

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770197

研究課題名(和文)細胞内の物質循環における細胞質ダイニンと積荷分子のダイナミックな相互作用の役割

研究課題名(英文) Regulation of motor-cargo interaction in cytoplasmic dynein-dependent intracellular transport

研究代表者

大谷 哲久(Otani, Tetsuhisa)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：50415105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ショウジョウバエの剛毛の先端部に局在するリン酸化酵素IKKの局在化機構を解析した。その結果、IKKがアダプタータンパク質Spn-Fを介してダイニンと複合体を形成して先端部へと輸送される事、またSpn-Fが先端部で選択的に係留されることを発見し、Spn-Fの係留の制御因子としてJvlを同定した。これらの結果は剛毛細胞の先端部がダイニンの積荷の仕分けの場である事、またその仕分けにはアダプタータンパク質の認識が重要であることを示しており、主要な微小管マイナス端モーターである細胞質ダイニンによる輸送の調節機構の一端を明らかにしたものである。本研究の成果は学術論文として公表する。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have investigated how a protein kinase IKKepsilon can localize to the distal tip of Drosophila bristle cells. I have demonstrated that IKKepsilon forms a complex with cytoplasmic dynein via an adaptor protein Spn-F. Photobleaching experiments revealed that IKKepsilon/Spn-F complex is selectively retained at the distal tip. Furthermore, I have identified Jvl as the key regulator of the retention of IKKepsilon/Spn-F complex. Thus, IKKepsilon localization is regulated by polarized transport and selective retention. The retention of IKKepsilon/Spn-F complex is in stark contrast with another dynein cargo, Rab11, which displays bidirectional shuttling movement. These results suggest that the distal tip of bristles act as a sorting station for cytoplasmic dynein-dependent cargoes, and suggests that the specific recognition of cargo adaptors plays a key role in cargo sorting. These results unveil the regulatory mechanisms of cytoplasmic dynein-dependent transport.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質ダイニン 細胞内輸送 微小管 IKK 細胞極性 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内の物質輸送が適切に機能するためには、モータータンパク質と積荷分子の相互作用が時空間的に厳密に制御されることが必要である。微小管プラス端に向かう分子モーターであるキネシンは、モーターのレパートリーを増加させることで多様な積荷分子の輸送を可能としているが、一方で微小管マイナス端に向かう主要な分子モーターである細胞質ダイニンは一つのモーターが多様な積荷分子を様々な目的地に輸送しているため、モーターと積荷分子の相互作用の時空間的制御が非常に重要である。しかしながら、細胞質ダイニンと積荷分子の相互作用がどのように調節されるのかはまだ十分に理解されていない。

(2) ショウジョウバエの剛毛は、その先端に向かって安定な微小管のマイナス端が斉一に配向するため、細胞質ダイニンによる物質輸送の制御機構を解析するのに優れたモデル系である。以前、私はショウジョウバエの剛毛細胞においては Rab11 陽性のリサイクリング・エンドソームと呼ばれる小胞が細胞体と先端部の間を往復運動している事を報告した (Otani et al., 2011)。Rab11 小胞は細胞質ダイニンによって先端部に運ばれた後、先端部に特異的に集積するリン酸化酵素 IKK がダイニンと Rab11 小胞のアダプターである Nuf/Rab11FIP3 をリン酸化して不活性化する事によって、プラス端に向かう輸送に切り替わる (Otani et al., 2011)。しかしながら、他のダイニン依存的な積荷分子が同様にふるまうのか、また先端部において積荷分子の仕分けが起こっているのかどうかはこれまでに明らかとなっていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、細胞質ダイニン依存的な細胞内物流の制御機構を明らかにするため、ショウジョウバエ剛毛細胞をモデル系として取り上げ、先端部に局在するリン酸化酵素 IKK に注目し、細胞質ダイニンの積荷分子の動態の制御機構を明らかにすることを目的とした。

(2) 前項の主目的を達成するため、特に以下の二つの課題を具体的に明らかにすることを旨とした。

IKK の先端部への局在化機構の解明

IKK の先端部への係留機構の解明

3. 研究の方法

(1) IKK の先端部への局在化機構を明らかにするために、IKK と相互作用する事が知られており、剛毛細胞において *ikk* 変異体と非常に良く似た表現型を示すことが知られているアダプタータンパク質 Spn-F に注目し、以下の方法によって研究を行なった。

ikk と *spn-F* の遺伝学的関係の解析

Spn-F と IKK、ダイニンの相互作用の生化学的解析

Spn-F の構造機能解析

変異 Spn-F 分子による *spn-F* 変異体のレスキュー実験

Spn-F::GFP 融合タンパク質の動態解析

(2) IKK の先端部への係留機構を明らかにするために、Spn-F と相互作用する事が報告されているアダプタータンパク質 Jvl に注目し、以下の方法によって研究を進めた。

jvl 変異体の表現型解析

Jvl が Spn-F の動態に与える影響の解析

4. 研究成果

(1) IKK の先端部への局在化機構の解明
ikk と *spn-F* の遺伝学的関係の解明

ikk と *spn-F* の二重変異体を作出したところ、剛毛の表現型は *ikk*、*spn-F* 単独の変異体の表現型と同等であった。この結果は、*ikk* と *spn-F* が同一の遺伝的経路で作用している事を示している。そこで、*ikk* と *spn-F* の遺伝学的上下関係を検討したところ、*ikk* は *spn-F* に対して epistatic であった。この結果は Spn-F が IKKε の上流に位置している事を示している。

IKKε の局在化における Spn-F とダイニンの役割の解明

IKKε の局在を *spn-F* 変異体において検討したところ、Spn-F は IKKε の先端部への局在に必須であることが明らかとなった。一方、Spn-F の先端部への局在には IKKε は必要ではなかった。また、ダイニンの機能を阻害したところ Spn-F と IKKε の先端部への局在が消失した。この結果はダイニン Spn-F IKKε という経路によって先端部への局在が制御されている事を示している。

Spn-F の微小管依存の輸送の発見

Spn-F::GFP 融合タンパク質を S2 細胞に発現し、その動態を観察したところ、Spn-F::GFP が顆粒状に局在し、微小管に沿って移動する様子が観察された。また、Spn-F::GFP の動態は微小管を脱重合すると消失した。この結果は、Spn-F が微小管に沿ってモーター依存的に輸送される事を支持している。

IKKε/Spn-F/ダイニン複合体の発見

IKKε、Spn-F、ダイニンの生化学的関係を検討するため、卵巣抽出液より抗 Spn-F 抗体によって免疫沈降を行った結果、IKKε とダイニン重鎖が Spn-F と共沈降した。この結果は、IKKε/Spn-F/ダイニン複合体の存在を示唆している。

Spn-F の機能ドメインの発見

Spn-F の構造機能解析を行った結果、IKKε は Spn-F の中央部の Coiled-coil 領域と相互作用したのに対し、ダイニン重鎖は Spn-F の C 末端領域と結合した。この結果は、Spn-F が異なる領域を介して IKKε およびダイニン重鎖と相互作用している事を示している。

Spn-F が IKKε とダイニンのアダプターとして働く事の発見

IKKε およびダイニン重鎖との結合領域を

それぞれ特異的に欠損した変異 Spn-F 分子が *spn-F* 変異体の表現型を救済できるかどうかを検討したところ、Spn-F の生理機能には IKK ϵ 、ダイニン重鎖の両者と結合できることが必要であることが示された。この結果は、Spn-F が IKK ϵ とダイニンのアダプターとして働く事を強く示唆している。

Spn-F が先端部に係留される事の発見

Spn-F が剛毛細胞において往復運動するかどうかを検討するため、Spn-F::GFP 融合蛋白を剛毛に発現し、その動態を観察した結果、Spn-F は Rab11 小胞とは異なり、先端部に安定的に局在する事を発見した。この結果は、先端部においてダイニンの積荷の仕分けが行われている事を示している。

(2) IKK の先端部への係留機構の解明

Jvl が Spn-F/IKK ϵ 複合体の係留因子である事の発見

Spn-F の先端部への係留の分子機構を明らかにするため、Spn-F と相互作用し卵母細胞において IKK の局在に参与する事が示されている Jvl に注目して研究を進めた。

剛毛細胞における Jvl の機能を検討するために、*jvl* 変異体の剛毛細胞における Spn-F と IKK ϵ の局在を検討した。その結果、興味深いことに剛毛細胞の伸長初期においては Spn-F と IKK ϵ は正常に先端部に局在化したのに対し、伸長後期には Spn-F と IKK ϵ の先端部への局在が失われることが明らかとなった。この結果は Jvl が Spn-F と IKK ϵ を先端部に係留するのに必要であることを示している。

Jvl の微小管依存的動態の発見

Jvl の分子機能を検討するために、Jvl::GFP 融合タンパク質を S2 細胞に発現したところ、微小管に沿った顆粒状の局在を示した。また、その動態を観察したところ、微小管依存的にダイナミックに動く様子が観察された。

Jvl/Spn-F の複合体形成による不動化の発見

Jvl と Spn-F を S2 細胞に共発現したところ、両者は共局在した。Spn-F/Jvl の複合体形成がそれぞれの動態に与える影響を検討するために、S2 細胞に Jvl::GFP と Spn-F::mCh を共発現し、その動態を観察したところ、Jvl::GFP あるいは Spn-F::mCh 単独の顆粒はダイナミックに動いたのに対し、両者が共局在する顆粒は動かなかった。この結果は、Jvl/Spn-F の複合体形成により、Jvl と Spn-F が不動化されることを示している。

Jvl の微小管結合領域の解明

Jvl の構造機能解析を行った結果、Jvl は C 末端領域を介して微小管上に局在した。興味深いことに、全長 Jvl は微小管上に顆粒状に局在したのに対し、N 末端欠損型 Jvl は微小管上に一様に局在した。また、Spn-F を全長 Jvl 分子と共発現したところ、Jvl による微小管の束化が著しく促進された。これらの結果

は、Jvl の微小管結合能がその N 末端領域によって抑制されている事、また Spn-F が Jvl の微小管結合能を活性化する事を示唆している。

(3) 研究成果の意義と今後の展開

剛毛細胞先端部はダイニンの積荷の仕分け基地である

本研究において明らかとなった Spn-F/IKK ϵ 複合体の剛毛細胞先端部への係留は、先に我々が報告した Rab11 小胞の往復運動とは対照的である。Spn-F/IKK ϵ 複合体も Rab11 小胞も共にダイニンによって先端部に輸送されるが、Rab11 小胞は先端部で IKK ϵ によってアダプタータンパク質 Nuf/Rab11FIP3 がリン酸化されることによりダイニン輸送からキネシン輸送への切り替えが起こって細胞体に戻っていくのに対し、Spn-F/IKK ϵ 複合体は先端部に安定的に係留される。この事は、剛毛細胞先端部においてダイニンの積荷の仕分けが起こっている事を示しており、積荷がそれぞれ特異的に認識されることによりその動態と運命が決定されると考えられる (図 1)。

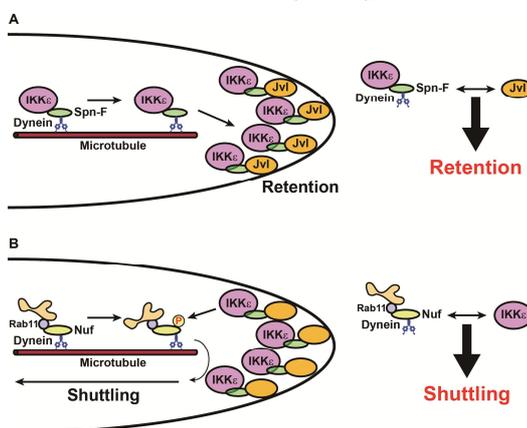


図 1. 剛毛細胞先端部における積荷の仕分け
(A) Spn-F/IKK ϵ 複合体は Jvl の作用によって先端部に係留される。(B) Rab11 小胞は IKK ϵ が Nuf/Rab11FIP3 をリン酸化する事により往復運動する。

アダプタータンパク質の認識による積荷の仕分け

Rab11 小胞の往復運動においては、Rab11 とダイニンを結ぶアダプタータンパク質 Nuf/Rab11FIP3 が IKK ϵ によって認識されることが重要であったのに対し、Spn-F/IKK ϵ 複合体の係留においては、IKK ϵ とダイニンを結ぶアダプタータンパク質である Spn-F が Jvl によって特異的に認識されることが重要である (図 1)。これらの結果は、ダイニンの積荷の仕分けにおいては、アダプタータンパク質の認識が中心的な役割を果たしている事を示している。

Jvl による Spn-F の不動化のモデル

Jvl はどのような機構によって Spn-F/IKK ϵ 複合体の係留を促進するのだろうか？本研究においては、Spn-F が Jvl によ

る微小管の束化を著しく促進する事、また S2 細胞において Jvl と Spn-F が複合体を形成する事によって不働化されることを見いだした。これらの結果から、Spn-F と Jvl が複合体を形成する事により Jvl の微小管結合能が亢進し、Jvl/Spn-F/IKKε 複合体が微小管上に係留するとのモデルが考えられる。今後、Jvl の微小管結合領域を同定し、このモデルを検証する事が必要であると考えられる。

今後の展開

本研究において、Spn-F/IKKε 複合体の係留における Jvl の重要性が明らかとなった。しかしながら、Jvl の分子機能についてはまだ不明な点が多い。今後は、Jvl の微小管結合能に注目して解析を進め、ダイニンの積荷の係留機構を明らかにしたい。また、ダイニン輸送の異常は神経変性疾患の原因となるが、最近になって哺乳類の IKKε 相同分子である TBK1 が運動神経に異常を来す神経変性疾患である筋委縮性側索硬化症の発症に関与する事が報告された。神経変性疾患の発症に細胞質ダイニンによる輸送の調節異常がどのように寄与しているかは今後の重要な検討課題である。

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 5 件)

Tetsuhisa Otani, Kenzi Oshima, Akiyo Kimpara, Michiko Takeda, Uri Abdu, and Shigeo Hayashi. (2015). Transport and retention mechanism for the sustained distal localization of Spn-F/IKKε during *Drosophila* bristle elongation. *Development*, accepted. (査読有)

Yukako Oda, Tetsuhisa Otani, Junichi Ikenouchi, and Mikio Furuse. (2014). Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts via Cdc42. *J Cell Sci.*, **127**:4201-12. (査読有)

Simha Amsalem, Anna Bakrhat, Tetsuhisa Otani, Shigeo Hayashi, Bareket Goldstein, and Uri Abdu. (2013). *Drosophila* oocyte polarity and cytoskeleton organization requires regulation of Ik2 activity by Spn-F and Javelin-like. *Mol Cell Biol.*, **33**:4371-80. (査読有)

Bo Dong, Ken Kakihara, Tetsuhisa Otani, Housei Wada and Shigeo Hayashi. (2013). Rab9 and retromer regulates retrograde trafficking of luminal protein required for epithelial tube length control. *Nature Communications*, **4**:1358. (査読有)

Louise L Collins, Glenn Simon, Johanne Matheson, Christine Wu, M. Clare Miller, Tetsuhisa Otani, Xinzi Yu, Shigeo Hayashi, Rytis Prekeris and Gwyn W Gould. (2012). Rab11-FIP3 is a cell cycle-regulated phosphoprotein. *BMC Cell Biology*, **13**:4. (査読有)

[学会発表](計 14 件)

Tetsuhisa Otani, Polarized transport and selective retention localizes the signaling center for bristle cell elongation, The 56th Annual *Drosophila* Research Conference, 2015 年 3 月 5 日 ~ 7 日, シカゴ (米国)

大谷哲久, 第 66 回日本細胞生物学会大会, Cytoplasmic dynein-dependent localization of IKKε is required for cell polarity maintenance during cell elongation, 2014 年 6 月 12 日, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)

大谷哲久, 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会, A self-sustaining signaling center controls cell elongation, 2014 年 6 月 4 日, 金沢歌劇座 (石川県・金沢市)

大谷哲久, 第 47 回日本発生生物学会大会, Integration of local and global IKKε signaling regulates polarized cell elongation, 2014 年 5 月 29 日, ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)

Tetsuhisa Otani, ESF/EMBO conference “Cell Polarity and membrane trafficking”, Cytoplasmic dynein-dependent localization of IKKε is required for cell polarity maintenance during cell elongation, 2014 年 5 月 29 日, ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)

the distal tip is essential for Drosophila bristle cell elongation, 2014 年 5 月 11 日 ~ 12 日, Pułtusk (ポーランド)

大谷哲久, 第 86 回日本生化学会大会, A self-sustaining signaling center controls cell elongation, 2013 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

大谷哲久, 第 65 回日本発生生物学会大会, A self-sustaining signaling center controls cell elongation, 2013 年 6 月 19 日, ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)

大谷哲久, 第 46 回日本発生生物学会大会, IKK ϵ antagonizes PKC-dependent inhibitory phosphorylation of Singed/Fascin to promote paracrystalline actin bundle assembly, 2013 年 5 月 30 日, くにびきメッセ (島根県・松江市)

Tetsuhisa Otani, The 2nd Asia-Pacific Drosophila Research Conference, A self-sustaining signaling center controls cell elongation, 2013 年 5 月 14 日, ソウル (韓国)

大谷哲久, The 23rd CDB Meeting, "Building multicellular systems from Cellular Cross-Talk", IKKepsilon promotes paracrystalline actin bundle assembly by protecting Singed/Fascin from PKC-dependent inhibitory phosphorylation, 2013 年 1 月 22 日 ~ 23 日, 理研 CDB (兵庫県・神戸市)

大谷哲久, 第 35 回日本分子生物学会大会, IKKepsilon promotes paracrystalline actin bundle assembly by protecting Singed/Fascin from PKC-dependent inhibitory phosphorylation, 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

大谷哲久, 第 10 回日本ショウジョウバエ研究会, IKKepsilon promotes paracrystalline actin bundle assembly by protecting Singed/Fascin from PKC-dependent inhibitory phosphorylation., 2012 年 10 月 13 日 ~ 15 日, 東京慈恵会医科大学 (東京都・港区)

大谷哲久, 第 45 回日本発生生物学会大会・第 64 回日本細胞生物学会大会合同大会, Dynamic Organization of Paracrystalline Actin Bundles by IKK ϵ , 2012 年 5 月 28 日 ~ 31 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

大谷哲久, 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理」, Dynamic Organization of Paracrystalline Actin Bundles, 2012 年 4 月 12 日 ~ 13 日, 理化学研究所 (埼玉県・和光市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 哲久 (Tetsuhisa Otani)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：50415105