

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 岩田 卓

本研究は、モータータンパク質であるキネシンスーパーファミリータンパク質 KIF17 について、その機能を明らかにするため、一連の分子細胞生物学的手法を用いた解析を行い、神経活動依存的な可塑性についての分子メカニズムにおける KIF17 の役割について解明を試みたものであり、下記の報告がなされた。

1. キネシンスーパーファミリータンパク質は 45 種類以上のメンバーからなる分子モーターであり、これまでに様々な分子細胞生物学的、及び分子遺伝学的手法を用いた解析を通して様々な生命機能に関与していることが報告されてきた。KIF17 に関しては遺伝子 *kif17* に関連した様々な遺伝子改変マウスが作製され、これまでに神経可塑性における KIF17 の役割が提示され、また統合失調症や筋萎縮性側索硬化症への関与が示唆されており、本研究では一連の分子細胞生物学的手法を用いた解析を通して神経活動依存的な KIF17 の機能を解明することを目的とした。
2. 神経細胞における神経活動依存的な KIF17 の分子メカニズムを解明するため、海馬由来の培養神経細胞に神経活動を起こさせ、イムノブロットィングで KIF17 発現量を定量したところ、神経活動依存的に KIF17 がその発現量を減少させていることが示された。加えて、神経細胞にいくつかの試薬を添加した状態で神経活動を起こさせた後、KIF17 発現量を定量した解析によって、KIF17 が NMDA 受容体の活性化に依存して、プロテアソームによりタンパク質分解を受けていることが示唆された。
3. プロテアソームによって神経活動依存的にタンパク質分解を受ける標的タンパク質にはポリユビキチン鎖が結合し、プロテアソームはポリユビキチン鎖を認識することでタンパク質分解を実行するというシステム(ユビキチン-プロテアソームシステム、UPS) が報告されていることから、KIF17 が神経活動依存的にポリユビキチン鎖結合を形成しているかを確かめるため、レンチウイルスを用いた遺伝子導入と免疫沈降による解析を行ったところ、神経活動依存的な KIF17 発現量減少にポリユビキチン鎖形成が必要であることと、神経活動依存的に KIF17 がポリユビキチン鎖と結合していることが示された。
4. レンチウイルスを用いた遺伝子導入によって培養神経細胞に GFP-KIF17 を導入し、神経活動を起こさせ、その後固定し顕微鏡観察を行ったところ、神経活動依存的に樹状突

起内で GFP-KIF17 発現量の減少が観察された。また前述と同様にいくつかの試薬を添加して神経活動を起こさせたところ、イムノブロットングの結果と同様の観察結果を得た。これまでの結果により、KIF17 は神経活動依存的にユビキチン-プロテアソームシステムによるタンパク質分解を受けていることが示唆された。

5. 神経活動依存的に KIF17 発現量が減少した後の KIF17 発現量を調べたところ、KIF17 は神経活動から 3 分後に一度発現量を落とし、その後神経活動から 30 分後には元の発現量に戻ることがイムノブロットングにより示された。加えて、転写・翻訳を阻害する試薬を添加した状態で同様の実験を行うことで、KIF17 は神経活動から 30 分後に翻訳に依存してその発現量を回復するが、転写には依存していないことが示された。

6. 転写に依存しない KIF17 発現量の回復についてより詳しく調査するため、*in situ* hybridization 法を用い KIF17 mRNA の局在を調べたところ、KIF17 mRNA が神経細胞の樹状突起内に存在することが示された。また、translation reporter として広く活用されている Kaede を KIF17 3'UTR に繋げた、Kaede-KIF17 3'UTR をレンチウイルスにより導入し、転写に依存しない KIF17 の翻訳が神経活動依存的に樹状突起内で行われていることが観察された。

6. *in vitro* の系で示された KIF17 の神経活動依存的な挙動を *in vivo* の系でも確認するために、文脈性恐怖条件付けを行ったマウスに恐怖記憶を想起させることで海馬内の神経細胞に神経活動を起こさせ、その後海馬を取り出し、記憶想起後の KIF17 発現量をイムノブロットングで定量したところ、KIF17 発現量が記憶想起から 5 分後に一度その発現量を落とし、30 分後に元の発現量まで回復することが示された。よって、*in vitro* の系で示された一連の KIF17 の挙動が *in vivo* の個体レベルでも起きていることが示された。

以上、本研究はモータータンパク質である KIF17 の機能を調べるため、神経活動依存的な KIF17 の挙動について一連の分子細胞生物学的な解析を行い、新たな KIF17 の可塑性における役割についての分子メカニズムを提示することに成功した。この新しい KIF17 の分子メカニズムによって、今後、神経可塑性の分野における記憶獲得・固定・想起のメカニズムの解明が飛躍的に進むことが強く期待され、学位の授与に値するものと考えられる。