

平成22年 5月11日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17054013

研究課題名（和文） 発生分化を制御するDECODE回路の解明

研究課題名（英文） Regulation of DECODE system in Development

研究代表者

澁谷 浩司 (SHIBUYA HIROSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30261324

研究成果の概要（和文）：発生過程の細胞の運命決定において重要な役割を担っている TGF- β および Wnt シグナルに注目し、特にこれらのシグナルクロストークに関わる NLK シグナルが関与する発生制御機構の解明を目指した。NLK シグナル因子と相互作用するリン酸化酵素、ユビキチン関連酵素、転写因子等を単離し、培養細胞系やモデル生物である *Xenopus* を用いた機能解析を進め、主に頭部形成制御に関与することを示した。

研究成果の概要（英文）：We focus on the signal transduction regulating the mechanisms of morphogenesis and organogenesis in development. To explore potential regulators of NLK function, we identified a MAPK, ubiquitin ligase and transcriptional factors as candidate proteins that physically interact with NLK. We finally provided the evidence that these factors specifically regulates NLK function required for the anterior formation in *Xenopus* development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	21,000,000	0	21,000,000
2006年度	20,800,000	0	20,800,000
2007年度	20,800,000	0	20,800,000
2008年度	18,300,000	0	18,300,000
2009年度	18,300,000	0	18,300,000
総計	99,200,000	0	99,200,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：NLK、シグナル、NARF、p38、MEF2A、リン酸化、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

生物の発生過程において、個々の細胞の運命は細胞外に存在する様々なシグナル因子や転写因子により規定される。その際個々の細胞内では、それぞれのシグナル因子に対応したシグナル伝達経路が活性化しており、その結果として核内の転写因子の活性が変動し

遺伝子発現が調節されている。TGF- β および Wnt ファミリーは線虫やショウジョウバエから哺乳動物に至るまで広く保存され、生体内において様々な生理活性を発揮することが知られており、また初期発生における形態形成、器官形成の調節因子として作用する。また、両シグナルのバランス（クロストーク）

により生物の形態形成、組織形成が調節されていることもよく知られている。したがって、これらシグナルの下流で働く転写制御機構の解明は生物の形態形成機構を明らかにするとともに疾患発症機構にもつながる重要な課題である。TGF- β シグナルには Smad、Wnt シグナルには LEF/TCF の転写因子の存在が知られているだけで、両シグナルの生理活性を説明できる詳細な転写制御機構はわかっていないのが現状である。我々は TGF- β シグナルや Wnt シグナルに関与する分子をいくつか単離し、その重要性を示し、また、Smad4 や TAB1/TAK1-NLK が両シグナルのクロストークを担っていること等、世界的にブレークスルーとなる報告をしてきた。

2. 研究の目的

本研究では TGF- β および Wnt シグナル間の発生分化制御機構を解明するため TGF- β および Wnt シグナルに関与する転写制御機構の解析を目指した。すなわち、これらのシグナル因子と相互作用する新たな分子をこれまでより大規模に質量分析計を駆使して単離し、両シグナル間での機能を転写制御機構を通して明らかにし、これらシグナル伝達分子および転写因子の解析からより直接的な TGF- β および Wnt の生理活性機構が明らかにし、結果として TGF- β および Wnt シグナルの関わる発生分化機構全容を知ることができると考えた。

3. 研究の方法

本研究では疾患発症、形態形成に関わる TGF- β および Wnt シグナル分子の制御機能を解明するため、TGF- β および Wnt シグナルに関与する分子に相互作用する分子を網羅的に単離し、個体レベルでの解析を目指し、以下のような研究を中心に進めた。

(1) TGF- β および Wnt シグナル関連分子 NLK 会合分子の単離

培養細胞系もしくは *Xenopus* 胚に TGF- β および Wnt シグナル関連分子 NLK を強制発現し、これらを免疫沈降した。これらの沈降物を電気泳動することなく、特殊な微量カラムを通すことにより分離し、質量分析計により直接アミノ酸配列を決定した。これにより *in vivo* で複合体形成している分子群を網羅的に同定した。同定された複合体形成候補分子の全長 cDNA をクローニングし、哺乳動物細胞内において結合を確認した。

(2) *Xenopus* を用いた機能解析

単離された分子の機能解析を *Xenopus* を用いて進めた。特に、ステージ別、組織別の発現解析、大量発現による表現系、各マーカー遺伝子発現の解析、morpholino-antisense oligonucleotide (MO) を用いた発現抑制等の技術を駆使した機能解析を優先的に行った。

4. 研究成果

Nemo-like kinase (NLK) は MAP キナーゼファミリーと考えられている。我々は NLK が TCF/LEF を直接リン酸化することで TCF/LEF と β -カテニンの複合体形成を阻害し、Wnt シグナル伝達を抑制すること、TGF- β シグナルの下流で STAT3 の機能制御に関与し、中胚葉誘導を担っていること、一方、初期胚において NLK は前頭部の神経領域において強く発現し、神経系を誘導することを報告してきた。

(1) NLK と会合する分子群の検索を酵母 two hybrid 法を用いて実施した結果、N 末端側に RING フィンガー領域を有する分子 NARF を単離した。次に NARF と会合する分子の同定を試みたところ、ユビキチン結合酵素 E2-25K を検出した。多くの RING フィンガータンパクが E3 ユビキチンリガーゼとして機能することから、NARF がユビキチンリガーゼ活性を発揮するのか検討した。NARF と E2-25K を用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行ったところ、NARF が自己ユビキチン化されることが確認され、NARF がユビキチンリガーゼ活性を有していることが明らかとなった。

in vitro ユビキチン化を指標に NARF の標的分子の検索を行ったところ、Wnt シグナル下流の転写因子 TCF/LEF が NARF によってユビキチン化されることが判明した。この TCF/LEF のユビキチン化は、NLK のキナーゼ活性に依存して促進された。siRNA を用いて内在性 NARF を消失させると TCF4 の蓄積が確認された。これらの結果は NARF がユビキチン化を介して TCF4 のタンパク量を制御していることを示している。また、Wnt3a 刺激により誘導される Wnt シグナルの標的遺伝子 DKK1 と axin2 遺伝子の転写が siRNA を用いた内在性 NARF タンパクの消失により、更に増強された。

以上の結果から、NLK による Wnt シグナル伝達の抑制機序には、NLK が TCF/LEF をリン酸化修飾することに加えて、NARF による TCF/LEF のユビキチン化とそれに伴うタンパク分解が関与するが明らかとなった。

(2) NLK の機能に関与する新たな関連因子を得ることを目的として、293 細胞に強制発現させた NLK を免疫沈降し、共沈タンパク質群をマスマスペクトロメーターにより解析した。その結果、初期胚において体節および神経系で発現し、MyoD 等の標的遺伝子プロモーターの AT-rich 配列に結合し、活性化する転写因子である myocyte enhancer factor 2A

(MEF2A) を NLK 結合因子として同定した。実際、293 細胞に NLK と MEF2A を共発現させ、免疫沈降およびウエスタンブロット法により、細胞内で NLK と MEF2A が複合体を形成していることを確認した。次に、発生過程における NLK-MEF2A 複合体の機能を明らかにするため、アフリカツメガエルを用いて解析を進めた。アフリカツメガエル初期胚へ Mo を微量注入し、内在の NLK あるいは MEF2A をノックダウンしたところ、いずれの胚においても頭部形成が不完全となった。Mo を微量注入し

た胚における各種マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法により調べた結果、いずれの遺伝子ノックダウンによっても、前方マーカー遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった。以上のことより、NLK-MEF2A の前頭部形成制御に関与している可能性が示唆された。

(3) MAP キナーゼである p38 を NLK 結合因子として同定し、機能解析をすすめた。実際、293 細胞に NLK と p38 を共発現させ、免疫沈降およびウエスタンブロット法により、細胞内で NLK と p38 が複合体を形成していること、p38 が NLK をリン酸化できることを確認した。次に、発生過程における NLK-p38 複合体の機能を明らかにするため、アフリカツメガエルを用いて解析を進めた。アフリカツメガエル初期胚へ Mo を微量注入し、内在の NLK あるいは p38 をノックダウンしたところ、いずれの胚においても頭部形成が不完全となった。Mo を微量注入した胚における各種マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法により調べた結果、いずれの遺伝子ノックダウンによっても、前方マーカー遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった。以上のことより、NLK-p38 の前頭部形成制御に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Watanabe, Y., Itoh, S., Goto, T., Ohnishi, E., Inamitsu, M., Itoh, F., Satoh, K., Wiercinska, E., Yang, W., Shi, L., Tanaka, A., Nakano, N., Mommaas, A. M., Shibuya, H., ten Dijke, P. and Kato, M. (2010). TMEPAI, a transmembrane TGF- β -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- β signaling. **Mol. Cell** 37, 123-134.
- ② Ohnishi, E., Goto, T., Sato, A., Kim, M., Iemura, S., Ishitani, T., Natsume, T., Ohnishi, J. and Shibuya, H. (2010). NLK, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase. **Mol. Cell. Biol.** 30, 675-683.
- ③ Nifuji, A., Ideno, H., Ohyama, Y., Takanabe, R., Araki, R., Abe, M., Noda, M. and Shibuya, H. (2010). Nemo-like kinase (NLK) expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation. **Exp. Cell Res.**
- ④ Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M.-Y., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shirode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa, H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F. and Kato, S. (2009). DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. **Nature** 461, 1007-1012.
- ⑤ Hisamoto, N., Moriguchi, T., Urushiyama, S., Mitani, S., Shibuya, H. and Matsumoto, K. (2008). *C. elegans* WNK-STE20 pathway regulates tube formation by modulating ClC channel activity. **EMBO Rep.** 9, 70-75.
- ⑥ Matsubara, Y., Kawasaki, I., Urushiyama, S., Yasuda, T., Shirakata, M., Iino, Y., Shibuya, H. and Yamanashi, Y. (2007). The adaptor-like protein ROG-1 is required for activation of the Ras-MAP kinase pathway and meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. **Genes Cells** 12, 407-420.
- ⑦ Yang, S.-S., Morimoto, T., Rai, T., Chiga, M., Sohara, E., Ohno, M., Uchida, K., Lin, S.-H., Moriguchi, T., Shibuya, H., Kondo, Y., Sasaki, S. and Uchida, S. (2007). Molecular pathogenesis of pseudohypoadosteronism type II: generation and analysis of a *Wnk4*^{D561A/+} knock-in mouse model. **Cell Metabolism** 5, 331-344.
- ⑧ Satoh, K., Ohnishi, J., Sato, A., Takeyama, M., Iemura, S., Natsume, T. and Shibuya, H. (2007). NLK-MEF2A signaling regulates anterior formation in *Xenopus* development. **Mol. Cell. Biol.** 27, 7623-7630.
- ⑨ Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, M.-Y., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Kato, S. (2007). A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR- γ transactivation. **Nature Cell Biol.** 9, 1273-1285.
- ⑩ Honma, M., Higuchi, O., Shirakata, M., Yasuda, T., Shibuya, H., Iemura, S., Natsume, T. and Yamanashi, Y. (2006). Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases. **Genes Cells** 11, 143-151.
- ⑪ Yamada, M., Ohnishi, J., Ohkawara, B., Iemura, S., Satoh, K., Hyodo-Miura, J., Kawachi, K., Natsume, T. and Shibuya, H. (2006). NARF, an Nemo-like kinase (NLK)-associated Ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of T cell factor/Lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). **J. Biol. Chem.** 281, 20749-20760.
- ⑫ Ohnishi, J., Ohnishi, E., Shibuya, H. and Takahashi, T. (2005). Functions for proteinases in the ovulatory

process. Biochim Biophys Acta. 1751, 95-109.

- ⑬ Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K. and Shibuya, H. (2005). WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. J. Biol. Chem. 280, 42685-42693.

[学会発表] (計 31 件)

- ① 後藤利保、大西英理子、佐藤淳、金美善、家村俊一郎、石谷太、夏目徹、大西淳之、澁谷浩司 NLK, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ② 小川靖、吉田実代、大西英理子、平松俊行、小野木博、澁谷浩司、細谷孝充、萩原正敏 リン酸化阻害剤によるダウン症治療薬開発アプローチ 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16-18 日、横浜
- ③ Shigeaki Kato, Mi-sun Kim, Hiroshi Shibuya 「Hormonal control of DNA demethylation for gene activation」Advanced Bone and Joint Science (ABJS) Symposium-Workshop "Molecular Regulation of Bone and Cartilage", December, 2008
- ④ 大西淳之、大西英理子、家村俊一郎、丸山剛、西頭英起、石谷太、夏目徹、澁谷浩司 p38 MAPK-NLK 経路による Xenopus 前頭部形成の制御機構 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸
- ⑤ 伊東進、渡邊幸秀、大西英理子、佐藤清敏、澁谷浩司、加藤光保 TMEPAI による TGF- β /アクチビンシグナル抑制機構 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸
- ⑥ 金美善、近藤剛史、延みんよん、高田伊知郎、武山健一、大竹史明、澁谷浩司、加藤茂明 DNA 脱メチル化はビタミン D 一位水酸化酵素遺伝子の活性型ビタミン D 依存的な転写抑制解除を制御する 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸
- ⑦ 佐藤淳、Andrew Tomlinson、澁谷浩司 CRD タンパク質 Corin の機能解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸
- ⑧ 澁谷浩司 p38-NLK による頭部形成制御 第 1 回 XCIJ 首都圏支部会 (XCIJ-MA) 研究集会 2008 年 10 月 18 日、東京
- ⑨ 小川靖、吉田実代、大西英理子、平松俊行、小野木博、澁谷浩司、細谷孝充、萩原正敏 ダウン症治療薬の創成 第 119 回日本薬理学会関東部会、2008 年 10 月 4 日、東京
- ⑩ Mi-sun Kim, Shigeaki Kato, Hiroshi Shibuya 「DNA demethylation for hormone-induced transcriptional derepression」The 21th NAITO CONFERENCE, Nuclear Dynamics and RNA[I], Japan, June, 2008
- ⑪ 澁谷浩司 「NLK と結合因子による頭部形成制御」文部科学省科学研究費助成金「特定領域研究」2 領域合同 公開シンポジウム、2008 年 1 月 8 日、東京
- ⑫ パストゥホフ・ストラヒル、花房洋、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司、松本邦弘 Hsp90/Cdc37 によるパーキンソン病原因因子 LRRK2 のキナーゼ活性制御 第 30 回日本分子生物学会年会、2007 年 12 月、横浜
- ⑬ 慶田城迅、花房洋、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司、松本邦弘 Dynein モータータンパク質結合因子 Nud C による EGFR の細胞内トラフィック制御 第 30 回日本分子生物学会年会、2007 年 12 月、横浜
- ⑭ 石川光紀、花房洋、澁谷浩司、松本邦弘 LRRK1 による EGFR の細胞内トラフィックの制御 第 30 回日本分子生物学会年会、2007 年 12 月、横浜
- ⑮ 花房洋、石川光紀、後藤美樹、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司、松本邦弘 LRRK1 は Grb2 を介した EGFR エンドサイトーシスを制御する 第 30 回日本分子生物学会年会、2007 年 12 月、横浜
- ⑯ 久本直毅、漆山誠一、森口徹生、伊藤健太郎、三谷昌平、澁谷浩司、松本邦弘 線虫 WNK, SPAK および CLC チャネルによる水分排出器官の形態制御 日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 9 日、名古屋
- ⑰ 森口徹生、漆山誠一、久本直毅、家村俊一郎、内田信一、夏目徹、松本邦弘、澁谷浩司 偽性低アルドステロン症 2 型の原因遺伝子 WNK1 プロテインキナーゼは STE20 様キナーゼを介して Na⁺-Cl⁻共輸送体の N 末制御領域をリン酸化する。第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 9 日、福岡
- ⑱ 大西淳之、山田美里、大河原美静、澁谷浩司 : ユビキチンリガーゼとして機能する NLK 結合因子 NARF による Wnt シグナル制御機構。第 28 回日本分子生物学会

- 年会、2005年12月9日、福岡
- ①⑨ 足達俊吾、佐藤清敏、大河原美静、家村俊一郎、夏目徹、大西淳之、濹谷浩司：Dishevelled/IQGAP 複合体の細胞内局在制御機構。科学技術振興機構 戦略的基礎研究推進事業 生物の発生・分化・再生研究領域 第4回公開シンポジウム、2005年10月4日、東京
- ②⑩ 山田美里、大河原美静、家村俊一郎、夏目徹、大西淳之、濹谷浩司：ユビキチンリガーゼとして機能する NLK 結合因子 NARF による Wnt シグナル制御機構。科学技術振興機構 戦略的基礎研究推進事業 生物の発生・分化・再生研究領域 第4回公開シンポジウム、2005年10月4日、東京

[その他]

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/mri/mri-mcb/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濹谷 浩司 (SHIBUYA HIROSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：30261324

(2) 研究分担者

大西 淳之 (OHNISHI JUNJI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：40261276

(H17→H20)

佐藤 清敏 (SATO KIKYOTOSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助手
研究者番号：50401386

(H17→H19)

森口 徹生 (MORIGUCHI TETSUO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・COE
拠点形成特任教員

研究者番号：40323571

(H17→H19)

金 美善 (KIM MISUN)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：70508332

(H20→H21)