The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Murine homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis
Author(s)	岸, 憲幸
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42582
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【18】

氏　　名	岸（きし）　憲（のり）　幸（ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16025　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学　位　論　文　名	Murine homologs of *deltex* define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. （マウス Deltex ホモログは脊椎動物Notch 情報伝達系を構成し、神経発生に関与している）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岡野　栄之 （副査） 教　授　仲野　　徹　　教　授　濱田　博司

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

Notch 情報伝達系は細胞間相互作用による細胞運命の制御に重要な役割を果たしており、無脊椎動物からヒトに至るまでその働きは保存されている。近年、Notch 情報伝達系がガン化や遺伝子病、痴呆性神経疾患に関与していることが明らかとなり、基礎生物学的重要性のみならず、医学的重要性も高まっている。ショウジョウバエや線虫などにおける研究から、Notch 情報伝達系の構成因子が同定されているが、現在のところ、情報伝達系の生化学的機構は不明である。ショウジョウバエ Notch 情報伝達系の構成因子 Deltex は Notch 受容体の細胞内ドメインに結合して Notch 情報伝達系を正に制御していると考えられている。本研究では、遺伝学的手法を用いることのできる脊椎動物の実験系としてマウスを選び、*deltex* のマウスホモログを同定し、これまで明らかにされていない脊椎動物におけるマウス *deltex* 遺伝子の構造、発現、機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

1、マウス *deltex* ホモログの同定と構造解析

ショウジョウバエ Deltex と相同性を示すポリペプチドをコードしていると予測される cDNA 断片を dbEST より同定した。これらの cDNA をプローブとしてマウス cDNA ライブラリーをスクリーニングし、マウス *deltex* ホモログに対応すると思われる 4 つの cDNA を同定した。それぞれを *mouse deltex－1*（*MDTX1*）、*MDTX2*、*MDTX3* と名付け、更に *MDTX2* の選択的スプライシング産物と思われる cDNA を *MDTX2△E* と名付けた。塩基配列より推測される MDTX 1 と MDTX 2 のアミノ酸配列からは、ショウジョウバエ Deltex の 3 つのドメイン、すなわち Notch 受容体のアンキリンリピートと結合するドメインⅠ、プロリン残基に富んだ領域を含むドメインⅡ、蛋白質間相互作用に関与することが示唆されている RING－H 2 フィンガーを含むドメインⅢが、これらのマウスホモログにおいても保存されていることが明らかになった。MDTX 3 はドメインⅠの大部分を欠いていたが、ショウジョウバエ Deltex に見られるその他のモチーフは保存されていた。*MDTX2△E* より予測されるアミノ酸配列はプロリン残基に富んだ領域を欠いている他は MDTX 2 のそれと同一であった。

2、yeast two hybrid 系を用いたマウス Notch 1 およびマウス Deltex 間の結合

yeast two hybrid 法を用いて、マウス Notch 1 のアンキリンリピートと各 MDTX ホモログの結合を調べたところ、MDTX 1、MDTX 2、MDTX 2△E は強く結合したが、ドメインⅠを欠く MDTX 3 は結合しなかった。また

MDTX ホモログ間においても様々な程度に結合が認められた。

3、*MDTX* 遺伝子の発現解析

MDTX1、*MDTX2*、*MDTX3* の 3' 非翻訳領域をプローブとして、マウス胚の各ステージで *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて発現解析を行った。胎生期において *MDTX1*、*2*、*3* は中枢神経系、末梢神経系、胸腺において発現が認められ、マウス Notch 1 の発現と部分的に一致していた。一方、成体の各臓器についてノーザンブロット法を用いて発現解析を行ったところ、MDTX 1 は脳、胸腺、脾臓、精巣、卵巣において、*MDTX3* は精巣において、*MDTX3* は脳、腎臓、精巣、卵巣において発現が認められた。

4、MDTX ホモログの転写因子 E47に及ぼす影響

Notch 情報伝達系の活性化によりヒト basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子 E47の転写活性能が哺乳類培養細胞 NIH 3 T 3 細胞で抑制されることが知られている。この系を用いて MDTX ホモログの機能解析を行ったところ、活性型ヒト Notch－1 を発現させた時と同様に MDTX 1、MDTX 2、MDTX 2 △E、MDTX 3 の過剰発現によっても E47の活性が抑制されることが明らかとなった。

5、C 2 C12細胞における MDTX 2 と MDTX 2 △E の強制発現による myogenic 遺伝子への影響

一定の条件下において C 2 C12細胞（筋芽細胞に相当する細胞株）は筋細胞へと分化するが、Notch 情報伝達系の活性化によりこの筋細胞への分化が抑制されることが知られている。レトロウイルスを用いて MDTX 2 と MDTX 2 △E を C 2 C12細胞に遺伝子導入したところ、myogenic 遺伝子の 1 つである *myogenin* 遺伝子の転写量の減少が認められた。

6、アフリカツメガエル胚での *MDTX* の異所性発現

in vivo での MDTX ホモログの機能解析を行うため、アフリカツメガエル胚を用いた。4 つの *MDTX* の mRNA を 2 細胞期のアフリカツメガエル胚の半割球に注入することで、異所性に MDTX を発現させたところ、活性化型 X－Notch と同様に神経板のマーカーである NCAM の発現領域が拡大した。一方で、活性化型 X－Notch の過剰発現により 1 次ニューロンのマーカーである N－tubulin の発現の減少が認められたが、MDTX の異所性発現では変化がなかった。

【総括】

4 つのマウス Deltex ホモログ MDTX 1、MDTX 2、MDTX 2 △E、MDTX 3 は、幾つかの差異はあるもののショウジョウバエ Deltex のもつ 3 ドメイン構造を基本的には保持していた。*MDTX* 遺伝子の発現は胎生期においては中枢神経系、末梢神経系、胸腺に発現が認められ、部分的にマウス Notch 1 の発現と一致していた。MDTX ホモログの強制発現による NIH 3 T 3 細胞での E47の転写活性化能の抑制や C 2 C12細胞での *myogenin* 遺伝子の転写量の減少、またアフリカツメガエル胚における神経板の拡大はいずれも活性化型 Notch の強制発現による効果と似ている。

以上の結果より、今回同定した 4 つの MDTX ホモログは少なくとも部分的には機能的に脊椎動物Notch 情報伝達系を構成していて、神経発生に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、様々な細胞の運命決定を制御している Notch 情報伝達系の調節因子の 1 つである Deltex 遺伝子のマウスホモログの同定、発現および機能解析を行ったものであり、脊椎動物における Notch 情報伝達系の制御機構の一端を明らかにした。Deltex 遺伝子のマウスホモログを 4 つ（MDTX 1、MDTX 2、MDTX 2 △E、MDTX 3）同定し、アミノ酸配列の比較により、ショウジョウバエ Deltex の基本的な構造が保存されていることを明らかにした。これらのマウス Deltex ホモログの内、ドメイン I が保存されていた MDTX 1、MDTX 2、MDTX 2 △E はショウジョウバエ Deltex と同様に、生化学的にマウス Notch 1 受容体のアンキリンリピートと結合する能力を有することを示すと共に、胎生期における中枢神経系、末梢神経系、胸腺においてマウス Deltex 遺伝子と Notch 遺伝子の発現が部分的に一致していることを示した。更に哺乳類細胞培養系やアフリカツメガエル胚における機能解析により、これらのマウス Deltex ホモログが機能的にも Notch 情報伝達系に関与していることを明らかにした。

本論文により明らかとなったこれらの一連の事実は、Deltexによる脊椎動物Notch情報伝達系の調節を示すものであり、学位の授与に値すると判断された。