

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430080

研究課題名(和文) ヒト 3チューブリン変異が引き起こす神経発達異常のメカニズム解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of a neurodevelopmental disorder caused by human beta3 tubulin gene mutations

研究代表者

箕浦 逸史 (Minoura, Itsushi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員

研究者番号：70373371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト 3チューブリンの262番目のアルギニン残基の変異により神経軸索の正常な伸長が阻害され、外眼筋線維症の原因となる分子メカニズムを明らかにした。この病気でみられる神経軸索の伸長異常を *in vitro* で再現し、更にここに結合するキネシンの KIF21A および KIF5B に変異を入れることで分子の結合が回復すること、*in vitro* および *in vivo* での神経軸索の伸長も回復できることを示した。これらのキネシンは、3チューブリンの伸長、短縮を制御していると考えられるため、これらのキネシンが微小管の機能を調節していることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mutation at R262 amino acid residue of human beta3 tubulin impairs axon growth which leads to congenital fibrosis of extraocular muscles type 3. A model of the axon growth defects was constructed, which was rescued by a mutation at L12 loop of KIF21A or of KIF5B. These mutations recover the binding of these kinesin molecules to microtubules composed of beta-3 tubulin. These kinesins may control the dynamics of beta-3-tubulin rich microtubules which play essential roles in neuronal development. Our result suggests that these kinesin control the dynamics of such microtubules and these microtubules are important for axon growth and steering during brain morphogenesis.

研究分野：生物物理学

キーワード：チューブリン 外眼筋線維症 微小管 ダイナミクス キネシン クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

遺伝子解析技術の発達により、さまざまな種類の神経発達異常疾患の原因がチューブリン遺伝子の変異であることが明らかとなってきた。例えば3型の外眼筋繊維症は、外眼筋を支配する神経の発達異常、脳梁の発達不全、四肢の発達不全などが、 $\beta 3$ チューブリンの変異によって引き起こされることが近年報告された。また、少数であるが、この疾患がキネシン遺伝子の変異によって引き起こされる例も報告されている。

一方、我々はヒトのチューブリン遺伝子を昆虫細胞に導入し、ヒトのチューブリンタンパク質を大量発現、単離精製する技術を開発した。このヒト組換えチューブリンは微小管を形成し、またモータータンパク質と相互作用するなど、正常な機能を発揮することから、さまざまな病気の分子メカニズムの解析に使用できることが期待された。この技術を使用して、3型の外眼筋繊維症の分子メカニズムの分子メカニズムを解明するため、本研究を企画した。

2. 研究の目的

ヒトの3型外眼筋繊維症を引き起こす $\beta 3$ チューブリン変異の主要なもの、キネシンのチューブリン結合部位と一致することが知られている。一方、262番目のアルギニンの変異については、このアミノ酸残基がどのような機能を果たしているのか明らかではない。このアミノ酸残基も同様にキネシン結合部位であるという仮説を確かめるために、このアミノ酸を変異させたヒトの変異 $\beta 3$ チューブリンを発現、単離精製して、その機能解析を行うとともに、キネシンとの結合メカニズムの解明を行う。この *in vitro* での生物物理学的な解析を元に、これらのタンパク質の機能を補うことができるキネシン変異のデザインも試みる。このような変異を作出することが可能であれば、単離精製したタンパク質だけでなく、細胞内、および個体レベルでもこの機能が解析できるようになることが期待される。

3. 研究の方法

前述のように、ヒトの $\alpha 1\beta 3$ チューブリンの野生型および $\beta 3$ チューブリンの262番目のアルギニンに変異を導入した変異チューブリンタンパク質を発現、単離精製することで、そのキネシンとの相互作用メカニズムを解析する。反応キネティクスの測定および1分子レベルでの運動解析を行う。これらを、これまで得られてきたチューブリンの構造-機能相関との比較を通じて、どのようにチューブリンの機能が損なわれるかを明らかにする。

更に、この異常をレスキューするキネシン変異体のスクリーニングおよび、そのレスキ

ューメカニズムの解明も行う。レスキューメカニズムの構造的な解析を行うとともに、多数存在するキネシンスーパーファミリータンパク質のどのキネシンがこのメカニズムに関与しているかも調査する。

一方、これらの分子レベルの現象と、個体レベルの異常との関係を理解するため、マウスを用いて、この異常を解析することができるモデル系を構築し、実際の神経発達異常での解析も行う。

4. 研究成果

ヒト $\beta 3$ チューブリンの262番目のアルギニン残基 (R262) をヒスチジンおよびアラニンに置換した変異チューブリンの単離精製に成功し、変異チューブリンからなる微小管上でキネシンのATP加水分解サイクルに異常が生じ、運動できないことを示した。

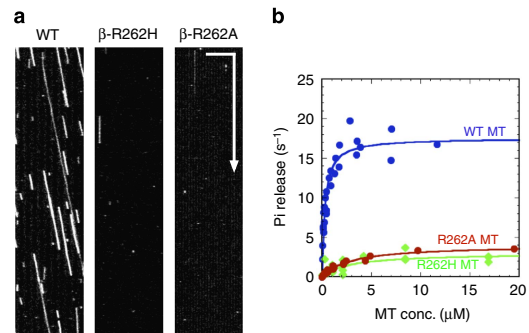


図1 $\beta 3$ チューブリンの変異によるキネシン運動異常 (a) 一分子運動アッセイによる運動解析の結果。 (b) ATP加水分解アッセイの結果。

この運動異常は、キネシンのATP加水分解サイクルのうち強結合 (AMPPNP結合状態) と弱結合状態 (ADP結合状態) の両方に異常が起こっていることが明らかとなった。これまで、チューブリンのキネシン結合部位の変異では、強結合または弱結合のどちらかに異常が起こる変異しか知られていなかったが、このアミノ酸残基は、ATP加水分解に伴う構造変化の前後ともに結合を支える重要な結合部位であることが明らかとなった。

このR262は、キネシンのL12ループと呼ばれる微小管結合ドメインと結合していることもわかった。そこで、このL12ループに変異を導入し、微小管への結合が回復するものをスクリーニングしたところ、L12ループのアスパラギン酸をアルギニンに置換した変異体が、変異微小管に結合できるだけでなく、運動機能も回復することを見いだした。この回復では、キネシンと微小管との強結合、弱結合の両方が回復していることも明らかとなった。

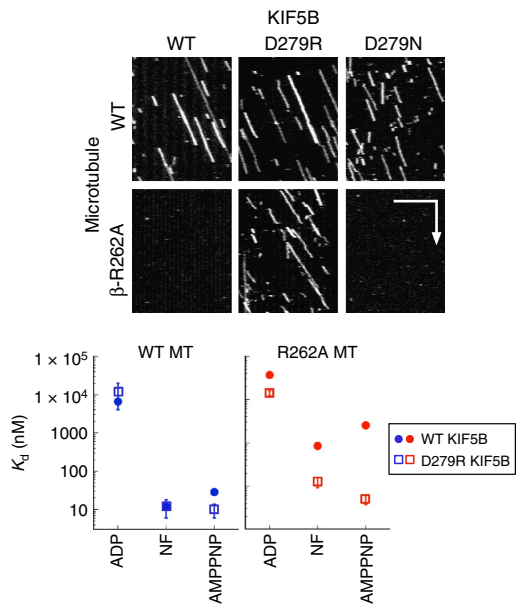


図2 β3 チューブリンの変異によるキネシン運動異常を回復できるキネシン (KIF5B) 変異体 (上) 一分子運動アッセイによる運動解析の結果。(下) ATP 加水分解アッセイの結果。

次に、この回復変異体を用いて、細胞およびマウス個体において、外眼筋繊維症で見られる神経発達異常の原因を明らかにする実験を行った。まずβ3 チューブリンに変異を導入した遺伝子を発現させると、マウスの大脳皮質細胞からの神経軸索の伸長が遅くなることを確認した。ここに、キネシンの回復変異体を発現させると、軸索の伸長の遅れが有意に回復することが明らかとなった。

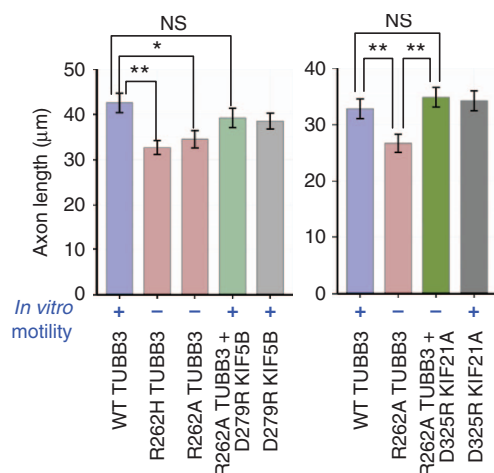


図3 β3 チューブリンの変異による軸索の伸長異常の回復。キネシン運動異常を回復できるキネシン (KIF5B) 変異体 (左) KIF5B 変異体による回復 (右) KIF21A 変異体による回復。

同様の現象はマウスの個体レベルでも検証することに成功した。マウス胎児脳にエレクトロポレーション法で変異遺伝子を導入し、神経伸長の異常が確認された。また、キネシンの回復変異体を同時に導入した個体では、伸長が正常になることも確認された。

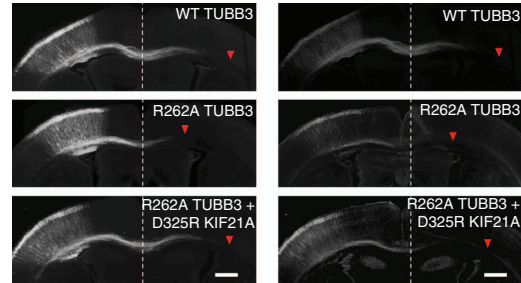
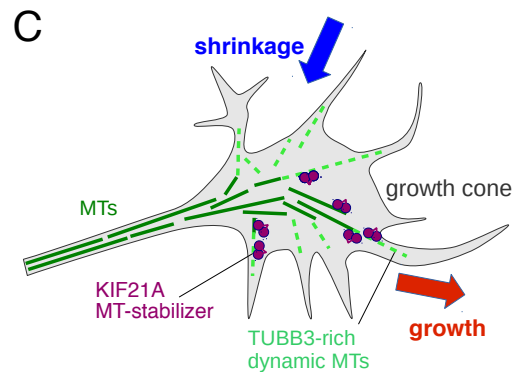


図4 β3 チューブリンの変異による脳梁の伸長異常の回復。キネシン運動異常を回復できるキネシン (左) 遺伝子導入のマーカとして同時に導入した GFP の局在。(右) 変異チューブリンに付加したペプチドタグに対する抗体で染色したもの。

ここに関与するキネシンとして、これまで関与が示唆されてきた KIF21A 以外に KIF5B も関与していることが明らかとなった。KIF21A は神経末端での微小管の安定化に、一方 KIF5B は、軸索伸長の初期における神経突起の伸長に寄与していると考えられる。



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3件)

1. Itsushi Minoura (2017)

Towards an understanding of the isotype-specific functions of tubulin in neurons: Technical advances in tubulin expression and purification

Neuroscience Research (in press)
DOI: 10.1016/j.neures.2017.04.002
査読あり

2. Itsushi Minoura, Hiroko Takazaki, Rie Ayukawa, Chihiro Saruta, You Hachikubo, Seiichi Uchimura, Tomonobu Hida, Hiroyuki Kamiguchi, Tomomi Shimogori, Etsuko Muto (2016)

Reversal of axonal growth defects in an extraocular fibrosis model by engineering the kinesin-microtubule interface.

Nature Communications 7:10058
査読あり

3. Seiichi Uchimura, Takashi Fujii, Hiroko Takazaki, Rie Ayukawa, Yosuke Nishikawa, Itsushi Minoura, You Hachikubo, Genji Kurisu, Kazuo Sutoh, Takahide Kon, Keiichi Namba, and Etsuko Muto (2015)

A flipped ion pair at the dynein- microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation

Journal of Cell Biology 208:211-222
査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. Itsushi Minoura

Reversal of axon growth defects in an extraocular fibrosis model by engineering the kinesin-microtubule interface

CSH-Asia Conference: Development, Function & Disease of Neural Circuits (May 16-20, 2016 Shuzou, China)

2. S. Uchimura, T. Fujii, H. Takazaki, R. Ayukawa, Y. Nishikawa, I. Minoura, Y. Hachikubo, G. Kurisu, K. Sutoh, T. Kon, K. Namba, E. Muto

A Mechanical Switch from Diffusion to Directional Motion Activates ATPase in Dynein Motor.

Biophysical Society 59th Annual Meeting (Feb. 7-11, 2015, Baltimore, USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

「先天性外眼筋繊維症に伴う神経発達異常の仕組みを解明」

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160118_2/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箕浦 逸史 (Itsushi Minoura)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・
研究員

研究者番号 : 70373371

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者