

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659011

研究課題名（和文）

カーゴ分子によるキネシン-1 モーター活性制御機構の解明

研究課題名（英文）

Mechanism of kinesin-1 activation by cargo receptor

研究代表者

鈴木 利治（SUZUKI TOSHIHARU）

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：80179233

研究成果の概要（和文）：順行輸送モーターであるキネシン-1 は、通常不活性状態であるが、輸送カーゴ分子と相互作用することによって活性化される。我々が単離したアルカデインはキネシン-1 軽鎖(KLC)に結合し、キネシン-1 モーターを活性化する事が明らかになっていたが、その詳細な分子機構は未解明であった。本研究では、アルカデインの細胞質ドメインの WD モチーフがキネシン-軽鎖である KLC の TPR 領域と相互作用する事でキネシン-1 を活性化する事を初めて明らかにした。さらに、WD ドメイン内の重要なアミノ酸と 6 つの TPR ドメインの重要な領域を決定した。

研究成果の概要（英文）：Kinesin-1 anterogradely transports vesicles containing cargo proteins when a protein-protein interaction activates it from an inhibited state. The C-terminal cytoplasmic region of Alcadin interacts with the kinesin light-chain KLC tetrapeptide repeat (TPR) region, activating kinesin-1 association with vesicles and anterograde transport. Only 10 amino acids WD motif was enough to activate kinesin-1 motor. This mechanism contributes to explain how kinesin-1 can organize the transport of a wide variety of cargo molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

キネシンファミリー分子は数多く報告され、その生物物理学の特徴は、これまで良く解析されてきた。しかしながら、どのような仕組みで輸送小胞やオルガネラに結合・解離してカーゴを順行輸送するのかに関する分子機構は、未解明の点が多く残されていた。

Alcadin は、研究代表者が見いだした神経特異的膜タンパク質である(*J. Biol. Chem.* [2003] 278, 49448)り、キネシン-1 と高親和性に直接結合して輸送されるカーゴ受容体である事を明らかにしてきた。さらに、Alcadin は単なるカーゴ受容体ではなく、キネシン-1 分子を活性化出来る初めてのカー

ゴ受容体である事を報告して来た (*EMBO J.* [2007] 26, 1475). しかしながら、その分子機構はまだ解明されていなかった。神経細胞など大型の細胞では、細胞内輸送機構が発達しており、輸送システムの破綻は神経活動に影響を与え、神経変性疾患を引き起こすと考えられている。従って、キネシン-1による小胞輸送の制御システムを解明することは細胞生物学的に需要であるだけでなく、神経変性疾患の発症メカニズムを解明し、新たな創薬標的を探索する上でも求められている研究である。

## 2. 研究の目的

Alcadein が、通常不活性化状態にあるキネシン-1 を活性化する分子機構を解明する事で、カーゴ受容体が小胞とモーターを受動的に接続する分子ではなく、能動的にモーターを活性化する機能分子であることを実証し、順行輸送モーターの活性化機構に新たな概念を提唱することを目的とする。

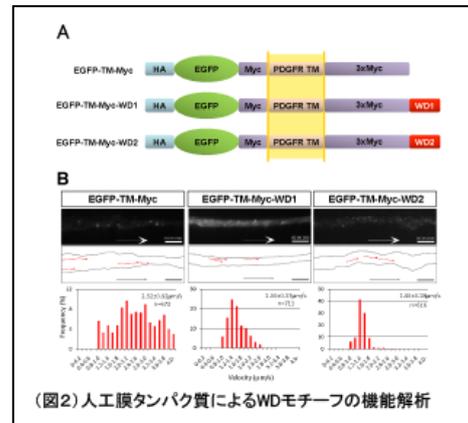
## 3. 研究の方法

Alcadein およびキネシン-1 軽鎖の機能部位を生化学的に同定し、神経細胞内の輸送を全反射顕微鏡で解析する事で機能解明を行う。機能部位の解明には、遺伝子工学的手法を用いて各種ドメイン・モチーフ欠質・変異タンパク質を作製し、*in vitro* および *in vivo* における結合実験から必要領域を同定した。さらに、機能部位だけをもつ人工膜タンパク質を作製し、キネシン-1 が活性化し膜小胞に結合して微小管上を順行に移動することを GFP 融合タンパク質を発現させて行い、全反射顕微鏡で解析する。輝点の速度、順行性等を解析することで、ドメインの機能実証を行う。

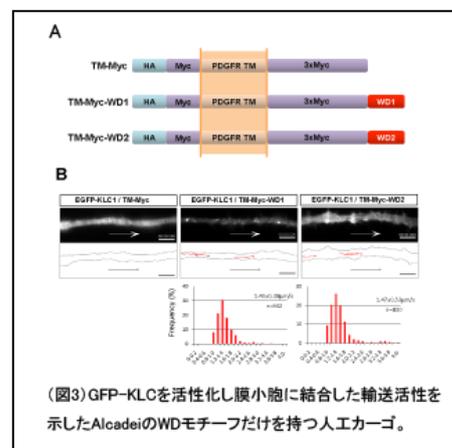
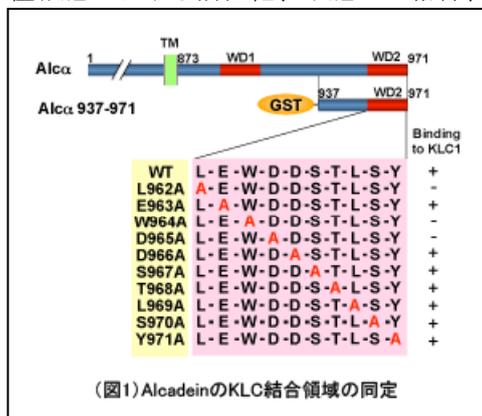
## 4. 研究成果

Alcadein および KLC-1 の各種欠失変異体を作製し、生化学的に相互作用に重要な領域を同定した。同定した Alcadein の WD モチーフと KLC の TPR モチーフの機能検定を GFP-KLC の神経細胞における活性化、小胞への結合、順

行への輸送、微小管への結合で検証し、Alcadein WD モチーフの 10 アミノ酸が、キネシン-1 モーターの活性化に必要である事を明らかにした (図 1)。

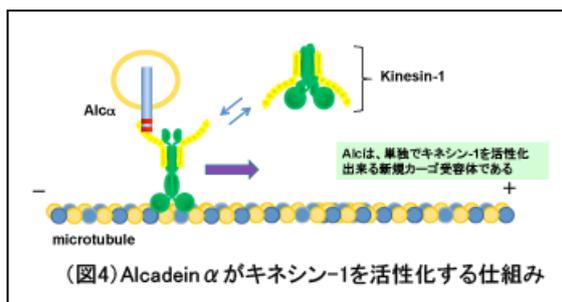


さらに、この 10 アミノ酸だけを含む人工的カーゴ受容体を作製し、神経細胞に発現させ、この領域だけが細胞内でキネシン-1 の活性化に必要である事を実証した。本成果は、カーゴ分子の特定のアミノ酸配列が、不活性化状態で存在するキネシン-1 を活性化出来ることを示した (図 3)。図 3 では、通常キネシン-1 は、キネシン重鎖 (KHC) とキネシン軽鎖 (KLC) が 4 量体を形成していても、autoinhibition 状態を呈しており、微小管に結合活性を持たず、また、輸送小胞にも接続出来ていない。すなわち、全反射顕微鏡で解析した場合、移動する小胞として GFP-KLC を観測できない。しかしながら、Alcα の 2 つの WD モチーフのいずれかを持つ人工カーゴ受容体を同時に神経細胞に発現させると、図に示すように順行方向へ輸送される膜小胞が輝点として検出出来るようになる。この膜小胞が、kinesin-1 によって輸送されていることは速度解析および KLC の発現を抑制した解析系で確認している。



また、KLC 側の必要領域も同様の手法で解析した。これまでの研究代表者の解析から、KLC の C 末端側が WD モチーフとの相互作用に必要である事は判明していた (*EMBO J.* [2007]26, 1475)。KLC1 の場合、C 末側には 6 つの TPR モチーフが存在している。今回、KLC1 の各種欠質変異体を作製して解析した結果、WD モチーフとの相互作用には、2-5 番目の TPR モチーフが必要である事が初めて明らかになり、また、この領域はキネシン-1 の活性化にも重要であることを見いだした。

一方、KLC1 のこの領域には、JIP1b というアダプター分子が結合することが知られている。JIP1b は APP (アミロイド前駆体タンパク質) という他のカーゴ受容体と結合する事で、APP をキネシン-1 に接続することを研究代表者は報告してきた (*J. Biol. Chem.* [2002] 277, 20070)。JIP1 の KLC1 への結合は、キネシン-1 モーターを活性化出来ない。このことから、Alc の WD モチーフは KLC1 の TPR 領域へ結合する事でキネシン-1 の構造変換を引き起こし、autoinhibition 状態を解除すると考えられる (図 4)。



本研究成果の詳細な報告は、*Traffic* 誌に "A small peptide sequence is sufficient for initiating kinesin-1 activation through part of TPR region of KLC1" として報告した (*Traffic* 13, 834-848. (2012))。

## 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 8 件)

① Kawano, T., Araseki, M., Araki, Y., Kinjo, M., Yamamoto, T. and Suzuki, T. : A small peptide sequence is sufficient for initiating kinesin-1 activation through part of TPR region of KLC1. *Traffic* 13, 834-848. (2012) 査読有

② Dumanis, S., Chamberlain, K. A., Sohn, Y. J., Lee, Y. J., Guenette, S. Y., Suzuki, T., Mathews, P. W., Pak, D. T. S., Rebexk, G. W., Suh, Y-h., Park, H-S., Hoe, H-S. :

FE65 as a link between VLDLR and APP to regulate their trafficking and processing. *Mol. Neurodegen.* **7:9.** (2012) doi:10.1186/1750-1326-7-9 査読有

③ Cui, H., Hung, A. C., Klaver, D. W., Suzuki, T., Freeman, C., Narkowicz, C., Jacobson, G. and Small, D. H. : Effects of heparin and enoxaparin on APP processing and Ab production in primary cortical neurons from Tg2576 mouse. *PLoS One* 6, e23007. (2011) doi:10.1371/journal.pone.0023007 査読有

④ Saito, Y., Akiyama, M., Araki, Y., Sumioka, A., Shiono, M., Taru, H., Nakaya, T., Yamamoto, T. and Suzuki, T. : Intracellular trafficking of amyloid  $\beta$ -protein precursor (APP) regulated by novel function of X11-like. *PLoS ONE* 6, e22108. (2011) doi:10.1371/journal.pone.0022108 査読有

⑤ Cheung, K. L., Ko, JMY, Lung H-L., Chang K-W., Stanbridge, E. J., Zabarovsky, E. R., Tokino, T., Kashima, L., Suzuki, T., Kwong, D L-w., Chua, D., Tsao, S. W., Lung, M. L. : Cystein-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF $\kappa$ B-mediated pro-angiogenic cytokines transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8390-8395 (2011) 査読有

⑥ Hata, S., Fujishige, S., Araki, Y., Taniguchi, M., Urakami, K., Peskind E., Akatsu, H., Araseki, M., Yamamoto, K., Martins, N. R., Maeda, M., Nishimura, M., Levey, A., Chung, K. A., Montine, T., Leverenz, J., Fagan, A., Goate, A., Bateman, R., Holtzman, D. M., Yamamoto, T., Nakaya, T., Gandy, S. and Suzuki, T. : Alternative g-secretase processing of g-secretase substrates in common forms of mild cognitive impairment and Alzheimer disease: Evidence for g-secretase dysfunction. *Ann. Neurol.* 69, 1026-1031. (2011) 査読有

⑦ Kawai, T., Nakaya, T., and Suzuki, T. : Role of the intramolecular regions of FE65 in its trans-accumulation and in p53 stabilization in the nuclear matrix of

osmotically stressed cells  
*FEBS Lett.* 584, 765-769. (2010) 査読有

⑧ Minami, S. S., Sung Y. M., Dumanis, S. B., Chi, S. H., Burns, M. P., Ann, E-J., Suzuki, T., Tuner, R. S., Park, H-S., Pak, D. T. S., Rebeck, G. W. and Hoe, H-S. : The cytoplasmic adaptor protein X11a and extracellular matrix protein Reelin regulate ApoE receptor 2 trafficking and cell movement.  
*FASEB J.* 24, 58-69. (2010) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① 方家、齋藤有紀、鈴木利治 APP代謝・輸送制御を担う X11Like (X11L)の機能ドメイン 日本薬学会第132年会 2012年3月28日~31日 北海道大学 (札幌市)

② Araseki, M., Kawano, T., Araki, Y., Kinjo, M., Yamamoto, T., Suzuki, T. Molecular mechanism of kinesin-1 activation by Alcadin  $\alpha$ . 51th The American Society for Cell Biology annual meeting, Dec 3-7, 2011, Colorado Convention Center (USA)

③ Saito, Y., Suzuki, T. Intracellular Trafficking of the Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor Regulated by PDZ domains of X11-Like. 51th The American society for cell biology annual meeting, Dec 3-7, 2011, Colorado Convention Center (USA)

④ 千葉杏子、野澤啓輔、荒関雅彦、齋藤有紀、金城政孝、鈴木利治 JIP-KLC1 結合による APP 輸送の効率化 第84回 日本生化学会大会 2011年9月21~24日 国立京都国際会館 (京都)

⑤ Fang, J., Konno, T., Horikoshi-Sakuraba, Y., Hata, S., Saito, Y., Maeda, M., Akatsu, H., Suzuki, T. Quantification of plasma p3-Alca level with sELISA systems. Alzheimer's Association International Conference 2011 July 16-21, 2011, Porte de Versailles (France)

⑥ Hata, S., Urakami, K., Taniguchi, M., Akatsu, H., Gandy, S., Suzuki, T. Alternative gamma-secretase processing in sporadic Alzheimer's disease suggested by p3-Alc peptide, metabolic product of Alcadin. Alzheimer's Association International Conference 2011 July 16-21, 2011, Porte de Versailles (France)

⑦ Suzuki, T. Intracellular trafficking and metabolism of APP regulated by novel function of X11L. Alzheimer's Association International Conference 2011 "Developing Topics" July 16-21, 2011, Porte de Versailles (France)

⑧ Chiba, K., Nozawa, K., Araseki, M., Kinjo, M., Taru, H., Suzuki, T. Molecular mechanism of JIP1b-mediated APP association to kinesin-1 in APP transport and metabolic regulation. Alzheimer's Association International Conference 2011 July 16-21, 2011, Porte de Versailles (France)

⑨ Araseki, M., Nozawa, K., Furukori, K., Davis, R. J., Taru, H., Kinjo, M., Suzuki, T. Role of Jip1b in the fast axonal transport of APP by kinesin-1 in neuron. The American Society for Cell Biology 50th Annual meeting December 11-15, 2010, Pennsylvania Convention Center (USA)

⑩ Gotoh, N., Maruta, C., Suzuki, T., Yamamoto, T. Intracellular dynamics of a kinesin-1 cargo Alcadin. The American Society for Cell Biology 50th Annual meeting December 11-15, 2010, Pennsylvania Convention Center (USA)

⑪ Suzuki, T., Matsushima, T., Kawano, T., Araki, Y., Kinjo, M., Yamamoto, T. Alcadin as a kinesin-1 cargo receptor with motor regulation. The American Society for Cell Biology 50th Annual meeting December 11-15, 2010, Pennsylvania Convention Center (USA)

⑫ 千葉杏子、野澤啓輔、内藤志保、多留偉功、鈴木利治 APP 輸送において働く分子: JIP1b と KLC の結合機構の詳細 第29回日本認知症学会学術集会 2010年11月5~7日 ウィンクあいち (愛知)

⑬ Hata, S., Urakami, K., Fagan, A., Peskind, E., Akatsu, H., Maeda, M., Levey, A., Chung, K. A., Montine, T., Leverenz, J., Goate, A., Bateman, R., Holzman, D. M., Gandy, S., and Suzuki, T.  $\gamma$ -secretase dysfunction in sporadic Alzheimer's disease suggested by p3-Alc peptide, metabolic product of Alcadin. Alzheimer's Association ICAD2010 July 10-15 2010, Hawai'i Convention Center (USA)

⑭ Shiono, M., Akiyama, M., Saito, Y. and Suzuki, T. Functional reagon of X11L in the regulation of APP metabolism and trafficking. Alzheimer's Association ICAD2010 July 10-15 2010, Hawai'I Convention Center (USA)

⑮ Piao, Y., Gotoh, N., Kondo, M., Saito, Y., Hata, S., Yamamoto, T. and Suzuki, T. Expression and localization of Alcadein along with X11L and APP in mouse brain. Alzheimer's Association ICAD2010 July 10-15 2010, Hawai'I Convention Center (USA)

⑯ Suzuki, T., and Mizumaru, C. Regulation of APP  $\alpha$ -secretase activity involued in protein palmitoylation by DHHC-12. Alzheimer's Association ICAD2010 July 10-15 2010, Hawai'I Convention Center (USA)

[図書] (計 1 件)

Hata, S., Saito, Y. and Suzuki, T. (2011) Alzheimer's disease as a membrane-associated enzymopathy of  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) secretases, in "Lipids and Cellular Membranes in Amyloid Disease" (Eds by Jelinek, R.) pp177-194. Wiley-VCH (ISBN: 978-3-527-32860-4)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/shinkei/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木利治 (SUZUKI TOSHIHARU)

研究者番号 : 80179233

### (2) 研究分担者

無

### (3) 連携研究者

無