

論文内容の要旨

申請者氏名 赤松 理恵

BNIP-2は、本来 Bcl-2 に結合し細胞死を促進する蛋白質として同定されたが、その正確な機能は不明であった。培養細胞で BNIP-2 を過剰発現すると、細胞は細長くなり細胞突起を伸長する。この形態変化は、Cdc42 の活性に依存すると報告されているが、分子機構は不明である。申請者の研究室では、BNIP-2 と同じファミリーに属する Caytaxin 蛋白質を解析し、Caytaxin が、N 末領域の WED アミノ酸配列でキネシン軽鎖(KLC)を介してキネシン 1 に結合し、細胞内小胞やミトコンドリアなどの細胞内小器官に局在してこれらの小胞の輸送に関わる、キネシン 1 のアダプター分子であることを発見した。申請者は、BNIP-2 もキネシンのアダプター分子であることを証明し、BNIP-2 の C 末側の CRAL-TRIO ドメインに結合する因子を探索することで、BNIP-2 が輸送する貨物の全容を明らかにする目的で研究を行った。

まず、KLC が BNIP-2 タンパク質の WED 配列に結合することを示し、BNIP-2 が Caytaxin と同じ機構でキネシン 1 と結合することを証明した。また、過剰発現した BNIP-2 は伸長した細胞突起の先端で KLC およびキネシン重鎖と共に局在すること、GFP 標識 BNIP-2 を含む顆粒が微小管に沿って約 $0.5 \mu\text{m}/\text{秒}$ で細胞周辺へ向けて移動することから、BNIP-2 がキネシン 1 により運搬されることを示した。WED 配列を置換した BNIP-2 変異体は細胞突起を進展する活性を失い、細胞の周辺部にも移動しないので、BNIP-2 のキネシン 1 による運搬が細胞の形態変化に必須であると結論した。

次に、BNIP-2 に対する抗体を作成し、これを用いて内在性の BNIP-2 が微小管に沿って分布しエンドソーム、トランスゴルジ、ミトコンドリアに局在することを示した。

小胞構造への局在の機構を解明するため、BNIP-2 に結合するタンパク質を免疫沈降/質量分析法で探索したが、有力な候補は得られなかった。本来 CRAL-TRIO ドメインは脂質結合ドメインであることから、次に申請者は精製した BNIP-2 タンパク質を用いて脂質との結合を検討した結果、BNIP-2 がフォスファチジルセリン (PS) に特異的に結合することを見出した。CRAL-TRIO ドメイン中の 271 番目のリジンは、他の CRAL-TRIO ドメインタンパク質でも高く保存されており脂質結合に必須であるが、これをトリプトファンに変換した BNIP-2K271W は PS と結合せず、小胞への局在も示さなくなった。以上の結果から、申請者は、BNIP-2 は WED モチーフで KLC を介してキネシン 1 に結合し、CRAL-TRIO ドメインで PS を介して、種々の小胞構造と結合して小胞の運搬に係る、キネシンのアダプター分子であると結論した。

更に、申請者は、BNIP-2 が細胞内ではリン酸化されており、精製した BNIP-2 を脱リン酸化処理することにより PS との結合能が上昇することを示し、BNIP-2 の機能がリン酸化により制御される可能性を示した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 赤松 理恵

キネシンは細胞内物質輸送や細胞内小器官の分布に関わり、細胞の機能に必須である。実際、最も代表的なキネシンであるキネシン1のKOマウスは胎生致死となり、キネシン1の突然変異はヒトでは遺伝性痙性対麻痺を引き起こす。最近、キネシン1の軽鎖サブユニット(KLC)に結合する蛋白質中に、トリプトファンと酸性アミノ酸から構成されるWEDモチーフと呼ばれるKLC結合配列を持つ一群の蛋白質が見つかり、注目を浴びている。この中には、ワクシニアウイルスのゲノムにコードされ、ウイルス粒子の細胞内運搬と細胞外への放出に関わる蛋白質や、リソソームの細胞内分布に関わると共にサルモネラ菌の感染過程で重要な役割を果たす蛋白質が発見されている。

BNIP-2は、ヒトでCayman型運動失調症を引き起こすCaytaxinと高い相同性を持ち、両者ともWEDモチーフをN末側に、CRAL-TRIOドメインをC末側に持つ同一のファミリーに属する蛋白質である。Caytaxinは神経細胞中でキネシン1とミトコンドリアを繋ぐアダプター蛋白質としてミトコンドリアの輸送に機能することが先行研究により証明された。申請者は、より広範な組織で発現するBNIP-2の機能を明らかにする目的でこの研究を開始した。

その結果、BNIP-2がキネシン1に結合して輸送されることを証明した。また、BNIP-2は細胞内では、トランスゴルジ、初期エンドソーム、リサイクルエンドソーム、ミトコンドリアに結合し、微小管に沿って局在して、微小管上をキネシン1の運動速度と同じ速さで核周囲から細胞膜の方向へ運搬されていることを明らかにした。これまで知られているBNIP-2の機能である、細胞形態を変化させ細胞突起の伸展を行う活性は、キネシン1による輸送に依存していた。

BNIP-2が小胞膜構造へ局在する機構を解明するため、BNIP-2に結合する因子を探索した結果、申請者は、BNIP-2のCRAL-TRIOドメインが、これまで報告されてきた蛋白質にではなく、リン脂質のフォスファチジルセリン(PS)に結合することを発見した。また、細胞内ではBNIP-2はリン酸化されており、リン酸化がBNIP-2とPSとの結合を抑制することで、BNIP-2の機能を制御している可能性を示した。

以上のように、本論文はキネシンによる細胞内輸送に関わる新たなアダプター蛋白質グループを提唱し、その生理機能の理解を深めるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。