

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770167
 研究課題名（和文） ERK活性化時間をモニターする細胞内分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism how cells monitor the duration of ERK activity
 研究代表者
 花房 洋(Hanafusa Hiroshi)
 名古屋大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：00345844

研究成果の概要：細胞は外部からのシグナルによって増殖／分化する。成長因子など細胞外からのシグナルは、細胞膜上の受容体によって認識され、細胞内シグナル伝達経路を介して核に伝達される。その結果、様々な遺伝子の発現を生じ、細胞は適切な応答を引き起こすことができる。主要なシグナル伝達経路のひとつに ERK MAP キナーゼ経路が存在し、細胞応答に重要な役割を果たしていることが知られている。また、我々を含め最近の研究から、ERK の活性化の ON/OFF のみならず活性化時間が細胞の応答に重要であることがわかってきた。我々はほ乳類培養細胞やアフリカツメガエル初期胚を用い、細胞がどのように ERK の活性化時間をモニターしているのか解析を行った。その結果、ネガティブフィードバック因子 Sprouty が ERK の活性化時間をコントロールし、アフリカツメガエル初期胚中胚葉形成時、背腹軸形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また初期胚において、転写因子 X Fos が自身の安定性をもとに ERK の活性化時間をモニターしていることを明らかにした。X Fos は ERK によってリン酸化されると安定に存在し、アフリカツメガエル初期胚背側領域においてオーガナイザー遺伝子 Chordin の発現に寄与していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ERK、MAP キナーゼ、Fos、中胚葉形成

1. 研究開始当初の背景

ERK/MAP キナーゼ経路は細胞の増殖／分化に重要な役割を果たしている細胞内シグナル伝達経路である。これまで主に哺乳類培養細胞を用いた研究から、ERK 活性化の on/off に加え、ERK の活性化時間の持続時間が細胞の分化に重要であることが示唆されてきた。例えば神経細胞 PC12 細胞は、EGF 刺激による一過的な ERK の活性化では、細胞増殖を行うのに対し、NGF 刺激による持続的な ERK の活性化では、神経突起の伸長を引き起こす。このようにモデル細胞を用いた研究から、ERK の活性化時間が細胞分化に重要であることはわかっていたが、実際に生理的条件下で、本当に ERK の活性化時間が細胞運命決定に影響を与えるのか不明であった。また、ERK の活性化時間の違いを細胞がどのようにモニターし、適切な細胞応答（分化を含む）につなげているのかもあまりわかっていなかった。我々は哺乳類培養細胞とアフリカツメガエル初期胚を用い、ERK 経路のネガティブフィードバック因子 Sprouty が ERK の活性化時間を制御し、特に初期発生における細胞の運命決定に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。Sprouty は FGF 刺激依存的にチロシン残基がリン酸化され、Grb2 と結合する。その結果、Grb2/Sos 複合体が FGF 受容体へリクルートされず、Sos による Ras の活性化を阻害する (Hanafusa et al., Nat. Cell Biol. 2002)。また Sprouty はチロシンフォスファターゼ Shp2 によって脱リン酸化され、阻害活性を失う。このことは Sprouty がチロシンリン酸化、脱リン酸化という翻訳後修飾によって可逆的かつ迅速にインヒビターとして

機能していることを示唆している。このようなタイプのネガティブフィードバック因子は初の例である。また Shp2 はフォスファターゼであるにも関わらず ERK 経路に対しポジティブに働くことが知られていたが、そのメカニズムは不明であった。我々の結果から、Shp2 はネガティブフィードバック因子 Sprouty を脱リン酸化することで、ERK 経路に対してポジティブに働いている可能性が示唆された (Hanafusa et al., J. Biol. Chem. 2004)。このようにこれまで我々は、Sprouty による ERK 経路の活性化制御機構を分子レベルで解析してきた。本研究では、Sprouty による ERK 経路の制御が、生理的条件下でどのように重要か明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、ネガティブフィードバック因子 Sprouty によって制御された ERK の活性化時間を、細胞がどのようにモニターし、細胞分化に結び付けているのか、その分子メカニズムの解明を目指した。またアフリカツメガエル初期胚を用いることで、生理的条件下（個体レベル）においてその重要性を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

アフリカツメガエル初期胚 4～8 細胞期に目的遺伝子に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを微量注入し、内在性蛋

白質をノックダウンする。その後後期胞胚期にアニマルキャップを切り取り、モルフォリノアンチセンスオリゴ微量注入によって生じる効果を、各種マーカー遺伝子を用いた real time RT-PCR によって検討した。また優勢不能型 XSprouty2 変異体の mRNA を同様に微量注入し、個体レベルの表現型や real time RT-PCR によるマーカー遺伝子の発現パターンを解析することで検討した。さらに、XFos の安定性を、XFos にたいする抗体を用いたウエスタンブロッティング法によって検討した。

4. 研究成果

本研究から、アフリカツメガエル初期胚中胚葉形成期、背腹軸にそった分化に ERK の活性化時間の違いが重要であることを明らかにした。ほ乳類培養細胞同様、アフリカツメガエル初期胚においても、XSprouty2 は ERK の活性化時間を制御することがわかった。アフリカツメガエル初期胚において XSprouty2 は中胚葉に発現が見られた。そこで、この領域で ERK の活性化時間を制御し、細胞の運命決定に重要な役割を果たしているか検討した。まず中胚葉領域における ERK の活性化状態を検討したところ、過去に報告のあるように、ERK は中胚葉の背側で持続的に活性化していた。モルフォリノアンチセンスオリゴによる内在性 XSprouty2 のノックダウン実験や、優勢不能型 XSprouty2 mRNA 微量注入実験から、腹側で XSprouty2 が機能し、この領域における ERK の活性を抑制していることを明らかにした。次に ERK の活性化がどのようにモニターされているのか、転写因子 XFos に注目し解析を行った。その結果 ERK の活性化は、XFos タンパク質が自身の安定性をもとにモ

ニターしていることを明らかにした。XFos タンパク質は ERK によってリン酸化されると、プロテアソームによる分解を免れ安定に存在できる。リン酸化され安定化された XFos は標的遺伝子の発現を誘導することができると考えられている。アフリカツメガエル初期胚中胚葉では、XFos は主に中胚葉背側領域で ERK によってリン酸化/安定化され、その結果、オーガナイザー遺伝子 Chordin の発現に寄与していることを明らかにした。内在性 XFos タンパク質をノックダウンすると、Chordin の発現が減少したことから、XFos は実際に Chordin の発現に重要と思われる。さらに中胚葉腹側で、内在性 XSprouty2 をノックダウンすると、この領域で ERK の異所的な活性化が生じ、XFos の安定化を介して、Chordin が異所的に誘導された。このことは、XSprouty2 による ERK 活性化時間の制御は、中胚葉背腹軸形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。なおこれらの成果は、国際的に著名な雑誌である *Nature Cell Biology* 誌に発表済みである。

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 2 件)

(1) Hanafusa, H., Matsumoto, K., and Nishida, E.

Regulation of the ERK activity duration by Sprouty contributes to dorsoventral patterning. *Nature Cell Biology*, 11:106-109 (2009). (査読有)

(2) Ishibashi, H., Matsumura, N., Hanafusa, H., Matsumoto, K., De Robertis, E.M., and Kuroda, H.

Expression of Siamois and Twin in the blastula Chordin/Noggin signaling center is required for brain formation in *Xenopus laevis* embryos. ***Mech. Dev.***, **125**: 58-66 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 花房洋 LRRK1 は Grb2 を介した EGFR エンドサイトーシスを制御する。 分子生物学会 2007 年 12 月 13 日 横浜

(2) 花房洋 LRRK1 は ESCRT-0 複合体と相互作用することで EGFR 細胞内トラフィックを制御している。 分子生物学会 2008 年 12 月 12 日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花房 洋 (Hanafusa Hiroshi)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00345844