

論文の内容の要旨

論文題目：ヘッジホッグシグナルにおける転写因子 Gli の新規結合因子の
同定とその生物学的意義の検討

指導教官：小俣政男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名：浅岡 良成

研究の背景および目的

Gli タンパク質はヘッジホッグシグナルの標的遺伝子の発現制御に関わる Zn フィンガーをもつ転写因子である。このシグナル伝達経路は *Drosophila* からヒトにいたるまで発生のプロセスにおいて中心的な役割を果たしており、これらの異常により、様々な先天奇形や癌が発生することが報告され、そのシグナル伝達機構は主に *Drosophila* の系において詳細に検討されている。しかし、哺乳類では、不明な点も多い。*Drosophila* において転写因子は Ci の一つのみであるが、哺乳類では役割分担が不明な 3 種類の Gli 転写因子が存在する。また、Ci と複合体を形成する Cos-2 や Fu の homologue などは明らかとなっていない。一方で、ヒトの癌において、基底細胞癌や髄芽腫で、ヘッジホッグシグナルを構成する分子の変異が明らかとなっている。最近では、膵臓などの上部消化器癌や肺癌、前立腺癌、乳癌においても、腫瘍の発生あるいは維持にヘッジホッグシグナルが重要な役割を果たすという報告が相次いでいるが、これらの癌では責任分子が必ずしも明らかとなっていない。このため、哺乳類におけるヘッジホッグシグナルの新たな構成因子を同定することは、この経路を明らかにするのに役立つだけでなく、腫瘍の発生、維持の機構を解明する一助になると考えられた。

そこで、今回、2つの affinity タグ (myc および Flag) と TEV プロテアーゼによる切断部位を直列につないだダブルタグ (MEF タグ法) による affinity purification の手法と質量分析計を用いて Gli の新規結合タンパクの同定を行い、その機能解析を行った。

方法

MEF タグによる組換え Gli1 をヒト胎児腎細胞で強制発現させ、この細胞抽出液

を抗 myc 抗体・抗 Flag 抗体を固相化したビーズとインキュベーションし、結合分子の affinity purification を行った。特異的に結合したタンパク質を電気泳動後、銀染色し、バンドを切り出して、ハイブリッド（四重極—飛行時間）型の質量分析計（Q-TOF2, Micromass Wythenshawe, UK）にてシーケンスを行った。さらに、同定したタンパク質との結合に関して生物学的意義の検討を行った。

結果

Gli1 の新規結合因子として 14-3-3 を見出した。

14-3-3 は結合タンパク質中のリン酸化された特異的な配列に結合することが知られている。mutagenesis により予測結合部位に変異を導入した Gli1 を作成し、遺伝子導入、14-3-3 との免疫沈降を行った。これにより 640 番目と 659 番目のセリンが結合部位であることがわかった。640 番目のセリンは PKA によるリン酸化配列であることが知られていたため、PKA を活性化した状態で再度、免疫沈降を行い、結合が増強することを示した。また、リコンビナントタンパクを用いた in vitro kinase assay を行い、この配列が PKA によりリン酸化されることを確認した。

Gli2 および Gli3 も同様の手法により Gli1 と相同な領域（Gli2 では 956 番目のセリン、Gli3 では 1006 番目のセリン）で 14-3-3 が結合し、この部分も PKA によりリン酸化されることを in vitro kinase assay で確認した。

Gli の転写活性にこの結合が関与するかレポーターアッセイを行い、検討した。Gli 結合配列をプロモーターにもつルシフェラーゼプラスミドを Gli の野生株あるいは 14-3-3 に対する結合部位の変異体とともに遺伝子導入し、転写活性を測定した。PKA を活性化した条件で Gli2 でのみ有意差を認め、野生株は 14-3-3 と結合しない変異体と比較し、転写活性が低下する傾向を認めた。

この転写活性への影響が細胞内局在の変化によるものか免疫細胞染色を行い、検討した。Gli2 において、野生株、変異体いずれも核に局在し、PKA を活性化した条件でも核に局在したため、この結合は細胞内局在の変化には影響しないと考えられた。

考察

本研究で、Gli2 が PKA によるリン酸化依存的に 14-3-3 と結合し、転写活性が低下することが示された。Gli1 と Gli3 も相同な領域で PKA によるリン酸化依存的に結合したが、これらでは転写活性への影響は明らかとならなかった。PKA は vivo でヘッジホッグシグナルを負に制御することが知られていたが、その機序はリン酸化とそれに引き続くプロセッシング、リプレッサーの形成によると考えられている。今回の 14-3-3 との結合は新たなヘッジホッグシグナル伝達機序

を示したものと考えられる。転写活性低下の機序として、14-3-3 は BAD、FOX 転写因子 FKHRL1 やヒストン脱アセチル化酵素 HDAC とリン酸化依存的に結合し、その細胞内局在を変化させることで機能の制御を行うことが知られている。このため、今回の Gli と 14-3-3 との結合も細胞内局在に影響を与えるか検討したが、免疫細胞染色で明らかな変化を認めなかった。この結合は Gli2 の転写活性に影響を与えるが、Gli1 には影響を与えないこと、Gli2、3 とのみ結合する転写コアクチベーター CBP との結合領域が 14-3-3 結合領域の近傍に位置することから、この結合に影響を与える可能性があり、今後の検討を要する。また、最近、JNK により 14-3-3 自体がリン酸化をうけ、結合が低下するという機序も報告されている。ヘッジホッグシグナルは、組織傷害時の幹細胞プールの維持に重要であると考えられているため、今回の系を介して、細胞ストレス→JNK の活性化とヘッジホッグシグナルとのクロストークがあるか興味深い。

結語

MEF タグ法による affinity purification と質量分析計を用いて、Gli の新規結合因子 14-3-3 を見出した。この結合は PKA によるリン酸化依存的であり、Gli2 および Gli3 も PKA によるリン酸化配列を介して 14-3-3 と結合した。Gli2 においてのみこの結合が転写活性を低下させた。この研究は、ヘッジホッグシグナルの新たな伝達機序を示したものである。