

グラントNo.: L S I 2 0 2 0 3

ライフサイエンスイノベーションセンター
「令和2年度重点プロジェクト研究および学内共同研究等研究費助成」

核移行因子インポーチン (KPNA) による細胞質ダイニン輸送制御と 精神・神経疾患発症メカニズムの解明

研究代表者: 水野 克俊 (医学系部門・助教)

共同研究者: 藤田 聡 (工学系部門・准教授)、山田 雅己 (医学系部門・教授)

概 要	
神経細胞における軸索輸送制御機構の解明は、記憶・学習・情動など高次脳機能を理解し、精神・発達障害の治療法を確立するために必須である。近年、精神・発達障害の発症に核移行因子が関わる事が報告されている。本研究では、当該疾患の発症機構に核移行因子の軸索領域での機能が重要であるとの仮説のもと、脳内で発現量が高い KPNA1 に注目し、研究を開始した。蛍光ライブイメージングの結果、神経軸索上での KPNA1 はインポーチン β 、神経特異的 β チューブリンタイプ III 及び細胞質ダイニン (以下ダイニン) と挙動を共にしていることが明らかになった。さらに、KPNA1 遺伝子の破壊が神経遊走に及ぼす影響を調べるため、ナノファイバー上での細胞遊走活性測定法と子宮内胎児脳内遺伝子導入法による細胞および個体レベルでの解析を開始した。	
関連キーワード	精神・発達障害、核移行因子、軸索輸送、神経細胞遊走、細胞質ダイニン

研究の背景および目的

神経細胞における細胞体から神経終末に至るまでの軸索輸送は記憶・学習・情動など高次脳機能において決定的な役割を果たす。KPNA やインポーチン β (IPO β) は代表的な核移行因子であり、細胞質から核内への基質の輸送により様々なシグナルを核内へと伝える機能を持つ。近年、統合失調症や自閉症スペクトラム障害 (ASD)、注意欠如・多動性障害 (AD/HD) などの精神・発達障害に核移行因子が関与することが報告されている。しかし、記憶・学習・情動など高次の脳機能を核移行だけで説明することは困難である。また、KPNA が核移行以外の機能を有する多機能因子であることが明らかとなりつつある。高次脳機能に関わる情報伝達を、神経細胞の核内外のみならず神経終末に至るまでの細胞内物質輸送システムとして統合的に理解することが必要である。

本研究で代表者らは KPNA ファミリーの中でも脳内で顕著に高発現がみられる KPNA1 に着目した。KPNA1 ノックアウト (KO) マウスを作製しその行動解析実験を行った結果、新規物体認知機能

の低下、感覚運動統合障害などの行動異常がみられた。KPNA1 KO マウス由来の脳抽出液を用いた DNA マイクロアレイから、統合失調症(様)症状を誘発する向精神薬フェンシクリジン (PCP) の薬剤負荷条件下において、ダイニンおよびその関連遺伝子に顕著な発現低下がみられ、薬剤に対する脆弱性が示唆された。ダイニンは神経細胞においては軸索輸送、細胞遊走などに必須の役割を有する分子内モーターである。この結果は KPNA1 とダイニンによる軸索輸送が深く関与していることを示唆する。本研究では、KPNA1 とダイニンの神経細胞における新規の機能的役割を明らかにすることを目的とする。軸索輸送においてダイニンは必須であり、また核-中心体とダイニン/微小管の連関は細胞遊走において重要であるが、KPNA1 がそれらをつなぐ鍵として働く可能性がある。神経細胞における KPNA1 とダイニン相互作用と機能を明らかにすることで、本研究は核-細胞質-神経軸索をつなげる新たな細胞内物質輸送システムの理解を提唱する上での基盤的研究となる。

研究の内容および成果

軸索輸送における KPNA1 の機能を検証するため、蛍光退色後回復法 (FRAP) およびマルチカラーライブセルイメージングにより、マウス幼若個

体の後根神経節細胞 (DRC) を KPNA1 およびダイニン中間鎖 1 (DIC1)、タイプ III β -チューブリン (Tubb3)、インポーチン β (IPO β) の動態を観察し

た。FRAP による各分子の動態の検証から、KPNA1 や IPO β が軸索上を活発に輸送されていることがあきらかとなった。さらに、ライブセルイメージングによる直接観察の結果、KPNA1 と DIC1、Tubb3、IPO β が共局在し、軸索上を共に活発に移動する様子が観察された (図 1A, B)。本来逆行性モーターであるダイニンは神経軸索の順行、逆行の両方向に輸送され、順方向輸送は主に Tubb3 から構成される移動性微小管により担われる (Yamada *et al.*, EMBO J, 2008)。これらの因子と核移行因子である KPNA1、IPO β が挙動をともにし、輸送されていることは、軸索において KPNA1/IPO β が核移行とは異なる機能を有することを強く示唆する。

さらに、KPNA1 KO マウスの解析から、神経細胞遊走時の微小管による核の牽引に重要な役割を果たすダブルコルチン X の発現レベルが PCP 依存的に低下することが確認されたことから、細胞遊走における KPNA1 の機能にも着目した。そのための実験系として、共同研究者の藤田聡准教授 (工学系部門) とともに、エレクトロスピンニング法

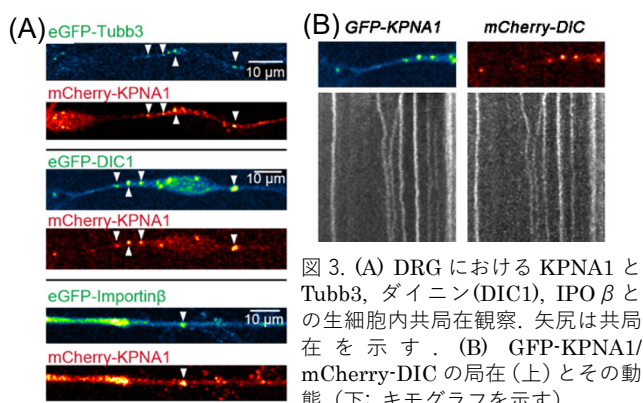


図 3. (A) DRG における KPNA1 と Tubb3, ダイニン(DIC1), IPO β との生細胞内共局在を観察。矢尻は共局在を示す。(B) GFP-KPNA1/mCherry-DIC の局在(上)とその動態(下; キモグラフを示す)。

による作成したナノファイバー上での小脳顆粒細胞遊走の観察を試みた。その結果、ポリ-L-リジンおよびラミニンによりコーティングをしたナノファイバー上で、小脳顆粒細胞が遊走する様子を効率良く観察することに成功した (図 2A, B)。今後は、遺伝子導入とライブセルイメージングを行い、遊走中における細胞内での核-中心体の連関やダイニン/KPNA1 の動態を詳細に解析し、さらに遺伝子破壊を行った場合での変化を検証する。加えて、*in vivo* での細胞遊走への KPNA1/IPO β の機能を検証するために、子宮内電気穿孔法による遺伝子導入の系を確立した。E14.5 のマウス胚脳に GFP を導入し、E17.5 のマウス胚から脳を回収した結果、大脳皮質における GFP の導入と、細胞の遊走の様子を可視化することに成功した (図 5C, D)。今後は、CRISPR/Cas9 による KPNA1 や他因子の遺伝子破壊を行い、神経の遊走における KPNA1 や核移行関連因子とダイニン/中心体の関連を検証する。

これらの実験を通して、神経細胞における KPNA の多機能性と、それが高次脳機能における役割を解明することで新たな細胞内物質輸送システムを提唱すると共に、精神障害・発達障害の根本治療法の確立を目指す上での分子基盤を解明する。

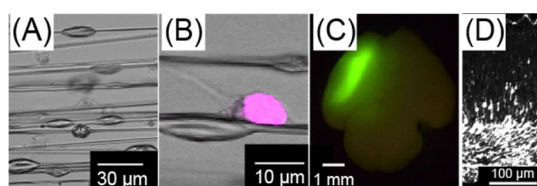


図 5. (A) ガラス上ナノファイバー。(B) ファイバー上で観察された小脳顆粒細胞 (明視野および核染色)。(C) 子宮内電気穿孔法によりマウス脳内に導入された GFP。(D) GFP 陽性細胞の遊走確認像。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

国際学会

Katsutoshi Mizuno, Masaki Sugahara, Hirota Nomiya, Yoichi Miyamoto, Masahiro Oka, Takatoshi Hikida, Satoshi Fujita, Masami Yamada. Cell Bio Virtual 2020 An online ASCB/EMBO meeting. December 2020.

国内学会

菅原 将樹, 水野 克俊, 山口 楓香, 野宮 廣貴, 宮本 洋一, 岡 正啓, 疋田 貴俊, 藤田 聡, 山田 雅己. 第 43 回日本分子生物学会年会. オンライン開催. 2020 年 12 月.

「特記事項」

特になし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

採択済み

上原記念生命科学財団・研究助成・研究奨励金・2021 年・核移行因子インポーチン α (KPNA) による細胞質ダイニン輸送制御と精神・神経疾患発症メカニズムの解明・代表・200 万円

科学研究費・基盤 C・2019 年-2021 年・左右決定におけるノード繊毛由来カルシウムの機能解明・代表・442 万円 (総額)

申請中

武田科学振興財団・医学系研究助成・2021 年・神経軸索性インポーチン α (KPNA) による細胞質ダイニン輸送制御と精神・神経疾患発症機構の解明・代表・200 万円