

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500385

研究課題名(和文) 軸索輸送における足場タンパク質 JSAP の役割とその分子メカニズム

研究課題名(英文) Roles of scaffold protein JSAP in axonal transport

研究代表者

善岡 克次 (Yoshioka, Katsuji)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：60200937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：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ことが知られています。我々は軸索輸送を制御するメカニズムの解明に向け、足場タンパク質 JSAP を対象として研究を行いました。その結果、JSAP はキネシン依存的な軸索輸送の制御因子であり、その破綻は神経変性を引き起こす可能性を見出しました。

研究成果の概要(英文)：Axonal transport is essential for neuronal development and function, and disrupted axonal transport is an important pathophysiological factor in a variety of neurodegenerative diseases. We suggest that scaffold protein JSAP may function as a positive regulator of kinesin-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration.

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：神経科学・分子・細胞神経科学

キーワード：シグナル伝達 足場タンパク質 MAPキナーゼ マウス 軸索 JNK 神経 神経変性

### 1. 研究開始当初の背景

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。軸索輸送では、細胞内小器官やタンパク複合体等の様々な積荷は、キネシンとダイニン（モータータンパク質）により、主に微小管に沿って細胞内の適切な場所に運ばれる。軸索輸送は厳密に制御されていると考えられるが、その分子機構については不明な点が多い。

最近の研究から、モータータンパク質と積荷を連結するアダプター分子が、軸索輸送において重要な役割を担うことが示唆されている。具体的には、ショウジョウバエ及び線虫での分子遺伝学的解析により、アダプター分子 SYD, UNC-16, APLIP1 はシナプス小胞前駆体の輸送制御に関与することが明らかになった。一方、哺乳類では、キネシン-1 の軽鎖に結合する分子として JIP1,2, JSAP1,2 が同定された。また、JSAP1 とダイナクチン複合体の相互作用も報告されている。このようなことから、JIP, JSAP の軸索輸送への関与が示唆される。しかし、JIP1,2 二重欠損マウスにおいて、軸索輸送の障害は認められていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、最終的には軸索輸送の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目指している。その中で本研究課題では、マウス逆遺伝学的解析及びレスキュー実験等を行い、足場タンパク質 JSAP は軸索輸送を制御する重要な分子であることを明らかにする。また、JSAP 欠失により軸索輸送障害を示す細胞内小器官、タンパク質を同定する。さらに、JSAP による軸索輸送制御の分子メカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1) 遺伝子改変マウスを用いた実験、及び(2) 初代培養系を用いた実験を行った。

(1) プルキンエ細胞特異的 JSAP1,2 二重欠損マウス、プルキンエ細胞特異的に野生型 JSAP1 を発現するトランスジェニックマウス、背側終脳特異的 JSAP1,2 二重欠損マウス等を用い、免疫組織学的解析を行った。

(2) JSAP1,2 タンパク質の欠失が誘導可能な初代培養神経細胞系を構築し、JSAP 欠失による軸索輸送障害の解析を行った。また、キネシン-1 と微小管の相互作用における JSAP の役割を明らかにするため、微小管共沈実験を行った。

### 4. 研究成果

カルピンジン（小脳プルキンエ細胞マーカー）に対する抗体を用いた免疫組織染色を行い、プルキンエ細胞特異的 JSAP1,2 二重欠損

[JSAP1,2 cKO(PC)]マウスにおいて、脳プルキンエ細胞の軸索腫大及び脱落が見出した(図1)。また、JSAP1,2 cKO(PC)

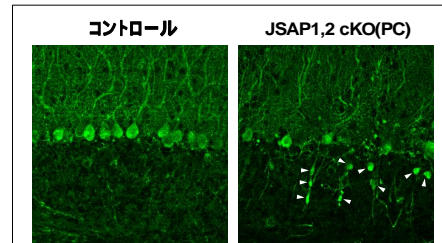


図1. JSAP欠失によるプルキンエ細胞の軸索膨化と脱落  
Calbindin (プルキンエ細胞マーカー) に対する抗体を用いた免疫組織染色。7ヶ月齢マウス。矢頭は膨化した軸索。

マウスの経時的解析を行い、軸索腫大が神経細胞脱落に先だって起こることを明らかにした。プルキンエ細胞の軸索腫大は生後4週齢マウスおよびそれ以降の週齢のマウスで認められるのに対し、プルキンエ細胞の有意な脱落が認められるのは生後16週齢以降であった。一方、プルキンエ細胞特異的に野生型 JSAP1 を発現するトランスジェニック [[L7-JSAP1(WT)]マウスを用いたレスキュー実験を行い、JSAP1,2 cKO(PC)マウスで見出したプルキンエ細胞の軸索腫大と脱落が、真にプルキンエ細胞での JSAP 欠失に起因することを検証した。また、背側終脳特異的 JSAP1,2 二重欠損[JSAP1,2 cKO(Emx1)]マウスの作出・解析を行い、側脳室が拡大することを見出した(図2)。さらに、JSAP1,2 タンパク質の欠失が、誘導可能な初代培養系海馬

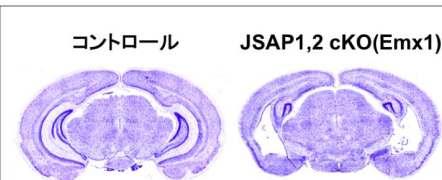


図2. JSAP欠失による脳室の拡大

14日齢マウスのニッスル染色。JSAP1,2欠損マウスにおいて、側脳室の拡大が認められる。

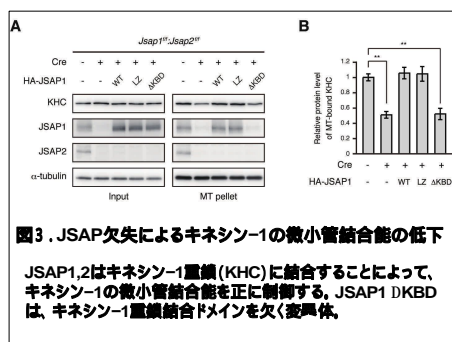
神経細胞を用いて、解析を行った。その結果、軸索腫大、軸索変性、および神経細胞死が順に起こることを見出した。

前述の初代培養神経細胞系を用い、JSAP1,2 欠失によってミトコンドリアの軸索輸送が障害されるか検討した。そのため、ミトコンドリア移行シグナルを付加した増強緑色蛍光タンパク質を神経細胞内で発現させ、共焦点蛍光顕微鏡によるタイムラプス解析を行った。その結果、JSAP 欠失により順行性の軸索輸送が有意に阻害されることが明らかになった。

このようなことから、JSAP がキネシン-1 依存的な軸索輸送における重要な制御因子であることが示唆される。

次に、JSAP が KHC に結合することによって、

キネシン-1 の微小管結合能を正に制御する可能性について検討した。図3に示す通り、



JSAP1欠失によりキネシン-1の微小管結合能は低下し、その低下は野生型JSAP1によってレスキューされた。しかし、キネシン-1重鎖結合ドメインを欠く変異JSAP1ではキネシン-1の微小管結合能は回復しなかった。

以上のことから、JSAPはキネシン-1モーターの多様な積荷の軸索輸送制御を通じて神経細胞の生存維持に寄与すると考えられる。本研究成果は、神経変性疾患で観察される軸索変性や神経細胞死の普遍的なメカニズムの理解につながる事が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Enkhtuya R, Sato T, Wakasugi M, Tuvshintugs B, Miyata H, Sakurai T, Matsunaga T, Yoshioka K. (2014) The scaffold protein JLP plays a key role in regulating ultraviolet B-induced apoptosis in mice. *Genes Cells* 19:350-358. 査読有

Liu HX, Lopatina O, Higashida C, Fujimoto H, Akther S, Inzhutova A, Liang M, Zhong J, Tsuji T, Yoshihara T, Sumi K, Ishiyama M, Ma WJ, Ozaki M, Yagitani S, Yokoyama S, Mukaida N, Sakurai T, Hori O, Yoshioka K, Hirao A, Kato Y, Ishihara K, Kato I, Okamoto H, Cherepanov SM, Salmina AB, Hirai H, Asano M, Brown DA, Nagano I, Higashida H. (2013) Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nat. Commun.* 4:1346. 査読有

Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, Nakata K, Sato T, Kasahara Y, Nakao S. (2012) Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions. *Haematologica* 97:1295-1303. 査読有

[学会発表](計9件)

Enkhtuya R, Tuvshintugs B, Miyata H, Sato T, Yoshioka K. “Role of the scaffolding protein JLP in UVB-induced apoptosis” 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)

Gunarta IK, Sato T, Endo Y, Li R, Nishiuchi T, Yamada Y, Yoshioka K. “Role of Gli1 transcription activator in the metastasis of melanoma” 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)

Ishikawa M, Sato T, Ohta M, Yoshioka K. “Role of the MAP kinase scaffold proteins JSAP1 and JLP in cerebellar Purkinje cells” 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)

Tuvshintugs B, Sato T, Yoshioka K. “Role of JNK signaling pathway in the regulation of stability of transcription factor Gli1” 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月14日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)

Mochizuki M, Sato T, Yoshioka K. “Functional analysis of the MAP kinase scaffold proteins JSAP1 and JLP in cortical neurons” 第11回アジア太平洋神経化学学会大会・第55回日本神経化学学会大会, 2012年9月30日, 神戸国際会議場(兵庫県)

佐藤時春, Tuvshintugs B., Enkhbat A., 李蓉, 善岡克次 “FGF/JSAP1/JNK signaling accelerates degradation of Gli1 and reduces its transcriptional activity” 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜(神奈川県)

望月美希, 佐藤時春, 善岡克次 “Role of the MAP kinase scaffold proteins JSAP1 and JLP in cortical neurons” 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜(神奈川県)

佐藤時春, Tuvshintugs B., 善岡克次 “Cross-talk between JSAP1/JNK and Shh/Gli signaling pathway during the differentiation of cerebellar granule cell progenitors” 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋国際会議場(愛知県)

佐藤時春, Enkhbat A., Tuvshintugs B., 善岡克次 “Subcellular localization of the scaffold protein JSAP1 during the differentiation of cerebellar granule cell precursors” 日本分子生物学会第11回春期シンポジウム, 2011年5月26日, 石川県音楽堂(石川県)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/department/mccb/03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

善岡 克次 (YOSHIOKA KATSUJI)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：60200937

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし