

審査の結果の要旨

氏名 清水 清

高等動物 Notch シグナル系は複数の Notch レセプターとそのリガンドと考えられている DSL たんぱく質より構成され、個体の発生・細胞の分化・細胞の癌化に関係することが知られている。本研究は高等動物 Notch シグナル系のよりよい理解を目的に、独自に構築した結合評価系またはシグナル検出系を用いて複数 Notch と DSL たんぱく質間のレセプター・リガンド対応関係とリガンドによる Notch レセプターの活性化機構を評価し、下記の結果を得ている。

1. 新規の DSL たんぱく質を単離する目的で、これら間で非常によく保存されている領域である DSL 配列をプローブに使い、マウス胎児由来の cDNA ライブラリーを起源として low-stringency ハイブリダイゼーション法を実施し、マウス Jagged1 遺伝子を単離した。
2. Jagged1 結合細胞または結合 Notch レセプターを同定する目的で、全細胞外領域からなる可溶化型 Jagged1 蛋白質を作製し、それを利用した結合細胞株のスクリーニングによって白血球系細胞株である BaF3 と 32D 細胞株を見出した。さらに RNA 解析と共沈実験を行い結合レセプターとして Notch2 を同定した。さらに Jagged1 欠失変異体を用いた解析により DSL 領域は必須領域かつ最小結合単位であることと EGF 様リピート配列は結合の安定化に寄与することも明らかにした。
3. Jagged1 を含めた 3 種類の DSL たんぱく質が Notch2 レセプター活性化能を有す

る分子であることを示すため、全長 DSL たんぱく質発現細胞株を作製し、結合試験によって Jagged1 だけでなく Jagged2 や Delta1 も細胞表面上 Notch2 に結合することを示した。さらに Notch シグナル特異的なレポーター遺伝子を遺伝子導入した BaF3 細胞と共培養を行うと、共培養依存的にレポーター遺伝子の活性化がおきることも明らかとした。一方、コントロールに用いた DSL 蛋白質を発現していない親株では遺伝子の活性化は認められなかった。これらのことは 3 種類の DSL たんぱく質がいずれも Notch2 のリガンドであることを示唆するものであった。

- 4、さらに、DSL たんぱく質刺激後の BaF3 内 Notch2 レセプターの挙動についても検討し、刺激によって BaF3 膜表面上 Notch2 のたんぱく量が減少し、核内に新たに表面上 Notch2 たんぱく質より小さい断片が蓄積されるという現象を見出した。このことは、DSL たんぱく質刺激により Notch レセプターの細胞内領域が切断され、切断された Notch 断片が核内に移行したことを意味するものであった。また、その切断・核移行は 15 分といった非常に早期におこることと、核内に移行した Notch2 断片は過度にリン酸化を受けていることも明らかとした。
- 5、Notch2 強制発現 CHO 細胞株を用いたレポーター・アッセイで、3 種類の DSL たんぱく質はいずれも外来性 Notch2 レセプターを活性化可能であることを示した。また、Notch2 シグナルは HES1 や HES5 といった細胞の分化調節に関わる遺伝子の発現を活性化させることも明らかとした。
- 6、solid-phase binding assay と呼ばれる可溶化型 Jagged1 蛋白質をプレートに固定化した結合試験系を用いて、3 種類の DSL たんぱく質が Notch2 だけでなく Notch1 や Notch3 にも結合することを示した。このことは 3 種類の DSL たんぱく質が Notch2 だけでなく Notch1 と Notch3 レセプターのリガンドであることを強く示唆するものであった。

本論文は、Delta1、Jagged1、Jagged2 はいずれも Notch1, Notch2, Notch3 のリガンドであることと、リガンド刺激後に Notch レセプターの細胞内領域で切断が起こり、切断によって遊離した Notch 断片はその後核内に移行し転写補助因子として機能するといった Notch シグナリング経路が存在することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、複数存在する Notch と DSL たんぱく質間のレセプター・リガンド対応関係とリガンドによる Notch レセプター活性化機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。