

[第一回千葉医学会奨励賞]

キネシン分子モーターの1分子顕微解析 による神経変性メカニズムの解明 - 遺伝性痙性対麻痺を引き起こす分子モーターの変異 -

川 口 憲 治

要 旨

キネシン1は主に神経細胞内でATP加水分解エネルギーを利用し微小管のプラス端方向へ移動する分子モーターである。近年の1分子レベルの技術的進歩によりキネシン1の移動メカニズムは詳細に明らかになってきている。正常の状態の理解が進めば、遺伝子変異などにより分子モーターの機能不全が起こった時、その動きの変化のみでなく神経軸索全体に与える影響、またその対処（治療）も考慮できる。実際臨床において遺伝性痙性対麻痺の一部はキネシン1のモータードメイン（KIF5A）の遺伝子変異により引き起こされることが分かっている。本稿ではキネシン1の微小管を移動するメカニズムについて、自らの研究成果も含めたこれまで得られた最新の知見を述べると共に、KIF5Aの変異が神経変性疾患を引き起こすメカニズムについて議論する。

Key words: キネシン1, KIF5A, 遺伝性痙性対麻痺, SPG10

I. はじめに

神経細胞は、極めて高い極性を持つ細胞である。核が存在する神経細胞体から長く伸びた突起は軸索と呼ばれ、先端部分でシナプス前膜を形成する。軸索は長いもので1m以上にもなり、神経細胞体の1,000倍以上の容積を持つ。軸索内はシナプス小胞や神経栄養因子、ミトコンドリア等の細胞内小器官、その他の蛋白複合体など様々な物質が移動しているが、神経細胞体とシナプス形成に関与する軸索先端部分との交通は、ATP加水分解のエネルギーを利用した分子モーターによる細胞内輸送系に高度に依存している[1]。

キネシン1は軸索の細胞骨格である微小管のプラス端に進む順行性（神経体からシナプス末端へ向かう）の物質輸送を担っている分子モーターで

あり、モーター活性を持つ2つの重鎖（kinesin heavy chain: KHC, 頭部と呼ばれている）と、輸送する物質（荷物）と相互作用する2つの軽鎖（kinesin light chain: KLC）から構成されているヘテロ4量体である（図1）。またKHCにはKIF5A, 5B, 5Cのサブタイプの存在が知られている。5Bはubiquitousに発現しているのに対し、5Aと5Cは神経細胞特異的に発現している[1]。キネシン1は、この2つの頭部が微小管との結合・解離を交互に繰り返しつつ微小管のプラス端に向かって“歩く”リニアモーターであるといわれている。そこにはATP加水分解と共役した巧妙な仕組みが存在している[2,3]。このように非常に精巧であるため、たった一つの遺伝子変異においてもその変異部位によってはキネシン1の機能が大きく損なわれる可能性があることは想

千葉大学大学院医学研究院神経生物学

Kenji Kawaguchi: Elucidation of the mechanism of neuronal degeneration by microscopic analysis of kinesin-1 - mutations of molecular motor that cause hereditary spastic paraplegia - .

Department of Neurobiology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

Tel. 043-226-2024. Fax. 043-226-2024. E-mail: kkawaguchi-cib@umin.org

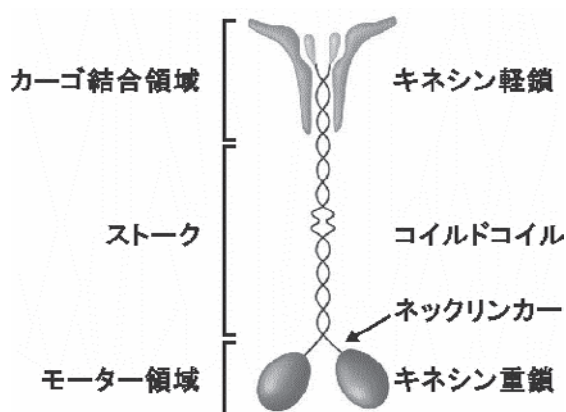


図1 キネシン1の構造
(文献[1]より改変)

像に難くない。実際、臨床において遺伝性痙性対麻痺 (Hereditary Spastic Paraplegia: HSP) の一部は上述のKIF5Aの変異により引き起こされることが分かっている (SPG (Spastic Gait) 10) [4]。HSPは軸索内輸送の障害に起因する軸索変性とその共通する病態の1つであると考えられており、軸索変性に至るメカニズムを解明することができれば、その対処法 (治療法) へつながる研究へも発展できる。また逆に疾患からモータータンパク質のまだ明らかになっていない生理的機能の解明の糸口が見つかる期待もある。本稿では、キネシン1のこれまでの研究からコンセンサスの得られている歩く仕組みについて述べ、遺伝子変異によるキネシン1の機能不全がどのように神経変性を引き起こすかについて議論する。

II. キネシン1の“歩く”メカニズム

双頭構造を持つキネシン1はプロセシブであり、微小管から解離するまでに8 nmステップを1秒間に100回以上繰り返す。8 nmステップは α , β サブユニットで構成されている一対のチューブリンヘテロダイマーのサイズに対応する。またキネシン1はタイトカップリングモーターであり、8 nmステップは1回のATP加水分解を伴う[2,3]。1999年にRiceら[5]によってキネシン1の頭部と尾部をつなぐネック領域 (ネックリンカー) が、頭部に結合したヌクレオチドの状態によって頭部に結合 (ドック) または頭部から解離 (アンドック) するという構造変化が報告されたことか

ら、キネシン1はhand-over-handモデルとよばれるメカニズムで移動することが提唱された。このモデルはその後の光ピンセット[6-8]やFRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) [9]、量子ドット[10]、遺伝子工学的手法[11,12]を用いた実験結果等により、キネシン1の2つの頭部が微小管に結合しているときに後方の頭部が前方の頭部より微小管から解離しやすいこと[7]、2つの頭部が交互に働くこと[12]、1つの頭部のプラス端方向への動きは1回のサイクルあたりチューブリン2量体2つ分に当たる約16nmとなること (分子全体の変位は2つの頭部の重心位置になるので8 nmになる)[10]、キネシン1はATPの濃度が低い状態、いわゆる“waiting state”においては単頭で微小管と結合していること[8,9]から受け入れられている。以下にまだ明らかになっていない部分はあるものの、現時点で最もコンセンサスを得ているキネシン1のhand-over-handモデルを紹介する (図2)[3]。

最初、微小管が存在しないときはキネシン1の両方の頭部にはADPが結合している。片方の頭部が微小管と結合すると、その結合した頭部からADPは解離する (もう一方の頭部にはADPは結合したままであり、微小管から離れているか、ごく弱く結合しすぐ離れるのを繰り返している) (図2のA。以下同様)。ATPが微小管と結合している頭部に結合すると、ネックリンカーが構造変化を起こしてプラス端方向に固定される (結合頭部の2重矢印)。この構造変化により後方の頭部がブラウン運動で大きく動いて微小管との結合部位を探ることができるようになる (B)。全くランダムなブラウン運動の場合、前後どちらの微小管結合部位とも相互作用してしまうが、キネシン1自身もつ構造によるものや微小管の結合部位にはプラス端方向へ進むようなバイアスがかかっているため、前方の微小管結合部位と結合し (C)、ADPを解離することで微小管と強く結合する (D)。今まで後方だった頭部が前方に来るため、この時点で2つの頭部はそれぞれ始めの位置関係と逆になり、キネシン1の重心は8 nm微小管上を移動したことになる。ATPの結合した頭部は、加水分解によってADP・Pi結合状態になる。ここで重要なのは頭部内のPi (リン酸)

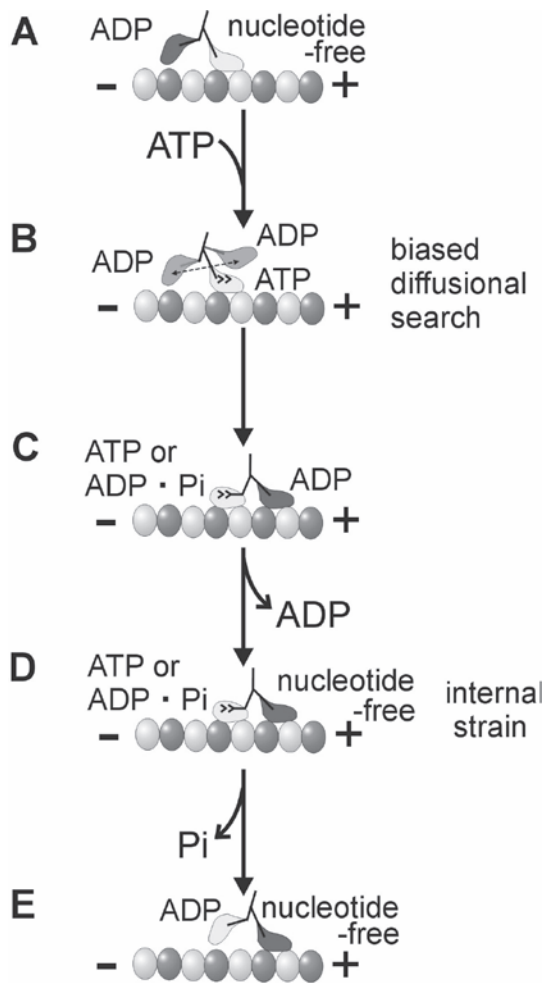


図2 キネシン1の歩くメカニズム

に感受性があり、構造変化に大きく寄与するとされている3領域 (P-ループ, switch I, switch II 領域) [13] の存在と共に、キネシン1が双頭で結合しているときはそのinternal strain (キネシン1の内部にかかる負荷) のため構造変化が起き、後方の頭部からPiが放出されADP結合状態になるまでは前方のヌクレオチドを結合していない頭部に新たにATPが結合できないようになっていることである [7]。後方の頭部からPiが放出されると、ネックリンカーは元の状態に戻り、微小管とは解離する。よって前方に一步進んだ状態で最初と同様の形態をとる (E)。

III. 遺伝性痙性対麻痺 (HSP) とは

HSPは、緩徐進行性の両下肢の痙性と筋力低下を主体とする、遺伝性の上位ニューロン変性疾患の症候群である。両下肢の痙性と筋力低下のみ

を主症状とする純粋型と、痙性対麻痺に加え視神経萎縮、精神発達遅滞、難聴、認知症、筋萎縮、網膜色素変性症などの症状を伴う複合型に大きく分類される。一般的に経過は数年~数十年と非常に緩徐であり、発症年齢も生下時から70歳代まで幅広く、家系内においても発症年齢が大きく異なることが知られている。頻度は正確には分かっていないものの、特定疾患の臨床個人調査票を基礎にした統計では脊髄小脳変性症のうち4.7%を占める [14-16]。

遺伝学的には常染色体優性遺伝 (autosomal dominant: AD), 常染色体劣性遺伝 (autosomal recessive: AR), X染色体連鎖遺伝 (X-lined recessive: XR) の3型に大別される。現在までにHSPの原因遺伝子は非常に多く同定されており、これまで46の遺伝子座と17の遺伝子が同定されている [14-16]。

IV. 変異KIF5Aと軸索変性

SPG10は1999年にReidら [4] により、AD形式で純粋型HSPのイギリスの2家系が12q13に連鎖することが報告され、SPG10と命名された (その後2002年に同グループにより異常遺伝子がKIF5Aであることが明らかになっている [17])。AD例の約3%程度と推定されており、当初は10~20歳代発症の純粋型として報告されていたが、最近になり複合型も呈する症例が報告され、AD例の複合型の中では約10%と比較的頻度が高いことが判明している。合併症状として難聴、末梢神経障害、Silver症候群様、シャルコー・マリー・トゥース病様、精神発達遅滞、網膜色素変性、パーキンソニズムなどが報告されている [18]。

KIF5Aは1028アミノ酸残基より構成され、アミノ酸番号1~324に微小管結合部位とATPase活性を持つモータードメインを持つことが知られている [1]。現在までに15のミスセンス変異と1つの欠失変異が報告され [4,17-24], ネック領域にあるA361V (アミノ酸番号361のアラニンをバリンに置換。以下同様) を除き他は全て頭部領域に存在している (表1)。

上述のこれまで確立されてきた1分子レベルでの実験手法を用いて、これらの遺伝子変異を

表1 報告されている KIF5A の変異

エクソン	変異	アミノ酸置換	臨床症状	文献
2	c. 188 a > g	p. Y63C	パーキンソニズム, 難聴	[18]
2	c. 217 g > a	p. D73N	末梢神経障害	[19]
8	c. 593 t > c	p. M198T	末梢神経障害, パーキンソニズム	[18]
8	c. 608 g > c	p. S203C	末梢神経障害	[20]
8	c. 610 c > t	p. R204W	末梢神経障害	[21]
8	c. 611 g > a	p. R204Q	Silver 症候群様	[18]
9	c. 751 g > a	p. E251K	シャルコー・マリー・トゥース病様	[18]
9	c. 759 g > t	p. K253N	末梢神経障害	[19]
9	c. 767 a > g	p. N256S	純粋型 HSP	[17]
9	c. 768_770 del CAA	p. N256del	末梢神経障害	[19]
9	c. 771 g > c	p. K257N	精神発達遅滞, 末梢神経障害	[18]
10	c. 838 c > t	p. R280C	純粋型 HSP	[22]
10	c. 839 g > t	p. R280L	純粋型 HSP	[18]
10	c. 839 g > a	p. R280H	網膜色素変性	[18]
10	c. 1035 a > g	p. Y276C	純粋型 HSP	[23]
11	c. 1082 c > g	p. A361V	純粋型 HSP	[24]

もつ KIF5A の機能の変化を観察できれば, より詳細に SPG10 の病態に迫ることができる。ドイツのグループは実際に HSP 患者で報告されている変異 KIF5A を 4 種類作成し (K253N, N256S, R280C, A361V: 図 3 参照), 微小管上の移動速度や微小管との親和性について調べている [25]。A361V (ネック領域の変異) では微小管上の移動速度に関しては変化がなかったが, 他の 3 つ (頭部領域の変異) に関しては微小管との親和性や移動速度が減少した。また光ピンセット法を用いた実験では全ての変異 KIF5A が正常の前進性を示さなかった。これは 1 分子レベルでは KIF5A の機能がほぼ完全に低下していることを示している。全ての HSP 患者は変異 KIF5A と正常 (wild type) の KIF5A 遺伝子両方を有している (ヘテロ接合体) ため, 軸索輸送が突然滞ってしまうわ

けではないものの, 機能不全の変異 KIF5A が微小管の track をブロックし正常のキネシン 1 の結合を妨げたり, 正常のキネシン 1 の絶対数が減少することで徐々にシナプスへ運ばれるべき物質が遅れ, 結果としてシナプスの機能不全から軸索変性を引き起こすことが考えられる。しかし軸索変性のメカニズムの詳細は明らかにされていない。全貌解明に向けて更なる研究が望まれる。

V. 終わりに

HSP の病態機序は今回の KIF5A の変異のみでなく, 微小管やニューロフィラメント (神経細胞における中間径フィラメントであり, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やシャルコー・マリー・トゥース病などの疾患では神経細胞内にニューロフィラメントの異常集積が認められる) 等の細胞骨格の制御, ミエリンの維持や構築, 神経突起形成, ミトコンドリア機能など様々な障害の可能性が示唆されている [26]。変異 KIF5A の研究が他の HSP の病態機序の解明, さらに治療法の開発へ貢献することを大いに期待する。

SUMMARY

Kinesin-1 is a dimeric motor protein that transports cellular cargo along microtubules by using the energy released by ATP hydrolysis. Recent novel studies at the single molecular level have provided

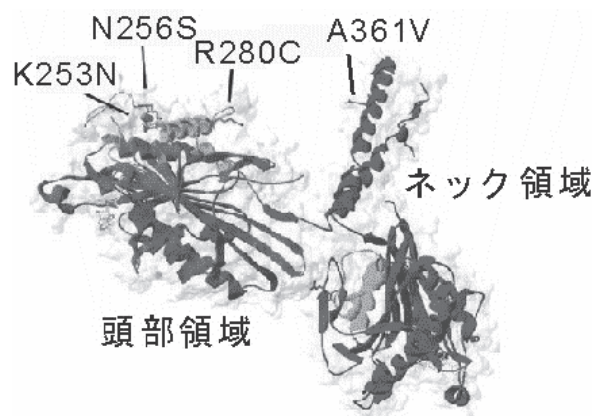


図3 変異 KIF5A の場所 (文献 [25] より改変)

extensive knowledge on how kinesin-1 moves along microtubules. The interaction between kinesin-1 and microtubules has been implicated in several serious diseases. In fact, one of the dominantly inherited forms of hereditary spastic paraplegia is caused by point mutations in KIF5A (kinesin-1 gene). Since the complete elucidation of the mechanism of the movement of mutant KIF5A may open new avenues for investigations in the treatment of neurodegenerative diseases, further investigations of mutant KIF5A are desired.

文 献

- 1) Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron* 2010; 68: 610-38.
- 2) Block SM. Kinesin motor mechanics: binding, stepping, tracking, gating, and limping. *Biophys J* 2007; 92: 2986-95.
- 3) Kawaguchi K. Energetics of kinesin-1 stepping mechanism. *FEBS Letters* 2008; 582: 3719-22.
- 4) Reid E, Dearlove AM, Rhodes M, Rubinsztein DC. A new locus for autosomal dominant "pure" hereditary spastic paraplegia mapping to chromosome 12q13, and evidence for further genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 757-63.
- 5) Rice S, Lin AW, Safer D, Hart CL, Naber N, Carragher BO, Cain SM, Pechatnikova E, Wilson-Kubalek EM, Whittaker M, et al. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 1999; 402: 778-84.
- 6) Kawaguchi K, Ishiwata S. Nucleotide-dependent single-to double-headed binding of kinesin. *Science* 2001; 291: 667-9.
- 7) Uemura S, Ishiwata S. Loading direction regulates the affinity of ADP for kinesin. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 308-11.
- 8) Guydosh NR, Block SM. Direct observation of the binding state of the kinesin head to the microtubule. *Nature* 2009; 461: 125-8.
- 9) Mori T, Vale RD, Tomishige M. How kinesin waits between steps. *Nature* 2007; 450: 750-4.
- 10) Yildiz A, Tomishige M, Vale RD, Selvin PR. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* 2004; 303: 676-8.
- 11) Tomishige M, Vale RD. Controlling kinesin by reversible disulfide cross-linking: identifying the motility-producing conformational change. *J Cell Biol* 2000; 151: 1081-92.
- 12) Kaseda K, Higuchi H, Hirose K. Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 1079-82.
- 13) Kikkawa M. The role of microtubules in progressive kinesin movement. *Trends Cell Biol* 2008; 18: 128-35.
- 14) 高野弘基, 春日健作, 小林 央, 西澤正豊. 遺伝性痙性対麻痺の遺伝子的研究. *脳神経* 2003; 55: 757-63.
- 15) 瀧山嘉久. 遺伝性痙性対麻痺. *山梨医科学誌* 2009; 24: 1-12.
- 16) 石浦浩之, 辻 省次. 遺伝性痙性対麻痺の分子遺伝学. *最新医学* 2010; 65: 113-20.
- 17) Reid E, Kioos M, Koch AA, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Vance MAP, Rubinsztein DC, Marchuk DA. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1189-94.
- 18) Goizet C, Boukhris A, Mundwiller E, Tallaksen C, Forlani S, Toutain A, Carriere N, Paquis V, Depienne C, Durr A, Stevanin G, Brice A. Complicated forms of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia are frequent in SPG10. *Hum Mutat* 2009; 30: E376-85.
- 19) Schüle R, Kremer BP, Kassubek J, Auer-Grumbach M, Kostic V, Klopstock T, Klimpe S, Otto S, Boesch S, van de Warrenburg BP, Schöls L. SPG10 is a rare cause of spastic paraplegia in European families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 584-7.
- 20) Musumeci O, Bassi MT, Mazzeo A, Grandis M, Crimella C, Martinuzzi A, Toscano A. A novel mutation in KIF5A gene causing hereditary spastic paraplegia with axonal neuropathy. *Neurol Sci* 2011; 32: 665-8.
- 21) Tessa A, Silvestri G, de Leva MF, Modoni A, Denora PS, Masciullo M, Dotti MT, Casali C, Melone MA, Federico A, Filla A, Santorelli FM. A novel KIF5A/SPG10 mutation in spastic paraplegia associated with axonal neuropathy. *J Neurol* 2008; 255: 1090-2.
- 22) Fichera M, Lo Giudice M, Falco M, Sturnio M, Amata S, Calabrese O, Bigoni S, Calzolari E, Neri M. Evidence of kinesin heavy chain (KIF5A) involvement in pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 2004; 63: 1108-10.
- 23) Blair MA, Ma S, Hedera P. Mutation in KIF5A can also cause adult-onset hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics* 2006; 7: 47-50.
- 24) Lo Giudice M, Neri M, Falco M, Sturnio M, Calzolari E, Di Benedetto D, Fichera M. A missense mutation in the coiled-coil domain of the KIF5A gene and late-onset hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol* 2006; 63: 284-7.
- 25) Ebbing B, Mann K, Starosta A, Jaud J, Schöls L, Schüle R, Woehlke G. Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1245-52.
- 26) Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1127-38.