

Alcadein の細胞内輸送を制御する アダプタータンパク質 X11L および KLC の機能解析

学位論文内容の要旨

Alcadein (Alc) は X11L と結合するタンパク質として、当研究室で単離・同定された一回膜貫通型タンパク質である。Alc はこれまでに2段階の切断を受け、細胞外、細胞内に切断産物を放出すること、その細胞質領域とアダプタータンパク質との結合依存的な機能として、X11L との結合より Alc および複合体を形成する APP の輸送、切断が制御されうること、KLC との結合より、kinesin-I モーターを活性化し、小胞輸送を積極的に制御していることが明らかとなっている。しかしながら、Alc の詳細な分子メカニズムや個々の性質の関連性については未だ解明されていない点が多く残されている。本研究では、Alc の機能および制御に重要な役割を担っていると考えられるこれらの結合タンパク質 X11L と KLC に焦点をあて新たな知見を得たのでここに報告する。

第1章 APP/X11L/Alc 複合体形成機構の解析

アルツハイマー病原因因子の一つとされる A β の前駆体タンパク質 APP および Alc はともに細胞質領域にある NP 配列を介して、X11L の PTB ドメインと結合する。一般的に競合すると考えられるこれらのタンパク質であるが、これまでの *in vivo* において APP, X11L, Alc が複合体を形成することが明らかとされており、また培養細胞系では X11L の解離により APP と Alc の輸送および代謝が協調的に制御される可能性が示唆されており、これらの複合体の詳細な分子メカニズムを解明することは興味深い。APP/X11L/Alc の複合体形成モデルとして①APP、Alc がそれぞれ X11L と結合し、X11L 同士あるいは内在性タンパク質の結合を介して複合体を形成する ② APP、Alc が1つの X11L PTB ドメインに結合し、複合体を形成するという可能性を考え、以下に検証した。

1-1 X11L 分子間結合の検証

X11L は中央部に PTB ドメイン、C 末に2つの PDZ ドメインを有する細胞質タンパク質である。X11L ファミリー分子の最 C 末部分が自身の PDZ1 ドメインに結合することが報告されている。このことから、複数の X11L 存在下においては分子内結合だけでなく、分子間結合も起こりうるのではないかと考え、X11L の各部位の欠失体を用いて X11L 同士の結合を共役免疫沈降法により検証した。その結果、X11L WT は異なるタグを付加した X11L WT と結合すること、その結合には X11L は PDZ ドメインを含む C 末側が必要であることを明らかとした。

1-2 APP-X11L-Alc 三量体形成の検証

X11L 同士の分子間結合が消失する欠失体 X11L N+PTB での APP-X11L-Alc 複合体形成の可能性を検証した。その結果、X11L WT 存在下と同様に、X11L N+PTB においても APP-X11L-Alc 複合体を形成しうることを明らかとした。このことから、APP、Alc が1分子の X11L と三量体を形成する可能性が示唆された。

X11L PTB ドメイン内における APP、Alc の結合様式が異なる可能性を考え、PTB ドメイン内における欠失体、および変

異体を用いて結合を検証した。その結果、APPの結合に必要なPTBドメイン内の $\beta 5$, $\alpha 2$ 部位はA β との結合には必須ではないことを明らかとした。このことから、APPとA β はPTBドメイン内で異なる部位を介して結合するため、競合しないことが示唆された。

PTBドメインとの結合がX11Lの他の領域から及ぼされる影響がAPPとA β で異なるかを検証した。その結果、APP-X11LにおいてはN末領域が安定な結合に必須であり、C末部位があることでその結合は弱まることを確認した。

一方、A β -X11Lの結合にはPTBドメインが含まれていればほぼ同様の結合の強さを示すことがわかった。これらのことから、APPとA β では結合様式が異なるため他の領域による影響も異なることが示唆された。

これらの結果よりモデル①、②ともに起こりうるものが考えられ、APPとA β がX11Lを介し互いに影響を与えうる距離で複合体を形成することでX11Lの解離シグナルによりこれらのタンパク質が協調的に制御されることが示唆された。

第2章 A β -KLCの結合、解離制御機構の解析

KLCはKHCと結合するcoiled-coilドメイン、A β と結合するTPRドメインにより成り立っている。KLCは主に神経系に発現するKLC1とユビキタスな発現のKLC2からなり、TPRドメインよりC末側の相同性が低い。kinesin-Iモーターは2分子のKHCおよび2分子のKLCにより構成されており、微小管上の順行方向へカーゴ(小胞)を輸送する。A β はこれまでにKLCと結合することで、不活性状態であったkinesin-Iモーターを活性化することで小胞輸送を積極的に制御していることが明らかとなっている。小胞輸送において、カーゴ(A β)とモーター(KLC)の結合、解離はそれらの分子の局在だけではなく、カーゴ内に含まれる膜タンパク質や分泌タンパク質の輸送、局在に影響を与えるため、これらの制御機構を解明することは重要である。そこで、A β とKLCの結合、解離がどのように制御されるかを以下に検証した。

2-1 リン酸化によるA β -KLC結合、解離制御の検証

これまでにカーゴとモーターの結合、解離がリン酸化により制御されるという報告が複数あることからA β とKLCの結合、解離がリン酸化により制御される可能性を検証した。HEK293T細胞にA β 、KLC1あるいはKLC2を共発現させ、okadaic acidによりリン酸化レベルを上昇させることで、A β とKLC1、KLC2との結合を共役免疫沈降法により検証した。その結果、A β -KLC2の結合がokadaic acid処理により減弱すること、また、この条件下ではA β -KLC1の結合には変化がないことが明らかとなった。

A β -KLC2のリン酸化による解離がどちらのタンパク質に依存しているかを検証するため、HEK293T細胞にA β 、KLC2を別々に発現させ、それぞれにokadaic acid処理を行い、各細胞抽出液を混合し、結合を検出した。その結果、KLC2のリン酸化依存的にA β との結合は減弱した。またKLC2を発現させた細胞の膜画分をATPとともにインキュベートすることで内在性のリン酸化酵素の活性化が起こり、KLC2がリン酸化され、その結果、A β との結合が減弱し、 λ PPaseにより脱リン酸化処理をすることでA β との結合が顕著に増大した。KLC1においてはokadaic acid処理および脱リン酸化処理によるA β との結合、解離に変化は見られなかった。

2-2 リン酸化依存的なA β との結合変化にตอบสนองするKLC領域の検証

KLC2のリン酸化依存的なA β との結合変化に必要な領域を検証した結果、TPRドメインよりもC末側のKLC1、KLC2とで相同性の低い部位であることがわかった。KLC1はC末部位の異なる数多くのsplicing variantが存在するためこれらのKLC1variantをクローニングしA β との結合を検証した結果、C末部位のアミノ酸配列中のリン酸化されるSer, Thrの数が多いものはKLC2と同様にokadaic acidによりA β との結合が解離することを見出した。

これらの結果からKLCのC末部位のリン酸化状態が上昇することでA β と解離すること、つまり、小胞輸送の停止がKLCのリン酸化により制御されることが示唆された。

APP/X11L/Alc の複合体は主にゴルジ体において観察され、小胞輸送中でこれらの 3 分子が共局在する割合は非常に低いことがわかっている。このことから、Alc は kinesin-I モーターによる小胞輸送の前段階で X11L および APP との複合体により輸送、代謝を制御され、その後、KLC1 あるいは KLC2 を含むモーターの選択により Alc の担う小胞輸送の多様性が生み出されている可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 木 原 章 雄
副 査 准教授 山 本 融

学 位 論 文 題 名

Alcadein の細胞内輸送を制御する

アダプタータンパク質 X11L および KLC の機能解析

Alcadein (Alc)は、家族性アルツハイマー病 (AD)の原因遺伝子産物である APP と同様の構造、分布、機能を持つ I 型膜タンパク質である。神経細胞では神経特異的アダプタータンパク質 X11-like (X11L)を介して複合体を形成し、X11L が解離すると Alc と APP は協調的な代謝を受ける。しかしながら、Alc と APP が複合体を形成している詳細な仕組みや Alc が細胞内を小胞輸送される分子機構は未解明であった。本論文の前半では、Alc と APP が X11L を介して複合体を形成する分子機構を解明した。APP と Alc は X11L の phosphotyrosine interaction (PTB)ドメインと相互作用する。著者は、1つの PTB ドメインに2つの膜タンパク質が同時に結合できることを実証し、これまで、1つの PTB ドメインは1つのタンパク質を結合するという常識を覆す新たな事例を示した。本論文の後半では、Alc (特に3種の Alc のうち Alc α) の細胞質ドメイン結合タンパク質であるキネシン軽鎖(KLC)に着目し、Alc の細胞内小胞輸送における KLC と Alc の結合制御機構の解析を行った。複合体から解離した Alc と APP は独立した小胞でキネシン-1 モーターにより小胞輸送されることが半明していたが、その結合制御機構および KLC 分子種の役割は未解明であった。キネシン-1は、2つの重鎖 (KHC)と2つの軽鎖 (KLC)からなる4量体である。Alc は KLC ファミリーの KLC1 および KLC2 と結合するが、著者は結合制御機構が KLC1 と KLC2 では異なることを見だし、KLC2 と Alc の結合では、KLC2 のリン酸化が Alc を解離することを見いだした。さらに多様な KLC2 の欠失変異体を作成し、Alc との結合に必要な領域の同定と結合制御に関わるリン酸化サイトの絞り込みを行い、KLC1 と KLC2 の Alc への結合制御機構の違いを明確にした。さらに、KLC1 と KLC2 の Alc への結合解離機構の違いと KLC 分子種の発現・分布様式の違いから、神経細胞の軸索のような長距離の順行輸送には KLC1 が機能し、細胞体の短距離小胞輸送では KLC2 が機能するという新たな仮説を提示した。

本論文の成果は、(1) Alc と APP が細胞質 X11L を介して複合体を形成する分子機構を解明し、PTB ドメインが同時に複数のタンパク質を結合できる新しい事実を見いだした。また、(2) Alc とキネシンモーターとの結合解離機構がタンパク質のリン酸化であることを実証し、同じ KLC ファミリー分子間でも結合解離の制御機構が異なることを初めて示した。神経変性疾患の原因として、軸索の長距離小胞輸送の変調が考えられており、本研究は代表的な神経変性疾患である AD の発症原因解明と新たな治療法の開発に貢献するもので、薬学領域の博士号に相当するきわめて先進的な研究である。

これは、要するに、著者はアルツハイマー病(AD)に関連する膜タンパク質の輸送制御機構の分子メカ

ニズムを解明し、新たな知見を見いだしたもので、ADをはじめとする神経変性疾患の発症機構の解明と新たな創薬ターゲットの創出に貢献するところ大なるものがある。

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。