

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19373

研究課題名(和文)キリンのキネシンは速いのか? ～軸索輸送の速度進化の検証～

研究課題名(英文)Is giraffe kinesin faster than human kinesin?

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):神経細胞の機能は軸索輸送と呼ばれる高速輸送システムによって支えられている。本研究ではキリンのような長い軸索を持つ生物では軸索輸送が高速化しているのではないか?という仮説を検証することを旨とした。そのために細胞体から軸索末端までシナプス小胞の材料を輸送するKIF1Aとよばれる分子モーターを解析した。キリンゲノムを解析して得られたキリンKIF1A遺伝子のcDNAを全合成し、それを用いて大腸菌、昆虫細胞で発現し、精製することに成功した。ヒト、線虫、ショウジョウバエのKIF1Aについても解析した。これらをもちいて速度を計測したところ、キリンKIF1AはヒトKIF1Aよりも1.5倍高速であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少生物由来のタンパク質や酵素は新しい機能を持っている可能性がある。本研究ではゲノム解析と長鎖DNA合成技術を組み合わせて用いることで、生体サンプルの入手が困難な希少生物由来のタンパク質の機能を解析することができることを示した。様々な種由来のKIF1Aとよばれる分子モータータンパク質の速度を計測する実験系を確立し、キリンのような長い軸索を持つ生物では軸索輸送が高速化している可能性を示唆するデータが得られた。

研究成果の概要(英文):The function of neuron depends on axonal transport. Synaptic vesicles are transported by a kinesin superfamily protein KIF1A. Here, we tested a hypothesis that axonal transport is faster in giraffe than human because giraffe has a long axon along the long neck. By analyzing giraffe genome, we identified KIF1A sequence in silico. Based on the sequence, we synthesized the giraffe KIF1A cDNA. Using the cDNA, we expressed and purified giraffe KIF1A as well as human, worm and Drosophila KIF1A. We measured the velocity of these KIF1A and found that giraffe KIF1A is 1.5 times faster than human KIF1A.

研究分野：細胞生物学

キーワード：KIF1A キネシン 軸索輸送

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軸索輸送とは？

軸索内にはタンパク質合成機構が存在しないため、シナプス小胞やミトコンドリアといったシナプスのオルガネラはすべて細胞体で合成された後に分子モータータンパク質キネシンによって軸索末端まで軸索輸送される。ヒトやマウス、ネコといった小型・中型哺乳類の場合は軸索輸送のスピードはすべて $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ 程度であり、種間で大きな差は見られない。この速度は KIF1A や KIF5A といった軸索輸送を担うキネシンの速度と一致しているため、モータータンパク質の速度が軸索輸送の速度を規定していると言える。軸索輸送は1日に換算すると 40cm 進む計算となる。ヒトの場合、最も長い軸索は 1 m 程度であるため、細胞体でオルガネラが合成されてから軸索の末端に届くまで二日半かかる計算である。一方で、シナプス小胞のタンパク質の寿命は平均 4 日程度であると言われていた (Cohen et al., *PLoS ONE*, 2013)。このため、軸索末端のタンパク質が 2 日半かけて軸索輸送されてもなお十分に機能する時間的余裕がある。

キリンの軸索は 5 m にも達する

反回神経は脳幹から出て胸部を下降し、鎖骨下動脈を回って再び上行し、声帯の筋肉を支配する神経である。首が 2 m もあるキリンの場合には右図のようにその軸索の長さは約 5 m にも達する。キリンの場合も軸索輸送キネシンのスピードが小型・中型哺乳類と全く同じ $40\text{cm}/\text{day}$ であると仮定すると、シナプスのタンパク質が軸索末端まで軸索輸送されるのに 12 日かかる計算である。シナプス小胞のタンパク質の寿命 (=4 日程度) が種間で変わらないとすると、軸索の末端までシナプス小胞が輸送される前に寿命を迎えてしまう。

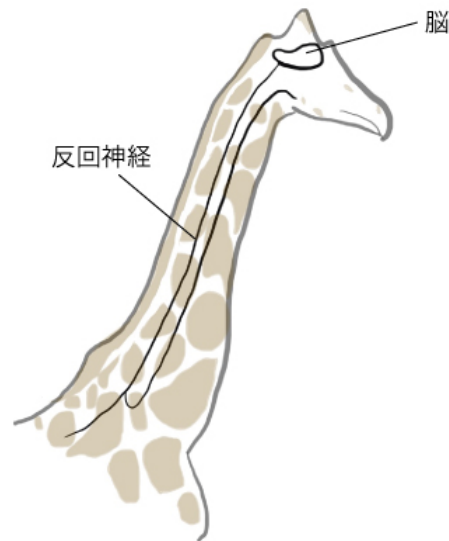


図1 キリンの反回神経は 5 m にも達する。

2. 研究の目的

軸索輸送の速度は分子モータータンパク質の速度と概ね一致する。そこで本研究では、キリンのような長い軸索をもつ生物の軸索輸送を担うキネシンの速度を計測することでこの可能性を検証した。シナプス小胞の材料を軸索輸送する KIF1A とよばれる分子モータータンパク質について比較解析を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) in silico のデータを用いたキリンの KIF1A 遺伝子の同定

キリンのゲノム解析のデータ (Agaba et al., *Nature Communications*, 2016) を利用した。ヒト KIF1A の配列を指標として、キリンゲノムの配列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/33930?genome_assembly_id=593415) からキリンの KIF1A の配列を抽出した。

(2) KIF1A の cDNA の全合成

10 年くらい前までは合成できる DNA 長はせいぜい数百 bp 程度であった。しかし、ここ数年は 1bp あたり数十円ほどのコストで数 kbp 程度の DNA を合成する商業サービスが増えてきている。本研究ではこれを利用してキリンの KIF1A 遺伝子の cDNA を合成した。大腸菌に発現するためにコドン进行调整したもの、および、線虫に発現するためにコドン調整をしたものの 2 種類を準備した。コドン調整のためには genart と呼ばれる cDNA 合成サービスに付随するコドン最適化ツールを利用した。

(3) リコンビナント KIF1A の発現と精製

大腸菌を使ったアプローチ

KIF1A の 1-393 アミノ酸を含む部位 (モータードメインに加えて neck の coiled-coil を含む) と、1-736 アミノ酸をコードする部位 (モータードメイン、neck の coiled-coil および短い二つの coiled-coil を含む) に sfGFP と呼ばれる蛍光タンパク質と His タグとよばれるアフィニティー精製のタグを融合したリコンビナントタンパク質を発現するプラスミドを作製した。比較のためにヒトや線虫の KIF1A 遺伝子についても同じ部位を発現するプラスミドを作製した。

バキュロウイルスと sf9 細胞を使ったアプローチ

キリンの KIF1A 全長に mScarlet 徒呼ばれる赤色蛍光タンパク質と、アフィニティー精製のための StrepII タグを融合したリコンビナントタンパク質を発現するための遺伝子組換えバキュロウイルスを作製した。sf9 細胞にウイルスを感染させ、3 日後に細胞を回収して、界面活性剤である Triton-X100 の存在下で破碎した。遠心後の上清から StrepII タグによるアフィニティー精製と、ゲル濾過を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって KIF1A を精製した。

(4) リコンビナント KIF1A の解析

SEC-MALS による解析

マウス KIF1A はモノマーであると報告されている。一方で、Kinesin-1 (KIF5) と呼ばれるキネシンはモノマー状態よりもダイマー状態の方が速いと報告されている。キリン KIF1A がモノマーであるか、ダイマーであるかを決定するためにサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と多角度光散乱法 (MALS) を組み合わせた SEC-MALS という方法を用いた。

TIRF を用いた分子モーターの運動解析

いくつかの種の KIF1A の速度を測定するためには、カリフォルニア大学デビス校リチャードマッキニー助教授と共同研究で全反射蛍光顕微鏡法 (TIRF) を用いた。ガラス表面を PEG および PEG-biotin で処理する。avidin を介して biotin ラベルした微小管を PEG-biotin に固定する。微小管は Alexa647 によってラベルすることで可視化する。ここに精製した KIF1A (sfGFP で標識してある) と ATP を加えて微小管上を運動する KIF1A の輝点の運動を観察する。

4. 研究成果

(1) リコンビナント KIF1A を安定的に発現・精製する系の確立

リコンビナント KIF1A を大腸菌で発現、精製するのは困難とされてきた。本研究ではキリンやヒト、線虫、ショウジョウバエといった様々な種由来の KIF1A を大腸菌のコドンに合わせて人工合成した。これらを sfGFP とよばれる可溶性タグとして機能し、かつ観察のための蛍光ラベルとしても機能する蛍光タンパク質と融合したものを作製した。これを pCold ベクターを用いて発現することで高効率にスタートコドンからコイルドコイル 2 とよばれる領域までを含む KIF1A を発現し、精製することに成功した。バキュロウイルスと sf9 細胞を用いてコドン調節した KIF1A を発現することで、ヒト、キリン、線虫、ショウジョウバエの KIF1A 全長を精製できた。

(2) ヒトやキリンの KIF1A はダイマーを形成する

マウス KIF1A はモノマーであることが報告されている。線虫の KIF1A (UNC-104 と呼ばれる) は溶液中ではモノマーで、活性化するとダイマーになると報告されている。一般に、キネシンスーパーファミリーの分子モーターはモノマーよりもダイマーの方が速度が上昇する。モノマーかダイマーかは軸索輸送の速度を決める重要なファクターである可能性がある。そこで、ヒト、およびキリンの KIF1A の会合状態を決めるために、SEC-MALS によってヒト、およびキリン由来の KIF1A (1-736)::sfGFP の分子量を測定した。SEC のピークは見かけ上はモノマーのサイズとなった。しかし、得られた SEC のピークを MALS によってさらに解析するとそのサイズはダイマーのサイズとなっていることがわかった。これは溶液中では KIF1A (1-736) がフォールディング状態にあり、見かけ上は実際よりもコンパクトになっていることを示唆している。

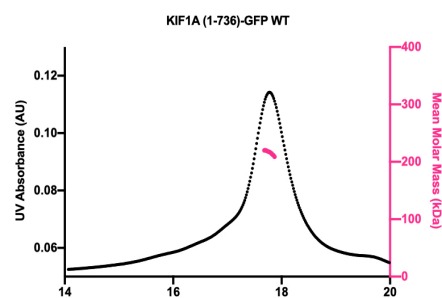


図2 SEC-MALS の結果

これは溶液中では KIF1A (1-736) がフォールディング状態にあり、見かけ上は実際よりもコンパクトになっていることを示唆している。

(3) 様々な種のリコンビナント KIF1A の速度測定系の確立

精製した KIF1A (1-393)::sfGFP および KIF1A (1-736)::sfGFP を TIRF で観察したところ、KIF1A (1-393)::sfGFP は非常に短い距離しか動かないことがわかった。一方で、KIF1A (1-736)::sfGFP は微小管上を非常に長い距離動くことができた。

(4) キリン KIF1A はヒト KIF1A よりも速い

KIF1A (1-736)::sfGFP を用いて、キリンおよびヒト由来の KIF1A の速度を測定した。ヒト KIF1A (1-736)::sfGFP は $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ 程度で微小管上を運動することがわかった。一方で、キリン由来の KIF1A (1-736)::sfGFP は $1.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ 程度で微小管上を運動していた。キリン由来の KIF1A はヒト由来の KIF1A よりも高速に運動することがわかった。

(5) 今後に向けて

キリン KIF1A がヒトや線虫よりも高速運動することがわかった。全長 KIF1A でもダイマーを形成して、1-736 と同じように運動できるかどうかは現在解析中である。in vivo でこれを確かめるために線虫の KIF1A である UNC-104 を欠損した変異体に線虫用にコドン調節したキリン KIF1A を発現したトランスジェニック線虫を作製した。シナプス小胞タンパク質 RAB-3 を GFP でラベルすることで軸索輸送の速度を測定している。1.5 倍という速度でシナプスタンパクの寿命と軸索輸送の速度の関係が説明できるかどうかはさらなる考察が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1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 -

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 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹羽伸介
2. 発表標題 The regulation of axonal transport and motor neuron disease
3. 学会等名 北京大学生物科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹羽伸介
2. 発表標題 The regulation of axonal transport and motor neuron disease
3. 学会等名 清華大学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----