

博士論文

論文題目 Parafibromin による Wnt-Hedgehog-Notch シグナル連関の制御機構

氏名 菊地 逸平

目次

目次	2-4
要旨	5
序文	6-13
細胞内シグナル伝達経路とシグナルクロストーク	6-8
parafibromin/Cdc73	8-10
parafibromin によるシグナル伝達経路の制御	10-13
方法	14-23
細胞培養	14
プラスミド	14-16
細胞への遺伝子導入	16
抗体	17
免疫沈降とイムノブロット	17-18

ルシフェラーゼレポーターアッセイ	18
siRNA	19
定量的 RT-PCR 解析	19-20
マウス	20-21
腸管上皮オルガノイド培養	21
免疫組織化学染色	21-22
<i>In situ</i> proximal ligation assay	22
統計処理	23
結果	24-69
parafibromin による Hh シグナル経路制御機構	24-32
parafibromin による Notch シグナル経路制御機構	32-38
parafibromin を介した Wnt シグナル-Hh シグナル間の競合機構	39-44
parafibromin を介した Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調機構	45-48
腸管上皮における parafibromin ならびに Wnt シグナル・Notch シグナル	
関連分子の発現解析	49-52

parafibromin によるシグナル制御を介した腸管上皮の恒常性維持機構	53-62
Ptk6 による parafibromin 依存的シグナル活性化の抑制機構	62-69
考察	70-84
核内足場タンパク質としての parafibromin	72-73
parafibromin によるシグナル制御における PAF 複合体の関与	73-75
parafibromin を介した Wnt-Hh シグナル関連機構	75-77
parafibromin を介した Wnt-Notch シグナル関連機構	77-79
SHP2 の脱制御によるシグナル経路の異常活性化	80-82
今後の展望	82-84
引用文献	85-98
謝辞	99-100

要旨

Wnt 経路-Hedgehog (Hh) 経路-Notch 経路間の連関した制御を司る分子機構の本態は未だ不明である。本研究では、核内タンパク質 *parafibromin* が Wnt、Hh、Notch シグナルにより共有される転写コアクチベーターとして機能することを示す。さらに、各シグナル経路のエフェクター転写因子との複合体形成を分子基盤として、*parafibromin* が Wnt-Hh 経路間の競合ならびに Wnt-Notch 経路間の協調を担うことを示す。*parafibromin* による Wnt-Hh-Notch シグナルの連関制御機構は腸管上皮組織の維持を初めとする多様な生命現象に重要な役割を果たすと考えられる。

序文

細胞内シグナル伝達経路とシグナルクロストーク

生物は、外部環境から受ける様々な刺激を認識・処理し、適切に応答することによって内部の状態を一定に保ちながら生命活動を維持している。このことは、個体としての生物ならびに個体を形成する基本単位である細胞レベルにおいても同様に営まれている。細胞は、細胞膜表面に発現した受容体分子により細胞外からの刺激を感知する。この受容体刺激を引き金として下流細胞内分子が連続的に活性化され、様々な細胞内情報シグナルが生成される。細胞内シグナルは最終的に遺伝子情報発現調節の場である核内へと伝えられ、各シグナル経路に特異的な転写因子の活性化による標的遺伝子群の発現制御がなされる。こうした細胞内シグナル伝達のプロセスを経て、増殖、分化、運動、細胞死など多様な細胞応答が誘導される。

細胞内に加え、細胞間の情報交換がその形成ならびに恒常性（ホメオスタシス）維持に必須となる多細胞生物には、進化的に高度に保存された比較的少数の細胞内シグナル伝達経路が存在する。具体的な経路として、Wnt 経路、Hedgehog (Hh) 経路、Notch 経路、Transforming growth factor- β (TGF- β)/Bone

morphogenetic protein (BMP) 経路、Receptor tyrosine kinase (RTK)-RAS 経路、Janus kinase (JAK)-Signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路、Hippo 経路などが挙げられる。これら種を超えて高度に保存されているシグナル経路は、胚発生から成体組織の再生にいたるまでの広範な生命現象に必須の役割を担うと同時に、シグナル経路を構成する分子の異常な活性化や不活性化により引き起こされるシグナル制御の破綻はがんを初めとする多様なヒトの疾患発症に深く関与する。

系統進化的に高度に保存されたシグナル伝達経路は、様々な生命現象を担う上で各々が独立してシグナルを伝えるばかりでなく、複数の経路が互いに連動して相互のシグナル強度を調節し合うこと（シグナルクロストーク）が知られる。例えば、脊椎動物の初期発生における背腹軸に沿った神経管のパターン化は Wnt シグナルと Hh シグナル間の競合的なクロストークにより厳密に制御されることが知られる [1]。この過程において、分泌性シグナル分子である Wnt は神経管背側の蓋板より分泌されて背側から腹側にかけて濃度勾配を生み出す一方、Hh シグナル活性化の液性リガンド因子である Sonic hedgehog (Shh) は腹側の脊索や底板から分泌され腹側から背側にかけて濃度勾配を生み出す。これらシグナル分子群の時空間的な濃度勾配の変動に応じ、未分化神経上皮細胞内

において Wnt シグナルと Hh シグナルが互いのシグナル活性化強度を競合的に抑制し合うことで背側特異的な遺伝子 (*Pax6* など) や腹側特異的な遺伝子 (*Nkx2.2* など) がそれぞれ誘導され、神経管の各部位に応じた神経細胞の秩序だった分化が誘導される。このように、細胞内シグナルクロストークを司る分子機構の詳細を明らかにすることは多細胞生物の発生・分化・恒常性維持やその破綻としての疾患発症を理解する上できわめて重要な意義を有することに異論の余地はない。しかしながら、2 種類以上の細胞内シグナル経路間を統合的に調節・制御する分子機構ならびにその機構を司る制御因子の存在等はこれまでのところ全く明らかにされていない。

parafibromin/Cdc73

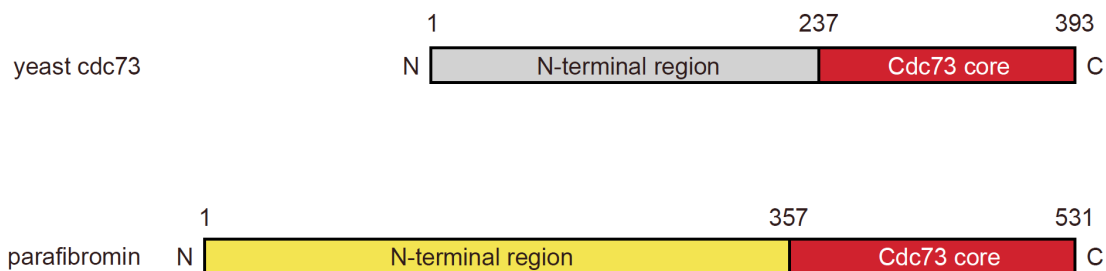
parafibromin/Cdc73 (以下 parafibromin) は *HRPT2* (*hyperparathyroidism type 2*) 遺伝子にコードされ、主に細胞核内に局在する核内タンパク質である [2]。

HRPT2 は、その不活性化型変異が遺伝性の副甲状腺機能亢進症-顎腫瘍症候群 (hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome; HPT-JT) の原因となる遺伝子として 2002 年に最初に単離・同定された [3, 4]。

HRPT2 遺伝子配列から、その遺伝子産物である parafibromin は酵母において

発見された RNA polymerase II-associated factor (PAF) 複合体の構成因子の 1 つである *cdc73* タンパク質のヒトのオーソログであることが明らかとなった。さらに、酵母 *cdc73* の場合と同様に、*parafibromin* はヒト細胞内で PAF 複合体を構成する因子であることも明らかとなった [5]。ヒトの PAF 複合体は、*parafibromin*、*Paf1*、*Ctr9*、*Leo1*、*Rtf1*、*Ski8* の 6 つの構成因子から構築され、RNA polymerase II やその他の転写調節因子と相互作用することで転写の開始、転写の伸長、RNA プロセッシング、ヒストン修飾など多様な機構を介して核内における遺伝子の発現調節機構に関わっていると考えられている [6-8]。

ヒト（哺乳動物）*parafibromin* と酵母 *cdc73* はそのカルボキシ (C) 末端側に「*cdc73* コアホモロジードメイン」とよばれる配列相同性を有する領域を共有する一方、*parafibromin* のアミノ (N) 末端側には酵母の *cdc73* には存在しない特有のドメインが存在することが明らかとなった (序図 1) [2, 9]。興味深いことに、この N 末端側ドメインは後生動物 (Metazoan、いわゆる多細胞動物) の間においては線虫からヒトにいたるまで広く進化的に保存されている [2]。この事実から、系統進化の過程において、*parafibromin* は N 末側ドメインを付加することで後生動物に特異的な何らかの新規機能を獲得したものと推察される。



序図 1 parafibromin の分子構造

parafibromin は全長 531 アミノ酸残基からなり、そのカルボキシ (C) 末端側 (アミノ酸残基 357 番-531 番目) に酵母の cdc73 タンパク質 (yeast cdc73) との間で配列相同性のある「cdc73 コアホモロジードメイン」と呼ばれる領域を保有する。一方、そのアミノ (N) 末端側 (アミノ酸残基 1 番-357 番目) には、酵母には存在しない後生動物に特有の配列を有する。

parafibromin によるシグナル伝達経路の制御

2006 年に Mosimann らは、ショウジョウバエを用いた遺伝学的研究からショウジョウバエの parafibromin オーソログである Hyrax が Wnt シグナル経路の伝達に重要な役割を果たすことを報告した [9]。

細胞内 Wnt シグナルの伝達には、同経路の主要エフェクターである転写のコアクチベーター分子 β -catenin の機能制御が重要な鍵を握る [10]。Wnt シグナルが非活性化状態にある細胞では、 β -catenin は Axin、APC、GSK3 β 、CKI からなる細胞質分解複合体によって細胞質において構成的に分解され、細胞内には

わずかしかな存在できない。一方、分泌性のリガンド分子である Wnt が細胞膜上の Frizzled 受容体に結合し Wnt シグナルが活性化されると、細胞質分解複合体による β -catenin の分解が抑制され、細胞質で β -catenin が安定化される。安定化された β -catenin は核内へと移行し、DNA 結合因子 TCF/LEF と複合体を形成して Wnt シグナル標的遺伝子を転写活性化する。この Wnt シグナル伝達機構のうちで、parafibromin は安定化された β -catenin と核内で直接的に複合体を形成し、転写コアクチベーターとして機能することで Wnt シグナル標的遺伝子の転写活性化を促進することが明らかとなった。この発見に引き続き、2009 年には parafibromin が Hh シグナル経路の制御にも関わっていることが明らかにされた [11]。

細胞外に分泌されるシグナル分子である Hh は、哺乳動物では Sonic hedgehog (Shh)、Desert hedgehog (Dhh)、Indian hedgehog (Ihh) の 3 種類のホモログが同定されている [12]。これら Hh リガンドの非存在下では、細胞膜に発現した Patched 受容体 (Ptch) が 7 回膜貫通タンパク質 Smoothened (Smo) を持続的に抑制することで細胞内シグナルは抑制された状態にある。これに対し、Hh リガンドが結合した Ptch は Smo への抑制効果を失い、Smo 依存的な細胞内シグナル経路活性化を介して Hh シグナルのエフェクター転写因子 GLI1 が核内へと移行し、Hh

シグナル標的遺伝子群の転写活性化が誘導される。この過程において、**parafibromin** は核内で **GLI1** と直接結合し Hh シグナル標的遺伝子転写のコアクチベーターとして機能することが明らかにされた [11]。

また、2011 年に発表された当研究室の高橋らによる先行研究において、チロシンホスファターゼ **SHP2** の細胞内基質分子の網羅的探索が行われ、新規の **SHP2** 基質として **parafibromin** が同定された [13]。

SHP2 は細胞増殖を促す **RAS/MAPK** シグナル経路の活性化に関与する非受容体型チロシンホスファターゼとして知られている [14, 15]。**SHP2** をコードする **PTPN11** 遺伝子の機能獲得型遺伝子変異が多様なヒトのがんにおいて見出されることから、**SHP2** はその異常活性化が細胞のがん化を促す「がんタンパク質」として理解されている [14-19]。高橋らは、**SHP2** が細胞質に加えて核内にも存在することを示すとともに、核内 **SHP2** が **parafibromin** をチロシン脱リン酸化すること、そして **parafibromin** はチロシン脱リン酸化依存的に **β-catenin** と複合体を形成する能力を獲得し細胞増殖あるいは発がんに促進的な **Wnt** シグナルの活性化を誘導することを明らかにした。この発見により、**SHP2** は細胞質で **RAS** 経路の活性化を促進する一方、核内で **parafibromin** の脱リン酸化を介して **Wnt** 経路の活性化を誘導することが明らかとなり、機能獲得型 **SHP2** はこれら 2 つの

主要発がん関連経路を同時に脱制御することで細胞のがん化を加速させることが示唆された。

上述の知見を統合すると、parafibromin は、Wnt シグナル、Hh シグナル、RTK-RASシグナルなどの複数の細胞内シグナル伝達経路と機能的に相互作用することで、後生動物に特徴的な生命活動をコーディネートする分子として機能している可能性が強く示唆される。このことは同時に、parafibromin が異なる複数の細胞内シグナル伝達経路の協調的制御に重要な役割を果たしている可能性を浮かび上がらせる。しかしながら、parafibromin がそのようなシグナル・コーディネーターとしての役割を実際に果たしうるのかという謎は全く明らかにされていない。そこで本研究では、哺乳動物細胞内に共存する複数のシグナル経路の入力を統合・制御し、個々の細胞あるいは組織の文脈に依存したシグナル活性制御を担う分子として parafibromin が果たす役割の解明を目指した。

方法

細胞培養

ヒト胎児腎細胞由来 HEK293T 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞ならびにヒト乳がん由来 MCF7 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した DMEM 培地 (日水製薬株式会社) を用いて培養した。ヒト胃上皮由来 AGS 細胞の培養には 10% FBS を添加した RPMI-1640 培地 (日水製薬株式会社) を、ヒト Ewing 肉腫由来 SKES 細胞の培養には 15% FBS を添加した McCoy's 5a 培地 (GIBCO) をそれぞれ用いた。内因性の Wnt シグナル活性化のためには、HEK293T 細胞を GSK3 β の阻害剤である LiCl (最終濃度 25 mM) で 24 時間処理した。

プラスミド

野生型 parafibromin を発現するベクターは、ヒト *HRPT2* 遺伝子をコードする cDNA の 5'末端に Flag タグあるいは HA タグをコードする配列を付加した後、哺乳動物細胞用発現ベクター pcDNA3 (Invitrogen) のマルチクローニングサイト内に挿入することで作製した。チロシンリン酸化抵抗性 parafibromin (Y290/293/315F) 発現ベクターは野生型 parafibromin 発現ベクターを基に

Chameleon Site Directed Mutagenesis キット (Stratagene) を用いて作製した。GLI1 発現ベクターは、ヒト *GLI1* 遺伝子をコードする cDNA 配列の 5'末端に HA タグをコードする配列を付加し、pcDNA3 のマルチクローニングサイト内に挿入して作製した。SHP2 発現ベクターは、ヒト *PTPN11* 遺伝子をコードする cDNA 配列の 3'末端に Myc タグをコードする配列を付加し、哺乳動物細胞用発現ベクター pSP65SRa のマルチクローニングサイト内に挿入したものを用いた。Notch 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain; NICD) 発現ベクターは、マウス *Notch1* タンパク質の細胞内領域 (アミノ酸残基 1,733 番-2,813 番目) の C 末端に Myc タグの 6 回繰り返し配列を付加したものを pcDNA3 のマルチクローニングサイト内に組み込むことで作製した。β-catenin S33Y 発現ベクターは、マウス *Ctnnb1* 遺伝子をコードする cDNA 配列のうち 33 番目のセリン残基をコードする塩基配列をチロシン残基をコードするものに置換した後に 5'末端に HA タグをコードする配列を付加して、哺乳動物細胞用発現ベクター pCGN にクローニングしたものをを用いた。Ptk6 発現ベクターは、ヒト *PTK6* 遺伝子をコードする cDNA 配列の 3'末端に Flag タグをコードする配列を付加した後に哺乳動物細胞用発現ベクター pRC/CMV のマルチクローニングサイト内にクローニングしたものをを用いた。parafibromin を標的とする shRNA 発現ベクターは、報告されている標的配

列 [20] を含む DNA 断片を pSUPER ベクター (OligoEngine) に組み込むことにより作製した。また、RNA 干渉耐性型 *parafibromin* は野生型 *parafibromin* 発現ベクターを基に shRNA の標的配列を別の配列へと置換することにより作製した。Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポータープラスミド [21]、Notch 反応性ルシフェラーゼレポータープラスミド [22]、および Wnt 反応性ルシフェラーゼレポータープラスミド [23] は、過去の報告と同様のものを実験に用いた。

細胞への遺伝子導入

HEK293T 細胞への遺伝子導入は Lipofectamine reagent (Invitrogen) と Plus reagent (Invitrogen) を用いて行った。A549 細胞、MCF7 細胞、および AGS 細胞への遺伝子導入には Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いた。遺伝子導入の操作は各製品の推奨プロトコールに準拠して行った。

抗体

抗 Flag 抗体 (M2、SIGMA)、抗 HA 抗体 (3F10、Roche)、抗 Myc 抗体 (9E10、Santa Cruz)、抗 β -Actin 抗体 (C-11、Santa Cruz)、抗 parafibromin 抗体 (A300-170A、Bethyl Lab.)、抗 β -catenin 抗体 (H102、Santa Cruz)、Cleaved Notch1 (NICD) 抗体 (#2421、Cell Signaling)、抗 Sox9 抗体 (AB5535、Millipore)、ならびに抗 GLI1 抗体 (L42B10、Cell Signaling) をイムノブロットおよび蛍光免疫染色における 1 次抗体として用いた。免疫組織化学染色の 1 次抗体には、抗 parafibromin 抗体 (A300-170A、Bethyl Lab.)、抗 CD44 抗体 (550538、BD Biosciences)、Cleaved Notch1 抗体 (#2421、Cell Signaling)、抗 β -catenin 抗体 (610154、BD Biosciences)、抗 HES1 抗体 (H-20、Santa Cruz)、抗 Ki-67 抗体 (TEC3、Dako)、および抗 Villin 抗体 (C-19、Santa Cruz) を用いた。

免疫沈降とイムノブロット

培養細胞に各種発現ベクターを一過性に遺伝子導入し、24 時間あるいは 48 時間後に細胞を回収した後に溶解バッファー (250 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、0.5% NP-40、2 mM Na_3VO_4 、10 mg/ml leupeptin、10 mg/ml trypsin inhibitor、10 mg/ml aprotinin、2 mM PMSF) を用いて溶解し、細胞抽出液を各種

抗体による免疫沈降に供した。得られた免疫沈降物は溶解バッファーを用いて 6 回希釈洗浄した。

得られた免疫沈降物を SDS-PAGE で分離した後に、イムノブロットを行った。イムノブロットの 2 次抗体反応には、HRP 付加した抗マウス、ウサギ、ラット IgG 抗体 (GE Healthcare)、ならびに抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz) を用いた。イムノブロットフィルターを Western blot chemiluminescence reagent (PerkinElmer Life sciences) によって化学発光させ、Hyper Film (Amersham Biosciences) に現像した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイは、Dual-Luciferase reporter assay kit (Promega) を用いて推奨プロトコールに従って行った。pRL/CMV あるいは pRL/TK ウミシイタケルシフェラーゼ活性を 2nd ルシフェラーゼレポーターとして用いることで標準化を行い、得られた相対値を実験結果として示した。

siRNA

β -catenin 特異的 siRNA は Hs_CTNNB1_5 FlexiTube siRNA (QIAGEN) を用いた。

Ptk6 特異的 siRNA ならびにコントロール siRNA は以下の配列のものを合成して実験に用いた。

si-Ptk6: 5'-GCGACUCUGAUGAGAAAGUTT -3'

Control siRNA: 5'-GCGGAGAGUCAUUUGAUUATT -3'

細胞への siRNA の導入は Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いて行った。

定量的 RT-PCR 解析

細胞からの Total RNA の精製は TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて推奨プロトコールに従って行った。cDNA はランダムヘキサマープライマーおよび SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて Total RNA より逆転写合成した。

逆転写により得られた cDNA サンプルを、SYBR *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time) (TaKaRa) を使用して StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystem) により適切なアニーリング温度でリアルタイム PCR 解析を行った。内部標準コントロールには *TBP* を用いることで標準化を行い、得られた相対値

を実験結果として示した。定量的 RT-PCR 解析に用いたプライマーの配列を以下に示す。

HES1 forward プライマー: 5'- CCAAAGACAGCATCTGAGCA -3'

HES1 reverse プライマー: 5'- CCGCGAGCTATCTTTCTTCA -3'

HEY1 forward プライマー: 5'- GAGACCATCGAGGTGGAGAA -3'

HEY1 reverse プライマー: 5'- TCGGCGCTTCTCAATTATTC -3'

TBP forward プライマー: 5'- GCTCACCCACCAACAATTTAGTAG -3'

TBP reverse プライマー: 5'- CTGCTCTGACTTTAGCACCTGTTA -3'

マウス

Hrpt2^{lox/lox} マウス [24]、*CAG-Cre-ER* トランスジェニックマウス [25]、および *Villin-Cre* トランスジェニックマウス [26] を本研究では使用した。*Hrpt2*^{lox/lox} マウスと *CAG-Cre-ER* マウスあるいは *Villin-Cre* マウスを交配させることにより、*parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス *CAG-CreER; Hrpt2*^{lox/lox} ならびに *Villin-Cre; Hrpt2*^{lox/lox} をそれぞれ作製し、実験に用いた。成体マウスにおける *parafibromin* コンディショナルノックアウト実験では、4-6 週齢の *CAG-CreER; Hrpt2*^{lox/lox} マウスならびにその同腹仔にコーン油に溶解したタモキシフェンを

マウス体重 40 g あたり 4 mg 腹腔内投与し、投与 5 日後にマウスを安楽死させて解析を行った。なお、本研究で実施した全ての動物実験は、本学大学院医学系研究科における動物実験倫理委員会が規定する実験プロトコールに準拠して行った。

腸管上皮オルガノイド培養

マウス腸陰窩の精製ならびに腸管上皮オルガノイド培養は、過去の報告 [27] に記載されるプロトコールに準拠して行った。*parafibromin* のコンディショナルノックアウト誘導は、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を培地中に最終濃度 500 nM で添加することにより行った。

免疫組織化学染色

マウスから得た新鮮な組織を氷冷 PBS で洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液中に一晩 4°C で浸して組織の固定を行った。固定後、組織の脱水処理・パラフィン包埋を行って、マイクロトームにより 4 μ m の厚さで薄切し切片とした。得られた切片を脱パラフィン処理し、再水和した。内因性のペルオキシダーゼ活性を阻害するため、切片を 0.3% 過酸化水素/メタノール溶液で 30 分

間室温で処理した。抗原の賦活化はクエン酸バッファー (pH 6.0) あるいは Tris-EDTA (pH 9.0) 溶液中に浸した状態で電子レンジを用いて 15 分間組織切片を煮沸することにより行った。免疫組織化学染色の 1 次抗体反応は、以下の抗体および希釈倍率で組織切片を一晩 4°C で反応させることにより行った: 抗 parafibromin 抗体 (1:250)、抗 NICD 抗体 (1:50)、抗 β -catenin 抗体 (1:500)、抗 CD44 抗体 (1:500)、抗 Sox9 抗体 (1:5000)、抗 HES1 抗体 (1:50)、抗 Ki-67 抗体 (1:25)、抗 Villin 抗体 (1:50)。染色は Vectastain ABC-Elite kit (Vector Labs) ならびに Dako Liquid DAB+ Substrate (Dako) を用いて推奨プロトコールに従って行った。蛍光免疫染色の検出には 2 次抗体として抗マウス IgG Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) ならびに抗ウサギ IgG Alexa-Fluor 546 (Invitrogen) を用いて、共焦点蛍光顕微鏡によりシグナルを検出した。

In situ proximal ligation assay

HEK293T 細胞をポリ *D*-リジンをコートしたガラススリップ (IWAKI) 上に播種し、その 16 時間後に遺伝子導入をした。4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で細胞を固定した後、TritonX-100 を用いて易透化し、1 次抗体反応を行った。その後、Duolink In situ PLA kit (Olink Bioscience) の推奨プロトコールに従って *In situ proximal ligation assay* (PLA) を行った。

統計処理

各実験データに対する統計学的処理は、パラメトリックな 2 群間の比較には Student's *t*-test を、パラメトリックな多群間の比較には ANOVA (Bonferroni's post-test) を、ノンパラメトリックな群間の比較には Wilcoxon rank sum test をそれぞれ用いて行った。

結果

parafibromin による Hh シグナル経路制御機構

ショウジョウバエを用いた研究から、parafibromin は GLI1 との直接的な複合体形成を介して Hh 経路標的遺伝子の転写活性化に関与することが報告されている [11]。そこで本研究では、哺乳動物細胞において parafibromin が Hh 経路の制御に果たす役割を確認するために、ヒト胎児腎上皮細胞由来 HEK293T 細胞に parafibromin 特異的な shRNA を発現させて内因性 parafibromin の発現を抑制し、Hh シグナル標的遺伝子の転写活性化に及ぼす影響を Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価した。その結果、shRNA を介した内因性 parafibromin の発現抑制により、Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーター活性は有意に減少した (図 1)。一方、Hh レポーター活性の低下は RNA 干渉耐性型 parafibromin (RNAi-resistant Flag-parafibromin) の異所性発現によって解消された (図 1)。これらの観察より、哺乳動物細胞において内因性 parafibromin は Hh シグナル標的遺伝子の転写活性化に寄与していることが確認された。

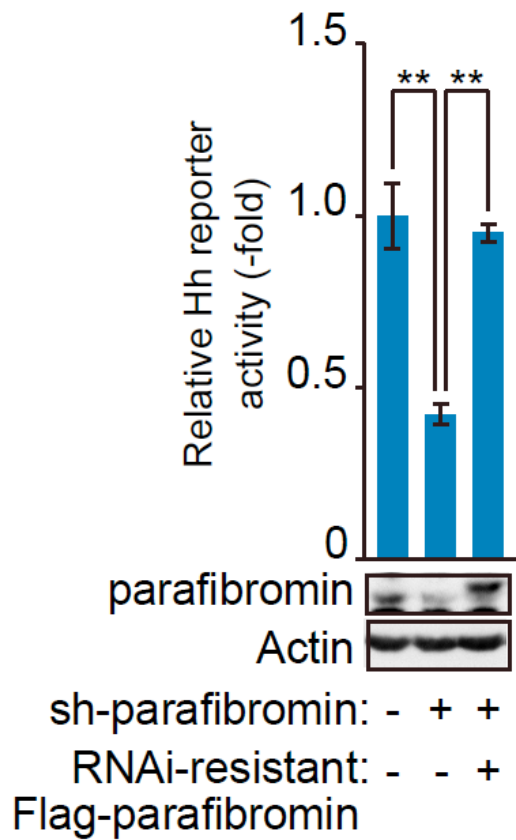


図 1 内在性 parafibromin による Hh シグナル標的遺伝子の転写活性化
 HEK293T 細胞に parafibromin 特異的 shRNA (sh-parafibromin) 発現ベクターおよび Flag タグを付加した RNA 干渉耐性型 parafibromin (RNAi-resistant Flag-parafibromin) 発現ベクターを Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、72 時間後に調製した細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 ** $p < 0.01$ 。

次に、細胞内における parafibromin-GLI1 複合体の形成を調べるため、Hh シグナルの恒常的活性化が報告されている [28] ヒト Ewing 肉腫由来細胞株 SKES の細胞抽出液を用い、抗 parafibromin 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、内因性 GLI1 ならびに parafibromin の共免疫沈降が観察された (図 2)。このことから、parafibromin と GLI1 は細胞内で物理的な複合体を形成して存在することが示された。

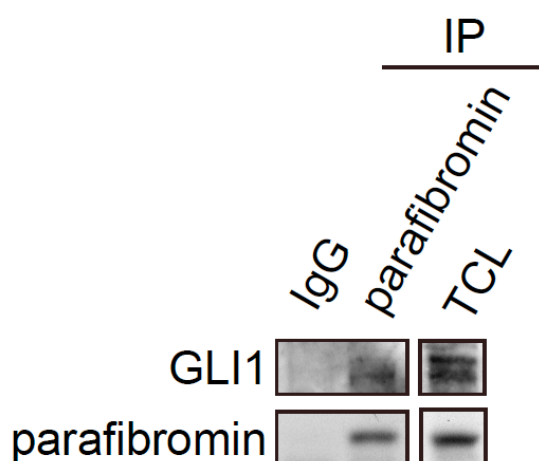


図 2 内因性 parafibromin-GLI1 複合体の共免疫沈降

SKES 細胞由来の細胞抽出液 (TCL) を用いてコントロールウサギ IgG 抗体あるいは抗 parafibromin 抗体による免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。

当研究室におけるこれまでの先行研究により、parafibromin 分子内の主たるチロシンリン酸化部位は 290 番、293 番、および 315 番目の 3 つのチロシン残基であり、またこれらの 3 つの残基が SHP2 によるチロシン脱リン酸化の標的残基であることが明らかとなっている [13]。さらに、SHP2 によりこれら残基がチロシン脱リン酸化された parafibromin は β -catenin と安定的に結合する能力を獲得し、Wnt シグナル標的遺伝子の転写活性化を促進することが示されている [13]。

一方、parafibromin のチロシンリン酸化/脱リン酸化調節と Hh シグナル制御との関連は不明である。そこで、parafibromin 分子内のチロシン残基-290, -293, -315 を全てフェニルアラニン残基に置換したチロシンリン酸化抵抗性 parafibromin (Flag-PR-parafibromin) を用い、parafibromin のチロシンリン酸化/脱リン酸化調節が Hh シグナルの制御に果たす役割を検討した。まず、parafibromin のチロシン脱リン酸化が Hh シグナル標的遺伝子の転写活性化に与える影響を調べるために、HEK293T 細胞に野生型あるいはチロシンリン酸化抵抗性 parafibromin を発現させて Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーター活性を検討した。その結果、野生型 parafibromin もしくはリン酸化抵抗性 parafibromin の異所性発現により、Hh レポーター活性がコントロールと比較してそれぞれ 1.6 倍および 7.0 倍に有意に上昇した (図 3A)。また、parafibromin と共に GLI1 を共発現させ同

様の実験を行ったところ、リン酸化抵抗性 **parafibromin** は野生型と比較して著しく強力な Hh レポーター活性化を誘導した (図 3B)。さらに、**parafibromin** の脱リン酸化を担う SHP2 により Hh シグナルの転写活性化が促進されるか否かを検討するため、Hh シグナルが恒常的に活性化されているヒト肺腺がん由来 A549 細胞に SHP2 を異所性発現させて Hh シグナルレポーターアッセイを行ったところ、SHP2 発現増大により Hh レポーター活性が有意に増強することが示された (図 3C)。

以上の結果から、SHP2 によってチロシン脱リン酸化された **parafibromin** が Hh シグナル標的遺伝子の転写活性化を特異的に促進することが示唆された。

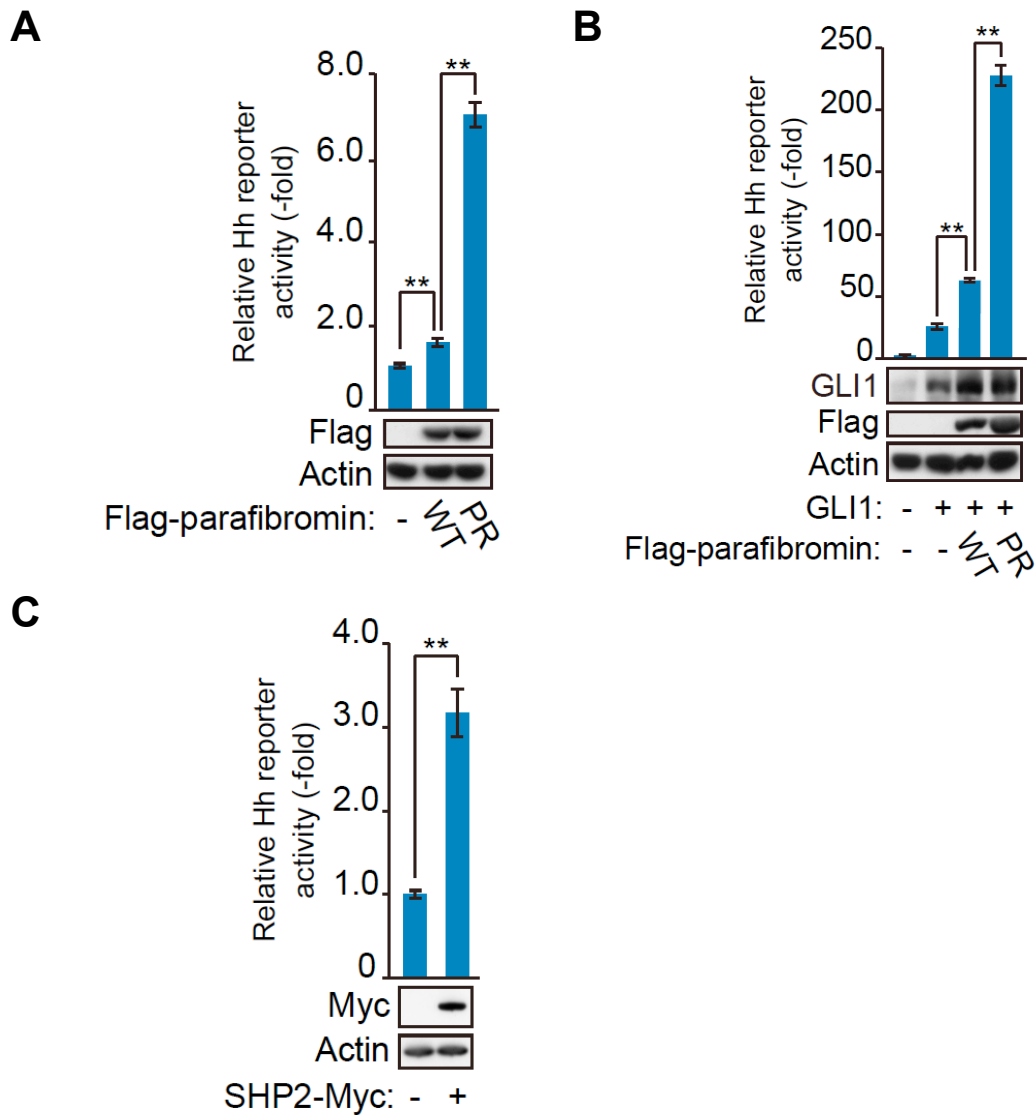


図 3 parafibromin のチロシン脱リン酸化依存的な Hh シグナル標的遺伝子の転写活性化

(A, B) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、36 時間後に調製した細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(C) A549 細胞にコントロールベクターあるいは Myc タグを付加した SHP2 (SHP2-Myc) 発現ベクターを Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、36 時間後に調製した細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(A-C) グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 ** $p < 0.01$ 。

次に、チロシン脱リン酸化 parafibromin によって Hh シグナル標的遺伝子が転写活性化される分子機構の解明を試みた。parafibromin-GLI1 間の複合体形成に必要な parafibromin 分子内の GLI 結合領域 (アミノ酸残基 200 番から 343 番の領域) は、上記の実験結果で Hh シグナル活性化への関与が示された parafibromin のチロシンリン酸化/脱リン酸化部位 (Y290、Y293、Y315) の近傍に位置する [11]。このことから、これら残基における parafibromin のチロシン脱リン酸化状態に依存して parafibromin-GLI1 間の複合体形成が制御される可能性が考えられた。この可能性を検証するため、HEK293T 細胞に野生型 parafibromin もしくはリン酸化抵抗性 parafibromin を GLI1 と共に一過性に発現させ、parafibromin/GLI1 複合体形成を共免疫沈降実験により解析した。その結果、リン酸化抵抗性 parafibromin を用いた場合、野生型と比較して parafibromin/GLI1 複合体形成量の著明な増加が観察された (図 4)。このことから、parafibromin/GLI1 複合体形成は、parafibromin/ β -catenin 複合体形成と同様、parafibromin の Y290/Y293/Y315 チロシン脱リン酸化依存的に制御されることが示唆された。また、リン酸化抵抗性 parafibromin を共発現させた場合には、イムノブロットの結果において GLI1 のバンドがスメア状にシフトアップすることが観察された (図 4)。GLI1 は細胞内においてリン酸化修飾ならびにそれに続く

ユビキチン化-プロテアソーム系によるタンパク質分解の制御を受けることが知られるため [29, 30]、脱リン酸化依存的に GLI1 に結合した parafibromin は GLI1 のプロテアソーム依存的分解を抑制し、リン酸化/ユビキチン化された GLI1 の細胞内蓄積を促進する可能性が推察される。

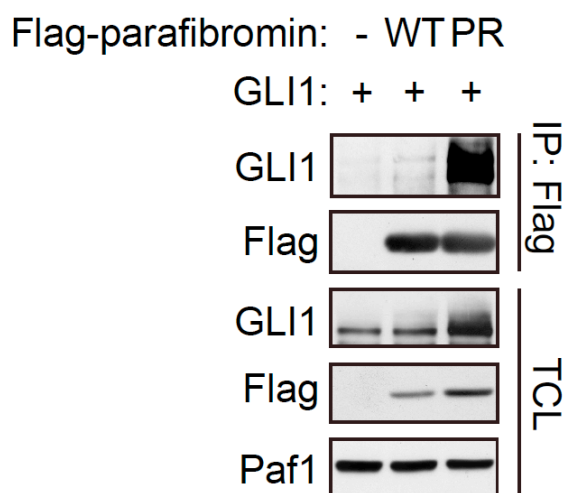


図 4 parafibromin のチロシン脱リン酸化依存的な parafibromin/GLI1 複合体形成

HEK293T 細胞に GLI1 および Flag タグを付加した野生型 parafibromin (WT) もしくはチロシンリン酸化抵抗性 parafibromin (PR) を発現させ、48 時間後に細胞抽出液 (TCL) を調製して抗 Flag 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。

以上の結果から、parafibromin は SHP2 によるチロシン脱リン酸化依存的に GLI1 と複合体形成し、Hh シグナル標的遺伝子転写のコアクチベーターとして機能することで Hh シグナルの活性化を促進する機能を有することが示唆された。

parafibromin による Notch シグナル経路制御機構

Notch シグナルは、胚発生や細胞運命の決定など様々な生命現象に重要な役割を果たすシグナル伝達経路である。序文にて列挙した多細胞生物に保存される種々のシグナル経路の中で、Notch シグナルは隣接した細胞間の物理的な接触を介した情報伝達を行う点が特徴的である。膜一回貫通型受容体である Notch は、隣接した細胞の細胞外領域に提示された Delta/Jagged リガンドとの結合により活性化される。活性化された Notch は細胞膜近傍で ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ならびに γ -secretase による連続的な切断を受ける。切断された Notch の細胞内領域 (Notch intracellular domain; NICD) は核へ移行し、DNA 結合因子 CSL と直接的に結合したのちに転写調節因子として Notch シグナル標的遺伝子の発現を制御する。

興味深いことに、2007 年に報告されたゼブラフィッシュを用いた遺伝学的研究において、PAF 複合体の構成タンパク質である Rtf1 ならびに Ctr9 が胚発生に

における Notch シグナル経路の制御に重要な役割を担うことが示された [16]。この事実は、parafibromin を含む PAF 複合体が Notch シグナルの制御にも深く関与している可能性を示唆している。しかしながら、現時点では Notch シグナルへの parafibromin の関与は全く明らかにされていない。

そこで、Notch シグナル標的遺伝子の転写制御に parafibromin が関与しているか否かを検討するために、293T 細胞において Notch シグナル反応性プロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ (Notch レポーターアッセイ) を行った。parafibromin 特異的な shRNA を単独発現させた場合、あるいは NICD と共発現させた場合のいずれでも、内因性 parafibromin の発現抑制により Notch レポーター活性の減少が認められた (図 5A)。一方、このレポーター活性の減少は RNA 干渉耐性型 parafibromin (RNAi-resistant Flag-parafibromin) をさらに発現させることにより解消された (図 5B)。これらの結果から、内因性 parafibromin は Notch シグナル標的遺伝子の転写活性化に促進的に働くことが示唆された。

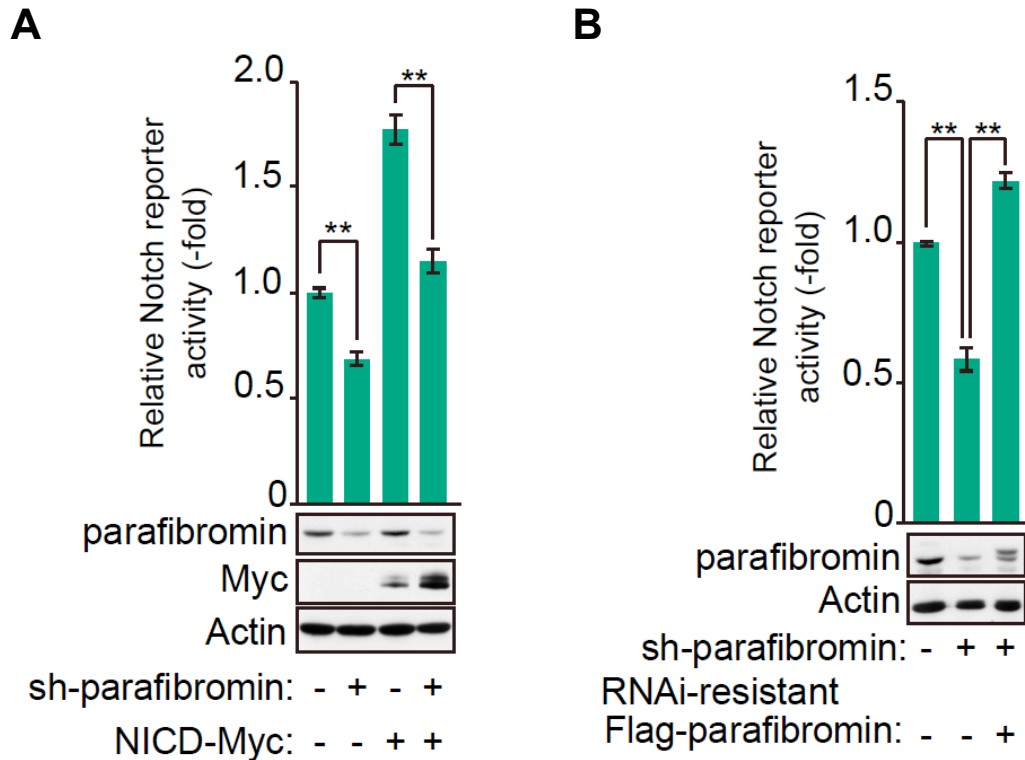


図 5 内因性 parafibromin による Notch 標的遺伝子の転写活性化

(A) HEK293T 細胞に parafibromin 特異的 shRNA (sh-parafibromin) 発現ベクターおよび Myc タグを付加した NICD (NICD-Myc) 発現ベクターを Notch シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、72 時間後に調製した細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(B) HEK293T 細胞に parafibromin 特異的 shRNA (sh-parafibromin) 発現ベクターおよび Flag タグを付加した RNA 干渉耐性型 parafibromin (RNAi-resistant Flag-parafibromin) 発現ベクターを Notch シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、72 時間後に調製した細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(A, B) グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 ** $p < 0.01$ 。

そこで次に、parafibromin は Notch シグナルの転写複合体と物理的に相互作用し Notch シグナル標的遺伝子の転写活性化を促進する転写コアクチベーターとして機能する、という作業仮説を立てた。この仮説を検証するため、Notch シグナルが恒常的に活性化されている [31] ヒト乳がん由来細胞株 MCF7 を用いて、parafibromin と Notch 細胞内領域 (NICD) との複合体形成を共免疫沈降実験により検討したところ、内因性の NICD と parafibromin との共免疫沈降が観察された (図 6)。この結果から、parafibromin は Notch シグナルの転写複合体と物理的に相互作用することで転写コアクチベーターとして機能することが示唆された。

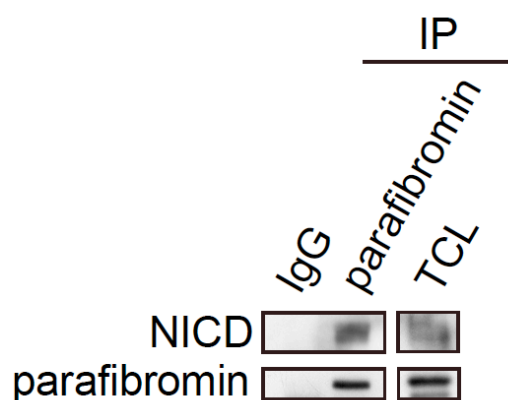


図 6 内因性 parafibromin-NICD 複合体の共免疫沈降

MCF7 細胞由来の細胞抽出液 (TCL) を用いてコントロールウサギ IgG 抗体あるいは抗 parafibromin 抗体による免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。

次に、parafibromin のチロシンリン酸化/脱リン酸化が Notch シグナルに影響を与えるか否かを検討するため、HEK293T 細胞に野生型 parafibromin もしくはリン酸化抵抗性 parafibromin を NICD と共発現させ、共免疫沈降実験により parafibromin-NICD 相互作用を検討した。その結果、リン酸化抵抗性 parafibromin は野生型と比較して著しく強い NICD 結合能を示すことが明らかになった (図 7A)。このことから、parafibromin はチロシン脱リン酸化依存的に NICD と相互作用することが示唆された。また、野生型およびリン酸化抵抗性 parafibromin の共発現に伴って、細胞内における NICD タンパク質の量が増加し、イムノブロットのバンドがスメア状になることが観察された (図 7A)。上述した GLI1 の場合と同様に、NICD もユビキチン化-プロテアソーム系による制御を受けることが知られるため [32]、parafibromin は複合体形成を介して NICD のタンパク質分解を抑制する可能性が推察された。次に、parafibromin のリン酸化調節が Notch シグナルの転写活性化に及ぼす影響を検討するために、HEK293T 細胞を用いて Notch レポーターアッセイを行ったところ、リン酸化抵抗性 parafibromin の異所性発現は野生型と比較して著明な Notch シグナルの活性化を誘導した (図 7B)。さらに、MCF7 細胞にリン酸化抵抗性 parafibromin を異所性発現させて定量的 RT-PCR 解析を行ったところ、Notch シグナルの標的遺伝子である *HES1* 遺伝子

ならびに *HEY1* 遺伝子の発現上昇が認められた (図 7C)。以上の結果より、*parafibromin* はその脱リン酸化依存的に NICD と相互作用し、転写コアクチベーターとして機能することで Notch シグナル標的遺伝子の転写活性化を促進することが示唆された。

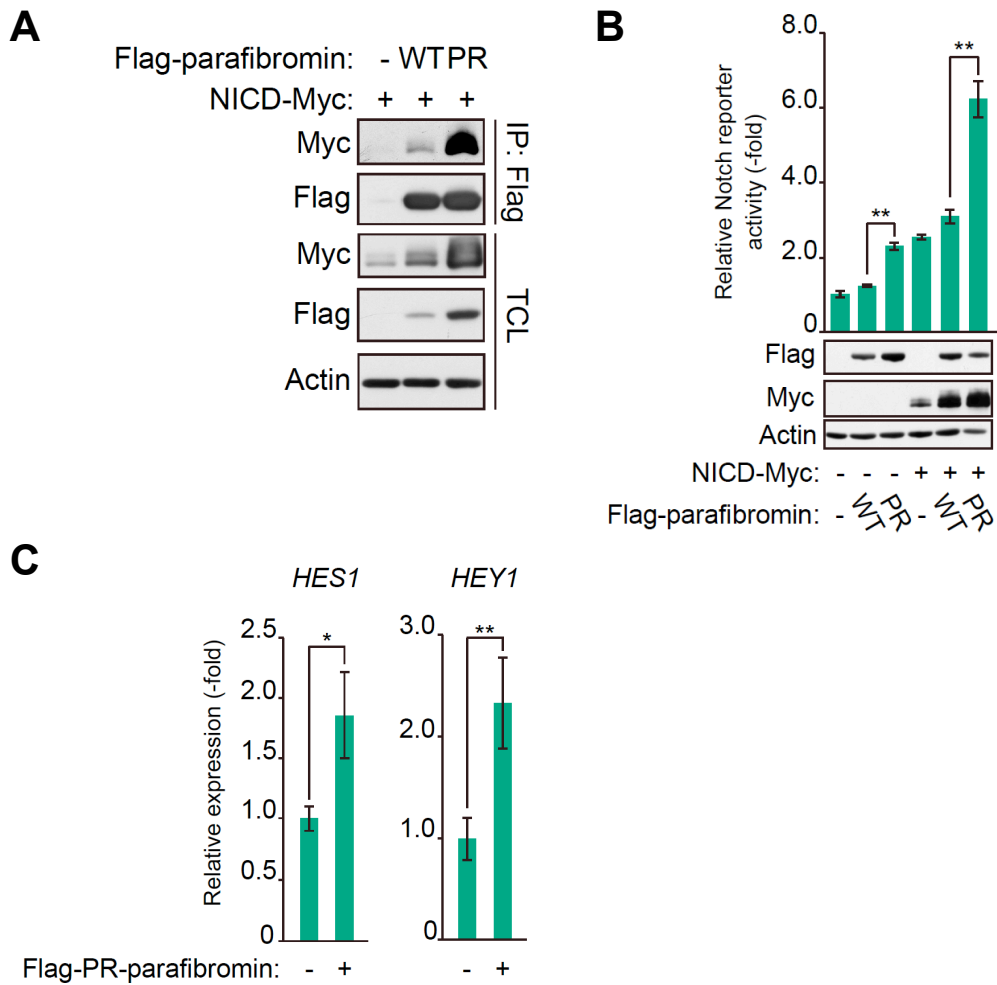


図7 チロシン脱リン酸化型 **paraifibromin** による Notch シグナル活性化

(A) HEK293T 細胞に Myc タグを付加した NICD (NICD-Myc) および Flag タグを付加した野生型 **paraifibromin** (WT) もしくはチロシンリン酸化抵抗性 **paraifibromin** (PR) を発現させ、細胞抽出液 (TCL) を調製して抗 Flag 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。(B) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを Notch シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、調製した細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 ** $p < 0.01$ 。(C) MCF7 細胞にリン酸化抵抗性 **paraifibromin** (Flag-PR-**paraifibromin**) を異所性発現させて細胞から RNA を抽出した後、*HES1* および *HEY1* に対する定量的 RT-PCR 解析を行った。グラフは 4 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

parafibromin を介した Wnt シグナル-Hh シグナル間の競合機構

これまでに得られた実験結果から、parafibromin は Wnt シグナル、Hh シグナル、Notch シグナルそれぞれのエフェクター分子との直接的な相互作用を介してこれら 3 つのシグナル伝達経路に共通する転写コアクチベーターとして機能することが明らかとなった。この結論から、細胞、組織、個体レベルにおいて観察される Wnt 経路-Hh 経路-Notch 経路間のシグナルの協調あるいは競合・抑制において parafibromin が重要な役割を担う可能性が考えられた。

このきわめて興味深い可能性を検証するため、初めに parafibromin 依存的な Hh シグナルの活性化に対する Wnt シグナルの影響を検討した。HEK293T 細胞に野生型あるいはリン酸化抵抗性 parafibromin、GLI1、およびタンパク質分解抵抗性を示す恒常的活性化型 β -catenin (β -catenin S33Y) を一過性に遺伝子導入し、parafibromin 依存的な Hh シグナルの活性化に対する β -catenin 共発現の効果を検討した。その結果、parafibromin の発現依存的に上昇した Hh シグナル反応性ルシフェラーゼレポーターの活性は β -catenin S33Y の共発現により著明に減少することがわかった (図 8A)。次に、 β -catenin の分解を促進する GSK3 β の阻害剤である LiCl を用いて内因性 Wnt シグナルの活性化が parafibromin 依存的な Hh シグナルの制御に与える影響を検討したところ、parafibromin 依存的な Hh シグ

ナルの活性化は LiCl 処理によって著しく抑制された (図 8B)。一方、LiCl 処理を行った HEK293T 細胞に β -catenin 特異的 siRNA を導入し内因性 β -catenin の発現を抑制したところ、Hh シグナルレポーター活性の上昇が観察された (図 8C)。

以上の結果から、Wnt シグナル経路の活性化ならびにそれに伴って誘導される β -catenin の核内蓄積は、parafibromin 依存的な Hh シグナルの活性化を競合的に抑制することが示された。続いて、parafibromin に依存した Wnt シグナルならびに Hh シグナルの活性化が相互に競合し合うか否かを検討するため、HEK293T 細胞に Wnt レポーターを遺伝子導入し、parafibromin/ β -catenin 依存的な Wnt シグナルの活性化に GLI1 の異所性発現が及ぼす影響を検討した。GLI1 の異所性発現により、parafibromin/ β -catenin 依存的な Wnt 反応性レポーターの活性上昇は有意に抑制された (図 8D)。この結果から、Hh シグナルの活性化は parafibromin 依存的な Wnt シグナルの活性化を競合的に抑制することが示され、parafibromin を介した Wnt シグナルならびに Hh シグナルの活性化は相互抑制的な関係にあることが明らかになった。

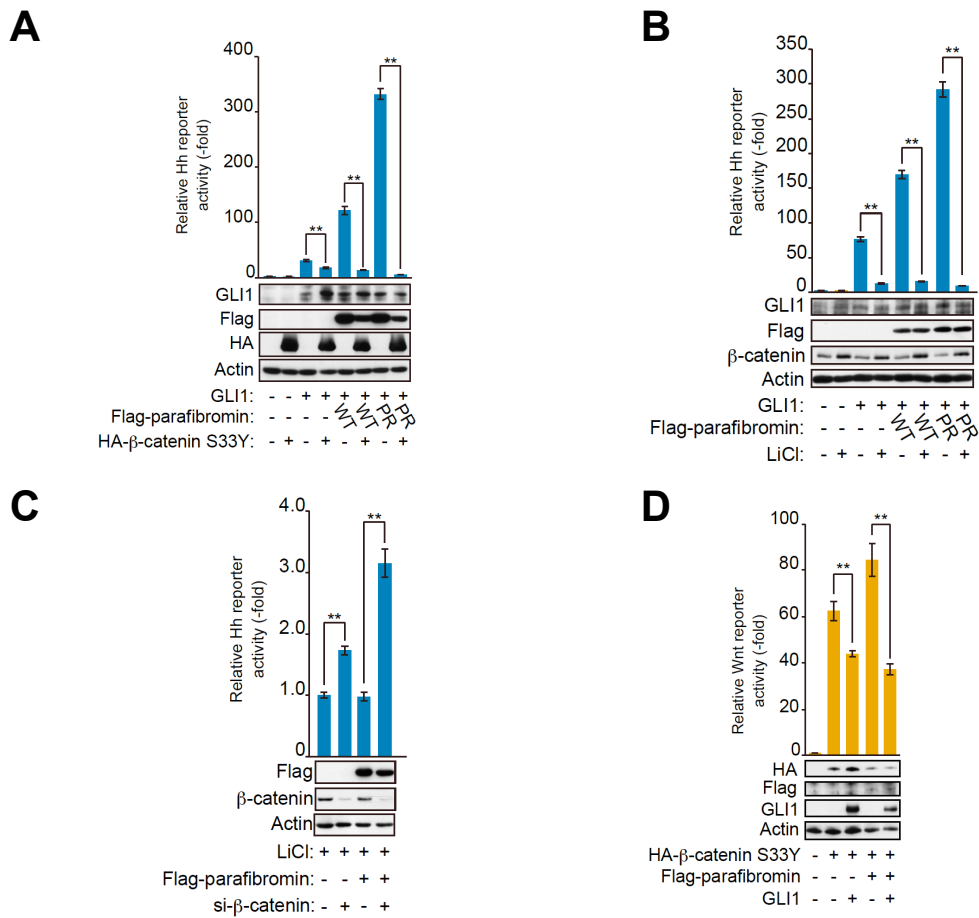


図 8 parafibromin 依存的な Wnt シグナルと Hh シグナルの競合的抑制

(A) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、レポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(B) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを Hh シグナル反応性レポーターと共に一過性に導入し、12 時間後に 25 mM の NaCl もしくは LiCl を含む培地による培地交換を行った。さらにその 24 時間後に細胞を回収し、レポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(C) HEK293T 細胞に Flag タグを付加した parafibromin (WT) 発現ベクターおよび β-catenin 特異的 siRNA を Hh シグナル反応性のレポーターと共に一過性に導入し、その 24 時間後に 25 mM の NaCl もしくは LiCl を含む培地による培地交換を行った。さらにその 24 時間後に細胞を回収し、レポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(D) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを Wnt シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入し、レポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。(A-D) グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 **p < 0.01。

次に、parafibromin 依存的な Wnt シグナルと Hh シグナルが相互抑制的に制御される分子機構の解明を試みた。既に報告されている parafibromin 分子上の β -catenin 結合領域 (アミノ酸残基 218 番から 263 番の領域) と GLI1 結合領域 (アミノ酸残基 200 番から 343 番の領域) は重複して存在する [9, 11]。このことから、parafibromin との複合体形成において β -catenin と GLI1 が結合部位を互いに競合しあうことが両シグナルの相互排他的な抑制基盤となっている可能性が考えられた。この可能性を検証するため、HEK293T 細胞に parafibromin、GLI1 および β -catenin S33Y を一過性に共発現させ、免疫沈降実験によって parafibromin/GLI1 複合体形成に対する β -catenin の阻害効果を調べたところ、 β -catenin S33Y の発現により parafibromin/ β -catenin 複合体形成の増加が見られると同時に、parafibromin/GLI1 複合体形成は減少した (図 9A)。さらに、細胞の LiCl 処理によって内因性 Wnt シグナルを人為的に活性増強させた細胞を用いた実験においても、LiCl 処理細胞では parafibromin と内因性 β -catenin との複合体形成の増加が誘導された一方で、parafibromin/GLI1 複合体形成は減少した (図 9B)。これらの結果から、Wnt シグナル活性化によって核内に蓄積した β -catenin は parafibromin-GLI1 間の複合体形成を競合的に阻害し、parafibromin/GLI1 依存的な Hh シグナル標的遺伝子の転写を抑制することが示唆された。

次に、核内に蓄積した GLI1 が parafibromin/ β -catenin 相互作用を競合的に抑制するか否かを検討するために、HEK293T 細胞を LiCl 処理して内因性 Wnt シグナルを活性化した後に GLI1 を異所性発現させ、*In situ proximal ligation assay* (PLA) 法を用いて、GLI1 の発現が内因性の parafibromin/ β -catenin タンパク質間相互作用に及ぼす影響を検討した。その結果、GLI1 発現細胞ではコントロール細胞と比較して内因性の parafibromin/ β -catenin 複合体形成を示す PL spot 数が有意に減少した (図 9C)。この結果から、Hh シグナルの活性化によって核内に蓄積する GLI1 は、parafibromin/ β -catenin 複合体形成を競合的に阻害することが示唆された。

これら一連の成果を通して、parafibromin との複合体形成における β -catenin と GLI1 間の競合が Wnt 経路-Hh 経路間のシグナル競合の分子基盤であることが示唆された。

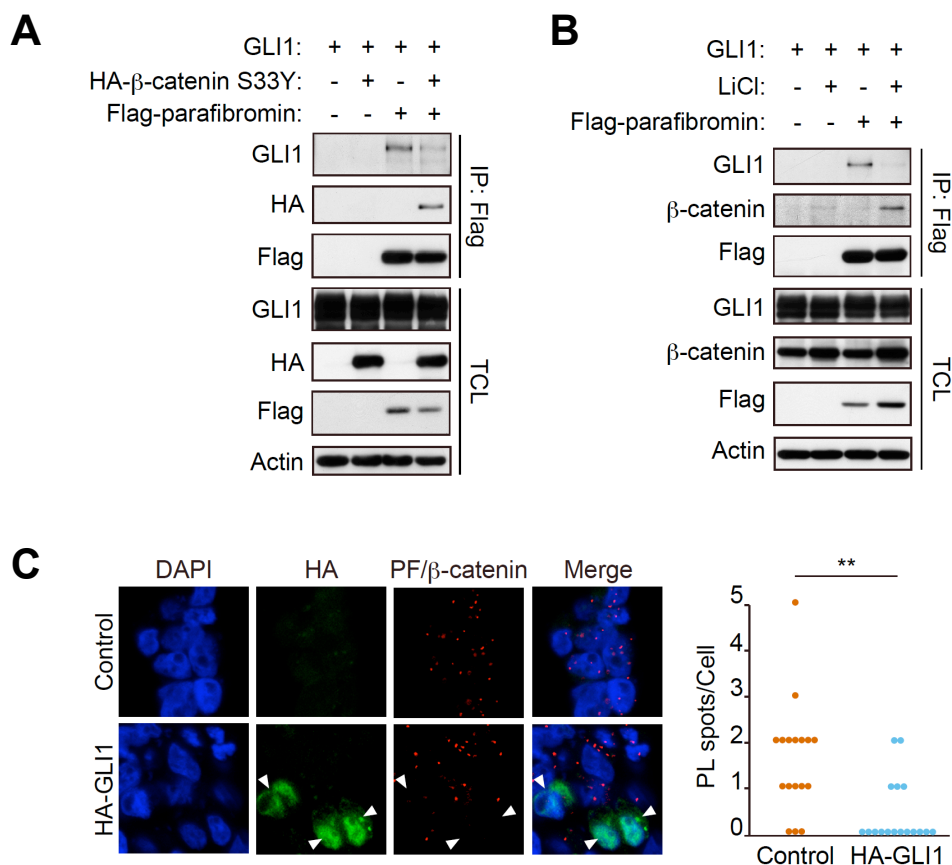


図 9 parafibromin との複合体形成における β-catenin-GLI1 間の競合

(A) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを一過性に導入し、48 時間後に細胞抽出液 (TCL) を調製して抗 Flag 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。(B) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを一過性に導入し、24 時間後に 25 mM の NaCl もしくは LiCl を含む培地による培地交換を行った。さらにその 24 時間後に細胞を回収し、細胞抽出液 (TCL) を抗 Flag 抗体による免疫沈降に供した。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。(C) *In situ* proximal ligation assay (PLA) による内因性 parafibromin/β-catenin 相互作用の解析。HEK293T 細胞にコントロールベクターまたは HA タグを付加した GLI1 (HA-GLI1) 発現ベクターを一過性に導入し、25 mM の LiCl を含む培地で培養した。左図中の赤い点 (PL spot) は parafibromin/β-catenin 相互作用を示す。青色の染色は DAPI による核染色を、緑色の染色ならびに図中の矢頭は HA-GLI1 発現細胞をそれぞれ示す。コントロール細胞ならびに HA-GLI1 発現細胞 1 個あたりの PL spot 数を計数した結果を右グラフに示す。n=17。**p < 0.01。

parafibromin を介した Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調機構

様々な生命現象において、Wnt シグナルと Notch シグナルは密接な相互連関のもとに協調的な機能制御を受けることが知られる。例えば、哺乳動物の腸管上皮組織においては、腸管上皮幹細胞の維持ならびに細胞増殖の制御に Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調的な活性化が必須の役割を担うことが報告されている [33, 34]。しかし、これら 2 つのシグナル経路間の協調的な活性化を担う分子機構の詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究では次に、Wnt ならびに Notch 両シグナルの標的遺伝子群活性化に関わるコアクチベーターとしての機能が明らかとなった parafibromin がこれら 2 つのシグナル間の協調的な制御に関与している可能性を考えた。この可能性を検証するため、初めに parafibromin 依存的な Notch シグナルの活性化に対する Wnt シグナルの影響を検討した。HEK293T 細胞に parafibromin、NICD、および β -catenin S33Y を共発現させ、Notch レポーターの活性変動を測定したところ、 β -catenin S33Y との共発現によって parafibromin/NICD に依存した Notch シグナルの活性化は増強された (図 10A)。

次に、parafibromin 依存的な Wnt シグナルに対する Notch シグナルの影響を同様の実験により検討したところ、parafibromin/ β -catenin を介した Wnt シグナルの活性化は NICD との共発現により有意に促進された (図 10B)。以上の観察から、

parafibromin を介した Wnt シグナルと Notch シグナル間の相互作用は、Wnt-Hh シグナル間で観察された相互抑制的なものではなく、互いの機能を促進し合う関係にあることが示唆された。

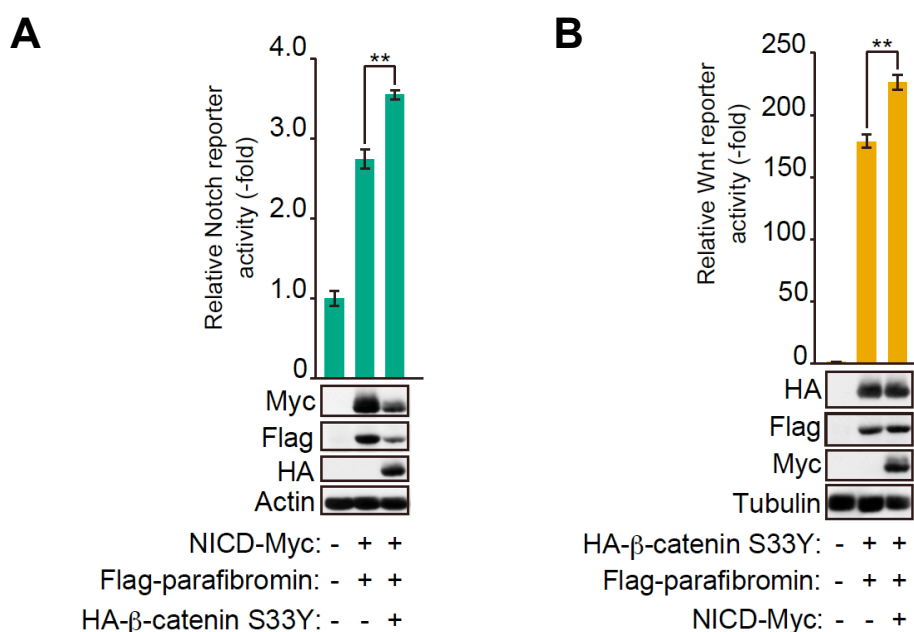


図 10 parafibromin 依存的な Wnt シグナルと Notch シグナルの協調的活性化
 (A, B) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを Notch シグナル反応性のルシフェラーゼレポーター (A) もしくは Wnt 反応性のルシフェラーゼレポーター (B) と共に一過性に導入し、細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 ** $p < 0.01$ 。

次に、parafibromin を介した Wnt シグナル-Notch シグナル間の相互機能増強を担う分子機構を明らかにするため、parafibromin、 β -catenin、および NICD 間のタンパク質相互作用の解析を進めた。HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降実験の結果、 β -catenin の共発現による parafibromin/ β -catenin 複合体形成の増大にともない、parafibromin/NICD 複合体形成が増大することがわかった (図 11A)。従って、Wnt シグナルの活性化により核内に蓄積した β -catenin が parafibromin/NICD 複合体形成の安定化を誘導し、その結果として Notch シグナル標的遺伝子の転写活性化を促進することが示唆された。加えてこのデータは、parafibromin との結合において β -catenin と NICD は互いに競合しないことを示唆している。よって、 β -catenin と NICD は parafibromin に同時に結合可能であり、これら 3 つのタンパク質はタンパク質ヘテロ三量体を形成するというモデルが考えられた。このモデルを検証するため、HEK293T 細胞にリン酸化抵抗性 parafibromin、 β -catenin S33Y、NICD を共発現し、これら 3 分子間におけるヘテロ三量体形成の有無を解析したところ、parafibromin あるいは NICD に対する抗体を用いた免疫沈降実験のいずれの場合においても、残る 2 種類のタンパク質が共免疫沈降することが観察された (図 11B)。この結果より、parafibromin は β -catenin および NICD と共にタンパク質ヘテロ三量体複合体を形成することが示唆され、この三量体

形成を介して Wnt 経路-Notch 経路間の協調的な活性化が促進されることが推察された。

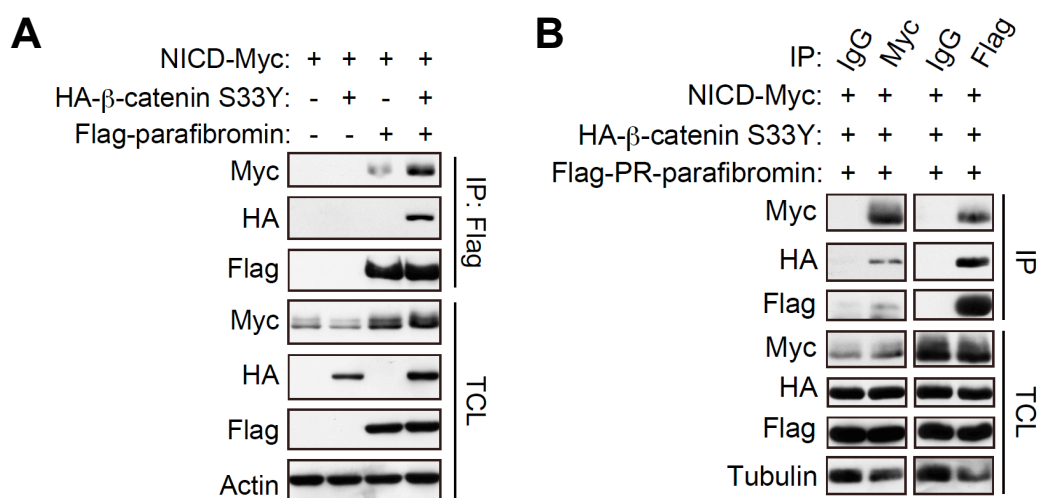


図 11 paraflagbromin/β-catenin/NICD ヘテロ三量体複合体の形成

(A) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを一過性に導入し、48 時間後に細胞抽出液 (TCL) を調製して抗 Flag 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。(B) HEK293T 細胞に図中に示した各発現ベクターを一過性に導入し、細胞抽出液 (TCL) を調製してコントロールマウス IgG 抗体、抗 Flag 抗体、または抗 Myc 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。

腸管上皮における **parafibromin** ならびに **Wnt** シグナル・**Notch** シグナル関連分子の発現解析

これまでの実験結果により示唆された **parafibromin** による **Wnt** シグナル・**Notch** シグナルの機能制御機構は実際に生体内 (*in vivo*) において役割を果たしているのかを調べるため、次にマウス腸管上皮組織における **parafibromin** ならびに **Wnt** シグナル・**Notch** シグナル関連分子の発現解析を行った。マウス大腸組織を試料とした免疫組織化学染色を行ったところ、腸管上皮幹細胞ならびに増殖性の一時増幅細胞 (*transient amplifying cells*) が存在する [35] 腸管陰窩 (*intestinal crypts*) 底部領域の細胞群において、**Wnt** 標的遺伝子 **CD44**、**Sox9** ならびに **Notch** 標的遺伝子 **Hes1** の発現が認められた (図 12A)。このことより、陰窩底部のこれら腸管上皮細胞において **Wnt** シグナルならびに **Notch** シグナルは活性化状態にあることが示唆された。次に、**parafibromin**、**NICD**、 **β -catenin** の免疫組織化学染色ならびにヘマトキシリン・エオジン染色を行った結果、上述した **Wnt**・**Notch** 両シグナルの活性化が見られた陰窩底部領域の細胞において、**parafibromin**、**NICD**、 **β -catenin** の陽性染色がそれぞれ観察された (図 12B)。さらに、同試料を用いて多重蛍光免疫染色を行ったところ、陰窩底部の細胞核内において **parafibromin** と **β -catenin** の共染色 (図 13A) ならびに **β -catenin** と **NICD** の共染色 (図 13B) が見

られた。これらの観察から、parafibromin、 β -catenin ならびに NICD は陰窩底部の腸管上皮細胞内で共発現していることが示唆された。これまでの報告により、腸管上皮幹細胞の維持ならびに一時増幅細胞の細胞増殖制御には Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調的な活性化が重要な役割を担うことが知られる [36]。本項で得られた一連の結果から、parafibromin は腸管上皮細胞内で β -catenin、NICD と共発現し、Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調的な制御に役割を演じている可能性が考えられた。

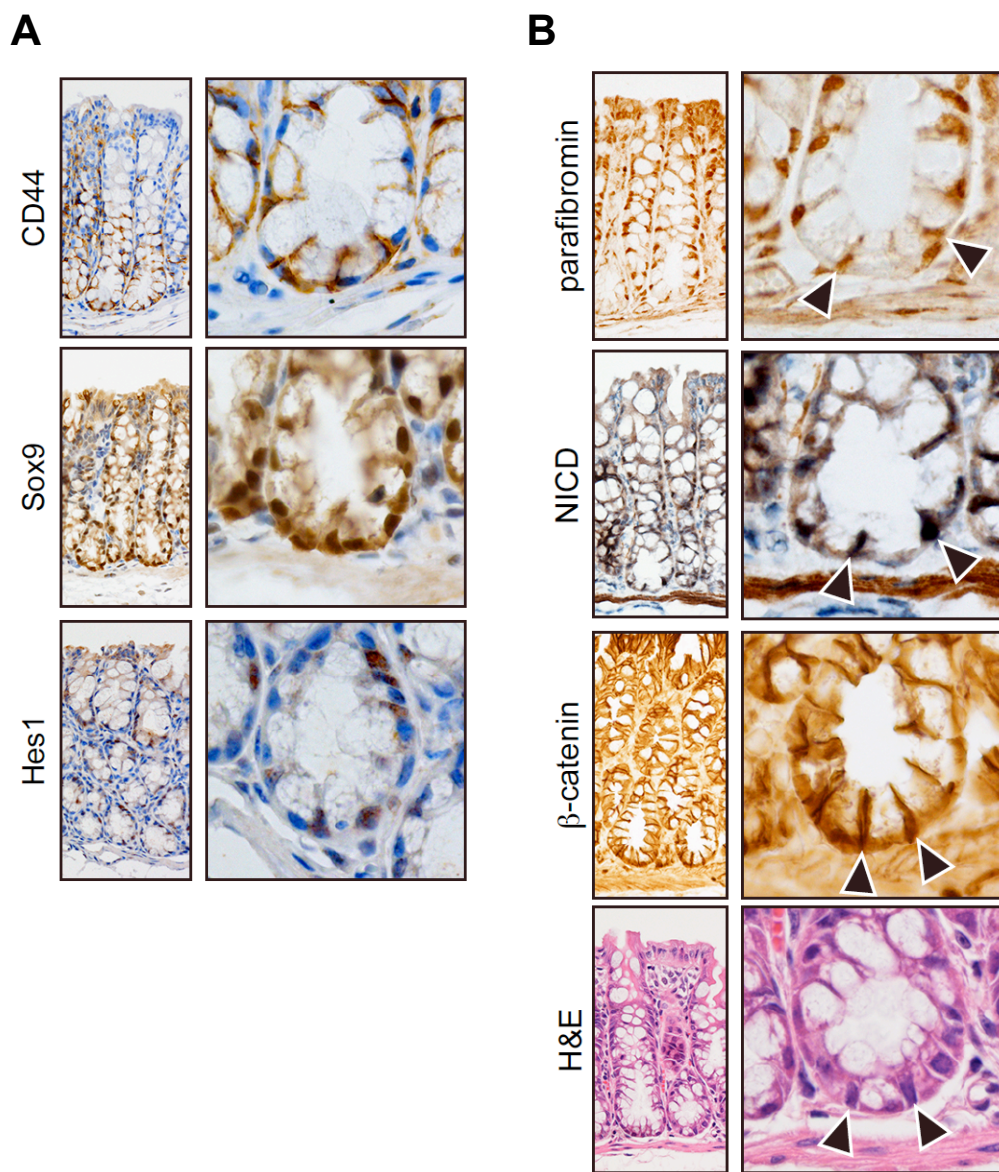


図 12 マウス大腸上皮組織における **parafibromin** ならびに **Wnt** シグナル・**Notch** シグナル関連分子の発現解析

マウス大腸上皮組織における (A) CD44、Sox9、Hes1 の免疫組織化学染色像 (B) parafibromin、NICD、β-catenin の免疫組織化学染色像ならびにヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色像を示す。右側のパネルは大腸陰窩底部の拡大像を示す。(B) 図中の矢頭は大腸陰窩底部に存在する細胞の核内における陽性染色を示す。

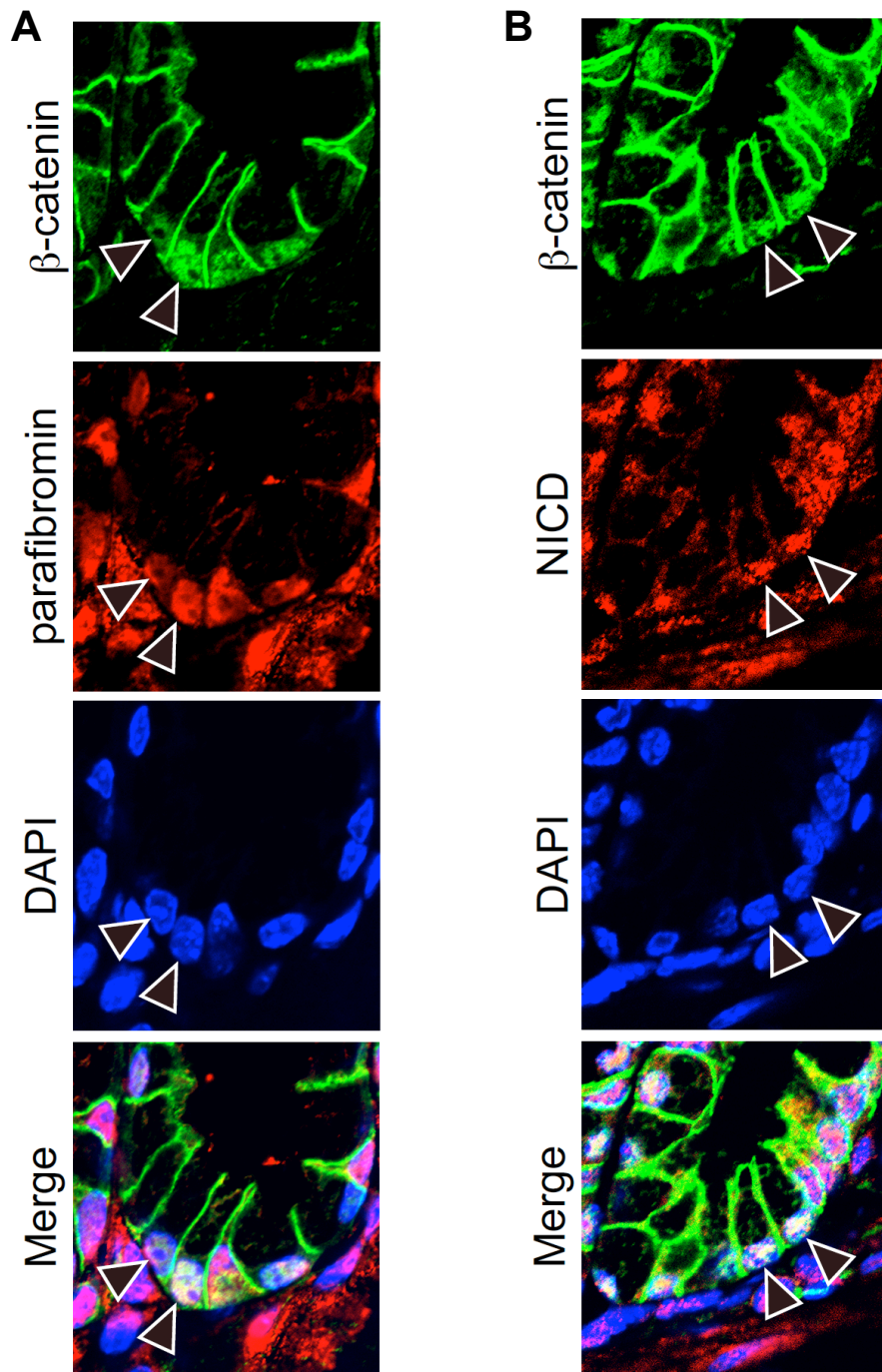


図 13 マウス大腸上皮組織における parafibromin、 β -catenin、NICD の多重蛍光免疫染色

マウス腸管陰窩底部における (A) β -catenin ならびに parafibromin (B) β -catenin ならびに NICD の多重蛍光免疫染色像を示す。青色の染色は DAPI による核染色を示す。図中の矢頭は 2 分子の共発現が観察された細胞を示す。

parafibromin によるシグナル制御を介した腸管上皮の恒常性維持機構

In vivo における parafibromin の役割をさらに解析するため、*parafibromin/Hrpt2* 遺伝子のコンディショナルノックアウト (cKO) マウス (CAG-CreER;
Hrpt2^{fllox/fllox} マウス [24, 25]) を用いた研究を次に進めた。この cKO マウスでは、タモキシフェンの腹腔内投与によって β -actin プロモーターの制御下で全身性に発現したタモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼが活性化し、*parafibromin* 遺伝子のノックアウトが誘導される。このマウスを使って、初めにタモキシフェンの投与によって腸管上皮細胞で *parafibromin* の発現消失が起こるか否かを免疫組織化学染色により検討した。タモキシフェン投与開始 5 日後において、コントロールマウスの腸管上皮細胞核内に観察される *parafibromin* 陽性染色が *parafibromin* cKO マウスでは顕著に減弱していることが明らかとなった (図 14)。この観察から、本研究実験条件下で、マウス腸管上皮細胞における *parafibromin* の効率的な欠損が誘導されることが示された。

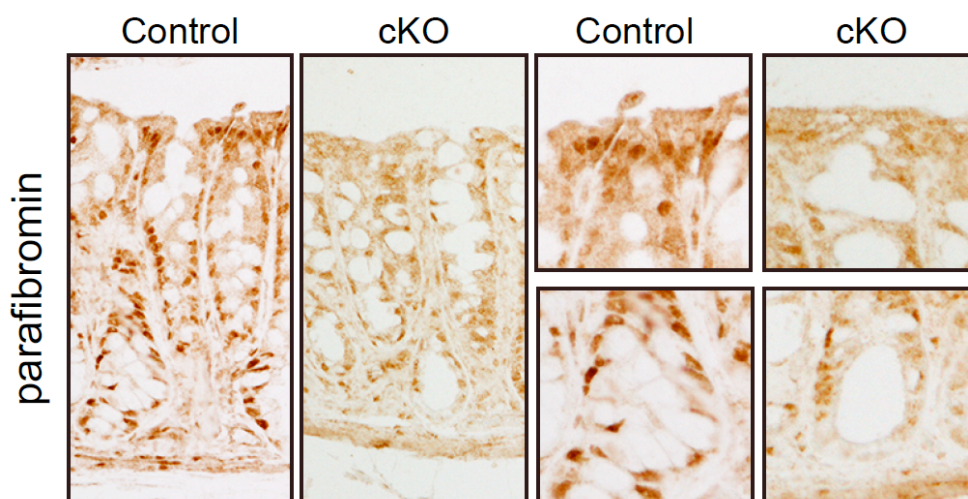


図 14 *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス大腸上皮組織における *parafibromin* の免疫組織化学染色

野生型同腹仔コントロールマウス (Control) および *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス (cKO) のタモキシフェン投与後 5 日目の大腸上皮組織における *parafibromin* の免疫組織化学染色像を示す。右側のパネルは大腸陰窩の頂端部および底部の拡大像を示す。Control の腸管上皮細胞で観察される細胞核内の *parafibromin* 陽性染色が cKO では著しく喪失していた。

Wnt シグナルと Notch シグナルの協調的活性化における *parafibromin* の役割を
個体レベルで検証するため、*parafibromin* cKO マウスの腸管上皮における Wnt
シグナルならびに Notch シグナルの活性化状態を免疫組織化学染色により検討
したところ、コントロールマウスの陰窩基底部に陽性染色が観察される Wnt 標
的遺伝子 CD44、Sox9、ならびに Notch 標的遺伝子 Hes1 が、*parafibromin* cKO
マウスでは著しく発現低下していることが明らかとなった (図 15A、B、C)。こ
れらの観察により、*parafibromin* はマウス腸管上皮における Wnt シグナルならび
に Notch シグナル活性化に必須の役割を担うことが示唆された。また、
parafibromin cKO マウスの腸管上皮においては、*parafibromin* の欠失誘導にとも
ない細胞増殖マーカーである Ki-67 の陽性細胞が著明に減少した (図 15D)。こ
の結果は、*parafibromin* の喪失により Wnt/Notch シグナルが制御する腸管上皮の
細胞増殖制御が破綻したことを示唆しており、Wnt-Notch 制御に *parafibromin* が
必須の役割を果たすという本研究のモデルを支持する。

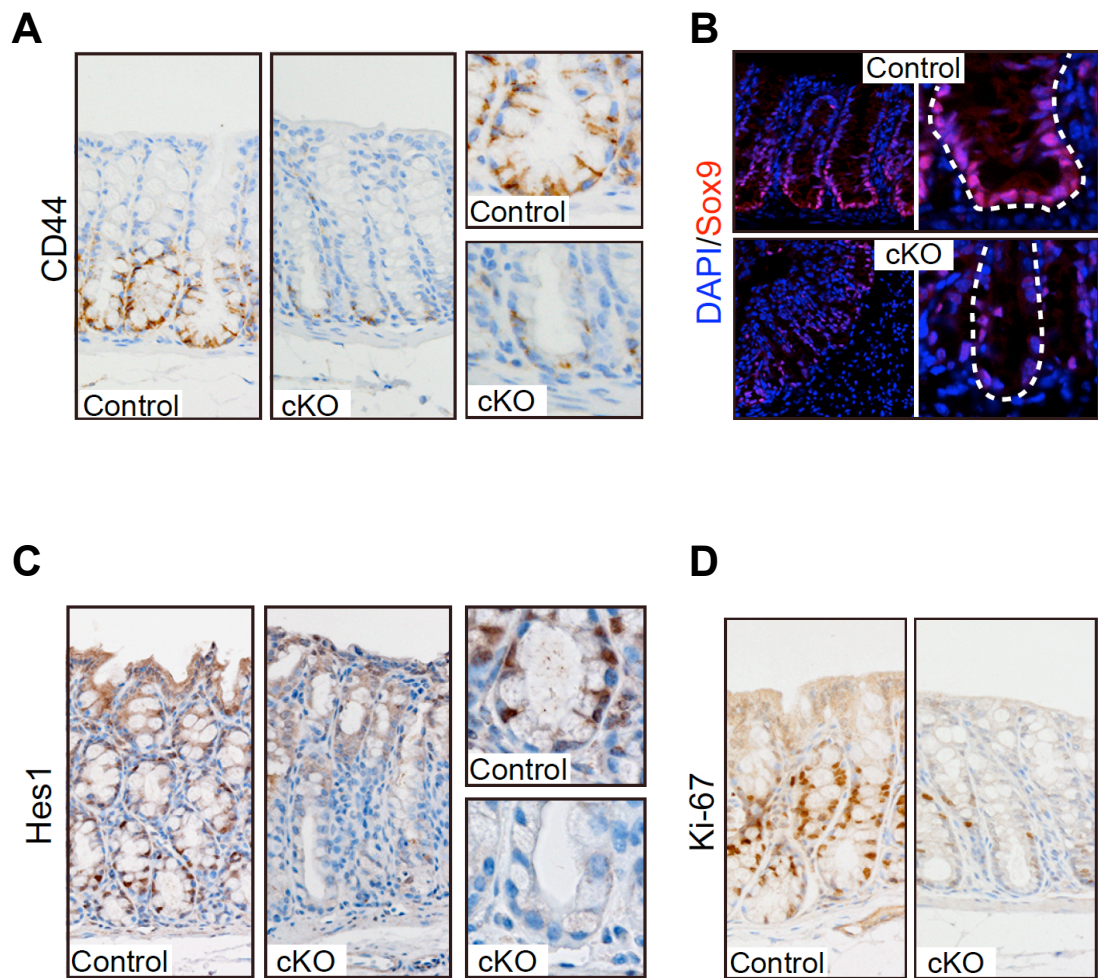


図 15 *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス大腸上皮組織における Wnt 標的遺伝子、Notch 標的遺伝子、ならびに細胞増殖マーカーの免疫染色

(A-D) 野生型同腹仔コントロールマウス (Control) および *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス (*CAG-CreER; Hrpt2^{lox/lox}*, cKO) のタモキシフェン投与後 5 日目の大腸上皮組織における (A) CD44 の免疫組織化学染色像、(B) Sox9 の免疫蛍光染色像、(C) Hes1 および (D) 細胞増殖マーカー Ki-67 の免疫組織化学染色像をそれぞれ示す。各図右側のパネルは大腸陰窩底部の拡大像を示す。図 (B) 中の白い破線は腸陰窩底部の輪郭を示す。

加えて、*parafibromin* cKO マウスでは腸管上皮細胞の興味深い形態学的変化が観察された。コントロールマウスの大腸陰窩頂端部には高度に分化し極性化した円柱状の形態を示す吸収上皮細胞 (enterocytes) が観察され (図 16A)、実際にこれら吸収上皮細胞の頂端 (apical) 部には免疫染色により微絨毛 (microvilli) のマーカータンパク質 Villin が検出された (図 16B)。これに対し、*parafibromin* を cKO したマウスの大腸陰窩頂端部構成細胞は正常な吸収上皮細胞の形態を喪失しており (図 16A)、Villin 陽性の微絨毛構造も欠失していた (図 16B)。腸管上皮における吸収上皮細胞の分化には間葉系細胞における Hh シグナルの活性化が必須の役割を担うと考えられていることから [37, 38]、*parafibromin* のノックアウトにより引き起こされた間葉系細胞における Hh シグナルの異常不活化を介して、吸収上皮細胞への分化が阻害された可能性が考えられた。

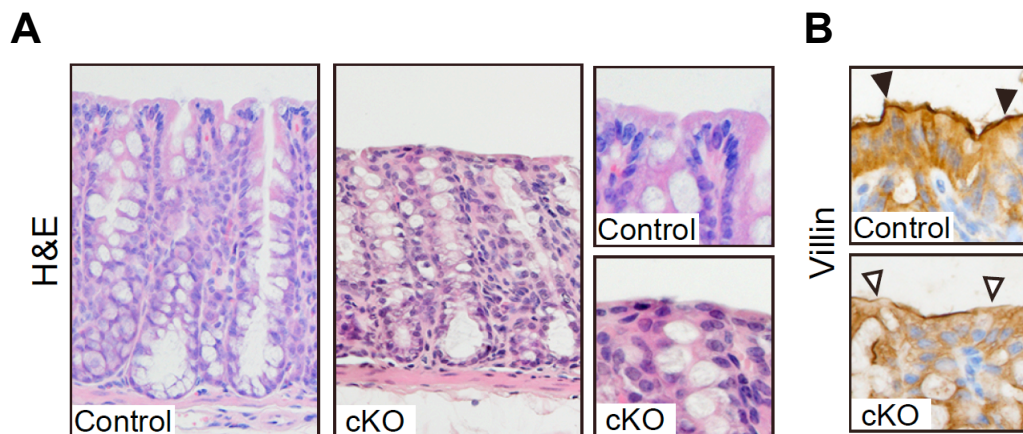


図 16 *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウスにおける腸管上皮細胞の形態・分化異常

野生型同腹仔コントロールマウス (Control) および *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス (*CAG-CreER; Hrpt2^{lox/lox}*、cKO) 大腸上皮組織の (A) ヘマトキシリン・エオジン染色像および (B) Villin の免疫組織化学染色像を示す。図 (B) 中の黒矢頭は吸収上皮細胞頂端部に存在する微絨毛を示す。cKO の細胞では白矢頭で示すように微絨毛の喪失が観察された。

腸管上皮細胞系列における *parafibromin* の役割をさらに解明するため、*Hrpt2^{lox/lox}* マウスと *Villin-Cre* マウス [26] を交配した *parafibromin* cKO マウス (*Villin-Cre; Hrpt2^{lox/lox}* マウス) を作製した。この *Villin-Cre; Hrpt2^{lox/lox}* マウスでは、胎生期 E9 より腸管上皮細胞系列特異的な *parafibromin* のノックアウトが誘導される。興味深いことに、この *Villin-Cre; Hrpt2^{lox/lox}* マウス胚の腸管上皮組織をヘマトキシリン・エオジン染色により観察したところ、コントロールマウス

では胎生期 E16.5 までに形成される腸管上皮構造がノックアウトマウスでは形成されないことが明らかとなった (図 17)。この観察から、*parafibromin* はマウス胚発生における腸管上皮組織の形成に必須であることが示された。

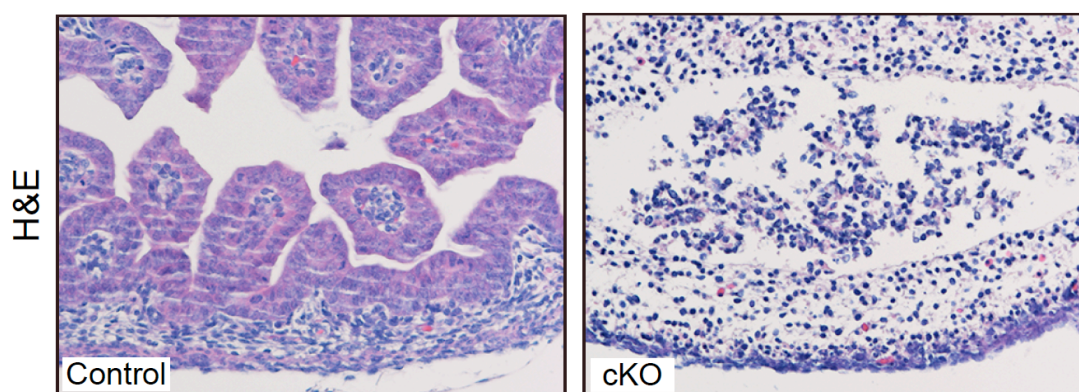


図 17 腸管上皮特異的 *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウスにおける胚性腸管上皮の形成不全

野生型同腹仔コントロールマウス (Control) および腸管上皮特異的 *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス (*Villin-Cre; Hrpt2^{flx/flx}*, cKO) の胎生期 E16.5 における胚性腸管組織のヘマトキシリン・エオジン染色像を示す。

次に、マウス腸管上皮幹細胞の3次元オルガノイド培養法 (intestinal organoid culture) [27] を用いて、腸管上皮細胞の維持に *parafibromin* が果たす役割を解析した。コントロールマウスもしくは *parafibromin* cKO マウス (*CAG-CreER*; *Hrpt2^{lox/lox}* マウス) のそれぞれから精製した腸管陰窩を用いてオルガノイド培養を開始し、オルガノイドが形成された後に培地中に 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を添加することで *parafibromin* のコンディショナルノックアウトを誘導した。その結果、*parafibromin* cKO マウスの腸管陰窩から形成されたオルガノイドは 4-OHT の添加後に成長が著しく抑制され、オルガノイド構造の崩壊が観察された (図 18A)。さらに、4-OHT 添加後におけるコントロールと *parafibromin* cKO それぞれのオルガノイド数を定量したところ、*parafibromin* cKO ではオルガノイド数の著しい減少が認められた (図 18B)。よって、*parafibromin* はマウス腸管上皮細胞のオルガノイド形成と維持に必要不可欠な分子と考えられる。

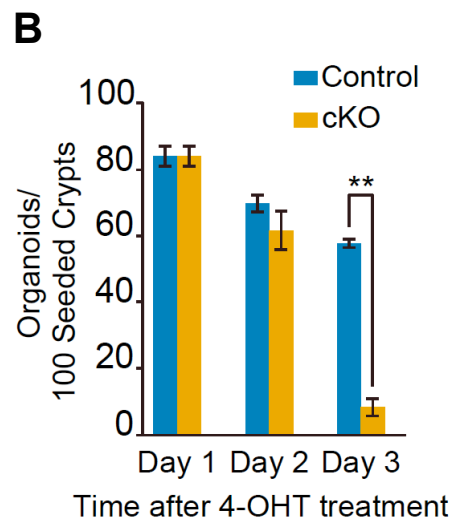
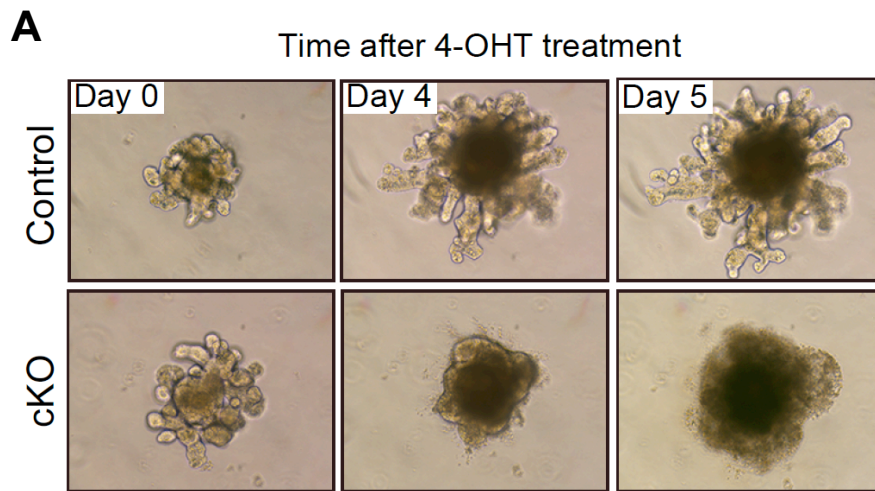


図 18 マウス腸管上皮 3次元オルガノイド培養における *parafibromin* ノックアウトの影響

(A) 野生型同腹仔コントロールマウス (Control) および *parafibromin* コンディショナルノックアウトマウス (*CAG-CreER; Hrpt2^{lox/lox}*, cKO) の腸管陰窩から形成されたオルガノイド培養の様子を示す。培養開始 8 日目に培地中に 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を添加し、その後単一オルガノイドの経時観察を行った。(B) 4-OHT 添加後 1 日目、2 日目、3 日目における Control と cKO それぞれのオルガノイド数を定量した結果をグラフで示す。グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 **p < 0.01。

以上の一連の研究成果から、parafibromin は腸管上皮におけるシグナル経路の制御を通して腸管上皮組織の恒常性維持ならびに胚発生における腸管上皮の形成に必須の役割を果たしていることが示唆された。このことは、parafibromin の質的・量的異常が消化器がんを含む多様な疾患の発症につながる可能性を示している。

Ptk6 による parafibromin 依存的シグナル活性化の抑制機構

parafibromin は Wnt シグナル、Notch シグナルならびに Hh シグナルにより複雑に制御される腸管上皮の陰窩-絨毛軸 (crypt-villus axis) に沿った細胞の増殖・分化制御に重要な役割を担う。しかしながら、parafibromin を介して腸管上皮の陰窩-絨毛構造に依存した細胞増殖-分化の制御を支配する上位機構の本態は不明である。この問題に迫るべく、本研究最後の課題として parafibromin/Wnt シグナル/Notch シグナル依存的な細胞増殖制御を抑制する分子機構の解明を試みた。その結果、parafibromin の機能制御を介して Wnt/Notch シグナルの活性化を抑制する興味深い候補分子として Protein tyrosine kinase 6 (Ptk6) を見出した。

Ptk6 は非受容体型のタンパク質チロシンキナーゼであり、そのアミノ (N) 末端側から順に SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、タンパク質チロシンキナーゼドメ

イン、そしてカルボキシ (C) 末端尾部から構成される [39]。この全体構造は、Src ファミリーキナーゼときわめて類似するが、細胞膜局在に必須となる N 末端側ミリスチル化サイトを保有しないこと、ならびにアミノ酸配列相同性の低さから、Ptk6 は Src ファミリーキナーゼとは異なるチロシンキナーゼファミリーに分類される。Ptk6 はヒトのメラノサイトならびに乳がん細胞から最初に単離された [40, 41]。興味深いことに、マウスの正常組織では、Ptk6 は分化した非増殖性の腸管上皮細胞特異的に発現している [42, 43]。これらの知見に基づき、本研究では「腸管上皮細胞に発現するチロシンキナーゼである Ptk6 が parafibromin をチロシンリン酸化することにより parafibromin 依存的な Wnt シグナルならびに Notch シグナルの活性化を抑制し腸管上皮細胞の増殖を負性制御する」という作業仮説を立てた。この仮説を検証するために、初めにマウス小腸腸管上皮における Ptk6 ならびに parafibromin の発現を免疫組織化学染色により解析したところ、Ptk6 と parafibromin は、腸管上皮の陰窩 (crypt) と絨毛 (villus) の境界部 (crypt-villus border) から絨毛の先端にかけて存在する分化した非増殖性の腸管上皮細胞の核内に共発現していることが明らかとなった (図 19)。この観察により、これら腸管上皮細胞内で Ptk6 が parafibromin をチロシンリン酸化するという上述の作業仮説に当てはまる状況証拠が得られた。

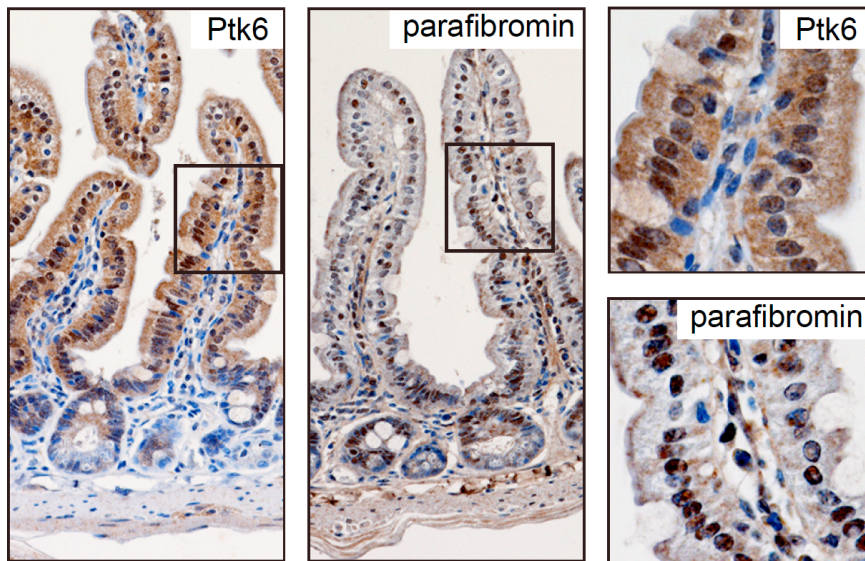


図 19 マウス小腸上皮組織における Ptk6 および parafibromin の免疫組織化学染色

マウス小腸上皮組織における Ptk6 および parafibromin の免疫組織化学染色像を示す。右側のパネルは小腸上皮絨毛部における拡大像を示す。

次に、Ptk6 が parafibromin を実際にチロシンリン酸化するか否かを検討するため、ヒト胃上皮由来細胞株 AGS に parafibromin ならびに Ptk6 を異所性に共発現させ、parafibromin のチロシンリン酸化状態を免疫ブロットにより解析した。その結果、Ptk6 の共発現により parafibromin のチロシンリン酸化レベルは著しく増加した (図 20A)。さらに、AGS 細胞の内因性 Ptk6 を特異的な siRNA により発現抑制したところ、内因性 parafibromin のチロシンリン酸化レベルの減少が観

察された (図 20B)。これらのことから、Ptk6 は細胞内で parafibromin のチロシン

リン酸化を実際に担う責任キナーゼであることが強く示唆された。

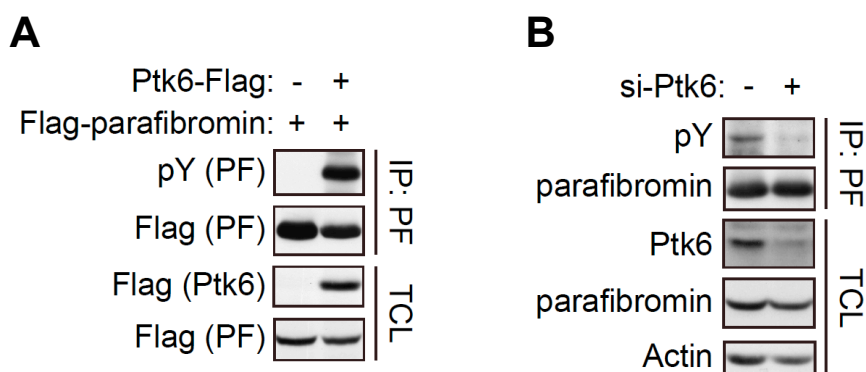


図 20 Ptk6 による parafibromin のチロシンリン酸化調節

(A) AGS 細胞に Flag タグをそれぞれ付加した parafibromin と Ptk6 を共発現させ、細胞抽出液 (TCL) を調製して抗 parafibromin 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。(B) AGS 細胞に Ptk6 特異的 siRNA を一過性に遺伝子導入し、細胞抽出液 (TCL) を調製して抗 parafibromin 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。

次に、Ptk6 が SHP2 による parafibromin のチロシン脱リン酸化部位と同一のチロシン残基をリン酸化することで parafibromin の脱リン酸化依存的な活性を拮抗的に抑制する可能性を考えた。この可能性を検証するために、野生型 parafibromin もしくは SHP2 の標的部位となるチロシン残基 (Y290、Y293、Y315) をフェニルアラニンに置換したチロシンリン酸化抵抗性 parafibromin を Ptk6 と共に AGS 細胞内に共発現させたところ、Ptk6 による野生型 parafibromin のリン酸化は観察された一方、チロシンリン酸化抵抗性 parafibromin のリン酸化は観察されなかった (図 21)。このことより、Ptk6 は SHP2 による標的部位と同じ parafibromin の 290 番、293 番、および 315 番目の 3 つのチロシン残基をリン酸化することが示唆され、Ptk6 はそれら標的チロシン残基のリン酸化を介して parafibromin のチロシン脱リン酸化依存的なシグナルの活性化を抑制することが考えられた。

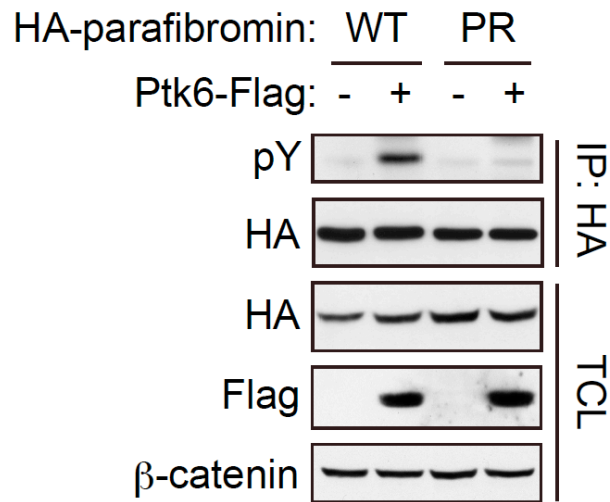


図 21 Ptk6 による parafibromin のチロシンリン酸化部位の解析

AGS 細胞に HA タグを付加した野生型 parafibromin (WT) もしくはチロシンリン酸化抵抗性 parafibromin (PR) を Flag タグを付加した Ptk6 と共発現させ、細胞抽出液 (TCL) を調製して抗 HA 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。

Ptk6 が細胞内で parafibromin の機能を直接制御しているのか否かを検討するために、AGS 細胞に Ptk6 特異的 siRNA を導入し、Wnt シグナルの活性変化を測定した。その結果、siRNA による内因性 Ptk6 の発現低下に反比例する形で Wnt レポーターの有意な活性上昇が観察された (図 22A)。加えて、siRNA による Ptk6 の発現抑制は、AGS 細胞内の内因性 parafibromin/ β -catenin 複合体形成を促進した (図 22B)。従って、Ptk6 は parafibromin のチロシンリン酸化を介して

parafibromin 依存的な parafibromin/ β -catenin 複合体形成を拮抗的に阻害し、Wnt シグナル活性化の抑制に機能することが示唆された。

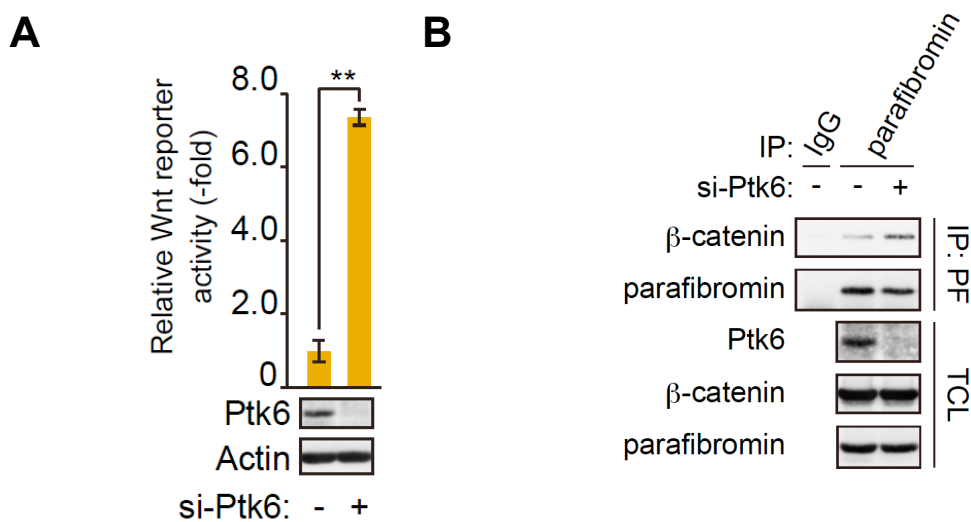


図 22 Ptk6 による parafibromin 依存的な Wnt シグナル活性化の抑制

(A) AGS 細胞に Ptk6 特異的 siRNA を Wnt シグナル反応性のルシフェラーゼレポーターと共に一過性に導入した細胞抽出液を試料としてレポーター活性の測定およびイムノブロット解析を行った。グラフは 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。 ** $p < 0.01$ 。 (B) AGS 細胞に Ptk6 特異的 siRNA を一過性に遺伝子導入し、細胞抽出液 (TCL) を調製してコントロールウサギ IgG 抗体あるいは抗 parafibromin 抗体による免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物 (IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、イムノブロット解析を行った。

以上の実験結果より、腸管上皮の crypt-villus border を超えた増殖性の細胞（一時増幅細胞、transient amplifying cells）では、核内に発現する Ptk6 を介した parafibromin のチロシンリン酸化により Wnt シグナルが抑制され、細胞増殖が抑制される、という腸管上皮における新規の増殖・分化制御モデルが考えられた。

考察

本研究から、parafibromin は Wnt 経路、Hh 経路、Notch 経路という 3 つの細胞内シグナル経路の標的遺伝子活性化に共通して関与する分子であることが明らかとなった。細胞外リガンド分子による受容体の刺激によって生成され、細胞質内を並走した Wnt、Hh、Notch 各シグナルは、核内に入り parafibromin を足場タンパク質とする遺伝子転写制御複合体の構築に関わる。この複合体構築において、parafibromin は各シグナル経路の最終エフェクターとなる転写制御因子間の競合的あるいは協調的な複合体形成を促し、各シグナルの遮断、選択、増強をもたらす。本研究で明らかにした parafibromin による Wnt-Hh-Notch シグナル連関の制御機構の模式図を以下に示す (図 23)。

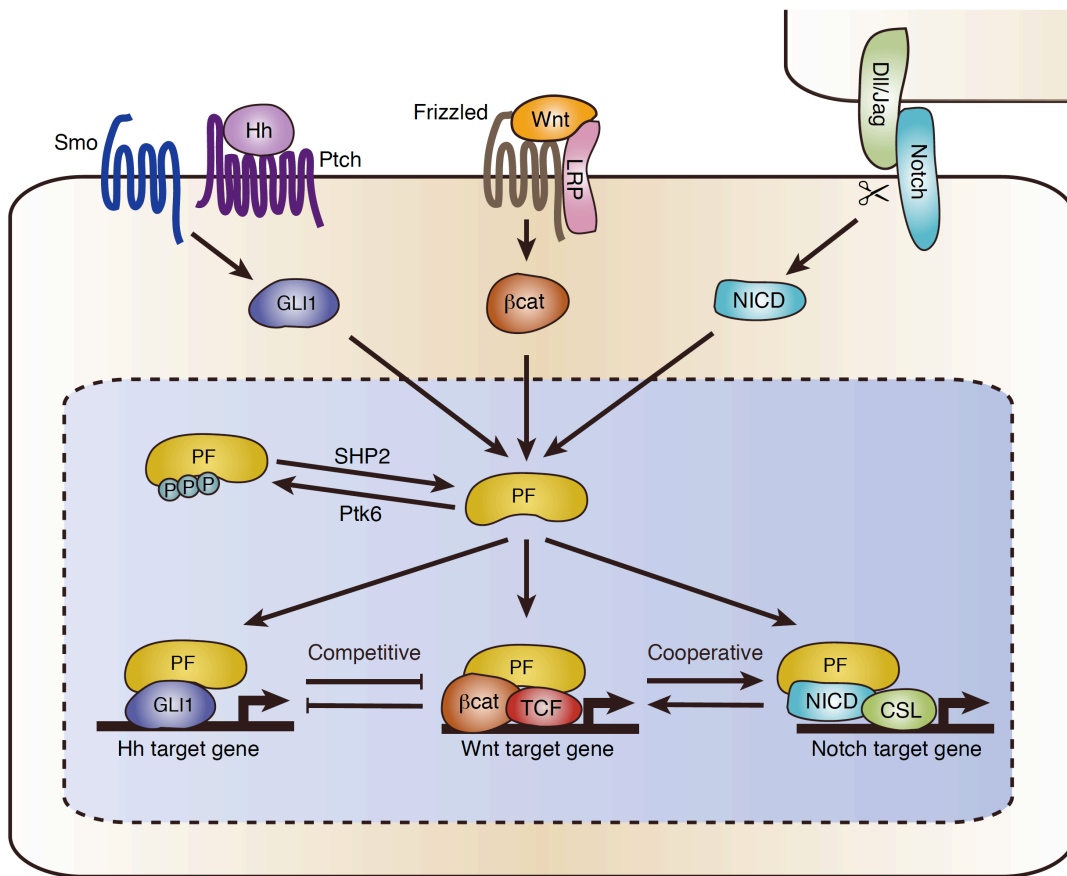


図 23 parafibromin による Wnt-Hh-Notch シグナル連関の制御機構

細胞外リガンド分子による受容体刺激によって活性化された Wnt、Hh、Notch 各シグナル経路はそれぞれのシグナルのエフェクター分子 (β -catenin、GLI1、ならびに NICD) の核内移行を誘導する。核内に集積したそれらエフェクター分子は、SHP2 ならびに Ptk6 により調節されるチロシン脱リン酸化依存的に parafibromin と複合体形成し、parafibromin は Wnt、Hh、Notch 各経路の標的遺伝子転写活性化における転写コアクチベーターとして機能する。しかしここで、 β -catenin と GLI1 は parafibromin との複合体形成において互いに競合し合う関係にあり、下流の Wnt シグナルと Hh シグナルは parafibromin を介して相互抑制的に制御される。一方、parafibromin は β -catenin ならびに NICD とタンパク質ヘテロ三量体複合体を形成し、Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調的な活性化を促進する。この parafibromin による Wnt-Hh-Notch シグナルの連関制御機構は腸管上皮の維持を初めとする多様な生命現象に重要な役割を果たしていることが本研究成果から示唆される。

核内足場タンパク質としての **parafibromin**

本研究により、**parafibromin** は Wnt、Hh、Notch 各シグナル経路のエフェクター転写制御因子 (β -catenin、GLI1、NICD) と複合体形成し、これらシグナル経路間の連動した制御に働く分子であることが明らかとなった。1つのタンパク質が複数のシグナル伝達分子と物理的に相互作用し、時空間的にそれら分子を関連づけることで機能的な相互作用を媒介するという点において、**parafibromin** は核内における一種の「足場タンパク質」として捉えられる。ただし、他の既知の足場タンパク質と比較して、**parafibromin** はきわめてユニークな性質ならびに生物学的機能を有する足場タンパク質であると考えられる。これまでに知られる足場タンパク質の多くは、同一のシグナル伝達経路に属する複数の分子群を空間的に近場に繋ぎ止めることによりシグナルの効率的な伝達を媒介する働きを持つ（例えば、哺乳動物 RAS/MAPK シグナル伝達に機能する KSR 足場タンパク質など） [44]。これに対し **parafibromin** は、異なるシグナル伝達経路に属する分子群が各々のシグナル伝達の終着点として行き着く共通のプラットフォームになると考えられる。そのうえで、Wnt シグナルと Hh シグナルの伝達が同時に行き着いた場合には、両シグナルの相対的強度や β -catenin・GLI1 の細胞内濃度に応じて、**parafibromin** はどちらか一方のシグナル分子に優先的にそのプラ

ットフォームを占有させ、他方は排斥してしまう。一方、Wnt シグナルと Notch シグナルのペアの場合には、両シグナルの転写制御因子を同時にプラットフォーム上にとどめ、協調的なシグナル活性化を促進する。このような複雑かつ巧妙な核内足場タンパク質としての機能により、parafibromin は細胞文脈に依存した多様なシグナルの入力を統合・制御し、最終的に出力すべき情報を決定する「細胞のロジックボード」のように機能する分子である可能性が考えられる。

このシグナル統合のためのロジックボードとしての parafibromin の機能は、増殖・分化といった細胞レベルの現象から、組織・臓器の発生・構築・維持・再生といった生体现象にいたるまでの多くの生物学的イベントの制御に深く関与していることが本研究から推察される。

parafibromin によるシグナル制御における PAF 複合体の関与

本研究により、チロシン脱リン酸化 parafibromin は、これまで明らかとなっていた Wnt シグナルの転写制御に加え、Hh シグナルならびに Notch シグナル標的遺伝子群の転写活性化にも働くことが明らかとなった。しかし、parafibromin によるシグナル制御機構について、現状では解決されていない重要な課題もある。それは、「parafibromin による Wnt・Hh・Notch シグナルの転写活性化制御は、

PAF 複合体の機能に依存したのか否か」という点である。当研究室の先行研究において、PAF 複合体構成因子 (Paf1, Ctr9) の発現が抑制された細胞においても parafibromin の異所性発現が Wnt シグナルの転写活性化を誘導したことから、「parafibromin は PAF 複合体非依存的に（あるいは単独に）Wnt シグナル標的遺伝子の転写活性化に機能しうる」というモデルが提起されている [13]。しかしながら、このモデルは parafibromin が PAF 複合体依存的にシグナル制御に働く可能性を必ずしも否定するものではない。生理的条件下において細胞内 parafibromin の大部分は PAF 複合体を形成して存在することを示唆する化学量論的な実験結果（未発表データ）や、Notch シグナルの制御に PAF 複合体の構成因子 (Ctr9 ならびに Rtf1) が関与することを示す遺伝学的知見 [16]、ならびに PAF 複合体の構成因子 Leo1 と β -catenin が相互作用することを示す知見 [9] などに鑑みるに、parafibromin によるシグナル活性化に PAF 複合体の機能が関与している可能性は依然として十分に考えられる。そこで、この可能性を検証するため、細胞内で PAF 複合体構成因子を発現抑制させる実験や、各シグナルの標的遺伝子 DNA と parafibromin・PAF 複合体間の相互作用を解析するクロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験等を行うことにより、parafibromin 依存的なシグナル制御における PAF 複合体の役割を明らかにしていきたいと考えている。また、本研

究で観察された **parafibromin** 関連の表現型は、PAF 複合体が担う基本的な転写制御の破綻によるものであるか、という点について明確にすることも重要な課題である。本研究で行ったルシフェラーゼレポーターアッセイの結果では、特定のシグナルに依存しない非特異的なレポーター (内部標準レポーター) の活性は **parafibromin** の発現量やリン酸化状態に依らずほぼ一定であったことから、**parafibromin** は基本的な転写制御よりもむしろ特異的なシグナル制御に機能していることが現状では考えられる。この点についてさらに検討を深めていくために、腸管上皮オルガノイド培養実験で **parafibromin** または他の PAF 複合体構成因子の発現抑制または亢進を行い、表現型を比較する実験などを今後は進めていきたい。

parafibromin を介した Wnt-Hh シグナル連関機構

本研究ではまず、Wnt シグナルと Hh シグナルの両者に共通して役割を担う分子である **parafibromin** に着目することで、単一の細胞内でこれら 2 つのシグナルが相互排他的な活性調節を受ける機構の本態について解明を試みた。そして、**parafibromin** との複合体形成における β -catenin-GLI1 間の競合が起きることにより、その下流の Wnt 標的遺伝子ならびに Hh 標的遺伝子発現が相互排他的な発現

制御を受けることを見出した。この新たな知見は、生体内やヒト疾患において観察される Wnt シグナル-Hh シグナル間の二律排他的調節を分子レベルで説明しうるものである。

ヒトの大腸がん [45, 46] や胃がん [47, 48] において、核内に β -catenin を高発現しているがん組織では GLI1 の発現が低く、逆に GLI1 を高発現しているがん組織では β -catenin の発現が低い、という β -catenin-GLI1 間の発現パターンの逆相関が報告されている。またマウス中脳におけるドーパミンニューロンの分化調節には、Wnt シグナルが Hh シグナルに対して拮抗的に作用することで前駆細胞からのドーパミンニューロンの産生を抑制することが知られている [49]。

本研究で行った *in vitro* の実験結果から、これらの発がん過程や神経系で観察される現象の背景には parafibromin を介した β -catenin-GLI1 間の競合が分子基盤として存在している可能性が強く示唆される。従って今後の展望として、個体内での生理的な働きとして単一細胞内での parafibromin を介した Wnt-Hh 間の拮抗的相互作用が実際に機能しているのかを知ることは重要である。この問題を追求するため、大腸がん細胞や胃がん細胞を用いた発がんモデル実験における parafibromin の役割のさらなる検討や、マウス中枢神経系の発生に対して parafibromin のノックアウトが及ぼす影響の解析などを行っていく予定である。

また、本研究における *parafibromin* を介した Wnt シグナル-Hh シグナル間の競合的制御モデルを考えると、細胞内における *parafibromin* の発現量やリン酸化状態がシグナル間競合の度合いを決定する重要な要素となりうる可能性が推察されるが、*parafibromin* 遺伝子の片アリル性の機能喪失を保有する家族性 HPT-JT 症候群患者や *parafibromin* のヘテロ KO マウスにおいてはハプロ不全による明確な表現型が観察されない [24] ということは大きな疑問であり、興味深い。従って今後の課題として、細胞内における *parafibromin* の発現量やリン酸化状態の変化が Wnt シグナル-Hh シグナル間の制御モードに及ぼす影響の定量的あるいはシステム生物学的な解析にも取り組んでいきたい。

***parafibromin* を介した Wnt-Notch シグナル連関機構**

本研究の実験結果から、*parafibromin* は β -catenin ならびに NICD とタンパク質ヘテロ三量体複合体を形成し、Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調的な活性化を促すことが示唆された。 β -catenin と NICD は *parafibromin* との複合体形成においても下流のシグナル伝達においても互いに競合しないという事実は、 β -catenin と GLI1 が互いに競合関係にあるという事実と好対照を示す興味深い現象である。 β -catenin と GLI1 の場合、*parafibromin* 上の結合責任領域が重複して

いたため複合体形成において互いに競合したことを考えると、parafibromin 上の β -catenin と NICD の結合責任領域は異なる可能性が考えられる。しかし、parafibromin 上の β -catenin 結合責任領域は既に同定されているものの、parafibromin 上の NICD 結合責任領域は未だ不明である。そこで今後の課題として、parafibromin 上の NICD 結合責任領域を明らかにするために、種々の parafibromin の領域欠損変異体と NICD との結合を解析していきたいと考えている。また、本研究における免疫沈降実験の結果（図 11A, B）から parafibromin/ β -catenin/NICD 三量体の存在が示唆されたものの、その存在のより厳密な証明のためには、連続的 (sequential) な免疫沈降（例えば、抗 parafibromin 抗体で免疫沈降した後に得られた免疫沈降物に対してさらに抗 β -catenin 抗体を用いた免疫沈降を行い、NICD の共免疫沈降を検出する実験）による解析を行う必要があると考えられる。これに加え、三量体が実際にシグナル標的遺伝子クロマチン上に存在するか否かをクロマチン免疫沈降実験やゲルシフトアッセイ (EMSA) により解析することも重要である。さらに、三量体形成の生物学的な意義を明らかにするために、マウス腸管上皮試料を用いた三量体形成の解析や、parafibromin ノックアウトマウス腸管上皮組織での β -catenin/NICD タンパク質発現量の変化ならびに細胞内局在への影響を今後解析していきたい。

本研究の *parafibromin* ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験から、実際に *parafibromin* は腸管上皮における Wnt/Notch シグナルの活性化や腸管上皮組織の形成・維持に必須の分子であることが明らかとなった。これまでの報告から、Wnt-Notch シグナル間の協調的な活性化は腸管上皮組織幹細胞の維持や細胞増殖の制御のみならず、消化管腫瘍の発生にも関与していることが明らかにされている [33, 34]。従って、本研究で見出した *parafibromin*-Wnt-Notch シグナル間の制御機構は腸管上皮の発がん過程にも寄与している可能性は十分考えられる。そこで、腸管上皮における腫瘍形成に *parafibromin* が果たす役割の解明を今後の研究課題の一つとして取り組んでいきたい。具体的には、がん抑制遺伝子 *APC* の機能喪失型変異を保有し、自発的に腸管上皮に多数の腺腫を形成する腸管上皮がんモデルマウス *Apc min* マウス [50, 51] と *parafibromin* ノックアウトマウスとを交配し、*parafibromin* の喪失が腸管上皮発がんに及ぼす影響の解析を行いたいと考えている。

SHP2 の脱制御によるシグナル経路の異常活性化

parafibromin チロシン脱リン酸化の責任ホスファターゼである SHP2 は、増殖因子による受容体キナーゼの刺激を起点とした RAS/MAPK 経路の活性化を増強する正の制御因子として知られており、その脱制御は様々なヒト疾患に深く関与する [14, 15, 17-19]。顔面形態の異常や先天性の心臓機能の欠陥などの発達性の障害、および若年性骨髄単球性白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) に代表される血液がんの発症リスクの増加により特徴づけられる Noonan 症候群の約半数において、生殖系列細胞での SHP2 をコードする *PTPN11* 遺伝子の機能獲得型変異が見出されている [52]。また、体細胞レベルでの *PTPN11* 遺伝子の機能獲得型変異も JMML を主体とする悪性血液腫瘍において観察される [53]。さらに、SHP2 はヒトの胃に棲息するヘリコバクター・ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) が保有する細菌性がんタンパク質 CagA の宿主細胞内標的タンパク質であることが明らかになっており、CagA が持つ発がん活性には CagA による SHP2 の異常活性化が中心的な役割を担うことが示されている [54-56]。以上の事実より、SHP2 はその脱制御・活性亢進がヒトの種々のがんの発がんを促す「がんタンパク質」として理解されている。

本研究の結果より、SHP2 は RAS/MAPK 経路を活性化するのみならず、

parafibromin の脱リン酸化を介して Hh シグナルおよび Notch シグナルの活性化にも関与しうることが示唆された。このことから、SHP2 の脱制御を原因とした病態形成には、RAS 経路に加え、SHP2-parafibromin 経路を介した Hh シグナル・Notch シグナルの異常活性化も寄与している可能性が新たに浮かび上がる。

事実、この可能性はこれまでの多くの知見からも支持される。例えば、Noonan 症候群のモデルマウスである機能獲得型 SHP2 D61G ノックインマウスの新生脳では、野生型と比較して神経細胞数が増加する一方で、星状膠細胞が減少することが報告されている [57]。興味深いことに、中枢神経系の発生においては Hh ファミリーの 1 つである Shh が神経前駆細胞から神経細胞への分化を促すことが示されていることから [58, 59]、上述の Noonan 症候群モデルマウスで見られた新生脳の異常には parafibromin の脱リン酸化亢進を介した Hh シグナルの異常活性化が寄与している可能性が考えられる。また、Hh シグナルは頭蓋顔面の正常な形態形成に不可欠な役割を担うことが知られているため [60]、Noonan 症候群で見られる顔面形成異常の病態形成にも SHP2 下流の parafibromin 依存的な Hh シグナル活性化が関与している可能性がある。さらに、Hh シグナルおよび Notch シグナルは正常の造血幹細胞ならびに骨髄性白血病のがん幹細胞の維持に必須の役割を果たすことが近年報告されている [61, 62]。このことから、

JMML に代表される SHP2 の機能獲得型変異を原因とした悪性血液腫瘍の発症における SHP2-*parafibromin* 経路を介した Hh シグナル・Notch シグナルの活性制御異常の関与が推察される。

以上のように、本研究により明らかにされた *parafibromin* による細胞内シグナルの統合的制御機構の破綻は SHP2 の脱制御を起点としたヒト疾患の発症に主たる役割を担う可能性が考えられる。従って、*parafibromin* を介したシグナル制御機構を標的とすること（例えば *parafibromin* と GLI1 の結合を阻害する薬剤など）により、SHP2 異常を起点とするヒト疾患に対する新規の治療法・予防法を確立しうると考えられる。

今後の展望

現在までに、*parafibromin* は Wnt、Hh、Notch の少なくとも 3 つの細胞内シグナル伝達経路に関与することが明らかとなっている。この現状に立ち、「これら 3 つのシグナルに加えて、*parafibromin* はさらに他のシグナル経路にも役割を果たしているのか？」という問いかけは大変興味深い。

当研究室の最近の研究により、細胞密度を感知するシグナル伝達系である Hippo 経路が、核内での SHP2 ならびに *parafibromin* の機能制御に重要な役割を

果たすことが示された [63]。SHP2 は Hippo 経路のエフェクター分子である YAP/TAZ と複合体を形成し、上流の Hippo シグナルの不活性化に伴って YAP/TAZ と共に細胞質から核内へと移行する。そして核内に集積した SHP2 は parafibromin のチロシン脱リン酸化を介して Wnt シグナル標的遺伝子ならびに Hippo シグナル標的遺伝子を転写誘導することが明らかとなった。さらに、YAP/TAZ が β -catenin と相互作用して Wnt シグナルの転写活性化に機能するという Wnt-Hippo シグナル間のクロストークも近年報告されている [64-66]。これらの知見と、parafibromin もまた β -catenin と相互作用するという事実とを合わせて考えると、parafibromin が YAP/TAZ との相互作用を介して Hippo シグナル経路の制御にも関与している可能性が考えられる。

さらに、質量分析装置を用いた parafibromin 相互作用タンパク質の網羅的探索やChIP-chip法による parafibromin-DNA 相互作用のゲノムスケールの解析を行うことで、parafibromin が関与する細胞内シグナルネットワークの全容を明らかにする試みも今後における挑戦的な研究課題として重要であろう。

以上、本研究ならびに続く今後のさらなる研究を通じて、形態形成や組織恒常性の維持など多様な生命現象に普遍的な役割を担う種々の細胞内シグナル制御機構の包括的な理解を前進させていきたい。そして、そこから導き出される

成果が、シグナル経路の破綻によって引き起こされる様々な疾患発症機構の解明や、新規創薬標的の発見など医学への実践的応用につながっていくことを期待したい。

引用文献

1. Dessaud, E., McMahon, A.P. and Briscoe, J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503 (2008).
2. Newey, P.J., Bowl, M.R. and Thakker, R.V. Parafibromin--functional insights. *J. Intern. Med.* **266**, 84-98 (2009).
3. Carpten, J.D., Robbins, C.M., Villablanca, A., Forsberg, L., Presciuttini, S., Bailey-Wilson, J., Simonds, W.F., Gillanders, E.M., Kennedy, A.M., Chen, J.D., Agarwal, S.K., Sood, R., Jones, M.P., Moses, T.Y., Haven, C., Petillo, D., Leotlela, P.D., Harding, B., Cameron, D., Pannett, A.A., Hoog, A., Heath, H., 3rd, James-Newton, L.A., Robinson, B., Zarbo, R.J., Cavaco, B.M., Wassif, W., Perrier, N.D., Rosen, I.B., Kristoffersson, U., Turnpenny, P.D., Farnebo, L.O., Besser, G.M., Jackson, C.E., Morreau, H., Trent, J.M., Thakker, R.V., Marx, S.J., Teh, B.T., Larsson, C. and Hobbs, M.R. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat. Genet.* **32**, 676-680 (2002).

4. Shattuck, T.M., Valimaki, S., Obara, T., Gaz, R.D., Clark, O.H., Shoback, D., Wierman, M.E., Tojo, K., Robbins, C.M., Carpten, J.D., Farnebo, L.O., Larsson, C. and Arnold, A. Somatic and germ-line mutations of the HRPT2 gene in sporadic parathyroid carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1722-1729 (2003).
5. Rozenblatt-Rosen, O., Hughes, C.M., Nannepaga, S.J., Shanmugam, K.S., Copeland, T.D., Guszczynski, T., Resau, J.H. and Meyerson, M. The parafibromin tumor suppressor protein is part of a human Paf1 complex. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 612-620 (2005).
6. Jaehning, J.A. The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 379-388 (2010).
7. Kim, J., Guermah, M. and Roeder, R.G. The human PAF1 complex acts in chromatin transcription elongation both independently and cooperatively with SII/TFIIS. *Cell* **140**, 491-503 (2010).
8. Rozenblatt-Rosen, O., Nagaike, T., Francis, J.M., Kaneko, S., Glatt, K.A., Hughes, C.M., LaFramboise, T., Manley, J.L. and Meyerson, M. The tumor suppressor Cdc73 functionally associates with CPSF and CstF 3' mRNA processing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 755-760 (2009).

9. Mosimann, C., Hausmann, G. and Basler, K. Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell* **125**, 327-341 (2006).
10. Clevers, H. and Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192-1205 (2012).
11. Mosimann, C., Hausmann, G. and Basler, K. The role of Parafibromin/Hyrax as a nuclear Gli/Ci-interacting protein in Hedgehog target gene control. *Mech. Dev.* **126**, 394-405 (2009).
12. Ruiz i Altaba, A., Sanchez, P. and Dahmane, N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 361-372 (2002).
13. Takahashi, A., Tsutsumi, R., Kikuchi, I., Obuse, C., Saito, Y., Seidi, A., Karisch, R., Fernandez, M., Cho, T., Ohnishi, N., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., Neel, B.G. and Hatakeyama, M. SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver. *Mol. Cell* **43**, 45-56 (2011).
14. Mohi, M.G. and Neel, B.G. The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 23-30 (2007).

15. Neel, B.G., Gu, H. and Pao, L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284-293 (2003).
16. Akanuma, T., Koshida, S., Kawamura, A., Kishimoto, Y. and Takada, S. Paf1 complex homologues are required for Notch-regulated transcription during somite segmentation. *EMBO Rep* **8**, 858-863 (2007).
17. Chan, R.J. and Feng, G.S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. *Blood* **109**, 862-867 (2007).
18. Chong, Z.Z. and Maiese, K. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol. Histopathol.* **22**, 1251-1267 (2007).
19. Zheng, H., Alter, S. and Qu, C.K. SHP-2 tyrosine phosphatase in human diseases. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2**, 17-25 (2009).
20. Lin, L., Zhang, J.H., Panicker, L.M. and Simonds, W.F. The parafibromin tumor suppressor protein inhibits cell proliferation by repression of the c-myc proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17420-17425 (2008).

21. Arai, M.A., Tateno, C., Hosoya, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T. and Ishibashi, M. Hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors from *Zizyphus cambodiana*. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 9420-9424 (2008).
22. Minoguchi, S., Taniguchi, Y., Kato, H., Okazaki, T., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G.W. and Honjo, T. RBP-L, a transcription factor related to RBP-Jkappa. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2679-2687 (1997).
23. Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R.M., Jr., Azuma, T. and Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **26**, 4617-4626 (2007).
24. Wang, P., Bowl, M.R., Bender, S., Peng, J., Farber, L., Chen, J., Ali, A., Zhang, Z., Alberts, A.S., Thakker, R.V., Shilatifard, A., Williams, B.O. and Teh, B.T. Parafibromin, a component of the human PAF complex, regulates growth factors and is required for embryonic development and survival in adult mice. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2930-2940 (2008).

25. Hayashi, S. and McMahon, A.P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* **244**, 305-318 (2002).
26. el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D. and Robine, S. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* **39**, 186-193 (2004).
27. Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J. and Clevers, H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262-265 (2009).
28. Beauchamp, E., Bulut, G., Abaan, O., Chen, K., Merchant, A., Matsui, W., Endo, Y., Rubin, J.S., Toretsky, J. and Uren, A. GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **284**, 9074-9082 (2009).
29. Huntzicker, E.G., Estay, I.S., Zhen, H., Lokteva, L.A., Jackson, P.K. and Oro, A.E. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes Dev.* **20**, 276-281 (2006).

30. Di Marcotullio, L., Ferretti, E., Greco, A., De Smaele, E., Po, A., Sico, M.A., Alimandi, M., Giannini, G., Maroder, M., Screpanti, I. and Gulino, A. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1415-1423 (2006).
31. Stylianou, S., Clarke, R.B. and Brennan, K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res.* **66**, 1517-1525 (2006).
32. McGill, M.A. and McGlade, C.J. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 23196-23203 (2003).
33. van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F. and Clevers, H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-963 (2005).
34. Fre, S., Pallavi, S.K., Huyghe, M., Lae, M., Janssen, K.P., Robine, S., Artavanis-Tsakonas, S. and Louvard, D. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6309-6314 (2009).

35. Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J. and Clevers, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* **449**, 1003-1007 (2007).
36. Sato, T. and Clevers, H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* **340**, 1190-1194 (2013).
37. van den Brink, G.R., Bleuming, S.A., Hardwick, J.C., Schepman, B.L., Offerhaus, G.J., Keller, J.J., Nielsen, C., Gaffield, W., van Deventer, S.J., Roberts, D.J. and Peppelenbosch, M.P. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat. Genet.* **36**, 277-282 (2004).
38. van Dop, W.A., Uhmman, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G.J., van den Bergh Weerman, M.A., Boeckxstaens, G.E., Hommes, D.W., Hardwick, J.C., Hahn, H. and van den Brink, G.R. Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology* **136**, 2195-2203 e2191-2197 (2009).

39. Serfas, M.S. and Tyner, A.L. Brk, Srm, Frk, and Src42A form a distinct family of intracellular Src-like tyrosine kinases. *Oncol. Res.* **13**, 409-419 (2003).
40. Lee, S.T., Strunk, K.M. and Spritz, R.A. A survey of protein tyrosine kinase mRNAs expressed in normal human melanocytes. *Oncogene* **8**, 3403-3410 (1993).
41. Mitchell, P.J., Barker, K.T., Martindale, J.E., Kamalati, T., Lowe, P.N., Page, M.J., Gusterson, B.A. and Crompton, M.R. Cloning and characterisation of cDNAs encoding a novel non-receptor tyrosine kinase, brk, expressed in human breast tumours. *Oncogene* **9**, 2383-2390 (1994).
42. Vasioukhin, V., Serfas, M.S., Siyanova, E.Y., Polonskaia, M., Costigan, V.J., Liu, B., Thomason, A. and Tyner, A.L. A novel intracellular epithelial cell tyrosine kinase is expressed in the skin and gastrointestinal tract. *Oncogene* **10**, 349-357 (1995).
43. Haegerbarth, A., Bie, W., Yang, R., Crawford, S.E., Vasioukhin, V., Fuchs, E. and Tyner, A.L. Protein tyrosine kinase 6 negatively regulates growth and promotes enterocyte differentiation in the small intestine. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4949-4957 (2006).

44. Good, M.C., Zalatan, J.G. and Lim, W.A. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* **332**, 680-686 (2011).
45. Akiyoshi, T., Nakamura, M., Koga, K., Nakashima, H., Yao, T., Tsuneyoshi, M., Tanaka, M. and Katano, M. Gli1, downregulated in colorectal cancers, inhibits proliferation of colon cancer cells involving Wnt signalling activation. *Gut* **55**, 991-999 (2006).
46. Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N. and Beachy, P.A. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**, 846-851 (2003).
47. Kim, J.H., Shin, H.S., Lee, S.H., Lee, I., Lee, Y.S., Park, J.C., Kim, Y.J., Chung, J.B. and Lee, Y.C. Contrasting activity of Hedgehog and Wnt pathways according to gastric cancer cell differentiation: relevance of crosstalk mechanisms. *Cancer Sci.* **101**, 328-335 (2010).

48. Yanai, K., Nakamura, M., Akiyoshi, T., Nagai, S., Wada, J., Koga, K., Noshiro, H., Nagai, E., Tsuneyoshi, M., Tanaka, M. and Katano, M. Crosstalk of hedgehog and Wnt pathways in gastric cancer. *Cancer Lett.* **263**, 145-156 (2008).
49. Tang, M., Villaescusa, J.C., Luo, S.X., Guitarte, C., Lei, S., Miyamoto, Y., Taketo, M.M., Arenas, E. and Huang, E.J. Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* **30**, 9280-9291 (2010).
50. Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A. and Dove, W.F. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* **256**, 668-670 (1992).
51. Moser, A.R., Pitot, H.C. and Dove, W.F. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322-324 (1990).
52. Tartaglia, M. and Gelb, B.D. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**, 45-68 (2005).

53. Tartaglia, M., Niemeyer, C.M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., Hahlen, K., Hasle, H., Licht, J.D. and Gelb, B.D. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* **34**, 148-150 (2003).
54. Hatakeyama, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 688-694 (2004).
55. Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**, 683-686 (2002).
56. Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T. and Hatakeyama, M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1003-1008 (2008).
57. Gauthier, A.S., Furstoss, O., Araki, T., Chan, R., Neel, B.G., Kaplan, D.R. and Miller, F.D. Control of CNS cell-fate decisions by SHP-2 and its dysregulation in Noonan syndrome. *Neuron* **54**, 245-262 (2007).

58. Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T.M. and Edlund, T. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* **81**, 747-756 (1995).
59. Zhu, G., Mehler, M.F., Zhao, J., Yu Yung, S. and Kessler, J.A. Sonic hedgehog and BMP2 exert opposing actions on proliferation and differentiation of embryonic neural progenitor cells. *Dev. Biol.* **215**, 118-129 (1999).
60. Hu, D. and Helms, J.A. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development* **126**, 4873-4884 (1999).
61. Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N. and Reya, T. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* **6**, 314-322 (2005).
62. Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C.H., Fereshteh, M., Abrahamsson, A., Blum, J., Kwon, H.Y., Kim, J., Chute, J.P., Rizzieri, D., Munchhof, M., VanArsdale, T., Beachy, P.A. and Reya, T. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**, 776-779 (2009).

63. Tsutsumi, R., Masoudi, M., Takahashi, A., Fujii, Y., Hayashi, T., Kikuchi, I., Satou, Y., Taira, M. and Hatakeyama, M. YAP and TAZ, Hippo signaling targets, act as a rheostat for nuclear SHP2 function. *Dev. Cell* **26**, 658-665 (2013).
64. Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi, M. and Piccolo, S. YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **158**, 157-170 (2014).
65. Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., Cordenonsi, M. and Piccolo, S. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* **151**, 1443-1456 (2012).
66. Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A.G., Li, X., Neal, J.T., Schafer, E.J., Zack, T.I., Wang, X., Tsherniak, A., Schinzel, A.C., Shao, D.D., Schumacher, S.E., Weir, B.A., Vazquez, F., Cowley, G.S., Root, D.E., Mesirov, J.P., Beroukhim, R., Kuo, C.J., Goessling, W. and Hahn, W.C. beta-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* **151**, 1457-1473 (2012).

謝辞

本研究の遂行にあたり、大変恵まれた研究環境を与えてくださり、終始に亘り懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科微生物学教室の畠山昌則教授に、深甚なる謝意を表します。大学院という貴重な期間に先生のもとで研究に没頭できたことは、私の人生における最高の幸運のひとつであると思っております。

学位審査の主査を務めていただきました東京大学大学院医学系研究科深山正久教授ならびに副査を務めていただきました中釜斉連携教授、井上純一郎教授、油谷浩幸教授、鯉沼代造准教授に、深く感謝申し上げます。

実験試料のご供与ならびに実験手法のご助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科宮川清教授、千葉大学大学院薬学研究院石橋正己教授、岐阜大学医学部大野貴敏准教授、慶応義塾大学医学部佐藤俊朗准教授、Van Andel Research Institute Bart O. Williams 教授に、感謝申し上げます。

本研究の細部にわたる懇切なご指導、ご支援、ご協力を賜りました 現 Ontario Cancer Institute/UHN Research の堤良平博士ならびに東京大学大学院医学系研究科微生物学教室の高橋昌史先生に、心より感謝申し上げます。尊敬できる研究者であるお二人と日々接し、一緒に研究をさせて頂いた中で、本当に多くを学ばせて頂きました。有り難うございました。

本研究の遂行にあたり多大なるご協力、ご支援を頂きました東京大学大学院医学系研究科微生物学教室の野嶋奈津紀さんに、心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり様々な面でご協力を頂きました東京大学大学院医学系研究科微生物学教室の皆様ならびに全ての関係者の方々に深く感謝申し上げます。

最後に、こんな身勝手な私にも関わらず、日々付き合い続けてくれて、支えてくれている身の周りの方々、友人たち、ランナー仲間、そしてこの世に一人しかいない大切な姉に、心から感謝します。

そして何より、幼少の頃より絶えず私に恵まれた環境を与え続けてくれて、陰ながら応援し続けてくれた両親に、最大の感謝を表します。

2015年2月 菊地逸平