

分子モーターたんぱく質 KIF26A による 痛みの体感短縮機構の解明

1. 発表者：

- 王 力 (研究当時：東京大学大学院医学系研究科 寄付講座 分子構造・動態・病態学 特任研究員)
- 田中 庸介 (東京大学大学院医学系研究科 細胞構築学分野 講師)
- 王 斗斗 (東京大学大学院医学系研究科 寄付講座 分子構造・動態・病態学 特任研究員)
- 森川 桃 (東京大学大学院医学系研究科 寄付講座 分子構造・動態・病態学 特任研究員)
- 周 如贇 (研究当時：東京大学大学院医学系研究科 寄付講座 分子構造・動態・病態学 特任研究員)
- 本間 典子 (研究当時：東京大学大学院医学系研究科 細胞構築学分野 講師)
- 宮本 祐希 (東京大学大学院医学系研究科 博士課程1年生)
- 廣川 信隆 (東京大学大学院医学系研究科 寄付講座 分子構造・動態・病態学 特任教授)

2. 発表のポイント：

- ◆ 疼痛が遷延するキネシン分子モーター「KIF26A」(注1) ノックアウトマウスの解析から、KIF26A が「接着斑キナーゼ」(FAK、注2) を微小管上につなぎとめ「Srcファミリーキナーゼ」(SFK、注3) のアクセスから守ることで、細胞からのカルシウムイオン(注4) の排出を助ける「細胞膜カルシウムポンプ」(PMCA、注5) を活性化し、疼痛の持続時間(注6) を短くしていることを明らかにした。また SFK 阻害剤 PP2 を投与したところ、痛みに対する反応の遷延化が顕著に改善した。
- ◆ これまで疼痛研究は痛みに対する過敏性の軽減を主に実験の尺度としてきたが、本研究により痛みの持続時間を短縮する KIF26A-FAK-PMCA 系の分子機構がはじめて明らかとなり、新しい持続痛・慢性痛の治療ターゲットとしてのこの系の有効性が、細胞から個体レベルまで一貫した研究結果によって示された。
- ◆ 今後、この KIF26A ノックアウトマウスを用いることで、SFK/FAK シグナル伝達の亢進による痛みの持続時間の遷延やがん転移の新規治療法にむけて、研究が大きく前進することが期待される。

3. 発表概要：

我々のあらゆる細胞の中には、微小管の線維に沿って細胞の中心と周縁を結ぶ物質輸送のシステムが張りめぐらされ、45 種類以上のキネシン分子モーターが、さまざまな種類の積荷複合体を秩序だてて輸送している。一方、それぞれの細胞の状態は「細胞内

シグナル伝達」によってグローバルに規定されている。また細胞内のカルシウムを速やかに排出して神経細胞の興奮を収束させる「細胞膜カルシウムポンプ」は、活性型 **FAK** によるリン酸化によってその機能が阻害される。これまで分子モーターは「シグナル伝達」の手足となるものと信じられてきたが、ここ数年の本グループの研究により、分子モーターがシグナル伝達分子を運び分けることによって、細胞内シグナルをさまざまに制御していることが明らかになりつつある。

東京大学大学院医学系研究科 寄付講座 分子構造・動態・病態学の廣川信隆特任教授、細胞構築学分野の田中庸介講師、分子構造・動態・病態学の王力特任研究員（研究当時）らは今回、**KIF26A** 分子モーターが **FAK** を末梢感覚ニューロンの深部の微小管につなぎとめることで細胞外基質(注7)からインテグリン(注8)を介した **FAK** の活性化を阻害し、神経細胞からのカルシウムの排出を促進して、末梢神経細胞の興奮を早く鎮静化させる作用を明らかにした。まず *Kif26a* 遺伝子欠損マウスは、ごく軽く尾をつまんだだけで数分間にわたって疼痛反応が遷延していた。そこで末梢感覚ニューロンの性質を調べると、カプサイシン（注9）あるいは電気刺激によってニューロンが一度興奮すると、その刺激を取り去っても数分間にわたり細胞内カルシウム上昇が続き、痛みが遷延していくことがわかった。一方、超解像度顕微鏡の観察により、**KIF26A** が **FAK** を微小管につなぎとめており、**KIF26A** がないと **FAK** が微小管から外れて細胞周辺部に出てきてしまうことがわかった。このことによってノックアウトマウスでは **FAK** が細胞膜直下のインテグリン・**SFK** 複合体に結合しやすくなり、**FAK** シグナル伝達が異常に活性化された結果として **PMCA** による細胞内からのカルシウム排出が妨げられていたことがわかった。このカルシウム排出と疼痛の遷延は両方とも、**SFK** 阻害剤である **PP2** を投与することで、細胞レベルでも個体レベルでも実際に治療できることがわかった。

本研究は **KIF26A** 分子モーターによる細胞内シグナル伝達の新しい制御機構を発見したものであり、これらの成果により遷延性の疼痛、がん等の新規治療法の開発に道を開くものである。

4. 発表内容：

キネシンスーパーファミリータンパク質(**KIFs**)は細胞内の物質輸送を担う分子モーターであり、機能分子の局在・活性を制御することで細胞の生命・機能を維持する重要なタンパク質群である。特に神経系に多く発現されている分子モーター「**KIF26A**」がかかわる分子機構に関してはまだあまり研究が進展していなかった。東京大学大学院医学系研究科 寄付講座 分子構造・動態・病態学の廣川信隆特任教授、細胞構築学分野の田中庸介講師、分子構造・動態・病態学 王力研究員（研究当時）らの研究グループはこの **KIF26A** 分子モーターに注目し、ノックアウトマウスの解析と細胞生物学的・薬理学的実験から、**KIF26A** が **FAK** を細胞質中の微小管細胞骨格上につなぎとめることによって、末梢感覚ニューロンの疼痛反応の収束に大きな役割を果たしていることを明らかにした。

まず本研究チームは **KIF26A** の発現を脊髄後根神経節 (**DRG**、注10) において **in situ hybridization** 法を用いて調べたところ、すべての感覚ニューロンで発現が見られ、特に **CGRP**(カルシトニン遺伝子関連ペプチド)陽性の痛覚ニューロンに強い発現が見られた。そこで **KIF26A** ノックアウトマウス尾部を軽くつまんだ際のマウスの痛覚応答をシングルブラインド法 (注11) によって調べたところ、野生型マウスは数秒以内に痛覚応答が収束するのに対して、ノックアウトマウスでは数分以上にわたり応答が遷延することが明らかとなった。さらに、温冷覚や痛覚の過敏状態であることも観察された。

そこでこのマウスの感覚神経系を形態学的に検索したところ、**DRG** に存在する感覚ニューロンの細胞体には大きな変化はなかったが、手掌における末梢の分枝は著しく増加していた。そこで **DRG** 組織片の培養を行ってみると、そこからの軸索伸長がノックアウトマウスにおいて増強していた。

さらに **DRG** の感覚ニューロンの分散培養を行い、カプサイシンならびに細胞外電気刺激後の細胞応答をカルシウム顕微蛍光測光法ならびにパッチクランプ法の電気生理学によって検索してみると、刺激終了後の細胞内カルシウムの排出不全と、それによる神経活動の活性化状態の顕著な遷延が見られ、個体レベルでの痛覚応答の遷延を神経細胞レベルでも裏付ける結果を得た。

そこで、**DRG** ニューロンのカルシウム排出系においてもっとも重要である細胞膜カルシウムポンプ、**PMCA** の活性を生化学的に測定すると、これが正常のほぼ半分に低下していた。また **PMCA** の活性は、活性型リン酸化型 **FAK** によるチロシンリン酸化 (注12) によって阻害されるので、**SFK**, **FAK**, **PMCA** それぞれのチロシンリン酸化を免疫沈降法、リン酸化特異的抗体によるイムノブロット法、蛍光抗体法などを用いて測定してみると、**SFK** のチロシンリン酸化レベルには有意な差がなかったが、**KIF26A** の発現をおさえた細胞では **FAK** と **PMCA** のチロシンリン酸化レベルがいずれも増加しており、**SFK** から **FAK** へのシグナル伝達が特異的に増強している印象を受けた。そこで免疫沈降法や近接ライゲーションアッセイ法、酵母2ハイブリッド法などの実験を行ってみると、**KIF26A** の C 末端領域が直接 **FAK** の N 末端領域の **FERM1**, **FERM3** ドメインに結合して、**FAK**・**SFK** の間の結合を阻害していることが明らかとなった。

さらに **KIF26A** は微小管に結合するがモーター活性がほとんどないことを以前の研究で明らかにしていたため、**KIF26A** による **FAK** の微小管上への局在化について検証した。まず、あらかじめ微小管を蛍光標識した細胞を用いて、**KIF26A** と **FAK** が結合しているポイントを近接ライゲーションアッセイ法によって細胞内で染め出したものを **PALM/STORM** 法の超高解像度顕微鏡を使って観察してみると、**KIF26A/FAK** の結合ポイントは微小管上にきれいに整列していることが明らかとなった。さらに、微小管と **FAK** の結合点を近接ライゲーションアッセイ法によって定量してみると、**KIF26A** のノックアウト細胞では有意に結合点が減少していた。これらのことから **KIF26A** は **FAK** を微小管上につなぎとめて、これを **SFK** から遠ざける役割を果たしていることが示唆された。

最後に、**SFK/FAK** シグナリングの増強が **KIF26A** ノックアウトマウスの痛覚遷延の原因であるかどうかを調べるため、**SFK** の特異的な阻害薬 **PP2** の効果を調べた。まず培養した **KIF26A** ノックアウト **DRG** ニューロンに **PP2** を作用させると、**FAK** のチロシンリン酸化の亢進が消失した。培養 **DRG** 組織片に **PP2** を作用させると、異常な軸索伸長が起こらなくなった。分散培養した **DRG** ニューロンでも **PP2** によって細胞内カルシウム応答の遷延が改善した。そこでノックアウトマウスに個体レベルで **PP2** を投与してみると、投与後 4 時間かけて痛覚の持続時間が徐々に低下し、正常レベルにまで改善していった。これらのことは **PP2** と分子構造が似た不活性型薬剤 **PP3** を投与してもまったく認められなかったため、**KIF26A** の機能不全による **SFK/FAK** シグナリングの活性化を **PP2** が特異的に阻害した結果であることが確かめられた。

以上の研究結果から、**KIF26A** が末梢感覚ニューロン細胞質の微小管上に **FAK** をつなぎとめることによって、細胞膜直下で生じるインテグリン/**SFK/FAK** シグナル伝達が阻害され、**FAK** 活性が低下する。その結果、**PMCA** が阻害的リン酸化による抑制から解放され、細胞内カルシウムの排出による痛覚反応収束が促進される。このような疼痛持続時間を制御するためのまったく新しい分子メカニズムの存在が明らかとなった。実際に **PP2** の投与によりこのノックアウトマウスの痛覚遷延が消失したことは、疼痛に対するインテグリン/**SFK/FAK** 阻害剤の有効性を示唆するものであり、このノックアウトマウスのさらなる解析により、新しい疼痛治療戦略の開発が期待される。また、がん細胞の一部では **SFK/FAK** シグナル伝達が悪性を促進していることが知られており、このようながん組織で特異的に **KIF26A** モーターを活性化する薬剤を開発できれば、新しい角度からのがんの治療戦略にも道が開かれる。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Cell Reports（米国東部夏時間 9 月 11 日オンライン版）

論文タイトル：The atypical kinesin KIF26A facilitates termination of nociceptive responses through sequestering focal adhesion kinase

著者：Li Wang, Yosuke Tanaka, Doudou Wang, Momo Morikawa, Ruyun Zhou, Noriko Homma, Yuki Miyamoto, and Nobutaka Hirokawa

DOI 番号：10.1016/j.celrep.2018.05.075

アブストラクト URL：<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.075>

7. 用語解説：

（注 1）分子モーター「**KIF26A**」：

神経系などに多く発現するキネシンスーパーファミリーたんぱく質の一種。45 種類あるキネシン分子モーターは微小管という細胞内のレールに沿って積み荷を運び、精神疾患をはじめ糖尿病・発がん・胎児の発生などにさまざまな重要な役割を果たしている。**KIF26A** は進化の過程で運動能が消失しているが微小管への結合活性は残っており、今

回この微小管への係留によって **KIF26A** が積み荷たんぱく **FAK** の活性を制御していることを示唆する証拠を得た。

(注2) 接着斑キナーゼ (**FAK**) :

細胞が細胞外基質に接着するときを作る細胞表面の斑状の構造である「接着斑」(**focal adhesion**)の維持に必要な非レセプター型チロシンキナーゼの一つで、疼痛の悪化やがんの悪性化における役割が示唆されてきた。

(注3) **Src** ファミリーキナーゼ (**SFK**) :

がん遺伝子の一つ **Src** に類縁の細胞内シグナル伝達分子群で、細胞膜直下に局在する非レセプター型チロシンキナーゼの一つ。 **FAK** とよじれあってキナーゼ複合体を形成し、細胞外基質からインテグリンを介したシグナルを伝達する。

(注4) 細胞内カルシウムイオン :

イオンの形で水に溶けたカルシウムは、細胞のさまざまな挙動の際にその細胞内濃度が上下し、このことが細胞内シグナル伝達のトリガーとして神経細胞の興奮性や可塑性などを制御する。一次感覚ニューロンが刺激されると細胞膜上の **TRPV1** などのレセプター型イオンチャネルが開口し、カルシウムが細胞内に流入してニューロンの興奮を惹起する。刺激の終結後はいち早くカルシウムが **PMCA** 等のカルシウムポンプたんぱく質によって細胞質からくみ出され、反応が収束する。

(注5) 細胞膜カルシウムポンプ (**PMCA**) :

細胞内カルシウムの上昇を収束させる酵素たんぱく質の一つで、細胞膜上に局在して細胞内から細胞外スペースにカルシウムイオンをくみ出す活性がある。同様に小胞体の内腔にカルシウムイオンをくみ出す酵素等も知られているが、**DRG** ニューロンでは **PMCA** がもっとも重要な役割を果たしている。

(注6) 疼痛の持続時間 :

機械・熱・化学物質などにより末梢の感覚ニューロンは痛みを受容し、これが脊髄を介して脳に伝えられることで疼痛が知覚される。激しく打撲したときなどにはこの痛みの感覚が一瞬で消えずに、長い時間遷延することは誰でも経験することだが、この痛みの持続時間がどのようにして決まるかについてはあまり注目されてこなかった。本研究は **KIF26A** ノックアウトマウスの表現型から、新規治療ターゲットとしての「疼痛の持続時間」に光をあてるものである。

(注7) 細胞外基質 :

細胞外マトリックスとも呼ぶ。細胞が細胞外スペースに分泌したラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの線維状の不溶性たんぱく質群から構成されており、細胞接着、がんの転移や細胞の増殖を制御している。

(注8) インテグリン：

細胞表面の細胞膜上に発現されている $\alpha\beta$ 二量体の受容体たんぱく質の一つで、種々の細胞外基質と反応して細胞接着を起こし、**SFK/FAK** 系の細胞内シグナル伝達を惹起することで、細胞運動、細胞増殖、組織の形成、がん転移、組織修復、血液凝固などにかかわる。

(注9) カプサイシン：

トウガラシに含まれる発痛物質で、痛みと辛味をもたらす。末梢感覚ニューロンの表面に発現されているレセプターたんぱく質 **TRPV1** に結合し、細胞内にカルシウムイオンを流入させて神経細胞の興奮をもたらす。

(注10) 脊髄後根神経節(DRG)：

末梢の感覚ニューロンの細胞体からなり、脊髄の後側に各レベル左右一つずつある塊状の組織。ここから感覚ニューロンは二又に分かれた軸索を伸ばし、中枢側では脊髄の後根から入っていき、末梢側では末梢神経を通じて皮膚表面などの感覚受容器や自由神経終末において感覚を受容する。

(注11) シングルブライント法：

研究者の主観的な思い込みをできるだけ除くために、マウスの遺伝型を知らないまま観測を行い、その後に遺伝型を調べて観測結果と照合する方法をとった。

(注12) チロシンリン酸化：

たんぱく質は **20** 種類程度の決まったアミノ酸からなる鎖状の分子であるが、そのうちセリン、トレオニン、チロシンは鎖から突出している残基の部分がリン酸化酵素(プロテインキナーゼ)によってリン酸化されることで電気化学的性質を変化させ、そのたんぱく質の活性を制御する。多段階のチロシンリン酸化は特にシグナル伝達にかかわることが多いとされている。

8. 添付資料：

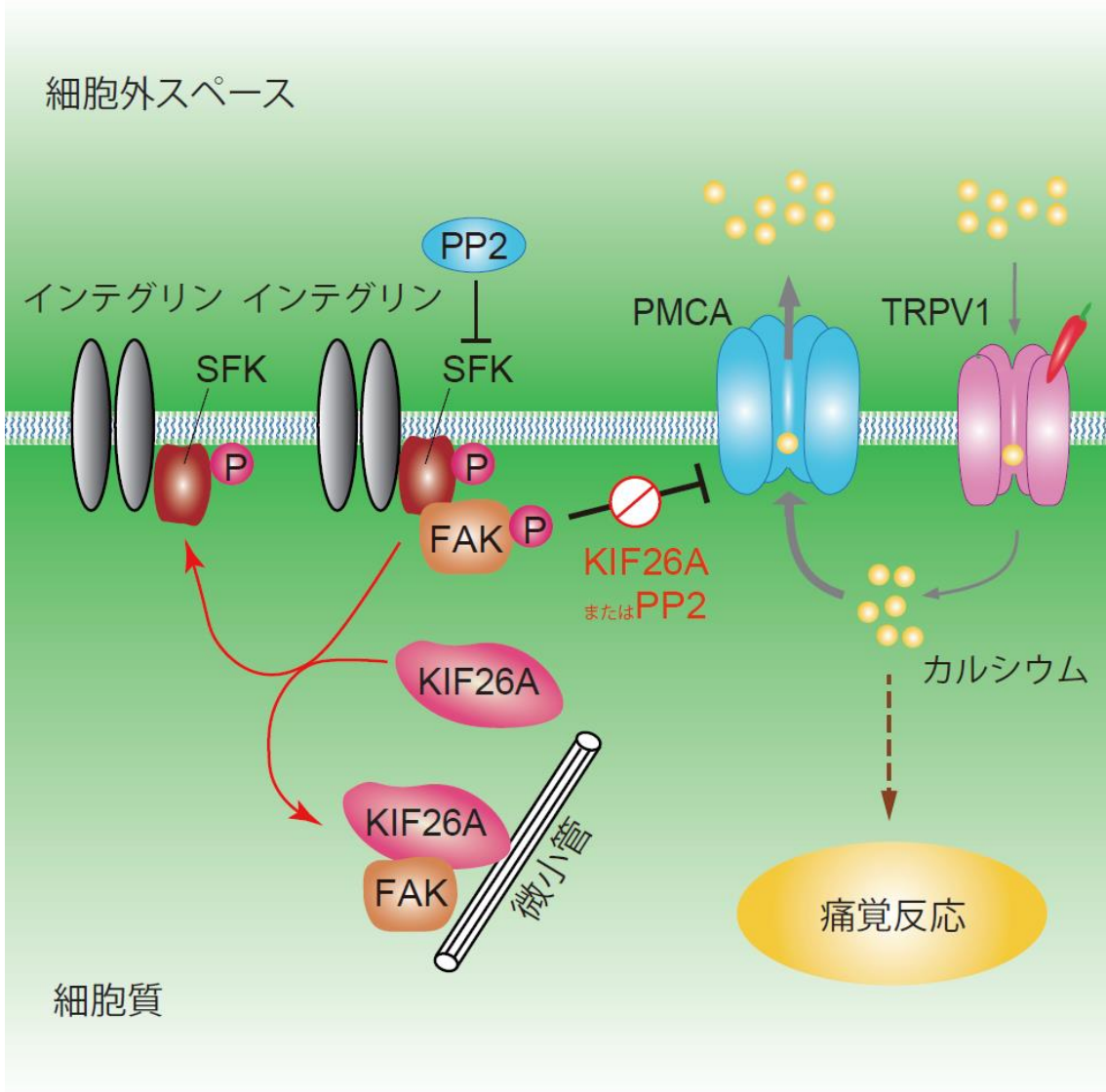


図1. KIF26AによるFAKの係留と疼痛持続時間の制御機構