

[課程-2]

## 審査結果の要旨

氏名 趙顯洙

本研究は神経系の組織に発現量の多い細胞内物質輸送を担っていると思われるモーター分子、KIF21A が神経細胞内において何を運んでいるかを同定するため、分子細胞生物学的研究手法を用い、以下の結果が得られた。

### イーストツー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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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。これらの結果により、KIF21A と Elmo1 が結合する事が示された。

### 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、免疫沈降実験を行った。Elmo1 は normal rabbit IgG では共沈せず、抗 GFP 抗体で GFP-KIF21A と共沈することが分かった。KIF21A と Elmo1 の結合が確認できた。

### 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 miRNA をデザインした。Neuro2A 細胞で KIF21A miRNA を 3 つ試し、そのうち 2 つがウエ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 miRNA 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、同様にして 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。また、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

CFOEM 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。この結果より、CFOEM の発症が KIF21A の Elmo1-Dock180-Rac1 complex との結合量・輸送量の低下に起因する事が示唆された。

以上の結果により、KIF21A が運こぶ Elmo1-Dock180-Rac1 complex が axon の成長と actin distribution に関与していることが判明しました。