

# 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/45384">http://hdl.handle.net/2297/45384</a>

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



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

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

金沢大学大学院自然科学研究科  
生命科学専攻

石川 桃絵

## Abstract

Axonal transport is critical for neuronal development and function, and disruption of axonal transport causes various neurodegenerative diseases. In previous studies, JSAP1 and JLP, scaffolding proteins for mitogen-activated protein kinase signaling pathways, have been suggested to function as regulators of axonal transport through interaction with kinesin-1. However, *in vivo* physiological roles of JSAP1 and JLP remain unclear. In this study, to investigate the role of JSAP1 and JLP, I generated and analyzed Purkinje cell (PC)-specific *Jsap1* and *Jlp* conditional double knockout (cDKO) [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)] mice. *Jsap1:Jlp* cDKO(PC) mice exhibited PC axonal swelling, followed by progressive PC loss. Kinesin-1 cargoes, mitochondria and APP, were found to accumulate selectively in the swollen axons of PCs in *Jsap1:Jlp* cDKO(PC) mice. These results suggested that JSAP1 and JLP play essential roles in PC survival and kinesin-1-dependent axonal transport. Since JSAP1 is highly expressed in PCs and basket cells (BCs), it is possible that JSAP1 expressed in BCs affects PC survival. To investigate this possibility, I analyzed PC- and BC-specific *Jsap1* and *Jlp* cDKO [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)] mice. *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC) mice exhibited similar phenotypes with those of *Jsap1:Jlp* cDKO(PC) mice. PC-specific transgenic expression of JSAP1 rescued the PC loss detected in *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC) mice. Collectively, these results suggest that JSAP1 and JLP play cell-autonomous roles in regulating kinesin-1-dependent axonal transport, and their deficiency causes neurodegeneration.

## 序論

神経細胞における軸索輸送の異常は、特定の神経細胞群の神経細胞が神経細胞死によって進行性に減少する神経脱落を特徴とした、様々な神経変性疾患を引き起こす。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る。そのため、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、シナプス小胞やタンパク質、オルガネラなどが異所的に蓄積、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。

JNK/SAPK-associated protein (JSAP1)とそのファミリーメンバーである JNK-associated leucine zipper protein (JLP)は、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 MAP キナーゼ(MAPK)経路の足場タンパク質であり、特に JNK 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り、そ

それぞれの経路の特異性と効率を制御していると考えられている。JSAP1, JLP は、線虫やショウジョウバエ、*in vitro* での研究により、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物質に結合するアダプタータンパク質として機能することや、キネシン-1 の活性と運動性を促進することが示されており、軸索輸送への関与が示唆されている。さらに、*in vitro* で初代培養された海馬由来神経細胞における先行研究では、JSAP1, JLP は海馬神経細胞の生存に必須の相互に重複した機能を持ち、キネシン-1 (重鎖 kinesin light chain (KLC) 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。しかし、JSAP1, JLP の哺乳類の生理学的な機能には不明な点が残されている。

本研究では、JSAP1, JLP が脳神経系の中でも小脳のプルキンエ細胞(PC)とバスケット細胞(BC)で強い発現が認められていることに着目し、PCにおけるJSAP1, JLPの機能解析を行なった。まず、領域特異的にコンディショナルノックアウト(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がPCにおけるJSAP1, JLPの機能に影響を与えている可能性が考えられるため、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タンパク質を発現する *L7-Jsap1* トランスジェニックマウスを用いたレスキューマウス [*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7Jsap1*] マウスを作出し、解析を行なった。

## 結果

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<sup>ff</sup>:Jlp<sup>ff</sup>*)、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC) (*Jsap1<sup>ff</sup>:Jlp<sup>ff</sup>:L7-Cre*)、*Jsap1* cKO(PC) (*Jsap1<sup>ff</sup>:Jlp<sup>ff</sup>:L7-Cre*)、*Jlp* cKO(PC) (*Jsap1<sup>ff</sup>:Jlp<sup>ff</sup>: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<sup>ff</sup>, Jlp<sup>ff</sup>*) 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で作出した。

*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスのPC特異的にJSAP1, JLPタンパク質が欠失しているかどうか、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を行い、生後 4 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスのPC特異的にJSAP1, JLPのシグナルが欠失していることを確認した。抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析では、生後 24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスでPCの神経脱落が認められた。ニッスル染色によって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

コントロールと比較して PC の数が統計的に有意な減少が認められた。また、抗 calbindin 抗体を用いた免疫組織化学的解析では、生後 24 週齢の *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで PC の軸索の途中が肥大化する軸索膨化が生じていた。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。*Jsap1* cKO(PC)、*Jlp* cKO(PC)ではこれらの異常は認められなかった。まとめると、これらの結果は JSAP1, JLP は機能的に重複しており、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。

生後 8、12、16、24、40 週齢のコントロール、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスの PC の数の統計学的解析を行った結果、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程度だったが、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 の進行性の神経脱落が認められた。また、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。PC の軸索膨化は神経脱落が認められない生後 8 週齢でも認められたため、PC の軸索膨化は PC の神経細胞死が引き起こされる前に既に生じていると考えられる。生後 24 週齢の *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、脳神経系が傷害を受けたときに活性化するグリオシスが生じていた。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。

*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、さらに、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、*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トの cytochrome c (Cyt c)、キネシン-1 以外によって輸送されるカーゴ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、免疫組織化学的解析を行った。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。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。これらの結果から、JSAP1, JLP は PC におけるキネシン-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、軸索膨化を引き起こしている

ことが示唆される。

*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。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であり、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。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、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を行った。その結果、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。この結果から、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスの PC では JNK 経路が活性化しており、JNK 経路の活性化によって PC の神経細胞死が引き起こされている可能性が示唆される。

*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、小脳では PC と BC のピンスーでの発現が高いため、ここまでに示唆された JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能は、BC で発現している JSAP1 の影響を受けていることが考えられる。そこで、PC における JSAP1, JLP の機能に対する BC で発現している JSAP1(と JLP)の影響を解析するために、*GluRδ2-Cre* プロモーターの制御によって PC および BC で *Jsap1*, *Jlp* を cKO された *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウス(*Jsap1<sup>ff</sup>;Jlp<sup>ff</sup>;GluRδ2-cre*)の解析を行なった。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。PC の細胞数を測定した結果、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と比較して統計的に有意に減少していた。また、これらの異常はコントロール、*Jsap1* cKO(PC/BC) (*Jsap1<sup>ff</sup>;Jlp<sup>ff/+</sup>;GluRδ2-cre*)、*Jlp* cKO(PC/BC) (*Jsap1<sup>ff/+</sup>;Jlp<sup>ff</sup>;GluRδ2-cre*)マウスでは認められなかった。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 は重複した機能を持っており、PC の生存に必須であることが示唆される。

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ところ、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。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)マウスでは PC の数は生後 8 週齢ではコントロールと同等だが、生後 16 週齢で PC の数が統計的に有意に減少しており PC の数の進行性の減少が認められた。また、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、グリオシスが生じていた。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る。

*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の軸索膨化が、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと同様にキネシン-1 依存的な軸索輸送の異常によるものなのか、解析を行った。キネシン-1 によって輸送されるシナプス小胞について、SNAP25 を用い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 SNAP25 のシグナルが検出された。一方で、キネシン 3 によって輸送される SYT1 のシグナルは検出されなかった。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 依存的な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る。

*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと同様に、PC の神経変性が引き起こされていた。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、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。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。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、以上の結果から、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは *Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと同様の表現型が認められたため、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。

これまでの結果から、*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、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。また、*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。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が、PC における JSAP1, JLP の機能が PC において細胞自律的であるかどうかは不明である。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かどうか解析するために、*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った。レスキューマウス

[ *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* (*Jsap1<sup>ff</sup>;Jlp<sup>ff</sup>;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 タンパク質

を発現する *L7-Jsap1* トランスジェニックマウス (*Jsap1<sup>flf</sup>;Jlp<sup>flf</sup>;L7-Jsap1*)を交配することによって作出した。*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 週齢のマウス小脳から total RNA を調整し、RT-PCR を行なって解析したところ、*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。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認するために、生後 8 週齢マウス小脳から調整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 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。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 PC 特異的に JSAP1 タンパク質がレスキューされていることを確認した。*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。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 の軸索膨化が *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/*L7-Jsap1* マウスでは認められず、PC 特異的な JSAP1 の発現によって軸索膨化が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 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る。

## 考察

今回の研究では、先行研究によって軸索輸送への関与が示唆されている、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。

その結果、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスでは生後 12 週齢から神経変性の特徴である進行性の PC の数の統計的に有意な減少が認められた。また、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで認められた PC の軸索膨化は軸索輸送の異常を示唆し、これは神経変性の原因としてよく知られている。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。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。



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。しかし、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで認められたこれらの異常は JSAP1 か JLP の単独 cKO では認められなかった。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も関わらず、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスで認められた PC の神経脱落がレスキューされた。このことは JSAP1, JLP が重複した機能を持ち、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することが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。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する。確かに、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスでは 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や 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。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 依存性の軸索輸送に異常を生じていることをサポートする結果である。また、*in vitro* で培養した *Jsap1:Jlp* DKO 海馬由来神経細胞における JSAP1, JLP の機能解析を行なった先行研究でも、同様に 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が示唆されている。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* 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。実際、JSAP1 は小脳では PC に発現しているだけでなく、BC のピンスーでも高い発現が認められている。そのため、PC における JSAP1, JLP の機能に対し BC で発現した JSAP1 が何らかの影響を与えており、PC における JSAP1, JLP の機能は細胞非自律的である可能性が考えられる。しかし、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスでは PC 軸索膨化と進行性の PC の数の減少、PC の軸索膨化部にはキネシン -1 特異的な積荷の蓄積が認められ、これらは *Jsap1 : Jlp* cDKO(PC)マウスと同様の結果であった。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、PC 特異的に JSAP1 タンパク質を発現させた *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)/L7*Jsap1* マウスでは、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の軸索膨化と神経細胞数の減少がレスキューされた。これらの結果から、PC における JSAP1, JLP の PC の生存に必須の機能は細胞自律的であることが示唆される。すなわち、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)および *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マウスで認められた PC の神経細胞死は PC 細胞自律的な現象であると考えられる。

PC の神経細胞死については、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスと *Jsap1:Jlp* cDKO(PC/BC)マ

ウスの PC の軸索膨化部に活性型の JNK が認められたため、*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おり、*in vitro* における *Jsap1:Jlp* DKO 海馬由来神経細胞を用いた先行研究では、JNK 経路が海馬由来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。このことから、*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。

まとめると、本研究により、神経細胞において JSAP1, JLP は、相互に重複した機能を持っており、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細胞自律的なメカニズムでキネシン -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、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。そのため、*Jsap1:Jlp* cDKO(PC)マウスは神経変性疾患のメカニズムの研究に有用なモデルマウスとなる可能性が考えられる。

## 学位論文審査報告書（甲）

## 1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

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.....

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

## 2. 論文提出者 (1) 所属 生命科学 専攻

(2) 氏名 石川 桃絵

## 3. 審査結果の要旨 (600~650 字)

軸索輸送は神経細胞の成長と生存に不可欠であり、その障害は神経細胞死や神経変性疾患の直接の原因となる。しかし、軸索輸送制御とその破綻による神経変性機序については不明な点が多い。一方、JSAP1 とそのファミリーメンバー JLP は脳で高い発現を示し、キネシン-1 依存性の軸索輸送に関与することが示唆されている。しかし、JSAP1, JLP の生理的機能は十分に理解されていない。そこで本研究では、小脳プルキンエ細胞 (PC) に注目して、JSAP1, JLP 遺伝子改変マウスの作出・解析を行った。

まず、PC 特異的 JSAP1 単独、JLP 単独、および JSAP1, JLP 二重欠損マウスを作出し、免疫組織化学法による解析を行った。その結果、JSAP1, JLP 二重欠損マウス [JSAP1:JLP cDKO(PC)] においてのみ、PC の軸索腫大と進行性の神経脱落が認められた。次に、軸索腫大部には、キネシン-1 の積荷が選択的に蓄積していることを明らかにした。さらに、PC と小脳バスケット細胞 (BC) 特異的 JSAP1, JLP 二重欠損マウス [JSAP1:JLP cDKO(PC/BC)] の作出・解析、および PC 特異的に JSAP1 を発現するトランスジェニックマウスを用いたレスキュー実験を行った。その結果、JSAP1:JLP cDKO(PC) マウスと JSAP1:JLP cDKO(PC/BC) マウスはほぼ同様の表現型を示し、PC の軸索腫大と脱落は当該トランスジェニックマウスによってレスキューされることを見出した。以上の結果から、JSAP1, JLP は、機能的に重複したキネシン-1 依存性軸索輸送の制御因子として PC 自律的に機能しており、その機能破綻は神経変性を引き起こすことが示唆された。

本論文は、小脳 PC における JSAP1, JLP の生理的機能を初めて明らかにした労作であり、学位に値すると評価された。

## 4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格・不合格

(2) 授与学位 博士(理学)