

「生命活動のプログラム」
平成7年度採択研究代表者

松本 邦弘

(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

「発生・分化を規定する新規シグナル伝達ネットワーク」

1. 研究実施の概要

チロシンキナーゼ型細胞増殖因子受容体のシグナル伝達経路として、Ras - Raf - MAPキナーゼカスケードが、1990年代前半に解明されたことが生物学上の一大契機となり、シグナル伝達研究は生命科学の一つの先端的研究を担うようになった。TGF- β スーパーファミリー、TollファミリーやWntファミリーは、高等真核生物の発生及び分化を規定する細胞外リガンドとして不可欠の役割を果たしている。本研究グループは、TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達を制御するMAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) として分離したTAK1 (TGF- β -activated kinase) が、Tollファミリーに属するIL-1シグナル伝達経路に関与することを明らかにした。さらに、線虫のTAK1ホモログ TLK-1 (TAK1-Like Kinase) が、Wntシグナル伝達経路による内胚葉誘導を正に制御していることが明らかとなった。これらの成果を基に、本研究においては発生及び分化を制御するシグナル伝達経路解明を第1の目的とし、第2に分子遺伝学的手法と生化学的手法により、さらに新規シグナル伝達分子群を見出し、新たな研究領域を創出することをめざす。これらの研究成果は、動物の形を作る発生のプログラムを解明に大きく貢献するものと期待される。

2. 研究実施内容

- (1) 発生・分化におけるMAPキナーゼファミリー分子の役割を中心に解析を行なった。Dishevelled (Dsh) は、Wntシグナル伝達系における必須の因子であり、発生および形態形成に重要な役割を担うことが示されている。Dshは、 β -カテニン経路およびJNK経路を活性化させるとともに、アフリカツメガエルの2次軸形成能を有する。我々は、まずDshの発現によってMKK7ならびにJNKの活性化を引き起こすことを示した。次いで、Dshのアミノ末端領域の発現は、 β -カテニン経路の活性化を引き起こすと同時にアフリカツメガエル卵において2次軸形成を引き起こすことを明らかにした。一方、カルボキシル末端 (DEPドメイン) 領域はJNKの活性化を引き起こすが、2次軸形成を誘導しないことを示した。従って、Dshは異なるドメインを介して、 β -カテニン経路およびJNK経路をそれぞれ活性化させることを明らかにした。また、発生の様々な過程に必須の経路である、TGF- β シ

グナル伝達経路の解析を行った。TGF- β によって誘導される遺伝子発現には、TAK1 (MAPKKK)、MKK6 (MAPKK)、p38 (MAPK) というキナーゼカスケードが関与することを示した。

- (2) MAPキナーゼカスケードは、遺伝学的解析が比較的簡便に行なえるショウジョウバエ (*Drosophila*) や線虫 (*C. elegans*) やにおいても保存されている。従って、発生・分化におけるMAPキナーゼカスケードの役割を個体レベルで解析する系として、*Drosophila* と *C. elegans* は非常に有用な系である。そこで、*Drosophila* におけるJNKカスケードの役割について解析を行なった。JNKカスケードはストレス応答の他に、胚発生で左右の上皮層が背部正中線で融合する過程 (dorsal closure) で上皮細胞の背腹軸方向への伸長において機能し、TGF- β スーパーファミリーに属するDecapentaplegic (Dpp) の発現の誘導に必要なことが知られる。JNKの上流因子を同定するために、類似の表現型を示すP因子挿入突然変異の誘発・検索から哺乳類c-*Src*に相同な*Src42A*を同定した。*Src42A*の欠損によりJNKの活性が低下し、反対に、constitutive active *Src42A*の強制発現でJNKの活性化が認められた。このようなJNKカスケードの突然変異との遺伝的相互作用などから、胚発生でのdorsal closureと成虫背部の正中線での融合の両過程で*Src42A*がJNKカスケードの上流で機能することを明らかにした。また、*Btk*に相同な*Tec29*との二重変異体では、JNKカスケードの変異体と同様の強い表現型を示すことから、*Src42A*と並列に機能する*Tec29*の関与するカスケードの存在が示唆された。
- (3) *Drosophila*の翅におけるDppとWg (Wingless) は、モルフォゲンと呼ばれる分泌性タンパク質である。モルフォゲンは、未分化の組織塊の限られた領域で産生されて組織全体に拡散し、その濃度勾配が組織に最初の極性を与え、各細胞に適切な位置情報をもたらすと考えられている物質である。翅におけるDppとWgの産生場所は、それぞれ翅の原基の中央を通る1本のベルト状の領域であり、両者は翅の原基の中央で直交している。この直交するモルフォゲンの勾配が協調的に働いて翅の近遠軸 (体の中心から外側に向かう座標軸) を作る、というのが現在最も有力な翅形成における仮説である。そこで、翅の発生時におけるJNKカスケードの役割について解析を行なった。JNKはDppシグナルの強度自体を修飾することではなく、細胞が受けるDppシグナルが強すぎた時、または弱すぎた時に活性化されてくることが明らかになった。さらにその活性化は、Dppシグナル単独の強度によって決まってくるのではなく、Wgシグナル強度との和によって決められていた。従って、JNKはDppとWgの和によってもたらされる近遠軸位置情報が乱された時に活性化すると考えられる。さらに、その活性化の意義は、DppあるいはWgに対する細胞の反応を変化させることではなく、間違った強度のシグナル、すなわち間違った近遠軸位置情報を受け取った細胞に死 (アポトーシス) を運命づけ

ることであった。JNKシグナル伝達経路の突然変異体を用いてJNKを活性化させなかった場合、この細胞は生き残り、個体はより重篤な形態異常を見せた。従って、JNKの役割は異常細胞を殺して組織を正常方向へ修復することにある、このようにJNKカスケードが発生上の細胞死制御で必須の役割を果たしていることが明らかになった。

- (4) MAPKKKファミリーに属するTAK1は、さまざまな外的刺激に応答して活性化される。これまでに、われわれはTAK1とその活性化因子であるTAB1が、TGF- β 、IL-1、およびWntのシグナル伝達経路で機能することを明らかにした。しかし、TAK1がそれぞれの刺激によってどのような機構で活性化されるかは明らかではない。そこで、これらの刺激とTAK1をつなぐ機構を明らかにするために、TAK1に結合する新たな因子をyeast two-hybrid systemを用いて検索した。その結果、新規のタンパク質TAK1 binding protein 2 (TAB2) を単離した。TAB2は、693アミノ酸から構成され、そのC末領域を介してTAK1と結合する。TAB2がどの刺激に関係するかを検討した結果、TAB2の大量発現がIL-1刺激と同様にNF- κ BとJNKの両方を活性化すること、一方でdominant-negativeなTAB2の大量発現がIL-1刺激によるNF- κ BおよびJNKの活性化を抑制することを見出した。この結果は、TAB2がIL-1シグナル伝達経路で機能していることを示唆する。そこで、次にTAB2がIL-1シグナル伝達経路でどのような役割を果たしているか、IL-1経路の他の構成因子との関係を検討していった。その結果、TAB2はTAK1だけでなくTAK1の上流因子であるTNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)とも結合すること、さらに細胞内在性TAB2は、IL-1依存的にTRAF6、TAK1、TAB1と複合体を形成することが明らかになった。次に、この複合体がどのような機構でIL-1依存的に形成されるか検討するため、それぞれの因子の細胞内局在と結合を検討した。その結果、(1)刺激をしていない細胞では、それぞれ細胞内在性のTRAF6は細胞質・細胞膜の両方に、TAK1およびTAB1は細胞質に、TAB2は細胞膜に局在すること、(2) IL-1刺激を行うと、TRAF6とTAK1、TAB1の局在は変化しないが、TAB2は細胞膜から細胞質へと移行すること、(3) 大量発現したTRAF6と TAK1は、この2つだけではほとんど結合しないが、TAB2を共に発現すると TRAF6-TAB2-TAK1複合体が形成されることが明らかになった。これらの結果は、TAB2はIL-1刺激によって細胞質に移行し、もともと細胞質にあったTRAF6とTAK1の間のアダプターとして働き、TRAF6-TAB2-TAK1-TAB1複合体形成を誘導すること、さらに、この複合体形成がIL-1シグナル伝達に重要であることを示している。以上のことから、TAB2はIL-1シグナル伝達経路において、TRAF6とTAK1の間のアダプターとして機能し、IL-1シグナルをTAK1に伝え活性化する役割を果たしていると考えられる。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, S., 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).

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).

Kishimoto, K., Matsumoto, K. and Ninomiya-Tsuji, J. TAK1 MAP kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J. Biol. Chem.*, 275: 7359-7364 (2000).

Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 398: 252-256 (1999).

Menegini, M. D., Ishitani, T., Carter, C., Hisamoto, N., Ninomiya-Tsuji, J., Thorpe, J., Matsumoto, K. and Bowerman, B. MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis. elegans*. *Nature*, 399: 793-797 (1999).

Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Menegini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H. and Matsumoto, K. The TAK1-NLK-MAPK related pathway antagonizes signalling between β -catenin and the transcription factor TCF. *Nature*, 399: 798-802 (1999).

Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y. and Matsumoto, K. Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature*, 400: 166-169 (1999).

Suzanne, M., Irie, K., Glise, B., Agnes, F., Mori, E., Matsumoto, K. and Noselli, S. The *Drosophila* p38 MAPK pathway is required during oogenesis for asymmetric development. *Genes & Dev.*, 13: 1464-1474 (1999)

Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. and Matsumoto, K. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.*, 18: 179-187 (1999).

Kawasaki M., Hisamoto N., Iino Y., Yamamoto M., Ninomiya-Tsuji J. and Matsumoto, K. A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *EMBO J.*, 18: 3604-3615 (1999).

Kondo, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 1136-1143 (1999).

Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. and Matsumoto, K. p38 mitogen-Activated Protein Kinase can be Involved in transforming growth factor b superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 2322-2329 (1999).

Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N. and Matsumoto, K. PDK1 homologs activate the Pkc1-MAP kinase pathway in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 8344-8352 (1999).

Nakashima, S., Wang, S., Hisamoto, N., Sakai, H., Andoh, M., Matsumoto, K. and Nozawa, Y. Molecular cloning and expression of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase-related kinase from Tetrahymena cell. *J. Biol. Chem.*, 274: 9976-9983 (1999).

Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, Y., Matsumoto, K. and Nishida, E. Involvement of the p38 MAP kinase pathway in TGF- β -induced gene expression. *J. Biol. Chem.*, 274: 27161-27167 (1999).

Moriguchi, T., Kawachi, K., Kamakura, S., Masuyama, N., Yamanaka, H., Matsumoto, K., Kikuchi, A. and Nishida, E. Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the JNK/SAPK activation and the axis formation in vertebrates. *J. Biol. Chem.*, 274: 30957-30962 (1999).