

「線虫のキネシン変異体を利用した新規活性制御メカニズムの解明」

関西学院大学・理工学部・生命科学科 木村 健二

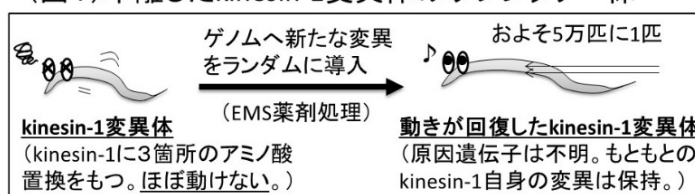
1 研究の背景と目的

社会を支える高速道路や鉄道網は主要な輸送経路である。我々の細胞の中にも似たシステムが存在し、細胞骨格の上をモータータンパク質がさまざまな荷物を運んでいる。主要なモータータンパク質としてキネシンの一つである kinesin-1 が知られており、その機能低下は発生異常や神経変性疾患、癌化の要因となる。しかし、kinesin-1 の活性を調節する分子やシグナル経路にはまだ不明な点が多い。

申請者はこれまでモデル生物・線虫 *C. elegans* を用いて kinesin-1 に関する研究をしてきた(Kimura et al, Nature Cell Biol. 2017)。線虫の kinesin-1 変異体は神経障害で麻痺しており、ほとんど動くことができない。

申請者は以前、この変異体のゲノムへ薬剤によるランダムな変異を導入し、動きが回復した株を複数樹立することに成功した(図1・サプレッサー株)。これらの原因遺伝子は kinesin-1 の活性を向上させる珍しい新規因子群と期待されるが、まだ特定には至っていない。そこで本研究では、これらを特定して、kinesin-1 の新たな活性制御経路を解明することを目的とした。

(図1)単離したkinesin-1変異体のサプレッサー株



2 研究方法・研究内容

(1) 薬剤変異導入による kinesin-1 変異体のサプレッサー株の新規スクリーニング

- 本研究に用いた線虫の kinesin-1 変異体である FM50 は、kinesin-1 の三箇所がアミノ酸置換(G45E, I304M, E338K)されており、ほぼ動くことができない。この線虫のゲノムへ EMS 薬剤によるランダムな変異導入を行うことで、動きが回復したサプレッサー株の単離を試みた。申請時点で既に2ライン有していたが、同様の追加実験により新たに別のサプレッサー株の単離を試みた。

(2) シークエンスによる原因遺伝子の特定・その効果の検証

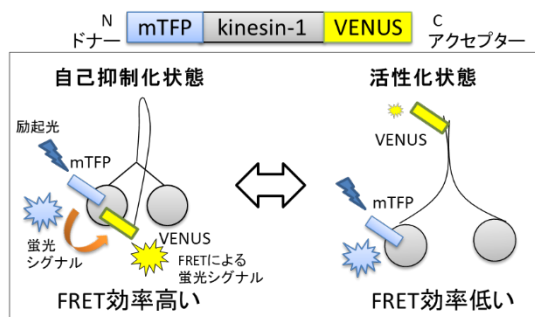
- 得られたサプレッサー株がどの遺伝子に変異をもつのか特定するため、ゲノムを抽出してシークエンス解析を行った。
- 特定した変異の効果を検証するため、明らかになった遺伝子の変異をゲノム編集法(CRISPR/Cas9)により線虫へ導入し、遺伝子組換え体を樹立した。
- 上記の遺伝子組換え体における kinesin-1 活性への影響を評価するため、kinesin-1 に依存した細胞内現象の一つである細胞質流動の測定を行った。

(3) kinesin-1 の活性化状態を評価するためのセンサー分子の開発および評価

- kinesin-1 は自身の自己抑制化や二量体化といった構造変化で活性制御されるため、特定した変異はそれらに作用するかもしれない。そのような具体的な経路を明らかにするため、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を線虫用に改変した kinesin-1 の分子セン

サーを開発した (図 2)。一般的に、kinesin-1 は尾部 (C 末端側) をモータードメイン (N 末端側) に折り畳んで自己抑制化しており、活性化時にそれが解除される。過去の文献において kinesin-1 の FRET センサーが開発されており (Cai et al, J Cell Biol 2007)、抑制状態では蛍光が強く、活性化状態では蛍光が弱くなるという仕組みである (図 2)。

(図 2) kinesin-1 の FRET 分子センサー



- kinesin-1 の FRET 分子センサーを線虫で発現させるため、mTFP と VENUS 配列を線虫用にコドン最適化し、さらに人工イントロンを挿入したオリゴ配列を合成した。mTFP と VENUS の間に (i) 短いリンカーのみを挿入したコントロールプラスミド (mTFP::linker::VENUS)、(ii) kinesin-1 全長を挿入したプラスミド (mTFP::kinesin-1::VENUS)、(iii) 自己抑制化できない変異をもつ kinesin-1(E173K)を挿入したプラスミド (mTFP::kinesin-1(E173K)::VENUS) の計 3 種を構築した。これらのプラスミドを線虫のゲノムへ挿入し、安定株をそれぞれ樹立した。
- 樹立した株を共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、FRET 蛍光を定量的に評価した。線虫では受精前の卵母細胞では kinesin-1 の活性が低く、受精後の受精卵では kinesin-1 の活性が高いため、受精前後の卵細胞における FRET 蛍光の比較を行った。

3 研究成果

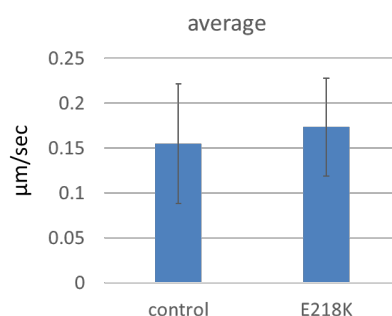
(1) kinesin-1 変異体のサブレッサー株の新規単離

- 新たに EMS 薬剤によるランダムな変異導入を kinesin-1 変異体 (FM50) へ行い、サブレッサー株の単離を試みた結果、新たにサブレッサー株を 3 ライン単離することに成功した。これにより以前の 2 ラインと合わせて計 5 ラインのサブレッサー株を得た。

(2) サブレッサー株の原因遺伝子の特定

- 得られたサブレッサー株のゲノムを抽出し、シークエンスを行った。その結果、5 ラインすべてに共通して kinesin-1 自身に新たなアミノ酸置換変異 E218K が存在することがわかった。つまり、サブレッサー株は元から kinesin-1 にある 3 箇所のアミノ酸置換 (G45E, I304M, E338K) に加えて、新たに E218K が加わっていることが判明した。
- ゲノム編集法 (CRISPR/Cas9) により線虫の kinesin-1 へ E218K アミノ酸置換を導入し、その効果を調べた。kinesin-1 に依存した受精卵における細胞質流動の平均速度を測定することで、E218K を有する kinesin-1 活性の評価を試みた。その結果、control では $0.15 \pm 0.07 \mu\text{m}/\text{sec}$ に対し、E218K では $0.17 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{sec}$ であり、有意な差は見られないことがわかった (図 3)。つまり、E218K を有する kinesin-1 の活性は、受精卵においては通常のものとはあまり変わらないと考えられる。
- G45E は kinesin-1 における ATP 結合領域、

(図 3) 細胞質流動の平均速度

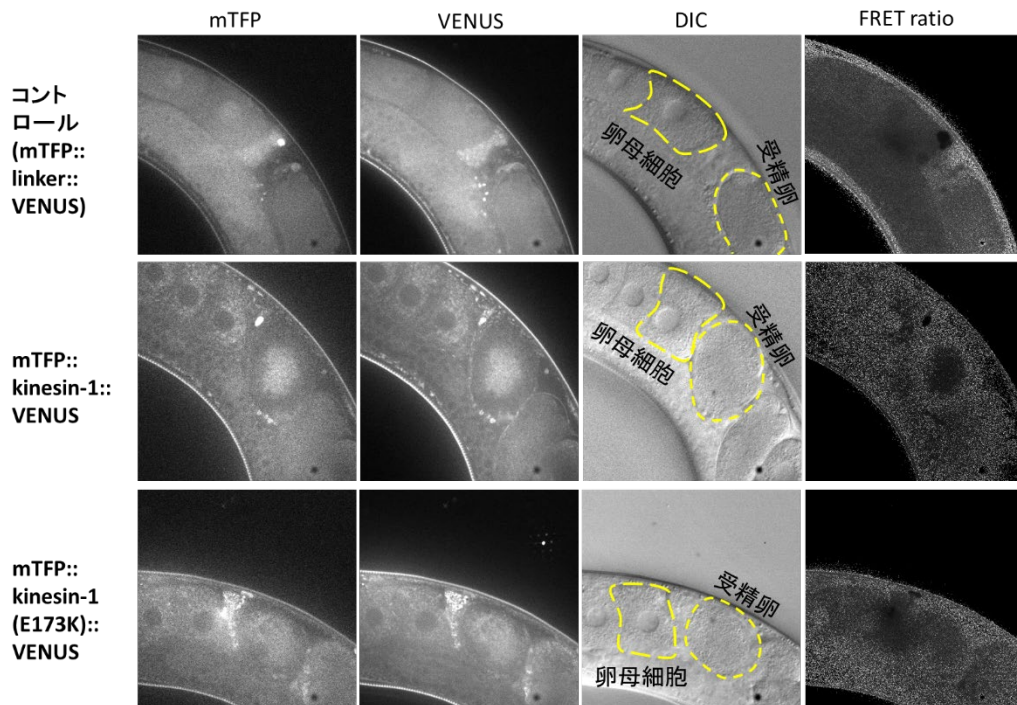


I304M は微小管結合領域、E338K は二量体化に重要な Neck linker 領域の変異である。ここに E218K 置換が加わることで kinesin-1 の立体構造に変化が起き、元からある欠損効果を回復させたという可能性が考えられる。

- 今回の細胞質流動の測定では、kinesin-1 の活性を間接的にしか評価していない。今後はさらに E218K の効果を検証するため、神経における小胞輸送への影響や in vitro でのモーター活性の評価も行う必要があるだろう。

(3) kinesin-1 の活性化状態を評価するためのセンサー分子の開発に成功

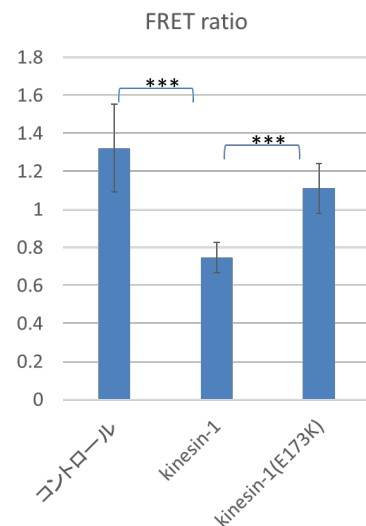
- FRET コントロール株 (mTFP::linker::VENUS 発現株) の受精卵では、mTFP 用の励起光により mTFP と VENUS の蛍光が両方とも確認できた。これは構築したコンストラクトが線虫で発現し、FRET も起きていることを示している (図4)。
- 同様に、mTFP::kinesin-1::VENUS 発現株および mTFP::kinesin-1(E173K)::VENUS 発現株においても両蛍光が確認できた (図4)。株樹立が成功したといえる。



(図4)線虫におけるFRET分子センサーの発現

- 受精前の卵母細胞と受精後の受精卵における FRET 効率を比較するため、FRET ratio (VENUS 蛍光強度を mTFP 蛍光強度で割った値) を求めた。卵母細胞における FRET ratio を 1 とした場合、受精卵における FRET ratio 値はコントロールでは 1.32 ± 0.23 、kinesin-1 では 0.74 ± 0.08 、kinesin-1(E173K)では 1.11 ± 0.13 となった。kinesin-1 ではコントロールと比べて有意に値が低くなり ($P < 0.001$)、受精後に活性化する kinesin-1 の特徴を反映していると思われる (図5)。一方、自己抑制化できない kinesin-1(E173K)ではコントロールと値は変わらなかった (図5)。

(図5)FRET ratioの値



- これらの結果から、(ア) 線虫の受精卵における **kinesin-1** 活性もまた自己抑制化で制御されており、(イ) それが受精に伴う細胞周期の再開に依存しているという可能性を示唆している。したがって、本研究の **FRET** 解析から、受精をきっかけとした細胞周期進行による **kinesin-1** の活性制御という新しいシグナル経路の存在が見いだされつつある。
- 今後は、この経路の分子基盤を明らかにするため、さらに詳細な解析を進めていく予定である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究で着目している主要なキネシンモーターの一つである**kinesin-1**は、ヒトを含め多くの種で発現しており、細胞内における微小管上の輸送を担うことで生命に必須の役割を多数有している。しかしながら、受精卵や神経細胞といった実際の生体内における活性が如何に制御されているのか未だ不明な部分が多い。本研究により、そのような具体的なしくみの一つとして、受精をきっかけとして再開する細胞周期の進行がモーター活性をタイミングよく発揮させるタイマーであるという可能性が明らかになった。今後、本研究によりこの新たなシグナル経路が明らかになれば、それを利用することで、**kinesin-1**が関わるさまざまな疾患の予防や治療に役立てることが十分に可能と考えている。たとえば、アルツハイマー病で見られる異常タンパクの蓄積（老人斑）の要因の一つは、**kinesin-1**が仲介する神経での輸送阻害であることが指摘されている。また**kinesin-1**は損傷した神経軸索の再生にも寄与することが報告されている。したがって、本研究はそれらの疾患の新たな予防法や創薬の標的を明らかにすることが期待できると考えている。