

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657135

研究課題名（和文）ヘッジホッグ受容体細胞質ドメインの核内移行による新規発癌抑制経路
の挑戦的解明

研究課題名（英文）Novel signaling pathway in Patched1.

研究代表者

川原 裕之(KAWAHARA Hiroyuki)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：70291151

研究成果の概要（和文）：

Patchedは、細胞の増殖と分化をコントロールする12回膜貫通型のヘッジホッグレセプターである。その機能不全はヒト癌原性を誘導することが知られていたが、細胞膜上でのリガンド受容情報が機能発現の場である核内にどのように伝達されるかについては十分な理解はされていなかった。我々は最近、PatchedのC末端第7細胞質ドメインが特異的プロセッシングを受け、生じた断片が核内に移行し癌原性転写因子を不活性化していること、断片の代謝調節系により発癌誘導がコントロールされうることを世界で初めて明らかにした。本研究では、Patched第7細胞質ドメインの⊖プロセッシング機構、⊖核移行と転写調節作用、⊕発癌性の鍵を握る代謝的安定性の制御機構、の3点に注目した解明を進め、ヘッジホッグ経路を介した細胞機能制御の新しいパラダイムを確立することを最終目的に解析を進めている。2年目にあたる2012年度においては、これまで我々が蓄積した知見や技術的ノウハウ、さらに各種レコンビナン蛋白質、一連の変異体遺伝子・抗体などの研究資産を用いて、Patched1の細胞質ドメインの構造と機能の解析を進めた。その結果、Patched第7細胞質ドメインの切断を一部阻害する化学物質の同定に成功した。さらに、Patched第7細胞質ドメインの翻訳後修飾の実体を明らかにしつつある。また、Patched1の細胞質ドメインに対する新規結合タンパク質（複数）の同定などに成功した。さらに、Patched第7細胞質ドメインをドキシサイクリン存在下で、適切な量を発現させる事により、Patched第7細胞質ドメインの核局在を人工誘導すること、それにより下流の転写因子の局在と転写活性を制御する全く新しい制御システムを新しく見いだした。これらの成果は、Patched1の細胞質ドメインを介した第7細胞質フラグメントの生理的意義解明の一步となる。

研究成果の概要（英文）：

Patched 1 (Ptcl) is a polytopic receptor protein that is essential for growth and differentiation. Its extracellular domains accept its ligand, Sonic Hedgehog, while the function of its C-terminal intracellular domain is largely obscure. In this study, we stably expressed human Ptcl protein in HeLa cells and found that it is subjected to proteolytic cleavage at the C-terminus, resulting in the generation of soluble C-terminal

fragments. These fragments accumulated in the nucleus, while the N-terminal region of Ptc1 remained in the cytoplasmic membrane fractions. Using an anti-Ptc1 C-terminal domain antibody, we provide conclusive evidence that C-terminal fragments of endogenous Ptc1 accumulate in the nucleus of C3H10T1/2 cells. Similar nuclear accumulation of endogenous C-terminal fragments was observed not only in C3H10T1/2 cells but also in mouse embryonic primary cells. Importantly, the C-terminal fragments of Ptc1 modulate transcriptional activity of Gli1. Although Ptc1 protein was originally thought to be restricted to cell membrane fractions, our findings suggest that its C-terminal fragments can function as an alternative signal transducer that is directly transported to the cell nucleus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Patched1, GLI, ヘッジホッグ, ユビキチン, プロテアソーム, 蛋白質品質管理

1. 研究開始当初の背景

Patchedは、細胞の増殖と分化をコントロールする 12 回膜貫通型蛋白質である。もともとはモルフォゲンとして知られるヘッジホッグ (Sonic Hedgehog) のレセプターとしてショウジョウバエで同定された。今日までリガンドを受容する細胞外ループの機能が世界的に注目を浴び、この領域の機能不全によりショウジョウバエやマウスの胚性致死や形態形成異常を引き起こすことが報告されている。一方、細胞膜上でのリガンド受容情報が機能発現の場である核内にどのように伝達されるかについては十分な理解が得られていない。我々は、これまで、Patched 線虫ホモログの 1 つである 12 回膜貫通型レセプター TRA-2 の情報伝達経路を調べている過程で、TRA-2 の C 末端 (第 7) 細胞質ドメインが極めて重要であることを見出した (川原ら, *Mol. Biol. Cell*, 2006)。すなわち、① TRA-2 活性化時に TRA-2 細胞質ドメインの切断断片が生じ、それが膜から遊離して核内に

移行すること、② TRA-2 細胞質ドメイン断片の核内集積が下流の転写因子 TRA-1 (ヒト癌原性転写因子 GLI1 のホモログ) の活性を亢進することを免疫化学的手法により 可視化することに世界で初めて成功したのである。線虫をモデル系として得られたこの成果は TRA-2/Patched 第 7 細胞質ドメインの全く新しい機能的重要性を示唆してはいるが、一方で哺乳類 Patched の細胞質ドメインの機能はこれまで全くアプローチされていなかった。

ヒト Patched1 の機能不全は癌原性を誘導することが知られていたが、細胞膜上でのリガンド受容情報が機能発現の場である核内にどのように伝達されるかについては十分な理解はされていなかった。我々は最近、Patched の C 末端第 7 細胞質ドメインが特異的プロセッシングを受け、生じた断片が核内に移行し癌原性転写因子を不活性化していること、断片の代謝調節系により発癌誘導がコントロールされうることを世界で初めて明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、Patched 第 7 細胞質ドメインの①プロセッシング機構、②核移行と転写調節作用、③発癌性の鍵を握る代謝的安定性の制御機構、の 3 点に注目した解明を進め、ヘッジホッグ経路を介した細胞機能制御の新しいパラダイムを確立することを最終目的に解析を進めている。

3. 研究の方法

これまで我々が蓄積した知見や技術的ノウハウ、さらに各種レコンビナン蛋白質、一連の変異体遺伝子・抗体などの研究資産を用いて、Patched1の細胞質ドメインの構造と機能の解析を進めた。

4. 研究成果

Patched 第 7 細胞質断片に結合する内在性核蛋白質を探索したところ、核移行性の転写・スプライシング制御因子蛋白質が強固な複合体を形成しうることを最近初めて見出した。また、Patched 第 7 細胞質断片は、核移行の結果として、ヘッジホッグ情報伝達系下流の核内癌原性転写因子 GLI1 の転写活性を強力に抑制することを初めて明らかにした。Patched 第 7 細胞質ドメインの切断を一部阻害する化学物質の同定に成功した。さらに、Patched 第 7 細胞質ドメインの翻訳後修飾の実体を明らかにしつつある。また、Patched1 の細胞質ドメインに対する新規結合タンパク質(複数)の同定などに成功した。さらに、Patched 第 7 細胞質ドメインをドキシサイクリン存在下で、適切な量を発現させる事により、Patched 第 7 細胞質ドメインの核局在を人工誘導すること、それにより下流の転写因子の局在と転写活性を制御する全く新しい制御システムを新しく見いだした。これらの

成果は、Patched1 の細胞質ドメインを介した第 7 細胞質フラグメントの生理的意義解明の一歩となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Kawahara, H., Minami, R. and Yokota, N. (2013) *JB Review: BAG6/BAT3: Emerging roles in quality control for nascent polypeptides.* *J. Biochem.* 153, 147-160. 査読有り
<http://jb.oxfordjournals.org/content/153/2/147.full>

[学会発表] (計 5 件)

(1) 志野優佳、賀川裕貴、川原裕之「ヒトヘッジホッグレセプターPatched1 はC末端細胞質ドメインでプロセッシングを受ける」第 12 回 日本蛋白質科学会、平成 24 年 6 月 2 日 名古屋国際会議場

(2) 江川博、賀川裕貴、川原裕之 (2012) 「Protein Kinase CによるPatched1 細胞内領域のリン酸化とその意義」第 35 回日本分子生物学会年会、12月11日～14日、福岡国際会議場

(3) 岩崎茜、川原裕之 (2012) 「新規Patched1 結合タンパク質を介したShh情報伝達経路の調節機構」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日-16 日、福岡国際会議場

(4) 高橋俊樹、横田直人、川原裕之 「12 回膜貫通タンパク質Patched1 のアッセンブリと品質管理メカニズム」科研費新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」第 1 回領域班会議 平成 25 年 1 月 29 日 (火) -30 日 (水) 淡路夢舞台国際会議場

(5) 川原裕之 (2012) 「BAG6-プロテアソーム

複合体を介した易凝集性タンパク質の品質管理」第85回日本生化学会大会シンポジウム「プロテアソーム：タンパク質分解の分子基盤と疾患・バイオロジー」オーガナイザー、村田茂穂、川原裕之 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日、福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/lab0.asp?ID=celche>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 裕之 (KAWAHARA Hiroyuki)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：70291151

(2) 研究分担者

横田 直人 (YOKOTA Naoto)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：40610564