

線虫遺伝学が明らかにする軸索輸送不全と神経変性

丹羽 伸介

1. 軸索輸送とシナプスの形成

神経細胞の情報伝達は軸索上に形成されるシナプスに集積したシナプス小胞 (synaptic vesicle) を介して行われる。シナプスにはさまざまなタンパク質が局在しており、それぞれのタンパク質が機能を発揮することで初めて情報伝達が行われる。しかし、軸索内にはリボソームや粗面小胞体といったタンパク質合成装置がほとんど存在しない。そのため、シナプス前終末 (presynapse) やシナプス小胞を構成するタンパク質のほぼすべては細胞体において合成される。ここで問題になるのは、軸索の長さである。ヒトの運動神経は細胞体の長さが100マイクロメートル程度なのに対して、軸索の長さは1メートルにも達する。この距離の問題を解決するのが軸索輸送と呼ばれる高速輸送メカニズムである¹⁾。シナプス前終末やシナプス小胞を構成するタンパク質は、細胞体において合成された後に軸索輸送によって軸索内に局在することとなる。シナプス前終末やシナプス小胞の材料の軸索輸送を担うのがキネシンスーパーファミリーの一種であるKIF1AやKIF1B β と呼ばれる分子モータータンパク質である。もともと、KIF1AやKIF1B β はシナプス小胞の材料 (synaptic vesicle precursor) のみを特異的に輸送すると考えられてきたが、近年ではショウジョウバエや線虫の遺伝学の結果などからシナプス小胞だけではなくシナプス前膜の材料もまたKIF1AやKIF1B β に輸送されると考えられている²⁾。

シナプスは神経細胞の機能の根幹となる構造である。シナプスの形成をつかさどる軸索輸送モーターの異常が神経疾患の原因の一つとなっているというのは想像にかたくない。実際にKIF1B β やKIF1Aの遺伝的変異が家族性神経

疾患の原因となることは古くから報告されている³⁻⁵⁾。近年ではゲノムシーケンスが容易になったため、弧発性の先天性神経疾患においてもKIF1Aの変異の報告が相次いだ。痙性対麻痺を伴う神経疾患では数%の患者でKIF1A遺伝子に変異があったという報告もある²⁾。KIF1A変異が高頻度でみられるため、KIF1A関連神経疾患 (KIF1A-associated neurological disorder, 略してKAND) という名称が提案されている²⁾。我々は線虫 *Caenorhabditis elegans* を利用してKIF1A関連神経疾患のメカニズムを解析し、軸索輸送に関する新たな知見を得た。

2. 軸索輸送を亢進する KIF1A 変異の同定

KIF1AやKIF1B β の線虫オルソログはUNC-104と呼ばれる (図1左)。これらの軸索輸送モータータンパク質は微小管上を運動するためのモーター (motor) ドメイン、モーター運動のために必須のネックコイル (NC) ドメイン、二量体形成やカーゴへの結合に必須のコイルドコイル (CC) ドメイン、役割不明のForkhead associated (FHA) ドメイン、カーゴ小胞上のリン脂質に結合するためのPHドメインを共通して持っている。unc-104遺伝子の欠損変異体線虫では、全身の神経細胞でシナプスの局在に異常が起こる。unc-104遺伝子の欠損変異体ではシナプスが軸索内のあるべき場所に形成されず、代わりに細胞体近傍、細胞体内、樹状突起に形成される (図1右)。これに伴ってunc-104変異体線虫は運動することができなくなる。GFPを融合したRAB-3 (シナプス小胞のマーカータンパク質) やUNC-10 (シナプス前終末のマーカータンパク質Rimのオルソログ) を用いて変異体線虫で軸索輸送を観察すると、これら分子の軸索輸送がほぼ消失している。このunc-104遺伝子欠損変異体線虫にヒトKIF1Aを発現をさせると、運動やシナプスの異常をほぼ完全にレスキューすることができる⁶⁾。そのため、シナプスやシナプス小胞の材料の軸索輸送機構は線虫とヒトの間で非常によく保存されているといえる。

我々は遺伝学的スクリーニングによりシナプスやシナプス小胞の軸索輸送変異体を単離して原因遺伝子を特定してきた⁷⁻⁹⁾。その結果、small GTPaseであるARL-8 (哺乳類のARL8AおよびARL8Bのオルソログ) や、BLOC-1関連複合体 (BORC) の欠損変異体において、シナプス小

東北大学学際科学フロンティア研究所 (〒980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3)

Defects in axonal transport and neurological disorders revealed by worm genetics

Shinsuke Niwa (Frontier Research Institute for Multidisciplinary Sciences, Tohoku University, 6-3 Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-0845, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950594

© 2023 公益社団法人日本生化学会

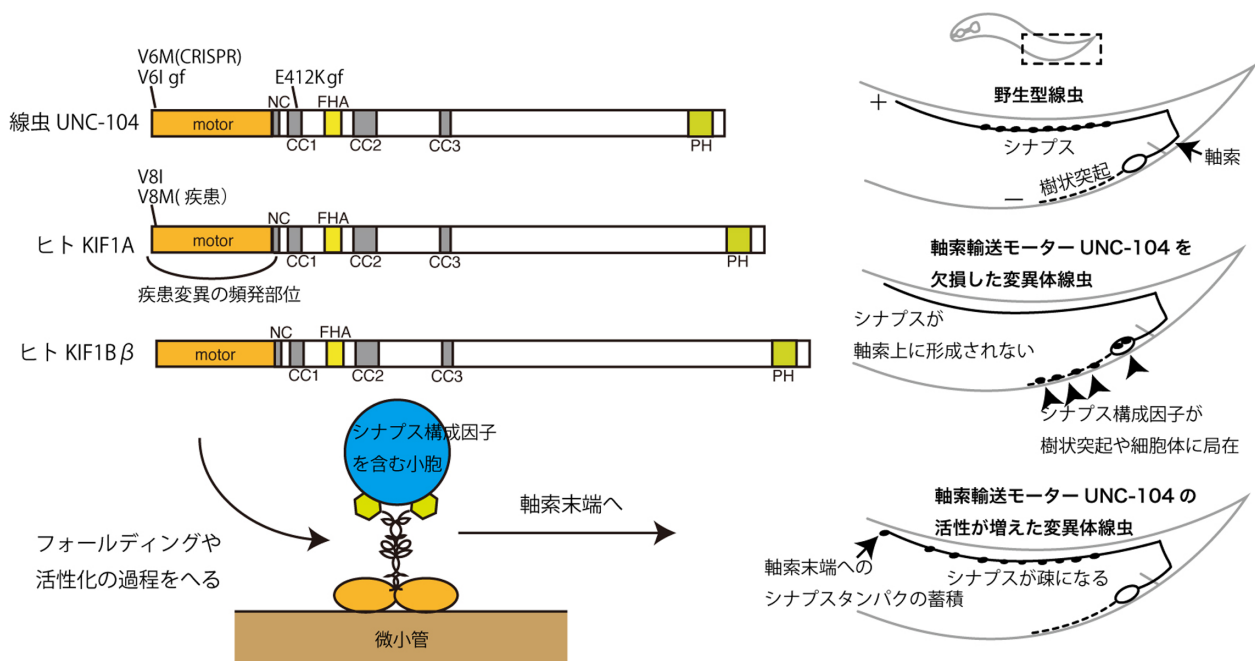


図1 KIF1Aファミリーによるシナプス構成因子の軸索輸送および線虫変異体の表現型

左：線虫UNC-104，ヒトKIF1A，ヒトKIF1B β のドメイン構造は非常によく保存されている。右：我々がモデルとして用いているDA9運動神経細胞では背側の軸索に沿ってシナプスが形成される。UNC-104の機能を欠損した線虫ではシナプスが軸索上に形成される代わりに細胞体や樹状突起上に形成される。逆にUNC-104の機能が亢進した変異体線虫ではシナプスタンパク質が軸索末端に異常に蓄積する。

胞やシナプス前終末のタンパク質の軸索内での量が減少し，逆に細胞体への蓄積が増加することがわかった。また，BORC \rightarrow ARL-8 \rightarrow UNC-104というシグナル伝達経路がシナプス小胞の材料の軸索輸送に必要であることが明らかになった⁷⁾。逆に逆行性軸索輸送のモーターであるダイニンの変異体では軸索の先端にシナプス小胞が蓄積した⁸⁾。

この研究の過程で，*unc-104*遺伝子にV6IやE412Kといったアミノ酸置換を引き起こす点変異が入ると順行性の軸索輸送が増加することがわかった(図1)⁹⁾。オルソログであるヒトKIF1Aに対してUNC-104(V6I)やUNC-104(E412K)変異に対応するV8IやE439Kといったアミノ酸置換を導入してCOS-7細胞に発現し，その局在を観察した。COS-7細胞にはKIF1Aの活性化因子が十分でないため，COS-7細胞に発現した野生型KIF1Aは小胞にほとんど結合しないし，微小管上を動くKIF1Aの量も限られたものになる。しかし，V8IやE439Kといったアミノ酸置換を導入したKIF1AはCOS-7細胞内で小胞に結合し，さらに微小管の+端のある方向である細胞周辺領域に強い集積をした。したがってV8IやE439Kといった変異は種を超えてUNC-104やKIF1Aの活性を亢進し，シナプス小胞などの順行性の軸索輸送を増加させるといえる。後に他のグループが行った構造解析によりUNC-104(E412)やKIF1A(E439)といった部位は，ATPase活性を持つモータードメインとの間に分子内結合を作ることによって活性を阻害するブ

レーキとして作用する領域であることがわかっている³⁾。このブレーキのことを自己阻害(autoinhibition)と呼ぶ(図2)。UNC-104(E412K)やKIF1A(E439K)といったアミノ酸置換はこの自己阻害によるブレーキを失わせるために活性上昇がみられると考えられる。一方でUNC-104(V6I)やKIF1A(V8I)といったアミノ酸置換で活性が上昇するメカニズムは現時点ではわかっていないが，おそらく自己阻害の欠損によるものだろうと私は考えている。

3. 家族性神経疾患におけるKIF1Aの活性亢進

我々が論文発表をした次の年に遺伝性痙性対麻痺の家系でKIF1A(V8M)という変異が報告された(図1)¹⁰⁾。これは我々が見つけたKIF1Aの活性を亢進させるKIF1A(V8I)変異と非常によく似ているが，著者らは我々の研究には気づかなかったようである。この論文をみてさっそく我々はCRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集によって線虫のUNC-104にKIF1A(V8M)変異と相同なUNC-104(V6M)変異を導入した⁶⁾。その結果，予想どおりシナプス小胞マーカーなどの軸索輸送が増加した。変異体線虫ではシナプスが本来形成されないような軸索遠位にシナプスが形成されてしまうような表現型がみられた。遺伝的変異によるKIF1Aの活性の上昇を示すには，ヒトKIF1Aの活性を直接計測するのが必須である。そこで1分子レベルで

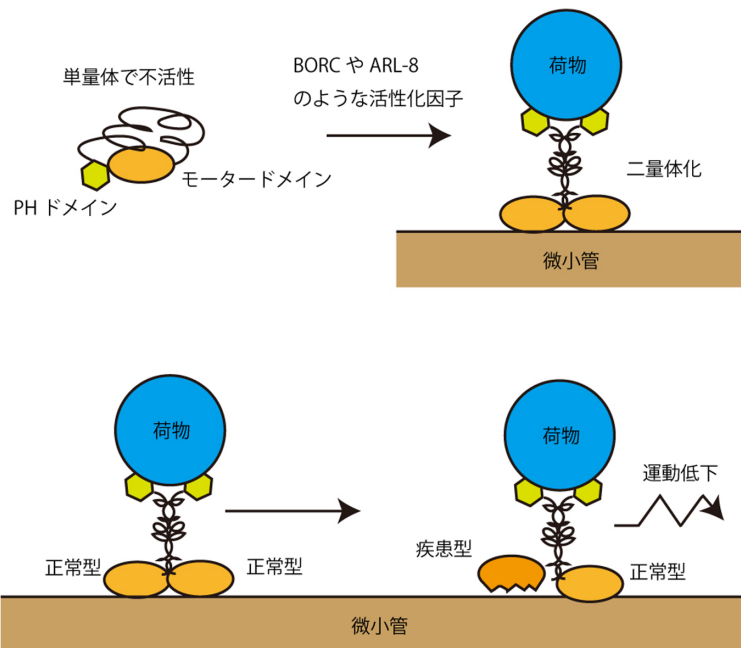


図2 KIF1Aの二量体化による活性化メカニズムと疾患における運動低下のメカニズム
 上：KIF1Aは単量体として作られたのちに活性化因子の働きで二量体化が促進され活性化する。下：患者の細胞では疾患型KIF1Aが正常型KIF1Aと二量体化している。これが正常型KIF1Aを発現しているにもかかわらず、患者の細胞で軸索輸送に異常が起こるメカニズムであると考えられる。

の分子モーターの運動性能の計測を専門とするカリフォルニア大学デイビス校のRichard McKenney博士と共同研究を行った。KIF1A (V8M) 変異では予想どおりKIF1Aの活性が亢進していた。特に微小管への結合頻度が大きく上昇することがわかった⁶⁾。他にも遺伝性痙性対麻痺の原因として見つかったKIF1A (A255V) やKIF1A (R350G) といった変異もまたKIF1Aの活性を亢進した。我々は「順行性軸索輸送の増加が神経疾患の原因となる」と結論づけた。

4. KIF1Aの活性低下を引き起こす疾患変異の解析

「順行性軸索輸送が増加すると神経疾患となる」のは概念としては斬新であったが、他方でKIF1A関連神経疾患の原因となるKIF1A遺伝子の変異の多くがKIF1Aのモーター活性を失わせることがわかっていった。また、KIF1A関連神経疾患の大部分は*de novo*変異が原因である。100以上の変異が見つまっているにもかかわらず、大部分がATPase活性を持つモータードメイン内にあることもまたモーター活性の低下が疾患の原因であることを示唆する。一般に、*de novo*変異は一方の染色体のみで起こるため患者は正常型のKIF1A遺伝子も持っている。一方でKIF1Aのノックアウトマウスのヘテロ接合体は重篤な表現型を示さない。それではなぜ正常なKIF1Aを半分有しているにもかかわらず神経疾患を発症するのだろうか？

5. KIF1Aは二量体を形成して軸索輸送をする

キネシン型分子モーターが微小管上を一步進む際にはATP1分子を消費する。歩幅は8ナノメートルである。仮に1マイクロメートルの距離を微小管から外れずに進む場合を考えると、 $1000\text{nm} \div 8\text{nm} = 125$ 歩となり、125回のATP代謝反応が連続して起こることになる。100回以上のATPの代謝反応を連続で行うために、キネシン型分子モーターは二量体を形成してそれぞれのサブユニットが交互に代謝反応を行う。反応をしない方の足が微小管に強く結合することで微小管からの解離を抑制する。ちょうどヒトが二足歩行する様子をイメージすると理解しやすい。しかし、奇妙なことにKIF1Aは単量体として精製される¹¹⁻¹³⁾。そのため「KIF1Aは単量体ではあるが、正の荷電を持つKループと呼ばれる部位があるために負の荷電を持つ微小管から離れることなく連続で反応することができる」という説¹¹⁾と「KIF1Aはそのままでは弱い二量体しか作れないが、小胞に結合すると局所的な濃度が上昇して二量体を形成できるようになる」という説^{12,13)}とが提唱されていた。

我々はKIF1Aのオルソログである線虫のUNC-104を用いて過去のモデルをあらためて検証した。リコンビナントUNC-104タンパク質はKIF1Aと同じように単量体として精製された。このUNC-104は微小管上を動く活性を持っていなかった。上述のように我々は軸索輸送を亢進するアミノ酸置換変異を複数見つけていた⁹⁾。そのうちの一つで

あるE412K変異をUNC-104に導入したものを精製すると、二量体として精製されるようになった。先行研究で提示されていたモデルとは異なりUNC-104の二量体形成には小胞への結合は必要としない。二量体を形成したUNC-104は微小管上を非常に活発に動くことができるようになった。我々はUNC-104やKIF1Aは自己阻害が解除されるとそれだけで二量体を形成し、運動を開始できるという新しいモデルを提唱した(図2上)¹⁴⁾。

6. 正常型KIF1Aと疾患型KIF1Aからなる二量体の運動解析

KIF1Aが二量体を形成するのであれば、KIF1Aの疾患変異をヘテロ接合体として持っている患者の神経細胞内では機能低下型KIF1Aと正常型KIF1Aで形成されたヘテロ二量体が半分を占めることになる。しかし、先行研究では機能低下型KIF1Aのホモ二量体の解析ばかりが行われてきた。我々はこのようなヘテロ二量体型KIF1Aを発現・精製する方法を確立してその活性を計測した。その結果、解析を実施したすべての例で「正常型KIF1Aのホモ二量体」に比べて「機能低下型KIF1Aと正常型KIF1Aのヘテロ二量体」の運動は微小管上での走行距離、微小管上での速度といったパラメーターが顕著に低下していた¹⁵⁾。この結果は、機能低下型KIF1Aは正常型KIF1Aの運動を強く阻害することを示唆した。生体内でも機能低下型KIF1Aは正常型KIF1Aによる運動や軸索輸送を阻害するだろうか？これを検証するために野生型線虫に機能低下型変異を導入したUNC-104を過剰発現した。このトランスジェニック線虫は正常なUNC-104も発現しているにもかかわらず、シナプス小胞の材料の軸索輸送が減少していた。その結果、シナプス小胞が細胞体や軸索の途中、あるいは樹状突起内に異所局在するようになった。機能低下型のKIF1A変異は単純な機能低下によって軸索輸送の量を減らすというより、むしろ正常型KIF1Aの活性を妨げることによってシナプス小胞の材料の軸索輸送を減少させることが示唆された(図2下)¹⁵⁾。

7. おわりに

線虫の遺伝学と生化学とを用いることでシナプスの材料の軸索輸送不全が原因となる神経変性疾患のメカニズムを解明し、順行性軸索輸送の減少だけでなく、軸索輸送の亢進も疾患の原因となりうるという新たなパラダイムを提唱することができた。線虫遺伝学で得られた変異データを基にした生化学を行い、UNC-104/KIF1Aの活性化について新たなメカニズムを提唱した。順行性軸索輸送の分子モーターの活性が低すぎても高すぎても神経細胞の機能に異常

が起こるとすると、神経細胞は何らかのメカニズムで軸索輸送の荷物の量を感じ、その情報をKIF1Aの自己阻害によるブレーキに伝えることで軸索輸送の量を調節していると考えられる。現在までのところ、このメカニズムはまったく不明であるが、線虫遺伝学に基づいた地道な解析が解決への道を拓いてくれると私は考えている。

謝辞

本研究をともに推進してきた東北大学生命科学研究科の大学院生たちと千葉杏子博士(東北大学学際科学フロンティア研究所)にこの場を借りて御礼申し上げる。

文 献

- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 682–696.
- Chiba, K., Kita, T., Anazawa, Y., & Niwa, S. (2023) Insight into the regulation of axonal transport from the study of KIF1A-associated neurological disorder. *J. Cell Sci.*, **136**, jcs260742.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeida, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., et al. (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*, **105**, 587–597.
- Rivière, J.B., Ramalingam, S., Lavastre, V., Shekarabi, M., Holbert, S., Lafontaine, J., Srour, M., Merner, N., Rochefort, D., Hince, P., et al. (2011) KIF1A, an axonal transporter of synaptic vesicles, is mutated in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 219–230.
- Klebe, S., Lossos, A., Azzedine, H., Mundwiller, E., Sheffer, R., Gaussen, M., Marelli, C., Nawara, M., Carpentier, W., Meyer, V., et al. (2012) KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: Distinct phenotypes according to the nature of the mutations. *Eur. J. Hum. Genet.*, **20**, 645–649.
- Chiba, K., Takahashi, H., Chen, M., Obinata, H., Arai, S., Hashimoto, K., Oda, T., McKenney, R.J., & Niwa, S. (2019) Disease-associated mutations hyperactivate KIF1A motility and anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 18429–18434.
- Niwa, S., Tao, L., Lu, S.Y., Liew, G.M., Feng, W., Nachury, M.V., & Shen, K. (2017) BORC regulates the axonal transport of synaptic vesicle precursors by activating ARL-8. *Curr. Biol.*, **27**, 2569–2578.
- Higashida, M. & Niwa, S. (2023) Dynein intermediate chains DYCI-1 and WDR-60 have specific functions in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*, **28**, 97–110.
- Niwa, S., Lipton, D.M., Morikawa, M., Zhao, C., Hirokawa, N., Lu, H., & Shen, K. (2016) Autoinhibition of a neuronal kinesin UNC-104/KIF1A regulates the size and density of synapses. *Cell Rep.*, **16**, 2129–2141.
- Iqbal, Z., Rydning, S.L., Wedding, I.M., Koht, J., Pihlström, L., Rengmark, A.H., Henriksen, S.P., Tallaksen, C.M., & Toft, M. (2017) Targeted high throughput sequencing in hereditary ataxia and spastic paraplegia. *PLoS One*, **12**, e0174667.
- Okada, Y. & Hirokawa, N. (1999) A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science*, **283**, 1152–

- 1157.
- 12) Klopfenstein, D.R., Tomishige, M., Stuurman, N., & Vale, R.D. (2002) Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell*, **109**, 347–358.
- 13) Tomishige, M., Klopfenstein, D.R., & Vale, R.D. (2002) Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. *Science*, **297**, 2263–2267.
- 14) Kita, T., Chiba, K., Wang, J., Nakagawa, T., & Niwa, S. (2023) Comparative analysis of two *Caenorhabditis elegans* kinesins KLP-6 and UNC-104 reveals common and distinct activation mechanisms in kinesin-3. *eLife*, **12**, RP89040.
- 15) Anazawa, Y., Kita, T., Iguchi, R., Hayashi, K., & Niwa, S. (2023) De novo mutations in KIF1A-associated neuronal disorder (KAND) dominant-negatively inhibit motor activity and axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2113795119.

著者寸描

●丹羽 伸介 (にわ しんすけ)



東北大学学際科学フロンティア研究所
准教授. 博士 (医学).

■**略歴** 1978年北海道に生る。2001年
東京大学理学部生物学科卒業。07年同大
学院医学系研究科博士課程修了。スタン
フォード大学Research associateを経て19
年より現職。

■**研究テーマと抱負** 研究テーマは軸索
輸送と微小管による形態形成と分子モー

タータンパク質。よい研究をしてよい論文を書くことを目標に
しております。

■**趣味** 釣り。