

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15270

研究課題名（和文）複数のメカニズムによるAPP神経軸索輸送機構とその生理的意義の解析

研究課題名（英文）Analysis of multiple mechanisms of APP axonal transport

研究代表者

蘇武 佑里子（Sobu, Yuriko）

同志社大学・脳科学研究科・助教

研究者番号：80825068

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：アミロイド前駆体タンパク質（APP）の軸索輸送機構について、これまでに報告されてきたものとは別の分子機構が存在することを明らかにした。また、この機構の違いが複数のキネシンIsoformによるのもであり、既知の分子機構とはまったく違ったメカニズムによりキネシンと相互作用していることが示された。ほとんどの場合、APPはより高速に輸送される方法で軸索末端に向けて輸送されるが、この輸送を担う分子のノックダウンはAPP軸索輸送を阻害させなかった。本研究で新たに同定した分子を同時にノックダウンすることで、APP輸送はほぼ停止したことから、新たな輸送機構が実際に神経細胞内で機能していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、APPの軸索輸送機構について複数の分子メカニズムが提唱されてきたが、関連分子のノックダウンがAPP輸送を完全に停止させないなど、輸送機構の複雑さが提唱されてきた。本研究は1つの軸索の中で、APPが複数のメカニズムにより輸送されていることを明らかにしたものであり、今後の軸索輸送機構の議論をより正確にするための土台になりうる。APPはアルツハイマー関連分子としてだけでなく、発生期やシナプス形成の機能も報告されており、同定した輸送機構は軸索外の機能に関与する可能性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：Several mechanism of axonal transport of amyloid precursor protein (APP) have reported. In this study, se showed that there is a different molecular mechanism for axonal transport of APP. We also found that this difference is due to multiple kinesin Isoforms. APP interacts with new identified kinesin by a mechanism quite different from known molecular mechanisms. In most cases, APP is transported toward axon terminals in a more rapid manner, but knockdown of the molecules responsible for this transport did not inhibit APP axonal transport. Simultaneous knockdown of the newly identified molecules in this study inhibited most APP transport, indicating that a novel transport mechanism is indeed functioning in neurons.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：細胞生物学

キーワード：軸索輸送 APP アミロイド前駆体タンパク質 細胞内輸送 キネシン1

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は高度に極性化された細胞であり、細胞体から伸びる軸索は細胞体の数千倍の長さにもなる。従って、細胞体で翻訳されたタンパク質は成長円錐やシナプス部位に向けて効率的に輸送される必要がある。アルツハイマー病(AD)発症と関連が深いとされるアミロイドβ(Aβ)が、アミロイド前駆体タンパク質(APP)の切断産物であることが明らかになって以来、APPの細胞内動態、切断機構や本来の生理機能についての解析が盛んに行われてきた。APP軸索輸送機能の低下がAβの産生を促進すること(Science [2005] 307,1282)、家族性AD変異を持つAPPの発現が神経変性に強く関連する軸索膨張を誘導する(Front Aging Neurosci. [2014] 6, 13)などの報告から、APPの軸索輸送とAD発症機構の関連が予想されている。APPはキネシン軽鎖KLCと重鎖KHCからなるKinesin-1によって軸索中を輸送されることは広く受け入れられている。一方で、APPとKinesin-1の接続機構についてははっきりしておらず(図1)、主にアダプタータンパク質JIP1bを介したAPPとKLCの間接結合(Mol. Biol. Cell [2014] 25, 3569)、KLCとAPPの直接結合(Neuron [2000] 28, 449)、APPとKinesin-1は結合せず、同一の輸送小胞に含まれるAlcadein α(Alcα)がKLCと結合することによる輸送(Biol Open. [2012]15, 761)という複数のモデルが提唱されており、その全貌はいまだ明らかになっていない。

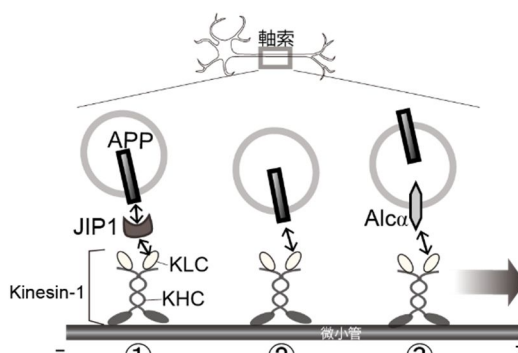


図1: Kinesin-1によるAPP軸索輸送モデル
APPは神経軸索微小管上をKinesin-1により軸索末端に向けて輸送される。Kinesin-1とAPP輸送小胞の接続にはJIP1を介した輸送、直接結合による輸送、小胞中のAlcαを介した輸送が報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、これまで不明瞭であったAPP軸索輸送の全体像を明らかにすることを目的とした。これまでにAPPのKinesin-1への接続機構やAPP輸送小胞の内容物(カーゴ)については対立した報告が多くなされてきた。本研究では、APPの軸索輸送は一つのメカニズムによらず、複数の機構がバランスを取りながら成り立っている可能性を見出し、AD発症機構への関与およびAPP生理機能への寄与を明らかにすることを目指した。所属研究室では、これまでAPPの軸索輸送速度の解析を行ってきた(Mol. Biol. Cell [2014] 25, 3569; FEBS Letters [2018] 592, 2716)。Kinesin-1による輸送速度は通常、1.6-1.8 μm/秒ほどであるが、APPはこれに加えて非常に高速な輸送(平均2.7 μm/秒)が観察される。アダプター分子JIP1の欠損はAPPの高速な輸送を消失させる一方で、APPの軸索輸送そのものはKinesin-1の通常速度で保持される。これらの輸送はKHCの欠損により完全に消失する。このことは、Kinesin-1によるAPPの軸索輸送は高速なJIP1を介した機構と、通常速度のJIP1を介さない機構が両方存在し得ることを示している。

本研究ではJIP1を介さないAPP軸索輸送についてKinesin-1への接続機構と輸送小胞形成機構の解明を目指した。またAPP輸送小胞に含まれるカーゴを同定し、APP軸索輸送の役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

JIP1のKOによって輸送速度の変化が起きるがAPPの軸索輸送自体は保たれていることから、APPの輸送機構にはJIP1を介するものと、JIP1を介さずにKinesin-1と接続する機構が存在することが示唆される。JIP1KOマウスまたはNeuro-2A細胞において、APPとKinesin-1がJIP1を介さずに相互作用するかを解析した。また、JIP1を介さない相互作用を担うAPPドメインは各種部分欠失体を作成することで探索した。CAD細胞またはマウス大脳皮質初代培養神経細胞について、相互作用を担う分子のノックダウンを行うことで、またAPPの同定した相互作用部位の欠失体を発現させることで輸送状態の変化を観察した。

また、APP輸送小胞に含まれるカーゴを同定するため、マウス脳から密度勾配遠心法を用いて輸送小胞を分画し、抗APP抗体、またはAPP輸送への関連が示されているAlcαに対する抗体を用いてAPP、Alcαの各分子を含む輸送小胞を精製した。輸送小胞に含まれるタン

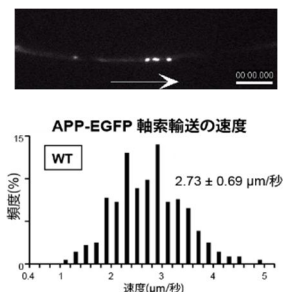


図2: APP輸送小胞の観察
上: 軸索内のAPP-EGFP含有小胞を全反射顕微鏡で観察した。Scale bar=5μm
下: APP輸送小胞の速度分布図。

パク質は質量分析(UPLC/Q-Tof MS, Waters) により検出した。

4. 研究成果

Neuro-2A 細胞に発現させた APP の免疫沈降により、これまでに知られていた Kinesin-1 構成分子 kinesin light chain 1 (KLC1) の他に、免疫沈降により相互作用が確認された Kinesin アイソフォームが確認された。KLC1 は既に知られているように、JIP1 の共発現時にのみ APP との相互作用が確認されたのに対して、本研究で同定したアイソフォームでは、JIP1 の発現の有無に関わらず APP と相互作用することが確認された。CAD 細胞およびマウス大脳皮質初代培養神経細胞において、APP 軸索輸送を観察したところ、多くの APP は既知の高速な輸送機構により輸送されており、JIP1 のノックダウンは高速輸送の割合を減らしたが、APP の軸索輸送自体は破綻させなかった。本研究で新たに同定した分子を JIP1 または KLC1 と同時にノックダウンすることで APP 輸送はほぼ停止したことから、本研究で同定した新たな輸送機構が実際に神経細胞内で機能していることが示された。APP の欠失体を用いた相互作用部位探索では、APP と新たに同定したアイソフォームの相互作用は細胞質内では起きておらず、他の分子を介した間接的な相互作用である可能性を示した。この結果は、1 つの軸索の中で、APP が複数のメカニズムにより輸送されていることを明らかにしたものであり、今後の APP 輸送のメカニズム解明のために必要な視点を提供しうる。

質量分析により、APP 輸送小胞の内容物(カーゴ)の同定を行った結果、APP 輸送小胞に含まれるカーゴのほとんどは Alca 輸送小胞に含まれているカーゴと一致しなかった。この結果は、APP 輸送小胞の多くが Alca の輸送小胞とは独立しているという知見(EMBO J. ([2007]26: 1475 - 1486)と一致している。Alca 輸送小胞から同定された Wnt 受容体 Frizzled5 は実際に Alca 輸送小胞に多く存在していることが Western blotting により示された。免疫染色により軸索を観察すると、Frizzled5 は APP 輸送小胞よりも Alca 輸送小胞中に優先的に存在することが確かめられた一方で、APP / Alca / Frizzled5 が全て含まれる輸送小胞も少数観察された。APP と Alca は多くが独立した小胞により、一部が同一の小胞で輸送される可能性が示唆された。これらの結果から、APP 輸送小胞は Kinesin-1 により輸送されるが、APP と Kinesin-1 を接続する分子機構が、1 細胞の中に複数存在していることが示唆される。今後更に解析を進めることで、これらの輸送機構がどのように制御されているのか、それぞれがどのような生理的役割を持つのかを解析できると考えられる。

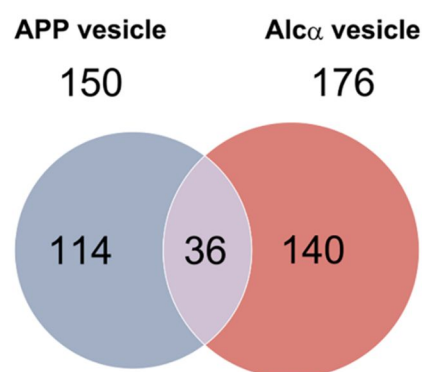


図 3: APP 輸送小胞と Alca 輸送小胞から同定されたタンパク質数
質量分析により APP 輸送小胞、と Alca 輸送小胞小胞からそれぞれ同定したタンパク質数を示す。ほとんどのタンパク質はそれぞれの小胞に独自に含まれていた。Mol. Biol. Cell

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiraki Yuzuha, Mitsuma Monet, Takada Ritsuko, Hata Saori, Kitamura Akira, Takada Shinji, Kinjo Masataka, Taru Hidenori, Mueller Ulrike C., Yamamoto Tohru, Sobu Yuriko, Suzuki Toshiharu	4. 巻 34
2. 論文標題 Axonal transport of Frizzled5 by Alcadein -containing vesicles is associated with kinesin-1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 ar110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E22-10-0495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hata S, Saito H, Kakiuchi T, Fukumoto D, Yamamoto S, Kasuga K, Kimura A, Moteki K, Abe R, Adachi S, Kinoshita S, Yoshizawa-Kumagaye K, Nishio H, Saito T, Saido TC, Yamamoto T, Nishimura M, Taru H, Sobu Y, Ohba H, Nishiyama S, Harada N, Ikeuchi T, Tsukada H, Ouchi Y, Suzuki T	4. 巻 15
2. 論文標題 Brain p3 Alc peptide restores neuronal viability impaired by Alzheimer's amyloid peptide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e17052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/emmm.202217052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sobu Yuriko, Suzuki Toshiharu	4. 巻 192
2. 論文標題 Measuring Axonal Cargo Transport in Mouse Primary Cortical Cultured Neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/64999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y. Sobu, S. Abe, T. Suzuki
2. 発表標題 Axonal transport of Amyloid precursor protein is mediated by several mechanisms
3. 学会等名 An ASCB/EMBO meeting CELL BIO 23 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------