

平成23年 5月26日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700454

研究課題名(和文)

ヘッジホグシグナルを伝達するSufuの点突然変異マウスを用いた発がん機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of point mutations in mouse Sufu, which mediates Hedgehog signal transduction, in tumor formation

研究代表者

牧野 茂 (MAKINO SHIGERU)

独立行政法人理化学研究所・新規変異マウス研究開発チーム・開発研究員

研究者番号： 30462732

研究成果の概要(和文)： *Sufu* は、Hh シグナル伝達を仲介するがん抑制遺伝子である。*Sufu* の機能解明を目指し、理研 ENU 誘発マウス点突然変異ライブラリーから発見した *Sufu* 点突然変異マウスの解析を行った。その結果、*Sufu* は、Gli3<sup>REP</sup> 転写因子の安定性、及び、細胞質内局在を、Thr<sup>396</sup> 残基を介し調節することを見いだした。この結果は、先行研究の結論とは異なっており、本研究によって、新たな Hh シグナル伝達の調節機構を見いだすことができた。

研究成果の概要(英文)：

Hedgehog (Hh) signal transduction is known to have important roles in cancer formation. To understand the in vivo function of Sufu, which is a negative mediator of Hh signaling, we made use of *Sufu* mutant mice, which we established by the RIKEN ENU-based gene-driven mutagenesis system. The results showed that Sufu was necessary to regulate subcellular localization as well as stabilization of the Gli3<sup>REP</sup> transcription factor. These results are not consistent with the previous publications, indicating novel mechanism of Hh signal transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：点突然変異マウス、ENU ミュータジェネシス、ヘッジホグシグナル伝達、発がん、Sufu、Gli3、形態形成

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚の基底細胞がんは、アメリカで年間 75 万人ほど発見される最も発症率の高いがんの一つであり、日本人も年間 6000 人以上がこのがんにかかると考えられている。近年の研究から、基底細胞がんの半数以上の症例で、ヘッジホグ (Hh) シグナル関連遺伝子のなかに突然変異が見出されることが明らかにされた。さらに、小脳の髄芽腫や、肺、前立腺、卵巣がんなどでも、Hh シグナルの亢進が発がんの主要な原因の一つであることが明らかになりつつある。

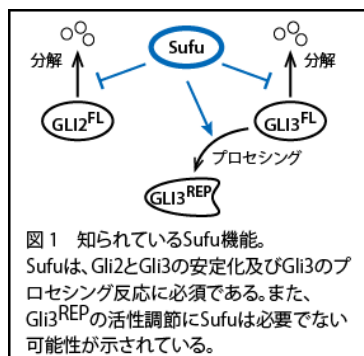
植物から抽出された家畜に奇形を起こすアルカロイド Cyclopamine が、Hh シグナル伝達の上流に位置するタンパク質 Smoothened (Smo) 活性を抑制するという発見を基盤として、Smo 活性を抑制する抗がん剤の開発が盛んに進められている。2008 年 8 月、Curis 社は、新規化合物の Phase2 臨床試験を開始したことを発表した。しかし、細胞内 Hh シグナル伝達のみか、これまでほとんど明らかにされていない。そのため、偶然に活性抑制物質が発見された Smo 以外の遺伝子をターゲットにした創薬は、困難であり、Smo より下流で働く遺伝子の突然変異を原因としたがんに対する薬剤を開発することも出来ない。また、全てのがんが Hh シグナルの活性化に起因しているわけではなく、投薬に際しては、各患者がもつ Hh シグナルに応じた個別医療 (personalized medicine) が必要である。しかし、各自の Hh シグナルの活性化の診断には、シグナル伝達に関する知見の少なさと抗体の性能の問題から、Hh シグナルを仲介する転写因子 *Gli* 遺伝子の転写が用いられており、かなりの設備や手間、技術が必要とされる。

近年、*Sufu* は、Smo 下流で、*Gli* 転写因子の活性調節に携わる必須の遺伝子である事が、遺伝学的解析により明らかにされた。しかしながら、*Sufu* のタンパク質としての機能は未だ不明であり、その機能を解明する事は、創薬や Hh シグナルの活性化を簡便に検査する技術開発の基礎として必須であると考えられる。本研究では、独自に開発した、*Sufu* 遺伝子の ENU 誘発マウス点突然変異系統を用い、*Sufu* による *Gli* 転写因子の活性調節のメカニズムを明らかにする。

## 2. 研究の目的

Hh シグナルは、2つの転写因子 *Gli2* と *Gli3* によって仲介され、組織や時期依存的に下流遺伝子の発現を調節する。Shh (ほ乳類 Hh オートログの一つ) リガンド存在下では、膜タンパク質 Smo が活性化し、機能未知で負の調節因子 *Sufu* が不活性化される。その結果、

*Gli2* アクチベータの活性化と *Gli3* リプレッサー (*Gli3<sup>REP</sup>*) 生成の抑制が起こり、下流遺伝子の転写が活性化される。一方、Shh が存在しないとき、Hh の膜受容体 Patched (Ptc) が Smo 活性を抑制する結果、*Sufu* が未知の機構で活性化される。そして、*Gli2* タンパク質は、PKA 等のキナーゼによるリン酸化と、それに続くユビキチン化を受け、プロテアソームにより分解される。また、*Gli3* は、ユビキチン化された後、C 末端側の転写活性化ドメインがプロテアソームにより部分的に分解され、残った N 末端側フラグメント (*Gli3<sup>REP</sup>*) が、転写のリプレッサーとして機能する。



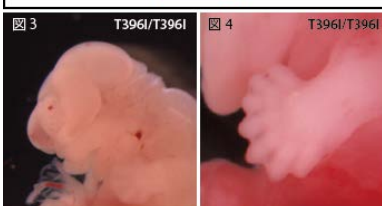
近年、複数のグループにより、*Sufu* が以下のように、*Gli* 活性調節に重要な役割を果たす可能性が示された (図1) (Chen et al. 2009, Humke et al. 2010, Wang et al. 2010)。1、*Sufu* は、*Gli2<sup>FULL</sup>*

と *Gli3<sup>FULL</sup>* タンパク質を安定化する。2、*Sufu* は *Gli3<sup>FULL</sup>* から *Gli3<sup>REP</sup>* へのプロセッシング反応に必須である。3、*Sufu* は *Gli3<sup>REP</sup>* の安定化や活性調節には関与しない。しかしながら、これらの知見の多くは、培養細胞等を使った *in vitro* での実験結果に基づくため、生体内での機能を必ずしも反映しているとは限らない。生体内での *Sufu* 機能を解明するために、新たなリソースが必要である。

所属する研究チームは、ENU で誘発された点突然変異を持つ約 8000 個体全てのマウスゲノム DNA から、ゲノム上の突然変異を高速に見出す TGCE (temperature gradient capillary electrophoresis) 法を開発した (Sakuraba et al. 2005)。さらに、見出された点突然変異を持つマウス系統を、凍結精子から速やかに復元するシステムを構築した (Gondo 2008)。このスクリーニングシステムを利用して、研究代表者らは、*Sufu* 遺伝子上に 16 系統の点突然変異を見出し、その内の 4 系統を IVF により復元した。

そのうちのひとつ T396I 変異は、PKA によるリン酸化配列と相同性を持つドメインの Thr<sup>396</sup> のミセンス変異である (図2)。*Sufu<sup>T396I</sup>* ホモ個体は、

		PKA T396							
mouse	H	G	R	H	F	T	Y	K	S
human	H	G	R	H	F	T	Y	K	S
fly	H	G	R	H	F	T	F	K	-



など Hh シグナルが亢進したときの表現型を示す。そのため、*Sufu<sup>T396I</sup>* タンパク質は、機能を部分的に欠失した分子である可能性が考えられ

た。本研究では、世界でここにしかない *Sufu*<sup>T396I</sup> 系統の詳細な表現型解析を基盤とし、*Sufu* による Gli 転写因子の活性調節のメカニズムの解明を目指す。また、分子生物学的解析から、未だに不明である *Sufu* タンパク質の機能を明らかにし、創薬や診断技術の基礎的な知見を明らかにする。

Chen M. H. *Genes Dev* 23(6): 1910-28 (2009)  
 Humke, E. W. *Genes Dev* 24(7): 670-82 (2010)  
 Wang, C. *Development* 137(12): 2001-9 (2010)

Cheung, H. O. *Sci Signal* 2(76): ra29 (2009)  
 Sakuraba Y. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 336 (2): 609-16 (2005)

Gondo Y. *Nat Rev Genet* 9(10): 803-810 (2008)

### 3. 研究の方法

#### (1) *Sufu*<sup>T396I</sup> ホモ個体の表現型解析

マウス胚発生での神経管形成において、Hh シグナルは、背腹軸に沿った神経分化に必要な遺伝子の転写制御に中心的な役割を果たす。そのため、背腹軸に沿ったマーカー遺伝子の発現領域解析は、Hh シグナル伝達の活性化及び Gli 転写因子群の活性化の度合いを調べるのに広く利用される。

発生 9.5 日胚で神経管の背腹軸形成を調べたところ、*Sufu*<sup>T396I</sup> 胚では、Gli3 に制御される背側の Pax7 発現がほぼ消失し、中間領域で発現する遺伝子は、背側にシフトした。一方、Gli2 によって制御される腹側の遺伝子発現に、大きな異常は見られなかった。この結果より、*Sufu*<sup>T396I</sup> ホモ胚では、Gli2 ではなく、Gli3 の制御異常が示唆された。また、神経管の腹側化、すなわち、Hh シグナルの活性化が観察された事から、*Sufu*<sup>T396I</sup> 突然変異は、Gli3 活性を調節する機能を部分的に失った機能低下型（ハイポモルフ）突然変異である可能性が示唆された。

#### (2) Gli と *Sufu* の相互作用

##### ① *Sufu* による Gli の安定化

神経管の解析で Gli3 活性の異常が示唆されたのに加え、*Sufu*<sup>T396I</sup> ホモ胚は、頭部や四肢に *Gli3* 欠損変異系統と類似した表現型を示す (図 3, 4)。*Sufu*<sup>T396I</sup> 胚で、Gli の発現量が増える可能性を考え、内在性 Gli2 と Gli3<sup>FULL</sup>、Gli3<sup>REP</sup> の発現量を調べた。その結果、Gli2 と Gli3<sup>FULL</sup> の発現量に大きな異常は見られなかったが、Gli3<sup>REP</sup> 発現量の有為な低下が観察された (図 5)。

Gli3<sup>REP</sup> 発現の低下は、Gli3<sup>FULL</sup> から Gli3<sup>REP</sup> へのプロセッシング反応の低下によるか、Gli3<sup>REP</sup> の安定性の低下によると考えられる。

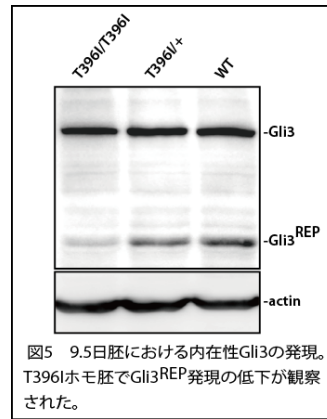


図5 9.5日胚における内在性Gli3の発現。T396Iホモ胚でGli3REP発現の低下が観察された。

この2つの可能性を検証するため、C末端側を欠き Gli3<sup>REP</sup> と同等の Gli3ΔC と *Sufu* の相互作用を、培養細胞でのトランスフェクション実験で解析した。

その結果、野生型 *Sufu* 存在下で Gli3ΔC 発現が増加する事、すなわち、野生型 *Sufu* は、Gli3ΔC を安定化する活性を持つ事が明らかとなった (図 6A lane2)。この結果は、*Sufu* は、Gli3<sup>REP</sup> の安定性や活性調節に関与しないという近年の Humke らや Wang らの主張に反する。さらに、*Sufu*<sup>T396I</sup> 存在下では、野生型 *Sufu* の場合とは異なり、Gli3<sup>REP</sup> の発現量が劇的に減少した (図 6A lane3)。以上の結果より、*Sufu* は、Thr<sup>396</sup> 残基に依存して Gli3ΔC を安定化する役割を持つ事が明らかとなった。

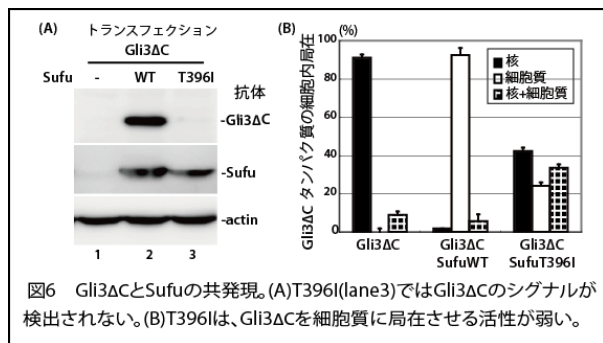


図6 Gli3ΔCと*Sufu*の共発現。(A)T396I(lane3)ではGli3ΔCのシグナルが検出されない。(B)T396Iは、Gli3ΔCを細胞質に局在させる活性が弱い。

##### ② *Sufu* と Gli の相互作用と細胞内局在

*Sufu* は、Gli やユビキチンリガーゼなど複数の因子と細胞質内複合体を形成する (Cheung et al, 2009)。本研究では、*Sufu*<sup>T396I</sup> 変異タンパク質の細胞質内複合体の形成を、特に Gli 転写因子との相互作用を中心に解析する。

培養細胞において、導入した Gli3<sup>REP</sup> タンパク質は、主に核に局在する事が知られている。本研究で、野生型 *Sufu* と Gli3<sup>REP</sup> を共発現したところ、Gli3<sup>REP</sup> は、主に細胞質に局在する事を見いだした。つまり、野生型 *Sufu* は、Gli3<sup>REP</sup> の細胞質への局在を促進する活性を持つ事を見いだした (図 6B)。一方、*Sufu*<sup>T396I</sup> との共発現時、Gli3<sup>REP</sup> の細胞質への局在は、著しく低下した (図 6B)。そのため、*Sufu* は、Thr<sup>396</sup> を介して Gli3<sup>REP</sup> の細胞質局在を促進する事が明らかとなった。

##### (3) *Sufu*<sup>T396I</sup> の Gli 転写因子抑制活性

培養細胞での Gli 転写因子依存的ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、*Sufu* は、Gli によるレポーター遺伝子の転写活性化を抑制する事

が知られている。このシステムを用い、*Sufu*<sup>T396I</sup>がGli2転写因子の抑制活性をどの程度保持するかを解析した。その結果、*Sufu*<sup>T396I</sup>は、野生型 *Sufu* と同程度にレポーター遺伝子の転写抑制活性を示した。*Sufu*<sup>T396I</sup> 胚において、Gli2タンパク質発現量に異常は見られなかったが、Gli2活性も *Sufu*<sup>T396I</sup> 分子によりほぼ正常に抑制される事が明らかとなった。以上の結果より、*Sufu*<sup>T396I</sup> 胚が示す形態異常は、Gli2の制御異常によるものではないことが強く示唆された。

#### (4) *Sufu*の安定性とリン酸化

2009年の先行論文(Yue et al, 2009)で、*Sufu*タンパク質は、上流からのシグナル依存的にリン酸化され、プロテアソームにより分解される可能性が示された。また、突然変異の導入された Thr<sup>396</sup> 周辺のアミノ酸配列がPKAのコンセンサス配列に類似する(図2)。そのため、Thr<sup>396</sup>は、PKAによりリン酸化される可能性、およびThr<sup>396</sup>リン酸化 *Sufu*の安定性や活性が変化する可能性を検証した。

##### ① *Sufu*<sup>T396I</sup>タンパク質の安定性

内在性 *Sufu*タンパク質の発現を調べたところ、*Sufu*<sup>T396I</sup>ホモ胚では、野生型胚の30%程度に低下した。また、培養細胞における *in vitro*の実験でも、*Sufu*<sup>T396I</sup>タンパク質の半減期の低下が観察された。これらの結果より、*Sufu*<sup>T396I</sup>タンパク質の安定性は、野生型と比べて低いことが明らかとなった。一方、野生型の50%程度の発現となる *Sufu*ノックアウトのヘテロ個体で、形態異常や生存、繁殖に異常は観察されない。そのため、胎生致死となる *Sufu*<sup>T396I</sup>胚の重篤な表現型は、*Sufu*タンパク質の量的な変化ではなく、質的な変化によるところが大きいものと考えられる。

##### ② Thr<sup>396</sup>残基のリン酸化

*Sufu*には、PKAによるリン酸化サイトが、複数存在すると推定されるので、Thr<sup>396</sup>以外のリン酸化サイトを含まない *Sufu*ペプチド断片を用いて、*in vitro*のリン酸化実験を行った。その結果、Thr<sup>396</sup>を含む *Sufu*断片は、PKAによりリン酸化されたことから、*Sufu*は、PKAの基質になりうる事が分かった。

*in vitro*で観察されたThr<sup>396</sup>リン酸化の生物学的意義を調べるため、擬似的なリン酸化タンパク質 *Sufu*<sup>T396D</sup>の発現ベクターを作製し、タンパク質の安定性を解析した。その結果、*Sufu*<sup>T396D</sup>は、*Sufu*<sup>T396I</sup>と同様、野生型 *Sufu*より低い安定性を示した。つまり、Thr<sup>396</sup>のリン酸化は、*Sufu*の安定性の制御に重要な役割を果たさないことが示唆された。また、Gliタンパク質を安定化する活性を解析したところ、*Sufu*<sup>T396D</sup>は、*Sufu*<sup>T396I</sup>と同様に、Gli3<sup>REP</sup>

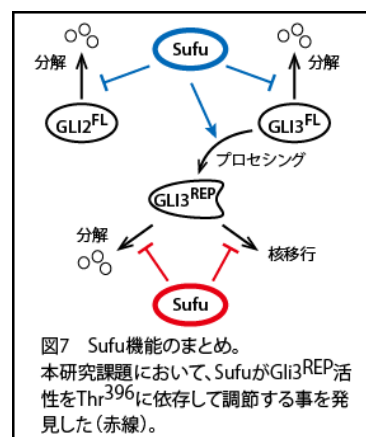
を安定化する活性を欠く事が明らかとなった。以上の結果より、Thr<sup>396</sup>残基のリン酸化に生物学的意義は見いだされなかった。さらに、Thr<sup>396</sup>残基は、IleやAspではなく、Thrである事がGli3<sup>REP</sup>の安定性を制御する上で重要である事が明らかとなった。

Yue S. et al. *Oncogene* 28(4): 492-9 (2009)

#### 4. 研究成果

ヒトの *Sufu*や *Gli3*などHhシグナル関連遺伝子の突然変異により、形態異常を伴う遺伝的疾患を発症する例が、これまでに数多く示されてきた。また、*Gli*の制御異常による下流遺伝子の活性化は、基底細胞がんや髄芽種をはじめとする様々な発がんの原因の一つである事も示されている。しかし、数多くの精力的な研究にも関わらず、Gli転写因子の活性調節機構の全体像は、未だに解明されていない。

本研究は、点突然変異を *Sufu*遺伝子にもつマウスシステムを開発したことで初めて可能となり成果が得られた。まず、*Sufu*は、Gli3<sup>REP</sup>の安定性や細胞内局在調節に重要な役割を果たす事を明らかにした(図7)。さらに、*Sufu*のThr<sup>396</sup>残基が、Gli2やGli3<sup>FL</sup>ではなく、Gli3<sup>REP</sup>と特異的に相互作用するのに必要な残基であることを明らかにした。この結果は、*Sufu*タンパク質の異なった領域/残基が、複数のGli転写因子の活性調節を独立して行う可能性を暗示する。つまり、*Sufu*は、Smoなど上流からのシグナルに応じて、複数のGli転写因子活性を制御する中心的な因子であると考えられる。*Sufu*によるGli活性調節機構の全貌を明らかにする事で、発がんの基礎的なメカニズムの解明と新規の薬剤や治療法に対するターゲット遺伝子の設定に近づく事ができると考える。



## 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 4 件)

- ① Gondo Yoichi, Murata Takuya, Makino Shigeru, Fukumura Ryutarō, Ishitsuka Yuichi. Mouse Mutagenesis and Disease Models for Neuropsychiatric Disorders. *Curr Top Behav Neurosci* Vol.7 1-35 (2011) 査読あり
- ② Gondo Yoichi, Fukumura Ryutarō, Murata Takuya, Makino Shigeru. ENU-based gene-driven mutagenesis in the mouse: a next-generation gene-targeting system. *Experimental Animals* Vol.59 5 537-548 (2010) 査読あり
- ③ Gondo Yoichi, Fukumura Ryutarō, Murata Takuya, Makino Shigeru. Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics. *BMB Reports* Vol.42 6 315-323 (2009) 査読無し
- ④ Cheung Helen, Zhang Xiaoyun, Ribeiro Ana, Mo Rong, Makino Shigeru, Puvindran Vijitha, Law Kelvin, Briscoe James, Hui Chi-Chung. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in Mammalian hedgehog signaling. *Science Signaling* Vol. 2 76 ra29-1-7 (2009) 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① 牧野 茂, 村田 卓也, 福村 龍太郎, 石塚 祐一, 小瀧 逸人, Hui Chi-Chung, 榎藤 洋一、機能低下型 *Sufu* 点突然変異マウスを用いた細胞内ヘッジホグシグナル伝達機構の解析。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) 神戸 日本 2010 12 月 9 日、10 日
- ② Makino Shigeru, Fukumura Ryutarō, Murata Takuya, Ishitsuka Yuichi, Kotaki Hayato, Gondo Yoichi. RIKEN next-generation gene-targeting system with the ENU mutant mouse library. 4th AFLAS Congress Meeting/5th AMMRA Annual Meeting/11th CSLAS Annual Meeting Taipei Taiwan 2010 11 月 9 日
- ③ 牧野 茂、*Sufu* 点突然変異マウス系統群を用いた細胞内ヘッジホグシグナル伝達機構の解明。平成 21 年度採択研究奨励ファンド・連携の芽ファンド成果報告会 和光 日本 2010 10 月 15 日

- ④ 牧野 茂, 村田 卓也, 福村 龍太郎, 石塚 祐一, 小瀧 逸人, 榎藤 洋一、次世代ジーンターゲットングに基づくヘッジホグシグナル伝達系のマウス発生遺伝学: II. *Sufu* 変異系統の表現型解析。日本遺伝学会第 82 回大会 札幌 日本 2010 9 月 21 日
- ⑤ 牧野 茂, 村田 卓也, 福村 龍太郎, 石塚 祐一, 小瀧 逸人, 榎藤 洋一、ヘッジホグシグナル伝達を仲介する *Sufu* の活性調節機構の解析。第 24 回モロシヌス研究会 熊本県南阿蘇村 日本 2010 9 月 17 日
- ⑥ 牧野 茂, 村田 卓也, 福村 龍太郎, Hui Chi-Chung, 山田 源, 榎藤 洋一、ENU 誘発点突然変異マウスを用いた細胞内ヘッジホグシグナル伝達機構の解析。第 57 回日本実験動物学会総会 京都 日本 2010 5 月 12 日
- ⑦ Makino Shigeru, Fukumura Ryutarō, Murata Takuya, Gondo Yoichi. Characterization of allelic series of mouse point mutations in a hedgehog signaling gene, *Sufu*, from the ENU mutant mouse library. 23rd International Mammalian Genome Conference La Jolla USA 2009 11 月 3 日
- ⑧ 牧野 茂, 村田 卓也, 福村 龍太郎, 小瀧 逸人, Hui Chi-chung, 榎藤 洋一、次世代ジーンターゲットングに基づくヘッジホグシグナル伝達系のマウス発生遺伝学: I. *Sufu* 変異系統の樹立。日本遺伝学会第 81 回大会 松本 日本 2009 9 月 16 日
- ⑨ Makino Shigeru, Fukumura Ryutarō, Murata Takuya, Gondo Yoichi. Identification and characterization of mouse mutations in Hedgehog signaling genes identified in the ENU mutant mouse library. Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference Mouse Genetics & Genomics: Development & Disease Hinxton UK 2009 9 月 5 日
- ⑩ 牧野 茂, 村田 卓也, 福村 龍太郎, 榎藤 洋一、ENU 誘発点突然変異マウスを用いたヘッジホグシグナル伝達系の発生遺伝学的解析。第 23 回モロシヌス研究会 守山 日本 2009 7 月 11 日

[その他]

(報道関連)

- ① 牧野 茂、不思議を追って 373「発がんに形作りの遺伝子が関わる?!」常陽新聞 2011 年 3 月 2 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 茂 (MAKINO SHIGERU)  
独立行政法人理化学研究所・新規変異マウス  
研究開発チーム・開発研究員  
30462732

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

権藤 洋一 (GONDO YOICHI)  
独立行政法人理化学研究所・新規変異マウス研  
究開発チーム・チームリーダー

Chi-Chung Hui  
The Hospital for Sick Children, University of  
Toronto, Professor