所 属 (主指導教官)	細胞内情報学講座 (塩坂 貞夫 教授)		
氏 名	加藤 真樹	提 出	平成14年 1月 8日
題 目	中枢神経系のパターン形成に関与する分泌性因子Sonic hedgehogの細胞内シグナル伝達機構の研究		

要旨

Sonic hedgehogは分泌性のシグナル分子であり、形態形成において重要な役割を担っていることが知られている。特に、中枢神経系の発生においては、脊索から分泌されたShhが未分化な神経上皮からなる神経管に作用し、その濃度依存的に底板、運動ニューロンなどの腹側特異的な組織を誘導することが知られている。しかしながら、Shhによる細胞内シグナル伝達機構については未だ不明な点が多い。そこで、私は以下の2つのテーマについて研究を行った。

I. Shhシグナル伝達系における濃度依存的作用とGli転写因子群の関係

Shhはショウジョウバエのsegment-polarity遺伝子群に属するhedgehog (Hh)の相同遺伝子ファミリーのメンバーのひとつとして単離された。これまでの解析から、HhならびにShhは、いずれも細胞膜上に存在するSmoothed (Smo)およびPatched (Ptc)と呼ばれる2種類の膜貫通型タンパク質で構成される受容体を介して、細胞内にシグナルを伝達するとされている。またショウジョウバエにおいては、Cubitus interruptus (Ci) と呼ばれるZinc-finger型転写因子がHhのシグナル伝達系において極めて重要な役割を担っていることが示されている。Ciの脊椎動物における相同遺伝子はGliファミリーと呼ばれ、特に哺乳動物においてはこれまでにGli1、Gli2、Gli3の3種類の転写制御因子の存在が知られている。しかしながら、脊椎動物においてShhの下流でGliファミリーが果たして生理的な機能を担っているのか否か、あるいは3種類のGli転写制御因子の機能的な差違は何かについては明確になっていない。また、異なる濃度のShhがどのような異なる細胞応答を引き起こすことによって、最終的に異なる細胞運命を誘導するのかについては、未だ不明のままである。そこで本研究では、我々の研究グループにおいて樹立されたShh応答性の神経前駆細胞株MNS-70をモデル系として用い、Shhの細胞内シグナル伝達の分子機構の詳細を解明することを目的として、特にGli転写因子群に着目した解析を行った。まず哺乳動物細胞におけるShhのシグナル伝達系において、Gliファミリーの転写制御因子が機能しているかを検討するため、Gliの特異的結合配列を有するレポーターを用いた実験を行った。Shhの生物活性を担うN末端断片 (Shh-N) の発現プラスミドとともにMNS-70細胞に導入すると、Shh依存的なレポーター遺伝子の転写活性化が認められた。同様の系を用いて3種類のGli因子の発現プラスミドを導入すると、Gli1あるいはGli2の発現によって強い転写活性化が観察されたが、Gli3の場合は逆に抑制が認められた。このことから、Shhのシグナル伝達系の下流でGliファミリーの転写因子が機能していることが示唆された。さらに、MNS-70細胞におけるGli因子群の発現動態をRT-PCR法を用いて解析したところ、未処理の細胞においてはGli2、Gli3のmRNAは胎生11.5日の神経上皮組織 (NE)とほぼ同程度の生理的なレベルで発現したのに対し、Gli1 mRNAはコントロールレベルの1/100以下しか検出されなかった。一方Shhを作用させると、Gli1 mRNAの発現は著明に誘導された。以上の結果から、MNS-70細

胞においては、Shhの細胞内シグナル伝達の初期過程は主にGli2によって媒介されており、これに応答して発現が誘導されるGli1がより後期のシグナル伝達に関与すると考えられた。またGli3は、このようなGli1, Gli2を介した遺伝子発現の誘導に対して抑制的に作用する因子と考えられた。

次に、Shhのモルフォジェンとしての作用の実体を明らかにするために、種々の濃度で処理した細胞の応答性の違いを、Shhのシグナル伝達に関与するPtcおよびGli1の発現を指標として定量的RT-PCR法により解析した。その結果、Ptcは低濃度のShhによって発現誘導が観察された。一方、Gli1 mRNAの発現は低濃度のShhによっては誘導されず、高濃度ではじめて顕著な増加が認められた。このことから、ShhがPtcとGli1という異なる標的遺伝子の発現を誘導する際には、それぞれ異なる閾値をもって作用していることが示された。以上の結果から、異なる濃度のShhが作用することによって、細胞内において質的に異なる遺伝子発現応答が起こることが明らかになった。

本研究によって、神経系の領域特異性の決定に関与する分泌性因子Shhの細胞内シグナル伝達においては、Gli転写因子群が遺伝子発現の主要な制御因子として機能していることが明らかになった。Gli1, Gli2, Gli3はそれぞれ異なる機能を担い、また異なる発現調節を受けていた。これらGli遺伝子産物ならびに受容体分子Ptcによって構成される細胞内シグナル伝達ネットワークのダイナミックな調節機構が、Shhがモルフォジェンとしての多彩な生理機能を発揮する上で極めて重要な役割を担っているものと考えられる。

II. cDNAマイクロアレイを用いたShh応答性遺伝子群の探索

Shhは、中枢神経系に限らず、形態形成の過程で非常に重要な役割を果たしており、また、そのシグナル伝達に関わるコンポーネントの変異は、ヒトの様々な疾患に関与していることが知られている。しかしながら、脊椎動物においてShhの下流でどのような遺伝子が制御されているのか未だ多くの点が不明のまま残されている。その原因の一つには、実験系の問題から、一度に扱える遺伝子の数に限界があったことが挙げられる。しかし、cDNAマイクロアレイの登場により、一度に数千もの遺伝子の発現動態を視覚化、数値化することが可能となった。先に述べたように、Shhは発生分化に重要な役割を果たしているながら、その下流のシグナル伝達機構については不明の部分が多いことから、Shhによって制御されている未知の遺伝子（新規、既知）が存在している可能性は十分にあると考えられた。そこで、MNS-70細胞と、マウス胎児cDNAライブラリー由来の2304遺伝子から成るcDNAマイクロアレイを用いて、Shh応答性遺伝子の探索を行った。まず、MNS-70細胞にコントロールプラスミドとShh発現プラスミドをそれぞれ導入し、各々の細胞からmRNAを抽出した。それぞれのmRNAからcDNAを合成する際にCy3またはCy5で標識し、マイクロアレイ上で競合的ハイブリダイゼーションを行った。その結果、Shhによって発現量が亢進している3つの遺伝子が同定された。ひとつはすでにShh応答遺伝子として知られているPatched (Ptc)であり、残りの2つはCeruloplasmin (Cp)とInter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3 (ITIH3)であった。さらに、CpとITIH3がGliを介して制御されているか否かをRT-PCR法で検討したところ、ITIH3はGli1, Gli2によっても発現量が増加したが、CpはShhでのみ発現が亢進されたことから、CpはGliを介さない経路でShhによって制御されている可能性が考えられた。また、Cpの発現パターンを*in situ* hybridization法により解析したところ、マウス胎生12日胚では視床下部、後脳腹側部、眼柄において発現しており、Shhの発現部位近傍に発現していた。この結果から、Cpは生体内においてもShhに制御されている可能性が強く示唆された。このように、マイクロアレイを用いることによって、これまで知られていなかったシグナル分子による作用機序の一端が明らかになった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 加藤 真樹

Sonic hedgehog (Shh) は脊椎動物の発生過程において重要な役割を果たす分泌性のシグナル分子である。特に中枢神経系の背腹軸に沿ったパターン形成において、中軸中胚葉組織から分泌された Shh は未分化な神経上皮に作用し、濃度依存的に腹側特異的な一連の遺伝子群の発現を誘導することが知られている。このように Shh は重要なシグナル分子であるにもかかわらず、その細胞内シグナル伝達機構についていまだ不明な点が残されている。本論文では、このような背景を踏まえて研究を遂行し、以下のような成果を得ている。

(1) Shh の下流で主要な働きをしていると考えられる転写制御因子 Gli ファミリー (Gli1, Gli2, Gli3) に着目し、我々の研究グループで樹立した Shh 応答性の神経前駆細胞株 MNS-70 と Gli の結合配列を含むレポータープラスミドを用いて、Shh の細胞内シグナル伝達機構の解析を行った。その結果、Shh の下流において、主にシグナルを伝達しているのは Gli1, Gli2 であることが明らかになった。また、Shh の濃度依存的な遺伝子発現は、Shh のシグナルに対して抑制的な機能をはたしている Gli3 と Shh の受容体である Patched (Ptc) による緩衝作用により、Shh の濃度に対する遺伝子発現応答に閾値の設定が行われていることが明らかになった。

(2) マウス胎児 cDNA ライブラリー由来の 2304 遺伝子から成る cDNA マイクロアレイを作製し、Shh 応答性遺伝子群の探索を行った。マイクロアレイを用いたスクリーニングで、発現量が亢進している 3 つの遺伝子が同定できた。ひとつはすでに Shh 応答遺伝子として知られている Ptc であり、残りの 2 つは Ceruloplasmin (Cp) と inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3 (ITI H3) であった。さらに、Cp についてその発現パターンを *in situ* hybridization 法により解析した。その結果、視床下部、後脳腹側部、眼柄において、Cp は Shh の発現部位近傍に発現することが確認され、Cp は生体内においても Shh に制御されていることが明らかになった。また、ITIH3 は Gli1, Gli2 によって mRNA の発現が誘導されたことから、ITIH3 は Shh の下流で Gli を介した経路で制御されていることが示唆された。

以上のように、本論文は Shh のシグナル伝達における Gli 転写制御因子の機能と、濃度依存的な細胞応答のメカニズムを明らかにし、世界に先駆けて自作 cDNA マイクロアレイを用いて Shh 応答性遺伝子を同定したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。