

## 論文内容の要旨

申請者氏名 青山 貴音

Caytaxin蛋白質は*Atcay* 遺伝子にコードされ、中枢と末梢の神経細胞で発現している。ヒトでは機能欠失型の変異により Cayman type ataxia といわれる常染色体劣性の遺伝的小脳性運動失調症が引き起こされる。また、マウスとラットでも相同遺伝子の変異により遺伝的運動失調症が引き起こされる。したがって、Caytaxin は神経の正常な働きに必須のタンパク質であるが、その生理機能はまったく不明であった。Caytaxin はC末端側に蛋白質間相互作用や脂溶性分子との結合に関わるCRAL-TRIOドメインをもち、BNIP2、BNIP-S $\alpha$ 、BNIP-XLと高い相同性を持ち同じファミリーに属する蛋白質と考えられている。

申請者は Caytaxin の機能を解明するため、マウス Caytaxin と結合する蛋白質を探索した。Yeast two-hybrid 法により、Caytaxin と相互作用するタンパク質として Kinesin Light Chain-1 (KLC-1) を同定した。さらに、Caytaxin の 115-120 アミノ酸に位置する ELEWED 配列が KLC1 との結合に必須であることを明らかにした。また、Caytaxin と kinesin1 が KLC1 を介して複合体を形成していることも明らかにした。Caytaxin の N 末側を過剰発現させると神経突起が短くなったが、WED をアラニンに置換した変異体ではその効果はなくなった。したがって、細胞での Caytaxin の生理的な作用には KLC1 との結合が重要であることがわかった。

ラット海馬の初代培養神経細胞に発現させた GFP-Caytaxin は顆粒状に点在し、神経突起の末端に濃縮していた。Time lapse で顆粒を観察すると、キネシンで運搬される他の物質とほぼ同じ速度の、約 1.2  $\mu\text{m}/\text{sec}$  で動いていた。また、モータードメインを欠失した Dominant negative 型の kinesin-1 を過剰発現させると神経突起末端の Caytaxin 量が減少したことから、Caytaxin がチューブリンや kinesin-1 と共局在していたことから、Caytaxin は細胞内を kinesin-1 で輸送されることが示された。

Caytaxin は APP や JIP1b、JPDI の局在と一致しなかったが、ミトコンドリアとは共局在を示し、免疫電顕でもミトコンドリア外膜への分布がみられた。一部のミトコンドリアと Caytaxin が Time lapse で同じ挙動を示し、Caytaxin ノックダウン細胞では突起の末端にあるミトコンドリアの数が減少したことから、Caytaxin がミトコンドリアの輸送に関わっている可能性が示唆された。

本研究から、申請者は KLC1 との新規結合配列として WED モチーフを提唱した。また、Caytaxin が C 末端側で結合した積荷を kinesin-1 で運搬する、新規アダプタータンパク質であることを示した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 青山 貴音

Caytaxin に機能欠失型の変異が起こると Cayman type ataxia といわれる小脳性運動失調症が引き起こされることから、Caytaxin は神経の正常な働きに必須のタンパク質である。申請者は、神経突起の伸長が盛んな時期に Caytaxin mRNA が最も高く発現すること、タンパク質は細胞体のある領域ではなく神経線維で構成される層に局在することから、Caytaxin は神経突起を伸ばす働きがあると予想した。実際、ラット海馬の初代培養神経細胞に Caytaxin を過剰発現させると神経突起がより伸長し、ノックダウンすると伸長が阻害されたことから、神経突起の伸長に確かに関与していることを明らかにした。

また、KLC1 が Caytaxin 分子上の ELEWED 配列を介して結合し、神経突起内で Caytaxin が kinesin-1 により輸送されていることを明らかにした。ELEWED 配列に類似した配列は KLC1 と結合して kinesin-1 で運ばれるいくつかの蛋白質で保存されている。たとえば、神経細胞特異的に発現している膜貫通タンパク質の Calsyntenin、脳以外の組織でも発現し、エンドソーム表面のタンパク質と結合して選択的小胞輸送を行なう Gadkin、ワクシニアウイルスの A36R が報告されており、これらのタンパク質は発現場所も ELEWED 配列以外のドメイン構造は全く異なっている。そこで申請者は、KLC との結合に幅広く使用されているモチーフとして WED モチーフを提唱した。

Caytaxin は C 末端側の CRAL-TRIO ドメインでタンパク質や脂質、あるいは小胞等の膜構造物などと結合すると推測される。このことから、Caytaxin は N 末側の WED モチーフで KLC1 と結合し、kinesin-1 で C 末についた積荷を輸送する、キネシンの新規アダプタータンパク質であると提唱した。さらに、Caytaxin の積荷の候補としてミトコンドリアを同定した。また、Caytaxin は 同じく kinesin-1 で運搬される APP、JIP1b、JPDI とは異なる複合体に含まれていることを明らかにした。

長い軸索を有する神経細胞では、kinesin モーターによる輸送は細胞機能に必須であり、多くの神経変性疾患で軸索輸送の異常が報告されている。Cayman type ataxia も軸索輸送の異常により引き起こされることを明らかにした。

以上のように、本論文は神経細胞の軸索輸送についての新たな機構を明らかにしたもので、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。