

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370090

研究課題名（和文） 器官形成における Notch シグナルの機能とその分子基盤の統合解析

研究課題名（英文） Molecular and functional analysis of Notch signaling in organogenesis

研究代表者 伊藤 素行 (MOTOYUKI ITOH)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：20377906

研究成果の概要（和文）：Notch シグナルは進化上保存された細胞間シグナル伝達経路であり、多様な組織の発生に関わっていることが知られている。本研究では、ゼブラフィッシュを用い、リガンドおよび Notch 受容体の生理機能、活性制御機構を解析した。その結果、Mib1-Jagged1-Notch シグナルによる脊索細胞の運命決定と脊索の機能制御や NLK による Notch1 タンパク質のリン酸化修飾を介した Notch 転写活性複合体形成阻害制御メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Notch signaling is an evolutionary conserved pathway that plays an important role in the development of various organs. In this study, physiological functions of Notch ligands and the mechanism by which Notch activity is regulated were analyzed using zebrafish. We found a previously unrecognized mechanism regulating the patterning and structural roles of the notochord by Mib-Jag1-Notch signaling. Furthermore, using a biochemical screen, we identified Notch as a new substrate of NLK. NLK-phosphorylated Notch1 intercellular domain is impaired in its ability to form a transcriptionally active ternary complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：器官形成, Notch zebrafish

## 1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは進化上保存された細胞間シグナル伝達経路であり、多様な組織の発生に関わっていることが知られている。特に、高等生物では、Notch リガンド、受容体の種類が増え、機能の多様性が增大した。これまでに、複数の Notch 受容体・リガンドのノック

アウトマウスが作製されているが、マウスは胎生発生であるため、特に初期発生過程での解析が不十分である。また、高等生物での Notch シグナルの生理機能とその分子機構は、複数リガンド・受容体の存在やそれらの発現場所・時期・活性の複雑な調節機構の存在のため、不明な点が多く残されている。

### (1) Mib を介した Notch リガンド-Jagged の生理機能とその制御機構

Notch シグナル伝達経路の解明が進み、リガンドとの結合⇒ Notch 受容体の細胞膜貫通領域切断⇒ 細胞内領域の核内移行⇒ DNA 結合因子 CSL との結合⇒ 標的遺伝子の活性化、という基本的メカニズムが明らかになってきたが、多岐にわたる Notch シグナル機能の分子レベルでの解明には不十分である。Notch シグナルの多機能の一つの要因は、2つのクラスの Notch リガンド、Delta および Jagged がそれぞれ時空間的に異なって発現制御されているからである。一方、これまでに我々は Mib ユビキチンリガーゼが Delta をユビキチン化し、Notch シグナルを活性化するという発見を報告した(Itoh, M et al, Dev. Cell, 2003)が、その後の研究により、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。これらのことから、Mib は Delta, Jagged 両リガンドクラスの活性を制御することが考えられる。しかしながら、Mib を介した Jagged の機能制御機構とその生理機能については、不明な点が多く残されていた。

### (2) Notch リガンド Delta の Notch シグナル非依存的機能

Delta, Jagged タンパク質が Notch 受容体に対するリガンドとして作用することに加え、細胞運動、発癌性形質転換およびニューロン新生のような異なるプロセスで Notch シグナルに依存しない独立した機能を持つことがわかってきた。例えば MAGI と Dlg というような PDZ タンパク質は、PDZ タンパク質と結合するために必要とされる PDZ-BD を持つ Delta1 の表面発現を安定させ、隣接細胞間での細胞間接着を促進することが知られている。一方、Delta タンパク質の PDZ-BD 以外の細胞内領域の機能については、十分に理解されていなかった。

### (3) NLK による Notch1 タンパク質機能制御

これまで Notch シグナルが、神経幹細胞から神経細胞を生み出す調節機構の一つであることは知られているが、分子レベルでの全容解明には至っていない。他方、NLK は、進化的に保存されたタンパク質キナーゼであり、ショウジョウバエ個眼、線虫、内胚葉誘導、ゼブラフィッシュの脳前後パターンニング、マウス造血過程など様々な発生過程に関与することが知られていた。NLK は Lef1、c-Myb、STAT3 を含むいくつかの転写因子をリン酸化する。ショウジョウバエでは、NEMO (ショウジョウバエ NLK ホモログ) の変異型アレルが Notch のモディファイヤースクリーニングで同定されており、このことから NEMO が、Notch シグナル伝達に関

与することを示唆されるが、その詳細は不明であった。

### (4) NGF 誘導性神経突起伸長のメカニズム解明：NLK の関与

神経成長因子 (NGF) は、神経発達に重要な役割を果たしている。また、ラットの褐色細胞腫瘍細胞株、PC12 の形態分化および神経突起伸長を促進する。PC12 は、NGF の下流シグナル伝達機構を解析するためのモデル系として使用されている。NGF は、古典 MAPK として知られる ERK を含め、多数の細胞内シグナル伝達経路を活性化することによって神経突起伸長を促進する。NGF の下流のシグナル伝達メディエーターは、神経突起成長の細胞内制御に重要な役割を果たしていると考えられている。他方、哺乳動物 NLK は、神経組織で発現することから、神経発生や維持に重要な役割を担っていると示唆されるがその詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

### (1) Mib を介した Notch リガンド-Jagged の生理機能とその制御機構

Mib を介した Jagged の機能制御機構とその生理機能については、不明な点が多く残されていた。そこで本研究では、発達過程における Mib による Jagged の生理機能と Mib による Jagged の活性調節機構の解明を目的とした。

### (2) Notch リガンド Delta の Notch シグナル非依存的機能

Delta1 タンパク質が Notch 受容体に対するリガンドとして作用する以外の機能、すなわち Notch シグナルに依存しない独立した機能およびその生理機能発揮に関わるメカニズムの解明を目的とした。

### (3) NLK による Notch1 タンパク質機能制御

NLK が Notch をリン酸化するという発見を契機として、NLK による Notch シグナル制御の生理機能解明とその制御機構の解明を目的とした。

### (4) NGF 誘導性神経突起伸長のメカニズム解明：NLK の関与

神経組織で発現する NLK が上記 Notch シグナル以外で機能することが想定されたため、NGF 誘導性神経突起伸長における NLK の機能およびその制御機能の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Mib を介した Notch リガンド-Jagged の生理機能とその制御機構

① Mib, Jagged 発現プラスミドを COS7 細胞に導入し、Jagged を認識する抗体で免疫沈降後、Jagged タンパク質のユビキチン修飾を抗体で検出した。

② siRNA で Mib タンパク発現をノックダウンし、Jagged タンパクの表面発現を FACS にて検出した。

③ Jagged 発現細胞で siRNA により Mib タンパク発現をノックダウンし、Notch 発現細胞と共培養して隣接細胞の Notch シグナル活性化状態をルシフェラーゼアッセイにて測定した。

④ Jagged1a, 1b に対する、アンチセンスモルフォリノオリゴを注入または、Jagged1b 変異体を用い、脊索の形成過程を形態や各種細胞マーカーにて解析、Mib 変異体、delta 機能阻害胚、su(H)機能阻害胚と比較し、jagged1a/1b リガンドの脊索形成における生理機能を解析した。

(2) Notch リガンド Delta の Notch シグナル非依存的機能

① Neuro2a 細胞に Delta1 全長または種々のトランケーション型発現プラスミドをトランスフェクションした。24 時間後、細胞を固定し、Delta タンパク質発現細胞を免疫染色法にて可視化した。同時に細胞形態をロダミン・ファロイジンで可視化した。

② Notch シグナル活性化は Neuro2a 細胞へ 8xwtCSL 結合配列を持つルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて測定した。トランスフェクション効率の校正には、pRL-EGFP を用い、トランスフェクション 48 時間後、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性をプロメガデュアルルシフェラーゼアッセイシステムで測定した。

③ in vivo での Delta タンパク質の細胞移動への影響: 各種 Delta 断片由来の mRNA を 1 細胞期胚に注入した後、24 時間後に固定した。その後、in situ ハイブリダイゼーション法にて、固定胚での神経細胞マーカー elavl3 発現を検出し、その存在場所を解析した。

(3) NLK による Notch1 タンパク質機能制御

in vitro キナーゼアッセイ

FLAG-NLK と NLK-KN、Myc-NICD を HEK-293 細胞で発現させ、抗 FLAG または抗 Myc 抗体、およびプロテイン G-セファロースビーズを用いて免疫沈降で精製した。免疫沈降産物を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP を含むキナーゼ緩衝液中で、インキュベーションし、SDS-PAGE による分離後、リン酸化タンパク質をオートラジオグラフィによって検出した。

レポーター遺伝子アッセイ

neuro2a 細胞に各種発現ベクターとともに、8xwtCSL-Luc レポータープラスミドをトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定した。共培養アッセイでは、SW480 細胞に NLK siRNA をトランスフェクションし、24 時間後、細胞に、さらに 8xwtCSL レポータープラスミドをトランスフェクトした。

siRNA トランスフェクション後 48 時間後に、Jagged1 発現または Jagged2 発現 NIH/3T3 細胞を加え、上述した方法でルシフェラーゼ活性を測定した。

ゲルシフトアッセイ

各種精製タンパク質を結合緩衝液中で、<sup>32</sup>P 標識 CSL 結合配列とインキュベートし、混合物をポリアクリルアミドゲル (4%) で分離後、オートラジオグラフィにより、DNA-タンパク複合体を検出した。スーパーシフト実験では、タンパク質-DNA 複合体形成のインキュベーション中に抗 Notch1 または抗  $\beta$ -アクチン抗体を添加した。

ゼブラフィッシュ胚での in vivo 機能解析

2-5 ng の NLK モルフォリノ (MO)、nocth1a MO、notch3 MO、または 200pg の Notch1ICD mRNA、NLK mRNA を 1-2 細胞期の受精卵に注入した。注入胚を発生させた後、in situ ハイブリダイゼーション法により、神経細胞マーカーや Notch 標的遺伝子の発現を検出した。

(4) NGF 誘導性神経突起伸長のメカニズム解明: NLK の関与

NLK 発現発プラスミドのトランスフェクション 24 時間後、100 ng/mL の NGF で処理し、細胞を固定した。免疫染色法にて、一次抗体として、抗微小管、抗パキシリン、抗 MAP1B のリン酸化、抗 NLK、抗 GFP、抗  $\beta$ -チューブリン、抗ホスホ-Ser126 パキシリン、抗 pMAP1B、抗 Flag、抗 Myc 抗体、二次抗体として、Alexa488、Alexa594 標識抗体を使用し、細胞内各種タンパク質の検出を行った。F-アクチンを可視化するために、Alexa594 標識ファロイジンを用いた。

NLK の PC12 細胞での効率的なノックダウンのため、siRNA オリゴ (30 nM) を、リポフェクタミン LTX plus で、24 時間の間隔で 3 回トランスフェクトした。ノックダウン効率は抗 NLK 抗体でイムノプロットングにより測定した。

インビトロキナーゼアッセイ

基質として PC12 細胞から免疫沈降にて精製した MAP1B、paxillin を用い、キナーゼ緩衝液中で NLK タンパク質とともにインキュベートした。その後、SDS-PAGE によって分離し、リン酸化タンパク質は、抗ホスホ-MAP1B または抗ホスホ-パキシリン抗体でイムノプロットによって可視化した。

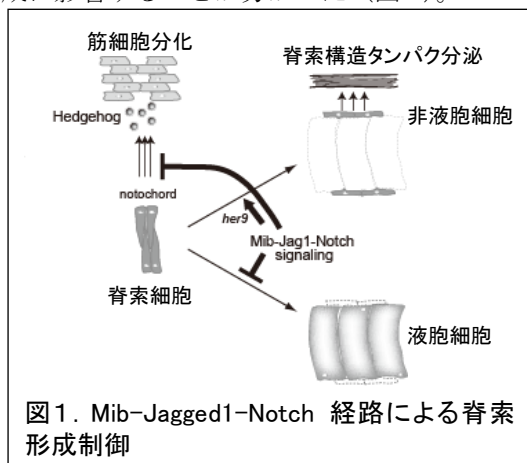
#### 4. 研究成果

(1) Mib ユビキチンリガーゼによる Jagged1 ユビキチン化は、Notch シグナルを活性化し、脊索細胞の運命決定を担う。

Mib はユビキチン化リガーゼとして、Delta をユビキチン化し、Notch シグナルを正に制御する。一方、ゼブラフィッシュ Mib 変異体の表現型から Delta 以外の基質の存在

が示唆されていたが、その詳細は不明であった。

我々は、a) Mib が Jagged1 をユビキチン化すること、b) Jagged の Mib によるユビキチン化は、Jagged の膜表面での発現を阻害しないこと、c) Jagged の Mib によるユビキチン化は、Jagged のシグナル送信活性に必要であることを明らかにした。また、個体発生において、Mib-Jagged1-Notch 経路が、体の中心部支持器官である脊索の形成過程で発生する、液胞細胞と非液胞細胞の運命決定に関与する事が分かった。さらに、この運命決定は、脊索構造形成と脊索の周囲の筋組織形成に影響することが分かった (図 1)。



(2) Notch リガンド Delta の Notch シグナル非依存的機能：Delta1 タンパク質による filopodia 形成と細胞移動制御

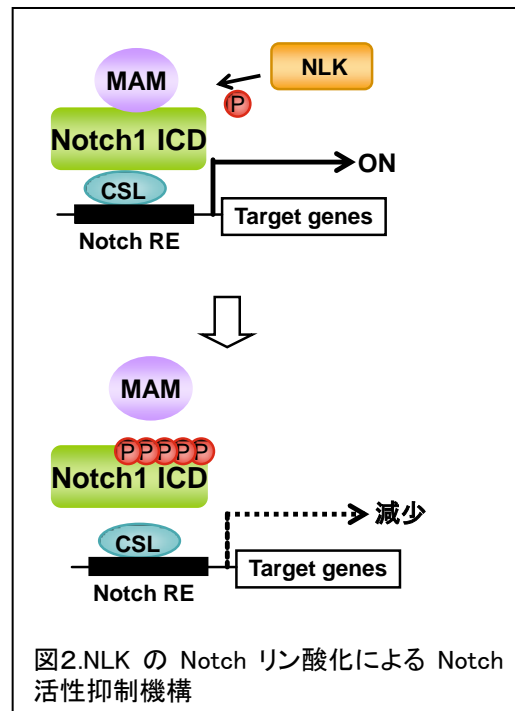
Delta の Mib によるユビキチン化制御機構解析の過程で、我々は、a) Delta1 が neuro2a 細胞で、filopodia 形成を誘導すること、b) Delta1 による filopodia 形成誘導に、Notch シグナル活性化は関与しない事、c) Delta1 の細胞膜直下のアミノ酸領域が重要である事、d) Delta がゼブラフィッシュ神経細胞の移動に関与する事、などを明らかにした。これらのことから、Delta による Notch 非依存性の filopodia 形成制御機能が神経細胞移動を制御する可能性が示唆された。

(3) NLK による Notch1 タンパク質機能制御

Notch シグナル活性化には、リガンド刺激により切断された Notch 細胞内ドメイン (NotchICD) が、核内で CSL、MAM と 3 者複合体形成することが標的遺伝子の転写活性化に重要である。しかしながら、その複合体形成機構は不明であった。

我々は、a) リン酸化酵素である NLK が Notch1 タンパク質をリン酸化する事、b) そのリン酸化された Notch1 では標的遺伝子活性化能力が低下する事、c) Notch リン酸化により、3 者複合体形成能が低下する事、などから Notch 活性調節における新規制御メカニ

ズムを明らかにした (図 2)。また、この NLK による Notch の負の制御は、個体発生において、初期神経分化を促進させる働きを持つことが分かった。



(4) NGF 誘導性神経突起伸長のメカニズム解明：NLK の関与

NGF (nerve growth factor) は、神経突起伸長誘導因子であるが、NGF 受容体下流で突起伸長機能にかかわるシグナル伝達経路については、不明な点も残されている。

上記 (3)、NLK の神経細胞での機能研究の過程で、我々は、a) NLK が NGF 刺激により、活性化される事、b) PC12 細胞での NLK 過剰発現・機能阻害により、NLK が突起伸長誘導に関与する事、c) paxillin と MAP1B が NLK による神経突起伸長促進に関わる NLK の基質である事、を解明した。これらの結果から、NLK が、NGF シグナル下流で、細胞骨格のダイナミクスを制御することが示唆された。

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 4 件)

① 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. Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. *Development*. 2010, 137:2527-37. (査読有)

doi: 10.1242/dev.051011

② Sugiyama K, Nishide K, Matsuo H, Okigawa S, Okano M, Ishitani T, Matsumoto K, Itoh M. Delta1 family members are involved in filopodial actin formation and neuronal cell migration independent of Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010, 398 : 118-124.(査読有)

doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.047

③ Ishitani 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)

doi: 10.1038/ncb2028.

④ Ishitani 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)

doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06400.x.

[学会発表] (計 7 件)

① Makoto Okano, Hiromi Matsuo, Katsuo Hozumi, Motoyuki Itoh Mind bomb1 is required for trans-endocytosis of Notch into ligand-expressing cells to activate Notch signaling. 第44回大会 日本発生生物学会 2011年05月20日 沖縄コンベンションセンター

② 沖川沙佑美, 磯田美帆, Maximiliano Suster, 川上浩一, 伊藤素行 DeltaA and DeltaD act cooperatively to maintain V2 interneuron progenitors 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月7日 神戸ポートアイランド

③ 伊藤素行 小型魚類モデルでの分子機能解析に有効なアンチセンス核酸 第20回アンチセンスシンポジウム 2010年12月3日 甲南大学 ポートアイランドキャンパス

④ 岡野誠、松尾宏美、穂積勝人、伊藤素行 Mind bomb1 is required for transendocytosis of Notch in signal-sending cells to activate Notch signaling. 第5回 Notch 研究会 2010年11月8-9日 東京理科大 野田キャンパス

⑤ 沖川沙佑美、磯田美帆、Maximiliano Suster、川上浩一、伊藤素行 Maintenance of neuronal progenitors requires the DeltaA in zebrafish. 第32回日本分子生物

学会 2009年12月11日 パシフィック横浜

⑥ 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 第32回日本分子生物学会 2009年12月10日 パシフィック横浜

⑦ 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日-9月2日 Jeju, Korea

[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 (MOTOYUKI ITOH)  
千葉大学・大学院薬学研究院・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

川上 浩一 (KOICHI KAWAKAMI)  
国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授  
研究者番号：70195048