



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	KLC1リン酸化によるJIP1-KLC結合およびAPP軸索輸送制御の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	千葉, 杏子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12277号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62161
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kyoko_Chiba_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 千葉 杏子

学 位 論 文 題 目

KLC1 リン酸化による JIP1-KLC 結合および APP 軸索輸送制御の解析

Kinesin-1 は KHC (Kinesin Heavy Chain)、KLC (Kinesin Light Chain)から構成される 4 量体であり、神経細胞において順行性軸索輸送を担う主要なモータータンパク質である。モータードメインを有する KHC に対し、KLC は cargo の接続やモータードメインの制御を担うことで輸送の調節や多様性に寄与していると考えられる。KLC と相互作用する分子として、アルツハイマー病原因遺伝子産物である APP が知られている。APP は一回膜貫通型タンパク質であり、APP 細胞質ドメインはアダプタータンパク質 JIP1b を介し KLC に結合する。当研究室において JIP1 遺伝子欠損マウスを用いた実験などにより、APP 小胞の順行性軸索輸送は JIP1b-KLC 結合依存的に高速・高頻度に維持されることを報告している。また、同じく Kinesin-1 のカーゴでありながら、JIP1b を介さずに KLC と相互作用する積み荷である Alcadin α は、APP のような高速では輸送されず、むしろ JIP1 遺伝子欠損時における APP 輸送速度と近い速度であることを明らかにしてきた。これらの結果は JIP1 が Kinesin-1 の輸送速度を高速にする機能を持つこと、また APP が他の積み荷とは異なる高速輸送を受ける積み荷であることを示唆している。しかしながら、JIP1b と KLC の相互作用がどのように制御され、どのようなメカニズムで APP 輸送の効率化を行っているかは未だ明らかではない。そこで本研究では JIP1b-KLC 結合の制御機構と、その結合変化が APP 輸送に果たす役割について解析した。

本研究においては KLC ファミリーのうち APP 軸索輸送に関して主要な役割を果たすと考えられる KLC1 を解析対象とした。JIP1b 及び KLC1 はともにリン酸化タンパク質であることが報告されていることから、JIP1b-KLC1 結合制御機構として、初めにリン酸化修飾による結合能変化の可能性を検討した。JIP1b あるいは KLC1 を発現させた細胞をホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸で処理することで細胞内タンパク質のリン酸化レベルを相対的に上昇させた。細胞抽出液を調整した後、JIP1b、KLC1 発現細胞(阻害剤処理有・無)の抽出液を任意の組み合わせで混和し、共役免疫沈降法により JIP1b-KLC1 間の結合強度を検証した。その結果、KLC1 側をホスファターゼ阻害剤で処理することで、両者の結合は大きく減弱することが明らかとなった。そこで JIP1b との結合を制御する KLC1 リン酸化サイトの同定を行った。KLC1 を過剰発現させた細胞をホスファターゼ阻害剤で処理したのち、細胞抽出液より KLC1 を精製し、酵素消化後、LC-MS/MS による解析を行った。APP 輸送調節には JIP1b-KLC1 間の C 末端側の結合が重要だが、その結合部位である KLC1 TPR ドメイン内に、複数のリン酸化部位を同定した。それらリン酸化部位のアミノ酸置換 KLC1 変異体を作成し、JIP1b との結合能を検証した。リン酸化状

態を模倣したグルタミン酸置換変異により JIP1b との結合減弱が見られる残基を探索した結果、KLC1 TPRドメイン中の Thr 残基を JIP1b との結合を制御する候補部位として同定した。

続いて KLC1 リン酸化体の存在の有無を確認する為、リン酸化特異抗体を作成した。リン酸化ペプチドをウサギに免疫し、得られた抗血清をリン酸化ペプチドを用いた Affinity Purification により精製したのち、非リン酸化ペプチドカラム・リン酸化 Thr カラムを通過させ、精製抗体を得た。作成した抗体を用い、リン酸化 KLC1 の検出を行った。KLC1 を過剰発現させた細胞をオカダ酸で処理し、細胞抽出液より KLC1 を回収した。これをサンプルとしてリン酸化特異抗体による Western Blot を行った結果、ホスファターゼ阻害剤処理後の野生型 KLC1 においてシグナルが検出された。リン酸化部位のアミノ酸置換変異体や脱リン酸化処理を行ったサンプルではシグナルが検出されないことから、得られたシグナルは確かにリン酸化に由来するものであり、また配列特異的なシグナルであることが確認された。従って KLC1 リン酸化体が細胞内に存在することが実証された。

ここまでの実験において KLC1 TPRドメイン内の Thr リン酸化が JIP1b との結合を制御していることを示した。そこで、リン酸化を模倣した KLC1 変異体が神経突起中の APP 輸送に与える影響を検証した。分化誘導を行った神経由来細胞に APP-EGFP を導入し、内在性 KLC をノックダウンした上で野生型 KLC1 或いは KLC1 変異体を共発現させた。突起中の APP-EGFP 小胞を全反射顕微鏡により観察した所、野生型 KLC1 や KLC1 非リン酸化模倣変異体発現下では、突起中 APP 小胞の順行性輸送速度は、APP-EGFP 単独発現時と同様であるのに対し、KLC1 リン酸化模倣変異体発現下では JIP1 ノックダウン時同様、輸送速度の低下が観察された。したがって KLC1 Thr リン酸化模倣体存在下では JIP1 依存的な APP 高速輸送は維持されていないと考えられる。

以上の結果より私が同定した KLC1 Thr のリン酸化は、KLC1 の JIP1b との結合状態を変化させることで APP 輸送を制御することが示唆された。このリン酸化は APP のみならず、JIP1 を介して結合する多くのカーゴ分子についても同様の機能を発揮することが推測される。また本研究においては輸送速度の検証に留まったが、KLC1 のリン酸化は他の局面においても機能を発揮する可能性が高いと考えられる。たとえば JIP1b と KLC の結合状態は Kinesin-1 の活性化能を持つことから、Kinesin-1 が輸送を開始する際の効率の調節、あるいは輸送終了時におけるカーゴの解離およびモーターの不活性化などに働く可能性が考えられる。今後このリン酸化について解析を深めることで、Kinesin-1 による輸送を制御する動的仕組みを解明できると考えられる。また、APP の場合、疾患原因物質であるアミロイドβの産生は細胞内局在と密接に関与することが知られており、APP 小胞の順行性軸索輸送の停滞はアミロイドβの産生を促進することが既に報告されている。本研究により APP 輸送の制御機構を明らかにしたことは、アルツハイマー病発症の分子メカニズムを解明する上でも重要であると考えられる。