

## 審査の結果の要旨

氏名 徐 正媛

多細胞生物を構成する個々の細胞は、栄養状態や浸透圧の変化、熱や異常タンパク質の蓄積などによる化学的・物理的ストレスに応答し、個体としての恒常性の維持に努めている。これらのストレス応答に介在する細胞内シグナル伝達分子の1つとして、c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) が知られている。この JNK の活性化因子として MKK4 と MKK7 の2種の上流キナーゼが存在し、これまでの研究から、MKK4 欠損マウス及び MKK7 欠損マウスは肝形成不全を伴って胎生致死となることが見出されてきた。しかしながら、マウスは子宮内で発生するために初期発生の観察が困難であり、MKK4 と MKK7 の機能については未解明な部分が多く残されている。

「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)」と題する本論文においては、脊椎動物でありながら体外受精後に短時間で発生し、その発生過程が容易に観察可能なゼブラフィッシュをモデルに MKK4 と MKK7 の機能を解析し、JNK シグナルが初期の形態形成において重要な収斂伸長 (convergent extension, CE) の細胞運動に必須の役割を果たすこと、さらに、その CE 運動に際して Wnt11 の遺伝子発現を局所的に抑制することを明らかにしている。

### 1. JNK はゼブラフィッシュの初期発生期に活性化している

まず、データベース上から MKK4 と MKK7 をコードするゼブラフィッシュの遺伝子を探索し、*mkk4a*、*mkk4b*、*mkk7* の3種の遺伝子を単離・同定した。それらは、マウスの MKK4 や MKK7 と 80%以上の高い相同性をもち、さらに上流のキナーゼによってリン酸化される配列を保存していた。また、ゼブラフィッシュの MKK4A、MKK4B と MKK7 は、マウスの MKK4 や MKK7 と機能的にも相同な遺伝子であることを確認した。アンチセンス鎖プローブを用いて *in-situ* hybridization を行い、3つの遺伝子が原腸形成期である 75%-epiboly 段階と bud 段階で胚全体に発現していることを認めた。JNK キナーゼアッセイによる解析から、原腸形成期の胚 (30%から 75% epiboly まで) において JNK が活性化され、原腸形成が終わる bud 以降の胚ではその活性化が低下することを見出した。

### 2. MKK4B の機能障害により、原腸形成期の収斂伸長運動に異常が生じる

モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いて機能障害実験を行った結果、24 時間胚において、*mkk4a* の MO で処理した胚は正常であったのに対して、*mkk4b* の MO の場合に体全体において形態形成の異常を認めた。一方、*mkk7* の MO で処理した胚では、弱い形態形成の異常を示した。*mkk4b* の MO による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 の注入量に依存して、神経板細胞の移動や脊索の伸長に異常が認められた。このような細胞運動の異常は、初期発生段階の原腸形成時における CE 運動に異常が生じた時の表現型として知られている。これらの結果から、MKK4B が CE 運動に必須の役割を果たすことが明らかにされた。

### 3. MKK4B の機能阻害は Wnt11 の発現を上昇させる

JNK が CE 運動に関わる遺伝子の発現を制御している可能性を考え、RT-PCR にて各種の関連遺伝子の発現を検討した。MKK4B の MO を注入した胚では、E カドヘリン、Stat3、Liv1、また、Wnt シグナル経路に属する Wnt8 や Wnt5 の発現量に変化はなかった。しかしながら、Wnt11 の発現量だけが特異的に上昇していた。したがって、JNK は Wnt11 の発現を通常は抑制していると考えられた。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による解析から、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に、Wnt11 アンチセンス鎖プローブを用いて *in-situ* hybridization を行った。正常の胚では、Wnt11 はシールド段階以前まで境界領域部分全体に発現しているが、シールド段階になってオーガナイザーが形成されると、オーガナイザー部分の Wnt11 の発現は弱くなる。しかしながら、MKK4B の MO を注入した胚では、境界領域部分の全体にわたって Wnt11 の発現量が増加するとともに、オーガナイザー部分の発現も増加していた。オーガナイザーはそれ自身が体軸中胚葉に分化するとともに、原腸陥入を誘導する能力をもっている。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異常な Wnt11 の発現上昇は、以降の細胞運動に異常をもたらすと考えられた。

### 4. Wnt11 の発現上昇は収斂伸長運動の異常を誘導する

Wnt11 の mRNA を受精直後の卵に注入して過剰発現させ、Wnt11 の発現上昇が細胞運動に与える影響を検討した。11 時間胚と 24 時間胚で観察した結果、Wnt11 の過剰発現によって CE 運動に異常が生じることを確認した。この知見は、JNK の阻害による CE 運動の異常が、Wnt11 の発現上昇によって生じた可能性を支持している。

以上を要するに、本研究は、マウスの *mkk4* と *mkk7* の相同遺伝子であるゼブラフィッシュの *mkk4a*、*mkk4b* と *mkk7* を単離・同定し、MKK4B をノックダウンすると、ゼブラフィッシュの初期発生において収斂伸長運動に異常が生じることを明らかにしている。また、JNK シグナル伝達経路が、Wnt11 の局所的な遺伝子発現の抑制を介して初期発生期の CE 運動に必須の役割を果たしていることを見出している。これらの研究成果は、脊椎動物の発生における JNK シグナルの分子メカニズムを理解する上で重要な知見を提供しており、博士 (薬学) の学位として十分な価値があるものと認められる。