

キネシンによる軸索基部形成の時間的空間的制御機構の解明

1. 発表者：

一ノ瀬 聡太郎（研究当時：東京大学大学院医学系研究科 分子構造・動態・病態学
特任研究員）

小川 覚之（東京大学大学院医学系研究科 細胞構築学 助教）

蔣 緒光（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 医学博士課程3年生）

廣川 信隆（東京大学大学院医学系研究科 分子構造・動態・病態学 特任教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ 神経軸索基部の形成に関わる時間的空間的制御機構の1つを明らかにしました。
- ◆ 神経軸索基部の形成に重要な働きをするリン酸化酵素と基質およびリン酸化部位を同定し、リン酸化によってタンパク質間相互作用が制御されている仕組みを明らかにしました。
- ◆ これまで神経軸索基部はてんかんや精神疾患との関連が指摘されており、今回の発見は新規治療薬開発の基盤となることが期待されます。

3. 発表概要：

正常な神経伝達回路を形成するためには、神経細胞の多数の突起から1本だけを軸索に分化（注1）させ、他の神経細胞の樹状突起へと接続することが必要です。軸索基部（注2）は軸索のタンパク質だけを軸索内部へと輸送させる関門として働いており、神経の成長過程において、軸索基部の形成が神経突起を軸索へと分化させる重要な1ステップであると考えられてきました。しかし、どのような時期に、どのような制御機構のもとで、どのような分子群が軸索基部を形成するのか、詳細は不明でした。このたび東京大学大学院医学系研究科の一ノ瀬聡太郎 特任研究員（研究当時）、小川覚之 助教、蔣緒光 大学院生、廣川信隆 特任教授の研究グループは、キネシンモータータンパク質 KIF3 複合体による神経軸索への物質輸送に着目した解析を進め、*kif3b* ヘテロノックアウトマウス由来の培養神経細胞や KIF3 複合体のリン酸化解析により軸索基部形成の時間的空間的制御機構を明らかにしました。神経軸索基部の形成に重要なリン酸化酵素と基質およびリン酸化部位を同定し、リン酸化によって神経軸索基部形成分子の輸送が制御されている仕組みを解明したことにより、これらの分子群の異常によって生じる病気の病因の解明や、軸索基部異常と関連があるてんかんや自閉症などの精神疾患の新規治療薬開発の基盤となると考えられます。

4. 発表内容：

① 研究の背景・先行研究における問題点

正常な神経伝達回路を形成するためには、神経細胞の多数の神経突起の中から1本を軸索に分化させ、他の神経細胞の樹状突起へと接続することが必要です。軸索基部は軸索のタンパク質だけを軸索内部へと輸送させる関門として働いており、神経の成長過程において、軸索基部の形成が神経突起を軸索へと分化させる重要な1ステップであると考えられてきました。軸索基部を形成するタンパク質の1つである TRIM46 は軸索基部において微小管（注3）を単一極性的に束化する（注4）と共に、TRIM46 が軸索内への物質輸送を制御する関門としての役割を果たしていると考えられていますが、いつ、どのようにして TRIM46 が軸索基部に集積するか、詳しい制御機構は明らかになっていませんでした。

② 研究内容（具体的な手法など詳細）

本研究グループは、軸索基部を形成するタンパク質を細胞体から軸索基部へと移動させるための物質輸送として、キネシン（注5）を候補として考えました。そこでキネシンの中で研究が進んでいる KIF1A、KIF5 と、KIF3（注6）のアダプタータンパク質である KAP3 を海馬の培養細胞でノックダウン（注7）しました。その結果、KIF5 と KAP3 のノックダウンで軸索基部の形成異常を観察しました。また、*kif3b* ヘテロノックアウト（注8）マウス由来培養神経細胞でも同様に軸索基部の形成異常を観察しました。

kif3b ヘテロノックアウトマウス由来培養神経細胞をさらに詳細に観察したところ、軸索内の微小管が双極性であり、また微小管の束化も減少していました。これら2点の特徴が過去に報告のあった *trim46* ノックアウトマウスの表現型と類似していたことから、KAP3 と TRIM46 の結合を調べたところ、予想通り TRIM46 は KAP3 と結合して KIF3 によって軸索基部へと運ばれていることがわかりました。また、このタンパク質結合は軸索基部の構成タンパク質が軸索基部への集積を開始するステージ3からステージ4（注1）への遷移時期に非常によく観察されることもわかりました。

次に TRIM46 と KAP3 の結合を制御するリン酸化（注9）酵素を同定することを目指しました。試験管内で種々のリン酸化酵素と KAP3 を反応させ質量分析法を用いて解析を行ったところ、KAP3 の 60 番目のセリンが MARK2 によってリン酸化されていることがわかりました。MARK2 に GFP をつけて培養神経細胞内で発現させたところ、MARK2 は樹状突起に多く分布していました。そこで、MARK2 を抑制する薬剤を培養神経細胞に添加したところ、樹状突起内で TRIM46 と KAP3 の結合が上昇していました。これは、MARK2 が KAP3 をリン酸化することで、TRIM46 との結合を抑制することを示唆しています。

そこで、最後に KAP3 の 60 番目のセリンにアミノ酸点変異を加えた変異体を *cos-7* 細胞と培養神経細胞に発現させました。すると、リン酸化不能変異体ではリン酸化模倣変異体に比べて、TRIM46 と KAP3 の結合が優位に上昇すると共に、TRIM46 の神経突起内での集積を促進していることがわかりました。

以上の結果から、神経細胞がステージ3からステージ4へ遷移する時期に、樹状突起内では MARK2 によってリン酸化された KAP3 が TRIM46 との結合を抑制される一方で、軸索内では非リン酸化 KAP3 が TRIM46 と結合し、これを軸索基部へと輸送し、軸索基部の形成を促進すると結論づけました。（図1）

なお本研究は、日本電子、カールツァイス、グローバル COE プログラム、科学研究費助成事業（特別推進、基盤研究 S）、日本医療研究開発機構（AMED）の支援によって実施されました。

③ 社会的意義・今後の予定 など

本研究により、神経軸索基部の形成に重要な輸送モーター分子群のリン酸化酵素と基質およびリン酸化部位を同定し、リン酸化によって神経軸索基部形成分子の輸送が制御されている詳細な仕組みを解明したことにより、これらの分子群の異常によって生じる病気の病因の解明や、軸索基部異常と関連があるてんかんや自閉症などの精神疾患の新規治療薬開発の基盤となると考えられます。今後、これらの分子群がどのような病気に関連しているかを解析していきたいと考えています。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Cell Reports*」 28, 1-14

論文タイトル：The Spatiotemporal Construction of the Axon Initial Segment via KIF3/KAP3/TRIM46 Transport under MARK2 Signaling

著者：Sotaro Ichinose, Tadayuki Ogawa, Xuguang Jiang, and Nobutaka Hirokawa*.

(*責任著者)

DOI 番号：10.1016/j.celrep.2019.07.093

アブストラクト URL：<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.093>

6. 注意事項：

日本時間 8 月 28 日 (木) 午前 1 時 (米国東部標準時 EST：27 日午前 11 時)以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科 分子構造・動態・病態学

特任教授 廣川 信隆 (ひろかわ のぶたか)

Tel: 03-5841-3336、Fax: 03-5802-8646

E-mail: hirokawa@m.u-tokyo.ac.jp

8. 用語解説：

(注 1) 神経の分化とステージ

培養神経細胞は、初めは葉状仮足を形成している (ステージ 1) が、徐々に数本の神経突起を伸ばし始める (ステージ 2)。この段階では、各神経突起の長さはほぼ同じであることから対称的と表現される。そしてこれらの神経突起の中から 1 本が急激に伸長し軸索となる (対称性が壊れる、ステージ 3)。その後、残った神経突起も伸長を開始し、樹状突起へと分化する (ステージ 4)。さらに成熟が進むと軸索と樹状突起間にシナプスが形成される (ステージ 5)。(図 2 参照)

(注 2) 軸索基部

細胞体に近い軸索のコンパートメントで、ナトリウムチャネルが多く存在して活動電位の発生の場となると同時に、タンパク質の軸索内への移動を制御する関門としての役割も併せ持っている。

(注 3) 微小管

細胞骨格の一つで α β チュブリンヘテロダイマーが重合してできる直径約 25nm の円筒状繊維。方向性を持っており、 β チュブリン側がプラス端。

(注 4) 微小管の極性

軸索ではほとんどの微小管のプラス端が軸索遠位方向に向いている単一極性だが、樹状突起ではプラス端が樹状突起遠位方向と近位方向に向いている微小管がランダムに存在する双極性である。

(注 5) キネシン

モータータンパク質の一つで、ATP を加水分解しながら微小管に沿ってカーゴ (荷物) の輸送を行う。

(注6) KIF3

キネシンスーパーファミリータンパク質 (KIFs) の一つで、モーター領域を持つ KIF3A、KIF3B、カージとの結合を担うアダプタータンパク質 KAP3 のヘテロ三量体を形成する。

(注7) ノックダウン

小分子 RNA が標的 RNA と結合することでタンパク質合成を抑制する手法

(注8) ノックアウト

遺伝子操作により遺伝子を除去する手法

(注9) リン酸化

タンパク質の翻訳後修飾の一つで、リン酸基を可逆的に付加する現象。タンパク質の構造変化をもたらし、様々にシグナル伝達経路の制御に重要な反応である。

9. 添付資料 :

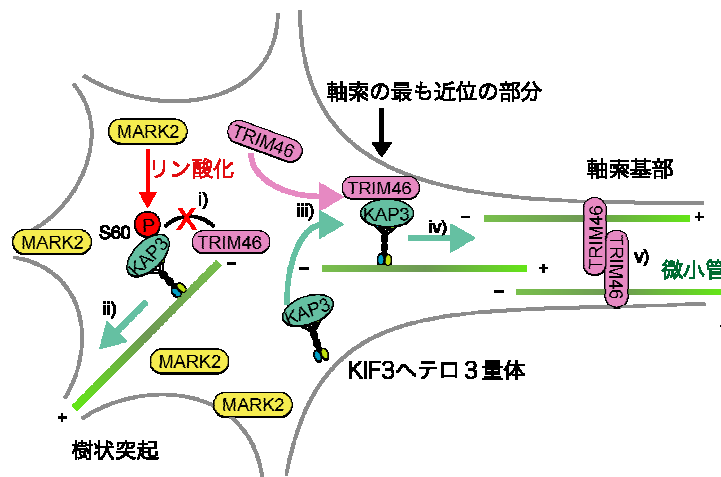


図1 モデル図

樹状突起では MARK2 が KAP3 のセリン 60 番をリン酸化する (i) ため、KIF3 は TRIM46 と結合せず他の分子を樹状突起へと輸送する (ii)。一方で、軸索の最も近位の部分では非リン酸化 KAP3 が TRIM46 と結合し (iii)、KIF3 はこれを軸索基部へと輸送する (iv)。その結果、軸索基部で TRIM46 により安定化された単一極性の微小管の束が形成される (v)。

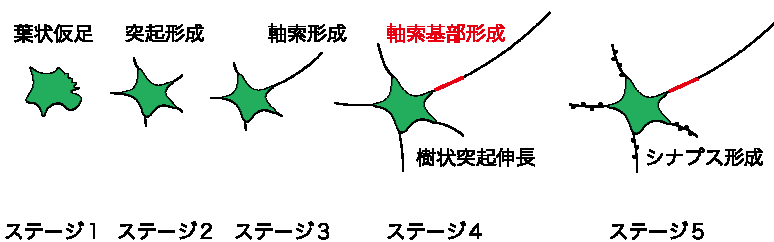


図2 神経の分化とステージ