

43. 軸索輸送病モデル線虫を用いた治療標的分子の探索

丹羽 伸介

東北大学 学際科学フロンティア研究所 先端学際基幹研究部 丹羽グループ

Key words : KIF1A 関連神経疾患, 軸索輸送, 線虫, シナプス小胞

緒言

軸索内のタンパク質やオルガネラはすべて細胞体で合成されたのちに軸索の目的地まで輸送される。この現象を軸索輸送と呼ぶ [1]。細胞体から軸索末端に向かう輸送を順行性の軸索輸送、軸索末端から細胞体に向かう輸送を逆行性の軸索輸送と呼ぶ。順行性の軸索輸送は多数のキネシンスーパーファミリータンパク質 (KIF) が担うのに対して、逆行性の軸索輸送は1つの細胞質ダイニン複合体が担っている。特にシナプス小胞やシナプス前膜の成分の順行性の軸索輸送を担う分子モータータンパク質が KIF1A である [1]。KIF1A 遺伝子の変異は家族性の遺伝性痙性対麻痺の原因になっていることがわかっていたが、最近の全ゲノムシーケンス技術の発展によって孤発性の先天性の神経疾患でも KIF1A 遺伝子の変異が多数同定されてきている。KIF1A を原因とする神経疾患を KIF1A 関連神経疾患 (KIF1A-associated neuronal disorder, 略して KAND) と呼ぶ [2]。KAND の患者では遺伝子変異の位置によって、進行性の痙性対麻痺だけでなく、自閉症、発達障害、精神遅滞、視神経の変性などの様々な神経症状が見られる。アメリカでは患者団体 (kif1a.org) も作られている。私たちのグループは kif1a.org から遺伝子変異や症状といった情報を提供してもらいながら、KAND 発症のメカニズムや治療法の探索を行ってきた。

線虫は神経細胞生物学のモデルとして世界中で用いられている。ヒト KIF1A の線虫オルソログは UNC-104 と呼ばれる [3]。unc-104 欠損変異体ではシナプス形成に異常が起こる。unc-104 変異体ではシナプスが本来あるべき軸索内に形成されず、細胞体周辺や本来は樹状突起だった場所に形成される現象がみられる。その結果、unc-104 変異体は線虫の運動に異常が起こる。

我々はヒト KIF1A 遺伝子を線虫に発現するとレスキューすることができることを見つけている [4]。これは軸索輸送メカニズムは種を超えて保存されていることを示唆する。本研究では KAND の遺伝子変異の解析にこの手法を応用した。また、ゲノム編集によって unc-104 遺伝子にヒト KIF1A の KAND 変異に相同な変異を導入することで KAND モデル線虫を確立した。この KAND モデル線虫を用いてサプレッサー変異を単離し、シナプス形成の基本的なメカニズムを探ると共に、KAND の治療標的となり得る因子の探索を行った。トランスジェニックを用いた KAND 変異の機能解析の一部は論文掲載済みである [5]。

方法

1. トランスジェニック (外来遺伝子発現) 線虫を用いた KAND の原因解析

線虫 (*C.elegans*) の飼育は常法によって 20°C で行った。KIF1A の変異による神経疾患は機能欠損による軸索輸送の減少が原因の場合と、機能亢進による軸索輸送の増加が原因の場合とがある [4]。KIF1A 関連神経疾患でよく見られる KIF1A (R254Q) 変異および KIF1A (P305L) 変異が機能欠損型変異であるのか、機能亢進型変異であるのかを区別するために、線虫の KIF1A オルソログである unc-104 の欠損変異体にヒト KIF1A の cDNA を発現することでレスキューを行った。

2. ゲノム編集を用いた KAND モデル線虫の作製

ゲノム編集は addgene に寄託されている cas9 発現プラスミド pDD162 を用いることで行った。ヒト KIF1A の点変異 R245Q は KAND で最も多く見られるアミノ酸置換である。線虫の KIF1A のオルソログである *unc-104* 遺伝子では R251Q 変異に相当する。線虫に点変異 R251Q を導入するので R251Q を含む repair template (R251Q 周辺の 100bp) を pDD162 および guide RNA 発現ベクターと共に線虫の生殖腺にインジェクションした。R251Q 変異が導入された線虫は *unc* (uncoordinate、線虫の運動に異常がある) の表現型がでることが予測されたので、インジェクションした親から生まれた子の世代で運動に異常がある個体を単離した。単離した線虫を増やして、*unc-104* 遺伝子のゲノム領域を KOD FX neo (東洋紡) によって増幅し、シーケンスを決定した。その結果、狙い通り、複数の株で R254Q 変異が導入されていることが確認できた。

3. サプレッサースクリーニング (ランダム mutagenesis)

作製した *unc-104* (R251Q) 線虫を 8 枚の 6 cm プレート上で増やした。L4 ステージに達したところで、常法に従って変異原であるメタンスルホン酸エチル (EMS) による処理を行った。処理後の線虫を 20 枚の 10 cm プレートに分けて 20°C で培養を続けた (約 10 日間)。プレート上の線虫のほとんどは運動に異常があり、動くことができない。その中で、運動の異常が回復し、野生型線虫のようにサインカーブを描いて運動する個体を見つけて単離して培養した。

4. サプレッサースクリーニング (candidate screening)

私たちのこれまでの研究で small GTPase である *arl-8* の変異体では軸索輸送の量が減っていることがわかっている。*arl-8* の軸索輸送異常を回復するサプレッサ変異体を単離し、その原因遺伝子を探索することで多数の分子が得られている。これらの分子の変異は軸索輸送を増加させると考えられることから、*unc-104* (R251Q) 変異体における軸索輸送を回復する可能性があると考えられた。そこで *arl-8* のサプレッサ群を *unc-104* (R254Q) 変異体とかけ合わせた。掛け合わせ後は PCR やゲノム DNA のシーケンスを行い、遺伝型を確定した上でシナプスの局在や線虫の運動を指標にして異常が緩和しているかどうかを解析した。

結 果

1. KIF1A 関連神経疾患変異の分類

線虫の *unc-104* 欠損変異体ではシナプス小胞やシナプス前膜の構成成分の軸索輸送が低下するため、シナプスの局在に異常が起こる。結果として線虫は正常な運動ができない表現型を呈する。*unc-104* 遺伝子のプロモーターを用いて線虫の神経細胞にヒトの *KIF1A* 遺伝子の cDNA を発現すると、線虫は運動能を回復する。このことからヒト KIF1A と線虫 *UNC-104* の軸索輸送に関する機能は種を超えて保存されていると言える。疾患変異が loss of function 型変異だった場合は、その変異を導入した KIF1A の cDNA では線虫の運動はレスキューできないはずである。この系を利用し、KIF1A 関連神経疾患で多く見られる R254Q 変異および P305L 変異を導入した KIF1A の cDNA を線虫に導入した。その結果、R254Q および P305L 変異では *unc-104* 変異体をレスキューできないことがわかった (図 1)。このことは KIF1A 関連神経疾患で頻発する R254Q、P305L 変異がシナプス小胞の材料を軸索輸送する活性を低下させることを示唆している。

2. KIF1A 関連神経疾患モデル線虫の確立

トランスジェニックによってレスキューした線虫は変異型のヒト KIF1A が過剰発現しているため、そのままでは治療標的となるような因子を遺伝学的に探索する目的では使いにくい。KIF1A による軸索輸送に関与する因子や KAND の基礎研究、治療のための標的因子を単離するために、ゲノム編集によってヒト KIF1A 変異と相同な遺伝子変異を持つ KAND のモデル線虫を確立することを目指した。線虫は世界中で神経細胞生物学のモデルとして用いられている。線虫では CRISPR/cas9 によるゲノム編集による点変異の導入が比較的容易に実施可能である。

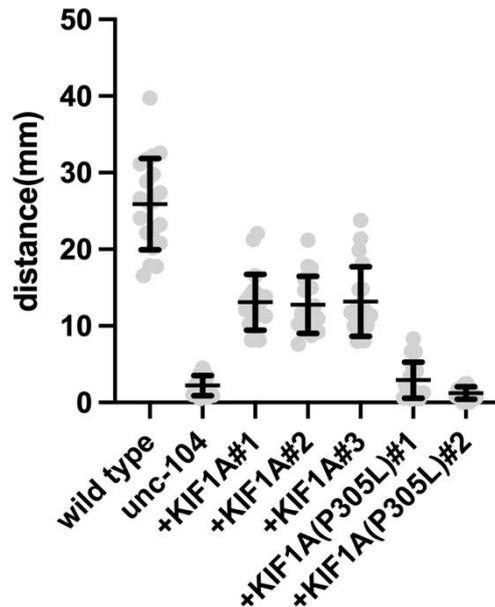


図1. ヒトKIF1AのcDNAによる*unc-104*変異体線虫のレスキュー実験の例
線虫*unc-104*変異体にヒトKIF1AのcDNAを導入し、プレート上を1分間に動く距離を定量した。健常人型のKIF1AcDNAを導入した場合は運動の低下がレスキューされる。一方、P305L変異を導入した場合はレスキューできない。

3. EMS mutagenesis 法によるサブレッサーの単離

unc-104 (R251Q) 株を元にして EMS 処理を行い、運動が回復した線虫株を同定した。その結果、8つのサブレッサー変異体を同定することができた。ゲノムシークエンスを行って変異の位置を特定したところ、サブレッサー変異はすべて *unc-104* 遺伝子のモータードメイン内に見られた。

4. 軸索輸送増強因子は KAND の治療標的になり得るか?

私たちはこれまでに行ってきた研究で軸索輸送を亢進する遺伝子変異を複数見つけてきた(発表済み因子の例 [6])。その中の一つである *jip-1* (哺乳類の JIP1、MAPK8IP1) の変異体と 2 重変異体を作製したところ、KAND モデル線虫の運動が部分的に回復した。シナプスの局在を観察したところ、軸索内から消失して細胞体近傍に集積していたシナプスが *jip-1* との二重変異体では軸索内に局在を回復することがわかった。

考 察

KAND モデル線虫を用いて遺伝学的な解析を行った結果、1. 分子モータータンパク質の遺伝子変異自体、2. *jip-1* 遺伝子の loss of function 変異が軸索輸送を回復させることがわかった。分子モータータンパク質遺伝子自体の変異は分子モーターの運動を回復させていると考えられるため、現在、1分子アッセイによってその運動特性を計測中である。*jip-1* の loss of function 型変異が KAND モデル線虫のシナプスの局在や運動を回復させることは、JIP1 の阻害剤が治療標的薬となりうることを示唆している。JIP1 阻害剤は抗ガン剤としてフェーズ 3 の治験実施中である。KAND の患者由来の iPS 細胞から誘導した運動ニューロンなどを使って JIP1 阻害剤がヒト細胞で軸索輸送を回復させるかどうかを検証したい。また、*jip-1* 変異が軸索輸送を増加させる分子メカニズムも興味深い。今後は *jip-1* の軸索輸送における機能解析を行う予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、カリフォルニア大学デイビス校 Richard McKenney 博士である。また、KAND の患者団体 kif1a.org からは遺伝子変異情報の提供などをしていただいた。

文献

- 1) Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Oct;10(10):682-96. doi: 10.1038/nrm2774.
- 2) PMID: 33880452 Boyle L, Rao L, Kaur S, Fan X, Mebane C, Hamm L, Thornton A, Ahrendsen JT, Anderson MP, Christodoulou J, Gennerich A, Shen Y, Chung WK. Genotype and defects in microtubule-based motility correlate with clinical severity in KIF1A-associated neurological disorder. *HGG Adv.* 2021 Apr 8;2(2):100026. doi: 10.1016/j.xhgg.2021.100026. Epub 2021 Jan 30. PMID: 33880452
- 3) Hall DH, Hedgecock EM. Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell.* 1991 May 31;65(5):837-47. doi: 10.1016/0092-8674(91)90391-b. PMID: 1710172
- 4) Chiba K, Takahashi H, Chen M, Obinata H, Arai S, Hashimoto K, Oda T, McKenney RJ, Niwa S. Disease-associated mutations hyperactivate KIF1A motility and anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Sep 10;116(37):18429-18434. doi: 10.1073/pnas.1905690116. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31455732
- 5) Lam AJ, Rao L, Anazawa Y, Okada K, Chiba K, Dacy M, Niwa S, Gennerich A, Nowakowski DW, McKenney RJ. A highly conserved 310 helix within the kinesin motor domain is critical for kinesin function and human health. *Sci Adv.* 2021 Apr 30;7(18):eabf1002. doi: 10.1126/sciadv.abf1002. PMID: 33931448
- 6) Niwa S, Lipton DM, Morikawa M, Zhao C, Hirokawa N, Lu H, Shen K. Autoinhibition of a Neuronal Kinesin UNC-104/KIF1A Regulates the Size and Density of Synapses. *Cell Rep.* 2016 Aug 23;16(8):2129-2141. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.043. Epub 2016 Aug 11. PMID: 27524618