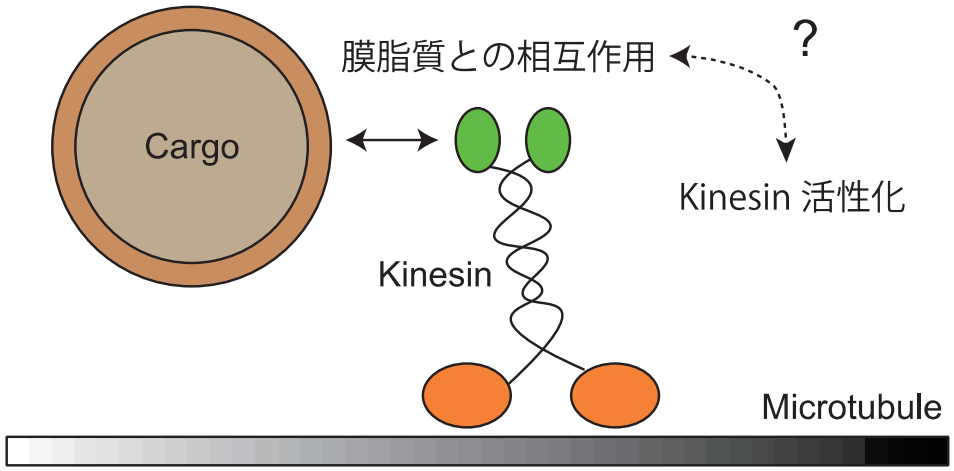
128　キネシン活性化に果たすオルガネラ膜脂質の機能解明	千葉　杏子

【目的】モータータンパク質の一つであるキネシンは細胞内において微小管プラス端方向すなわち順行性の積み荷（カーゴ）輸送に携わる。キネシンは直接あるいはアダプタータンパク質を介して間接的にカーゴ膜と相互作用することが知られている。脂質膜との相互作用がキネシンの運動活性にどのような役割を果たすのかはこれまで明らかにされていない。当研究ではキネシンスーパーファミリーのうち神経特異的に発現しシナプス小胞輸送に携わることが知られている KIF1A に着目した。KIF1A と膜脂質との相互作用がどのように調節されているか、またその相互作用とモーター活性の関係姓を明らかにするため精製 KIF1A タンパク質を用いた生化学的な解析を行った。

【方法】ヒト KIF1A 全長タンパク質を精製し解析に用いた。C 末端に蛍光タンパク質である mScarlet、またアフィニティー精製のための StrepⅡタグを付加した KIF1A を Bac to Bac システムを用いて昆虫細胞（Sf9 細胞）で発現した。細胞を可溶化後 StrepⅡによるアフィニティー精製を行った。得られたタンパク質を用いてゲル濾過クロマトグラフィー、SDS-PAGE を行った。また KIF1A タンパク質の分子会合状態を明らかにするため Mass Photometry 法による分析を行った。

【結果】野生型 KIF1A は小胞膜と殆ど相互作用しない一方、モータードメインを欠損した変異体である KIF1AΔMD は小胞膜と相互作用することがこれまでに報告されてきた。今回の解析により野生型 KIF1A が単量体と二量体の平衡状態であること、野生型 KIF1A と異なり KIF1AΔMD は安定な二量体を形成することが明らかとなった。二量体形成は KIF1A の微小管上の運動においても重要である。一連の結果から、膜脂質がカーゴ膜上への活性型 KIF1A の選択的リクルートに働くことが示唆された。

カーゴ膜との相互作用とモーター活性の制御



128. キネシン活性化に果たすオルガネラ膜脂質の機能解明

千葉　杏子

東北大学 学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部

Key words：モータータンパク質，キネシン，微小管，膜脂質

緒　言

細胞内には膜で覆われた多種の細胞内小器官（オルガネラ）が存在する。それらオルガネラの多くはモータータンパク質の積み荷（カーゴ）として細胞内輸送を受ける。細胞内輸送によるオルガネラの適切な分布・局在は細胞の機能維持に不可欠である。特に複雑な形態をもつ神経細胞のような細胞種においてカーゴ輸送は厳密に制御されていると考えられる。モータータンパク質の一つであるキネシンは微小管のマイナス端からプラス端すなわち順行性の小胞輸送に携わる［1］。キネシンには多くの種類が存在し、キネシンスーパーファミリー（Kinesin Super Family : KIF）と呼ばれる。すべての KIF がカーゴ輸送に携わるわけではないが、多くは間接的あるいは直接的にオルガネラ膜と相互作用することが知られている。一方、脂質膜との相互作用がどのように制御されているか、また脂質との相互作用がモーターの運動活性にどのような役割を果たすのかは未だ明らかでない。Kinesin-1 としてよく知られる KIF5 をはじめとして KIF の多くは自己阻害により制御される。KIF とカーゴの結合を担うアダプタータンパク質が KIF の自己阻害を解く活性化因子と予想されてきたが、最近の研究からアダプタータンパク質の結合だけでは KIF は十分に活性化しないことが明らかになってきた［2］。そこで本研究ではカーゴ自体の成分である膜脂質がキネシン活性化に果たす役割および膜脂質とキネシンの結合制御機構の解明に取り組んだ。特に神経細胞に発現しシナプス小胞前駆体の輸送に携わることが知られている KIF1A の解析を行った。KIF1A は線虫から哺乳類まで進化上高度に保存されており、シナプス小胞前駆体のほかリソソームや Dense Core Vesicle（DCV）などの輸送に携わる［3］。これまでに痙性対麻痺など神経変性疾患のほか発達障害や自閉症などの広範な神経疾患に KIF1A が関わることが報告されている。KIF1A は C 末端に脂質結合ドメインとして知られる PH ドメインを有する。KIF1A の PH ドメインはホスファチジルイノシトールへ結合することが知られており、また脂質との相互作用がモーター活性化に寄与することが報告されてきた［4，5］。KIF1A の線虫オルソログである Unc-104 において、PH ドメインの 1 アミノ酸置換変異によりシナプス小胞の輸送は阻害される［6〜8］。シナプス小胞輸送に PH ドメインを介した KIF1A と脂質の結合は重要と考えられる。細胞内において全長 KIF1A は PH ドメインを有するにもかかわらず小胞膜と殆ど相互作用しない一方、モータードメインを欠損した KIF1AΔMD は小胞膜と相互作用できることが報告されてきた［8］。本研究では KIF1AΔMD の生化学的解析に取り組んだ。その結果、膜脂質がカーゴ膜上への活性型 KIF1A の選択的リクルートに働くことが示唆された。

方　法

1. 昆虫細胞を用いた KIF1A タンパク質の発現

C 末端に蛍光タンパク質である mScarlet、アフィニティー精製のための StrepⅡタグを付加したヒト KIF1A を Bac to Bac システムを用い昆虫細胞で発現した。バクミドの調製は DH10Bac を用い常法にて行った。昆虫細胞 Sf9 は Sf -900Ⅱ培地中、27℃のインキュベーターを用いて回転式シェーカー（120 rpm）で浮遊培養した。タンパク質の発現は細胞密度 2×10^{6} cells/ml の Sf9 細胞 300 ml にバキュロウイルス液を加え 65 時間培養する

ことで行った。細胞は 3,000×g で遠心することで回収し、液体窒素で凍結したのち−80℃で保存した。

2. タンパク質精製

融解した Sf9 細胞に 30 ml の Protein Buffer（25 mM Hepes、150 mM Kace、2 mM MgSO4、10% Glycerol（pH7.5）、1 mM PMSF、1 mM ATP、0.5% TritonX-100）を加え懸濁した。懸濁液を 15,000×g で 30 分遠心することで上清を得た。上清は Strep-Tactin XT ビーズを充填したカラムを用いてアフィニティー精製した。カラムに上清を通したのちレジン容量の 5 倍量の Protein Buffer により洗浄し、100 mM Biotin を含む Protein Buffer を用いて溶出した。溶出液は 100 MWCO のコンセントレーターを用いて濃縮し、液体窒素で凍結したのち−80℃で保存した。

3. ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィーは NGC クロマトグラフィーシステム（Bio-Rad）を用いて行った。カラムは BioSep SEC-s4000 7.8×600 mm（Phenomenex 社）を用いた。タンパク質溶液 500 μl をインジェクションしたのち GF150 Buffer（25 mM Hepes、150 mM KCl、2 mM $MgCl_2$、pH7.2）を流速 0.8 ml/min で通液することで溶出し、UV 280 nm の吸光で検出した。得られた画分は SDS-PAGE を行ったのち目的タンパク質の含まれる画分を回収、濃縮した。

4. Mass photometry による解析

25 mM HEPES、150 mM KCl、2 mM $MgCl_2$（pH 7.2）を用いて KIF1A タンパク質を終濃度 5 nM に希釈し Refeyn OneMP（Refeyn 社）を用いて測定を行った。データ解析は Refeyn DiscoverMP を用いた。分子量の校正は BSA を使用した。

結果および考察

1. KIF1A の分子会合状態について

まず野生型の全長 KIF1A を精製しゲル濾過クロマトグラフィーによる解析を行った。野生型 KIF1A は単量体および二量体相当の位置にそれぞれ溶出が見られた。このことから少なくとも細胞抽出液の可溶性画分に回収される KIF1A は単量体と二量体の混和物であることを明らかとした。これまでに KIF1A は溶液中では単量体だがカーゴ膜への結合により局所濃度が上昇することで二量体化する可能性が挙げられてきた。また細胞内ではカーゴに結合していない状態でも二量体であるとの報告もある。KIF1A は単量体においても微小管に結合しプラス端方向への動きを示すが、アデノシン三リン酸（ATP）の加水分解による連続的な運動のためには 2 量体化が必要と考えられている。KIF1A は複数のコイルドコイルドメインを有している。コイルドコイルドメインは二量体化に必要であることが知られているが、二量体形成のための分子間相互作用だけではなく分子内の相互作用のみを引き起こすこともあるため全長 KIF1A が単量体であるか二量体であるかはこれまで明らかでなかった。実際に KIF1A と同じ Kinesin-3 ファミリーである KLP-6 はコイルドコイルドメインを有するものの全長は単量体であることが既に構造解析から明らかになっている。KIF1A の二量体化については、①KIF1A が単量体と二量体の平衡状態である、あるいは②細胞内で結合タンパク質との相互作用などにより一部の KIF1A が単量体から二量体へと転換される、という二つの可能性が考えられる。この可能性については単量体、二量体の各画分を再度ゲル濾過クロマトグラフィーで分離することで検証できる。仮に精製後の KIF1A 二量体が単量体へと解離するが再度の二量体形成を起こさないようであれば他の生体分子が二量体形成に必要である可能性がある。また *in vitro* と細胞内のタンパク質濃度の差異も考慮する必要がある。本実験ではタンパク質を細胞中に過剰発現していることから、細胞内の目的タンパク質の濃度は生理的条件より高い。ゲル濾過クロマトグラフィーに用いるタンパク質の濃度は数 μM だが、細胞内の濃度を大きく下回るようであれば二量体の再形成は起こらないと

予想される。今後、各種条件で更なる解析を進めていきたいと考えている。

2. モーターの活性化と脂質結合

KIF1AΔMD はモータードメインに相当する 1 から 393 番目のアミノ酸を欠失した部位欠損変異体であり、野生型 KIF1A に比べ小胞膜との相互作用が増すことが報告されている。モータードメインの欠損が KIF1A の脂質結合に必要な構造変換など何らかの変化を引き起こすと予想された。KIF1AΔMD を精製しゲル濾過クロマトグラフィーにより解析したところ野生型 KIF1A は二量体と単量体相当の二つのピークを示すのに対し KIF1AΔMD は二量体相当の位置にのみピークを示した。ゲル濾過クロマトグラフィーは分子量だけではなく構造変化も反映されるため、より正確に解析するため Mass Photometry による分析を行った。Mass Photometry では生体分子の散乱光情報を基に一分子レベルでの分子量を測定することが可能である。これを用い KIF1AΔMD の解析を行ったところ、単量体が少量含まれるものの大部分は二量体であることが明らかになった。他の Kinesin-3 ファミリーの構造解析などからモータードメインはコイルドコイルドメインの一部と相互作用することが知られている。モータードメインの欠損はコイルドコイルドメインの分子内相互作用を解き分子間相互作用すなわち二量体形成を促したと考えられる。ホスファチジルイノシトールと相互作用する他のタンパク質も膜上で二量体であることが知られている。KIF1A においてもカーゴ膜と相互作用する際には二量体である可能性が高い。これまで単量体 KIF1A は膜上で二量体化すると考えられてきた。本結果は KIF1A が膜上ではなく溶液中であらかじめ二量体化していることが脂質結合に重要であることを示唆した。二量体化は KIF1A の運動活性においても重要である。二量体 KIF1A が活性型であるとすれば、膜脂質と相互作用する際にはモーターは既に活性化型であることになる。これらの結果はモーターの二量体化がモーター活性と脂質結合の両方に重要であることを示している。アダプタータンパク質を介する場合とは異なり、脂質の直接結合がモーターとの主要な相互作用であるシナプス小胞のようなオルガネラにおいては、膜脂質は活性型モーターを選択的にリクルートする役割を果たすと予想される。本研究で野生型 KIF1A は二量体成分をある程度含むことが明らかになった。しかしこれまでの研究においてオルガネラ膜と野生型 KIF1A の相互作用は強くはないことが分かっている。このことから二量体化以外にも脂質との結合を制御する機構があると考えられる。今後、野生型 KIF1A 二量体と KIF1AΔMD の構造解析を行い、両者の構造を比較することで詳細なメカニズムを明らかに出来ると考えている。

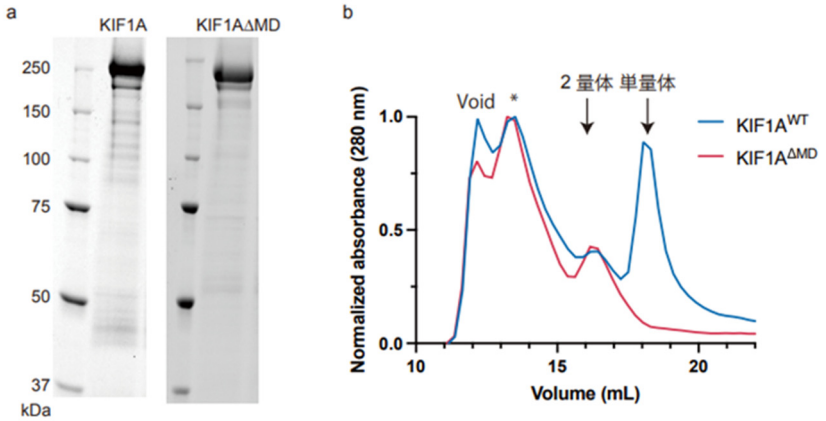


図 1. KIF1A タンパク質の精製とゲル濾過クロマトグラフィー

a) 精製 KIF1A および KIF1AΔMD タンパク質の SDS-PAGE。アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った後のタンパク質を用い SDS-PAGE を行った。左端は分子量マーカーである。

b) ゲル濾過クロマトグラム。アフィニティー精製後のタンパク質を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。横軸は溶出液量（ml）、縦軸は 280 nm における吸光度を示す。カラムの排除限界を「void」で示す。*は吸光度のシグナルはあるもののタンパク質の殆ど含まれていない画分である。野生型 KIF1A は 2 量体相当および単量体相当の位置にそれぞれピークが見られるのに対し、KIF1AΔMD は 2 量体相当の位置にのみピークが見られた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は東北大学学際科学フロンティア研究所先端学際基幹研究部の丹羽伸介准教授である。また、Mass photometry 法による測定にあたり大阪大学蛋白質研究所超分子構造解析学研究室の中川敦史教授および同研究室の王継業さんに多大なサポートを頂いた。ここに深く感謝を述べる。最後に、本研究に多大なご支援をいただいた上原記念生命科学財団の皆様、審査員の先生方に感謝申し上げる。

文　献

1） Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nat　Rev Mol Cell Biol. 2009 Oct;10(10):682-96. PMID: 19773780 DOI: 10.1038/nrm2774.

2） Chiba K, Ori-McKenney KM, Niwa S, McKenney RJ. Synergistic autoinhibition and activation mechanisms control kinesin-1 motor activity. Cell Reports, 2022 May 31; 39(9):110900. PMID: 35649356 DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110900.

3） Chiba K, Kita T, Anazawa Y, Niwa S. Insight into the regulation of axonal transport from the study of KIF1A-associated neurological disorder. Journal of Cell Science. 2023 Mar 1;136(5):jcs260742. PMID: 36655764 DOI: 10.1242/jcs.260742.

4） Klopfenstein DR, Tomishige M, Stuurman N, Vale RD. Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. Cell. 2002 May 3;109(3):347-58. PMID: 12015984 DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00708-0.

5） Michio Tomishige, Dieter R Klopfenstein, Ronald D Vale. Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. Science. 2002 Sep 27;297(5590):2263-7. PMID: 12351789 DOI: 10.1126/science.1073386.

6） Hall DH, Hedgecock EM. Kinesin-related gene unc-104 is required for axonal transport of synaptic vesicles in C. elegans. Cell. 1991 May 31;65(5):837-47. PMID: 1710172 DOI: 10.1016/0092-8674(91)90391-b.

7） Otsuka AJ, Jeyaprakash A, García-Añoveros J, Tang LZ, Fisk G, Hartshorne T, Franco R, Born T. The C. elegans unc-104 gene encodes a putative kinesin heavy chain-like protein. Neuron. 1991 Jan;6(1):113-22. PMID: 1846075 DOI: 10.1016/0896-6273(91)90126-k.

8） Kumar J, Choudhary BC, Metpally R, Zheng Q, Nonet ML, Ramanathan S, Klopfenstein DR, Koushika SP. The Caenorhabditis elegans Kinesin-3 motor UNC-104/KIF1A is degraded upon loss of specific binding to cargo. PLoS Genetics. 2010 Nov 4; 6(11):e1001200. PMID: 21079789 DOI: 10.1371/journal.pgen.1001200.

9） Niwa S, Lipton DM, Morikawa M, Zhao C, Hirokawa N, Lu H, Shen K. Autoinhibition of a Neuronal Kinesin UNC-104/KIF1A Regulates the Size and Density of Synapses. Cell Reports. 2016 Aug 23;16(8):2129-2141 PMID: 27524618 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.043