

時期・部位特異的ノックアウトマウスの作成に当たり、Ror2（およびRor1）に特異的なポリクローナル抗体の作成を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は所属動物実験施設指針等に則り、動物愛護上の配慮をもって行った。

C. 研究結果

Ror2, Wnt5a 遺伝子ノックアウトマウスにおいて骨軟骨系の異常の類似性に加え、心臓大血管系、肺及び腎臓の形成異常にも高い類似性が認められた。Ror2 は発生過程の顎顔面口腔領域に発現が認められ、Ror2 ノックアウトマウス（新生児致死）において顎顔面口腔領域の形態異常（低形成等）が認められるが、本年度に作成した神経堤細胞特異的 Ror2 ノックアウトマウス（新生児致死を回避）においても同様の病態が観察された。また、Ror2 が rFz2 または hFz5 と細胞外システインリッチドメインを介して特異的に会合し、Wnt5a の受容体として機能することが示された。また、Wnt5a および Ror2 を介するシグナル伝達系が JNK を活性化し PCP 経路に関与することを明らかにした（Wnt5a, Ror2 が PCP 経路に関与することは、アフリカツメガエルを用いた分担者澁谷博士との共同研究に

よっても示された。）。また、CKIεに加え CKIαが Ror1, Ror2 をセリン・スレオニンリン酸化し、Ror1, 2 のチロシン自己リン酸化亢進・チロシンキナーゼ活性化を誘導することを明らかにした。さらに、本年度の研究により、Ror2 が B 型短趾症、劣性遺伝を示す Robinow 症候群で欠失が認められる Ror2 の細胞内プロリンリッチドメインを介して、転写制御等に関与することが知られているアダプター分子である Dlxin-1/NRAGE と結合し、Ror2 のチロシンキナーゼ活性に非依存的に Dlxin-1/NRAGE の細胞内局在・転写活性制御能を調節することを見出した。

D. 考察

本年度の研究により、これまで不明であった Ror2（及び Ror1）を介するシグナル伝達について新たな糸口が開かれたと考えている。また、Ror2 によるチロシンキナーゼ活性非依存的な Dlxin-1/NRAGE (Mx2・Dlxin-1/NRAGE)の細胞内局在・転写制御能の調節機構の知見は、Ror2（恐らくは Ror1 も）が新しいタイプの受容体型チロシンキナーゼとして機能することを示唆するものである。今後これらのシグナル伝達に関する知見と、疾患モデルマウス（各種ノックアウトマウス）の病態との関連につ

いて明らかにしたいと考えている。また、発生過程の歯胚や骨折時の修復過程において Ror2 の発現が誘導されることを見出している（未発表）、本年度に作成した神経堤細胞特異的 Ror2 ノックアウトマウスや現在作成中の疾患モデルマウスを用いて、これらの過程における Ror2（将来的には Ror1）の役割を明らかにしたい。

E. 結論

Ror2, Wnt5a 遺伝子ノックアウトマウスにおいて骨軟骨系の異常の類似性に加え、心臓大血管系、肺及び腎臓の形成異常にも高い類似性が認められ、遺伝学的解析結果から両分子間の関連が示唆された。また、Ror2, Wnt5a の分子・細胞レベルでの解析から、Wnt5a が Ror2 の細胞外領域に特異的に結合すること、Ror2 が細胞外領域を介して rFz2 または hFz5 と特異的に結合すること、および Wnt5a, Ror2 を介するシグナル伝達が JNK 経路を活性化することが示された。これらの知見から、Wnt5a, Ror2（及び rFz2 または hFz5）がリガンド・レセプターの関係にあることが示された。また、CKIε が Ror1, Ror2 の主に細胞内プロリンリッチドメインに結合し、Ror1, 2 をセリン・スレオニンリン酸化することにより、Ror1, 2 のチロシン自己リン酸化及びチロシンキナー

ゼを活性化することが明らかとなった。さらに、Ror2 が B 型短趾症、劣性遺伝を示す Robinow 症候群で欠失が認められる Ror2 の細胞内プロリンリッチドメインを介して、転写制御等に関与することが知られているアダプター分子である Dlxin-1/NRAGE と結合し、Ror2 のチロシンキナーゼ活性に非依存的に Dlxin-1/NRAGE の細胞内局在・転写活性制御能を調節することを明らかにした。

F. 健康危険状況

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Iida, T., Mine, S., Fujimoto, H., Suzuki, K., Minami, Y., and Tanaka, Y.: Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. **Genes to Cells** 7: 143-149, 2002.

Tanaka, Y., Nakayamada, S., Fujimoto, H., Okada, Y., Umehara, H., Kataoka, T., and Minami, Y.: H-Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. **J. Biol. Chem.** 277: 21446-21452, 2002.

Yoda, A., Oishi, I., and Minami, Y.: Expression and function of the Ror-

family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of the nematodes, mice, and human. **J. Receptor and Signal Transduction**, 2003, in press.

2. 学会発表

飯田武、岡田洋右、福島あゆみ、南康博、田中良哉、ステロイドによる HIF-1 誘導性血管内皮細胞アポトーシスの増強効果、第 20 回日本骨代謝学会、2002.

南康博、依田成玄、渡辺研、高田慎治、大石勲、形態形成における Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼを介するシグナル伝達系及び他のシグナル伝達系とのクロストークについて、第 75 回日本生化学会大会、2002.

鈴木泰明、松田武、黒田嘉和、南康博、古森孝英、受容体型チロシンキナーゼ Ror2 の骨形成シグナル伝達における役割、第 47 回日本口腔外科学会総会、2002.

可児修一、大石勲、山本裕之、鈴木泰明、依田成玄、内匠透、高田慎治、菊池章、南康博、受容体型チロシンキナーゼ Ror1, Ror2 と Wnt シグナル制御分子との機能共役、第 25 回日本

分子生物学会年会、2002.

大石勲、鈴木泰明、可児修一、大西伸幸、大河原美静、澁谷浩司、山田源、高田慎治、南康博、Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼによる器官形成の分子機構、第 25 回日本分子生物学会年会、2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

該当なし。

20020274

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading.

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T.

J Bone Miner Res. 2002 Jun;17(6):1015-25.

A RING finger protein Praja1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1.

Sasaki A, Masuda Y, Iwai K, Ikeda K, Watanabe K.

J Biol Chem. 2002 Jun 21;277(25):22541-6. Epub 2002 Apr 16.

Involvement of NLK and Sox11 in neural induction in Xenopus development.

Hyodo-Miura J, Urushiyama S, Nagai S, Nishita M, Ueno N, Shibuya H.

Genes Cells. 2002 May;7(5):487-96.

Targeted disruption of the Tab1 gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis.

Komatsu Y, Shibuya H, Takeda N, Ninomiya-Tsuji J, Yasui T, Miyado K, Sekimoto T, Ueno N, Matsumoto K, Yamada G.

Mech Dev. 2002 Dec;119(2):239-49.

The TAK1–NLK mitogen–activated protein kinase cascade functions in the Wnt–5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta–catenin signaling.

Ishitani T, Kishida S, Hyodo–Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, Shibuya H, Moon RT, Ninomiya–Tsuji J, Matsumoto K.

Mol Cell Biol. 2003 Jan;23(1):131–9.

Cytokines suppress adipogenesis and PPAR–gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade.

Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S.

Nat Cell Biol. 2003 Mar;5(3):224–30.

Hypoxia–inducible factor–1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells.

Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y.

Genes Cells. 2002 Feb;7(2):143–9.

H–Ras/mitogen–activated protein kinase pathway inhibits integrin–mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts.

Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y.

J Biol Chem. 2002 Jun 14;277(24):21446–52. Epub 2002 Apr 04.

Expression and function of the Ror–family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of nematodes, mice, and humans.

Yoda A, Oishi I, Minami Y.

J Recept Signal Transduct Res. 2003 Feb;23(1):1–15.