

# 細胞内物質輸送と分子モーターKinesin superfamily proteins, KIFs; 構造、動態、機能

東京大学大学院医学系研究科 廣川信隆

細胞はその形作りおよび機能発現に必要な蛋白および脂質を合成した後、多種類の膜小器官あるいは蛋白複合体として必要とされる部位に、巧妙に送り分けており、この物質輸送の機構は神経細胞や極性のある上皮細胞のみでなくあらゆる細胞で細胞機能の要となっている。

私たちはビデオ光学顕微鏡や電子顕微鏡での解析から、微小管をレールとする多種類のモーター分子の存在を予測し、新しいモーター分子群 KIFs (Kinesin Super Family Proteins) を同定し分子細胞生物学的、分子生物物理学的、構造生物学的及び分子遺伝学的手法を駆使したその構造と機能の解析により、物質輸送の機構を理解しようとしている。現在まで私たちは哺乳類 (マウス、ヒト) で、KIF1A, 1B $\alpha$ , 1B $\beta$ , 2A, 2B, 3A, 3B, 4, 5A, 5B, 5C, 17 および KIFC1, C2, C3 を始めとして 45 種すべての遺伝子を同定している。このシンポジウムでは、KIF1A, KIF1B $\beta$ , KIF3, KIF5s, KIF17 そして KIF2 について紹介する。

KIF1A は神経特異に発現され、シナプス小胞の前駆体を運び、神経細胞の生存に必須である。それに対し KIF1B $\alpha$  は多くの細胞に発現されミトコンドリアを輸送する。最近我々は、KIF1B $\alpha$  の isoform であるが C 末端の cargo との結合部位が全く異なる KIF1B $\beta$  を発見し、KIF1B $\beta$  がシナプス小胞の前駆体を輸送しヒト先天性神経疾患の原因遺伝子であることを明らかにした。また我々は KIF モーター分子の基本的性質である微小管上の processive な運動の機構及び微小管のプラス端方向へ動く機構を、ユニークなモノマー型モーターである KIF1A モーター領域単分子に一つの蛍光を標識しこの動きの直接観察、クライオ電顕による KIF1A モーター領域と微小管複合体の超微細三次元構造の解析、そして KIF1A モーター領域の X 線結晶解析により解明した。この結果、KIF1A は Biased Brownian Movement によって作動していることが分かった。

KIF3A は KIF3B とヘテロダイマーを形成し、 $\sim$ 100KD の結合蛋白 KAP3 を持つ。gene targeting による KIF3B $-/-$  及び KIF3A $-/-$  のマウスは体の左右決定がランダムであった。左右非対称性の発現に重要である Node を解析すると Node 上皮細胞の monocilium (単線毛) が KIF3B $-/-$  及び KIF3A $-/-$  では欠損しており、また、野生型ではこの Monocilium 内に KIF3 が局在しており、KIF3 が monocilium を形成する蛋白群を輸送している事が明らかとなった。さらにこの monocilia をビデオ顕微鏡で観察すると今まで動かないと思われていた monocilia が活発に回転運動しておりその結果 Node の領域のみで全体として細胞外液の左向きの流れを形成していることが示され、これを Node 流と命名した。この Node 流が特定の分泌性 Morphogen の濃度勾配を作り、左側での左右軸決定にかかわる遺伝子群の発現を開始する事が強く示唆された。このように KIF3 は Node の線毛の材料を輸送する事により線毛を形成し体の左右軸という発生学上の重要な決定に大きな役割を担っていることを明らかとし、またごく最近 Morphogen の物質基盤を解明した。

さらに我々は神経樹状突起内で記憶・学習等の基本的神経機能に関連する NMDA 受容体を含む小胞が KIF17 モーターにより輸送され、KIF17 は mLin10 (Mint1) - mLin-2 (CASK) - mLin-7 (MALS/Velis) - NR2B 蛋白複合体を形成する事により NMDA 受容体を輸送する事を明らかにし、KIF17 を overexpress すると、マウスの記憶学習能力が向上することを示した。また新しい KIF13A が、KIF13A tail-AP-1 adaptor complex を介して Mannose-6-phosphate

receptor に結合し、これを含む小胞をゴルジ装置から形質膜へと輸送することも明らかにし、長年不明であったモーター分子がどのように cargo と結合するのかという問題にも解答を与えた。さらに、私達は AMPA 型グルタミン酸受容体が Kinesin (KIF5) により Kinesin 尾部-GRIP1-GluR2 の結合を介して樹状突起に運ばれ、樹状突起 vs 軸索への振り分け輸送が GRIP1 等の結合蛋白により制御されていることも明らかとした。さらに KIF5 はその尾部に mRNA と多数の蛋白複合体を結合し、これを神経樹状突起内で輸送する事を明らかとした。ごく最近我々は中央にモーター領域のあるユニークな KIF2 が神経成長端での微小官の重合を抑制することにより、軸索側枝の伸長を制御することによって神経回路形成に必須な役割を果たしている事を示した。さらに KIF2 の微小管脱重合能に必須な部分の ADP 状態、ATP 様状態の X 線結晶解析により KIF2 がどのようにして微小管を脱重合するかを示した。この様に KIFs は細胞にとって重要な機能分子を含む膜小器官や蛋白複合体を輸送するだけでなく、左右軸決定のような発生学上の重要な現象あるいはレール微小管を脱重合させることにより神経回路形成を制御した学習、記憶等も制御している事も明らかとなった。



## Reference

- (1) **Hirokawa, N.** Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J. Cell Biol.* 94: 129-142. 1982.
- (2) **Hirokawa, N., K. K. Pfister, H. Yorifuji, M. C. Wagner, S. T. Brady, and G. S. Bloom.** Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* 56: 867-878. 1989.
- (3) **Okabe, S. and N. Hirokawa.** Turnover of fluorescently labelled tubulin and actin in the axon. *Nature* 343: 479-82. 1990.
- (4) **Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, T. Yoshida, and T. Kawashima.** Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J. Cell Biol.* 111: 1027-1037. 1990.
- (5) **Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, N. Kobayashi, K. K. Pfister, G. S. Bloom, and S. T. Brady.** Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J. Cell Biol.* 114: 295-302. 1991.
- (6) **Aizawa, H., Y. Sekine, R. Takemura, Z. Zhang, M. Nangaku, and N. Hirokawa.** Kinesin family in murine central nervous system. *J. Cell Biol.* 119: 1287-1296. 1992.
- (7) **Kondo, S., R. Sato-Yoshitake, Y. Noda, H. Aizawa, T. Nakata, Y. Matsuura, and N. Hirokawa.** KIF3A is a new microtubules-based anterograde motor in the nerve axon. *J. Cell Biol.* 125:1095-1107, 1994.
- (8) **Sekine, Y., Y. Okada, Y. Noda, S. Kondo, H. Aizawa, R. Takemura, and N. Hirokawa.** A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *J. Cell Biol.* 127: 187-201. 1994.
- (9) **Nangaku, M., R. Sato-Yoshitake, Y. Okada, Y. Noda, R. Takemura, H. Yamazaki, and N. Hirokawa.** KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79: 1209-1220. 1994.
- (10) **Noda, Y., R. Sato-Yoshitake, S. Kondo, M. Nangaku, and N. Hirokawa.** KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J. Cell Biol.* 129: 157-167. 1995.
- (11) **Okada, Y., H. Yamazaki, Y. Sekine-Aizawa, and N. Hirokawa.** The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 81: 769-780. 1995.
- (12) **Kikkawa, M., T. Ishikawa, T. Wakabayashi, and N. Hirokawa.** Three-dimensional structure of the kinesin head-microtubule complex. *Nature* 376: 274-277. 1995.
- (13) **Yamazaki, H., T. Nakata, Y. Okada, and N. Hirokawa.** KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J. Cell Biol.* 130: 1387-1399. 1995.
- (14) **Hirokawa, N.** Organelle transport along microtubule - the role of KIFs (Kinesin superfamily proteins). *Trend Cell Biol.* 6:135-141. 1996.
- (15) **Terada, S., T. Nakata, A. C. Peterson, and N. Hirokawa.** Visualization of slow axonal transport in vivo. *Science* 273: 784-788. 1996.
- (16) **Yamazaki, H., T. Nakata, Y. Okada, and N. Hirokawa.** Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B. *PNAS* 93: 8443-8448. 1996.
- (17) **Saito, N., Y. Okada, Y. Noda, Y. Kinoshita, S. Kondo, and N. Hirokawa.** KIFC2 is a novel neuron-specific

- C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* 18: 425-438. 1997.
- (18) Hirokawa, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279: 519-526. 1998.
- (19) Yonekawa, Y. A. Harada, Y. Okada, T. Funakoshi, Y. Kanai, Y. Takei, S. Terada, T. Noda, and N. Hirokawa. Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J. Cell Biol.* 141: 431-41. 1998.
- (20) Tanaka, Y., Y. Kanai, Y. Okada, S. Nonaka, S. Takeda, A. Harada, and N. Hirokawa. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93: 1147-1158. 1998.
- (21) Nonaka, S., Y. Tanaka, Y. Okada, S. Takeda, A. Harada, Y. Kanai, M. Kido, and N. Hirokawa. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95: 829-837. 1998.
- (22) Okada, Y. and N. Hirokawa. A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* 283: 1152-1157. 1999.
- (23) Kikkawa, M., Y. Tanaka, Y. Okada, S. Takeda, A. Harada, Y. Kanai, M. Kido, and N. Hirokawa. 15 Angstrom resolution model of the monomeric kinesin motor, KIF1A. *Cell* 100: 241-252. 2000.
- (24) Setou, M., T. Nakagawa, D. H. Seog, and N. Hirokawa. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288: 1796-1802. 2000.
- (25) Terada, S., M. Kinjo, and N. Hirokawa. Oligomeric tubulin in large transporting complex is transported via kinesin in squid giant axons. *Cell* 103: 141-155. 2000.
- (26) Nakagawa, T., M. Setou, D. Seog, K. Ogasawara, N. Dohmae, K. Takio, and N. Hirokawa. A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 103: 569-581. 2000.
- (27) Miki, H., M. Setou, K. Kaneshiro, and N. Hirokawa. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *PNAS* 98: 7004-7011, 2001.
- (28) Kikkawa, M., E. P. Sablin, Y. Okada, H. Yajima, R. J. Fletterick, and N. Hirokawa. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* 411: 439-445. 2001.
- (29) Zhao, C., J. Takita, Y. Tanaka, M. Setou, T. Nakagawa, S. Takeda, H. W. Yang, S. Terada, T. Nakata, Y. Takei, M. Saito, S. Tsuji, Y. Hayashi, and N. Hirokawa. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105: 587-597. 2001.
- (30) Setou, M., D.-H. Seog, Y. Tanaka, Y. Kanai, Y. Takei, M. Kawagishi, and N. Hirokawa. Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417: 83-87. 2002.
- (31) Wong, R. W.-C., M. Setou, J. Teng, Y. Takei, and N. Hirokawa. Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *PNAS* 99: 14500-14505. 2002.
- (32) Guillaud, L., M. Setou, and N. Hirokawa. KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 23: 131-40. 2003.
- (33) Homma, N., Y. Takei, Y. Tanaka, T. Nakata, S. Terada, M. Kikkawa, Y. Noda, and N. Hirokawa. Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* 114: 229-239, 2003.
- (34) Okada Y., H. Higuchi, and N. Hirokawa. Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. *Nature* 424: 574-577, 2003.
- (35) Ogawa, T., R. Nitta, Y. Okada, and N. Hirokawa. A common mechanism for microtubule destabilizers - M-type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* 116: 591-602, 2004.
- (36) Nitta, R., M. Kikkawa, Y. Okada, and N. Hirokawa. KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules. *Science* 305: 678-683, 2004.
- (37) Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43: 513-525, 2004.
- (38) Teng J., T. Rai, Y. Tanaka, Y. Takei, T. Nakata, M. Hirasawa, A. B. Kulkarni, and N. Hirokawa. The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium *Nature Cell Biology.* 7:474-482, 2005.
- (39) Tanaka, Y., Y. Okada, and N. Hirokawa. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination *Nature* 435:172-177, 2005.
- (40) Okada, Y., S. Takeda, Y. Tanaka, J.-C. I. Belmonte and N. Hirokawa. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121:633-644, 2005.
- (41) Hirokawa, N. and R. Takemura. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature Reviews Neuroscience* 6:201-214, 2005.