

学 位 論 文 題 名

Alcadein α による kinesin-1 活性化機構の解析

学位論文内容の要旨

【序論】

神経細胞は軸索を経て標的細胞とシナプスを形成することで個体内における情報伝達を担っている。神経細胞では細胞体で作られた必要なタンパク質を遠く離れた神経末端まで運ぶ必要がある。また、軸索を介して他の細胞からシグナル分子などを受け取ることも必要である。そのため、長距離にわたる軸索中での効率的な小胞輸送、すなわち軸索輸送が神経細胞の生存や機能維持においてきわめて重要な役割を果たしている。

軸索輸送において細胞体から神経末端方向への順行性輸送を kinesin というモータータンパク質が担っており、これを動力として、また、微小管をレールとしてオルガネラや小胞の輸送を行っている。

軸索輸送における順行性輸送を担う主な kinesin として kinesin-1 がある。kinesin-1 は、二つの Kinesin Heavy Chain (KHC) と二つの Kinesin Light Chain (KLC) で構成されるヘテロ四量体である。kinesin-1 が KLC の Tetra-trico-peptide repeat (TPR) ドメインを介して膜タンパク質などのカーゴに結合することで小胞輸送が行われる。しかし、kinesin-1 は、通常、KLC と KHC のみで存在するとき、微小管とは結合できないモーターとして不活性な状態であることが知られており、小胞輸送を行うためには、この不活性な状態からモーターとして活性をもつ状態にならなければならないが、どのような機構で活性化されるのかなど不明な点が多い。

当研究室で単離・同定された Alcadein α (Alc α) は I 型の膜タンパク質であり、KLC と直接結合し、kinesin-1 と輸送体を形成するカーゴである。Alc α -EGFP を用いた細胞内の輸送小胞の観察から Alc α 小胞の輸送速度が約 1.3 $\mu\text{m/s}$ であることが分かっている。また、EGFP-KHC を細胞に単独発現させると輸送小胞が観察され、KLC と共発現させると細胞全体に遍在するようになり、さらに Alc α を発現させると EGFP-KHC の輸送小胞が観察されるようになること、この現象が他の kinesin-1 のカーゴ分子を共発現させても観察されないことから、この現象は KLC の過剰発現で不活性状態となった kinesin-1 を Alc α が活性化していることを示している。本研究では、Alc α によってどのようにして kinesin-1 が活性化されるのか明かでないことから、Alc α による kinesin-1 活性化機構を解明することを目的に実験を行った。

【実験結果】

まず、Alc α の KLC 結合部位が明かでないことからその同定を行った。Alc α 細胞質ドメイン (ICD) の欠失変異体を GST 融合蛋白質として精製し、精製した KLC1 との結合実験を行った結果、KLC 結合部位は細胞質ドメインに二か所存在し、アミノ酸配列が非常に類似していたことから WD-motif と名付けた。また、同様な結合実験から WD-motif が KLC 結合部位として十分であることを明らかとした。

次に、WD-motif が実際の細胞内輸送に必要であるのかを検討するため、Alc α の WD-motif

を欠失させ C 末端に EGFP を付加したコンストラクトを作成し、神経系の培養細胞である CAD 細胞に強制発現させて全反射顕微鏡を用いて神経突起における輸送を観察した。その結果、WD-motif 欠失変異体では輸送される小胞数がほとんど観察されず、WD-motif が Alca 小胞の輸送に重要であることが明らかとなった。

さらに、WD-motif が実際の細胞内輸送で kinesin-1 のカーゴとして十分に機能できるのかを検討するため人工的な膜タンパク質に EGFP、WD-motif を付加したコンストラクトを作成し、CAD 細胞に強制発現させ神経突起の輸送を観察した。その結果、WD-motif を付加したコンストラクトの速度は Alca 小胞と同様であったことから、WD-motif は kinesin-1 のカーゴとして十分に機能できることが明らかとなった。

次に WD-motif が kinesin-1 を活性化する機能部位であるかを検討するため、EGFP-KLC1 及び EGFP-KHC、KLC1 と WD-motif を付加した人工的な膜タンパク質を CAD 細胞に強制発現させ神経突起の輸送を観察した。その結果、WD-motif を付加したコンストラクトでは EGFP-KLC1 の輸送の様子が観察された。また、EGFP-KHC、KLC1 と WD-motif を付加したコンストラクトの共発現では EGFP-KHC の輸送が観察された。よって、Alca による kinesin-1 活性化の機能部位は WD-motif であることが明らかとなった。

次に、Alca の kinesin-1 活性化機構を解析するために、kinesin-1 活性化に必要な KLC の領域を同定することにした。KLC1 の TPR 欠失変異体コンストラクトと EGFP-KHC、Alca を CAD 細胞に共発現させて神経突起の観察を行った。その結果、KLC1 の 2-5 番目の TPR ドメインがあれば多数の順行性の輸送小胞が観察され、この領域が kinesin-1 の Alca 依存的活性化には必要十分であることが明らかとなった。

次に、Alca の WD-motif が 2 ヲ所で非常に類似したアミノ酸であったことから、様々な kinesin-1 カーゴの中の少なくとも一部に WD-motif が含まれ、kinesin-1 活性化モチーフとして利用されているのではないかと考えた。そこで、Blast search を用いて WD-motif を持つタンパク質を検索した結果、Toll-like receptor 4 (TLR4) などにも WD-motif 様の配列が認められた。そこで、TLR4 の WD-motif を付加した人工的な膜タンパク質を作成し、EGFP-KHC、KLC と CAD 細胞に強制発現させ神経突起の観察を行った。その結果、TLR4 の WD-motif があれば多数の順行性の輸送小胞が観察され、TLR4 の WD-motif に kinesin-1 活性化機能があることが明らかとなった。よって、TLR4 が kinesin-1 活性化機能を有する可能性が示唆された。

【まとめ】

1. Alca の KLC 結合サイトは細胞質ドメインに二か所存在し、アミノ酸配列が非常に類似していることから WD-motif と名付けた。
2. WD-motif は kinesin-1 による小胞輸送に十分機能でき、また Alca の kinesin-1 活性化機能部位であった。
3. Alca の kinesin-1 活性化において KLC の 2-5 番目の TPR ドメインが必要十分な領域であった。
4. WD-motif をもつ TLR4 も新規な kinesin-1 活性化タンパク質である可能性が示唆された。

これらの結果は、kinesin-1 活性化に関与する最小機能単位を始めて明らかにしたものであり、その制御機構を解析していく上で重要な知見を提供しうるものであると考えている。また、WD-motif は kinesin-1 活性化機能部位として広く用いられている可能性が示唆され、今後未知の kinesin-1 カーゴの同定にも大いに役立つものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 利 治

副 査 教 授 稲 垣 冬 彦

副 査 准教授 山 本 融

副 査 講 師 野 田 展 生

学 位 論 文 題 名

Alcadein α による kinesin-1 活性化機構の解析

Alcadein (Alc)は、神経細胞に特徴的に発現する I 型膜タンパク質であり、独立した遺伝子がコードする Alc α 、Alc β 、Alc γ の 3 分子がファミリーを形成している。本研究室で見いだした Alc は、これまでキネシン-1 モーターにより微小管上を順行輸送される膜小胞カーゴ受容体であることが判明していた。さらに Alc は、単にキネシン-1 に接続して輸送される受容体ではなく、キネシン-1 を活性化する能動的な機能を持つ初めてのカーゴ受容体であることが判明していた。しかしながら、Alc のキネシン-1 活性化機構の詳細は全く解析されていなかった。著者は、Alc α の細胞質ドメインの詳細な解析を行い、KLC に結合するドメインとして、新しい配列を見だし WD モチーフと命名した。WD モチーフは、キネシン-1 で輸送される他の膜タンパク質やウイルスタンパク質にも見られ、キネシン-1 結合モチーフとしての普遍性が示唆された。キネシン-1 は、通常 2 分子の KLC と 2 分子の KHC が 4 量体を形成しているが、KHC のテールドメインがモータードメインに相互作用した構造をとり自己不活性状態として微小管に結合しない状態で存在している。著者は Alc の WD モチーフと KLC の結合がキネシン-1 の活性化を引き起こし、膜小胞の順行輸送を行うことを神経系培養細胞に KLC および Alc の各種変異体を発現させ、その機能を全反射顕微鏡で解析する実験より明らかにした。さらに詳細な解析により、WD モチーフだけでキネシン-1 を活性化できることを実証し、加えて WD モチーフがキネシン-1 を活性化するモチーフとして普遍的に働いている可能性を示唆した。また、KLC 側の Alc による活性化に必要な領域の同定も行い、KLC1 の 6 つの TPR ドメインの内、2 番目から 5 番目に至る配列が WD モチーフによるキネシン-1 の活性化に必要な領域であることを実証した。

本論文の成果は、(1) Alc の KLC 結合領域として新規 WD モチーフを同定した。(2) WD モチーフの KLC への結合は、キネシン-1 の自己不活性状態を解除しキネシン-1 モーターを活性化させることを初めて明らかにした。(3) さらに、WD モチーフによるキネシン-1 活性化に必要な部位として KLC1 の TPR ドメインの 2 番目から 5 番目にいたる領域を決定した。本研究は、膜小胞カーゴ受容体タンパク質がキネシン-1 を活性化する機構を世界で初めて実証した先端的な研究である。すなわち、本研究の成果により、カーゴ受容体は、単なるモーターへのつなぎ手であるだけでなく、モーター活性を能動的に制御する分子であることが初めて示され、細胞生物学に新たな概念を提示し、その進歩に大きな貢献をした。よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があるものと認める。