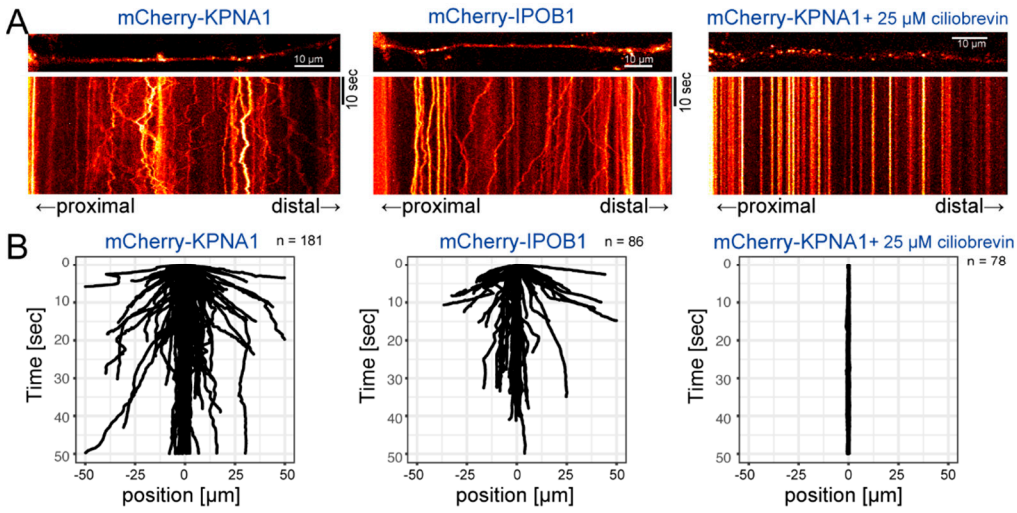
163　核移行因子による軸索内ダイニン輸送制御機構の解明	水野　克俊

【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（IPOβ）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、IPOβ、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



163. 核移行因子による軸索内ダイニン輸送制御機構の解明

水野　克俊

福井大学 学術研究院 医学系部門 医学領域 生命情報医科学講座 分子生体情報学分野

Key words：神経軸索，インポーチンα，インポーチンβ，細胞質ダイニン

緒　言

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、中枢神経系においては記憶・学習・情動など高次脳機能において決定的な役割を果たし、末梢神経系においても細胞体と軸索、シナプス間の情報伝達において必須の役割を果たす。KPNA やインポーチンβ（IPOβ）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、KPNA 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 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。先行研究において KPNA1 ノックアウト（KO）マウスが作製され、その行動解析実験の結果、新規物体認知機能の低下、感覚運動統合障害などの行動異常が確認された［1］。また、我々のグループによる KPNA1 KO マウス由来の脳抽出液を用いた DNA マイクロアレイから、統合失調症（様）症状を誘発する向精神薬フェンシクリジン（PCP）の薬剤負荷条件下において、細胞質ダイニン（以下ダイニンと呼称）およびその関連遺伝子に顕著な発現低下がみられ、薬剤に対する脆弱性が示唆された（未発表）。ダイニンは神経細胞においては軸索輸送、細胞遊走などに必須の役割を有する分子内モーターである。これらの結果は KPNA1 とダイニンによる軸索輸送が深く関与していることを示唆する。本研究では、KPNA1 とダイニンの神経細胞における新規の機能的役割を明らかにすることを目的とした。我々の研究グループではこれまで、Lis1 や神経特異的βⅢ-チューブリン（Tubb3）からなる移動性微小管フラグメント（tMT : transportable microtubule）がキネシンやダイニンといったモータータンパク質による物質輸送の制御に関与していることを発見した［2，3］。軸索輸送においてダイニンは必須であり、また核-中心体とダイニン／微小管の連関は細胞遊走において重要であるが、KPNA1 がそれらをつなぐ鍵として働く可能性がある。インポーチン分子の軸索における局在は生化学的には以前に示されているが［4］、その動態は明らかではなく詳しいことはわかっていない。本研究により神経細胞における KPNA1 とダイニン相互作用と機能を明らかにすることで、核 - 細胞質 - 神経軸索をつなげる新たな細胞内物質輸送システムの理解を提唱する上での基盤的な知見を得ることを目指した。

方法および結果

1. ラット大腿神経からのインポーチン関連因子免疫沈降と質量分析

末梢神経系をモデルに軸索性のインポーチン関連因子の解析を試みた。まず、軸索中にどのようなインポーチン関連因子が存在するかを確かめるために、ラットの大腿神経軸索を単離、可溶化して SDS-PAGE を行った後に LC-MS/MS による質量分析を行い、大腿神経の構成タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、神経軸索に Importinβ1（IPOB1）、Importin 5 などインポーチンβ分子、KPNA1、KPNA4 などインポーチンα分子、CRM1／XPO1 や CAS／XPO2 などエクスポーチン分子、低分子量 G タンパク質 Ran 分子などが含まれていることが明らかとなった。さらに軸索を結紮し輸送複合体を蓄積させダイニン中間鎖抗体、KPNA1 抗体で免疫沈降を行った。その結果、ダイニン抗体により KPNA1、KPNA1 抗体によりダイニンサブユニットが沈降されてくることが質量分析により明らかになり、

ダイニンと KPNA1 が輸送複合体を形成することが示唆された（図 1）。これらの結果は、軸索においてダイニンなどの分子モーターとインポーチン分子が複合体を作る可能性を示唆した。

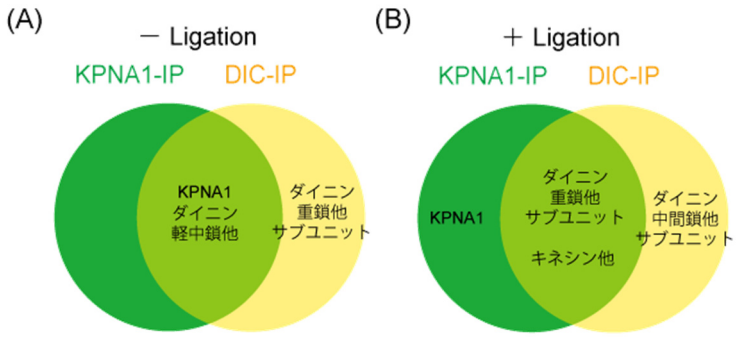


図 1. ラット大腿神経抽出物からの免疫沈降産物の質量分析による解析

結紮あり／なし（±Ligation）の条件で KPNA1 抗体および DIC 抗体（74-1）での免疫沈降。

A) 結紮なしの条件では、KPNA1 抗体および DIC 抗体の両方で KPNA1 およびダイニンサブユニットが沈降された。

B) 結紮を加えた条件でも、いくつかのダイニン関連因子とキネシン分子が KPNA1 および DIC 抗体により沈降された。

2. マウス後根神経節細胞（DRG）を用いた KPNA1 および Importin Beta 1 分子のライブイメージング

つづいて、神経軸索内での KPNA1／ダイニン等の動態を明らかにするために、共焦点顕微鏡を用いて GFP もしくは RFP の誘導体と融合させた KPNA1、さらにインポーチン β である IPOB1 分子などのライブイメージングを行った。生後 1～2 日（P1～P2）の幼若な B6／J の野生体マウスから DRG を単離し、初代培養を行った。この DRG 細胞に Neon Transfection System もしくは Lipofectamine 3000 を用いて遺伝子導入を行い、DIV2～3 の DRG 細胞を用いて Olympus FV1200 による共焦点顕微鏡観察を行った。まず、DRG 軸索領域における KPNA／IPOB1 の動態を確かめるために、EGFP-KPNA1 および EGFP-IPOB1 の FRAP（Fluorescence Recovery After Photobleaching）を行った。FRAP による各分子の動態の検証から、KPNA1 や IPOB1 が軸索上を活発に輸送されていることがあきらかとなった。さらに、ライブセルイメージングによる直接観察を行った。その結果、KPNA1 およびインポーチン β が軸索上においてドット上の構造物を形成し、軸索上を順行方向、逆行方向へと輸送されていく様子が観察された。同時に、ドット上の KPNA1／IPOB1 の移動は間断的であり、停止した状態にとどまるものも数多く見られた（図 2）。さらに、複数の蛍光融合遺伝子を導入して二色ライブイメージングを試みた。その結果、KPNA1 と DIC、Tubb3、IPOB1 が共局在し、軸索上を共に活発に移動する様子が観察された（図 3）。これらの結果は、KPNA1 がダイニンや Tubb3 と輸送複合体を形成し、分子モーターによって輸送されていることを強く示唆する。

3. 変異 KPNA1 の神経細胞内動態の解析

KPNA1 は統合失調症など複数の精神・神経疾患と関係することが知られる。ここでは KPNA1 に特に注目して、統合失調症関連変異の 1 つである変異を作製し、その経細胞内における動態を、DRG を用いて解析した。Full Length（FL）の KPNA1 は多くが核内に集積する一方で細胞質にも一定の割合で分配された。軸索領域にも一定の割合で分配され、その一部はドット状に局在した。一方で変異 KPNA1（ΔC）はほぼすべての KPNA1 が核内へと集積した（図 4）。これは、変異により核外への輸送が阻害されたためと考えられる。一方で軸索においてダイニンと KPNA1 がエクスポーチンを介して相互作用することが示唆されており［4］、核外輸送異常とダイニンとの相互作用の異常とを区別する必要がある。そこで PKI-NES シグナルを C 末端につなげた KPNA1 - FL-NES および KPNA1 - ΔC-NES を作製し、遺伝子導入を行った。その結果、KPNA1 - FL-NES のほぼすべてが核外および核膜に局在した。一方で

KPNA1 - ΔC-NES は多くが核内に集積した一方で、細胞質／軸索にも分配され、軸索領域のイメージングを行うことができた。変異によるダイニンと KPNA1 の相互作用変化と動態変化に関しては現在解析中である。

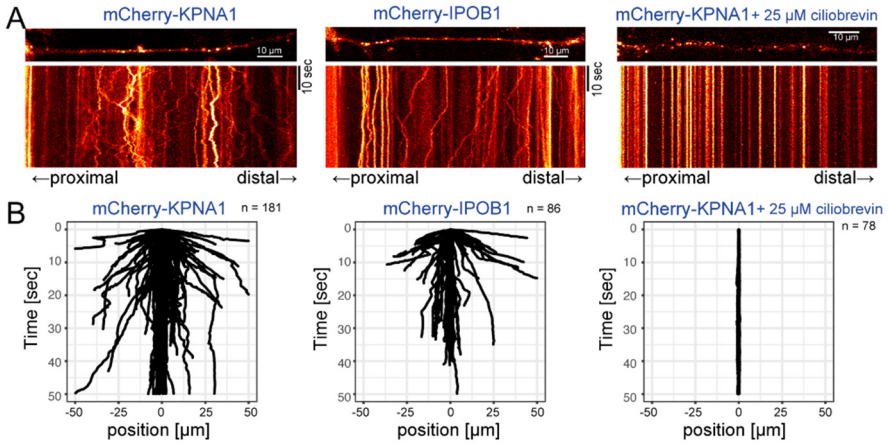


図 2. DRG 軸索における mCherry - KPNA1／IPOB1 の運動軌跡

DRG に遺伝子導入した KPNA1／IPOB1 の蛍光標識タンパク質の動態を観察した。さらにダイニン阻害剤である Ciliobrevin 処理を行った細胞でも同様の観察を行った（右端）。

A) DRG 細胞における mCherry 融合 KPNA1／IPOB1 の局在（上）とそのキモグラフ（下）。スケールバー：10 μm。

B) mCherry - KPNA1／IPOB1 の運動軌跡。

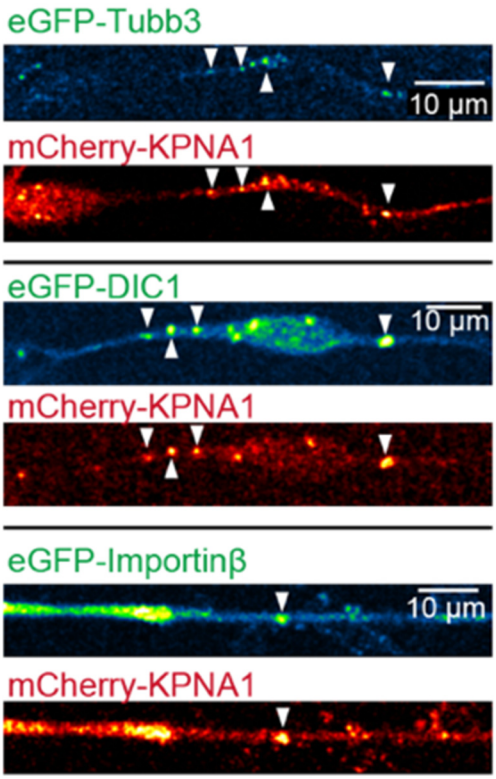


図 3. DRG における KPNA1、Tubb3、DIC1、IPOB1 の共局在解析

mCherry - KPNA1 および EGFP - Tubb3、DIC1、もしくは IPOB1 を導入した DRG のライブイメージング像。矢じりは明確な共局在が確認された顆粒を示す。スケールバー：10 μm。

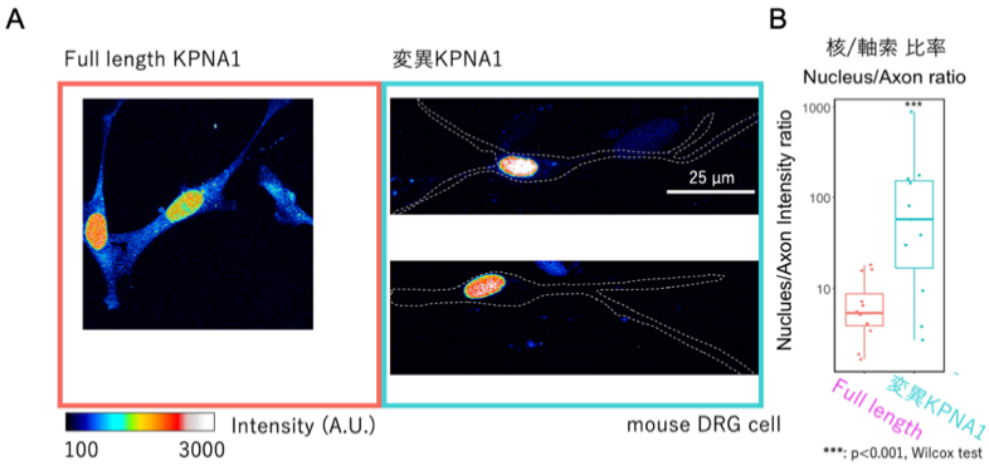


図 4. 変異による KPNA1 の核内異常集積

A) EGFP-KPNA1（FL）および EGFP-KPNA1（変異）を導入した DRG（スケールバー：25μm）。

B) FL と変異での KPNA1 蛍光輝度の核／軸索比率。変異 KPNA1 では有意な核への集積が確認された。Wilcoxon's test、$p<0.001$。

考　察

本研究では、質量分析により神経軸索においてインポーチン関連分子が存在していることを示した。軸索性のインポーチン分子は一部が顆粒状の局在を示し、分子モーターによって輸送されていた。顆粒状構造の実体は現在研究進行中であるが、小胞やストレス顆粒などとの関連が示唆されている。これらの結果は、軸索性インポーチンが核移行だけでなく、軸索から細胞体、もしくは細胞体から軸索、シナプスへの物質輸送やシグナル伝達に関わり、重要な機能を持つことを強く示唆する。さらなる解析により、顆粒状構造の分子的実体と疾患の原因についての研究に取り組んでいく。さらに本研究により統合失調症関連変異である E448X 変異により、神経細胞において KPNA1 が核に異常に集積することが明らかとなった。統合失調症の病因となるのが、KPNA1 が核外に輸送されないことによる核内外のタンパク質分配異常に起因するものか、ダイニンとの相互作用など核輸送とは異なる機能が核への異常集積により影響されているのか、今後の解析により明らかにしていく必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福井大学大学院医学系研究科の山田雅己教授、大阪大学タンパク質研究所の疋田貴俊教授、医薬基盤・健康・栄養研究所の岡正啓プロジェクトリーダー、宮本洋一サブプロジェクトリーダー、福井大学大学院工学系研究科の藤田聡教授である。また、LC-MS/MS による質量分析に関しては、福井県立大学生物資源学部の伊藤貴文教授にお世話になった。この場を借りて御礼申し上げる。

文　献

1) Sakurai K, Itou T, Morita M, Kasahara E, Moriyama T, Macpherson T, Ozawa T, Miyamoto Y, Yoneda Y, Sekiyama A, Oka M, Hikida T. Effects of Importin α1/KPNA1 deletion and adolescent social isolation stress on psychiatric disorder-associated behaviors in mice. PLoS One 2021 Nov 12;16(11):e0258364. PMID: 34767585; DOI: 10.1371/journal.pone.0258364.

2) Yamada M, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Mimori-Kiyosue Y, Nakamura T, Itoh K, Fushiki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Torisawa T, Toyoshima YY, Hirotsune S. LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. EMBO J. 2008 Oct 8;27(19):2471-83. PMID: 18784752; DOI: 10.1038/emboj.2008.182.

3) Yamada M, Toba S, Takitoh T, Yoshida Y, Mori D, Nakamura T, Iwane AH, Yanagida T, Imai H, Yu-Lee LY, Schroer T, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. EMBO J. 2010 Feb 3;29(3):517-31. PMID: 20019668; DOI: 10.1038/emboj.2009.378.

4) Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, van-Minnen J, Twiss JL, Fainzilber M. Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. Neuron. 2003 Dec 18;40(6):1095-104. PMID: 14687545; DOI: 10.1016/s0896-6273(03)00770-0.

5) Yudin D, Hanz S, Yoo S, Iavnilovitch E, Willis D, Gradus T, Vuppalanchi D, Segal-Ruder Y, Ben-Yaakov K, Hieda M, Yoneda U, Twiss TL, Fainzilber F. Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve. Neuron. 2008 Jul 31;59(2):241-52. PMID: 18667152; DOI: 10.1016/j.neuron.2008.05.029.