

学位論文

BIP (BRAM interacting protein) のクローニングと
線虫 *C. elegans* における機能解析

総合研究大学院大学

生命科学科分子生物機構論専攻

菅原 桂

平成 12 年度
(2000 年度)

【目次】

略語表

序章	4
----	---

第1章 BRAM interacting protein のクローニングと構造決定

1-1 序論	13
1-2 実験方法と結果	13
1-3 考察	25

第2章 BRAM interacting protein の *C. elegans* における役割

2-1 序論	33
2-2 実験方法と結果	36
2-3 考察	48

結語	52
----	----

参考文献	53
------	----

謝辞	57
----	----

【略語表】

3-AT: 3-amino-1,2,4-triazole

BMP: bone morphogenetic protein

BRAM: BMP receptor associated molecule

BIP: BRAM interacting protein

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

dCTP: deoxycytidine 5'-triphosphate

DIG: digoxigenin

dsRNAi: double-stranded RNA-mediated interference

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EST: expression sequence tag

FBS: fetal bovine serum

GFP: green fluorescence protein

MAPKKK: MAP (mitogen activated protein) kinase kinase kinase

ORF: open reading frame

OSBP: oxysterol binding protein

PCR: polymerase chain reaction

RNA: ribonucleic acid

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SL sequence: spliced leader sequence

TAB1: TAK1 binding protein 1

TAK1: TGF- β activated kinase

TGF- β : transforming growth factor- β

序章

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) は線形動物に属する体長約 1.2mm の生物で、比較的単純な体制ではあるが神経系、消化器系、筋肉系、上皮、生殖器官などの基本的な構造が存在することや、体が透明で観察が容易であること、卵から成虫に至る発生過程において全細胞の lineage (細胞系譜) が明らかになっていること (Sulston et al., 1983)、世代時間が短いことなどモデル動物としての利点が多い (Brenner, 1974)。また種々の変異体 (mutant) が知られており遺伝学的手法による解析が広く行われていることや、多細胞生物としては初めてゲノム配列が解明されたこと (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) など遺伝学的解析にも有利である。また従来行われてきたトランスポゾンや変異原による欠失変異体の作製に加えて、最近 double stranded RNA interference (dsRNAi) という手法により目的遺伝子の機能欠失 (loss of function) を比較的簡便に観察できること (Fire et al., 1998)、またコスミドや cDNA を用いて過剰発現 (gain of function) も可能なことから、目的遺伝子の機能解析という面でも優れたモデル動物であると考えられる。

近年、生物の形づくりに関して多種多様な成長因子やそのシグナル伝達分子が重要な役割を果たすことが明らかとなっている。なかでも TGF- β スーパーファミリーは種を越えて様々な生命現象に関与することが知られている (Heldin et al, 1997; Attisano and Wrana, 1998; Derynck et al., 1998; Padgett et al., 1998; Whitman 1998, Massagué, 2000)。TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達経路は種間で非常に良く保存されており、図 1 に示すようにリガンド、二種類の受容体および細胞内シグナル伝達分子から構成されている。リガンドが type II 受容体に結合するとリガンド-type II 受容体が type I 受容体と会合して複合体を形成し、リガンドにより活性化された type II 受容体のセリン/スレオニンキナーゼによって type I 受容体の細胞膜直下に存在する GS ドメインがリン酸化される。このようにして活性化

された type I 受容体は次に細胞内シグナル伝達因子である Smad をリン酸化する。Smad はリガンド特異的に活性化される receptor-regulated Smad (R-Smad), および活性化された R-Smad と結合して核内へ移行する common Smad (Co-Smad), さらにリガンド刺激に対してネガティブフィードバック機構として働く antagonistic Smad に分類される (Massagué, 1998; 表 1)。type I 受容体によりリン酸化された R-Smad は Co-Smad である Smad4 と会合して核内へと移行し, そこで FAST-1 などの co-activator と複合体を形成して (Chen et al., 1996) 標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている。このメカニズムは線虫, ショウジョウバエ, アフリカツメガエル, マウス, ヒト等の分子について詳細に解析されており, これらの生物で共通な基本的メカニズムであることが明らかとなっている。

さらに最近, これらの基本的な伝達経路が確立されるとともに, シグナル伝達分子に結合する新規分子がクローニングされるにつれて, シグナルを修飾するメカニズムも次第に明らかとなってきた。Smad anchor for receptor activation (SARA) は Smad2 の MH2 ドメイン (Smad の C 末端側ドメインで, 各 Smad 間で相同性の高い部分) に結合する因子として, まずアフリカツメガエル原口背唇部 cDNA ライブラリから単離され, そのホモログがヒト cDNA ライブラリから単離・同定された (Tsukazaki et al., 1998)。SARA は FYVE ドメインを有しており, phosphatidylinositol-3-phosphate への結合を介して細胞膜にアンカーしていると考えられている。SARA はリン酸化されていない Smad2 と結合してこれを細胞膜に存在する Type I 受容体へと提示し, そこでリン酸化された Smad2 は SARA と解離したのち Smad4 と複合体を形成して核内へと移行すると考えられている。また, Smad1 に結合する分子として yeast two-hybrid スクリーニングにより単離された Smurf1 は ubiquitin ligase であり, Smad1 を特異的にユビキチン化してタンパク分解へと導くことが報告されている (Zhu et al., 1999)。このように, 生物間で共通なシグナル伝達機構以外に種特異的, 組織特異的, あるいはシグナル特異的な修飾分子をクローニングし役割を解明することは, シグナル伝達経路の全貌を明

らかにするとともに、シグナル伝達の特異性を明らかにするうえで重要であると考えられる。

線虫における TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達経路には *daf* 経路と *sma* 経路が存在することが明らかとなっており（図 2），その基本的なシグナル伝達機構も他の種と共通している（表 1）。*daf* 経路は線虫が栄養飢餓状態や温度変化などの劣悪な生育環境に置かれた場合に dauer larva と呼ばれる耐性幼虫に移行する際のシグナル伝達経路である (Albert et al., 1981; Golden and Riddle, 1984)。リガンドである DAF-7 が TypeII 受容体である DAF-4 (Estevez et al., 1993) に結合すると Type II 受容体のキナーゼ活性によって TypeI 受容体である DAF-1 (Georgi et al., 1990) がリン酸化されて活性化し，そのシグナルが DAF-3, DAF-8, DAF-14 を介して核内へと伝達される。同様に *sma* 経路ではリガンドである DBL-1 が DAF-4 に結合すると，DAF-4 が *sma* 経路の TypeI 受容体である SMA-6 をリン酸化して活性化し，そのシグナルが細胞内シグナル伝達分子である SMA-2, SMA-3, SMA-4 を介して核内へと伝達される。SMA-2, SMA-3, SMA-4 は DBL-1 のシグナルを受けると MAB-21 を抑制することにより，オスの特徴的な構造である尾部の sensory ray のパターン形成を制御することも知られている (Savage et al., 1996; Morita et al., 1999)。

sma 経路のシグナル伝達分子である SMA-2, SMA-3, SMA-4, SMA-6 は体長の短い変異体 *Sma* (small) の原因遺伝子であり，それぞれの機能欠失 (loss of function) では体長が短くなる (Savage et al. 1996)。また *sma* 経路のリガンドである DBL-1 の欠失変異体は *Sma* の表現型を示し，過剰発現では体長が長くなる *Lon* (long) の表現型を示すことも明らかとなっている (Suzuki et al., 1999; Morita et al., 1999; 図 3)。

さらに最近，線虫の TGF- β シグナル伝達に関与する分子として BRA-1, BRA-2 がクローニングされた。BRA-1 および BRA-2 は，マウス BMP typeI 受容体の細胞

内ドメインに結合する分子としてクローニングされた BMP receptor associated molecule (BRAM: Kurozumi et al., 1998) の線虫ホモログであり, BRA-1 は *daf* 経路の Type I 受容体である DAF-1 に結合して DAF-7 シグナル伝達系に対し抑制的に作用することが明らかとなっている (Morita et al., 論文改訂中)。また BRA-2 は *sma* 経路の Type I 受容体である SMA-6 と相互作用して *sma* 経路に対し抑制的に作用すると考えられている (Morita et al., 投稿準備中)。

以上のように, 線虫における TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達系のうち DBL-1 / Sma 経路は体長調節に関与すると考えられているが, そのシグナルを修飾する分子の存在や他のシグナル経路との相互作用, また DBL-1 / Sma シグナルがどのように体長を調節しているかというメカニズムについては不明な点が多く, その解明は生物学的に非常に興味深いテーマと考えられる。

筆者は BRAM に結合し線虫の体長調節に関わる新規分子として BRAM interacting protein (BIP) を同定した。元来 BIP は哺乳類の BRAM に結合する因子としてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の cDNA ライブラリからクローニングしたものであるが, そのホモログが線虫にも存在し BRA-1, BRA-2 と相互作用すると考えられたのでその機能について解析を行った。第 1 章では yeast two-hybrid スクリーニングによる *Xenopus* BIP cDNA の単離および *C. elegans* BIP の同定について述べ, 第 2 章では *C. elegans* BIP の体長調節における役割について述べる。

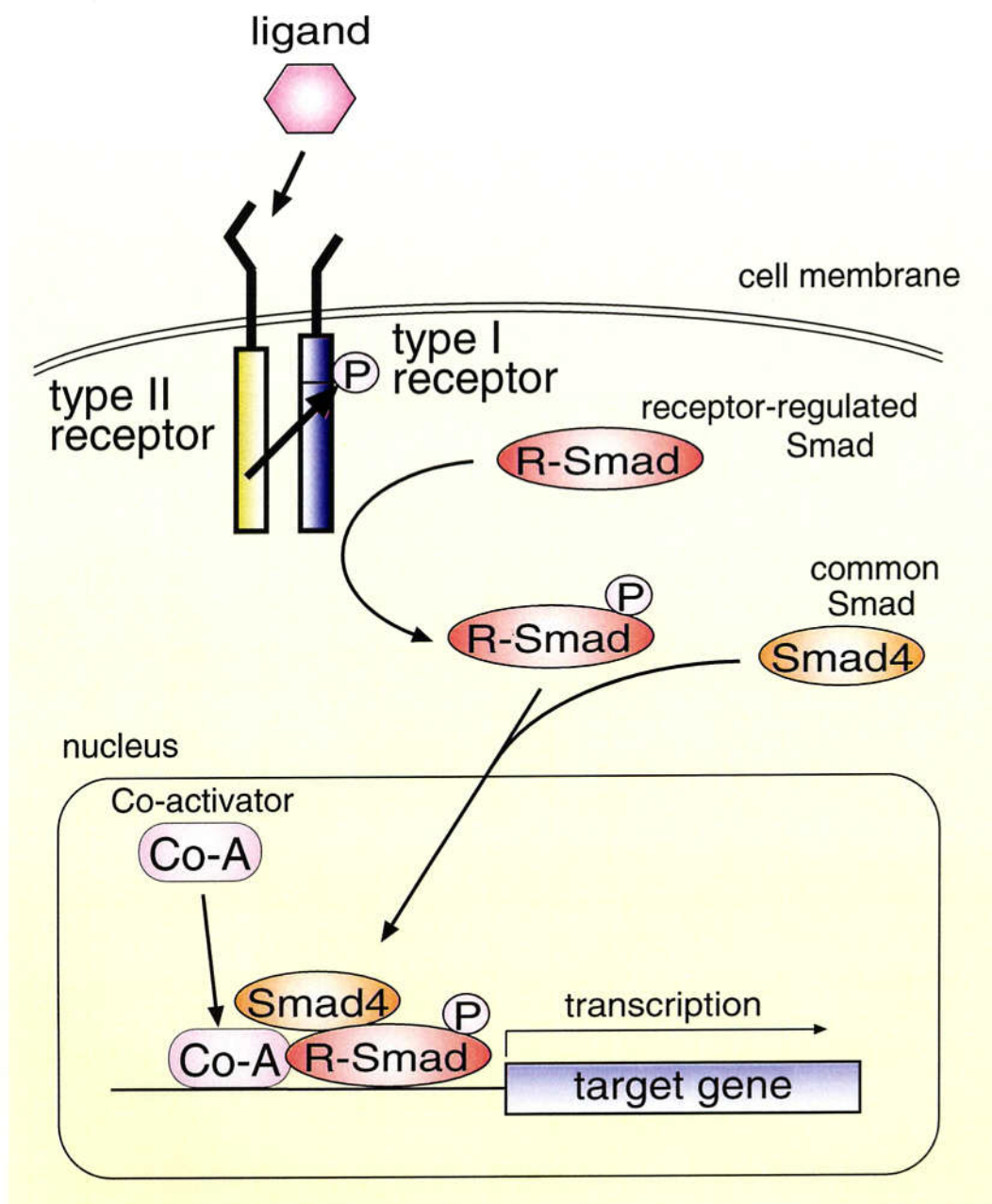


図 1 TGF- β スーパーファミリー情報伝達経路

表 1 TGF- β シグナル伝達分子

Ligand	Type II receptor	Type I receptor	R-Smad	Co-Smad
vertebrate				
TGF β	T β RII	ALK5	Smad2 Smad3	Smad4
Activin	ActRII ActRIIB	ALK4	Smad2 Smad3	Smad4
BMP2/4	BMPRII ActRII	ALK3 ALK6	Smad1 Smad5 Smad8	Smad4
<i>Drosophila</i>				
Dpp	Punt	Thickveins Saxophone	Mad	Medea
dActivin	Punt	Baboon	dSmad2	Medea
<i>C. elegans</i>				
DAF-7	DAF-4	DAF-1	DAF-8 DAF-14	DAF-3
DBL-1	DAF-4	SMA-6	SMA-2 SMA-3	SMA-4

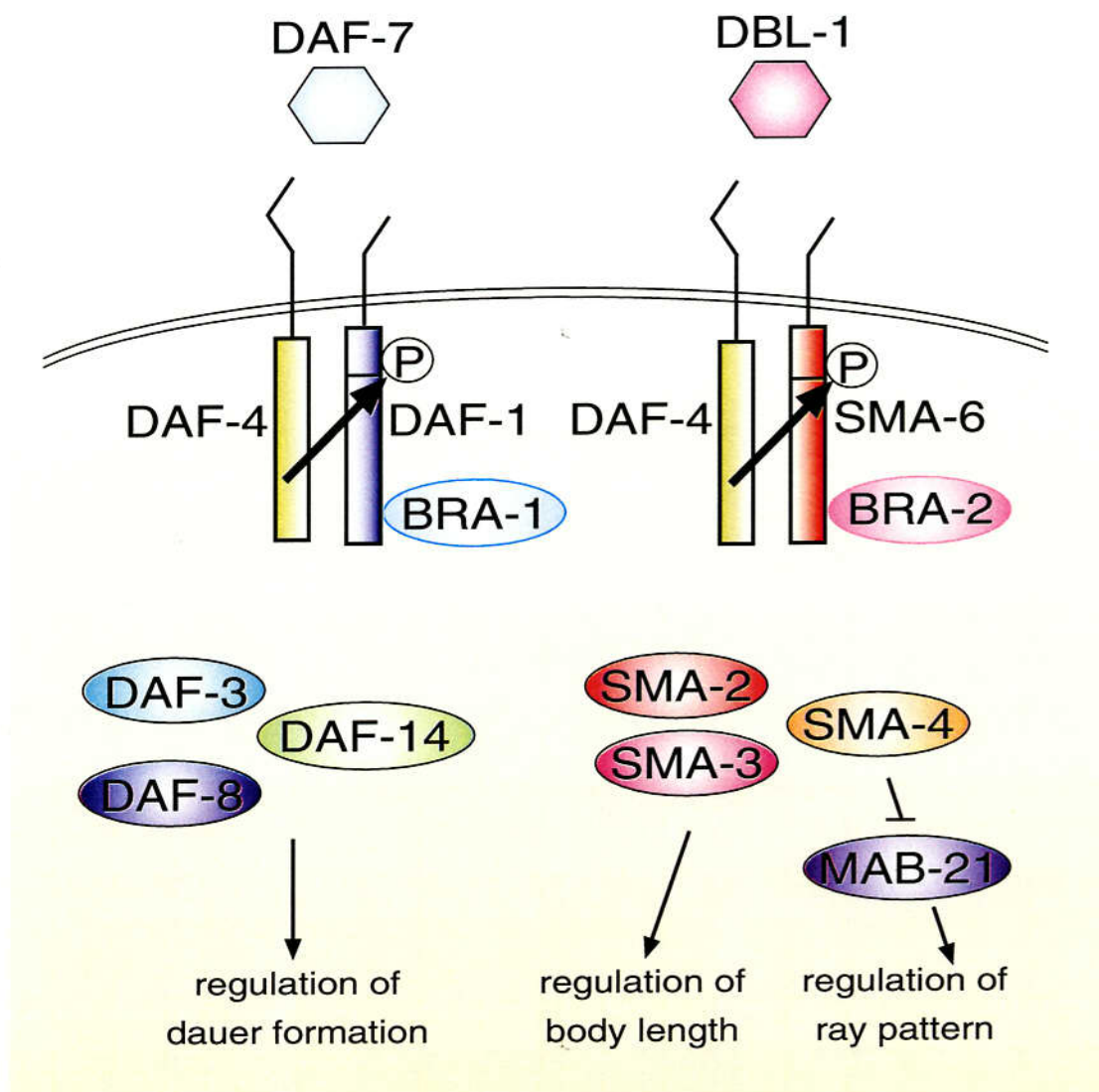


図2 *C. elegans* における TGF-β シグナル伝達系とその機能

線虫 *C. elegans* における主な TGF-β シグナル伝達系には DAF-7/*daf* 経路 (図左) および DBL-1/*sma* 経路 (図右) が存在する。DAF-7/*daf* 経路は線虫が dauer larva と呼ばれる耐性幼虫に移行する際のシグナル経路であり、また DBL-1/*sma* 経路は線虫の体長を調節するシグナル経路である。DBL-1/*sma* 経路は MAB-21 を介してオスの sensory ray パターン形成を制御することも知られている。

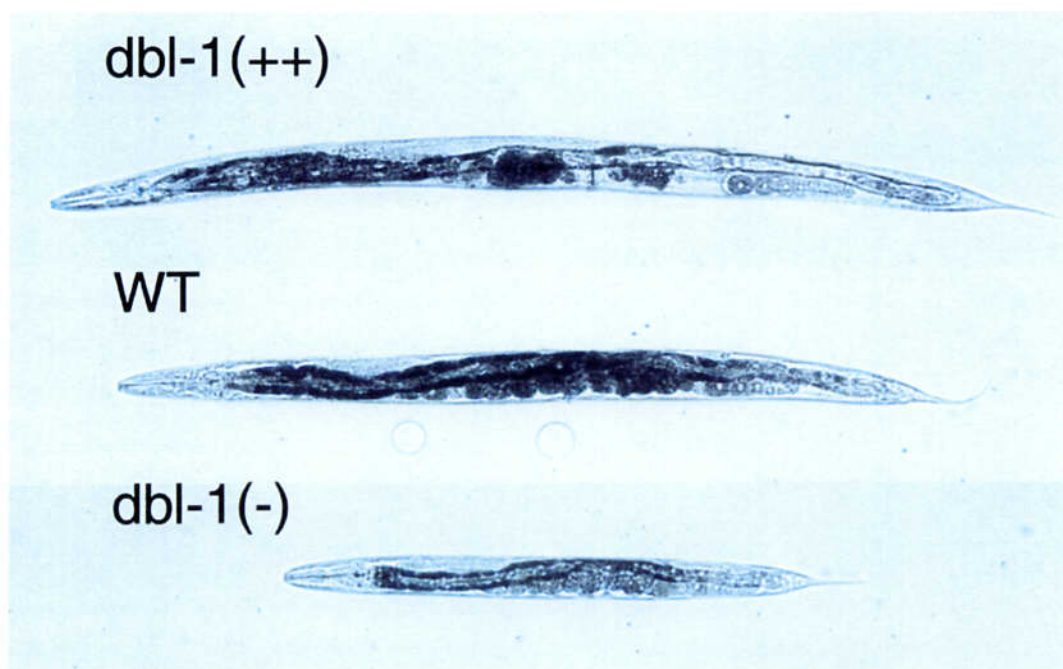


図3 DBL-1/*sma* 経路による *C. elegans* の体長調節

野生型の体長に比べ、DBL-1/*sma* 経路のリガンドである DBL-1 を過剰発現させた *dbl-1(++)* 株では体長が長い Lon (long) の表現系を示す。また DBL-1 の欠失変異体である *dbl-1(-)* は体長が短い Sma (small) の表現型を示す (Morita et al., 1999 より改変)。

第 1 章 BRAM interacting protein (BIP) のクローニングと構造決定

1-1 序論

これまでに新規分子をクローニングすることを目的として多くの方法が開発されてきた。ハイブリダイゼーションや PCR による相同遺伝子のクローニング，細胞や組織によって発現の異なる遺伝子をサブトラクションあるいはディファレンシャルディスプレイでクローニングする方法，あるいは発現ベクターを用いてタンパクの機能をアッセイする発現クローニングなどである。近年，あるタンパク質に結合する分子をクローニングする有効な方法として yeast two-hybrid スクリーニングが広く用いられるようになった（図 1-1）。

これは既知タンパクとそれに結合する分子が酵母内で発現すると，それぞれのタンパク質に融合させた DNA 結合ドメインおよび活性化ドメインがレポーター遺伝子のプロモーター領域に作用し，アミノ酸（図 1-1 ではヒスチジン）合成酵素の転写を活性化する。タンパク質間相互作用の無い場合はヒスチジン合成酵素が誘導されないため，ヒスチジン欠失培地上で酵母は生育できないが，タンパク質間相互作用（結合）が起こるとヒスチジン合成酵素が誘導されてヒスチジンが合成されるため，ヒスチジン欠失培地上で酵母が生育するようになるという原理である。この方法により多くの新規分子，特に細胞内シグナル伝達分子がクローニングされ，新規分子のスクリーニングに有用であることが示されている。そこで本研究では，最初にこの yeast two-hybrid スクリーニングで TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達に関与する新規分子のクローニングを行った。

1-2 実験方法と結果

1-2-1 yeast two-hybrid スクリーニングによる BRAM interacting protein (BIP)

cDNA のクローニング

TGF- β シグナル伝達に関与する新規分子をクローニングすることを目的に，BMP Type IA 受容体の細胞内ドメインに結合する BRAM と結合するタンパクを

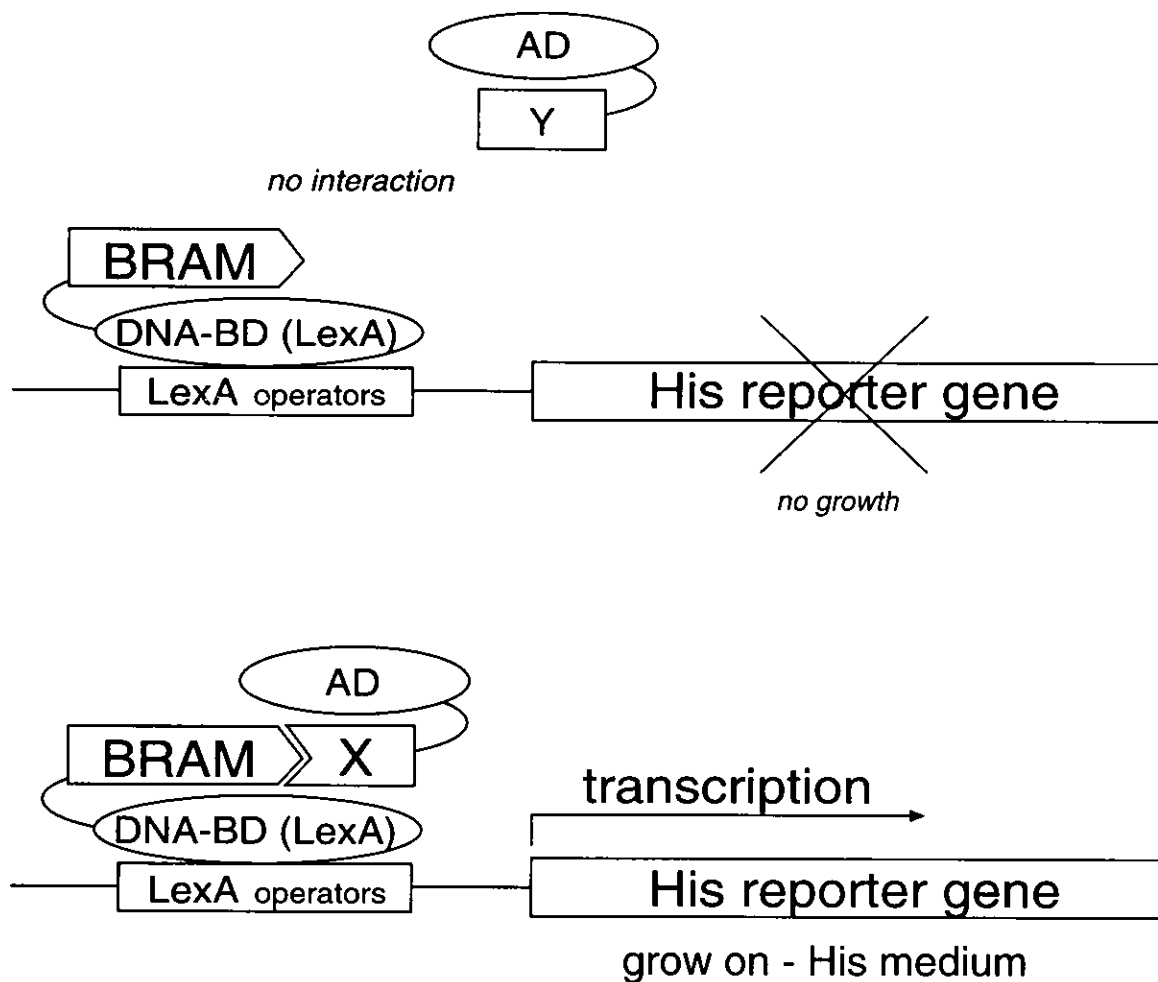


図 1-1 yeast two-hybrid system の概要

DNA-BD (LexA): LexA の DNA 結合ドメイン, AD: 転写活性化ドメイン。ヒスチジン合成酵素の転写が起こるためには DNA-BD と AD が結合して AD がプロモーター領域 (LexA operator) に作用する必要がある。BRAM と相互作用のないタンパク質 (Y) の場合は AD がプロモーター領域に作用しないので転写活性化は起こらないが, BRAM と相互作用のあるタンパク質 (X) の場合, BRAM と X が結合して AD がプロモーター領域に作用することができるためヒスチジン合成酵素の転写が起こり, ヒスチジン選択培地 (-His 培地) 上で酵母が増殖できるようになる。

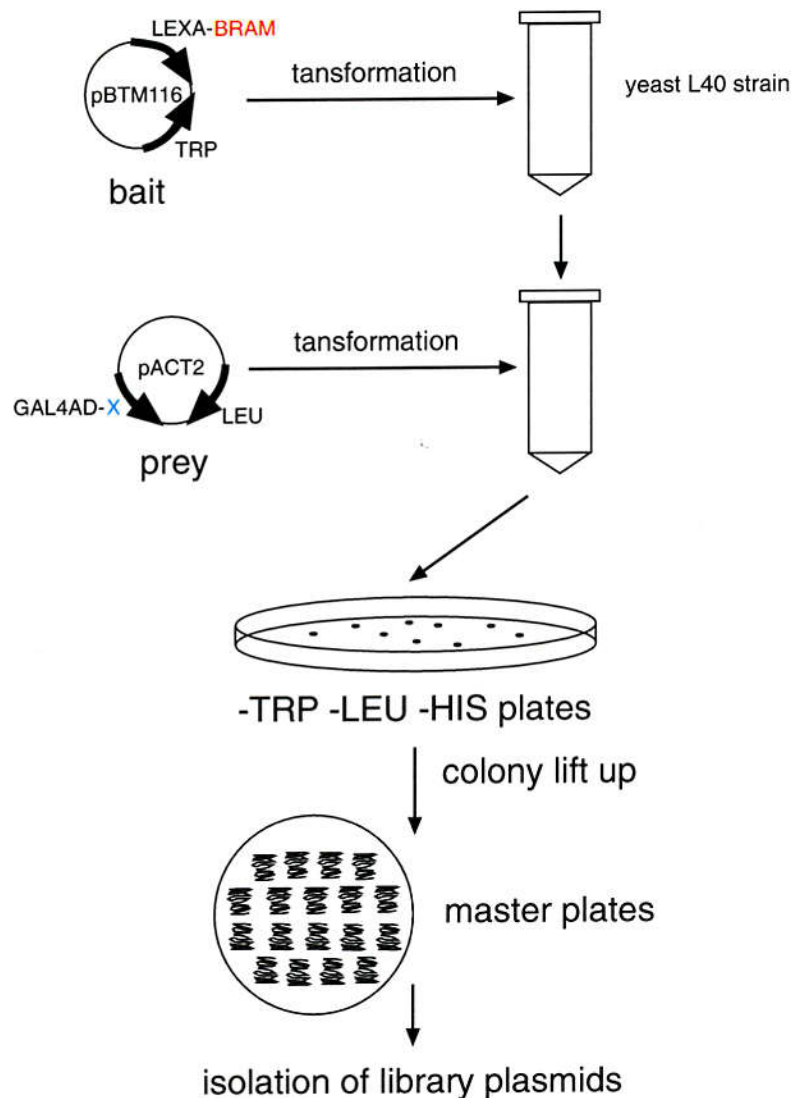


図 1-2 スクリーニング手順

BRAM と LexA の DNA 結合ドメインが融合タンパク質として発現するように bait プラスミドを構築し、これを宿主酵母 L40 株に導入した。次にライブラリのタンパク質と GAL4 の転写活性化ドメインが融合タンパクとして発現するように構築した prey プラスミドを導入した。BRAM タンパク質と結合するタンパク質 (X) をコードするプラスミドが導入された場合には両プラスミドのマーカ (TRP および LEU) 合成酵素とヒスチジン合成酵素 (HIS) が誘導されるため、TRP, LEU, HIS を欠く選択培地上でも酵母が生育できるようになる。この酵母のコロニーから単離されたライブラリプラスミドを候補クローンとした。

yeast two-hybrid スクリーニングで検索した（図 1-1, 図 1-2）。bait として human BRAM を LexA-DNA binding domain vector である pBTM106 のクローニングサイト (EcoRI / PstI) へ挿入し, BRAM と LexA- DNA binding domain が融合タンパクとして発現するよう構築した。この bait プラスミドを酵母への遺伝子導入の常法である酢酸リチウム法によって宿主酵母 L40 株へ導入し樹立したのちに, *Xenopus* oocyte cDNA が挿入された pACT2 ライブラリ (MATCHMAKER ZL4001AH, CLONTECH, CA, USA) を導入し形質転換株を得た。この形質転換株を -Trp, -Leu, -His の選択培地プレート (非特異的な生育を抑制するために 50mM 3-amino-1,2,4-triazole を含む) に播種し, 生育したコロニーを順次拾って - Trp, -Leu プレートに塗布しマスタープレートを作製した。マスタープレート上の酵母からライブラリのプラスミドを回収し, 陽性確認のためこのライブラリプラスミドと bait プラスミドを同時に酵母 L40 株に導入して陽性であるクローンを次の解析へと進めた (ここで陰性となったクローンについては疑陽性と考えられたため以後の解析は行わなかった)。陽性と考えられたクローンについてはシーケンス解析を行い, その塩基配列を BLAST search に供することで既知の遺伝子であるかあるいは新規の遺伝子であるかを判別した。

このスクリーニングの結果, 同一配列のインサート (1.5kb) を含むプラスミドが 12 クローン得られ, データベース検索の結果, 新規遺伝子と考えられたのでこれを *Xenopus* BIP と命名し以下の解析に供した。

1-2-2 完全長 *Xenopus* BIP cDNA のクローニング

yeast two-hybrid スクリーニングで得られた *Xenopus* BIP の完全長 cDNA を得るために, *Xenopus* Stage30 cDNA ライブラリ (STRATAGENE, USA) からのスクリーニングを行った。yeast two-hybrid スクリーニングで得られた *Xenopus* BIP の cDNA 断片を制限酵素 EcoRI / XhoI で切り出してプローブを調製し, DNA labeling kit (Multiple DNA labeling system RPN1601Z, Amersham Pharmacia

Biotech, UK) を用いて ^{32}P -dCTP で放射標識されたプローブを得た。このプローブを用いて 2×10^6 のクローンをスクリーニングし約 4 kb の *Xenopus* BIP cDNA を得た。このクローンの全長をシーケンスしたところ、図 1-3 に示すように 693 アミノ酸をコードし、oxysterol binding protein (OSBP) モチーフを有する新規タンパクであることが明らかとなった (OSBP モチーフ: E-[KQ]-x-S-H-[HR]-P-P-x-[STACF]-A)。また PSORT II (Nakai and Horton, 1999) による解析ではシグナル配列は持たないものと推定され、分泌性タンパク質ではなく細胞内タンパク質であると考えられた。

1-2-3 *C. elegans* BIP 遺伝子の構造決定

完全長 *Xenopus* BIP cDNA の配列をもとにホモロジー検索 (BLAST search) を行ったところ、線虫の遺伝子で極めて相同性の高い遺伝子 ZK1086.1 が見出されたので、これを *C. elegans* BIP と命名した。線虫においては全ゲノム配列が明らかになっており GeneFinder (The Sanger Centre) などのソフトウェアにより遺伝子産物が予測されているが、イントロンが長くエクソンが離れているような場合にそれぞれを別個の遺伝子と判断するなどの問題点も指摘されていることから、*C. elegans* BIP の構造を正確に決定するため以下の検討を行った。

(1) EST による cDNA 塩基配列の決定

ZK1086.1 の配列をもとにホモロジー検索を行ったところ部分配列の一致する EST クローンとして yk318d4, yk36e10, yk536c11, yk154e4, yk504f2 が見出された。これらの EST クローンの塩基配列を決定し比較したところ yk504e2 が最も長い ORF (2199base) を含んでおり、その翻訳開始点は GeneFinder で予測されている第一メチオニンよりもさらに 123 塩基 (41 アミノ酸) 上流のメチオニンであることが明らかとなった。

MDTISLDGEH	EKTPNNCENK	DSHGSSHLVA	NSEPPLTLPA	KMSQRQGKDA	50
YLSPTKDLVQ	ATLSPGIIHS	HGFDRGKDEV	LQSKEDASVS	MSKSKSESKL	100
YNGSEKDIAS	ASSKLTKKES	LKVQKKNYRE	EKKRAAKELL	STITDPSVIV	150
MADWLKIRGT	LKSWTKLWCV	LKPGVLLIYK	TPKNGQWVGT	VLLNACEIIE	200
RPSKKDGFCF	KLFQPMEQSI	WAVKGPKGEA	VGSITQPLPS	SYLIIRAASE	250
SDGRCWMDAL	ELALKCSSLL	KRTMIREGKE	HDLNSSAENS	QMSFYGLLRV	300
NNLHSNENFQ	LNDSEIERHN	FKDQDTYSDK	SDKDNDHDHD	ESDNDGLGKS	350
EESDSDTSE	QDDSFVDPEP	PELLKETTYV	EEAHEELGEA	GEASQTETVS	400
EEHKSLIWT	LKQVRPGMDL	SKVVLPTFIL	EPRSFLDKLS	DYYYHADLLS	450
EAALEENPYS	RMKKVVKWYL	SGFYKKPKGL	KKPYNPILGE	TFRCLWIHPR	500
TNSKTFYISE	<u>QVSHHPPVSA</u>	FYVSNRKDGF	CLSGSILAKS	KFYGNSLSAL	550
LEGDGRLTFL	NRGEDYLMTM	PYAHCKGILY	GTMTLELGGS	VTITCEKTSY	600
SATLEFKLKP	FLGNDDSVNQ	ISGKIKLGKE	VLATLEGHWD	SEVFIHDKKT	650
DVSETFWNPT	LEIRHGRLIR	CTVNQEEQGE	FESERLWRLV	LWP	693

図 1-3 *Xenopus* BIP の構造

Xenopus BIP は 693 アミノ酸をコードしており oxysterol binding protein motif (下線) が存在している。シグナル配列は持たないものと推定された。

(2) PCRによる翻訳開始点の決定

yk504e4.5 のさらに上流に翻訳開始点が存在する可能性も考えられるため、次に *C. elegans* cDNA ライブラリを鋳型とした PCR で 5'側非翻訳領域の配列を確認した。線虫の mRNA 5'末端には SL (spliced leader) 配列が付加されることが多い。そこで cDNA ライブラリを鋳型として、SL1 配列あるいは SL2 配列の sense primer と yk504f2 の ORF 部分の anti-sense primer を用いて PCR を行い、その PCR 産物をクローニングして *C. elegans* BIP mRNA の 5'端の配列を決定した。

SL1 5'-GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG-3'

SL2 5'-GGTTTTAACCCAGTTACTCAAG-3'

yk504f2 anti-sense 5'-CGTTTCTTCTCGTCGCGATACT-3'

cDNA は *C. elegans* N2 野生株 mRNA を鋳型として逆転写反応を行い調製した。

この cDNA を鋳型として、SL1 と yk504f2 anti-sense あるいは SL2 と yk504f2 anti-sense の組み合わせで、以下の反応条件の PCR を行った。

10× PCR buffer	5.0μl
dNTP(2.5mM each)	4.0μl
cDNA	1.0μl
primer (sense, 10mM)	2.5μl
primer (anti-sense, 10mM)	2.5μl
polymerase *	0.5μl
H ₂ O	34.5μl
total	50.0μl

*Pyrobest DNA polymerase (Takara shuzo, Otsu, Japan)

(98°C, 10sec) , (55°C, 30sec), (72°C, 1min) x 30 cycles

この PCR の結果，SL1 プライマーと yk504f2 anti-sense プライマーの組み合わせにおいて PCR 産物が認められたので，これをクローニングし塩基配列を決定したところ，SL1 配列から 109 塩基下流に yk504f2 の翻訳開始点（第 1 メチオニン）が存在し，その間に開始コドンは存在しないことから yk504f2 の翻訳開始点が *C. elegans* BIP 遺伝子の翻訳開始点であると考えられた。

以上の結果とゲノム配列のデータから決定した *C. elegans* BIPcDNA の塩基配列とアミノ酸配列を図 1-4 に，ゲノム構造を図 1-5 に示す。また，*Xenopus* BIP との相同性の比較を図 1-6 に示す。*C. elegans* BIP は 733 アミノ酸をコードし，シグナル配列は存在しないことから細胞内タンパクであると推定された。また oxysterol binding protein motif 様の配列が認められたが（図 1-5 下線部），C 末端側の 1 アミノ酸がアラニンではなくセリンに置き換わっているため，このモチーフが oxysterol binding protein として機能するかどうかは不明である。なお *C. elegans* BIP 完全長 cDNA から遺伝子構造を推定するとエクソンは 11 個であり，GeneFinder により予測されていた 10 個とは異なっていた。GeneFinder による予測では第 1 エクソンが欠けており，これは第 1 イントロンが約 6.6kb と長いためソフトウェアが第 1 エクソンを無視し判断を誤ったものと考えられた。

1-2-4 *C. elegans* BIP と BRA-1, BRA-2 の相互作用

1-2-1 で述べたように BIP は human BRAM に結合する因子として *Xenopus* ライブラリから単離した分子であるが，線虫においても BIP と BRAM ホモログの間に相互作用（結合）が保存されていることを確かめるため，COS-7 細胞にそれぞれのタンパクを発現させ，免疫沈降と Western blotting により両者のタンパク複合体の検出を試みた。

BRAM の *C. elegans* ホモログである BRA-1, BRA-2 あるいはそれらの欠失変異体（ Δ C 体， Δ N 体）については HA (hemagglutinin) との融合タンパク質として発現するよう，まず HA tag およびその C 末端に停止コドンの入った配列を含む

```

GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGAAGCGTTG CACTCTTAAC TTGGTGAAAA CGAATCTACT CAGAAAAACA CTCTACTTTT TTTGGTGGAA TTTGCATAAG 100
CCATCTCGAC CAGCAGTGCC CGAAACAATC ATGGAGGAAT TTGACGAAAA TAGCCGCAAA TCGTTAAAGA AACAAAAAAA GGAGTATCGC GACGAGAAGA 200
M E E F D E N S R K S L K K Q K K E Y R D E K K

AACCGCTCAA CGATGAGCTT TTGTCGGGCG TGGCGGATCC GACAGTGGTC GTCATGGCGG ACACGCTCAA GATTCGCGGA GCTCTGAAC GGTGGAACCG 300
R V N D E L L S A L R D P T V V V M A D T L K I R G A L K R W N R

GTATTACTGC GTGCTCAAGC CTGGAATTCT CATTTTGATC AAGCAGAAAA AAGCGGACAG GGGTGATTGG GTCGGAACAG TTCTCTTAA CCATTGCGAG 400
Y Y C V L K P G L L I L Y K H K K A D R G D W V G T V L L N H C E

CTGATTGAGA GACCGTCGAA AAAAGATGGG TTTTGCTTCA AACTGTTTCA CCCAATGGAC ATGAGCATTT GGGGCAACCG TGGCCCACTT GGACAATCGT 500
L I E R P S K K D G F C F K L F H P M D M S I W G N R G P L G Q S F

TTGGAAGETT CACCTTAAAC CCCCTGAACA CATCATTCTC CATTTGCAGA GCACCCGAGG ACCAGGCTGG CCGATGTTGG ATGGATGCTC TTGAGTTGTC 600
G S F T L N P L N T S F L I C R A P S D Q A G R C W M D A L E L S

ATTCAAGTGC ACTGGACTGC TGAAGAAAGC TATGAATGAG CTGATGACA AAAATGGAGA CAGCAGCATG AACGATGGTC AGAGAGATGA ATCAAGATG 700
F K C T G L L K K T M N E L D D X N G D S S M N D G Q R D E S R M

TCACGCGATT CCGATGGAGA TGATACTCGA GAATTGGCAG TGTGAGAGC GGATGCTGAA AAGCATTTC AAGAGATTGA TGATGTCGA GATGAAGATC 800
S R D S D G D D T R E L A V S E T D A E K H F Q E I D D V Q D E D H

ATGAAGACGG AAAAATGTCA GAGACAAGT ACATAAAG AGAGGCAATC ACAGAGAGCG CATGGATTCC GAGCCGCAAA GAAATGTTTG GCCCGGATGG 900
E D G K M S E T S D T I R E A F T E S A W I P S P K E V F G P D G

TTCATTAACG GAAGAAGTGC GCGAAGAAAA CAAGTCACTT ATCTGGACAC TGCTCAAGCA AATTCGCCCA GGAATGGACC TTTCCAAAGT TGTCTCCTC 1000
S L T E E V G E E N K S L I W T L L K Q I R P G M D L S K V V L P

ACATTATACC TCGAGCCAAG ATCATTTTTG GAGAACTTG CCGATTATTA TTATCATGCC GATCTCATTT CAGAGCGCTG TCGAGGCCA GACCCATTC 1100
T F I L E P R S F L E K L A D Y Y Y H A D L I S E A V A E P D P F Q

AGAGAATTGT CAAGGTATCC AAGTTCTTCT TGCTGGGATT TTACAAAAA CCAAGGGGAC TCAAAAAGCC TTACAATCCA ATTCCTGGTG AAACGTTCCG 1200
R I V K V T K F F L S G F Y K K P K G L K K P Y N P I L G E T F R

TTGTAATGCG GAACATCCAG ATGGATCCAC AACTTTCTAC ATGGCCGAAC AAGTTTCTCA TCACCTCTCA GTTTCATCAC TTTTCATCAC CAATCGAAAA 1300
C K W E H P D G S T T F Y M A E Q V S H H P P V S S L F I T N R K

GCCGGGTTCG ATATCAGCGG AACGATTCTA GCCAAGACCA AATATTACGG AAATTCACGT TCAGCTATTC TTGCGCGGAA GCTTCGTCTG ACGTTGCTGA 1400
A G F N I S G T I L A K S K Y Y G N S L S A I L A G K L R L T L L N

ATCTTGGCGA GACATACATT GTCAACCTCG CATAACCCAA TTGCAAGGA ATCATGATCG GAACCATGAC TATGGAACCT GCGCGGAGAG TTAACATTGA 1500
L G E T Y I V N L P Y A N C K G I M I G T M T M E L G G E V N I E

GTGCGAAG ACCGCTACA GGACCCAGCT GGATTTCAAG TTGAAGCCAA TGCTTGGAGG AGCCTACAAT CAAATTGAGG GAAGTATCAA GTACGGAAGT 1600
C E K T G Y R T T L D F K L K P M L G G A Y N Q I E G S I K Y G S

GATCGGTTGG CAGTATTGTA AGGTGCATGG GACGGAGTTA TTAGGATAAA GGGACCATG GGCAAGAAAG AACTTTGGAA TCCCAACCA GAAGTGATCA 1700
D R L A S I E G A W D G V I R I K G P D G K K E L W N P T P E V I K

AAACTCGGCT TCCTCGCTAC GAGATTAAAC TGGATGAGCA AGGCGAATGG GAATCGGCTA AGCTCTGGCG CCACGTTACT GAAGCGATT CGAACGAGGA 1800
T R L P R Y E I N M D E Q G E W E S A K L W R H V T E A I S N E D

TCAGTACAAA GCTACAGAAG AAAAGACGGC TTGGAAAAAC GATCAAGAG CCGCGGCCAA ATCCGGAATT CCACACGAGA CAAAGTTCTT CAAAAACAG 1900
Q Y K A T E E K T A L E N D Q R A R A K S G I P H E T K F F K K Q

CACGGAGATG ATATGTGTGA CATTATGCCC GACTACCGCC CATGGGACAA CAACAACGAT ATTCAACAAA TTGAGAACAA CTACGTGGTA AAAACGATT 2000
H G D D Y V Y I H A D Y R P W D M N N D I Q Q I E N N Y V V K T I S

CGAGGCATCC CAAAAGGAAA ACGGGAACA GTGAACAGTT GGGCAGTGAC AATACATCAG AGGCCAGTGA AAGCGATGAA GAAGTGATTG AGCCAAAAAT 2100
R H S K R K T G N S E Q L G S D N T S E A S E S D E E V I E P K I

TAAGAAGAAG GAAATTGTCC CAGCGAAGTC AAAACCAATC ACACCGGAGG TCGCTGATGA GCGTATCAAG GAAATGGAGC GCAAAATTGA ATGGCTATT 2200
K K K E I V P A K S K P I T P E V A D E R I K E M E R K F E L A I

CGCAGAATGG AAGCAGCCAA CGAAGACAAA TCGTCCCGAA CGTTGAACGC TATCCAGTCA ACTCTGCTCT TCGTTTTTGT TGTAACTCCG GTAGTTCAAT 2300
R R M E A A N E R Q S S R T L N A I Q S T L L F V F V V T S V V Q S

CTATTTTCAT GTTCTTCATG CTTCGCAAGT GATCTGTATC AAATATTAAG TATTTTGACT TGTATATTA TATTATTCAA TGAATTATT GTATTTTGT 2400
I F M F F M L R K *

CCTGTCAATT TGCTTATTT GCTAGTTTCG GTTCAACTCA TCGTGATTT TTGTTTTCAT TTCTCTGAA TCCTAGTCCA AACTCTTTCC CTCTTTCCAT 2500
TTCAACGCTA CTCTCTTTTC CCGTGCTAT GCTCCAAAAT TCGTTAACCC ATTTCTGCC TTTAATTTT TCCTATTGCT TCCTCTCTC ACTATTTGA 2600
ACCATCAATA TTCATCTAT GAATCTTTT TTTTGCCAC CTCCAAAAAT TTGTGCTGA GAGTCTGTGC CAAAAAGAT GTGTAATAA CTAATCCTAC 2700
TGATCAAGA ATCTACTGA TTAGATTCT TAGAGCAAGA TATTTGAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA A
2771

```

図 1-4 *C. elegans* BIP cDNA の塩基配列と予想アミノ酸配列

二重下線は SL1 (spliced leader 1) 配列を，下線は oxysterol binding protein 様配列を示す。* は停止コドン。

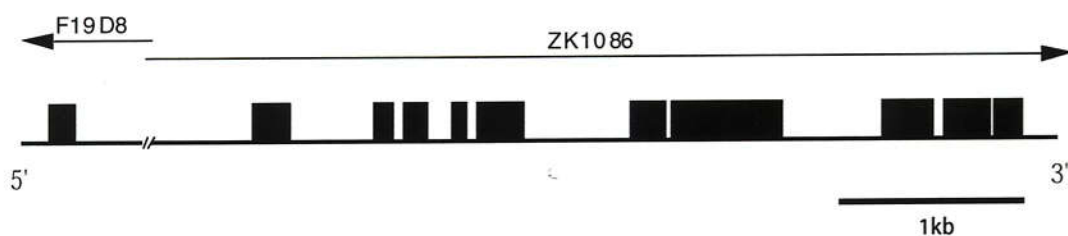


図1-5 *C. elegans* BIP のゲノム構造

C. elegans BIP 遺伝子は11エクソンから成る。矢印はコスミドを示す。

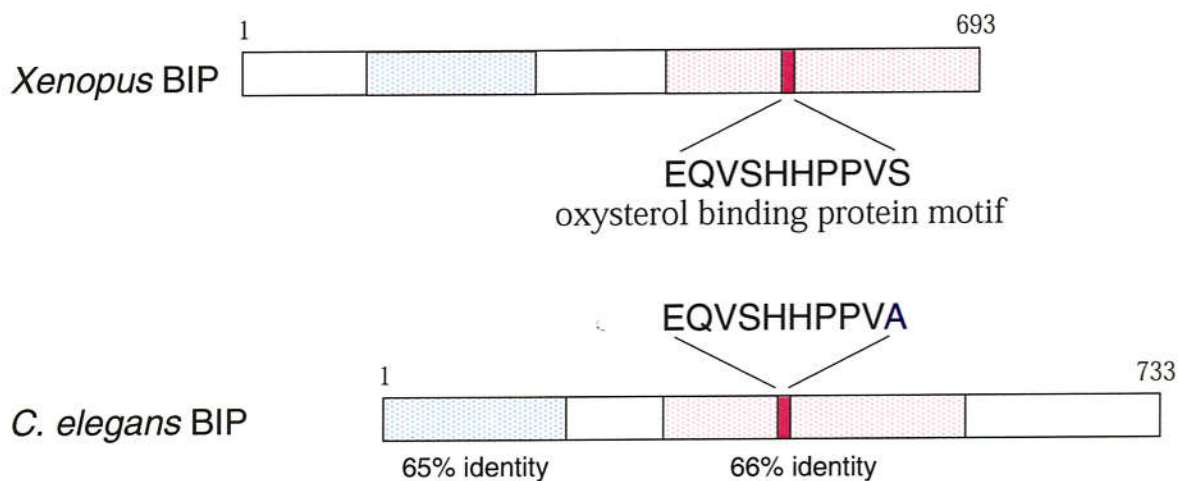


図 1-6 (A) BRAM interacting protein (BIP) の構造

yeast two-hybrid スクリーニングで得られた *Xenopus* BIP およびその線虫ホモログである *C. elegans* BIP の構造。 *Xenopus* と *C. elegans* で相同性の高い部分を青色と赤色でそれぞれ示した。

Xenopus BIP	MDTISLDGEH EKTPTNNCEK DSHGSSHLVA NSEPPLTLPA KMSQRQKDA	50
C. elegans BIP	ME-----	2
Xenopus BIP	YLSPTKDLVQ ATLSPGIIHS HQEDRGKDEV LQSMEDASVS MSKSKSESKL	100
C. elegans BIP	-----EED-----ENS-----	8
Xenopus BIP	YNGSEKDIAS ASSKLTKKHS LKMKKKYFE EKKPAAKELV STITDPSMIV	150
C. elegans BIP	-----RKS LKMKKKYFD EKKRVNDELQ SALRDEIVAV	41
Xenopus BIP	MADLAKIRGT LKEMTKLWCV LKPGMLLYRTER--NGLVYGVVLLNACET	198
C. elegans BIP	MADLAKIRGA LKFNRYVYCV LKPGMLLYRTER--HMDRQGVVIGTVLLNCEL	91
Xenopus BIP	TERPSKKDGP CFKLE FMDQ STNAVKGFG EAVGSIT CEALPSSMLTIRA	247
C. elegans BIP	TERPSKKDGP CFKLE FMDM STNGNFGELQ DSHGSSHLVA LKISLTLIRA	141
Xenopus BIP	ASESDGRGM DALEL ALKCS SLKKTWIRE CKEDLNSA ENSQMSFYGL	297
C. elegans BIP	ESDQGRGM DALEL SFKCT GELKVM NE LDDKNGSSM NDQRDESRM	190
Xenopus BIP	LRVNNLHSNE NFQNDSELEF HNEKDQDTY SDKSKDINH IDESDNDGL	347
C. elegans BIP	SRDSDGDDTR ELAVSETDAE KH FDE-----IDVUDE DED-----	226
Xenopus BIP	QKSEESISL TISERODDSVD PEPELLNET TYVEEAHEL SEASEASIR	397
C. elegans BIP	QKM-----SEFNSDTIREAF-----TES AWIPSPKEVF EPLG-----SLTE	261
Xenopus BIP	TVSEHKSLT WYLLKQ RFG MDLSKVLETERFILEPRSELE KIDVYVHAD	447
C. elegans BIP	EVSEENKSLT WYLLKQ RFG MDLSKVLETERFILEPRSELE KIDVYVHAD	311
Xenopus BIP	LISEAPALEEN EYRMMKVMK WYLSGFYKCPANGLAKCPNPELGEPRCKMI	497
C. elegans BIP	LISEAVHEPD EFORIVKVMK FFLSGFYKCPANGLAKCPNPELGEPRCKME	361
Xenopus BIP	RPRTNSMFEV LSEOVSHHPEVSAFYVSNRKA GECLESLITAKSKHYGNSL	547
C. elegans BIP	RPDCSUTFA MABOVSHHPEVSLFITNRKA GENISLITAKSKHYGNSL	410
Xenopus BIP	SALDEGDRLETHANGETIL MIMPYA CKGETLYMDMT EISGGSMITICEK	597
C. elegans BIP	SALPAGKLRGTHLNLGETIL VNLEPYANCKGTIMIGTMMKAGGEVATICEK	460
Xenopus BIP	TSYSATLEERTLKPHLGNDDS VNOTHCKEL CKEVLATLAGEHASEVHTID	647
C. elegans BIP	TSVRTTLDFKLEMLG--GA VNOTHCKELV GSDFLASIEGAWLG--VIRI	506
Xenopus BIP	KCTIVSETM ANPTLEIRHCR LIRCTVNDERFOGBESESFLWRIM-----	690
C. elegans BIP	KGHGKKELW/NPTLDEVIKTRMLRVEINMLRFOGBESESFLWRIMVTEAISNE	556
Xenopus BIP	-----I-----	693
C. elegans BIP	DQYKATEEKT ALENDQRARA KSGIPHETKF FKKQHGDYV YIHADYRFD	606
Xenopus BIP	-----	693
C. elegans BIP	NNNDIQQIEN NYVVKTISRH SKRKTGNSEQ LGSDNTSEAS ESDEEVIEPK	656
Xenopus BIP	-----	693
C. elegans BIP	IKKKEIVPAK SKPITPEVAD ERIKEMERKF ELAIRMEAA NERQSSRTLN	706
Xenopus BIP	-----	693
C. elegans BIP	AIQSTLLFVF VVTSVVQSIF MFFMLRK	733

図 1-6 (B) *Xenopus* BIP と *C. elegans* BIP のアミノ酸配列の比較

相同アミノ酸を影で示した。

pBluescript II (Stratagene, USA) にサブクローニングしたのち、BRA-1 については cDNA 断片を切り出して発現ベクター pcDNA3 (INVITROGEN, Netherland) にクローニングした。また BRA-2 については HA 配列の入った pBluescript II にサブクローニングしたものを鋳型とし、制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて PCR を行ったのち、BRA-2 および HA タグの塩基配列を確認して発現ベクター pCS2+ にクローニングした。BRA-1 の ΔC 体はアミノ酸の 1-101 位, ΔN 体は 103-183 位, また Bra2 の ΔC 体は 1-128 位, ΔN 体は 129-214 位に該当する部位を PCR で増幅し塩基配列を確認したのちクローニングに用いた。

また、BIP は FLAG タグとの融合タンパクとして発現するよう、FLAG タグ配列の入った発現ベクター pCMV5 (J. Wrana から供与) の SalI / XbaI サイトにクローニングした。

COS-7 細胞は常法に従って 10% FBS (BIOWHITTAKER, MA, USA) を含む DMEM 培地 (LIFE TECHNOLOGIES, USA) で培養した。細胞を 5×10^5 cells/dish の密度で 10cm 培養ディッシュ (IWAKI, JAPAN) へ播種し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で一晚培養したのち、リン酸カルシウム法あるいは FuGENE (Roche, Switzerland) によって各プラスミドを細胞に導入した。15 時間後に新鮮な培地に交換したのち 24 時間培養を続け細胞を回収した。細胞の回収は、培地を除去し冷 PBS(-) でリンスしたのち可溶化バッファーでエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離によって上清 (可溶化画分, lysate) を得た。この可溶化画分の一部 (10 μ l) を採取し電気泳動用バッファーと混合したのち SDS-PAGE に供した。また可溶化画分の残りは 10 μ l の Protein A-Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) と共に 4°C でインキュベートして Protein A-Sepharose に非特異的に吸着する成分を除去したのち、抗 FLAG 抗体 (anti-Flag Ab (M2) mouse monoclonal, SIGMA, MO, USA) を吸着させた Protein A-Sepharose とインキュベートして複合体を免疫沈降し、遠心分離の後、上清を除去して Protein A-Sepharose を電気泳動バッファーに懸濁し、これ

を免疫沈降複合体 (Immunoprecipitant, IP) として SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE ののちセミドライ型エレクトロブロッター (MILLIPORE, MA, USA) を用いてタンパクを PVDF メンブレン (BIO-RAD, CA, USA) にプロットした。メンブレンは5%スキムミルクを含む T-TBS バッファー (100mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween20) で1時間ブロッキングしたのち抗 HA 抗体 (anti-HA Ab (Y-11), rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, USA) あるいは抗 FLAG 抗体と反応させた。反応終了後, メンブレンは2次抗体 (horseradish peroxidase-conjugate antibody, Amersham) と反応させ ECL kit (Amersham) で検出した。

図 1-7 に示すように BIP は BRA-1 (full length) と結合することが示唆された。また欠失変異体を用いた結果から BIP は BRA-1 の C 末端側と強く相互作用することが示された。一方, BRA-2 との相互作用についても図 1-8 に示すように BRA-2 (full length) と結合すること, さらに BRA-2 においても C 末端側と相互作用することが示された。BRA-1 と BRA-2 は C 末端側の相同性が非常に高いことから (図 1-9), *C. elegans* BIP はこの C 末端を認識して BRA-1 および BRA-2 と相互作用するものと考えられる。このように BRAM の線虫ホモログである BRA-1, BRA-2 と *C. elegans* BIP の結合が示されたことは, 先の yeast two-hybrid スクリーニングで human BRAM に結合する因子として *Xenopus* BIP が取られたことと良い一致を示しており, BRAM と BIP の関係が種を越えて保存されている可能性を示唆するものと思われた。

1-3 考察

TGF- β シグナルに関与する新規分子を取得し初期発生における役割を解明することを目的として, yeast two-hybrid スクリーニングを行った。yeast two-hybrid スクリーニングはタンパク質同士の「結合」を検出する方法であり, 特に細胞内シ

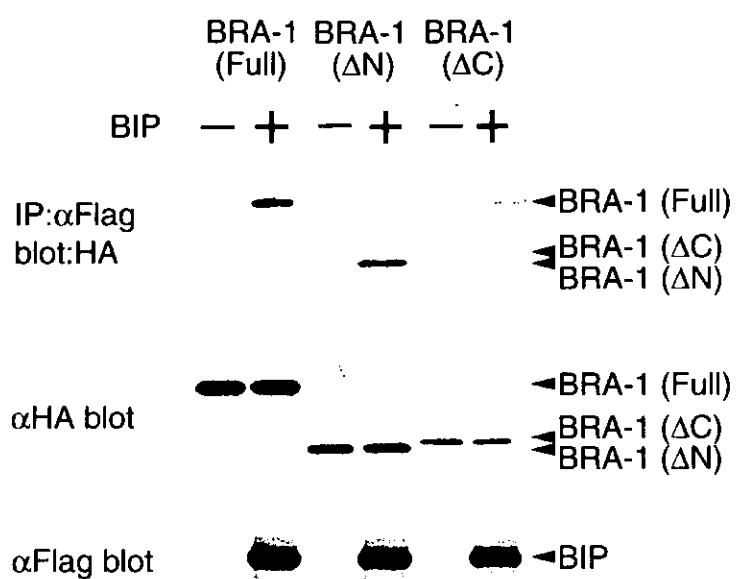


図 1-7 *C. elegans* BIP と BRA-1 の相互作用

抗 Flag 抗体により BIP およびその結合タンパクを免疫沈降し、
抗 HA 抗体により BRA-1 およびその欠失変異体を検出した。
BRA-1(Full) と BRA-1(ΔN) が BIP と結合していることが分かる。

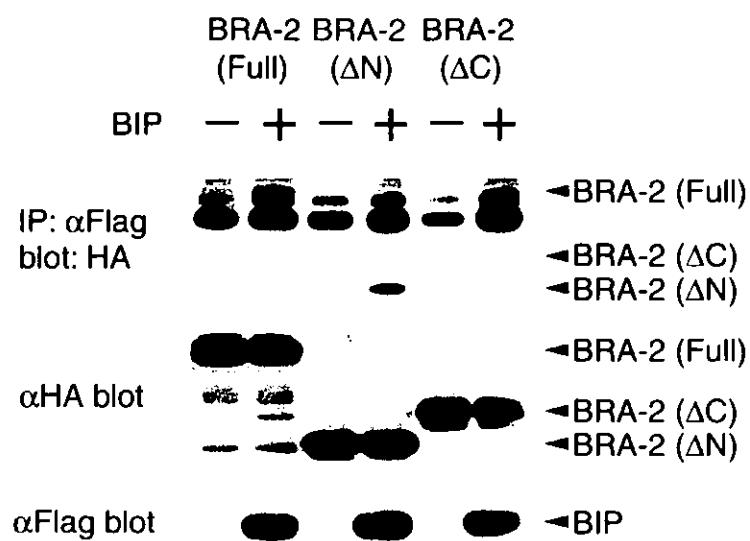


図 1-8 *C. elegans* BIP と BRA-2 の相互作用

抗 Flag 抗体により BIP およびその結合タンパクを免疫沈降し、
 抗 HA 抗体により BRA-2 およびその欠失変異体を検出した。
 BRA-2 (Full) と BRA-2(Δ N) が BIP と結合していることが分かる。

BRA-1	MSE-----EAEAGP SPK-----VNGENGNT -----NTF--	24
BRA-2	MADGQVHDEL MMDQQQQGV VPQQGDIHLS PDKDLGDAA LENNVROVHL	50
BRA-1	DDLYVDDKMR RMINDLQRCW LITVHLSREK SLVALTEKLH QEFMDQERV	74
BRA-2	DGVVVSQGMK RMIDDLQRCW LSEYHASREK SLVALTEKLH QEFMDQOKI	100
↓		
BRA-1	RRILLMOFKI ELLOTKEELE KKHAENLKES LHKUSEKHUR ELAVAKKQW	124
BRA-2	RSELLQOFKD ELLOTKEELE NKHRENEKME SAKLNEKHRR ELVASRKKW	150
↑		
BRA-1	CWQCNSEAIY HCCWNTAYCS VECQOQHWOT HRKECRRKKS NG--GAPG-E	171
BRA-2	CASQCNSEAIY HCCWNTAYCS VECQOQHWOT HRKECRRKKS NNAPGAPSVF	200
BRA-1	V-PTAEPITQ S-QQ	183
BRA-2	AFQGVGAPMP PQQQ	214

図 1-9 BRA-1 と BRA-2 の相同性

影は相同アミノ酸を示す。BRA-1 と BRA-2 は C 末端側の配列に高い相同性が認められる。矢印は免疫沈降実験に用いた ΔN , ΔC 体の境界を表す。

グナル伝達に関わる分子をクローニングするには優れた方法である。これまで TGF- β スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達系においても yeast two-hybrid スクリーニングを用いた新規分子取得の例は多く, type I 受容体の細胞内ドメインに結合するタンパクとして immunophilin FKBP12 (Wang et al., 1994), p21 RAS farnesyl transferase α subunit (Wang et al., 1996), BRAM (Kurozumi et al., 1998) などが報告され, また Type II 受容体の細胞内ドメインに結合するタンパクとして cyclin B2 (Liu et al., 1999) が報告されている。他に細胞内シグナル伝達因子に結合する分子としては TGF- β シグナル伝達系の MAPKKK である TAK1 に結合する分子として TAB1 が得られている (Shibuya et al., 1996) ほか, Smad2 および Smad3 に結合して co-repressor として働く Ski (Luo et al., 1999), Smad1 と Smad2 および Smad4 と CBP/p300 に結合してシグナルを抑制する SNIP1 (Kim et al., 2000), Smad1 をユビキチン化してタンパクの分解へと導く Smurf1 (Zhu et al., 1999) などが報告されている。このように yeast two-hybrid スクリーニングは「結合」という, シグナル伝達において基本的なおかつ重要な機能を指標にして新規分子を取得できる有用な方法である。

TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達に関わる新規遺伝子のクローニングにあたり, 私は bait として human の BMP Type I 受容体の細胞内ドメインに結合することが報告されている BRAM を用いて *Xenopus* cDNA ライブラリを検索し, BRAM interacting protein (BIP) cDNA を得た。*Xenopus* BIP は 693 アミノ酸をコードしており, oxysterol binding protein モチーフ (E-[KQ]-x-S-H-[HR]-P-P-x-[STACF]-A) を有していた。oxysterol はコレステロールが酸化された誘導体であり, スフィンゴ脂質代謝への作用, 血小板凝集, アポトーシス, タンパクのプレニル化など様々な生物活性を有しているほか (Schroepfer, GJ, Jr, 2000), 最近, oxysterol が orphan receptor である LXR α を介してコレステロール代謝を制御することが報告されている (Janowski et al., 1996; Schroepfer, 2000)。oxysterol binding protein はヒト, *Mus musculus*

(マウス), 線虫, *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ) *Neurospora crassa* (アカパンカビ), *Schizosaccharomyces pombe* (分裂酵母), *Shaccharomyces cerevisiae* (出芽酵母), *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) など多くの種にわたって保存されており, 動物においてはコレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の発現を負に調節するものと推察されている。これらのことから, oxysterol binding protein モチーフを有する *Xenopus* BIP は TGF- β シグナル伝達系だけでなくコレステロール代謝に関与する可能性があり, 例えば TGF- β シグナルによる細胞外マトリクスの蓄積と細胞膜のコレステロール代謝の両者を調節する可能性も考えられ, 細胞接着などとの関わりについても今後興味を持たれる。

次いで *Xenopus* BIP のアミノ酸配列をもとにデータベースを検索した結果, 相同性の高いホモログが線虫に存在することが明らかとなった。cDNA および EST クローンを解析した結果, *C. elegans* BIP は 733 アミノ酸をコードし, その遺伝子は 11 エクソンから成ることが示された。興味深いことに *C. elegans* BIP には oxysterol binding protein に酷似したモチーフが存在しており, *C. elegans* BIP の機能が *C. elegans* の oxysterol binding protein とどのように関連するか, あるいは oxysterol を含めたコレステロール代謝とどのように関連するかという点については今後の課題であると考えられる。

C. elegans においては BRAM ホモログとして BRA-1 と BRA-2 が同定されている。免疫沈降と Western blotting による相互作用の検討から, *C. elegans* BIP が BRA-1 および BRA-2 と結合しうることが示された。BRA-1 と BRA-2 の C 末端側は非常に高い相同性を有しており C 末端を介して両者と結合することが示されたが, 線虫において BRA-1 と BRA-2 は組織発現も異なり, また関与するシグナル伝達経路も異なっている。BRA-1 は主に神経細胞で発現し, DAF-1 と相互作用することで *daf* 経路に関与するが, BRA-2 は咽頭筋, 腸管, hypodermis で発現し SMA-6 と相互作用して *sma* 経路に関与すると考えられている。従って実際に *in vivo* にお

いて BIP が BRA-1, BRA-2 のどちらと相互作用するか,あるいは両者と相互作用するかという点についてはそれぞれの分子の組織発現パターンを比較することと, *C. elegans* BIP の機能欠失 (loss of function) あるいは過剰発現 (overexpression) でどのような表現型を示すかということを検討する必要があると思われる (第 2 章)。

第2章 線虫 *C. elegans* における BIP の機能解析

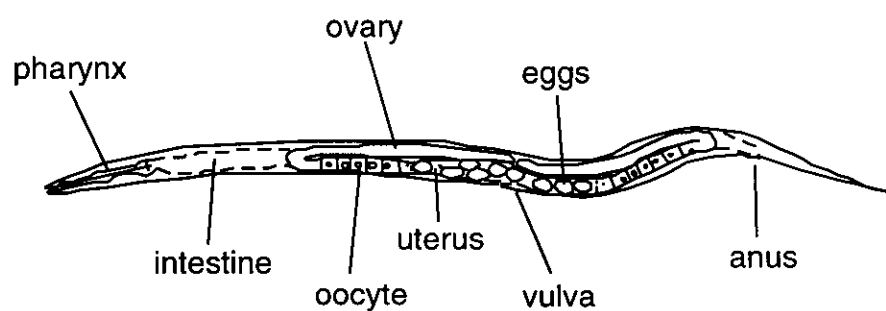
2-1 序論

線虫 *C. elegans* は多細胞生物のなかでも非常にシンプルな構造で、体全体の細胞数も雌雄同体で 959 個、オスで 1031 個と少ないものの、神経系、消化器系、筋肉系、上皮、生殖器官などの基本的な組織が存在し、多細胞生物の構造あるいは機能を研究するためのモデル動物として有用である（図 2-1）。また、線虫の初期発生においても体軸の決定や不等分裂、原腸形成など基本的な生命現象を見ることができる。

近年、生物の初期発生において重要な役割を果たすシグナル分子が次々と解明されてきており、そのような分子の多くが線虫、ショウジョウバエ、両生類、鳥類、哺乳類といった様々な生物で保存されていることが明らかになってきている。従って、ある生物の発生過程をシグナル伝達という観点から記述することができれば、それは他の生物の発生過程の解明に有力な作業仮説を提供する可能性が高い。そのようなシグナル伝達分子の中でも TGF- β スーパーファミリーに属する分子群、即ち TGF- β , BMP, activin や、その調節因子である noggin, chordin, follistatin, 等は増殖、分化誘導、背腹軸決定、骨形成など多彩な役割を果たしている。

線虫における TGF- β シグナル伝達機構も他の生物との共通性が高い。TGF- β シグナル伝達系のリガンドとしては DAF-7 (Ren et al., 1996), UNC-129 (Colavita et al., 1998), DBL-1 (Suzuki et al., 1999; Morita et al., 1999) が報告されている（線虫の全ゲノム解析の結果、orphan ligand である TIG-2 が見出されているが機能は不明）。DAF-7 をリガンドとする *daf* 経路は耐性幼虫である dauer larva へ移行する際のシグナルである。その受容体は DAF-1 (Type I 受容体), DAF-4 (Type II 受容体) であり、その下流には細胞内シグナル伝達因子として DAF-3, DAF-8, DAF-14 が存在する。また DAF-1 と直接相互作用する因子として BRA-1 があり、BRA-1 は神経で強く発現することとその欠失変異体は dauer 形成が亢進すること

A



B

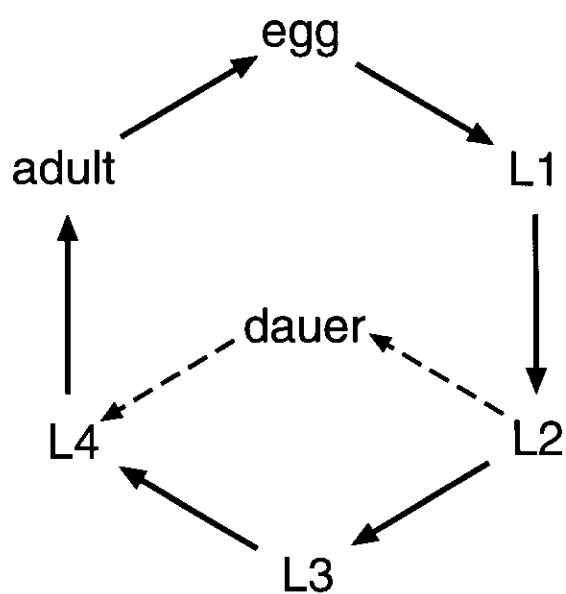


図 2-1 線虫 *C. elegans* の構造と生活環

(A) hermaphrodite (雌雄同体) 成虫の構造

(B) *C. elegans* の生活環 (L: larva, 幼虫)。生育環境の悪化により L2 から dauer larva (耐性幼虫) へと移行する

表 2-1 TGF- β シグナル伝達分子の組織発現パターンおよびその変異体

DAF-7/<i>daf</i> 経路			
molecule	expression	phenotype (loss of function)	Ref.
DAF-7	sensory neurons	dauer constitutive	1, 2
DAF-4	neuronal cells	dauer constitutive	3, 4, 5
	hypodermis	small, abnormal mail tail	
	pharynx		
	intestine		
DAF-1	amphid neurons	dauer constitutive	6, 7
BRA-1	amphid neurons		8
DAF-3	neuronal cells	dauer defective	9
	intestine		
	hypodermis		
	distal tip		
DAF-8		dauer constitutive	10
DAF-14		dauer constitutive	10

1: Ren et al., 1996, 2: Swanson et al., 1981, 3: Riddle et al., 1981, 4: Savage et al., 1996, 5: Patterson et al., 1997, 6: George et al., 1990, 7: Gunther et al., 2000, 8: Morita et al., *in submission*, 9: Patterson et al., 1997, 10: Inoue et al., 2000

DBL-1/<i>sma</i> 経路			
molecule	expression	phenotype (loss of function)	Ref.
DBL-1	neurons	small	12
	body wall muscle		
DAF-4	(see above)		
SMA-6	pharyngeal muscle	small, abnormal mail tail	13
	intestine		
BRA-2	pharyngeal muscle	long	14
	intestine		
SMA-2		small, abnormal mail tail	15
SMA-3	ubiquitous	small, abnormal mail tail	16
SMA-4		small, abnormal mail tail	17
LON-1		long	18

12: Suzuki et al., 1999, 13: Krishna et al., 1999, 14: Morita, unpublished data, 15-17: Savage et al., 1996, 16: Savage-Dunn et al., 2000, 18: Maduzia et al., 2000

が明らかになっている (Morita et al., 論文改訂中)。一方, DBL-1 の受容体は SMA-6 (Type I 受容体), DAF-4 (Type II 受容体) でありその下流に存在する細胞内シグナル伝達因子は SMA-2, SMA-3, SMA-4 である。DBL-1, SMA-6, SMA-2, SMA-3, SMA-4 は全て機能欠失変異体で Sma の表現型を示すことから, このシグナル伝達経路は線虫の体長調節に関わっているものと考えられている。表 2-1 に線虫 TGF- β シグナル伝達に関与する分子の組織発現パターンおよび機能欠失変異体 (loss of function) の表現型を示す。

第 2 章においては, 線虫 *C. elegans* の TGF- β シグナル伝達系に関与する分子として得られた BIP の組織発現および dsRNAi による表現型の観察をもとに, 線虫における BIP の役割について論ずる。

2-2 実験方法と結果

2-2-1 線虫 (*C. elegans*)

C. elegans Bristol 株 (N2), *dbl-1*(++) 株 (Suzuki et al., 1999) および *lon-1* BW1976 株は Brenner (1974) の方法に従い, 20℃にて飼育した。

2-2-2 *C. elegans* BIP の組織発現

C. elegans BIP の組織発現を検討するために, BIP promoter-GFP の強制発現および whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

(1) BIP promoter-GFP による組織発現の検討

BIP のプロモーター領域 (-4243 -- -1) をコスミド F19D8 を鋳型として PCR で増幅し, GFP 発現ベクター pPD95.67 (A. Fire より供与) の XbaI / BamHI サイトに読み枠を合わせてクローニングした。この BIP promoter-GFP プラスミドを 100ng/ μ l 濃度に調製して雌雄同体の gonadal syncytia にインジェクションし (Mello et al., 1991), F1 における GFP の発光を蛍光顕微鏡で観察した。

(2) whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション

whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションに用いたプローブは、*C. elegans* BIP の全 ORF が含まれている cDNA クローン yk504f2 / pBluescript II を制限酵素 PstI で切断し、直鎖状にしたものを鋳型として T7 primer を用いて以下の反応条件で anti-sense RNA プローブを合成した。

linearized cDNA	2μl
5× T7 buffer	4μl
0.1M DTT	2μl
DIG (fluorescein) mix	2μl
T7 polymerase	2μl
H ₂ O	8μl
total	20μl

反応は 37℃ で 2 時間行ったのち反応液をエタノール沈殿に供し、沈殿物を 50 μl 蒸留水に溶解して使用した。*in situ* ハイブリダイゼーションの方法を図 2-2 に示す (Mochii et al., 1999)。

BIP promoter-GFP の強制発現および *in situ* ハイブリダイゼーションによる *C. elegans* BIP 組織発現の結果を図 2-3 に示す。BIP promoter-GFP を発現させた線虫では、咽頭筋 (pharyngeal muscle) に強い発現が認められ (図 2-3A) , また hypodermis (図 2-3A) と尾部の神経 (図 2-3C) にも発現が観察された。特に咽頭筋, hypodermis については観察した全ての個体において発現が見られた。

さらに *in situ* ハイブリダイゼーションにおいては咽頭筋で強い発現が認められ (図 2-3E) , この結果は BIP promoter-GFP の結果と良い一致を示している。なお *in situ* ハイブリダイゼーションでは腸管と生殖腺 (gonad) にも発現が見られたが (データは示さず) , BIP promoter-GFP による検討ではこれらの部位での強い

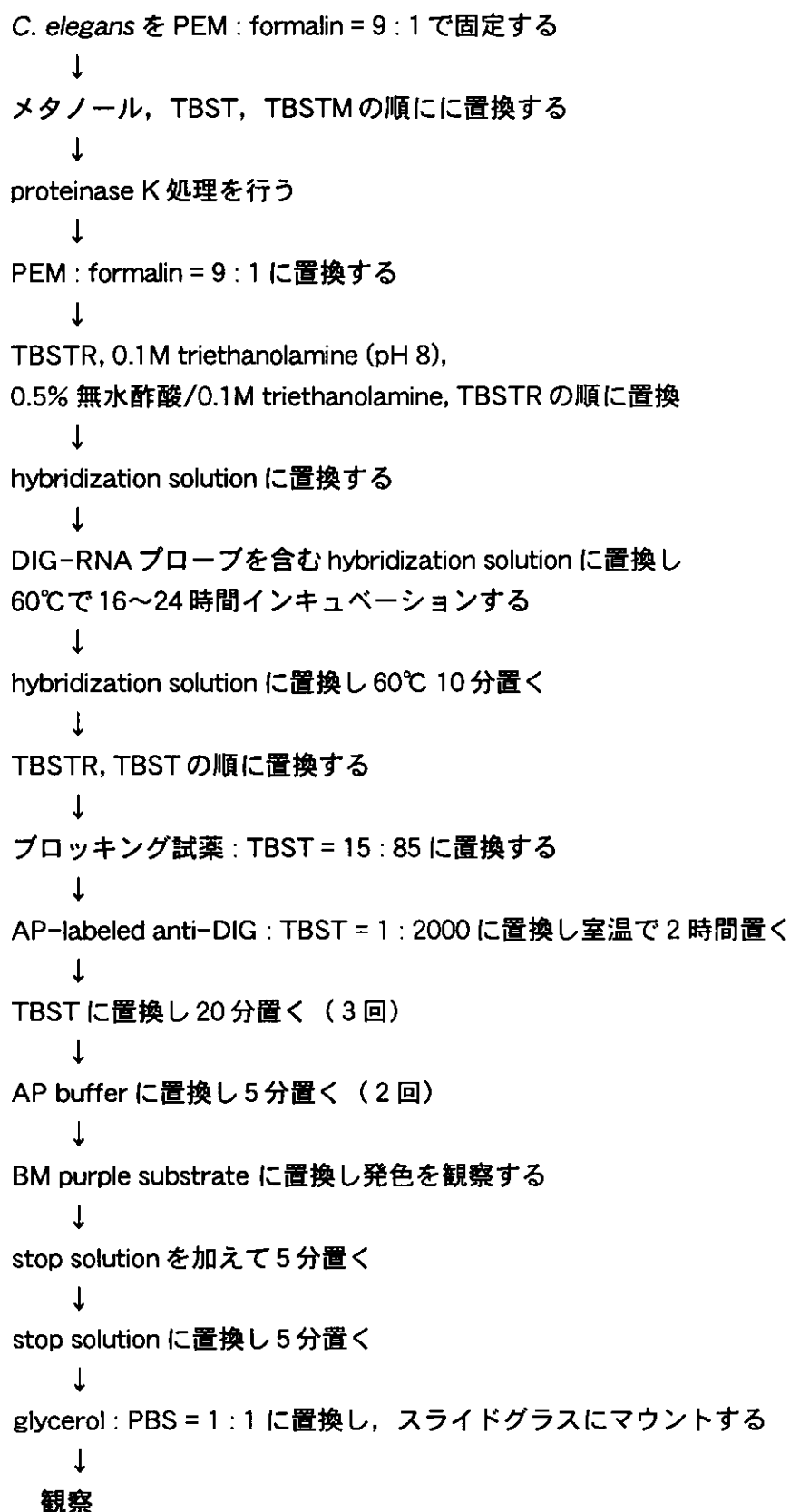


図 2-2 whole mount *in situ* hybridization の手順

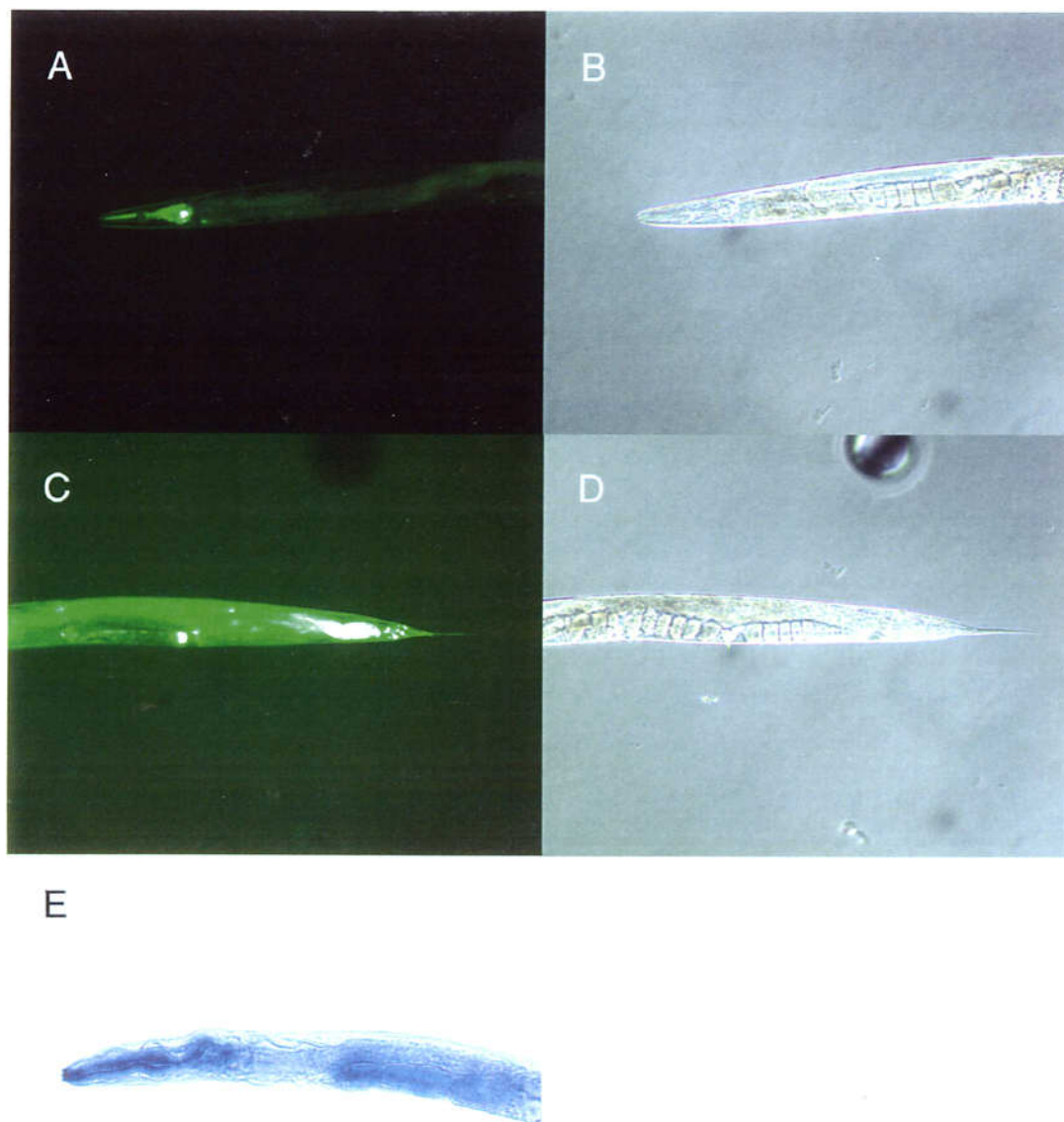


図 2-3 BIP の組織発現

(A) 成虫（雌雄同体）頭部における BIP::GFP の発現。咽頭筋および hypodermis に蛍光が観察される。(B) (A) のノマルスキー像。(C) 尾部神経にも蛍光が観察される (D) (C) のノマルスキー像。(E) *in situ* ハイブリダイゼーションでも咽頭筋に発現が認められる。

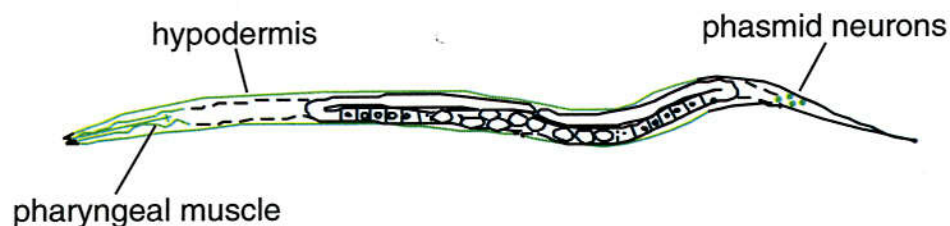
発現は観察されなかった。

BIP の発現が咽頭筋と hypodermis で見られたことは、*sma* 経路の type I 受容体である SMA-6, および SMA-6 と相互作用すると考えられる BRA-2 の組織発現と重なっており, BIP が *sma* 経路に関与することが期待された。また尾部神経 (phasmid neurons) にも一部の個体で発現が観察されたことは *daf* 経路の type I 受容体である DAF-1, および DAF-1 に結合する BRA-1 の発現部位とも重なっていることから, BIP が *daf* 経路に関係する可能性も考えられた。図 2-4 に DAF-1, BRA-1 (*daf* 経路), SMA-6, BRA-2 (*sma* 経路) および BIP の組織発現パターンを模式的に示す。

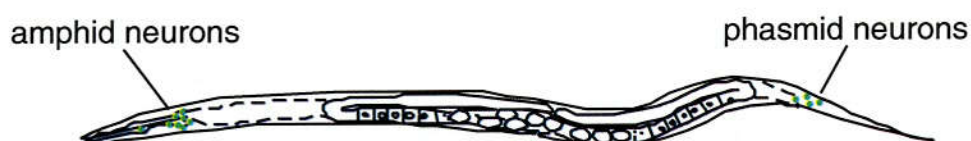
2-2-4 dsRNAi による表現型の観察

線虫において double stranded RNA interference (dsRNAi) と呼ばれる手法で目的遺伝子の機能欠失 (loss of function) を検討できることが示され (Fire et al., 1998), トランスポゾンや変異原による欠失変異体の単離とともに有用な手法となっている (図 2-5)。そこで BIP について dsRNAi を行い表現型の観察を行った。二重鎖 RNA 合成の鋳型には, BIP の ORF 全長が含まれている cDNA クローン (yk504f2 / pBluescript II) を用いた。この cDNA を直鎖状にするため制限酵素 Pst I あるいは Kpn I で切断したフラグメントを鋳型とし MEGAscript RNA 合成キット (Ambion, TX, USA) で T3 プライマーと T7 プライマーを用いて sense および anti-sense 鎖をそれぞれ合成したのち annealing して二重鎖とし, 吸光度を測定して収量を確認した。合成した dsRNA を *C. elegans* 野生株あるいは *dbl-1(++)* 株の syncytial gonad にマイクロインジェクションした。インジェクションから 6 時間後に新たなプレートへ線虫を移し, その後産卵された卵が hatch して生育する過程を観察した。

BIP



DAF-1, BRA-1



SMA-6, BRA-2

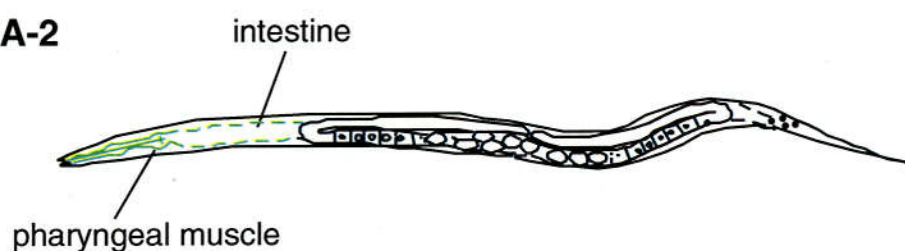


図 2-4 BIP および DBL-1, BRA-1, SMA-6, BRA-2 の組織発現 (模式図)
緑色は発現部位を示す。DAF-1, BRA-1, SMA-6, BRA-2 の発現パターンは
表 2-1 の各文献をもとに作成した。

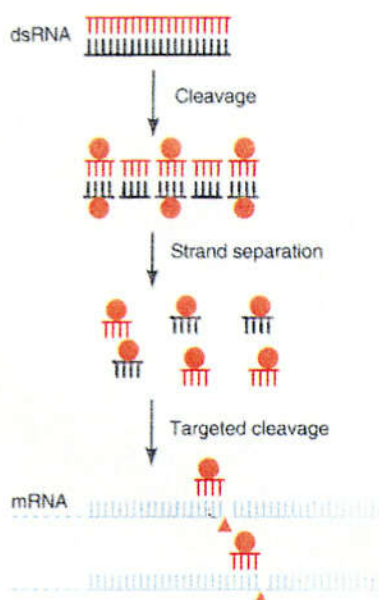


図 2-5 double stranded RNAi (モデル図)

インジェクションした dsRNA は dsRNA 特異的ヌクレアーゼによって 21-23 塩基対のフラグメントに分解されたのち開裂し、標的 mRNA に結合する。mRNA はヌクレアーゼにより分解される (Zamore, 2000 より引用)。

(1) 野生株に対する BIP dsRNAi の作用

BIP dsRNA をインジェクションした群で産卵あるいは孵化に異常はみられず胚性致死ではないと考えられた。孵化から 2 日後に観察したところ野生株に比べて体長が短い個体が高頻度で見られたので、完全に成虫になる 5 日後に体長を測定した。その結果を図 2-6 に示す。BIP dsRNA をインジェクションした群では野生株に比べて著しく体長が短くなっていた（実験は 3 回反復し同様の結果が得られた）。その形態から表現型は Dpy (dumpy, 体長だけ短くなって体幅は野生株と変わらない) ではなく Sma (small, 体長が短くなるのと比例して体幅も細くなる) であると考えられた。また dsRNA をインジェクションした群で行動異常, dauer 形成など *daf* 経路に関係すると思われるような表現型は観察されなかった。免疫沈降と Western blotting による BRA-1, BRA-2 との相互作用（第 1 章）および組織発現の結果から, BIP は BRA-1, BRA-2 の両者と相互作用する可能性があるため, dsRNAi では BRA-2 との相互作用による Sma の表現型だけでなく, BRA-1 との相互作用による Daf の表現型を示す可能性も考えられるが, 一般に神経に発現する因子は dsRNAi の効果が出ないと言われており (Tavernarakis et al., 2000), 今回の検討で Daf の表現型が観察されなかったのは, BIP と BRA-1 の相互作用の場が神経系であるため Daf の表現型が顕在化しなかったものと思われる。さらに詳細な検討を行うには, BIP 遺伝子の欠失変異体を用いて解析を行う必要があると思われる。

BIP の dsRNAi で Sma の表現型が観察されたことから, BIP が DBL-1 / *sma* 経路に関わっていることを確かめるため, 次に *sma* 経路のエピスタシス (epistasis) 解析を行った。図 2-7 にエピスタシスによるシグナル伝達系の解析の原理について示す。野生型ではシグナル伝達分子が正常に発現, 機能し, 正常な形態形成が行われる (図 2-7 A)。一方, リガンドが過剰発現している個体ではシグナル伝達も過剰となり, それに伴い形態異常を生じる (図 2-7 B)。これに対し, 過剰発現しているリガンドの下流にあるシグナル伝達因子の発現量を dsRNAi で抑制すると, リ

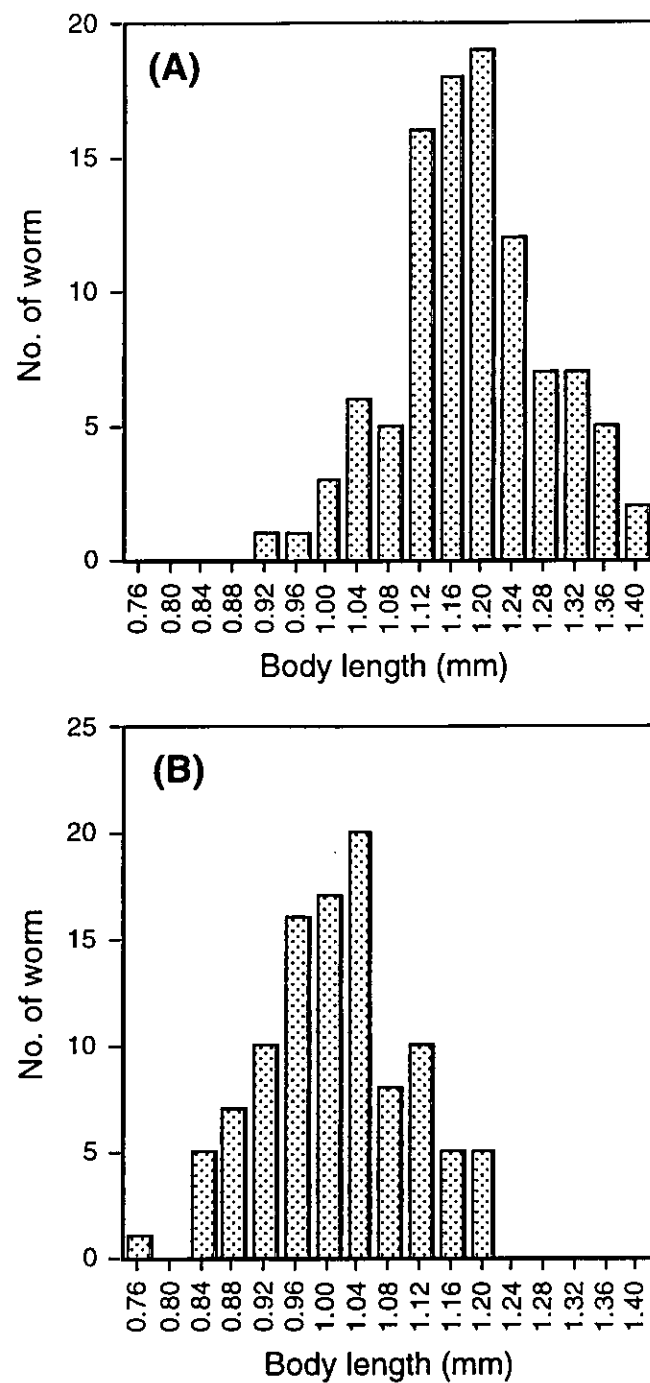


図 2-6 double stranded RNA interference による
BIP の機能欠失

(A) 野生株の体長 (1.18 ± 0.09 mm, $n=102$) (B) BIP dsRNA を
インジェクションした線虫の体長 (1.00 ± 0.09 mm, $n=104$)
BIP の機能欠失は Sma (small) の表現型を示した。

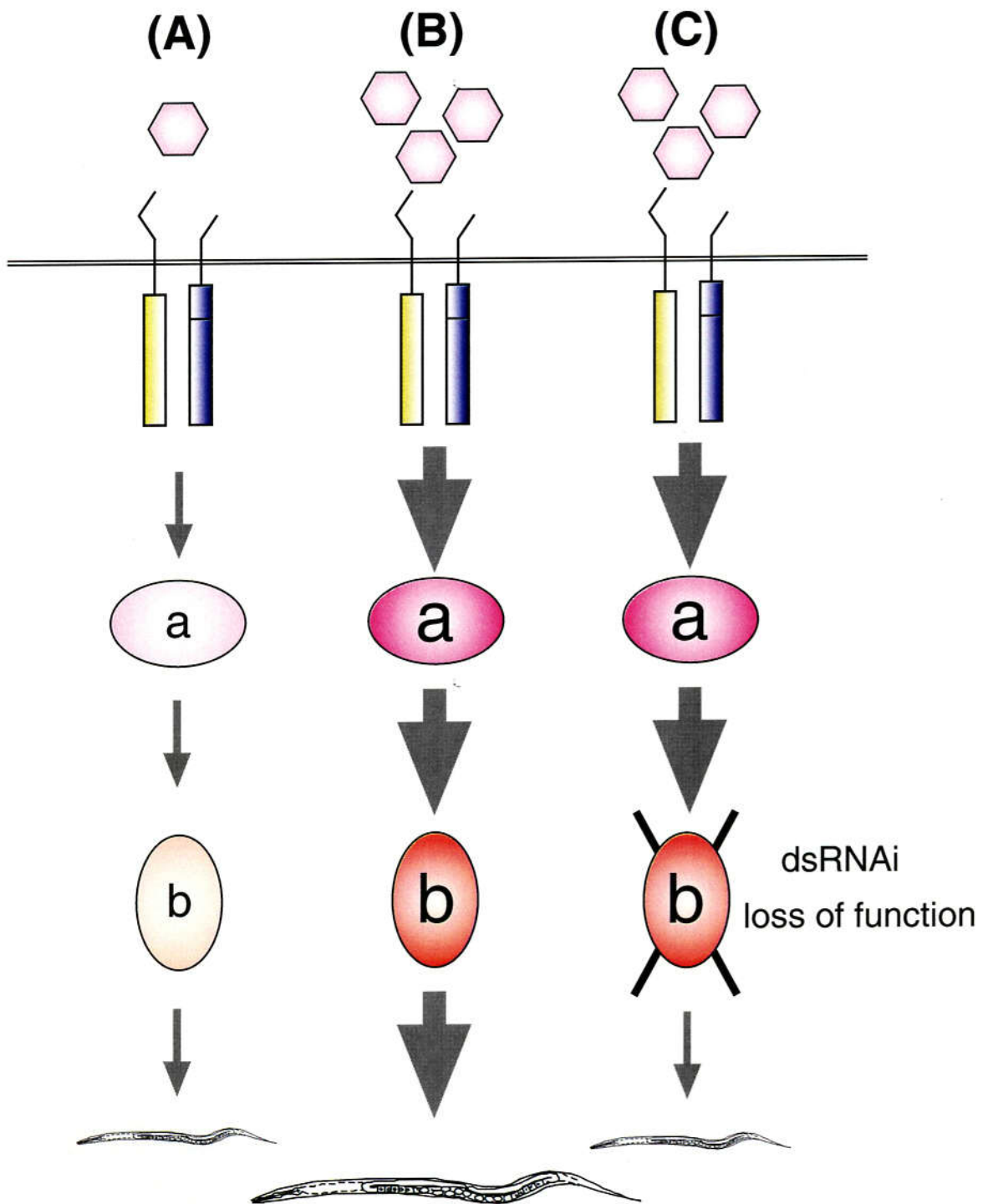


図 2-7 エピスタシス解析の原理

- (A) 正常なシグナル伝達 (B) リガンドの過剰発現により形態異常が起こる
(C) リガンド下流のシグナル伝達因子の発現を抑制すると形態は野生型に戻る

ガンドからの過剰なシグナルが抑制されるため野生型の形態に戻る（図 2-7 C）。換言すると、リガンドを過剰発現している個体（図 2-7 C）に対して細胞内シグナル伝達因子（図 2-7 の b の分子）の発現を dsRNAi によって抑制することで、表現型が野生型に戻れば、b の分子はリガンドの下流に存在すると考えることができる。この原理に基づいて、DBL-1 / *sma* 経路のリガンドである DBL-1 の過剰発現変異体 *dbl-1(++)* に対する BIP dsRNAi の作用を検討した。図 2-8 (A) に示すように *dbl-1(++)* mutant の体長は 1.53 ± 0.06 mm（平均 \pm 標準偏差）であり野生型に比べて約 1.3 倍長い *Lon* (*long*) の表現型を示す。これに対し BIP dsRNA をインジェクションした群では図 2-8 (B) に示すように 1.33 ± 0.08 mm と体長が短くなり、*dbl-1(++)* の表現型を抑制することが明らかとなった。このことは DBL-1 過剰発現によるシグナルが BIP dsRNAi により抑制されたことを意味する。この結果から BIP はリガンドである DBL-1 より下流で機能することが示された。最後に、BIP が DBL-1 の下流でしかも *sma* 経路に存在することを確認するために *lon-1* に対する BIP dsRNAi の作用を検討した。現在までに DBL-1 / *sma* 経路の標的遺伝子として知られているものは少ないが、LON-1 は DBL-1 / *sma* 経路の下流にあって負の調節を受けている（Morita, 未発表）。そこで LON-1 の欠失変異体である *lon-1* に対し BIP dsRNA をインジェクションして作用が現れるかどうか検討したところ、*lon-1* の体長が 1.51 ± 0.05 mm であるのに対し、BIP dsRNA をインジェクションした群では 1.55 ± 0.07 mm と、dsRNAi の効果は全く認められなかった。この結果から、BIP は *sma* 経路において *lon-1* より上流に位置するものと考えられた。以上のように、*dbl-1(++)* および *lon-1* 欠失変異体に対する BIP dsRNAi の結果から、(1) BIP は *sma* 経路に関与すること (2) BIP はリガンドである DBL-1 より下流かつ LON-1 より上流で機能することが明らかとなった。このことは、第 1 章で示したように BIP が BRA-2 と相互作用することと良い一致を示すものと考えられる。図 2-9 に線虫の DBL-1 / *sma* 経路における BIP の役割について模式的に示す。

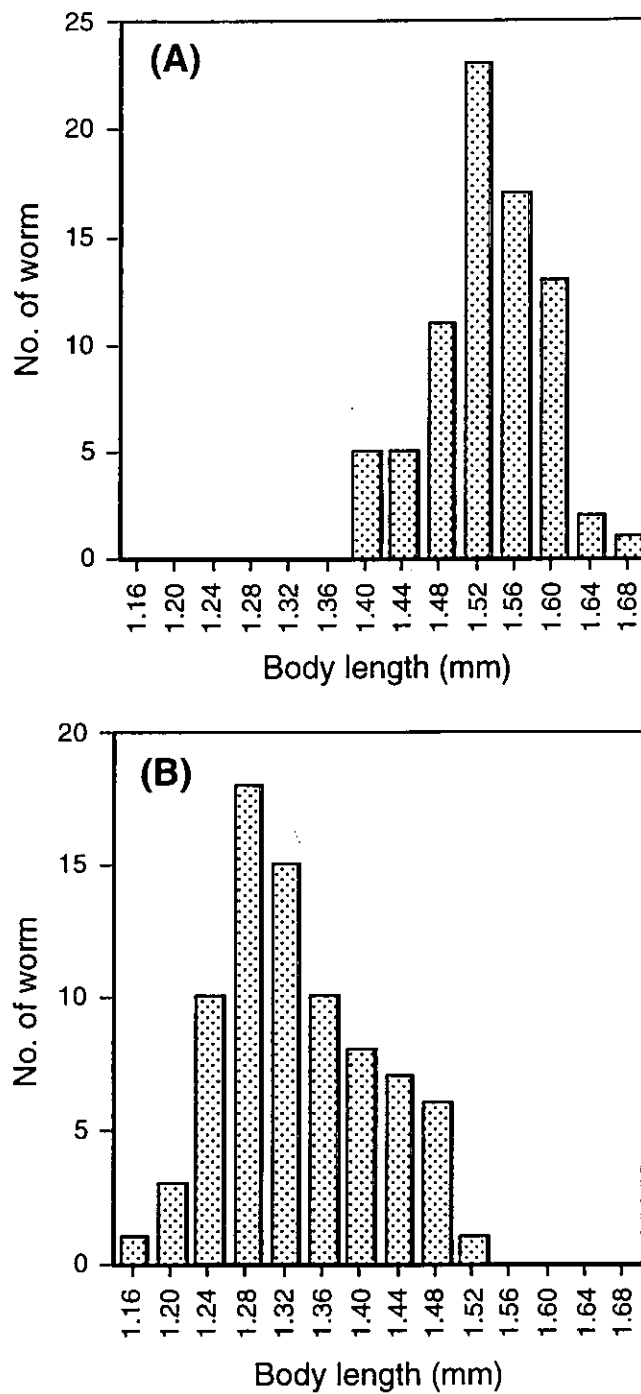


図 2-8 *dbl-1(++)* に対する BIP dsRNAi の作用

(A) *dbl-1(++)* の体長 (1.53 ± 0.06 mm, $n=77$) (B) BIP dsRNA をインジェクションした *dbl-1(++)* の体長 (1.33 ± 0.08 mm, $n=79$) リガンドである DBL-1 の過剰発現により体長が長くなっている *dbl-1(++)* に対し、BIP dsRNAi によって体長が短くなったことから BIP が DBL-1 の下流にあることが示唆された。

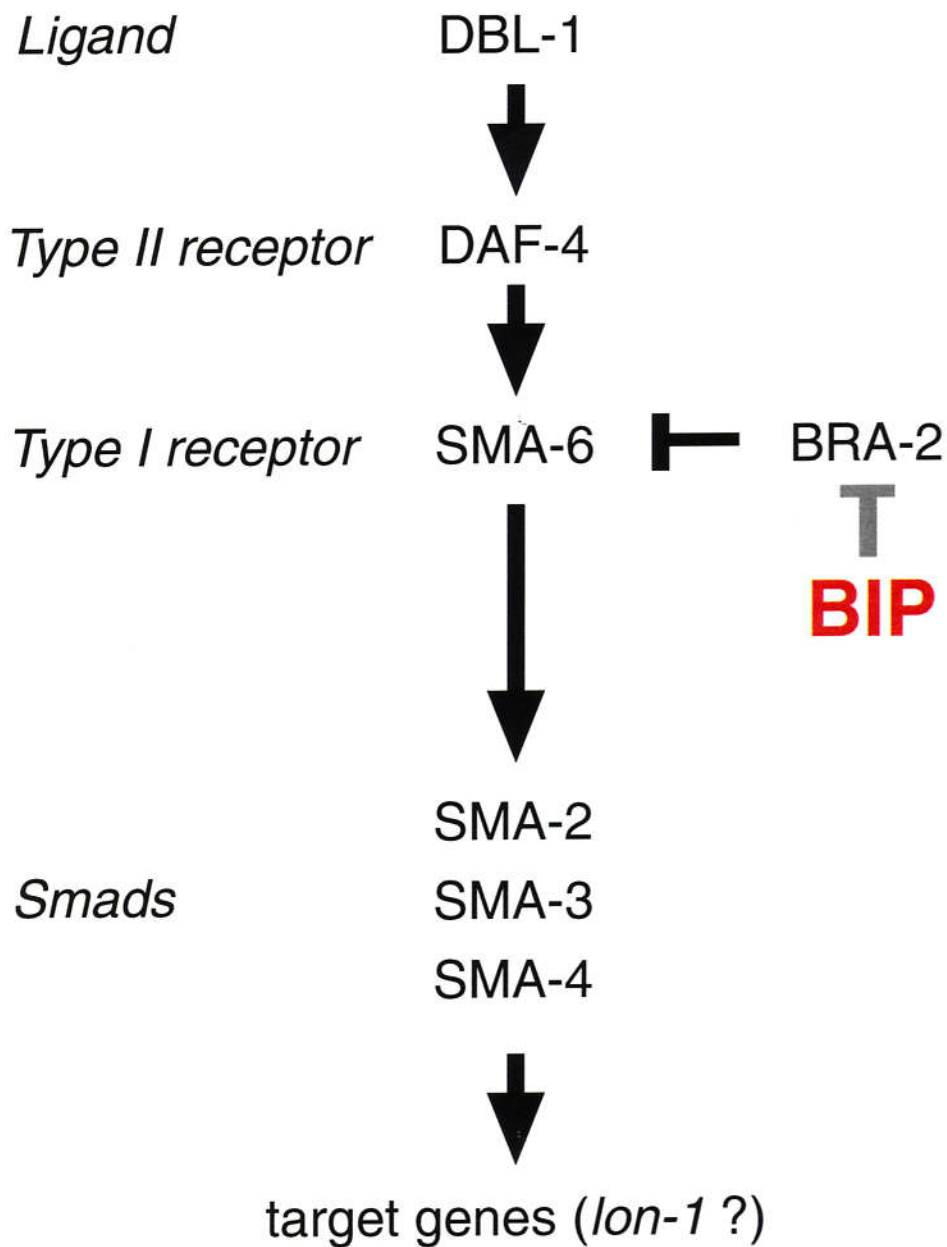


図 2-9 *C. elegans* BIP の *sma* 経路における役割

sma 経路に対してネガティブに作用する BRA-2 の機能を BIP が抑制することで結果的に *sma* 経路を正に調節している可能性を示す

2-3 考察

TGF- β スーパーファミリーは様々な生物の発生過程において重要な役割を果たしており、その作用は線虫、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、マウスなどをモデル動物として詳細に検討されている。そして、その基本的なシグナル伝達経路、即ちリガンド、type I および type II の二種類の受容体、細胞内シグナル伝達因子 Smad、そして標的遺伝子という基本経路が種を越えて良く保存されていることが明らかになっている。今回筆者は BRAM を bait に用いてこれに結合する分子をスクリーニングしたが、BRAM も human, *Xenopus*, *C. elegans* にホモログが存在し、その中で初めにクローニングされた human BRAM は BMP type IA 受容体および TAB1 に結合することが報告されている (Kurozumi et al., 1998)。 *C. elegans* においては BRA-1, BRA-1 の 2 種の BRAM ホモログが存在し、human BRAM を含めてその C 末端側が非常に良く保存されている。線虫においては TGF- β スーパーファミリーのリガンドとして DAF-7, DBL-1, UNC-129, TIG-2 が存在すると考えられているが、BRA-1 および BRA-2 はこれらのうち DAF-7, DBL-1 のシグナル伝達を調節すると考えられている。

BRA-1 は DAF-7 / *daf* 経路の type I 受容体である DAF-1 に結合し、シグナルを負に調節することが明らかとなっている (Morita et al., 論文改訂中)。BRA-1 は DAF-1 の発現と同様、主に神経系 (amphid neuron, phasmid neuron) に発現している。一方、DBL-1 / *sma* 経路は線虫の体長調節に関わっている。BRA-2 はこの経路の type I 受容体である SMA-6 と相互作用してシグナルを負に調節していると考えられており、BRA-2 の発現は SMA-6 と同様、咽頭筋、小腸に見られる (Morita, 未発表)。

筆者は BRAM に結合する新規分子 *Xenopus* BIP をクローニングし、そのホモログが *C. elegans* にも存在することを明らかにし、さらに *C. elegans* BIP が BRA-1 および BRA-2 の両者と相互作用しうることを免疫沈降とウェスタンブロッティング

グで示した（第1章）。次に *C. elegans* BIP の組織発現パターンを調べ、BRA-1 および BRA-2 の発現パターンと比較した。BIP プロモーターに GFP を結合させたプラスミドを構築し、線虫に強制発現させて蛍光を観察したところ、BIP は咽頭筋、hypodermis に強く発現するとともに尾部神経系にも発現が認められた。また whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションでは咽頭筋に強いシグナルが観察された。この発現パターンは上述の BRA-1 および BRA-2 の両方の発現部位とオーバーラップしており、*C. elegans* BIP が BRA-1, BRA-2 の両者と相互作用する可能性が示された。

C. elegans BIP が BRA-1, BRA-2 と相互作用することから、BIP は BRA-1, BRA-2 を介して DAF-7 / *daf* 経路あるいは DBL-1 / *sma* 経路に関与することが考えられた。そこで次に dsRNAi により BIP 機能欠失の表現型を観察した。dsRNAi は比較的簡便に機能欠失の表現型を観察できる方法として線虫で始めに報告され（Fire et al., 1998）、次いでショウジョウバエ（Kennerdell and Carthew, 1998）、ゼブラフィッシュ（Wargelius et al., 1999）、マウス（Wianny et al., 2000）等でも報告されているほか、線虫においては dsRNAi を用いて網羅的に機能欠失の表現型を検討した報告もある（Fraser et al., 2000; Gonczy et al., 2000）。また作用メカニズムについても研究が進んでおり、細胞内に取り込まれた dsRNA が dsRNA 特異的ヌクレアーゼにより 21-23 塩基のフラグメントに切断されたのち sense 鎖と anti-sense 鎖とに開裂し、anti-sense 鎖が mRNA に特異的に結合したところで mRNA がヌクレアーゼによって分解されるため翻訳が阻害されるものと考えられている（Zamore et al., 2000; 図 2-5）。

図 2-6 に示したように、野生株に BIP dsRNA をインジェクションしたところ明らかに体長の短い個体が出現したので、完全に成虫になる 7 日目に体長を測定したところ体長が短くなる *Sma* の表現型であることが確認された。前述のように BIP は BRA-2 と結合することと、組織発現が *sma* 経路のシグナル伝達因子とオーバー

ラップしていることから、BIP が BRA-2 を介して *sma* 経路を調節している可能性が高いと思われたので、このことを確かめるために *sma* 経路の変異体に対する dsRNAi の作用を検討した。*sma* 経路のリガンドである DBL-1 の過剰発現変異体 *dbl-1(++)* は Lon (long) の表現型を示すが、これに対し BIP dsRNAi を行うと体長が短くなり Lon の表現型が抑制された (図 2-8)。このことは、DBL-1 の下流に BIP が存在することを示唆する。さらに *sma* 経路の細胞内シグナル伝達因子である SMA-2, SMA-3, SMA-4 よりも下流に存在する LON-1 分子の機能欠失変異株 *lon-1* に対する BIP dsRNAi の作用を検討したところ、この場合は作用が見られなかったことから (データは示さず)、先の *dbl-1(++)* の結果と合わせて BIP は DBL-1 より下流かつ LON-1 より上流で機能し *sma* 経路に作用していることが明らかとなった。BIP の作用点としては、BIP が BRA-2 と結合することと、BRA-2 および SMA-6 と組織発現が一致すること、そしてエピスタシス解析の結果から考えると、図 2-9 に示したように type I 受容体である SMA-6 に作用して *sma* 経路を負に調節している BRA-2 に対して、BIP が抑制的に機能することにより、結果的に *sma* 経路を正に調節している可能性が最も高いと考えられる。BIP の作用点をより詳細に解明するためには BIP と SMA-6, SMA-2, SMA-4, SMA-4 との相互作用を分子生物学的手法あるいは遺伝学的手法によって検討する必要があると考えられた。

現在のところ線虫の体長を調節するメカニズムには不明な点が多いが、*daf-4* および *sma-2* 変異体を用いた検討で、線虫の体の外枠とでもいうべき hypodermis について細胞数は野生型と差は見られないが endoreduplication (核の倍数化) に異常が起こり、これらの変異体では hypodermis の DNA 量が野生型に比べて低いことが報告されている (Flemming et al., 2000)。線虫の全ての体細胞は孵化の時点で二倍体 (diploid) であり、ほとんどの体細胞が成虫においても二倍体であるのに対し、小腸細胞と hypodermis については成長過程で endoreduplication が起こり、

成虫では多倍体 (polyploidy) となってそれに比例して細胞が大きくなっていることが知られている (Hedgecock et al., 1985)。従って *sma-2* および *daf-4* 変異体においてはこの endoreduplication が障害され hypodermis が小さいままで体長が短くなるものと推定されている。これらについても詳細なメカニズムは今後の課題ではあるが、hypodermis には SMA-6, BRA-2, BIP が発現していることから DBL-1/*sma* 経路のシグナル伝達と hypodermis における endoreduplication の関連について興味を持たれる。

本研究において線虫の TGF- β シグナル伝達に関わる新規分子 BRAM interacting protein をクローニングし、この分子が線虫の体長調節を制御する DBL-1/*sma* 経路に関与していることを明らかにしたが、今後のさらなる課題としては BIP の作用メカニズムの詳細な検討、oxysterol binding protein 様モチーフの機能、*daf* 経路における BIP の役割などを解明してゆくことが重要であると思われる。

3-1 結語

本研究により明らかにされたことを以下に示す。

1. yeast two-hybrid スクリーニングにより, TGF- β シグナル伝達系に関わる新規分子, BIP (BRAM interacting protein) をクローニングした。
2. BIP は *Xenopus*, *C. elegans* において高い相同性を示した。
3. *C. elegans* BIP は 733 アミノ酸をコードし, oxysterol binding protein に極めて類似したモチーフを有していた。
4. *C. elegans* BIP は BRA-1, BRA-2 と結合することが明らかとなった。またその結合部位は BRA-1, BRA-2 および human BRAM で極めて高い相同性を示す C 末端側であった。
5. *C. elegans* BIP の発現部位は咽頭筋, hypodermis, 尾部神経であり, これらは BRA-1, BRA-2 の発現部位と一致することから, BIP は BRA-1, BRA-2 の両者と相互作用するものと考えられた。
6. *C. elegans* BIP の機能欠失で体長が短くなる *Sma* の表現型を示したことから, *C. elegans* BIP は線虫の体長調節に関与していると考えられた。
7. *sma* 経路の変異体に対する BIP dsRNAi の結果から, BIP は *sma* 経路に関与して体長を調節しているものと考えられた。

参考文献

- Albert PS, Brown SJ, Riddle DL (1981). Sensory control of dauer larva formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* **198**, 435-451.
- Attisano, L., Wrana, J.L. (1998) Mads and Smads in TGF β signalling. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 188-94.
- Brenner S (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 269-271.
- Chen X, Rubock MJ, Whitman M. (1996) A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature* **383**, 691-6.
- Colavita A, Krishna S, Zheng H, Padgett RW, Culotti JG (1998). Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF- β . *Science* **281**, 706-709.
- Derynck, R., Zhang, Y., Feng, X.H. (1998) Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* **95**, 737-40.
- Estevez M, Attisano L, Wrana JL, Albert PS, Massague J, Riddle DL (1993). The daf-4 gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Nature* **365**, 644-649.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Flemming AJ, Shen ZZ, Cunha A, Emmons SW, Leroi AM (2000) Somatic polyploidization and cellular proliferation drive body size evolution in nematodes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 5285-90.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-30.
- Georgi LL, Albert PS, Riddle DL (1990). daf-1, a *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase. *Cell* **61**, 635-645.
- Golden JW and Riddle DL (1984). A pheromone-induced developmental switch in *Caenorhabditis elegans*: Temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent processes. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 487-492.
- Gonczy P, Echeverri G, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, Copley RR, Duperon J, Oegema J, Brehm M, Cassin E, Hannak E, Kirkham M, Pichler S, Flohrs K, Goessen A, Leidel S, Alleaume AM, Martin C, Ozlu N, Bork P, Hyman AA. (2000) Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**, 331-6.
- Gunther CV, Georgi LL, Riddle DL. (2000) A *Caenorhabditis elegans* type I TGF β receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development. *Development* **127**, 3337-47.

- Hedgecock E. M. and White J. G. (1985) Polyploid Tissues in the Nematode *Caenorhabditis elegans* *Dev. Biol* **107**, 128-133.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-71.
- Inoue T, Thomas JH. (2000) Targets of TGF- β signaling in *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Dev Biol* **217**, 192-204.
- Janowski, BA ., Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* **383**, 728-31.
- Kennerdell JR, Carthew RW. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.
- Kim RH, Wang D, Tsang M, Martin J, Huff C, de Caestecker MP, Parks WT, Meng X, Lechleider RJ, Wang T, Roberts AB. (2000) A novel smad nuclear interacting protein, SNIP1, suppresses p300-dependent TGF- β signal transduction. *Genes Dev*, **14**, 1605-16.
- Krishna S, Maduzia LL, Padgett RW (1999). Specificity of TGF- β signalling is conferred by distinct type I receptors and their associated SMAD proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **126**, 251-60.
- Lisa L. Maduzia, Pradnya Shetgiri, Srikant Krishna, Cathy Savage-Dunn, Huang Wang, Richard W. Padgett (2000) Cloning and Characterization of lon-1, a gene downstream of TGF β signaling involved in body size regulation. *East Coast Worm Meeting abstract* 44
- Liu JH, Wei S, Burnette PK, Gamero AM, Hutton M, Djeu JY. (1999) Functional association of TGF- β receptor II with cyclin B. *Oncogene*. **18**, 269-75.
- Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S, Zhou Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev*, **13**, 2196-206.
- Massagué, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-91.
- Massagué, J. (2000) HOW CELLS READ TGF- β SIGNALS. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 169-178.
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991). Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* **10**, 3959-3970.
- Mochii M, Yoshida S, Morita K, Kohara Y, Ueno N (1999). Identification of transforming growth factor- β -regulated genes in *caenorhabditis elegans* by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 15020-5.

- Morita K, Chow KL, Ueno N (1999). Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF- β family. *Development* **126**, 1337-1347.
- Nakai K and Horton P (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- Padgett, R.W., Das, P., Krishna, S. (1998) TGF- β signaling, Smads, and tumor suppressors. *Bioessays* **20**, 382-90.
- Patterson GI, Kowek A, Wong A, Liu Y, Ruvkun G. (1997) The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF- β -related receptor signaling in the *Caenorhabditis elegans* dauer pathway. *Genes Dev* **11**, 2679-90.
- Patterson, GI and Padgett RW (2000). TGF- β related pathways roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends in Genetics* **16**, 27-33.
- Ren P, Lim CS, Jhonsen R, Albert PS, Pilgrim D, Riddle DL (1996). Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF- β homolog. *Science* **274**, 1389-1391.
- Riddle DL, Swanson MM, Albert PS. (1981) Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature* **290**, 668-71.
- Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. (1996) *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**, 790-4.
- Savage C, Scott R, Townsend, Huang Wang, Richard W. Padgett (1996) LOOKING FOR OTHER ROLES IN DEVELOPMENT FOR TGF- β PATHWAY COMPONENTS. *Worm Breeder's Gazette* **14**, 38.
- Savage-Dunn C, Tokarz R, Wang H, Cohen S, Giannikas C, Padgett RW. (2000) SMA-3 smad has specific and critical functions in DBL-1/SMA-6 TGF β -related signaling. *Dev Biol* **223**, 70-6.
- Schroepfer GJ Jr (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* **80**, 361-554.
- Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K. (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- β signal transduction. *Science*, **272**, 1179-82.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.
- Suzuki Y, Yandell MD, Roy PJ, Krishna S, Savage-Dunn C, Ross RM, Padgett RW, Wood WB (1999). A BMP homolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **126**, 241-250.

- Swanson MM, Riddle DL. (1981) Critical periods in the development of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *Dev Biol* **84**, 27-40.
- Tavemarakis N., Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genet* **24**, 180-183.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2046.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., Wrana, J.L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell* **95**, 779-91.
- Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF- β family with the immunophilin FKBP-12. *Science*, **265**, 674-6.
- Wang T, Danielson PD, Li BY, Shah PC, Kim SD, Donahoe PK. (1996) The p21(RAS) farnesyltransferase α subunit in TGF- β and activin signaling. *Science*, **271**, 1120-2.
- Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. (1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 156-61.
- Whitman, M. (1998) Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily. *Genes Dev* **12**, 2445-62.
- Wianny F, Zernicka-Goetz M. (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* **2**, 70-5.
- Xu W, Angelis K, Danielpour D, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Stavnezer E, Medrano EE. (2000) Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type β transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**, 5924-9.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. (1999) A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**, 687-93.

謝辞

本研究を行うにあたり厳しくも暖かく御指導いただき、また学生生活に対する様々な御配慮をいただきました基礎生物学研究所・形態形成研究部門の上野直人教授に感謝致します。また実験の遂行にあたり直接の御指導御鞭撻をいただきました同・澁谷浩司助教授（現・東京医科歯科大教授）に感謝致します。

本学位論文を審査いただきました基礎生物学研究所の諸橋憲一郎教授および山森哲雄教授に感謝致します。

実験にあたり yeast two-hybrid スクリーニングを御指導いただきました名古屋大学理学部の松本邦弘教授、田中美歩さんに感謝致します。さらに線虫の実験を懇切に御指導いただきました森田清和博士に深謝致します。最後に学生生活を様々な面で支えていただきました形態形成研究部門の皆様と、遠い札幌から暖かく励ましていただきました両親に感謝致します。