

機関番号：12601
 研究種目：特別推進研究
 研究期間：2006～2010
 課題番号：18002013
 研究課題名（和文） キネシンモーター分子群による細胞内物質輸送の分子機構：構造、機能、動態及び制御
 研究課題名（英文） The Mechanism of Intracellular Transport and Kinesin Motors, KIFs : Structure, Function, Dynamics and Regulation
 研究代表者
 廣川 信隆 (HIROKAWA NOBUTAKA)
 東京大学・大学院医学系研究科・特任教授
 研究者番号：20010085

研究成果の概要（和文）：神経細胞を始め全ての細胞機能の基盤となる細胞内輸送機構をその主役であるキネシンスーパーファミリーモーター分子群（KIFs）を中心に解明した。分子細胞生物学、分子遺伝学、構造生物学を駆使して、13種の新しいKIFsの一次構造を決定し、以下を明らかにした。KIF1A/KIF1B beta 及びKIF17の解析により、KIFsは、主にアダプター蛋白質を介してカーゴ膜小器官を認識・結合し、カーゴとの乖離は、small G-proteinのGTP加水分解とモーター尾部のリン酸化がその主な機構である。輸送の方向性決定の重要な機構として、軸索微小管が、GTP tubulinに富むことが重要である。KIF4は、活動依存性の神経細胞の生死を決定する鍵分子であり、KIF26Aは、GDNF/Retシグナル伝達の抑制因子として働き、腸管神経節の発生を制御し、KIF16Bは、FGF受容体の輸送により、初期発生に必須であり、KIF17は、NMDA受容体を輸送するだけでなく、リン酸化CREBを介してKIF17、NR2B mRNAの転写、蛋白合成、NR2Aのユビキチン・プロテアゾーム系による分解を制御し、記憶・学習の重要な基盤となることと解明した。Mg⁺⁺ADPから水分子とMg⁺⁺が抜ける過程の構造を解明しATP加水分解のほとんどの過程の構造を明らかにして、モーター分子の動く機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：Intracellular transport is fundamental for cellular functions in cells in general. We studied this mechanism focusing on the kinesin superfamily proteins (KIFs). The primary structures of 13 new KIFs were solved. Using molecular cell biology and molecular genetics we revealed that KIF4 is a key molecule determining activity dependent survival or death of juvenile neurons, that KIF26A is fundamental for development of enteric nervous system by acting as a suppressor for GDNF/Ret signaling, and that KIF17 plays a significant role by not only transporting NMDA receptors, but also controlling transcription and translation of NR2B and KIF17 through CREB phosphorylation and ubiquitin-proteasome dependent degradation of NR2A. We solved atomic structures during Mg⁺⁺ and water release from Mg⁺⁺ADP so that we solved almost all states during ATP hydrolysis which gives us strong bases to understand how KIFs move along microtubules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	311,300,000	93,390,000	404,690,000
2007年度	310,400,000	93,120,000	403,520,000
2008年度	306,100,000	91,830,000	397,930,000
2009年度	292,100,000	87,630,000	379,730,000
2010年度	274,700,000	82,410,000	357,110,000
総計	1,494,600,000	448,380,000	1,942,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：分子モーター、キネシン、細胞内輸送、微小管

1. 研究開始当初の背景

神経細胞をはじめすべての細胞は、細胞の機能にとり必須の機能蛋白分子を合成後、様々な膜小器官あるいは蛋白複合体さらには mRNA 蛋白複合体として目的地へ適正な速度で輸送する必要がある。この細胞内の物質輸送は細胞の重要な機能、形作りそして生存のため必須である。私達は今までにこの輸送機構の主役である微小管をレールとしたキネシンスーパーファミリーモーター分子群、Kinesin superfamily proteins (KIFs) を発見し哺乳類の全遺伝子 45 個を同定した。またこの KIFs が多様な機能分子を輸送するだけでなく脳の高次機能、神経回路網形成、左右の決定、腫瘍の抑制等に重要な役割を果たす事を明らかにして来た。このようにモーター分子群 KIFs は重要な細胞機能の根幹を担っていると同時に私達の体の様々な基本的生命現象に深く関わっておりこの研究は分子細胞生物学、神経科学、発生生物学、生物物理学、臨床医学等の広範な学問分野に非常に大きな学術的意義を有すると思われる。私達は今まで遺伝子群の発見、機能の解析、個体レベルの機能解析、作動原理等すべての課題について常に世界をリードする研究を行なって来た。しかしながら、まだ未知の多くの課題が存在しこれらを解く大きな必要性があった。

2. 研究の目的

上述した研究を世界に先駆けて大きく発展させ、キネシンスーパーファミリーモーター分子群による物質輸送の分子機構を解明するため以下の具体的目的を課題とした。

- (1) 新しいモーター分子の構造と機能の分子細胞生物学的解析。私達の発見した物質輸送に関わるすべての KIFs の機能の解明が細胞内物質輸送の全貌解明に必要不可欠である。その詳細な構造と細胞内での機能の分子細胞生物学的研究を行う。
- (2) モーター分子による cargo の認識・結合およびその制御機構。私達のこれまでの研究により 1 種の細胞の中で多数の KIFs がそれぞれ異なる cargo を認識し、その目的地へと正しく輸送することが明らかとなって来た。この一連の過程を分子レベルで理解するために、KIFs と cargo の結合を仲介する scaffold 分子およびそれらを修飾するシグナル分子を同定・解析することで、細胞内物質輸送システムを分子レベルの実体として理解する事を目指す。
- (3) モーター分子による細胞内輸送の振り分け機構。神経細胞は樹状突起に各種の受容体また軸索にシナプス小胞蛋白などを特異的に振り分けている。脳回路網形成の基本であるこの未知の機構を解明する。
- (4) モーター分子の機能の分子遺伝学的解析。

KIFs の機能の個体レベルから細胞レベルを通じた包括的な解析のため分子遺伝学的アプローチを継続して推進し、特に神経系と発生過程をモデル系として KIFs の新しい役割を発見・解析することを目的として研究を進める。その過程において KIFs が新たに鍵となるヒト疾患の病態解明の可能性もある。

- (5) モーター分子による mRNA の輸送機構の解明。

私達は KIF5 の Cargo として巨大タンパク-mRNA 複合体を単離同定した。この複合体は神経細胞において樹状突起へと輸送され、局所でタンパク質を合成することで記憶の形成に非常に重要な役割を担っていると思われる。そこで、この KIF5 と直接結合する複体内のタンパク質を同定し、輸送の制御機構を明らかにする。

- (6) モーター分子の作動機構の構造生物学的・生物物理学的解析。

これまでの私達の研究の基盤に立ち、クライオ電子顕微鏡、X 線結晶解析法等を用いた構造生物学的手法を組み合わせ、私たちが発見した最も単純なモノマー型モーター分子 KIF1A が微小管上を動く機構を解明する。

3. 研究の方法

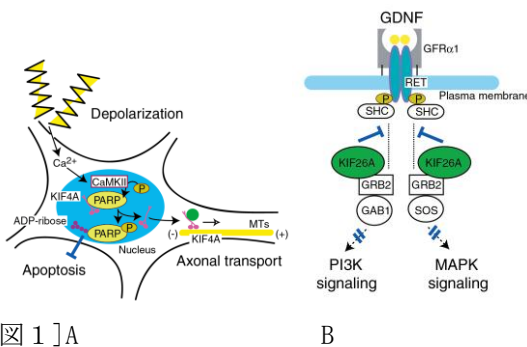
上述した課題を解明するため、分子細胞生物学、分子遺伝学、電気生理学、新しい光学顕微鏡法を用いたイメージング、クライオ電子顕微鏡法、X 線結晶解析法など多彩な方法を駆使した。

4. 研究成果

- (1) 新しいモーター分子の構造と機能の分子細胞生物学的解析。
 - (4) モーター分子の機能の分子遺伝学的解析。
- (1) と (4) は、互いに深く関連し、同時に並行して進んだものが多いので以下にまとめて報告する。
- ① まず 13 種の KIF について全長配列の決定、発現様式の解析、抗体の作成、結合蛋白の解明、RNAi による発現阻害を通じた、機能の分子細胞生物学的解析を行った。
 - ② KIF4 は、脳の形成の過程で多数生まれる神経細胞の活動依存性の生存と死滅を制御する鍵分子であることを解明した。脳の発達の過程で多くの神経細胞が生まれるが、そのうち活動するものだけが生き残る。この分子機構は、全く不明であった。KIF4 は、幼若神経細胞の核内に局在し、尾部で PARP-1 (poly ADP ribose polymerase-1) に結合し PARP-1 の活性を抑制することにより、活動しない神経細胞を細胞死に至らしめ、神経が活動し脱分極すると、Ca⁺⁺ の細胞内流入、核内流入に伴い Ca⁺⁺

calmodulin kinase II alpha が活性化し、PARP-1 をリン酸化する。リン酸化された PPARP-1 は、KIF4 からはずれ、PARP-1 は、活性化され、細胞を生存させるシグナル系を on にする。PARP-1 が脱離した KIF4 は、核外へ出てカーゴの輸送を行うことが明らかになり、KIF4 は、脳の発達の過程で活動依存性に神経細胞の生死を決定する分子スイッチとカーゴ輸送の2つの機能を有していることを明らかとした。(Midorikawa et al. *Cell* 2006) (図 1A)

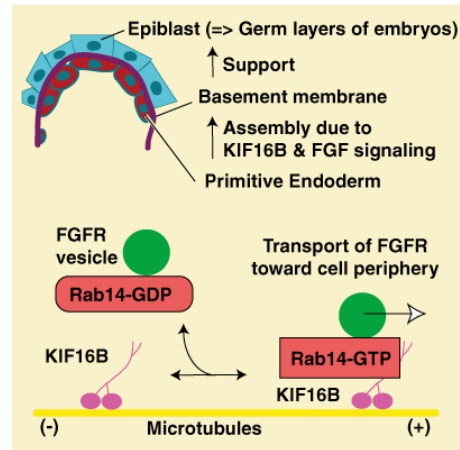
- ③ KIF26A の全長配列を明らかにし、モーター領域のアミノ酸配列、特に ATP 加水分解にかかわる部分に変異したユニークな KIF であり実際に微小管により活性化される ATPase 活性がないことがわかった。KIF26A 欠損マウスを作成すると、生後5週以内に巨大結腸症のため死亡することが示された。分子細胞生物学的解析により、KIF26A は、腸管神経節細胞に発現され、KIF26A 欠損マウスでは、GDNF-Ret 情報伝達系が過剰に活性化され腸管神経節細胞が特に結腸で50%ほど増加しこのため結腸の過剰な収縮が起こり巨大結腸になることがわかった。そして、KIF26A が GDNF/Akt/ERK 情報伝達系を、その構成因子である Grb2 に直接結合し抑制することにより腸管神経節細胞の適正な発生を制御していることを明らかとした。このことにより KIF26A は、ユニークな KIF であり細胞増殖シグナル系を抑制することにより腸管神経系の発生を制御する重要な働きをしていることを解明した。(Zhou et al. *Cell* 2009) (図 1B)



[図 1] A

B

- ④ KIF16B、の全長配列を決定した。KIF16B、について抗体を作製しそのカーゴを同定した。KIF16B は FGF 受容体 2 及び Rab14 を含む小胞をゴルジ装置から細胞周辺部に輸送する事を明らかにした。KIF16B KO マウスを解析し、KIF16B が初期胚で FGFR2/Rab14 をゴルジ装置から形質膜を供給し三胚葉分化に基本的な役割を果たしている事を解明した (Ueno et al. *Dev. Cell* 2011) (図 2)

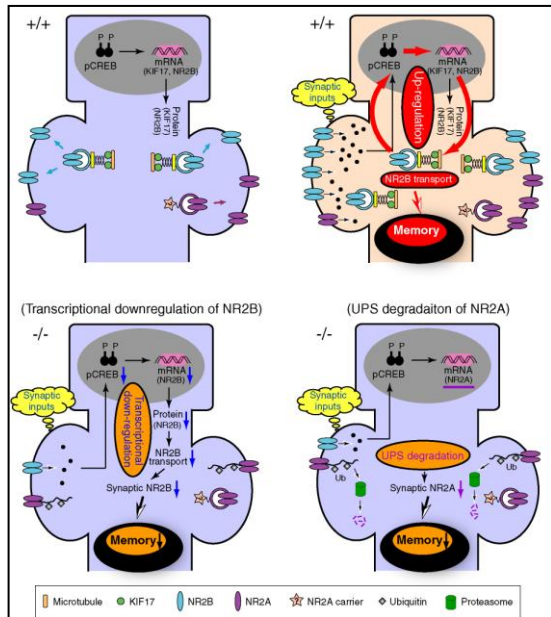


[図 2]

- ⑤ 脳神経系の NMDA 受容体は、グルタミン酸に結合してはたらく受容体であり、動物の記憶や学習に深くかかわりを持つことが知られていたが、NMDA 受容体の輸送が脳や神経の機能にどのような意味を持つのか、ほとんど不明だった。今回、KIF17 が NMDA 受容体の輸送を行うだけではなく、その量を調節していることを解明した。KIF17 を欠いたマウスの神経細胞を調べると、サブユニット 2A (NR2A) とサブユニット 2B (NR2B) の量が減り、その結果、マウスの学習・記憶能力は著しく低下した。更に詳しく調べると、サブユニット 2A が分解されやすく、サブユニット 2B の生成量が減少していた。サブユニット 2B の減少は、主に其の mRNA の転写の減少によりこれは、転写因子リン酸化 CREB の減少に由来し、サブユニット 2A の減少は、ユビキチン・プロテアゾーム系による分解によっていることが分かった。神経の働きが盛んになると KIF17 と NMDA 受容体の mRNA 及び蛋白質量がともに増え、運ばれる NMDA 受容体の量も増大する。この発見で重要なことは、KIF17 が単に NR2B を輸送しているだけでなく、NR2B および、自分自身 (KIF17) の遺伝子 mRNA の転写をリン酸化 CREB を介して制御し、記憶・学習の基盤になっていることが解明されたことある。このことは、勉強すればするほど頭が良くなる根拠が解明されたことになる。このような K I F 分子モーターによる脳・神経機能の調整機構は、将来、神経疾患の治療法への新しいアプローチとなることが期待される。(Yin et al. *Neuron* 2011) (図 3)

- (2) モーター分子による cargo の認識・結合およびその制御機構。

- ① 燐酸化によるカーゴの結合の制御機構：KIF17 は足場蛋白 Mint1 を介して、グルタミン酸受容体を認識しこれを神経樹状突起で輸送する。FRET を使って、KIF17 の尾



[図 3]

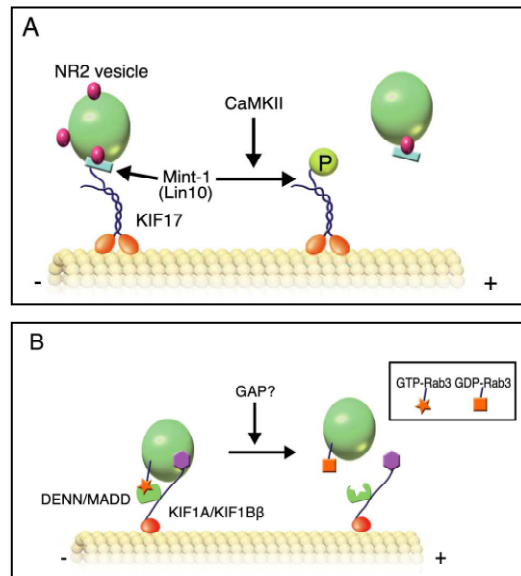
部とカーゴの結合の制御機構を解析した。KIF17 尾部に CaMKII が結合し、活性化されると KIF17 尾部 Ser1029 がリン酸化され、カーゴの Mint 1 が、KIF17 より脱離し、シナプス後部へ受容体が組み込まれることが分かった。(Guillaud et al. *Nature Cell Biol* 2008) (図 4 A)

- ② G 蛋白質によるカーゴ結合の制御機構：KIF1A/KIF1B beta は相同性の高い stalk と尾部を有しており、Rab3A を含むシナプス小胞前駆体を神経軸索で順行性に輸送し、神経の機能と生存に必須である。KIF1A/KIF1B beta の stalk が DENN/MADD に結合し、それが Rab3A に結合する事が分かった。GTP-Rab3A は、DENN/MADD と結合し、KIF1A/KIF1Bbeta と結合できシナプス小胞前駆体をシナプスまで運んでいる。GTP 加水分解により GDP-Rab3A は DENN/MADD と脱離してカーゴを脱着する事が分かった。(Niwa et al. *Nature Cell Biol* 2008) (図 4 B) これらは重要な発見であるので前者は *Nature Cell Biology* の News and Views で、後者は *Cell* 135: 373-374, 2008 “Leading Edge, Neurobiology Select” で紹介された。

(3) モーター分子による細胞内輸送の振り分け機構

- ① 神経軸索をはじめとして細胞内では、蛋白質が膜小器官に組み込まれる形で送られる速い輸送と、細胞質蛋白質が複合体の形で送られる遅い輸送がある。主要なモーター分子である KIF5s は、この両方の輸送を行っている。今回、イカの巨大軸索を用いた生物物理学、細胞生物学、マウスの分子遺伝学をもちいて、KIF5s による輸送の変換機構を明らかにした。KIF5s は、軽鎖

が、Hsc70 を介して細胞質蛋白と結合し遅い輸送を行うが、軽鎖が、直接 scaffold protein を介して膜小器官と結合することにより速い輸送を行う。従って、Hsc70 が、遅い輸送と速い輸送の交換スイッチの役割を果たしていることを明らかにした。実際 Hsc70 と結合する軽鎖の結合部位を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作成すると、遅い輸送が阻害され、早い輸送が促進された。細胞内輸送の重要な制御機構を解明した。(Terada et. al. *EMBO J* 2009)



[図 4]

- ② 先に私たちの研究により、KIF5 モーター領域は、軸索と樹状突起の微小管の違いを読み取り、軸索方向に運動することを明らかにしたが、微小管のどのような構造的差異が軸索・樹状突起への振り分け輸送のカギとなっているかは、不明であった。今回、抗体染色、PALM 超顕微鏡法、免疫細胞化学、細胞内抗体発現などを組み合わせ、軸索微小管は、GTP tubulin に富んでおり、これが、樹状突起微小管との違いであると同時にこの違いを KIF5 が認識し、方向性を決定していることを解明した。(Nakata et al. *J. Cell Biol* 2011 (印刷中))

(5) モーター分子による mRNA の輸送機構の解明。

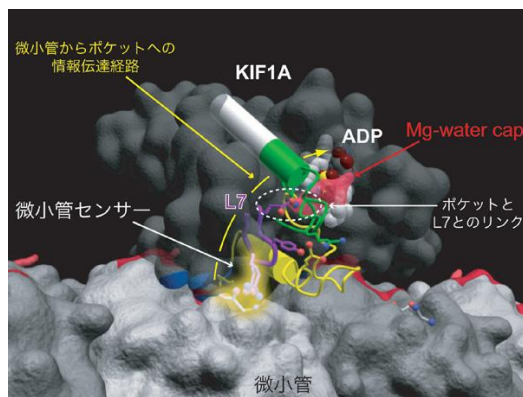
KIF5がPur α を介して mRNA 複合体と結合し輸送する事を明らかにした。

(6) モーター分子の作動機構の構造生物学的・生物物理学的解析。

- ① モーター分子 KIF の動きの仕組みの解明の為には、レールである微小管との相互作用の解析が不可欠である。この目的には、クライオ電子顕微鏡が非常に有効である。電解放射型透過型電子顕微鏡を用い精度の高い画像解析により、2次構造に迫る 10

Å の解像度を達成した。(Kikkawa & Hirokawa *EMBO J* 2006)

- ② ATP 加水分解の律速段階である Mg⁺⁺ADP から ADP 状態 にいたる課程の構造を KIF1A のモーター領域について X線結晶解析により初めて解いた。ADP は Mg 及びその配意水の密な水素結合ネットワーク (Mg-water cap) に覆われ、ATP ポケット内にトラップされ、さらに Switch I, Switch II を介して L7 に結合し安定化されていた。L7 の先端部は微管センサーとして働き beta tubulin の H4 helix を認識すると静電的引力により引かれる。すると L7 と ADP の周りの結合が外れ、Mg-water cap が外れ、ADP が出て行く。ATP 加水分解の重要なステップである微管による化学的チェックポイント解除の原子レベルの機構が明



らかとなった。(Nitta et al. *Nature Struct Mol Biol* 2008) (図5)

[図5]

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- 1) Nakata, T. et al. Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J Cell Biol* (掲載確定 (印刷中)) 2011.
- 2) Yin, X., Y. Takei, M. A. Kido and N. Hirokawa. Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels. *Neuron* 70: 310-325, 2011.
- 3) Ueno, H., X. Huang, Y. Tanaka, and N. Hirokawa. KIF16B/Rab14 molecular motor complex is critical for early embryonic development by transporting FGF receptor. *Develop Cell* 20: 60-71, 2011.
- 4) Hirokawa, N., S. Niwa and Y. Tanaka. Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68: 610-638, 2010.
- 5) Terada, S., M. Kinjo, M. Aihara, Y. Takei, and N. Hirokawa. Kinesin-1 Hsc70-dependent mechanism of slow axonal and its relation to fast axonal transport. *EMBO J* 29: 843-854, 2010.
- 6) Okada, Y. and N. Hirokawa. Observation of Nodal Cilia Movement and Measurement of Nodal Flow. *Method Cell Biol* ed. by S. M. King and G. J. Pazour, Academic Press. Elsevier Inc. 91: 265-285, 2009.
- 7) Hirokawa, N., R. Nitta and Y. Okada. The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 877-884, 2009.
- 8) Zhou R., S. Niwa, N. Homma, Y. Takei, and N. Hirokawa. KIF26A is an unconventional kinesin and regulates GDNF-Ret signaling in enteric neuronal development. *Cell* 139: 802-813, 2009.
- 9) Hirokawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka, and S. Niwa. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 682-696, 2009.
- 10) Hirokawa, N., Y. Okada and Y. Tanaka. Fluid dynamic mechanism responsible for breaking the left-right symmetry of the human body: The nodal flow. *Ann Rev Fluid Mechanics*. 41: 53-72, 2009.
- 11) Niwa, S., Y. Tanaka and N. Hirokawa. KIF1beta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat Cell Biol* 11: 1269-1276, 2008.
- 12) Nitta, R., Y. Okada and N. Hirokawa. Structural model for strain-dependent microtubule activation of Mg-ADP release from kinesin. *Nat Struct & Mol Biol* 15 (10): 1067-1075, 2008.
- 13) Hirokawa, N. and Y. Noda. Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88: 1089-1118, 2008.
- 14) Guilaud, L., R. Wong and N. Hirokawa. Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CamKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat Cell Biol* 10: 19-29, 2008.
- 15) Nakata, T and N. Hirokawa. Neuronal Polarity and the Kinesin Superfamily Proteins. *Science STKE* 6 February 2007: pe6.
- 16) Kikkawa, M. and N. Hirokawa.

High-resolution cryo-EM maps show the nucleotide binding pocket of KIF1A in open and closed conformations. *EMBO J* 25: 4187 - 4194, 2006.

- 17) **Hirokawa, N.** mRNA Transport in Dendrites: RNA Granules, Motors, and Tracks. *J Neurosci* 26: 7139-7142, 2006.
- 18) Midorikawa R., Y. Takei, and N. Hirokawa. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell* 125: 371-383, 2006.
- 19) **Hirokawa, N.**, Y. Tanaka, Y. Okada and S. Takeda. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125 (1): 33-45, 2006.

[学会発表] (計 104 件)

1. N. Hirokawa. Intracellular transport and kinesin superfamily molecular motors (KIFs): Key regulators for neuronal function, development and tumorigenesis. (Plenary Lecture) 6th International APOCB Congress for Cell Biology. Feb 4, 2011. Shangri-La, Manila, Philippines.
2. N. Hirokawa. Kinesin superfamily molecular motors, KIFs and intracellular transport: Mechanism of motility. 2010 Keystone Symposia Meeting, "Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology." January 12, 2010. Beaver Run Resort, Breckenridge, Colorado, USA.
3. N. Hirokawa. 6th FENS (Forum of European Neuroscience). (Human Frontier Science Program Lecture.) July 13, 2008. Geneva, Switzerland.
4. N. Hirokawa. Nobel Mini Symposium 38 - Frontiers in Medicine Series. Active Dendrites. May 18, 2006. Stockholm, Sweden. ほかに

[図書] (計 2 件)

- 1) **Hirokawa, N.**, Y. Tanaka and Y. Okada. Left-Right determination: Involvement of molecular motor KIF3, cilia, and nodal flow. "*Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*." July 2009; 1:a000802.
- 2) **Hirokawa, N.** and R. Takemura. Intracellular transport and kinesin superfamily proteins: structure, function and dynamics. In "Controlled Nanoscale Motion, Lecture Notes in Physics, Nobel Symposium 131," ed by H. Linke and A. Mansson, Springer-Verlag, 711: 85-121, 2007.

[その他]

ホームページ: <http://cb.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣川 信隆 (HIROKAWA NOBUTAKA)

東京大学・大学院医学系研究科・特任教授

研究者番号: 20010085

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

(H18, H19: 研究分担者→H20)

・中田 隆夫 (NAKATA TAKAO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 50218004

・野田 泰子 (NODA YASUKO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 50262019

(4) 研究協力者

(H18, H19: 研究分担者→H20: 連携研究者→H21, H22)

・金井 克光 (KANAI YOSHIMITSU)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 80218004

・武井 陽介 (TAKEI YOSUKE)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 20272487

・岡田 康志 (OKADA YASUSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号: 50272430

・田中 庸介 (TANAKA YOSUKE)

東京大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号: 90302661

・仁田 亮 (NITTA RYO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40345038

・本間 典子 (HOMMA NORIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 50345039

・三木 玄方 (MIKI HARUKATA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10361461

・小川 覚之 (OGAWA TADAYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 40436572

・矢島 孔明 (YAJIMA HIROAKI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号: 30376412