

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15053

研究課題名（和文）KIF5Aの二重自己阻害の異常による神経変性疾患

研究課題名（英文）Altered autoinhibition of KIF5A in neurodegeneration

研究代表者

千葉 杏子（Chiba, Kyoko）

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：10795701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：キネシンは細胞内でカーゴ輸送などに携わるモータータンパク質の1つである。キネシンの1つであるKIF5Aの遺伝子変異は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となる。遺伝子変異の多くはKIF5Aのexon27周辺配列に生じ、多くがスプライシング異常によりexon27のスキップを引き起こす。本研究ではexon27のスキップによって生じる変異型KIF5Aの解析を行った。ALS変異型KIF5Aのリコンビナントタンパク質を用いた生化学解析や細胞生物学的解析から、ALS変異型KIF5Aは野生型に比べ過剰な凝集傾向を持つようになることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キネシンは細胞内で運び屋の役割をするタンパク質である。近年、KIF5Aの遺伝子変異が筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症に関わることが報告されたが、発症のメカニズムは分かっていなかった。本研究は、ALS変異型のKIF5Aタンパク質においても、運び屋としての機能は保たれていることを示した。逆に、細胞内で塊になってしまうという、本来は持っていない性質を獲得してしまっていることが明らかとなった。これらの知見は、KIF5Aを原因として発症するALSの発症機構解明や治療法の確立に繋がる知見である。

研究成果の概要（英文）：Kinesin is a type of molecular motor proteins involved in cargo transport within cells. Genetic mutations in KIF5A gene, a neuronal kinesin, cause amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Most mutations occur around exon 27 of KIF5A, leading to the skipping of exon 27 due to mis-splicing. We analyzed the mutant KIF5A resulting from the skipping of exon 27. Biochemical and cell biological analyses using recombinant proteins of the ALS mutant KIF5A revealed that ALS-associated KIF5A protein is prone to form aggregates and oligomers in cells and in vitro.

研究分野：生化学

キーワード：モータータンパク質 キネシン 細胞内輸送 ALS

1. 研究開始当初の背景

(1) モータータンパク質は細胞内の物質輸送に携わるタンパク質群である。細胞内に存在するオルガネラの多くはモータータンパク質による細胞内輸送を受ける(図1)。モータータンパク質の機能異常およびそれに伴うカーゴ輸送の異常は個体の機能に深刻な影響を及ぼし、ヒトの疾患とりわけ神経変性疾患の原因となる。細胞内輸送によるオルガネラの適切な分布・局在は細胞の機能維持に不可欠である。

(2) モータータンパク質の一つであるキネシンは微小管のマイナス端からプラス端すなわち順行性の小胞輸送に携わる。キネシンには多くの種類が存在し、キネシンスーパーファミリー(Kinesin Super Family: KIF)と呼ばれる。KIFのうち、最初に見出されたものが Kinesin-1 という呼び名でよく知られている KIF5 である。Kinesin-1 はイカ巨大軸索から 1985 年に発見されたタンパク質であり、神経軸索輸送に主要な役割を果たす。その後の解析から Kinesin-1 は Kinesin Heavy Chain と Kinesin Light Chain それぞれ 2 分子から構成されるヘテロ四量体タンパク質であることが明らかになり、KIF のクローニングが始まる端緒となった。KIF のクローニングが進められる中で Kinesin Heavy Chain は KIF5 と呼ばれるようになった。KIF5 は N 末端に微小管に結合し ATP 依存性の運動を行うモータードメイン、C 末端にカーゴ結合部位や、Kinesin Light Chain の結合部位が存在する。一方 Kinesin Light Chain はモータードメインを持たないため KIF とは呼ばれない。KIF5 は線虫から哺乳類まで高度に保存されており、核、ミトコンドリア、アミロイド前駆体タンパク質やリソソームなどの多様なカーゴの輸送に携わる。カーゴは KIF5 に直接結合するものもあるが、多くは Kinesin Light Chain を介して結合する。Kinesin Light Chain および KIF5 の C 末端はカーゴ結合に必要であると共にモータードメインの活性を抑制する自己阻害に関わることが知られている。KIF5 はそれ自体で分子内相互作用による自己阻害を行う。Kinesin Light Chain による KIF5 の阻害は KIF5 の分子内相互作用とは別のメカニズムで阻害を行う。この2つの自己阻害様式は、カーゴ非存在下でのモーターの不要な活性化を防ぐために働いているものと考えられている。これまでに申請者は、他のキネシンモーターである KIF1A タンパク質では自己阻害の異常による過剰な活性化が異所性のシナプス形成を通じて神経変性の原因となることを明らかとしてきた。したがって、KIF5 の二重自己阻害も KIF1A 同様に生体にとって重要な仕組みであることが予想された。

(3) キネシンの一つである KIF5A の遺伝子変異は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因となることが近年報告された。遺伝子変異の多くは KIF5A の exon27 周辺配列に生じ、スプライシング異常によりエクソン 27 のスキップを引き起こすと予想されている(図 2)。エクソン 27 の欠失は、ヒト KIF5A タンパク質を構成する 1032 アミノ酸のうち、998 番目のグリシンでフレームシフトを起こす。したがって 999 番目以降の 34 アミノ酸は、変異型 KIF5A では 39 アミノ酸からなる別の配列に置き換わる。ALS 変異体において生じるこの新規配列をここでは新規 C 末端と呼ぶ。新規 C 末端を獲得することが KIF5A の分子機能にどのような影響を与えるかは調べられていない。

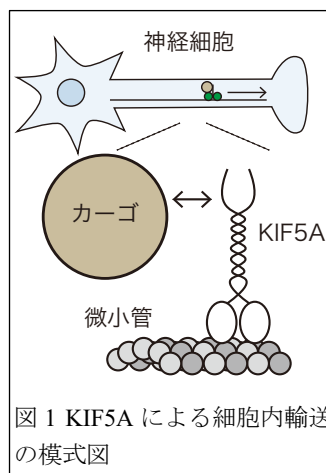


図1 KIF5A による細胞内輸送の模式図

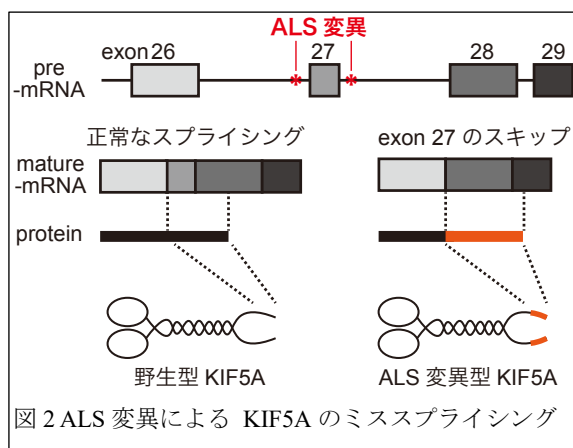


図2 ALS 変異による KIF5A のミスプライシング

2. 研究の目的

本研究では KIF5A の遺伝子変異が ALS を引き起こすメカニズムを明らかにするため、特に新規 C 末端が KIF5A の分子機能に与える影響を解析した。特に KIF5A の適切なカーゴ輸送に必要な、上記の二重自己阻害に対する新規 C 末端の影響に着目した。自己阻害に重要な KIF5A の分子内相互作用は、N 末端のモータードメインと C 末端の尾部ドメインが相互作用することにより引き起こされる。フレームシフトは尾部ドメインの中に生じることから、KIF5 の分子内相互作用に影響を与えることが強く示唆される。また、Kinesin Light Chain の結合領域も尾部ドメインの近傍に位置していることから、Kinesin Light Chain 依存性の KIF5 の自己阻害にも新規 C 末端が影響を与える可能性が考えられた。

3. 研究の方法

KIF5A タンパク質自体の機能変化を解析するため、はじめに KIF5A のリコンビナントタンパク質を用いた生化学的な解析に取り組んだ。N 末端に蛍光タンパク質である mScarlet、アフィニティー精製のための StrepII タグを付加したヒト KIF5A を Bac to Bac システムを用い昆虫細胞で発現した。バクミドの調製は DH10Bac を用い常法にて行った。昆虫細胞 Sf9 は Sf900II 培地中、27°C のインキュベーターを用いて回転式シェーカー(120 rpm)で浮遊培養した。タンパク質の発現は細胞密度 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞 300 ml にバキュロウイルス液を加え 65 時間培養することで行った。細胞は $3,000 \times g$ で遠心することで回収し、液体窒素で凍結したのち -80°C で保存した。常温にした上記の Sf9 細胞に Protein Buffer (25 mM Hepes, 150 mM KAc, 2 mM MgSO₄, 10% Glycerol, pH7.5, 1 mM PMSF, 1 mM ATP, 0.5% TritonX-100)を加え懸濁した。懸濁液を $50,000 \times g$ で 30 分遠心することで上清を得た。上清は Strep-Tactin XT ビーズを充填したカラムを用いてアフィニティー精製した。カラムに上清を通したのちレジソ容量の 5 倍量の Protein Buffer により洗浄し、100 mM Biotin を含む Protein Buffer を用いて溶出した。溶出液は 100 MWCO のコンセントレーターを用いて濃縮し、液体窒素で凍結したのち -80°C で保存した。続いて、ゲル濾過クロマトグラフィーを NGC クロマトグラフィーシステム (Bio-Rad)を用いて行った。カラムは BioSep SEC-s4000 7.8 x 600 mm (Phenomenex 社)を用いた。タンパク質溶液 500 μ l をインジェクションしたのち GF150 Buffer (25 mM Hepes, 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, pH7.2)を流速 0.8 ml/min で通液し、UV 280 nm の吸光で検出した。得られた画分は SDS-PAGE を行ったのち目的タンパク質の含まれる画分を回収、濃縮した。得られたタンパク質を用いて全反射顕微鏡による一分子観察(文献①)を行った。また同様に N 末端に蛍光タンパク質を付加した KIF5A を哺乳類神経細胞由来の細胞株である CAD 細胞に発現し、分化誘導を行ったのち KIF5A の細胞内局在を共焦点顕微鏡(LSM 800)により解析した。

4. 研究成果

リコンビナント KIF5A タンパク質の一分子運動観察において、ALS 変異型 KIF5A は野生型より 10 倍以上高い微小管への結合頻度を示した。野生型 KIF5A では自己阻害が働いているのに対し、ALS 変異型 KIF5A においては自己阻害機構が破綻していることが予想される。さらに Kinesin Light Chain との複合体を形成するか検討したところ、ALS 変異型 KIF5A においても Kinesin Light Chain との結合は保持されていることが明らかになった。ALS 変異型 KIF5A の微小管結合頻度は Kinesin Light Chain との複合体形成によってやや低下するが、依然として野生型 KIF5A より高かった。したがって、ALS 変異型 KIF5A においても Kinesin Light Chain 依存的な自己阻害は働いているが、自己阻害全体に対する KIF5A 分子内相互作用の寄与が大きいため、分子全体の活性としては ALS 変異型 KIF5A は野生型 KIF5A よりはるかに高い運動能を示すことになると考えられる。

また、リコンビナントタンパク質のゲル濾過クロマトグラフィーと培養細胞内の局在観察により ALS 変異型 KIF5A においてはタンパク質の凝集が起こることを明らかにした。ゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出位置は、野生型 KIF5A にくらべ ALS 変異型 KIF5A では高分子量側へとシフトした。また CAD 細胞において野生型 KIF5A はほぼ一様に分布するが、ALS 変異型 KIF5A は多数の凝集体を形成する(図3)。SOD1をはじめとした他の ALS 原因タンパク質においても細胞内凝集体の形成が報告されていることから、KIF5A の凝集体も ALS 発症に主要な役割を果たしていると考えられた。これに加え、自己阻害の破綻による KIF5A の過剰な活性化が、細胞内輸送の異常を通して細胞毒性の増悪に働いていることが考察される。以上の研究成果は文献②、③で発表済みである。

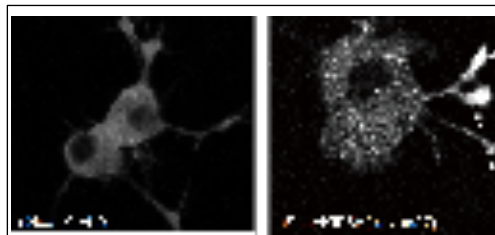


図3 KIF5A の細胞内凝集(文献③)

<引用文献>

① Chiba K, Ori-McKenney KM, Niwa S, McKenney RJ. Synergistic autoinhibition and activation mechanisms control kinesin-1 motor activity. Cell Rep. 2022 May 31;39(9):110900. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110900. Erratum in: Cell Rep. 2022 Jun 28;39(13):111016. PMID: 35649356; PMCID: PMC9365671.

② Chiba K, Niwa S. Autoinhibition and activation of kinesin-1 and their involvement in amyotrophic lateral sclerosis. Curr Opin Cell Biol. 2024 Feb;86:102301. doi: 10.1016/j.ceb.2023.102301. Epub 2023 Dec 13. PMID: 38096601.

③ Nakano J, Chiba K, Niwa S. An ALS-associated KIF5A mutant forms oligomers and aggregates and induces neuronal toxicity. Genes Cells. 2022 Jun;27(6):421-435. doi: 10.1111/gtc.12936. Epub 2022 May 20. PMID: 35430760; PMCID: PMC9322661.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 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 -
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 80
2. 論文標題 Generation of recombinant and chickenized scFv versions of an anti kinesin monoclonal antibody H2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytoskeleton	6. 最初と最後の頁 356 ~ 366
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 Kita Tomoki, Chiba Kyoko, Wang Jiye, Nakagawa Atsushi, Niwa Shinsuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative analysis of two <i>Caenorhabditis elegans</i> kinesins KLP-6 and UNC-104 reveals a common and distinct activation mechanism in kinesin-3	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP89040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.89040	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, Niwa Shinsuke	4. 巻 86
2. 論文標題 Autoinhibition and activation of kinesin-1 and their involvement in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 102301 ~ 102301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jceb.2023.102301	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 千葉杏子
2. 発表標題 An ALS-associated KIF5A mutant forms oligomers and aggregates and induces neuronal toxicity
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology (ASCB), Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉杏子
2. 発表標題 KIF5A のALS 関連遺伝子変異はKIF5A のオリゴマー化と凝集を促進し神経毒性を引き起こす
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉杏子
2. 発表標題 Kinesin-3の分子内相互作用と自己阻害
3. 学会等名 第12回分子モーター討論会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kyoko CHIBA, Shinsuke NIWA
2. 発表標題 KIF1A and KIF1B form a heterodimer
3. 学会等名 The 49th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kyoko CHIBA, Shinsuke NIWA
2. 発表標題 The FHA domain is essential for the autoinhibition of KIF1A
3. 学会等名 Cell Bio 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>リサーチマップ https://researchmap.jp/kchiba</p>

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