

氏 名 菅 原 桂

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第536号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 BIP(BRAM interacting protein)のクローニングと線虫
C.elegans における機能解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 諸橋 憲一郎
教授 上野 直人
教授 山森 哲雄

論文内容の要旨

生物の発生過程においては、多種多様の成長因子や細胞内シグナル伝達因子がダイナミックに機能して生物固有の形や器官の構造を形成していることが分かってきた。なかでも TGF- β スーパーファミリーに属する TGF- β , activin, BMP などは、細胞増殖, 分化誘導, 背腹軸決定, 骨形成などにおいて多彩な生理活性を示す。TGF- β スーパーファミリーの作用機構は線虫, ショウジョウバエ, アフリカツメガエル, マウスなどで詳細に研究されており, その基本経路は種を越えて良く保存されていることが明らかとなっている。TGF- β シグナル伝達を担う分子は, 細胞外にあるリガンド, 細胞膜上に存在する type I および type II の 2 種類の受容体, そして受容体によって活性化されてシグナルを核内へ伝達する Smad 分子である。これらのように種を越えて共通に使われるシグナル伝達分子の他に, 最近ではシグナル特異性を決定するような修飾分子や種特異的な分子もクローニングされており, シグナル伝達系の全貌が明らかになりつつあるとともに, 種間の多様性を議論することも可能になりつつある。彼は TGF- β シグナル伝達に関わる新規分子を取得することを目的として, yeast two-hybrid スクリーニングにより BMP receptor associated molecule (BRAM) に結合する因子, BRAM interacting protein (BIP) をクローニングした。元来 BRAM は BMP type IA 受容体の細胞内ドメインおよび TAB1 (TAK1 binding protein 1) に結合するシグナル伝達因子であり, これに結合する因子は TGF- β シグナル伝達系に関与することが予想され, 初期発生においても重要な役割を果たしているものと期待された。

最初に yeast two-hybrid スクリーニングによってアフリカツメガエルの cDNA ライブラリから BIP をクローニングし, その配列をもとに相同タンパクを検索したところ, BIP ホモログはヒト, アフリカツメガエル, 線虫 *C. elegans* に存在していた。線虫においては既に BRAM ホモログとして BRA-1, BRA-2 がクローニングされており, *C. elegans* BIP がこれらと相互作用することが期待されたので, *C. elegans* をモデル動物として BIP の機能解析を行うこととした。完全長 cDNA の塩基配列から, *C. elegans* BIP は 733 アミノ酸をコードしており, シグナル配列は持たないことから細胞内タンパクであると推定された。モチーフ検索の結果, oxysterol binding protein モチーフ (E-[KQ]-x-S-H-[HR]-P-P-x-[STACF]-A) に極めて似た配列 (EQVSHHPVSS) が存在したが, 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たため, *C. elegans* BIP がコレステロール代謝などに作用を有するかどうかは今のところ不明である。また, *C. elegans* BIP の遺伝子は X 染色体上に存在し, 11 エクソンから成ることが明らかとなった。次に *C. elegans* BIP と BRAM の線虫ホモログである BRA-1, BRA-2 の相互作用を検討するために免疫沈降とウェスタンブロットティングを行ったところ, *C. elegans* BIP は BRA-1, BRA-2 の両者と結合することが明らかとなった。BRA-1, BRA-2 の結合部位は C 末端側であり, この部分は human も含め BRAM ホモログで相同性が高い部分であることから, BIP が BRAM ホモログの C 末端側と結合することは種を越えて保存されているものと考えられた。次に *C. elegans* BIP の組織発現を検討した。BIP プロモーター領域に GFP 遺伝子を結合させたプラスミドを構築し, 野生型の線虫に強制発現させたところ, 咽頭筋と hypodermis で強い発現が見られたほか, 尾部の神経細胞にも発現が認められた。尾部神経での発現は, 線虫の *daf* シグナル伝達経路 (線虫の生育環境が悪化した場合などに dauer larva と呼ばれる耐性幼虫へ移行する際

のシグナル伝達経路)の type I 受容体である DAF-1 およびそれに結合する BRA-1 の発現部位とオーバーラップするものであり、また、咽頭筋と hypodermis での発現は、*sma* シグナル伝達経路(線虫の体長を制御するシグナル伝達経路)の type I 受容体である SMA-6 およびそれと相互作用すると考えられる BRA-2 の発現部位と重なっていた。前述の BIP と BRA-1 および BRA-2 が結合するという結果と、組織発現がオーバーラップするという結果から、*C. elegans* BIP は BRA-1 あるいは BRA-2 を介して *daf* 経路あるいは *sma* 経路に関与している可能性が考えられた。

次に *C. elegans* BIP の機能解析のため、double stranded RNA interference (dsRNAi) という手法を用いて BIP の機能欠失(loss of function)を検討した。野生型の線虫に BIP dsRNA をインジェクションし、F1 を観察したところ体長の短い個体が認められた。測定の結果、野生型の体長は 1.18 ± 0.09 mm (平均±標準偏差)であるのに対し、BIP dsRNA をインジェクションした群では 1.00 ± 0.09 mm と、BIP の機能欠失によって体長の短い *Sma* (small)の表現型を示すことが明らかとなった。このことから BIP は BRA-2 と相互作用して *sma* 経路を調節している可能性が示唆された。そこで次に BIP が *sma* 経路に関与していることを確かめるために、*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 の作用を検討したところ、*dbl-1(++)* の体長は 1.53 ± 0.06 mm であったが、これに BIP dsRNAi をインジェクションした群の体長は 1.33 ± 0.08 mm と顕著に短くなっていた。このことは、リガンド DBL-1 の過剰発現によりシグナル伝達が過剰になっている *sma* 経路に対して、BIP の発現を dsRNAi で抑制したためにシグナルが正常に戻ったことを示すものと考えられた。さらに、*sma* 経路の標的遺伝子の 1 つと考えられる *lon-1* の機能欠失変異体について dsRNAi を行ったが、この変異体に対しては作用が全く認められなかったことから、*C. elegans* BIP は *sma* 経路においてリガンド DBL-1 より下流かつ標的遺伝子である LON-1 より上流で機能することが確認された。先に述べたように BIP が BRA-2 と結合することと、type I 受容体である SMA-6 および BRA-2 と組織発現が一致することを考えると、BIP は BRA-2 に作用して SMA-6 を介した *sma* 経路を調節しているものと思われた。今後のさらなる課題としては遺伝学的解析および分子生物学的解析による *C. elegans* BIP の作用メカニズムの詳細な検討、oxysterol binding protein 様モチーフの機能の解明および *daf* 経路における BIP の役割などを明らかにしていくことが重要であると考えられた。

論文の審査結果の要旨

生物の発生過程においては、多種多様な成長因子や細胞内シグナル伝達因子がダイナミックに機能して生物固有の形や器官の構造を形成している。なかでも TGF- β スーパーファミリーに属する TGF- β , activin, BMP などは、細胞増殖, 分化誘導, 背腹軸決定, 骨形成など多彩な生理活性を有している。TGF- β スーパーファミリーの作用機構は線虫, ショウジョウバエ, アフリカツメガエル, マウスなどで詳細に研究されており, その基本経路は種を越えて良く保存されていることが明らかとなっている。しかし, シグナルの特異性を決定するような修飾分子の存在や機能など, シグナル伝達系の全貌については不明な点が多い。

申請者は TGF- β シグナル伝達メカニズムの詳細を明らかにするために, BMP type IA 受容体の細胞内ドメインおよび TAB1 (TAK1 binding protein 1) に結合し BMP シグナルを調節する既知因子 BMP receptor associated molecule (BRAM) と相互作用する新規因子をツメガエル cDNA ライブラリーより yeast two-hybrid スクリーニングによって探索した。その結果, BRAM interacting protein (BIP) を同定し, BRAM の C 末端に結合することを明らかにした。また, 線虫 *C. elegans* に存在する相同遺伝子の全長 cDNA クローニングを行い, その遺伝子構造を明らかにするとともに, 線虫 BIP が線虫における BRAM 相同因子で daf 経路あるいは sma 経路を調節すると考えられている BRA-1, BRA-2 の C 末端側に結合することを確認し, 両者の相互作用が種を越えて保存されていることを示した。また, BIP プロモーター領域に GFP 遺伝子を結合させたプラスミドを構築し, 野生型の線虫に強制発現させることにより, BIP 遺伝子は咽頭筋と上皮細胞, 尾部の神経細胞に発現すること, またこの発現は線虫 TGF- β シグナル伝達に必須の type I 受容体である DAF-1 および SMA-6 の発現とよく一致することを示した。類似した組織発現や物理的相互作用から *C. elegans* BIP も線虫は BRA-1 あるいは BRA-2 を介して daf 経路あるいは sma 経路に関与している可能性が考えられたことから, 申請者は特異的 RNA 破壊法を用いて同分子が TGF- β シグナル伝達経路を制御していることを検討した。野生型の線虫に BIP 二重鎖 RNA をインジェクションし, F1 を観察したところ野生型の体長に対し体長の短い個体が認められた。すでに Sma-6 を介する経路は線虫の体長を調節することが知られており, この結果は BIP が BRA-2 に作用して SMA-6 を介した sma 経路を調節していることを示すものである。

これらの研究成果は TGF- β シグナル伝達経路に新規因子 BIP が関わっていることを明らかにしたものであり学術的な意義が大きい。また審査会での質疑に対しても申請者は的確に応答したことから, 関連分野において十分な知識を有しているものと判断し, 学位授与にふさわしいと判断した。

学位論文として提出された研究成果に付いて口頭発表させた後, 審査委員が論文内容に付いて試問した。また, 関連分野の一般知識, 及びその背景となる基礎知識に付いても口頭試問により審査を行った。これらの質問に対する申請者の応答はいずれも的確なものであった。また, 提出された学位論文は日本語で書かれていたが, 申請者は既に国際誌に数遍の論文を発表しており, 英語に関する能力に付いても十分であると思われた。これらの結果をもとに, 審査委員会は申請者の持つ研究能力及び, 学力は学位取得に値するものと判断した。