

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570181
 研究課題名（和文）
 線虫 JNKカスケードの網羅的解析
 研究課題名（英文）
 Genome-wide analysis of *C. elegans* JNK cascade
 研究代表者：
 久本 直毅 (Hisamoto Naoki)
 名古屋大学・理学研究科・准教授
 研究者番号：80283456

研究成果の概要（和文）：

JNK MAP キナーゼ経路は、進化的に多様な種におけるさまざまなストレス応答において極めて重要な役割を果たしている。*C. elegans* では、MLK-1 MAPKKK、MEK-1 MAPKK および KGB-1 MAPK からなる JNK 様の MAPK 経路が重金属ストレス応答で働くことが知られている。しかし、その上流および下流の因子については不明の点が多い。これまでの解析から、KGB-1 は MAPK ホスファターゼである VHP-1 によって負に制御されること、また *vhp-1* の欠損は成長停止を引き起こすが、その表現型は KGB-1 カスケードが機能しなくなるような変異により抑圧されることが示されている。そこで、我々は KGB-1 カスケードで機能する遺伝子を同定するために、*vhp-1* のサプレッサーのゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。結果として、新規遺伝子を含むいくつかの遺伝子を *vhp-1* のサプレッサーとして同定することができた。それに加えて、われわれはアダプター蛋白質 SHC-1、プロテインキナーゼ MAX-2 および低分子量 G 蛋白質 MIG-2 を MLK-1 の上流で機能する因子として同定し、その KGB-1 カスケードにおける役割について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The JNK MAP kinase (MAPK) pathway plays a pivotal role in the various stress responses of evolutionarily diverse species. In *C. elegans*, a JNK-like MAPK pathway composed of MLK-1 MAPKKK, MEK-1 MAPKK and KGB-1 MAPK is known to act in a heavy metal stress response. However, the upstream or downstream components of this pathway remain unknown. It has been shown that the KGB-1 pathway is negatively regulated by VHP-1, a dual-specificity MAPK phosphatase, and that mutations defective in the KGB-1 pathway suppress the growth arrest caused by a loss-of-function mutation in the *vhp-1* gene. Therefore, we performed genome-wide RNAi screening for *vhp-1* suppressor to identify genes functioning in the KGB-1 pathway. As the result, we identified several genes including novel genes as *vhp-1* suppressors. In addition, we identified an adaptor protein SHC-1, a protein kinase MAX-2 and a small G protein MIG-2 as upstream factors of MLK-1 and clarified their roles in KGB-1 cascade.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード： *C. elegans*, JNK, RNAi

1. 研究開始当初の背景

JNK型MAPキナーゼカスケードは種を越えて保存されたシグナル伝達経路であり、細胞のストレス応答やアポトーシス、発生、分化等のさまざまな生命現象に関与することが明らかになっている。培養細胞等を用いた解析では、さまざまな細胞におけるさまざまなJNKの機能について報告されているものの、それらのうち個体レベルで本当にその意義が検証されたものは多くない。JNK MAPキナーゼカスケードは線虫からヒトまでよく保存されているため、線虫やショウジョウバエなどのモデル動物を用いた個体レベルでの研究も行われており、それによりJNKカスケードの機能についていろいろなことが分かってきている。しかし、JNKカスケードについては未だ不明の部分も多く、上下流あるいは周辺で機能する因子についても未知の部分が多く残っている。

申請者は、これまでに線虫 *Caenorhabditis elegans* をモデル動物としたJNK MAPキナーゼカスケードの解析を行い、それにより線虫のMAPKKKであるMLK-1、MAPKKであるMEK-1およびJNK型MAPキナーゼであるKGB-1がMAPキナーゼカスケードを構成し、個体レベルでの重金属ストレス応答に関わること、またMAPキナーゼホスファターゼであるVHP-1がこのカスケードを負に制御することをすでに報告していた。しかし、MLK-1の上流で機能する因子およびKGB-1の下流で機能する因子については全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

これまでの解析から、*vhp-1* 変異体は致死性を示すが、その致死性がKGB-1カスケードの変異により抑圧されることがわかっていた。このことから、逆に*vhp-1* 変異体の致死性を抑圧するサブレッサーを同定すれば、KGB-1カスケード上の遺伝子が同定できるであろうと推測された。また、線虫では全ゲノム上の遺伝子を網羅的RNAiにより容易にノックダウンできることも報告されていた。そこで、*vhp-1* 変異体の致死性と全遺伝子を対象とした網羅的RNAiのシステムを組み合わせたスクリーニングを行うことにより、KGB-1カスケードの遺伝子の網羅的同定が可能となると考えられた。そ

れに加えて、酵母 two-hybrid 法などの手法を用いた KGB-1 カスケード周辺で機能する因子の探索も同時に行えば、より多面的スクリーニングの遂行が可能になる。そこで、上記のスクリーニングにより KGB-1 カスケードの因子を同定し、それらについて分子遺伝学および生化学的な手法で解析することにより、線虫 KGB-1 カスケード上の因子を網羅的に同定し、その役割をそれぞれ明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、線虫の全遺伝子の RNAi ライブラリーを用いて、*vhp-1* の欠損変異による致死性をノックダウンにより抑圧できる遺伝子についてゲノムワイドの網羅的なスクリーニングを行った。一方、それとは別に酵母 two-hybrid 法などの手法を用いた周辺因子の探索も同時並行で行った。その後、上記の手法で同定された遺伝子についてそれぞれ変異体入手あるいは単離し、KGB-1 カスケード上の因子として機能しているかについて検証した。具体的には、KGB-1 カスケードが変異すると重金属に感受性を示すようになるが、同定された遺伝子の変異についても同様の表現型を示すのか、またそれが KGB-1 カスケードと同一の経路上で機能しているのかについて遺伝学的に検証した。さらに KGB-1 のキナーゼ活性を測定するなどの生化学的手法も用いることにより、KGB-1 カスケードとの関係を明らかにした。

4. 研究成果

vhp-1 遺伝子欠損変異体を用いた網羅的 RNAi によるスクリーニングにより、まず JNK カスケードの構成因子である MLK-1、MEK-1 および KGB-1 を同定できた。これは *vhp-1* 変異体を用いた網羅的 RNAi のスクリーニング系がきちんと機能していることを示唆するものである。今回の網羅的スクリーニングにより同定されたものとして、他に新規一回膜貫通型蛋白質、CDK-8 などの転写メディエーター複合体の構成因子、MAPKKK である DLK-1、p38 MAPK である PMK-3、転写因子および C/EBP の線虫ホモログ CEBP-1 などがあった。それらのうち、まず新規一回膜貫通型蛋白質をコードする遺伝子について、その欠損変異体を単離した後、当該変異体における KGB-1

の活性を生化学的に検討した。その結果、この変異体では、通常の飼育条件における KGB-1 の活性が消失していた。従ってこの新規膜蛋白質は KGB-1 カスケードの上流で機能する因子であり、通常の飼育条件下での KGB-1 カスケードの活性に必要であることが示唆された。面白いことに、この変異体は KGB-1 カスケードの他の因子とは異なり重金属に対する感受性は示さず、それと符合する形で重金属による KGB-1 の活性化は野生型の線虫と同様に起きた。このことから、KGB-1 カスケードの上流には2つの経路があり、ひとつは新規膜蛋白質が通常の飼育条件での KGB-1 の活性を制御しているが、重金属による KGB-1 の活性化は別の因子により行われていると考えられる。

次に転写メディエーター複合体について、KGB-1 カスケードの周辺で機能するかどうか解析を行った。KGB-1 カスケードの因子の変異体は、重金属に対して感受性を示すことが分かっている。そこで、転写メディエーター複合体の変異体についても重金属感受性を調べたところ、それらの変異体も重金属に対して部分的な感受性を示した。しかし、*kbg-1* 変異とメディエーター複合体の構成因子の変異との二重変異体を用いた遺伝学的解析から、転写メディエーター複合体は線虫 KGB-1 カスケードとは別に重金属耐性を制御していることが判明した。このことから、転写メディエーターは KGB-1 カスケードとは平行に機能することにより、*vhp-1* 変異の抑圧あるいは重金属耐性に関与すると考えられる。

なお、DLK-1 と PMK-3 および CEBP-1 は KGB-1 カスケードとは別の MAPK カスケードの構成因子であることが既に報告されており、KGB-1 カスケードとは別の MAP キナーゼカスケードのノックダウンによっても *vhp-1* 変異体を抑圧できることが新たに示唆される結果となった。実際、生化学的解析では VHP-1 は KGB-1 だけでなく PMK-3 と結合したことから、VHP-1 は KGB-1 と PMK-3 の両方に作用することにより、幼虫での生育を制御するのではないかと考えられる

一方、KGB-1 カスケードの周辺で機能する因子を探索する目的で、酵母ツーハイブリッド法により、MAPKK である MEK-1 と結合する因子を探索したとこ

ろ、アダプター蛋白質 SHC の線虫ホモログ SHC-1 を同定した。*shc-1* 変異体を同定して調べたところ、*shc-1* 変異が *vhp-1* 変異による致死性を抑圧できること、さらに *shc-1* 変異体では KGB-1 活性がほとんど消失していることが判明した。SHC-1 は PTB ドメインと SH2 ドメインをもつが、その両方が協調して重金属耐性に関わることも見いだした。さらに、SHC-1 は MLK-1 の 940 番目のチロシンがリン酸化されるとその領域に結合することを、合成ペプチドを用いた実験で明らかにした。以上の結果から、SHC-1 はスカフォールド蛋白質として機能することにより、KGB-1 カスケードにおけるシグナル伝達に必須であることを見出し、これを論文として報告した。

さらにこの研究とは別に、KGB-1 MAP キナーゼカスケードの上流で機能する因子として MAX-2 を同定し、この変異体では KGB-1 活性が減少していること、さらに MAX-2 が MLK-1 の 355 番目のセリンをリン酸化することにより MLK-1 を活性化していることを見いだした。それに加えて、MAX-2 が低分子量 G 蛋白質である MIG-2 に結合すること、*mig-2* 変異体では KGB-1 の活性低下が起きていること、さらに *mig-2* 変異体は重金属感受性も示すが、その感受性は MAX-2 の多量発現により抑圧されることなどを見いだした。これらの成果についても論文として報告した。

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. Arimoto M, Koushika SP, Choudhary B, Li C, Matsumoto K, Hisamoto N (2011) The *C. elegans* JIP3 protein UNC-16 functions as an adaptor to link kinesin-1 with cytoplasmic dynein. **J. Neurosci.** **31**, 2216-24.
2. Hayakawa T, Kato K, Hayakawa R, Hisamoto N, Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H. (2011) Regulation of Anoxic Death in *Caenorhabditis elegans* by Mammalian Apoptosis Signal-Regulating Kinase (ASK) Family Proteins. **Genetics.** **187**, 785-92.
3. Okuyama T, Inoue H, Ookuma S, Satoh T, Kano K, Honjoh S, Hisamoto N, Matsumoto K, Nishida E. (2010) The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and

insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. **J. Biol. Chem.** **285**, 30274-81.

4. Shivers RP, Pagano DJ, Kooistra T, Richardson CE, Reddy KC, Whitney JK, Kamanzi O, Matsumoto K, Hisamoto N, Kim DH. (2010) Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genet.** **6**, e1000892.

5. Fujiki K, Mizuno T, Hisamoto N, Matsumoto K. (2010) The *Caenorhabditis elegans* Ste20-related kinase and Rac-type small GTPase regulate the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway mediating the stress response. **Mol. Cell. Biol.** **30**, 995-1003.

6. Schouest KR, Kurasawa Y, Furuta T, Hisamoto N, Matsumoto K, Schumacher JM. (2009) The germinal center kinase GCK-1 is a negative regulator of MAP kinase activation and apoptosis in the *C. elegans* germline. **PLoS One** **4**, e7450.

7. Saha S, Guillily MD, Ferree A, Lanceta J, Chan D, Ghosh J, Hsu CH, Segal L, Raghavan K, Matsumoto K, Hisamoto N, Kuwahara T, Iwatsubo T, Moore L, Goldstein L, Cookson M, Wolozin B. (2009) LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. **J. Neurosci.** **29**, 9210-9218.

8. Hiatt SM, Duren HM, Shyu YJ, Ellis RE, Hisamoto N, Matsumoto K, Kariya K, Kerppola TK, Hu CD. (2009) *Caenorhabditis elegans* FOS-1 and JUN-1 regulate plc-1 expression in the spermatheca to control

ovulation. **Mol. Biol. Cell.** **20**, 3888-3895.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 久本直毅
(名古屋大学大学院理学研究科)

研究者番号 : 51583915

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号 :