

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 **Molecular Cell Biology of New Motor Protein, KIF16B**

和訳 新規モーター分子 **KIF16B** の分子細胞生物学的研究

指導教官 廣川 信隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月 進学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 上野 仁之

細胞内物質輸送は細胞の機能および形態形成などに重要な役割をしている。タンパク質や脂質は合成された後に厳格な制御のもとタンパク複合体や膜小胞、細胞内小器官として細胞内を輸送されていることが知られており、それらは細胞骨格の上を滑走するモータータンパク質群によって行われていることが知られている。キネシンスーパーファミリープロテイン (**KIFs**) はそんなモータータンパク質群の一種で細胞骨格の一つである微小管の上を **ATP** 依存的に滑走することが知られている。**KIFs** の中にはタンパク複合体や膜小胞などの輸送だけでなく、細胞が分裂する際の動力や微小管の安定化や脱重合に関係あるものも知られている。

近年ヒトゲノム計画の終焉に伴い、ゲノム上にコードされるすべてのタンパク質の同定が行えるようになり、**KIFs** の全体像も見えるようになった。**KIF16B** は分子遺伝学的解析によりシナプス小胞を輸送していることが知られている **KIF1A**, **KIF1Bbeta** や **AP-1** 複合体などの輸送をしている **KIF13A** に近いことが明らかになった。またモータードメインの配列をプローブに使っ

た Northern blotting により KIF16B は広くいろいろな細胞に発現していることが判った。

そこで KIF16B も細胞内で重要な役割をしていると考え、以前にクローニングされていたモータードメインの配列を用いファージライブラリー法により全長のクローニングを行い、塩基配列を決定した。*Kif16b* 遺伝子のオープンリーディングフレームの解析により KIF16B は 1323 アミノ酸からなるタンパク質であることが判明した。

Coiled-coil の予想やドメインサーチにより N 末端にキネシンモータードメイン、他にも FHA ドメインと C 末端に PX ドメインを持つことが判り、中央にある Coiled-coil により他の多くの KIFs 同様に二量体を作っているのではないかということが示唆された。FHA ドメインは KIF1, KIF13, KIF14, KIF16 だけがそれぞれ同じ位置に持っておりモータードメインの制御に関係していると考えられているが、実際の機能ははまだ不明である。PX ドメインは sorting nexin proteins (SNXs) と呼ばれるタンパク群が持っているドメインで SH3 ドメインやホスファチジルイノシトールリン脂質に直接つくことが知られている。

次に抗体を作るために抗原となる KIF16B の全長 N 末 His-Tag 付きのコンストラクトを Baculovirus に組み込み昆虫細胞で発現させた後にニッケルカラムで精製をかけ SDS PAGE で分離ところ、150 kDa 辺りにほぼ単一のバンドを検出した。この試料を用いてウサギよりポリクローナル抗体 Anti-KIF16B を作成した。

作成した抗体をアフィニティー精製した後に KIF16B が欠損した細胞と欠損していない細胞を用い Western blotting をしたところ KIF16B が欠損していない細胞でのみ 150 kDa 辺りにバンドが検出された。さらに各臓器のライセートを使い Western blotting を行ったところ多くの臓器の 150 kDa 辺りにバンドが検出された。

次に抗体を用い細胞内局在を調べるために遠心分画および密度勾配遠心法による Floating assay を試みた。そうしたところ KIF16B は 界面活性剤がないときは浮いてきてあるときはほとんど浮いてこないことから膜小胞または膜小器官に局在しているのではないかということが示唆された。さらに 10,000 g である P2 まででほとんど落ちてしまっていることにより KIF16B はかなり大きな膜小胞または膜小器官を輸送しているのではないかということが判明し

た。さらに膜との結合の強さを見るために条件をいろいろ変えて実験したところ 500 mM NaCl で膜からはずれ始めることから静電的な結合であることが示唆された。

次にモータードメインと PX ドメインの機能を調べた。KIFs は ATP 依存的に微小管に結合することから ATP のアナログである AMP-PNP を使い微小管と共に落とし ATP で微小管からはずす assay をした。そうしたところ kinesin (KIF5B) 同様に微小管から ATP 依存的にはずれることが判り、微小管上を滑走するのではないかと示唆された。

PX ドメインは SH3 ドメインやホスファチジルイノシトールリン脂質に結合することが知られているが KIF16B は SH3 ドメインに結合するモジュールが保存されていないので、ホスファチジルイノシトールリン脂質 (PIPs) の結合能をドットプロットで調べた。そうしたところ KIF16B の PX ドメインは多くの PX ドメイン同様に PI3P につくことが判明した。さらに PI5P, PI(3,4)P2, PI(3,5)P2 にも結合することが判明した。このことにより KIF16B は PI3P の多く局在するエンドソームやライソソームなどに多いことが示唆された。また PI3K の阻害剤である Wortmannin を使用しても膜小胞からはずれないことから、膜結合には他の因子があることが示唆された。

次に KIF16B の機能をより詳しく調べるため KIF16B の結合タンパクの探索をするため、Yeast Two-Hybrid によるスクリーニングをした。そうしたところ、87 クローンの陽性コロニーがあり、その中の 2 クローンから Rab14 の遺伝子が検出された。

Rab タンパク質群は GTPase である Ras スーパーファミリーの一種で主に細胞内膜小胞輸送や膜の融合などに関係していることが知られている。また Ras スーパーファミリーのタンパク質は活性型である GTP 型と不活性型の GDP 型になることが知られており、Ras に結合して GTPase 活性を高めたり GDP を GTP に入れ替えたりするいくつかのエフェクターがあることが知られている。また Rab14 は以前の研究でゴルジコンプレックスからエンドソームへの膜輸送に関わっていることが知られている。

そこでまず KIF16B が Rab14 のどの状態と結合しているかを確かめるため Rab14 の活性型と不活性型のミュータントを使い免疫沈降法を用いてその結合をみた。そうしたところ、KIF16B は Rab14 の活性型とのみ結合していることが判明した。また細胞内膜小胞に対する KIF16B の抗体での免疫沈降法

より **KIF16B** は **Rab14** の活性型が存在するエンドソームに結合するが、**Rab14** の不活性型が存在するゴルジコンプレックスには結合していないことが判明した。さらに密度勾配遠心法により **KIF16B** はライソゾームやゴルジコンプレックスのマーカータンパク質とは違う比重にピークができたが、エンドソームのマーカータンパク質と同じ比重のフラクションに分離することが判明した。

以上、今回の結果をまとめると

1, *Kif16b* の全長 cDNA をクローニングし、**KIF16B** を認識するポリクローナル抗体 anti-**KIF16B** を作成した

2, **KIF16B** は N-末にモータードメイン、その後ろに **FHA** ドメイン、C 末に **PX** ドメインを持つ事が判明した。

3, **KIF16B** は 150 kDa のタンパク質で広くいろいろな臓器に発現し、細胞内では主に膜小器官に局在している事が判明した。

4, **KIF16B** は膜小器官に局在し、その **PX** ドメインは何種類かの **PIPs** に直接結合する事が判明した。

5, **Yeast Two-Hybrid** により **KIF16B** は **Rab14** に直接結合することが判り、さらに免疫沈降法により活性型には結合するが不活性型には結合しないということが判明した。