

平成18年度 学術創成研究費 研究進捗状況報告書（中間評価用）

平成18年3月31日現在

ふりがな	にしだ えいすけ		所属研究機関・ 部局・職	京都大学・生命科学研究科・教授				
研究代表者 氏名	西田 栄介							
研究課題名 (英訳名)	寿命と発生を制御するシグナル伝達ネットワーク (Signal transduction networks regulating life span and development)							
研究経費 (千円未満切捨) <small>平成16,17年度使用内訳は支出額、平成18年度以降の交付額は内約額、使用内訳は支出予定額を記入</small>	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円) <平成18年度以降は支出予定額>				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成16年度	94,100	94,100	41,478	48,740	21	3,251	609
	平成17年度	99,100	99,100	10,422	50,136	1,030	34,251	3,258
	平成18年度	103,300	-	1,219	64,080	2,000	33,000	3,000
	平成19年度	105,000	-	0	67,000	2,000	33,000	3,000
	平成20年度	105,000	-	0	67,000	2,000	33,000	3,000
	総計							
研究組織（研究代表者及び研究分担者）								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）					
西田 栄介	京都大学・生命科学研究科・教授	生化学	研究全般					
計1名								

当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)

多細胞生物は、一つの細胞、すなわち受精卵から細胞増殖と細胞分化をくり返す発生の過程を経て成体となり、成体は成長後、老化過程を経て寿命を終える。この多細胞動物の時間軸に沿った生命現象を制御する分子機構を細胞内シグナル伝達ネットワークの解明を通してアプローチすることが本研究計画の基本戦略である。現在の国内外の状況は、個々のシグナル伝達経路が寿命制御や発生の諸過程で必須の役割を果たしていることがわかりつつあるところであり、同一の限られたシグナル伝達経路(PI3キナーゼ経路やMAPキナーゼ経路)が生命現象の諸過程においてくり返し使われながら、個々の局面で細胞応答の特異性をどのように決定しているか、という最も根源的な問いに答えが見い出されていない。そこで本研究において、まず第一に、個々のシグナル伝達経路が発生および寿命制御の諸過程に果たす役割とその際のターゲット遺伝子を同定すること、ならびに個々の生命諸過程を制御する新たなシグナル伝達機構を見い出すことを目的とする。第二には、シグナル伝達の特異性決定の分子機構の解明のために、シグナル伝達ネットワークの時空間的調節機構を明らかにすることを目指す。すなわち、シグナル伝達経路は、単一の経路におけるポジティブおよびネガティブフィードバック機構や複数のシグナル伝達経路間のクロストークが時間的空間的に制御されていると予想され、その分子機構を解明することを目指す。

これまでの研究経過

1. 本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。
2. 研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

本研究は、学術創成研究費の趣旨のうち、創造的・革新的・学際的学問領域を創成する観点から行われているものである。

線虫において、インスリン/IGF-1シグナル伝達経路およびその下流の転写因子 DAF-16 が寿命を制御していることが知られているが、DAF-16 の転写ターゲットは不明であった。そこで我々は、DAF-16 が結合するとされる DNA 配列 DBE (DAF-16 binding element) を線虫ゲノム上からデータベースを用いて検索し、転写ターゲットの候補として 19 の遺伝子を同定した。このうちのひとつとして、哺乳類ベータカロテンモノオキシゲナーゼに高い相同性をもつ *bml-1* を同定し、その解析を行った。*bml-1* を RNAi 法によって抑制したところ、線虫の寿命およびストレス耐性が抑制された。逆に過剰発現によってはこれらが延長・増大した。また、線虫の餌にベータカロテンを添加したところ、寿命が延長した。この寿命延長は *bml-1* RNAi 処理下および *daf-16* 欠失変異体では抑制されており、ベータカロテンによる寿命延長効果における *bml-1* および *daf-16* の必要性が明らかになった。ベータカロテンモノオキシゲナーゼはベータカロテンを代謝してレチノイドを生成することが知られている。そこで、13-cis レチノイン酸を線虫の餌に添加したところ、顕著な寿命延長効果を示した。13-cis レチノイン酸による寿命延長効果は、核内レセプターである寿命制御遺伝子 *daf-12*、カロリー制限による寿命延長に關与する遺伝子 *sir-2.1*、熱ショック蛋白質を制御し寿命を延長する転写因子 *hsf-1*、そして *daf-16* の欠失変異体においても、維持されていた。つまり、レチノイン酸は、既知のシグナル経路とは全く異なる新たな機構で寿命を制御することが示唆された。さらに、哺乳類レチノイン酸レセプターに対して高い相同性を持つ 4 つの遺伝子のうち、*nhr-64* が線虫においてレチノイン酸レセプターとして寿命を制御していることが新たに示された。

野生型および長寿変異体 *daf-2* を用いたマイクロアレイを行い、MAP キナーゼ (MAPK) カスケードを構成する 3 つの遺伝子に關して発現に差が見られることを見出した。そこで、線虫において MAPK カスケードを構成する 36 の遺伝子群について網羅的に RNAi 法を用いて抑制し、寿命に対する影響を検討した。その結果、10 の遺伝子において寿命の延長あるいは短縮が観察された。さらに、ボディーサイズの制御と寿命との関連が以前より指摘されていることから、TOR、S6K および Rheb というボディーサイズを制御するシグナルカスケードの構成因子を線虫ゲノムデータベースから探索し、RNAi をおこなった。その結果、いずれの場合もボディーサイズの減少を引き起こしたが、Rheb の RNAi のみ寿命の短縮が観察された。このことから、ボディーサイズの減少そのものが寿命延長の原因となるわけではないことが明らかになった。

これまでの研究経過 つづき

脊椎動物初期胚発生を制御するシグナル伝達について、MAPK ファミリー分子を中心に、アフリカツメガエルとマウスをモデルとして解析をおこなった。まず、アフリカツメガエル初期胚において中胚葉が背腹軸に沿って分化する際、背側中胚葉の誘導には古典的 MAPK である ERK1/2 の持続的な活性化が必要であることがわかった。そして、ERK1/2 経路のネガティブフィードバックインヒビターである Sprouty が、腹側において ERK1/2 経路の持続的活性化を負に制御し、腹側が背側に分化することを防いでいることを明らかにした。すなわち、ERK1/2 経路の時間的調節により中胚葉の背腹軸決定が制御されていることがわかった。さらに我々は、ERK1/2 とは別の MAPK カスケードを構成する ERK5、MEK5 のアフリカツメガエルホモログを同定した。ERK5 あるいは MEK5 のアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を初期胚に微量注入してノックダウンを行うと、神経組織の分化が阻害された。そして MEK5-ERK5 経路の活性化により、神経組織を異所的に誘導することができた。また、MEK5-ERK5 経路は、転写因子 SoxD の下流、かつ転写因子 Xngnr1 の上流で神経分化を制御していることが示された。さらに、SoxD が増殖因子 FGF13 を誘導し、FGF13 が ERK5 経路を活性化することで神経分化を引き起こす可能性が示された。PI3K 経路の下流で活性化し、かつ ERK1/2 経路によってその転写が誘導されるプロテインキナーゼ Sgk のアフリカツメガエルホモログに着目し、Sgk が予定内胚葉に特異的に発現すること、Sgk の過剰発現により背側に屈曲した表現型が観察されることを見出した。さらに、アフリカツメガエル胚の原腸陥入に参与するシグナル分子の探索を行い、PKC ファミリー分子 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、原腸陥入を制御することを示した。加えて我々は、哺乳類初期発生の分子機構についても解析を行い、着床前発生期間 (受精から着床までの期間) に JNK と p38 が活性化していること、そして JNK 経路と p38 経路が胚盤胞形成に必要であることを明らかとした。さらにマイクロアレイを行い、39000 転写産物のうち、たった 10 遺伝子の発現が JNK 経路と p38 経路の阻害に感受性であり、そのうち 4 遺伝子の siRNA により胚盤胞形成が阻害されることを見出した。

シグナル伝達の時空間的制御機構の解明、およびシグナル伝達ネットワークのさらなる同定を試みた。ERK1/2 は、様々な局面で細胞の運命決定に重要な役割を果たしているが、その特異性決定の分子機構として、ERK1/2 の活性化時間や程度の制御と、活性化 ERK1/2 の空間的な制御がある。我々は以前の研究成果で Sprouty が ERK1/2 の活性化時間を制御することを示したが、さらに最近、増殖因子刺激による Sprouty のチロシンリン酸化のタイムコースが、アイソフォームによって違いがあることを見出した。このような違いが、ERK1/2 の活性化のタイムコースの差に結びつき、細胞応答の特異性を決定している可能性があると考えられた。また Sprouty がチロシンフォスファターゼである Shp2 により脱リン酸化されることを示し、Shp-2 と結合するシグナル分子 SHPS-1 により Sprouty のリン酸化が阻害されることを見出した。次に、ネガティブフィードバックインヒビター Sef が、ERK1/2 の核内移行を阻害する一方、細胞質での ERK1/2 の活性は阻害しないことを発見し、Sef が ERK1/2 の空間的な制御因子として機能することを示した。さらに、Sef のスプライスアイソフォーム Sef-S が Sef とは異なる細胞内局在を示し、核内での ERK1/2 の機能をより促進する機能を持つことを見出した。また Sef の機能に必要なタンパク質間相互作用を Sef-S が阻害することから、Sef-S は Sef に対して優勢不能型として機能する可能性があることがわかった。ERK1/2 経路を活性化する新たなシグナル分子として Centaurin-alpha を見出し、Centaurin-alpha が PI3K 依存的に核から膜へ移行し、Ras を経由して ERK を活性化することを示した。MEK5-ERK5 経路の空間的制御についても解析を進め、ERK5 の細胞内局在が核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) の両方によって能動的に制御されていることを見出した。

シグナル経路間の新たなクロストークを同定した。まず、筋分化における Notch 経路と MAPK 経路のクロストークを見出し、Notch 経路が MAPK ホスファターゼである MKP1 の誘導を介して MAPK 経路のひとつである p38 経路を不活性化することを示した。そして MKP1 の過剰発現が筋分化を抑制し、MKP1 の siRNA により筋分化が促進することを示し、MKP1 が Notch と同様に筋分化において抑制的な役割を果たしていることを明らかにした。哺乳類小腸上皮細胞のホメオスタシスにおける、レチノイン酸経路と ERK1/2 経路のクロストークを見出した。すなわち、分化した小腸上皮細胞では、レチノイン酸シグナルが MAPK ホスファターゼである MKP4 の発現を誘導して ERK1/2 経路を負に制御する一方で、未分化な細胞では ERK1/2 経路がレチノイン酸経路を負に制御することを示した。

特記事項

これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。

線虫において寿命を制御する転写因子 DAF-16 の下流を探索した結果、ベータカロテンモノオキシゲナーゼ *bml-1* が寿命を正に制御していることが明らかになり、ベータカロテンやレチノイン酸も寿命延長効果を持つことを見出した。さらに、寿命制御に関与するレチノイン酸レセプターを同定した。ヒトにおいても、レチノイン酸シグナル伝達は皮膚および神経の老化に関与することが示唆されていることから、線虫をモデルとしたレチノイン酸シグナル伝達の解析により、種をこえて保存された寿命や老化の制御機構について、先端的な知見が得られることが期待できる。また、我々の結果はインスリン/IGF-1 シグナルとレチノイン酸シグナルをリンクする最初の知見であり、シグナル伝達のネットワークの観点からも興味深い。さらに、寿命を制御するシグナル分子として 10 種類の MAPK カスケード構成分子を同定した。その中には、*daf-16* 依存的に寿命を制御するものと、*daf-16* 非依存的なものが存在した。すなわち、MAPK カスケードとインスリン/IGF-1 シグナルのクロストークの存在を示唆すると共に、インスリン/IGF-1 シグナルとは独立に寿命を制御する MAPK カスケードの存在をも示唆している。また我々の結果は、線虫においてはボディーサイズの減少が寿命延長の原因とならないことを明らかにした。このことは、従来推察されていたボディーサイズの制御と寿命との関連性に疑問を投げかけるものである。また *Rheb* の解析結果は、寿命を制御する全く新規のシグナルカスケードの存在を示唆しており、新たなシグナル伝達経路の発見が期待できる。

脊椎動物初期胚発生過程を制御するシグナル伝達経路を複数同定し、特に神経分化の分子メカニズムについて、当該分野において強いインパクトのある結果を得た。これまでアフリカツメガエル胚の神経組織は、*Chordin* や *Noggin* といった BMP シグナルの阻害因子の下流で、*Zicr1*、*SoxD*、*Xngnr1* といった転写因子が順番に誘導されることにより形成されていく、と言われていた。我々は、*SoxD* の下流、*Xngnr1* の上流で神経分化を制御する細胞内シグナル伝達経路として MEK5-ERK5 経路を同定した。そして、*SoxD* が分泌因子 FGF13 を誘導することを示した。FGF13 が MEK5-ERK5 経路を活性化し、神経分化を引き起こすと考えられる。すなわち、単純な転写因子のカスケードだけで説明されていた神経分化の分子機構に、*SoxD* / FGF13 / MEK5-ERK5 で構成されるシグナル伝達経路を新たに登場させた。さらに、マウスにおいて JNK 経路と p38 経路が着床前の胚盤胞形成を制御することを発見し、ほとんど未解明であった哺乳類着床前発生のシグナル伝達機構の解明に大きく貢献することができた。

シグナル伝達の時空間的制御機構の解明およびシグナル伝達ネットワークのさらなる同定においても格段の進展があった。これまで培養細胞の系において、ERK1/2 経路の活性化時間や程度が、細胞応答において重要であることが示唆されていた。しかしながら、このような ERK1/2 経路の活性化時間や程度が、個体レベルにおいて生理的に重要かどうかは不明であった。今回我々は、アフリカツメガエル初期胚において中胚葉が背腹軸に沿って分化する際、*Sprouty* による ERK1/2 経路の活性化時間の制御が極めて重要であることを明らかにした。また、*Sef* および、*Sef* のスプライスアイソフォームである *Sef-S* に着目し、ERK1/2 経路を空間的に制御するユニークな分子メカニズムを解明した。これらの研究成果は、単一の ERK1/2 経路というシグナル伝達が、どのように時間的・空間的に制御され、その結果多様な細胞応答が生じるのか、という根源的な問いに答えるものである。

新規のクロストークとして、筋分化における Notch 経路と p38 経路のクロストーク、哺乳類小腸上皮細胞のホメオスタシスにおけるレチノイン酸経路と ERK1/2 経路のクロストークを発見した。特にレチノイン酸経路と ERK1/2 経路のクロストークについては、従来全く知られていなかったものであり、さらなる解析が待たれる。我々の線虫の寿命制御の研究によって、レチノイン酸シグナルの下流や作用メカニズムの分子的解析に線虫を用いることが可能となったので、今後、線虫と哺乳類の実験系のそれぞれの利点を活かすことにより、このクロストークの分子機構が解明されれば、学術上多大なインパクトが期待できる。

研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について、2頁以内に記入してください。

主な発表論文

Ogawa, S., Matsubayashi, Y., and Nishida, E. (2004). An evolutionarily conserved gene required for proper microtubule architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* 9, 83-93.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., Matsumoto, K., and Nishida, E. (2004). 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.

Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S., and Nishida, E. (2004). ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Curr. Biol.* 14, 731-735.

Miyata, Y., and Nishida E. (2004). CK2 controls multiple protein kinases by phosphorylating a kinase-targeting molecular chaperone, Cdc37. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4065-4074.

Maekawa, M., Yamamoto, T., and Nishida, E. (2004). Regulation of subcellular localization of the antiproliferative protein Tob by its nuclear export signal and bipartite nuclear localization signal sequences. *Exp. Cell Res.* 295, 59-65.

Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., and Nishida, E. (2004). Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev. Cell* 7, 33-44.

Mizuno, T., Hisamoto, N., Terada, T., Kondo, T., Adachi, M., Nishida, E., Kim, D.H., Ausubel, M.F., and Matsumoto, K. (2004). The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. *EMBO J.* 23, 2226-2234.

Kusakabe, M., and Nishida, E. (2004). The polarity-inducing kinase Par-1 controls *Xenopus* gastrulation in cooperation with 14-3-3 and aPKC. *EMBO J.* 23, 4190-4201.

Torii, S., Nakayama, K., Yamamoto, T., and Nishida, E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J. Biochem (Tokyo)*. 136, 557-561.

Miyata, Y., and Nishida, E. (2004). Supervision of multiple signaling protein kinases by the CK2-Cdc37 couple, a possible novel cancer therapeutic target. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1030, 150-157.

Tschiya, Y., Minami, I., Kadotani, H., and Nishida, E. (2005). Resetting of peripheral circadian clock by prostaglandin E2. *EMBO Rep.* 6, 256-261.

Maekawa, M., Yamamoto, T., Tanoue, T., Yuasa, Y., Chisaka, O., and Nishida, E. (2005). Requirement of the MAP kinase signaling pathways for mouse preimplantation development. *Development* 132, 1173-1183.

Yasunaga, T., Kusakabe, M., Yamanaka, H., Hanafusa, H., Masuyama, N., and Nishida, E. (2005). *Xenopus* ILK (integrin-linked kinase) is required for morphogenetic movements during gastrulation. *Genes Cells* 10, 369-379.

Kondoh, K., Torii, S., and Nishida, E. (2005). Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chomosome*. 114, 86-91.

Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell Sci.* 118, 2997-3002.

研究成果の発表状況のつづき

Nishimoto, S., Kusakabe, M., and Nishida, E. (2005). Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development. *EMBO Rep.* 6, 1064-1069.

Inoue, H., Hisamoto, N., An, J.H., Oliveira, R.P., Nishida, E., Blackwell, T.K., and Matsumoto, K. (2005). The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev.* 19, 2278-2283.

Hayashi, H., Matsuzaki, O., Muramatsu, S., Tsuchiya, Y., Harada, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Matsuda, A., and Nishida, E. (2006). Centaurin- α 1 is a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activator of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 281, 1332-1337.

Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R.E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., and Matsuda, M. (2006). Dynamics of the Ras/ERK MAPK Cascade as Monitored by Fluorescent Probes. *J. Biol. Chem.* 281, 8917-8926.

Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H., and Nishida E. (2006). Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1679-1690.

Imajo, M., Tsuchiya, Y., and Nishida E. (2006). Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB Life*, in press.

国際会議における発表

Nishida E: "Signal transduction by the ERK family of MAP kinases." The First Shanghai Symposium On Signal Transduction And Cancer, Shanghai, China, August 29-September 1, 2004.

Ookuma S., Taniguchi E., Bamba C., Kanoh K., Hashimoto Y. and Nishida E: "Extension of the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by beta-carotene." 15th International *C. elegans* Conference, University of California, Los Angeles, California, USA, June 25-29, 2005.

Nishimoto S., Kusakabe M. and Nishida E: "The MEK5-ERK5 pathway is essential for *Xenopus* neural differentiation." 15th International Society of Developmental Biologists Congress 2005, Sydney, Australia, September 3-7, 2005.

Nishida E: "Signal transduction by the ERK family of MAP kinases." International Symposium of Kobe University 21st century COE program on Signal transduction In Memory of Prof. Yasutomi Nishizuka, International Conference Center Kobe, Japan, February 9-11, 2006

など

国内学会における発表

Nishida E: "Signal transduction by the ERK family of MAP kinases." The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, October 19-22, 2005.

西田 栄介 クロストークによる MAP キナーゼシグナル伝達の制御機構 第 28 回日本分子生物学会シンポジウム (2005年12月)

など