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。特に神経軸索では、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、KIF5 は非神経細胞でも特定の微小管に選択的に結合すること、生細胞内での反応速度論的解析により細胞内では KIF5 との親和性が異なる、数種類のタイプの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

Triton-X100 処理により脱膜したセミインタクト細胞に、精製した近位依存性ビオチン化酵素-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の網羅的探索を行う。

KIF5 は ATP を加水分解しながら微小管上を約 1 マイクロメートル/秒の速さで移動するため、TurboID との相性は良くない。そこで ATP 存在下でも微小管から解離しない KIF5 変異体と TurboID の融合タンパク質を用いることで、ダイナミックにおこる KIF5 と微小管の結合解離反応をフリーズさせて KIF5 近傍タンパク質のビオチン標識を試みた。KIF5 変異体と TurboID の融合タンパク質を発現・精製し、セミインタクト U2OS 細胞と反応させてビオチン標識を行った。全反射顕微鏡による直接観察およびウエスタンブロットにより、ビオチン化標識を確認した。現在、反応条件の検討を行っているところである。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

これまで、APEX2 を用いて近接依存性標識を行ってきたが、APEX2 の非特異的標識などの問題により、セミインタクト細胞でのビオチン化は成功していなかった。TurboID-KIF5 変異体を用いることで、KIF5 が ATP 非依存的に微小管に結合し、TurboID によるビオチン化標識が可能であることを示した。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

キネシンと微小管の相互作用という動的な現象をフリーズさせて近傍タンパク質をビオチン化標識できる本手法は、他のキネシンファミリーだけでなく、他のモータータンパク質への応用が可能であり、細胞内輸送メカニズムの

解明への手掛かりになることが期待される。

セミインタクト細胞を用いたアプローチであるため、トランスフェクションや遺伝子操作が必要ない。よって、それらの操作が難しい細胞への適用が可能である。

【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

本年度は U2OS 細胞を用いて TurboID-KIF5 変異体の検証を行った。今後は、マウス海馬神経細胞を用いて実験を行い、候補タンパク質を同定する。さらに、それらの候補タンパク質から、微小管とキネシンの親和性を変化させる制御因子を同定する。