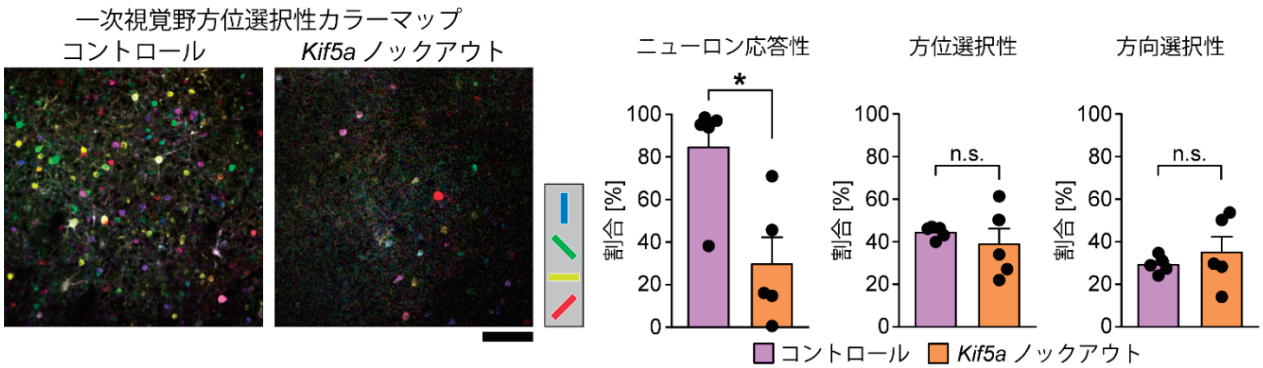
114　キネシン分子モーターによる神経突起内分子機構の解明	岩田　卓

【目的】神経細胞から分岐し伸びる樹状突起は、ひとつの構造体として数百から数千にものぼる他の軸索終末からのシナプス伝達を受け取り、複数のポストシナプス構造やタンパク質組成を変化させることで認知・情動・感覚情報処理などの高次的機能を支える役割を担っていることが知られている。このように樹状突起は多数のシナプス伝達を受け取ることで神経回路における情報のハブとしての役割を担っているとされているが、情報処理に際しての突起内における詳細な分子メカニズムについてはいまだ不明な部分が多い。そこで本研究では、樹状突起内においてシナプス伝達に重要なグルタミン酸受容体を輸送するキネシン分子モーターKIF5A に着目して、マウス視覚野内に存在する樹状突起内の分子メカニズムの詳細を解明するため、主に二光子顕微鏡を用いた Ca^{2+}イメージングによって解析を行った。マウス視覚野には生後 21 日から 35 日までの間に、臨界期と呼ばれる神経可塑性が一過的に高まる時期が存在するが、その期間中の分子モーターによる視覚野ニューロンの可塑性への寄与を解析することで、視覚機能の正常な発達の基盤となる分子メカニズムをより正確に理解できると同時に、成熟した脳における視覚機能発達障害の治療法創出に貢献することができると考えられる。

【方法】Kif5a-flox マウスと Ca^{2+}イメージングによく用いられる Thy1-GCaMP6s 導入マウスを掛け合わせることでダブルノックインマウスコロニーを形成し、臨界期開始直前の視覚野に Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入した。微量注入から 10 日ほど経過した視覚野における分子モーターKIF5A とその積み荷とされるグルタミン酸受容体についてのタンパク質発現量解析と Ca^{2+}イメージングによる神経活動パターン解析を行った。

【結果】まず、Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入したダブルノックインマウスについてイムノブロッティングによるタンパク質発現量解析を行ったところ、Cre-loxP システムによりマウス視覚野内において KIF5A は著しくその発現量を落としていた。また、輸送タンパク質である KIF5A の積み荷とされるグルタミン酸受容体 GluR1 についても同様にその発現量を落としていた。一方で、KIF5A と同じ kinesin-1 というグループに含まれる KIF5B と、GluR1 とは違う別のサブユニットである GluR2 についてはその発現量に変化は見られなかった。また、神経活動が起こった際に蛍光を発するタンパク質（GCaMP6s）を用いることで発現量解析と同様に Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入したマウスの Ca^{2+}イメージングを行ったところ、ウイルスを注入されたマウスは視覚刺激に対する応答性を減弱させていることがわかった。一方で、観察した視覚野内神経細胞の各活動パターンを詳細に解析したところ、ウイルスを注入されたマウスでも方位選択性あるいは方向選択性を有した神経細胞の数は変化がなかった。これらのことから、分子モーターKIF5A は樹状突起内において積み荷であるグルタミン酸受容体 GluR1 の発現量を維持する役割を担っており、KIF5A が無くなってしまうと受容体分配が滞ることで視覚機能においては視覚刺激に対する応答性が弱まってしまうことが判明した。

アデノ随伴ウイルスを用いた一次視覚野特異的な *Kif5a* 遺伝子ノックアウトによるニューロン応答性の変化



114. キネシン分子モーターによる神経突起内分子機構の解明

岩田　卓

筑波大学 医学医療系 生命医科学域 解剖学・神経科学研究室

Key words：分子モーター，視覚臨界期，グルタミン酸受容体，Ca^{2+}イメージング，方位選択性

緒　言

ヒトやマウスが外界からの視覚情報を処理する際には、網膜から大脳皮質の一次視覚野、高次視覚野まで情報が伝達される。「見る」ことはすなわち視覚野での情報処理であり、その基盤となるものは神経回路網内に存在するニューロンの神経活動であると言える。また、視覚野には発達期において臨界期と呼ばれる神経可塑性が一過的に高まる時期が存在し、マウスにおいては生後 21 日から 35 日の期間がそれにあたるが、これは脳機能の可塑的変化の優れたモデル系として現在様々な研究が盛んに行われている。この分野において最も重要なことは、臨界期中の視覚野は両眼視による正常な視覚情報を求めており、それによって臨界期前では不完全な状態の神経回路網を正規化しているということであり、この時期に正常なニューロンの神経活動を得られなかった視覚野はうまく機能せず、臨界期を過ぎてしまうと元に戻すことができない [1〜3]。一方で、神経細胞は高度に発達した突起構造を有しており、細胞体から遠く離れた突起末端において必要な物資は、神経突起内で ATPase の機能により微小管をレールとして順行性に細胞内小器官や機能分子を輸送するキネシン分子モーター [4] によって届けられる。近年の報告では、神経可塑性や脳高次機能の発達に重要な役割を担っている分子モーターは、臨界期視覚野と同様に正常な輸送を行う上でニューロンの神経活動を必要とし、それによって自身の輸送状態を可塑的に変化させることで神経可塑性及び脳機能の発達に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた [5, 6]。これらのことから神経突起内の物質輸送システムは視覚臨界期中の神経回路網の発達に多大な影響を与えていることが考えられ、キネシン分子モーターによる神経突起内分子機構を解明することで視覚機能の正常な発達の基盤となる分子メカニズムをより正確に理解できると同時に、成熟した脳における視覚機能発達障害の治療法創出に貢献することができると考えられる。

そこで本研究では、まず視覚臨界期中の生後 22 日から 28 日まで暗黒飼育をマウスに施し、その後最長で 24 時間の明環境暴露による光刺激を与えて視覚臨界期における種々の分子モーターの発現量解析を行った。すると、KIF5A の発現量が暗黒飼育によって減少し、その後の光刺激によって増加した。加えて KIF5A が輸送するとされる AMPA 型グルタミン酸受容体（AMPAR）の GluR1 についても同様の変化が検出された。さらに、光刺激の有無によってその発現量を変化させることから KIF5A に着目した実験として、Kif5a-flox マウスと、Ca^{2+}イメージングによく用いられる Thy1-GCaMP6s 導入マウスを掛け合わせることでダブルノックインマウスコロニーを形成し、臨界期開始直前の視覚野に Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入した。まず、Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入したダブルノックインマウスについてイムノブロッティングによるタンパク質発現量解析を行ったところ、KIF5A と GluR1 どちらもその発現量を落としていた。また、Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入したマウスの Ca^{2+}イメージングを行ったところ、ウイルスを注入されたマウスは視覚刺激に対する応答性が減弱した。一方で、観察した視覚野内神経細胞の各活動パターンを詳細に解析すると、ウイルスを注入されたマウスで方位選択性あるいは方向選択性を有した神経細胞の数に変化はなかった。これらのことから、分子モーターKIF5A は樹状突起内において積み荷である GluR1 の発現量を維持する役割を担っており、KIF5A が無くなってしまうと受容体分配が滞ることで視覚機能においては視覚刺激に対する応答性が弱まってしまうことが判明した。

方法および結果

1. 暗黒飼育と明環境刺激によって KIF5A はその発現量を変化させた

キネシン分子モーターは脳の発達において重要な役割を担っていることがすでに知られている［4, 5］。本研究においては、キネシン分子モーターによる視覚機能の発達への寄与を調べるため、視覚臨界期中である生後 22 日から 28 日までの間マウスに暗黒飼育を施し、その後最長で 24 時間の明環境暴露による光刺激を与えた。臨界期における種々の分子モーターの一次視覚野（V1）におけるタンパク質発現量を解析するためイムノブロッティングを行ったところ、KIF5A と GluR1 の発現量は暗黒飼育によって下がり、その後光刺激によって、通常飼育マウスの KIF5A、GluR1 発現量と同等の発現量レベルまで回復していることが判明した（図 1）。一方で、KIF5B、GluR2 の発現量については暗黒飼育・光刺激による発現量の変化がともになく、NMDA 型受容体を輸送する KIF3A、KIF17 と NMDA 型受容体自身については暗黒飼育による発現量の低下は観察されたが、光刺激による発現量の回復は観察されなかった。また、同時に体性感覚野（S1）内の発現量についても同様の解析を行ったが、いずれのタンパク質についても変化は観察されなかった。したがって KIF5A とその積み荷である GluR1 が光刺激の有無によって大きくその発現量を変化させることから、KIF5A による輸送系は視覚機能に対して大きな寄与がある可能性が考えられるため、以後この KIF5A に着目して研究を遂行することとした。

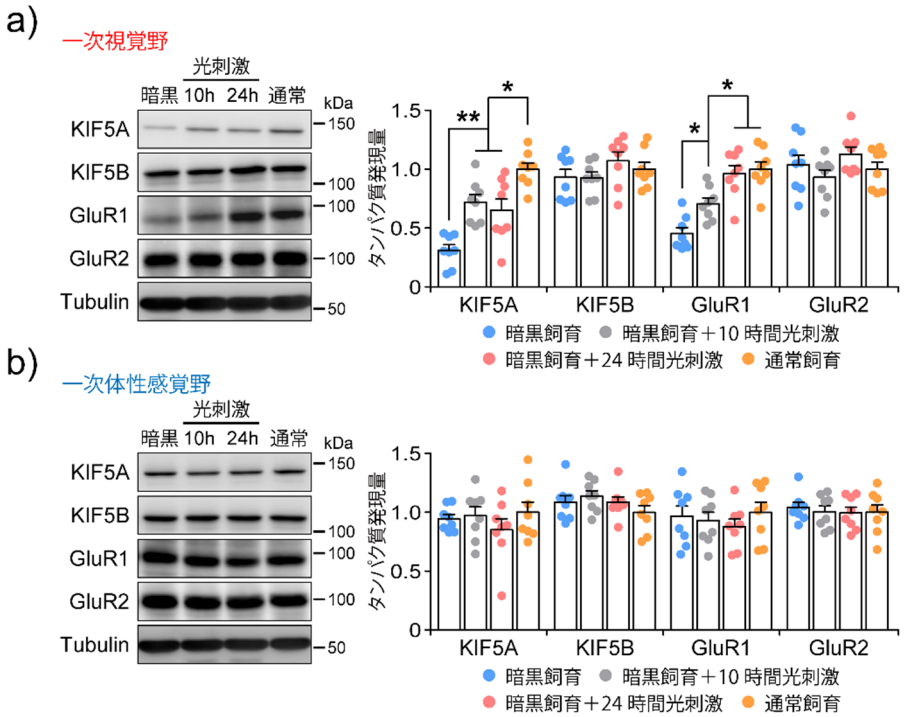


図 1. 暗黒飼育と光刺激を施したマウスにおける V1 内発現量変化

a) 一次視覚野（V1）内でのタンパク質発現量変化（平均値±標準誤差）。*P <0.05、**P <0.01（one-way analysis of variance（ANOVA）with Bonferroni's post hoc comparison）。

b) 一次体性感覚野（S1）内でのタンパク質発現量変化（平均値±標準誤差）。P >0.05（one-way ANOVA）。

2. *Kif5a* 遺伝子ノックアウトを施すと GluR1 発現量が下がった

前述の実験によって光刺激の有無によってその発現量を変化させることが分かった KIF5A の視覚機能発達における役割を解明するため Kif5a-flox マウスの視覚野に Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入し、通常飼育を

施した上でイムノブロッティングによるタンパク質発現量解析を行った。Cre 発現アデノ随伴ウイルスを注入した Kif5a-flox マウスの視覚野では Cre-loxP システムにより *Kif5a* 遺伝子がノックアウトされる。そのため KIF5A のタンパク質発現量は著しく減少し、それに伴って GluR1 のタンパク質発現量も減少することが分かった（図 2）。

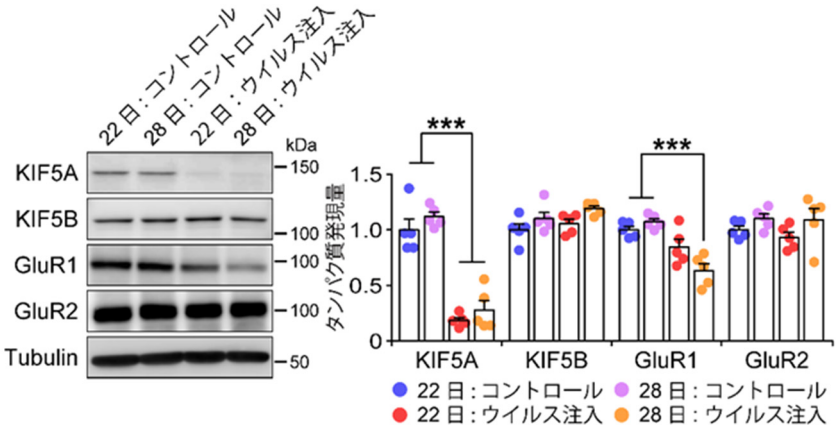


図 2. Cre 発現アデノ随伴ウイルスを注入した Kif5a-flox 視覚野におけるタンパク質発現量
Kif5a-flox マウスの視覚野におけるタンパク質発現量（平均値±標準誤差）。****P*＜0.001（one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparison）。

3. *Kif5a* 遺伝子ノックアウトを施すと V1 における視覚刺激応答性が減弱した

視覚臨界期中の視覚機能において KIF5A がどのような役割を担っているのかを知るため、Kif5a-flox マウスラインと Ca^{2+}イメージングによく用いられる Thy1-GCaMP6s 導入マウスを掛け合わせることでダブルノックインマウスコロニーを形成した。このダブルノックインマウスの視覚野に Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入した後、二光子顕微鏡を用いた Ca^{2+}イメージングを行うことで視覚刺激に対応した V1 での神経活動が *Kif5a* 遺伝子ノックアウトマウスではどのようになっているかを解析した。すると、*Kif5a* 遺伝子のノックアウトされた視覚野では、マウスを通常飼育していたにもかかわらず視覚刺激に対する応答性が減弱していた。一方で、観察した視覚野内神経細胞の各活動パターンを詳細に解析すると、ウイルスを注入されたマウスで方位選択性あるいは方向選択性を有した神経細胞の数に変化はなかった（図 3）。

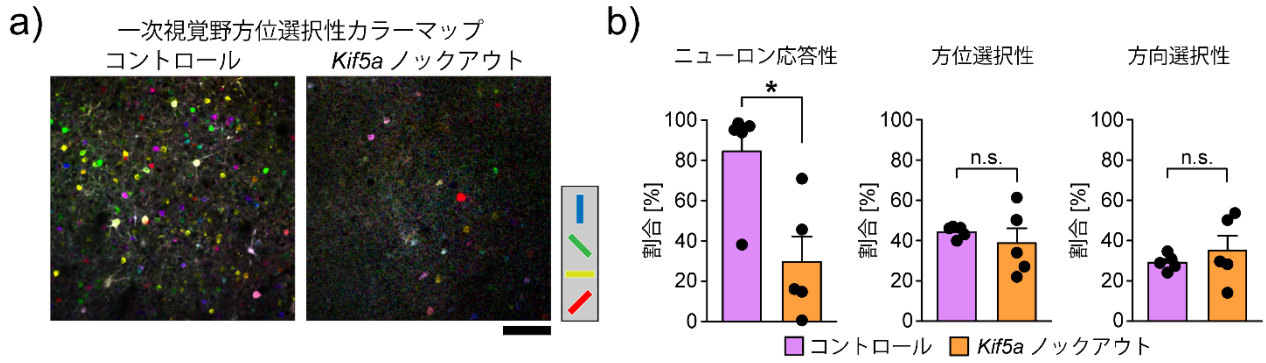


図 3. アデノ随伴ウイルスを用いた *Kif5a* 遺伝子ノックアウトによるニューロン応答性の変化
a） 一次視覚野の方位選択性カラーマップ。右のボックスは視覚刺激の角度とマップ内の色の関係性を示す。スケールバー：100 μm。
b） コントロール群と *Kif5a* 遺伝子ノックアウト群のニューロン応答性、方位選択性、方向選択性を有する細胞の割合の比較（平均値±標準誤差）。**P*＜0.05（two-tailed *t* test）。

考　察

本研究における結果から、マウスの視覚発達期において暗黒飼育を施すと KIF5A 発現量の低下を招き、また *Kif5a* 遺伝子ノックアウトマウスでは GluR1 発現量の低下と視覚刺激に対するニューロン応答性の減弱が引き起こされるということが示された。これらのことから、KIF5A は樹状突起内において積み荷である GluR1 の発現量を維持する役割を担っており、KIF5A が無くなってしまうと受容体分配が滞ってしまい、視覚機能においては視覚刺激に対する応答性が弱まったと示唆される。近年では神経活動による分子モーターの輸送動態制御に関する研究が多い。KIF5A が輸送する AMPAR は神経活動を誘発した後すぐに新規に合成された分の AMPAR 輸送を一時ストップさせ、ポストシナプスへの受容体リクルートを促し、その数十分後、輸送動態を以前の状態よりも活発にして輸送量を増加させるということが報告されている［7］。現在、キネシン分子モーターの神経突起内分子機構解明のため、視覚野内の神経突起における分子機構に着目した研究を遂行しているが、視覚野内の輸送動態をダイレクトに観察する実験手法を開発中であり、それによって分子モーターという観点から視覚機能発達障害の治療戦略を創出していく計画である。

共同研究者・謝辞

本研究は筑波大学医学医療系生命医科学域解剖学・神経科学研究室で行った。本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科細胞構築学の廣川信隆特任研究員、東京大学大学院医学系研究科統合生理学研究室の大木研一教授、根東覚特任准教授である。最後になりますが、本研究をご支援頂いた上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展を心よりお祈り申し上げます。

文　献

1） Hensch T.K. Critical period plasticity in local cortical circuits. Nat Rev Neurosci. 2005 Nov 6(11):877-88. PMID: 16261181 DOI: 10.1038/nrn1787

2） Hooks B.M, Chen C. Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. Neuron. 2007 Oct 25;56(2):312-26. PMID: 17964248 DOI: 10.1016/j.neuron.2007.10.003

3） Espinosa J.S, Stryker M.P. Development and plasticity of the primary visual cortex. Neuron. 2012 Jul 26;75(2):230-49. PMID: 22841309 DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.009

4） Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Neuron. 2010 Nov 18;68(4):610-38. PMID: 21092854 DOI: 10.1016/j.neuron.2010.09.039

5） Kondo M, Takei Y, Hirokawa N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. Neuron. 2012 Feb 23;73(4):743-57. PMID: 22365548 DOI: 10.1016/j.neuron.2011.12.020

6） Iwata S, Morikawa M, Takei Y, Hirokawa N. An activity-dependent local transport regulation via degradation and synthesis of KIF17 underlying cognitive flexibility. Sci. Adv. 2020 Dec 16;6(51):eabc8355. Print 2020 Dec. PMID: 33328231 DOI: 10.1126/sciadv.abc8355

7） Hangen E, Cordelieres F.P, Petersen J.D, Choquet D, Coussen F. Neuronal activity and intracellular calcium levels regulate intracellular transport of newly synthesized AMPAR. Cell Rep. 2018 Jul 24;24(4):1001-1012.e3. PMID: 30044968 DOI: 10.1016/j.celrep.2018.06.095