

論文の内容の要旨

論文題目 : The Molecular Cell Biology of a New Kinesin
Superfamily Protein , KIF21A

和訳 : 新規モーター分子 KIF21A の分子細胞生物学的研究

指導教員 廣川信隆

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

分子細胞生物専攻

氏名 趙顯洙

[背景]

キネシンスーパーファミリー蛋白 KIF21A は1999年に同定が報告された微小管上を ATP を加水分解しながら能動的に移動するモーター分子である。最初の報告では神経系などの臓器での発現がみられることがノザンブロットィング法や in situ hybridization 法により報告された。KIF21A が細胞内で運搬する具体的な cargo (荷物) には言及されていない。その後先天性外眼筋線維症 Congenital fibrosis of the extraocular muscles (CFEOM) の原因遺伝子としての報告がある。2003年の Nature Genetics 誌にて CFOEM1 の家系における KIF21A の遺伝子座の変異が発表され、その後合わせて24本の論文が CFEOM と KIF21A 遺伝子座における変異に関して発表されている。神経原性である CFEOM1 において KIF21A に変異を認める報告が多数あるが未だその疾病の発症機構は明らかにされていない。動眼神経の軸索の伸長阻害が認められる症例報告もある。本研究はこれまで報告のない KIF21A が担う細胞内物質輸送の

cargo を特定し、その生物学的な機能を解明し、CFEOM の発症機構を明らかにすることを目的としている。

[方法・対象]

KIF21A の cargo を同定するためにイーストツーハイブリ法、生化学的結合実験、免疫染色を用いた。また、免疫沈降法、免疫染色により、KIF21A が結合蛋白を介して複合体として輸送している蛋白を見出した。dominant negative construct の強制発現や miRNA を用いた KIF21A の機能阻害実験により KIF21A の輸送が神経細胞の軸索の形成に寄与しているかをみた。

[結果]

イーストツハイブリ法による結合蛋白の探索

KIF21A の結合蛋白を探するために KIF21A の C 末端に位置する WD40 部位 (a.a.1214-1593) とそのすぐ上流にある α -helical 領域(a.a. 857-1090)部分を bait として mouse brain cDNA library をイーストツーハイブリ法を用いてスクリーニングした。その結果、80 個の positive clone が得られ、そのうち 2 個の独立した Elmo1 のクローンが得られた。Elmo1 と KIF21A 両分子の結合する最小領域を調べた結果、Elmo1 が KIF21A の α -helix 領域に結合することが分かった。同様にして KIF21A が Elmo1 の N-末端に結合することが認められた。

Elmo1 が KIF21A に直接結合

KIF21A と Elmo1 の直接結合過程を確認するために in vitro binding assay を実施した。GST-KIF21A と His-Elmo1 をそれぞれ精製し、binding assay を行った結果、His-Elmo1 が GST-KIF21A に特異的に結合することが確認された。さらに GFP-KIF21A と cMyc-Elmo1 を Cos7 細胞系列に co-transfection し、抗 GFP 抗体で免疫沈降実験を行った。normal rabbit IgG では Elmo1 は共沈せず、GFP-KIF21A と共沈することが分かった。KIF21A に CFEOM の家系と同じ点変異を入れて Elmo1 と結合するかどうかを調べた。KIF21A に起因する CFEOM の患者家系の 84.2%がもっている KIF21A の R943W 点変異を作って His-Elmo1 との binding assay を行ったところ、野生種 GST-KIF21A と比べて GST-KIF21A(R943W)は His-Elmo1 との結合が 43%減少した。

KIF21A が Elmo1-Dock180-Rac1 複合体を運ぶ

Elmo1 が Dock180 と結合し、Rac1 の活性を調節することが知られている。

免疫沈降法により、これらの蛋白が KIF21A と結合しているかを調べた。抗 KIF21A ウサギ抗体を作製し、マウス brain lysate を使用した結果、Elmo1,Dock180,Rac1 が KIF21A と共沈することが分かった。海馬神経細胞を用いて免疫染色を行ったところ、div1 の海馬神経細胞において KIF21A は Elmo1,Dock180,Rac1 と共局在することが認められた。

KIF21A の miRNA 実験

KIF21A を knockdown するため、KIF21A の miR RNA をデザインした。Neuro2A 細胞で KIF21A miR RNA を 3 つ試し、#2023 と #2119 の 2 つがウェスタンブロッティング法と免疫染色法でそれぞれ有為に KIF21A の翻訳を抑制していることを確認した。この 2 つを使用して FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)を行うため、div1 の海馬神経細胞に KIF21A miRNA と GFP-Rac1 又は GFP-Elmo1 を co-transfection した。その結果、KIF21A miRNA と共に GFP-Rac1 あるいは GFP-Elmo1 を transfection したもののほうが蛍光強度の回復が control miR RNA より遅くなることが分かった。また、KIF21A miRNA と GFP-Rac1 を div3 の海馬に co-transfection して 48 時間培養した後、軸索の GFP 蛍光強度を測定した。FRAP の結果と同様に KIF21A miRNA を入れた細胞の方が control miRNA を入れた細胞より GFP-Rac1 の signal が軸索において 30%少ないことが示された。これらの結果により、KIF21A が Elmo1、Dock180 と Rac1 を軸索内で運ぶことが示唆された。

KIF21A の actin 又は軸索伸長への影響

Rac1 が Rho family GTPase として actin 細胞骨格を調節し、特に軸索の成長と誘導に関与しているという報告がある。そこで、KIF21A の actin 及び軸索伸長への関与を調べた。KIF21A miRNA と control miRNA を GFP と co-transfection をして軸索の長さを測定したところ、KIF21A miRNA 入れた海馬神経細胞の軸索の長さ(96.6 nm ± 11.5)が control miRNA を入れた海馬神経細胞の軸索(207.8 nm ± 24.8)より短くなることを見いだされた。また、同様に actin の分布を見た結果、KIF21A miRNA が入った海馬細胞の成長円錐の actin 染色が平均して control より 31 arbitrary unit 少ないことが示された。以上の結果により KIF21A が運ぶ Elmo1-Dock180-Rac1 複合体が軸索の伸長、特に成長円錐における actin の分布に関与していることが示唆された。

[考察]

神経細胞内における KIF21A の機能

KIF21A は Elmo1 と直接結合し、Dock180 と共同して Rac1 を活性化し、神経細胞において軸索の形成に関わっていることが本研究によって明らかになった。KIF21A が直接 Elmo1 と結合することはイーストツーハイブリ法、生化学的結合実験、免疫染色の共局在などにより示した。また、免疫沈降法、免疫組織染色により、KIF21A が Elmo1 を介して Dock180 及び Rac1 と結合し、さらに miRNA を用いた KIF21A の機能阻害によりこの輸送が阻害され、FRAP の Rac1 蛍光回復、すなわち Rac1 の輸送の低下がみられ、div3 の神経細胞では軸索が短かった。これらのことより、KIF21A の輸送が軸索の形成に貢献していることが見い出された。

KIF21A と軸索伸長と CFEOM

CFEOM1 の遺伝家系において KIF21A 遺伝子に点突然変異が入っている報告がある。特に遺伝家系のうちの 84.2%が KIF21A 蛋白に R943W という変異をもっていることが知られている。また動眼神経の軸索が短くなっているという症例報告もある。ただし、この疾病の発症の分子機構はもとより、KIF21A がどのように関係しているかは明らかにされていない。KIF21A の R943W 変異体は、Elmo1 との結合能が野生種より 40%減少した。Elmo1 と Dock180 は Rac1 に結合して Rac1 を GDP form から活性型の GTP form に変換し、発達中の軸索の伸長や誘導を行っている。KIF21A と Elmo1-Dock180-Rac1 の親和性が低下すると軸索終末まで運搬される Elmo1-Dock180-Rac1 が減少して軸索が伸長しなくなることが本研究により示された。このことにより、KIF21A による動眼神経の軸索伸長阻害に起因する CFEOM1 の発症の分子機構が示唆された。

[結論]

本論文では Elmo1 がイーストツーハイブリ法を用いて KIF21A と直接結合していることが見い出された。両分子の互いの最小結合領域と in vitro binding assay や免疫沈降法により、この結合が特異的で、しかも生体内においても存在することを示した。Elmo1 が Dock180 と結合し Rac1 を活性化することが知られており、神経細胞内でこれら 4 分子が共局在し、免疫沈降法で共沈することが認められた。miR RNA で KIF21A の機能阻害を行うと発達途中の神経細胞の軸索の成長円錐において Rac1 の量が減少し、actin の量も減少することが見い

出された。軸索の長さも短くなっていた。これらの結果より **Elmo1-Dock180-Rac1** 複合体が **KIF21A** によって運ばれて神経細胞の軸索の伸長に寄与していることが示唆された。