

論文題目

cargo recognition mechanisms of molecular motors

和訳

物質輸送選択性の分子機構

氏名 瀬藤光利

要旨

目的

細胞内物質輸送選択性の分子機構を明らかにする。

背景

細胞内物質輸送機構の存在は20世紀初頭から知られていたがその実体は長く謎であった。1980年代急速凍結法による広川の観察などによって多様性が示唆され、ミオシンとダイニンとキネシンがクローニングされ、細胞内物質輸送がそれら三者の分業で説明されはじめた。キネシンが、様々な物を輸送するという報告が相次ぐ中、1990年代に当教室がキネシンが実は多様な遺伝子群 (Kinesin superfamily proteins, KIFs) を形成していることを報告し、ミトコンドリア、シナプス小胞、その他固有の膜器官を運ぶ事を示した。それら多様なモーターがいかに間違えずに多様なカーゴを認識しているかは不明であった。

方法

PCRcloningで細胞内の凡てのKIFモーターを網羅し、そのうち神経細胞をモデルにして神経細胞に多いKIFについて全長をクローニングし、抗体を作成、分子細胞生物学的に解析する。さらにその分子に対する結合蛋白を探索して結合機構を明らかにする。

結果

まず細胞内に同時に発現しているKIFの全容を明らかにした。PCR cloningによって約40種類のKIFを同定した。そのうち約20種類前後が1つの神経細胞に発現すると考えている。うち6種類 (KIF1A, KIF1B, KIF2, KIF3A/B, KIF4, KIF5B,) にモーター活性が示されていた。さらに神経細胞で発現する新たな3種類の KIF, KIF1Bβ, KIF13A, KIF17について新たにモーター活性を示した。

そのうちNorthern blottingで成獣の脳に、in situ hybridization で神経細胞層に発現しているKIF17に着目した。昆虫細胞および大腸菌を用いて組み換え蛋白を発現、精製し、それらおよび合成ペプチドをもちいてKIF17特異的抗体を作成した。Western blottingの結果、KIF17は中枢神経系に多く発現する蛋白であることが判明した。特に前脳の灰白質に多く存在し、白質にはほとんど認められなかった。蛍光抗体法をもちいた組織染色で、KIF17は神経細胞の樹状突起に多く局在することが判明した。海馬初代神経細胞培養をもちいた免疫細胞染色によっても樹状突起局在が確認された。さらに免疫沈降法でKIF17のカーゴを精製し、電子顕微鏡で観察することにより、KIF17は形態学的にKIFC2のカーゴとことなるvesicleに結合していることが判明した。さらに、その結合はいわゆるperipheral associationであることが生化学的に判明した。

KIF17が、特異的なvesicleに結合するメカニズムを、より物質に即して明らかにするために、KIF17でtwo-hybrid screening, pull down assay, surface plasmon response, immunoprecipitation の手法でbinding proteinを同定した。結果、KIF17は、輸送蛋白質として知られているmLin10と結合することが判った。mLin10の線虫homologueであるLin10はLin2,Lin7とともにLin complexを作り、細胞内のレセプター局在に関与していることが遺伝学的解析から示唆されている。さらにマウスにおいてもmLin10,2,7 はコンプレックスを作っている。また、Lin7はNMDA receptor-2B subunit (NR2B)と直接結合すると報告されている。そのためこれらLin2,7,10,NR2BはKIF17のカーゴの候補として適当である。はたして実際にKIF17のカーゴにこれらの関連蛋白がふくまれていることを免疫沈降法を用いて示した。

考察

KIF17はmLin10と直接結合し、Lin complex を介してNMDA receptorを含むvesicleに結合する。すなわち選択性は存在する。同時に、Lin complexがそのcomponentの組み合わせが複数通りあること、Lin complexによってPDZ認識配列を持つ複数の蛋白が認識されうることから、variationとredundancyが保証されていると考えられる。この機構と方法の一般性を問うために私は中川博士と協力しKIF13Aについても同様に調べた。結果、KIF13Aはβ-adaptinと直接結合し、AP-1 complexを介してM6PRを含むvesicleと結合することが判明した。多くのモーターは直接機能分子に結合するだけでなくlight chain あるいはsorting protein complexといった蛋白群を用いて多様なカーゴを認識していると考えられる。今後はaxonal motorとdendritic motorのpolarityの機構はいかなるものか、in vivoでselectivityはいかなる局面で発揮されているのか、(もしくは発揮されていないのか)等、がさらなる問題であると考えている。

結語

モーター蛋白が輸送蛋白分子複合体を介して機能分子を認識することが、細胞内物質輸送選択性の基本的な分子機構の一つである。