



Title	カーゴ受容体APPとAlcadein の機能解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	白木, 柚葉
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第13174号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/69958">http://hdl.handle.net/2115/69958</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yuzuha_Shiraki_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 白木 柚葉

## 学位論文題名

### カーゴ受容体 APP と Alcadin $\alpha$ の機能解析

長い突起を有する神経細胞では、微小管に沿って運動するモータータンパク質によるタンパク質輸送システムが発達している。膜タンパク質や分泌タンパク質は細胞体で合成された後、ゴルジ体で選別され輸送小胞内に取り込まれる。その後、特定のキネシンモータータンパク質によって神経軸索末端へ輸送される。キネシンモータータンパク質と輸送小胞の組み合わせによって積み荷タンパク質の局在が制御される。カーゴ受容体タンパク質はモータータンパク質と輸送小胞の結合を担うタンパク質であり、選択的な積み荷輸送を制御する機能を持つと考えられている。

アミロイドベータ前駆体タンパク質 (APP) と Alcadin  $\alpha$  (Alc $\alpha$ ) は神経細胞で主要な Kinesin-1 モータータンパク質に結合するカーゴ受容体タンパク質である。APP と Alc $\alpha$  は Kinesin-1 との結合様式が異なることや、軸索内での平均輸送速度が異なることから、それぞれ独立した小胞で運ばれる経路が主要であると考えられるが、神経軸索内で約 20-30% が共局在を示すことから APP と Alc $\alpha$  が両方含まれる経路も存在すると想定されている。しかし、積み荷タンパク質は未解明であり、積み荷の選択性についても明らかではない。本研究では APP と Alc $\alpha$  が輸送する積み荷タンパク質を明らかにし、並びに APP と Alc $\alpha$  の機能を解明することを目的に研究を行った。

APP または Alc $\alpha$  が輸送する積み荷タンパク質を明らかにするため、APP 小胞または Alc $\alpha$  小胞内に含まれるタンパク質の同定を行った。マウス脳から輸送小胞画分を調製し、APP 小胞または Alc $\alpha$  小胞を免疫沈降法 (IP) で回収した後、それぞれ LC-MS/MS で小胞内に含まれるタンパク質を網羅的に解析した。その結果 APP 小胞または Alc $\alpha$  小胞特異的なタンパク質が多く同定され、特に軸索末端に輸送され機能するタンパク質に着目したところ、軸索ガイダンスや軸索伸長など神経形成時に必要なタンパク質が複数個含まれていることが明らかになった。APP と Alc $\alpha$  がこれらタンパク質を輸送することで神経の形成を制御する機能を持つのではないかと考え、次にこれらタンパク質が APP、Alc $\alpha$  による軸索輸送を受けるのか解析することにした。同定したタンパク質の中でも Alc $\alpha$  小胞 IP サンプルから同定した Frizzled5 (Fzd5) 受容体に着目し検証を行った。

最初に Fzd5 が Kinesin-1 による輸送を受けるのか解析するため、マウス脳より調製した輸送小胞画分から Kinesin-1 コンプレックスを免疫沈降し、共沈する輸送小胞内に Fzd5 が含まれるか解析した。結果、Kinesin-1 の回収とともに、Kinesin-1 カーゴ受容体である APP と Alc $\alpha$  が共沈し、さらに、Fzd5 の共沈も認められた。これは Fzd5 が Kinesin-1 小胞内に含まれることを示唆するものである。

次に Fzd5 が Alc $\alpha$  による軸索輸送を受けるのか解析するためマウス初代培養神経軸索内における Fzd5 と Alc $\alpha$  の局在を免疫染色法で解析した。結果、約 30% の共局在を示した。さらに Alc $\alpha$  依存的に Fzd5 の軸索輸送が行われているのか解析するため Alc $\alpha$  を KD し、神経軸索内の Fzd5 量を定量した。その結果 Alc $\alpha$  を KD した細胞では有意に軸索内の Fzd5 量が減少していた。さらに軸索末端に形成される Growth cone においても Fzd5 と Alc $\alpha$  は共局在を示した。よって Fzd5 が Alc $\alpha$

によって軸索末端へ輸送されることが示された。

これまでの結果から、Fzd5 が Alcaによる軸索輸送を受けることが証明されたため、LC-MS/MS で同定したタンパク質は APP、Alca軸索輸送小胞由来であることが実証された。しかし、同じ Kinesin-1 カーゴ受容体である APP 小胞との積み荷の選択性は明らかではない。よって次にマウス初代神経細胞の軸索中における APP、Alca、Fzd5 の三者の共局在を解析した。その結果、APP と Fzd5 も共局在を示すことから、Fzd5 は APP によっても軸索輸送されるが、Alcaとの共局在率が APP との共局在率と比較して有意に高いことから、Alca小胞がより多くの Fzd5 を輸送することが示唆された。

さらに Fzd5 の輸送速度の解析を行い、APP と Alcaによる Fzd5 の輸送についてさらなる解析を行った。EGFP 融合タンパク質をそれぞれマウス初代培養神経細胞に発現させ、神経軸索中を移動する輝点を観察した。APP と Alcaの平均輸送速度が異なることはすでに明らかである。解析の結果 Fzd5 の平均輸送速度は APP と Alcaのおよそ中間の速度となり、Alca様の速度と APP 様の速度の二峰性の速度分布を示した。この結果からも Fzd5 は APP と Alca小胞によって輸送されていることが確かめられた。

成熟した神経系においても同様に APP、Alcaによる Fzd5 の輸送が行われているのか解析するため、マウス坐骨神経軸索中における Fzd5 と APP または Alcaの局在解析を行った。その結果、これまでの解析と同様に、APP と Alcaがそれぞれ Fzd5 と共局在を示し、成熟した神経においても Fzd5 は APP 小胞、Alca小胞によって軸索輸送されることが示された。

次に APP、Alcaによる輸送が Fzd5 の神経終末への局在を制御するのか、APP、Alca KO マウス脳から、神経終末であるシナプス部位を濃縮したシナプトソーム画分を調製し、含まれる Fzd5 量を解析した。その結果、total lysate における Fzd5 受容体量に変化はなかったが、シナプトソーム画分では、WT マウスと比較して両 APP、Alca KO マウスで Fzd5 量が有意に減少していた。よって APP、Alcaによる輸送が Fzd5 の神経終末への局在を制御していることが明らかになった。さらに Alca KO マウスシナプトソーム画分において Fzd5 の下流シグナル経路で活性化する pCamKII レベルが低下しており、APP KO マウスにおいても減少傾向がみられた。この解析から APP と Alcaによる輸送が Fzd5 の局在を制御し、その結果 Fzd5 下流の Ca<sup>2+</sup>シグナルを調節し、シナプス可塑性やシナプトジェネシスを制御していることが示唆された。

本研究により APP 小胞、Alca小胞が神経形成に関与する積み荷タンパク質を輸送することが明らかになり、特に Fzd5 は APP 小胞による輸送も受けるが、Alcaがより多くの Fzd5 を輸送することが示唆された。APP と Alcaがそれぞれ単独の小胞を形成することや Alcaの KD で Fzd5 の輸送量が減少することからも APP と Alcaが Fzd5 を輸送する機能はお互いに補償し合うものではなく、それぞれが別々の機構で Fzd5 の輸送を制御していると考えられる。本研究は一つの積み荷タンパク質が複数のカーゴ受容体によって輸送が制御されることを示すものであり、タンパク質の局在がより複雑に制御されていることを示唆するものである。