



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Kinesin-1カーゴ分子Alcadein α の神経軸索輸送機構の解析
Author(s)	蘇武, 佑里子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13175号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13175
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69380
Type	doctoral thesis
File Information	Yuriko_Sobu.pdf



博士学位論文

Kinesin-1 カーゴ分子 Alcadein α の
神経軸索輸送機構の解析

蘇武 佑里子

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
神経科学研究室

2018 年 3 月

目次

1.略語一覧	p. 2
2. 序論	p. 4
神経細胞における輸送	
モータータンパク質による小胞輸送	
Alcadein(Alc) family proteins	
Alc α の Kinesin-1 による輸送	
3. 実験結果	p. 6
1. Alc α 細胞質ドメインリン酸化の検出	
2. Alc α のリン酸化による KLC 結合制御	
3. Alc family の KLC1 への結合とリン酸化の関与	
4. KLC1 結合制御に関わる Alc α リン酸化部位の同定	
5. Alc α 3A 変異による Kinesin-1 複合体に対する結合減弱	
6. S940/S942/S943 の種間・アイソフォーム間の保存	
7. <i>In vivo</i> における Alc α のリン酸化の実証	
8. Alc α S940/S942/S943 の Glu 変異	
9. Alc α 3A の神経軸索への局在	
10. Alc α 3A の軸索輸送における速度変化	
11. Alc α 輸送速度変化への Kinesin-1 結合の関与	
12. Kinesin-1 結合減弱による APP 小胞への局在化	
13. 3A 変異の X11L への結合の影響	
14. Alc α 特異小胞形成に対する Kinesin-1 結合の関与	
4. 考察	p. 16
5. 実験材料及び方法	p. 19
6. 参考文献	p. 28
7. 図表	p. 34
8. 謝辞	p. 66

略語

A β : amyloid β -protein
ADAM: a disintegrin and metalloproteinase
Ala (A): Alanine
Alcadein: Alzheimer-related cadherin-like protein
APP: amyloid precursor protein (amyloid precursor protein)
BSA: Bovine serum albumin
CTF: carboxyl-terminal fragment
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA: ethylene diamine N,N,N,N 7-tetraacetic acid
ECL: enhanced chemiluminescence
EGFP: Enhanced green fluorescent protein
ER: endoplasmic reticulum
Glu (E): Glutamic acid
HA: hemagglutinin
HBS-T: HEPES buffered saline with Triton X-100
HRP: horseradish peroxidase
ICD: intracellular domain
IgG: immunoglobulin G
IP: immunoprecipitation
JIP: c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)-interacting protein
JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase
KHC: kinesin heavy chain
KLC: kinesin light chain
KO: Knock out
 λ PPase: lambda protein phosphatase
N2a cell: mouse neuroblastoma cell
pAl α : phosphorylated Al α
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PI mix: protease inhibitor mixture
PP: protein phosphatase
SDS: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser (S): serine

TBS-T: Tris-buffered saline with Tween 20

Thr (T): Threonine

TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence

TPR: tetratricopeptide repeat

Triton X-100: polyoxyethylen (10) octylphenyl ether

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

Tween-20: polyoxyethylene (20) solbitan monolaurate

Tyr (Y): tyrosine

X11L: X11-like

序論

○神経細胞における輸送

細胞の複雑な機能を発揮するためには、細胞内小器官やタンパク質は適切な部位に局在する必要がある。神経細胞は細胞体、ポストシナプスが形成される樹状突起、プレシナプスを形成する軸索から構成される。これらのドメインは機能的にも形態的にも区別され、神経細胞は高度に極性化された細胞であるといえる。この極性は細胞体および樹状突起(Somatodendrite)と軸索(Axon)の間でタンパク質や脂質、オルガネラが異なる局在をとることにより保たれている。例えば、膜タンパク質である Tfr や NMDA 型グルタミン酸受容体などはほぼ軸索に局在しないが、N-Cadherin は細胞全体に、細胞膜上 NgCAM は軸索に特異的に局在する(Sampo *et al.*, 2003; Farías *et al.*, 2012)。

神経細胞が正常に機能するためには極性化された細胞内輸送が適切に行われる必要がある(Namba *et al.*, 2011)。軸索に局在しないタンパク質は、主に軸索起始部(AIS: Axon Initial Segment)(Leterrier and Dargent, 2014)または更に細胞質側に位置する PAEZ(pre-axonal exclusion zone)(Farías *et al.*, 2015)において軸索への侵入が防がれると考えられている。軸索に存在するタンパク質の多くは細胞体で翻訳された後に PAEZ、AIS を超えて軸索中に入る。AIS の細胞膜上ではタンパク質や脂質の受動的な拡散も阻害されている(Leterrier and Dargent, 2014)ため、これらのタンパク質は能動的な小胞輸送により運ばれる必要がある。

○モータータンパク質による小胞輸送

主な細胞内輸送は ATP を加水分解することで微小管上を移動する Kinesin や Dynein が担う。Kinesin ファミリー分子の多くは微小管のプラス端に向かって、Dynein はマイナス端に向かって移動する(Hirokawa *et al.*, 2010)。神経軸索の微小管の方向はプラス端を神経末端に向けて一律に並んでおり、Kinesin は軸索の末端へ、Dynein は細胞体に向かった輸送を行う(Fig.1)。Kinesin や Dynein が輸送する積み荷(Cargo)としては、タンパク質、輸送小胞、mRNA やミトコンドリアやリソソームなどの細胞内小器官などが知られており、モータータンパク質による輸送は様々な生理機能に関与する。

モータードメインを持つ細胞質 Dynein は一種類のみ存在する一方で、Kinesin ファミリーは哺乳類において 15 個のサブグループに分類される、45 種類の遺伝子が存在する(Hirokawa *et al.*, 2009)。なかでも、イカの神経軸索から最初に同定された Kinesin-1 は Conventional kinesin と呼ばれ(Vale *et al.*, 1985)、最もよく解析されている。Kinesin-1 は ATPase 活性を持ち微小管と結合する KHC(Kinesin Heavy Chain)二分子、カーゴと結合する KLC(Kinesin Light Chain)二分子からなるヘテロ四量体である。Kinesin-1 は通

常、ATPase 活性が阻害された Autoinhibition 状態にあり、微小管に結合できない。この不活性化状態は他分子の結合により解除されることが明らかになっており、現在までに少なくとも FEZ と JIP の二分子の結合(Blasius *et al.*, 2007)もしくは Alcadin α の結合が Kinesin-1 を活性化できる(Araki *et al.*, 2007)ことが知られている。

○Alcadin(Alc) family proteins

Alcadin(Alc)/Calsyntnein(Clst) ファミリーは神経系に発現する一型の膜タンパク質であり、脊椎動物において Alc α (Clst1)、Alc β (Clst3)、Alc γ (Clst2)の3種類のファミリー分子が存在する(Fig.2)(Hintsch, 2002, Araki *et al.*, 2003)。その一次構造は線虫からヒトまで高度に保存されており、細胞外ドメインに2つのカドヘリンリピート、細胞内ドメインには NP 配列(PTB 結合配列)、20–40 a.a.ほどの Acidic region に加えて Alc β には一箇所の、Alc α 、Alc γ では二箇所の WD(Tryptophan-Asparagic acid) motif が存在している。

Alc は当研究室において APP(Amyloid precursor protein)の代謝を抑制する分子として解析されてきた。Alc と APP はどちらも二段階の切断を受ける分子であり(Araki *et al.*, 2004, Hata *et al.*, 2009)、APP からはアルツハイマー病の原因因子である A β が産生する。Alc α は A β の産生を抑制するアダプタータンパク質 X11L(Saito *et al.*, 2011)に結合する分子として同定され、その後の解析により Alc α は X11L を介して APP と三量体を形成することが示唆された。Alc α の発現により、Alc α 、APP 双方の切断が抑制されていることから、三量体の形成は Alc α と APP が Golgi 体から切断の場である後期分泌経路への移行を抑制していると考えられている。実際に、Alc α KO マウスでは A β 産生量の増加が認められている(投稿準備中, 後藤)。

近年、Alc の生理的機能の解析がいくつか報告され、Alc ファミリーはそれぞれ異なった機能を有していることが示唆された。Alc β はポストシナプスにおいてプレシナプス上の α -neurexin と *trans* に結合することでシナプス形成に関与していることが明らかになった(Pettem *et al.*, 2013)。一方で、Alc γ の線虫オルソログである CASY-1 は線虫の連合学習に(Ikeda *et al.*, 2008)、ヒト Alc γ の SNP 変異は記憶学習(Papassotiropoulos *et al.*, 2006)に関与するといった報告に加えて、Alc γ KO マウスは海馬における Interneuron 数の減少と空間学習の障害を示す(Lipina *et al.*, 2015)など、Alc γ は機能する部位は不明ではあるが、記憶・学習に関与することが示唆されている。

Alc α についても、ニワトリ胚脊髄交連神経における軸索ガイダンス(Alther *et al.*, 2016)やゼブラフィッシュ感覚神経における軸索分岐(Ponomareva *et al.*, 2014; Calderon *et al.*, 2017)に必要であるなど軸索における機能が報告されており、正常な軸索の形成には Alc α の軸索輸送が必要であることが予想されている。

○Alcαの Kinesin-1 による輸送

Alcαの機能解析の過程において、細胞質ドメインの結合分子探索により KLC1/KLC2 が同定された(Araki *et al.*, 2007)。Alcαは 2 ヶ所の WD モチーフを介して KLC の TPR ドメインと直接結合することで Kinesin-1 の Autoinhibition を解除する(Fig.3)。その後の解析により WD モチーフのみが Kinesin-1 と結合、活性化するのに十分であり(Kawano *et al.*, 2012)、一分子内に WD モチーフが二ヶ所存在することで KLC との結合アフィニティーが飛躍的に増加することが明らかになった(Zhu *et al.*, 2012)。

Alcαは Golgi 体において Alcα輸送小胞を形成し、細胞質ドメインで Kinesin-1 と直接結合することで神経軸索上を輸送される。Alcαはカーゴ受容体であると予想され、Alcα小胞内に含まれる積み荷(カーゴ)を軸索末端まで輸送することで Alcαの機能を発現すると考えられる(Fig.4)。Alcαは TfR などの軸索に輸送されない分子、Kinesin-3 により輸送されるシナプス小胞前駆体等と異なる小胞を形成する。また、Golgi 体で Alcαと複合体を形成する APP も、JIP1 を介して Kinesin-1 と結合することで軸索中を輸送される(Chiba *et al.*, 2014a, 2017)。APP の輸送速度は Alcαよりも高速であること(Chiba *et al.*, 2014a)、マウス坐骨神経軸索において内在性 Alcαと APP の約 70%以上が別の小胞として存在していることから、Alcαと APP はそれぞれ別の特異的な小胞を形成する事が明らかである。

○目的

Alcαの軸索輸送機構の多くは不明である。軸索に輸送されるタンパク質はクラスリンなどのコート分子を使用せず、Alcαの特異的な小胞形成機構や関連する分子についての知見はない。また、Alcαの輸送は小胞内カーゴの必要性に応じて制御される必要があると考えられる。Kinesin の翻訳後修飾による輸送制御は知られている(Verhey and Hammond, 2009; Vagnoni *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2012)が、1 種のカーゴに限定した輸送制御メカニズムはほとんど報告されていない。

本研究では、Alcαの神経軸索輸送機構を明らかにすることを目的にし、Alcα輸送制御機構及び Alcα特異小胞の形成に関して解析を行ったものである。

実験結果

1. Al α 細胞質ドメインリン酸化の検出

Kinesin-1 結合モチーフが存在する Al α の細胞質ドメインには、周辺配列を基にリン酸化部位を予測する NetPhosK 1.0 server(Blom *et al.*, 2004)によって予測されるリン酸化部位が多く存在する (threshold>0.5)。初めに、実際に *In vivo* において Al α 細胞質ドメインがリン酸化されるか検討した。Al α は細胞外、膜内と続く二段階の切断(Regulated intramembrane proteolysis (Brown *et al.*, 2000))を受ける分子である。Al α は細胞外ドメイン膜近傍において ADAM10/17 により切断され、細胞膜上にほとんどの細胞外ドメインを失った Al α CTF(C-terminal fragment)を残す。Al α CTF は更に膜内で γ -secretase による二段階目の切断を受けることで細胞質中に Al α ICD(intracellular domain)を放出する (Fig.5A)。

これらのフラグメントのリン酸化を検出するため、マウス脳を膜画分、細胞質画分に分画し細胞質画分から抗 Al α C 末抗体により Al α ICD を免疫沈降した。全長 Al α については λ PPase 処理およびオカダ酸処理(PP1, PP2A 阻害剤)によるリン酸化状態の変化を移動度の変化として検出することはできなかったが、膜画分 Lysate 中の Al α CTF、免疫沈降した Al α ICD をそれぞれ Tris-Tricine Gel を用いて分離、Western blotting により検出した結果、Al α CTF、Al α ICD のどちらについても λ PPase による脱リン酸化処理による低分子側への移動度の変化が検出された(Fig.5B)ことから、Al α の細胞質ドメインは *In vivo* でリン酸化されていることを明らかにした。

2. Al α のリン酸化による KLC 結合制御

Al α が細胞内でリン酸化されていることが実証されたため、リン酸化が Kinesin-1 への結合を制御しうるか検討した。この結合について、KLC1 のリン酸化が Al α の結合量を減弱させることが既に報告されている(Vagnoni *et al.*, 2011)。ここでは Al α のみのリン酸化の影響を検討するため、*In vitro* の系で結合実験を行った(Fig.6A)。N2a 細胞に Al α -FLAG と HA-KLC1 を別々に発現させ、Al α -FLAG のみを免疫沈降した。免疫沈降物に対して脱リン酸化処理とそれに続いて wash を行い、resin を HA-KLC1 発現 Lysate と混和することで HA-KLC1 結合量を解析した。その結果、Al α -FLAG の脱リン酸化処理により HA-KLC1 量が有意に減弱した(Fig.6B)。

Kinesin-1 を構成する KLC は複数のアイソフォームが存在しており、神経細胞では主に KLC1 と KLC2 が発現している(Rahman *et al.*, 1998) (Fig.7A)。KLC2 は KLC1 と同様に TPR motif を持ち、Al α が結合することは既に明らかにされている。Al α の脱リン酸化は

KLC2 の結合量も同様に減弱させたことから(Fig.7B)、Alc α のリン酸化は神経細胞内のほぼ全ての種類の Kinesin-1 への結合を制御していることが示唆された。

3. Alc family の KLC1 への結合とリン酸化の関与

これまでの Alc family の解析により、Alc α ICD の他に、Alc β ICD、Alc γ ICD が N2a 細胞でリン酸化修飾を受けることが示されている(小笠原卒業論文,2015)。そこで、Alc family 間でリン酸化による Kinesin-1 結合制御が保存されているか検討した。Alc β -FLAG、Alc γ -FLAG について HA-KLC1 に対する *In vitro* 結合実験を行った。Alc α 、Alc γ は WD1,WD2 motif の二ヶ所の Kinesin-1 結合配列を持つ一方で、Alc β は WD2 モチーフを欠損している(Fig.2A)。Alc β は Alc α に比べてかなり弱い KLC1 結合量を示し、 λ PPase 処理による結合量変化は見出されなかった(Fig.8)。一方で Alc γ は Alc α とほぼ同等の KLC1 結合量を示し、 λ PPase 処理による結合量の減弱が観察された。このことから、リン酸化による Kinesin-1 結合制御は少なくとも 2 つの WD モチーフを持つ Alc α と Alc γ の間で保存されていることが示唆された。本研究では脳内で広範に発現しており、Kinesin-1 による軸索輸送の解析が進んでいる Alc α について解析を行った。

4. KLC1 結合制御に関わる Alc α リン酸化部位の同定

4-1. リン酸化部位は Acidic region 中に存在する

更に解析を進めるため、Kinesin-1 結合制御に関与する Alc α リン酸化部位の同定を試みた。まず数種類の Alc α 部分欠失体または非リン酸化模倣 Ala 置換変異体を作成することで、細胞質ドメインの全ての Ser、Thr、Tyr 残基が欠失またはアラニンに変異された Alc α 変異体シリーズを作成した(Fig.9A)。各欠失体・変異体について *in vitro* 結合実験を行った結果、N 末側の領域を欠損した Alc α Δ CN-FLAG、APP や integrin に保存されたモチーフである NP(ME)TY 内、WD2 モチーフ内にそれぞれ存在する Ser、Thr、Tyr 残基を二残基ずつ Ala に置換した Alc α TYAA-FLAG、Alc α SYAA-FLAG、Alc α STAA-FLAG の全ての変異体は Alc α WT-FLAG と同様に、 λ PPase により HA-KLC1 結合量の減弱が観察された(Fig.9B;青枠)。一方で、Acidic region を欠損した Alc α Δ AC-FLAG では脱リン酸化による結合減弱が見られなかった(Fig.9B;赤枠)ことから、KLC1 との結合を制御するリン酸化部位は Acidic region 中に存在することが推察された。

Acidic region は 2 つの WD モチーフの中間に位置する、酸性アミノ酸が高頻度に存在する約 40 残基ほどの領域であり、リン酸化されうるセリン、スレオニンが計 8 つ存在する。これらの残基は全て Casein kinase I と Casein kinase II のどちらかもしくは両方のコンセンサスリン酸化配列を持つ(Fig.10A)。実際にこれらの残基が細胞内でリン酸化されうる配列であることを MALDI-TOF/MS により確認した。Acidic region のみをコードす

る Al α AC-FLAG を N2a 細胞に発現させ抗 FLAG 抗体により回収、MALDI-TOF/MS により解析した。質量分析では一つのリン酸化(HPO₃)は 80Da の質量増加として検出される。Al α AC-FLAG では、少なくとも 7 個の 80Da 質量増加ピークが観察された (Fig.10B)。この質量増加ピークは λ PPase 処理により消失することから、Al α Acidic region 中の 8 つの Ser/Thr 残基のほとんどが細胞内でリン酸化されうることが示唆された。

4-2. KLC1 結合減弱に関わるリン酸化サイトは複数個存在する

Kinesin-1 結合制御に関わるリン酸化部位について、Acidic region 中の Ser/Thr 残基に対する Ala mutagenesis と *In vitro* 結合実験による同定を試みた (Fig.11A)。

Al α -FLAG の Acidic region 中の 8 ヶ所全ての Ser/Thr 残基を Ala に置換した変異体 (8Ala) では、WT に比べて KLC1 結合量が減弱しており、 λ PPase 処理による結合減弱も観察されなかった (Fig.11B) ことから、Acidic region 中のリン酸化が Kinesin-1 結合制御を行うことが強く示唆された。この領域の Ser/Thr 残基を更に 3 つの領域に分割し、913A/S914A、S926A、5Ala (T936A/S937A/S940A/S942A/S943A) の変異体を作成した。このうち、5Ala のみが 8Ala と同様に結合量は減弱し、 λ PPase 処理による影響を示さなかった (Fig.11B)。以上のことから、KLC1 結合を制御するリン酸化部位が Acidic region C 末端側の 5 残基に存在することが推察された。

そこでこの 5 残基について 1 残基ずつ Ala に置換した変異体を作成し目的のリン酸化部位の同定を試みた (Fig.12A)。しかし、*In vitro* 結合実験において、全ての Al α -FLAG の 1 残基変異体 (T936A, S937A, S940A, S942A, S943A) が、 λ PPase 処理による KLC1 結合量の減弱を示した (Fig.12B, 青棒)。このことから、KLC 結合に関与するリン酸化部位は T936-S943 の 5 残基のうちの複数箇所に存在する可能性が示唆された。

4-3. S940/S942/S943 が KLC1 結合制御に関与する

KLC1 結合制御に関与するリン酸化残基を推察するため、Al α -FLAG の 5Ala から 1 残基のみを Thr または Ser に回復した変異体を作成した (Fig.13A)。このうち、T936 または S937 が回復された変異体は 5Ala と同様に λ PPase 処理の影響が見出されなかった。一方で、S942 または S943 を回復させた変異体について、明確な λ PPase 処理による結合減弱が観察された。また、S940 を回復させた場合でも、S942 や S943 より弱い程度ではあるが、 λ PPase 処理による KLC1 結合変化が見出された (Fig.13B)。

ここから予想されたリン酸化部位を含む、2-3 残基の Ala 変異体を作成し (Fig.14A)、再び *In vitro* 結合実験を行った。回復実験により結合への関与が低いと予想された T936A/S937A の 2 残基のみの変異では λ PPase による結合変化が観察された。また、S942A/S943A の 2 残基の変異により KLC1 結合量は WT よりも減少しているように観察されたが、 λ PPase による結合減弱を示した。この減弱は S940A を加えた 3 残基の変異により観察されなくなったことから、KLC1 への結合制御は S940/S942/S943 の 3 残基が

関与することが *In vitro* 結合実験により示唆された(Fig.14B)。

実際にこの 3 残基の Ala 変異が細胞内での KLC1 結合制御に関与することを確認するため、培養細胞を用いた共免疫沈降を行い、結合量の定量を行った。N2a 細胞に Alca-FLAG の各変異体と HA-KLC1 を共発現させ、抗 FLAG 抗体により免疫沈降した(Fig.15A)。その結果、*In vitro* 結合実験と同様に、Acidic region の Thr、Ser の全て(8 残基)、C 末端側 5 残基、3 残基の変異(8Ala, 5Ala, S940A/S942A/S943A)により HA-KLC1 結合量は有意に減弱した。一方で、*In vitro* 結合実験により強く KLC1 結合制御に関与することが示唆された S942、S943 のみの変異(S942A/S943A)では HA-KLC1 結合量は減弱傾向にはあるものの、有意な結合減弱は示さなかった(Fig.15B)。以上の結果より、KLC1 結合制御に関与するリン酸化部位は S940、S942、S943 のタンデムに存在する 3 残基であることが示唆され、以降この 3 残基の Ala 変異を 3A として表記し、解析を行った。

5. Alca3A 変異による Kinesin-1 複合体に対する結合減弱

Alca3A 変異により、KLC1 結合量が減弱することが明らかになった。軸索輸送において、KLC1 は KHC とともに複合体を形成し Kinesin-1 として機能する。実際にこの 3 残基が輸送を行う Kinesin-1 複合体への結合を制御しているか検討することにした。KHC は KIF5A、KIF5B、KIF5C の 3 種のアイソフォームが存在し、KIF5B はユビキタスに、KIF5A と KIF5C は神経特異的に発現する。ここでは多くの解析に用いられている KIF5C を用いた。N2a 細胞に Alca または Alca3A、HA-KLC1 に加えて myc-KHC を共発現させ、抗 KHC 抗体により免疫沈降した。AlcaWT と Alca3A 変異体の発現により KHC から IP された HA-KLC1 量には変化は見られず、Kinesin-1 複合体の形成には影響は見られなかった。一方で、Alca の免疫沈降量は 3A 変異により減弱した(Fig.16)。このことから、Alca の S940、S942、S943 の 3 残基は輸送の本体である Kinesin-1 複合体との結合を制御していることが示された。

6. S940/S942/S943 の種間・アイソフォーム間の保存

Alca の機能はマウスやゼブラフィッシュなどで解析されている。同定したヒト Alca S940、S942、S943 の 3 残基が種間、アイソフォーム間で保存されているか検討した。マウス/ラット、ゼブラフィッシュなどの脊椎動物中では Alca 細胞質ドメインの配列は高度に保存されており、リン酸化 3 残基についてもマウス/ラット、ゼブラフィッシュ S950/S952/S953 が周辺配列とともに保存されている(Fig.17A)。このことから、Alca3 残基のリン酸化による Kinesin-1 の結合制御は脊椎動物中で保存されていると予想された。また、Fig.8 においてヒト Alcγ についてもリン酸化による KLC1 結合制御を行うことが示

唆されたが、ヒト Al α S940/S942/S943 の 3 つの Ser 残基と周辺配列は Alc γ で完全に保存されていない。しかし、Alc γ Acidic region 中に Casein kinase I/II のコンセンサス配列である、酸性アミノ酸を近傍に持つ Thr、Ser 残基が複数存在しており、Alc γ においても Acidic region 中のリン酸化による KLC1 結合制御機構の存在が示唆された。ただし、マウス/ラットの Alc γ はヒトやゼブラフィッシュと異なり WD2 motif を欠損しており、Alc γ の機能が種間で保存されているか不明である。

2 ケ所の WD motif と Acidic region 中の Thr / Ser は線虫やショウジョウバエのオルソログである CASY-1 についても同様に存在し、(Fig.17B) Al α リン酸化による結合制御は種間で広く保存されている可能性が考えられた。ただし、マウス/ラットの Alc γ はヒトやゼブラフィッシュと異なり WD2 motif を欠損しており、Alc γ の機能が種間で保存されているか不明である。

7. In vivo における Al α のリン酸化の実証

Ala mutagenesis により同定した S940/S942/S943 が実際に脳内でリン酸化されていることを実証するため、リン酸化部位特異的な抗体による検出を試みた。抗原として、S940/S942/S943 がリン酸化修飾された Al α (A938-E946)のペプチド(Fig.18A)を用いて、ウサギポリクローナル抗体を作成した。得られた抗血清から抗原ペプチド結合カラムを用いて粗リン酸化抗体を精製した。また、抗原部位以外のリン酸化 Ser 残基に非特異的に反応する抗体を除くために Al α 3A-FLAG を用いた。Acidic region の質量分析により、Al α 3A 変異体は Acidic region 中の目的のリン酸化部位以外の Ser 残基もリン酸化されることが予測される(Fig.10B)。粗リン酸化抗体を、N2a 細胞に発現後抗 FLAG 抗体で精製した Al α 3A-FLAG とインキュベートさせ、その素抜け成分を抗 Al α リン酸化抗体として用いた。

作成した抗体の特異性は N2a 細胞に発現させた Al α -FLAG 各変異体を用いて確認した。リン酸化抗体は Al α WT-FLAG を検出したのに対して、Al α 3A-FLAG はほとんど検出しないことを確認した(Fig.18B)。また、この抗体が特定の 1 残基だけではなく、3 ケ所のリン酸化を認識する抗体であるか確かめるため、1 残基のみを Ala に変異させた Al α -FLAG(S940A、S942A、S943A)を用いた。リン酸化抗体は S943A には多少の反応性を示したが、残りの S940、S942 の片方のみを Ala に変異させた場合(S942A、S943A)ではほとんど反応性が失われていたことから、作成した抗体は 1 残基のみがリン酸化された Al α にはほとんど反応せず、3 残基または少なくとも 2 残基でリン酸化された Al α を検出する Al α pS940/pS942/pS943 に対する抗体であることが示された。

この抗体を用いて、マウス脳内 Al α の検出を試みた。マウス脳 Lysate から抗 Al α 抗体により IP した Al α を western blotting により解析した。抗 Al α リン酸化抗体によりマウス脳内の Al α が検出され、そのシグナルは λ PPase 処理により完全に消失した(Fig.18C)。

このことから、Ala mutagenesis により同定した Alca S940/S942/S943 の領域が実際に *In vivo* でリン酸化されていることが示された。

8. Alca S940/S942/S943 の Glu 変異

S940、S942、S943 が *In vivo* でリン酸化されていること、Alca の脱リン酸化により KLC1 結合が減弱することが示された。今後の解析を進めるにあたって、この 3 残基を Glu に変異させることでリン酸化模倣変異体として利用できるか検討した。N2a 細胞に Alca-FLAG 各変異体と HA-KLC1 を発現させ、抗 FLAG 抗体による共免疫沈降を行った (Fig.19A)。その結果、Alca3A-FLAG だけではなく、Alca3E(S940E/S942E/S943E)-FLAG においても HA-KLC1 結合量は有意に減弱した (Fig.19B) ことから、Alca3E が S940、S942、S943 でリン酸化された Alca を模倣できていないことが示唆された。このような模倣の失敗はリン酸基と Glu 残基の間で構造や負電荷数が異なることから起こりうることでありと考えられている (Bah and Forman-Kay, 2016)。この結果より、Alca の 3 残基の Glu 変異はリン酸化模倣変異体として使用できないと判断し、以降の解析には AlcaWT と Alca3A の比較による機能解析を行うこととした。

9. Alca3A の神経軸索への局在

Alca のリン酸化が Kinesin-1 との結合を制御することから、Alca の軸索輸送はリン酸化により制御されることが示唆され、神経細胞内の Alca 挙動を観察することとした。まず、Alca-EGFP、Alca3A-EGFP をマウス大脳皮質の初代培養神経細胞に発現させ、細胞内局在を観察した (Fig.20)。Alca3A は軸索輸送を担う Kinesin-1 との結合が減弱しているが、AlcaWT と同様に神経軸索末端において小胞として局在していることが観察され (Fig.20, 右端拡大図)、神経軸索中を輸送されていることが示唆された。

10. Alca3A の軸索輸送における速度変化

次に Alca3A の輸送状態に変化があるか検討した。同様に発現させた初代培養神経細胞の軸索を TIRF 顕微鏡による Live imaging により観察した。局在観察から予想された通り、AlcaWT-EGFP (Fig.21A; 左)、Alca3A-EGFP (Fig.21B; 左) のどちらも小胞として神経軸索中を順行性に輸送されているのが観察された。輸送を詳細に解析した結果、輸送方向については、Alca3A-EGFP は AlcaWT-EGFP と比較して順行性、逆行性の割合に変化は見られなかった (Fig.21C)。

一方で、輸送速度に関しては 3A 変異による変化が認められた。AlcaWT-EGFP の輸送速度は約 1.70 $\mu\text{m}/\text{sec}$ であり (Fig.21A; 右)、この速度は既知の Alca 輸送速度と一致している

(Araki *et al.*, 2007)。一方で、Alc α 3A-EGFP の輸送速度は約 2.65 $\mu\text{m}/\text{sec}$ と、より高速でな輸送が観察された(Fig.21B;右)。

Alc α は二段階の切断を受け、細胞質中に Alc α ICD を放出する。Alc α 3A の解析を続ける過程で、Alc α WT-EGFP と Alc α 3A-EGFP を N2a 細胞に発現させた際の Alc α ICD-EGFP の産生量、種類が異なる事を見いだした。ヒト Alc α ICD は SDS-PAGE において移動度が異なる Alc α ICD(H)、Alc α ICD(L)の二種類が検出されることが明らかになっている(Takei *et al.*, 2015)。Alc α WT-EGFP または Alc α 3A-EGFP を発現した N2a 細胞の細胞質画分を分画し(Fig.22A)、免疫沈降により Alc α ICD-EGFP を検出した所、Alc α 3A-EGFP から産生される ICD-EGFP は WT のものと比べて存在量と ICD(H)の比率が多いことが見出された(Fig.22B)。二種類の ICD がどのような変化により生じているのかは明らかになっていないが、ICD は Kinesin-1 と結合できる WD モチーフを保持しており、全長 Alc α と Kinesin-1 間の結合と競合しうる。ICD-EGFP の種類、存在量の違いが Alc α 3A-EGFP の速度変化の原因となっている可能性を検討するため、Alc α HA 変異体を用いた輸送観察を行った。Alc α HA 変異体は ADAM10/17 による一段回目の切断部位を HA sequence により置換しており、Alc α CTF、ICD を産生しない(Fig.22C)(Maruta *et al.*, 2012)。Alc α WT-HA-EGFP、Alc α 3A-HA-EGFP の軸索輸送を同様に観察した結果、ICD が産生しない条件においても Alc α 3A-EGFP と同様に 3A 変異による速度の高速化が観察され(Fig.23A,B)、かつ輸送方向には変化は見られなかった(Fig.23C)。このことから、3Ala 変異による輸送速度変化は Alc α の切断産物によるものではないことが確かめられた。

11. Alc α 輸送速度変化への Kinesin-1 結合の関与

次に、Alc α 3A-EGFP の速度変化が Kinesin-1 との結合減弱の結果なのか確認するため、Kinesin-1 非結合型変異体を用いた解析を行った。二ヶ所の KLC 結合モチーフ中の WD 配列を Ala に置換する(WDAA)ことで、Alc α の KLC 結合能は完全に失われる(Fig.24A,B)(Kawano *et al.*, 2012, Zhu *et al.*, 2012)。この Alc α WDAA-EGFP について同様に輸送の観察を行った。その結果、Kinesin-1 と直接結合しない Alc α WDAA-EGFP についても、軸索中を小胞として順行性に輸送されていることが観察された(Fig.24C)。また、その輸送速度も約 2.56 $\mu\text{m}/\text{sec}$ であり、Alc α 3A-EGFP と同様に Alc α WT-EGFP よりも有意に高速に輸送されていることが見出された(Fig.24D)。

以上のことから、Alc α は Kinesin-1 と直接結合できないことで、通常よりも高速に軸索中を輸送されるということが明らかになった。

12. Kinesin-1 結合減弱による APP 小胞への局在化

Kinesin-1 と直接結合できない場合にも Alc α は軸索中を輸送されていることから、この状

態の Al α は別のタンパク質を介して Kinesin と結合する小胞により輸送されると考えられる。その候補として、通常の Kinesin-1 の輸送速度よりも高速に輸送され、かつ Al α と関連の深いタンパク質として、APP に着目した。APP 小胞はアダプタータンパク質である JIP1 を介して KLC1 と結合することで、通常の Kinesin-1 や Al α の速度よりも高速に軸索中を輸送されることが既に明らかになっている (Fig.25) (Chiba *et al.*, 2014a)。また、Al α は APP と Golgi 体で複合体を形成しうることから、Golgi 体において互いに近い距離に存在していると考えられる。これらのことから、Al α が Kinesin-1 と結合できない際、Al α は APP 輸送小胞に入り込むことで高速な軸索輸送を受けている可能性を検討した。Al α -FLAG、Al α 3A-FLAG、Al α WDAA-FLAG を初代培養神経細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体、抗 APP 抗体を用いて内在性 APP との共免疫染色を行った (Fig.26)。神経軸索中において、各 Al α -FLAG と内在性 APP はそれぞれ小胞として検出された。以前までの報告と同様に、Al α WT-FLAG と APP 小胞の多くは独立した小胞として存在しており、共局在している小胞はごく一部のみであった (Fig.27A)。一方で、Al α 3A-FLAG 及び Al α WDAA-FLAG については多くの Al α -FLAG が APP 小胞と共局在していることが観察された。また、Al α -FLAG と APP の軸索中の共局在効率を算出することで、Al α 3A-FLAG、Al α WDAA-FLAG の APP 小胞への共局在が有意に増加していることが見出された (Fig.27B)。このことから、Kinesin-1 と結合できない Al α がは、APP 小胞のような別の輸送小胞に入り込むことで軸索中を輸送されていることが示唆された。

13. 3A 変異の X11L への結合の影響

Al α と APP は Golgi 体において X11L を介して三量体を形成すると考えられ、独立した小胞形成は三量体の解離の後に行われる (Fig.25)。免疫染色により、Al α 3A-FLAG は APP 小胞に局在していることが観察された。この現象は 3A 変異により三量体の解離が阻害された結果、APP と Al α が分離できなくなったためである可能性が考えられた。これを検討するため、Al α -FLAG または Al α 3A-FLAG と HA-X11L を N2a 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体により共免疫沈降した (Fig.28A)。Al α -FLAG と Al α 3A-FLAG の間で HA-X11L の結合量は変化せず (Fig.28B)、3A 変異による三量体形成・解離に影響するような X11L との結合アフィニティー変化は見出されなかった。

14. Al α 特異小胞形成に対する Kinesin-1 結合の関与

Fig.27A において、Al α 3A-FLAG や Al α WDAA-FLAG は APP を含まない、Al α 独自の小胞はほとんど観察されなかった。このことから、Al α が Golgi 体で Al α 小胞を形成するために Kinesin-1 への直接結合を必要とすることが示唆された。これを検討するため、Al α の Golgi exit を観察した。解析には APP 小胞への入り込みの影響を極力抑えるた

め、内在性 APP 発現量の少ない CAD 細胞を用いた(Fragkouli *et al.*, 2017)。BFA は Arf ATPase の阻害剤であり、細胞に添加することで Golgi 体から小胞体への逆行性輸送が阻害され可逆的に Golgi 体を崩壊させる。その後培地を交換し BFA を washout することで、Golgi 体が再建される。BFA の washout 後、約 1 時間で細胞膜へ輸送される膜タンパク質は再建された Golgi 体に集積する。その後観察を続けることで膜タンパク質が Golgi 体から細胞膜へ輸送される過程を観察することができる(Fig.29)。ここでは、Ala 変異により細胞内の存在量が異なり(Fig.22)、細胞内を拡散する ICD による蛍光強度測定に対する影響を除外するため、Alcα-HA-EGFP を用いて解析を行った。

AlcαWT-HA-EGFP、Alcα3A-HA-EGFP、AlcαWDAA-HA-EGFP を発現した CAD 細胞に BFA を加え培養し、GM130 の免疫染色により Golgi 体の崩壊を確認した(0h)。BFA を washout し、1 時間後に全種の Alcα-HA-EGFP が Golgi 体に集積することが観察され、小胞体から Golgi 体へ向かう輸送が正常に行われていることが確認された(1h)。更に 2 時間後、4 時間後の細胞を観察することで、AlcαWT-HA-EGFP に関しては Golgi 体から細胞全体への EGFP 蛍光の広がりが観察され、Golgi 体以降の輸送が観察された。一方で、Alcα3A-HA-EGFP と AlcαWDAA-HA-EGFP は washout 後 4 時間後でも多くが Golgi 体に局在しているのが観察された(Fig.30A)。Golgi 体以降の輸送効率を Golgi 体に対する細胞全体の Alcα-HA-EGFP の蛍光強度比をとることで算出した結果、washout4 時間後において、3A、WDAA 変異による Golgi exit 効率が有意に低下していた(Fig.30B)。このことから、Alcαは Kinesin-1 と結合することで Golgi 体において Alcα独自の小胞を形成することが示唆された。

以上の結果より、Alcαと Kinesin-1 の結合は Alcα特異小胞の形成に必要であり、Alcαの適切な Golgi exit は Alcαのリン酸化により制御されることが示唆された。

考察

本研究では、Alc α の神経軸索輸送機構を明らかにすることを目的に輸送小胞形成、輸送制御機構に着目した解析を行った。これまでに報告されている Kinesin-カーゴ間結合の調節機構は多くが Kinesin のリン酸化によるものであった。Alc α についても、KLC1 TPR motif 中に位置する Ser460 のリン酸化が Kinesin-1 と Alc α の結合解離を引き起こすことが報告されている(Vagnoni *et al.*, 2011)。しかし、リン酸化による結合調節が軸索輸送のどの段階で機能しているのかは明らかになっていなかった。また、Alc α の Kinesin-1 結合配列である WD motif は多くのタンパク質で保存されている(Dodding *et al.*, 2011)。WD motif を持つタンパク質には Lysosome の輸送 (Rosa-Ferreira and Munro, 2011)や筋細胞における核の局在(Wilson and Holzbaur, 2014)に関与するものが存在しており、WD motif と Kinesin-1 の結合は広範な機能に関与すると考えられる。したがって、WD motif と Kinesin-1 の結合はカーゴごとの制御を受ける可能性が考えられる。

本研究では、Alc α の細胞質ドメインにリン酸化予測配列が高頻度に存在することに着目し、カーゴ側のリン酸化による結合制御の可能性を検討した。その結果、Alc α の細胞質ドメインがマウス脳内でリン酸化されていること、Alc α の脱リン酸化が KLC との結合を減弱させることを示した。また、Alc α のリン酸化により制御される Kinesin-1 への結合が Golgi 体における Alc α 特異的な小胞の形成に必要であるという、新規 Alc α 輸送メカニズム・制御メカニズムを明らかにした(Sobu *et al.*, 2017)。

Alc α と Kinesin-1 の結合制御は Alc α S940/S942/S943 の 3 残基のリン酸化によるものであることを示した。この 3 残基は二ヶ所の WD motif の中間に位置する Acidic region 中に連続して存在している。Acidic region は酸性アミノ酸に富んだ領域であり、決まった構造を取らない Disorder 領域であることが予想される(PONDR FIT(Xue *et al.*, 2010))。この Disorder な領域のリン酸化がどのようにして WD モチーフと KLC の結合を調節するのか明らかではないが、このような Disorder 領域(IDP, intrinsically disordered protein)の重要性が近年注目されつつある。Disorder 領域のリン酸化修飾による機能制御機構の一つに構造変換によるものが報告されている(Travers *et al.*, 2015; Wright and Dyson, 2015)。Alc α 細胞質ドメインペプチドを用いた解析により、一分子中に二ヶ所の WD motif が存在することで、単独の WD モチーフを保持する場合より、KLC TPR motif に対する結合アフィニティーが大幅に増加することがわかっている(Fig. 24B)(Zhu *et al.*, 2012)。Alc α の脱リン酸化は KLC1 への結合能を完全に消失させず、結合アフィニティーの減弱を示す。結合制御機構の一つの可能性として、Acidic region のリン酸化は二ヶ所の WD motif が適切に KLC と結合する構造に必要であることが考えられる。

非リン酸化模倣変異体である Alca3A は Kinesin-1 と結合量が減弱する。近年、輸送小胞には Kinesin と Dynein の両方が結合しており、輸送の方向は両者のモーター活性のバランスにより決定されるという、Tug-of-war 仮説が主流となりつつある(Müller *et al.*, 2008; Hancock, 2014)。この仮説に一致して、Kinesin とカーゴの結合が減弱した際、カーゴの順行性輸送が減少し逆行性輸送の割合が増加するという現象がいくつか報告されている(Vagnoni *et al.*, 2011; Fu and Holzbaur, 2013)。しかし、Alca3A については輸送方向の変化は見出されず、輸送の高速化が観察された。また、WDAA 変異によっても輸送の高速化が観察されたことから、この変化は Alca と Kinesin-1 の結合によらないことが明らかになった。

その後の解析により、Kinesin-1 との結合減弱により Alca は APP 小胞により輸送されることが示された。Alca と APP は三量体から解離後、別の領域で小胞を形成すると考えられる。しかし、*In vivo* において~30% の内在性 Alca は APP と共局在していることから、一部の Alca は APP 小胞形成領域に入り輸送されていると予想される。Alca3A や WDAA 変異では Alca 小胞を形成できず、輸送されなかった Alca が APP 小胞に入り込むことで軸索中を輸送されていることが予想された。

これまで、Alca の小胞形成メカニズムについての見解はなかった。極性輸送の多くは上皮細胞において解析されており、神経軸索と上皮細胞の頂端側(Apical)への極性輸送機構は類似している。Apical に輸送される小胞はクラスリンのようなコートタンパク質を小胞形成に利用せず、小胞形成機構はカーゴにより異なる。

本研究では CAD 細胞における解析により、Kinesin-1 への結合が Alca の効率的な Golgi exit に必要であることを示した。この結果は Kinesin が輸送小胞小胞形成に関与するといういくつかの報告と一致している(Jaulin *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2012)。Alca と Kinesin-1 の結合が小胞形成のどの段階に寄与しているか明らかにすることはできなかったが、活性化 Kinesin-1 の人工リボソームへの結合はリボソームから tubular 状の構造を伸長させることが報告されている(Su *et al.*, 2016)。Alca と Kinesin-1 の結合は小胞形成時の膜の変形に必要な力の発生源である可能性が考えられる。また、膜タンパク質は小胞形成時、膜状で集積する必要がある。その機構としては、脂質ラフトへの集積によるものや、細胞外ドメインの糖鎖修飾と糖鎖結合レクチンを利用した集積などが知られている(Cao *et al.*, 2012)。関与は検討されていないものの、Alca についても raft への局在、細胞外ドメインの糖鎖修飾を示すことが知られている。また、Kinesin-1 は最大で 4 分子の Alca と結合することから、Kinesin-1 が Alca の集積に関与する可能性も考えられ、Alca の小胞輸送機構の解明のためには更に詳細な検討が必要である。

Alca のリン酸化が Golgi Exit を制御することから、リン酸化 Alca の割合は Golgi 体で増加していることが予想された。しかし、作成した抗 Alca リン酸化抗体について、オルガネラ分画後の Alca を検出するのに十分な力価が得られなかったこと、免疫染色において Alca の

検出に利用できなかったことから、現段階では検討することはできなかった。

マウス脳に含まれる AlcaCTF と AlcaICD については Fig.5 において SDS-PAGE によるリン酸化の移動度が確認できた。ヒトとマウスの Alca は配列類似性が高く、ヒト AlcaCTF、ICD のリン酸化バンドシフトは 3A 変異により大幅に消失することを確認している。ADAM10/17 が主に細胞膜上に局在することから、AlcaCTF および ICD は Alca の輸送後に生じると考えられる。マウス脳内 AlcaCTF のほとんどはリン酸化体として存在していることから、輸送される Alca のほとんどは輸送開始制御シグナルとしてリン酸化を受け一方で、Alca が Kinesin-1 から解離する際には、脱リン酸化による制御が行われていないことが示唆された。細胞質中に放出される AlcaICD は約半数が脱リン酸化体として存在している。AlcaICD は Kinesin-1 と結合することで Alca や APP の輸送を阻害しうる (Araki *et.al.*, 2007)。細胞質に放出された AlcaICD は脱リン酸化されることで結合アフィニティーを減弱させるという制御を受けている可能性も考えられた。

Alca はカーゴ受容体として機能し、Alca 小胞に含まれるカーゴを軸索末端に輸送することで機能すると考えられる。Alca の欠損モデル動物の解析により、Alca は神経軸索の軸索ガイダンスや分岐に寄与すると考えられており、必要な時期に Alca 小胞の輸送を亢進するメカニズムの存在が予想される。Alca カーゴ分子については現在プロテオミクスによる解析中が行われ、候補分子の同定・解析が進められている (白木博士論文, 2017)。本研究により、Alca のリン酸化は Kinesin-1 への結合による Alca 特異小胞の形成に必要であることを明らかにした。この結果は、Alca のリン酸化は軸索末端においてカーゴが必要な際に、Alca 特異小胞形成を促進することでカーゴの輸送量を調節する、輸送開始シグナルであることを示唆する。同定されたリン酸化部位は全て神経細胞に発現する Casein kinase I または Casein kinase II のリン酸化コンセンサス配列を保持しており、Alca 細胞質ドメイン精製タンパク質を Casein kinase II と *In vitro* で反応させることで、リン酸化バンドシフトが起きることは確認されている。今後、Alca の軸索輸送が増加する条件下で Casein kinase によるリン酸化が亢進するか、またその上流シグナル分子を同定することで、新規の軸索輸送制御メカニズムの解明が可能であると考えられる。

実験材料および方法

動物

実験に用いたマウスは、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回/時間に調節された北海道大学大学院 薬学研究院 SPF 飼育施設において維持、繁殖した。12/12 時間の暗/明サイクルで飼育し、餌および水は自由に摂取できるものとした。動物の取り扱いについては、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に従った。

細胞培養・トランスフェクション

Neuro 2a (N2a)細胞は非働化处理(56°C , 30 min)した5%(v/v) fetal bovine serum(MP)を含むDMEM (Wako)中で、CAD (Mouse CNS catecholaminergic cell) 細胞は非働化处理した8%(v/v) Calf Serum (BIOSCIENCE) を含むDMEM:F12 (Wako)中で 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した。N2a細胞は6 well dishに 6×10^5 cell/well で、CAD細胞はpoly-D-lysineでコートした8-well chambered coverglass (Nalgen Nunc)に播種し、24時間培養後にLipofectamine 2000 (Invitrogen) または Polyethylenimine Max (Polysciences, Inc.)を用いてプラスミドの遺伝子導入を行った。

マウス大脳皮質初代培養神経細胞の調製

マウス胎児脳(E15.5)の大脳皮質を分離し、Papain(Worthington) 20units/ml in 2 mg/ml L-Cysteine, 0.2 mg/ml BSA, 5 mg/ml Glucose, $40 \mu\text{m}/\text{mL}$ DNase I in PBS で 15 分間処理した。処理後の大脳皮質組織を CM(+)(Neurobasal medium containing 2%B27, 4 mM Glutamax I, 5% Horse serum (heat inactivated), and penicillin/ streptomycin(Thermo)) 中で懸濁し Cell strainer ($40 \mu\text{m}$)により組織片を取り除き、poly-L-lysine でコートした 8-well chambered coverglass に $3\text{--}5 \times 10^4$ cell/well で播種した。培養 4-5 日目(Div.4-5)にリン酸カルシウム法(invitrogen)のマニュアルに従いプラスミドの導入を行った。導入から 3 時間後、10% CO_2 で平衡化した DMEM:F12 により 2 回 wash し、CM(+)中で培養した。

Western blotting

高分子量タンパク質の検出に用いたサンプルには 5x Sample buffer を、内在性 Al α CTF、ICD の検出に用いたサンプルには 2x Tricine Sample buffer をそれぞれ最終 1x になるように加え、熱処理(Boil, 5 min)したものを Western blotting に用いた。高分子量タンパク質の分離には 7.5% (w/v) polyacrylamide gel を用いた Tris-Glycine-buffered SDS-PAGE (Laemmli, 1970)を、低分子量タンパク質には 10% (Al α CTF), 17.5% (Al α ICD) (w/v) polyacrylamide gel を用いた Tris-Tricine-buffered SDS-PAGE(Schägger, 2006)を行い、Nitrocellulose membrane(Pall Corporation)に転写した。抗リン酸化 Al α 抗体を用いる際は 2%BSA in TBS-T で、その他には 5% Skim milk in TBS-T 中による室温 1 時間のブロッキ

ングを行った。TBS-T で洗浄後、各種一次抗体を用いて一晩、4°Cで反応させた。TBS-T で洗浄後、各種二次抗体と室温で 0.5-1 時間反応させ、TBS-T で洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents または Clarity Western ECL Substrate(Bio-RAD) と反応させ、ImageQuant LAS 4000 mini(Fujifilm)により検出・定量した。
使用した一次抗体を以下に示す。

一次抗体

anti-actin (Sigma-Aldrich)

anti- α -tubulin antibody (Wako)

anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich)

anti-HA 12CA5 (Roche)

anti-APP G369, provided by S. Gandy(Oishi *et al.*, 1997)

anti-KHC H2, provided by G. S. Bloom(Brady *et al.*, 1990)

anti-Alc α UT195

二次抗体

anti-mouse IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare)

anti-rabbit IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare)

TrueBlot: Anti-IgG HRP, Rabbit (Rockland)

Alc α CTF, Alc α ICD の検出

Mouse brain を取り出し、ice cold PBS で二回洗浄後、8 倍量の BufferH を加え 30 回 homogenize した。培養細胞の場合、PBS で細胞を wash し、240 μ L の Buffer H を加え 27Gneedle で 30 回 stroke した。1,000 xg で 10 min 遠心後の上清を 100,000 xg, 4°Cで 1 hr 遠心し、得られた上清を細胞質画分とした。沈殿を HBS-T を加え Sonication 後 19,000 xg 4°C, 10min 遠心した上清を膜画分とした。細胞質画分に同量-2 倍の HBS-T を加え、UT195 及び Protein G sepharose (GE)により免疫沈降した後、resin 及び膜画分 Lysate に 2mM MnCl₂ 存在下で λ PPase (≥ 400 units)を加え 30°C で 3 時間反応させることで脱リン酸化処理を行い、Western blotting により検出した。

In vitro 結合実験

Alc α -FLAGと HA-KLC1をN2a細胞にそれぞれトランスフェクション後24時間培養し、HBS-Tにより可溶化した。Alc α -FLAGを発現させた細胞Lysateに対して、抗FLAG抗体及びProtein G sepharoseを加え、4°C, overnightで免疫沈降した。Resinをwash後、2 mM MnCl₂を含むHBS-T及び λ PPase (≥ 400 units)を加え30°Cで3時間反応させることで脱リン酸化処理を行った後、HBS-Tで3回washした。HA-KLCを発現させた細胞Lysateをresinに

加え、4 °C, 二時間 rotateすることで結合させた。各実験は複数回行い結果の再現性を得ている。

MALDI-TOF/MS

Alcα-AC-FLAGをN2a細胞にトランスフェクション後24時間培養し、HBS-Tにより可溶化した。抗FLAG抗体及びProtein G sepharoseを加え、4 °C, overnightで免疫沈降した。5,000 rpm、3 min、4 °Cで遠心したresinをWash Buffer I、Wash Buffer IIによりwashした。Bufferを30G needleを用いて全て除去した後、sinapinic acid を飽和させた trifluoroacetic acid/acetonitrile/water (1:20:20)を加え、上清をサンプルとした。Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics)によりLinear positive modeで測定した。

免疫染色法

初代培養神経細胞(Div.5)にAlcα-FLAG各変異体を発現させ、トランスフェクション後8時間後にice cold PBSでwash、4% (w/v) PFA/PBS、室温 10minで固定した。0.1% Triton X-100/ PBSで細胞を透過後、3% (w/v) goat and horse serumを加え室温 1 hrでブロッッキングした。CAD細胞については、Alcα-HA-EGFP各コンストラクトを発現させ、12時間後に2 µg/mLのBFAを含む培地に交換した4時間培養した。培地をwash後、100 µg/mL の cycloheximideを含む培地中で培養し、0,1,2,4時間培養し4% (w/v) PFA/PBS、室温 10minで固定した。0.2% Triton X-100/ PBSで細胞を透過後、1% (w/v) goat serumを加え室温 1 hrでブロッッキングした。各細胞をブロッッキングバッファーで希釈した一次抗体で4°C、オーバーナイトで反応させた。PBSでwash後、二次抗体と室温 1 hrで反応させ、PBS wash後観察した。蛍光顕微鏡(BZ-710X; Keyence)を用いて観察・画像を取得し、蛍光強度の定量や共局在効率の定量はFiji/ImageJ(ImageJ-Fiji-ImgLib; <http://Fiji.sc> or <http://imageJ.net>) およびColco2 Fiji pluginを用いて行った。

一次抗体

anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich)	1/5000
anti-APP polyclonal antibody (G369)	1/500
anti-MAP2B (clone 18) (BD Biosciences)	1/500
anti-GM130 (clone 35) (BD Biosciences)	1/500

二次抗体

anti-rabbit Alexa546 antibody (Thermo)	1/1000
anti-mouse Alexa488 antibody (Thermo)	1/1000
anti-mouse Alexa546 antibody (Thermo)	1/1000

Live imaging

初代培養神経細胞(Div.4)に Alc α -EGFP または Alc α -HA-EGFP の各コンストラクトをトランスフェクションし、16-20 時間後に 37°C、5%CO₂ の条件下 (TOKAI HIT)で TIRF 顕微鏡(ECLIPSE TE2000, Nikon)により観察した。対物レンズ Nikon CFI Apo TIRF (100x, NA=1.49 in oil)を用いて神経軸索を観察し、Metamorph 6.1 ソフトウェア (Molecular Device)による 200ms ごとに画像を取得した。Track point を用いて 5 フレーム平均 (1 s) の順行性に輸送される小胞の移動速度を算出し、これを 1 データセットとした。2 フレーム間の移動速度が 0.4 μ m/sec 以下であった場合はブラウン運動とみなし、解析から除外した。Kymograph は Kymomaker (Chiba *et al.*, 2014b)を用いて作成した。

リン酸化特異抗体の作成

抗原ペプチド NH₂-Ala-Glu-pSer-Glu-pSer-pSer-Glu-Glu-Glu-Lys-Lys+Cys-CONH₂ は Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan)により購入し、ウサギへの免疫、抗血清の回収は株式会社免疫生物研究所に委託した。SulfoLink coupling gel(Thermo)のマニュアルに従い、抗原ペプチドを共有結合させた resin を作成し、抗血清と反応させた。0.1M Glycine-HCl pH2.5 で粗精製リン酸化抗体を溶出後、1M-Tris-HCl pH8.4 で中和、透析により TBS への Buffer 交換を行った。N2a 細胞に Alc α -3A-FLAG を発現させ、24 時間後 HBS-T で Lysis した。抗 FLAG 抗体と Protein G sepharose により Lysate から免疫沈降し、HBS-T 及び TBS-T で 2 回ずつ wash することで Alc α -3A-FLAG 結合 resin を得た。TBS-T で希釈した粗精製リン酸化抗体と resin を 4°C、2 時間 rotate し非特異的抗体の吸着を行った。遠心した上清を抗リン酸化 Alc α 抗体とし、特異性の確認を行った。

Alc family 配列情報

Alc α 、Alc γ の配列の比較に用いた NCBI Reference Sequence number を示す。

Human Alc α /Calstn1 (BC033902.2), Human Alc γ /Calstn 2 (BC104485.1), Mouse/Rat Alc α /Calstn1 (NM_001007092.1), Mouse/Rat Alc γ /Calstn 2 (NM_02305.5), Zebra fish Alc α /Calstn1 (XM_005162269.4), Zebra fish, Alc γ /Calstn 2 (NM_001159839.1), *D. melanogaster* Alc/Calstn (NM_001297793.1), and *C. elegans* Alc/Calstn (NM_001025939.5).

Plasmid

plasmid の精製には FastGene Plasmid Mini Kit(日本ジェネティクス)を、初代培養神経細胞のトランスフェクションするものについては PureYield Plasmid Midiprep System(Promega)をプロトコールに沿って使用した。また、ゲルからの抽出による DNA の精製には FastGene Gel/PCR Extraction kit (日本ジェネティクス)をプロトコールに沿って使用した。

以下の Plasmid は当研究室で作成されたものを利用した。

C-FLAG/ pcDNA3.1(+)

myc-KHC(KIF5C)/ pcDNA3.1(+)

HA-mKLC1/ pcDNA3.1(+)

HA-KLC2/ pcDNA3.1(+)

HA-X11L/ pcDNA3.1(+)

Alc β -FLAG/ pcDNA3.1(+)

Alc γ -FLAG/ pcDNA3.1(+)

コンストラクトの作成

下で示す各鋳型と各 primer を用いて Ex taq(Takara)を用いて PCR 反応を行った。目的の DNA を電気泳動、ゲルから抽出することで精製した。精製した DNA と vector をそれぞれ 2 種類の制限酵素で処理し、Ligation-Convenience Kit (NIPPON GENE)を用いて目的のコンストラクトを作成した。下に PCR の鋳型プラスミド、用いたプライマー配列、挿入した Vector プラスミド、Ligation に用いた制限酵素を示した。

Alc α -FLAG/ pcDNA3.1(+)

Alc α / pcDNA3(+)(Araki, 2003)

For: 5' CAGAGCTCTCTGGCTAACTAG 3'

Rev: 5' CGTCTCGAGGTAGCTGAGGGTGGA 3'

Cloned into C-FLAG/ pcDNA3.1(+)

NheI / XhoI

Alc α -HA-EGFP / pcDNA3.1(+)

Alc α -HA / pcDNA3(+)(Maruta, 2012)

For: Alc α 1663-Sse8387-for (5'ATTGGACCTGCAGGTCCTC 3')

Rev: 5' CGTCTCGAGGTAGCTGAGGGTGGA 3'

Cloned into Alc α -EGFP/ pcDNA3.1(+)(Araki, 2007)

Sse8387I / XhoI

Alc α STAA-FLAG / pcDNA3.1(+)

Alc α -FLAG / pcDNA3.1(+)

For: Alc α 1663-Sse8387-for

Rev: 5' AGACTCGAGGTAGCTGAGTGCTGCGTCATCCCA 3'

Cloned into Alc α -FLAG/ pcDNA3.1(+)

Sse8387I / XhoI

Alcα SYAA-FLAG / pcDNA3.1(+)

Alcα-FLAG / pcDNA3.1(+)

For: Alcα1663-Sse8387-for

Rev: 5' TCTAGACTCGAGTGCTGCGAGGGTGGAGTC 3'

Cloned into Alcα-FLAG/ pcDNA3.1(+)

Sse8387I / XhoI

Alcα WD2AA-FLAG / pcDNA3.1(+)

Alcα-FLAG / pcDNA3.1(+)

For: Alcα1663-Sse8387-for

Rev: 5' CGTCTCGAGGTAGCTGAGGGTGGAGTCTGCTGCCTCCAGCTG 3'

Cloned into Alcα-FLAG/ pcDNA3.1(+)

Sse8387I / XhoI

Alcα AC -FLAG peptide

Alcα-FLAG / pcDNA3.1(+)

For: 5' CGGGGTACCATGGAGGACCAGCACAG 3'

Rev: 5' CGTCTCGAGCTGCTCCCCCTCCTC 3'

Cloned into C-FLAG/ pcDNA3.1(+)

KpnI / XhoI

Megaprimer 法

二種類の primer (1stPCR for / 1stPCR rev)を用いた PCR により、上述した方法で増幅された DNA 断片をゲルから抽出しこれを mega primer として用いた。作製した mega primer と別の primer(2ndPCR for)を用いて 2nd PCR を行い、得られた目的 DNA に制限酵素処理を行い vector に挿入した。以下に 1st PCR、2nd PCR に用いた鋳型、プライマーと Ligation に用いた Vector、制限酵素を示した。

1.Alcα-FLAG / pcDNA3.1(+)を鋳型としたもの

1st PCR

Alcα-FLAG / pcDNA3.1(+)

For: 下記一覧に表示

Rev: 5' TTCTAGTTGCCAGCCATCTGT 3'

2nd PCR

For: Al α 1663-Sse8387-for

Rev : 1st PCR 産物

Coloned into Al α -FLAG/ pcDNA3.1(+)

Sse8387I / XhoI

1st PCR; forward primer

Al α Δ N-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' GTATTTCGGATCCGGAACCCCATGGAGACC 3'

Al α Δ AC-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' ATGAGGACCAGCACAAACGCAACCCGGCA 3'

Al α TYAA-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' AACCCCATGGAGGCAGCAGAGGACCAGCA 3'

Al α S913A/S914A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' CTATGAGGACCAGCACGCAGCAGAGGAGGAGGAGGAA 3'

Al α S926A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' CAGCAGTGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGCAGAG
GACGGCGAAG 3'

Al α T936-S943A(5Ala)-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' AGAGGATGACATCGCAGCAGCCGAGGCAGAGGCAGCAGAGGAGGAG
GAGGGGGA 3'

Al α T936A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' GAAGAAGAGGATGACATCGCAAGCGCCGAGTCGGA 3'

Al α S937A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' GAGGAGGATGACATCACCGCAGCCGAGTCGGAGAG 3'

Al α S940A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' GACATCACCGAGCGCCGAGGCAGAGAGCAGCGAGGA 3'

Al α S942A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' ACCAGCGCCGAGTCGGAGGCAAGCGAGGAGGAGGAGGGGGA 3'

Al α S943A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' GCCGAGTCGGAGAGCGCAGAGGAGGAGGAGGGGGA 3'

Al α T936A/S937A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' GAAGAAGAGGATGACATCGCAGCAGCCGAGTCGGAGAG 3'

Al α S942A/S943A-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' ACCAGCGCCGAGTCGGAGGCAGCAGAGGAGGAGGAGGGGGAGCA 3'

Al α S940A/S942A/S943A(3Ala)-FLAG / pcDNA3.1(+),

5' ACCAGCGCCGAGGCAGAGGCAGCAGAGGAGGAGGAGGGGGA 3'

Alcα WD1AA-FLAG / pcDNA3.1(+)

5' AACGAGATGGACGCAGCAGACTCTGCCC 3'

2. AlcαS940A/S942A/S943A(3Ala)-HA-EGFP / pcDNA3.1(+)

1st PCR

For: 5' ACCAGCGCCGAGGCAGAGGCAGCAGAGGAGGAGGAGGGGGA 3'

Rev: 5' TTCTAGTTGCCAGCCATCTGT 3'

2nd PCR

For: Alcα1663-Sse8387-for

Rev: 1st PCR 産物

Coloned into Alcα-EGFP/ pcDNA3.1(+)

Sse8387I / XhoI

3. AlcαS940A/S942A/S943A(3Ala)-HA-EGFP / pcDNA3.1(+)

1st PCR

For: 5' ACCAGCGCCGAGGCAGAGGCAGCAGAGGAGGAGGAGGGGGA 3'

Rev: 5' TTCTAGTTGCCAGCCATCTGT 3'

2nd PCR

For: Alcα1663-Sse8387-for

Rev : 1st PCR 産物

Coloned into Alcα-EGFP/ pcDNA3.1(+)

Sse8387I / XhoI

4. Alcα AllA(8Ala)-FLAG / pcDNA3.1(+)

AlcαS913A/S914A-FLAG / pcDNA3.1(+)

AlcαS926A-FLAG / pcDNA3.1(+)

AlcαT936-S943A(5Ala)-FLAG / pcDNA3.1(+)

上記の各コンストラクト作成手順を Alcα-FLAG / pcDNA3.1(+)に繰り返し行う
ことで作成した。

5. Alcα WDAA-FLAG / pcDNA3.1(+)

Alcα WD1AA-FLAG / pcDNA3.1(+)

Alcα WD2AA-FLAG / pcDNA3.1(+)

上記の各コンストラクト作成手順を Al α -FLAG / pcDNA3.1(+) に繰り返し行うことで作成した。

6. Al α -EGFP / pcDNA3.1(+),

7. Al α 3A-EGFP / pcDNA3.1(+),

8. Al α WDAA-EGFP / pcDNA3.1(+)

Each Al α sequence from Al α -FLAG / pcDNA3.1(+), Al α 3A-EGFP / pcDNA3.1(+), Al α WDAA-EGFP / pcDNA3.1(+) were cloned into C-EGFP / pcDNA3.1(+) with NheI / XhoI

使用した buffer の組成

BufferH: 20 mM HEPES (pH 7.4), 10% Glycerol, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ 10 mM Sodium Pyruvate, 1/1000 protease inhibitor mix

HBS-T: 10mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5% TritonX-100, 5 mM NaF, 10 mM Sodium Pyruvate, 1/1000 protease inhibitor mix

PBS: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 137 mM NaCl, 27 mM KCl

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl

TBS-T: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Tween20

5x Tris-Glycine Sample buffer: 43% Glycerol, 16% SDS, 64 ng/ml Bromo phenol blue, 5 mM EDTA, 0.22 M Tris-HCl (pH 6.8)

2x Tris-Tricine Sample buffer: 30% Gel buffer [3 M Tris-HCl (pH 8.45), 0.3% SDS], 25% Glycerol, 8% SDS, 4% β -Mercaptoethanol, 0.015% CBB

Protease inhibitor (PI) mix: 5 μ g/ml Leupeptin, 5 μ g/ml Pepstatin A, 5 μ g/ml Chymostatin

Wash Buffer I : 0.1% n-octylglucoside, 140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.025% Sodium Azide

Wash Buffer II : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.025% Sodium Azide

参考文献

- Alther, T. A., Domanitskaya, E., and Stoeckli, E. T. (2016). Calsynenin1-mediated trafficking of axon guidance receptors regulates the switch in axonal responsiveness at a choice point. *Development* 1, 994–1004.
- Araki, Y. *et al.* (2004). Coordinated metabolism of Alcadein and amyloid beta-protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 24343–24354.
- Araki, Y. *et al.* (2007). The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *EMBO J.* 26, 1475–1486.
- Araki, Y., Tomita, S., Yamaguchi, H., Miyagi, N., Sumioka, A., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2003). Novel cadherin-related membrane proteins, Alcadeins, enhance the X11-like protein-mediated stabilization of amyloid beta-protein precursor metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 49448–49458.
- Bah, A., and Forman-Kay, J. D. (2016). Modulation of intrinsically disordered protein function by post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* 291, 6696–6705.
- Blasius, T. L., Cai, D., Jih, G. T., Toret, C. P., and Verhey, K. J. (2007). Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J. Cell Biol.* 176, 11–17.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633–1649.
- Brady, S., Pfister, K., and Bloom, G. (1990). A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1061–1065.
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391–398.

Calderon, F. *et al.* (2017). The Kinesin Adaptor Calsyntenin-1 Organizes Microtubule Polarity and Regulates Dynamics during Sensory Axon Arbor Development. *Front. Cell. Neurosci. Artic. Front. Cell. Neurosci* 11, 1073389–107.

Cao, X., Surma, M. A., and Simons, K. (2012). Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Res.* 22, 793–805.

Chiba, K., Araseki, M., Nozawa, K., Furukori, K., Araki, Y., Matsushima, T., Nakaya, T., Hata, S., Saito, Y., Uchida, S., Okada, Y., Nairn, AC., Davis, RJ., Yamamoto, T., Kinjo, M., Taru, H., Suzuki, T. (2014a). Quantitative analysis of APP axonal transport in neurons: role of JIP1 in enhanced APP anterograde transport. *Mol. Biol. Cell* 25, 3569–3580.

Chiba K., Chien K., Sobu Y., Hata S., Kato S., Nakaya T., Okada Y., Nairn AC., Kinjo M., Taru H, Wang R., Suzuki T. (2017). Phosphorylation of KLC1 modifies interaction with JIP1 and abolishes the enhanced fast velocity of APP transport by kinesin-1. *Mol. Biol. Cell* 28, 3857–3869.

Chiba, K., Shimada, Y., Kinjo, M., Suzuki, T., and Uchida, S. (2014b). Simple and Direct Assembly of Kymographs from Movies Using KYMOMAKER. *Traffic* 15, 1–11.

Dodding, M. P., Mitter, R., Humphries, A. C., and Way, M. (2011). A kinesin-1 binding motif in vaccinia virus that is widespread throughout the human genome. *EMBO J.* 30, 4523–4538.

Farías, G. G., Cuitino, L., Guo, X., Ren, X., Jarnik, M., Mattera, R., and Bonifacino, J. S. (2012). Signal-Mediated, AP-1/Clathrin-Dependent Sorting of Transmembrane Receptors to the Somatodendritic Domain of Hippocampal Neurons. *Neuron* 75, 810–823.

Farías, G. G., Guardia, C. M., Britt, D. J., Guo, X., and Bonifacino, J. S. (2015). Sorting of Dendritic and Axonal Vesicles at the Pre-axonal Exclusion Zone. *Cell Rep.* 13, 1221–1232.

Fragkouli, A., Koukouraki, P., Vlachos, I. S., Paraskevopoulou, M. D., Hatzigeorgiou, A. G., and Doxakis, E. (2017). Neuronal ELAVL proteins utilize AUF-1 as a co-partner to induce neuron-specific alternative splicing of APP. *Sci. Rep.* 7, 44507.

Fu, M. M., and Holzbaur, E. L. F. (2013). JIP1 regulates the directionality of APP axonal transport by coordinating kinesin and dynein motors. *J. Cell Biol.* 202, 495–508.

Hancock, W. O. (2014). Bidirectional cargo transport: Moving beyond tug of war. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 615–628.

Hata, S. *et al.* (2009). Alcadin cleavages by amyloid beta-precursor protein (APP) alpha- and gamma-secretases generate small peptides, p3-Alcs, indicating Alzheimer disease-related gamma-secretase dysfunction. *J. Biol. Chem.* *284*, 36024–36033.

Hintsch, G. (2002). The Calsyntenins—A Family of Postsynaptic Membrane Proteins with Distinct Neuronal Expression Patterns. *Mol. Cell. Neurosci.* *21*, 393–409.

Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* *68*, 610–638.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 682–696.

Ikeda, D. D., Duan, Y., Matsuki, M., Kunitomo, H., Hutter, H., Hedgecock, E. M., and Iino, Y. (2008). CASY-1, an ortholog of calsyntenins/alcadeins, is essential for learning in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5260–5265.

Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulan, E., and Kreitzer, G. (2007). Polarization-Dependent Selective Transport to the Apical Membrane by KIF5B in MDCK Cells. *Dev. Cell* *13*, 511–522.

Kawano, T., Araseki, M., Araki, Y., Kinjo, M., Yamamoto, T., and Suzuki, T. (2012). A small peptide sequence is sufficient for initiating kinesin-1 activation through part of TPR region of KLC1. *Traffic* *13*, 834–848.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.

Leterrier, C., and Dargent, B. (2014). No Pasaran! Role of the axon initial segment in the regulation of protein transport and the maintenance of axonal identity. *Semin. Cell Dev. Biol.* *27*, 44–51.

Lipina, T. V., Prasad, T., Yokomaku, D., Luo, L., Connor, S. a, Kawabe, H., Tian Wang, Y., Brose, N., Roder, J. C., and Marie Craig, A. (2015). Cognitive Deficits in Calsyntenin-2 Deficient Mice Associated with Reduced Gabaergic Transmission. *Neuropsychopharmacology*, 1–9.

Maruta, C., Saito, Y., Hata, S., Gotoh, N., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2012). Constitutive cleavage of the single-pass transmembrane protein α prevents aberrant peripheral retention of Kinesin-1. *PLoS One* 7, e43058.

Müller, M. J. I., Klumpp, S., and Lipowsky, R. (2008). Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 4609-4614

Namba, T., Nakamuta, S., Funahashi, Y., and Kaibuchi, K. (2011). The role of selective transport in neuronal polarization. *Dev. Neurobiol.* 71, 445–457.

Oishi, M., Nairn, A. C., Czernik, A. J., Lim, G. S., Isohara, T., Gandy, S. E., Greengard, P., and Suzuki, T. (1997). The Cytoplasmic Domain of Alzheimer β Amyloid Precursor Protein and Thr668 in Adult Rat Brain and Cultured Cells. *Mol. Med.* 3, 111–123.

Papassotiropoulos A, Stephan DA, Huentelman MJ, Hoernkli FJ, Craig DW, Pearson JV, Huynh KD, Brunner F, Corneveaux J, Osborne D, Wollmer MA, Aerni A, Coluccia D, Hänggi J, Mondadori CR, Buchmann A, Reiman EM, Caselli RJ, Henke K, de Q. D. (2006). Common Kibra Alleles Are Associated with Human Memory Performance. *Science* (80-.). 314, 475–478.

Pettem, K. *et al.* (2013). The Specific α -Neurexin Interactor Calsyntenin-3 Promotes Excitatory and Inhibitory Synapse Development. *Neuron* 80, 113–128.

Ponomareva, O. Y., Holmen, I. C., Sperry, A. J., Eliceiri, K. W., and Halloran, M. C. (2014). Calsyntenin-1 regulates axon branching and endosomal trafficking during sensory neuron development in vivo. *J. Neurosci.* 34, 9235–9248.

Rahman, a, Friedman, D. S., and Goldstein, L. S. (1998). Two kinesin light chain genes in mice. Identification and characterization of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 15395–15403.

Rosa-Ferreira, C., and Munro, S. (2011). Arl8 and SKIP Act Together to Link Lysosomes to Kinesin-1. *Dev. Cell* 21, 1171–1178.

Saito, Y., Akiyama, M., Araki, Y., Sumioka, A., Shiono, M., Taru, H., Nakaya, T., Yamamoto, T., and Suzuki, T. (2011). Intracellular trafficking of the amyloid ??-protein precursor (APP) regulated by novel function of X11-like. *PLoS One* 6, 1–11.

Sampo, B., Kaech, S., Kunz, S., and Banker, G. (2003). Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37, 611–624.

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16–22.

Sobu, Y., Furukori, K., Chiba, K., Nairn, A. C., Kinjo, M., and Hata, S and Suzuki, T. (2017). Phosphorylation of multiple sites within an acidic region of Alcadin α is required for kinesin-1 association and Golgi exit of Alcadin α cargo. *Mol. Biol. Cell*, 1–37.

Su, Q. P., Du, W., Ji, Q., Xue, B., Jiang, D., Zhu, Y., Lou, J., Yu, L., and Sun, Y. (2016). Vesicle Size Regulates Nanotube Formation in the Cell. *Sci. Rep.* 6, 1–10.

Takei, N., Sobu, Y., Kimura, A., Urano, S., Piao, Y., Araki, Y., Taru, H., Yamamoto, T., Hata, S., Nakaya, T., Suzuki, T.. (2015). Cytoplasmic fragment of Alcadin α generated by regulated intramembrane proteolysis enhances amyloid β -protein precursor (APP) transport into the late secretory pathway and facilitates APP cleavage. *J. Biol. Chem.* 290, 987–995.

Travers, T., Shao, H., Joughin, B. a, Lauffenburger, D. a, Wells, A., and Camacho, C. J. (2015). Tandem phosphorylation within an intrinsically disordered region regulates ACTN4 function. *Sci. Signal.* 8, ra51.

Vagnoni, A., Rodriguez, L., Manser, C., De Vos, K. J., and Miller, C. C. J. (2011). Phosphorylation of kinesin light chain 1 at serine 460 modulates binding and trafficking of calyculin-1. *J. Cell Sci.* 124, 1032–1042.

Vale, R. D., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39–50.

Verhey, K. J., and Hammond, J. W. (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 765–777.

Wilson, M. H., and Holzbaur, E. L. F. (2014). Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive nuclear distribution in muscle cells. *Development* 142, 218–228.

Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 18–29.

Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2010). PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 996–1010.

Yin, X., Feng, X., Takei, Y., and Hirokawa, N. (2012). Regulation of NMDA receptor transport: a KIF17-cargo binding/releasing underlies synaptic plasticity and memory in vivo. *J. Neurosci.* 32, 5486–5499.

Zhu, H., Lee, H. Y., Tong, Y., Hong, B. S., Kim, K. P., Shen, Y., Lim, K. J., Mackenzie, F., Tempel, W., and Park, H. W. (2012). Crystal structures of the tetratricopeptide repeat domains of Kinesin light chains: Insight into cargo recognition mechanisms. *PLoS One* 7, 1–10.

図表

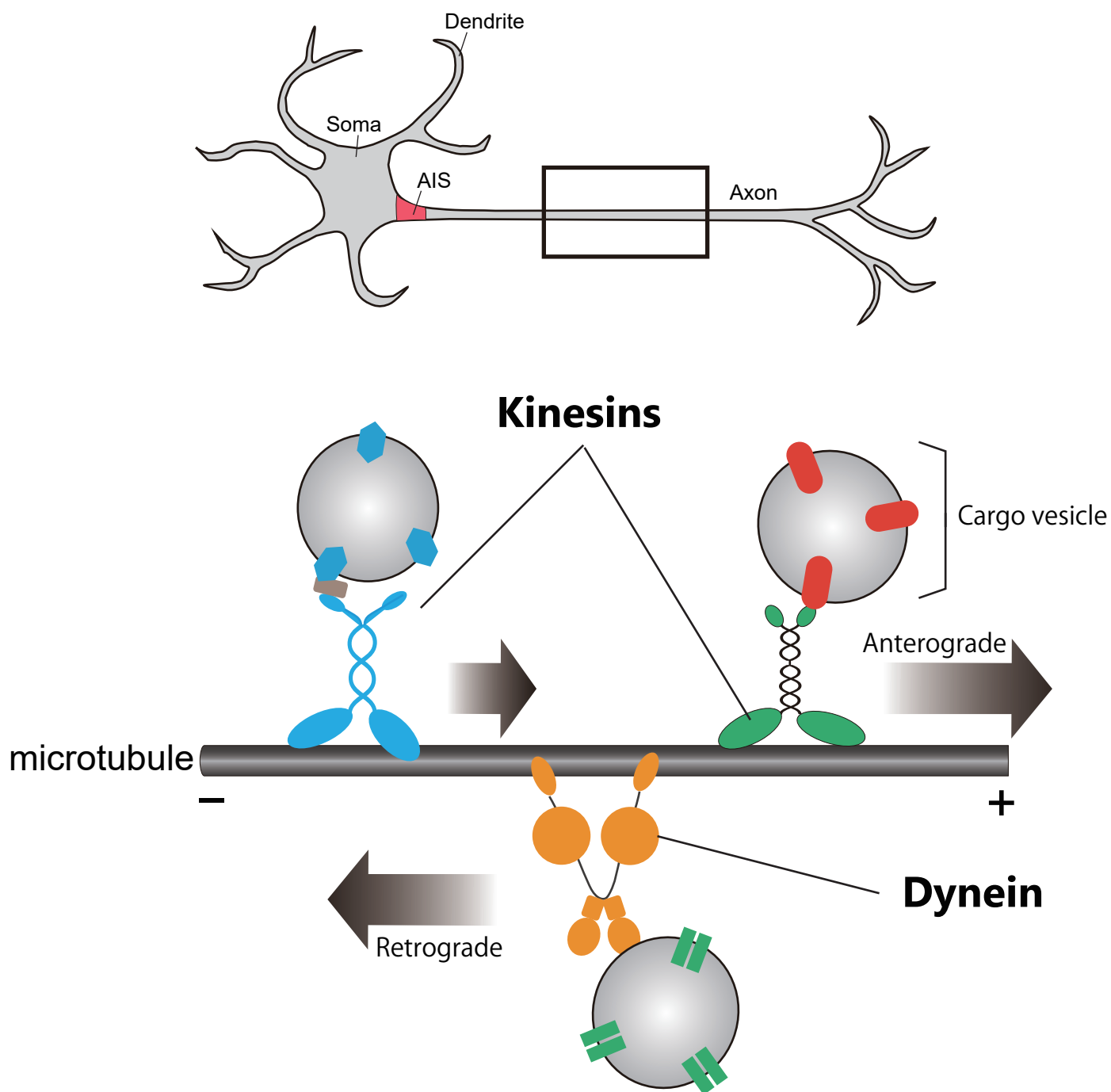


Fig.1 神経軸索内のモータータンパク質による小胞輸送

神経軸索中では膜タンパク質は輸送小胞として輸送される。この輸送は微小管上を移動するモータータンパク質である、Kinesin と Dynein が担う。軸索末端に向かう順行性の輸送は Kinesin ファミリーが、細胞体に向かう逆行性の輸送は Dynein が行う。

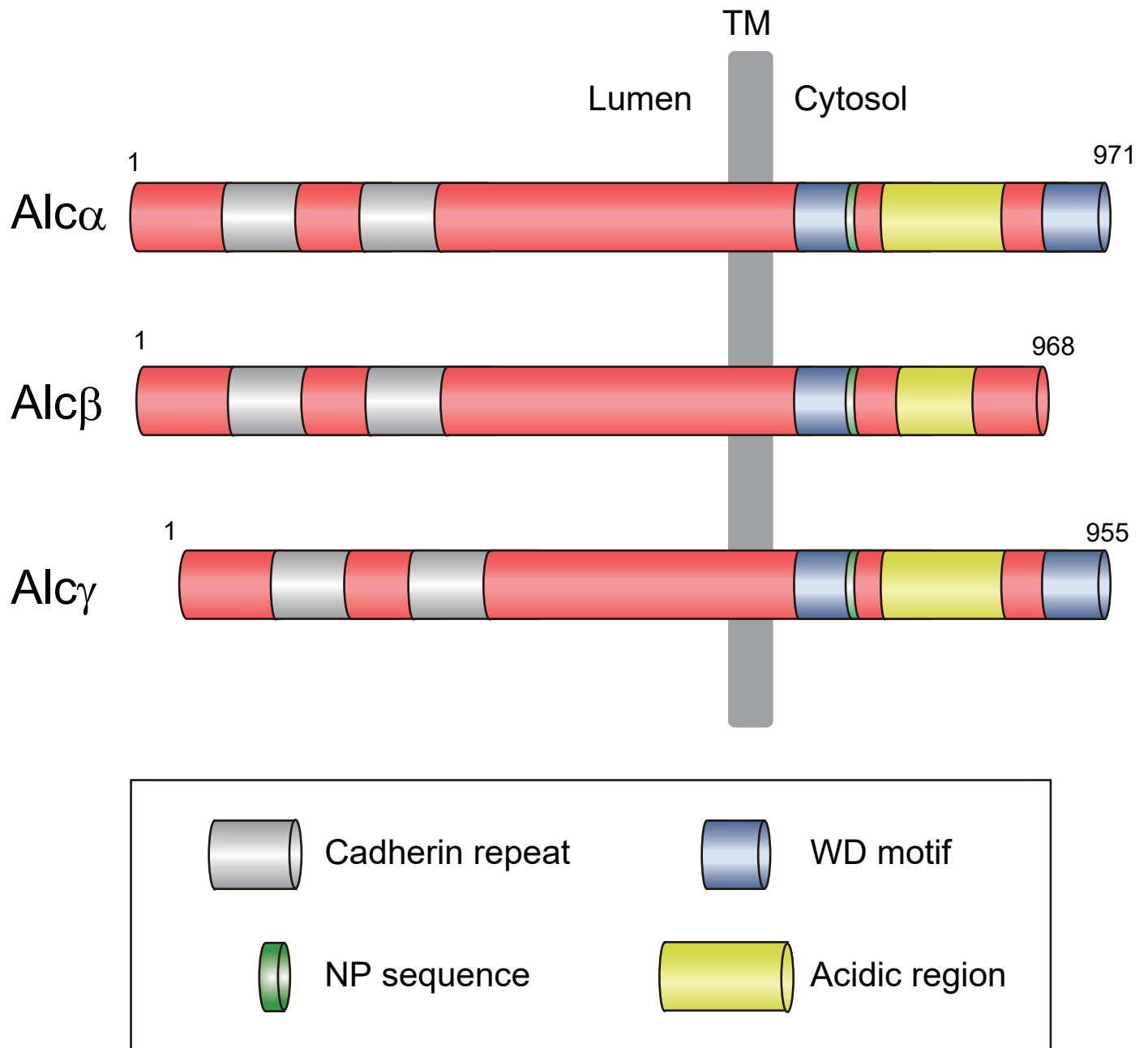
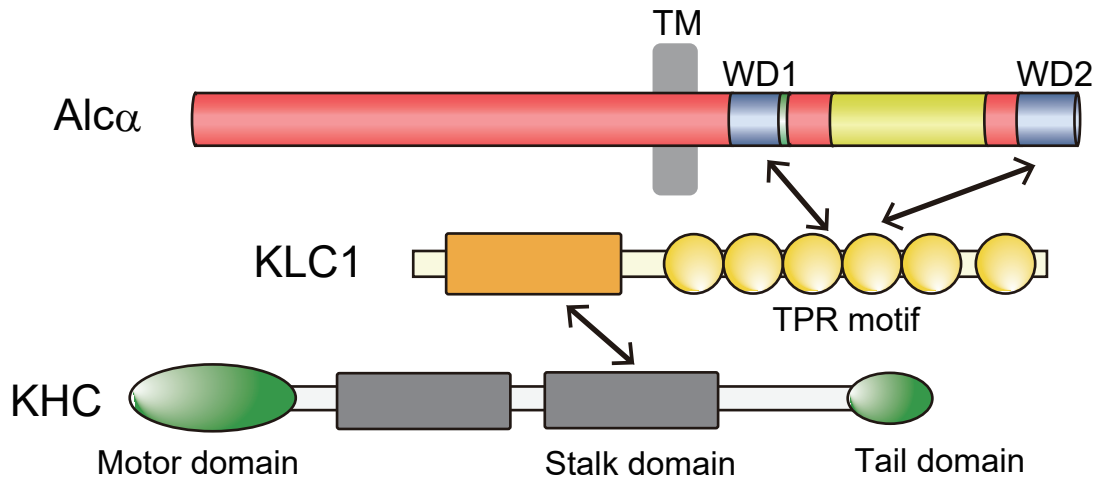


Fig.2 Alcadein(Alc) ファミリー

Alcadein は高度に保存された I 型の膜タンパク質であり、脊椎動物では Alcα、Alcβ、Alcγ の 3 つのファミリータンパク質から構成される。ここでは、ヒト Alc ファミリーの構造を示す。細胞外ドメインには 2 つの Cadherin リピート、細胞内ドメインには PTB 結合モチーフである NP 配列、Kinesin-1 結合モチーフである WD motif、酸性アミノ酸に富んだ Acidic region がファミリー間、種間で保存されている。(TM: Trans membrane)

A



B

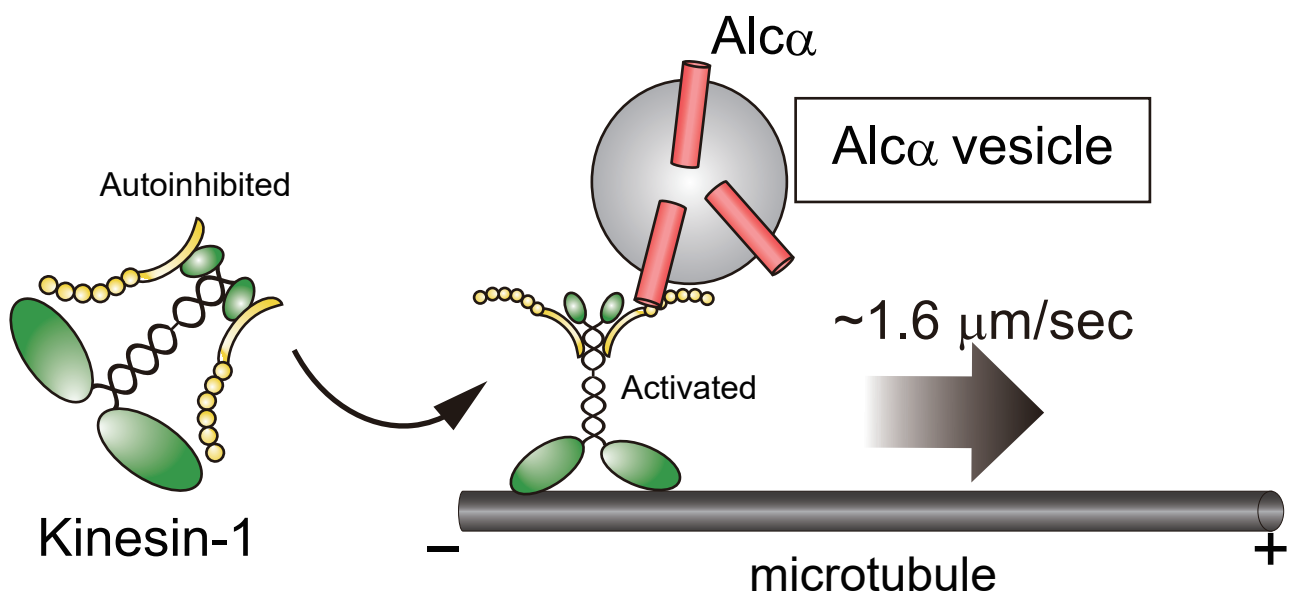


Fig.3 Alca と Kinesin-1 の結合

(A) Kinesin-1 は2分子の KLC(kinesin light chain)、2分子の KHC(kinesin heavy chain) からなるヘテロ四量体である。Alca は二箇所の WD モチーフにより KLC1 の TPR モチーフと 1:1 で結合する。
 (B) Kinesin-1 は輸送を行わない際には KLC と KHC モータードメインが近づいた Autoinhibition 状態にあるが、Alca が KLC に直接結合することで Kinesin-1 は活性化し、Alca 小胞を順行性に輸送する。

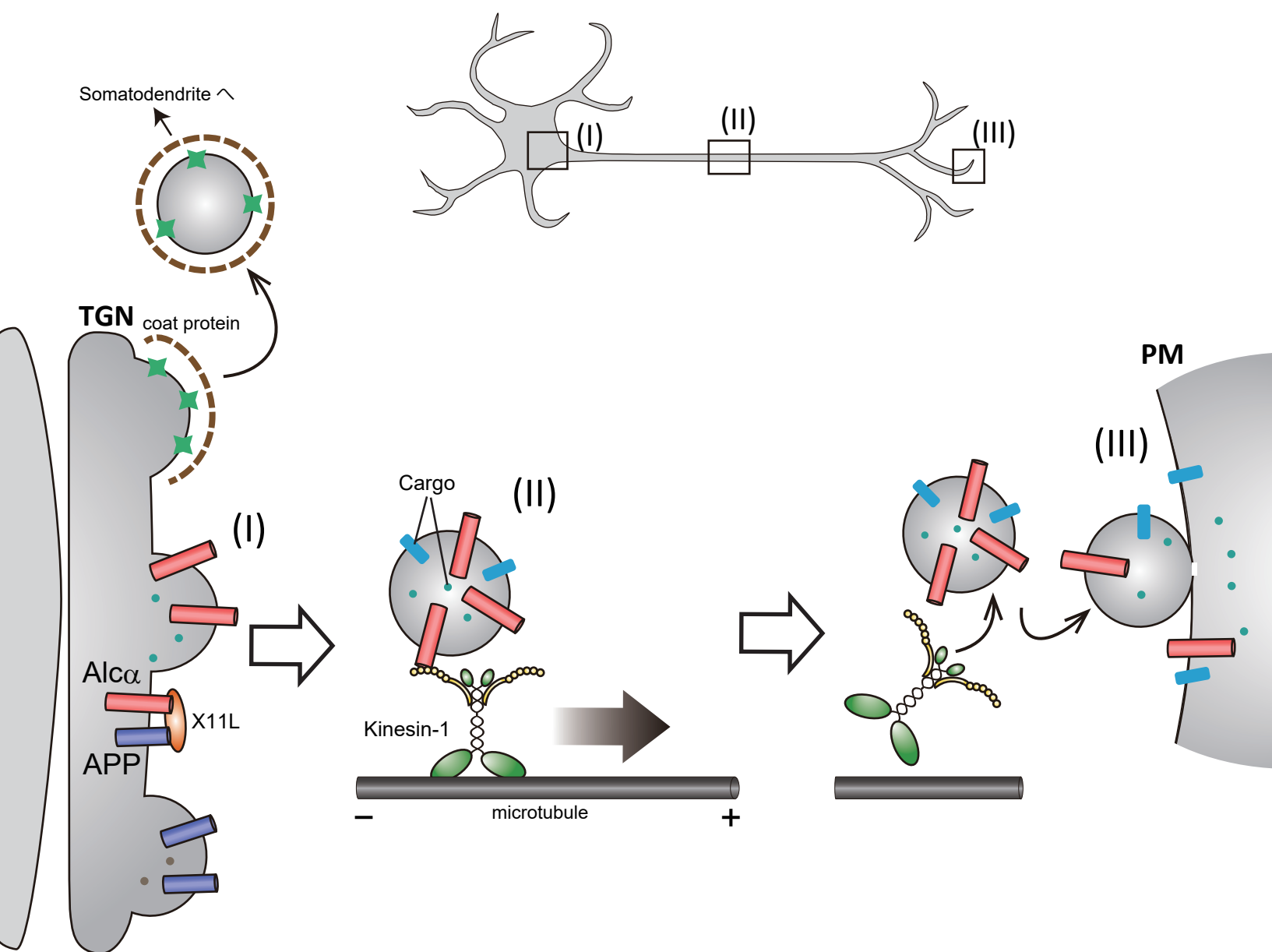


Fig.4 Alcα 小胞の神経軸索輸送

(I): Alcα の輸送小胞は Golgi 体において形成される。Golgi 体には Alcα と X11L を介して三量体を形成する APP やその他 Dendrite へ向けて輸送されるようなカーゴも存在するが、Alcα はそれらを含まない特異的な小胞を形成する。

(II): Alcα はカーゴ受容体として機能し、神経軸索上を小胞内に含まれるカーゴとともに Kinesin-1 により輸送される。

(III): Alcα 小胞が細胞膜と融合することで小胞内のカーゴは軸索末端に放出され、Alcα の機能を発現すると考えられる。(TGN: Trans Golgi Network, PM: Plasma membrane)

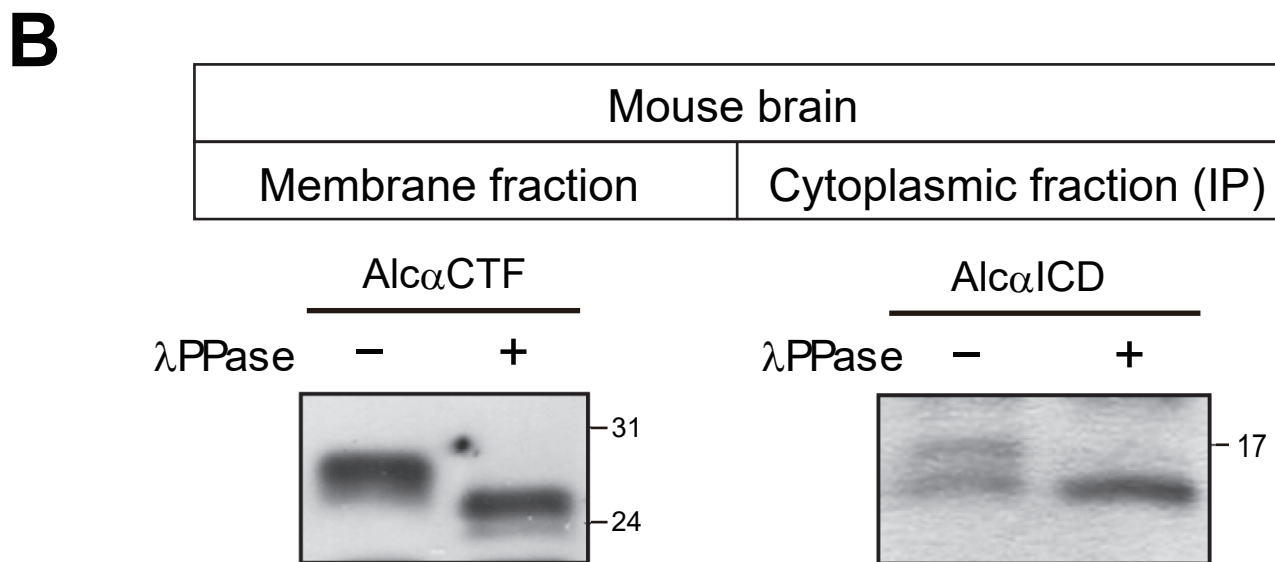
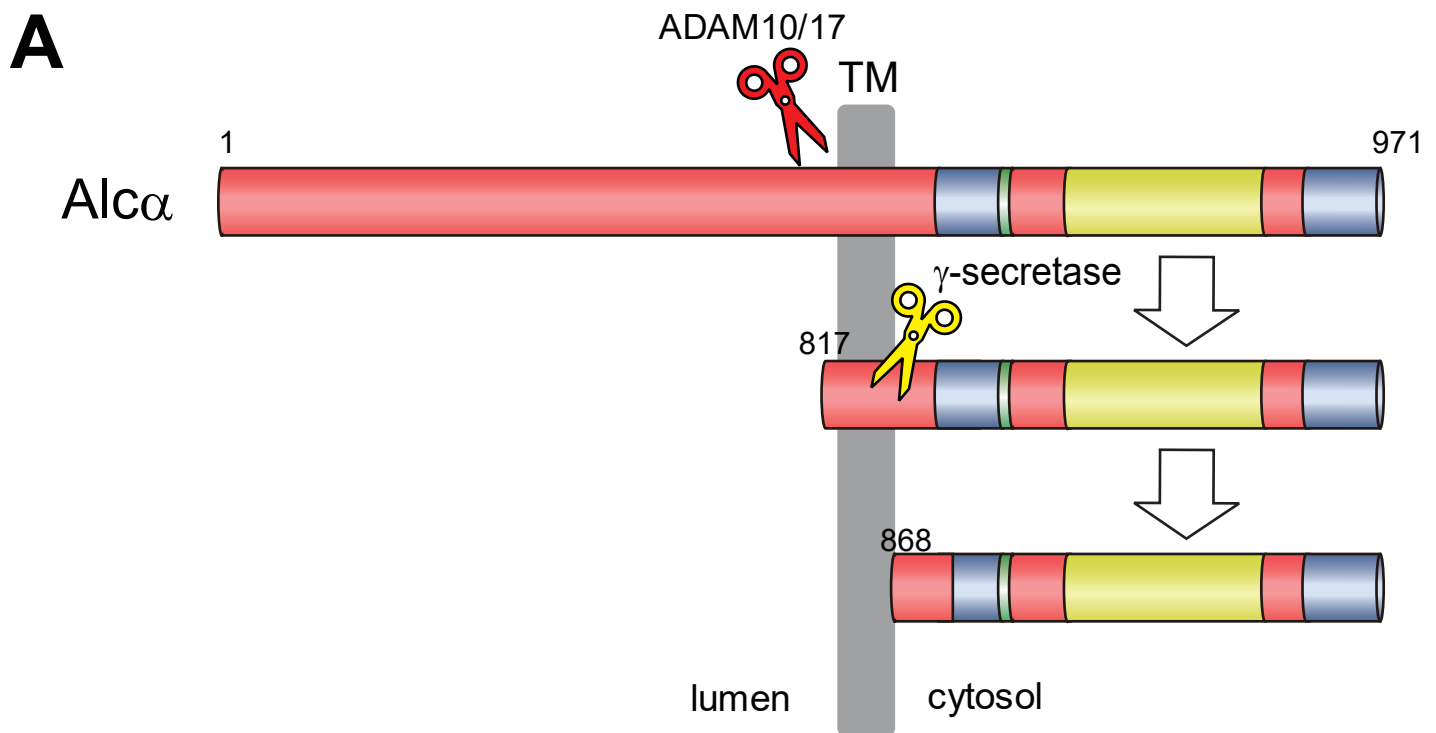
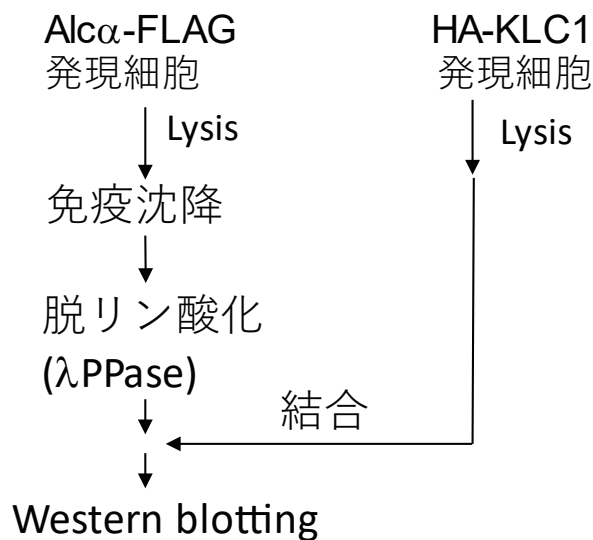
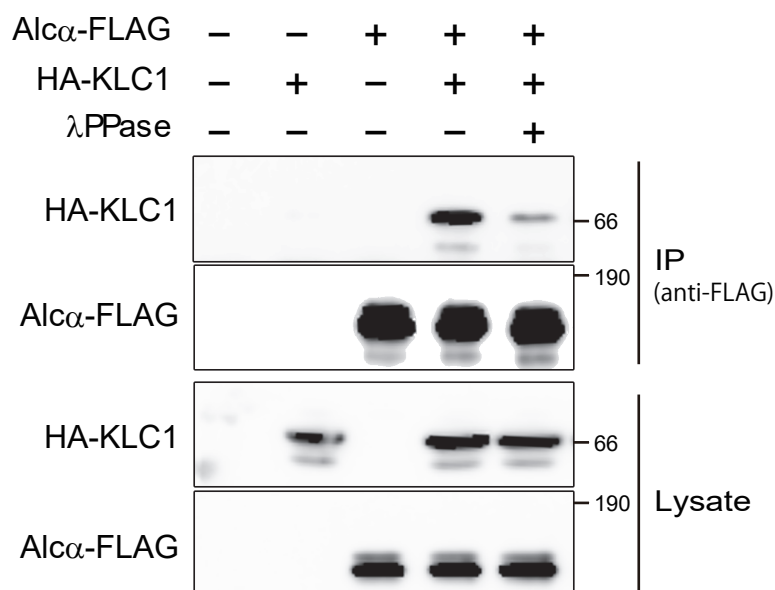
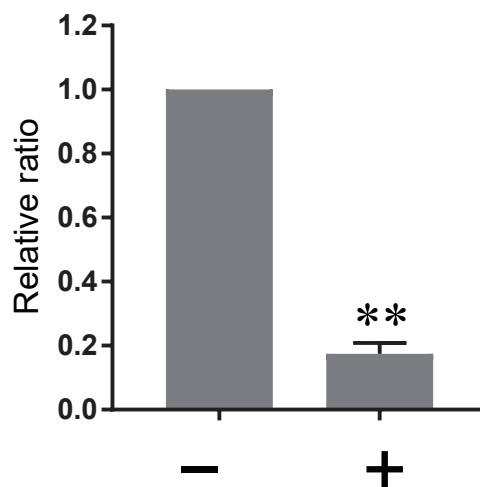


Fig.5 Aβ細胞質ドメインは In vivo でリン酸化修飾を受ける

(A) Aβ は細胞外ドメインの膜近傍で ADAM10/17 による切断を受け、膜上に AβCTF を残す。AβCTF は更に、膜内で γ-secretase による二段階目の切断を受け、細胞質中に AβICD を放出する。

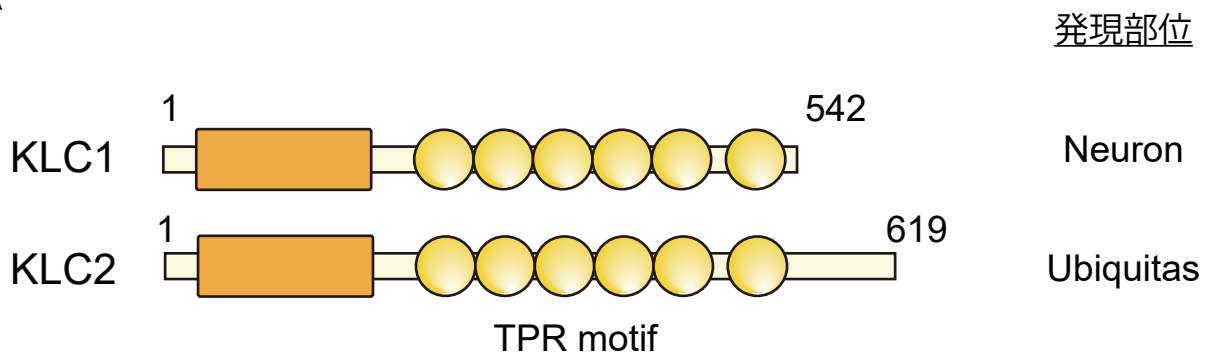
(B) マウス脳から膜画分、細胞質画分をそれぞれ調整した。λPPase による脱リン酸化処理 (+) または未処理 (-) の細胞膜画分 Lysate を Tris-Tricine 10%Gel により、細胞質画分から抗 Aβ 抗体により回収した免疫沈降物を Tris-Tricine 17.5% Gel により分離後、抗 Aβ 細胞質ドメイン抗体を用いた Western blotting により AβCTF、AβICD をそれぞれ検出した。

A**In vitro binding assay****B****KLC1 bound to Alcα****Fig.6 Alcαの脱リン酸化による KLC1 結合制御**

(A) In vitro 結合実験スキームを示す。Alcα-FLAG と HA-KLC1 を別々に N2a 細胞に発現させた後、HBS-T により Lysis した。Alcα-FLAG のみを抗 FLAG 抗体により免疫沈降 (IP) し、λPPase による脱リン酸化処理 (+) もしくは未処理 (-) 後、wash した後に HA-KLC1 発現細胞 Lysate を加えた。

(B) Alcα-FLAG の脱リン酸化による HA-KLC1 結合量を定量した。Alcα の脱リン酸化により KLC1 結合量は有意に減弱した (means ± SE, n = 3, **p < 0.01)。

A



B

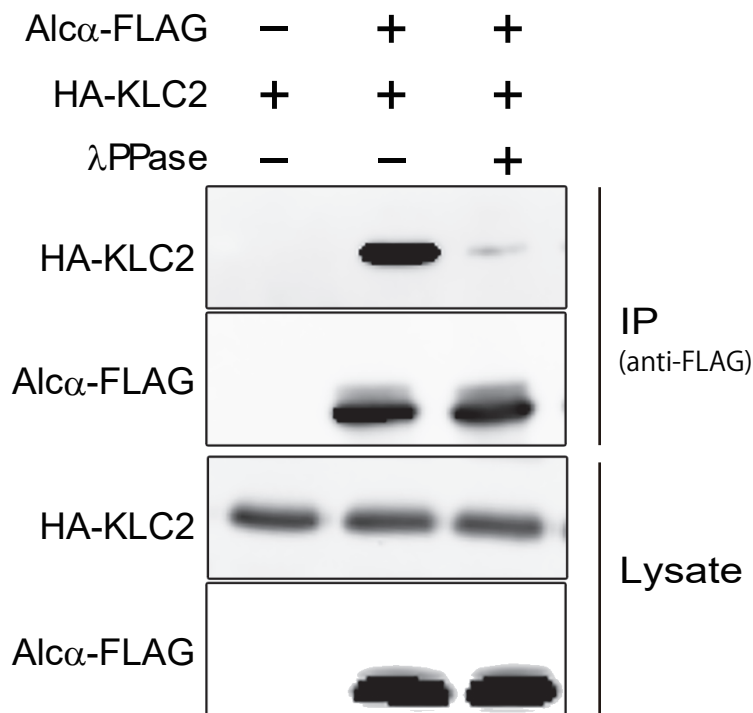


Fig.7 Alc α のリン酸化による KLC2 結合制御

(A) 神経細胞に発現する KLC アイソフォームの模式図と発現部位を示す。KLC1 と KLC2 は神経細胞にほぼ同量発現し、TPR motif を介して Alc α と結合する。

(B) Alc α -FLAG と HA-KLC2 の結合について *In vitro* 結合実験を行った。HA-KLC2 も KLC1 と同様に Alc α の脱リン酸化により結合量が減弱した。

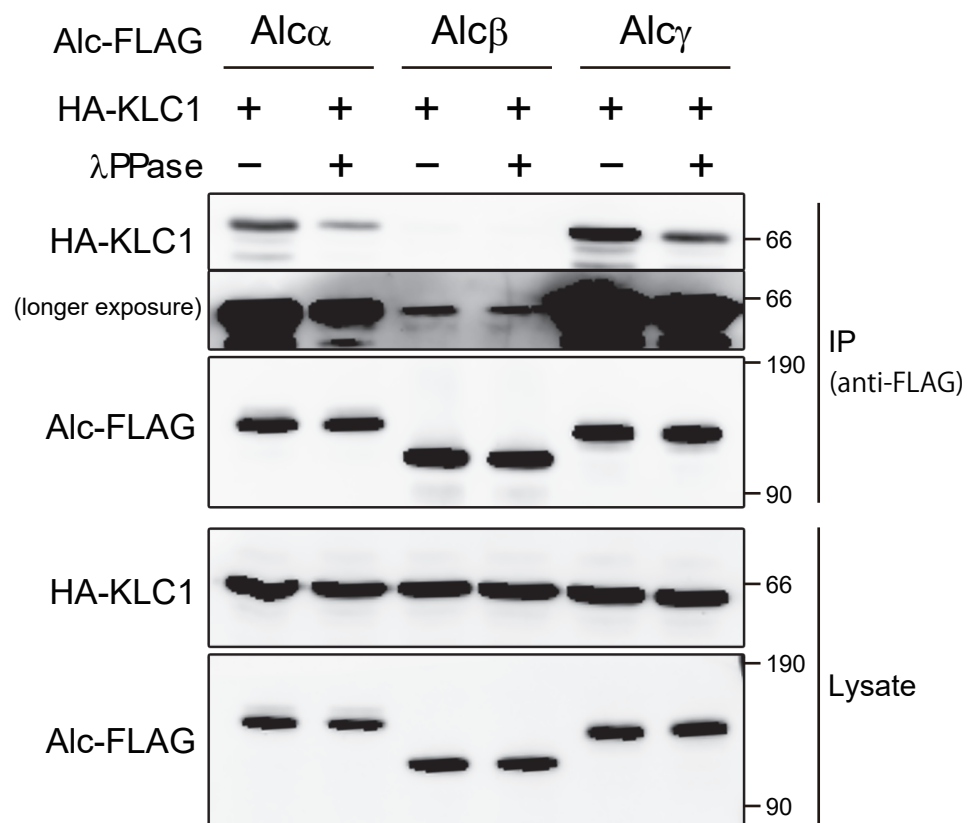
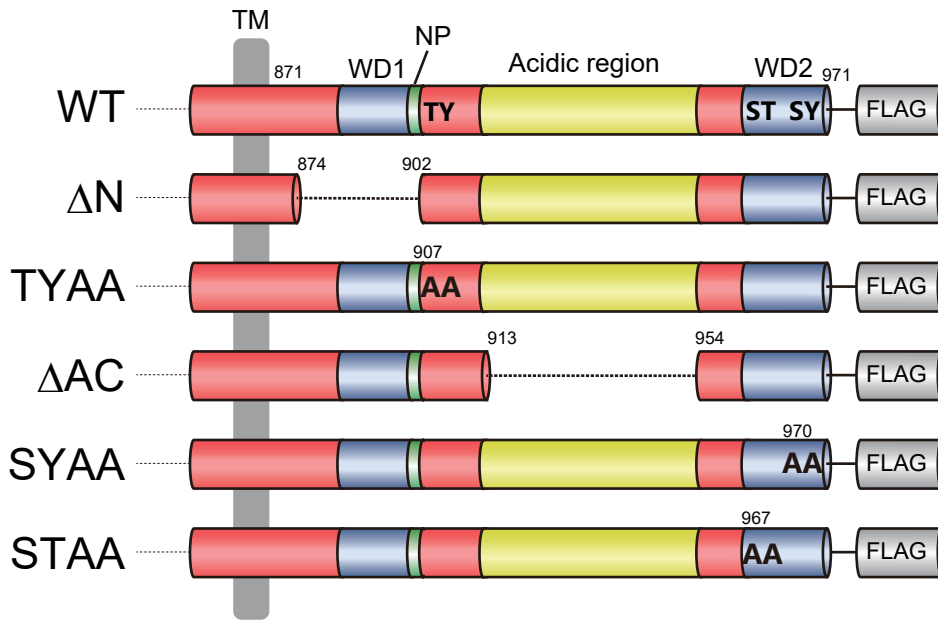


Fig.8 Alc ファミリーと KLC1 の結合とリン酸化による制御

Alc α -FLAG、Alc β -FLAG、Alc γ -FLAG のそれぞれについて *In vitro* 結合実験を行った。Alc β は WD motif が一箇所のみ存在し、KLC1 とは弱い結合を示す。2 つの WD motif を持つ Alc γ は Alc α と同様に KLC1 に結合し、脱リン酸化処理による結合減弱を示した。

A



B

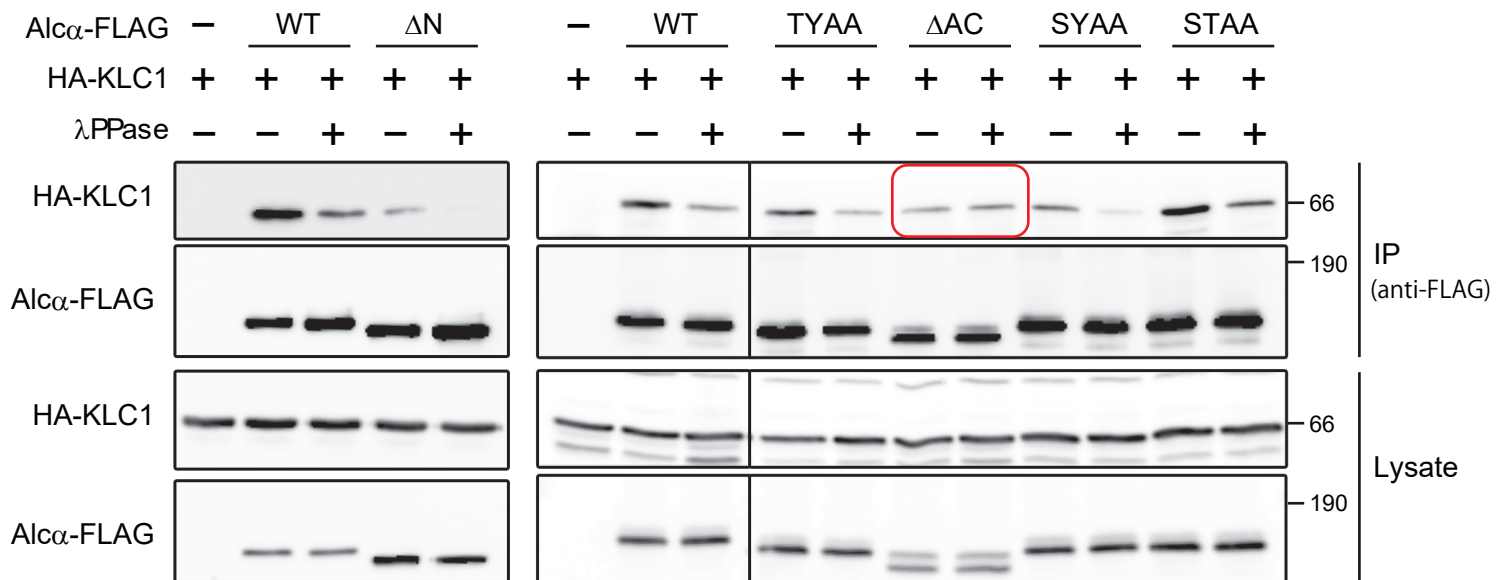
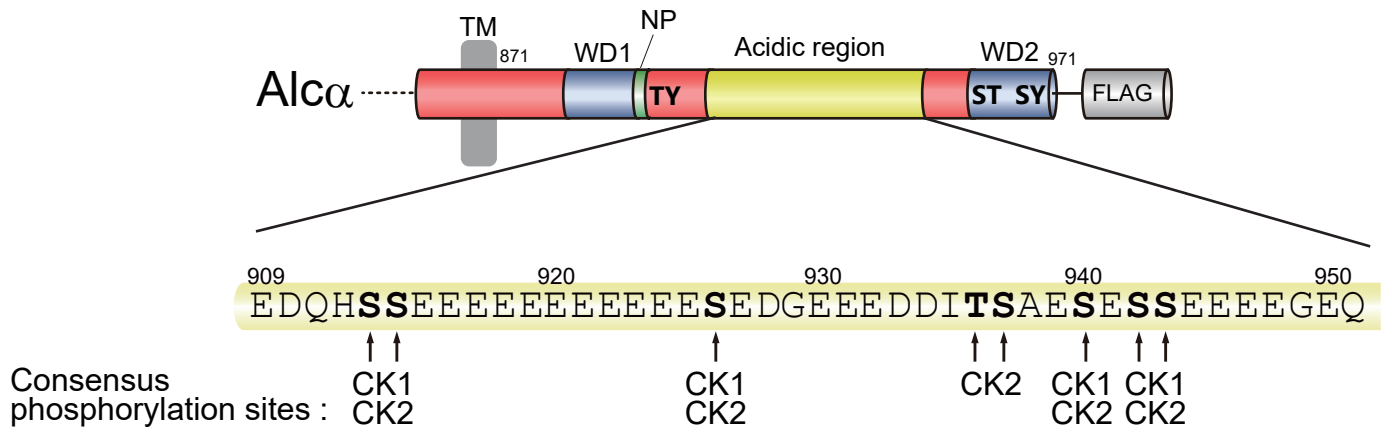


Fig.9 Alcα のリン酸化領域は Acidic region に存在する

(A) リン酸化領域の同定に使用した Alcα-FLAG の各種部分欠失体、Ala 変異体を示す。

(B) 各変異体と HA-KLC1 の *In vitro* 結合実験を行った。ΔAC を除く変異体において Alcα 脱リン酸化による結合減弱が観察され、ΔAC では結合減弱は見出されなかった (赤枠)。

A



B

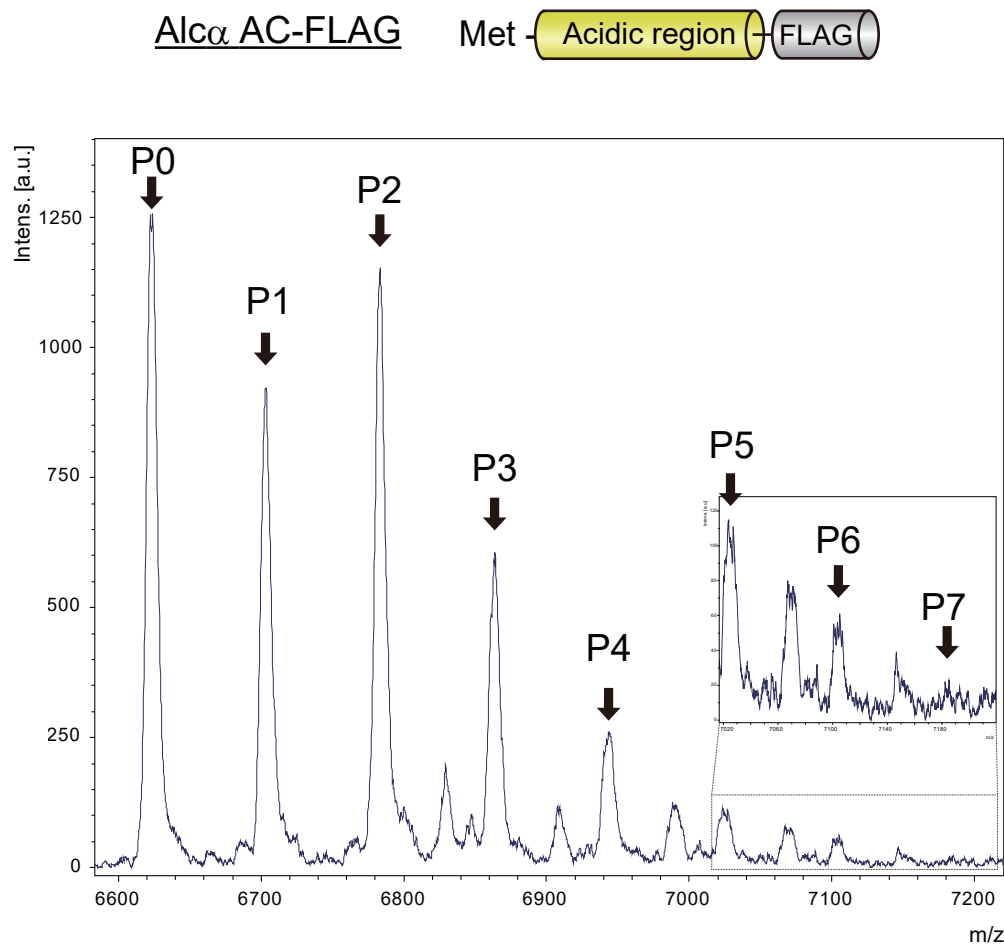
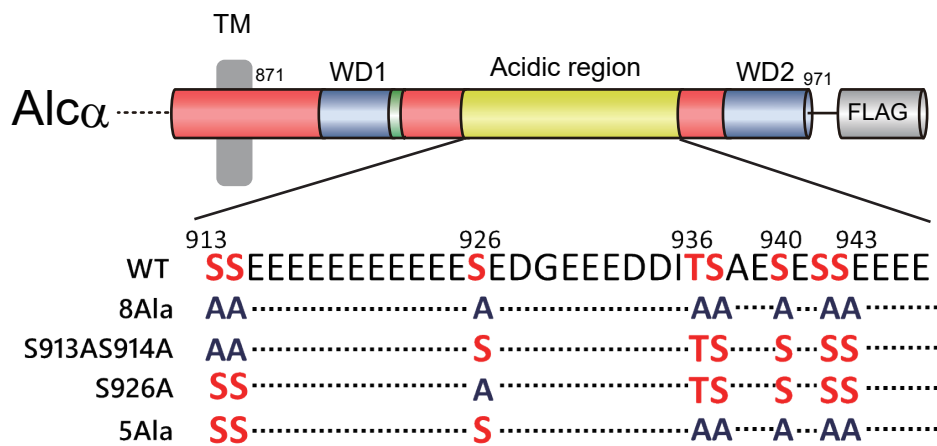


Fig.10 Alcα acidic region はリン酸化されうる

(A)Alcα Acidic region の配列とコンセンサス配列から予測されたリン酸化候補部位とそのキナーゼを示す。(CK1 : Casein kinase I, CK2 : Casein kinase II)

(B)Alcα AC -FLAG を N2a 細胞に発現後、抗 FLAG 抗体で精製後 MALDI-TOF/MS により解析した。非リン酸化ペプチドと 80Da の質量増加を示すリン酸化ペプチドを矢印で示す (P1~P7)。

A



B

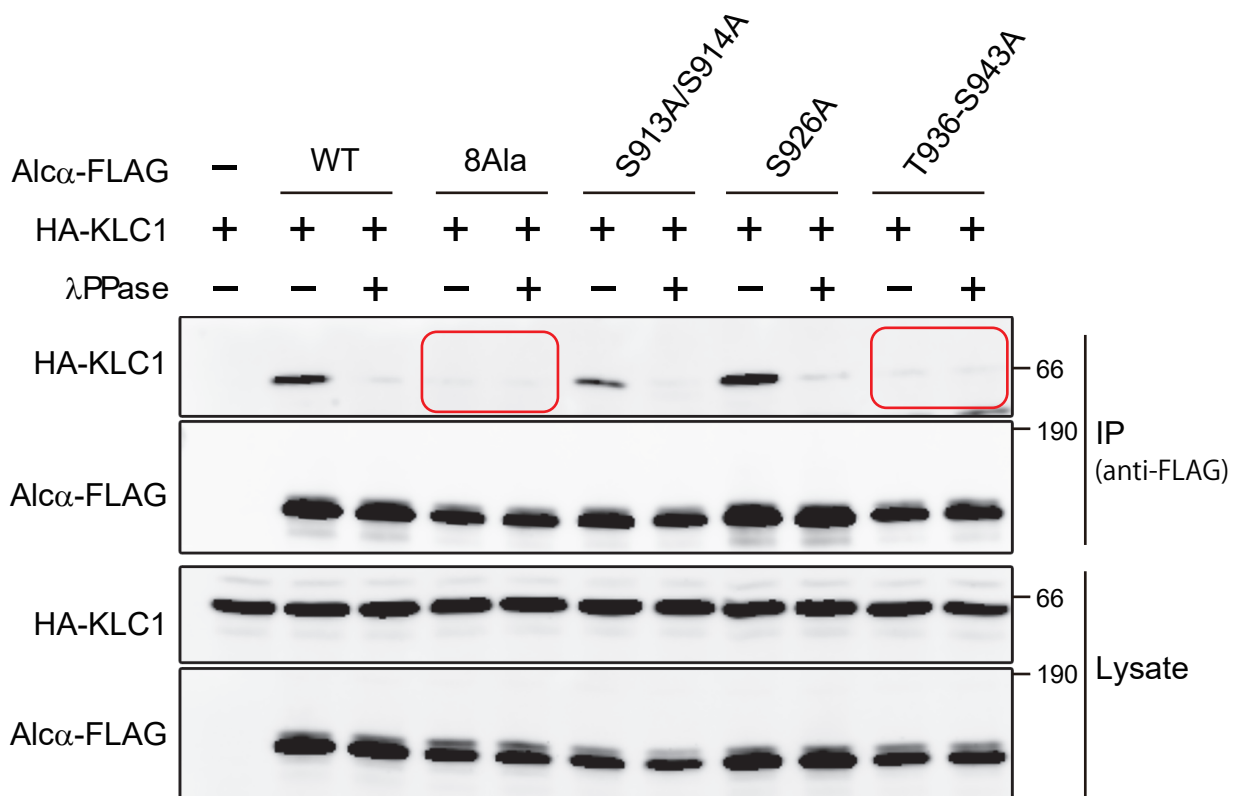
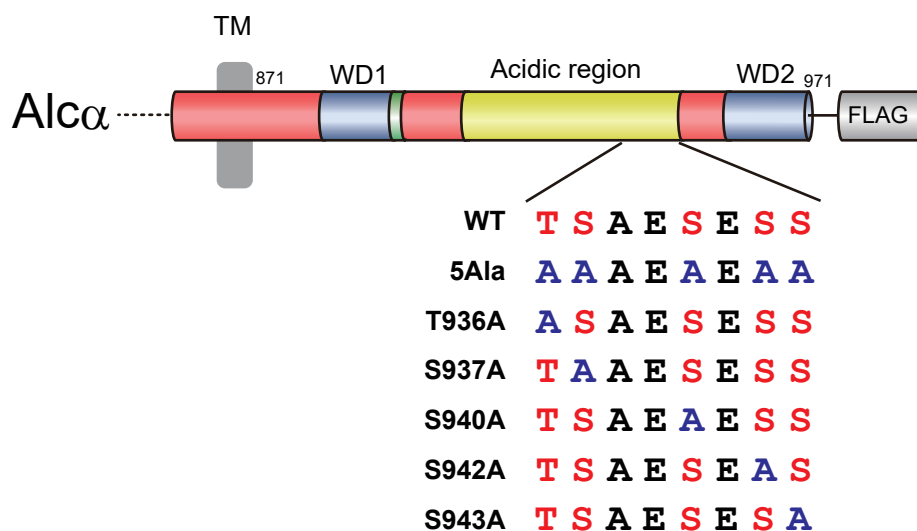


Fig.11 リン酸化部位は acidic region C 末端側の 5 残基中に存在する

(A) Acidic region 中の Thr、Ser を 3 つのグループに分け、含まれる全ての Thr、Ser を Ala に置換した Alcα-FLAG Ala 変異体を作成した。

(B) 作成した Alcα-FLAG Ala 変異体と HA-KLC1 について In vitro 結合実験を行った。S913/S914 または S926 の Ala 変異は WT と同様の結合減弱を示したが、Alcα8Ala、5Ala(赤枠)については結合量の減弱を示し、かつ λPPase による結合減弱を示さなかった。

A



B

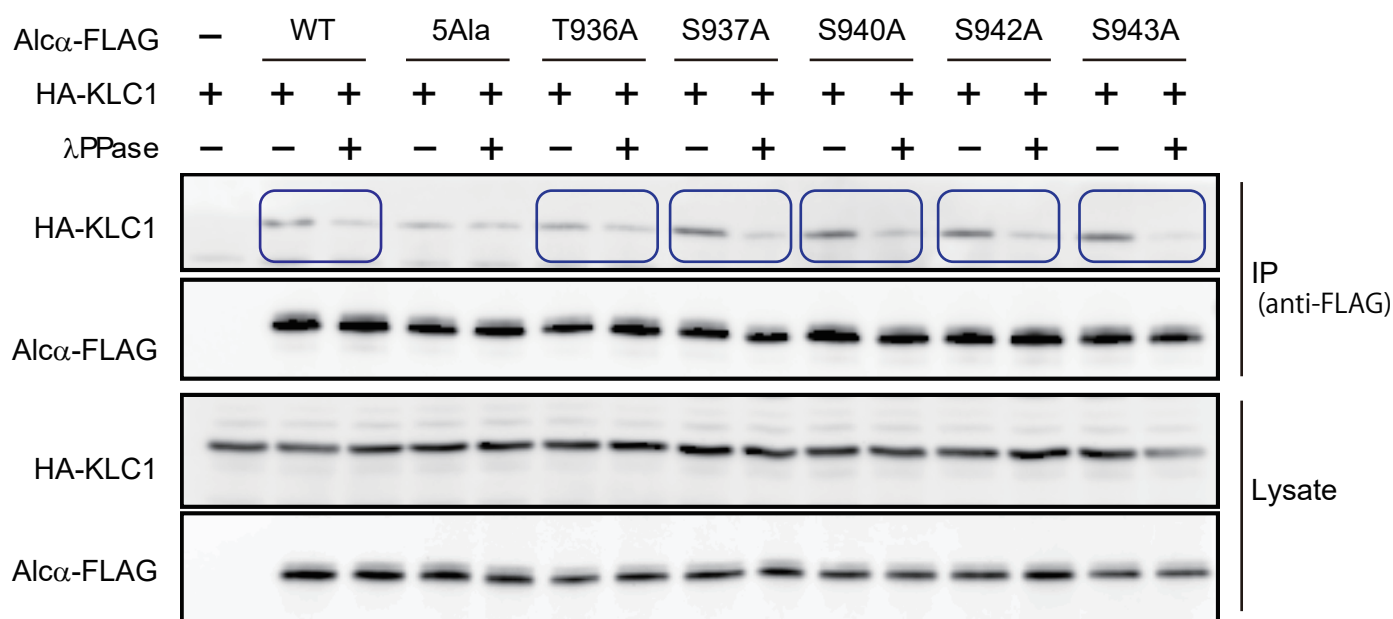
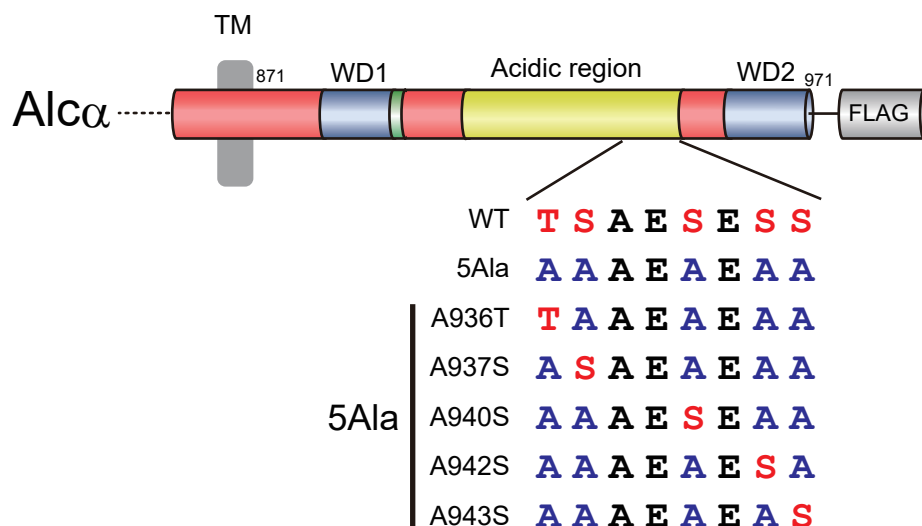


Fig.12 リン酸化部位は1残基のみではない

(A) Acidic region C 末端側の 5 残基のうち、1 残基ずつを Ala に変異させた Alcα-FLAG 変異体を作成した。

(B) 作成した Alcα-FLAG の 1 残基 Ala 変異体と HA-KLC1 について In vitro 結合実験を行った。5 残基全てを Ala に変異させた際は λPPase による結合減弱が観察されたのに対して、1 残基の Ala 変異は WT と同様に λPPase による結合減弱を示した (青枠)。

A



B

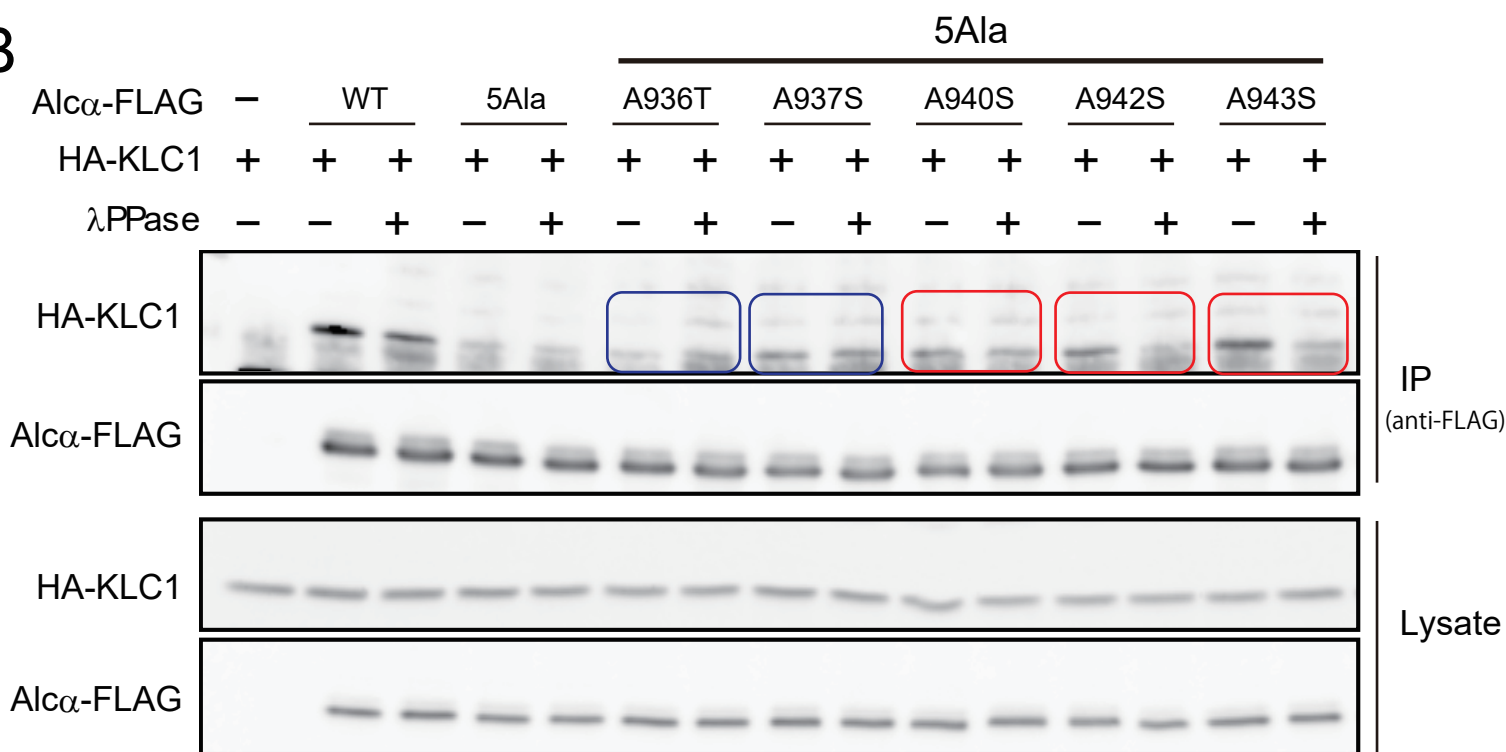
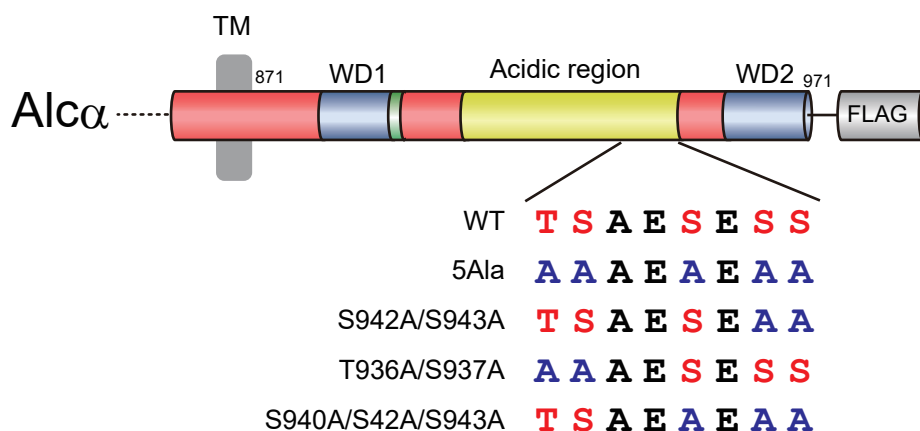


Fig.13 結合制御に関与するリン酸化部位候補の同定

(A) Acidic region C 末端側の 5 残基を全て Ala に変異させたものから、1 残基のみを Thr または Ser に回復させた Alcα-FLAG コンストラクトを作成した。

(B) 作成した Alcα-FLAG の 1 残基 Ala 変異体と HA-KLC1 について In vitro 結合実験を行った。T936 と S937 の回復時には KLC1 結合量の変化は見出されなかった (青枠)。S940、S942、S943 のうち 1 残基を回復させた場合では、KLC1 の結合変化が見出された (赤枠)。

A



B

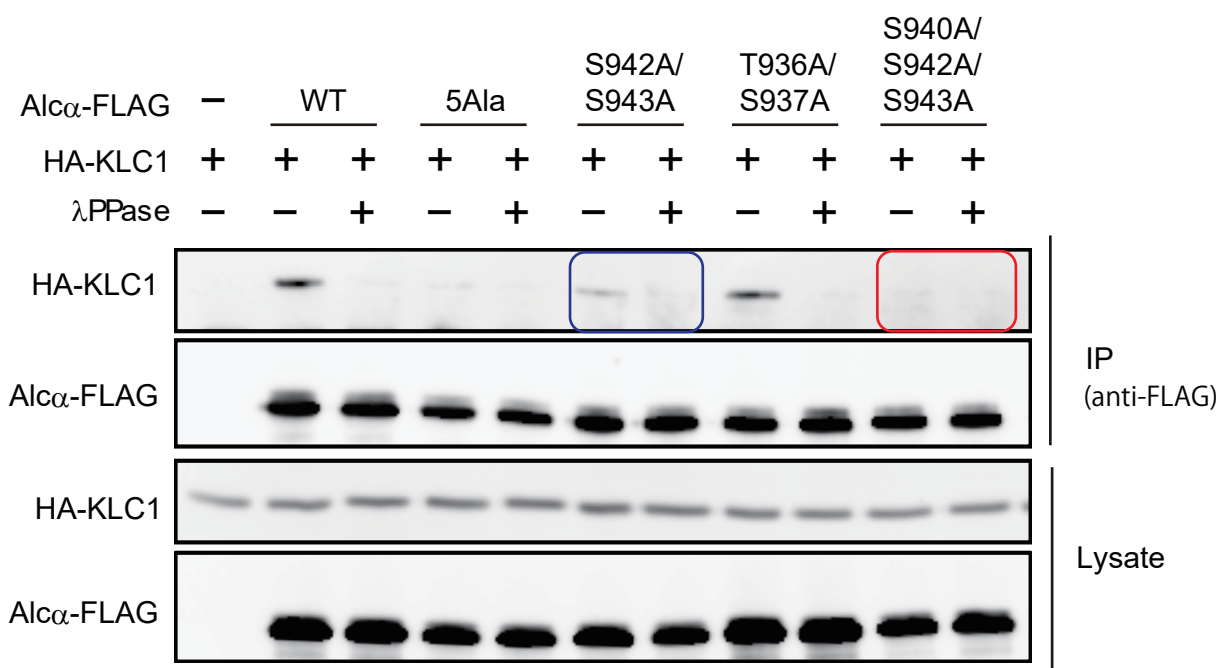
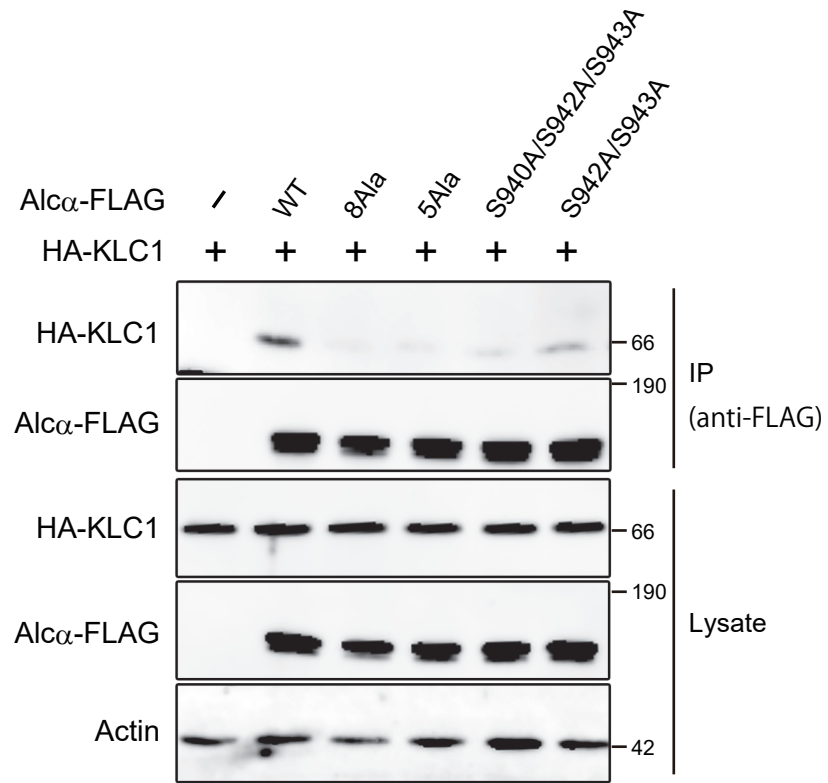


Fig.14 リン酸化による KLC1 結合制御には S940/S942/S943 が関与する

(A) Acidic region C 末端側の 5 残基のうち、Fig で同定した複数の Thr または Ser を Ala に変異させた Alcα-FLAG 変異体を作成した。

(B) 作成した Alcα-FLAG 複数残基の Ala 変異体と HA-KLC1 について In vitro 結合実験を行った。T936 と S937 の変異は KLC1 結合減弱を示した。S942/S943 の 2 残基の変異では KLC1 結合量の減弱が確認されたが、λPPase による結合減弱が観察された (青枠) のに対して、S940/S942/S943 の 3 残基の変異によって結合減弱は観察されなくなった (赤枠)。

A



B

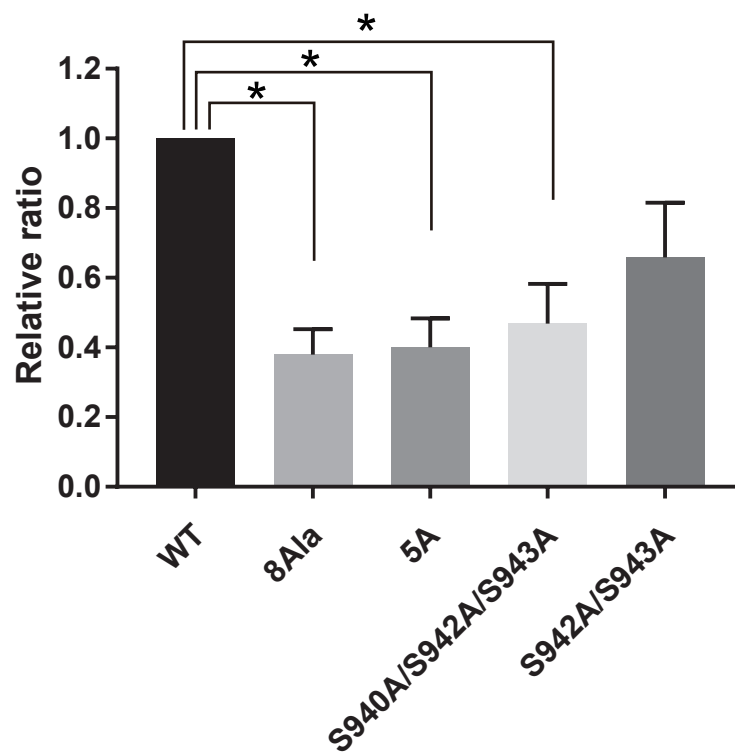


Fig.15 S940/S942/S943 3 残基の Ala 変異により KLC1 結合量が減少する

(A) 各種 Alcα-FLAG WT 及び Ala 変異体と HA-KLC1 を N2a 細胞に発現させた。細胞 Lysate から抗 FLAG 抗体により共免疫沈降することで Alcα に結合する HA-KLC1 を回収、Western blotting により解析した。

(B) 共免疫沈降された Alcα-FLAG に対する HA-KLC1 量を定量した。S940/S942/S943 3 残基の Ala 変異により HA-KLC1 結合量は有意に減弱した (means ± SE, n = 4, *p < 0.05)。

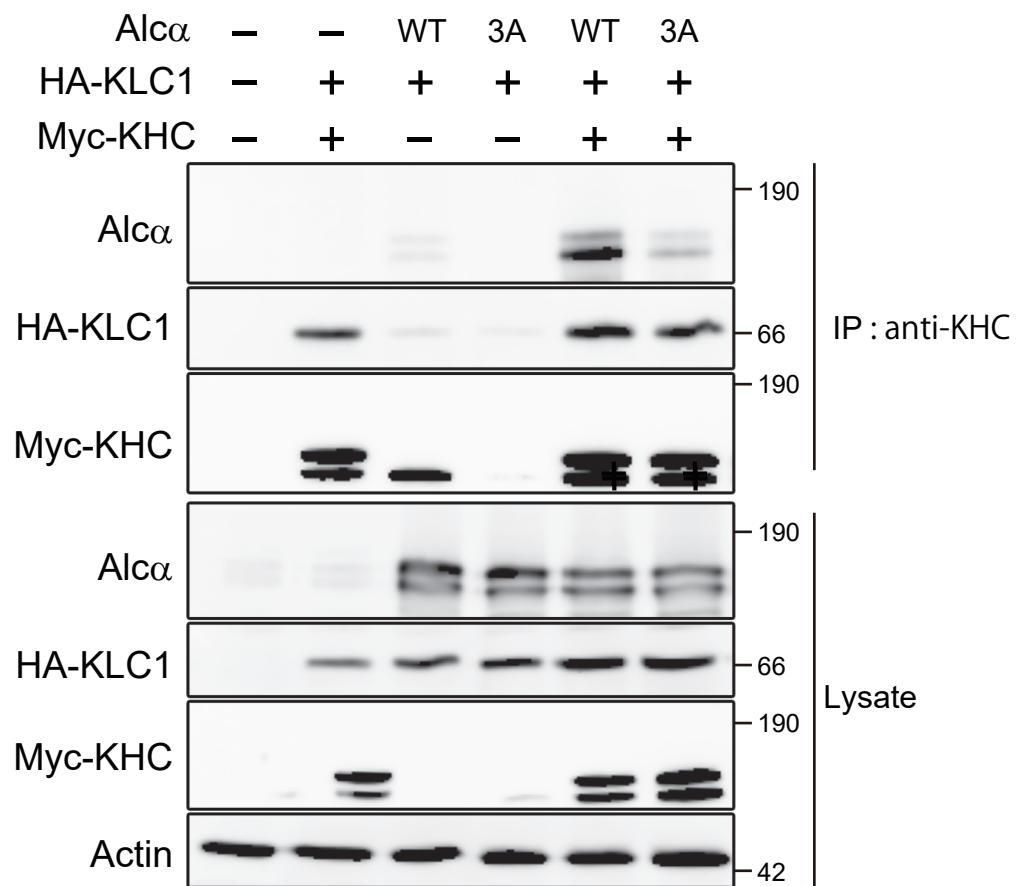


Fig.16 Kinesin-1 複合体への S940/S942/S943 による結合制御

(A) 各種 AlcαWT または Alcα3A に加えて HA-KLC1、muc-KHC を N2a 細胞に発現させた。細胞 Lysate から抗 KHC 抗体を用いて共免疫沈降することで、KHC に結合する HA-KLC1、Alcα を Western blotting により解析した。IP された HA-KLC1 量に変化は見られなかった。一方で、Alcα3A は WT に比べて結合量の減弱が観察された。

A

Human Alca α

human Aica 940 942/943
891-MDWDDSSALTIITVNPMEITYEDQHSSEEEEEEEEEEESEDGEEEDDITSAESSESEEEEEGEOGDPQNATRQQQLWDDSTLSY-971

Human Alc γ

874-MDWDDSAITITVNPMEKHGEPGHGEDETEGEEEEAAEEEMSSSSGSDDEEEEEEEGMGRGRHGQNGARQAQLEWDDSTLPY-955

Mouse/Rat Alcα

901-MDWDDSAITITVNPMEITYEDQHSSEEEEEEEEEEESEDGEEEDITSAESSESEEEEGGPGDGQNATROLEWDDSTLSY-979

Mouse/Rat Alc γ

872-MDWDDSA¹LT²VPMEKHEGPGHG³ED⁴ETEGEEEEAA⁵EGMSSSSSGSDD⁶SEEEEEEGMGRVRH⁷GQSGTSSQ⁸RPERSTWNTAGVINIW⁹K-955

Zebra fish $\text{Alc}\alpha$

ebra lish Alca

902-MDWDDSSALTITVNP⁹⁵⁰MET^{952/953}YEDQHSS⁹⁵⁰EEEG^{952/953}D⁹⁵⁰EEEE^{952/953}ES⁹⁵⁰ED^{952/953}GEE⁹⁵⁰ED^{952/953}ITS⁹⁵⁰AE^{952/953}SD⁹⁵⁰SE^{952/953}DE⁹⁵⁰AGE^{952/953}QED⁹⁵⁰QOG^{952/953}SS⁹⁵⁰RQ^{952/953}QQL⁹⁵⁰EWDD^{952/953}STLT⁹⁵⁰Y-801

Zebra fish $Alc\gamma$

862-MDWDNSNLNSIEGTQIAEEVREEEPEDDEDEDEDDLAGDLSSAESEDSDEDEETNIQKGKVKGKLEWDPSTLPY -937

B

D. melanogaster Alcadein

892- LIWDDSA**L**TI**T**IN**P**MQAVTSDA**S**SE**S**ENSE**S**E**D**E**E**VALKDGFT**H**IN**Q**L**E**WDNSNIF**Q**Q -979

C. elegans Alcadein

921-MHWDDSGMNI TVNPLDDVEKNGGI DEFSDEEEEEETDGESECSYRDEEDDVSEDEEDQTEVLPHLDANQQRVVGGL EWDDDAISTNARSYRV-983

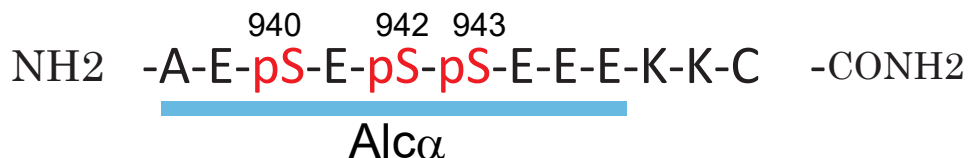
Fig.17 hAlc α S940/S942/S943 は脊椎動物間で保存されている

(A) Human, Rat/mouse, zebrafish の $\text{Alc}\alpha$ 及び $\text{Alc}\gamma$ の細胞質ドメインの一次構造を WD motif (緑)、NP 配列 (青)、Acidic region (赤) で示す。Human $\text{Alc}\alpha$ の S940/S942/S943 は Rat/mouse、zebrafish の $\text{Alc}\alpha$ でも保存されている (S950/S952/S953、太字)。 $\text{Alc}\gamma$ 中の配列のうち、Acidic region 中に含まれる Thr/Ser に下線を付した。

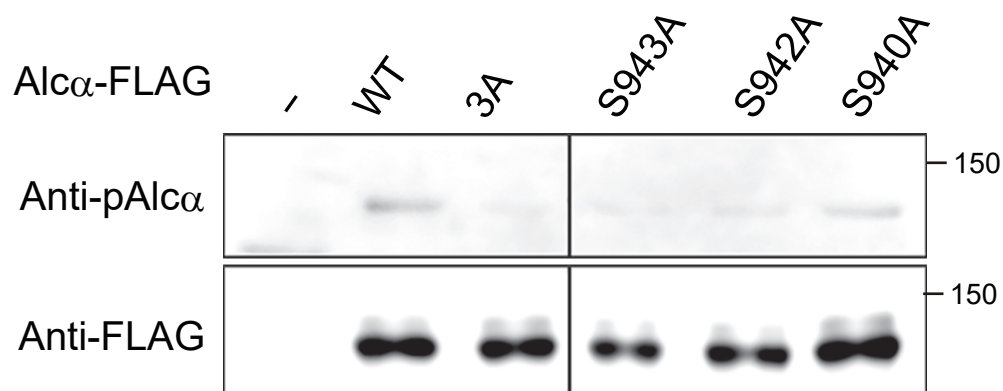
(B) *Caenorhabditis elegans* および *Drosophila* の Alc の一次構造を示す。2つの WD motif と Acidic region 中の Thr、Ser が存在する。

A

Antigen



B



C

Mouse brain

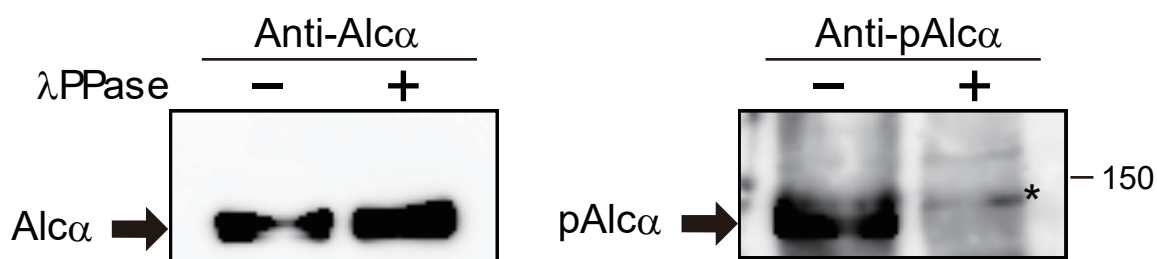


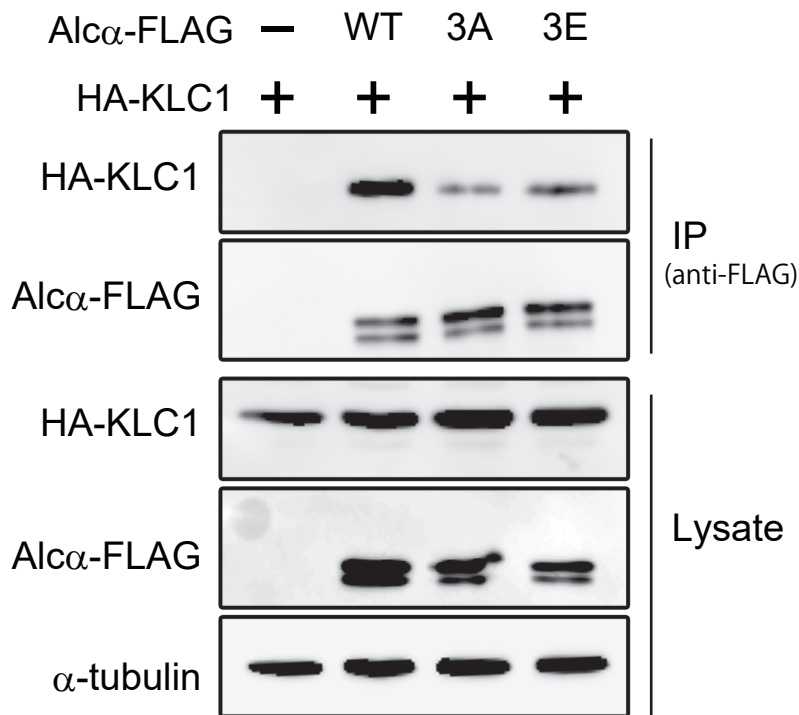
Fig.17 In vivo における S940/S942/S943 のリン酸化の検出

(A) リン酸化特異抗体に使用した抗原を示す。S940/S942/S943 がリン酸化された Alcα ペプチド (A938-E946 of Human Alcα) を用いてウサギポリクローナル抗体を作成した。

(B) N2a 細胞に発した各 Alcα-FLAG を抗 FLAG 抗体により免疫沈降し、抗体のリン酸化部位特異性を確認した。抗 FLAG 抗体および精製したリン酸化特異抗体を用いて Western blotting により各 Alcα-FLAG を検出した。

(C) マウス脳 Lysate から抗 Alcα 抗体を用いて Alcα を濃縮し、Western blotting により解析した。精製リン酸化抗体により λPPase により消失する、リン酸化 Alcα が検出できた。(*: non-specific)

A



B

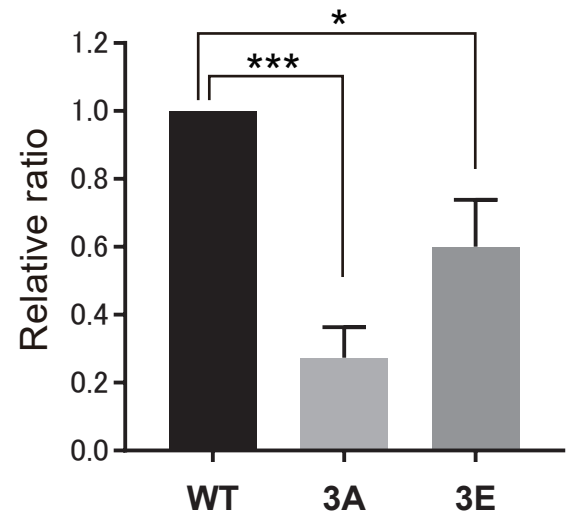


Fig.19 S940/S942/S943 の Glu 変異はリン酸化状態を模倣しない

(A) 各種 Alcα-FLAG WT、3A(S940A/S942A/S943A) または 3E(S940E/S942E/S943E) 変異体と HA-KLC1 を N2a 細胞に発現させた。細胞 Lysate から抗 FLAG 抗体により共免疫沈降することで Alcα に結合する HA-KLC1 を回収、Western blotting により解析した。

(B) 共免疫沈降された Alcα-FLAG-FLAG に対する HA-KLC1 量を定量した。3 残基の Ala 変異および Glu 変異のどちらにおいても HA-KLC1 結合量は有意に減弱した (means $\pm$ SE, $n = 5$, *** $p < 0.005$, * $p < 0.05$)。

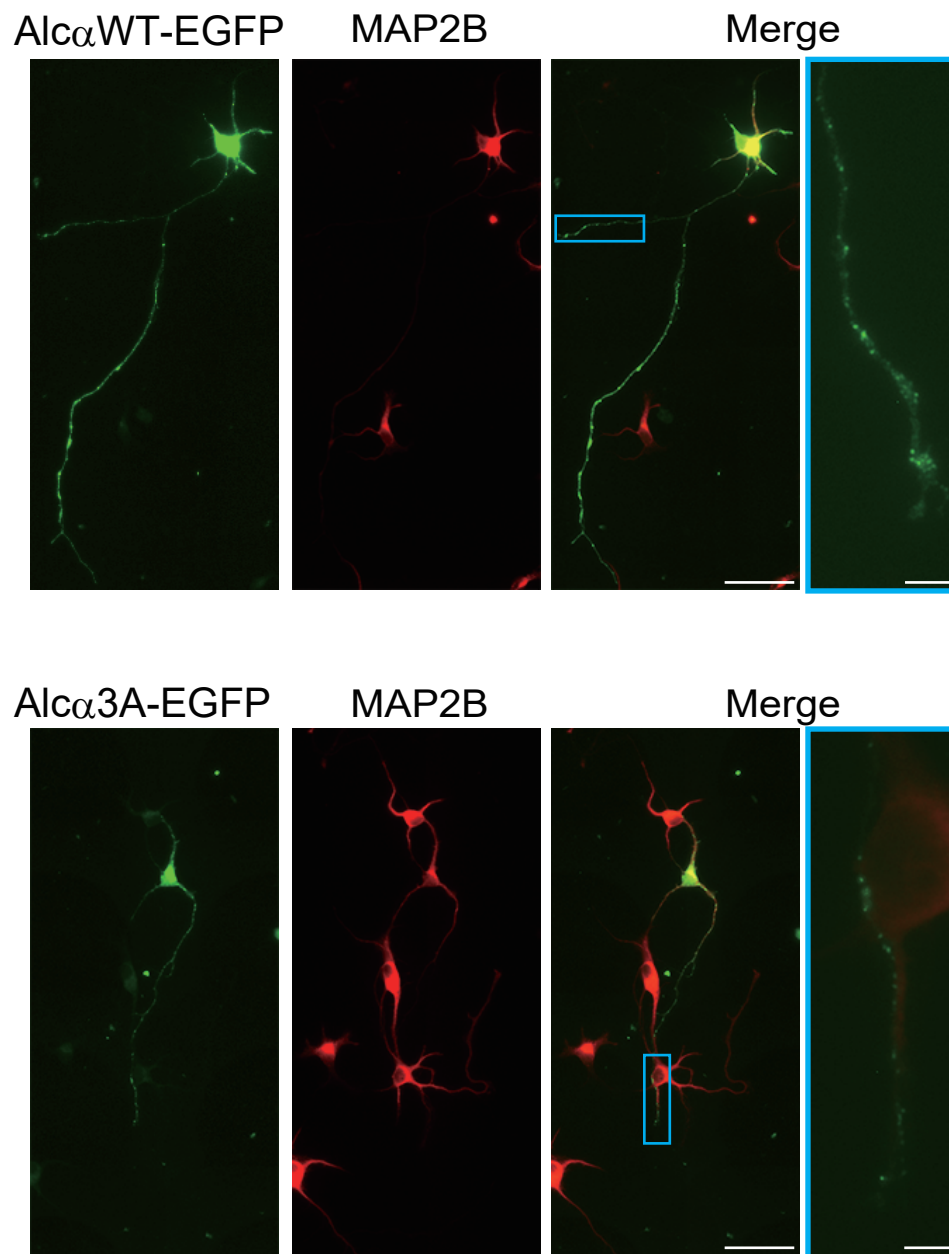


Fig.20 Alcα3A(S940A/S942A/S943A) の神経細胞内の局在

Alcα-EGFP または Alcα3A-EGFP をマウス大脳皮質初代培養神経に発現させ、時間後に固定した。樹状突起のマーカーである MAP2B を免疫染色により検出した。軸索末端を拡大した図を右端に示し、AlcαWT-EGFP、Alcα3A-EGFP のどちらにおいても軸索末端で Alcα 小胞が存在することが確かめられた。(scale bar : 50 μm、拡大図 : 5 μm)

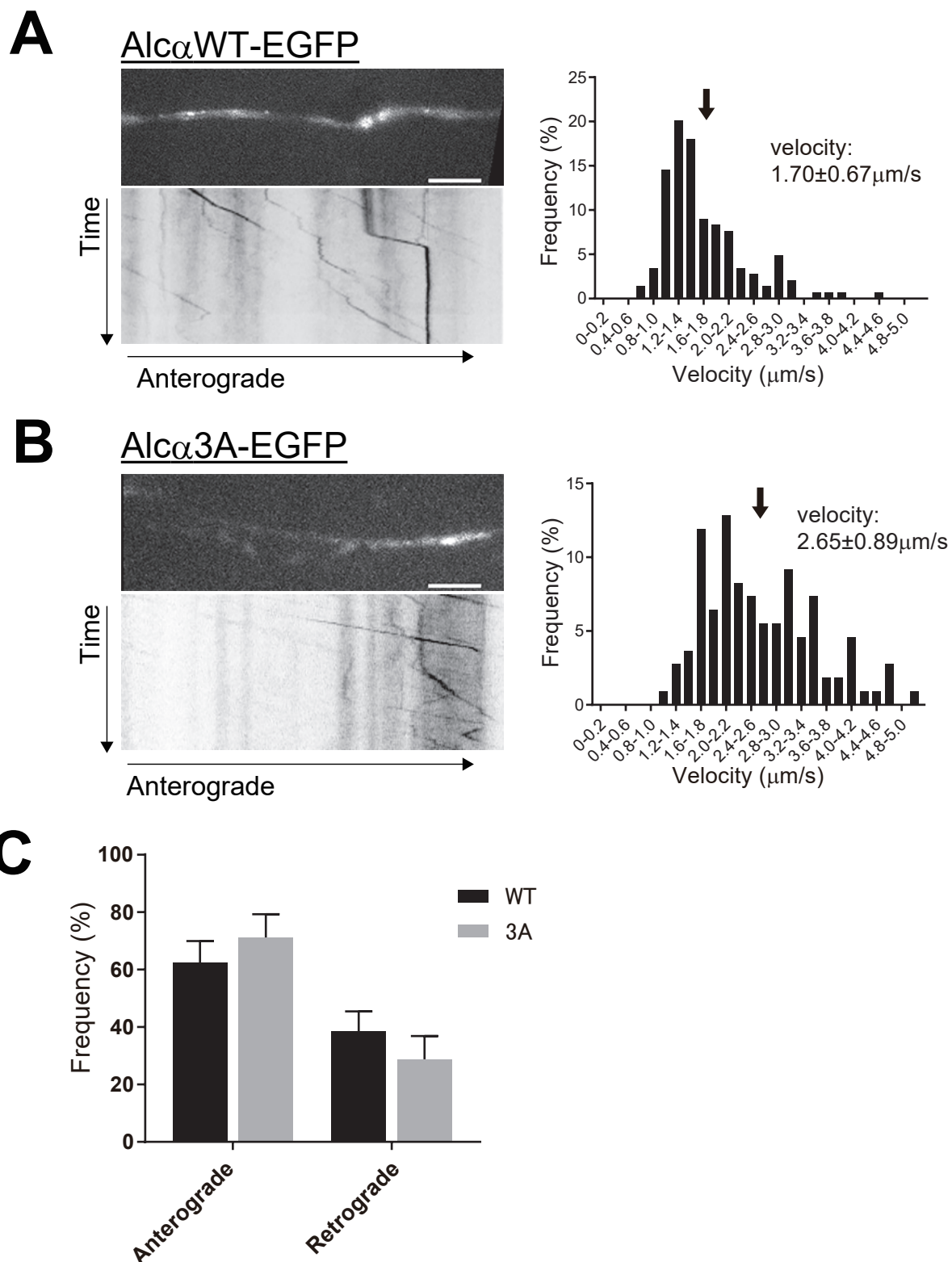
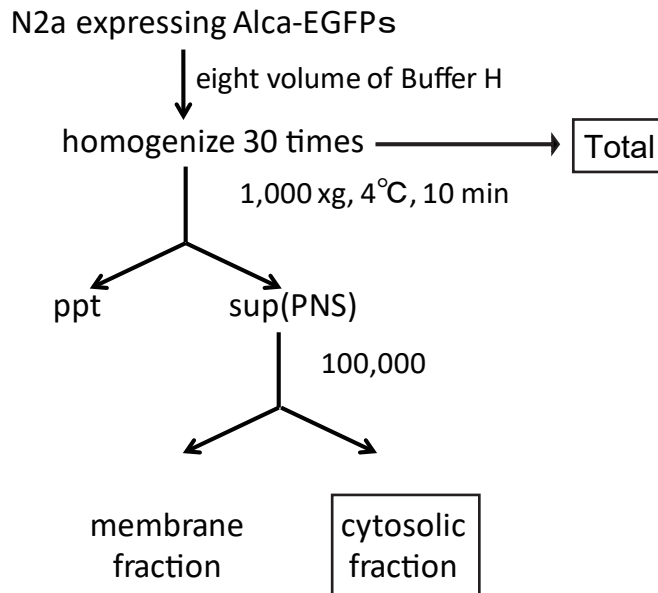
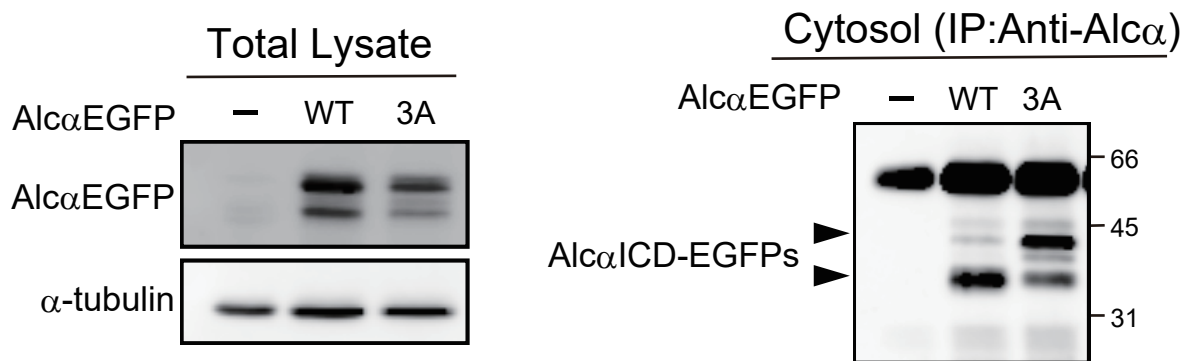
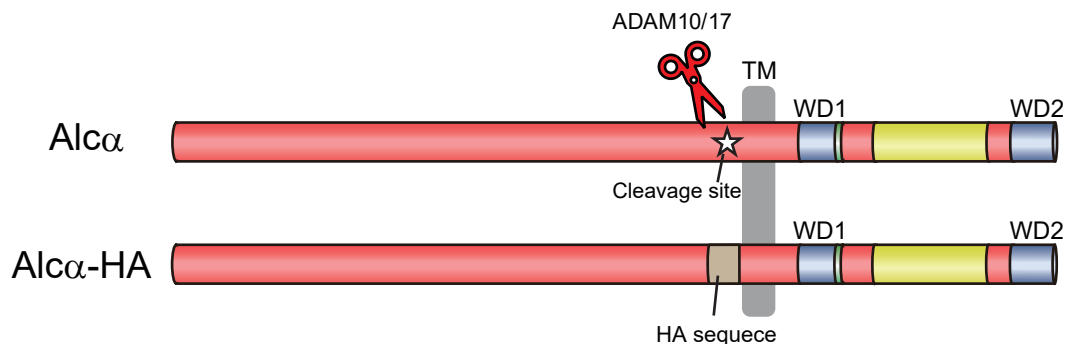


Fig.21 Alc α の 3A 変異による軸索輸送速度の変化

(A)Alc α -EGFP をマウス大脳皮質初代培養神経細胞に発現させ、軸索中の小胞輸送を全反射顕微鏡により観察した。左：神経軸索と輸送小胞の軌跡を描いた Kymograph を示す。右：輸送小胞の速度分布と平均速度を矢印で示す (mean $\pm$ SD, n= 144, scale bar : 5 μm)。

(B)Alc α 3A-EGFP をマウス大脳皮質初代培養神経細胞に発現させ、軸索中の小胞輸送を全反射顕微鏡により観察した。左：神経軸索と輸送小胞の軌跡を描いた Kymograph を示す。右：輸送小胞の速度分布と平均速度を矢印で示す (mean $\pm$ SD, n= 109, scale bar : 5 μm)。

(C)Alc α WT-EGFP と Alc α 3A-EGFP のそれぞれの輸送小胞について、輸送方向の割合を示す。
(mean $\pm$ SE, WT : n= 20, 3A: n= 21)

A**B****C****Fig.22 Alcα3A の ICD-EGFP**

(A) Alcα-EGFP または Alcα3A-EGFP を N2a 細胞に発現させ、細胞質画分を分画した方法を示す。

(B) N2a の Total Lysate から全長 Alcα-EGFP を、細胞質画分から抗 Alcα 抗体により免疫沈降することで AlcαICD-EGFPs を、それぞれ Western blotting により検出した。検出された二種類の AlcαICD-EGFP を矢頭で示す。Alcα3AICD-EGFP は WT とは異なる存在量、ICD 種の比率を示した。

(D) ADAM10/17 による切断サイトを含む領域を HA sequence で置換した、AlcαICD を産生しない Alcα-HA の模式図を示す。

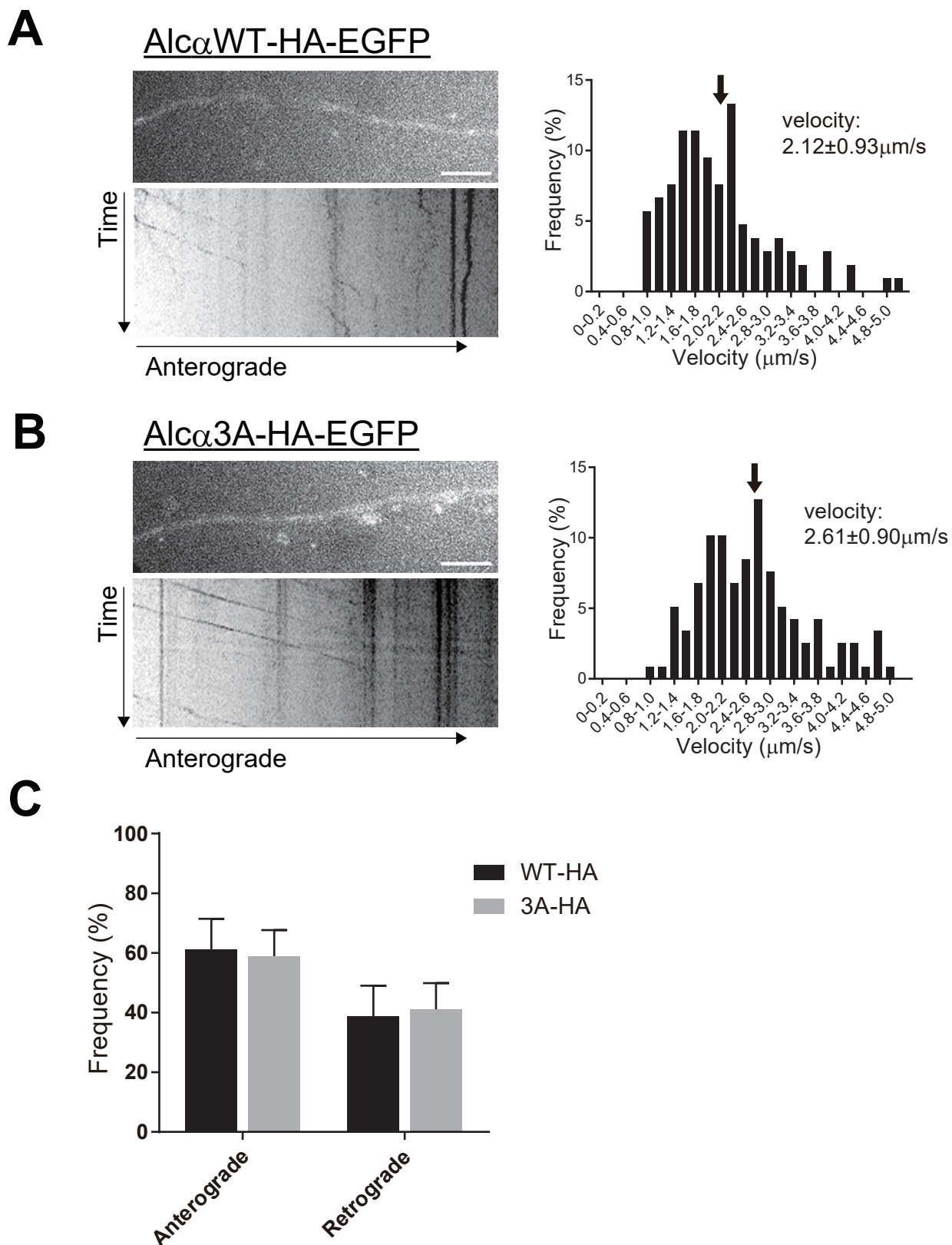


Fig.23 AlcαWDAA の神経軸索輸送速度

(A) AlcαWT-HA-EGFP をマウス大脳皮質初代培養神経細胞に発現させ、軸索中の小胞輸送を全反射顕微鏡により観察した。左：神経軸索と輸送小胞の軌跡を描いた Kymograph を示す。右：輸送小胞の速度分布と平均速度を矢印で示す (mean±SD, n= 105, scale bar: 5 μm)。

(B) Alcα3A-HA-EGFP をマウス大脳皮質初代培養神経細胞に発現させ、軸索中の小胞輸送を全反射顕微鏡により観察した。左：神経軸索と輸送小胞の軌跡を描いた Kymograph を示す。右：輸送小胞の速度分布と平均速度を矢印で示す (mean±SD, n= 118, scale bar: 5 μm)。

(C) AlcαWT-HA-EGFP と Alcα3A-HA-EGFP のそれぞれの輸送小胞について、輸送方向の割合を示す。(mean±SE, WT-HA; n= 13, 3A-HA; n= 16)

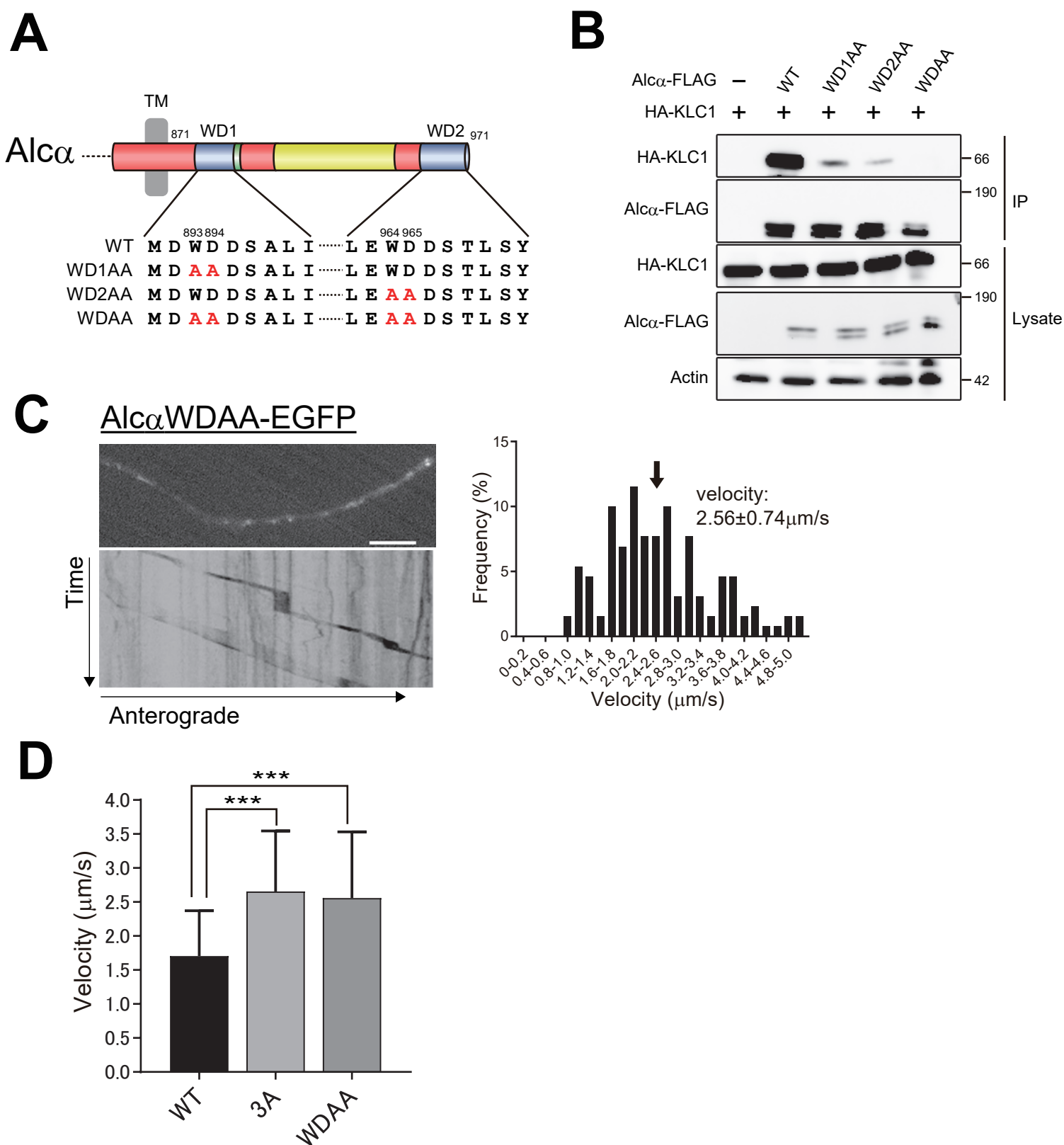


Fig.24 AlcαWDAA の神経軸索輸送速度

(A) Kinesin-1 結合 WD motif 中の WD 配列を Ala に置換した AlcαWDAA 変異体シリーズを示す。

(B) AlcαWDAA-FLAG 変異体シリーズと HA-KLC1 を N2a 細胞に共発現させ、細胞 Lysate から抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。WDAA 変異による Alcα と KLC1 の結合能消失を Western blotting により確認した。

(C) AlcαWDAA-EGFP をマウス大脳皮質初代培養神経細胞に発現させ、軸索中の小胞輸送を全反射顕微鏡により観察した。左：神経軸索と輸送小胞の軌跡を描いた kymograph を示す。右：輸送小胞の速度分布と平均速度を矢印で示す (mean ± SD, n = 130, scale bar: 5 μm)。

(D) AlcαWT-EGFP、Alcα3A-EGFP、AlcαWDAA-EGFP の輸送速度を示す。3A、WDAA 変異により輸送速度は WT よりも高速化した。(means ± SD, ***p < 0.005, Dunn' s multiple comparisons test)

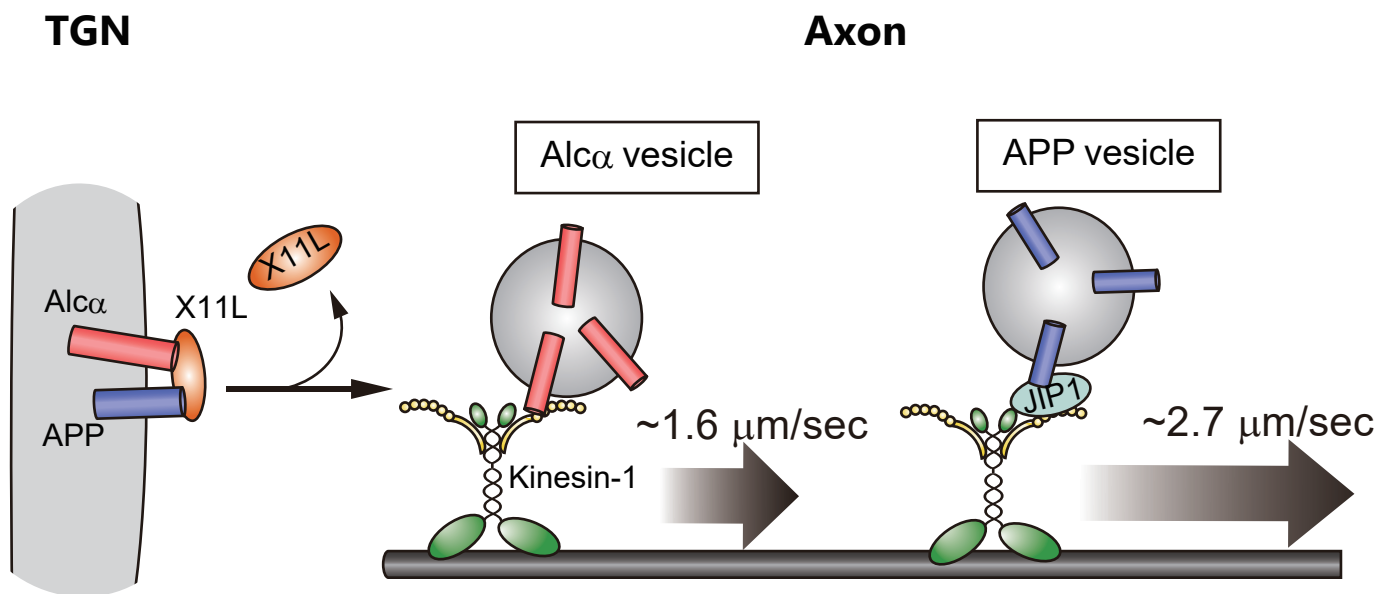


Fig.25 Aβ と APP の小胞輸送

Aβ と APP は Golgi 体において X11L を介して三量体を形成する。X11L の解離に後、Aβ と APP は別々の輸送小胞を形成し、軸索中を輸送される。Aβ は Kinesin-1 と直接結合し、1.6 μm /sec 付近で輸送される。一方で、APP は JIP1 を介して間接的に Kinesin-1 と結合することで、より高速 (~2.7 μm/sec) に輸送される。

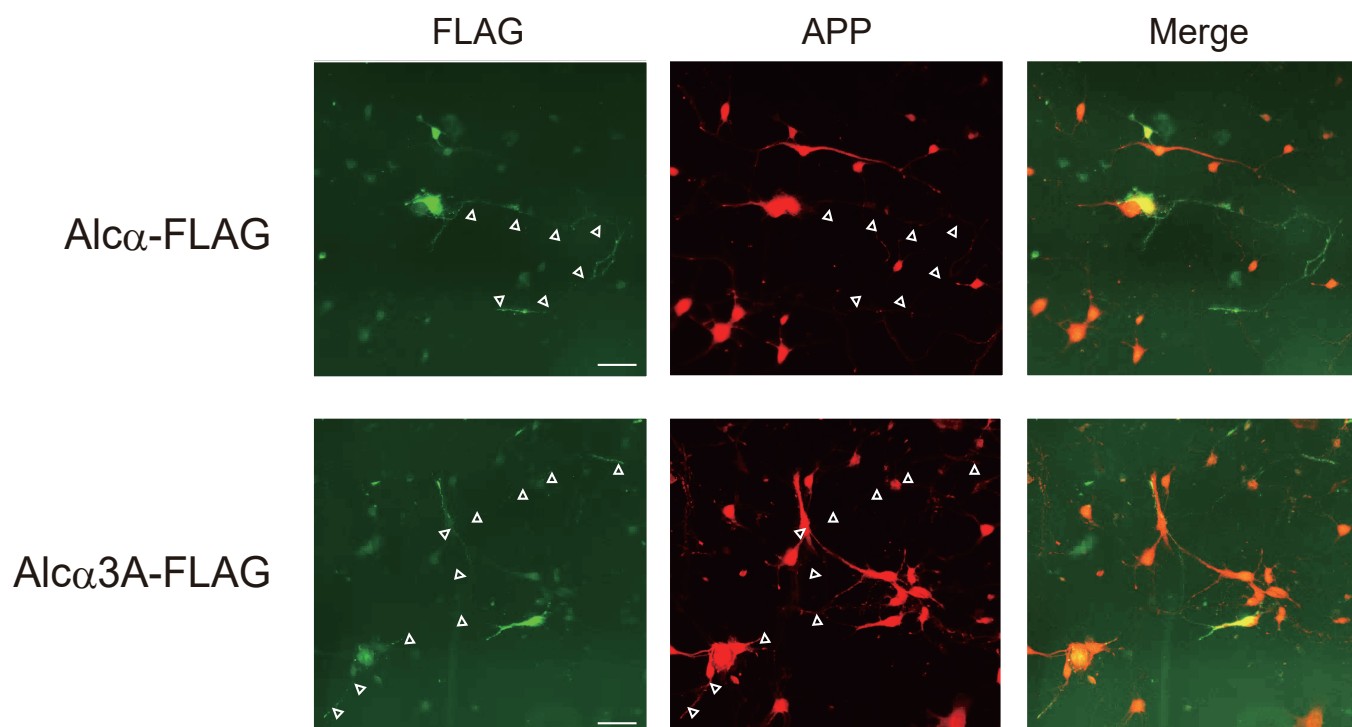
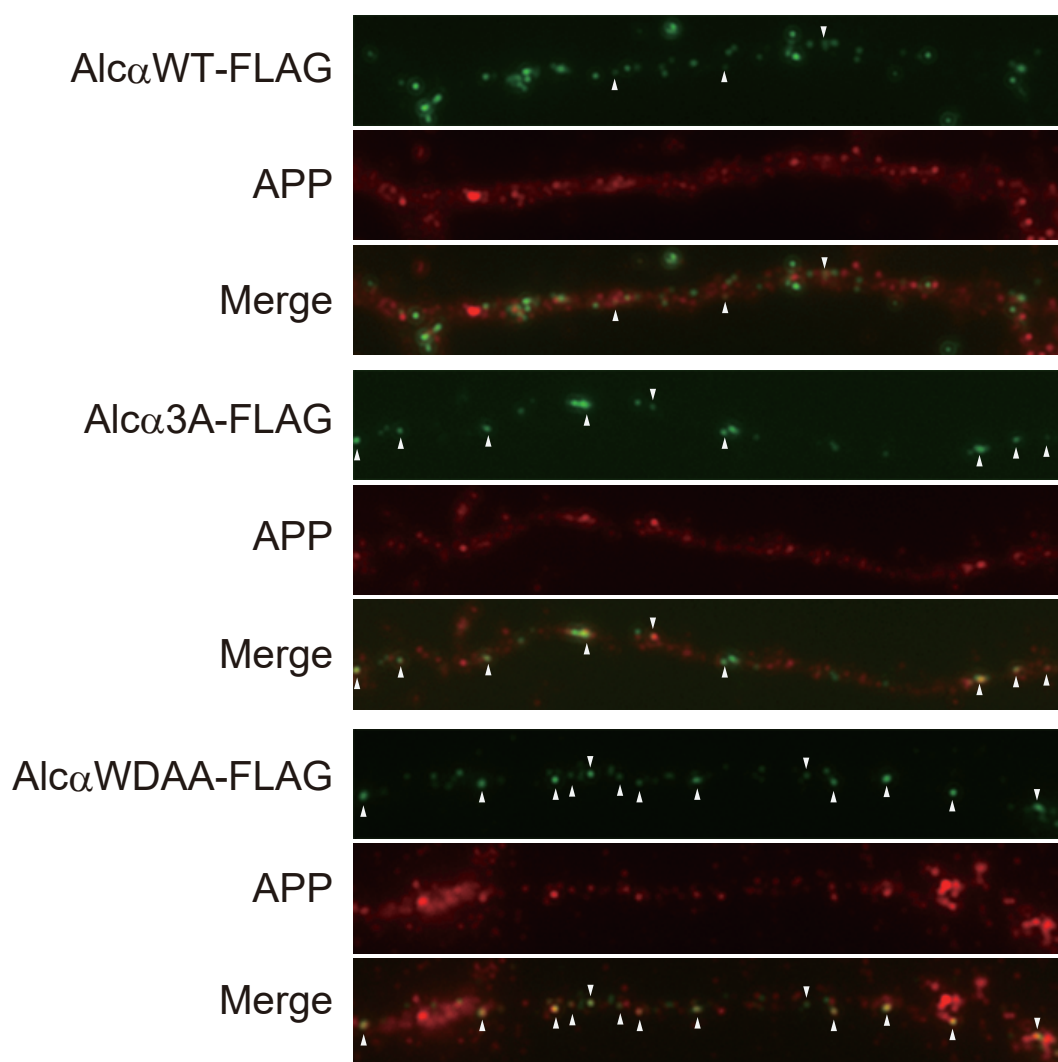


Fig.26 Alc α -FLAG と APP の共免疫染色

Alc α -FLAG または Alc α 3A-FLAG を初代培養神経細胞に発現させ、固定後抗 FLAG 抗体及び抗 APP 抗体を用いて共免疫染色を行った。細胞の全体像を示す。(矢頭 : 軸索、Scale bar =50 μ m)

A



B

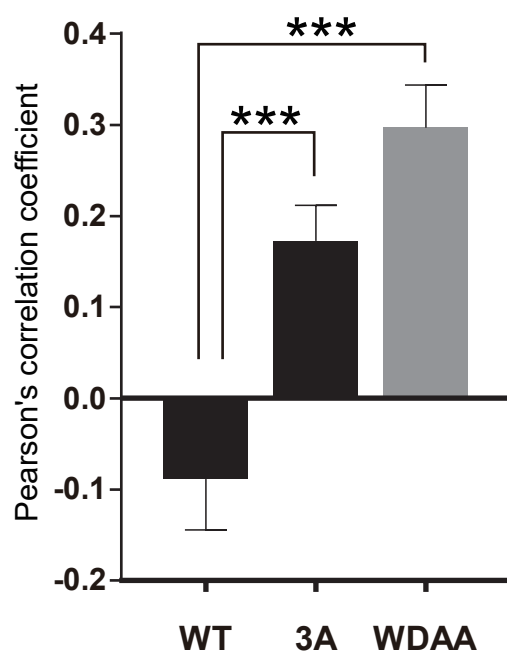
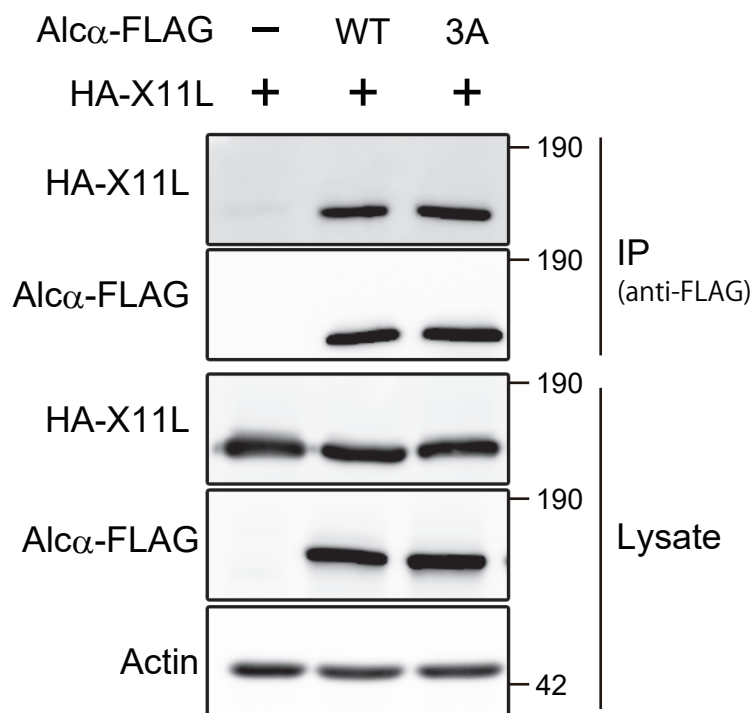


Fig.27 軸索中の Alca と APP 小胞の共局在

(A) 初代培養神経細胞の軸索の拡大図を示す。APP 小胞と共局在する Alca 小胞を白矢頭で示す。

(B) 軸索中の Alca と APP 小胞の共局在効率を Pearson' s correlation coefficient の算出により検討した。3 A、WDAA 変異により Alca-FLAG は APP と共局在 が増加した。(means $\pm$ SE, WT, n = 7; 3A, n = 7; WDAA, n = 9; ***p < 0.005)

A



B

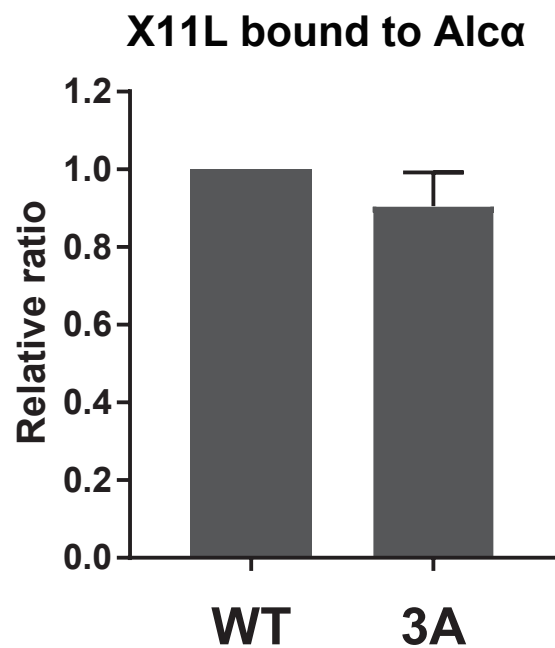


Fig.28 Ala 変異による X11L 結合量への影響

(A)N2a 細胞に Alcα-FLAG 及び HA-X11L を共発現させ、細胞 Lysate から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降、Western blotting による結合した HA-X11L を検出した。

(B) 各 Alcα-FLAG に対する HA-X11L 結合量を定量した。3A により X11L の結合量には変化は見られなかった。(means $\pm$ SE, n = 4)

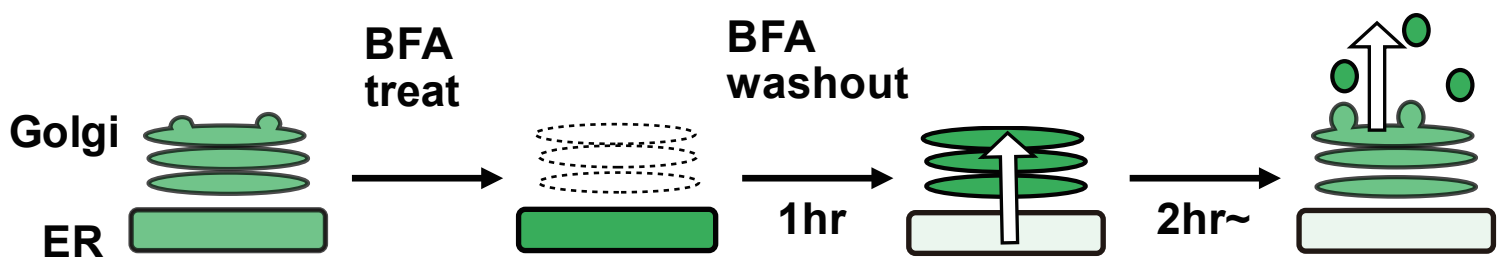


Fig.29 BFA(Brefeldin A) 添加による Golgi exit の観察

細胞に BFA を添加することで Golgi 体を一旦崩壊させることができる。BFA を washout することで Golgi 体を再建することができ、細胞体に輸送される膜タンパク質は約 1 時間で Golgi 体に集積する。さらに培養を続けることで Golgi 体から膜タンパク質が出芽、輸送する過程を観察することができる。

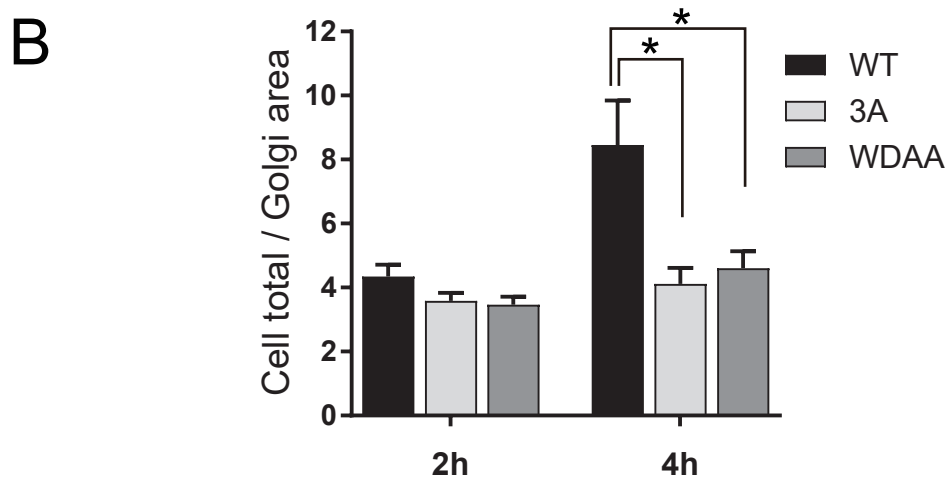
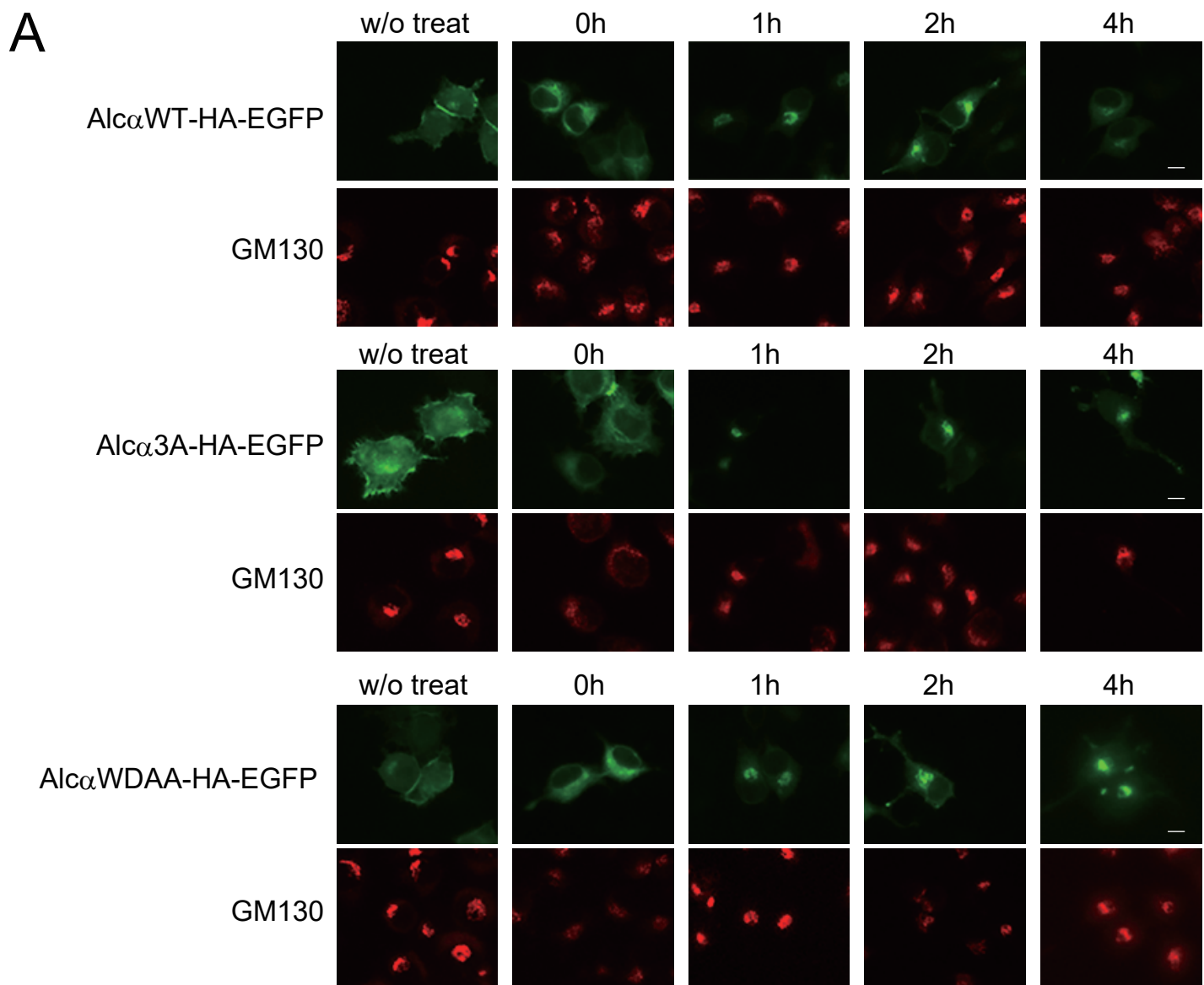


Fig.30 Alca の Golgi exit は Kinesin-1 の結合が必要になる

(A) 各 Alca-HA-EGFP を発現した CAD 細胞に BFA を時間添加した (0hr)。BFA を washout した後 1、2、4 時間の時点で細胞を固定、GM130 を染色した。(Scale bar = 10 μ m)

(B) Golgi exit 効率を Golgi 体に対する細胞全体の蛍光強度を測定することで算出した。3A、WDAA 変異により Alca-HA-EGFP の Golgi exit 効率は低下した。(means $\pm$ SE, Kruskal-Wallis one-way ANOVA with Dunn's multiple comparison test, * $p < 0.05$) (AlcaWT-HAEGFP: 2h, $n = 32$; 4h, $n = 30$, Alca3A-HA-EGFP: 2h, $n = 32$; 4h, $n = 29$, AlcaWDAA-HA-EGFP: 2h, $n = 32$; 4h, $n = 23$)

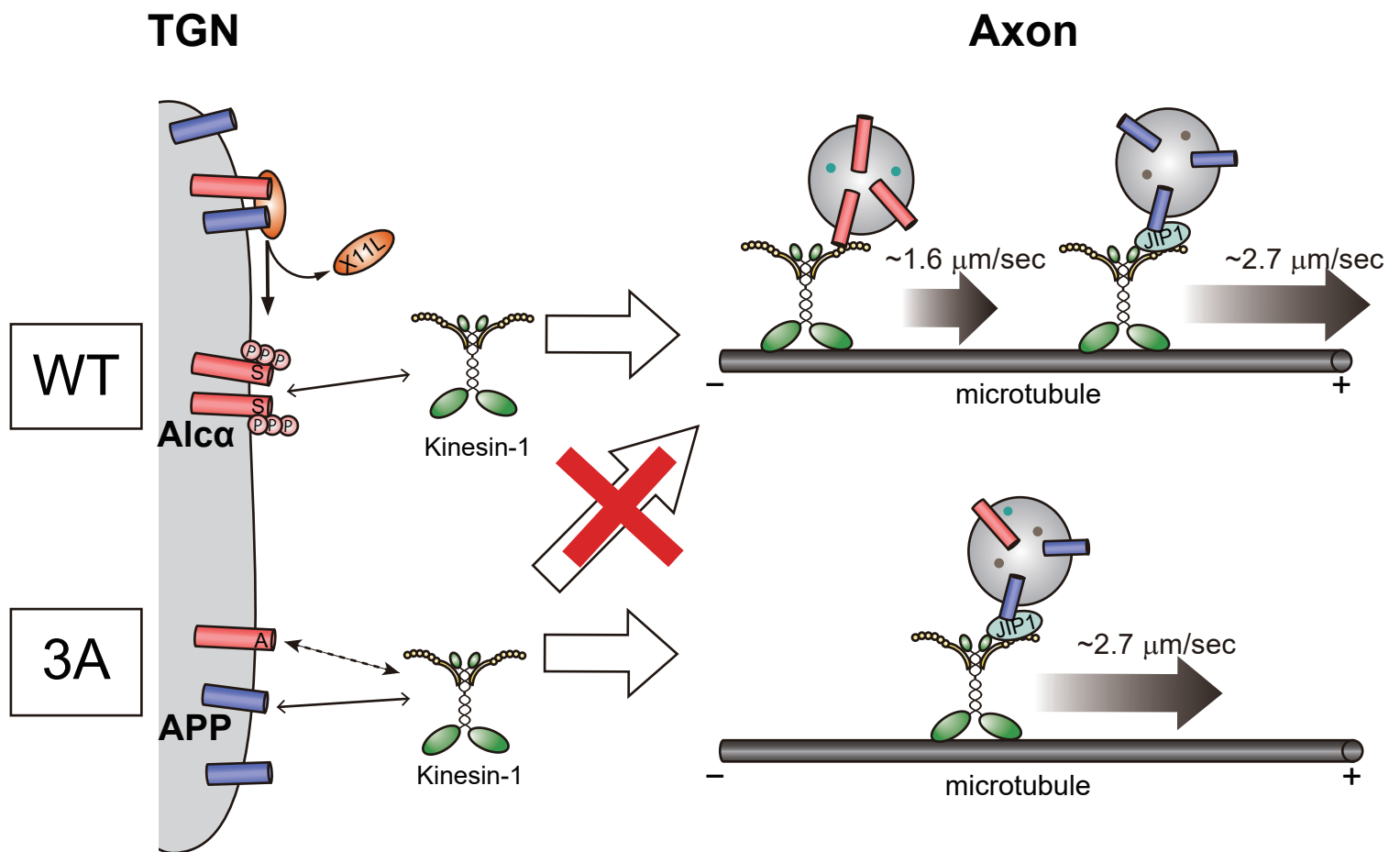


Fig.31 Alca のリン酸化による神経軸索輸送制御機構

Alca は TGN において三量体から解離後、小胞を形成する。リン酸化された Alca は Kinesin-1 と結合することで APP とは別の、Alca 特異小胞を形成する (WT)。Alca がリン酸化されない場合、Alca は Kinesin-1 と結合できず、小胞を形成できない (3A)。非リン酸化 Alca は近傍で形成される APP 小胞に入り込むことで、軸索中を高速に輸送される。

謝辞

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室 鈴木利治教授には本研究を行うにあたり的確な御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝申し上げます。また、本論文の審査を頂いたことにも重ねて御礼申し上げます。

御多忙の中、本論文を審査・御指導頂きました北海道大学 大学院薬学研究院 RNA生物学研究室 中川真一教授、米田宏先生、同神経科学研究室 多留偉功先生に深く感謝申し上げます。

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室 多留偉功先生、中矢正先生、羽田沙緒里先生、香川大学 医学部・医学研究科 分子神経生物学研究室 山本融教授には、平素より御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝申し上げます。

北海道大学 大学院先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室 金城政孝教授には全反射顕微鏡の使用にあたり、御指導を頂きましたことを厚く感謝申し上げます。

Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, Angus Nairn教授には多くのご助言を頂きましたこと厚く感謝申し上げます。

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室の皆様には、長くに渡り、技術的・精神的に支えて頂きましたことを心から感謝いたします。秘書の西田祥江様には事務的にも精神的にも厚いご支援を頂いたことを心から感謝いたします。

最後に、日々の生活を支え、精神的・経済的にも多大なご支援を頂いた両親に心から感謝いたします。

2018 年 2 月
蘇武 佑里子