

機関番号：12102
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21770201
 研究課題名 (和文) ゼブラフィッシュ側線形成の研究から明らかになった
 Jagged の新たな機能の解析
 研究課題名 (英文) A novel function of Jagged in the zebrafish lateral line development

研究代表者
 水野 智亮 (MIZUNO TOMOAKI)
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教
 研究者番号：80529032

研究成果の概要 (和文)：

ゼブラフィッシュ側線形成をモデル系として、Notch 非依存的な Jagged1b による抗アポトーシス制御機構の解析をおこなった。がん抑制因子 p53 の機能阻害によって、Jagged1b 機能阻害胚の表現型が抑圧されたこと、転写因子 Six1 の発現が Jagged1b 機能阻害によって低下したこと、Six1 機能阻害胚では Jagged1b 機能阻害胚と同様の表現型がみられたことから、Jagged1b による抗アポトーシス制御に p53 と Six1 が関与していると予想された。

研究成果の概要 (英文)：

We studied an anti-apoptotic role of Jagged1 using the zebrafish lateral line development as a model system. Jagged1 knockdown-induced apoptosis was suppressed by knockdown of p53 tumor suppressor. Expression of Six1 transcription factor was decreased in Jagged1 knockdown embryos. Similar to Jagged1, Six1 knockdown induced apoptosis. These results imply that p53 and Six1 are involved in regulation of anti-apoptosis via Jagged1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子遺伝学、情報伝達
 科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学
 キーワード：ゼブラフィッシュ、Notch

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュは、変異系統やアンチセンスオリゴを用いた分子遺伝学的解析が可能である上に、遺伝子の機能が哺乳類と非常に類似していることから、脊椎動物に共通の分子機構を明らかにするために有用なモデル生

物と考えられている。側線器官は魚類および両生類に共通に存在する水流感知器官であり、ゼブラフィッシュでは顔面や体側両面に多数存在している。なかでも耳より後方に位置する側線は後部側線とよばれ、頭部より尾部まで直線状に配置されている。後部側線の形成は耳の後方でプラコード(原器)が形成

されることから始まる。プラコードは、個体発生の際に後部まで移動していくが、その過程で、プラコード後部の細胞集団が一定間隔で分離される。分離された細胞集団は分化し、有毛細胞と支持細胞からなる neuromast (感丘) が形成される。これまでに、ゼブラフィッシュ側線器官の形成過程で、Notch リガンドである Delta から Notch へのシグナルが有毛細胞と支持細胞の運命決定において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。それに対して、Jagged のひとつである Jagged1b も側線原器で発現しているが、その機能は不明であった。

そこで、アンチセンスオリゴを用いて Jagged1b の機能を阻害したところ、有毛細胞と支持細胞の運命決定には影響がみられなかったのに対して、感丘数の減少がみられた。感丘数が減少する原因のひとつとして側線原器の移動不全が考えられる。しかしながら、Jagged1b の機能阻害を行っても側線原器の移動自体は起こっていた。このことから、Jagged1b の機能阻害による感丘数の減少は側線原器の移動不全によるものではないと考えられた。次に、Jagged1b の機能阻害による表現型を詳細に観察したところ、側線原器内の細胞数の減少とアポトーシスの増加が認められた。このことから、感丘となる細胞集団が分離、定着、分化し、正常な器官を形成していく過程には、細胞数の減少を防ぐ抗アポトーシス機構が必須であると考えられた。

Notch シグナル伝達経路は、膜貫通型受容体である Notch の細胞外領域に Delta もしくは Jagged といったリガンドが結合することによって活性化される。リガンドが結合すると、Notch の細胞内領域は切り離され核内へ移行し、標的遺伝子の転写を活性化する。したがって、Jagged の機能は Notch 受容体を介した Notch シグナル伝達経路の活性化によるものと考えられる。そこで、Jagged1b を機能阻害したときと同様の異常が Notch シグナル伝達経路の働きを阻害した場合にもみられるかを検討した。しかしながら、驚くべきことに、アンチセンスオリゴを用いた Notch 自体の機能阻害、および、Notch 細胞内領域の分離に機能するガンマセクレターゼの阻害剤による処理によって、細胞の運命決定には異常が生じたが、細胞数の減少とアポトーシスの増加はみられなかった。したがって、Jagged1b は Notch とは独立した未知の分子機構を介して抗アポトーシス機構を制御していると予想された。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ側線形成をモデル系と

して、Jagged1b がどのように抗アポトーシス機構を制御し、どのように正常な器官形成に機能しているかを明らかにすることを目的とする。また、ゼブラフィッシュ側線形成での解析結果を踏まえて、哺乳類培養細胞を用いた分子生物学的解析をおこない、Jagged の脊椎動物で共通した分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Jagged 抗アポトーシス機能に関わる細胞の特定

ゼブラフィッシュ側線形成期において、タイムラプス解析による Jagged1b 機能阻害胚の詳細な観察、免疫染色による Jagged1b 発現細胞の同定と細胞内局在の分析、移植実験による Jagged1b 機能の細胞自律性・非自律性の検討をおこなう。

① Jagged 機能阻害による表現型の解析

Jagged1b を機能阻害した際にどのような細胞でどの時期にアポトーシスが起きるかを理解するために、タイムラプス解析をおこなう。側線原器細胞の観察には、側線原器細胞で膜局在型 GFP を発現するトランスジェニック系統、および、側線原器の一部の細胞で細胞質局在型 GFP を発現するトランスジェニック系統を用いる。

② Jagged 抗体による免疫染色

Jagged1b の発現細胞と局在領域をタンパク質レベルで明らかにするために、免疫染色をおこなう。そのために、最初に、Jagged1b の細胞外領域および細胞内領域それぞれの融合タンパク質または合成ペプチドを用いて Jagged1b に対する抗体を作製する。その後、側線原器の一部の細胞で細胞質局在型 GFP を発現するトランスジェニック系統由来の胚を、作製した Jagged1b 抗体で免疫染色し、Jagged1b が発現している細胞群を同定する。また、同時に、Jagged1b の細胞内局在パターンを調べる。

③ 移植実験

Jagged の抗アポトーシスにおける機能が細胞自律的であるかを検討するために移植実験をおこなう。Jagged1b は一回膜貫通型タンパク質であることから、Jagged1b の機能阻害による異常が、Jagged1b を発現している細胞で起こっている可能性 (細胞自律的) と Jagged1b を発現している細胞の周辺の細胞で起こっている可能性 (細胞非自律的) が考えられる。そこで、Jagged1b 機能阻害胚から取り出した側線原器の野生型胚への移植、逆に、野生型胚から取り出した側線原器の Jagged1b 機能阻害胚への移植をおこない、アポトーシスが Jagged1b 機能阻害細胞と野生型細胞のいずれで起こるかを調べる。

(2) Jagged 抗アポトーシス機能の分子作用機構の解明

ゼブラフィッシュ側線形成時の抗アポトーシス機能における Jagged1b タンパク質の機能ドメインの特定と Jagged1b 下流因子の同定を行う。

① Jagged 抗アポトーシス機能ドメイン解析

Jagged の抗アポトーシスにおける機能に重要なドメインを同定するために断片化した Jagged1b の過剰発現による rescue 実験をおこなう。Jagged1b 機能阻害胚に対して、断片化した Jagged1b の mRNA を injection し、Jagged1b 機能阻害表現型が rescue されるかを検討する。mRNA 注入では、発現が全身で一過性に起こるために、期待した効果が得られない可能性がある。その場合には、GAL4-UAS システムを用いて側線原器で特異的に Jagged1b 遺伝子の発現を試みる。そのために、側線で特異的に発現する遺伝子のプロモーターの制御下で GAL4 を発現する系統と UAS の下流に Jagged1b 断片を組み込んだ系統を作製する。その後、側線特異的 GAL4 系統と種々の UAS-Jagged1b 断片を組み込んだ系統とを交配して、側線発生への効果を見る。さらに、それらの系統で Jagged1b で機能阻害をさらにを行い、抗アポトーシスに必要な機能ドメインを同定する。

② Jagged 下流因子の同定

Jagged1b 下流で抗アポトーシスに機能する因子の同定を試みる。Jagged1b は Notch とは独立した未知の分子機構を介して機能していることが予想されたことから、Jagged1b の作用機構を明らかにするため、Jagged1b 機能阻害胚で発現が変化する遺伝子をマイクロアレイによって網羅的に探索する。Jagged1b 機能阻害胚で発現が変化する遺伝子について、機能阻害した場合に Jagged1b の機能阻害と同様の表現型がみられるか、Jagged1b 機能阻害による表現型が抑圧されるかを調べ、Jagged1b 下流因子を同定する。

(3) 脊椎動物共通の Jagged 機能の解析：抗アポトーシス機構とガン化の関連

ゼブラフィッシュ側線器官をモデル系として明らかにしてきた Jagged を介した抗アポトーシス機構が哺乳類においても保存されているかを検討する。正常細胞と比較してガン細胞で Jagged の発現が上昇している例やガン細胞の生存および増殖に Jagged が不可欠である例が報告されている。また、細胞のガン化にはアポトーシスに対する抵抗性が重要であることが知られている。これらのことから、Jagged を介した抗アポトーシス機構が細胞のガン化に関与する可能性が考えられる。そこで、Jagged が高発現している哺乳類ガン細胞に対して、Jagged および上述の

解析で明らかにしてきた Jagged 下流因子の機能阻害をおこない、これらの機能阻害の表現型を細胞形態、細胞増殖、アポトーシスなどの点で比較解析する。また、同定してきた Jagged 下流因子の発現が哺乳類細胞においても Jagged の下流で制御されているかについても検討する。これらの解析により、ゼブラフィッシュ側線器官で機能している分子機構が脊椎動物で共通して利用されているか、Jagged を介した抗アポトーシス機構と細胞のガン化が関連しているかを検討する。

4. 研究成果

Notch シグナル伝達経路は、多細胞真核生物において保存されたシグナル伝達経路のひとつであり、個体発生において重要な役割を果たしている。申請者らは、Notch リガンドのひとつである Jagged1b の個体レベルでの機能を明らかにすることを目的とし、ゼブラフィッシュ胚において Jagged1b の機能阻害をおこなった。その結果、Jagged1b 機能阻害胚では、側線原基内の細胞数が減少すること、および、細胞のアポトーシスが増加することを見出した。これに対して、Notch の機能阻害では側線原基内における細胞数の減少とアポトーシスの増加はみられなかったことから、Jagged1b の抗アポトーシスにおける機能は Notch 非依存的であると考えられた。しかしながら、実際に Jagged1b がどのようにしてアポトーシスを抑制しているのかは不明であった。そこで、抗アポトーシスにおける Jagged1b の機能を個体レベル、分子レベルの両面で明らかにすることを本研究の目的として解析をおこなった。

(1) Jagged1b 機能阻害胚の側線原基において異常が生じる過程を経時的撮影によって詳細に観察した。その結果、正常胚では側線原基はまとまった細胞集団として移動するのに対して、Jagged1b 機能阻害胚では移動中の側線原基から徐々に脱落する細胞がみられた。この細胞の脱落は、側線原基内でアポトーシスした細胞が最終的に脱落したために生じていると予想される。

(2) Jagged1b がアポトーシスを抑制する分子機構を明らかにするため、種々のアポトーシス経路を制御することで知られるがん抑制因子 p53 との関連性を調べた。その結果、p53 を機能阻害することによって、Jagged1b 機能阻害胚の表現型が抑圧されることを見出した。このことから、Jagged1b は p53 を介したアポトーシス経路を負に制御していると予想される。

(3) Jagged1b を介したアポトーシス制御機構をさらに理解するため、Jagged1b 機能阻害によって側線原基内での発現に変化が生じ

る遺伝子や機能阻害すると側線発生において Jagged1b 機能阻害胚と同様の表現型を示す遺伝子を探索した。その結果、転写因子をコードする Six1 の側線原基における発現が Jagged1b 機能阻害によって低下すること、および、Six1 機能阻害胚では Jagged1b 機能阻害胚と同様に感丘数の減少と側線原基におけるアポトーシスの亢進が起ることを見出した。これらの結果から、Six1 が Jagged1b の下流で機能すると考えられる。

今後は、Jagged1b による Six1 発現制御機構や Six1 によるアポトーシス制御機構、特に p53 との関係について解析をおこない、Jagged1b を介したアポトーシス制御機構の実体を明らかにしていきたい。

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 1 件)

*Kota Fujiki, *Tomoaki Mizuno, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto (*=equal contribution)
The Caenorhabditis elegans Ste20-Related Kinase and Rac-Type Small GTPase Regulate the c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathway Mediating the Stress Response.
Molecular and Cellular Biology
査読有
30(4):995-1003, 2010

[学会発表] (計 7 件)

①李春、久本直毅、水野智亮、松本邦弘
線虫をモデル動物とした神経再生を誘導する因子/受容体の解析
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会
2010年12月7日～10日
神戸

②Ayuna Hattori, Tomoaki Mizuno, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto
The C. elegans JNK signaling pathway regulates FOS-1 transcription factor in stress response
East Asia Worm Meeting
2010/7/11~14
Tokyo, JAPAN

③服部鮎奈、水野智亮、久本直毅、松本邦弘
線虫 JNK は転写因子 Fos をリン酸化し負に制御する

第32回日本分子生物学会年会
2009年12月9日～12日
横浜

④Ayuna Hattori, Tomoaki Mizuno, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto
KGB-1, a JNK-like MAPK, negatively regulates FOS-1 transcription factor in stress response
International Worm Meeting
2009/6/24~28
Los Angeles, USA

⑤Kota Fujiki, Tomoaki Mizuno, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto
C. elegans MLK-1 MAPKKK is regulated by double phosphorylation in JNK-mediated stress response pathway
International Worm Meeting
2009/6/24~28
Los Angeles, USA

[その他]
ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molcellbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 智亮 (MIZUNO TOMOAKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教
研究者番号：80529032