

■ はじめに

■ 研究テーマ

- ▶ 現在進行中のテーマ
- ▶ 過去の研究成果

■ メンバー

■ 研究業績リスト

■ ラボ写真

■ 小型魚類を使った医学・薬学研究

■ お問い合わせ

■ アクセス

- 国立大学法人群馬大学 [📍](#)
- 群馬大学生体調節研究所 [📍](#)
- 細胞競合 [📍](#)

NLKと共に歩んできた研究人生

NLK人生その1 「NLKとの出会い」



石谷が如何に恵まれているか。
そういう話である。

あらかじめ言うておくが、NLKの話にはなかなか到達しない。
しかし、そこに至るまでの諸イベントのうち、ひとつでも欠けていれば、わたしはNLKに出会うことはなかった。

研究室入門

名古屋大学理学部分子生物学科（いまはもうない学科）の松本邦弘教授の研究室に卒業研究性として入った。

学部2，3年の時の松本先生の授業は、知識詰め込みとは全く無縁であり、「提示されたデータから、可能性を推測したり、次に試すべき実験を考えたりする」という、基礎研究の醍醐味に触れることができるエキサイティングなものだった。また、「基礎研究をやるとしても、少しでも人の役に立つようなことをしたい」という欲望を満たす研究を行っていたのは、松本先生の研究室しかないと感じていた（最近、「人の役に立ちたいという中途半端な考えをもった学生が多い」とおっしゃる先生方もいらっしゃるが、私は、しごく普通の考え、モチベーションだと思う。）。この二つの理由が研究室選択の決め手となった。

研究室に入ってから、当時研究室の助手(現准教授)であった久本直毅先生のご指導のもとで、線虫C. elegansと酵母を使ったシグナル伝達研究を学ばせていただいた。私は二つの研究テーマをいただいていた。一つは、「神経細胞に発現する新規細胞骨格結合蛋白質の線虫ホモログの機能解析」、もう一つは、「松本研究室でクローニングされた新規MAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAP3K)であるTAK1の線虫ホモログの機能解析」である。前者は、卒論で発表する仕事となったが、論文にはできず、一方で後者は、その後の人生を左右する仕事となった。ここでは、この後者の仕事の話をしたい。

TAK1は、松本研究室の大先輩である、山口京子さんや入江賢児先生（現筑波大学教授）らによって同定されたMAP3K (Science, 1995) である。TAK1は、その結合蛋白質であるTAB1 (Science, 1996) とともに機能し、下流のMAPK経路を活性化することが知られていた。しかしながら、当時はTAK1のノックアウトマウスもなく、TAK1の生理機能は全く不明であった。そこで、遺伝子機能阻害が容易にできる生物である線虫を用い、TAK1の生理機能の解析を行うことになった。TAK1の機能解明はラボのメインテーマであり、たとえ線虫とはいえ、私は結構燃えていた。

初めてのクローニングに苦戦

まず、線虫TAK1のクローニングを行った。「ゲノム配列からTAK1のmRNA配列を推測し、それをもとにプライマーを設計し、cDNAライブラリにPCRをかける」という方法をとった。PCRはうまくかかり、クローニングは成功したかに見えた。しかしながら、なんとPCRかけても500bpにつき、1, 2個、mutationが入ってしまっていた。当時は増幅効率と正確性の両方が良いtaqではなく、増幅効率のよいtaqを使うとmutationが入り、正確性をとると増幅できないという状態であった。しかも、今振り返ってみても原因はよくわからないが、人よりも高頻度でmutationが入ってしまっていた（実験が下手だっただけ？）。周りの人に「呪いかもしれないから神社におはらいに行くように」と冗談(?)を言われてしまうほどの不可解な高頻度mutationがおきていた。これに対しては、久本先生がNucleic Acid Research誌に掲載されていた論文を参考に解決法を考えてくれた。それは、PCRでcDNAを増やすのではなく、cDNAライブラリから直接cDNAを引っ張り出してくるという方法だった。簡単に説明すると、目的のcDNAの配列に相補的なオリゴを合成し、これにビオチンを付け、これをcDNAにまずハイブリさせる。そして、そこにアビジンのついた磁石をくっつけ、できたcDNA-オリゴ-ビオチン-アビジン-磁石複合体を永久磁石で吸いつけるという方法である。これにより、TAK1ホモログのクローニングに成功することができた。そして、TAK1-like kinase-1 (TLK-1) という名

前をつけた。

この失敗続きの間、久本先生に違う仕事の手伝いもさせてもらっていた。「線虫のMAPKホモログをゲノムデータベースからブラストサーチで片っ端から見つけてくる」という仕事の手伝いである。これが後々生きてきた（後述）。

「GFPによる可視化」と「酵母ツーハイブリッドスクリーニング」を体験

線虫は、透明な無脊椎動物であり、GFPをつかった可視化に非常に適したモデル生物である。私は、TLK-1の生理機能を推測するために、TLK-1のプロモーター領域とGFP遺伝子を融合したコンストラクトを線虫に導入し、TLK-1の発現を可視化した。GFPの発現は、線虫の成長と共にダイナミックに変化した。私はその美しさに感動した。

また一方でTLK-1の分子機能を明らかにする目的で、TLK-1をベイトとした酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。その結果、哺乳動物におけるTAK1のパートナーであるTAB1のホモログをTLK-1結合蛋白質としてとることができた。このことから、TLK-1はやはりTAK1のホモログである、ということを確認できた。また、TAK1-TAB1の関係が種を越えて保存されていることがわかった。加えて、「初めてのスクリーニングで期待通りのものが取れるなんて、おれってツイテルかもしれない」とこのとき初めて思った。

松本研究室の最初の8カ月で、「モデル動物」「クローニング」「可視化」「スクリーニング」と、現代の生命科学研究において必須のアプローチを体験することができ、また、それらの実験結果の解釈を行うという貴重な体験をすることができた。さらに、松本先生は「私のわがまま」を聞いてくださり、ここまでの成果を12月の分子生物学会大会でポスター発表するというチャンスをいただいた。これにより、多くの人に自分の研究をプレゼンするという体験を早期に行うことができた。

このように、松本研究室での一年目は、とてつもなく濃い一年だった。今考えれば、「最初の研究室にここを選んでいなければ、今の自分はない」と、間違いなく言える。実際、現在の自分の研究スタイルは「モデル動物」「可視化」「スクリーニング」から成り立っているし、論理的思考の展開もこの研究室で鍛えられたものが今の基本となっている。

「RNAi」を体験。でも……………

他の生物種に先駆けて、線虫ではRNAiが効くということが早くから知られていた。この当時は、double-strand RNAを導入するという方法ではなく、single-strand antisense RNAを導入するという方法が採られていた。私（このころはM1）もこれに倣い、線虫の生殖巣にTLK-1 mRNAに対するantisense RNAを導入し、TLK-1機能阻害個体の作製を試みていた。そして、胚が孵化せずに死ぬということを発見していた。しかしながら、発生物学的素養がなかった私には、この異常がどういった異常であるのかを解析することができなかった。

渡りに舟とはこのことか？

私が悶々とした日々を過ごしていたところ、突然ラッキーの神が舞い降りた。それは、オレゴン大学のBruce Bowerman博士からの松本先生からのメールがきっかけだった。メールの内容を要約すると、「内胚葉誘導に異常が生じて中胚葉が余分にできる線虫変異株mom-4の原因遺伝子を同定したら、TAK1のホモログだった。お前らのところもTAK1の線虫ホモログやっとなんじやないの？どんくらい進んだら？いっしょにやる??」ということだった。ここまでで持っていたデータのうち、Bowerman博士らが持っていないデータは、「TAK1ホモログ（TLK-1）とTAB1ホモログ（TAP-1）のcDNA全長配列」、「in vitroでTLK-1とTAP1が結合する」、「TAP-1はTLK-1の酵素活性を活性化する」、「TLK-1がMAPKKをリン酸化してMAPK経路を活性化する能力を持つ」、のみであった。が、松本先生の交渉能力もあり、すんなり共同で論文を出す運びとなった。

この時点では、私の研究テーマは、Bowerman博士のグループに吸収された状態であったので、完全な敗北ではないものの、結構悲しい気分になっていた。しかしながら、ここから雪だるま式に話は膨らんでいき、私の幸運はピークを迎えていく。。

NLKとの出会い

Bowerman博士らのグループは、mom-4と全く同じ表現型を示す線虫変異株lit-1にも注目していた。同じ表現型ということは同じ経路で働いている可能性が強いからだ。彼らは、lit-1の原因遺伝子を見事に同定し、それがショウジョウバエのNemoのホモログであることを発見した。NemoはMAPKに似た蛋白質をコードしている。ここで、「あれれ？」と思った。以前、線虫のMAPKをゲノムデータベースから探していたときに、Nemoが引っ掛かってきていて、なんじゃこりゃと思って論文を読んでいたことを思い出した。おかげで、すんなりlit-1の話に入ることができた。

[ここで、皆さまに誤解されやすいので、一度説明させていただきたい。このNemoはNF κ B 制御因子のNEMOではない！NemoはKoreaの言葉で「四角」を意味する。ショウジョウバエのNemo変異体は、個眼の形状が四角になる（正常個体では六角？まちがってたらごめんさい）ため、この名前が付いている。]

この時点で、mom-4とlit-1の関係、mom-4とlit-1による内胚葉中胚葉形成制御の分子メカニズムなどを解明すれば、良い論文になる可能性が見えてきた。しかしながら、線虫の研究はBoweman研究室のほうに一日の長（一万日の長？）があるので、私たちが線虫で解析を続けることに意味があまりないと考えていた。そこで、共同研究は続けて、遺伝学的解析はBoweman研究室にお任せして、こちらはいっそ、哺乳動物のTAK1とNemoホモログ（NLK!）を使って、哺乳動物におけるTAK1とNLKの関係とその機能を調べていこう、という話になった。

NLK人生その2 「Road to Nature Cell Biology 2010」

あまりに長くきつかったNature Cell Biology (NCB)受理への道、迷惑かけた人に謝りながら振り返る。（全部かくの大変なので、少しずつ書き足します。）

2002年初頭 「NLKターゲット探索にいたるきっかけ」

MCBに論文を通すため、NLKをHEK293細胞から免疫沈降してin vitro kinase assay、CBB染色の毎日。そんな中、CBB染色を眺めてて、いつもNLKと一緒に落ちてくる蛋白質があるのが異常に気になる。

培養細胞実験のsupervisorだった辻順先生に「気になるんですよ」と話すと、「ゲルから切り出して何か調べたら？」とsuggestionをいただいた。

そんなことができるのか？と私は思った。

その頃はまだ田中耕一先生もノーベル賞を取っておらず、質量分析器（マス）はやっとはやり始めたところだった。

また、名古屋大学理学部にも、あいば先生の研究室に質量分析器が入ったばかりのころだった。

2002年春-2003年 「NLKターゲット探索」

そうこうしているうちに、辻先生はアメリカで独立してしまい、辻グループはほぼみんなアメリカについて行ってしまった。

一人っきになってしまった石谷は、博士号を取って松本研ポスドクになり、NLKに関する2本の論文もMCBにとおりそうであったので、つぎのNLK研究の展開を考えていた。

「CBB染色の結果から考えると、NLKにくっつくものはたくさんありそうだし、Tcf/LefのほかにもNLKのターゲットはあるんじゃないか??」

「でも、NLKって酵素だよな？」

「酵素って、ターゲットと反応したら結合が外れるって言うよな??」

「ふつうにNLKの結合蛋白質を共免疫沈降でとってその中にはターゲットは含まれていない??」と悶々とした日々を過ごす。

とりあえず、方法だけ考えた。

～リン酸化酵素ターゲット探索法～

1. FLAGタグ付きNLKとリン酸化酵素活性を欠く変異FLAG-NLK(FLAG-NLK KN)をHEK293で作る。
2. 1 x 1 0 E 8 個の細胞抽出液をとる
3. 1 と 2 を混ぜて抗FLAG抗体でIP (免疫沈降) する。(ここで、EGTA入りでIPするのが大事)
4. IP産物を二つに分け、一方をin vitro kinase assay後にSDS-PAGEし、もう一方はin vitro kinase assayをせずにSDS-PAGEをすぐにしてCBB染色する。
CBB染色でNLKとNLK KNの両方にくっついている蛋白質を同定する。さらにin vitro kinase assayのオートラジオグラフィーをみて、NLK結合蛋白質についてNLKはリン酸化するが、NLK-KNはリン酸化しないものを絞り込む。これにより、NLKが結合して直接リン酸化するものを同定する。
5. 4 でみつけたターゲット候補をCBB染色したゲルから切り出して質量分析器にかける。

大切なトリックは、3にある。

単にNLKを細胞に発現させてNLKをIPしても、NLKのターゲットは共にIPされない。

なぜなら、NLKのターゲットの多くはNLKのリン酸化を細胞内で受けてNLKと離れてしまう可能性が高いからだ。そこで、ターゲットはNLKを発現させていない大量のHEK293 (内在性NLK少ない) からとることにした。

また、1 と 2 を混ぜた液にEGTAを入れることで、リン酸化反応に必要なMg²⁺イオンを働かなくし、さらにIPを低温で行うことで、1 と 2 の混合液中でNLKの酵素反応を起こらなくした。

というふうに、方法は考えたものの、松本研ポスドクとしてやっていたもう一つのテーマ「TAK1-binding protein 3(TAB3)」の解析が忙しくなり、NLKの仕事は保留していた

(TAB3の仕事、海外の3つくらいのグループと競争していた)。

そんななか、大学院生を一人、つけてもらえることになった。

私はその大学院生、**鈴木さん**にNLKのターゲット探索をやらせてもらっちゃったことになった。

非常に彼女は優秀で、いまだ松本研で誰もやったことのない質量分析を見事に習得した。

さらに、私が強制した「拷問のような”1 x 1 0 E 8 個の細胞抽出液をとる”という作業」を根性でやってくれた。

今思えば、よくあんなきつい実験やってくれたな、と思う(ほんと、ごめんなさい)。

(横にそれるが、私が学生やスタッフに厳しいのは、鈴木さんをスタンダードにしているせいかもしれない。ようするに、求めるハードルが高くなっちゃってます)

そして、さらに凄いことに、NLKのあたらなターゲットとして、**Notch3**を同定してくれた。

正直、うそだろーーと思った。

Wntシグナルの次にNotchシグナルなんてそんなラッキーはあり得ないと思った。

まず、Notch3 (その活性化型、Notch3ICD) の転写活性にNLKによるリン酸化が影響を与えるかどうかをHEK293あるいはHeLa細胞を用いたLuciferase assayでしらべた。

しかしながら、まったくNLKの影響はなかった。

やっぱりアーティファクトかあ? と思いながら、月日は過ぎて行き、結局、鈴木さんの修士卒業まで大きな進展はなかった。

しかし、アーティファクトじゃないかと思いつつも、やめられず、いろんな条件でLuciferase assayを続けた。

そんな中、ある日突然道が開けた。

それは、コントロールとして使っていた**Notch 1**、**その転写活性をNLKが抑制する**という発見だった。

さらに、NLKがNotch1の細胞内領域に結合し、直接リン酸化することも分かった。

あとでわかったが、最初のスクリーニング法でNotch3だけでなくNotch2もNotch1もNLKの結合蛋白質として取れていて、たまたま読めたのがNotch3だったということだった。

しかしながら、やはりNLKがNotchを本当に生体で抑制しているのかが信じられなかった。

私は散々1998年から2003年にかけて培養細胞に遺伝子を過剰発現させて解析する手法をやってきたが、このころには過剰発現実験の限界を痛感するようになり、自分のたてたモデルが現実の生理現象を反映してないのではないかという不安に駆られていた。

理研CDBの日比先生(シグナル伝達研究の若手実力者の一人だった)がホームページ上でゼブラフィッシュをつかった個体研究に方向転換された理由を記述されていて、それをみてやはり個体で実験しないと何も言えないよなどの思いを強くした。

2004-2006年「ゼブラフィッシュにおいてNLKはNotchシグナルを抑制する」

恐ろしいことに、NLKとNotchの関係が知りたい、個体でやりたいと思っていたところ、ゼブラフィッシュでNotchの研究をしているNIHの伊藤先生が名古屋大学で独立されることが決まった。海外留学も考えていたが、このような偶然、そして、自分の研究の流れを完全に断ちたくないという思いもあり、名古屋大学の松本研究室から同じ名古屋大学の伊藤研究室に移籍した。

幸い、松本先生と伊藤先生のご厚意とご支援でNLKの研究をサイドワーク的に続けることができた。その間、NrarpというNotchシグナルの抑制因子の解析をゼブラフィッシュで行い、ゼブラフィッシュを使ったNotch研究が理解できるようになった。（これも恐ろしいことに、Notchの研究をしていたら自分の得意領域のWntシグナルに話が行ってしまうというラッキーがあった。が、これはまた別のお話）

そして、またまた、学生を一名付けてもらえることになった。

その学生、平尾さんにゼブラフィッシュにおいてNLKをノックダウンし、Notchシグナルへの影響、そしてNotchシグナルに依存した神経分化抑制への影響をしらべてもらった。

ここでまた、超ラッキー！！

NLKのノックダウン胚は、Notchシグナルが過剰活性化し、神経細胞が減少していた。

つまり、神経発生において、**NLKがNotchシグナルを抑制し、神経発生を促進していることが判明**した。

ここでやっと、自分たちのやってきた研究が意味があるものだと確信できた。また、この仕事は、「鈴木さんのガッツ」と「平尾さんの運んできたラッキー」に依存しているといえる。

しかしながら、「NLKがNotchシグナルを抑制する分子機構」はまだ明らかにできていなかった。また、NLKはNotch以外の分子もリン酸化するので、NLKノックダウン胚の表現型がNotchシグナルの異常のみに依存したのか確認がなかった。

平尾さん、そしてもう一人の学生磯田さんと「NLKがNotchシグナルを抑制する分子機構」について解析を行ったが、結局、これを解明できなかった。

そうこうしているうちに、学術振興会特別研究員PDの任期が近づいてきた。

結婚もして、研究者というとなんでもない人生をどう歩んでゆくか、相当悩んだ。

そんななか、「若手研究者の自立的な研究環境整備促進」というプログラムが開始されるのを知った。このままどっかの研究室の助手になるのも良いが、だれが、NLKの研究をするんだ？という思いがあった。ほっておいても、面白い酵素だから誰かが研究を始めるだろうとは思ったが、この世でいちばんNLKと苦楽を共にしてきたのは自分であるという自負があった。

PIになるという意識より、NLK道を更に究めたいという思いから、このプログラムに応募した。

(以降続きはまた)

