

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21227004

研究課題名(和文) 寿命と発生を制御するシグナル伝達ネットワーク

研究課題名(英文) Signal transduction networks regulating life span and development

研究代表者

西田 栄介(Nishida, Eisuke)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60143369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 168,000,000円、(間接経費) 50,400,000円

研究成果の概要(和文)：線虫において飢餓による寿命延長を制御するシグナル伝達経路として、ストレス応答性MAPキナーゼJNK/転写因子AP-1経路を同定した。アフリカツメガエル初期胚発生において、プロテインキナーゼSGK1が細胞非自律的なシグナル伝達経路を介して外胚葉細胞の生存を促進することを見出した。哺乳類筋分化において筋細胞の融合を制御するシグナル伝達経路を見出した。哺乳類筋細胞と脂肪細胞の分化が排他的に起こることを見出し、その分子機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：We found that a signaling pathway consisting of the stress-responsive MAP kinase JNK and the transcription factor AP-1 is essential for fasting-induced extension of life span in *C. elegans*. We also found that the kinase SGK1 promotes ectodermal cell survival during early *Xenopus* embryonic development through a non-cell-autonomous signaling pathway. Furthermore, we identified a signaling pathway regulating cell fusion during mammalian skeletal muscle differentiation. Also, we identified an antagonistic interaction between skeletal muscle and adipose differentiation programs.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：寿命 発生 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達ネットワークは、様々な生命現象を制御する重要な役割を担っている。ヒトやモデル生物のゲノムプロジェクトが完了した現在、個々の遺伝子の機能や遺伝子間の機能的な関連を解析することが重要な課題となっている。近年盛んに行われている大規模解析により遺伝子に関する膨大なデータが蓄積されてきてはいるが、シグナル伝達という観点から見ると、その全貌解明にはまだまだ至っていないのが現状である。したがって、これら膨大なゲノムデータを有効に活用しつつ、個々のシグナル伝達経路がどのように関連しあるいは協調しながら高次生命現象を制御しているかを明らかにすることは、生命現象の根本原理に迫るうえで極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、寿命や発生といった多細胞生物の時間軸に沿った生命現象に注目し、モデル生物を用いた多方面からのアプローチにより、新たな細胞内シグナル伝達分子や経路の同定、および種々のシグナル伝達経路間におけるネットワークを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

線虫 (*C. elegans*) は、分子遺伝学的アプローチが容易に使い、哺乳類に比べてライフサイクルも極端に短いため、寿命研究において非常に優れたモデル生物である。本研究では、遺伝学的アプローチおよびマイクロアレイ等を用いたスクリーニングによって、寿命に関与する新たなシグナル伝達分子を同定し、その下流や上流を詳細に解析することによって新たなシグナル伝達経路を明らかにする。さらに、新たに同定したシグナル伝達経路が、既知のシグナル伝達経路を含む種々の経路と、どのように関連し協調しながら、寿命を制御するのかを明らかにする。

さらにアフリカツメガエル初期胚をモデルとして利用し、発生過程を制御するシグナル伝達ネットワークを解明する。データベースの探索やマイクロアレイによるスクリーニングにより独自に着目した種々の機能未知シグナル分子について、その発生過程における機能解析を最初の足掛かりとして、新規のシグナル伝達経路を同定する。同定した新規のシグナル伝達経路と既知のシグナル伝達経路 (ERK 経路、BMP 経路、Hippo 経路など) の協調に着目し、その分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

線虫を用いて寿命制御の分子機構の解析を行なった。最初に、寿命を正に制御すると考えられている生命現象の一つであるオートファジーに着目した。今までの研究では、数多くのオートファジー関連遺伝子群のう

ち寿命研究の対象とされたのは一部の遺伝子だけだった。そこで我々は、関連する全遺伝子を網羅的にノックダウンして寿命への影響を調べた。発生時期からのノックダウン実験では多くの場合寿命が短縮したが、発生完了後にノックダウンした場合には、寿命の延長が観察される遺伝子が多かった。以上の結果は、オートファジーは単純に寿命を正に制御しているのではなく、組織や発生過程などによって寿命に与える影響が変わってくることを示唆しており、これまでの定説に強く再考を促すものである (Hashimoto et al., *Genes Cells* 14, 717-726 (2009))。また、古典的 MAP キナーゼ ERK は様々な細胞機能に重要であることが知られているが、これまでに個体の寿命への影響は報告されていなかった。我々は、ERK MAP キナーゼ経路関連分子群の体系的な RNAi によって、ERK シグナルカスケードが寿命を正に制御していることを見出した。さらに既知の寿命制御因子とのクロストークについて検討を行い、SKN-1 (ストレス存在下で活性化される転写因子 Nrf2 の線虫ホモログ) の上流で、ERK シグナルカスケードが働くことが分かった。さらに、SKN-1 がインスリン様受容体の上流で働いていること、ERK が SKN-1 のセリン残基をリン酸化すること、SKN-1 が一部のインスリン様ペプチドの転写を制御することを見出し、ERK が寿命を制御する一連の分子機構を明らかにすることに成功した (Okuyama et al., *J. Biol. Chem.* 285, 30274-30281 (2010))。

以上のような通常の摂食状態における寿命を制御するシグナル伝達経路を明らかにしていくのと同時に、食餌制限による寿命延長のメカニズムについても研究を行った。我々は以前の研究において、常に食餌を行うがその量を調節する食餌制限法「カロリー制限 (Calorie Restriction (CR))」よりも、食餌を十分に与える状態と全く与えない状態とを繰り返す食餌制限法「断続的飢餓 (Intermittent Fasting (IF))」の方が、線虫の寿命延長に対して効果的であることを見出している。そこで、CR より寿命延長効果の大きい IF に焦点を絞り、その分子機構を明らかにすることを目指した。以前の研究より我々は IF による寿命延長に Rheb/TOR シグナル伝達経路が必要であることを発見している。Rheb/TOR シグナル伝達経路の阻害は飢餓に応答する遺伝子発現の変化を抑制したことから、IF による寿命延長にとって、飢餓により引き起こされる遺伝子発現の変化が重要な役割を果たしていることが考えられた。そこで我々はマイクロアレイを用い、時系列に沿った飢餓による遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。その結果、老化やストレス応答関連遺伝子の多くは、線虫を飢餓にさらしてから 12 時間以内で発現上昇を示すことが明らかになった。そして、12 時間以内で発現上昇する遺伝子群のプロモータ

一領域について *in silico* で解析した結果、既に寿命への関与が明らかになっている転写因子 DAF-16 の結合配列と共に、AP-1 転写因子の結合配列も優位に濃縮していた。そこで AP-1 転写因子の関与について検討を行い、IF による寿命延長に必要であることを示した。さらに、飢餓によりストレス応答性 MAP キナーゼである JNK が活性化されて AP-1 をリン酸化すること、また、JNK シグナル伝達経路の上流の因子も IF による寿命延長に必要であることが分かった。そしてこの JNK/AP-1 シグナル伝達経路は、飢餓時にインスリン様シグナル伝達経路と協調的に働くことによって、老化やストレス応答関連の遺伝子群の転写を制御することが分かった。さらに、飢餓時にインスリン様シグナル伝達経路と JNK/AP-1 シグナル伝達経路の両方により制御される遺伝子群を解析した結果、ユビキチン・プロテアソーム系の因子が IF による寿命延長において重要な役割を果たすことが示唆された。以上の成果は、IF による寿命延長の分子機構の理解を格段に進展させるものである (Uno et al., *Cell Rep.* 3, 79-91 (2013))。

発生過程におけるシグナル伝達経路についてもインパクトの高い成果を得ることができた。アフリカツメガエル初期胚発生において、内胚葉特異的に発現するプロテインキナーゼ SGK1 が、多段階から成る細胞間シグナル伝達経路を経て外胚葉細胞の生存を促進することを見出した (Endo et al., *Sci. Signal.* 4, ra2 (2011))。我々は 10 年前に、ERK シグナル伝達経路の持続的活性化によって強く発現誘導されるが一時的活性化では誘導されない遺伝子として SGK1 を同定している。従って ERK シグナル伝達経路の活性化時間の程度により、離れた組織の細胞死を防止する細胞間シグナル伝達モジュールの ON/OFF が切り替わることが示唆され、シグナル伝達経路の時空間制御の観点からも興味深い発見である。

アフリカツメガエル初期胚外胚葉において ERK シグナル伝達経路により転写抑制を受ける遺伝子をマイクロアレイにより多数同定した。そのうち新規の 1 回膜貫通型タンパク質をコードする EIG121L が、腹側外胚葉に特異的に発現し外胚葉の表皮への分化を促進することを見出した。そして EIG121L が BMP 受容体と結合することにより BMP シグナル伝達経路を正に制御することを示した (Araki et al., *J. Biol. Chem.* 286, 6760-6768 (2011))。

さらに軟骨形成を制御する新規分子として MAPKKK ファミリー分子 MLTK を同定した。MLTK のノックダウンは神経堤細胞のマーカー遺伝子 Snail の発現を変化させなかったが、神経堤由来である軟骨細胞のマーカー遺伝子 Col2a1, Aggrecan, Matrilin-1 の発現を減少させ、軟骨組織の縮小を引き起こした。そして軟骨細胞の分化のマスター制御因

子 Sox9, Sox5, Sox6 のうち、MLTK のノックダウンは Sox6 の発現のみを減少させた。また、Sox9 を共発現させた条件下において MLTK の過剰発現は容量依存的に Sox6 の発現を上昇させた。以上の結果は、重要なマスター因子である Sox6 が MLTK によって制御されることを示唆しており、軟骨細胞分化の分子機構のさらなる理解に繋がった (Suzuki et al., *Development* 139, 2988-2998 (2012))。

我々は哺乳類の筋肉形成のメカニズムについてもインパクトの大きい成果を挙げた (Sunadome et al., *Dev. Cell* 20, 192-205 (2011))。筋肉は収縮能をもつ繊維状の多核細胞から構成される。このような多核細胞は、筋芽細胞と呼ばれる単核の前駆細胞が互いに融合する (筋融合) ことによって形成される。筋分化のマスター転写因子としては MyoD ファミリーが同定されているが、筋融合がどのように制御されているかについては不明な点が多かった。我々は分化の中でも筋融合に特異的に関係する細胞内シグナル伝達経路 (MAP キナーゼ ERK5/転写因子 Sp1/転写因子 Klf/接着分子 Npnt 経路) を同定した。筋分化はマスター転写因子 MyoD の下流で、分化の全てのプロセスが不可分に進行すると従来考えられていたため、融合のみを特異的に制御するシグナル伝達経路の発見は、その定説を覆すものである。

筋肉細胞と脂肪細胞は、同じ間葉系の細胞から発生するが、全く異なる性質を持つ。我々は、筋肉細胞分化のマスター制御因子である MyoD と脂肪細胞分化のマスター制御因子である PPAR γ が拮抗的に作用することにより、筋肉細胞分化と脂肪細胞分化が互いに排他的に起こることを見出した。そしてこの排他性を保証する分子機構として、筋肉細胞ではエピジェネティックな制御を介した PPAR γ 標的遺伝子の転写抑制がおり、脂肪細胞ではユビキチンプロテアソーム系を介して MyoD が分解されることを明らかにした (Sunadome et al., *Mol. Cell* 54, 526-535 (2014))。

Hippo シグナル伝達経路は、器官サイズを制御することが知られており近年注目を集めているが、他のシグナル伝達経路とのクロストークについてはほとんど解明されていない。我々は哺乳類小腸上皮細胞分化の系において、Hippo シグナル伝達経路の下流で機能する転写制御因子 YAP/TAZ が Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路によって駆動される転写を制御する分子機構を解明した (Imajo et al., *EMBO J.* 31, 1109-1122 (2012))。

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 31 件、全て査読あり)

- 1) Sunadome, K., Suzuki, T., Usui, M., Ashida, Y. and Nishida, E. Antagonism between the master regulators of differentiation ensures the discreteness and robustness of cell fates. *Mol. Cell* 54, 526-535 (2014). doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.005.
- 2) Koga, M., Matsuda, M., Kawamura, T., Sogo, T., Shigeno, A., Nishida, E. and Ebisuya M. Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. *Nature Commun.* 5, 3197 (2014). doi: 10.1038/ncomms4197.
- 3) Uno, M., Honjoh, S., Matsuda, M., Hoshikawa, H., Kishimoto, S., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Yamamoto, T., Matsumoto, K. and Nishida, E. A fasting-responsive signaling pathway that extends life span in *C. elegans*. *Cell Rep.* 3, 79-91 (2013). doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.018.
- 4) Suzuki, T., Kusakabe, M., Nakayama, K. and Nishida, E. The protein kinase MLTK regulates chondrogenesis by inducing the transcription factor Sox6. *Development* 139, 2988-2998 (2012). doi: 10.1242/dev.078675.
- 5) Imajo, M., Miyatake, K., Iimura, A., Miyamoto, A. and Nishida, E. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling. *EMBO J.* 31, 1109-1122 (2012). doi: 10.1038/emboj.2011.487.
- 6) Honjoh, S. and Nishida, E. Two sides of lifespan regulating genes: pro-longevity or anti-longevity? *J. Biochem.* 149, 381-388 (2011). doi: 10.1093/jb/mvr026.
- 7) Sunadome, K., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Kondoh, K., Sehara-Fujisawa, A. and Nishida, E. ERK5 regulates muscle cell fusion through Klf transcription factors. *Dev. Cell* 20, 192-205 (2011). doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.005.
- 8) Endo, T., Kusakabe, M., Sunadome, K., Yamamoto, T. and Nishida, E. The kinase SGK1 in the endoderm and mesoderm promotes ectodermal survival by down-regulating components of the death-inducing signaling complex. *Sci. Signal.* 4, ra2. (2011). doi: 10.1126/scisignal.2001211.
- 9) Araki, T., Kusakabe, M. and Nishida, E. A transmembrane protein EIG121L is required for epidermal differentiation during early embryonic development. *J. Biol. Chem.* 286, 6760-6768 (2011). doi: 10.1074/jbc.M110.177907.

10) Imajo, M. and Nishida, E. Human Tribbles homolog 1 functions as a negative regulator of retinoic acid receptor. *Genes Cells* 15, 1089-1097 (2010). doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01445.x.

11) Mitsushima, M., Aoki, K., Ebisuya, M., Matsumura, S., Yamamoto, T., Matsuda, M., Toyoshima, F. and Nishida, E. Revolving movement of a dynamic cluster of actin filaments during mitosis. *J. Cell Biol.* 191, 453-462 (2010). doi: 10.1083/jcb.201007136.

12) Okuyama, T., Inoue, H., Ookuma, S., Satoh, T., Kano, K., Honjoh, S., Hisamoto, N., Matsumoto, K. and Nishida, E. The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 285, 30274-30281 (2010). doi: 10.1074/jbc.M110.146274.

13) Inoue, H. and Nishida, E. The DM domain transcription factor MAB-3 regulates male hypersensitivity to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell Biol.* 14, 3453-3459 (2010). doi: 10.1128/MCB.01459-09.

14) Satoh, T., Torii, S., Nakayama, K. and Nishida, E. CrkL is a novel target of Sprouty2 in fibroblast growth factor signaling. *Genes Cells* 15, 161-168 (2010). doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01373.x.

15) Tsuchiya, Y., Akashi, M., Matsuda, M., Goto, K., Miyata, Y., Node, K. and Nishida, E. Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Sci. Signal.* 2, ra26 (2009). doi: 10.1126/scisignal.2000305.

16) Hashimoto, Y., Ookuma, S. and Nishida, E. Lifespan extension by suppression of autophagy genes in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* 14, 717-726 (2009). doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01306.x.

他 15 件

〔学会発表〕(計 117 件)

1) 西田栄介 “MAP2 から MAP キナーゼ、そしてシグナル伝達ネットワーク研究へ” 第 36 回日本分子生物学会年会シンポジウム「シグナル伝達温故知新ー発見者に聴くー」、神戸ポートアイランド、神戸市、日本、2013 年 12 月 3-6 日

2) 西田栄介 “細胞内シグナル伝達：寿命制御と組織ホメオスタシス維持機構” 第 86 回日本生化学会大会特別講演、パシフィコ横

浜、横浜市、日本、2013年9月11-13日

3) Kishimoto, S., Uno, M., Kaneko, Y., Nishioka, S. and Nishida, E. “Molecular mechanisms underlying fasting-induced longevity in *C. elegans*.” The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Coex, Seoul, Korea, June 23-27, 2013.

4) Takayama, M., Hiramatsu, T. and Nishida, E. “Identification of signaling molecules that regulate renal branching morphogenesis.” Joint meeting of the BSDB/BSCB/JSDB, University of Warwick, Coventry, UK, April 15-18, 2012.

5) Takahashi, C., Suzuki, T., Nishida, E. and Kusakabe, M. “Identification and characterization of *Xenopus* *kctd15*, an FGF-repressed ectodermal gene.” Joint meeting of the BSDB/BSCB/JSDB, The University of Warwick, Coventry, UK, April 15-18, 2012.

6) Uno, M., Honjoh, S. and Nishida, E. “A conserved JNK/AP-1 module is a key mediator of intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*.” 18th international *C. elegans* meeting, University of California, Los Angeles, California, USA, June 22-26, 2011.

7) Suzuki, T., Kusakabe, M. and Nishida, E. “Role of *Sox5* and *Sox6* in *Xenopus* development” 13th International *Xenopus* Conference, Fairmont Chateau Lake Louise, Lake Louise, Alberta, Canada, September 12-16, 2010.

8) Araki, T., Kusakabe, M. and Nishida, E. “A novel Regulator of the BMP Pathway required for epidermal differentiation during early embryonic development.” 13th International *Xenopus* Conference, Fairmont Chateau Lake Louise, Lake Louise, Alberta, Canada, September 12-16, 2010.

9) Honjoh, S., Yamamoto, T. and Nishida, E. “The age-dependent changes in the gene expression profile in *C. elegans*.” EMBO Conference Series, *C. elegans* Development and Gene Expression, EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany, June 17-20, 2010.

10) Uno, M., Honjoh, S. and Nishida, E. “Requirement for the stress-responsive MAP kinase KGB-1 signalling pathway in intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*.” 17th International *C. elegans* Meeting, UCLA, Los Angeles, California, USA, June 24-28, 2009.

他 107 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/signal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 栄介 (Nishida Eisuke)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：60143369