

## 論文内容要旨

論文題目 **Functional Analysis of Kinesin Superfamily Protein KIF1B $\beta$**

和訳 モーター分子 KIF1B $\beta$  の機能解析

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17年4月入学

医学博士課程 分子細胞生物学専攻

小田柿 敦士

### 背景

キネシンファミリータンパク質(KIFs)は微小管上を ATP 依存に移動する分子モーターであり、細胞内物質輸送や細胞分裂において重要な働きをしていることが知られている。その中の一つである KIF1B にはオルタナティブスプライシングによる2種類のアイソフォーム(KIF1B $\alpha$  と KIF1B $\beta$ )が存在し、これまでに  $\alpha$  isoform はミトコンドリア、 $\beta$  isoform はシナプス小胞前駆体の輸送に関与していることが明らかになっている。しかし、KIF1B 欠損マウスにおいて脳の発達異常などが観察され、これらはミトコンドリアやシナプス小胞の輸送が障害されることのみでは説明することができないことから、KIF1B にこれまで知られていない新たな機能が存在することが示唆されていた。

そこで本研究では、KIF1B 欠損マウスにみられる脳の発達異常を詳細に解析し、この解析結果と KIF1B の生化学的および細胞生物学的解析結果を併せることにより、KIF1B の未知の機能を明らかにしようとした。

### 研究方法・対象

本研究では、まず解剖学および組織学的手法を用いて KIF1B 欠損マウスの脳の表現型を野生型と比較した。それとともに KIF1B の遺伝子座に *LacZ* レポーター遺伝子を組み込んだマウスを用いて KIF1B の脳内における発現パターンを調べた。

次に KIF1B により輸送されるタンパクを同定するために、免疫沈降したサンプルをマスマスペクトロメトリーを用いて解析し、同定されたタンパク質の中から KIF1B 欠損マウスの表現型を説明でき且つ KIF1B の発現パターンと合致するものを選別し、被輸送候補タンパクとした。

さらにこの候補タンパクが実際に KIF1B によって輸送されているか確かめるために、フローテーションアッセイや免疫沈降法、免疫細胞染色、micro RNA を用いた KIF1B $\beta$  のノックダウン実験を行った。

### 結果

#### KIF1B 欠損マウスの解剖学的・組織学的解析

KIF1B 欠損マウスの胎児(E18.5)の脳を外観的に野生型と比較すると、嗅球が著しく縮小

しており、また脳全体が 10 %程度小さかった。脳の組織切片を観察すると、KIF1B 欠損マウスの脳では、神経前駆細胞がその発生部位である線条体側脳室周辺領域(Striatal Subventricular Zone, SVZ)から嗅球へ移動する途上(Rostral Migratory Stream, RMS)に大量に蓄積していることが明らかになった。このことから KIF1B 欠損マウスにおける嗅球形成不全が神経前駆細胞の移動不全に起因することが示唆された。一方、KIF1B $\beta$  の相同タンパクである KIF1A の欠損マウスではこのような脳の形成不全は観察されなかった。

### KIF1B の脳内発現パターン

マウス胎児(E16.5)の脳における KIF1B の発現を調べたところ、KIF1B の発現は線条体側脳室周辺領域(Striatal Subventricular Zone, SVZ)から嗅球脳質側領域(Olfactory Ventricular Zone, OVZ)にかけての領域(RMS)に多く認められた。

### 抗 KIF1B $\beta$ 抗体による免疫沈降

KIF1B の機能的な被輸送タンパクを同定するために、マウス新生児の脳ホモジェネートから抗 KIF1B $\beta$  抗体による免疫沈降を行い、共沈したタンパクをマススペクトロメトリーで解析した ky)IF1B family Protein KIF1Bb

ところ、これまでに知られていたシナプス小胞タンパクの他に NCAM-180 が同定された。ポリシアル酸 (polysialic acid, PSA)で細胞外ドメインが修飾された NCAM-180(PSA-NCAM)が嗅球への細胞移動に必須の因子であることから、KIF1B 欠損マウスの表現型を説明しうる NCAM-180 が KIF1B の機能的被輸送タンパクの一つであることが推察された。さらに NCAM-180 の共沈が KIF1B $\beta$  に特異的であることを、抗 KIF1A 抗体および抗 KIF3A 抗体を用いた免疫沈降をコントロールとして、抗 PSA-NCAM 抗体を用いたウェスタンブロット法で確認したところ、PSA-NCAM と共沈するのは KIF1B $\beta$  だけであることが明らかになった。

### フローテーションアッセイ

マウス新生児の脳ホモジェネートを Nycodenz 密度勾配によって分画し、KIF1B $\alpha$  および KIF1B $\beta$ 、KIF1A、PSA-NCAM の分布パターンをウェスタンブロット法で確認したところ、相同タンパク同士である KIF1A と KIF1B $\beta$  の分布パターンは一致し、かつ PSA-NCAM の分布パターンと重なることが示された。一方、KIF1B $\alpha$  のパターンは全く異なるものになった。この結果、KIF1B の二つのアイソフォームのうち KIF1B $\alpha$  は PSA-NCAM の輸送に関与しておらず、KIF1B $\beta$  のみがこれに寄与していることが示唆された。

### 免疫細胞染色

KIF1B $\beta$  が神経細胞内で実際に PSA-NCAM を輸送しているか確かめるために、抗 KIF1B $\beta$  抗体あるいは抗 KIF1A 抗体と抗 PSA-NCAM 抗体による DIV8 培養海馬神経の二

重染色を行った。その結果、KIF1B $\beta$  は PSA-NCAM は軸索内で共局在したのに対し、KIF1A は共局在しなかった。このことから KIF1B $\beta$  が PSA-NCAM を輸送する特異的なモーター分子であることが示唆された。

## 免疫細胞染色(2)

KIF1B 欠損マウスの細胞で実際に PSA-NCAM の局在に異常が認められるか確かめるために、野生型および KIF1B 欠損型の培養神経細胞を抗 PSA-NCAM 抗体で染色し、比較した。その結果、野生型では細胞膜および神経突起の先端に PSA-NCAM が局在したのに対し、KIF1B 欠損型では細胞体に蓄積した。このことから、KIF1B 欠損マウスの神経細胞では確かに PSA-NCAM の細胞表面への局在が障害されていることが示された。

## RNAi を用いた KIF1B $\beta$ ノックダウン実験

KIF1B $\beta$  が PSA-NCAM の細胞内局在に寄与していることを確かめるために、NCAM-180-EGFP を発現させた神経細胞に KIF1B $\beta$  に対する miRNA を同時に強制発現させ、NCAM-180-EGFP の局在をコントロールと比較した。すると、コントロールでは NCAM-180-EGFP は細胞膜および神経突起の先端に局在したが、KIF1B $\beta$  をノックダウンした細胞では KIF1B 欠損型と同様に細胞体への蓄積が認められた。このことから KIF1B $\beta$  が NCAM-180 の局在に寄与していることが明らかになった。

## 考察

### KIF1B と脳の発達

以前の報告および本研究から、KIF1B 欠損マウスが嗅球の形成不全をはじめとした様々な脳の形態的異常を示すことが明らかになった。しかし KIF1B $\beta$  の相同タンパクである KIF1A の欠損マウスではこのような脳の形成不全は観察されず、また KIF1C の欠損マウスでも目立った異常が全くないことが報告されている。このように脳形成への関与は KIF1 サブファミリーに共通する機能ではなく、KIF1B に特異的な機能であることが判明した。脳の形態的発達に寄与するキネシンはこれまで報告されておらず、この発見は組織形成における細胞内物質輸送の役割を解明する足掛かりとなると考えられる。

### KIF1B $\beta$ と KIF1A の相違点

これまで KIF1B $\beta$  は神経細胞において相同タンパクである KIF1A と同様にシナプス小胞前駆体を細胞体からシナプス終末へ輸送するという機能が明らかにされており、そのため KIF1A と KIF1B $\beta$  との補完的な類似性が広く受け入れられていた。しかし本研究において、KIF1A の欠損マウスでは嗅球形成が正常であり、また抗 KIF1A 抗体を用いた免疫沈降で PSA-NCAM が共沈しないことが明らかになった。このことから PSA-NCAM の輸送は KIF1B $\beta$  特異的なものであり、したがって KIF1B $\beta$  は KIF1A と全く異なる未知のタンパク輸

送機構を担うことが示唆された。今後この新規のタンパク輸送機構を解明していくことが新たな課題となっていくと考えられる。

### 中枢神経系における KIF1B $\beta$ の機能

これまでの研究で **PSA-NCAM** は中枢神経系における細胞接着の制御因子であり、細胞表面の **PSA-NCAM** がもたらす負電荷同士の反発により細胞間接着が弱まることが明らかになっている。実際、細胞表面での **PSA-NCAM** の発現制御は神経細胞の移動・定着や軸索の伸長、シナプス形成およびその可塑性に大きく寄与していることが知られ、またその他に概日リズムの制御に寄与していることも知られている。したがって本研究で **KIF1B $\beta$**  が **PSA-NCAM** を細胞表面に輸送していることが明らかにされたことで、**KIF1B $\beta$**  が **PSA-NCAM** と同様に、細胞移動、軸索伸長、シナプス形成および可塑性、概日リズム制御に寄与している可能性が強く示唆された。今後は **KIF1B $\beta$**  がこれらの現象にどの程度関与しているかを細胞生物学的および分子遺伝学的解析などを用いて明らかにしていくことが望まれる。

### 結論

本研究によって、モーター分子 **KIF1B $\beta$**  が嗅球前駆細胞の細胞移動に必須の因子である **PSA-NCAM** を細胞表面にまで輸送することが明らかになった。このことは **KIF1B** 欠損マウスにおける嗅球形成不全とよく合致し、嗅球の正常発達における **KIF1B $\beta$**  の新しい機能を示唆している。