

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05010

研究課題名(和文) シナプス小胞の軸索輸送の分子カスケードの解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism that regulates axonal transport of synaptic vesicle precursors

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) 16,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞はシナプスに局在するシナプス小胞と呼ばれる軸索内の膜小胞によって情報伝達をする。シナプスやシナプス小胞の構成成分は細胞内でしか合成されない。そのため、細胞内で合成されたシナプスやシナプス小胞の材料を輸送する仕組みが重要となる。これを軸索輸送と呼ぶ。本研究ではBLOC-1関連複合体(BORC) small GTPase ARL-8 分子モーター-KIF1Aからなる分子カスケードがシナプスやシナプス小胞の軸索輸送を担っていることを明らかにした。BORCはsmall GTPaseであるARL-8をGTP状態にする。GTP状態のARL-8は分子モーター-KIF1Aを活性状態にし軸索輸送が開始する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索輸送は神経細胞の機能を支える重要なマシナリーであるにもかかわらず、その制御についてはほとんどわかっていなかった。また、制御機構があるとしてそれが破綻した場合に何が起こるのかも不明であった。本研究では軸索輸送の制御メカニズムの一端を解明することができた。また、このメカニズムに異常が起こることが遺伝性痙性対麻痺と呼ばれる運動神経疾患の原因となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neurons transmit information via synaptic vesicles that are localized in the axon. Synaptic vesicles are synthesized only in the cell body and transported down to the axon by a transport mechanism called axonal transport. In this work, we have shown that axonal transport is regulated by a molecular cascade consisting of BLOC-1 related complex (BORC), small GTPase ARL-8 and a molecular motor KIF1A. BORC activates ARL-8 by converting ARL-8(GDP) to ARL-8(GTP). ARL-8(GTP) binds to KIF1A and unlock the autoinhibition. Activated KIF1A binds to axonal transport carriers and transport them.

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 ARL8A ARL8B BORC UNC-104

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は筋肉や他の神経細胞に情報を伝達する。情報の伝達は軸索が担う。この際に特に重要なオルガネラがシナプス小胞である。高等生物では神経細胞間の情報のやりとりは主に化学シナプスによって行われる。化学シナプスではシナプス小胞内の神経伝達物質が神経の活動に応じて開口放出される。開口放出の制御などのためにシナプス小胞の膜上には数百のタンパク質が載っている。ところが軸索内にはシナプス小胞を構成するタンパク質を合成するためのリボソームや合成されたタンパク質を修飾するゴルジ体は存在しない。そのため軸索のシナプス小胞はすべてその材料が細胞体において合成された後に軸索に輸送される。この輸送を担うのが微小管をレールとするモータータンパク質であるキネシンスーパーファミリー(KIF)のうちで、KIF1Aである(図1)。

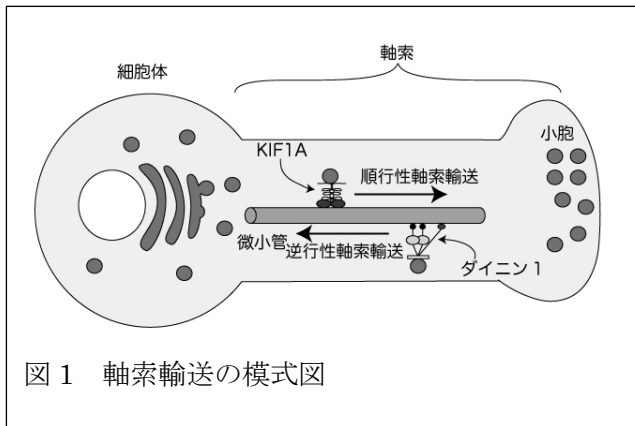


図1 軸索輸送の模式図

シナプス小胞前駆体を軸索輸送するモータータンパク質 KIF1A のファミリーは線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の遺伝学によって発見された。線虫で運動に異常が起こる変異体は unc(uncoordinated の略) と名付けられている。百以上ある unc 変異体のうちの *unc-104* と呼ばれる変異体ではシナプス小胞がシナプスからなくなり、細胞体近傍に集積する表現型が見られた。*unc-104* 変異体の原因遺伝子はキネシンスーパーファミリーモータータンパク質をコードする遺伝子であった。後の解析で UNC-104 は種を越えて保存されていることがわかり、哺乳類では KIF1A と名付けられた。

スタンフォード大学 Kang Shen のグループは線虫の遺伝学を用いることで small GTPase ARL-8 がシナプス小胞前駆体の軸索輸送に必須であることを明らかにした。線虫の *arl-8* 遺伝子変異体ではシナプス小胞前駆体の軸索輸送が大幅に減少し、シナプス小胞が軸索の途中に集積する。ARL-8 タンパク質が GTP 状態に変換されたときに UNC-104 キネシンに結合して自己阻害を解除し、軸索輸送が活性化されることがわかった。

2. 研究の目的

シナプスごとのシナプス小胞の数は普通の状態では極端に増減することはない。このことから、シナプス小胞前駆体の軸索輸送を制御することで必要な分を供給する分子メカニズムがあると推測される。モータータンパク質 (当然、無生物である!) が必要なシナプス小胞タンパク質の供給量をどのように認識し、どのように輸送量を調節しているのかは大きな謎である。本研究ではこのシナプス小胞の材料の軸索輸送量を調節するメカニズムの解明を目指した。そのヒントとして、ARL-8 タンパク質が不活性な GDP 状態から活性型の GTP 状態に変換されることが軸索輸送開始の鍵となる現象であると考えられることが私たちの過去の研究でわかっていた (Niwa et al., Cell Reports, 2016)。本研究では神経細胞において ARL-8 タンパク質を活性型に変換する分子の探索と機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1)線虫の遺伝学スクリーニング

線虫の遺伝学を用いた。ARL-8 タンパク質が不活性化する変異体を単離し、その原因遺伝子を決定することを目指した。ARL-8 タンパク質は small GTPase である。small GTPase の共通の性質として、活性化状態 (=GTP 結合状態) では膜に結合し、不活性化状態 (=GDP 結合状態) では細胞質に局在するというものがある。ARL-8 タンパク質もまた GDP 状態を模倣する変異体 (T34N 変異体) は細胞質中に局在し、GTP 状態を模倣する変異体 (D133N 変異体) はシナプス小胞やゴルジ体などに局在することがわかっていた。野生型の ARL-8 タンパク質は野生型の線虫の神経細胞ではシナプス小胞やゴルジ体に結合する。このことから、何らかのメカニズムによって神経細胞内の ARL-8 タンパク質のうちの一定量は GTP 状態に変換され、活性化されていると考えられた。この ARL-8 タンパク質の性質に着目することにした。もし、神経細胞内の ARL-8 タンパク質が完全に膜から外れるような変異体を同定することができれば、その変異体の原因遺伝子は ARL-8 タンパク質を GTP 状態に変換する役割を持っている分子のはずである。ARL-8 タンパク質の局在を生きた線虫の中で観察するために、ARL-8::YFP を安定的に発現した線虫を作製した。ARL-8 タンパク質が不活性化するような変異体を同定するために、作製した ARL-8::YFP 線虫を変異原であるメタンスルホン酸エチル (EMS) によって処理を行った。線虫は雌雄同体であるため F2 世代では 1/4 でホモ接合体が得られる。F2 世代の線虫を蛍光顕微鏡下で x63 のレンズで 1 匹ずつ観察し、ARL-8::YFP が膜から外れるような変異体を探索した。

(2) その他の変異体の入手

blos-1/BLOS1、*snpn-1*/Snapin と *kxd-1*/KXD1 については線虫遺伝学センター (CGC、ミシガン大学) およびナショナルバイオリソースプロジェクト「線虫」の変異体ライブラリの中に含まれていたため、それらを取り寄せた。*blos-2*/BLOS2、*blos-7*/Lyspersin、*blos-8*/Diaskedin については既存の変異体が存在しなかったため、CRISPR/cas9 法を用いたゲノム編集によって欠損変異体の作製を試みた。

(3) ARL-8 の生化学的解析

ARL-8 は GST 融合タンパクとして大腸菌に発現した。その際に、修飾を受けて膜に結合することが知られている N 末端の 11 アミノ酸は削ることとした ($\Delta 11$)。GST-ARL-8 ($\Delta 11$) は大腸菌の中で可溶化し、グルタチオンビーズを用いてアフィニティー精製した。BORC のサブユニットは非常に小さいため、大腸菌で発現、精製した。ラジオアイソトープでラベルした GDP を GST-ARL-8 に取り込ませた。ラベルしていない GTP と精製した BORC サブユニットを加え、ラジオアイソトープを定量し、GST-ARL-8 に取り込まれている GDP の経時変化を測定した。

4. 研究成果

(1) ARL-8 が不活化した変異体の同定と原因遺伝子の解析

ARL-8::YFP が膜から外れるような変異体を複数得ることに成功した。全ゲノムシーケンスなどを駆使することでその原因遺伝子を決定したところ、哺乳類の MEF2BNB 遺伝子のオルソログである *blos-9* 遺伝子に変異が入っていることがわかった。*blos-9* の変異体線虫でシナプス小胞の局在を観察すると、細胞体近傍にシナプス小胞が集積することがわかった。このことは *blos-9* 遺伝子が ARL-8 タンパク質の膜への結合を制御し、シナプス小胞前駆体の軸索輸送を活性化する因子であることを示唆する。

このスクリーニングと同時に、既存のシナプス小胞前駆体の軸索輸送の変異体で ARL-8::YFP の局在を観察する実験も行った。軸索輸送に異常があることはわかっているが、その分子メカニズムが不明である変異体はいくつか存在しており、*sam-4* と呼ばれる変異体はその一つであっ

た。解析の結果、*sam-4*変異体 (*sam-4*は哺乳類の Myrlysin のホモログをコードしている) においてもまた ARL-8::YFP がシナプス小胞やゴルジ体から外れ、細胞質中に局在することがわかった。

(2)BLOC-1 関連複合体(BORC)がシナプス小胞前駆体の軸索輸送に必須である

blos-9/MEF2BNB 遺伝子と *sam-4*/Myrlysin 遺伝子は線虫から哺乳類まで保存されている分子であり、100 アミノ酸程度の小さい分子であった。Hela 細胞を用いて細胞内のリソソームの局在を研究していた NIH の Juan Bonifacino グループが BLOC-1 関連複合体(BORC)と呼ばれる 8 つのサブユニットから形成されるタンパク質複合体がリソソームの局在を制御していることを示した。彼らの論文で BORC が ARL8B を何らかのメカニズムによって活性化することでリソソームが細胞の周辺部に輸送するというモデルが示された。MEF2BNB と Myrlysin はともに BORC のサブユニットであった。そこで、残り 6 つの BORC の構成因子もまた ARL-8 タンパク質の活性化やシナプス小胞前駆体の軸索輸送に必須であるかどうかを解析した。BORC のサブユニットは線虫においてもすべて保存されていた。変異体ライブラリーおよび、CRISPR/cas9 を利用することですべての BORC 変異体を包括的に解析することができた。BORC サブユニットの変異体に ARL-8::YFP を発現したところ、*blos-1*、*blos-2*、*sam-4*、*snpn-1*、*blos-8*、*blos-9* の 6 つの BORC 遺伝子の変異体ではシナプス小胞前駆体からはずれていることがわかった。一方で *kxd-1* と *blos-7* の二つの変異体では ARL-8::YFP はシナプス小胞前駆体に結合したままとなっていた。この ARL-8 タンパク質の局在の結果と一致し、シナプス小胞前駆体の軸索輸送は *blos-1*、*blos-2*、*sam-4*、*snpn-1*、*blos-8*、*blos-9* の 6 つの BORC 遺伝子の変異体で低下する一方で、*kxd-1* と *blos-7* の変異体では変化がなかった。

(3)ARL-8 を過剰発現すると BORC の変異体をレスキューできた

BORC は ARL-8 タンパク質を活性化する上流因子であると考えられた。これを立証するため BORC サブユニット変異体に ARL-8 タンパク質を過剰発現する実験を行った。その結果、BORC の欠損下でも ARL-8 タンパク質を過剰発現することでシナプス小胞前駆体の軸索輸送は増加し、シナプス小胞は背側のシナプスに正しく集積するようになることがわかった。

(4)*arl-8* の GTP 状態変異体は BORC サブユニット変異体のサプレッサーとなる

次に遺伝学的に BORC が ARL-8 の上流因子であることを示す実験を行った。私は以前の研究で ARL-8 タンパク質を GTP 状態に固定するアミノ酸置換 D133N を誘導する点変異を CRISPR/cas9 を用いたゲノム編集によって導入した線虫変異体を作製していた(Niwa et al., Cell Reports, 2016)。この線虫変異体では個体内の ARL-8 タンパク質はすべて GTP 状態になっている。本成果報告ではこれを *arl-8(GTP)*変異体と呼ぶ。BORC サブユニットの変異体と *arl-8(GTP)*変異体とを掛け合わせた二重変異体を作ったときに BORC サブユニット変異体における軸索輸送の低下がレスキューできれば、BORC が ARL-8 を GTP 状態にすることが軸索輸送に必須であると結論づけることができる。2 重変異体を作製して観察した結果、*sam-4 arl-8(GTP)*や *blos-2 arl-8(GTP)*といった 2 重変異体では、シナプス小胞の局在が野生型レベルに回復していた。小胞輸送をタイムラプス観察すると、軸索輸送の量は増加していた。

(4)精製した SAM-4 は精製した ARL-8 に対して GEF 活性を持っていた

以上の遺伝学的な実験により(1)BORC を欠損した神経では ARL-8 が膜小胞から外れて細胞質中に局在する。ARL-8 は small GTPase であるから、ARL-8 が GDP 状態になっているためであると考えられる (2) BORC のサブユニットが欠損しても ARL-8 が GTP 状態であれば軸索輸送の量は表面上は正常であることがわかった。BORC が ARL-8 を GTP 状態にする因子

GDP-GTP exchange factor (GEF)である可能性が考えられた。この仮説を生化学的に示すために、スタンフォード大学（現カリフォルニア大学サンフランシスコ校）Maxence Nachury のグループと共同研究を実施し、精製した ARL-8 タンパク質および BORC サブユニットタンパク質を用いた生化学実験を行った。SAM-4 タンパク質を加えたときに、ARL-8 からの GDP リリースが大幅に加速することがわかった。このことから、BORC のサブユニットのうちで SAM-4 サブユニットが ARL-8 タンパク質の GEF としての活性を持っていることが示唆された。

(5)考察

以上の結果から、新しく見つかった BLOC-1 関連複合体(BORC)は ARL-8 の GEF として機能することがわかった。BORC はシナプス小胞の軸索輸送の制御因子として機能している。BORC がシナプス小胞の量を何らかの手段でモニタリングし、ARL-8 の活性状態へとフィードバックすることでシナプス小胞の材料の軸索輸送を制御しているのだと考えられた。この結果は筆者が筆頭著者かつ責任著者として論文をまとめ、Current Biology 誌において報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 8件）

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 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 Kumiko Hayashi, Shiori Matsumoto, Miki G. Miyamoto, Shinsuke Niwa	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 Review	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 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 該当する
1. 著者名 Shao Zhenhua, Niwa Shinsuke, Higashitani Atsushi, Daigaku Yasukazu	4. 巻 82
2. 論文標題 Vital roles of PCNA K165 modification during C. elegans gametogenesis and embryogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102688 ~ 102688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2019.102688	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 Yanagi Shota, Sugai Tomoya, Noguchi Takuma, Kawakami Masato, Sasaki Makoto, Niwa Shinsuke, Sugimoto Asako, Fuwa Haruhiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Fluorescence-labeled neopeltolide derivatives for subcellular localization imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 6771 ~ 6776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ob01276a	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 Obinata Hiroyuki, Sugimoto Asako, Niwa Shinsuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Streptothricin acetyl transferase 2 (Sat2): A dominant selection marker for Caenorhabditis elegans genome editing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0197128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0197128	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 Chia Poh Hui, Zhong Franklin Lei, Niwa Shinsuke, Bonnard Carine, Utami Kagistia Hana, Zeng Ruizhu, Lee Hane, Eskin Ascia, Nelson Stanley F, Xie William H, Al-Tawalbeh Samah, El-Khateeb Mohammad, Shboul Mohammad, Pouladi Mahmoud A, Al-Raqad Mohammed, Reversade Bruno	4. 巻 7
2. 論文標題 A homozygous loss-of-function CAMK2A mutation causes growth delay, frequent seizures and severe intellectual disability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e32451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.32451	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 Xu Fang, Takahashi Hironori, Tanaka Yosuke, Ichinose Sotaro, Niwa Shinsuke, Wicklund Matthew P., Hirokawa Nobutaka	4. 巻 217
2. 論文標題 KIF1B mutations detected in hereditary neuropathy impair IGF1R transport and axon growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3480 ~ 3496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201801085	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 Niwa Shinsuke, Tao Li, Lu Sharon Y., Liew Gerald M., Feng Wei, Nachury Maxence V., Shen Kang	4. 巻 27
2. 論文標題 BORC Regulates the Axonal Transport of Synaptic Vesicle Precursors by Activating ARL-8	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2569 ~ 2578.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2017.07.013	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 Niwa Shinsuke, Nakamura Fumio, Tomabechi Yuri, Aoki Mari, Shigematsu Hideki, Matsumoto Takashi, Yamagata Atsushi, Fukai Shuya, Hirokawa Nobutaka, Goshima Yoshio, Shirouzu Mikako, Nitta Ryo	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-017-11031-4	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 Niwa Shinsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Immobilization of <i>Caenorhabditis elegans</i> to Analyze Intracellular Transport in Neurons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiment	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) 10.3791/56690	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, Hasegawa Shin, Sagawa Takashi, Tasaki Sohei, Niwa Shinsuke	4. 巻 20
2. 論文標題 Non-invasive force measurement reveals the number of active kinesins on a synaptic vesicle precursor in axonal transport regulated by ARL-8	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 3403 ~ 3410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cp05890j	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyoko Chiba, Richard McKenney, Shinsuke Niwa
2. 発表標題 Disease mutations in human KIF1A disrupt autoinhibition of KIF1A motor.
3. 学会等名 EMBL symposium, Microtubule (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyoko Chiba, Richard McKenney, Shinsuke Niwa
2. 発表標題 Disease mutations in human KIF1A disrupt autoinhibition of KIF1A motor.
3. 学会等名 ASCB annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丹羽伸介
2. 発表標題 線虫遺伝学を用いた分子モーター研究
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

運動神経疾患の新たな原因を発見 細胞内のトラックの暴走が疾患を引き起こす
<https://www.fris.tohoku.ac.jp/feature/topics/detail---id-631.html>
シナプスの位置を規定する因子の発見 細胞内のトラックの鍵がシナプスの場所を決める
<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/results/detail---id-47492.html>

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