

氏 名	た 田 村 公 実 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1887 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-Jk/Su(H) (転写因子 RBP-Jk と膜レセプター Notch は Notch の新たな領域を介して結合しうる。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 川 伸 一 教 授 清 水 章 教 授 本 庶 佑

論 文 内 容 の 要 旨

RBP-Jk は分子量 60kDa の DNA 結合蛋白で転写因子として働く。mouse, human, *Drosophila* から単離された遺伝子を比較するとそのアミノ酸配列は進化的によく保存されており mouse と *Drosophila* でも 80% 保たれている。*Drosophila* RBP-Jk は遺伝学的ならびに分子生物学的解析から neurogenic gene の一員であり神経分化を抑制する Suppressor of Hairless(Su(H)) と同一であることが明らかになった。

RBP-Jk の転写因子としての活性を制御する協調分子を単離するため、申請者は酵母の genetic assay を基調とした two hybrid system を用い RBP-Jk と結合するクローンを複数個得た。その中に *Drosophila* Notch のマウス相同遺伝子 mouse Notch1 (mNotch1) の一部 (RAM23) が含まれていた。*Drosophila* Notch も neurogenic gene の一員で RBP-Jk 同様神経分化を抑制する方向に働く。この 2 つの遺伝子は同じシグナル伝達経路上にあると思われ、RBP-Jk は Notch の下流に位置付けられている。

Notch は約 2600 アミノ酸からなる 1 回膜貫通型レセプターで種をこえてよく保存されている。マウスでは 4 つの Notch 蛋白が同定されている。種間、種内で保存されているドメインとして、細胞外にリガンドと結合する EGF 様リピート, cysteinrich モチーフの LNR を、細胞内に 33 アミノ酸からなる 6 つの CDC10 アンキリンリピートをもつ。申請者が単離した RAM23 は細胞膜直下からアンキリンリピートの直上までの 100 アミノ酸をコードしていた。

RBP-Jk が RAM23 領域外の mNotch1 と結合しうるかどうか調べるため mNotch1 の欠失変異体を作製し、3 つの系、酵母 two hybrid system, GST 共役沈降法、変異体発現細胞の免疫沈降法を用いて蛋白結合の有無を調べた。その結果、RBP-Jk は mNotch1 と RAM23 領域でのみ結合することがわかった。

同様の結果は *Drosophila* RBP-Jk と *Drosophila* Notch の間でもみられたこの蛋白-蛋白結合は保存されていることが示された。また RAM23 領域の N 側前半で強い結合がみられたため、その領域でよく保存されているアミノ酸を置換した変異体を作製し細胞膜直下の Arg-His Gly と TrpPhePro が RBP-Jk と

の結合に重要であることを明らかにした。

同じシグナル伝達経路上にある細胞膜上のレセプター Notch と核内転写因子 RBP-Jk が直接会合することから、このシグナルを伝える機構として2つのメカニズムが考えられる。第1は RBP-Jk が細胞質に存在し Notch と会合しており刺激後すみやかに核内へ移行するというものでこの場合 RBP-Jk は転写因子であると同時にシグナル変換分子としても働く。第2はリガンドから刺激が入ると膜レセプター Notch が細胞内で切断され核に移行し核内で RBP-Jk と会合し標的遺伝子の発現を制御するというものである。どちらの機構が用いられているかはまだ明らかではないが、RBP-Jk を介した Notch レセプターからのシグナル伝達機構は今までに報告されている細胞からのシグナル伝達機構とは違うことが示された。

論文審査の結果の要旨

RBP-Jk は分子量 60kDa の DNA 結合蛋白で転写因子として働く。Drosophila の遺伝学的解析により RBP-Jk は Notch レセプターの下流で機能し、神経系や生殖系の細胞運命づけに関与することが知られている。

申請者は酵母を用いた結合蛋白スクリーニングを用い mouse Notch (mNl) の細胞内ドメインが RBP-Jk と結合することを見い出した。

さらに mNl の欠失変異体を作製し、酵母蛋白結合法、GST 共役沈降法および変異体発現細胞の免疫沈降法を用いて RBP-Jk が mNl とその細胞膜直下の領域で直接結合することを明らかにした。

同じシグナル伝達経路上のレセプター Notch と核内転写因子 RBP-Jk が直接会合することからこのシグナル伝達機構はこれまでに例を見ない新しい分子機構を用いることが明らかとなった。転写因子がシグナル変換分子として膜と核を往復する、またはレセプター細胞内部分が刺激後切断され核に移行する、というモデルが考えられている。

以上の研究は発生分化のシグナル伝達機構の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年2月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。