

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21570184

研究課題名（和文）DLK-JNK シグナル系による細胞内輸送制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism for intracellular transport depending on the DLK-JNK signaling pathway

研究代表者

平井 秀一（SYU-ICHI HIRAI）

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228759

研究成果の概要（和文）：細胞の分化や機能発現を支える重要な要素の一つである細胞内輸送は、輸送そのものを担うモータータンパク質と、輸送の足場となる細胞骨格に依存する。我々は、JNK の活性化を誘導するタンパク質リン酸化酵素である DLK が、これら二つに対して別々のルートから影響を及ぼし、細胞内輸送の制御に関わっている可能性を示した。即ち、DLK は JNK の活性化を通して微小管の安定性を制御していることを明らかにしたと共に、JIP1 との結合を介してキネシンモーターとカーゴ分子との結合を制御している可能性を示すことができた。これらの研究成果は細胞内輸送制御の原理を理解する新たな糸口を与えるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Intracellular trafficking is one of crucial factors supporting cell differentiation and function. This depends on motor proteins, which carry different kinds of cargos, and cytoskeletons, which serve as scaffold or rail of motor proteins. We showed that a protein kinase DLK affect the intracellular trafficking via two different pathways. One is the regulation of microtubules via the activation of JNK, and the other is the regulation of the binding between kinesin motor and cargo molecules via adaptor protein JIP. These findings give new insight into the molecular mechanism regulating intracellular trafficking.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：JNK、JIP、Kinesin-1、細胞内輸送、微小管、神経軸索

1. 研究開始当初の背景

細胞が持つ独特の機能の発現は、遺伝子発現制御の他に、合成したタンパク質（或いは脂質、糖、核酸）を適所に配置するための細胞内輸送制御に大きく依存している。このような特異的な（方向性を持った）細胞内輸送は細胞分化や形態形成の過程に於いても重要な意味を持つものであると共に、細胞内輸送の異常は様々な疾患の原因となる。特に神経細胞の軸索における様々な分子や細胞小器官の方向性を持った輸送にはこのシステムが不可欠で、細胞内輸送の異常が神経変性等様々な疾患の原因となることを示唆する研究報告も多い（Hirokawa & Takemura 2003, Trends Biochem Sci 28:558-565）。細胞内輸送の分子機構について、研究開始当時、輸送を支える様々なモータータンパク質が既に同定されていた他（Mallik & Gross 2004, Curr Biol 14:R971-982）、種々の細胞内小器官へのターゲティングに関しても既に多くの研究報告があった（Nakai 2000, Adv Protein Chem 54:277-344）。しかし、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その大部分が未解明の状態であった。

2. 研究の目的

本研究は神経細胞内での物質輸送に於ける DLK-JNK シグナル系の機能解析を通して細胞内輸送の方向性や効率を制御する分子機構の一端を明らかにすることを目指すものである。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細胞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（Kawasaki et al 1999, EMBO J 18:3604-3615; Xia & Karin 2004, Trends Cell Biol 14:94-101）。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 を同定した（Hirai et al 1996, Oncogene 12:641-650）。マウス胚発生期における DLK の発現は神経組織に特異性が高く、ノックアウトマウスを用いた解析により、我々は DLK 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た（Hirai et al 2006, J Neurosci 26:11992-2002）。細胞の移動や軸索形成は、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おり（Hirokawa & Takemura 2003, Trends Biochem Sci 28:558-565; Yoshimura et al 2006, J Neurosci 26:10626-10630）、細胞内輸送の方向性や効率を制御する分子機構が重要な働きをする局面とも言える。

このように DLK 及び JNK の機能は、細胞内輸送の方向性や効率の制御と密接に関連するものであると考えられることから、DLK、JNK を含む分子システムの構成と機能を、細胞内輸送制御の観点から明らかにする事を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞内輸送は、輸送を担うモータータンパク質と輸送の足場となる細胞骨格に依存する。DLK 及び JNK と細胞内輸送との接点もこの二つにある。DLK と JNK は、MAPKK として機能する MKK7 と共に JIP1 と呼ばれる足場タンパク質と結合するが (Whitmarsh et al. 1998, Science 281:1671-1674)、この JIP1 はキネシン 1 や APP、ApoER2 等の膜タンパク質とも結合することから、細胞内輸送のアダプター分子として機能するものと考えられる (Verhey et al. 2001, J Cell Biol 152:959-970)。そこで、DLK-JNK 経路が JIP1 とキネシン 1 を介した細胞内輸送を制御している可能性の検証を本研究の一つの柱とした。これには主として培養細胞系を用い、JIP1 への DLK、JNK の結合や JNK の活性が JIP1 とキネシン 1 との結合に与える影響等について検討した。

2) もう一つは、DLK-JNK 経路がキネシン 1 をはじめとするモータータンパク質の足場となる微小管を制御している可能性の検証である。DLK は神経細胞の中で微小管に沿った顆粒状の構造体に含まれ、DLK を COS-1 細胞中で強制発現すると微小管形成中心が失われ、微小管の細胞内分布が大きく変化することを我々は既に報告している (Hirai et al. 2002, Development 129:4483-4495)。また、多くの微小管結合タンパク質が JNK の基質として報告されている。これらは DLK-JNK 経路が微小管制御を介して細胞内輸送の制御に寄与していることを示唆するものである。この検証にあたっては、まず以前作成した DLK ノックアウトマウスと JNK1 ノックアウトマウスの交配により DLK/JNK1 ダブルノックアウトマウス (胚) を作成し、JNK 活性をより強く絞り込むことの神経軸索形成能への影

響を検討した。さらに、培養系において DLK ノックダウンの効果を活性价 JNK によりレスキュー出来るか否かを検討した他、微小管制御との関係を明らかにするため、タキソールによるレスキューの可否の検討も行った。

4. 研究成果

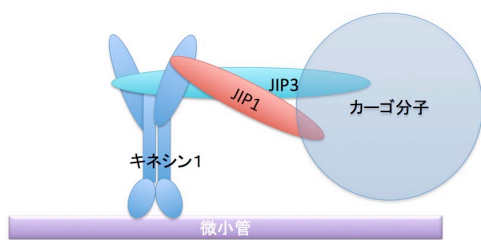
1-a) JIP1 への JNK の結合は JIP1 とキネシン 1 との結合に影響を及ぼさない： JIP1 の N 末端領域に位置する JNK 結合ドメインを除いた変異体と野生型 JIP1 との間でキネシン 1 との結合能を免疫沈降法により比較検討した所、有意な差は認められなかった。また、JNK 結合ドメインを除いた JIP1 も野生型 JIP1 同様 Neuro2a 細胞中で細胞突起の先端部への濃縮が認められた。このことから、JIP1 に結合した JNK が細胞内輸送を制御する可能性は低いと考えられる。

1-b) JNK 活性は JIP1 とキネシン 1 との結合に影響を及ぼさない： 次に活性价 MEKK1 強制発現による JNK 活性化が Neuro2a 細胞中での JIP1 とキネシン 1 との結合に及ぼす影響を検討したが、JNK の活性化が JIP1 とキネシン 1 との結合に影響を及ぼすことは無かった。また、JNK 阻害剤 SP600125 添加の効果も認められなかった。

1-c) JIP1 の PTB ドメインがキネシン 1 との結合に大きく寄与する： JIP1 はキネシン 1 結合ドメイン、JNK 結合ドメインの他にも SH3 ドメイン、PTB ドメインを持つ。SH3 ドメインは JIP1 二量体の形成に重要とされ、PTB ドメインには多種多様なタンパク質が結合する。この PTB ドメインのアミノ酸を置換した JIP1 変異体の幾つかは、C 末端部のキネシン 1 結合ドメインを保持しているにも関わらず、キネシン 1 との結合がほとんど認められなかった。このことは、

PTB ドメインに何らかのタンパク質が結合することにより、JIP1 とキネシン 1 との結合が増強されることを示唆している。

1-d) JIP3 は JIP1 の PTB に結合し、JIP1 とキネシン 1 との結合を増強する： Neuro2a 細胞中で JIP1 の PTB ドメインに結合するタンパク質の同定を試みた所、主たる結合タンパク質は JIP3 であった。JIP3 をノックダウンすると JIP1 とキネシン 1 との結合や JIP1 の細胞突起先端への濃縮が著しく減弱した。JIP3 もキネシン 1 と結合することが報告されていること (Byrd et al. 2001, Neuron 32:787-800) から、JIP1-JIP3-キネシン 1 の三者複合体形成により JIP1 とキネシン 1 との結合が安定化する可能性が浮かび上がってきた。さらに、PTB ドメインを介した JIP1 と JIP3 の結合が、JIP3 とキネシン 1 との結合にも JIP1 とキネシン 1 との結合にも依存しないことから、JIP1 と JIP3 がまず複合体を形成し、これがキネシン 1 と安定的な複合体を形成することにより微小管上を輸送されるものと考えられる。



1-e) DLK は JIP1-JIP3-キネシン 1 複合体形成を制御する： JIP1-PTB ドメインには JIP3 の他 DLK も結合する。JIP3 の結合が PTB ドメイン中の Phe687 依存的なものであったのに対し、DLK のこの残基への依存度は低かったことから、結合の様式は互いに異なると考えられる。しかし、Neuro2a 細胞に DLK を高発現することにより、JIP1 とキネシン 1 あるいは JIP3 との結合が減弱

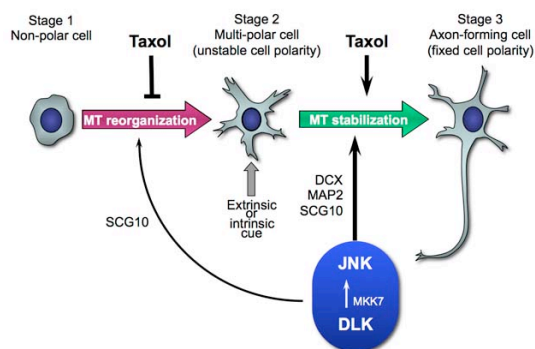
し、JIP1 の細胞突起先端部への濃縮も部分的にはあるが抑制された。この効果は DLK のキナーゼ活性には依存せず、むしろ活性喪失変異体の方が安定した効果をもたらした。このことから、DLK は JNK の活性化非依存的に JIP1 を介して細胞内輸送を制御している可能性が浮かび上がってきた。小胞のような大きなカーゴには微小管の+端方向への輸送を担うキネシンタイプのモーターと-端方向への輸送を担うダイニンタイプのモーターの双方が結合し、そのバランスにより輸送の方向性が決まると考えられているが、この中で DLK はキネシンタイプのモーターとの結合を切ることにより輸送の効率のみならず、方向性を決めている可能性がある。事例の提示を含めて今後検討を要する課題である。

2-a) 大脳皮質神経軸索形成は DLK-JNK 経路に大きく依存する： DLK/JNK1 ダブルノックアウトマウスの解析から、大脳皮質神経の軸索形成が DLK 及び JNK1 に大きく依存することが明らかとなった。JNK1 単独ノックアウトの効果はほとんど認められなかったが、DLK を合わせてノックアウトすることにより、DLK 単独ノックアウトで観察される軸索形成の障害が著しく増強された。JNK をコードする遺伝子は JNK1, JNK2, JNK3 の三つ存在しどれも大脳皮質神経で発現していること、DLK 以外の MAPKKK が神経細胞内に存在すること、さらに DLK-MKK7-JNK というキナーゼ経路が *in vitro* で確認できていることを合わせて考えると、DLK を介した経路と JNK1 を介した経路が独立していると考えより JNK1 ノックアウトによる JNK 量の絞り込みが、DLK ノックアウトによる JNK 活性低下の効果をより明確なものとしたと解釈するのが妥当と考えられる。また、初代培養神経を用いた軸索形成試験におい

て、DLK ノックダウンによる軸索形成抑制が、活性型 JIP1 (MKK7 と JIP1 の融合タンパク質) によりレスキューされたことも、この解釈を支持している。

2-b) DLK-JNK 経路は微小管をタイミングよく制御することにより軸索形成を支える：軸索の形成時にシャフト部分では微小管の安定化が起こる。DLK-JNK 経路が微小管の安定性を制御しているとする、DLK ノックダウンや JNK 阻害剤処理に依る軸索形成不全は微小管の安定化を引き起こすタキソールによりレスキューされると考えられる。事実、初代培養系において軸索形成を促進すると言われる低濃度のタキソールの添加により stage 2 神経から stage 3 神経への移行、即ち短い神経突起の伸長に関してはレスキューされることが確認できた。しかし、タキソール添加は、神経突起がほとんど無い stage 1 神経の増加をもたらした(下図参照)。このことは、軸索形成において、微小管の継続的な安定化が必要なのではなく、stage 1 から stage 2 への移行時には活発な微小管の再構成が必要で、stage 2 から stage 3 へ移行する段階に入って微小管の安定化が重要な要素となることが窺える。DLK あるいは活性型 JNK によるレスキューではタキソール添加時に観察された様な stage 1 神経の増加 (stage 1 から stage 2 への移行の阻害) は観察されなかったことから、DLK-JNK 経路を介した微小管安定化は、stage 特異的に進められるものと考えられる。こういった微小管制御は単に細胞骨格の構築による軸索形成を支えるのみならず、これを足場とした細胞内輸送の効率も大きく左右するものであることは疑いない。ただ微小管制御により特異的なカーゴの輸送方向まで制御できるかという問題は残る。他の細胞骨格との連携や細胞内の

特定部位への輸送の制御につながることを期待出来る部位特異的な微小管制御が特定のタイミングで進めば、巨視的に見て輸送の方向を制御することになる可能性はあるが、そのようなことを可能にする分子機構が存在するのか否か、今後検討を要する。



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 8 件)

- ① T. Satake, K. Ohtsuki, Y. Banba, J. Suenaga, H. Hirano, Y. Yamanaka, S. Ohno, S. Hirai. The interaction of Kinesin-1 with its adaptor protein JIP1 can be regulated via proteins binding to the JIP1-PTB domain. BMC Cell Biol (査読有) 14, 12 (2013).
- ② D.S. Welsbie, Z. Yang, Y. Ge, K.L. Mitchell, X. Zhou, S.E. Martin, C.A. Berlinicke, L. Hackler Jr., J. Fuller, J. Fu, L.H. Cao, B. Han, D. Auld, T. Xue, S. Hirai, L. Germain, C. Simard-Bisson, R. Blouin, J.V. Nguyen, C.H. Davis, R.A. Enke, S.L. Boye, S.L. Merbs, N. Marsh-Armstrong, W.W. Hauswirth, A. Diantonio, R. W. Nickells, J. Inglese, J. Hanes, K.W. Yau, H.A. Quigley, D.J. Zack. Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key

- mediator of retinal ganglion cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (査読有) 110, 4045-4050 (2013).
- ③ 平井秀一 軸索形成に必要な DLK-JNK 経路と微小管制御, 生体の科学 (査読無) 63, No. 3, 183-188 (2012)
- ④ S. Hirai, Y. Banba, T. Satake, S. Ohno. Axon formation in neocortical neurons depends on stage-specific regulation of microtubule stability by the Dual Leucine zipper Kinase-c-Jun N-terminal Kinase pathway. *J. Neurosci.* (査読有) 31, 6468-6480 (2011).
- ⑤ K. Hayashi, A. Suzuki, S. Hirai, Y. Kurihara, C.C. Hoogenraad, S. Ohno. Maintenance of dendritic spine morphology by partitioning-defective 1b through regulation of microtubule growth. *J. Neurosci.* (査読有) 31, 12094-12103 (2011).
- ⑥ J. Jin, H. Suzuki, S. Hirai, K. Mikoshiba, T. Ohshima. JNK phosphorylates Ser332 of doublecortin and regulates its function in neurite extension and neuronal migration. *Dev. Neurobiol.* (査読有) 70, 929-942 (2010).
- ⑦ H. Saitsu, J. Tohyama, T. Kumada, K. Egawa, K. Hamada, I. Okada, T. Mizuguchi, H. Osaka, shR. Miyata, T. Furukawa, K. Haginoya, H. Hoshino, T. Goto, Y. Hachiya, T. Yamagata, S. Saitoh, T. Nagai, K. Niiyama, A. Nishimura, N. Miyake, M. Komada, K. Hayashi, S. Hirai, K. Ogata, M. Kato, A. Fukuda, N. Matsumoto. Dominant-negative mutations in a-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am. J. Hum. Genet.* (査読有) 86, 1-11 (2010).
- ⑧ 平井秀一 がん細胞を知る一分子レベルでみた正常細胞との違いー *Medical Technology* (査読無) 38, No. 5, 503-506 (2010)
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Hirai S, Ohno. JNK reduces SCG10 protein level to regulate axon formation. 2012 Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, Dec 15-19, 2012, San Francisco, USA,
- ② Furukawa K, Ohno S, Hirai S. JNK facilitates the formation of epithelial cell sheet. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会合同大会, 2012年12月11日, 福岡
- ③ Hirai S, Molecular mechanism supporting transitions in cell polarity during neuronal development. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dec 15, 2011 Yokohama
- ④ Hirai S, Banba Y, Satake T, Ohno S. Axon formation in neocortical neurons depends on the stage-specific stabilization of microtubules by DLK-JNK pathway. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会合同大会, 2010年12月8日, 神戸
- ⑤ Satake T, Banba Y, Ohno S, Hirai S. Regulatory mechanism for Kinesin-1 motor activity through JIP1. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会合同大会2010年12月8日, 神戸
- ⑥ Satake T, Banba Y, Ohno S, Hirai S. Regulatory mechanism for Kinesin-1 motor activity through JIP1. 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, 2009年12月12日, 横浜
- [図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.wakayama-med.ac.jp/med/lasbiology1/Biology_Index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 秀一 (SYU-ICHI HIRAI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228759

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し