

論文内容の要旨

論文題目 Molecular Cell Biological Analysis of a kinesin superfamily protein,
KIF1B β

和訳 キネシンスーパーファミリータンパク質 KIF1B β の分子細胞生物学的解析

指導教官 廣川信隆 教授

東京大学医学系研究科

平成15年4月進学

医学博士課程分子細胞生物学専攻

氏名 丹羽伸介

キネシンスーパーファミリープロテイン (KIF) は微小管をレールとするモータータンパク質である。多くの KIF は KIF に共通のキネシンモータードメインとさまざまな tail domain(尾部)から成り立っている。キネシンモータードメインが ATP を分解することによって発生するエネルギーを用いて KIF は微小管の上を+端に向かって動き、多様性のある尾部にカーゴを結合することによって細胞内輸送を担っている。私は KIF に属するタンパク質の一つである KIF1B β について調べた。オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質 (GFP) に KIF1B β を結合したものをアデノウイルスによって神経細胞に発現すると、主に神経細胞の軸索の中を末端に向かって動くことがわかった。しかも軸索の中を毎秒約 1 μ m の速さで動いている。これは昔からよく知られている軸索輸送の早い輸送と遅い輸送のうち早い輸送とほぼ同じ速さで、精製した KIF1B β を用いて精製した微小管を動かしたときの速さに一致する。

次にいかにカーゴが KIF1B β に結合するかを調べるために、KIF1B β のさまざまな欠損変異体を作成し、神経細胞に発現した。その結果、フォスファチジルイノシトール 4, 5 ビスフォスフェイト (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate,PIP2) に結合する PH ドメインと、進化的によく保存されたストーク領域の両方がカーゴに結合するために必要であることがわかった。PH ドメインの機能はすでに知られているので、まだ解析されていないストーク領域の機能を調べることにした。酵母ツーハイブリッド法によってストーク領域に結合するタンパク質を調べると、その中の一つに Rab3GEP というタンパク質があった。

酵母ツーハイブリッド法だけでは偽陽性の可能性があるので、293FT 細胞を用いた免疫沈降法を用いて結合を確認し、GFP 変異体である YFP を結合した Rab3GEP と CFP を結合した KIF1B β を同時に神経細胞に発現し、二つと一緒に細胞の中を動くことも確認した。また、KIF1B β の抗体を用いて小胞を精製すると、KIF1B β が含まれる小胞には Rab3GEP が含まれる。KIF1B β のホモログである Unc-104 を欠損する線虫では Rab3 などのシナプス小胞前駆体を含む小胞の輸送に異常が現われることが知られていた。Rab3GEP を欠損する線虫でもまた Rab3 の細胞内輸送に異常が起こる。KIF1B β に結合する領域だけの Rab3GEP の欠損変異体 (Rab3GEPDD) を細胞内に発現して Rab3 の細胞内の局在を観察すると、Rab3 が神経の突起の中から減った。このことから KIF1B β -Rab3GEP-Rab3 という結合が Rab3 の細胞内輸送に必要であることが示唆された。Rab3GEP と Rab3 の結合を調べると、Rab3GEP の N 末端側の領域が Rab3 に結合した。

KIF1B β は L 細胞に過剰発現すると、他の KIF と同様に突起の先端に集まる傾向がある。このとき Rab3GEP の局在を観察すると、KIF1B β を発現していない細胞に比べて突起の先端に Rab3GEP が多く集まった。

KIF1B のノックアウトマウスの神経細胞で Rab3GEP や Rab3 の局在を調べると、軸索の中からこれらのタンパク質の量が減っていることがわかった。RabGTPase は膜に結合する GTP フォームと、膜から外れやすい GDP フォームの二つの状態がある。早い輸送は膜輸送によって担われているので、輸送されている Rab3 は GTP フォームであることが予想された。KIF1B のノックアウトマウスの神経細胞に GTP-Rab3 を発現することによって動きを観察すると、動きが悪いことがわかった。さらに、KIF1B のノックアウトマウスに KIF1B β を導入することによって局在がもとに戻った。これらのことから KIF1B β を欠損しているために Rab3GEP や Rab3 の細胞内輸送に異常が起こり、結果として Rab3GEP と Rab3 の量が軸索の中から減っていると考えられた。

点変異を導入することによって Rab3 の GDP フォームと GTP フォームに似た状態を作り出すことによって酵母ツーハイブリッド法を行うと、Rab3 は GTP フォームで Rab3GEP の N 末端側に結合した。代謝されない GTP アナログである GTP γ S を Rab3 に取り込ませることによって Rab3 を GTP 状態にすることができる。これを用いた免疫沈降法によって確かに Rab3GEP と Rab3 の結合が GTP 依存性であることがわかった。GDP 状態の Rab3 と GTP 状態の Rab3 を神経細胞に発現すると、後者がより突起の中に運ばれやすいことがわかった。また、GTP 状態の Rab3 に CFP を融合したものと、KIF1B β に YFP を融合したものを同時に神経細胞に導入して動きを調べると両者が同時に動いていることがわかった。Rab3GEP は GDP 状態の Rab3 を GTP 状態に変える活性 (GEF 活性) があることが知られていた。今回私が示したように Rab3GEP は GTP フォームの Rab3 と KIF1B β の間の架け橋として働き、Rab3 の軸索輸送に必要な分子であることがわかった。Rab3GEP が GEF の活性を持つことを考慮に入れると、Rab3GEP は Rab3 を膜に結合しやすい GTP 状態に固定することによって軸索輸送のような長い距離の輸送を保障しているのではないか、

と考えられる。実際、Rab3GEP を過剰発現すると細胞内の GTP-Rab3 の量が3倍に増えることが知られている。

また、KIF1B β がカーゴを運ぶためには従来いわれていたPHドメインを介した脂質との結合だけではなくストーク領域を介したタンパク質との結合が必要であることがわかった。いくつかのモータータンパク質は同じような脂質結合領域を持っていることが知られていますが、それらのモータータンパク質の局在は必ずしも脂質の局在と一致しない。それらのモータータンパク質も同じようなメカニズムによって正しいカーゴと結合することができるのではないかと考えられる。