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［全文の要約］
Author(s)	千葉, 杏子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/62162
Type	doctoral thesis
File Information	Kyoko_Chiba_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

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 名

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、KLC 各 2 分子から構成される 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分子モーターである。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 I 型膜タンパク質であり、アダプタータンパク質 JIP1b を介し KLC に結合する。当研究室においては神経細胞における APP 小胞の順行性軸索輸送は JIP1b-KLC 間の結合依存的に高速に維持されることを報告している。本研究では、JIP1b-KLC 結合による軸索輸送高速化の制御機構の解明に取り組んだ。

JIP1b-KLC1 結合の制御機構として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し、細胞抽出液を任意の組み合わせで混和した後、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した。そこで LC-MS/MS により 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。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 ドメイン内にリン酸化部位を同定した。またその部位のグルタミン酸置換変異体において JIP1b との結合減弱が見られることを確認した。

また、KLC1 リン酸化体の存在を確認する為、リン酸化特異抗体を作成し、細胞抽出液より回収した KLC1 を Western Blot により検出した。野生型 KLC1 においてシグナルが検出された一方、リン酸化部位のアミノ酸置換変異体や脱リン酸化処理後の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部位特異的リン酸化に由来し、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 との結合を制御しうることを示した。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結果、細胞突起中の APP 輸送速度は KLC1 リン酸化模倣変異体発現下で低下した。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、APP 輸送を制御することが示唆された。これはモーターの速度多様性のメカニズムを解明する上で重要な知見である。