

【目的】 KIF1A は、ATP の加水分解エネルギーを使用してシナプス小胞前駆体や高親和性ニューロトロフィン受容体を軸索先端に輸送する分子モーターである。軸索型シャルコー・マリー・トゥース病 (CMT2) の患者家系において、KIF1A の一塩基変異を同定した。この変異により、KIF1A タンパク質のモータードメイン内にある $\beta 7$ 領域に電荷の逆転が生じる。 $\beta 7$ 領域は、モータードメインの中で機能的に重要とされてきたヌクレオチド結合領域や微小管結合領域とは離れた領域であり、その機能は不明である。本研究では、KIF1A の軸索輸送における $\beta 7$ の機能と、 $\beta 7$ 変異による CMT2 発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】 $\beta 7$ 変異が KIF1A の軸索輸送にどのような影響を与えるかを明らかにするため、*Kif1a*^{+/-}マウスの DRG ニューロンに $\beta 7$ 変異体を導入し、痛みや熱さの感覚の発生に関わる KIF1A カargo である TrkA 及び TRPV1 の軸索遠位部での局在を調べた。次に、軸索における $\beta 7$ 変異体のモーター活性を調べるため、蛍光標識した $\beta 7$ 変異体を DRG ニューロンに発現させ、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いてライブイメージングを行い、軸索輸送の速度・頻度・方向を野生型 KIF1A と比較した。さらに $\beta 7$ 領域のモーター活性能をより詳細に調べるため、ATPase 活性を保持する最小単位のモータードメインコンストラクトを用いて、 $\beta 7$ 変異体の *in vitro* モーター活性を測定した。微小管滑走運動アッセイと ATPase アッセイを行い、ガラスに固定した KIF1A が微小管を動かす速度、微小管上運動に伴う ATP 加水分解速度、微小管との親和性について、野生型 KIF1A と変異体を比較した。

【結果】 先行研究による報告と同様に、*Kif1a*^{+/-}マウスの DRG ニューロンでは細胞表面の TrkA の局在が有意に減少していた。この *Kif1a*^{+/-}マウスの DRG ニューロンに野生型 KIF1A を発現させると細胞表面の TrkA の局在は回復したが、 $\beta 7$ 変異体を発現させた場合は細胞表面の TrkA の局在は回復しなかった。細胞表面の TRPV1 についても同様の結果が得られ、 $\beta 7$ 変異体はカargo の輸送に障害があることがわかった。また、蛍光標識した野生型と変異型の KIF1A を DRG ニューロンに導入し、遠位軸索の粒子の動きを観察したところ、軸索内輸送の速度が $\beta 7$ 変異体の方が野生型よりも約 25%遅いことがわかった。この遅い輸送の原因を探るため、*in vitro* での運動活性を確かめた。微小管滑走運動アッセイにより KIF1A が微小管を動かす速度を測定すると、軸索内での動きと同様、 $\beta 7$ 変異体の方が野生型よりも約 22%遅かった。さらに微小管存在下での ATP 加水分解速度を測定すると、 $\beta 7$ 変異体は野生型よりも ATPase 活性が低かった。一方で、微小管への親和性に違いはなかった。このことから $\beta 7$ 変異は、微小管との結合に影響しないが、ATP 加水分解のサイクルに遅れをもたらすことがわかった。キネシンの三次元構造から $\beta 7$ 領域は ATP 結合時にネックリンカー領域と相互作用するため、 $\beta 7$ 変異体では電荷の逆転によってネックとの間に異常に強い相互作用が生まれることが示唆される。その結果、ネックリンカーの構造変化に伴うリン酸の放出が遅れ、モーター活性の低下につながると考えられる。

$\beta 7$ 変異体が CMT2 を引き起こすメカニズム

