

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 木瀬 孔明

近年、胚発生に重要な役割を果たしている Hedgehog(Hh)シグナル伝達のメカニズムがシヨウジョウバエと哺乳動物とで異なっていることが示唆されている。本研究は、Hh シグナル伝達因子 Fused (Fu) と Suppressor of fused (Sufu) の哺乳動物における機能解析を行うための手がかりとして、それらの結合タンパク質を同定し、Fu、Sufu とその結合タンパク質との複合体の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1-1. Fu の結合タンパク質として、キナーゼのシャペロンである Cdc37/Hsp90 複合体を同定した。細胞を Hsp90 阻害剤 Geldanamycin(GA)あるいは Cdc37 の間接的阻害剤 TBB で処理したところ、Fu の存在量が減少した。また GA 処理によって Fu の半減期が減少することがわかり、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示唆された。これらの結果から、Cdc37/Hsp90 は Fu の安定化に寄与することが示唆された。さらに、Fu はユビキチン化を受けて、プロテアソーム経路で分解されることも示唆された。
- 1-2. Fu の転写因子 Gli1 活性への効果をレポーターアッセイで調べたところ、Gli1 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。この現象のメカニズムを調べたところ、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。
- 1-3. 前立腺癌由来の PC3 細胞の増殖は、Hh シグナルに大きく依存しているとされている。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、myc-Gli1 を過剰発現する PC3 細胞株を 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。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。
- 2-1. Sufu の結合タンパク質を探索したところ、GSK3βが同定された。GSK3β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、Hh シグナルの負の制御因子である。GSK3βが Gli3 をリン酸化する過程において、Sufu は *in vitro* で GSK3β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示唆された。そ

して *Sufu* は *Gli3* のプロセッシングに必要とされる *GSK3β* のリン酸化部位の 1 つである *Ser903* のリン酸化を主に促進することがわかった。

- 2-2. *C3H10T1/2* 細胞で *Sufu* をノックダウンすると、*Gli3* のプロセッシングが阻害された。さらに、*Sufu* のノックアウトマウス由来のマウス胎児繊維芽細胞でも *Gli3* のプロセッシングが阻害されており、また *Sufu* の発現を戻すことによってプロセッシングが引き起こされることもわかった。これらの結果から、*Sufu* が *Gli3* のプロセッシングに必要であることが強く示唆された。
- 2-3. 次にノックダウン耐性の野生型 *Sufu* (WT) あるいは、*Gli3* とは結合するが *GSK3β* とは結合できない変異体 *Sufu*(Δ *GSK*)の安定発現細胞に *Sufu* の siRNA を導入すると、*Sufu*(WT)発現細胞では *Gli3* のプロセッシングが維持されたのに対して、*Sufu*(Δ *GSK*)発現細胞では *Gli3* のプロセッシングが阻害された。この結果は、*Sufu* が *GSK3β* を *Gli3* に引き寄せることが、*Gli3* のリン酸化とプロセッシングに重要であることを強く示唆している。
- 2-4. また、*Hh* 刺激によって *Sufu* と *GSK3β* の結合は維持されたのに対して、*Sufu* と *Gli3* の結合が減少することがわかった。以上の結果より、*Hh* 刺激によって、*Sufu*/*GSK3β* 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、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。

以上、本論文では (1) 哺乳動物 *Fu* が *Cdc37/Hsp90* によって安定化されることを見出し、この性質を利用して、*Fu* が転写因子 *Gli1* を安定化することによって *Hh* シグナルの出力を上昇させること、(2) 哺乳動物 *Sufu* が転写因子 *Gli3* の活性を負に制御するキナーゼのリクルーターをして働くこと、を明らかにした。これらの機能はショウジョウバエにおいて報告のないものであり、本研究は哺乳動物における *Hh* シグナル伝達のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。