

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21370097

研究課題名（和文）

セマフォリンシグナルによる表皮形態形成制御の研究

研究課題名（英文）

A study of epidermal morphogenesis regulated by semaphorin signaling

研究代表者

高木 新 (TAKAGI, Shin)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90171420

研究成果の概要（和文）：本研究では線虫 *C. elegans* を材料にして、セマフォリンシグナルと TOR シグナルの関係を遺伝学的・生化学的に解明した。これまでの TOR シグナルの研究から Raptor, Rictor という2種類のアダプタータンパク質は相互排他的に mTOR と結合して TORC1, TORC2 という全く機能の異なる複合体を形成することが知られていたが、2種の複合体形成調節のメカニズムについてはほとんど知られていなかった。本研究の結果、セマフォリンシグナルが TORC2 形成から TORC1 形成へのシフトを促すことが明らかになった。さらに、この複合体形成調節を介して、セマフォリンシグナルがそれぞれの TORC 下流因子の活性化状態を変化させること、そして、このことが細胞形態の変化を引き起こすことを見出した。

研究成果の概要（英文）：The target of rapamycin (TOR) resides in the two functionally distinct complexes TORC1 and TORC2, which are defined by their adaptors Raptor and Rictor, respectively. How the formation of the two TORCs is orchestrated remains unclear. Through our study in *C. elegans*, we demonstrated the control of TOR partnering by semaphorin-plexin signaling *in vivo*. In semaphorin and plexin mutants, TOR-Raptor association decreases whereas TOR-Rictor association increases, concomitantly with TORC1 down- and TORC2 up-regulation. Epidermal defects in semaphorin and plexin mutants are suppressed by inhibiting TORC2 or reinforcing TORC1 signaling. Conversely, inhibition of TORC1 signaling phenocopies semaphorin and plexin mutants. Our results indicate that TORC formation is a singularly important step in semaphorin signaling that culminates in diverse outcomes including TORC1-promoted mRNA translation and TORC2-regulated cytoskeletal remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：セマフォリン、表皮、形態形成、線虫、TOR、器官形成

1. 研究開始当初の背景

セマフォリンとその受容体であるプレキシ

ンは、動物に普遍的に存在し、それぞれ大きな蛋白質ファミリーを形成している。セマ

フォリン-プレキシン系は発生中の形態形成に必須のシグナル経路であり、脊椎動物では神経回路や心・血管系、表皮系など様々な組織の形成過程で細胞形態・運動性を調節することが知られている。最近では免疫系の活性化、神経損傷時の神経線維再生やがん転移に関与することから臨床的にも注目されている。

セマフォリンによって引き起こされるプレキシン下流の細胞内シグナル伝達の分子機構は、生物学的重要性および創薬など応用面での期待により、現在セマフォリン研究の焦点の一つとなっている。これまでに脊椎動物培養神経細胞系を材料とした研究から、プレキシン下流細胞内シグナル伝達はプレキシン直下で低分子量G蛋白質 Rnd1 を介した R-Ras の活性化によって開始され、Fyn、CDK5 などのリン酸化酵素や MICAL、Offtrack などの因子が関与することが明らかになっている。一方、セマフォリンシグナルの主要な出力としては、細胞骨格中のマイクロフィラメントの制御系、微小管の制御系、および蛋白質翻訳制御系、の3経路が示されている。しかし、これら多様な出力と前述の因子との関係は確定しておらず、伝達経路の解析の現状は混沌としており、統一的な像の形成には至っていない。また、培養神経細胞系の生化学的解析で得られた結果が一般的なセマフォリンシグナル伝達をどの程度反映しているのかは検討の余地がある。

セマフォリンシグナル伝達分野では、これまで本格的な遺伝学的アプローチはなかった。私達は *C. elegans* プレキシンA遺伝子である *plx-1* 変異体を作成し、表皮形態形成に異常を示すことを明らかにした (Fujii et al., *Development* 129 2053, 2002, Liu et al., 2005)。現在、プレキシン下流因子を明らかにするために、*plx-1* 変異体の表現型を抑圧するサプレッサー検索・同定を進めている。これまでにサプレッサー変異の一つ *nc40* の原因遺伝子 *gcn-1* が酵母 *GCN1* 遺伝子の相同遺伝子であることを明らかにし、セマフォリンシグナルが eIF2 $\alpha$  のリン酸化を抑制することによって蛋白質翻訳を活性化すること、さらにこの蛋白質翻訳活性化は表皮形態形成制御におけるセマフォリンシグナルの主要な出力であることを明らかにした。さらに、セマフォリンシグナルによって翻訳活性化を受ける蛋白質の一つとしてアクチン脱重合因子 cofilin / UNA-60a を同定した。細胞形態変化では細胞骨格制御因子の化学的修飾が注目されているが、翻訳をはじめとする様々な細胞の基本的な機能も細胞骨格制御等を介して形態形成の調節に関わる可能性があると思われる。また、セマフォリンシグナルが多面的な細胞機能制御を介して細胞形態を調節していることが裏付

けられた。

## 2. 研究の目的

セマフォリンシグナルが多面的な細胞機能制御を解明するために、線虫 *C. elegans* *plx-1* 変異体新規サプレッサーを解析する。

1) リン酸化酵素 mTOR は細胞内代謝の key regulator として最近大きな注目を集めているが、私達が単離したサプレッサー変異 *nc41* の原因遺伝子は mTOR 結合因子 Rictor をコードしていた。Rictor は mTOR 複合体 TORC2 の足場蛋白であり TORC2 による細胞骨格系調節・細胞代謝調整に必須の因子である。TORC2 の調節機構は不明であり mTOR 研究分野の大きな研究課題であるが、私達の結果はセマフォリンシグナルが TORC2 上流シグナルの一つである可能性を示唆している。一方、mTOR は足場蛋白 Raptor と共にもう一つの複合体 TORC1 を形成し、eIF4 系を介して蛋白質翻訳を制御することが知られている。前述のように私達はセマフォリンシグナルが eIF2 系を介して翻訳調節を行うことを証明したが、脊椎動物神経系細胞ではセマフォリンシグナルによる mTOR を介した eIF4 系の活性化が報告されており、*C. elegans* でもこの系が活性化されている可能性が高い。セマフォリンシグナルの多様な作用を考える上で、セマフォリンシグナルの本質が TORC1, TORC2 両者を含む mTOR シグナル系の調節であるというモデルは大変魅力的であり、本研究では遺伝学的・分子遺伝学的・生化学的手法を用いてこの仮説を検証する。

2) 私達は endocytosis/exocytosis に関与する UNC-41/stonin2 の遺伝子変異が *plx-1* 変異の表現型を抑圧することを見出していた。脊椎動物でもセマフォリンが軸索成長円錐の endocytosis を活性化するという報告があり、このシグナルが膜動態を制御して細胞形態変化を調節する可能性を示している。本研究ではセマフォリンシグナルが stonin2-synaptotagmin 系を介して膜の動態を調節する可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 線虫 *C. elegans* 雄尾部の表皮細胞由来の感覚器である ray1 の位置を指標に、変異体・RNAi・transgene を利用して mTOR 系、並びに stonin2-synaptotagmin 系とセマフォリンシグナルとの関係を遺伝学的に検討した。

(2) *lin-32* 遺伝子プロモーターによるトランスジーン発現系を利用してプレキシン発現細胞特異的なタンパク質標識と免疫沈降実験を行い、プレキシン発現細胞内での特定タンパク質のリン酸化レベルの検討および複合体形成を生化学的に解析した。

(3) 蛍光タンパク質で標識したシナプトタグミン1発現系統を作製し、細胞内シナプトタ

グミン局在を解析した。

#### 4. 研究成果

1) *plx-1* 変異体の Ray 表現型に対するサブレッサー変異 *nc41* が Rictor 遺伝子の機能欠損変異であることが判明し、セマフォリンシグナルと TOR アダプター因子の1つである Rictor とのつながりが示唆された。そこでまず、もう1つの TOR アダプター因子 Raptor の寄与についても解析した。野生型背景での Raptor の RNAi は、セマフォリン/プレキシン変異体と同様の Ray 1 前方化異常を引き起した。逆にセマフォリン/プレキシン変異の背景では、Raptor の過剰発現により、Ray 1 前方化異常の抑圧が見られた。これらの結果から、セマフォリンシグナル伝達において、TORC1 は正の作用を、反対に TORC2 は負の作用を及ぼすことがわかり、セマフォリンが前者を活性化し、後者を抑制することが示唆された。

そこで、TOR 複合体の活性が、複合体形成自体を介して調節される可能性を考えた。このことを生化学的に検証するため、TOR、Raptor、Rictor に FLAG、Myc、HA をそれぞれ付加し、これらを Ray 前駆細胞特異的に発現するトランスジェニック株を作成した。そして、セマフォリンが担う Ray 形態変化が劇的に起こる 3 齢～4 齢幼虫期のオス個体を回収した後、抗 FLAG 抗体免疫沈降実験により、TOR 複合体に含まれる Raptor および Rictor の量比を、野生型とセマフォリン/プレキシン変異体との間で比較解析した。セマフォリン/プレキシン変異体では野生型と比べ、TOR と結合する Raptor の量が減少し、これと逆に TOR と結合する Rictor の量が増加していた。このとき、全体の TOR、Raptor、Rictor の量は遺伝子型で違いがなかった。この結果から、セマフォリン-プレキシン入力により TOR アダプター因子が Rictor から Raptor へシフトすることが明らかになった。

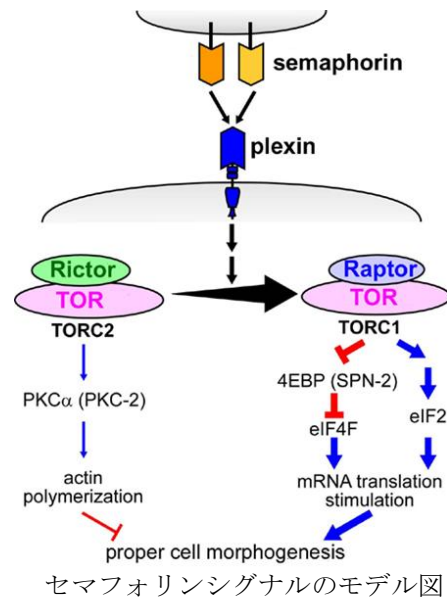
次に、TORC1 基質の 4EBP および TORC2 基質の PKC $\alpha$  のリン酸化状態をモニターした。脊椎動物の各タンパク質を線虫 Ray 前駆細胞特異的に発現させ、リン酸化された各タンパク質に対する抗体を利用して定量するという方法を用いた。その結果プレキシン変異体において、TORC1 の減少および TORC2 の増加と合致するように、4EBP のリン酸化は低下し、逆に PKC $\alpha$  のリン酸化は上昇することが分かった。以上の結果から、セマフォリンによる TOR アダプター因子のシフトに伴って TORC1 の活性化と TORC2 の不活性化が同時に起こることが示された。なお、これらの2つの出力いずれもが、セマフォリン制御下の正常な Ray 形態形成に必要な下流イベントであることも、遺伝学的解析から示唆された。さらに、TORC1 での TOR アダプター Raptor の RNAi は、

eIF2 $\alpha$  のリン酸化を促進することを見出し、eIF2 が TOR とクロストークすることが示唆された。

以上の結果からセマフォリンシグナルの本質が TORC1、TORC2 両者を含む mTOR シグナル系の調節であるというモデルが指示された。

これにひきつづき蛍光蛋白質標識した TOR、Raptor、Rictor、さらにその他の TORC コンポーネントを利用して野生型と *plx-1* 変異体の雄尾部表皮細胞でこれらの分子の局在を検討した。しかし、いずれの標識蛋白質の場合も蛍光が極めて弱く、局在性の判定が難しかった。

以上の結果は論文にまとめて発表した。



2) *unc-41/stonin2* 変異の複数のアレルが *plx-1* 変異体の Ray 表現型を抑圧することから、UNC-41 と相互作用する SNT-1/synaptotagmin1 遺伝子変異の効果についても検討した結果、*snt-1* の複数のアレルが *plx-1* 変異体の Ray 表現型を抑圧することを見出した。このことから、セマフォリンシグナルが synaptotagmin/stonin2 系を制御して、細胞形態を調節する可能性が示唆された。

次に、*snt-1* が表皮細胞である Ray 前駆細胞で実際に機能しているのかどうか、確認するために、SNT-1::mCherry を Ray 前駆細胞に発現させた。*snt-1* 変異体での SNT-1::mCherry 発現は *plx-1* 変異に対する抑圧を救済したことから、*snt-1* が Ray 前駆細胞で細胞自律的に働くことが明らかになった。今後、セマフォリンシグナルと synaptotagmin/stonin2 系との関係を更に詳細に解析し、endocytosis/exocytosis との関係を解明した後に、成果をまとめて論文として発表する予定である。

神経細胞シナプス小胞の endocytosis/exocytosis における synaptotagmin1 の役割についてはこれまで膨大な研究がなされている。これに対して、synaptotagmin1 の表皮細胞での機能はこれまで全く知られていなかった。そこで、本研究では線虫腹側正中部の表皮細胞からの FGF/EGL-17 分泌に SNT-1 が関与する可能性を検討したところ、*snt-1*、*unc-41* 変異体では FGF/EGL-17 分泌が低下して細胞内に残留するという表現型を示すことを見出した。このことは synaptotagmin/stonin2 系が神経細胞に限らず、様々な細胞での endocytosis/exocytosis に関与する可能性を示唆して、興味深い。今後、この実験系を用いて他の endocytosis/exocytosis 関連因子と synaptotagmin/stonin2 系との関係を更に詳細に検討し、論文としてまとめる予定である。

#### 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 4 件)

① 糠塚 明、高木 新 セマフォリンシグナルを介した TOR アダプター因子の選択機構 実験医学 30 (3) 475-478 (2012) 査読なし。

② Akira Nukazuka, Shusaku Tamaki, Kunihiro Matsumoto, Yoichi Oda, Hajime Fujisawa, & Shin Takagi Nature Communications 2:484 doi: 10.1038/ncomms1495 (2011) 査読あり。

[学会発表] (計 8 件)

① Tanaka Hiroki, Shimojou Masaki, Takagi Shin Synaptotagmin and Stonin is required for efficient EGL-17/FGF secretion by epidermal cells in *C. elegans*. East asia *C. elegans* meeting. 2012 年 6 月 28 日, (Taipei, Taiwan)

② Tanaka Hiroki, Shimojou Masaki, Takagi Shin Synaptotagmin and Stonin is required for efficient EGL-17/FGF secretion in *C. elegans* 日本分子生物学会大会 2012 年 5 月 29 日 神戸国際会議場 (神戸)

③ Tanaka Hiroki, Shimojou Masaki, Takagi Shin Synaptotagmin and Stonin is required for efficient EGL-17/FGF secretion in *C. elegans* 日本分子生物学会大会 2011 年 12 月 14 日 パシフィコ横浜 (横浜)

④ 糠塚 明、玉木 修作、松本 邦弘、小田 洋一、藤澤 肇、高木 新 線虫 *C. elegans* においてセマフォリンは、TOR の結合アダプタータンパク質を Rictor から Raptor へシフトする RNA フロンティアミーティング 2011 年 8 月 31 日 愛知健康プラザ (大府市)

⑤ 高木 新 セマフォリンによる翻訳制御を介した *C. elegans* 表皮形態形成の調節 第 84 回日本生化学会大会、シンポジウム (招待講演) 2011 年 8 月 京都国際会館 (京都)

⑥ Akira Nukazuka, Mie Chikuma, Toshifumi Inada, Yoichi Oda, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. Up- and Down-regulation of TOR-Raptor and TOR-Rictor Complexes by Semaphorin in *C. elegans*. RNA Sciences in Developmental Biology, The 19th CDB Meeting 2010 年 5 月 1 日 理研 CDB (神戸)

⑦ Akira Nukazuka, Mie Chikuma, Toshifumi Inada, Yoichi Oda, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. Up- and down-regulation of TOR-Raptor and TOR-Rictor complexes by semaphorin in *C. elegans*. 17th International *C. elegans* meeting 2009 年 6 月 UCLA (Los Angeles USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~m7home/research/takagi.html>

[http://www.nu-research.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=129:biologysemaphorins-contribute-to-cellular-changes-by-regulating-two-tor-complexes&catid=2:entry&Itemid=3](http://www.nu-research.com/index.php?option=com_content&view=article&id=129:biologysemaphorins-contribute-to-cellular-changes-by-regulating-two-tor-complexes&catid=2:entry&Itemid=3)

「セマフォリンによる細胞の形の制御機構 解明」名大トピックス No.226 2012 年 3 月 15 日発行

「細胞変形、仕組み解明」日経産業新聞 2011 年 12 月 2 日

「動物細胞の形制御 分子の仕組み解明」日刊工業新聞 2011 年 10 月 18 日 3 面

「細胞の伸び仕組み解明」中日新聞 朝刊

2011年9月28日 3面

研究者番号：90171420

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 新 (TAKAGI SHIN)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

(2) 研究分担者

なし