

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）

研究分担者：Xue Li（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、キネシンが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、生細胞内での反応速度論的解析によって、細胞内では KIF5 との親和性が異なる微小管が存在することを明らかにした。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

マウス海馬神経細胞を Triton-X100 処理により脱膜したセミインタクト神経細胞に、精製した近位依存性ビオチン化酵素と KIF5 の融合タ

ンパク質をインキュベートすることで、微小管に結合した KIF5 近傍のタンパク質をビオチン化する。プロテオーム解析によりビオチン化されたタンパク質を同定する。

当初、TurboID/KIF5 融合タンパク質を用いて実験を行っていたが、TurboID では、反応中に微小管の安定性が維持できないことがわかり、反応時間が短い APEX2 を用いることとした。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

APEX2/KIF5-GFP を発現・精製し、微小管の状態を維持するために用いられる PEM バッファー (100mM PIPES pH6.8, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, 30% Glycerol) 下でのペルオキシダーゼ活性のチェックを行ったところ、グリセロール存在下ではペルオキシダーゼ活性が阻害されることが判明した。

グリセロール非存在下では微小管は室温では数分で脱重合してしまう。そのため、グリセロール非存在下でもセミインタクト神経細胞の微小管が維持できる条件を検討し、APEX2/KIF5-GFP によるビオチン化を行った。ビオチン化タンパク質を Alexa Fluor 594-streptavidin で標識して顕微鏡で観察したところ、GFP シグナルと Alexa Fluor 594 シグナルが共局在している微小管様の構造が確認できた。一方、Alexa Fluor 594 シグナルのみが見られる、非特異的な標識も確認された。ウェスタンブロットによっても非特異的標識の存在が確認され、APEX2 が本研究には適さないことが明らかになった。

[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

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後は、AirID やラッカーゼなど、TurboID やAPEX2 以外の近位依存性ビオチン化酵素を試みることで、セミインタクト神経細胞に適した近位依存性ビオチン化酵素を探索する。