

## 論文内容の要旨

論文題目 In vitro study of functional evolution of the mammalian Brn-2 protein  
哺乳類 Brn-2 蛋白質の機能進化に関する研究

岩本和也

哺乳類 class III POU 転写因子群は発生過程を通じて大脳新皮質を含む中枢神経系で発現しており、標的遺伝子群の発現調節を介して中枢神経系の発生、分化及び機能維持に関与している。脊椎動物において同定されている class III POU 転写因子群(Brn-1、Brn-2、Brn-4、SCIP)のアミノ酸配列を比較すると、POU ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインはほぼ完全に配列が一致し、進化上その機能が保存されてきたことが伺える。ところが、転写活性化ドメインは、哺乳類と下等脊椎動物（魚類、両生類）では顕著な違いがある。哺乳類では様々な種類の単一アミノ酸リピート構造が存在するのに対し、下等脊椎動物ではこれらの構造は、欠失している傾向があるのである。この点を除くと、転写活性化ドメインのアミノ酸配列は高度に保存されている。また、哺乳類間では、アミノ酸リピート構造は、その存在位置、アミノ酸残基の種類、連続する残基数が保存されている。以上のことから、哺乳類の系統で獲得されたアミノ酸リピート構造になんらかの機能的な意義があることが推察される。一般的に転写活性化ドメインは様々な蛋白質と相互作用し、標的遺伝子群の発現を調節することが知られており、アミノ酸リピート構造の有無によって相互作用する蛋白質の種類や相互作用の様式が変化した可能性が考えられる。そこで本研究では哺乳

類 Brn-2 に注目し、Brn-2 の転写活性化領域と相互作用する蛋白質を探索した。Brn-2 は class III POU 転写因子群中、アミノ酸リピート構造の進化上の差異が最も顕著であり、哺乳類 Brn-2 のグリシン、グルタミン、プロリンの3種類のアミノ酸リピート構造は、下等脊椎動物では全て完全に欠失している。

酵母 2-ハイブリッド法を用いたスクリーニングの結果、ヒト Brn-2 の転写活性化ドメインと相互作用する蛋白質を3種類得た。これらを B2BP (Brain-2-binding protein)<sup>2-4</sup> とした。このうち B2BP2, 3 は新規蛋白質であり、既知のモチーフも存在しないことから機能未知であった。B2BP4 は多機能蛋白質である FUS/TLS と一致した。両者の相互作用する部位を調べ、Brn-2 のプロリンリピート構造を含む領域と B2BP が相互作用することを明らかにした。またヒト Brn-2 と FUS/TLS を大腸菌で組み換え蛋白質として発現させ、far-western blotting 法により、両者の直接的な相互作用を確認した。

FUS/TLS は原癌遺伝子として発見された RNA 結合蛋白質であり、構造の類似した EWS、hTAFII68 と共に TET family と呼ばれるグループに分類されている。この TET family のメンバーは互いに排他的な関係で TFIID 複合体に存在すると考えられている。そこで、Brn-2 と TET family との相互作用の有無と、相互作用が Brn-2 の転写活性化能に与える影響を調べた。その結果、Brn-2 は FUS/TLS とのみ強く相互作用し、EWS や hTAFII68 とはほとんど相互作用しないこと、また、FUS/TLS は Brn-2 の転写活性化能を上昇させる coactivator として働くが、EWS や hTAFII68 は Brn-2 の転写活性化能に影響を与えないことを明らかにした。従って、哺乳類 Brn-2 は、FUS/TLS を含む TFIID 複合体を選択的に使用し転写制御を行っていることが示唆された。

哺乳類 Brn-2 の祖先型となる Brn-2 は下等脊椎動物と同様にアミノ酸リピート構造を持たなかったと推定される。哺乳類において獲得されたアミノ酸リピート構造の進化的意義を考察するため、哺乳類 Brn-2 に存在するグリシン、グルタミン、プロリンの3種類のアミノ酸リピート構造をそれぞれ正確に欠失した人工 Brn-2 を構築した。構築の際、欠失によっておこるであろう蛋白質の立体構造変化が、Brn-2 の分子進化上の足跡を反映するように変異体を設計した。これらに加え、両生類 *Xenopus laevis* 由来の Brn-2 ホモログ、XLPOU3B を用意した。XLPOU3B はアミノ酸リピート構造の有無を除き、哺乳類 Brn-2 と構造が非常に類似しており、全てのアミノ酸リピート構造をもたない哺乳類 Brn-2 とみなした。

構築した人工 Brn-2 の転写活性化能を HeLa 細胞を用いた luciferase assay により比較したところ、アミノ酸リピート構造の有無に関わらず、全ての人工 Brn-2 及び XLPOU3B は、野生型哺乳類 Brn-2 とほぼ同じレベルの転写活性化能を示した。このことは、Brn-2 自身の転写活性化能は進化上一定のレベルで維持されてきたことを示している。次に人工 Brn-2 と TET family との相互作用を測定したところ、予測されたように、プロリンリピート構造を欠失させた Brn-2 と XLPOU3B は FUS/TLS との相互作用が消失していた。しかし、グリシン、グルタミンリピート構造を欠失させた Brn-2 では、逆に相互作用の強さが増加しており、これらのリピート構造がプロリンリピート構造部位での相互作用に阻害的な影響を与えていることが考えられた。また、EWS、hTAFII68 とでは全ての組み合わせで相互作用が認められなかった。次に coactivator としての働きを調べてみると、グリシン、グルタミンリピート構造を欠失させた Brn-2 では、FUS/TLS のみが coactivator として働いた。しかし意外にも、プロリンリピート構造を欠失させた Brn-2 と XLPOU3B に対しては、FUS/TLS を含む TET-family の 3 者が coactivator としての活性を示した。このことから、Brn-2 と相互作用する未知の蛋白質(蛋白質 X)の存在が予想でき、TET family の 3 者はこの蛋白質 X と相互作用することによって、プロリンリピート構造を欠失させた Brn-2 と XLPOU3B に対して、coactivator として働くという機構が示唆された。

本研究の一連の実験により、哺乳類 Brn-2 は FUS/TLS を選択的に coactivator として使用するが、これは、(1) プロリンリピート構造が関わる FUS/TLS との相互作用と、(2) プロリンリピート構造による EWS、hTAFII68 と蛋白質 X の相互作用の阻害、というプロリンリピート構造の二つの機能の結果生じることを示した。また、プロリンリピート構造を持たない祖先型 Brn-2 は、TET-family の 3 者全てを蛋白質 X を介して coactivator として使用できたことを示した。このようなアミノ酸リピート構造の有無によっておきる哺乳類特異的な転写制御機構の変化は、中枢神経系で発現する標的遺伝子群の機能発現に影響を与え、大脳新皮質構造の獲得など、哺乳類特異的な進化を促した要因の一つになり得たと思われる。