

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つ細胞では、タンパク質が適切な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の輸送が不可欠であり、この輸送を担うキネシンは、数多くの神経突起の中から唯一の軸索を正確に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、ほとんど解明されていない。

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、微小管の構造は GTP 結合型と GDP 結合型で異なり、KIF5 は GTP 結合型微小管に対する親和性が高いこと、さらに神経細胞軸索基始部には GTP 結合型微小管が密集していることを示してきた。また、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り、細胞内には KIF5 との親和性が異なる複数の種類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、微小管とキネシンの親和性を変化させる制御因子を同定し、微小管構造の多型制御機構を解明することを目指す。

[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神経細胞に、精製した近位依存性ビオチン化酵素 (TurboID) と KIF5 の融合タンパク質を反応させ、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。これにより、プロテ

オーム解析を用いてビオチン化されたタンパク質を網羅的に探索する。

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、動的に生じる KIF5 と微小管の結合解離反応をフリーズさせ、KIF5 近傍のタンパク質を効率的にビオチン化することを試みた。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

顕微鏡観察により、TurboID-KIF5 変異体が ATP 存在下で神経軸索起始部の微小管に選択的に結合し、蛍光ストレプトアビジン染色によりビオチン化が確認された。

KIF5 が、神経軸索起始部の微小管に選択的に結合する条件と、薬剤添加により選択性が失われ、すべての微小管に結合する条件で質量分析を行い、それぞれの条件で同定されたタンパク質を比較した。その結果、KIF5 が特定の条件下で微小管に結合した際に、有意に蓄積するタンパク質を同定した。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本手法は、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、近傍タンパク質をビオチン化標識することが可能である。そのため、KIF5 に限らず他のキネシンファミリーや、さらに他のモータータンパク質にも応用できると考えられ、細胞内輸送メカニズムの解明に貢献することが期待される。また、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。そのため、これらの操作が困難な細胞への適用が可能であり、広範な応用が期待される。

【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

今回同定したタンパク質の中には、神経軸索起始部の微小管に局在し、KIF5の微小管へのリクルートに関与するMAP7や、軸索微小管に特異的に結合するタウタンパク質は含まれていなかった。このことから、今回用いたTurboID-KIF5変異体では、微小管とキネシンの親和性を変化させる制御因子を完全には同定できていない可能性がある。今後は、異なるTurboID-KIF5変異体コンストラクトを作製し、さらなる解析を進める。