

論文の内容の要旨

論文題目 Physical and functional interaction between Zic, Gli and NKL zinc finger proteins in neural development

和訳 Zn フィンガー蛋白質 Zic、Gli、NKL の蛋白質間相互作用とその神経発生における役割

指導教官 御子柴 克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 小藪 芳男

(序論) *Zic* (zinc finger protein of cerebellum)は小脳に限局して発現する遺伝子としてクローニング、命名された。現在マウスとアフリカツメガエル(ツメガエル)では4種類のサブタイプが報告されている。ツメガエル胚を使った研究によって、*Zic*は神経誘導や神経堤誘導に積極的な役割をもつことが明らかにされている。

また *Zic* ファミリーと良く似た C2H2 型 Zn フィンガーモチーフをもつ遺伝子群が他に2つ存在する。1つはヘッジホッグ(Hh)シグナルの下流因子である *Gli* ファミリーであり、もう1つは *NKL*(neuronal Kruppel-like)である。

Gli ファミリーは発生過程において、*Zic* ファミリーと発現部位の重なる部分が多いことや、*Zic* と *Gli* とは神経堤の発生では拮抗的に、また椎弓の前後軸に沿った形態形成では協調的に働くことが明らかにされている。また、*Gli* はゲノム上の特定の塩基配列(*Gli* binding sequence(*GBS*))を特異的に認識して結合し、遺伝子の発現制御をすることが分かっている。*Zic* の結合塩基配列の探索の結果、*Zic* も *GBS* を最もよく認識して結合することが明らかとなった。しかし、*Zic* の *GBS* に対する親和性は *Gli* に比べて低いことや、レポーターアッセイの結果、*Gli* が *GBS* 依存的な転写活性を示すのに対して *Zic* は *GBS* 様の配列を持たない様々なプロモーター(チロシンキナーゼ(*TK*)、*SV40*、*Zic1* プロモーターなど)に対しても活性をもつことなど、*Zic* と *Gli* の分子的性質の違いも明らかにされた。

一方、*NKL* はニワトリの神経管で過剰発現させた場合、分裂増殖中の神経前

駆細胞の分化を促進させることから、神経細胞分化を促進する因子と考えられている。また、ツメガエルの神経胚の時期の神経板境界部から神経堤細胞の発生分化が起るが、NKLはこの領域でも発現していることから神経堤発生との関わりが示唆された。

そこで今回の研究では、Zicによる発生制御の分子メカニズムの解明を目的に Gli、NKLとZicとの関係について調べた。

(結果 1) 始めに、ZicとGliとの相互作用を調べるため、293T細胞にヘマグルチニン(HA)のタグを付けたZic遺伝子とFlagタグを付けたGli遺伝子を導入し発現させ、その細胞溶解液を使って抗HA抗体で免疫沈降反応を行った。ウエスタンブロッティングの結果Gliに相当するバンドを検出できた。最終的にZic1、Zic2、Zic3とGLI1、Gli2、GLI3とはZicとGliのどのような組み合わせでもそれぞれの複合体を形成することが分かった。また、Zic-Gli蛋白質間結合に必要な領域を決定するため、GLI3を様々な断片に分割化し、その領域を含むGST融合蛋白質を精製して、このGST融合蛋白質とZic1および様々なZic1変異蛋白質を発現させた細胞溶解液との間で結合実験を行った。その結果、ZicとGliとは互いにZnフィンガー領域で結合することが明らかになった。さらに、大腸菌で発現精製したZic1とGLI3蛋白質の精製蛋白質同士でも結合が見られたことから、この結合は他の因子を介さない直接的なものであることが示唆された。

次に、ZicとGliの細胞内局在について調べた。実験で使用した細胞株の全てにおいてZicは核に局在した。Gliは従来の研究報告の結果と同様に、細胞株により細胞質と核にさまざまな割合で分布した。NIH3T3細胞ではGLI3は細胞質に優位に存在した。ところが、Zicと共発現させたときには、GLI3が核に優位に局在して発現する細胞数の割合が上昇した。また、Zicとの結合に必要なZnフィンガーモチーフを除いたGLI3では、Zicと共発現させても細胞内での局在に変化が生じなかった。

次に、ZicとGliの転写活性における機能的相互作用について調べた。TKプロモーターの5'側にGBSを6つ付けた場合と付けない場合のルシフェラーゼ発現プラスミド(pGBS-TK-LucまたはpTK-luc)をレポーターにして、ZicとGliによる転写活性の制御を調べた。その結果、NIH3T3細胞ではZic1とGLI1を共発現させると協調的に転写活性が増強することが明らかになった。GLI3についても、GLI3とZic1とCBPの3者を共発現させるとGBS依存性のGLI3による転写の活性がZic1によって増強された。

(考察 1) 培養細胞におけるZicとGliの細胞内局在の実験結果では、Zicと共発現することで核に発現するGliの割合が増えることから、細胞内でZicとGliは相互作用をもつことが示唆された。またレポーターアッセイの結果、ZicはGliの核への局在を増加させるなどによって、GliのGBS依存性の転写活性を調節す

る可能性が示唆された。

Gli は Hh シグナルを介在する因子として知られているが、これまで Zic がどのようなシグナルを介在するかは分っていなかった。今回の研究の結果、Zic も Hh シグナルになんらかの影響をもつ因子として働いている可能性が示唆された。

今回の研究によって、Zic と Gli の関わる発生現象の分子的基盤の可能性のひとつとして、Zic と Gli との互いの Zn フィンガーモチーフを介した蛋白質間相互作用が関わっていることが示唆された。

(結果 2) Myc タグをツメガエル *Zic3*(*Zic3*)、マウス *Gli2*(*Gli2*)とマウス *NKL*(*NKL*) の cDNA につけた遺伝子を作製し、その mRNA をツメガエル胚の 2 細胞期の片側割球に注入し蛋白質を過剰発現させる実験を行った。そして中期神経胚で神経堤分化マーカー *Xenopus slug* の発現を *in situ* hybridization によって観察した。その結果、*NKL* を過剰発現させた側で神経堤領域の減少または消失が観察された。また、従来の研究報告と同様に、*Zic3* を過剰発現させた場合は神経堤領域の拡大が観察され、*Gli2* の場合は *NKL* と同様に神経堤領域の減少が見られた。そこで *Zic3* と *NKL* を同時に過剰発現させたところ、神経堤領域の *Zic3* による拡大と *NKL* による減少の効果が互いに打ち消され、内在性の発現パターンに近づいた。この現象は *Zic3* と *Gli2* を同時に過剰発現させた場合にも観察された。また、*Zic3* を過剰発現させると神経堤細胞に由来する色素細胞の細胞塊が生じることが分かっているが、*NKL* と *Zic3* の共発現により色素細胞の細胞塊は減少した。

ゲルシフトアッセイの結果、*NKL* は Zn フィンガー領域で GBS に結合することが報告されている。そこで *NKL* が GBS 依存性の転写活性を示すかを調べた。レポーター遺伝子として pGBS-TK-Luc または pTK-luc を、*NKL* または *Zic3* mRNA と同時に 2 細胞期のツメガエル胚に注入した。後期胞胚期にアニマルキャップと呼ばれる動物極側表皮予定外胚葉領域を切り取り培養し、姉妹胚が中期神経胚に達した時期にルシフェラーゼの発現量を測定した。その結果、*NKL* は GBS 依存的にルシフェラーゼの発現を抑制した。*Zic3* は TK プロモーターに反応してルシフェラーゼの発現を僅かながら増強した。さらに、*Zic3* と *NKL* を同時に発現させた場合、*NKL* の発現量の増加に応じて *Zic3* による転写活性化作用は抑制された。

次に、*NKL* は *Zic* や *Gli* に良く似た Zn フィンガー構造をもつことから、*Zic* と *NKL* の結合の可能性を免疫沈降反応によって調べた。その結果 *Zic* と *NKL* は *Zic* と *Gli* の場合と同様に Zn フィンガーモチーフを介して結合することが明らかになった。また、293T 細胞や NIH3T3 細胞では *NKL* は *Zic* と同じように核に局在していた。しかし、*NKL* の Zn フィンガーモチーフを除くと核への局在はなくなり、細胞全体に発現するようになった。

(考察2) 以上の結果から、神経堤発生の過程では *NKL* は *Gli* と同じように抑制的に働き *Zic3* とは拮抗的な作用をもつことが示唆された。

転写活性の実験では、*NKL* は GBS 依存的に抑制な転写活性を示したことから、*NKL* は *in vivo* で GBS 様の配列に結合して転写を抑制的に調節する可能性が示唆された。また、*Zic* と *NKL* は転写制御のレベルでも相互作用をもつ可能性が示唆された。

さらに、*NKL* の Zn フィンガーモチーフを除いた蛋白質では、核への局在が観察されなくなることから、Zn フィンガーモチーフに核移行シグナルが存在する可能性が示唆された。

(結論) 今回の2つの研究から *Zic*、*Gli*、*NKL* 蛋白質の Zn フィンガーモチーフは、蛋白質間相互作用に利用されることが明らかになった。今回の研究によって、*Zic*、*Gli*、*NKL* が関わる発生過程における機能的な相互作用の分子的基盤の可能性のひとつとして、*Zic*、*Gli*、*NKL* 蛋白質の Zn フィンガーモチーフを介した蛋白質間相互作用の関わりが示唆された。