

【目的】 神経細胞における細胞体から神経終末に至るまでの軸索輸送は記憶・学習・情動など高次脳機能において決定的な役割を果たす。インポーチン α (KPNA) やインポーチン β (IPO β) は代表的な核移行因子であり、細胞質から核内への基質の輸送により様々なシグナルを核内へと伝える機能を持つ。近年、統合失調症や自閉症スペクトラム障害 (ASD)、注意欠如・多動性障害 (AD/HD) などの精神・発達障害に核移行因子が関与することが報告されている。また、ストレス顆粒や凝集体の解消にインポーチンがシャペロンとして機能するなど、インポーチンが核移行以外の機能を有する多機能因子であることが明らかとなりつつある。本研究で代表者らは神経軸索中の KPNA の機能に着目した。特に、KPNA ファミリーの中でも脳内で顕著に高発現がみられる KPNA1 に着目した。細胞質ダイニン (以下ダイニンと呼称) との関係に着目し、核移行とは異なるインポーチンの神経軸索における機能の解析を目指し、精神・神経疾患の新たな治療方法開発を目指した。

【方法】 まず、ラットの大腿神経をモデルに構成タンパク質群を LC-MS/MS による質量分析を用いて同定した。さらに、大腿神経を結紮し抗細胞質ダイニン中間鎖 (DIC) 抗体、抗 KPNA1 抗体を用いて免疫沈降を行い、それぞれの分子複合体の単離を試み、質量分析による同定を行った。加えて、GFP/RFP 誘導体と KPNA、IPO β 、DIC 等との融合タンパク質を共焦点顕微鏡で観察する他、FRAP による動態解析を試みた。さらに、様々な変異を有する KPNA1 を作製し、蛍光観察することでその動態の変化を調べた。

【結果】 ラット大腿神経軸索抽出物を LC-MS/MS による質量分析で解析した結果、複数のインポーチン α/β 分子、低分子量 G タンパク質 Ran などが含まれることが明らかとなった。また、同抽出物からダイニン中間鎖および KPNA1 抗体で免疫沈降を行った結果、ダイニン中間鎖によりインポーチン分子が、KPNA1 抗体によるダイニンの沈降が確認され、インポーチンとダイニンが軸索中で複合体として存在することが示唆された。さらにマウス後根神経節 (DRG) の一次培養細胞に GFP/RFP の誘導体とダイニンもしくはインポーチン関連因子との融合タンパク質の遺伝子導入を行い、その動態を解析した。FRAP や共焦点顕微鏡観察の結果、KPNA1 や IPOB1 が軸索中においてアクティブに運搬され、さらにドット状の顆粒を形成して軸索中に局在している様子が観察された。これらの顆粒は順行方向、逆行方向に分子モーターによって運搬されていた。統合失調症の原因となる変異を有する KPNA1 を導入し、その動態を観察したところ、核への異常集積が確認された。現在はこの変異におけるダイニンと KPNA1 の相互作用変化を確認中である。以上の結果は、核移行とは異なる軸索におけるインポーチンの機能と、疾患の原因を考える上で非常に重要な知見である。

後根神経節細胞軸索におけるインポーチン α/β 分子の運動軌跡

