

キネシン分子モーターKIF4の遺伝子変異は てんかん発症の誘因となる

1. 発表者：

Wan Yuansong (東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 特任研究員)
森川 桃 (研究当時：東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 特任研究員／
現：筑波大学医学医療系解剖学・神経科学研究室 日本学術振興会特別研究員S P D)
森川 真夏 (東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 特任研究員)
岩田 卓 (研究当時：東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 特任研究員／
現：筑波大学医学医療系解剖学・神経科学研究室 助教)
田中 庸介 (東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 講師)
廣川 信隆 (東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 特任研究員・名誉教授)

2. 発表のポイント：

- ◆てんかんを持つ小児患者の遺伝子解析により、キネシン分子モーターKIF4にアミノ酸置換をもたらす点突然変異が同定された。
- ◆*Kif4* 遺伝子変異マウスを作成して解析を行ったところ、変異型 KIF4 が核内で PARP1 と結合しその活性を抑えることで、細胞内の Cl⁻濃度が増加することがわかった。その結果、神経細胞の樹状突起の異常な分枝が引き起こされ、マウスのてんかん発症の頻度を高めた。
- ◆これはまったく新しいてんかん発症メカニズムであり、今後この *Kif4* 遺伝子変異マウスを用いることで、てんかんという神経難病の治療法開発が大きく進むことが期待される。

3. 発表概要：

てんかんは最も一般的な神経疾患の一つであり、日本では約 100 万人（有病率は 1000 人に 8 人程度）、世界中では約 5,000 万人が罹患すると言われている。てんかんの発症には、神経の形態異常、細胞内外のミネラル動態異常、外傷、薬の副作用など、様々な要因があることが知られているが、その発症メカニズムの詳細については不明な点が多く残っていた。東京大学大学院医学系研究科の廣川信隆特任研究員、Wan Yuansong 特任研究員らは、キネシン分子モーターKIF4の変異が、結合タンパク質 PARP1 の活性を抑制してしまうために、海馬の神経細胞における樹状突起分枝の異常な増加や、細胞内の Cl⁻イオン動態の障害などを引き起こし、マウスがてんかんになりやすくなることを発見した。本研究は、患者から同定された変異を導入したマウスの研究であり、キネシン分子モーターが関わる神経細胞の形態異常及び Cl⁻イオン動態異常による新しいてんかんの発症機構が解明されたことは、てんかんを含む神経疾患の治療に道を開くものである。本研究成果は、2022 年 12 月 8 日（米国東部標準時）に米国科学誌「*Journal of Cell Biology*」に掲載された。

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、機能分子の局在や活性を制御することで細胞の生命や機能を維持する重要なタンパク質群である。これまでに多くの KIFs が脳の高次機能や個体の発生に大きな役割を持つことが示されてきたが、X 染色体に存在し、神経系に多く発現する「KIF4」の役割に関してはまだまだ研究が行われていなかった（注 1）。

東京大学大学院医学系研究科の廣川信隆特任研究員、Wan Yuansong 特任研究員らはこの KIF4 に注目し、小児のてんかん患者から KIF4 の 728 番目のアミノ酸であるアルギニンがグルタミンに変異しているミスセンス変異 (p.R728Q) を同定した (注 2)。そこで遺伝子操作により患者と同じ *Kif4* 変異を持つマウスを作製し行動解析を行ったところ、幼若マウスで発達遅延が見られた。成体の *Kif4* 変異マウスは過活動の傾向と記憶・学習能力の低下を示した。またペンチレンテトラゾール化合物 (PTZ) を腹腔内注射し脳波測定を行ったところ、*Kif4* 変異マウスが低濃度でもてんかん発作を起こす様子が観察された (注 3)。これらの結果から、*Kif4* 変異マウスは患者と同様の表現型を持つモデルマウスとして研究を行うことが可能であると判断した。

私達の先行研究により KIF4 は核に局在して細胞死及び遺伝子発現に重要な役割を担う PARP1 と結合し、神経細胞の活動依存性に生・死の制御を行う事を示しているが、BioID 法及び免疫沈降法の実験結果から、KIF4 と PARP1 の結合が R728Q 変異により異常に強くなることが分かった。さらにマウスの胎児から海馬の初代培養神経細胞を樹立し、PARP1 の酵素産物である PAR の量を免疫細胞化学的に評価すると、変異型で有意な低下が見られたことから、PARP1 の酵素活性が KIF4 の変異により強く抑制されていることが分かった。その結果、*Kif4* 変異神経細胞は生存率が低下していた。

先行研究により、PARP1 の活性変化は細胞のプロテオミクスプロファイルの変動を引き起こすことがわかっている (注 4)。そこで研究チームは、*Kif4* 変異マウスの脳組織及び初代培養神経細胞のタンパク質を抽出し、イムノブロット法を用いててんかんに関わる様々なタンパク質の発現量を調べたところ、*Kif4* 変異が神経栄養因子受容体 TrkB の増加及び TrkB の下流の一連のシグナル変化を引き起こすことを発見した。特に TrkB の下流因子の一つである KCC2 の低下が顕著であり、KIF4 による PARP1 を介したこれらの機能タンパク質の発現量の調整が、てんかんの病理に関係することが示唆された。

次に、TrkB によるシグナル伝達が神経細胞の形態に重要な役割を担っていることから、海馬の初代培養細胞をセミ超高解像レーザー顕微鏡で観察したところ、変異型 KIF4 初代培養細胞では樹状突起の分枝の異常な増加及び幼弱なスパインの増加が見られた。また野生型の初代培養細胞に、変異 *Kif4* 遺伝子を導入したり PARP1 の阻害剤 DHIQ を添加したりすると、変異型と同様の表現型を示した。そこで KIF4 が PARP1-TrkB を介して神経細胞の形態を制御していることを確かめるため、DHIQ 処理して分枝が異常に増加した野生型神経細胞に TrkB の阻害剤 ANA12 及び PARP1 酵素の基質 NAD⁺ を添加すると、樹状突起数は野生型と同じレベルにまで減少しスパインも成熟化した。一方、変異型 KIF4 初代培養細胞への PARP1 の強制発現または ANA12 あるいは NAD⁺ の添加によっても、野生型と同じレベルへの回復が見られた。この条件で機能タンパク質の発現量を評価したところ、NAD⁺ の添加により変異型 KIF4 初代培養細胞における TrkB 及び KCC2 の発現量は正常に回復した。したがって KIF4 は PARP1 活性を介して TrkB-KCC2 シグナル伝達を制御することで神経細胞の形態形成を制御していると示唆された。このシグナル伝達の制御に分子モーター-KIF4 が関与していることは、世界で初めての報告である。

KCC2 は Cl⁻ の輸送を介しててんかんの発症に関わっているため、Cl⁻ センサー蛍光タンパク質を用いて初代培養細胞のイメージングを行ったところ、変異型 KIF4 神経細胞は細胞内の塩化物濃度が高かったが、NAD⁺ の添加により低下した。そこで、NAD⁺ の抗てんかん薬としての可能性を検討するため、*Kif4* 変異マウスに NAD⁺ を腹腔内注射し PTZ を用いててんかんを誘発したところ、野生型マウスと同程度にてんかんを発症しにくくなった。

変異型 KIF4 の分子細胞生物学的・神経細胞学的な特徴は、てんかんマウスの表現型としてこれまでに報告されたものとよく一致しており、このマウスの解析を通じて TrkB 及び KCC2 の機能異常がてんかん発症に関与していることが提唱された (図 1)。てんかんは 1000 人に 8 人が発症すると言われているが、発症メカニズムの全容が解明されていないため、根本的な治療法はまだ十分開発されていない。今回、KIF4 が PARP1 の活性を介して TrkB-KCC2 シグナル伝達を調整し神経細胞の形態形成や細胞内の Ca^{2+} ダイナミクスを維持すること、そして KIF4 の変異によってその機能が障害されるとてんかんの発症につながるという新規の分子メカニズムが明らかになった。この研究成果は、てんかん治療法開発の基盤の一つになると期待される。

本研究は文部科学省科研費 (JP23000013、JP16H06372) の支援により実施された。

5. 発表雑誌:

雑誌名: Journal of Cell Biology (オンライン版 12 月 9 日)

論文タイトル: KIF4 regulates neuronal morphology and seizure susceptibility via the PARP1 signaling pathway

著者: Yuansong Wan, Momo Morikawa, Manatsu Morikawa, Suguru Iwata, Muhammad Imran Naseer, Adeel Gulzar Ahmed Chaudhary, Yosuke Tanaka, and Nobutaka Hirokawa*

DOI 番号: 10.1083/jcb.202208108

6. 問い合わせ先:

東京大学名誉教授

東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 特任研究員

廣川 信隆 (ひろかわ のぶたか)

Tel: 03-5841-3326

E-mail: hirokawa@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説:

(注 1) KIF4: 神経系に多く発現するキネシンスーパーファミリータンパク質の一種。45 種類あるキネシン分子モーターは微小管というレールに沿って積み荷を運び、神経難病をはじめ糖尿病・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。

(注 2) てんかん: てんかんは、脳の一部の神経細胞が突然一時的に異常な電気活動 (電気発射) を起こすことにより意識を失う病気であり、その原因は人により様々で、乳幼児から高齢者までどの年齢層でも発症する可能性がある。

(注 3) ペンチレンテトラゾール (PTZ): 細胞表面の $GABA_A$ 受容体複合体の阻害剤で、痙攣発作を誘導する。PTZ をマウスの腹腔内に注射することでてんかん様行動が引き起こされ、脳波の記録によりてんかん発症のしやすさを評価することができる。

(注 4) ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP1): PARP1 は NAD^+ を利用してポリ (ADP-リボース) (PAR) を合成し、周りのタンパク質及び DNA などに PAR 修飾を加える。DNA 損傷修復、アポトーシス、炎症遺伝子の発現、細胞癌化、老化など多彩な役割を果たしている。

8. 添付資料：

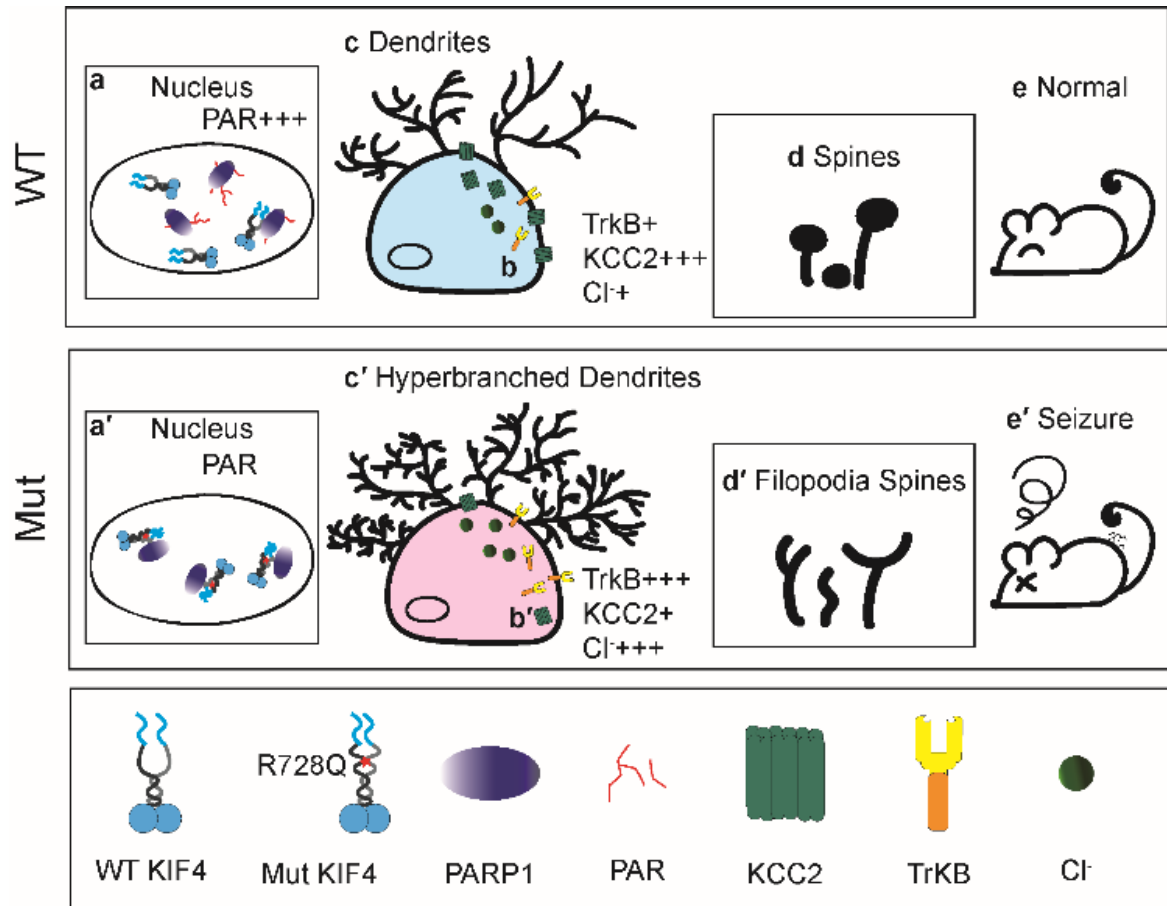


図1. KIF4によるPARP1の活性抑制とてんかん感受性を高める分子メカニズム