

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670020

研究課題名（和文）Notchシグナルの人為操作を目指した新規ツールと活性測定法の創出

研究課題名（英文）Development of tools and activity measurement methods for artificial manipulation of Notch signaling pathway

研究代表者

伊藤 素行（ITO, MOTYUKI）

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：20377906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：Notchシグナルは、種々の組織発生に関与する重要な細胞間シグナル伝達経路の一つであり、その人為操作は多能性細胞から標的細胞への分化誘導に有用である。本研究では、ヒトD114およびJAG1リガンド固定化ビーズを調製し、それらがT細胞分化誘導活性を有することを実証した。D114については、点突然変異を導入することにより、野生型よりも優れた活性を有するリガンドタンパク質の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Notch signaling plays important roles in various tissue development, and its manipulation is useful for artificially inducing the differentiation from pluripotent cells into target cells. In this study, human D114 and JAG1 ligand-immobilized beads were prepared and we demonstrated that they showed T cell-inducing activity from hematopoietic progenitor cells. Further, we succeeded in developing a D114 ligand protein with superior activity to wild type by introducing a point mutation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Notch シグナル伝達 固相化

### 1. 研究開始当初の背景

Notch シグナル伝達経路は、細胞間での情報伝達経路であり、脊椎動物で多くの組織の発生過程において重要な役割を果たしている。膜貫通型のリガンド (Delta, Jagged) と受容体 (Notch) が結合することによって Notch の細胞内領域は切り離され核内へ移行する。核内に移行した Notch 細胞内領域は DNA 結合蛋白質 CSL と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。Notch シグナル伝達経路は Notch-リガンド相互作用に依存するが、相互作用のみではシグナル活性化には不十分である。以前の研究では、リガンドは機械的引っ張り力またはリサイクリングを誘導するために細胞内ユビキチン化によって活性化されなければならないことが分かった [Itoh et al., Le Borgne et al., 2005; Musse et al., 2012]。これらの2つのメカニズムは相互に排他的ではないが、これらのメカニズムが Notch 活性化にどのように寄与するかは十分に理解されていない。Notch 活性化メカニズムを調べるために、Notch リガンド提示細胞と Notch 受容体発現細胞の共培養系が広く使用されている。しかしながら、このアプローチは、生化学分析においては、両方の細胞由来のタンパク質が混在してしまう欠点を有する。他方、Notch リガンド発現細胞の代わりに、自己組織化単層 [Goncalves ら, 2009] またはマイクロビーズ [Taqvi ら, 2006] のような材料を用いた固定化リガンドタンパク質を使用する手法も行われている。これらのアプローチは、Notch リガンド - 受容体相互作用後の Notch シグナル伝達活性の調節機構の理解に有用であるが、それらによるシグナル活性化機構解明やその応用研究は十分になされていない。

### 2. 研究の目的

上記のような問題点を解決するため、1) Notch シグナルを活性化するツールの作製、2) Notch シグナルの定量的かつ経時的活性測定系の樹立、3) 多能性細胞への1) で作製したツールによる分化制御の検証を行い、Notch シグナル調節による細胞分化の人為的操作法の樹立を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) リガンドタンパク質の発現と精製  
Notch リガンドタンパク質産生のために、HEK-293T 細胞に 3 : 1 のポリエチレンイミン (PEI) / DNA 比で各発現プラスミド 10 µg を細胞にトランスフェクションし、24 時間後、リガンドタンパク質のビオチン化のために 20mM のビオチンを添加した。24~48 時間後、細胞を回収し、1% BSA を含む PBS を用いて 3 回洗浄した。タンパク質抽出には、PBST (1% TritonX-100) 中のプロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む溶解緩衝液を使用し、タンパク質をストレプトアビジンビーズ (Promega) とともに 4

で 1 時間インキュベートした。遠心分離後、PBST (0.1% Tween) を用いてビーズを 6 回、PBS で 2 回洗浄し、100 µL の PBS に懸濁した。

### (2) ウェスタンブロットおよびクーマシーブルー染色

ウェスタンブロット分析および CBB Stain One Super (Nacalai Tesque) を用いたクーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を、標準的手法に従って実施した。ウェスタンブロットには、c-Myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology) およびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch) を用いた。調製されたリガンドタンパク質の平均濃度は、20ng / 1 × 10<sup>5</sup> ビーズ (約 2 × 10<sup>-4</sup> ng / ビーズ) であった。SDS-PAGE によって決定された DLL4 および JAG1 誘導体のおおよその分子量は以下の通りであった：DLL4 FL、90kDa; DLL4 N-EGF2, 40kDa; DLL4 N-EGF3 または DLL4 N-EGF3 N257P, 45kDa; JAG1 FL, 230kDa; JAG1 N-EGF2, 50kDa; および JAG1 N-EGF3, 60kDa。40 µg の JAG1 FL および 10ng の N-EGF3 または N-EGF2 のいずれかが約 0.17pmol に相当する一方で、40ng の DLL4FL および 20ng の N-EGF3 または N-EGF2 のいずれかが約 0.44pmol に相当する。

### (3) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

pGL4.1-TP1 dElucPEST (Notch シグナルレポーター, Toyobo 製 Eluc) を含む混合物を XtremeGene 9 (Roche) トランスフェクション試薬を用いて、96 ウェルプレート (5 × 10<sup>3</sup> 細胞/ウェル) 中の SW480 細胞または HeLa 細胞へトランスフェクションした。24 時間のインキュベーション後、D-ルシフェリン (Wako) の存在下で Notch リガンド発現細胞または固定化 Notch リガンドタンパク質をトランスフェクト細胞に添加し、CL96 自動生物発光測定装置 (中立電機) を用いて 5 分毎に自動的に各ウェルからの生物発光を測定した。

### (4) 可溶性 Notch1Fc の調製

5 µg の mNotch1Fc pTracer-CMV および 5 µg の mEng MIGR プラスミドを HEK-293T 細胞に PEI を用いてトランスフェクトした。24 時間のインキュベーション後、細胞を PBS で洗浄し、培地を Freestyle293 (GIBCO) に変更し、細胞を 5 日間インキュベートした。上清を回収し、9000rpm で 35 分間遠心分離して細胞を除去した。

### (5) Notch1Fc 結合アッセイ

可溶性 Notch1Fc に対する精製リガンドタンパク質の結合能を測定するために、Notch1Fc をマウス抗ヒト Fc 抗体 (1 : 250, Jackson ImmunoResearch) を用いて 37 °C で 30 分間ブレンダリングした。2pmol および 5pmol の DLL4 (FL, N-EGF3, N-EGF3 N257P, および

N-EGF2) または c gal ビーズを 4 で 40 分間プレクラスタリングした Notch1Fc と共にインキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後、ビーズを抗マウス POD 抗体 (1 : 5000, Sigma) と共に室温で 2 時間インキュベートし、PBST (0.1% Tween) で 4 回、PBS で 2 回洗浄し、100  $\mu$ L の PBS に懸濁した。発光は、Glomax ルミノメーター (Promega) を用いて ECL を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 共培養系を用いた Notch 活性の時間経過解析

我々は、これまでに DLL4-または Jag1 発現細胞が、Notch1 発現細胞と共培養 24 時間~40 時間後に Notch レポーターを活性化することを示した [Yamamoto et al., 2010]。しかしながら、Notch 活性の経時的変化を評価する手段や報告は限られている。そこで、我々は Notch リガンドを発現する DLL4-3T3 または JAG1-3T3 細胞と 12xCSL 結合部位を含む TP-1 Notch レポータープラスミドをトランスフェクションした SW480 細胞 (Notch 受容体を発現) を共培養した後、5 分毎に Notch 活性を記録した。その結果、DLL4 発現細胞または JAG1 発現細胞 ( $2 \times 10^3$  個) を添加してから 12 時間後までに、Notch 活性が増加し、ピークレベル (約 5 倍) に達したことを見出した。Notch リガンド発現細胞 ( $8 \times 10^3$  細胞) を増加させるとさらに、Notch 活性化は約 10~15 倍増加した。

共培養 30 時間後、DLL4-または JAG1 誘導 Notch レポーター活性はピークレベルの約 70% で維持された。この持続性 Notch 活性は、共培養中の Notch リガンド細胞の増殖によって引き起こされ得る可能性がある。リガンド細胞増殖による Notch 活性誘導効果を除去するため、Notch リガンド発現細胞をマイトマイシン C (MMC) で前処理して、共培養中の細胞増殖を防止した。共培養後 30 時間で、MMC 処理 DLL4-または JAG1 発現細胞 ( $8 \times 10^3$  細胞) による Notch 活性は、ピークレベルの 50% 未満に減少した。したがって、Notch リガンド細胞の増殖は、細胞がピークレベルに達したあとの Notch 活性持続に寄与することが分かった。我々はまた、MMC 処理 DLL4 発現細胞が非 MMC 処理 DLL4 発現細胞と比較して Notch 活性においてより高いピークを引き起こすことを見出した。対照的に、MMC 処理 JAG1 発現細胞によって引き起こされるピーク Notch 活性は、非 MMC 処理 JAG1 発現細胞と比較して、有意差はなかった。MMC が DLL4 により誘導される Notch 活性を増強する機構は不明であるが、これらの結果から、細胞表面に発現する DLL4 または JAG1 が SW80 細胞における Notch レポーター活性を刺激し、約 5-10 時間でピークに達するという経時的 Notch 活性化メカニズムの存在が明らかとなった。

##### (2) Notch リガンドコートビーズの調製

哺乳動物 Notch リガンドおよび受容体は、膜貫通タンパク質である。したがって、リガンド結合による Notch 受容体活性化の機序を解明するためには共培養に基づくアッセイ系が必要である。しかしながら、このアプローチは、個々の Notch リガンドまたは受容体がどのように活性化されるメカニズムの生化学的解析には不都合である。この問題を克服するために、我々は全長 DLL4 および JAG1 リガンドタンパク質 (DLL4 FL および JAG1 FL) を作製した (図 1)。

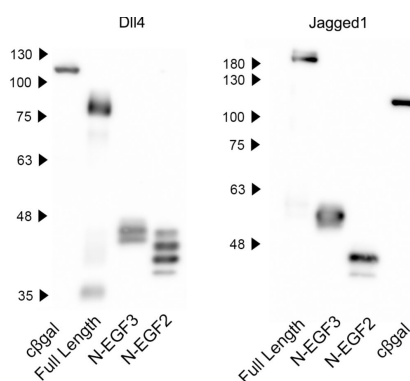


図 1 ビーズコート DLL4 および JAG1 リガンドタンパク質 (FL, N-EGF3, N-EGF2) のウェスタンブロット

DLL4 および JAG1 タンパク質の C 末端をビオチン化のための Avi タグと融合し、続いてストレプトアビジンで被覆した磁性ビーズを用いて精製した。Avi タグ付き c-galactosidase Avi (c gal) タンパク質を調製し、対照として使用した (図 1)。ウェスタンブロットおよび CBB 染色を行い、タンパク質の純度および量を評価した。この一段階精製手順により、活性 Notch リガンドを調製することができた。

##### (3) Notch リガンドコートビーズは SW480 および HeLa 細胞において Notch シグナル活性を用量依存的に活性化する

DLL4 および JAG1 リガンドによる Notch シグナル活性化を測定するため、TP-1 ルシフェラーゼ Notch レポータープラスミドをトランスフェクションした SW480 または HeLa 細胞に Notch リガンドコートビーズを添加し、Notch 活性を 5 分ごとに記録した。その結果、DLL4 または JAG1 コートビーズが用量依存的に Notch シグナル伝達を活性化することを見出した。すなわち、SW480 細胞において、40ng および 10ng の DLL4 FL が、コントロールと比較して、それぞれ約 16 倍および 12 倍の最大 Notch シグナル活性を生じることを見出した。我々はまた、40ng および 10ng の JAG1 FL が、コントロールと比較して、それぞれ最大 Notch 活性において 14 倍および 2 倍の増加を生じることを見出した。同様に HeLa 細胞では、40ng および 10ng の DLL4 FL を添加すると、コントロールと比較して Notch 活性が > 6 倍および 5 倍増加したが、40ng および 10ng

の JAG1 FL は、コントロールと比較して、それぞれ Notch 活性が 17 倍および 5 倍増加した。これらの知見は、DLL4 が HeLa 細胞と比較して SW480 細胞においてより大きな Notch シグナル伝達を引き起こすことを示す。DLL4 または JAG1 コートピースのより高い用量 (40ng) は、SW480 および HeLa 細胞において 10ng と比較して、最大活性が 2~3 時間より早く見られた。これは、リガンドが細胞上のより多くの Notch 受容体に結合する可能性があるためであると考えられた。

(4) SW480 および HeLa 細胞における DLL4 および JAG1 によって誘導される異なる Notch 活性は、Notch および Fringe 発現の差異によることが示唆される。

我々は、SW480 細胞では、DLL4 FL 誘導性および JAG1 FL 誘導性 Notch 活性化がそれぞれ約 16 倍および最大 13 倍であることを見出したが、HeLa 細胞ではそれぞれ 6 倍および約 16 倍の増加が見られた。したがって、DLL4 FL と JAG1 FL によって誘導された Notch 活性との比は、HeLa 細胞よりも SW480 細胞で高かった。この差は、2 つの細胞株における Notch 受容体および Fringe ファミリータンパク質の発現の差に起因する可能性がある。DLL4 は、DLL1 よりも NOTCH1 受容体に対する結合親和性が高い [Andrawes et al., 2013]。Jag1 は Notch2 と Notch3 よりも Notch1 との相互作用が少ないことが示されている [Shimizu et al., 1999]。Fringe 遺伝子の発現は Notch リガンドと受容体の組み合わせに依存して Notch シグナル活性を調節する。我々はまた、リアルタイム PCR を用いて、SW480 および HeLa 細胞における Notch 受容体および Fringe ファミリータンパク質の相対発現レベルを調べた。HeLa 細胞と比較して、SW480 細胞における NOTCH1 および NOTCH2 / NOTCH3 発現レベルの増加が見られた。さらに、3 種類の Fringe 遺伝子は全て、HeLa 細胞と比較して SW480 細胞で発現が多く認められた。Notch 受容体および Fringe タンパク質のこれらの発現レベル差は、SW480 および HeLa 細胞における DLL4 コートおよび JAG1 コートピースを用いて見出される Notch シグナル伝達の差を少なくとも部分的に説明し得ると考えられた。

(5) DLL4 または JAG1 の N 末端 EGF リピート 3 領域は、Notch 活性化に重要である Notch シグナル活性化に必要な Notch リガンドの領域を同定するために、我々は各リガンドについて 2 つの異なるリガンド断片、すなわち EGF ドメインの EGF リピート 1 から 3 (N-EGF3) および EGF リピート 1 から 2 (N-EGF2) を作製した (図 1)。20 ng の DLL4 N-EGF3 または DLL4 N-EGF2 による SW480 および HeLa 細胞における Notch レポーター活性を、40 ng の DLL4 FL によって引き起こされたものと比較した。使用されたタンパク質の

量は、各タンパク質のおおよその総モル数に基づいて調整した。同様に、10ng の JAG1 N-EGF3 または JAG1 N-EGF2 に起因する SW480 および HeLa 細胞における Notch レポーター活性を、40ng の JAG1 FL によって引き起こされるものと比較した。SW480 および HeLa 細胞株の両方において、DLL4 FL が DLL4 N-EGF3 の活性化に比べてより大きな活性化を引き起こしたのに対して、JAG1 FL は JAG1 N-EGF3 の活性化と同様のレベルの Notch 活性化を示した。対照的に、我々は、DLL4 N-EGF2 および JAG1 N-EGF2 は、SW480 または HeLa 細胞株のいずれにおいても Notch 活性にほとんど影響を及ぼさないことを見出した。よって、DLL4 および JAG1 の N 末端 EGF リピート 3 領域が Notch 活性化に必要であると結論付けられた。

(6) DLL4 における N257P 突然変異による DOS モチーフの再構築は、Notch 活性を増加させる

DOS モチーフは Notch レセプター結合に関与している可能性があり (Kopan and Ilagan, 2009)、ほとんどの Notch リガンドは EGF1-EGF2 に及び DOS モチーフを持っているが、DLL4 には存在しない [Komatsu et al., 2008]。ヒト DLL4 において、EGF2 中のアルギニン 257 は、DLL1、JAG1 および JAG2 に見出される DOS モチーフのプロリンに対応する。

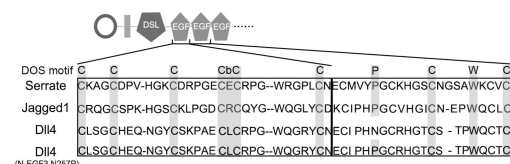


図 2 DLL4EGF2 中のアルギニン 257 は、DLL1、JAG1 および JAG2 に見出される DOS モチーフのプロリンに対応

そこで、我々は DLL4 N-EGF3 中のアルギニン 257 をプロリン (DLL4 N-EGF3 N257P) に改変し、Notch シグナル伝達活性に対するその効果を評価した (図 2)。DLL4 N-EGF3 N257P は、SW480 細胞において DLL4 FL または DLL4 N-EGF3 の Notch 活性の約 2~3 倍の増加を引き起こし、HeLa 細胞では、DLL4 N-EGF3 N257P は、DLL4 FL のそれと比較して、Notch 活性の 20 倍の増加を引き起こした。これらの知見は、DLL4 における DOS モチーフの再構成が Notch シグナル伝達活性を増加させることを示唆している。

(7) 固定化 DLL4 リガンドは、T 細胞分化を促進することができる

以前の研究では、胸腺上皮細胞上の DLL4 が NOTCH1 媒介性シグナル伝達を介した胸腺における造血前駆細胞 (HPC: 系列マーカー陰性かつ c-kit 陽性 FL (LK-FL)) からの T 細胞分化の原因であることが明らかとなっていた [Hozumi ら 2008 年。Koch ら、2008]。他方、JAG1 は HPC からの T 細胞分化を促進しない

[Abe et al., 2010]。そこで、我々は、ビーズに固定化した DLL4 または JAG1 タンパク質が、HPC から T 細胞分化を誘導できるかどうかを試みた。Notch リガンドコートビーズ添加 1 週間後、HPC を回収し、フローサイトメトリーを用いて T 細胞マーカー Thy1.2 ++ および B 細胞マーカー B220 + CD19 + を評価した。コントロールビーズ添加により、HPC は当アッセイの既定状態である B 細胞運命に分化決定された (図 3)。反対に、DLL4 FL および N-EGF3 N257P コートビーズが T 細胞分化を促進し、B 細胞分化を阻害した。また、DLL4 N-EGF3 コートビーズは T 細胞分化を促進せず、B 細胞分化をブロックしたことも見出した。DLL4 N-EGF3 を添加した細胞は、初期 T 細胞前駆体 (ETP、c-kit 高陽性) 段階で停止した。対照的に、JAG1 FL 被覆も N-EGF3 被覆ビーズも T 細胞分化を引き起こさなかった (図 3)。よって、JAG1 ではなく DLL4 が T 細胞分化に寄与し、T 細胞誘導が Notch シグナル伝達のレベルと相関することが示唆された。

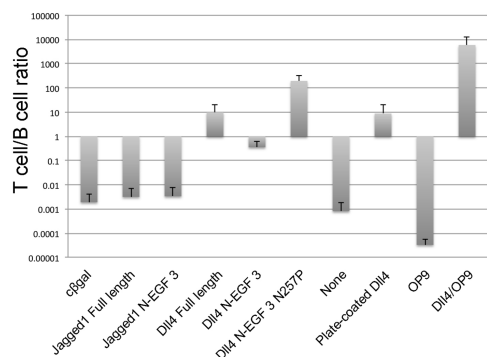


図 3 DLL4 コートビーズによる T 細胞誘導

#### 参考文献

Abe N, Hozumi K, Hirano K, Yagita H, Habu S. 2010. Notch ligands transduce different magnitudes of signaling critical for determination of T-cell fate. *Eur J Immunol* 40:2608-17.

Andrawes MB, Xu X, Liu H, Ficarro SB, Marto JA, Aster JC, Blacklow SC. 2013. Intrinsic selectivity of Notch 1 for Delta-like 4 over Delta-like 1. *J Biol Chem* 288:25477-89.

Goncalves RM, Martins MC, Almeida-Porada G, Barbosa MA. 2009. Induction of notch signaling by immobilization of jagged-1 on self-assembled monolayers. *Biomaterials* 30:6879-87.

Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Hollander GA, Shima DT, Habu S. 2008. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* 205:2507-13.

Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ,

Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, Weissman AM, Lewis J, Chandrasekharappa SC, Chitnis AB. 2003. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* 4:67-82.

Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, Manley NR, Duarte A, Macdonald HR, Radtke F. 2008. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med* 205:2515-23.

Komatsu H, Chao MY, Larkins-Ford J, Corkins ME, Somers GA, Tucey T, Dionne HM, White JQ, Wani K, Boxem M, Hart AC. 2008. OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol* 6:e196.

Kopan R, Ilagan MX. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216-33.

Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F. 2005. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132:1751-62.

Musse AA, Meloty-Kapella L, Weinmaster G. 2012. Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity. *Semin Cell Dev Biol* 23:429-36.

Shimizu K, Chiba S, Kumano K, Hosoya N, Takahashi T, Kanda Y, Hamada Y, Yazaki Y, Hirai H. 1999. Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem* 274:32961-9.

Taqvi S, Dixit L, Roy K. 2006. Biomaterial-based notch signaling for the differentiation of hematopoietic stem cells into T cells. *J Biomed Mater Res A* 79:689-97.

Yamamoto M, Morita R, Mizoguchi T, Matsuo H, Isoda M, Ishitani T, Chitnis AB, Matsumoto K, Crump JG, Hozumi K, Yonemura S, Kawakami K, Itoh M. 2010. Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. *Development* 137:2527-37.

Yang LT, Nichols JT, Yao C, Manilay JO, Robey EA, Weinmaster G. 2005. Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Mol Biol Cell* 16:927-42.

#### 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)

Liu L, Wada H, Matsubara N, Hozumi K, Itoh M. Identification of Domains for Efficient Notch Signaling Activity in Immobilized Notch Ligand Proteins. J Cell Biochem. 185, 785-796 (2017) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Ledi Liu, Hiroe Wada, Natsuki Matsubara, Kensuke Izumoto, Motoyuki Itoh. Immobilized Notch ligand proteins activate Notch signaling through MNLN-EGF repeat 3 region. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日~11月27日, パシフィコ横浜(横浜)

Ledi Liu, Hiroe Wada, Natsuki Matsubara, Kensuke Izumoto, Katsuto Hozumi, Motoyuki Itoh. Identification of the critical region of Notch ligand for stimulating signal using immobilized proteins. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月01日~12月04日 神戸ポートアイランド(神戸)

Ledi Liu, Hiroe Wada, Natsuki Matsubara, Kensuke Izumoto, Katsuto Hozumi, Motoyuki Itoh. Identification of domains for efficient Notch signaling activity in immobilized Notch ligand proteins Notch meeting: Fine tuning of Notch signaling activity: its importance and mechanisms. Notch meeting. 2016年10月05日~10月06日, 遺伝研レクチャーホール(三島)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/seika/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 素行 (ITO, motoyuki)

千葉大学大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 20377906