

## 審査の結果の要旨

氏名 郭 敬卓

本研究は神経細胞の中で重要な役割をしていると考えられる **KIF5** の機能を明らかにするため、**KIF5** が運んでいる新しいカーゴの蛋白複合体を探して、**KIF5** がどのようにカーゴを運ぶのかそのメカニズムを研究しており、下記の結果を得ている。

1. **KIF5** の結合蛋白を同定する目的で、**KIF5** 特異的な抗体を用いてマウス脳の P 3 膜分画より、カーゴ蛋白を含む **KIF5** を精製した。サンプルを電気泳動で分離後切り出して酵素処理し、質量分析にかけ、上記の **SNARE** 蛋白およびその周辺蛋白群を同定した。抗 **KIF5** 抗体は 5 A, 5 B, 5 C 各々について特異的なものを使用したが、アイソフォームによる実験結果の違いは見られなかった。さらにこれらの **SNARE** 蛋白の遺伝子を蛍光分子でラベルし、**KIF5** と共に海馬初代培養神経細胞内に強制発現させて、軸索内で **KIF5** と一致した局在を示す事を確認し、**KIF5** により運ばれる事を証明した。

2. 多点蛍光ビデオ解析装置にて、**SNAP25**, **VAMP2**, **syntaxin1A** 三者の神経細胞内での輸送を詳細に観察、比較検討を行った。各 **SNARE** 蛋白の輸送速度を測定したところ、最大速度では三者の輸送に全く差は認められなかった。しかしながら、この内二者を神経細胞内に同時に発現させて動きを観察した結果、三者は各々独立に軸索内を輸送されている事が判明した。

3. 酵母ツーハイブリッド法を用いて各々の蛋白の直接相互作用を調べたところ、キネシン重鎖 (**KIF5**) と軽鎖の間の既知の結合の他、これまで報告のあった **SNAP25** と **KIF5** の結合に加えて(Diefenbach et al., 2002a)、**VAMP2** とキネシン軽鎖の直接結合が明らかになった。**Syntaxin1A** は、**KIF5**、キネシン軽鎖いずれとも直接結合はせず、**scaffolding** 蛋白を介するというこれまでの報告と矛盾はなかった (Su et al., 2004)。**SNARE** 蛋白に対する抗体を用いた免疫沈降では、キネシン軽鎖は抗 **VAMP2** 抗体でのみで共沈され、**SNAP25**, **syntaxin1A** の輸送担体には、キネシン軽鎖が含まれない事が確認された。

以上より、(1) **SNAP25** が **KIF5** に直接結合、(2) **syntaxin1A** が軽鎖以外の蛋白を介して **KIF5** に結合、(3) **VAMP2** がキネシン軽鎖を介して **KIF5** に結合、という三種類の輸送形態が存在し、各々は軸索内を **KIF5** によって別々に運ばれる事が明らかになった。

以上、本論文は神経細胞の内でKIF5の役割において、K I F 5により輸送されるカーゴの中には、キネシン軽鎖を介さず直接K I F 5に結合する蛋白が存在する事は知られていたが、キネシン軽鎖とカーゴの結合部位が、K I F 5上で異なる事から、両者が同時に結合する可能性も云われていた。S N A R E蛋白は軸索先端まで別々に運ばれる事が明らかになった結果、必然的にそれ以降、細胞膜直下で複合体を形成する事が明らかになり、未知の制御系の軸索先端にしばった検索も今後可能になると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。