

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：2011～2015

課題番号：23000013

研究課題名(和文) キネシンモーター分子群の機能と制御の統合生物学的研究

研究課題名(英文) Integrative biological research on function and regulation of Kinesin superfamily molecular motors

研究代表者

廣川信隆 (HIROKAWA, Nobutaka)

東京大学・大学院医学系研究科・特任教授

研究者番号：20010085

交付決定額(研究期間全体)(直接経費)：511,300,000円

研究成果の概要(和文)：主に以下の成果を得た。

1) KIFs の細胞内物質輸送における機能とその制御機構解明の課題について：a) KIF17 が脳高次機能を KIF17, NR2B の転写レベルで制御する。b) KIF17 尾部の CaMKIIa によるリン酸化により NR2B カーゴの解離と高次脳機能を制御する。c) 刺激の豊かな環境下での飼育による海馬でのシナプス形成の亢進と記憶・学習機能の亢進は、KIF1A が必須である。d) KIF3A による N cadherin の荷積みと輸送が神経活動依存性の PKA/CaMKIIa によるリン酸化で亢進する。

2) 細胞内での KIFs と微小管との相互作用による方向性輸送の解明について：a) 方向性輸送の分子機構として、KIF5 モーター領域が軸索起始部及び軸索内に優位に局在する GTP beta tubulin に富む GTP 型微小管と親和性が強く、それにより軸索方向に進む事を解明。

3) KIFs の個体レベルでの機能の解明と関連疾患の課題について：a) KIF5A が、GABARAP を介して GABA_A 受容体を輸送し、その障害により癲癇を起因する。b) KIF13A は、セロトニン受容体 5HT-1A を輸送しその欠損は、不安症状の亢進を起因する。c) KIF19A は、微小管プラス端で脱重合活性を持ち線毛の先端で微小管の長さを決め脳室周囲上皮細胞や、卵管上皮の線毛の長さを調節し、体液の流れを制御し、其の欠損は、水頭症、女性不妊等を起因する。

4) KIFs の情報伝達因子としての新しい機能の解明の課題について：

a) KIF12 は、膵β細胞で微小管上に SP1-Hsc70 と複合体を形成し、それらを安定化させ peroxisome の機能を制御し、oxidative stress を防御し、insulin 分泌をコントロールしている。KIF12 欠損によりこれらが障害され II 型糖尿病を起因する。同じ経路が高脂肪食摂取により起こり、それに伴う病態メカニズムを解明。

研究成果の概要(英文)：Main accomplishment follows.

1) Functions and regulation of KIFs in cellular level and in memory and learning.:

a) KIF17 regulates transcription of NR2B and KIF17 to enhance memory and learning. b) KIF17 unloads cargo containing NR2B by phosphorylation of KIF17 tail domain by CaMKIIa and regulates memory and learning. c) KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. d) KIF3A loads cargo vesicles containing N cadherin via the phosphorylation by PKA and CaMKIIa by the activity dependent mechanism.

2) The mechanism of directional transport, axon vs dendrites : a) Preferential binding of KIF5 motor domain to GTP-tubulin-rich microtubules in the axon underlies polarized cargo transport.

3) Function of KIFs at the whole body level and its relationship with diseases.

a) KIF5A is essential for GABA_A receptor transport and KIF5A deletion causes epilepsy.

b) KIF13A controls anxiety by transporting the serotonin type 1A receptor. c) KIF19A is a microtubule-depolymerizing kinesin for ciliary length control and its deletion causes hydrocephalus and female infertility.

4) New functions of KIFs as a factor in signaling cascades.

a) Antioxidant signaling involving KIF12 is an intracellular target of nutrition excess in pancreatic beta cells.

研究分野：分子細胞生物学、神経生物学

キーワード：キネシンモーター分子群、細胞内物質輸送、微小管、統合生物学

1. 研究開始当初の背景

私達の体を構成する神経細胞を始め全ての細胞は、細胞の働きに必須な機能蛋白分子を合成後、多種類の膜小器官、蛋白複合体、さらには mRNA 蛋白複合体として細胞内の目的地へ適正な速度で輸送する。この輸送は、細胞の機能、形作り、そして生存の為に必須である。私達はその主役である微小管をレールとする Kinesin superfamily 分子群 (KIFs) を発見し、哺乳類の全遺伝子 45 個を同定した。分子細胞生物学、分子遺伝学、を駆使して、KIFs が、多様な機能分子を輸送し分けるだけでなく、脳の高次機能、神経回路網形成、体の左右非対称性の決定、腸管神経系の発生、腫瘍の抑制など驚くべき重要な生命現象を司っている事を解明した。この様にモーター分子群 KIFs は、細胞機能の根幹を担っていると同時に様々な基本的生命現象を司っている。私達は、今まで KIFs 遺伝子群の発見、機能の解析、個体レベルの機能解析、作動原理の解析などすべての課題について常に世界をリードする研究を行ってきた。しかしながらまだ機能が解明されていない多くの KIFs が存在し、KIFs の制御機構、KIFs の個体レベルでの機能、KIFs の情報分子等としての新たな機能、微小管との相関による KIFs の作動・方向性輸送機構を含む多くの解明すべき課題が存在する。

2. 研究の目的

本研究は、下記にあげる未知の課題について世界に先駆けて研究を一層大きく発展させる事を目的とする。

1) KIFs の細胞内物質輸送における機能とその制御機構を神経細胞を主なモデル系として解明。

A) 未知の KIFs の機能の解明、B) KIFs のカーゴ認識・結合機構の構造生物学的解明、

C) KIFs の機能のリン酸化による制御機構の解明、D) 神経系で発現する KIFs の脳・神経活動依存性の機能制御の機構の解明

2) 細胞内での KIFs の分子動態の可視化と KIFs と微小管との相互作用による輸送の方向性及び作動制御の機構の解明

3) KIFs の個体レベルでの機能の解明

4) KIFs の情報伝達因子等としての新しい機能の解明

3. 研究の方法

分子細胞生物学、分子イメージング、マウスの分子遺伝学、X線結晶解析学、クライオ電子顕微鏡法、電気生理学などの多彩な手法を駆使する。

4. 研究成果

1) KIFs の細胞内物質輸送における機能とその制御機構を神経細胞を主なモデル系として解明。

A) 未知の KIFs の機能の解明、B) KIFs のカーゴ認識・結合機構の構造生物学的解明、

C) KIFs の機能のリン酸化による制御機構の解明、D) 神経系で発現する KIFs の脳・神経活動依存性の機能制御の機構の解明については、以下の成果を得た。

a) KIF17KO マウスの解析から KIF17 が NMDA 受容体 NR2B を樹状突起で輸送し輸送の障害による NR2B の減少はシナプス活動の低下による CREB リン酸化の減少を経て NR2B 更には KIF17 自身の転写、翻訳の低下をもたらす。KIF17 は、単に NMDA 受容体の輸送だけでなく高次脳機能を転写のレベルからも制御する (**Neuron** 2011)。

b) KIF17 尾部の CaMKIIa によるリン酸化が NMDA 受容体を含む小胞の解離を制御し、記憶・学習を制御する事を Knock-in mouse を用いて示した (**J. Neurosci** 2012)。

c) 刺激の豊かな環境下での飼育により海馬でのシナプス形成の亢進と記憶・学習機能の亢進が見られるが、これは、BDNF の発現上昇の下流で KIF1A の発現亢進が起こることが必須である (**Neuron** 2012)。

d) KIF16B が神経樹状突起内で early endosome の輸送を行い、AMPA 受容体や NGF 受容体の輸送と機能を制御し、その stalk domain が、極性輸送の Key である (**J Neurosci** 2015)。

e) KIF3A による樹状突起内での N cadherin の輸送が神経活動依存性の PKA/CaMKIIa によるリン酸化により、荷積み及び輸送が亢進する (**Neuron** 2015)。

f) 微小管脱重合活性をもち、神経成長端で微小管の伸長を制御する KIF2A の活性が神経成長端の膜に局在する PIPK alpha により活性化される (**PNAS** 2012)。

g) 定量的質量分析法などの先駆的実験系により in vivo の KIFs のリン酸化を網羅的・定量的に測定する手法を確立し、さらにそれぞれのリン酸化部位を区別してその責任 Kinase を同定し上流のシグナルを明らかにする手法を確立した。それにより KIF2A の微小管脱重合活性が BDNF-PAK1/CDK5 によるリン酸化で抑制され、LPA-ROCK により促進される事を示した (**Cell Rep** 2015)。

h) 主要な微小管関連蛋白 (MAP) である MAP1A は、PSD93 を介して NMDA 受容体を含む小胞をつなぎ止めることで KIF17 による輸送を制御する (**J Neurosci** 2015)。

2) 細胞内での KIFs の分子動態の可視化と KIFs と微小管との相互作用による輸送の方向性及び作動制御の機構の解明については以下の成果を得た。

a) 方向性輸送の分子機構として、KIF5 モーター領域が軸索起始部及び軸索内に優位に局在する GTP beta tubulin に富む GTP 型微小管と親和性が強く、それにより軸索方向に進む (JCB 2011)。

b) 単粒子法を応用した新しい解析法を開発し、クライオ電顕で GTP 型微小管と GDP 型微小管の構造の差異を解明した (JCB 2012)。

c) X線結晶解析とクライオ電顕で KIF5・GTP 型微小管複合体の構造を解析した (EMBO J 2015)。

3) KIFs の個体レベルでの機能の解明と関連疾患の課題については、以下の成果を得た。

a) KIF5A の脳での conditional KO マウスの作製と解析により、KIF5A が、GABARAP を介して GABA A 受容体を樹状突起内で輸送し抑制神経系で重要な機能を持ちその障害により癲癇を起因する (Neuron 2012)。

b) KIF13A は、セロトニン受容体 5HT-1A を輸送しその欠損は、不安症状の亢進を起因しこのマウスは、不安神経症や鬱病の良いモデルである、(Cell Rep 2013)。

c) KIF19A は、微小管プラス端で脱重合活性を持ち線毛の先端で微小管の長さを決め脳室周囲上衣細胞や、卵管上皮の線毛の長さを調節し、体液の流れを制御し、其の欠損は、水頭症、女性不妊等を起因する (Dev Cell 2012)。

d) 微小管の beta -tubulin の mutation によるヒトの神経変性症は、軸索流の障害がその病態メカニズムである (EMBO J 2012)

4) KIFs の情報伝達因子等としての新しい機能の解明については以下の成果を得た。

a) KIF13B は、LRP1 の caveolae による endocytosis を誘導しその欠損は、高脂血症を起因する (JCB 2015)。

b) KIF12 は、膵ベータ細胞で微小管上に SP1-Hsc70 と複合体を形成し、それらを安定化させ peroxisome の機能を制御し、oxidative stress を防御し、insulin 分泌をコントロールしている。KIF12 欠損によりこれらが障害され II 型糖尿病を起因する。同じ経路が高脂肪食摂取により起こり、それに伴う病態メカニズムを解明 (Dev Cell 2014)。

以上のように世界を大きくリードする質が高く学術的評価の高い多くの研究成果を挙げたと信ずる。これに対し平成 26 年度 研

究進捗評価結果として、A+ 「当初目標を超える研究の進展があり、期待以上の成果が見込まれる」という高い評価を受けた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件) ※すべて査読有り

1. Ichinose, S., T. Ogawa, and N. Hirokawa. Mechanism of Activity-dependent Cargo Loading via the Phosphorylation of KIF3A by PKA and CaMKIIa. **Neuron** 87: 1022-1035, 2015.
2. Ogawa, T. and N. Hirokawa. Microtubule destabilizer KIF2A undergoes distinct site-specific phosphorylation cascades that differentially affect neuronal morphogenesis. **Cell Rep** 12: 1-15, 2015.
3. Yang, W., ... and N. Hirokawa. (4/4) Antioxidant Signaling Involving the Microtubule Motor KIF12 Is an Intracellular Target of Nutrition Excess in Beta Cells. **Dev Cell** 31: 202-214, 2014.
4. Zhou, R., ... and N. Hirokawa. (5/5) A Molecular Motor, KIF13A, Controls Anxiety by Transporting the Serotonin type 1A Receptor. **Cell Rep** 3: 509-519, 2013.
5. Nakajima, K., ... and N. Hirokawa. (6/6) Molecular Motor KIF5A Is Essential for GABAA Receptor Transport, and KIF5A Deletion Causes Epilepsy. **Neuron** 76: 945-961, 2012.
6. Niwa, S., ... and N. Hirokawa. (6/6) KIF19A is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. **Dev Cell** 23: 1167-1175, 2012.
7. Yajima, H., ... and N. Hirokawa. (6/6) Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy. **J Cell Biol** 198 (3): 315-322, 2012.
8. Kondo, M., Y. Takei, and N. Hirokawa. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. **Neuron** 73: 743-757, 2012.

9. Nakata, T., ... and N. Hirokawa. (5/5) Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin - rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J Cell Biol* 194 : 245-255, 2011.

[学会発表] (計 83 件)

1. Hirokawa N. Kinesin superfamily molecular motors, KIFs and intracellular transport: from regulation of higher brain function and development to related diseases. "The Biennial Conference and the 15th Congress of the Chinese Society for Cell Biology, 2015, Shenzhen," Apr 1-4(2), 2015. Shenzhen Exhibition Center, Shenzhen, China.
2. Hirokawa N. Kinesin superfamily molecular motors, KIFs and intracellular transport: from regulation of learning/memory and development to diseases. In Symposium, "Machinery of the Cell." The ASCN/IFCB Meeting. Dec 8, 2014. Philadelphia, Pennsylvania, USA.
3. Hirokawa N. Mutual conformational changes of Kinesin (KIF5) and GTP-Microtubule upon their binding and the mechanism of the directional transport revealed by the cryo-electron microscopy and super resolution microscopy (PALM). 18th International Microscopy Congress. (The EMBO lecture) Sept 8, 2014. Prague, Czech Republic.
4. Hirokawa N. Kinesin superfamily molecular motors, KIFs and intracellular transport: from regulation of learning/memory and development to diseases. (Special Lecture) in "International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology" Oct 9, 2013. COEX, Seoul, Korea.
5. Hirokawa N. Intracellular transport of synaptic vesicle precursors by KIF1A and NMDRA receptors by KIF17 and regulation of memory and learning. "GRC (Gordon Conference) Molecular and Cellular Neurobiology." June 17-22, 2012. Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China.
6. Hirokawa N. Intracellular transport and kinesin superfamily molecular motors (KIFs): Key regulators for neuronal function, development and tumorigenesis. (Plenary lecture, March 29). The 12th Hunter Meeting. March 27-30, 2012. The Sebel-Kirkton Park, Hunter Valley, Australia.
7. Hirokawa N. Kinesin superfamily molecular motors: From intracellular transport to brain development, wiring, and learning and memory. 2012 AAAS Annual Meeting, "Flattening the World: Building a Global Knowledge Society. (Topical Lecture). February 26, 2012. Vancouver, Canada.
8. Hirokawa N. Kinesin superfamily molecular motors, KIFs: From intracellular transport to brain development, wiring and learning and memory. The 9th Biennial Conference of the Chinese Neuroscience Society and the 5th Member Congress. (Plenary lecture) Aug 1, 2011. Zhengzhou International Convention and Exhibition Centre, Henan, China.

[その他]

新聞報道等

1. 睡眠中に記憶定着 仕組み解明 分子モーター変化(毎日新聞 2015年10月5日 p7 夕刊・総合)
2. IFCB and ASCB-Together Again! ASCB NEWSLETTER JUNE 2014
3. コレステロール下げる「運び屋」; たんぱく質を発見 マウス実験で東大チーム (毎日新聞 2014年4月9日 p8 社会)
4. 日本のイノベーター 広川信隆氏 ミクロの世界 視覚で証明 (上・下) 「専門」 破り本質追究 (日経産業新聞 2014年1月28日・29日 p6 先端技術)
5. 廣川信隆氏 文化勲章受章者・文化功労者 主な業績(毎日新聞 2013年10月26日 p26 総合)
6. 不安抑えるたんぱく質 (毎日新聞 2013年2月26日 p19 科学)
7. 不安 たんぱくでセーブ 東大チーム解明(朝日新聞 2013年2月9日 p2 国際)
8. てんかん原因物質発見(毎日新聞 2013年1月15日 p21 科学)

9. 「絨毛」長さ決めるたんぱく質(毎日新聞 2012年12月4日 p15 科学)
10. 脳の神秘の一端解明 物質運ぶ「分子モーター」発見(読売新聞 2012年5月17日 p7 科学)
11. 仲間や遊具で賢くなる -「刺激と脳」仕組み解明- (毎日新聞 2012年2月23日 p29 総合)
12. 賢くなるたんぱく質解明 -刺激多い環境で育つと増加-(朝日新聞 2012年2月23日 p38 社会)

ホームページ

<http://cb.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣川 信隆 (HIROKAWA, Nobutaka)
東京大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号：20010085

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

武井 陽介 (TAKEI, Yosuke)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20272487

金井 克光 (KANAI, Yoshimitsu)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80214427

岡田 康志 (OKADA, Yasushi)
東京大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：50272430

田中 庸介 (TANAKA, Yosuke)
東京大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：90302661

仁田 亮 (NITTA, Ryo)
東京大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：40345038

本間 典子 (HOMMA, Noriko)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50345069

三木 玄方 (MIKI, Harukata)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10361461

小川 覚之 (OGAWA, Tadayuki)
東京大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：40436572

矢島 孔明 (YAJIMA, Hiroaki)
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：30376412