

笹部 潤平, 相磯 貞和
(慶應義塾大学医学部解剖学教室)

D-Serine in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis
Jumpei Sasabe and Sadakazu Aiso (Department of Anatomy, KEIO University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan)

スプライシングにより生じるキネシン KIF1Bの多様性とその機能

1. はじめに

キネシンは微小管上を移動しさまざまな物質を輸送するモータータンパク質である。現在、キネシンは哺乳類において約45種類のファミリー遺伝子が同定されている。この多様なタンパク質群はキネシンスーパーファミリーとも呼ばれ、共通する構造として球状のモータードメインを持つ。このドメインが微小管との結合とATP加水分解によって移動する活性を持っている。モータードメイン以外の領域は比較的多様性に富んでおり、カーゴ（積荷）の選択性やモーター活性の制御などに関与している。

2. KIF1Bのスプライシングアイソフォーム

KIF1Bは哺乳類のキネシンスーパーファミリーの一つである。KIF1Bとアミノ酸配列上相同性の高いKIF1サブファミリーにはKIF1A, KIF1B, KIF1Cが属し、線虫ホモログはUNC104である。KIF1サブファミリーは、一般的に二量体である他のキネシンとは異なり、微小管に結合していない状態では単量体として存在すると考えられている¹⁾。この興味深い特徴のため、微小管上を移動する際のメカニズムに関して、単量体あるいは二量体として機能するかを含めて多くの研究がなされている。

KIF1Bは1150アミノ酸、130 kDaのタンパク質として報告された(図1A, KIF1B α)²⁾。その後の研究により、1770アミノ酸、200 kDaのアイソフォームの存在が発見された(KIF1B β)^{3,4)}。両者はアミノ末端側660アミノ酸について全く同一であり、選択的スプライシングによって生じるアイソフォームである。初出の報告ではKIF1B α はミトコンドリアを、KIF1B β はシナプス小胞を輸送すると報告され、カルボキシル末端側の違いが積荷の選択性を決定している。また、この大きな配列上の変化に加えて、モータードメインの中およびその近傍に、特定のエクソンの挿入による、6アミノ酸と40アミノ酸の2箇所の挿入配列が生じることがmRNAの解析を行った複数のグループに

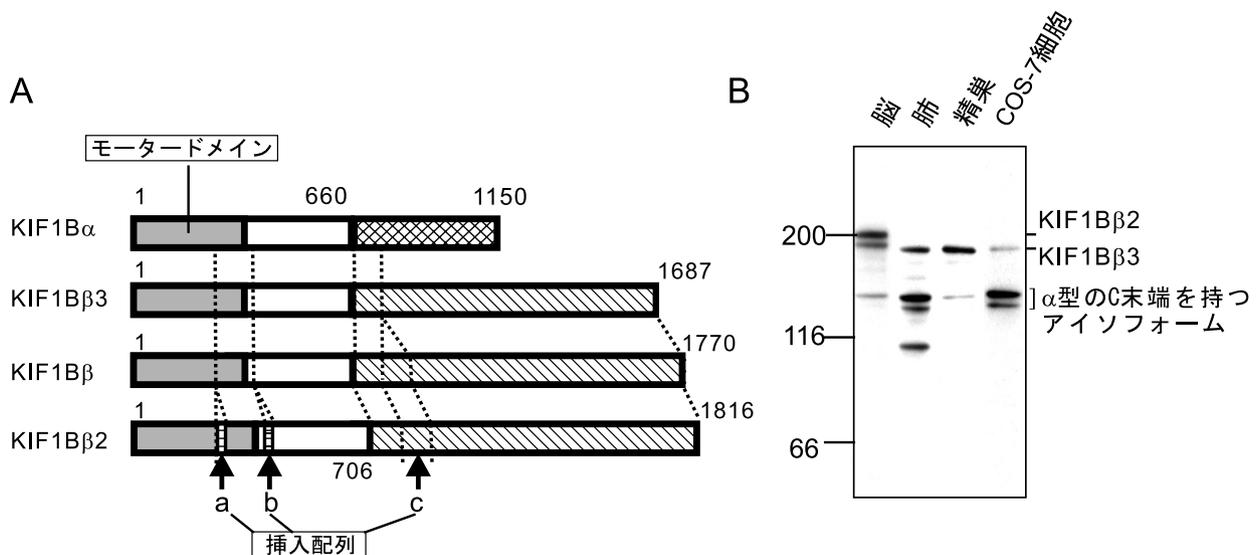


図1 KIF1Bのスプライシングアイソフォーム

(A) KIF1Bのスプライシングアイソフォームの模式図。

KIF1Bのアイソフォームは α 型と β 型のカルボキシル末端を持つ2種類に大別され、さらに挿入配列の有無による違いがある。

(B) 臓器・細胞におけるKIF1Bの発現(汎KIF1B抗体による検出)。

より報告された(図1A, 矢印aとb)^{3,5)}. 我々は40アミノ酸の挿入配列(図1, 矢印b)に対する抗体と汎KIF1B抗体を作成し組織での発現を検討した⁹⁾. その結果, 挿入配列を持つ約204 kDaのKIF1B β アイソフォーム(KIF1B β 2)が脳や神経細胞で発現していることが明らかになった(図1A). また, 非神経細胞において発現しているKIF1B β アイソフォームは約190 kDaであり(図1B), 挿入配列を持たない型であることがわかった. しかしこの非神経細胞型アイソフォームは2箇所挿入配列を持たないとしても計算上の分子量からは約10 kDaほど小さく, 異なるアイソフォームであることが示唆された. そこで解析を行った結果, β 型のカルボキシル末端側領域に, 選択的スプライシングにより生じる83アミノ酸の欠失があることがわかった(図1A, 矢印c). そこで, この非神経型アイソフォーム(1687アミノ酸)を他と区別するためにKIF1B β 3と名付けた⁶⁾.

KIF1B以外のキネシンにおいてもスプライシングアイソフォームの存在が網羅的解析によって明らかになっている. しかし, KIF1Bは多様なアイソフォームを持つ点で特徴的である. また, こうしたスプライシングによる多様性の生理的意義やモーター活性との関連性が明らかになっている例は少ない^{7,8)}.

3. KIF1Bの細胞内での機能

KIF1B α とKIF1B β はカーゴ結合領域と考えられているカルボキシル末端側の領域が全く異なるため, 運ぶ対象は全く異なる. 前述したようにKIF1B α は神経細胞におけるミトコンドリアの輸送に関わることが報告されている²⁾. また, KIF1B α はそのカルボキシル末端にPDZ (postsynaptic—density95/disc—large/zona occludens)ドメイン結合モチーフを持ち, この部分を介してPSD-95などシナプス後膜に存在するPDZタンパク質と結合する⁹⁾. この結果から, KIF1B α はミトコンドリア以外にもPDZタンパク質が局在する小胞も輸送していると考えられる. 一方, KIF1B β は神経細胞においてはシナプス小胞に局在することが示され, 我々もKIF1B β 2が同様の局在を示すことを報告している^{5,10)}. さらに, KIF1B遺伝子の変異がシャルコー・マリー・トゥース病や多発性硬化症と関連するという報告があり, 神経における小胞輸送機能の異常が何らかの形で疾患に関連する可能性がある^{10,11)}.

非神経細胞にはシナプス小胞は存在せず, 非神経型アイソフォームKIF1B β 3の機能は不明であった. 我々は汎KIF1B抗体による免疫染色の結果, 一部がリソソームと

共局在することを見出した⁶⁾. また, KIF1B β 3を過剰発現した場合, 放射状に広がる微小管ネットワークの最辺縁部に集積することがわかった(図2A). この細胞においては通常, 微小管形成中心(マイナス端側)から辺縁部(プラス端側)へ, またその逆方向へ向かうリソソームの運動がバランスよく行われている. しかしKIF1B β 3を過剰発現させた場合には, 中心方向への動きは見られなくなった. 多数のKIF1B β 3タンパク質が存在することで, 微小管のプラス端側へのリソソーム輸送が亢進し, 辺縁部へ蓄積したと思われる. これらの結果からKIF1B β 3はリソソームの辺縁部方向への輸送に関与していると考えられる. しかし, リソソーム輸送にはほかのキネシン分子の関与も報告されている¹²⁾. 微小管依存リソソーム輸送の全体理解には多種のキネシンの使い分けやそれぞれの制御機構の解明が必要であろう.

4. スプライシングとモーター活性

KIF1Bと近縁のキネシンには, 球状ドメインであるモータードメインの中にKループと呼ばれるリジン残基に富んだ突出領域がある. 1個目の挿入配列はこのループ領域に存在する. Kループ領域は微小管を構成するチューブリンタンパク質上の負電荷に富んだ領域と相互作用し, 微小管との結合を安定させると考えられる. 2個目の挿入配列は球状のモータードメインの近傍にあり, 比喩的に, モータードメインをヘッド(頭)とするとこの近傍領域はネック(首)領域と呼ばれる. 挿入配列はネック領域を構成する2本の α ヘリックス領域の間の「ヒンジ」にある. このネック領域は線虫ホモログUNC104ではダイマー化に関与する領域と報告されている^{13,14)}. このようにスプライシングによる多様性が生じる部位は, モーターとしての性質を考える上で興味深い場所である.

我々はこれらの挿入配列の有無とモーター活性との関連性を検討するため, モータードメインとネック領域を含む組換えタンパク質を発現・精製し活性測定を行った¹⁵⁾. その結果, 挿入配列を2箇所持つものは, 持たないものに比較して高い微小管依存ATPase活性を持つことがわかった(図3A). つまり, 挿入配列は活性上昇に寄与している. また2箇所の挿入配列のうち, 1個のみを持つタンパク質では中間的な活性を示すことも明らかとなり, 活性上昇への寄与は相加的であると考えられる.

さらに, Kループの挿入配列(6アミノ酸残基)に変異を導入し, 解析を行った. Kループの特徴であるリジン残基は, 挿入配列が無い状態で5個存在し, 挿入配列によ

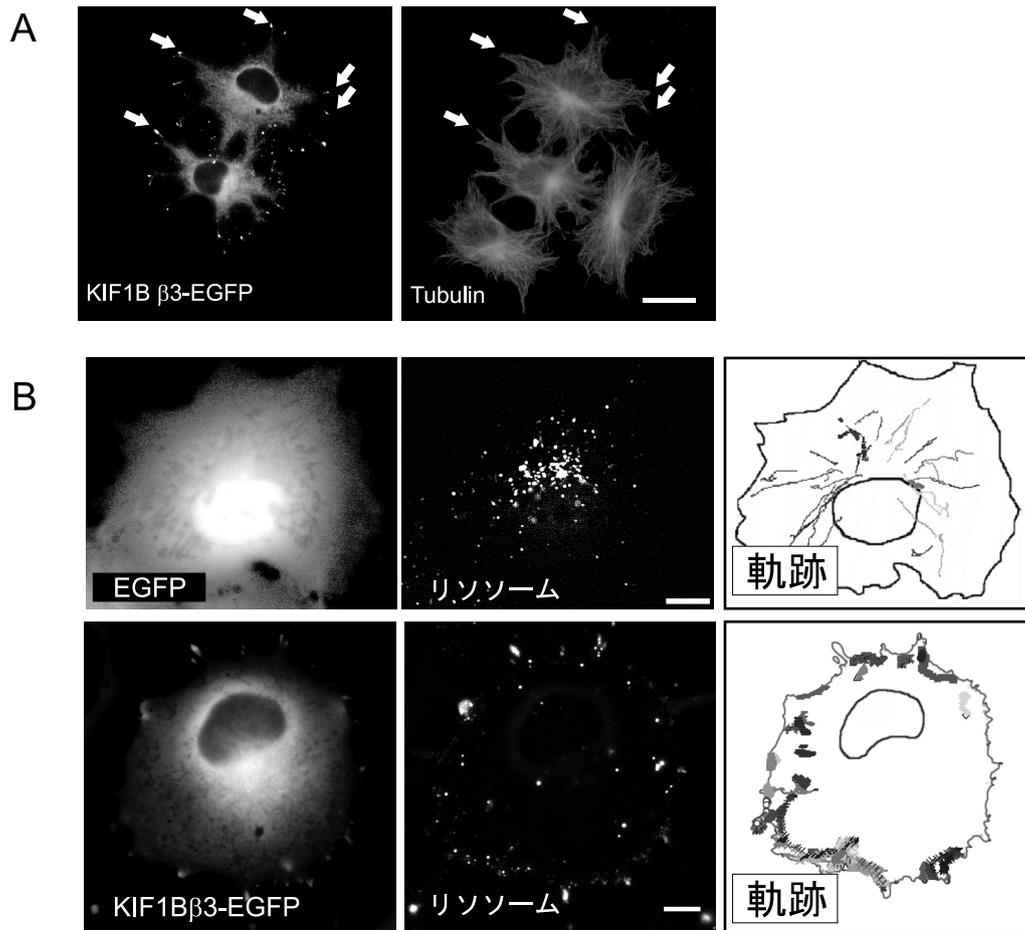


図2 KIF1Bβ3 過剰発現の効果

(A) 発現された KIF1Bβ3-EGFP タンパク質 (左) は微小管ネットワーク (右) の最端部 (矢印) に集積する。

(B) 蛍光デキストランにより、細胞内でのリソソームを可視化し、移動の軌跡を描画した。KIF1Bβ3 の過剰発現により、微小管形成中心から辺縁部の間での往復運動が見られなくなり、辺縁部に集積している。

てさらに1個追加される。この残基をアラニンに変異させても、挿入配列の効果はほぼ変化が無く、正電荷残基の増加は挿入配列による活性上昇の直接の原因では無いことが明らかになった。そこで、挿入配列によるループの延長が重要である可能性を検討するために、挿入配列の長さを変えると、より長い配列で高い活性を示す傾向が明らかになった。アラニンのみで構成された挿入配列を導入した場合も、長い挿入を持つ場合はより高い活性を示した。しかしアラニンのみで構成された挿入配列の場合は、チューブリンに対する $K_{1/2(MT)}$ (チューブリンを基質としてミカエリス-メンテン式に当てはめた場合のミカエリス-メンテン定数) から導かれる微小管との親和性は大幅に低下しており、

単純に長さだけが重要な訳ではない。Kループの挿入配列は球状ドメインから微小管に伸びる「腕」の長さや動きやすさを変えることで微小管との相互作用の強弱を微調整し、結果としてATPase活性を上昇させていると考えられる。

さらに、我々はリポソームを微小管上で移動させる速度を測定した(図3B)。その結果、挿入配列の有無によって移動する速度に大きな違いは見られなかった。微小管との親和性の変化から、速度ではなく、一度に連続・安定的に移動できる距離等に変化が出ることも考えられる。今後はより生理的な条件に近い系で、挿入配列の効果を測定する必要があるだろう。

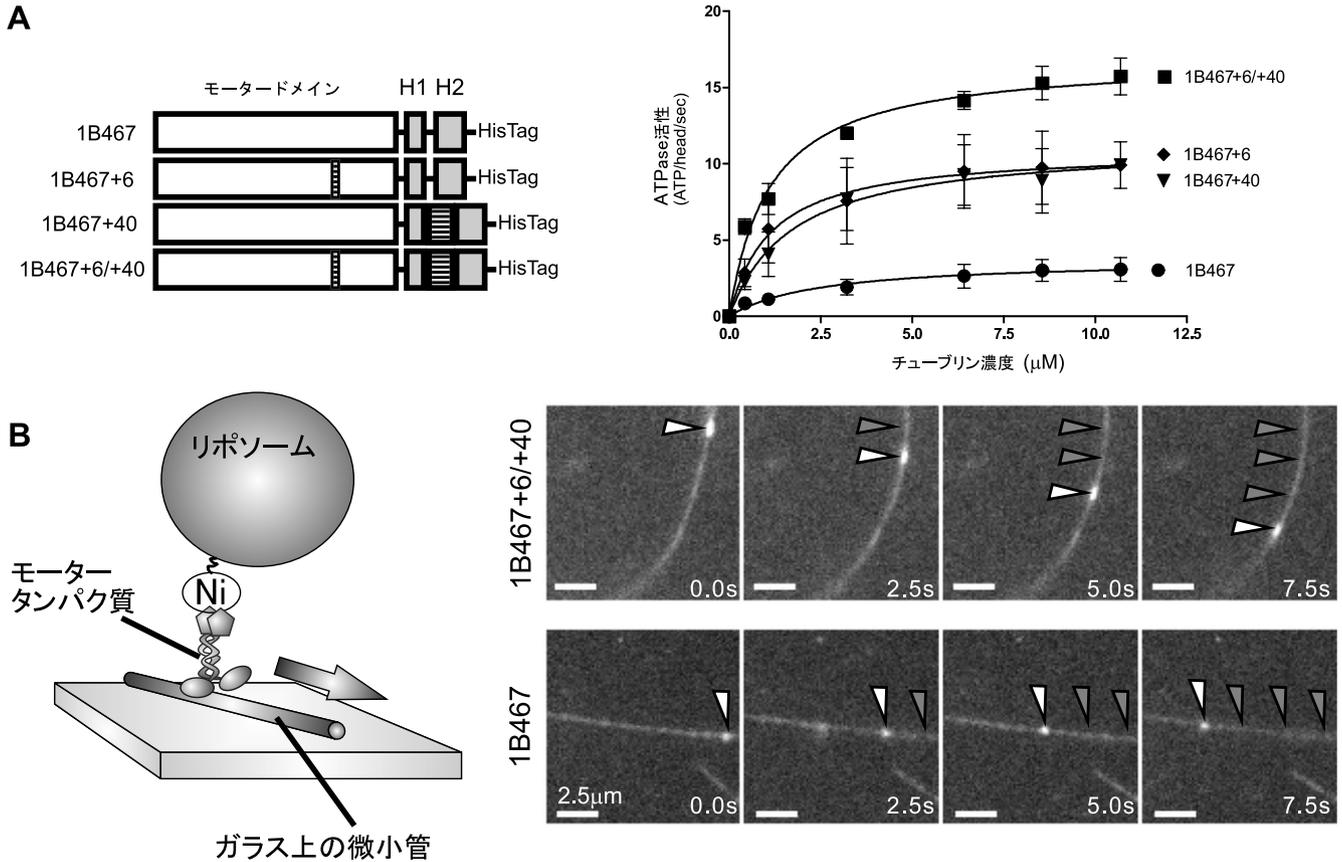


図3 スプライシングとモーター活性
 (A) 挿入配列を二つ持つ [1B467+6/+40], 一つのみ持つ [1B467+6 および 1B467+40], 共に持たない [1B467] タンパク質の模式図と微小管依存 ATPase 活性.

(B) リポソーム輸送速度の測定. 弱く蛍光を発する微小管上を, 強い蛍光を発するリポソームが移動する様子について, 時間を追って示した.

5. おわりに

我々は Na⁺/H⁺ 交換輸送タンパク質の制御因子であるカルシニューリン様タンパク質 (CHP) に結合するタンパク質を探索する過程で, 機能のわからない挿入配列を持った KIF1B を見出した⁵⁾. 今のところ CHP と KIF1B の結合の機能的意義は不明である. 一方, 見つかった挿入配列に着目して研究を進めた結果, KIF1B はスプライシングによって非常に多彩な機能・性質を獲得していることがわかってきた. これはもともと遺伝子の数が多く多様なキネシンに, 組織や細胞種依存的に mRNA/タンパク質レベルで更なる多様性を与えているという点で興味深く, 高等動物におけるスプライシングの重要性を示す一例でもあろう. しかし, 神経細胞内とその他の細胞内での輸送能力に差があるのかどうかなど, 生理的な側面からの理解はまだ

まだ途上であり, 今後発展していくと考えられる.

本研究に関して御助言下さった石渡信一教授 (早稲田大学) および石渡研究室の皆様, ならびに井上明男准教授 (大阪大学) に深く感謝致します.

- 1) Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y., & Hirokawa, N. (1995) *Cell*, 81, 769-780.
- 2) Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Take-mura, R., Yamazaki, H., & Hirokawa, N. (1994) *Cell*, 79, 1209-1220.
- 3) Gong, T.W., Winnicki, R.S., Kohrman, D.C., & Lomax, M.I. (1999) *Gene*, 239, 117-127.
- 4) Conforti, L., Buckmaster, E.A., Tarlton, A., Brown, M.C., Lyon, M.F., Perry, V.H., & Coleman, M.P. (1999) *Mamm. Genome*, 10, 617-622.
- 5) Nakamura, N., Miyake, Y., Matsushita, M., Tanaka, S., Inoue,

- H., & Kanazawa, H. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)*, **132**, 483–491.
- 6) Matsushita, M., Tanaka, S., Nakamura, N., Inoue, H., & Kanazawa, H. (2004) *Traffic*, **5**, 140–151.
- 7) Cheng, L.J., Zhou, Z.M., Li, J.M., Zhu, H., Zhou, Y. D., Wang, L.R., Lin, M., & Sha, J.H. (2002) *Life Sci.*, **71**, 2741–2757.
- 8) Santama, N., Krijnse-Locker, J., Griffiths, G., Noda, Y., Hirokawa, N., & Dotti, C.G. (1998) *Embo J.*, **17**, 5855–5867.
- 9) Mok, H., Shin, H., Kim, S., Lee, J.R., Yoon, J., & Kim, E. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 5253–5258.
- 10) Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y., & Hirokawa, N. (2001) *Cell*, **105**, 587–597.
- 11) Aulchenko, Y.S., Hoppenbrouwers, I.A., Ramagopalan, S.V., Broer, L., Jafari, N., Hillert, J., Link, J., Lundstrom, W., Greiner, E., Dessa Sadovnick, A., Goossens, D., Van Broeckhoven, C., Del-Favero, J., Ebers, G.C., Oostra, B.A., van Duijn, C.M., & Hintzen, R.Q. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 1402–1403.
- 12) Hollenbeck, P.J. & Swanson, J.A. (1990) *Nature*, **346**, 864–866.
- 13) Al-Bassam, J., Cui, Y., Klopfenstein, D., Carragher, B.O., Vale, R.D., & Milligan, R.A. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 743–753.
- 14) Tomishige, M., Klopfenstein, D.R., & Vale, R.D. (2002) *Science*, **297**, 2263–2267.
- 15) Matsushita, M., Yamamoto, R., Mitsui, K., & Kanazawa, H. (2009) *Traffic*, **10**, 1647–1654.

松下 昌史, 金澤 浩

(大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻)

Variation and function of splicing isoforms of kinesin motor KIF1B

Masafumi Matsushita and Hiroshi Kanazawa (Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, Machikaneyama-cho 1-1, Toyonaka City, Osaka 560-0043, Japan)

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のユビキチン化を介したエンドサイトーシス機構

1. はじめに

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は7回膜貫通型の細胞膜タンパク質であり, ヒトゲノムにおいて約900種類からなるファミリーを形成している。これら GPCR は細胞の増殖, 形態変化をはじめ, 血圧の調節, 味覚, 嗅覚,

光感覚など様々な生体現象において必要とされている。最近の研究において, 幾つかの GPCR ががん細胞に過剰発現し, 異常なシグナルを伝えることにより, 細胞のがん化に関わっていることが報告されている¹⁾。また, GPCR の多くは生理活性物質をリガンドとし, このため GPCR は創薬の重要な標的タンパク質となっている。現在まで開発された医薬品の中で50%程度は GPCR に作用する薬剤であり, これらのことから GPCR シグナルの調節機構を明らかにすることは, がんやその他の病気の効果的な治療薬の開発にとって非常に重要である。

出芽酵母の接合フェロモン受容体である Ste2p は GPCR の一種であり, GPCR のシグナル伝達, 修飾, ダウンレギュレーションの分子機構を調べるモデル受容体として研究されてきた。特に, GPCR シグナルとエンドサイトーシスの関係や GPCR のユビキチン化についての先駆的な研究は Ste2p を用いて行われている^{2,3)}。また, 出芽酵母はエンドサイトーシス研究の非常に優れたモデル生物でもある^{4,5)}。本稿では GPCR のユビキチン化を介したエンドサイトーシス機構について, 最近の出芽酵母を用いた研究によって明らかにされた知見を概説する。

2. リガンド結合による GPCR の修飾

GPCR の脱感作とそれに引き続くエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みは, GPCR シグナルのダウンレギュレーションにおいて中心的な役割を果たしている。図1に示すように, 多くの GPCR はリガンドと結合することにより三量体 G タンパク質を活性化し, 細胞内へとシグナルを伝達する。その後, GPCR は細胞内領域がリン酸化, ユビキチン化され, クラスリン小胞によりエンドサイトーシスされる。細胞内に取り込まれた GPCR はエンドソームにおいてリガンドと分離し, リソソームに輸送されて分解されるか, もしくは細胞膜へトリサイクリングされる。

GPCR のリン酸化は主に細胞内ドメインの Ser もしくは Thr 残基に起こる。GPCR のリン酸化を行う酵素としては GPCR キナーゼ (GRK) やカゼインキナーゼなどが報告されており, 多くの GPCR はリン酸化されることによりアレステチン (arrestin) タンパク質に結合し, エンドサイトーシスされる。また, これまでの研究から, GPCR の多くがリン酸化に加えて, ユビキチン化されていることが報告されている。しかしながら, GPCR のユビキチン化がエンドサイトーシスにおいて果たす役割についてはまだよく分かっていない。例えば, トロンビンにより活性化される