

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960807

氏名

千葉 杏子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: Davis (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

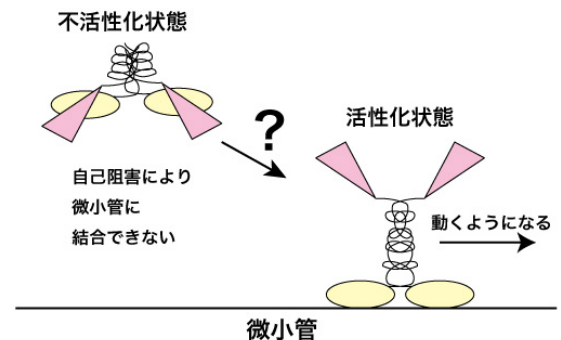
一分子解析法によるモータータンパク質制御機構の解明3. 派遣期間: 令和 1 年 6 月 1 日 ~ 令和 3 年 5 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: カリフォルニア大学デービス校部局名: Department of Molecular and Cellular Biology5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

Kinesin-1 の活性化機構は不明である

Kinesin-1 は最初に見つかったキネシンスーパーファミリーであり、一般にキネシンとして知られている。Kinesin-1 は最もよく研究が行われているキネシンスーパーファミリーのメンバーである。Kinesin-1 は細胞内でオルガネラ輸送に携わる分子モーターであり、微小管上をマイナス端からプラス端方向へ移動することで輸送を行う。Kinesin-1 のモータードメインが微小管上をステップする仕組みはよく解析されている。一方、輸送が始まる時にモータードメインが何をきっかけにして微小管へ結合するのか、すなわち Kinesin-1 の活性化機構は分かっていない。



細胞を用いた in vivo の実験では真の活性化機構は分からない

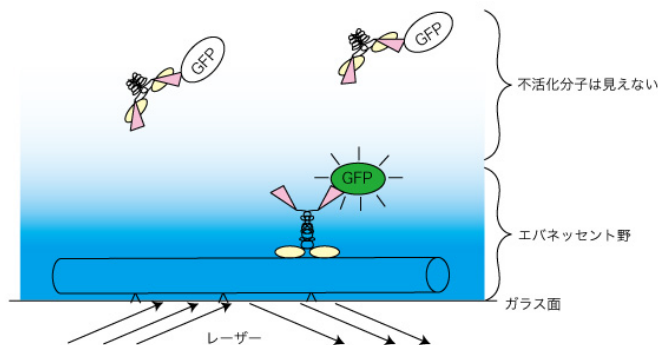
これまでの研究で細胞内のライブイメージングやオルガネラの観察など細胞生物学的手法によって Kinesin-1 活性化モデルが提唱されてきた。どのような機序で Kinesin-1 活性化が起こっているかを理解するためには精製タンパク質を用いた in vitro 再構成で活性化を再現することが必須である。細胞の上清を用いた半再構成系での Kinesin-1 活性化は示されてきたが、完全な in vitro の再構成系での Kinesin-1 活性化がきちんと示されたことはない。

一分子観察による in vitro 再構成によりキネシン活性化の分子機構を明らかに出来る

そこで私は全反射頭微鏡(TIRF)を用いた in vitro の一分子観察法を用いてキネシンモーター制御機構の解析に取り組んできた(Chiba et al. *PNAS*, 2019 など)。細胞系の実験と異なり、全反射頭微鏡を用いた一分子観察は微小管上を運動する分子モーター一つ一つの動きを捉えることが出来る。In vitro の実験系は精製タンパク質を用いて分子の働きを明確に出来ることからモーター活性化機構の解析に最適

である。

一分子アッセイはカバーガラス上に作った容量 10 ul 程度のチャンバーの中で行う。カバーガラス表面に PLL-PEG とアビジン-ビオチンの架橋を用いて蛍光ラベル微小管を固定する。次にチャンバー内に蛍光タグを付加したモーター分子を入れると、活性化型のみが微小管に結合し運動を開始する。全反射顕微鏡により微小管の存在するガラス界面周辺のみを励起することで微小管に結合して動くモーター分子を可視化することができる。このような仕組みにより Kinesin-1 の活性化に必要な条件の解析を行った。



Bac to Bac システム、MultiBac システムを用いた Kinesin-1 モーターの精製

はじめに実験に用いる Kinesin-1 モーターの精製を行った。多くの Kinesin-1 解析では ATPase 活性を持つモータードメインのみを実験に用いるが、本実験では分子活性化のメカニズムに迫るため、Kinesin-1 の自己阻害部位や結合タンパク質の相互作用部位を含む全長タンパク質を実験に用いることとした。Kinesin-1 はモータードメインを有する KIF5 のダイマーあるいは、KIF5 に加えカーゴとの結合を担う KLC を含むテトラマーのいずれかの状態として存在する。KIF5 および KLC が Kinesin-1 の自己阻害に果たす役割はよくわかっていない。KLC を含まない KIF5 ダイマーでは KIF5 の分子内相互作用による阻害のみが発生すると予想される。KLC が KIF5 の活性をどのように変化させるかはまだ分かっていない。KIF5 ダイマーおよび KIF5-KLC テトラマーを精製するため、まず C 末端に赤色蛍光タンパク質である mScarlet およびアフィニティー精製のための Strep タグを付加した KIF5 を昆虫細胞用発現ベクターにクローニングし、Bac to Bac システムによりバクミドを作成した。また 3 種類存在する KIF5 ファミリー間での活性制御機構の差異をしらべるため最も解析が進んでいる KIF5B に加え、神経特異的に発現する KIF5A, KIF5C も精製した。KIF5A-C のバクミドをそれぞれ昆虫細胞 Sf9 に感染・増幅させてウイルスを作成した。また、KLC を含む KIF5-KLC 4 量体の作成は、単一ウイルスによる複数タンパク質の共発現を可能とする MultiBac システムを用いて行った。MultiBac システムを用いることで KIF5, KLC はそれぞれ別々のプロモーター下でタグ付きタンパク質として発現することが出来る。このように作成した KIF5 または KIF5-KLC を Sf9 細胞に発現し、細胞抽出液から Strep タグによるアフィニティー精製を行うことで KIF5 ダイマーまたは KIF5-KLC テトラマーを精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーで更に精製を行うことで夾雑タンパク質を取り除きリコンビナントタンパク質を作成することに成功した (図 1)。精製したタンパク質は多角度光散乱検出器 (MALS) により分子量を解析し、KIF5 ダイマー及び KIF5-KLC テトラマーに相当する分子量であることを確認した。

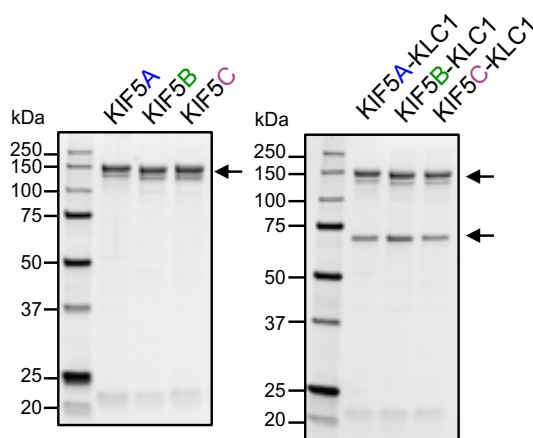


図 1 全長kinesin-1精製タンパク質
左：KIF5 dimer 右：KIF5-KLC1 tetramer
矢印はそれぞれタンパク質を指す
(KIF5 ~140 kDa, KLC 66 kDa)

KIF5 と KLC はそれぞれ独立した仕組みで Kinesin-1 モータードメインを阻害する

精製した Kinesin-1 を用いて一分子アッセイを行った。KIF5 モータードメイン単体が微小管へ高頻度に結合するのに比較して KIF5 ダイマーの活性はその 100 分の 1 程度に低く抑えられていることが観察された。KIF5 の C 末端領域はモータードメインに結合し活性を抑えることが報告されてきたが、ATPase アッセイなどの間接的な指標しかこれまで用いられてこなかった。本実験により Kinesin-1 の一分子レベルでの運動が C 末端の有無で大きく制御されていることを示した。一方、KIF5 と KLC から構成され

るテトラマーは微小管への結合がほぼ全く見られなかった。これが KIF5 の C 末端による効果が増強された為、あるいは KLC が KIF5 の C 末端とは別の機構でモーター活性を制御しているのか確かめるため、KIF5 の分子内相互作用に必要なアミノ酸に変異を導入した。KIF5 C 末端とモータードメインが相互作用しないアミノ酸置換変異体において KLC の有無による活性の変化を解析したところ、変異体においても KLC 依存的な微小管結合能の低下が見られることが分かった。KLC が KIF5 の分子内相互作用を介してモーターの自己阻害を引き起こしているならば、変異体では KLC の有無は活性を変化させないはずである。一連の実験から、KLC は KIF5 の分子内相互作用とは独立した分子機構で Kinesin-1 の活性制御を行っていることが明らかとなった。下表に Kinesin-1 の各分子状態における微小管結合頻度の違いを示す。KIF5 ファミリー分子間の活性の違い

ここまでの一連の実験で KIF5 ファミリー分子 KIF5A, KIF5B, KIF5C の活性を比較したところ、KLC と複合体を形成しない状態、すなわち KIF5 ダイマーにおいては KIF5A が KIF5B や KIF5C より有意に高い微小管結合およびプロセッシブな運動を示した。KIF5A は C 末端領域に KIF5B や KIF5C と相同性の低い配列を持つことから、C 末端に由来する自己阻害の効果を減らす何らかの差異が生ずると考えられる。マウスにおいて KIF5A のノックアウトは致死性であり、ユビキタスな発現を示す KIF5B は KIF5A の機能を補完できないことが明らかになっている。しかしながら、既存の報告で KIF5A と KIF5B の大きな機能の違いは見つかっておらず、マウス表現型と矛盾が生じていた。今回の一分子解析から KIF5A が KIF5B より高活性であることが明らかとなった。生体内で KIF5A が KIF5B では補償出来ない生理機能を果たすことを示唆している。

	モーターの微小管への結合頻度(# of motors/ μ m/s/uM)
常時活性型KIF5	147 \pm 35
全長KIF5	0.11 \pm 0.11
全長KIF5 + KLC	0.38 \pm 0.20

全長KIF5の活性はKIF5モータードメインの100分の1程度である。
KLCとの複合体形成は更に活性を低下させる

KIF5 ファミリー分子間の活性の違い

ここまでの一連の実験で KIF5 ファミリー分子 KIF5A, KIF5B, KIF5C の活性を比較したところ、KLC と複合体を形成しない状態、すなわち KIF5 ダイマーにおいては KIF5A が KIF5B や KIF5C より有意に高い微小管結合およびプロセッシブな運動を示した。KIF5A は C 末端領域に KIF5B や KIF5C と相同性の低い配列を持つことから、C 末端に由来する自己阻害の効果を減らす何らかの差異が生ずると考えられる。マウスにおいて KIF5A のノックアウトは致死性であり、ユビキタスな発現を示す KIF5B は KIF5A の機能を補完できないことが明らかになっている。しかしながら、既存の報告で KIF5A と KIF5B の大きな機能の違いは見つかっておらず、マウス表現型と矛盾が生じていた。今回の一分子解析から KIF5A が KIF5B より高活性であることが明らかとなった。生体内で KIF5A が KIF5B では補償出来ない生理機能を果たすことを示唆している。

Kinesin-1 活性化の再構成

これまで Kinesin-1 の自己疎外や活性化機構は細胞抽出液など夾雑物が存在する条件でしか行われていない。アダプタータンパク質が単体で Kinesin-1 を活性化できるかどうか検証するため、活性化因子の活性化の *in vitro* 再構成を行うこととした。Nesprin-4 は核の外膜に存在する膜タンパク質であり Kinesin-1 サブユニットの KLC と相互作用することが知られている。そこで GFP を付加した Nesprin-4 を精製し、Nesprin-4 を混和することで KIF5-KLC テトラマーを活性化できるかどうか検証した。その結果、Nesprin-4 の濃度依存的に KIF5-KLC の微小管結合能が回復することが明らかになった(図2 右のカイモグラフには Kinesin-1 の運動を示す斜線が見られる)。運動能を取り戻した KIF5-KLC の大部分は Nesprin-4 と共局在しながら微小管上を移動する。このことより Nesprin-4 は他の分子を必要とせず単

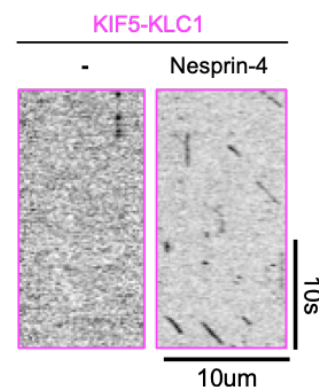


図2 kinesin-1活性化の再構成
KIF5-KLCテトラマーは単体では低活性(左)だが、アダプタータンパク質の添加で運動能を取り戻す(右)。
Scale bars, 10 sec, 10 μ m

体で Kinesin-1 を活性化し共輸送されることが明らかとなった。活性化した Kinesin-1 の移動距離や速度は Kinesin-1 モータードメイン単体の運動パラメーターとほぼ一致する。したがって Nesprin-4 はキネシン-1 の自己疎外を弱めることにより微小管への結合頻度を増加させるが、モーターの性質自体には影響を与えず、微小管に結合した後のキネシン-1 モーターは本来の活性に則った運動をすると予想される。

Kinesin-1 活性化に果たす微小管結合タンパク質の役割

Nesprin-4 の存在化で Kinesin-1 は活性化するものの、活性化の度合いは大きくはない。結合タンパク質以外にモーター活性化に関わる分子があるのではないかと考えた。微小管結合タンパク質は微小管上をコートしモーターの結合や運動速度に影響を与えることが報告されてきた。微小管結合タンパク質のうち特に KIF5 との相互作用が報告されている MAP7 が Kinesin-1 活性化にどのような役割を果たすか検証した。右下図に示すように Nesprin-4 添加に加え微小管を MAP7 でコートした場合、KIF5 の高頻度且つ長距離の輸送が観察された。一方 MAP7 のみでは微小管への結合は起こるものの、運動は見られない。したがって、Kinesin-1 の活性化には Kinesin-1 結合タンパク質が必要であり、微小管結合タンパク質はさらなる活性上昇に寄与することが示唆された。一連の実験結果をまとめた論文は bioRxiv (doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.12.434960>) にプレプリントとして公表した上、学術雑誌へ投稿中である。

