

氏 名	増 山 典 久
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2108 号
学位授与の日付	平成 11 年 5 月 24 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	アフリカツメガエルの初期胚発生における FGF/MAP キナーゼカスケードと TGF- β /Smad ファミリーの機能

論文調査委員 (主 査) 教 授 西 田 栄 介 教 授 竹 市 雅 俊 教 授 平 野 丈 夫

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の初期胚発生においては、分化の方向性の決定や複雑なパターンの形成などがダイナミックに起こる過程であり、その中で細胞間情報伝達による相互制御の機構が重要な役割を果たしている。アフリカツメガエルの初期胚を用いた実験などによって、FGF ファミリーと TGF- β スーパーファミリーが、中胚葉の誘導や体軸の形成過程、神経分化など、様々な初期胚発生のプロセス中に重要であることが明らかになっている。MAP キナーゼカスケードは MAP キナーゼ、MAP キナーゼキナーゼ、MAPKK-キナーゼからなるシグナル伝達カスケードで、多くの増殖因子や分化因子によってチロシンキナーゼ型の受容体を介するシグナルの細胞内での伝達に重要であり、体細胞の増殖刺激や、PC 12 細胞の神経様分化など、様々な生理機能を担うことが明らかにされてきた。しかしながら初期胚発生において MAP キナーゼカスケードが重要な役割を担うかどうか明らかでなかった。本論文では MAP キナーゼカスケードを構成する因子を初期胚に発現することで、MAP キナーゼカスケードが FGF による中胚葉誘導にしめる役割について詳細な検討がなされた。また TGF- β スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達を担う因子として、近年 Smad ファミリーが多数単離されてきており、その役割の解析が進められてきた。本研究では新規の Smad 分子の cDNA クローニングが行われ、生化学的、あるいは細胞生物学的な手法によって、アフリカツメガエルにはヒト Smad 4 に相同性を持つ 2 種類の因子が存在し、共にオーバーラップした機能を持つものの、細胞内シグナル伝達において異なる作用を持つ可能性が示唆された。

MAP キナーゼカスケードについては、まず恒常的活性型の MAP キナーゼキナーゼを初期胚に発現して強制的に MAP キナーゼを活性化したところ、誘導因子の刺激なしに中胚葉が誘導できることを示した。また MAP キナーゼを不活性化するホスファターゼを発現することで、FGF による中胚葉誘導が阻害されることを示し、これらのことから MAP キナーゼカスケードの活性化が FGF による中胚葉の誘導に必要で、かつ十分であることを明らかにした。また MAP キナーゼの活性は TGF- β スーパーファミリーに属するアクチビンによる中胚葉の誘導にも必要であることを示し、中胚葉組織の形成のためには独立した 2 つのシグナルが同時に伝えられることが重要であることを明らかにした。これらの結果から、MAP キナーゼカスケードは初期胚発生に重要な役割を担っており、FGF シグナルの細胞内情報を伝達することで、中胚葉の誘導に必須の役割果たすことが明らかにされた。

近年 TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達を担う因子として、Smad と呼ばれる一群の因子が同定され、様々な動物種で同様に機能していることが明らかになってきた。哺乳類などでは Smad 4 以外の pathway-restricted Smad と呼ばれるファミリーが、それぞれの TGF- β スーパーファミリーの受容体によって特異的にリン酸化を受けて活性化する。またそれらに Smad 4 が共通に結合してヘテロ複合体を形成することで、シグナル伝達を可能にしている。哺乳類ではこのような co-Smad としての働きをするファミリーとして、Smad 4 のみが知られていた。本論文ではアフリカツメガエルの 2 つの Smad 4 関連 pathway-restricted Smad への協調的な働きから、ともに co-Smad として働きうることを明らかにした。また 2 つの XSmad 4 は pathway-restricted Smad である Smad 1 と Smad 2 の両方に、それぞれ異なる刺激に応答してヘテ

ロ複合体を形成した。このようにアフリカツメガエルにおいては co-Smad として機能することができる分子が2つあることを明らかにした。しかしながら一方で、2つの XSmad 4 の間でいくつかの異なる特徴があることが分かった。すなわち mRNA の発現のパターン、細胞内での局在、リン酸化の程度、初期胚に過剰発現したときの効果などである。これらの結果から、2つの Smad 4 関連分子は共に co-Smad として機能できるものの、生体内で異なる機能を持つ可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

初期胚発生では細胞間での相互作用によって、各細胞の分化の方向性の決定や、体のパターンの形成が調節されており、これらの過程での情報伝達経路の解明は発生分化の分子機構を知る上で、重要な問題となっている。これまでにシグナルカスケードを構成する因子の単離と、その役割に関する解析が行われてきたが、総体的な情報伝達経路の制御機構の解明と、分子間での相互の関わりについて、多くの問題が残されていた。申請者はシグナル伝達に関わる因子の変異型や阻害因子を用い、初期胚に導入することで、MAP キナーゼカスケードと Smad ファミリーの機能の解析を行った。

MAP キナーゼキナーゼの活性型変異を発現することで中胚葉が誘導されること、また MAP キナーゼを不活性化するホスファターゼを発現することで、FGF による中胚葉誘導が阻害されることを示し、これらのことから MAP キナーゼカスケードの活性化が FGF による中胚葉の誘導に必要で、かつ十分であることを明らかにした。この結果は MAP キナーゼカスケードが初期胚発生において重要な役割を果たすことを示したはじめての例であり、大変価値が高いと考えられる。

さらに申請者は分子生物学的な手法を用いて、アフリカツメガエルにヒト Smad 4 と相同性を持つ2つの遺伝子を単離、クローニングした。これまで哺乳類では co-Smad として働くサブタイプとして Smad 4 のみが報告されているだけで、Smad 4 が様々な pathway-restricted Smad に対して共通のパートナーとして働くと考えられてきた。申請者は生化学的、あるいは細胞生物学的な手法によって、アフリカツメガエルの2つの Smad 4 関連分 pathway-restricted Smad への協調的な働きから、ともに co-Smad として働きうることを明らかにした。また2つの XSmad 4 は pathway-restricted Smad である Smad 1 と Smad 2 の両方に、それぞれ異なる刺激に応答してヘテロ複合体を形成し、co-Smad として機能することができる分子が2つあることを明らかにした。しかしながら一方で、2つの XSmad 4 の間でいくつかの異なる特徴があることを見出した。すなわち mRNA の発現のパターン、細胞内での局在、リン酸化の程度、初期胚に過剰発現したときの効果などである。これらの結果から、2つの Smad 4 関連分子は共に co-Smad として機能できるものの、生体内で異なる機能を持つ可能性を示した。この発見は TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達の制御の機構について貢献するところが大きい。

以上本申請論文は、MAP キナーゼカスケードが FGF による中胚葉誘導に関与することを示し、また新規の Smad ファミリーを同定、シグナル伝達における機能について解析を行ったものであり、博士（理学）の学位論文として十分に価値のあるものとして認められる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について試問した結果、合格と認めた。