博士学位論文

カーゴ受容体 APP と Alcadein αの機能解析

2018 年 3 月

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

白木　柚葉

目次

1.　略語

a.a.: amino acid

Aβ: amyloid β-protein

AD: Alzheimer's disease

APP: amyloid precursor protein (amyloid β protein precursor)

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

EDTA: ethylene diamine N,N,N,N 7-tetraacetic acid

ECL: enhanced chemiluminescence

EGFP: enhanced green fluorescent protein

HBS-T: HEPES buffered saline with Triton X-100

IgG: immunoglobulin G

IP: immunoprecipitation

JIP: c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK)-interacting protein

JNK: c-Jun NH2-terminal kinase

KHC: kinesin heavy chain

KIF: kinesin superfamily proteins

KLC: kinesin light chain

KO: knock out

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MS: mass spectrometry

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PI mix: protease inhibitor mixture

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SDC: sodium deoxycholate

TBS-T: Tris-buffered saline with Tween 20

TGN; Trans-golgi network

TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence

TPR: tetratricopeptide repeat

TritonX-100: polyoxyethylene (10) octhylphenyl ether

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

2. 序論

2-1　神経細胞の極性化

神経細胞は長い軸索と複数の樹状突起を持つ、高度に発達した極性細胞であり（Vaegter *et al.*, 2011)、神経軸索と標的細胞の樹状突起間でシナプスを形成し、細胞間の情報伝達を行う。神経細胞の発達過程はラットやマウスの脳から調製した初代培養神経細胞を用いて解析が行われ、主に 5 つのステージが存在することが明らかである（Craig and Banker, 1994; Dotti *et al.*, 1988)。神経細胞は培養開始数時間で葉状仮足を形成し（stage 1)、その後細胞体から数本の神経突起が伸長する（stage 2)。この時点では各突起に極性は存在しないが、培養 1.5 日後にはこれら突起のうち一本が急激に伸長し（stage 3)、軸索特異的分子が集積する軸索へと分化する。培養 4 日後に残りの突起の伸長が始まり、樹状突起特異的分子が集積する樹状突起へと分化する（stage 4)。その後、軸索と樹状突起間にシナプスが形成され、成熟した神経細胞となる（stage 5)。これまでに神経細胞の極性化に関与する分子の探索が行われ、細胞内外のシグナルによる極性化や神経突起伸長メカニズム、軸索や樹状突起特異的分子の選択的な輸送メカニズムに関して解析が進められてきた。

2-2　神経細胞の極性化と軸索伸長メカニズム

極性化と突起伸長を制御するシグナルには拡散性シグナル（遠距離作動性因子）と接着性シグナル（短距離作動性因子）が存在する。拡散性シグナルの代表的なものには軸索ガイダンス因子が挙げられ、Netrin や Semaphorin、複数の神経栄養因子、Wnt などが報告されている。Netrin はニワトリ胚の脳から精製､同定された蛋白質であり（Serafini *et al.*, 1994)、その後、線虫の *unc-6* のホモログであることが明かになった（Ishii et al., 1992; Serafini et al., 1994)。線虫の *unc-6* 遺伝子変異体は軸索形成の遅れや神経軸索の走行に異常がみられたことから、*unc-6* は軸索ガイダンスを制御する機能を持つと考えられ、これまでに線虫 *unc-6* とそのホモログである Netrin が種を超えて保存されたメカニズムで軸索をガイドすることが解明されてきた。Netrin の受容体には DCC (UNC-40) ファミリーと UNC-5 ファミリーが存在し、DCC は神経回路形成時に Netrin を介した軸索誘引機能を(Fazeli et al., 1997; Keino-masu *et al.*, 1996)、UNC-5 は線虫において Netrin 依存的な軸索反発機能を持つことが示唆されている。

Semaphorin はショウジョウバエの胚やニワトリ胚から同定された分子であり (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996)、一番初めに同定された Sema3A がニワトリ後根神経節細胞の成長円錐を退縮させる因子であったことから、神経軸索の反発機能や伸長抑制機能に関して解析が行われてきた。Sema3A の同定後、細胞外にセマドメインを有する類似の構造を持つタンパク質が多数同定され、その C 末の構造の違いから現在 8 つのサブファミリーに分類されている（Bamberg *et al.*, 1999)。C 末構造の違いで分泌型や膜貫通型、GPI アンカー型などの様々な種類が存在する。Semaphorin の主要な受容体はプレキシンで

あり（Nogi *et al.*, 2010)、低分子量 G タンパク質やグアニンヌクレオチド交換因子の結合やリン酸化酵素の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達し、反発性ガイダンス因子として機能することが解明された（Mitsui *et al.*, 2002)。Semaphorin はその種類の多さや多様な生体内局在を示すことからもわかるように、神経ガイダンス因子として働くだけではなく、心血管系や免疫系組織の形成など多様な生理機能に関与することが明かになってきている。

神経栄養因子は神経成長因子（NGF）関連遺伝子ファミリーの総称であり、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 が知られている。受容体としては低親和性受容体（p75）と高親和性受容体(TrK）が同定されており、細胞内の Ras-MAPK、PLC-γ、PI3K などを活性化しシグナルを伝達することで、神経細胞を分化方向に誘導し、神経突起の伸長を促す役割を持つ（Binder and Scharfman, 2004; Huang, 2001)。

Wnt は分泌性の糖タンパク質であり、複数のシグナル経路を介して転写や細胞骨格の制御し、神経軸索ガイダンスや突起の伸長を制御する因子であることが明かである。Wnt はショウバヨウバエを用いた遺伝学的解析から発見されたタンパク質であり、哺乳類ではこれまでに 19 種類が同定されている。Wnt は 7 回膜貫通型の受容体である Frizzled に結合することで、細胞内に Wnt シグナルを伝達するが、Wnt の種類によって発現部位や時期、結合する Frizzled 受容体の種類が異なっており、それぞれが特異的な機能を持つと考えられている。細胞内に伝達する Wnt シグナル Wnt と受容体の組み合わせにより異なっており、主に canonical 経路（Wnt/β-catenin 経路）と 2 つの non-canonical 経路（Wnt/JNK と Wnt/Ca^{2+}経路）が存在する（Dijksterhuis *et al.*, 2014)。

接着性シグナルとしては、ラミニンや NgCAM、TAG1、L1-CAM などが挙げられ、細胞表面や細胞間で情報を伝える。例えばラミニンをコーティングした基質上で神経細胞を培養すると、ラミニンに接触した軸索が優先的に軸索へと分化する。このことからラミニンは神経の極性形成を制御する接着性のシグナル伝達を担うと考えられている。ラミニンのレセプターとしてはインテグリンが知られており、神経細胞の発達過程の早期から発現が確認されている（Barros *et al.*, 2011)。

このように神経細胞の極性化や神経突起伸長に必要な分子が同定、解析され、神経細胞の極性形成や維持には上記分子が正しく局在することが重要であることが明かになってきた。よって神経細胞の軸索や樹状突起への選択的輸送メカニズムについても解析が進められてきた。

2-3　神経細胞内膜小胞輸送

極性形成と軸索伸長時には細胞膜の表面積の拡大やタンパク質の集積が必要であり、微小管やアクチン繊維などの細胞骨格の構築と上記で述べたようなタンパク質や膜成分の輸送が活発である（Foletti *et al.*, 1999)。神経細胞ではタンパク質の合成は主に細胞体で行われるため、ほとんどの膜タンパク質や分泌タンパク質は細胞体に存在する小胞体で合成され、小胞体やゴルジ体で修飾を受けたのちに輸送小胞に取り込まれ適切なオルガネラへと小胞

輸送される。よって軸索や樹状突起末端へタンパク質を輸送する際には、極性のある効率的な輸送システムが重要であり、このようなタンパク質の輸送メカニズムは極性形成時や神経細胞の発達時だけでなく、成熟した神経細胞においても機能発現や細胞の維持のため制御されている。選択的なタンパク質輸送は積み荷タンパク質がゴルジ体から出芽する異なる輸送小胞内に選別されて、標的のオルガネラへ適切に輸送されることで成り立っている。これらステップにはコートタンパク質やモータータンパク質、RabGTPase タンパク質、SNARE タンパク質など多くの輸送関連タンパク質が関与している。

2-4　輸送小胞の形成と積み荷タンパク質の選別機構

輸送小胞の形成と積み荷タンパク質の選別にはコートタンパク質が重要な役割を担っている（Bonifacino, 2014; Guo *et al.*, 2014)。コートタンパク質の代表的なものには Coat protein complex I (COPI) や Coat Protein complex II (COPII)、Clathrin などが挙げられ、それぞれ COPI がゴルジ体から小胞体への輸送小胞、COPII が小胞体からゴルジ体への輸送小胞、Clathrin がゴルジ体以降の輸送小胞の形成を担っている。積み荷タンパク質は輸送小胞形成時に選別され取り込まれるが、その選別機構として積み荷タンパク質とコートタンパク質の相互作用や膜タンパク質受容体と分泌タンパク質の相互作用を介した選別、その他アダプタータンパク質を介した選別機構が報告されており、特に小胞体からゴルジ体への COPII 小胞における選別機構がよく解析されている（Glick and Nakano, 2009; Guo et al., 2014)。COPII は Sec23/24p と Sec13/31p の複合体からなるコートタンパク質である。COPII 小胞の形成は低分子量 GTPase タンパク質である Sar1p が小胞体膜上のグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）である Sec12p によって不活性型の GDP 型から活性型の GTP 型に変換されることにより開始される。GTP 型になった Sar1p は小胞体膜へ結合し、COPII コートタンパク質分子を集結させる。COPII の湾曲した構造から膜の曲率が変化し小胞を形成するため、輸送小胞の直径はコートタンパク質の種類によっておおよそ決定される。この際に COPII コートタンパク質の一つである Sec24p が複数の積み荷タンパク質と結合し積み荷タンパク質を小胞中へリクルートすることが明かになっている。COPII 小胞の Sec24p に結合するシグナル配列としては DxE（アスパラギン酸-X-グルタミン酸）モチーフ、LxxLE モチーフ、2 つのフェニルアラニン残基からなる FF モチーフなどが挙げられるが、これら配列を持たないタンパク質とも結合することが明かになっている。その他にも細胞質ドメインを持たない分泌タンパク質が同じ輸送小胞内に選別される膜タンパク質受容体に結合して選別される機構や、GPI アンカー型のタンパク質や膜タンパク質がアダプタータンパク質との相互作用を介して小胞内に選別される機構が明かになってきている。さらに小胞体における積み荷タンパク質の選別機構として糖鎖認識による選別機構が報告されている。タンパク質は小胞体で合成された後、小胞体とゴルジ体で様々な修飾を受ける。糖鎖修飾もその一つであり、糖鎖を認識するドメイン（Carbohydrate Recognition Domain；CRD）を持つタンパク質によって正しく糖鎖修飾を受けたタンパク

質のみが選別されゴルジ体へと輸送される。哺乳類では CRD を持つタンパク質として ERGIC-53 が同定されており（Hauri *et al.*, 2000)、出芽酵母を用いた解析からも ERGIC-53 と同様のドメインを持つ Emp46p と Emp47p が発見されている（Satoh *et al.*, 2006)。糖鎖によるタンパク質の選別機構は小胞体におけるタンパク質の品質管理機構として機能していると考えられるが、糖鎖の機能は未解明な部分が多く、今後糖鎖研究が進展することで糖タンパク質を選別する新たなタンパク質選別機構が発見されるかもしれない。

COPII 小胞によってゴルジ体へ輸送されたタンパク質は Clathrin 小胞や他の様々な輸送小胞によって細胞の各所へ輸送されるため、COPII 小胞形成時よりもより複雑な積み荷タンパク質の選別機構が存在すると考えられる。しかし、ゴルジ体以降の積み荷タンパク質の選別に関しては不明な点が多く、一部のタンパク質の選別機構しか明らかになっていない。COPII 小胞と同様にコートタンパク質や膜タンパク質受容体を介した選別機構も存在するが、ゴルジ体以降の小胞輸送に関してはアダプタータンパク質を介した選別機構について解析が進んでいる。Adaptor protein 1 から 4 (AP-1 から 4) や GGA などが同定され、各 AP に結合する特異的な配列が複数報告されており（Bonifacino, 2014)、異なる積み荷タンパク質を認識することでゴルジ体以降の選択的な積み荷輸送に関与している。APs は β, γ, σ, μなど異なる機能をもったサブユニットと共に複合体を形成して機能しており σ, μ サブユニット周辺に積み荷タンパク質の結合ポケットを持つことが多いため、σ, μサブユニットが積み荷の選択性を制御していると考えられる。これまでに AP-1, 3, 4 がゴルジ体からエンドソームや細胞膜への輸送小胞に関与していることが明らかになり、AP-2 は細胞膜表面からエンドサイトーシスした輸送小胞に関与することが報告されているが、これ以外に多くのタンパク質を選別できる機構はほとんど解明されていない。

2-5　モータータンパク質による膜小胞輸送

ゴルジ体で形成した輸送小胞は微小管上を運動するモータータンパク質によって軸索または樹状突起内へ選択的に輸送される（Hirokawa *et al.*, 2010)。そして RabGTPase や SNARE タンパク質によって標的の細胞内小器官との膜融合が制御されることが明かになっている（Bhuin and Kumar, 2014; Bucci *et al.*, 2014; Stenmark, 2009, Chen *et al.*, 2001)。特に長い突起を持った神経細胞では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おり、モータータンパク質が選択的に膜小胞やタンパク質分子を輸送することで効率的なタンパク質輸送が可能になる。なかには細胞体の百万倍以上の長さの軸索をもつ神経細胞も存在する。

モータータンパク質は ATP 加水分解エネルギーを利用して運動するタンパク質であり、アクチン上を動く Myosin、微小管上を動く Kinesin、Dynein の 3 種類に分類される。特に Kinesin や Dynein は細胞内物質輸送に重要な役割を果たしている。Kinesin は微小管上を－端から＋端方向（順行方向）へ移動するのに対し、Dynein は＋端から－端（逆行方向） へ移動する。ゴルジ体で輸送小胞内に取り込まれた積み荷タンパク質は、Kinesin に

よって神経軸索末端へ輸送される。Kinesin は遺伝子ファミリーを形成しており（Kinesin Super Family, KIFs)、これまでに 45 種類が同定されている。構造の違いやモータードメインの特徴などから、 Kinesin-1 から Kinesin-14A, B までの 15 のファミリーに分類され、それぞれ輸送の極性や輸送する積み荷タンパク質が異なることが明かになってきた。KIF の構造は多様であるが、主にモータードメイン、ストーク、尾部で構成されている。モータードメインは通常アミノ酸配列の N 末端側にあり、ここで ATP を分解し微小管上での運動を可能にする。ストーク部はコイルドコイル構造を持っており、2 本の重鎖がこの部位で相互作用し二量体を形成する。尾部は KIF 間で多様性があり、様々な積み荷（小胞や細胞内小器官、mRNA など）の結合部位となっている。

Kinesin の中で最も初めに見出された Kinesin-1 に関する研究が進んでいる（Vale *et al.*, 1985)。Kinesin-1 は KIF5 2 分子と軽鎖である KLC (Kinesin Light Chain) 2 分子から 構成されるヘテロ四量体であり、KIF5 の尾部に結合した KLC に多様なタンパク質が結合することでタンパク質や膜小胞の輸送が制御される。Kinesin-1 複合体中の KIF5 は KHC (Kinesin Heavy Chain)とも呼ばれている。Kinesin-1 の軽鎖である KLC1 の ノックアウト（KO）マウスは胎生致死又は出生後早期の致死性を示し、その脳内では軸索肥大の表現型が報告されている（Stokin *et al.*, 2005)。Kinesin-1 の機能は個体および軸索の維持において主要な役割を果たすことが明かである。

2-6　カーゴ受容体タンパク質の機能

ゴルジ体から出芽した輸送小胞はそれぞれ特定のモータータンパク質と相互作用し、標的部位へと輸送される。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 (Kamal *et al.*, 2000)。各 Kinesin に結合するタンパク質のスクリーニングなどからこれまでに複数のカーゴ受容体が同定されてきた。これまでに発見されたカーゴ受容体は輸送小胞内に存在する膜タンパク質が多いが、輸送小胞表面に結合する細胞質タンパク質もカーゴ受容体として機能することが明かになってきている。膜小胞輸送を担うカーゴ受容体の代表的なものとして APP (amyloid precursor protein /amyloid-β protein precursor) や Alcα (Alcadein α); Kinesin-1、Rab3; KIF1A (シナプス小胞前駆体の輸送)、Syntaxin; KIF5 などが挙げられる。このようにいくつかのカーゴ受容体分子が同定されてきたが、特に膜小胞輸送を担うカーゴ受容体がどのような積み荷タンパク質を輸送するのか明らかになっているケースは少ない。

2-7　Kinesin-1 カーゴ受容体タンパク質 APP と Alcα

APP (amyloid precursor protein /amyloid- β protein precursor) や、Alcα (Alcadein α) は神経細胞で主要なモータータンパク質である Kinesin-1 のカーゴ受容体タンパク質である (Araki *et al.*, 2007; Kamal *et al.*, 2000)。

APP はＩ型の一回膜貫通型タンパク質であり、神経変性疾患であるアルツハイマー病の最も特徴的な病理所見である老人班の主要構成成分である Amyoid β (Aβ) ペプチドをもとにした遺伝子クローニングで同定された（Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987; Robakis *et al.*, 1987; Kitaguchi *et al.*, 1988)。APP は、細胞系や APP KO mice による解析で細胞接着、神経形成、神経突起伸長、シナプス小胞の開口放出に関与する機能を持つことが示唆されている（Schubert *et al.*, 1989; Kibbey *et al.*, 1993; Milward *et al.*, 1992; Herms *et al.*, 2004, Fanutza; 2015)。

Alcαも I 型の一回膜貫通タンパク質であり、脊椎動物において Alcα (Clst1)、Alcβ (Clst3)、Alcγ (Clst2)の 3 種類のファミリー分子が確認されており、その 1 次構造は線虫からヒトに至るまで高度に保存されている。線虫において Alc のオルソログである Casy-1 が連合学習に関与していることや（Ikeda *et al.*, 2008)、マウスニューロンを用いた解析から、軸索ガイダンス異常や神経突起の分岐異常が報告されていることから（Sahores *et al.*, 2010; Slater *et al.*, 2013)、Alcαも神経形成や突起の分岐に関与していると考えられている。

これまでに Kinesin-1 との結合や輸送機構の解析が行われてきた。APP は JIP1b を介して Kinesin-1 と結合するのに対し(Chiba *et al.*, 2014)、Alcαは WD モチーフを介して直接 KLC と結合するなど結合様式が異なることが明らかになったことから（Araki *et al.*, 2007)、APP と Alcαは異なる制御を受け輸送されていると考えられる（Fig. 1A)。蛍光タグ融合タンパク質を発現させた神経細胞軸索内における APP と Alcαの輸送速度解析で、両者の平均輸送速度が異なることが明らかになったことから、別々に輸送小胞を形成する成分が主要であると考えられる(Araki *et al.*, 2007)。また、マウス坐骨神経軸索の免疫染色法による局在解析では APP と Alcαの約 30%が共局在を示す(Araki *et al.*, 2007)。これは APP と Alcαが共に含まれる輸送小胞が存在することを示す。よってこれらの解析から APP と Alcαが共に含まれる輸送小胞も存在するが、APP と Alcαがそれぞれ単独で形成される小胞が主要であることがこれまでに解明されてきた（Fig. 1B)。

2-8　研究目的

これまで APP と Alcαの輸送機構が解明されてきたが、積み荷タンパク質は未解明であり、同じモータータンパク質に結合するカーゴ受容体間の積み荷の選択性についても明らかではない。よって APP、Alcαが輸送する積み荷タンパク質を明らかにし、並びに APP、Alcαの機能を解明することを目的に本研究を行った。

3. 実験結果

3-1　APP 小胞または Alcα小胞の積み荷タンパク質の同定

APP または Alcαが輸送する積み荷タンパク質を明らかにするため、マウス脳から APP 小胞又は Alcα小胞を回収し、LC-MS/MS を用いて小胞内に含まれるタンパク質の同定を行った。まず破砕したマウス脳をサイズフラクショネーションし（Fig. 2A)、200 nm 以下の膜小胞が含まれる輸送小胞画分（P4 画分）を調製した。Western Blot 法で輸送関連タンパク質（Synaptotagmin, Synaptophysin, VGluT1, VGAT, Kinesine-1; KHC and KLC）や各オルガネラに局在するマーカータンパク質（cytosol; α-Tubulin, cell membrane; N-cadherin, ER; Calnexin, TGN; syntaxin 6, lysosome; LAMP1, Early endosome; EEA1）を検出し分画状況を確認した。Total lysate と P4 画分のバンド強度比（enrichment factor）から、オルガネラマーカータンパク質よりも輸送関連タンパク質がより多く P4 画分に回収されていることがわかる（Fig. 2B)。カーゴ受容体タンパク質である APP や Alcαは輸送小胞画分である P4 画分よりも P2 や P3 画分により多く回収された。今回用いた分画法では P1 画分に large cell fragments や nuclei が回収され、輸送関連タンパク質が P2 画分にも多く回収されることからわかるように、P2 画分には主にシナプトソームが濃縮されることが明らかである。APP や Alcαも軸索末端へ輸送される分子であるため P2 画分に多く回収されたと考えられる。P3 には各オルガネラマーカー分子が多く含まれることからわかるように、主にエンドソームやリソソームなどの細胞内小器官を含む large membranes が回収される。APP や Alcαはカーゴ受容体タンパク質として機能するが、輸送小胞の存在割合が細胞の膜全成分中でごくわずかであることや、APP と Alcαの細胞内局在はゴルジ体やカーゴ受容体としての機能を終えたあとに代謝を受ける場所であるエンドソームで強いことから、P3 画分にも多くの APP と Alcαが回収されたと考えられる。

次に P4 画分から Dynabeas と抗 APP C 末抗体（G369）または抗 Alcα C 末抗体（UT195）を用いて APP 小胞または Alcα小胞を免疫沈降法（IP）で回収し、Western Blot 法で各マーカータンパク質を検出した（Fig. 3)。Beads から膜小胞を溶出する際には、以後の LC-MS/MS 解析を妨害する界面活性剤や多量の IgG 抗体の混入を避けるため、膜を可溶化する界面活性能をもちながら、その後溶出液から除去できるデオキシコール酸ナトリウム（DOC）で膜小胞を可溶化し MS 解析のサンプルとした。Western Blot 法で解析する際には、DOC 溶出後さらに SDS を用いた二段階目の溶出を行い、APP や Alcαを溶出し解析した (Fig. 3A)。糖鎖修飾の違いにより APP は 3 本、Alcαは 2 本のバンドが検出される。APP は小胞体で N-結合型糖鎖修飾（immature APP or imAPP）を受け、ゴルジ体へ輸送され O-結合型糖鎖修飾（mature APP or mAPP）を受ける（Suzuki and Nakaya, 2008)。Alcα も主に小胞体に存在する高マンノース型の N-結合型糖鎖修飾体（immature Alcα or imAlcα）とゴルジ体に存在する複合型の N-結合型糖鎖修飾体（mature Alcα or mAlcα）が存在する（Araki et al., 2007)。SDS 溶出サンプルではゴルジ体以降の後期輸送経路に存在

することが明かである mAPP または mAlcαが優先的に回収されていた（Fig. 3B SDS eluate)。DOC 溶出サンプル内には APP IP から Alcαの、Alcα IP から APP の共沈が認められた。これは APP と Alcαが共に含まれる輸送小胞が存在することを示している（Fig. 3B DOC eluate 上段)。さらに DOC 溶出サンプル内に含まれる RabGTPase タンパク質について解析を行った。RabGTPase タンパク質は活性状態に依存して膜に可逆的に結合し、膜小胞の出芽や特異的なオルガネラへの繋留や融合を制御する（Bhuin and Kumar, 2014; Bucci *et al.*, 2014; Stenmark, 2009)。解析の結果、IP で回収した APP 小胞と Alcα小胞は ER からゴルジ体への輸送を制御する Rab1B や late endosome から lysosome への輸送を制御する Rab7、TGN/RE から細胞膜表面への輸送を制御する Rab11 と比較して、TGN から細胞膜表面への輸送を担う Rab3C や Rab10 との結合が強いことがわかった（Fig. 3B 中段)。各オルガネラマーカー分子の共沈はほとんど検出されなかった（Fig. 3B 下段)。よってゴルジ体から順向性に輸送される輸送小胞が多く回収されていると考えられる。

APP IP と Alcα IP の DOC 溶出サンプルをそれぞれトリプシン消化し、LC-MS/MS を用いて、小胞内に含まれるタンパク質を網羅的に解析した。5 回の独立した実験からタンパク質の同定を行い、normal rabbit IgG で免疫沈降を行った Ctrl サンプルで検出されたタンパク質を除く総タンパク質の中で PLGS Score が 200 以上のタンパク質を抽出した結果、APP IP からは 175 個､Alcα IP からは 173 個のタンパク質が得られた（Fig. 4A, Table 1-3)。共通して検出されたタンパク質は 41 個で、輸送関連タンパク質が多く含まれていた。同定したタンパク質を Gene Ontolgy (GO）の情報をもとに分類すると小胞輸送、メタボリックプロセス、細胞骨格タンパク質の割合が高いことがわかる（Fig. 4B)。その中で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、細胞骨格や受容体、細胞接着能を持つタンパク質の中に、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かになった。APP 小胞には Ephrin receptor 10, Collagen type 1, IGF like receptor 1, ICAM-5 などが含まれていた。Alcα小胞には Frizzled5, Netrinreceptor unc-5, Apolipoprotein E, SynCAM3, Sortilin などが含まれていた。APP や Alcαの欠損モデル動物を用いた解析からも軸索形成やガイダンス異常といったフェノタイプがみられることから（Alther *et al.*, 2016; Korte *et al.*, 2012; Ortiz-Medina *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2005)、APP と Alcα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、Alcα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 Alcα小胞 IP サンプルから同定した Frizzled5（Fzd5）受容体に着目した。Fzd5 は Wnt の受容体であり、神経軸索末端へ輸送され、細胞膜表面で Wnt と結合し細胞内にシグナルを伝達する 7 回膜貫通型の受容体タンパク質である。10 種類のファミリータンパク質が存在し、それぞれ発現時期や部位や結合する Wnt 分子の違いによって異なる機能を持つ（Dijksterhuis *et al.*, 2014)。これまでに Alcαが Fzd3 受容体の輸送を制御することが主にニワトリ胚を用いた解析で報告されているが（Alther *et al.*, 2016)、他の Fzd 受容体ファミリーに関する報告はない。マウスニュー

ロンを用いた解析から、軸索ガイダンス異常やシナプス形成異常など Alcα欠損モデル動物で見られるフェノタイプと類似した結果が報告されている（Sahores *et al.*, 2010; Slater *et al.*, 2013)。APP 小胞 IP と Alcα小胞 IP の DOC 溶出液中に含まれる Fzd5 量をウエスタンブロット法で検出し比較したところ、APP 小胞にも Fzd5 が含まるが、Alcα小胞により多く含まれていた（Fig. 5A)。よってまず Fzd5 に着目し、Alcα小胞が Fzd5 受容体を軸索輸送するのか解析することで、LC-MS/MS で同定したタンパク質が APP、Alcαの軸索小胞由来であるか検証することにした。

3-2　Alcα小胞による Fzd5 の輸送解析

最初に Fzd5 が Kinesin-1 による輸送を受けるのか解析するため、マウス脳から輸送小胞画分を調製し、Kinesin-1 構成分子である KHC に対する抗体を用いて Kinesin-1 コンプレックス（KHC and KLC）を免疫沈降し､共沈する輸送小胞内に Fzd5 が含まれるか Western Blot 法で解析した。結果、Kinesin-1 の回収とともに、Kinesin-1 カーゴ受容体である APP と Alcαが共沈し、さらに、Fzd5 の共沈も認められた（Fig. 5B)。さらに Kinesin-1 の輸送小胞に Fzd5 が含まれるか解析するため、輸送小胞画分（P4 画分）を Sucrose 密度勾配遠心法で分離した（Fig. 5C)。Kinesin-1 の軽鎖である KLC1 と輸送関連タンパク質である SYT や SYP、VGluT1、VGAT は fraction 3-6 に局在することから、Kinesin-1 輸送小胞は fraction 3-6 に分布していると考えられる。Fzd5 は Kinesin-1 輸送小胞と成分と同様に fraction 3-6 に局在していた。また Fraction 3-6 には mAPP と mAlcαの局在も確認できた。mAPP と mAlcαは fraction 3-6 以外に fraction 13-15 にも強く検出されたが、これは APP と Alcαが P4 画分に一部混入してしまう Golgi 体やエンドソームなど様々な細胞内小器官に局在するためであると考えられ、fraction 13-15 に分布する輸送小胞より大きな膜小胞にも APP と Alcαが局在することを示している。imAPP と imAlcαは ER（Calnexin）と同様の分布を示した。Kinesin-1 輸送小胞 IP で Fzd5 が共沈したことや、Sucrose 密度勾配遠心法で Kinesin-1 輸送小胞と Fzd5 が共局在を示したことは、Fzd5 が Kinesin-1 小胞内に含まれることを示唆している。

次に Fzd5 が Alcα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 Alcαの局在を免疫染色法で解析した（Fig. 6A)。共局在率を解析した結果、約 30%の共局在を示した。Fzd5 が Alcαの軸索小胞内に含まれることが明かになった（Fig. 6B)。さらに Alcα依存的な Fzd5 の軸索輸送が行われているのか解析するため、shRNA を用いて Alcαをノックダウン（KD）し、神経軸索内の Fzd5 量を蛍光強度により定量した。まず EGFP 発現ベクターと Ctrl ベクターもしくは shAlcαベクターを共導入した細胞で、Alcαの細胞体における発現量を定量し KD 効率を検証した。Alcαを KD した細胞では Alcα量が約 50%まで低下していることを確認した（Fig. 6C,D)。その条件下で軸索中に存在する Fzd5 の軸索面積当たりのパンクタ数を比較したところ、Alcαを KD した細胞では有意に軸索内の Fzd5 量が減少していた（Fig. 6E,F)。これらの結果から、Fzd5 は Alcα小胞による

軸索輸送を受けることが示された。

つづいて軸索末端への輸送について解析した。マウス初代培養神経細胞の軸索伸長時に形成される Growth Cone（GC）は主に微小管で形成される中心部とアクチンで形成される周辺部に大別され、中心部には EE や RE などを含む vesicular pool が存在し、必要に応じて周辺部の細胞膜表面へ必要なタンパク質や膜の供給を行う（Fig. 7A)。Growth cone における Fzd5 の局在を解析した結果、微小管構成分子であるチューブリンが局在する中心部と周辺部にも局在していたが、中心部により多く分布していた（Fig. 7B)。GCV は中心部の veicular pool が存在する部位に厚みがあり、その他周辺は比較的薄く厚みのない構造をとっている。Fig. 7B はβ-Tubulin に焦点を合わせて観察した図であるため、Fzd5 が vesicular pool 様の構造は確認できないが、焦点面を少しずつずらして GC を観察することで Fzd5 が vesicular pool に局在することを確認している（data not shown)。よって GC の中心部における Fzd5 と Alcαの共局在を観察した（Fig. 7C)。その結果軸索で観察された共局在率と同程度の共局在率が中心部で観察され、周辺部では共局在率が有意に低下していた（Fig. 7D)。Fig. 7C の画像は GC を Z 軸方向に観察した時に焦点が合う全焦点面のちょうど中間面に焦点を合わせて観察した画像であり、vesicular pool の一部と周辺の輸送小胞が観察できる。Fzd5 と Alcαは中心部の中でも vesicular pool 周辺で共局在を示す割合が高かった。Fzd5 と Alcαが vesicular pool とその周辺で共局在する割合が高かったことから、GC へ輸送された Fzd5 は主に vesicular pool へ貯留されると推測される。細胞膜表面の Fzd5 が Wnt と結合し下流シグナルが活性化することで、細胞膜表面の Fzd5 量が増大することがすでに報告されていることから、外部シグナルに応じて vesicular pool から Fzd5 を供給することで膜表面の Fzd5 量を調節すると考えられる。

さらに Kinesin-1 によって輸送される Alcα小胞内に Fzd5 が含まれるのか解析するため、同様にマウスニューロンを抗β-tubulin 抗体と抗 Alcα抗体と抗 Fzd5 抗体で染色しβ-tubulin に焦点を合わせて観察しを行った。その結果、GC の中心部に存在する微小管に沿って Alcα と Fzd5 が共局在をすることが示された（Fig. 7E)。これは軸索から GC の中心部へ輸送される Alcα輸送小胞内に Fzd5 が含まれることを示している。

3-3　APP 小胞と Alcα小胞の積み荷の選択性

これまでの結果から、Fzd5 は Alcα小胞によって軸索輸送をうけ、末端の vesicular pool へ輸送されることが示された。LC-MS/MS で同定した Fzd5 が Alcαによる軸索輸送を受ける積み荷タンパク質であることが証明されたことから、LC-MS/MS で同定した APP、Alcα 小胞内タンパク質は APP、Alcα軸索輸送小胞由来であることが実証された。よって APP や Alcαは神経形成、伸長に関与する積み荷タンパク質の輸送に関与することが明かになった。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 Fzd5 が APP 小胞によっても軸索輸送されるのか解析するため、マウス初代神経細胞の軸索中における APP、Alcα、Fzd の三者の共局在を解析した（Fig. 8A)。

その結果、Fzd5 は APP とも共局在を示し、APP と約 25%、Alcαと約 35%の共局在率を示した（Fig. 8B)。さらに APP、Alcαと共局在を示す Fzd5 の puncta のうち約 50%は Alcα単独の小胞と、約 30%が APP 単独の小胞との共局在を示し、残り 20%は APP、Alcαとの三者共局在を示した（Fig. 8C)。これらの結果から APP 小胞にも Fzd5 が含まれていること、Alcαとの共局在率が高いことから、Fzd5 は Alcα小胞でより多く輸送されていることが示された。

さらに Fzd5 の輸送速度の解析を行い、APP と Alcαの輸送速度を比較し、APP と Alcα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 Alcαの平均輸送速度が異なることはすでに明らかである(Fig. 9A-D)。解析の結果 Fzd5 の平均輸送速度は APP と Alcαのおよそ中間の速度となり、Alcα様の速度と APP 様の速度の二峰性の速度分布を示した（Fig. 9E,F)。この結果からも Fzd5 は APP と Alcα小胞によって輸送されていることが確かめられた。

3-4　成熟した神経系における Fzd5 の輸送解析

APP と Alcα小胞は共に Fzd5 を軸索輸送すること、Alcαがより多くの Fzd5 の輸送を担い、軸索末端の vesicular pool へ輸送することが示された。Frizzled 受容体ファミリーは哺乳類において 10 種類、結合する Wnt についても 19 種類が同定されおり、発生期から成体期において固有の空間的・時間的発現があり、それぞれ特異的な機能を発揮すると考えられている。これまで初代培養神経細胞を用いて神経の形成期における解析を行ってきたが、Fzd5 も APP、Alcαと同様にマウスの胎児期から成体期まで発現が確認されており、成体期まで機能していると考えられる。成熟した神経系においても同様に APP、Alcαによる Fzd5 の輸送が行われているのか解析することにした。

まず成体マウス軸索内における三者の局在を解析するため、個体中で軸索の直径が最大であり、輸送小胞が観察しやすいマウス坐骨神経軸索を用いて免疫染色法で観察した（Fig. 10A)。その結果、これまでの解析と同様に、APP と Alcαがそれぞれ Fzd5 と共局在を示し、APP は約 30%、Alcαは約 40%が共局在することが明かになり、成熟した神経においても Fzd5 は APP 小胞、Alcα小胞によって軸索輸送されることが示された（Fig. 10B)。

次に APP、Alcαによる輸送が Fzd5 の神経終末への局在を制御するのか、APP、Alcα 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（Fig. 11A, B)、シナプトソーム画分では、WT マウスと比較して両 APP、Alcα KO マウスで Fzd5 量が有意に減少していた（Fig. 11C, D)。よって APP、Alcαによる輸送が Fzd5 の神経終末への局在を制御しうることが明かになった。

3-5　APP、Alcα KO マウス シナプトソーム画分の解析

APP、Alcα KO マウス神経終末において Fzd5 量が減少していたことから、次に Fzd5 下流の Wnt シグナルについて解析を行った。Frizzled 受容体は 10 種類が、Wnt は 19 種類の遺伝子がマウスで同定されており、受容体とリガンドの組み合わせによって異なるシグナル経路を活性化し細胞増殖、分化、移動、形態形成を制御する機能を持つ（Dijksterhuis *et al.*, 2014)。Wnt と Fzd 受容体の結合によって canonical 経路（Wnt/β-catenin 経路）と 2 つの non-canonical 経路（Wnt/JNK と Wnt/Ca^{2+}経路）の少なくとも 3 つの経路が活性化されることが明かであり、Wnt/β-catenin 経路は GSK3βの不活性化に伴うβ-catenin のユビキチン化を介したプロテアソームによる分解が抑制され、β-catenin が核内へ移行することで標的タンパク質の発現が増加することが明かである。Wnt/JNK 経路では Rac の活性化 を介して JNK を活性化し、細胞骨格の制御に重要であることが明らかになってきている (Huelsken and Behrens 2002; Habas and Dawid 2005)。Wnt/Ca^{2+}経路では Wnt と Fzd5 の結合に伴い細胞内に Ca^{2+}が流入することで CaMKII を活性化し、細胞間接着や原腸胚形成時の細胞動態に関与することが報告されている（Habas and Dawid., 2005; Kohn and Moon, 2005)。発生期における解析から Fzd5 は Wnt3、5、7 と結合することで細胞内にシグナルを伝達し、軸索ガイダンス、軸索伸長、シナプトジェネシスに関与することが報告されている（Dijksterhuis *et al.*, 2014)。成体マウス海馬でも Wnt3、5、7 の発現が認められており、Wnt3 や 7 はプレシナプスにおけるシナプス小胞の放出に関与すること、Wnt5 は成熟神経における神経新生に関与することが明かにはなってきているが、成熟した神経シナプス部におけるこれら経路の活性化に Fzd5 が関与するかは未だ未解明である (Inestrosa and Arenas, 2010)。よって Fzd5 量の減少がみられた APP、Alcα KO マウスのシナプトソーム画分でこれら下流シグナルに変化見られるか解析し、成体脳で Fzd5 がどのシグナル経路の制御に関与するのか、また APP、Alcαによる輸送がシナプスにおける Fzd5 の機能発現に影響すしうるのか解析するため、シナプトソーム画分における各シグナル量を解析した。まず Wnt/β-catenin 経路の活性化で存在量が増加するβ–catenin 量についてマウス脳の total lysate、シナプトソーム画分検証を行った（Fig. 12)。共に、WT と比較して有意な差は検出されなかった。次にリン酸化 JNK 量については、total lysate でのみスプライシングバリアントである p54 のリン酸化レベルの増加が認められたが（Fig. 13A, B, C)、Fzd5 量が減少しているシナプトソーム画分では変化が検出されなかったため（Fig. 13D, E, F)、Fzd5 受容体の輸送とは別の原因によるものではないかと考えられる。続いて CamKII のリン酸化レベルについて検証したところ、total lysate におけるリン酸化レベルに変化はなかったが、Alcα KO マウスシナプトソーム画分においてリン酸化レベルの低下がみられ、さらに APP KO マウスにおいても減少傾向がみられた。よって APP KO、Alcα KO マウスシナプトソーム画分では Ca^{2+}経路の活性が低下していると考えられる。この解析により APP と Alcαによる輸送で Fzd5 のシナプス部における局在が制御され、その結果 Fzd5 下流の Ca^{2+}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うることが示

唆された。

4. 考察

本研究では APP と Alcαが輸送する積み荷タンパクの同定と、APP、Alcα間での積み荷の選択性に着目して解析を行った。LC-MS/MS 解析から APP 小胞、Alcα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かになり、さらに Fzd5 について詳細に解析した結果、Fzd5 は Alcα依存的な軸索輸送をうけ、Growth cone の vesicular pool へ輸送されることが明らかになった。次に APP 小胞と Alcα小胞の積み荷の選択性について検証した結果、Fzd5 は APP 小胞による輸送も受けるものの、Alcαがより多くの Fzd5 を輸送することが明らかになった。さらに成熟した神経系においても APP、Alcαが Fzd5 を輸送しており、神経終末における Fzd5 の局在量を制御することで Fzd5 受容体の下流シグナルである pCaMKII レベルの調節に関与することを明らかにした。

APP 小胞 IP や Alcα小胞 IP の結果からもこれまで明らかになっているように APP と Alcαが単独で形成される輸送小胞が主要であることがわかる（Fig. 3B)。LC-MS/MS を用いて小胞内のタンパク質同定を行った結果も APP と Alcαが独自の積み荷タンパク質を輸送しうることを示している（Fig. 4A)。しかし、今回着目した積み荷タンパク質 Fzd5 は LC-MS/MS の解析から Alcα特異的に同定されたタンパク質であるが、Western Blot 法で検出した際には、Alcα小胞と比較すると少ないものの、APP 小胞内にも含まれていた（Fig. 5A)。さらに蛍光免疫染色法による局在解析でも APP と Fzd5 が約 25%共局在することが示された。これは小胞内 Alcα小胞に含まれる Fzd5 量の方が多いものの、APP 小胞によっても輸送されることを示している。LC-MS/MS の解析で APP 小胞から Fzd5 が検出されなかったのは APP 小胞内に含まれる Fzd5 量が少なかったためだと考えられる。しかし、初代培養神経細胞で Alcαを単独でノックダウンすると、軸索中の Fzd5 量が有意に減少することや、APP KO マウスや Alcα KO マウスのシナプトソーム画分で Fzd5 量が減少し Wnt シグナルで活性化される pCamKII レベルが低下していたことから、APP と Alcαが Fzd5 の輸送をお互いに補償し合うのではなく、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。

輸送を制御する機能を持つタンパク質として RabGTPase タンパク質が挙げられる。これまでに Rab11 結合型の Alcα小胞が存在し、順行性軸索輸送を受けるということが報告されている（Steuble *et al.*, 2010)。Rab11 は主にリサイクリングエンドソームへの輸送を制御する RabGTPase である。本研究では Alcα 小胞 IP の結果、Rab3 や Rab10 の強い結合が検出された（Fig. 3B)。Rab11 結合型の小胞の回収率が低いのは輸送小胞画分の調製方法や

vesicle IP の際に用いる抗体の違いが回収できる小胞の種類に影響するためであると考えられる。Alcα小胞には Rab3 や Rab10、Rab11 結合型の小胞が存在することから、RabGTPase が強調して小胞輸送を制御する可能性や、Alcα小胞が複数のオルガネラを標的に小胞輸送を行う可能性が考えられる。RabGTPase タンパク質の他にもカーゴ受容体や Kinein-1 側のリン酸化や、アダプタータンパク質の結合により輸送が制御されることが解明されてきた（Chiba *et al.*, 2014b, 2017; Sobu *et al.*, 2017)。今後 RabGTPase タンパク質に限らず Fzd5 や APP、Alcαの小胞輸送を制御する機構やタンパク質の解明が進むことで、APP と Alcαが Fzd5 輸送を異なる経路で制御しうるか否か検証することが可能になるであろう。

ニワトリ胚を用いた解析から Alcαが Frizzled 受容体ファミリーの一つである Fzd3 の輸送を制御することが報告されている。Fzd 受容体は 10 種類同定されており、さらに 5 つのサブファミリーに分類される（Jones, 2015)。Fzd 受容体はサブファミリー間で発現部位や発現時期が異なることや、KO マウスを用いた解析からもサブファミリー間で表現型に冗長性が見られないことから、それぞれが異なる機能を持っていると考えられている。Fzd5 と Fzd3 はサブファミリーが異なっており、特に Fzd5 が胎生期から adult なマウスまで発現が維持、増加するのに対し、Fzd3 の発現は胎生期に限局していることから Fzd3 は特に胎児期における神経の形成に重要であると考えられる。Alcαが Fzd5 と Fzd3 の両方を輸送する可能性が考えられるが、同様の機構で選別され輸送されるのか明らかではない。他のファミリー分子も同様に Alcαによって輸送されるのか解析することで、Fzd5 受容体の構造の違いが Alcα小胞への積荷の選別機構を解明する手がかりなると考えられる。

軸索末端へ輸送されるタンパク質はまずゴルジ体で選別され、輸送小胞を形成する。APP 小胞と Alcα小胞はそれぞれ単独で小胞を形成するものが主要であり、ゴルジ体で選別を受けることが想定されるが、その選別機構は明らかではない。輸送小胞への積み荷タンパク質の選別機構の一つとして、小胞形成時に膜表面に結合するコートタンパク質やアダプタータンパク質が関与することが明かになってきている（Guo *et al.*, 2014; Nakatsu and Ohno, 2003)。最も良く解析されているのは Adaptor protein (AP) complexes である。ヘテロ四量体で機能する AP はこれまでに 5 種類が同定されおり、主にクラスリンコート小胞の積み荷選別に関与する。AP -2 は細胞膜表面からエンドサイトーシスする小胞形成を制御し、その他 AP-3 から AP-5 はゴルジ体からエンドソームや細胞膜表面へ輸送される小胞の形成を制御する。AP complex は小胞形成時に主に膜タンパク質の細胞内ドメインの特定の配列を認識して相互作用することで積み荷タンパク質を集合させ、積み荷の選別を行っている。AP complex には複数のタンパク質結合サイトが存在し、結合する配列も明らかになってきている。これまでに AP-4 が APP の C 末部位と結合しゴルジ体からの小胞形成選別に関与することが報告されている。しかし、AP complex は 5 種類しか同定されておらず、複数の

配列を認識し積み荷タンパク質を制御することが明らかになっているが、エンドソームやリソソーム、細胞膜表面への輸送など大まかな分類を担うのみであり、軸索末端へ輸送される数多くのタンパク質を選別するメカニズムであるとは考えにくい。これまでにクラスリンコート小胞などのプロテオミクス解析が行われてきたが、多くのタンパク質を選別できるコートタンパク質やアダプタータンパク質、その他メカニズムは未解明である。積み荷タンパク質の選別機構を明らかにするためにも、各輸送小胞内にどのような積み荷タンパク質が含まれるのか解析を進める必要がある。

Fzd5 は Wnt3、5、7 と結合し Wnt シグナルを活性化することがすでに知られている。Wnt3 や 7 に結合することで Wnt/β-catenin 経路が活性化し、Wnt5 と結合すると Wnt/JNK と Wnt/Ca^{2+}経路が活性化することが報告されている。成熟した神経においてもこれら 3 つの Wnt と Fzd5 が発現しているにも関わらず、APP と Alcα KO マウスから調製したシナプトソーム画分では Wnt/Ca^{2+}経路下流の分子である pCaMKII のリン酸化レベルの低下のみが検出された。これまで報告されている Wnt シグナルは主に初代培養神経細胞など神経発生期における解析で見出された結果であるため、adult なニューロンでは Fzd5 の下流シグナルのうち Wnt/Ca^{2+}経路が主要である可能性が考えられる。しかし、adult なニューロンにおける Wnt/Ca^{2+}経路の活性化はポストシナプスに存在する Fzd 受容体の機能が報告されているのみで、プレシナプスで Fzd5 が Wnt/Ca^{2+}経路を制御するかは明らかではない。また、成熟した神経におけるシナプス可塑性時に活性するなど刺激依存的に局所で受容体の活性が制御される場合、シナプトソーム画分を解析するだけではシグナルの活性状態を検出できない可能性もある。本研究で Fzd5 が成熟した神経終末の Wnt/Ca^{2+}経路の活性を担う可能性が示唆されたが、今回の結果がシナプトソーム画分における Fzd5 の減少に由来した減少であるのか、Wnt/Ca^{2+}経路他のシグナル経路の活性化に Fzd5 が関与するかなど更なる解析が必要である。

本研究では APP と Alcαが神経形成に関与する積み荷を輸送することを明らかにし、特に Fzd5 においては APP と Alcαの両カーゴ受容体によって輸送や局在が制御されることが明かになった。これまで単一のカーゴ受容体による積み荷輸送の解析はいくつか行われてきたが、複数のカーゴ受容体に着目して研究を行っている例は少ない。他の積み荷タンパク質においても同様に複数のカーゴ受容体によって制御されるのか解析することで、今後複雑な積み荷輸送機構がどのように制御されるのか、どのように選別され小胞を形成するのかを明らかにしていくことが可能であると考えられる。

5. 実験方法

5-1 抗体

anti-APP C-terminal rabbit polyclonal antibody (G369), anti-Alcadeinα C-terminal guinea pig polyclonal antibody (Col90), anti-Alcadeinα C-terminal rabbit polyclonal antibody (UT195) and anti-KLC rabbit polyclonal antibody (UT109) were described previously (Oishi *et al.*, 1997; Araki *et al.*, 2007; Sobu *et al.*, 2017). anti-KIF5 mouse monoclonal antibody (H2) was provided by George S. Bloom (Brady et al., 1990; Pfister et al., 1989). Following antibodies were purchased from the indicated suppliers: anti-APP (N-terminal, 22C11, chemicon), anti-Frizzled5 (Y500, Bioworld Technology), anti-Calnexin (Stressgen), anti-EEA1 (BD Bioscience), anti-GFP (MBL), anti-LAMP1 (1D4B, BioLegend), anti-Actin (Merck Millipore), anti-α-Tubulin (10G10, Wako), anti-Neuron-specific beta -Ⅲ Tubulin (TUJ1, R&D Systems), anti-MAP2B (BD Bioscience), anti-N-Cadherin (BD Bioscience), anti-Flotillin-1 (BD Bioscience), anti-Rab1B (G-20, Santa Cruz Biotechnology), anti-Rab3C (N1C3, Gene Tex), anti-Rab7 (D95F2, Cell Signaling), anti-Rab10 (Bethyl Laboratories), anti-Rab11 (ERP787(B), Abcam), anti-Synaptotagmin (BD Bioscience), anti-Synaptophysin (D-4, Santa Cruz Biotechnology), anti-Syntaxin 6 (BD Bioscience), anti-VGluT1 (SIGMA-Aldrich), anti-VGAT (F-2, Santa Cruz Biotechnology), anti-VAMP2 (D601A, Cell Signaling), anti-β-Catenin (BD Bioscience), anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9, Cell Signaling), anti-SAPK/JNK (Cell Signaling), anti-phospho-CamKII (Thr286) (D21E4, Cell Signaling) and anti-CaM Kinase II (6G9, EMD Millipore).

ウエスタンブロット法に用いた二次抗体

anti-mouse IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare)
anti-rabbit IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare)
anti-rat IgG-HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare)
anti-goat IgG-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology)

蛍光免疫染色法に用いた二次抗体

Cy3-conjugated AffiniPure Donkey anti-Guinea Pig IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories)
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 647 (Abcam)
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific)

5-2　マウス脳の細胞分画法

輸送小胞画分の調製 - Steuble et al. (2010) で述べられた手法を一部改変して用いた。 野生型マウス脳に 3 ml の sol A (5 mM HEPES pH 7.6, 320mM Sucrose, 1 mM EDTA) を加えて Dounce Homogenizer で 10 回ホモジナイズし、1,000xg, 10 min で遠心後、sup (S1) と pet (P1) を回収した。S1 を 11,000 xg, 10 min 遠心し、sup (S2) と pet (P2) を回収後、さらに S2 を 40,000 xg, 4℃, 40 min 遠心し、sup (S3) と pet (P3) を回収した。S3 を 166,000 xg, 60 min 遠心後、sup (S3)と pet (P4)を回収した。P4 画分を Buffer A で懸濁後 1 時間 rotate し、輸送小胞画分とした。各画分のタンパク濃度を micro Lowry 法で定量し、ウエスタンブロット法では 10 μg/ lane となるように使用した。

シナプトソーム画分の調製 - Carlin et al. (1980)で述べられた手法を一部改変して用いている。1 か月齢の野生型マウス脳を上記と同様にホモジナイズし、1000 xg, 10 min で遠心後、sup をさらに 13,800 xg, 20 min 遠心し pet (P2) を回収した。P2 に 1 ml の solA を加え、Dounce Homogenizer で 7 回ホモジナイズした (P2')。遠心管に 3 ml ずつ 1.2 M、1.0 M、0.8 M sucrose を重ね、その上に P2'を重層し、82,500 xg, 2hr (Beckman SW41Ti rotor) 遠心した。1.2 M sucrose と 1.0M sucrose の境界 1 ml を回収し、シナプトソーム画分とした。タンパク定量を行い、micro Lowry 法で定量し、W.B.で解析した。上記操作は全て on ice 条件下、Protease inhibitor (PI) mix (5 μg/ml Leupeptin, 5 μg/ml Pepstatin A, 5 μg/ml Chymostatin) 存在下で行った。

5-3　免疫沈降法による輸送小胞の回収

APP 小胞と Alcα小胞の回収－1 サンプルあたり 60 μl の Dynabeads Protein G (Invitrogen) と 6 μg の抗 APP 抗体 (G369) または抗 Alcα抗体 (UT195) を 1 ml の PBS (10 mM Sodium Phosphate buffer, pH7.6, 150 mM NaCl) 中で混和し、1 時間 rotate した。ビーズを PBS で 2 回洗浄後、輸送小胞画分を 250 μg 加え(0.5 μg/μl in PBS)、2 hr rotate した。ビーズを PBS で 8 回 wash 後、10 μl のデオキシコール酸ナトリウム (SDC) 溶出液 (5%SDC in 25 mM NH_4HCO_3) を加えて 5 分間混和した。上清を回収後、もう一度同じ操作を繰り返して回収した計 20 μl を SDC eluate とした。さらに残ったビーズに SDS 溶出液 (5%SDS in 25 mM NH_4HCO_3) を加え上記と同様の操作で回収した計 20 μl を SDS eluate とした。

MS 解析用のサンプル調製－SDC eluate サンプルを 5 分間煮沸し、還元 (100 mM DTT, 25 mM NH_4HCO_3, pH 8.0, 56℃, 30 min)、アルキル化 (55 mM IAA, 25 mM NH_4HCO_3, pH 8.0, 遮光, 20min, RT)し、0.5%SDC 濃度になるように希釈後、トリプシン消化 (0.5 μg, 37℃, overnight) した。PTS 法 (Masuda et al., 2008) を用いて、サンプル溶液ちゅうから SDC を除去した。サンプルをフィルター (0.20 μm) に通し、減圧下で濃縮しサンプルとした。

ウエスタンブロット用のサンプル調製－SDC eluate と SDS eluate サンプルは SDS-Sample Buffer 中で 5 分間煮沸し、上清をサンプルとした。

5-4　LC-MS/MS を用いた小胞内タンパク質の同定解析

LC-MS/MS 解析－調製したサンプルは ACQUITY UPLC（Waters Corp., Milford, MA, USA）と Xevo G2 QTof（Waters Corporation)を用いて解析した。消化後のサンプルは nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column（75 µm × 20 mm, Waters Corporation)で濃縮と脱塩後、ACQUITY UPLC HSS T3 Column (1.8 µm, 75 µm × 150 mm, Waters Corporation）を用いて分離した（流速: 300 nL/min, グラジエント: 0.1%ギ酸, 5–40% アセトニトリル, 80 分)。独立した実験を 5 回行った。MS 解析はポジティブイオンモード（source temperature: 120°C, capillary voltage: 3.0 kV）で Data-independent (MS^E) 解析を行った。

タンパク質の同定－LC-MS/MS 解析で得られたデータを PLGS（ProteinLynx Global SERVER Ver. 2.5）で解析しタンパク質の同定を行った（Peptide Tolerance: Automatic; Fragment Tolerance: Automatic; Missed cleavages: 1; False positive Rate: 4)。タンパク質データベースは mouse taxonomy (Uniprot）を用いた。

同定したタンパク質は PANTHER（**P**rotein **AN**alysis **TH**rough **E**volutionary **R**elationships）システムを用いて分類した。

5-5　マウス大脳皮質及び海馬神経細胞の培養

マウス大脳皮質及び海馬の初代培養神経細胞は E15.5-16.5 マウス胎児を用いて調製した。Chiba et al., 2014 で述べられた手法を一部改変して用いた。細胞は poly-L-lysine でコーティングしたチャンバー（Nalgen Nunc in Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY）に蛍光免疫染色用には 4 × 10^4 cells/cm^2、kive imaging やノックダウン解析用には 8 × 10^4 cells/cm^2 で播種し、2% B-27 Supplement (Invitrogen, Carlsbad, CA), 4 mM Glutamax I, 5% heat-inactivated horse serum を含む Neurobasal Medium (Life Technologies)中で培養した。トランスフェクションは DIV 3-4 ニューロンで行い、全反射顕微鏡を用いた観察はトランスフェクション後 16 時間､ノックダウン細胞の観察はトランスフェクション後 24 時間の時点で行った。

5-6　蛍光免疫染色法

DIV 4-5 のマウス初代培養神経細胞を 4%PFA/PBS で 10 分間固定し、0.2% Triton X-100/PBS 中で 5 分間透過処理を行った。1% goat serum/PBS で 10 分間ブロッキングを行った後、anti-Fzd5 又は anti-Alcα (Col90）、anti-APP (22C11）抗体を含むブロッキング液中で 4℃一晩インキュベーションした。洗浄後二次抗体を反応させた。蛍光画像は蛍光顕微鏡(BZ-710X; Keyence, Osaka, Japan)を用いて取得し、ImageJ (National Institutes of

Health)で解析を行った。

5-7　全反射顕微鏡を用いた軸索内輸送速度解析

DIV 3-4 の初代培養神経細胞に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてプラスミドをトランスフェクションし、16 時間後に全反射顕微鏡(C1; Nikon, Tokyo, Japan) で観察した。観察は 5%CO2 充満 37℃インキュベーション条件下で、Nikon CFI Apo TIRF (100x, NA=1.49 in oil)を対物レンズとして用い、488 nm のレーザー光を用いて観察を行った。画像は Cascade650 CCD カメラ (Photometrics)で取得し、Metamorph 6.1 ソフトウェア (Molecular Device)を用いて解析した。速度解析は、Track pts を用い、Exposure time を 200 ms として 5 フレームの平均の速度を算出した。カイモグラフは Kymomaker ソフトウェア (Chiba et al., 2014) を用いて作製した。全反射顕微鏡を用いた観察と解析は北海道大学 大学院先端生命科学学院 細胞機能科学研究室 金城政孝教授の御厚意により同研究室内設置のものを使用し行った。

5-8　cDNA クローニングとプラスミドの作製

マウス Frizzle5 cDNA (585 amino acids, GenBank accession number NM_022721) は P56 マウス脳から調製した cDNA を template として、次のプライマーを用いてクローニングした (5'-GGGGTACCGCCACCATGGCTCGACCCGACCCGTC-3' and 5'- CCGCTCGA GTACGTGCGACAGGGACACTTGC-3')。作成したプラスミドはシークエンシングを行い、挿入部位に変異のないことを確認した。但しサイレント変異は許容した。

pcDNA3.1-hAPP-GFP と pcDNA3.1-hAlcα-EGFP は Araki et al., 2007 に記載。pSuperm-Alcαは nucleotides1174-1192 (5'-GAGACAATTCTCTGCAGTT-3') を標的として作製され、Nakaya et al., 2008 に記載の手法で調製した。

5-9　マウス坐骨神経軸索の調製と蛍光免疫染色法

マウス坐骨神経軸索の蛍光免疫染色は Spiegel et al., 2007 に記載の手法をもとに行った。3 か月齢マウスの坐骨神経を取り出し、4%PFA/PBS、4℃条件下で 3 時間固定後、30% Sucrose/PBS で一晩置換した。3-5 mm サイズに切断し、スライド上で神経をほぐしたのち風乾した。0.1% Triton X-100/PBS で 10 分間透過処理を行った後 5%goat serum/PBS で 30 分間ブロッキングした。anti-Fzd5 と anti-Alcα (Col90) 抗体、又は anti-Fzd5 と anti-APP (22C11) 抗体を含むブロッキング液中で 4℃一晩インキュベーションし、洗浄後、二次抗体を反応させた。蛍光画像は蛍光顕微鏡(BZ-710X; Keyence, Osaka, Japan)を用いて取得した。

6. 参考文献

Alther, T.A., Domanitskaya, E., and Stoeckli, E.T. (2016). Calsyntenin1-mediated trafficking of axon guidance receptors regulates the switch in axonal responsiveness at a choice point. Development *143*, 994–1004

Araki, Y., Kawano, T., Taru, H., Saito, Y., Wada, S., Miyamoto, K., Kobayashi, H., Ishikawa, H.O., Ohsugi, Y., Yamamoto, T., et al. (2007). The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. EMBO J. *26*, 1475–1486.

Bamberg, J.A., Baumgartner, S., Betz, H., Bolz, J., Chedotal, A., Christensen, C.R.L., Comoglio, P.M., Culotti, J.G., Doherty, P., Drabkin, H., et al. (1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. Cell *97*, 551–552.

Barros, C.S., Franco, S.J., and Mu, U. (2011). Extracellular Matrix : Functions in the Nervous System. Cold Spring Harb Perspect Biol. *3,* a005108.

Bhuin, T., and Kumar, J. (2014). Rab proteins : The key regulators of intracellular vesicle transport. Exp Cell Res. *8*, 1–19.

Binder, D.K., and Scharfman, H.E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors *22*, 123–131.

Bonifacino, J.S. (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. J. Cell Biol. *204*, 7–17.

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.

Bucci, C., Alifano, P., and Cogli, L. (2014). The Role of Rab Proteins in Neuronal Cells and in the Trafficking of Neurotrophin Receptors. Membranes *4*, 642–677.

Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S., and Siekevitz, P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: Enrichment of different types of postsynaptic densities. J. Cell Biol. *86*, 831–843.

Chen, Y.A., Scheller, R.H., and Medical, H.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. Nature Reviews Molecular Cell Biology *2*, 98–106.

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

Chiba, K., Araseki, M., Nozawa, K., Furukori, K., and Araki, Y. (2014b). 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, A.C., Kinjo, M., Taru, H., et al. (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.

Craig, A.M., and Banker, G. (1994). Neuronal Polarity. Annu. Rev. Neurosci. *17*, 267–310.

Dijksterhuis, J.P., Petersen, J., and Schulte, G. (2014). WNT/Frizzled signalling: Receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. Br. J. Pharmacol. *171*, 1195–1209.

Dotti, C.G., Sullivan, C. a, and Banker, G. a (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. J. Neurosci. *8*, 1454–1468.

Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R. V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dec) gene. Nature *386*, 796–804.

Foletti, D.L., Prekeris, R., and Scheller, R.H. (1999). Generation and Maintenance of Neuronal Polarity: Mechaninsms of Transport and Targeting. Neuron *23*, 641–644.

Glick, B.S., and Nakano, A. (2009). Membrane Traffic Within the Golgi Apparatus. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *25*, 113–132.

Guo, Y., Sirkis, D.W., and Schekman, R. (2014). Protein Sorting at the *trans*-Golgi Network. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *30*, 169–206.

Hauri, H.P., Kappeler, F., Andersson, H., and Appenzeller, C. (2000). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. J. Cell Sci. *113 Pt 4*, 587–596.

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.

Huang, E.J. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. Annu Rev Neurosci. *24*, 677–736.

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

Inestrosa, N.C., and Arenas, E. (2010). Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 77–86.

Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans. Neuron *9*, 873–881.

Jones, C.L. (2015). Frizzled Receptors in Development and Disease. Curr Top Dev Biol. *33*, 117–139.

Kamal, A., Stokin, G.B., Yang, Z., Xia, C.-H., and Goldstein, L.S.B. (2000). Axonal Transport of Amyloid Precursor Protein Is Mediated by Direct Binding to the Kinesin Light Chain Subunit of Kinesin-I. Neuron *28*, 449–459.

Keino-masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Culotti, J.G., and Tessier-lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer. Cell *87*, 175–185.

Korte, M., Herrmann, U., Zhang, X., and Draguhn, A. (2012). The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: Lessons from genetic mouse models. Exp. Brain Res. *217*, 435–440.

Masuda, T., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2008). Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. J. Proteome Res. *7*, 731–740.

Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., and Yanagi, S. (2002). Involvement of Fes / Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. EMBO J. *21*.

Nakatsu, F., and Ohno, H. (2003). Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. Cell Struct. Funct. *28*, 419–429.

Nakaya, T., Kawai, T., and Suzuki, T. (2008). Regulation of FE65 nuclear translocation and function by amyloid β-protein precursor in osmotically stressed cells. J. Biol. Chem. *283*, 19119–19131.

Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Uchiyama, S., Goshima, Y., Kumanogoh, A., et al. (2010). Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. Nature *467*, 1123–1127.

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's Amyloid Precursor Protein and Thr668 in Adult Rat Brain and Cultured Cells. *3*, 111–123.

Ortiz-Medina, H., Emond, M.R., and Jontes, J.D. (2014). Zebrafish calsyntenins mediate homophilic adhesion through their amino-terminal cadherin repeats. Neuroscience *286C*, 87–96.

Pfister, K.K., Wagner, M.C., Stenoien, D.L., Brady, S.T., and Bloom, G.S. (1989). Monoclonal antibodies to kinesin heavy and light chains stain vesicle- like structures, but not microtubules, in cultured cells. J. Cell Biol. *108*, 1453–1463.

Sahores, M., Gibb, A., and Salinas, P.C. (2010). Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. Development *137*, 2215–2225.

Satoh, T., Sato, K., Kanoh, A., Yamashita, K., Yamada, Y., Igarashi, N., Kato, R., Nakano, A., and Wakatsuki, S. (2006). Structures of the carbohydrate recognition domain of Ca2+-independent cargo receptors Emp46p and Emp47p. J. Biol. Chem. *281*, 10410–10419.

Serafini, T., Kennedy, T.E., Gaiko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. Cell *78*, 409–424.

Slater, P.G., Ramirez, V.T., Gonzalez-Billault, C., Varela-Nallar, L., and Inestrosa, N.C. (2013). Frizzled-5 Receptor Is Involved in Neuronal Polarity and Morphogenesis of Hippocampal Neurons. PLoS One *8*, e78892.

Sobu, Y., Furukori, K., Chiba, K., Nairn, A.C., Kinjo, M., and Hata, S. (2017). Phosphorylation of multiple sites within an acidic region of Alcadein α is required for kinesin-1 association and Golgi exit of Alcadein α cargo. Mol. Biol. Cell, *28*, 3844-3856.

Spiegel, I., Adamsky, K., Eshed, Y., Milo, R., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Horresh, I., Scherer, S.S., Rasband, M.N., and Peles, E. (2007). A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination. Nat. Neurosci. *10*, 861–869.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 513–525.

Steuble, M., Gerrits, B., Ludwig, A., Mateos, J.M., Diep, T.-M., Tagaya, M., Stephan, A., Schätzle, P., Kunz, B., Streit, P., et al. (2010). Molecular characterization of a trafficking organelle: Dissecting the axonal paths of calsyntenin-1 transport vesicles. Proteomics *10*, 3775–3788.

Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S., et al. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Science *307*, 1282–1288.

Suzuki, T., and Nakaya, T. (2008). Regulation of amyloid β-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. J. Biol. Chem. *283*, 29633–29637.

Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. Nat. Neurosci. *14*, 54–63.

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.

Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y., Zhao, N., Dominguez, B., Lee, K., Gan, W., et al. (2005). Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2. *25*, 1219–1225.

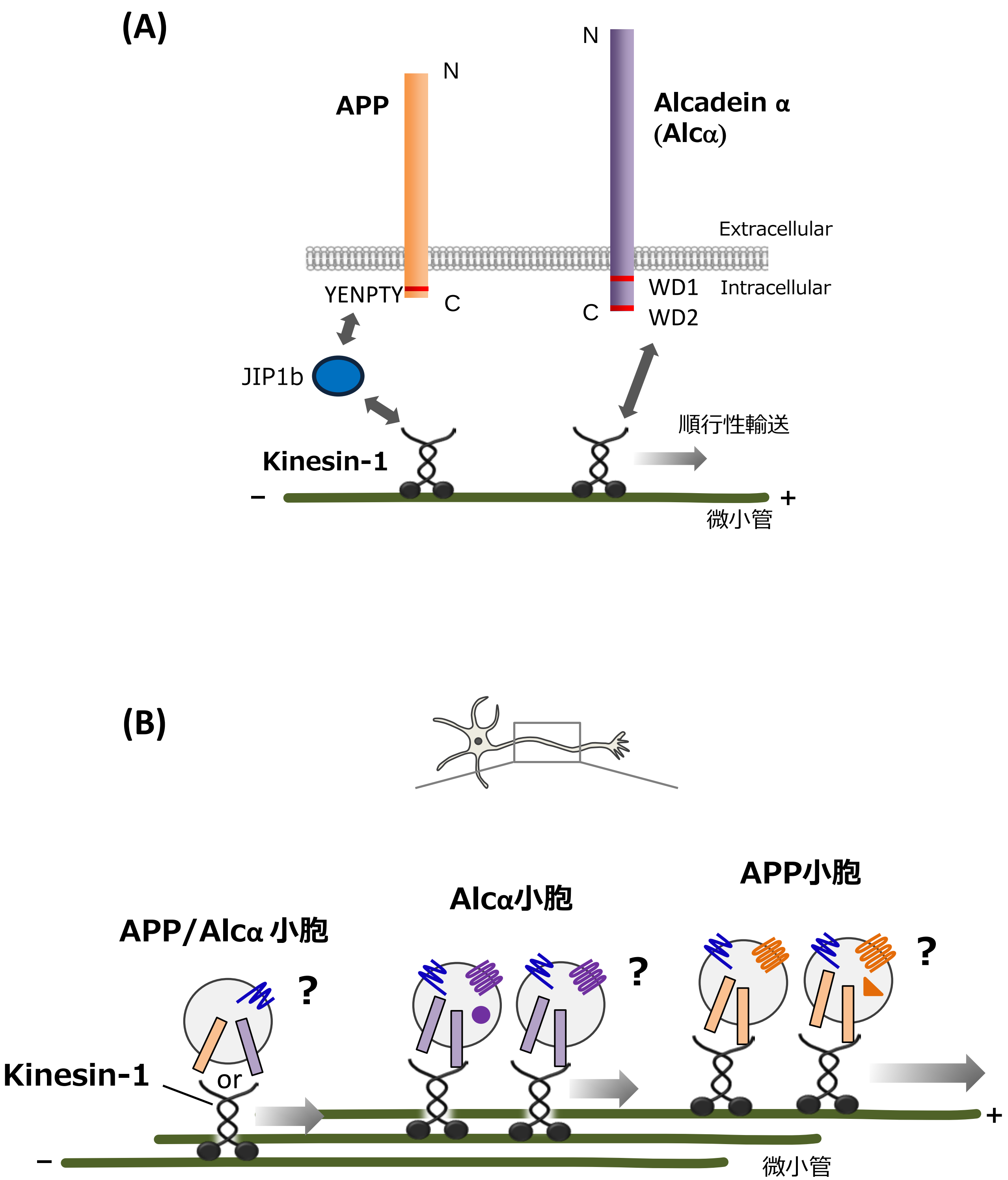


Figure 1. Kinesin-1のカーゴ受容体タンパク質APPとAlcα

(A) Kinein-1とAPP又はAlcαの結合様式。APPはJIP1bを介してKinesin-1と結合するのに対し、AlcαはWDモチーフで直接Kineshin-1と結合する。

(B) APP又はAlcαが単独で形成する小胞が主要である。APPとAlcaが輸送する積み荷タンパク質は未解明である。

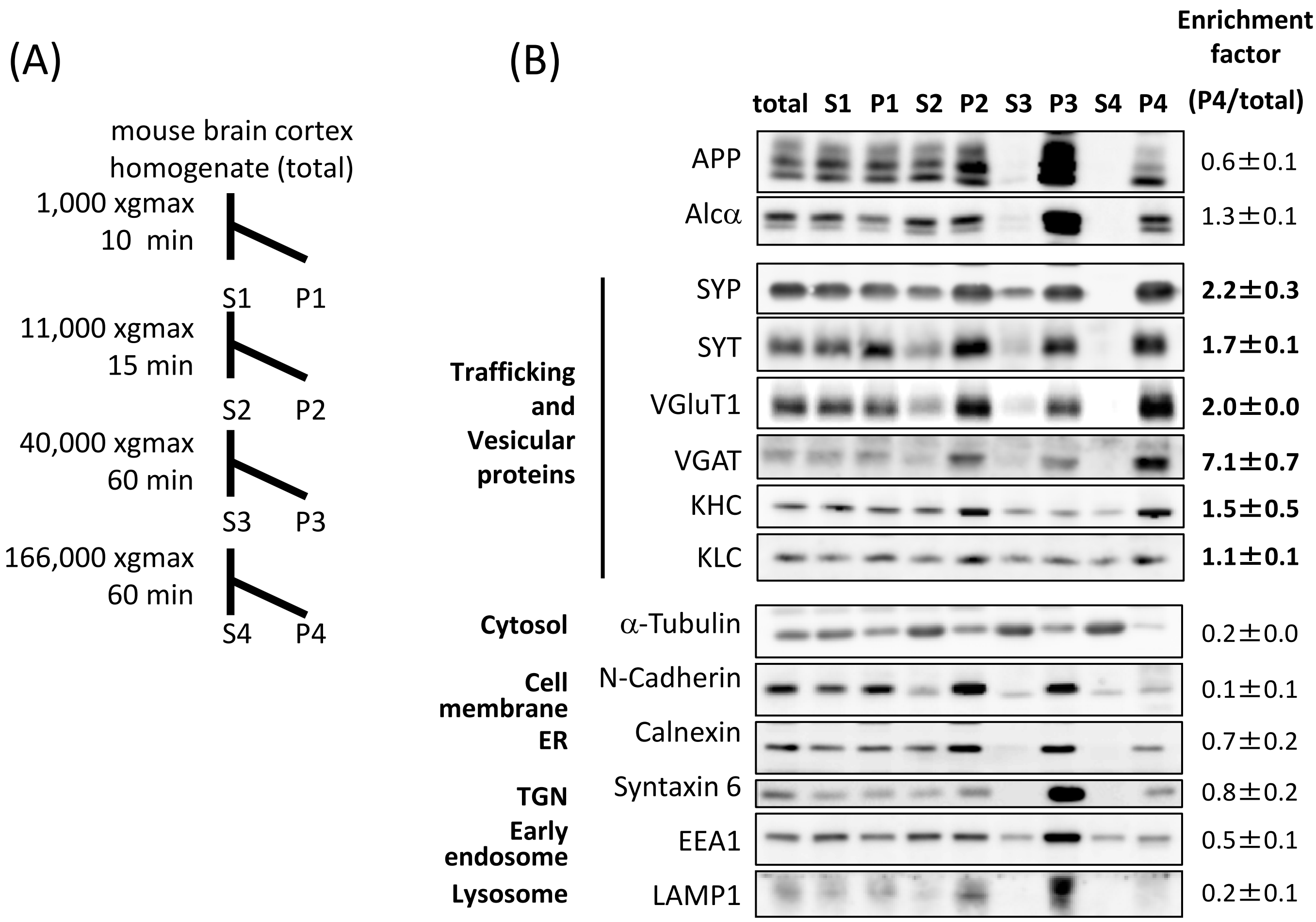


Figure 2. 輸送小胞画分の調製

(A) 遠心分画手法。

(B) (A)の手法で調製した各fractionをWestern Blot法で解析した。Total lysateに対するP4fractionのバンド強度比をEnrichment factorとした。オルガネラマーカー分子と比較して輸送関連タンパク質がより多く回収されていることがわかる。10 μg/ lane, n = 3, mean ± S.E.

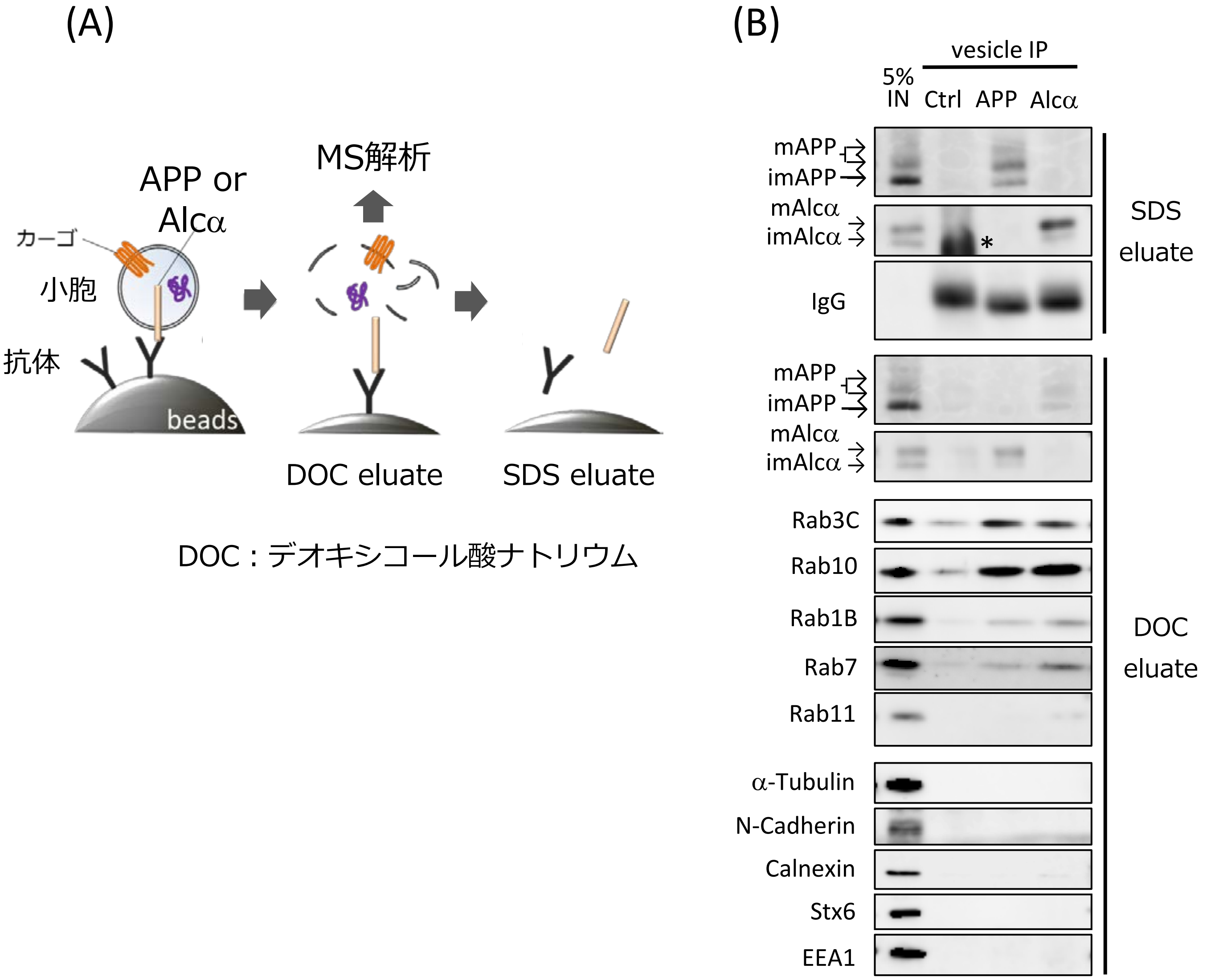
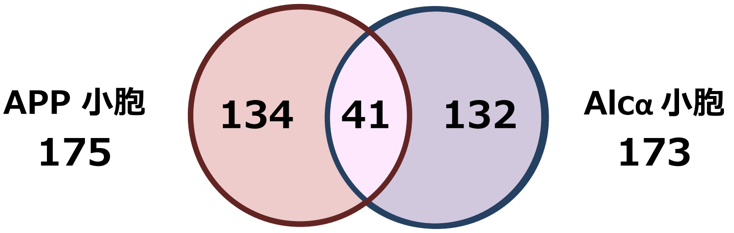


Figure 3. 膜小胞免疫沈降法によるAPP小胞とAlcα小胞の回収と解析
(A) Vesicle IP溶出方法の模式図。
(B) APP小胞とAlcα小胞内タンパク質の解析。SDS eluateからAPP IPとAlcα IPどちらにおいてもmAPP又はmAlcαが濃縮されていることがわかる。またゴルジ体から細胞膜表面への順行性の膜小胞輸送を制御するRab3CやRab10の結合が他のRabGTPaseと比較して強いことやオルガネラマーカー分子(a-Tubulin, N-Cadeherin, Calnexin, Syntaxin 6, EEA1) の共沈が認められないことから、膜小胞免疫沈降法により、順行性のAPP輸送小胞とAlcα輸送小胞が回収されていると考えられる。

(A)



(B)

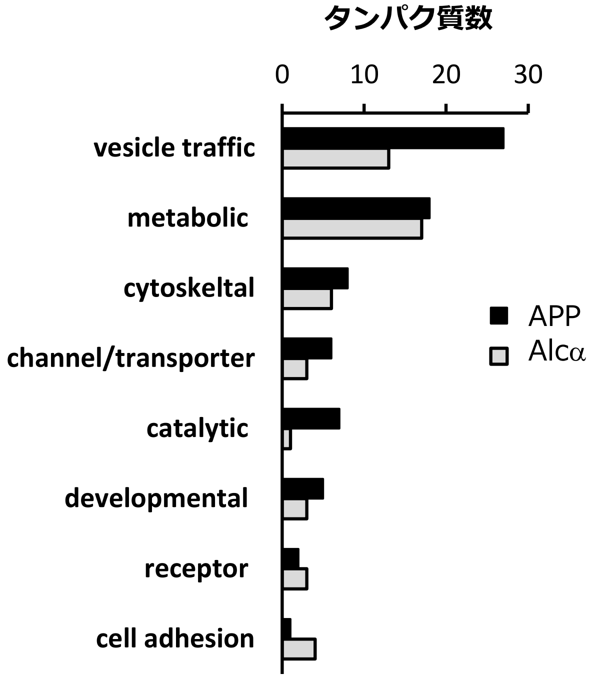


Figure 4. LC-MS/MSによるAPP小胞とAlcα小胞内タンパク質の同定
(A) 同定したタンパク質数と内訳。n=5
(B) Gene Ontology (GO) 解析によるタンパク質の分類。APPとAlcαで特異的に同定されたタンパク質をGOの情報をもとに表記のカテゴリーに分類した。タンパク質の機能が未解明なものや、表記のカテゴリーに分類されないものは除外した。

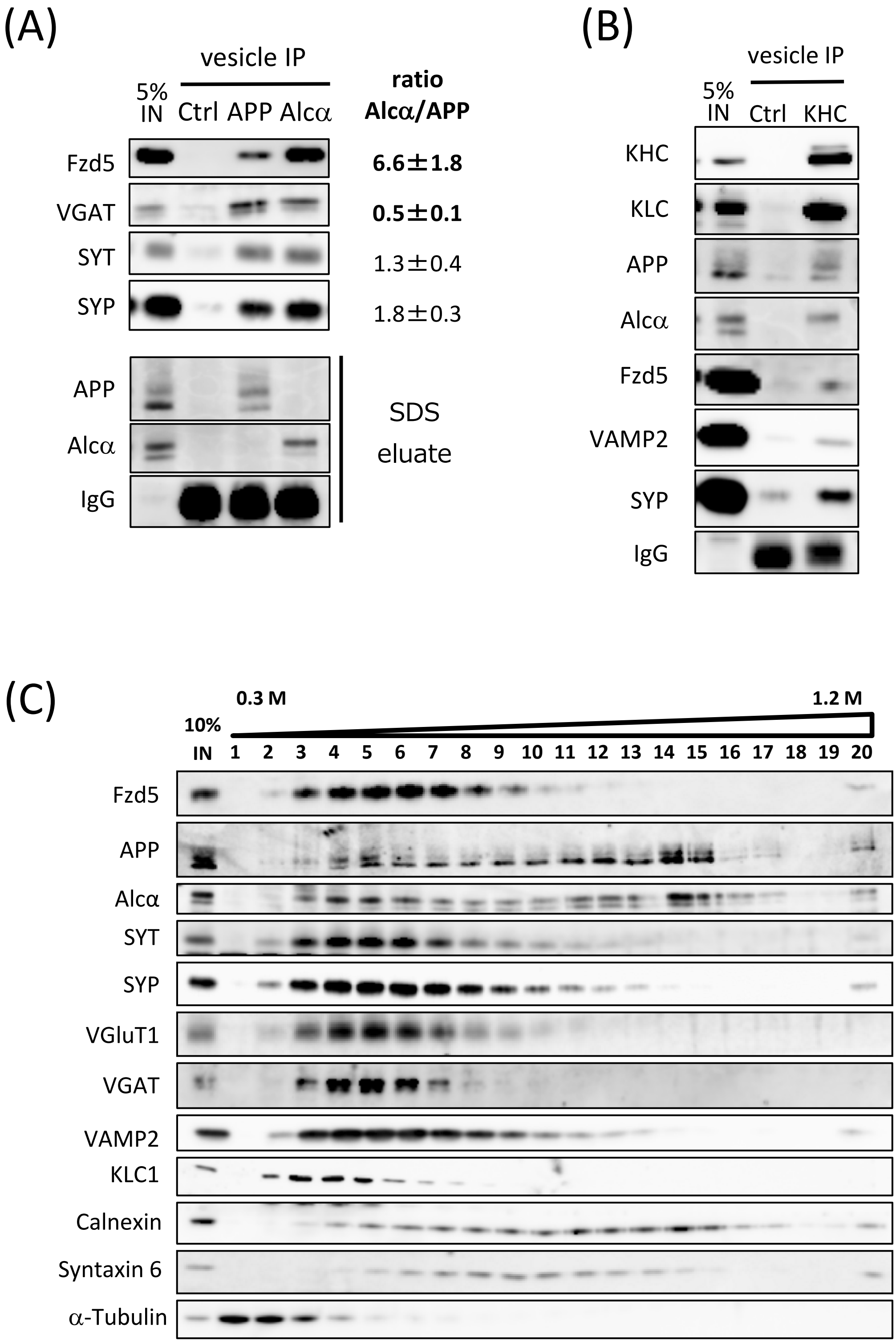


Figure 5. LC-MS/MSによるAPP小胞とAlcα小胞内タンパク質の同定
(A) APP vesicle IP又はAlcα vesicle IPで回収したFzd5量の比(ratio Alcα/APP) を定量した。
(B) 輸送小胞画分から抗KHC抗体を用いて免疫沈降を行い、Western Blotで解析した。
KHC IPによりKinein-1 (KHC and KLC) とカーゴ受容体APPとAlcα、さらにFzd5が共沈した。
(C) 輸送小胞画分をSucrose密度勾配遠心法によって分離し、Western Blot法で各マーカー分子を検出した。Fzd5は輸送関連分子が濃縮するfraction 3-6に存在する。

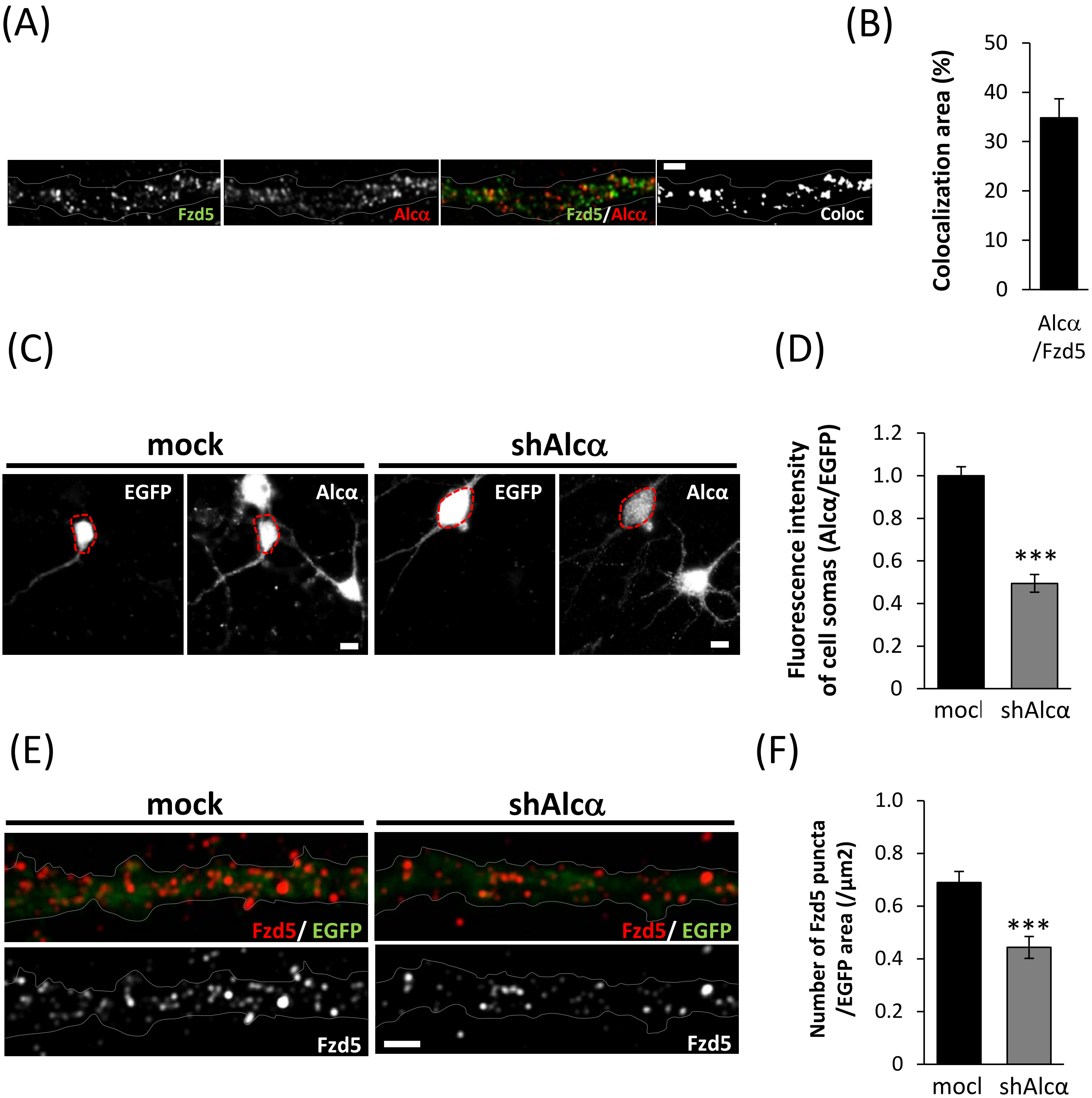


Figure 6. AlcαによるFzd5の軸索輸送

(A) マウスニューロン軸索中におけるFzd5とAlcαの共局在解析。DIV4-5の初代培養神経細胞を抗Alcα抗体と抗Fzd5抗体で免疫染色し観察した。Colocは共局在部位を示している。Scale bar = 2 µm

(B) (A)からAlcαとFzd5の共局在率を定量した。n = 11, mean ± S.E.

(C) AlcαのノックダウンKD) 効率の解析。Ctrlベクター (mock)またはshAlcαベクターを発現させ、細胞体部分の（赤枠内）のAlcα量を定量した。どちらもEGFP発現ベクターを共導入している。

(D) (C) の定量結果。n = 9, mean ± S.E., *** :p<0.001, Scale bar = 10 µm

(E) AlcαをKDした細胞を抗Fzd5抗体で染色し、軸索中に存在するFzd5を観察した。Scale bar = 2 µm

(F) (E) で軸索中に存在するFzd5のpuncta数を定量した。n = 11, mean ± S.E., *** :p<0.001

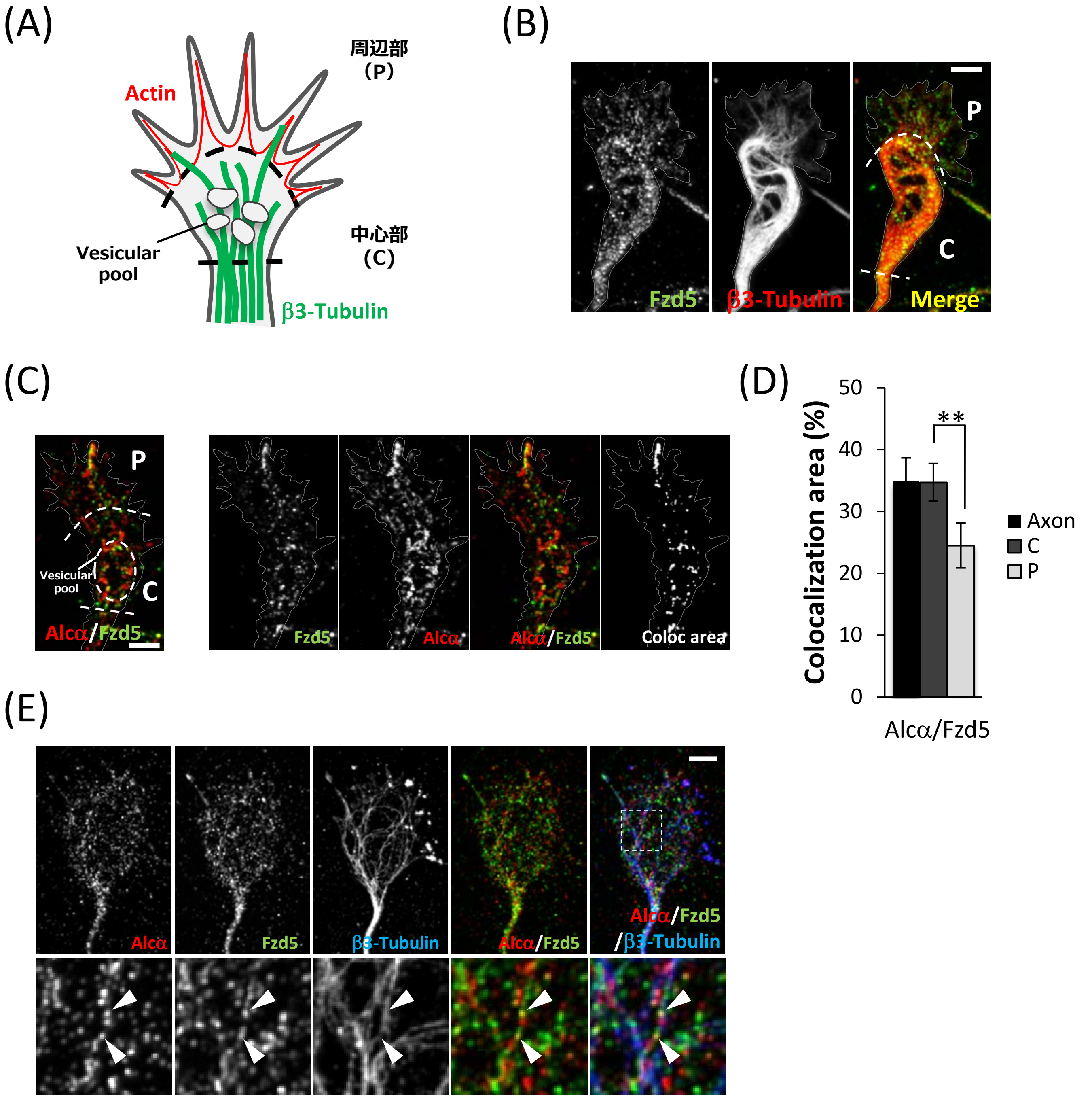


Figure 7. Growth ConeにおけるFzd5とAlcαの局在解析

(A) GCの模式図。GCはβ3-Tubulinから構成される中心部 (C) と主にActinから構成される周辺部 (P) に大別される。中心部にはVesicular poolが存在し、周辺部へのタンパク質や膜成分の供給を担う。

(B) マウスニューロンのGrowth ConeにおけるFzd5の局在解析。DIV4-5の初代培養神経細胞を抗Fzd5抗体と抗β3-Tubulinで共染色し、GCにおけるFzd5の局在を観察した。Scale bar = 5 μm

(C) GCにおけるAlcαとFzd5の共局在解析。(A)と同様にマウスニューロンを抗Alcα抗体と抗Fzd5抗体で染色し、共局在を観察した。CはGCの中心部を、Pは周辺部を示している。Cloc areaはmerge部位を示している。Scale bar = 5 μm

(D) (C)でAlcαとFzd5が共局在する面積を定量した。n = 11, mean ± S.E., ** :p<0.01

(E) GCにおけるβ3-TubulinとAlcα、Fzd5の共局在解析。AlcαとFzd5は微小管上で共局在を示した。白い点線で囲った部位を拡大して下段に示している。白矢頭はMerge部位を示している。Scale bar = 5 μm

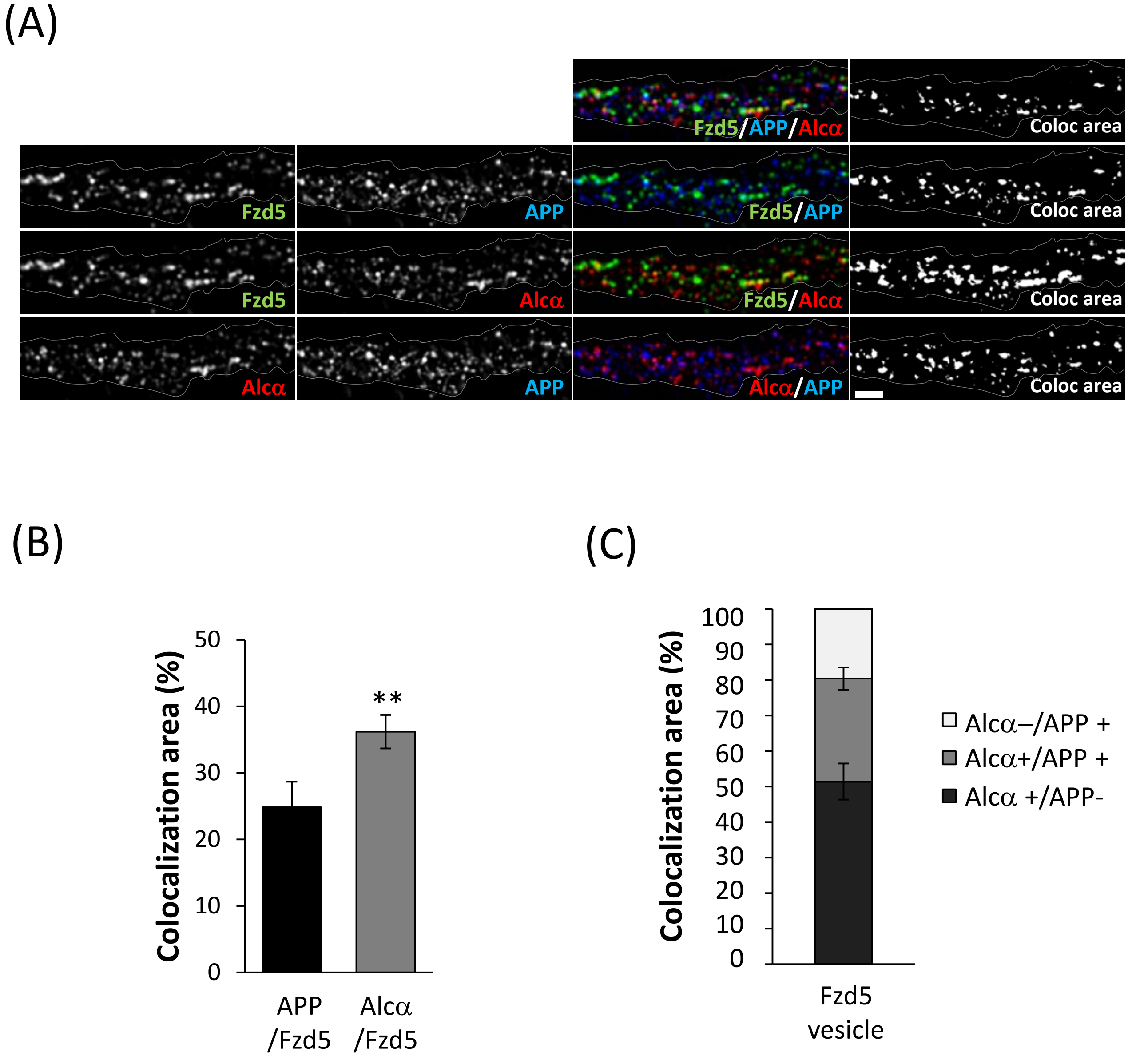


Figure 8. 神経軸索におけるAPPとAlcα、Fzd5の三者共局在解析

(A) DIV4-5の初代培養神経細胞を抗APP抗体と抗Alcα抗体、抗Fzd5抗体を用いて蛍光免疫染色し、軸索中における共局在を観察した。それぞれ単独の染色画像と二者のmerge画像とそのmerge部位 (Coloc area) を示している。一番上の図は三者のmerge画像とmerge部位を示している。Scale bar = 2 μm

(B) Fzd5と共局在するAPPとAlcαの面積を定量した。n = 7, mean ± S.E., ** :$p<0.01$

(D) APP又はAlcαと共局在する全Fzd5 vesicleを100%としたときの共局在率の内訳を示した。n = 7, mean ± S.E., ** :$p<0.01$

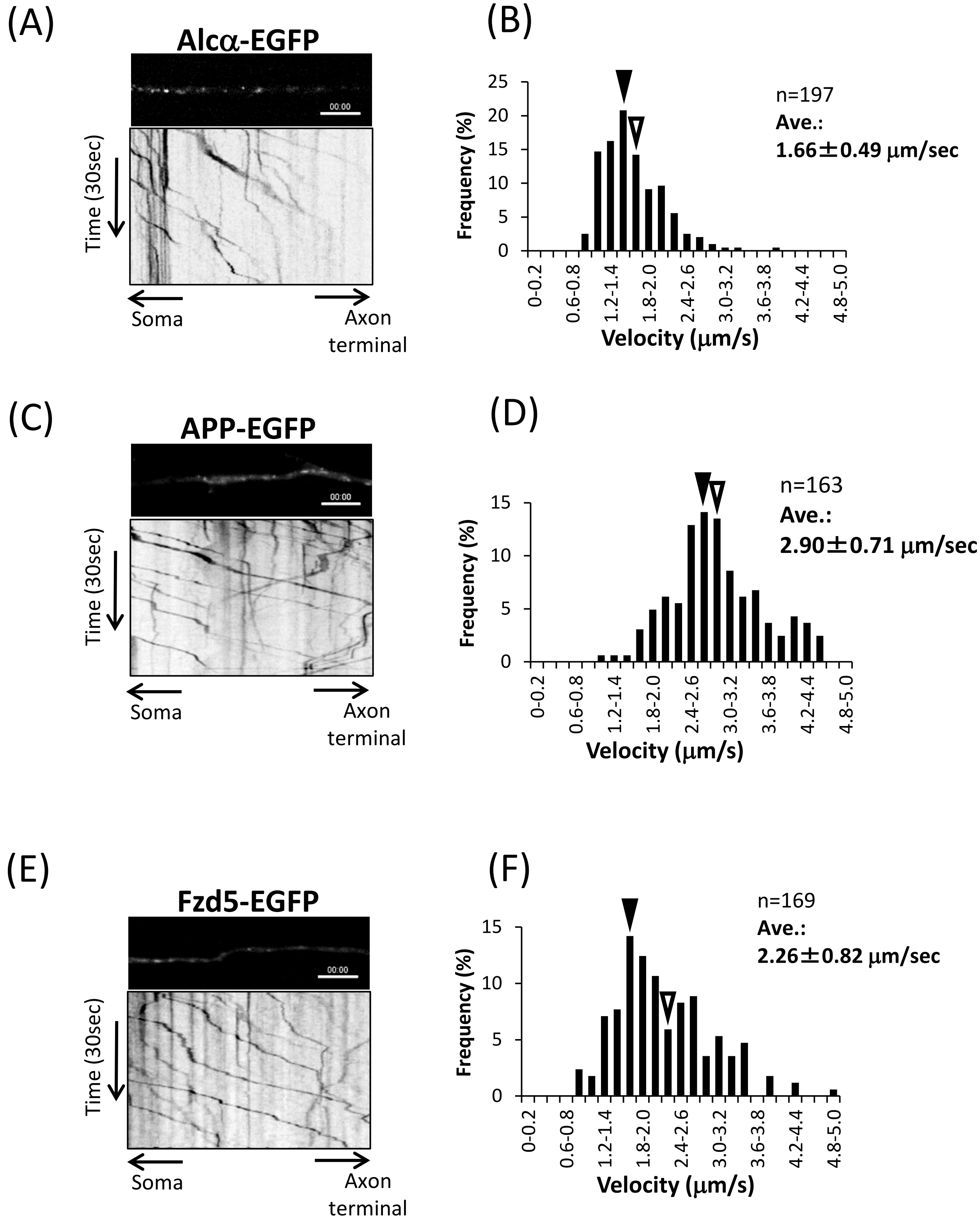
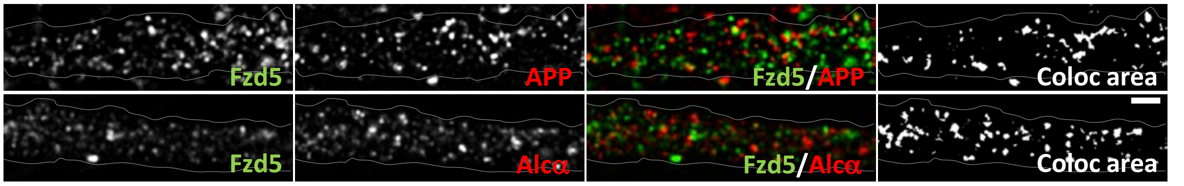


Figure 9. 神経軸索中におけるFzd5、Alcα、APPの輸送速度解析

(A, C, E) DIV 3-4の初代培養神経細胞に表記のタンパク質を発現させ、全反射顕微鏡で軸索内を観察した。30 secの動画を撮影し、0 sec時点の軸索の画像とカイモグラフを示した。
Scale bar = 5 μm

(B, D, F) (A, C, E)で撮影した動画から順行性輸送の速度を解析し、速度分布と平均速度 (Ave.) を示した。黒矢頭は速度の最頻値、白矢頭は平均値が含まれるピークを示している。
mean ± S.E.

(A)



(B)

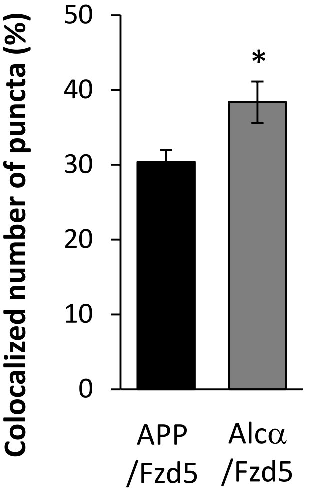


Figure 10. マウス坐骨神経軸索における局在解析
(A) 3か月齢マウスの坐骨神経を取り出し、実験材料と方法に記載の方法で染色を行い観察した。
Scale bar = 2 μm
(B) (A) でFzd5と共局在するAPPとAlcαの面積を定量した。n = 7, mean ± S.E., * :p<0.05

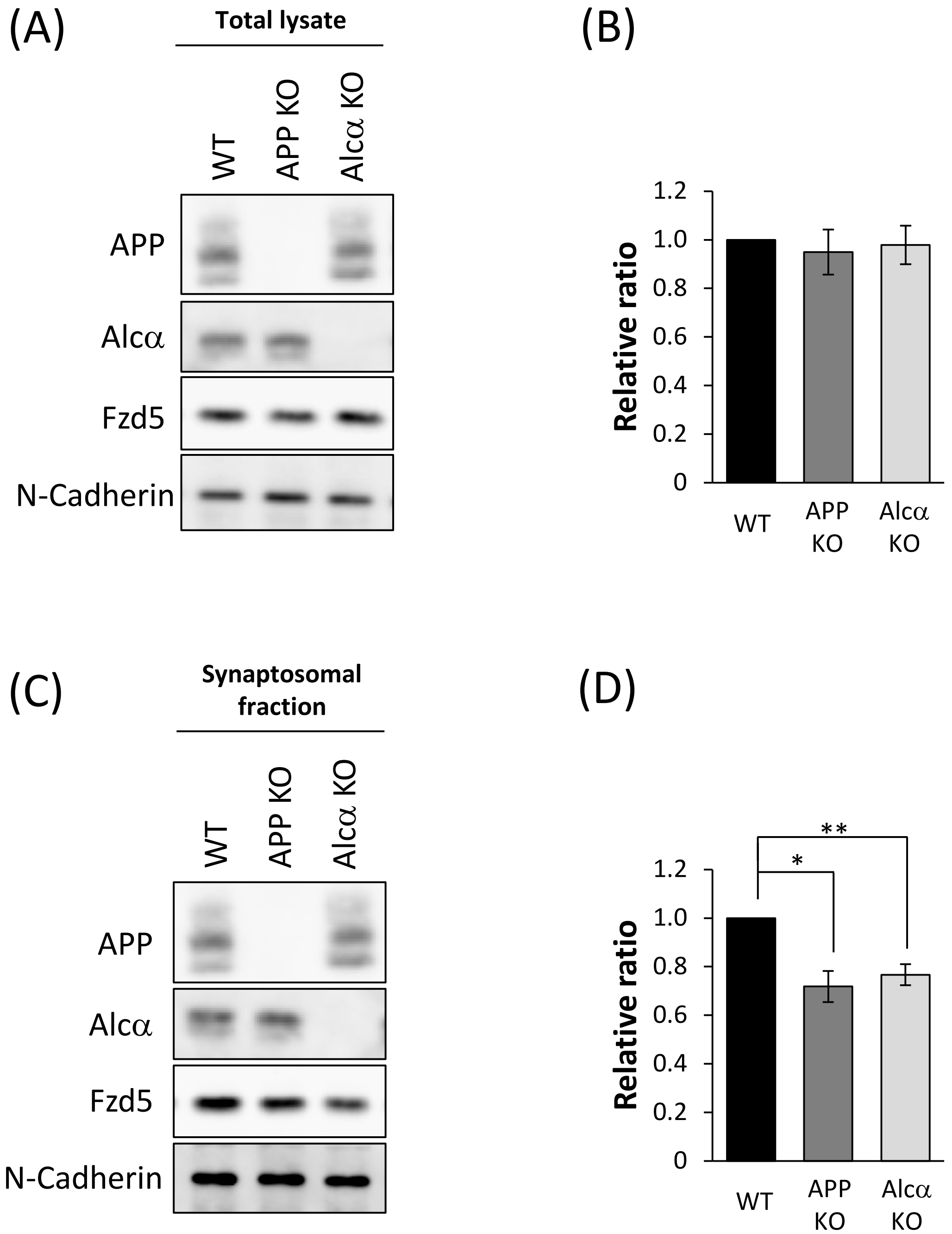


Figure 11. シナプトソーム画分におけるFzd5量の定量
(A, C) WT及びAPP KO、Alcα KOマウス脳からTotal lysate (A) とシナプトソーム画分 (C) を調製し、Western Blot法でFzd5を検出した。
(B, D) 定量結果。n = 5, mean ± S.E., * :p<0.05, ** :p<0.01

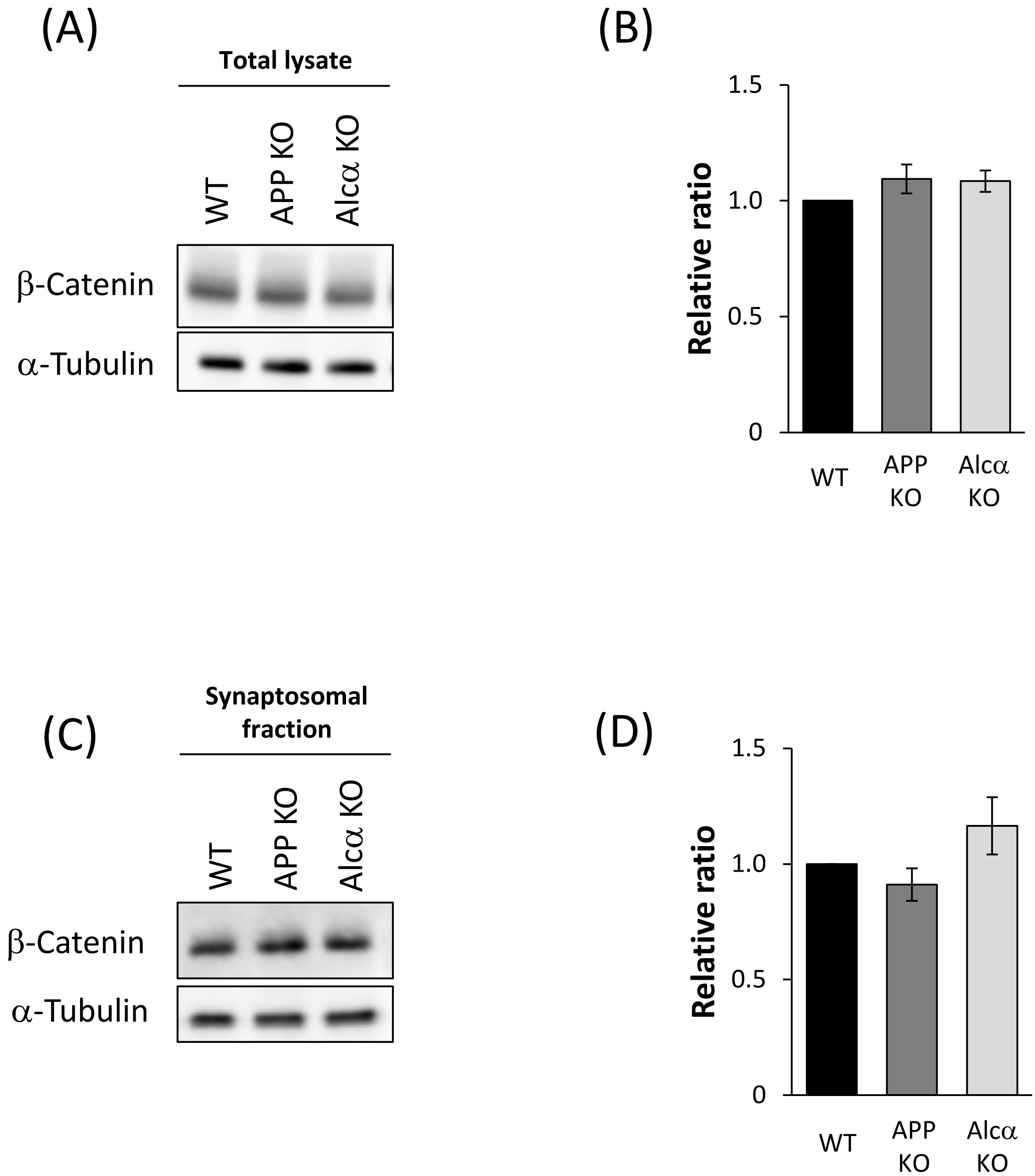


Figure 12. シナプトソーム画分におけるβ-Catenin量の定量
(A, C) WT及びAPP KO、Alcα KOマウス脳からTotal lysate (A) とシナプトソーム画分 (C) を調製し、Western Blot法でβ-Cateninを検出した。
(B, D) (A, C)からβ-Catenin量を定量し比較した。n = 7, mean ± S.E.

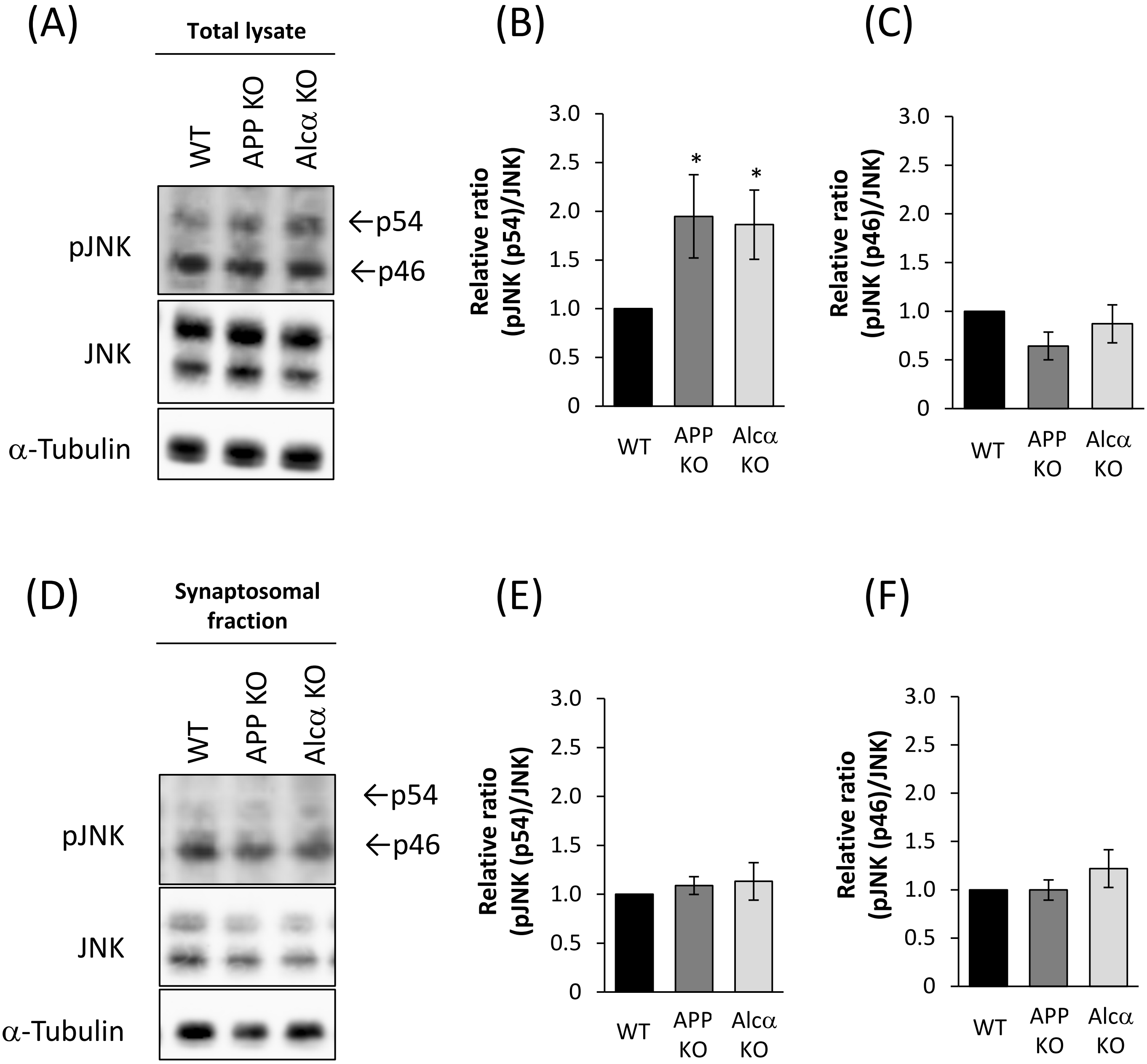


Figure 13. シナプトソーム画分におけるpJNK量の定量
(A, C) WT及びAPP KO、Alcα KOマウス脳からTotal lysate (A) とシナプトソーム画分 (C) を調製し、Western Blot法でpJNKとJNKを検出した。
(B, D) (A, C)からpJNK/JNKを定量した。n = 5, mean ± S.E., * :$p<0.05$

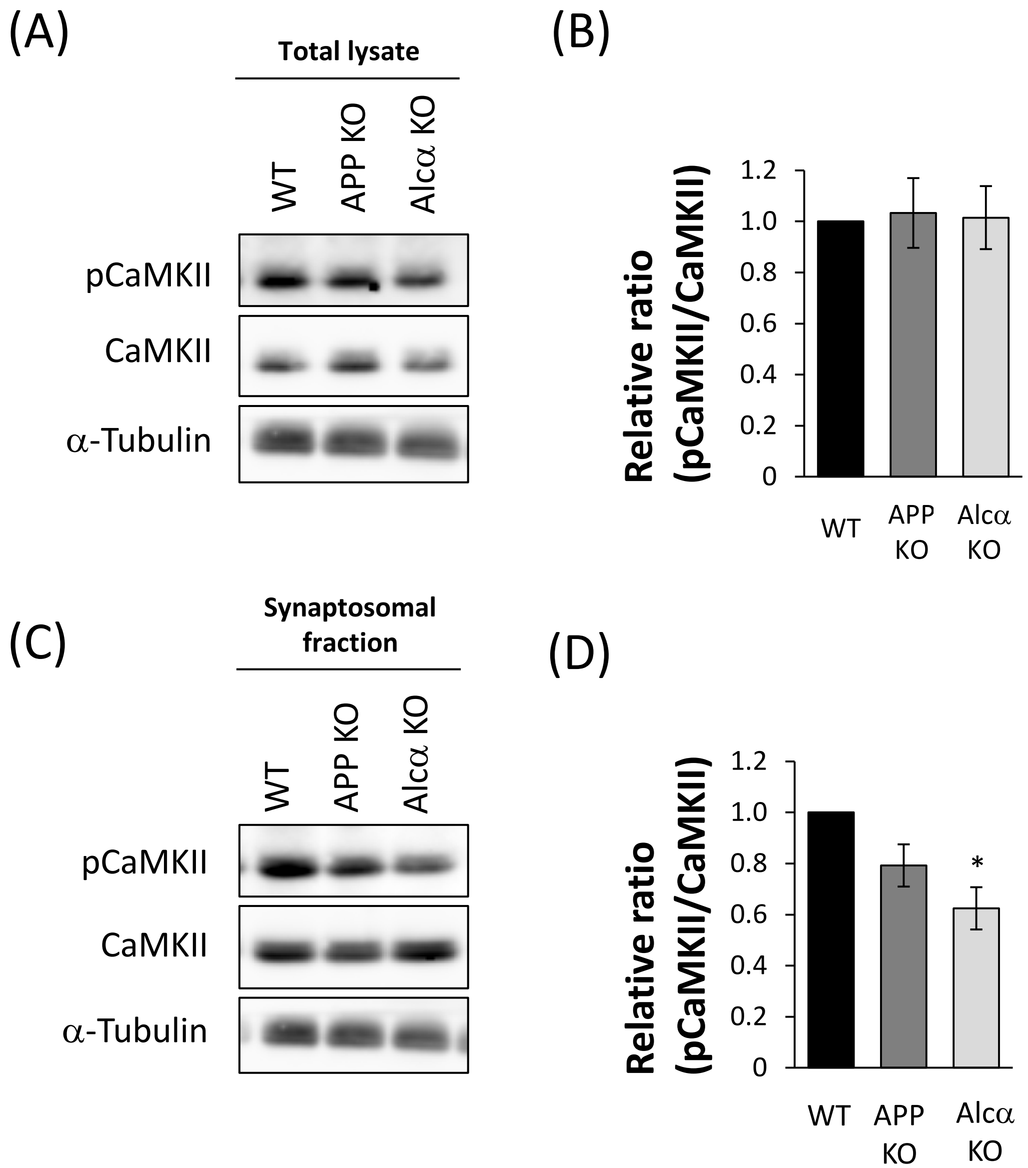
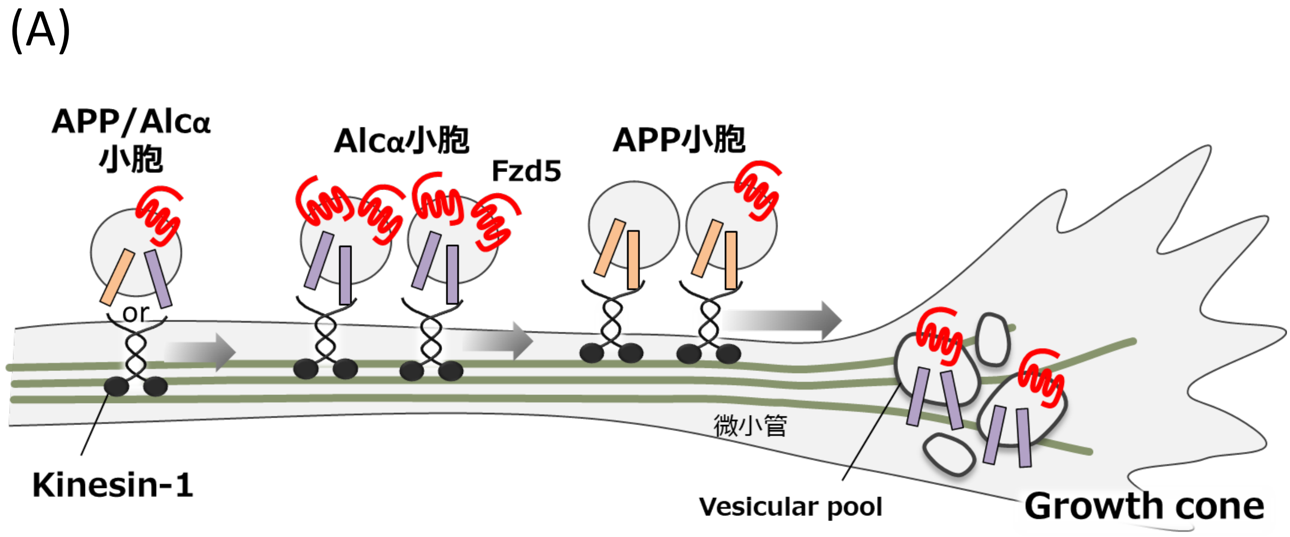


Figure 14. シナプトソーム画分におけるpCaMKII量の定量
(A, C) WT及びAPP KO、Alcα KOマウス脳からTotal lysate (A) とシナプトソーム画分 (C) を調製し、Western Blot法でCamMIIとpCaMKIIを検出した。
(B, D) (A, C)からpCaMKII/CaMKIIを定量した。n = 6, mean ± S.E., * :$p<0.05$



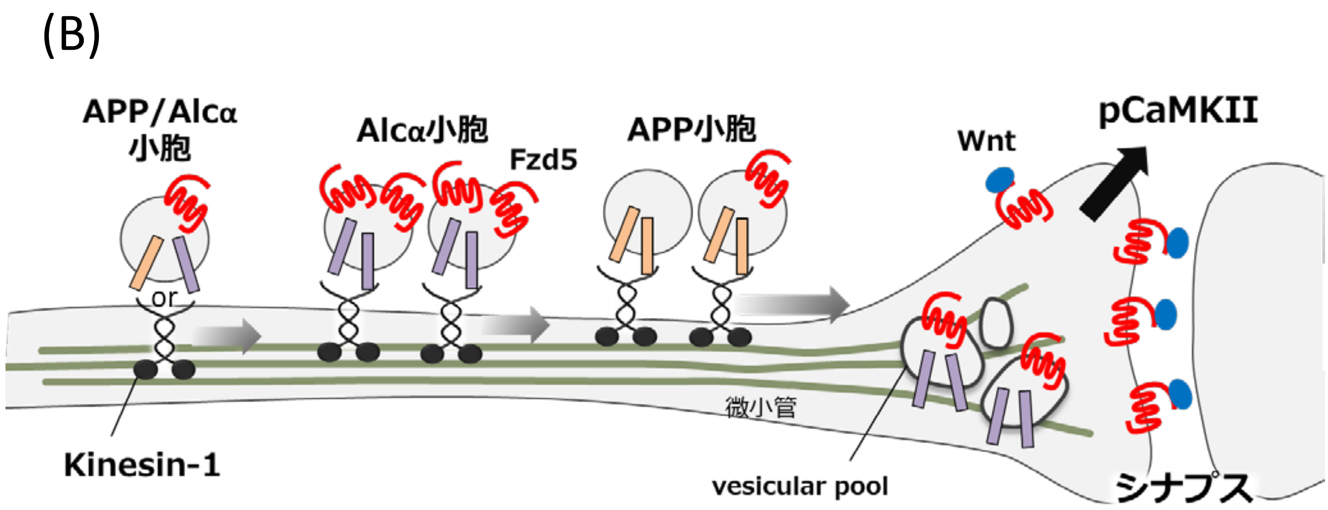


Figure 15. 本研究のまとめ
神経軸索伸長時 (A) と成熟した神経 (B) におけるAPP小胞とAlcα小胞によるFzd5の輸送模式図。
Fzd5はAPP小胞とAlcα小胞によって輸送されるが、Alcα小胞による輸送をより多く受ける。
APP小胞とAlcα小胞は成熟した神経においても同様にFzd5を輸送し、神経終末におけるFzd5の局在を制御することで、下流のシグナルであるpCaMKIIレベルを調節しうる。

Table 1-1. List of proteins co-immunoisolated with APP vesicles listing the gene name, Accession number, number of unique peptides, and %sequence coverage

Accession number	Gene name	Protein name	Peptid number	Sequence coverage (%)
P01942	Hemoglobin subunit alpha	Hba	8	59.15
A8DUV3	Alpha-globin	Hbat1	8	59.15
Q99KF1	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	Tmed9	7	35.74
Q32P04	Keratin 5	Krt5	9	16.9
P46460	Vesicle-fusing ATPase	Nsf	21	25.81
P0CG49	Polyubiquitin-B [Cleaved into: Ubiquitin]	Ubb	16	30.82
Q3U7X9	Putative uncharacterized protein	Ap2a2	25	24.09
Q8BJ40	Putative uncharacterized protein	Gm6498	11	60.77
P50446	Keratin, type II cytoskeletal 6A	Krt6a	5	7.23
Q8BGZ7	Keratin, type II cytoskeletal 75	Krt75	4	9.44
Q3UV11	Keratin, type II cytoskeletal 6B	Krt6b	6	8.3
Q8R1V4	Transmembrane emp24 domain-containing protein 4	Tmed4	6	34.8
P63011	Ras-related protein Rab-3A	Rab3a	9	25.91
Q3USC3	Putative uncharacterized protein	Rab4b	6	26.37
Q8BPG5	Putative uncharacterized protein	Rac1	8	30.73
Q3U561	Ribosomal protein	Rpl10a	8	27.65
Q50HX3	RAB14 protein variant	Rab14	9	53.3
Q8BRM8	Putative uncharacterized protein	Rab26	4	31.15
Q0PD10	Ras-related protein Rab-43	Rab43	6	26.19
P60335	Poly(rC)-binding protein 1	Pcbp1	11	32.87
Q3TYB1	Putative uncharacterized protein	Rab15	13	10.38
Q544E8	Ras-related protein Rab-37	Rab37	5	18.83
P61027	Ras-related protein Rab-10	Rab10	10	26.5
Q0PD62	Ras-related protein Rab-3B	Rab3b	5	10.05
Q8BHC1	Ras-related protein Rab-39B	Rab39b	7	16.43
Q3TU26	Putative uncharacterized protein	Rab3c	6	9.78
Q3UHW5	Putative uncharacterized protein	Rab8a	6	16.35
B2RRN5	Ras-related protein Rab-4A	Rab4a	4	5.16
D3YWL1	Ras-related protein Rab-3D	Rab3d	4	10.38
A2CG35	Ras-related protein Rab-12	Rab12	7	11
Q923S9	Ras-related protein Rab-30	Rab30	7	17.24
P61079	Ubiquitin-protein ligase D3	Ube2d3	2	16.33
P62838	Ubiquitin-protein ligase D2	Ube2d2	2	16.33
O55143	Calcium pump 2	Atp2a2	18	19.54
Q5M9L7	40S ribosomal protein S17	Rps17	7	38.52
Q5M8Q0	Ribosomal protein L15	Rpl15	4	15.2
Q61990	Poly(rC)-binding protein 2	Pcbp2	8	19.61
A2AJ95	NMDA receptor synaptonuclear-signaling and neuronal migration factor	Nsmf	9	14.82
E9QAZ2	Ribosomal protein L15	Gm10020	4	15.2
Q6IWE3	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	Gapd	3	17.71
P57722	Poly(rC)-binding protein 3	Pcbp3	5	16.44
J3QK04	MCG67952	Gm7808	2	12.5
E9QNP0	KxDL motif-containing protein 1	Kxd1	4	6.9
Q642L7	MCG13441	Rps27a	4	10.26
Q66JP1	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	Uba52	4	12.5
Q60928	Gamma-glutamyltransferase 1	Ggt1	16	12.5
P60764	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	Rac3	6	14.06
Q9Z1R9	Trypsinogen 16	Prss1	4	29.67
Q80TL6	MKIAA1042 protein	mKIAA1042	14	9.82
Q8C132	Putative uncharacterized protein	Glt28d2	3	14.55
E9PX10	Putative bifunctional UDP-N-acetylglucosamine transferase and deubiquitinase ALG13	Alg13	3	21.29

Table 1-2. List of proteins co-immunoisolated with APP vesicles listing the gene name, Accession number, number of unique peptides, and %sequence coverage

Accession number	Gene name	Protein name	Peptid number	Sequence coverage (%)
V9GX06	Protein Gm11214	Gm11214	4	6.56
Q05144	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	Rac2	6	40.1
Q3V065	Putative uncharacterized protein	Gm1698	5	33.73
B2RXU3	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 6	Arl6ip6	2	20.8
Q80TY7	MKIAA0515 protein	Prrc2b	10	5.36
Q6PD31	Trafficking kinesin-binding protein 1	Trak1	13	9.9
Q60610	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1	Tiam1	26	9.68
F6W8R9	Nesprin-2	Syne2	35	7.91
Q3UJB9	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	Edc4	19	10.95
G3UZX4	Casein kinase II subunit beta	Csnk2b	2	8.17
Q3TII3	Elongation factor 1-alpha	Eef1a1	8	36.15
A6ZI46	Fructose-bisphosphate aldolase	Aldoart1	11	27.21
Q8C4Q1	Putative uncharacterized protein	Ccdc174	3	20.61
E9Q210	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4	Ptpn4	2	32.58
P17182	Alpha-enolase	Eno1	18	23.27
F6QJ09	Protein Gm10203	Gm10203	4	36.36
Q545V3	Gamma-enolase	Eno2	14	6.45
Q8BY33	Putative uncharacterized protein	Ipp	2	47.15
E9QKR0	Protein 2010300C02Rik	Gnb2	9	11.26
A7DTG5	Protein Olfr392	Olfr392	1	43.1
E0CYM8	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	Sirpa	20	13.84
Q4FK59	Eno3 protein	Eno3	10	7.83
F6Z6A5	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	Ergic1	2	27.84
E9Q0U5	IGF-like family receptor 1	Igflr1	3	20.55
Q8BLA7	Putative uncharacterized protein	Phf3	7	5.93
Q8C985	Neurexin-3-beta	Nrxn3	4	6.17
B2MWM9	Calreticulin	Calr	13	20.91
Q3UY32	SNARE-associated protein Snapin	Snapin	5	49.26
P05202	Transaminase A	Got2	10	17.44
Q3TU38	Putative uncharacterized protein	2610005L07Rik	22	46
J3QMN4	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	Txnrd2	10	11.2
Q3U227	Putative uncharacterized protein	Zfp395	5	15.16
O55082	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 20	Ptpn20	7	11.74
Q0VBR8	Growth arrest specific 7	Gas7	10	12.11
Q99JV4	Brpf1 protein	Brpf1	10	7.79
O35082	Klotho	Kl	15	5.33
Q6AXG6	Kank1 protein	Kank1	15	5.74
Q9DAF3	Protein DDI1 homolog 1	Ddi1	10	21.57
P62918	60S ribosomal protein L8	Rpl8	5	13.62
E9Q9E7	Centriolin	Cntrl	31	8.43
Q80U69	MKIAA0172 protein	mKIAA0172	11	6.53
Q99K08	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	Pfkm	17	10.13
E9PV87	Protein TALPID3	Talpid3	17	6.78
Q8VD37	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1	Sgip1	13	7.57
E9Q3Y8	Protein Gm6811	Gm6811	10	18.82

Table 1-3. List of proteins co-immunoisolated with APP vesicles listing the gene name, Accession number, number of unique peptides, and %sequence coverage

Accession number	Gene name	Protein name	Peptid number	Sequence coverage (%)
P21271	Unconventional myosin-Vb	Myo5b	36	4.95
Q811P8	Rho GTPase-activating protein 32	Arhgap32	39	7.23
E9Q0E2	Protein 2700049A03Rik	2700049A03Rik	14	7.19
Q6A042	MKIAA0586 protein	mKIAA0586	15	7.64
E9QAU4	Sickle tail protein	Etl4	26	2.35
Q3TV27	GABA(A) receptor subunit rho-2	Gabrr2	7	9.12
A2AQ25	Sickle tail protein	Skt	27	2.42
E9Q9H6	Zinc finger protein 451	Zfp451	18	3.57
Q8R429	Calcium pump 1	Atp2a1	15	11.17
Q9CUM4	Putative uncharacterized protein	Dnm2	13	10.14
A2AIV8	Caspase recruitment domain-containing protein 9	Card9	15	12.69
B1AR10	Protein Mllt6	Mllt6	17	14.43
A2AUY4	Protein Baz2b	Baz2b	30	7.77
P41230	Lysine-specific demethylase 5C	Kdm5c	21	4.83
Q60625	ICAM-5	Icam5	16	13.52
Q3UW86	Putative uncharacterized protein	Phip	4	6.83
B0R019	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator	Ralgds	5	21.05
Q8BYG9	Ephrin type-A receptor 10	Epha10	9	9.14
Q6NXI6	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2	Rprd2	17	3.61
Q3US81	Glycoprotein m6b, isoform CRA_f	Gpm6b	4	7.64
F6TMZ3	Epididymis-specific alpha-mannosidase	Man2b2	4	10.73
Q6XK24	Membrane-bound maltase-glucoamylase	Mgam	9	7.46
M1JB08	Fer-1-like 5 protein	Fer1l5	6	7.89
Q91VR5	ATP-dependent RNA helicase DDX1	Ddx1	10	10.14
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	Eef1a2	13	9.5
Q91VB1	Chymase 2	Cma2	4	10.98
B1AS47	Zinc finger protein castor homolog 1	Casz1	5	22.43
Q91ZJ0	Crossover junction endonuclease MUS81	Mus81	8	9.07
Q3UV17	Keratin, type II cytoskeletal 2	Krt76	8	2.86
Q8K040	BC048546 protein	BC048546	3	7.37
W4VSN8	MCG1026354, isoform CRA_a	Gm5114	16	19.93
Q8BMF4	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	Dlat	10	12.77
Q3UFI7	Putative uncharacterized protein	Nup205	14	9.01
Q924T7	E3 ubiquitin-protein ligase RNF31	Rnf31	16	2.35
Q9ER99	Regulatory solute carrier protein family 1 member 1	Rsc1a1	8	15.98
Q0PD42	Rab13	Rab13	7	7.43
Q3TU64	Collagen alpha-1(I) chain	Col1a2	21	6.49
Q6KAP7	MFLJ00217 protein	mFLJ00217	8	4.24
P21271	Unconventional myosin-Vb	Myo5b	36	4.95
Q811P8	Rho GTPase-activating protein 32	Arhgap32	39	7.23
E9Q0E2	Protein 2700049A03Rik	2700049A03Rik	14	7.19
Q6A042	MKIAA0586 protein	mKIAA0586	15	7.64
E9QAU4	Sickle tail protein	Etl4	26	2.35
Q3TV27	GABA(A) receptor subunit rho-2	Gabrr2	7	9.12
A2AQ25	Sickle tail protein	Skt	27	2.42

Table 2-1. List of proteins co-immunoisolated with Alcα vesicles listing the gene name, Accession number, number of unique peptides, and %sequence coverage

Accession number	Gene name	Protein name	Peptid number	Sequence coverage (%)
C1IE02	Receptor expression-enhancing protein	Reep2	6	17.06
G8JL69	Protein Gm11027	Gm11027	15	63.64
D6RFA6	DmX-like protein 2	Dmxl2	1	20.73
Q8CGP6	Histone H2A type 1-H	Hist1h2ah	6	27.34
P70304	Phosphoinositide 3-kinase p85alpha	Pik3r1	18	22.24
Q64426	Histone H2A	H2A	7	51.09
Q8R1M2	Histone H2A.J	H2afj	5	27.13
Q8CGP4	Histone H2A	Hist1h2aa	3	27.13
Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	Hist1h2af	6	26.92
Q8CGP7	Histone H2A type 1-K	Hist1h2ak	6	26.92
F8WIX8	Histone H2A	Hist1h2al	7	56
B2RWH3	Histone H2A	Hist2h2aa1	7	53.85
Q149V4	Histone H2A	Hist2h2ac	7	54.26
Q8BFU2	Histone H2A type 3	Hist3h2a	6	26.92
D6REH8	Polyhomeotic-like protein 2	Phc2	3	70
P46097	Synaptotagmin-2	Syt2	11	33.41
F6YHZ8	F-actin-capping protein subunit beta	Capzb	10	34.04
P86048	60S ribosomal protein L10-like	Rpl10l	6	23.36
Q920I9	WD repeat-containing protein 7	Wdr7	31	22.57
Q8CAA2	Putative uncharacterized protein	C2cd2l	16	18.81
Q80U48	MKIAA0285 protein (Fragment)	mKIAA0285	13	20.08
Q545R3	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrg1	10	15.99
Q64467	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	Gapdhs	9	12.27
Q9R0N5	Synaptotagmin-5	Syt5	7	20.21
V9GXA7	Protein Gm15294	Gm15294	5	47.11
Q564E8	60S ribosomal protein L4	Rpl4	13	23.39
Q545X8	40S ribosomal protein S4	Rps4x	9	20.91
A0PJ96	Mtap1b protein	Map1b	21	14.36
A2A5Y4	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Kansl1	14	8.46
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	Hist3h2ba	3	23.02
I7HLV2	60S ribosomal protein L10	Rpl10	6	24.88
Q5RKP3	60S ribosomal protein L13	Rpl13	4	17.62
O35465	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	Fkbp8	2	7.21
E0CZ27	Histone H3	H3f3a	3	32.77
Q6AXB7	Fragile X mental retardation protein 1 homolog	Fmr1	30	8.79
Q3URS8	Putative uncharacterized protein	Mlf2	6	21.05
P02301	Histone H3.3C	H3f3c	3	28.68
Q3THE2	Myosin regulatory light chain 12B	Myl12b	4	20.93
A2AMR1	Fibronectin type III domain-containing protein 3C1	Fndc3c1	2	46.88
F6YP03	Caprin-1	Caprin1	2	45.33
Q3UX90	Putative uncharacterized protein	Sytl2	8	26.79
Q3UCH0	60S ribosomal protein L6	Rpl6	10	22.97
D3YUN6	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5	C1qtnf5	8	30.43
Q6ZWQ9	MCG5400	Myl12a	4	5.81
P08226	Apolipoprotein E	Apoe	8	10.93
Q8C901	Kinesin-like protein	Kif6	6	4.78
Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1	Hyou1	22	8.51
A2ARD4	Kinesin heavy chain isoform 5C	Kif5c	6	14.81
D3Z5I6	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	Iqsec2	50	16.03

Table 2-2. List of proteins co-immunoisolated with Alcα vesicles listing the gene name, Accession number, number of unique peptides, and %sequence coverage

Accession number	Gene name	Protein name	Peptid number	Sequence coverage (%)
Q80WT5	Aftiphilin	Aftph	23	5.48
A4FTY8	Mettl4 protein	Mettl4	9	12.22
P22752	Histone H2A type 1	Hist1h2ab	3	14.62
Q9JJY4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	Ddx20	14	3.15
D3Z1B6	Regulator of G-protein-signaling 10	Rgs10	3	20
P60904	DnaJ homolog subfamily C member 5	Dnajc5	4	38.38
G8JL47	Protein MMS22-like	Mms22l	17	6.01
Q922A3	Tars2 protein	Tars2	17	16.5
Q3UU47	Agouti related protein	Agrp	5	14.5
C8YR32	Lipoxygenase homology domain-containing protein 1	Loxhd1	26	3.87
Q3V1Z5	40S ribosomal protein S4	Rps4l	7	18.32
A2AKD9	Protein CBFA2T2	Cbfa2t2	4	31.22
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	Hist1h2bc	2	19.05
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	Hist1h2bf	2	19.05
Q64478	Histone H2B type 1-H	Hist1h2bh	2	19.05
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	Hist1h2bk	2	19.05
P10854	Histone H2B type 1-M	Hist1h2bm	2	19.05
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	Hist1h2bp	2	19.05
Q8CBB6	Histone H2B	Hist1h2br	2	17.91
Q64525	Histone H2B type 2-B	Hist2h2bb	2	19.05
Q64524	Histone H2B type 2-E	Hist2h2be	2	19.05
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	Hist3h2bb	2	19.05
Q921L4	Histone H2B	LOC665622	2	17.78
Q8K4L6	Osteoregulin	Mepe	20	16.55
O88196	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	Ttc3	28	3.34
E9PWB1	Pleckstrin homology-like domain family B member 1	Phldb1	26	5.59
Q3V2W5	Putative uncharacterized protein	Bcor	26	12.12
Q1EG27	Myosin-IIIb	Myo3b	22	6.59
Q6P1J1	Crmp1 protein	Crmp1	12	8.75
Q3UIJ2	Putative uncharacterized protein	Eif2s3x	8	19.28
O55208	Factor in the germline alpha	Figla	6	22.68
Q9ER00	Syntaxin-12	Stx12	5	8.03
F6R220	GDP-Man:Man(3)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,2-mannosyltransferase	Alg11	6	21.25
Q3UHD9	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	Agap2	17	9.44
K4DI58	Cell adhesion molecule 3	Cadm3, SynCAM3	7	9.53
F6QY72	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6	Eml6	4	37.35
Q3TWY6	Putative uncharacterized protein	Cog1	26	8.98
Q9CWU8	Putative uncharacterized protein	Dnmbp	7	17.55
Q7TME8	Schlafen 9	Slfn9	29	9.01
Q5R1D3	TRAV14-1	TRAV14-1	4	22.31
D3Z2G7	Histone deacetylase 11	Hdac11	11	33.14
Q9EQD0	Frizzled-5	Fzd5	7	7.01
Q3TUA9	Protein O-mannose kinase	Pomk	11	16.05
E9Q941	Protein Cdh18	Cdh18	16	11.15
A2A4N9	40S ribosomal protein S4	Gm15013	42	6.13
Q9WTR5	Cadherin-13	Cdh13	21	4.48
B2RUG8	Asxl2 protein	Asxl2	47	14.25
F6WIU1	Protein KRI1 homolog	Kri1	13	14.75

Table 2-3. List of proteins co-immunoisolated with Alcα vesicles listing the gene name, Accession number, number of unique peptides, and %sequence coverage

Accession number	Gene name	Protein name	Peptid number	Sequence coverage (%)
Q3TML0	Protein disulfide-isomerase A6	Pdia6	7	11.69
Q8K1S4	Netrin receptor UNC5A	Unc5a	16	2.56
Q8R3D4	Zfp282 protein	Zfp282	12	9.28
Q9JI08	Bridging integrator 3	Bin3	11	14.62
E9Q3P9	Ras-related protein Rab-11A	Rab11a	6	33.33
E9Q1C7	Protein Gm10471	Gm10471	6	4.04
F8WHB1	Calcium-transporting ATPase	Atp2b2	21	5.71
Q8CHP5	Partner of Y14 and mago	Pym1	5	17.24
Q3TXU8	Membrane-associated progesterone receptor component 1	Pgrmc1	7	32.31
Q8C795	Putative uncharacterized protein	Soat1	10	19.7
Q9JIS5	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	Sv2a	16	8.09
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	7	16.46
Q8BUY7	Putative uncharacterized protein	Srcap	27	5.34
Q70IV5	Synemin	Synm	37	5.7
Q80T95	MKIAA1756 protein	Syne1	36	6.36
B0G0X9	Putative uncharacterized protein	Kif26b	7	7.71
E9PUX4	60S ribosomal protein L6	Rpl6l	7	9.12
Q3UQL7	Putative uncharacterized protein	Ncoa3	43	2.42
Q04447	Creatine kinase B-type(Creatine kinase B chain)	Ckb	7	2.89
Q3UPR7	Transmembrane protein 102	Tmem102	9	17.29
H6W0X2	Vlgr1 isoform f	Adgrv1	30	8.91
Q6PHM1	Lamc1 protein	Lamc1	13	6.82
Q3TML0	Protein disulfide-isomerase A6	Pdia6	7	11.69
Q8K1S4	Netrin receptor UNC5A	Unc5a	16	2.56
Q8R3D4	Zfp282 protein	Zfp282	12	9.28
Q9JI08	Bridging integrator 3	Bin3	11	14.62
E9Q3P9	Ras-related protein Rab-11A	Rab11a	6	33.33
E9Q1C7	Protein Gm10471	Gm10471	6	4.04
F8WHB1	Calcium-transporting ATPase	Atp2b2	21	5.71
Q8CHP5	Partner of Y14 and mago	Pym1	5	17.24
Q3TXU8	Membrane-associated progesterone receptor component 1	Pgrmc1	7	32.31
Q8C795	Putative uncharacterized protein	Soat1	10	19.7
Q9JIS5	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	Sv2a	16	8.09
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	7	16.46
Q8BUY7	Putative uncharacterized protein	Srcap	27	5.34
Q70IV5	Synemin	Synm	37	5.7
Q80T95	MKIAA1756 protein	Syne1	36	6.36
B0G0X9	Putative uncharacterized protein	Kif26b	7	7.71
E9PUX4	60S ribosomal protein L6	Rpl6l	7	9.12
Q3UQL7	Putative uncharacterized protein	Ncoa3	43	2.42
Q04447	Creatine kinase B-type(Creatine kinase B chain)	Ckb	7	2.89
Q3UPR7	Transmembrane protein 102	Tmem102	9	17.29
H6W0X2	Vlgr1 isoform f	Adgrv1	30	8.91
Q6PHM1	Lamc1 protein	Lamc1	13	6.82
Q3TML0	Protein disulfide-isomerase A6	Pdia6	7	11.69
Q8K1S4	Netrin receptor UNC5A	Unc5a	16	2.56
Q8R3D4	Zfp282 protein	Zfp282	12	9.28
Q9JI08	Bridging integrator 3	Bin3	11	14.62

Table 3. List of proteins co-immunoisolated with APP and Alcα vesicles listing the gene name, Accession number, number of unique peptides, and %sequence coverage

Accession number	Gene name	Protein name	Peptid number	Sequence coverage (%)
P63044	Vesicle–associated membrane protein 2	Vamp2	22245.34	7
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	Rplp2	12406.34	3
Q62277	Synaptophysin	Syp	9755.85	14
Q8C2K0	Putative uncharacterized protein	Rpl12	7099.531	7
Q60605	Myosin light polypeptide 6	Myl6	5747.648	5
P60879	Synaptosomal–associated protein 25	Snap25	4465.515	9
A8DUP0	Beta–globin	Hbbt1	4319.975	4
P46096	Synaptotagmin–1	Syt1	4217.906	10
Q6ZWU9	40S ribosomal protein S27	Rps27	3810.635	4
Q9QUN8	Beta–2–globin	Hbb–b2	3408.757	3
D4N6M2	Beta–globin	Hbbt2	3408.757	3
E9Q223	Protein Hbb–bs	Hbb–bs	3362.946	3
Q3UKW2	Calmodulin	Calm1	3349.477	4
P02104	Hemoglobin subunit epsilon–Y2	Hbb–y	3267.988	2
B1Q450	Hemoglobin beta chain subunit	HBB1	3263.451	4
P02088	Hemoglobin subunit beta–1	Hbb–b1	3263.451	3
Q3TXT5	V–type proton ATPase subunit a	Atp6v0a1	2721.785	38
F8VQK7	Protein Gm16519	Gm16519	2395.84	1
Q8C1L3	Putative uncharacterized protein	Mark4	1988.73	5
Q921S5	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D1	Atp6v0d1	1782.075	18
Q3UBI6	Putative uncharacterized protein	Rpl7	1622.638	10
Q3U1B1	Putative uncharacterized protein	Gnb1	1453.064	10
Q3U9S9	Putative uncharacterized protein	Atp6v1h	1365.147	4
Q6ZPF0	MKIAA3012 protein	Rab1a	1225.753	13
Q6ZWY3	40S ribosomal protein S27–like	Rps27l	937.7624	2
Q3TYI8	Putative uncharacterized protein	Sptan1	933.2311	26
Q91VB8	Alpha globin 1	Hba–a2	665.551	3
Q3U1K9	AP complex subunit beta	Ap1b1	563.3331	29
Q8BH44	Coronin–2B	Coro2b	546.1896	18
Q3TZ84	Putative uncharacterized protein	Epn3	515.7698	10
Q6KAM8	MFLJ00343 protein	Flna	465.1345	38
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	Cltc	450.1595	26
Q64475	Histone H2B type 1–B	Hist1h2bb	444.7703	2
A0JLV3	Histone H2B	Hist1h2bj	444.7703	2
O54834	Rho GTPase–activating protein 6	Arhgap6	430.8762	13
Q80U89	MKIAA0034 protein	mKIAA0034	422.5384	31
P35980	60S ribosomal protein L18	Rpl18	419.9615	4
P27773	Protein disulfide–isomerase A3	Pdia3	384.7565	12
Q78ZJ8	MCG22989, isoform CRA_b Ras–related protein Rab–11B	Rab11b	340.21	7
Q3TKF8	Putative uncharacterized protein	Hspa5	275.6688	16
Q3U0T9	Ras–related protein Rab–35	Rab35	254.6474	5
Q3U944	Protein ERGIC–53	Lman1	217.748	17

8. 謝辞

本研究を行う機会を与えてくださり、終始ご指導いただきました北海道大学大学院 薬学研究院 鈴木 利治 教授、多留 偉功 准教授、中矢 正助 助教、羽田 沙緒里 助教、ならびに神経科学研究室の皆様に心より感謝申し上げます。

また本論文の審査に際し、北海道大学大学院 薬学研究院 機能科学研究室 前仲勝実 教授、ならびに北海道大学大学院 薬学研究院 RNA 生物学研究室 中川　真一 教授、北海道大学大学院 薬学研究院 神経科学研究室 多留偉功 准教授にはご多忙な中、多大なご指導をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

また北海道大学 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、北村 朗 助教、山本 条太郎 特任助教には全反射顕微鏡の使用に際し、終始ご指導、ご協力いただきました。深く感謝申し上げます。

研究の基礎の部分から、研究の進め方を教えてくださり、本研究を行うにあたって抗体のご提供やディスカッションをして頂いた香川大学医学部 医学系研究科 分子神経生物学研究室 山本 融 教授に深く感謝申し上げます。

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 分子発生学研究部門 高田 慎治 教授には細胞のご提供だけでなく、Wnt 研究に関してご指導くださいました。心より御礼申し上げます。

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室の先輩や皆様には大変お世話になりました。特に研究室への配属から共に学んできた蘇武 佑里子 博士、本館 利佳 博士には研究面だけでなく、日々の生活においても支えていただきました。心より御礼申し上げます。また、研究運営や研究生活における事務作業を行ってくださり、さらに日々の雑談まで快く応じてくださいました秘書 西田 祥江 様に深く感謝申しあげます。

最後に、長い大学生活を支えていただき、博士課程への進学を応援してくださった家族に心より感謝申しあげます。

2018 年 3 月
白木柚葉