

論文の内容の要旨

Hedgehog シグナル伝達における Fu、Sufu の機能解析

指導教員 吉田 進昭 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

木瀬 孔明

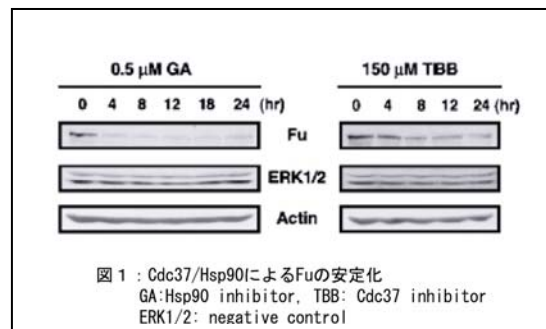
Hedgehog (Hh) シグナルはショウジョウバエから哺乳動物まで保存されているシグナル伝達経路であり、発生時に細胞の分化、増殖を制御している。また Hh シグナルの亢進が基底細胞癌、髄芽腫といった細胞癌化と関連していることも知られている。したがって、Hh シグナルのメカニズムを理解することは生物学上、医学的応用上も非常に意義がある。

<第1部 Fu の機能解析>

Fused (Fu) はショウジョウバエの Hh シグナル伝達に必要なリン酸化酵素 (キナーゼ) である。ショウジョウバエにおいて Fu は転写因子 Cubitus interruptus (Ci) の転写活性を高レベルに上昇させる働きがある。哺乳動物でも Fu が Ci のホモログ Gli の活性を正に制御していることが期待されるが、Fu のノックアウトマウスは水頭症で生後まもなく死ぬものの、Hh シグナルの異常と見られる表現型は確認されておらず、哺乳動物 Fu の役割はよくわかっていない。

本研究では哺乳動物 Fu の機能解析の手がかりとして、Fu の結合タンパク質を探索し、キナーゼ特異的なシャペロン複合体 Cdc37/Hsp90 を同定した。Fu が Cdc37/Hsp90 によって安定化されているのかを調べるために、細胞を Hsp90 阻害剤 Geldanamycin(GA)で処理したところ、Fu の存在量が急速に減少することがわかった (図 1)。Cdc37 とその標的キナーゼとの相互作用には casein kinase 2(CK2)による Cdc37 の Ser13 リン酸化が必要である。Cdc37 の Fu 安定化に対する重要性を調べるために、細胞を CK2 阻害剤 TBB で処理したところ、Fu の量は時間経過に伴い減少した (図 1)。これらの結果は Cdc37 も Fu の安定化に寄与していることを示唆している。

GA による Fu の存在量の減少メカニズムを調べるために、Fu を ³⁵S でラベルし、その後の挙動を GA 処理あ

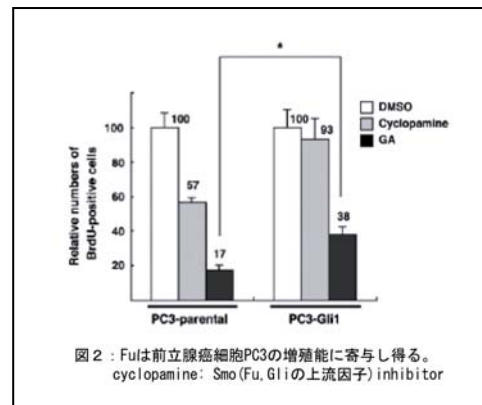


りなしで比較したところ、GA 処理によって、Fu の半減期が減少することがわかった。これにより、GA による Fu の存在量の減少は、Fu タンパク質の分解促進によることがわかった。GA によって引き起こされる Fu の分解経路を調べるために、細胞を GA およびプロテアソーム阻害剤、リソソーム阻害剤で処理し、Fu の存在量を調べたところ、プロテアソーム阻害剤でのみ GA による Fu の分解が抑えられた。このことから、Fu の分解はプロテアソーム依存的であることが示唆された。プロテアソームによる分解には、標的タンパク質のユビキチン化が重要である。Fu もユビキチン化されるのかについて調べるために、プロテアソーム阻害剤と GA で処理した細胞の溶解液から Fu を免疫沈降し、抗ユビキチン抗体でウエスタンブロッティングした。すると、プロテアソーム阻害剤処理したサンプルには本来の Fu のバンドの上にスミアなシグナルが見られ

た。これはポリユビキチン化された高分子量 Fu の形成を示唆している。

Fu の、Ci のホモログ Gli1、Gli2 活性への効果を調べるために、ルシフェラーゼアッセイを行った。すると Gli1、Gli2 の発現量とレポーター活性が、Fu を共発現させることによって上昇することがわかった。そして GA 処理によって Fu の分解を誘導すると、その効果が失われることもわかった。Fu が Gli を安定化しているのかを調べるために、Gli1 を ³⁵S でラベルし、Fu の存在下、非存在下での Gli1 の半減期を調べたところ、Fu によって Gli1 の分解が抑えられることが示唆された。次に Fu の Gli1 ユビキチン化に対する効果を調べたところ、Gli1 のユビキチン化レベルが Fu の共発現によって抑えられていることがわかった。これらのことから、Fu は Gli1 のユビキチン化を抑えることで Gli1 を安定化し、Gli1 のレポーター活性の上昇に寄与していることが示唆された。

前立腺癌由来の細胞 PC3 では、Hh シグナルが高く活性化され、またその増殖が Smoothened の阻害剤 cyclopamine で抑制されることが報告されている。そこで Fu が Gli を安定化することによって PC3 細胞の増殖に寄与し得る可能性について検討した。



PC3 細胞を GA 処理すると Fu が分解し、細胞増殖能が減少した。次に、Hh シグナルの抑制が GA 処理の効果に関与していることを確かめるために、myc-Gli1 を安定に発現する PC3 細胞株 (PC3-Gli1) を作成した。PC3-Gli1 細胞を GA 処理すると、PC3 親株と比べて増殖阻害が一部救済されることがわかった (図 2)。これらの結果より、GA 処理によって PC3 細胞の Hh シグナルが抑制されること、また Fu は Gli1 を安定化することによって PC3 細胞の増殖に寄与しているかもしれないことが示唆された。

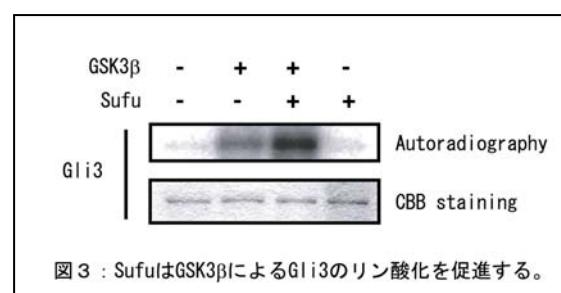
<第2部 Sufuの機能解析>

ショウジョウバエの Suppressor of fused (Sufu) は転写因子 Ci と結合し、Ci の核移行を阻害することが示唆されているが、*sufu* 変異体には特に表現型が現れない。一方、*Sufu* のノックアウトマウスは恒常的な Hh シグナルの活性化を示し、胚性致死となることから、哺乳動物では Sufu が Hh シグナルの主要な抑制因子と考えられている。しかしながら、Sufu が細胞内強制発現系で Gli の核移行を抑制することが知られているものの、細胞内在性 Sufu による Hh シグナルの抑制メカニズムに関してはよくわかっていない。今回、マウス Sufu の結合タンパク質を探索したところ、GSK3 β が同定された。GSK3 β は Hh 非存在下において転写因子 Gli3 をリン酸化して、Gli3 の限定分解（プロセッシングという）による転写抑制因子の生成を誘導することが知られている。まず始めに、Gli3 と GSK3 β との結合に Sufu がどう影響するのかを調べたところ、*in vitro* において Sufu が Gli3 と GSK3 β との結合を仲介することがわかった。次に GSK3 β による Gli3 のリン酸化における Sufu の効果を、*in vitro* キナーゼアッセイにより調べたところ、Sufu の存在下で Gli3 のリン酸化が促進されることがわかった（図3）。以上のことから、Sufu が GSK3 β を Gli3 に引き寄せることによって Gli3 のリン酸化を促進することが *in vitro* で示唆された。そして Gli3

のプロセッシングに必要とされる GSK3 β のリン酸化部位をアラニンに置換した変異体を作成し、GSK3 β による *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、Sufu

は *in vitro* で Gli3 の Ser903 のリン酸化を主に促進することがわかった。

次に、実際に細胞内で Sufu が Gli3 のプロセッシングに必要なのかを検証するために、C3H10T1/2 細胞で Sufu をノックダウンしたところ、プロセッシング型



Gli3-83 の生成が阻害されることがわかった。さらに、*Sufu* のノックアウトマウス由来の胎児繊維芽細胞 (MEF) での Gli3 プロセシングの有無を調べたところ、Gli3-190 は存在するものの、Gli3-83 は検出されなかった。*Sufu* ノックアウト MEF に対して、*Sufu* 発現用レトロウイルスを感染させて *Sufu* の発現を戻してやると、Gli3-83 のバンドが検出された。これらの結果から、*Sufu* が Gli3 のプロセシングに必要であることが強く示唆された。

次に、*Sufu* によって GSK3 β を Gli3 へ引き寄せることが、Gli3 のプロセシングに重要なのかを検証した。GSK3 β の *Sufu* における結合部位を詳細に調べ、Gli3 とは結合するが、GSK3 β とは結合できない *Sufu* の変異体 *Sufu*(Δ GSK) を作成した。次にノックダウン耐性の myc-*Sufu*(野生型 : WT) および myc-*Sufu*(Δ GSK) の安定発現細胞株を C3H10T1/2 細胞より樹立した。myc-*Sufu*(WT) 発現株に *Sufu* の siRNA を導入しても、Gli3-83 の生成が維持された。一方、myc-*Sufu*(Δ GSK) 発現株では、siRNA 導入後も *Sufu*(Δ GSK) の発現が維持されているにもかかわらず、Gli3-83

の生成が阻害された (図 4)。この結果は、Shh 非存在下において *Sufu* が GSK3 β を Gli3 に引き寄せることによって、Gli3 のリン酸化とプロセシングがなされる、というストーリーを強く支持するものである。

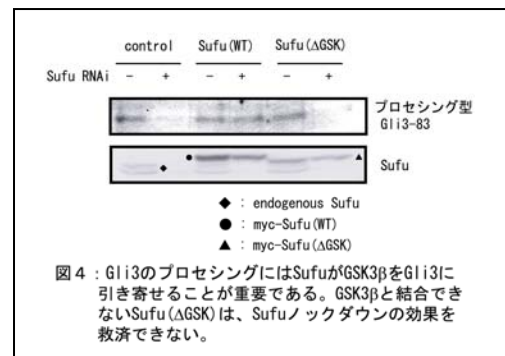


図 4 : Gli3 のプロセシングには *Sufu* が GSK3 β を Gli3 に引き寄せることが重要である。GSK3 β と結合できない *Sufu*(Δ GSK) は、*Sufu* ノックダウンの効果を救済できない。

最後に、Shh 刺激後の *Sufu*/GSK3 β /Gli3 複合体の挙動について検討した。Shh 刺激ありなしでの C3H10T1/2 細胞の細胞溶解液を抗 *Sufu* 抗体で免疫沈降し、GSK3 β および Gli3 の共沈量の変化を調べたところ、Shh 刺激によって GSK3 β の共沈量は変わらなかったのに対して、Gli3 の共沈量が減少していることがわかった。以上の結果より、Shh 刺激によって、何らかのメカニズムで *Sufu*/GSK3 β

複合体が Gli3 から解離することで Gli3 のリン酸化とプロセッシングが抑えられ、全長の Gli3 が核移行して標的遺伝子の転写を開始する、というシグナル伝達のモデルが提起された。