

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06577

研究課題名（和文）ユビキチンリガーゼによる神経内モータータンパク質分布制御

研究課題名（英文）Regulation of distribution of motor proteins in synapse by ubiquitin ligase

研究代表者

菊島 健児（Kikushima, Kenji）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：50569142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチンプロテアソームによるタンパク質分解はの様々な細胞機能に重要である。我々はE3ユビキチンリガーゼであるSCRAPPERが神経軸索内輸送を担うモータータンパク質であるKIF1を選択的に分解することを見出した。神経内のどこでKIF1分解が行われているのかを可視化するためオートファジー検出蛍光タンパク質を用いたイメージングを行い、SCRAPPER-KOマウス、ならびにユビキチンプロテアソーム阻害剤を用いた解析により、SCRAPPERが神経細胞内におけるKIF1分布を制御するとともに、神経軸索内輸送を調整している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KIF1は神経内軸索輸送において重要な機能を担っているにもかかわらず、その活性制御や分解過程に関してはほとんど明らかになってはいなかった。我々は、脳内でユビキチン化プロテアソーム系タンパク質分解を担うSCRAPPERがKIF1の選択的な分解を担っており、KIF1は順行性軸索輸送を担った後に、「使い捨てモータータンパク質」としてSCRAPPERにより分解されている可能性を見出した。このことはユビキチンプロテアソームによるタンパク質分解がモータータンパク質の神経内局在、ならびに小胞輸送機構を制御するといった、これまでにない機構を提唱するものである。

研究成果の概要（英文）：Protein degradation by the ubiquitin proteasome system plays important roles for various cellular functions. We found that SCRAPPER, an E3 ubiquitin ligase, selectively degrades KIF1, a motor protein responsible for axonal transport in neuron. To visualize the location of KIF1 degradation in neurons, we performed bioimaging using an autophagy-detecting fluorescent protein with SCRAPPER-KO mice as well as ubiquitin proteasome inhibitors. We found that SCRAPPER regulates the distribution of KIF1 in neurons and may modulate the axonal transport.

研究分野：生物物理学関連

キーワード：分子モーター ユビキチンリガーゼ 軸索輸送 神経細胞 パイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

モータータンパク質は細胞運動だけでなく、細胞分裂や細胞内の物質輸送といった多くの生命現象の基礎として重要である。キネシンは神経内における順行性軸索輸送を担っており、神経細胞の成長と生存に不可欠である。脳神経内に多く局在する KIF1 キネシンは、代表的なコンベンショナルキネシン(KIF5)と並んで最もよく研究されている。Charcot-Marie-Tooth 病をはじめとした脳神経疾患の研究を通じて、KIF1 は神経の伸長と維持に重要な役割を果たすことが明らかとなっている(Tanaka et al. Neuron 2016; Niwa et al. Cell Rep. 2016)。瀬藤らを中心とした我々のグループでも、神経細胞内における KIF1 の分布を制御する因子として Tubulin Tyrosine Ligase-Like protein (TTLL)-1 による微小管のポリグルタミン酸化が重要であることを明らかにした (Ikegami et al. PNAS 2007 ; Lessard et al. J Biol Chem 2019)。

実際の神経細胞内においては様々な因子によりモータータンパク質活性が調節されていると考えられてはいるものの、その実態についてはほとんど明らかになってはいない。また、キネシンは細胞内で目的の地点まで到達した後にどのようになるのか、すなわち、不活性化されたのちに逆行性輸送を担うモータータンパク質であるダイニンによって再び開始点に回収されるのか、あるいは運んだ先で分解されるのかに関しても明らかにされてはいない。

これまでに、我々の研究グループでは、脳内でユビキチン化プロテアソーム系タンパク質分解の基質特異性を担う酵素として E3 リガーゼである SCRAPPER を見出した。これまでに、SCRAPPER は神経シナプス末端における Rab3-interacting molecule 1 (RIM1) の分解を促すことでシナプス情報伝達を調節しており、遺伝子改変マウスの解析から SCRAPPER は長期記憶形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

我々は SCRAPPER の作用因子のスクリーニングを続けることで、KIF1 キネシンを見出した。本研究では SCRAPPER 遺伝子改変マウス由来の神経細胞、ならびに培養細胞を対象とし、様々なイメージング技術を応用することにより、詳細な SCRAPPER と KIF1 の相互作用と神経内局在を分子レベルで明らかにする。これらの実験を通じて、ユビキチンプロテアソームによるタンパク質分解がモータータンパク質の神経内局在、ならびに小胞輸送機構を制御するといった新規機構の検証を行う。

3. 研究の方法

SCRAPPER 遺伝子改変マウス、ならびにユビキチンプロテアソーム阻害剤を用いることにより、SCRAPPER による KIF1 分解を生化学的に検証する。最新の超解像イメージング技術を用いることにより、脳神経内における KIF1 と SCRAPPER の相互作用を検証するとともに、オートファジー検出蛍光タンパク質 : SRAI (Katayama et al. Cell 2020) を用いることで、神経内のどこで KIF1 分解が行われているのかを可視化する。更に、オプトジェネティクスツール iLID (Guntas et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2015) を用いて

SCRAPPER の細胞内局在を制御し、SCRAPPER の局在変化が KIF1 の局在や機能、更には神経細胞形態やシナプス小胞分泌に与える影響を調査する。

4 . 研究成果

KIF1 がユビキチンプロテアソーム系により分解されており、SCRAPPER の結合部位を生化学的に明らかにした。神経細胞内においても全長の KIF1 と SCRAPPER は共局在を示すが、生化学実験より示唆された SCRAPPER 結合部位を持たない KIF1 コンストラクトは SCRAPPER との共局在を示さなくなることを確認した。野生型のマウス神経初代培養細胞において、KIF1 は広く神経末端に局在を示し、神経終末への集積は観測されないが、ユビキチンプロテアソーム阻害剤を添加することで、KIF1 がシナプス末端に集積を示す様子が観測された。同様の神経末端における KIF1 の集積は、SCRAPPER-KO マウス由来の神経細胞においても観測された。これらのことから、軸索輸送を終えてシナプス末端にまで到達した KIF1 は、SCRAPPER による分解を受け、「使い捨てのモータータンパク質」として働いている可能性が示唆される。

また、FRET を用いた pH 依存的に蛍光波長が変化するオートファジー検出用蛍光タンパク質 (SRAI) により細胞内における KIF1 分解を可視化可能な実験系を確立。細胞飢餓状態によりオートファジーを誘発させることで、KIF1 分解の検出に成功した。

更に、オプトジェネティクスツール iLID により SCRAPPER の細胞内局在を制御し、SCRAPPER の局在変化が KIF1 キネシンや RIM1 の局在、機能に与える影響を調査するツールを樹立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀬藤 光利 (Setou Mitsutoshi) (20302664)	浜松医科大学・国際マスメージングセンター・センター長 (13802)	
研究分担者	矢尾 育子 (Yao Ikuko) (60399681)	関西学院大学・理工学部・教授 (34504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関