

研究題目 微小管多型制御因子の同定

研究組織

研究代表者：岡田康志（理化学研究所）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：神原丈敏（理化学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

神経細胞や上皮細胞などの極性を持った細胞では、タンパク質は細胞極性に従って機能すべき場所に局在することが必要である。特に、神経軸索には、軸索構造の維持や軸索末端のシナプスで機能するタンパク質などを輸送する必要があり、軸索輸送を担っているキネシンは、数多くの神経突起の中から1本しかない軸索を見つけ出さなければならない。しかし、細胞極性に従って正しい目的地へと物質を輸送する機構は、ほとんど分かっていない。

我々は、軸索輸送を担うキネシン(KIF5)が、ATPase活性と微小管結合部位を有するモータードメインのみでも軸索の微小管に選択的に結合し、軸索と樹状突起の微小管を区別して輸送するというsmart motor仮説を提唱してきた。その分子基盤として、微小管の構造がGTP結合型とGDP結合型で異なり、KIF5はGTP結合型微小管への親和性が高く、神経細胞軸索基始部にGTP結合型の微小管が密集していることを示してきた。さらに最近、KIF5は非神経細胞でも特定の微小管に選択的に結合し、生細胞内で反応速度論的解析を行うことで細胞内ではKIF5との親和性が異なる複数の微小管の存在を明らかにした。そこで本研究では、微小管とキネシンとの親和性を変化させる制御因子を同定することで微小管構造多型制御機構の解明を目指す。

[1-2]研究の方法・経過

KIF5は、特定の微小管に選択的に結合し、神経細胞内では軸索に局在する。微小管の安定化剤であるタキソール存在下では、KIF5はこの選択性を失い、樹状突起の微小管にも結合する。

この性質を利用して、KIF5-TurboID融合タンパク質を±タキソールで処理した神経細胞の微小管に結合させてビオチンラベルすることで、KIF5が選択的に結合している微小管近傍のタンパク質の同定を試みた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

KIF5-TurboIDを界面活性剤によって脱膜したセミインタクト神経細胞とインキュベートしてビオチン標識を行い、全反射顕微鏡下でセミインタクト神経細胞内でのKIF5-TurboIDによるビオチン化の確認を行った。タキソール比存在下では軸索特異的に、タキソール存在下では軸索および樹状突起で蛍光ストレプトアビジンのシグナルを確認し、本研究の基盤となる技術を確立することができた。

質量分析法により、軸索の微小管上のKIF5-TurboID結合制御因子の解析を行ったが、軸索特異的に局在する既知のタンパク質であるタウやMAP7は検出されなかった。特にMAP7はKIF5と相互作用することが報告されており、今後は様々なKIF5-TurboIDタンパク質を試す必要があると考えられた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究は、セミインタクト細胞を用いることから、生細胞よりも条件検討が容易で、新たな実験系として多様な分野への波及効果が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表
なし

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

軸索特異的タンパク質として知られている
タウや MAP7 は検出されなかった。これらのタン
パク質は TurboID からの距離が離れているか
らであると考えられ、今後は KIF5 と TurboID
の相対的な位置関係を変えた KIF5-TurboID を
用いて解析を行う予定である。また、TurboID
よりも標識距離が長い APEX2 など試す予定
である。