

学位論文題名

APP軸索順行性輸送におけるJIP1の機能

学位論文内容の要旨

神経細胞では細胞体で合成されたタンパク質を樹状突起や遠く離れた軸索末端まで正確に運ぶ必要がある。そのため、長距離にわたる軸索中での効率的な小胞輸送、すなわち軸索輸送が神経細胞の生存や機能維持においてきわめて重要な役割を果たしていると考えられる。

アルツハイマー病 (AD)原因因子のひとつであるアミロイド前駆体タンパク質 (APP)も神経細胞内で軸索順行性輸送を受けるタンパク質として報告された。その後に輸送を担う motor が kinesin-1 であることと APP は細胞内輸送過程で AD 発症につながるアミロイド産生的代謝を受けている可能性が示唆され、APP 輸送機構を理解することは AD 発症メカニズムを解明する上で重要な手掛かりとなると考えられている。

これまで当研究室では APP が c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) Interacting Protein 1 (JIP1)を介して kinesin-1 構成因子 KLC に結合し、高速な軸索順行性輸送を受けることを明らかにしている。しかしながら現在までに APP は KLC と直接相互作用するという報告や JIP1b はリン酸化状態の APP のみと相互作用するといった報告もあるなど議論は続いており結論には至っていない。そこで本研究では、JIP1 が kinesin-1 による APP の神経軸索高速輸送に果たす役割を明らかにすることを目的として、JIP1 Knock-out (KO)マウスを用いて解析を行った。

マウス脳内 APP-JIP1-kinesin-1 複合体の検出

これまで APP-JIP1-kinesin-1 複合体の形成は培養細胞での過剰発現系において共役免疫沈降で示唆されていたものの、生体内における複合体形成は確認されていなかった。マウス脳内で複合体が形成されているか確認することとした。2 か月齢と 14 か月齢の野生型マウス脳を sample として lysate を調製し、KHC 抗体による共役免疫沈降を行った。その結果、2 か月齢のマウス脳において KHC と APP、JIP1、KLC1、2 の結合が確認された。それに対し 14 か月齢のマウス脳においては KHC と KLC1、2 の結合は 2 か月齢と同程度に認められたものの、JIP1 および APP との結合は 2 か月齢と比較して減弱していた。以上の結果より APP および JIP1 はマウス成体脳で kinesin-1 と複合体を形成していること、そしてその結合が加齢によって減弱することが示された。このことは加齢が主要因とされている非遺伝性の孤発性 AD との相関性を示唆する結果と考えられる。

神経軸索内 APP 小胞および Alca 小胞輸送観察

APP 小胞輸送過程を他の cargo 小胞と比較する目的で、APP と同じく I 型膜タンパク質で kinesin-1 に運ばれる Alcadein α (Alca)小胞の初代培養神経細胞における軸索輸送を解析した。その結果、APP 小胞の順行輸送速度は Alca 小胞よりも高速になっていることが明らかになった。これまで一般的に motor

はその motor 固有の速度で動くと考えられており、kinesin-1 の速度は *in vitro* の実験等では Alca 小胞のように 2 μ m/s を超えることはほとんどないとされており、APP 小胞がとりわけ高速な順行性輸送を受けていることがわかった。

JIP1 KO 神経細胞における APP 小胞輸送観察

APP と kinesin-1 のアダプタータンパク質である JIP1 の APP 高速順行性輸送への必要性を検証する目的で JIP1 KO 神経細胞における APP 小胞輸送を解析した。その結果、順行性輸送速度が野生型に比べて低下し、また逆行性輸送が多く観察されることが明らかになった。さらに JIP1 が存在しないときの APP 小胞輸送が低速かつ逆行性が増加するという現象が JIP1 の欠失によることを明らかにする目的で、JIP1 KO 神経細胞に APP-EGFP とともに JIP1b を導入し、APP 小胞輸送活性の回復実験を行った。その結果、JIP1b を導入した JIP1 KO 神経細胞では 3 μ m/s を超える APP の高速な順行性輸送が回復した。これにより、JIP1b が APP の速度を規定している因子であることが明らかとなった。

JIP1 欠損状態における APP 輸送の kinesin-1 依存性の検証

JIP1 が存在しないときの低速な APP 輸送を担う motor が kinesin-1 かどうかを免疫染色と knockdown 実験により検証した。実験の結果、APP と KLC1 の共局在は変化がなく、JIP1 と kinesin-1 の同時 knockdown で APP 輸送は停滞したことから kinesin-1 によって輸送されていることが示された。

JIP1 KO 神経細胞に APP 小胞輸送機能回復実験

JIP1 が APP の軸索高速輸送に果たす機能を明らかにすることを目的として、JIP1 が各結合分子と結合できない変異体を作製し、JIP1 KO 神経に APP-EGFP とともに共発現させて APP の順行性かつ高速な輸送が回復されるかどうか検証することとした。その結果、まず APP の高速順行性輸送には APP と JIP1 の結合は必要であることおよび JNK との結合は必須ではないことが示された。また APP 自身のリン酸化も影響しない可能性が高いと考えられた。そして JIP1 と kinesin-1 の結合については 351 から 514 番目のアミノ酸領域は必要であるが C 末端 11 アミノ酸領域と TPR motif の結合は高速化には必須であるが順行性割合には影響を与えないことが示唆された。

JIP1 が APP 代謝に与える影響の検証

APP 神経軸索内輸送と APP 代謝には関連性が示唆されていることから APP 輸送が変化している JIP1 KO マウス神経細胞内において APP 代謝が変化している可能性が考えられたので老齢マウス脳および初代培養神経細胞における APP 代謝を解析した。

その結果、老齢 JIP1 KO マウス脳内における APP 代謝産物の量は野生型マウス脳と比較して有意な差は認められなかった。しかしながら初代培養神経細胞において APP 代謝分解速度を解析する実験では JIP1 KO 神経細胞のほうが野生型と比較して有意に分解速度が上昇しているという結果が得られた。

以上より、本研究では JIP1 が神経軸索内において APP が kinesin-1 による高速な順行性輸送を受けるために必須の分子であることを示し、kinesin-1 との結合様式によって速度と方向性を制御しうる可能性を示唆した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	利治
副査	教授	有賀	寛芳
副査	准教授	山本	融
副査	講師	米田	宏

学位論文題名

APP軸索順行性輸送におけるJIP1の機能

博士学位審査等の結果について（報告）

キネシン-1はモーター活性を持つ重鎖(KHC, kinesin heavy chain)とカーゴ結合部位を持つ軽鎖(KLC, kinesin light chain)が2つずつ結合した4量体として機能している。キネシン-1は、イカの巨大軸索から最小に精製・同定された順行性輸送モータータンパク質であり、微小管上を移動する仕組みは生物物理学的に良く解析されている。しかしながら、カーゴの結合解離を制御する機構やモーター機能が制御される仕組みは、ほとんど解明されていない。荒関が所属する研究室では、アルツハイマー病の発症因子であるアミロイドβペプチド(Aβ)の前駆体タンパク質APPの細胞質ドメインに結合するタンパク質としてJIP1を単離し、JIP1がKLCと結合する事からキネシン-1による膜小胞順行輸送にJIP1が果たす機能を探索していた(Taru H., *et al* [2002] *J. Biol. Chem.* 277, 20070)。荒関は、JIP1遺伝子破壊(JIP1-KO)マウスの初代培養神経細胞に、APP-GFPを発現させ、順行輸送速度および順行輸送頻度を全反射顕微鏡(TIRF)を用いて解析し、JIP1がキネシン-1モーターの活性を制御する事を、世界で初めて実証した。これまでキネシン-1は、カーゴの種類によらず同じ速度で動くという通説に対して、JIP1がカーゴとキネシン-1モーターの間に介在した場合は、高速で輸送されること(Araki Y., *et al.*, [2007] *EMBO J.* 26, 1475)を見いだしていたが、その仕組みは明らかではなかった。荒関は、この仕組みの解明を行った。荒関は、高速輸送と順行輸送の頻度は、独立したJIP1の機能であることをJIP1機能欠失変異体を発現した神経細胞におけるAPP輸送の解析から証明し、JIP1の活性領域の解析を行った。APPの軸索輸送障害は神経毒性を示すAβの生成増加を促進し、腫大神経突起など神経変性病理の形成に関与すると考えられている。従って、JIP1がAPPの軸索順行輸送の質と量を制御する仕組みの解明は、発症原因が多様であると理解されている孤発性アルツハイマー病の発症機構の解明に貢献する。

すなわち、荒関の発見は、キネシン-1によるカーゴ輸送を制御するJIP1の分子機構を解明し、細胞生物学的にカーゴ輸送の機能制御機構を解明する事に大きな貢献をただけでなく、孤発性アルツハイマー病の発症機構と治療薬の新たな標的を開発するために貢献する薬学的な知見を含み、薬学領域の博士号に相当する極めて重要な研究である。

これは、ようするに、著者は神経細胞の軸索小胞輸送に関わる新たな制御機構を解明し、その制御異常による神経変性の分子機構の解明に迫る解析を行い、孤発性アルツハイマー病の発症機構の解明に貢献するもので、APP膜小胞輸送制御に基づいた創薬開発という観点で貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格があるものと認める。