

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19370084  
 研究課題名（和文） 個体発生期における Notch シグナル伝達経路の時空間的統合理解  
 研究課題名（英文） Functional analysis of Notch signaling during development  
 研究代表者  
 伊藤 素行 (ITO MOTUYUKI)  
 名古屋大学・高等研究院・特任准教授  
 研究者番号：20377906

研究成果の概要（和文）：Notch リガンドである Jagged が発生過程で Delta とは異なる機能を持ち、脊索細胞の発生制御を介して、体軸構造形成に重要な働きをする事が明らかとなった。また、Notch シグナルを調節するタンパク質として、NLK を同定し、NLK が Notch をリン酸化する事で、その活性を抑制し、神経細胞発生を制御する事を明らかにした。

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：個体発生、Notch

## 1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは発生段階で異なった組織で繰り返し働くことが知られるシグナル伝達経路である。リガンドとの結合により、Notch 受容体は活性化され、その細胞内ドメインが核内移行後、DNA 結合因子 CSL と結合し、標的遺伝子の活性化を行うということが知られている。さまざまな組織で実際にこの共通の Notch-CSL 経路が使われていることが分かってきているが、神経、体節、血液細胞などの異なった組織では異なった標的遺伝子群の活性化が必須であり、Notch-CSL

経路以外に、それぞれのコンテキストに依存したシグナルの調節機構や標的遺伝子の活性化機構が存在する。しかしながら、このような研究は個体レベルでの実験が必須であり、まだ十分研究がなされているとはいえない。

これまでに国内外にて、数多くの Notch シグナル関連分子のノックアウトマウスが作成されているが、胎生致死となる場合もあり、母体内で発生が進行するマウス胚の発生異常の詳細な解析は進んでいない。逆に、マウスを用いた手法では、組織特異的ノックアウト

トといった手法で神経、免疫などの高次機能を解析が進んでいる。しかし、この方法では、複数のシグナル伝達分子の個体発生における生理的機能を解析するには時間がかかる。一方、ゼブラフィッシュはその発生が体外で進行するため、初期発生における遺伝子の機能解析に適している。

我々はこれまでに、ゼブラフィッシュをモデルとして、Notch シグナルの個体レベルでの機能を解析してきた。近年、Notch シグナル伝達経路に異常のあるゼブラフィッシュ変異体 *mind bomb (mib)* の原因遺伝子をポジショニングクローニングにより同定した。その結果、*mib* は Notch のリガンドである Delta をユビキチン化するユビキチンリガーゼであり、膜上の Delta を細胞内に取り込むのを促進することで、隣接する細胞の Notch 細胞外領域を Delta 発現細胞側へ引き抜き、Notch の細胞内領域の核内移動を効率化するという機構を提唱した (Itoh, M et al, *Dev. Cell*, 2003)。その後の研究により、Notch のもう一つのリガンドである Jagged もまた、Mib によって、ユビキチン化されることが分かってきた。しかし、Mib-Jagged-Notch シグナルが発生期において、どのような生理機能を持つかは未だ不明であった。当時、Mib-Jagged-Notch シグナルの発生過程における生理機能の一つとして、脊索形成を発見していた。他方、Notch 活性化制御機能の解明を目指した研究として、Notch をリン酸化するキナーゼの同定とその生理機能解析に着手したところであった。

## 2. 研究の目的

個体発生期における Notch シグナル伝達機構について、時空間を考慮した統合的解析を行うことである。これまでのシグナル伝達経路の研究は新しいシグナル伝達経路分子の発見に重点が置かれてきた。このような研究の多くは細胞レベルで行われ、シグナル伝達経路における分子機構の解明に寄与したが、個々の分子の生理的機能は個体レベルで解析する必要がある。なぜなら、シグナル伝達経路で用いられる分子の組み合わせや標的遺伝子は細胞、組織、時間ごとで、共通である部分と異なった部分が存在するからである。本研究では、当時研究の緒にあった、

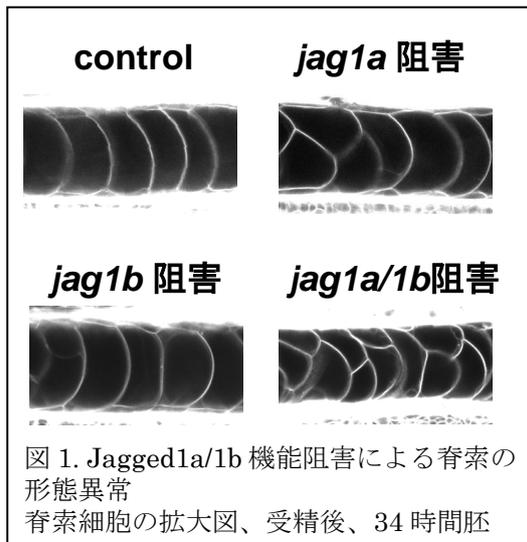
- 1) Jagged-Notch シグナルが脊索や骨の形成に関する機能と作用メカニズム、および
- 2) Notch をリン酸化するキナーゼ (NLK : *nemo-like kinase*) の生理機能と Notch に対する制御機構の解明を目標とした。

## 3. 研究の方法

- (1) Jagged-Notch シグナルが脊索形成に関する機能と作用メカニズム  
ゼブラフィッシュ *jagged1a*, *jagged1b* の機能欠損時における表現型を解析するため、
  - ① *jagged1a*, *1b* に対する、アンチセンスモルフォリノオリゴを注入し、脊索形成における表現型を解析
  - ② ①の表現型を Mib 変異体、*deltaA/deltaD* 機能阻害胚、CSL 機能阻害胚と比較し、Notch シグナルにおける *jagged* リガンドの役割を解析
  - ③ *jagged1a/1b* の脊索形成における標的遺伝子を既知の Hes ファミリー遺伝子の中から探索。
- (2) Notch をリン酸化するキナーゼ (NLK : *nemo-like kinase*) の生理機能と Notch に対する制御機構の解明
  - ① PC12 細胞での NLK の機能阻害、強制発現による突起伸長における機能解析
  - ② PC12 細胞での NLK 突起伸長における基質探索
  - ③ Notch 機能に対する NLK の機能解析
  - ④ NLK のゼブラフィッシュにおける生理機能の解析
  - ⑤ Notch 機能に対する NLK の作用機序の解析

## 4. 研究成果

- (1) Jagged-Notch シグナルが脊索形成に関する機能と作用メカニズム
  - ① Jagged1a/1b は脊索形成に関与する。  
Jagged1a は *jagged1b* と強調して脊索の形態形成に関わっていることが明らかとなった。Jagged1a/1b 両方の機能阻害により、脊索の液胞細胞が増加することが分かった (図 1)。
  - ② Jagged1a/1b-Notch シグナルは DeltaA/D-Notch シグナルと独立して、脊索形成に関わる。  
①の同様の解析を Notch シグナル下流の DNA 結合因子である CSL の機能阻害胚や、Jagged と異なるファミリーに属し、*hypochord* の形成に関わるとして知られている、DeltaA、DeltaD の二重機能阻害胚と比較したところ、CSL の機能阻害胚では、Jagged1a/1b の機能阻害胚と同様の脊索形成異常が見られたのに対し、DeltaA/D 機能阻害胚では見られなかった。このことから、中胚葉形成過程で、Jagged-Notch シグナルは、Delta-Notch シグナルとは別の働きを持つことが明らかとなった。



③脊索形成時の Jagged-Notch シグナルの標的遺伝子は her9 である。

既知の Notch シグナルの標的遺伝子ファミリーである Hes 遺伝子の中から、脊索形成における Jagged-Notch シグナルの標的遺伝子として、her9 を見出した。

## (2) Notch をリン酸化するキナーゼ

(NLK : nemo-like kinase) の生理機能と Notch に対する制御機構の解明

① PC12 細胞での NLK の機能阻害、強制発現による突起伸長における機能解析

NLK は神経系細胞で発現するという知見から、NLK の神経細胞での生理機能を解析した。NLK を PC12 細胞で強制発現したところ、突起形成が見られた。この突起形成は、キナーゼ活性欠損型 NLK の強制発現では、見られなかったことから、キナーゼ活性依存性であると考えられた。PC12 細胞は、NGF 存在下で神経突起を伸長する事が知られている。NLK は NGF 処理により、リン酸化され、活性化することが分かった。この NGF による PC12 細胞神経突起伸長は、NLK に対する siRNA による機能阻害で抑制された。これらのことから、神経細胞において、NLK は NGF により、活性化され、神経突起伸長を促進することが明らかとなった。

② PC12 細胞での NLK 突起伸長における基質探索

NLK による神経突起伸長の過程で働く NLK のリン酸化基質を探索したところ、MAP1B および paxillin が NGF 下流で、NLK によりリン酸化されることが分かった。これらのことから、NLK は NGF により活性化され、微小管などの細胞骨格形成および接着斑形成に関わる MAP1B, paxillin のリン酸化を介して、神経細胞の突起伸長を促進すること

が明らかとなった。

## ③ Notch 機能に対する NLK の機能解析

NLK のリン酸化基質として、Notch1 を同定し、Notch 活性化に対する NLK の機能を Notch 応答性レポータ活性を測定することにより、検討した。細胞内ドメインのみ持つ活性化型 Notch1 による Notch 応答レポータ活性の上昇は、野生型 NLK によって、抑制されたが、キナーゼ不活型 NLK の存在下では、抑制されなかった。このことから、Notch1

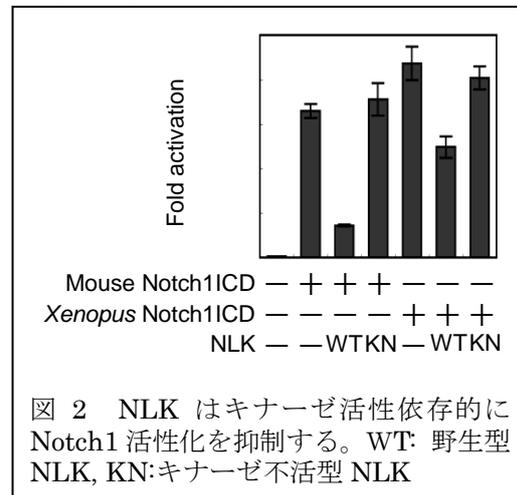


図 2 NLK はキナーゼ活性依存的に Notch1 活性化を抑制する。WT: 野生型 NLK, KN: キナーゼ不活型 NLK

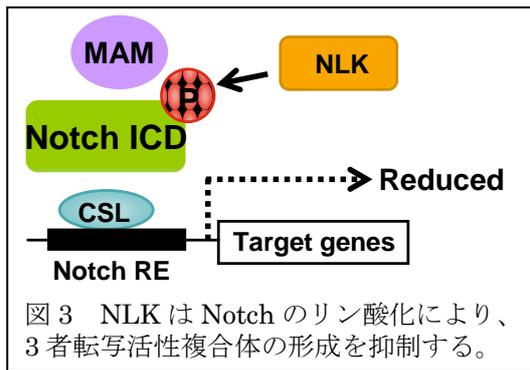
活性は NLK のキナーゼ活性依存的に抑制されることが明らかとなった (図 2)。

④ゼブラフィッシュ発生過程における NLK の生理機能の解析

NLK の Notch に対する生理機能を解析するため、ゼブラフィッシュの発生過程での NLK 機能を解析した。ゼブラフィッシュ NLK に対するアンチセンスモルフォリノオリゴを受精卵に注入することにより、NLK の機能を阻害したところ、Notch の標的遺伝子の転写量が増加していることが明らかとなった。一方、NLK 機能阻害による Notch 標的遺伝子発現の増加は、NLK と Notch の複合機能阻害により、消失したことから、NLK による Notch 標的遺伝子発現の抑制効果は、Notch を介している事が明らかとなった。

⑤ Notch 機能に対する NLK の作用機序の解析

NLK による Notch 活性抑制機構をさらに詳細に検討したところ、NLK によって、リン酸化を受けた Notch タンパク質は、Notch 標的遺伝子の活性化に必要な 3 者 (Notch, CSL, MAM) を含む転写活性複合体形成能力が低下していた。このことから、NLK は Notch をリン酸化する事で、CSL/Notch/MAM の 3 者複合体形成を阻害し、Notch の活性化を抑制することが分かった (図 3)。



これらの解析から、NLKは神経発生過程では、Notchシグナルを抑制し、神経幹細胞から神経細胞への分化のタイミングをコントロールする重要な働きを持つことが明らかとなった。

#### 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)

①Ishitani T, Hirao T, Suzuki M, Isoda M, Ishitani S, Harigaya K, Kitagawa M, Matsumoto K, Itoh M. Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nat. Cell Biol.* 2010, 12:278-285. 査読有り

②Ishitani T, Ishitani S, Matsumoto K, Itoh M. Nemo-like kinase is involved in NGF-induced neurite outgrowth via phosphorylating MAP1B and paxillin. *J. Neurochem.* 2009, 111:1104-1118. 査読有り

[学会発表] (計16件)

① Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Shizuka Ishitani, Kenichi Harigaya, Motoo Kitagawa, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh : Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex 2009年12月10日 第32回日本分子生物学会 パシフィコ横浜

②盛田良子、山本麻衣、溝口貴正、磯田美帆、松本邦弘、米村重信、川上浩一、伊藤素行 : Jagged-NotchシグナルはNotochord細胞の分化・運命決定を通じて、周囲組織のパターン

形成活性と体軸支持構造形成を調節する。2009年12月10日 第32回日本分子生物学会 パシフィコ横浜

③盛田良子、山本麻衣、溝口貴正、磯田美帆、松本邦弘、米村重信、川上浩一、伊藤素行 : Jagged-NotchシグナルはNotochord細胞の運命決定を通じて、周囲組織のパターン形成活性と体軸支持構造形成を調節する。2009/09/12-13 第15回小型魚類研究会 名古屋大学

④ 伊藤素行 : Jagged-Notch signaling regulates cell fate decisions during notochord development in zebrafish, 4th Asia-Oceania zebrafish meeting 2009年8月31-9月2日 済州 jeju island, phoenix island resort., KOREA

⑤ Mai Yamamoto, , Kunihiro Matsumoto, Shigenobu Yonemura, Koichi Kawakami, , Motoyuki Itoh : Jagged-Notch signaling regulates notochord morphogenesis and vertebral patterning in zebrafish., Third Strategic Conference of Zebrafish Investigators Jan25 and 26 on poster January 24 - 28, 2009 - Asilomar, California, USA

⑥石谷太、平尾智子、鈴木真帆、磯田美帆、北川元生、松本邦弘、伊藤素行 : Nemo-like kinaseはNotchシグナルを阻害し、神経分化を制御する BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 神戸ポートアイランド2008年12月11日

⑦磯田美帆、堤真紀子、松本邦弘、伊藤素行 : 側線の発生過程における Jagged1b の機能解析 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 神戸ポートアイランド2008年12月10日

⑧Miho Isoda, Makiko Tsutsumi, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh : Functional Analysis of Jagged1b in Lateral Line Development 第14回 小型魚類研究会 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター 2008年9月20日

⑨磯田美帆、堤真紀子、松本邦弘、伊藤素行 : 側線の発生過程における Jagged1b の機能解析 第3回 Notch 研究会 若手の会 国立遺

伝学研究所 平成 20 年 7 月 1 8 日

⑩ Mai Yamamoto, , Kunihiro Matsumoto, Shigenobu Yonemura Motoyuki Itoh: Jagged-Notch signaling is involved in zebrafish notochord development. 第 4 1 日本発 生生物学会年会 徳島郷土文化会館 平成 20 年 5 月 28 日

⑪ Mai Yamamoto, , Kunihiro Matsumoto, Shigenobu Yonemura, Koichi Kawakami, , Motoyuki Itoh: Jagged-Notch signaling is involved in zebrafish notochord development., 8th International Meeting on Zebrafish Development and Genetics June 27, 2008, poster presentation - Madison, WI, USA

⑫ 山本麻衣、米村重信、松本邦弘、伊藤素行: Mib-Jagged-Notch シグナルによる Notochord 形成の制御機構, 2007 年 12 月 13 日 第 30 回分子生物学会 パシフィコ横浜

⑬ Motoyuki Itoh, Miho Isoda, Makiko Tsutsumi : Notch signaling controls lateral line development in zebrafish, 2007 年 12 月 12 日 第 30 回分子生物学会 パシフィコ横浜

⑭ Makiko Tsutsumi, Miho Isoda, , Motoyuki Itoh: Notch signaling controls lateral line development in zebrafish, 第 47 回 ASCB meeting, 2007 年 12 月 3 日、Washington DC. USA.

⑮ Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh: Nemo-like kinase promotes neurogenesis by blocking Notch-signaling., 第 40 回日本発 生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会、福岡、2007 年 5 月 29 日

⑯ Tohru Ishitani, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh : Regulation of the vertebrate axonal development by Nemo-like kinase, 2<sup>nd</sup> Strategic conference of zebrafish investigators. Asilomar, USA. Feb. 2, 3, 2007

[その他]

ホームページ等

<http://www.iar.nagoya-u.ac.jp/tenure/itoh/itoh.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 素行 (ITO MOTOYUKI)

名古屋大学高等研究院・特任准教授

研究者番号 : 20377906

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :