

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins

和訳 転写制御因子としての Zic 蛋白質の特徴および GLI 蛋白質との関係

指導教官 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

氏名 水岸 貴代美

*Zic* (Zinc finger protein of the cerebellum) ファミリー遺伝子はもともと小脳の顆粒細胞に強く限局して発現している遺伝子として単離され、小脳の発生過程において重要な働きをしている。*Zic* 蛋白質は、5 回繰り返す Zn フィンガーモチーフを持つ転写因子であり、ショウジョウバエの節形成関連遺伝子 *odd-paired* の脊椎動物ホモログである。現在、マウス、カエル、ニワトリ、ヒトで数種類の関連遺伝子が発見されている。*Zic* ファミリー遺伝子は脊椎動物の発達、特に神経系の発達に重要な役割を果たしており、その欠損マウスでは、小脳の低形成や失調運動 (*Zic1*)、二分脊椎や全前脳症 (*Zic2*)、内臓逆位 (*Zic3*)などが生じる。ヒトでも関連した疾患が報告されており、さらに髄芽腫でも特異な発現が認められている。

*Zic* ファミリー遺伝子は、さらに髄芽腫で増幅している癌遺伝子として同定

された *Gli* ファミリー遺伝子とも、その Zn フィンガードメインを中心として高い相同性を示す。*Gli* は Sonic hedgehog (Shh) シグナル伝達経路の下流因子として、標的配列に直接結合し、標的遺伝子の転写を制御する。現在までに *Zic* 蛋白質は、*Gli* 蛋白質の標的配列に結合しうることが報告されているが、*Zic* 蛋白質がどのように転写を制御するかについて分子レベルでの解明はほとんど行われていない。

今回、私はまず *Zic1*、*Zic2* および *Zic3* 蛋白質に対する標的配列を決定した。N を 30 個含むプローブを作製し、PCR による増幅、精製、ゲルシフトアッセイ、蛋白質と結合してシフトしたバンドの切り出し、DNA の溶出という過程を 5 回繰り返し、選択されてきた配列を決定した。蛋白質としては DNA 結合領域である、Zn フィンガードメインを用いた。その結果、選択された標的配列は *GLI* 蛋白質の標的配列と同じ、TGGGTGGTC であった。さらに 1 つずつ塩基置換した変異配列を作製してゲルシフトアッセイを行ったところ、結合に必要な最小標的配列は GGGTGGTC であった。

しかしながら、*GLI* 蛋白質と *Zic* 蛋白質には標的配列に対する結合親和性に大きな差があり、すべての *Zic* 蛋白質の親和性は *GLI* 蛋白質のそれよりずっと低かった。結合親和性の違いを定量化するため、ゲルシフトアッセイにおいて DNA プローブの濃度または蛋白質の濃度を変化させ、解離定数を決定した。その結果、算出された解離定数は *GLI*  $8.5 \times 10^9$ 、*Zic1*  $5.2 \times 10^8$ 、*Zic2*  $4.8 \times 10^8$ 、*Zic3*  $7.1 \times 10^8$  であり、解離定数に明らかな差が認められた。

さらに、私はレポーターアッセイによって、*Zic* 蛋白質の転写制御について解析した。全長の *Zic* 蛋白質を培養細胞に発現させた時、*Zic* 蛋白質は様々なプロモーターを活性化することができた。さらにこの活性化に *GLI* の標的配列の存在が必要であるかどうか調べるため、TK (thymidine kinase) プロモーターの上流に *GLI* の標的配列を 6 個つけたレポーターとつけないレポーター遺伝子を用いて解析を行った。すべての *Zic* 蛋白質は *GLI* の標的配列が存在しなくても TK プロモーターを活性化することができ、*GLI* の標的配列が存在するとその活性化は幾分促進された。これは、*GLI* の転写活性化に標的配列の存在が不可欠であるという事実と対照的であった。この *Zic* 蛋白質と *GLI* 蛋白質の転写活性化メカニズムの差異は、*GLI* 標的配列に対する結合親和性の違いを反映していると思われる。

また、培養細胞において *GLI* と *Zic* を共に発現させ、標的配列を介した *GLI*

蛋白質の転写活性化に Zic 蛋白質がどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、Zic 蛋白質は培養細胞の種類に依存して、GLI 蛋白質による転写活性化をさらに促進、または抑制した。このデータは GLI と Zic の間に重要な相互作用が存在する可能性を示唆している。

以上の結果から Zic 蛋白質の転写制御メカニズムについていくつかの仮説が考えられる。1 つは、Zic 蛋白質が DNA と結合せずに転写を制御するという仮説である。最近、我々のグループで GLI と Zic が直接、蛋白質レベルで相互作用することが証明された。したがって、Zic 蛋白質は GLI 蛋白質と直接相互作用し、GLI による標的配列を介した転写活性化を制御している可能性がある。また、細胞の種類により、その作用が異なるため、細胞特異的なコファクターも関与していると思われる。つまり Zic 蛋白質は転写制御過程の中でコアクティベーターとして働き、その機能は GLI 蛋白質やその他の細胞特異的なコファクターによって調節されていると考えられる。他方、Zic 蛋白質と GLI 蛋白質が、時間的、空間的制約の中で同じ標的配列に異なる親和性で結合することにより、発生過程における緻密なネットワークを制御している可能性もある。

Zic 蛋白質がどのように発生過程に関与しているかを解明するため、GLI 以外の、相互作用する因子の同定、下流の標的遺伝子の同定などさらなる解析が必要である。