

「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らかとなり、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) p38MAP 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

MAPKKK スーパーファミリーに属する ASK1 (Apoptosis Signalling Kinase 1) は、培養細胞を用いた解析から、ストレスやサイトカインによって活性化しストレス応答やアポトーシスなどの細胞応答に関与する。ASK1 が個体内でどのような刺激に応答して、どのような生命現象に関わるのかを明らかにする目的で、遺伝学的解析の容易な線虫 *C. elegans* をモデル動物として、ASK1 MAPKKK の関わる情報伝達経路の解明を行った。哺乳動物の ASK1 と約 64%の同一性を持つ線虫の MAPKKK ASK-1 を分離した。ask-1 遺伝子の近傍に位置する変異体を調べた結果、ask-1 が神経系の左右非対称性が失われる変異 *nsy-1* (*Neuronal symmetry-1*) の原因遺伝子であることが明らかになった。線虫は、形態的に対称な左右一対の嗅覚神経細胞 AWC を有している。野生型においては、7 回膜貫通型の嗅覚刺激受容体 STR-2 (Seven Transmembrane Receptor-2) が左右どちらか片方の AWC で発現する。一方、*nsy-1* 変異体においては、左右両方の AWC で STR-2 が発現する。従って、NSY-1/ASK-1 MAPKKK は AWC における左右非対称的な運命制御に関与すると考えられる。

(2) JNK MAP キナーゼカスケードによる神経系の制御

シナプスの可塑性には多くの因子が関与することが明らかになっているが、機能的なシナプスの維持やその位置的变化の制御に関与する因子については今だ不明の点が多い。線虫では、運動神経のひとつである D 型 GABA 産生ニューロンにおいて、そのシナプスの局在が発生過程で変化する。L1 幼虫期には、D 型ニューロンの機能的なシナプスは腹側に存在するが、L2 幼虫期以降は背側にその局在を変える。このシナプスの局在制御に関与する因子として、哺乳動物の JSAP ホモログ UNC-16 を同定した。JSAP は、動物細胞において JNK 型 MAPK カスケードの構成因子である MLK MAPKKK、MKK7 MAPKK および JNK3 MAPK とそれぞれ結合することにより、MAPK カスケードの scaffold 因子として機能する。線虫では、JNK のホモログとして JNK-1、MKK7 のホモログとして JKK-1 が単離され、JKK-1→JNK-1 MAPK カスケードが D 型ニューロンを介した運動調節において機能している。動物細胞の JSAP と同様に、線虫の UNC-16 も JKK-1、JNK-1 と結合すること、また *jnk-1*、*kk-1* 欠損変異株では、*unc-16* 欠損変異株と同様に D 型ニューロンでシナプスの局在制御が異常である。さらに、UNC-16 と結合する因子としてキネシン軽鎖 KLC-2 が単離され、*klc-2* 欠損変異株も *unc-16* 変異株と同様にシナプスの局在制御の異常を示し、同様の異常はキネシン重鎖の遺伝子 *unc-116* 欠損変異株においても観察された。これらのことから、線虫ではキネシンーUNC-16ーJNK カスケード複合体が、発生過程における D 型ニューロンでの機能的なシナプスの局在を制御することが明らかになった。

(3) ショウジョウバエをモデル系とした p38 MAPK カスケードの機能解明

p38 MAPK は、真核生物において進化的に高度に保存されており、哺乳類培養細胞を用いた研究から、温度、浸透圧など様々な環境ストレスによって活性化することが知られていた。個体レベ

ルにおける p38 MAPK カスケードの役割を明らかにする目的で、ショウジョウバエをモデル動物として p38 MAPK カスケードの機能解析を行った。まず、p38 MAPK の活性を制御する新規 MAPKKK、D-MEKK1 を分離した。D-MEKK1 は哺乳類細胞において MKK6 のリン酸化、および p38 MAPK の活性化を引き起こしたことから、MKK6-p38 MAPK 経路を活性化できる MAPKKK として機能していることが明らかとなった。この D-MEKK1 の機能を明らかにするため、D-MEKK1 のキナーゼドメインを欠失した変異体を得ることができた。この D-MEKK1 変異体は、外見上正常であり生存可能であった。D-MEKK1 の下流因子として考えられる、ショウジョウバエ p38 MAPK はストレスにより活性化することが知られている。そのため、D-MEKK1 がストレス応答に関与する可能性を考え、D-MEKK1 変異体のストレス感受性を検討した。その結果、野生型に対して、D-MEKK1 変異体は高温、高浸透圧に対して高い感受性を示した。次に、浸透圧ストレスがショウジョウバエ体内で D-MEKK1-p38 MAPK の活性化を引き起こすかどうか検討した。その結果、ストレス刺激により D-MEKK1 が活性化し、p38 MAPK も活性化することが明らかとなった。ストレス刺激を与えた結果生じる p38 MAPK の活性化は、D-MEKK1 変異体では非常に弱くなることから、D-MEKK1 依存的に p38 MAPK が活性化することが考えられる。以上の結果より、D-MEKK1-p38 MAPK からなる経路がショウジョウバエ体内でストレス応答に対し機能していることが明らかとなった。

(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 シグナルに関わる新規分子を取得することを目的として、yeast two-hybrid スクリーニングにより BMP receptor associated molecule (BRAM) に結合する因子、BRAM interacting protein (BIP) を単離した。BIP ホモログはヒト、アフリカツメガエル、線虫 *C. elegans* に存在していた。*C. elegans* には BRAM ホモログ、BRA-1、BRA-2 が存在し、*C. elegans* BIP がこれらと相互作用することが期待されたので、*C. elegans* を用いた BIP の機能解析を行った。*C. elegans* BIP は BRA-1、BRA-2 の両者と結合することが明らかとなった。次に double stranded RNA interference (dsRNAi) を用いて、機能喪失実験を行った。野生型に BIP dsRNAi をインジェクションすると、体長の短い *Sma* の表現型を示すことが明らかとなった。そこで、*sma* 経路のリガンドである DBL-1 の過剰発現変異体 *dbl-1(++)* に対する BIP dsRNAi を検討したところ、体長が野生型と同程度になる個体が認められた。さらに、*sma* 経路の標的遺伝子である *lon-1* 機能欠失変異体に dsRNAi を行ったが、この変異体に対しては作用が全く認められなかったことから、*C. elegans* BIP は *sma* 経路においてリガンド DBL-1 より下流かつ標的遺伝子である LON-1 より上流に位置することが確認された。以上の結果より、BIP は BRA-2 に作用して *sma* 経路をポジティブに調節している可能性が高いと考えられる。

3. 研究実施体制

名古屋大学大学院・理学研究科 松本グループ

松本 邦弘 (名古屋大学大学院理学研究科, 教授)

TAK1 の発生・分化における機能解明

名古屋大学大学院・理学研究科 西田グループ

西田 育巧 (名古屋大学大学院理学研究科, 教授)

発生・分化を制御するショウジョウバエシグナル伝達因子の探索・解析

東京医科歯科大学・難治疾患研究所 澁谷グループ

澁谷 浩司

Xenopus での NLK による頭部形成機構の解析

京都大学大学院・生命科学研究科 福田グループ

福田 真

Xenopus と哺乳類培養細胞を用いて、生化学的手法によりシグナル因子の分離

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Kondo, T., Wakayama, T., Naiki, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K.
Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms.
Science 294: 867-870 (2001)
- Sagasti, A., Hisamoto, N., Hyodo, J., Tanaka-Hino, M., Matsumoto, K. and Bargmann, C.I.
The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates.
Cell 105: 221-232 (2001)
- Byrd, D.T., Kawasaki, M., Walcoff, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K. and Jin, Y.
UNC-16, a JNK signaling scaffold protein, regulates vesicle transport in *C. elegans*.
Neuron 32: 787-800 (2001)
- Tadauchi, T., Matsumoto, K., Herskowitz, I. and 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)
- Inoue, H., Tateno, M., Fujimura-Kamada, K., Takaesu, G., Adachi-Yamada, T., Ninomiya-Tsuji, J., Irie, K., Nishida, Y. and Matsumoto, K.
A *Drosophila* MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK.
EMBO J. 20: 5421-5430 (2001)
- Suzuki, N., Buechner, M., Nishiwaki, K., Hall, D.H., Nakanishi, H., Takai, Y., Hisamoto, N. and Matsumoto, K.
A putative GDP-GTP exchange factor is required for development of the excretory cell in *C. elegans*.
EMBO Rep. 2: 530-535 (2001)
- Wakayama, T., Kondo, T., Ando, S., Matsumoto, K. and 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. and 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)

- Naiki, T., Kondo, T., Nakada, D., Matsumoto, K. and Sugimoto, K.
Chl12/Ctf18 forms a novel RFC-related complex and functions redundantly with Rad24 in the DNA replication checkpoint pathway.

Mol. Cell. Biol. 21: 5838-5845 (2001)

- Ono, K., Ohtomo, T., Sato, S., Sugamata, Y., Suzuki, M., Hisamoto, H., Ninomiya-Tsuji, J., Tsuchiya, M. and Matsumoto, K.

An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK.

J. Biol. Chem. 276: 24396-24400 (2001)

(2) 特許出願

国内 4件

国外 1件