



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Kinesin-1カーゴ分子Alcadein α の神経軸索輸送機構の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	蘇武, 佑里子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13175号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69379
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuriko_Sobu_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 蘇武 佑里子

学 位 論 文 題 名

Kinesin-1 カーゴ分子 Alcadin α の神経軸索輸送機構の解析

【序論】

神経細胞は細胞体、樹状突起、最長で 1 m にもなる長い軸索を持つ。神経細胞の正常な活動のためには、効率的で制御された軸索輸送のシステムが必要である。Alcadin α (Alc α) は神経系に発現する I 型膜タンパク質であり、Kinesin-1 と直接結合・活性化することで神経軸索上に輸送される。Alc α は様々なカーゴ(積み荷)を含む Alc α 小胞として神経軸索上に輸送され、神経軸索分岐や軸索ガイダンスなどの正常な軸索形成に寄与することが報告されている。しかし、Golgi 体における Alc α 小胞の形成や、小胞に含まれるカーゴを選別するメカニズムなどの分子機構は不明である。また、軸索輸送はカーゴの必要性に応じて制御されると考えられるが、Alc α 小胞の輸送の制御機構が存在するかも不明であり、Alc α 輸送機構の多くの点は未解明である。本研究では、Alc α が細胞質ドメインでリン酸化を受けることに着目し、Alc α 軸索輸送の制御機構および輸送開始時のメカニズムについて解析を行った。

【結果・考察】

Alc α は Kinesin-1 結合モチーフが存在する細胞質ドメインに多くのリン酸化コンセンサス配列を持つ。実際にマウス脳内で Alc α 細胞質ドメインがリン酸化される事を確認し、Alc α の軸索輸送を担う Kinesin-1 への結合をリン酸化が制御するか検討した。Alc α と Kinesin-1 の構成分子である KLC1 との結合を *In vitro* 結合実験により解析した結果、Alc α の脱リン酸化処理によって Alc α に結合する KLC1 量が有意に減弱することを見いだした。以上の結果より、Alc α はリン酸化により Kinesin-1 結合を制御することが示唆された。

続いて Kinesin-1 の結合を制御するリン酸化部位の同定を行った。細胞質ドメインの部分欠失体や Alanine scanning によりリン酸化部位の同定を行った結果、2 つの Kinesin-1 結合モチーフの中間に位置する Acidic region 中の S940/S942/S943 の 3 残基のセリン残基のリン酸化が Kinesin-1 への強固な結合に必要であることを明らかにした。

次に、リン酸化が Alc α 軸索輸送を制御するか検討するため、初代培養神経細胞に GFP タグを付加した Alc α WT 及び非リン酸化模倣変異体である Alc α 3A(S940A/S942A/S943A)を発現させ、全反射顕微鏡による Live imaging により輸送を観察した。Alc α WT-EGFP の輸送速度は、既知の Alc α 及び Kinesin-1 による輸送速度と一致していた。一方で、Alc α 3A-EGFP の輸送速度は、Alc α WT-EGFP よりも有意に高速で輸送されていた。また、KLC 結合モチ

ーフ中の WD 配列を Ala に置換した Kinesin-1 非結合変異体(Alc α WDAA-EGFP)についても Alc α 3A-EGFP と同様に高速な軸索中の輸送が観察された。以上のことから、Alc α は Kinesin-1 が結合できない場合でも軸索中を輸送されるが、その速度は Alc α WT よりも高速であることが示された。

Alc α が高速に輸送される原因として、APP(Amyloid precursor protein)の関与を推察した。APP は JIP1 を介して Kinesin-1 と結合し、軸索中を Alc α よりも高速で輸送される膜タンパク質である。Alc α の細胞質ドメインは X11L を介して APP と結合し Golgi 体において三量体として存在し、解離した後にそれぞれ別の輸送小胞を形成すると考えられる。Alc α -FLAG と内在性 APP の共免疫染色を行った結果、神経軸索において Alc α WT-FLAG の小胞はほとんどの APP 小胞と独立に存在しているのが観察された。一方で、Alc α 3A-FLAG、Alc α WDAA-FLAG は多くの小胞が APP と共染色されていた。このことから、Kinesin-1 に結合できない状態の Alc α は APP 小胞に入り込むことで軸索中を高速に輸送されていることが示唆された。

Alc α 3A-FLAG において Alc α 特異的な小胞がほとんど観察されなかったことから、Alc α の Golgi 体における輸送小胞の形成は Kinesin-1 への結合を必要とすることが示唆された。この検討のために Brefeldin A(BFA)を用いた解析を行った。BFA は Arf GTPase の阻害剤であり、Golgi 体を可逆的に崩壊させることで Golgi 体からの小胞輸送を阻害する。BFA を含む培地で細胞を培養後、washout し BFA を除くことで約一時間後に Golgi 体が再建され、続いて Golgi 体から細胞全体への輸送が観察できる。BFA を用いて、CAD 細胞における Golgi exit 観察した結果、washout 後 2-4 時間では、Alc α WT-EGFP は Golgi 体から細胞全体へ分布している様子が観察されたのに対して、Alc α 3A-EGFP、Alc α WDAA-EGFP は Golgi 体に留まっている割合が有意に多かったことから、Kinesin-1 と結合できない Alc α は Golgi 体からの輸送効率が低いことが示された。

【総括】

本研究では、Alc α の細胞質ドメインにリン酸化予測配列が高頻度に存在することに着目し、カーゴ側のリン酸化による結合制御の可能性を検討した。その結果、Alc α の細胞質ドメインがマウス脳内でリン酸化されていること、Alc α の脱リン酸化が KLC との結合を減弱させることを示した。また、Alc α のリン酸化により制御される Kinesin-1 への結合が Golgi 体における Alc α 特異的な小胞の形成に必要であるという、新規 Alc α 輸送メカニズム・制御メカニズムを明らかにした。Alc α 輸送小胞は小胞内に含まれるカーゴを軸索末端に向けて輸送することで機能を発現すると考えられる。Alc α のリン酸化は、軸索末端におけるカーゴの必要性に応じて Alc α 輸送小胞の形成・輸送を促進する制御シグナルとして機能する可能性が示唆された。