

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840096

研究課題名(和文) 双方向のNotch-Deltaシグナルによる組織発生制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of tissue developments regulated by bi-directional Notch-Delta signal

研究代表者

大久保 佑亮 (Okubo, Yusuke)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究者番号：80596247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Notch-Deltaの結合時には、Delta細胞内ドメイン(DICD)もNotch同様に切断を受け核に移行することが知られていたが、その役割は明らかになっていなかった。今回、我々はマウス後根神経節発生においてDICDが後根神経節の細胞増殖を抑制し、神経細胞へ分化を促すことを明らかにした。また神経堤幹細胞を用いた分化誘導実験により、DICDがNotchとは独立したシグナル伝達経路を介し神経細胞への分化を促進することを発見した。我々のデータは後根神経節の細胞増殖と分化は双方向性のNotch-Deltaシグナルにより厳格に制御されることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Notch-Delta signaling has been known as a mono-directional signaling. Upon binding Delta-Notch, Notch intracellular domain is cleaved and activates the target gene expression. On the other hand, it is reported that Delta intracellular domain (DICD) is also cleaved by the binding of Notch and translocates to the nucleus, suggesting that Delta transmits the reverse signaling of Notch. To address this question, we focused on DICD in the dorsal root ganglia (DRG) development. We found overexpression of DICD in DRG cells resulted in the promotion of neurogenesis and the inhibition of gliogenesis. Conversely, the inhibition of the DICD production resulted in reduced neurogenesis and promoted gliogenesis. In addition, dispersed culture of neural crest stem cells isolated from DRG overexpressing DICD showed promoted neural differentiation in the absence of endogenous Notch signaling. These results suggest that Delta signal fine tunes DRG development by acting as the reverse signal of Notch.

研究分野：発生生物学

キーワード：Notchシグナル Deltaシグナル 後根神経節発生

1. 研究開始当初の背景

隣接細胞間で直接作用する Notch-Delta シグナルは、発生期の器官形成や成体幹細胞の分化を制御するだけでなく様々な疾患の原因となるため、その活性化機構、シグナル伝達経路、生理作用が研究領域を超えて盛んに研究されている。それら多岐にわたる研究において一つの共通する原理が存在し、Notch-Delta シグナルはリガンド Delta と受容体 Notch の結合により Notch の細胞内領域(NICD: Notch intracellular domain)が切断を受け転写を制御する一方向性のシグナル伝達として研究されている。その一方で、Delta の細胞内領域(DICD: Delta intracellular domain)もまた Notch の切断と同時に切断され、DICD により Notch シグナルが抑制されることや TGF シグナルが増強されることが培養細胞において報告されている。しかしながら、個体における DICD の生理作用が不明のため、Delta を受容体としたシグナルは Notch-Delta シグナルとして考慮されていない。

先行研究として代表者は、個体における Delta シグナルの生理作用を調べるために、Delta like 1 (DII1) 細胞内領域(D11CD: DII1 intracellular domain)を恒常発現するトランスジェニックマウス(CAG- floxed CAT- 3xHA_D11CD_Flag)を作製した。Notch シグナルによりニューロン・グリア分化が制御されている後根神経節(DRG: dorsal root ganglia)発生に焦点を当て、DRG の一部の細胞で D11CD を恒常発現させたところ、ニューロンマーカーである Tuj1 陽性細胞数の割合が増加した。また、卵黄嚢で D11CD を恒常発現させると血管のリモデリング異常が観察されるなど、Delta シグナルが個体において生理作用を有することを示唆する結果が得られていた。

2. 研究の目的

本研究では、異なる Notch-Delta シグナルの制御を受ける DRG 形成と体節形成を対象として、Delta シグナルの生理作用を明らかにすると共に Notch-Delta シグナルを両面から解析することで、これまで隠れていた双方向性の Notch-Delta シグナルによる組織発生の制御機構を導き出す。

3. 研究の方法

- (1)D11CD の産生を抑制する DII1(NC-DII1: non-cleavable DII1)マウスの作製
- (2)DRG 発生における D11CD の生理機能解析
- (3)D11CD 結合タンパク質の網羅的解析
- (4)体節形成における D11CD の生理機能解析

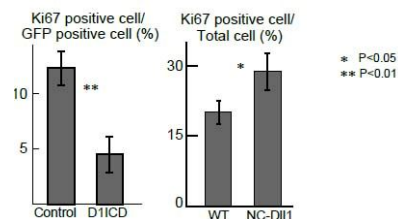
4. 研究成果

(1)NC-DII1 マウスの作製

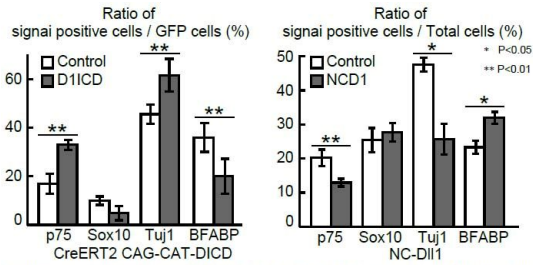
これまでに、D11CD の産生には DII1 膜貫通領域の外側の 48 塩基対が必要であることが報告されていた。申請時には、その 48 塩基対を欠失させた NC-DII1 の cDNA を DII1 locus にノックインしたマウスを作製済みであった。しかしながら、このマウスはイントロンがない影響で対照胚においても表現型が観察された。そのため、CRISPR 法を用い、ゲノムからその 48 塩基のみを欠失させた新規の NC-DII1 マウスを作製した。

(2)後根神経節発生における D11CD の生理機能解析

Wnt1-Cre を用い DRG すべての細胞で D11CD を恒常発現させた結果、DRG の細胞数が減少した。DRG は神経堤細胞(NCC: Neural crest cell)が遊走し、形成される。Wnt1-Cre は遊走中の NCC においても発現していることから、DRG 細胞数の減少が遊走の異常か細胞増殖の異常かは区別できない。そこで、UBC-CreERT2 マウスを用い DRG 形成後にタモキシフェン投与により、D11CD を恒常発現させた結果、D11CD は細胞増殖(Ki67:細胞増殖マーカー)を抑制した。一方で、NC-DII1 マウスを用い D11CD の産生を抑制した結果、DRG の細胞増殖は促進された。これらの結果から D11CD は細胞増殖を抑制することが明らかになった。

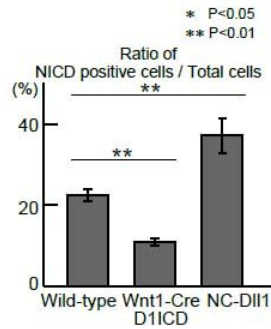


次に、DRG の細胞運命決定における D11CD の役割を検討した。D11CD を恒常発現させるとニューロン分化が促進され、グリア分化が抑制された。一方で D11CD 産生抑制により、ニューロン分化が抑制され、グリア分化が亢進した。これらの結果は、D11CD がニューロンへの細胞分化を促進することを示している。

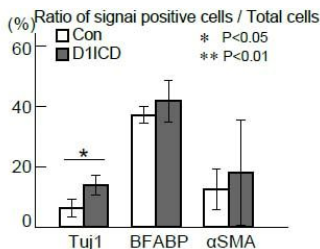


p75: Neural progenitor marker Sox10: Multipotency marker Tuj1: Neuron marker BFABP: Glia marker

これまで、Notch シグナルを欠失させると、DRG のグリア分化が完全に抑制され、すべての細胞がニューロンに分化することが報告されている。そこで D11CD の増減により Notch シグナルが影響を受けるか否かを検討した。その結果、DRG において D11CD は Notch シグナルを抑制することが明らかになった。



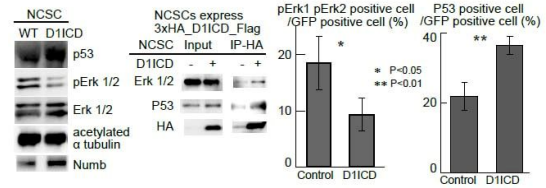
これまでの結果から D11CD は Notch シグナルを抑制し、細胞増殖や細胞運命決定を制御していることが示唆された。しかしながら、Notch-Delta は表裏一体であり、*in vivo* における解析ではこれらを区別することができない。そこで、Notch-Delta シグナルが隣接細胞間でのみ活性化されることを利用し、内在性の Notch-Delta シグナルが存在しない極低密度培養条件での *in vitro* 解析を試みた。ニューロン(Tuj1)、グリア(GFAP)、マイヨフィブロブラスト(α SMA)に分化する神経堤幹細胞(NCSC: Neural crest stem cell)を発生期 DRG より単離し、外来の D11CD による NCSC の分化への影響を解析した。その結果、D11CD は Notch シグナルが存在しない条件においてもニューロンへの分化を促進することが明らかになった。このことは、D11CD が Notch シグナルとは独立した独自の Delta シグナル伝達経路を有していることを示唆している。



(3) D11CD 結合タンパク質の網羅的解析

D11CD は核に局在するため転写に関わることが予測されるが、典型的な DNA 結合配列は

存在しない。そこで、パートナータンパク質と結合し作用すると仮説を立てた。HEK293T 細胞に 3xFlag_D11CD をトランスフェクションし、Flag に対する免疫沈降の後、質量分析により D11CD 結合タンパク質を網羅的に解析した。その結果、MAP kinase や P53 シグナル、Cell cycle に関わるタンパク質が同定された。NCSC 及び DRG において、これらのタンパク質を解析したところ、D11CD は Erk1/2 のリン酸化を抑制すること、p53 タンパク質を増加させることが明らかになった。また、D11CD は Notch シグナルを抑制することで DRG の細胞運命に重要な役割を果たす Numb タンパク質を増加させることも発見した。



これらの結果は、DRG 神経発生において D11CD を介した Delta シグナルが Notch シグナルと協調し、適切に細胞増殖と細胞分化を制御していることを意味している。

(4) 体節形成における D11CD の生理機能解析

末分節中胚葉において D1CD を過剰発現させると脊椎骨の形成異常を示した。そこで、体節形成を制御する Notch シグナル活性および Mesp2 の発現を調べた。その結果、Notch 活性、Mesp2 の発現ともにコントロールとの差はなく体節の分節も正常であった。しかしながら D1CD 過剰発現胚では尾芽が細くなっており、このことが脊椎骨の異常の原因であることが示唆された。

Notch-Delta シグナルは様々な生理機能を有するため、精力的に研究がなされている。しかしながら、これまでのほぼすべての研究が Delta から Notch への一方向性のシグナル伝達を前提として行われている。本研究では、Notch だけでなく Delta もまたその細胞内ドメイン(D1CD)を介し、DRG 発生において細胞増殖や細胞分化を制御していることを明らかにした。また、D1CD は Notch シグナルを調節するとともに、Erk1/2 や P53 を介した Notch とは独立したシグナル伝達経路を有することが示唆された。これらの結果は、これまで一方向性のシグナル伝達とされた Notch-Delta が双方向性のシグナル伝達であ

ることを示しており、今後の研究において Notch-Delta を両面から解析する必要性を提示する。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

Okubo Y., Sugawara T., Abe-Koduka .N, Kanno J., Kimura A., Saga Y.: Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans-repression of Notch signalling. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist (2013年5月) くにびきメッセ (松江、島根)

Okubo Y., Sugawara T., Abe-Koduka .N, Kanno J., Kimura A., Saga Y.: Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans-repression of Notch signalling. 17th International Congress of Developmental Biology, Cancun, Mexico. (2013年7月)

大久保佑亮, 五十嵐勝秀, 相賀裕美子, 菅野純: マウス胚発生における Notch とは逆方向の Delta シグナル解析. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist (2014年5月) ウィンク愛知 (名古屋、愛知)

Okubo Y., Igarashi K., Saga Y., Kanno J.: Analysis of the Delta signaling as the reverse signaling of Notch during mouse development. Gordon Research Conferences Notch signaling in Development, regeneration & Disease, Lewiston, USA. (2014年7月)

Okubo Y., Ohtake F., Igarashi K., Yasuhiko Y., Saga Y., Kanno J.: Cleaved Dll1 intracellular domain fine-tunes DRG development as the reverse signal of Notch. BMB2015 (2015年12月) 神戸ポートアイランド (神戸、兵庫)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保 佑亮 (OKUBO, Yusuke)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・主任研究官

研究者番号: 80596247

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし