

Functional role of the scaffolding proteins JSAP1 and JLP in mouse cerebellar Purkinje cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/45416

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博 士 論 文

小脳プルキンエ細胞における足場タンパク質 JSAP1, JLP の機能解析

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻

学籍番号 1323032001

氏名 石川 桃絵

主任指導教官名 善岡 克次

提出年月 平成二十八年一月

目次

本論文における略称一覧(アルファベット順).....	3
要旨	5
序論	6
方法	9
マウス.....	9
遺伝子型解析.....	9
抗体	10
免疫組織化学的解析	10
PC 数測定.....	11
ウェスタンブロッティング	11
Reverse transcription (RT)-PCR	12
統計学的解析.....	12
結果	13
PC 特異的 JSAP1, JLP 欠失による PC 軸索膨化と神経脱落.....	13
PC 特異的 JSAP1, JLP 欠失による PC の神経変性.....	14
PC における JSAP1, JLP によるキネシン-1 依存性の軸索輸送制御	17
PC 特異的 JSAP1, JLP 欠失マウスにおける PC 軸索膨化部での JNK 活性化.....	18
PC および BC 特異的 JSAP1, JLP 欠失マウスを用いた、BC で発現している JSAP1, JLP が PC における JSAP1, JLP の機能に与える影響の解析.....	19
PC 特異的に JSAP1 を発現する <i>Jsap1:Jlp</i> cDKO(PC/BC)/L7- <i>Jsap1</i> マウスを用いたレ スキュー実験.....	23
考察	27
謝辞	30
参考文献.....	31

本論文における略称一覧(アルファベット順)

APP : amyloid precursor protein
BC : basket cell, バスケット細胞
BCA : bicinchoninic acid
BSA : bovine serum albumin
cDKO : conditional double knockout
Ce : cerebellum
cKO : conditional knockout
Cx : cerebral cortex
Cyt c : cytochrome c
DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole
DCN : deep cerebellar nuclei
DKO : double knockout
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GFP : green fluorescent protein
HRP : horseradish peroxidase
JLP : JNK-associated leucine zipper protein
JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase
JSAP1 : JNK/stress-activated protein kinase-associated protein 1
KHC : kinesin heavy chain
KLC : kinesin light chain
KO : knockout
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MAPKK : MAPK kinase
MAPKKK : MAPKK kinase
NP-40 : nonidet p-40
OCT : optimal cutting temperature
PB : phosphate buffer
PBS : phosphate-buffered saline
PC : Purkinje cell, 小脳プルキンエ細胞
PCR : polymerase chain reaction

PFA : paraformaldehyde
Phospho : phosphorylated
PVDF : polyvinylidene fluoride
RIPA : radioimmunoprecipitation assay
rpm : rotations per minute
RT-PCR : reverse transcription-PCR
SDS : sodium dodecyl sulfate
SNAP25 : synaptosomal-associated protein 25
SYP : synaptophysin
SYT1 : synaptotagmin 1
TBS : tris-buffered saline

要旨

神経細胞において、オルガネラやタンパク質、シナプス小胞などの積荷を輸送する軸索輸送は神経細胞の生存に必須の機能であり、軸索輸送の破綻は様々な神経変性疾患を引き起こす。JSAP1, JLP は脳神経系で高い発現が認められ、細胞の増殖、分化、生存、死などを制御する細胞内シグナル伝達経路である MAP キナーゼ (MAPK) 経路の中でも特に JNK 経路の効率と特異性を制御する足場タンパク質として知られている。また、JSAP1, JLP は線虫やショウジョウバエ、*in vitro* での先行研究によって、順行性の軸索輸送のモータータンパク質であるキネシンと結合し、神経細胞の軸索輸送の制御に関与することが示唆されている。しかし、*in vivo* における哺乳類神経細胞での JSAP1, JLP の生理学的な機能にはまだ不明な点が残されている。そこで、Cre-loxp システムを用いて小脳プルキンエ細胞(PC)におけるコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作出、解析することによって、JSAP1, JLP の *in vivo* での機能解析を行った。PC 特異的 *Jsap1, Jlp* cDKO [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)] マウスを解析した結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスでは PC の軸索膨化と進行性の神経脱落、グリオシスが認められた。さらに、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス PC の軸索膨化部にはキネシン-1 によって軸索輸送されるミトコンドリア、APP が選択的に検出された。また、*in vivo* ではバスケット細胞(BC)が PC の軸索開始点に軸索のクラスターであるピンスーを形成しており、ピンスーでは JSAP1 の高い発現が認められる。そのため、特に BC で発現している JSAP1 の機能が PC の生存に対して影響を与えているのではないかと考え、この可能性を調べるために、まず Cre-loxp システムを用いて PC および BC 特異的 *Jsap1, Jlp* cDKO [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)] マウスを作出し、解析を行なった。結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで PC の軸索膨化、進行性の神経脱落などが認められ、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの表現型は *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの表現型と一致していた。さらに、*L7-Jsap1* トランスジェニックマウスを用いて PC 特異的に JSAP1 を発現させることによって、BC 特異的に JSAP1, JLP を欠失したレスキューマウスを作出し、解析した結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の神経脱落がレスキューされた。本研究によって、JSAP1, JLP は哺乳類神経細胞において冗長的な機能を持っており、キネシン-1 依存性の軸索輸送を制御していることが示唆された。また、JSAP1, JLP は PC の生存に必須であり、JSAP1, JLP の欠失はキネシン-1 依存性の軸索輸送の破綻を生じ、細胞自律的な神経変性を引き起こすことが示唆された。

序論

神経変性疾患は特定の細胞群の神経細胞が年齢の進行とともに徐々に神経細胞死によって進行性に神経脱落し、その細胞数が減少することを特徴とした疾患である。神経細胞において軸索輸送は神経細胞の機能や生存に非常に重要であり、軸索輸送の異常が、様々な神経変性疾患を引き起こすことが知られている^{1),2)}。神経細胞の軸索はタンパク質合成機能をほとんど持たず、軸索に必要な物質は、細胞体からのキネシン、ダイニンなどのモータータンパク質を介して微小管に沿った軸索輸送によって運搬されている³⁾。これまでの先行研究によって、軸索輸送に異常が生じた神経細胞の軸索では、神経伝達物質などを内包するシナプス小胞やタンパク質、オルガネラ、オートファゴソームやユビキチン化タンパク質の凝集体などの異所的な蓄積や、軸索が肥大化した軸索膨化が認められるという知見が得られている²⁾。また、軸索輸送に異常が生じた神経細胞では軸索変性や神経変性が引き起こされることが明らかになっている^{1),2),4)}。

細胞は細胞内外からの刺激を受容し、細胞内シグナル伝達によって様々な応答を引き起こしている。その中でも、MAP キナーゼ(MAPK)経路は細胞外からの刺激に応答して、細胞の増殖、分化、生存、死などを制御する重要な細胞内シグナル伝達経路であり、MAPK kinase (MAPKKK)から MAPK kinase (MAPKK)、MAPK へとシグナルを伝達する⁵⁾⁻⁷⁾。この経路は酵母からヒトに至るまで進化的に高く保存されており、哺乳類では主に extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 という 3 つの経路が詳しく解析されている⁵⁾⁻¹⁰⁾。本研究で着目した JNK/stress-activated protein kinase-associated protein 1 (JSAP1)とそのファミリーメンバーである JNK-associated leucine zipper protein (JLP)は、脳神経系で高い発現が認められ、JNK 経路および p38 経路を構成するタンパク質と相互作用し、機能的モジュールと呼ばれる複合体を形成することによってそれぞれの経路の特異性と効率を制御している足場タンパク質である¹¹⁾⁻¹⁵⁾。先行研究において、*Jsap1* ノックアウト(KO)マウスや神経細胞特異的 *Jsap1* コンディショナルノックアウト(cKO)マウスは出生直後に死亡し、脳梁の欠損などが認められており、JSAP1 は脳神経系において生存に必須の役割を果たしていることが示唆されている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。*Jlp* KO マウスは一見正常に発達するが¹⁹⁾、先行研究では、背側終脳特異的に *Jsap1*, *Jlp* を cKO したマウスは生後 5 週間までに死亡し、側脳室の拡大、大脳皮質の第 2/3 及び 5 層の進行性の神経脱落が認められ、JSAP1, JLP が冗長的な機能を持ち、発達期の脳神経系に必須であることが明らかになっている²⁰⁾。これらのことから、JSAP1, JLP は神経細胞の生存や機能に必須の役割が存在すると考えられる。さらに、JSAP1, JLP は線虫やショウジョウバエ、*in vitro* での先行研究により、軸索輸送のモータータンパク質であるキネシン-1 との結合ドメインを持ち、モー

タータンパク質と相互作用することで、モータータンパク質と軸索内を輸送される積荷とのアダプタータンパク質として機能すること²¹⁾⁻²³⁾や、キネシン-1の活性と運動性を促進すること²⁴⁾が示されており、軸索輸送への関与が示唆されている。*In vitro*で初代培養された海馬由来神経細胞を用いた先行研究では、JSAP1, JLPは海馬神経細胞の生存に必須の冗長的な機能を持ち、キネシン-1（重鎖 kinesin heavy chain (KHC) 2本と軽鎖 kinesin light chain (KLC) 2本からなる二量体）のKHCサブユニットと相互作用することでキネシン-1による軸索輸送を制御していることが示唆されている²⁰⁾。しかし、*in vivo*での哺乳類神経細胞を用いた解析はあまり行なわれておらず、JSAP1, JLPの神経細胞における生理学的な機能には不明な点が残されている。

JSAP1, JLPの機能解析を試みるにあたり、*Jsap1* KO マウスは出生直後に死亡する¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、²⁰⁾ため、JSAP1, JLPの機能の詳細な解析を単純 KO マウスで行なうことは難しい。このような場合、様々な時期、領域、組織特異的にタンパク質の機能を欠失させた cKO マウスが用いられる。そこで、本研究では足場タンパク質 JSAP1, JLP が、小脳プルキンエ細胞(PC)とバスケット細胞(BC)に強い発現が認められていることに注目した²⁵⁾。小脳は協調運動や平衡維持、随意運動などを制御する運動中枢であり、PCはシグナルの出力を行なう主要な神経細胞である。PCはJSAP1, JLPの発現が高く²⁵⁾、免疫組織化学的解析によって細胞体および軸索の双方を観察することが可能であるため、*in vivo*でのJSAP1, JLPの機能解析に有用であると考えた。さらに、*in vivo*において、神経細胞は他の神経細胞やグリアなどに周囲を取り囲まれており、これらの細胞から様々な影響を受けていると考えられる。BCはPCの軸索開始点を取り囲むように軸索のクラスターであるピンスーを形成しており、このピンスーではJSAP1の発現が高いことが報告されている²⁵⁾。BCの機能やそのメカニズムはあまり明らかになっていないが、先行研究では、BCはピンスーにおいてPCの軸索における活動電位の発生を抑制的に制御しているなど、小脳の正常な機能に必須の役割があると考えられている²⁶⁾⁻³⁰⁾。そこで、PCにおけるJSAP1, JLPの機能はBCで発現しているJSAP1の影響を受けている可能性が高いのではないかと考えた。小脳ではこれまでに、*Cre-loxP* システムを用いて、PC特異的に発現する *L7-Cre* 遺伝子を用いた cKO マウス³¹⁾や、PCとBC特異的に発現する *GluRδ2-Cre* 遺伝子を用いた cKO マウス³²⁾が確立されており、これらの cKO マウスはPCに着目した *in vivo*におけるJSAP1, JLPの機能解析に非常に有用であると考えた。

本研究では、PCにおけるJSAP1, JLPの機能解析を行なうために、まず *Jsap1, Jlp* を領域特異的に cKO した PC 特異的 *Jsap1, Jlp* cDKO [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)] マウスの作出、解析を行なった。さらに、BCで発現しているJSAP1(あるいはJLP)がPCにおけるJSAP1, JLPの機能に影響を与えている可能性を調べるために、PCおよびBC特異的 *Jsap1, Jlp*

cDKO [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)] マウス、PC 特異的に JSAP1 を発現する *L7-Jsap1* トランスジェニックマウスを用いたレスキュー [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7Jsap1*] マウスを作出し、解析を行なった。その結果、足場タンパク質 JSAP1, JLP は PC において冗長的な機能を持ち、PC の生存に必須であることが示唆された。JSAP1, JLP は PC においてキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御しており、JSAP1, JLP の欠失はキネシン-1 依存性の軸索輸送の破綻を生じ、神経変性を引き起こす。また、これらの PC における JSAP1, JLP の機能は PC 内で細胞自律的に行われていることが示唆されたため、ここに報告する。

方法

マウス

動物実験は文部科学省による研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針と金沢大学の動物実験委員会の規程に従って行った。*Jsap1^{flox/flox}(Jsap1^{ff})*マウス^{19), 25)}および*Jlp^{flox/flox}(Jlp^{ff})*マウス²⁰⁾はがん進展制御研究所学際科学実験センター実験動物研究施設のSpecific Pathogen Free (SPF)環境で飼育していたマウスを用いた。今回の研究では、コントロールマウスとして*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}*マウスを用いた。*Jsap1:Jlp cDKO(PC)*マウス(*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}:L7-Cre*)はJackson Laboratoryの*L7-Cre*トランスジェニックマウス³¹⁾と*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}*マウスを交配することによって作出した。*Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)*マウス(*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}:GluRδ2-Cre*)は、崎村健司教授(新潟大学)から分与していただいた*GluRδ2-Cre*マウス³²⁾と、*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}*マウスを交配することによって作出した。*Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)/L7-Jsap1*マウス(*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}:GluRδ2-Cre:L7-Jsap1*)は*Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)*マウスと*L7-Jsap1*トランスジェニックマウスを交配することで作出した。*L7-Jsap1*トランスジェニックマウスはPCで*L7-Jsap1*遺伝子を発現するマウスであり、*L7-Jsap1*遺伝子のコンストラクトはFig. 9Aに示した。*L7*遺伝子本来のATGに変異が入ったp*L7* ΔAUGベクターを用いて、平井宏和教授(群馬大学)から分与していただいたpBS-*L7-green fluorescent protein (GFP)*ベクターから*L7*遺伝子領域の開始コドンATGを欠失させ、作成したpBS-*L7-GFP*ベクターのGFPコーディング領域に*Jsap1*のcDNA遺伝子を挿入した³³⁾⁻³⁵⁾。*L7-Jsap1*トランスジェニックマウスは理化学研究所で作成していただいたマウスを用いた(Accession No. CDB0513T: <http://www2.clst.riken.jp/arg/TG%20mutant%20mice%20list.html>)。

遺伝子型解析

マウスの組織片を採取し、採取したマウス組織片から、簡便に組織片からゲノムDNAを調製することのできるホットショットの手法に従い、pH 12.0のLysisバッファー (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA)を組織片にくわえ、95 °Cでボイルし、氷上で冷却したのち、pH 5.0のNeutralizationバッファー (40 mM Tris-HCl)をくわえてpHを中和し、4 °Cで遠心して、バッファー中にゲノムDNAを調製した。調製したゲノムDNAを鋳型として、目的遺伝子に特異的に結合するprimerを用いてPCRを行い、DNAの増幅を行った。PCRに用いるDNAポリメラーゼはGo Taq DNA ポリメラーゼ(Promega KK社)を用いた。PCRに用いたprimer配列。*Jsap1*, 5'-AGGAACAGCCATAGATGGGACCGT-3', 5'-GGGCTACACAGAGAAACCC TGTCTCAA-3' : *Jlp*, 5'-GTTTCCGTGTTTCATTAGGGTGTGTTTCAC-3', 5'-CCCATGTAAGA

GCAACACAGTTCTTACC-3' : Cre , 5'-ACCTGATGGACATGTTTCAGGGATCG-3', 5'-TCC GGTATTCAACTTGCACCATGC-3' : L7-Jsap1 (primer set 1) , 5'-TGTTTGGAGGCACT TCTGACTTGC-3', 5'-CTCGTCCATCTGGATCTCCATCAT-3' : L7-Jsap1 (primer set 2) 5' -CGGAGAGGATGATGAACTGAGGA-3', 5'-CACTCAACTCTTTGTTGCTAGTGCC-3'

抗体

免疫組織化学的解析に使用した一次抗体 [anti-JSAP1 (1 µg/ml)²⁵⁾, anti-JLP (2 µg/ml)¹⁹⁾, anti-mouse calbindin D28K (1:500 および 1:2000; C9848, Sigma-Aldrich 社), anti-rabbit calbindin D28K (1:250 および 1:1000; AB1778, Millipore 社), anti-cytochrome c (Cyt c) (1:500; 556432, BD Bioscience 社), anti-amyloid precursor protein (APP) (1:50; MAB348, Millipore 社), anti-synaptotagmin 1 (SYT1) (1:100 および 1:300; 105002, Synaptic Systems 社), anti-synaptophysin (SYP) (1:200; S5768, Sigma-Aldrich 社), anti-SNAP25 (1:500; T5168, Sigma-Aldrich 社), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:500; G3893, Sigma-Aldrich 社), anti-phosphorylated (Phospho) JNK (1:200 および 1:100; 9251, Cell Signaling 社)] 使用した二次抗体 [mouse Alexa 488, mouse Alexa 568, rabbit Alexa 488, rabbit Alexa 568-conjugated anti-mouse と anti-rabbit IgG (1:500 および 1:1000; Invitrogen 社)]. これらにくわえ、核染色に 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich 社)を使用した。ウェスタンブロッティングに使用した一次抗体 [anti-JSAP1 (0.33 µg/ml)²⁵⁾, anti-α-tubulin (1:5000; T5168, Sigma-Aldrich 社)]使用した二次抗体[horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse, rabbit IgG (1:5000; GE Healthcare 社)]

免疫組織化学的解析

マウスに十分な麻酔を施し、4 % パラホルムアルデヒド(PFA)/0.1 M リン酸緩衝液(PB)で灌流固定を行い、脳を取り出して 4 % PFA/0.1 M PB 中におき、4 °C で一晩後固定を行った。後固定の後、10 %, 20 %, 30 %のスクロース/1 M リン酸緩衝液(PBS)でスクロース置換を行い、矢状面でトリミングした脳のサンプルを OCT コンパウンド(Sakura Finetek Japan 社)で包埋し、-80 °C で凍結した。クリオスタットを用いて凍結サンプルの 20 µm, 25 µm 凍結切片を作成し、スライド(S9441, Matsunami 社)に貼付け乾燥した後、TBST (0.1 % Tween 20 /トリス緩衝生理食塩水(TBS))で切片の OCT コンパウンドを取り除いた。その後、ブロッキングバッファー(2 % BSA, 2 % goat serum, 1 % Triton X-100 /TBST)で室温、1 時間のブロッキング反応を行った。ブロッキング反応後、一次抗体をくわえ、4 °C で一晩一次抗体反応を行った。TBST で洗浄し、二次抗体をくわえ、室温、3 時間二次抗体反応を行った。二次抗体反応終了後、TBST で洗浄し、蛍光用封入剤(vector laboratories 社)で封入した。封

入したサンプルは共焦点レーザースキャン顕微鏡(LSM510 META, Carl Zeiss 社)の 20x, 40x レンズを用いて画像を取得した。

PC 数測定

クリオスタットを用いて、小脳の正中線付近のパラサジタルと呼ばれる領域の 20 μm , 25 μm 凍結切片を作成し、スライドに貼付け乾燥後、TBS で切片の OCT コンパウンドを取り除き、ニッスル染色液(0.1 % cresyl violet)で染色を行った後、エタノールで脱水を行い、キシレンによって透徹し、封入剤(大道産業株式会社)で封入した。ニッスル染色を行ったサンプルは蛍光顕微鏡(IX71, Olympus 社)の CCD カメラ (DP50, Olympus 社)を使用して画像の取得を行った。この時取得した画像を用いて、画像解析ソフト Image J(National Institutes of Health 社)を用いて小脳の 2 から 9 葉目までに存在する PC の細胞体を形態的に判別し、PC 数の測定を行った。PC 層の長さは、同様に画像解析ソフト Image J を用いて、PC 層と顆粒細胞層の間に線を引き、その長さを測定した。

ウェスタンブロッティング

頸椎脱臼によって安楽死したマウスから脳をとりだし、氷上、顕微鏡下で小脳と大脳皮質を採取した。採取した脳サンプルは即座に液体窒素中で凍結し、 -80°C で保存した。採取した脳をProtease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich社)をくわえたRIPAバッファ(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS)でホモジェナイズし、ソニケーションし、12,000 rpmで遠心して細胞抽出液を調製した。調製した細胞抽出液にSDSサンプルバッファ(250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS, 30 % Glycerol, 5 % β -mercaptoethanol, 0.02 % Bromophenol blue)をくわえ、ボイルすることによって細胞抽出液中のタンパク質を変性させた。細胞抽出液中のタンパク質濃度はBCA protein assay kit (23225, Thermo Scientific社)によって測定した。アクリルアミドゲルの各ウェルにタンパク質を20 μg アプライし、SDS-PA-gel electrophoresis (PAGE)を行なった。その後ゲルを切り出し、TBST溶液で洗浄後、PVDFメンブレン(Millipore社)にゲルを重ねてトランスファー装置に設置し、トランスファーバッファ中でPVDFメンブレンにゲル中のタンパク質をトランスファーした。タンパク質がトランスファーされたPVDFメンブレンをTBST溶液で洗浄し、5 %スキムミルク/TBST溶液(ブロッキングバッファ)で1時間ブロッキングを行い、一次抗体をくわえたブロッキングバッファで 4°C で一晩一次抗体反応を行った。一次抗体反応後、メンブレンをTBST溶液で洗浄し、二次抗体をくわえたブロッキングバッファで二次抗体反応を行なった。その後、タンパク質のバンドをImmobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore社)で検出し、LAS-4000 (GE healthcare社)を用

いて画像を取得した。

Reverse transcription (RT)-PCR

Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque社)の手法に従い、実験機材や空気中のRNaseによってサンプル中のRNAが分解されないよう、RNA抽出実験用に用意した実験器具とRNaseフリーの水を使用して以下の作業を行ない、total RNAを調製した。マウスから採取したマウス脳サンプルの重量を測定し、重量に応じた量のセパゾールをくわえ、ホモジェナイズした。クロロホルムをくわえ、12,000 rpm、4 °Cで遠心し、上清を採取し、採取した上清と等量のイソプロパノールをくわえ、12,000 rpm、4 °Cで遠心し、RNAを析出させた。沈殿に70 %エタノールをくわえ、転倒混和によって沈殿に付着した塩を取り除き、12,000 rpm、4 °Cで遠心してエタノールを取り除いた後、RNaseフリーの水をくわえて沈殿を溶解させ、RNA溶液を得た。RNA溶液に含まれるRNAの濃度は分光光度計を用いて測定した。PrimeScript® 1st strand cDNA synthesis kit (Takara社)の手法に従い、RNAにランダムに結合するランダムprimerを用いてRTを行い、調製したtotal RNAからcDNAを得た。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1*マウスから得られたcDNAを鋳型として、*L7-Jsap1*および*Gapdh*遺伝子のprimerを用いてRT-PCRを行った。*L7-Jsap1*遺伝子のコンストラクトと、primerが認識する領域はFig. 9Aに示した。*L7-Jsap1*遺伝子を認識するprimerは*L7-Jsap1*遺伝子の*L7*遺伝子領域のexon3と*Jsap1*遺伝子領域の最初の配列を認識するように設計されており、*L7-Jsap1*遺伝子のcDNA、すなわち*L7-Jsap1* mRNAが小脳において発現しているかどうかを解析した。RT-PCR に 使 用 し た Primer 配 列 。 : *L7-Jsap1*, 5'-CGTGTAACAGTTAATTCCTGCCTG -3', 5'-CTCGTCCATCTGGATCTCCATCAT -3' : *Gapdh*, 5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3', 5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'.

統計学的解析

統計学的解析には Student's *t-test* を用いて分析を行った。*P* 値は $P < 0.05$ を統計的に有意とした。

結果

PC 特異的 JSAP1, JLP 欠失による PC 軸索膨化と神経脱落

PC における足場タンパク質 JSAP1, JLP の機能を解析するために、まず Cre-loxp システムを用いた PC 特異的な *Jsap1*, *Jlp* cKO マウスを作出した。実験に使用したコントロール (*Jsap1^{fl/fl}:Jlp^{fl/fl}*)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC) (*Jsap1^{fl/fl}:Jlp^{fl/fl}:L7-Cre*)、*Jsap1* cKO(PC) (*Jsap1^{fl/fl}:Jlp^{fl/fl}:L7-Cre*)、*Jlp* cKO(PC) (*Jsap1^{fl/fl}:Jlp^{fl/fl}:L7-Cre*)マウスは、loxP-flanked (floxed)配列を挿入した *Jsap1*, *Jlp* の遺伝子組み換えマウス(それぞれ *Jsap1^{fl/fl}*, *Jlp^{fl/fl}*)と、小脳では PC 特異的に発現することで知られる *L7* 遺伝子のプロモーターの制御下で Cre 組み換え酵素を発現する *L7-Cre* トランスジェニックマウスを掛け合わせることによって作出した^{19), 20), 25), 31)}。Cre 組み換え酵素は loxP 配列を認識し、この配列に挟まれた DNA 領域を組み換え、欠失させるタンパク質である。まず、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスにおいて PC 特異的に JSAP1, JLP が欠失しているかどうかを、PC マーカーである抗 calbindin 抗体と、抗 JSAP1 あるいは抗 JLP 抗体を用いた免疫組織化学的解析で調べた。その結果、生後 4 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC において、JSAP1, JLP のシグナルが欠失していることを確認した(Fig. 1A)。ここで、免疫組織化学的解析で示した JSAP1 のシグナルは PC の細胞体では欠失している一方、同様に JSAP1 の高い発現が認められる BC が PC の軸索開始点に形成する軸索のクラスターであるピンスーには JSAP1 のシグナルが認められた。これは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスでは *L7* プロモーターの制御下で PC 特異的に JSAP1, JLP が欠失していることを示している。生後 24 週齢のコントロール、*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析では、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで PC の神経脱落が認められた(Fig. 1B)。そこで、生後 24 週齢のコントロール、*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの凍結サンプルから作成した切片をニッスル染色し、PC の細胞体数を測定した。結果、生後 24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスではコントロールマウスと比較して PC 数の統計的に有意な減少が認められた(Fig. 1C)。*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)ではこれらの異常は認められなかった(Fig. 1B, C)。また、生後 24 週齢のコントロール、*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析では、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで PC の軸索が存在する領域に、calbindin のドット状のシグナルが認められ、軸索の途中が肥大化する形態異常である軸索膨化が生じていた(Fig. 1B)。軸索膨化は神経細胞の軸索輸送に異常が生じた際に認められる表現型としてよく知られている。これらの結果は JSAP1, JLP は冗長的な機能を持ち、PC の生存に不可欠な役割を果たしていることを示唆している。さらに、JSAP1, JLP の機能は PC における軸索輸送の制御にも関与していると考えられる。

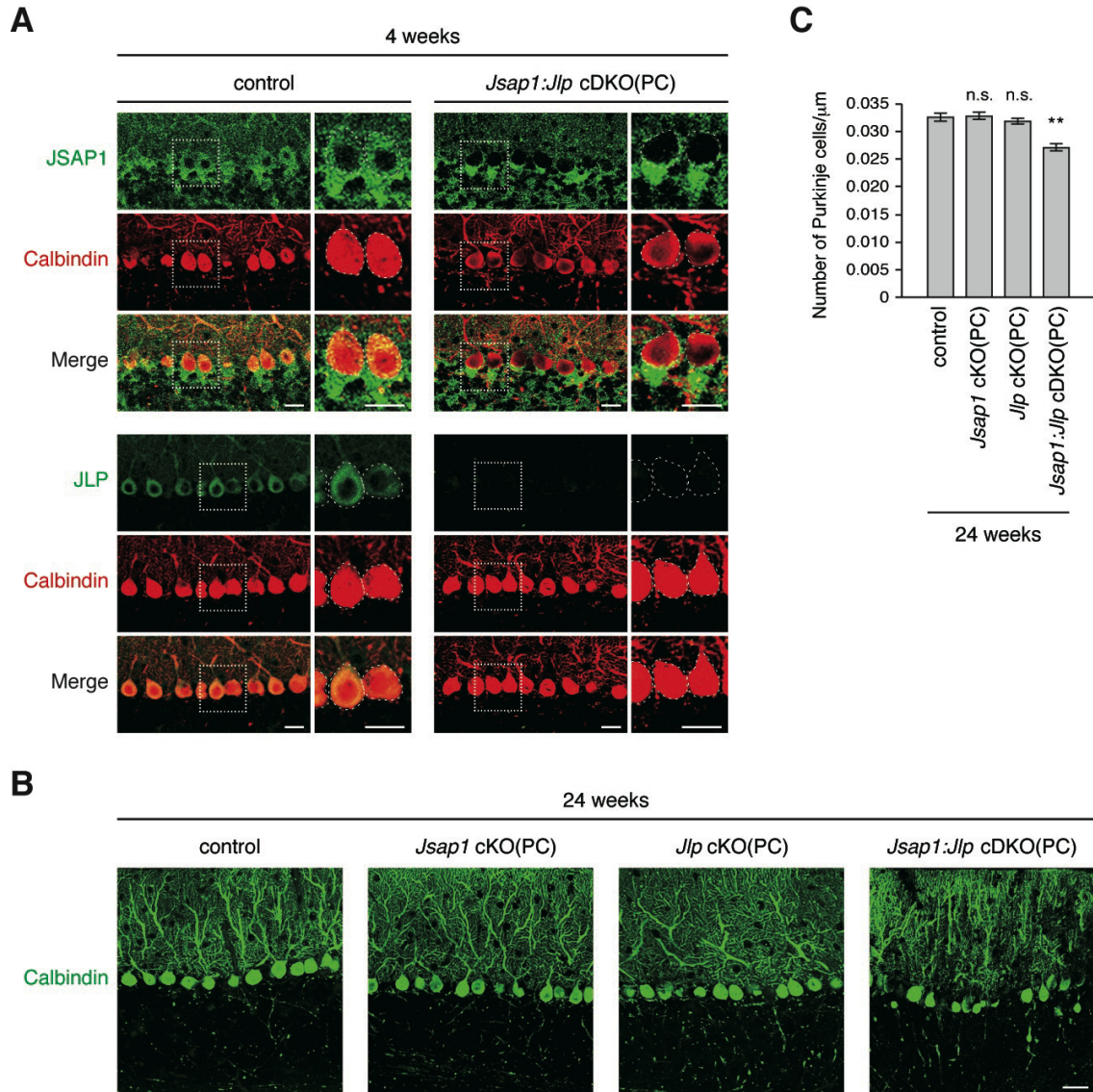


Figure 1 PC 特異的な JSAP1, JLP の欠失

(A) *Jsap1^{flf}:Jlp^{flf}* (コントロール)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの免疫組織化学的解析。生後 4 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片を抗 calbindin 抗体および抗 JSAP1 抗体あるいは抗 JLP 抗体で免疫染色した。右に拡大図を示し、PC の細胞体をドットの線で囲むことで示した。(B) 生後 24 週齢 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC の軸索膨化と神経脱落。コントロール、*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片を抗 calbindin 抗体で免疫染色した。(C) PC 数の統計学的解析。生後 24 週齢のコントロール、*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片をニッスル染色し、小脳の 2 から 9 葉目までの PC をカウントして 1 μm あたり PC の数を測定した。N 数は 4 である。Scale bars, 25 μm . ** $P < 0.01$; n.s., not significant.

PC 特異的 JSAP1, JLP 欠失による PC の神経変性

様々な週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスを用いて、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスのより詳細な組織学的解析を行った。生後 8、12、16、24、40 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの凍結サンプルから作成した切片をニッスル染色し、PC の数の

統計学的解析を行った。その結果、生後 8 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスでは PC の数はコントロールマウスと同等だったが、生後 8 週齢以降の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスではコントロールマウスと比較して PC の数の統計的に有意な減少が認められ、PC の数の減少の割合はマウスの週齢が進むとともに増加しており、PC の進行性の神経脱落が認められた (Fig. 2A)。また、様々な週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC の軸索について、抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。結果、生後 8、12、16、24 週齢の全ての週齢で、PC の細胞体の近くに軸索膨化が観察された (Fig. 2B)。さらに、PC の軸索膨化は、PC の軸索の末端が投射する小脳核 (DCN) 領域でも認められ、PC の軸索の数が生後 16、24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの DCN では減少しているような画像が得られた (Fig. 2C)。これは軸索変性が生じていることを示唆していると考えられ、軸索変性は神経変性で認められる現象のひとつであるため、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで認められた PC の神経細胞死が神経変性であることをサポートする結果である。PC の軸索膨化は神経脱落が認められない生後 8 週齢でも認められ (Fig. 2B, C)、このことは PC の軸索膨化は神経細胞死が引き起こされる前に既に生じていることを示唆している。また、生後 24 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学的解析では、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで GFAP の異常な活性化が認められた (Fig. 2D)。GFAP は脳神経系のグリアのひとつであるアストロサイトのマーカーであり、アストロサイトは脳神経系が傷害を受けたときに活性化しグリオシスが生じるため、GFAP の異常な活性化は脳神経系の傷害のマーカーとして用いられる。さらに、グリオシスは神経変性でよく認められる現象である。これらは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで認められた PC の進行性の神経脱落が神経変性であることを示唆する結果である。これらの結果は、PC における JSAP1, JLP の欠失は、まず PC の軸索膨化を生じ、軸索での異常が生じた後に、PC の神経変性が引き起こされていることを示唆している。

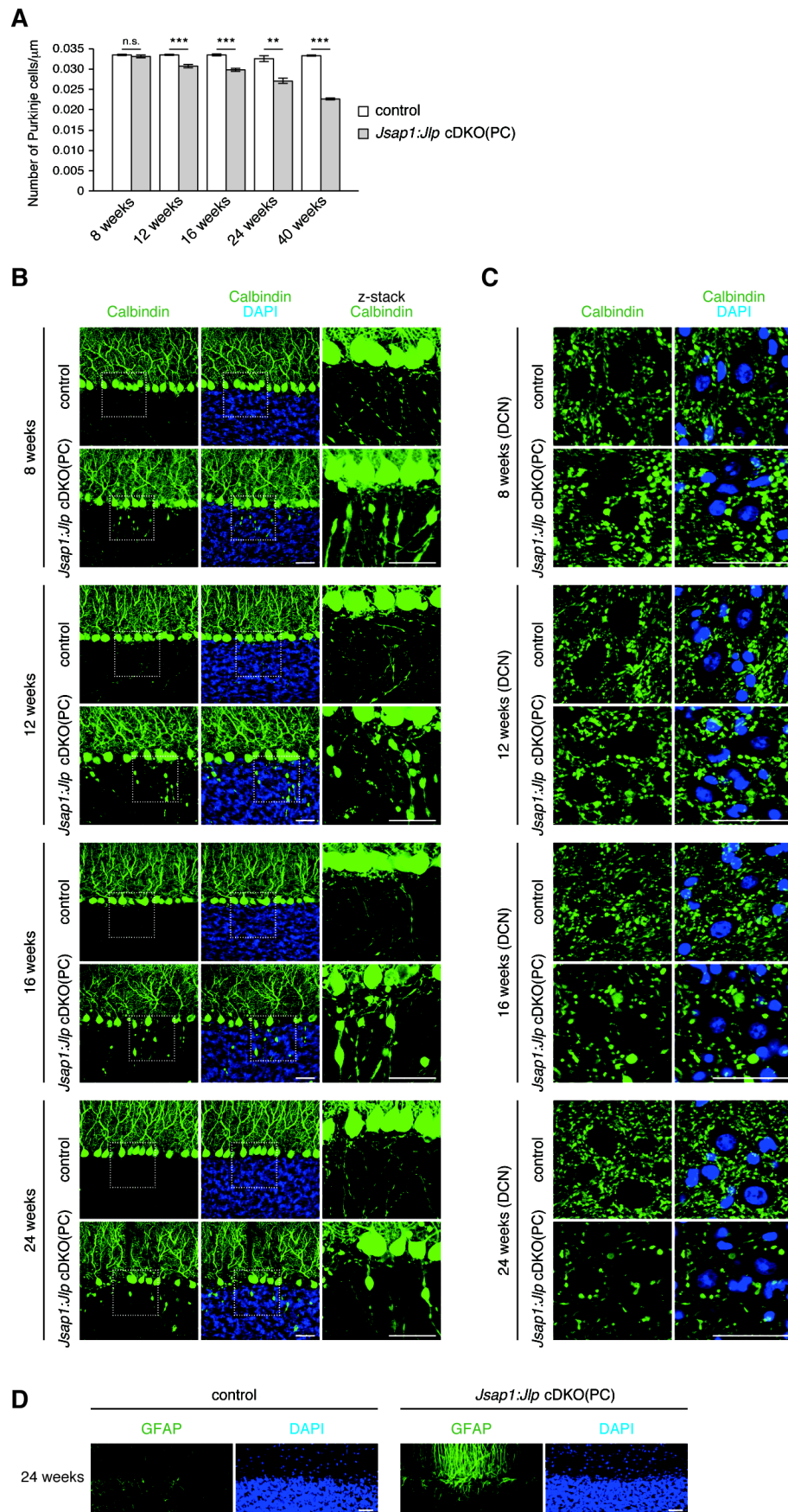


Figure 2 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス PC における軸索膨化と進行性の神経脱落

(A) PC 数の経時的な統計学的解析。生後 8、12、16、24、40 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片をニッスル染色し、小脳の 2 から 9 葉目までの PC をカウントして 1 μm あたりの PC の数を測定した。N 数は 4 である。(B) コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの抗 calbindin 抗体を用いた PC 層の免疫組織化学的解析。コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片を抗 calbindin 抗体と DAPI で免疫染色した。右図は共焦点顕微鏡の Z-stack を用いて、厚さを 2 μm に設定し、各切片を計 10 枚撮影した拡大図を示した。(C) コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの抗 calbindin 抗体を用いた PC の DCN 領域の免疫組織化学的解析。コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片を抗 calbindin 抗体と DAPI で免疫染色した。(D) 生後 24 週齢 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスのグリオーシス。コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片を抗 GFAP(アストロサイトマーカー)抗体で免疫染色した。DAPI は核を示している。Scale bars, 25 μm (B, C). Scale bar, 50 μm (D). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s., not significant.

PC における JSAP1, JLP によるキネシン-1 依存性の軸索輸送制御

Jsap1:Jlp cDKO(PC)マウスでは軸索輸送に異常が生じていることを示唆する軸索膨化が認められ、JSAP1, JLP は軸索輸送のモータータンパク質であるキネシン-1 と相互作用することが知られているため²⁰⁾⁻²⁴⁾、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC ではキネシン-1 依存性の軸索輸送に異常が生じているのではないかと考えられる。この可能性を調べるために、生後 8 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC の軸索膨化部にキネシンによって軸索輸送される積荷が蓄積しているかどうか、免疫組織化学的解析を行った。キネシン-1 によって輸送されるアミロイド前駆体タンパク質(APP)、ミトコンドリアマーカーの cytochrome c (Cyt c)、キネシン-1 以外によって輸送される積荷についてはキネシン-3 によって輸送されるシナプトフィジン(SYP)とシナプトタグミン 1(SYT)に着目して³⁾、抗 calbindin 抗体と、APP、Cyt c、SYP、SYT 1 のいずれかの抗体による二重染色をおこなった。免疫組織化学的解析の結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC 軸索膨化部にキネシン-1 によって輸送されるミトコンドリア、APP のシグナルが検出された(Fig. 3 上段)。一方で、キネシン-3 によって輸送される SYP、SYT1 のシグナルは PC の軸索膨化部にほとんど検出されなかった(Fig. 3 下段)。この結果は *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC の軸索膨化部にキネシン-1 によって輸送されるオルガネラや積荷が選択的に蓄積していることを示唆している。これらの結果から、JSAP1, JLP は PC においてキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御しており、JSAP1, JLP の欠失はキネシン-1 依存性の軸索輸送を障害し、神経変性を引き起こしていることが示唆される。

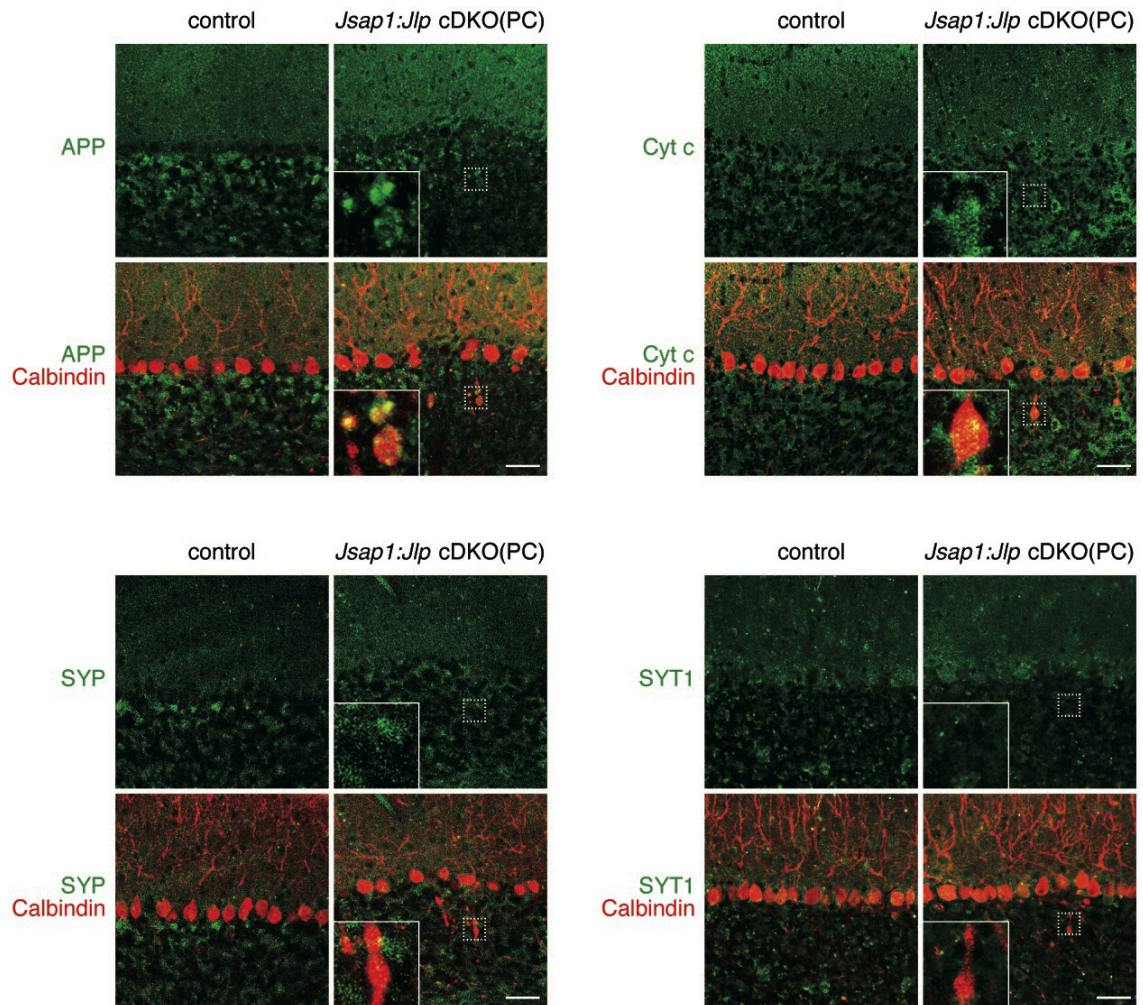


Figure 3 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス PC 軸索膨化部におけるキネシン-1 の積荷の選択的な蓄積
 生後 8 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片を、抗 calbindin 抗体と、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、ミトコンドリアマーカーCyt c、シナプトフィジン(SYP)、シナプトタグミン 1(SYT 1)に対する抗体のいずれかで二重染色した。ボックスの内部は拡大図である。APP とミトコンドリアはキネシン-1 の積荷であり、SYP と SYT1 はキネシン-3 の積荷である。
 Scale bars, 25 μ m.

PC 特異的 JSAP1, JLP 欠失マウスにおける PC 軸索膨化部での JNK 活性化

Jsap1:Jlp cDKO(PC)マウスでは PC の神経脱落が引き起こされていた(Fig. 1B, Fig. 2A)。*JSAP1*, *JLP* は MAPK 経路の足場タンパク質であり、特に JNK 経路の効率と特異性を制御している足場タンパク質として知られている¹¹⁾⁻¹⁵⁾。また、JNK 経路は細胞死を制御する経路としても知られている³⁶⁾。そこで、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで認められた PC の神経細胞死に JNK 経路が関与しているのではないかと考え、免疫組織化学的解析を行った。活性型である抗リン酸化型(Phospho-)JNK 抗体を用いた免疫組織化学的解析により、生後 8 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC の軸索膨化部で活性型の JNK が認められた(Fig. 4)。この結果から、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC では JNK 経路が活性化しており、PC

の神経細胞死が JNK 経路の活性化によって引き起こされている可能性が示唆された。

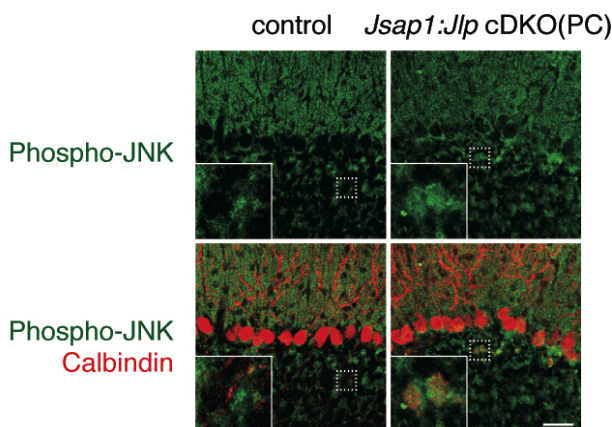


Figure 4 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス PC の軸索膨化部における JNK の活性化
生後 8 週齢のコントロールと *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウス小脳の矢状面切片を、抗 calbindin 抗体と抗 Phospho-JNK 抗体で免疫染色した。ボックスの内部は拡大図を示している。Scale bar, 25 μ m.

PC および BC 特異的 JSAP1, JLP 欠失マウスを用いた、BC で発現している JSAP1, JLP が PC における JSAP1, JLP の機能に与える影響の解析

Jsap1:Jlp cDKO(PC)マウスを用いた PC における JSAP1, JLP の機能解析によって、JSAP1, JLP は PC の生存に必須であることが示唆された。ここで、*in vivo* では PC は他の神経細胞やグリアなどの異なる細胞に周囲を取り囲まれており、周囲の細胞からのシナプス形成や接触などによって様々な影響を受けているため、周囲の細胞が PC の生存に影響を与えている可能性がある。中でも、本研究では、BC が PC の軸索開始点を取り囲むように形成する軸索のクラスターであるピンスーにおいて JSAP1 の高い発現が認められていることに着目した²⁵⁾。BC の機能やそのメカニズムはあまりわかっていないが、PC の活動電位の発生を抑制的に制御しているのではないかと考えられている²⁶⁾⁻³⁰⁾。そのため本研究では、特に BC で発現している JSAP1(あるいは JLP)が、PC における、JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能に関与し、影響を与えている可能性があると考えた。しかし、Cre-loxp システムを用いた BC 特異的に発現する Cre トランスジェニックマウスによる cKO マウスはまだ確立されていない。そこで、JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能に対する、BC で発現している JSAP1, JLP の影響を解析するために、まず *GluRδ2-Cre* プロモーターの制御によって PC および BC 特異的に *Jsap1, Jlp* を cKO された *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス (*Jsap1^{flf}:Jlp^{flf}:GluRδ2-Cre*)の解析を行なった^{19), 20), 25), 32)}。抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析により、生後 24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC では軸索膨化と神経脱落が観察された(Fig. 5A)。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで観察されたこれらの異常

はコントロール、 *Jsap1* cKO(PC/BC) (*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}:GluRδ2-Cre*)、 *Jlp* cKO(PC/BC) (*Jsap1^{ff}:Jlp^{ff}:GluRδ2-Cre*)マウスでは観察されなかった(Fig. 5A)。生後 24 週齢のコントロール、 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)、 *Jsap1* cKO(PC/BC)、 *Jlp* cKO(PC/BC)マウス凍結サンプルから作成した切片のニッスル染色を行い、PC の数を測定した結果、生後 24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは PC の数がコントロールマウスと比較して統計的に有意に減少していた(Fig. 5B)。また、 *Jsap1* cKO(PC/BC)、 *Jlp* cKO(PC/BC)の PC の数はコントロールマウスと同等であった(Fig. 5B)。これらの結果から、 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC においても、JSAP1, JLP は冗長的な機能を持っており、PC の生存に必須であることが示唆された。

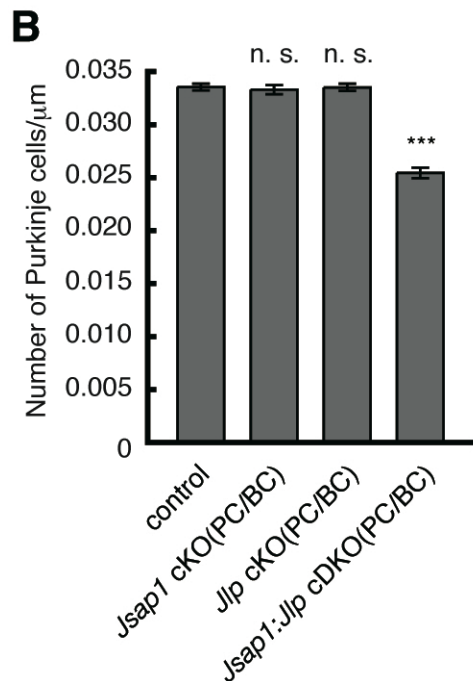
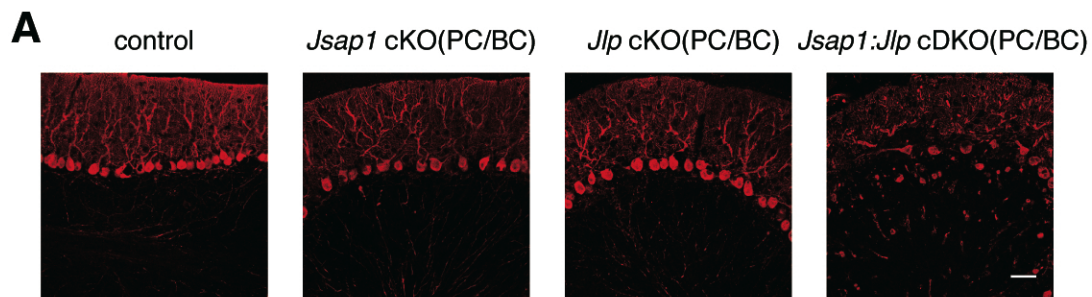


Figure 5 PC および BC 特異的 JSAP1, JLP の欠失による PC の軸索膨化と神経脱落

(A) 生後 24 週齢 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析。コントロール、 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)、 *Jsap1* cKO(PC/BC)、 *Jlp* cKO(PC/BC)マウス小脳の矢状面切片を抗 calbindin 抗体で免疫染色した。(B) PC 数の統計学的解析。生後 24 週齢のコントロール、 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)、 *Jsap1* cKO(PC/BC)、 *Jlp* cKO(PC/BC)マウス小脳の矢状面切片をニッスル染色し、小脳の 2 から 9 葉目までの PC をカウントして 1 μm あたりの PC の数を測定した。N 数は 3 である。Scale bar, 50 μm. *** $P < 0.001$; n.s., not significant.

さらに、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスについて、より詳細に経時的な解析を行なった。抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析の結果、PC の軸索膨化は生後 4、8、16、24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの全ての週齢で観察された(Fig. 6A)。生後 4、8、16、24、40 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC) マウスの凍結サンプルから作成した切片のニッスル染色を行い、PC の数を測定した結果、コントロールマウスと比較して、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC の数は、生後 8 週齢ではコントロールマウスと同等であったが、生後 16 週齢では PC 数が統計的に有意に減少しており、PC 数の減少の割合は週齢が進むとともに増加し、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC) マウスでは PC の進行性の神経脱落が認められた(Fig. 6B)。また、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでグリオシスが生じているか、抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学的解析で調べた結果、生後 24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで GFAP の異常な活性化が認められ、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスではグリオシスが生じていた(Fig. 6C)。これらの結果から、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC においても、JSAP1, JLP は軸索輸送の制御に関与しており、JSAP1, JLP が欠失することによって PC の軸索膨化と神経変性が引き起こされていることが示唆された。

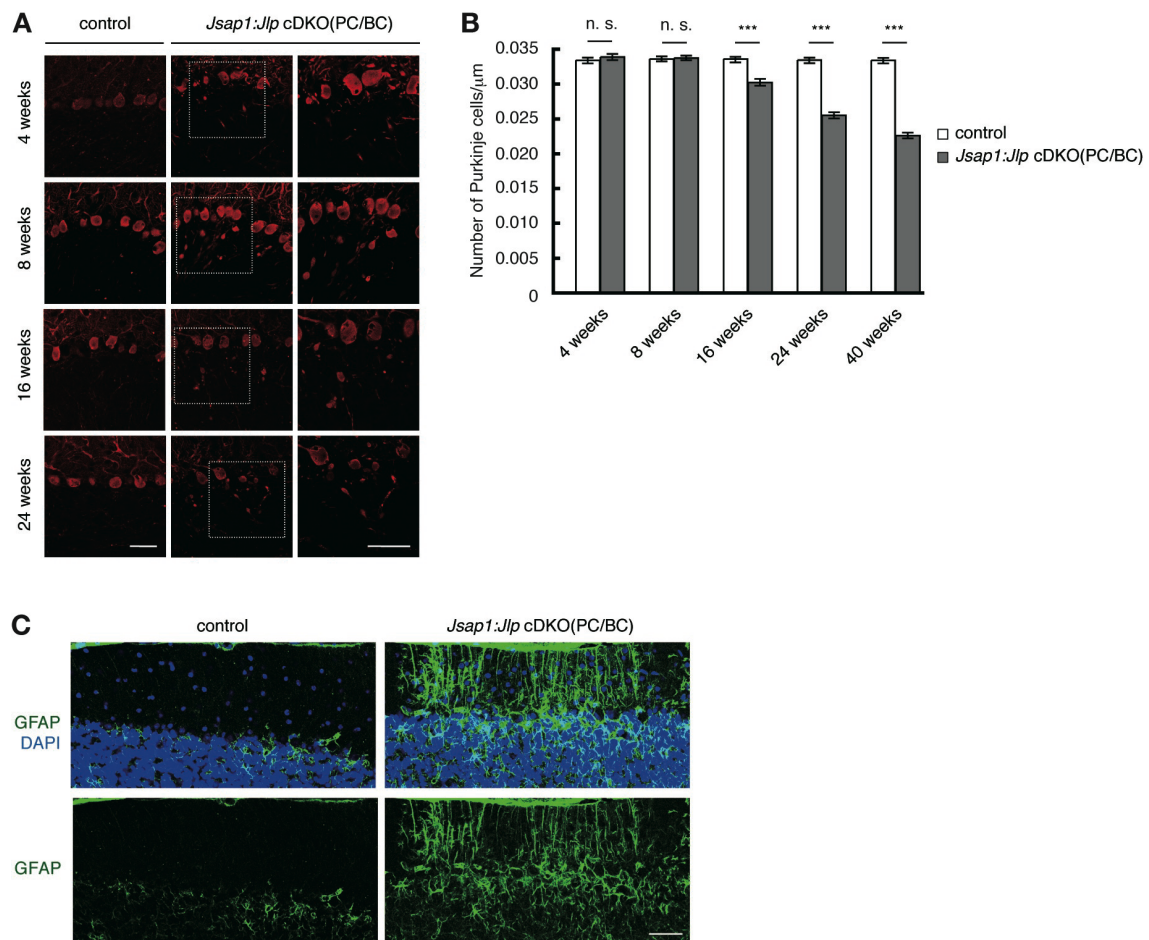


Figure 6 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス PC の軸索膨化と進行性の神経脱落

(A) *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスにおける軸索膨化の経時的解析。生後 4、8、16、24 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス小脳の矢状面切片を抗 calbindin 抗体で免疫染色した。(B) PC 数の経時的な統計学的解析。生後 4、8、16、24、40 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス小脳の矢状面切片をニッスル染色し、小脳の 2 から 9 葉目までの PC をカウントして 1 μm あたりの PC の数を測定した。N 数は 4 である。(C) 生後 24 週齢 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスのグリオーシス。コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス小脳の矢状面切片を抗 GFAP 抗体で免疫染色した。DAPI は核を示している。Scale bars, 50 μm . *** $P < 0.001$; n.s., not significant.

Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)マウスで PC の軸索膨化が認められたため、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと同様にキネシン-1 依存性の軸索輸送に異常が生じているのか調べるために、キネシン-1 によって輸送される積荷が軸索膨化部に蓄積しているかどうかを、免疫組織化学的解析によって調べた。キネシン-1 によって輸送されるシナプス小胞について、SNAP25³⁾に着目して免疫組織化学的解析を行なったところ、生後 16 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの軸索膨化部に SNAP25 のシグナルが検出された(Fig. 7 左)。一方で、キネシン-3 によって輸送される SYT1³⁾のシグナルは検出されなかった(Fig. 7 右)。これらの結果から、JSAP1, JLP は *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC においてもキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御しており、JSAP1, JLP の欠失はキネシン-1 依存性の軸索輸送の破綻を引き起こし、神経変性を引き起こすことが示唆された。

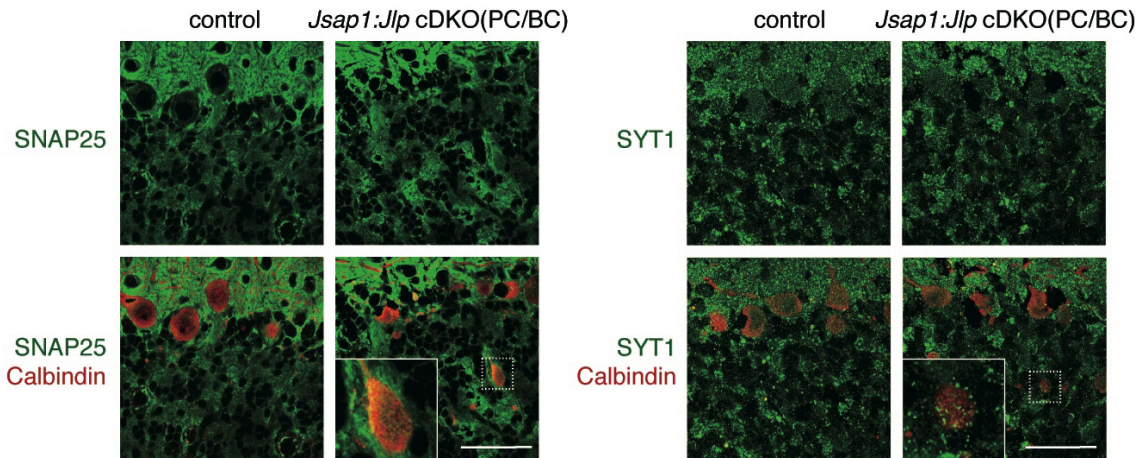
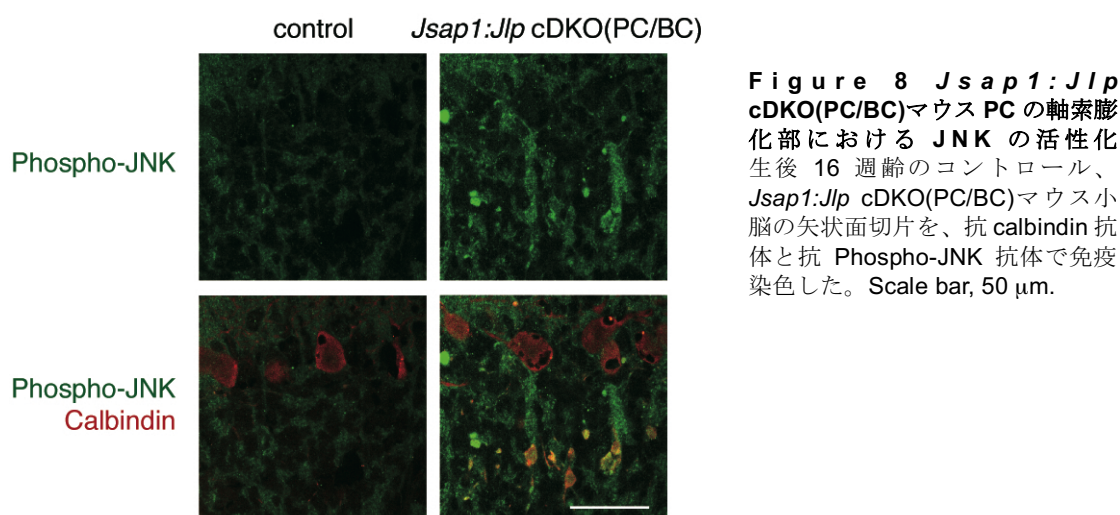


Figure 7 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス PC 軸索膨化部におけるキネシン-1 の積荷 SNAP25 の選択的蓄積

生後 16 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス小脳の矢状面切片を、抗 calbindin 抗体と、抗 SNAP25 抗体あるいは抗 SYT1 抗体のいずれかで免疫染色した。SNAP25 はキネシン-1 の積荷であり、SYT1 はキネシン-3 の積荷である。Scale bars, 50 μm .

Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)マウスでは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと同様に、PC の神経脱落が引き起こされていた(Fig. 5, Fig. 6B)。JSAP1, JLP は JNK 経路の効率と特異性を制御している足場タンパク質として知られており¹¹⁾⁻¹⁵⁾、また、JNK 経路は細胞死を制御する経路

としても知られている³⁶⁾。さらに、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスにおいても PC の軸索膨化部で活性型 JNK が認められた(Fig. 4)。そこで、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでも PC の神経細胞死に JNK 経路が関与しているのではないかと考え、解析を行なった。活性型である抗 Phospho-JNK 抗体を用いた免疫組織化学的解析により、生後 16 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC の軸索膨化部で活性型の JNK が認められた(Fig. 8)。この結果から、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと同様に *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC でも JNK 経路が活性化しており、PC の神経細胞死は JNK 経路の活性化によって引き起こされている可能性が示唆された。さらに、以上の結果をまとめると、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの表現型は *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの表現型と一致していたため、PC における JSAP1, JLP は、BC での JSAP1, JLP の発現の有無に関わらず、PC の生存に必須の機能を果たしている可能性が考えられる。



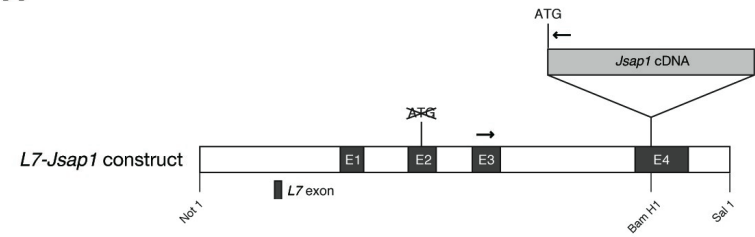
PC 特異的に JSAP1 を発現する *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスを用いたレスキュー実験

Jsap1:Jlp cDKO(PC) マウスでは PC の軸索膨化と神経変性が引き起こされており (Fig. 1, Fig. 2)、JSAP1, JLP は PC の生存に必須の機能を果たしていることが示唆された。ここで本研究では、JSAP1 は PC と、BC のピンスーで高い発現が認められるため²⁵⁾、BC で発現している JSAP1(あるいは JLP)が、PC における、JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能に影響を与えている可能性が否定できないことに着目した。そこで、PC の生存に BC で発現している JSAP1, JLP が影響を与えているのかを調べるために、BC 特異的に JSAP1, JLP を欠失したマウスを用いた解析を試みた。しかし、Cre-loxp システムを用いた BC 特異的な cKO マウスはまだ確立されていない。そのため、まず *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスを作出し、解析した結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC) マウスと同様に PC の軸索膨化と神経変性が引き起こされていた(Fig. 5, Fig. 6)。これらの結果は、

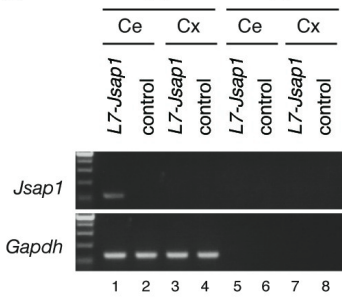
PC における JSAP1, JLP の機能は BC で発現している JSAP1, JLP の影響を受けていないことをサポートする結果である。そこでさらに、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで欠失している PC の JSAP1 を、*L7-Jsap1* トランスジェニックマウスを用いて PC 特異的に発現させるレスキュー実験を行なうことで、BC 特異的に JSAP1, JLP を欠失したマウスを用いた解析を試みた。レスキュー [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* (*Jsap1^{flf}:Jlp^{flf}:GluRδ2-Cre:L7-Jsap1*)] マウスは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスに、*L7* プロモーターの制御下で野生型の JSAP1 を発現する *L7-Jsap1* トランスジェニックマウス(*Jsap1^{flf}:Jlp^{flf}:L7-Jsap1*) (Fig. 9A に *L7-Jsap1* 遺伝子のコンストラクトを示した)を交配することで作出した。まず、*L7-Jsap1* トランスジェニックマウスの *L7-Jsap1* がマウス小脳で発現しているかどうかを確認するために、生後 8 週齢のマウス小脳、大脳皮質から total RNA を調製し、RT-PCR を行なって解析した結果、*L7-Jsap1* トランスジェニックマウス小脳で *L7-Jsap1* RNA の発現が認められた (Fig. 9B)。また、*L7-Jsap1* 遺伝子によって発現した mRNA が JSAP1 タンパク質に翻訳されているのかを確かめるために、生後 8 週齢マウス小脳から調製した細胞抽出液をウェスタンブロッティングによって解析した結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスでは、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは減少が認められる JSAP1 タンパク質の発現がレスキューされていることを確認した (Fig. 9C)。抗 JSAP1 抗体を用いた免疫組織化学的解析によって、生後 8 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスでは *L7* 遺伝子のプロモーターの制御によって発現する *L7-Jsap1* によって PC 特異的に JSAP1 タンパク質がレスキューされており、一方で *L7* 遺伝子が発現しない BC のピンスーには JSAP1 タンパク質はレスキューされていないことを確認した (Fig. 9D)。この結果は *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスでは PC 特異的に JSAP1 がレスキューされており、BC では JSAP1, JLP が欠失していることを示している。そこで、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた異常がレスキューされたかどうかを、生後 24 週齢 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスにおける PC の数の減少を指標として解析した。コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)、*L7-Jsap1*、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウス凍結サンプルから作成した切片のニッスル染色によって *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスの PC の数を測定した結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスでは PC 特異的に JSAP1 が発現することによって、生後 24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の神経脱落がレスキューされた (Fig. 9E)。また、抗 calbindin 抗体による免疫組織化学的解析では、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の軸索膨化 (Fig. 9D の下段左の矢頭、および Fig. 6A) が *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスでは認められない (Fig. 9D 下段右) ため、PC の軸索膨化が、PC 特異的な JSAP1 の発現によってレスキューされたと考えられる。これらの結果から、JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能は、BC で発現している JSAP1, JLP の影響を受け

ないことが明らかになった。すなわち、PC における JSAP1, JLP の機能は、PC の周囲に存在している異なる種類の神経細胞やグリアの影響を受けておらず、PC の細胞内で自律的に制御されている機能であることが示唆された。

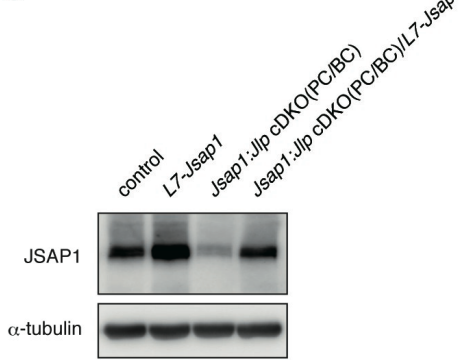
A



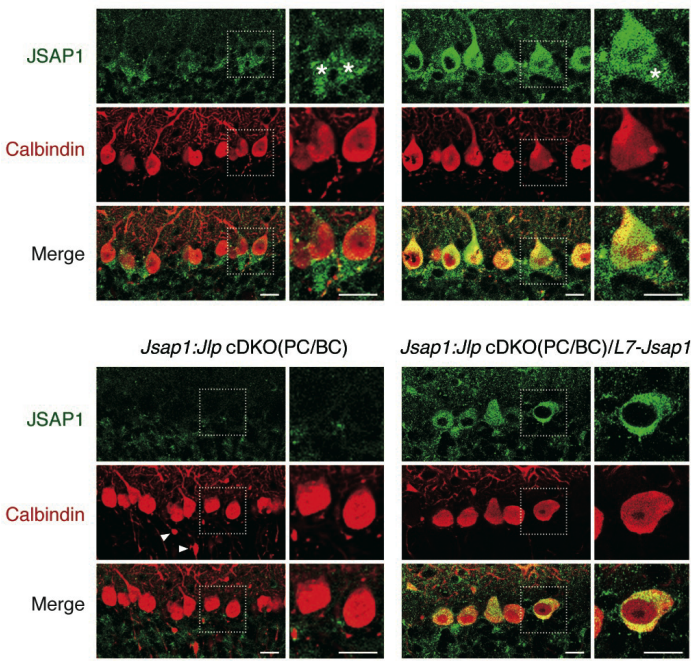
B



C



D



E

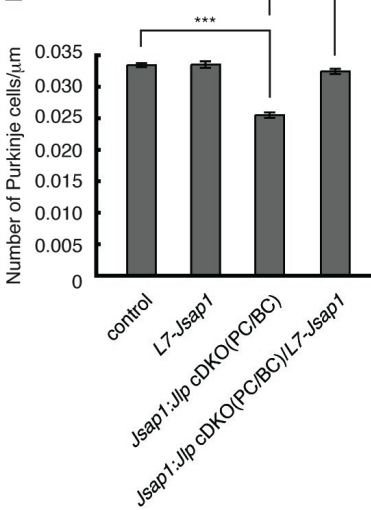


Figure 9 PC 特異的 JSAP1 タンパク質発現による、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス PC 数減少の回復

(A) *L7-Jsap1* 遺伝子コンストラクトの概略図。矢印は B の RT-PCR に使用した primer の認識部位を示している。(B) RT-PCR による *L7-Jsap1* RNA 発現解析。生後 8 週齢のコントロール、*L7-Jsap1* トランスジェニックマウスの小脳(Ce)および大脳皮質(Cx)から total RNA を調製し、RT によって total RNA から cDNA を作成した後、*L7-Jsap1* 遺伝子を認識する primer (A の矢印で示した)を用いて RT-PCR を行なった。レーン 1 から 4 は RT を行ったもの、レーン 5 から 8 は RT を行っていないサンプルの結果である。(C) ウェスタンブロッティングによる JSAP1 タンパク質発現解析。生後 8 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)、*L7-Jsap1*、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスの小脳細胞抽出液を、抗 JSAP1 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析した。 α -tubulin はローディングコントロールとして用いた。(D) 免疫組織化学的解析による *L7-Jsap1* タンパク質発現解析。生後 8 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)、*L7-Jsap1*、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウス小脳の矢状面切片を抗 calbindin 抗体および抗 JSAP1 抗体を用いて免疫染色した。右パネルは拡大図である。アスタリスクで示した部位は JSAP1 の高い発現が認められる BC のピンスーを示している。矢頭は PC の軸索膨化部を示している。(E) 生後 24 週齢 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスの PC 数の統計学的解析。コントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)、*L7-Jsap1*、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウス小脳の矢状面切片をニッスル染色し、小脳の 2 から 9 葉目までの PC をカウントして 1 μ m あたりの PC の数を測定した。N 数は 4 である。Scale bars, 25 μ m. *** P <0.001; n.s., not significant.

考察

本研究では、先行研究によって軸索輸送への関与が示唆されている²⁰⁾、MAPK 経路の足場タンパク質である JSAP1 とそのファミリーメンバーである JLP に着目し、JSAP1, JLP の *in vivo* での機能を明らかにするために、PC における JSAP1, JLP の機能解析を行った。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの解析の結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで PC の神経脱落(Fig. 1B, C)と軸索膨化(Fig. 2B, C)、進行性の PC の数の減少が認められた(Fig. 2A)。また、脳神経系に傷害が生じていることを示すグリオーシスも認められた(Fig. 2D)。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC の軸索膨化部にはキネシン-1 によって軸索輸送されるミトコンドリアと APP が検出され、キネシン-3 によって軸索輸送される SYP, SYT1 は検出されなかった(Fig. 3)。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC 軸索膨化部では活性型 JNK も認められた(Fig. 4)。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと同様に PC の軸索膨化と神経脱落が認められた(Fig. 5, Fig. 6A)。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは進行性の PC 数の減少が認められ(Fig. 6B)、グリオーシスも認められた(Fig. 6C)。また、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC の軸索膨化部ではキネシン-1 によって軸索輸送される SNAP25 (Fig. 7)が認められ、活性型 JNK (Fig. 8)も認められた。さらに、*L7-Jsap1* トランスジェニックマウスを用いて PC 特異的に JSAP1 を発現させるレスキュー実験によって、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の数の減少がレスキューされた(Fig. 9)。*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の軸索膨化や PC の神経脱落は、*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)、*Jsap1* cKO(PC/BC)、*Jlp* cKO(PC/BC)マウスでは認められなかった(Fig. 1, Fig. 5)。

Jsap1:Jlp cDKO(PC)マウスでは生後 12 週齢以降の週齢で進行性の PC 数の統計的に有意な減少が認められた(Fig. 2A)。進行性の神経脱落は神経変性の特徴である。また、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで認められた PC の軸索膨化(Fig. 2B, C)によって示唆される軸索輸送の異常は神経変性の原因としてよく知られている^{1), 2)}。さらに、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで、神経変性が生じた際によく認められる脳神経系の傷害を示唆するグリオーシスも認められた(Fig. 2D)。これらの結果から、JSAP1, JLP は PC の生存に必須であり、JSAP1, JLP の欠失は PC の神経変性を引き起こすと考えられる。

また、PC において JSAP1, JLP が神経細胞の生存に必須であり、JSAP1, JLP の欠失が神経変性を引き起こすことが示唆される結果は、*in vitro* で初代培養した *Jsap1:Jlp* DKO 海馬由来神経細胞を用いた先行研究において、JSAP1, JLP が海馬神経細胞の生存に必須であり、JSAP1, JLP の欠失は神経変性を引き起こすことが示唆されている²⁰⁾ことと一致する。このことから、PC における JSAP1, JLP の神経細胞の生存に必須の機能は、脳神経系の神

経細胞に普遍的な機能ではないかと考えられる。

PC における JSAP1, JLP の欠失は PC の軸索膨化と神経変性を引き起こした(Fig. 2, Fig. 6)。しかし、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)および *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた軸索膨化や神経脱落などの異常は *Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)、*Jsap1* cKO(PC/BC)、*Jlp* cKO(PC/BC)マウスなどの *Jsap1* か *Jlp* の単独 cKO マウスでは認められなかった(Fig. 1, Fig. 5)。さらに、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/L7*Jsap1* マウスでは PC 特異的に JSAP1 が発現し、一方で JLP の発現はレスキューされていないに関わらず、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の神経脱落がレスキューされた(Fig. 9E)。このことは JSAP1, JLP が冗長的な機能を持ち、どちらか片方が欠失しても、もう片方が欠失した方の機能を補完できることを強く示唆する結果である。

Jsap1:Jlp cDKO(PC)マウスでは PC の軸索膨化が認められた(Fig. 2B, C)。軸索の形態異常である軸索膨化は軸索輸送に異常が生じていることを示唆している。また、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスでは PC の軸索膨化部にキネシン-1 によって軸索輸送されるミトコンドリアと APP が検出され、一方でキネシン-3 によって軸索輸送される SYP や SYT1 は検出されなかった(Fig. 3)。この結果は JSAP1, JLP がキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御しており、JSAP1, JLP の欠失はキネシン-1 依存性の軸索輸送の異常を引き起こしていることをサポートする結果である。また、*in vitro* で初代培養した *Jsap1:Jlp* DKO 海馬由来神経細胞を用いて JSAP1, JLP の機能解析を行なった先行研究でも、タイムラプスによる解析ではキネシン-1 によって輸送される APP とミトコンドリアの輸送障害が認められており、JSAP1, JLP がキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御しているというメカニズムが示唆されている²⁰⁾。この結果と、本研究での *in vivo* で JSAP1, JLP がキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御していることを示唆する結果は一致しており、よって、*in vivo* においても JSAP1, JLP はキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御していると考えられる。

In vivo では神経細胞は他の神経細胞やグリアなどに周囲を取り囲まれて存在しており、神経細胞はこれらの周囲に存在する細胞から様々な影響を受けている。中でも、本研究では、BC のピンスーにおいて高い発現が認められる JSAP1²⁵⁾ (あるいは JLP)が、JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能に関与し、JSAP1, JLP を欠失した PC の生存に影響を与えているのではないかと考えた。そこで、まず PC および BC 特異的 *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスを作成して解析を行った結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは PC 軸索膨化(Fig. 6A)と進行性の PC 数の減少(Fig. 6B)、PC の軸索膨化部におけるキネシン-1 選択的な積荷の蓄積が認められ(Fig. 7)、これらは *Jsap1 : Jlp* cDKO(PC)マウスと同様の結果であった(Fig. 2, Fig. 3)。この結果は BC での JSAP1, JLP の発現の有無に関わらず、PC で JSAP1, JLP が欠失することが PC の神経細胞死を引き起こしていることを示唆する結果である。さらに、

L7-*Jsap1* トランスジェニックマウスを用いて、PC 特異的に JSAP1 を発現するレスキューマウスを作出することで BC 特異的に JSAP1, JLP を欠失したマウスにおける解析を行なった結果、PC 特異的に JSAP1 を発現させた *Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)/L7Jsap1* マウスでは、*Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)* マウスで認められた PC の軸索膨化と PC 数の減少がレスキューされた(Fig. 9D, E)。これらの結果から、JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能に対して、近接する神経細胞である BC における JSAP1, JLP は関与していないことが明らかになった。小脳では JSAP1, JLP は PC と BC のピンスーで強い発現が認められるため²⁵⁾、PC における JSAP1, JLP の欠失によって引き起こされる神経変性は PC 細胞自律的な現象であると考えられる。なお、本研究では PC にのみ着目しており、BC に発現している JSAP1 がどのような機能をもっているのかは不明である。そのため、BC における JSAP1 の機能解析については、今後新たに解析が行なわれる必要がある。

PC の神経細胞死については、*Jsap1:Jlp cDKO(PC)* および *Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)* マウスで活性型の JNK が PC の軸索膨化部に認められ(Fig. 4, Fig. 8)、*Jsap1:Jlp cDKO(PC)* および *Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)* マウスでは JNK 経路が活性化していることが示唆された。JNK 経路は細胞死を制御する経路としても知られている³⁶⁾。さらに、*in vitro* で初代培養した *Jsap1:Jlp DKO* 海馬由来神経細胞を用いた先行研究では、JNK 経路が海馬神経細胞の神経細胞死を制御していることが示唆されている²⁰⁾。このことから、*Jsap1:Jlp cDKO(PC)* マウスおよび *Jsap1:Jlp cDKO(PC/BC)* マウスで認められた神経細胞死は JNK 経路の活性化によって引き起こされている可能性が考えられる。なお、本研究では JNK の活性化がどのようなメカニズムによって引き起こされたのかは不明である。*In vitro* で初代培養した *Jsap1:Jlp DKO* 海馬由来神経細胞を用いた先行研究においては、JSAP1, JLP の欠失によって生じたキネシン-1 依存性のミトコンドリアの軸索輸送の異常によって、軸索内部の ATP 濃度が減少し、その結果として軸索内部 Ca^{2+} 濃度が上昇することで JNK 経路が活性化することが示唆されている²⁰⁾。このことから、PC においても、JSAP1, JLP の欠失によって生じたキネシン-1 依存性の軸索輸送の異常の結果として、JNK 経路が活性化し、神経細胞死が引き起こされたのではないかと考えている。

本研究により、脳神経系で高い発現が認められる JSAP1, JLP は、神経細胞において冗長的な機能を持っており、神経細胞の生存に必須であることを *in vivo* において明らかにした。JSAP1, JLP は哺乳類神経細胞においてキネシン-1 依存性の軸索輸送を制御しており、JSAP1, JLP の欠失はキネシン-1 依存性の軸索輸送の破綻を引き起こし、細胞自律的に、JNK 経路によって制御される神経変性を引き起こしていることが示唆された。本研究によって示唆された JSAP1, JLP の機能は、脳神経系に存在する神経細胞に普遍的な機能なのではないかと考えられる。

謝辞

本稿および研究にさいし、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました金沢大学自然科学研究科の善岡克次教授、佐藤時春博士、中里亮太博士、金沢大学がん進展制御研究所シグナル伝達研究室所属の皆様に深く感謝をいたします。また、*GluRδ2-Cre* マウスを分与していただいた新潟大学の崎村健司教授、*pBS-L7-GFP* ベクターを分与していただいた群馬大学の平井宏和教授、*L7-Jsap1* トランスジェニックマウスを作成していただいた理化学研究所の清成寛博士に御礼申し上げます。最後に、研究および論文をまとめるにあたり、支えてくれました家族に感謝します。

参考文献

- 1) Perlson E, Maday S, Fu MM, Moughamian AJ, Holzbaur EL. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci.* 2010; 33: 335-344
- 2) Millecamps S, Julien JP. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 161-176
- 3) Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 682-696
- 4) Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA, Brown RH Jr, Brown H, Tiwari A, Hayward L, Edgar J, Nave KA, Garberrn J, Atagi Y, Song Y, Pigino G, Brady ST. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J. Neurosci.* 2009; 29: 12776-12786
- 5) Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19: 91-118
- 6) Yoshioka K. Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *J Biochem.* 2004; 135: 657-661
- 7) Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene.* 2007; 26: 3185-3202
- 8) Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20: 117-122
- 9) Herskowitz I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell.* 1995; 80: 187-197
- 10) Waskiewicz AJ, Cooper JA. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7: 798-805
- 11) Ito M, Yoshioka K, Akechi M, Yamashita S, Takamatsu N, Sugiyama K, Hibi M, Nakabeppu Y, Shiba T, Yamamoto KI. JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 7539-7548
- 12) Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 1030-1043
- 13) Lee CM, Onésime D, Reddy CD, Dhanasekaran N, Reddy EP. JLP: A scaffolding protein

- that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 14189-14194
- 14) Kelkar N, Standen CL, Davis RJ. Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 2733-2743
 - 15) Jagadish N, Rana R, Selvi R, Mishra D, Garg M, Yadav S, Herr JC, Okumura K, Hasegawa A, Koyama K, Suri A. Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein. *Biochem J*. 2005; 389: 73-82.
 - 16) Kelkar N, Delmotte MH, Weston CR, Barrett T, Sheppard BJ, Flavell RA, Davis RJ. Morphogenesis of the telencephalic commissure requires scaffold protein JNK-interacting protein 3 (JIP3). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 9843-9848
 - 17) Ha HY, Cho IH, Lee KW, Lee KW, Song JY, Kim KS, Yu YM, Lee JK, Song JS, Yang SD, Shin HS, Han PL. The axon guidance defect of the telencephalic commissures of the JSAP1-deficient brain was partially rescued by the transgenic expression of JIP1. *Dev Biol*. 2005; 277: 184-199
 - 18) Iwanaga A, Sato T, Sugihara K, Hirao A, Takakura N, Okamoto H, Asano M, Yoshioka K. Neural-specific ablation of the scaffold protein JSAP1 in mice causes neonatal death. *Neurosci Lett*. 2007; 429: 43-48
 - 19) Iwanaga A, Wang G, Gantulga D, Sato T, Baljinnyam T, Shimizu K, Takumi K, Hayashi M, Akashi T, Fuse H, Sugihara K, Asano M, Yoshioka K. Ablation of the scaffold protein JLP causes reduced fertility in male mice. *Transgenic Res*. 2008; 17: 1045-1058
 - 20) Sato T, Ishikawa M, Mochizuki M, Ohta M, Ohkura M, Nakai J, Takamatsu N, Yoshioka K. JSAP1/JIP3 and JLP regulate kinesin-1-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration. *Cell Death Differ*. 2015; 22: 1260-1274
 - 21) Bowman AB, Kamal A, Ritchings BW, Philp AV, McGrail M, Gindhart JG, Glodstein LS. Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell*. 2000; 103: 583-594
 - 22) Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, Margolis B. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol*. 2001; 152: 959-970
 - 23) Nguyen Q, Lee CM, Le A, Reddy EP. JLP associates with kinesin light chain 1 through

- a novel leucine zipper-like domain. *J Biol Chem.* 2005; 280: 30185-30191
- 24) Sun F, Zhu C, Dixit R, Cavalli V. Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility. *EMBO J.* 2011; 30: 3416-3429
 - 25) Miura E, Fukaya M, Sato T, Sugihara K, Asano M, Yoshioka K, Watanabe M. Expression and distribution of JNK/SAPK-associated scaffold protein JSAP1 in developing and adult mouse brain. *J Neurochem.* 2006; 97: 1431-1446
 - 26) Iwakura A, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Watanabe M. Lack of molecular-anatomical evidence for GABAergic influence on axon initial segment of cerebellar Purkinje cells by the pinceau formation. *J Neurosci.* 2012; 32: 9438-9448
 - 27) Buttermore ED, Piochon C, Wallace ML, Philpot BD, Hansel C, Bhat MA. Pinceau organization in the cerebellum requires distinct functions of neurofascin in Purkinje and basket neurons during postnatal development. *J Neurosci.* 2012; 32: 4724-4742
 - 28) Bobik M, Ellisman MH, Rudy B, Martone ME. Potassium channel subunit Kv3.2 and the water channel aquaporin-4 are selectively localized to cerebellar pinceau. *Brain Res.* 2004; 1026: 168-178
 - 29) Laube G, Röper J, Pitt JC, Sewing S, Kistner U, Garner CC, Pongs O, Veh RW. Ultrastructural localization of Shaker-related potassium channel subunits and synapse-associated protein 90 to septate-like junctions in rat cerebellar Pinceaux. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996; 42: 51– 61
 - 30) Korn H, Axelrad H. Electrical inhibition of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 77: 6244-6247
 - 31) Barski JJ, Dethleffsen K, Meyer M. Cre recombinase expression in cerebellar Purkinje cells. *Genesis.* 2000; 28: 93-98
 - 32) Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M. Glutamate receptor $\delta 2$ is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.* 2011; 31: 3362-3374
 - 33) Wang T, Parris J, Li L, Morgan JI. The carboxypeptidase-like substrate-binding site in Nna1 is essential for the rescue of the Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. *Mol Cell Neurosci.* 2006; 33: 200-213
 - 34) Oberdick J, Smeyne RJ, Mann JR, Zackson S, Morgan JI. A promoter that drives transgene expression in cerebellar Purkinje and retinal bipolar neurons. *Science.* 1990; 248: 223-226

- 35) Tomomura M, Rice DS, Morgan JI, Yuzaki M. Purification of Purkinje cells by fluorescence-activated cell sorting from transgenic mice that express green fluorescent protein. *Eur J Neurosci.* 2001; 14: 57-63
- 36) Ghosh AS, Wang B, Pozniak CD, Chen M, Watts RJ, Lewcock JW. DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity. *J Cell Biol.* 2011; 194: 751-764