

神経と腭臓の初期発生に關与する

bHLH 型転写因子の解析

小幡順子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

動物遺伝子機能学講座

(川市正史教授)

平成13年3月提出

目次

序論	4
第1章 RBP-J κ 結合因子の同定及び RBP-J κ との結合解析	
1-1 RBP-J κ 結合因子の検索	6
1-2 RBP-J κ 結合因子の同定	6
1-3 p48 と RBP-J κ の結合様式	7
1-4 細胞内局在でみる p48 と RBP-J κ の結合	7
1-5 免疫沈降でみる p48 と RBP-J κ の結合	8
1-6 p48 の RBP-J κ との結合領域の同定	8
1-7 考察	9
第2章 p48 の発現解析	
2-1 マウス胎児及び成体組織での p48 の発現	11
2-2 Whole mount <i>in situ</i> hybridization による p48 の発現領域の解析	11
2-3 神経分化過程における p48 の発現パターン	12
2-4 考察	13
第3章 p48 の転写活性	
3-1 他の bHLH 型因子の転写活性に与える p48 の影響	14

3-2	A box と E box を必要とする p48 の転写制御	15
3-3	p48 の転写活性に与える RBP-J κ の影響	15
3-4	考察	16
第4章 p48 のレチノイン酸反応性		
4-1	レチノイン酸による p48 の誘導	17
4-2	p48 プロモーター中のレチノイン酸反応領域の同定	17
4-3	考察	18
第5章 p48 の機能解析		
5-1	p48 ノックアウトマウスの解析	20
5-2	考察	20
総括		21
図と表		24
材料と方法		54
謝辞		62
参考文献		63

序論

ショウジョウバエの頭と背中には感覚剛毛がある。この感覚毛の正確な位置と数が調節されるためには、発生過程における細胞間相互作用が重要である。感覚神経細胞の発生は段階を経て進行し、まず体の一定の場所で数個から十数個の細胞が神経細胞に分化する能力を同等に獲得する。このクラスターからたった1つの細胞が任意に選ばれて感覚母細胞に分化する。この選択機構は、クラスターの中で最も神経細胞に分化が進んだ細胞が、その周辺の細胞に神経細胞への分化を抑制するシグナルを出すことによる。その結果、周囲の細胞は上皮細胞へと分化していく (Scheme 1)。この機構を側方抑制という。

側方抑制の機構は、線虫からヒトに至るまで広く保存されており、多細胞生物の発生調節機構において重要な役割を担っている。ショウジョウバエの遺伝学的解析から、この側方抑制には様々な遺伝子が関与していることが知られている。その中で特に重要な働きをしているのが、Notch、Delta、Suppressor of Hairless (Su(H))、Enhancer of split (E(spl))などの neurogenic genes である (Scheme 2)。neurogenic genes を活性化すると、感覚母細胞への分化が抑制されて感覚毛の数が減少する。一方、不活性化すると、感覚毛の数が増加する。このメカニズムは、感覚母細胞に発現している Delta が、周囲の細胞に発現している Notch に結合して、膜貫通型レセプターである Notch を活性化することから始まる。活性化された Notch は、まず細胞外領域がタンパク分解を受け、次に細胞内領域 (NotchIC) が切断されて細胞質に放たれる (Schroeter *et al.*, 1998; Mumm *et al.*, 2000) (Scheme 3)。そして、NotchIC と Su(H)が共に核内に移動して E(spl)の発現量を上げることによって、この細胞の神経細胞への分化を抑制する。このように、Notch を中心とした Notch シグナル伝達系によって側方抑制の機構が制御されている。

Notch は、側方抑制以外に細胞の増殖、移動、死などにも関与している。さらに、Notch のタンパク質分解に presenilin 1 が働いていることも報告されており (Ray *et al.*, 1999; De Strooper *et al.*, 1999; Struhl and Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999)、アルツハイマー症候群の病因と Notch シグナル伝達系の関与も示唆されている。このように Notch シグナル伝達系が様々な領域で機能している中で、特に Su(H)は多くの種間で保存されており (Furukawa, 1992)、マウスの Su(H)ホモログは RBP-J κ と呼ばれている (Kawaichi *et al.*, 1992)。Notch の細胞外領域には EGF 様リピートと保存されたシステインリッチな領域、細胞内領域には RAM ドメインと cdc10/アンキリンリピートがあり、RAM ドメインに Su(H)が結合することがわかっている (Kurooka *et al.*, 1998)。RBP-J κ は、5'-CGTGGGAA-3'とい

う保存された DNA モチーフを認識して結合する (Tun, 1994; Lecourtois and Schweisguth, 1995; Bailey and Posakony, 1995)。細胞質で結合した NotchIC と RBP-J κ は核に入り、コアクチベーターとして E(spl)の転写を活性化する。RBP-J κ 自身には転写活性化能は無く、NotchIC といっしょに作用して初めて E(spl)の転写を活性化できる。しかし、RBP-J κ は、NotchIC などのコアクチベーターが存在しない状態では転写抑制因子として働く。RBP-J κ は、ほ乳類で知られている 4 つの全ての Notch と結合し、RBP-J κ のノックアウトマウスは生後 8.5 日目という早い時期で異常をきたして E10.5 には死亡する (Oka *et al.*, 1995)。これらのことから、RBP-J κ が Notch シグナル伝達系で重要な役割を担っていることがわかる。

そこで我々は、酵母を用いた Two-hybrid システムを用いて E9.5 マウス胎児ライブラリーから RBP-J κ 結合タンパク質をスクリーニングすることにした。その結果、PTF1 の p48 サブユニットを単離した。PTF1 は、スイスの Krapp らによって既に同定された、ラット膵臓の外分泌組織特異的な転写因子である (Krapp *et al.*, 1996)。PTF1 は p48, p64, p75 からなる 3 量体で、全て bHLH 型因子である。p75 は普遍的な bHLH 型因子である E12 であり、p64 は ALF1 の N 末端を欠いたものであり、また p64 と p48 が細胞質に局在して、それに p75 が結合することにより核に移行することが明らかになっている。また、PTF1 はラットの E16 から膵臓の原基で発現し、外分泌細胞で amylase, trypsin, chymotrypsin, elastase などの消化酵素遺伝子の転写を活性する。p48 のノックアウトマウスは、膵臓の外分泌細胞を全く欠いてしまうことが報告されている (Krapp *et al.*, 1998)。

我々は、既に報告されている PTF1 の膵臓での発現より早い時期に、p48 が神経管の背側で発現することを見いだした。神経管の背側領域には感覚介在神経に分化していく細胞があることから、p48 は介在神経の発生過程で機能する因子ではないかと考えられた。しかし、Krapp らの作成した p48 ノックアウトマウスには、膵臓の欠失がみられるものの神経系に形態的な異常はなかった。p48 とよく似たタイプの因子に、細胞特異的な bHLH 型転写因子である BETA2/NeuroD がある (Ishibashi *et al.*, 1996)。BETA2/NeuroD も膵臓と神経系の両方に発現が認められ (Lecourtois and Schweisguth, 1995)、膵臓の内分泌細胞に発現してインシュリン遺伝子の転写を活性化しているが、そのノックアウトマウスの初期神経発生に異常は見られていない。

このように、由来の異なる組織で、少なくとも部分的には同一の因子が働いている可能性が示唆される知見が得られつつある。我々もこの機構に興味を持ち、さらに明らかにするために p48 の解析をすすめることにした。

第1章 RBP-J κ 結合因子の同定及び RBP-J κ との結合解析

1-1 RBP-J κ 結合因子の検索

酵母を使った Twohybrid system を用いて、完全長の RBP-J κ をベイトに、マウス 9.5 日目胎児の cDNA ライブラリーから RBP-J κ 結合タンパク質の検索を始めた。この時期の cDNA ライブラリーを用いた理由は、RBP-J κ や Notch のノックアウトマウスがこの時期から異常を示すので、機能的な RBP-J κ 結合タンパク質が単離できる可能性が高いと考えたからである。スクリーニングには計 450 万個の酵母形質転換体を用いた。

1 次スクリーニングのヒスチジン (-) プレートで生えたクローンは約 140 個で、さらに 42 個が β -ガラクトシダーゼ活性の有無による 2 次スクリーニングで生き残った。この中で 5 種類のクローンが繰り返し陽性クローンとして単離された。Notch1 が 9 回、Msx2 結合タンパク質である MINT (Newberry *et al.*, 1999) が 7 回、PTF1 の p48 サブユニット (Krapp *et al.*, 1996) が 5 回、その他に LaminB と hnRNP がそれぞれ 3 回と 2 回とれた。RBP-J κ と結合することがわかっている Notch1 がとれたことは、このスクリーニングが有効であることを示している。

近年、bHLH 型転写因子がいろいろな場面で重要な役割を担っていることが明らかになっていることと、p48 の神経系での働きについての報告がないことから、我々は bHLH モチーフをもつ p48 の解析を行うことにした。

1-2 RBP-J κ 結合因子の同定

Fig. 1-1 に、上記のスクリーニングで取れた p48 の cDNA 構造及び予想されるアミノ酸配列を示した。p48 は約 1.5 Kbp の長さを持ち、324 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。そして、タンパク質の中央部分 (166 番目から 216 番目のアミノ酸配列間) に bHLH モチーフが存在した。

ホモロジー検索を行った結果、p48 の bHLH 領域は、Math1 (Akazawa *et al.*, 1995)、Tal1、Dermo1、Twist などの bHLH 部分と相同性を示した (Fig. 1-2)。Math1 はショウジョウバエ *atonal* の哺乳類ホモログ (Akazawa *et al.*, 1995)、Tal1 (Huang *et al.*, 2000) は赤血球の分化に、Dermo1 (Lee *et al.*, 2000) と Twist (Lee *et al.*, 2000) は骨形成などに関わることがわかっている。この中で最も似ている Math1 でも 54% 程度の相同性しか示さないことから、p48 は新しいタイプの bHLH 型因子だと考えられる。bHLH モチーフ以外の領域で有為な相同性を示す蛋白質は見つか

っていない。

1-3 p48 と RBP-J κ の結合様式

β -ガラクトシダーゼアッセイを用いて、RBP-J κ と p48 の結合の強さを定量的に調べた。その結果、RBP-J κ と p48 の結合活性の値が 116.9 であるのに対し、RBP-J κ と Notch1 の値は 25.4 であった (Table 1)。この結果、p48 は Notch1 より強固に RBP-J κ と結合していることがわかった。

さらに、RBP-J κ の各種変異体と p48 との結合活性を調べることにより、p48 と RBP-J κ の結合様式を調べた。用いた RBP-J κ の変異体は次の 4 種類である。EEF259AAA (Hsieh *et al.*, 1995) は Notch との結合に必要なアミノ酸を置換したもので、コリプレッサーの SMRT, NcoR, CIR (Horlein *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 1999) とも結合しない変異体である。RL218GS と KR90SL は、DNA 結合領域を別のアミノ酸に置換した変異体であり (Waltzer *et al.*, 1995)、TP378AA はリン酸化部位と思われる部位のアミノ酸を置換した変異体である (Cristensen *et al.*, 1996) (Table 1)。EEF259AAA は予想通り Notch1 とは結合しなかったが、p48 とは野生型の RBP-J κ と同様の強さで結合した (Table 1)。このことは、RBP-J κ と p48 の結合様式が、RBP-J κ と Notch のそれとは異なることを示している。KR90SL と RL218GS を用いた時には、それぞれ Notch と p48 の両方に結合活性が検出された。よって、RBP-J κ のこれらの DNA 結合領域も、Notch や p48 との結合には使われていないことがわかった。TP378AA を用いた時も、Notch と p48 の両方に結合活性が見られたので、RBP-J κ のリン酸化部位と思われる箇所も Notch や p48 との結合には必要でないことがわかった。

1-4 細胞内局在でみる p48 と RBP-J κ の結合

酵母中での RBP-J κ と p48 の結合が実際に動物細胞内でも生じているのかどうかを明らかにするために、蛍光免疫染色法を用いて Cos7 細胞内における RBP-J κ と p48 の局在を調べた (Fig. 1-3)。

C 末端に myc タグを付けた p48 と N 末端に FLAG タグを付けた RBP-J κ 、さらに E47 をそれぞれ発現ベクターに挿入し、これらのベクターを Cos7 細胞に導入することで細胞内に強制発現させた。そして、それぞれにつけたタグの抗体を検出に用いた。

p48 は転写因子なので核に存在するのではないかと考えられたが、p48 を細胞

中で強制発現させて myc 抗体で検出すると、実際には細胞質に局在していた (Fig. 1-3 の 1)。また、RBP-J κ を強制発現させて FLAG 抗体で検出すると、核に局在していた (Fig. 1-3 の 2)。RBP-J κ と p48 を同時に発現させて p48 を検出すると、p48 単独の時と同様に細胞質に存在した (Fig. 1-3 の 3)。また、RBP-J κ と p48 を同時に発現させて RBP-J κ を検出すると、単独の時には核にあった RBP-J κ が細胞質に局在するようになった (Fig. 1-3 の 4)。このように、RBP-J κ と p48 が挙動を共にしたことから、両者が実際に動物細胞内でも結合することが強く示唆された。

一般に、細胞特異的な bHLH 型転写因子は、E12 や E47 などの普遍的な bHLH 型因子とヘテロダイマーを形成することが知られている (Benezra *et al.*, 1990; Shen and Kadesch, 1995)。そこで、E47 を RBP-J κ や p48 と同時に発現させた時の細胞内局在を調べた。p48 と E47 を共に発現させて p48 を検出すると、単独の時とは細胞質にあった p48 が核に存在するようになった。(Fig. 1-3 の 5)。次に、RBP-J κ 、p48、E47 の 3 者を同時に発現させて RBP-J κ を検出すると、RBP-J κ は核に局在していた (Fig. 1-3 の 6)。つまり、RBP-J κ と p48 の 2 者だけでは細胞質にあったものが、E47 が加わることにより核に移行したのである。また、図に示していないが RBP-J κ 、p48、E47 の 3 者を同時に強制発現させて p48 を検出すると、p48 も核に局在していた。これらの結果から、細胞質にある RBP-J κ と p48 の複合体に E47 が結合することによって核に移行している可能性が示唆された。

1-5 免疫沈降でみる p48 と RBP-J κ の結合

p48 と RBP-J κ の結合をさらに確かめるために、免疫沈降を行った (Fig. 1-4)。myc タグを付けた p48、FLAG タグを付けた RBP-J κ 、E47 をそれぞれ発現ベクターにのせたものを Cos7 細胞に導入し、その細胞抽出液を実験に用いた。

RBP-J κ と p48 を共に導入した細胞の抽出液を FLAG 抗体で免疫沈降し、それを myc 抗体でウエスタンブロッティングした。その結果、p48 のバンドが検出された (Fig. 1-4A)。逆に、同じ細胞抽出液を myc 抗体で免疫沈降し、FLAG 抗体でウエスタンブロッティングすると、RBP-J κ のバンドが検出された (Fig. 1-4B)。これらの結果からも、RBP-J κ と p48 が結合していることが強く示唆された。

1-6 p48 の RBP-J κ との結合領域の同定

RBP-J κ との結合に必要な p48 上の領域を決定するために、Twohybrid system を用いて各種制限酵素で削った p48 と RBP-J κ との結合活性を調べた (Fig. 1-5)。

各種制限酵素で切断した8種類の p48 のフラグメントをそれぞれ pGAD424 に挿入し、RBP-J κ は pGBT9 に挿入した。SFY526 酵母に各 pGAD424-p48 と pGBT9-RBP-J κ を形質転換した。この酵母を濾紙に塗り、凍結と融解を繰り返して細胞を破壊した後、X-gal の溶液に浸して β -ガラクトシダーゼ活性を調べた。

Fig. 1-5 に示すように、C 末端側が欠失した p48 には活性はみられなかったが、C 末端の 231~324 アミノ酸間の 93 残基を含むフラグメントには活性が見られた。よって、p48 のこの 93 残基を含む領域が、RBP-J κ との結合に必要であることがわかった。この領域のモチーフ解析を行ったが、蛋白-蛋白間相互作用に必要とされる既知のモチーフは存在しなかった。

1-7 考察

マウス E9.5 cDNA ライブラリーを使った RBP-J κ 結合タンパク質のスクリーニングの結果、PTF1 (Sommer *et al.*, 1991) の p48 サブユニットを単離した。PTF1 は、腭臓原基の発生過程 (Sussel *et al.*, 1998) と消化酵素遺伝子の発現 (Krapp *et al.*, 1996) に重要な役割を果たしている。その中の p48 サブユニットが RBP-J κ 結合タンパク質として取れたことは、腭臓の発生過程で Notch シグナル系が働いている可能性も考えられ、bHLH モチーフをもつ p48 の解析を始めた。

これまでに E9.5 という早い時期での p48 の発現量は低いと報告されていたが (Krapp *et al.*, 1996; Sussel *et al.*, 1998)、我々の実験では p48 が Notch と同程度の頻度で取れた。このことから、RBP-J κ と p48 の結合がかなり強固であると考えられた。実際に Table 1 に示した β -ガラクトシダーゼ活性の値からも、p48 と RBP-J κ の結合が、Notch と RBP-J κ の結合よりも強いことがわかった。

RBP-J κ の配列上には、DNA 結合に不可欠な3つの領域 (Waltzer *et al.*, 1995; Sommer *et al.*, 1991) と、いくつかのタンパク質と相互作用するのに必要な領域が存在する (Waltzer *et al.*, 1995; Hsieh and Hayward, 1995)。RBP-J κ の Notch 結合ドメインに変異を入れた EEF259AAA 変異体と p48 の結合の強さは、野生型の RBP-J κ と p48 の結合の強さとほとんど変わらなかった (Table 1)。このことは、RBP-J κ が Notch 結合領域とは異なる領域で p48 と結合していることを示している。その他、RBP-J κ の DNA 結合領域を壊した変異体や MAP キナーゼによるリン酸化部位と思われる領域を壊した変異体も p48 との結合に影響を与えなかったことから、RBP-J κ のこれらの領域も p48 との結合には使われていないことがわかった。これらのことから、RBP-J κ と p48 の結合様式が、これまでに知られていたものとは異なるものであることがわかった。

そこで、今度は p48 上の RBP-J κ 結合領域を調べたところ、p48 の C 末端の 93 残基が p48 と RBP-J κ の結合に必要であることがわかった。しかし、この領域に既知のタンパク質結合モチーフはなかった。このことから、p48 と RBP-J κ の結合様式がこれまでに知られているものではないことがわかった。

第 2 章 p48 の発現解析

2-1 マウス胎児及び成体組織での p48 の発現

これまでに p48 は、ラットの胎児で E16 以降という遅い時期の腓臓にのみ発現していると報告されていた (Krapp *et al.*, 1996; Krapp *et al.*, 1998)。しかし、前章で述べたように我々は、p48 をマウス胎児 E9.5 の cDNA ライブラリーから単離したことから、さらに詳しく p48 の発現パターンを調べることにした。

まず、マウス胎児と成体組織での p48 の発現を RT-PCR で調べた (Fig. 2-1)。RT-PCR に用いた Total RNA は、E8.5~E15.5 と成体の各臓器から調製した。プライマーは、p48 のコーディング部分の 463 bp を増幅するようにデザインしたものを使った。Fig.2-1 でバンドが 2 本見えるのは、この p48 プライマーが、cDNA 産物より 333 bp 大きいゲノム由来の断片も増幅するからである。ポジティブコントロールには β -アクチンのプライマーを用いた。産物はアガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色で可視化した。さらに、そのゲルから産物をフィルターに移してサザンハイブリダイゼーションを行った (Fig. 2-1)。

その結果、p48 は E8.5 から発現しはじめ、E10.5 をピークに E15.5 まで発現が続いた (Fig. 2-1A)。サザンプロットを行うと、E8.5 から E15.5 にわたる p48 のバンドがさらに明確になった。成体では、腓臓に強く発現していることは既に報告されている通りであったが (Krapp *et al.*, 1996)、さらに脊髄にも弱く発現していることが見い出された。この他の組織には全く発現していなかった (Fig. 2-1B)。

2-2 Whole mount *in situ* hybridization による p48 の発現領域の解析

マウス胎児で持続的に p48 の発現が見られたことから、我々は胎児期における p48 の発現領域を調べることにした。p48 の中の 2 つの領域を使ってそれぞれジコキシゲンラベルしたアンチセンス RNA プローブを作成し、Whole mount *in situ* hybridization を行った。1 つのプローブは p48 の 5'末端、もう 1 つは 3'末端領域を用いたもので、それぞれのプローブを使用した時に同じ発現パターンが得られたことから、この実験結果は信用できるものと考えた。

Fig.2-2A は、E10.5 の胎児に p48 の 5'末端側プローブを使用した時の結果である。シグナルは神経管の後部、後脳の下部から尾の先までの全長にわたってみら

れた (Fig.2-2B)。p48 の発現の頭側の境界は、Fig.2-2C に示すように後脳のちょうど中央から後ろからで、小脳より前の中枢神経領域には発現は見られなかった。何度か同じ実験を行うと、耳胞や脳にも少しシグナルが見られることもあったが、ネガティブコントロールにセンス RNA プローブを用いた時にも同様のシグナルが見られたことから、それらのシグナルはバックグラウンドだとみなせる。

また、Fig. 2-3 に示すように、Whole mount *in situ* hybridization で p48 の発現領域を染色した胎児を切片にした。Fig. 2-3a は、胎児を心臓の高さでホリゾンタルに切ったものである。Fig. 2-3b は、後ろ足付近で切ったものである。p48 の発現は神経管の背側に限局しており、その中でも特に内側の Ventricular zone と呼ばれる領域に強く発現していた。Ventricular zone は、この領域で未分化な神経細胞が発生し、分化が進むにつれて序々に細胞が外側に遊走していくことが知られている。p48 は roof plate には発現していなかった。

p48 が発現する神経管の背側領域の細胞は、将来介在神経になることから、p48 が介在神経の分化過程で機能している可能性が示唆された。介在神経は、末梢感覚神経から受け取った刺激を脳へ伝えるニューロンである。

さらに、E9.5 胎児の前足の間にスポット状シグナルを 2 つ見い出した (Fig. 2-4A)。この場所は、膵臓の原基で発現することが知られている Pdx1 の発現箇所とほぼ重なることから (Offield *et al.*, 1996)、これらの p48 のシグナルも膵臓の原基であろうと考えている。この結果は、これまでに報告されていた p48 の膵臓での発現時期をさらに早めることになった。

2-3 神経分化過程における p48 の発現パターン

p48 が未成熟な神経細胞の集まる Ventricular zone で強く発現していたことから、神経分化過程での p48 の発現状況を解析した。

マウスの胎児性カルシノーマ細胞である P19 細胞は、そのままでは未分化な状態を維持するが、凝集させてレチノイン酸を添加することにより神経系細胞に分化誘導することができる (McBurney, 1982)。この細胞株が神経系細胞に分化していく過程で、p48 がどのような発現パターンを示すのか RT-PCR で調べた。

その結果、神経系細胞へ分化しつつある P19 細胞での p48 の発現は、レチノイン酸添加後 1 日目から始まり、2 日目をピークにして 10 日目まで続いた (Fig. 2-5A)。

P19 細胞の神経系細胞への分化誘導には、レチノイン酸添加と凝集化が必要不可欠である (Rudnicki and McBurney, 1987)。そこで、P19 細胞をレチノイン酸含

有培地中で凝集させずに培養し、細胞が未分化のままの状態と同様の実験を行った。この時にも p48 の発現は見られたが、それはレチノイン酸処理後 12 時間でピークに達し、その後すぐ減少し始めて 4 日目には検出できなくなった (Fig. 2-5B)。

また、P19 細胞は 1% の DMSO (ジメチルスルホキシド) を添加して凝集化させることにより、筋肉細胞へ分化誘導することもできる (McBurney *et al.*, 1982)。しかし、このような処理により筋肉細胞に分化誘導した P19 細胞には p48 の発現は見られなかった (図省略)。

これらの結果から、p48 は神経の発生過程で特異的に発現し、p48 の持続的な発現と神経の分化過程に相関性があることが示された。

2—4 考察

p48 は、ラット胎児 E16 頃からの胎児期後期の腭臓で強く発現していることが報告されていたが (Krapp *et al.*, 1996)、早期の発現パターンについては報告されていなかった。そこで、我々が早期のマウス胎児を用いた *in situ* hybridization を行ったところ、p48 は E10 頃の神経管でも発現していることがわかった (Fig. 2-1)。染色した胎児をホリゾンタルに切ってみると、神経管でも背側の ventricular zone に限局して発現していた (Fig. 2-3)。この p48 の発現パターンから、後に感覚介在神経やグリア細胞になる神経前駆細胞で p48 が機能している可能性もでてきた。また、E10 頃の腭臓原基でも既に p48 が発現していることもわかった。

p48 の他にも神経管で発現する bHLH 型因子はいくつか知られており、その中でも p48 に似て神経管の背側に限局して発現するものに Mash1 (Goulding *et al.*, 1993)、Math1、Pax3、Pax7 などがある。そして、achaete-scute 複合体のほ乳類ホモログで Notch シグナル伝達系における neurogenic gene の 1 つである Mash1 (Lo *et al.*, 1991) とショウジョウバエの proneural gene である atonal のほ乳類ホモログである Math1 は、神経細胞と内分泌細胞の発生過程に関与していることが知られている。このような知見から、p48 も発生過程における神経系と腭臓の両方の組織で発現し、機能している可能性が示唆される。

第3章 p48の転写活性

3-1 他のbHLH型因子の転写活性に与えるp48の影響

多くの組織特異的な bHLH 型因子は、E12 や E47 などの普遍的な bHLH 型因子とヘテロダイマーを形成し、ターゲット遺伝子のプロモーター中に存在する E ボックスに結合して転写を制御する。E ボックスは、多くの bHLH 型因子が認識する保存された配列 (CANNTG) である。そこで、p48 が、E ボックスを含むプロモーターに与える影響をルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。

ルシフェラーゼ遺伝子上流に 7 つの E ボックス (CANNTG) を含むプロモーターを挿入したレポータープラスミドと、E47 と p48 をそれぞれ挿入した発現ベクターを作成した。まず、レポータープラスミドと E47 を挿入した発現ベクターを Cos7 細胞に導入した。この時、すでに報告されているように転写の活性化が見られた (Fig. 3-1A)。次にレポータープラスミドと p48 の発現ベクターを細胞に導入した時、転写の活性化は見られなかった。そして、レポータープラスミドと E47 発現ベクターと p48 発現ベクターを同時に細胞に導入した時、転写活性は抑制された (Fig. 3-1B)。これらのことから、E47 単独の転写活性を p48 が抑制することがわかった。

次に、組織特異的な bHLH 型因子の 1 つである Mash1 と E47 の転写活性化に与える p48 の影響を調べた (Fig. 3-2)。Mash1 発現ベクターと先のレポータープラスミドを細胞に導入した時、25 倍の転写活性化が見られた。そして、Mash1 と E47 を同時に細胞内で発現させると、約 300 倍の転写活性化が見られた。これらのことは、Mash1 がホモダイマーかヘテロダイマーを形成して E ボックスをもつプロモーターの転写を活性化するという既知の報告に一致するものである (Horton *et al.*, 1999)。しかし、Mash1 と p48 を同時に発現させると、Mash1 単独時の転写活性が抑制された (Fig. 3-2A)。さらに、Mash1 と E47 と p48 の 3 者を同時に発現させた時、Mash1 と E47 で約 300 倍あった転写活性が、p48 が加わることによりその約半分に抑制された (Fig. 3-2B)。これらの結果から、E ボックスをもつプロモーターを用いた時、p48 は普遍的な bHLH 型因子と組織特異的な bHLH 型因子のどちらに対してもそれらの活性を抑制するように働き、他の多くの bHLH 型因子が転写を活性化するように働くのとは異なる性質を示すことがわかった。しかし、p48 を加えた後も多少の活性は残ることから、他の多くの bHLH 型因子よりも転写活性可能性が低いだけであるとも考えられる。

3-2 A box と E box を必要とする p48 の転写制御

p48 が 3 つのサブユニットのうちの 1 つを担う PTF1 は、ラットにおいてキモトリプシノーゲン B 遺伝子や α -アミラーゼ 2 遺伝子など消化酵素遺伝子のプロモーター中に存在する PTF1 モチーフに結合することがわかっている (Roux *et al.*, 1989)。このモチーフには、E ボックスと A ボックスと呼ばれる配列が含まれており、両ボックス間のスペーサーの長さは各々の消化酵素によって 5 bp から 15 bp の間で異なる (Fig. 3-3)。また、A ボックスの配列 (A/CTGGGAAA) は、RBP-J κ の認識配列 (CGTGGGAA) とよく似ている。これらのことから、p48 が E ボックスと A ボックスの両方をもつプロモーターに厳密に反応することが予想された。そこで、キモトリプシノーゲン B 遺伝子の PTF1 モチーフを 4 つ並べた配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを作成し、ルシフェラーゼアッセイによりこのモチーフを用いた時の p48 の転写活性を調べた (Fig. 3-4)。

レポータープラスミドと共に E47 発現ベクターを Cos7 細胞に導入した時、転写の活性化はおこらなかった。p48 を発現させた時には、約 8 倍の活性化がみられた (Fig. 3-4A)。p48 と E47 を同時に発現させると、加えた E47 の DNA 量に依存して転写活性は約 40 倍まで上昇した。しかし、A ボックスあるいは E ボックスに変異をいれた (Am, Em : 下記の配列参照) レポータープラスミドを用いて同様の実験を行うと、いずれの場合も転写活性は検出されなかった (Fig. 3-4B, C)。このように、p48 と E47 による転写の活性化には、A ボックスと E ボックスの両方が必要であることがわかった。

Am: TCGACGGCCATCCGAAAAGGACAGGTGCCCTC

Em: TCGACGGCCATGGGAAAAGGAGAGGTCCCCCTC

3-3 p48 の転写活性に与える RBP-J κ の影響

Fig. 3-4A に示したように PTF1 モチーフを 4 つもつレポータープラスミドを用いて実験を行った結果、A ボックスと E ボックスの両方が p48 と E47 による転写活性化に必要であることがわかった。そして、この A ボックスの配列が RBP-J κ の DNA 結合配列とよく似ていることと、p48 が RBP-J κ と結合する因子として取られた経緯から、Fig. 3-4 の実験にさらに RBP-J κ を加えた実験を行うことにした。

Cos7 細胞中で p48、E47、RBP-Jκ を同時に発現させた。少量 (50 ng 以下) の RBP-Jκ は、p48 と E47 による協調的な転写活性化をさらに上昇させた (Fig. 3-5B)。しかし、多量 (250 ng 以上) の RBP-Jκ を加えると、その効果は小さくなった。これらの結果の解釈として、多量の RBP-Jκ を加えることで余分な複合体ができしまい、必要な形の複合体の形成が阻害されているのではないかと考えている。

この実験で PTF1 モチーフに RBP-Jκ が結合している可能性が示唆されたので、RBP-Jκ のどの領域がその結合に使用されているのか調べた。第 1 章で用いた RBP-Jκ の各種変異体を使って上記と同様の実験を行った (Fig. 3-6)。DNA 結合領域の一部が欠失した変異体である KR90SL は (Waltzer *et al.*, 1995)、p48 と E47 による転写活性をさらに上げることはなかった。しかし、別の DNA 結合領域の一部が欠失した変異体である RL218GS は (Waltzer *et al.*, 1995)、p48 と E47 による転写活性を約 1.5 倍上昇させた。よって、RBP-Jκ の PTF1 モチーフへの結合には、RBP-Jκ の DNA 結合領域の一部が使用されている可能性がある。また、RBP-Jκ の転写抑制活性をなくす変異体である EEF259AAA は (Hsieh *et al.*, 1999)、野生型の RBP-Jκ と同様に p48 と E47 による転写活性をさらに上昇させた。これは、RBP-Jκ のアミノ酸 259 から 261 番目の領域が PTF1 モチーフへの結合には必要ないことを示している。

3-4 考察

p48 は、E ボックスを含むプロモーターを使用した時の E47 による転写活性を抑制したが (Fig. 3-1)、その後の実験で p48/E47 複合体による転写の活性化には A ボックスと E ボックスの両方を含んだ PTF1 モチーフをもつプロモーターが必要であることがわかった (Fig. 3-4A)。一般的な bHLH 型因子は、ホモダイマーかヘテロダイマーを形成して E ボックスをもつプロモーターで転写を活性化する。よって、p48 は一般的な bHLH 型因子とは異なる新しいタイプの bHLH 型因子であるといえる。

少量の RBP-Jκ を加えた時、p48/E47 による転写活性化をさらに 2 倍に上昇させたが、多量の RBP-Jκ を加えた時はその効果が低下した (Fig. 3-5B)。これは、多量の RBP-Jκ を加えることによって不必要な複合体が多く形成されてしまうために生じる現象ではないかと考えている。また、PTF1 モチーフへの RBP-Jκ の結合には、RBP-Jκ の DNA 結合領域の一部が使用されている可能性がある。

第4章 p48 のレチノイン酸反応性

4-1 レチノイン酸による p48 の誘導

第2章の結果から、p48 がレチノイン酸を用いて誘導をかけた細胞の神経分化過程で持続的に発現することが示されたことと、レチノイン酸が神経管後部の形成に必要であることが既に知られていることから、神経管後部で発現している p48 が実際に生体内でもレチノイン酸の影響を受けている可能性が考えられた。

そこで我々は、p48 のプロモーター領域にレチノイン酸反応部位が存在するかどうかをルシフェラーゼアッセイで調べることにした。まず最初に、完全な p48 を含む長さ約 3 Kbp のゲノムフラグメントを分離した。Fig. 4-1 に示すように、p48 は1つのイントロンをはさんで2つのエクソンからなっている。p48 のプロモーター領域の配列は、既に報告されているラット p48 のプロモーター領域と高い相同性を示した (Knofler *et al.*, 1996)。

p48 のプロモーター領域で転写開始部位を含む Sali/XhoI 間の約 2.3 Kbp の断片を、pGVB のルシフェラーゼ遺伝子の前にサブクローニングした。このレポータープラスミドを 24 穴の組織培養皿で培養した P19 細胞に形質転換した。レチノイン酸処理は、各濃度のレチノイン酸を入れた新しい培地を加えることで行った。このように培養した P19 細胞の細胞抽出液をルシフェラーゼアッセイに用いた。ルシフェラーゼ活性値は3回の実験結果の平均値を用い、レチノイン酸を加えずに培養した細胞の細胞抽出液のルシフェラーゼ活性値を1として、それぞれの値を補正した。

その結果、ルシフェラーゼ活性はレチノイン酸濃度を 0 から 10 μ M まであげるに従って 240 倍まで増加した (Fig. 4-2)。よって、この 2.3 Kbp のプロモーター領域に p48 のレチノイン酸反応領域が含まれていることがわかった。

また、NIH3T3、Cos7、CV1 細胞などの他の細胞株を用いた時には、p48 のプロモーター領域はレチノイン酸に反応しなかった (図省略)。この領域がレチノイン酸に反応するというのは P19 細胞に特異的であることもわかった。このことから、p48 の発現には神経分化の過程が必要であることがわかった。

4-2 p48 プロモーター中のレチノイン酸反応領域の同定

p48 の 2.3 Kbp のプロモーター領域中にレチノイン酸反応領域が含まれていることがわかったので、さらにその領域を狭めることにした。いくつかの制限酵素

で切断した p48 のゲノム断片を作成し、それらのレチノイン酸反応性を調べることによって、レチノイン酸による p48 の誘導に必要な領域を同定した (Fig. 4-3)。

pGVB のルシフェラーゼ遺伝子上流に、それぞれのゲノム断片を挿入したレポータープラスミドを P19 細胞に導入し、レチノイン酸存在下で 48 時間培養した。培養後の細胞抽出液を用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、ゲノム中の -969 bp から -875 bp 間の 94 bp の領域を含むクローンにレチノイン酸反応性が見られた (Fig. 4-3)。よって、我々は p48 のレチノイン酸反応領域をこの 94 bp に位置づけた。同定した 94 bp の配列を Fig. 4-4 に示した。

プログラム MOTIF (京都大学科学研究所、Genome Net Web サイト) を用いて、この領域に既知のモチーフがあるかどうか調べた。その結果、この領域にはいくつかの転写因子結合配列が含まれていることがわかったが、確実なレチノイン酸反応エレメント (Knöfler *et al.*, 1996) は存在せず、その半分の配列 (AGGTCA) しか存在しなかった (Giguere *et al.*, 1994)。しかし、Nkx-2.5 や CdxA のようなホメオドメインタンパク質の結合に必要な 3 つの AT リッチな配列に近い配列は存在した。

このようなモチーフ解析の結果と、Fig. 2-5 で示したように p48 のレチノイン酸反応開始時間が少し遅いことから、レチノイン酸による p48 の活性化は間接的ではないかと考えている。

4-3 考察

p48 の発現は、P19 細胞をレチノイン酸処理することで誘導される (Fig. 4-2)。しかし、同様にレチノイン酸を添加した他の細胞種や 2 章で示したように DMSO で筋肉細胞に分化誘導した P19 細胞では p48 の発現が見られなかったことから、p48 の発現には、単にレチノイン酸だけではなく、それに伴う神経分化過程が必要であると考えられる。p48 が発現する神経管の形成にレチノイン酸が重要な働きをしていることが知られており、その機構の中に p48 が存在するものと思われる。そこで、p48 の位置関係を探るために p48 のプロモーターを解析し、94 bp のレチノイン酸反応領域を明らかにした (Fig. 4-3)。この領域は、既に知られているレチノイン酸反応エレメントの一部しか含んでおらず (Knöfler *et al.*, 1996)、必要とされる繰返し構造ははっきりしなかった (Fig. 4-4)。しかし、この領域が A-T リッチであることから、ここにホメオドメインをもつタンパク質が結合する可能性が考えられる。つまり、p48 が受けるレチノイン酸の影響は、別の因子が

仲介する間接的なものである可能性がある。このように考えられるもう1つの理由は、レチノイン酸を添加してから p48 が発現するまでに時間がかかっていることである (Fig. 2-5)。レチノイン酸がレチノイン酸レセプターに結合してターゲット遺伝子の転写を活性化する応答機構は、2段階からなると言われている。その1次応答は少数の特定遺伝子の転写を直接引き起こすもので、30分以内に起こるとされている。P19細胞をレチノイン酸処理した時の、p48発現のピークが培養後2日目であることから、p48は2次応答に属していると考えられる。このような知見から、p48に与えるレチノイン酸の影響は間接的であると考えられた。

ところで、これまで p48 が間接的にしろレチノイン酸の影響を受けていると考える結果を示してきたが、*in vivo* で機能的なレチノイン酸レセプターは神経管の腹側に発現し、その効果は腹側に限局しているという報告がある (Maden *et al.*, 1989)。p48 が神経管の全長にわたって背側に限局して発現している結果から考えると、*in vivo* で p48 はレチノイン酸の影響を受けていないことが懸念された。この矛盾については、神経管の背腹軸形成では p48 はレチノイン酸の影響を受けておらず、前後軸形成時に影響を受けているのではないかと考えている。

近年、体軸形成においてレチノイン酸が Hox 遺伝子の発現を調節していることが報告されているので、p48 も神経管の前後軸形成において、Hox 遺伝子を挟んで間接的にレチノイン酸のシグナルを伝えている可能性がある。今後、レチノイン酸のノックアウトマウスを解析することでさらに研究をすすめたい。

第5章 p48 の機能解析

5-1 p48 ノックアウトマウスの解析

p48 の機能を調べるために、Krapp らのグループが p48 ノックアウトマウスを作成して解析したところ、ホモのマウスは生後1日以内に死亡し、その腭臓は完全に欠失していた (Krapp *et al.*, 1998)。このことは、p48 が腭臓の発生過程で大きな役割を担っていることを示している。

我々は p48 が神経管で発現している結果を得ていたので、そのノックアウトマウスを供与してもらい、神経系に異常がないかどうか調べた。生後1日目の p48 ノックアウトマウスの脊髄を切片にして、ヘマトキシリン-エオシン染色を行った (Fig. 5-1)。ヘマトキシリン-エオシン染色は一般的な組織染色法で、核や髄鞘を青紫色に染めることができる。また、同様の切片を髄鞘染色にも供じた。いずれの場合も、ホモと野生型マウスの間で顕著な違いは認められなかった (Fig. 5-2)。

5-2 考察

腭臓形成に必須だとされる PDX1 のノックアウトマウスも腭臓が完全に欠失し、生後1週間程度生存した後、脱水症状を起こして死亡する。この報告は、p48 ノックアウトマウスが脱水症状を起こす間もなく生後1日で死亡する原因が、腭臓以外にもあるのではないかと考えさせる。また、Fig. 3-2 で示したように、E ボックスをもつプロモーターを使った proneural gene の Mash1 と E47 との協調的な転写活性を p48 が阻害した結果から、p48 が神経発生を抑制的に制御している可能性がある。

我々の実験結果では、p48 ノックアウトマウスの神経系に形態的な異常は見られなかったが、今回の実験は形態的な差異を見たにすぎないので、今後、さらに詳細に調べる必要がある。p48 の発現する神経管の背側領域から発生する介在神経に本当に異常がないかどうか、p48 ノックアウトマウスで介在神経マーカーの発現状況を調べる予定である。

総括

3章に示したように、p48は消化酵素遺伝子のプロモーター中に共通して存在するPTF1モチーフを認識して結合し、転写を活性化する。PTF1モチーフは、EボックスとAボックスと呼ばれる配列からなる。一般的なbHLH型因子はホモダイマーかヘテロダイマーを形成してEボックスに結合することが知られているので、p48がEボックスとAボックスの両方の配列を必要とすることは、p48はこれまでにはない新しいタイプのbHLH型因子であるといえる。Krappらは、ラットにおいてp48とALF1とE12の3者がPTF1モチーフを認識して消化酵素遺伝子の転写を活性化することを報告している。我々の転写活性の実験では、マウスにおいてp48とE47とRBP-J κ の3者がPTF1モチーフを認識することが示された。Aボックスは、RBP-J κ のDNA認識配列と非常によく似た配列をしている。我々はp48をマウスE9.5胎児のライブラリーから単離し、その時期の胎児の神経管にp48の発現が認められることから、臍臓ではp48/ALF1/E12の3者で消化酵素遺伝子中のPTF1モチーフを認識するが、神経系ではp48/E47/RBP-J κ の3者で何らかの遺伝子のプロモーターに存在するPTF1モチーフを認識しているのではないかと考えている。その時、おそらくbHLH型因子のp48とE47がEボックスに結合し、RBP-J κ がAボックスに結合しているものと思われる。神経系でのp48のターゲット遺伝子はわかっていないが、神経系ではp48は相手をALF1からRBP-J κ に変えてNotchシグナル伝達系の中で機能している可能性がある。今後、神経管での発現時期及び領域がp48と似た因子の中からp48のターゲット遺伝子の候補となるものをしばって解析をすすめたい。神経管で発現する因子をScheme 4にまとめた。図の中にはないが、RBP-J κ もNotchも神経管全体に発現している。

p48は神経管後部の背側領域に局限して発現しており、転写活性の実験からレチノイン酸の影響を受けていると考えられる結果をえている。しかし、レチノイン酸は体軸形成において重要な働きを担っているものの、神経管では腹側にのみ影響を及ぼし、p48が発現している背側には作用していないといわれている(Maden *et al.*, 1989)。このことから、レチノイン酸は神経管背側でのp48の発現には関係していないのかもしれないが、体軸に沿った神経管の形成過程でp48の発現を調節していることが考えられる。そして、p48のプロモーター解析の結果、p48プロモーター領域にはレチノイン酸レセプターの正確な結合配列は存在しなかった。さらに、第4章でも述べたようにp48がレチノイン酸に反応するまでに時間がかかることから、レチノイン酸のp48制御は間接的であると考

えられる。その場合、レチノイン酸と p48 の間をつなぐ因子の候補としては、ホメオドメインをもつ HOX 遺伝子群が考えられる。なぜなら、近年、肢芽や体軸に沿った領域でも HOX 遺伝子群がレチノイン酸に発現を調節されていることがわかってきたからである。神経管での発現領域と発現時期が p48 と似ているホメオドメインタンパク質としては Pax3 と Pax7 があげられる。候補となりうる因子については、それらの p48 発現に与える影響を転写活性の実験およびノックアウトマウスの解析などにより詳細に調べていきたい。しかし、神経管の背側で発現する因子の報告例が少ないので、既知のものだけから判断するのは難しい。

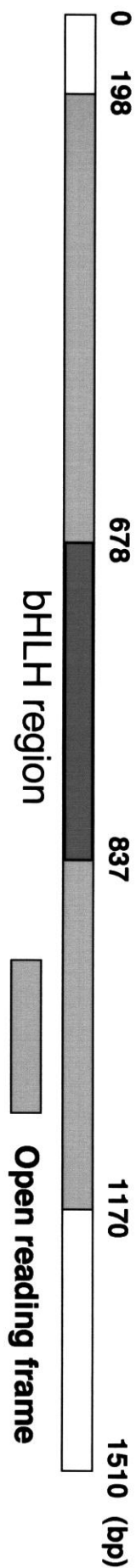
これまでの知見から p48 は、内胚葉由来の膵臓と外胚葉由来の神経系という異なった組織で同様に機能している可能性が示唆された。Table 2 に膵臓と神経系の両方で発現あるいは機能していることがわかっている因子をまとめた。p48 と同じ bHLH 型因子の BETA2/NeuroD は、膵臓の内分泌細胞と腸および発生過程の神経管腹側に発現し、インシュリン遺伝子の転写を活性化すると共に神経細胞を誘導する (Naya *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997)。アフリカツメガエル卵を用いた BETA2/NeuroD の過剰発現の実験では、本来表皮になる細胞が神経細胞に分化することが報告されており、BETA2/NeuroD には細胞運命を神経に決定する機能があると考えられている。ホメオドメインタンパク質では Pax6 と Pax4 が知られている。Pax6 は中枢神経や発生中の目に発現し、神経管での発現は腹側に限局している。そして、膵臓ではグルカゴンを作る α 細胞の正常な分化に必要である (Sosa-Pineda *et al.*, 1997; St-Onge *et al.*, 1997)。Pax6 や BETA2/NeuroD の発現する神経管の腹側は、将来運動神経になる領域である (Lee *et al.*, 1997; Pfaff *et al.*, 1996)。また、膵臓の内分泌細胞の発生が、LIM-ホメオドメインタンパク質である Isl-1 (Ahlgeren *et al.*, 1997) に依存していること

神経管の腹側で発現して腭臓の内分泌細胞でも機能する BETA2/NeuroD が、神経管の背側で発現して腭臓の外分泌細胞で機能する p48 と相対する因子ではないかと考えている。

近年、Delta のマウスホモログ Dll1 や RBP-J κ のノックアウトマウスにおいて、E8.5 から E9 という早い時期に腭臓の内分泌細胞の分化が早まること (Apelqvist *et al.*, 1999) や、脊椎動物で知られる 4 種類の Notch (Notch1, 2, 3, 4) と Notch1 に誘導される HES1 が、それぞれ腭臓の細胞で発現している (Lammert *et al.*, 2000) 報告がなされた。Notch1 が腭臓原基に発現する時期に、Notch2 の発現は腭臓の内分泌細胞と外分泌細胞の源と考えられている embryonic ducts に限られている。さらに HES1 が内分泌細胞のネガティブな制御因子であることや (Jensen *et al.*, 2000)、achaete のマウスホモログ Mash1 が肺の内分泌細胞形成に必要であること (Borges *et al.*, 1997) が報告されている。これらの報告は、Notch シグナル伝達系が腭臓でも機能していることを示唆するものである。RBP-J κ と結合する p48 が、神経管で感覚介在神経の生じる背側で発現し、腭臓では外分泌細胞の発生を制御している背景には、神経管においては背側の感覚介在神経と腹側の運動神経を選択するために、そして、腭臓においては外分泌細胞と内分泌細胞を選択するために、Notch シグナル伝達系の細胞運命決定機構が使われているものと考えられる。Math1 が neurogenic gene の Hes1 と拮抗的に働いて細胞運命の制御をしている可能性も示されている (Akazawa *et al.*, 1995)。これらのことは、腭臓の細胞運命決定時にも、神経系の発生過程と同様に Notch シグナル伝達系が働き、その側方抑制システムを用いていることを強く示唆するものである。そして、本研究結果からは、p48 が Notch シグナル系とレチノイン酸シグナル系の間で橋渡しの役割を担っている可能性も考えられる (Scheme 6)。

本研究で p48 ノックアウトマウスを調べた結果、形態的な異常は見られなかった。しかし最近、当研究室においてアフリカツメガエルの受精卵を用いた p48 の過剰発現の実験を行ったところ、将来介在神経になる領域の神経細胞が欠失したという結果をえている。この結果は、p48 が Notch シグナル系で働く Hes1 と同様に神経抑制因子として機能している可能性を示唆するものである。

p48遺伝子構造



p48 アミノ酸配列

```

1      10      20      30      40      50      60
MDAVLLEHFPGLDTPSPYFDEEDFTDQSSRDPLEDDELLGDEQAEEFTLSQLHEYC
61      70      80      90     100     110     120
YRDGACLLLPAPSAAPALALAPPPLGDPEPEDNVSYCCDAGAPLAAFPYSPGSPSCL
121     130     140     150     160     170     180
AYPCA AVLSPGARGLNGAAAAAARRRRVRVSEAEIQQLROAAVRRRRRMOSTINDAF
181     190     200     210     220     230     240
EGLRSHIPLPPEYKRLSKVDLRLAIGYINFTSELVQADLPLHGSGAGCGGPGGSRHLG
241     250     260     270     280     290     300
EDSPGNQAQKVIIICHRGTRSPSPSPDPDYGLPPLAGHSLSWTDEKQKEQNIIRTAKWTP
301     310     320
EDPRKLNSKSFNDNIENEPPFEFVS

```

Fig. 1-1. p48の遺伝子構造とアミノ酸配列

p48は、1510bpの長さを持ち、323残基のアミノ酸からなることが分かった。その配列を示した。また、モチーフ検索の結果、アミノ酸161番目から213番目までにヘリックス・ループ・ヘリックスモチーフをもつことが分かった。その領域を囲った。(モチーフ解析は、京大ゲノムネットサーバーのMOTIFプログラムを使って、データベースPfamに対して行った。)

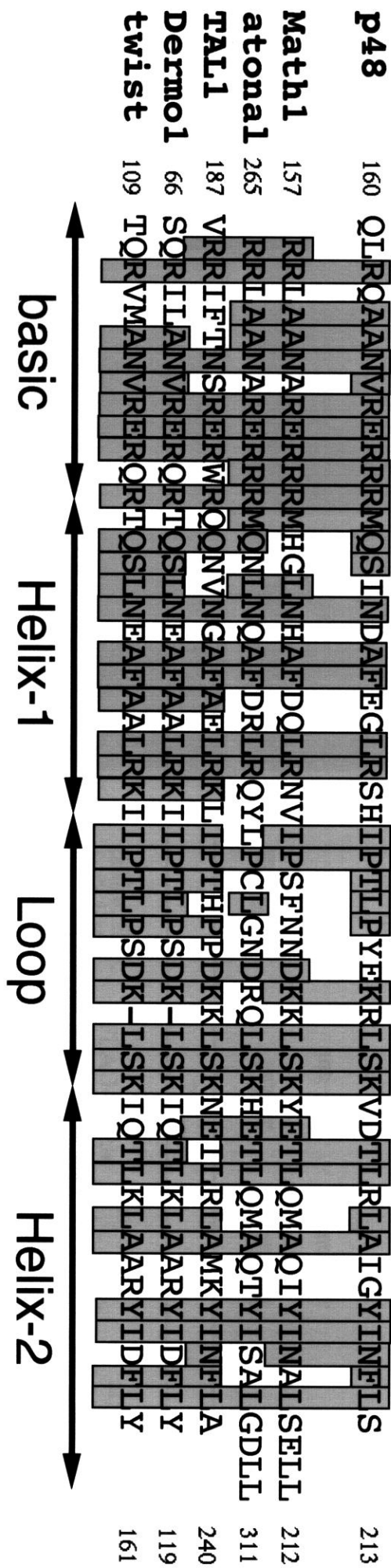


Fig. 1-2. p48と他の bHLH 型因子の比較

p48と他のbHLH型因子間で、bHLH領域のアミノ酸配列比較を行った。6タンパク質中3つ以上に共通しているアミノ酸を囲んだ。各タンパク質のアミノ酸番号を配列の前後に示した。p48と最も似ていたMath1でも約50%の相同性であった。Math1は、ショウジョウバエatonalのラウスホモログである。ここに示した因子は、atonal以外は全てラウス由来である。

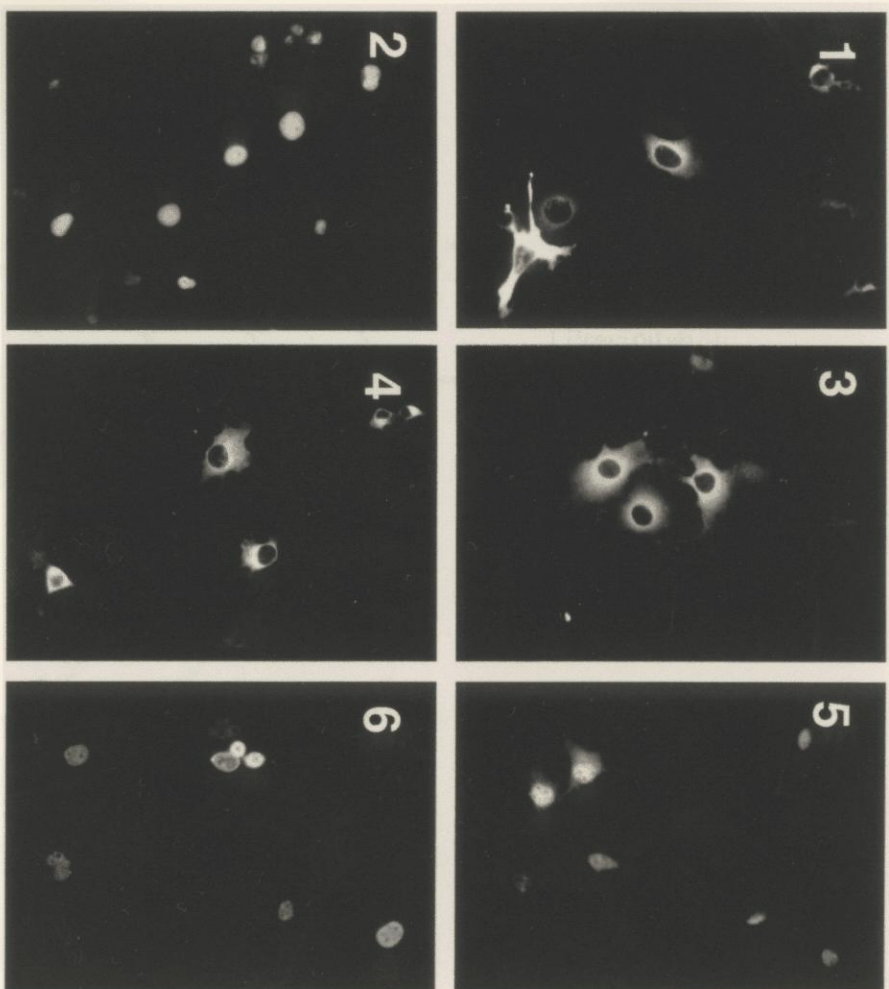


Fig. 1-3. RBP-Jk と p48 の Cos 細胞内局在

発現ベクターに挿入した p48、RBP-Jk および E47 を Cos 細胞に導入し、免疫染色法により細胞内局在を調べた。左の図の 1 は、細胞に myc タグをつけた p48 を導入し、anti-myc 抗体を使って検出した。2 は FLAG タグをつけた RBP-Jk を細胞に導入し、anti-FLAG 抗体で検出した。同様に、3 以下は右の表に記した通りである。

	1	3	5
細胞に導入したもの	myc-p48	myc-p48 FLAG-RBPJk	E47 myc-p48
検出	anti-myc	anti-myc	anti-myc
局在場所	細胞質	細胞質	核

	2	4	6
細胞に導入したもの	FLAG-RBPJk	myc-p48 FLAG-RBPJk	E47 myc-p48 FLAG-RBPJk
検出	anti-FLAG	anti-FLAG	anti-FLAG
局在場所	核	細胞質	核

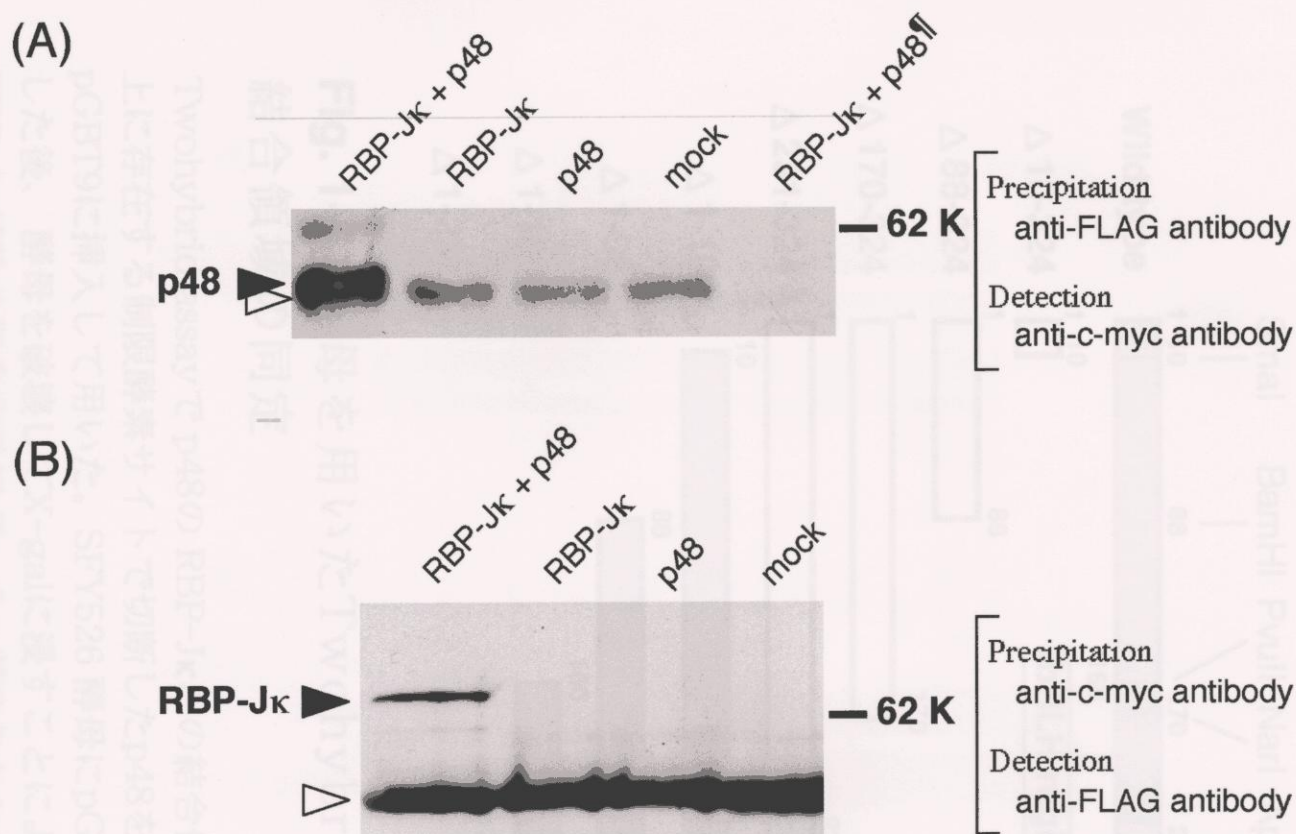


Fig. 1-4. 免疫沈降を用いたRBP-J κ /p48複合体の検出

RBP-J κ にはN末端にFLAGタグをつけた。p48にはC末端にmycタグをつけた。(A)anti-FLAG抗体でタンパク質を沈降させ、anti-c-myc抗体で検出した。(B)anti-c-myc抗体でタンパク質を沈降させ、anti-FLAG抗体で検出した。抽出液は、RBP-J κ とp48を両方入れたもの(lane "RBP-J κ + p48")、RBP-J κ だけ入れたもの(lane "RBP-J κ ")、p48だけ入れたもの(lane "p48")、RBP-J κ もp48も入れていないもの(lane "mock")から調整した。 Δ は免疫グロブリンの重鎖である。

Deletion forms of p48

β -galactosidase activity

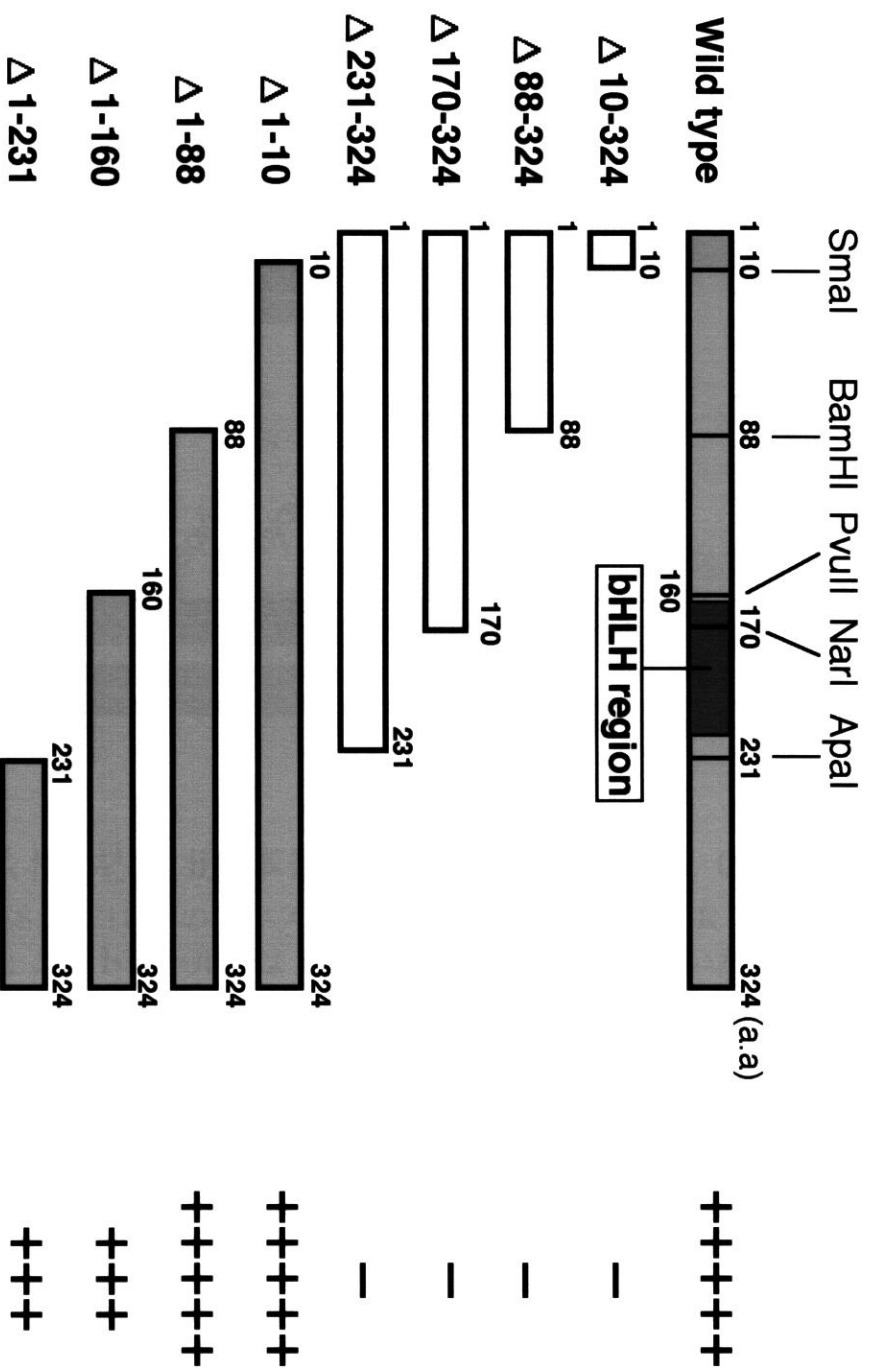


Fig. 1-5. 酵母を用いたTwohybrid assayによるp48のRBP-J κ との結合領域の同定

Twohybrid assayでp48のRBP-J κ との結合領域を調べた。用いたp48欠変異体は、p48上に存在する制限酵素サイトで切断したp48をpGAD424に挿入して作成した。RBP-J κ は、pGBT9に挿入して用いた。SFY526 酵母にpGAD424-p48とpGBT9-RBP-J κ を導入して培養した後、酵母を破壊してX-galに浸すことにより β -ガラクトシダーゼを誘導した。p48とRBP-J κ が強く結合するほど、 β -ガラクトシダーゼ活性が強くあらわれる。

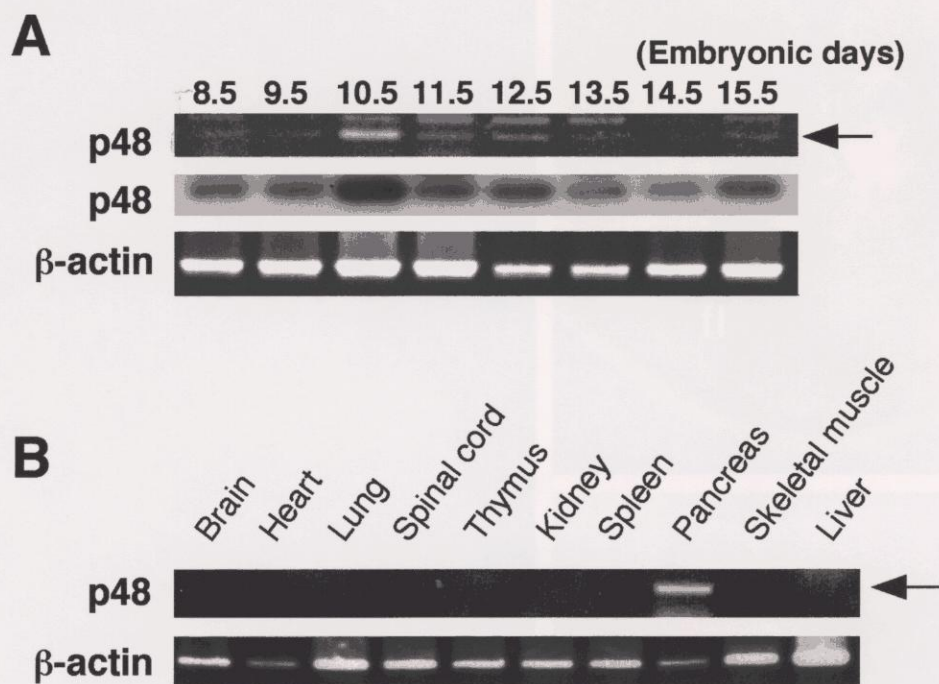


Fig. 2-1. マウス胎児と成体組織におけるp48 の発現

A. 使用したRNAは、E8.5~E15.5 のマウス胎児から調整した。RT-PCR にはp48 のプライマー（1段目）とコントロールには β -actin のプライマーを用いた（3段目）。産物の検出は、電気泳動アガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色した。さらに、産物をアガロースゲルからフィルターに移してサザンハイブリダイゼーションを行った（2段目）。矢印はp48のバンドの位置を示している。

B. 使用したRNAは、マウス成体の様々な臓器から調整した。RT-PCR 産物は、Aと同様の方法で検出した。矢印はp48のバンドの位置を示している。

In situ hybridizationにより、マウスE10.5をp48のプロープを使って染色した。コントロールにはp48のセンスプロープを使用し、シグナルが検出されないことを確認した(data not shown)。

(A)側面から見たものである。シグナルは後脳から脊髄の全長と内臓の一部に検出された。矢印は後脳の辺りを指し、矢頭は内臓の一部（おそらく肺臓の原基）を指す。

(B) 胎児を更に濃く染めて明確にしたp48のシグナルの末端を矢頭で示した。

(C)頭側のp48のシグナルは後脳までである。（矢印）写真は左側が頭である。

ov: otic vesicle, fi: forelimb bud, hi: hindlimb bud.

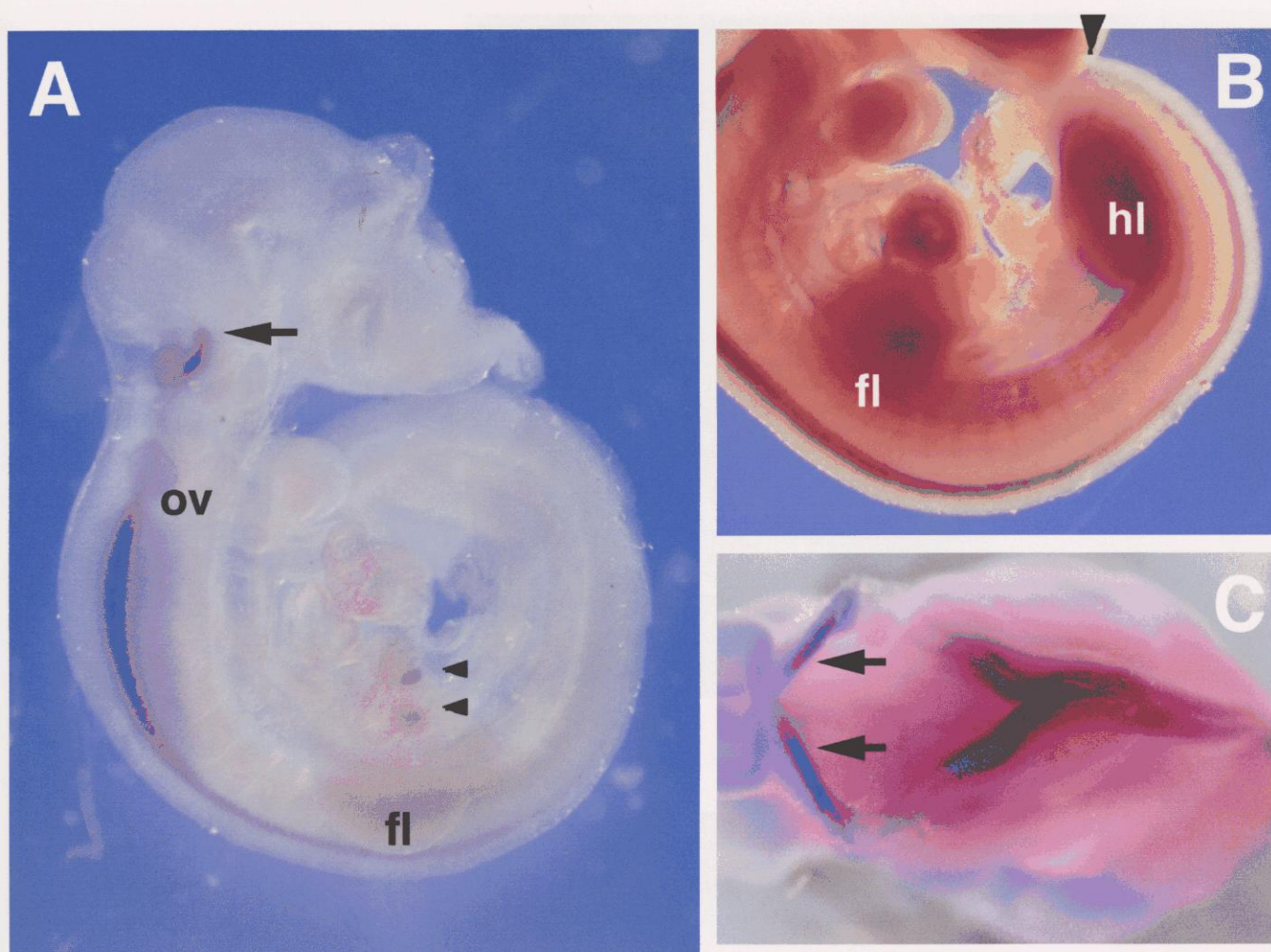


Fig. 2 - 2. マウスE10.5 の*in situ* hybridization

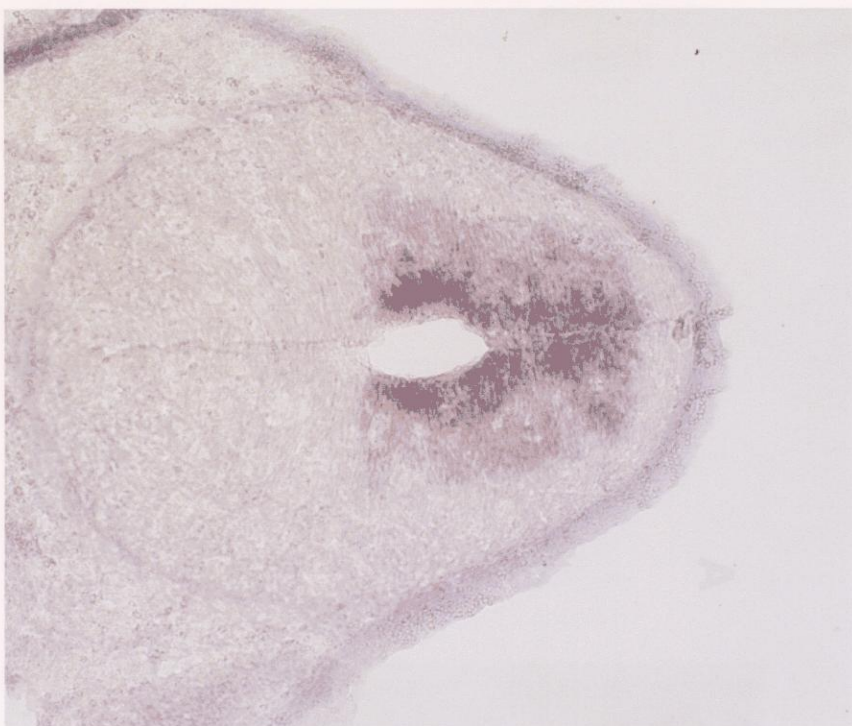
in situ hybridizationにより、マウスE10.5 をp48のプロープを使って染色した。コントロールにはp48のセンスプロープを使用し、シグナルが検出されないことを確認した(data not shown)。

(A)側面から見たものである。シグナルは後脳から脊髄の全長と内臓の一部に検出された。矢印は後脳の辺りを指し、矢頭は内臓の一部（おそらく膀胱の原基）を指す。

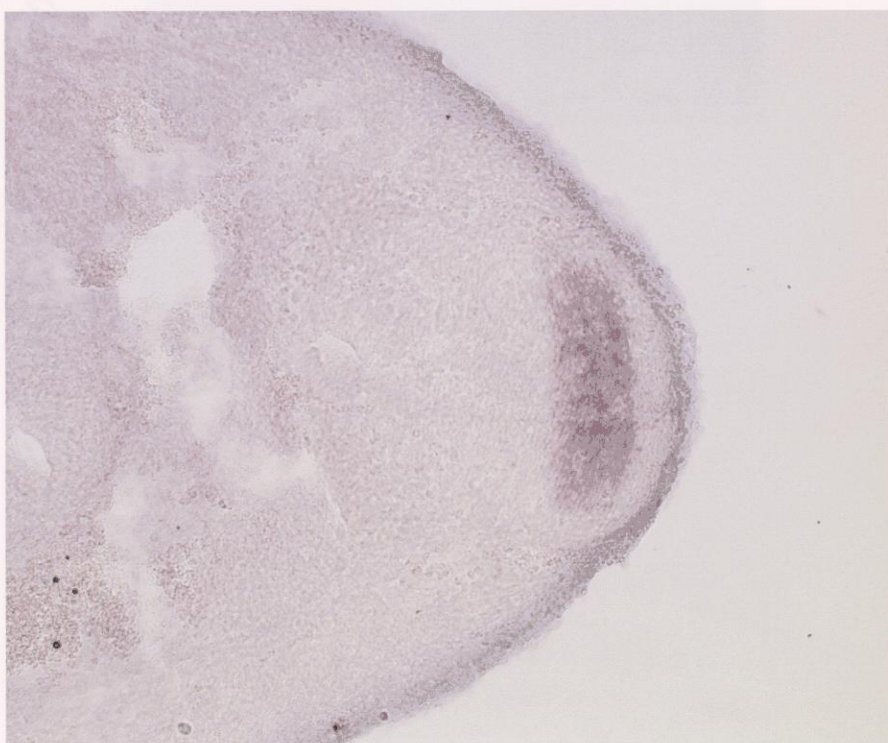
(B) 胎児を更に濃く染めて明確にしたp48のシグナルの末端を矢頭で示した。

(C)頭側の p48のシグナルは後脳までである。（矢印）写真は左側が頭である。

ov: otic vesicle, fl: forelimb bud, hl: hindlimb bud.



頸部の切片



後ろ足付近の切片

Fig. 2-3. 神経管の背側領域におけるp48の特異的な発現

E11マウス胎児をp48のプロームを用いて *in situ* hybridizationにより染色した。p48のシグナルは、神経管の全長にわたって背側領域のみに検出された。



Fig. 2-4 . マウス胎児の *in situ* hybridization

(A) E9.5 マウス胎児の内臓付近での切片である。p48の
シグナルが前腸の側面に 見える。(左印)

(B) E9.5 マウス胎児の小脳付近での切片である。p48の
シグナルが内側領域に見える。写真上が背側である。

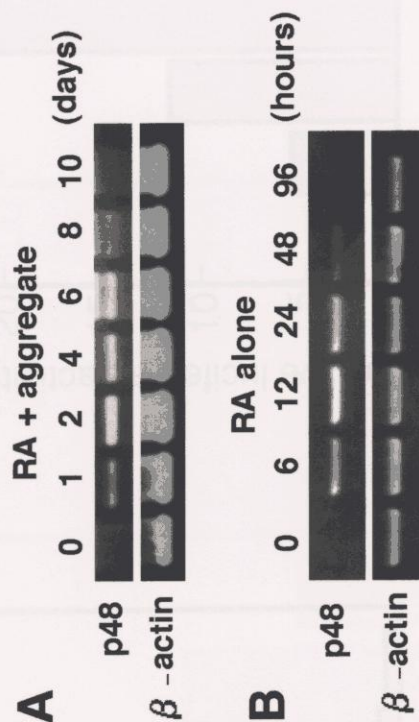


Fig. 2-5. 神経系へ分化誘導させたP19細胞におけるp48の発現

(A) 0.2 μ M のレチノイン酸存在下で凝集化させて培養し、神経細胞へ分化誘導したP19細胞におけるp48の発現をRT-PCRにより調べた。使用したRNAは、レチノイン酸処理後、図に示した時間ごとに回収した細胞から調整した。

(B) P19細胞は、レチノイン酸添加のみの処理では神経細胞へ分化しない。この状態のP19細胞におけるp48の発現をRT-PCRにより調べた。

ポジティブコントロールには、 β -アクトチンを検出した。 RA: レチノイン酸

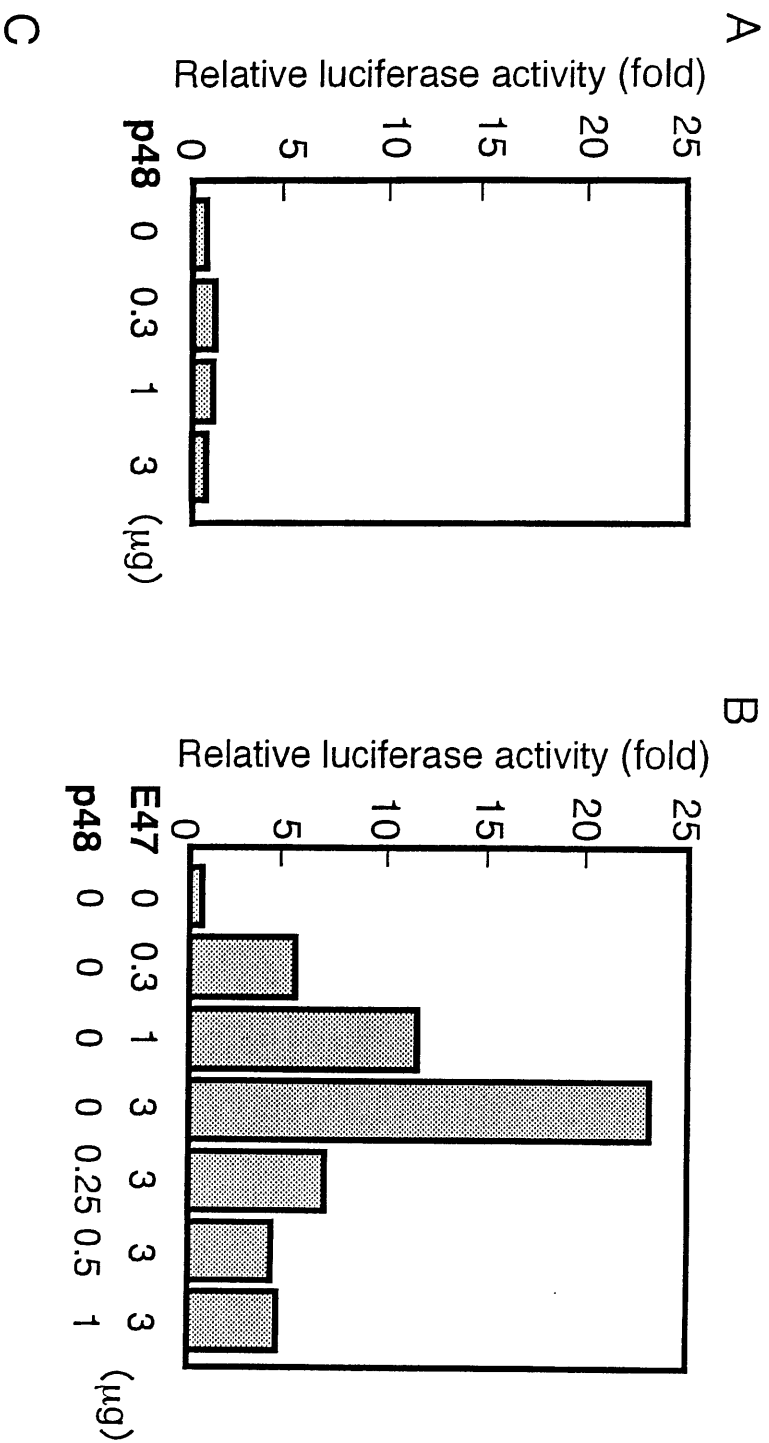


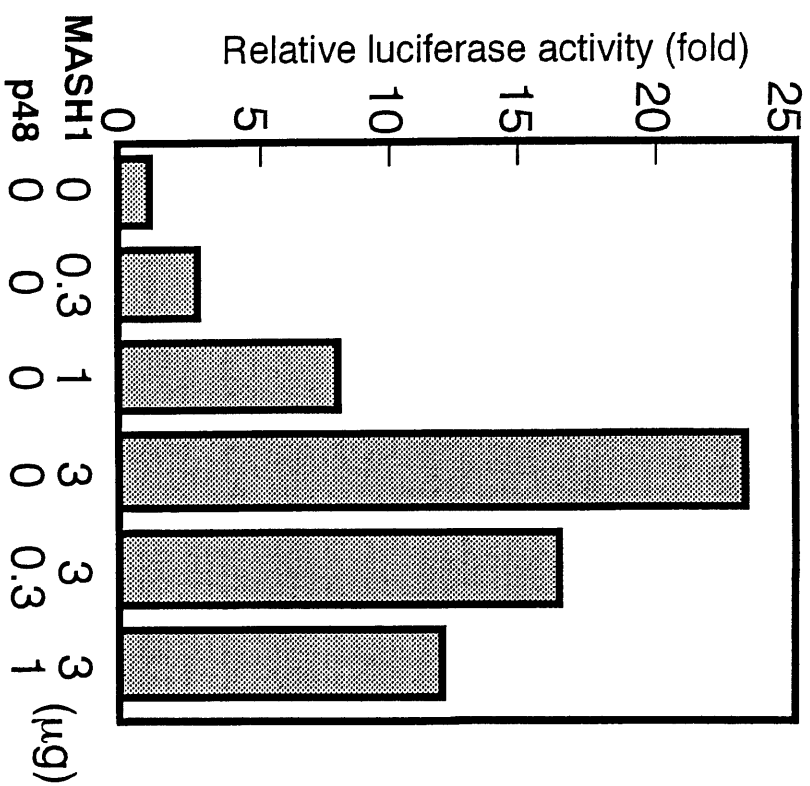
Fig. 3-1. E-box をもつプロモーターを使った p48 と E47 の転写活性

Aは、E-box を使った p48 の転写活性を見たものである。

Bは、E-box を使った E47 の転写活性に与える p48 の影響をみたものである。

これらは、NIH3T3 細胞を 6well プレートで培養し、pKE7-βA-luc レポータープラスミド、各量の pME18S-E47、pME18S-E48 を導入した後、ルシファゼアッセイにより転写活性を測定した。

A



B

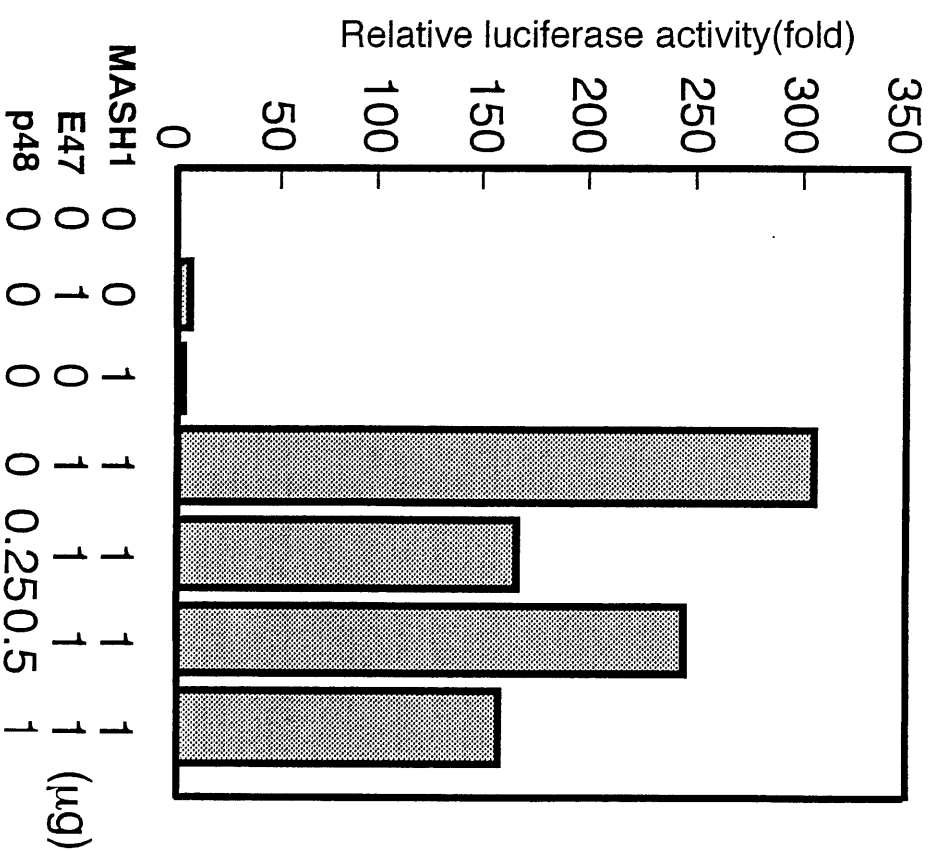


Fig. 3-2. E-boxをもつ promoterを使ったp48, MASH1, E47の転写活性

MASH1はEボックスを使って転写を活性化する。この活性化に与える p48の影響を見た。Aは、MASH1単独の転写活性に与えるp48の影響を示している。Bは、MASH1とE47による協調的な転写活性化に与えるp48の影響を示している。実験は、6well plate中でNIH3T3細胞に各々のプラスミドを取り込ませた後、ルシファゼアッセイにより活性を測定した。用いたプラスミドは、pKE7-β A-luc、pME18S-MASH1、pME18S-E47、pME18S-E48である。

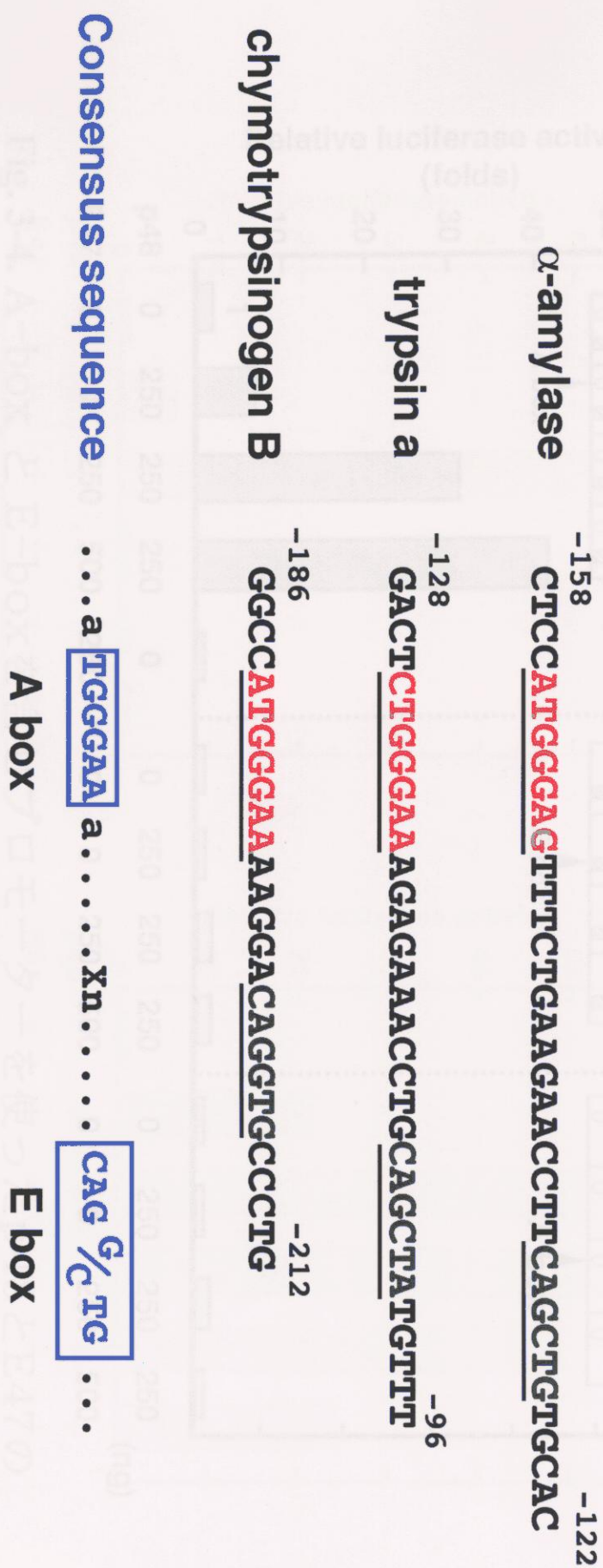


Fig. 3-3. PTF 1 の認識配列

α-アミラーゼ、トリプシン-a、キモトリプシノーゲンBなどの消化酵素遺伝子に共通に存在するPTF-1モチーフには、AボックスとEボックスと呼ばれる配列が含まれる。Aボックスを赤、Eボックスを緑で示した。その下にはAボックス、Eボックスの共通配列を青で示した。

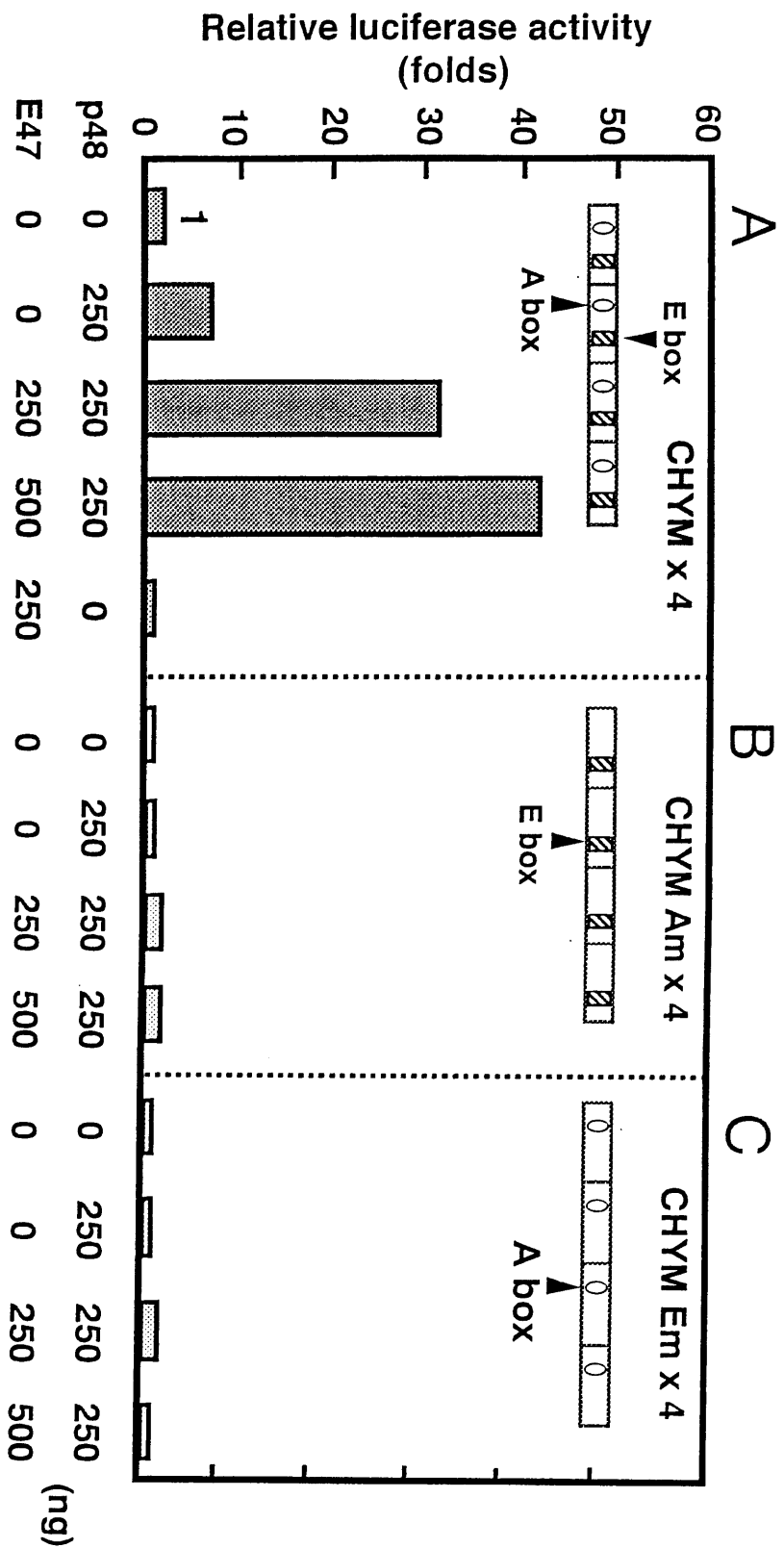
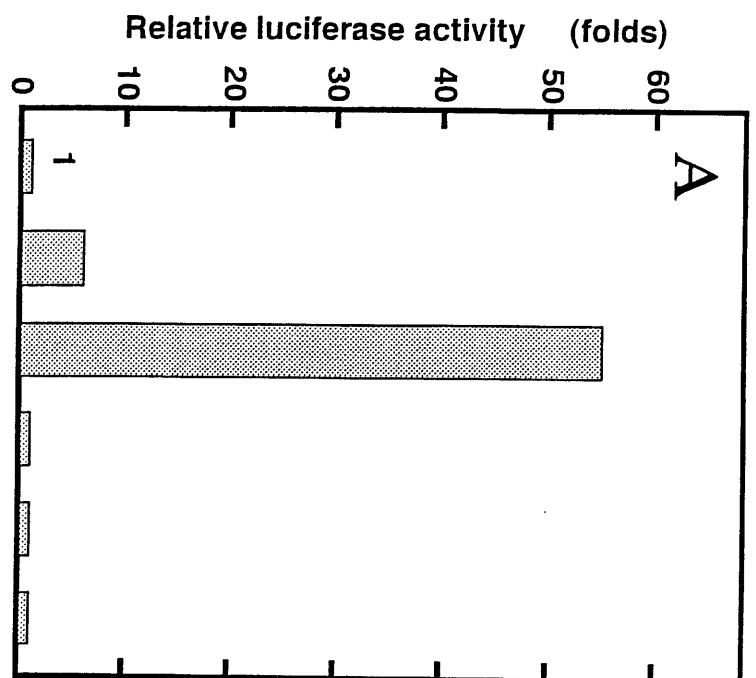
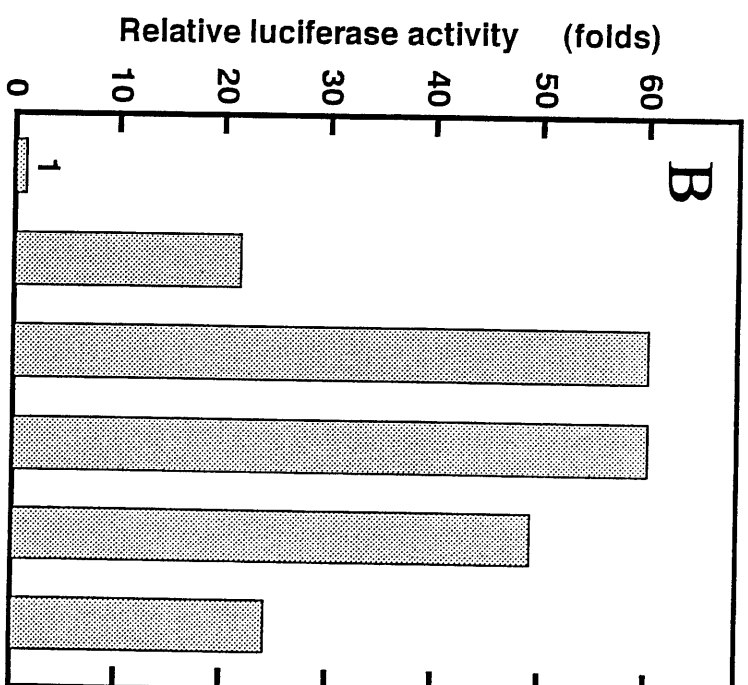


Fig. 3-4. A-box と E-box を含むプロモーターを使ったp48とE47の転写活性

(A) 発現ベクターにp48とE47をそれぞれ挿入し、キモトリプシノーゲンのプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドといっしょに細胞に導入した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。加えたE47の量依存に活性は上昇した。(B) キモトリプシノーゲンのプロモーター中に含まれるAボックスとEボックスのうち、Aボックスだけをつづしたプロモーターを使ってAと同じ実験を行った。この時、活性は検出されなかった。(C) キモトリプシノーゲンのプロモーター中に含まれるAボックスとEボックスのうち、Eボックスだけをつづしたプロモーターを使ってAと同じ実験を行った。この時も活性は検出されなかった。グラフの下の数字は、細胞に導入した各DNAの量を示している。CHYM：キモトリプシノーゲンのプロモーター



p48	-	+	+	-	+	+
E47	-	-	+	+	+	+
Wild-type			Am		Em	



p48	-	+	+	+	+	+
E47	-	+	+	+	+	+
RBP-Jk	-	-	10	50	250	500
(ng DNA)						

Fig. 3-5. PTF1 モチーフをもつプロモーターを使ったp48 とE47 の転写活性

(A) 発現ベクターにp48とE47をそれぞれ挿入し、キモトリジンローゼンのプロモーターの下流にルシファゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドといっしょに細胞に導入した後、ルシファゼ活性を測定した。AmとEmは、プロモーター中のAボックスとEボックスのうち、AボックスあるいはEボックスをつぶしたプロモーターを使用した時の値である。使用したCos細胞は24well platesで培養し、125 ng DNA/well になるようにpME18S-p48およびpME18S-E47を導入した。(B) Aの実験にさらにRBP-J κ を加えた時の影響を見たものである。

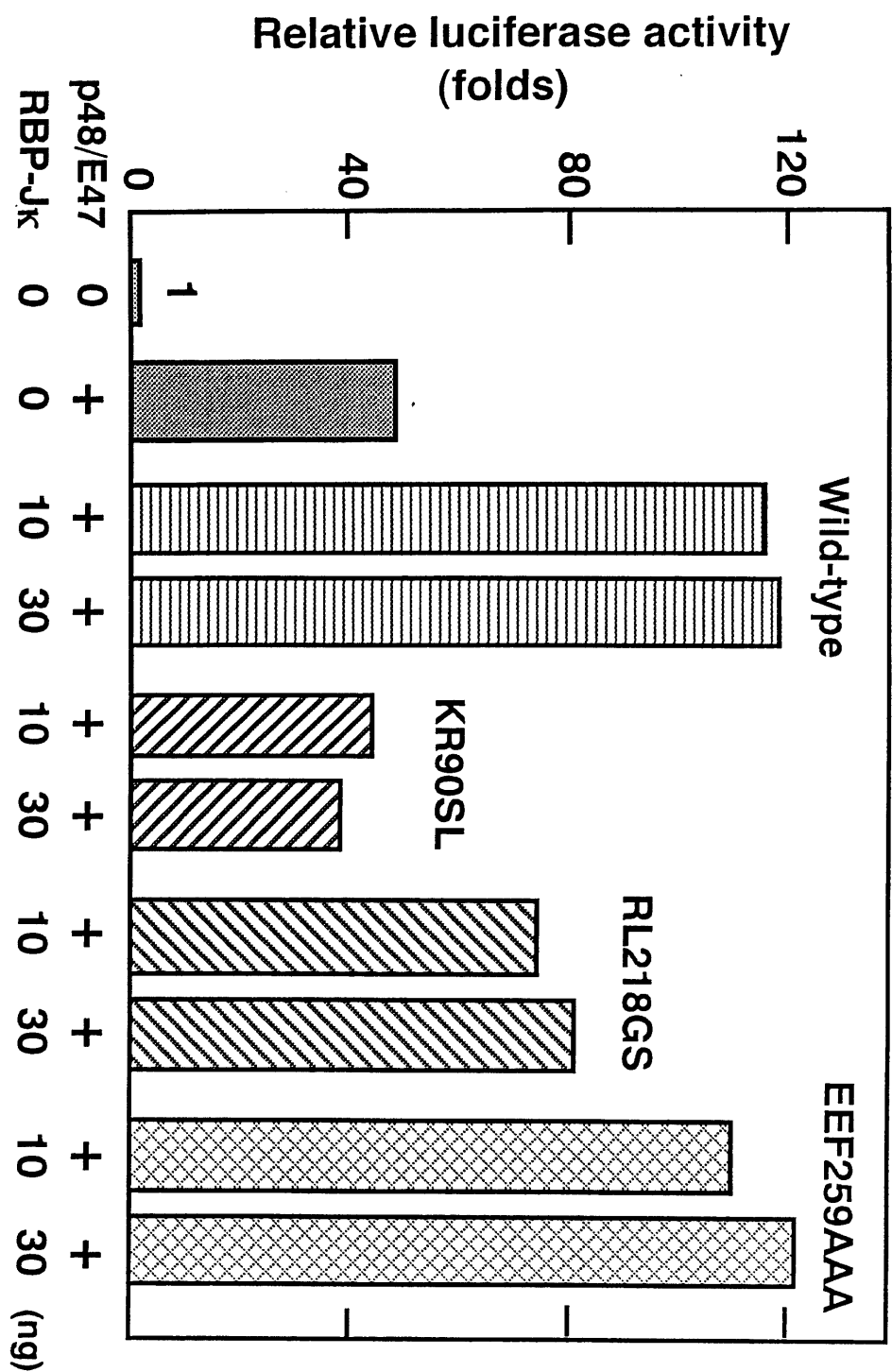


Fig. 3 - 6. PTF1モチーフもつプロモーターを使用したp48 と E47 の転写活性に与えるRBP-Jκの影響

キモトリプシノーゲンのプロモーターを使用した時のp48 と E47の転写活性に与えるRBP-Jκの影響をみた。レポータープラスミドと発現ベクターに挿入した p48 と E47 とRBP-Jκを同時に細胞に導入し、ルシファゼアッセイにより転写活性を測定した。RBP-Jκはwildといくつかの変異体を用いた。

p48遺伝子を含むDNA断片の構造

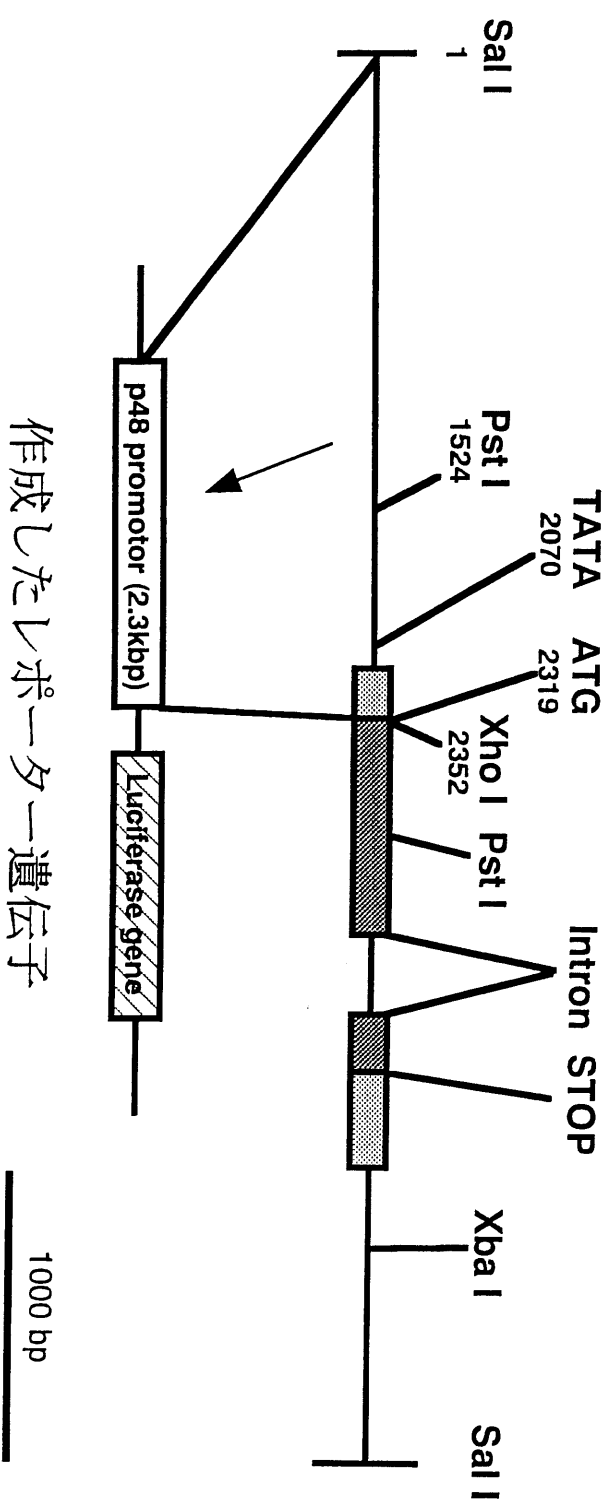


Fig. 4-1. p48の構造と p48 プロモーター (SalI-XhoI fragment) をもつレポータープラスミドの構築

p48の構造を示した。開始コドンや存在する制限酵素の位置を示した。その下には、p48のプロモーター領域 (SalI-XhoI間) の下流にルシファゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを示した。

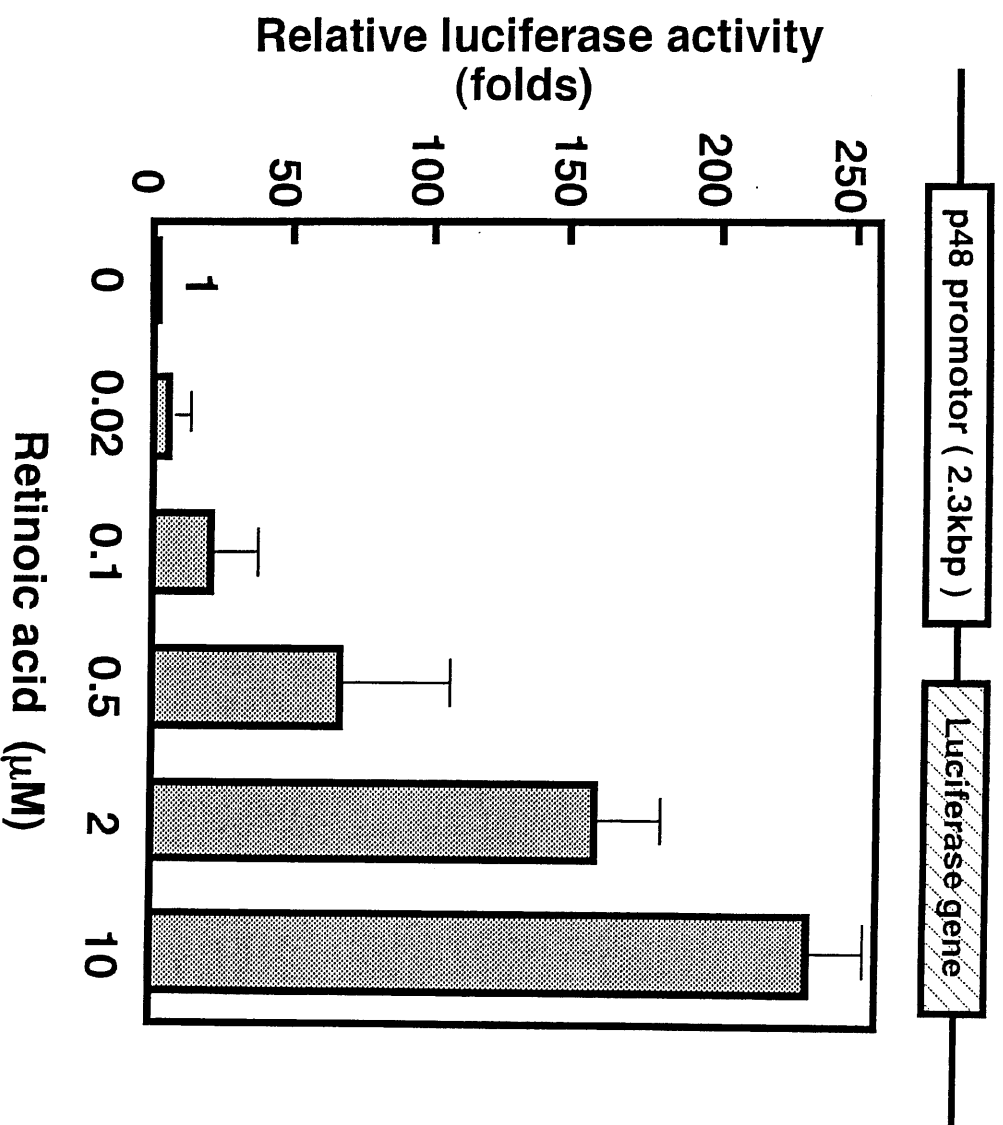


Fig. 4 - 2. P19 細胞中におけるp48 promoterのレチノイン酸応答

P19細胞は24wellの組織培養皿で培養し、リン酸カルシウム共沈殿法により p48プロモーター領域を挿入したpGVBを細胞に導入した。レチノイン酸を含む新しい培地を加えて48時間後、ルシファゼアッセイにより活性を測定した。その結果、レチノイン酸の量に依存して活性は上昇した。値は独立した3回の測定結果の平均値とした。

Deletions of 5' flanking region of p48 gene

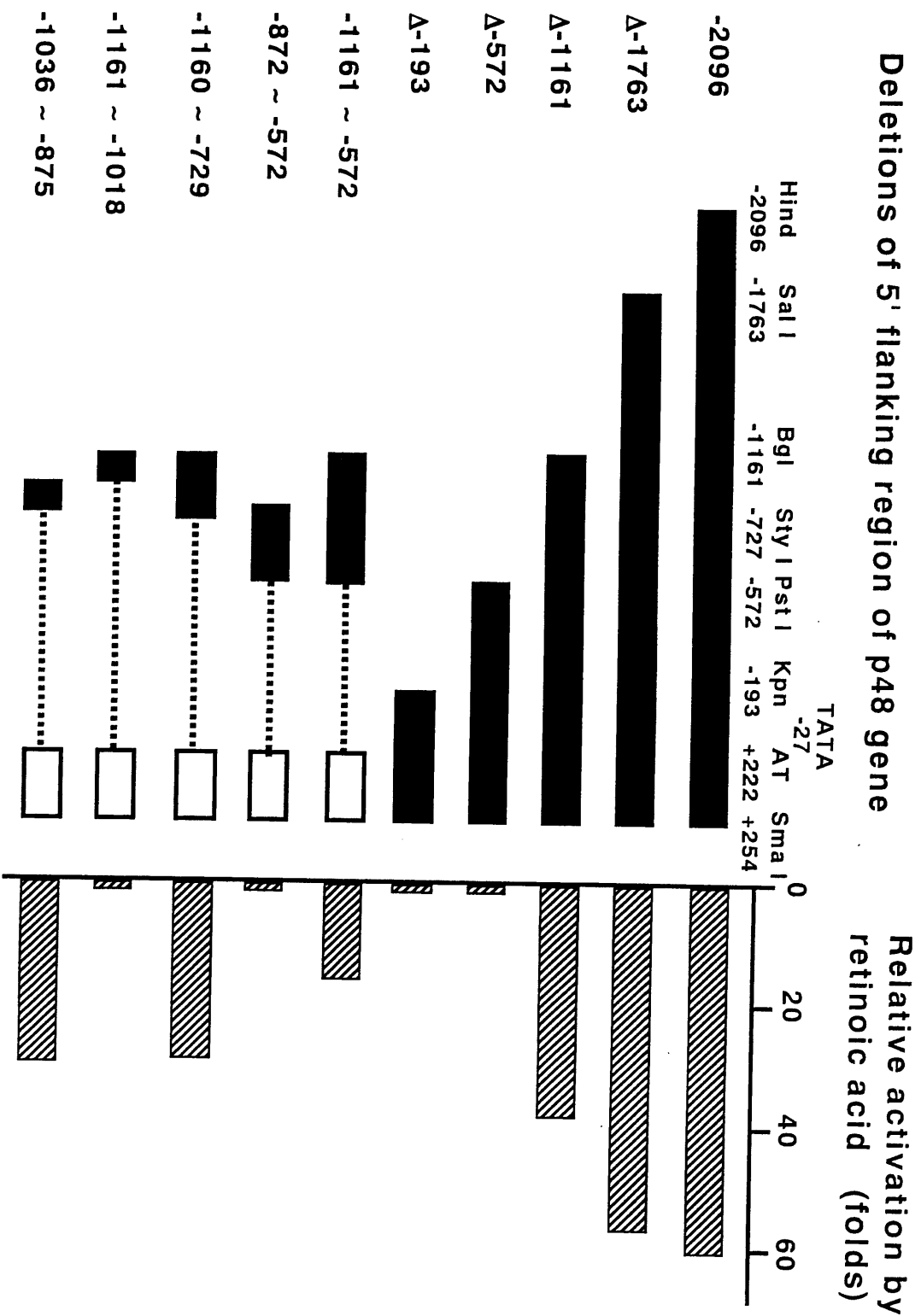
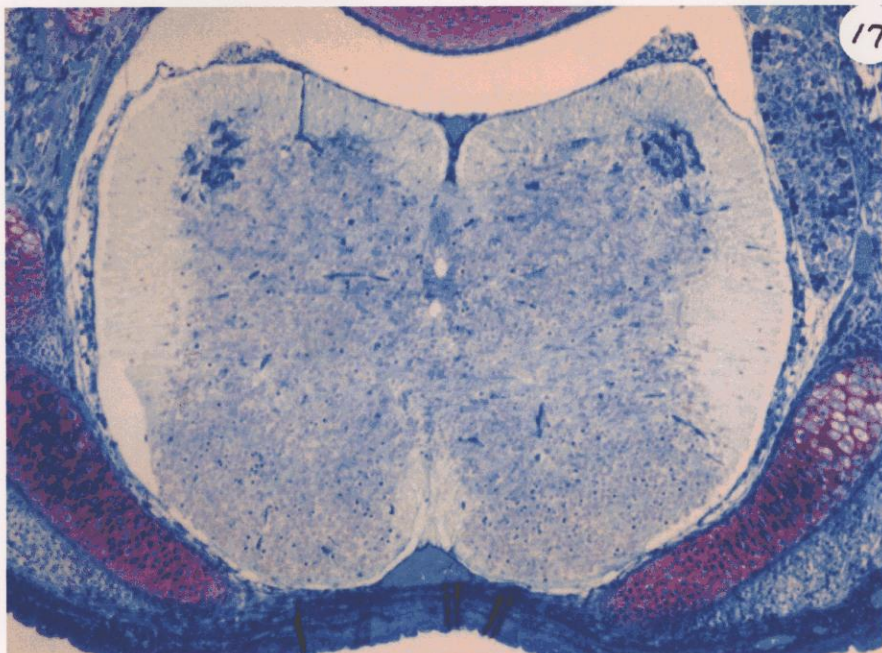


Fig. 4 -3. p48プロモーターのレチノイン酸反応領域

p48の2.3 kbpのプロモーター領域を制限酵素サイトで切断して作成したいくつかのフラグメントをpGVβに挿入した。このコンストラクトをP19細胞に導入し、1 μ Mレチノイン酸存在下で48時間培養後、ルシフェラーゼアッセイにより各フラグメントのレチノイン酸反応性を調べた。ルシフェラーゼ活性値は、レチノイン酸を加えずに培養した細胞の値を1として計算し、3回の独立した実験結果の平均値とした。用いた制限酵素サイトは図の上に示した(転写開始点を+1とした。)

(A)



(B)

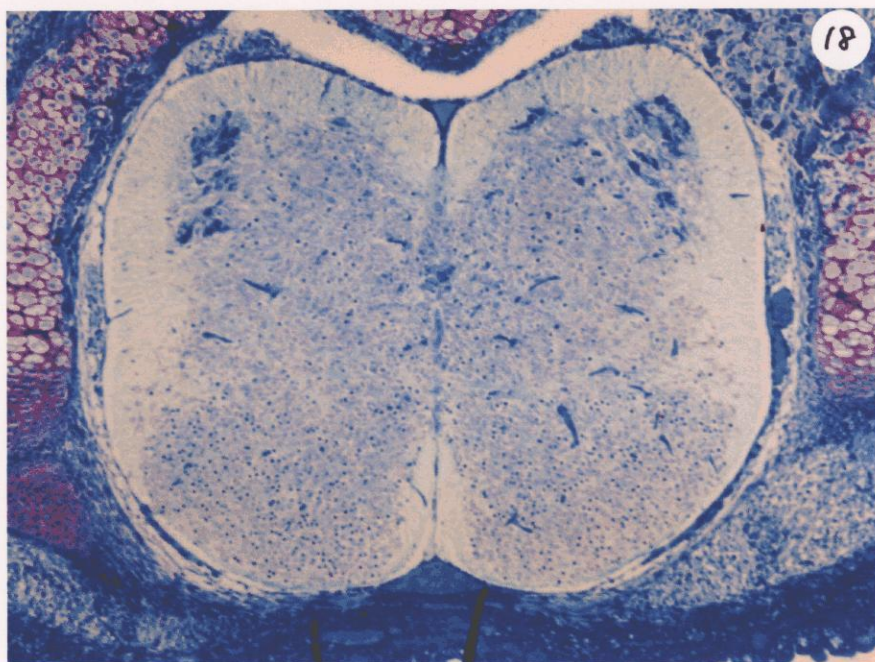
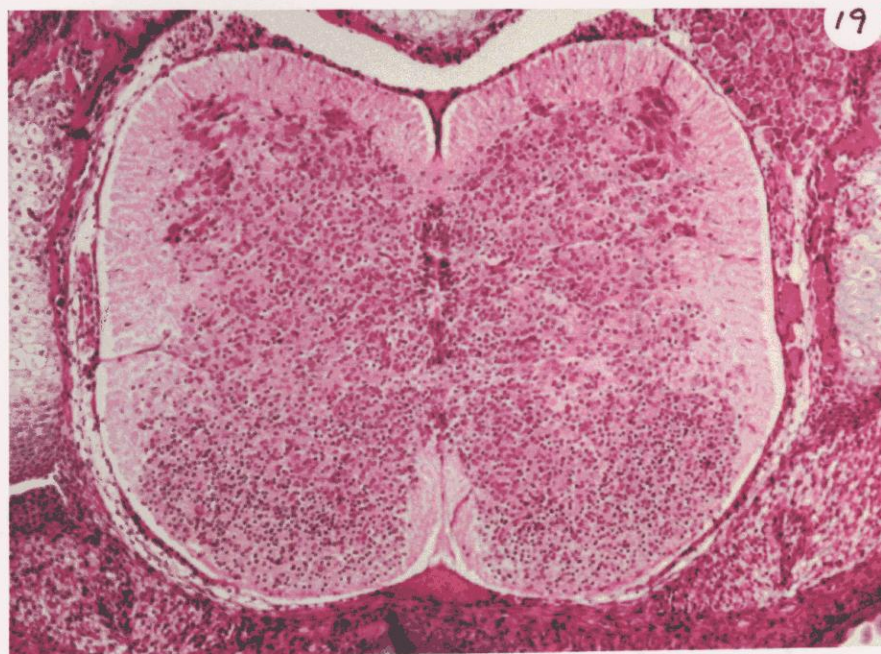


Fig. 5-1. マウス新生児のHematoxylin - Eosin 染色

(A) 野生型マウス (B) p48 ノックアウトマウス

p48 ノックアウトマウスに形態的な異常は見られなかった。

(A)



(B)



Fig. 5-2. マウス新生児の髄しょう染色

(A) 野生型マウス (B) p48 ノックアウトマウス

p48 ノックアウトマウスに形態的な異常は見られなかった。

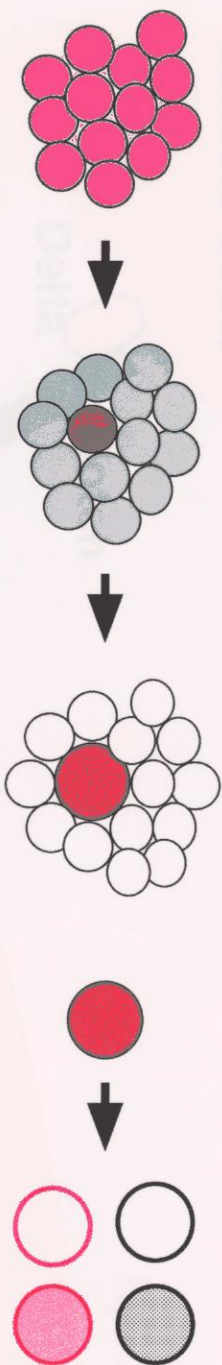
Table 1. RBP-Jkと Notch 1、 p48、 MINTとの結合

Clone	RBP-Jk derivatives			
	Wild type	KR90SL	RL218GS	EEF259AAA TP378AA
	b-galactosidase activity (Miller unit)			
Notch 1	25.4	102.5	50.1	0.33 25.3
p48	116.9	87.1	55.5	80.7 64.4
MINT	28.7	10.7	67.6	5.0 10.7

pGBT9 に全長のRBP-Jkと RBP-Jkの各変異体を挿入したものと、スクリーニングで単離した因子を挿入した pGAD424 をSFY526 酵母に導入し、 β -ガラクトクトシダーゼアッセイにより結合活性を測定した。この結果、p48がNotchより強固にRBP-Jkと結合していることがわかった。

Table 2. 膵臓と神経系に關与する転写因子

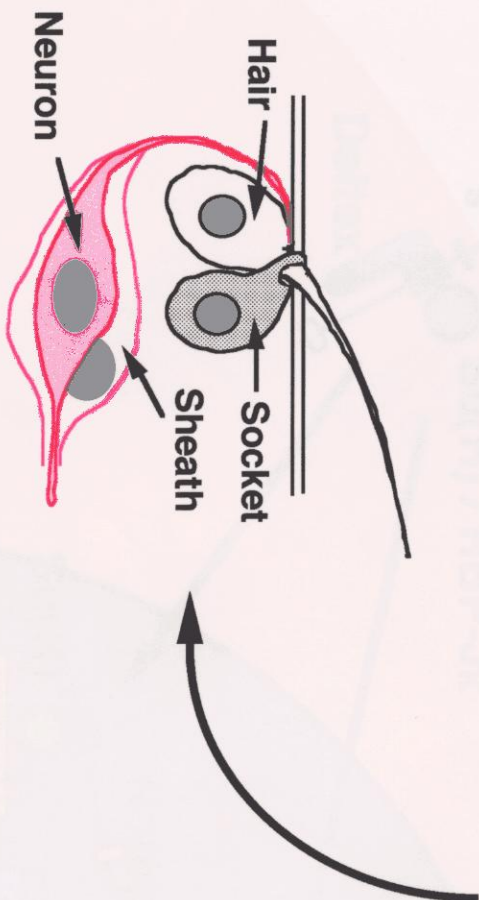
Transcription factors	Obvious phenotype of null mutants	
	Pancreas	Nervous systems
Pax- 6	Reduction in the number of α cells	Absense of eyes and moter neurons in the hindbrain
Pax- 4	Reduction in the number of β cells	Not analyzed
NeuroD	Reduction in the number of β cells	Normal
p48	Complete Loss of pancreas	Normal?
Pdx-1	Complete Loss of pancreas	Not analyzed
Islet-1	Absense of all islets cells	Absense of moter neurons



Proneural cluster

Single out of a precursor cell
by lateral inhibition

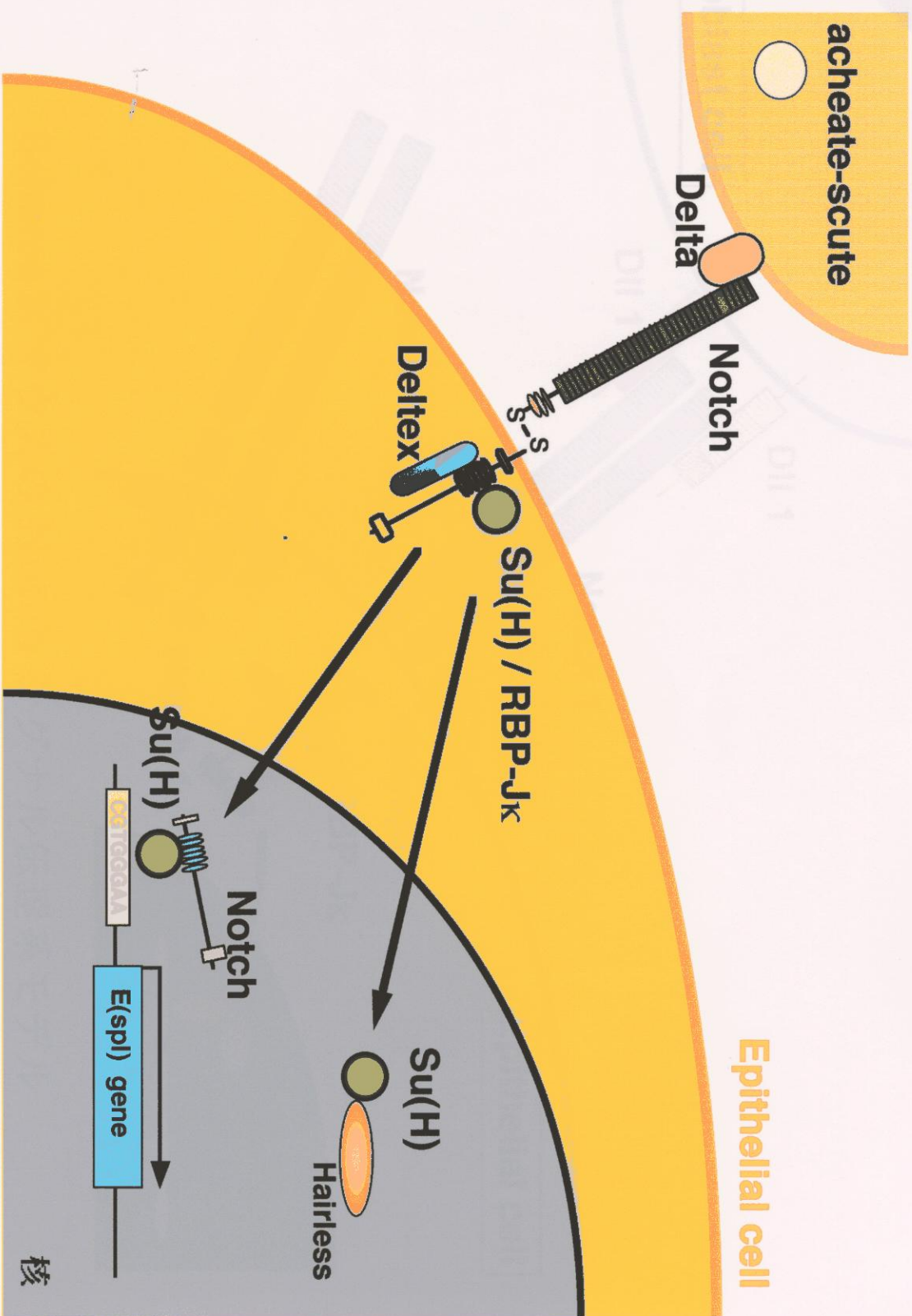
Cell type determination



Scheme 1. ショウジョウバエの神経発生における側方抑制機構

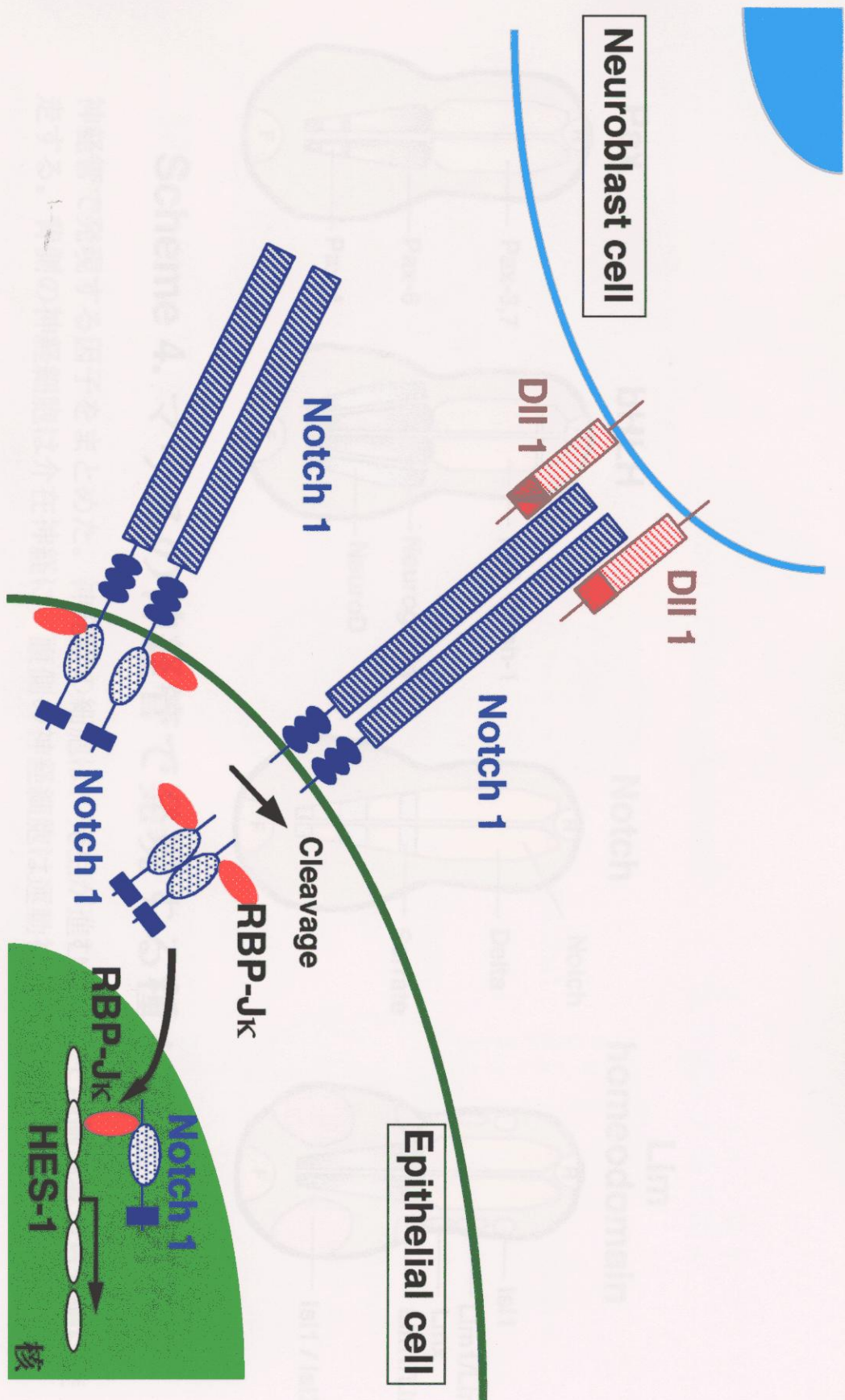
感覚神経細胞の発生は段階を経て進行し、まず体の一定の場所で数個から十数個の細胞が神経細胞に分化する能力を同等に獲得する。このクラスターからたった1つの細胞が任意に選ばれて感覚母細胞に分化する。この選択は、クラスターの中で最も神経細胞に分化が進んだ細胞が、その周辺の細胞に神経細胞への分化を抑制するシグナルを出すことによっておこる。その結果、周囲の細胞は上皮細胞へと分化していく。この機構を側方抑制という。

Sensory mother cell



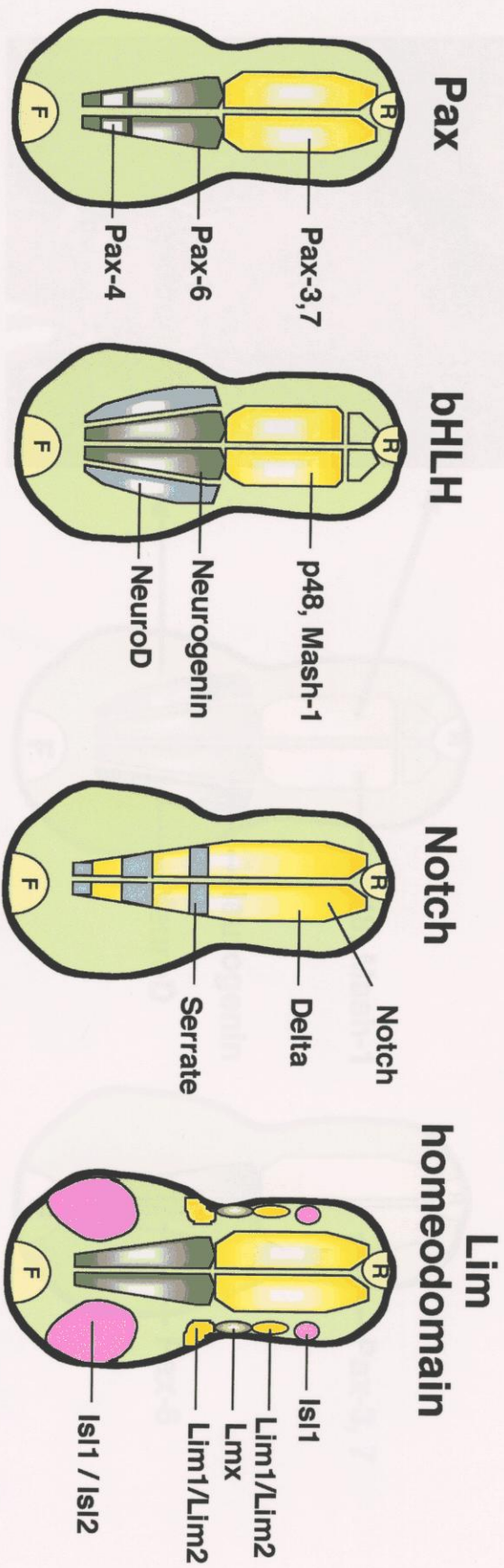
Schem 2. ショウジョウバエのNotchシグナル伝達系モデル

感覚母細胞に発現しているDeltaが、周囲の細胞に発現している膜貫通型レセプターのNotchに結合して、Notchを活性化する。活性化されたNotchは、細胞内領域 (NotchIC) が切断されて細胞質に放たれる。そして、NotchICとSu(H)が共に核内に移動してE(spl)の発現量を上げることによって、この細胞の神経細胞への分化を抑制する。



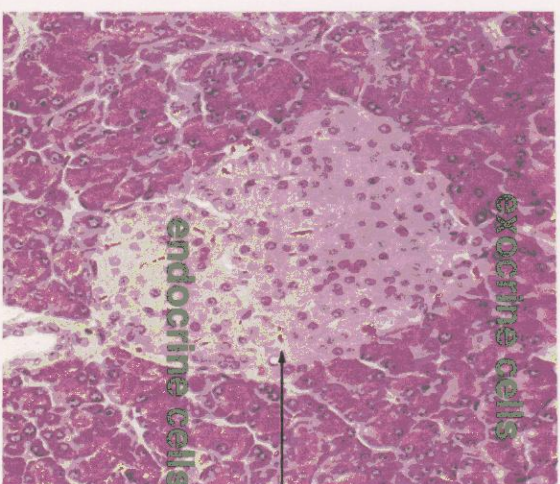
Scheme 3. マウスの Notch シグナル伝達系モデル

細胞質で結合したNotchICとRBP-Jkは核に入り、E(spl)の転写を活性化する。RBP-Jk自身には転写活性化能は無く、NotchICとつしよに作用して初めてE(spl)の転写を活性化できる。



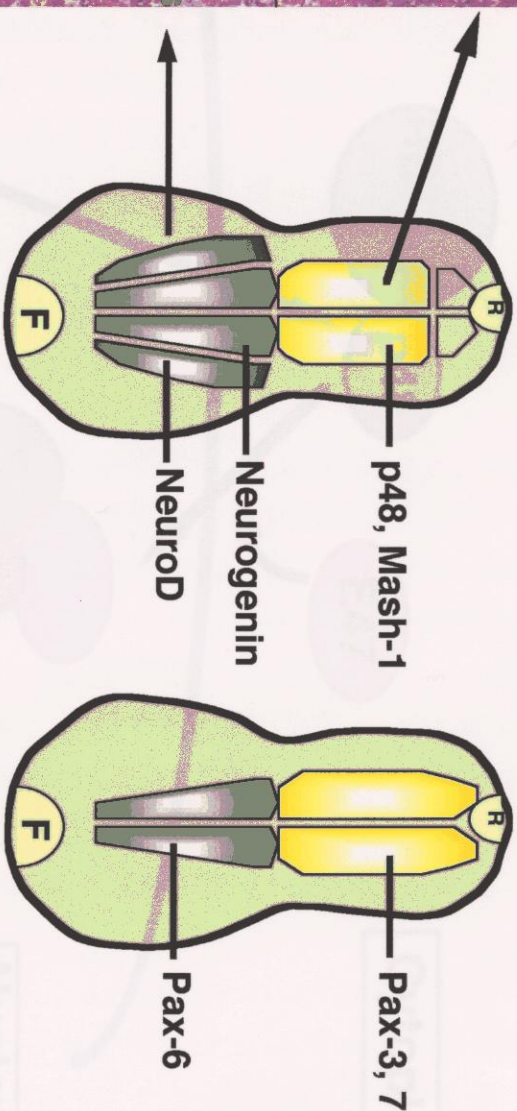
Scheme 4. マウスの神経管で発現する種々の転写因子

神経管で発現する因子をまとめた。神経管の細胞は、発生が進むにつれて内側領域から外側に遊走する。背側の神経細胞は介在神経に、腹側の神経細胞は運動神経へと分化していく。



bHLH型因子の発現領域

ホメオドメインをもつ
転写因子の発現領域



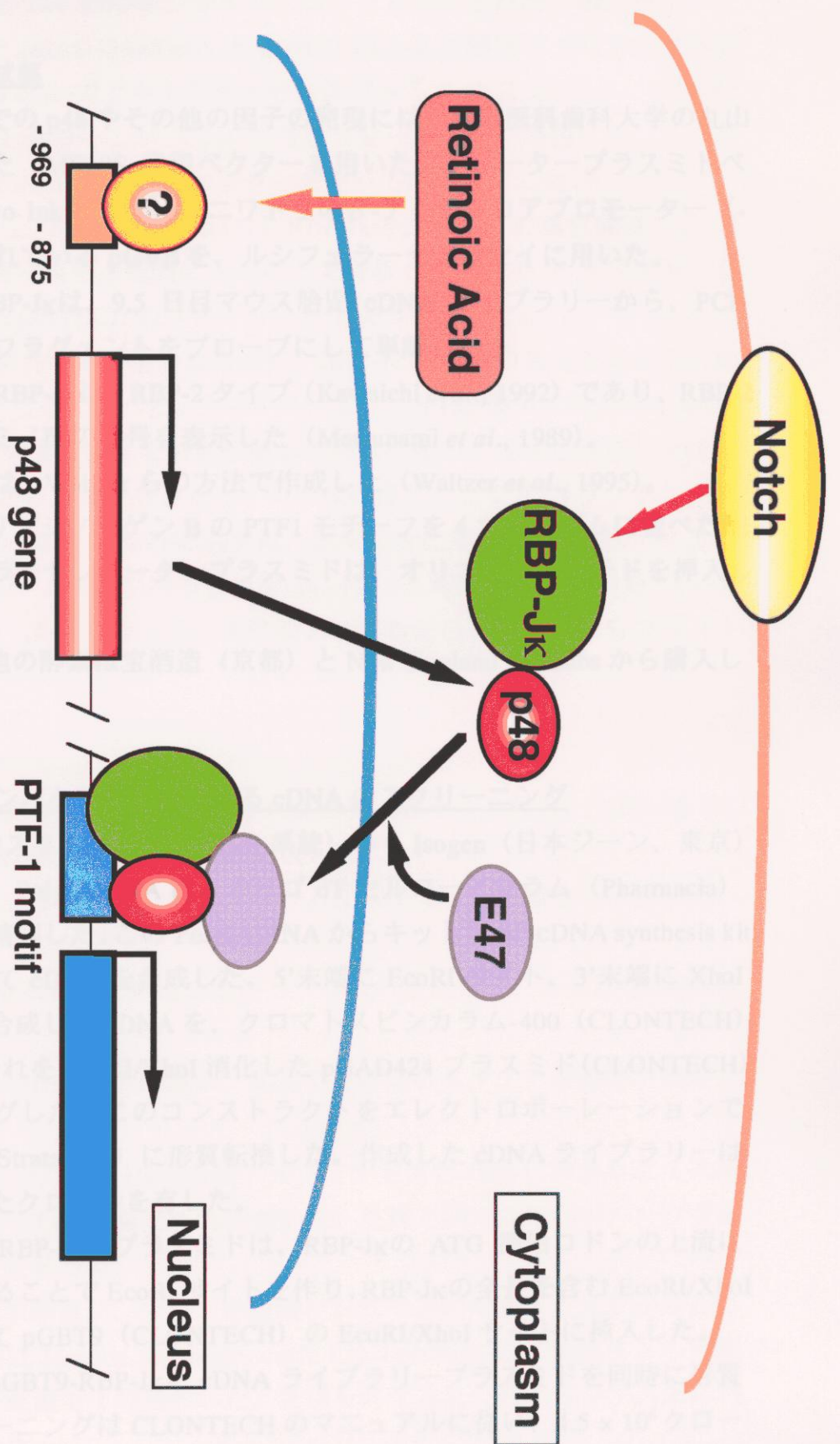
膵臓の切片写真

神経管の切片図

Scheme 5. 膵臓と神経系におけるp48と他の転写因子の関係

p48やMash1は、ワウスの神経管の背側に発現すると同時に膵臓の外分泌細胞の発生に関与することが知られている。NeurogeninやNeuroD、ホメオドメインをもつPax6などは、神経管の腹側に発現して膵臓の内分泌細胞の発生に関与していることがわかつている。

膵臓の外分泌細胞と神経管の背側領域、膵臓の内分泌細胞と神経管の腹側領域には、それぞれ同じ因子が関わって機能している可能性がある。



Scheme 6 . 膵臓の外分泌細胞と介在神経におけるp48 の役割モデル

p48がNotchシグナル伝達系とレチノイン酸シグナル系の間で橋渡しの役割を担っている可能性も考えられる。

材料と方法

1. プラスミドと試薬

ほ乳動物細胞中での p48 やその他の因子の発現には、東京医科歯科大学の丸山先生から貰い受けた pME18S 発現ベクターを用いた。レポータープラスミドベクター pGVB (Toyo Ink, Tokyo) とニワトリの β -アクチンコアプロモーター (-55~+53) が挿入されている pGVB を、ルシフェラーゼアッセイに用いた。

全長のマウス RBP-J κ は、9.5 日目マウス胎児 cDNA ライブラリーから、PCR で増幅した cDNA フラグメントをプローブにして単離した。

本実験に用いた RBP-J κ は、RBP-2 タイプ (Kawaichi *et al.*, 1992) であり、RBP-2 の配列を基準にアミノ酸の番号を表示した (Matsunami *et al.*, 1989)。

RBP-J κ の変異体は、Waltzer らの方法で作成した (Waltzer *et al.*, 1995)。

ラットのキモトリプシノーゲン B の PTF1 モチーフを 4 つタンデムに並べた配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドは、オリゴヌクレオチドを挿入して作成した。

制限酵素とその他の酵素は宝酒造 (京都) と New England BioLabs から購入した。

2. RBP-J κ 結合タンパク質をコードする cDNA のスクリーニング

Total RNA はマウス 9.5 日目胎児 (ICR 系統) から Isogen (日本ジーン、東京) を使って調整した。Poly(A)RNA は、オリゴ dT セルロースカラム (Pharmacia) に 2 回通すことで精製した。この Poly(A)RNA からキット (ZAP-cDNA synthesis kit, Stratagene) を使って cDNA を合成した。5'末端に EcoRI サイト、3'末端に XhoI サイトをもつよう合成した cDNA を、クロマトスピンカラム-400 (CLONTECH) でサイズ分画し、それを EcoRI/XhoI 消化した pGAD424 プラスミド (CLONTECH) にサブクローニングした。このコンストラクトをエレクトロポレーションで XL-1-Blue MRF' (Stratagene) に形質転換した。作成した cDNA ライブラリーは 2×10^7 個の独立したクローンを有した。

ベイトとしての RBP-J κ のプラスミドは、RBP-J κ の ATG 開始コドンの上流に PCR で変異を入れることで EcoRI サイトを作り、RBP-J κ の全長を含む EcoRI/XhoI フラグメントにして pGBT9 (CLONTECH) の EcoRI/XhoI サイトに挿入した。

酵母の HF7c に pGBT9-RBP-J κ と cDNA ライブラリープラスミドを同時に形質転換した。スクリーニングは CLONTECH のマニュアルに従い、 4.5×10^6 クローンをスクリーニングした。1st スクリーニングでは、ヒスチジン(-)プレートで生

育することができた 124 個がポジティブクローンとしてとれた。ポジティブクローンから回収した pGAD424-cDNA と pGBT9-RBP-J κ を酵母の SFY526 に形質転換し、2 者の結合を β -ガラクトシダーゼ活性でみる 2nd スクリーニングを行った。この中で、42 クローンが X-gal を含むプレートで青く発色した。このポジティブクローンを ABI373A シーケンサーを使って配列決定した。

単離したクローンと RBP-J κ 、あるいは RBP-J κ の変異体との結合能は、 β -ガラクトシダーゼの発現量を定量的にみることで分析した。この β -ガラクトシダーゼアッセイは、CLONTECH のプロトコールに従って行った。

p48 中の RBP-J κ 結合領域を決めるために、RBP-J κ と p48 の欠失変異体との結合をフィルターアッセイで調べた。フィルターアッセイは、濾紙 (Whatman 3MM) に RBP-J κ と p48 の欠失変異体を形質転換した酵母を塗り、細胞を破壊した後、 β -ガラクトシダーゼの基質である X-gal の溶液に浸すことで β -ガラクトシダーゼの発現をみるものである。活性の判定は、鮮明に青に発色した時間が 30 分以内のものを (+++++)、1 時間以内のものを (++++), 2 時間以内のものを (+++), 4 時間以内のものを (++) で示した。8 時間おいても発色しなかったものは (-) で示した。

3. 免疫染色

1. C 末端に c-myc タグを付けた p48、N 末端に FLAG タグを付けた RBP-J κ 、E47 をそれぞれ pME18S 発現ベクターに挿入した。
2. これらの発現ベクターをリン酸カルシウム沈澱法で Cos7 細胞に形質転換した。
3. 形質転換後 24 時間を経た細胞をカバーガラスの上にまき、さらに 24 時間培養した。
4. その後、細胞を PBS で 1 回洗い、室温で 2 分間のメタノール処理で固定した。
5. さらに PBS で洗った後、1%牛血清アルブミンを含む PBS に溶かした 1 次抗体を細胞上に垂らして室温で 1 時間おいた。乾燥を防ぐ為に、カバーガラス上にパラフィン被せた。
6. 細胞を PBS で 3 回洗い、マウスの免疫グロブリンに対する蛍光ラベルしたヤギ抗体 (1/1000, Jackson Immunoresearch Laboratories) を 2 次抗体として細胞上に垂らして室温で 1 時間おいた。乾燥を防ぐ為に、カバーガラス上にパラフィン被せた。
7. 細胞を PBS で 3 回洗い、グリセロールで包埋した後、蛍光顕微鏡 (Olympus

BX-500) で観察した。

1 次抗体は、以下のものを用いた。

ヒトの c-myc 抗体-ATCC から購入したハイブリドーマ myc 1-9E10.2c の腹水
FLAG 抗体-Eastman Chemicals から購入のタイプ M2
neurofilament 抗体-ハイブリドーマ 2H3 の培養上清

4. 免疫沈降

1. C 末端に c-myc タグを付けた p48、N 末端に FLAG タグを付けた RBP-J κ 、E47 をそれぞれ pME18S 発現ベクターに挿入した。
2. これらのプラスミドをリン酸カルシウム沈澱法で Cos7 細胞に形質転換した。
3. 形質転換後 48 時間培養した細胞から、Chung らの方法で核抽出液と細胞質抽出液を分離した (Chung *et al.*, 1994)。
4. 核抽出液 (200-1000 μ l) に 10 μ l の Protein A Sepharose (50% suspension, Pharmacia) を混ぜ、さらに 1 μ g の c-myc あるいは FLAG のモノクローナル抗体を加えて 4°C で 2 時間攪拌した。
5. その後 Sepharose 樹脂を軽い遠心で集め、PBS で 3 回洗った。
6. 樹脂に吸着したタンパク質は SDS 電気泳動で分離し、ニトロセルロースフィルター (BA85, Schleicher&Schuell) にブロットした。
7. キット (ECL, Amersham) を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。方法はキットの説明書に従った。

5. RT-PCR

Total RNA は、それぞれ、マウス胎児 (E8.5 から E15.5)、マウス成体の組織 (Heart, Spleen, Liver, Thymus, Kidney, Muscle, Brain, Lung, Pancreas, Spinal Cord)、P19 培養細胞 (神経分化誘導前と分化誘導後 1 日目、2 日目、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目) から、Isogen (日本ジーン、東京) で調製した。キット (First Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia) を使って、RNA から cDNA を合成した。合成した一本鎖 cDNA の 1/100 から 1/20 量を、1.5 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Takara) と、特異的なオリゴヌクレオチドプライマー (20 pmol) を含む 30 μ l の反応溶液中で PCR した。反応装置は Omni Gene を使い、反応条件は、95°C 30 秒、55°C 1 分、72°C 1 分を 35 サイクルと、続いて 72°C 10 分を 1 サイクルとした。p48 mRNA を検出するために用いたプライマーは、12JOF2 (5'-CATGCAGTCCATCAACG-3') と 12JOR (5'-GATGTGAGCTGTCTCAGGA-3') である。このプライマーにより、p48 の C 末端領域 463 bp のフラグメントと約 800 bp

の p48 ゲノム由来のフラグメントが増幅された。ポジティブコントロールとして使用した β -アクチンのプライマーは、

(5'-GTGACGAGGCCAGAGCAAGAG-3' と
5'-AGGGGCCGGACTCATCGTACTC-3')である。

PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動で分離した。ゲルは、エチジウムブロマイドで染色し、その後、サザンハイブリダイゼーションのためにニトロセルロースフィルターにプロットした。

6. Whole mount *in situ* hybridization

本実験に用いたマウス胎児は、受精後 8.5 日目から 12.5 日目のものである。

In situ hybridization の作業は以下のように行った。

器具、試薬中の RNase の不活化

mRNA を材料及びプローブとする際には RNase の不活化を行い、またその混入を防止する必要がある。用いる器具は 180℃、4 時間で乾熱処理を施し、蒸留水には RNase 阻害剤である Diethylpyrocarbonate (DEPC) を 0.1% になるよう加えて 2~3 時間放置した後、120℃、30 分のオートクレーブで DEPC を不活化したものをを用いた。DEPC を不活化する理由は、DEPC は RNase を阻害する一方で、その他の酵素も阻害するからである。そして、実験系への RNase の混入を防ぐために、この RNase free の蒸留水を用いて種々の試薬を調整した。

プローブの作製

プローブは、DIG RNA Labeling Kit (ベーリンガー・マンハイム社) を用いて RNA プローブを作製した。目的遺伝子の cDNA を、SP6、T7、あるいは SP3 RNA ポリメラーゼのプロモーターのいずれかを有するプラスミドにサブクローニングする。プラスミドに組み込まれた cDNA の方向を制限酵素切断パターンで確認後、このプラスミドを 5' あるいは平滑末端を形成する制限酵素で切断する。このようにして、環状のプラスミド DNA を線状 DNA に変え、線状になったことをアガロース電気泳動で確認後、DIG RNA Labeling Kit (ベーリンガー・マンハイム社) を用いて *in vitro* 転写を行った。

基本的に DIG RNA Labeling Kit のプロトコールに従った。反応系は 20 μ l で 1 μ g のテンプレートを用いて ATP、CTP、GTP、UTP、DIG-UTP (ジゴキシゲニン標識した UTP) 存在下で T7 ポリメラーゼ、T3 ポリメラーゼまたは SP6 ポリメラーゼを用いて *in vitro* 転写を行った。系には RNase inhibitor を 1 μ l 加え、RNase の分解を抑制している。

転写反応終了後、DNase でテンプレートを分解し、EDTA により反応を停止し、

LiCl 沈殿により RNA を回収した。プローブの長さが 500 bp 以下ならそのままハイブリダイゼーションしても組織への浸透性は良いが、それより長いものだと浸透性が悪く、良好なシグナルが得られないので加水分解してから用いた。加水分解は以下のような式に基づいて行った。

$$Lo - Lf / Lo \times Lf \times 0.11 \text{ (分)}$$

Lo: 転写産物の長さ (Kb)、Lf: 加水分解後の長さ (Kb)

前処理とハイブリダイゼーション

1. 胚を取り出し、PBS の入ったシャーレに入れる。そして、薄い膜などを取り除き、固定液 (4%パラホルムアルデヒド/PBS) の入ったシャーレに入れ替える。脳、心臓、眼、耳胞などに注射針で穴を開けて液の浸透性を良くする。
2. 胚を 4%パラホルムアルデヒド/PBS が入った 50ml チューブに入れて、4℃で 2 時間から 1 晩放置する。
3. 液を捨て、PBT (0.1% Tween 20/PBS) を入れて、4℃で 5 分間インキュベートする。これを 2 回繰り返す。
4. 以下の要領で脱水する。25%エタノール/PBT, 5 分; 50%エタノール/PBT, 5 分; 75%エタノール/PBT, 5 分, 100%エタノール/PBT, 5 分 x 2 回繰り返す。
5. ここで、100%エタノールの入ったシャーレ上でもう 1 回注射針で脳、心臓、耳胞などに穴を軽く開ける。それから以下の要領で再水和を行う。
6. 75%エタノール/PBT, 5 分; 50%エタノール/PBT, 5 分; 25%エタノール/PBT, 5 分; PBT, 5 分 x 2 回繰り返す。
7. 10 mg/ml プロテアーゼ K/PBT に液を換え、室温で 15 分間インキュベートする (組織によって調節する)。
8. 新しく準備した 2 mg/ml グリシン/PBT に液を換え室温で 5 分間インキュベートする。
9. 液を PBT に換え、5 分間インキュベートする。これを 2 回繰り返す。
10. 新しく準備した 0.2%グルタルアルデヒド+4%パラホルムアルデヒド/PBT に液を換え室温で 20 分間インキュベートする。
11. 液を PBT に換え、5 分間インキュベートする。これを 2 回繰り返す。
12. 液を PBT に換え、70℃で 30 分間インキュベートする。
13. 6%過酸化水素/PBT に液を換え、室温で 1 時間インキュベートする。
14. 液を PBT に換え、5 分間インキュベートする。これを 3 回繰り返す。
15. 胚を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、70℃で保温しておいた Prehybridization mix (50%ホルムアミド、5 X SSC pH5、50 mg/ml yeast RNA、50 mg/ml ヘパリン) を 1 ml 加える。

16. 揺らしながら 70℃で 1 時間インキュベートする。
17. Prehybridization mix にジゴキシゲニン RNA プロブが約 1 mg/ml になるように混ぜ、この溶液を 15 のチューブに 1 本につき 0.4 ml 加える。
18. 揺らしながら 70℃で 1 晩インキュベートする。

ハイブリダイゼーション後の洗浄と抗体反応

1. ハイブリダイゼーション後、エッペンドルフチューブから Prehybridization mix を吸出し、solution 1 (50%ホルムアミド、5 X SSC pH5、1% SDS) を加え、70℃で 30 分間インキュベートする。これを 2 回繰り返す。
2. 液を吸出し、solution 1 と solution 2 (0.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl pH7、0.1% Tween 20) の 1:1 の溶液を加え、70℃で 10 分間インキュベートする。
3. 液を吸出し、solution 2 を加え、5 分間インキュベートする。これを 3 回繰り返す。
4. 液を吸出し、100 mg/ml リボヌクレアーゼ A/solution 2 を加え、37℃で 30 分間インキュベートする。これを 2 回繰り返す。
5. 液を吸出し、solution 2 を加え 5 分間インキュベートし、さらにその液を吸出して solution 3 (50%ホルムアミド、2 x SSC, pH5) を加え 5 分間インキュベートする。
6. 液を吸出し、solution 3 を加え 65℃で 30 分間インキュベートする。これを 2 回繰り返す。
7. 胚を 24 ウエル-プレートに移す。
8. 液を吸出し、TBST (0.15M NaCl、0.1M Tris-HCl pH7.5、0.1% Tween 20) を加え、5 分間インキュベートする。これを 3 回繰り返す。
9. 液を吸出し、ブロッキング溶液 (1.5% Blocking-reagent (Boehringer)/TBST) を加え、室温で 60~90 分間インキュベートする。
10. 上記の操作を行っている間に抗体の前処理を行う。
 - a) 3 mg の embryo-powder を計り、エッペンドルフチューブの中に入れる。そこに TBST を 0.5 ml 加え、70℃で 30 分間インキュベートする。
 - b) インキュベート後、氷上で冷やしてからブロッキング溶液を 5 ml、DIG-AP-conjugate を 1 μ l 加える。
 - c) ゆっくり揺らしながら 4℃で 1 時間インキュベートする。インキュベート後、4℃、12,000 rpm で 10 分間遠心する。上清を別の 2 ml のブロッキング溶液の中に移す。
11. 9.のブロッキング溶液を吸出し、10 の前処理を行った抗体溶液を加える。ゆっくり揺すりながら 4℃で 1 晩インキュベートする。

12. 上記の操作中、shaker で揺らし、用いる溶液は各温度で保温しておいたものを用いる。

洗浄と発色反応

1. 1 晩インキュベート後、液を吸って TBST に入れ換え、5 分間インキュベートする。これを 3 回繰り返す。
2. 液を吸って TBST に入れ換え、1 時間インキュベートする。これを 5 回繰り返す。
3. 液を吸って NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH9.5, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) に入れ替え、10 分間インキュベートする。これを 3 回繰り返す。
4. 液を吸って発色液を加え、遮光してゆっくりインキュベートする。
5. 発色液は NTMT 1 ml に対して NBT 4.5 μ l, BCIP 3.5 μ l を加えて調整する。
6. 発色は約 1~2 時間行い、ちょうど良いところで発色を止める。
7. 発色液を吸い、NTMT を加え 10 分間インキュベートする。これを 2 回繰り返した後、NTMT を吸って PBT を加え 4℃で保存する。
8. 顕微鏡で検鏡する。

上記の操作中、shaker の目盛は 4~5 にして揺すっておく。

抗体反応に用いた embryo-powder の調整

胎児をリン酸 Buffer PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄ per 1 liter) に溶かした 4% パラフォルムアルデヒドに入れて、4℃で 1 晩おいて固定した。その後 PBS でリンスし、-20℃のエタノール中で保存した。*In situ* hybridization は、Sasaki らのプロトコールに従った (Sasaki *et al.*, 1993)。BSKS(+)ベクター (Stratagene) に p48 cDNA の 2 つのフラグメントをそれぞれ挿入し、キット (DIG RNA Labeling Kit, Boehringer) を使って、ジコキシゲニンラベルした p48 のアンチセンス RNA プローブを合成した。ジコキシゲニンラベルしたセンス RNA プローブもコントロールとして作成した。

7. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイに用いた Cos7 細胞は、Dulbecco の培地 (DMEM) に 10% の牛胎児血清を加えた培地中で培養した。NIH3T3 細胞は、DMEM に 10% の仔牛血清を加えた培地中で培養した。そして、それらの細胞はすべて 37℃の恒温槽で 5% 二酸化炭素中に維持した。

ルシフェラーゼアッセイにはキット (PicaGene 東洋インキ、東京) を使用し、用いた細胞の形質転換にはカルシウムリン酸沈澱法を使用した (Chen *et al.*,

1987)。

24well のプレートに 2×10^4 /well になるようにまいた Cos7 細胞に、1.0~1.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ のプラスミドを加えた。用いたプラスミドは、ルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミド (pGVB) 0.25 μg と β -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pME18S-LacZ) 0.25 μg と共に、導入したいタンパク質の発現ベクター (pME18S-cDNA) である。NIH3T3 細胞を用いた時には 4~5 $\mu\text{g}/\text{well}$ のプラスミドを加えた。細胞抽出液は、Lysis buffer (PicaGene Lysis Buffer, 東洋インキ、東京) で、形質転換後 24~48 時間に抽出した。そして、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターを使って検出した。

ルシフェラーゼ活性値の補正に使用した β -ガラクトシダーゼ活性値は、次のように測定した。100 mM リン酸カリウム buffer (pH 7.8)、100 mM 塩化マグネシウム、45 mM 2-メルカプトエタノール、0.88 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ X-gal と 5~10 μl の細胞抽出液を入れた 60 μl の反応液を 37°C で 3~30 分間反応させた。100 μl の 1 M 炭酸ナトリウムを加えることで反応を停止した後、2-ニトロフェノールの呈色を 420 nm の吸収で測定した。ルシフェラーゼ活性値は、 β -ガラクトシダーゼ活性値で補正し、独立した 3 回の実験結果の平均値で示した。

8. P19 胎児性カルシノーマ細胞の培養と神経誘導

P19 細胞の神経への誘導は、Rudnicki らの方法に従って行った (Rudnicki and McBurney, 1987)。P19 細胞は、トリプシン処理で分散させた後、60 mm のバクテリア用皿に移し、0.2 μM のレチノイン酸 (all-trans, Sigma) を含む培地中で培養した。細胞数は、培地 1 ml あたり 10^5 の細胞が含まれるようにした。2 日後に細胞塊を 10 cm のバクテリア用皿に移して、レチノイン酸の入った新しい培地に交換した。培地の交換は 2 日おきに行った。培養を始めて 4 日目にレチノイン酸を除いた。細胞の形態を観察するため、培養後 4 日目の細胞塊をカバーガラスの上にまいて 2~4 日間培養した。そして、ニューロフィラメント抗体で免疫染色することにより、神経分化状態をみた。細胞塊のほとんどがニューロフィラメントを発現していた。

9. ヘマトキシリン-エオジン染色

p48 ノックアウトマウスの脊髄の切片の染色には、ヘマトキシリン-エオジン染色法を用いた。染色は、西方らの方法で行った (西方敬人、バイオ実験イラストレイテッド、秀潤社、p126)。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・動物遺伝子機能学講座に於いて、川市正史教授の元で遂行されたものであり、終始細やかな指導をして下さいました川市正史教授にお礼申し上げます。また、同講座の古久保哲朗助教授には、折にふれて数々の有益なアドバイスを頂きましたことに感謝致します。

博士前期過程と後期過程に渡って、副査として指導して下さいました安田國雄教授、高橋直樹教授、竹家達夫教授、古久保哲朗助教授に心からお礼申し上げます。

Swiss Institute for Experimental Cancer Research の Professor P. K. Wellauer には未公開データや p48 ノックアウトマウスを、京都大学の影山龍一郎教授には種々のプラスミドを提供して頂きましたことにお礼申し上げます。

そして、本研究を共同で行ってくれた研究室の三村英樹君、後藤智和君、中山里香さん、壬生優子さん、加藤彰君ら諸氏の努力と協力に感謝します。

参考文献

- Ahlgeren, U., Pfaff, S. L., Jessel, T. M., Edlund, T. and Edlund, H. (1997) Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* **385**, 257-260.
- Akazawa, C., Ishibashi, M., Shimizu, C., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1995) A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene atonal is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem.* **270**, 8730-8738.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., de Angelis, M., Lendahl, U. and Edlund, H. (1999) Notch signaling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**, 877-881.
- Bailey, A. M. and Posakony, J. W. (1995) Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* **9**, 2609-2622.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. and Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**, 49-59.
- Borges, M., Linnoila, R. I., van de Velde, H. J., Chen, H., Nelkin, B. D., Mabry, M., Baylin, S. B. and Ball, D. W. (1997) An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature* **386**, 852-5.
- Chung, C.-N., Hamaguchi, Y. Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994) Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-Jκ. *Nucleic Acids Research* **22**, 2938-2944.
- Cristensen, S., Kodoyianni, V., Bosenberg, M., Friedman, L. and Kimble, J. (1996) *Lag-1*, a gene required for *lin-12* and *glp-1* signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su (H). *Development* **122**, 1373-1383.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. and Kopan, R. (1999) A presenilin-1-dependent γ-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-522.
- Furukawa, T., Maruyama, S., Kawaichi, M. and Honjo, T. (1992) The *Drosophila* homolog of the immunoglobulin recombination signal-binding protein regulates peripheral nervous system development. *Cell* **69**, 1191-1197.

- Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M. Otulakowski, G. (1994) Isoform-specific amino terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* **8**, 538-553.
- Goulding, M. D., Lumsden, A. and Gruss, P. (1993) Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* **117**, 1001-1016.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. and Guillemot, F. (2000) neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 1607-1611.
- Horlein, A. J., Anders, M. N., Thorsten, H., Joseph, T., Bernd, G., Riki, K., Aimee, R., Yasutomi, K., Mats, S., Christopher, K. G. and Michael, G. R. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404.
- Horton, S., Meredith, A., Richardson, J. A., Johnson, J. E. (1999) Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol Cell Neurosci* **14**, 355-369.
- Hsieh, J. J. and Hayward, S. D. (1995) Masking of the CBF1/RBP-J κ transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* **268**, 560-563.
- Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B. and Hayward, S. D. (1999) CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 23-28.
- Huang, S., Qiu, Y., Shi, Y., Xu, Z. and Brandt, S. J. (2000) P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J.* **19**, 6792-803.
- Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. and Guillemot F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* **9**, 3136-3148.
- Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O. D. (2000) Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet.* **24**, 36-44.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evans, R. M. and Kadesch, T. (1998) A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* **12**, 2269-2277.

- Kawaichi, M., Oka, C., Shibayama, S., Koromilas, A. E., Matsunami, N., Hamaguchi, Y., Honjo, T. (1992) Genomic organization of mouse J κ recombination signal binding protein (RBP-J κ) gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 4016-4022.
- Knofler, M., Krapp, A., Hagenbuchle, O. and Wellauer, P. K. (1996) Constitutive expression of the gene for the cell-specific p48 DNA-binding subunit of pancreas transcription factor 1 in cultured cells is under control of binding sites for transcription factors Sp 1 and α Cbf. *J. Biol. Chem.* **271**, 21993-22002.
- Krapp, A., Knofler, M., Frutiger, S., Hughes, G. J., Hagenbuchle, O. and Wellauer, P. K. (1996) The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J.* **15**, 4317-4329.
- Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O. and Wellauer, P. K. (1998) The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Gene Dev.* **12**, 3752-3763.
- Kurooka, H., Kuroda, K. and Honjo, T. (1998) Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5448-5455.
- Lammert, E., Brown, J. and Melton, D. A. (2000) Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech Dev.* **94**, 199-203.
- Lecourtois, M. and Schweisguth, F. (1995) The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev.* **9**, 2598-2608.
- Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N. and Weitraub, H. (1997) Conversion of *Xenopus* Ectoderm into neurons by neuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* **268**, 836-844.
- Lee, M. S., Lowe, G., Flanagan, S., Kuchler, K. and Glackin, C. A. (2000) Human dermo-1 has attributes similar to twist in early bone development. *Bone* **27**, 591-602.
- Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenshell, C. W., Saito, T. and Anderson, D. J. (1991) Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subset of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev.* **5**, 1524-1537.
- Maden, M., Ong, D. E., Summerbell, D. and Chytil, F. (1989) The role of retinoid-binding proteins in the generation of pattern in the developing limb, the regenerating limb and the nervous system. *Development.* **107**, 109-19.
- Matsunami, N., Hamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Kuze, K., Kangawa, K., Matsuo, H.,

- Kawaichi, M. and Honjo, T. (1989) A protein binding to the J κ recombination sequence of immunoglobulin genes contains a sequence related to the integrase motif. *Nature* **342**, 934-937.
- McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M., Edwards, M.K. and Anderson, P. J. (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* **299**, 165-7.
- McBurney, M. W. and Rogers, B. J. (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev. Biol.* **89**, 503-508
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J. and Kopan, R. (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell.* **5**, 197-206.
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qui, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B. and Tsai, M. J. (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* **11**, 2323-2334.
- Newberry, E. P., Latifi, T. and Towler, D. A. (1999) The RRM domain of MINT, a novel MSX 2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* **38**, 10678-10690.
- Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L. and Wright, C. V. (1996) PDX1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**, 983-995.
- Oka, C., Nakano, T., Kakeham, A., la Pompa, J.L., Mori, G., Sasaki, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W., and Honjo, T. (1995) Disruption of the mouse RBP-J κ gene results in early embryonic death. *Development* **121**, 3291-3301.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T. and Jessell, T. M. (1996) Requirement for LIM homeobox gene Isl 1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**, 309-320.
- Ray, W. J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W., Wu, J. Y., Kopan, R. and Goate, A. M. (1999) Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3263-3268.
- Roux, E., Strubin, M., Hagenbuchle, O. and Wellauer, P. K. (1989) The cell-specific transcription factor PTF1 contains two different subunits that interact with the DNA. *Genes Dev.* **10**, 1613-24.
- Rudnicki, M. A. and McBurney, M. W. (1987) Cell culture methods and induction of

- differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In Robertson, E.J. (ed.), *Teratocarcinomas and embryonic stem cells, Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK, pp. 19-49.
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A. and Kopan, R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382-386.
- Shen, C. P. and Kadesch, T. (1995) B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Mol Cell Biol.* **15**, 4518-24.
- Sommer, L., Hagenbuchle, O., Wellauer, P. K. and Strubin, M. (1991) Nuclear targeting of the transcription factor PTF1 is mediated by a protein subunit that does not bind to the PTF1 cognate sequence. *Cell* **67**, 987-994.
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G. and Gruss, P. (1997) The *Pax 4* gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas. *Nature* **386**, 399-404.
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. and Gruss, P. (1997) *Pax 6* is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature* **387**, 406-409.
- Struhl, G. and Greenwald, I. (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* **398**, 522-525.
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D. J., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Rubenstein, J. L. and German, M. S. (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* **125**, 2213-21.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T. and Kawaichi, M. (1994) Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J κ . *Nucleic Acid Res.* **22**, 965-971.
- Waltzer, L., Bourillot, P. Y., Sergeant, A. and Manet, E. (1995) RBP-J κ repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4939-4945.
- Ye, Y., Lukinova, N. and Fortini, M. E. (1999) Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila Presenilin* mutants. *Nature* **398**, 525-529.