

「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JNK/p38 MAPKカスケードの役割：線虫のMAPKホスファターゼとして、新

規にVHP-1を同定した。vhp-1遺伝子破壊をおこなったところ、vhp-1欠失ホモ個体は幼虫初期から中期の間において発生を停止することが判明した。さらに、この発生停止は線虫MAPKカスケードの構成因子であるMLK-1 (MAPKKK)、MEK-1 (MAPKK)、KGB-1 (JNK MAPK) の変異によって抑圧された。このことから、VHP-1はMLK-1 - MEK-1 - KGB-1キナーゼカスケードを抑圧することにより、幼虫初期での発生停止がおきないように制御する因子であると考えられる。さらに、KGB-1経路の下流の因子を探索する目的で、線虫KGB-1と結合する因子のスクリーニングを行い、線虫FOS-1 (Fos transcription factorのホモログ)を同定した。fos-1遺伝子破壊を行ったところ、fos-1欠失ホモ個体は後期発生過程の異常および生殖細胞の成熟の異常が見られた。生殖細胞の成熟異常は、kgb-1変異体においても高温下において観察されることから、FOS-1はKGB-1カスケードで機能していることが考えられる。

(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：Xenopus初期胚を用いたスクリーニングから、ERK経路のnegative feedback regulatorであるSproutyのXenopusホモログ (xSpry1) を単離した。また、ほ乳類培養細胞を用いた研究から、SproutyがFGF刺激依存的にチロシンリン酸化されERK経路を阻害することを明らかにした。Sproutyは刺激依存的なリン酸化という翻訳後修飾によって、その阻害活性を発揮するという新しいタイプのnegative feedback regulatorである。このようなSproutyの作用機序の分子メカニズム解明に加え、実際の生体内でSproutyがどのような機能を果たしているのか解析すべく、本研究でXenopus初期胚を用いた解析を行った。xSpry1は原腸胚において、中胚葉が形成される帯域に特異的な発現が見られた。また、神経胚では神経板の後方、尾芽胚では前脳の前 (anterior neural ridge: ANR)、中脳と後脳の境界 (midbrain-hindbrain boundary: MHB) などに発現が見られた。これらの発現パターンは、FGF mRNAの発現パターン及びERKの活性化領域と重複していることが明らかとなった。中胚葉が形成される領域にSproutyの発現及びERKの活性化が見られることから、中胚葉形成におけるSproutyとERKの機能を解析した。アニマルキャップを用いて解析したところ、野生型SproutyはFGF刺激によるERKの活性化をより一過的にし、優勢不能型Sproutyはより持続的にすることが明らかになった。また、ERKの活性化の持続時間と一致するように背側中胚葉遺伝子Chordinの発現が変化することを見い出した。原腸胚期ERKは背側領域でのみ活性化がみられることから、Sproutyは腹側領域でERKの活性化を抑制している可能性が考えられる。実際優勢不能型Sproutyを腹側に発現させると異所的に背側中胚葉遺伝子Chordinを誘導することが明らかとなった。さらに、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いて背側でERKをknockdownさせると、オーガナイザー領域におけるChordinの発現が減少し、結果として頭部構造の欠失した表現型が得られることが明らかになった。以上のことから、Xenopus原腸胚においてERK経路はオーガナイザーが形成される背側領域で持続的に活性化し、Chordinを誘導するのに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、ERK経路のnegative feedback regulatorであるSproutyは腹側で機能し、ERKの活性化を抑制していることが示唆された。このように、中胚葉形成に必要なNodal

シグナル経路に加え、ERK経路の活性化が背腹軸に沿った細胞の分化に重要である事が明らかとなった。

(3) 哺乳動物における細胞運命決定にかかわるシグナル伝達経路の解析：これまでの研究によって、哺乳動物細胞において Wnt5A-Ca²⁺-CaMKII-TAK1 MAPKKK-NLK MAPK-like kinase経路がWnt-β-cateninシグナル伝達経路を負に制御することを明らかにしてきた。今年度は、1) TAK1とNLKの間で働くkinaseの同定とその役割を明らかにすること、2) この経路がWnt-β-catenin経路の転写因子TCFを制御する分子機構を同定することを目指し研究を進めた。その結果、NLKに結合するキナーゼとしてHIPK2を単離し、TAK1がHIPK2を介してNLKを活性化することを見出した。また、石井俊輔教授との共同研究によって、Wnt-1経路にTAK1 - HIPK2 - NLK経路が働くことを明らかにした。Wnt-1シグナルはTAK1-HIPK2を介してNLKを活性化し、活性化されたNLKはc-Mybをリン酸化しユビキチン化を介した分解を引き起こすことを見出した。さらに、Mybの分解は細胞分化を誘導することを見出した。従って、TAK1 - HIPK2 - NLK経路はTCFだけでなくMybも制御し、形態形成の複数の過程において働いていると考えられる。また、NLKによるTCFのリン酸化部位を同定した。このリン酸化部位の変異株を作成し解析した結果、NLKによって2つのアミノ酸残基をリン酸化されたTCFはβ-cateninと複合体を作るがDNAに結合できなくなり、その転写活性が可能が失われることを明らかにした。

3. 研究実施体制

松本研究グループ

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）

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

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）

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

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）

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

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）

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

研究分担グループ長：辻 順（ノースカロライナ州立大学）

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

- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., **Matsumoto, K.**, and Davis, R. L.
Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*.
Science 302, 1765-1768 (2003).
- Suzawa, M., Yanagisawa, J., Takada, I., Ohtake, F., Ogawa, S., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., **Matsumoto, K.**, and Kato, S.
Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression of PPAR γ function through the TAK1/TAB1-NLK mediated cascade.
Nature Cell Biol. 5, 224-230 (2003).
- Nakada, D., **Matsumoto, K.**, and Sugimoto, K.
ATM-related Tell associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism.
Genes Dev. 17, 1957-1962 (2003).
- Ishitani, T., Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Shibuya, H., Gaynor, R. B., and **Matsumoto, K.**
Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling.
EMBO J. 22, 6277-6288 (2003).
- 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.
J. Biol. Chem. 278, 18485-18490 (2003).
- Nishiwaki, K., Kubota, Y., Chigira, Y., Roy, S. K., Suzuki, M., Schvarzstein, M., Jigami, Y., Hisamoto, N., and **Matsumoto, K.**
An NDPase links ADAM protease glycosylation with organ morphogenesis in *C. elegans*.
Nature Cell Biol. 6, 31-37 (2004).
- Ohkawara, B., Shirakabe, K., Hyodo-Miuraa, J., Matsuo, R., Ueno, N., **Matsumoto, K.**, and Shibuya, H.
Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF- β -mediated mesoderm induction.
Genes Dev. 18, 381-386 (2004).
- Kanei-Ishii, C., Ninomiya-Tsuji, J., Tanikawa, J., Nomura, T., Ishitani, T., Kishida, S., Kokura, K., Kurahashi, T., Ichikawa-Iwata, E., Kim, Y., **Matsumoto, K.**, and Ishii, S.
Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK.
Genes Dev. 18, 816-829 (2004).
- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., Ninomiya-Tsuji, J., **Matsumoto, K.**, and Ichijo, H.
Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation.
EMBO Rep. 5, 161-166 (2004).
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, J.W., Chui, Y.L., Huang, D.P., Chen, Z.J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W., Akira, S., **Matsumoto, K.**, Liu, Z., and Wu, Z.
Elucidation of the JNK pathway mediated by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein.
Mol. Cell. Biol. 24, 192-199 (2004).
- Naiki, T., Wakayama, T., Nakada, D., **Matsumoto, K.**, and Sugimoto, K.
Association of Rad9 with double-strand breaks through a Mec1-dependent mechanism.
Mol. Cell. Biol. 24, 3277-3285 (2004).

○ Tadauchi, T., Inada, T., **Matsumoto, K.**, and Irie, K.

Post-transcriptional regulation of H0 expression by the Mkt1-Pbp1 complex.

Mol. Cell. Biol. 24, 3670-3681 (2004).

(2) 特許出願

なし