

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 13 年度博士課程 入学
堀口かおり
指導教員 館川宏之

論文題目 **Transport of PIP₃ by GAKIN, a Kinesin-3 Family Protein, Regulates**

Neuronal Cell Polarity

(キネシン 3 ファミリーたんぱく質、GAKIN による PIP₃ 輸送はニューロンにおける極性決定を調節する)

細胞は外界の変化に対応するために、膜表面の受容体で外界からの刺激を受け取り、細胞内にさまざまなシグナルを伝達し、細胞増殖、分化、移動、また細胞骨格再構成や、膜輸送など、さまざまな応答を引き起こす。ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3 キナーゼ) は、刺激を受け取った受容体により活性化され、ホスファチジルイノシトール三リン酸(PIP₃)を産生する。PIP₃ はセカンドメッセンジャーとして下流のシグナル伝達を活性化し、上記の細胞応答を引き起こす、重要なシグナル伝達分子である。PIP₃ は、細胞刺激により一時的に産生され、即座に代謝されることは以前から知られていたが、近年の技術的進歩により、PIP₃ が特定の場所に一時的に蓄積することで、局所的な細胞応答を起こしていることが明らかとなった。たとえば、アメーバや好中球の走化性時におけるリーディングエッジでの PIP₃ の蓄積による細胞骨格再構成により、細胞運動が引き起こされる。また、神経細胞のモデルシステムである PC12 細胞では神経突起伸長に PI3 キナーゼが重要な役割を担っていることは古くから知られていたが、近年、PIP₃ が神経突起の先端に多く局在し、神経突起の伸長を引き起こすことが報告された。また、海馬ニューロンでは、神経突起の先端への PIP₃ の蓄積により、下流の軸索決定因子の局在誘導、活性化がおり、ひいては

ニューロンの極性（軸索－樹状突起）が決定される。しかし、いかにして PIP_3 が特定の場所へ蓄積されるのかはなお不明であった。これまで PIP_3 の局所的な蓄積を説明するために、ポジティブフィードバックという概念が広く受け入れられていた。外界からの刺激を受け取った受容体によって、細胞膜上で局所的に活性化された PI3 キナーゼが、 PIP_3 を局所的に一時的に産生し、その PIP_3 が下流の Rac、Cdc42 の活性化を引き起こし、これら Rac、Cdc42 がまた PI3 キナーゼを活性化し、さらに PIP_3 の局所的な産生を促すというのが、これまで広く受け入れられている概念であった。

本研究では、キネシンモーターたんぱく質、GAKIN による、 PIP_3 の輸送という新たなメカニズムを提唱し、そのような PIP_3 の輸送が局所的な PIP_3 の蓄積、ひいてはニューロンにおける極性決定を担っていることを示した。

PIP_3 binding protein (PIP_3BP) は PIP_3 アナログカラムを用いて単離同定されたたんぱく質であり、二つの PH ドメインを介して PIP_3 と特異的に結合する。N 末に核局在化配列、ArfGAP 相同 Zinc finger motif をもつが、その細胞内での機能はいまだ不明であった。そこで PIP_3BP 結合たんぱく質を模索する目的で酵母ツーハイブリッドが行われ、Guanylate kinase Associate Kinesin (GAKIN) の N 末をコードするクローンが見出された。GAKIN/KIF13B はキネシン 3 ファミリーたんぱく質に属するキネシンであり、N 末にモータードメイン、次にフォークヘッド結合(FHA)ドメイン、MAGUK 結合(MBS)、C 末に微小管結合 Cap-Gly ドメインを持つ。本研究ではまず、 PIP_3BP と GAKIN との直接結合を確かめるために *in vitro* で pull down assay を行い、GAKIN の PIP_3BP 結合領域は、モータードメインのすぐ近くに位置する FHA ドメインであることを明らかにした。また、GAKIN に最もホモロジーの高いキネシンである KIF13A が PIP_3BP と結合しなかったことから、この結合が特異的であると示した。ここで、GAKIN が PIP_3BP と結合すること、 PIP_3BP が PIP_3 と結合することから、GAKIN が PIP_3BP を介し、 PIP_3 小胞の輸送を担うという仮説を立てた。この仮説を確かめるために、まず GAKIN のモーター活性を試験管内で示すために微小管 gliding assay を行った。GAKIN のモータードメインと、 PIP_3BP との結合に必要な FHA ドメインを含むリコンビナントたんぱく質 (motor-FHA) をガラス上にコートし、蛍光ラベルした微小管を、その上に導入した。蛍光ラベルした微小管が ATP と motor-FHA 存在下でなめらかに動くのが顕微鏡下で確かめられた。次に、GAKIN と PIP_3BP が合成 PIP_3 を含む小胞上で複合体を形成するかどうかを、確かめるため、liposome floatation assay を試みた。GAKIN の motor-FHA ドメインと PIP_3BP とを PIP_3 を含む小胞と混ぜ、ショ糖濃度勾配遠心により、小胞と結合したたんぱく質と、結合しなかったたんぱく質に分離した。上層から回収した PIP_3 リポソームフラクションに、 PIP_3BP と GAKIN motor-FHA がともに検出された。 PIP_3BP 非存在下では GAKIN は PIP_3 リポソームフラクションに検出されず、また PIP_3 の代わりに PIP_2 を用いた時には、GAKIN、 PIP_3BP 共に、リポソームフラクションに検出されなかった。このことから、GAKIN は PIP_3BP との結合を介して PIP_3 小胞に特異的に結合するというのを確かめた。次に GAKIN が

PIP₃BP を介して PIP₃ 小胞を輸送するかどうかを直接確かめるために、小胞輸送観察システムを、試験管内で再構築した。微小管を緑に蛍光ラベルし、ガラス上に敷き詰めた上に、ローダミンホスファチジルエタノールアミンで赤く蛍光ラベルした PIP₃ 小胞と GAKIN motor-FHA、PIP₃BP と導入したところ、PIP₃ 小胞は、motor-FHA、PIP₃BP 存在下で ATP 依存的に輸送されることを顕微鏡下で確かめた。次にこの GAKIN による PIP₃ 輸送メカニズムが、生体内で存在するのか、どのような役割を担っているのかを示すため、動物細胞を用いた実験を行った。GAKIN、PIP₃BP はともに、脳に多く発現し、ラット脳から共沈殿するという知見から、脳、特に神経細胞で重要な役割を担っているのではないかと考えたため、神経細胞での役割に特に注目して研究を行った。PIP₃ に特異的に結合する GFP-Akt-PH を用いて可視化した PIP₃ は、神経突起の先端に蓄積することが知られている。PC12 細胞においてはその PIP₃ の蓄積が神経突起伸長に重要であり、海馬神経細胞においては PIP₃ が蓄積した突起が、軸索へと分化する。PC12 細胞に発現させた GAKIN、PIP₃BP は神経突起の先端で共局在した。また内在性の GAKIN は GFP-Akt-PH で可視化した PIP₃ と共に神経突起の先端に局在した。これら、PIP₃、PIP₃BP、GAKIN が神経突起の先端で共局在することは、GAKIN-PIP₃BP により PIP₃ が神経突起の先端に輸送される可能性を示唆している。そこで、モータードメインを欠く GAKIN (DN-GAKIN) の過剰発現により、PIP₃ の蓄積が阻害されるかどうかを調べた。GFP-Akt-PH により可視化された PIP₃ の神経突起の先端への蓄積は、DN-GAKIN 過剰発現により部分的に阻害されたが、全長 GAKIN、また FHA ドメインを欠く GAKIN の過剰発現によつては阻害されなかった。このことから、神経突起先端への PIP₃ の蓄積は、局所的に活性化した PI3 キナーゼによる局所的な PIP₃ 産生によるものだけではなく、GAKIN による細胞内の特定の場所への選択的な PIP₃ 輸送によつても、もたらされていることを示した。この結果を確かめるため、さらにもうひとつ別の系、マウス海馬由来、初代培養神経細胞を用いた。培養海馬神経細胞において、GFP-Akt-PH により可視化された PIP₃ と、特異的抗体を用いて染色した内在性の PIP₃BP は共に軸索の先端で局在した。また GAKIN の過剰発現により PIP₃ の蓄積が亢進されたこと、DN-GAKIN の過剰発現により、もっとも長い突起の先への PIP₃ の蓄積が見られなくなったことから、神経細胞において PIP₃ の輸送が、軸索先端への PIP₃ の蓄積において重要な役割を果たしていることを示した。DN-GAKIN 過剰発現により、PIP₃ の蓄積が阻害された結果、細胞の形が大きく変化した。軸索がなく、多く枝分かれした樹状突起様の突起をいくつももつ細胞が多く観察された。また、GAKIN の過剰発現により PIP₃ の蓄積は亢進したが、もっとも長い突起の先だけではなく、しばしばいくつもの突起の先に PIP₃ が蓄積しているのが観察され、それによつても細胞は極性を失い、軸索形成が阻害されるのが見られた。そこで、この結果を確かめるため、GAKIN のさまざまな変異体を、海馬神経細胞に発現させ、細胞の形態を観察した。全長 GAKIN、DN-GAKIN、motor-FHA 過剰発現により、軸索形成によつて特徴付けられる神経細胞の極性形成は、失われた。しかし PIP₃BP との結合領域である FHA ドメインを欠くミュータント (motor) の過剰発現によつては極性は失われなかった。このことから、FHA

ドメインを介した PIP₃BP との結合による PIP₃ 輸送の阻害によって、神経細胞の極性形成を阻害していることを示した。また軸索マーカーである Tau 染色により、この極性の喪失は、マルチ軸索形成ではなく、軸索の形成抑制によるものであることを明らかにした。

これらの結果から、GAKIN-PIP₃BP 複合体による PIP₃ の輸送が生体内でも存在し、特に神経細胞で神経突起の先端への PIP₃ の輸送に関与し、ひいては神経細胞の極性決定を調節することを示した。

参考文献

(1)2006年7月 Journal of Cell Biology, Vol. 174, No. 3, pp 425-436

“Transport of PIP₃ by GAKIN, a kinesin-3 family protein, regulates neuronal cell polarity”

(Horiguchi, K., Hanada, T., Fukui, Y., and Chishti, A. H.)

(2)2006年10月 細胞工学 Vol. 25, No. 11, pp 1290-1291

「キネシンモータータンパク質 GAKIN による PIP₃ 輸送と神経細胞極性」

(堀口かおり、花田俊彦、Athar H.Chishti)