

氏 名	黒 田 一 樹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2128 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 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 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Delta-induced notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis

(Deltaによって誘導された NotchシグナルはRBP-Jを介して MyoD の発現及び筋芽細胞の分化を抑制する)

(主査)

論文調査委員 教授 中西重忠 教授 影山龍一郎 教授 本庶 佑

論 文 内 容 の 要 旨

Notchシグナルは多細胞生物において細胞の分化制御に深く関与することが示されている。我々は脊椎動物におけるリガンド依存的Notchシグナル（以下Notchシグナル）による細胞分化の制御メカニズムの解析を行った。

我々はNotchシグナルの解析を行うために、細胞の分化にNotchシグナルが関与すると考えられている筋芽細胞（C2C12）を用いてアッセイ系の構築を行った。これまでにC2C12細胞ではNotchの細胞内領域を発現させると細胞の分化が抑制され、また内在性のNotchが発現していることも示されている。まずNotchのリガンドであるマウスのDelta1をミエローマ細胞（X63）に導入して、Delta1を安定に発現する細胞株（D10）を作製し、膜表面上にNotchと結合可能なDelta1が発現していることをFACS解析により確認した。このD10細胞を用いてC2C12細胞との共培養を行い、Notchシグナルの筋分化への影響を解析した。通常、C2C12細胞は分化誘導時に筋管を形成し筋細胞へ分化していく。D10細胞との共培養下では分化誘導時でもC2C12細胞の筋管形成は抑制され、MyoDの発現も低下し、筋細胞への分化が抑制されることが示された。この時、C2C12細胞にMyoDを強制発現させるとNotchシグナルによる分化抑制は解除されたので、NotchシグナルはMyoDの発現を低下させ筋分化を抑制していると考えられた。

このNotchシグナルによるMyoDの低下がどのようなメカニズムによるのかを解析した。これまでに我々によりクローニングされたDNA結合タンパク質・RBP-JはNotchシグナルに関与し、また活性型RBP-J（RBP-J-VP16）をC2C12細胞に発現させると筋分化が抑制される事を示した。この活性型RBP-Jが発現する細胞においてMyoDの発現を調べると、MyoDの発現が低下していることが示された。この事はRBP-Jを活性化するとMyoDの発現が抑制される為と考えられたので、NotchシグナリングがRBP-Jを介した転写活性を上昇させるのかをレポーターアッセイにより調べた。C2C12細胞をD10細胞と共培養するとRBP-Jの結合配列を有するプロモーターの転写活性の上昇が見られ、またこのNotchシグナルによる転写活性の上昇は過剰なRBP-Jの発現により抑制された。これらのことよりNotchシグナルはRBP-Jを介して標的遺伝子の発現を制御していると考えられた。

これまでにRBP-Jの標的遺伝子としてHES1が考えられるので、NotchシグナルによりC2C12細胞でHES1プロモーターが活性されるのかを調べたところ、活性化されることが示された。この為、D10細胞とC2C12細胞との共培養を行い経時的にHES1とMyoDのmRNAの発現を調べた。HES1 mRNAは共培養を始めて1時間のところで上昇し、MyoD mRNAはその直後から減少することが示された。またサイクロヘキサミド存在下ではHES1 mRNAが増加してもMyoD mRNAは減少しないことから、NotchシグナリングはHES1を介してMyoDの発現を抑制していると考えられた。

以上の結果よりC2C12細胞においてNotchシグナルはRBP-Jを介してHES1を活性化し、MyoDの発現を低下させて筋分化の抑制を行っていると考えられる。我々は生体においてNotchシグナルが組織特異的な分化調節を行うbHLH型の転写

因子の発現を制御することにより、細胞の分化を調節していると考えている。

論文審査の結果の要旨

Notchシグナルは多細胞生物において細胞の分化制御に関わることが示されている。しかし脊椎動物においてその分子機構は不明であった。

申請者は、内在性にNotchを発現するマウス筋芽細胞（C2C12）とNotchのリガンド（Delta1）を発現させた細胞（D10）を同時培養すると、C2C12細胞での筋細胞のマスター遺伝子であるMyoDの発現が低下し、分化誘導刺激を与えても筋細胞への分化が抑制されることを示した。またNotchシグナルによりC2C12細胞ではDNA結合蛋白質RBP-Jの認識配列を調節領域に有するHES1の発現が一過性に上昇し、引き続いてMyoDの発現が低下することを示した。今回の結果とこれまでの研究成果を総合すると、Delta1の刺激により、NotchはRBP-Jに結合し、その標的遺伝子で分化を負に制御するHES1遺伝子の転写を誘導する。次いでHES1は、分化を正に制御し、自己による正のフィードバック発現調節機構を持つMyoD遺伝子の発現を抑制することにより、C2C12細胞の筋細胞への分化を抑制していると考えられる。

以上の研究は細胞分化の制御機構の解明に貢献し、医学の発展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11年2月26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。