

## 論文の内容の要旨

論文題目      The Molecular Cell Biology of a New Kinesin Superfamily

Protein, KIF16A

新しいキネシンスーパーファミリー蛋白

KIF16A の分子細胞生物学的研究

指導教員      廣川信隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 王礼寧（宁）

細胞内物質輸送は細胞の形態、機能、極性を保つのに極めて重要である。蛋白質は細胞内の特定領域における機能を発揮するために、粗面小胞体で合成されたあと、ゴルジに輸送され、翻訳後修飾を受けて目的地別に仕分けられてから運ばれる事が知られている。近年、細胞内物質輸送の担い手としてモーター分子が発見され、その機能解明が進められている。微小管を軌条として輸送を担うキネシンスーパーファミリー蛋白（kinesin superfamily proteins、KIFs）は配列がよく保存されているモーター領域を有し、頸部（neck）を経て茎状部（stalk）に続き、多様な尾部（tail）によって特異的

な荷物 (cargo) と結合することが解明されてきた。モーター領域は三ヵ所で微小管と結合し、ATP の加水分解の化学的エネルギーを機械的エネルギーに変換して動力源としている。KIFs は、ポリペプチド鎖におけるモーター領域の位置によって N-末、C-末、M-型の三種類に分類される。我々の研究室では、マウスを対象とし、KIFs の機能について研究している。全部で 45 個がゲノム中に存在することが分かり、私はそのうちの一つである KIF16A について解析を行った。

KIF16A のモーター領域は PCR ホモロジークローニングに基づいて既に発見されていた。KIF16A はモーター領域のアミノ酸配列の分子系統分類により Kinesin-3 ファミリーに属することがわかった。このファミリーは膜状小胞の輸送を担う KIFs が分類されており、さらに解析を進めることにした。脳 cDNA ライブラリーを使って、PCR 法を用いて全長クローニングを行った。その結果、KIF16A は全長 14337 塩基、4590 アミノ酸をもつ N-末型モーター分子であることが分かった。全長のアミノ酸配列からその分子量は 500kDa と推定され、現在報告されている KIFs の中で最も大きいと思われる。In silico のドメイン検索では、モーター領域は N-末に位置し、隣接して FHA ドメインが予想された。FHA ドメインは Kinesin-3 ファミリーの構成分子に特異的に見い出され、リン酸化蛋白との結合及びモーター活性を調節する分子内相互作用において役割を果たしていると報告されている。C-末には START と呼ばれる脂質結合ドメ

インが存在することも推測された。

異種生物間において、KIFs はよく保存されていることが知られている。Xenopus

laevis には KIF16A によく類似した XKLP4 が発表されているが、機能は不明である。

ノーザンブロッティングの結果では XKLP4 は 12kb のバンドとして検出されたが、そ

の配列の同定は N-末の 4496 塩基、1499 アミノ酸残基にとどまり、部分的にしか明ら

かにされていない。KIF16A を XKLP4 と比較したところ、59%の相同性がみられ、

KIF16A と XKLP4 は同族体 (homolog) であることが示唆された。一方、KIF16A を既

知の KIF5 (KHC、kinesin heavy chain) と比較するとモーター領域のみが保存されてい

ることが分かった。哺乳類や鳥類でも KIF16A と高い類似性をもち、かつ 12-14kb の長

さの KIF が GenBank に登録されていることからも、KIF16A は進化の過程で保存され

ていると思われる。

kif16a 遺伝子の転写産物の大きさ及び組織分布を解析するため、ノーザンブロッテ

ィング法を用いて 12 種類の組織での発現について調べた。その結果、すべての組織に

おいて、高さが約 14kb の位置にバンドが見い出された。これはクローニングした長さ

と一致している。また、kif16a の発現量は脳、肺、心臓に多く、筋肉、小腸などには

少量であることも分かった。

さらに蛋白としての機能を調べるために抗体を作成した。まず、選択した二つのペプチドを化学合成し、担体と結合させたものを抗原としてそれぞれ二匹づつのウサギに免疫し、血液を採取した。それぞれの抗原で免疫されたウサギ No.179 と No.4 の血清から抗体を精製し、ウェスタンブロッティングを行った結果、血清 No.179 は約 500kDa の単一のバンドを認識した。このバンドは全長から計算した大きさと一致し、抗原ペプチドによってブロックされた。異なる抗原より得られた抗体 No.4 は同じ高さのバンドを認識できた。抗体 No.4 を使って脳の膜状小胞分画から免疫沈澱したものは抗体 No.179 で認識でき、逆に抗体 No.179 を使って免疫沈澱したものも抗体 No.4 で認識できた。二つの異なった抗原より得られた抗体は同一のバンドを認識した。

マウスの臓器別ウェスタンブロッティングの結果、脳、肺、心臓などでバンドが見い出され、ノーザンブロッティングの結果と一致した。以上のことから、二つの異なる抗原部位を認識する抗 KIF16A 抗体の作成に成功し、KIF16A の分子量と多数の組織で発現を蛋白として確認することができた。

KIF16A が膜状小胞を運んでいるかどうかを追求するために、細胞分画遠心分離法を用いて調べた。マウスの脳をリン酸化緩衝液でホモゲナイズし、 $1000 \times g$  で 10 分遠心

分離し、上清を S1、沈殿物を P1（核分画）とした、この S1 を  $10k \times g$  で 20 分遠心分離し、上清を S2、沈殿物を P2（リソソーム分画）とした。この S2 を  $100k \times g$  で 60 分遠心分離し、上清を S3、沈殿物を P3（微細膜状小胞分画）とした。KIF16A は微細膜状小胞分画（P3）と細胞質（S3）と両方に存在している。界面活性剤 TritonX-100 存在下では P2 にある KIF16A の量は微減し、S2 と S3 に微増したことが認められた。この点から KIF16A は一部 TritonX-100 感受性の膜状小胞と結合するが、大半は耐性の分画に存在すると考えられる。

さらに、膜状小胞輸送に携っているかどうかを密度勾配遠心による floating assay で調べた。OptiPrep（Iodixanol）による密度勾配を使って、脳組織の S2 分画を出発材料とした。65krpm 4Hr 遠心して、0.5ml ずつ、分画を採取した。その結果、TritonX-100 がなかった場合は KIF16A のピークの密度は 1.13g/ml であった。この密度はゴルジ体に由来するリソソーム系の膜状小胞のそれと一致する。TritonX-100 存在下では、ピークの密度が変わったことから、TritonX-100 によって一部の膜小胞は壊れ、KIF16A との複合体が分解され、密度が変化したと考えられる。

KIF16A の細胞内の分布を調べるために、蛍光抗体法による細胞内の局在を観察した。ウェスタンプロットティングの結果、KIF16A は Neuro2A 細胞抽出物にバンドが検出さ

れたのでこの細胞系列を用いて抗体によって染色した。その結果、KIF16A は微細顆粒を表す様な点状の染色像を呈した。細胞体の特に核周辺に染色が強く、突起にも染色がみられる。伸長途中と思われる短い突起に染色は強く、長い突起では比較的弱かつた。NGF 存在下 3 日後の分化された細胞で特に長い突起が認められ、染色は弱かった。

培養海馬神経細胞では培養開始後 3 日目の突起の伸びていない細胞では成長円錐や突起の基部に染色が強く、短い突起を出している細胞では突起が強く染まっている。5 日目で伸長途中の短い突起に強く、培養後 8 日目では染色は弱くなつており、Neuro2A と似た結果となつた。これらの染色像より KIF16A は成長途中の突起の先端へ膜状小胞を輸送していることが推察される。

KIF16A 結合蛋白の探索のため、KIF16A の C 末端をベートとして、yeast two-hybrid を行った。その結果、TPC の中の TRAPPC6A という蛋白質が KIF16A 結合蛋白候補として同定できた。TPC は 10 個のサブユニットにより構成されている複合体であり、分泌顆粒などの膜状小胞の輸送に関わつてゐることが知られている。また、TRAPPC6A 遺伝子の不活性型変異マウスでは皮膚の色素量が正常より低いと発表されている。TRAPPC6A の不活化によりゴルジ体に由来する色素胞の輸送に異常を来たしてゐると推察され、これまでの KIF16A の機能の所見と合致する。

KIF16A と TRAPPC6A の親和性を確認するために、結合実験を行った。KIF16A の C 末端のベートおよび TRAPPC6A の分子全長を大腸菌にそれぞれ発現させ、精製し、CNBr ビーズと結合した。その結果、コントロールとして BSA に結合がみられないのに対して、KIF16A のビーズを使って、TRAPPC6A の結合がみられ、TRAPPC6A のビーズを使って、KIF16A も結合しているのが確認できた。両者の間に特異的な親和性が存在すると考えられる。

TRAPPC6A の GFP 融合蛋白を Neuro2A 細胞に発現させたところ、KIF16A と同様に、突起の先端に蓄積している様子や基部や突起の途中に観察できた。KIF16A の抗体を使って染めてみると、突起などに共局在が見られた。KIF16A の分布は外来性の TRAPPC6A の発現に影響されなかった。

まとめると以下の結論に至った。KIF16A は 500kDa の大型で多数の組織に発現する新しい KIF であり、TRAPPC6A を介して膜状小胞を神経突起の成長円錐まで輸送していることが示唆された。