

「生物の発生・分化・再生」
平成12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)

「発生における器官・形態形成と細胞分化の分子機構」

1. 研究実施の概要

近年の多細胞生物における個体構築の分子機構に関する研究から、形態形成・器官形成の過程には、線虫、ショウジョウバエから高等脊椎動物に至るまで、種を越えて共通なシグナル分子による統一的な機構が存在することが明らかになってきた。従って、線虫やショウジョウバエをモデル動物とした発生・分化を規定するシグナル分子によるシグナル伝達ネットワークの解明は、脊椎動物における形態形成・器官形成の制御機構解明に大きく寄与することが期待される。さらに、線虫とショウジョウバエでは、全ゲノム配列が決定されたことから、このゲノム情報を基盤としてシグナル伝達機構を分子遺伝学的に解析することが可能である。一方、シグナル伝達研究は、増殖因子受容体のシグナル伝達経路でERK型MAPキナーゼ (MAPK) カスケードの存在を明らかにし、さらにERK型とは異なるJNK型、p38型MAPKカスケードが、高等脊椎動物において発生、分化、アポトーシス等を制御していることが明かとなり、MAPKカスケードに関する研究はシグナル伝達研究の中心的な地位を占めるようになった。JNK型、p38型MAPKカスケードは、線虫やショウジョウバエの系においても、発生、分化、形態形成の制御に関与していることから、高等脊椎動物におけるMAPKカスケードによる発生・分化の制御機構を解明する上で良いモデル系になるものと期待される。

本研究グループは、我々が開発した分子遺伝学的手法により哺乳類の新規MAPKカスケードのシグナル伝達因子TAK1を発見し、TGF- β 及びIL-1シグナル伝達経路で機能することを明らかにした。BMPを含むTGF- β ファミリーは、高等脊椎動物の発生・分化を規定する細胞外リガンドとして不可欠の役割を果たし、またIL-1受容体はショウジョウバエの形態形成を制御するTollファミリーに属することから、TAK1カスケードは発生・分化の過程において重要な役割を担っていると考えられる。さらに、線虫と動物細胞において、TAK1を介した新規MAPKカスケードが、Wntシグナル伝達経路と関連しながら発生・分化を制御していることが明らかになった。このように、TAK1という新規シグナル伝達因子の発見をスタートとして、さらなるシグナル伝達因子群の発見・同定を行い、TAK1カスケードの解析を通し

て、発生・分化を制御するシグナル伝達経路解明への手掛りを得た。本研究計画では、これらの成果をさらに発展させ、発生過程におけるMAPKカスケードを中心とした細胞運命、細胞極性、形態形成の制御機構の解明を第1の目的とし、さらに新規シグナル伝達因子群の同定と、発生・分化における機能解析を行い、発生・分化の分子機構のネットワークの解明を目指す。本研究は、高等脊椎動物の形態形成・器官形成の解明に大きく貢献し、その延長上に臓器形成の基礎研究となる「再生医学」という新しい学問領域への展開が期待される。

2. 研究実施内容

(1) Toll/IL-1シグナル伝達機構

Toll/IL-1レセプターファミリーは、ショウジョウバエから哺乳動物までの進化の過程で保存されて存在し、発生初期の形態形成および細菌感染などの異物に対する生体防御に重要な役割を果たしている。細胞表面のToll/IL-1レセプターにリガンドが結合すると、まずアダプタータンパク質のMyD88を含むレセプター複合体が形成される。次に、この複合体にMyD88を介してセリン/スレオニンキナーゼであるIL-1 receptor associated-kinase(IRAK) が結合し、IRAKが活性化される。活性化されたIRAKは、下流の分子であるtumor necrosis factor receptor associated-factor 6(TRAF6) へとシグナルを伝える。TRAF6の下流ではJNKとI κ B kinase(IKK) の2つのキナーゼが活性化され、その結果形態形成および生体防御に働く遺伝子の発現が誘導される。

我々は、これまでの研究によって、細胞をリガンド(IL-1) 処理すると、MAPKKKファミリーのひとつであるTAK1が、TRAF6と複合体を形成し活性化され、JNKとIKKの両方のキナーゼを活性化する働きをしていることを明らかにした。さらに、TRAF6とTAK1の結合には、TAK1の結合因子であるTAB2がアダプター分子として働いており、IL-1刺激によってTRAF6 - TAB2 - TAK1複合体が形成されることを見出した。しかし、この経路において、(1)TRAF6 - TAB2 - TAK1複合体がどのような機構で形成されるのか？、および(2)TRAF6の上流因子であるIRAKがこの複合体形成とTAK1の活性化にどのように関与するのか？、については未解決の課題として残っていた。そこで、今年度の研究は、これらの解明を目指した。その結果、(i)IL-1刺激のない時にはTAB2は膜に局在するが、TRAF6は膜と細胞質の両方に、TAK1は細胞質に存在し、IL-1刺激によって、TAB2が細胞質へと移行すること、(ii)TAB2の細胞質への移行と同時期に、TAB2がIRAKと一過的に複合体を形成すること、さらに、(iii)IRAKの欠損変異株では、TAB2の細胞質への移行が起こらないこと、(iv)IRAKの欠損によってTAB2の細胞質への移行が起こらない時は、TRAF6 - TAB2 - TAK1複合体が形成されず、TAK1も活性化されないことが示された。これらの結果は、IRAKがTAB2を膜から細胞質へ移

行させる働きをしており、このTAB2の局在変化がIL-1によるTRAF6 - TAB2 - TAK1複合体形成ひいてはTAK1活性化の必須のステップであることを示している。

(2) Gタンパク質活性化因子による器官伸長の制御機構

発生の過程において、もっとも興味深い現象のひとつとして、器官形成が挙げられる。線虫にはいくつかの器官があるが、excretory systemと呼ばれる水分調節器官は、線虫の全長にわたって伸びるH型の器官excretory canalと、排出管excretory ductおよび排出口(pore)から構成されている。なかでも、excretory canalは単細胞からなり、発生の後期において細胞が特異的な形態になり、方向性をもって伸長することから、器官形成のモデル系のひとつとして有用であると思われる。これまでの研究から、excretory canalの形成過程には、ネトリンホモログであるunc-6などのガイダンス分子や、スペクトリンなどの分子が関与することが知られている。今回、器官形成に関わる分子を単離・同定する目的で、excretory canalの伸長が異常になる変異であるexc-5を単離した。exc-5変異株では、excretory canalが伸長せず、体の前部で水泡状にふくれてしまう。また、canal内の構造や、アクチンの局在も異常になっていた。exc-5の遺伝子をクローニングしたところ、Rhoタイプ低分子量Gタンパク質のGuanine-Nucleotide Releasing Factorに特徴的なドメインをもち、顔面奇形を伴うヒトの遺伝病であるFGD (Faciogenital Displasia)の原因遺伝子と最も相同性の高いタンパク質をコードすることが明らかになった。exc-5遺伝子の発現パターンをしらべたところ、excretory canalで特異的に発現していた。これらのことから、EXC-5がexcretory canalにおいて、Rhoタイプ低分子量Gタンパク質の上流で機能している可能性が考えられた。そこで、exc-5変異株の表現型が、Rhoタイプ低分子量Gタンパク質の活性化型変異によって抑圧されるかどうか見るために、*C. elegans*のRhoタイプ低分子量Gタンパク質であるmig-2の活性化型変異とexc-5の二重変異株を作成してその表現型を調べたところ、exc-5の表現型が弱く抑圧されていることが明らかになった。また、exc-5変異株で、別のRhoタイプ低分子量Gタンパク質であるced-10やcdc-42の活性化型変異の遺伝子を多量発現してもその表現型は抑圧された。以上の結果から、線虫では、exc-5遺伝子がRhoタイプ低分子量Gタンパク質を活性化することにより、excretory canalの形態形成を制御することが示唆された。

(3) MAPキナーゼカスケードによる神経の左右非対称的分化の制御機構

発生過程における神経系では、さまざまな非対称性の獲得機構の存在が示唆されている。線虫*C. elegans*では、感覚神経のひとつであるAWC神経細胞は左右に1対あるが、神経の最終分化の過程において左右の非対称性が生じ、左右のどち

らか片方でのみstochasticに7回膜貫通型受容体であるstr-2が発現するようになる。この発現には、左右のAWC神経細胞同士の軸索接触が必須であることから、AWC神経同士が何らかの情報のやりとりをすることによって、この運命決定が行われると推測された。Bergmannらのグループは、これまでの研究で、カルシウムチャンネルをコードするunc-2/unc-36と、カルシウム依存性プロテインキナーゼをコードするunc-43の変異株およびnsy-1, 2, 3(neuronal symmetry)変異株において、左右非対称性の決定が異常になり、両方のAWC神経でstr-2が発現することを示していた。今回、Bergmannらのグループとの共同研究でnsy-1の遺伝子をクローニングした結果、ほ乳動物のMAPKKKであるASK1のホモログであることが明らかになった。nsy-1をほ乳動物細胞で発現させた場合、MAPKKであるMKK6をリン酸化してこれを活性化する。C. elegansでは、MKK6のホモログとしてSEK-1が想定されたので、sek-1遺伝子破壊株についてもAWC神経での非対称性への関与を調べたところ、nsy-1変異株と同様に、両方のAWC神経でstr-2が発現する表現型を示すことが判明した。また、unc-2/unc-36カルシウムチャンネルや、カルシウム依存性プロテインキナーゼunc-43を含めた遺伝学的な上下関係の解析から、unc-2/unc-36 - unc-43 - nsy-1 - sek-1の順番でカスケードが構成されていることが明らかになった。更に、nsy-1およびunc-43変異株でのin vivoでのsek-1の活性を測定したところ、これらの変異株では野生株と比べてsek-1の活性が著しく低下していた。このように、遺伝学および生化学的な手法の両方により、上記のシグナル伝達系の存在が示された。nsy-1やunc-43変異株を用いたモザイク解析から、このシグナル伝達系は細胞自律的にstr-2の発現を抑制しており、上記の変異株では神経軸索の接触に関係なく常にstr-2が発現することが明らかになった。以上の結果から、unc-2/unc-36 - unc-43 - nsy-1 - sek-1よりなるシグナル伝達カスケードが、AWC神経同士の軸索接触に依存して片方の細胞でのみ活性化することにより、str-2の発現を制御していることが明らかになった。

(4) TGF- β ファミリー、骨形成因子 (BMP) シグナル伝達に関与する新規因子

TGF- β ファミリーに属する増殖因子は、細胞の増殖・分化・形態形成など様々な細胞機能の調節因子である。多くの増殖因子は細胞内にシグナルを伝えた後、何らかのメカニズムによってそのシグナルは抑制されることが知られており、TGF- β ファミリーはその多様な生理作用からシグナルのon/offに緻密な制御機構が存在すると考えられている。特にそのシグナル前後での抑制機構を知ることは重要な課題となっている。これまでに、我々は骨形成因子 (BMP) のレセプターに結合する因子としてヒトBRAM1を単離した。しかしながら、BRAM1の分子機能は不明であった。そこでBRAM1の線虫相同遺伝子cBRA1, 2を単離し、解析を行った。

線虫にはTGF- β ファミリーに属する因子として、DAF-7とDBL-1が存在する。DAF-7をリガンドとするdafシグナル伝達経路は耐性幼虫への移行を調節しており、DBL-1をリガンドとするsmaシグナル伝達経路は主に体長を調節している。cBRA 1の発現はDAF-7と同様に神経系の組織で強く発現していたことから、dafシグナル伝達経路への関与が示唆された。そこで、Tc-1を用いた遺伝子破壊法によりcBRA1 Null変異株を作製し、dafシグナル伝達経路に属する変異株との二重変異株を作製し、耐性幼虫形成率を測定したところ、有意にその割合が減少した。従って、cBRA1はレセプターの下流で、かつSmadの上流で抑制因子として機能していることが明らかになった。またcBRA1はタイプIレセプターであるDAF1と特異的に結合することも確認された。cBRA2はcBRA1のアミノ酸配列と53%の相同性を持ち、特にC末端において保存されていた。cBRA2は咽頭筋および腸細胞において強く発現していた。cBRA2の二重鎖RNA阻害実験(dsRNAi)を行った結果、Lon(long)の表現型を示したことからcBRA2は線虫の体長を調節するDBL1 TGF- β シグナル伝達経路において抑制因子として働く可能性が示唆された。さらにcBRA 2はタイプIレセプターであるSMA6と特異的に結合することも確認された。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Nishiwaki, K., Hisamoto, N. & Matsumoto, K. A metalloprotease disintegrin that control cell migration in *Caenorhabditis elegans*.

Science, 288 : 2205-2208 (2000)

Sagasti, A., Hisamoto, N., Hyodo, J., Tanaka-Hino, M., Matsumoto, K. & Bargmann, C. I. The CaMKII UNC43 activates the MAPKKK NSY-1 to excute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates.

Cell, 105 : 221-232 (2001)

Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, S., Irie, I., Ninomiya-Tsuji, J. & Matsumoto, K. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway.

Mol. Cell, 5 : 649-658 (2000)

Tadauchi, T., Matsumoto, K., Herskowitz, I. & Irie, K. Post-transcriptional regulation through the HO 3'-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF.

EMBO J., 20 : 552-561 (2001)

Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S. and Inoue, J. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis.

EMBO J, 20 : 1271-1280 (2001) .

Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., Danos, M. C., Matsumoto, K., O'Connor, M. B., Shibuya, H. & Ueno, N. TAK1 participates in JNK signaling during *Drosophila* development.

Mol. Cell. Biol., 20 : 3015-3026 (2000)

Naiki, T., Shimomura, T., Kondo, T., Matsumoto, K. & Sugimoto, K. Rfc5, in cooperation with Rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle.

Mol. Cell. Biol., 20 : 5888-5896 (2000)

Wakayama, T., Kondo, T., Ando, S., Matsumoto, K. & Sugimoto, K. Pie1, a protein interacting with Mec1, controls cell growth and checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*.

Mol. Cell. Biol., 21 : 755-764 (2001)

Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Kishida, S., Li, X., Stark, G. R. & Matsumoto, K. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway.

Mol. Cell. Biol., 21 : 2475-2484 (2001)

Kishimoto, K., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop.

J. Biol. Chem., 275 : 7359-7364 (2000)

Mochida, Y., Takeda, K., Saitoh, M., Nishitoh, H., Amagase, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. & Ichijo, H. ASK1 inhibits IL-1-induced NF- κ B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction.

J. Biol. Chem., 275 : 32747-32752 (2000)

Hamada, M., Ninomiya-Tsuji, J., Komaki, K., Ohnishi, M., Katsura, K., Ikeda, S., Kanamaru, R., Matsumoto, K. & Tamura, S. Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C.

J. Biol. Chem., 276 : 5753-5759 (2001)