

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ポリグルタミン配列に特異的に結合する新規遺伝子
PQBP-1 のクローニングと機能解析

指導教官 金澤一郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 藁谷 正明

[目的] ポリグルタミン配列(CAG リpeat翻訳産物)は、ハンチントン病等のトリプレットリピート病の病因遺伝子蛋白質とともに、多くの転写関連遺伝子に存在することが知られている。

先に、我々は、POU 転写因子ファミリーである Brn-2 と Brn-4 において神経特異的遺伝子に対する転写活性化作用が異なることを示した。Brn-2 と Brn-4 の構造の違いの 1 つにポリグルタミン配列の有無があり、それに結合する転写補助因子が Brn-2 と Brn-4 の作用の違いを生むのではないかと考えた。そこで Brn-2 のポリグルタミン配列に結合する蛋白をクローニングする目的で Brn-2 のポリグルタミン配列に結合する因子を two-hybrid 法を用いて探索し、新規遺伝子 PQBP-1[poly-glutamine (Q) tract-binding protein-1]をクローニングし、その機能を解析した。

[対象, 方法] two-hybrid 法に使用した bait は POU 転写因子マウス Brn-2 の 26 個のポリグルタミン繰り返し配列を含む領域(アミノ酸 122~154 番)

を bait プラスミド(pEG202)の *EcoR* I, *Xho* I 部位にサブクローニングして作成した. この bait を用いて, two-hybrid 法による human embryonic brain cDNA library スクリーニングを行った.

[結果] two-hybrid 法により, Brn-2 のポリグルタミン配列に特異的に結合するクローンとして, 6 個の独立した cDNA クローンを得た (B83-4, B234-4, B255-2, B264-1, B375-1 および B436-6). BLAST homology search により (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 6 個のクローンのうち, B264-1 は, transitional endoplasmic reticulum ATPase (TERA)[83, 84]と同一であった. これは ATP 依存性に小胞体からゴルジ体への蛋白の細胞内輸送に関与するとされている機能分子である. B83-4 は, EST データベース上で, JM26 (GeneBank accession No. AJ005893)として登録されているものと同一であった. B83-4, B234-4, B255-2, B375-1 および B436-6 をそれぞれ PQBP-1, PQBP-2, PQBP-3, PQBP-4 および PQBP-5 と命名した.

cDNA 配列より推定されるアミノ酸配列は親水性, 極性アミノ酸に富むものであり, この中で PQBP-1, -2, -5 は二次構造として Helix-Turn-Helix 構造を形成することが推測された. ポリグルタミン配列自身も極性アミノ酸であることを考えると, これらのクローンは極性アミノ酸配列同士の水素結合を介してポリグルタミン配列に結合することが推測された. また, 我々の得たクローンには, ポリグルタミン配列を有するものはなく, 既知のポリグルタミン病原因遺伝子産物結合蛋白もなかった. 多組織ノザンプロット法による各種クローンの発現パターンでは, PQBP-1 と TERA が脳における発現が多かった. 以上の結果を踏まえて, 今回は, PQBP-1 について検討した.

1. PQBP-1 の構造

PQBP-1 は 265 個のアミノ酸残基からなり, WW ドメイン, 7 アミノ酸繰り返し配列, アルギニン(R)/アスパラギン酸(D), アルギニン(R)/グルタミン酸(E)の繰り返し配列からなる極性アミノ酸の豊富な領域, および核移行シグナル等の構造を有する核蛋白質である.

2. PQBP-1 の転写因子 Brn-2 に対する効果及び培養細胞に対する影響

培養細胞系では、PQBP-1 は、Brn-2 による D_{1A} ドーパミン受容体の転写活性を抑制した。さらに PQBP-1 の一過性過剰発現で、細胞の増殖、生存に抑制的に働き、PQBP-1 の恒常的発現では、細胞の形態的变化および各種ストレスに対する脆弱性の増強をもたらした。

3. PQBP-1 の局在

PQBP-1 の messenger RNA は、全身臓器に発現しており、中枢神経内では小脳、海馬および嗅球に豊富に発現していた。

マウス神経芽培養細胞 NS20Y に、PQBP-1-EGFP 発現ベクターを導入し、蛍光顕微鏡を用いてその細胞内局在を検討した結果、その発現は核に認められた。

4. マウス PQBP-1 cDNA のクローニング

EST(expressed sequence tag)データベースからヒト PQBP-1 cDNA に相同性の高い核酸配列を探してプライマーを設計し、PCR 法により、マウス PQBP-1 全長 cDNA を得た。マウス PQBP-1cDNA はヒト PQBP-1cDNA に核酸配列で 83%、アミノ酸配列で 86%の相同性を有していた。

5. 他種における PQBP-1 の保存

さらに詳細な EST データベース検索により、*C. elegans*(線虫)と *Arabidopsis*(シロイヌナズナ)にも PQBP-1 の相同遺伝子が存在することが明らかとなった。PQBP-1 の N 末端に存在する WW ドメインは、*C. elegans* からヒトまで、PQBP-1 の C 末端側アミノ酸配列は、*Arabidopsis* からヒトまでよく保存されていた。

6. PQBP-1 と相互作用する機能分子のクローニング

PQBP-1 の機能を検討するために、two-hybrid 法を用いて PQBP-1 の機能ドメインと仮定される PQBP-1 の C 末端側アミノ酸配列(191~265 アミノ酸)に結合する機能分子として U5-15kD をクローニングした。U5-15kD は、uridine rich small ribonucleoprotein (UsnRNP)の構成分子の 1 つで、スプライシングに関与することが知られている。

[考察] 我々は、ポリグルタミン鎖の生理的機能およびポリグルタミン病における伸長したポリグルタミン鎖による神経細胞死の分子機構を検討する上で、

two-hybrid 法を用いて、ポリグルタミン配列に特異的に結合する機能分子として新規遺伝子 PQBP-1 をクローニングした。PQBP-1 は、N 末端側に WW ドメイン、ポリグルタミン鎖に結合する極性アミノ酸に富む領域および Arabidopsis からヒトまで保存されている C 末端領域(CTD: アミノ酸 191~265)からなる。また PQBP-1 は核移行性を有し、PQBP-1 の過剰発現が転写因子 Brn-2 の転写活性に影響を与えることから、転写調節に関わる可能性を考えていた。ところが、PQBP-1 の C 末端領域(CTD:191~265 アミノ酸)に結合する蛋白を two-hybrid 法で探索した結果、U5-15kD/dim1p が得られた。U5-15kD は、スプライソゾームの構成因子 U5 small ribonucleoprotein particle (snRNP)の構成蛋白の 1 つで、スプライシングに関与するとされる。したがって、PQBP-1 はスプライシングにも関与していることが示された。

以上から、PQBP-1 はスプライシング、転写などの核機能に深く関与することが推測された。ポリグルタミンが PQBP-1 機能にどのように影響を与えるのか、またそれが細胞死にどう関与するのかが次の課題である。