

Title	Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling : Live monitoring and significance in neural development
Sub Title	Notchシグナルの可視化 ; Notchシグナルの中枢神経発生における時間空間的制御と重要性について
Author	神山, 淳(Kōyama, Jun)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.14-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0014

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: Live monitoring and significance in neural development

(Notchシグナルの可視化：Notchシグナルの中樞神経発生における時間空間的制御と重要性について)

神 山 淳

内容の要旨

哺乳類中樞神経系の組織構築は一層からなる神経上皮が増殖、分化などの過程を経ることで完成される。この過程においてNotchシグナルが重要な役割を果たすことが知られる。近年、過剰発現系や遺伝子欠損マウスなどを用いてNotchシグナルの中樞神経発生における役割の解析が進んでいる。しかしながら、Notchシグナルの作用は発生段階依存的に異なるため、このような手法はNotchシグナルの中樞神経系組織構築における作用のダイナミズムを解析するには最適とは言えない。そこで申請者はNotchシグナルの活性化を可視化する手法を開発し、生体内でのNotchシグナル活性化部位の同定、およびNotchシグナルによる神経幹細胞系譜の時間・空間的制御の解析に着手した。

申請者はNotchシグナルの標的遺伝子*hes1*プロモーターおよびNotchシグナルの下流転写因子RBP-Jの結合配列制御下に改変型YFP (Yellow Fluorescent Protein) 蛋白質VenusのDNA配列を結合した遺伝子を持つレポーターシステムを作成した。さらにタンパク質の不安定性をもたらすPEST配列をVenusに結合させ(dVenus)、半減期の短いレポーターも同時に作成し、Notchシグナルの活性化のon/offをより精妙に感知する手法を確立した。このレポーター遺伝子を胎生14日目のマウス胎児に電気穿孔法を用いて導入するとNotchの活性化は未分化神経幹細胞において選択的に生じていることが分かった。さらに、神経幹細胞の増殖能、自己複製能を評価するニューロスフェア法により、Notchシグナルの活性化が神経幹細胞の未分化維持能、多分化能に相関していることが明らかとなった。さらに、胎生後期より産生されるアストロサイトの分化とNotchシグナルの活性化との関係調べたところ、Notchシグナルの活性化は成熟したアストロサイトには観察することができなかった。また出生後直後のマウスに活性化Notchを電気穿孔法により大脳に導入するとアストロサイトの成熟が遅れることが分かった。しかしながら、Notchシグナルの活性化を阻害する γ -セクレターゼ阻害剤で処理すると神経幹細胞からアストロサイト分化は阻害されることから、Notchシグナルはアストロサイト分化に関しては神経幹細胞からアストロサイトへの初期誘導においては重要であるが、成熟にはむしろ阻害的であり、さらにNotchシグナルの活性化の度合いが低下することがアストロサイトの成熟に必要なことが示唆された。

これらのことから申請者が開発したNotchレポーターシステムにより中樞神経系のみならず、他の臓器・組織においても各発生段階における生理的なNotchシグナルの活性化部位およびその役割を生きたままの細胞、組織で解析することが可能となった。

論文審査の要旨

哺乳類中樞神経系の組織構築は一層からなる神経上皮が増殖、分化などの過程を経ることで完成される。この過程においてNotchシグナルが重要な役割を果たすことが知られる。しかしながら、Notchシグナルの作用は発生段階依存的に異なるため、申請者はNotchシグナルの活性化を可視化する手法を開発し、生体内でのNotchシグナル活性化部位の同定、およびNotchシグナルによる神経幹細胞系譜の時間・空間的制御の解析に着手した。

申請者はNotchシグナルの標的遺伝子*Hes1*プロモーターおよびNotchシグナルの下流転写因子RBP-Jの結合配列制御下に改変型YFP

(Yellow Fluorescent Protein) 蛋白質VenusのDNA配列を結合した遺伝子を持つレポーターシステムを作成した。このレポーター遺伝子を電気穿孔法などにより発生期中樞神経系において解析したところ、未分化な神経幹細胞においてNotchシグナルの活性化が起こり、神経幹細胞の自己複製能、多分化能に相関していることが分かった。次に、胎生後期より産生されるアストロサイトの分化とNotchシグナルの活性化との関係調べた。まず、Notchシグナルのアストロサイト分化系への影響を、Notchシグナルの活性化を阻害する γ -セクレターゼ阻害剤を用いて検討したところ、成熟アストロサイトのマーカーであるGFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) の出現が抑制された。しかしながら、レポーター遺伝子を用いて解析するとNotchシグナルの活性化は成熟したアストロサイトには観察することができなかった。培養系、個体における恒常活性型Notchの過剰発現系においてアストロサイトの成熟が遅れることから、Notchシグナルはアストロサイト分化に関しては神経幹細胞からアストロサイトへの初期誘導においては重要であるが、成熟にはむしろ阻害的であり、さらにNotchシグナルの活性化の度合いが低下することがアストロサイトの成熟に必要なことが示唆された。

審査では、Notchシグナルのレポーターシステムに*Hes1*のプロモーターを利用することの妥当性に関して質問があった。これに対して、*Notch1*の遺伝子欠損マウスにおいて*Hes1*の発現が低下していないことから*Hes1*がNotchシグナル以外によっても制御されているという報告もあるが、今回使用したプロモーターはNotchシグナルによって制御される重要な領域のみを用いていること、さらにNotchシグナルの応答配列に変異を加えたプロモーターを併用することでより正確にNotchシグナルの活性化を検出するような手法を取り入れているとの回答がなされた。また、Notchのレポーターシステムで蛍光が観察された細胞において、活性化Notch抗体で染色される細胞数の割合はどの程度かとの質問がなされた。これに対して、70%程度の蛍光陽性細胞において活性化Notch抗体の染色が確認されたと回答された。また、発生段階依存的に異なるNotchの作用が分子レベルでどのように説明できるのかとの質問がなされた。これに対して、細胞外からのNotchシグナルの入力以外にも、クロマチン構造レベルでの違いが細胞内在性のプログラムとしてNotchシグナルの作用の違いを生み出しているという予備的な知見があるとの回答がなされた。さらに、Notchレポーターシステムを用いることでNotchシグナルのレセプターのうち*Notch1*以外のレセプターによるNotchの活性化が検出できるかとの質問がなされた。これに対して*Notch1*に限らず、転写因子RBP-Jを介して作用すると考えられる他のNotchレセプターによる活性化も検出できるが、今回の研究では検討していないという回答がなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき点を残しているものの、個体発生に重要な役割をすると考えられるNotchシグナル活性化の可視化技術の開発を試みており、本システムは中樞神経系のみならず、他の臓器の発生過程に及ぼすNotchシグナルの役割の解析も可能であることから幅広い研究領域に応用でき発生研究に於いて強力なツールと成り得るという点で非常に有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 生理学 岡野 栄之
構造生物学 福田 恵一 発生・分化生物学 須田 年生
解剖学 仲嶋 一範
学術確認担当者：
審査委員長：福田 恵一

試問日：平成18年 1月26日