

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20621

研究課題名（和文）H2抗体によるキネシンモーター阻害機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of H2 antibody and the inhibitory effect on kinesin

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） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：キネシンモーターは細胞内でミトコンドリアなどの輸送に携わるタンパク質である。抗キネシン抗体であるH2は細胞内輸送の解析において汎用される抗体の一つだが、H2抗体がキネシンを認識する部位のアミノ酸配列はこれまで分かっていなかった。本研究ではH2抗体可変領域のアミノ酸配列を同定することでリコンビナントH2抗体を作成し、定常領域をIgY定常領域と置換することでニワトリ化した。作成したリコンビナント抗体はキネシンの各種機能解析において有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で物質輸送に携わるキネシンモーターにはさまざまな種類が存在する。今回解析対象としたH2抗体はKIF5A、KIF5BおよびKIF5Cを認識する抗体である。KIF5ファミリーはいずれも疾患原因となるが、特にKIF5Aは痙性対麻痺やシャルコーマリートウス病といった多くの神経変性疾患の原因となる。H2抗体にはキネシンモーターの阻害作用があることが報告されてきた。抗原認識部位のアミノ酸配列を決定しモーター阻害の分子メカニズムを明らかにすることで、疾患治療法探索の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Kinesin motor is involved in the intracellular transport of various cargos, including mitochondria. The H2 antibody, an anti-kinesin antibody, is widely used for analyzing intracellular transport. However, the amino acid sequence of the H2 antigen recognition site has not been determined. In this study, we identified the amino acid sequence of the variable region of the H2 antibody and created a recombinant H2 antibody. We further showed that the recombinant H2 was useful for functional analysis of kinesin.

研究分野：生化学

キーワード：モータータンパク質 微小管 キネシン KIF5 scFv

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内に存在する多くのオルガネラはモータータンパク質による細胞内輸送を受ける。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。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。

(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、最も初めに見出されたものが Kinesin-1 構成タンパク質である KIF5 である。Kinesin-1 はイカ巨大軸索から 1985 年に単離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を有する。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、ミトコンドリアやリソソームなどの輸送に携わる。いずれのオルソログにおいてもモータードメインは KIF5 の N 末端に存在し、C 末端には Kinesin Light Chain の結合部位が存在する。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。

(3) 線虫やショウジョウバエが KIF5 の遺伝子を 1 つのみ有するのに対し、哺乳類には 3 つの遺伝子が存在し、それぞれ KIF5A, KIF5B, KIF5C と呼ばれている。KIF5B がユビキタスに発現するのに対し、KIF5A および KIF5C の発現は神経特異的である。KIF5 ファミリーそれぞれのノックアウトマウスを用いた解析ではそれぞれ異なる表現系が現れることが分かっている。KIF5A および KIF5B のノックアウトマウスは出生後あるいは胎生致死である。KIF5C ノックアウトマウスは生存するが脳の大きさの異常や運動神経の減少がみられる。最近、我々は KIF5A, KIF5B, KIF5C が異なる運動性とオリゴマー化傾向を持つことを示してきた(文献①)。KIF5B と KIF5C は、KIF5A よりも短い Run Length と低い微小管結合頻度を示す。さらに、KIF5A のみがオリゴマー形成の傾向を示す。この KIF5A の特性は、KIF5A の遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症と関連していることが示唆される (文献②)。KIF5A モータードメインの機能低下は、癌性脊髄性麻痺との関連も示唆されている。KIF5 ファミリーの中では特に KIF5A がさまざまな疾患の原因となるが、KIF5B と KIF5C の変異も遺伝性疾患と関連する。KIF5C の変異は神経発達障害を引き起こす一方、KIF5B の変異は広範な疾患を引き起こす。基礎生物学、神経科学、ウイルス学、医学などさまざまな領域の研究者が現在 KIF5 について研究を行っている。

(4) モノクローナル抗体(mAb)はこれまで生物学や医学において有用なツールとして用いられてきた。KIF5 を認識する H1、H2、H3 の mAb は、Kinesin-1 を抗原として作成された抗体である(文献③)。中でも、H2 は最もよく使われており、さまざまな種の KIF5 を認識するだけでなく、免疫蛍光顕微鏡法、ウェスタンブロッティング、Kinesin-1 の機能阻害、免疫電顕など多様なアプリケーションに使用可能である。H2 は市販品されているが、抗体の免疫グロブリン (Ig) G の cDNA 配列を決定することが出来れば、組換え抗体などの作成や H2 タンパク質の Kinesin-1 機能阻害のメカニズムも解明可能になる。またプラスミド DNA はハイブリドーマ細胞よりも保存・配布の点で優れており、cDNA 配列のクローニングは貴重な抗体を失うリスクを低減することができる。

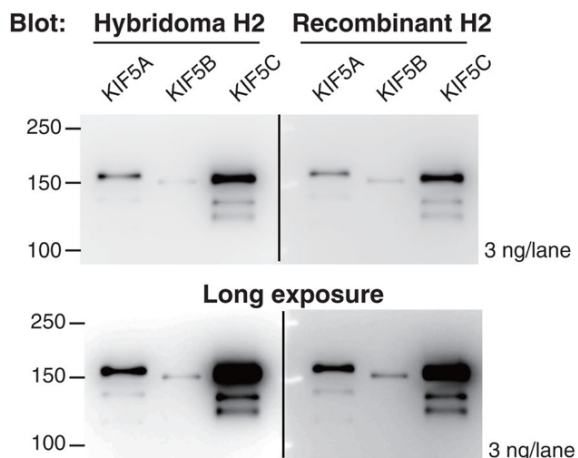


図1 ハイブリドーマ由来および組換え H2 抗体を用いた Western Blotting.

2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究でシナプス小胞を運ぶキネシンの一種である KIF1A の活性化・不活性化スイッチ機構を解析し、KIF1A 活性制御不全が神経変性疾患の原因となることを示した (Chiba et al., PNAS, 2019)。一方 KIF5 の活性化機構には未だ不明な点が多い。KIF5 の活性制御機構を明らかにし、KIF5 の異常が各種疾患を引き起こすメカニズムを明らかにするため、KIF5 の研究を行う上で鍵となる H2 抗体の抗原認識部位の配列決定を行った(文献④)。

3. 研究の方法

はじめに 5' RACE 法を用いて H1 および H2 のハイブリドーマから IgG cDNA を得た。ハイブリドーマは抗体の作製者であるバージニア大学の George Bloom 博士から供与頂いた。軽鎖については H1 および H2 ハイブリドーマの両方からラムダ鎖ではなくカッパ鎖の断片が得られた。これは、以前に報告された H1 および H2 の IgG の組成と一致した結果である (Pfister et al., 1989)。次に可変領域の配列を Sanger シーケンスにより決定した。以降の研究では幅広いアプリケーションに適用できることが知られている H2 に焦点を当てた。組換え H2 を発現するためのプラスミドを作製するため、市販されている抗 GFP 抗体 (N86/8R 抗体) の発現ベクターの可変領域を H2 のものに置換した。また scFv 化にあたっては重鎖および軽鎖の可変領域をリンカーで繋いだ構造のプラスミドを作製した。

組換え抗体は 293FT 細胞を用いて発現した。75cm² フラスコに 80%コンフルエントになるよう播種した 293FT 細胞に PEI Max を用いて 20 µg の抗体発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後に培地を回収し、ウェスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色に用いた。精製 KIF5 タンパク質はすでに発表した手法を用いて調製した(文献①)。

4. 研究成果

作製した組換え抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。ハイブリドーマ由来の H2 と組換え H2 を用いて精製 KIF5A、KIF5B および KIF5C タンパク質の検出を行ったところ、組換え H2 はハイブリドーマ由来の H2 と同じ特異性を示すことが明らかになった (図 1)。両抗体は、3 つのヒト KIF5 すべてを認識するが、KIF5B のシグナルは KIF5A、KIF5C に比べ低い。この結果は、以前の報告とも一致する。これにより組換え H2 抗体が H2 ハイブリドーマから得られた抗体と同様に機能することを実証した。

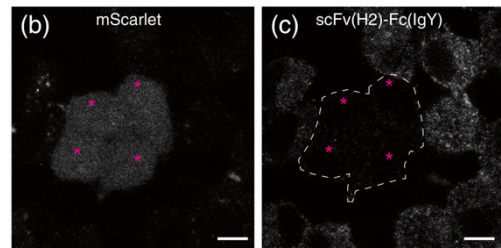
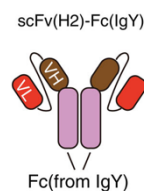


図 2 ニワトリ化組換え H2 抗体による免疫蛍光染色

また鶏 IgY の Fc 領域を融合することで H2 のアイソタイプを切り替えられることを示した。作製したニワトリ化 H2 抗体を用い HeLa 細胞内在性 KIF5 の検出を行った (図 2)。mScarlet でラベルされた KIF5A、KIF5B、KIF5C トリプルノックダウン細胞においてニワトリ化 H2 抗体による染色シグナルが消失することから、抗体が KIF5 を特異的に認識していることを確認した。抗体の種のスイッチングは微小管やアクチンなど主要な細胞骨格タンパク質と KIF5 の多重染色を可能とする。KIF5A の細胞内凝集は ALS の発症に関わるが、今回作製した組換え抗体は KIF5A に付加した蛍光タンパク質の蛍光だけでは検出の難しい比較的小さな KIF5A 凝集体も検出可能であることを示した (文献②)。一連の研究は KIF5 の機能解明および疾患発症との関わりを研究する上で組換え H2 抗体が有用であることを示している。H2 は軸索輸送の阻害作用がこれまでに報告されているが、どのような機構で輸送をコントロールするかは未だ不明である。今後は作製した H2 抗体を用いた生化学的解析により KIF5 の運動能制御の仕組みが解明できると考えている。

<引用文献>

- ① Kyoko Chiba, Kassandra M. Ori-McKenney, Shinsuke Niwa, Richard J. McKenney “Synergistic autoinhibition and activation mechanisms control kinesin-1 motor activity” Cell Reports, 2022 May 31; 39(9), p 110900.
- ② #Juri Nakano, #Kyoko Chiba, Shinsuke Niwa (# equal contribution) “An ALS-associated KIF5A mutant forms oligomers and aggregates and induces neuronal toxicity.” Genes to Cells, 2022 April 17; (27)6, pp 421-435
- ③ Pfister, K. K., Wagner, M. C., Stenoien, D. L., Brady, S. T., & Bloom, G. S. “Monoclonal antibodies to kinesin heavy and light chains stain vesicle-like structures, but not microtubules, in cultured cells.” The Journal of Cell Biology, 1989; 108(4), 1453-1463.
- ④ Shinsuke Niwa, Kyoko Chiba “Generation of recombinant and chickenized scFv versions of an anti-kinesin monoclonal antibody H2” Cytoskeleton, 2023 Apr 10; Epub ahead of print.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Niwa Shinsuke, Chiba Kyoko	4. 巻 -
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 -
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 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyoko Chiba
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

〔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		
米国	University of California, Davis		