

脳神経発生に関わるシグナル伝達経路の機能と制御の解明

Clarification of the function and regulation of
the signaling pathway which is involved in nervous system development.

(日本生化学会推薦)

代表研究者 九州大学 石谷 太 Kyushu University Tohru Ishitani

During nervous system development, a number of extracellular cues induce the expression of genes, which are required for the formation of nervous system, via activating intracellular signaling pathways. Recent studies show that a variety of signaling pathway, such as Wnt and Notch signaling pathway, contributes to the nervous system development. However, the mechanism of the special and temporal regulation of signaling pathways has not been clearly understood. In this study, we investigate the function and regulation of both Wnt and Notch signaling pathways in vertebrate nervous system development using genetic and biochemical approach. Furthermore, we generate the new system to monitor “the spatial and temporal regulation of the molecular signaling activity” and “interaction between each of signaling pathway” at individual level.

研究目的

脳神経組織の再生あるいは創出は、21世紀の医療における重要な課題である。そのための基礎研究と脳神経系の形成システムの解明は必須である。本研究においては「脊椎動物個体(主にゼブラフィッシュ)を用いた遺伝学及び細胞生物学的研究」と「Co-IP や ChIP assay, in vitro kinase assay などの生化学研究」そして「DNA マイクロアレイやプロテオミクスなどの網羅的研究手法」を組み合わせ、脳神経系形成に関わるシグナル伝達分子群の分子・細胞・個体の各レベルにおける機能を解析する。さらに、生きた脊椎動物個体においてシグナル伝達の活性を可視化するシステムを構築し、脳神経発生を中心とした個体発生におけるシグナル伝達の時空間的制御の全貌を明らかにして行く。

本研究では特に、脳神経系発生だけでなく疾病の発症にも関わるシグナル伝達経路である Wnt シグナル伝達系と Notch シグナル伝達系、そしてそのシグナル活性の強弱をファインチューンするタンパク質リン酸化酵素 NLK に注目して研究をすすめる。

最終的には、本研究で得られた結果を足がかりに、脳神経系形成におけるシグナル伝達ネットワークの全貌を解明し、脳神経系形成システムを理解することを目標としたい。そして、将来的な再生医療のための基礎となる情報を収集していきたい。

研究経過

(A) NLK と Notch シグナルの関係の検討

①研究開始以前に明らかになっていたこと

Nemo-like kinase (NLK)は種を越えて保存された蛋白質リン酸化酵素である。私たちは、NLK の基質を生化学的方法により探索し、Notch シグナル伝達系の主要な構成因子である Notch が NLK によってリン酸化されることを見いだした(石谷未公表データ)。Notch シグナルは神経発生や疾病の発症に深く関わるシグナル伝達経路であり、NLK の作用は非常に興味深い。そこで私は、NLK と Notch シグナルの関係の検討を行った。

②明らかにしたこと

a) mouse neuro-2a細胞においてNLKはNotchをリン酸化し、Notchシグナルを抑制する。 mouse neuroblastoma neuro-2a細胞を用い、NLKとNotchシグナルの関係を検討した。まず、NLKがNotchシグナルに及ぼす影響を検討するために、Notchシグナルのレポーターアッセイを行った。Notchシグナルのレポーター活性は、活性型Notchの過剰発現により誘導できる。NLKはその酵素活性依存的に活性型Notchによるレポーターの活性化を抑制した。また、NLKをRNAiによりノックダウンすると、レポーターの活性が逆に促進された。したがって、NLKはNotchシグナルの活性を負に制御すると考えられる。

b) NLKはNotchのリン酸化を介してNotchシグナルを抑制する。 続いて、NLKがNotchのどの部分をリン酸化するかを調べた。その結果、脊椎動物のNotchで保存された7つのセリン残基をNLKがリン酸化することが明らかになった。さらに、これらの部位をアラニンに置換した変異型NotchによるNotchレポーターの活性化を、NLKは抑制できなかった。したがって、NLKはこれらの7つのセリン残

基のリン酸化を介してNotchシグナルを負に制御すると考えられる。

c) NLKはNotch転写複合体の形成を阻害することにより、Notchシグナルを抑制する。 続いて、NLKによるNotchのリン酸化がどのようなメカニズムでNotchシグナルの抑制を導くのかを検討した。活性型Notchは、DNA上で転写因子CSLとco-activator MAMLと三者複合体を形成することで、標的遺伝子の発現を誘導する。私は、NLKがこの三者複合体形成を阻害するのではないかと期待し、NLK存在下あるいはNLK非存在下で、NotchとCSLあるいはMAMLの結合を調べた。その結果、NLKがその酵素活性依存的に三者複合体形成を阻害することが明らかになった。

d) NLKはゼブラフィッシュ胚発生において、Notch標的遺伝子の発現を抑制し、神経分化を促進する。 脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用い、NotchシグナルとNLKの関係の検討を行った。Notchシグナルは体節形成期の神経板において神経分化を負に制御することが知られている。そこで、NLKがこの過程に関与するか検討した。ゼブラフィッシュ胚にNLKのアンチセンスオリゴヌクレオチドを注入しNLK機能阻害胚を作成した、NLK機能阻害胚では、神経板においてNotchシグナル標的遺伝子の発現が上昇し、神経細胞が過形成されることがわかった。したがって、NLKはNotchシグナルを負に制御し、神経分化を正に制御すると考えられる。

以上の結果より、NLKはNotchをリン酸化することによりNotch転写複合体の形成を阻害し、神経発生を正に制御することが明らかになった。

(B) NGFシグナルにおけるNLKの機能の検討

神経軸索の誘導と伸展は、正常に機能する脳神経系の構築に必須のプロセスである。Nerve growth Factor (NGF)は神経軸索形成において重要な機能を果たす細胞外シグナル分子として知られている。NGFによる神経突起形成機構は、主にラット由来のモデル神経細胞であるPC12細胞を用いて解析が進められてきており、NGFはMAPキナーゼやPI3キナーゼなどのプロテインキナーゼを活性化することによって神経突起形成を制御すると考えられている。しかしながら、その機構は十分には理解されていない。

NLKはNGFシグナルの下流で働いて神経突起形成に関与する。 私たちが注目して研究を行っているNLKは、種を超えて保存されたMAPキナーゼに類似したセリン/スレオニンキナーゼであり、また、NLKは脳神経系組織に強く発現しており、脳神経系形成に関与する可能性が期待されてい

る。これらのことから、NLKがMAPキナーゼ同様にNGFの下流で働いて神経突起形成を制御する可能性が期待できる。そこで、この可能性を検討した。私たちはまず、PC12 細胞において、NLKが他のMAPK同様にNGFによって活性化されるかを検討した。その結果、NGF刺激後すぐにNLKのキナーゼ活性が亢進することが明らかになった。さらに、NLKがNGF刺激依存的に細胞辺縁部へ移動すること、NLKが微小管結合蛋白質MAP1Bや細胞接着制御蛋白質paxillinをリン酸化することが明らかになった。また、NGFの誘導するMAP1B及びpaxillinのリン酸化と神経突起形成は、NLKのRNAiによって阻害された。これらの結果から、NLKはNGFの下流で機能し、細胞辺縁部でMAP1Bやpaxillinをリン酸化することによって微小管の安定性や細胞接着を制御し、神経突起形成を制御することが示唆された。

我々はさらに、この NGF-NLK 経路の脊椎動物神経軸索形成における生理学的機能を探る目的で、ゼブラフィッシュにおいてNLKとNGFの機能阻害胚を作製した。その結果、いずれの阻害胚においても脊髄神経軸索の伸展に異常が見られた。以上の結果より、NGF-NLK 経路は、脊椎動物の神経軸索形成に重要な役割を果たすと考えられる。

(C) 生きた脊椎動物個体におけるシグナル伝達活性のライブイメージング

従来の生命科学の研究は、特定の“組織・器官”や“レベル(分子レベル・細胞レベル・個体レベル)”に限定して行われてきた。しかし、私たちの体内で機能する分子の多くは、様々な組織・器官において機能しており、また分子・細胞・個体の各レベルに影響を及ぼしている。このため、分子の活動を細胞レベル/個体レベルの現象とリンクさせて理解することが「生命現象の全貌を分子レベルで解明する」ためには不可欠である。これを達成するための最も良い方法が「個体を用いた分子の活動のライブイメージング」である。本研究では、胚体が透明という優れた特性を持つモデルであるゼブラフィッシュを用いて「個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の活動のライブイメージング」を行う。さらに作製したツールを用いて、『シグナル分子の活動と個体の形成と維持の過程の同時把握』や『各シグナルの細胞レベル個体レベルにおける機能の網羅的推測』を行う。これにより、シグナル伝達、個体発生、恒常性の維持のメカニズムの研究を促進することを目標とする。現在、Wnt シグナル、Notch シグナル、Hedgehog シグナル、NFκB シグナルを可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュを作成中である(未完成)。具体的方法を以下に記載する。

(a) シグナルの標的遺伝子の発現を蛍光蛋白質の発現に変換して、シグナルの活性を可視化する。実際には「特定の転写因子の結合配列」と「基本転写因子の結合する basal promoter」、「蛍光蛋白質発現遺伝子」をつないだレポーター遺伝子を作成する。蛍光蛋白質は、GFP ではなく destabilized GFP (dGFP)を用いる。GFP は非常に安定であるため、シグナルの増減を正確に判定するためには不安定な GFP である dGFP が適していると考えた。

(b)メダカトランスポゾン Tol2 のシステムを利用してトランスジェニックゼブラフィッシュを作成する。Tol2 に作成した各レポーター遺伝子を挿入したベクターを作成し、これと共にトランスポゾン転移酵素を発現する mRNA をゼブラフィッシュ卵に注入する。これより、レポーター遺伝子を組み込んだ魚が作成できる。そして、レポーター遺伝子を保有する魚を選別し、その系統を維持する。

考察

本研究により、蛋白質リン酸化酵素 NLK が神経分化抑制シグナル分子である Notch や細胞骨格蛋白質 MAP1B、接着関連蛋白質 paxillin のリン酸化を介して、神経細胞の運命決定や神経突起形成に関与することが明らかになった。今後も、NLK の機能と制御に焦点をあてて研究を進め、個体発生、神経発生の分子メカニズムの解明に貢献して行きたい。

また、本研究で開発を行っているシグナルライブイメージングゼブラフィッシュは、「シグナル伝達の解析を分子レベルと個体レベルをリンクさせて行うこと」を可能にし、さらには、「脊椎動物発生における各シグナルの活動の全貌把握」や「特定のシグナルを特異的に阻害する化合物のスクリーニング」が可能になると期待できる。これらの開発を今後も続行し、生命科学研究に貢献して行きたい。

研究発表

口頭発表

- ① Nemo-like kinase promotes neurogenesis by blocking Notch-signaling. Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh “第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会 ワークショップ 福岡” 2007年
- ② Nemo-like kinase is a critical mediator of NGF-regulated axonal development. Tohru Ishitani, Shizuka

Ishitani, Kunihiro Matsumoto “第 41 回日本発生生物学会大会 ワークショップ 徳島” 2008 年

③ Nemo-like kinase は Notch シグナルを阻害し、神経分化を制御する 石谷 太、平尾 智子、鈴木 真帆、磯田 美帆、松本 邦弘、伊藤 素行 “第 41 回日本発生生物学会大会 ワークショップ 徳島” 2008 年

④ Nemo-like kinase は Notch シグナルを阻害し、神経分化を制御する 石谷 太、平尾 智子、鈴木 真帆、磯田 美帆、北川 元生、松本 邦弘、伊藤 素行 “第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 ワークショップ 神戸” 2008 年

⑤ Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. Tohru Ishitani “The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE (Frontier Biomedical Science Underlying Organelle Network Biology) Symposium 大阪” 2009 年

誌上発表

① Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Motoo Kitagawa, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh (*Nature Cell Biology* in revise)

② A LiCl-sensitive protein kinase NLK is involved in NGF-induced neurite outgrowth via phosphorylating MAP1B and Paxillin. Tohru Ishitani, Shizuka Ishitani, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh (投稿中)