

2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	ダイニンによる可溶性タンパク質の局在化機構の解明
キーワード	①タンパク質の局在、②タンパク質の輸送、③MAP2

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	ヨネムラ ヨウジ 米村 洋而
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	同志社大学 研究開発推進機構・助教
現在の所属先・職位等	神戸大学 先端バイオ工学研究センター 特命助教
プロフィール	大学院ではアルツハイマー病の研究を行い、大学院卒業後ドイツのイエナで5年間、細胞内でのタンパク質の輸送制御について研究を行い2019年に帰国。2019年から2024年まで同志社大学脳科学研究科で、神経細胞における微小管結合タンパク質の輸送の制御について研究を行った。

1. 研究の概要

微小管は管上の構造をし、細胞の骨格として、また細胞内での物質輸送の“レール”としての役割をもつタンパク質である。神経細胞で合成される MAP2 と呼ばれるタンパク質は微小管に結合するタンパク質のひとつとして知られる。微小管は細胞全体に張り巡らされているが、微小管に結合するタンパク質である MAP2 は神経細胞において細胞体、樹状突起に限定して存在する。一方で、軸索にはほとんど存在しないことが知られている(図1)。この特徴的な局在から、MAP2 は神経細胞の細胞体・樹状突起マーカーとして世界中で認識されている(MAP2 の存在するところが細胞体・樹状突起であると考えられている)。しかし、どのように MAP2 がこのような特徴的な局在を示すのかについては長い間未解明であった。

私は、この問題を解決するためにMAP2の局在を制御している領域の特定、その領域がどういったメカニズムで局在制御に関わっているのかについて研究を行い、MAP2はMAP2内のセリンとプロリンに富む領域(以下、S/P領域)依存的にモータータンパク質(ダイニン)によって運ばれることで、細胞体・樹状突起に限定的に存在することをはじめて明らかにした。

より詳細な分子機構を解明する目的で、およそ120アミノ酸残基から構成されるS/P領域内のどの部位が局在制御に重要かを明らかにすることを、本奨励金の援助によって試みた。その結果、S/P領域後半の約75アミノ酸からなる領域を欠損すると、S/P領域全体を欠損したときと同様の局在を示したことから、S/P領域の後半がMAP2の局在化に重要であることが明らかになった。領域Cをさらに細かくc1、c2、c3と図7のように分割し、局在に重要な最小領域を探索した結果、c1とDの欠損(約50アミノ酸から構成される)によって S/P領域全体を欠損させたときと同じ局在を示した。以上からMAP2の局在に真に重要な領域として当初の120アミノ酸の半分以下の50アミノ酸に絞りこむことに成功した。今後はこの50アミノ酸に着目して、MAP2が

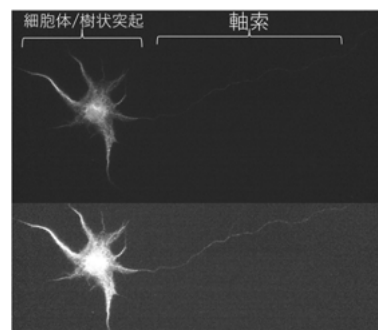


図1 MAP2の局在の様子。下段の写真は軸索がわかりやすいように上段の写真を編集したもの。

局在を制御される詳細なメカニズム、さらに同様のメカニズムでほかのタンパク質も輸送、局在を制御されるのかについて検討したい。

2. 研究の動機、目的

哺乳類細胞では1分間におよそ1千万個ものタンパク質が合成される。これら膨大な量のタンパク質が適切なタイミングで適切な場所に局在することで細胞は正しく機能することができる。タンパク質の輸送・局在化の制御機構はタンパク質自身がつまみシグナル配列の発見によって理解が進んできた。その後、核に局在するタンパク質にも核局在化シグナルが存在することが明らかとなった。このような局在化シグナルをもつタンパク質はシグナルを認識するタンパク質によって運ばれることで適切に局在化される。つまり、タンパク質自身に宛先が刻まれていて、宛先を認識する別のタンパク質によって運ばれていることが明らかとなった。タンパク質の局在化が適切になされないと病気になることも知られている。例えば、LDL受容体のシグナル配列に変異があることで高コレステロール血症になることや、インスリンのシグナル配列の変異によって糖尿病になることなどが報告されている。このようにタンパク質が正しく局在を制御されることは生物にとって非常に重要であると考えられる。従って、タンパク質局在の制御機構の解明および正確な理解によって、タンパク質の異常局在によって引き起こされる問題に対処できるようになると考えられる。

私は、局在制御機構について理解が進んでいない細胞質に存在するタンパク質のうち、神経細胞に発現する微小管結合タンパク質 MAP2 がなぜ細胞体・樹状突起に特異的に局在するのか、そのメカニズムを解明することを目的としてきた。これまでに私はMAP2の正常な局在化に重要な領域としてS/P領域を同定し、S/P領域を介したモータータンパク質（ダイニン）による MAP2 局在制御機構を提唱してきた（図2、Yonemura et al., 査読中）。しかし、S/P領域を構成するおよそ120のアミノ酸残基のどの領域がダイニンによる局在化に重要なのか明らかにできていなかった。この領域のうち、真にMAP2の局在に重要な領域を決定することができれば、ダイニンによるMAP2の輸送機構をほかの可溶性タンパク質の輸送機構にも一般化できる可能性がある。また、ダイニンは複合体で機能しているため、ダイニン複合体のどのタンパク質を介してMAP2の輸送が制御されるのかを明らかにできれば、ほかの可溶性タンパク質の輸送メカニズムにも一般化できる可能性やダイニンによる輸送対象の選別のメカニズムの解明につながると考えられる。従って、本研究では、S/P領域内でMAP2の局在制御にかかわる領域の同定とその領域がどのようにMAP2の局在を制御するのかを解明することを目的とした。

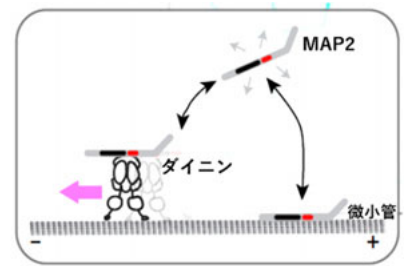


図2 MAP2の局在化機構のモデル。

3. 研究の結果

まずは、およそ120のアミノ酸残基から構成されるS/P領域内のうちMAP2の局在制御に関与する最小領域を決定することを目的として図3のようにS/P領域を、既に報告されている構造的特徴をもとにA、B、C、Dと4つに分割し、それぞれの欠損変異体を発現させるプラスミドを新規に作製した。プラスミドをラットの脳から取り出した海馬初代培養細胞に導入し、それらの局在を野生型およびS/P領域全体の欠損変異体の局在と比較し評価した。その結果、AまたはBを欠損しても局在は野生型と同様となることが明らかになった。一方、CまたはDの欠損はS/P領域全体の欠損変異体と同様の局在を細胞体に近い部位の軸索において示した。局在の定量結果を図4に示す。この結果からS/P領域後半の約75アミノ酸にMAP2の正常な局在化に重要な領域があることが示唆された。しかし、D欠損MAP2は細

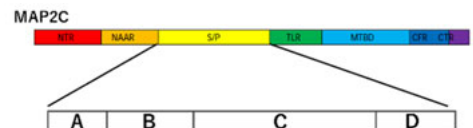


図3 S/P領域をA、B、C、Dに分割。

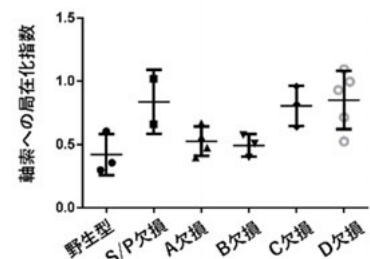


図4 C、Dを欠損すると細胞体に近い軸索にMAP2が局在するようになる。

胞体から遠位の軸索にはほとんど局在せず、野生型のような局在を示した(図 5)。さらに、C のみを欠損した MAP2 も軸索遠位では S/P すべてを欠損したときのような局在にはならなかった(図 5)。そこで、C と D の両方を欠損させた MAP2 についてその局在を検討したところ、図 6 に示すように近位、遠位ともに S/P 欠損変異体のように MAP2 が軸索に局在した。さらに、およそ 50 アミノ酸で構成される C を構造的な特徴をもとに c1、c2、c3 の 3 つに分割し図 7 のような欠損変異体を作成した。作成したこれらの欠損変異体の局在を野生型 MAP2、S/P 欠損型 MAP2 と比較した結果、c1 と D を欠損した変異体が S/P 欠損変異体や CD の欠損変異体と同様の局在パターンを軸索において示した(図 8)。以上の結果により、約 120 アミノ酸から構成される S/P 領域のうち、約 50 アミノ酸に MAP2 局在制御に関わる領域を限定することができた。

この新規に同定した領域(c1 と D)には、既知のリン酸化サイトが複数存在する。MAP2 と同じ微小管結合タンパク質である Tau は、MAP2 とは逆に軸索に主に局在する。Tau の局在はリン酸化で制御されることが示されており、MAP2 も同様にリン酸化によって局在が変わるかどうかを検討するために c1 と D の領域にあるアミノ酸を疑似リン酸化または疑似脱リン酸化状態にする変異体を作成し、リン酸化または脱リン酸化で MAP2 の局在制御が可能かどうかを検討する準備をしている。

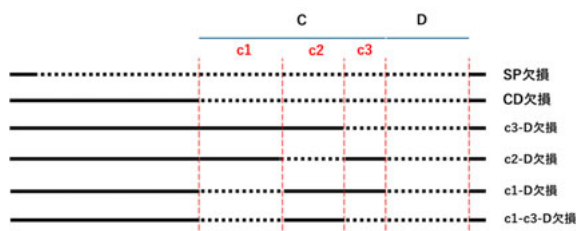


図 7 C をさらに c1、c2、c3 と分割し作製した新規の変異体。

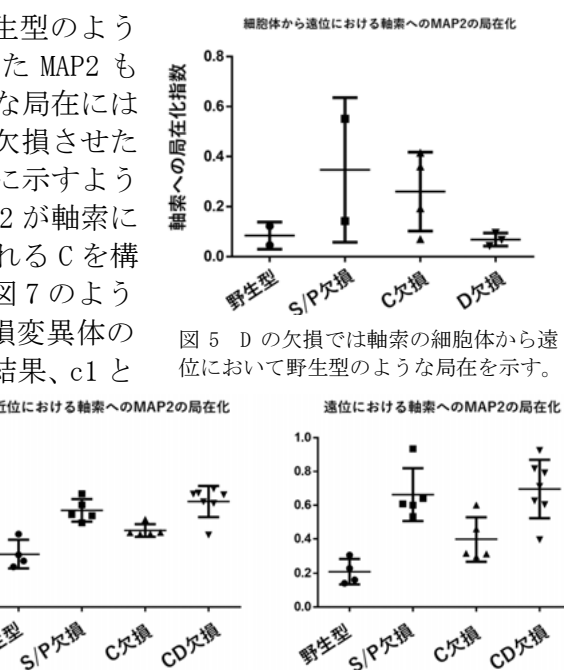


図 5 D の欠損では軸索の細胞体から遠位において野生型のような局在を示す。

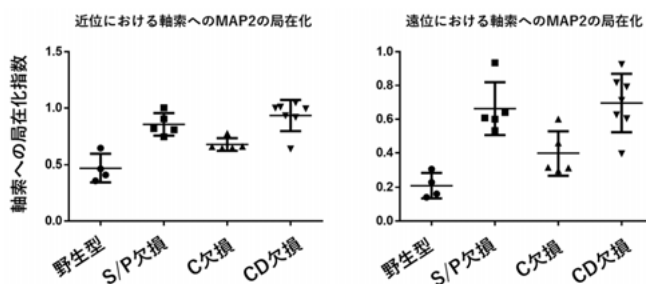


図 6 C と D の両方を欠損させると軸索の細胞体から遠い部位にも MAP2 が局在し、S/P 欠損のような局在様式を示す。

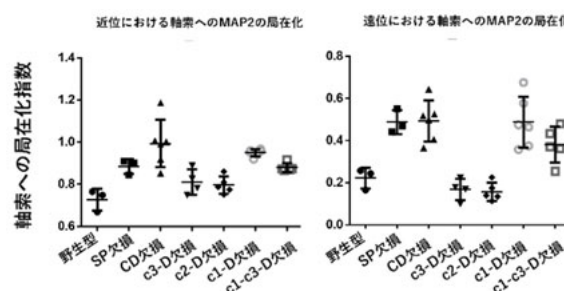


図 8 c1 と D の欠損だけで S/P 領域欠損と同様に、細胞体から近位、遠位両方に MAP2 が局在するようになる。

4. 研究者としてのこれからの展望

これまでに私は、大きく分けてふたつの研究に取り組んできた。それは、アルツハイマー病の原因タンパク質のひとつとして知られるアミロイドβ (Aβ) を産生する酵素についての研究とタンパク質の輸送・局在化メカニズムの研究である。大学院で取り組んだ Aβ 産生酵素の研究からタンパク質の輸送の研究に分野が変わった当初は新しい知識や手法を学ぶ必要があり大変だった。しかし、タンパク質輸送の研究分野でいろいろと勉強できたおかげで、異なる分野の考え方や実験手法に触れることができ、それまでと違う視点で過去の自分の研究を見直すことができるようになったと感じている。大学院では主に酵母を用いて研究を行い、その後は培養細胞、ラット脳のプライマリーカルチャー(生体から脳を取り出しその細胞をディッシュで培養すること)と多種多様な実験系でこれまで実験を行ってきた。このような経験から、幅広くいろいろな分野で得た知識を大事にしながら自分の興味のある研究分野で解決されていない課題に取り組んでいきたい。これまで身に付けてきた実験手法と異分野で使われている手法を組み合わせ、いろいろな分野を渡り歩いてきた自分にしかできない研究で新しい発見を可能にしていきたい。このような研究によって得られた成果が、他の研究者や一般の人の何らかの役に立てば幸いである。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は本奨励金に採択していただき、ご寄付いただきました企業様、関係者の皆様、日本私立学校振興・共済事業団の方々には深く感謝申し上げます。研究に必要な試薬類を購入できたことにより、以前より行いたいと考えていた実験を行うことができ、MAP2が適切な場所に存在するための詳細なメカニズムの解明にさらに一歩近づくことができました。今後はこの研究で得られた局在制御メカニズムがMAP2以外のタンパク質にも当てはまるのかどうかという点に着目したいと考えています。これによって、タンパク質の異常局在によって引き起こされる問題を解決できる可能性があると考えています。本奨励金によって、試薬類の購入のほかにも研究設備の向上もすることができました。これによって時間を有効に使えるようになり、研究意欲をさらに高めることができた点でも非常に有意義な1年を送ることができたと考えております。今回の支援で得られた研究成果で次の研究費の獲得に繋げていくことができればと考えております。

競争的資金全般を考えると、科研費を獲得していない研究者が得られる本奨励金のような助成金は珍しく、且つこのような救済的性質のある助成金は、若手研究者にとって非常に意義があり、私自身も研究を遂行するにあたり非常に助けられました。今後もこれまで取り組んできた研究や研究手法をもとに新しい疑問や解決が望まれている課題に取り組み、研究成果を基に社会還元できるよう邁進してまいります。

