

受賞者

石谷 太 九州大学生体防御医学研究所 細胞統御システム分野

研究テーマ

脳神経系形成におけるNemo-like kinaseによるWnt/Notch シグナルの制御

1. はじめに

①Nemo-like kinase (NLK)の分子機能: NLKは種を超えて保存されたタンパク質リン酸化酵素である。これまで私は、NLKがWntシグナルの転写因子TCFをリン酸化し、Wntシグナルを制御することを明らかにしている。また最近、NLKの新規基質を生化学的方法により探索した結果、Notchシグナルの主要な構成因子であるNotchがNLKによってリン酸化されることを見いだした。

②NLKの生理機能: 脊椎動物NLKは共通して分化・成熟期の脳神経系に強く発現するが、脳神経細胞におけるNLKの機能は全く研究されていなかった。しかし最近、私たちは、NLKがNotchのリン酸化を介してNotchシグナルを負に制御し、神経細胞分化を促進することを見いだした。

③未解明な点: NLKによるTCFリン酸化の生理学的機能はほとんどわかっていない。また、NLKによるNotchシグナル抑制の分子メカニズムがわかっていない。本研究では、以上二点を明らかにする。

2. 方法

①NLKによるNotchシグナル抑制の分子メカニズムの解明

以下の手法で、これを行う。(1) NLKによるNotchリン酸化部位の同定。(2) Notchリン酸化を特異的に認識する抗体の作成。(3) Notchリン酸化特異的抗体を用いてゼブラフィッシュ胚を抗体染色し、NLKによるNotchシグナルの時空間的制御の動態を明らかにする。(4) NLKによるNotchシグナル制御の分子機構の解明。(5) Notchシグナル標的配列の下流に蛍光蛋白質遺伝子(dGFP)をつないだレポーターを作成し、これをゼブラフィッシュに導入する。これによりNotchシグナルの活性をライブで観察することを可能にする。

②NLKによるTCFリン酸化の生理学的機能の解明

以下の手法でこれを行う。(6) TCF/LEFあるいはNLKをゼブラフィッシュ胚において機能阻害し、表現型の重複を調べる。(7) Wntシグナルのレポーター遺伝子を組み込んだゼブラフィッシュにおいてNLKの機能阻害を行い、発生段階のいつ、あるいは、どこで、NLKがWntシグナルを制御するのかを検討する。(8) TCFリン酸化を特異的に認識する抗体の作成。(9) TCFリン酸化特異的抗体を用いてゼブラフィッシュ胚を抗体染色し、NLKによるTCFリン酸化とWntシグナル制御の時空間的動態を明らかにする。

3. 結果 研究成果

①NLKによるNotchシグナル抑制の分子メカニズムの解明

(1) NLKによるNotchリン酸化部位の同定。: Notchの7つのセリン残基がNLKによるNotchシグナルの抑制に必要であることを見いだした。具体的には「7つのセリン残基をアラニンに変えた7A mutant NotchがレポーターアッセイにおいてNLKによる抑制を受け付けないこと」、「ゼブラフィッシュにおいて野生型Notchよりも7A mutantの方が強くNotchシグナル標的遺伝子の発現を誘導し、神経発生を強く抑制すること」を明らかにした。

(2) Notchリン酸化を特異的に認識する抗体の作成。 & (3) Notchリン酸化特異的抗体を用いた、NLKによるNotchシグナルの時空間的制御の動態の解明。: リン酸化部位が7つあるため、良いリン酸化抗体を作製することが出来なかった。

(4) NLKによるNotchシグナル制御の分子機構の解明。: Notchは核内で転写因子CSLとco-activator MAMと三者複合体を形成することで標的遺伝子の転写を誘導する。今回我々は、NLKがNotchをリン酸化することにより、この三者複合体の形成を阻害することを見いだした。

(5) Notchシグナルレポーターゼブラフィッシュの作成: 現在、transientにNotchシグナルをゼブラフィッシュにおいて可視化することには成功している。現在、レポーターフィッシュのライン化を進めている。

②NLKによるTCFリン酸化の生理学的機能の解明

(6) TCF/LEFあるいはNLKをゼブラフィッシュ胚において機能阻害し、表現型の重複を調べる。: NLKとTCF/LEFの機能阻害を行い、表現型を比較したところ、いずれの機能阻害胚も、小脳、中脳、神経堤細胞

の発生に異常が生じることがわかった。

(7) WntシグナルレポーターゼブラフィッシュにおけるNLKの機能阻害: レポーターフィッシュにおいてNLKを機能阻害したところ、神経堤細胞でWntシグナルが亢進していることがわかった。

(8) TCFリン酸化を特異的に認識する抗体の作成。 & (9) TCFリン酸化特異的抗体を用いてゼブラフィッシュ胚を抗体染色し、NLKによるTCFリン酸化とWntシグナル制御の時空間的動態を明らかにする。: TCF/LEFのリン酸化抗体の作成を試みたが、良い抗体が得られなかった。

4. 考察 まとめ

①NLKによるNotchシグナル抑制の分子メカニズムの解明

NLKが、Notchの7つのセリン残基をリン酸化することにより、NotchのCSL及びMAMとの三者複合体形成を阻害し、Notchシグナルを抑制することが明らかになった。今後は、NLK-Notchシグナルの脊椎動物における生理学的意義の全貌を明らかにして行きたい。

②NLKによるTCFリン酸化の生理学的機能の解明

NLKがTCF/LEFを介して神経堤細胞でWntシグナルを抑制し、神経堤細胞の発生を制御することが明らかになりつつある。今後は、この研究を完成させるとともに、NLK-TCFシグナルの脊椎動物における生理学的意義の全貌を明らかにして行きたい。

5. 発表論文、参考文献

Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex

Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Kenichi Harigaya, Motoo Kitagawa, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh

(Nature Cell Biology, 投稿中)