

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19570167

研究課題名（和文） DLK-JIP-JNK 複合体による細胞内輸送制御の新たな分子機構解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of intracellular transport by DLK-JNK complex

研究代表者

平井 秀一（HIRAI SYU-ICHI）

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80228759

研究成果の概要：

我々は細胞の中の物流を制御するメカニズムの解明に向け、JIP1 と呼ばれるタンパク質を対象とした研究を行って来ました。JIP1 は、細胞内の物流を支えるモータータンパク質の代表格であるキネシンと結合してこれを活性化すると共に、「荷物」となる種々のタンパク質とキネシンとを繋ぐアダプター分子としての機能を兼ね備えたタンパク質です。我々は、JIP1 に結合する種々の「荷物」分子の内、特定のものが JIP1 とキネシンとの結合とキネシン活性制御に関わる可能性を見出しました。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：生体高分子構造・機能

## 1. 研究開始当初の背景

種々の細胞が持つ独特の機能は、その細胞でどのようなタンパク質を合成するかといった遺伝子発現のレベルの他に、合成したタンパク質（或いは脂質、糖、核酸）をどこに配置するかということに大きく依存している。神経細胞を例に取れば、軸索と樹状突起がそれぞれシグナルの出力端子、入力端子として分化しており、シナプス小胞は軸索へ、神経伝達物質の受容体は樹状突起へとそれぞれ運ばれる。このような特異的な（方向性

を持った) 物質輸送は、細胞機能の発達過程、即ち細胞分化の過程に於いても重要な意味を持つものである。種々の細胞内小器官へのターゲティングの分子機構については既に多くの研究報告があるが、細胞質内に於いて輸送の方向性や効率を制御する分子機構についてはほとんど分っていない。

JNK (c-Jun N-terminal kinase) は細胞内シグナル伝達を担うタンパク質リン酸化酵素群である MAP キナーゼファミリーのメンバーで、線虫、ショウジョウバエといったモデ

ル動物においては遺伝学的解析から神経分化や形態形成において重要な役割を担っていることが示されている。MAP キナーゼファミリーメンバーの活性は上流に位置するMAPKKおよびMAPKKKから成るリン酸化カスケードに依存しており、JNK の活性化に関わるMAPKKKとして我々はDLK (MUKとも呼ぶ)を同定した。マウス胚におけるDLKの発現は神経組織特異的で、大脳皮質では脳室帯を離れて辺沿部へ向かって移動中の若い神経細胞に発現が集中している。これまでにマウス胚への遺伝子導入やDLKノックアウトマウスを用いた解析により、DLK-JNK経路が、神経細胞の移動、及び軸索の形成に関わっていることを示す結果を得ている。細胞の移動や軸索形成は、細胞内の特定の場所、即ち細胞移動の先端端や軸索と成る細胞突起への種々の物質の特異的な輸送に依存するものであることは多くの文献に示されているが、このような輸送を可能にする分子基盤については不明な点が多い。我々はDLKとJNKを結ぶキナーゼカスケードの足場タンパク質として同定されたJIP1が神経細胞の軸索輸送や軸索の形成に必要であるという線虫、ショウジョウバエの遺伝学的解析の結果及びJIP1及びこの関連分子がモータータンパク質であるキネシンと小胞等のカーゴを結ぶアダプター分子として機能するという分子間結合実験の結果に着目し、DLKによるJNKの活性化がJIP1を介した輸送を制御しているという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず上記の仮説を、生化学的分析および細胞レベルでの分析により検証して行く。生化学的分析では、JIP1にDLK及び活性化したJNKが結合することにより、JIP1のキネシンモータータンパク質及び輸送物に対する結合力に生じる変化を明らかにする。細胞レベルでの分析では、JNK阻害剤のJIP1を介した細胞内輸送に対する影響について、JIP1自身やキネシンの特定領域への濃縮を指標にして明らかにする。さらに上記の生化学及び細胞レベルでの分析の結果より予想される分子機構の生理的意義を関与分子の変異体導入やノックダウンにより検証し、DLK-JIP1-JNK複合体を介した細胞内輸送制御の分子モデルの提唱を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) JIP1とキネシンとの結合に対する活性化JNKの影響の検定。

293T, N2aといった培養細胞を用い、これらの細胞に強制発現させたJIP1とキネシン(N2aの場合は内在性キネシン)の結合を免疫

沈降により検定する。この際、細胞にDLK、MEKK1といったJNK活性化酵素を強制発現させることにより細胞内に活性化JNKを生成し、これのJIP1とキネシンとの結合に及ぼす影響を検定する。

(2) 「荷物」タンパク質とJIP1との結合に対する活性化JNKの影響の検定。

JIP1タンパク質上の「荷物」が結合する領域(複数存在)を変異させた変異体を作製し、これらとキネシンとの結合を(1)と同様の方法で検討する

(3) JIP1によるキネシン活性化能の検定。

レチノイン酸により分化誘導した(細胞突起の伸長を促した)N2a細胞にGFPとJIP1の融合タンパク質を発現させ、これの突起先端部への濃縮率により、JIP1と結合したキネシンの活性を評価する。また、キネシン抗体を用いて同細胞を染色することにより、キネシンの突起先端部への濃縮率を検定し、これによりキネシンの活性を直接評価する。

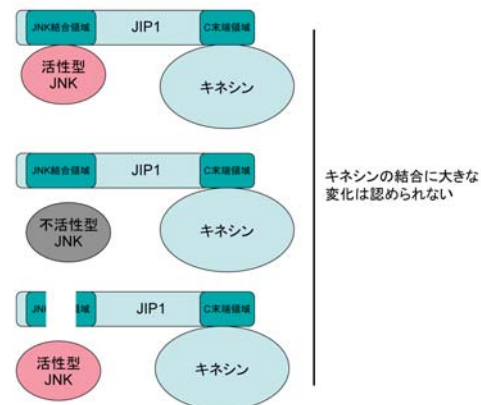
(4) この領域に結合する制御タンパク質の同定。

N2a細胞にタグ付きJIP1を発現させ、これのプルダウンによりJIP1結合タンパク質を同定する。また、同定したタンパク質がJIP1のどの領域に結合するかを、(2)で用いたJIP1変異体との結合を検定する事により明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) DLKによるJNKの活性化がJIP1を介した輸送を制御している可能性は低い。

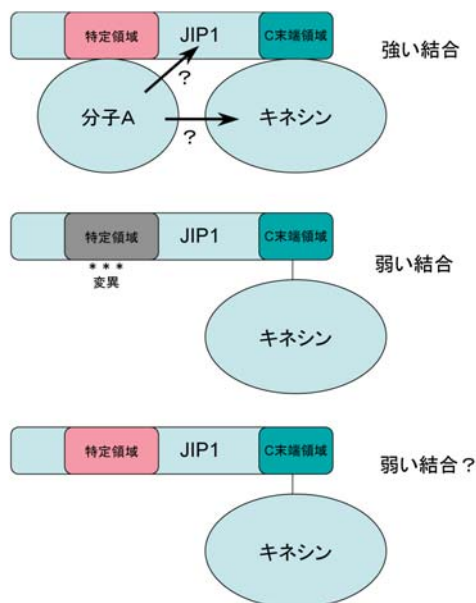
DLKにより活性化したJNKが非活性化型JNKより安定的にJIP1と結合することを見出したが、この結合がJIP1とキネシンとの結合に大きな影響を与えることを明確に示す結果を得る事は出来なかった。また、活性化JNKの結合に必須な領域を欠損させたJIP1と野生型JIP1との間でキネシン結合能に大きな差は認められなかった。(下図)



これらのことから、JIP1 に結合した JNK1 が JIP1 のキネシン結合能を制御している可能性は低いと考えた。しかしながら、JNK 活性阻害により JIP1 の輸送が部分的に阻害されることを示す実験結果を得ている他、キネシンと JIP1 との結合がキネシン活性化の十分条件ではなく、少なくとも他に FEZ1 の結合が必要な事が報告されている事等から、JNK が間接的に JIP1 を介したキネシン活性制御に関わる可能性は否定できていない。

(2) JIP1 とキネシンの結合に影響を及ぼす JIP1 上の領域を同定した。

これまでに JIP1 の C 末端部がキネシンとの結合に必須であることが報告されていたが、我々はこの C 末端部のみではキネシンとの十分な結合が得られず、JIP1 の別の領域が C 末端部を介したキネシンとの結合を強化することを見出した。さらにこの領域依存的に結合する分子を同定した。JIP1 の C 末端部を欠いた変異体ともこの分子は複合体を形成するが、キネシンはこの複合体と結合しないことから、この分子は JIP1 の上記領域にキネシン非依存的に結合し、キネシンとの直接結合能を持たないものと考えられる。また、この分子の JIP1 への結合が JIP1 もしくはキネシンの構造変化を誘導することにより JIP1 とキネシンの結合を強化するものと考えるが、これについては a) この分子の除去により細胞内でのキネシンと JIP1 の結合が抑制されるか、b) この分子を持たない細胞中でのキネシンと JIP1 の結合がこの分子の導入により増強するか、等の方法で検証していく必要がある (下図)。



キネシンモーターは、神経細胞を初めとした多くの細胞において物質輸送を司る主要なモーター分子の一つである。キネシン分子

は自己阻害作用を持つ事により不必要に ATP を消費して微小管上を運動する事は無く、JIP1 や FEZ1 といった分子の結合による構造変化により始めてモーター活性を發揮することが米国の研究者により既に報告されている。しかしながら JIP1 や FEZ1 によるキネシンの活性化が如何に制御されているかについては不明であった。我々の研究成果は、「荷物」となる特定の分子が JIP1 に結合して始めて JIP1 を介したキネシンの活性化が可能になる事を示唆しており、これは物質輸送制御の本質に関わる問題の解決に繋がるものである。近年神経疾患を始めとする種々の疾患が細胞内物質輸送の異常により引き起こされることを示す多くの研究成果が発表されており、我々の研究成果はこういった疾患の原因解明、予防、診断、治療法の開発の基盤となり得るものである。

今後はキネシンとの結合やその活性化の制御に関わる JIP1 の特定領域に結合する分子について、これまでに同定した分子以外の分子の同定を試みると共に、これらが期待通りの機能、即ち JIP1 とキネシンの結合強化能を持つことを前述のような方法により検証していく。さらにこれらの分子と結合する新たな分子を同定すること等により、細胞内輸送制御の分子機構の一端を明らかにしていきたい。

## 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)

① W. Zhao, T. Hirose, M. Ishikawa, Y. Oshima, S.-i. Hirai, S. Ohno, H. Taniguchi. Neonatal pancreatic cells redifferentiate into both neural and pancreatic lineages. *Biochem Biophys Res Commun.* **352**, 84-90 (2007). 査読有

② H. Saitsu, M. Kato, T. Mizuguchi, K. Hamada, H. Osaka, J. Tohyama, K. Uruno, S. Kumada, K. Nishiyama, A. Nishimura, I. Okada, Y. Yoshimura, S.-i. Hirai, T. Kumada, K. Hayasaka, A. Fukuda, K. Ogata, N. Matsumoto. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* **40**, 782-788 (2008). 査読有

③ 平井秀一、大野茂男  
EMT における細胞極性の転換  
*細胞工学* **27**, 326-331 (2008). 査読無

〔学会発表〕(計4件)

- ① 平井秀一, 番場由美, 大槻香林, 佐竹智子, 大野茂男: DLK、JNKによる神経細胞軸索形成の制御, 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会(BMB2007), 横浜, 2007年12月
- ② 大槻香林, 大野茂男, 平井秀一: リン酸化により活性化されたJNKが選択的にJIP-1と結合する, 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会(BMB2007), 横浜, 2007年12月
- ③ 平井秀一, 番場由美, 佐竹智子, 大野茂男: 大脳皮質神経発生に関わる二つのJNKシグナル経路, 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会合同大会, 神戸 2008年12月
- ④ 佐竹智子, 大野茂男, 平井秀一: Kinesin-1とJIP1の結合制御機構, 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会合同大会, 神戸 2008年12月

〔その他〕

研究紹介 web サイト:

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohno/research/dlk.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 秀一 (HIRAI SYU-ICHI)  
横浜市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 80228759

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし