

論文の内容の要旨

論文題目 神経細胞プレシナプス形成における Notch シグナルの機能解析

林 ゆかり

【序論】

Notch は高度に保存された細胞膜受容体蛋白質であり、隣接した細胞の細胞膜上に発現するリガンドと細胞間相互作用によるシグナル伝達を介して、さまざまな器官の発生過程において重要な役割を果たす。リガンドを受容した Notch は、連続した二段階の限定切断を受け、細胞内ドメイン (NICD) が切り出されて核内に移行し、直接標的遺伝子の転写活性化を引き起こす。この NICD 産生が起きる二段階目の切断は、 γ セクレターゼが担うことが知られている。

近年、Notch の発現量を低下させたトランスジェニック動物において、学習や長期記憶形成に異常が見られることが示され、Notch シグナルがシナプス可塑性に関与する可能性が示唆されている。一方 Notch シグナルが神経幹細胞の分化や維持の調節に重要な役割を果たすことが知られているが、分化を終えた神経細胞における Notch シグナルの役割はほとんど明らかにされていない。私は修士課程において、神経細胞に対する Notch リガンド刺激が、プレシナプス小胞膜蛋白質の発現量を増加させること、その効果が Notch 依存性であることを見出した。博士課程においてはさらにその分子機構と生理的意義について研究を行った。

【方法・結果】

1. Coculture 系による Jagged1 刺激により、シナプス小胞膜蛋白質の発現量が増加する。

神経細胞における Notch シグナルの活性化を行いその効果を観察するため、NIH3T3 細胞に、Notch のリガンドである Jagged1 を過剰発現させ、マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞と共培養 (coculture) した。ウエスタンブロット解析により、プレシナプスに存在するシナプ

ス小胞膜蛋白質 synaptophysin1 や小胞性グルタミン酸トランスポーター1 (VGLUT1) の蛋白質発現量が、Jagged1 を発現する NIH3T3 細胞との coculture で増加することが明らかになった (図1)。一方小胞性 GABA トランスポーター (VGAT) の発現量には大きな変化が観察されず、Jagged1 の効果はグルタミン酸作動性神経細胞に特異的であると考えられた。

Jagged1 によるシナプス小胞膜蛋白質発現量増加が Notch シグナルを介したものであるかどうかを明らかにするため、NTKO マウス (遺伝子型 Notch1^{lox/lox}; Notch2^{lox/lox}; Notch3^{+/+}) 由来初代培養神経細胞と組み換えアデノウイルスを用いた Cre リコンビナーゼ発現系により、*in vitro*

において Notch1, 2, 3 をすべてノックアウトした初代培養神経細胞を作製して検討を行った。Notch ノックアウト培養神経細胞では、Jagged1 による synaptophysin1, VGLUT1 の発現量増加が抑制されていた (図2)。したがって、Jagged1 による Notch シグナルの活性化が、シナプス小胞膜蛋白質発現量を増加させることが示唆された。

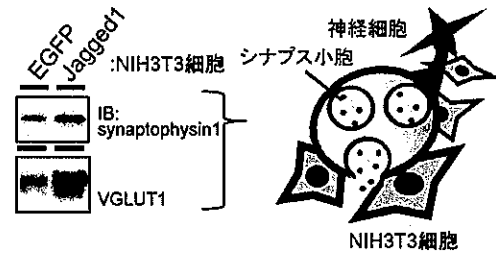


図1 初代培養神経細胞と NIH3T3 細胞の coculture におけるシナプス小胞膜蛋白質のウエスタンブロット解析

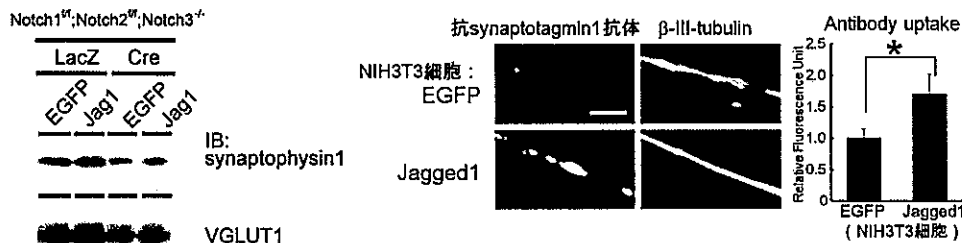


図2 NTKO マウス由来神経細胞における coculture のウエスタンブロット解析

図3 高カリウム刺激依存的抗体取り込み実験による coculture における機能的プレシナプスの免疫染色面積当たりの抗 synaptotagmin1 抗体の免疫蛍光染色シグナルを定量し、平均値を比較した。Scale bar: 5 μ m, n=4, Mean \pm SE., *P<0.05.

2. Coculture 系において Jagged1 は、機能的プレシナプスの形成を増加させる。

Jagged1 によるシナプス小胞膜蛋白質増加が、機能的なプレシナプスの形成に与える影響を調べるため、シナプス小胞に存在する膜蛋白質 synaptotagmin 1 の内腔側に対する抗体の取り込み実験を行った。機能的プレシナプスにおいては、高カリウム刺激による脱分極刺激を行うと、シナプス小胞からの神経伝達物質放出の後、小胞のリサイクリングが生じる。この際、リサイクリングを起こしたシナプス小胞へ抗 synaptotagmin1 抗体を取り込ませることで、機能的プレシナプスを標識することができる。NIH3T3 細胞との coculture 後、抗体取り込み実験を行ったところ、Jagged1 発現 NIH3T3 細胞との coculture においては、機能的プレシナプスの免疫染色シグナルが増加していることがわかった (図3)。この結果から、Jagged1 刺激が、機能的プレシナプスの形成を増加させることが示唆された。

3. Notch ノックアウト培養海馬神経細胞において VGLUT1 の発現量が低下する。

マウス脳における Notch の発現を免疫染色により検討したところ、大脳皮質および海馬において、Notch1 の神経細胞への発現が確認された (図4)。そこで、神経細胞において Notch がシナプス小胞膜蛋白質の発現量を調節することを確認するため、Notch をノックアウトさせた神経細胞を免疫染色により観察した。NTKO マウス由来海馬初代培養神経細胞に Cre リコ

ンビナーゼと Venus を共発現させ、培養 10 日目に、免疫染色により軸索における VGLUT1 発現量を検討した。その結果、Cre リコンビナーゼを発現する Notch ノックアウト海馬神経細胞の軸索においては、単位長さあたりの VGLUT1 の免疫染色シグナル量が、有意に低下していることを見出した。したがって、グルタミン酸作動性神経細胞で Notch をノックアウトすると、VGLUT1 蛋白質の発現量が減少することが示唆された (図 5)。

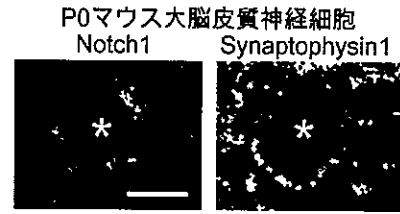


図4 マウス大脳皮質神経細胞(*印)における Notch1 の免疫染色 Scal bar: 5 μ m.

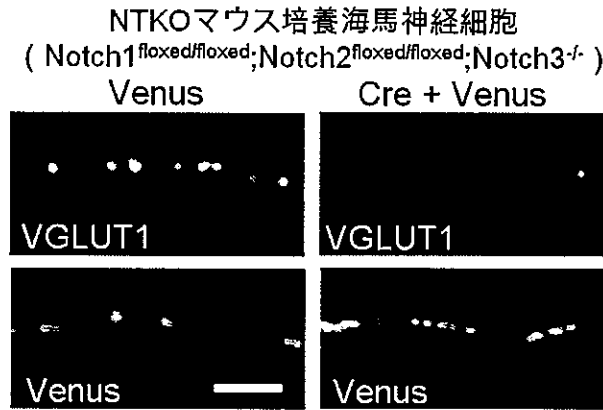
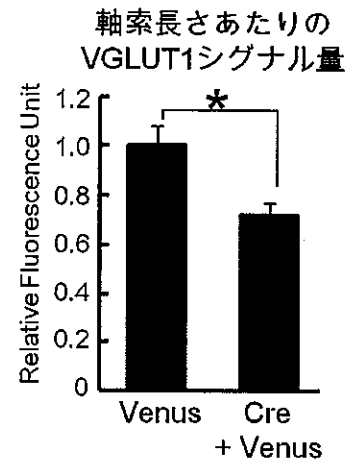


図5 NTKO マウス由来培養海馬神経細胞の軸索における VGLUT1 の免疫染色シグナルの定量 軸索の長さあたりの VGLUT1 免疫蛍光染色シグナルを定量した。Scal bar: 2 μ m, $n=4$ or 5, Mean \pm SE., * $P<0.05$.



4. Jagged1 によるシナプス小胞膜蛋白質増加は、NICD の産生を必要としない。

Notch シグナルによるシナプス小胞膜蛋白質増加の分子メカニズムを調べるため、まず、NICD 産生を抑制する γ セクレターゼ阻害剤 DAPT 処理下において coculture を行ったところ、Jagged1 発現 NIH3T3 細胞による synaptophysin1、VGLUT1 の発現量増加は、抑制されなかった (図 6)。また初代培養神経細胞に対して DAPT 処理を行っても、これらの蛋白質発現量に大きな影響は観察されなかった。このことから、Jagged1 によるシナプス小胞膜蛋白質増加に γ セクレターゼ活性は必要ないことが示唆された。

そこで、NICD の産生を引き起こさない変異型 Jagged1 である Slalom 変異体 (Slm) を NIH3T3 細胞に発現させ、coculture を行ったところ、野生型 Jagged1 と同様に、Slm 変異体によっても、synaptophysin1、VGLUT1 の発現量が増加すること、また、その効果は NTKO マウス由来神経細胞を用いて Notch1、2、3 をノックアウトすることにより抑制されること (図 7) が明らかになった。さらに、定量的 RT-PCR 法を用いて解析した結果、野生型 Jagged1 および

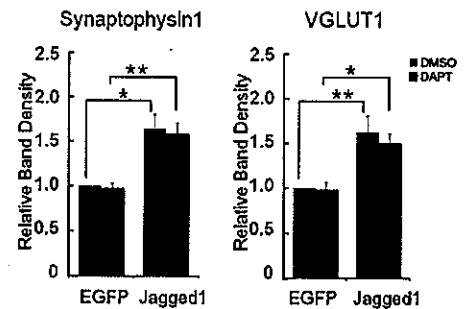


図6 coculture における Jagged1 のシナプス小胞膜蛋白質増加効果に対する γ セクレターゼ阻害剤 DAPT の影響 ウェスタンブロットにおけるシグナル強度を定量した。 $n=26$ or 18, Mean \pm SE., * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Slm 変異体発現 NIH3T3 細胞との coculture により、synaptophysin1、VGLUT1 の mRNA 発現量に大きな変化は見られなかった (図 8)。これらの結果から、Jagged1 によるシナプス小胞膜蛋白質増加は、NICD 産生を介した転写レベルでの発現量増加によるものではないことが示された。

【まとめ・考察】

これまでほぼすべての種類の Notch シグナルがγセクレターゼ依存性の NICD 産生を介していることが示されているが、ショウジョウバエ神経細胞においてはγセクレターゼ非依存性シグナルの存在が示唆されていた。本研究により、哺乳類神経細胞においても、リガンド刺激による、NICD 非依存的な新奇 Notch シグナル経路が、グルタミン酸作動性神経細胞におけるプレシナプス形成を調節する可能性が示された。本研究の成果は、シナプス形成の分子機構において、また Notch シグナル伝達機構の理解においても、新しい概念を提唱する点で意義を有するものと考えられる。今後は、NICD 非依存的 Notch シグナルの分子メカニズムを明らかにするとともに、神経細胞における Notch シグナルがシナプス形成に果たす役割を、個体レベルで明らかにしていきたい。

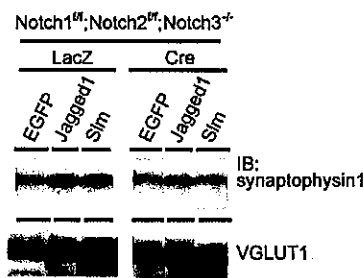


図7 NTKO マウス由来神経細胞と Jagged1 Slm 変異体発現 NIH3T3 細胞の coculture のウエスタンブロット解析

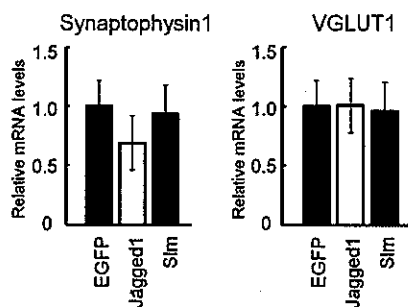


図8 coculture における mRNA 発現量の定量 n=4, Mean±SE.