

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号： 11301

研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間： 2017～2019

課題番号： 17KK0139

研究課題名（和文） 遺伝性神経疾患における軸索輸送キネシンKIF1Aの制御メカニズムの破綻

研究課題名（英文） Misregulation of KIF1A in motor neuron disease

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・准教授

研究者番号： 30714985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：神経細胞は軸索輸送と呼ばれる高速輸送システムによってその機能が維持されている。この軸索輸送においてトラックの役割をするタンパク質がKIF1Aと呼ばれる分子モータータンパク質である。本研究では、KIF1Aの活性が異常に亢進し、軸索輸送が増加することが神経疾患の原因となることを示した。CRISPR/cas9法によるゲノム編集で線虫のKIF1A遺伝子にヒト疾患と同じ変異を導入したモデル生物を作製したところ、KIF1Aの荷物であるシナプス小胞が軸索末端に異常に集積した。TIRF法による1分子運動解析によって疾患変異を持つKIF1Aは活性が亢進していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正しい治療法のためには正しい原因解明が必須である。これまでは軸索輸送の低下が神経疾患の原因となると考えられてきた。しかし、この研究によってはじめて、今までの常識とは逆に、軸索輸送の亢進もまたヒト神経疾患の原因となりうることが示された。近年の全ゲノムシークエンス技術の発達により、KIF1Aの点変異が先天性神経疾患のホットスポットの一つであることが分かってきている。本研究で得られた成果により、そのような神経疾患でみられる変異がKIF1Aの機能の低下を起こしているか、亢進を起こしているかを調べるのが治療方針を立てる上で重要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：KIF1A is a motor protein involved in the axonal transport of synaptic vesicles along microtubules. Mutations in KIF1A are associated with the motor neuron disease. However, not all of these mutations appear to inhibit the motility of the KIF1A motor, and thus, a molecular explanation for how KIF1A mutations lead to neuropathy is not available. In this project, we established in vitro motility assays with full-length human KIF1A and found that KIF1A mutations associated with the motor neuron disease lead to hyperactivation of KIF1A motility. Introduction of the corresponding mutations into *Caenorhabditis elegans* KIF1A homologue revealed abnormal accumulation of synaptic vesicles at the tips of axons. This project revealed that hyperactivation of kinesin motor activity is a novel cause of motor neuron disease.

研究分野： 分子細胞生物学

キーワード： 軸索輸送 KIF1A 遺伝性痙性対麻痺

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は他の細胞に比べて非常に大きいという特徴がある。普通の細胞のサイズがせいぜい数百マイクロメートルオーダーなのにたいして、神経細胞の軸索とよばれる突起はセンチメートルからメートルのオーダーになる。神経細胞はこの軸索を用いて他の神経細胞や筋肉に対して指令を出している。この軸索の機能や構造を維持するために、軸索の材料となるタンパク質や軸索が指令を出すためのシナプス小胞の材料などは常に軸索輸送と呼ばれる高速輸送システムによって供給される必要がある。この高速輸送システムの核となるのがキネシンスーパーファミリーと呼ばれる分子モータータンパク質群である。その中でも KIF1A 徒呼ばれるモータータンパク質はシナプス小胞の材料を軸索輸送していることが知られている。KIF1A をはじめとするキネシンスーパーファミリーの遺伝子に異常が起こり軸索輸送が減少することは様々な神経疾患の原因となることが知られていた。

線虫は軸索輸送を解析するためのよいモデル生物である。私たちの以前の研究で軸索輸送が増加する変異体の原因を解析したところ、線虫の KIF1A 遺伝子(線虫では UNC-104 と呼ばれる)であった(Niwa et al., Cell Reports, 2016)。多くの遺伝子変異は遺伝子の機能の欠損を起こすが、私たちが線虫で見つけた UNC-104/KIF1A 遺伝子の変異はむしろ UNC-104/KIF1A モータータンパク質の機能を増強し、軸索輸送を増加させることがわかった。

一方で、近年の全ゲノムシーケンシング技術の発達により、多くの稀少神経疾患の遺伝子変異が同定されるようになってきている。KIF1A は神経疾患変異のホットスポットになっており、多くの変異が見つかりつつある。そのためアメリカでは KIF1A associated neuronal disorder(KIF1A 関連神経疾患。略して KAND)という概念も提唱され、患者団体も結成されている(kif1a.com)。多くの KIF1A 遺伝子変異の多くは KIF1A の機能欠損であることがわかってきた。ほとんどの変異は KIF1A が微小管上を歩行するためのモータードメインのアミノ酸置換を引き起こし、KIF1A の微小管上での運動能を低下させることがわかってきた。ところが、KIF1A 遺伝子の変異の中にはモータードメイン内のアミノ酸置換を引き起こす遺伝子変異にもかかわらず KIF1A の微小管上での運動自体には異常が見られないケースもある。そのような変異のうちの一つが KIF1A(V8M)変異である。この変異は私たちが線虫を使った研究で同定した軸索輸送を増加させる変異 KIF1A(V8I)とほぼ同じであった(Niwa et al., Cell Reports, 2016)。これらの結果から私たちは「KIF1A の遺伝子変異の中には軸索輸送を低下させるタイプと軸索輸送を逆に亢進するタイプがあり、その両方が神経疾患の原因となっているかもしれない」と着想した。

2. 研究の目的

基課題である若手研究 A では BORC→ALR8→KIF1A という軸索輸送活性化のカスケードによって KIF1A の活性が調節されることを示すことを目指している。それに対して本研究課題ではヒトの疾患の原因となる KIF1A の遺伝子変異のうち、軸索輸送を増加させる可能性のある遺伝子変異の同定を目指した。この解析によって、「軸索輸送活性化のカスケードが遺伝的要因によって破綻して軸索輸送の亢進が起こることが、ヒトの神経疾患の原因の一つである」という新たな概念を打ち立てることを本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 線虫変異体のレスキューを用いたヒト KIF1A 遺伝子変異の解析

遺伝子変異には大きく分けて gain of function 型変異と loss of function 型変異がある。これまで、KIF1A 遺伝子の変異について、この二つを簡便に区別する方法はなかった。私たちは野生型ヒト KIF1A 遺伝子を線虫の unc-104 変異体(線虫の KIF1A オルソログを欠損した変異体)に発現することでレスキューすることができることを見つけた。この結果を生かせば、疾患変異型の KIF1A を unc-104 変異体に発現することで KIF1A の遺伝子変異が gain of function 型か loss of function 型かを区別できるのではないかと考えた。gain of function 型変異であれば、その変異を導入した KIF1A を線虫に発現すると線虫の運動の以上をレスキューできる。一方で、loss of function 型変異を導入した KIF1A を unc-104 変異体に導入するとレスキューできないはずである。

(2) CRISPR/cas9 法による遺伝性痙性対麻痺モデル線虫の作製と表現型解析

線虫では CRISPR/cas9 法によって任意の点変異を導入することができる。疾患の原因となる KIF1A の遺伝子変異によって変化するアミノ酸は線虫の KIF1A オルソログである UNC-104 においてもよく保存されている。また、(1) に述べたように、ヒトの KIF1A と線虫の UNC-104 は置換可能なほどにその機能がよく保存されている。そこで、CRISPR/cas9 法によって UNC-104 遺伝子にヒトの疾患の原因となるアミノ酸置換を導入した。

(3) 遺伝性痙性対麻痺型 KIF1A の 1 分子レベルでの運動解析

微小管分子モータータンパク質は全反射蛍光顕微鏡法(TIRF)を用いることによってその運動を 1 分子レベルで観察し、解析する方法が確立している。KIF1A の全長はモノマーだとすると 200kDa、ダイマーだとすると 400kDa ほどの巨大なタンパク質であるため、全長を用いた 1 分子解析は困難であった。本研究課題で滞在した海外研究機関であるカリフォルニア大学デイビス

校の Richard McKenney 助教授はダイニンと呼ばれる巨大複合体分子モーターの 1 分子レベルでの運動解析において顕著な業績を挙げてきた。McKenney 博士のタンパク質精製の技術と 1 分子解析の手法をもちいることで、全長 KIF1A を用いた 1 分子レベルでの運動解析を実施した。

4. 研究成果

(1) KIF1A 遺伝子変異の分類法の確立

unc-104 遺伝子のプロモーター配列 (スタートコドンの 4kb 上流からスタートコドンまで) を用いて、神経疾患の原因となっている変異を導入した KIF1A を線虫の unc-104 の欠損変異体に発現した。ほとんどの疾患変異型 KIF1A は UNC-104 変異体をレスキューできなかった。これは、疾患変異の大部分は KIF1A の機能を欠損するためであると考えられた。一方で、KIF1A (V8M)、KIF1A (A255V)、KIF1A (R350G) の 3 種類の疾患変異型 KIF1A は、線虫の unc-104 変異体を野生型と同レベルにレスキューすることができた。この結果から、少なくともこの 3 種類の変異は KIF1A の機能阻害は起こっていないことを示唆した。

(2) 遺伝性痙性対麻痺モデル線虫では軸索輸送が増加している

CRISPR/cas9 法によって線虫の UNC-104 遺伝子に KIF1A (V8M) と KIF1A (A255V) に相当する変異である UNC-104 (V6M) と UNC-104 (A252V) を導入することに成功した。この二つの疾患モデル線虫の表現型を解析した。

疾患モデル線虫は一見すると運動の異常がないように見えたが、高齢になるにつれて野生型に比べて運動能力の低下が顕著に見られるようになった。これはヒトの遺伝性痙性対麻痺において高齢になるにつれて症状が重くなることと一致していた。

次にシナプスの異常を解析した。疾患モデル線虫のシナプスを GFP-RAB-3 によって可視化した株を観察したところ、野生型ではシナプスが形成されないような軸索末端部などにシナプス小胞の異常な集積が認められた。この表現型は逆行性の軸索輸送モーターダイニンを欠損した変異体と似ていた。ダイニンの欠損もまた運動神経疾患の原因として知られている。

(3) 疾患変異型 KIF1A の活性は亢進している

昆虫細胞 sf9 に遺伝子組換えバキュロウイルスを用いて KIF1A 全長に mScarlet と呼ばれる赤色蛍光タンパク質を融合したリコンビナントタンパク質を発現した。精製のために StrepII tag を付加した。Triton-X100 の存在下で sf9 細胞を破碎したのちに、Strep-Tactin を用いたアフィニティー精製、ゲル濾過によるサイズ排除クロマトグラフィーを行った結果、KIF1A::mScarlet を精製することに成功した。この野生型 KIF1A の運動を TIRF 法によって観察したところ、非常に頻度は低いが、KIF1A が微小管上を運動する様子が観察された。次に、V8M、A255V、R350G 変異を導入した KIF1A を同様の手法で発現し精製した。このリコンビナントタンパク質を用いて運動解析を行ったところ、どの変異を導入した場合でも、KIF1A の運動の頻度が野生型よりも大きく増加していた。KIF1A (V8M) は 20 倍程度の増加が見られたのに対して、KIF1A (A255V)、KIF1A (R350G) は 5 倍程度の増加であった。速度については KIF1A (R350G) が大幅に増加しているのに対し、KIF1A (A255V) は野生型 KIF1A と変わらない程度であった。KIF1A (V8M) の速度はわずかに上昇していた。異常の解析から、疾患変異型 KIF1A では活性が亢進する場合があることがわかった。

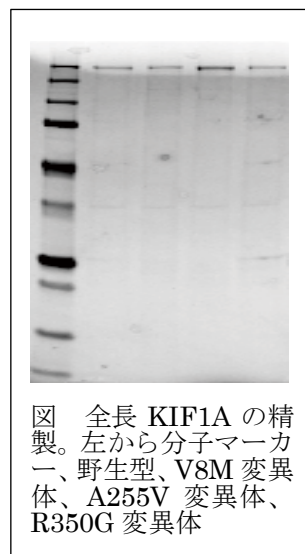


図 全長 KIF1A の精製。左から分子マーカー、野生型、V8M 変異体、A255V 変異体、R350G 変異体

(4) KIF1A 関連神経疾患 (KAND) の診断法と治療法の確立に向けて

アメリカでは KIF1A 遺伝子の変異が原因となる先天性の神経疾患の患者が多く見つかっており、患者団体も作られている。この研究以前は、KIF1A の機能の阻害 (loss of function) とそれに伴う軸索輸送の現象が KAND の原因であると信じられてきた。この研究の成果は、その概念を変えるものである。KIF1A の遺伝子変異には gain of function 型変異と loss of function 型の少なくとも 2 種類があることがわかった。興味深いことに、この二つのタイプの症状は微妙に異なっている。gain of function 型の変異を持つ患者群では運動神経疾患の症状のみで知的障害の症状は見られないのに対して、loss of function 型変異を持つ患者群では運動神経疾患の症状に加えて、変異によって軽度～重度の知的障害がみられた。これは症状によってその原因が異なっていることを示唆する。しかも、疾患の背景にあるのが軸索輸送の亢進と減少という真逆な現象であるため、治療方針も全く異なることを意味している。前者の場合は軸索輸送を抑制するような薬剤が有効であるのに対し、後者の場合は軸索輸送を亢進するような薬剤が有効となりそうである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Monroy Brigette Y., Tan Tracy C., Oclaman Janah May, Han Jisoo S., Sim? Sergi, Niwa Shinsuke, Nowakowski Dan W., McKenney Richard J., Ori-McKenney Cassandra M.	4. 巻 53
2. 論文標題 A Combinatorial MAP Code Dictates Polarized Microtubule Transport	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 60 ~ 72.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.01.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gabrych Dominik R., Lau Victor Z., Niwa Shinsuke, Silverman Michael A.	4. 巻 13
2. 論文標題 Going Too Far Is the Same as Falling Short †: Kinesin-3 Family Members in Hereditary Spastic Paraplegia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chiba Kyoko, Takahashi Hironori, Chen Min, Obinata Hiroyuki, Arai Shogo, Hashimoto Koichi, Oda Toshiyuki, McKenney Richard J., Niwa Shinsuke	4. 巻 116
2. 論文標題 Disease-associated mutations hyperactivate KIF1A motility and anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 18429 ~ 18434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1905690116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Kumiko, Matsumoto Shiori, Miyamoto Miki G., Niwa Shinsuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Physical parameters describing neuronal cargo transport by kinesin UNC-104	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 471 ~ 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-019-00548-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyoko Chiba, Richard J. McKenney, Shinsuke Niwa
2. 発表標題 Motor disease mutations in human KIF1A disrupt autoinhibition of KIF1A motor
3. 学会等名 American Society for Cell Biology (ASCB) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyoko Chiba, Richard J. McKenney, Shinsuke Niwa
2. 発表標題 Motor disease mutations in human KIF1A disrupt autoinhibition of KIF1A motor
3. 学会等名 EMBL Symposium "Microtubule: From Atoms to Complex Systems" (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	マッキニー リチャード (McKenney Richard)	カリフォルニア大学デビス校・Molecular and Cellular Biology・Assistant Professor	