

学 位 論 文 題 名

Patched 細胞質断片の生成を介した
新規発癌抑制機構に関する研究

学位論文内容の要旨

Patched は、細胞の分化と増殖をコントロールする細胞外分泌蛋白質 Sonic Hedgehog (shh) の 12 回膜貫通型レセプター蛋白質である。Patched が機能不全を起こすと胚性致死になることが知られており、生物の初期発生に必須の蛋白質であると考えられている。また、Patched はヒトにおいて皮膚癌の中でも世界で最も罹患患者数の多い基底細胞癌(Basal Cell Carcinoma) や、脳腫瘍(Medulloblastoma)等の癌の抑制遺伝子としても知られており、Patched の変異によってこれらの癌が発症することが明らかとなっている。

今日まで、Patched 研究は主に形態的な発生遺伝学の分野で進められてきたが、近年 Patched の蛋白質としての重要性に着目した生化学的解析が進みつつあり、その結果 shh を受容する Patched 細胞外領域の機能が明らかになってきた。しかし、Patched 細胞内領域の機能は全く明らかとなっていない。嶋田らはこれまでに Patched 線虫ホモログのひとつである TRA-2 において、第 7 細胞質ドメイン (ICD7) が膜直下で切断され、核内移行することでシグナルを核内に伝達していることを明らかにしたが、哺乳動物において同様の現象が起こるかは不明であった。さらに、BCC 発症患者の Patched 解析により、Patched ICD7 の 1 アミノ酸置換が BCC の原因となっていることが報告されているが、発癌に至る機構は明らかでない。

本研究では、以上の知見より Patched ICD7 の重要性に着目し、ヒト培養細胞を用いて Patched ICD7 の機能を解析した。その結果、Patched ICD7 がリン酸化、プロセッシングを受け、その切断断片が核内に移行することを新しく見出した。さらに第 7 細胞質ドメインに核移行性蛋白質である p32 が結合し、Patched ICD7 切断断片の核移行を調節しているという新知見を得た。また、報告されている発癌性点突然変異により、Patched ICD7 の安定性が低下し、そのことが起因となって発癌因子である核内転写因子 Gli1 が活性化することも発見した。

まず、Patched の機能を解析する目的で、ヒト全長 Patched 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、シングルコピーを HeLa 細胞遺伝子に導入することで、Patched の安定発現細胞株を構築した。その結果、分子量 150kDa の全長 Patched の発現を確認すると同時に、C 末端タグにのみ反応する断片が生成していることが明らかとなった。N 末端と C 末端それぞれのタグで免疫染色したところ、Patched N 末端と C 末端では細胞内局在パターンが異なり、N 末端側は細胞質にドット状に分布する一方で、C 末端側は核内に移行していることが明らかとなった。同様の結果は細胞分

画でも確認できた。また、Patched ICD7 C 末端20アミノ酸を抗原とする抗体を用いて、内在性 Patched の C 末端を観察したところ、同様に核に蓄積していることも確認された。生成する Patched C 末端断片の分子量はほぼ ICD7 の大きさに相当すること、また断片のほぼ全量が核内に移行していることから、全長 Patched のプロセッシングにより生じた ICD7 相当断片が核内に移行しているものと考えられる。線虫 TRA-2 の ICD7 断片は転写因子 TRA-1 の活性を直接調節すること、また Patched の下流ターゲットとして TRA-1 ホモログの Gli1 が同定されていることから、一番可能性が考えられるのが、Patched C 末端断片が癌原性転写因子 Gli1 と相互作用することである。そこで、Gli1 をターゲットにしたレポーター解析を行った。Patched 安定発現細胞株で Gli1 の活性が抑制されると同時に、Patched ICD7 断片のみの発現でも全長 Patched と同程度 Gli1 の活性を抑制することが明らかとなった。この結果は、Patched ICD7 の核内ターゲットが Gli1 であることを示している。

Patched は常時プロセッシングを受けるわけではなく、その調節には何らかのシグナルが必要であることが考えられた。そこで Patched ICD7 を過剰発現させ、解析したところ、リン酸化を受けていることが明らかとなった。また、各種変異体を作成することによって、リン酸化修飾を受けない変異体を作成、観察したところ、Patched C 末端断片の生成が確認できず、全長のまま発現していることが確認された。これにより、Patched はリン酸化修飾を受けることによって、そのプロセッシングが調節されていることが明らかとなった。

生成する Patched C 末端断片には核移行シグナル (NLS) 配列は確認できない。そこで、何らかのリクルート蛋白質と結合し、核内に輸送されているのではないかと考え、Patched C 末端断片と免疫共沈降する蛋白質をアミノ酸配列分析により同定した。その結果、NLS を有する p32 と Patched C 末端断片が結合することが明らかとなった。

現在、多くの Patched ヒト発癌性変異が報告されているが、その中でも発症機構が不明である ICD7 の 1 アミノ酸置換型変異体に着目して解析を行った。Patched ICD7 蛋白質を HeLa 細胞内で発現させたところ、1311 番、あるいは 1315 番のロイシンがプロリンに置換された発癌性点変異体では発現量が低下し、MG132 や、リソソーム阻害剤であるロイペプチン処理によって発現量が回復することが明らかとなった。

さらに、この発現量の低下が Patched ICD7 の不安定化に由来するものか確認するためにシクロヘキシミド(CHX)処理し、チェイス実験を行ったところ、ICD7 ヒト発癌性変異体の安定性が正常型(WT)と比較して低下していることが確認された。このことは、BCC 患者の発癌に Patched ICD7 の不安定化が関与していることを示唆する。

以上の結果から、Patched ヒト発癌性変異体では生成する C 末端断片の安定性が低下することにより癌原性遺伝子産物 Gli1 の抑制機能を失い、結果として発癌に向かう可能性が示された。Patched C 末端断片には未知の発癌抑制機能が存在する可能性が非常に高く、この機能を解析することで Patched ICD7 の発癌性変異由来の BCC 患者の新規治療ターゲットを提案できると考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 松 田 正

副 査 講 師 米 田 宏

副 査 教 授 川 原 裕 之 (首都大学東京

大学院理工学研究科)

学 位 論 文 題 名

Patched 細胞質断片の生成を介した

新規発癌抑制機構に関する研究

Patched は、細胞の分化と増殖をコントロールする細胞外分泌蛋白質 Sonic Hedgehog (shh) の 12 回膜貫通型レセプター蛋白質であり、生物の初期発生に必須の蛋白質であると考えられている。また、Patched は基底細胞癌や、脳腫瘍等の癌の抑制遺伝子としても知られている。また、shh を受容する Patched 細胞外領域の機能が明らかになってきたが、Patched 細胞内領域の機能は全く明らかとなっていない。嶋田らは Patched 線虫ホモログのひとつである TRA-2 が第 7 細胞質ドメイン (ICD7) が膜直下で切断され、核内移行し核内にシグナル伝達することを明らかにしたが、哺乳動物での機能は不明であった。また、BCC 発症患者の Patched 解析により、Patched ICD7 の 1 アミノ酸置換が BCC の原因との報告があるが、発癌に至る機構は明らかでない。

本研究では、Patched ICD7 の重要性に着目し、ヒト培養細胞を用いて Patched ICD7 の機能を解析した。その結果、Patched ICD7 がリン酸化、プロセッシングを受け、その切断断片が核内に移行することを新しく見出した。さらに第 7 細胞質ドメインに核移行性蛋白質である p32 が結合し、Patched ICD7 切断断片の核移行を調節しているという新知見を得た。また、報告されている発癌性点突然変異により、Patched ICD7 の安定性が低下し、そのことが起因となって発癌因子である核内転写因子 Gli1 が活性化することも発見した。

まず、Patched の機能を解析する目的で、ヒト全長 Patched 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、シングルコピーを HeLa 細胞遺伝子に導入することで、Patched の安定発現細胞株を構築した。その結果、分子量 150kDa の全長 Patched の発現を確認すると同時に、C 末端タグにのみ反応する断片が生成していることが明らかとなった。N 末端と C 末端それぞれのタグで免疫染色したところ、Patched N 末端と C 末端では細胞内局在パターンが異なり、N 末端側は細胞質にドット状に分布する一方で、C 末端側は核内に移行していることが明らかとなった。同様の結果は細胞分画でも確認できた。また、Patched ICD7 C 末端 20 アミノ酸を抗原とする抗体を用いて、内在性 Patched の C 末端を観察したところ、同様に核に蓄積していることも確認された。生成する Patched C 末端断片の分子量はほぼ ICD7 の大きさに相当すること、また断片のほぼ全量が核内に移行していることから、全長 Patched のプロセッシングにより生じた ICD7 相当断片が核内に移行しているものと考えられる。線虫 TRA-2 の ICD7 断片は転写因子 TRA-1 の活性を直接調節しうること、また Patched の下流ターゲットとして TRA-1 ホモログの Gli1 が同定されていることから、一番可能性が考えられるのが、Patched C 末端断片が癌原性転写因子 Gli1 と相互作用することである。そこで、Gli1 をターゲットにしたレポーター解析を行った。Patched 安定発現細胞株で Gli1 の活性が抑制されると同時に、Patched ICD7 断片のみの発現でも全長 Patched と同程度 Gli1 の活性を抑制することが明らかとなった。この結果は、Patched ICD7 の核内ターゲットが Gli1 であることを示している。

Patched は常時プロセッシングを受けるわけではなく、その調節には何らかのシグナルが必要であることが考えられた。そこで Patched ICD7 を過剰発現させ、解析したところ、リン酸化を受けていることが明らかとなった。また、各種変異体を作成することによって、リン酸化修飾を受けない変異体を作成、観察したところ、Patched C 末端断片の生成が確認できず、全長のまま発現していることが確認された。これにより、Patched はリン酸化修飾を受けることによって、そのプロセッシングが調節されていることが明らかとなった。

生成する Patched C 末端断片には核移行シグナル (NLS) 配列は確認できない。そこで、何らかのリクルート蛋白質と結合し、核内に輸送されているのではないかと考え、Patched C 末端断片と免疫共沈降する蛋白質をアミノ酸配列分析により同定した。その結果、NLS を有する p32 と Patched C 末端断片が結合することが明らかとなった。

現在、多くの Patched ヒト発癌性変異が報告されているが、その中でも発症機構が不明である ICD7 の 1 アミノ酸置換型変異体に着目して解析を行った。Patched ICD7 蛋白質を HeLa 細胞内で発現させたところ、1311 番、あるいは 1315 番のロイシンがプロリンに置換された発癌性点変異体では発現量が低下し、MG132 や、リソソーム阻害剤であるロイペプチン処理によって発現量が回復することが明らかとなった。

さらに、この発現量の低下が Patched ICD7 の不安定化に由来するものか確認するためにシクロヘキシミド(CHX)処理し、チェイス実験を行ったところ、ICD7 ヒト発癌性変異体の安定性が正常型(WT)と比較して低下していることが確認された。このことは、BCC 患者の発癌に Patched ICD7 の不安定化が関与していることを示唆する。

以上の結果から、Patched ヒト発癌性変異体では生成する C 末端断片の安定性が低下することにより癌原性遺伝子産物 Gli1 の抑制機能を失い、発癌に向かう可能性が示された。Patched C 末端断片には未知の発癌抑制機能が存在する可能性があることから Patched ICD7 の発癌性変異由来の BCC 患者の新規治療ターゲットを提案できると考えられる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。