

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「生物の発生・分化・再生」

研究課題

「発生における器官・形態形成と細胞分化の分子機構」

研究終了報告書

研究期間 平成12年11月～平成17年10月

研究代表者：松本 邦弘

(名古屋大学大学院理学研究科、教授)

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、器官・形態形成の過程には、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・神経系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、高等脊椎動物における器官・形態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。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・神経系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・神経系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、我々が独自に開発した分子遺伝学的手法により哺乳動物の新規 MAPK カスケードのシグナル伝達因子 TAK1 MAPKKK を発見し、TGF- β シグナル伝達経路で機能することを明らかにしてきた。さらに、線虫と哺乳類動物細胞において、TAK1 は MAPK 様因子 NLK とカスケードを構成し、Wnt シグナル伝達経路と連関しながら発生・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。本研究では、これらの成果をさらに発展させ、発生過程における TAK1 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機能解析を行い、発生・分化・神経系を制御する分子ネットワークの解明を目指した。以上の研究推進のために、マウス、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、及び線虫を材料とした分子遺伝学、分子生物学並びに生化学を専門とする研究者チームを組織した。

(I) TAK1 カスケードが制御するシグナル伝達ネットワーク

本研究開始以前に、TAK1 MAPKKK が発生過程における形態形成に関与する複数のシグナル伝達経路で重要な働きをしていることを明らかにしてきた。しかしながら、TAK1 がどのような機構で活性化されるか？ TAK1 のターゲットは何か？等の問題点が未解決であった。また、これまでの研

究では、線虫及びアフリカツメガエルをモデル動物として TAK1 が実際の形態形成に果たす役割の同定を行ってきたが、哺乳動物における個体レベルでの解析が進んでいなかった。そこで、本研究では Wnt と TGF- β 経路における TAK1 経路の解明と、組織特異的 TAK1 欠損マウスを作成し TAK1 の哺乳動物における形態形成での役割を同定することを目指した。

本研究における5年間の研究成果によって、まず Wnt 経路を制御する TAK1-NLK 経路について不明であった部分を明らかにすることに成功した。TAK1-NLK 経路は、Wnt ファミリーの中で Wnt1 とは別のグループに属する Wnt5A によって誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇が Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) を活性化し、この CaMKII によって TAK1 が活性化されることを発見した。さらに、核内に存在するキナーゼ HIPK2 が TAK1 と NLK の間で働くことを見出した。また、NLK の下流では、Wnt1 によって活性化される転写因子 TCF が NLK によって直接リン酸化され、転写活性が抑制されることを明らかにした。ここに、Wnt5A Ca^{2+} CaMKII TAK1 HIPK2 NLK TCF 経路を完成させた。TGF- β 経路において不明であった TAK1 のターゲットを同定することに成功した。TGF- β によって活性化された TAK1 は核に蓄積し、TGF- β 経路の転写抑制因子 SnoN をリン酸化し、このリン酸化が SnoN を分解に導くことを見出した。さらに、哺乳動物の個体レベルでの TAK1 の役割を同定する目的で、組織特異的 TAK1 欠損マウスを作成した。標的組織として、TGF- β 及び炎症性サイトカインの IL-1 と TNF がその形態形成、恒常性において必須の役割を果たしている皮膚を選び、皮膚特異的 TAK1 の欠損マウスを作成した。その結果、TAK1 の欠損によって、皮膚ケラチノサイトの細胞死が引き起こされることを見出した。この結果は、TAK1 が哺乳動物の皮膚表皮の細胞生存に必須の働きをしていることを始めて示すものである。

(II) 新規シグナル伝達因子群の同定と発生・分化・神経系を制御する分子ネットワーク

(1) アフリカツメガエルをモデル動物とした神経系・形態形成を制御するシグナル伝達機構

アフリカツメガエルは胚操作の簡便さ、材料となる初期胚を大量に入手可能な事などから、スクリーニングに適したモデル動物である。特に、*in vitro* で神経形成の誘導が可能なこと、及び初期体軸形成を異所的に完全に再現できることから、これらの発生過程で機能する因子群の同定に優れたメリットを持っている。さらに、初期胚を用いた whole-mount *in situ* hybridization やアニマルキャップアッセイを用いた RT-PCR から、マイクロアレイで得られた大量の遺伝子群の中から、重要な因子の同定が比較的簡単に行える。本研究では、このメリットに着目しマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子探索とその機能解析を行った。その結果、神経形成過程に関与する候補因子群と Wnt シグナルの下流で初期体軸形成に関与する因子群の同定に成功した。

神経形成過程に関与する新規因子の一つとして、XRassf6 を同定した。XRassf6 は、Ras 結合ドメイ

ンを持つタンパク質で、神経胚期に anterior-neural ridge (ANR) と呼ばれる領域で特異的に発現がみられる。ANR は初期前脳の分化に重要なオーガナイザーセンターとして働き、この活性には FGF8-ERK MAPK 経路が重要な役割を果たしていることが知られている。本研究の解析から、XRassf6 は ANR において ERK 経路を制御することで、前脳の分化に機能している可能性が示唆された。また、ショウジョウバエ Grainyhead のホモログ XGrhl3 が、神経組織と拮抗的に形成される表皮組織の誘導に重要である事が明らかとなった。XGrhl3 が BMP シグナルの下流で表皮形成に機能するとともに、Wnt シグナルを抑制することで神経形成を負に制御することを見出した。一方、Wnt シグナルの下流で体軸形成に関与する因子として Pinhead を同定した。Pinhead は腹側中胚葉及び神経管で特異的に発現がみられ、これらの発現は Wnt シグナルに依存していた。Pinhead の作用機構を明らかにする目的で、酵母 Two-hybrid 法スクリーニングを行ったところ、BMP シグナル経路の負の制御因子 Smad6 が同定できた。アフリカツメガエル初期胚を用いた解析から、Pinhead は腹側中胚葉において Wnt シグナル依存的に発現が誘導され、Smad6 と相互作用することで BMP シグナルを正に制御していると考えられる。さらに、体軸形成に重要なシュペーマンオーガナイザーの形成に、ERK MAPK 経路が必要であることが明らかとなった。ERK は原腸胚期オーガナイザーの形成される背側領域で持続的な活性化がみられるが、腹側領域では ERK 経路のネガティブフィードバック因子 Sprouty が ERK の活性化を抑制していることがわかった。この Sprouty による ERK の活性化制御は中胚葉形成に必須な Nodal シグナルの下流で行われており、背腹軸形成、特にオーガナイザーの形成に新たな分子機構の存在が明らかになった。

(2) ゼブラフィッシュでの Notch シグナルと Wnt シグナルを制御する新規因子の役割

発生過程で重要なシグナル伝達経路の一つに、Notch シグナル伝達経路が上げられる。Notch は受容体であり、リガンドとの結合でその細胞内ドメインが切り離され核内へ移行する。核内移行した Notch 細胞内領域は DNA 結合タンパク質 CSL と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。これまでに Notch-CSL 複合体の活性を制御する因子が複数見ついているが、時期、場所などの特異的制御機構や個体レベルでの機能については不明な点が多い。また、Notch シグナルの標的遺伝子の中に、他のシグナル伝達経路の調節を受けているものがあることが知られている。本研究では、これまでに Notch シグナルを負に制御していることが知られていたが、その生体内での機能が分かっていなかった Nrarp (Notch-regulated ankyrin repeat protein) について、ゼブラフィッシュをモデル動物として機能解析を行った。ゼブラフィッシュは大規模突然変異体の作成やその胚の観察の容易さなどから、発生の分野で特によく利用されている。また、アンチセンスモルフォリノを受精卵に注入することで、特定の遺伝子の機能阻害を個体レベルで容易に行うことが出来る。

Nrarp では突然変異体が報告されておらず、ゼブラフィッシュではホモログが 2 種類存在するため、アンチセンスモルフォリノによる機能阻害を行うことで Nrarp の個体発生における役割を明らかにすることとした。実際に、Nrarp の機能をゼブラフィッシュ胚で阻害したところ、これまでに報告されていた Notch シグナル系への関与と考えられる表現型に加えて、神経冠細胞由来の組織に異常が認められた。神経冠細胞の発生にはさまざまなシグナル伝達経路の関与が知られているが、中でも Wnt シグナルの関与が重要であることが知られている。そこで、Nrarp が生体内では Notch シグナルを制御すると共に、Wnt シグナルを調節しているのではないかと考え、Nrarp による Wnt シグナル調節機能の解析を新たな目標として研究を進めた。そのための実験計画として Wnt シグナルの活性化状態を個体レベルで観察するための Wnt レポータートランスジェニックフィッシュラインを用いた解析法や、Wnt シグナルでの Nrarp の標的遺伝子の探索を加えた。その新たな計画に沿って実験を行った結果、Nrarp は Notch 以外にも Wnt シグナル伝達経路の転写因子である LEF1 と結合し、LEF1 タンパク質を安定化することが分かった。この LEF1 タンパク質の安定化によって、Nrarp は Wnt シグナルを正に制御し、神経冠細胞の発生に必須の役割を果たすと考えられる。

(3) 線虫をモデル動物とした MAPK カスケードによる 発生・神経系の制御機構

MAPKカスケードは、さまざまな生命現象を制御していることが知られている。本研究では、線虫 *C. elegans* をモデル動物として、MAPKカスケードの構成因子群と発生・分化・神経系との関係を探索すると同時に、それらの因子群の個体レベルでの役割を明らかにすることを目指した。

神経細胞は、軸索と樹状突起という異なる極性を持った領域を持ち、それぞれ特異的なタンパク質を局在化させることにより機能している。線虫をモデル動物として、この神経細胞の極性制御に JNK MAPK カスケードが関与することを明らかにした。シナプス小胞は軸索特異的に局在し、樹状突起には局在化しないように制御されている。線虫のシナプス小胞マーカーであるシナプトブレビンを用いて、シナプス小胞の局在が異常になる変異体の分離を行った。その結果、JNK-1、JKK-1、UNC-16 の変異体が得られ、JNK-1 は JNK 型 MAPK、JKK-1 は JNK-1 の上流で働く MAPKK、UNC-16 は哺乳動物の JNK カスケードの足場タンパク質 JIP3 のホモログであった。このように、JKK-1 (MAPKK) JNK-1 (MAPK) カスケードが足場タンパク質 UNC-16 とともに、シナプス小胞の発生依存的な局在制御に関与することが明らかになった。さらに、シナプス小胞の局在を制御する JKK-1

JNK-1 カスケードにおいて、JKK-1 の上流で機能する MAPKKK の同定を試みる過程で、新規 MAPKKK 様因子 LRK-1 を分離した。LRK-1 欠損変異体は、化学感覚神経においてシナプス小胞が軸索だけでなく樹状突起末端にも局在するという異常を示した。シナプス小胞はキネシンモーター UNC-104 によって軸索に輸送され、その局在にはクラスリンを介した細胞膜からのエンドサイトー

シスが関与している。LRK-1 欠損変異体で見られるシナプス小胞の異常は、UNC-104 には非依存的であるのに対し、樹状突起特異的なタンパク質の局在に関わるクラスリンアダプタータンパク質 UNC-101 には依存していた。これより、LRK-1 変異体ではシナプス小胞が誤って樹状突起への輸送経路に選別されていると考えられる。すなわち、LRK-1 は軸索と樹状突起に特異的に局在するタンパク質の極性的な選別輸送機構を制御していると考えられる。最近、LRK-1 がパーキンソン病の原因遺伝子の一つ PARK8 のホモログであることが判明した。ここに、線虫をモデル動物とした LRK-1 による神経系のシグナル伝達制御機構の解明から、パーキンソン病モデル系への展開が可能となった。哺乳動物において JNK カスケードの足場タンパク質として、JIP3の他に JIP1 が存在する。JIP1 の作用機構を明らかにする目的で、JIP1 の線虫ホモログ JIP-1 の周辺因子の探索を行った。JIP-1 と結合する因子として、ヒト家族性アルツハイマー病原因遺伝子 APP(アミロイドβ前駆体タンパク質)の線虫ホモログ APL-1 を同定した。APL-1 は哺乳類 APP 同様、主に神経で発現していること、APL-1 遺伝子をノックアウトした線虫は致死となること、APL-1 の細胞質ドメインを線虫の神経で発現させると神経機能が抑制されることを見出した。JIP-1 欠損変異体では、神経において APL-1 タンパク質量が増加すること、JIP-1 と結合できない変異型 APL-1 においてもタンパク質量が増加していた。これらのことから、JIP-1 が APL-1 の細胞質ドメインに結合し APL-1 タンパク質量を負に制御することが示唆された。さらに、JIP-1 と結合する因子としてキネシンと 26S プロテアソームの構成因子を同定し、キネシン欠損変異体においても APL-1 タンパク質量の増加が見られた。以上の結果より、神経細胞において JIP-1-キネシン複合体が APL-1 の細胞質ドメインを介し、26S プロテアソーム依存的に APL-1 タンパク質量を負に制御すると考えられる。今後、線虫の APL-1 と JIP-1 との解析から、哺乳動物の APP のモデル系構築が可能である。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

高等脊椎動物の個体構築は、細胞の DNA 上に書き込まれた形づくりの設計図に基づき、さまざまなシグナル分子が時間的・空間的に細胞応答を誘導することにより成立する。発生・分化・神経系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、高等脊椎動物における個体構築機構を明らかにする上で重要な研究課題である。我々は新規 MAPK カスケードの一員 TAK1 の発見・解析から、TAK1 カスケードが制御する発生・分化のシグナル伝達経路を解明し、新たな研究領

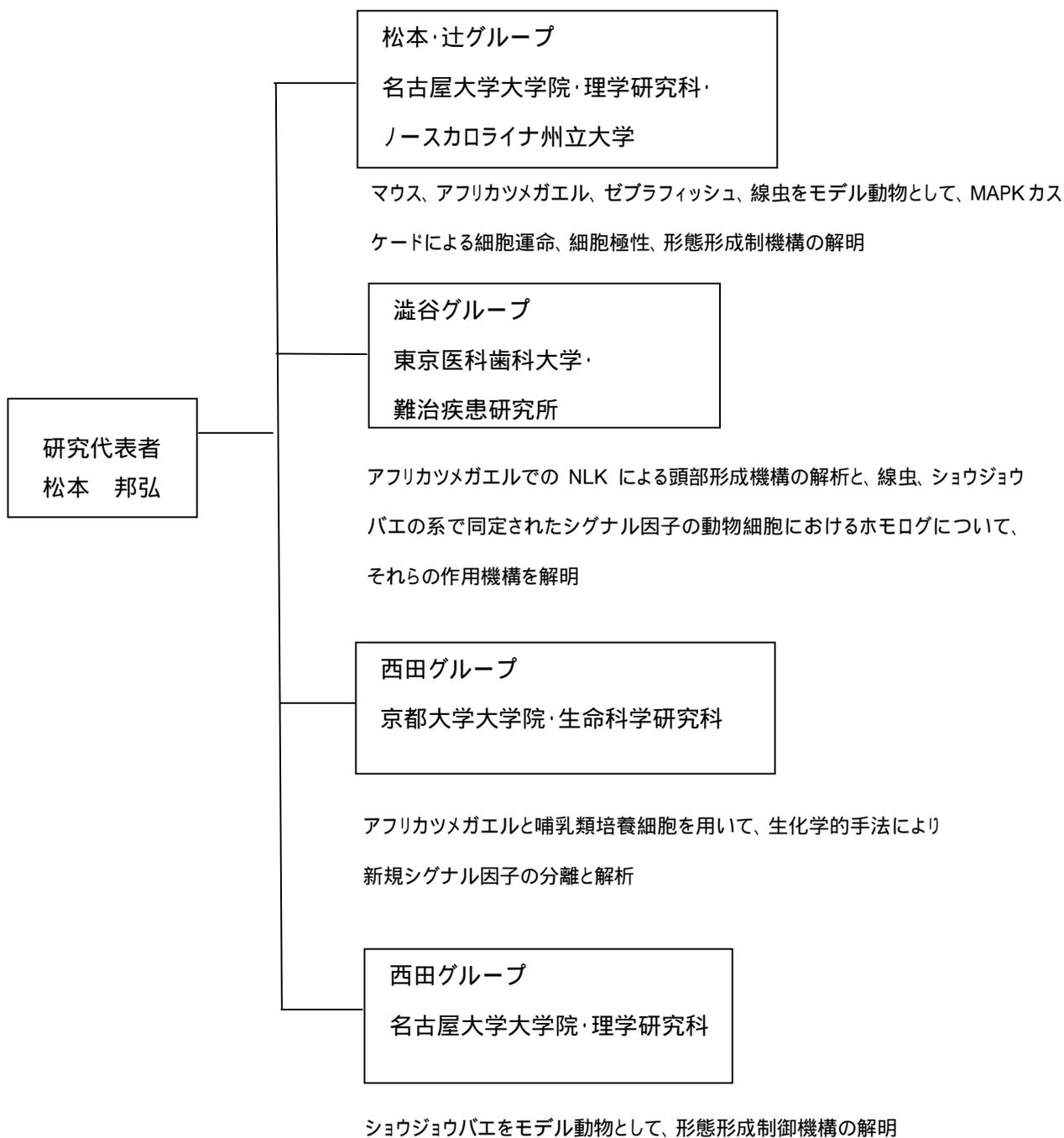
域を創出してきた。これらの成果をさらに発展させ、TAK1 シグナル伝達経路の全容解明と発生・分化における役割の解明を主目的として、さらに新たなシグナル伝達分子群の発見から発生・分化・神経系を制御する分子ネットワークの解明を目指して、以下に示す目標で本研究を開始した。

(I) TAK1 を中心として、そのシグナル伝達経路の上流及び下流のシグナル伝達因子群を同定し、TAK1 カスケードの全体像を明らかにする。さらに、マウスをモデル動物として、個体レベルにおけるTAK1 の機能を解明する。

(II) 高等脊椎動物(アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ)、高等無脊椎動物(ショウジョウバエ)、及び線虫を用いて、新規シグナル伝達因子群の同定と機能解析を行い、発生・分化・神経系の分子機構ネットワークの解明を目指す。

上記の研究に加え、線虫をモデル動物として、個体レベルにおける発生・分化・神経系を制御するp38型、JNK型MAPKシグナル伝達経路の解明を目指した。本研究で、線虫のMAPKKK、MAPKK、MAPKのノックアウト線虫の作製を完了し、それらのphenotypeの共通性からカスケードを完成した。このように、世界に先駆けてMAPKカスケードネットワークを個体レベルで解析できるシステムが準備できたことになる。さらに、5年間の研究での新たな展開として、線虫のMAPKシグナル伝達経路の研究過程で同定した新規シグナル伝達因子の中に、アルツハイマー病、パーキンソン病、遺伝性高血圧症などのヒト遺伝性疾患の原因遺伝子が見い出されてきたことである。今後は遺伝性疾患原因関連因子に焦点を合わせ、これらの因子群による発生・分化・神経系のシグナル伝達制御機構を明らかにし、これを基盤とした遺伝性疾患のモデル系構築を目指したい。この研究により、発生・分化・神経系を制御するシグナル伝達ネットワークの解明と、遺伝性疾患の分子メカニズムの根幹が明らかとなることが期待される。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 松本・辻研究グループ(名古屋大学大学院・理学研究科・ノースカロライナ州立大学)

(1) 研究実施内容及び成果

(I) TAK1 カスケードが制御するシグナル伝達ネットワーク

本研究開始以前の研究において、TAK1 MAPKKKが発生過程における形態形成に関与する複数のシグナル伝達経路で重要な働きをしていることを明らかにしてきた(図1)。まず、TAK1が背腹軸の決定を始め形態形成のいくつかの段階で働くTGF- β シグナル伝達経路で働くことを見出した。この経路において、TAK1はアダプター分子として働くタンパク質XIAPとTAK1の活性化サブユニットであるTAB1を介して活性化されることを明らかにした。さらに、TAK1がWntによる発生過程の細胞運命決定に関与することを、線虫をモデル動物とした研究から発見した。後に、アフリカツメガエル及び哺乳動物においても、TAK1がWnt1のシグナル伝達を制御することを見出した。この経路において、TAK1はMAPK様のキナーゼNLKを介してWnt1の転写因子であるTCF/LEFを修飾することを示した。また、TAK1が炎症性サイトカインのシグナル伝達経路で必須の役割を果たすことを明らかにした。炎症性サイトカインは生体防衛に働く免疫系の活性化に働くが、同時に発生過程の細胞分化やプログラム細胞死に必須の働きをしていることが知られている。炎症性サイトカインであるIL-1及びTNFシグナル経路において、TAK1はMAPKKKとしてJNK MAPKを活性化すること、転写因子NF- κ Bの活性化に働くI κ B kinase (IKK)も活性化することを明らかにした。

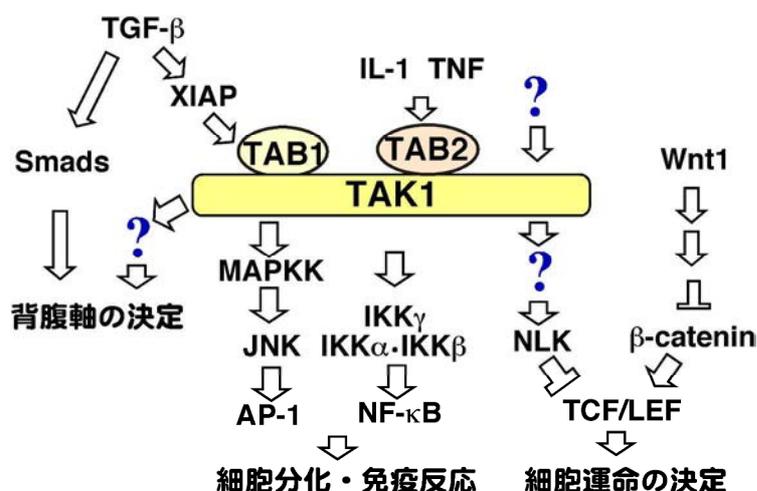


図1 TAK1のかかわるシグナル伝達経路

これらの研究結果は、TAK1が形態形成にかかわる複数のシグナル伝達経路において重要な働き

をしていることを示唆している。しかしながら、図1に示すように、TAK1がどのような機構で活性化されるか？ TAK1のターゲットは何か？ 等について明らかになっていなかった。また、これまでの研究では、線虫及びアフリカツメガエルをモデル動物としてTAK1が実際の形態形成に果たす役割の同定を行ってきた。しかしながら、哺乳動物におけるTAK1の個体レベルでの解析は進んでいなかった。そこで、本研究では、1) Wntシグナルを制御する新規のTAK1シグナル伝達経路の解明；2) TGF- β シグナル伝達経路におけるTAK1の役割の解明；3) マウスをモデル動物として、TAK1の形態形成の細胞運命決定における役割を組織特異的TAK1欠損動物を作ることによって解明していくこと；4) さらに、今後のTAK1研究の有効なツールを得る目的で、低分子のTAK1阻害剤の開発を目標とした。

1) Wnt1 シグナルを制御する新規の TAK1 シグナル伝達経路の解明

これまでの研究成果によって、TAK1とその下流で働くキナーゼNLKがWnt1 β -catenin TCF/LEF (転写因子) を負に制御することが明らかになっていた(図2)。しかし、i) TAK1がどのようなシグナルによって活性化されるか？ ; ii) TAK1がどのようにNLKを活性化するか？ ; また iii) NLKがWnt1の転写因子TCF/LEFをどのように制御するのか？、については明らかになっていなかった。本研究において、これらの問題点を明らかにするため以下に述べる研究を実施し、新規のシグナル伝達機構を解明することに成功した。

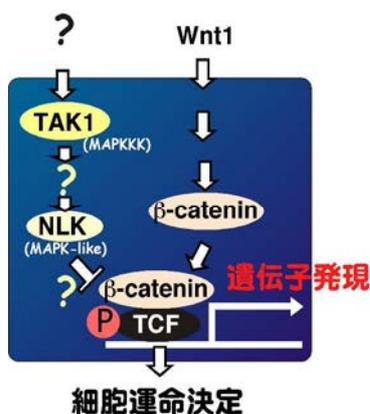


図2 Wnt1 を制御する経路

i) TAK1 はどのようなシグナルによって活性化されるか？

Wnt1シグナルと相反する働きをする因子として、Wntファミリーの一員であるWnt5Aが報告されていた。Wnt5Aは細胞内カルシウム濃度を上昇させ、Ca²⁺依存性プロテインキナーゼII (CaMKII) を活性化することが報告されている。そこで、Wnt5A Ca²⁺ CaMKIIがTAK1の上流で働く可能性を考え、まずTAK1とCaMKIIの関係を検討した。その結果、TAK1とCaMKIIは結合し、TAK1とNLKを活性化できることを見出した。また、Wnt5AがCaMKIIを介してTAK1を活性化することも見出した。さらに、実際のアフリカツメガエルの発生過程において、Wnt5Aと活性化型CaMKIIがTAK1と同様に β -catenin

による2次軸形成を阻害することが明らかになった(図3)。従って、TAK1-NLK経路は、Wnt5A Ca²⁺ CaMKIIによって活性化されていることが示された(図4)。

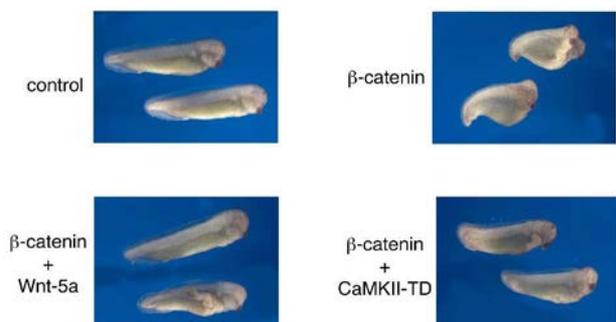


図3 アフリカツメガエルの発生における Wnt5A と CaMKII の効果
CaMKII-TD:活性化型 CaMKII

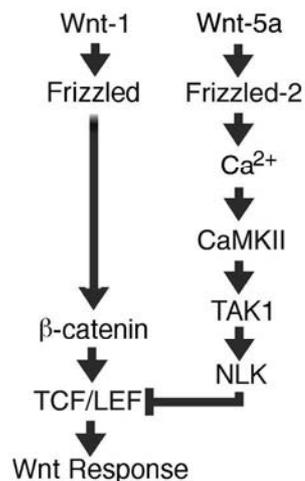


図4 Wnt1とWnt5Aシグナル伝達経路

ii) TAK1 はどのように NLK を活性化するか？

TAK1-NLK経路の研究の過程で、NLKはリン酸化によって活性化されるにもかかわらず、TAK1がNLKを直接リン酸化できないことが明らかになった。このことは、TAK1とNLKの間で別のキナーゼが働く可能性を示唆する。そこで、NLKに結合するタンパク質を酵母のTwo-hybrid システムを用いて検索した。その結果、NLK結合タンパク質として、核に局在するキナーゼで遺伝子発現の調節に関与していることが知られるHIPK2を同定した。TAK1、HIPK2、及びNLKの関係を細胞内で検討したところ、HIPK2はTAK1によってリン酸化され、活性化されたHIPK2はNLKをリン酸化し活性化することが明らかになった(図5)。従って、TAK1

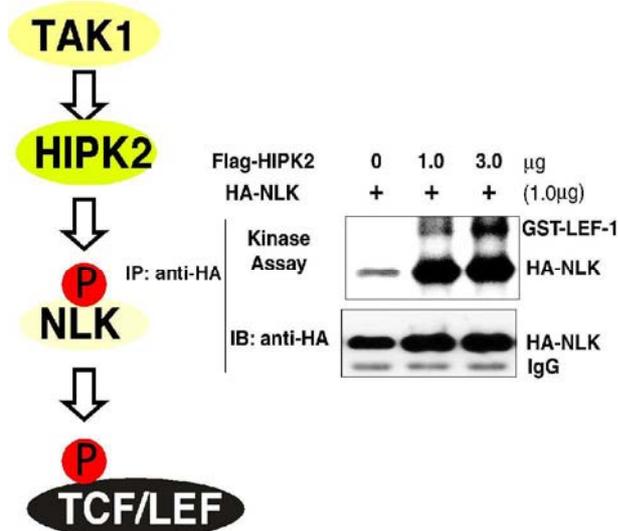


図5 TAK HIPK2 NLKシグナル伝達経路

HIPK2 NLKキナーゼカスケードがWntのシグナル伝達を制御すると考えられる。

iii) NLK は Wnt1 の転写因子 TCF/LEF をどのように制御するのか？

TAK1-NLK経路の最終的標的であるTCF/LEFが、どのような機構で負に制御されているのかを検討した。これまでに、NLKがTCF/LEFを直接リン酸化することがわかっていたが、その詳しい制御機構は不明であった。そこで、TCF/LEFのNLKによるリン酸化部位の同定を試みた結果、TCF4の178番目と189番目のスレオニン残基、及びそれに対応するLEFのスレオニン/セリン残基がNLKによってリン酸化されることを見出した。また、NLKは直接TCF/LEFに結合し、NLK-TCF/LEF- β -catenin複合体を形成し、TCF- β -catenin複合体のDNA結合活性を阻害することが明らかになった。さらに、

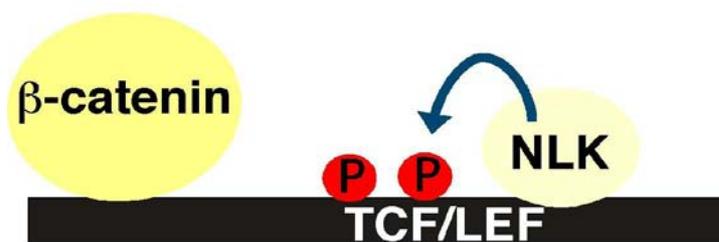


図6 NLKはTCF/LEFをリン酸化し制御する

TCF/LEFのリン酸化部位をリン酸化されないアミノ酸バリンに置換すると、変異型TCF/LEFは β -catenin及びNLKとの結合は阻害されないものの、NLKによるTCF/LEF- β -cateninのDNAへの結合阻害が起こらなくなることを見出した。従って、NLKはTCF/LEFの2つのアミノ酸残基をリン酸化し、それによってTCF/LEF- β -catenin複合体がDNAから解離し、転写活性化を阻害すると考えられる(図6)。

2) TGF- β シグナル伝達経路におけるTAK1 MAPKKKの役割の解明

これまでの研究成果から、TAK1はTGF- β によって活性化されること、TGF- β ファミリーであるBMPによる体軸形成の過程に必須の働きをすることが明らかになっていた。しかしながら、TAK1のターゲットが何であるかは不明であった。そこで、本研究ではTGF- β シグナル伝達経路におけるTAK1の標的分子を同定し、TAK1の役割を明らかにすることを目指した。

TAK1と結合するタンパク質を、酵母のTwo-hybridシステムを用いて検索した。その結果、癌遺伝子産物でTGF- β による遺伝子発現制御に関わるタンパク質SnoNを、TAK1結合因子として新たに見出した。SnoNはTGF- β シグナル伝達に働く転写活性化因子Smadと細胞核内で結合し、その転写活性化能を阻害することが知られている。すなわち、SnoNはTGF- β の刺激がない時にSmadの基礎活性を阻害する役割をしている。また、細胞がTGF- β 刺激を受けると、Smadが活性化されると同時にSnoNが分解されることが知られていた。しかし、TGF- β によるSnoNの分解の機構はほとんどわかっていなかった。そこで、TGF- β によって活性化されたTAK1は、SnoNをリン酸化し、そのリン酸化によってSnoN分解が誘導され、その結果TGF- β による遺伝子発現を促進する働きをするという仮説を構築

した。この仮説を検証するため、まずTAK1とSnoNの結合が生理学的条件下で起こっているかを検討した。細胞をTGF- β で処理し、細胞質と細胞核においてTAK1とSnoNの関係を検討した(図7)。その結果、生理学的条件下において、TAK1とSnoNは細胞核内で結合し、TGF- β 刺激によって核内のTAK1の量が増加することが明らかになった。

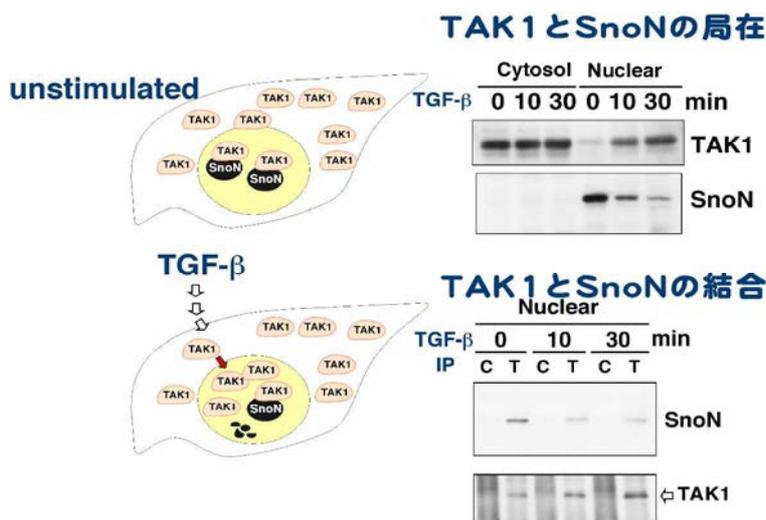


図7 TAK1とSnoNは核で結合する

IP: immunoprecipitation

C: control IgG

T: anti-TAK1

次に、TAK1によるSnoNのリン酸化を検討した結果、TAK1はSnoNの115番目と117番目のセリン残基及び119番目のスレオニン残基をリン酸化することを見出した。また、このリン酸化が起こらないような変異型のSnoNでは、TGF- β による分解が阻害されることが明らかになった(図8)。従って、TAK1はSnoNをリン酸化し分解を誘導する働きをしていると考えられる。そこで、このTAK1-SnoN分解の経路がTGF- β シグナル伝達にどのような役割を果たしているかを検討した。そのために、small RNA interference (siRNA) 法を用いてTAK1の発現を低下させた細胞を作成し、この細胞ではTGF- β によるSnoNの分解が抑制されることを確認した(図9)。次に、この細胞を用いてTGF- β によって発現が上昇するp21遺伝子の発現を検討した。その結果、TAK1はp21の発現に必須の働きをすることが明らかとなった。

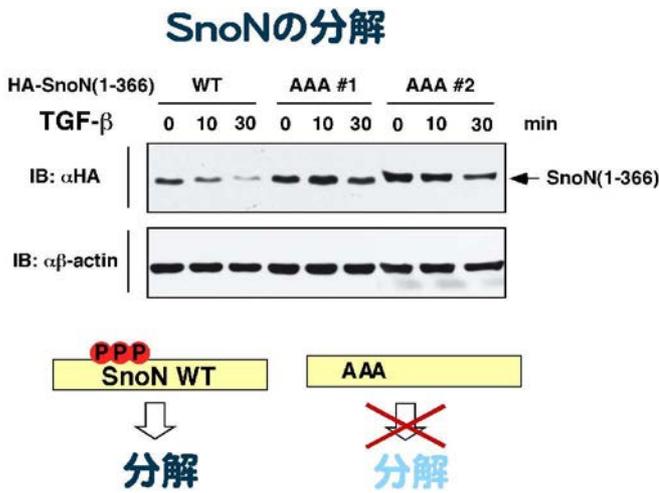


図8 SnoN の分解は TAK1 によるリン酸化を介する
この実験では、N 末端側 366 アミノ酸の SnoN
SnoN(1-366)を用いた。これは、全長の SnoN と同じ
機能を持つ。

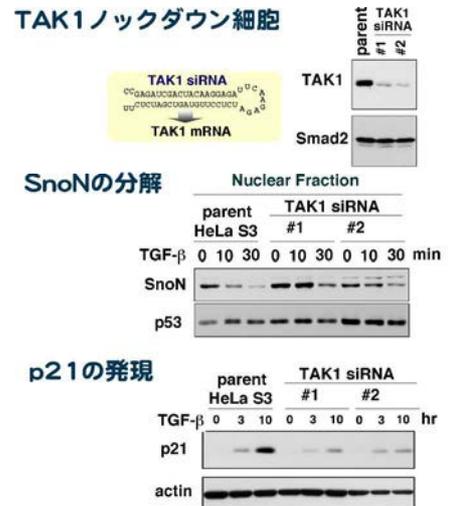


図9 TAK1 は TGF-βによる SnoN の分解と
遺伝子発現に必須である。

これらの結果から、TGF-βによって活性化された TAK1 は核内に移行し、SnoN をリン酸化することにより分解を誘導するという新規の TGF-βシグナル伝達経路の存在が明らかになった(図10)。この経路によって SnoN が分解され、転写抑制が解除され Smad による遺伝子発現が促進されると考えられる。

3) マウスをモデル動物とした TAK1 の形態形成の細胞運命決定における役割の解明

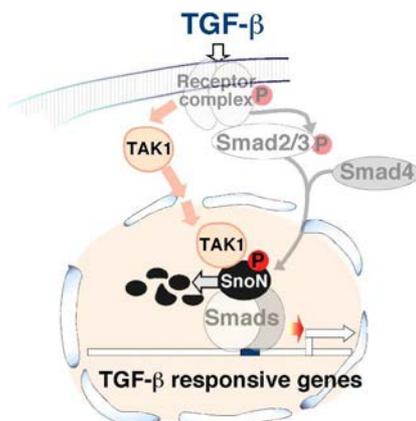


図10 TGF-βシグナル伝達経路における TAK1 の役割

TAK1の欠損マウスは、胚発生の初期に致死となる。このことは、TAK1が発生過程の形態形成に必須の働きをしていることを示唆する。このマウスを解析することが、TAK1の個体レベルでの役割解明に必須であると考えられる。しかし、発生初期の致死性は詳細な解析を非常に困難にする。そこで、

本研究ではCre-loxPシステムを用い組織特異的なTAK1欠損マウスを作成し、それぞれの組織の形態形成及び恒常性におけるTAK1の役割を明らかにしていくことを目指した。さまざまな組織の中で、TGF- β 及び炎症性サイトカインのIL-1、TNFが組織の分化と恒常性に重要な働きをしていることが知られる皮膚を選択した。皮膚表皮特異的に発現するケラチン5のプロモーターで発現するCreを持ったマウスと、loxPサイトを挿入したTAK1遺伝子を持つマウス(大阪大学審良教授より供与)を交配し、皮膚表皮特異的TAK1欠損マウスを作成した(図11)。

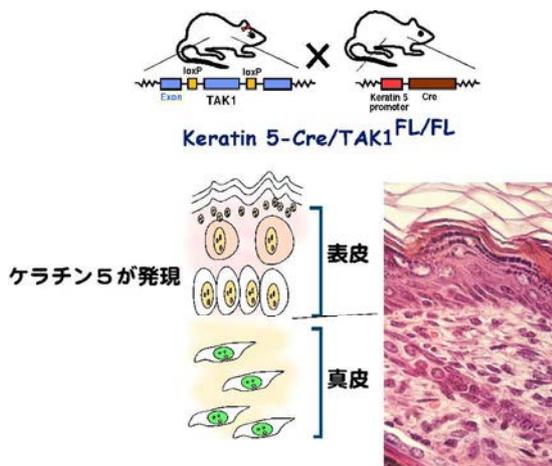


図 11 皮膚表皮特異的 TAK1
ノックアウトマウスの作成

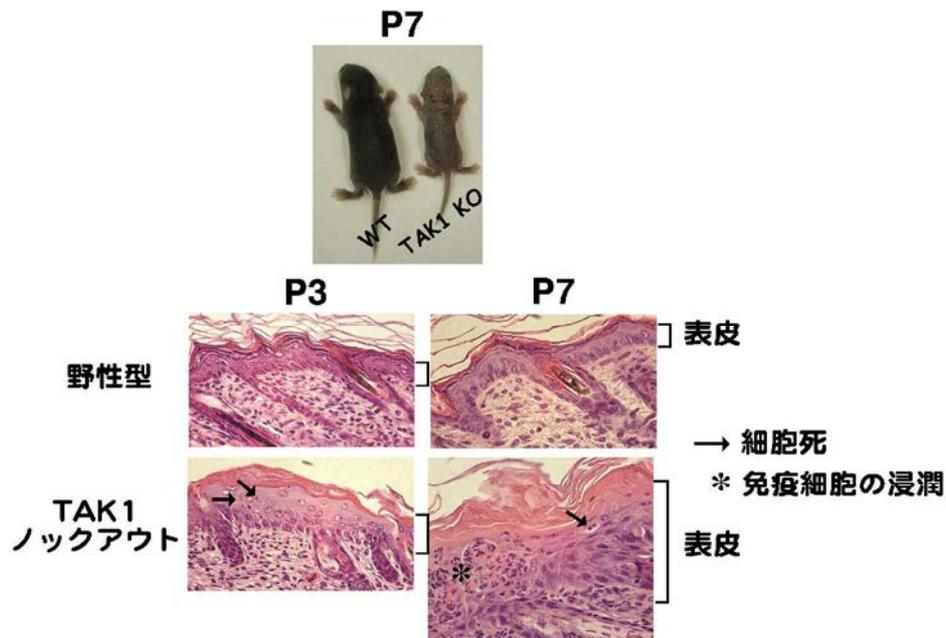


図 12 皮膚表皮特異的 TAK1 ノックアウトマウスの表現型

WT:野性型;TAK1 KO:皮膚表皮特異的 TAK1 欠損

P3:生後 3 日目;P7:生後 7 日目

皮膚表皮特異的TAK1欠損マウスは生まれた時は正常であるが、生後5-8日目に乾癬様の皮膚病を発病した。皮膚の柔軟性が失われ、鱗屑が皮膚全体に発生する(図12)。組織学的に検討すると、皮膚表皮特異的TAK1欠損マウスでは、生後3日目から表皮細胞のいたるところで顕著な細胞のアポトーシス及び細胞壊死が起こり、皮膚損傷の際に起こる典型的な反応(表皮の肥厚化、損傷型のケラチンの発現、ケモカインの産生上昇など)が起こることを見出した。さらに、生後7日目では過激な炎症の典型的特徴である免疫細胞の浸潤が皮膚全体で観察された。これらの結果は、TAK1の欠損により細胞死が誘導され、その結果炎症が引き起こされた可能性を示唆する。そこで、野生型と皮膚表皮特異的TAK1欠損マウスから皮膚表皮の主な構成細胞であるケラチノサイトを単離し、細胞死を引き起こす因子を検索した。その結果、TAK1欠損ケラチノサイトではTNFによって著しい細胞死が引き起こされることを見出した。このような細胞死は、野生型ケラチノサイトでは起こらなかった。TNFは細胞死のシグナルと細胞死を阻害するNF- κ B及びJNK活性化の2つのタイプのシグナル伝達経路を、同時に活性化することが知られている。正常な細胞では、通常この細胞死を阻害するシグナルが働きTNFによる細胞死は観察されない。そこで、野生型とTAK1欠損ケラチノサイトにおいて、NF- κ BとJNKの活性化を検討した。その結果、TAK1欠損ケラチノサイトでは、TNF刺激によってNF- κ B及びJNKの活性化が起こらないことを見出した。従って、皮膚表皮特異的TAK1欠損マウスでは、TNFに反応したケラチノサイトで細胞死阻害シグナルが活性化されないため、壊死/アポトーシスが引き起こされ、これが炎症を引き起こす原因である可能性が考えられる。この可能性を検証するため、TNFレセプター欠損と皮膚表皮特異的TAK1欠損の2重欠損マウスを作製した。2重欠損マウスは、生後5日目でもほぼ正常に発育し、TAK1欠損マウスのような体全体に広がる炎症は見られなかった(図13)。組織学的解析から、皮膚のかなりの部分において



図13 TNFレセプター欠損と皮膚表皮特異的TAK1欠損の2重変異マウス

グナルが働きTNFによる細胞死は観察されない。そこで、野生型とTAK1欠損ケラチノサイトにおいて、NF- κ BとJNKの活性化を検討した。その結果、TAK1欠損ケラチノサイトでは、TNF刺激によってNF- κ B及びJNKの活性化が起こらないことを見出した。従って、皮膚表皮特異的TAK1欠損マウスでは、TNFに反応したケラチノサイトで細胞死阻害シグナルが活性化されないため、壊死/アポトーシスが引き起こされ、これが炎症を引き起こす原因である可能性が考えられる。この可能性を検証するため、TNFレセプター欠損と皮膚表皮特異的TAK1欠損の2重欠損マウスを作製した。2重欠損マウスは、生後5日目でもほぼ正常に発育し、TAK1欠損マウスのような

体全体に広がる炎症は見られなかった(図13)。組織学的解析から、皮膚のかなりの部分において

正常であり、細胞死も観察されないことが確認された。この結果は、TNFによる細胞死が乾癬様の皮膚の炎症の原因であることを示唆する。

以上の皮膚表皮特異的TAK1欠損マウスの解析から、TAK1はケラチノサイトの生存に必須の働きをしていることが始めて示された。皮膚は常に、外界のストレスや病原菌(バクテリア)にさらされている。そのため、皮膚にはさまざまなサイトカインが常に一定量存在し、抗バクテリアペプチド産生等の防衛システムを働かせている。しかし、それらのサイトカインの中には、細胞死シグナルを活性化するTNFファミリーが含まれている。正常な細胞では、TNFファミリーによって細胞死と細胞死阻害のシグナルが同時に活性化され、顕著な細胞死は起こらない。TAK1の欠損は、細胞死阻害のシグナルをシャットアウトし、細胞死が誘導される。この結果、最終的に乾癬に非常に近い特徴を持つ皮膚の炎症が発生すると考えられる。

4) 低分子の TAK1 阻害剤の開発

これまでにキナーゼ活性を阻害することが知られる天然及び合成化合物、さらにそれに類似する化合物から、TAK1を阻害するものを検索した。その結果、5Z-7-oxozeaenolがTAK1に非常に選択的で強力な阻害剤であることを発見した(図14)。5Z-7-oxozeaenolは、精製したTAK1に対してIC50値が8 nMであり、培養細胞の培地に加えた場合は、約100-300 nMでほぼ完全にTAK1の活性を阻害する。

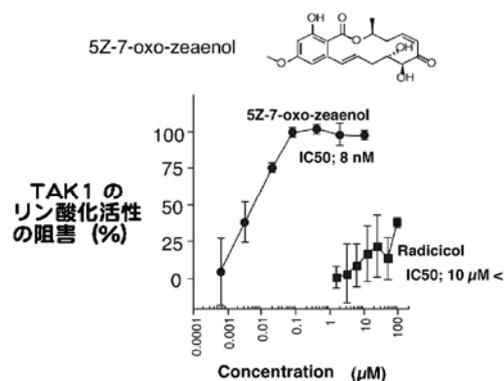


図14 TNF 阻害剤

(II) アフリカツメガエルをモデル動物とした神経系・形態形成を制御するシグナル伝達機構

初期胚では、様々な組織の誘導・分化(三胚葉の形成、オーガナイザーの形成、神経誘導及び中枢神経組織の形成、体節の分化など)が起き、秩序だった個体が形成されていく。本研究では、1) 中枢神経組織の誘導・分化と、2) 初期体軸形成という、二つのイベントに焦点を合わせ、これらの過程で機能する新規因子群の同定と、それらが構成するシグナルネットワーク機構を明らかにする事を目指した。

1) 中枢神経組織の誘導・分化に関する因子群の同定と機能解析

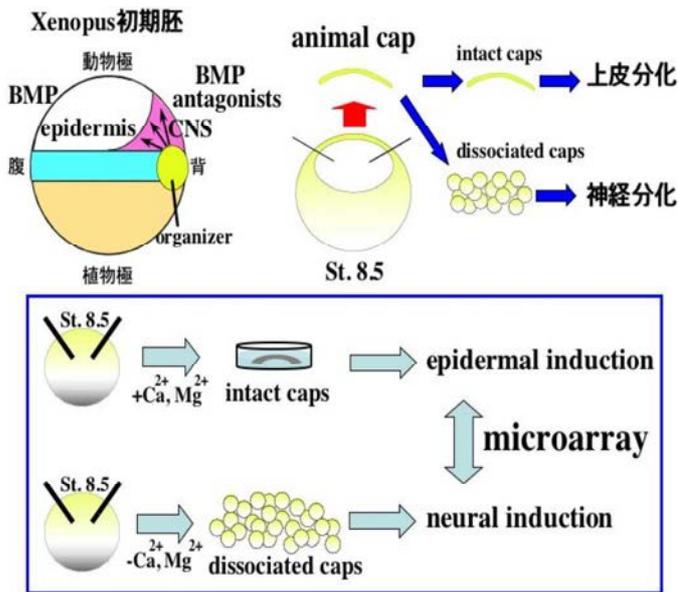


図1 Xenopus 初期胚を用いた神経形成過程に関する遺伝子群の同定

脳を含む中枢神経組織は非常に複雑な構造を持ち、その形成過程には様々なシグナル伝達経路、及び転写因子や構造タンパク質に代表される多数の神経特異的な因子群が機能している。これまでの研究から、神経組織の誘導・分化を制御する分子メカニズム及び因子群は、カエルからヒトまで高度に保存されていることが明らかとなってきている。胎内で胚発生が進行するマウスなどと異なり、アフリカツメガエルは体外で初期胚発生が進行し、胚操作の容易さや材料となる胚を簡便に大量に入手可能

なことなどから、候補因子群のスクリーニング及びそれらの機能解析に非常に適したモデル動物である。そこで、アフリカツメガエル初期胚を用いて神経形成に関する新規因子群の同定及び機能解析を行い、これらの解析を通じて哺乳類高等動物まで保存された中枢神経形成過程を明らかにすることを旨とした。

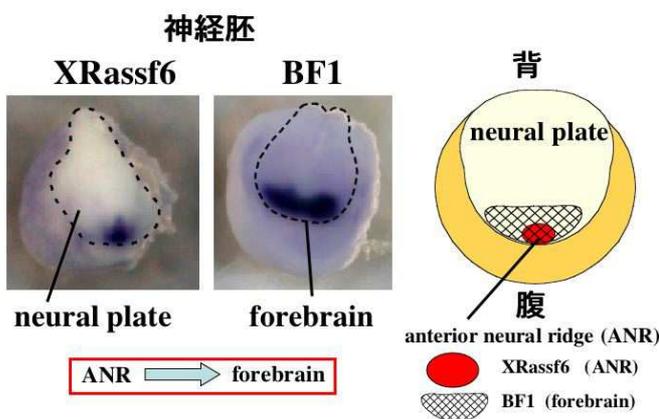


図2 Xrassf6 の発現領域

アフリカツメガエル初期胚外胚葉組織(アニマルキャップと呼ばれる)は様々な組織に分化する多分化能を持ち、カルシウム、マグネシウム非存在下で培養すると神経組織へと細胞自律的に分化する。アニマルキャップのこの性質を利用し、神経誘導及び神経組織形成過程に重要な因子群の同定を、cDNA マイクロアレイを用いて試みた(図1)。

14400 転写産物に対し発現解析を行ったところ、アニマルキャップを神経組織へ分化させることで、約 120 個の遺伝子の発現が顕著に上昇した。さらに候補遺伝子を絞り込むため、同定した

遺伝子群のうち新規のもの(51 個)に対し、(i)実際に神経形成時に発現が誘導されるか？(ii)神経組織で発現がみられるか？を検討した。その結果、興味深い発現様式とタンパク質の構造をもつ因子、ヒト Rassf6 のホモログ XRassf6 を同定した。XRassf6 は Ras 結合ドメインを持つタンパク質で、神経胚期に anterior neural ridge (ANR) とよばれる領域で特異的な発現が見られた(図 2)。ANR は midbrain-hindbrain boundary と呼ばれる領域とともに、初期脳の分化に重要な役割を果たしている。ANR は初期前脳のパターンニングにおいて局所的なオーガナイザーセンターとして機能しており、このオーガナイザー活性には FGF8-ERK MAPK 経路が必須な役割を果たしている事が知られている。XRassf6 に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)を用いて、内在性 XRassf6 タンパク質の knockdown を試みたところ、頭部構造が欠損した表現型が見られた。Whole-mount in situ hybridization を用いて初期脳の分化を検討したところ、前脳特異的に発現する遺伝子 BF1 の発現が顕著に減少していた。このことから、XRassf6 が前脳の分化に重要である事がわかる。また、XRassf6 は Ras 結合ドメインを持つ事から、ANR において ERK 経路の活性化を制御している可能性が考えられる。事実、XRassf6 は ERK の活性化を正に制御していることが確認された。以上の結果から、XRassf6 は ERK MAPK 経路を制御することで、前脳の分化に必須な役割を果たしていると考えられる。脳は非常に複雑な構造と機能を持つ中枢神経組織である。脳が正しく形成されるためには、その形成過程に様々な局所的オーガナイザーセンターが働き、周囲の細胞の分化を誘導することが重要である。ANR における XRassf6 の機能など、局所的オーガナイザーセンターで機能する因子の解析は、脳形成を理解する上で非常に重要な課題である。

次に、外胚葉の分化を制御する因子としてアフリカツメガエル Grainyhead-like 3(XGrhl3)を同定した。XGrhl3はアフリカツメガエル初期胚予定表皮領域に特異的に発現し、神経胚期には神経板の前方に発現がみられる(図3)。外胚葉が表皮と神経に分化する際、BMPシグナルは表皮組織誘導

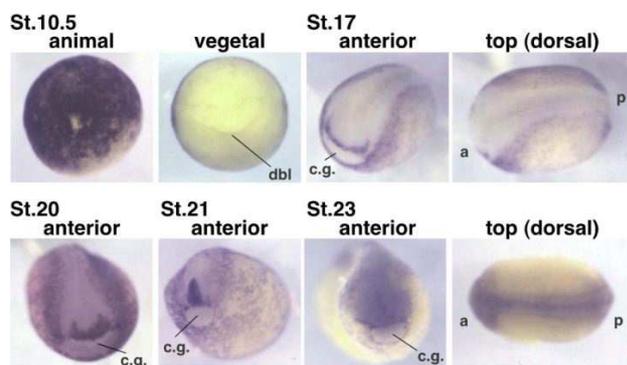


図3 XGrhl3の発現領域

因子として働く。これに対し、神経組織が誘導される領域では、ChordinなどBMPアンタゴニストが発現しBMPシグナルを阻害している。このように、神経誘導にはBMPシグナルの阻害が必須であることが知られている。アフリカツメガエル初期胚における優勢不能型XGrhl3やXGrhl3-MOを用いた解析から、XGrhl3はBMPシグナルの下流で機能し、表皮形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなっ

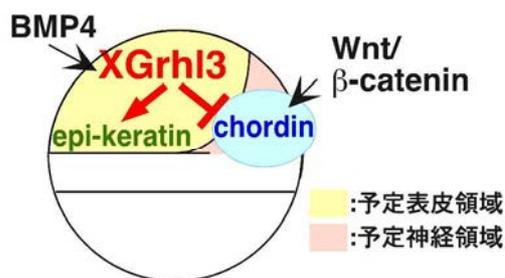


図4 XGrhl3による外胚葉分化の制御

た。さらに興味深いことに、XGrhl3がWntシグナルを阻害する活性を持つことを見出した。XGrhl3はWntシグナルによる二次軸形成を阻害する一方、内在性XGrhl3をknockdownした胚では異所的なChordinの発現上昇が見られた。外胚葉予定神経領域におけるChordinの発現はWntシグナルに依存しており、XGrhl3はWntシグナルを阻害することでChordinの発現が予定表皮領域に広がることを防いでいると考え

られる(図4)。アフリカツメガエル初期胚外胚葉は、表皮と神経という二つの組織に分化する。この過程にはBMPシグナルやWntシグナル、FGFシグナルなどいくつかのシグナルがクロストークしながら働いていると考えられる。表皮形成に重要なXGrhl3と、スクリーニングで同定された神経形成に関与する因子群とを有機的に関連付けながら解析することで、神経形成過程のシグナルネットワークが明らかになることが期待される。

2) 初期体軸形成に関与する因子群の同定と機能解析

アフリカツメガエルにおいて、初期体軸形成は将来シュペーマンオーガナイザーが形成される背側領域へのβ-catenin(Wntシグナル経路の転写因子)の局在により開始される。これまでの研究から、アフリカツメガエル初期胚腹側領域にWnt8 mRNAを微量注入すると、頭部を含む完全な二次軸が形成されることが明らかとなっている(図5A)。このように、アフリカツメガエル初期胚は完全な初期体軸形成を異所的に再現させることが可能である。そこで、Wnt8 mRNAを微量注入した胚とコントロール胚とからcDNAプールを作製しサブトラクティブスクリーニングを行う事で、初期体軸形成、特にWntシグナル下流で機能する因子群の同定を試みた(図5B)。その結果、Wntシグナル依存的に発現が誘導される因子として、Pinheadを同定した。Pinheadは原腸胚期に腹側中胚葉で、神経胚期に神経管で特異的な発現が見られた。また、Pinheadの発現はβ-cateninをknockdownすることで消失したことから、Wntシグナルに依存していると考えられる(図6)。Pinhead-MOにより内在性Pinheadタンパク質をknockdownすると、頭部が尖った表現型が得られる。また、腹側中胚葉においてPinheadをknockdownすると、一部の腹側中胚葉遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。このことから、Pinheadは腹側中胚葉の形成に重要な働きをしていると考えられる。Pinheadの作用機構を明らかにするため、酵母Two-hybridスクリーニング法を用いて相互作用する因子の探索

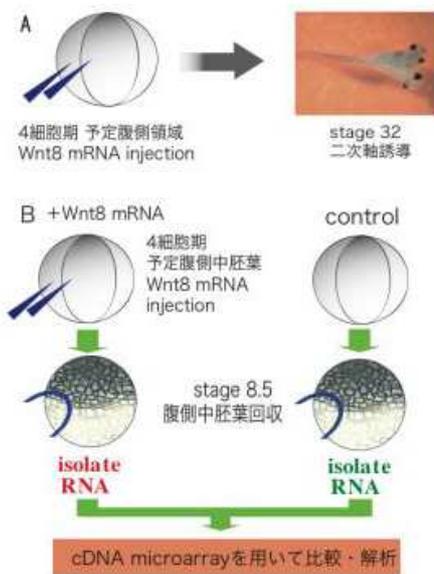


図5 Wntシグナル下流で体軸形成に関与する因子群の同定

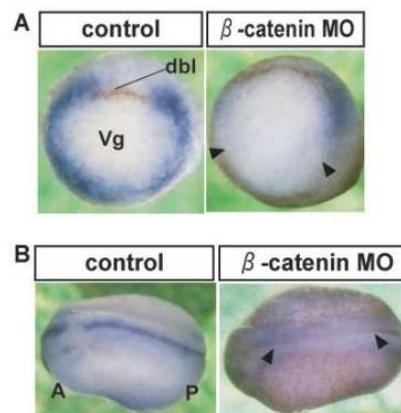


図6 PinheadはWnt- β -catenin依存的に発現している

を行った。その結果、BMPシグナルの阻害因子 Smad6 が Pinhead と相互作用することが明らかになった。BMPシグナルは、細胞内伝達因子 Smad1 や Smad5 がレセプターによってリン酸化され、Smad4 とヘテロダイマーを形成することで核へ移行しシグナルが伝達される。Smad6 は BMP レセプターと結合することでレセプターによる Smad1、Smad5 のリン酸化を阻害し、BMPシグナルを抑制することが知られている。事実、Pinhead は Smad6 と結合する事で Smad6 の活性を阻害し、結果として BMP シグナルを促進していることが確認された。腹側中胚葉の形成には、Wntシグナルとともに BMPシグナルが重要である事が知られている。Pinhead は Wnt シグナル依存的に発現が誘導され、Smad6 による BMPシグナル阻害を抑制することで BMPシグナルを促進し、腹側中胚葉形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

体軸の形成は、初期 Wnt シグナルによる背腹軸の決定後、胞胚期から原腸胚期にかけて、スーパーマンオーガナイザーによる分化誘導が重要な役割を担っている。初期胚における ERK MAPK 経路の機能解析を通じ、ERK の持続的な活性化がオーガナイザー遺伝子の発現に重要である事を見出した。ERK の活性化時間は、ネガティブフィードバック因子 Sprouty によって制御されている。初期胚において、ERK はオーガナイザーが形成される背側領域で持続的な活性化が見られる。優勢不能型 Sprouty を腹側領域に発現させたところ、腹側でも背側同様 ERK の持続的な活性化が見られたことから、Sprouty は普段腹側で ERK の活性化を抑制していると考えられる。この時、腹側でオ

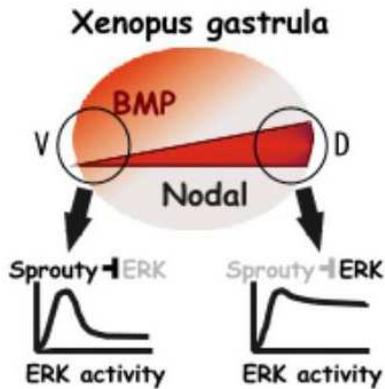


図7 SproutyによるERKの活性化制御と背腹軸形成

ーガナイザー遺伝子 Chordin の発現が異所的に誘導された。以上のことから、背腹軸形成時、Sprouty は腹側で ERK の活性化を抑制し ERK の持続的な活性化とオーガナイザー遺伝子の発現を背側領域に局限していると考えられる。ERK-MO の微量注入により背側領域で内在性 ERK タンパク質を knockdown すると、オーガナイザー遺伝子の発現が消失したことから、ERK 経路は実際にオーガナイザー形成に重要である事が分かる。さらに、Sprouty による ERK の活性化時間の制御が、背腹軸形成に重要なもう一つのシグナル経路、Nodal シグナルの下流で行われている事が明らかになった。Nodal

は初期胚において、背腹軸にそって濃度勾配を形成し、濃度依存的に様々な組織を誘導すると考えられている。アニマルキャップを用いた解析から、低濃度の Nodal シグナル(初期胚の腹側領域に相当)のもとでは Sprouty が機能し ERK の活性化が一過的になるのに対し、高濃度の Nodal シグナル(背側領域に相当)のもとでは Sprouty が不活性化され、ERK の持続的な活性化が生じることが明らかになった(図7)。これまでの培養細胞を用いた研究から、細胞の分化・増殖の決定に ERK の活性化時間(量)が重要な役割を果たしている事が知られている。本研究から、個体レベルにおいても細胞の分化に ERK の活性化時間(量)が重要である事が明らかとなり、この制御にネガティブフィードバック因子 Sprouty が関与する事、さらに Nodal シグナルとのクロストークが存在することが明らかとなった。

(III) ゼブラフィッシュでの Notch シグナルと Wnt シグナルを制御する新規因子の役割

発生過程で重要なシグナル伝達経路の一つに、Notch シグナル伝達経路がある。Notch シグナルの阻害因子 Nrarp(Notch-regulated ankyrin repeat protein)は、2 個のアンキリンリピートを含むわずか 114 アミノ酸からなるが、その生体内での役割は不明であった。そこで、ゼブラフィッシュをモデル動物として Nrarp タンパク質の生体内での機能とその作用機序の解析を行った。ゼブラフィッシュには 2 種類の Nrarp(Nrarp-a, Nrarp-b)が存在し、Nrarp-a の方が広範囲で発現している。Nrarp-a、Nrarp-b それぞれの機能を生体内で阻害するため、アンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)を作成した。作成した MO をゼブラフィッシュの受精卵に微量注入し、その個体発生における影響を調べたところ、Nrarp-a の MO の注入により体表の色素やあごの形成に異常が認められた(図1)。一方、Nrarp-b の MO 注入胚では形態上の変化は認められなかった。色素や顎といった組織は、神経冠細胞に由

来することが知られている。これに一致して、Nrarp-a MO 注入胚では神経冠細胞由来である後根神経節の発生に異常が認められた。



図 1 Nrarp-a 機能阻害胚での色素や顎の骨の形成異常。

Uninjected: コントロール野生型胚、Nrarp-a MO: Nrarp-a MO 注入胚。

図左: 受精後 2 日目、図右: 受精後 5 日目、アルシアンブルーによる軟骨染色

Nrarp は Notch シグナルを負に制御することが知られているが、Nrarp-a MO 注入胚での神経冠細胞発生異常という表現型は、これまでに知られている Notch シグナルの神経冠細胞発生での促進効果と合致しない。そこで、神経冠細胞発生に重要な働きをしている Wnt シグナル系と Nrarp の関係について検討した。生体内での Wnt シグナルの活性化を見るため、LEF1- β -catenin 依存的なレポーター (TOPdGFP) トランスジェニックラインを使用した。このトランスジェニックラインでは、Wnt シグナル経路の転写複合体 LEF1- β -catenin の DNA 結合配列の下流に GFP (Green Fluorescent protein) を繋いであるので、生体内で Wnt シグナル経路が活性化されている場所で GFP の発現が見られる。この TOPdGFP トランスジェニックラインの受精卵に Nrarp-a MO を注入し、その GFP の発現を調べた。その結果、神経冠細胞や尻尾の先で見られる Wnt シグナルの活性化が、Nrarp-a MO 注入胚では減少していた (図 2)。さらに、色素細胞の発生に必須であり Wnt シグナル経路の直接的

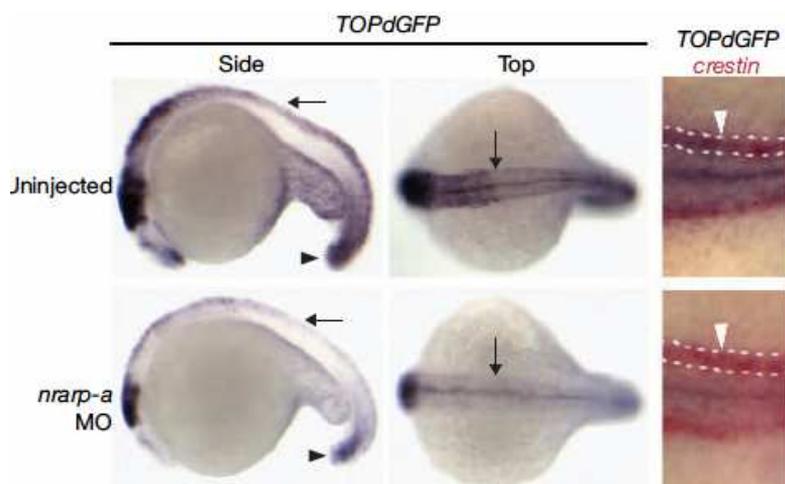


図 2 Nrarp-a 機能阻害胚における Wnt シグナル活性化の減少

図左: GFP の発現を紫色で示す。矢印は神経冠細胞での発現、矢尻は尾先端部での発現。

図右: crestin(赤)と GFP(紫)の発現の二重染色。神経冠細胞を示す Crestin 発現領域(片側のみ 白点線で囲む)での GFP の発現が減少している(白矢尻)。

標的遺伝子である転写因子 *mitf* の発現も、Nrarp-a MO 注入胚で減少していた (図 3)。これらの結果により、Nrarp-a は Wnt シグナル系を調節することにより色素細胞の発生に関与していることが明らかとなった。

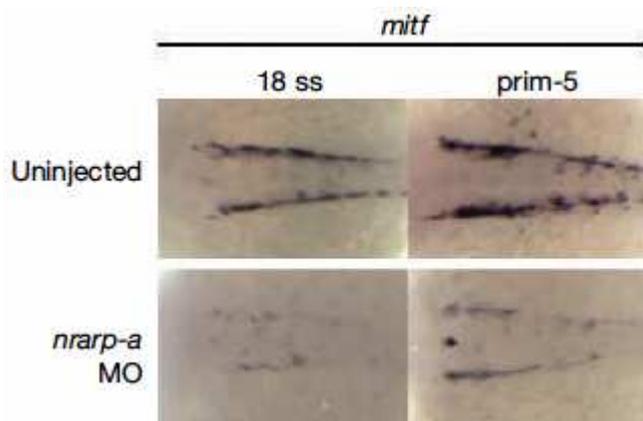


図 3 Nrarp-a 機能阻害胚での *mitf* 遺伝子発現の減少。
異なる 2 つの発生段階 (18ss, prim-5) で *mitf* の発現が減少している。

では、Nrarp-a は Wnt シグナル伝達経路のどのステップ作用しているのでしょうか？ Wnt シグナル伝達経路では、Wnt が受容体へ結合し、細胞内で LEF1- β -catenin 複合体が標的遺伝子の転写を活性化する。そこで、Nrarp と LEF1- β -catenin との関係について検討した。Nrarp と LEF1- β -catenin の結合を調べた結果、Nrarp は β -catenin とは結合しないが、LEF1 とは結合することが分かった。従って、Nrarp は LEF1 への作用によって、神経冠細胞の発生に関与する可能性が考えられる。しかしながら、これまで LEF1 の神経冠細胞発生への影響は知られていない。そこで、ゼブラフィッシュ LEF1 の神経冠細胞への機能を LEF1 に対する MO を用いて検討した。その結果、LEF1 MO 注入胚では、Nrarp-a MO 注入胚と同様に、色素や顎の骨の形成に異常が認められた。さらに、LEF1 MO 注入胚で、Wnt レポーターである TOPdGFP の発現と *mitf* の発現が神経冠細胞で減少することが確認された。これらのことから、LEF1 と Nrarp は神経冠発生において、同様の働きを持つことが示唆された。

Nrarp の LEF1 に対する作用は、どのようなものでしょうか？ LEF1 と Nrarp を発現させ、LEF1 タンパク質の DNA 結合能を調べた。その結果、Nrarp の共発現により LEF1 の DNA 結合能には変化がなかったが、LEF1 タンパク質の安定化が起こることが分かった。次に、Nrarp がゼブラフィッシュの生体内で LEF1 タンパク質の安定化に寄与するか検討した。Nrarp-a MO 注入胚から全タンパク質を抽

出し、LEF1 タンパク質を抗 LEF1 抗体で調べたところ、Nrarp-a MO 注入胚では LEF1 タンパク質が減少していることが分かった。 β -catenin はユビキチン経路によって分解されるが、LEF1 も同様の経路によって分解されているのであろうか？この可能性を検討する目的で、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により、LEF1 タンパク質が安定化するか調べた。その結果、MG132 処理によって LEF1 が安定化されることが確認された。このように、Nrarp はプロテアソーム経路への作用を介して LEF1 の安定化に寄与すると考えられる。次に、LEF1 がユビキチン化されるか検討した。HEK293 細胞に T7-LEF1 を発現させ、抗 T7 抗体で免疫沈降後、抗ユビキチン抗体でプロットすると、MG132 処理によってユビキチン化された LEF1 が検出された。このことから、LEF1 はユビキチン化されプロテアソーム経路によって分解されることが示唆された。次に、Nrarp を LEF1 と共に発現させて、LEF1 のユビキチン化に対する効果を検討した。その結果、Nrarp が共発現する場合には、LEF1 のユビキチン化が減少することが分かった。以上の結果から、Nrarp は LEF1 がユビキチン化されプロテアソーム経路によって分解されるのを防ぐ機能を持つと考えられる。以上をまとめると、Nrarp は LEF1 タンパク質の安定性を促進することより Wnt シグナル伝達系を正に制御し、神経冠細胞の発生に必須の役割を果たすと考えられる。

Nrarp は、これまで Notch シグナルを負に制御することが知られている。そこで、ゼブラフィッシュの発生においても、Nrarp が Notch シグナルを制御しているかを検討した。Notch シグナルはゼブラフィッシュ発生において、体節や神経形成に関与することが知られている。体節形成や神経形成時に Notch シグナルの下流で働く her1 と her4 の発現を、Nrarp MO 注入胚で調べた。Nrarp-a MO と Nrarp-b MO とを両方注入した胚では her1 および her4 の発現が増加した(図 4)。また、Mind bomb (mib)変異体では Notch シグナルが低下していることが知られており、その結果として her1 や her4 の発現が低下する(図 4A)。mib 変異体に Nrarp-a MO、Nrarp-b MO を注入したところ、her1 や her4 の発現が少し回復した。このことから Nrarp は mib 遺伝子の下流で Notch シグナルに作用すると考えられる。Nrarp は NICD と共に発現させると、NICD の分解を促進することが知られている。そこで、Nrarp の発現量と NICD タンパク質の安定性の相関を調べた。Myc タグ NICD mRNA とタンパク質量のコントロールとして Myc タグ GFP mRNA を同時に、Nrarp-a mRNA または Nrarp-a MO、Nrarp-b MO と共にゼブラフィッシュ胚に注入した。全タンパク質を回収し、抗 Myc 抗体でプロットした結果、Nrarp-a タンパク質を増加させると NICD は減少し、逆に Nrarp タンパク質が減少させた場合には NICD は増加した(図 4B)。この結果は、これまで示唆されていた、NICD の分解に Nrarp が働くという結果を支持する。

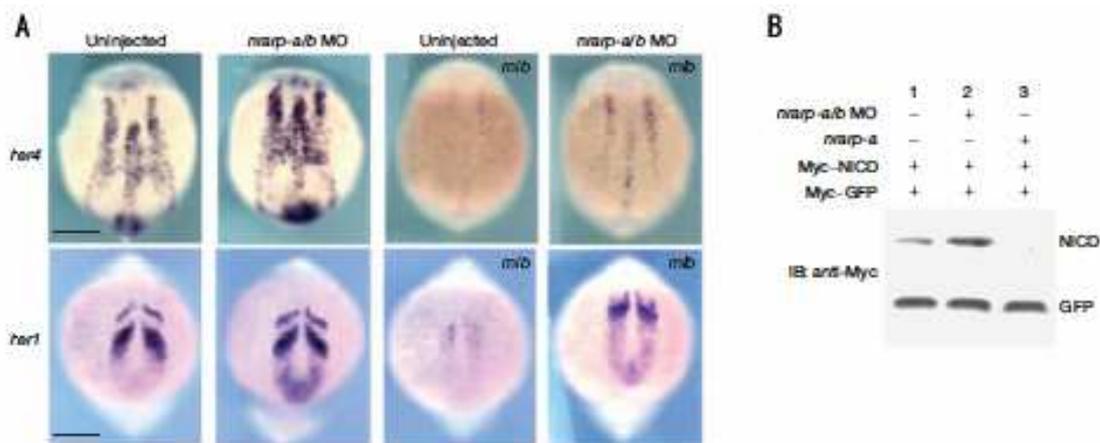


図4 NrpapはNotchシグナルを負に制御する。

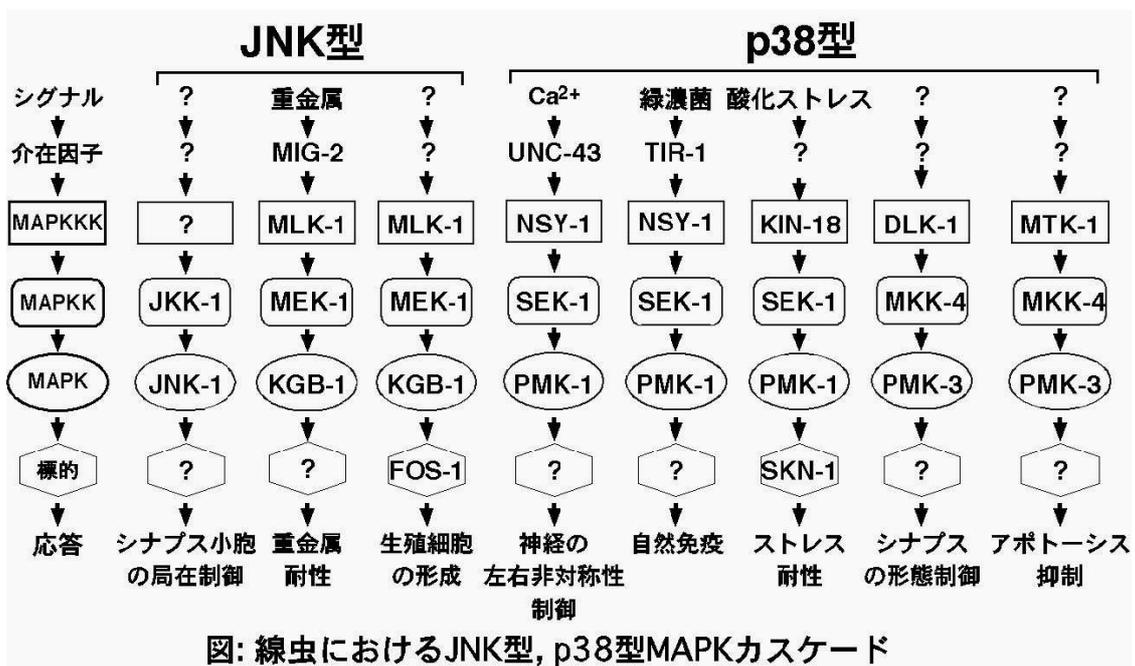
(A) Nrpapは神経形成や体節形成においてNotchシグナルを負に制御する。Nrap-a MOとNrap-b MO両方を野生型または *mib* 変異体に注入し、3体節期(*her4*)または10体節期(*her1*)にそれぞれの遺伝子の発現を whole mount in situ hybridization によって染色した。

(B) NrapapはNotch細胞内領域(NICD)を含むタンパク質を不安定化する。MycタグNICD mRNA、MycタグGFP mRNAとNrap-a MO、Nrap-b MOを同時にゼブラフィッシュ胚に注入したあと、3体節期に全タンパク質を回収し、抗Myc抗体でプロットした。

これまで、NotchとWntシグナルは異なる発生過程や組織によって、協調的あるいは拮抗的に働くことが知られている。そこで、両シグナルのクロストークがLEF1とNICDのレベルでおこっているかどうか調べた。その結果、NICDはLEF1によるTOPFLASH活性化やLEF1タンパク質の安定化に影響を与えなかった。また、逆に、LEF1による転写活性化はNICDの転写活性化能へ影響しなかった。この結果、Nrapap機能の阻害によって見られたさまざまな表現型はNICDを通じたNotchシグナルへの影響と、LEF1を通じたWntシグナルへの影響がそれぞれ独立におこったものであり、NICDとLEF1を介するお互いのシグナルのクロストークの結果ではないことが分かった。

(III) 線虫をモデル動物としたMAPKカスケードによる発生・神経系の制御機構

MAPキナーゼ(MAPK)カスケードは、さまざまな生命現象を制御していることが知られている。本研究では、線虫をモデル動物として、個体レベルにおける発生・分化・神経系を制御するp38型、JNK型MAPKシグナル伝達経路の解明を目指した。また、線虫のMAPKKK、MAPKK、MAPK、及び周辺因子のノックアウト線虫の作製を完了し、それらのphenotypeの共通性から下図に示すカスケードを完成した。



1) 神経細胞のシナプス小胞局在を制御するシグナル伝達因子群の解析

神経細胞のシナプスは、刺激や発生過程において変化してゆくことが知られており、培養細胞系や脳神経を用いた研究から、この変化にはさまざまな因子が関与することが知られている。しかし、発生過程におけるシナプスの維持やその位置的变化を制御する因子については、知見が少なく不明の点が多い。線虫 *Caenorabditis elegans* (*C. elegans*) では、運動神経の一つである DD 神経において、そのシナプスの局在が成長段階に応じて変化する。DD 神経はH型を横にしたような形の細胞であり、下側が腹部に、上側は背部に nerve cord を伸ばしている。線虫の L1 幼虫期には、DD 神経のシナプスは腹側の nerve cord にあるが、L2 幼虫期以降は腹側の nerve cord から背側の nerve cord にその局在を変える。この変化は、GFP を融合させたシナプトブレビン (SNB-1::GFP) を用いて、

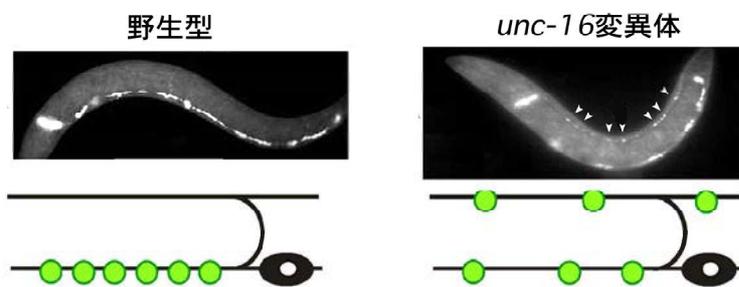


図1 L1 DD 神経における SNB-1::GFP の局在
下が腹側、左が頭部の方向で示す。L1 DD 神経における SNB-1::GFP を蛍光にて可視化した。unc-16 変異体で背側への異常な局在を示す SNB-1::GFP を、白矢頭で示した。L1 DD 神経の模式図を、それぞれ下に示す。細胞体および nerve cord は黒色、SNB-1::GFP は緑色で示した。

シナプス小胞の局在を可視化することにより in vivo で容易に観察できる。哺乳動物の JNK MAPK カスケードの足場タンパク質である JIP3 の線虫ホモログ UNC-16 が、L1 幼虫期における腹部特異的なシナプス小胞の局在制御に関与していることを見出した。unc-16 欠損変異体では、L1 期の DD 神経におい

て本来プレシナプス側である腹側だけに局在するはずの SNB-1::GFP が、ポストシナプス側である背側にも局在化するようになる(図 1)。UNC-16 が JIP3 ホモログであったことから、JNK MAPK カスケードも UNC-16 と同様にシナプス小胞の局在制御に関与することが予想された。線虫では、JNK のホモログ JNK-1 が、その上流で働く MAPKK として JKK-1 と SEK-1 をすでに単離・同定しており、これまでの研究から JKK-1 は DD 及び VD 神経で機能し、その破壊株は運動異常の表現型を示すことを明らかにしていた。jnk-1 変異体及び jkk-1 変異体では、共に L1 DD 神経における SNB-1::GFP の局在が unc-16 変異体と同様の異常を示した。従って、UNC-16 は JNK-1 MAPK カスケードと複合体を形成し、ともにシナプス小胞の L1 DD 神経における腹部特異的な局在を制御することが明らかとなった。

次に、UNC-16-JNK-1 複合体の周辺で働く他の因子を同定する目的で、酵母 Two-hybrid 法を用いて UNC-16 と結合する因子をスクリーニングしたところ、線虫のキネシン軽鎖 KLC-2 が単離された。UNC-16 と KLC-2 の結合は、培養細胞を用いた生化学的実験によっても確かめられた。逆遺伝学的手法により klc-2 欠損変異体を作成し、L1 DD 神経における SNB-1::GFP の局在について検証したところ、unc-16 変異体と同様にシナプスの局在制御の異常を示すことがわかった。また、同様の異常はキネシン重鎖 unc-116 変異体においても観察された。これらのことから、キネシンが UNC-16 と複合体を形成し、L1 DD 神経における SNB-1::GFP の局在を制御していると考えられる。UNC-16 に結合する別の因子として、オートファジーを制御するプロテインキナーゼ UNC-51 の結合タンパク質である UNC-14 を同定した。培養細胞内において、UNC-16 は KLC-2 及び UNC-14 を同時に含んだ複合体を形成した。また、UNC-16 と結合する部位を欠いた UNC-14 の変異である unc-14 (ju56) 変異体では、unc-16 変異体と同様にそれぞれシナプス小胞の局在が異常になった。これらのことから、UNC-14 は UNC-16 と複合体を形成し、L1 DD 神経における SNB-1::GFP の局在を制御していると考えられる。キネシンはモータータンパク質であり、さまざまなタンパク質の輸送に関与することから、キネシンが UNC-16 及び UNC-14 の細胞内局在を制御する可能性が考えられた。そこで、運動神経である D 神経における UNC-16 の細胞内局在について、GFP を用いて可視化したところ、野生型では nerve cord 全体に局在しているが、klc-2 変異体及び unc-116 変異体ではその局在が異常になっていた。一方、unc-14 変異体では UNC-16 の局在に異常はみられなかった。さらに、UNC-14 について同様に GFP を用いて可視化したところ、野生型において nerve cord においてドット状に局在すること、そしてその局在パターンは klc-2、unc-116 及び unc-16 変異体では消失することを見出した。これらのことから、キネシンは UNC-16 を正常に局在させるのに必要であり、またキネシン及び UNC-16 は UNC-14 を適切な位置に局在化させることによりシナプス小胞の局在を制御してい

ると考えられる。

次に、JKK-1-JNK-1カスケードの上流因子を探索する目的で、jnk-1変異体と同様にL1 DD神経でのSNB-1::GFPの局在異常を示すMAPKKK遺伝子の欠失変異体をスクリーニングした。その結果、新規因子LRK-1を同定した。LRK-1はアンキリンリピート、ロイシンリッチリピート、Ras様ドメイン、MAPKKK様キナーゼドメイン及びWD40リピートをもつ新規のキナーゼであり、ヒトやショウジョウバエにもホモログが存在するが、その機能について全く解析されていなかった。lrk-1欠損変異体では、L1 DD神経においてjnk-1やunc-16変異体と同様なSNB-1::GFPの局在異常が見られた。しかし、jnk-1変異体とは異なり、本来はSNB-1::GFPが局在化しない樹状突起先端部にもSNB-1::GFPが局在化するようになった(図2)。これらの表現型は野生型のLRK-1遺伝子の発現によりレスキューされるが、キナーゼ活性を失うタイプの変異をもったLRK-1では、その表現型をレスキューできない。GFPを用いた解析から、LRK-1タンパク質は細胞質およびER/ゴルジ体周辺に局在することから、おそらくER/ゴルジ体周辺において何らかのタンパク質をリン酸化することにより、軸索タンパク質の極性輸送を制御していると考えられる。さらに、lrk-1変異体の表現型は、ゴルジ体から樹状突起方向への輸送に關与するクラスリンアダプターunc-101の変異によって抑圧されることから、LRK-1はクラスリンアダプターそのものか、クラスリンアダプターを介した輸送過程の制御に關与すると思われる。最近、LRK-1のヒトホモログであるPARK8/LRRK2が、パーキンソン病の原因遺伝子であることが報告された。今後、線虫LRK-1の機能解析から、LRK-1によるシナプス小胞の局在制御機構を明らかにできるだけでなく、ヒトパーキンソン病の原因や発症機序に迫る手掛りが得られることが期待される。

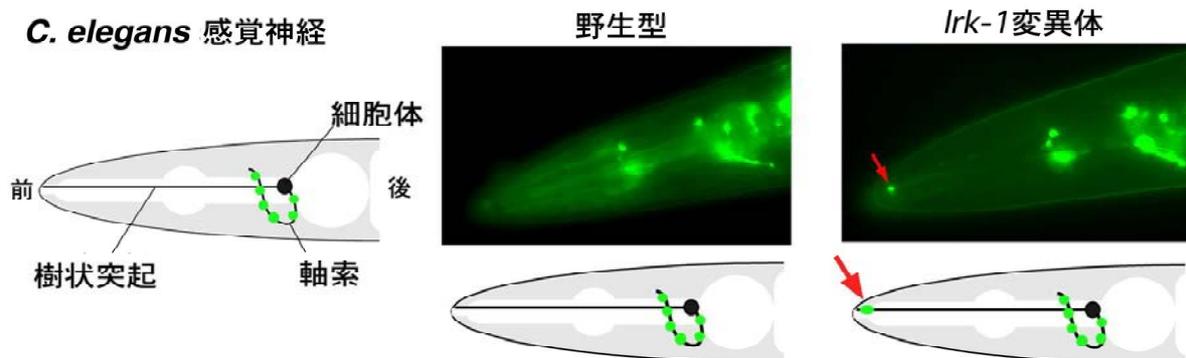
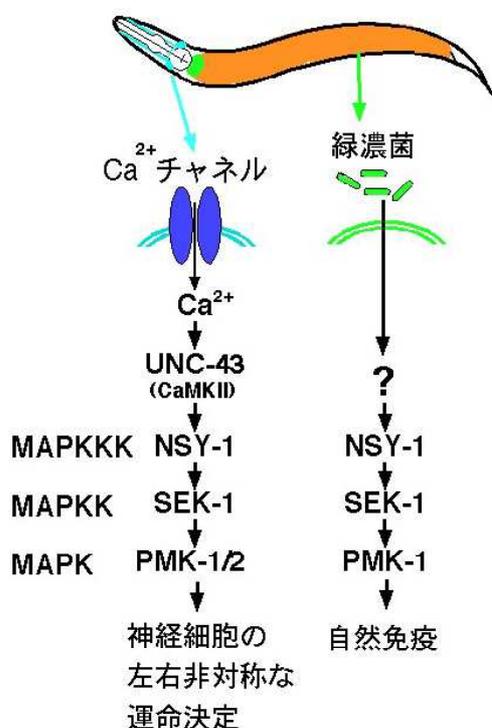


図2 lrk-1変異体におけるSNB-1::GFPの樹状突起先端部への異常局在
線虫頭部における感覚神経の模式図を左に示す。感覚神経は細胞体、軸索および樹状突起からなる。シナプス小胞タンパク質であるSNB-1::GFPの局在パターンを緑色で示した。野生型(中、写真)とlrk-1変異体(右、写真)における頭部感覚神経でのSNB-1::GFPの局在の写真。それぞれ模式図を下に示す(SNB-1::GFPは緑色で示す)。lrk-1変異体では、野生型では本来局在しないはずの樹状突起先端部でのSNB-1::GFPの局在がみられる。

2) 自然免疫と MAPK カスケード

緑濃菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、ヒトをはじめとするさまざまな動物に感染する菌の一つであり、線虫 *C. elegans* にも感染することが知られている。野生型の線虫は、緑濃菌感染に対して自然免疫による防御機構を持っており、通常は感染に対して抵抗性を示す。緑濃菌感染に対する抵抗性が低下する変異体を探索したところ、哺乳動物の ASK1 MAPKKK の線虫ホモログ NSY-1、SEK-1 MAPKK 及び PMK-1 MAPK の変異体において、いずれも緑濃菌感染に対する抵抗性が低下していることがわかった。sek-1 変異体での感染感受性は、腸特異的なプロモーターで SEK-1 を発現させることにより回復することから、このカスケードは腸で機能することが示唆された。また、緑濃菌感染によって、PMK-1 が線虫個体内で NSY-1 及び SEK-1 依存的に活性化することも判明した。これらの結果から、NSY-1 SEK-1 PMK-1 からなる MAPK カスケードが、線虫の自然免疫において重要な役割



割を果たすことが明らかとなった。これまでの解析から、NSY-1 及び SEK-1 は嗅覚受容神経である AWC 神経における左右非対称性の運命決定の制御に関わることが判明しており、また NSY-1 を活性化する上流の因子として CaMKII の線虫ホモログ UNC-43 が同定されていた。しかし、unc-43 変異体では緑濃菌感染に対する抵抗性が低下しなかったことから、NSY-1 の活性化は UNC-43 以外の因子が行っていることが示唆された (図 3)。

図 3 神経系の左右非対称性と自然免疫を制御する MAPK カスケード

3) 酸化ストレスに反応する MAPK カスケード

生物は酸化ストレスに対するいろいろな防御機構を持っており、ストレスに反応してその防御機構を発動させる。これまでに、哺乳動物細胞等においてストレス応答型 MAPK カスケードが酸化ストレス等により活性化し、さまざまな遺伝子発現を誘導することが知られていたが、個体レベルではそれがどのくらい意味のあるものなのかわかっていなかった。そこで、線虫を用いて個体レベルでのストレス応答とストレス応答 MAPK カスケードとの関係について検討した。その結果、酸化ストレスにより SEK-1 と PMK-1 からなるキナーゼカスケードが腸で活性化すること、そしてそれが個体レベルにおけ

る酸化ストレス耐性に必須であることが明らかとなった。次に、PMK-1 の下流で機能する因子を探索したところ、哺乳動物のストレス応答におけるフェーズ II 酵素であるグルタチオン合成酵素 (GCS) の線虫ホモログ GCS-1 が、酸化ストレスにより SEK-1、PMK-1 及びヒトの転写因子 Nrf2 の線虫ホモログ SKN-1 依存的に、腸で発現誘導されることが判明した。さらに、in vitro において SKN-1 の 74 番目と 340 番目のセリンが PMK-1 によってリン酸化されること、in vivo において SKN-1 は酸化ストレスにより核移行するが、sek-1 及び pmk-1 変異体内ではそれが起こらないことも見出した。そこで、74 番目と 340 番目のセリン残基をアラニンに置換した SKN-1 を作成して線虫内での挙動を調べたところ、この変異型 SKN-1 は酸化ストレスによる核移行ができなかった。逆に、これらのセリン残基をリン酸化状態を模倣するグルタミン酸に置換すると、sek-1 変異体内でも酸化ストレスにより核移行できるようになった。これらのことから、酸化ストレスにより SEK-1 PMK-1 カスケードが活性化し、それが転写因子 SKN-1 をリン酸化して核移行可能な状態にすることにより、GCS-1 遺伝子の転写などストレス応答の誘導に寄与することが示唆された。

SKN-1 の核移行を負に制御する因子として、さらに哺乳動物 GSK3 β の線虫ホモログ GSK-3 を同定した。gsk-3(RNAi) 個体では、ストレス非依存的に SKN-1 の核移行が起きること、SKN-1 が GSK-3 により in vitro でリン酸化されること、GSK-3 によりリン酸化される 393 番目のセリンをアラニンに置換すると酸化ストレス非依存的に SKN-1 が核移行できることがわかった。これらのことから、線虫では SEK-1 PMK-1 カスケードと GSK-3 が、それぞれ SKN-1 の酸化ストレス依存的な核局在を制御することにより、ストレス応答を個体レベルで制御していることが明らかになった (図 4)。

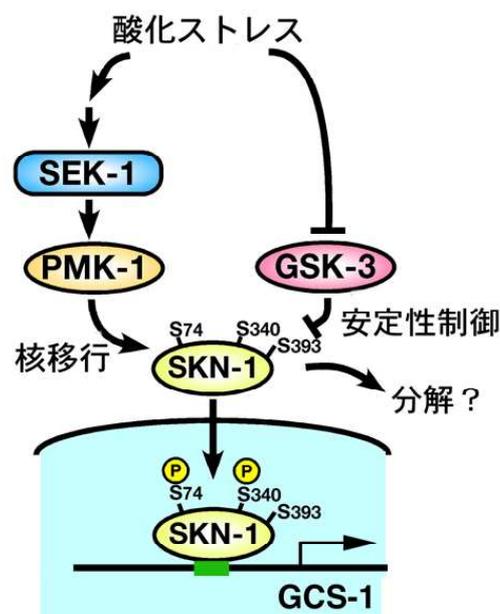


図 4 PMK-1 と GSK-3 による SKN-1 制御

4) 足場タンパク質 JIP1 の線虫ホモログ JIP-1 の解析

JIP1 及び JIP2 は、哺乳動物において JNK MAPK やその上流の MAPKK、MAPKKK と複合体を形成し、キナーゼカスケードの足場タンパク質として機能することが知られている。しかし、JIP-1/JIP-2 が *in vivo*、特に個体レベルでどのような生命現象に關与し、また何を制御しているのかわかっていない。そこで、線虫を用いて JIP-1/JIP-2 の個体レベルにおける機能の解析を行った。まず、JIP-1/JIP-2 の線虫ホモログとして JIP-1 を同定し、線虫 *jip-1* 欠損変異体を単離した。哺乳動物では、JIP1 はアルツハイマー病の原因遺伝子である膜タンパク質 APP や、モータータンパク質キネシン軽鎖 KLC と結合することが知られている。しかし、その意義や機能については未だによくわかっていない。そこで、APP の線虫ホモログである APL-1 と JIP-1 の関係について調べたところ、線虫 JIP-1 は APL-1 の細胞質ドメインとキネシン軽鎖 KLC-2 と結合することがわかった。さらに、*jip-1* 変異体では全長の APL-1 タンパク質の量が増加すること、同様の表現型はキネシン重鎖 *unc-116* の変異体においても起きることが確認された。APL-1 は 673 番目のチロシン残基依存的に JIP-1 と結合するが、このチロシンをアラニンに変えた変異型 APL-1 は野生型と比べてそのタンパク質量が増加した。これらのことから、JIP-1 は APL-1 とキネシンにそれぞれ結合し、キネシン依存的に APL-1 のタンパク質量を制御していると考えられる。

JIP-1 と APL-1 との関係性を明らかにする目的で、JIP-1 と結合する因子を酵母 Two-hybrid 法でスクリーニングを行った。その結果、26S プロテオソームの調節サブユニットと F-box タンパク質が、JIP-1 結合因子として単離された。これらは、いずれもユビキチン-プロテオソーム系の因子であったことから、APL-1 がユビキチン化されることによりそのタンパク質量が負に制御されていると考えられた。ユビキチンは標的タンパク質のリジン残基に結合することがわかっているため、APL-1 細胞質ドメインにある唯一のリジンをアルギニンに置換したところ、前述の 673 番目のチロシンをアラニンに変えた APL-1 と同様にタンパク質量の増加が観察された。これらのことから、APL-1 はユビキチン化されることによりその量が制御されており、JIP-1 はプロテオソームや F-box タンパク質を APL-1 の近くに連れてくることによりその過程を促進していると考えられる。さらに、哺乳動物と線虫の因子の相同性から、哺乳動物においても同様の調節機構が存在する可能性が考えられる(図 5)。

APP はヒトアルツハイマー病の原因遺伝子であり、APP が β 及び γ -セクレターゼにより切断された場合のみ、アルツハイマー病の原因と考えられているアミロイド β が産生される。しかし、APP を β 及び γ -セクレターゼによる切断経路に送るのか、それとも別の分解・切断経路に送るのかを選択する機構については不明である。今後、APL-1 の分解経路と切断経路の相互関係を明らかにすることにより、ヒト APP の分解、切断、アミロイド β 産生メカニズムの理解のための情報を提供し、ひいてはアルツ

ハイマー病の理解及び創薬にも有用な情報を提供することが期待される。

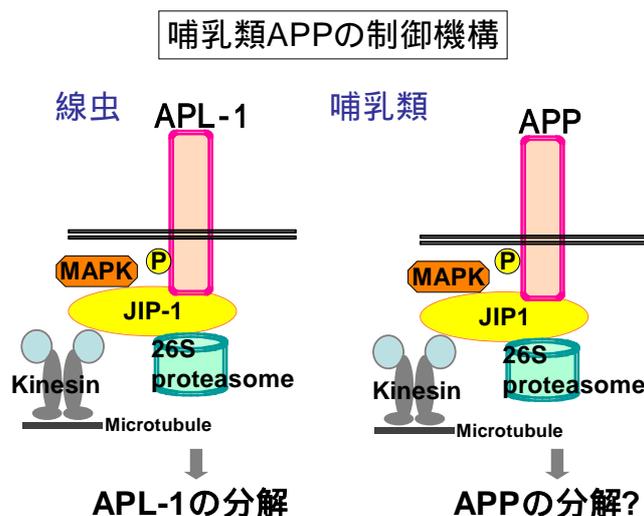


図5 線虫と哺乳動物における APL-1/APP 調節機構のモデル

(2) 研究成果の今後期待される効果

1) これまでの研究において、TAK1 が炎症性サイトカイン (TNF 及び IL-1) のシグナル伝達経路で必須の役割をしていることを明らかにしてきた。また、本研究によって TAK1 が Wnt シグナル伝達経路を制御する分子機構を解明した。さらに、マウスをモデル動物として、TAK1 は皮膚表皮の細胞生存に必須であることを発見した。このことは、皮膚表皮においては TAK1 は TNF ファミリーシグナルの細胞死阻害のシグナルに必須の働きをしていることを示している。今後は、Wnt 及び炎症性サイトカインが関わる他の組織での TAK1 の役割を明らかにすることを目指す。たとえば、腸上皮は常に新生されており、その新生のプログラムには Wnt と TGF- β が必須の働きをしていることが知られている。今後の研究として、TAK1 の腸上皮恒常性における役割を、腸上皮特異的 TAK1 欠損マウスを作成し検討することを計画している。

乾癬は人口の 1-3% が発症する皮膚病で、その発症原因は未だ不明である。また、乾癬は特に欧米に多いが、近年我が国でもその発症が増加傾向にある。本研究において、皮膚上皮特異的 TAK1 欠損マウスが、ヒトの乾癬の特徴と非常によく似た炎症性皮膚病を発症することを発見した。さらに、この原因が細胞死阻害シグナルの欠如によるものであることを突き止めた。これは、未だ不明である乾癬の発症原因解明に大きく貢献すると考えられる。また、本研究において、TAK1 の阻害剤

を開発することに成功した。一方、マウスをモデル系とした研究成果は、TAK1 が個体レベルの皮膚において細胞死阻害シグナルに必須の働きをしていることを明らかにした。これまでに、さまざまな組織の癌研究から、過剰な細胞死阻害シグナルが癌の発症及び進行の原因となることが知られている。従って、TAK1 阻害剤は TAK1 研究の有用なツールとなるだけでなく、癌の阻害剤として有効である可能性が考えられる。皮膚特異的 TAK1 欠損マウスで明らかになったように、完全な TAK1 の欠損は細胞死による炎症を引き起こす。しかし、阻害剤を用い TAK1 阻害の程度を調整することによって、癌の進行を阻害できる可能性が考えられる。今後は、マウスの皮膚癌をモデル系として、TAK1 阻害の癌進行阻害の可能性について検討していく。これは、我が国においても重大な問題である皮膚癌において、新しい治療の道を開く可能性を持つ。

2) 脳など中枢神経組織の損傷は、ヒトが社会生活を営む上で非常に重大な支障をきたす。近年再生医療の可能性が注目され、損傷部位の組織を副作用なしに再生させる技術の開発が急がれている。このような技術の開発には、脳発生の分子メカニズムの解明が必要不可欠である。しかし、現状は中枢神経形成に機能する遺伝子群の同定も不完全な状況である。これまでの研究から、カエルからヒトまで中枢神経組織の形成に関与する因子群やシグナル伝達経路などは非常によく保存されている事が明らかとなっている。そこで、胚発生が胎内で進行し、胚操作が非常に困難な哺乳類高等動物のかわりに、新規因子群のスクリーニングが容易なアフリカツメガエル初期胚を用い、網羅的に神経形成に関与する候補遺伝子の同定を試みた。今後は、同定した因子に関して、アフリカツメガエル初期胚の持つメリットを活かした解析を行い、アフリカツメガエルの系で得られた知見を基により高等な哺乳類動物へと展開していく予定である。神経形成過程が種を超えて高度に保存されていることを考えると、アフリカツメガエル初期胚を用いた解析で明らかにできた分子機構は、ヒトを含めた哺乳類高等動物においても保存されている可能性が高い。

3) 線虫をモデル動物として、個体レベルにおける発生・分化・神経系を制御するp38型、JNK型 MAPKシグナル伝達経路を明らかにしてきた。本研究で、線虫のMAPKKK、MAPKK、MAPKのノックアウト線虫の作製を完了し、世界に先駆けてMAPKカスケードネットワークを個体レベルで解析できるシステムが準備できた。さらに、線虫のMAPKシグナル伝達経路の研究の過程で、線虫で同定したシグナル伝達因子の中にヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子ホモログが見い出されてきた。今後は、線虫のシグナル伝達経路における遺伝性疾患原因遺伝子の機能を解明することで、遺伝性疾患モデル系構築へと研究を展開できるであろう。これらの研究から、発生・分化・神経系を制御するシグナ

ル伝達ネットワークの解明と、遺伝性疾患の分子メカニズムの根幹が明らかとなることが期待される。
その延長上に、遺伝性疾患に対しての有効な治療・創薬の開発への展開が可能であろう。

3.2 澁谷グループ(東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

(1) 研究実施内容及び成果

(I) アフリカツメガエルでの TAK1-NLK カスケードによる頭部形成機構の解析

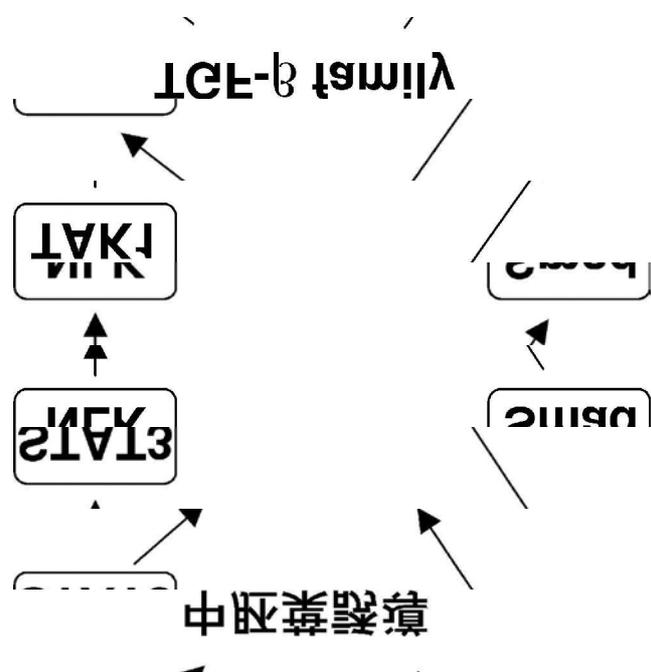
これまでの研究から、TAK1の下流で働くMAPK様因子NLKは、転写因子であるTCF/LEFをリン酸化する事によりWntシグナル伝達経路を負に制御する事を明かにしてきた。しかし、NLKを活性化する機構や、生体内におけるNLKの機能については不明な点が多い。本研究では、胚発生の形態観察が容易なアフリカツメガエルを用いて、初期発生における体軸形成を制御するシグナル伝達経路の系を利用し、Wntシグナルに関与するNLKの生体内での役割を分子レベルで明らかにすることを目指した。

新たなNLKの標的分子を同定する目的で、NLKのC末端領域と直接相互作用する分子群の検索を、アフリカツメガエル胚のcDNAライブラリーを用いた酵母Two-hybridスクリーニングを行った。その結果、JAK-STATシグナル伝達経路の転写因子であるSTAT3を同定した。STAT3は、サイトカイン刺激をうけて活性化したJAKチロシンキナーゼによりC末側のチロシン残基がリン酸化を受け、二量体を形成して核へと移行し、標的遺伝子の発現を誘導する。また、STAT3のC末側のセリン残基のリン酸化もSTAT3の活性化に必要である事が報告されている。そこで、NLKがSTAT3のC末側のセリン残基を直接リン酸化する可能性について検討した。NLKとSTAT3を共発現する事で、STAT3のC末側のセリン残基のリン酸化が増強する事がわかった。また、培養細胞に発現して免疫沈降したNLKが、組み替え型STAT3をリン酸化する事を確認した。C末側のセリン残基をリン酸化されないアラニン残基に置換した変異体STAT3-SAは、NLKでリン酸化されなかった。さらに、NLKとSTAT3が細胞内でも複合体を形成する事を免疫沈降法によって確認した。以上の事から、NLKがSTAT3に直接結合し、特異的にC末側のセリン残基をリン酸化する事が明らかとなった。

次に、STAT3がアフリカツメガエル胚における中胚葉誘導に関与するか検討した。内在性のSTAT3の発現抑制は、中胚葉誘導を抑制した。さらに、STAT3-SAや、C末側のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したSTAT3-YFが、優勢不能的に中胚葉誘導を抑制しうる事もわかった。また、チロシン残基のリン酸化をミミックする活性型変異とセリン残基のリン酸化をミミックする活性型変異のうち片方だけ持つ活性型STAT3は中胚葉マーカーを誘導できないが、同時に持つ活性型STAT3は単独で中胚葉マーカーを誘導しうる事もわかった。これらの結果は、中胚葉誘導にSTAT3のセリン残基とチロシン残基両方のリン酸化が重要な役割を果たしている事を示唆している。これま

で、TGF-βファミリーやFGFといった細胞外シグナル因子が中胚葉を誘導する事が、報告されている。そこで、NLKとSTAT3がどのシグナル伝達経路で機能しているのか検討した。TGF-βファミリーに属するBvg1やBMP4を予定外胚葉に発現させると中胚葉マーカーの発現が誘導されるが、この中胚葉マーカーの発現誘導はNLKやSTAT3の発現を阻害する事で抑制された。一方、FGFによって誘導される中胚葉マーカーの発現はNLKやSTAT3の発現阻害によって抑制されなかった。以上の結果から、NLKとSTAT3はTGF-βファミリーによる中胚葉誘導に特異的に関与している事が明らかとなった。TAK1はもともとTGF-βファミリー刺激で活性化するMAPKKKとして同定され、Wntシグナル伝達経路の抑制に際しTAK1がNLKの上流で機能する事を明らかにしていた。これらの事から、アフリカツメガエル胚における中胚葉誘導において、TAK1がNLKとSTAT3の上流で機能している可能性が考えられる。確かに、TAK1の発現阻害は中胚葉誘導を抑制し、Bvg1やBMP4による中胚葉マーカーの発現誘導はTAK1の発現阻害によって抑制されたが、FGFによる中胚葉マーカーの発現誘導は抑制されなかった。また、TAK1の活性化による中胚葉マーカーの発現誘導が、NLKやSTAT3の発現阻害によって抑制される事もわかった。これらの結果から、TGF-βファミリーによる中胚葉誘導において、TAK1 NLK STAT3というシグナル伝達経路が機能している事が明らかになった。

TGF-βシグナル伝達経路において、Smadファミリー転写因子が中心的な役割を果たしており、中胚葉誘導にも関与する事が知られている。そこで、TAK1 NLK STAT3経路とSmad経路がTGF-βの下流でどのようにして中胚葉誘導を制御しているのか検討した。Smad2によって誘導される中胚葉マーカーの発現は、TAK1、NLK、STAT3の発現阻害によって抑制されなかった。同様に、STAT3の活性化による中胚葉マーカーの発現は、優勢不能型Smad2によって抑制されなかった。さらに、活性型



STAT3とSmad2が相乗的に中胚葉マーカーの発現を誘導する事もわかった。以上の結果から、TAK1 NLK STAT3経路とSmad経路が独立にかつ相乗的に、TGF-βの下流で中胚葉誘導に関与している事が明らかになった。

(II) WNK1 シグナル伝達経路

Wnt シグナル伝達系に關与する新規シグナル伝達因子を同定する目的で、線虫の Wnt 経路の因子 GSK-3(哺乳動物 GSK3 β のホモログ)と結合する因子を、酵母 Two-hybrid スクリーニングにより分離した。その中の一つ WNK-1 は MAPKKK ファミリーに属し、最近同定された偽アルデステロン性高血圧症の原因遺伝子 WNK1/WNK4 のホモログであった。WNK-1 のノックアウト線虫が発生致死になること、WNK-1 の結合因子として SPA-1(哺乳動物の SPAK キナーゼのホモログ)が分離され SPA-1 のノックアウト線虫も発生致死になることを見出した。一方、哺乳動物の WNK1/WNK4 と結合する因子として SPAK キナーゼが分離され、WNK1 ノックアウトマウスも発生致死になることを見出した。このように、線虫 WNK-1 と哺乳動物の WNK1/WNK4 は共通の性質を示す。そこで、哺乳動物細胞を用いて WNK1 の機能解析を進めることにより、新たな細胞内シグナル制御機構を明らかにすることを旨とした。

WNK1 結合因子候補を酵母 Two-hybrid スクリーニング及びエピトープタグと質量分析を用いた相互作用解析を行い、共通に見出された結合因子候補である STE20 様プロテインキナーゼ SPAK について解析を進めた。特異的抗体を用いた共沈実験により、内在性の SPAK 及び SPAK とキナーゼドメインが 90%以上の相同性をもつ OSR1 は、293 細胞ならびに MDCK 細胞内で WNK1 と結合していることが認められた。さらに、過剰発現系を用いた実験により、その結合には WNK1 に存在する四カ所の(R/K)FX(V/I)配列が重要であることが明らかになった。また、WNK1 は SPAK 及び OSR1 のキナーゼドメインの C 末側に存在する進化的に保存されたセリン残基をリン酸化した。しかも、このセリン残基をアスパラギン酸に置換した OSR1 変異体は、野生型に比較してキナーゼ活性が上昇していた。偽性低アルドステロン性高血圧症 II 型の治療にはサイアザイド系利尿薬が有効であることから、サイアザイド感受性 Na⁺-Cl⁻共輸送体(NCC)の調節について検討した。NCC は、12 回膜貫通型の構造をもつ Na⁺-(K⁺)-Cl⁻共輸送体ファミリーに属し、同様にこのファミリーに属する NKCC1 は N 末側細胞内領域のリン酸化 / 脱リン酸化により活性制御を受けていることが知られている。SPAK/OSR1 は、Na⁺-(K⁺)-Cl⁻共輸送体ファミリーに属する NKCC1、NKCC2 及び NCC の N 末制御領域を、直接リン酸化することを明らかにした。NKCC2 及び NCC は腎臓に発現している共輸送体で、それぞれの異常により Bartter 症候群、Gitelman 症候群が引き起こされることが知られている。両症候群とも、低カリウム血症が認められる。偽性低アルドステロン症 II 型の一家系では WNK1 のイントロン領域の欠損が認められ、WNK1 遺伝子産物の発現上昇を引き起こしていることが明らかにされている。WNK1 SPAK/OSR1 経路が NKCC2 や NCC を活性化すると仮定すると、WNK1 の変異により高カリウム血症が生じる説明が可能となる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

今後も NLK 結合因子に関して機能解析を進めることにより、さまざまなシグナルに関与していると考えられる NLK の機能の全容を明らかにしていく。一方、SPAK/OSR1 の活性化は WNK によるリン酸化に加えて別の制御機構も存在すると考えられ、詳細なメカニズムは今後の検討課題である。特に、WNK1 SPAK/OSR1 共輸送体経路が恒常的に活性化することが偽性低アルドステロン性高血圧症 II 型発症の一因であることを個体レベル(マウス)で調べることや、活性型 OSR1 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスが高血圧・高カリウム血症を呈するか調べることにより、WNK の機能及び分子メカニズムの解明と高血圧発症機序を理解することに結びつくと考えられる。細胞内シグナル伝達機構は創薬のターゲットとしての実績が多く、特に TGF- β や Wnt ファミリーの細胞増殖・分化因子は、広い反応性と多くの作用性を持つことから、組織形成に特異的な細胞内シグナルをドラッグデザインの対象とすることが可能である。将来的には、シグナル伝達分子の欠損による組織形成異常をきたす動物モデルを用いた *in vivo* の研究を個体レベルの研究へと展開することにより、新規治療法・薬物療法など応用面での発展性も考えられる。

3.3 西田グループ(京都大学大学院・生命科学研究科)

(1) 研究実施内容及び成果

生物の発生・分化には、さまざまなシグナル伝達経路が関わっている。本研究では、アフリカツメガエル初期胚をモデルとした発生生物学的・生化学的解析を行い、高等脊椎動物の発生過程における形態形成プログラムを規定するシグナル伝達ネットワークを明らかにすることを目指した。特に、原腸陥入及び神経分化を制御するプロテインキナーゼについて着目し解析を行った。原腸陥入はダイナミックな細胞極性の変化や細胞移動をともなう形態形成運動である。あらゆる発生過程には細胞極性や細胞移動の適切な制御が必須であり、その破綻は発生異常や発癌を引き起こす。従って、細胞極性や細胞移動を制御するシグナル伝達の基礎研究は非常に重要であると考えられ、アフリカツメガエルの原腸陥入はそのモデルとして優れている。また、神経分化のシグナル伝達の解析は、神経難病の幹細胞治療の基盤研究となりうることから、ますます重要性が増している。

まず、MAPK 経路のひとつである MKK7-JNK 経路が、非古典的 Wnt 経路の下流において原腸陥入の進行に必須であることを明らかとした。さらに、PKC ファミリー分子である aPKC が、プロテインキナーゼ Par-1 をリン酸化し、アダプタータンパク質 14-3-3 とともに Par-1 の細胞内局在を変化させることで、原腸陥入を制御することを示した。また、インテグリンと相互作用するプロテインキナーゼ ILK が、細胞同士、及び細胞と細胞外マトリクスとの接着性を制御することにより、原腸陥入において重要な役割を果たしていることを示した。さらに、神経分化を制御する細胞内シグナル伝達経路として、MAPK 経路の一つである MEK5-ERK5 経路を見出した。MEK5-ERK5 経路は、Sox ファミリー転写因子 SoxD の下流、かつ bHLH ファミリー転写因子 Xngnr1 の上流で神経分化を制御していることを示した。

(I) Wnt シグナルにおける JNK の役割

Wnt は分泌型糖タンパク質であり、重要なシグナル分子として、多細胞生物間で広く保存されている。従来考えられてきた古典的な Wnt シグナル経路では、分泌された Wnt が受容体である Frizzled に結合し、細胞内の Dishevelled を活性化する。Dishevelled は GSK3 β を不活性化することで β -catenin の分解を阻止し、細胞質内で蓄積した β -catenin は転写因子 TCF/LEF と結合して、遺伝子発現を誘導する。これに対し、ショウジョウバエの翅の毛や複眼にみられる平面における極性 (planar cell polarity: PCP)、脊椎動物の原腸陥入時に見られる収束的伸長 (convergent extension) とよばれる細胞運動において、古典的な Wnt シグナル経路とは異なる非古典的 (non-canonical) Wnt シグナル経路が関与することが示されている。この非古典的な Wnt シグナル経路においては、Dishevelled の機能が必須であるが、 β -catenin の蓄積は必要ない。ショウジョウバエでは、非古典的な Wnt シグナル経路において、Dishevelled の下流に MAPK 経路のひとつである MKK7-JNK 経路が存在することが示唆されている。また脊椎動物の培養細胞において、Dishevelled を発現させることで MKK7、JNK が活性化されることも報告された。これらの報告から、脊椎動物において非古典的 Wnt シグナル経路が MKK7-JNK 経路の活性化を通じて、収束的伸長の制御を行っているのではないかと考えた。

まず、脊椎動物細胞において Wnt の下流に JNK が存在することを示すため、NIH3T3 細胞を用いて、Wnt による JNK の活性化を調べた。Wnt4、Wnt5A、Wnt8、Wnt11 の 4 種類の Wnt を発現させ、共発現させた JNK の活性を調べた。比較のため、JNK と同じ MAPK ファミリーである ERK2、p38 の活性について同様に調べた。それぞれの Wnt と MAPK の組み合わせで NIH3T3 細胞に発現させた後、MAPK を免疫沈降して *in vitro* でキナーゼアッセイを行った。JNK に関しては、Wnt5A による特

異的な活性化が見られたが、その他の Wnt による活性化は見られなかった。ERK や p38 に関しては、どの Wnt によっても活性化が見られなかった。この結果から、Wnt5A の下流に JNK が存在することが示された。さらに、Wnt5A を含む conditioned medium を用いて JNK の活性化を誘導できるかどうか実験を行った。NIH3T3 細胞において conditioned medium 及び control medium をそれぞれ培地中に加え、内在的な JNK を免疫沈降してキナーゼアッセイを行った。その結果、Wnt5A を含む conditioned medium による特異的な JNK の活性化が確認できた。さらに、アフリカツメガエル胚における、Wnt5A による JNK 活性化の機能を調べるため、アフリカツメガエルの JNK 及び MKK7 をクローニングした。アフリカツメガエルの JNK、MKK7 はマウスの JNK1、MKK7 とアミノ酸レベルで、それぞれ 93%、81%の相同性を示した。アフリカツメガエルにおいて JNK1、MKK7の両者は maternal に発現しており、原腸胚では予定外胚葉及び中胚葉に、神経胚及び尾芽胚では主に背側領域に発現が見られた。

Wnt1、Wnt3、Wnt8などは古典的 Wnt シグナル経路を活性化し、アフリカツメガエル胚の腹側に二次軸を誘導することができるが、Wnt4、Wnt5A、Wnt11などの Wnt は二次軸誘導能がなく、胚に発現させると収束的伸張を抑制することが知られている。Wnt5A による収束的伸長の抑制に MKK7-JNK 経路の活性化が関わっているのではないかと考えた。アフリカツメガエル胚のアニマルキャップを切り出して、アクチピンや BVg1 といった TGF- β ファミリー分子を添加して培養すると、中胚葉が誘導されるとともに組織の伸長が見られるが、これは収束的伸長によるものと考えられている。アニマルキャップにおいて Wnt5A を発現させると、BVg1 の存在下でも収束的伸長が抑制され、アニマルキャップは伸長しなかった。ところが、Wnt5A に加えて、MKK7-JNK 経路の活性化を抑制すると考えられる JNK 及び MKK7 の変異体、JNK-APF、MKK7-3A を同時に発現させると、アニマルキャップの伸長は回復した。またこの時、Wnt5A、JNK、MKK7の共発現によって中胚葉マーカーの発現量に差は見られなかった。以上の結果から、Wnt5A による収束的伸長の抑制には、MKK7-JNK 経路の活性化が関与していることが示された。さらに、MKK7の活性型変異体 MKK7-DED をアニマルキャップに発現させ MKK7-JNK 経路の過剰な活性化を誘導することで、アニマルキャップの収束的伸張が抑制されることを示した。さらに、アフリカツメガエルの 4 細胞期胚の背側領域に mRNA をインジェクションし、JNK-WT と MKK7-DED を発現させ、MKK7-JNK 経路を活性化させた。その結果、神経胚期(stage 14)においては、神経板が閉じないという表現型がみられた。さらに、発生後期(stage 34)においては、体軸が頭尾軸方向に短くかつ背側に湾曲する表現型が見られた。これらは、原腸陥入が特異的に阻害されたときによく見られる表現型である。JNK-WT と MKK7-3A を発現させた胚では、このような表現型は見られなかった。従って、MKK7-JNK 経路の過剰な活性化を誘導することで、原腸陥入

が抑制されることが示唆された。また、逆にアンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)を用い、内在的 JNK の活性を抑制した場合でも、背側に湾曲し頭尾軸方向に短縮した表現型が見られた。以上の結果から、原腸陥入における収束的伸長には適切なレベルの MKK7 及び JNK の活性が必要であることが示された。以前の報告で、アフリカツメガエル胚において、収束的伸長に関わる Dishevelled の野生型を過剰発現させた場合でも、逆にドミナントネガティブ型の Dishevelled を過剰発現させた場合でも、正常な収束的伸長が抑制されることが示されている。また、同様の現象はショウジョウバエの平面極性においても見られる。これらの結果から、正常な収束的伸長には適切な強度のシグナルが必要であると考えられる。

(II) 原腸陥入におけるプロテインキナーゼ Par-1、aPKC の機能

Par 遺伝子は、胚の非対称分裂を制御する遺伝子群として、線虫において最初に同定された。Par 遺伝子群としては、Par-1 から 6、及び atypical PKC (aPKC) が知られている。このうちセリン/スレオニンキナーゼ Par-1 は、線虫 1 細胞期胚の後方表層に非対称に分布して極性を制御することが知られている。これまで Par-1 に関しては線虫やショウジョウバエの発生における機能については解析が進んでいるが、脊椎動物の発生過程における機能は不明であった。また、他の Par 遺伝子群の具体的な作用機構についても不明な点が多かった。そこで、囊胚遺伝子ライブラリーからアフリカツメガエルの Par-1 を単離し、その胚発生における機能解析を行った。アフリカツメガエル Par-1 は、785 個のアミノ酸から成り、ヒト Par-1b とアミノ酸レベルで 79% の相同性を示した。また、RT-PCR により Par-1 がアフリカツメガエル初期胚で継続的に発現することが分かった。次に、野生型 Par-1 をアフリカツメガエル胚の動物極側に過剰発現させアニマルキャップアッセイをおこなった。一般にアニマルキャップをアクチビン処理すると、中胚葉が誘導されるとともに原腸陥入時の細胞運動と類似した組織の伸張が見られることが知られている。野生型 Par-1 の過剰発現により、このようなアクチビンによるアニマルキャップの伸張は著しく阻害されたが、中胚葉の誘導に関しては阻害されなかった。すなわち、Par-1 は組織の分化ではなく、原腸陥入における細胞運動を制御することが示唆された。また、野生型の Par-1 をアフリカツメガエル胚の背側赤道領域に発現させ尾芽胚期まで培養すると、体軸が短く背側に屈曲した表現型が観察された。これは、原腸陥入が阻害されたことを示している。ドミナントネガティブ型の Par-1 (Par-1-K86R や Par-1-T212A/S216A) あるいは Par-1 の MO による実験によって、野生型の過剰発現実験と同じく、原腸陥入の阻害が観察された。すなわち、Par-1 の適切な活性が、原腸陥入に必要であることが示唆された。さらに、Par 遺伝子群の他のメンバーである PDZ ドメインをもつ Par-3 及び Par-6 の過剰発現によって、原腸陥入の阻害が観察された。Par-6 のア MO

によっても原腸陥入の阻害が観察されたため、Par-6 の適切な活性が原腸陥入に必要であることが示唆された。また、aPKC についても検討を行った。ドミナントネガティブ型 aPKC-K275E の過剰発現により、アクチピンによるアニマルキャップの伸張及び胚の原腸陥入が著しく阻害されたが、野生型 aPKC では阻害されなかった。すなわち、aPKC が原腸陥入の進行に必須の役割をになうことが示された。このように、Par 遺伝子群が脊椎動物の発生段階の初期において、原腸陥入の制御に必要であることを初めて見出した。

2002年にPar遺伝子群のメンバーであるPar-5が線虫の14-3-3ホモログであることが示されたが、その極性形成における役割は十分に解明されていなかった。そこで、14-3-3とPar遺伝子群の相互作用の解析を試みた。まず、哺乳類培養細胞を用いた共沈実験を行ったところ、Par遺伝子群のうちPar-1及びPar-3は14-3-3と結合するが、Par-6とaPKCは結合しないことがわかった。また、14-3-3のリン酸化セリンを認識する部位(phosphoserine binding pocket)に変異を導入すると、Par-1及びPar-3との結合が見られなくなった。すなわち、14-3-3がリン酸化セリン依存的にPar-3やPar-1と結合することが示唆された。さらに、Par-1と14-3-3の結合は、PKCのインヒビターであるbisindolylmaleimide Iで阻害されることを示した。一方、PKAやPI3K、MEK、JNK、p38などの他のキナーゼのインヒビターでは阻害されなかった。このように、Par-1と14-3-3の結合はPKC依存的であることがわかった。一方、Par-3と14-3-3の結合はbisindolylmaleimide Iや他の様々なキナーゼのインヒビターによって阻害されなかったため、未知のキナーゼ依存的であると考えられた。PKCのなかでは、aPKCがPar遺伝子群のメンバーとして知られているので、aPKCに注目して共沈実験をおこなった。すると、Par-1と14-3-3の結合はaPKCの共発現により促進されることが示された。そこで、aPKCが直接Par-1をリン酸化する可能性について検討した。さまざまなdeletion mutantやpoint mutantを基質としておこなったin vitro kinase assayにより、aPKCがPar-1のスペーサー領域に存在する593番目のスレオニン残基と646番目のセリン残基をリン酸化することを示した。さらに、これらのリン酸化部位依存的に14-3-3がPar-1と結合することを見出した。リン酸化部位をアラニンに置換した変異体Par-1-T593A/S646AのmRNAをアフリカツメガエル胚に微量注入したところ、野生型のPar-1と比べて原腸陥入が強く阻害された。したがって、aPKC依存的な14-3-3とPar-1の結合が原腸陥入の適切な進行に重要であることがわかった。さらに、アフリカツメガエル胚及び哺乳類培養細胞の両方において、Par-1の細胞内局在が14-3-3依存的に細胞膜から細胞質に変化することを観察した。一方、Par-1のキナーゼ活性については、14-3-3やaPKCによって影響を受けなかった。すなわち、14-3-3とaPKCがPar-1の細胞内局在を制御することによって、正常な原腸陥入が起こることが示唆された。

Par 遺伝子群は、哺乳類において神経細胞や上皮細胞の極性形成に関与することが、近年報告されている。また Par-1 が、神経変性疾患にともなう微小管結合タンパク質 Tau の過剰なリン酸化をひき起こすことも報告されている。今回の研究によって明らかとなった Par-1、14-3-3/Par-5 及び aPKC の相互関係は、神経細胞や上皮細胞の極性形成、あるいは神経変性疾患の過程においても作用している可能性が高く、新たなシグナルネットワークの発見として非常に価値が高いと思われる。

(III) ILK による細胞接着の制御

インテグリンを介した細胞と細胞外基質との接着は、遺伝子発現、細胞の生存・増殖及び、胚発生などにおいて重要な役割を果たしている。インテグリン結合分子として同定された ILK (integrin-linked kinase) は、ショウジョウバエや線虫を用いた遺伝学的な解析から、筋形成に重要な役割を果たしており、細胞と細胞外基質との接着においてアダプター分子として働いていることが示されていた。また、培養細胞を用いた解析からは、ILK は Wnt シグナル伝達経路や、PKB/AKT シグナル経路などのシグナル分子として、細胞の生存、分化、細胞周期の進行などを制御していることが示されていた。最近、ILK のノックアウトマウスが報告され、着床前後の時期において胎生致死であり、ILK が胚盤葉上層の形成に必須の役割を果たしていることが報告された。着床は、初期胚発生の中でも比較的早い時期に起こる、哺乳類特有の発生現象であるため、原腸陥入運動や中胚葉誘導といったような、脊椎動物に共通の初期発生過程における ILK の機能は不明であった。そこで、アフリカツメガエルをモデル系として用い、脊椎動物初期胚発生過程における ILK の機能解析を行った。まず、卵母細胞遺伝子ライブラリーからアフリカツメガエルの ILK を単離した。アフリカツメガエル ILK は 452 アミノ酸からなり、ヒト、ショウジョウバエ、線虫 ILK とは、アミノ酸レベルでそれぞれ、88%、59%、56%の相同性を示した。Whole mount in situ hybridization 及び RT-PCR により、ILK はアフリカツメガエル初期胚内で継続的かつ遍在的に発現することがわかった。哺乳類培養細胞の系において ILK が Wnt シグナルを正に制御することが示唆されていたので、ILK と Wnt シグナルの関連性について、アフリカツメガエル初期胚を用いて検討した。TOP-FLASH を用いたレポーターアッセイや腹側割球へのインジェクションを行ったところ、ILK は Wnt シグナル伝達経路の活性化能を持たなかった。すなわち、少なくともアフリカツメガエルの初期胚発生過程においては、ILK は Wnt シグナルとは独立の経路ではたらく可能性が示唆された。次に、ILK に対する MO を作成し、4細胞期の背側赤道領域に微量注入したところ、原口の閉鎖の遅延及び頭尾軸方向への体軸の伸長の阻害が観察された。さらに、ILK の機能を詳細に解析するために、アニマルキャップアッセイを行った。アニマルキャ

プをアクチビン処理すると、中胚葉が誘導されると共に、原腸陥入の細胞運動と類似した組織の伸長が見られることが知られている。ILK に対する MO の微量注入により、アクチビン処理によるアニマルキャップの中胚葉への分化は阻害しなかったが、細胞が特異的に組織から脱落するという現象が観察された。背側赤道領域の組織を用いた実験でも同様に、ILK に対する MO の微量注入によって細胞同士及び細胞と細胞外マトリクスとの接着性の異常が観察された。以上の結果から、ILK は、脊椎動物の初期胚発生過程において、細胞同士及び細胞と細胞外マトリクスとの接着性を制御する分子として機能しており、原腸陥入期における細胞運動の制御に必須の役割を果たしていることが示された。

(IV) MEK5-ERK5 経路による神経分化の制御

外胚葉領域に神経組織が形成される神経誘導の現象は 1900 年代前半から知られており、盛んに研究が行われている。近年の神経誘導因子の発見によりその分子メカニズムが徐々に解明されつつあり、神経誘導因子である Chordin、Noggin が BMP シグナルの阻害因子であること、BMP シグナルの抑制が神経誘導において中心的な役割を果たしていることが明らかとなっている。BMP シグナルを阻害した際に誘導される神経化因子としては、SoxD、Zic1 などいくつかの転写因子が同定されている。しかし、神経分化を制御する細胞内シグナル伝達経路に関しては、その重要性にも関わらず、スクリーニングの困難さからあまり解析が進んでいない。そこで、そのようなシグナル伝達経路として、MAPK 経路のひとつである MEK5-ERK5 経路に着目し、この経路が神経分化に必須な新たな経路であることを明らかにした。

まず、アフリカツメガエルの初期胚から ERK5、MEK5 を単離した。RT-PCR の結果から ERK5、MEK5 とともに初期発生を通して発現がみられ、また *in situ* ハイブリダイゼーションにより、ERK5 は原腸胚以前では外胚葉組織、神経胚においては神経管、尾芽胚以降では頭部と中枢神経での強い発現が示された。次に、ERK5、MEK5 の機能を解析するために、ERK5 あるいは MEK5 の MO を用いて内在性の ERK5、MEK5 の発現を阻害した。その結果、ERK5-MO あるいは MEK5-MO により、ともに頭部、特に眼の形成に異常がみられた。この表現型を分子的に解析するため、アニマルキャップアッセイを用いて細胞分化における MEK5-ERK5 経路の機能を調べた。予定外胚葉領域であるアニマルキャップは自立的に表皮へと分化するが、アクチビンや優性不能型の BMP レセプターによって強制的に神経組織を誘導させることができる。これらの因子による神経誘導は、ERK5-MO あるいは MEK5-MO の存在下では阻害された。さらに、ERK5-MO 存在下では、*in vivo* でも神経マーカーの発現が阻害された。また、アニマルキャップにおいて、MEK5 の活性型と ERK5 の野生型の強制発

現による MEK5-ERK5 経路の活性化により、神経組織の誘導が見られた。これらの結果により、MEK5-ERK5 経路の活性化が神経分化に必要十分であることが明らかとなった。さらに、MEK5-ERK5 経路の作用点を解析するために、神経化因子として知られている SoxD、Zicr1、Xngnr1 との上下関係を検討した。これらの分子はすべて転写因子であり、SoxD は DNA と結合する HMG ドメインを、Zicr1 はジンクフィンガードメインを、Xngnr1 はヘリックス・ループ・ヘリックス構造を持つ。神経分化の分子機構としては、BMP シグナルの阻害により Zicr1 の誘導が見られ、さらに Zicr1 は SoxD を、SoxD は Xngnr1 の発現を誘導することが知られている。SoxD による神経分化は、ERK5-MO あるいは MEK5-MO の存在下では抑制された。一方、Xngnr1 による神経分化は ERK5-MO あるいは MEK5-MO によって阻害されなかった。さらに、MEK5-ERK5 経路の活性化により、Xngnr1 の発現誘導が見られた。これらの結果から、MEK5-ERK5 経路は SoxD の下流、かつ Xngnr1 の上流で神経分化を制御していると考えられる。本研究によって明らかとなった MEK5-ERK5 経路の神経分化への関与は、これまで全く予想されておらず、神経分化において機能する新たなシグナル伝達経路の発見として非常に意義深いものである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

以上のように、原腸陥入や神経分化において機能するプロテインキナーゼを複数同定し、さらにそれぞれの上流や下流で機能するシグナル分子についても機能解析をおこなった。現在、プロテオミクスやマイクロアレイにより、これらのキナーゼの活性化因子や基質、あるいは下流で変化する遺伝子発現プロファイルをより網羅的に明らかにし、原腸陥入や神経分化を制御するシグナル伝達のネットワークの詳細を理解することを試みている。

アフリカツメガエルの原腸陥入は細胞極性や細胞移動を制御するシグナル伝達研究のモデルとして優れているため、原腸陥入をモデルとして解明したシグナル伝達ネットワークは、高等脊椎動物の発生過程における形態形成プログラムの解明に大きく貢献するのみならず、癌などの細胞極性の異常をともなう病態の制御機構の解明にも多大な効果を及ぼすことが期待される。一方、神経分化のシグナル伝達の解析は、神経疾患治療の基盤研究となりうることから、ますます重要性が増している。そこで、MEK5-ERK5 経路については、マウス ES 細胞においても神経分化を引き起こしうるかについて解析を行い、神経難病の幹細胞治療への応用を目指したい。また、プロテインキナーゼは創薬ターゲットとして非常に注目されているが、生化学的性質や生理的機能の解析が進んでいないキナーゼが多いため、基礎研究の重要性が近年ますます高まっている。例えば、本研究でとりあげたプロテ

インキナーゼ Par-1 は、神経変性疾患にともなう微小管結合タンパク質 Tau の過剰なリン酸化をひき起こすことで知られている。今回の研究によって明らかになった発生生物学的・生化学的知見が、キナーゼを標的とした新薬開発にあたっての重要な基礎的情報となることも期待できる。

3.4 西田グループ(名古屋大学大学院・理学研究科)

(1) 研究実施内容及び成果

ショウジョウバエは、遺伝学・分子生物学・発生学などがよく発達し、P 因子を用いたゲノム操作が容易であり、またゲノムプロジェクトも完了しており、モデル生物として特に優れる。ショウジョウバエをモデル系として採用し、発生・分化に関わる新規因子の機能解析を目指した。そして、その主要テーマとして、個体や器官のサイズを決める新規のシグナル伝達経路の解明を取り上げた。この主要テーマとともに、形態形成期に細胞の形態変化・運動を制御するミオシンフォスファターゼの主要サブユニットである DMBS や、神経発生に関わる転写調節因子 dMi-2、自然免疫や発生に関わる Toll 受容体ファミリーの解析も同時に進めた。

(I) サイズを決定する新規シグナル伝達経路の解析

生物の個体や器官の大きさを決める仕組みは、生物学上の重要な基本問題の一つであるが、ほとんど解明されていないのが現状である。個体や器官の大きさは、主にそれを構成する細胞の数とサイズとによって決められると考えられる。細胞の数は、細胞分裂の回数とアポトーシスとの間のバランスによって決められ、細胞のサイズは DNA 量や細胞成長の度合いによって決められると考えられる。しかし、どの時点で細胞増殖を停止するのかということは全く未知である。ショウジョウバエをモデル系として、発育が遅く小さな個体を生じる P 因子挿入突然変異を検索し、X 染色体上に 1 遺伝子座を同定した。この突然変異体 Gp99 では、細胞の数とサイズが減少することにより、個体サイズが小さくなっていることがわかった。この突然変異にホモ接合のメスは産卵するが、胚は分割期で致死となる。そして、すべての核において M 期で細胞周期が停止していた。分割期の細胞周期は S 期と M 期とのみからなり、ギャップ期がないので、4 つの期からなる幼虫脳における細胞周期を調べた。その結果、G1 期と M 期に主に異常を生じていることがわかった。また、この突然変異は hypomorph であったので、EMS による突然変異誘発により、新たに null 変異体をも分離した。この変異体では、孵化

後ほとんど発育せずに1週間以上にわたって生存を続ける。このように、この遺伝子は、成長とともに細胞周期制御にも関わるということが明らかになった。

Gp99 突然変異体に挿入している P 因子をプローブとして、遺伝子と cDNA をクローニングした。そして、塩基配列を決定し、コードしているタンパク質のアミノ酸配列を推定した。その結果、418 アミノ酸残基からなる新規のタンパク質をコードしており、C 末側半分の配列が酵母からヒトに至るまで強く保存されていることがわかった。この研究の過程で、酵母遺伝子がクローニングされ、ミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリアタンパク質の移送に関わる Tim50 というタンパク質をコードすることが報告された。そこで、HA タグを付けたショウジョウバエ cDNA を個体に導入し、細胞内局在を調べたところ、ミトコンドリアに局在することがわかり、Tim50 の相同遺伝子であると考えられる。また、突然変異体では、ミトコンドリア生成が異常になっていることも確認した。酵母、線虫、ヒトでは、Tim50 相同遺伝子は1種ずつしかないのに、ショウジョウバエのゲノム中には3種存在することがわかった。発現パターンを解析した結果、最初に単離した遺伝子(dTim50-1)は、腸管で強い発現が見られ、その他の全身で弱い発現があるのに対して、残りの2遺伝子(dTim50-2, dTim50-3)は、精巣特異的に発現がみられた。その内の一つ dTim50-2 の欠失突然変異を P 因子を用いて作製したところ、精巣の外見的な異常は認められなかったが、成熟した精子の形成が強く阻害されていることがわかった。

GAL4/UASシステムで、dTim50-1 cDNA を発現するトランスジェニック系統を多数作製した。アクチンプロモーターで全身に発現させると、大部分の系統は致死となった。低レベルで発現する系統では、生存可能で、また、突然変異体の表現型を回復することができる。中レベル発現系統について、複眼特異的に発現を誘導すると、いわゆる“粗複眼表現型”を示した。幼虫の複眼原基をアクリジンオレンジで染色すると、アポトーシスが誘発されていることがわかった。また、このアポトーシスは、バキュロウィルスのカスパーゼインヒビターである p35 を共発現すると完全に抑制できることがわかった。また、ショウジョウバエでのアポトーシス・インデューサーである reaper, hid, grim(3 遺伝子はクラスターを形成している)の遺伝子量を半減させると、粗複眼表現型が有為に回復することから、アポトーシスの誘導に、これら遺伝子が関与していると考えられる。一方、Gp99 突然変異体では、しばしば腸管においてネクローシスが認められることから、この遺伝子(dTim50-1)はアポトーシスの誘発に関与すると考えられる。

ショウジョウバエの複眼は、約 750 の個眼から構成される。dTim50-1 cDNA を p35 と共に複眼原基で発現させると、個眼数が約 800 に増加した。このことから、dTim50-1 は、細胞増殖の誘発にも関与することが示唆された。この個眼数が増加する表現型を利用して各種の増殖関連突然変異との遺伝的相互作用を解析したところ、E2F、Cyclin E の遺伝子量を半減すると抑圧され、反対に CDK インヒビ

ターである dacapo の遺伝子量を半減すると増強されることから、dTim50-1 は、E2F の上流で機能することが示唆された。dTim50-1 cDNA を engrailed プロモーターを用いて翅原基の後部コンパートメントで発現させると、細胞サイズが、前部コンパートメントのものに比べて有為に大きくなっていった。これは、FACS 解析によっても示された。以上の結果から、dTim50-1 はアポトーシスの誘導のみならず、細胞成長や細胞分裂をも誘導することが明らかになった。

近年、ショウジョウバエを中心として、細胞成長に関わるシグナル伝達経路が明らかにされつつあり、インスリンシグナル伝達経路や、TOR 経路、Myc などの経路が明らかにされつつある。dTim50-1 cDNA と p35 の共発現による個眼数の増加という表現型を利用して、これらシグナル伝達経路の突然変異との遺伝的相互作用を解析したが、明瞭な関係を認めることができなかった。このことから、ミトコンドリアにおけるエネルギー生産などのシグナルを伝達する新規のシグナル伝達経路の存在が示唆された。

データベースの検索から、Tim50 に類似した配列が他にも存在し、大きく 3 グループに分類可能な、進化的に保存された大きな遺伝子ファミリーを形成していることが明らかになった。その一つのグループには、出芽酵母では Psr1、Psr2 の互いに類似した 2 遺伝子が含まれ、核膜に存在してその二重突然変異体では、高い NaCl 濃度に対する耐性に必要であるが、KCl やソルビトールに対しては関係ないことが示されている。ショウジョウバエにも 1 種存在し、HA タグの cDNA を導入して発現することにより、やはり核膜に存在することを明らかにした。この遺伝子の欠損は生存可能であり、NaCl などに対する耐性を調べたが、顕著な効果を認めることができなかった。もう一つのグループは、出芽酵母では Nem1 をコードしており、核膜の形成に関与することが明らかにされている。ショウジョウバエには、3 種類似た遺伝子が存在することがわかった。この内の一つについては P 因子挿入突然変異系統が存在し、それを入手して解析を進めている。この突然変異は hypomorph であり、生存可能であったが、オスの妊性が非常に低下していた。精巢の形態異常が認められ、わずかながら成熟精子が形成されることがわかった。In situ hybridization により、この遺伝子は、減数分裂前の細胞で発現が認められ、その細胞の過増殖が認められた。これら細胞の増殖には、TGF- β ファミリーに属する dpp が正に関与していることが知られるが、dpp シグナル伝達経路の正・負の突然変異との遺伝的相互作用の解析から、この遺伝子は dpp シグナル伝達経路に対して負に働いて、減数分裂前の細胞の過増殖を抑制していることが示唆された。P 因子の不正確な転位により、欠失突然変異体を作製したが、発生の様々な段階で致死となることから、発生過程で様々な過程に関与することが示唆された。また、HA タグ cDNA の導入・発現から、核膜よりも細胞質に存在することが示された。この遺伝子は、多くの組織で発現し、また、母性 mRNA 伽藍に多量に蓄積されていることがわかった。一方、他の 2

遺伝子は、精巢特異的に発現することを見いだした。

(II) ミオシンフォスファターゼの発生過程における機能解析

非筋ミオシン II は、細胞の形態や運動を制御することで、発生過程の様々な局面で機能している。ミオシンフォスファターゼは、非筋ミオシン II のミオシン軽鎖を脱リン酸化することで、負の制御因子として機能する。ミオシンフォスファターゼは 3 つのサブユニットから構成され、その内、ミオシン結合サブユニット MBS が、上流からのシグナルの受容と、基質特異性を決める中心的な役割を果たしている。ショウジョウバエのホモログ(DMBS)の機能を解析する目的で、まず cDNA クローンを単離し、その塩基配列からヒト MBS に類似したタンパク質の一次構造を明らかにした。また、スプライシングの違いにより 129 アミノ酸残基が挿入されたものと、そうでないものを生じることを明らかにした他、複数の cDNA クローンの塩基配列から、他にもアイソフォームの存在することも明らかにした。Rho キナーゼによってリン酸化されると考えられる配列が保存されており、実際にその部位がリン酸化されることを *in vitro* で明らかにした。

DMBS の P 因子挿入突然変異及び EMS 誘発突然変異を同定した。DMBS に対する抗体を作製し、突然変異体ではタンパク質がほとんど消失していることを認めた。Northern 解析、及び *in situ* hybridization 解析から、発生過程を通じて全身で発現し、また大量の母性 mRNA の存在を認めた。そのため、null 変異体でも胚発生は正常に進行し、1 令幼虫で致死となる。そこで、生殖系列クローン法を用いて、母性および胚自身の DMBS 遺伝子を欠損した胚を作製したところ、胚発生後期に生じる Dorsal closure の過程に異常が認められた。Dorsal closure は、上皮が背正中線上で融合する現象で、これには細胞分裂は伴わず、細胞が伸長することによっておこる。そして、この過程で非筋ミオシン II が重要な役割を担っていることが知られている。突然変異胚では、表皮の先端細胞の伸張に異常が認められ、非筋ミオシン II の不活化が、正常な Dorsal closure に重要なプロセスであることを示唆した。また、非筋ミオシン II をコードする zipper 突然変異との遺伝的相互作用の解析から、DMBS は zipper に対して抑圧的に作用することを明らかにした。

DMBS の null 変異と hypomorph とのヘテロ接合体では、3 令幼虫後期まで発生し、そのまましばらく生存した後、致死となる。このような幼虫体内では、成虫原基細胞の増殖が引き続き行われ、通常は成虫原基は一層の細胞層からなるのに対して、多層の細胞塊を形成することを見いだした。このことから、成虫原基細胞の上皮性組織の性質の消失が示唆された。そこで、null 突然変異を用いてクローン解析を行った。その結果、突然変異クローンでは、上皮性組織の伸長した形態が失われ、丸くなって基盤側に固まって存在していた。また、上皮性細胞の先端部で発現している Dlg や DE カ

ドヘリンなどの adherence junction を特徴づけるタンパク質が検出されなくなっていた。代わって、F アクチンが先端部に凝集していることが認められた。また、変異細胞は、コンパートメント境界を越えて移動したり、癌細胞の転位に類似した行動をも示した。DMBS に対する抗体を作製したところ、DE カドヘリンと同じ局在を示すことが示され、adherence junction におけるダイナミックな非筋ミオシン II の活性化と不活性化が、上皮性組織の特性の維持に重要であることが示唆された。

(III) dMi-2 クロマチンリモデリング因子の神経発生における機能解析

Mi-2 は、最初ヒト自己免疫疾患の自己抗原として同定されたが、その後の研究から、ヒストンデアセチラーゼやメチル化 DNA 結合タンパク質などと NuRD コンプレックスと呼ばれる複合体を形成し、クロマチンリモデリングを行って、その領域の遺伝的活性の恒久的な不活化に関わる因子であることが明らかにされた。ショウジョウバエ相同遺伝子も同定され、突然変異体も分離されている。この遺伝子は、卵形成時に大量に発現され、卵細胞質中に mRNA が蓄積される。胚発生期にもユビキタスに発現され、そのため、突然変異体は 1-2 令幼虫で致死となり、形態的異常は特に認められていなかった。突然変異体の約 0.1% は、成虫まで発生し、背板や翅に過剰な剛毛 (機械的刺激に対する受容体) を形成することを見い出した。また、新たに dMi-2 遺伝子内に GAL4 を含む P 因子の挿入された系統を見だし、同様の表現型を示すことと、致死性や成虫での剛毛過剰形成などの表現型が、この P 因子の GAL4 による導入 UAS-dMi-2 の発現により回復することを示した。剛毛の形成には、翅成虫原基内で形成された位置情報をもとに、最初に achaete や scute などのいわゆる proneural 遺伝子群が発現され、続いて Notch/Delta シグナル伝達系による側方抑制によって単一の sensory organ precursor (SOP) 細胞が生じる。dMi-2 突然変異体の成虫原基では proneural クラスタが拡張しており、SOP も過剰に形成されることを見いだした。このことから、dMi-2 による proneural 遺伝子群の発現抑制が、正常な剛毛形成に重要であることが示唆された。

これまで、3 令幼虫期には dMi-2 の発現はないとされていたが、Western blotting や抗体による組織染色で、3 令幼虫期にも強く発現していること、しかも、その発現パターンはユビキタスであり、proneural クラスタや、SOP 細胞でも発現していることを見い出した。dMi-2 は、転写抑制因子である tramtrack (ttk) と結合することが知られているが、ttk は proneural クラスタや SOP 細胞では発現しておらず、dMi-2 を含む NuRD コンプレックスが ttk によってリクルートされることによって、ヒストンの脱アセチル化などを通じて、proneural 遺伝子群の発現を抑制するものと考えられる。実際、唾腺染色体への抗体染色により、dMi-2 と ttk がほぼ完全に一致したパターンで分布すること、dMi-2 とアセチル化ヒストンの分布が排他的であることを見いだした。これらの結果は、上述のモデルを支持する

ものである。

(IV) ショウジョウバエ Toll 様受容体突然変異系統の作製と表現型の解析

Toll は、ショウジョウバエで背腹軸の異常を生じる突然変異の原因遺伝子として同定された。Toll 遺伝子のコードするタンパク質は一回膜貫通型の受容体で、相同遺伝子がショウジョウバエゲノム中に 9 つ、哺乳類のゲノム中には 10 以上見つかっている。哺乳類では Toll 様受容体は自然免疫系で異物の認識を行う受容体として機能することが明らかにされ、複数の Toll 様受容体がそれぞれ異なる異物の認識を行うことなどが詳細に研究されている。ショウジョウバエの Toll 様受容体については、Toll が初期胚で背腹軸の形成の制御に関わる他、幼虫及び成虫期に自然免疫系のシグナル伝達を行う受容体として機能することが明らかにされているが、Toll 以外の Toll 様受容体で突然変異系統の報告があるのは 18w のみで、他の 7 遺伝子については突然変異系統の存在は報告されておらず、個体レベルでの機能解析は進んでいない。そこで、突然変異系統の存在しない Toll 様受容体のうち Toll-4, -6, -7, -8 について、機能欠損突然変異系統の作製を行った。

Toll-6 と Toll-8 については、それぞれの遺伝子近傍にトランスポゾン (P 因子) の挿入系統が存在することがデータベース検索により発見された。これらの系統では Toll-6, -8 の転写は失われていなかったため、P 因子を再転移させることにより、Toll-6, Toll-8 それぞれの遺伝子を欠失した系統の作製を試みた。その結果、Toll-6, Toll-8 のコード領域に欠失を持つ系統をそれぞれ 2 系統得ることができた。得られた変異系統を観察した結果、Toll-8 については成虫で 10-20% の個体の肢に形態異常が認められた。Toll-6 変異系統については、正常に成虫まで発生はすすみ、外部形態の異常、妊性の異常は見られなかった。

Toll-4 と Toll-7 については遺伝子近傍に P 因子の挿入系統が存在しなかったため、相同組み換え法により点突然変異の導入を試みた。Toll-4 については、相同組み換えが起きた系統が 2 系統得られ、それぞれ Toll-4 コード領域に点突然変異、あるいは欠失が存在することから、Toll-4 遺伝子の機能が失われていると考えられた。Toll-7 については、相同組み換えにより Toll-7 コード領域に点突然変異、欠失の導入された系統が 2 系統得られた。作製した変異系統について、変異による異常を観察した。Toll-4, -7 については成虫まで正常に発生し、形態異常は見られず、妊性にも異常は見られなかった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

個体や器官のサイズを決める分子機構の解明は現在、急速に進みつつあり、多様な経路の関与が示されつつある。ショウジョウバエを用いた本研究から、ミトコンドリアからの ATP 産生などのシグナルを伝達する新規の経路の存在が示唆された。ショウジョウバエ実験系に特有の遺伝学的手法を駆使して、今後その新規のシグナル伝達経路の解明を展開してゆく予定である。それから予想される成果は、生物学上の基本問題の理解に貢献することが予想されるとともに、癌や各種遺伝病の理解にも貢献するものと思われる。

ミオシンフォスファターゼについては、モエシンとの遺伝的相互作用が予想されるため、Rho シグナル伝達経路との関連を含めて、研究を展開する予定である。ミオシンフォスファターゼは癌抑制遺伝子の一種としてみることもでき、癌細胞の転位機構の理解への貢献が期待される。

Tollファミリー受容体の変異体では、あまり顕著な表現型がみられないことから、機能的な重複が考えられ、多重変異体の作成により、機能解析を進めていく予定である。また、標的遺伝子である抗菌遺伝子のプロモーターを利用した解析系で、自然免疫シグナル伝達経路の新規の因子の探索も展開する予定である。ヒトにも相同遺伝子が見いだされれば、ヒト自然免疫系の理解にも貢献できるであろう。

4 研究参加者

松本研究グループ(松本 邦弘)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
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	平成 12 年 11 月 ~ 平成 17 年 10 月
杉本 勝則	名古屋大学大学院 理学研究科	助教授	動物細胞におけるシグナル伝達 因子の探索・解析	平成 12 年 11 月 ~ 平成 16 年 3 月
辻 順	名古屋大学大学院 理学研究科	助手	動物細胞における TAK1 の発生・ 分化における機能解明	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 3 月
久本 直毅	名古屋大学大学院 理学研究科	助教授	線虫における新規シグナル伝達 因子の探索・解析	平成 12 年 11 月 ~ 平成 17 年 10 月
花房 洋	名古屋大学大学院 理学研究科	助手	動物細胞におけるシグナル伝達 因子の探索・解析	平成 14 年 3 月 ~ 平成 17 年 10 月
伊藤 素行	名古屋大学大学院 理学研究科	特任助教授	ゼブラフィッシュにおけるシグナル 伝達因子の探索・解析	平成 16 年 1 月 ~ 平成 17 年 10 月
高江洲義一	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	動物細胞における TAK1 の発生・ 分化における機能解明	平成 13 年 4 月 ~ 平成 13 年 8 月
川崎 正人	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 13 年 4 月 ~ 平成 14 年 2 月
檀 一平太	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	動物細胞における TAK1 の発生・ 分化における機能解明	平成 13 年 4 月 ~ 平成 14 年 3 月
山岸 敦	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	動物細胞における TAK2 の発生・ 分化における機能解明	平成 13 年 4 月 ~ 平成 14 年 7 月
木村幸太郎	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 13 年 4 月 ~ 平成 15 年 2 月
日野 未歩	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 14 年 4 月 ~ 平成 14 年 6 月
水野 智亮	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 16 年 3 月
石谷 太	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	動物細胞における TAK1 の発生・ 分化における機能解明	平成 15 年 4 月 ~ 平成 15 年 7 月
稲田 仁	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 5 月
中野 俊詩	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 時給制研究 補助員	特定のタンパク質と相互作用する 因子の分離及び解析	平成 13 年 4 月 ~ 平成 13 年 6 月
牧 貴美香	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究補助員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 13 年 4 月 ~ 平成 16 年 8 月
太田真由美	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究補助員	特定のタンパク質と相互作用する 因子の分離及び解析	平成 13 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
檀 はるか	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 時給制研究 補助員	特定のタンパク質と相互作用する 因子の分離及び解析	平成 13 年 5 月 ~ 平成 14 年 3 月
加藤 実穂	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 時給制研究 補助員 CREST 研究補助員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析 線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 14 年 4 月 ~ 平成 14 年 7 月 平成 14 年 8 月 ~ 平成 17 年 10 月
近藤 多恵	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究補助員	特定のタンパク質と相互作用する 因子の分離及び解析	平成 14 年 4 月 ~ 平成 14 年 9 月

木村 友美	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 時給制研究 補助員	特定のタンパク質と相互作用する 因子の分離及び解析	平成 15 年 4 月 ~ 平成 15 年 6 月
汲田真知子	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究補助員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 16 年 1 月 ~ 平成 16 年 10 月
松尾 宏美	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究補助員	ゼブラフィッシュにおけるシグナル 伝達因子の探索・解析	平成 16 年 3 月 ~ 平成 17 年 10 月
寺西 明子	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究補助員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 16 年 10 月 ~ 平成 17 年 10 月
濱田 典子	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究補助員	線虫の発生・分化を制御する因子 の解析	平成 17 年 5 月 ~ 平成 17 年 10 月
今井 有紀	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 事務員	研究チームの予算の管理等の経 理的業務	平成 13 年 4 月 ~ 平成 16 年 1 月
中尾由美子	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 時給制事務 員	研究チームの予算の管理等の経 理的業務	平成 16 年 11 月 ~ 平成 17 年 10 月

辻研究グループ(辻 順)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
辻 順	ノースカロライナ州 立大学	助教授	動物細胞における細胞運命決定 を制御するシグナル伝達経路の 解明	平成 14 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
岸田 聡	名古屋大学大学院 理学研究科	大学院生	動物細胞における細胞運命決定 を制御するシグナル伝達経路の 解明	平成 14 年 7 月 ~ 平成 17 年 10 月
梶野 泰祐	名古屋大学大学院 理学研究科	大学院生	動物細胞における細胞運命決定 を制御するシグナル伝達経路の 解明	平成 14 年 10 月 ~ 平成 17 年 10 月
上村 規行	名古屋大学大学院 理学研究科	大学院生	動物細胞における細胞運命決定 を制御するシグナル伝達経路の 解明	平成 15 年 10 月 ~ 平成 17 年 10 月

澁谷研究グループ(澁谷 浩司)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
澁谷 浩司	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	教授	シグナル分子結合因子の単離及 び機能解析	平成 12 年 11 月 ~ 平成 17 年 10 月
漆山 誠一	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	助手	線虫、ショウジョウバエの系で同定 されたシグナル因子の動物細胞 におけるホモログについて、それ らの作用機構を解析	平成 12 年 11 月 ~ 平成 16 年 8 月
白壁 恭子	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	助手	アフリカツメガエル初期胚の発生・ 分化を制御する細胞内シグナル 伝達機構の解析	平成 14 年 4 月 ~ 平成 16 年 10 月
森口 徹生	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	特任助教授	アフリカツメガエル初期胚の発生・ 分化を制御する細胞内シグナル 伝達機構の解析	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月

川地 薫	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	CREST 研究員	アフリカツメガエル初期胚の発生・ 分化を制御する細胞内シグナル 伝達機構の解析	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
大河原美静	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	CREST 研究員	アフリカツメガエルを用いた機能 解析	平成 17 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
梅田 昭子	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	CREST 研究補助員	線虫、ショウジョウバエの系で同定 されたシグナル因子の動物細胞 におけるホモログの分離	平成 13 年 2 月～ 平成 15 年 1 月

西田研究グループ(西田 栄介)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
西田 栄介	京都大学大学院 生命科学研究科	教授	アフリカツメガエルと哺乳類培養 細胞を用いて、生化学的手法によ りシグナル因子の分離	平成 16 年 3 月～ 平成 17 年 10 月
福田 真	京都大学大学院 生命科学研究科	助手	アフリカツメガエルと哺乳類培養 細胞を用いて、生化学的手法によ りシグナル因子の分離	平成 12 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
日下部杜央	京都大学大学院 生命科学研究科	CREST 研究員	アフリカツメガエルと哺乳類培養 細胞を用いて、生化学的手法によ りシグナル因子の分離	平成 14 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
広津 崇亮	京都大学大学院 生命科学研究科	CREST 研究員	アフリカツメガエルと哺乳類培養 細胞を用いて、生化学的手法によ りシグナル因子の分離	平成 16 年 4 月～ 平成 16 年 12 月
青木 智子	京都大学大学院生 命科学研究科	CREST 研究補助員	Xenopus 初期発生におけるシグ ナル伝達因子の解析	平成 13 年 4 月～ 平成 14 年 3 月

西田研究グループ(西田 育巧)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
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	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
杉山 伸	名古屋大学大学院 理学研究科	助手	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	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
八木 克将	名古屋大学大学院 理学研究科	助手	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	平成 15 年 5 月～ 平成 17 年 10 月
水野 智亮	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	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	平成 13 年 4 月～ 平成 14 年 2 月

5 成果発表等

(1) 論文発表 (海外 55 件)

主要な海外の論文発表

1. Nishiwaki, K., Hisamoto, N., and **Matsumoto, K.** A metalloprotease disintegrin that controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 288, 2205-2208 (2000).
2. Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., **Shibuya, H.**, Irie, I., **Ninomiya-Tsuji, J.**, and **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).
3. Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., Danos, M. C., **Matsumoto, K.**, O'Connor, M. B., **Shibuya, H.**, and Ueno, N. TAK1 participates in JNK signaling during *Drosophila* development. **Mol. Cell Biol.** 20, 3015-3026 (2000).
4. Naiki, T., Shimomura, T., Kondo, T., **Matsumoto, K.**, and Sugimoto, K. Rfc5, in cooperation with Rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle. **Mol. Cell Biol.** 20, 5888-5896 (2000).
5. Kishimoto, K., **Matsumoto, K.**, and **Ninomiya-Tsuji, J.** TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. **J. Biol. Chem.** 275, 7359-7364 (2000).
6. Mochida, Y., Takeda, K., Saitoh, M., Nishitoh, H., Amagase, T., **Ninomiya-Tsuji, J.**, **Matsumoto, K.**, and Ichijo, H. ASK1 inhibits IL-1-induced NF- κ B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. **J. Biol. Chem.** 275, 32747-32752 (2000).
7. 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).
8. 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).
9. 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).

10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. 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).
16. 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).
17. Holtmann, H., Enninga, J., Kalble, S., Thiefes, A., Dorrie, A., Broemer, M., Winzen, R., Wilhelm, A., **Ninomiya-Tsuji, J.**, **Matsumoto, K.**, Resch, K., and Kracht, M. The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. **J. Biol. Chem.** 276, 3508-3516 (2001).
18. Hamada, M., **Ninomiya-Tsuji, J.**, Komaki, K., Ohnishi, M., Katsura, K., Ikeda, S., Kanamaru, R., **Matsumoto, K.**, and Tamura, S. Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. **J. Biol. Chem.** 276, 5753-5759 (2001).
19. 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).

20. Qian, Y., Commane, M., **Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K.**, and Li, X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the IL-1-induced activation of NF- κ B. **J. Biol. Chem.** 276, 41661-41667 (2001).
21. Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., **Matsumoto, K.**, Tan, M-W., and Ausubel, F. M. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. **Science** 297, 623-626 (2002).
22. Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P. A., Vale, R. D., **Matsumoto, K.**, and Herskowitz, I. The Khd1 protein, which has four KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. **EMBO J.** 21, 1158-1167 (2002).
23. Tanaka-Hino, M., Sagasti, A., Hisamoto, N., Kawasaki, M., Nakano, S., **Ninomiya-Tsuji, J.**, Bargmann, C. I., and **Matsumoto, K.** SEK-1 MAPKK mediates Ca²⁺ signaling to determine neuronal asymmetric development in *C. elegans*. **EMBO Rep.** 3, 56-62 (2002).
24. Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., **Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K.**, and Sakurai, N. Receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL, activates TAK1 MAPKKK through a signaling complex containing RANK, TAB2 and TRAF6. **Mol. Cell. Biol.** 22, 992-1000 (2002).
25. Jiang, Z., **Ninomiya-Tsuji, J.**, Qian, Y., **Matsumoto, K.**, and Xiaoxia, L. IRAK-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. **Mol. Cell. Biol.** 22, 7158-7167 (2002).
26. McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., **Matsumoto, K.**, and Davis, R. L. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. **Science** 302, 1765-1768 (2003).
27. Suzawa, M., Yanagisawa, J., Takada, I., Ohtake, F., Ogawa, S., Takeuchi, Y., **Shibuya, H.**, Gotoh, Y., **Matsumoto, K.**, and Kato, S. Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression of PPAR α function through the TAK1/TAB1-NLK mediated cascade. **Nature Cell Biol.** 5, 224-230 (2003).
28. Nakada, D., **Matsumoto, K.**, and Sugimoto, K. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. **Genes Dev.** 17, 1957-1962 (2003).
29. Ishitani, T., Takaesu, G., **Ninomiya-Tsuji, J., Shibuya, H.**, Gaynor, R. B., and **Matsumoto, K.** Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. **EMBO J.** 22, 6277-6288 (2003).

30. Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., **Shibuya, H.**, Moon, R. T., **Ninomiya-Tsuji, J.**, and **Matsumoto, K.** The TAK1-NLK MAPK cascade functions in the Wnt-5a/Ca²⁺ pathway to antagonize Wnt/ β -catenin signalling. **Mol. Cell. Biol.** 23, 131-139 (2003).
31. Sanjo, H., Takeda, K., Tsujimura, T., **Ninomiya-Tsuji, J.**, **Matsumoto, K.**, and Akira, S. TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for IL-1 signaling. **Mol. Cell. Biol.** 23, 1231-1238 (2003).
32. Ishitani, T., **Ninomiya-Tsuji, J.**, and **Matsumoto, K.** Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by MAP kinase-related NLK-dependent phosphorylation in Wnt/ β -catenin signalling. **Mol. Cell. Biol.** 23, 1379-1389 (2003).
33. Li, M. G., Katsura, K., Nomiyama, H., Komaki, K., **Ninomiya-Tsuji, J.**, **Matsumoto, K.**, Kobayashi, T., and Tamura, S. Regulation of the interleukin-1-induced signalling pathways by a novel member of protein phosphatase 2C family (PP2C ϵ). **J. Biol. Chem.** 278, 12013-12021 (2003).
34. **Ninomiya-Tsuji, J.**, Kajino, T., Ono, K., Ohtomo, T., Matsumoto, M., Shiina, M., Mihara, M., Tsuchiya, M., and **Matsumoto, K.** A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. **J. Biol. Chem.** 278, 18485-18490 (2003).
35. Nishiwaki, K., Kubota, Y., Chigira, Y., Roy, S. K., Suzuki, M., Schvarzstein, M., Jigami, Y., Hisamoto, N., and **Matsumoto, K.** An NDPase links ADAM protease glycosylation with organ morphogenesis in *C. elegans*. **Nature Cell Biol.** 6, 31-37 (2004).
36. Ohkawara, B., Shirakabe, K., Hyodo-Miura, J., Matsuo, R., Ueno, N., **Matsumoto, K.**, and **Shibuya, H.** Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF- β -mediated mesoderm induction. **Genes Dev.** 18, 381-386 (2004).
37. Kanei-Ishii, C., **Ninomiya-Tsuji, J.**, Tanikawa, J., Nomura, T., Ishitani, T., Kishida, S., Kokura, K., Kurahashi, T., Ichikawa-Iwata, E., Kim, Y., **Matsumoto, K.**, and Ishii, S. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. **Genes Dev.** 18, 816-829 (2004).
38. Mizuno, T., Hisamoto, N., Terada, T., Kondo, T., Adachi, M., **Nishida, E.**, Kim, D. H., Ausubel, F. M., and **Matsumoto, K.** The *C. elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. **EMBO J.** 23, 2226-2234 (2004).

39. Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., **Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K.**, and Ichijo, H. Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation. **EMBO Rep.** 5, 161-166 (2004).
40. Kim, D. H., Liberati, N. T., Mizuno, T., Inoue, H., Hisamoto, N., **Matsumoto, K.**, and Ausubel, F. M. Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101, 10990-10994 (2004).
41. Wan, J., Sun, L., Mendoza, J. W., Chui, Y. L., Huang, D. P., Chen, Z. J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W., Akira, S., **Matsumoto, K.**, Liu, Z., and Wu, Z. Elucidation of the JNK pathway mediated by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein. **Mol. Cell. Biol.** 24, 192-199 (2004).
42. Naiki, T., Wakayama, T., Nakada, D., **Matsumoto, K.**, and Sugimoto, K. Association of Rad9 with double-strand breaks through a Mec1-dependent mechanism. **Mol. Cell. Biol.** 24, 3277-3285 (2004).
43. Tadauchi, T., Inada, T., **Matsumoto, K.**, and Irie, K. Post-transcriptional regulation of HO expression by the Mkt1-Pbp1 complex. **Mol. Cell. Biol.** 24, 3670-3681 (2004).
44. Kimura, D. K., Miyawaki, A., **Matsumoto, K.**, and Mori, I. The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming. **Curr. Biol.** 14, 1291-1295 (2004).
45. Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., **Matsumoto, K.**, and **Nishida, E.** Shp2, an SH2-containing protein tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor sprouty. **J. Biol. Chem.** 279, 22992-22995 (2004).
46. Akiyama, S., Yonezawa, T., Kudo, T., Li, M. G., Wang, H., Ito, M., Yoshioka, K., **Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K.**, Kanamaru, R., Tamura, S., and Kobayashi, T. Activation mechanism of c-Jun amino-terminal kinase in the course of neural differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. **J. Biol. Chem.** 279, 36616-36620 (2004).
47. Ishitani, T., **Matsumoto, K.**, Chitnis, A. B., and Itoh, M. Nrarp functions to modulate neural-crest-cell differentiation by regulating LEF1 protein stability. **Nature Cell Biol.** 7, 1106-1112 (2005).
48. Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., **Matsumoto, K.**, Takeda, K., and Ichijo, H. ROS-dependent activation of TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. **Nature Immunol.** 6, 587-592 (2005).

49. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., **Ninomiya-Tsuji, J.**, Yamamoto, M., Kawai, T., **Matsumoto, K.**, Takeuchi, O., and Akira, S. Essential function of the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. **Nature Immunol.** 6, 1087-1095 (2005).
50. Inoue, H., Hisamoto, N., An, J. H., Oliveira, R. P., **Nishida, E.**, Blackwell, T. K., and **Matsumoto, K.** The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. **Genes Dev.** 19, 2278-2283 (2005).
51. Jae-Hyuck Shim, J-H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K-Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., **Matsumoto, K.**, and Ghosh, S. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. **Genes Dev.** 19, 2668-2681 (2005).
52. Kojima, H., Sasaki, T., Ishitani, T., Iemura, S., Zhao, H., Kaneko, S., Kunimoto, H., Natsume, T., **Matsumoto, K.**, and Nakajima, K. STAT3 enhances TAK1-dependent NLK activation for its Ser727 phosphorylation by acting as a scaffold specifically in IL-6 signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102, 4524-4529 (2005).
53. An, J. H., Vranas, K., Lucke, M., Inoue, H., Hisamoto, N., **Matsumoto, K.**, and Blackwell, T. K. Regulation of the C. elegans oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102, 16275-16280 (2005).
54. Sakamoto, R., Byrd, D. T., Brown, H. M., Hisamoto, N., **Matsumoto, K.**, and Jin, I. The C. elegans UNC-14 RUN domain protein binds to the Kinesin-1/UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization. **Mol. Biol. Cell** 16, 483-496 (2005).
55. Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., **Matsumoto, K.**, and **Shibuya, H.** WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled kinases, SPAK and OSR1. **J. Biol. Chem.** In press (2005).

(2) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

川崎 正人、久本 直毅、坂本 リエ、辻 順、D. Byrd、Y. Jin、松本 邦弘
 線虫の JNK MAP キナーゼカスケードによるシナプス配置制御機構
 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル 平成12年12月14日

高江洲 義一、岸田 聡、辻 順、松本 邦弘
 IL-1 シグナル伝達経路における IRAK による TAK1 MAP3K の活性化機構
 第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル

ル 平成12年12月14日

近藤 多恵、松本 邦弘、杉本 勝則

出芽酵母におけるDNA二重鎖切断時のチェックポイントコントロール

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
平成12年12月13日

石谷 太、辻 順、澁谷 浩司、久本 直毅、松本 邦弘

Wnt シグナル伝達系を制御する TAK1-NLK MAP キナーゼカスケード

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
平成12年12月15日

日野 未歩、久本 直毅、中野 俊詩、川崎 正人、辻 順、A. Sagastj、C. Bargmann、松本 邦弘

線虫の神経左右非対称性を制御する新規 MAPK カスケード

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
平成12年12月16日

内木 隆寛、下村 俊泰、近藤 多恵、松本 邦弘、杉本 勝則

出芽酵母Rad24-RFCタンパク複合体は細胞周期を通してDNA損傷チェックポイントを制御する

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
平成12年12月16日

岸田 聡、高江洲 義一、辻 順、松本 邦弘

IL-1 シグナル伝達経路における TAK1 のネガティブフィードバック制御

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
ル 平成12年12月14日

若山 達志、近藤 多恵、安藤 聖子、松本 邦弘、杉本 勝則

出芽酵母Mec1結合タンパク質Pie1は、細胞増殖とチェックポイント応答を制御する

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
平成12年12月16日

井上 英樹、館野 実、鎌田このみ、高江洲 義一、入江 賢児、

安達(山田) 卓、辻 順、西田 育巧、松本 邦弘

ショウジョウバエの新規 MAP3K を用いた p38MAPK カスケードの機能解析

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
平成12年12月14日

多々内 智史、松本 邦弘、入江 賢児

出芽酵母PumilioホモログMpt5による、HO mRNA 3'UTRを介した転写後段階でのHO 遺伝子発

現抑制

第23回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル
平成12年12月13日

内木隆寛、下村俊泰、近藤多恵、松本邦弘、杉本勝則

出芽酵母 Rad24-RFC タンパク複合体の DNA 損傷チェックポイントコントロールへの関与
第73回日本生化学会 パシフィコ横浜 平成12年10月13日

岸田 聡, 高江洲 義一, 辻 順, 松本 邦弘

IL-1 シグナル伝達経路において IKK は TAK1 に対してネガティブフィードバック制御を行う
第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月11日

中田 大介, 下村 俊泰, 松本 邦弘, 杉本 勝則

出芽酵母 ATM 関連遺伝子 MEK1, TEL1 の DNA 損傷応答における役割
第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月11日

石谷 太, 岸田 聡, 辻 順, 松本 邦弘

カルシウムシグナリングは TAK1-NLK キナーゼカスケードを活性化することにより Wnt/ β -catenin 経路を負に制御する
第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月11日

井上 英樹, 館野 実, 鎌田 このみ, 高江洲 義一, 辻 順, 入江 賢児, 西田 育巧, 松本 邦弘

ショウジョウバエ MAPKKK, D-MEKK1 は p38 MAPK の活性化を介してストレス応答に關与する
第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月11日

久本 直毅, 川崎 正人, 日野 未歩, 坂本 リエ, 松本 邦弘

線虫 *C. elegans* をモデル動物とした JNK/p38 MAP キナーゼカスケードの神経系における役割
第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月10日

大森 英美理, 辻 順, 松本 邦弘

TGF- β シグナル伝達系における TAK1 による SnoN の制御機構
第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月11日

坂本 リエ, 川崎 正人, Dana Byrd, Yishi Jin, 久本 直毅, 松本 邦弘

線虫における JNK カスケードのスカフォールドタンパク質 UNC-16 によるシナプス小胞局在の制御機構
第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月11日

内木 隆寛, 近藤 多恵, 中田 大介, 松本 邦弘, 杉本 勝則

RFC 関連タンパク質 Chl12, Rad24 による DNA 複製チェックポイントの制御

第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月9日

日野 未歩, 久本 直毅, 中野 俊詩, 松本 邦弘

線虫 *C. elegans* の神経で機能する SEK-1 MAP キナーゼカスケード

第24回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成13年12月11日

久本 直毅, 西出 賢次, 井上 英樹, 松本 邦弘

線虫におけるストレス応答型 p38 MAP キナーゼカスケードの役割

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月12日

石谷 太, 辻 順, 松本 邦弘

Wnt/ Ca^{2+} シグナリングは TAK1-NLK キナーゼカスケードを活性化することにより Wnt/ β -catenin 経路を負に制御する

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月11日

花房 洋, 西本 聡子, 松本 邦弘, 西田 栄介

新規因子 XGRH の単離とアフリカツメガエル初期胚における機能の解析

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月14日

内木 隆寛, 若山 達志, 松本 邦弘, 杉本 勝則

出芽酵母における DNA 二重鎖切断時の Rad9 の局在解析

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月12日

井上 英樹, 日野(田中) 未歩, 福田 真, 西田 栄介, 久本 直毅, 松本 邦弘

線虫 p38 MAPK カスケードはアルセナイトストレス応答に関与する

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月14日

坂本 リエ, 川崎 正人, Dana Thyra Byrd, Yishi Jin, 久本 直毅, 松本 邦弘

線虫の JNK MAPK カスケード-UNC-16 複合体とキネシンによるシナプス小胞局在の制御機構

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月14日

中田 大介, 松本 邦弘, 杉本 勝則

出芽酵母 ATM 関連遺伝子 TEL1 の DNA 二重鎖切断損傷応答における役割

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月12日

西出 賢次, 久本 直毅, 松本 邦弘

線虫の ZAK MAPKKK ホモログ zak-1 は摂食運動に必要である

第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月13日

- 上村 規行、梶野 泰祐、岸田 聡、石谷 太、辻 順、松本 邦弘
 Mulibrey Nanism syndrome 原因遺伝子 MUL は NF- κ B 経路を負に制御する
 第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月11日
- 漆山 誠一、久本 直毅、山田 美里、白壁 恭子、辻 順、安藤 恵子、三谷 昌平、澁谷 浩司、松本 邦弘
 線虫 *C. elegans* の Wnt シグナル伝達経路に關与するプロテインキナーゼ GAK-1
 第25回 日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 平成14年12月11日
- 井上 英樹、久本 直毅、福田 真、西田 栄介、Jae Hyung An, T. Keith Blackwell、松本 邦弘
 線虫 p38 MAP キナーゼ経路は転写因子 SKN-1 の調節によりアルセナイトストレスの調節を行う
 14th International *C. elegans* Conference University of California Los Angeles 平成15年6月30日
- 久本 直毅、牧 貴美香、加藤 実穂、松本 邦弘
C. elegans MAPK カスケードの構成因子の欠失変異体
 14th International *C. elegans* Conference University of California Los Angeles 平成15年7月1日
- 水野 智亮、久本 直毅、松本 邦弘
 線虫 MAPK ホスファターゼ VHP-1 の分子遺伝学的解析
 14th International *C. elegans* Conference University of California Los Angeles 平成15年6月30日
- 坂本 リエ、川崎 正人、Dana Thyra Byrd、Yishi Jin、久本 直毅、松本 邦弘
C. elegans のキネシンと UNC-14 はシナプス小胞の局在を制御する
 14th International *C. elegans* Conference University of California Los Angeles 平成15年7月1日
- 坂口 愛沙、久本 直毅、Yishi Jin、松本 邦弘
C. elegans の LRK-1 MAPKKK はシナプス小胞の輸送を制御する
 14th International *C. elegans* Conference University of California Los Angeles 平成15年7月2日
- 西出 賢児、久本 直毅、松本 邦弘
C. elegans ZAK-1 は摂食に必要である
 14th International *C. elegans* Conference University of California Los Angeles 平成15年7月1日
- 久本 直毅、松本 邦弘
 線虫 JNK/p38 MAP キナーゼカスケードの役割
 第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月10日
- 花房 洋、松本 邦弘、西田 栄介
 オーガナイザー形成における持続的な ERK の活性化の必要性と Sprouty による ERK 活性化時間の

制御

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月10日

森 裕美、花房 洋、松本 邦弘

Ras/MAP キナーゼ経路の negative feedback regulator : Sprouty と相互作用するキナーゼタンパク質 ULK の解析

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月10日

豊田 裕美、花房 洋、西本 聡子、西田 栄介、松本 邦弘

アフリカツメガエル新規遺伝子 XGRH による Wnt シグナルの制御

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月10日

水野 智亮、寺田 敬、久本 直毅、松本 邦弘

線虫 MAPK ホスファターゼ VHP-1 はストレス応答 MAPK カスケードを制御する

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月11日

中田 大介、松本 邦弘、杉本 勝則

出芽酵母 ATM 関連因子 Tel1 は Xrs2 依存的に DNA 二重鎖切断損傷部位に結合する

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月11日

井上 英樹、久本 直毅、福田 真、西田 栄介、Jae Hyung An、T. Keith Blackwell、松本 邦弘

アルセナイトストレス応答における線虫 p38 MAP キナーゼカスケードと転写因子 SKN-1 の関係

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月11日

坂本 リエ、久本 直毅、Dana Thyra Byrd、Yishi Jin、松本 邦弘

線虫の UNC-16、キネシンと UNC-14 によるシナプス小胞局在の制御機構

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月11日

梶野 泰祐、大森 英美理、辻 順、松本 邦弘

TGF- β 刺激によって誘導される SnoN の分解における TAK1 MAPKKK の役割

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月11日

坂口 愛沙、久本 直毅、Yishi Jin、松本 邦弘

線虫 LRK-1 MAPKKK は神経細胞における極性的な選別輸送を制御する

第26回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成15年12月11日

松本邦弘、久本直毅、花房洋

個体レベルにおける MAP キナーゼカスケードの役割

第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成16年12月8日

花房 洋、松本 邦弘、西田 栄介

Sprouty による ERK 活性化のフィードバック制御は中胚葉背腹軸形成に必要である。

第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成16年12月9日

水野智亮、久本直毅、寺田敬、近藤多恵、足立誠、西田栄介、松本邦弘

線虫 MAP キナーゼホスファターゼ VHP-1 はストレス応答において新規 JNK 様シグナル伝達経路を制御する

第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成16年12月8日

井上英樹、久本直毅、福田真、西田栄介、Jae Hyung An、T. Keith Blackwell、松本邦弘

線虫 p38 MAP キナーゼカスケードは GSK3 β とともに、転写因子 SKN-1 の制御を介してアルセナイトストレス応答を行う。

第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成16年12月8日

坂本 リエ、久本 直毅、Dana Thyra Byrd、Yishi Jin、松本 邦弘

線虫のキネシン、UNC-16 と UNC-14 によるシナプス小胞局在の制御機構

第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成16年12月10日

末岡 啓吾、花房 洋、森 裕美、澁谷 浩司、松本 邦弘

哺乳類新規 MAPKKK 様キナーゼ LRK1 の機能解析

第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポートピアホテル 平成16年12月8日

坂口 愛沙、久本 直毅、Yishi Jin、松本 邦弘

線虫新規キナーゼ LRK-1 は神経細胞における極性的な選別輸送を制御する

第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポ

ートピアホテル 平成16年12月9日

上村 規行、辻 順、山条 秀樹、佐藤 慎太郎、審良 静男、松本 邦弘

TAK1 MAPKKK は Epstein-Barr ウィルス遺伝子産物 LMP1 と複合体を形成し JNK 活性化に働く。
第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポ
ートピアホテル 平成16年12月8日

石谷 太、松本 邦弘、Ajay Chitnis、伊藤 素行

Nrarp はゼブラフィッシュの neural crest の発生に関与し、古典的 Wnt シグナル伝達系を正に制御す
る。
第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポ
ートピアホテル 平成16年12月8日

西出 賢次、石谷 太、松本 邦弘、伊藤 素行

膜局在型 Delta 細胞内領域は神経芽細胞において細胞突起の形成を誘導する。
第27回 日本分子生物学会年会 神戸国際展示場、神戸国際会議場、ワールド記念ホール、ポ
ートピアホテル 平成16年12月8日

Taisuke Kajino, Emiri Omori, Shunsuke Ishii, Kunihiro Matsumoto and Jun Ninomiya-Tsuji

"TAK1 MAPKKK mediates TGF- β signaling by targeting SnoN for degradation"
Gordon Conference "Growth Factor Signaling" Oxford, UK, July 25-30, 2004

Noriyuki Uemura, Hideki Sanjo, Shintaro Sato, Shizuo Akira, Kunihiro Matsumoto, Jun Ninomiya-Tsuji

"Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 complex contains TAK1 MAPKKK that is essential
for activation of JNK but not of NF- κ B"
Keystone Symposia "Inflammation and Cancer" Beaver Run Resort, Breckenridge, CO, USA
Feb. 27-Mar. 3, 2005

藤原奨、花房洋、松本邦弘

アフリカツメガエル初期胚を用いた Wnt シグナル下流因子 pinhead の機能解析
日本発生生物学会第38回大会 仙台国際センター 2005年6月2日 - 4日

Aya Sasakawa, Takashi Terada, Tomoaki Mizuno, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto.

Forward genetic screening for new genes involved in the KGB-1 MAP kinase cascade.
15th international C. elegans meeting UCLA June 25-29, 2005

Aisa Sakaguchi, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto.

Mutational analysis of C. elegans LRK-1 kinase, which regulates polarized sorting system in
neurons
15th international C. elegans meeting UCLA June 25-29, 2005

Makoto Arimoto, Naoki Hisamoto, Chris Li and Kunihiro Matsumoto.

JIP-1 and kinesin motor proteins regulate levels of APL-1 protein.

15th international C. elegans meeting UCLA June 25-29, 2005

Wei-Chun HuangFu, Emiri Omori, Shizuo Akira, Kunihiro Matsumoto, Jun Ninomiya-Tsuji.

The TAK1-TAO2 Complex Mediates Stress-Activated Signaling.

Gordon Conference, Stress Proteins in Growth, Development & Diseases Newport, RI, USA

July 17-22, 2005

(3) 特許出願

国内出願 (4 件)

1 . JSTNo. : A192-P02

発明の名称 : 出芽酵母 Mec1 と結合するタンパク質の変異体、及びその変異体作成のための DNA

発明者 : 若山達志、近藤多恵、安藤聖子、松本邦弘、杉本勝則

出願人 : JST

出願日 : 10/05/01

出願番号 : 2001-140758

2 . JSTNo. : A191-P06

発明の名称 : 線虫 *C.elegans* 由来の Rho ファミリー GTPase 活性を制御する遺伝子、その遺伝子産物としてのタンパク質、及びこれら遺伝子・タンパク質の利用方法

発明者 : 鈴木教郎・久本直毅・松本邦弘

出願人 : JST

出願日 : 02/10/01

出願番号 : 2001-306978

3 . JSTNo. : A191-P14

発明の名称 : P38 MAPK の活性化を介してストレス応答に關与する新規タンパク質及びその遺伝子

発明者 : 井上英樹、館野 実、松本邦弘

出願人 : JST

出願日 : 11/01/02

出願番号 : 2002-5348

4 . JSTNo. : A191-P21

発明の名称 : 出芽酵母由来の mRNA の細胞内局在に關与するタンパク質、その遺伝子及びそれらの利用

発明者:入江賢児、ハーター E., タキサリ、ロナルド ティー. ウェイル、松本邦弘、イーラ ヘルズ
コグイツ
出願人:JST
出願日:04/03/02
出願番号:2002-057868

海外出願 (0件)

(4) 受賞等

受賞:

2001年3月 日産科学賞 受賞
2001年5月 木原記念財団学術賞 受賞
2002年2月 井上学術賞 受賞

新聞報道:

2002年7月 「自然免疫の経路を解明」として、Scienceの発表論文について中
日新聞に掲載される。

(5) その他特記事項

なし

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

(2) 招聘した研究者等

なし

7 結び

戦略的基礎研究「生物の発生・分化・再生」で、「発生における器官・形態形成と細胞分化の分子機構」の研究テーマを、平成12年にスタートさせた。共同研究者にも恵まれて、研究計画は予想以上の展開をみせた。本研究グループは、新規 MAP キナーゼカスケードの一員 TAK1 の解析から、全く未知であった発生・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。さらに、線虫、シヨウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルをモデル動物として、細胞運命、細胞極性の決定に關与する新しい因子を発見し、新たな研究領域を創出した。特に、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を発見、確立した点で世界的業績であると考え。今後、この研究領域をさらに発展させ、発生過程において細胞運命、細胞極性、器官形成を制御するシグナル伝達ネットワークの全容解明を目指したい。また、線虫のモデル系をストレス応答と抗炎症・抗アレルギー薬剤開発へ応用するシステムは、今後の医薬品開発への展開が期待される。当初目標以外の成果として、線虫のシグナル伝達経路に關与する新規シグナル伝達因子群の中に、遺伝性高血圧症、パーキンソン病、アルツハイマー病などの遺伝性疾患の原因遺伝子が見い出されてきたことが重要な成果である。今後、この研究領域をさらに発展させ、発生・分化・神経系を制御するシグナル伝達ネットワークの解明を基盤とした遺伝性疾患モデル系構築へと研究を展開させていきたい。これらの研究成果は、遺伝性疾患に対しての有効な治療・創薬の開発へと展開が可能であろう。





