

京都大学	博士（生命科学）	氏名	鈴木 俊康
論文題目	MAPKKKファミリー遺伝子MLTKの初期胚発生における役割の解明		
（論文内容の要旨） MAPキナーゼ経路は細胞増殖、分化、生存などのさまざまな局面で重要な役割を担っている。MAPキナーゼ経路は、MAPキナーゼ（MAPK）、MAPキナーゼキナーゼ（MAPKK）、MAPキナーゼキナーゼキナーゼ（MAPKKK）から構成されており、これらのキナーゼのリン酸化カスケードによってシグナルが伝達される。MLTK（MLK-like mitogen-activated protein triple kinase）はMAPKKKであり、現在知られている4つのMAPK経路のうちJNK経路やp38経路をその下流として活性化することが報告されている。しかしながら、MLTKの生理的な意義はこれまでに明らかとなっていなかった。申請者は、MLTKの胚発生における役割を明らかにするために、アフリカツメガエル<i>Xenopus laevis</i>をモデル生物として用いてMLTKの機能解析を行った。はじめに、MLTKの<i>Xenopus laevis</i>オルソログxMLTKを単離し、そのアミノ酸配列は脊椎動物においてよく保存されていることを明らかにした。発現パターンの解析から、xMLTKは尾芽胚期以降に発現が上昇し、さまざまな組織に発現することが分かった。次に、モルフォリノ・アンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いて、<i>Xenopus</i>胚においてxMLTKのノックダウンを行い、xMLTKは頭蓋顔面軟骨の形成に必要であることを示した。さらに、軟骨形成におけるxMLTKの下流にp38経路やJNK経路が働いていることを示した。頭蓋顔面軟骨は神経堤細胞に由来することが知られている。xMLTKのノックダウンは神経堤細胞の発生には影響を与えなかった一方で、軟骨細胞の分化を著しく阻害したことから、xMLTKは神経堤細胞から軟骨細胞への分化に必要であることが示された。軟骨細胞の分化において、Sox5、Sox6、Sox9の3つの転写因子は分化のマスター制御因子であると考えられており、xMLTKはそのうち、xSox6の発現に必要であることが明らかとなった。さらに、過剰発現の実験から、Sox9によるSox6の発現誘導はxMLTKによって促進されることが明らかとなった。<i>Xenopus</i>においてxSox6の発生における役割についてはこれまでに報告がなかった。xSox6の機能解析を行った結果、xSox6は軟骨形成期に発現が上昇することと頭蓋顔面軟骨の形成に必要であることが明らかになった。さらに、マイクロアレイを用いたゲノムワイドな発現変化の比較からxMLTKとxSox6のノックダウンによる遺伝子発現変化が似通っていることが示された。本研究から、胚発生においてxMLTKはxSox6の発現制御を介して軟骨形成に必要であることが明らかになった。			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、アフリカツメガエルをモデル生物として用いることにより、MLTKがSox6の発現誘導を介して、頭部軟骨組織の形成を制御していることを見出した。哺乳類MLTKは2001年に単離され、p38 MAPキナーゼとJNKを活性化しうることが明らかにされていた。MAPキナーゼ経路は、MAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)、MAPキナーゼキナーゼ、MAPキナーゼから構成され、リン酸化による活性化のカスケードによってシグナルが伝達される。MLTKはMAPKKKとして働くことが報告されていたが、MLTKの初期胚発生における機能はこれまでにどの生物種においても報告されていなかった。申請者は、はじめに、MLTKの*Xenopus laevis*オルソログxMLTKを単離した。その結果、MLTKのアミノ酸配列は脊椎動物においてよく保存されていることを示した。in situ hybridizationによりxMLTKの発現パターンを解析した結果、xMLTKは軟骨を含む様々な組織に発現することを示した。次に、アンチセンス・モルフォリノ・オリゴヌクレオチドを用いたxMLTKのノックダウン実験から、xMLTKは頭蓋顔面軟骨の形成に必要であることを見出した。さらに、軟骨形成においてxMLTKの下流でp38経路やJNK経路が働いている可能性を示した。また、神経堤細胞と軟骨細胞のマーカー遺伝子の発現パターンの解析から、xMLTKは神経堤細胞から軟骨細胞への分化に必要であることを示した。xMLTKの軟骨細胞分化における機能をさらに詳細に調べた結果、xMLTKは予定軟骨領域におけるxSox6の発現に必要であることを明らかにした。さらに、申請者は、xMLTKがxSox6の発現を誘導できるかについて検討を行い、xMLTKがxSox9の転写活性を上昇させることによってxSox6の発現誘導に機能する可能性を示した。xMLTKがxSox6の発現を制御することが明らかになったが、*Xenopus*初期胚におけるxSox6の機能はこれまでに報告がなかった。そこで申請者はxSox6の機能について解析を行った。in situ hybridizationによりxSox6の発現パターンを解析し、xSox6は鰓弓、脳、体節に発現することを明らかにした。次に、xSox6のノックダウンから、xSox6はアフリカツメガエルにおいて頭蓋顔面軟骨の形成に必要であることを明らかにした。さらに、マーカー遺伝子の発現パターンの解析から、xMLTKは神経堤細胞から軟骨細胞への分化に必要であることを示した。また、申請者はマイクロアレイを用いて、xMLTKまたはxSox6によって制御される遺伝子を網羅的に解析し、両者によって共通に制御される遺伝子群が存在することを示した。さらに、xMLTKまたはxSox6によって制御される遺伝子には軟骨形成に関わる遺伝子が多く含まれていることを示した。以上の結果から、軟骨細胞分化にMLTKが必須であることが明らかとなり、さらに、Sox9によるSox6の発現制御にMLTKが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。よって、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た。また、平成24年7月13日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日