

審査の結果の要旨

氏名 劉 偉 華

本研究はキネシンスーパーファミリーに属し、脳組織に特異的に発現するモーター蛋白、KIFC2 の機能を明らかにするためイーストツーハイブリ法、免疫沈殿法、免疫染色法、in vitro binding assay などの分子細胞生物学的手法を駆使して神経細胞内での KIFC2 の輸送する荷物を同定する試みであり、下記の結果を得ている。

1. KIFC2 の C 末端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。そして KIFC2 の fragment と Pacsin1 を大腸菌で発現し、精製して両方とも特異的に直接結合することを確認した。
2. KIFC2 と Pacsin1 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。Pacsin1 との結合には KIFC2 の 89 番目から 132 番目のアミノ酸までが必要である事が分かった。一方、KIFC2 との結合には Pacsin1 の 236 番目から 311 番目のアミノ酸までが必要である事が見いだされた。
3. KIFC2 の fragment、Pacsin1、huntingtin(Htt) の fragment、HIP1 をそれぞれ大腸菌で発現し、精製して、in vitro で結合できるかどうかをみた。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。この結果により、Htt と HIP1 は Pacsin1 を介して KIFC2 と結合することが確認された。
4. KIFC2 の 85-274 アミノ酸 fragment を抗原としてウサギを免疫し、抗体を作製して精製した。この抗体の特異性をウエスタンブロッティング法、免疫細胞染色法にて確認して使用した。KIFC2、Pacsin1、Htt、HIP1、NR2B と NR1 免疫沈殿法により共沈し、抗 Pacsin1 抗体と抗 Htt 抗体を用いて同様の結果を得た。また、フローテーションアッセイにより、上記全ての分子が浮揚し、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。
5. 分散培養した海馬神経細胞を免疫染色法にて染色し、KIFC2 の分布と各分子の局在を見たところ、KIFC2 は細胞体と樹状突起の shaft 内に点状に局在し、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。

以上、本論文はマウス脳組織において、機能が分からないモーター蛋白KIFC2の解析から、KIFC2は Pacsin1、Htt、HIP1を経由して内在化されたNMDA受容体を神経細胞樹状突起の

shaft内で逆行性輸送されることを明らかにした。本研究はKIFC2の神経細胞内での物質輸送の役割とNMDA受容体のリサイクリングの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。