

平成21年 5月11日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770102

研究課題名（和文） 小型魚類を用いたストレスシグナルの可視化と生理機能の解明

研究課題名（英文） In vivo imaging and functional analysis of JNK signaling pathway using transgenic fish.

研究代表者

浅岡 洋一（ASAOKA YOICHI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：10436644

研究成果の概要： SAPK/JNK は、物理化学的ストレスをはじめ多様な刺激に応答して活性化されるキナーゼであり、JNK の活性化状態を捉えることは、発生、細胞死、老化などの基本生命現象に加え、癌の病態発症を理解する上でも極めて重要である。しかし、従来の解析手法では JNK 活性化状態の時空間的変遷を捉えることが難しく、この分野の研究進展の障壁となってきた。そこで本研究では、生きた個体の中で、活性化型 JNK の時空間的挙動をリアルタイムに可視化し、JNK 活性化の生理的役割を解明することを目的とした。これまでに細胞レベルで使用可能なプローブの作出に成功し、現在、個体レベルで使用可能であるか否かをトランスジェニックメダカの作出で検討している。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 480,000 | 3,880,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ストレス，MAP キナーゼ，SAPK，JNK，可視化，小型魚類，メダカ，ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

ストレス応答性 MAP キナーゼである stress-activated protein kinase (SAPK、別名 JNK) は、UV 照射，DNA 損傷，熱ショック，浸透圧変化などの物理化学的ストレスや炎症性サイトカイン，増殖因子など多岐にわたる刺激に応答して活性化されるキナーゼであり、ハエからヒトに至るまで保存されてい

る。研究代表者の所属する研究室では、JNK シグナル伝達系の生理的役割を明らかにする目的で、JNK の上流に位置する活性化キナーゼである SEK1 及び MKK7 を欠損するマウスを作出し、本シグナル系が免疫応答や肝形成の制御に必須の役割を果たしていること (Nature 1997; J. Exp. Med. 1997; Development 1999; Dev. Biol. 2002)、JNK

の活性化が転写因子 c-Jun を介して肝幹細胞の増殖・生存、細胞老化を制御すること (Nat. Cell Biol. 2004)、更に、JNK の活性化がストレスの強弱を反映し、細胞の生死の運命決定を担う分子スイッチとして機能すること (J. Biol. Chem. 2001; J. Biol. Chem. 2003; J. Biol. Chem. 2004; EMBO J. 2006) を示してきた。このように、JNK 経路は生命維持に必須の役割を果たしており、JNK の活性化状態を生化学的に捉えることは、発生、細胞死、老化などの基本生命現象に加え、癌や II 型糖尿病等の病態発症を理解する上での重要な尺度と考えられている。従来の JNK の活性化を捉える手法は免疫沈降と放射性同位元素を用いた JNK キナーゼアッセイから始まった。その後、JNK の活性化が JNK の “TPY (Thr-Pro-Tyr)” 部位の Thr と Tyr のアミノ酸残基のリン酸化と一致していることが明らかとなり、抗リン酸化 JNK 抗体が開発され、JNK キナーゼアッセイに必要な煩雑な実験から開放された。この抗リン酸化 JNK 抗体は JNK の活性化を知る上での重要なツールとして世の中に広く流布し、JNK の研究の進歩を促した。

2. 研究の目的

上記の抗リン酸化 JNK 抗体を用いた JNK 活性化の検出では、プロット用に検体をすり潰す、または細胞組織染色用に検体を固定する必要があり、以下の根本的な問題の解決ができていない。

1) 同一細胞での連続した時間的変化を捉えることができない。

2) 活性化部位の変遷、細胞内移動など空間的変化を捉えることができない。

こうした理由から、発生時および病気発症時の JNK 活性化の実態を十分に捉えることができず、この分野の研究進展の障壁となっている。本研究においては、生きた 1 細胞や個体全体の中で、活性化型 JNK の時空間的挙動をリアルタイムに可視化し、JNK 活性化の生理的役割を明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 活性化型 JNK の検出方法

JNK は、その直接の活性化因子である SEK1, MKK7 により Tyr、Thr 残基がリン酸化を受けることで活性化する。一方で、様々な分子に存在する SH2 ドメインはリン酸化された Tyr に特異的に結合することが知られている。そこで、Tyr リン酸化された JNK に SH2 ドメインを結合させることで JNK の活性化を検出できないかと考えた。様々な検討の結果、出力方法としては FRET (Fluorescence Resonance

Energy Transfer) が本研究に最も適していると考えられた (図 1)。

FRET とは二種の蛍光を発する物質が近接すると共鳴しあい、元来持っている蛍光波長から特異的な蛍光波長にシフトする現象をさす。具体的には、CFP が励起されると青色の 480nm の蛍光を発するが、CFP の近傍に YFP が存在すると、放射されるはずのエネルギーが YFP を励起し、最終的に 535 nm の黄緑の蛍光を発するという蛍光エネルギー移動が観察される。そこで、図 1 に見られる YFP-JNK-SH2-CFP の作製を試みた。

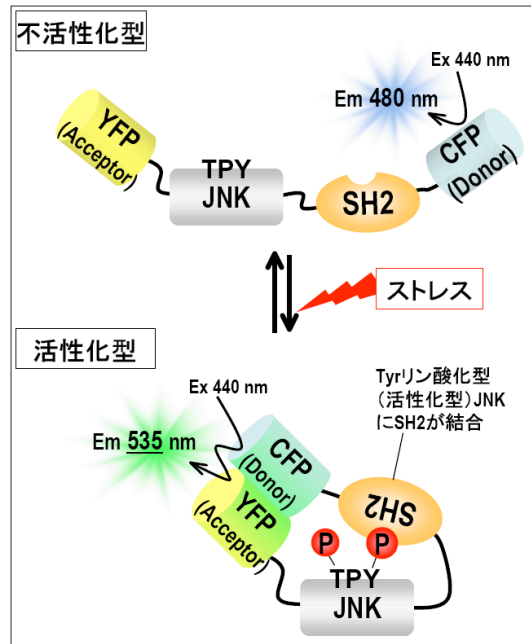


図1. FRETを用いたJNK活性化の可視化
物理化学的ストレスによって活性化 (Tyrリン酸化) されたJNKにSH2ドメインが結合し、YFPとCFPが接近することで蛍光波長が変化する

(2) in vivo における活性化型 JNK の検出

in vivo における JNK 活性化の真の意味を把握する目的で、JNK-FRET コンストラクト (YFP-JNK-SH2-CFP) を導入したトランスジェニック動物の作出を試みた。発生から成体維持の間、JNK はあらゆるステージにおいて重要な役割を果たしている。全ての段階における JNK の活性化状態の FRET を観察するには個体の “透明度” が必要とされる。研究代表者は大学院時代に小型魚類を用いて松果体の光受容細胞特異的な遺伝子発現を研究した実績を持ち、トランスジェニック個体の作出や可視化技術の経験がある (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002)。そこで本研究では日本が誇る生物資源であり近年ヒト疾患モデル生物としても世界的に注目されている小型魚類のメダカを用いることにした。メダカはゼブラフィッシュを含む他のモデル脊椎動物と比して、受精卵から幼魚にいたるま

での間、透明度が高く、詳細な蛍光観察が容易である。哺乳動物とは異なり、発生段階に子宮を必要とせず、受精卵からの発生過程を蛍光顕微鏡下で観察可能である。また、成魚になっても色素が失われた突然変異体“透明メダカ”もモデル生物として有効であると考えられた。

4. 研究成果

(1) JNK-FRET 分子の培養細胞への導入

まず脱リン酸化酵素 SHP 由来の SH2 ドメインと最適化のために点変異を導入された JNK を融合し、YFP-JNK-SH2-CFP 融合タンパク質を発現可能な JNK-FRET 発現ベクターを作製した。次に JNK-FRET 発現ベクターを培養細胞に導入し、JNK が活性化するような物理化学的ストレス、炎症性サイトカイン、増殖因子など、多岐にわたる各種刺激時において JNK の細胞内局在と活性の変化といった時空間的な情報が得られるか否かを検討した。また、JNK の活性化が関与する遺伝子発現、細胞死誘導、増殖促進、老化抑制などの細胞応答との関連についても検討を試みた。観察には本学の共通機器室に備えてある共焦点顕微鏡ならびにタイムラプス装置を利用した。これら一連の解析から、細胞レベルで使用可能な JNK-FRET プローブの作出に成功している。

(2) FRET 分子を発現するトランスジェニックメダカの作出

作製した JNK-FRET ベクターは哺乳動物細胞用であるため、メダカ個体で発現可能なベクターに組換える必要がある。そこで、広範な組織で発現誘導可能な β -アクチンプロモーターに加え、組織特異的な発現誘導が期待されるメダカの各種プロモーターの下流に、YFP-JNK-SH2-CFP をコードする cDNA を組み込むことにした。現在、得られた発現ベクターをメダカ受精卵にマイクロインジェクションし、YFP-JNK-SH2-CFP 分子の発現を指標にして、トランスジェニックメダカを選別している (図 2)。今後、トランスジェニック系統を樹立することにより、JNK-FRET プローブが培養細胞のみならず小型魚類の個体レベルにおいても使用可能かどうかを検証できると考えている。FRET を利用した *in vivo* での JNK の活性化状態の視覚化は、将来的には JNK に起因する異常な発生、細胞死、老化、癌など、多岐にわたる生命現象に関して、これまでの生化学的なアプローチでは得られなかった膨大かつ有用な情報をもたらすと考えられる。

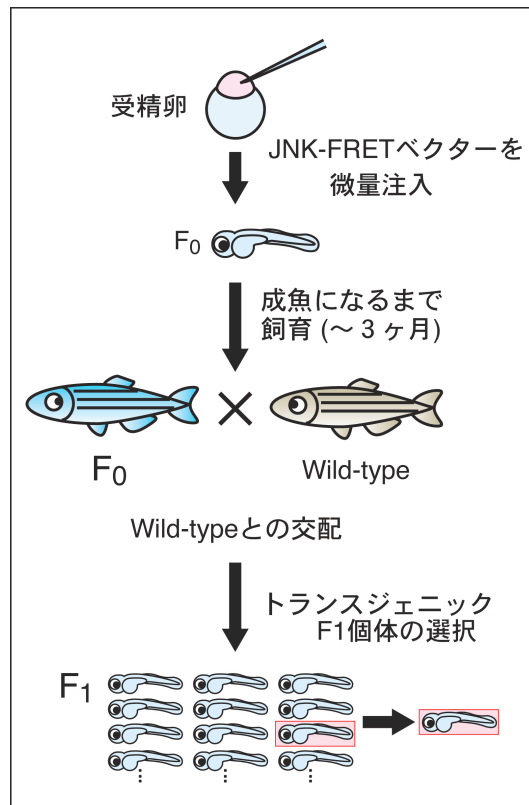


図2. トランスジェニック魚の作出

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① 著者名 : Yoshifumi Matsumoto, Hiroki Oota, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Koji Watanabe, Janusz M Bujnicki, Shoji Oda, Shoji Kawamura and Hiroshi Mitani.
論文標題 : Medaka: a promising model animal for comparative population genomics.
雑誌名 : BMC Research Notes (in press)
査読有り

② 著者名 : Norio Miyamura, Jun Hirayama, Kenji Sawanobori, Teruya Tamaru, Yoichi Asaoka, Reiko Honda, Takuro Yamamoto, Hatsume Uno, Ken Takamatsu and Hiroshi Nishina.
論文標題 : CLOCK:BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochromela gene.
雑誌名 : Biol. Pharm. Bull. (in press)
査読有り

③ 著者名 : Shinya Ohata, Makiko Nawa, Takeshi Kasama, Tokiwa Yamasaki, Kenji Sawanobori, Shoji Hata, Takashi Nakamura, Yoichi Asaoka, Toshio Watanabe, Hitoshi

Okamoto, Takahiko Hara, Shuji Terai, Isao Sakaida, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina.

論文標題：Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells.

雑誌名：Biochem. Biophys. Res. Commun. 379(4) 817-823 (2009).

査読有り

〔学会発表〕(計2件)

① 発表者(代表)名：浅岡洋一

発表標題：「肝機能異常変異メダカを用いた脂質代謝・動態解析」

学会等名：生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能 第一回若手ワークショップ(静岡、2008年1月)

② 発表者(代表)名：浅岡洋一

発表標題：「ゼブラフィッシュ松果体に特異的に発現するエクソロドプシンの転写活性化機構」

学会等名：第13回小型魚類研究会(東京、2007年9月)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.html#>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅岡 洋一 (ASAOKA YOICHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：10436644

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：