

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 20 日現在

機関番号：34318
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009（4月）～2012（9月）
 課題番号：21590195
 研究課題名（和文）
 ラパマイシン標的経路の因子は発生期の細胞分裂、形態機能形成を制御するか？
 研究課題名（英文）
 Does TOR related factors control the cell division mode and the morphogenesis in developing embryo?
 研究代表者
 廣瀬 英司 (HIROSE EIJI)
 研究者番号：40380620

研究成果の概要（和文）：RagGTPase の cDNA を分離・解析し、発生期における発現の時空間分布と両遺伝子の欠損や翻訳抑制が発生にあたる影響を解析した。その結果、発生胚における RagGTPase 群の 2 種のファミリー分子の発現量比が発生期に大きく変化することが解った。また、この 2 つの RagGTPase 群の量比の変動が富栄養下で速い分裂する初期発生胚の分裂様式と、貧栄養下や飢餓状態で速度低下した場合の分裂様式や休眠状態に対応することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We isolated the RagGTPase family genes and mapped their spatial and temporal expression pattern in the developing embryo. We also analyzed the effects of the gene defects such as gene deletion or the translation blockage on the cell division mode in the developing embryo. The expression of two RagGTPase genes showed unique pattern, and the expression ratio of these two genes were drastically changed in the developing stage. This ratio changing of two genes suggested to switch the two cell division modes during the embryonic development. The one is a rapid cell division mode in nutrient-rich condition (early embryonic cell division with sufficient york), and another is slow cell division mode in nutrient-poor condition (late embryonic cell division or starved animal).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 24 年度	0	0	0
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：アフリカツメガエル、線虫、マウス、TOR、RagGTPase

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母でアミノ酸感知に関わり、かつ小分子量 G 蛋白質 Ran に遺伝的にリンクする小分子量 G 蛋白質群-RagGTPase は近年、細胞成長シグナルの重要な経路であるラパマイシン標的因子群に含まれ、外界の栄養源感知に関

わることが解ってきていた。しかし発生過程における動態やその機能についてはほとんど調べられていなかった。

2. 研究の目的

癌化過程や栄養飢餓状態にたいする応答

経路ではない「正常な状態」の多細胞生物における生物学的プロセス、発生における細胞分裂様式の調節や組織分化過程において RagGTPase や TOR 経路に関わる分子群の役割を解明することを目指す。そのため初期発生、器官形成時の RagGTPase の発現様式を逐一明らかにする。また初期発生胚における RagGTPase を含む TOR 蛋白質群複合体形成を調べることで、両分子群が細胞増殖の様式や栄養依存性にどのように影響するかを明らかにすることを目的とする。

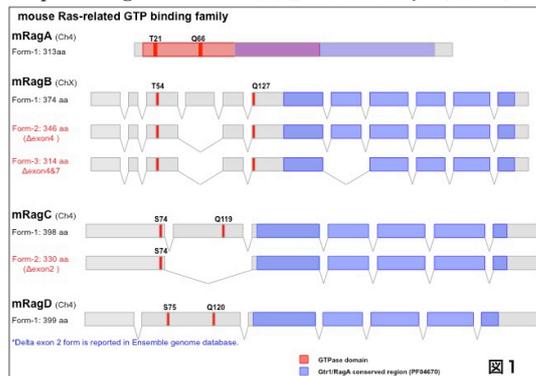
3. 研究の方法

モデル実験生物としてアフリカツメガエル、線虫、哺乳類の3種類の動物を用いた。それぞれの RagGTPase 群とその関連遺伝子をクローニングし、それら分子群の発現パターンを含む発現・機能制御の時空間分布を解析するとともに、遺伝子発現の抑制あるいは遺伝子欠損の表現形を発生胚で調べ、細胞増殖・成長に対する両分子の役割を解析した。

4. 研究成果

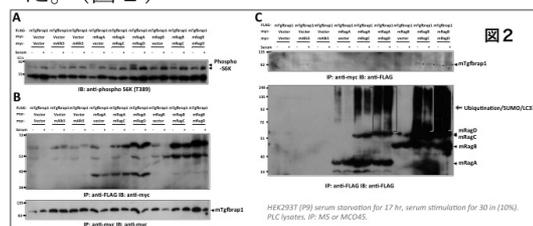
(1) アフリカツメガエル (*X. laevis*) の RagGTPase が哺乳類 RagA/B と RagC/D に相当する2遺伝子 (XRag1/2) からなることが判明した。配列情報により、その翻訳抑制が期待できるモルフォリノアンチセンスヌクレオチドを合成し、受精卵に注入して発生における両蛋白質の機能不全による表現型の検出を試みた。当初、抑制が不十分であったため、ツメガエルゲノムの倍数性を考慮して、両遺伝子の非翻訳領域 (特に 5' 側上流域の転写開始部位から) の配列情報と、exon-intron 境界領域配列を再確認した。これらの結果をふまえ、5' 領域と exon-intron 境界に対する複数個の新たなモルフォリノを合成し受精卵に注入した結果、XRag1 の転写産物は有為に減少し、胚の細胞の分裂速度が遅くなった。

(2) 哺乳類の RagGTPase の解析のためマウスの相同体 (mRagA, B, C, D) をクローニングしたところ、新たに mRagB に2つ、mRagC に1つの splicing variant を見いだした。(図1)



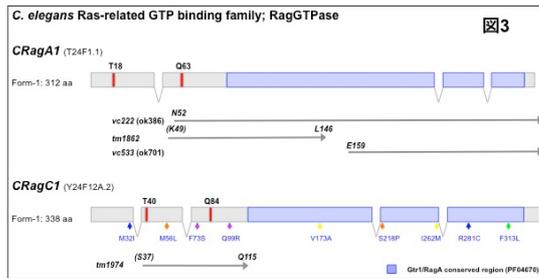
mRagB Δ exon4 は GTPase activating domain のうち、PM2-PM3 間に欠失があり、結果として PM1-G1-PM2-PM3 (PM: リン酸/Mg 結合モチーフ、G: GTP 結合モチーフ) の各間隔が全く mRagA と同じものになる。他動物の相同体との比較から mRagB の本来の発現様式であることが予想された。一方 mRagC Δ exon2 は G1-PM2-PM3 が欠失し、mRagC Δ exon4&7 は exon4 の欠失に加え G3モチーフをも持たない。このことから GTP/GDP サイクルによる活性調節を受けない、あるいは C 端側のエフェクターとの結合領域のみからなる蛋白質となる。RagGTPase 群はこれらの variants との混合で機能調節されている可能性が示唆された。

(3) また酵母を用いた他グループの知見により、Vam6 が GTR1 (酵母 RagGTPase) の GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) であり、この反応を通して TORC1 を活性化している事が解明されたので、我々はその Vam6 の哺乳類相同体である mTgfbrap1 の cDNA をマウスより分離し、並行してマウスの Rag (mRagA, B, C, D) を発現ベクターに組み込んで HEK293 細胞に遺伝子導入して発現させ、その挙動を血清飢餓・血清刺激の前後で調べた。その結果、p70S6K (T389) のリン酸化で検出される mTOR の活性化が RagGTPase (特に mRagA, D のコンビネーション) との共発現した場合、血清飢餓状態、血清刺激後共に上昇することや、このとき mTgfbrap1 と mRagA, B, C, D が結合していること、さらにこのとき RagC, D に修飾が入り高分子側にシフトすることを見いだした。(図2)



この結果は栄養状態に依存した細胞増殖経路において RagGTPase のグアニンヌクレオチドサイクル、即ち RagGTPase が GTP 型であるか GDP 型であるか、その状態が細胞増殖の栄養依存性、あるいは感受性を修飾する可能性を示唆する。

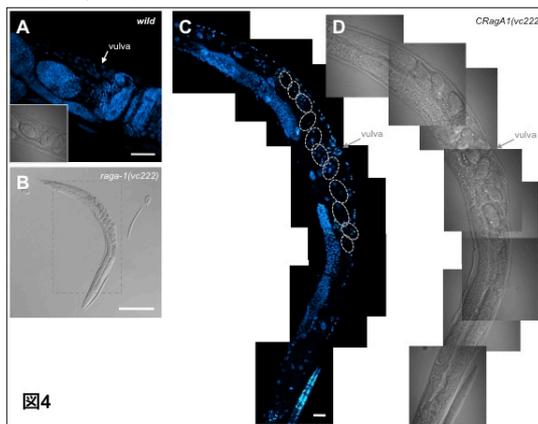
(4) さらに線虫 (*C. elegans*) の RagGTPase 遺伝子群 (CRagA1, CRagC1) の機能解析のため、染色体欠失株 (deletion 株) を入手した。(図3)



Wormbase データ上の RNAi と欠失株の表現型は多様であるが、実際の欠失株の表現型も安定せず生存率が低いことが判明したので、株個体をクローニングして数を増やし、致死段階とその表現形を観察したところ、複雑な表現型を示すことがわかった。

CRagA1 の遺伝子破壊株は、継代を行う期間が長くても維持できる系統であり、これは産卵数または胚や幼虫の生存率が低いことを示唆するため、発生胚を構成する細胞核数 (=細胞数) と細胞サイズを調べたところ、産卵後の発生胚であっても、構成核数が大幅に減少し、逆に細胞サイズは成長して大型化していることが判明した。

(図 4、5)



線虫の体の構成細胞数は遺伝的に厳密に決まっているので、細胞分裂速度の低下が発生の遅延と生存胚数の低下を引き起こすためと考えられる。しかしその後の個体の発生、成長は緩慢ではあるが正常に進み成体になる。これに対し CRagC1 の破壊株では飢餓状態で耐性幼虫にはなるものの正常幼虫へ復帰ができない表現形を示すことが判った。



(5) これらのデータから CRagA1 (XRag1、RagA/B 相当) は富栄養状態での成体の生存には大きな影響を与えず、またその欠損が発生期の胚細胞の細胞死をもたらすこともない。その機能欠損は細胞サイズが成長

(細胞内の環境として富栄養状態である) しているにもかかわらず、細胞分裂速度を低下させる。これはツメガエルの翻訳抑制実験結果と整合する。つまり CRagA1 (XRag1、RagA/B) の存在は増殖シグナル系へ細胞の富栄養状態の情報を伝達し、基本的な細胞分裂を保証することになる。従ってその機能欠損 (あるいは量的減少) は富栄養状態であるにも関わらず分裂速度の減少をもたらし、結果、細胞はサイズを増したままとなる。

これに対し CRagC1 欠損株では耐性幼虫から正常幼虫への復帰欠損を示すが、これは CRagC1 (XRag 2、RagC/D 相当) が細胞の富栄養状態を増殖シグナル系へと伝達し、かつ CRagA1 (XRag1、RagA/B) との共在が富栄養状態の高速な細胞分裂を保證する情報伝達であることを示す。その機能欠損 (あるいは量的減少) は細胞分裂速度を抑制あるいは個体を耐性休眠状態へ導くことになる。この状態で富栄養状態に移行しても細胞は貧栄養状態のように振る舞うため、線虫は正常幼虫へ復帰できない。これはツメガエルの XRag2 の転写産物の量的変化の結果によく一致する。

3つのモデル生物を用いた実験の結論として、構造的に良く似ており、かつ種間でよく保存された2つの RagGTPase 群は共同 (結合) して発生期の細胞分裂の様式をスイッチングするが、これは細胞中の栄養状態が細胞分裂に適しているか、分裂停止 (あるいは休眠) に適しているかを、両分子の存在量比で増殖シグナル系に伝えていることが強く示唆される結果となった。

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 8 件)

- ① Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Freeze-fracture electron microscopic study of tight junction strands in HEK293 cells and MDCK II cells expressing claudin-1 mutants in the second extracellular loop. Histochem Cell Biol. 査読有り、2009 131(6) pp681-90
- ② Kojima T, Takahashi N. Influence of teratogenic factors on mouse 39 hox gene expression. Biosci. Biotech. Biochem. 査読有り、2009 73(11) pp2416-21.

- ③ Watanabe Y, Ikegawa M, Naruse Y, Tanaka M. A novel splicing variant form suppresses the activity of full-length signal transducer and activator of transcription 5A. FEBS J. 査読有り、2009 276(21) pp6312-23.
- ④ Inai T, Kamimura T, Hirose E, Iida H, Shibata Y. The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility. Eur J Cell Biol. 査読有り、2010 89(7) pp547-56
- ⑤ Isoda M, Sako K, Suzuki K, Nishino K, Nakajo N, Ohe M, Ezaki T, Kanemori Y, Inoue D, Ueno H, Sagata N. Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of Xenopus eggs. Dev Cell. 査読有り、2011 21(3) pp506-19
- ⑥ Tominaga A, Ishizaki N, Naruse Y, Kitakoji H, Yamamura Y. Repeated application of low-frequency electroacupuncture improves high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. Acupunct Med. 査読有り、2011 29(4) pp276-83
- ⑦ Nakajo N, Deno YK, Ueno H, Kenmochi C, Shimuta K, Sagata N. Temporal and spatial expression patterns of Cdc25 phosphatase isoforms during early Xenopus development. Int J Dev Biol. 査読有り、2011 55(6) pp627-32
- ⑧ Saito Y, Kojima T, Takahashi N. Mab2112 is essential for embryonic heart and liver development. PLoS One 2012 査読有り、7(3) pp1-12
- [学会発表] (計 8 件)
- ① Hirose E, Ishitani T, Nishii K, Inai T, Shibata Y. Molecular cloning of Zebrafish pannexin2 and the spatio-temporal expression profile in the developing heart. International Gap Junction Conference、2009 年 7 月
- ② 廣瀬英司、石谷太、西井清雅、稲井哲一朗、柴田洋三郎、ゼブラフィッシュ Pannexin2 のクローニングとその発現の解析、日本解剖学会 第 65 回九州支部学

術集会、2009 年 11 月

- ③ 廣瀬英司、石谷太、西井清雅、稲井哲一朗、柴田洋三郎、ゼブラフィッシュ Pannexin2 のクローニングと組織発生における発現の解析、日本解剖学会 第115回 全国学術集会、2010年03月
- ④ 出野結己、剣持千尋、中條信成、上野裕之、佐方功幸、アフリカツメガエル胚発生過程におけるCdc25ホスファターゼの発現、日本発生物学学会年会、2011年5月
- ⑤ 磯田道孝、迫洗佑、鈴木和広、中條信成、佐方功幸、ツメガエル未受精卵の分裂停止におけるAPC/C阻害因子Emi2の動的制御-その1、日本分子生物学会年会、2011年12月
- ⑥ 迫洗佑、磯田道孝、鈴木和広、中條信成、佐方功幸、ツメガエル未受精卵の分裂停止におけるAPC/C阻害因子Emi2の動的制御-その2、日本分子生物学会年会、2011年12月
- ⑦ 小島拓哉、西谷健、山根一祐、高橋直樹、催奇形成因子による転写調節因子への影響性、日本農芸化学会、2012年3月
- ⑧ Saito Y, Kojima T, and Takahashi N, Mab2112 is essential for embryonic heart and liver development、日本農芸化学会、2012年3月

[図書] (計 1 件)

Kojima T, Takahashi N. Hox genes and teratogenic factors. Congenital Anomalies - Case studies and Mechanisms. 2012 pp1-8

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 英司 (EIJI HIROSE)

明治国際医療大学・医学教育研究センター
・准教授

研究者番号：40380620

(2) 研究分担者

鳴瀬 善久 (NARUSE YOSHIHISA)

明治国際医療大学・医学教育研究センター
・准教授

研究者番号：00326216

中條 信成 (NAKAJO NOBUSHIGE)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：90294876

小島 拓哉 (KOJIMA TAKUYA)

東京大学・農学生命科学研究院・助教

研究者番号：90346312

稲井 哲一郎 (INAI TETSUICHIRO)

福岡歯科大学・基礎医歯学部門・教授

研究者番号：00264044

(3) 連携研究者

なし