

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 一ノ瀬 聡太郎

本研究は、シナプスの形成に必要な N-cadherin の輸送が、プロテインキナーゼ A (PKA) による KIF3A のリン酸化によって制御されていることを分子生物学的手法を用いて示したものであり、下記の結果を示している。

1. 海馬初代培養細胞内において、培養開始後 5 日後、12 日後、19 日後に、KIF3A による N-cadherin 輸送を観察したところ、樹状突起ではシナプス形成に応じて N-cadherin の輸送が上昇していた。
2. 細胞分画法を用いて、N-cadherin を輸送している KIF3A としていない KIF3A を分画し、リン酸化された KIF3A の割合を調べたところ、N-cadherin を輸送している KIF3A の方がよくリン酸化されていた。そこで、このリン酸化部位を特定するために全脳から精製した KIF3A のリン酸化部位を質量分析にて解析したところ、689 番セリンのリン酸化を同定した。
3. 689 番セリンのリン酸化を担うキナーゼを同定するため、大腸菌から発現、精製した KIF3A を数種類のキナーゼと反応させリン酸化レベルを調べた。その結果 KIF3A は PKA・PKC・RSK・CaMKII によってリン酸化されることが示された。さらに、各々のキナーゼのリン酸化部位を質量分析により定量分析し、PKA、PKC、RSK の 3 種類が 689 番セリンをリン酸化し、CaMKII はこの部位をリン酸化していなかった。また、3 種類のうち PKA によるリン酸化が最も優位であった。
4. 大脳初代培養細胞を forskolin により刺激したところ、刺激後の時間経過とともに KIF3A のリン酸化の上昇がみられたことから、細胞内でも KIF3A は PKA によってリン酸化されていることが示された。
5. 689 のセリンのリン酸化がシナプス形成にどのような影響を及ぼすか調べるために、KIF3A の疑似リン酸化変異体 (S689E) および、疑似脱リン酸化変異体 (S689A) を海馬初代培養細胞で発現させたところ、S689E ではスパインヘッドの肥大化が観察された一方で、S689A では糸状の構造物が観察され、統計上はスパインの長さは変わらないが、幅が S689E では長く、S689A では短いことが観察された。また、S689E では N-cadherin

がスパインヘッドにも局在するのに対し、S689A では N-cadherin はスパインヘッド内には局在しないことから、KIF3A の 689 番セリンのリン酸化によって、N-cadherin を正常にスパインヘッドまで運ぶことができシナプスが形成されることが示された。

6. KIF3A の 689 番セリンのリン酸化によって KIF3A と N-cadherin 間の結合がどのように変化するかを *in vitro* での結合実験により調べ、S689A よりも S689E のほうがより強く結合しているという結果を得た。このことから、KIF3A の 689 番セリンのリン酸化により、KIF3A と N-cadherin との結合が上昇することが分かった。

以上の結果より、PKA が KIF3A の 689 番セリンをリン酸化することにより、KIF3A と N-cadherin との結合が上昇し、その結果 KIF3A は N-cadherin をスパインヘッドまで輸送してシナプス形成を促進するというモデルを示した。本研究は、未知の部分が多い神経細胞内物質輸送の制御メカニズムを解明するために、高精度のリン酸化部位解析とキナーゼの同定および神経細胞内輸送の可視化を行い、荷物認識部位のリン酸化による制御モデルを提唱しており、学位の授与に値する内容であると考えられる。