

論文の内容の要旨

論文題目 Physiological roles of stress-responsive kinases, MKK4 and MKK7,
in zebrafish gastrulation

(和訳 ストレス応答性キナーゼ MKK4 と MKK7 のゼブラフィッシュ初期胚形成における役割)

氏名 徐正媛

【序】

ストレス応答性キナーゼ JNK/SAPK 系は、紫外線や熱などの物理化学的ストレスや腫瘍壊死因子 $TNF\alpha$ 、インターロイキン 1β などの炎症性サイトカインによって活性化され、免疫応答や細胞の生死の制御などに関与する重要な細胞内シグナル伝達経路である。JNK の活性化因子としては MKK4 と MKK7 の2つの上流キナーゼが存在する(図1)。これまでに、MKK4 欠損マウス、および MKK7 欠損マウスの解析から、JNK シグナル伝達系は発生や免疫系の制御に深く関与することが明らかになってきた。

私は JNK シグナル系の初期発生期における役割を詳細に研究するために、モデル生物としてゼブラフィッシュの利用を考えた。ゼブラフィッシュは脊椎動物でありながら、体外受精後短時間で発生し、その発生過程を実体顕微鏡下で観察できるという利点がある。私は本研究でゼブラフィッシュの MKK4 と MKK7 をクローニングし、JNK シグナルの初期発生における詳細な機能解析を行った。

【方法と結果】

1. ゼブラフィッシュの *mkk4*, *mkk7* をクローニング

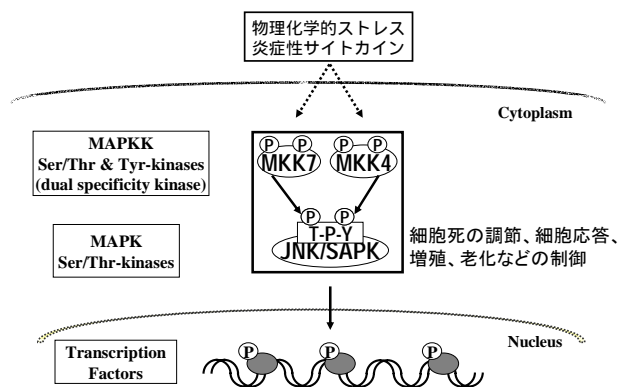


図1. JNK/SAPKシグナル伝達経路

ゼブラフィッシュのMKK4とMKK7をコードする遺伝子をデータベース上で探索し、*mkk4a*, *mkk4b*, *mkk7*の3種類の遺伝子を見出した。RACE法によりクローニングされた各遺伝子の全長は、マウスのMKK4やMKK7と80%以上の高い相同性を持ち、MAPKKKによってリン酸化される部位を保存していた(図2)。マウスのMKK7は6種類のisoformがあり、ゼブラフィッシュの初期胚から1と1を同定した。クローニングされたゼブラフィッシュのMKK4A, MKK4BとMKK7は、マウスのMKK4やMKK7と機能的にも対応する相同遺伝子であることを確認した。

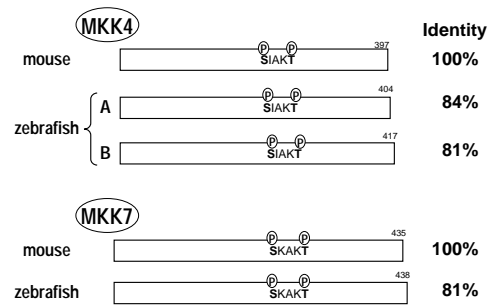


図2. ゼブラフィッシュMKK4, MKK7のクローニング

2. JNKはゼブラフィッシュの初期発生期に活性化している

発生期における*mkk4a, b*および*mkk7*のmRNAの発現を確認するために、アンチセンス鎖プローブを用いて*in-situ* hybridizationを行った。3つの遺伝子は原腸形成が行われる75%-epiboly段階とbud段階で胚全体に発現していた。ゼブラフィッシュ胚をJNKキナーゼアッセイで解析したところ、原腸形成期の胚(30%から75%-epiboly

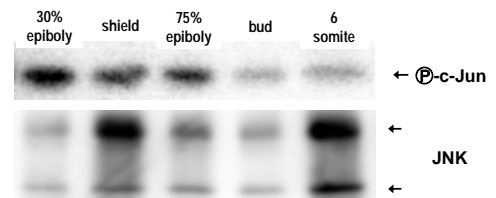


図3. 初期発生期におけるJNKの活性化

3. MKK4Bの機能阻害により、原腸形成時における収斂伸長運動に異常が生じる

細胞期のゼブラフィッシュ卵に*mkk4a, b*および、*mkk7*のモルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)をインジェクションし、機能阻害実験を行った。24時間胚(24hpf)を観察した結果、*mkk4a*のMOで処理された胚は正常であったのに対して、*mkk4b*のMOで処理した場合は体全体的な形態形成異常を示した(図4)。一方、*mkk7*のMOで処理した胚は24hpfで弱い形態形成の異常を示した。*mkk4b*の強い表現型を詳細に検討すべく、神経板細胞の縁、脊索、MHBのマーカを用いて、10時間胚の*in-situ* hybridizationを行った。その結果、*mkk4b*のMOで処理した卵は、脊索、体節などへの細胞の分化は行われていたが、MOのインジェクション量依存的に、神経板細胞の移動や脊索の伸長に異常が確認された。この結果から、MKK4Bの機能を阻害すると、初期発生段階の原腸形成時における収斂伸長(convergent extension, CE)の形態形成運動に異常が生じることが確認された。CE運動は背側中胚葉細胞がお互いの滑り込み運動によって組織の幅を収斂させ、前後方向に伸長する、胚発生の中でも最もダイナミックな形態形成運動である。

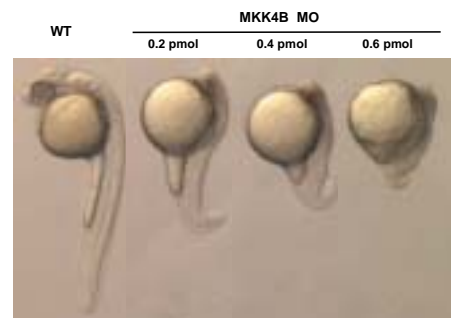
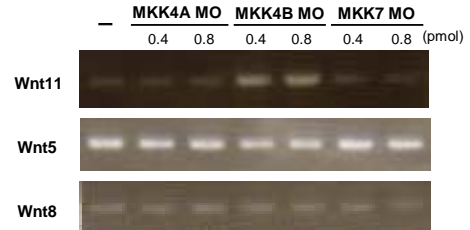


図4. MKK4Bの阻害による表現型

4. MKK4B の機能阻害により、Wnt11 の発現が上昇する

JNK が遺伝子の発現制御を行っている可能性を考え、RT-PCR で収斂伸長運動にかかわる分子の発現を検討した。関連因子である E-cadherin や Mir, Stat3, Liv1 などの分子の発現には差がなかった。また、Wnt シグナル経路に属する Wnt8 や Wnt5 の発現量にも変化はなかった。しかしながら、Wnt11 の発現量だけが MKK4B の MO をインジェクションした胚で上昇していた(図 5)。このことから、JNK は Wnt11 の発現を通常抑制的に制御していることが考えられる。Wnt11 はショウジョウバエの平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity, PCP) 経路のリガンドとして知られており、最近のゼブラフィッシュやアフリカツメガエルの解析から、PCP 経路が脊椎動物では CE 運動の制御を行っていることが示唆されている。



その発現上昇を詳細に調べるため、Wnt11 アンチセンス鎖プローブを用い、*in-situ* hybridization を行った。WT の胚では shield 段階以前まで境界領域部分全体に発現している Wnt11 が shield 段階になりオーガナイザーが形成されるとともに、オーガナイザー部分の発現が弱くなる。しかし、MKK4B の MO をインジェクションした胚では、境界領域部分全体的に Wnt11 の発現量が上昇するとともに、オーガナイザー部分の発現も上昇する。オーガナイザーはそれ自身が体軸中胚葉に分化するが、原腸陥入の誘導能をもち、それによって、epiblast と hypoblast が形成され、さらに、細胞が移動していくことで正しい位置に各組織が配置されるようにする。このような重要な役割を果たしているオーガナイザー部分での Wnt11 の異常発現は、以降の細胞運動に異常をもたらす可能性がある。

図5. MKK4B阻害時の遺伝子発現変化

5. Wnt11 の発現上昇は CE 異常を誘導する

Wnt11 の発現上昇が細胞運動に異常をもたらすかを検討した。Wnt11 の mRNA を受精直後の卵にインジェクションすることで過剰発現させ、表現型を観察した。11時間胚と24時間胚を観察した結果、Wnt11 が過剰発現することで、CE 運動に異常が生じた(図 6)。この結果は、JNK の阻害による CE 運動の異常が Wnt11 の発現上昇により生じることを示唆している。

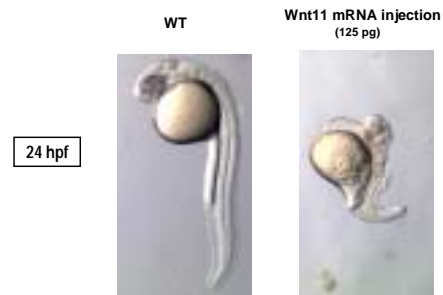
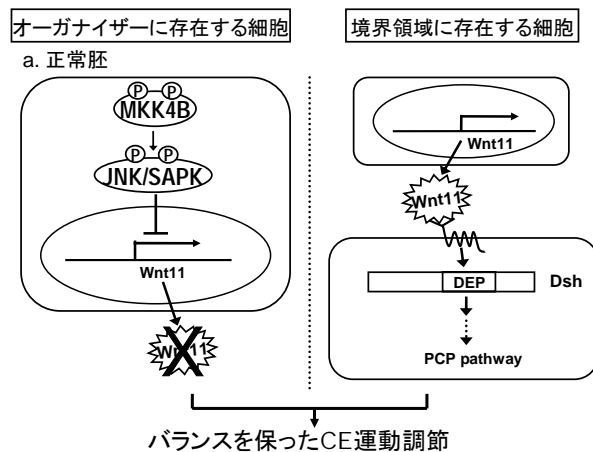


図6. Wnt11過剰発現によるCE異常

【総括】

本研究において私は、ゼブラフィッシュの *mkk4a*, *mkk4b*, *mkk7* をクローニングし、MKK4B をノックダウンすると、細胞の分化には影響がないが、CE 運動に異常が起こることを明らかにした。その際に Wnt11 の発現が上昇すること、また、その上昇部位が通常 Wnt11 が発現しなくなるオーガナイザー部位であることを見出した。さらに、Wnt11 の発現上昇により、CE 運動に異常が起きることを示した。以上の



バランスを保ったCE運動調節

結果から次のようなモデルを考えた(図7)。正常の発生を行っている胚の場合、shield 段階になると境界領域の細胞では Wnt11 が発現され続けるが、オーガナイザー部分では MKK4B が活性化され、JNK にシグナルが伝わり、何らかの転写因子を介して Wnt11 の発現を抑制する。このような正確な Wnt11 の発現制御により、バランスを保った CE 運動が行われる。一方、MKK4B の機能を阻害された胚では、オーガナイザー部分での Wnt11 の発現抑制ができなくなり、Wnt11 の発現上昇が起こり、CE 運動の異常が生じる。

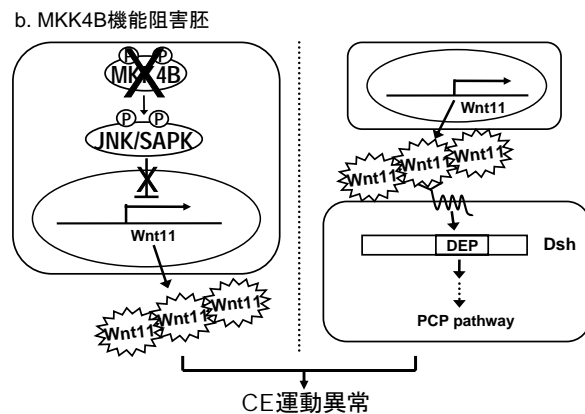


図7. CE運動の分子メカニズムのモデル図

私は本研究により、JNK シグナル伝達経路が Wnt11 の遺伝子発現制御を通じて初期発生期の CE 運動に必須の役割を果たしていることを見出した。この結果は脊椎動物の発生における分子メカニズムを理解する上で重要な知見であると考えられる。