

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

松本 邦弘

(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

「発生における器官・形態形成と細胞分化の分子機構」

1. 研究実施の概要

近年の多細胞生物における個体構築の分子機構に関する研究から、形態形成・器官形成の過程には、線虫、ショウジョウバエから高等脊椎動物に至るまで、種を越えて共通なシグナル分子による統一的な機構が存在することが明らかになってきた。従って、線虫やショウジョウバエをモデル動物とした発生・分化を規定するシグナル分子によるシグナル伝達ネットワークの解明は、脊椎動物における形態形成・器官形成の制御機構解明に大きく寄与することが期待される。シグナル伝達研究は、増殖因子受容体のシグナル伝達経路でERK型MAPキナーゼ (MAPK) カスケードの存在を明らかにし、さらにERK型とは異なるJNK型、p38型MAPKカスケードが、高等脊椎動物において発生、分化、アポトーシス等を制御していることが明かとなり、MAPKカスケードに関する研究はシグナル伝達研究の中心的な地位を占めるようになった。JNK型、p38型MAPKカスケードは、線虫やショウジョウバエの系においても、発生、分化、形態形成の制御に関与していることから、高等脊椎動物におけるMAPKカスケードによる発生・分化の制御機構を解明する上で良いモデル系になるものと期待される。

本研究グループは、我々が開発した分子遺伝学的手法により哺乳類の新規MAPKカスケードのシグナル伝達因子TAK1を発見し、TGF- β 及びIL-1シグナル伝達経路で機能することを明らかにした。さらに、線虫と動物細胞において、TAK1を介した新規MAPKカスケードが、Wntシグナル伝達経路と関連しながら発生・分化を制御していることが明らかになった。このように、TAK1という新規シグナル伝達因子の発見をスタートとして、さらなるシグナル伝達因子群の発見・同定を行い、TAK1カスケードの解析を通して、発生・分化を制御するシグナル伝達経路解明への手掛りを得た。本研究計画では、これらの成果をさらに発展させ、発生過程におけるMAPKカスケードを中心とした細胞運命、細胞極性、形態形成の制御機構の解明を第1の目的とし、さらに新規シグナル伝達因子群の同定と、発生・分化における機能解析を行い、発生・分化の分子機構のネットワークの解明を目指す。

2. 研究実施内容

(1) 線虫におけるp38 MAPKカスケードの役割

線虫 *C. elegans* の NSY-1-SEK-1-PMK-1/2 から成る p38 MAPK カスケードは、神経細胞においてその非対称的な分化に必須であることを明らかにした。本年度、このカスケードの別の組織における機能を調べたところ、このカスケードの変異株では腸におけるシュードモナス菌などの感染に対する抵抗性が低下していることが判明した。また、神経系では NSY-1-SEK-1-PMK-1/2 から成るカスケードの上流でカルシウムに依存した CaMKII の活性化が関与するが、腸における感染抵抗性には関与していなかったことから、同じカスケードが異なる組織では異なるシグナルおよび上流のシグナル因子によって制御されていることが明らかになった。また、MLK スーパーファミリーの因子である ZAK、MLK、DLK MAPKKK の線虫ホモログについて解析を行った。まず、ZAK ホモログである *zak-1* について、その発現パターンを解析した結果、線虫の咽頭筋、腸、excretory canal などでの発現が観察された。*zak-1* 遺伝子破壊株を作成したところ、*zak-1* ホモ個体は L1 幼虫期で生育停止をおこすことが判明した。この表現型について詳細に解析した結果、L1 幼虫期での生育停止の原因は、咽頭筋での摂食運動の異常による摂食阻害であることが判明した。さらに、同様の表現型を示す MAP キナーゼの変異株として、線虫 p38 MAPK のホモログである PMK-2 の変異株を同定した。以上の結果から、線虫内で ZAK-1 は PMK-2 とシグナル伝達カスケードを構成している可能性が示唆された。一方、線虫の MLK ホモログである MLK-1 と、DLK ホモログである DLK-1 についても解析を行った。これらの遺伝子破壊株を作成して、その表現型を調べたところ、MLK-1 の遺伝子破壊株では銅などの重金属に対して感受性になることが判明した。また、DLK-1 の破壊株では、それ単独では重金属に対して感受性を示さないものの、MLK-1 と二重変異株にするとその感受性が増大することが判明した。そして、その感受性は線虫の MAPKK のホモログである *mek-1* 変異株の感受性と同程度になった。従って、MLK-1 と DLK-1 は協調して MEK-1 の上流で機能すると考えられる。

(2) アフリカツメガエル初期胚における ERK MAPK カスケードの役割

ERK は古典的な Ras/MAPK 経路を形成する MAPK であり、アフリカツメガエル初期胚においては主に FGF シグナルの下流で中胚葉の誘導とその維持あるいは神経誘導に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、優勢不能型 FGF レセプターを発現するトランスジェニック胚を用いた解析から、FGF シグナルは中胚葉誘導及び神経誘導に関与しないという報告があり、FGF シグナル及び Ras/MAPK の重要性に関しては未だ不明である。そこで、アフリカツメガエル ERK2 (初期胚においては ERK2 のみが働いている) に対する antisense morpholino oligonucleotide (ERK-MO) を作製し、初期胚における ERK の役割を解析した。ERK-MO を 4 細胞期胚背側領域にインジェクションすると、頭部を欠失した表現型が得られた。初期脳に特異的に発現するマーカーを用いて whole-mount in situ hybridization した結果、forebrain 及び midbrain を含む初期脳の大部分が欠失していることが明らかとなった。さらに、ERK-MO をインジェクションした胚ではオーガナイザーが形成される原腸胚期に、オーガナイザー特異的な遺伝子である *chordin* 及び *noggin* などの発現が消失してい

ることが明らかとなった。chordinやnogginはBMPシグナルを阻害することで神経を誘導することが知られている。上記の結果は、ERK-MOをインジェクションした胚でBMPシグナルの阻害が正常に行われなかった可能性を示唆している。この考えと一致するように、ERK-MOによる頭部欠失は優勢不能型BMPレセプターを共発現させることによってレスキューされた。以上の結果から、ERK/MAPキナーゼ経路はアフリカツメガエル初期胚においてシュペーマンオーガナイザーの形成に重要な役割を果たし、その結果正常な初期脳の形成に必要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(3) アフリカツメガエル胚発生におけるPar (partitioning defective) 遺伝子の機能解析

アフリカツメガエル囊胚遺伝子ライブラリーからPar-1 (xPar-1) を単離し、その胚発生における機能解析を行った。xPar-1は785個のアミノ酸から成り、ヒトPar-1bとアミノ酸レベルで79%の相同性を示した。また、RT-PCRによりxPar-1が初期胚で継続的に発現することが分かった。野生型xPar-1をアフリカツメガエル胚の動物極側に過剰発現させ、アニマルキャップアッセイをおこなった。一般にアニマルキャップをアクチビン処理すると、中胚葉が誘導されるとともに原腸陥入時の細胞運動と類似した組織の伸張が見られることが知られている。野生型xPar-1の過剰発現により、このようなアクチビンによるアニマルキャップの伸張は著しく阻害されたが、中胚葉の誘導に関しては阻害されなかった。すなわち、xPar-1は組織の分化ではなく、原腸陥入における細胞運動を制御することが示唆された。また、野生型のxPar-1をアフリカツメガエル胚の背側赤道領域に発現させ尾芽胚期まで培養すると、体軸が短く背側に屈曲した表現型が観察された。さらに、xPar-1の機能が原腸陥入に必要なものであるか検討するために、優勢不能型のxPar-1あるいはxPar-1のM0による実験を行なった結果、原腸陥入の阻害が観察された。これらの結果から、Par遺伝子群は脊椎動物の発生段階の初期において、原腸陥入の制御に必要なことが示唆された。

3. 研究実施体制

松本研究グループ

- ① 研究分担グループ長：松本 邦弘（名古屋大学大学院理学研究科、教授）
- ② 研究項目：TAK1の発生・分化における機能解明

西田研究グループ

- ① 研究分担グループ長：西田 育巧（名古屋大学大学院理学研究科、教授）
- ② 研究項目：発生・分化を制御するショウジョウバエシグナル伝達因子の探索・解析

澁谷研究グループ

- ① 研究分担グループ長：澁谷 浩司（東京医科歯科大学 難治疾患研究所、教授）
- ② 研究項目：XenopusでのNLKによる頭部形成機構の解析

福田研究グループ

- ① 研究分担グループ長：福田 真（京都大学大学院生命科学研究科、助手）
- ② 研究項目：Xenopusと哺乳類培養細胞を用いて、生化学的手法によりシグナル因子

の分離

辻研究グループ

- ① 研究分担グループ長：辻 順（ノースカロライナ州立大学）
- ② 研究項目：動物細胞における細胞運命決定を制御するシグナル伝達経路の解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., **Matsumoto, K.**, Tan, M-W., and Ausubel, F. M.
A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. **Science** 297, 623-626 (2002).
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P. A., Vale, R. D., **Matsumoto, K.**, and Herskowitz, I.
The Khd1 protein, which has four KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. **EMBO J.** 21, 1158-1167 (2002).
- Tanaka-Hino, M., Sagasti, A., Hisamoto, N., Kawasaki, M., Nakano, S., Ninomiya-Tsuji, J., Bargmann, C. I., and **Matsumoto, K.**
SEK-1 MAPKK mediates Ca^{2+} signaling to determine neuronal asymmetric development in *C. elegans*. **EMBO Rep.** 3, 56-62 (2002).
- Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., Ninomiya-Tsuji, J., **Matsumoto, K.**, and K., Sakurai, N.
Receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL, activates TAK1 MAPKKK through a signaling complex containing RANK, TAB2 and TRAF6. **Mol. Cell. Biol.** 22, 992-1000 (2002).
- Jiang, Z., Nonomiya-Tsuji, J., Qian, Y., **Matsumoto, K.**, and Xiaoxia, L.
IRAK-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. **Mol. Cell. Biol.** 22, 7158-7167 (2002).
- Komatsu, Y., Shibuya, H., Takeda, N., Ninomiya-Tsuji, J., Yasui, T., Miyado, K., Sekimoto, T., Ueno, N., **Matsumoto, K.**, and Yamada, G.
Targeted disruption of the *Tab1* gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis. **Mech. Dev.** 119, 239-249 (2002).
- Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman,

M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J., and **Matsumoto, K.**

The TAK1-NLK MAPK cascade functions in the Wnt-5a/Ca²⁺ pathway to antagonize Wnt/ β -catenin signalling.

Mol. Cell. Biol. 23, 131-139 (2003).

- Sanjo, H., Takeda, K., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., **Matsumoto, K.**, and Akira, S.

TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for IL-1 signaling.

Mol. Cell. Biol. 23, 1231-1238 (2003).

- Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., and **Matsumoto, K.**

Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by MAP kinase-related NLK-dependent phosphorylation in Wnt/ β -catenin signalling.

Mol. Cell. Biol. 23, 1379-1389 (2003).

- Li, M. G., Katsura, K., Nomiyama, H., Komaki, K., Ninomiya-Tsuji, J., **Matsumoto, K.**, Kobayashi, T., and Tamura, S.

Regulation of the interleukin-1-induced signalling pathways by a novel member of protein phosphatase 2C family (PP2C ϵ).

J Biol. Chem. 278, 12013-12021 (2003).

- Ninomiya-Tsuji, J., Kajino, T., Ono, K., Ohtomo, T., Matsumoto, M., Shiina, M., Mihara, M., Tsuchiya, M., and **Matsumoto, K.**

A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase.

J. Biol. Chem. 278, 18485-18490 (2003).

- Takaesu, G., Surabhi, R. M., Park, K-J., Ninomiya-Tsuji, J., **Matsumoto, K.**, and Ganor, R. B.

TAK1 is critical for I κ B kinase mediated activation of the NF- κ B pathway.

J. Mol. Biol. 326, 105-115 (2003).

(2) 特許出願

なし