

学位論文題名

Functional analysis of TGF- β -activated
kinase I(TAKI) in *Drosophila*

(ショウジョウバエを用いた TGF- β -activated kinase I(TAKI) の機能解析)

学位論文内容の要旨

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)は真核生物に普遍に存在するセリン/スレオニンキナーゼで、活性化因子、MAPK kinase (MAPKK)及びその活性化因子、MAPKK kinase (MAPKKK)と共にMAPKカスケードを形成し、多種多様な細胞外刺激で活性化される。現在まで、哺乳類では少なくとも3つのMAPKカスケードが存在することが示されている。すなわちMAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK)カスケード、c-Jun amino-terminal kinase (JNK)カスケード、p38-MAPKカスケードである。

TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)はMAPKKKスーパーファミリーに属する分子である。TAK1はTGF- β /bone morphogenetic protein (BMP)シグナル伝達系において機能すること、セラミドによるアポトーシス誘導において機能することが共に培養細胞を用いた研究で示されている。このようにTAK1の機能解析は、現在まで主に培養細胞を用いて行なわれており、実際の生体を用いた解析はほとんど行なわれていない。唯一、アフリカツメガエルの受精卵へのmRNA注入実験において*Xenopus* TAK1 (xTAK1)が、初期胚でアポトーシスを誘導すること、BMP2/4の下流因子として腹側中胚葉の誘導に関係していることが示唆されているのみである。TAK1の生体内での機能には不明な点が多く残されており、生体内でのTAK1の下流MAPKK及びMAPKに関する知見は全くない。

本研究では生体内でのTAK1の機能及びTAK1シグナル伝達経路を解析するために生物モデルとしてショウジョウバエを用いた。ショウジョウバエを用いた機能解析には以下のような利点がある。(1)トランスポゾンを用いた遺伝子導入個体の作製が容易である。(2)導入遺伝子を時間部位を限定して発現させることが可能である。(3)遺伝子変異の導入が容易ですでに多くの遺伝子の変異体が存在しており、遺伝学的相互作用を解析することにより上流、下流で機能するシグナル伝達因子を同定することができる。(4)哺乳類と同じく3つのMAPK、すなわち*rolled* (MAPK/ERKホモログ)、*basket* (JNKホモログ)、*D-p38* (p38ホモログ)が単離されており、MAPKシグナル伝達経路の研究がさかんに行なわれている。

本研究ではまず、マウスTAK1(mTAK1)及び改変型mTAK1をショウジョウバエに導入し、TAK1の生体内での機能を解析した。mTAK1及び活性型mTAK1を複眼で強制発現すると複眼が縮小した。これらの複眼では光受容細胞、レンズ細胞、色素細胞など複眼を構成するすべての細胞種が減少していた。アクリジンオレンジ染色で細胞死を観察した結果、活性型mTAK1が発

現している領域で細胞死が顕著に亢進していることが分かった。さらに、アポトーシスの阻害タンパク質であるp35を共発現した結果、複眼の大きさは野生型と同等まで回復した。以上の結果から過剰なTAK1シグナルは生体内でアポトーシスを誘導することが示された。

さらに活性型mTAK1とp35を共発現した個体では、アポトーシスの抑制だけでなく個眼と個眼の間に存在する細胞(個眼間細胞)の形態異常が観察された。不活性型mTAK1を複眼で発現させて内在のTAK1シグナルを抑制した個体においても、同様に個眼間細胞の形態が異常になり、配列が乱れていることが分かった。以上よりTAK1シグナルはアポトーシスだけでなく個眼間細胞の形態と配列を制御していることが明かとなった。

次に、TAK1シグナルに関連するシグナル伝達分子を同定するために、既存の様々な変異体と活性型mTAK1との遺伝学的相互作用を解析した。活性型mTAK1は、MAPK/ERKシグナル伝達系や*decapentaplegic* (ショウジョウバエBMPホモログ)シグナル伝達系に属する分子の変異体とは遺伝学的相互作用を示さなかった。これに対して、JNKシグナル伝達系に属する*basket*、*hemipterous* (MKK7ホモログ)の機能欠損変異体とは優位な遺伝学的相互作用を示した。詳しい解析の結果、TAK1はショウジョウバエにおいてBasket-Hemipterousシグナル伝達経路を活性化することが明かとなった。このことは脊椎動物においてTAK1がJNK-MKK7シグナル伝達経路において機能しているMAPKKKであることを強く示唆している。

以上のmTAK1を用いた解析の結果は、実際にTAK1がショウジョウバエにも存在し、Hemipterous、Basketと共にMAPKカスケードを形成していることを強く示唆した。そこで、共同研究者O'Connorらのグループによって単離されたショウジョウバエのTAK1ホモログ(DTAK1)がmTAK1の機能ホモログであるかどうかを検討した。この結果、DTAK1はmTAK1と同様にJNKシグナル伝達経路の上流で機能し、個眼間細胞の形態とアポトーシスを制御していることが示された。これはDTAK1がmTAK1の機能ホモログであり、DTAK1の機能欠損変異体を単離し詳細に解析することにより、TAK1の生体内での役割をさらに明確にできることを意味している。

最後にDTAK1によって誘導されるアポトーシスと、ショウジョウバエに存在する細胞死誘導因子(*reaper*、*head involution defective*)との関係を詳細に検討した。その結果、DTAK1は細胞死誘導因子が誘導することによりアポトーシスを引き起こすことが分かった。このようにTAK1シグナルがcell death machineの上流に位置し、転写レベルでアポトーシスを調節していることを明らかにした。

以上のようにTAK1の生体内での機能をショウジョウバエをモデル動物として解析した結果、TAK1が生体内でJNKシグナル伝達経路の上流で機能し、細胞形態と細胞移動を制御していることが明らかとなった。また、過剰なTAK1シグナルがショウジョウバエで細胞死促進因子を誘導することによりアポトーシスを引き起こすことを示した。このことは脊椎動物でもTAK1によるアポトーシス誘導において、細胞死促進因子が関与していることを示唆している。さらにTAK1が種を越えて存在する重要なシグナル伝達分子であることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 教 授 上 野 直 人
副 査 助 教 授 松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

Functional analysis of TGF- β -activated kinase I(TAKI) in *Drosophila*

(ショウジョウバエを用いた TGF- β -activated kinase I(TAKI) の機能解析)

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は真核生物に普遍に存在するセリン/スレオニンキナーゼで、活性化因子、MAPK kinase (MAPKK) 及びその活性化因子、MAPKKkinase (MAPKKK) と共に MAPK カスケードを形成し、多種多様な細胞外刺激で活性化される。現在まで、哺乳類では少なくとも 3 つの MAPK カスケード、すなわち MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) カスケード、c-Jun amino-terminal kinase (JNK) カスケード、p38-MAPK カスケードが存在することが示されている。学位申請者、高津吉広は新規 MAPKKK である TAK1 の機能を明らかにするためにショウジョウバエをモデルとして研究を行った。

TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) は MAPKKK スーパーファミリーに属する分子で、TGF- β /bone morphogenetic protein (BMP) シグナル伝達系において機能すること、セラミドによるアポトーシス誘導において機能することが共に培養細胞を用いた研究で示されている。しかしながら TAK1 の機能解析は現在まで主に培養細胞を用いて行なわれており、実際の生体を用いた解析はほとんど行なわれていない。したがって TAK1 の生体内での機能には不明な点が多く残されており、生体内での TAK1 の下流 MAPKK 及び MAPK に関する知見は全くなかった。

本研究で申請者は生体内での TAK1 の機能及び TAK1 シグナル伝達経路を解析するために、マウス TAK1(mTAK1) 及び改変型 mTAK1 をショウジョウバエに導入し、TAK1 の生体内での機能を解析した。mTAK1 及び活性型 mTAK1 を複眼で強制発現すると複眼が縮小し、光受容細胞、レンズ細胞、色素細胞など複眼を構成するすべての細胞種が減少することや活性型

mTAK1 が発現している領域で細胞死が顕著に亢進していることを明らかにした。アポトーシスの阻害タンパク質である p35 を共発現した結果、複眼の大きさは野生型と同等まで回復したことから、申請者は過剰な TAK1 シグナルは生体内でアポトーシスを誘導すると結論づけた。また、活性型 mTAK1 と p35 を共発現した個体では、アポトーシスの抑制だけでなく個眼と個眼の間に存在する細胞 (個眼間細胞) の形態異常が観察されることや、不活性型 mTAK1 を複眼で発現させて内在の TAK1 シグナルを抑制した実験から、TAK1 シグナルはアポトーシスだけでなく個眼間細胞の形態と配列を制御していることなどを明らかにした。

さらに、申請者は TAK1 シグナルに関連するシグナル伝達分子を同定するために、既存の様々な変異体と活性型 mTAK1 との遺伝学的相互作用を解析し、活性型 mTAK1 は、MAPK/ERK シグナル伝達系や *decapentaplegic* (ショウジョウバエ BMP ホモログ) シグナル伝達系に属する分子の変異体とは遺伝学的相互作用を示さないものの、JNK シグナル伝達系に属する *basket*、*hemipterous* (MKK7 ホモログ) の機能欠損変異体とは有意な遺伝学的相互作用を示すことを明らかにし、TAK1 はショウジョウバエにおいて Basket-Hemipterous シグナル伝達経路を活性化すること、さらには脊椎動物において TAK1 が JNK-MKK7 シグナル伝達経路において機能している MAPKKK であることを示唆した。

以上の mTAK1 を用いた解析から、実際に TAK1 がショウジョウバエにも存在し、Hemipterous、Basket と共に MAPK カスケードを形成していることが予想されたことから、申請者は共同研究者 O'Connor らのグループによって単離されたショウジョウバエの TAK1 ホモログ (DTAK1) が mTAK1 の機能ホモログであるかについて検討した。その結果、DTAK1 は mTAK1 と同様に JNK シグナル伝達経路の上流で機能し、個眼間細胞の形態とアポトーシスを制御していることや、そのアポトーシスは細胞死誘導因子 (*reaper*、*head involution defective*) を誘導することにより起こることを示した。

以上のように申請者は TAK1 の生体内での機能をショウジョウバエをモデル動物として解析し、TAK1 が生体内で JNK シグナル伝達経路の上流で機能すること、また細胞形態と細胞移動も制御していることを明らかにし、TAK1 の機能に関して先駆的かつ重要な知見を得た。

本博士論文における計画の立案、実験方法、結果の考察、および学位論文発表会における質疑応答から、学位申請者高津吉広は博士 (薬学) の称号を受けるに十分な資格を有しているものと判断した。