

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03394

研究課題名(和文)神経軸索での小胞輸送速度が速いのはなぜか？

研究課題名(英文)Why do vesicles move faster in the axon than in vitro?

研究代表者

岡田 康志 (Yasushi, Okada)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：50272430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病との関連も示唆されているAPP輸送小胞は、従来型キネシンKIF5で輸送されている。その神経軸索での輸送速度は、精製したキネシンKIF5の運動速度の3～5倍である。このように、細胞内での小胞輸送の速度が、これを駆動するモーター分子の試験管内での運動速度の数倍以上に達する例は少なくない。本研究では、この高速化機構の解明を目的として、従来型キネシンKIF5Aに着目し、精製したキネシン分子の一分子力学計測と、細胞内での一分子レベルの運動速度計測、神経細胞での小胞輸送速度計測を統合的に実施した。その結果、連続運動性と運動速度のトレードオフ関係が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索輸送速度の低下は、さまざまな神経変性疾患との関連が示唆されている。また、マウスの実験系では、軸索や樹状突起での輸送を向上させることで疾患の予防や記憶力の改善が報告されている。したがって、軸索輸送速度の調節機構、特に高速化するための機構を理解することは、神経変性疾患の発症機構の理解の一端につながるだけでなく、あらたな治療戦略として期待される。

研究成果の概要(英文)：Transport of APP-containing vesicle is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease. It is conveyed by conventional kinesin KIF5 in the neuronal axons. The transport velocity is 3-5 times faster than the velocity of KIF5 in vitro. Similarly, many transport vesicles in cells are moving at much faster velocities than the velocity of the responsible motor proteins in vitro. To clarify this mechanism, we examined the conventional kinesin KIF5A. We measured its motor activities under external load force in vitro, and in living cells, as well as the motility of the cargo vesicles in neurons. The results suggested the trade off relations between processivity and velocity.

研究分野：生物物理学、細胞生物学

キーワード：軸索輸送 分子モーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞体から軸索末端へと向かう順行性の軸索輸送を担う主な分子モーターとしてキネシンが同定された。しかし、精製したキネシンの *in vitro* での運動速度は 0.5-1 $\mu\text{m/s}$ であり、軸索内を輸送される小胞の輸送速度より遅いことが指摘されていた。

たとえば、従来型キネシン KIF5 によって輸送される APP 輸送小胞は、中央値が 3 $\mu\text{m/s}$ 、最大で約 5 $\mu\text{m/s}$ と、キネシンの *in vitro* の運動速度の 5 倍速い速度で運ばれている (Chiba et al., Mol Biol Cell 2014)。

さらに、私たちは、軸索輸送小胞の速度ゆらぎから輸送小胞に働く力を推定する手法を開発し、軸索輸送小胞に働く力と輸送速度の関係を解析した (Hayashi et al., Mol Biol Cell 2018)。その結果、軸索輸送小胞の力速度関係は、*in vitro* でこれまで計測されていた力速度関係とは一致せず、*in vitro* の力速度関係から速度を約 4 倍したものとよく一致することが示された。この結果からも、軸索内での小胞の輸送速度が *in vitro* より 4-5 倍高速化していることが示唆される。

一方、遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子の一つとして KIF5 が同定されており、変異による運動速度の低下が発症の原因であると考えられている。同様に、アルツハイマー病においても、APP の輸送速度の低下が発症につながる可能性が提唱されている。

2. 研究の目的

本研究では、従来型キネシン KIF5 のうち、とくにヒトやマウスなど哺乳類の神経細胞で発現している主要なアイソフォームである KIF5A を中心に、その *in vitro* での運動速度と細胞内での運動速度を系統的に比較し、高速化の機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

大型哺乳動物であるキリンは長い神経軸索を有することから、マウスなどより軸索輸送速度が速いことが予想される。そこで、キリンのゲノム配列から KIF5A 遺伝子を検索し、マウスやヒトの KIF5A との相違点を検索した。さらに、その結果を基に、既知のゲノム配列・遺伝子配列から KIF5A の運動活性を担うモータードメインのアミノ酸配列を比較した結果、3ヶ所のアミノ酸配列で、大型動物とそれ以外の動物の間で差異が見られた。特に、キリンと同様に長い首を持つ大蛇では、3ヶ所すべてのアミノ酸配列がキリンと共通していた。このことは、長い軸索輸送を行うために適した形質へと収斂進化した可能性を示唆している。そこで、マウスおよびキリンの KIF5A をモデルとして、*in vitro* および細胞内での運動速度を計測し、その速度調節機構の解明を目指した。

4. 研究成果

まずマウスおよびキリンの KIF5A から、小胞結合に必要な C 末側を欠失させ、運動活性に必要な N 末側のみ (1-560aa, 以下 K560) を合成して、その運動速度を *in vitro* および細胞内で計測した。

キリンの配列に基づいて合成した K560 は、マウスやヒトの K560 より *in vitro* の一分子モーターアッセイで速い運動速度を示した。また、マウスの K560 にキリン型の 3ヶ所のアミノ酸変異を導入することで運動速度が増加することが示された。

つぎに、K560 を Vero 細胞など非神経細胞に発現させ、細胞内での運動速度を計測した。その結果、*in vitro* での実験結果とは異なり、マウスとキリンの K560 の運動速度に差は認められなかった。

初代培養神経細胞系に K560 を導入した結果でも、アストロサイトではマウスとキリンの運動速度の差は認められなかった。神経細胞においても、樹状突起では速度差はみられなかった。しかし、軸索においては、*in vitro* と同様に、キリンの K560 はマウスより速い速度で動くことが確認された。すなわち、神経軸索の微小管上でのみキリン K560 は高速に運動すると考えられる。これまでの私たちの研究から、*in vitro* の実験で私たちが通常用いている微小管は、KIF5 との相互作用において、軸索型の微小管に近いことが示されているため、*in vitro* の実験の結果とも整合的であるといえる。

つぎに、キリン KIF5A 全長分子をマウス神経細胞に過剰発現させ、KIF5 により高速輸送される輸送小胞である APP 輸送小胞の速度を計測した。マウス KIF5A の過剰発現では速度に変化はみられなかったが、キリン KIF5A を過剰発現させると速度が増加した。

キリン型 KIF5A の高速化のメカニズムを更に詳細に検索した結果、酵素化学反応サイクルで

は、ADP 放出が高速化されていることが判った。これにより、ATP 加水分解の回転速度が増加し、K560 の高速化につながったと考えられる。

さらに、一分子力学計測結果を詳細に解析した結果、キリン KIF5A は、マウスよりも連続運動性が低く、微小管から乖離しやすいことが示された。キネシンは、微小管上を完全に外れることなく長距離運動し続ける性質を持っており、連続運動性 processivity と呼ばれている。この連続運動性は、軸索輸送のような長距離輸送のために重要な性質だと考えられてきた。しかし、マウスよりも長距離を輸送する筈のキリンの KIF5A の連続運動性が低いということは、この考え方と逆である。

そこで、私たちは、微小管から K560 が乖離する際の速度定数の負荷依存性を計測するとともに、確率的モデルを用いた定量的シミュレーションを行い、その機能的意義を検討した。その結果、キリン型の KIF5A は、前方へ押されたときに微小管から外れやすくなることで、多分子での協調運動を可能にしていることが示唆された。すなわち、従来 KIF5 では、前方への外力がかかっても微小管から外れないため、複数分子が協調的に輸送しようとしても互いにブレーキとなってしまうことが知られていた。しかし、キリン型の KIF5A では、前方への外力によって微小管から外れてしまうために、他の分子に対してブレーキとならない。その結果、複数分子の協調運動が可能となると考えられる。そして、神経細胞の中では、複数のモーター分子が一つの小胞にリクルートされ、強調して輸送を行うことで、高速かつ長距離の輸送が実現されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujioka Yuko, Alam Jahangir Md., Noshiro Daisuke, Mouri Kazunari, Ando Toshio, Okada Yasushi, May Alexander I., Knorr Roland L., Suzuki Kuninori, Ohsumi Yoshinori, Noda Nobuo N.	4. 巻 578
2. 論文標題 Phase separation organizes the site of autophagosome formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 301 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1977-6	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Kakizuka Taishi, Takai Akira, Yoshizawa Keiko, Okada Yasushi, Watanabe Tomonobu M	4. 巻 56
2. 論文標題 An improved fluorescent protein-based expression reporter system that utilizes bioluminescence resonance energy transfer and peptide-assisted complementation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3625 ~ 3628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC08664A	査読の有無 有
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 Haraguchi Tokuko, Koujin Takako, Shindo Tomoko, Bilir ??kriye, Osakada Hiroko, Nishimura Kohei, Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Mori Chie, Kobayashi Shouhei, Okada Yasushi, Chikashige Yuji, Fukagawa Tatsuo, Shibata Shinsuke, Hiraoka Yasushi	4. 巻 5
2. 論文標題 Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 78-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03021-8	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 Nagao Yukiko, Sakamoto Mika, Chinen Takumi, Okada Yasushi, Takao Daisuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Robust classification of cell cycle phase and biological feature extraction by image-based deep learning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-03-0187	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 Yuan Jian Wang Jay, Kambara Taketoshi, Okada Yasushi	4. 巻 154
2. 論文標題 Single-Molecule Imaging of Intracellular Transport in Neurons and Non-neuronal Cells: From Microscope Optics to Sample Preparations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroMethods	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0532-5_1	査読の有無 有
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13件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 岡田康志
2. 発表標題 Dissecting molecular mechanisms by optical microscopy in living cells and in vitro.
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会年会19回日本蛋白質科学会年会合同年次大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田康志
2. 発表標題 小胞輸送の速度と揺らぎと温度
3. 学会等名 第4回バイオサーモロジーワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田康志
2. 発表標題 Dissecting the Molecular Mechanisms of Axonal Transport through Imaging.
3. 学会等名 The 7th Workshop on physics between Ecole Normale Superleure and University of Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田康志
2. 発表標題 超解像・一分子イメージングで生きた細胞の中を見る
3. 学会等名 日本量子生命科学会第2回総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasushi Okada
2. 発表標題 Development of super-resolution microscopy and its application to the study of axonal transport
3. 学会等名 第43回日本神経科学会大会塚原伸晃記念賞記念講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nobuhiko Yamamoto and Yasushi Okada, ed	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana	5. 総ページ数 331
3. 書名 Single Molecule Microscopy in Neurobiology	

〔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
研究 分担者	神原 丈敏 (Kambara Taketoshi) (40451637)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員 (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	池崎 圭吾 (Ikezaki Keigo) (10722960)	東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教 (12601)	
研究分担者	池田 一穂 (Ikeda Kazuho) (20642565)	東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師 (12601)	
研究分担者	榎 佐和子（苮口佐和子） (Enoki Sawako) (50467635)	東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関