

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	船橋 輝記
論文題目	Roles of kinesin-2 motor proteins involved in intraciliary protein trafficking (繊毛内タンパク質輸送に関するモータータンパク質キネシン 2 の機能)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>動物のほぼ全ての細胞に存在する繊毛は、多様な外部シグナルを受容するアンテナとして機能するオルガネラである。繊毛の形成不全や機能異常は、多指症や嚢胞腎などの症状を呈する「繊毛病」と総称される多様な遺伝性疾患を引き起こす。繊毛の伸長に必須なタンパク質の繊毛内での順行輸送は、IFT-B 複合体とキネシンが共役することによって媒介される。IFT-B 複合体と相互作用すると考えられているキネシンには、KIF17 キネシン、および KIF3A、KIF3B、KAP3 からなるヘテロ三量体キネシン 2 の二種類がある。しかし、これらのキネシンが IFT-B 複合体のどのサブユニットと直接相互作用しているのかは不明であった。また、これらのキネシンのどちらが IFT-B 複合体のモーターとして機能しているのかも不明であった。そこで著者は、これらのキネシンと相互作用する IFT-B 複合体のサブユニットを同定して、IFT 複合体による繊毛内タンパク質輸送や繊毛形成の分子基盤を解明することを目的に以下の研究を行った。</p> <p>第一章 KIF17 キネシンは IFT-B 複合体の積み荷タンパク質である</p> <p>著者の所属する研究室は、従来の方法では困難であった多数のサブユニットからなる複合体の構築様式でも簡単に調べることができる VIP (<u>v</u>isible <u>i</u>mmunoprecipitation) アッセイを開発している。まず、VIP アッセイを用いて KIF17 キネシンと相互作用する IFT-B 複合体のサブユニットを網羅的に調べた。その結果、KIF17 キネシンは IFT46-IFT56 のヘテロ二量体を介して IFT-B 複合体と相互作用していることが分かった。さらに、この結合には種間で保存された KIF17 の C 末端領域のアルギニン残基が重要なことが分かった。次に、野生型または IFT-B 複合体と相互作用できない変異型 KIF17 を細胞に発現させて、その細胞内局在を調べたところ、野生型 KIF17 は繊毛の先端に蓄積したのに対して、IFT-B 複合体と相互作用できない変異型 KIF17 は繊毛内に全く局在しなかった。このことから、KIF17 が繊毛先端へ輸送されるためには、IFT-B 複合体との相互作用が必要であることが示唆された。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて IFT56 ノックアウト (KO) 細胞を作製して KIF17 の局在を調べたところ、IFT56-KO 細胞では KIF17 が繊毛先端へと輸送されなかった。また、KIF17-KO 細胞では繊毛は正常に形成され、調べたかぎり全ての繊毛内タンパク質の局在も正常であった。さらに、モータードメインを欠失した変異型 KIF17 を細胞に発現させて、その細胞内局在を調べたところ、モータードメインを欠失した変異型 KIF17 も、野生型 KIF17 と同様に繊毛先端に局在することが明らかになった。以上の実験結果から、KIF17 キネシンは IFT-B 複合体のモーターとして機能するのではなく、積み荷タンパク質として繊毛先端へと輸送されると考えられる。</p> <p>第二章 ヘテロ三量体キネシン 2 は IFT-B 複合体のモーターとして繊毛形成に必須の役割を担う</p>			

KIF17 キネシンが IFT-B 複合体のモーターとして機能していないと考えられたことから、ヘテロ三量体キネシン 2 が IFT-B 複合体のモーターなのではないかと考えた。そこでまず、VIP アッセイを用いてヘテロ三量体キネシン 2 と相互作用する IFT-B 複合体のサブユニットを調べたところ、ヘテロ三量体キネシン 2 は IFT38、IFT52、IFT57、IFT88 からなる四量体を介して IFT-B 複合体と相互作用することが分かった。さらに、この結合にはヘテロ三量体キネシン 2 のサブユニットの一つである KIF3B の C 末端領域が重要であることが分かった。KIF3B-KO 細胞を作製して調べたところ、KIF3B-KO 細胞において、IFT-B 複合体は基底小体に局在するものの、繊毛が全く形成されないことが分かった。また、KIF3B-KO 細胞に野生型 KIF3B を発現させたところ、繊毛形成がレスキューされたのに対して、KIF3A および KAP3 とは相互作用するものの IFT-B 複合体との相互作用が減弱する変異型 KIF3B を発現させても繊毛形成はレスキューされなかった。これらの実験結果から、ヘテロ三量体キネシン 2 は、IFT38、IFT52、IFT57、IFT88 からなる四量体を介して IFT-B 複合体と相互作用することで、IFT-B 複合体のモーターとして繊毛形成に必須な様々なタンパク質の繊毛基部からの順行輸送を担っていると考えられる。

総括

以上、著者の行った研究によって、KIF17 キネシンおよびヘテロ三量体キネシン 2 は、それぞれ IFT46-IFT56 のヘテロ二量体および IFT38、IFT52、IFT57、IFT88 からなる四量体を介して IFT-B 複合体と相互作用することが明らかになった。さらに、これらのキネシンのうち、ヘテロ三量体キネシン 2 が IFT-B 複合体のモーターとして繊毛形成に必要な様々なタンパク質の繊毛内輸送を媒介することが証明された。一方で、KIF17 キネシンは IFT-B 複合体のモーターとして機能するのではなく、IFT-B 複合体の積み荷タンパク質として繊毛内を輸送されると考えられる。IFT-B 複合体による繊毛形成の分子基盤の解明は繊毛病発症機構の解明にとって必須であるが、本研究の成果はその根幹をなす重要な知見であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

動物のほぼ全ての細胞に存在する繊毛は、微小管を骨格とした細胞小器官であり、外部シグナルのセンサーとして機能することで、発生などの過程で重要な機能を担う。繊毛の形成不全や機能異常は、多指症や嚢胞腎、網膜色素変性症など種々の症状を呈する「繊毛病」と総称される多様な遺伝性疾患を引き起こすことが知られている。チューブリンなどの繊毛の形成や伸長に必須なタンパク質の繊毛基部から先端への順行輸送は、IFT-B複合体とキネシンモーターが協働することによって行われている。IFT-B複合体と相互作用すると考えられているキネシンは、KIF17キネシン、およびKIF3A、KIF3B、KAP3からなるヘテロ三量体キネシン2の二種類が存在するが、これらのキネシンがIFT-B複合体のどのサブユニットと直接相互作用しているのかは不明であった。また、これらのキネシンが、それぞれどのような役割を担っているのかも不明であった。そこで著者は、所属研究室で開発されたVIPアッセイを利用して、これらのキネシンとIFT-B複合体の様々なサブユニットとの結合を網羅的に解析することで、キネシンと相互作用するIFT-B複合体のサブユニットを同定して、IFT複合体による繊毛内タンパク質輸送や繊毛形成の分子基盤の解明を目指した。

第一章において、著者は、VIPアッセイを利用することで、KIF17がIFT46-IFT56のヘテロ二量体を介してIFT-B複合体と相互作用していることを明らかにした。さらに、この結合にはKIF17のC末端領域に存在する生物種間で保存されたアルギニン残基が重要であることを見出した。次に、野生型あるいはIFT-B複合体と相互作用できない変異型KIF17を細胞に発現させて、その細胞内局在を調べたところ、野生型KIF17は繊毛先端に局在したのに対して、IFT-B複合体と相互作用できない変異型KIF17は繊毛内に全く局在しないことが分かった。このことから、KIF17が繊毛先端へ輸送されるためには、IFT-B複合体との相互作用が必要であることが示唆された。そこで著者は、IFT56をノックアウト (KO) すると、KIF17がIFT-B複合体と相互作用できなくなると考え、CRISPR/Cas9システムを用いてIFT56-KO細胞を作製して、KIF17の細胞内局在を調べた。その結果、野生型細胞ではKIF17は繊毛先端に局在したのに対して、IFT56-KO細胞ではKIF17は繊毛内に全く局在しなかった。このことから、KIF17が繊毛先端に局在するためにはIFT-B複合体との相互作用が必要であることが明らかになった。さらに、著者は、KIF17-KO細胞では、繊毛が正常に形成され、IFT-B複合体、ARL13B、Smoothed、およびDRD1など、調べた限り全ての繊毛内タンパク質の局在も正常であることを見出した。また、モータードメインを欠失した変異型KIF17も、野生型KIF17と同様に繊毛先端に局在することを見出した。以上の結果により、著者は、KIF17がIFT46-IFT56のヘテロ二量体を介してIFT-B複合体と相互作用するが、そのモーターとして機能するのではなく、IFT-B複合体の積み荷タンパク質として繊毛先端へと輸送されることを明らかにした。

続いて第二章において、著者は、VIPアッセイによって、ヘテロ三量体キネシン2がIFT38、IFT52、IFT57、IFT88からなる四量体を介してIFT-B複合体と相互作用することを見出した。また、この結合にはヘテロ三量体キネシン2のサブユニットの一つであるKIF3BのC末端領域が重要であることを見出した。さらに、KIF3B-KO細胞を作製して調べたところ、KIF3B-KO細胞ではIFT-B複合体は基底小体に局在するものの、繊毛が全く形成されないことが分かった。このことから、KIF3Bのノックアウトによって基底小体からのIFT-B複合体の輸送が滞ることで、繊毛形成に必須のタンパク質の輸送が行われず、繊毛が形成されないことが示唆された。さらに、KIF3B-KO

細胞に野生型KIF3Bを発現させたところ、繊毛形成がレスキューされる一方で、KIF3AおよびKAP3とは相互作用するもののIFT-B複合体との相互作用が減弱する変異型KIF3Bを発現させても、繊毛形成が全くレスキューされないことを見出した。以上の結果により、著者は、ヘテロ三量体キネシン2はIFT38、IFT52、IFT57、IFT88からなる四量体を介してIFT-B複合体と相互作用して、そのモーターとして、チューブリンなどの繊毛形成に必須なタンパク質の繊毛基部からの順行輸送を担っていることを示した。

以上、著者は、VIPアッセイによる徹底的なタンパク質間相互作用解析とノックアウト細胞を用いた解析を組み合わせることで、KIF17キネシンとヘテロ三量体キネシン2が、それぞれIFT46-IFT56のヘテロ二量体、およびIFT38、IFT52、IFT57、IFT88からなる四量体を介してIFT-B複合体と相互作用すること、そしてこれらのキネシンのうち、ヘテロ三量体キネシン2こそがIFT-B複合体のモーターとして繊毛形成に必要な様々なタンパク質の繊毛内輸送を媒介することを明らかにした。本研究の成果は、IFT-B複合体による繊毛の形成機構、さらにはその破綻による病態発現機構を理解するための根幹をなす知見を見出したものである。また、論文は論理的かつ一貫性をもって記述されている。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。