

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 菊地 逸平

本研究は高等真核生物の胚発生や成体組織の再生に重要な役割を演じていると考えられる細胞内シグナル経路間の連関した制御機構を明らかにするため、培養細胞を用いた*in vitro*の実験系ならびに哺乳動物の腸管上皮をモデルとした*in vivo*の実験系により、核内タンパク質parafibrominがWntシグナル-Hedgehog (Hh)シグナル-Notchシグナル間の連関した調節に果たす役割の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト胎児腎臓由来HEK293T細胞でparafibrominをノックダウンした結果、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。parafibrominチロシンリン酸化の役割を調べるため、リン酸化抵抗性parafibrominを作製し、HEK293T細胞に発現させたところ、リン酸化抵抗性parafibrominは野生型と比べてより安定的にGLI1と複合体形成し、Hhレポーターの活性化をより強力に誘導した。
2. HEK293T細胞でparafibrominをノックダウンしたところ、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細胞を用いた免疫沈降実験において、内因性のparafibrominとNotch細胞内領域 (NICD) との複合体形成が認められた。リン酸化抵抗性parafibrominを用いた実験により、parafibromin/NICD複合体形成はparafibrominのチロシン脱リン酸化に依存しており、脱リン酸化状態のparafibrominがNotch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。
3. HEK293T細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、parafibromin依存的なWntシグナルとHhシグナルの活性化は相互に抑制しあうことが示された。免疫沈降実験ならびに*in situ proximal ligation assay*において、 $\beta$ -cateninとGLI1はparafibrominとの複合体形成において互いに競合したことから、この分子間競合が基盤となり細胞内Wntシグナル-Hhシグナルは相互排他的に制御されることが示唆された。
4. HEK293T細胞におけるルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、 $\beta$ -cateninの共発現はparafibromin依存的なNotchシグナル活性化を促進した。また、NICDの共発現はparafibromin依存的なWntシグナル活性化を亢進した。免疫沈降実験の結果、 $\beta$ -cateninの共発現によりparafibromin/NICD複合体形成が増加すること、ならびにparafibromin、 $\beta$ -catenin、NICDの3分子は共免疫沈降されることが示された。以上より、parafibromin

は $\beta$ -catenin、NICDと三量体を形成し、Wnt-Notchシグナル間の協調的な活性化を仲介する分子であることが示唆された。

5. *in vivo*における制御機構を解明するため、マウス腸管上皮におけるparafibrominならびにWntシグナル・Notchシグナル関連分子の発現を免疫組織化学染色により解析したところ、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において、parafibromin、 $\beta$ -catenin、NICDそれぞれの発現が見られた。また、多重蛍光免疫染色の結果、陰窩底部の腸管上皮細胞核内においてparafibromin/ $\beta$ -catenin/NICDは共発現していることが示唆された。
6. parafibrominコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、腸管上皮におけるWnt標的遺伝子 (CD44, Sox9)・Notch標的遺伝子 (Hes1) の発現ならびに細胞増殖制御にparafibrominの機能が必須であることが明らかとなった。マウス胎生期における腸管上皮特異的parafibrominノックアウトを誘導したところ、腸管上皮の形成不全が観察された。さらに腸管上皮オルガノイド培養でparafibrominのノックアウトを誘導したところ、オルガノイド構造の崩壊が認められた。
7. parafibrominによるシグナル活性化を抑制する分子としてチロシンキナーゼPtk6に着目し、その機能解析を行った。マウス腸管上皮の免疫組織化学染色の結果、Ptk6とparafibrominは非増殖性の分化細胞で共発現していることが示された。ヒト胃上皮由来AGS細胞にPtk6を発現させたところparafibrominチロシンリン酸化が亢進し、ノックダウンした場合にはparafibrominチロシンリン酸化は減少した。加えて、Ptk6のノックダウンによってparafibromin/ $\beta$ -catenin複合体形成は増加し、Wntシグナル反応性のルシフェラーゼレポーター活性は上昇した。以上より、Ptk6はparafibrominのチロシンリン酸化を介してparafibromin依存的なシグナル経路の活性化を抑制することが示唆された。

以上、本論文は、parafibrominがWnt-Hh-Notchシグナル間の競合的あるいは協調的な連関制御を司る転写制御因子であることを明らかにし、parafibrominによるシグナル制御が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演じている可能性を示した。本研究は、未だ理解の進んでいない複数の細胞内シグナル経路間の統合的な制御機構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。