

氏 名 岡村 佳明

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1060 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 **Regulation of Notch signaling via Protein *O*-fucosyltransferase1
and the role in the enteric nervous system development**

論文審査委員 主 査 教授 城石 俊彦
教授 広海 健
助教授 一色 孝子
助教授 平田 たつみ
教授 松野 健治（東京理科大学）

Notch signaling は進化的に保存されたシグナル伝達経路であり、細胞の運命決定や形態形成などに重要な役割を果たしている。哺乳類において Notch 受容体は Notch1-4 の 4 つと、リガンドとして Delta-like-1, 3, 4 と Jagged1, 2 の 5 つが存在する。このシグナル伝達経路の活性化は、Notch 受容体が隣接した細胞において発現するリガンドと結合することにより開始される。この結合は γ -secretase 複合体を介した Notch 受容体の切断を誘導し、最終的に遊離の Notch intracellular domain (NICD) が産生される。NICD は核内へ移行し、転写調節因子 RBP-J κ と共に下流遺伝子の転写を促進する。このようなシグナル伝達経路において、様々な補助因子が同定され、それらによりシグナル活性は厳密な制御を受けている。そのような補助因子の一つとして Fringe が知られる。Fringe は、Notch 受容体の細胞外ドメインに存在する EGF リピートの *O*-fucose 残基を修飾する β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase であることが示され、Notch signaling は *O*-fucosylation により制御されることが示唆されていた。その後、EGF リピートの serine もしくは threonine 残基に *O*-fucose 修飾する酵素として Protein *O*-fucosyltransferase 1 (*Pofut1*) が同定された。

私は、Notch signaling における *O*-fucosylation の役割を調べるため、*Pofut1* ノックアウトマウスの作製を試みた。*Pofut1* は発生初期においてユビキタスな発現を示したことから、条件付きノックアウトマウスを作製した。*Pofut1* null 変異体は、激しい形態形成異常を示し、E9.5 で致死となった。その表現型は *RBP-J κ* null 変異体と非常に良く似たものであり、体節形成過程におけるマーカー遺伝子の発現解析から、*Pofut1* は Notch signaling に必須であることが示された。次に、*Pofut1* の Notch signaling における作用機序を調べるため、*Pofut1* と NICD との epistasis を検討した。その結果、*Pofut1* は NICD の上流で機能することが示された。これらの結果から、*Pofut1* は Notch 受容体の trafficking もしくはリガンドとの結合を制御している可能性が考えられた。そこで、次に Notch 受容体の局在を調べた。その結果、野生型の胚において Notch 受容体は細胞膜に局在するものが観察されたのに対し、*Pofut1* null 変異体において大半の Notch 受容体は細胞質に蓄積し、リガンドである Delta-like 1 との共局在を示さなかった。これらの結果は、*Pofut1* は Notch 受容体の局在を制御し、隣接した細胞において発現するリガンドとの結合に必要と考えられる Notch 受容体の細胞膜への局在に必須であることを示唆する。

また、今まで関与の知られていない発生過程における Notch signaling の役割を解明するため、神経堤細胞に着目した。神経堤細胞は多能性を有した細胞集団であり、神経褶の外側領域に由来し、胚の様々な組織へと移動し、様々な細胞へと分化する。神経堤細胞は特に、末梢神経系と腸管神経系を含む自律神経系を生み出す。神経堤細胞における Notch signaling の役割を明らかにするため、*Pofut1* 条件付きノックアウトマウスと、移動中の神経堤細胞特異的に Cre recombinase を発現する Wnt1-Cre マウスを用い、解析を行った。神経堤細胞特異的 *Pofut1* ノックアウトマウスは、形態形成異常を示さず生後 1 日以内に致死となったが、腸管神経系における欠陥を伴っていた。腸管神経系における lineage 解析から、神経堤細胞特異的 *Pofut1* ノックアウトマウスにおいて腸管神経堤細胞の減少が観察された。さらに、この減少は細胞の生存や増殖の異常なく腸管神経系の早発性の神経分化によるものであった。これらの結果から、Notch signaling は腸管神経系前駆体細胞の形成もしくは維持に必要であることが示唆された。神経堤細胞において、Sox10 は神経系前駆体細胞の維持に必須な因子として知られている。また、腸管神経系は二つの前駆体細胞集団から発生し、初期に分化する腸管神経は Mash1 依存的に産生され、後期に分化するは Mash1 非依存的に産生され

ることが知られている。そこで、Notch signaling がどのように腸管神経系前駆体細胞の形成もしくは維持を制御しているかを調べるため、これらの遺伝子の発現を調べた。神経堤細胞特異的 *Pofut1* ノックアウトマウスにおいて、*Sox10* の発現は減少し、*Mash1* の発現が上昇していた。これらの結果から、Notch signaling は *Sox10* と *Mash1* の発現を制御することにより、腸管神経系前駆体細胞の形成を制御していることが示唆された。

これらの研究により、Notch 受容体の局在を介した Notch signaling の制御と、Notch signaling を介した腸管神経系前駆体細胞の形成機構が明らかになったと考えられる。

Notch signaling は、発生過程において細胞運命の決定や形態形成の制御に重要な役割を果たしている。Notch 受容体が隣接した細胞上のリガンドと結合すると、Notch 受容体の切断が誘導され、遊離の Notch intracellular domain (NICD) を産生することでシグナル伝達経路が活性化される。その後、NICD は核内へ移行し、転写調節因子 RBP-J κ と共に下流遺伝子の転写を促進する。このシグナル活性化には様々な補助因子が必要とされるが、Notch 受容体の EGF リピートへの糖修飾がシグナル伝達経路を制御することが示唆されていた。しかし、糖修飾の役割やそのメカニズムの詳細は不明であった。そこで、本論文では、Notch 受容体における糖転移を触媒する酵素である Protein O-fucosyltransferase 1 の遺伝子 (*Pofut1*) の条件付きノックアウトマウスを作製し、以下の二つの実験を行って、Notch signaling における糖修飾の働きを解析した。

1: はじめに *Pofut1* null 変異体の表現型解析を行った。ホモ変異個体は *RBP-J κ* null 変異体と良く似た形態形成異常を示し E9.5 で致死であり、*Pofut1* が Notch signaling に必須であることが示された。次に、*Pofut1* と NICD との epistasis を検討した結果、*Pofut1* は NICD の上流で機能し、*Pofut1* は Notch 受容体の trafficking もしくはリガンドとの結合を制御している可能性が示された。そこで、Notch 受容体の局在を調べたところ、*Pofut1* 変異体では、大半の Notch 受容体は細胞質に蓄積し、リガンドである Delta-like 1 との共局在を示さなかった。以上から、マウスにおいて糖修飾はリガンドとの結合に必要な Notch 受容体の細胞膜への局在を制御することが明らかとなった。

2. 神経堤細胞から腸管神経系形成における Notch signaling の関与はこれまで知られていなかった。そこで、条件付き *Pofut1* ノックアウトマウスと移動中の神経堤細胞特異的に Cre recombinase を発現する *Wnt1-Cre* マウスを用いて、腸管神経系の形成における *Pofut1* の働きについて解析した。この変異マウスは形態形成異常を示さず生後 1 日以内に致死となったが、腸管神経堤細胞の減少が観察された。この減少はアポトーシスや細胞増殖異常でなく、腸管神経系の早発性の神経分化によるものであった。この結果は、Notch signaling が腸管神経系前駆体細胞の形成もしくは維持に必要であることを示唆している。神経堤細胞において、*Sox10* は神経系前駆体細胞の維持に必須な因子として知られている。また、腸管神経系は二つの前駆体細胞集団から発生し、初期に分化する腸管神経は *Mash1* 依存的に、後期に分化するものは *Mash1* 非依存的に産生されることが知られている。そこで、*Sox10* と *Mash1* 両遺伝子の発現を調べたところ、変異マウスにおいて、*Sox10* の発現は減少し、*Mash1* の発現は上昇していた。以上から、Notch signaling は、*Sox10* と *Mash1* の発現バランスを制御することにより、腸管神経系前駆体細胞の形成を制御している可能性が示された。

Pofut1 条件付きノックアウトマウスを用いた以上の二つの実験により、マウスにお

いて糖修飾が Notch 受容体の細胞膜局在を介した Notch signaling の制御と、Notch signaling による腸管神経系前駆体細胞の形成に重要な働きを持つ可能性が示された。以上から、本論文は、今後の Notch signaling 機構の解明に大きな手が掛かり与えるものと評価できる。