

平成 22年 5月 27日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700310

研究課題名 (和文) キネシンによる神経極性の認識機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms for recognition of neuronal polarity by kinesin

研究代表者 小西 慶幸

(KONISHI YOSHIYUKI)

浜松医科大学・分子イメージング先端研究センター・准教授

研究者番号：00382838

## 研究成果の概要 (和文)：

細胞内輸送において重要な役割を担う分子、キネシンのモーター領域は軸索を認識することが知られているが、これに関わる分子機構は明らかにされていなかった。本研究により神経細胞内の微小管を構成するチューブリンのカルボキシル末端におけるチロシン化/脱チロシン化のアミノ酸修飾が、キネシンの輸送方向を制御することを明らかにした。また、チロシン化を担う酵素、TTL を神経細胞でノックダウンすることにより、微小管修飾を介したキネシンの方向性の制御が神経極性の維持に必要であることが明らかになった。以上の結果より、細胞内の物質輸送制御ならびに神経細胞の形態制御における新しい分子機構が解明された。

## 研究成果の概要 (英文)：

Neurons form distinctive axonal and dendritic compartments that are important for directional signaling, but the mechanisms that discriminate axons from dendrites remain elusive. In this study, we found that tyrosinated tubulins that are abundant in somatodendrites prevent kinesin-1 from binding to microtubules, thereby regulate polarized kinesin-1 trafficking to the axon. Consistently, inhibition of tubulin tyrosination in hippocampal neurons disrupted neuronal polarity. Our study identifies a molecular mechanism that discriminates the axonal microtubules from somatodendritic microtubules, and provided novel molecular mechanisms involved in the neuronal morphogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,120,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経科学一般

キーワード：(1) キネシン (2) トラフィック (3) 微小管 (4) チューブリン (5) 神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞の機能発現にはタンパク質やRNAなどの分子が軸索や樹状突起へ正しく輸送されることが必要である。また神経細胞の極性の確立においては軸索決定因子が特定の神経突起に輸送されることが必要である。これらの輸送極性の決定には、キネシンファミリーの微小管モーター蛋白質による神経細胞の極性の認識が中心的な役割を果たしている。しかし、キネシンが軸索、樹状突起それぞれの微小管レールの違いを認識する機構は十分に解明されていなかった。また、神経細胞の微小管は多様な翻訳後修飾を受けることが知られていたが、神経極性におけるその機能は明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究ではキネシン分子が軸索、樹状突起内の微小管レールを選択する機構を明らかにすることで、神経極性認識の分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、キネシン分子において軸索認識に関わる領域を同定するとともに、軸索を認識できないキネシンを作製する。得られた変異体キネシンと野生型キネシンとの分子特性を比較解析することで、軸索-樹状突起認識の機構を解明することを目的とした。特に、キネシンが軸索、樹状突起における微小管の違いを認識すると仮定し、微小管結合因子や翻訳後修飾、特に神経細胞内に見られるチロシン化、アセチル化、ポリグルタミン酸化に着目し、認識の特異性について解析を行うことを考慮した。

## 3. 研究の方法

キネシンのモーター領域は軸索を認識することが知られているが、これに関わる分子内領域は明らかにされていなかった。様々な変異を導入したキネシンのモーター領域を蛍光タンパク質、GFPと融合させ、神経細胞内で発現させる事でその細胞内局在を解析した。これにより軸索認識に関わる領域の同定を試みた。野生型と両極局在型変異体キネシンに結合する因子の組換え体タンパク質を精製し、微小管に対する結合性について直接比較することで輸送極性を制御する因子の同定を行った。

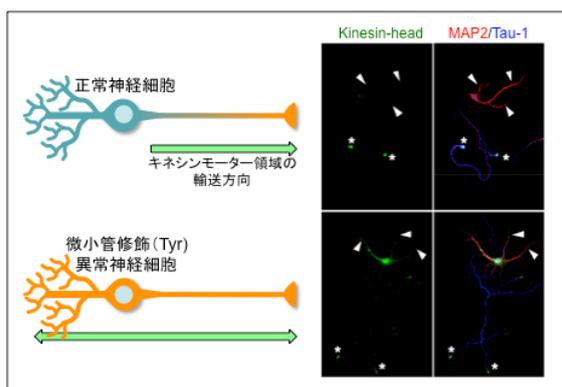
この解析により関与が示唆されたチロシン化について、神経細胞内の分布を解析すると共に、チロシン化酵素であるTTLを神経細胞内でsiRNAを用いてノックダウンすることで、チロシン化微小管を低下させた神経細胞を得た。この神経細胞内で、キネシンの分布を解析するとともに、神経細胞の形態について解析を行った。

## 4. 研究成果

キネシン分子に様々な変異を導入することで、軸索認識に関わる領域の同定に成功した。この結果、キネシンのモーター領域に存在するbeta5-Loop8と呼ばれる領域にアミノ酸置換を導入した変異体では、軸索のみに局在していたキネシンのモーター領域が、軸索と樹状突起の両方に局在するようになった。野生型と両極局在型変異体キネシンの微小管結合能について直接比較することで輸送極性を決定する因子の同定を行った。その結果、チューブリンそのものに対する結合性が変異により上昇することが明らかになった。さらなる解析により、異なった修飾を持った微小管を用いて結合の違いを比較し

た結果、変異体では神経細胞内の微小管を構成するチューブリンカルボキシル末端のチロシン化／脱チロシン化に対する認識できず、このことがキネシンの輸送方向の制御に関わることを明らかにした。さらに、チロシン化を担う酵素、TTL を神経細胞でノックダウンすることにより、キネシンを介した輸送極性の制御が、神経極性の維持に必要である事が明らかになり、神経細胞の形態制御機構について新しい知見を得ることができた。細胞内の物質輸送制御ならびに神経細胞の形態制御における新しい分子機構が解明された。(下図)。

図：チロシン化による軸索、樹状突起の識別。



正常細胞（上）では樹状突起の微小管がチロシン化（下）されることで標識され、キネシンのヘッド領域による軸索の認識が可能になる。チロシン化を抑制した細胞（下）では軸索と樹状突起の微小管構造の違いが認識できなくなるため、両方の神経突起にキネシンのヘッド領域の局在が観察された。

## 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 6 件)

- 1) Sugiura Y, Konishi Y, Zaima N, Kajihara S, Nakanishi H, Taguchi R, Setou M. Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *J Lipid Res.* 50:1776-1788 (2009) 査読有.
- 2) Konishi Y, Setou M. Tubulin Tyrosination Navigates the Kinesin-1 Motor Domain to Axons *Nat Neurosci.* 12:559-567 (2009) (corresponding author) 査読有.
- 3) 小西慶幸  
神経細胞の中にある交通標識  
神経科学ニュース、2009・No4 (vol.176) (2009)  
査読無.
- 4) Yamada MK, Konishi Y, Kakinoki B, Ikegami K, Setou M. Enhancement of Trk Signaling Pathways by the Cholestane Amide Conjugate MCC-257. *J Pharmacol Sci.* 108:131-134 (2008) 査読有.
- 5) Sugiura Y, Shimma S, Konishi Y, Yamada MK, Setou M. Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS ONE.* 3:e3232 (2008) 査読有.
- 6) Yang H, Takagi H, Konishi Y, Ageta H, Ikegami K, Yao I, Sato S, Hatanaka K, Inokuchi K, Seog DH, Setou M. Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1 (Tmub1/HOPS) facilitates surface expression of GluR2-containing AMPA receptors. *PLoS ONE.* 3:e2809 (2008) 査読有.

〔学会発表〕（計 7 件）

1) Konishi Y, Tsuchiya R, Ohata K, Ikegami K, Setou M.

Two distinct enzymes catalyze the alpha- and beta-tubulin polyglutamylation in brain.

第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12 (2009)

2) Konishi Y, Setou M.

The mechanism of axonal recognition by kinesin-I.

ASCB/JSCB/CDB Meeting, Kyoto, 09/21-23 (2009)

3) 小西慶幸、瀬藤光利

微小管チロシン化による神経極性維持機構

第 32 回日本神経科学学会大会、名古屋、9/16-18 (2009)

4) 小西慶幸、瀬藤光利

チューブリンのチロシン化修飾による軸索へのキネシン輸送制御

第 52 回日本神経化学学会大会、伊香保、6/21-24 (2009)

5) Konishi Y, Setou M.

Tubulin tyrosination regulates the polarized trafficking of kinesin-1 to the axon

第 61 回日本細胞生物学会、名古屋、06/02-04 (2009)

6) Konishi Y, Setou M.

The  $\beta$  5-L8 region of Kinesin links tubulin tyrosination to polarized trafficking in neurons.

The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, 11/15-19 (2008)

7) 小西慶幸、池上浩司、佐藤尚武、瀬藤光利  
チューブリンポリグルタミン酸付加の神経細胞における機能解析

第 31 回日本神経科学学会大会、東京、7/9-11 (2008)

〔図書〕（計 1 件）

1) 小西 慶幸

プローブ作製法、リン酸カルシウム法、RNAi による遺伝子抑制

改訂第 3 版 遺伝子工学実験ノート（下巻）、田村隆明編、羊土社: 31-44, 159-180 (2009)

〔その他〕

ホームページ等

<http://konishilab.web.fc2.com/>

<http://researchmap.jp/konishi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 慶幸 (KONISHI YOSHIYUKI)

浜松医科大学・分子イメージング先端研究センター・准教授

研究者番号：00382838