

## 論文の内容の要旨

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

菊地逸平

シグナル伝達による細胞間の情報伝達が必須である多細胞生物には、進化的に高度に保存された各種の細胞内シグナル伝達経路が存在する。それらのシグナル経路は、胚発生から成体組織の再生に至るまでの広範な生命現象に必須の役割を担う。一方、シグナル構成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様々な病態形成に深く関与する。

生体内の多様な現象において、各種のシグナル経路は互いに連関して活性を調節し合うこと(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神経管のパターン化は、Wnt シグナル-Hedgehog (Hh) シグナル間の競合的なクロストークを介して制御される。また、哺乳動物の腸管上皮組織における幹細胞の維持ならびに細胞増殖制御には、Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調的な活性化が必須となる。しかしながら、ここで見られるようなシグナル経路間の連関した制御を司る分子機構の本態は依然として明らかでない。

そこで本研究では、近年の研究から Wnt シグナルならびに Hh シグナルにおけ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核内タンパク質 parafibromin に着目し、細胞内シグナル経路間の連関した制御に parafibromin が果たす役割の解明を目指した。

初めに、哺乳動物細胞における Hh シグナルの制御に parafibromin が果たす役割を解析した。ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞で内在性 parafibromin の発現抑制を行ったところ、Hh シグナル反応性のルシフェラーゼレポーター活性が減少した。続いてヒト Ewing 肉腫由来 SKES 細胞を用いて免疫沈降実験を行った結果、Hh シグナルのエフェクター転写因子 GLI1 と parafibromin との内在性の複合体形成が示された。さらに、parafibromin のチロシンリン酸化調節が Hh シグナルの制御に果たす役割を検討するためにチロシンリン酸化抵抗性 parafibromin を HEK293T 細胞に発現させたところ、チロシンリン酸化抵抗性 parafibromin は野生型と比較して著しく安定的に GLI1 と複合体形成し、Hh シグナルの転写活性化を強く誘導することがわかった。これらの結果から、parafibromin は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の転写活性化に機能することが示唆された。

近年の研究により、RNA polymerase II-associated factor (PAF) 複合体が Notch シグナルの制御に関与することが示唆された。しかしながら、PAF 複合体の中心構成因子である *parafibromin* が Notch シグナルの制御に果たす具体的な役割は未だ不明であることから、その解明を次に試みた。HEK293T 細胞で内在性 *parafibromin* の発現抑制を行ったところ、Notch シグナル反応性のルシフェラーゼレポーター活性が減少した。ヒト乳がん由来 MCF7 細胞を用いて免疫沈降実験を行った結果、*parafibromin* は Notch シグナルのエフェクター分子である Notch 細胞内領域 (NICD) と内在性に複合体形成することが示された。さらに、HEK293T 細胞および MCF7 細胞にリン酸化抵抗性 *parafibromin* を発現させた実験から、リン酸化抵抗性 *parafibromin* は野生型と比較してより安定的に NICD と相互作用し、Notch シグナル標的遺伝子を転写活性化することがわかった。これらの結果より、*parafibromin* はその脱リン酸化依存的に Notch シグナルの転写複合体と相互作用して標的遺伝子の転写活性化に機能する転写コアアクチベーターであることが示唆された。

ここまでの結果から、*parafibromin* は Wnt シグナル/Hh シグナル/Notch シグナルに共通して関与する重要な分子であることが明らかとなった。そこで次に、*parafibromin* がこれら3つのシグナル間の関連した調節に役割を担う可能性を追求した。

初めに、*parafibromin* 依存的な Wnt シグナルと Hh シグナルは互いにどう影響し合うのかを検討した。Wnt シグナルのエフェクター分子  $\beta$ -catenin を HEK293T 細胞に発現させたところ、*parafibromin* 依存的な Hh シグナルの活性化は抑制された。同じ細胞に今度は GLI1 を発現させたところ、*parafibromin* に依存した Wnt シグナルの活性化は抑制された。Wnt シグナル-Hh シグナル間の競合的クロストークの分子機構を明らかにするために、*parafibromin*/ $\beta$ -catenin/GLI1 間のタンパク質相互作用を解析した結果、 $\beta$ -catenin は *parafibromin*/GLI1 複合体形成を競合的に抑制することが示された。また、HEK293T 細胞で *In situ* proximal ligation assay を行った結果、GLI1 の異所性発現によって *parafibromin*/ $\beta$ -catenin 相互作用は抑制された。これらの結果から、*parafibromin* との複合体形成における  $\beta$ -catenin-GLI1 間の競合が分子基盤となり、下流の Wnt シグナル/Hh シグナルは *parafibromin* を介して相互排他的に制御されることが示唆された。

次に、Wnt シグナル-Notch シグナル間の関連調節機構を解析した。HEK293T 細胞でルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、 $\beta$ -catenin の異所性発現により *parafibromin* 依存的な Notch シグナルが増強されること、ならびに NICD の異所性発現により *parafibromin* 依存的な Wnt シグナルが増強されることがわかった。Wnt シグナル-Notch シグナル間の協調的活性化の分子基盤を明らかにするため、*parafibromin*/ $\beta$ -catenin/NICD 間のタンパク質相互作用を免疫沈降実験により解析した。結果、 $\beta$ -catenin の共発現によって *parafibromin*/NICD 複合体形成が増加する

こと、ならびにこれらの 3 つのタンパク質は共免疫沈降されることが観察された。以上の結果より、parafibromin は $\beta$ -catenin/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制御することが示唆された。

これまでの結果から明らかとなった parafibromin によるシグナル制御機構は実際に生体内で稼働しているのかを次に検討した。マウス腸管上皮組織における免疫組織化学染色の結果、Wnt・Notch 両シグナルの活性化が確認された腸管陰窩底部領域の細胞核内において、parafibromin、NICD、 $\beta$ -catenin は共発現していることが示唆された。次に parafibromin コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを用いて腸管上皮組織の免疫組織化学染色を行った結果、parafibromin cKO マウスでは Wnt 標的遺伝子 (CD44、Sox9) ならびに Notch 標的遺伝子 (Hes1) の発現が喪失し、細胞増殖マーカーKi-67の陽性細胞が減少することがわかった。さらに、マウス胎生期における腸管上皮細胞系列特異的な parafibromin の cKO を誘導したところ、cKO マウスでは腸管上皮が正常に形成されなかった。加えて、マウス腸管上皮オルガノイド培養を行ったところ、parafibromin の cKO によりオルガノイドの崩壊が誘導された。これらの結果から、parafibromin は腸管上皮細胞におけるシグナルの制御を介して腸管上皮組織の発生ならびに維持に必須の役割を果たしていることが示唆された。

最後に、parafibromin を介したシグナル活性化を抑制する分子機構の解明を試みた。その結果、その役割を担う候補分子として非受容体型チロシンキナーゼ Protein tyrosine kinase 6 (Ptk6) を見出した。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 は絨毛部に存在する分化した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。次に、ヒト胃上皮由来 AGS 細胞に Ptk6 を発現させたところ、Ptk6 の発現によって parafibromin のチロシンリン酸化レベルは増加した。反対に、siRNA により内在性 Ptk6 の発現抑制した場合には parafibromin のチロシンリン酸化レベルは減少した。また、siRNA による内在性 Ptk6 の発現抑制に伴い Wnt レポーター活性が上昇し、parafibromin/ $\beta$ -catenin 複合体形成が促進されることが観察された。これらの結果から、Ptk6 は細胞内で parafibromin のチロシンリン酸化を触媒する責任チロシンキナーゼであり、parafibromin のチロシン脱リン酸化依存的なシグナルの活性化に対し拮抗的に機能することで腸管上皮組織における細胞増殖を抑制的に制御することが示唆された。

以上の結果より、parafibromin は Wnt-Hh-Notch シグナル間の関連した調節を制御することで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ことが示唆された。