

「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 *C. elegans* の JNK/p38 MAPK カスケード:

JNKの足場蛋白質であるヒトJIP3の線虫ホモログUNC-16は、線虫JNKのひとつJNK-1およびMAPKK JKK-1とともにシナプス小胞の局在制御に関与することがこれまでに明らかになっている。今回、UNC-16に結合する因子として、新たにキネシン軽鎖KLC-2と、オートファジーを制御するプロテインキナーゼUNC-51の結合蛋白質であるUNC-14をそれぞれ2-ハイブリッド法により同定した。培養細胞内において、UNC-16はKLC-2およびUNC-14と複合体を形成した。また、*k1c-2*および*unc-14*変異体では、*unc-16*変異体と同様にそれぞれシナプス小胞の局在が異常になった。運動神経であるD神経においてUNC-16の細胞内局在をGFPを用いて可視化したところ、野生型および*unc-14*変異体ではnerve cord全体に局在しているが、*k1c-2*変異体およびキネシン重鎖*unc-116*の変異体ではその局在が異常であった。さらに、UNC-14を同様に可視化したところ、nerve cordにおいてdot状に局在すること、そしてその局在パターンは*k1c-2*、*unc-116*および*unc-16*変異体では消失することを見出した。これらのことから、キネシンとUNC-16の複合体はUNC-14を適切な位置に局在化させることによりシナプス小胞の局在を制御すると考えられる。

(2) アフリカツメガエル初期胚における外胚葉細胞の運命決定機構:

Xenopus初期胚外胚葉は、上皮と神経の二つの組織に分化する。我々は、上皮形成に必要な転写因子XGrh13の機能解析、及び神経誘導時に発現が上昇する遺伝子の網羅的な同定／解析を行なう事で、外胚葉細胞の運命決定機構の解明を試みた。その結果、XGrh13は上皮形成に重要なBMPシグナルの下流で機能し、神経誘導に関与するWntシグナルを阻害する活性を持つことを明らかにした。XGrh13は転写因子 β -cateninの下流でWntシグナルを阻害し、Wntシグナル標的遺伝子Chordinの発現を抑制していることが明らかになった。その結果、XGrh13が発現している外胚葉腹側領域が上皮へと分化する。また、胞胚期外胚葉を切り出し細胞をバラバラに解離させると、細胞自律的に神経へと分化することが知られている。我々はこの時誘導される遺伝子群をcDNAマイクロアレイによって同定し、神経誘導に関与する遺伝子の単離およびそれらの遺伝子群を制御しているシグナル経路の検討を行なった。その結果、神経誘導時に発現が顕著に上昇する遺伝子132個を同定し、そのうち122遺伝子がPI3K経路によって制御されていることを見出した。神経誘導には他にWntシグナル、FGFシグナル、BMPシグナルが関与していることが知られており、現在これらのシグナルが制御する遺伝子群の同定と、それらの遺伝子群が機能する時期、領域を検討することで神経誘導におけるシグナルネットワークの一端を明らかにしようとして試みている。

(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:

TGF- β シグナルは、発生過程の細胞運命決定に必須の働きをする。これまでの研究において、TAK1がTGF- β シグナルで働くSnoNの制御に関わっていることを明らかにしてきた。本年度は、TAK1によるSnoN制御の分子機構の同定を目指した。まず、TAK1はSnoNのSer-115、Ser-117、Thr-119をリン酸化することを明らかにした。さらに、TAK1によるリン酸化が起こらない変異型SnoNを作製し、このリン酸化がTGF- β によるSnoNのユビキチン化を

介した分解に必須であることを見出した。これまでの結果を総合すると、TGF- β によって活性化されたTAK1が核内でSnoNと結合し、SnoNをリン酸化することによって、その分解を誘導すると考えられる。このTAK1-SnoN経路はSmad経路と協同的に働き、細胞運命決定に働く遺伝子発現を誘導すると考えられる。また、本年度から、マウスをモデル系とした哺乳動物の発生過程におけるTAK1の役割を明らかにするプロジェクトを開始した。さまざまな組織のなかで、TGF- β シグナルが重要な役割を果たすことが知られている皮膚の分化に注目し、皮膚特異的なTAK1ノックアウトマウスを作製を行った。その結果、TAK1の欠損によって皮膚の分化の制御異常が起こること、そのため皮膚特異的TAK1ノックアウトマウスは生後8-9日目で致死となることを見出した。

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（名古屋）

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

西田研究グループ（京都）

研究分担グループ長：西田 栄介（京都大学大学院生命科学研究科、教授）

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、助教授）

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

- 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).
 - Mizuno, T., Hisamoto, N., Terada, T., Kondo, T., Adachi, M., Nishida, E., Kim, D. H., Ausubel, F. M., and **Matsumoto, K.**
The *C. elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response.
EMBO J. 23, 2226-2234 (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).
 - Kim, D. H., Liberati, N. T., Mizuno, T., Inoue, H., Hisamoto, N., **Matsumoto, K.**, and Ausubel, F. M.
Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 10990-10994 (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 HO expression by the Mkt1-Pbp1 complex.

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

- Kimura, D. K., Miyawaki, A., **Matsumoto, K.**, and Mori, I.
The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming.
Curr. Biol. 14, 1291-1295 (2004).
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., **Matsumoto, K.**, and Nishida, E.
Shp2, an SH2-containing protein tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor sprouty.
J. Biol. Chem. 279, 22992-22995 (2004).
- Akiyama, S., Yonezawa, T., Kudo, T., Li, M. G., Wang, H., Ito, M., Yoshioka, K., Ninomiya-Tsuji, J., **Matsumoto, K.**, Kanamaru, R., Tamura, S., and Kobayashi, T.
Activation mechanism of c-Jun amino-terminal kinase in the course of neural differentiation of P19 embryonic carcinoma cells.
J. Biol. Chem. 279, 36616-36620 (2004).
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., **Matsumoto, K.**, Takeda, K., Ichijo, H.
ROS-dependent activation of TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity.
Nature Immunol. In press (2005).
- Kojima, H., Sasaki, T., Ishitani, T., Iemura, S., Zhao, H., Kaneko, S., Kunitomo, H., Natsume, T., **Matsumoto, K.**, Nakajima, K.
STAT3 enhances TAK1-dependent NLK activation for its Ser727 phosphorylation by acting as a scaffold specifically in IL-6 signaling.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 4524-4529 (2005).
- Sakamoto, R., Byrd, D. T., Brown, H. M., Hisamoto, N., **Matsumoto, K.**, Jin, I.
The *C. elegans* UNC-14 RUN domain protein binds to the Kinesin-1/UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization.
Mol. Biol. Cell 16, 483-496 (2005).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：4件）