

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06033

研究課題名(和文)神経細胞におけるオルガネラ局在機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms that regulates the localization of organelles

研究代表者

丹羽 伸介(Niwa, Shinsuke)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：30714985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経細胞におけるオルガネラの局在機構の解明を目指して研究を開始した。現在までに以下のような成果を得ることができた。(1)感覚神経の繊毛内の物質輸送(Intraflagellar transport, IFT)に必須の遺伝子ift-139およびその変異体を同定し、ift-139が逆行性のIFTに参与していることを明らかにした。(Niwa, Scientific Reports, 2016) (2)シナプス輸送の軸索輸送におけるモータータンパク質UNC-104の自己阻害機構を明らかにした(Niwa et al., Cell Reports, 2016)

研究成果の概要(英文)：I have started to analyze molecular mechanisms that regulate the localization of organelles in neurons. I have obtained following results: (1) I have cloned a new gene called ift-139 that is required for the intraflagellar transport (IFT) (Niwa et al. Scientific reports, 2016) (2) I have clarified a molecular mechanism of the autoinhibition of the axonal transport motor, UNC-104/KIF1A (Niwa et al., Cell Reports, 2016)

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞生物学 神経科学

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は樹状突起、細胞体、軸索といった領域に分かれている。樹状突起と軸索はそれぞれ情報の受容と伝達に特化している。これらの機能のためにそれぞれの領域にはそれぞれ必要なオルガネラが配置されている。例えば、感覚神経細胞の樹状突起には繊毛と呼ばれるオルガネラが存在し、これがアンテナの役割を果たして外界情報を受容する。繊毛の根元の樹状突起内にはエネルギー供給のためのミトコンドリアが集積している。一方、軸索のシナプス領域にはシナプス小胞と呼ばれる膜小胞器官が存在し、これが放出されることによって他の神経細胞や筋肉に指令を出す。シナプスにおける情報伝達もまた大量のエネルギーを消費するため、シナプスにはミトコンドリアが集積している。これらの現象は50年前には既に知られていたが、今日に至ってもまだその分子機構の全容は明らかにはなっていない。

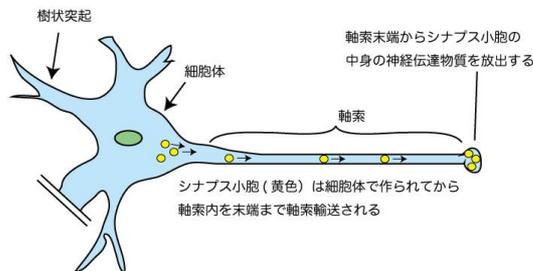


図1 神経細胞の形態の模式図

これらのオルガネラの局在はどのように制御されるのかは、細胞生物学や神経科学の重要な問題である。キネシンやダイニンと呼ばれる分子モータータンパク質がこれらオルガネラの輸送を担うことは明らかになっているが、その制御機構はわかっていない。また、これまでに同定されていない未知の分子機構も多数存在すると考えられている。

2. 研究の目的

線虫は細胞生物学の優れたモデルである。本研究では線虫の分子遺伝学を用いることにより神経細胞における様々なオルガネラの局在や形成がどのように制御されているのかを解き明かすことを目指した。

(1) 線虫の体内でオルガネラを可視化する第一段階としてまず繊毛、シナプス小胞、ミトコンドリア、リソソームなどといった様々なオルガネラを単一の神経細胞内で可視化した線虫を作製することを目的とした。

(2) オルガネラの局在の変異体を同定するこれらの株を使って変異体スクリーニングを行い、オルガネラの局在が変化する変異体を単離することを目指した。

(3) 原因遺伝子の決定

分子遺伝学的手法を駆使することにより、変異体の原因遺伝子を単離し、オルガネラの局在を制御する遺伝子を決定することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 生体内1細胞生物学

単一の神経細胞特異的なプロモーターを用いることで、生きた生体の中で単一神経細胞内のオルガネラの局在や形成を観察することができる(1細胞生物学的手法)。また、線虫では強力な遺伝学的手法が確立しているため、これを組み合わせることでその分子機構をも明らかにすることができる。

(2) 遺伝学

変異体のスクリーニングとしては、既知の疾患関連遺伝子の線虫ホモログの同定とその変異体の解析(候補探索法)と、EMS法によってゲノム上にランダムに変異を入れてその原因遺伝子を特定する方法(順遺伝学的なスクリーニング法)とを併用した。

(3) 変異体の観察と解析

作製した変異体は共焦点レーザー顕微鏡によって観察し、オルガネラの局在を定量的に記述した。また、生きた生体内におけるオルガネラの輸送を可視化するためには、スピニングディスク型共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

(1) 樹状突起上の繊毛形成の分子機構

繊毛は視細胞や嗅細胞においてアンテナとして機能する重要なオルガネラである。繊毛形成の異常は、網膜変性、不妊、水頭症、肥満などといった様々な疾患を引き起こす。これら繊毛の異常によって引き起こされる疾患は繊毛病と呼ばれている。繊毛病の一つ Joubert 症候群の原因の一つは TTC21B 遺伝子の異常である。TTC21B 遺伝子の機能を調べるために線虫の TTC21B ホモログを探索した。同定した遺伝子を、このファミリーの中で最初に見つかったクラミドモナスの遺伝子名にちなみ、ift-139 と名付けた。また、変異体ライブラリーの中から ift-139 の欠損変異体を同定することに成功した。ift-139 変異体では繊毛内に IFT 複合体と呼ばれる繊毛内輸送に必須のタンパク質群が蓄積していた。このことから、ift-139 変異体では繊毛内輸送に異常が起こっていることがわかった。

変異体を用いた機能解析の結果、ift-139 は逆行性の繊毛内輸送に関与するモータータンパク質 che-3(ダイニン2 遺伝子)と似たような表現型を呈していることがわかった。このことから、ift-139 は逆行性の繊毛内輸送に関与していると考えられた。

非常に興味深いことに、ift-139 と順行性の繊毛内輸送の変異体との2重変異体を作

製すると、ift-139 で見られる繊毛内の物質輸送の滞留が一部解消されることがわかった。このことから、ift-139 変異体では繊毛内で交通障害が起こっていることが示唆された。ヒトの TTC21B 遺伝子を線虫の ift-139 変異体に発現するとレスキューされることから、ヒトの Joubert 症候群も繊毛内輸送の交通障害によって引き起こされていることが示唆された (Niwa, Scientific Reports, 2016)。

(2) 軸索内のシナプス小胞の軸索輸送の分子機構

軸索はシナプスに局限しているシナプス小胞によって情報伝達をする。シナプス小胞は細胞体で合成され、シナプスまで UNC-104 と呼ばれるキネシンによって軸索内を輸送される。一方で、シナプス小胞の軸索輸送には ARL-8 と呼ばれる small GTPase が必須であることが知られていたが、両者の関係はわかっていなかった。

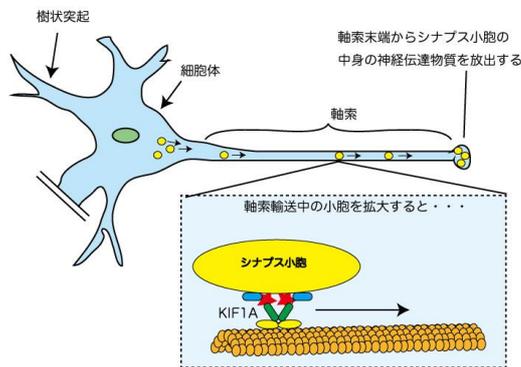


図2 UNC-104/KIF1A による軸索輸送

線虫の arl-8 変異体では軸索輸送が正常に行われず、シナプス小胞が軸索の途中に集積する表現型が見られる。arl-8 のサブレッサスクリーニングを行い、軸索輸送が回復する変異体の探索を行ったところ、unc-104 遺伝子の変異体が多数得られた。得られた変異体は全て優性変異体であった。このことから、arl-8 のサブレッサスクリーニングによって得られた unc-104 の変異体は UNC-104 キネシンの機能を上昇させるものであることが予想された。シナプス小胞を軸索輸送するキネシンである UNC-104 は"自己阻害"と呼ばれるメカニズムにおいて負の制御を受けていることが知られている。このメカニズムは UNC-104 のホモログであるヒトやマウスの KIF1A でもまた保存されている。

今回の研究で見つかった UNC-104 のアミノ酸に相同な領域はマウスやヒトの KIF1A でも非常に良く保存されていた。実際に、線虫の UNC-104 およびマウスの KIF1A に、スクリーニングで見つかったアミノ酸置換を導入したところ、UNC-104 や KIF1A の自己阻害が解除され常活性化状態へと変換されていることがわかった。

同じスクリーニングでは UNC-104 以外の変異体として、arl-8 を常活性化型に変換する変異体 ARL-8(D133N)を得ることに成功した。ARL-8(D133N)は GTP 型のコンフォメーションであると考えられた。結合実験では ARL-8(D133N)は非常に強く UNC-104 に結合することがわかった。このことから、ARL-8 が GTP 状態になったときに UNC-104 に結合すると考えられた。また、細胞を用いた今日発現実験では ARL-8 はマウス KIF1A の自己阻害を解除する活性を持っていることがわかった。以上の結果から、ARL-8 が GTP 状態に変換されると KIF1A に結合し、その自己阻害を解除するのであると考えられた (Niwa et al., Cell Reports; 図3)。

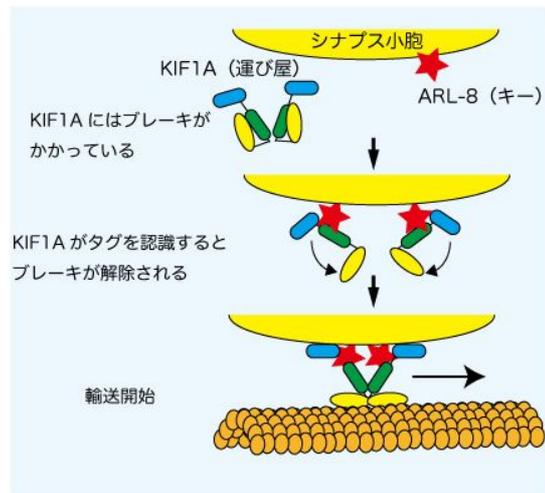


図3 ARL-8 と UNC-104 の関係

UNC-104 の自己阻害機構に異常が起こっている線虫ではシナプス小胞が本来は存在しない樹状突起や非シナプス領域にも集積していた。このことから、UNC-104 の自己阻害機構がシナプス小胞の局在を制御するのに重要な役割を持っていることがわかった。

ヒトの KIF1A の変異はさまざまな症状の神経疾患を引き起こす。現在はこれら神経疾患が自己阻害機構の異常によって起こっているかどうかを解析中である。

(3) 様々なオルガネラの局在を観察するためのマーカーの作製

リソソーム、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、プロテアソームといった様々なオルガネラの神経細胞における機能を解析するためにこれらのマーカーを GFP によって標識したトランスジェニック線虫を作製した。リソソームは Imp-1、ミトコンドリアは tomm-20 の N 末端、ペルオキシソームは prx-3、プロテアソームは pas-1 をそれぞれマーカーとした。これらはすべて哺乳類や酵母などにおけるオルガネラ研究でマーカータンパク質として用いられてきたものである。現在、これらの株を用いて、ミトコンドリアなどのオル

ガネラの局在機構を解析中である。すでに変異体は得られているため、今後はその原因遺伝子の決定を行い、分子メカニズムに迫りたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Niwa Shinsuke, Lipton M. David, Morikawa Manatsu, Zhao Charles, Lu Hang, Hirokawa Nobutaka and Shen Kang (2016) Autoinhibition of a neuronal kinesin UNC-104/KIF1A regulates the size and density of synapses. *Cell Reports* 16, 2129-2141 査読あり

Niwa Shinsuke (2016) Nephronophthisis-related gene *ift-139* is required for the ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports* 6, 31544; doi: 10.1038/srep31544 査読あり

Tanaka Yosuke,* Niwa Shinsuke* (同等貢献), Dong Ming*, Farkhondeh Atena, Wang Li, Zhou Ruyun, and Hirokawa Nobutaka (2016) The molecular motor KIF1A transports the TrkA neurotrophin receptor and is essential for sensory neuron survival and function. *Neuron* 90, 1215-29 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

丹羽伸介 線虫を用いた軸索輸送の解析
日本解剖学会 2017年3月28日 長崎大学 (長崎市)
招待講演

Shen Kang and Niwa Shinsuke A small GTPase ARL-8 regulates synapse formation by unlocking the autoinhibition of the axonal kinesin UNC-104/KIF1A. American Society for Cell Biology (ASCB 2015), San Diego, CA, USA. Dec.12, 2015.

Niwa Shinsuke The regulation of axonal transport and synaptic formation in *C. elegans*. Jeol ミニシンポジウム RNA regulation and Neuroscience 2015年10月29日 東北大学青葉サイエンスホール(宮城県仙台市) 招待講演

Niwa Shinsuke and Shen Kang. A small GTPase ARL-8 regulates synapse formation by unlocking the autoinhibition of the axonal kinesin UNC-104/KIF1A. Janelia conference 2015. The Long and Winding Road: Neuronal Trafficking in Physiology and Disease, Janelia Farm, Ashburn, VA, USA, June,2, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 伸介 (NIWA, Shinsuke)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教
研究者番号：30714985