

Title	The Fused Protein Kinase Regulates Hedgehog-stimulated Transcriptional activation in Drosophila Schneider 2 Cells
Author(s)	福元, 隆浩
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43776">https://hdl.handle.net/11094/43776</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	福元隆浩
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16825 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究生体制御医学専攻
学位論文名	The Fused Protein Kinase Regulates Hedgehog-stimulated Transcriptional activation in Drosophila Schneider 2 Cells. (ヘッジホッグ標的遺伝子発現における Fused プロテインキナーゼの機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一  (副査) 教授 近藤 寿人 教授 高井 義美

## 論文内容の要旨

## 【目的】

ヘッジホッグ (Hh) タンパク質は、個体発生における形態形成や神経分化に関与していることが知られている。Hh によるシグナル伝達機構の解析は、現在のところショウジョウバエを用いた遺伝学および発生学的解析が主に報告され、関連分子が同定されてきている。これまでの知見より、Hh の受容体から細胞内に伝達されたシグナルは、Fused、Costal-2、Suppressor of fused (Su(fu)) などの細胞内因子を介して転写因子である Cubitus Interruptus (Ci) に伝達され、Hh 標的遺伝子の発現を誘導する。しかし、細胞内での Hh によるシグナル伝達機構はほとんど明らかになっていない。そこで本研究は、Hh のシグナル伝達に関与する Fused の機能を解析することにより、Hh による遺伝子発現の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

## 【方法ならびに成績】

まず、Hh の標的遺伝子である patched のプロモーター領域にルシフェラーゼ cDNA を接続したレポーター遺伝子を用い、ショウジョウバエ Schneider2 (S2) 細胞における Hh シグナル応答系の樹立を試みた。レポーター遺伝子を S2細胞に導入して分泌型 Hh(Hh-N) によるレポーターの発現誘導を検討したが、応答は認められなかった。そこで転写因子 Ci を共に発現させたところ、Hh-N の用量に依存してレポーター発現誘導が観察されるようになった。このレポーター転写系に Fused を発現させると、Hh-N 依存的な転写活性化がさらに増強されることになった。Fused はアミノ酸配列より典型的なプロテインキナーゼであると考えられている。Fused の C 末端領域を欠損させてキナーゼドメインのみの変異体を発現させた場合にも同様の促進効果を示したが、ATP 結合部位に変異を導入したキナーゼ不活化変異体やキナーゼドメインを欠損した変異体では促進活性が認められなかった。つまり、Hh の標的遺伝子発現には、Fused のキナーゼ活性が重要な働きをしていることが明らかになった。一方、Fused の転写促進活性は Costal-2 や Su(fu) で抑制された。この抑制作用は、Costal-2 や Su(fu) と直接結合できない Fused の欠損変異体でも確認され、この抑制効果はこれらタンパク質の直接的な結合によるものではないことが示された。

サイトカインの細胞内シグナル伝達に関与する多くのプロテインキナーゼは、キナーゼドメイン中の activation segment にあるアミノ酸残基がよくリン酸化されて活性化されることが知られている。Fused の activation segment 内にある158番目のトレオニン残基 (Thr158) と159番目のセリン残基 (Ser159) がリン酸化される可能性を考

え、この残基の変異体を作成し、S2細胞における Hh シグナル応答系で検討した。Fused による促進効果は、Ser 159のみの Ala 変異体では変化が認められなかったが、Thr158のみの Ala 変異体と Thr158と Ser159両残基の Ala 変異体で消失した。一方、これらの残基を Asp/Glu に置換した変異体では、野生型 Fused の転写促進効果比べ、約 2 倍の Hh-N 依存的な転写活性促進効果が認められた。この結果より、Fused の活性発現には Thr158が必須であり、Hh シグナルで Thr158がリン酸化され、Ser159が Thr158のリン酸化に対し協調的に作用することで Hh 標的遺伝子の発現が誘導されることが示唆された。

#### 【総括】

本研究は、ショウジョウバエ由来の S2細胞を用いて Hh によるシグナルに応答する転写レポーター系の樹立を試み、Hh-N の用量と転写因子 Ci に依存した測定系を確立した。そして、Fused は Hh による転写活性化を正に制御しており、その機能には Fused のキナーゼ活性が必要であることを明らかにした。また、Fused の活性発現には、activation segment 内にある Thr158が必須であることが明らかになり、Hh シグナルで Thr158がリン酸化され、Ser 159が Thr158のリン酸化に対し協調的に作用することで Hh 標的遺伝子の発現が誘導されることが示唆された。今後は Fused がリン酸化される機構、Fused の標的分子の同定などが重要な課題であろう。

#### 論文審査の結果の要旨

ヘッジホッグ (Hh) は、個体発生における形態形成や神経分化に関与している細胞外因子である。この因子のシグナル伝達機構は、主にショウジョウバエを用いた遺伝学的解析によっておこなわれ、いくつかの関連分子が同定されているが、個々の分子の作用機構など十分解明されていない。そこで、本研究は、Hh のシグナル伝達に関与している分子、Fused の機能を生化学的に解析し、Hh による遺伝子発現の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

まず、ショウジョウバエ培養細胞 (Schneider2細胞) を用いて、Hh の用量と転写因子 Cubitus interruptus に依存した転写レポーター系を樹立した。そして、この系を用いて、Fused は Hh によるシグナル伝達を正に制御していることを示した。ついで、種々の変異を導入した Fused を用いることにより、その機能には Fused のキナーゼ活性が必須であること、Hh による刺激により、Fused のキナーゼドメイン内の一つのトレオニン残基がリン酸化される可能性を指摘した。

以上、本研究は世界に先駆け、Hh による遺伝子発現の制御機構を生化学的に解析し、Fused のキナーゼとしての作用を明らかにしたものであり、学位の授与に値すると考えられる。