

Kinesin-1 のアダプタータンパク質としての
BNIP-2 の機能解析

赤松 理恵
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能研究室
(川市 正史 教授)

平成 26 年 11 月 26 日提出

目次

| | |
|--|----|
| 1. 序論 | 3 |
| 2. 材料と方法 | 9 |
| 3. 結果 | 15 |
| 3.1 BNIP-2 は WED モチーフを介して KLC1 と結合する | |
| 3.2 過剰発現した BNIP-2 は細胞突起を誘導し、突起の末端に KLC および KHC とともに濃縮される | |
| 3.3 BNIP-2 は kinesin-1 によって輸送される | |
| 3.4 内在性 BNIP-2 は微小管に沿って顆粒状に分布する | |
| 3.5 BNIP-2 は Trans-Golgi network (TGN) に局在する | |
| 3.6 BNIP-2 はエンドソームに局在し、輸送される | |
| 3.7 BNIP-2 は phosphatidylserine (PS) と結合する | |
| 3.8 BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメイン内の Lys271 は PS への結合および細胞内局在に重要である | |
| 3.9 BNIP-2 の Cdc42 や Cdc42GAP 結合部位の変異は PS への結合や BNIP-2 の局在には影響を与えない | |
| 3.10 BNIP-2 は PS と共局在する | |
| 3.11 脱リン酸化型 BNIP-2 は PS との結合性が上昇する | |
| 3.12 BNIP-2 の Ser114 と Thr116 はリン酸化される | |
| 3.13 BNIP-2 の Ser114 と Thr116 のリン酸化は KLC1 や PS との結合、および細胞の形態変化に影響を与えない | |
| 3.14 BNIP-2 の局在とリン酸化は C2C12 筋芽細胞の分化前後で変化する | |
| 4. 考察 | 24 |
| 4.1 BNIP-2 の WED モチーフと KLC1 の結合 | |
| 4.2 BNIP-2 の細胞内局在 | |
| 4.3 BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインと PS の結合 | |
| 4.4 BNIP-2 のリン酸化による物質輸送制御 | |
| 4.5 BNIP-2 のミトコンドリアへの局在 | |
| 4.6 BNIP-2 の積み荷 | |
| 5. 図表 | 32 |
| 6. 謝辞 | 55 |
| 7. 参考文献 | 56 |

1. 序論

BNIP-2 タンパク質について

Bcl-2 ファミリータンパク質は細胞の生存とアポトーシスの制御に重要な役割を担うタンパク質である。このファミリータンパク質は Bcl-2 homology (BH) ドメインと呼ばれる保存された 4 つのモチーフ BH1、BH2、BH3、BH4 のうち少なくとも 1 つを含んでいる。これらのドメインによりアポトーシス促進性か抑制性かの特性が決定される(Adams et al., 1998)。アポトーシス促進性の Bcl-2 ファミリータンパク質は 2 つのグループに分けられる。1 つは Bad や Bid のような BH3 ドメインのみをもつグループであり、もう 1 つは Bax や Bak のような BH1、BH2、BH3 をもつグループである。近年、BH3-like ドメインをもつタンパク質として BNIP (Bcl-2 and adenovirus E1B-associated protein) が新たに Bcl-2 ファミリータンパク質のサブグループに加えられた(Zhang et al., 2003)。BNIP は Bcl-2 のホモログである adenovirus E1B 19kDa protein と相互作用するタンパク質として単離され、BNIP-1、BNIP-2、BNIP-3 の 3 つのメンバーに分けられている(Boyd et al., 1994)。これらのタンパク質は BH3-like ドメイン以外は互いのアミノ酸配列の相同性は低い。BNIP-1 と BNIP-3 は膜貫通ドメインを持ち、アポトーシス促進機能について研究が進んでいる(Nakajima et al., 2004, Zhang et al., 2009)。これに対し、BNIP-2 はアポトーシスへの関与よりも、以下に述べるように細胞の形態変化に与える影響について研究されている。

BNIP-2 は N 末端側に BH3-like ドメイン、C 末端側に CRAL-TRIO ドメインをもつ、314 アミノ酸からなるタンパク質である (図 1A)。CRAL-TRIO ドメインは、疎水性アミノ酸に富むドメインで、脂質との結合やタンパク質相互作用に関与する (図 1B)。BH3-like ドメインに比べ CRAL-TRIO ドメインはよく保存されていることから、BNIP-2 の機能に重要であると考えられる。BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインは Cdc42GAP の非触媒活性領域のアミノ酸配列と類似していることから BCH ドメイン (BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain) とも呼ばれる。このドメインは明確な GAP 活性化触媒ドメインを持たないが、アルギニンパッチモチーフ RRLRK (235-239aa) を介して GAP 活性をもつといわれている。また、BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメイン内の EYV (288-290aa) を介して Cdc42 に結合し、RRKMP (217-221aa) を介して Cdc42GAP に結合することも報告されている(Low et al., 2000)。

BNIP-2 は広範な組織で発現しており、様々な種類の培養細胞に BNIP-2 を過剰発現させると細胞突起が誘導され、その突起の末端に BNIP-2 が濃縮する。

BNIP-2 による細胞突起の誘導は、Cdc42 のドミナントネガティブ変異体である Cdc42T17N を BNIP-2 とともに細胞に発現させると阻害されることから、BNIP-2 の突起誘導は Cdc42 の活性に依存している (Zhou et al., 2005)。しかしながら、上記の BNIP-2 の機能に関する報告は、すべて BNIP-2 を細胞に過剰発現させた時に見られている現象であり、BNIP-2 の生理的な機能については不明な点が多く残されている。

caytaxin タンパク質について

371 アミノ酸からなるタンパク質 caytaxin は全長にわたって BNIP-2 と最も高い相同性を示す (図 1A)。BNIP-2 は広範な組織で発現しているのに対して、caytaxin は神経組織特異的に発現している。BNIP-2 と同様に、caytaxin の C 末端側には CRAL-TRIO ドメインが存在する。caytaxin をコードする *ATCAY* 遺伝子に変異が生じると、ヒトでは劣性遺伝性の Cayman 型運動失調症を発症し、マウスでは *Jittery* や *sidewinder* 型の運動失調症やラットでもジストニアを発症する (Bomar et al., 2003)。Cayman 型運動失調症のヒトでは、*ATCAY* 遺伝子の exon9 の塩基置換によるアミノ酸変異 S301R や、イントロン内の変異で生じたスプライシング異常による exon9 のスキップがみられる。exon9 は CRAL-TRIO ドメインの一部をコードしている。したがって、CRAL-TRIO ドメインは caytaxin タンパク質の正常な機能に重要である。

これまでに、caytaxin の CRAL-TRIO ドメインに kidney-type glutaminase (KGA) や peptidyl-prolyl isomerase (Pin1) が結合すると報告されている (Buschdorf et al., 2006; Buschdorf et al., 2008)。KGA はミトコンドリア内膜に局在するタンパク質でグルタミン酸をグルタミンに変換する酵素である。Pin1 はリン酸化 Ser/Thr-Pro 部位の *cis-trans* 異性化を行う酵素である。一方で、BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインに結合する Cdc42 や Cdc42GAP は caytaxin の CRAL-TRIO ドメインには結合しないという報告もある (Buschdorf et al., 2006)。このように、caytaxin には様々なタンパク質が相互作用する可能性がある。そこで、当研究室において caytaxin と相互作用するタンパク質を同定するために yeast two-hybrid 法を用いてスクリーニングを行った (Aoyama et al., 2009)。その結果、kinesin light chain 1 (KLC1) を単離した。KLC1 は微小管上を移動するモータータンパク質の 1 つである kinesin-1 の軽鎖サブユニットである。KLC1 との結合部位を調べたところ、caytaxin の C 末端側ではなく、N 末端側で KLC1 に結合していた。さらに、詳細に調べた結果、N 末端側にある ELEWED 配列が KLC1 との結合部位であることが明らかになった。ELE 配列を AAA 配列に置換した場合には KLC1 との結合が低下し、WED 配列を AAA 配列に置換した場合には KLC1 との結合

は全く見られなくなった。注目すべきことには、WED 配列は KLC に結合して kinesin-1 によって輸送される calyculin 1 や Gadkin、vaccinia virus の A36R や F12 などのタンパク質でも保存されていた(Ward et al., 2004, Schmidt et al., 2009, Konecna et al., 2006)。また、WED 配列は caytaxin タンパク質においては種を超えて保存されていた。そこで、我々はこの配列を WED モチーフと名付けた。

caytaxin を神経細胞内で発現させると、過剰発現した caytaxin は神経突起内では顆粒状に分布し、また神経突起末端に濃縮されていた。神経突起内の caytaxin 顆粒の多くは kinesin-1 による軸索内輸送とほぼ同じ速度 (約 $1\ \mu\text{m}/\text{秒}$) で、神経突起末端に向かって移動することが明らかにされた。また、内在性 caytaxin は神経細胞のプレシナプスに濃縮されており、神経突起内や軸索末端のミトコンドリアとも共局在していた。さらに caytaxin をノックダウンすると軸索末端に分布するミトコンドリアの数が減少する。これらの結果から caytaxin は kinesin-1 とミトコンドリアをつなぐアダプタータンパク質として機能し、ミトコンドリアの輸送に関与することが明らかになった(Aoyama et al., 2009)。しかし、caytaxin の分布はミトコンドリアと一致しない部分もみられることから、ミトコンドリア以外の小胞も輸送している可能性がある。

kinesin-1 とカーゴ

私たちの体を構成するすべての細胞は、タンパク質や脂質、mRNA あるいは様々な細胞内小器官を積み荷として細胞内の目的地へ輸送する必要がある。これらの積み荷の輸送にはモータータンパク質である kinesin、dynein そして myosin が必須である。myosin はアクチン線維上を移動し、神経細胞ではシナプスや細胞膜周辺で積み荷を輸送する。これに対し、kinesin と dynein は微小管上を移動し、積み荷を輸送する。微小管には極性があり、中心体側をマイナス端として細胞膜方向にプラス端が伸長している。この微小管上を dynein はマイナス端方向に移動し、kinesin はプラス端方向に移動する(Hirokawa et al., 2010)。

マウスやヒトでは約 45 種類の kinesin ファミリー遺伝子が同定されており、モータードメインの位置 (N 末端側、C 末端側、中間) の違いによって 3 つのグループに分けられる。最も標準的な kinesin である kinesin-1 は、モータードメインを N 末端側にもつ 2 分子の kinesin heavy chain (KHC) と、2 分子の kinesin light chain (KLC) から構成されるヘテロ 4 量体タンパク質である。積み荷は KHC や KLC に直接結合するほか、KLC に結合するアダプタータンパク質を介して結合する。KLC は N 末端側に KHC の C 末端側と結合する heptad repeat ドメインと、C 末端側に Tetratricopeptide repeat (TPR) ドメインを持ち、積み荷やアダプタータンパク質は TPR ドメインを介して結合する。kinesin-1 は神経小胞

や分泌小胞、エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリア、mRNA タンパク質複合体といった様々な分子を積み荷として輸送する (Hirokawa et al., 2009)。kinesin-1 に変異をもつヒトでは神経変性疾患である遺伝性痙性対麻痺 (Hereditary Spastic Paraplegia: HSP) を引き起こし、kinesin-1 の Kif5B のノックアウトマウスではリソソームやミトコンドリアが核近傍に凝集し、胎生致死を示す (Tanaka, Y. 1998)。また、kinesin-1 はアルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の輸送や (Arimoto et al., 2011)、ハンチントン病の原因タンパク質となる Huntingtin の輸送にも関与している (Rong et al., 2007)。したがって、kinesin-1 による積み荷の輸送メカニズムを解明することは生物学・医科学において重要な課題の 1 つである。

kinesin が輸送する積み荷の種類については、広く研究されているにも関わらず、kinesin がいつ、どこで、どのようにして運ぶべき積み荷と結合し、解離するのかについては、一部の報告があるのみである。例えば、神経細胞でシナプスに小胞を輸送する kinesin の KIF17 はポストシナプスに到達すると、キナーゼ CaMKII によってリン酸化され、小胞を解離する (Guillaud et al., 2008)。線虫神経細胞の kinesin-1 のアダプタータンパク質である UNC-76 はシナプス付近で Ser/Thr キナーゼによってリン酸化され、積み荷であるシナプス小胞を解離する (Toda et al., 2008)。これらのように、kinesin や kinesin のアダプタータンパク質のリン酸化が重要であるが、kinesin とカーゴの結合制御メカニズムの全体像は不明である。

CRAL-TRIO (Sec14-like) ドメインと脂質の結合

リン脂質は脂質二重層を形成して細胞膜の主要な構成成分となるだけでなく、シグナル伝達にも重要な役割を果たしている。特に、細胞外刺激を受けて産生される特定の phosphatidylinositol (PtdIns) はセカンドメッセンジャーとして多様な細胞応答を引き起こす。この過程において、リン脂質とタンパク質の特異的な相互作用が必須となる。特定の脂質に結合する脂質結合ドメインをもつタンパク質は、膜への局在を促され、活性化される。脂質結合ドメインには PH ドメイン、FYVE ドメイン、PX ドメイン、C2 ドメインなどがよく知られている。

CRAL-TRIO (cellular retinaldehyde binding protein/Trio protein homology) ドメインも脂質結合ドメインの 1 つである。このドメインは Sec14-like ドメインとも呼ばれ、約 500 種類のタンパク質において保存されている (Pfam entry: pfam00650) (Aravind et al., 1999)。CRAL-TRIO/Sec14-like ドメインは酵母 phosphatidylinositol transfer protein Sec14p を起源としている。Sec14p は phosphatidylcholine (PC) や PtdIns と結合して、ゴルジ体における脂質代謝や小胞輸送を制御している

(Curwin et al., 2009)。CRAL-TRIO ドメインは PtdIns に結合するという報告が多い。一方で、 α -tocopherol transfer protein (α -TTP) の CRAL-TRIO ドメインにはビタミン E が結合し、PTP-MEG2 の CRAL-TRIO ドメインに Phosphatidylserine (PS) が結合する(Zhao et al., 2003)。

Sec14p や α -TTP の CRAL-TRIO ドメインの立体構造はすでに決定されており、脂質との結合に重要となる構造が明らかにされている。Sec14p は N 末端側の α -helical ドメインと C 末端側の α/β ドメインの 2 つのドメインから構成される。C 末端側の α/β ドメインは疎水性のポケットを形成し、この領域のアミノ酸が脂質との結合に重要である。この領域に存在する Sec14p の 239 番目の Lys(K239) は、特に脂質との結合に重要であり、Sec14p K239A 変異体では PtdIns を輸送できない(Sha et al., 1998)。さらに、注目すべきことには、 α -TTP の 221 番目の Arg (R221) は Sec14p の K239 に相当するアミノ酸であり、 α -TTP R221W 変異体では、ヒトにおいて重篤なビタミン E 欠乏性運動失調症を引き起こす (Panagabko et al., 2003)。したがって、 α -TTP においても、このアミノ酸部位はビタミン E との結合に重要である。

Sec14p の K239、 α -TTP の R221 に相当するアミノ酸は、BNIP-2 (271 番目の Lys) や caytaxin (295 番目の Lys) においても保存されている (図 1C)。興味深いことには、caytaxin の CRAL-TRIO ドメイン内のアミノ酸変異 (S301R) は Cayman 型運動失調症を発症する。S301 は CRAL-TRIO ドメインのポケット部位に位置しており、caytaxin においても脂質との結合が疾患の原因に関与している可能性が高い。しかしながら、caytaxin に結合する脂質はまだ報告されていない。また、BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインも特定の脂質が結合する可能性は高いが、caytaxin と同様に、結合する脂質は知られていない。

細胞内におけるエンドソームの輸送

真核生物は、オルガネラ間での物質輸送の手段として細胞内輸送を発達させている。栄養分やシグナル分子、細胞膜受容体など細胞外の物質は、エンドサイトーシスで取り込まれ、細胞内で新たに合成されたタンパク質や脂質といった物質はエキソサイトーシスで運び出されている。この輸送は 1 重の生体膜からなる小胞であるエンドソームを介して行われ、細胞移動や分化、細胞極性の形成などにも重要な役割を果たしている。

エンドサイトーシスには分解、逆行、リサイクルの 3 つの経路がある (図 2)。分解経路では、細胞膜から取り込まれた物質は初期、後期エンドソームを経て、最終的にリソソームで分解される。逆行性輸送では取り込まれた物質は初期エンドソームを経てゴルジ体へ輸送される。リサイクリング経路では、初期エン

ドソームに取り込まれた物質は直接細胞膜へ戻るか、いったんリサイクリングエンドソームに取り込まれて、細胞膜へ戻る。エンドサイトーシスの逆であるエキソサイトーシスは、ゴルジ体から直接、細胞膜に向かう経路と、いったんリサイクリングエンドソームに取り込まれてから細胞膜に向かう経路の 2 つがある。

上記のように、細胞内輸送は真核生物、特に多細胞生物において複雑に交差したネットワークを形成している。このような複雑な経路において、Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質である Rab が、エンドソームを含む小胞の輸送の制御を行っている(Stenmark, 1994)。Rab は GDP を結合した不活性型と、GTP を結合した活性型をサイクリングし、活性型がエフェクタータンパク質と結合することで膜輸送を促進する。Rab はヒトやマウスでは約 60 種類の異なるアイソフォームが存在している。すべての種類の Rab の機能が解明されているわけではないが、Rab5 や Rab11、Rab9 といったいくつかについては深く研究されている。例えば、Rab5 は初期エンドソームに局在し、初期、リサイクリングエンドソームとの融合を制御し、Rab11 はリサイクリングエンドソーム、Rab9 は後期エンドソームの輸送を制御している。

また、エンドソームを含むオルガネラには特有のリン脂質が含まれる。例えば、リサイクリングエンドソームは PS を豊富に含み、初期エンドソームには PtdIns(3)P、ゴルジ体には PtdIns(4)P、細胞膜には PtdIns (4,5)P₂/ PtdIns (3,4,5)P₃/PS が豊富に含まれることが知られている (Yeung et al., 2008)。

本研究の目的

BNIP-2 と caytaxin では発現部位は異なるが、BNIP-2 でも KLC1 結合部位 WED モチーフや CRAL-TRIO ドメインを含む C 末端側のアミノ酸配列はよく保存されている。したがって、BNIP-2 と caytaxin は機能的に類似すると予想した。そこで、本研究は BNIP-2 が kinesin-1 のアダプタータンパク質であるかを検証し、BNIP-2 の生理的な機能を明らかにすることを目的とした。また、BNIP-2 はチロシンキナーゼである Fibroblast growth factor (FGF) receptor によってリン酸化されるという報告がある(Low et al., 1999)。BNIP-2 が kinesin-1 のアダプタータンパク質であるなら、BNIP-2 のリン酸化によって kinesin-1 と積み荷の結合が制御される可能性がある。そこで、BNIP-2 のリン酸化や BNIP-2 のリン酸化が kinesin と積み荷の結合を制御する可能性についても検証を行った。

2. 材料と方法

抗体

本研究では以下の抗体を用いた;抗 FLAG 抗体 M2(Sigma)、抗 Myc 抗体 9E10、抗 Tubulin 抗体 DM1A(Sigma)、抗 Syntaxin6 抗体(Synaptic Systems)、抗 GM130 抗体 5G8 (MBL)、抗 Transferrin receptor 1 (TfR1) 抗体 MEM-75 (Acris)、抗 Rab9 抗体 (Cell Signaling)、抗 Actin 抗体 ACTN05 (Thermo)、FITC 抗ラビット IgG 抗体 (Wako)、Rhodamine 抗ラビット IgG 抗体 (Wako)、Alexa488 抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen)、Rodamine 抗マウス IgG 抗体 (Wako)。KLC1 と KLC2 を認識する抗 KLC 抗体は貝淵弘三博士 (名古屋大学) より頂いた。

抗 BNIP-2 ポリクローナル抗体は次の通り作成した;ヒト BNIP-2 N 末端側 (1-130aa) を GST 融合タンパク質として精製・透析を行い (詳細は組換えタンパク質の発現と精製を参照)、これを抗原に用いた。抗原をウサギ (ニュージーランドホワイト) に 4 週間間隔で 3 回免疫をした後、血清を回収した。血清は硫酸分画法でグロブリン画分を精製し、抗 BNIP-2 ラビットポリクローナル抗体とした。

プラスミド

pXJ40-humanBNIP-2 は Boon Chuan Low 博士 (The National University of Singapore) より頂いた。N-末に Flag タグが融合した BNIP-2 を発現するベクター pcDNA3-Flag-BNIP-2 を作成するために、プライマー F1 5'-CGCGAATTCGATGGAAGGTGTGGAAGCTT-3' とプライマー R1 5'-GGGTCTAGATTACTGTTCATTTTTTCGGTT-3'を用いて pXJ40-humanBNIP-2 を鋳型として増幅した。この PCR 断片を EcoRI と XbaI で消化し、Flag タグが組み込まれたベクターFlag-pcDNA3 に組み込んだ。

pcDNA3-His-BNIP-2-His は pET28b (Novagen) から 6×His を切り出し、PCR 増幅により終止コドンに欠いた BNIP-2 cDNA の前後に組み込み、これを pcDNA3 に組み込んだ。

pcDNA3-Flag-BNIP-2WED/AAA は pXJ40-humanBNIP-2 を鋳型として、プライマーF1 とプライマーR2 5'-TATCCGCGGCCTCAA~~ACTCATTACTATTC~~-3'で増幅した PCR 断片と、プライマーF2 5'-TATCCGCGGCTGATCTTCCAAAACCCAA

G-3' とプライマーR1 で増幅した 2 つの PCR 断片を Sac II (下線は Sac II 制限酵素サイトを示す) でライゲーションすることで WED 配列を AAA 配列に置換し、Flag-pcDNA3 に組み込んだ。

BNIP-2-GFP を発現するベクター作成するために、プライマーF3
 5'-ACGAAGCTTATGGAAGGTGTGGAAGCTT-3' とプライマーR3
 5'-AGTGGTACCTGTTTCATTTTTTCGGTTC-3' を用いて pXJ40-humanBNIP-2 を鋳
 型として増幅した。この PCR 断片を Hind III と Kpn I で消化し、pAcGFP1-N1
 (Clontech) に組み込んだ。

特定のアミノ酸を置換した BNIP-2 変異体である BNIP-2RKM、BNIP-2RLR、
 BNIP-2LAV、BNIP-2EYV は次のプライマーとプライマーF1 または R1 を用いて
 前半部分と後半部分に分けて増幅し、前半部分と後半部分の PCR 断片を BNIP-2
 の cDNA 内にある Nar I サイトでライゲーションすることで目的のアミノ酸配
 列を Gly-Ala-Ala 配列に置換した (下線は Nar I 制限酵素サイトを示す)。Flag
 タグまたは His タグは WT と同様の方法で付加した。

| | | |
|-----------|---|--|
| BNIP-2RKM | F | 5'-CAAGGCGCCGCGCCCAGTCTGGGATGGCTCA-3' |
| BNIP-2RKM | R | 5'-ATCGGCGCCTCGAGTTGTTGCACCATTTA-3' |
| BNIP-2RLR | F | 5'-AGAGGCGCCGCGAAAAATCTAAAATCCCTAA-3' |
| BNIP-2RLR | R | 5'-ATCGGCGCCTCTATCAATTTGCTGATATC-3' |
| BNIP-2LAV | F | 5'-CTTGGCGCCGCTACAAGACCATTTATTAGCT-3' |
| BNIP-2LAV | R | 5'-ATCGGCGCCAAGTGTCTGATAAACCAAG-3' |
| BNIP-2EYV | F | 5'-ATGGGCGCCGCTGGCATAACCAGAATGCATAA-3' |
| BNIP-2EYV | R | 5'-TTTGGCGCCCATGGGGACAAGTTCTGCTA-3' |

特定のアミノ酸を置換した BNIP-2 変異体である BNIP-2 K242H、BNIP-2 PF、
 BNIP-2 K271W は次のプライマーを用いて、オーバーラップ PCR 法により作成し
 た。Flag タグまたは His タグは WT と同様の方法で付加した。

| | | |
|-------------|---|--|
| BNIP-2K242H | F | 5'-ACGGAAAAATCTACA <u>CACT</u> CCCTAATCATTG-3' |
| BNIP-2K242H | R | 5'-CAATGATTAGGGAGTGTAGATTTTTCCGT-3' |
| BNIP-2PF | F | 5'-GCTGTTACAAGACTTGGTTATTAGCTCGAA-3' |
| BNIP-2PF | R | 5'-TTCGAGCTAATAA <u>CCAGT</u> CCTTGTAACAGC-3' |
| BNIP-2K271W | F | 5'-GAAATTCAGCCAATGGATTAGATACGTGT-3' |
| BNIP-2K271W | R | 5'-ACACGTATCTAAT <u>CCATT</u> GGCTGAATTTC-3' |

Lact-C2-GFP は Sergio Grinstein 博士 (Department of Biochemistry University of
 Toronto) より、Rab11-GFP、Rab11-RFP、Rab5-GFP は Miklos Geist 博士
 (Simmelweis University) より、Flag-Gadkin は VolkerHaucke 博士 (Freie
 University, Berlin) より、Myc-KIF5DN、KLC1-Myc はすでに報告されている発
 現ベクターを用いた(Aoyama et al., 2009)。

BNIP-2 RNAi には、BLOCK-iT PolII miR RNAi expression vector kit with EmGFP

(invitrogen)を使用した。次のオリゴを pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR に組み込み、BNIP-2 RNAi ベクターを作成した。

5'-TGCTGTTCCCACTCAAACATCATTACTGTTTTGGCCACTGACTGACAGTAAT
GATTGAGTGGGAA-3'

5'-CCTGTTCCCACTCAATCATTACTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGTAATGAG
TTTGAGTGGGAAC

細胞とトランスフェクション

細胞は HEK293T、COS7、HeLa、C2C12 を用いた。HEK293T、COS7、HeLa 細胞には Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Sigma) に 10% Fetal Bovine serum (FBS) を加えた培地を用いた。C2C12 細胞には D-MEM に 15% FBS を加えた培養液を用いて維持し、筋分化を誘導するためには、培養液を 2% horse serum を含む D-MEM へ変更して培養した。それぞれの細胞は 5% CO₂ 存在下の 37°C の条件下で培養した。

HEK293T のトランスフェクションはリン酸カルシウム法で行った。トランスフェクションを行う前日に HEK293T (1.2 x 10⁶ 個) を 100mm dish にまいた。0.25M CaCl₂ 50μl + DNA 10μg の混合液に 2xBBS (pH6.95) (50mM BES, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄) 500μl をボルテックスにかけながら滴下していき、室温で 20 分間静置した後、細胞に加えた。トランスフェクションした 16 時間後に PBS(-) で洗浄し、新しい培地で 48 時間培養した。

PBS(-) 10ml でピペッティングにより細胞をはがして遠心分離 (1000rpm, 5 分, 4°C) し、ペレットを細胞抽出バッファ A (150mM NaCl, 100mM HEPES (pH7.9), 1mM EDTA, 1% TritonX-100, 5% glycerol, 1x protease inhibitor cocktail (2 μg/ml Leupeptin, 2 μg/ml Papstain, 2 μg/ml benzamide Hydrochloride Monohydrate)) 1ml で懸濁した。これを遠心分離 (15,000rpm, 30 分, 4°C) し、上清を可溶画分として回収した。

組み換えタンパク質の発現と精製

GST-BNIP-2 N 末、GST-BNIP-2 N 末 WED/AAA、GST-KLC1 タンパク質の精製は下記の方法に従った。BL21 菌株をそれぞれの cDNA を挿入した pGEX-5X-3 で形質転換し、アンピシリンを含む LB 培地で培養し、IPTG

(isopropyl-thio-B-D-galactopyranoside) 1mM を添加後、25°C で 12 時間培養し発現を誘導した。その後大腸菌を回収し、PBS(-) で再懸濁して超音波処理により細胞を破壊した。遠心 (15,000rpm, 4°C, 20 分) で得られた可溶画分を回収した。得られた可溶画分は Glutathione-Sepharose 4B (GE healthcare) で精製し、PBS(-)

で透析した。

His-BNIP-2 および各 His-BNIP-2 変異体タンパク質の発現・精製は下記の方法に従った。これらの発現プラスミドをリン酸カルシウム法でトランスフェクションした 100mm dish10 枚分の HEK293T 細胞を回収し、ペレットを 10ml の細胞抽出バッファーA で懸濁した。これを遠心分離 (15.000rpm, 30 分, 4°C) し、上清を可溶画分として回収した。可溶画分に Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を加え、4°C で 2 時間反応させた後に、オープンカラムに充填し、Wash バッファー (0.5M NaCl₂, 100mM Tris-HCl (pH 8.0)) で洗浄した。その後、Elution バッファー (0.5M NaCl₂, 100mM, Tris-HCl (pH 8.0), Imidazole (pH 8.0)) で溶出した。得られた溶出液は PBS(-) に対して透析を行った。

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE 泳動後、ゲルはバッファーB (25mM Tris, 5% methanol) に数分浸した。PVDF メンブレン (PALL) は 100%メタノールに浸したのち、バッファーB に浸した。また、ろ紙 (No.590, Advantec) をバッファーA (0.3M Tris, 5%methanol) に 2 枚、バッファーB に 1 枚、バッファーC (25 mM Tris, 40 mM 6-aminohexanoic acid, 5%methanol) に 3 枚浸した。セミドライブロッター上に、下からバッファーA のろ紙、バッファーB のろ紙、メンブレン、ゲル、バッファーC のろ紙の順に重ね、12V で 1 時間ブロッティングした。メンブレンを 5%スキムミルクを含む PBST (PBS+0.05% Tween20) で 1 時間ブロッティングした後、一次抗体を含む 5%スキムミルク/PBST で 4°C にて 1 晩反応させた。反応後、PBST で 3 回洗浄したのち horse radish peroxidase を結合した二次抗体を含む 5%スキムミルク/PBST で室温にて 1 時間反応させた。最後に、PBST で 3 回洗浄した後、発色反応を行った。発色には ECL Western Blotting Analysis System (GE healthcare)を用いて行い X 線フィルムを用いて検出した。

免疫沈降法

HEK293T 細胞から調整した細胞抽出液 400μl に Protein-G-Sepharose ビーズ (Amersham Bioscience) を 20μl 加え、4°C にて 2 時間プレクリアを行った。プレクリア後、遠心分離し (4000rpm、30 秒、4°C) 上清を回収した。この上清に抗体 1μg を加え、4°C で 2 時間反応させた。その後さらにビーズ 20μl を加え、4°C で 2 時間反応させた。その後ビーズを細胞抽出バッファーA で 3 回洗浄して 2×SDS サンプルバッファー (100mM Tris-HCl (pH6.8), 1% SDS, 0.2% BPB, 20% glycerol, 100mM DTT) を加えて加熱したのち SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロット法で検出した。

GST-pull down assay

HEK293T 細胞から調製した細胞抽出液 400 μ l に GST 融合タンパク質 5 μ g を混合し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。次に、Glutathione-Sepharose 4B を 20 μ l 加えて 4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。その後、細胞抽出バッファーA で 5 回洗浄して 2 \times SDS サンプルバッファーを加えて加熱したのち SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロット法により検出した。

マウス肝臓からの細胞分画

マウス肝臓からの細胞分画法は Frezza らの方法に従って行った(Frezza et.al 2007)。マウス肝臓を摘出し、PBS で血液成分を取り除いた後、肝臓をハサミで小さく刻み、5ml のホモジナイズ緩衝液(10mM Tris-MOPS, 1m MEGTA/Tris, 0.2M sucrose) に懸濁した。この懸濁液をポッター型ホモジナイザーでホモジナイズ(1600rpm、3-4strokes)した。このホモジネートを遠心分離し(600g、10分、4 $^{\circ}$ C)、得られた上清を再び遠心分離した(7000g、10分、4 $^{\circ}$ C)。これで得られた上清をサイトゾル画分とした。沈殿は再び 5ml のホモジナイズ緩衝液で懸濁した後、遠心分離し(7000g、10分、4 $^{\circ}$ C)、得られた沈殿をミトコンドリア画分とした。ミトコンドリア画分は細胞抽出バッファーA で懸濁した。これを遠心分離(15000rpm、30分、4 $^{\circ}$ C)し、上清を可溶画分として回収した。

Lipid membrane の作製

Phosphatidylserine (Sigma) を Chloroform/methanol (1:1 v/v) で 0、50、100、200、400pmol/ μ l に希釈し、ニトロセルロースメンブレン Hybond C+ (GE healthcare) に 1 μ l ずつブロットした。1 時間室温で乾燥させ、4 $^{\circ}$ C で保存した。

Lipid-membrane overlay assay

Lipid membrane には 15 種類のリン脂質(100pmol)とブランクがニトロセルロース膜上に固定化された PIP strips (Electron Research Lab) または、自作の Lipid membrane を使用した。

メンブレンはバッファーD(10mM Tris-HCl(pH8.0), 150mM NaCl, 0.1% Tween20)+3% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) で室温にて 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、メンブレンにバッファーD +3% fatty acid-free BSA と 2.5 μ g/ml の精製タンパク質を加え、4 $^{\circ}$ C にて一晩反応させた。翌日、メンブレンをバッファーD

で 10 分間 3 回洗浄したあと、1 次抗体として抗 BNIP-2 抗体を含むバッファー D +3% fatty acid-free BSA で室温にて 1 時間反応させた。バッファー D で 10 分間 3 回洗浄したあと、2 次抗体を含むバッファー D +3% fatty acid-free BSA で室温にて 1 時間反応させた。反応後、バッファー D で 10 分間 3 回洗浄し、ECL Western Blotting Analysis System で発色後、X 線フィルムを用いて検出した。

免疫蛍光染色および画像解析

COS7 または HeLa 細胞 (4.0×10^5 個) をカバーガラスを敷いた 24 ウェルプレートに播き、24 時間後、Lipofectamine 2000 (invitrogen) を用いて添付のマニュアルに従ってトランスフェクションを行った。発現プラスミド DNA 量は 24 ウェルプレートあたり $1 \mu\text{g}$ を用いた。トランスフェクションの 24 時間後、4%PFA/PBS を用い、室温で 20 分間固定した。0.2% TritonX-100/PBS で処理した後、1:100-1:1000 希釈の一次抗体および二次抗体で染色した。封入剤で封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS FV1000) で観察した。タイムラプス観察を行うときは、 μ -Dish (NIPPON Genetics) に細胞を播き、蛍光タンパク質発現ベクターをトランスフェクションした 8 時間または 24 時間後に観察した。

画像解析は Image J を用いた。最も伸びた細胞突起の核中心を通る長さ (a) と、核中心から最も近い細胞膜までの長さ (b) を測定し、その比で突起の有無を判断した。a/b の値が非トランスフェクション細胞の約 2 倍、つまり COS7 細胞では a/b の値が 8 以上、HeLa 細胞では 4 以上を示す細胞は突起を持つ細胞とした。非トランスフェクションの a/b の値は COS7 細胞では 4.23 ± 1.03 (SD), n=30、HeLa 細胞では 2.88 ± 0.79 (SD), n=30 であった。

RNAi

BLOCK-iT PolIII miR RNAi expression vector kit with EmGFP (invitrogen) を使用し、コントロールとして付属の LacZ RNAi ベクターを使用した。HeLa 細胞に Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションし、72 時間後に固定し、観察した。これらのベクターは GFP を発現するため、ベクターの導入された細胞かどうかは蛍光顕微鏡下で判別した。

3. 結果

3.1 BNIP-2 は WED モチーフを介して KLC1 と結合する

caytaxin は ELEWED (115-120aa) 配列を介して KLC1 と結合し、この配列の中でも特に WED 配列が KLC1 との結合に重要である(Aoyama et al.,2009)。BNIP-2 でも EFEWED (94-99aa) 配列は保存されており、BNIP-2 も WED モチーフを介して KLC1 と結合すると予想された。そこで、BNIP-2 と KLC1 が相互作用することを明らかにするために、以下の実験を行った。HEK293T 細胞に Flag-BNIP-2 と KLC1-Myc を共発現させ、その後細胞抽出液を調製して、抗 Myc 抗体および抗 Flag 抗体で免疫沈降を行った。その結果、沈降物にそれぞれ Flag-BNIP-2、KLC1-Myc が含まれていた (図 3A、矢尻)。次に、GST-BNIP-2 N 末断片 (GST-BNIP-2(1-130)) と BNIP-2 の WED 配列を AAA 配列に置換した N 末断片 (GST-BNIP-2(1-130) WED/AAA) を GST 融合タンパク質として大腸菌で作成し、これらを、KLC1-Myc を過剰発現させた HEK293T 細胞からの抽出液に加え、GST-pull down assay を行った。その結果、GST-BNIP-2 (1-130) と KLC1 の結合はみられたが、GST-BNIP-2(1-130) WED/AAA と KLC1 の結合はみられなかった (図 3B)。以上の結果から、BNIP-2 は WED モチーフを介して KLC1 と結合することが明らかとなった。

3.2 過剰発現した BNIP-2 は細胞突起を誘導し、突起の末端に KLC および KHC とともに濃縮される

COS7、MCF7、HeLa 細胞などの培養細胞において BNIP-2 を過剰発現させると細胞突起を誘導し、過剰発現した BNIP-2 は突起の末端に濃縮する(Zhou et al., 2005)。BNIP-2 の N 末断片 (1-130aa) を HeLa 細胞に発現させると、細胞質や核内に拡散して分布し、C 末断片 (147-314aa) のみを発現させると、核近傍において顆粒状に分布していた。これらの断片は細胞突起を誘導しなかった (図 4A)。KLC1 との結合部位である WED 配列を AAA 配列に置換した BNIP-2 WED/AAA 変異体を HeLa 細胞に過剰発現させると、変異体タンパク質は核近傍に顆粒状に分布した。また、BNIP-2 WED/AAA 変異体は細胞末端に局在せず、細胞突起の誘導は見られなかった (図 4B)。この結果は、KLC1 と結合しない BNIP-2 WED/AAA 変異体は細胞末端まで輸送されず、突起も誘導しないことを示している。

BNIP-2 は KLC1 と結合することが示されたので、過剰発現させた BNIP-2 と内在性 KLC および KHC の細胞内局在を調べた。内在性 KLC は主にゴルジ体付

近に分布し、一部が細胞質に分布することが知られている (Gyoeva et al., 2000) (図 4C 右端の写真)。COS7 細胞に BNIP-2 を過剰発現させると、内在性 KLC は BNIP-2 が濃縮している突起の末端にも局在するようになった。また、内在性の KHC についても KLC と同様の結果が得られた (図 4C 矢印)。これらの結果は BNIP-2 の WED モチーフを介して結合した KLC および HKC は、過剰発現した BNIP-2 とともに突起の末端まで輸送されることを示唆している。

3.3 BNIP-2 は kinesin-1 によって輸送される

次に、BNIP-2 が kinesin-1 によって輸送されるかどうかを調べた。kinesin-1 の重鎖 (KIF5A) のモータードメイン欠損変異体 KIF5DN はドミナントネガティブに作用する (Kimura et al., 2005)。そこで、KIF5DN を Flag-BNIP-2 とともに COS7 細胞に共発現させ、BNIP-2 の細胞内局在及び突起が誘導されるかどうかを観察した。その結果、コントロールでは約 83% の細胞が突起を有するのに対して、KIF5DN を共発現させた場合ではほとんどの細胞は突起を有していなかった。また、BNIP-2 の細胞末端への濃縮もみられなかった。(図 5A 黄色の点線)。つまりこの結果は、KIF5DN は BNIP-2 の細胞末端への濃縮および細胞突起の誘導を阻害することを示している。caytaxin の N 末断片はドミナントネガティブに働き神経突起の伸長を阻害し、この効果は WED 配列に依存することを報告している (Aoyama et al., 2009)。そこで、BNIP-2 の N 末断片も同様の効果を持つかどうかを調べた。WED モチーフを含む BNIP-2 の N 末断片 (BNIP-2-N-RFP) を Flag-BNIP-2 と共に発現させると、約 16% の細胞にしか突起が見られなかった (図 5B、中パネル)。しかし、WED 配列を AAA 配列に置換した BNIP-2-N-WED/AAA-RFP では約 53% の細胞で突起が見られた (図 5B、下パネル)。この結果は、BNIP-2 の N 末断片はドミナントネガティブに作用し、この効果は WED 配列に依存することを示している。以上より、BNIP-2 は kinesin-1 によって運搬されることが明らかになった。

3.4 内在性 BNIP-2 は微小管に沿って顆粒状に分布する

細胞に過剰発現した BNIP-2 は誘導された細胞突起の末端に局在するが (Zhou et al., 2005)、これまでに、内在性 BNIP-2 の細胞内局在は明らかにされていなかった。BNIP-2 の生理的な機能を明らかにするために、また BNIP-2 の積み荷を理解するためにも、内在性 BNIP-2 の局在を明らかにすることは重要である。そこで内在性 BNIP-2 を検出するために、GST-BNIP-2 (1-130aa) を抗原として抗 BNIP-2 ウサギポリクローナル抗体を作成した。作成した抗 BNIP-2 抗体は、BNIP-2 を特異的に認識する (図 6A)。この抗体を用いて、COS7 および HeLa

細胞の内在性 BNIP-2 の局在を観察した。その結果、内在性 BNIP-2 は主に核周囲に顆粒状に局在し、一部は細胞質にも顆粒状に分布することが明らかとなった。BNIP-2 は微小管上を移動する kinesin-1 の KLC1 と結合することから、顆粒状に局在する BNIP-2 も微小管上に存在していると予想された。そこで、BNIP-2 と微小管を共染色すると、顆粒状に見られる BNIP-2 は微小管に沿って存在していた (図 6B)。さらに、微小管脱重合剤であるノコダゾールで細胞を処理すると、核の周囲に局在していた BNIP-2 は細胞質全体に拡散した (図 6C)。また、細胞の低温処理 (4°C で 30 分間培養) は、ノコダゾール処理と同様に微小管の脱重合を引き起こす。そこで HeLa 細胞を低温処理した後、再び 37°C で細胞を培養することで微小管の脱重合とその後の回復に伴う BNIP-2 の局在変化について調べた。その結果、低温処理後の BNIP-2 の局在は細胞質に拡散していた。しかし、低温処理後、再び 37°C で培養し始めると 5 分後には微小管の回復が見られ、この微小管の回復にともない、BNIP-2 の分布も核周囲の局在へと戻った (図 6D)。以上の結果から、内在性 BNIP-2 は核周囲に顆粒状に分布し、微小管に依存して局在することが明らかになった。

3.5 BNIP-2 は Trans-Golgi network (TGN) に局在する

次に BNIP-2 の細胞小器官への局在を調べた。Protein disulfide isomerase を ER マーカーとして BNIP-2 と共染色したが、共局在しなかった (図 7A)。核の周囲で微小管に依存して顆粒状に分布するパターンは、ゴルジ体やエンドソームであることが知られている (Lin et al., 2002)。このことから、BNIP-2 もゴルジ体やエンドソームに局在しているのではないかと予想した。ゴルジ体は 3 つの領域、*cis*-Golgi と *trans*-Golgi network (TGN)、およびこれらの中に存在する中間層に分けられる。*cis*-Golgi は主に小胞体との間の小胞輸送に関与し、TGN はエンドソームやリソソーム、細胞膜との間の小胞輸送に関与する。TGN に局在する Syntaxin 6 と *cis*-Golgi に局在する GM130 をマーカーとして BNIP-2 の局在を観察したところ、BNIP-2 は Syntaxin 6 の局在とよく一致し (図 7B)、一部は GM130 と一致した (図 7C)。さらに、BNIP-2 が TGN に局在することを証明するために Brefeldin A (BFA) を添加した際の BNIP-2 の局在の変化を調べた。BFA は ARF-GEF 活性を阻害するため、ARF1 や COPI、AP1 などのコートタンパク質のゴルジ体への集合が阻害され、結果として *cis*-Golgi のタンパク質は ER に吸収され拡散し、一方で TGN のタンパク質は管状化する (Lippincott-Schwartz et al., 1989)。COS7 細胞に BFA を添加すると GM130 は細胞質に拡散して、ほとんど染色されなくなった。しかし、BNIP-2 の局在には大きな変化は見られなかった (図 7C)。さらにより詳細に BNIP-2 の局在を HeLa 細胞で観察すると、一部が

管状化していた (図 7C、矢尻)。以上の結果は、BNIP-2 がゴルジ体、特に TGN に局在することを示唆している。

また、COS7 細胞では BNIP-2 はミトコンドリアへの局在も観察された (図 7E)。

3.6 BNIP-2 はエンドソームに局在し、輸送される

内在性の BNIP-2 は顆粒状に分布し、ゴルジ体、主に TGN に局在することが示された。TGN からはエンドソームなどの小胞が形成されることから、BNIP-2 はエンドソームにも局在している可能性がある。そこで、低分子量 GTPase である Rab ファミリータンパク質をエンドソームのマーカーとして用いて、BNIP-2 の COS7 細胞内での細胞内局在を調べた。その結果、BNIP-2 はリサイクリングエンドソームのマーカーである Rab11 と最もよく共局在した (図 8A)。初期エンドソームのマーカーである Rab5 とは一部の顆粒で共局在していたが、共局在していない顆粒も特に細胞膜周辺においてみられた (図 8B)。初期エンドソームとリサイクリングエンドソームに局在する Transferrin receptor protein (TfR) や Gadkin、Cdc42GAP (p50RhoGAP) も BNIP-2 の一部と局在していた (図 8C,D,E)。Gadkin は TGN とリサイクリングエンドソームに (Schmidt et al., 2009)、Cdc42GAP は Rab11 と Rab5 陽性のエンドソームに分布する (Sirokmany et al., 2006)。

BNIP-2 を過剰発現させた細胞でも、BNIP-2 は Rab11 と共局在しており、特に、突起の末端においても Rab11 との共局在が観察された (図 8G)。同様に、Rab5 や TfR も BNIP-2 を過剰発現させた細胞の突起の末端で共局在する場合も観察された (図 8H,I)。しかしながら、BNIP-2 は後期エンドソームのマーカーである Rab9 とは全く一致していなかった (図 8F)。これらの結果から、BNIP-2 の一部は初期エンドソームに分布するが、多くはリサイクリングエンドソームに局在することが示唆された。

次に、実際に BNIP-2 が細胞内を運搬されるかどうかを調べるために、BNIP-2-GFP を COS7 細胞に過剰発現させ、GFP の蛍光によるタイムラプス観察を行った。その結果、BNIP-2-GFP は顆粒状に細胞内に分布しており、この顆粒は図 9A で示すように細胞内を移動していた。移動する BNIP-2-GFP の顆粒の速度を測定したところ 0.48 ± 0.262 (SD, n=35) $\mu\text{m}/\text{sec}$ で移動していた。これはキネシンの移動速度の範囲内である。さらに、COS7 細胞に BNIP-2-GFP と Rab11-RFP を共発現させ、タイムラプス観察を行った。その結果、BNIP-2-GFP と Rab11-RFP は共局在し、ともに移動していた (図 9B)。

3.7 BNIP-2 は phosphatidylserine (PS) と結合する

BNIP-2 は C 末端側に CRAL-TRIO ドメインをもつ。CRAL-TRIO ドメインは脂

質性の小分子と結合することが知られている(Panagabko et al., 2003; Saito et al., 2007)。このことから、BNIP-2 も特定の脂質性小分子と結合するのではないかと予想した。これを調べるために、15 種類の異なったリン脂質がブロットされたメンブレンに全長 BNIP-2 タンパク質を加え Lipid-membrane overlay assay を行った。assay を行うにあたり、全長 BNIP-2 タンパク質を発現・精製する必要があったが、大腸菌で BNIP-2 の全長や C 末断片を発現させることはできなかった。BNIP-2 の C 末端側の CRAL-TRIO ドメインは疎水性アミノ酸を多く含み、大腸菌で発現させた BNIP-2 タンパク質は不安定だと考えた。そこで、哺乳動物細胞で全長 BNIP-2 を発現・精製を試みた。HEK293T 細胞に His-BNIP-2 を発現させ、ニッケルビーズで部分的に精製して、His-BNIP-2 タンパク質を得ることが可能となった。このタンパク質を用いて Lipid-membrane overlay assay を行った結果、Phosphatidylserine (PS) に特異的に強く結合することが明らかとなった(図 10A 中パネル)。Phosphatidic acid (PA) や Phosphatidylinositol monophosphate (PtdInsP) にもシグナルは見られたが、PS のシグナルと比較すると、かなり弱い結合であった。次に、大腸菌で発現・精製した GST-BNIP-2 N 末断片のタンパク質 (GST-BNIP-2(1-130)) を PS のみをスポットしたメンブレンに加え assay を行うと、PS への結合は全く見られなかった(図 10B)。つまり、BNIP-2 の N 末端側ではなく、C 末端側の CRAL-TRIO ドメインが PS に結合する。

3.8 BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメイン内の Lys271 は PS への結合および細胞内局在に重要である

BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインは PS に結合することが明らかになったので、次に、CRAL-TRIO ドメインのどのアミノ酸が PS との結合に必要なのかを調べた。これまでに、CRAL-TRIO ドメインをもつ α -TTP や酵母 Sec14p の立体構造は明らかになっており、これらのタンパク質の CRAL-TRIO ドメインでは、脂質と結合するポケットが形成される (Sha et al., 1998; Panagabko et al., 2003)。また、立体構造予測から caytaxin と α -TTP の CRAL-TRIO ドメインの立体構造は類似している (Bomar et al., 2003)。Bomar et al.らは、予想される立体構造から caytaxin は α -TTP よりも極性の高い物質に結合すると予測している。したがって、BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインの立体構造も α -TTP や Sec14p と類似し、これらのタンパク質と同じように脂質と結合していると予想された。

α -TTP の CRAL-TRIO ドメインに変異が入ると、ヒトではビタミン E 欠乏性運動失調症を発症する。 α -TTP の CRAL-TRIO ドメイン内に位置する 192 番目のアルギニンのヒスチジンへの変異 (R192H) は軽い運動失調症を引き起こし、221 番目のアミノ酸変異 (R221W) は重篤な運動失調症を引き起こす (Panagabko et

al.,2003)。興味深いことに、これらのアミノ酸を含む領域は BNIP-2 においてよく保存されており、 α -TTP の R192 と R221 は BNIP-2 ではそれぞれ K242 と K271 に対応する。さらに、Sec14p の K239 は α -TTP R221 と BNIP-2 K271 に対応し、Sec14p の K239 は PtdIns との結合に必須である(Sha et al., 1998)。これらのことから、このアミノ酸領域は BNIP-2 においても PS との結合に必要である可能性が高い。そこで、図 11A に示すように、242 番から 271 番のアミノ酸領域にアミノ酸置換を導入した His-BNIP-2 変異体を 4 つ作成した。このアミノ酸領域の BNIP-2 L257 は Cdc42GAP の L173 に対応して保存されている。Cdc42GAP の L173 はエンドソームへの局在に重要なアミノ酸残基である(Sirokmany et al., 2006)。そこで、257-259 の LAV を GAA へ置換した変異体 BNIP2 LAV/GAA を作成した。BNIP-2 の PF(262-263aa)も高度に保存されていたので、アミノ酸置換を行った。BNIP-2 変異体は図 11B の矢尻で示すように、HEK293T 細胞で発現・精製することができた。これらのタンパク質と PS のみをブロットしたメンブレンを用いて Lipid-membrane overlay assay を行った。その結果 BNIP2 LAV/GAA 変異体では PS への結合性に低下がみられ、BNIP-2 K271W 変異体では PS との結合は見られなくなった(図 11B)。BNIP-2 K242H や BNIP-2 PF/LV では、PS との結合はむしろ促進していた。

次に、BNIP-2 K271W 変異体を様々なリン脂質がブロットされたメンブレンに加えて、同様の assay を行った。その結果、PA や PtdIns(3)P、PtdIns(5)P のシグナルは野生型と同じ程度であるが、PS のシグナルは全く検出されなかった(図 10A 右パネル)。

さらに、BNIP-2 変異体を COS7 細胞に過剰発現させた時の細胞形態への効果を調べた。その結果、BNIP-2 LAV/GAA 変異体を発現した細胞のうち 20% の細胞しか突起を持たず、BNIP-2 K271W 変異体にいたってはほとんどの細胞は突起を持たなかった。また、これらの変異体は核に濃縮される蛍光を示し、細胞質にも均一に拡散していた(図 11C)。ここで、BNIP-2 K271W 変異体は Cdc42GAP と結合するのかどうかを免疫沈降で調べた。その結果、BNIP-2 K271W 変異体は野生型の BNIP-2 と同様に Cdc42GAP と結合していた(図 11D)。つまり、BNIP-2 K271W 変異体のフォールディングは正常であると考えられた。以上の結果は BNIP-2 も α -TPP や Sec14p と同様に、CRAL-TRIO ドメインのポケット部分が脂質との結合に重要であり、BNIP-2 の PS への結合には K271 が必須であることが明らかになった。さらには、PS への結合は BNIP-2 の細胞内局在や突起の誘導にも必須であることが示唆された。

3.9 BNIP-2 の Cdc42 や Cdc42GAP 結合部位の変異は PS への結合や BNIP-2

の局在には影響を与えない

BNIP-2 は Cdc42 や Cdc42GAP と結合し、Cdc42 の活性に依存して突起を誘導する。Cdc42 の結合部位は BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメイン内の EYV (288-290aa) で、Cdc42GAP の結合部位は RRKMP (217-221aa) であり、RRLRK (235-239aa) は GAP 活性に重要であることが報告されている (Low et al., 2000)。そこで、これらのアミノ酸配列が PS との結合に関与しているかどうかを調べるために、図 12A に示すような BNIP-2 変異体を作成した。これらの BNIP-2 変異体を PS のみをブロットしたメンブレンに加え、Lipid-membrane overlay assay を行った。その結果、いずれの BNIP-2 変異体も野生型と同様に PS に結合していた (図 12B)。次に、これらの BNIP-2 変異体を COS7 細胞に過剰発現させると、どの変異体も野生型と同様に細胞突起を誘導し、突起の末端への局在も観察された (図 12C)。したがって Cdc42 や Cdc42GAP との結合や、GAP 活性とは無関係に、BNIP-2 は PS に結合することが示された。

3.10 BNIP-2 は PS と共局在する

PS は陰性電荷をもつリン脂質で、細胞膜に最も多く分布し、リサイクリングエンドソームや TGN にも多く分布する (Yeung et al., 2008; Fairn et al., 2011; Uchida et al., 2011)。そこで、BNIP-2 と PS が細胞内で共局在しているかどうかを調べるために、PS と特異的に結合することが報告されている GFP-Lact-C2 を PS マーカーとして利用した (Yeung et al., 2008)。COS7 細胞において GFP-Lact-C2 は細胞膜、ゴルジ体付近に分布していたことから、Lact-C2-GFP は PS の細胞内分布を反映していると考えられた。COS7 細胞に Lact-C2-GFP を発現させ、内在性または過剰発現した BNIP-2 の局在を観察した結果、内在性 BNIP-2 はゴルジ体付近において (図 13A)、過剰発現した BNIP-2 はゴルジ体付近および一部の細胞突起の末端においても PS と共局在していた (図 13B 矢印)。以上の結果から、PS と結合する BNIP-2 はゴルジ体付近において PS と共局在することが明らかになった。しかしながら、PS が最も多く含まれる細胞膜では BNIP-2 と PS の共局在はほとんど見られなかった。一方で、PS と結合しない BNIP-2 K271W 変異体は主に核や細胞質に拡散して分布し、Lact-C2-GFP との共局在は観察されなかった (図 13C)。エンドソームのマーカーである TfR とともに BNIP-2 K271W 変異体は共局在しなかった (図 13D)。

3.11 脱リン酸化型 BNIP-2 は PS との結合性が上昇する

HEK293T 細胞抽出液を抗 BNIP-2 抗体でウェスタンブロットを行うと図 14A のように複数のバンドが検出される。この主な理由は、ヒトの BNIP-2 には開始

ATG の選択的使用とスプライシングバリエーションが存在するためである。しかし、他の理由として BNIP-2 の翻訳後修飾の可能性もある。脱リン酸化酵素である lambda protein phosphatase (λ PPase) で細胞抽出液を処理した後、抗 BNIP-2 抗体でウェスタンブロットを行うと、バンドの下方へのシフトが見られた (図 14A、右レーン)。Lipid-membrane overlay assay のために精製した His-BNIP-2 も 2 本以上のバンドとして検出され、脱リン酸化すると一部のバンドの下方シフトが見られることから、リン酸化されていた (図 14B、左パネル)。この脱リン酸化した His-BNIP-2 で Lipid-membrane overlay assay を行った。その結果、脱リン酸化型 BNIP-2 と PS との結合性が約 2 倍に上昇した (図 14B)。つまり、リン酸化型 BNIP-2 は PS との結合が阻害されると考えられる。

3.12 BNIP-2 の Ser114 と Thr116 はリン酸化される

Flag-BNIP-2 を過剰発現させた HEK293T 細胞抽出液を抗 Flag 抗体でウェスタンブロットを行うと図 15A のように 2 本のバンドが検出されるが、 λ PPase で処理すると 1 本のバンドとして検出されることから、過剰発現させた BNIP-2 もリン酸化修飾されていた。また、Flag-BNIP-2 N 末断片 (1-130aa) または Flag-BNIP2 C 末断片 (147-314aa) を過剰発現させた HEK293T 細胞抽出液を抗 Flag 抗体でウェスタンブロットを行うと、C 末断片ではなく N 末断片がリン酸化修飾されていた (図 15B、矢印)。BNIP-2 は受容体型チロシンキナーゼである Fibroblast growth factor (FGF) receptor によってリン酸化されるという報告がある (Low et al., 1999)。N 末断片にはチロシン残基は Y118 しか存在しなかったため、Y118A 変異体を作成したが、この変異体はリン酸化されていた (図 15D)。一方で、タンパク質の翻訳後修飾に関するデータベース PhosphoSitePlus によると、ホスホプロテオーム解析結果から、リン酸化されるサイトとして BNIP-2 の S114 が 22 回、T116 が 6 回登録されている (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>)。そこで S114A、T116A 変異体を作成したところ、この変異体は、上方へのシフトを示さなかった (図 15D)。以上の結果から、過剰発現した BNIP-2 は少なくとも S114 と T116 が Ser/Thr リン酸化修飾されることが明らかになった。

3.13 BNIP-2 の Ser114 と Thr116 のリン酸化は KLC1 や PS との結合、および細胞の形態変化に影響を与えない

kinesin や kinesin のアダプタータンパク質のリン酸化が積み荷の結合や解離を制御することが知られている。そこで、BNIP-2 のリン酸化修飾は kinesin と積み荷の結合、解離に関わっているのではないかと予想した。まず、BNIP-2 の S114 と T116 のリン酸化が KLC1 との結合に与える影響を調べるために非リン酸化型

変異体 (BNIP-2 S114A,T116A) および疑似リン酸化型変異体 (BNIP-2 S114D,T116D) を用いて免疫沈降を行った。その結果、非リン酸化型変異体も疑似リン酸化型変異体も野生型 BNIP-2 と同程度に KLC-1 と結合していた (図 15E)。次に、これらの変異体と PS との結合を調べるために、Lipid-membrane overlay assay を行った。その結果、非リン酸化型変異体も疑似リン酸化型変異体も野生型 BNIP-2 と同程度に PS と結合していた (図 15F)。また、これらの変異体が細胞の形態変化に与える影響を調べたが、非リン酸化型変異体も疑似リン酸化型変異体も野生型 BNIP-2 と同様に突起末端に局在し、突起を誘導した (図 15G)。以上の結果から、BNIP-2 の S114 と T116 のリン酸化は KLC1 や PS との結合、および細胞の形態変化に影響を与えないことが強く示唆された。

3.14 BNIP-2 の局在とリン酸化は C2C12 筋芽細胞の分化前後で変化する

マウス C2C12 筋芽細胞は、低血清条件下で培養すると筋細胞へ分化を開始し、やがて細胞融合を開始して数日後には多核の筋管細胞へと分化する。抗 BNIP-2 抗体を用いて内在性 BNIP-2 の局在を観察した結果、分化前の C2C12 細胞では BNIP-2 はミトコンドリアに局在するのに対し、分化後の C2C12 ではミトコンドリアに局在していなかった (図 16A 上パネル)。そこで、アクチンを染色する抗ファロイジン抗体を用いて分化後の C2C12 細胞を抗 BNIP-2 抗体とともに共染色した。その結果、BNIP-2 とアクチンは共局在していた (図 16A 下パネル)。また、分化前後の C2C12 細胞抽出液で抗 BNIP-2 抗体を用いてウエスタンブロットを行うと、分化後の BNIP-2 の一部はリン酸化修飾されていた (図 16B)。

次に、マウス肝臓細胞を用いて細胞分画を行い、ミトコンドリア分画と細胞質分画に含まれる BNIP-2 のリン酸化状態を調べた。その結果、ミトコンドリア分画に含まれる BNIP-2 は非リン酸化型 BNIP-2 が含まれていた (図 16C)。以上の結果は、BNIP-2 のリン酸化状態が BNIP-2 のミトコンドリアへの局在に影響する可能性があることを示している。

4. 考察

4.1 BNIP-2 の WED モチーフと KLC1 の結合

BNIP-2 と高い相同性をもつ *caytaxin* は WED モチーフで KLC1 に結合し、輸送される (Aoyama et al, 2009)。特に両タンパク質の C 末端の CRAL-TRIO ドメインは約 90% の類似性をもつ。これに対して N 末端側の相同性は低い。KLC の結合部位である WED モチーフ周辺はよく保存されている。そこで、我々は BNIP-2 と *caytaxin* は *kinesin-1* のアダプタータンパク質として類似した機能をもつと予想した。免疫沈降法や GST-pull down assay を用いた解析から、BNIP-2 も 97-99 番目のアミノ酸である WED モチーフを介して KLC1 に結合することを明らかにした (図 3)。BNIP-2 が KLC に結合することは、細胞末端への BNIP-2 の濃縮と細胞末端での突起の誘導の 2 つの現象において非常に重要である。BNIP-2 が細胞末端へ輸送されることがこれらの現象に必須と思われる。詳細なメカニズムまでは解明することはできなかったが、細胞膜周辺にまで輸送された BNIP-2、あるいは BNIP-2 とともに輸送された物質が細胞突起を誘導するのだろう (考察 4.6 を参照)。

細胞に BNIP-2 を過剰発現させると、細胞突起の末端では、BNIP-2 とともに、内在性 KLC および KHC も濃縮されていた (図 4C)。また、*kinesin-1* のドミナントネガティブ変異体である KIF5DN を BNIP-2 とともに過剰発現させた実験では、BNIP-2 の細胞末端への局在や細胞突起の誘導が阻害されていた (図 5A)。KLC と結合する BNIP-2 の N 末断片を BNIP-2 とともに過剰発現させると、KIF5DN と共発現した時と同様に、BNIP-2 の細胞末端への局在や突起の誘導が阻害された (図 5B)。さらに、KLC と結合しない BNIP-2 の変異型 N 末断片は、このドミナントネガティブ効果を示さなかった。これら 3 つの実験結果から BNIP-2 は *kinesin-1* によって輸送されることが明らかとなった。さらには、全長の BNIP-2 内で WED 配列を AAA 配列に置換した BNIP-2-WED/AAA 変異体は、KLC とは結合できず、核近傍に顆粒状に局在した。これはつまり、CRAL-TRIO ドメインだけでは突起の誘導や、突起末端への濃縮を引き起こさないことを示している (図 4B)。しかし、Zhou らは BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインのみで細胞の形態変化や突起を誘導すると報告している (Zhou et al. 2005)。この原因は現段階では不明だが、BNIP-2 の発現量の差が 1 つの原因として考えられる。発現量が多い場合には BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインのみでも細胞末端で十分な濃度で到達し、細胞突起を誘導するのかもしれない。

caytaxin と BNIP-2 に共通して存在する WED モチーフは、KLC と結合する配列として様々なタンパク質において保存されている (図 17)。例えば、神経小胞の膜タンパク質である calyntenin 1 は EDDWDD (890-895aa) と QLEWDD (961-966aa) をもち(Konecna et al., 2006)、クラスリンと結合するタンパク質 Gadkin は DLEWED (207-212aa) と GLEWEN (257-262aa) をもち(Schmidt et al., 2009)、リソソームと結合する SKIP は NLEWDD (210-215aa) と STDWED (239-244aa) をもち(Rosa-Ferreira et al., 2011)、vaccinia virus A36R は ESDWED (61-66aa) と SLIWDN (94-99aa) をもつ(Ward et al., 2004)。これらのタンパク質はすべて KLC を介して kinesin に結合し、輸送される。Dodding らは、これらのタンパク質では WED モチーフを数十アミノ酸の間隔をあけて 2 回繰り返す傾向があると指摘している(Dodding et al., 2011)。BNIP-2 においても、今回調べた WED モチーフ EFEWED (94-99aa) の上流に WED モチーフと類似した配列 KEEWQD (7-12aa) が存在し、caytaxin においても WED モチーフ ELEWED (115-120aa) の上流に類似した配列 KEEWQD (16-21aa) が存在していた。しかし、BNIP-2 の 2 番目の WED モチーフを AAA 配列に置換すると、KLC1 と全く結合しなくなる (図 3 B)。また、caytaxin の 16-21aa にある KEEWQD 配列を失った欠損変異体は KLC1 と結合する(Aoyama et al, 2009)。これらの結果は、BNIP-2 と caytaxin は 2 番目の WED モチーフが KLC1 との結合に必須であることを示している。calyntenin 1 でも 2 番目の WED モチーフが重要であり、SKIP では 1 番目の WED モチーフが重要である(Rosa-Ferreira et al., 2011)。これらのことから、KLC との結合には 1 つの WED モチーフで十分であると思われる。2 つの WED モチーフのうちどちらが KLC に結合しやすいのかは、それぞれの WED モチーフの配列と KLC とのアフィニティーや、KLC と結合しやすい位置に WED モチーフが露出しているかなどの条件によるのだろう。したがって、WED モチーフの配列の中でも KLC の種類によるアフィニティーの違いや、BNIP-2 を含む WED モチーフをもつタンパク質の立体構造を明らかにすることも必要かもしれない。

また、Dodding らはバイオインフォマティクスデータ解析から、数十アミノ酸離れた 2 つの WED モチーフをもつタンパク質をコードする遺伝子がヒトゲノム中に 460 個存在することを報告している (Dodding et al., 2011)。これは、すでに知られている WED モチーフをもつ KLC 結合タンパク質よりも、かなり多くのタンパク質が KLC を介して kinesin と結合し、運搬されていることを示唆している。同じ空間に WED モチーフをもつタンパク質が複数存在する状況下で、どのように運搬すべき積み荷を選別するのかについてはほとんど明らかにされていない。BNIP-2 の場合は CRAL-TRIO ドメインを介してゴルジ体付近に局在

することで、KLC と結合しやすくなるのだろう。

4.2 BNIP-2 の細胞内局在

内在性 BNIP-2 の細胞内局在はこれまで明らかにされていなかった。本研究において我々は、内在性 BNIP-2 が核近傍のゴルジ体に顆粒状に分布しており、細胞質においてもリサイクリングエンドソームや一部の初期エンドソームに顆粒状に分布することを明らかにした (図 6)。また、ミトコンドリアへの局在も観察した (図 7D)。これらの細胞小器官や小胞は様々な kinesin や dynein と結合し、微小管に沿って配向している(Hirokawa et al., 2009)。BNIP-2 の顆粒も微小管に沿って 0.48 μ m/sec の速度で移動していた (図 9A)。この速度は kinesin による輸送速度の範囲内であり、BNIP-2 も kinesin-1 によって輸送されることを示している。BNIP-2 のミトコンドリアへの局在は COS7 細胞では観察されたものの、HeLa 細胞ではほとんど見られなかった。未分化の C2C12 細胞では BNIP-2 はミトコンドリアに局在するが、筋分化後にはミトコンドリアへの局在は見られなくなった (図 16A)。このように BNIP-2 のミトコンドリアへの局在は不安定であった。これは、BNIP-2 のリン酸化修飾や、ミトコンドリア外膜の脂質の構成が変化するためであるのかもしれない (考察 4.5 を参照)。

4.3 BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインと PS の結合

CRAL-TRIO ドメインは脂質との結合やタンパク質相互作用に関与するドメインである。BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインには Cdc42 や Cdc42GAP が結合し (Zhou et al., 2005)、caytaxin の CRAL-TRIO ドメインには kidney-type glutaminase (KGA) や peptidyl-prolyl isomerase (Pin1) が結合することが報告されている (Buschdorf et al., 2006; Buschdorf et al., 2008)。これらの報告から、BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインには様々なタンパク質が相互作用すると示唆された。そこで、BNIP-2 と相互作用するタンパク質を免疫沈降し、LC/MS 質量分析で解析を行った。沈降物の中には小胞に輸送関与するタンパク質である AP-2 complex subunit α -2 や p115、Arf-GAP with SH3 domain ANK repeat and PH domain-containing protein 2 (ASAP2)、RalA binding protein 1 (RalBP1)、Oxysterol binding protein2 (OSBP2) などが含まれていた。これらのタンパク質の一部については免疫沈降を行ったが、BNIP-2 と直接結合するタンパク質を同定できなかった (data not shown)。CRAL-TRIO ドメインは脂質と結合するドメインでもあることから、これらの小胞タンパク質は脂質を含む小胞ごと沈降された可能性がある。これまでに、BNIP-2 や caytaxin の CRAL-TRIO ドメインに特定の脂質が結合するかどうかは調べられていなかった。我々は lipid-membrane overlay

assay を用いて BNIP-2 は phosphatidylserine (PS) に特異的に結合することを明らかにした (図 10A)。また、BNIP-2 は PtdIns monophosphates や phosphatidic acid (PA) とともに弱く結合していた。

CRAL-TRIO ドメインを介して PS に結合するタンパク質にはチロシンフォスファターゼである PTP-MEG2 がある。PTP-MEG2 は、N 末端側に CRAL-TRIO ドメイン、C 末端にチロシンフォスファターゼ活性ドメインをもつ。PTP-MEG2 は核周囲に局在し、CRAL-TRIO ドメインはフォスファターゼ活性制御や核周囲への局在に重要である (Zhao et al., 2003)。PTP-MEG2 の CRAL-TRIO ドメインを欠損させた変異体は、チロシンフォスファターゼ活性が上昇し、細胞質全体に拡散して分布する。このような例からも、BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインと PS の結合が BNIP-2 の局在に重要であると予想された。

BNIP-2 が PS と結合するために必要なアミノ酸配列を調べるために、yeast Sec14p から human α -TTP にまで保存されている脂質結合部位に変異をいれた BNIP-2 変異体を作成した。その結果、BNIP-2 K271W 変異体は PS には結合しなかった。しかし、PtdIns monophosphates や PA との弱い結合は保持されていた (図 10A)。つまりこれは、BNIP-2 の CRAL-TRIO ドメインが PS との結合に重要であることを示している。BNIP-2 の立体構造はまだ明らかにされていないが、CRAL-TRIO ドメインの起源である Sec14p や α -TTP の CRAL-TRIO ドメインでは立体構造が明らかにされている。 α -TTP の R221 の変異は重篤なビタミン E 欠乏症をもたらし、この R221 は BNIP-2 の K271 に相当する。最近、生化学と X 線構造解析により α -TTP の R59 と R192 と R221 が塩基性残基のクラスター領域を形成し、主にリン酸基の認識を介して PtdIns phosphates と結合することが報告された (Kono et al., 2013)。この塩基性残基のクラスター領域は、ビタミン E が結合する疎水性ポケットの縁に存在する。Kono らは PtdIns phosphates との結合は次の 2 点において重要であると予想している。1 つは、PtdIns phosphates を豊富に含む細胞膜に α -TTP を導くことであり、もう 1 つは、 α -TTP のビタミン E 結合ポケットを開状態へと導きビタミン E を放出することである。この報告は、BNIP-2 と PS の結合が BNIP-2 を小胞の膜へと導くという我々の考えと一致する。また、BNIP-2 も PS と結合することによって立体構造が変化し BNIP-2 の機能が制御されているのかもしれない。

BNIP-2 と PS の結合は BNIP-2 の細胞内局在だけでなく、細胞の形態変化や突起の誘導にも関与している。PS に結合しない BNIP-2 K271W および LAV/GAA 変異体は細胞の形態変化や突起の誘導を引き起こさない。これらの変異体は PS

やゴルジ体およびエンドソームに局在せず、核に濃縮したり、細胞質に均一に拡散したりしていた(図 11C)。BNIP-2 は全長にわたって塩基性アミノ酸に富む配列を持っている。一旦 PS に結合できなかつた変異体はこれらの塩基性配列が核移行シグナルとなり核に局在してしまうと考えた。核移行シグナル用配列を全て除去することは現実的でなく、今までのところ、PS に結合せずかつ核へ移行することもない変異体を作ることはできていない。しかし、BNIP-2 WED/AAA 変異体は核ではなく細胞質に分布するが、細胞の形態変化や突起を誘導しない(図 4 B)。これは、PS と結合しない BNIP-2 変異体が核に局在したため、突起誘導が阻害されたのではないことを支持する。つまり、BNIP-2 を介した KLC と小胞の膜との結合が、突起の誘導に必要であることを示唆している。

細胞に過剰発現させた BNIP-2 は Cdc42 や Cdc42GAP と相互作用し、Cdc42 の活性に依存して細胞突起を誘導すると Zhou らは報告している(Zhou et al., 2005)。彼らは Cdc42 結合部位が VPMEYVGI (285-292aa) で、251-284aa の 34 アミノ酸が細胞の形態変化や突起誘導に必要であると述べている。K271 と LAV (257-259aa) はこの 34 アミノ酸内に含まれており、我々の結果と一致する。しかし、Cdc42 結合部位の EYV (288-290aa) を GAA に置換した BNIP-2 EYV/GAA 変異体は野生型と同様に細胞突起を誘導した(図 12C)。この矛盾の理由は、彼らは VPMEYVGI (285-292aa) の欠損変異体を用いているためだと考えた。おそらく CRAL-TRIO ドメインは厳密な立体構造を保っており、欠損変異体では K271 と LAV 周辺の立体構造に大きな影響を与えると我々は予想している。

PS は陰性電荷をもつリン脂質で、哺乳動物細胞のリン脂質のうちの約 5-11% を占めている。生体膜で囲まれた細胞小器官は特定のリン脂質を有することが知られており、PS は細胞膜に最も多く存在し、リサイクリングエンドソームや TGN にも多く存在するが、後期エンドソームやリソソームにはあまり含まれない(Leventis and Grinstein, 2010)。また、PS はミトコンドリアと小胞体では内腔側に偏って存在している。細胞膜に分布する PS は脂質二重層の細胞質側に偏って存在しており、アポトーシスを起こした細胞の認識・除去、シグナル分子のリクルートや活性化に重要である(Vance et al., 2005)。細胞膜以外に分布する PS の機能はあまり分かっていないが、リサイクリングエンドソームに存在する PS は逆行性輸送において重要であると近年報告されている(Uchida et al., 2011)。つまり、リサイクリングエンドソームからゴルジ体への逆行性輸送に必須な *evectin-2* はその PH ドメインでエンドソームの PS に結合している。

これらのことから、PS が多く含まれる TGN やリサイクリングエンドソームに、BNIP-2 が局在すると考えられる。そこで BNIP-2 と PS の共局在を調べるた

めに、PS に高い特異性をも Lact-C2-GFP を PS のプローブとして用いた (Yeung et al., 2008)。内在性 BNIP-2 は核近傍の TGN や細胞質では顆粒状に Lact-C2 と共局在していた (図 13A)。しかし、Lact-C2 は細胞膜に多く局在していたが、BNIP-2 は細胞膜には局在していなかった。BNIP-2 を過剰発現させると、突起の末端において BNIP-2 と Lact-C2 の共局在が見られた (図 13B)。内在性 BNIP-2 が細胞膜に分布していない理由はまだ明らかにできていないが、細胞膜の近辺では BNIP-2 の濃縮を阻害するメカニズムが存在すると予想している。例えば、BNIP-2 は細胞膜の周辺では小胞や kinesin-1 と解離し、核近傍に戻り、再び次の輸送を行う可能性がある。もしくは細胞膜の近辺に存在するプロテアーゼに分解されて小胞や kinesin-1 と解離するという可能性もある。実際、BNIP-2 は caspase (Valencia et al., 2007) や granzymeB (Scott et al., 2010) の基質となるという報告もある。

4.4 BNIP-2 のリン酸化による物質輸送制御

図 14B の結果から BNIP-2 のリン酸化が PS との結合を阻害していると考えられる。これまでの結果を合わせて、次のような BNIP-2 輸送モデルを予想した (図 18A)。BNIP-2 はゴルジ体近傍において KLC1 と結合し、また PS と結合することで、PS に富むリサイクリングエンドソームといった小胞を主要な積み荷とする。このような kinesin-BNIP-2-小胞の複合体が形成されると、kinesin は細胞膜方向へと移動する。kinesin-BNIP-2-小胞の複合体は細胞膜の周辺まで輸送されるとリン酸化され、小胞や kinesin-1 と解離し、核近傍に戻り、再び次の輸送を行う。これを証明するためにも BNIP-2 のリン酸化サイトやキナーゼを同定することは重要である。生化学的に同定されたり網羅的なプロテオーム解析で報告されたりしたリン酸化ペプチドを集積したデータベース PhosphoSitePlus によると Ser114 と Thr116 が最も多く、ついで Tyr118 が多く登録されていた。そこで、Ser114 と Thr116 の非リン酸化型変異体や疑似リン酸化型変異体を作成したが、これらの変異体は脂質への結合性や細胞の形態変化には影響を与えなかった (図 15F,G)。このことから、他のリン酸化部位が BNIP-2 の機能に影響するのだろう。最近北川らは、BNIP-2 の Tyr118 が FGF receptor の細胞内部分や C-Src によって特異的にリン酸化されるという結果を出した (N. Ishida-Kitagawa, unpublished data)。C-Src などのチロシンキナーゼによる BNIP-2 のリン酸化と機能の制御は今後の重要な研究課題ある。

上記の BNIP-2 輸送モデルは、vaccinia virus の宿主細胞内での輸送と非常に類似している (図 18B)。vaccinia virus は宿主細胞に感染後、微小管に沿って

核近傍まで運ばれて、自身のゲノムを転写・複製する。その後、TGNの膜に包まれたウイルス粒子として kinesin-1 により核近傍から細胞膜まで移動し、宿主細胞から離れる (Hall, 2004)。ウイルス粒子に含まれる A36R タンパク質は WED モチーフをもつ。核近傍で形成されウイルス粒子は A36R を介して KLC に結合し、細胞膜付近まで輸送される。ウイルス粒子が細胞膜まで輸送されると、細胞膜と融合し、Src チロシンキナーゼを活性化する。活性化した Src は A36R をリン酸化することで kinesin と解離する。このような宿主細胞内での、核周囲から細胞膜への物質輸送システムは、vaccinia virus のために用意されているわけではなく、細胞が通常この運搬経路を利用して物質輸送しているはずである。リン酸化による積み荷の解離の例は他の kinesin や kinesin のアダプターでも知られており、BNIP-2 も同様にリン酸化による制御を受けると考えられる。また、kinesin によって細胞膜付近まで輸送された積み荷は、myosin に乗り換えてアクチン線維に沿って輸送される (Ali et al., 2007)。分化後の C2C12 細胞の BNIP-2 の一部はリン酸化され、アクチン線維上に分布する現象から (図 16A,B)、BNIP-2 のリン酸化は、アクチン線維への乗り換えに関与するのかもしれない。これらについて明らかにするためには、細胞分画を行い、各画分に含まれる BNIP-2 のリン酸化状態を詳細に調べる必要がある。

4.5 BNIP-2 のミトコンドリアへの局在

caytaxin は神経細胞において、主にミトコンドリアと共局在する。また、caytaxin をノックダウンすると神経細胞末端のミトコンドリアの数が減少する。これらのことから、caytaxin の積み荷の一つはミトコンドリアである (Aoyama et al., 2009)。BNIP-2 の場合は、ミトコンドリアとの局在は培養細胞の種類や培養条件によって異なり、変化しやすい。COS7 細胞における内在性の BNIP-2 はミトコンドリアに分布している場合もあるが、COS7 細胞に BNIP-2 を過剰発現させた場合や、HeLa 細胞においてはミトコンドリアとはあまり一致していなかった。PS は PS synthase によって小胞体とミトコンドリア結合膜で合成される。ミトコンドリアでは合成された PS は直ちに phosphatidylethanolamine (PE) へと脱炭酸される (Leventis and Grinstein, 2010)。それゆえ BNIP-2 のミトコンドリアへの局在はミトコンドリア膜タンパク質を介している可能性も考えられる。KHC は Milton を介してミトコンドリア膜タンパク質である Miro と結合することでミトコンドリアに局在している (Boldogh and Pon, 2007)。例えば、Milton に結合した kinesin-1 が BNIP-2 をミトコンドリアにリクルートするのかもしれない。もしくは、ある生理的条件下ではミトコンドリア外膜に PS が存在し、そこに BNIP-2 が結合するのかもしれない。また、マウス肝臓から回収されるミトコンドリア

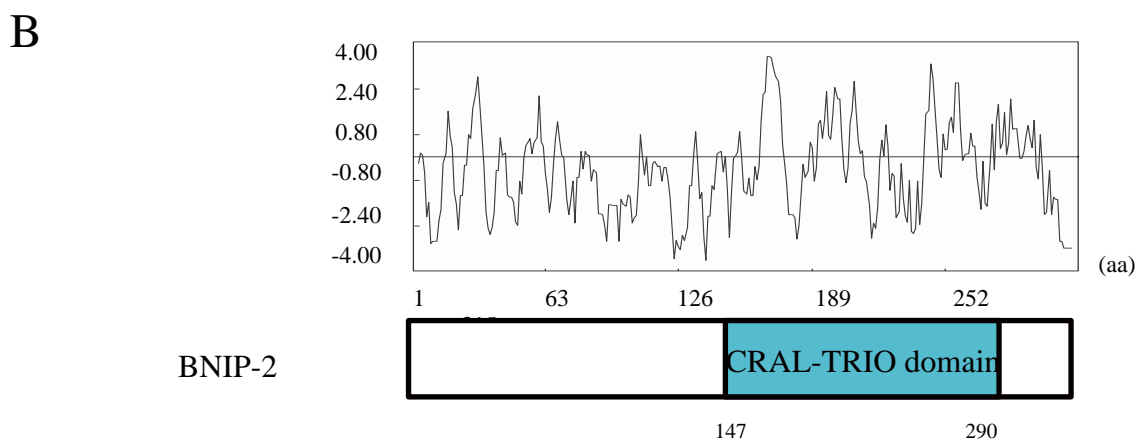
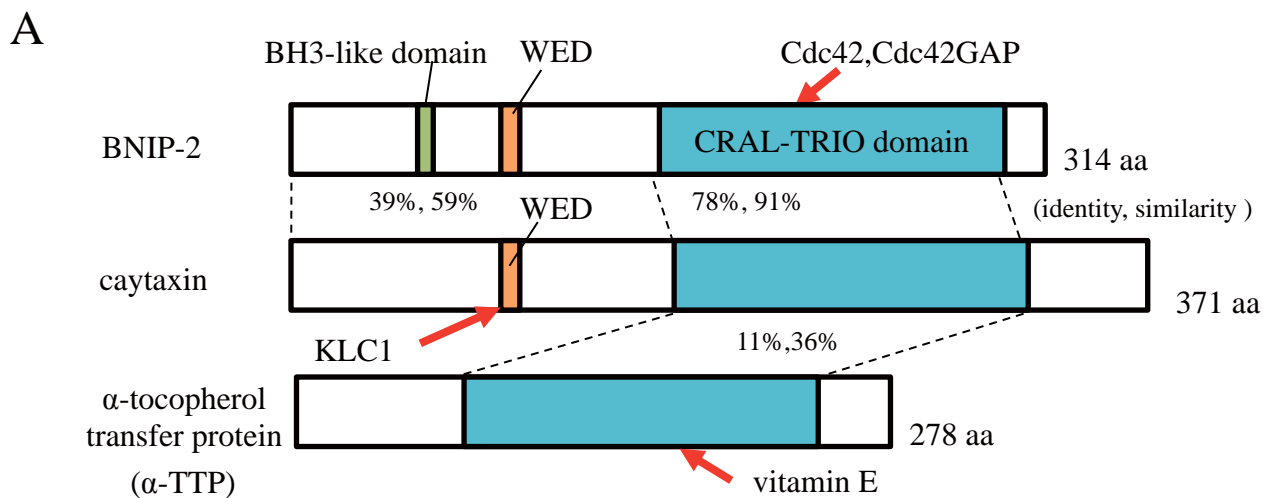
画分には非リン酸化型 BNIP2 が特異的に含まれていたことから、BNIP-2 のミトコンドリアへの局在にもリン酸化が関与している可能性がある(図 16C)。

4.6 BNIP-2 の積み荷

本研究で得られた結果から BNIP-2 は *caytaxin* と同様に *kinesin-1* のアダプタータンパク質であることが証明された。BNIP-2 の WED モチーフを介して KLC と結合し、CRAL-TRIO ドメインを介して小胞膜に存在する PS と結合する。BNIP-2 の主な機能は小胞の輸送であると考えている。Cdc42GAP はエンドソームに存在し、Rab11 と複合体を形成してエンドソームの輸送を制御している(Sirokmany et al., 2006)。BNIP-2 と Cdc42GAP との細胞内局在はよく一致しており、同じエンドソームに含まれているのであろう(図 8E)。また、細胞が移動する際には Rac と Cdc42 は Rab5 を含む初期エンドソームを利用して細胞質中をリーディングエッジへと輸送される(Schiefermeier et al., 2011)。BNIP-2 の機能のとして Rac1 や Cdc42 または Cdc42GAP と結合したエンドソームをリーディングエッジへと輸送するのかもしれない。過剰発現した BNIP-2 は過剰な Rac1 や Cdc42 をリーディングエッジに輸送した結果、細胞の形態変化や突起を誘導する可能性がある。

また、出芽酵母ではゴルジ体からの分泌経路によって出芽部位に PS が濃縮される。そこに静電的に Cdc42 がリクルートされて、細胞極性が形成される(Fairn et al., 2011)。BNIP-2 の場合も PS に富むエンドソームが BNIP-2 によって細胞末端で濃縮され、そこに Cdc42 がリクルートされて、突起が誘導されるのかもしれない。今後、BNIP-2 の積み荷を詳細に調べることで、突起誘導のメカニズムや BNIP-2 の *kinesin* のアダプタータンパク質としての役割が明確になると期待している。

5. 図表



C

| | | | |
|--------|-----|---|-----|
| Sec14p | 1 | -----MVTQQEKEFLESYPQNCPPDALPGTGNLDSAQEKALAELEKQ | 43 |
| A-TTP | 1 | -----MAEARSQPSAGPQLNALPDHSPLLQPLAALRRRAREAGVPL | 42 |
| BNIP2 | 1 | MEGVELKEEWQDEDFPIPLPEDDSIEADILAITGPEDQPGSLEVNGNKVRKCLMAPDISI | 60 |
| Sec14p | 44 | LEDAGFIERLDDSTLLR-----FLRARKEDVQLAKEMFENCEKWRKDYGTDITL | 92 |
| A-TTP | 43 | APLP-----LTDSTLLR-----FLRARDLDDLAWRLLKNYKWRACPEISAD | 86 |
| BNIP2 | 61 | TLDPSDGSVLSDDLDSESGEIDLGLDTPSENSNEFEWEDDLPKPKTTEVIRKGSITETYA | 120 |
| Sec14p | 93 | QDFHYDEKPLIAKFYPQYYEKTKDKDRPVPYFEELGAVNLHEMNK----VTSEERMLKNLV | 148 |
| A-TTP | 87 | LHPRS-----IIGLLKAGYFGLVLRSDPTGSKVLIYRIAHWDPK----VFTAYDVFRVSL | 137 |
| BNIP2 | 121 | AEEKEDGRRWRMFRIQEQRVDMKALEPYKQVISHGGYYGDGLNAIVVFAVCFMPESIQ | 180 |
| Sec14p | 149 | WEYESVQYRLPACSRAGHLVETSCTIMDFKGISISSAYSVMS-YVREASYISQNYYPE | 207 |
| A-TTP | 138 | ITSELIVQEVETQRN-----GIKAFEDLEGWQFSHAFQITPSVAKKIAAVLTDSPFL | 189 |
| BNIP2 | 181 | PNRYRLMDNLFKYVIGTLELLVAENYIVYFNCATTRRKMPSLG-WLRKCYQIDRRLEK | 239 |
| Sec14p | 208 | RMGKFYIINAPFGFSTAFRLFKPFLDPVTVSKIFILGSSYQKELLKQIPAEENLVKFGCK | 267 |
| A-TTP | 190 | KVRGIHLINPEPVIHFAVFSMKPFLTEKIKERLHMHGNNYKQSLQLQHFQ-DILELEYCGE | 248 |
| BNIP2 | 240 | NLKSLLIVHPSWFIKRTLLAVTRPFLSSKFSQKIRYVFN-----LAELAEIVPMEYVGI | 292 |
| Sec14p | 268 | SEVDESKGGLYLSDIGPWRDPKYIGPEGEAPEAFSMK | 304 |
| A-TTP | 249 | EFSMEDICQEWTFNFKMSED--YLSSISESIQ----- | 278 |
| BNIP2 | 293 | PECIKQVDQELNGKQDEPKNEQ----- | 314 |

図1 BNIP-2とCRAL-TRIOドメインをもつタンパク質の構造

(A) BNIP-2とcaytaxinおよびαTTPとの相同性。BNIP-2とcaytaxinは全長で相同性が高く、BNIP-2とcaytaxinのC末端側は78%のidentity、91%のsimilarityがあり、BNIP-2とCaytaxinのN末端側は39%のidentity、59%のsimilarityがある。

(B) BNIP-2タンパク質のKyte-Doolittle疎水性プロファイル。CRAL-TRIOドメインは疎水性を示す。

(C) BNIP-2、αTTPとSec14pのアミノ酸配列。青の下線はCRAL-TRIOドメインを示した。赤枠はSec14pのK239とそれに対応するα-TTPのR211およびBNIP-2のK271の保存された塩基アミノ酸を示す。

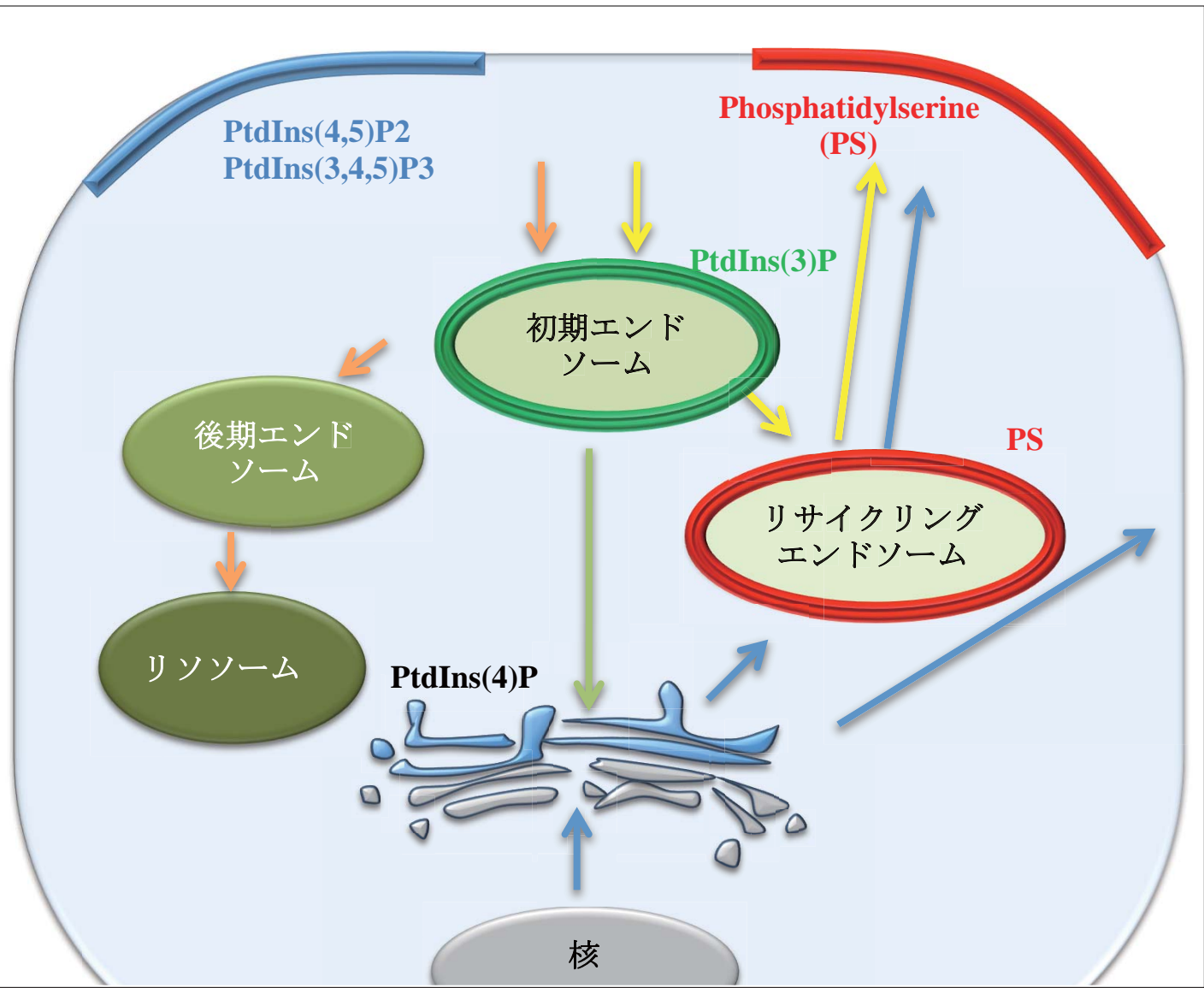
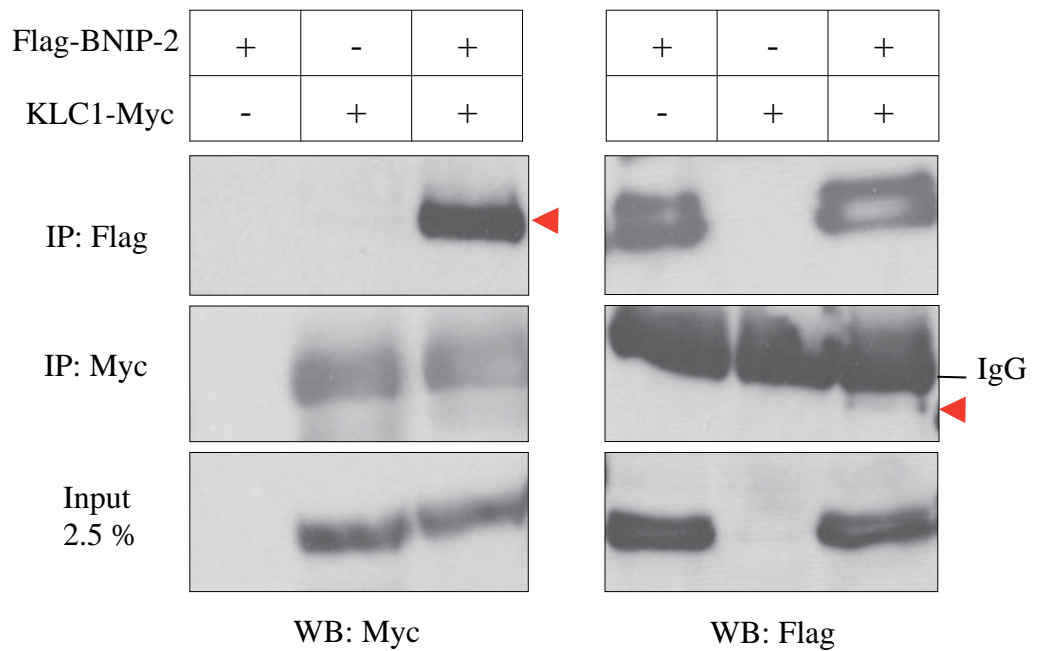


図2 細胞内輸送の概念図

細胞内における物質輸送はエンドサイトーシスとエクソサイトーシスに分けられ、前者が細胞外物質の取り込み、後者が細胞内物質の放出に関与する。エンドソームには初期エンドソームや後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームがある。オレンジ色の矢印は分解経路、緑色の矢印は逆行性経路、黄色の矢印はリサイクリング経路、青の矢印はエキソサイトーシス経路を示した。エンドソームを含むオルガネラには特有のリン脂質が含まれる。

A



B

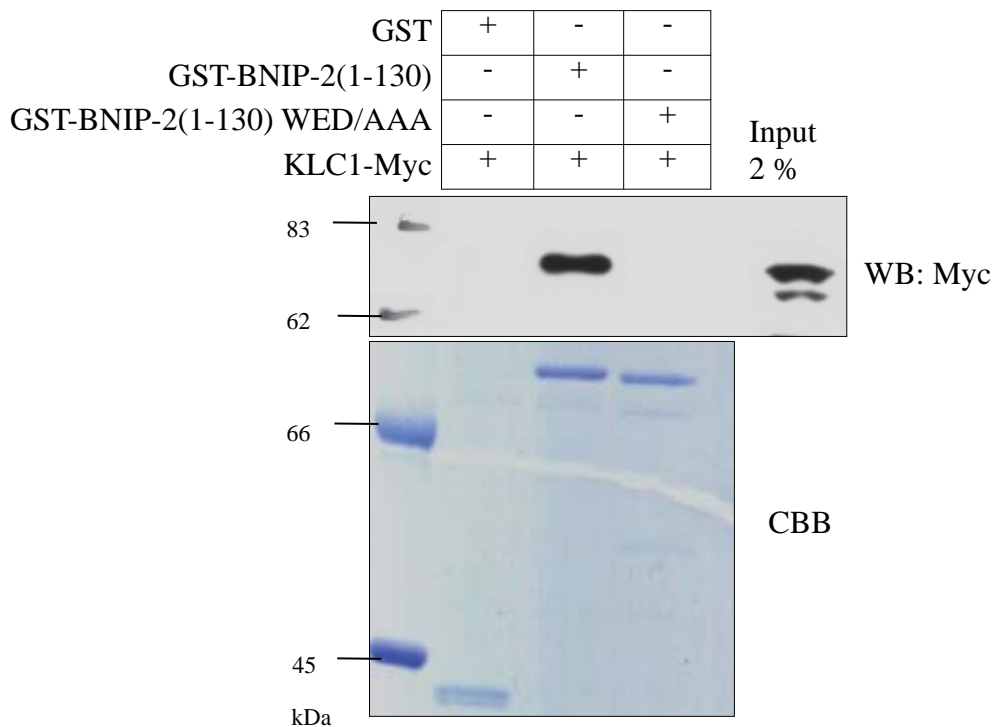


図3 BNIP-2はKLC1と結合する

(A) HEK293T細胞にFlag-BNIP-2、KLC1-Myc発現プラスミドをトランスフェクションした細胞抽出液を抗Flag抗体もしくは抗Myc抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物は抗Myc抗体もしくは抗Flag抗体を用いてウエスタンブロッティングで解析した。矢尻は沈降物中に含まれるKLC1とBNIP-2を示した。

(B) KLC1-Myc発現プラスミドをトランスフェクションしたHEK293T細胞抽出液にGST-BNIP-2(1-130) またはGST-BNIP2(1-130) WED/AAAを加えGST pull down assayを行った。

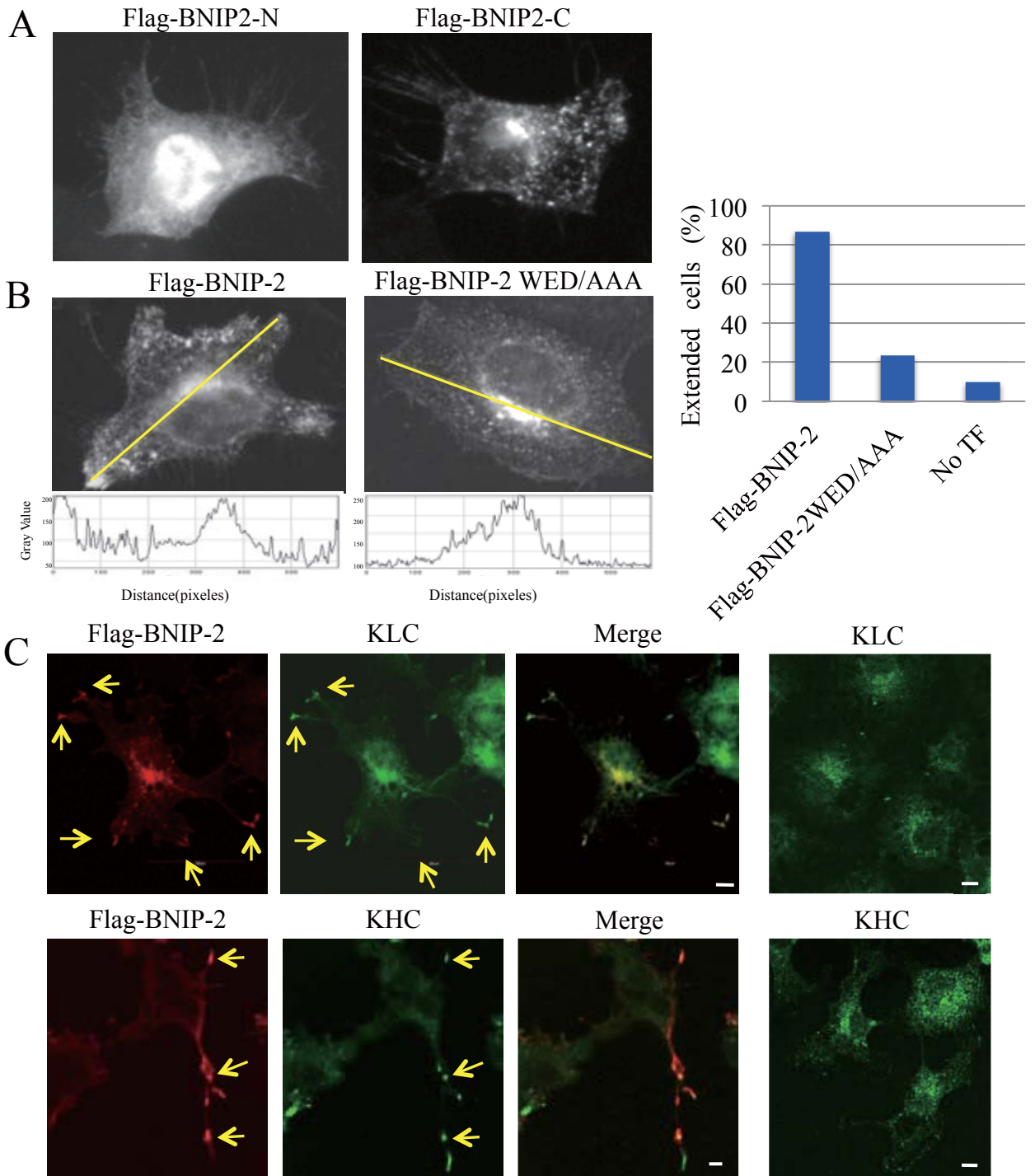


図4 過剰発現したBNIP-2は細胞突起を誘導し、突起の末端にKLC、KHCとともに濃縮される
 (A) HeLa細胞にFlag-BNIP-2-NまたはFlag-BNIP-2-C発現プラスミドをトランスフェクションし、抗Flag抗体で染色した。

(B) HeLa細胞にFlag-BNIP-2またはFlag-BNIP-2 WED/AAA発現プラスミドをトランスフェクションし、抗Flag抗体で染色した。黄色のライン上の蛍光強度をそれぞれの写真の下にグラフ化した(左パネル)。各プラスミドを発現した細胞のうち、突起を持つ細胞(測定方法は材料と方法を参照)の割合を示した(右パネル)。Flag-BNIP-2: 86.7% (mean ratio=6.66±3.25(SD),n=30)、Flag-BNIP-2 WED/AAA: 23.3% (mean ratio=3.26±1.09(SD),n=30)、No-transfection: 10.0% (mean ratio=2.88±0.79(SD),n=30)

(C) 過剰発現したBNIP-2とKLCおよびKHCの局在。COS7細胞にFlag-BNIP-2発現プラスミドをトランスフェクションし、抗Flag抗体(赤)と抗KLC抗体(緑)(上パネル)または抗KHC抗体(緑)(下パネル)で染色した。矢印は共局在している突起の末端を示した。各パネルの右には内在性KLCおよびKHCの染色を示した。Scale bar; 10µm

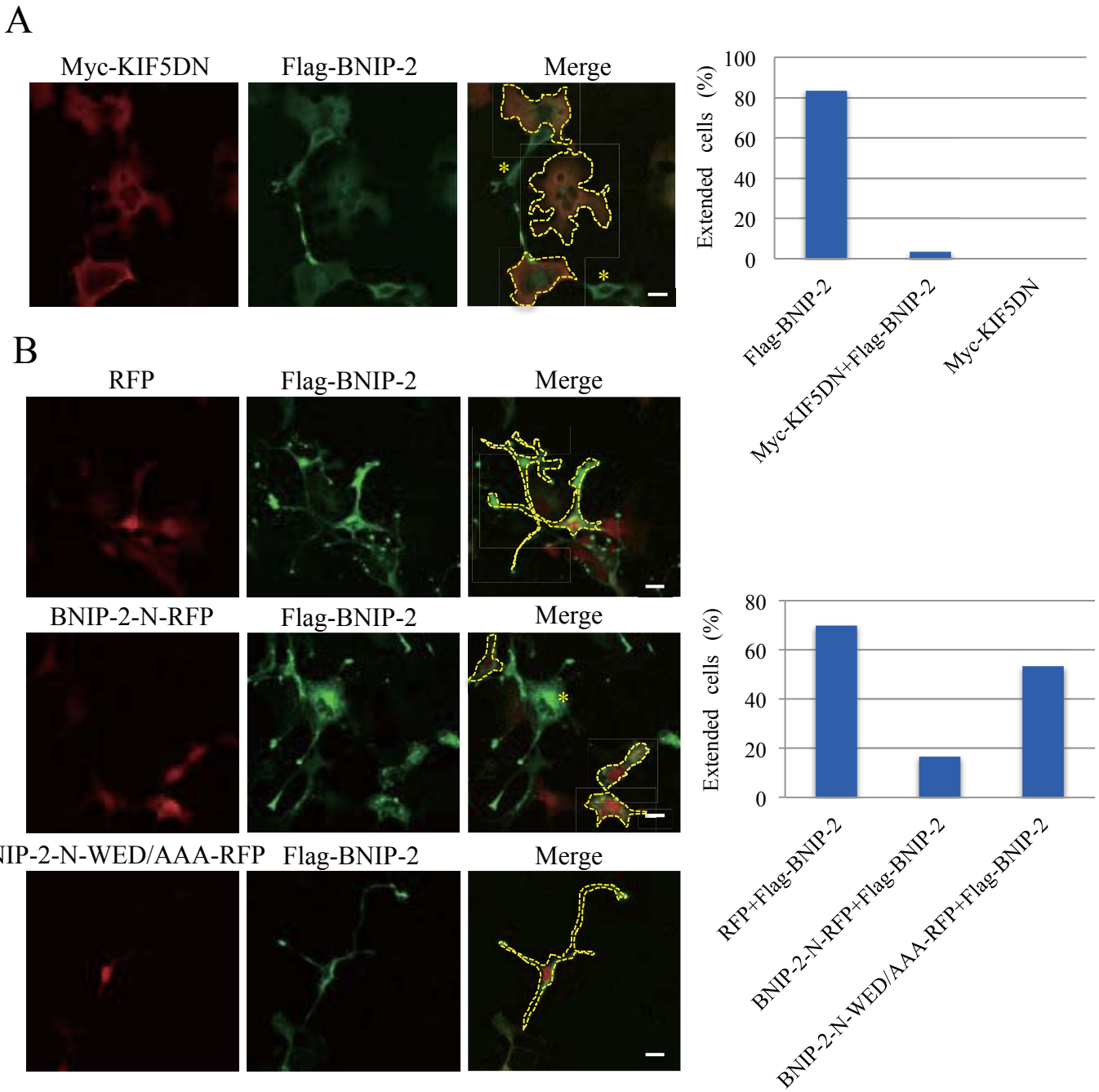


図5 BNIP-2はkinesin-1によって細胞末端に輸送される

(A) COS7細胞にFlag-BNIP-2のみ(左)、KIF5DNとFlag-BNIP-2(中)、KIF5DNのみ(右)を発現させ、細胞の形態変化およびBNIP-2の局在を観察した。Flag-BNIP-2のみを発現する細胞を*で、KIF5DNとFlag-BNIP-2の両方を発現する細胞を点線で囲った。右のグラフは突起を持つ細胞の割合を示した。Flag-BNIP-2: 83.3% (mean ratio=12.7±6.67(SD),n=30)、Myc-KIF5DN+Flag-BNIP-2: 3.3% (mean ratio=3.35±1.44(SD),n=30)、Myc-KIF5DN: 0% (mean ratio=3.30±0.82(SD),n=30)

(B) COS7細胞にRFPとFlag-BNIP-2(上パネル)、BNIP-2N-RFPとFlag-BNIP-2(中パネル)、BNIP-2N-WED/AAA-RFPとFlag-BNIP-2(下パネル)を発現させ、細胞の形態変化およびBNIP-2の局在を観察した。Flag-BNIP-2のみを発現する細胞を*で、両方を発現する細胞を点線で囲った。右のグラフは突起を持つ細胞の割合を示した。RFP+Flag-BNIP-2: 70.0% (mean ratio=11.5±5.68(SD),n=30)、BNIP-2-N-RFP+Flag-BNIP-2: 16.7% (mean ratio=50.6±3.21(SD),n=30)、BNIP-2-N-WED/AAA-RFP+Flag-BNIP-2: 53.3% (mean ratio=9.70±4.78(SD),n=30)、Scale bar; 10μm

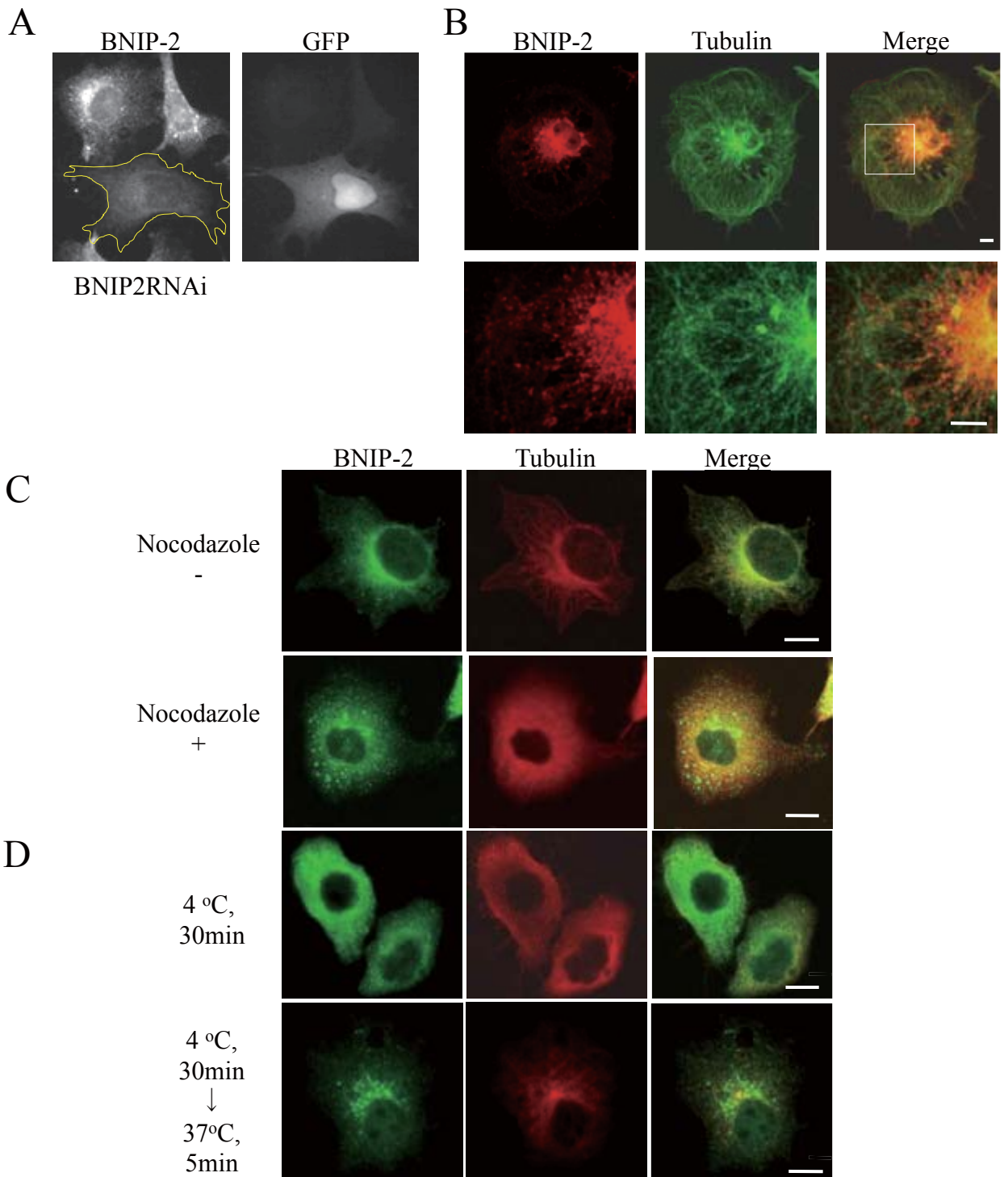


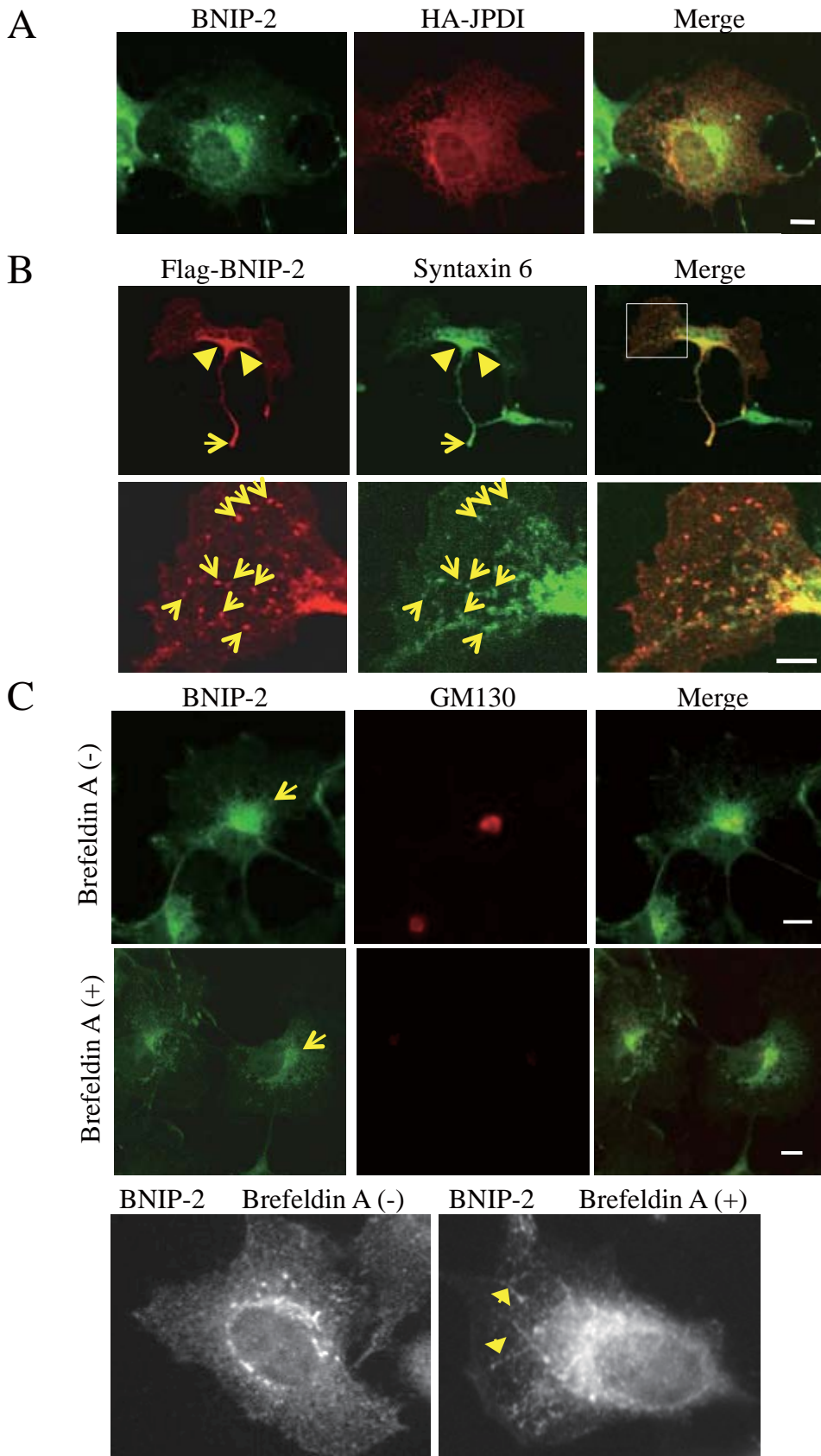
図6 内在性BNIP-2は微小管に沿って分布する

(A) BNIP-2 RNAi発現プラスミドをHeLa細胞にトランスフェクションし、72時間後に細胞を固定し、抗BNIP-2抗体を用いて染色した。黄色で囲んだ細胞はBNIP-2 RNAi発現プラスミドを発現している細胞を示した。

(B) 内在性BNIP-2と微小管の局在。COS7細胞を抗BNIP-2抗体(赤)と抗tubulin抗体(緑)を用いて共染色した。白色で囲んだ部分を拡大した写真を下に示した。Scale bar; 10 μ m

(C) HeLa細胞を抗BNIP-2抗体(緑)と抗tubulin抗体(赤)を用いて共染色した(上パネル)。5 μ Mのノコダゾール存在下で30分培養し、固定後、同様に染色した(下パネル)。

(D) HeLa細胞を氷上に30分間静置し、固定後、(C)と同様に染色した(上パネル)。HeLa細胞を氷上に30分間静置し、再び37 $^{\circ}$ Cで5分間培養後に固定し、(C)と同様に染色した(下パネル)。Scale bar; 10 μ m



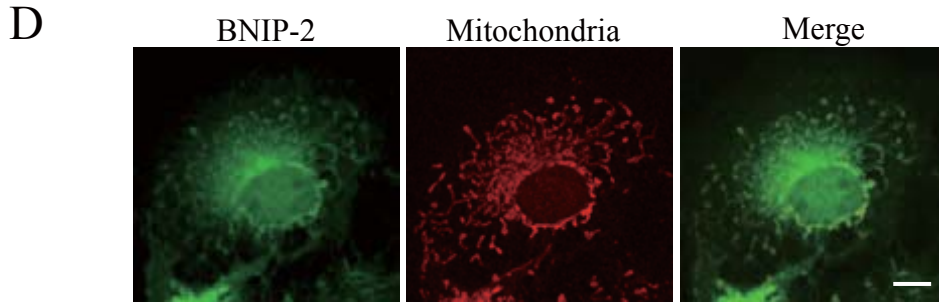


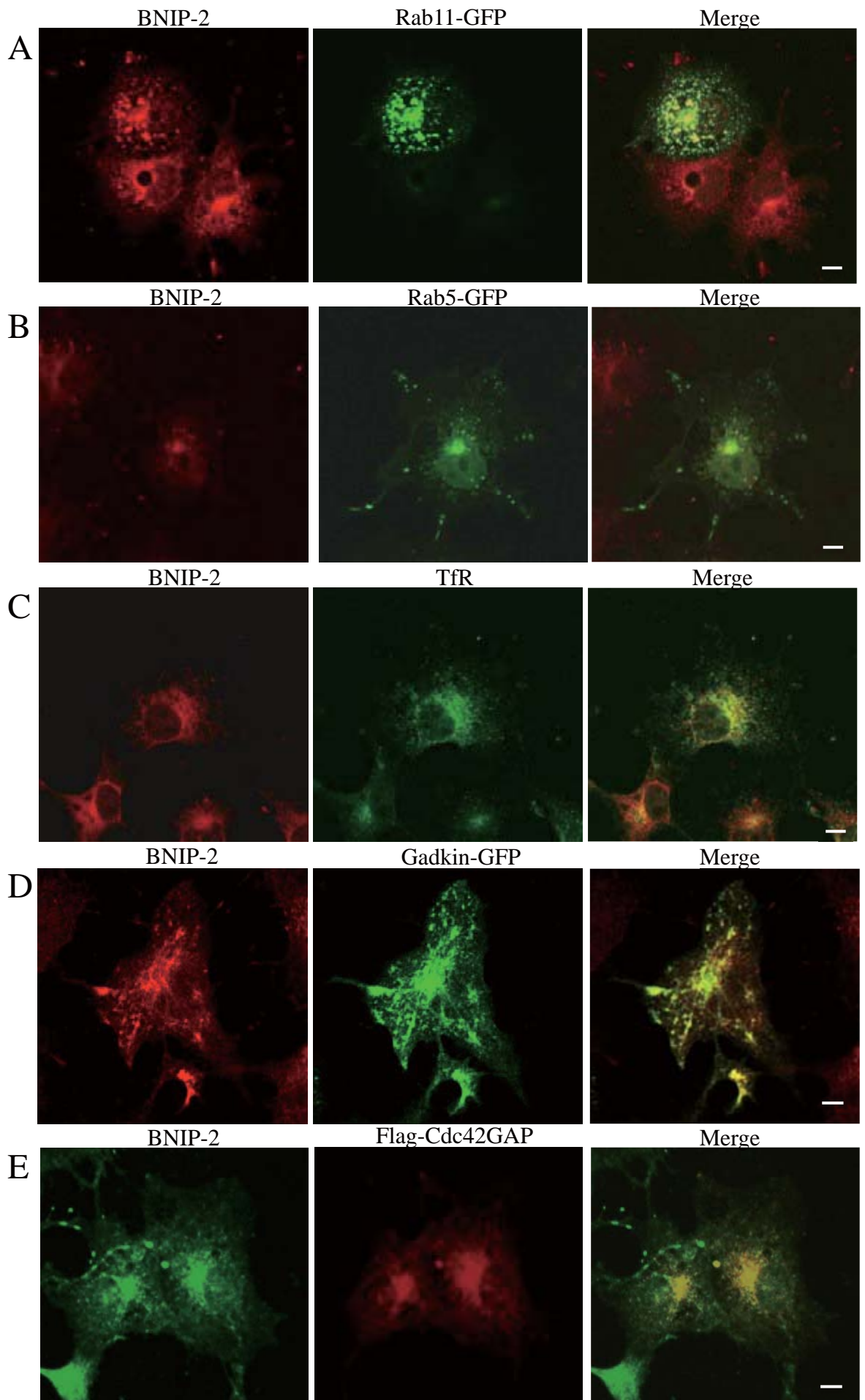
図7 BNIP-2はtrans-Golgi network(TGN)に局在する

(A) COS7細胞にHA-JPDI(ERマーカー)発現プラスミドをトランスフェクションし、固定後、抗BNIP-2抗体(緑)と抗HA抗体(赤)で共染色した。

(B) COS7細胞にFlag-BNIP-2発現プラスミドをトランスフェクションし、固定後、抗syntaxin6抗体(TGNマーカー)(緑)と抗Flag抗体(赤)で共染色した。白色で囲んだ部分を拡大した写真を下に示した。矢印は共局在を示した。

(C) COS7細胞またはHeLa細胞(下パネル)を5 $\mu\text{g/ml}$ のBrefeldinA存在下で30分間培養後、固定した。抗BNIP-2抗体(緑)と抗GM130抗体(赤)(cis-Golgiマーカー)(赤)を用いて共染色した。矢印は核近傍のBNIP-2、矢頭は線状化したBNIP-2を示した。

(D) COS7細胞を抗BNIP-2抗体(緑)とmitotracker(赤)で共染色した。Scale bar; 10 μm



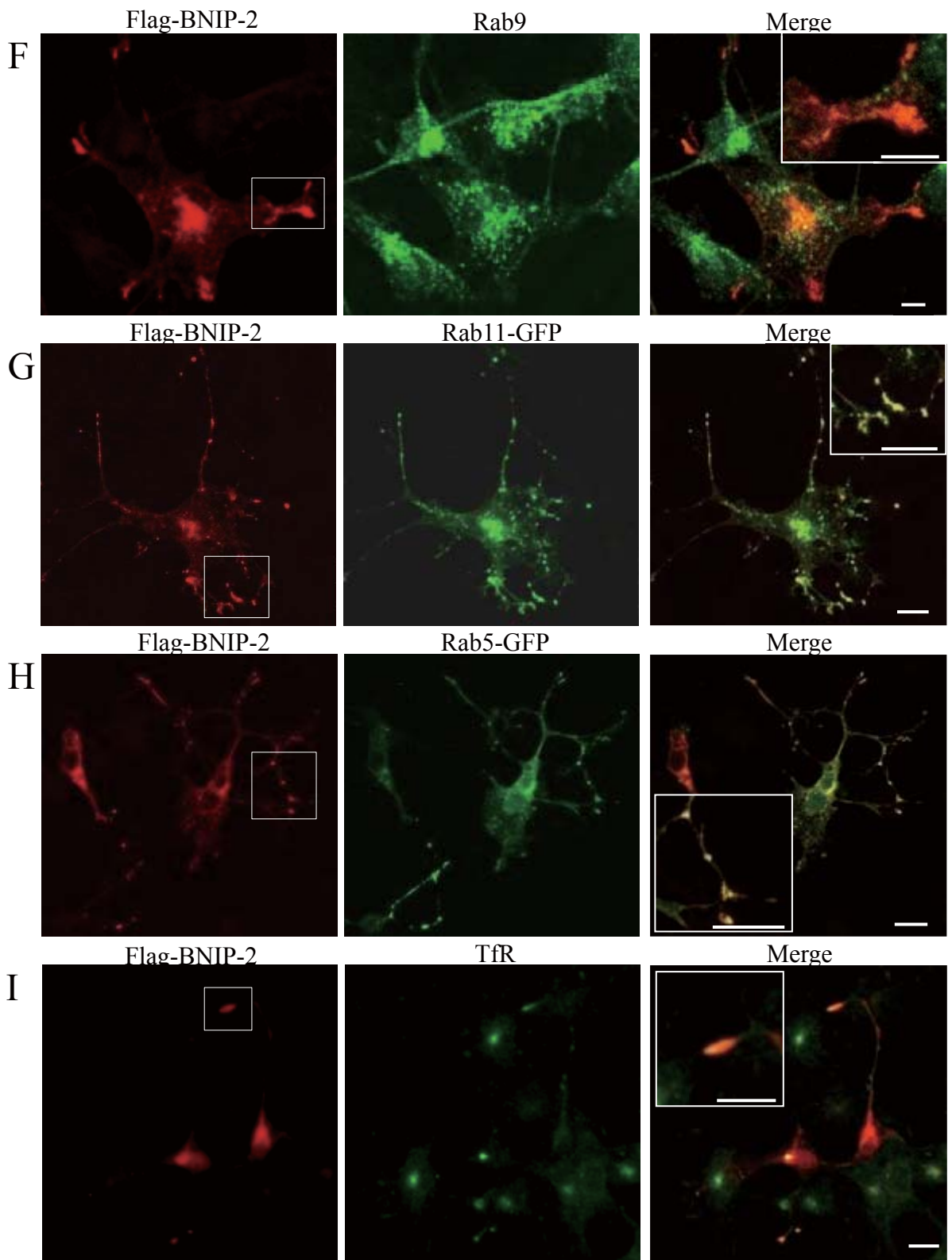
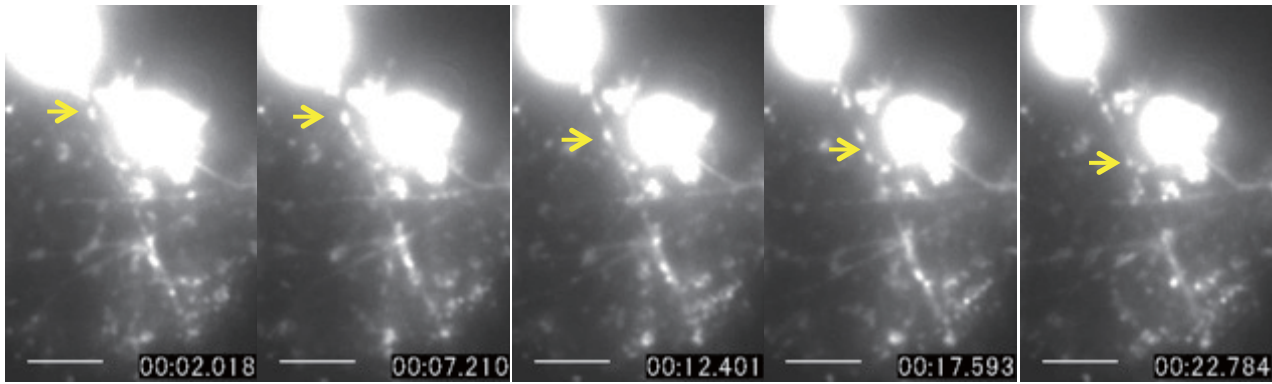


図8 BNIP-2はエンドソームに局在する

(A)(B)(D)(E)はCOS7細胞に各細胞小器官マーカーを過剰発現させ、24時間後に細胞を固定し、抗BNIP-2抗体を用いて、免疫染色を行った。(C)は細胞を固定後、抗BNIP-2抗体と抗TfR抗体を用いて、免疫染色を行った。(G)(H)はCOS7細胞にFlag-BNIP-2と各細胞小器官マーカーを過剰発現させ、24時間後に細胞を固定し、抗Flag抗体を用いて、免疫染色を行った。(F)(I)はCOS7細胞にFlag-BNIP-2を過剰発現させ、24時間後に細胞を固定し、抗Flag抗体と抗Rab9抗体または抗TfR抗体を用いて、免疫染色を行った。左パネルの白線で囲んだ部分を拡大したものをMergeパネルに示した。Scale bar; 10 μ m

(A)(G)Rab11-GFP:リサイクリングエンドソーム、(B)(F)Rab5-GFP:初期エンドソーム、(C)(I)TfR:初期エンドソームとリサイクリングエンドソーム、(D)Gadkin:初期エンドソームとリサイクリングエンドソーム、(E)Cdc42GAP:初期エンドソームとリサイクリングエンドソーム、(F)Rab9:後期エンドソーム

A



B

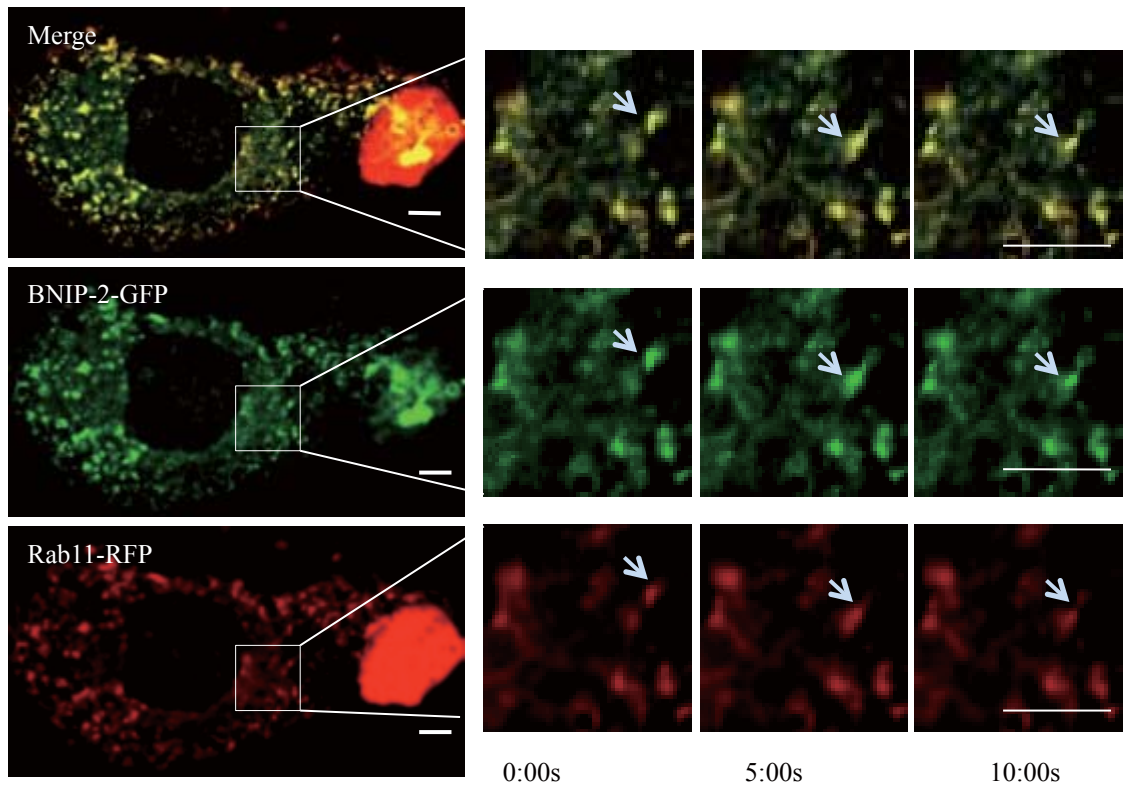


図9 BNIP-2は輸送される

(A) COS7細胞にBNIP-2-GFPを過剰発現し、8時間後にタイムラプス観察した。矢印は移動するBNIP-2の顆粒を示した。Scale bar; 5 μ m

(B) COS7細胞にBNIP-2-GFP(緑)とRab11-RFP(赤)を共発現し、24時間後にタイムラプス観察を行った。Scale bar; 10 μ m

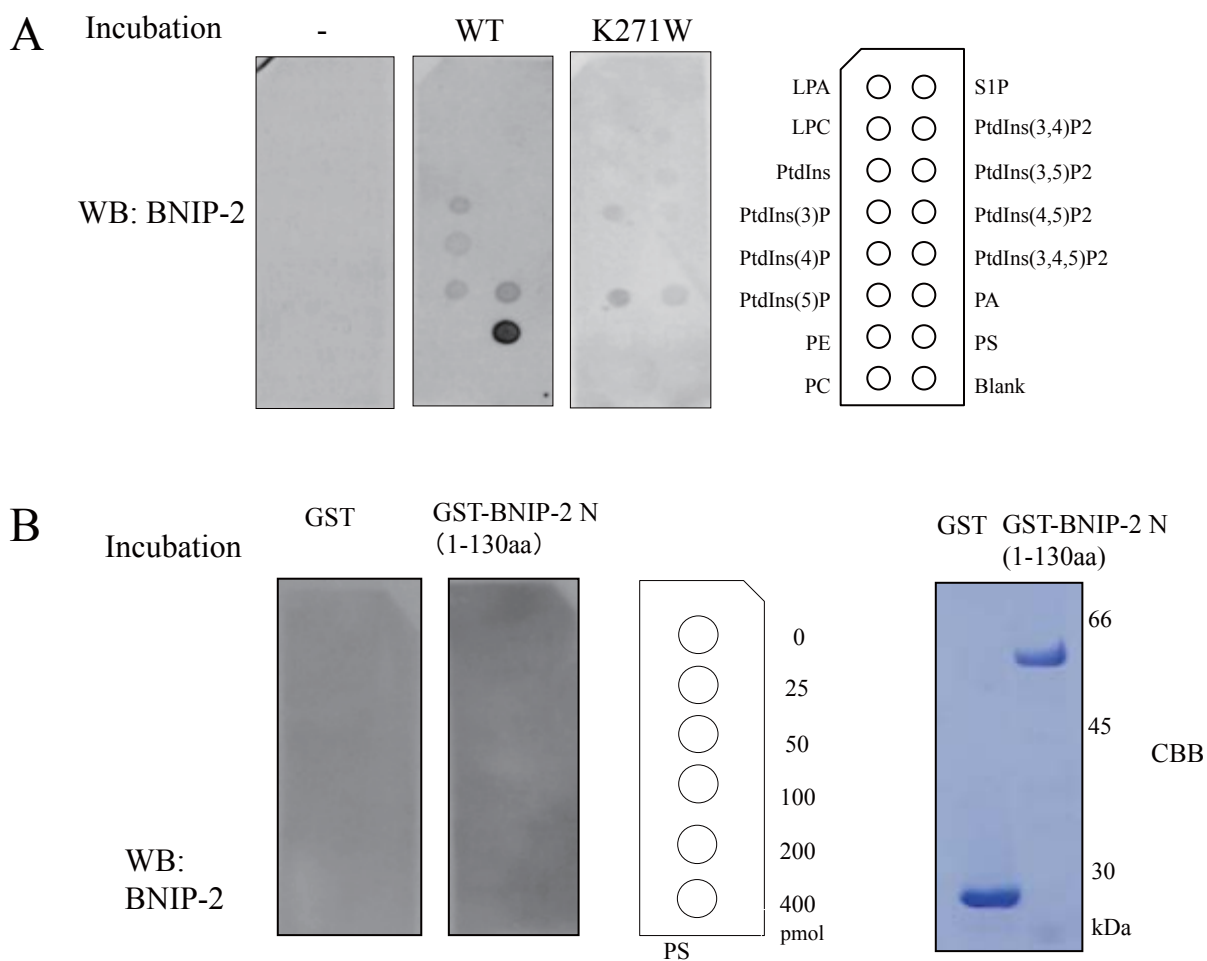


図10 BNIP-2はPhosphatidylserine (PS) に結合する

(A) HEK293T細胞で発現・精製したHis-BNIP-2(2.5 μ g/ml)およびHis-BNIP-2K271W(2.5 μ g/ml)をLipid membraneに加え、インキュベート後、抗BNIP-2抗体で検出した。コントロールはHis-BNIP-2を加えずにインキュベートし、同様に抗BNIP-2抗体を用いて検出した。LPA, Lysophosphatidic Acid; LPC, Lysophosphocholine; PE, Phosphoethanolamine; PC, Phosphatidylcholine; S1P, Sphingosine-1-Phosphate; PA, Phosphatidic Acid

(B) 精製タンパク質であるGSTおよびGST-BNIP-2N(1-130) (2.5 μ g/ml)をPSが0-400pmolの量でスポットされたLipid membraneに加え、インキュベート後、抗BNIP-2抗体で検出した。コントロールはGSTを加えインキュベートし、同様に抗BNIP-2抗体を用いて検出した。右パネルは精製後のGSTおよびGST-BNIP-2 N(1-130) タンパク質を泳動後、CBB染色したものを示した。

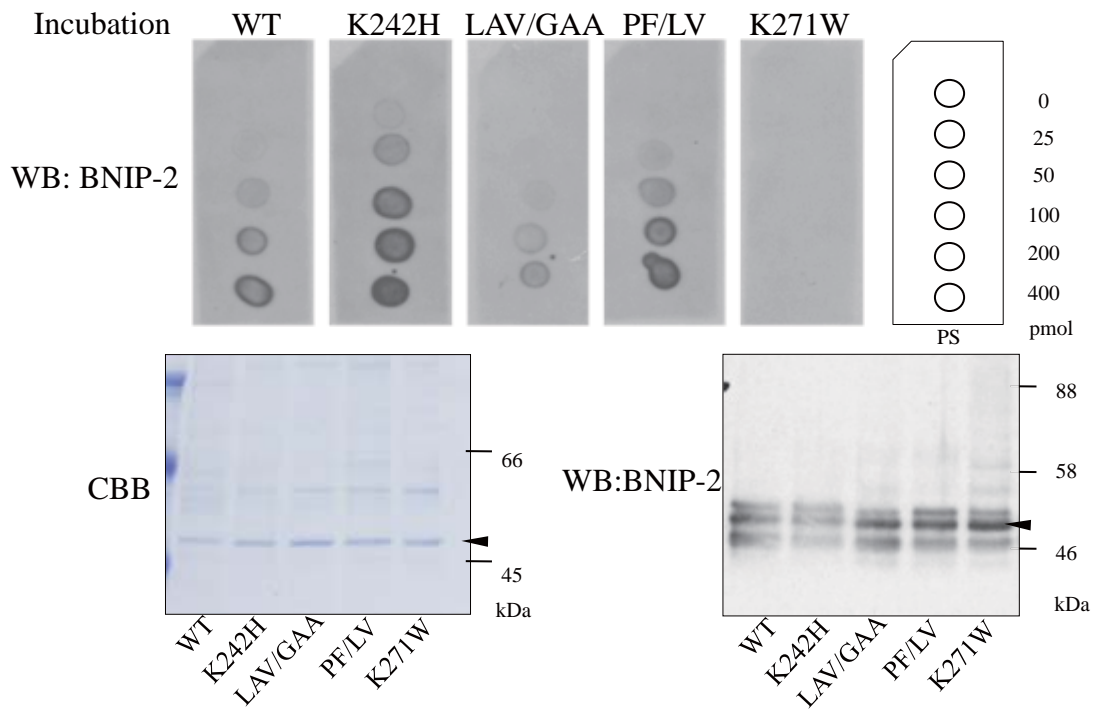
A

Sec14p 208 RMGKFYIINAPFGFSTAFRLFKPFLDPVTVSKIFILGSSY 247
 α-TTP 190 KVRGIHLINEPVIFHAVFSMIKPFLTEKIKERIHMHGNNY 229
 BNIP-2 240 NLKSLIIVHPSWFIRTL¹⁴⁷LAVTRPFISSKFSQKIRYVFN²⁹⁰-- 277
 : : : : : : : : : : : : : : : *



K242H 240 NLHSLIIVHPSWFIRTL¹⁴⁷LAVTRPFISSKFSQKIRYVFN 277
 LAV/GAA 240 NLKSLIIVHPSWFIRTL¹⁴⁷GAA¹⁴⁸TRPFISSKFSQKIRYVFN 277
 PF/LV 240 NLKSLIIVHPSWFIRTL¹⁴⁷LAVTR¹⁴⁸LVISSKFSQKIRYVFN 277
 K271W 240 NLKSLIIVHPSWFIRTL¹⁴⁷LAVTRPFISSKFSQ¹⁴⁸WIRYVFN 277

B



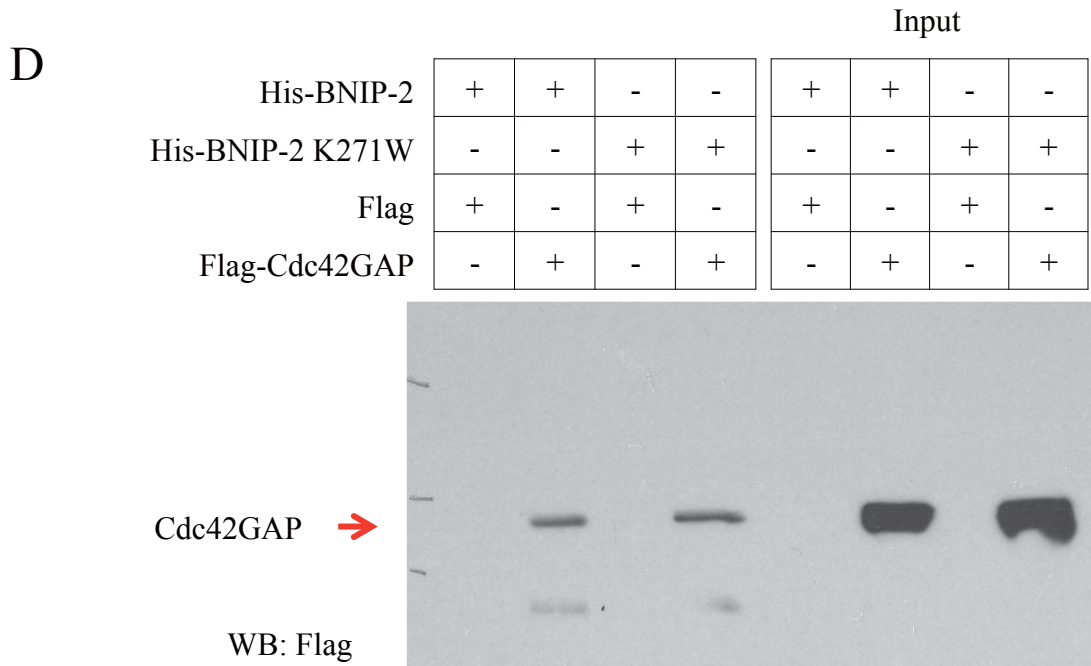
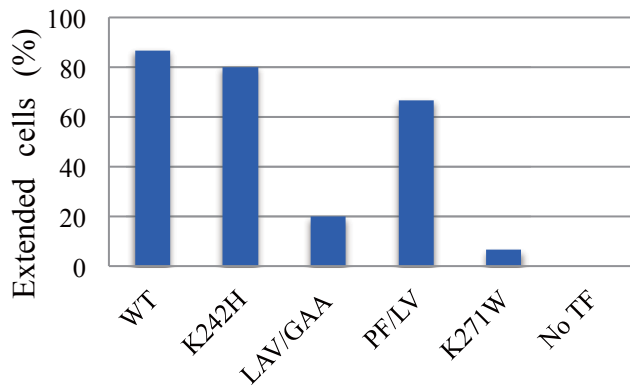
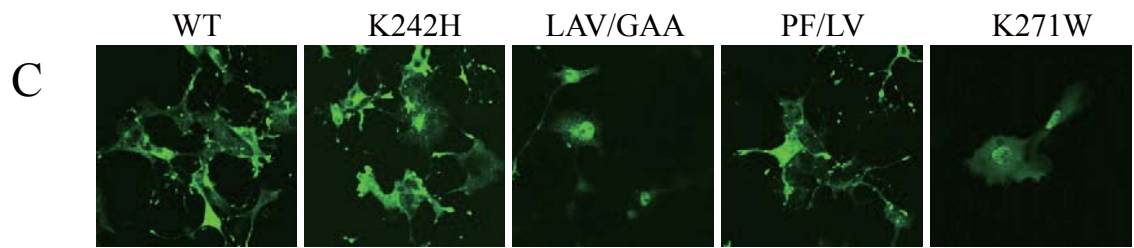


図11 BNIP-2 K271W変異体はPSに結合せず、細胞突起の誘導もみられない

(A) BNIP-2の240-277番目までのアミノ酸配列と、この領域と相同性をもつSec14pと α -TTPのアミノ酸配列を示した(上)。この領域内の赤字で示したBNIP-2の部位をアミノ酸置換した(下)。

(B) His-BNIP-2または各BNIP-2変異体 (2.5 μ g/ml)をPSが0-400pmolの量でスポットされたLipid membraneに加え、インキュベート後、抗BNIP-2抗体で検出した(上パネル)。HEK293T細胞で発現させ、精製した各BNIP-2変異体を泳動後、CBB染色したもの(左下パネル)、抗BNIP-2抗体でウエスタンブロッティングしたもの(右下パネル)を示した。矢尻はBNIP-2タンパク質を示した。

(C) 各BNIP-2変異体をCOS7細胞に過剰発現し、24時間後に固定し、抗Flag抗体で染色した。グラフは各BNIP-2変異体を発現した細胞のうち、細胞突起を持つ細胞の割合を示した。Flag-BNIP-2: 86.7% (mean ratio=12.5 \pm 4.57(SD),n=30)、Flag-BNIP-2K242H: 80.0% (mean ratio=11.5 \pm 4.16(SD),n=30)、Flag-BNIP-2LAV/GAA: 20.0% (mean ratio=7.13 \pm 5.40(SD),n=30)、Flag-BNIP-2PF/LV: 66.7% (mean ratio=11.0 \pm 4.63(SD),n=30)、Flag-BNIP-2K271W: 6.7% (mean ratio=4.71 \pm 2.22(SD),n=30)

(D) HEK293T細胞にHis-BNIP-2またはHis-BNIP-2K271WとFlag-Cdc42GAP発現プラスミドをトランスフェクションし、発現した細胞抽出液をNi-NTA Agaroseを用いて免疫沈降を行った。沈降物は抗Flag抗体を用いてウエスタンブロッティングで解析した。矢尻は沈降物中に含まれるCdc42GAPを示した。

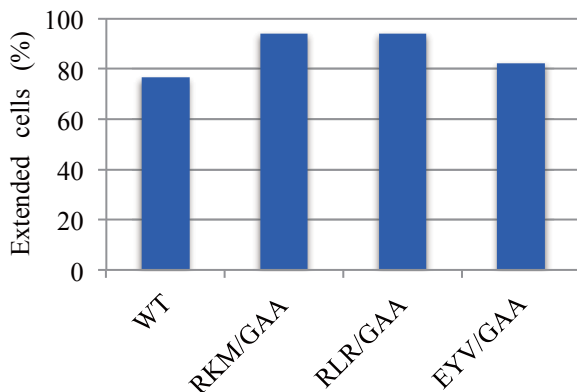
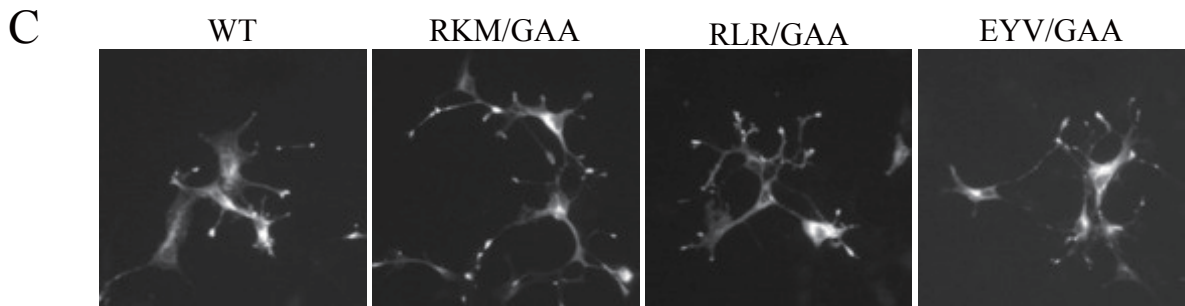
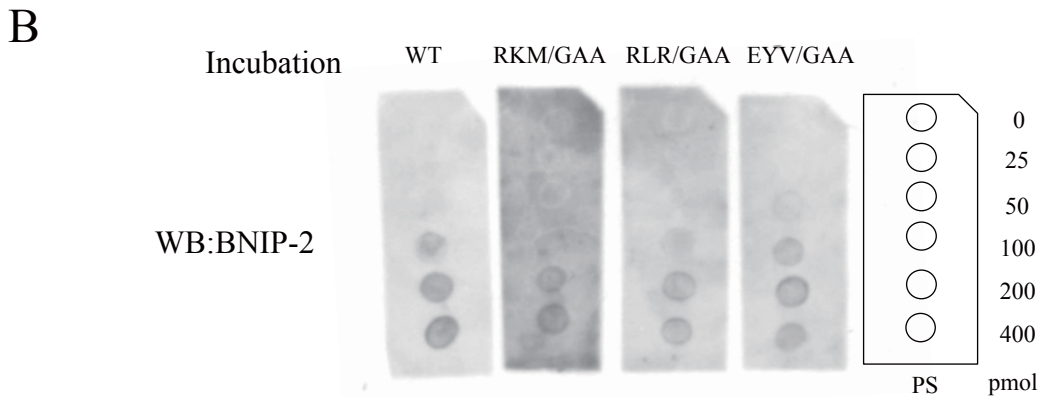
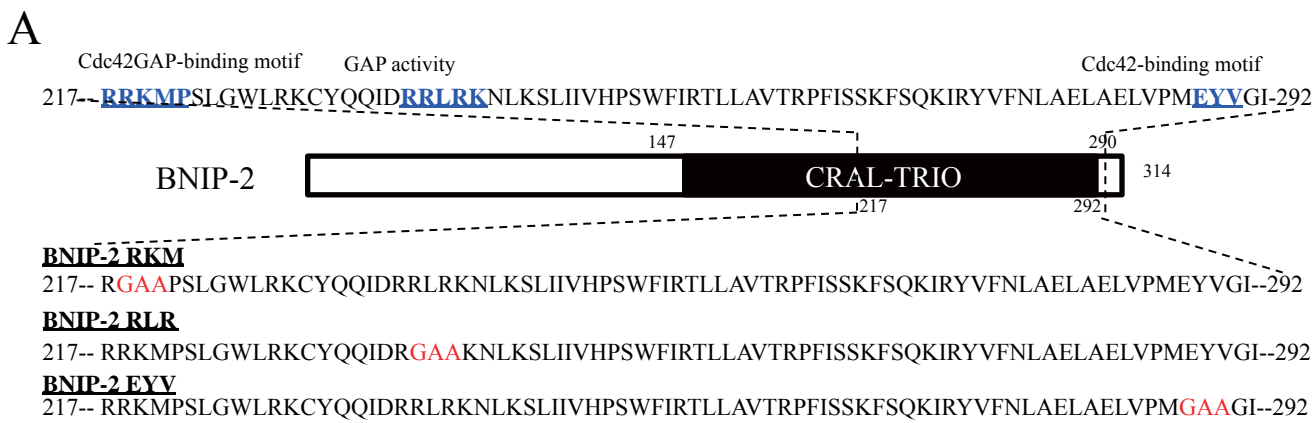


図12 BNIP-2のCdc42やCdc42GAP結合部位の変異はPSの結合および細胞形態に影響しない

(A) BNIP-2のCRAL-TRIOドメイン内のCdc42とCdc42GAP結合部位、GAP活性部位(青字)をそれぞれアミノ酸置換し(赤字)、変異体を作成した。

(B) (A)の変異体(2.5 μ g/ml)をPSが0-400pmolの量でスポットされたLipid membraneに加え、インキュベート後、抗BNIP-2抗体で検出した。

(C) (A)の変異体をCOS7細胞に過剰発現させ、24時間後に固定し、抗Flag抗体で染色した。グラフは各BNIP-2変異体を発現した細胞のうち、細胞突起を持つ細胞の割合を示した。Flag-BNIP-2: 76.5% (mean ratio=15.9 \pm 11.8(SD),n=17)、Flag-BNIP-2RKM/GAA: 94.1% (mean ratio=16.1 \pm 6.42(SD),n=17)、Flag-BNIP-2RLR/GAA: 94.1% (mean ratio=15.2 \pm 6.73(SD),n=17)、Flag-BNIP-2EYV/GAA: 82.4% (mean ratio=14.4 \pm 5.34(SD),n=17)

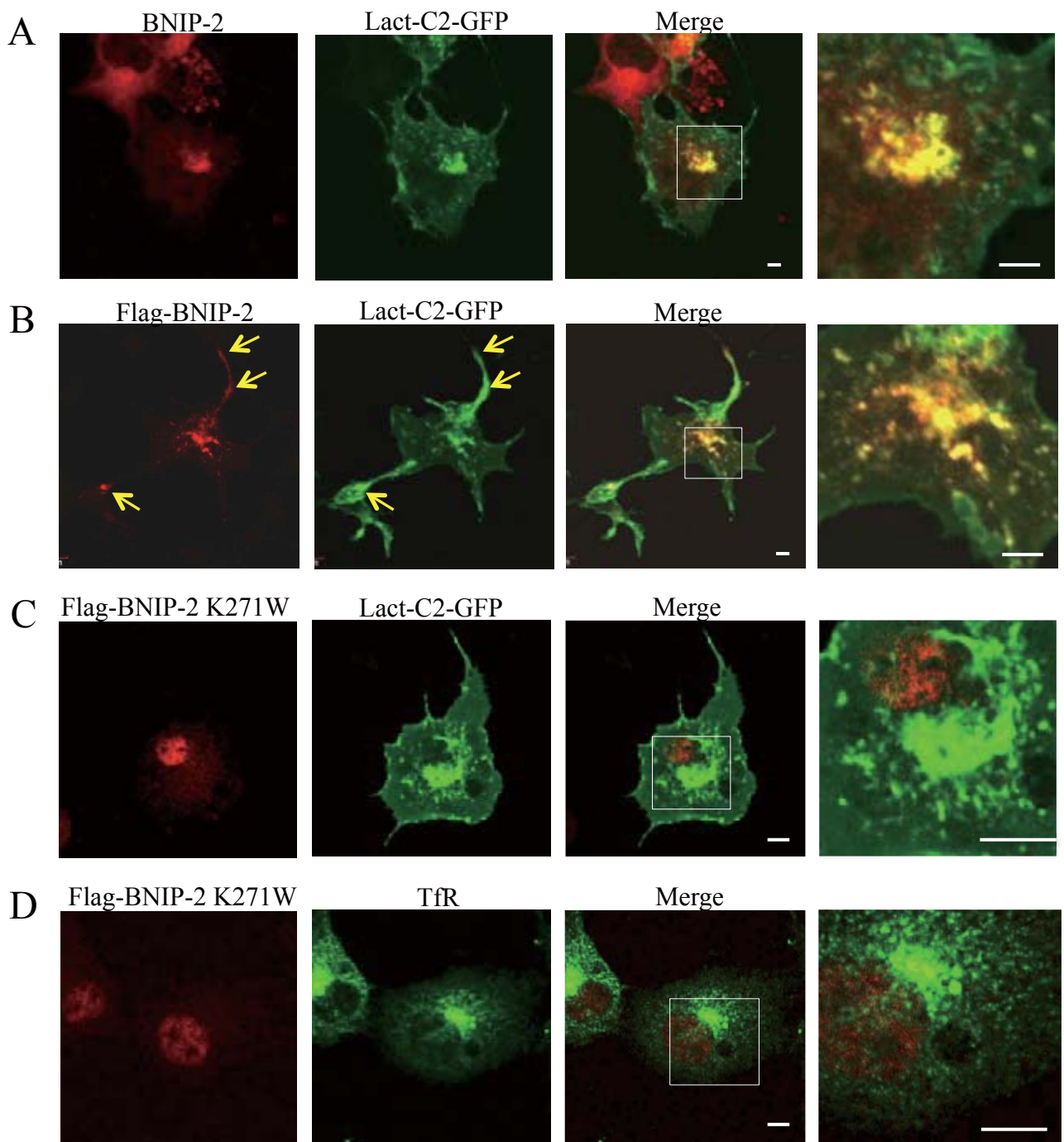


図13 BNIP-2およびBNIP-2 K271WとPSの細胞

(A) COS7細胞にLact-C2-GFP発現プラスミドをトランスフェクションし、抗BNIP-2抗体で染色した。白色で囲んだ部分を拡大した写真を右に示した。

(B) COS7細胞にLact-C2-GFPとFlag-BNIP-2発現プラスミドをトランスフェクションし、抗Flag抗体で染色した。白色で囲んだ部分を拡大した写真を右に示した。矢印は共局在を示す。

(C) COS7細胞にLact-C2-GFPとFlag-BNIP-2 K271W発現プラスミドをトランスフェクションし、抗Flag抗体で染色した。白色で囲んだ部分を拡大した写真を右に示した。

(D) COS7細胞にFlag-BNIP-2 K271W発現プラスミドをトランスフェクションし、抗Flag抗体と抗TfR抗体で共染色した。白色で囲んだ部分を拡大した写真を右に示した。

Scale bar; 10 μ m

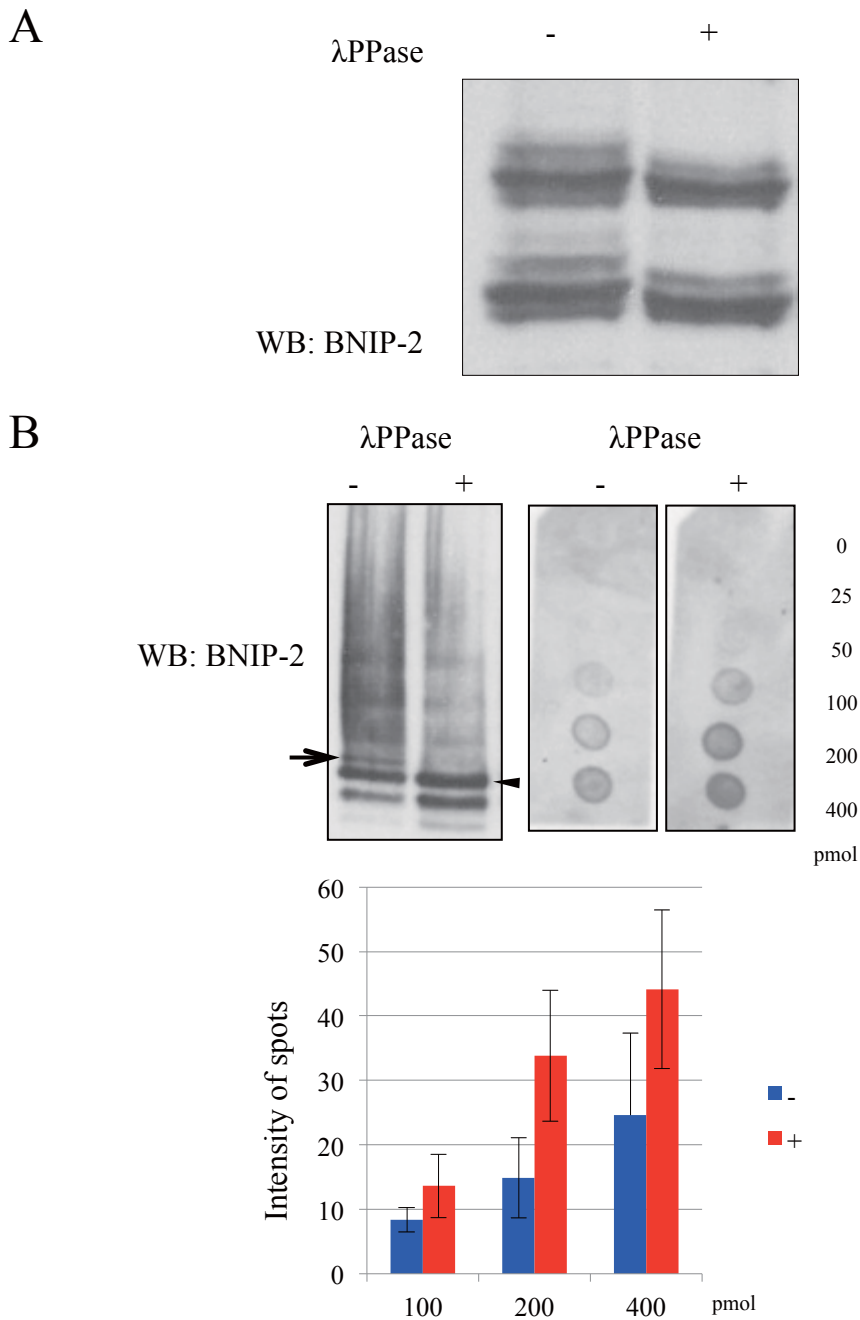
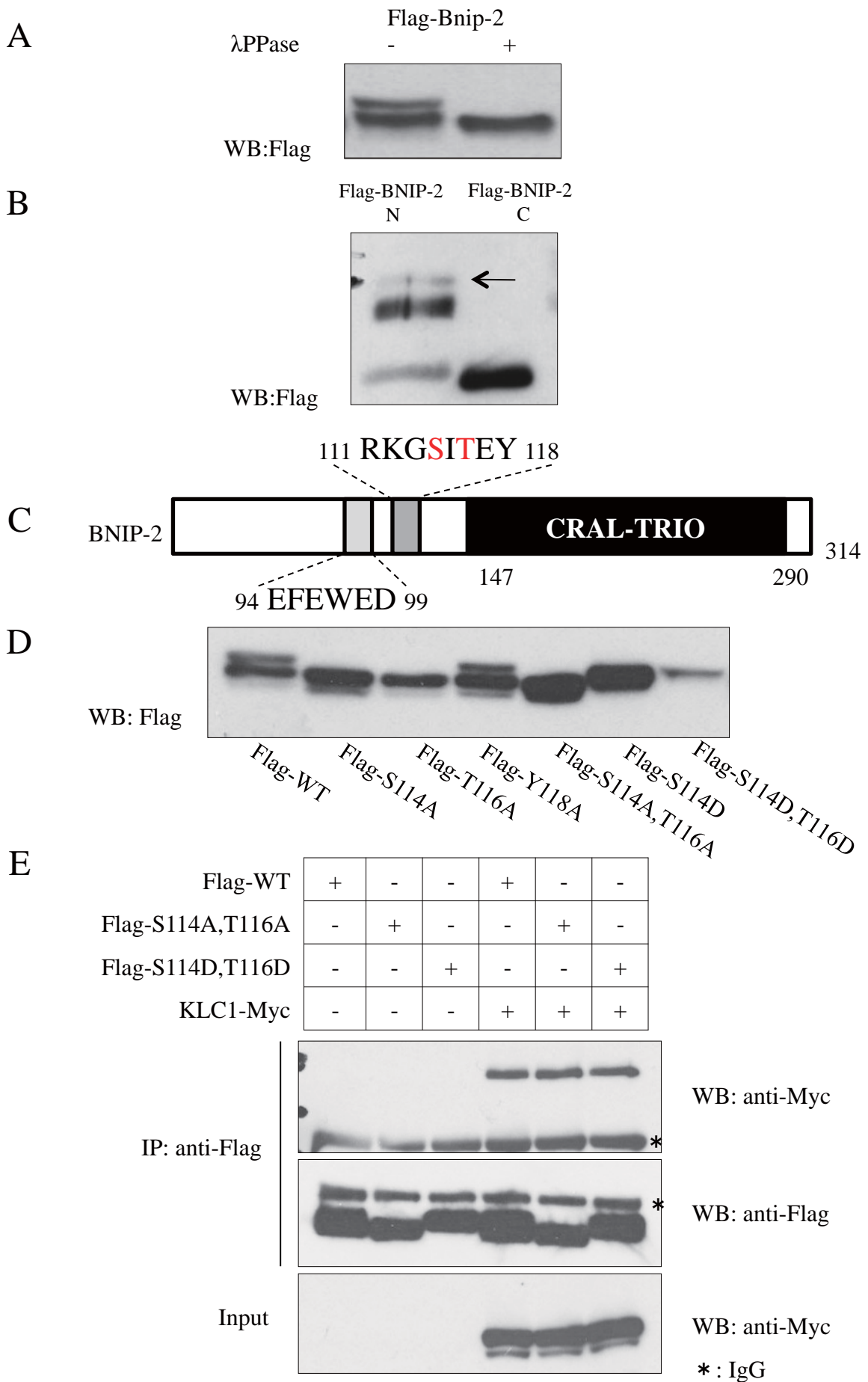


図14 BNIP-2を脱リン酸化するとPSへの結合性が上昇する

(A) HEK293T細胞抽出液にλPPaseを加え30°Cで30分間インキュベートしたサンプルとλPPase(-)で同様にインキュベートしたサンプルを抗BNIP-2抗体でウエスタンブロット解析した。

(B) His-BNIP-2またはλPPaseで脱リン酸化したHis-BNIP-2(2.5μg/ml)を抗BNIP-2抗体でウエスタンブロット解析した(左パネル)。これをPSがスポットされたLipid membraneに加え、インキュベート後、抗BNIP-2抗体で検出した(右パネル)。矢印はリン酸化されたBNIP-2を、矢尻は脱リン酸化されたBNIP-2を示した。Lipid membrane assayの結果得られたスポットのシグナルを定量化しグラフ化した(下パネル)。グラフは独立した3回の実験の平均と標準偏差を表した。



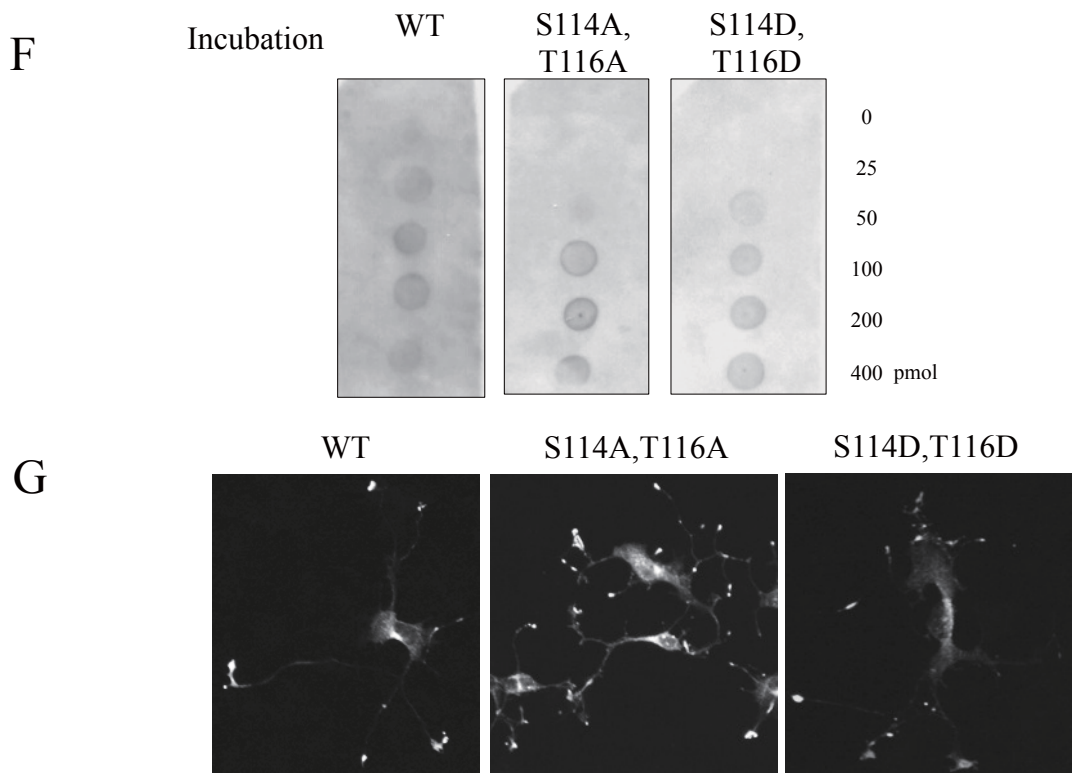


図15 BNIP-2のS114とT116のリン酸化はKLC1やPSとの結合や細胞形態変化に影響しない

(A) Flag-BNIP-2を発現させたHEK293T細胞抽出液にλPPaseを加え30分間インキュベートしたサンプルとλPPase(-)で同様にインキュベートしたサンプルを用いて、抗Flag抗体でウエスタンブロットリング解析した。

(B) Flag-BNIP-2 N末断片またはFlag-BNIP-2C末断片を過剰発現させたHEK293T細胞抽出液を用いて抗Flag抗体でウエスタンブロットリング解析した。矢印はリン酸化されたBNIP-2N末断片を示した。

(C) S114,T116はWEDモチーフとCRAL-TRIOドメインの間に位置する。

(D) 様々な変異体を作成し、これらを過剰発現させたHEK293T細胞抽出液を抗Flag抗体でウエスタンブロットリング解析した。

(E) HEK293T細胞にBNIP-2リン酸化部位変異体とKLC1-Myc発現プラスミドをトランスフェクションした細胞抽出液を抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物は抗Myc抗体もしくは抗Flag抗体を用いてウエスタンブロットリングで解析した。

(F) BNIP-2リン酸化部位変異体 (2.5μg/ml)をPSがスポットされたLipid membraneに加え、インキュベート後、抗BNIP-2抗体で検出した。

(G) BNIP-2リン酸化部位変異体をCOS7細胞に過剰発現させ、24時間後に固定し、抗Flag抗体で染色した。

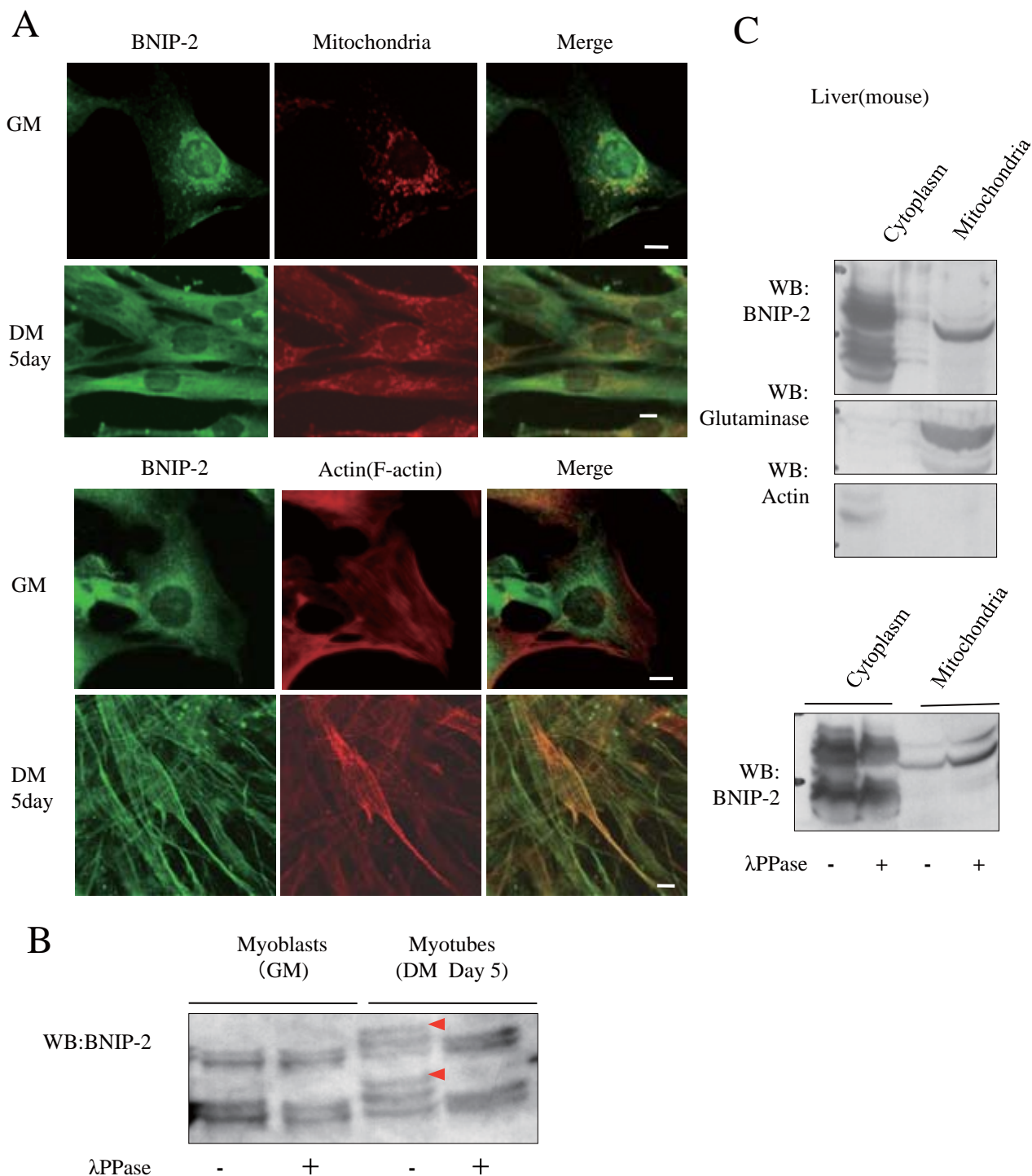


図16 C2C12細胞におけるBNIP-2の局在

(A) 分化誘導前(GM)と分化誘導後5日目(DM5day)のマウスC2C12筋芽細胞を抗BNIP-2抗体(緑)とmitotracker(赤)(上パネル)またはRhodamine標識ファロイジン抗体(赤)(下パネル)で染色した。

(B) 分化誘導前(GM)と分化誘導後5日目(DM5day)のC2C12細胞抽出液を抗BNIP-2抗体を用いてウエスタンブロッティング解析した。2、4レーンは脱リン酸化したサンプルを、1、3レーンは未処理のサンプルを示した。矢尻はリン酸化されたBNIP-2を示す。

(C) マウスの肝臓を細胞分画法で細胞質画分とミトコンドリア画分に分けた後、抗BNIP-2抗体、ミトコンドリア画分マーカーとして抗Glutaminase抗体、細胞質画分マーカーとして抗actin抗体を用いてウエスタンブロッティング解析した(上パネル)。細胞質画分とミトコンドリア画分を脱リン酸化したサンプルと未処理のサンプルを用いて抗BNIP-2抗体でウエスタンブロッティング解析した(下パネル)。

A

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Human BNIP2 | 88--PSENSNEFEWEDDLPKPK--105 |
| Mouse BNIP2 | 88--PSENSDEFEWEDDLPKPK--105 |
| Zebrafish BNIP2 | 205--PSDNSNEFEWEDDLPKPK--222 |
| Frog BNIP2 | 198--ASENSNEFEWEDDLPKPK--215 |
| Human Caytaxin | 109--FLGNGNELEWEDDTPVAT--126 |
| Mouse Caytaxin | 109--FLGNGNELEWEDDTPVAT--126 |
| Rat Caytaxin | 109--FLGNGNELEWEDDTPVAT--126 |
| Dog Caytaxin | 109--FLGNGNELEWEDDTPVAA--126 |
| Chicken Caytaxin | 111--FLGNGNELEWEDDTPVAT--128 |
| Zebrafish Caytaxin | 81--FITNGNDLEWEDDTPVAS--98 |
| Frog Caytaxin | 113--FVGNGNELEWEDDTPVAC--130 |
| Human BNIP-S α (BNIPL) | 51--QLDSGHEFEWEDELPRAE--68 |
| Mouse BNIP-S α (BNIPL) | 105--QLDSGHEFEWEDDLPRAE--122 |
| Zebrafish BNIP-S α (BNIPL) | 139--FPESMHDLEWEDDLPRMG--156 |

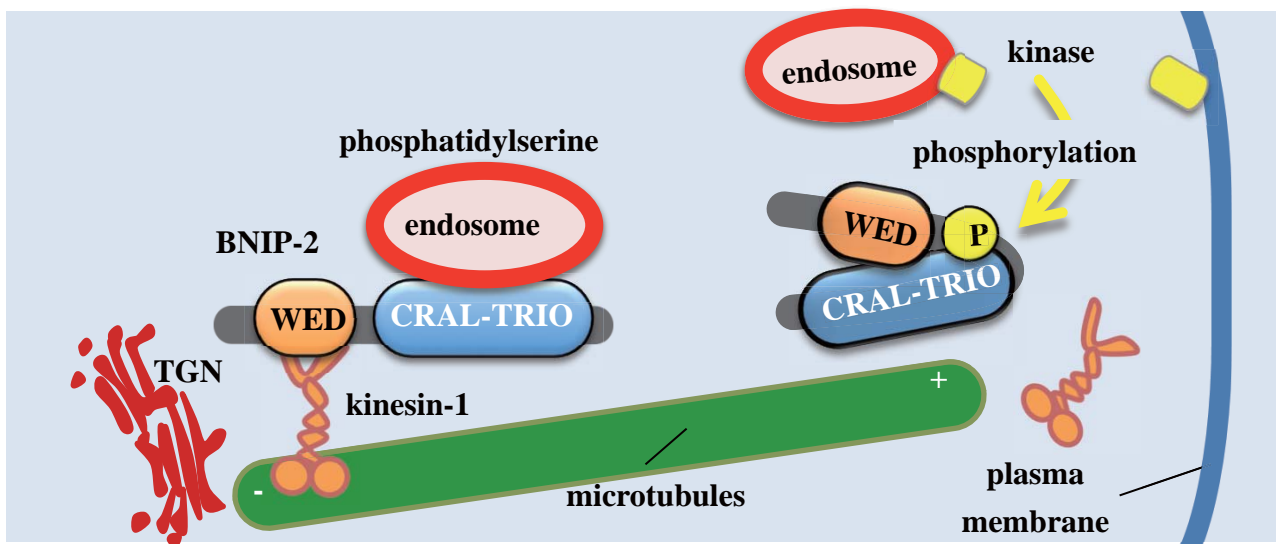
B

| | | |
|---------------------|------------------|------------------|
| Human BNIP2 | 7--KEEWQD--12 | 94--EFEWED--99 |
| Human caytaxin | 16--KEEWQD--21 | 115--ELEWED--120 |
| Human calsyntenin 1 | 890--EDDWDD--895 | 961--QLEWDD--966 |
| Human Gadkin | 207--DLEWED--212 | 257--GLEWEN--262 |
| Human SKIP | 210--NLEWDD--215 | 239--STDWED--244 |
| Vaccinia virus A36R | 61--ESDWED--66 | 94--SLIWDN--99 |

図17 BNIP-2モチーフはKLCに結合する配列として保存されている

- (A) BNIP-2と他のBNIP-2ファミリーのアライメント。KLCが結合する配列を黄色で示した。
 (B) BNIP-2、calsyntenin、Gadkin、SKIP、vaccinia virus A36Rで保存されているWEDモチーフ。

A



B

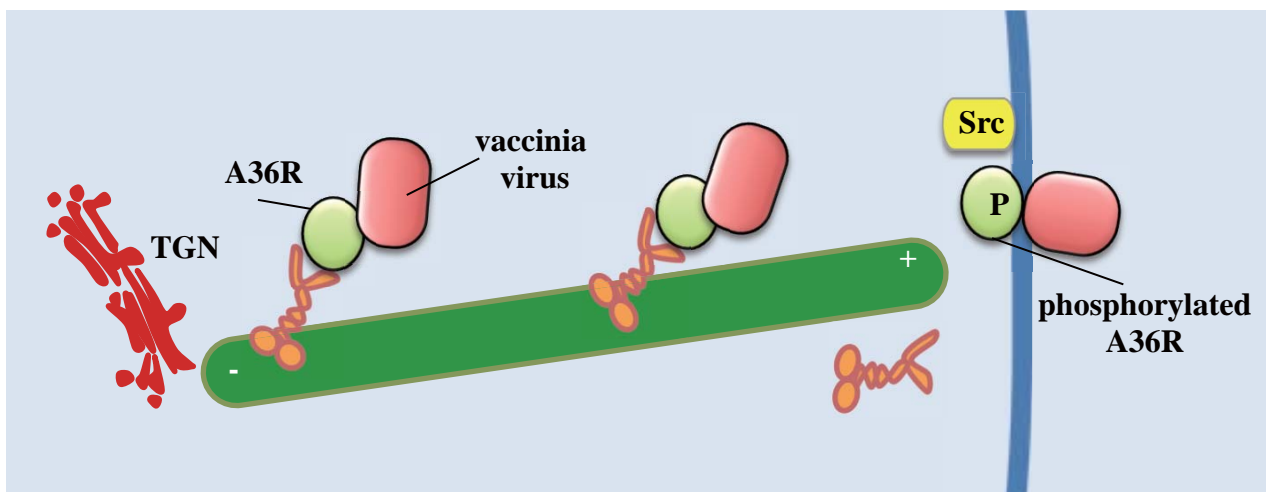


図18 BNIP-2と vaccinia virusの細胞内輸送のモデル図

(A) kinesin-1のアダプタータンパク質としてのBNIP-2のモデル図。BNIP-2はゴルジ体付近でKLCとPSに結合し、細胞膜方向に輸送され、細胞突起を誘導する。

(B) vaccinia virusの細胞輸送のモデル図。vaccinia virus A36R proteinを介してKLCに結合し、細胞膜方向に輸送され、リン酸化によってA36Rタンパク質はKLCから離れvaccinia virusは細胞外に放出される。

6. 謝辞

本研究は奈良先端大学科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物遺伝子機能研究室において川市正史教授のご指導の下、行った研究成果をまとめたものである。

研究を行うにあたり、すばらしい環境と絶えず適切なお指導、ご鞭撻を賜りました川市正史教授に心より御礼申し上げます。実験のお指導、ご助言を頂きました岡千緒助教授、青山貴音先輩に深く感謝申し上げます。セミナーなどを通じ、有益なお助言を頂きました石田靖雅准教授、並びに松田永照助教授には大変感謝しております。北川(石田) 教弘助教授には実験の一部を手伝って頂き、感謝しております。また、研究室のメンバーにも大変お世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

7 . 参考文献

- Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Ali, M.Y., Krementsova, E.B., Kennedy, G.G., Mahaffy, R., Pollard, T.D., Trybus, K.M., and Warshaw, D.M. (2007). Myosin Va maneuvers through actin intersections and diffuses along microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4332-4336.
- Aoyama, T., Hata, S., Nakao, T., Tanigawa, Y., Oka, C., and Kawaichi, M. (2009). Cayman ataxia protein caytaxin is transported by kinesin along neurites through binding to kinesin light chains. *J. Cell. Sci.* 122, 4177-4185.
- Aravind, L., Neuwald, A.F., and Ponting, C.P. (1999). Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr. Biol.* 9, R195-7.
- Arimoto, M., Koushika, S.P., Choudhary, B.C., Li, C., Matsumoto, K., and Hisamoto, N. (2011). The *Caenorhabditis elegans* JIP3 protein UNC-16 functions as an adaptor to link kinesin-1 with cytoplasmic dynein. *J. Neurosci.* 31, 2216-2224.
- Boldogh, I. R. and Pon, L. A. (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol.* 17, 502-510.
- Bomar, J.M., Benke, P.J., Slattery, E.L., Puttagunta, R., Taylor, L.P., Seong, E., Nystuen, A., Chen, W., Albin, R.L., Patel, P.D., *et al.* (2003). Mutations in a novel gene encoding a CRAL-TRIO domain cause human Cayman ataxia and ataxia/dystonia in the jittery mouse. *Nat. Genet.* 35, 264-269.
- Boyd, J.M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L.K., Schaeper, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C., and Chinnadurai, G. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 79, 341-351.
- Buschdorf, J.P., Chew, L.L., Soh, U.J., Liou, Y.C., and Low, B.C. (2008). Nerve growth factor stimulates interaction of Cayman ataxia protein BNIP-H/Caytaxin with peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in differentiating neurons. *PLoS One* 3, e2686.

Buschdorf, J.P., Li Chew, L., Zhang, B., Cao, Q., Liang, F.Y., Liou, Y.C., Zhou, Y.T., and Low, B.C. (2006). Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocates glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *J. Cell. Sci.* *119*, 3337-3350.

Curwin, A.J., Fairn, G.D., and McMaster, C.R. (2009). Phospholipid transfer protein Sec14 is required for trafficking from endosomes and regulates distinct trans-Golgi export pathways. *J. Biol. Chem.* *284*, 7364-7375.

Dodding, M.P., Mitter, R., Humphries, A.C., and Way, M. (2011). A kinesin-1 binding motif in vaccinia virus that is widespread throughout the human genome. *EMBO J.* *30*, 4523-4538.

Fairn, G.D., Hermansson, M., Somerharju, P., and Grinstein, S. (2011). Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1424-1430.

Fairn, G.D., Schieber, N.L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R.I., Grinstein, S., and Parton, R.G. (2011). High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J. Cell Biol.* *194*, 257-275.

Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* *2*, 287-295.

Guillaud, L., Wong, R., and Hirokawa, N. (2008). Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat. Cell Biol.* *10*, 19-29.

Gyoeva, F.K., Bybikova, E.M., and Minin, A.A. (2000). An isoform of kinesin light chain specific for the Golgi complex. *J. Cell. Sci.* *113 (Pt 11)*, 2047-2054.

Hall, A. (2004). Virology. Src launches vaccinia. *Science* *306*, 65-67.

Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* *68*, 610-638.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 682-696.

Kimura, T., Watanabe, H., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J. Neurochem.* *93*, 1371-1382.

Konecna, A., Frischknecht, R., Kinter, J., Ludwig, A., Steuble, M., Meskenaite, V., Indermuhle, M., Engel, M., Cen, C., Mateos, J.M., Streit, P., and Sonderegger, P. (2006). Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3651-3663.

Leventis, P.A., and Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* *39*, 407-427.

Lin, S.X., Gundersen, G.G., and Maxfield, F.R. (2002). Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin. *Mol. Biol. Cell* *13*, 96-109.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* *56*, 801-813.

Low, B.C., Lim, Y.P., Lim, J., Wong, E.S., and Guy, G.R. (1999). Tyrosine phosphorylation of the Bcl-2-associated protein BNIP-2 by fibroblast growth factor receptor-1 prevents its binding to Cdc42GAP and Cdc42. *J. Biol. Chem.* *274*, 33123-33130.

Low, B.C., Seow, K.T., and Guy, G.R. (2000). The BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain of BNIP-2 mediates its homophilic association and heterophilic interaction with Cdc42GAP. *J. Biol. Chem.* *275*, 37742-37751.

Low, B.C., Seow, K.T., and Guy, G.R. (2000). Evidence for a novel Cdc42GAP domain at the carboxyl terminus of BNIP-2. *J. Biol. Chem.* *275*, 14415-14422.

Nakajima, K., Hirose, H., Taniguchi, M., Kurashina, H., Arasaki, K., Nagahama, M., Tani, K., Yamamoto, A., and Tagaya, M. (2004). Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion. *EMBO J.* *23*, 3216-3226.

Ouahchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Ben Hamida, M., Sokol, R., Arai, H., Inoue, K., Mandel, J.L., and Koenig, M. (1995). Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat. Genet.* 9, 141-145.

Panagabko, C., Morley, S., Hernandez, M., Cassolato, P., Gordon, H., Parsons, R., Manor, D., and Atkinson, J. (2003). Ligand specificity in the CRAL-TRIO protein family. *Biochemistry* 42, 6467-6474.

Rong, J., Li, S., Sheng, G., Wu, M., Coblitz, B., Li, M., Fu, H., and Li, X.J. (2007). 14-3-3 protein interacts with Huntingtin-associated protein 1 and regulates its trafficking. *J. Biol. Chem.* 282, 4748-4756.

Rosa-Ferreira, C., and Munro, S. (2011). Arl8 and SKIP Act Together to Link Lysosomes to Kinesin-1. *Dev. Cell.* 21, 1171-1178.

Saito, K., Tautz, L., and Mustelin, T. (2007). The lipid-binding SEC14 domain. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 719-726.

Sall, A., Zhang, H.M., Qiu, D., Liu, Z., Yuan, J., Liu, Z., Lim, T., Ye, X., Marchant, D., McManus, B., and Yang, D. (2010). Pro-apoptotic activity of mBNIP-21 depends on its BNIP-2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain and is enhanced by coxsackievirus B3 infection. *Cell. Microbiol.* 12, 599-614.

Schiefermeier, N., Teis, D. and Huber, L. A. (2011). Endosomal signaling and cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 615-620.

Schmidt, M.R., Maritzen, T., Kukhtina, V., Higman, V.A., Doglio, L., Barak, N.N., Strauss, H., Oschkinat, H., Dotti, C.G., and Haucke, V. (2009). Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadkin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15344-15349.

Scott, G. B., Bowles, P. A., Wilson, E. B., Meade, J. L., Low, B. C., Davison, A., Blair, G. E. and Cook, G. P. (2010). Identification of the BCL2/adenovirus E1B-19K protein-interaction protein 2 (BNIP-2) as granzyme B target during human natural killer cell-mediated killing. *Biochem J.* 431, 423-431.

- Sha, B., Phillips, S.E., Bankaitis, V.A., and Luo, M. (1998). Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* 391, 506-510.
- Sirokmany, G., Szidonya, L., Kaldi, K., Gaborik, Z., Ligeti, E., and Geiszt, M. (2006). Sec14 homology domain targets p50RhoGAP to endosomes and provides a link between Rab and Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 281, 6096-6105.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513-525.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93, 1147-1158.
- Toda, H., Mochizuki, H., Flores, R., 3rd, Josowitz, R., Krasieva, T.B., Lamorte, V.J., Suzuki, E., Gindhart, J.G., Furukubo-Tokunaga, K., and Tomoda, T. (2008). UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes Dev.* 22, 3292-3307.
- Uchida, Y., Hasegawa, J., Chinnapen, D., Inoue, T., Okazaki, S., Kato, R., Wakatsuki, S., Misaki, R., Koike, M., Uchiyama, Y., *et al.* (2011). Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Valencia, C. A., Cotten, S. W. and Liu, R. (2007). Cleavage of BNIP-2 and BNIP-XL by caspases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 495-501.
- Vance, J.E., and Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* 44, 207-234.
- Ward, B.M., and Moss, B. (2004). Vaccinia virus A36R membrane protein provides a direct link between intracellular enveloped virions and the microtubule motor kinesin. *J. Virol.* 78, 2486-2493.
- Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319, 210-213.

Zhang, H.M., Cheung, P., Yanagawa, B., McManus, B.M., and Yang, D.C. (2003). BNips: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family. *Apoptosis* 8, 229-236.

Zhang, J., and Ney, P.A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* 16, 939-946.

Zhao, R., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B., and Zhao, Z.J. (2003). Specific interaction of protein tyrosine phosphatase-MEG2 with phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* 278, 22609-22614.

Zhou, Y.T., Guy, G.R., and Low, B.C. (2006). BNIP-Salpa induces cell rounding and apoptosis by displacing p50RhoGAP and facilitating RhoA activation via its unique motifs in the BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain. *Oncogene* 25, 2393-2408.

Zhou, Y.T., Guy, G.R., and Low, B.C. (2005). BNIP-2 induces cell elongation and membrane protrusions by interacting with Cdc42 via a unique Cdc42-binding motif within its BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain. *Exp. Cell Res.* 303, 263-274.