

## 論文の内容の要旨

論文題目 Par1 によるモータータンパク質 GAKIN のリン酸化と細胞極性の制御

指導教員 吉田 進昭 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

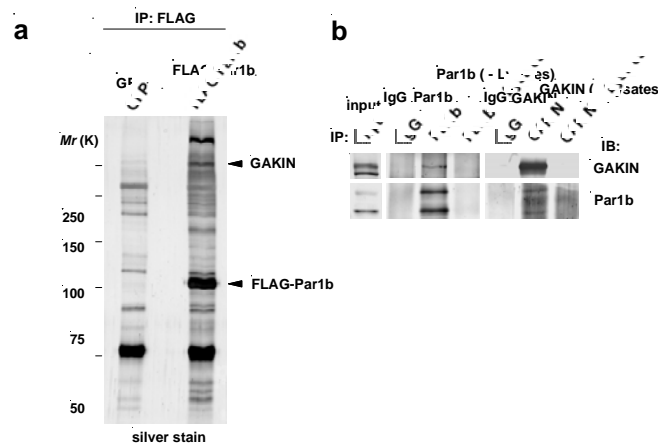
医学博士課程

病因病理学専攻

吉村 祐太

*Par* 遺伝子群は線虫初期胚の非対称分裂に関する変異体のスクリーニングにより、Kemphues らによって 1988 年に発見された。その後、*Par* 遺伝子群は進化上高度に保存されており、細胞極性において普遍的な役割を担っていることがわかってきた。また、各 *Par* タンパク質どうしの生化学的な関係についての解析が進み、Par3/Par6/aPKC からなる *Par* 複合体が Par1 をリン酸化し、その局在を膜から解離させることで Par1 の機能を制御していることが明らかになった。Par1 はセリン・スレオニンリン酸化酵素であり、哺乳類の相同分子種は microtubule affinity regulating kinase (MARK) として知られているが、これまでに細胞極性に関与する Par1 の基質は見つかっていない。

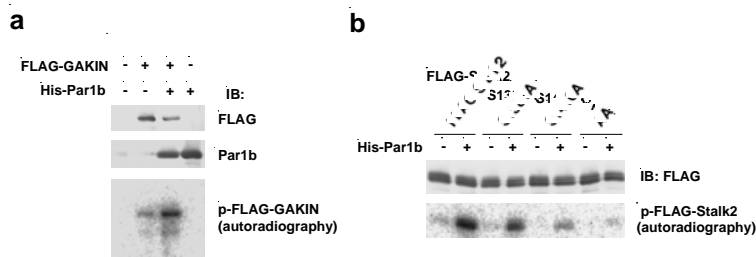
細胞内で Par1b に結合するタンパク質を網羅的に解析するため、FLAG-Par1b を安定発現させた MDCK 細胞抽出液から抗 FLAG 抗体ビーズで免疫沈降を行った。質量分析の結果、コントロールにはない 250-kDa のタンパク質が Guanylate kinase-associated kinesin (GAKIN; KIF13B) であることがわかった (Fig. 1a)。GAKIN はキネシン-3 ファミリーに属する微小管上を動くモータータンパク質であり、PIP3-binding protein (PIP3BP) として知られている centaurin- $\alpha$ 1 と結合することで、PIP3 を含むリン脂質小胞を微小管のプラス端方向に運ぶことが *in vitro* で観察されている。



**Fig. 1** Par1b とGAKINの結合 (a)FLAG-Par1bおよびGFPを発現させたMDCK細胞の抽出液から抗FLAG抗体ビーズで免疫沈降した。共沈物はSDS-PAGEして分離後、銀染色した。FLAG-Par1bとGAKINを矢頭で示した。(b)MDCK細胞とSH-SY5Y細胞の抽出液から抗Par1b抗体および抗GAKIN抗体で免疫沈降してから検出した。ウサギIgGと細胞抽出液なしをコントロールとして行った。

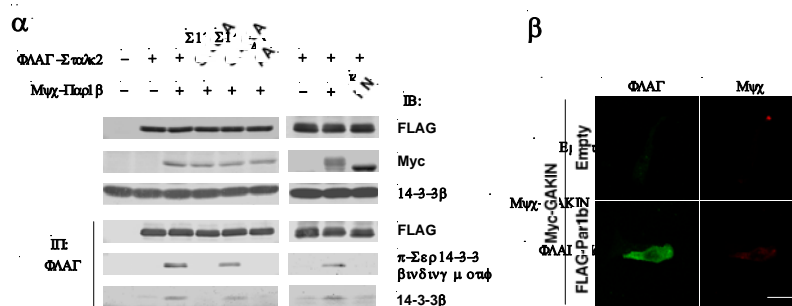
SH-SY5Y 細胞の抽出液から抗 Par1b 抗体および抗 GAKIN 抗体を用いて免疫沈降を行った。この結果、内在性の Par1b と GAKIN が細胞内で複合体を形成することが示唆された (Fig. 1b)。セリン・スレオニンリン酸化酵素である Par1b が結合することから、Par1b が GAKIN をリン酸化している可能性が考えられる。His-Par1b を FLAG-GAKIN に混合してリン酸化アッセイを行ったところ、リン酸化のシグナルが増加することが確認できた (Fig. 2a)。GAKIN の配列を他の種間で比較解析してみると、1381 番目と 1410 番目のセリンが高度に保存されていることがわかった。さらに 1381 番目のセリンは 14-3-3 結合モチーフである RSXpSXP または RXXXpSXP に一致している。これまでに Par1 が基質の 14-3-3 結合モチーフをリン酸化する例が報告されていることから、この残基がリン酸化サイトである可能性がある。これら 2 つのセリンをアラニンに置換した変異体 (S1381A、S1410A) を作製し、リン酸化アッセイを行った。それぞれの変異体でシグナルが減少しており、両方に変異を入れた AA ではシグナルがほとんど検出されなかった (Fig. 2b)。このことから、in vitro において Par1b によるリン酸化部位が 1381 番目と 1410 番目の Ser であることが示唆された。

14-3-3 結合モチーフである 1381 番目のセリンがリン酸化されることがわかったので、実際にリン酸化依存的な 14-3-3 の GAKIN への結合が起きているのか確認した。FLAG-Stalk2 を抗 FLAG 抗体ビーズで免疫沈降させて内在性 14-3-3 を検出すると、Myc-Par1b 依存的に 14-3-3 結合量が上昇した (Fig. 3a)。また、S1381A、AA では 14-3-3 が結合していないのが確認できる。これと同時に、抗リン酸化 14-3-3 結合モチーフ抗体を用いて調べてみると、Ser1381 のリン酸化状態と 14-3-3 の結合量が相関していた (Fig. 3a)。



**Fig. 2** Par1b によるGAKINのリン酸化 (a)COS-7細胞に発現させたFLAG-GAKINを抗FLAG抗体ビーズで集め、His-Par1bを混合してリン酸化アッセイを行った。オートラジオグラフィーのシグナルはリン酸化を示している。(b)1381番目と1410番目のSerをAlaに置換した欠失型変異体FLAG-Stalk2でリン酸化アッセイを行った。AAは両方のSerをAlaに置換したもの。

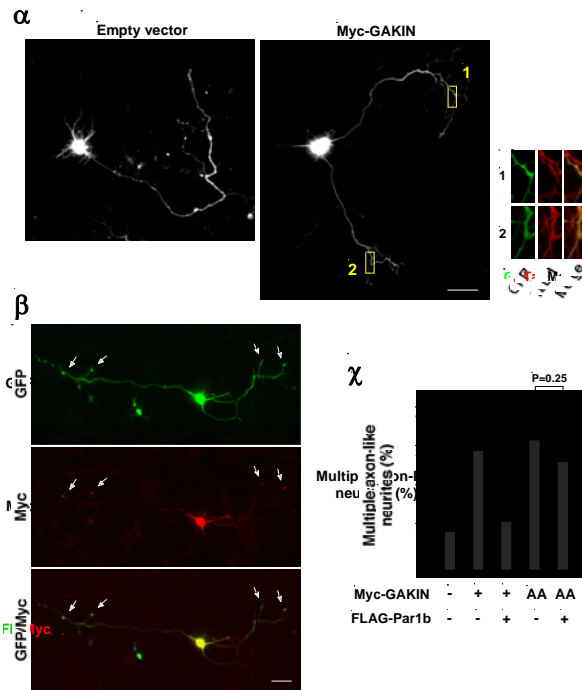
これまでに 14-3-3 の結合で細胞内局在が変化するタンパク質がいくつか知られている。GAKIN の局在が変化するかを MDCK 細胞で調べた (Fig. 3b)。Myc-GAKIN を過剰発現させると細胞突起を形成し、その先端に Myc-GAKIN が濃縮されているのが観察された。FLAG-Par1b を共発現させると Myc-GAKIN は細胞質中に分散し、細胞突起の形成は阻害された。Par1b-KN や GAKIN AA を代わりに発現させても、このような効果は観察できなかった。つまり、Par1b のリン酸化が GAKIN の細胞内局在を制御していることが示唆された。



**Fig. 3** Par1b によるリン酸化は14-3-3とGAKINの結合を誘導する (a)COS-7細胞に FLAG-Stalk2を発現させて抗FLAG抗体ビーズで免疫沈降を行い、抗14-3-3抗体及び抗リン酸化14-3-3結合モチーフ抗体で検出した。(b)MDCK細胞にMyc-GAKINとFLAG-Par1bを発現させて免疫染色をおこなった。Bar 20 mm

細胞極性の研究では海馬神経細胞の初代培養がよく利用されている。GAKIN の過剰発現が神経の極性に影響を与えることが報告されているが、内在性の GAKIN に関する実験は行われていない。神経細胞は、培養皿に定着しラメリポディアを形成 (stage 1)、いくつかの短い突起を伸ばし (stage 2)、1本だけの突起が急速に伸びて軸索に成長 (stage 3)、その後 stage 4-5 を経て成熟するが、まず stage 1-3 の各段階における GAKIN の局在について調べた。Stage 2 にな



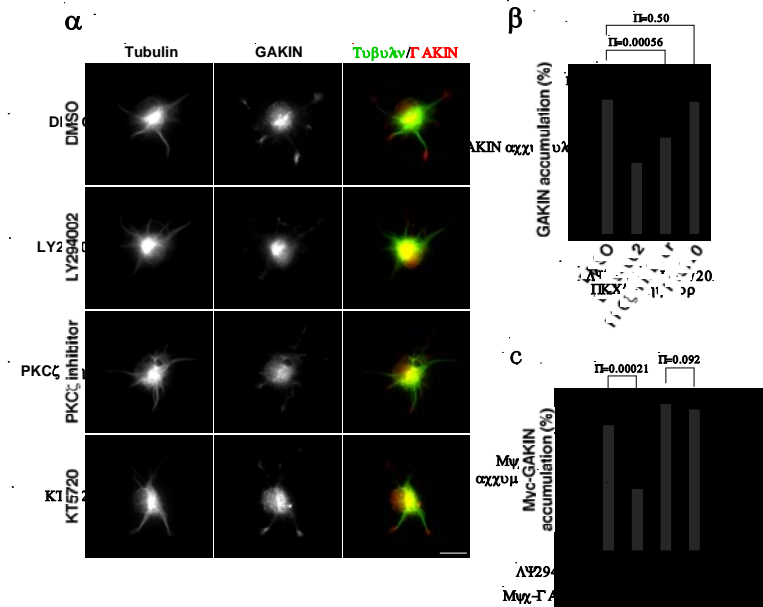


**Fig. 5** GAKINは軸索の過形成を引き起こす (a) 神経細胞を播種後48時間でMyc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (b) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (c) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (d) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (e) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (f) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (g) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (h) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (i) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (j) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (k) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (l) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (m) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (n) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (o) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (p) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (q) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (r) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (s) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (t) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (u) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (v) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (w) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (x) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (y) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m (z) Myc-GAKINをGFPと共にトランスフェクションで発現させた。黄線で囲った範囲のGFPおよびTau-1染色図は拡大して右に示した。Bar 20  $\mu$ m

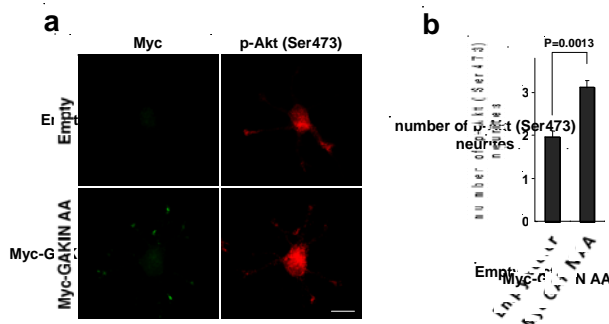
軸索決定過程における GAKIN の制御機構を調べるために、極性決定前の stage 2 での PI3K 阻害剤 (LY294002) および aPKC 阻害剤の処理による GAKIN の局在変化を調べてみた。またコントロールとして PKA 阻害剤 (KT5720) の処理を行った。その結果、コントロール (DMSO, KT5720) では GAKIN が神経突起の先端に集積していたが、LY294002 と PKC $\zeta$ 阻害剤では GAKIN の集積が著しく阻害されていた (Fig. 6a and b)。Myc-GAKIN を発現させて LY294002 処理をするとやはり突起先端への集積が阻害されたが、Myc-GAKIN AA の集積は阻害されなかったことから、この効果が Par1b のリン酸化依存的なものであると示唆された (Fig. 6c)。これらの結果から、GAKIN の集積は、PI3K シグナルの下流において Par1b リン酸化依存的に制御されると示唆された。

GAKIN は centaurin- $\alpha$ 1 との結合を介して PIP3 を含むリン脂質小胞を微小管上のプラス端方向に輸送することが知られている。それゆえ、GAKIN が PIP3 を突起先端に輸送し、集積させることが軸索の決定に貢献している可能性がある。PIP3 に結合することが知られているリン酸化 Akt (Ser473) の局在を観察することにより内在性 PIP3 の局在を調べた。通常、stage 2 の細胞では平均 2 本の神経突起の先端にリン酸化 Akt (Ser473) のシグナルが観察されたが、Myc-GAKIN AA を発現させた細胞ではその数が約 1.5 倍増加し、またリン酸化 Akt (Ser473) のシグナルが

Myc-GAKIN と共局在していた。逆に、GAKIN をノックダウンした細胞で、リン酸化 Akt (Ser473) シグナルをもつ神経突起の数は減少した。これらの結果から、GAKIN が神経突起の先端に PIP3 を集積させ、軸索の決定に貢献していることが示唆された。



**Fig. 6** PI3KはPar1/GAKINの上流で機能する (a) 播種24時間後の海馬神経細胞を LY294002 (20 mM)、aPKC阻害剤 (10 mM)、KT5720 (200 mM) で処理し、さらに24時間後に抗Tubulin抗体と抗GAKIN抗体で染色した。Bar 10 μm (b) 各阻害剤で処理した時にGAKINが神経突起先端に集積している細胞の割合を示す。(c) Myc-GAKINおよびMyc-GAKIN AAを発現させてLY294002処理した時、それぞれが神経突起先端に集積している細胞の割合を示す。



**Fig. 7** GAKINはPIP3局在を調節する (a) 海馬神経細胞にMyc-GAKIN AAを発現させ、stage 2で抗リン酸化Akt抗体 (Ser473) で染色した。Bar 10 μm (b) Empty, Myc-GAKIN, Myc-GAKIN AAを発現させた細胞中のp-Akt (Ser473) 陽性細胞の数を示す。

以前に報告された *in vitro* での結果と一致して、*in vivo* でも GAKIN が PIP3 の局在を調節

していることを示した。一方、PI3K 阻害剤を用いた実験では、PI3K の生成する PIP3 の下流で Par1 のリン酸化依存的に GAKIN が制御されていることがわかった。つまり、Par1/GAKIN を介する PIP3 集積のフィードバック機構が考えられる (Fig. 8)。これまで PIP3 は合成や分解で制御されていると考えられてきたが、軸索の先端での非常に密な局在を考慮した場合、細胞質内に拡散している PIP3 を積極的に集積している可能性も考えられる。実際に PIP3 が軸索のシャフト内を移動していると言及されていることから、この Par1/GAKIN を介したフィードバック機構が存在している可能性は高い。今後、さらに PIP3 集積過程のイメージング解析などを行うことで、この機構を解明していくことが望まれる。

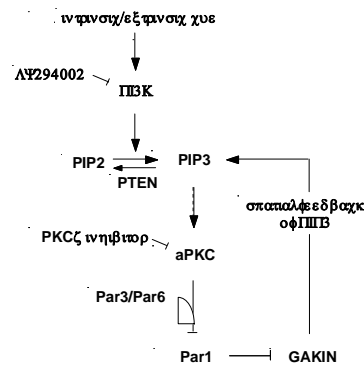


Fig. 8 Par1/GAKINを介するPIP3のフィードバック機構