

論文内容の要旨

論文題目

The functional analyses of SUMO modification in the Wnt signaling pathway during early *Xenopus* development

(ツメガエル初期発生における Wnt シグナル伝達系に対する SUMO 化修飾の機能解析)

氏名 雪田 聡

SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) 分子は sentrin、SMT3C と呼ばれるユビキチン分子に類似した約 100 アミノ酸からなるタンパク質で、SUMO 分子が標的タンパク質に結合する SUMO 化修飾はユビキチン化に類似したタンパク質翻訳後修飾である。SUMO 化修飾の反応経路はユビキチン化修飾と同様に SUMO 分子を活性化させる E1、活性化 SUMO 分子を運搬する E2、基質に SUMO 分子を結合させる E3 により触媒されるが、SUMO 化とユビキチン化とで触媒する酵素は異なっている。SUMO 化修飾経路は可逆的であり、SUMO 化されたタンパクから SUMO 分子を外す活性を持つ脱 SUMO 化酵素が複数同定されているが、基質特異性などについてはまだ未解明な部分が多い。SUMO 化修飾を受ける標的タンパク質は現在までに数多く報告されており、SUMO 化修飾によりその細胞内局在、安定性、転写活性が変化することが分かっている。このことから SUMO 化修飾は多くの生命現象に関与する重要なタンパク質翻訳後修飾であると考えられるが発生段階における SUMO 化修飾の役割については殆ど報

告がない。そこで私は発生段階における SUMO 化修飾の役割の役割について研究を行った。

第一章では、Wnt/ β カテニンシグナル伝達系における脱 SUMO 化酵素の役割を調査した。*Xenopus* (ツメガエル)を用いた研究などから、脊椎動物の発生段階において様々なシグナル伝達経路が厳密な調節を受けて重要な役割を担っている事が明らかになっている。その1つが Wnt/ β カテニンシグナル (カノニカル Wnt シグナル) であり、細胞質での β カテニンの分解を抑制することによりシグナルが伝達される。ツメガエル初期発生において、Wnt/ β カテニンシグナルに関与する因子が背腹軸の決定に重要な役割を担っている事が知られている。背腹軸の決定に関与する Wnt リガンドは決定されていないが、少なくとも将来背側となる領域には β カテニンの蓄積が認められ、*Siamois* や *Xnr3* といった標的遺伝子の転写活性を促進し、背側領域を決定すると考えられている。*Dishevelled* や β カテニンなど Wnt/ β カテニンシグナルの促進性因子を将来の腹側領域に過剰発現させると異所的な二次軸が誘導され、*Axin* や *GSK3 β* といった抑制性因子を背側領域に過剰発現させると頭部を含む背側構造の欠失が認められることから、Wnt/ β カテニンシグナルに関与する因子は背腹軸の決定する活性を持っている。

近年、Wnt シグナルに関与する因子のいくつかは SUMO 化修飾を受けうる事、および脱 SUMO 化酵素の1つである *Axam/SEN2* が Wnt/ β カテニン経路を抑制的に調節する事が報告され、Wnt シグナル伝達経路は SUMO 化修飾により何らかの調節を受けることが示唆されている。そこで、発生段階での Wnt シグナル伝達系における SUMO 化修飾の役割について解析したいと考え、脱 SUMO 化酵素である *Axam/SEN2* による Wnt/ β カテニン経路の抑制に着目し、ツメガエルを用いて研究を行った。ツメガエルにおいて脱 SUMO 化酵素についての報告は無かったので、脱 SUMO 化酵素群で保存されている C 末端側領域に相同性の高いツメガエル EST 配列をもとにスクリーニングを行った。その結果、ツメガエルではじめて脱 SUMO 化酵素と予想される配列を同定し、*Xenopus SEN1* (*XSEN1*)と名付けた。*XSEN1* mRNA は母性因子としてツメガエル卵に存在し、脱 SUMO 化活性を実際に有している事を確認した。さらに、*XSEN1* mRNA の顕微注入によって、ツメガエル胚は背側前方構造の欠損した表現型を示し、Wnt/ β カテニンシグナルの標的遺伝子の1つである *Xnr3* の発現を抑制することが分かった。この事は *XSEN1* が *Axam/SEN2* と同様に Wnt/ β カテニンシグナルの伝達を抑制する活性を持つ事を示唆している。その一方で、*Axam/SEN2* はその脱 SUMO 化活性により β カテニンの分解を促進する事が報告されているのに対し、*XSEN1* の過剰発現による β カテニンの分解促進は認められなかった。このことは *XSEN1* が *Axam* とは異なる

る作用で Wnt/ β カテニンシグナルを抑制していることを示唆している。また、Wnt/ β カテニンシグナルの促進性因子との共発現から、XSENP1 は β カテニンの下流かつ、標的遺伝子の 1 つである *Simois* の上流で Wnt/ β カテニンシグナルを抑制することが示された。近年、Wnt/ β カテニンシグナルにおいて転写因子として機能する Tcf4 が SUMO 化を受ける事で転写因子としての活性が上昇する事が報告された。この事と XSENP1 が主に核内に局在するという本研究での知見と併せて、核内において XSENP1 は転写因子 Tcf ファミリーの SUMO 化を阻害し Tcf の活性を抑えることで Wnt/ β カテニンシグナルを負の方向へ調節するモデルを考えている。

第 2 章では、脱 SUMO 化酵素だけではなく SUMO 化修飾のツメガエル発生段階での役割も知りたいと考え、*Xenopus* SUMO-1 (XSUMO-1)分子および SUMO 化修飾において E2、E3 として機能する *Xenopus* UBC9 (XUBC9)、*Xenopus* PIASy (XPIASy)の過剰発現、および XSUMO-1 のモルフォリノオリゴ(XSUMO-1-MO)による機能阻害実験を行った。第 1 章より、これらの SUMO 化因子が Wnt/ β カテニンシグナルの伝達を促進すると予想し腹側への過剰発現を行った。しかし、予想に反して SUMO 化因子の過剰発現による異所的な二次軸の誘導や標的遺伝子の発現の促進など、Wnt/ β カテニンシグナルの活性化は認められなかった。一方、SUMO 化因子をツメガエル卵の動物極側へ過剰発現すると、軸の伸長および神経管の形成に不全が認められた。この表現型はツメガエルにおいて Wnt/PCP(細胞内平面極性 : Planar cell polarity)経路に関与している因子を過剰発現及び機能阻害した場合に観察される表現型に類似している。Wnt/PCP 経路はショウジョウバエにおける翅の小毛の極性、ツメガエルやゼブラフィッシュにおける原腸胚期の細胞運動の制御などに関与することが報告されている。Wnt/PCP 経路も Wnt/ β カテニン経路と同様に、Wnt リガンドが受容体である Frizzled (Fz)に結合することによってシグナルが細胞質へと伝えられる。細胞質中では Dishevelled (Dsh/Dvl)を介して Rho および Rac が活性化され、JNK(c-Jun N-terminal kinase)による c-Jun のリン酸化レベルを上昇させる事で細胞極性を制御している。表現型の類似性から、SUMO 化因子の過剰発現および XSUMO-1 の機能阻害による表現型が Wnt/PCP 経路の調節を介して原腸胚期の細胞運動に関与しているのではないかと予想した。ツメガエル後期胞胚の動物極側から切り出した予定外胚葉領域(アニマルキャップ)をアクチビン処理すると、アニマルキャップは伸長する。この伸長は原腸陥入時の細胞運動を模倣していると考えられている。実際にドミナントネガティブ Wnt-11 や Fz などの過剰発現によって Wnt/PCP シグナルの伝達を乱した胚から切り出したアニマルキャップはアクチビン処理による伸長が阻害される。XSUMO-1-MO によって XSUMO-1 を機能阻害させた胚から切り出したアニマルキャップも同様にアクチビン処理による伸長

が大きく阻害されていた。さらにXSUMO-1 mRNAを過剰発現させることによってc-JunのN末側におけるリン酸化レベルの上昇が認められた。以上のことから、XSUMO-1の過剰発現および機能阻害の結果からSUMO化修飾の標的タンパク質は不明ではあるが、何らかの因子のSUMO化修飾によりWnt/PCPシグナル伝達を正の方向に調節する事で原腸胚期の細胞運動の調節を行っている事が考えられる。

本研究は第1章において脱SUMO化酵素の1つであるXSENP1を、第2章ではSUMO分子の1つであるXSUMO-1、およびSUMO化修飾を促進する酵素XUBC9、XPIASyのツメガエル発生段階における機能を解析した。その結果、SUMO化修飾はWnt/ β カテニンシグナル伝達の調節及び、Wnt/PCP経路を介して原腸陥入時の細胞運動に関与することが示唆された。現在までに様々なタンパクがSUMO化修飾を受けることが報告されており、発生段階においても本研究で得た知見の他にも多様な役割を担っている事が予想される。発生段階でのSUMO化修飾の役割を解析することは複雑に制御されている発生現象のさらなる解明の一助となることが期待される。