

「生命活動のプログラム」

平成7年度採択研究代表者

松本 邦弘

(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

「発生・分化を規定する新規シグナル伝達ネットワーク」

1. 研究実施の概要

チロシンキナーゼ型細胞増殖因子受容体のシグナル伝達経路として、Ras - Raf - MAP キナーゼカスケードが、1990年代前半に解明されたことが生物学上の一大契機となり、シグナル伝達研究は生命科学の一つの先端的研究を担うようになった。本研究において、発生及び分化を制御するシグナル伝達経路解明を第1の目的とし、第2に分子遺伝学的手法と生化学的手法により、さらに新規シグナル伝達分子群を見出し、新たな研究領域を創出することをめざす。

本年度、線虫における研究が端緒となり、動物の形態形成を制御する新たなシグナル伝達経路が見いだされた。一個の受精卵から完全な体が形成される過程において、細胞は分裂増殖を繰り返し、それぞれに異なる運命を与えられることにより多様に分化していく。今回、この細胞の運命決定に重要な働きをしている、新しいシグナル伝達の仕組みが明らかになった。この発見は、線虫の発生における形態形成に異常のある突然変異株の解析をきっかけとしてなされた。線虫の筋肉と腸を構成する細胞群は、もともと一つの細胞に由来する。この細胞が二つに分裂する際に、一方の細胞は将来筋肉となり、もう一方は腸になるように運命決定の情報が与えられる。今回、この筋肉と腸の分化の方向を決定する情報には2つの異なる伝達経路が関係していることが明らかになった。一つは既に知られている Wnt と呼ばれる分泌性のタンパク質が関係した経路で、もう一つが TAK1 と NLK という MAP キナーゼ関連タンパク質が関係する経路である。さらに、NLK は細胞の運命決定に関与する遺伝子の発現を調節している転写因子(TCF)の働きを、直接的に制御していることが明らかになった。これらの結果は、TAK1→NLK→TCF→遺伝子の発現→細胞の運命決定という情報伝達経路が、発生の過程において重要な働きをしていることを示している。これらの研究成果は、動物の形を作る発生のプログラムの解明に大きく貢献するものと期待される。

2. 研究実施内容

(1) TAK1 は、BMP (骨形成因子) などの TGF- β スーパーファミリーのシグナル

伝達経路で機能する MAP キナーゼキナーゼキナーゼ である。two-hybrid 法により得られた TAK1 結合因子 TAB1 は、TAK1 の活性化因子として機能することから、TAB1 は BMP 受容体と TAK1 の間で作用していると考えられるが、TAB1 と受容体との直接的な相互作用は確認されなかった。TAB1 と受容体との間には、さらなる因子が関与することが期待される。この因子の同定は、TAB1/TAK1 による BMP シグナル伝達機構の解明に不可欠である。そこで、この因子の同定を two-hybrid 法を用いて試みた結果、IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) ファミリーの一つである XIAP が得られた。IAP 蛋白質は、N 末端側の BIR ドメインと C 末端側の Ring Zinc Finger ドメインからなるが、TAB1 との結合は N 末端側の BIR ドメインでおこっている。他の IAP ファミリーに属する IAP1、IAP2 は TAB1 と結合しなかった。このように、XIAP は特異的に TAB1 と相互作用するものと考えられる。さらに、XIAP は I 型、II 型の BMP 受容体 complex と結合することが確認され、Xenopus (アフリカツメガエル) の初期発生に対する効果から、XIAP は BMP によるシグナル伝達経路において正の因子として作用していることが明らかになった。以上の結果から、XIAP は BMP シグナル伝達系において、TAB1/TAK1 を受容体にリクルートするようなアダプターの役割を果たしている可能性が考えられる。

(2) MAP キナーゼカスケードは、遺伝学的解析が比較的簡便に行なえる線虫 (*C. elegans*) やショウジョウバエ (*Drosophila*) においても保存されている。従って、動物細胞における TAK1 シグナル伝達系も、これらの生物においても保存されていることが予想され、個体レベルにおける TAK1 の機能解明は興味深い。そこで、*C. elegans* における TAK1 を介したシグナル伝達経路の役割を明らかにする目的で、*C. elegans* の TAK1 ホモログ TLK-1 (TAK1-Like Kinase) を分離した。さらに two-hybrid 法を用いて、TLK-1 と相互作用する因子を探索した結果、動物細胞の TAK1 活性化因子 TAB1 と類似した蛋白質 TAP-1 (TAB1-like Protein) が得られた。TLK-1 は哺乳類の培養細胞系において TAK1 と同様に、MAP キナーゼキナーゼである MKK6 をリン酸化し、TAP-1 は TLK-1 の活性化因子として機能することが確認された。Oregon 大学の Bowerman との共同研究により、*C. elegans* の胚発生における内胚葉誘導に異常を示す *mom-4* 変異株が、*tlk-1* 遺伝子に変異をもつことが明らかになった。*C. elegans* の内胚葉誘導は、4 細胞期の P2 細胞からのシグナルにより EMS 細胞の 2 つの娘細胞の一方の細胞運命が中胚葉から内胚葉へ変換されることで成立する。この内胚葉誘導に異常のある変異体のスクリーニングにより、*mom* (more mesoderm) 変異、*lit* (less of intestine) 変異、*pop* (posterior pharynx-defective) 変異が分離されている。このうち *mom-1*、*mom-2*、*mom-5*、*pop-1* の原因遺伝子は、いずれも Wnt シグナル伝達経路の構成因子に類

似した蛋白質をコードする。すなわち、MOM-1はWnt様分子、MOM-2はFrizzled様分子(Wnt受容体)、MOM-5はPorcupine様分子、POP-1は転写因子であるTCF様分子に相当する。このように、線虫におけるWntシグナル伝達経路は、内胚葉誘導の制御に関与している。ただし、動物細胞のTCFがWntの系において正に作用するのに対し、線虫のPOP-1は負に作用する。mom-4変異株の表現型は、mom-1、mom-2、mom-5よりもむしろlit変異であるlit-1変異株に類似することが明らかになった。lit-1遺伝子をクローニングした結果、LIT-1はMAPキナーゼ様の因子であり、MOM-4/TLK-1とLIT-1はいずれもPOP-1を負に制御することにより、Wntシグナル伝達経路による内胚葉誘導を正に制御していることが明らかとなった。それでは、動物細胞においてもTAK1はLIT-1ホモログを介して、Wntシグナル伝達経路に関与するのであろうか？動物細胞におけるLIT-1ホモログであるMAPキナーゼ様因子NLKを分離し、TAK1、NLKとWntシグナル伝達経路の因子である β -catenin、TCFとの関係を、Xenopusの系を用いて解析を行った。その結果、(i) TAK1とNLKは、 β -catenin-TCFによる転写の活性化を抑制する、(ii) TAK1はNLKの上流で作用し、NLKの活性化を引き起こす、(iii) NLKはTCFをリン酸化する、という結果を得た。これらの結果は、TAK1とNLKを含むキナーゼカスケードが、 β -catenin-TCFを抑制するシグナル伝達経路の一部である可能性を示唆する。

以上のように、本研究では、TAK1という新規シグナル伝達分子の発見をスタートとして、さらなるシグナル伝達遺伝子群の発見・同定を行った。さらに、それらの新規遺伝子群による発生・分化における機能解析を行った。今後、発生・分化を規定する新規シグナル伝達ネットワークの解明を、総合的に推進させたい。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K.
The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway.
Nature, 398: 252-256 (1999).
- Menegini, M. D., Ishitani, T., Carter, C., Hisamoto, N., Ninomiya-Tsuji, J., Thorpe, J., Matsumoto, K. and Bowerman, B.
MAP Kinase and Wnt Pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *C. elegans*.
Nature, 399: 793-797 (1999).
- Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Menegini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H. and Matsumoto, K.

The TAK1-NLK-MAPK related pathway antagonizes signalling between β -catenin and the transcription factor TCF.

Nature, 399: 798-802 (1999).

○Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y. and Matsumoto, K.

Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing.

Nature, 400: 166-169 (1999).

○Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. and Matsumoto, K.

XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway.

EMBO J., 18: 179-187 (1999).

○Kawasaki M., Hisamoto N., Iino Y., Yamamoto M., Ninomiya-Tsuji J. and Matsumoto, K.

A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons.

EMBO J., 18: 3604-3615 (1999).

○Suzanne, M., Irie, K., Glise, B., Agnes, F., Mori, E., Matsumoto, K. and Noselli, S.

The *Drosophila* p38 MAPK pathway is required during oogenesis for asymmetric development.

Genes & Dev., 13: 1464-1474 (1999).

○Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. and Matsumoto, K.

p38 mitogen-Activated Protein Kinase can be involved in transforming growth factor β superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis.

Mol. Cell. Biol., 19: 2322-2329 (1999).