

論文の内容の要旨

論文題目

Study on the regulation of gene expression by secreted signaling factor Sonic hedgehog
分泌性シグナル因子 Sonic hedgehog による遺伝子発現制御に関する研究

指導教官 中福 雅人 助教授

東京大学医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 深見 伸一

【研究目的】

脳神経系は、高次の神経・精神活動を担う器官であり、その機能は多様な形態と機能をもったニューロン群によって担われている。この神経系を構成する多様なニューロン群は、神経幹細胞と呼ばれる多分化能と自己複製能を保持する細胞が、様々な因子によって多段階の制御を受け、特定の個性をもつ細胞へと分化することにより形成される。この過程を理解することは、神経発生学の基本的な命題のひとつである。またその知見は、特定のニューロンの障害によって起こる種々の神経疾患の病態の理解、有効な治療法の開発にも貢献することが期待される。

近年、神経系の様々なニューロン群の形成過程において、分泌性シグナル因子が重要な役割を担っていることが明らかとなりつつある。しかしながら、これらの因子の細胞内シグナル伝達経路については、ほとんど明らかにされていない。

そこで、本研究では脳神経系における背腹軸に沿った細胞の特異化に重要な役割を演じる分泌性シグナル因子である Sonic hedgehog (Shh)に着目し、その細胞内シグナル伝達を明らかにすることを目的とした。

【研究結果と考察】

本研究では、Shh 応答性を保持した神経幹細胞由来の細胞株である MNS-70 細胞を主たるモデル系として実験を行った。これまでの研究により、この細胞株は Shh に応答して、神経系腹側特異的な遺伝子を発現することが明らかとなっている。

これまでのショウジョウバエの遺伝学を用いた解析から、Shh シグナル伝達に関与が示唆される分子が報告されている。その脊椎動物相同遺伝子として Suppressor of fused [Su(fu)]が、共同研究者であるトロント大学の C-C. Hui 博士らによって単離された。予想される Su(fu)遺伝子産物は、485 アミノ酸残基よりなる。その1次構造はショウジョウバエ Su(fu)とほぼ全長にわたって類似していた。また、Su(fu)にはショウジョウバエ Su(fu)以外の既知のタンパク質との有意な相同性、あるいは特定の機能を類推させるドメインは同定されなかった。

私はまず Hui 博士との共同研究により、MNS-70 細胞における Shh シグナル伝達構成分子の発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、Shh の受容体を構成する Ptc と Smo、転写因子 Gli2, Gli3 及び Su(fu)の mRNA は、構成的に発現していた。一方、Gli1 については検出限界以下であったが、Shh のシグナル活性を担うとされる N 末端断片(Shh-N)の刺激により著明な増加が観察された。

次に、Shh シグナル伝達における Gli 転写因子の機能を解析するため、Gli 結合配列を含むレポーターを用いた実験を行った。このレポーターは、MNS-70 細胞において Shh-N 依存的に活性化された。Gli 結合配列に変異を導入したレポーターではこのような活性化は起こらないことから、この活性化は Gli のレポーターへの直接の結合を介していると考えられた。同様の系を用いて Gli1, Gli2, Gli3 の発現プラスミドを導入すると、Gli1, Gli2 では活性化が、一方 Gli3 では抑制が観察された。従って、MNS-70 細胞における Shh による遺伝子発現誘導は、主に Gli1, Gli2 を介していると考えられた。

同様の系を用いて、Su(fu)の機能解析を行った。Su(fu)の単独高発現によっては、レポーター活性の変化は観察されなかった。しかし、Shh-N のレポーター活性化能に対する Su(fu)の効果を検討したところ、Shh-N 依存的なレポーター活性化が抑制された。また、Gli1, Gli2 に対しても抑制が観察された。従って、Su(fu)は Gli1, Gli2 のもつ転写活性化能に対して抑制的に作用し、結果として Shh による遺伝子発現を負に制御する因子であることが示唆された。

さらに、Su(fu)と Gli 転写因子とのタンパク質レベルの相互作用を免疫沈降実験により検討した。その結果、Su(fu)は Gli1-3 いずれとも複合体を形成し得ることが

示された。各種 Gli1 欠失変異体を用い、Su(fu)との相互作用に寄与するドメインについて検討した結果、DNA 結合能を担うとされる Zn-finger ドメインのみでは相互作用は検出されず、Zn-finger ドメインの N 末端側、C 末端側のドメインが各々独立に相互作用した。

次に、Gli1 の N 末端側、C 末端側各々における Su(fu)との相互作用が Gli1 の転写活性化能にどのように影響するのか検討するため、各種欠失変異体に対する Su(fu)の効果を検討した。Gli1 は C 末端に転写活性化に必要なドメインをもつ。そこで、このドメインを欠失した変異体には、ウイルス由来の転写活性化因子である VP16 を融合し転写活性化能をもたせた。その結果、N 末端側、C 末端側のいずれか一方の相互作用ドメインをもつ変異体は、Su(fu)の共発現により転写活性化を抑制された。また、N 末端側、C 末端側いずれのドメインも欠失した変異体は、転写抑制を受けなかった。この結果は、各種変異体と Su(fu)とのタンパク質レベルでの複合体形成の有無とよく一致していた。すなわち、Su(fu)は Gli1 の N 末端側、C 末端側のいずれと結合した場合も、その転写活性化能を抑制すると考えられた。

次に、Su(fu)による Gli1 の抑制がどのような機構によるものなのか検討した。まず Su(fu),Gli1 の細胞内局在を間接蛍光抗体法により解析した。その結果、Su(fu)は核にも細胞質にも一様に存在し、Gli1 は主に核に存在したが、Su(fu)との共発現により、大部分の Gli1 の分布が細胞質に変化することが観察された。以上のことから、Su(fu)の抑制機構のひとつとして、Gli 転写因子を細胞質に保持する機構が存在すると考えられた。

さらに、Su(fu)を核・細胞質の各々に局在させた時の Shh-N,Gli2 の転写活性化能に対する効果を検討したところ、どちらの場合も Shh-N,Gli2 を抑制した。このことから、Su(fu)には Gli 転写因子の細胞質保持以外に核内においても抑制の機構をもつことが示唆された。

次に、Su(fu)の各種欠失変異体の作成を試みたところ、Shh-N の転写活性化能を増強する変異体を見い出した。また、この変異体は全長の Su(fu)に対してドミナントネガティブ型変異体[DN-Su(fu)]として機能し、Su(fu)の抑制活性を解除した。同様の効果は Gli2 に対しても認められた。さらに、この変異体はそれ単独で Gli 結合配列を含むレポーターを活性化しうることが判明した。このことは、内在性の Su(fu)の効果を阻害することにより引き起こされると推定された。すなわち、Shh 刺激の無い状態では既に発現している Gli2 を内在性の Su(fu)が抑制しており、Shh 刺激によりこの抑制が解除される機構の存在が示唆された。

そこでまず、この DN-Su(fu)が Gli2 と相互作用するか否かを検討したところ、全長の場合と同様に複合体を形成した。

次に、DN-Su(fu)の細胞内局在による効果を検討した。その結果、核に局在させた場合でのみレポーターの活性化が観察され、細胞質に局在させた場合では活性化は観察されなかった。

以上の結果より、DN-Su(fu)は細胞質における Gli2 との結合によりその効果を発揮するのではなく、結合後の核内での転写活性抑制のなんらかのステップに対して拮抗的に作用していると考えられた。

核内での Su(fu)による転写抑制機構の候補分子として、Histone deacetylase (HDAC) を介した転写抑制機構との関連性を解析した。まず、レポーターアッセイにおいて、HDAC の阻害剤である Trichostatin A が、Su(fu)の Shh-N 及び Gli2 に対する抑制活性を解除することを観察した。さらに、Gli2 に対する HDAC の効果を検討したところ、HDAC4 が用量依存的な抑制活性を示した。しかしながら、Shh-N に対してはほとんど抑制効果が見られなかった。さらに、Su(fu)と HDAC4 との相互作用を検討したところ、複合体を形成し、この複合体は Shh-N 依存的に解離することが観察された。従って、Su(fu)は核内で HDAC4 と結合して Gli の転写活性を抑制しており、Shh シグナルはこの結合を解離させることにより、Su(fu)による Gli の抑制を打ち消し、転写を活性化するというモデルが考えられた。

【結語】

神経系腹側特異化に必須の分泌性シグナル因子である Shh の細胞内シグナル伝達に関わる分子として Su(fu)の機能解析を行った。

Su(fu)は核及び細胞質の両方に存在し、各々の存在部位において Shh のシグナル伝達に対して抑制活性をもつことが明らかとなった。すなわち、細胞質においては Shh の標的遺伝子発現を担う転写因子である Gli 転写因子と結合し、局在を細胞質に限局させると考えられた。また、核内においては、HDAC と複合体を形成し、転写を負に制御していると考えられた。Shh 刺激により、この Su(fu)と HDAC との結合が解除され、その結果、標的遺伝子の発現が開始される機構の存在が示唆された。