

論文要旨

Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin β -mediated nuclear import pathway

〔 Snail の zinc finger domain は importin β を媒介して
核移行シグナルとして機能する 〕

山崎 英樹

【序論および目的】

接着分子カドヘリンは細胞膜貫通型蛋白であり、種々の方法でカドヘリンの接着能を制御することにより、細胞の形態あるいは細胞集団から成る組織の形成過程がコントロールされている。

DNA-binding zinc finger protein である Snail は発生や腫瘍浸潤の関連する E-カドヘリンの転写抑制因子である。ヒトの Snail は 264 アミノ基残基から成る核蛋白であり、アミノ末端の SNAG domain とカルボキシル基末端の DNA-binding domain である zinc finger domain から成り立っている。また、Snail は E-boxes と呼ばれる E-カドヘリンの promoter に特異的に結合し、カドヘリンの発現を転写レベルで抑制し、初期発生における上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を引き起こすことが知られている。転写因子が機能するには、遺伝子上流に結合するという段階の前に、合成された細胞質から核に移行するという段階が必要であり、核移行の有無により、転写因子の働きがコントロールされているという報告もある。しかし、Snail には核移行に必要な核移行シグナルと考えられている部位は存在するものの、厳密な解析は未だなされていなかった。

本研究の目的は、Snail の核移行に必要な部位を同定することである。

【材料および方法】

Snail には 3 つの部位がある。SNAG domain を含む N 末端領域 (Snail-N)、zinc finger domain を含む C 末端領域 (Snail-C)、そしてそのどちらも含まない中央部位 (Snail-M) である。

この蛋白の細胞内局在を観察するために、分子生物学的手法を用いて Snail を 3 つの部位に分割し、各々の C 末端に緑色蛍光蛋白 (Green fluorescent protein: GFP) を付けた constructs (Snail-N-GFP、Snail-M-GFP、Snail-C-GFP) を作成した。これらの constructs を犬腎臓上皮細胞である MDCK に transfect し、発現クローンを得た。これらのクローンを蛍光顕微鏡下で観察し、Snail 蛋白の細胞内局在を観察した。また Western blot 法を用いて、核内の蛋白量を定量した。

zinc finger domain は 4 つの zinc finger から構成されているが、そのうち 1-3 つ を欠失

させた constructs を作成し、同様の観察、定量を行った。

さらに、importin β が Snail の核移行にどのように関与しているかについても検討した。

【結 果】

- 1) カルボキシル基末端に GFP を付けた Snail 蛋白 (Snail-GFP) は、核に集積し、上皮間葉転換を引き起こす。
 - ・ MDCK に Snail-GFP を導入すると、Snail-GFP は核に集積する。
 - ・ Snail-GFP が発現した MDCK は、fibroblast に形態が変化する。
 - ・ Snail-GFP が発現した MDCK は、E-カドヘリンの down-regulation を起こす。
- 2) Snail の zinc finger domain は、核移行に必要な部位である。
 - ・ Snail-N-GFP、Snail-M-GFP は細胞質に局在するが、Snail-C-GFP は核のみに局在する。
したがって、zinc finger domain は核移行シグナルとして機能する。
 - ・ 4 つの zinc finger は、その全てが核移行に必要なものである。
- 3) Importin β は、Snail の核移行を媒介する。
 - ・ GST-Snail-GFP は Importin β の存在下で核に集積するが、Ran と NTF2 が欠けると GST-Snail-GFP は核膜孔と複合する。
 - ・ Snail-C は、Importin β の媒介のもと、核に移行する。
 - ・ GST-Snail-GFP は、Importin β と直接結合する。
 - ・ Snail の核移行は、Importin β と zinc finger domain の直接的な相互作用により起こる。

【結論及び考察】

これらの結果から、Snail の zinc finger domain は核移行シグナルとしての働きがあり、また Snail は Importin β を媒介して核に移行することが示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	619	号	氏名	山崎 英樹
審査委員	主査	秋山 伸一			
	副査	中川 昌之		愛甲 孝	

Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin β -mediated nuclear import pathway

(Snail の zinc finger domain は importin β を媒介して核移行シグナルとして機能する)

接着分子カドヘリンは細胞膜貫通型蛋白であり、種々の方法でカドヘリンの接着能を制御することにより、細胞の形態あるいは細胞集団から成る組織の形成過程がコントロールされている。Snail は E-カドヘリンの転写抑制因子である。ヒトの Snail は 264 アミノ酸残基から成る核蛋白であり、E-カドヘリンの promoter の E-box と呼ばれる領域に特異的に結合し、カドヘリンの発現を転写レベルで抑制し、初期発生における上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を引き起こすことが知られている。

本研究の目的は、Snail の核移行に必要な部位を同定することである。

本研究で得られた新知見は以下の通りである。

- (1) MDCK に Snail-GFP を導入すると、Snail-GFP は核に集積した。Snail-GFP が発現した MDCK は、fibroblast に形態が変化した。Snail-GFP が発現した MDCK は、E-カドヘリンの down-regulation を起こした。これら結果から、カルボキシル基末端に GFP を付けた Snail 蛋白 (Snail-GFP) は、核に集積し、上皮間葉転換を引き起こすことが判明した。
- (2) Snail には 3 つの部位がある。SNAG domain を含む N 末端領域 (Snail-N)、zinc finger domain を含む C 末端領域 (Snail-C)、そしてそのどちらも含まない中央部位 (Snail-M) である。Snail-N-GFP、Snail-M-GFP は細胞質に局在するが、Snail-C-GFP は核のみに局在した。したがって、C 末端領域に存在する zinc finger domain は核移行シグナルとして機能することが示唆された。さらに 4 つの zinc finger は、その全てが核移行に必要なことが示唆された。これらの結果から、Snail の zinc finger domain は、核移行に必要な部位であることが判明した。
- (3) GST-Snail-GFP は Importin β の存在下で核に集積するが、Ran と NTF2 が欠けると GST-Snail-GFP は核膜孔と複合したが、核内には入れなかった。Snail-C は、Importin β の媒介のもと核に移行した。GST-Snail-GFP は、Importin β と直接結合した。Snail の核移行は、Importin β と zinc finger domain の直接的な相互作用により起こることが示唆された。これらの結果から、Importin β は Snail の核移行を媒介することが判明した。
- (4) Snail の zinc finger domain は核移行シグナルとしての働きがあり、また Snail は Importin β を媒介して核に移行することが示唆された。

本研究は、Snail の核移行に必要な部位について、初めて報告したものである。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第	619	号	氏名	山崎 英樹
審査委員	主査	秋山 伸一			
	副査	中川 昌之		愛甲 孝	

主査および副査の3名は、平成18年1月23日、学位請求者山崎英樹君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 今回の実験でMDCK細胞を使用したのは何故か。
(回答) すでに実験系が確立している上皮細胞だからである。

質問2) MDCK細胞ではSnailは発現しているのか。
(回答) 発現していない。

質問3) 細胞がfibroblast様の変化を起こすのはどうしてか。例えば浸潤しやすくなるなど、上皮間葉転換が生体内で起こらないといけない理由があるのか。
(回答) 受精卵が子宮内膜に着床するとき、trophoblastがfibroblast様の形態変化を起こす。また癌が転移・浸潤するとき、同様の形態変化が起こる。

質問4) カドヘリンのE-boxにはどのような転写因子が結合すると、従来考えられているのか。
(回答) 代表的な転写因子はSp1やAP-2である。

質問5) Snailはどれくらいの時間で核内に移行するのか。
(回答) 時間は正確には計測していないが、1時間以内と考える。

質問6) RanがないときにGST-Snail-GFPが核膜孔に結合する意味はどのように考えるか。
(回答) RanとNTF2が存在することにより、核膜孔に結合したGST-Snail-GFPが核膜孔を通過できるようになることを示している。

質問7) fibroblast様の変化が起こるのは、どのくらいの時間がかかるのか。
(回答) 時間は正確には計測していないが、数日で起こるということが最近報告された。

質問8) Snail-GFPは継代培養していてもfibroblast様の形態のままなのか？
(回答) fibroblast様の形態のままである。

質問9) Fig.3でSnail-N-GFPも核移行しているように見えるが。
(回答) N末端にあるSNAG domainにも核移行シグナルがあるのかもしれない。

質問10) zinc fingerは4つとも必要であると述べているが、Fig.4でzinc fingerの1-3領域を欠失しても核移行しているのは何故か。
(回答) Snail-C-GFPと比較すると、明らかに核移行の割合が落ちるので全て必要と考えた。なお、欠失があってもimportin β と弱く結合し、その結果核内に運ばれる可能性はある。

質問11) zinc fingerの1-3領域を欠失したときの細胞の形態変化はどうか。
(回答) 変化しない。

質問12) Fig.5ではSnail-GFPをHeLa細胞にinjectionしているが、injectionとtransfectionとの違いは何か。再現性はどの程度か。
(回答) injectionは蛋白を細胞内に導入する方法であり、またtransfectionは遺伝子を細胞内で発現させる方法である。injectionすると結果が早く出るが、transfectionすると遺伝子が発現するのに時間がかかる。transfectionの方が生理的であり、より再現性がある。

質問13) importin α は核移行に必要なのか。
(回答) Fig.6に示したが、Snailの核移行にはimportin α は必要ない。importin β のみで核移行する。

質問 14) 今後の臨床応用・将来の展望についてどのように考えるか。

(回答) ヒトの着床については、extravillous cytotrophoblast が epithelial-mesenchymal transition を起こし浸潤することはわかっているが、Snail の関与は未だよくわかっていない。臨床的に受精障害はある程度克服されているが、着床障害は治療困難である。着床のメカニズムが解明されて、着床を促すことが可能になれば、究極の不妊症治療になる。また癌の転移・浸潤を抑制することが可能になれば、新しいタイプの抗癌剤が作られる可能性があると考ええる。

質問 15) Snail と Snail-GFP とは性質が異なっている。Snail-GFP は蛋白のサイズが大きく、そのままの状態では核膜を通過できない。Snail が核膜を通過することと、Snail-GFP が importin β と結合して核膜を通過することと、生理的にどちらが重要なのか。拡散によって核膜を通過することと importin β と結合して核膜を通過することと、実際にはどちらが行われていると考えるか。

(回答) importin β と結合して核膜を通過すると考えるが、詳細なところはわからない。

質問 16) 上皮間葉転換はどのような情報伝達経路で起こっているのか。

(回答) Snail のリン酸化レベルを変えて起こっていると考ええる。例えば GSK-3 β (glycogen synthetase kinase-3 β) という酵素は Snail をリン酸化し、Snail をその機能部位である核から細胞質へと排出させ、さらには分解へと導いている。従って、GSK-3 β の活性を抑えると Snail は核内にとどまって E-カドヘリン等の転写を抑えて上皮間葉転換を引き起こすことになる。

質問 17) Classical pathway では importin α および importin β と結合し、三者複合体を形成して核移行する。その後 RanGTP が関与し結合が外れるが、Snail の場合も RanGTP が関与して importin β が外れると考えられるか。

(回答) その通りだと考える。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。