAA <u>GGA TCC</u> ATG GCT GAA ATA AAG ACG GGC A
zAmph1-AS/XhoI	AAA <u>CTC GAG</u> CTC CAG TGT GAA GTT TTC
zAmph1-AS/XhoI+2	AAA <u>CTC GAG</u> GG CTC CAG TGT GAA GTT TTC

察には共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000, オリンパス) を使用した。

### GSTプルダウンアッセイ

GSTまたはGST-Amph1を発現する大腸菌BL21 (DE3) の粗抽出液をグルタチオンセファロース4B (20 μl) と4℃, 2時間反応させた。その後, セファロースをホモゲナイズバッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, および 0.05% Tween40] を用いて十分に洗浄した。洗浄済みのセファロースをzCDKL5(1-350) (10 μg) と4℃, 2時間反応させた。反応後のセファロースをホモゲナイズバッファーによって十分に洗浄後, 20 μlの2×サンプルバッファーを添加することによって結合タンパク質を溶出した。溶出したサンプルはSDSポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) に供し, CBB染色またはウエスタンブロットティングによって解析した。

### タンパク質のリン酸化

タンパク質のリン酸化はこれまでの報告に従って行った<sup>(11)</sup>。酵素反応はキナーゼ (CDKL5) を添加することで開始させた。リン酸化反応を30℃にて60分間行い, 2×サンプルバッファーを添加することによって反応を停止後, SDS-PAGEに供し, オートラジオグラフィーによりリン酸化タンパク質を検出した。

### SDS-PAGEとウエスタンブロットティング

SDS-PAGEはLaemmliの方法に準じて行った<sup>(16)</sup>。分離したタンパク質はニトロセルロース膜に転写し, 従来の方法<sup>(17)</sup>に則り検出した。検出の際に, 8000倍希釈した抗His<sub>6</sub>タグ抗体を使用した。

## 結果と考察

### zCDKL5のクローニング

ゼブラフィッシュのCDKL5の機能について解析を開始するにあたり, ゼブラフィッシュ脳のcDNAライブラリーよりCDKL5のクローニングを行ったところ, 異なる大きさのzCDKL5スプライスバリエントを2種類得ることが出来た (図1)。このうち全長配列の長いものをzCDKL5-L, 短いものをzCDKL5-Sと命名した。次に, zCDKL5-LとzCDKL5-Sの塩基配列についてBLAST解析を行ったところ, zCDKL5-Sは16番目のエクソンが欠損していることが明らかになった。これらエクソン16の有無によって産生されるスプライスバリエントは哺乳動物においても報告されている<sup>(18,19)</sup>。

zCDKL5とmCDKL5のアミノ酸相同性を調べたと

ころ, zCDKL5-SとmCDKL5の相同性は57%であり, zCDKL5-LとmCDKL5の相同性は55%であった。また, zCDKL5-SとzCDKL5-Lには共にプロテインキナーゼに共通して見られる推定触媒ドメイン (Kinase domain) が存在した。

zCDKL5-Sに該当するバリエントであるmCDKL5は様々な組織に広く発現するのに対し, zCDKL5-Lに該当するmCDKL5-16bは主に脳に発現する<sup>(19)</sup>。このことから, zCDKL5-SとzCDKL5-Lも異なる組織分布を示す可能性が考えられる。

### zAmph1のクローニング

哺乳動物のCDKL5は非常に厳密な特異性をもつプロテインキナーゼであり, その良好な基質としてAmph1が知られている<sup>(11)</sup>。そのため, zCDKL5の活性検出にはzAmph1を取得する必要があると考えられる。そこで,

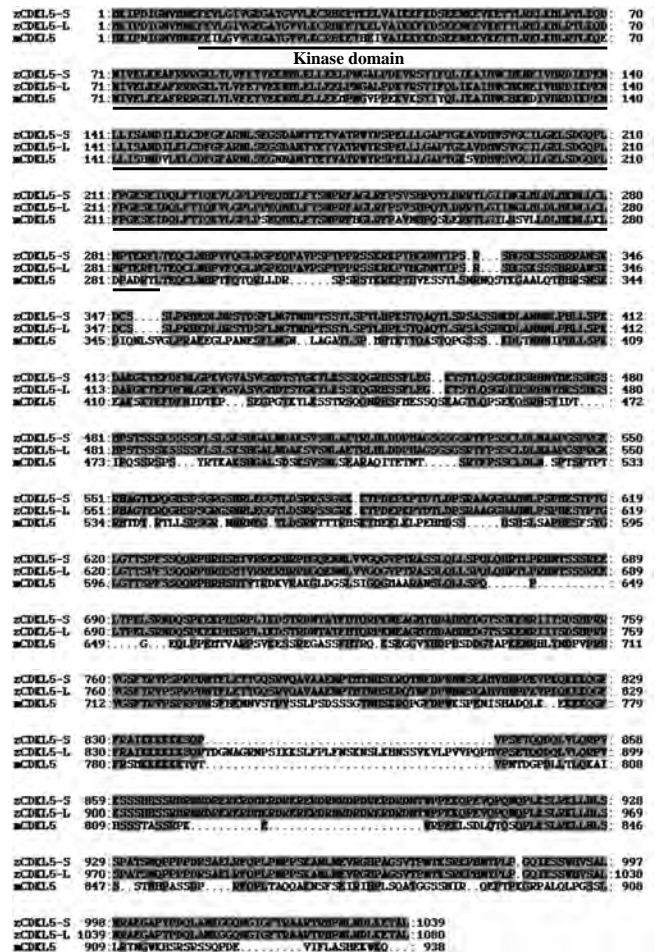


図1: CDKL5のアライメント

zCDKL5-S, zCDKL5-LとmCDKL5のアミノ酸配列のアライメントを示す。灰色で示したアミノ酸は2者以上に保存されている残基を示す。下線部はプロテインキナーゼの推定触媒ドメイン (Kinase domain) を示す。



ゼブラフィッシュ胚のcDNAライブラリーよりzAmph1のクローニングを行った。取得したzAmph1のアミノ酸配列についてmAmph1と比較したところ、その相同性は54%であり、Amph1の持つタンパク質結合ドメイン構造であるBARドメイン、proline-richドメイン (PRD)、CLAPドメイン、SH3ドメインはzAmph1に高度に保存されていた (図2)。さらに、mAmph1におけるCDKL5のリン酸化部位はSer-293であり<sup>(11)</sup>、該当するアミノ酸はzAmph1においても保存されていた (図2)。このことから、zAmph1はzCDKL5によりリン酸化される可能性が示唆された。

zCDKL5およびzAmph1の細胞内局在

まず、zCDKL5とzAmph1が細胞内で相互作用するか、細胞内局在を調べることににより解析した。N末端にEGFPタグを付加したzCDKL5-S、zCDKL5-Lの両者は主に細胞質に点状の局在を示した。また、この局在パターンはmCDKL5と同様であった (図3)。続いて、C末端にmycタグを付加したzAmph1の局在を調べたところ、zAmph1は細胞質全体に発現していた (図3)。

これまでに、CDKL5に特徴的な点状の局在に関する

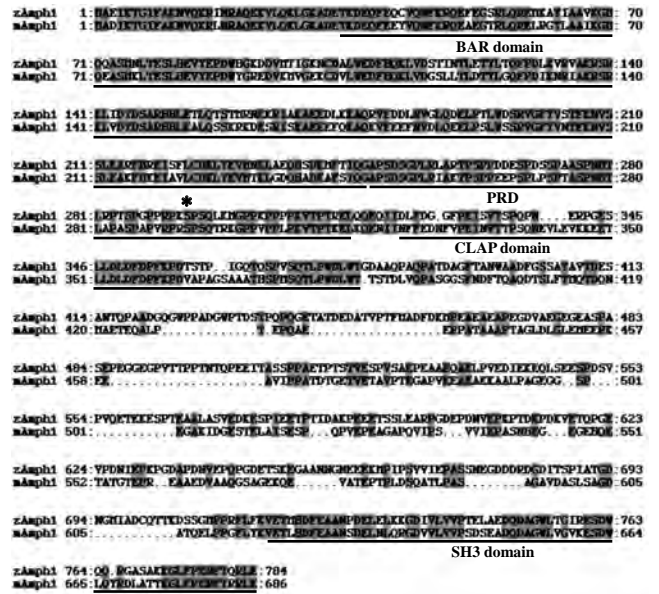


図2: Amph1のアライメント  
zAmph1とmAmph1のアミノ酸配列のアライメントを示す。灰色で示したアミノ酸は両者に保存されている残基を示す。下線部はamphiphysinに見られるタンパク質結合ドメイン (BARドメイン、PRD、CLAPドメイン、SH3ドメイン) を示す。\*はCDKL5によってリン酸化されるmAmph1のアミノ酸 (Ser-293) を示す。

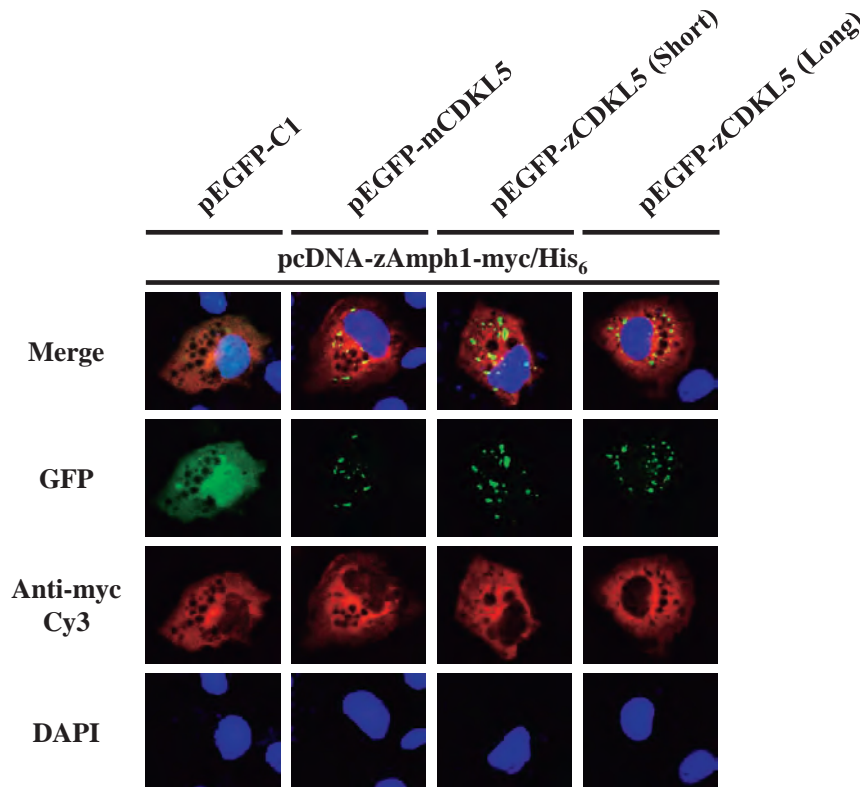


図3: zCDKL5とzAmph1の細胞内局在

EGFPタグを付加したCDKL5およびmycタグを付加したAmph1を発現するプラスミドをCOS-7細胞にトランスフェクトした。24時間後にEGFPタグの蛍光観察および抗mycタグ抗体を用いた免疫染色法により、それぞれのタンパク質の細胞内局在を観察した。また、DAPIで核を対比染色した。

論文は複数報告されているものの<sup>(4, 20, 21)</sup>, その決定的な要因は解明されておらず, 今後の解析が必要である. また, zAmph1に見られた局在パターンは哺乳動物のAmph1の局在パターン<sup>(22)</sup>と類似していた. これらのことからzCDKL5とzAmph1は細胞質において部分的に共局在しており, 直接相互作用する可能性があると考えられる.

### zCDKL5によるzAmph1のリン酸化

zCDKL5とzAmph1の細胞内での共局在が観察されたため, zCDKL5とzAmph1が直接結合するか調べた. 我々はまず, zCDKL5-SおよびzCDKL5-Lの精製酵素の取得を試みたが, 共に大腸菌の不溶性画分に発現したため, 活性のある酵素を得ることが困難であった. そこで, キナーゼドメインを含むC末端欠損変異体であるzCDKL5(1-350)を作製した(図4A). この変異体

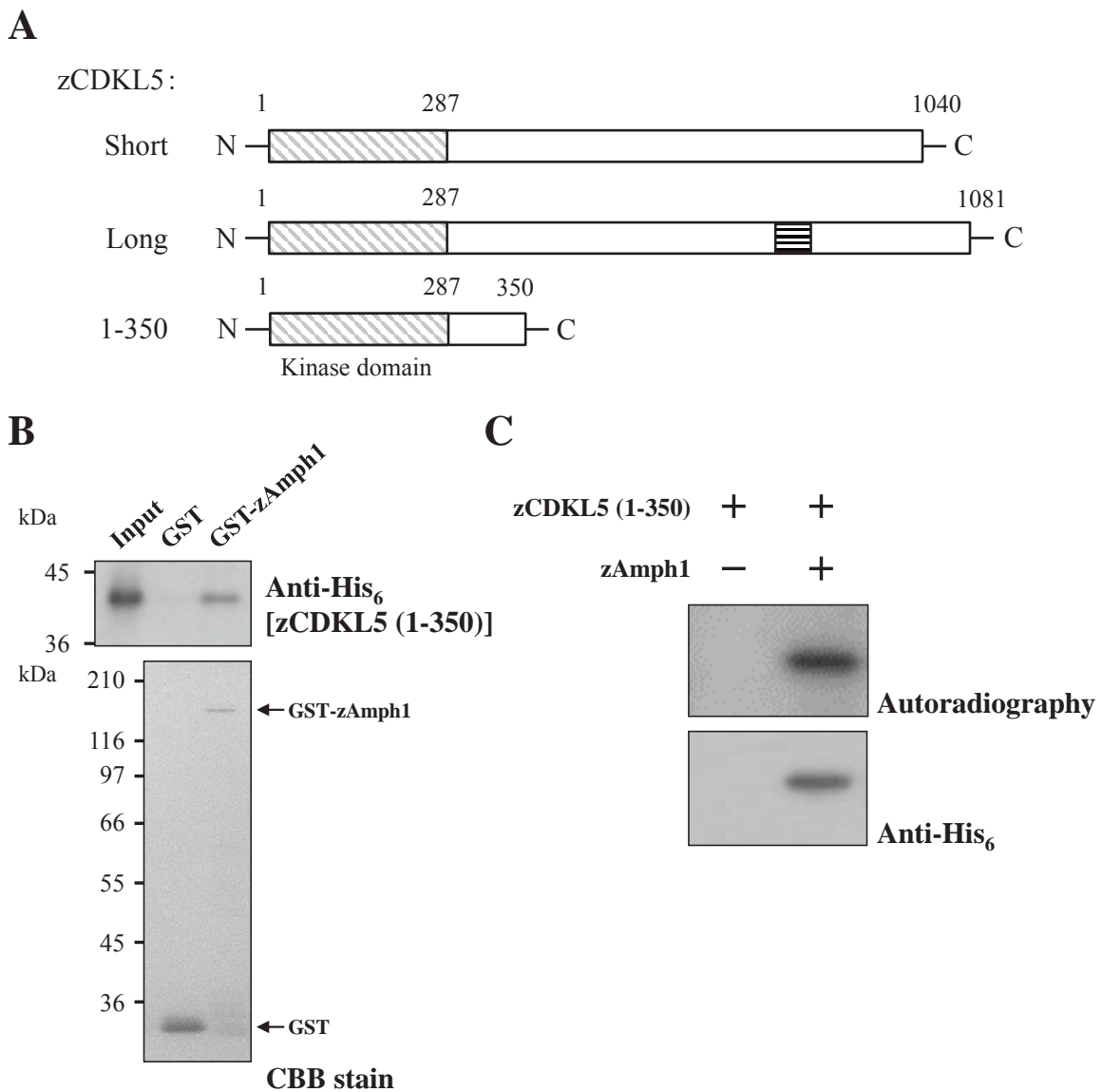


図4: zCDKL5によるzAmph1のリン酸化

(A) 本研究で用いたzCDKL5の一次構造について模式図を示す. キナーゼドメインを斜線枠の領域で示す. zCDKL5-Lにのみ見られる配列を横線枠で示す. (B) GSTまたはGST-Amph1をグルタチオンセファロース4B (20  $\mu$ l) に結合させた後, セファロースの洗浄を行った. 洗浄済みのセファロースをzCDKL5(1-350) (10  $\mu$ g) と反応させた. 反応後のセファロースを十分に洗浄後, 20  $\mu$ lの2 $\times$ サンプルバッファーを添加することによって結合タンパク質を溶出した. 溶出したサンプルは抗His<sub>6</sub>タグ抗体 (上段) とCBB染色 (下段) によって解析した. (C) zCDKL5(1-350) (200 ng) を用いてzAmph1 (400 ng) をリン酸化した. リン酸化されたzAmph1をオートラジオグラフィ (上段) で検出し, zAmph1を抗His<sub>6</sub>タグ抗体 (下段) によって検出した.

を, 大腸菌を用いて発現させたところ可溶性画分への発現が見られたため, zCDKL5(1-350) の精製酵素を取得した. これまでに我々は, CDKL5がAmph1をリン酸化するために, 両者の結合が重要であることを見出している<sup>(12)</sup>. そこでGST-プルダウンアッセイによってzCDKL5(1-350) とzAmph1が結合するか確かめた. その結果, zCDKL5(1-350) とGST-zAmph1は結合した (図4B). そこでzCDKL5(1-350) によるzAmph1のリン酸化を調べたところ, zCDKL5(1-350) はzAmph1をリン酸化した (図4C).

mAmph1はCDKL5によってSer-293をリン酸化されることで, エンドサイトーシス関連タンパク質であるendophilinとの結合を負に制御されることが報告されている<sup>(11)</sup>. その一方で, zAmph1のzCDKL5によるリン酸化

の意義は明らかになっておらず, 今後, リン酸化されたzAmph1とendophilinの結合について解析を行う必要がある. 本研究において, 我々はzCDKL5の細胞内局在およびzAmph1に対するリン酸化活性について報告した. 今後は, ゼブラフィッシュを用いることによりzCDKL5-SとzCDKL5-Lの発現組織の違いや細胞, 個体における機能的役割分担について解析を進める必要がある.

## 謝 辞

本研究はJSPS科研費(26・7002)の助成を受けたものです. また, 実験を補助して頂いた香川大学大学院農学研究科の三木洋祐氏および大井愛海氏に感謝致します.

## 引 用 文 献

- (1) Montini, E., Andolfi, G., Caruso, A., Buchner, G., Walpole, S. M., Mariani, M., Consalez, G., Trump, D., Ballabio, A., and Franco, B. *Genomics*, 51, 427-433 (1998).
- (2) Rusconi, L., Salvatoni, L., Giudici, L., Bertani, I., Kilstrup-Nielsen, C., Broccoli, V., and Landsberger, N. *J. Biol. Chem.*, 283, 30101-30111 (2008).
- (3) Kilstrup-Nielsen, C., Rusconi, L., La Montanara, P., Ciceri, D., Bergo, A., Bedogni, F., and Landsberger, N. *Neural. Plast.*, 728267. (2012).
- (4) Zhu, Y. C., Li, D., Wang, L., Lu, B., Zheng, J., Zhao, S. L., and Xiong, Z. Q. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 110, 9118-9123 (2013).
- (5) Ricciardi, S., Ungaro, F., Hambrock, M., Rademacher, N., Stefanelli, G., Brambilla, D., Sessa, A., Magagnotti, C., Bachi, A., Giarda, E., VerPELLI, C., Kilstrup-Nielsen, C., Sala, C., Kalscheuer, V. M., and Broccoli, V. *Nat. Cell Biol.*, 14, 911-923 (2012).
- (6) Wang, I. T., Allen, M., Goffin, D., Zhu, X., Fairless, A. H., Brodtkin, E. S., Siegel, S. J., Marsh, E. D., Blendy, J. A., and Zhou, Z. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 109, 21516-21521 (2012).
- (7) Mari, F., Azimonti, S., Bertani, I., Bolognese, F., Colombo, E., Caselli, R., Scala, E., Longo, I., Grosso, S., Pescucci, C., Ariani, F., Hayek, G., Balestri, P., Bergo, A., Badaracco, G., Zappella, M., Broccoli, V., Renieri, A., Kilstrup-Nielsen, C., and Landsberger, N. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 1935-1946 (2005).
- (8) Bertani, I., Rusconi, L., Bolognese, F., Forlani, G., Conca, B., De Monte, L., and Kilstrup-Nielsen, C. *J. Biol. Chem.*, 281, 32048-32056 (2006).
- (9) Kameshita, I., Sekiguchi, M., Hamasaki, D., Sugiyama, Y., Hatano, N., Suetake, I., Tajima, S., and Sueyoshi, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 1162-1167 (2008).
- (10) Senga, Y., Nagamine, T., Sekiguchi, M., Kaneko, K., Sueyoshi, N., and Kameshita, I. *Anal. Biochem.*, 408, 345-347 (2011).
- (11) Sekiguchi, M., Katayama, S., Hatano, N., Shigeri, Y., Sueyoshi, N., and Kameshita, I. *Arch. Biochem. Biophys.*, 535, 257-267 (2013).
- (12) Katayama, S., Sueyoshi, N., and Kameshita, I. *Biochemistry*, 54, 2975-2987 (2015).
- (13) Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T., and Terada, M. *Nucleic Acids Res.*, 19, 2785 (1991).
- (14) Nagamine, T., Shimomura, S., Sueyoshi, N., and Kameshita, I. *J. Biochem.*, 149, 619-627 (2011).
- (15) Nagamine, T., Nomada, S., Onouchi, T., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 446, 73-78 (2014).
- (16) Laemmli, U. K. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- (17) Kameshita, I., Tsuge, T., Kinashi, T., Kinoshita, S., Sueyoshi, N., Ishida, A., Taketani, S., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., and Okazaki, K. *Anal. Biochem.*, 322, 215-224 (2003).
- (18) Rademacher, N., Hambrock, M., Fischer, U., Moser, B., Ceulemans, B., Lieb, W., Boor, R., Stefanova, I., Gillissen-Kaesbach, G., Runge, C., Korenke, G. C., Spranger, S., Laccone, F., Tzschach, A., and Kalscheuer, V. M. *Neuro-*

- genetics, 12, 165-167 (2011).
- (19) Fichou, Y., Nectoux, J., Bahi-Buisson, N., Chelly, J., and Biennu, T. *J. Hum. Genet.*, 56, 52-57 (2011).
- (20) Ricciardi, S., Kilstrup-Nielsen, C., Biennu, T., Jacqueline, A., Landsberger, N., and Broccoli, V. *Hum. Mol. Genet.*, 18, 4590-4602 (2009).
- (21) Mertz, J. L., Tan, H., Pagala, V., Bai, B., Chen, P. C., Li, Y., Cho, J. H., Shaw, T., Wang, X., and Peng, J. *Mol. Cell. Proteomics*, mcp-M114 (2015).
- (22) Murakami, N., Xie, W., Lu, R. C., Chen-Hwang, M. C., Wieraszko, A., and Hwang, Y. W. *J. Biol. Chem.*, 281, 23712-23724 (2006).