

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03247
研究課題名（和文）分子モーターKIF1Aの疾患変異を手がかりとした軸索輸送メカニズムの解明

研究課題名（英文）The molecular mechanism of KIF1A Associated Neurological Disorders

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） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年、ゲノムシーケンスが容易になり弧発性の先天性神経疾患においてもKIF1Aの変異の報告が相次いだ。私たちは1分子レベルの分子モーターの運動解析の手法と、線虫Caenorhabditis elegansを利用してKIF1A関連神経疾患を解析し、この疾患の発症の分子メカニズムを解明すると共に、軸索輸送の分子メカニズムに関する新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義
軸索輸送は神経機能の維持に重要な役割を持っている。軸索輸送の異常はアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの様々な疾患の原因となっている。また、近年では老化によって軸索輸送の量が減ることが老化による神経機能の低下に関係しているとも言われている。この研究では軸索輸送を担うモータータンパク質の異常が引き起こす疾患について解析を行い、その原因を解明した。本研究の成果は軸索輸送の異常が原因で起こる他の神経疾患のメカニズムの解明にもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, as genome sequencing has become easier, mutations in KIF1A have been reported in a number of arcuate congenital neurological diseases. We analyzed KIF1A-associated neurological diseases using single-molecule-level molecular motor motility analysis methods and the nematode Caenorhabditis elegans to elucidate the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of these diseases and to gain new insights into the molecular mechanisms of axonal transport.

研究分野：細胞生物学

キーワード：軸索輸送 KIF1A シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の情報伝達は、軸索上のシナプス小胞を介して行われます。シナプスにはさまざまなタンパク質があり、それぞれのタンパク質が機能を発揮することで情報伝達が行われる。しかし、軸索内にはほとんどリボソームや粗面小胞体といったタンパク質合成装置が存在しないため、シナプス前終末やシナプス小胞を構成するタンパク質のほぼ全量は細胞体で合成される。しかし、軸索は非常に長いので、この問題を解決するために軸索輸送と呼ばれる高速輸送メカニズムが存在する。軸索輸送には KIF1A や KIF1B β という分子モータータンパク質が関与し、シナプス前終末やシナプス小胞の材料を軸索内に運ぶ。最近の研究では、これらのタンパク質がシナプス小胞だけでなく、シナプス前膜の材料も輸送する可能性があることが示唆されている。

軸索輸送モーターの異常は神経疾患の原因の一つとされており、KIF1B β や KIF1A の遺伝的変異が家族性神経疾患の原因となることが報告されてきた。最近では、KIF1A の変異が孤発性の先天性神経疾患でも見られることがゲノムシークエンスによって明らかになった。特に痙攣対麻痺を伴う神経疾患では、数%の患者で KIF1A 遺伝子の変異が見つかったと報告されている。この疾患は KIF1A 関連神経疾患 (KIF1A-associated neurological disorder : KAND) という名前が提案されている。

2. 研究の目的

(1) 1 分子レベルの運動解析の手法を用いて KIF1A 関連神経疾患において KIF1A の運動にどのような異常が生じているのかを明らかにすることを目指した。全反射蛍光顕微鏡法 (TIRF) とよばれる手法を用いると、分子モーター 1 分子の運動を顕微鏡下で観察することができる。この研究では疾患変異を導入した KIF1A の運動を TIRF を用いて解析した。

(2) 疾患モデル *C. elegans* を作成して KIF1A 関連神経疾患において細胞レベルでどのような異常が生じるのかを明らかにすることを目指した。*C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) は、線虫とも呼ばれる微小な生物で、生物学や神経科学の研究において非常に重要なモデル生物である。*C. elegans* は神経科学の研究において特に重要である。なぜなら、*C. elegans* の神経系はわずかな神経細胞 (約 302 個) からなり、その神経回路図が非常に詳細に解明されているからである。そのため、神経系の発達、機能、行動の研究において、個々の神経細胞の役割や相互作用を調べることが可能である。*C. elegans* は遺伝学的研究において特に有用である。*C. elegans* は短い生殖期間 (約 3 日間) を持ち、多数の子孫を生むことができるため、多数の個体を同時に解析できる。また、ゲノム編集をはじめとする遺伝子の機能を解析するための手法やツールが豊富に開発されていて、それを利用することができる。*C. elegans* はこれらの特徴により、生物学的な研究のさまざまな分野で広く利用されてきた。特に神経科学や遺伝学の分野で重要な知見が得られており、疾患のメカニズム解明や新たな治療法の開発に貢献してきた。

3. 研究の方法

ヘテロ 2 量体型 KIF1A の解析

疾患型 KIF1A の精製のため、BL21(DE3) 細胞に KIF1A(1-393)::LZ::mScarlet-I::Strep プラスミドを導入し、カナマイシン添加の LB 培地で培養した。この細胞を基にして Mix&Go キットでコンピテントセルを調製した。このコンピテントセルに KIF1A(1-393)::LZ::His プラスミドを導入した。LB 寒天培地でアンピシリンとカナマイシンによって 2 重選択し、コロニーを増殖させた。次の日に 2.5 倍濃度の YT 培地で振とう培養し大量の大腸菌を得た。この大腸菌を Streptactin-XT 樹脂にロードし、洗浄とビオチン添加でタンパク質を精製した。TALON 樹脂でも洗浄とイミダゾール添加でタンパク質を精製した。遠心濾過で濃縮し、Superdex 200 カラムで分離し、最終生成物とした。TIRF アッセイのレールとなる微小管を作るために、豚脳からチューブリンを精製し、Biotin-PEG2-NHS エステルと AZDye647 NHS エステルで標識しました。これらの標識されたチューブリンを使用してタキソール安定化微小管を形成しました。微小管はガラスチャンバーに固定した。アッセイバッファ中で希釈した KIF1A をガラスチャンバーに注入し、単一分子の運動を TIRF 顕微鏡 (ニコン) で観察した。

疾患モデル線虫の作成

unc-104 のターゲット配列は、pRB1017 (Andrew Fire 博士、スタン

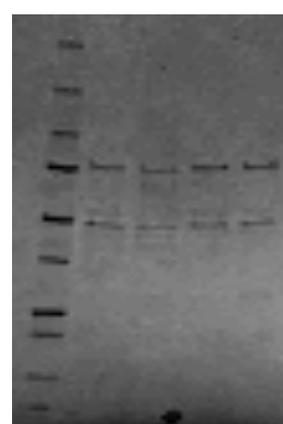


図1 KIF1A ヘテロ 2 量体の精製。左から、マーカー、野生型 2 量体、野生型と R11Q 変異体、野生型と R254Q 変異体、野生型と P305L 変異体

フォード大学、addgene #59936 から提供) に挿入した。ben-1 のターゲット配列も pRB1017 に挿入した。Cas9 の発現には pDD162 (Bob Goldstein 博士、UNC Chapel Hill、addgene #47549 から提供) を用いた。これらのプラスミドを *C. elegans* の生殖腺にインジェクションすることで点変異を導入した。ベンジイミダゾール耐性を指標としてゲノム編集が起こった線虫を選択した。

4. 研究成果

KIF1A の 2 量体化メカニズムの解明

キネシン型分子モーターは、ATP の消費によって微小管上を一步進む。その歩幅は 8 ナノメートルであり、1 マイクロメートルの距離を進む場合には 125 回の ATP 代謝反応が必要となる。一般にキネシン型分子モーターは 2 量体を形成し、交互に ATP 代謝反応を行います。2 量体の一方のサブユニットは微小管に強く結合し、解離を防ぎます。

KIF1A は単量体として精製される。単量体である KIF1A が動くメカニズムとしては、KIF1A には K ループと呼ばれる部位があり、微小管に強く結合するために単量体で連続的な反応が可能であるという説 (単量体説) と、KIF1A は小胞に結合することで局所的な濃度が上昇し、2 量体を形成するという説 (カーゴ依存的 2 量体化説) とがあった。

線虫の UNC-104 は KIF1A のオルソログであり、KIF1A と同じように単量体として精製される。しかし、この単量体型 UNC-104 は微小管上を動く活性を持たない。私たちは UNC-104 (E412K) 変異を軸索輸送を亢進する変異として発見していた。E412K 変異を UNC-104 に導入し精製すると、2 量体として精製されるようになった。この 2 量体化には小胞は全く必要ではなかった。2 量体を形成した UNC-104 は微小管上を非常に活発に動くことができた。私たちは新しいモデルとして、UNC-104 や KIF1A は自己阻害が解除されると 2 量体を形成し、運動を開始するという提案をした (自己阻害依存的 2 量体化説) (文献 1)。

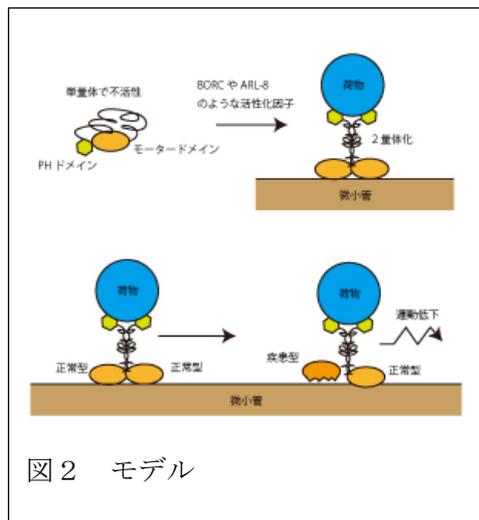


図 2 モデル

ヘテロ 2 量体 KIF1A の一分子レベルの解析

もし KIF1A が 2 量体を形成する場合、KIF1A の疾患変異をヘテロ接合体として持つ患者の神経細胞では、機能低下型 KIF1A と正常型 KIF1A で構成されるヘテロ 2 量体が半分を占めることとなる。しかし、これまでの先行研究では、主に機能低下型 KIF1A のホモ 2 量体の解析が行われてきた。私たちは、このようなヘテロ 2 量体型 KIF1A を発現・精製する方法を確立し、その活性を測定した。その結果、全ての例で「機能低下型 KIF1A と正常型 KIF1A のヘテロ 2 量体」の運動は、「正常型 KIF1A のホモ 2 量体」と比べて、微小管上での走行距離や速度などのパラメーターが顕著に低下していることがわかった。これは疾患変異で機能が低下した KIF1A は正常型 KIF1A の機能阻害をすることを示唆した (文献 2)。

線虫を用いた表現型解析

では、生体内でも機能低下型 KIF1A は正常型 KIF1A による運動や軸索輸送を阻害するのか？ この問いに答えるために、野生型線虫に機能低下型変異 UNC-104 を過剰発現した。このトランスジェニック線虫では、正常な UNC-104 も発現しているにもかかわらず、シナプス小胞の材料の軸索輸送が減少していた。その結果、シナプス小胞が細胞体や軸索の途中、あるいは樹状突起内に異所局在するようになっていた。

以上の研究結果から、機能低下型の KIF1A 変異は単純な機能低下によって軸索輸送の量を減らすのではなく、むしろ正常型 KIF1A の活性を妨げることによってシナプス小胞の材料の軸索輸送を減少させる可能性が示唆された (文献 2、文献 3)。

参考文献

1. Kita, T., Chiba, K., Wang, J., Nakagawa, T., Niwa, S. (2023) *Biorxiv*
2. Anazawa, Y., Kita, T., Iguchi, R., Hayashi, K., Niwa, S. (2023) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 119(32), e2113795119.
3. Chiba, K., Kita, T., Anazawa, Y., Niwa, S. (2023) *J. Cell Sci.*, 136(5), jcs260742.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Lam Aileen J., Rao Lu, Anazawa Yuzu, Okada Kyoko, Chiba Kyoko, Dacy Mariah, Niwa Shinsuke, Gennerich Arne, Nowakowski Dan W., McKenney Richard J.	4. 巻 7
2. 論文標題 A highly conserved 310 helix within the kinesin motor domain is critical for kinesin function and human health	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	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） 10.1126/sciadv.abf1002	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 該当する
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 該当する
1. 著者名 Hayashi Kumiko, Hasegawa Shin, Niwa Shinsuke	4. 巻 51
2. 論文標題 What is the temperature of a cell?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Europhysics News	6. 最初と最後の頁 48 ~ 50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1051/epr/2020510	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 Hayashi Kumiko, Miyamoto Miki G., Niwa Shinsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of dynein inhibitor on the number of motor proteins transporting synaptic cargos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	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） 10.1016/j.bpj.2021.02.018	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 Takahashi Hironori, Kamiya Mako, Kawatani Minoru, Umezawa Keitaro, Ukita Yoshiaki, Niwa Shinsuke, Oda Toshiyuki, Urano Yasuteru	4. 巻 118
2. 論文標題 Neural and behavioral control in <i>Caenorhabditis elegans</i> by a yellow-light-activatable caged compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2009634118	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, Kita Tomoki, Anazawa Yuzu, Niwa Shinsuke	4. 巻 136
2. 論文標題 Insight into the regulation of axonal transport from the study of KIF1A-associated neurological disorder	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs260742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.260742	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 Niwa Shinsuke, Chiba Kyoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of recombinant and chickenized scFc versions of an anti kinesin monoclonal antibody <sc>H2</sc>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytoskeleton	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) 10.1002/cm.21756	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 Higashida Maki, Niwa Shinsuke	4. 巻 28
2. 論文標題 Dynein intermediate chains DYCI 1 and WDR 60 have specific functions in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 97 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12996	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 Taguchi Shinya, Nakano Juri, Imasaki Tsuyoshi, Kita Tomoki, Saijo-Hamano Yumiko, Sakai Naoki, Shigematsu Hideki, Okuma Hiromichi, Shimizu Takahiro, Nitta Eriko, Kikkawa Satoshi, Mizobuchi Satoshi, Niwa Shinsuke, Nitta Ryo	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural model of microtubule dynamics inhibition by kinesin-4 from the crystal structure of KLP-12-tubulin complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e77877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.77877	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 Anazawa Yuzu, Kita Tomoki, Iguchi Rei, Hayashi Kumiko, Niwa Shinsuke	4. 巻 119
2. 論文標題 De novo mutations in KIF1A-associated neuronal disorder (KAND) dominant-negatively inhibit motor activity and axonal transport of synaptic vesicle precursors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2113795119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2113795119	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 Chiba Kyoko, Ori-McKenney Cassandra M., Niwa Shinsuke, McKenney Richard J.	4. 巻 39
2. 論文標題 Synergistic autoinhibition and activation mechanisms control kinesin-1 motor activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110900 ~ 110900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110900	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 Anazawa Yuzu, Niwa Shinsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Analyzing the Impact of Gene Mutations on Axonal Transport in Caenorhabditis Elegans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 465 ~ 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1990-2_25	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 Nakano Juri, Chiba Kyoko, Niwa Shinsuke	4. 巻 27
2. 論文標題 An ALS associated KIF5A mutant forms oligomers and aggregates and induces neuronal toxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 421 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12936	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yuzu Anazawa, Kita Tomoki, Hayashi Kumiko, Niwa Shinsuke
2. 発表標題 De novo mutations in KIF1A-associated neuronal disorder (KAND) dominant-negatively inhibit motor activity and axonal transport of synaptic vesicle precursors.
3. 学会等名 Cell Blo virtual 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹羽伸介
2. 発表標題 線虫遺伝学と1分子計測の融合アプローチによるオルガネラ局在機構の研究
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------