

2014年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 金憲誠 (理工学研究科西脇研究室)
研究課題 生殖巣形成リーダー細胞の移動を制御する核膜タンパク質の機能解析
研究期間 2014年4月1日～2015年3月31日
研究成果概要

線虫の U 字型の生殖巣 (チューブ状上皮よりなる) は、原基先端のリーダー細胞 (distal tip cell; DTC) が、幼虫期に 2 回の方向転換を伴う U 字型の移動を行うことにより形成される。私はこれまでに DTC の核は移動の間じゅう常に先端端付近へ維持されており、そのような核のポジショニングは核膜上に局在する UNC-83/SUN、UNC-84/KASH が Kinesin-1 を介して微小管と連結することで規定されていることを報告してきた。しかしこれらの核膜タンパク質が細胞の移動や器官の形成においてどのような機能を担っているのかについては未だ不明であった。これまでの解析から *unc-83(e1408)* 変異体、または Kinesin-1 の RNAi によるノックダウンでは DTC の早発性の方向転換が引き起こされることを見出しており、それはネトリンレセプターである UNC-5 が Rab1 や Rab11 などの小胞とともに核膜周辺から細胞表面へと早期に輸送されることに起因していることがわかってきた。このことから UNC-83/KASH、UNC-84/SUN、kinesin-1 は細胞移動において、これらの Rab が局在する小胞を介して UNC-5 を核膜近傍に繫留することでその輸送の量やタイミングを調節しているという可能性が示唆された。

2014 年度は UNC-5 の輸送を担っているモーターの同定および輸送と繫留機構の解明を目指して解析を行った。*unc-83(e1408)* 変異体や Kinesin-1 をノックダウンした DTC では、野生型で見られたような UNC-5-GFP の核膜周辺への蓄積は消失する代わりに細胞膜とその近傍への異常な蓄積が見られる。これは Kinesin-1 非存在下において UNC-5 を輸送する分子の存在を示唆している。そこでまずは UNC-5 の輸送が微小管依存的に起こるのかということを検証するために *unc-83(e1408)* 変異体で線虫 α tubulin、 β tubulin をコードする *tba-1*、*tba-2* および *tbb-1*、*tbb-2* をそれぞれ RNAi によってノックダウンし、UNC-5-GFP 局在への影響を調べた。その結果、いずれの RNAi においても *unc-83(e1408)* 変異体では見られなかった UNC-5-GFP の核膜周辺への局在が部分的に回復していた。このことから UNC-5 の輸送は微小管依存的に起こることがわかった。そこで微小管上を動くキネシンモーターに焦点を当て、RNAi ノックダウンによるスクリーニングを行い UNC-5 の輸送を司るモーターの同定を試みた。*unc-83(e1408)* 変異体でキネシンの RNAi をすることで、UNC-5-GFP の核膜周辺への局在が回復するクローンのスクリーニングを行ったが、期待した結果は得られなかった。そこでよりセンシティブな条件下で RNAi による効果を明確化する目的で、*unc-116* (Kinesin-1 重鎖) と候補クローンとのダブルノックダウンによる RNAi スクリーニングを行うことにした。その結果 Kinesin-3 の線虫ホモログである *kpl-4* と *unc-116* のダブル RNAi をした場合に、*unc-116* 単独のノ

ックダウンで見られた UNC-5-GFP の DTC リーディングエッジへの蓄積が減少し、核膜周辺や細胞質への局在が見られた。このとき核膜周辺に残った UNC-5-GFP 小胞は静的でありあまり動いておらず、また DTC 自体の背側へのターンも抑制されていたことから、UNC-5 の輸送が阻害されたと考えられた。しかし驚いたことに欠失変異体 *klp-4(tm2114)* では DTC の移動および UNC-5-GFP の局在はほとんど正常であった。したがって、KLP-4/Kinesin-3 と Kinesin-1 は協調して UNC-5 の輸送を調節しており、Kinesin-1 非存在下にもみ KLP-4 による UNC-5 の細胞膜方向への輸送が顕在化するのではないかと推測した。DTC 内での局在をライブイメージングしたところ、野生型 DTC で大部分の KLP-4-mcherry は UNC-5-GFP と同一の小胞上に存在しており、それらの小胞の細胞膜方向への共遊走も高頻度で観察された。また *unc-83(e1408)* 変異体でも細胞内局在は異常ではあるが（細胞膜近傍へ移行）両者の共局在は維持されていた。これらの結果から、ネトリンレセプターの輸送は① UNC-83/KASH、UNC-84/SUN、Kinesin-1 による核膜付近への繫留と、② Kinesin-1 および KLP-4/Kinesin-3 という 2 種類のキネシンによる細胞膜への輸送、といったプロセスが適切に制御されることで正しい器官の形成が行われているというモデルを提案した。

発表論文、学会発表など
—発表論文

1. (著書) 『器官形成を導く先端細胞での細胞骨格制御機構』公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院 生体の科学。第65巻第3号[特集]器官の発生と再生の基礎 総p.286 「器官形成を導く先端細胞での細胞骨格制御機構」の章を担当。pp.249-254 共著者：金憲誠、西脇清二

2. (総説) Control of the basement membrane and cell migration by ADAMTS proteinases: Lessons from *C. elegans* genetics. Hon-Song Kim and Kiyoji Nishiwaki. *Matrix Biology*, in press.

—学会発表

1. Nuclear membrane proteins act in transport of the Netrin receptor UNC-5 in cell migration in *C. elegans*. Hon-Song Kim and Kiyoji Nishiwaki. *C.elegans* development, cell biology and gene expression meeting in association with the 6th asia-pacific *C.elegans* meeting. 2014年7月15-19日、奈良県新公会堂、ポスター発表

2. 核膜タンパク質SUN、KASHは細胞移動においてネトリンレセプターUNC-5の輸送を制御する。金憲誠、西脇清二。第37回分子生物学会年会。2014年11月25-27日、パシフィコ横浜、ポスター発表