

主論文の要旨

Potential involvement of kinesin-1 in the regulation of subcellular localization of Girdin

Kinesin-1 は Girdin の細胞内局在の制御に
関わっている可能性がある

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病理病態学講座 腫瘍病理学分野

(指導：高橋 雅英 教授)

村松 彩

【諸言】

アクチン結合蛋白質である **Girdin** は、生後の神経芽細胞の移動を制御していることが知られている。これまでに様々な **Girdin** 関連蛋白質が同定されてきたが、**Girdin** がどのように細胞移動を制御しているのかは未だ十分に解明されていない。野生型のマウスでは、脳室下帯で生まれた神経芽細胞は **RMS(rostral migratory stream)**を通り、嗅球に向かってお互いに接着しながら鎖のような構築を示して集団的に移動するが、**Girdin** 欠損マウスおよび **Girdin** の重要な機能ドメインを欠いた変異マウス(**Basic mut** マウス)ではこれが障害される。

Girdin の結合蛋白質としてこれまで同定してきた **Par-3** と **DISC1** はいずれも、微小管モーター蛋白である **Kinesin** と関与していることが明らかとなっており、**Girdin** も細胞内輸送システムに関わっている可能性が考えられる。本研究では、**Kinesin-1** のアイソフォームの一つである **KIF5A** と **Girdin** との生化学的な相互作用について解析し、神経芽細胞の集団的移動における **Girdin** の役割を検討した。

【対象および方法】

1) **Girdin** と **Kinesin-1** の生化学的相互作用

胎生 19 日のラット脳およびラット褐色細胞腫由来の **PC12D** 細胞から抽出液を調整し、免疫沈降により **Girdin/Kinesin-1** 間の相互作用を調べた。また生後 7 日の野生型マウスと **Basic mut** マウスの脳抽出液を用いて同様の免疫沈降を行い、**Girdin/Kinesin-1** 間の相互作用を比較した。

2) **Girdin** と **KIF5A** の作用部位の同定

Girdin と **KIF5A(Kinesin-1** の重鎖)の相互作用に重要なドメインを同定するために、フラグメントあるいは一部を欠損させた変異コンストラクトを各々作成し、**HEK293FT** 細胞に強制発現させた上で免疫沈降を行い作用部位を検討した。

3) **Girdin** の細胞内局在における **KIF5A** の影響

COS7 細胞に全長の **KIF5A(GFP-KIF5A FL)**を強制発現させ、**Girdin** と **KIF5A** の共局在について解析した。また、モーター部分を欠損した変異 **KIF5A(GFP-KIF5A HL)**を強制発現させ、**Girdin** の局在の変化について検討した。

4) **Girdin** と **N-cadherin** の相互作用の検討

生後 7 日の野生型マウスと **Basic mut** マウスの **RMS** の矢状断切片を用いて **N-cadherin** の発現と局在を解析した。また生後 7 日のマウス脳およびマウス神経芽細胞腫由来の **N1E-115** 細胞の抽出液を用いて免疫沈降を行い、**N-cadherin** と **Girdin** の生化学的な相互作用を検討した。さらに **Girdin** を恒常的にノックダウンした **SH-SY5Y** 細胞を用いて **N-cadherin** の発現量と局在、細胞形態の変化について検討した。

【結果】

1) ラット脳および **PC12D** 細胞の抽出液を用いた免疫沈降において、**Girdin** と

Kinesin-1 の内因性の結合が示された(Fig. 1B)。Basic mut マウスは野生型マウスに比べ、Girdin/Kinesin-1 間の結合の低下がみられた(Fig. 1D)。

2) HEK293FT 細胞を用いた強制発現による実験では myc-KIF5A HL は免疫沈降法において GFP-Girdin CT と結合を示した(Fig. 2A, B)。また同様に HEK293FT 細胞に GFP-Girdin CT を強制発現させ免疫沈降を行ったところ、KIF5A の rod ドメイン後半を欠損した変異コンストラクトとの結合はみられず、KIF5A の rod ドメイン後半が Girdin との結合に重要であることが示された(Fig. 2D, E)。

3) COS7 細胞に GFP-KIF5A FL を強制発現させ、KIF5A と Girdin の細胞内局在を免疫染色で観察すると、細胞辺縁とゴルジにおいて両者が共局在していたが(Fig. 3A)、GFP-KIF5A HL を強制発現させた COS7 細胞ではこれが障害され、両者はともに核周囲に凝集して存在した(Fig. 3B)。

4) 生後 7 日の野生型マウスと Basic mut マウスの RMS の矢状断切片を用いて細胞接着分子の一つである N-cadherin の免疫染色を行い観察したところ、野生型では細胞接着部位および細胞質内に N-cadherin の発現がみられたが、Basic mut マウスでは N-cadherin の発現低下がみられた(Fig. 4A)。生後 7 日のマウス脳および N1E-115 細胞の抽出液を用いた免疫沈降では Girdin と N-cadherin の弱い結合が示された(Fig. 4B)。shRNA を用いて Girdin を恒常的にノックダウンした SH-SY5Y 細胞を用いて N-cadherin の局在や発現量を検討したが、コントロール細胞とノックダウン細胞で差はみられなかった(Fig. 4C, D)。またノックダウン細胞にさらに N-cadherin-GFP を強制発現させ、N-cadherin の局在の変化を検討したが、差はみられなかった(Fig. 4E)。

【考察】

Girdin と KIF5A の生化学的な相互作用が確認され、これには Girdin の CT ドメイン、特に Basic 領域が重要であることが明らかとなった(Fig. 2C)。これは Basic mut マウスの変異部位と同じ領域であり、Basic mut マウスの脳抽出液では野生型に比べ Kinesin-1 の沈降量が低下することとも合致する。

また、COS7 細胞に KIF5A-HL を強制発現させると、細胞辺縁とゴルジにおける Girdin と KIF5A の共局在が障害されることより、Girdin の適切な細胞内局在に KIF5A との結合が必要であることが示唆された。

免疫染色で観察すると Basic mut マウスでは RMS の神経芽細胞の N-cadherin の局在および発現が障害されていた。Kinesin ファミリーが N-cadherin の輸送に関わっているという過去の報告と合わせると、Girdin/Kinesin-1 複合体が神経芽細胞における N-cadherin の細胞内動態に関与しているのではないかと推察される。N-cadherin は神経細胞の移動にも重要であることが知られており、Girdin/Kinesin-1 による N-cadherin の局在制御が神経芽細胞の集団的移動に関わる可能性も示唆される。現時点で Basic mut マウスの神経芽細胞において N-cadherin の発現が低下する理由は不明である。Girdin の欠損により N-cadherin が適所に局在できなくなりプロテアソーム系等により分解されている可能性も推測される。培養細胞を用いた実験で

は Girdin をロックダウンしても N-cadherin の発現の低下は明らかではなく、そのメカニズムを明確にすることはできなかった。

【結語】

Girdin は微小管モーター蛋白質である KIF5A(Kinesin-1)と相互作用し、本相互作用は Girdin の適切な細胞内局在に必要なことが示された。また Basic mut マウスでは RMS の神経芽細胞の N-cadherin の発現が低下しており、これにも Girdin/Kinesin の複合体が関与している可能性が考えられた。