

受賞者

伊藤 素行 名古屋大学高等研究院 神経形成シグナル

研究テーマ

ユビキチン化によるNotchシグナルの調節機構とその機能解明

1. 序論

Notchシグナル伝達経路は種を越えて保存されており、様々な組織の発生に関わる重要なシグナルとして知られている。また、隣接する細胞間で情報を伝える働きを持ち、様々な組織や発生過程で異なる調節を受け、異なるアウトプットを示す特異性を持つ。Notch蛋白質は細胞表面の受容体であり、DeltaやJaggedといったリガンドと結合することで、Notch蛋白質細胞内領域が膜から切り離され、核内に移行する。核内に到達したNotch細胞内領域はDNA結合蛋白質であるCSLと結合し、下流の標的遺伝子の転写を活性化する。このような骨格となるシグナル伝達経路についてこれまで分かってきたが、特異性を決定する制御機構や機能は不明である点が多く残されている。本研究ではNotchシグナルを調節する一つの方法である、ユビキチン化による制御に注目し、その制御分子基盤と機能について、特に、NotchのリガンドであるJaggedがユビキチン化酵素Mibによる活性制御と、生体内でのJagged-Notchシグナルの脊索および脊椎骨での機能とその分子作用機序について解析を行った。

2. 方法

ゼブラフィッシュ胚（野生型、Mib mutant）を用いた。Jagged1a, Jagged1bのモルフオリノアンチセンスオリゴヌクレオチド(MO)を用いてノックダウンを行い、表現型を実体顕微鏡により、脊索の発生を観察した。また、H&E染色、ケルセリン染色により脊索と脊椎骨組織を観察した。また、電子顕微鏡で脊索組織細胞の観察を行った。脊索でのコラーゲンタンパク質の発現を抗Type2 collagen抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。ゼブラフィッシュ胚でのmRNA遺伝子発現は、in situ hybridization法によりのそれぞれの遺伝子のmRNAの発現パターンを調べた。

3. 結果

① Jagged1a/1bのノックダウン胚において脊索および脊椎骨に異常が生じる。

Jagged1a/1bをノックダウンしたゼブラフィッシュ胚を、実体顕微鏡を用いて観察するとノックダウンを行った胚の全体の20-50%の胚で脊索が体の側面に突出する表現型が観察された。また、発生後期に脊索に置き換わり脊椎骨が現れるが、その脊椎骨にもJagged1a/1bノックダウン胚で異常が認められた（図1）。

② Jagged1a/1bのノックダウン胚において脊索の基底膜の形態的な異常が引き起こされる。

Jagged1a/1bのノックダウンの表現型から脊索の形態を保つために重要な脊索の基底膜に注目した。基底膜の構造を詳細

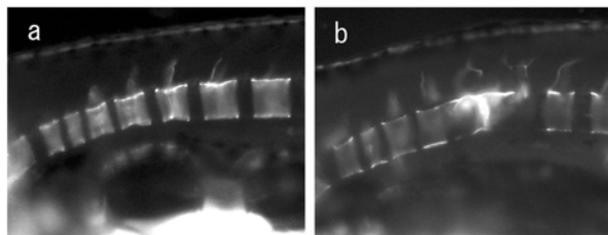


図1 Jagged1a/1b 機能阻害による脊椎骨異常
a: コントロール b: Jagged1a/b 機能阻害胚
受精後 15 日後

に調べるため、電子顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、3層から成る脊索基底膜の内、Medial layerが著しく薄くなっていることが分かった。

③ Jagged1a/1bのノックダウン胚、Mib mutant胚において脊索基底膜のType2 collagenの発現・局在が異常になる。

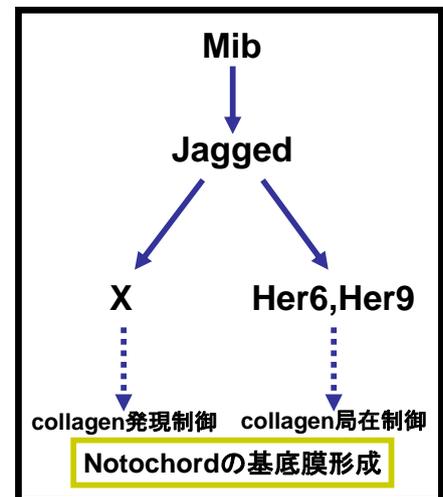
基底膜の構成成分であるcollagenの発現をタンパク質レベルで観察したところ、Jagged1a/1bのノックダウンを行うとコントロールに比べてType2 collagenの発現が減少し、局在が異常になることが分かった。また、Mib mutantにおいても、Jagged1a/1bのノックダウン時と同様な表現型が観察された。

④ Jagged1a/1bのノックダウン胚、Mib mutant胚においてher6, her9の脊索での発現が減少する。Jagged-Notchシグナルがどのように脊索基底膜のType2 collagenの発現・局在を制御しているのかという機構を分子メカニズムで明らかにするために、Jagged-Notchシグナルのターゲット遺伝子の探索を行った。そこで、Notchシグナルのターゲットとして知られているHes family遺伝子のうち、脊索で発現する遺伝子を探した。このうちher6, her9が脊索で発現し、これらの脊索での発現はJagged1a/1bのノックダウンによって減少することが分かった。また、Mib mutantにおいてもher6, her9の脊索での発現は減少することが分かった。

⑤ Her6/Her9のノックダウンによって脊索基底膜のType2 collagenの局在が異常になる。Her6, Her9がJagged-Notchシグナルの下流で脊索の基底膜のType2 collagenの制御においてどのように働くのかを調べるためにHer6/Her9のノックダウンを行い、Type2 collagenの発現・局在観察を行った。結果、Her6/Her9のノックダウンを行うとType2 collagenの発現は減少しないが、局在が異常になることが分かった。

4. 考察 まとめ

本研究の成果より、右図のようなモデルが考えられる。MibによるJaggedのユビキチン化はJagged-Notchシグナルの活性化に必須の役割を果たしている。また、Jagged-Notchシグナルは発生過程で脊索の基底膜を構成するType2 collagenの発現・局在制御を行っており、Jagged-Notchシグナルのターゲット遺伝子であるHer6, Her9はこのうちType2 collagenの局在制御のみを行っていると考えられる。よって発現制御は新たな因子Xによって行われていると予想している。今後は、マイクロアレイを用いてXにあたる因子を探索すると共にJagged-Notchシグナルが制御する脊索形成の全体像を明らかにしていきたいと考えている。



5. 参考文献

Itoh, M et al. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. Dev. Cell., 2003, 4:67-82