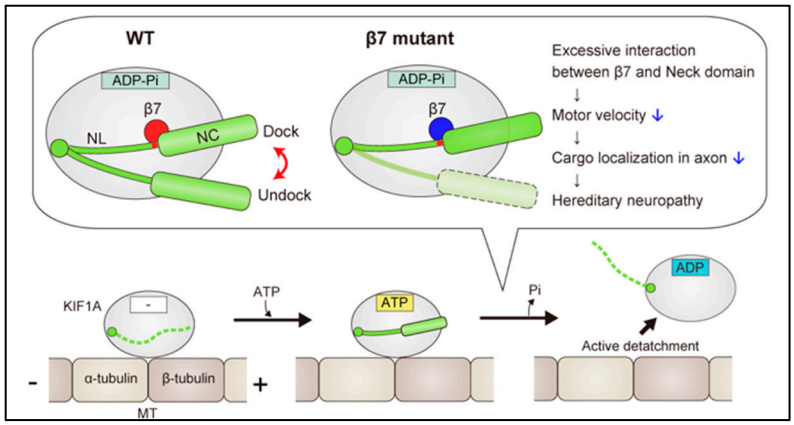
46　分子モーターの遺伝子変異による神経難病病態生理の研究	廣川　信隆

【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 β7 領域に電荷の逆転が生じる。β7 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 β7 の機能と、β7 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】β7 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 β7 変異体を導入し、痛みや熱さの感覚の発生に関わる KIF1A カーゴである 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 β7 変異体のモーター活性を調べるため、蛍光標識した β7 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 β7 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、β7 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、β7 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、β7 変異体はカーゴ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 β7 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、β7 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、β7 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 β7 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 β7 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、β7 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。

β7 変異体が CMT2 を引き起こすメカニズム



46. 分子モーターの遺伝子変異による神経難病病態生理の研究

廣川　信隆

東京大学 大学院医学系研究科 分子構造・動態・病態学講座

Key words : KIF1A, キネシン分子モーター, 遺伝子変異, シャルコー・マリー・トゥース病, CMT2

緒　言

KIF1A は、軸索輸送における主要なキネシンスーパーファミリーモーター分子群のひとつで、シナプス小胞前駆体や TrkA 含有小胞を細胞体から軸索先端に輸送する［1〜3］。マウス後根神経節（DRG）ニューロンでは、KIF1A が TrkA を細胞表面に提示することにより、PI3 キナーゼシグナル伝達経路を介したカプサイシン受容体 TRPV1 の活性が調節される［3］。このため KIF1A は痛みの発症に関与し、*Kif1a*$^{+/-}$マウスは進行性の感覚障害の表現型を持つ。このように KIF1A は神経の健康に必須であり、KIF1A の遺伝子変異はヒトの軸索神経障害および様々な神経症状と密接に関連している［4］。

シャルコー・マリー・トゥース病（CMT）は、下肢から始まる筋萎縮と感覚障害が上肢にまで進行し著しい QOL 低下をもたらす末梢神経性の神経変性疾患である。有病率は 1／2,500 人で、世界中に約 260 万人もの患者がいる［5］。CMT の発症メカニズムの全貌は未だ解明されておらず、CMT 特異的に効果のある治療法は開発されていない［6］。

今回、米国の研究協力者により軸索型 CMT（CMT2）を発症する家系において、KIF1A に一塩基ミスセンス変異が見つかった。この変異アミノ酸は、KIF1A モータードメインの中のβ7 領域にあり、β7 領域の電荷の逆転を生じる。β7 領域は、カーゴ結合・認識部位、ATP 結合部位、微小管結合部位などの KIF 分子内で重要と思われている構造要素とは離れており［7］、これまでにこの領域の変異が疾患に関わっていることは知られていなかった。我々が以前に解いたキネシンの三次元構造［8, 9］から予測すると、β7 領域は、ATP 結合時にネックリンカー領域と相互作用すると推定されるが、その機能は不明である。そこで本研究では、未解明の KIF1A 分子内相互作用が予想されるβ7 領域とネックリンカーの結合を探索し、キネシンの駆動メカニズムの理解を深めるとともに、β7 領域の異常がどのように CMT2 の発症に繋がるのかを明らかにする。

方　法

1. マウス DRG ニューロンの初代培養

DRG は 9〜12 ヶ月齢のオスの *Kif1a*$^{+/+}$および *Kif1a*$^{+/-}$マウスから単離した。単離された DRG 細胞をラミニンでプレコートした 8 ウェル Lab-Tek II チャンバーカバーグラス（Thermo Scientific）に撒いた。12 時間の培養後に培地を交換し、5%CO_2中 37℃で維持した。

2. マウス DRG ニューロンのライブイメージング

12 ヶ月齢の *Kif1a*$^{+/+}$マウスから単離された培養 DRG ニューロンに、DIV 4 で WT-EGFP および Mut-EGFP をコードするアデノウイルスベクターを形質導入した。アデノウイルスベクターによる形質導入の 24〜30 時間後に、共焦点レーザー走査顕微鏡（Airyscan, LSM780; Zeiss）を使用し、細胞体から約 150 μm 離れた軸索輸送を視覚化した。画像は、567 ミリ秒間隔で 250 フレーム取得した。データ分析とカイモグラフの作成は、Fiji ソフトウェアを使用した。粒子の速度と方向性は、カイモグラフの傾きから計算した。

3. DRG ニューロンにおける TrkA, TRPV1 の免疫細胞化学

9〜11 ヶ月齢の *Kif1a*$^{+/+}$および *Kif1a*$^{+/-}$マウスから分離された DRG ニューロンに、DIV 5 で WT-EGFP および Mut-EGFP をコードするアデノウイルスベクターを形質導入し、DIV 7 で固定・染色した。細胞表面の TrkA および TRPV1 を染色するために、透過処理のプロセスはスキップした。DRG ニューロンの軸索は、共焦点レーザー走査顕微鏡（Airyscan、LSM780、Zeiss）を使用し観察した。

4. KIF1A コンストラクトとタンパク質サンプルの準備

野生型、変異型 KIF1A モータードメイン（aa 1〜382）を大腸菌系で発現させ、アフィニティー精製、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより高純度で精製した。チューブリンはブタの脳から精製し、高モル濃度の Pipes バッファーを使用し重合・脱重合のサイクルを 6 回繰り返すことにより微小管関連タンパク質を除去した。

5. ATPase アッセイ

EnzChek リン酸アッセイキット（Molecular Probes）を使用し、分光光度計（V630-Bio、JASCO）を用いて 27℃で測定した。

6. 微小管滑走アッセイ

スライドガラスとカバーガラスから組み立てたフローチャンバー上に、ペンタ-His 抗体を用いて KIF1A を結合させた。そこにローダミン標識微小管溶液を注入し、微小管の動きを観察した。タイムラプス画像は、ELYRAP.1 システム TIRF 顕微鏡で 37℃で取得した。微小管滑走速度は、Fiji プラグイン Multi-kymograph で作成したカイモグラフの傾きから計算した。

結果および考察

1. CMT2 患者家系における KIF1A 変異

CMT2 患者家系において見つかった変異は、KIF1A タンパク質のモータードメインのβ7 シート内にある（図 1）。β7 は進化的に高度に保存されており、キネシン 3 ファミリーメンバータンパク質で共通であった［10］。

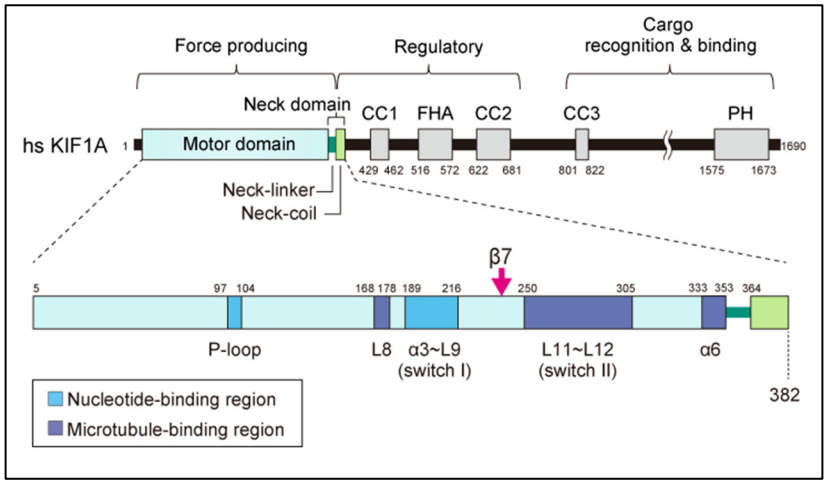


図1. KIF1Aのドメイン構造

KIF1Aタンパク質は、N末に推進力を生み出すモータードメインとネックドメイン、C末にカーゴとの結合ドメインを持つ。モータードメインにはATP結合部位や微小管結合部位変異が含まれるが、今回変異が見つかったβ7領域は、これらの部位とは離れていた。

2. KIF1A 変異体によるカーゴ輸送能の低下

β7 変異体が CMT2 患者の感覚神経にどのように影響するか明らかにするため、EGFP タグ付き野生型 KIF1A（WT-EGFP）とβ7 変異体（Mut-EGFP）を *Kif1a*$^{+/+}$ DRG ニューロンと *Kif1a*$^{+/-}$ DRG ニューロンに発現させ、軸索における TrkA と TRPV1 の局在を調べた。その結果、細胞表面の TrkA シグナルは、*Kif1a*$^{+/+}$よりも *Kif1a*$^{+/-}$の DRG ニューロンで有意に低く、この表現型は、WT-EGFP の過剰発現によってレスキューされたが、Mut-EGFP の過剰発現では WT-EGFP ほどレスキューされなかった（図 2A）。

同様に、NGF-TrkA シグナル伝達系によって細胞表面に提示されるカプサイシン受容体 TRPV1 の発現も、*Kif1a*$^{+/-}$では *Kif1a*$^{+/+}$よりも有意に減少した。この表現型も WT-EGFP でレスキューできるのに対し、Mut-EGFP ではレスキューされなかった（図 2B）。これらの結果は、β7 変異が *Kif1a*$^{+/-}$軸索の表現型を十分にレスキューすることができないことを示しており、β7 変異体がカーゴの適切な局在化を損なうことを示唆している［10］。

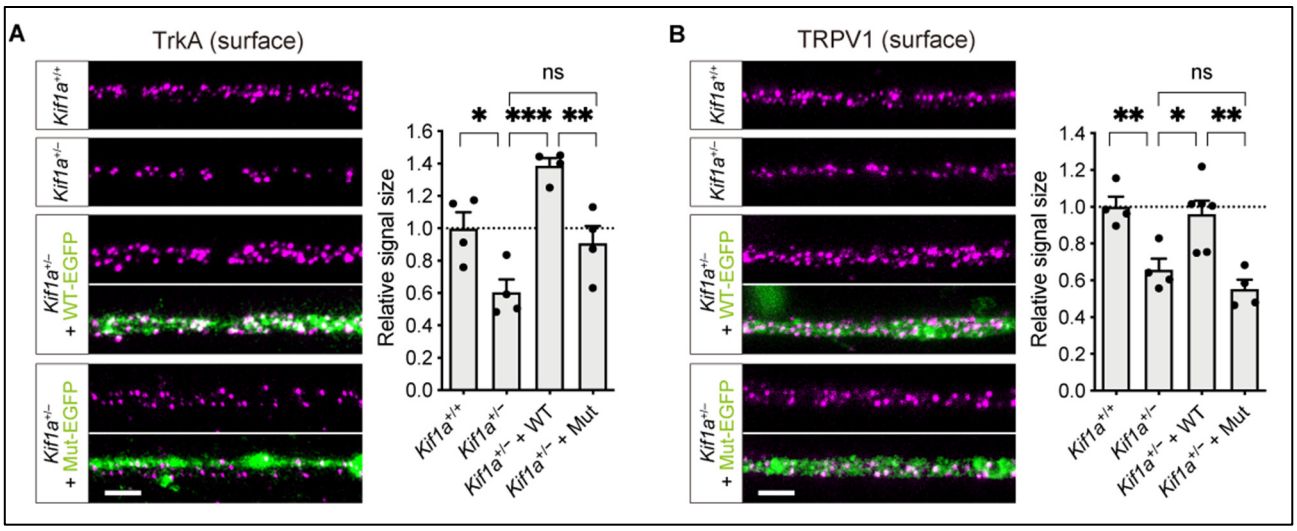


図2. WTおよびβ7変異体によるTrkA、TRPV1の軸索輸送

DRGニューロンの軸索表面におけるTrkA（A）、TRPV1（B）の免疫細胞化学および定量化グラフ。

ns：p＞0.05、*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001（Welch's t test）。エラーバーはSEMを示す。 スケールバー：2μm。

3. β7 変異体による軸索輸送スピードの低下

WT とβ7 変異体の軸索輸送活性の違いを調べるため、DRG ニューロンに発現させた WT-EGFP と Mut-EGFP のライブイメージングを実施した。その結果、野生型、変異型ともに KIF1A の動きが観察できた（図 3A）。速度は Mut-EGFP の方が WT-EGFP の速度より約 25%遅かった（図 3B）。動きの方向性に違いはなかった（図 3C）［10］。

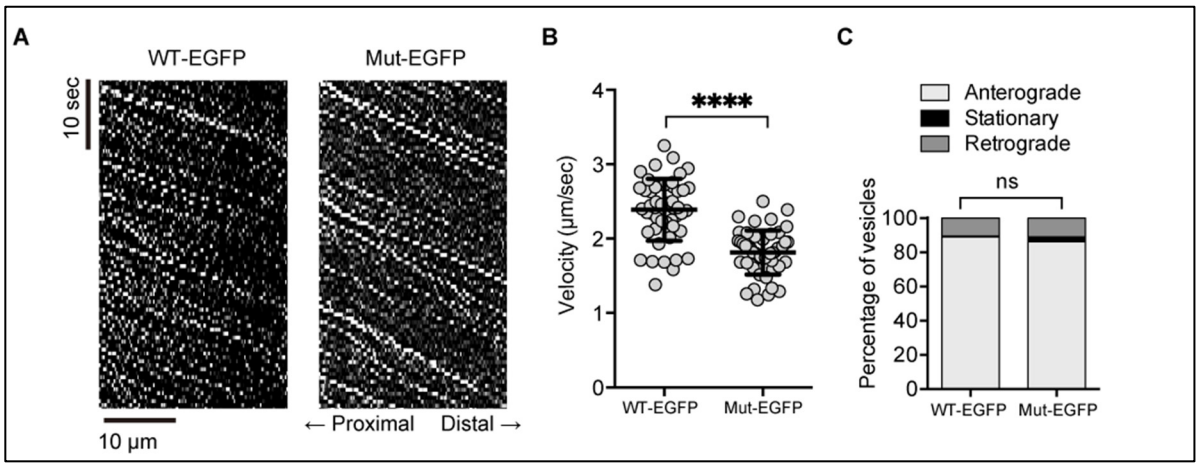


図3. WTとβ7変異体のライブイメージング

A) WT-EGFP および Mut-EGFP を発現する DRG ニューロンの小胞運動のカイモグラフ。

B) カイモグラフの傾きから計算された小胞の速度。 3 つの独立した実験からの平均と SD。 ****, p <0.0001; unpaired t test.

C) 観察開始時の小胞の方向。 ns : p = 0.1484（カイ二乗検定）。

4. β7 変異体の in vitro 運動活性の低下

KIF1A 運動活性に対するβ7 変異の影響をより詳細に明らかにするため、モータードメインコンストラクトを用いて *in vitro* 微小管滑走アッセイを実施した。その結果、β7 変異体による微小管の滑走速度は野生型による滑走速度よりも約 22%遅かった（図 4A)。

次に、微小管存在下でモータードメインコンストラクトの ATPase 活性を測定し、β7 変異体の速度の低下が ATP 加水分解活性の低下によるものかを検証した。その結果、β7 変異体の ATPase 活性は WT よりも約 27%低かった（図 4B)。この結果は微小管の滑走速度とほぼ相関しており、β7 変異体のモーター運動が遅いことを説明できた。一方、β7 変異体のミカエリスメンテン定数（*K*m）から、微小管結合親和性は W T とβ7 変異体に違いはなかった。これらの *in vitro* のデータは、β7 変異体が微小管結合親和性の変化を誘発しないが、ATP 加水分解サイクルの遅延を引き起こすことを示していた［10]。

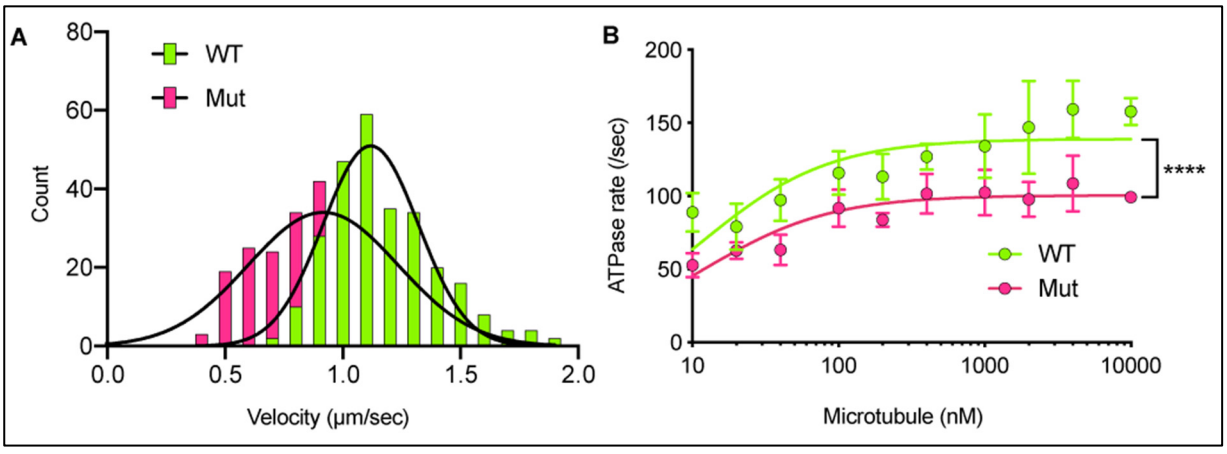


図4. WTとβ7変異体のライブイメージング

A) WT および Mut による微小管滑走速度。

B) 微小管存在下における WT および Mut の ATPase 活性。4 つの独立した試験からの平均と SD。****p＜0.0001（two-way ANOVA）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学医学系研究科の森川真夏氏、小川覚之助教（現・獨協医科大学先端医科学研究センター）、森川桃氏（現・筑波大学医学医療系）、田中庸介講師です。CMT2 変異に関する臨床情報については、University of Iowa の Nivedita Uberoi Jerath 氏にお世話になりました。本研究に対し多大なご援助を頂きました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10: 682–696. PMID: 19773780. DOI:10.1038/nrm2774

2) Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a uniqye monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. Cell. 1995;81: 769–780. PMID: 7539720. DOI:10.1016/0092-8674(95)90538-3

3) Tanaka Y, Niwa S, Dong M, Farkhondeh A, Wang L, Zhou R, et al. The Molecular Motor KIF1A Transports the TrkA Neurotrophin Receptor and Is Essential for Sensory Neuron Survival and Function. Neuron. 2016;90: 1215–1229. PMID: 27263974. DOI:10.1016/j.neuron.2016.05.002

4) Ylikallio E, Kim D, Isohanni P, Auranen M, Kim E, Lönnqvist T, et al. Dominant transmission of de novo KIF1A motor domain variant underlying pure spastic paraplegia. Eur J Hum Genet. 2015;23: 1427–1430. PMID: 25585697. DOI:10.1038/ejhg.2014.297

5) Ben Othmane K, Middleton LT, Loprest LJ, Wilkinson KM, Lennon F, Rozear MP, et al. Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. Genomics. 1993;17: 370–375. PMID: 8406488. DOI:10.1006/geno.1993.1334

6) Ekins S, Litterman NK, Arnold RJG, Burgess RW, Freundlich JS, Gray SJ, et al. A brief review of recent Charcot-Marie-Tooth research and priorities. F1000Research. 2015;4: 1–15. PMID: 25901280. DOI:10.12688/f1000research.6160.1

7) Nitta R, Kikkawa M, Okada Y, Hirokawa N. KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules. Science (80-). 2004;305: 678–683. PMID: 15286375. DOI:10.1126/science.1096621

8) Morikawa M, Yajima H, Nitta R, Inoue S, Ogura T, Sato C, et al. X-ray and Cryo-EM structures reveal mutual conformational changes of Kinesin and GTP-state microtubules upon binding. EMBO J. 2015;34: 1270–1286. PMID: 25777528. DOI:10.15252/embj.201490588

9) Shima T, Morikawa M, Kaneshiro J, Kambara T, Kamimura S, Yagi T, et al. Kinesin-binding–triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport. J Cell Biol. 2018;217: 4164–4183. PMID: 30297389. DOI:10.1083/jcb.201711178

10) Morikawa M, Jerath NU, Ogawa T, Morikawa Mo, Tanaka Y, Shy ME, Zuchner S, Hirokawa N. KIF1A mutation of human neurpathies hyperstabilizes the motor neck interaction in ATPase cycle. EMBO J. in press 2021