

Molecular Cell Biology of a C-terminal type motor,
Kinesin Superfamily Protein KIFC2

C 末型モーターキネシンスーパーファミリー蛋白 KIFC2 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

分子細胞生物学専攻

申請者 劉 偉華

学生番号 41-57323

[背景]

C 末型キネシンスーパーファミリー蛋白 KIFC2 は 1997 年に発見が報告され、神経細胞内での発現、電子顕微鏡写真によって膜小胞と結合していることが示唆された。細胞内物質輸送を担うモーター分子として推察されるが、具体的なカーゴ（積み荷）は発表されていない。C 末型キネシンスーパーファミリー蛋白 (KIF) は分子の C 末端にモーター部位があり、微小管のマイナス端に方向に向かう逆行性の運動能を有することが報告されている。神経細胞においては逆行性のモーター分子は樹状突起のポストシナプスなどから細胞体方向へのカーゴの輸送を担う。同様な微小管上の逆行性の輸送を担う分子としてサイトプラズミック・ダイニンが知られている。KIFC2 の遺伝子欠失マウスでは表現型が見い出せず、ダイニンとの重複した機能が示唆されている。また KIFC2 がエンドサイトーシス（内在化）された膜小胞を輸送していることが示唆された。また、エンドサイトーシスされた NMDA 型グルタミン酸受容体が huntingtin (Htt) 蛋白とその結合蛋白 Htt Interacting Protein 1 (HIP1) と結合することが知られている。

Htt が膜小胞のエンドサイトーシスに関与しているとされている **Pacsin1** と結合することが報告されている。本研究では **KIFC2** が **Pacsin1** と直接結合し、**Htt** と **HIP1** とで複合体を形成し、エンドサイトーシスされた **NMDA** 受容体を樹状突起において逆行性に輸送することが示された。

[材料・方法]

本論文ではマウス脳 cDNA library よりイーストツーハイブリ法を用いて **KIFC2** に直接結合する蛋白を同定し、その結合を生化学的結合実験を確認して、ツーハイブリ法で両分子の最小結合領域を決定した。マウス脳のオルガネラ分画を用いて免疫沈殿を行い、結合する蛋白が全て共沈することを確認した。フローテーションアッセイを行い、マウス脳のオルガネラ分画を原材料に密度勾配遠心分離を行い、浮揚する膜小胞を密度により分画した。海馬神経細胞を初代培養し、本論文で作製した抗体を用いて **KIFC2** が他の分子と共局在するかを見た。

[結果]

KIFC2 の C 末端部を用いたイーストツーハイブリ法により、**Pacsin1** が 2 つの独立したクローンとして得られ、直接結合することが示唆された。**KIFC2** と **Pacsin1** を大腸菌で発現し、精製して結合するかを見たところ、両分子ともに片方がカラムに結合した状態で他方の蛋白が結合し、非特異的な蛋白は結合しないことが確認された。両分子の結合に必要な最小領域をイーストツーハイブリ法により決定した。この結果、**Pacsin1** が **KIFC2** の 89-132 番目のアミノ酸残基に結合し、**KIFC2** は **Pacsin1** の 236-331 番目のアミノ酸残基（分子中央部）に結合することが分かった。また、**Pacsin1** が **Htt** と直接結合するという報告があることから **Htt** 及び **Htt** と直接結合するとされている **HIP1**、**Pacsin1**、**KIFC2** をそれぞれ大腸菌で発現し、精製した。**KIFC2** をビーズに共有結合させ、**Pacsin1** の存在下でのみ **Htt** と **HIP1** が **KIFC2** と結合することを見出し、**Pacsin1** の非存在下では結合はみられなかった。これら 4 分子と共に、**HIP1** と直接結合すると報告されている **NMDA** 受容体の構成分子、**NR2B** と **NR1** が免疫沈殿法により共沈すること認められた。これらの蛋白はマウスの胎生期より、あるいは海馬神経細胞の培養においても、発達段階が進むに従い発現量が上昇して発現量の挙動が一致している。また、フローテーションアッセイにより、これらの分子が浮揚し、

同じ分画に共分画されたことにより同じ膜小胞に乗っていることが示された。他の膜小胞に乗っている受容体構成分子 GABA(A) β 2 や本研究と無関係の KIF5A は浮揚したが共分画しなかった。培養した海馬神経細胞を免疫染色法にて染色し、各分子の局在を見たところ、KIFC2 と Pacsin1、KIFC2 と Htt、KIFC2 と NR1 並びに KIFC2 と NR2B が樹状突起において一部共局在することが観察された。染色像は細胞体で強いが、樹状突起では点状で、一部の点状の染色で共局在した。軸索では KIFC2 の染色は認められなかった。

[考察]

KIFC2 が Pacsin1 蛋白の中央部において結合し、Pacsin1 は N 末端の F-BAR 部位を介して 4 量体を形成し、C 末端にある SH3 部位において Htt と結合するので競合的な結合は発生せず、これらの分子が同時に結合することが可能であることが分かった。Pacsin1 を介して Htt と HIP1 が KIFC2 と複合体を形成することも今回の結合実験、免疫沈降、細胞染色により明らかになった。この蛋白複合体がエンドサイトーシスされた NMDA 受容体と結合し、逆行性に輸送していることがフローテーションアッセイ、免疫沈降、細胞染色での共局在により示唆された。KIFC2、Pacsin1、Htt、HIP1、NR1 及び NR2B は神経細胞において発現し、マウス胎生期より、あるいは海馬神経細胞の培養において発達段階が進むにつれて発現量が増加するという発現様式がこれらの分子に関して一致している。また、これらの分子が同じ膜小胞と結合していることも示された。NMDA 型グルタミン酸受容体は clathrin に依存するエンドサイトーシスを行うことが知られており、その後、リサイクルされて再びシナプスにおいて細胞膜表面に戻されるか微小管のある樹状突起の shaft 内を逆行性に輸送されてリソソームにおいて代謝されるとされている。本研究の結果により NMDA 型グルタミン酸受容体の微小管上の逆行性の輸送に KIFC2 が機能していること、その際に Pacsin1、Htt と HIP1 を介していることが新たに発見された。

[結論]

本研究では KIFC2 と直接結合する分子として Pacsin1 を特定し、Htt、HIP1 を經由して NMDA 受容体がカーゴであることを発見した。同時にアダプター蛋白やそれと結合する介在分子を特定し、KIFC2 が NMDA 受容体を輸送する分子機構も明らかにした。Pacsin1 や HIP1 と Htt は NMDA 受容体などの post-synapse

における clathrin を経由するエンドサイトーシスに携わっているとされている。**KIFC2** の様な C 末型モーター分子は逆行性の輸送をしていることが知られており、エンドサイトーシスされた分子を細胞体方向に輸送する役割を担っていることが推察される。**KIFC2** がこれらの分子と複合体を形成し、エンドサイトーシスされた受容体を含む膜小胞の逆行性輸送を行うことにより神経細胞の機能維持に必要な受容体の代謝機構の一端を担っていることが見いだされた。