

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440103

研究課題名(和文) 初期発生においてERK/MAPKが時期特異的に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Timing-dependent effects of ERK/MAPK effects on early embryogenesis

研究代表者

黒田 裕樹 (KURODA, Hiroki)

慶應義塾大学・環境情報学部・准教授

研究者番号：70402229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脊椎動物の発生の初期段階においては、ERKが活性化される時期によって、そのアウトプットが多彩に変化することを証明することを目的に行われた。ツメガエル胚を対象にいくつかのmRNAやDNAの顕微注入によって表現型を観察していった。その結果、胞胚期の直前、胞胚期中、原腸胚期にその変化が行われることが明らかとなった。研究に並行して作成したコンストラクトとして、ラパマイシン暴露によってERKを活性化させるもの、ならびに高温処理することによってERKを活性化させるものも作成した。これらは遺伝子組換えを用いることによって後期の胚においても、また、別の細胞系においても活用することができる。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study is to show the evidence that output phenotypes are variously changed in timing-dependent manner of ERK activation in early developmental stages in vertebrates. Phenotypical effects by microinjection of several mRNAs or DNAs into *Xenopus* embryos showed that obvious turning points of ERK effects were existed at pre-blastula, mid-blastula, and gastrula stages. Incidentally, new DNA constructs to activate ERK by exposure of the reagent Rapamycin or by heat treatment were also created in this study. They should be adaptable for observation of ERK activation effects in later stages by transgenic assay and for various cell biological assays.

研究分野：発生生物学

キーワード：ERK ツメガエル 顕微注入

1. 研究開始当初の背景

ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase)は上流分子 Ras、Raf、MEK らと共に癌原遺伝子の転写産物として知られ、癌、細胞周期等の様々な場面において働いている。初期発生においても、FGF シグナルを代表として、IGF、PDGF、EGF などのシグナルが ERK を活性化する。面白いことに、これらのリガンドや受容体、細胞内ファクターを用いた研究では、同じ ERK を活性化しているにも関わらず実験手法によって全く異なる結果が得られている。なぜ、このような違いが生じるのであろうか。我々はその原因について、過去の知見の検証や我々の基礎実験の内容から、ERK のアウトプットが発生の時期特異的に変化していくという仮説をたてた。それが正しいことを示唆させる証拠は3つある。

一つ目は、神経化は ERK 活性の時間に依存して生じる点である。ツメガエル胚の予定表皮細胞を解離すると、ERK が活性化され、それを引き金とした神経化が起こる文献¹。その神経化には3時間を超える解離が必要とされる。なぜ時間が重要なのだろうか。これは、長時間解離によって、原腸胚後期における ERK の活性化が導かれたために神経化したと考えることで説明がつく。

二つ目は、因子の違いは ERK の活性化時期を導いていたことである。①caMEK の mRNA を卵割期の割球に注入すると、その直後に注入した割球は分裂を止める。②常時活性化型の FGF 受容体を同じ割球に注入しても分裂は止まらず、胚は後方化する。③IGF を活性化させる mRNA を注入した場合は神経化を伴った前方化が起こる。これらの違いが生じた原因は、①では卵割期に ERK が、②では MBT (mid-blastula transition: 胞胚期に存在する転写開始点)を過ぎた直後に ERK が、そして③では IGF の受容体が発現する原腸胚後期に ERK が活性化されたために、違う表現型が得られたと考えれば説明がつく。

2. 研究の目的

既に Wnt シグナルでは初期発生において時期特異性が証明されている。それを意識した研究が展開されているが、時間軸の研究の指標にするには不十分である。ERK において、Wnt シグナル以上の多段階・多種類の変化があることを証明し、時間軸に対する発生の学的研究のブレイクスルーにさせる。

まず、時期特異的に ERK を活性化させる手法を確立させる。そして、そのツールを用いて得られた現象を詳細に記録していく。時期特異性を示す論文は必ず発表する。既存のシグナル系とのクロストークについても可能な限り調べていき、時期特異的な影響が生じる機序についても、解答を用意していく。

実は『FGF シグナルが強い時期特異性を持つに違いない』と口にする FGF の研究者は

いるが、役者が複雑であるため証明の手法がなかった。本研究ではここ数年の間に蓄積された分子ツールを活用し、その仮説が証明できるという点で独創的であり、且つ学術的に待ち望まれていた内容であると考えている。

今回の実験では、焦点を ERK に絞った活性化ツールを用いているため、非常にシンプルに理解できる結果が得られることが予想される。初期発生の分野はいわゆる 3D 軸を超えて、時間軸も対象とすべき時期に突入しており、本研究は時間軸を考える上でひとつの確かなモデル系となり得るであろう。また、開発される実験ツールは極めて汎用性の高いものであり、発生学の分野を超えて、医学や細胞生物学の分野においても広く活用できるものになるだろう。

3. 研究の方法

胚対象エレクトロポレーションの系の確立: ツメガエル胚を用いた遺伝子解析では、胞胚期直後に mRNA を大量発現するのは難しかった。それを解決したのが、胚対象エレクトロポレーション法である。胚の細胞膜と受精膜の間の空間に mRNA を注入し、電気刺激によって胚内に mRNA を注入する方法だ。本研究では、新たな遺伝子導入機器を研究室に導入し、胞胚期以降の任意の時期に mRNA を発現させる作業を効率よく進めていった。

ヒートショックプロモーター(hsp)の活用: ツメガエル研究で用いられるプロモーターの中でも、バックが最も低く、手軽に用いられるものが hsp である。本研究では、hsp の下流に caMEK を結合させ、その DNA を用いて顕微注入を行った。

FRB/FKBP/Rapamycin アッセイの活用: Rapamycin は TOR タンパク質の FRB ドメインと FKBP12 タンパク質に非常に強い結合性を示す薬剤である。この特性を利用して、FRB ドメインに目的のタンパク質 A を、FKBP に別のタンパク質 B を結合し、Rapamycin を加えることによって、A と B を人為的に接近させる FRB/FKBP/Rapamycin アッセイが最近の細胞生物学では頻用されている。今回は、ERK を活性化させるために、その上流となる Raf と MEK を会合させ、任意の時期に ERK 活性を導いていった。

4. 研究成果

今回の研究において、ERK 活性化によるアウトプットの現れ方のターニングポイントがわずか数時間の初期発生の段階において次々と訪れることが明らかとなった。これまでに確実視されていた MBT (mid-blastula transition: 中期胞胚期に存在する転写開始時期)、後期胞胚期、原腸胚後期である。具体的には、ERK の活性化は MBT 以前では細胞周期の停止を、MBT 以降には BMP シグナルの阻害による背側化を、後期胞胚期以降には

中胚葉誘導を、原腸胚後期以降には後方を導くことが判明した。

また、常時活性化 MEK (タンパク質として存在する際に ERK を自動的にリン酸化して活性化させるもの) をコードした遺伝子をヒートショックプロモーターの後ろに組み込んだコンストラクト、そして FGF 受容体の細胞外ドメインを FKBP と FRB に置き換えたものも完成した。これらは今後、発生生物学のみならず細胞生物学において非常に有用なツールとして活用できることが期待される。

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 3 件)

1) Hiroki Kuroda, Takahiro Iwamiya, Kenta Morimoto
The Experimental Procedures to Create Life and Transplantable Heart
SFC J. (2015) 15, 262-282.
査読有

2) Yoshihisa Ohata, Shinya Matsukawa, Yuki Moriyama, Tatsuo Michiue, Kenta Morimoto, Yuka Sato, Hiroki Kuroda
Sirtuin inhibitor Ex-527 causes neural tube defects, ventral edema formations, and gastrointestinal malformations in *Xenopus laevis* embryos
Develop. Growth Differ. (2014) 56, 460-468.
査読有

3) Shoko Mori, Yuki Moriyama, Kumiko Yoshikawa, Tomoyo Furukawa and Hiroki Kuroda
beta-adrenergic signaling promotes posteriorization in *Xenopus* early development
Develop. Growth Differ. (2013) 55, 350-358.
査読有

[学会発表] (計 7 件)

1) 黒田裕樹
脊椎動物の初期発生において分泌型小分子が果たす役割
第 9 回日本ツメガエル研究集会(2015 年 9 月 13-15 日)・秋田温泉さとみ(秋田県秋田市)

2) 辛承宰、富田勝、黒田裕樹
時計遺伝子が *Xenopus laevis* の初期発生に与える影響の解析
日本分子生物学会(2014 年 11 月 25-27 日)・パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

3) 藤川昂、黒田裕樹

ERK の活性化に対して両生類の初期胚が示す時期特異的な反応

日本分子生物学会(2014 年 11 月 25-27 日)・パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

4) Hiroki Kuroda, Yuka Sato, Shoko Mori
Beta-adrenergic signaling promotes posteriorization in *Xenopus* early development.

International *Xenopus* Conference (2014 年 8 月 24-28 日)・アシロマカンファレンスホール(米国・カリフォルニア州)

5) Yuka Sato, Shinya Matsukawa, Tomoyo Furukawa, Hiroki Kuroda
SKL-tagging: a method for generating dominant-negative inhibitors of dimeric transcriptional factors such as Siamois and Vent.

発生生物学会(2014 年 5 月 27-30 日), WINC 愛知(愛知県名古屋市)

6) Yoshihisa Ohata, Shinya Matsukawa, Yuki Moriyama, Tatsuo Michiue, Kenta Morimoto, Hiroki Kuroda.

The effects of rapamycin and EX-527 on early embryogenesis in *Xenopus*.

発生生物学会(2014 年 5 月 27-30 日), WINC 愛知(愛知県名古屋市)

7) 黒田裕樹

脊椎動物の初期発生にリガンド小分子が与える影響

第 7 回日本ツメガエル研究集会(2013 年 9 月 23-25 日)・秋吉台国際芸術村(山口県美弥市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 裕樹 (KURODA, Hiroki)
慶應義塾大学・環境情報学部・准教授
研究者番号：70402229

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：