

氏名	やま なか ひろ あき 山 中 洋 昭
学位の種類	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 7 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	生命科学 研究科 統合生命科学 専攻
学位論文題目	脊椎動物における収束的伸長を制御する非古典的 Wnt シグナル経路

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 竹市 雅俊 教授 上村 匡

論 文 内 容 の 要 旨

Wnt は分泌型糖タンパク質であり、重要なシグナル分子として、多細胞生物間で広く保存されている。従来考えられてきた古典的な Wnt シグナル経路では、分泌された Wnt が受容体である Frizzled に結合し、細胞内の Dishevelled を活性化する。Dishevelled は GSK3 を不活性化することで β -catenin の分解を阻止し、細胞質内で蓄積した β -catenin は転写因子 TCF/LEF と結合して、遺伝子発現を誘導する。これに対し、ショウジョウバエの翅の毛や個眼にみられる平面における極性 (planar cell polarity: PCP)、脊椎動物の原腸陥入時に見られる収束的伸長 (convergent extension) とよばれる細胞運動において、古典的な Wnt シグナル経路とは異なる Wnt シグナル経路が関与することが示されている。この非古典的な Wnt シグナル経路では、Dishevelled 以降のシグナル経路において、 β -catenin の蓄積が誘導されない。

ショウジョウバエにおける PCP 経路の研究から、ショウジョウバエでは Dishevelled の下流に MKK7-JNK という経路が存在することが示唆されている。また脊椎動物の培養細胞において、Dishevelled を発現させることで、MKK7, JNK が活性化されることが報告された。これらの報告から、われわれは脊椎動物において、非古典的 Wnt シグナル経路が JNK の活性化を通じて収束的伸長の制御を行っているのではないかと考えた。

われわれはまず、NIH3T3 細胞において、Wnt ファミリーと JNK を共発現させ、JNK のキナーゼアッセイを行い、Wnt5a によって JNK が特異的に活性化されることを示した。アフリカツメガエル胚において、Wnt1, Wnt3, Wnt8 などは古典的 Wnt シグナル経路を活性化し、腹側に二次軸を誘導することができるが、Wnt4, Wnt5a, Wnt11 などの Wnt は二次軸誘導能がなく、これらを胚に発現させると、収束的伸長を抑制することが知られている。そこで Wnt5a による収束的伸長抑制に JNK の活性が必要であることを示すため、アフリカツメガエル胚のアニマルキャップを用いて実験を行った。Wnt5a とともに JNK や MKK7 のドミナントネガティブ型変異体を共発現させると、収束的伸長が回復することから、Wnt5a による収束的伸長の抑制には JNK の活性化が必要であることが示された。さらに、MKK7 の活性型変異体をアニマルキャップやアフリカツメガエル胚背側領域に発現させ、JNK の過剰な活性化を誘導することで収束的伸長が抑制されることを示した。逆に、Morpholino oligonucleotide を用い、内在的 JNK の活性を抑制した場合でも、正常な収束的伸長が阻害されることを示した。以上の結果から、正常な収束的伸長には適切なレベルの JNK の活性が必要であることが示された。また、収束的伸長において Dishevelled の細胞内局在が重要な役割を果たしていると考えられることから、Wnt, Frizzled による Dishevelled の細胞内局在の変化についても実験を行い、Dishevelled が Wnt5a, Wnt11 によって特異的な局在化を行うことを見出した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Wnt は分泌型糖タンパク質であり、重要なシグナル分子として、多細胞生物間で広く保存されている。脊椎動物の Wnt シグナル経路には古典的 Wnt シグナル経路と非古典的 Wnt シグナル経路が存在し、非古典的 Wnt シグナル経路は β -

cateninに非依存的であることが報告されている。ショウジョウバエの翅の毛や個眼にみられる平面における極性（planar cell polarity: PCP）の制御において、Frizzled, DishevelledといったWntシグナル経路の因子が関与することが示されている。このPCP経路では、Dishevelled以降のシグナル経路において、 β -cateninの蓄積が誘導されない。PCP経路においてDishevelledの下流にMKK-7-JNKという経路が存在することが報告されている。また脊椎動物の培養細胞において、Dishevelledを発現させることでMKK7, JNKが活性化されることが報告された。申請者は脊椎動物における非古典的Wntシグナル経路とショウジョウバエにおけるPCP経路の類似性に着目し、非古典的Wntシグナル経路がJNKの活性化を通じて収束的伸長の制御を行う、という仮説を立て解析を行った。

本論文において、申請者は培養細胞においてWnt5aによってJNKが特異的に活性化されることを示した。これはWntの下流にJNKが存在することを直接示した成果である。また、アフリカツメガエル胚においてWnt5aは収束的伸長を抑制することがすでに報告されていたが、申請者はWnt5aとともにJNK不活性型を共発現させることで収束的伸長が回復することを示し、Wnt5aによる収束的伸長抑制にJNKの活性が必要であることを示した。さらに、Wnt5aなしに、胚においてJNKを過剰活性化させることで収束的伸長が抑制されることを示した。逆にJNKの発現をMorpholino oligonucleotideによって抑制した場合でも収束的伸長が抑制されることを示し、正常な収束的伸長には適切なレベルのJNK活性が必要であることが示された。JNKの脊椎動物の形態形成運動における機能については不明な点が多いが、この結果はJNKが非古典的Wntシグナル経路の下流で収束的伸長の制御に関わることを強く示唆する成果である。

また、収束的伸張における細胞の極性決定にDishevelledの細胞内局在が重要な役割を果たしていると考えられることから、申請者はWnt, Frizzled, StrabismusによるDishevelledの細胞内局在の変化についても解析を行い、Dishevelledの細胞内局在化におけるこれらの因子との相互作用を示した。

以上のように、本論文で述べられた成果は非常に重要であり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認められる。さらに、平成16年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問の結果、合格と認めた。