

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440096

研究課題名(和文) Sufu点突然変異マウスを用いたヘッジホグシグナル転写因子の活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanisms of GLI transcription factors in Hh signaling using mouse point mutations in Sufu

研究代表者

牧野 茂 (Shigeru, Makino)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発研究員

研究者番号：30462732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホグ(Hh)シグナルは、発生での形態形成や発がん重要な役割を果たすことが知られている。GLIは、Hhシグナルで働く必須の転写因子であるが、その活性制御機構は明らかとなっていない。本研究では、独自に開発した点突然変異マウスの発生遺伝学的解析を行い、新たなGLI転写因子活性制御機構を見出した。さらに、ゲノム編集技術を利用した変異細胞株の解析から、「翻訳再開」を見出した。翻訳再開は、基礎的な翻訳制御による新たな遺伝子発現制御の可能性や、ヒト疾患の解明/遺伝子治療につながる新たな研究分野の創設につながると考える。

研究成果の概要(英文)：Hedgehog signaling (Hh) has important roles in fetal development and diseases. SUFU is a cytoplasmic component of Hh signaling and is known to regulate the primary transcription factors, GLI1 and GLI2 activators and GLI3 repressor. However, little is known about the protein function of SUFU. In this project, we analyzed originally-developed mutant mice carrying point mutations in the Sufu gene, and found that SUFU played a central role in demarcating its regulatory actions of GLI1/2 activator and GLI3 repressor.

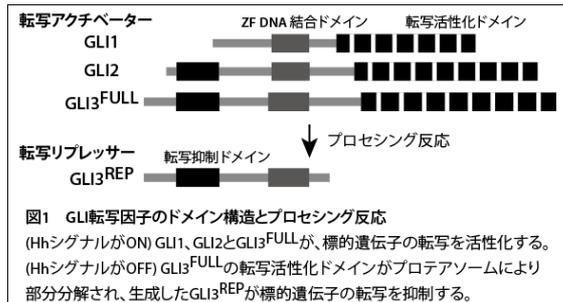
In addition, we found that translation reinitiation unexpectedly occurred in Gli3 knockout cell lines created by a genome-editing technology, CRISPR-Cas9 system. We propose that translation reinitiation is recognized as a critical regulatory mechanism for gene expression as a new paradigm of the central dogma and possible future application to the gene therapy.

研究分野：マウス発生遺伝学

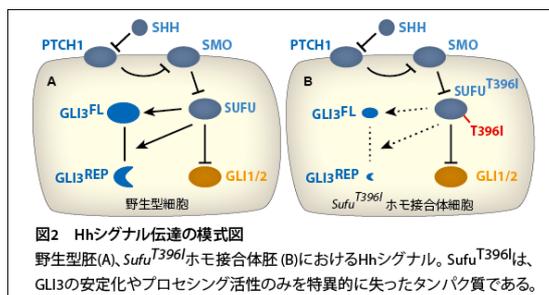
キーワード：ヘッジホグシグナル伝達 GLI転写因子 SUFU 突然変異マウス タンパク質の可視化 ゲノム編集 CRISPR-Cas9 翻訳再開

1. 研究開始当初の背景

ヘッジホグ(Hh)シグナル伝達系は、Hh リガンド濃度依存的に細胞の分化増殖を制御し、形態形成や発がん重要な役割を果たす。GLI 転写因子群 (GLI1, GLI2, GLI3) は、Hh シグナル最下流で働く必須のタンパク質であり、プロテアソーム分解やプロセッシング、細胞内局在など様々な翻訳後制御を受けると考えられているが、その全体像は明らかになっていない(図1)。



SUFU は、活性化型 GLI1/2 を抑制し、抑制型 GLI3 を活性化することで、Hh シグナルを抑制的に制御する細胞内因子である(図2左)。近年、SUFU は、GLI2 や GLI3 の安定化、および、全長の GLI3 (GLI3^{FL})から転写抑制型 N 末端断片 (GLI3^{REP}) を生成するプロセッシング反応に必須であることが明らかにされた。しかし、そのような制御が、シグナルの ON/OFF の決定にどのような役割を果たすのか明らかでない。また、SUFU は、既知のタンパク質とは目立った相同性を持たないことから、タンパク質としての機能は不明である。本研究プロジェクトでは、独自の変異体を駆使した SUFU の分子遺伝学的解析を基盤にして、GLI 転写因子活性制御機構の全貌を解明する。



2. 研究の目的

申請者らは、これまでに、多数の ENU 誘発 SuFu 点突然変異マウス系統を開発した。その中の 1 系統 SuFu^{T396I} ミスセンス変異は、頭部や四肢に形態異常を示し(図3) 発生後期に致死となる。一方、SuFu ノックアウト(KO) マウスは、発生 9 日までに致死となることがすでに知られている。SuFu^{T396I} ミスセンス変異系統の利用により、KO マウスでは解析できなかった発生後期における SuFu の機能解析が可能となる。また、SuFu^{T396I} 変異タンパ

ク質が部分的に機能を欠損している場合、SuFu^{T396I} マウスの解析により、複雑な GLI 活性制御の各段階を in vivo で解析することが可能となる。本研究プロジェクトでは、独自に開発したリソースを活用し、以下に述べる 2 点を中心に、GLI 活性調節機構の全貌を解明する。

(1) SuFu^{T396I} ミスセンス変異マウスの分子遺伝学的解析

SuFu^{T396I} ホモ胚は、多指症や頭部形態異常など Gli3^{-/-} マウスと類似した表現型を示す(図3)。そのため、SUFU^{T396I} は、GLI3 の活性制御能のみを失った突然変異タンパク質である可能性が示唆された。本研究では、SuFu^{T396I} 胚の神経管や四肢の詳細な表現型解析を行い、SUFU の Thr³⁹⁶ 残基の機能を明らかにする。また、SUFU^{T396I} の GLI1/2 抑制活性や GLI1/2/3 との相互作用、GLI1/2/3 の細胞内局在制御などを解析し、SUFU^{T396I} の分子レベルでの機能を明らかにする。

(2) GLI3 のライブセルイメージング

GLI3 は複雑な細胞内局在を取るが、活性制御との関連性は明らかでない。本プロジェクトでは、GLI3 の N 末端と C 末端を異なるタグで標識し、GLI3^{FULL} と GLI3^{REP} タンパク質を区別して可視化する。そして、培養細胞で GLI3 タンパク質の動態を細胞内でリアルタイムに観察する系を開発する。SuFu^{T396I} 細胞や SuFu KO 細胞株においてもタグ融合 GLI3 を発現し、SUFU 活性の段階的な破綻が、GLI3 の時空間的制御にどのような影響を与えるかを詳細に解析し、多段階にわたる GLI3 の活性制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

SUFU による GLI 活性制御機構を解明するため、独自に開発した点突然変異マウスと、ライブセルイメージング技術を取り入れた以下の研究を行う。

(1) SuFu^{T396I} 変異マウスにおいて、SuFu KO マウスでは致死性のため解析できない四肢や神経系の発生遺伝学的解析を行う。

(2) SUFU^{T396I} と 3 つの GLI 転写因子の相互作用を、in vitro と in vivo の両方で解析する。また、レポーターアッセイにより、SUFU^{T396I} の GLI 抑制活性の解析を行う。

(3) GLI3^{FULL} と GLI3^{REP} を区別できるように GLI3 タンパク質の両端をタグで標識し、GLI3 をリアルタイムに可視化する系を確立する。さらに、SuFu ノックアウトや SuFu^{T396I} 変異細胞など SUFU 活性を段階的に破綻させた系で、GLI3 の細胞内局在を明らかにし、上流からのシグナルによる GLI3 局在と活性制御の関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 代表者らが独自に樹立した *Sufu*^{T396I/T396I} ミスセンス変異マウスは、重度の多指症を示す(図3)。肢芽前後軸に沿った特異的な領域で発現するマーカー遺伝子の発現を解析したところ、*Sufu*^{T396I/T396I} 肢芽前側では、前側特異的遺伝子の発現消失と、異所的な後ろ側特異的遺伝子の発現が観察された。これまでの研究から、肢芽発生初期に前側で発現する *Gli3* が、前側遺伝子発現を誘導し、後ろ側遺伝子発現を抑制することが知られている。我々のマーカー遺伝子の発現パターン解析により、*Sufu*^{T396I/T396I} 肢芽は、GLI3 活性の低下により、肢芽の異常な後ろ側化が起きている可能性が強く示唆された。

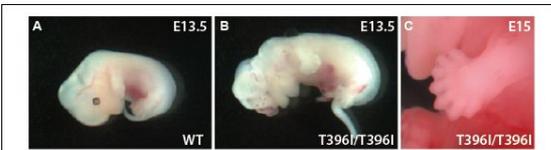


図3 *Sufu*^{T396I}変異マウス胚の表現型
(A) 発生13.5日野生型胚。(B) 発生13.5日T396Iホモ接合体胚。頭部や尾部に重度な形態異常を示す。(C) 発生15日T396Iホモ接合体胚の前肢。重度な多指症を示す。

この仮説が正しい場合、GLI3^{REP} 活性を増加することで、*Sufu*^{T396I/T396I} 肢芽前後軸異常を軽減することができるはずである。我々は、GLI3^{FL} の代わりに GLI3^{REP} を発現する突然変異(*Gli3*^{Δ699})を導入したマウス胚 (*Sufu*^{T396I/T396I}; *Gli3*^{Δ699/+}) 肢芽の解析を行った。その結果、*Sufu*^{T396I/T396I}; *Gli3*^{Δ699/+} では、*Sufu*^{T396I/T396I} で観察される肢芽前側での異所的な後ろ側遺伝子の発現が抑制され、消失した前側遺伝子の発現が回復した。よって、*Sufu*^{T396I/T396I} 胚肢芽では、GLI3^{REP} 活性の低下により、肢芽の異常な後ろ側化が引き起こされたことが明らかとなった。

さらに、*Sufu*^{T396I/T396I} 胚における GLI3 タンパク質の発現を調べたところ、GLI3^{FL} 及びプロセシング産物である GLI3^{REP} 両方の発現が低下することを見出した。以上の結果より、SUFU の Thr³⁹⁶ 残基は、GLI3^{FL} の安定化とプロセシングの両方に重要な役割を果たす事を明らかにした。

(2) 神経管形成では、3つの GLI 転写因子が背腹軸に沿って、領域特異的な遺伝子の発現を制御する事が知られている。*Sufu*^{T396I/T396I} 胚や、SUFU を活性化する突然変異を導入した変異マウス胚 (*Sufu*^{T396I/T396I}; *Smo*^{-/-}) での神経管マーカー遺伝子の発現を解析したところ、肢芽での解析と同様に、GLI3^{REP} 活性の低下に起因するマーカー遺伝子の発現異常が観察された。

一方、*Sufu*^{T396I/T396I} 胚や *Sufu*^{T396I/T396I}; *Smo*^{-/-} 胚では、活性化型 GLII/2 が制御する腹側遺伝子の発現異常は観察されなかった。さらに、

Sufu^{T396I/T396I} 胚で GLII/2 タンパク質の発現量にも変化は見られなかった。そのため、SUFU^{T396I} は、GLI3 活性制御能を失った一方、GLI1 と GLI2 の活性制御能を有することが明らかとなった。

以上の結果から、活性化型 GLII/2 と抑制型 GLI3 の活性は、質的に異なった2つの経路により制御されることを初めて明らかにした。さらに、抑制型 GLI3 活性制御には、SUFU の Thr³⁹⁶ 残基が必須であることを明らかにした (Makino et al. PLoS ONE 2015)。この成果により、他のタンパク質との目立った相同性が無い SUFU タンパク質を介した、GLI 活性制御機構の全貌の解明に大きく近づいた。

(3) GLI3 は、上流からのシグナルに応じて、繊毛内でのプロセシングや、核移行の制御、プロテアソームによる分解など、複雑な局在・活性制御を受けるとされる。GLI3 の細胞内局在制御機構を明らかにするため、GLI3 タンパク質のリアルタイム可視化を目指し、タグ化 GLI3 発現システムの樹立を試みた。

本プロジェクトでは、GLI3^{FL} と GLI3^{REP} を区別して標識するため、蛍光リガンドに共有結合する2つの異なるタグ(Halo タグ、SNAP タグ)を用いた標識システムを利用した。GLI3^{FL} の N 末端に Halo タグを、C 末端に SNAP タグを融合し、GLI3^{FL} と GLI3^{REP} を異なる蛍光で検出するシステムを作製した。今後、樹立した蛍光検出システムを利用して、GLI3 の細胞内局在をリアルタイムに可視化し、GLI3 転写因子活性制御機構の全貌の解明に挑む。

(4) GLI3 可視化実験では、内在性 GLI3 を発現しない細胞株で、タグ化 GLI3 活性を評価する必要がある。そのため、CRISPR-Cas9 システムを利用して、マウス 3T3 細胞の *Gli3* ORF の 5'領域にフレームシフト変異を導入した複数の株を樹立した。それら *Gli3* 「ノックアウト」細胞株で、実際に GLI3 タンパク質が発現しないことを確認するため、Western 解析を行った。その結果、*Gli3* 両アレルにフレームシフト変異を持った細胞株全てにおいて、GLI3 タンパク質の発現が検出された(図4)。変異細胞での GLI3 タンパク質の分子量は、野生型細胞での GLI3 とほぼ同じであった。フレームシフト変異の 3'側にできるナン

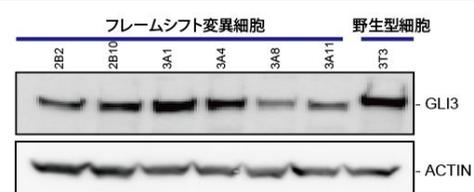
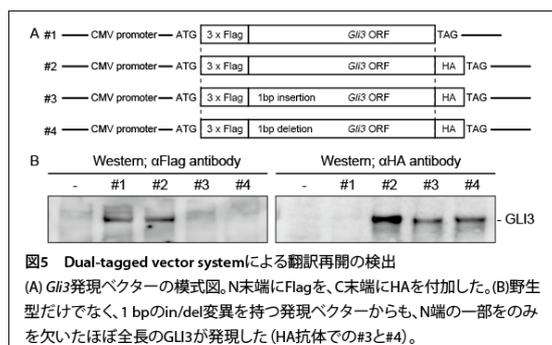


図4 *Gli3* フレームシフト変異細胞株での GLI3 タンパク質の発現
Gli3 ORF の 5'付近にフレームシフト変異を両アレルに持った細胞株でも、野生型細胞株と同様な GLI3 タンパク質の発現が観察された。

センスコドンまでの N 末端ペプチド断片は、野生型 GLI3 タンパク質よりもはるかに分子量は小さく、本実験条件では検出不能である。そのため、変異細胞で検出したシグナルは、(ほぼ)全長の GLI3 タンパク質であると考えられた。



フレームシフト変異細胞株で検出した GLI3 の末端形状を調べるため、N 末端と C 末端に異なったタグを付加した *Gli3* 発現ベクターを作製した(図 5 A: Dual-tagged vector system)。2B2 クローン(図 4、左端)は、*Gli3* ORF の 5' 付近に 1 bp の欠失と 1 bp の挿入変異をヘテロにもつ細胞株である。本研究では、2B2 と同一の欠失や挿入変異を導入した *Gli3* 発現ベクターも作成した(図 5、#3 と#4)。それら各発現ベクターを導入した細胞の溶解液を用い、N 末端に対するタグ(Flag)で Western を行ったところ、野生型 GLI3 のみが検出された(図 5 B 左)。一方、C 末端に対するタグ(HA)では、野生型だけでなく 1 bp の欠失や挿入変異を持った発現ベクターからも、ほぼ全長の GLI3 タンパク質が検出された(図 5 B 右、#3 と#4)。以上の結果より、フレームシフト変異を導入した *Gli3* 遺伝子では、フレームシフトより 3' 側に位置する in-frame の AUG コドンから翻訳が再開する可能性が強くと示唆された(図 6)。



この発見により、ゲノム編集により遺伝子ノックアウトを行う際、樹立した細胞・生体の塩基配列を解析するだけでなく、タンパク質発現を確認することが極めて重要であることを明らかにした。また、このような翻訳再開機構の存在を考慮してゲノム編集のターゲット領域の選択やコンストラクトの作成を行う事の重要性をも示す。我々の樹立した Dual-tagging system は、目的の挿入/欠失変異を導入したターゲット遺伝子から翻訳再開が起こるかどうかを、ターゲット遺伝子産物特異的な抗体を利用せずに in vitro で簡便に解

析することを可能にした実験システムである。

翻訳再開は、遺伝的なヒト疾患において、表現型の多様化に関連することが知られている。翻訳再開により作られる N 末端を欠いたタンパク質が、ドミナントネガティブに作用する場合や、ハイポモルフに働き表現型を軽減するケースなどの報告がある。また、翻訳再開は、突然変異が存在する場合だけでなく、正常な遺伝子発現制御機構として機能する可能性も示された。哺乳類 mRNA の 50% には、main ORF の 5' 側に Upstream Open Reading Frames (uORFs) の存在が報告されている。uORFs は、翻訳再開機構を介して、main ORF の発現制御に重要な役割を果たす例が報告された。以上のように、翻訳再開は、突然変異によって引き起こされる特殊な現象ではなく、一般的な遺伝子発現に関わる重要な制御メカニズムの一つである可能性が考えられる。翻訳再開機構の解析により、遺伝子発現制御機構の解明やヒト疾患の解明にもつながると考える。

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 2 件)

Makino S, Zhulyn O, Mo R, Puvindran V, Zhang X, Murata T, Fukumura R, Ishitsuka Y, Kotaki H, Matsumaru D, Ishii S, Hui C.C, Gondo Y, T3961 Mutation of Mouse Sufu Reduces the Stability and Activity of Gli3 Repressor. PLOS ONE, vol 10, e0119455 (2015) 査読あり
10.1371/journal.pone.0119455

Murata T, Ishitsuka Y, Karouji K, Kaneda H, Toki H, Nakai Y, Makino S, Fukumura R, Kotaki H, Wakana S, Noda T, Gondo Y. beta-CateninC429S mice exhibit sterility consequent to spatiotemporally sustained Wnt signalling in the internal genitalia. Scientific Report, vol 4, 6959 (2014) 査読あり
10.1038/srep06959

[学会発表](計 12 件)

牧野茂、福村龍太郎、榎藤洋一、フレームシフト変異下流からの翻訳再開による GLI3 タンパク質発現、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Shigeru Makino, Yoichi Gondo, Production of a truncated protein from the Gli3 gene with a frameshift

mutation, which is introduced by the CRISPR/Cas9 system. The 29th International Mammalian Genome Conference. 2015年11月10日、横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市)

牧野茂、榎藤洋一、Gli 転写因子の可視化の試み: CRISPR/Cas システムによる Gli3 遺伝子のノックダウン、日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 9 月 26 日、東北大学(仙台市、宮城県)

牧野茂、榎藤洋一、Gli 転写因子の可視化の試み-培養細胞での Gli3 遺伝子の不活性化、第 29 回モロシヌス研究会、2015 年 7 月 3 日、かんぼの宿(兵庫県神戸市)

牧野茂、石塚祐一、茂木浩未、福村龍太郎、村田卓也、小瀧逸人、野田哲生、榎藤洋一、成体での Hh シグナルを解析するための Sufu 点突然変異マウス系統群の樹立、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

牧野茂、Zhulyn Olena、村田卓也、福村龍太郎、石塚祐一、小瀧逸人、Hui Chi-Chung、榎藤洋一、Sufu 点突然変異マウスによる Gli 転写因子活性制御機構の解明、日本遺伝学会第 86 回大会、2014 年 9 月 19 日、長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

Shigeru Makino, Olena Zhulyn, Rong Mo, Vijitha Puvindran, Xiaoyun Zhang, Takuya Murata, Ryutaro Fukumura, Yuichi Ishitsuka, Hayato Kotaki, Daisuke Matsumaru, Shunsuke Ishii, Chi-Chung Hui, Yoichi Gondo, Missense mutant mice of Sufu demarcate its regulatory actions on Gli2 and Gli3. The 2014 Hedgehog Meeting on Hedgehog Signaling in Development and Disease. 2014 年 8 月 7 日. Ann Arbor, Michigan (USA)

牧野茂、石塚祐一、茂木浩未、福村龍太郎、村田卓也、小瀧逸人、野田哲生、榎藤洋一、内脂肪増加を示す Sufu 点突然変異マウスの解析、モロシヌス研究会、2014 年 7 月 20 日、国立遺伝学研究所(静岡県三島市)修善寺総合会館(静岡県伊豆市)

牧野茂、村田卓也、福村龍太郎、石塚祐一、小瀧逸人、榎藤洋一、複数の ENU 誘発マウス点突然変異系統を活用したヘッジホグシグナル伝達系の機能解析、日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、

神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

牧野茂、村田卓也、福村龍太郎、石塚祐一、小瀧逸人、榎藤洋一、複数の Sufu 点突然変異アレルを用いたヘッジホグシグナル伝達系の解析、日本遺伝学会、2013 年 9 月 19 日、慶応義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

牧野茂、村田卓也、福村龍太郎、石塚祐一、小瀧逸人、榎藤洋一、点突然変異系統間交配を用いたヘッジホグシグナル伝達系の解析、モロシヌス研究会、2013 年 6 月 28 日、理化学研究所バイオリソースセンター・筑波山江戸家(茨城県つくば市)

牧野茂、村田卓也、福村龍太郎、石塚祐一、小瀧逸人、榎藤洋一、Hh シグナル伝達系の点突然変異マウスを用いた疾患モデル開発の試み、日本実験動物学会、2013 年 5 月 15 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

[その他]

Makino et al. PLOS ONE (2015)に関する理化学研究所プレスリリース
http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150312_1/

Makino et al. (2015)のプレスリリースを基にした新聞記事

1. 理研、点突然変異マウス群を作成: 胎生致死を回避、遺伝子機能解明へ
化学工業日報 2015 年 3 月 12 日
2. 体を形成する細胞の位置情報 伝達不十分だと異常
日経産業新聞 2015 年 3 月 16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 茂 (MAKINO Shigeru)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発研究員
研究者番号: 30462732

(2) 連携研究者

榎藤 洋一 (GONDO Yoichi)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・チームリーダー
研究者番号: 40225678